

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра биофизики

Сравнение различных параметров (площади, средней оптической разности хода и количества гемоглобина) измеренных при помощи метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) двух препаратов фиксированных эритроцитов

Зима 2018

Сравнение различных параметров (площади, средней оптической разности хода и количества гемоглобина) измеренных при помощи метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) двух препаратов фиксированных эритроцитов

В данной задаче дается описание и применение метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) на примере измерения оптической разности хода (ОРХ) или геометрии клеток *in vitro*. Кроме того, в процессе выполнения задачи приобретает навык статистической обработки экспериментально измеренных данных. Приведено краткое описание теории метода, приведено описание работы прибора и программ, используемых для получения и количественной обработки изображений.

Теоретическая часть

Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) широко применяется для исследования формы как макроскопических, так и микроскопических объектов. В настоящее время приборы, на основе различных модификаций ЛИМ широко используется для определения различных параметров поверхностей и тонких пленок. Кроме того, в последнее время, различные модификации ЛИМ микроскопов, использующие в качестве источников света лазеры с низкой мощностью, приходящейся на объект, достаточно активно используются в биологии для оценки размеров и характеристик различных биологических объектов, например, клеток и их органелл.

Достоинства ЛИМ при исследовании биологических объектов. Биологические объекты — малые бесцветные полупрозрачные малоконтрастные объекты. Для получения информации об их строении или функционировании при помощи оптических микроскопов приходится прибегать к дополнительному контрастированию объектов. Как правило, это приводит к модификации объектов, например, в результате их окрашивания различными красителями. Данные вещества способны не только повышать разрешение метода, но также оказывать дополнительное воздействие на функциональное состояние биологического объекта. Применение фазово-контрастных методов позволяет значительно улучшить контрастирование биологических клеток, не прибегая к дополнительной модификации образца, что позволяет более корректно получать информацию о процессах, проходящих в клетках. Метод ЛИМ, помимо повышения контрастирования клеток, также позволяет количественно оценить изменение оптической плотности, что может позволить получать не

только качественную, но и количественную информацию об изменении состояния клеток и их органелл.

Таким образом, при помощи метода ЛИМ можно исследовать растительные и животные клетки, а также бактерии и некоторые выделенные органеллы, например, митохондрии (см. рисунок 2). Конечно, для исследования этих объектов можно использовать и другие методы микроскопии, однако, в ряде случаев метод ЛИМ обладает рядом преимуществ. Краткое сравнение некоторых методов микроскопии приведено на рисунке 1.

Использование различных методов микроскопии для исследования биологических объектов

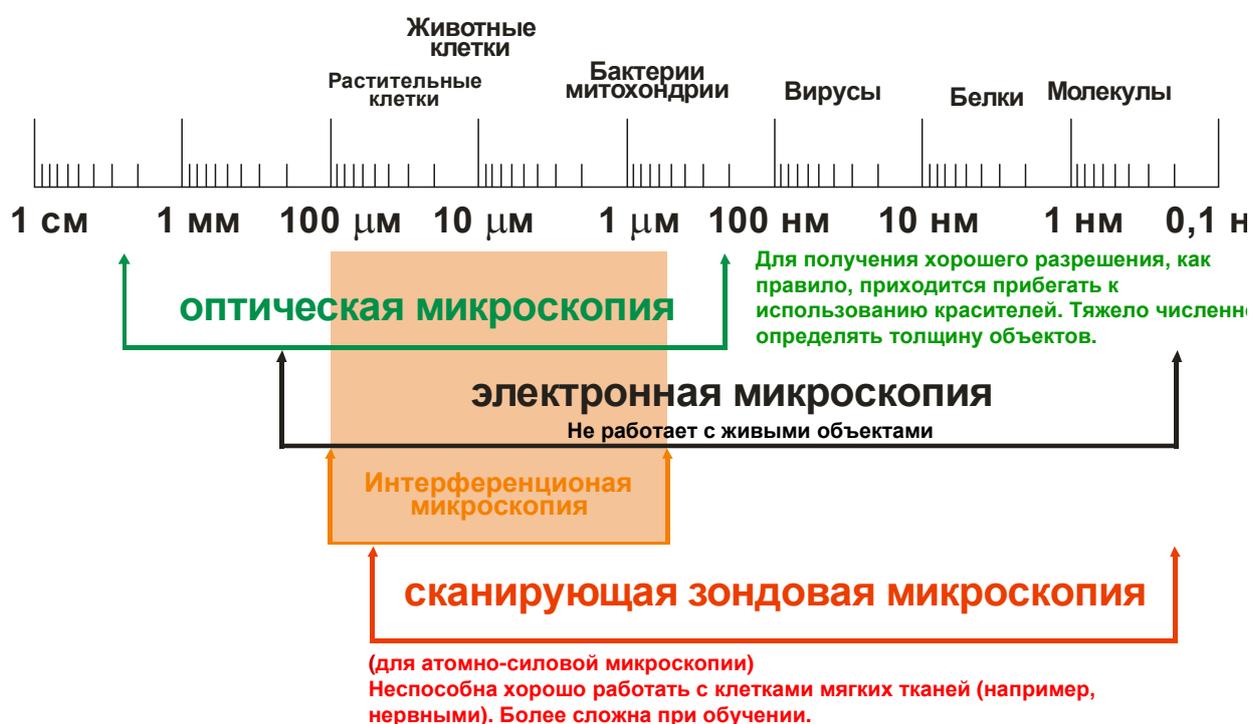


Рисунок 1

Принцип действия ЛИМ.

В последние несколько лет различные варианты лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) используются для исследования свойств живых клеток. Данные методы используют явление интерференции для получения изображения живых объектов.

Принцип действия прибора, используемого в настоящей работе, основан на измерении локальных фаз света отраженного объектом. В приборе луч лазера разделяется на два, один из которых, проходя через клетку, отражается от зеркальной подложки, на которой находится клетка (отраженный луч). Другой луч является контрольным и не проходит через объект. При наложении отраженного и контрольного луча формируется интерференционная картина

(фазовое изображение объекта). При построении фазового изображения сигнал нормируется по длине волны и определяется величина разности оптического пути двух лучей – оптическая разность хода (ОРХ) иногда именуемая фазовой высотой:

$$\Phi = \frac{\theta \lambda}{2\pi z}, \quad (1)$$

где θ – разность фаз, рад; λ – длина волны источника, нм.

В общем случае значение ОРХ, в каждой точке объекта связана с его геометрическими размерами (толщиной), z .

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z_{\max}} (n(x, y, z) - n_1) dz \quad (2)$$

где n_1 – показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна, $n(x, y, z)$ – величина показателя преломления в точке клетки с координатами x, y высотой z .

Схема интерференционного микроскопа



Рисунок 2

Фазовый портрет (ФП) клетки представляет собой распределение величин, в различных областях объекта, а значение ОРХ в каждой точке, i , представляет собой сумму произведений толщины различных оптических сред, z , на показатель преломления соответствующей среды, n :

$$\Phi_i = (n_1^i z_1^i + n_2^i z_2^i + \dots + n_n^i z_n^i) - n_1 z \quad (3)$$

В случае если различия показателя преломления для органелл не очень велики, и/или сами размеры объектов малы, то они не вносят существенный вклад в суммарное изменение ОРХ. Поэтому для безъядерных клеток, таких как эритроциты, и в отсутствие больших вкраплений, имеющих другую природу, основные различия в показателях преломления наблюдается между цитоплазмой и мембраной областью. Однако в силу равномерного

распределения мембраны мы можем пренебрегать этими различиями, оперируя неким усредненным показателем преломления клетки. Это позволяет значительно упростить формулу 2, рассчитав среднее значение ОРХ, $ОРХ_{сред}$:

$$\Phi_{mean} = (n_{er} - n_m) \cdot z_{mean} \quad (4)$$

где $n_{буф}$ – показатель преломления буферного раствора; $n_{клетки}$ – показатель преломления клетки (в нашем случае эритроцита); $z_{сред}$ – средняя геометрическая высота (толщина) объекта.

В общем случае показатель преломления связан с концентрацией вещества, C , следующей зависимостью:

$$n = n_m + \alpha C \quad (5)$$

где α – экспериментально определяемый параметр. Таким образом изменение показателя преломления вещества отражает изменение концентрации вещества в клетке.

В эксперименте измеряется среднее значение ОРХ клетки и ее площадь, S . Зная эти параметры можно оценить содержание гемоглобина в клетке:

$$m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{(n_{hem} - n_m)} \Phi S \quad (6)$$

Величина ρ_{Hb} , – удельная плотность эритроцита принимается равной $1,36 \text{ г/см}^3$. n_{hem} – показатель преломления гемоглобина, принимался равным $1,615$. Φ и S – экспериментально измеряемая средняя ОРХ и площадь клетки, соответственно. При подсчете не учитываются слипшиеся между собой эритроциты (2 и более клеток).

Разрешающая способность метода ЛИМ. Разрешающая способность метода ЛИМ в значительной степени определяет круг объектов исследования (рисунок 2). В настоящее время с помощью различных модификаций ЛИМ с высокой точностью исследуют профиль различных небιологических объектов. При этом для однородных, хорошо отражающих объектов, достигают вертикального разрешения порядка $0,5 \text{ нм}$ при латеральном разрешении до $10\text{-}15 \text{ нм}$. Однако при низкой отражающей способности образца, каковым, как правило, и является клетка, разрешающая способность прибора значительно ухудшается и зависит от свойств самого объекта. В этом случае наиболее правильным будет следующее утверждение: «разрешающая способность ЛИМ лучше, чем определяемая из критериев Релея». Таким образом латеральное разрешение, D , при исследовании клеток с помощью ЛИМ не хуже, чем определяемое согласно критерию Релея:

$$D = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (7)$$

где λ – длина волны лазера, NA – апертура объектива.

Отметим, что при использовании в ЛИМ лазера с длиной волны 480 нм (хотя обычно используются лазеры, с длиной волны в области 580 и более нм.) и инверсионного объектива с апертурой 1,4 латеральное разрешение составляет не более 200 нм.

Другим важным параметром является глубина резкости прибора, T :

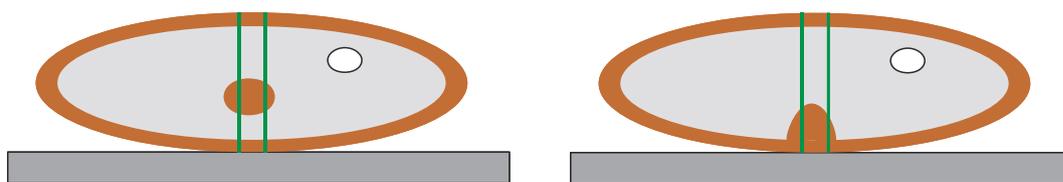
$$T = \frac{n\lambda}{(NA)^2} \quad (8)$$

где n – показатель преломления иммерсии, для сухих объективов $n=1$. Глубина резкости — расстояние по вертикали в пределах которого допускается измерение оптического микрорельефа при сохранении удовлетворительного качества изображения (т.е. находиться в фокусе). Если ОРХ объекта меньше глубины резкости, то мы можем получить информацию от всего объекта, если толщина объекта больше глубины резкости, то мы можем потерять информацию об объекте не попадающую в фокус.

Таким образом, для лазера с длиной волны 480 нм и объектива микроскопа с апертурой 1,4 глубина резкости составит около 250 нм. При использовании объектива с большой апертурой повышается латеральное разрешение системы, однако снижается глубина резкости, что значительно уменьшает возможности получения 3D рельефа объектов имеющих большую толщину (а к ним относятся практически все живые клетки и бактерии).

В случае, когда толщина объекта превышает половину длины волны используемого источника освещения, могут возникнуть аномальные явления «скачки фазы», обусловленные переходом на следующую интерференционную полосу. Отметим, что когда угол наклона

Нельзя разделить эти два случая



От перемены мест слагаемых сумма не меняется

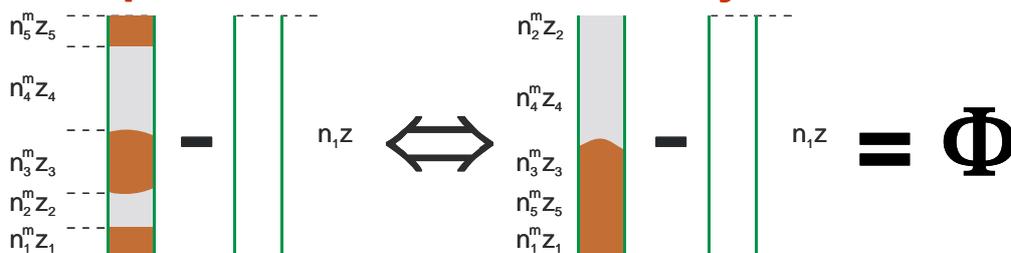
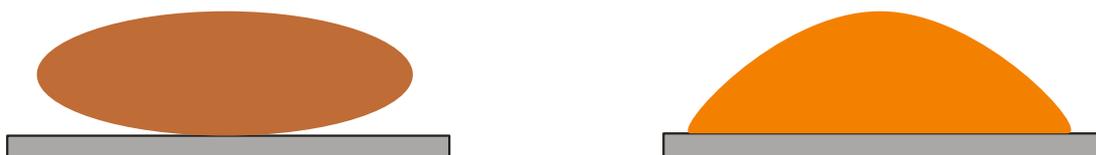


Рисунок 3

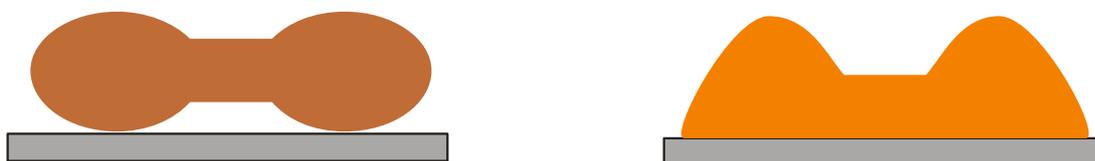
падающего света менее 30° возможно восстановление истинного профиля оптического

рельефа превышающего $\lambda/2$. Однако данная процедура весьма трудоемка и не всегда дает точного восстановления ОРХ.

сечение реального объекта	сечение инвертированного фазового портрета
однородные клетки сферической или цилиндрической формы (напр., сфероциты)	



однородные клетки более сложной формы (напр., дискоциты)	
---	--



гетерогенные объекты (большинство клеток в том числе нейроны пиявки и прудовика)	
---	--



Рисунок 4

Особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ. Суммарная величина, ОРХ в точке не зависит от того, в какой последовательности луч проходит через различные компоненты среды (формула 3). Это приводит к некоторым особенностям отображения клеток методом ЛИМ (см. рисунок 3), что, в свою очередь, приводит к значительным затруднениям при реконструкции истинного трехмерного рельефа биологического объекта. В меньшей степени это сказывается при изучении однородных клеток сферической или цилиндрической формы (рисунок 4). Однако известно, что субклеточные структуры клетки не однородны: цитоплазма имеет меньшую плотность и, соответственно, меньший коэффициент преломления, чем мембрана, ядро или другие органеллы, например, митохондрии. Кроме того, клеточные вакуоли наполнены жидкостью (коэффициент преломления приблизительно равен коэффициенту преломления воды) или

другими, более плотными веществами. Все эти особенности сказываются на суммарной оптической плотности в каждой точке объекта. В данном случае на фазовом изображении объекта цитоплазматические структуры с низким коэффициентом преломления будут выглядеть как впадины (например, вакуоли заполненные жидкостью), а клеточные органеллы, имеющие высокий коэффициент преломления — как выступы (ядро, митохондрии и т. д.) (рисунок 4). В связи с более низкой плотностью цитоплазмы величина ОРХ в точке будет меньше, по сравнению с участком клетки, имеющую такую же реальную высоту, но с низким коэффициентом преломления.

Ниже перечислены ряд статей, посвященных использованию метода лазерной интерференционной микроскопии в биологии.

1. *Тычинский В.П., Вайсс Д., Вышенская Т.В., Ягужинский Л.С., Никандров С.Л.* Кооперативные процессы в митохондриях: регистрация методом динамической фазовой микроскопии // *Биофизика*. 2000.V.45.870-877.
2. *Максимов Г.В., Никандров С.Л., Лазарева Е.С., Тычинский В.П., Рубин А.Б.* Исследование демиелинизации нервного волокна с помощью метода динамической фазовой микроскопии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001.V.131.539-542.
3. *Максимов Г.В., Никандров С.Л., Лазарева Е.С., Тычинский В.П.* Регистрация методом динамической фазовой микроскопии характерных частот флуктуации фазовой высоты участков миелинового нервного волокна в покое и при стимуляции // *Биофизика*. 2002.V.47.
4. *Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T.* Mitochondria optical parameters are dependent on their energy state: a new electrooptical effect? // *Eur.Biophys.J.* 2004.V.33.700-705.
5. *Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N.* A dynamic phase microscopic study of optical characteristics of individual chloroplasts // *Biochim.Biophys.Acta*. 2004.V.1665.57-64.
6. *Brazhe N.A., Erokhova L.A., Churin A.A., Maksimov G.V.* The relation of different-scale membrane processes under nitric oxide influence // *Journal of Biological Physics*. 2005.V.31.533-546.
7. *Popescu G., Ikeda T., Best C.A., Badizadegan K., Dasari R.R., Feld M.S.* Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy // *J Biomed.Opt.* 2005.V.10. P.060503
8. *Sosnovtseva O.V., Pavlov A.N., Brazhe N.A., Brazhe A.R., Erokhova L.A., Maksimov G.V., Mosekilde E.* Interference microscopy under double-wavelet analysis: a new approach to studying cell dynamics // *Phys.Rev.Lett.* 2005.V.94. P.218103
9. *Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N.* Coherent phase microscopy in cell biology: visualization of metabolic states // *Biochim.Biophys.Acta*. 2005.V.1708.362-366.
10. *Ерохова Л.А., Новиков С.М., Лазарев Г.Л., Казакова Т.А., Орлов Д.А., Индукаев К.В., Максимов Г.В.* Применение лазерной интерференционной микроскопии для исследования регулярных внутриклеточных и мембранных процессов в нейронах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2005.V.140.237-239.
11. *Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н.* Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках // *Цитология*. 2005.V.47.348-356.

