



Μικροσκοπία Οπτικών Τομών (Optical Sectioning Microscopy)

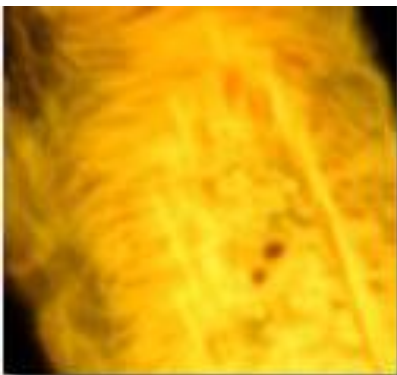
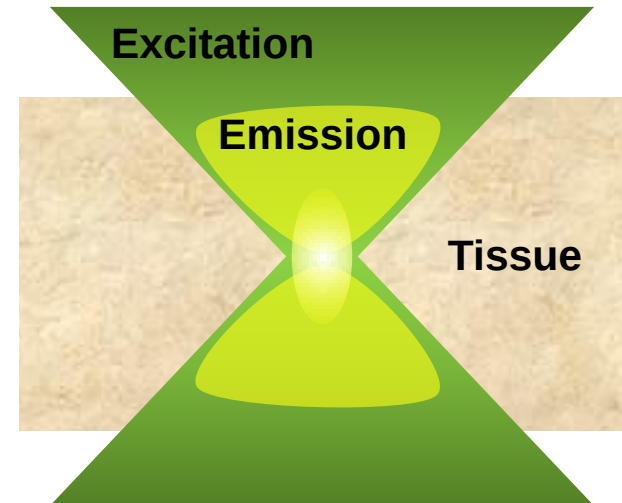
**Ομοεστιακή (Confocal),
Πολυφωτονική (Multi-Photon),
Χωρικά Διαμορφωμένου Φωτισμού (SMI),
Δεύτερης Αρμονικής (SHG)**

Περιορισμοί της Μικροσκοπίας

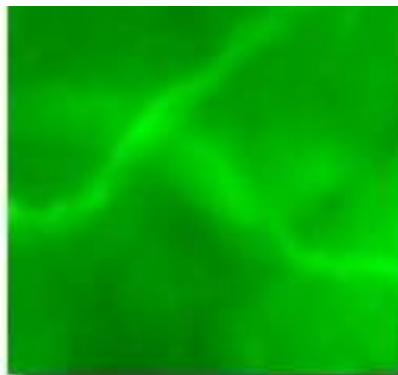


- **Η ευκρίνεια περιορίζεται σε χοντρά δείγματα**

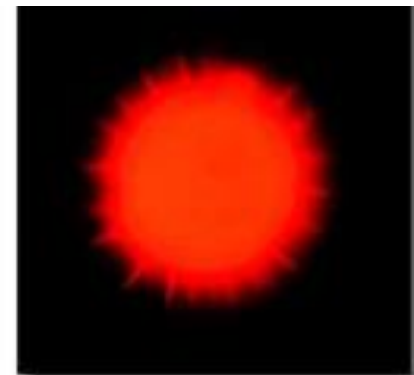
- Ανιχνεύεται φως εκτός εστίασης
- Η ακτίνα διέγερσης φωτίζει ομοιόμορφα ένα μεγάλο πεδίο στο δείγμα
- Αν το δείγμα είναι χοντρό, φθορισμός ή σκέδαση θα εκπέμπονται και από το εστιακό σημείο αλλά και από πάνω και από κάτω
- Κάποιο από αυτό το φως φτάνει στον ανιχνευτή και δημιουργεί μια θολή εικόνα που μοιάζει μη-εστιασμένη



Human medulla



Rabbit Muscle Fibers



Pollen Grain

Αρχές Ομοεστιακής Μικροσκοπίας



- **Στόχος:** Απόρριψη όσο το δυνατόν περισσότερου φωτός από τα σημεία εκτός εστίασης
- **Χρησιμοποιούνται συνήθως δύο οπές (pinholes):**
 - Οπή μπροστά από την πηγή φωτός → μετάδοση μόνο μέσα από μια μικρή περιοχή → απεικονίζεται πάνω στο εστιακό επίπεδο του δείγματος (δηλαδή μόνο ένα σημείο του δείγματος φωτίζεται κάθε φορά)
 - Φθορισμός ή σκέδαση από το εστιακό σημείο → απεικονίζεται σε μια ομοεστιακή οπή (ακριβώς μπροστά από τον ανιχνευτή)
 - Φως εκτός εστίασης (Out-of focus) δεν μπορεί να περάσει στον ανιχνευτή
- **Χρειάζεται σάρωση του σημείου**
 - Είτε το δείγμα περνά κάτω από την ακτίνα είτε σαρώνεται η ακτίνα πάνω στο δείγμα
 - Για βιολογικά δείγματα είναι πιο εύκολο το δεύτερο, με ένα ζεύγος γαλβανομετρικά κινούμενων κατόπτρων

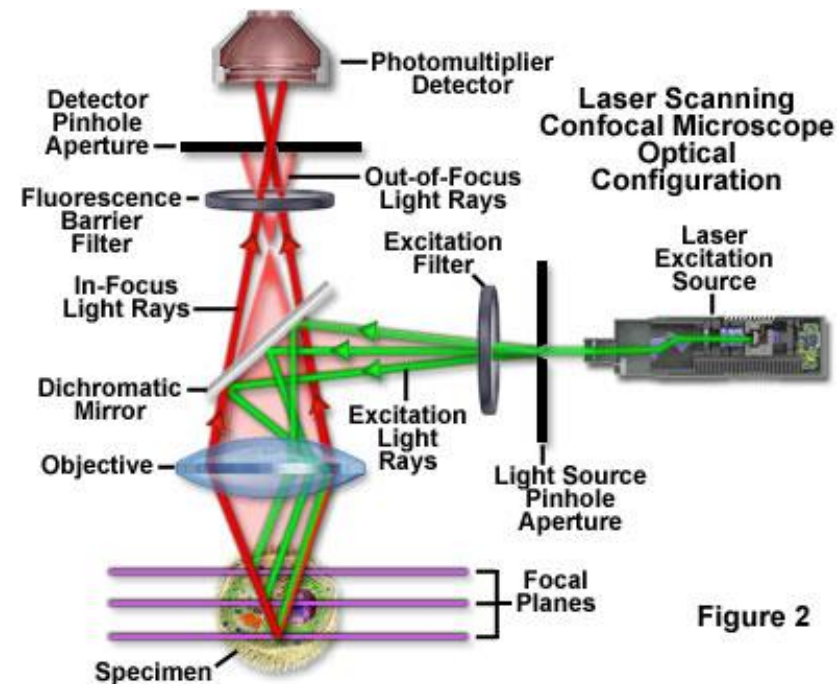
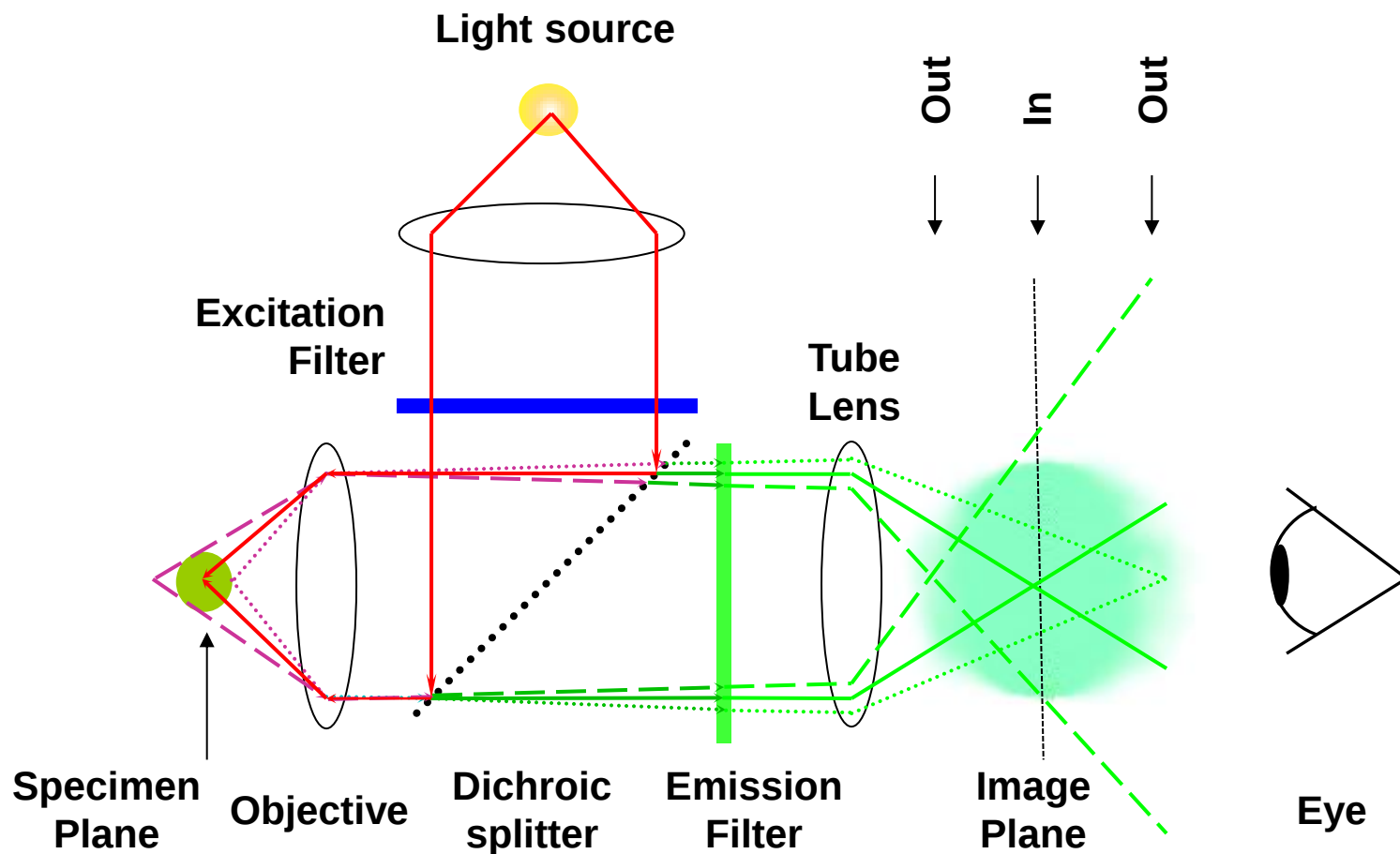
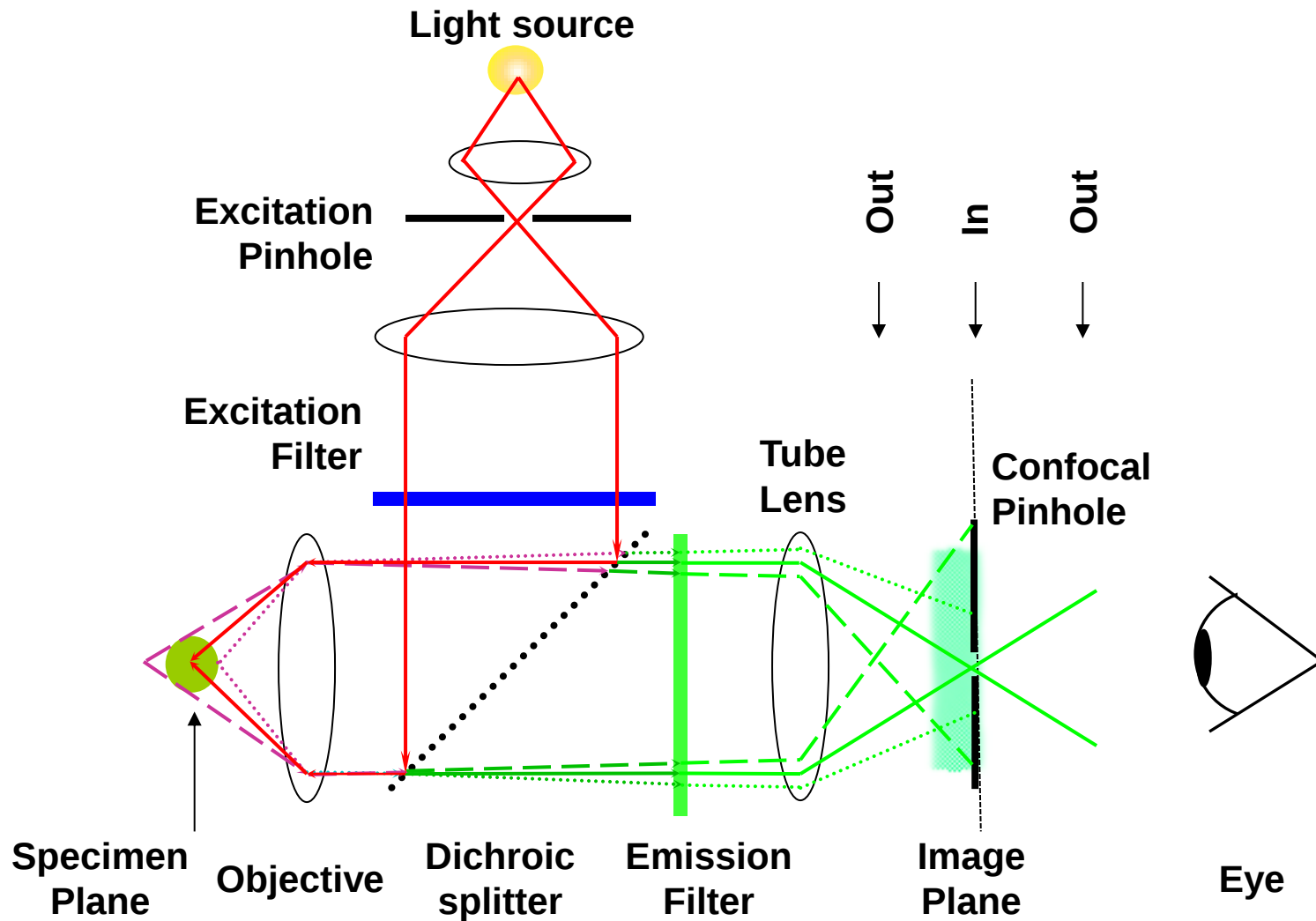


