Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

На правах рукописи

Дуденкова Варвара Вадимовна

ГОЛОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

01.04.21 – лазерная физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель к.ф.-м.н., доцент Захаров Юрий Николаевич

Нижний Новгород – 2017

Оглавление

Введение
Глава 1. Теоретическое исследование предельно достижимых параметров
голографической и флуоресцентной микроскопии
1.1. Теоретическое сравнение аналоговой и цифровой голографии40
1.2. Оценка влияния разрешающей способности цифровых матриц на
восстановление цифровых голограмм41
1.3. Алгоритм обработки цифровых внеосевых голограмм
1.4 Программа для восстановления цифровых голограмм
1.5 Теоретическая оценка предельно достижимых параметров цифровой
внеосевой голографии51
1.6 Расчет оптимальной мощности возбуждения флуоресценции для
реализации BaLM метода53
1.7. Моделирование влияния шума на работу SHRImP алгоритма
1.8 Моделирование влияния механической нестабильности на работу
SHRImP алгоритма61
1.9. Алгоритм SOFI для анализа флуоресцентных данных, полученных
методом BaLM63
1.10.Выводы
Глава 2. Комбинированные методы голографической и флуоресцентной
микроскопии
2.1. Особенности устройства оптических микроскопов разных типов70
2.2. Принцип включения осевой голографической микроскопии в
конструкцию прямого и инвертированного микроскопов
2.3. Изучение фиксированных культур с помощью осевой голографической
микроскопии, включенной в конструкцию прямого и инвертированного
микроскопов73
2.4. Оптическая схема и описание экспериментальной установки получения
аналоговых и цифровых голограмм75

2.5. Изучение распространения потенциала действия в живых нейронных
клеточных культурах с помощью цифровой
голографии
2.6 Принцип совмещения методов оптической микроскопии и цифровой
внеосевой голографии86
2.7. Параллельное изучение живых нейронных культур с помощью
кальциевого имиджинга и цифровой внеосевой голографии
2.8. Выводы
Глава3. Комбинированное применение голографической и флуоресцентной
микроскопии сверхвысокого разрешения94
3.1. Реализация метода BaLM в широкопольном и лазерном сканирующем
режиме для окрашенных живых и фиксированных клеточных культур и
срезов тканей
3.2. Применение алгоритма SHRImP для анализа флуоресцентных BaLM
данных в широкопольном и лазерном сканирующем режиме от окрашенных
фиксированных клеточных культур97
3.3. Применение алгоритма SOFI для анализа флуоресцентных данных от
фиксированных клеточных культур
3.4 Оценка эффективности работы SOFI алгоритма108
3.5.Принцип комбинирования голографической и BaLM микроскопии112
3.6 Изучение живых клеточных культур с помощью комбинированных
методов BaLM и голографической микроскопии116
3.7. Выводы118
Заключение120
Список сокращений122
Список литературы124
Список публикаций по диссертации

Введение

Исследования области быстропротекающих В клеточных процессов стимулировали прогресс в развитии новых методов прижизненной микроскопии и необходимости регистрации динамических процессов. Большинство биологических объектов является прозрачными для излучения в оптическом диапазоне. С точки зрения физической оптики такой объект является амплитуднофазовым И его внутренняя структура описывается трехмерными пространственным распределением показателя преломления и коэффициента поглощения [1]. Измерение этих оптических неоднородностей играет важную роль в исследовании клеточных культур, и предпочтительно проводить его без специфического окрашивания введения флуоресцентных меток. С ИЛИ показателем преломления и коэффициентом поглощения связаны различные физические параметры клеток. По распределению показателя преломления можно определить вес сухих веществ в клетке и ее органеллах [2] и места локализации инородных соединений, например лекарств. Можно наблюдать и динамические процессы в клетке, так как она остается живой, в частности, процессы синтеза и распада белков, а также определять традиционные морфологические параметры клеток. К важнейшим параметрам фазового микрообъекта относится и оптическая длина пути (ОДП), представляющая собой интеграл от функции распределения показателя преломления вдоль зондирующего луча. По набору значений ОДП, измеренных при различных углах зондирования, можно реконструировать трехмерное пространственное распределение показателя преломления, являющегося локальным по пространству параметром фазового объекта. Из ОДП трехмерного распределения можно вычислить различные производные И

характеристики от этих величин: плотность, концентрацию и морфометрические характеристики, например, объем и средний радиус клетки и т.п. Показатель преломления связан С поляризуемостью белковых структур клетки, фазовое изображение следовательно, несет ценную диагностическую информацию о состоянии биологического микрообъекта.

микроскопию амплитудно-фазовых объектов В целом можно условно разделить на задачу формирования или реконструкции двумерных изображений внутренних сечений трехмерных объектов, на оценку количественных характеристик, в них содержащихся, без дополнительных окрасок и на задачи флуоресцентного анализа определенных структур с помощью экзогенных и эндогенных специфических маркеров и их качественного или количественного анализа. Для чисто фазовых микрообъектов такие изображения должны нести количественную информацию о пространственном распределении показателя преломления, а для амплитудно-фазовых - еще и о коэффициенте поглощения. Для фазовых и амплитудных объектов изображение, формируемое микроскопом с помощью какого-либо контраста, не совпадает с томографической проекцией, а связано с ней нелинейным образом. Только для флуоресцентного объекта его изображение совпадает или линейно связано с проекцией, так как искомой характеристикой является пространственное распределение интенсивности излучения флуорофоров.

Другой задачей является формирование изображений прозрачных или полупрозрачных объектов, несущих количественную информацию об их структуре, а также наблюдение и оценка пространственных линейных масштабов и измерение их локальных и интегральных характеристик.

На сегодняшний день задача визуализации объемных фазовых объектов решается методами: фазового контраста Цернике; или метода интерференционного контраста, дифференциально-интерференционного контраста (DIC) Номарского; ИЛИ метода методом темного поля; поляризационного контраста и градиентной фазовой микроскопии [3].

Однако современный уровень исследований требует количественной информации о сверхмалых изменениях при трехмерной визуализации всего изучаемого препарата. Высокая чувствительность к изменениям оптической разности хода (OPX) достигается при фазовых измерениях. Существует несколько различных подходов получения количественной информации об OPX объектов микроскопии, каждый из которых имеет свою область применения.

Количественные исследования характеристик фазовых микрообъектов можно проводить с помощью интерференционных микроскопов [4]. Возможно проводить мониторинг состояния как отдельной клетки [5, 6], так и целой популяции клеток [7]. Корреляция между различными процессами, происходящими в живой клетке, и величиной ОРХ позволяет использовать фазовое изображение также для исследования этих динамических процессов.

Для проведения измерений в основном используют микроскопы, в основе которых лежат различные схемы двулучевых интерферометров: Майкельсона, Maxa-Цендера и Миро [4].

Схема деления пучков Майкельсона используется в микроинтерферометре академика В.Π. Линника. Микроскоп Линника позволяет работать С микрообъективами больших числовых апертур. В такой конфигурации фазовые микрообъекты должны размещаться на зеркале, расположенном в предметном канале. В такой схеме на отражение излучение дважды проходит сквозь исследуемый объект [4]. Схема деления пучков Маха-Цендера используется в микроскопе Хорна. В своем составе он имеет два идентичных оптических плеча, в которых располагаются исследуемый и калибровочный объекты. В такой конфигурации излучение проходит через исследуемый микрообъект один раз и реализует схему на просвет.

Известен также автоматизированный вариант микроскопа Хорна в котором используется метод фазовых шагов. Дискретный фазовый сдвиг обеспечивается поперечным перемещением компенсационного клина, управляемого пьезо-приводом. Данный метод получил название DRIMAPS (digitally recorded interference microscopy with automatic phase shifting - цифровая

интерференционная микроскопия с автоматическим фазовым сдвигом). Такая реализация сложна в эксплуатации и настройке, так как требует наличия двух идентичных каналов с одинаково приготовленными препаратами: исследуемого препарата и препарата сравнения.

В микроскопе Дайсона, опорный пучок формируется из части предметного, не прошедшего через исследуемый объект и предназначен для исследования фазовых микрообъектов на просвет. Недостатком такой схемы является значительная потеря энергии пучка и рассеянный свет, возникающие вследствие многократных отражений.

Тенденция современной интерференционной микроскопии - это создание самостоятельных оптических узлов с микрообъективами, реализующих тот или иной вид интерференционной схемы (микрообъектив-интерферометр). Известны такие схемы, реализованные для интерферометров Физо, Миро, Майкельсона и Линника.