12. *Brazhe N.A., Brazhe A.R., Sosnovtseva O.V., Pavlov A.N., Erokhova L.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Mosekilde E.* Unraveling cell processes: interference imaging weaved with data analysis // *Journal of Biological Physics*. 2006.V.32.191-208.
13. *Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Браже Н.А., Лазарев Г.Л., Максимов Г.В.* Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии // *Квант.электроника*. 2006.V.36.874-878.
14. *Rappaz B., Barbul A., Charriere F., Kuhn J., Marquet P., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.* Erythrocytes volume and refractive index measurement with a digital holographic microscope // *SPIE--The International Society for Optical Engineering*. 2007.V.6445. P.644509
15. *Rappaz B., Barbul A., Emery Y., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.J., Marquet P.* Comparative Study of Human Erythrocytes by Digital Holographic Microscopy, Confocal Microscopy, and Impedance Volume Analyzer // *Cytometry Part A*. 2008.V.73A. 895-903
16. *Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Bryzgalova N.Y., Brazhe A.R., Brazhe N.A., Lomakin A.G., Levin G.G., Maksimov G.V.* Laser Interference Microscopy in Erythrocyte Study. // *J.Appl.Phys*. 2009. 105(10). P. 102037
17. *Yusipovich A.I., Cherkashin A.A., Verdiyana E.E., Sogomonyan I.A. and Maksimov G.V.* Laser interference microscopy: a novel approach to the visualization of structural changes in myelin during the propagation of nerve impulses. // *Laser Physics Letters*. 2016. 13(8). P. 085601.
18. *Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., Platonova A., Parshina E.Y., Grygorczyk R., Maksimov G.V., Rubin A.B. and Orlov S.N.* Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index. // *Journal of Microscopy*. 2011. 244(3). P. 223

Контрольные вопросы по теоретической части

1. Какие параметры измеряет метод ЛИМ?
2. Какие особенности измерения биологических объектов существуют при использовании ЛИМ?
3. Какую информацию можно получить при использовании метода ЛИМ при исследовании биологических объектов?
4. Какова разрешающая способность метода ЛИМ?
5. Какие достоинства метода ЛИМ для отображения биологических объектов?
6. Каковы недостатки метода ЛИМ, какие трудности возникают при его использовании?
7. Каковы особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ?

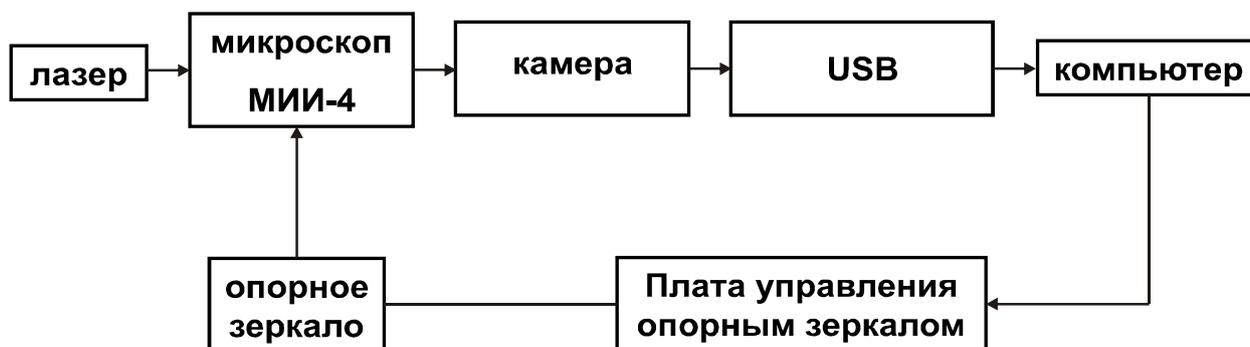


Рисунок 5

Описание прибора

В приборе, используемом в данной задаче, используется оптическая схема интерферометра Линника. Принципиальная оптическая схема интерферометра представлена на рисунке 1. Лазерный пучок попадает на светоделительную пластинку (полупрозрачное зеркало) со светоделительным покрытием. Она делит падающий пучок пополам: один пропускает, а другой отражает. Отраженный от пластинки пучок попадает на исследуемую поверхность (содержащую биологический объект), после отражения от которой снова проходит через светоделительную пластинку и попадает на детектор, где можно наблюдать изображение исследуемой поверхности. Другой пучок, пройдя через светоделительную пластину, попадает на зеркало, отразившись от которого, снова падает на светоделительную пластинку, где также делится: одна его часть проходит сквозь пластинку и не участвует в образовании изображения, а другая отражается от светоделительной пластинки попадает на детектор и интерферирует с лучами пучка, отраженного от исследуемой поверхности, образуя резкое изображение интерференционных полос в бесконечности. Полученная интерференционная картина передается в персональный компьютер и там обрабатывается. Для автоматизации измерений в приборе реализован метод дискретного фазового сдвига при помощи управляемого от компьютера опорного зеркала, находящегося на пьезоэлементе. Интерферограммы при различных положениях зеркала с помощью встроенной ПЗС-телекамеры через USB-интерфейс поступают в персональный компьютер (ПЭВМ), где производится их автоматическая обработка в результате которой, восстанавливается оптическая разность хода, соответствующая измеряемому профилю поверхности (см. схематическую схему прибора, представленного на рисунке 5). Результаты измерений в виде двумерных и трехмерных профилей исследуемых объектов, графиков сечений отображаются на экране компьютера.

Микроинтерферометр МИИ-4 (рисунок 6) состоит из головки микроинтерферометра, колонки **1**, круглого основания **2** и механизма точной фокусировки, управляемого микрометрическим винтом **3**. В центральной части расположен визуальный тубус **4**, на котором устанавливают ПЗС-камеру **5**. На визуальном тубусе имеется кольцо **6**, вращением которого можно переключать изображение между 1 и 2 каналом (второй канал не задействован).

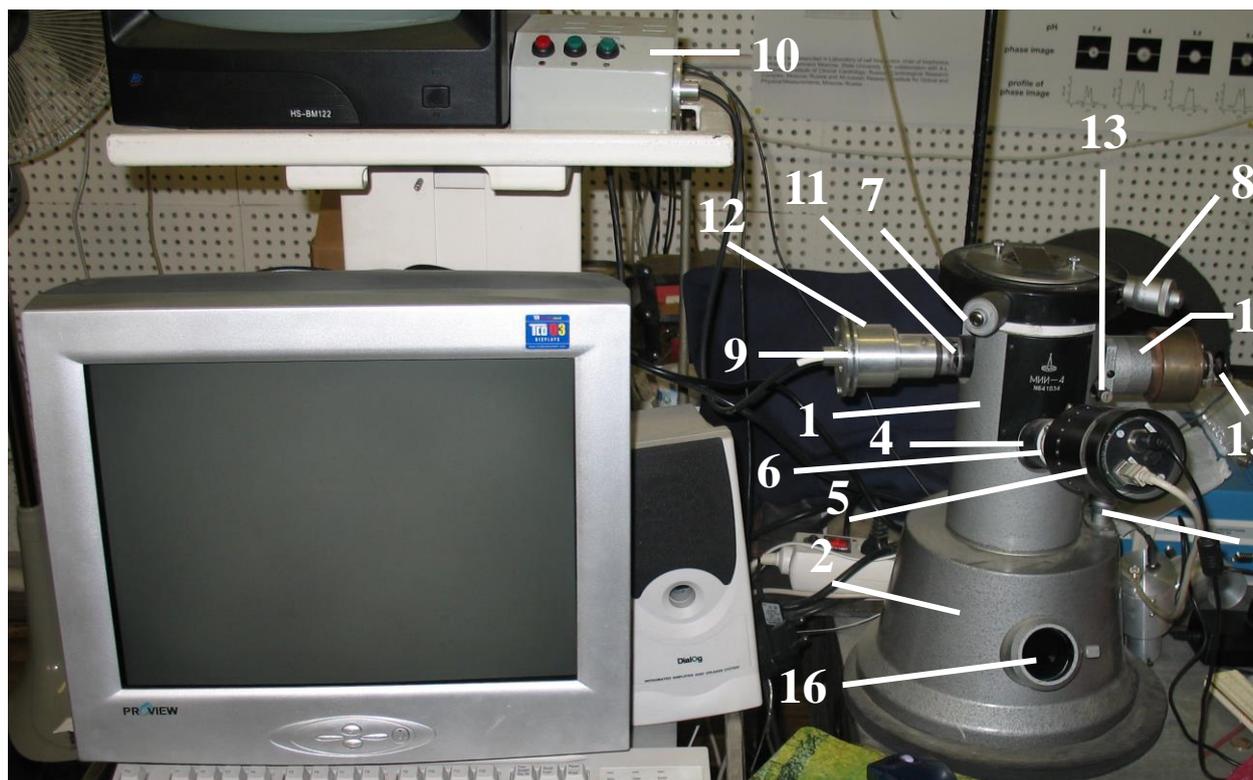


Рисунок 6

Фокусировка микроинтерферометра на объект осуществляется перемещением головки микроинтерферометра при вращении микрометрического винта **3**. Значение вертикального перемещения головки микроинтерферометра отсчитывается по шкале барабана микрометрического винта. Латеральные (в плоскости) перемещения головки интерферометра осуществляются при помощи микрометрических винтов **7** и **8**.

Головка микроинтерферометра укреплена на внутреннем стекане микроинтерферометра. Она состоит из левой, средней и правой частей. Левая часть головки включает в себя втулку **9**, в которую устанавливается до упора один конец волоконно-оптического жгута, идущего от лазера **10**, а также апертурную и полевую диафрагмы. Вращением кольца **11** с накаткой изменяется отверстие апертурной диафрагмы. Настройка освещения поля зрения производится поперечным перемещением волоконно-оптического жгута при помощи кольца с накаткой **12**. В средней части головки находится рукоятка **13**, служащая для включения шторки. При включенной шторке на изображении появляются характерные полосы. На торце рукоятки **13** нанесена стрелка, указывающая положение шторки. В правой части головки микроинтерферометра установлено, перемещаемое от пьезоэлемента зеркало (пьезозеркало). Пьезоэлемент управляется от компьютера с помощью соответствующей платы блока управления. Ширина интерференционных полос изменяется вращением винта **14** вокруг его оси, Изменение направления полос производится вращением винта **14** вокруг оси

интерференционной головки. Винт **15** служит для установки контраста интерференционных полос в поле зрения микроинтерферометра. Отверстие **16** используется для тубуса в который помещается ПЗС камера 2-го канала (не задействован).

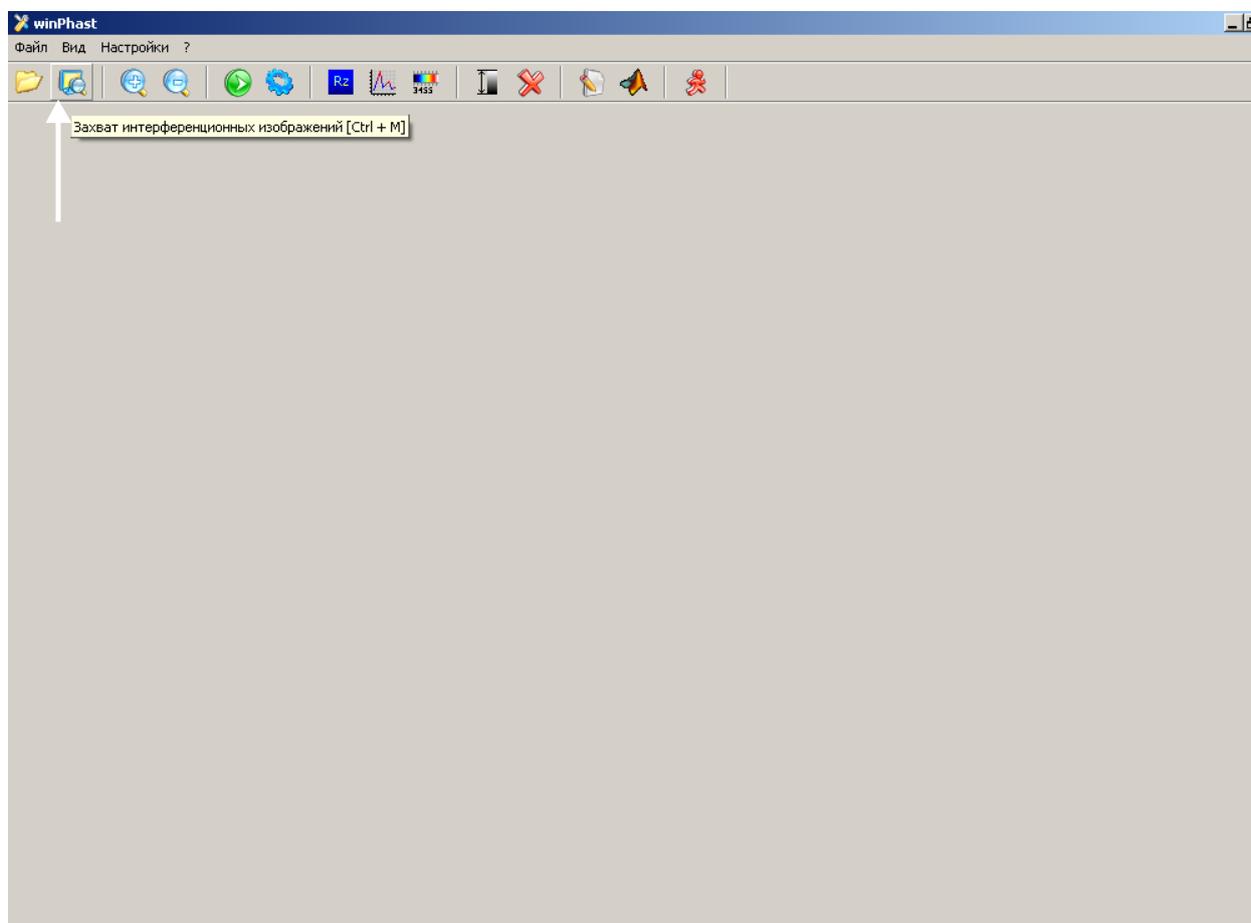


Рисунок 7

Микроинтерферометр имеет канал регистрации размер кадра которого составляет 196×145 мкм, изображение с него идет с ПЗС-камеры **5**.

Получаемый с ПЗС-камеры видеосигнал поступает через интерфейс USB в компьютер. Захват кадров и первичная обработка изображений производится с помощью программы **WinPhast**. Программа позволяет управлять захватом интерференционных изображений, работой пьезозеркала и шаговыми двигателями предметного столика. После захвата кадров производится восстановление трехмерного профиля по алгоритму, использующему дискретный фазовый сдвиг между интерферограммами.

Программа **WinPhast** позволяет:

- восстанавливать 2D карту фаз по нескольким интерференционным изображениям (по умолчанию 9);
- разворачивать фазу;
- вычитать плоскость (клин);

- визуализировать результаты измерений (сечения, 3D)

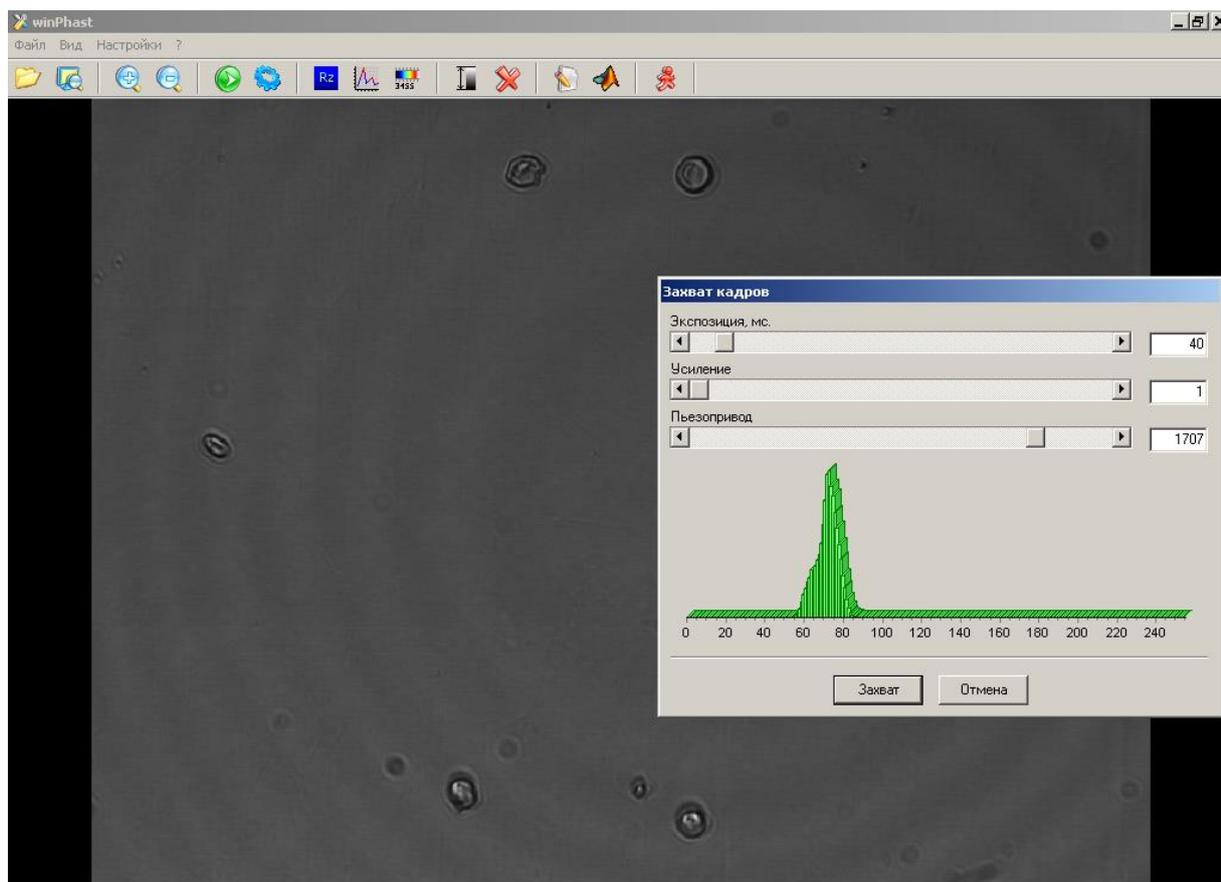


Рисунок 8

Управление работой пьезозеркала производится по сигналам от платы управления. Плата подключается к PCI IO контроллеру, обеспечивающего дополнительный LPT порт.

Проведение измерений с помощью программы WinPhast

1. Включить компьютер. Загрузить ОС Windows 2000/XP.
2. Щелкнуть два раза левой клавишей мыши на иконке программы **WinPhast**, находящейся на рабочем столе. Программа готова для начала новых измерений.
3. Нажать на панели кнопку «Захват интерференционных изображений» (рисунок 7). В окне появится изображение объектов, а также откроется дополнительное окно «Захват кадров» (рисунок 8).
4. Не изменять значения, приведенные в окне «Захват кадров». При помощи мыши сдвинуть это окно вправо.