Figure 2

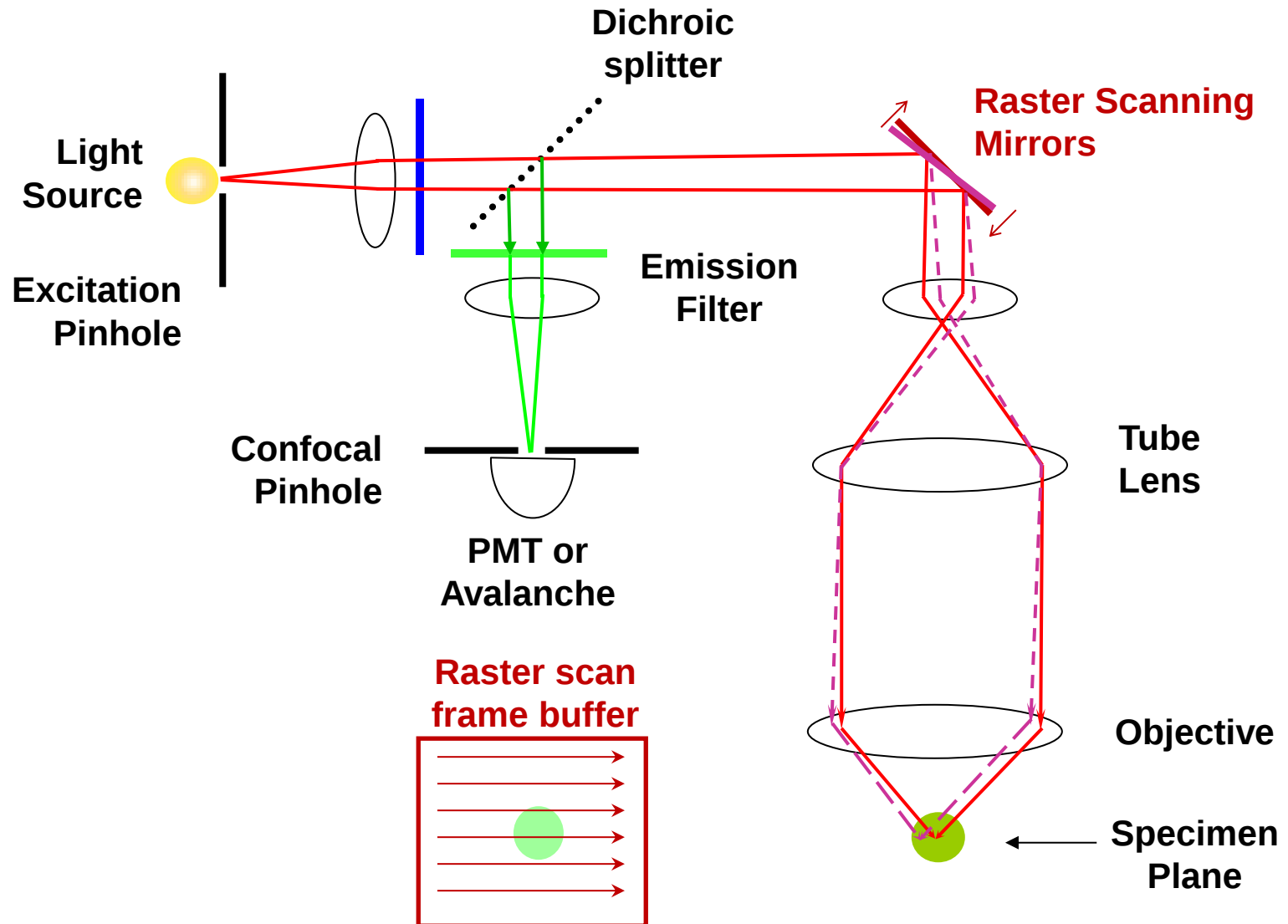
Αρχές Ομοεστιακής Μικροσκοπίας



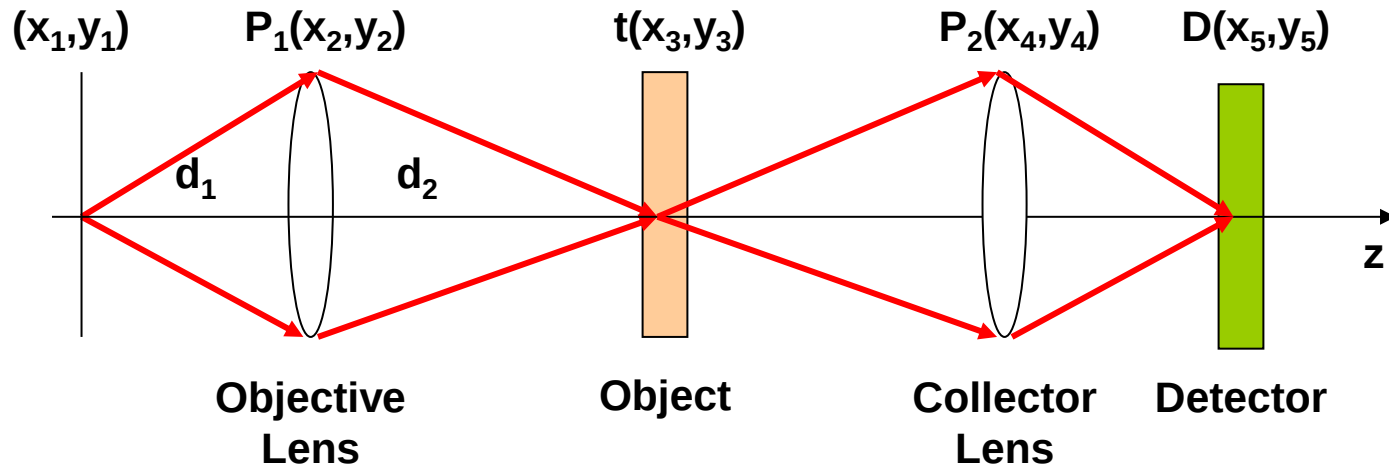
Αρχές Ομοεστιακής Μικροσκοπίας



Αρχές Ομοεστιακής Μικροσκοπίας



Αρχές Ομοεστιακής Μικροσκοπίας



$$E(x_3, y_3) = \iint E(x_1, y_1) h\left(x_1 + \frac{x_3}{M}, y_1 + \frac{y_3}{M}\right) dx dy$$

$$h(x, y) = \iint P(x_2, y_2) \exp\left[\frac{2\pi j}{\lambda} (x_2 x + y_2 y)\right] dx_2 dy_2$$

$$I(x_3, y_3) = \left| h\left(\frac{x_3}{M}, \frac{y_3}{M}\right) \right|^2 \quad (\text{point source})$$



Εγκάρσια (Transverse) Απόκριση

$$I(v) = \left| 2 \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \rho d\rho \right|^2 \quad (\text{circular aperture})$$

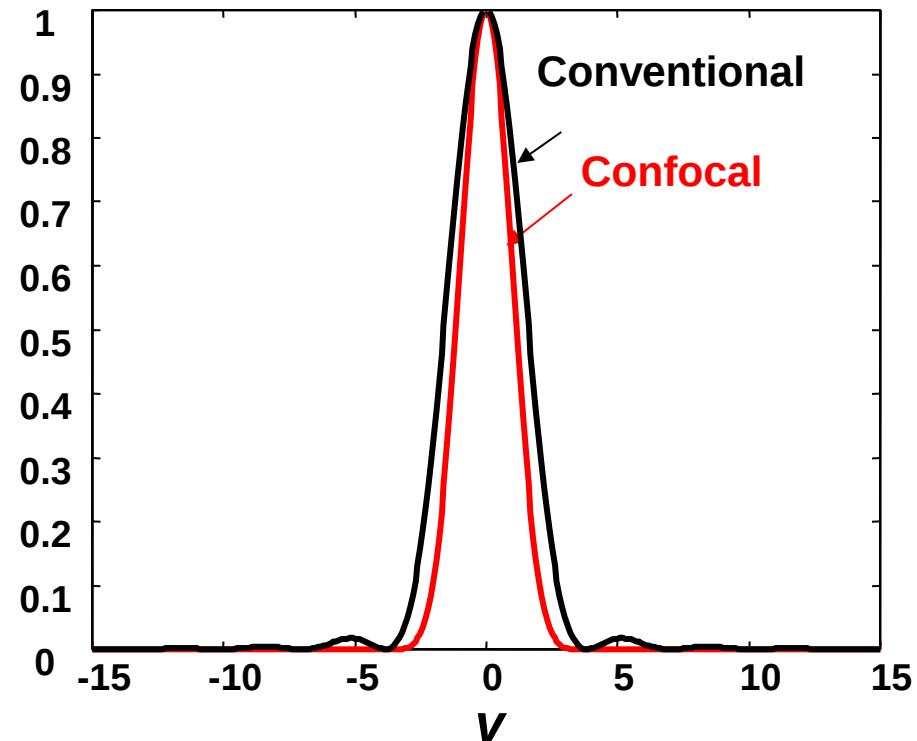
Conventional (Incoherent) Detection:

$$I = |h_1|^2 \otimes |t|^2 \quad I(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2$$

Confocal (Coherent) Detection:

$$I = |h_1 \otimes t|^2 \quad I(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^4$$

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} r_3 \sin \alpha$$





Αξονική (Axial) Απόκριση

$$h(u) = \iint P(\rho) \exp\left[\frac{j}{2} u \rho^2\right] J_0(v\rho) d\rho dv$$

Conventional (Incoherent) Detection:

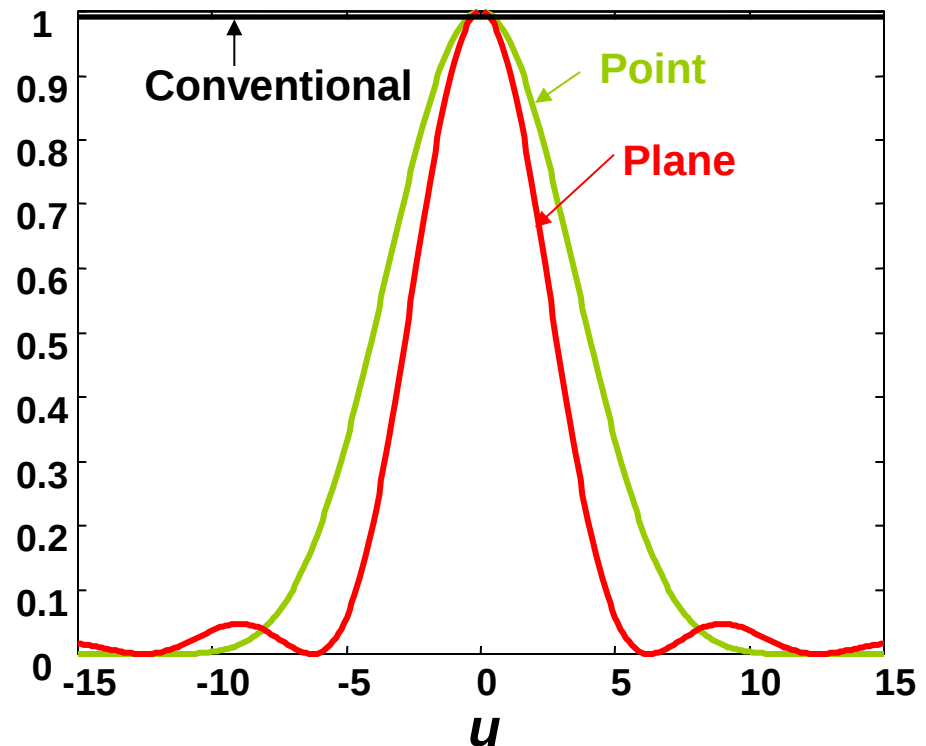
$$I(u) = \text{constant}$$

Confocal (Coherent) Detection:

$$I(u) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^4 \quad (\text{point})$$

$$I(u) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^2 \quad (\text{plane})$$

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2(a/2)$$

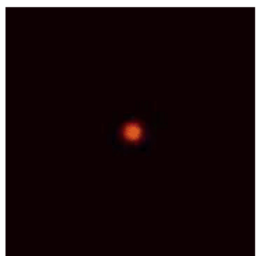




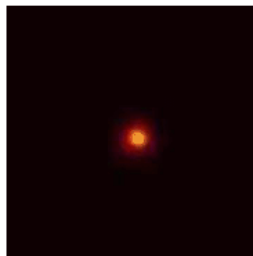
- **Δίσκος Airy**

- Η ευκρίνεια φθίνει γρήγορα μακριά από το εστιακό επίπεδο

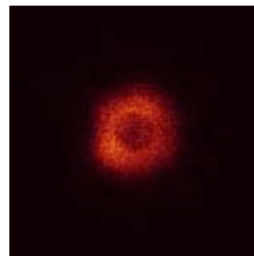
0.5 μm bead Plan Apo 100x 1.4 NA oil



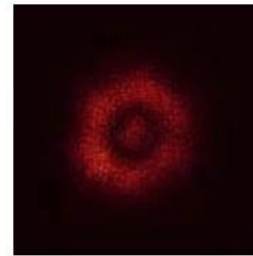
0.0 μm



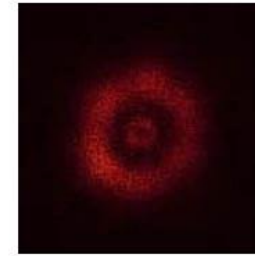
1.1 μm



2.4 μm



3.4 μm



3.7 μm



5.2 μm

Εγκάρσια (Lateral) Ευκρίνεια



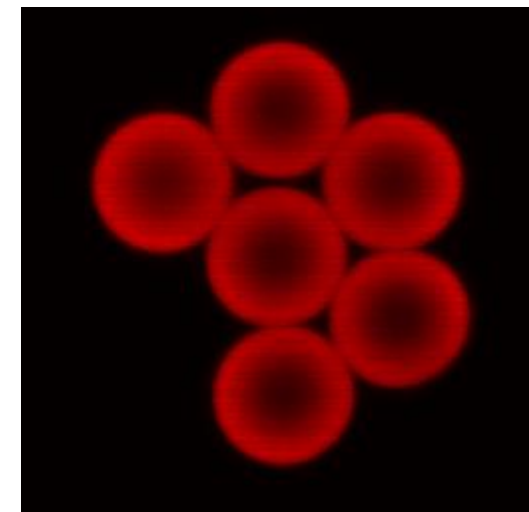
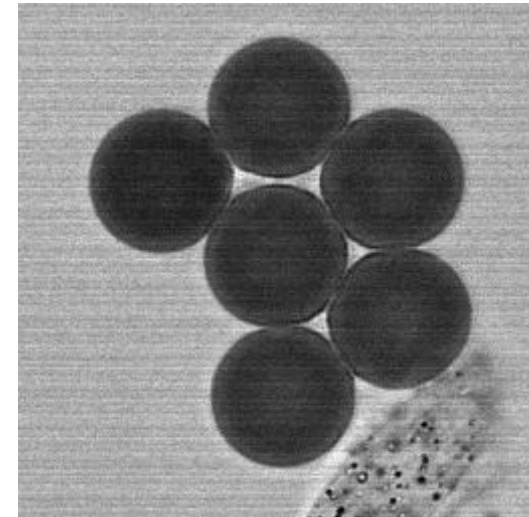
Wide field

	Transverse	
	dy	dy _{3db}
Point Object	$dy = \frac{0.61\lambda}{NA}$	$dy_{3dB} = \frac{0.51\lambda}{NA}$
Edge Response (10-90%)	$dy = \frac{0.49\lambda}{NA}$	

Confocal

	Transverse	
	dy	dy _{3db}
Point Object	$dy = \frac{0.56\lambda}{NA}$	$dy_{3dB} = \frac{0.37\lambda}{NA}$
Plane Object	N/A	N/A
Edge Response (10-90%)	$dy = \frac{0.44\lambda}{NA}$	

10 um beads – xy view



Αξονική (Axial) Ευκρίνεια

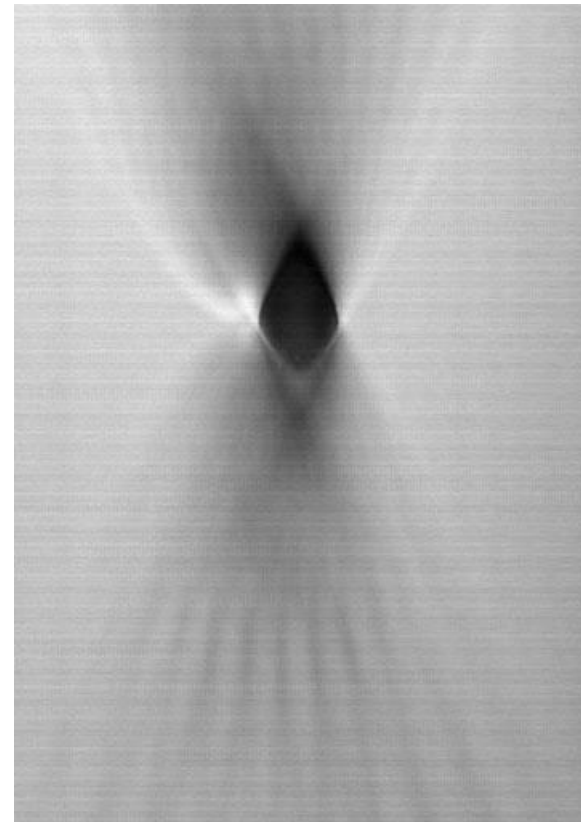


10 um bead – xz side view

Confocal



Wide field



Αξονική (Axial) Ευκρίνεια



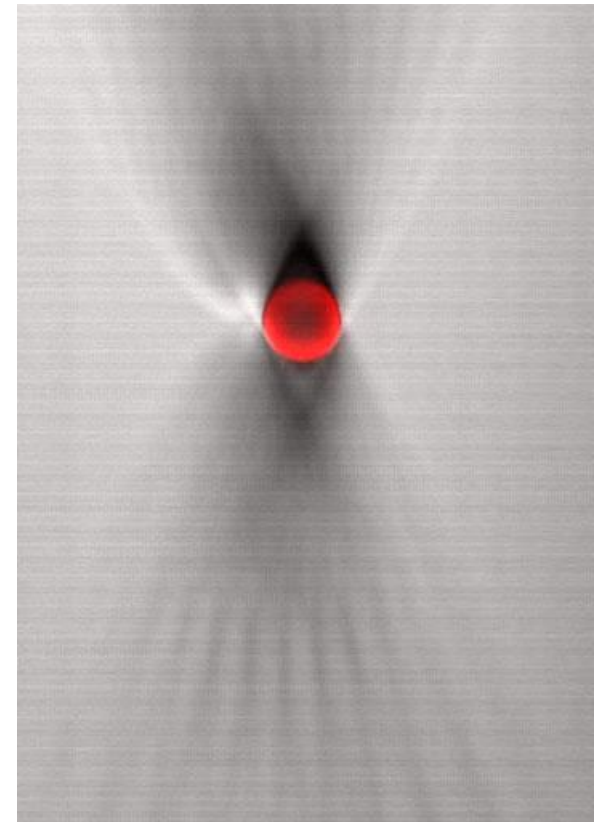
Wide field

	Axial	
	dz	dz _{3db}
Point Object	N/A	
Edge Response (10-90%)		

Confocal

	Axial	
	dz	dz _{3db}
Point Object	$dz = \frac{0.89\lambda}{n(1 - \cos\vartheta_o)}$	$dz_{3dB} = \frac{0.62\lambda}{n(1 - \cos\vartheta_o)} \approx \frac{1.24n\lambda}{NA^2}$
	(for large NA the approximation results in a 2-6% error)	
Plane Object	$dz = \frac{0.72\lambda}{n(1 - \cos\vartheta_o)}$	$dz_{3dB} = \frac{0.45\lambda}{n(1 - \cos\vartheta_o)} \approx \frac{0.90n\lambda}{NA^2}$
	(for large NA the approximation results in a 2-6% error)	
Edge Response (10-90%)	N/A	