Впервые автоматизированный вариант интерференционного микроскопа Линника МИИ-4 был разработан В.П. Тычинским в 1989. В качестве фотоприемного устройства в этом микроскопе используется диссектор, а изображение объекта получается путем развертки. Для реконструкции фазы реализован компенсационный метод временных интервалов. Значение фазы в выбранной точке пропорционально нормированному временному интервалу между моментами регистрации двух минимальных значений интенсивности на фотоприемнике при сдвиге зеркала опорного канала на половину длины волны излучения. Время получения данных прямо пропорционально зависит от числа отсчетов.

Среди всех схем наиболее предпочтительна схема интерферометра Линника с высоким пространственным разрешением вследствие использования микрообъективов большой числовой апертуры и повышенной чувствительности в измерении ОРХ из-за двойного прохождения света в варианте использования схемы на отражение.

Отсюда следует, что, несомненно, актуальной является тема разработки и исследования методов интерференционной микроскопии, позволяющих автоматизировать измерения, повысить разрешающую способность и чувствительность, а также сократить время регистрации данных для измерения ОРХ как статических, так и динамических объектов при большом числе отсчетов.

Наиболее перспективными оказываются интерференционной методы фазовая микроскопии, как когерентная И динамическая фазовая такие микроскопия, которые позволяют осуществлять неинвазивные исследования морфологии и динамики со клеточной сверхвысоким пространственным разрешением. Метод динамической фазовой микроскопии оказался весьма универсальным инструментом, охватывающим широкий класс биообъектов и регистрирующим динамические процессы с частотами от 0,05 до 500 Гц. Кроме того, высокое пространственное разрешение прибора, позволяет исследовать динамику отдельных органелл клетки. В процессе реализации методов динамической фазовой микроскопии была выявлена непригодность классического фазовых изображениях критерия Релея для возможность И получения сверхразрешения [8]. Применение этих методов В биофизике позволило исследовать пространственно-временные флуктуации в органеллах клеток [9].

Метод голографической интерферометрии представляет собой голограммой пространственных фазовых распределений восстановление волнового поля от изменяющегося во времени объекта [10]. Применяя голографическую интерферометрию можно определить относительные изменения фазы исследуемого сигнала (пространственного или временного) путем сравнения восстановленных волновых полей от объекта, прошедших по одному оптическому пути в разные моменты времени. Голографическая интерферограмма выявляет изменения объекта за время между последовательной записью волновых полей на возможность интерферометрического сравнения голограмме И дает ЭТИХ полей. По сравнению классической восстановленных волновых С интерферометрией, голографическая интерферометрия позволяет исследовать как пропускающие [11] так и отражающие объекты с точностью до нанометров [12].

Голографическая интерферометрия также делится на аналоговую и цифровую в зависимости от типа используемых регистрирующих сред. Аналоговая голографическая интерферометрия делится на метод двух экспозиций, метод реального времени, метод с усреднением во времени и стробоскопический метод [13, 14]. Она основана на применении фотохимических регистраторов и фототермопластиков для записи голограмм и формирования интерферограмм, что приводит к низкому временному разрешению метода и сложности отладки эксперимента, из-за значительного расхода фотоматериалов.

Метод иифровой голографической интерферометрии позволяет сформировать в численном виде цифровую голографическую интерферограмму за счет сложения числовых матриц комплексных амплитуд, полученных с цифровых голограмм одного объекта в разные моменты времени[15, 16]. Высокая частота записи кадров цифровых матричных фотоприемников обеспечивает возможность последовательной записи большого набора цифровых голограмм и осуществлять многокадровую голографическую интерферометрию для контроля быстропротекающих динамических процессов [17]. Метод цифровой голографической интерферометрии может быть реализован с использованием формирования интерферограммы по численного интенсивности, за счет вычисления квадрата модуля суммы комплексных амплитуд объектных полей как косинусоидальной интерферограммы, а также фазовой интерферограммы как тангенциальной интерферограммы, получаемой путем прямого вычитания фазовых пространственных распределений в восстановленных объектных полях [18-20]. При применении тангенциальных интерферограмм с применением алгоритмов развёртывания фазы, устраняющих неоднозначность, вычисление пространственного распределения разности фаз объектных полей осуществляется с относительным быстродействием [21, 22]. Использование косинусоидальных интерферограмм наиболее эффективно при реализации метода цифровой голографической интерферометрии сфокусированных изображений [23-25].

Для восстановления голограмм используется временное восстановление (метод фазовых шагов) и пространственное восстановление (внеосевой метод). Метод

фазовых шагов основан на подавлении нулевого порядка и выделении одного из +1 или -1 порядков, используя комбинацию из нескольких кадров временной выборки. Наиболее известный алгоритм фазовых шагов, предложенный Ямагучи [26], основан на записи 4 последовательных голограмм со сдвигом фазы на $\pi/2$. Различные комбинации кадров, полученных с использованием высокоточных пьезоэлектрических преобразователей для перемещения зеркал и изменения набега фазы опорной волны или использование акустооптических модуляторов [27] для частотного сдвига позволяют ИЗ результатов интерференции восстановить как интенсивность, так и фазу волны. Основная проблема метода фазовых шагов – это необходимость записи серии кадров для корректного восстановления, а эта процедура особенно чувствительна к шумам и вибрациям. Соответственно, достаточно трудно обеспечить стабильность сдвига фазы и образца во время эксперимента. Кроме того, требования к точности фазовых сдвигов довольно высоко по отношению к перемещению и по порядку величины приближается к сотням нанометров, предполагая использование высокоточных преобразователей. Существует несколько попыток решения этой проблемы путем уменьшения необходимого для восстановления количества кадров до двух [28, 29] или возможности одновременной регистрации кадров с разным фазовым сдвигом, например метод мультиплексирования [30]. Другое направление связано с понижением требований к точности фазового сдвига [31-33]. Развитие скоростной процедуры фазовых шагов для томографии [34] и методы, основанные на пространственном анализе интерференционных полос [35, 36], рассматриваемых как отражение пространственного сдвига фаз позволяет реконструировать объектную волну в случае внеосевой схемы записи [37, 38]. Другой подход для восстановления объектной волны для внеосевой схемы, основан на том, что дифракционные порядки (нулевой, реальное изображения), И мнимое содержащиеся в голограммной структуре, при восстановлении разделяются в пространстве на разные направления, что и позволяет разделить их при восстановлении [39]. Данная конфигурация и была впервые применена для полностью численной записи и реконструкции голограммы [40, 41]. На практике,

для реконструкции объектной волны для внеосевой схемы обычно используется Фурье метод с фильтрацией одного из порядков дифракции. Этот подход впервые был предложен Takeda и др.[42] в контексте интерференционной топографии. Позднее этот метод был расширен для измерения восстановленной фазы для топографии [21] и для восстановления амплитуды и фазы в случае использования цифровой голографической микроскопии [43]. Основной особенностью этого подхода является возможность восстановления сложной объектной волны только по одному зарегистрированному изображению, что снижает требования к устойчивости к вибрациям.

Типичная схема *цифрового голографического микроскопа* для изучения прозрачных образцов [44], в том числе и живых клеток, дает возможность количественного анализа набега фазы волнового фронта, что обеспечивает чувствительность измерений ОДП порядка нанометров.

Другие варианты конфигурации оптической схемы зависят от особенностей объекта изучения. Важным аспектом оптических схем являются характеристики опорного пучка, такие как интенсивность и поляризация. Голографический принцип регистрации позволяет также реализовать возможность послойной регистрации нескольких голограмм. Голограммы, записанные с использованием разных опорных пучков с различными поляризациями, могут служить для анализа свойств двулучепреломления образцов [45, 46]. В качестве опорных волн также могут быть использованы комбинации разных лазерных линий [47].