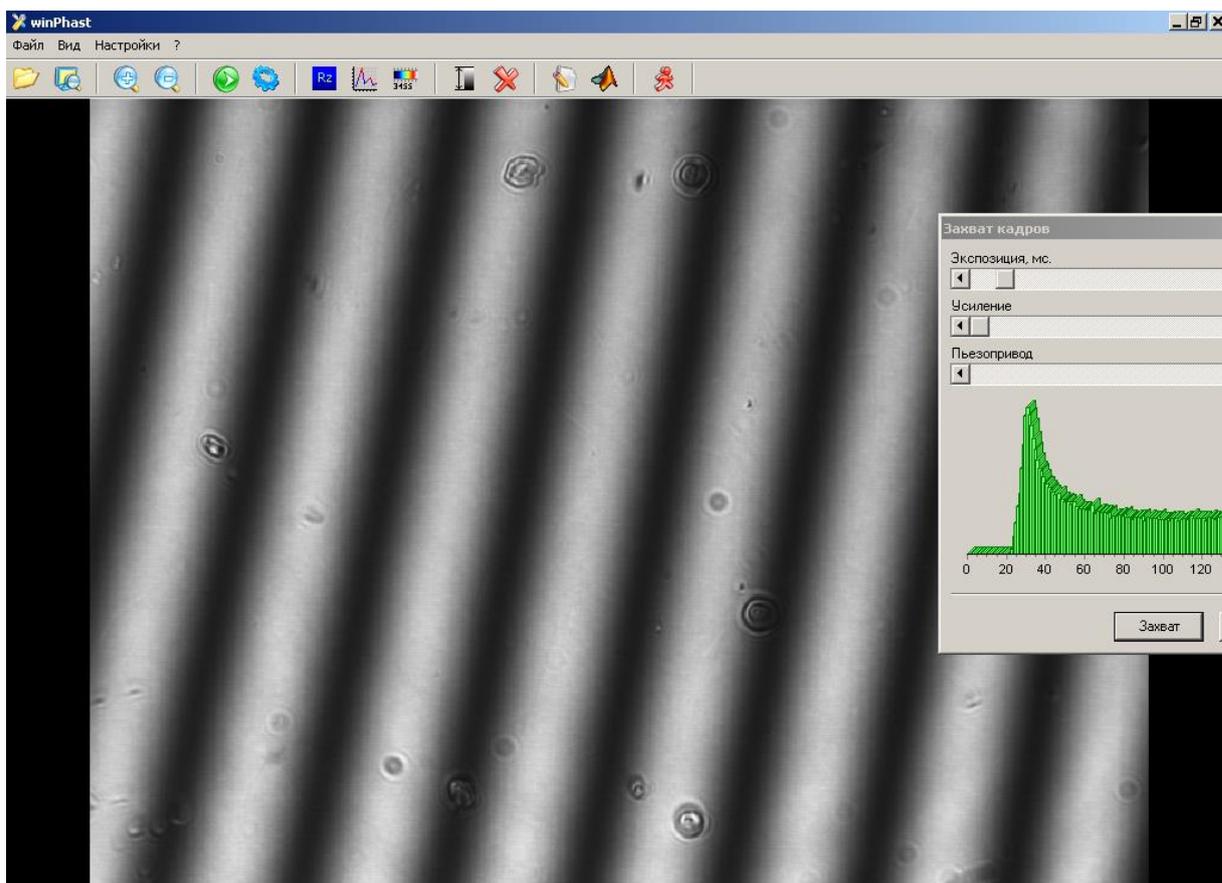


Рисунок 9

5. Вращая микрометрический винт **3** настроить изображение на резкость, используя микрометрические винты **7** и **8** выбрать интересующий участок объекта.
6. Повернуть рукоятку **13** против часовой стрелки, на экране должны появиться интерференционные полосы (рисунок 9). Настройка контрастности полос производится вращением винта **15**. Возможными причинами снижения контраста полос могут быть:
 - низкое отражение исследуемой поверхности;
 - сильно открытая апертурная диафрагма **11**;
 - малый ток лазера.
7. В окне «Захват кадров» Нажать клавишу «Захват» и захватить кадры в буфер памяти.
8. После этого в основном окне программы **WinPhast** автоматически откроется последнее сохраненное изображение, готовое к дальнейшей обработке. Для необходимо нажать кнопку «Выполнить расчет» (рисунок 10).

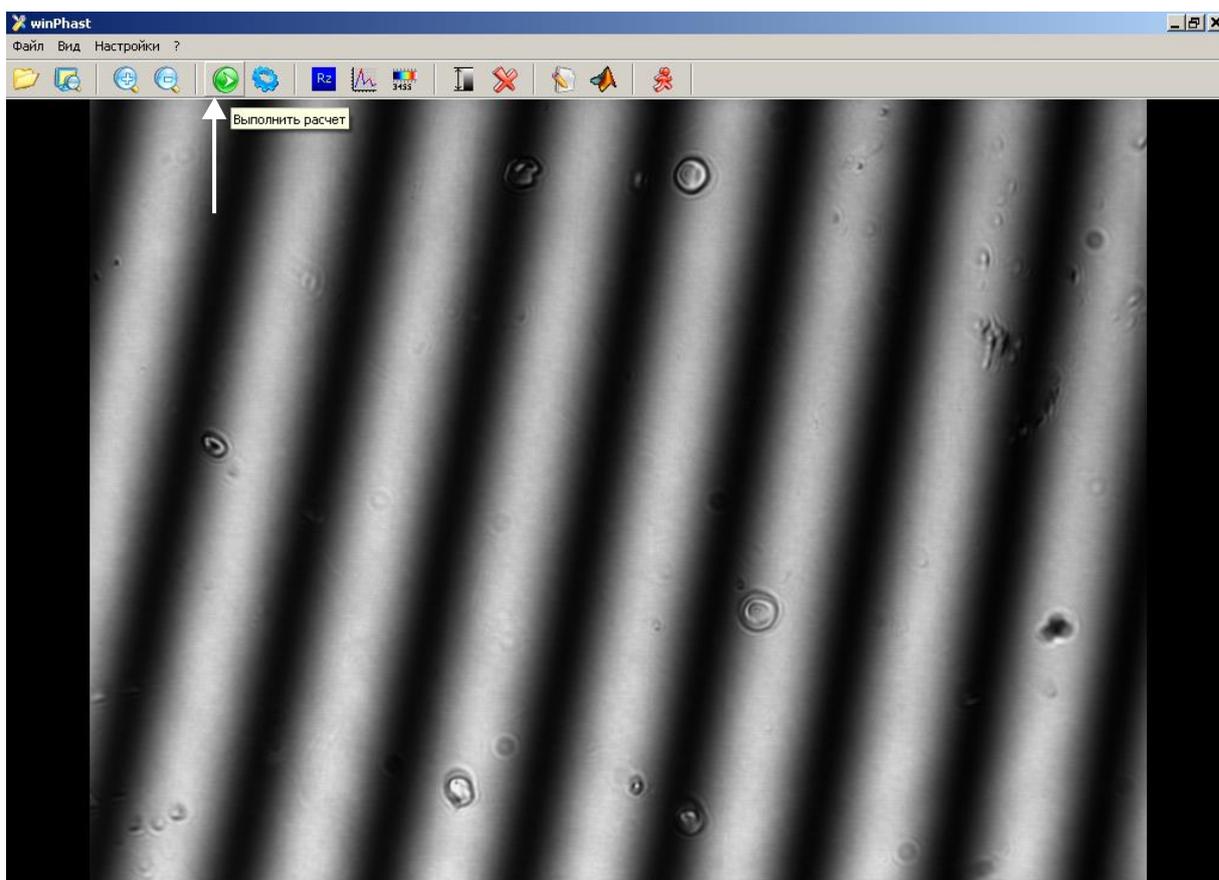


Рисунок 10

9. После этого в основном окне программы появится восстановленное (фазовое) изображение. Для сохранения фазового изображения необходимо выбрать в меню программы «Файл-Сохранить как». В открывшемся меню (рисунок 11) будет предложено два варианта сохранения: как изображение bmp (сохранять, если в дальнейшем не потребуется дальнейшая обработка изображения), или как файл Matlab. В этом случае изображение будет сохранено в ASCII-кодах, в нем будет сохранена корректная информация о значениях OPX, поэтому изображение пригодно для дальнейшей обработки в различных других программах (Matlab, SPIP, Origin и т.д).
10. Для сохранения оптической (не интерференционной) картинку повернуть рукоятку **13** по часовой стрелке (на экране должны исчезнуть интерференционные полосы), затем выбрать в меню программы «Файл-Сохранить как-Изображение.bmp».

Выше перечислены не все функции и возможности программ, используемых для захвата и получения фазовых изображений, однако вышеперечисленных действий вполне достаточно для проведения простых измерений.

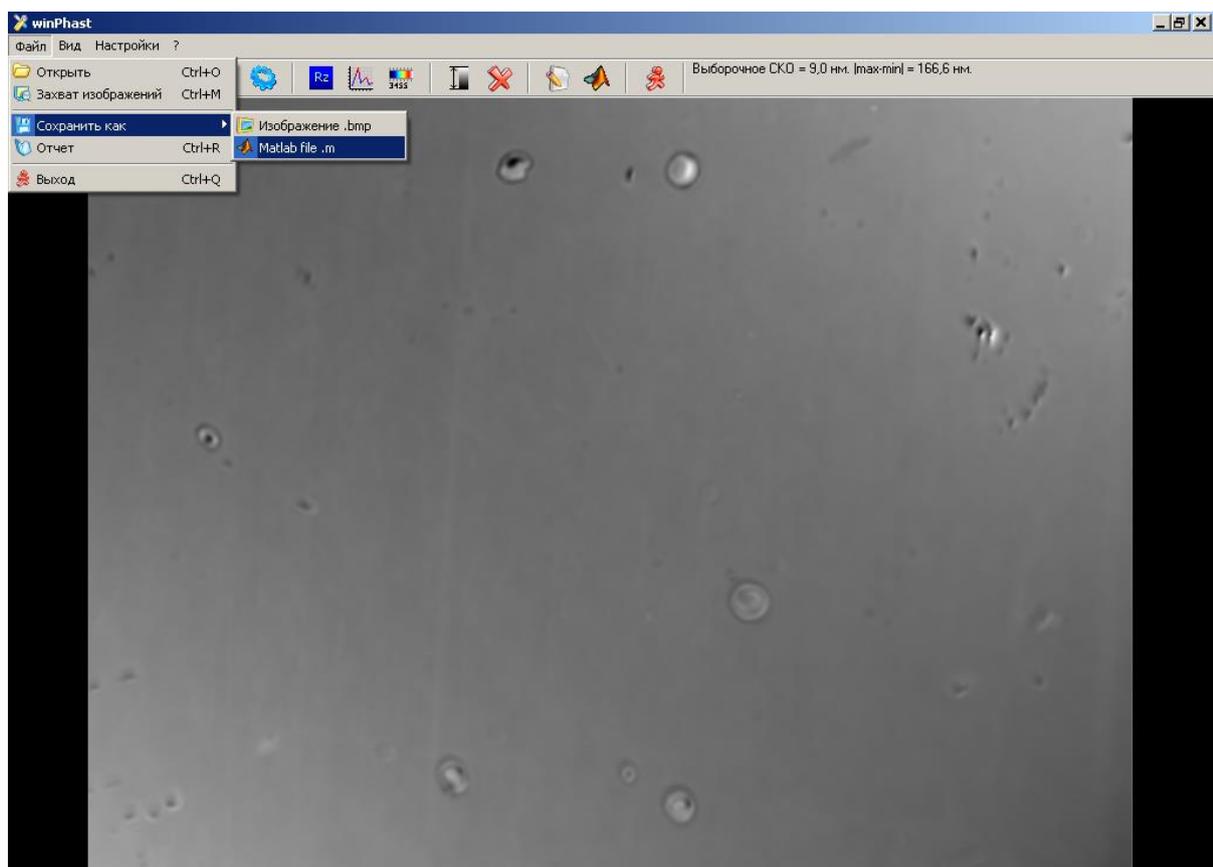


Рисунок 11

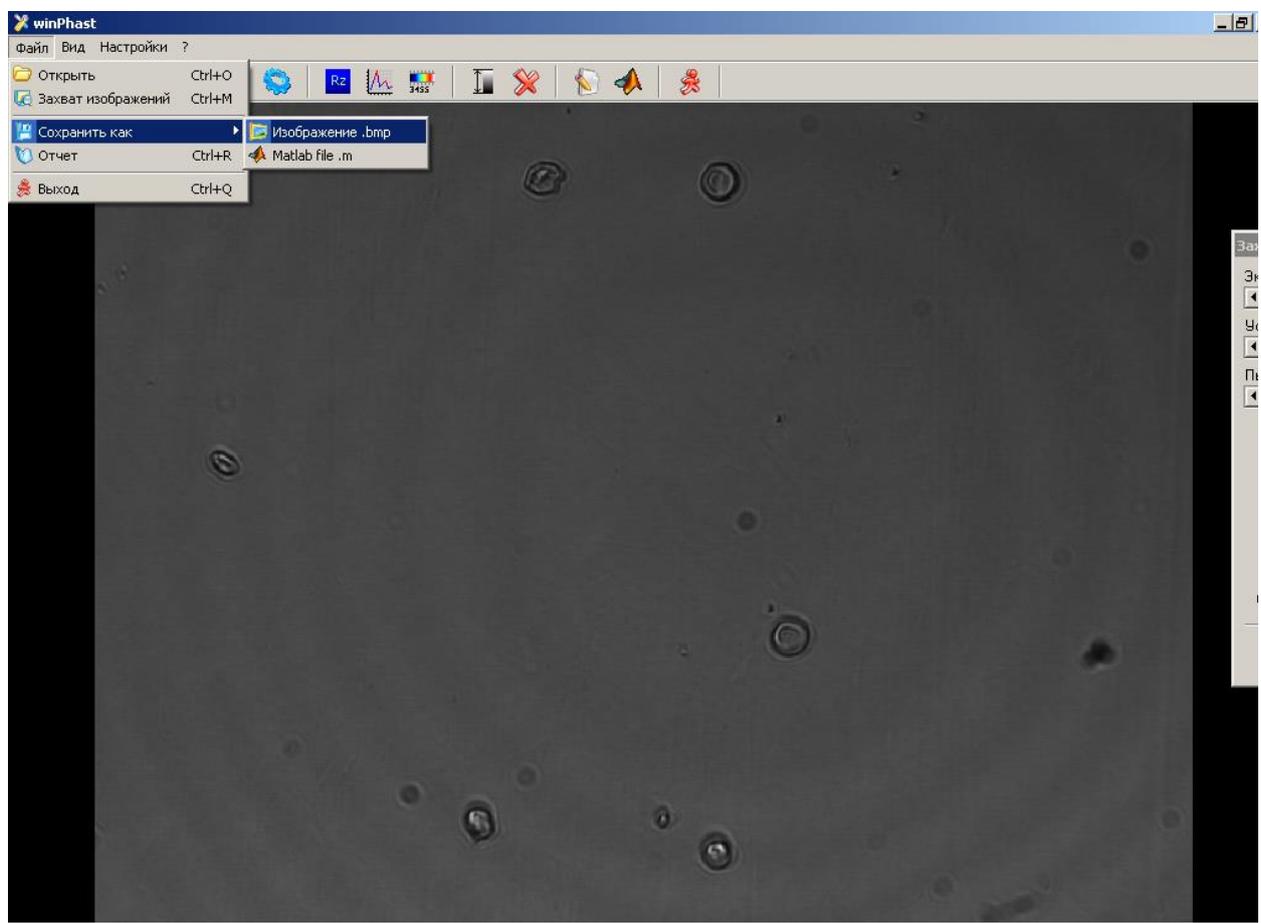


Рисунок 12

Приготовление препарата:

Для проведения задачи используются 2 готовых препарата, каждый из которых состоит из зеркального предметного стекла, содержащем эритроциты, зафиксированные при помощи глутарового альдегида, и находящиеся в водном растворе глицерина (показатель преломления равен 1,404). Затем каплю раствора покрывают покровным стеклом. Эритроциты представляют из себя однородный объект, показатель преломления которого определяется содержащимся в нем гемоглобином и равен 1,405.