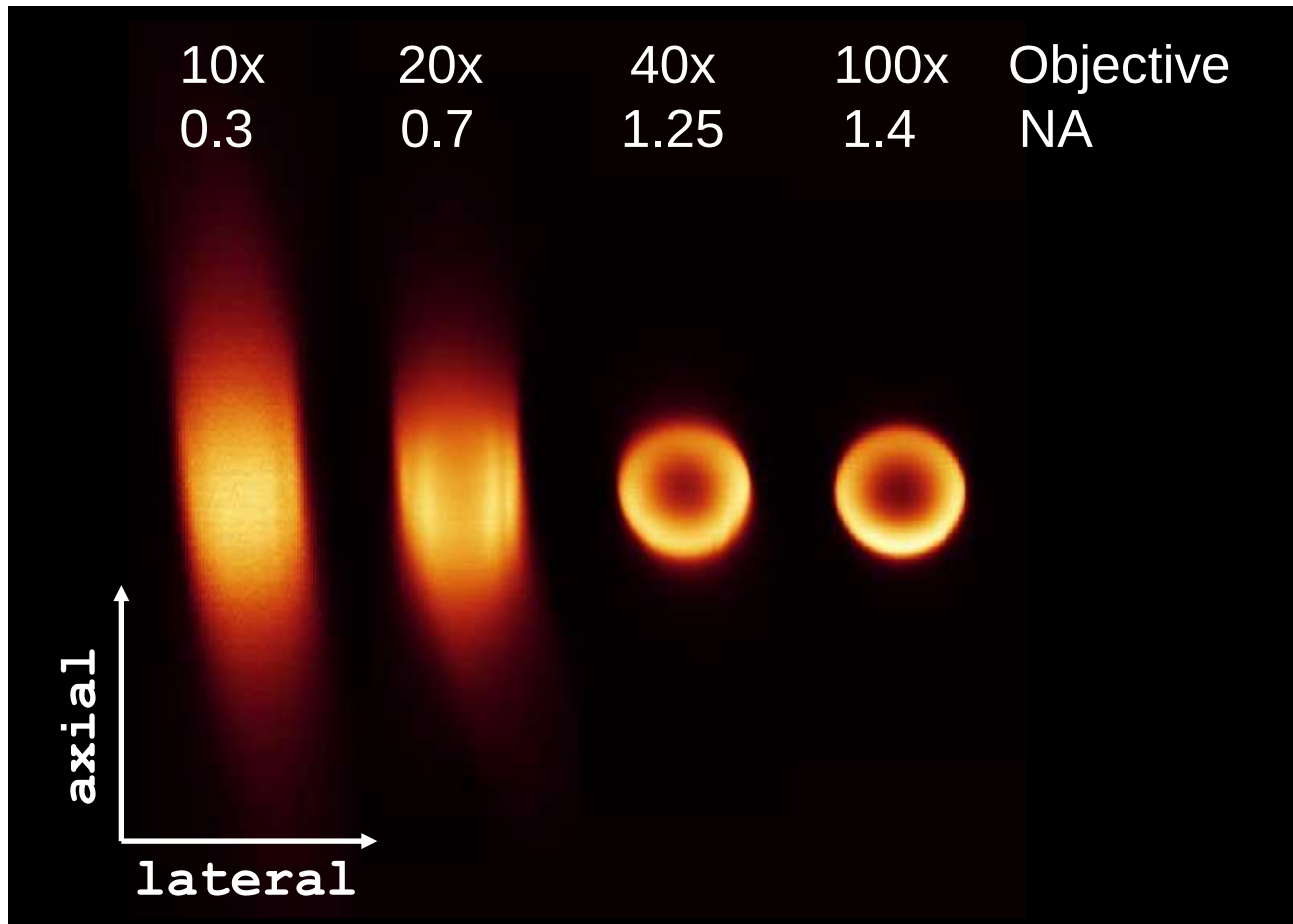
10 um bead – xz side view



Αξονική (Axial) Ευκρίνεια

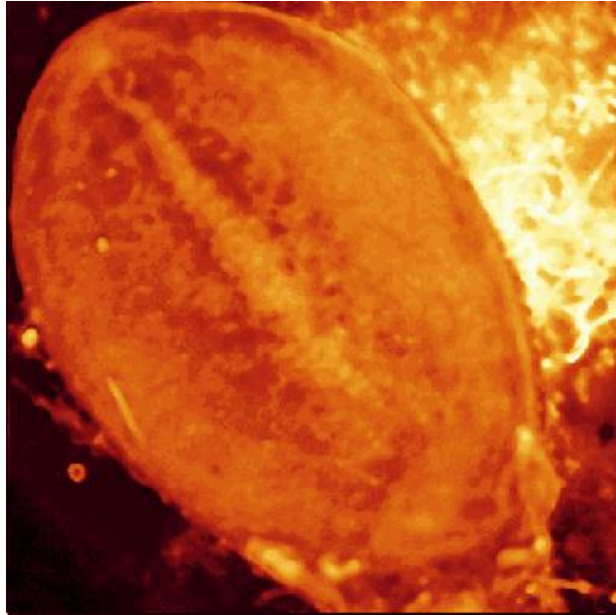


- Ευκρίνεια σε σχέση με το NA

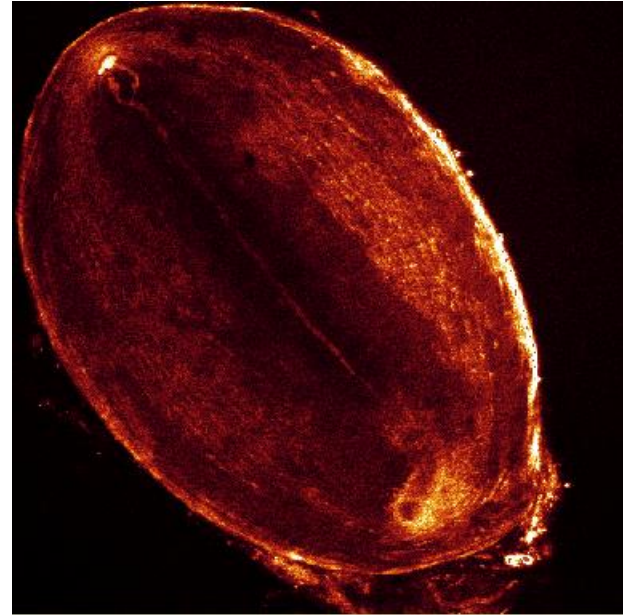




Pacinian Corpuscle 10X NA 0.3 FM 1-43



Wide field
~150 μm thick view
Glare
Out of focus
Low resolution



Confocal
~10 μm thick
High contrast
Low background
Good resolution



- Εξάλειψη του φθορισμού εκτός εστίασης παράγει εικόνες υψηλότερης ποιότητας

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

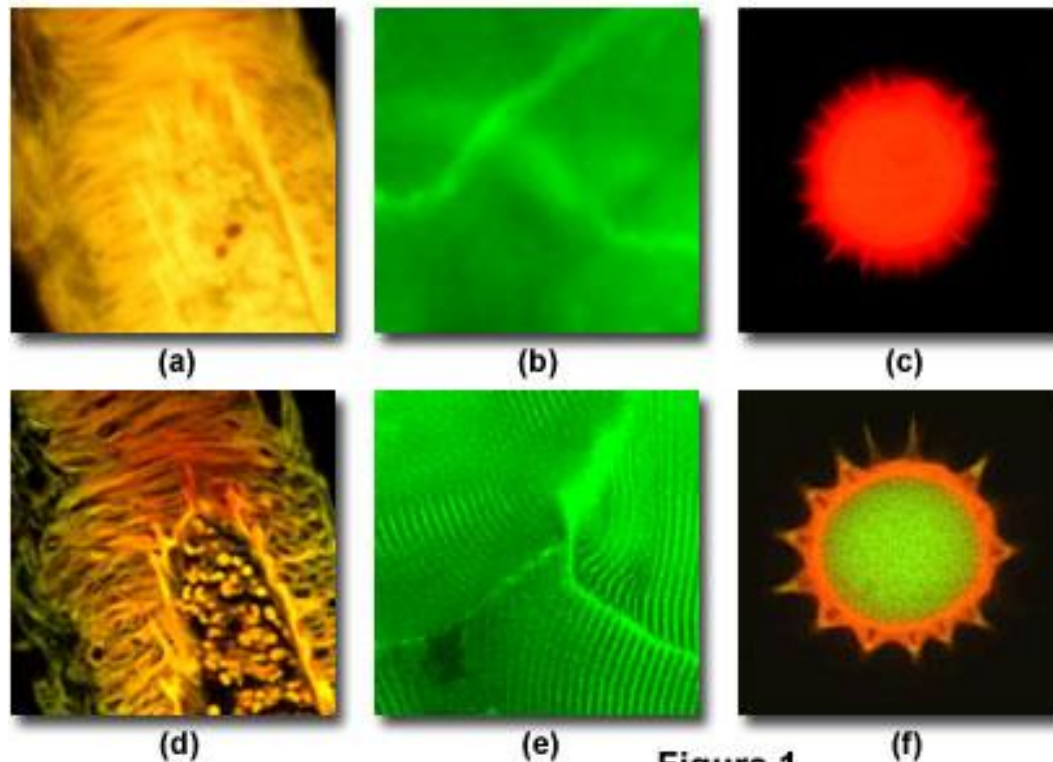


Figure 1



- **Ομοεστιακά Προτερήματα**

- Μείωση του φθορισμού στο φόντο
- Έλεγχος του βάθους πεδίου (depth of field) → Οπτική Τομή, απεικόνιση 3d
- Καλύτερη ευκρίνεια

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

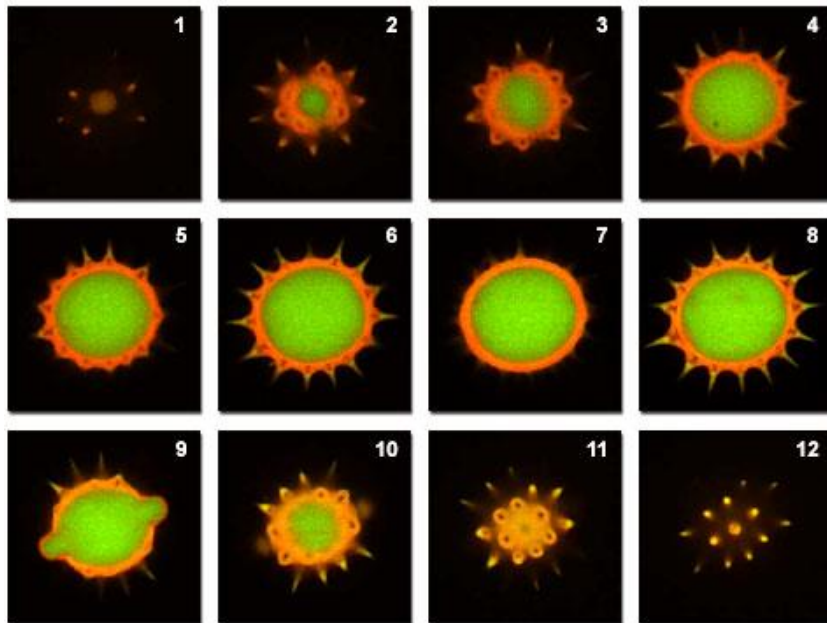
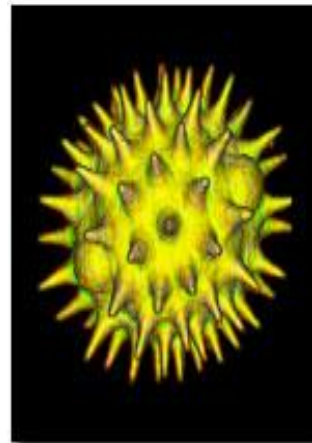


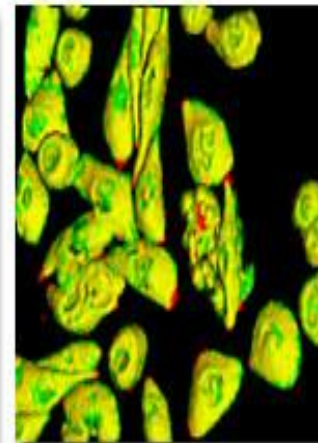
Figure 6

Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



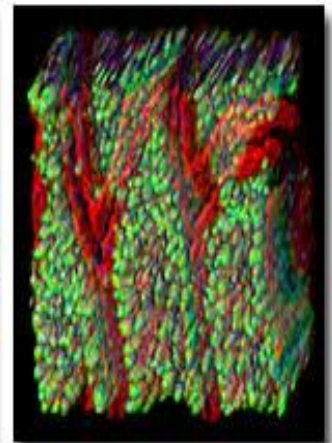
(a)

Pollen grain



(b)

Hamster ovary
cells



(c)