Восстановление голограмм, полученных методом цифровой голографической микроскопии основано на теории дифракции. Объектив, используется для построения на бесконечности изображения объекта, находящегося в фокальной плоскости. А голограмма в дальней зоне дифракции регистрирует Фурье образ объекта. Обратное Фурье преобразование восстанавливает волновой фронт в фокальной плоскости объектива. Однако, объекты, обычно реальные расположены и за пределами фокальной плоскости, таким образом их изображение расположено в некотором объеме восстановленное вблизи фокальной плоскости. Цифровая голографическая микроскопия позволяет

количественно восстановить комплексную амплитуду волны, а значит И амплитуду и фазу волнового фронта от объекта. Для цифрового восстановления используются различные алгоритмы И подходы, повышающие точность восстановленной фазы. Например, показано, что при численном восстановлении с расчетом скалярной дифракции в приближении Френеля, нулевой порядок дифракции может быть устранен с помощью фильтрации связанных с ним пространственных частот при Фурье преобразовании голограммы. Данная операция улучшает контраст восстановленных изображений и уменьшает шум от паразитных отражений, достигающих плоскости голограммы с углом падения, отличной от объектной волны [48]. Разные типы аберраций также могут быть устранены в процессе цифрового восстановления путем вычитания из голограммы полиномиальной фазовой маски[49] или путем использования части голограммы без объекта, как эталонной [50]. Использование высокоапертурной оптики дает возможность получения субмикроного поперечного разрешения и порядка 300 нм продольного. А точность фазовых измерений достигает 0,1°, что в отражательной конфигурации схем записи голограмм, соответствует продольному разрешению менее 1 нм при длине волны 632 нм [51]. В голографических схемах регистрации фазовой информации на прохождение ограничено единицами нанометров. Экспериментальные схемы записи живых клеточных культур могут быть таковы, что при восстановлении необходимо использовать расстояния, на которых приближение Френеля не работает должным образом, тогда распространение волнового фронта, генерируемого голограммой можно вычислить с помощью спектрального углового подхода [52].

Применение ЦГМ на прохождение применяется для количественного изучения живых клеточных культур [53]. Зафиксированы изменения фазового сдвига регистрируемого волнового фронта на прохождение. Высокая временная стабильность фазы сигнала порядка $\lambda/1800$ и время сбора (~ 20 мкс) позволяют отслеживать клеточные процессы в динамике. Авторы вычисляют как интегральный показатель преломления, так и клеточную толщину (морфометрия) из измеренного сдвига фазы. Метод был применен для исследования нейронов во

время гипотонического стресса. Для повышения результатов восстановления применен оригинальный численный метод [43], позволяющий реконструировать как амплитуду и так и фазу изображения по одной записанной голограмме [54]. Численная реконструкция позволяет корректировать оптические аберрации, вносимые объективом микроскопа и других дефектов оптического тракта устройства, а также позволяет компенсировать механические колебания, вносимые окружающей средой проведении при эксперимента. собой Экспериментальная установка представляет модифицированную конфигурацию интерферометра Маха-Цендера. Для клеток в культуре со средним показателем преломления около 1,375 [55], достигнута чувствительность по оси z в 11нм.

Особенность интерференционной вычислительной микротомографии заключается в решении задачи встраивания системы сбора проекционных данных в интерференционный микроскоп. Зондирование объекта можно осуществлять либо параллельным пучком света, либо расходящимся коническим. Возможна траекторией зондирования по окружности [56] или наклонное освещение с одномерной траекторией зондирования [57]. Такая быть схема может использована только для небольших объектов [58]. Все подходы имеют общий недостаток, так как угол зондирования объекта ограничен числовой апертурой микрообъектива и не может превышать 45°.

Схемы со сканированием объекта относительно неподвижного пучка (microaxial tomography) реализованы для вращения капилляра с находящимся внутри него объектом [59] и для наклона объекта, помещенного между двумя покровными стеклами. Эти схемы обеспечивают большой угол зондирования, однако для их реализации необходимо создавать сложные поворотные механизмы, обеспечивающие выравнивание микрообъекта относительно оси вращения.

Таким образом, в области интерференционной микроскопии актуальной является также проблема разработки методов оптической микротомографии

фазовых объектов, обеспечивающих большой угол зондирования, различные траектории сканирования и большое число проекций.

Оптическая когерентная микроскопия основана на принципах оптической когерентной томографии И представляет оптической метод локации С использованием низкокогерентного излучения [34]. Изображение сечения получается за счет интерференции света, рассеянного в тонком слое внутри объекта, и опорной волны. Толщина слоя определяется длиной когерентности визуализации источника. Метод пригоден для градиентов показателя преломления сильно рассеивающих фазовых объектов и слоистых структур.

Существуют также различные модификации методик. Так, например, пространственная световая интерференционная микроскопия (spatial light interference microscopy, SLIM) являющаяся сочетанием фазово-контрастной микроскопии и голографии позволяет измерять массы отдельных клеток с фемтограммовой точностью [60].

Метод сканирующей ближнепольной ультразвуковой голографии (Scanning Near Field Ultrasound Holography, SNFUH) сочетает в себе сканирующую зондовую микроскопию, совмещенную с ультразвуковой детекцией и голографическим подходом позволяет визуализировать углеродные наночастицы диаметром 70-100 нм в мышах *in vivo* [61].

Задача двумерных изображений микро-И наномасштабных структур клеточных культур, на сегодняшний день решается методами классической оптической микроскопии [62]. Однако к существенным недостаткам данных относятся ограничения, связанные c предельным методов значением пространственной разрешающей способности в силу явления дифракции волн, дифракционный предел Аббе, а также невозможностью или технической сложностью реализации трехмерной визуализации. Использование различных типов флуоресцентных является незаменимым меток инструментом ДЛЯ исследования активности белков, сигнальных каскадов и процессов в клетках. Это точный способ отслеживания поведения единичных клеток и возможность видеть

отдельные молекулы и их взаимодействия с помощью меченных антител или разнообразных генетических конструкций. Когда какие-либо процессы, сопровождающиеся флуоресценцией, требуется оценить быстро, но требования к разрешению и увеличению изображения невелики, оптимальным методом может быть обычная флуоресцентная микроскопия. Однако этого часто этого бывает недостаточно и нужны методы, дающие большую детализацию вне плоскости фокуса.

Основной характеристикой микроскопии является разрешающая способность, которая в равной степени определяется длинной волны возбуждения и числовой апертурой объектива. Фундаментальное ограничение заключается в невозможности разрешить два отдельных точечных объекта, находящихся на небольшом расстоянии друг от друга.

Широкопольная световая микроскопия основана на визуализации объекта с помощью проходящего белого света. Для широкопольной микроскопии определить толщину оптического среза невозможно. Аксиальное разрешение определяется по формуле:

$$d_{z} = \frac{n\lambda_{em}}{NA^{2}},$$
(1)

где λ_{em} - длина волны эмиссии, а n – коэффициент преломления иммерсионной жидкости. В сравнении с полушириной на полувысоте или FWHM (Half Width at Half Maximum) ФРТ будет равна:

$$FWHM = \frac{1.77n\lambda_{em}}{NA^2}.$$
 (2)

Латеральное разрешение определяется как:

$$d_{x,y} = \frac{0.51\lambda_{em}}{NA}.$$
(3)

Значительных результатов в исследовании внутриклеточных процессов удалось достичь, используя метод *флуоресцентной микроскопии*. При известных ограничениях и некой степени инвазивности этот метод позволяет получить количественную информацию о пространственно-временных флуктуациях флуоресцентного сигнала. Однако, метод традиционной флуоресцентной микроскопии не имеет механизма абсолютной нормировки интенсивности флуоресценции, а также обладает сравнительно низкой чувствительностью и малым временным разрешением, ограничивающие применимость метода для живых клеточных культур.

Для расширения возможной широкопольной флуоресцентной микроскопии используется способ, основанный на цифровом восстановлении изображений внутренних сечений микрообъекта путем решения трехмерного уравнения [63]. Однако, такой метод применим только для флуоресцентных объектов, так как только для них интенсивность света в любой точке его изображения складывается из интенсивностей света от соответствующих точек внутри объекта. Для фазовых и амплитудных объектов данный подход не применим.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия отличается от обычной флуоресцентной микроскопии улучшенным разрешением как в латеральной плоскости (XY), так и вдоль оптической оси объектива Z, которое достигается за счет пространственной фильтрации внефокусных лучей.

Для конфокальной микроскопии и раскрытия конфокальной диафрагмы РН в диапазоне от 1 диска Эйри до бесконечности, определить толщину оптического среза можно по формуле:

$$\Delta = \sqrt{\left(\frac{0,88\lambda_{em}}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2}\right)}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2}nPH}{NA}\right)^2}.$$
(4)

Аксиальное разрешение определяется как:

$$d_z = \frac{0.88\lambda_{ex}}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2}\right)},\tag{5}$$

где λ_{ex} - длина волны возбуждения.

В сравнении FWHM ФРТ будет равна:

$$FWHM = \frac{1.77n\lambda_{ex}}{NA^2},$$
(6)

при условии, что NA<0.5.