Ход работы:

- 1) Регистрация фазового и видео изображений фиксированных эритроцитов.
- 2) Оценка характеристик эритроцитов при помощи видео и фазового изображения.
- 3) Интерпретация полученных изображений
- 4) Оценка нормальности распределения измеренных параметров
- 5) Нахождение достоверных отличий между аналогичными параметрами двух препаратов при помощи t-критерия и непараметрического критерия Манна-Уитни ($p=0,05$)

Оформление работы:

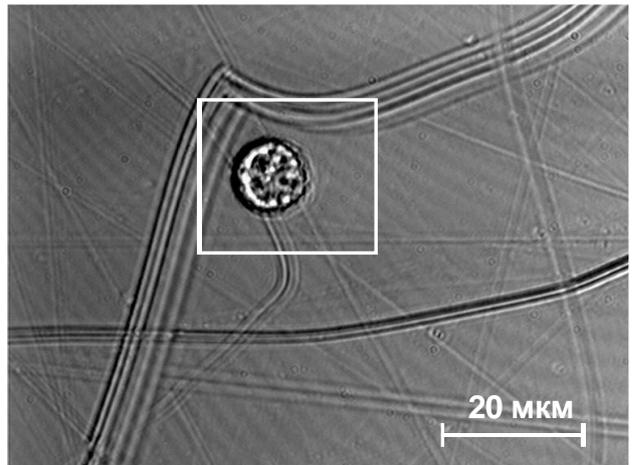
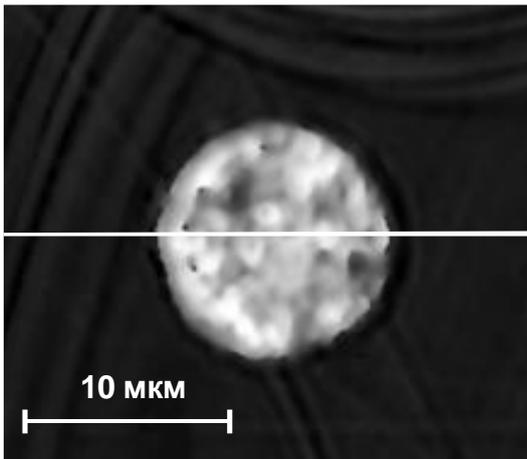
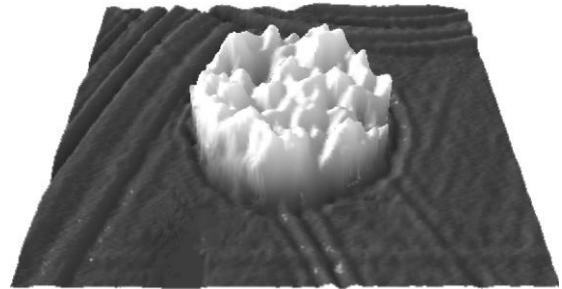
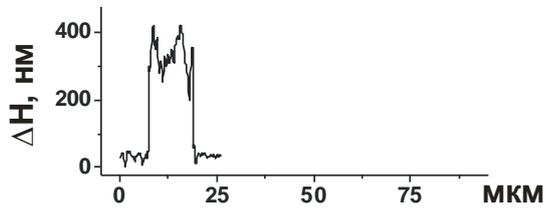
- 1) Титульный лист, с указанием названия задачи, ФИО курс и кафедры, выполнявших задачу, а также дата написания отчета;
- 2) Теоретическая часть (в произвольной форме не более 1 стр.);
- 3) Описание метода (в произвольной форме не более 1 стр.);
- 4) Результаты, примеры типичных световых и фазовых изображений, диаграммы размаха для выбранных параметров, а также гистограммы распределения измеренных параметров для каждого образца;
- 5) Выводы;

Примечания:

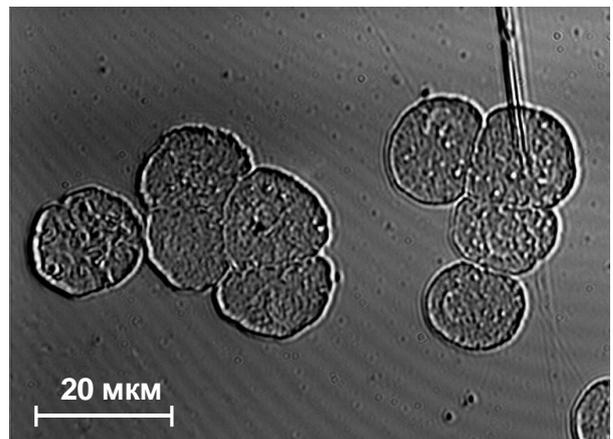
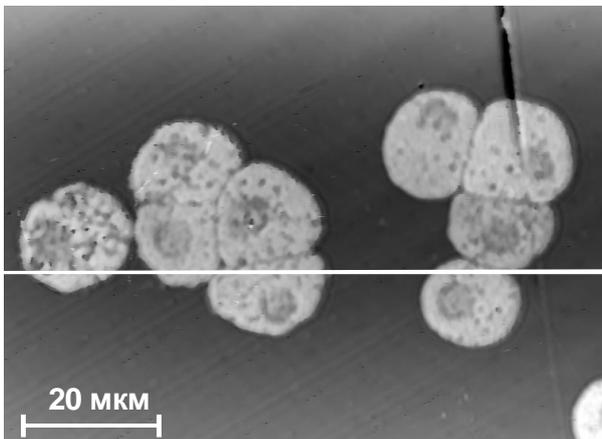
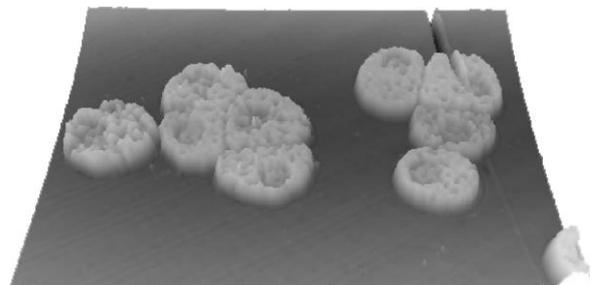
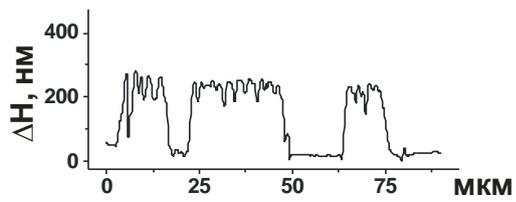
оформление задач проводится после представления полученных результатов;
отчет является результатом работы группы студентов, выполнявших задачу в один день;
сдача отчета преподавателю происходит очно, в присутствии всех участников группы;
оценка выставляется всей группе по результатам опроса и готового отчета.

Примеры различных биологических объектов, полученных с помощью ЛИМ микроскопа:

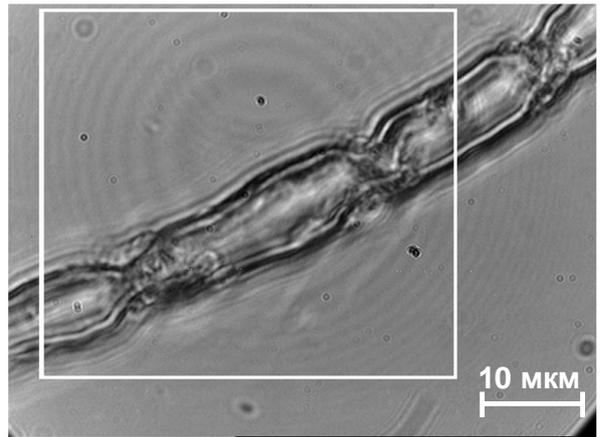
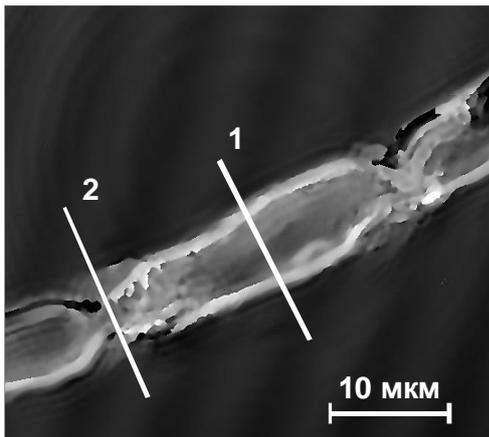
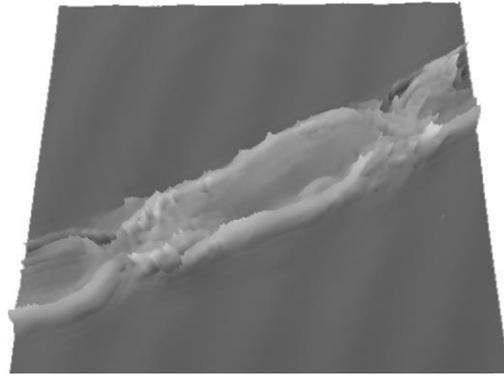
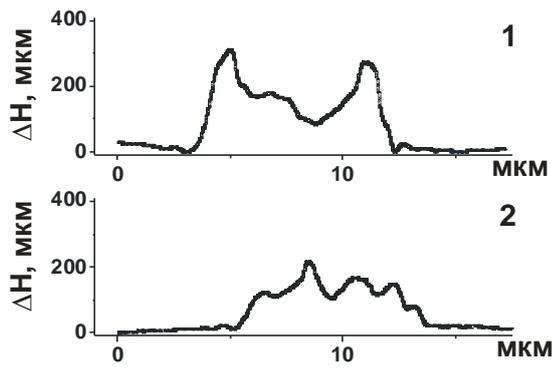
Тучные клетки (норма)



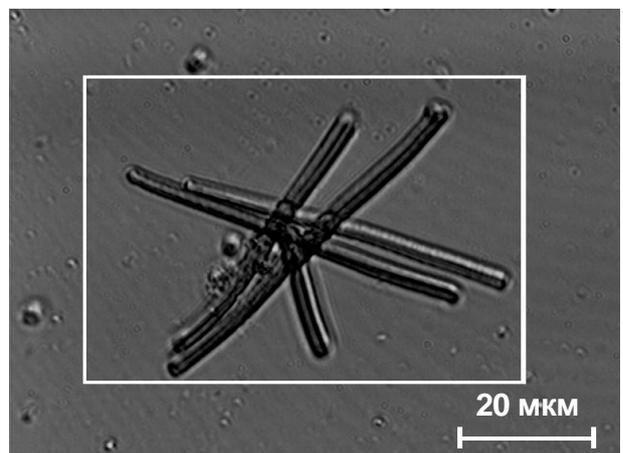
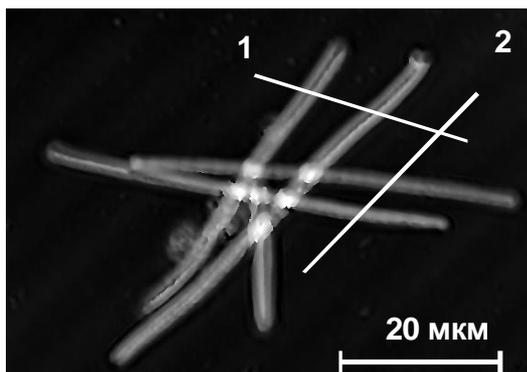
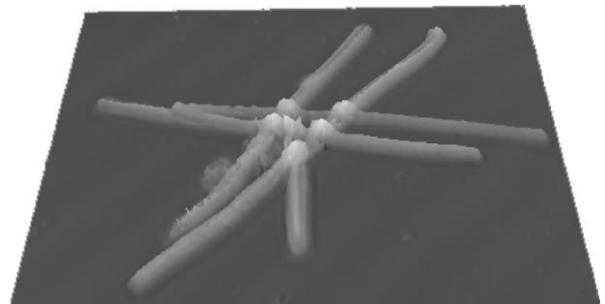
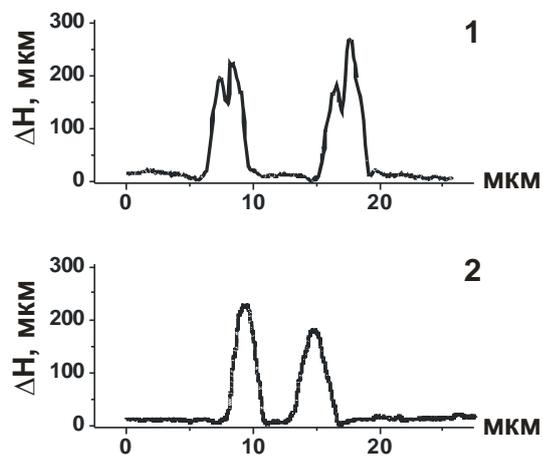
Тучные клетки (секреция гистамина)



Нервное волокно лягушки

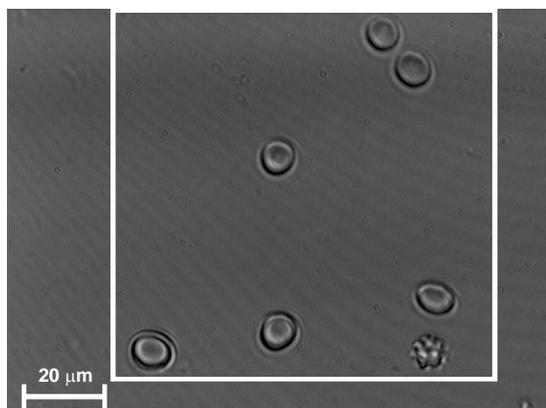


Синезеленые бактерии (Microcoleus)

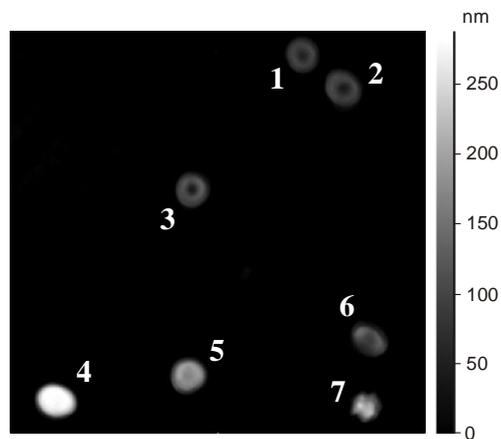


Эритроциты человека в плазме крови, измеренные при помощи метода ЛИМ.

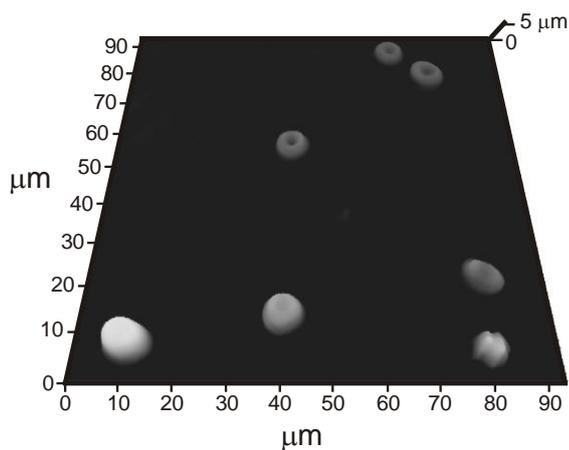
На рисунке представлено изображение различных форм эритроцитов полученное традиционным способом (а), а также фазовое изображение эритроцитов (b и c). На рисунке находятся следующие формы эритроцитов: 1, 2, 3 – дискоциты, 4 – агрегат из трех клеток, 5 – агрегат из двух клеток, 6 – стоматоцит, 7 – эхиноцит. На рис. b приведена фазовая высота клеток (в нм), на рис. c представлено трехмерное изображение объекта, фазовая высота которого пересчитана в настоящую толщину объектов (см. формулу 6).



a



b



c

Приложение 1

Использование программы FIJI для расчета параметров клеток измеренных методов ЛИМ

FIJI — бесплатная разновидность бесплатной же программы ImageJ предназначенной для обработки полученных изображений. Скачать программу FIJI для различных платформ можно со следующего сайта: http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Main_Page . Ниже описывается последовательность действий для определения таких характеристик клеток как длина, ширина, площадь, минимальную, максимальную и среднюю высоту клеток, а также объем. Возможности программы не исчерпываются вышесказанным. Подробнее о FIJI можно узнать на сайте программы.

Данный способ обработки данных предложен только для ознакомления. Аналогичные процедуры можно также производить в других программах, также возможно улучшение или модификация существующих алгоритмов в самой программе FIJI, что, однако не является целью данной задачи.

Для запуска программы необходимо нажать на соответствующий ярлык программы на рабочем столе (рисунок 1). После этого загрузится главная панель программы FIJI (рисунок 2).

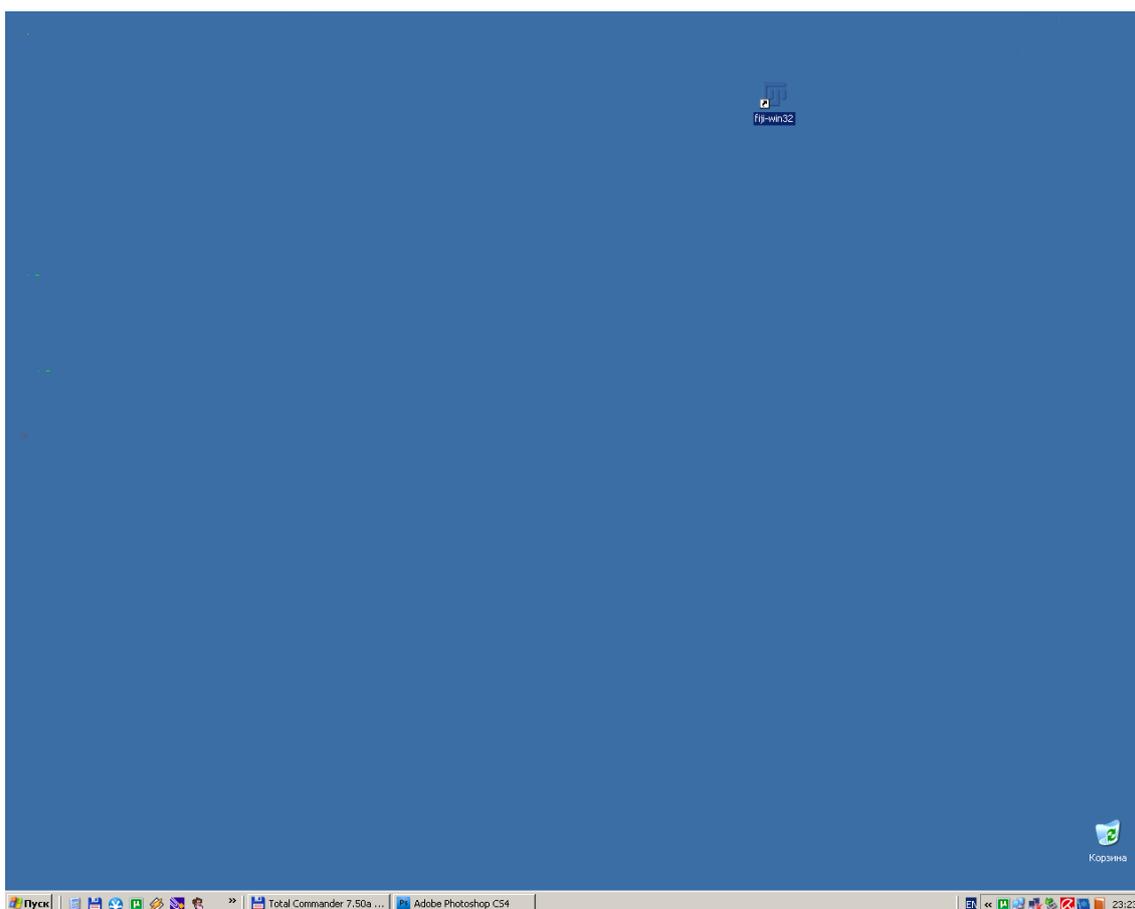


Рисунок 1.