Mouse
intestine

Figure 7

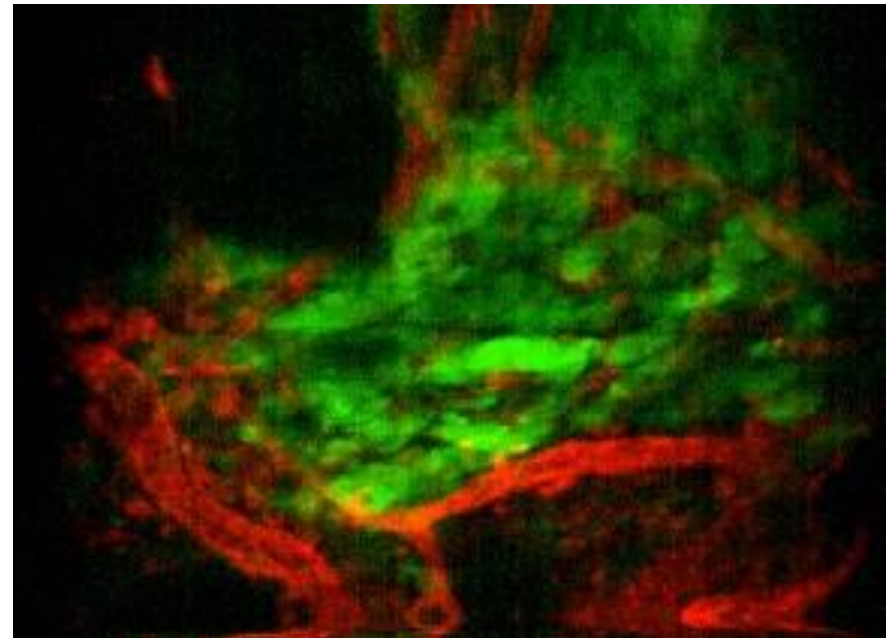


- **Εφαρμογές**

- Απεικόνιση κυττάρων
- Αναπτυξιακή βιολογία
- Απεικόνιση καρκίνου

- **Απεικόνιση In vivo σε καθορισμένο βάθος**

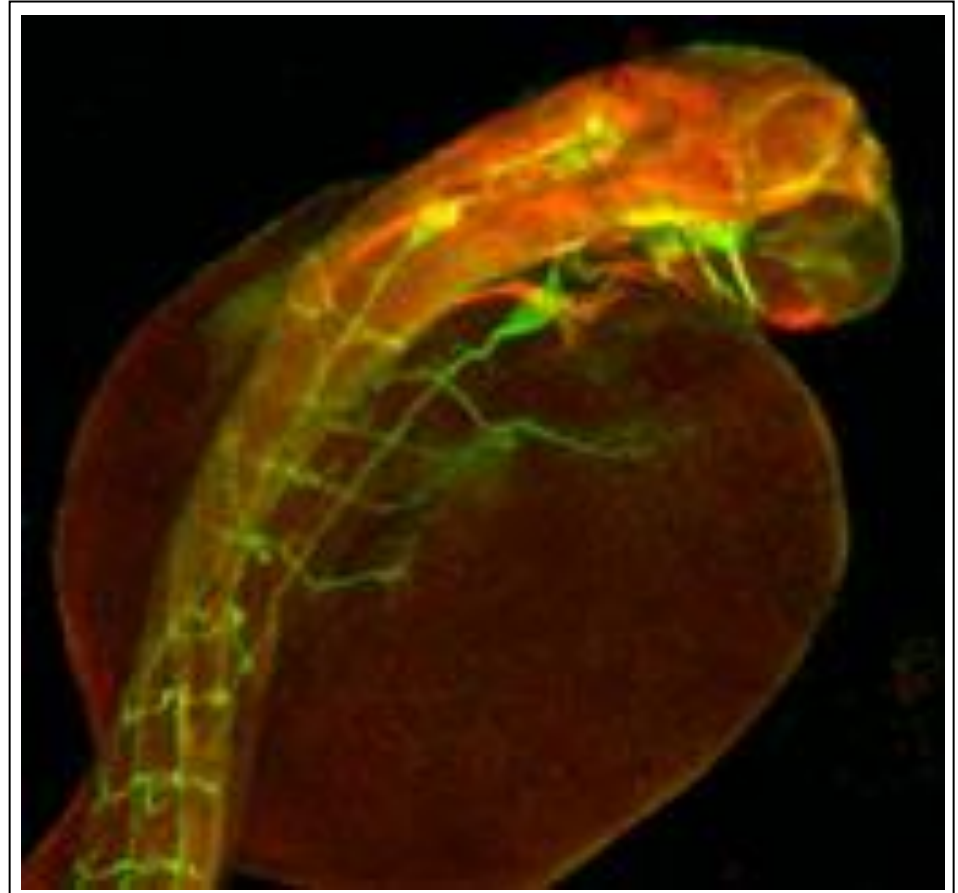
- Καρκινικά κύτταρα που αυξάνονται υποδόρια σε ποντίκια, και εκφράζουν Green Fluorescent Protein
- Αιμοφόρα αγγεία με χρώση Cy5-conjugated anti-PECAM antibody
- Μελέτη των αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων με το περιβάλλον τους και πιθανά φάρμακα/παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την μετάσταση





- **Αναπτυξιακή Βιολογία**

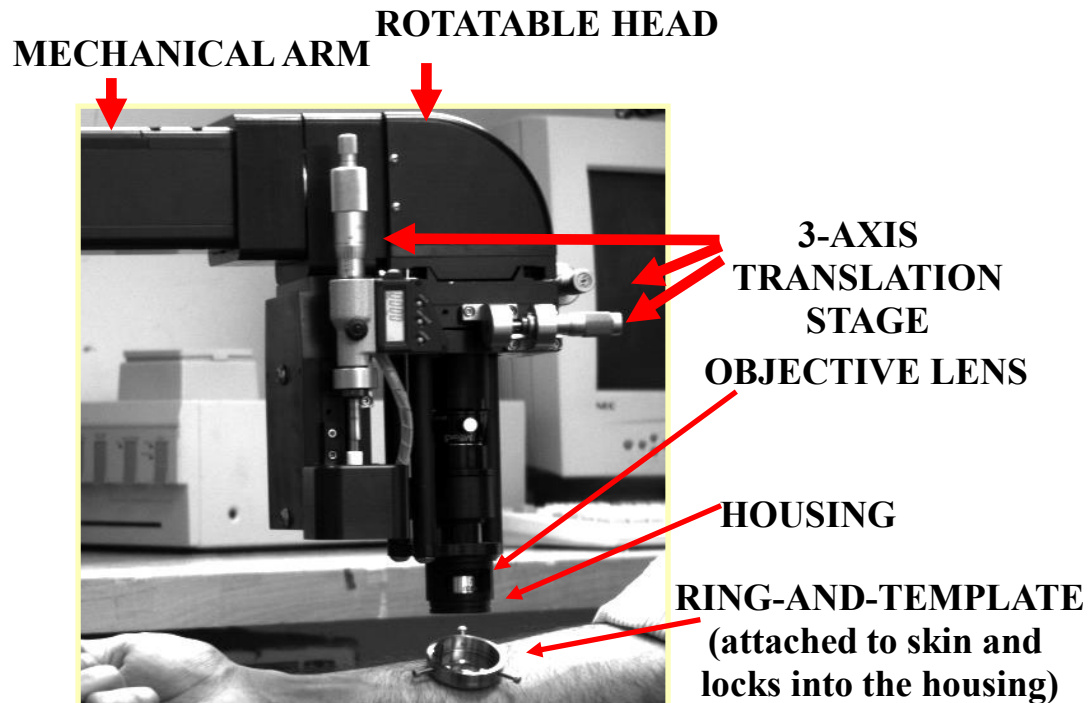
- Έμβρυο Zebra fish
 - Νευρώνες (Neurons) → πράσινο
 - Μόρια προσκόλλησης Κυττάρων (Cell adhesion molecules) → κόκκινο



Monika Marks, Martin Bastmeyer
University of Konstanz



- **In Vivo Ομοεστιακή Μικροσκοπία Ανάκλασης από το ανθρώπινο δέρμα**

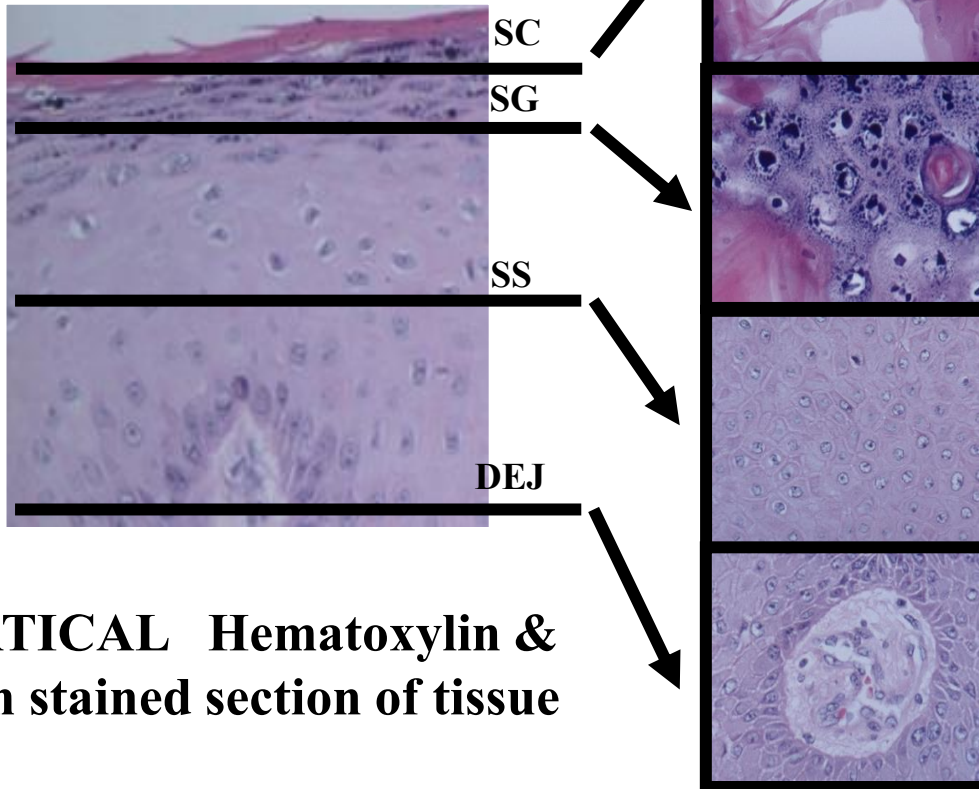


VivaScope by Lucid



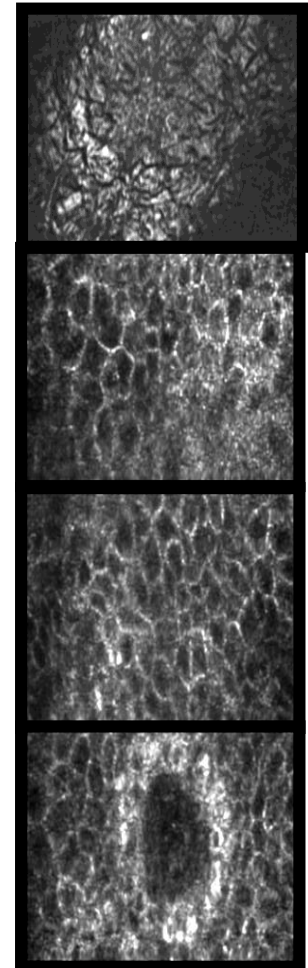
- **Ανακλαστική Ομοεστιακή Μικροσκοπία**

- Ζωντανό, φυσιολογικό, ανθρώπινο δέρμα



VERTICAL Hematoxylin & Eosin stained section of tissue

Confocal *in vivo*

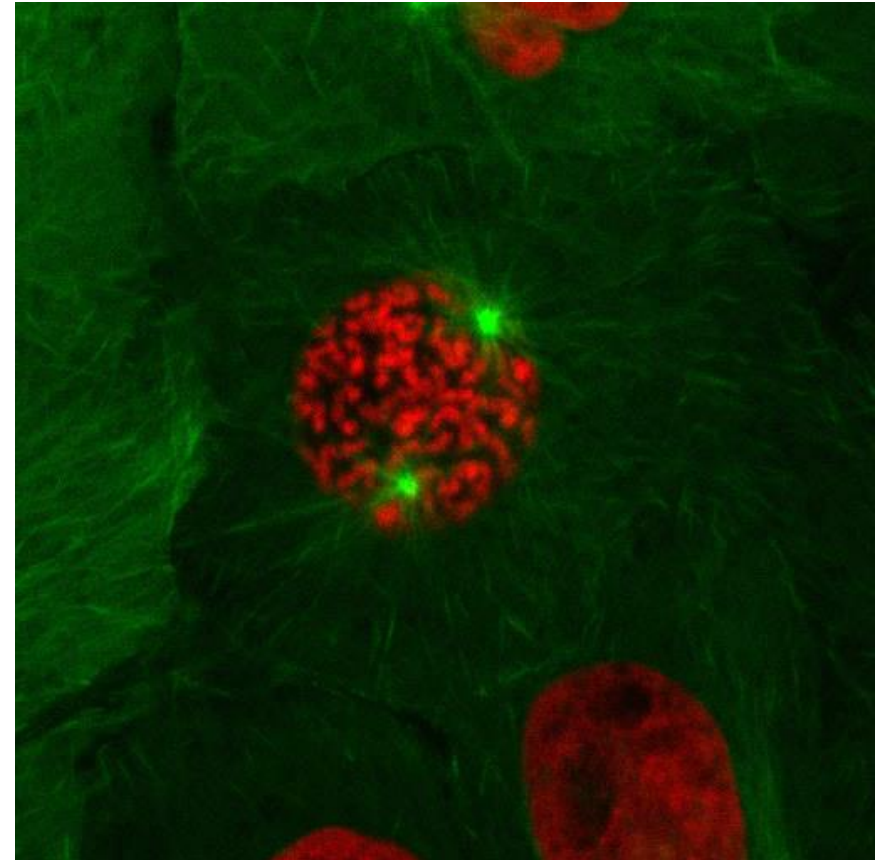


180 μm



- **Ομοεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου - Video**

- Παρακολούθηση δυναμικών αλληλεπιδράσεων
- Παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων κυττάρων-κυττάρων, κυττάρων-περιβάλλοντος στο φυσικό περιβάλλον
- Κατανόηση της ζωικής και ανθρώπινης βιολογίας και τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών
- Παρακολούθηση δυναμικών αλληλεπιδράσεων