Латеральное разрешение определяется как:

$$d_{x,y} = \frac{0.51\lambda_{ex}}{NA}.$$
(7)

В случае закрытия конфокальной диафрагмы РН до 0,25 диска Эйри определить толщину оптического среза можно по формуле:

$$\Delta = \frac{0.64\overline{\lambda}}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2}\right)},\tag{8}$$

где $\overline{\lambda}$ - средняя длина волны.

Аксиальное разрешение также определяется как:

$$d_z = \frac{0.64\lambda}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2}\right)},\tag{9}$$

В сравнении FWHM ФРТ будет равна:

$$FWHM = \frac{1.28n\lambda}{NA^2},\tag{10}$$

при условии, что NA<0.5.

Латеральное разрешение определяется как:

$$d_{x,y} = \frac{0.37\overline{\lambda}}{NA}.$$
(11)

измерения локальных характеристик внутренних неоднородностей Для микрообъектов разработаны методы конфокальной сканирующей микроскопии, где изображения внутренних сечений формируются за счет сканирования и пространственной фильтрации излучения [64]. Данный метод также пригоден флуоресцентных объектов. лишь исследования Использование для таких конфокальных микроскопов лишь незначительно улучшает поперечное разрешение, а продольное разрешение, хотя и значительно улучшается, остается ограниченным дифракционным пределом. Использование современных методов высокоскоростной конфокальной микроскопии при исследовании быстрых (более 10 Гц) процессов ограничено динамических вследствие низкого пространственного и временного разрешения. К тому же при исследовании быстропротекающих процессов в живых объектах, полученное таким образом

изображение не совсем корректно отображает реальную картину, так как сканирование происходит довольно медленно, и объект за время такого сканирования изменяется.

Для расширения получаемой информации используется комбинация конфокальной микроскопии с DIC при исследовании фазовых объектов. Однако такой способ позволяет получать лишь качественные, а не количественные данные [65].

В отличие от конфокальных систем, в системе *спиниинг-диск микроскопа* единичная диафрагма конфокальной системы заменяется диском Нипкова, что обеспечивает освещение и получение изображений многих точек образца единовременно. Метод отличает низкая фототоксичность, что дает возможность исследования живых клеточных культур и тканей *in vivo*, с временным разрешением сотен кадров в секунду, соответственно, превышающим возможности конфокальной микроскопии [66]. Ограничением применимости является максимальная глубина проникновения в 100 мкм.

Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (total internal reflection fluorescence, TIRF), основана на явлении внутреннего отражения световых волн, наблюдаемое на границе раздела сред, при условии, что волна проходит из среды с большим коэффициентом преломления в среду с меньшим коэффициентом преломления. TIRF микроскопия предназначена для оценки флуоресценции в тонкой области препарата, непосредственно контактирующей с покровным стеклом. Возбуждение флуорофоров происходит в области толщиной не более 200 нм, при этом значительно повышается отношение сигнал-шум, а флуорофоров, эффект фотообесцвечивания находящихся вне фокальной плоскости, напротив, снижается. В среднем, глубина проникновения для данного метода – 100 нм. Метод TIRF обладает очень высокой точностью, позволяющей молекулы [67], но требует специальной обработки увидеть отдельные изображения из-за неоднородности области возбуждения [68]. Комбинация нескольких последовательных TIRF-изображений, полученных при разном угле падения возбуждающего света, позволяет реконструировать трехмерную модель

клеточных структур с аксиальным разрешением до 20 нм [69]. Однако TIRFмикроскопия неприменима для визуализации внутриклеточных структур [70] и дает улучшение разрешения только вдоль оси Z [71].

Многофотонная (или мультифотонная, двухфотонная или нелинейная) микроскопия с использованием возбуждения ультракороткими лазерными импульсами, основана на нелинейном оптическом эффекте, при котором с увеличением плотности мощности света возрастает вероятность поглощения флуорофора одновременно двух и более фотонов. Сейчас для атомом мультифотонной микроскопии используются лазеры с длительностью импульса порядка 10⁻¹³с. Импульсы следуют с большой частотой порядка 100 МГц, и промежутки импульсами между значительно меньше. чем время позиционирования луча при сканировании. Возбуждающий свет ближнего ИКдиапазона меньше поглощается и поэтому глубже проникает в биологические ткани. По той причине уменьшается повреждение же живых клеток фотоиндуцированными процессами [72]. Преимущество заключается в достаточно хорошем разрешении даже в сильно рассеивающих тканях.

Существует целый класс узкоспециализированных подходов по *микроскопии* сверхвысокого разрешения на основе специального возбуждения флуоресценции. Методы микроскопии сверхвысокого разрешения имеют высокий потенциал применения в различных областях биологии и биомедицины. Ведется поиск и создание эффективных флуорофоров, совершенствуются алгоритмы обработки данных, предлагаются новые схемы организации оптического пути микроскопа. Наиболее активно развиваются технологии, объединяющие В себе флуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения с другими методами визуализации. Для таких методов подразумевается необходимость использования дополнительного оборудования, которое позволяет получить возбуждающее излучения с определенными свойствами.

Метод сканирующей микроскопии ближнего поля (near-field scanning optical microscopy — NSOM, или scanning near- field optical microscopy — SNOM) позволяет преодолеть дифракционный предел при исследовании биологических

препаратов [73]. Под ближним полем понимается зона над поверхностью изучаемого объекта размером менее λ зондирующего излучения. Изображения в NSOM микроскопии строятся с помощью освещения объекта через диафрагму малого диаметра субмикронного оптического зонда, расположенного, из-за отсутствия линз, на расстоянии много меньше λ излучения [74]. В латеральной плоскости разрешение достигает 20 нм [75], благодаря тому, что в области ближнего поля распространение света не подвержено дифракционным или интерференционным эффектам [76], однако главным ограничением, повлиявшим на ограниченое использование этого подхода в исследовании биологических препаратов, является принципиальное ограничение визуализации только поверхностных клеточных структур [77].

Микроскопии дальнего поля, в которой используются линзы, относительно удаленные от образца, последние годы демонстрирует значительные успехи в визуализации со сверхвысоким разрешением. Эти методы можно условно разделить на три основные группы: микроскопии структурированного освещения (structured illumination microscopy, SIM), микроскопии на основе истощения (флуоресценции) вынужденным излучением (stimulated emission depletion, STED) и локализационной микроскопии одиночных молекул (single-molecule localization microscopy, SMLM) [76].

SIM микроскопия основана на идее получения высокочастотной информации изображения с помощью облучения образца специальным светом [78]. Тонкая сетка помещается в промежуточное пространство широкопольного микроскопа или создается с помощью пространственного светового модулятора. Эта модель проецируется на образец. Сетка имеет постоянное значение пространственной частоты. Финальное изображение представляет собой интерференцию между этой сеткой и образцом.

Из-за интерференции высокие частоты изображения сдвигаются в область более низких частот. Возможно максимальное повышение разрешения в два раза и составляет примерно 100 и 300 нм в латеральной и аксиальной плоскостях соответственно [79]. Для получения результирующего изображения необходимо

9-15 изображений, что позволяет исследовать живые клетки. Единственные ограничения заключаются в том, что во время облучения не должно наблюдаться обесцвечивания или движения [78]. Преимущество метода также заключается в возможности визуализации большого поля зрения; и использования практически всех современных стандартных фотоустойчивых флуорофоров [80].

Существует многоцветная модификация под названием 3D-SIM-микроскопия, способная выявить особенности строения единичных комплексов ядерной поры [81] или структуры плазмодесмы [82].

Разновидностью SIM является технология *микроскопии насыщающего структурированного освещения (saturated structured illumination microscopy , SSIM)*, основанная и на муаровом эффекте и на способности флуорофоров к нелинейному возрастанию эмиссии в зависимости от дозы облучения. Такой метод дает разрешение до 50 нм в плоскости ХҮ, но требует значительно большей мощности лазера и соответственно использования только более фотостабильных флуорофоров [83], что делает этот подход неприменимым для исследования живых клеточных культур.

Продемонстрированы модифицированные варианты SIM-микроскопии с улучшенным разрешением, работающие на высокой скорости и низких мощностях лазерного облучения (high-numerical aperture TIRF-SIM u patterned activation nonlinear-SIM) [84].