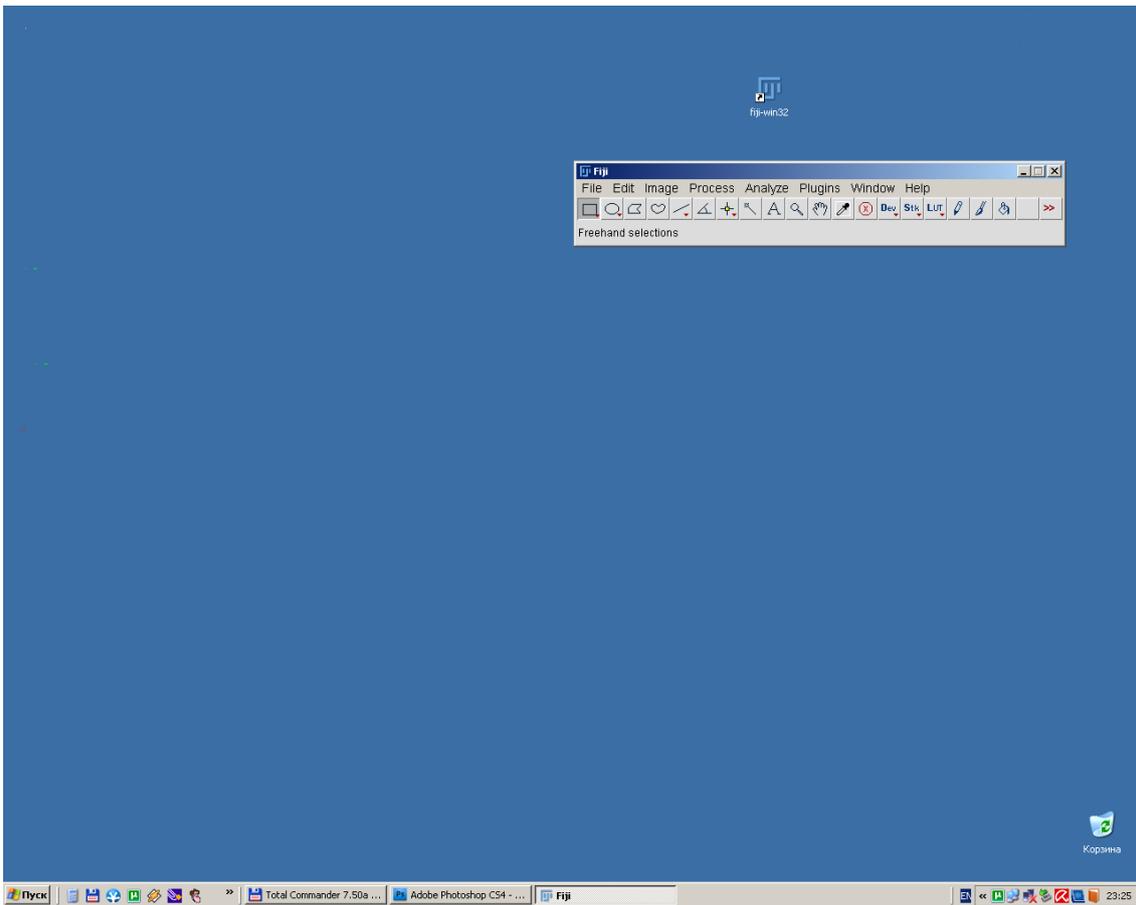


Рисунок 2.

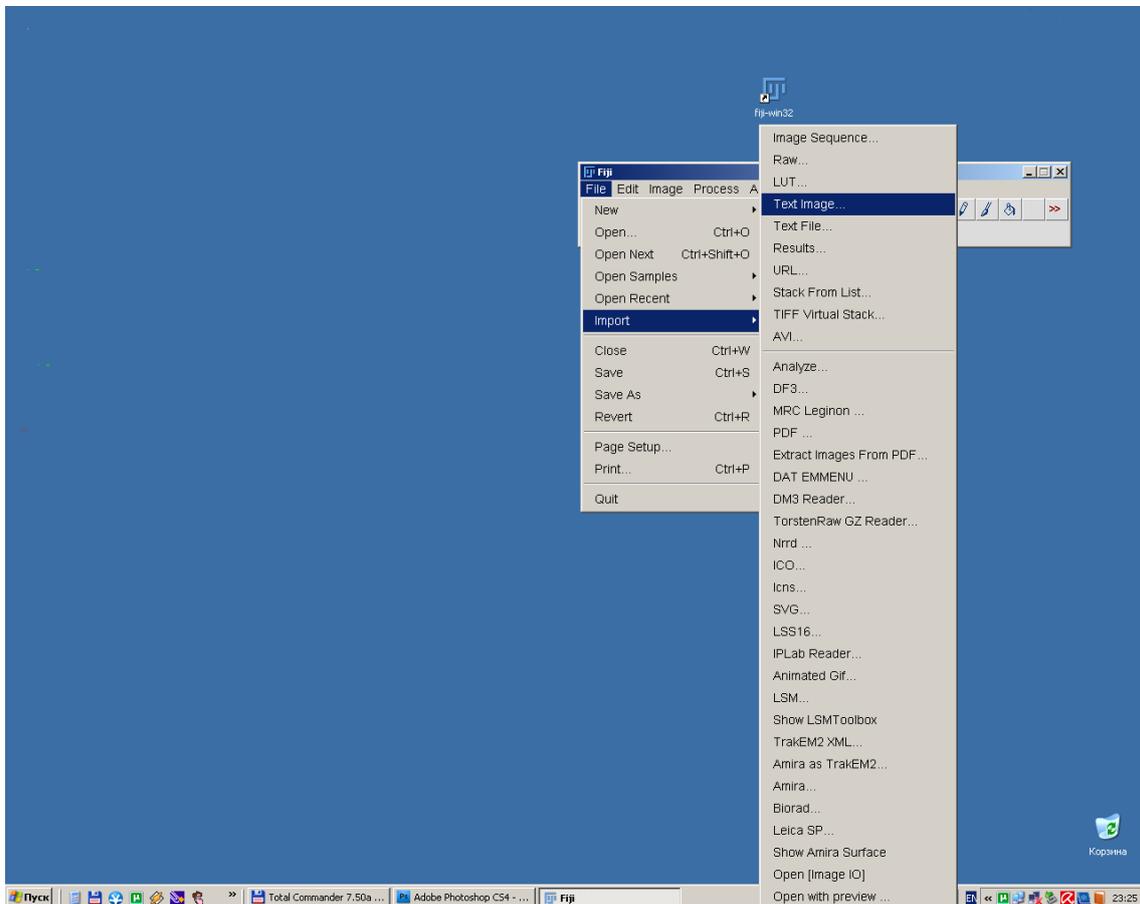


Рисунок 3.

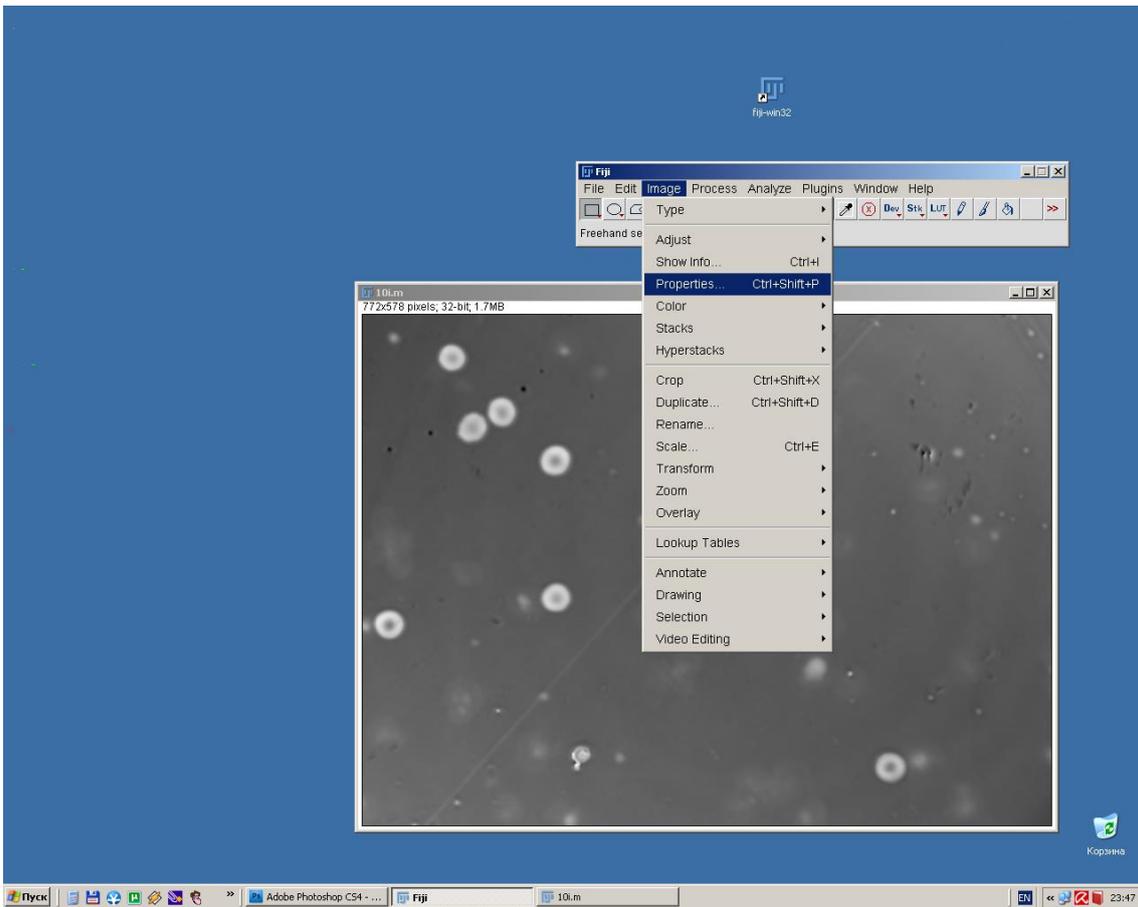


Рисунок 4.

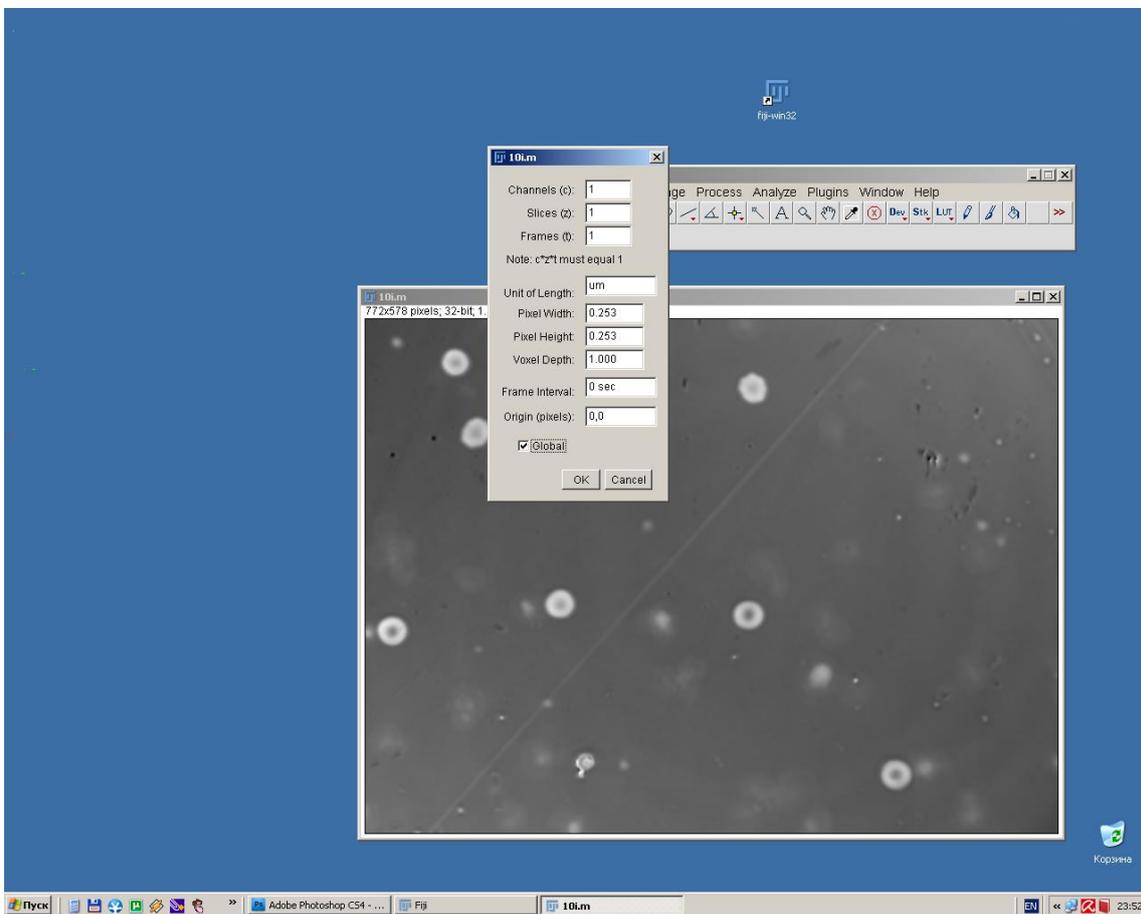


Рисунок 5.

Для открытия файла, содержащего фазовое изображение, необходимо выбрать пункт меню File-Import, а затем выбрать пункт Text Image (рисунок 3).

Затем необходимо провести калибровку латеральных размеров. Для этого в выбираем пункт меню Image-Properties (Рисунок 4). Далее (рисунок 5) устанавливаем в пункте «Units of Length» единицу измерения μm -микрометры; в закладке «Pixel Width» и «Pixel height» величину 0.253 (длина и ширина одного пикселя на используемом микроскопе), величину «Voxel Depth» оставляем равной единице (при проведении настоящих измерений данная величина не является важной). Для того чтобы установленная калибровка распространялась на все открытые изображения курсором мыши выставляем галочку в пункте «Global».

Затем для устранения случайных выбросов (обусловленных, главным образом, шумами на регистрирующей матрице прибора) необходимо провести усреднение. Для этого выбираем Process-Filters и далее Median (Рисунок 6). В открывшемся окне (Рисунок 7) в закладке «Radius» установить радиус области усреднения. Рекомендуется использовать малую область усреднения. Рекомендуется выставлять 1.0. Результат обработки можно предварительно оценить курсором мыши выставляем галочку в пункте «Preview». Для применения фильтра нажимаем кнопку «ОК».

Далее необходимо вычистить фон, чтобы все объекты находились на одном уровне (выровнять изображение). Для этого выбираем Process-Subtract Background (Рисунок 8). В открывшемся окне (рисунок 9) выставляем курсором мыши галочки напротив опций «Disable smoothing» (данный параметр можно и отключить, рекомендуется предварительно оценить получившееся изображения) и «Preview» (для предварительной оценки произведенных действий). Напротив остальных опций галочки не выставляются. Очень важно выбрать правильный радиус действия участков, в которых будет производиться операция. Данная величина устанавливается в закладке «Rolling Ball Radius». Чем больше диаметр объекта, тем больше радиус нужно устанавливать. Для установления оптимальной величины этого параметра рекомендуется предварительно оценивать, устанавливая и убирая галочку напротив опции «Preview». Для применения фильтра нажимаем кнопку «ОК». Оптимальным считается такая величина параметра «Rolling Ball Radius» при которой форма оцениваемых объектов не изменяется после применения операции (для этого необходимо увеличивать параметр), а на подложке не появляется большого количества артефактов (для этого необходимо уменьшать величину параметра). Для эритроцитов, оцениваемых при помощи интерференционного микроскопа на базе МИИ-4 оптимальным считается величина параметра «Rolling Ball Radius» в диапазоне 30-50 пикселей.

Рекомендуется провести операцию «Subtract Background» три раза.

Для корректного измерения параметров необходимо, чтобы высота подложки была равна нулю. Для этого находим наиболее часто встречаемое значение изображения (Mode) нажав $\text{Ctrl}+\text{H}$ (альтернатива Analyze-Histogram-см. рисунок 10) в открывшемся окне ничего не изменяем и нажимаем «ОК». В открывшемся окне (рисунок 11) находим значение Mode. Если эта величина больше 1 вычитаем данную величину из высоты изображения во всех точках. Для этого выбираем Process-Math (рисунок 12), далее выбираем «Subtract» в окне «Value» указываем значение Mode и нажимаем «ОК» (рисунок 13). Указанный алгоритм работает только в том случае если площадь занимаемая объектами меньше площади изображения, занимаемого подложкой!

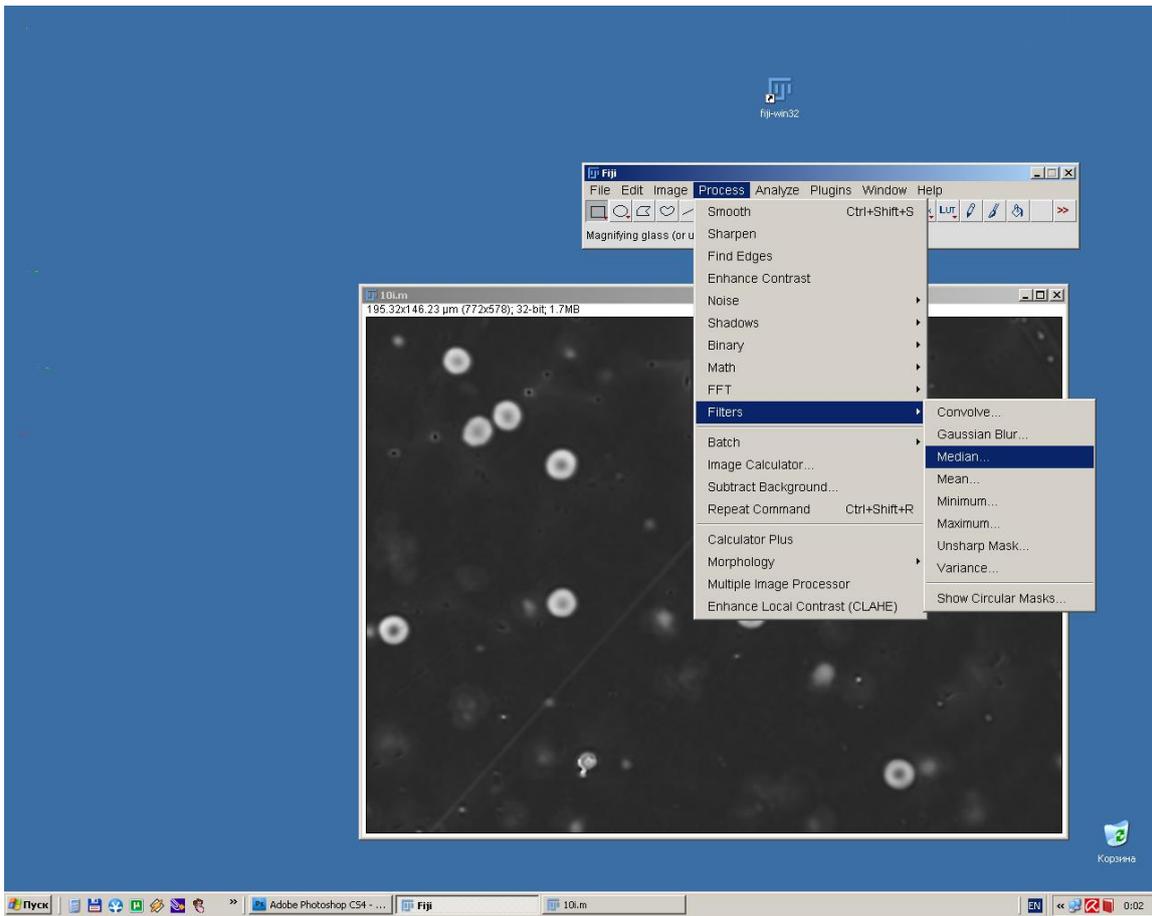


Рисунок 6.