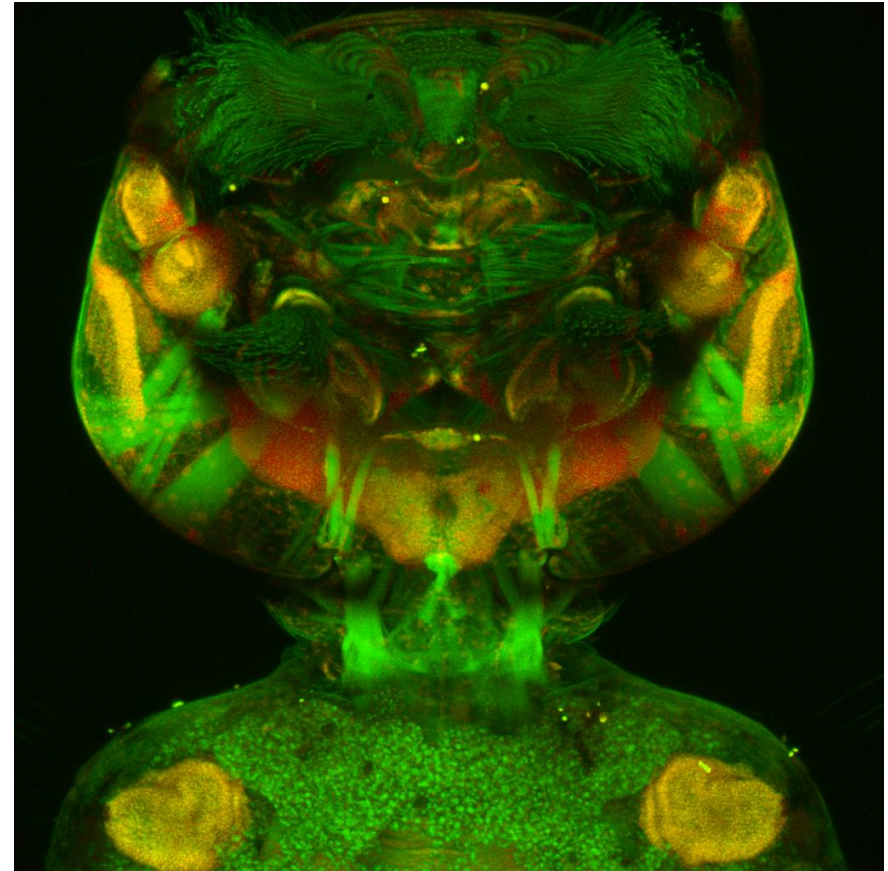


Mitosis in Pig Kidney Epithelial Cells



- Όμως η ομοεστιακή μικροσκοπία έχει και περιορισμούς:

- Η αποτελεσματικότητα της συλλογής φωτός περιορίζεται από την οπή
- Η σάρωση επιβραδύνει την παραγωγή της εικόνας
- Η σάρωση είναι δύσκολο να εφαρμοστεί ενδοσκοπικά
- Η σκέδαση στους ιστούς περιορίζει το βάθος στο οποίο μπορεί να γίνει απεικόνιση μιας τομής
- Υπάρχουν τεχνικά “κόλπα” για να αντισταθμίσουν εν μέρει τα προβλήματα αυτά, αλλά μόνο εν μέρει..
 - (π.χ., αντικατάσταση της οπής με πολλαπλές οπές, ή σάρωση γραμμής, δίνει περισσότερο φως, αλλά αυξάνει τα προβλήματα από τη σκέδαση)



Hydroethidine R. Zucker, EPA

Όριο της Ευκρίνειας του Μικροσκοπίου



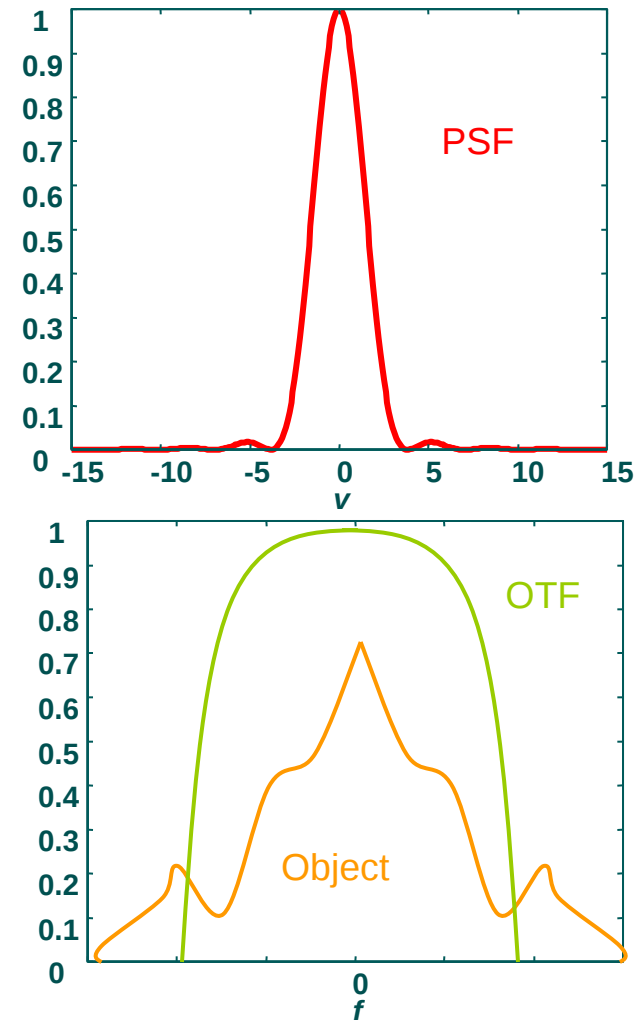
- **Ευκρίνεια**

- Περιορίζεται από το λ
- PSF / OTF

- **Πιο στενό PSF (Πιο πλατύ OTF) $\rightarrow$ Καλύτερη Ευκρίνεια**

- **Βελτίωση της αξονικής ευκρίνειας $\rightarrow$ Οπτικές τομές**

- Μικροσκοπία με Χωρικά Διαμορφωμένο Φωτισμό (Spatially modulated illumination - SMI)

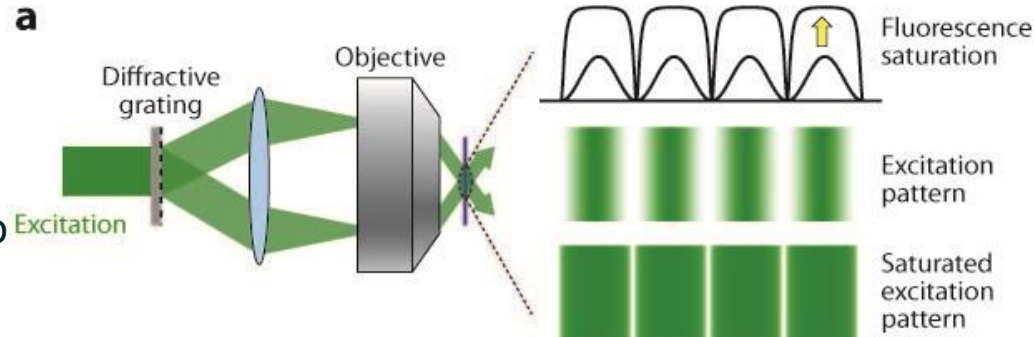


Χωρικά Διαμορφωμένος Φωτισμός



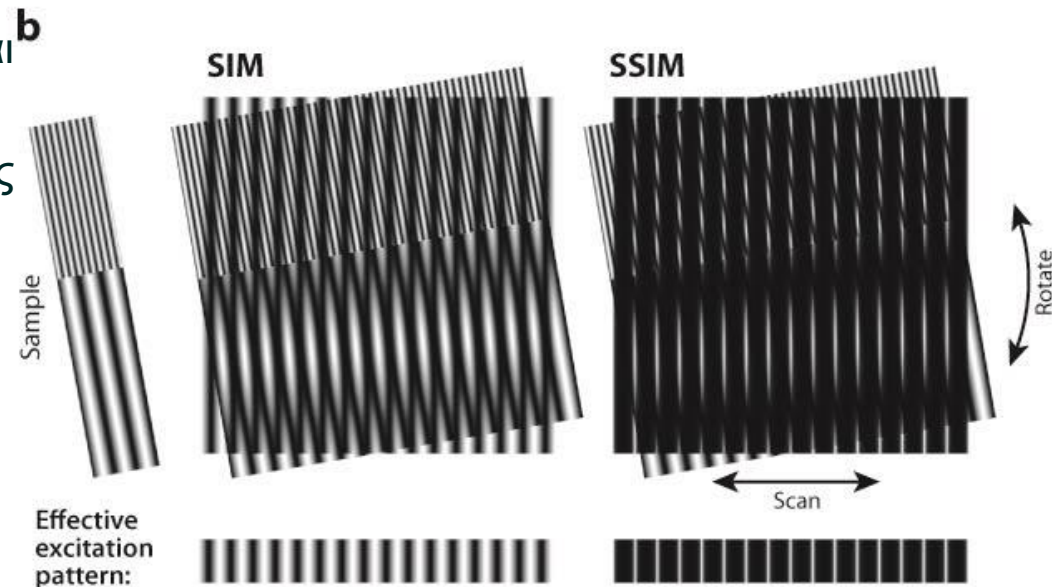
- **Δομημένος ή Διαμορφωμένος Φωτισμός**

- Ένα περιθλαστικό πλέγμα στην διαδρομή διέγερσης διαχωρίζει το φως σε δύο δέσμες → συμβολή στο δείγμα → ημιτονοειδής μορφή φωτισμού



- **Μοτίβο Moiré (Moiré pattern)**

- Ημιτονοειδής φωτισμός εφαρμόζεται σε ένα δείγμα → ένα μοτίβο Moiré σε σημαντικά χαμηλότερη χωρική συχνότητα από εκείνη του δείγματος → μπορεί να απεικονιστεί από το μικροσκόπιο
- Πολλαπλές εικόνες από τη σάρωση και την περιστροφή του μοτίβου διέγερσης → χρησιμοποιούνται για την ανακατασκευή της δομής του δείγματος.
- Η SMI εισάγει ψηλές συχνότητας μέσα στο μοτίβο, επιτρέποντας χαρακτηριστικά πολύ κάτω από το όριο περίθλασης να απεικονιστούν



Huang, Bo, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. 2009. "Super-Resolution Fluorescence Microscopy." *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 993-1016. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014.

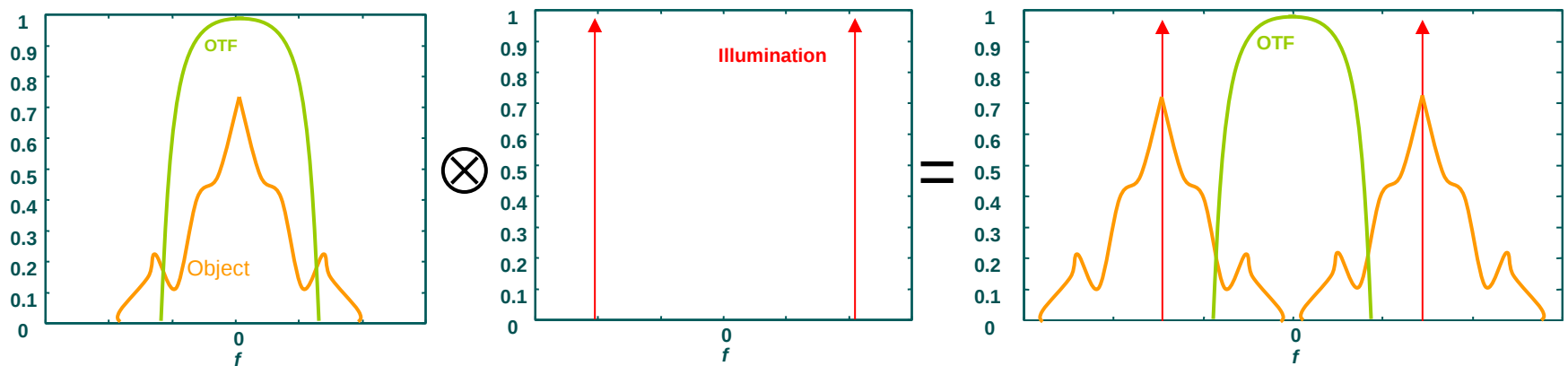
Χωρικά Διαμορφωμένος Φωτισμός



Spatial Domain



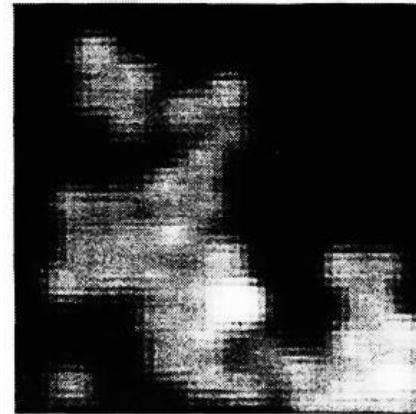
Frequency Domain





- Ανακατασκευή Εικόνας

- Φωτισμός σε 0, 90, 180, 270 μοίρες σχετική διαφορά χωρικής φάσης
- Αφαιρείται το DC και η αναδίπλωση (aliasing)
 - Απλές προσθαφαιρέσεις και σύζευξη (conjugations)
- Αποκατάσταση των χαμηλών συχνοτήτων
- Επαναλάβετε για x και y διαμόρφωση και συνδυάζετε