STED микроскопия является конфокальной лазерной сканирующей микроскопией с дополнительным STED-лазером, сверхвысокое разрешение в котором достигается путем избирательного тушения флуорофора [85]. STED микроскопия не имеет теоретического предела для разрешения, так как с повышением мощности лазера истощения происходит уменьшение площади в его центре. Оно ограничено свойствами объекта исследования [86], однако на практике фотоповреждение биологического образца ведет к ограничению мощности пучка и разрешающая способность обычно составляет примерно 30–80 нм в плоскости XY [70]. Другой проблемой STED является создание луча в форме тора и точное его совмещение с лучом возбуждения. В технологии gated STED с

использованием времяразрешенных детекторов, синхронизованных с импульсным возбуждающим лазером, можно снизить используемые мощности и достигать сверхвысокого разрешения и высокого соотношения сигнал/шум в изображении, снижая риск фотоповреждения живых клеток [87]. Преимущество STEDмикроскопии состоит в улучшении разрешения в режиме реального времени и обычно не требует долговременной обработки данных. Так с применением STED метода были визуализированы ультратонкие структуры дендритных шипиков пирамидальных нейронов в срезах гиппокампа мыши [88]. Детально описаны перемещения везикул, содержащих нейротрансмиттеры, в первичных культурах нейронов крысы [89]. Позднее было продемонстрировано успешное приложение STED-микроскопии для изучения динамики нейронов в коре головного мозга мыши *in vivo* [90].

Принцип STED может быть представлен в виде общей схемы, использующей обратимый переход между двумя молекулярными состояниями флуоресцентным и темновым [91]. Эта идея воплощена в методе микроскопии обратимого насыщенного оптического линейного флуоресцентного перехода RESOLFT (reversible saturable optical linear fluorescence transitions). реализован за счет флуоресцентных долгоживущих темновых И состояний обратимо фотопереключаемых флуорофоров с использованием особым лазеров С распределением интенсивности в фокальной плоскости [92]. А для запуска таких оптических переходов внутри флуорофора необходимы более низкие мощности лазера, пригодные для исследования живых клеток с разрешением 50–100 нм [93]. Метод RESOLFT позволил отслеживать динамику перестройки актиновых волокон в шипиках дендритов нейронов гиппокампа в течение нескольких часов без признаков повреждения, с разрешением, в три раза превосходящим разрешение конфокального микроскопа [94].

Стоит упомянуть о микроскопии I5M и 4Pi, в которой применяют два высокоапертурных объектива для освещения объекта с двух сторон и тем самым добиваются разрешения до 100 нм по оси Z [95].

В SMLM входят методы STORM (stochastic optical reconstruction microscopy — микроскопия стохастической оптической реконструкции) [96, 97], PALM (photoactivated localization microscopy — фотоактивируемая локализационная микроскопия) [98] и fPALM (fluorescence photoactivation localization microscopy — флуоресцентная фотоактивируемая локализационная микроскопия) [99].

Необходимость наличия специального оборудования для получения данных сверхвысокого разрешения накладывает сильное ограничение на применение SIM и STED методов. Использование информации об изменении сигнала во времени является альтернативным подходом. Методы, описываемые в этой части, основываются на анализе отдельных кадров временной серии. При этом для возбуждения флуоресценции используется широкопольное облучение образца.

Общий принцип заключается в анализе отдельных кадров записанной серии. Эти методы нельзя разделить по алгоритму обработки, зато они отличаются по типу микроскопа, который используется для получения данных, и классу флуорофора. STORM и PALM применяются к данным, полученным с помощью TIRF-микроскопа. Только в первом случае используют фотопереключаемые флуоресцентные белки, а во втором органические красители [96, 98]. fPALM соответственно реализован на флуоресцентном микроскопе.

Данные методы позволяют получить разрешение 50-20 нм в латеральной плоскости. Также возможно улучшение и в аксиальном направлении, используя дополнительные процедуры [97, 100] и разрешение по оси Z сильно варьирует в зависимости от конфигурации микроскопа.

Как и для STED подхода, в методах SMLM также можно использовать два объектива, расположенных по обе стороны от образца. Это применено в dualobjective-STORM [101] и iPALM (interferometric-PALM) [102], аксиальное paзрешение может достигать 20 нм; при этом стандартный TIRF-режим обеспечивает разрешение по Z в 100 нм. Для получения информации о положении молекулы по оси Z могут использоваться дополнительные цилиндрические линзы, расположенные перед детектором, при этом изображение ФРТ закономерно будет соответственно искажаться при удалении от фокуса [97].

В отличие от PALM и STORM принцип *BALM (Bleaching/blinking assisted localization microscopy)* основан на извлечении информации о положении каждого флуорофора и из процесса его мигания, и из фотообесцвечивания, которое, тоже происходит случайным образом. Такая идея расширяет арсенал пригодных к использованию флуорофоров, а также позволяет восстановить картину распределения одиночных молекул при их высокой плотности [103].

Данный метод не накладывает ограничений на количество активных флуорофоров на одном кадре, так как обработка происходит не самих кадров, а результата вычитания последующего из предыдущего [104]. Эта процедура позволяет обнаружить момент начала и окончания флуоресценции отдельной молекулы. Для корректной локализации необходимо чтобы между соседними кадрами загоралось/гасло достаточно разреженное подмножество источников. Такого эффекта до настоящего времени добивались эмпирически, подбирая условия эксперимента. Данный метод позволяет получить данные из живых клеток с использованием обычных флуоресцентных белков и ксеноновой дуговой лампы. При освещении образца лампой, флуорофоры начинают светиться, а их фотообесцвечивание происходит одновременно, не а В некоторой последовательности. В результате на кадрах видео мы можем заметить постепенное гашение всех флуорофоров [105]. В результате, метод BaLM позволяет в каждом кадре локализовать множество молекул флуорофоров, находящихся друг к другу не ближе, чем размер функции рассеяния точки, но с точностью, превосходящей дифракционный предел, и последовательно построить изображение со сверхвысоким разрешением.

В результате, в основе метода BaLM лежит другой алгоритм, который называется *SHRImP* (*Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching*) [106], обобщенный на случай множества флуорофоров. В случае двух перекрывающихся точечных источников необходимо: получить последовательность кадров, на которых происходит изменение состояния каждого флуорофора; вычислить новые изображения путем вычитания последующего кадра из предыдущего; проанализировать разностные изображения и выделить на

них моменты загорания или гашения каждого флуорофора; произвести процедуру локализации, которая заключается в поиске центра масс точечного источника и дальнейшей аппроксимации Гауссовым куполом. Ширина купола зависит от соотношения сигнал/шум на изображении. После обработки всех разностных кадров, результат объединяется в финальное изображение с разрешением вплоть до 50нм. В качестве источника сигнала используются синтетические флуоресцентные красители и генетически кодируемые флуоресцентные белки [104].

Микроскопия сверхвысокого разрешения на основе оптических флуктуаций (Super-resolution optical fluctuation (SOFI) microscopy) основана на статистическом анализе временных флуктуаций сигнала (вызванных миганием флуорофоров), которые записываются в поток изображений (видео). Метод можно применять к данным, полученным на широкопольном микроскопе с CCD камерой (на основе прибора с зарядовой связью) [107]. Для использования SOFI необходимо, чтобы флуорофоры должны иметь как минимум два состояния (например, гореть); отдельные флуоресцировать не источники И сигнала должны переключаться из одного состояния моментально В другое, при ЭТОМ переключения должны быть независимы друг от друга; изображение должно быть получено с размером пикселя меньше, чем дифракционный предел.

SOFI алгоритм можно применить с использованием квантовых точек [107], органических красителей [108] и флуоресцентных белков [109]. К преимуществам данного метода относится неспецифичность к возбуждению флуоресценции и типу красителей. За счет учета корреляции между кадрами происходит борьба с шумом, что позволяет комбинировать данный метод с деконволюцией [107]. Гибкость метода заключается в возможности изменения соотношения скорости обработки к её качеству за счет изменения временной задержки при вычислении корреляционной функции. Время сбора данных ограничено только тем, как быстро гаснут флуорофоры. SOFI-реконструкция возможна при анализе меньшего числа кадров, чем в методах РАLМ и STORM, однако требует отсутствия промежутков между кадрами и, как правило, высокой скорости съемки [107]. К

преимуществам SOFI относится возможность анализа образцов с высокой плотностью мечения, а также значительное снижение фонового сигнала на результирующем изображении [110].