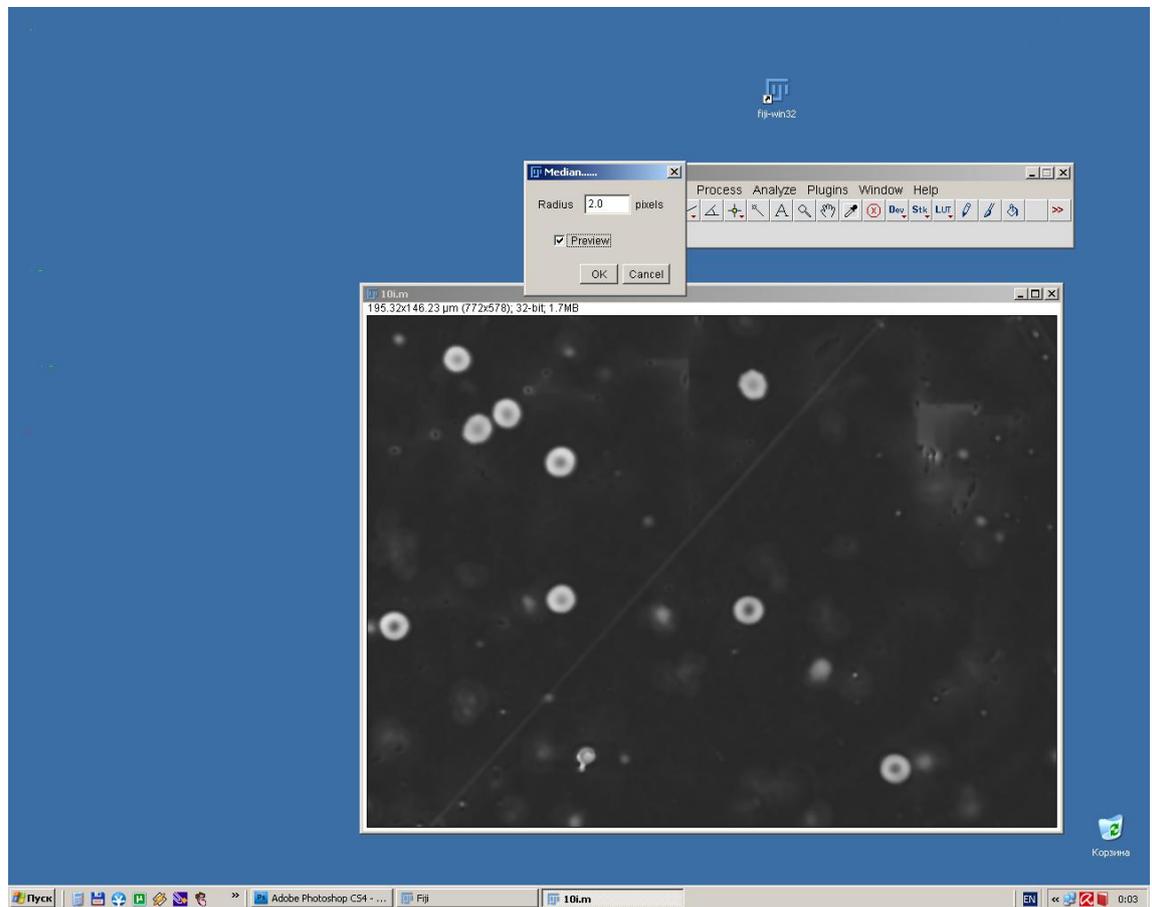


Рисунок 7.

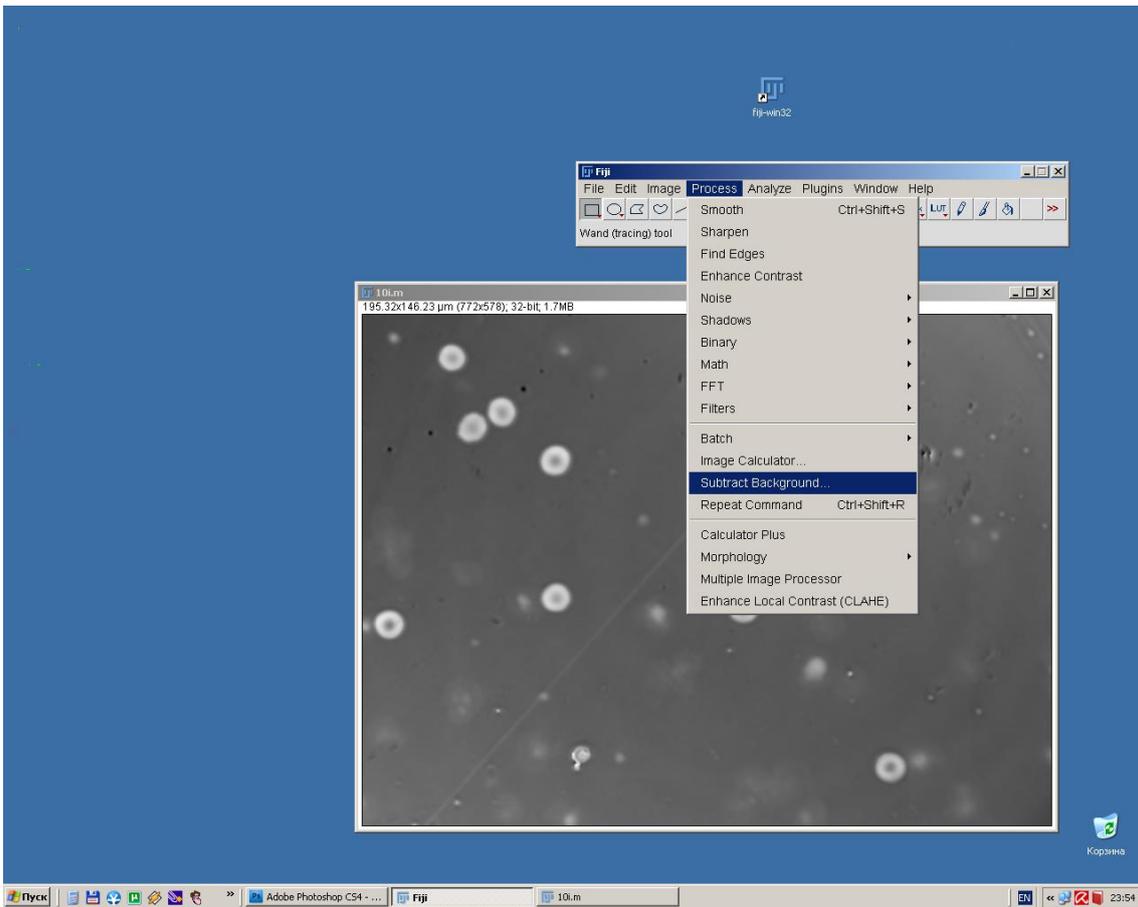


Рисунок 8.

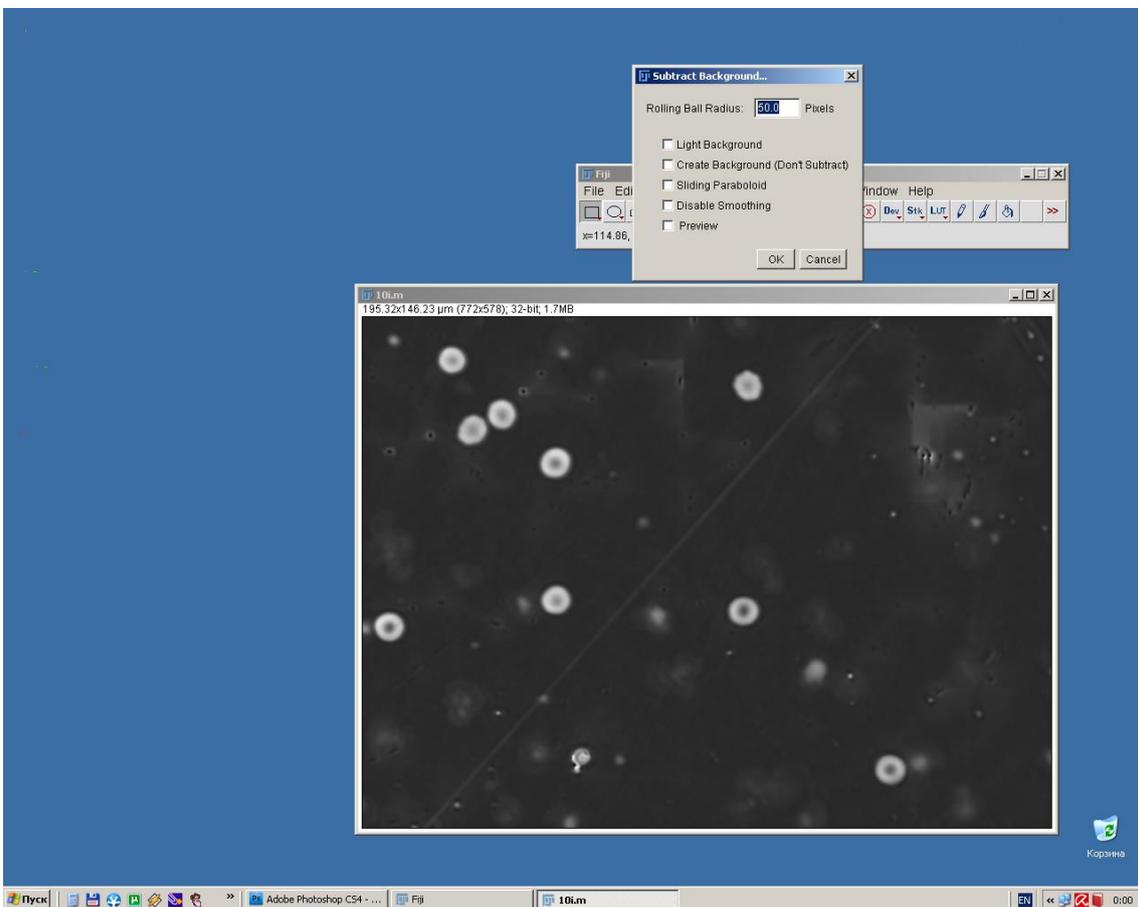


Рисунок 9.

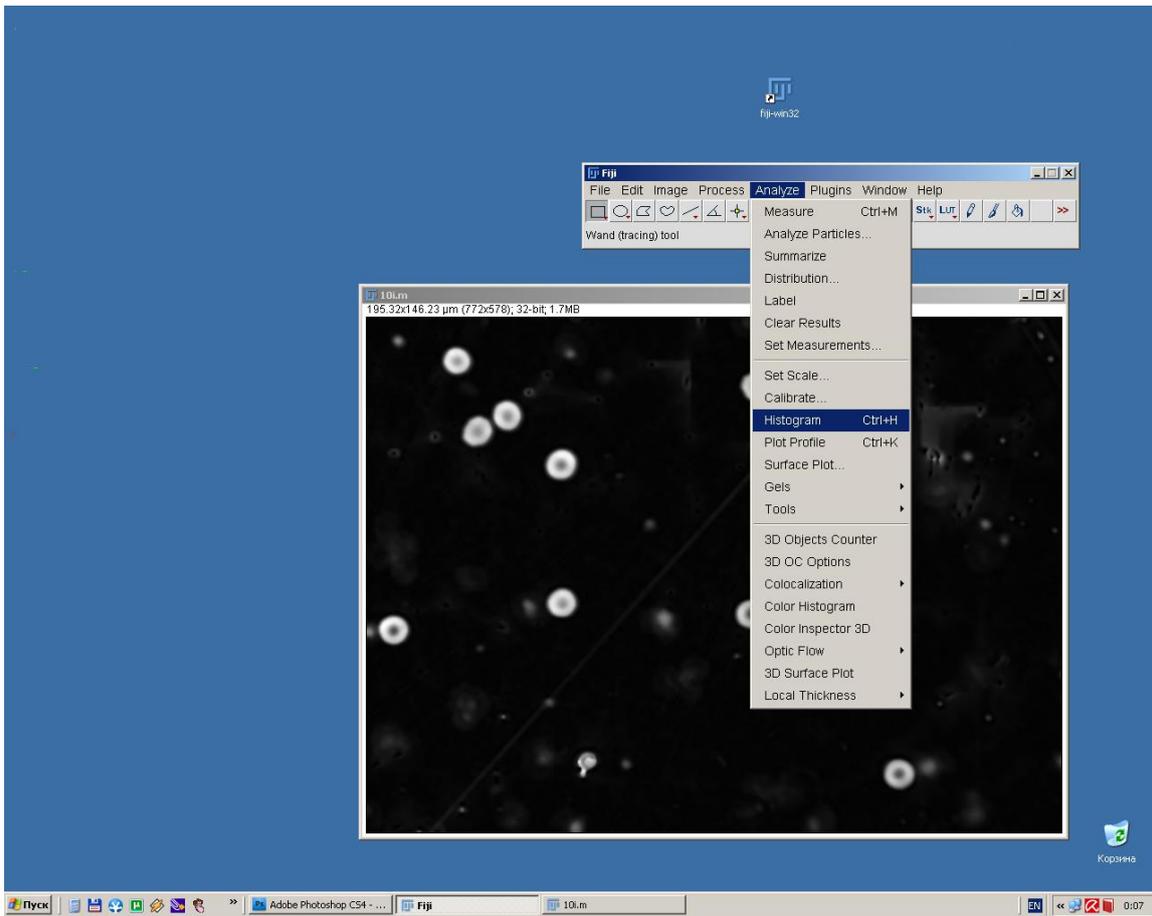


Рисунок 10.

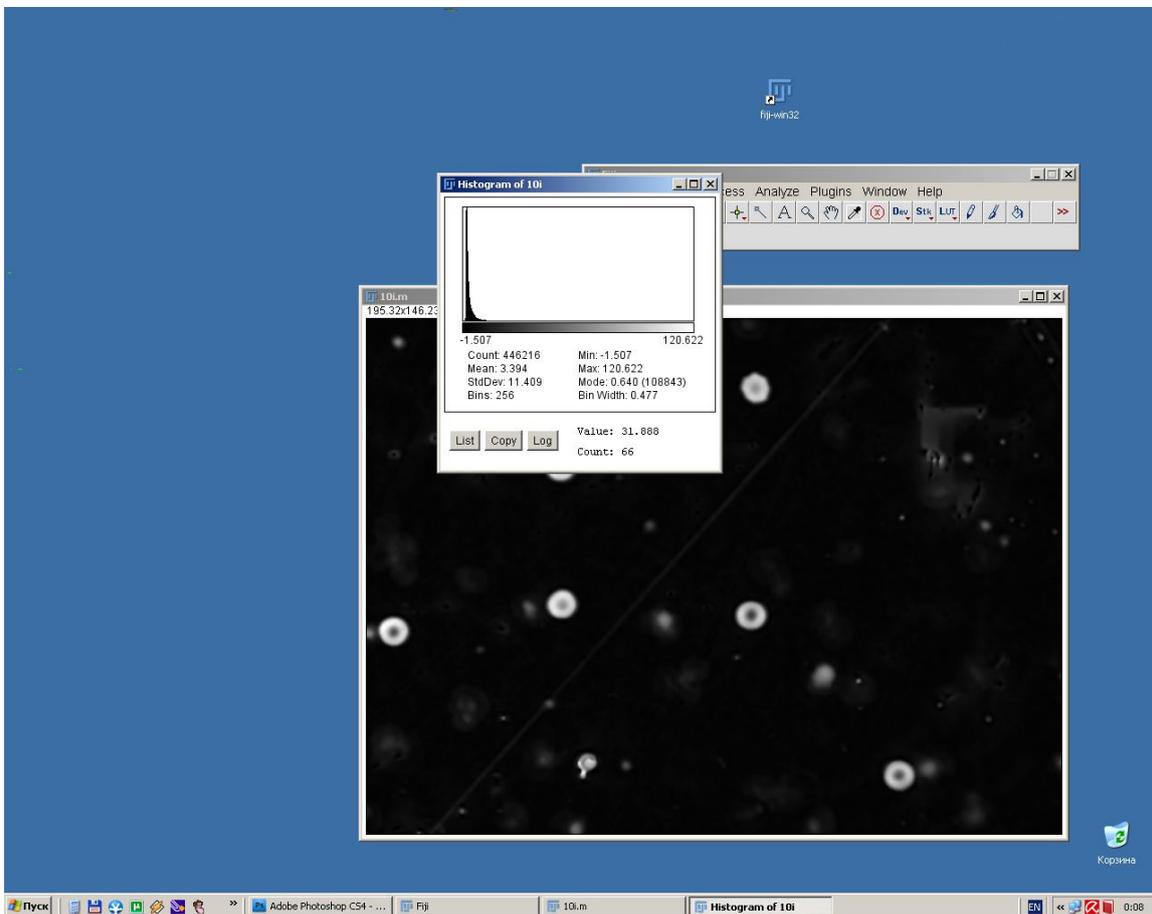


Рисунок 11.