(a)



(b)

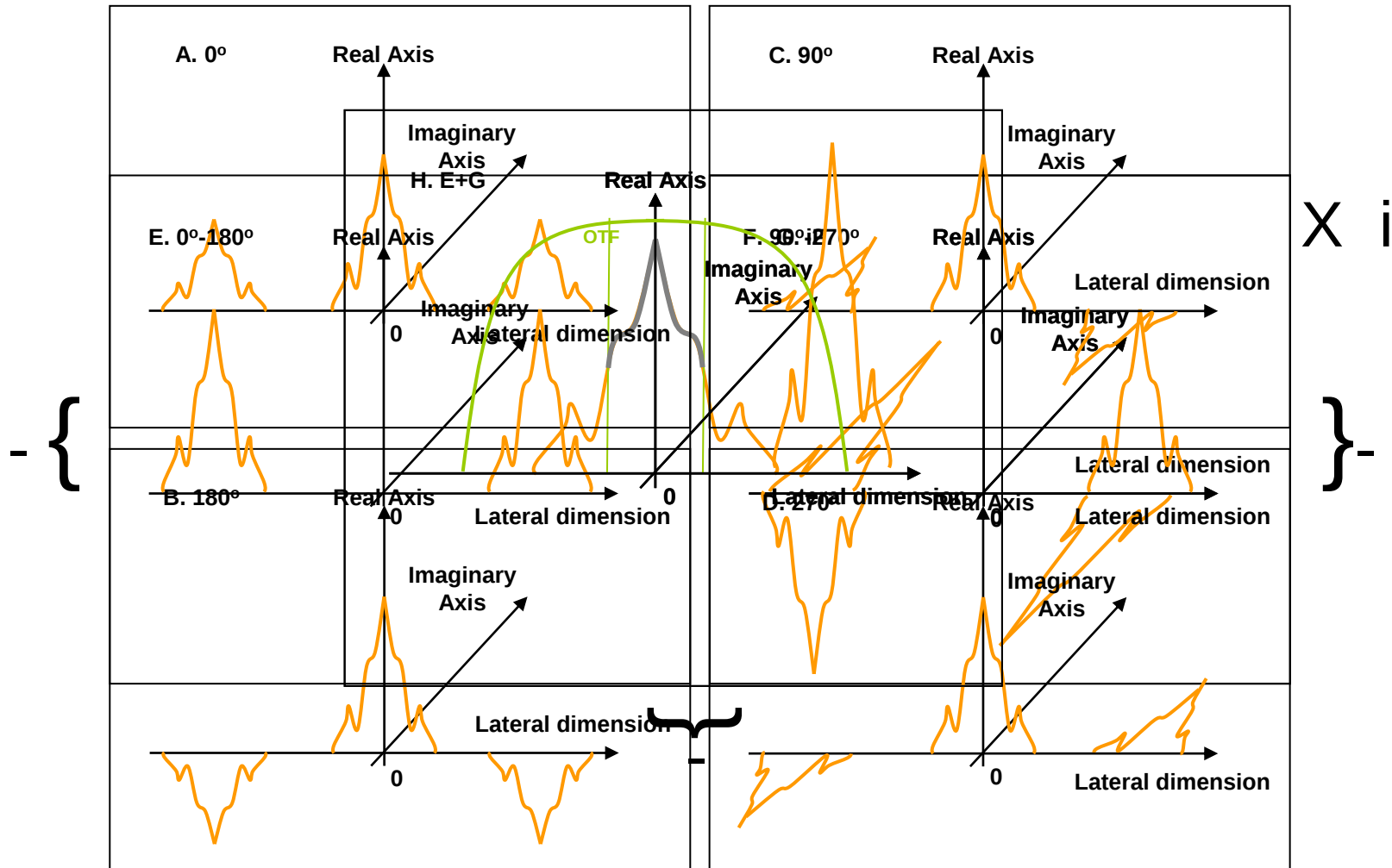
A cluster of microscopical quartz heads (416 nm in diameter with a 200 nm fluorescent core)

R. Heintzmann & C. Cremer, Laterally Modulated Excitation Microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating. SPIE Proceedings Vol. 3568, 1998

Χωρικά Διαμορφωμένος Φωτισμός



Shift in the Direction of Different Phasings

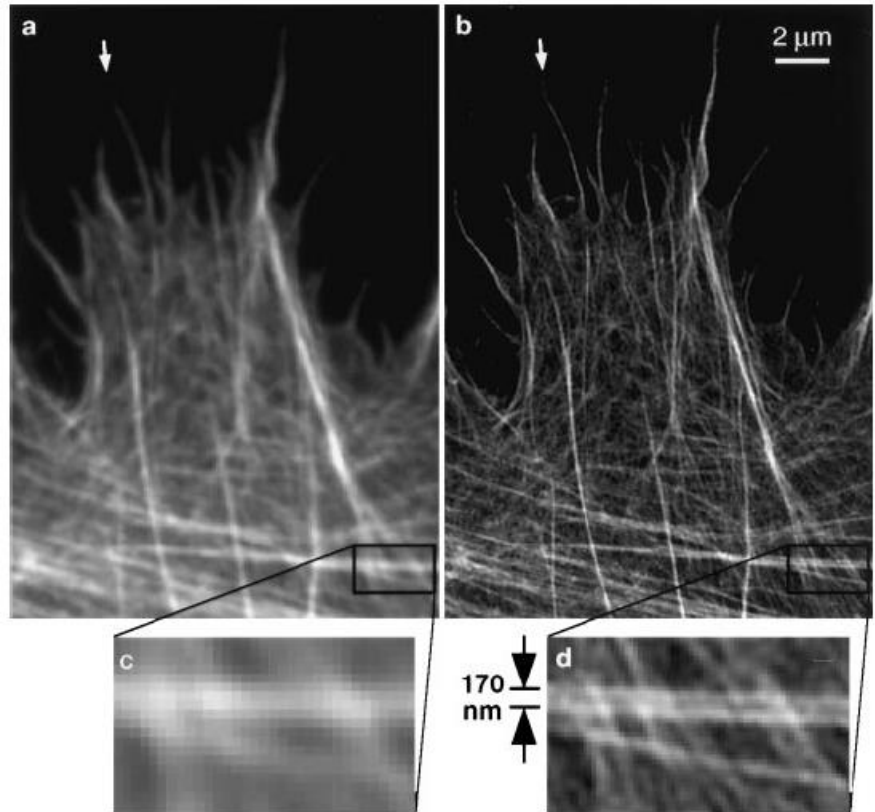


Χωρικά Διαμορφωμένος Φωτισμός



- **Μικροσκοπία Φθορισμού με SMI**

- Πλέγμα
- Μεγέθυνση < 1
 - Περίοδος φωτισμού κοντά στο όριο περίθλασης του αντικειμενικού φακού
- Έλεγχος Μοτίβου Φωτισμού
 - Περιστροφή και πλευρική μετακίνηση του διαμορφωμένου φωτισμού

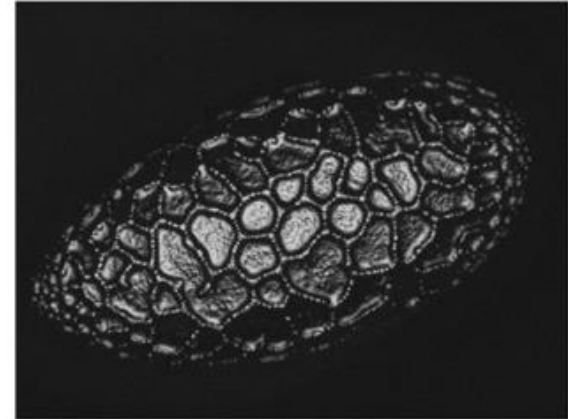


The actin cytoskeleton of a cell. Conventional (a, c) and spatially modulated illumination (b, d) microscopy.
M. G. L. GUSTAFSSON, Journal of Microscopy, Vol. 198, Pt 2, May 2000, pp. 82-87.
University of California San Francisco

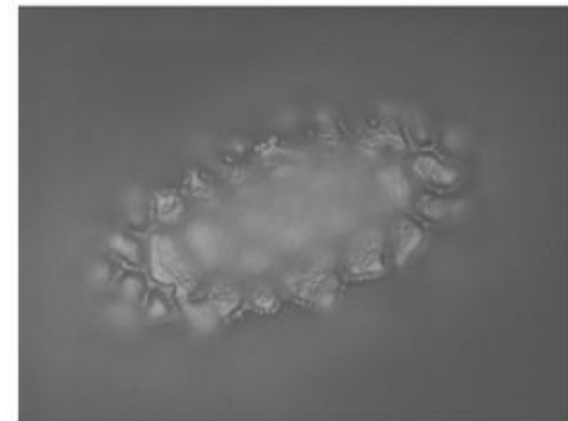


- **Οπτικές τομές SMI**

- Μια χωρική συχνότητα με σχετικά μεγάλη περίοδο
- Εικόνες λαμβάνονται σε τρεις χωρικές θέσεις
 - Σχετικές χωρικές φάσεις: $0, 2\pi / 3, 4\pi / 3$
- Εικόνες οπτικών τομών
 - Ουσιαστικά παρόμοια με ομοεστιακή μικροσκοπία
- Επεξεργασία σε πραγματικό χρόνο



(a)



(b)

Autofocus image of lily pollen grain (a) and conventional image (b)
M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, Optics Letters, Vol. 22,
Dec. 1997, 1905-7



- **Πλεονεκτήματα**

- Απλός σχεδιασμός
- Καλύτερος λόγος σήματος θορύβου από το ομοεστιακό μικροσκόπιο
- Λειτουργεί καλά για λεπτά δείγματα

- **Μειονεκτήματα**

- Για παχύτερα δείγματα → διέγερση φθοροφόρων σε άλλα μέρη του κυττάρου λόγω παρακείμενων στάσιμων κυμάτων
- Είναι δυνατόν να αφαιρεθεί μαθηματικά με αποσυνέλιξη (deconvolution), αλλά δύσκολο!
- Απαιτεί περισσότερη επεξεργαστική δύναμη



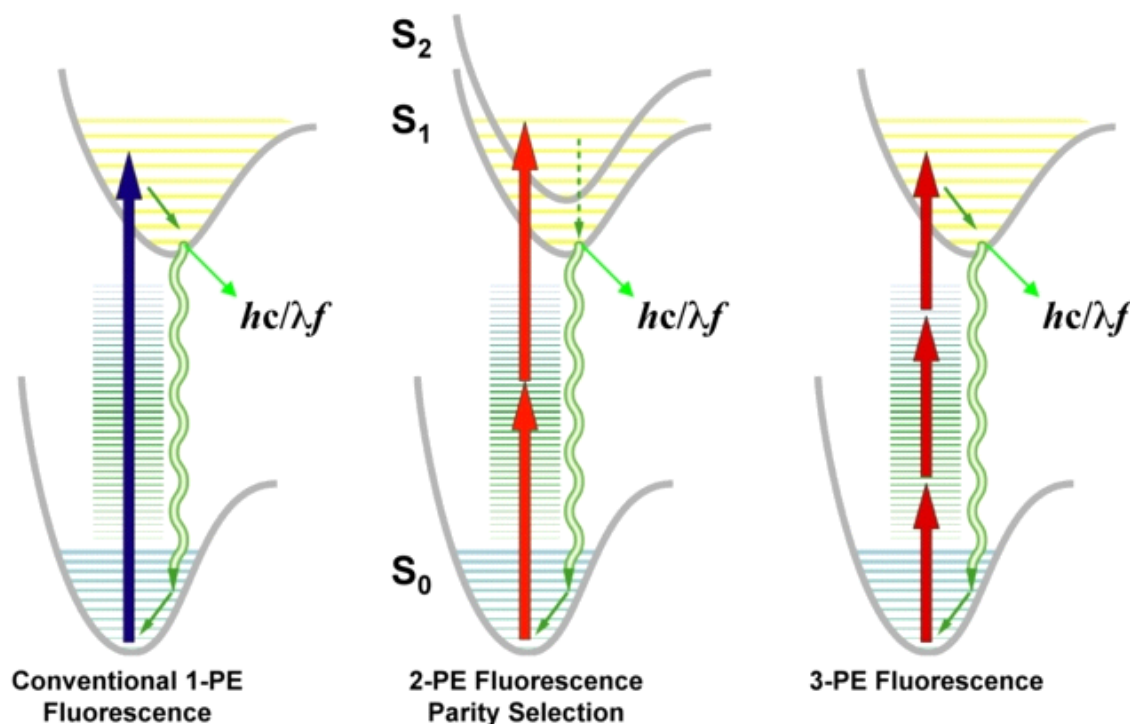
A detailed 3D image of the nucleus of a mouse cell. The picture was captured using a new imaging microscope technique called three-dimensional structured illumination, described in the journal Science.