Идея метода *3B* (*Bayesian analysis of the blinking and bleaching*) заключается в анализе данных, в которых множество перекрывающихся флуорофоров претерпевают фотообесчвечивание. На поведение образца не накладывается никаких дополнительных условий. На каждом кадре также могут находиться перекрывающиеся источники. Поэтому данный метод позволяет наблюдать за быстропротекающими процессами внутри образца.

Для каждого кадра строится вероятностная модель, максимально аппроксимирующая сигнал. В основе построения такой модели лежит метод Монте-Карло на основе Марковской цепи (МСМС) [111]. Марковский процесс – это случайный процесс, где для каждого момента времени вероятность любого состояния системы в будущем зависит только от состояния системы в настоящий момент и не зависит от того, каким образом система пришла в это состояние. Марковская цепь – частный случай такого процесса, когда пространство его состояний дискретно.

Главный недостаток 3В метода – это значительные вычислительные затраты. Для обработки одной статической молекулы необходимо несколько дней на персональном компьютере. Для обработки больших площадей или видео необходим доступ к кластеру. Данные должны быть записаны на EMCCD камеру для высокого соотношения сигнал/шум. 3В алгоритм позволяет получать разрешение до 50нм в латеральной плоскости [111]. Высокая эффективность этой методики позволила выявить динамику наноразмерных подосомных образований с пространственным разрешением 50 нм и временным - 4 с [112].

Таким образом, неинвазивность метода получения изображений с высоким разрешением является необходимым условием для визуализации биологических процессов в живых клеточных культурах. В последнее время, новые технологии цифровой микроскопии демонстрируют фазовые измерения с микронным поперечным разрешением и субдлинноволновым продольным разрешением для

изучения живых клеточных культур, без использования каких-либо контрастирующих веществ [38, 54, 113]. По сравнению с классическим фазовым контрастом и дифференциальным интерференционным контрастом Номарского, широко используемых в биологии для визуализации прозрачных неокрашенных образцов, методы интерферометрии имеют значительное преимущество, так как дают возможность получения количественных измерений фазового сдвига, создаваемого образцом. Измеренный фазовый сдвиг зависит как от показателя преломления, так и от толщины образца, которые связаны с характером изменения внутриклеточного содержимого И морфометрии образца, соответственно. Несмотря на интенсивное развитие современных методов цифровой интерферометрии, в зависимости от специфики исследуемых объектов существует необходимость адаптации оптических голографических схем. оптимизации условий эксперимента, согласование параметров средств цифровой регистрации с характеристиками оптической системы интерференционного микроскопа.

При использовании стандартных методик флуоресцентной микроскопии, препарат исследованием необходимо перед прокрасить специальными красителями или при выращивании образца применить трансгенные технологии для экспрессии флуоресцентных белков. Это необходимо, так как весь принцип метода основан на возбуждении и гашении флуоресценции, и ее дальнейшей регистрации. В то же время функциональные процессы в нейронных культурах сопровождаются столь малыми морфологическими изменениями, что они не заметны при использовании оптических методик обычного (дифракционного) специфический разрешения, характер, однако имеют что позволяют расшифровать новые неинвазивные методы их исследования.

Получается, что динамических процессов исследование В оптически низкоконтрастных объектах прозрачных С разрешением, превосходящим дифракционный предел продольного и поперечного разрешения, существующими методиками применимо лишь ограниченному классу образцов. Расширение подобных методов на новые классы объектов и процессов представляет собой

актуальную задачу. А выявление физиологических механизмов, лежащих в основе патофизиологических клеточных процессов требует возможности количественного и неинвазивного наблюдения структуры клеток и динамики на клеточном и субклеточном уровнях. Кроме того, клеточные процессы, как правило, многогранны и не могут быть эффективно описаны с помощью одного метода.

Таким образом, разработка подходов формирования изображений с высоким разрешением, обеспечивающих одновременное измерение нескольких параметров биообъектов, является актуальной задачей комплексного анализа.

Итак, **целью** диссертационной работы является исследование и разработка методов голографической и флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения для исследования физических характеристик и динамических процессов в живых клеточных культурах, таких как распространение сигналов и нейропластичность. Для достижения поставленной цели решены задачи:

- Исследовать взаимодействие живых нейрональных культур с когерентным оптическим излучением и выявить закономерности изменения оптической разности хода от биофизического состояния культур на клеточном и субклеточном уровнях
- Рассчитать оптимальную мощность для реализации алгоритма локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM
- Разработать и экспериментально подтвердить методы параллельного исследования клеточных культур in vitro методами внеосевой цифровой голографии, флуоресцентного имиджинга и локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM.
- Развить методы локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM в широкопольном и лазерном сканирующем режиме регистрации данных и алгоритмы обработки SHRImP и SOFI для повышения пространственного разрешения

Научная новизна проведенных исследований заключается в следующем:

1. Впервые выявлена корреляция динамики кальциевой активности в живой клеточной культуре с изменениями фазового набега, полученного при исследовании культуры голографическим методом.

2. Впервые дана теоретическая оценка оптимальной мощности оптического возбуждения для локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM, учитывающая свойства флуорофора, параметры лазерного пучка и условия регистрации выходного сигнала.

3. Разработан новый метод совмещенного применения голографической и локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM.

4. Впервые предложен коэффициент оценки эффективности методов получения сверхвысокого разрешения.

5. Впервые достигнуто сверхвысокое разрешение при применении SOFI алгоритма к BaLM данным, полученным с помощью лазерной сканирующей микроскопии.

6. Применением эквализации гистограммы впервые решена проблема растяжения динамического диапазона данных, обработанных SOFI алгоритмом, что позволило применять данный алгоритм к изображениям с высоким контрастом (до 1:4096).

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученное универсальное теоретическое выражение для определения мощности возбуждения флуоресценции, позволило оптимизировать реализацию BaLM метода локализационной микроскопии.

Введенный количественный коэффициент оценки эффективности получения сверхвысокого разрешения позволил объективно сравнивать результативность работы различных методов.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные в диссертации голографические и флуоресцентные методы позволяют улучшить визуализацию и количественные измерения фазовых набегов и расширить подходы к изучению структуры клеточных культур для задач биологии и медицины.

Разработанная и реализованная концепция применения осевой и внеосевой цифровой голографической микроскопии на базе прямого и инвертированного лазерного конфокального сканирующего микроскопа дополняет имеющиеся методы исследования биологических микрообъектов возможностью получения новой информации.

Реализованное в диссертации теоретическое обоснование выбора параметров получения данных при реализации методики BaLM для флуоресцентной локализационной микроскопии позволяет оптимизировать применение метода.

Комбинированный метод цифровой голографической и локализационной флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения позволяют неинвазивно исследовать морфологию и динамику внутриклеточных процессов биологических объектов, а также оценивать их функциональное состояние.

Оптическая разность хода, регистрируемая методом цифровой внеосевой голографической микроскопии, является объективным количественным параметром, отражающим функциональное состояние ряда биологических объектов.

Методология и метод исследования:

Проверка предложенных концепций голографической и сверхразрещающей флуоресцентной микроскопии осуществлялась путем проведения численных и натурных экспериментов в соответствии с техникой аналоговой и цифровой голографии, голографической интерферометрии и флуоресцентной микроскопии.

Перейдем к последовательному краткому изложению содержания диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка работ по теме диссертации и списка цитируемой литературы.

Во введении обосновывается актуальность работы, формулируются ее цели, освещается степень разработанности темы исследования, приводятся основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена теоретическому сравнению аналоговой и цифровой голографии с оценкой влияния разрешающей способности цифровых матриц на

голограмм. восстановление цифровых Приведена реализация алгоритма работоспособность обработки цифровых внеосевых голограмм, которого проверена с помощью программы для восстановления тестовых цифровых голограмм. Для практической реализации BaLM метода выведено теоретическое выражение И проведен расчет оптимальной мощности возбуждения флуоресценции. Смоделировано влияние шума и механической нестабильности на работу алгоритма. Описаны алгоритмы восстановления SHRImP и SOFI.

В п. 1.1. проведено теоретическое сравнение аналоговой и цифровой голографии, сформулированы их потенциальные возможности и применимость.

В п.1.2. проведена оценка влияния разрешающей способности цифровых матриц на восстановление цифровых голограмм. Проведен теоретический расчет оптимального угла схождения пучков для внеосевой голографии, с учетом параметров возбуждения и регистрации.