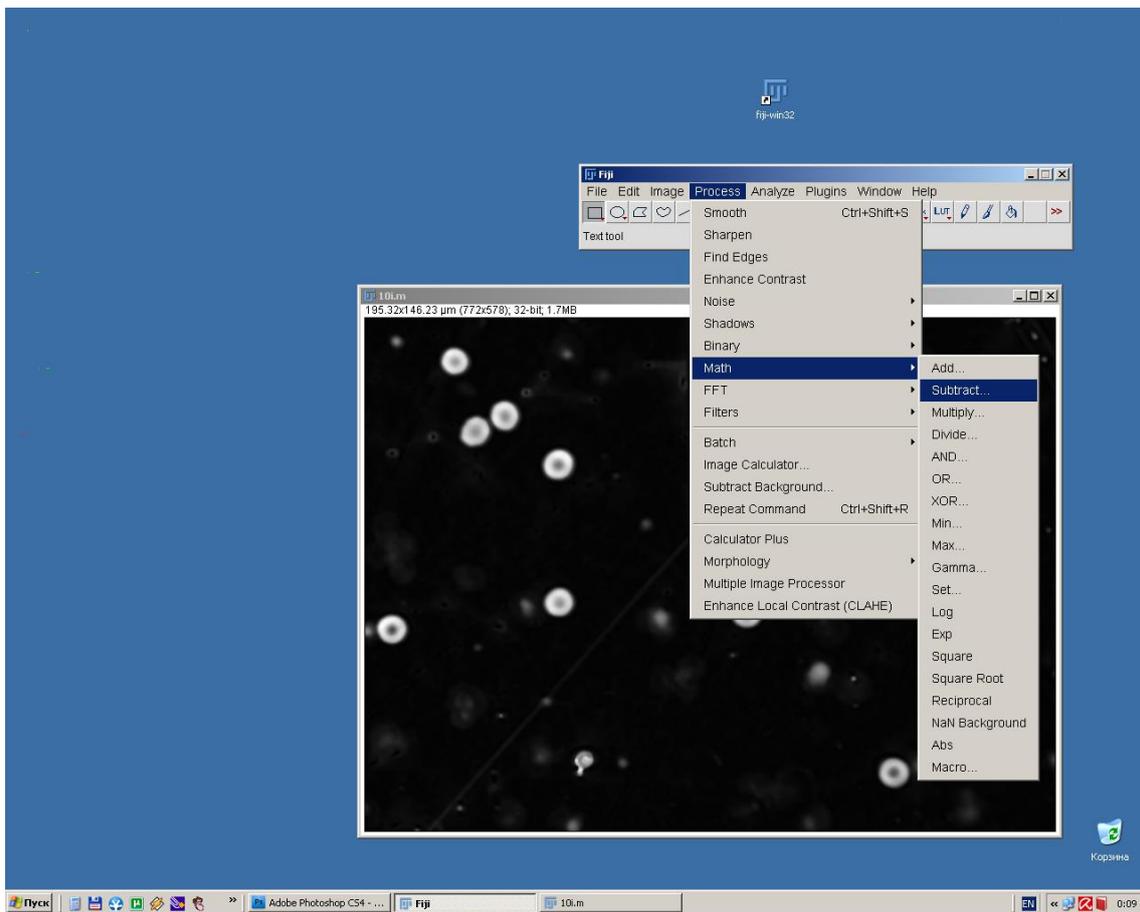


Рисунок 12.

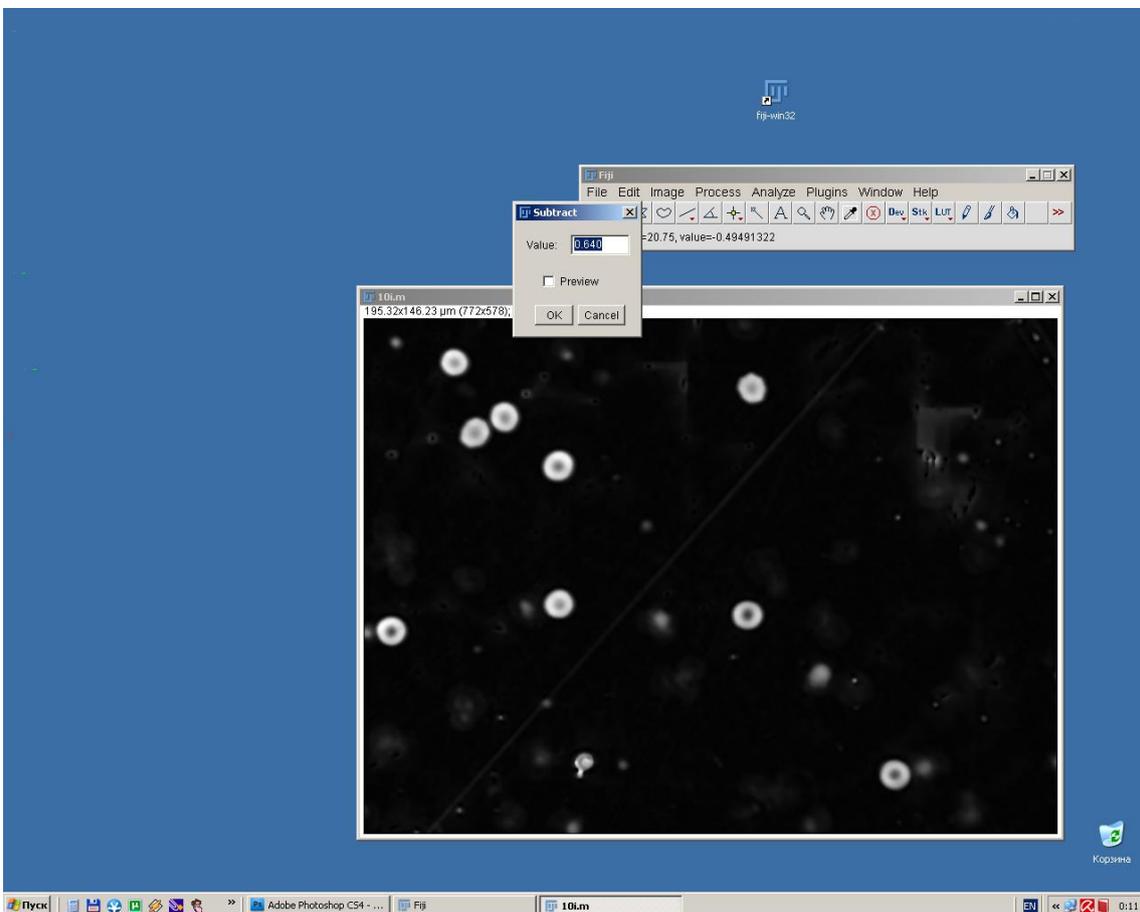


Рисунок 13.

Для удобства расчетов уберем все значения оптической разности хода изображения меньше 0. Для этого выбираем Process-Math-Abs.

Все вышеуказанные действия можно автоматизировать программными средствами FIJI для группы файлов, расположенных в одной папке.

Для подсчета соответствующих характеристик клеток необходимо установить пороговую величину по оси z (threshold). Эта величина выбирается больше 0, что обусловлено некоторым уширением объектов при их наблюдении в оптический микроскоп. Рекомендуется устанавливать пороговую величину в диапазоне от 20 до 50 % от высоты объекта. Для эритроцитов со средним значением оптической разности хода 80-100 нм рекомендуется устанавливать пороговую величину около 30-40. Для установки пороговой величины необходимо выбрать Image-Adjust-Threshold (рисунок 14). В открывшемся окне (рисунок 15) в правой закладке в центре выбрать «Other/Under» взамен «Red» или «B&W». При выборе этой опции подсвечиваются только точки выше (зеленые) или ниже (синие) порогового значения. Затем нажимая курсором мыши на бегунки под гистограммой устанавливаем нижнее (верхний бегунок, для эритроцитов рекомендуется 30-40) и верхнее (нижний бегунок рекомендуется устанавливать в крайнем правом положении) пороговые значения.

Далее необходимо выбрать измеряемые параметры. Для этого выбираем Analyze-Set Measurements (рисунок 16). В открывшемся окне (рисунок 17) устанавливаем курсором мыши галочки напротив интересующих нас измеряемых параметров. Для эритроцитов можно измерить такие параметры как «Area»-площадь, «Mean Grey Value»- среднее значение величины оптической разности хода в клетке (OPX), «Standard Deviation»- стандартное отклонение оптической разности хода в клетке, «Modal Grey Value»- наиболее часто встречаемое значение оптической разности хода в клетке, «Min&Max Grey Value»- минимальное и максимальное значение OPX в клетке. При желании можно выбрать другие параметры. Рекомендуется также установить галочку напротив «Limit to Threshold» и «Display Label». Для сохранения выбранных параметров нажать «ОК».

Если нет необходимости оценивать все объекты в изображении можно оценить параметры только выбранных нами объектов. Для этого необходимо на главной панели программы FIJI нажать кнопку «Wand (Tracing) Tool» (рисунок 19) и далее, удерживая клавишу «Shift», выделить интересующие нас объекты в изображении, указывая на них курсором и нажимая на левую кнопку мыши. Если какой-то из объектов выделен ошибочно, то навестись на него курсором и нажать левую кнопку мыши при одновременном нажатии кнопки «Alt», в этом случае выделение объекта будет снято. Затем выбрать Analyze-Analyze Particles. В открывшемся окне (рисунок 20) выбрать опции «Display Results»- «Отображать результаты» и «Include Holes»- «Включать провалы» (эритроцит имеет двояковогнутую форму, поэтому очень часто центральная часть эритроцита много ниже его краев, в результате чего центр эритроцита может оказаться ниже порогового значения, чтобы предотвратить эту ситуацию и предусмотрена данная опция). Для отображения полученных результатов нажать «ОК».

Для запуска процедуры измерения выбрать Analyze-Analyze Particles (рисунок 18).

Перед Вами появится новое окно с названием «Results» в которой будут приведены результаты измерений. Чтобы сохранить полученные данные необходимо нажать File-Save As в окне «Results» и выбрать название и место сохранения файла (рисунок 21).

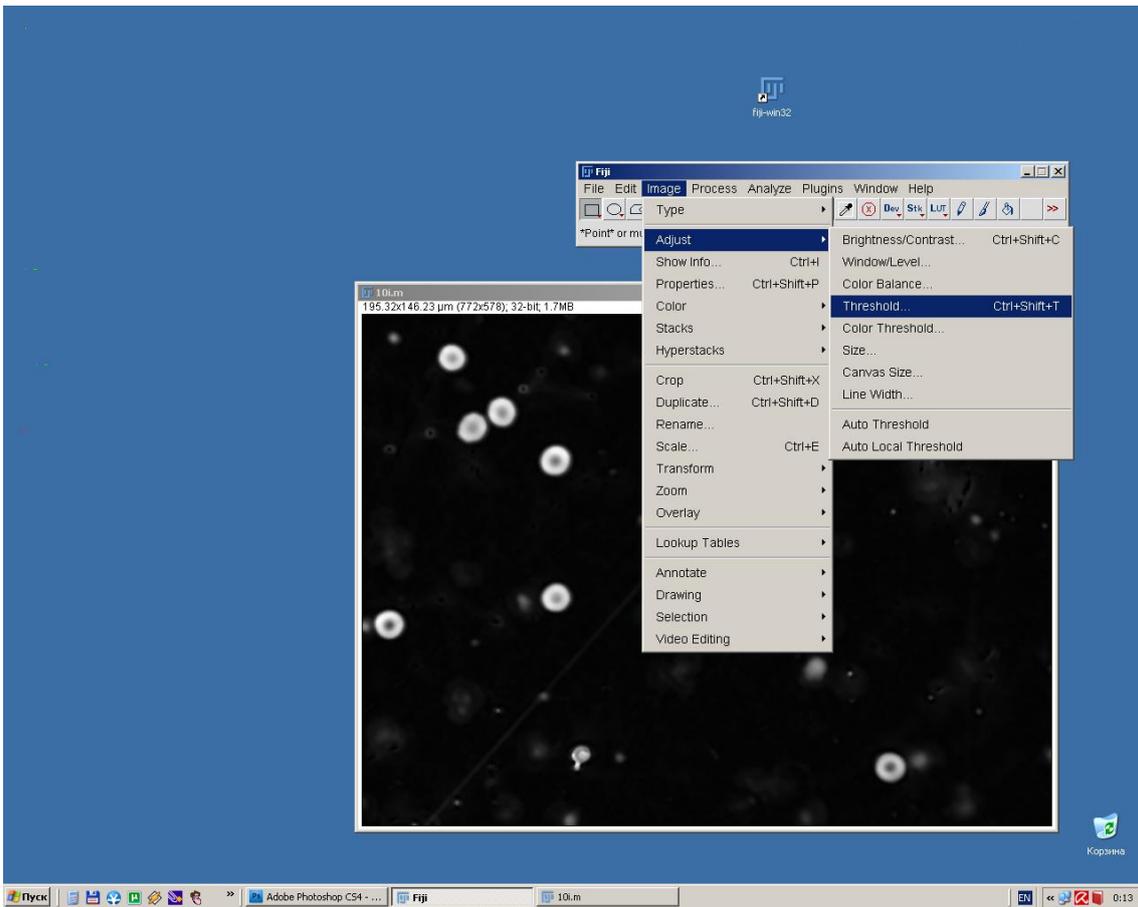


Рисунок 14.

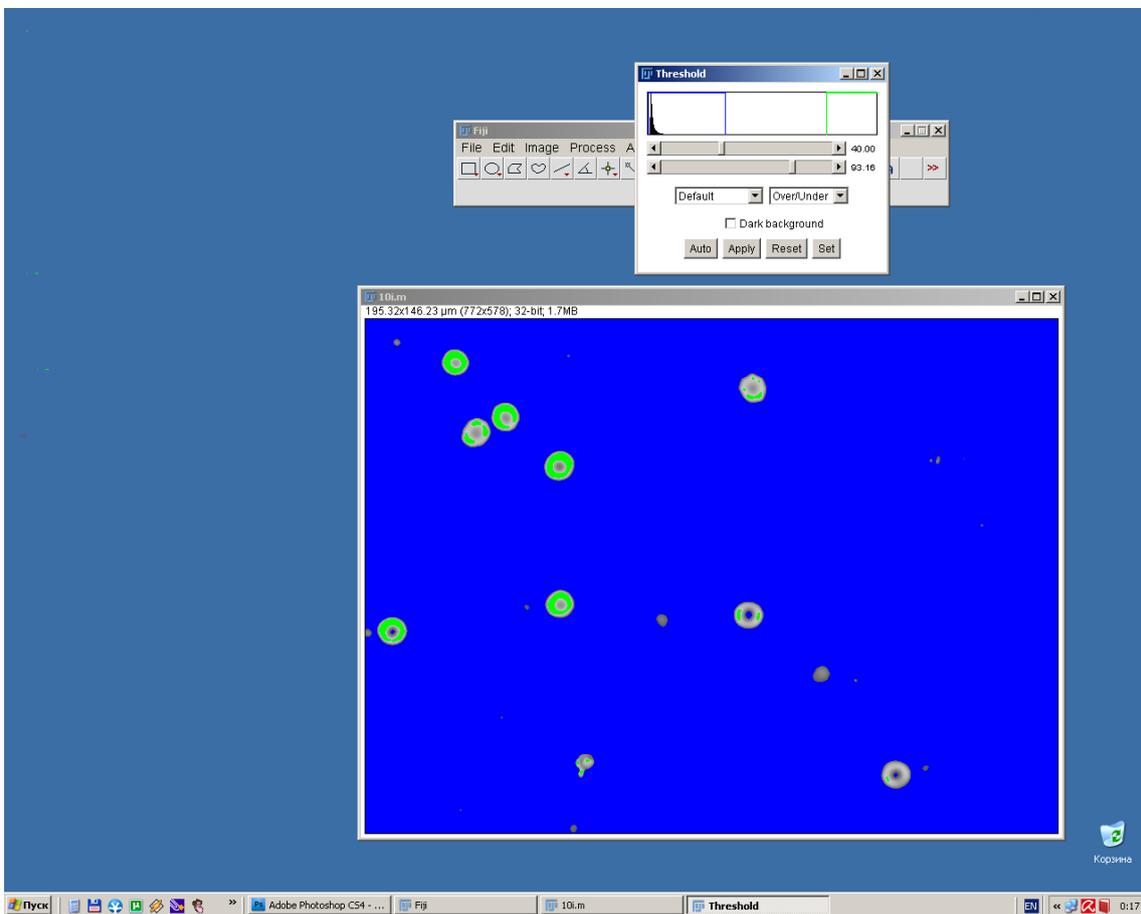


Рисунок 15.

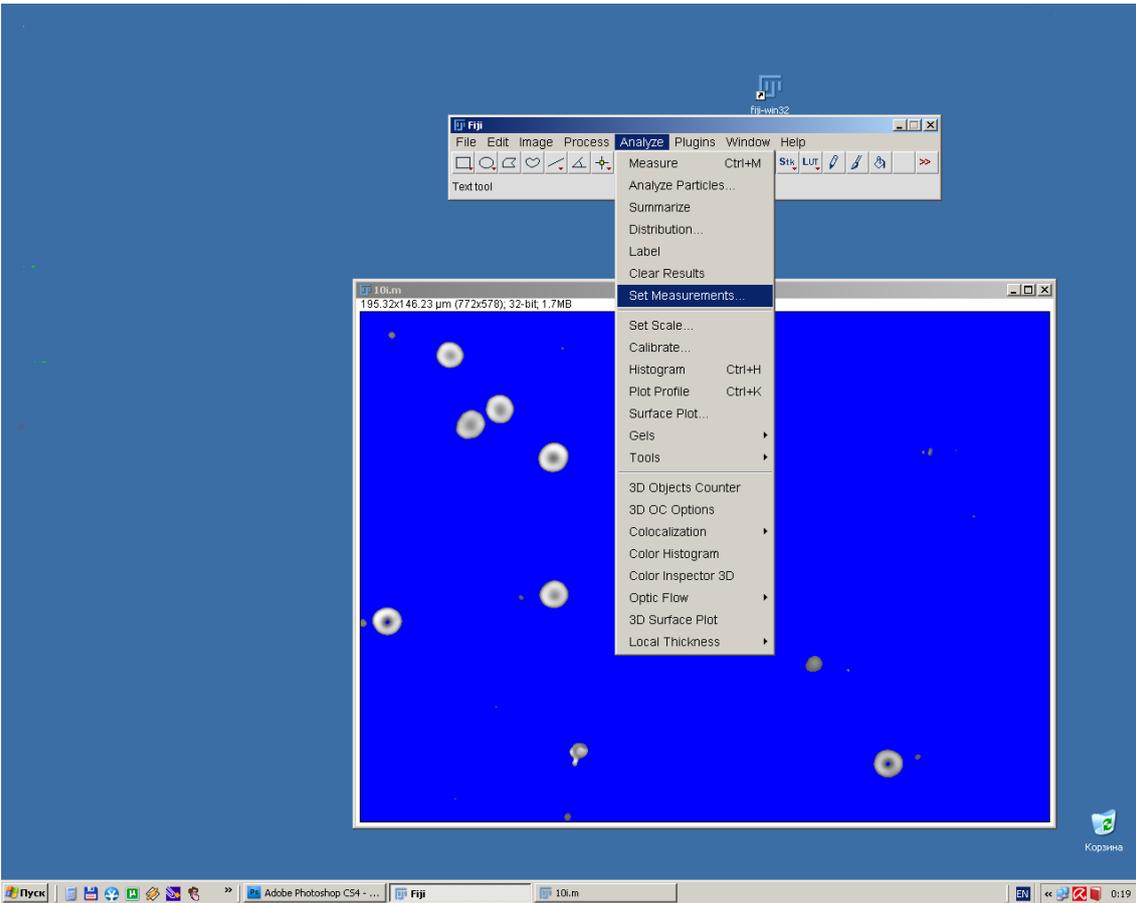


Рисунок 16.