Πολύ-φωτονική (Multi-photon) Μικροσκοπία



- Σε πολύ ψηλές πυκνότητες φωτονίων, καθίσταται δυνατόν για δύο ή περισσότερα φωτόνια να απορροφούνται ταυτόχρονα
- Κάθε πολλαπλή απορρόφηση συνεπάγεται μια μοριακή διέγερση ισοδύναμη με το άθροισμα των ενεργειών φωτονίων που απορροφούνται

Multiphoton Molecular Excitation Jablonski Energy Diagrams



Βασικές Αρχές της Πολύ-φωτονικής Μικροσκοπίας



- Η πολυ-φωτονική διέγερση είναι μία μη γραμμική διαδικασία
 - Επειδή δύο φωτόνια απαιτούνται για κάθε διέγερση, το ποσοστό της απορρόφησης εξαρτάται από το τετράγωνο της στιγμιαίας έντασης.
 - Λόγω των μεγάλων εντάσεων που απαιτούνται, χρησιμοποιούνται υψηλής ισχύος λέιζερ παρέχουν πολύ σύντομους παλμούς (~ 100 fs), έτσι ώστε η μέγιστη ένταση να είναι υψηλή, αλλά η μέση ένταση δεν καταστρέφει το δείγμα.
 - Έχουμε πυκνότητες φωτονίων επαρκώς ψηλές ώστε πολλαπλές φωτόνια να φτάσουν "ταυτόχρονα" (σε 10^{-15} s) σε ένα διεγέρσιμο μόριο (με 10^{-16} cm² διατομή) μόνο στο σημείο εστίασης της δέσμης.

- Η πιθανότητα ότι ένα φθοροφόρο στο κέντρο μιας εστιασμένης δέσμης απορροφά ένα ζεύγος φωτονίων κατά τη διάρκεια ενός μόνο παλμού είναι

$$n_a = \delta \langle P \rangle^2 F_p^{-1} \left(\frac{\pi^* NA^2}{hc\lambda} \right)^2 \xi$$

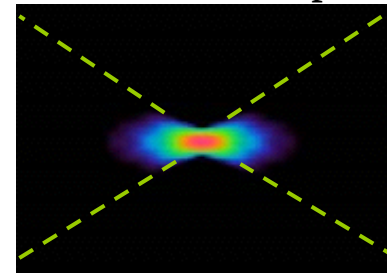
δ is the two-photon absorption cross-section

$\langle P \rangle$ is the average power

NA is numerical aperture

F_p is the repetition frequency

$\xi = \frac{\langle p^2 \rangle}{\langle p \rangle^2}$ is known as the two-photon advantage



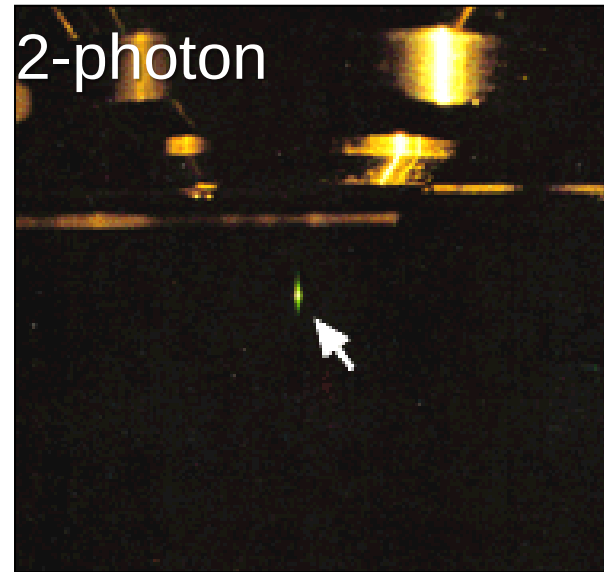
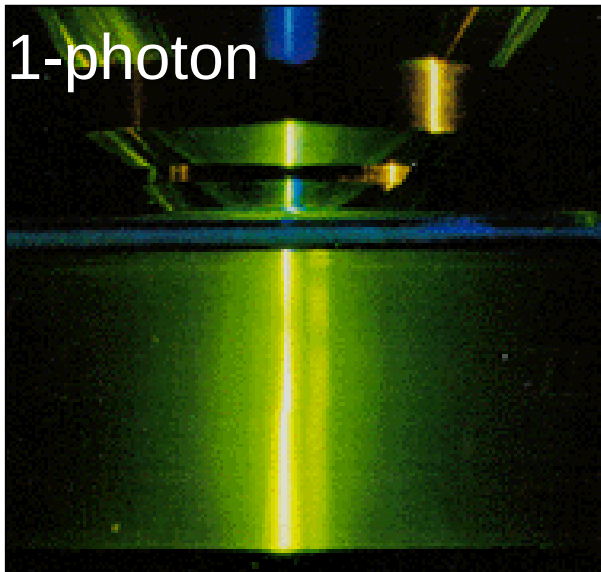
Προτερήματα της Πολύ-φωτονικής Μικροσκοπίας



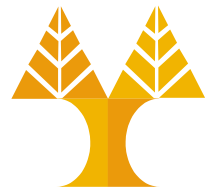
- **Εκ φύσεως ομοεστιακή**

- Με πηγή διέγερσης ενός φωτονίου, φθορισμός εμφανίζεται σε όλο το μήκος της δέσμης
- Με πηγή διέγερσης δύο φωτονίων ο φθορισμός περιορίζεται στο εστιακό σημείο
- Αυτός ο περιορισμός στο σημείο εστίασης παρέχει αυτόματα δυνατότητα 3d απεικόνισης

- **Οι φωτοβλάβες περιορίζονται με στο εστιακό επίπεδο**



Προτερήματα της Πολύ-φωτονικής Μικροσκοπίας



- **Δεν είναι απαραίτητο να εστιαστεί εκ νέου ο φθορισμός μέσω μιας οπής**

- Απλούστερη και πιο αποτελεσματική οπτική ανίχνευση → ισχυρότερο σήμα
- Η σκέδαση σε χοντρά δείγματα μειώνει το σήμα σε μικρότερο βαθμό

- **Μόρια που απορροφούν UV μπορούν να διεγερθούν με ορατό / NIR μήκος κύματος**

- Καλύτερη διείσδυση (2-400 nm)
- Επιτρέπει μετρήσεις σε ζώντα κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες



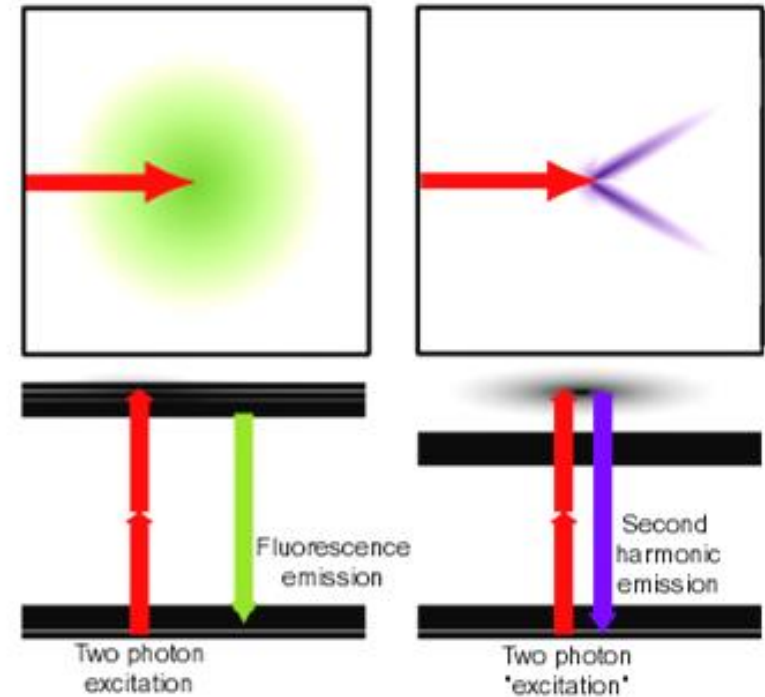
1-photon

2-photon

Γένεση Δεύτερης Αρμονικής (Second Harmonic Generation - SHG)



- **SHG (ονομάζεται επίσης διπλασιασμός συχνότητας)**
 - Μια μη γραμμική οπτική διαδικασία
 - Μπορεί να θεωρηθεί το ανάλογο του φθορισμού δύο φωτονίων αλλά στη σκέδαση
 - Τα φωτόνια αλληλεπιδρούν με ένα μη γραμμικό υλικό και "συνδυάζονται" για να σχηματίσουν νέα φωτόνια με το διπλάσιο της ενέργειας
 - Τα εκπεμπόμενα φωτόνια έχουν ακριβώς το μισό του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
 - Όταν αλλάζει η διέγερση, το εκπεμπόμενο σήμα SHG αλλάζει επίσης
- **Σήμα SHG**
 - Ίδια φάση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία
 - Εκπέμπεται πολύ κατευθυντικά
 - Εξαρτάται από το μέγεθος, σχήμα και δείκτη διάθλασης των σκεδαστών
 - Θυμηθείτε: η εκπομπή φθορισμού είναι ισοτροπική και δεν έχει συνοχή



Γένεση Δεύτερης Αρμονικής (Second Harmonic Generation - SHG)

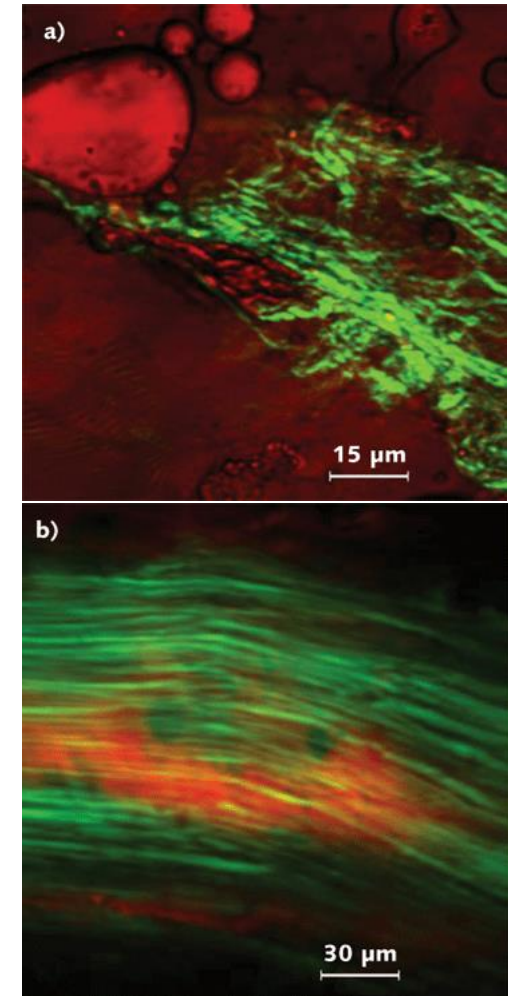


- **Εξοπλισμός**

- Παλμικό λέιζερ με παλμού femtosecond
- Κατάλληλα φίλτρα
- Το φως διέγερσης μπορεί να διαχωριστεί εύκολα από το εκπεμπόμενο μια και η συχνότητα διπλασιάζεται

- **Πολύ υψηλή αξονική και εγκάρσια ευκρίνεια**

- **Η μικροσκοπία SHG έχει χρησιμοποιηθεί για εκτεταμένες μελέτες των ιστών που αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο**



Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS, red) and second harmonic generation (SHG, green) microscopy of tissue from a) bovine muscle and b) rodent tail.