В п.1.3. приведен разработанный алгоритм обработки данных цифровых голограмм, представляющий собой двойное Фурье преобразование с фильтрацией в частотной плоскости и переносом выбранного порядка дифракции в начало координат для устранения линейного набега фазы. Алгоритм дополнен расчетом разности фаз, а также разворачивания (или сшивания) фазы. Для численнного рассчета дифракции применялся метод углового спектра (Angular Spectrum), а для устранения искажений, вносимых оптическими элементами установки применялась цифровая интерферометрия.

В **п.1.4.** реализована программа по восстановлению цифровых голограмм, в основе алгоритма которой лежат прямое и обратное преобразования Фурье. Проведено тестирование

В п.1.5 приведена теоретическая оценка предельно достижимого значения пространственного разрешения поперечном направлениях, а также глубины поля зрения и чувствительности определения набега фазы цифровой внеосевой голографии. Для случая с лазерной линией 650нм и объективом с числовой апертурой 0.8 и восьмибитной регистрирующей матрицей, поперечное

разрешение составило 406нм, точность определения изменения фазы 0,008π с чувствительностью ОДП 3нм.

В п.1.6 проведен теоретический расчет оптимальных параметров возбуждения флуоресценции для реализации BaLM метода, исходя из характеристик используемых флуорофоров и детектора. Выполнены расчеты оптимальной мощности возбуждения для широко используемых в исследованиях коммерческих флуорофоров в широкопольном режиме получения данных для Alexa Fluor 647 - 11,7 мВт; для Cy3 - 130мВт; для DyLight 405 - 58,9 мВт соответственно.

В п.1.7 приведены результаты моделирования работы SHRImP алгоритма для анализа флуоресцентных данных, полученных BaLM методом. С помощью созданных тестовых видеофрагментов сделан вывод о работоспособности SHRImP алгоритма вплоть до соотношения сигнал/шум равного 5.

В **п.1.8** представлены результаты влияния механической нестабильности на работу SHRImP алгоритма. Рассмотрены случаи однократной и многократной экспозиции с разными частотами и амплитудами колебания элементов установки.

В **п.1.9** представлены результаты моделирования работоспособности SOFI алгоритма при различных расстояниях между центрами флуорофоров.

В. п. 1.10. сделаны выводы по первой главе.

Во второй главе приведены принципы комбинирования методов голографической и флуоресцентной микроскопии для изучения клеточных культур.

В п. 2.1 выделены основные критерии оптических схем микроскопов для формирования подхода комбинированного применения методов голографической и флуоресцентной микроскопии.

В п. 2.2 описан принцип включения осевой голографической микроскопии в конструкцию прямого и инвертированного микроскопов. Опорный пучок формируется отраженной полупрозрачной частью света, OT пластинки, помещенной непосредственно объективом перед ПО направлению распространения светового пучка от лазера.

В п. 2.3 приведены результаты изучения фиксированных культур с помощью осевой голографической микроскопии, включенной в конструкцию прямого и инвертированного микроскопов. Временное разрешение осевой цифровой голографии в предложенной конфигурации составило в среднем порядка 60сек.

В п. 2.4 приведена оптическая схема и экспериментальная установка получения аналоговых и цифровых голограмм. Приведенная совмещенная распределенная оптическая схема на основе принципа записи Лейта-Упатниекса реализует возможность быстрой настройки и контроля параметров для регистрации одиночных или серий аналоговых и цифровых голограмм. Схема предназначена для записи голограмм клеточных культур, находящихся в чашке Петри с питательным раствором. Запись временной серии цифровых голограмм с помощью голографической установки и параллельно аналоговой записи позволила минимизировать наличие артефактов дискретизации и конечной ширины спектра цифровых голограмм.

В п. 2.5 приведены результаты изучения распространения потенциала действия в живых нейронных клеточных культур с помощью цифровой голографии. Показана возможность детектирования и визуализации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток, на примере действия КСL на первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей с помощью голографического подхода.

В п. 2.6 описан принцип совмещения методов оптической микроскопии и цифровой внеосевой голографии. Подобранные параметры оптической схемы внеосевой цифровой голографии были использованы при записи внеосевых цифровых голограмм на базе прямого микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия).

В п. 2.7 приведены результаты параллельного изучения живых нейронных культур с помощью кальциевого имиджинга и цифровой внеосевой голографии. Методика кальциевого имиджинга нейрональных культур основана на использовании кальций-зависимого красителя Oregon Green BAPTA1, по изменению интенсивности флуоресценции которого вычисляется концентрация

ионов Са2+ в клетках. Анализ временного ряда интерферограмм в сравнении с кальциевой динамикой показали соответствие наличия одиночных кальциевых осцилляций и изменения оптической разности хода в клетках с периодом порядка минут для нативного состояния культуры. Введение нейромодулятора приводит к возникновению сверхмедленных комплексных кальциевых осцилляций длительностью от 30 до 60 с. При этом фазовые измерения показывают квазипериодическое изменение оптической разности хода в клетках на сопоставимых с этими временных масштабах. Гипоксия приводит к появлению комплексных кальциевых осцилляций длительностью порядка 100 с, период колебаний оптической длины пути сквозь клетки составляет 10-15 секунд.

В п. 2.8. сделаны выводы по второй главе.

В третьей главе рассмотрены принципы совмещения цифровой внеосевой голографии и флуоресцентной локализационной микроскопии. Использован флуоресцентный метод BaLM, являющийся разновидностью методов локализационной микроскопии, и алгоритмы обработки в основе которого лежит принцип SHRImP, обобщенный на случай множества флуорофоров, и метод микроскопии сверхвысокого разрешения на основе оптических флуктуаций SOFI.

В п 3.1. описана реализация метода локализационной микроскопии BaLM в широкопольном и в лазерно-сканирующем режиме для исследования окрашенных фиксированных клеточных культур и срезов тканей. Исследована первичная диссоциированная культура нейронов гиппокампа мозга эмбриона мыши, прокрашенная с помощью вторичных антител, маркированных флуорофором Су3 и Alexa Fluor 647, ассоциированных к первичным антителам, специфичным к MAP2.

В п. 3.2 описано применение алгоритма SHRImP для анализа флуоресцентных данных от фиксированных клеточных культур, прокрашенных с помощью вторичных маркированных флуорофором Alexa Fluor 647 антител, и ассоциированных антителам, специфичным MAP2. к первичным к изображения микротрубочек дендрита Восстановленные нейрона, имеют разрешение в 10 раз превосходящее дифракционный предел.

В п.3.3 представлено применение алгоритма SOFI для анализа флуоресценции фиксированных клеточных культур, полученных с помощью широкопольной и лазерной сканирующей микроскопией. При реализации алгоритма обработки SOFI, проблема, связанная с растяжением динамического диапазона при переходе обработке полноразмерных изображений, устранена путем добавления к эквализации гистограммы каждого исходного изображения при расчете средней интенсивности. В качестве улучшения алгоритма, для повышения его разрешающей способности, использовалось изображение локальной средней интенсивности. Наибольший эффект данная адаптация показывает для алгоритма SOFI не выше 6 порядка и при разбиении на блоки длиной по два кадра. Впервые алгоритм SOFI применен для обработки данных от фиксированных срезов тканей.

B п.3.4 лля оценки эффективности полученных изображений co коэффициент, равный сверхразрешением введен отношению ширин на половинной амплитуде сигналов вдоль выделенного направления на исходном и результирующем изображениях соответственно. Применение коэффициента эффективности позволило оценить использование эквализации гистограммы интенсивности и выявило необходимость использования порядка SOFI больше 8. Показано, что эффективность использования изображения локальной средней интенсивности падает с повышением порядка алгоритма: примерно, 30% для SOFI 2 и до 10% для SOFI 8. Таким образом применение изображения локальной средней интенсивности целесообразно для алгоритма SOFI не выше 6 порядка.

В п. 3.5. представлен принцип комбинирования цифровой внеосевой голографической и BaLM микроскопии на базе прямого и инвертированного микроскопа LSM 510 и 710 (Carl Zeiss, Германия).

Конструктивно элементы схемы подобраны таким образом, что для перехода от голографической К локализационной микроскопии записи перекрывается опорный добавляется блокирующий фильтр пучок И для отсечения возбуждающего излучения перед цифровой матрицей.

В п. 3.6 приведены результаты изучения живых клеточных культур с помощью комбинированных методов BaLM и голографической микроскопии. На примере

живой культуры клеток линии кератиноцитов Het-1A в ходе их обычного развития при культивировании в питательной среде и при воздействии фармакологического ингибитора пролиферации клеток, методом голографической и BaLM микроскопии получена динамика их морфо-функционального состояния.