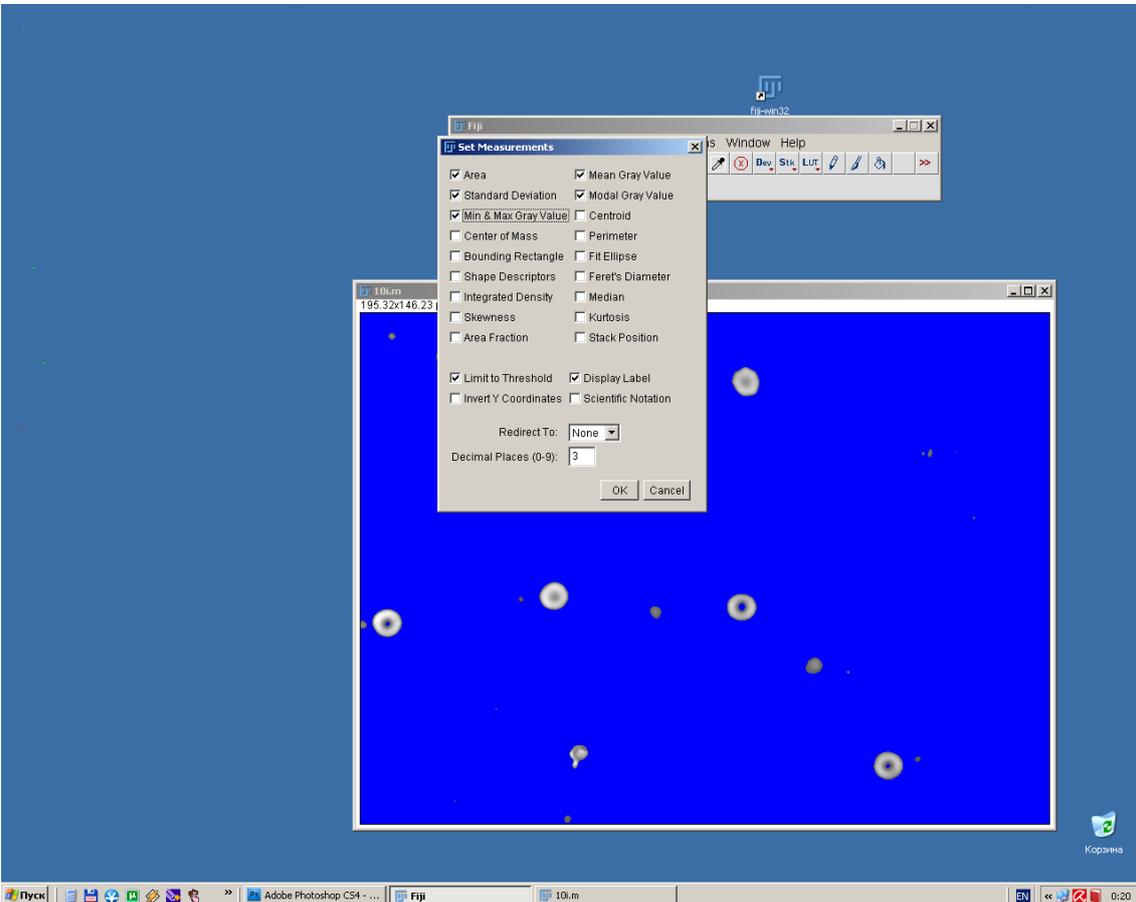


Рисунок 17.

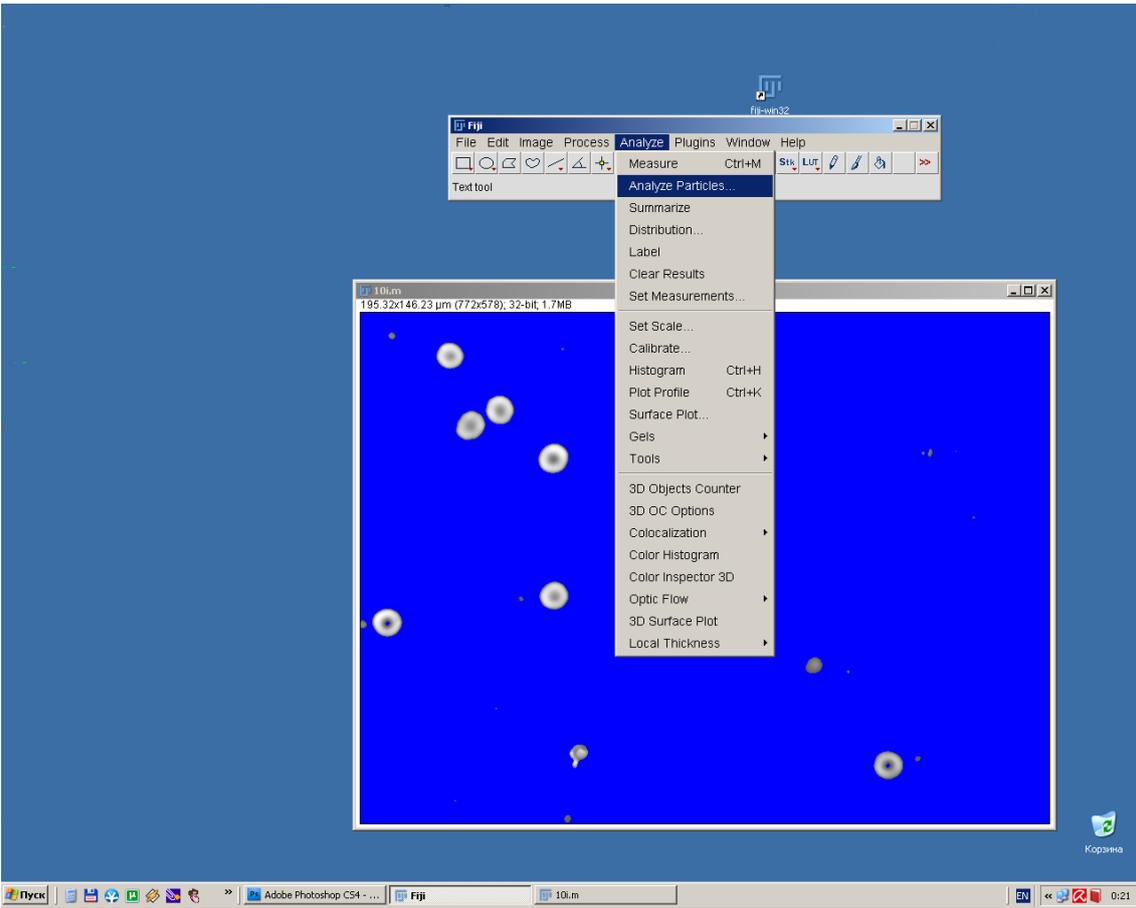


Рисунок 18.

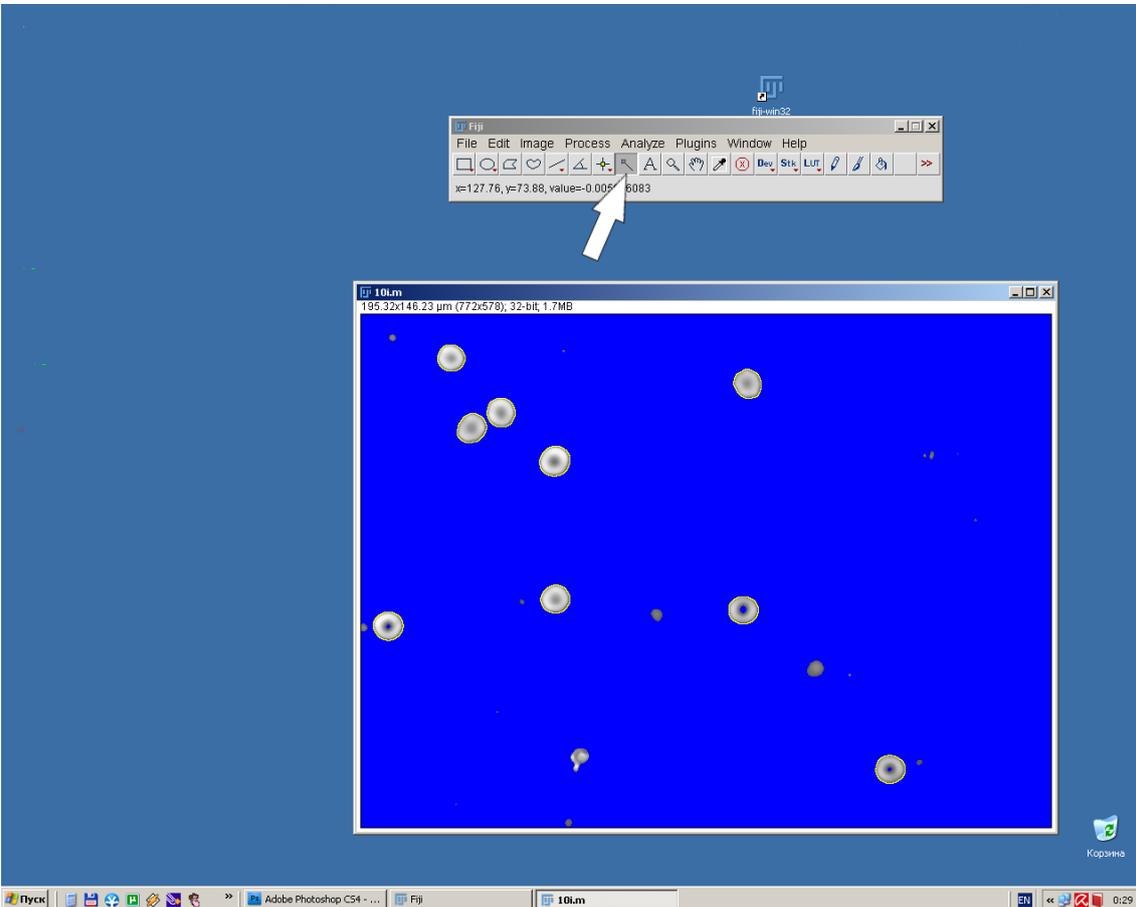


Рисунок 19.

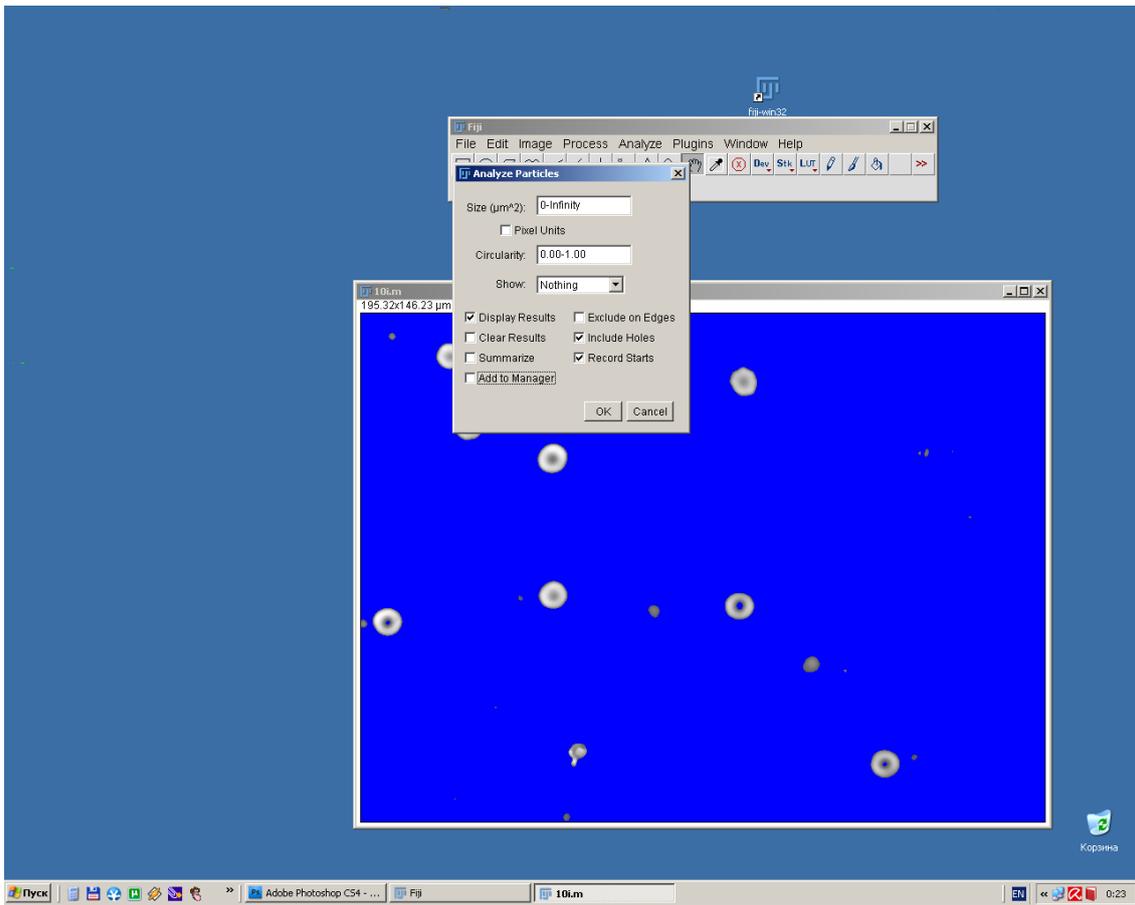


Рисунок 20.

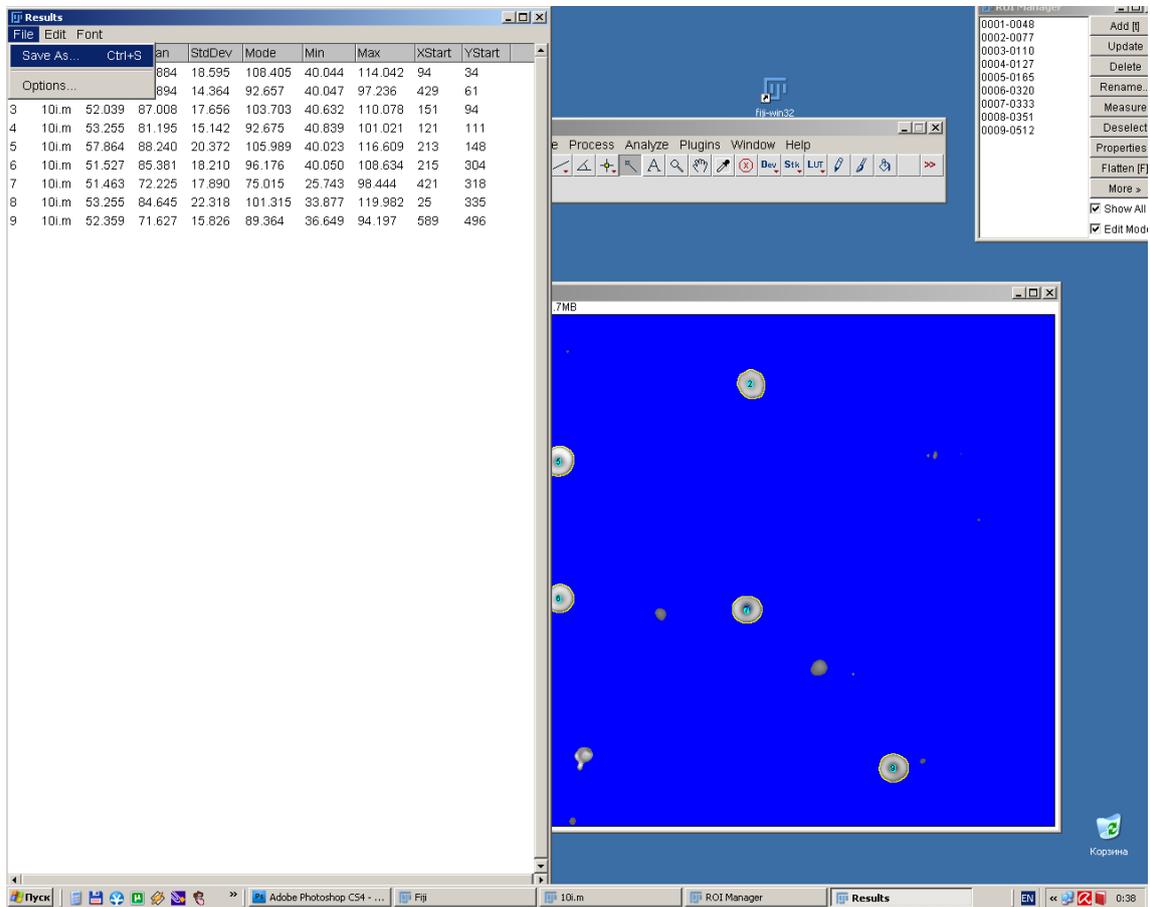


Рисунок 21.

Если необходимо отменить последнее действие то необходимо выбрать Edit-Undo.

Использование макроса

При выполнении задач практикума для ускорения процедуры обработки изображений возможно использование макроса, в котором автоматизировано применение вышеописанных процедур. Для запуска макроса необходимо выполнить команду Plugins-Macros-Run. В открывшемся окне выберете необходимый макрос (название макроса macro_macro.txt, который находится в папке C:/macro). После запуска откроется окно, в котором необходимо указать начальные параметры: в пункте «the rolling balls' value» указывается радиус действия участков, в которых будет производиться операция вычитания фона (Subtract Background, см. рисунок 8 и 9), рекомендуемый параметр для эритроцитов 40; в пункте «lower_threshold_value» устанавливается минимальное значение пороговой величины (необходимо для правильной работы Threshold, см. рисунок 14 и 15), рекомендуемое значение- 40; пункт «upper_threshold_value» устанавливает максимальное значение пороговой величины (необходимо для правильной работы Threshold, см. рисунок 14 и 15), рекомендуемое значение ≥ 200 . Затем нажать клавишу ОК. В следующем открывшемся окне выбрать папку в котором находятся ваши файлы. Перед Вами откроется окно с заголовком Result в котором будут меняться цифры. Процедура проводится автоматически и предназначена для установления значения фона, равной 0. Затем перед Вами откроется 1-е записанное изображение с уже установленными параметрами Treshhold. Необходимо, держа нажатой клавишу SHIFT, курсором мыши выделить интересующие Вас эритроциты. Кнопка «WAND» в главном окне программы должна быть нажата (см. рисунок 19). Если был выбран объект, который не нужно учитывать, то необходимо, удерживая клавишу «ALT», кликнуть на нем курсором мыши, объект перестанет быть выделенным. Затем необходимо нажать ОК в отдельном окне с надписью «Use the button "SHIFT" and "WAND" to select the cells, then click "OK"». Появится новое окно «RESULTS» в котором будут сохранены измеренные характеристики выделенных объектов. После нажатия кнопки ОК перед Вами откроется следующий файл из папки. Его обработка осуществляется по аналогичной процедуре. Характеристики выделенных объектов будут добавлены к предыдущим в окне «RESULTS». После измерения всех параметров, необходимо сохранить данные, указанные в окне «RESULTS» (см. рисунок 21).