В п. 3.7. сделаны выводы по четвертой главе.

В заключении кратко сформулированы основные результаты диссертации.

На защиту выносятся следующие основные научные положения:

- Оптическая схема, в которой одновременно регистрируется трехмерная структура микроскопических объектов и распределение фазы волнового фронта объектной волны, позволяет совместить достоинства аналоговой и цифровой голографии.
- 2. Комплементарное использование осевой и внеосевой цифровой голографической и флуоресцентной микроскопии позволяет выявлять изменения оптической разности хода с нанометровой чувствительностью совместно с применением стандартных флуоресцентных оптических режимов микроскопии, таких как кальциевый имиджинг.
- 3. Совмещение флуоресцентного кальциевого имиджинга с голографическими фазовыми измерениями позволяет установить наличие корреляции динамики кальциевой активности и изменений оптической разности хода в живых нейрональных культурах. Одиночные кальциевые осцилляции в нативном состоянии культуры соответствуют изменениям оптической разности хода в клетках с периодом порядка минут. Нейромодулятор 30-60 вызывает осцилляции ллительностью OT С И сопоставимые квазипериодические изменения оптической разности хода в клетках. Гипоксия приводит к появлению комплексных кальциевых осцилляций длительностью порядка 100 с и периодичности колебаний оптической длины пути сквозь клетки 10-15 секунд.
- 4. Комплементарное использование цифровой внеосевой голографической и локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM, в том числе в лазерном сканирующем режиме, позволяет выявить изменения оптической
длины пути клеточных культур и субклеточную структуру со сверхвысоким пространственным разрешением. Применение алгоритма обработки данных микроскопии сверхвысокого разрешения на основе оптических флуктуаций SOFI 2 порядка повышает поперечное разрешение по сравнению с дифракционным пределом в 1,48±0,22 раза, SOFI 4 порядка в 2,02±0,23, SOFI 6 порядка в 2,46±0,27, SOFI 8 порядка в 3,03±0,39 раза, что соответствует теоретическим оценкам. Точность измерений OPX составляет 20 ± 3 нм.

5. Существует оптимальная мощность для реализации алгоритма локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM, зависящая от концентрации красителя, сечения поглощения флуорофора, длины волны и площади пучка возбуждения, квантового выхода, числовой апертуры и частоты регистрации сигнала. В широкопольном режиме сбора данных для коммерческих флуорофоров оптимальная мощность излучения составляет: для Alexa Fluor 647 – 11,7 мВт, для Cy3 – 130мВт, для DyLight 405 – 58,9 мВт.

Достоверность полученных работе научных результатов В И выводов обусловлена: использованием широко применяемых на практике методов цифровой аналоговой голографии, голографической интерферометрии, И флуоресцентной микроскопии и математического моделирования; корректностью применяемых численных алгоритмов, методов постобработки голограмм и интерферограмм И серий флуоресцентных изображений; корректностью натурных экспериментов; постановки И численных соответствием экспериментальных результатов, полученных разными методами, а также их соответствием теоретическим результатам выводам И математического моделирования.

Апробация материалов диссертации проводилась на 32 научных конференциях, в том числе на 14 конференциях международного уровня, на 5 конференциях всероссийского уровня и на 13 конференциях регионального уровня.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доценту Захарову Ю.Н. за постановку задач, ценные указания и обсуждение результатов, а также за помощь и постоянную поддержку, оказанные при подготовке диссертации.

Автор признателен своим коллегам Муравьевой М.С., Рыбникову А.И. и Кулагину Ф.А. за помощь в проведении экспериментов и участие в обсуждении результатов, относящихся к первой и второй главам.

Глава 1. Теоретическое исследование предельно достижимых параметров голографической и флуоресцентной микроскопии

В данной главе представлены результаты теоретического сравнения аналоговой и цифровой голографии, описаны границы их применимости. Проведена оценка влияния разрешающей способности цифровых матриц на цифровых восстановление голограмм И представлен подход расчёта необходимого угла схождения при внеосевой цифровой голографии с учетом параметров регистрирующих элементов. Показаны результаты работы алгоритма восстановления цифровых внеосевых голограмм на синтезированных объектах. Для BaLM метода впервые теоретически выведена формула для определения оптимальной мощности возбуждения флуоресценции. Выполнены расчеты оптимальной мощности возбуждения для используемых в опытах коммерческих флуорофоров Alexa Fluor 647, Cy3 и DyLight 405.

Приведены результаты тестирования SHRImP алгоритма на искусственных видеофрагментах с отсутствием шума, при наличии шума, а так же несколько случаев симуляции колебаний элементов установки для короткой и многократной экспозиции целью устойчивость алгоритма к механической С выявить Ha нестабильности. основании проведенного анализа сделан вывод 0 возможности применения алгоритма, как при высоких, так и при низких отношениях сигнал/шум (5 и 10). Рассмотрены случи многократной экспозиции с разными частотами и амплитудами колебания элементов установки при частоте кадров 1 Гц. Случаи соответствуют условиям со временем экспозиции много

меньшим периода колебаний элементов установки и временем между первой и последней экспозициями большим периода колебаний элементов установки.

Приведены результаты работы алгоритма SOFI на модели, описывающей флуоресценцию точечных источников на различных расстояниях между их центрами, заданными в диапазоне от одного до трех диаметров флуорофора с шагом 1/6 этого диаметра.

Основные результаты главы опубликованы в работе [А6], [А14], [А15], [А16], [А18], [А20], [А32], [А34], [А38].

1.1. Теоретическое сравнение аналоговой и цифровой голографии.

Голограмма, В общем смысле, представляет собой результирующую интенсивность при интерференции двух волн и содержит информацию об их разности фаз, при условии, ЧТО они не поляризованы BO взаимно перпендикулярных направлениях.

Процесс регистрации голограмм требует высокой точности и сопряжен с рядом проблем. Прежде всего, при записи голограмм необходимо обеспечить высокую механическую стабильность и защиту оптической схемы от колебаний. Малейшие вибрации могут сделать интерференционную картину заметно менее четкой или нарушить ее вообще. Существует несколько значительных различий между аналоговой и цифровой голографией, их потенциальными возможностями и классических голограмм, Так при регистрации применимостью. каждая голограмма или серия голограмм, снятая за один раз, требует отдельной фотопластинки. Фотопластинка, перед применением в оптической схеме, должна быть подготовлена и обрезана до требуемых габаритов. Для получения аналоговых голограмм требуются процессы проявления и закрепления в химических растворах с соблюдением точного времени. Очевидно, что цифровая голография фотохимическими процессами не связана С И позволяет регистрировать голограммы со скоростью, на два порядка выше, чем при регистрации аналоговой голограммы. Также, из-за большей матрицы требуется меньшие время экспозиции, либо мощность используемого лазера, что принципиально важно при работе с живыми клеточными культурами. Меньшее время экспозиции, соответственно, упрощает требования к механической стабильности оптической схемы. Цифровая матрица также не требует постоянной настройки, устанавливается в оптическую схему, сохраняет свое положение и не требует замены. Цифровой подход предоставляет широкие возможности варьирования обработки без необходимости перестройки оптической схемы.

К недостаткам цифровой регистрации относится значительно меньшая разрешающая способность, связанная с технологией производства цифровых матриц, не позволяющей пока получить расстояние между светочувствительными элементами менее микрометра. Цифровая голография зависит и от размеров матрицы и размеров самих пикселей. У аналоговых голограмм, записанных на галогенсеребряные фотопластинки такого ограничения практически нет. Эта особенность определяет информационную емкость голограмм – отношение поля зрения или размера получаемого изображения к минимально разрешимому элементу. У аналоговой голографии это значение значительно выше, то есть информация в ней записывается плотнее. Обычно, для регистрации цифровых голограмм используются CCD или CMOS матрицы. Размер пикселей в таких устройствах колеблется около нескольких микрометров, а количество пикселей составляет порядка 10⁶. Эти параметры ограничивают пространственную частоту голограммной структуры при записи и сказываются на угловом размере поля зрения, составляющим в случае регистрации голограммы светочувствительной матрицей несколько градусов. В то время как аналоговая голограмма может зарегистрировать почти 180°.

1.2. Оценка влияния разрешающей способности цифровых матриц на восстановление цифровых голограмм.

При использовании внеосевой голографии, одним из важнейших параметров является угол схождения опорного и предметного пучков. Для оптимизации угла

41

схождения необходимо учитывать число элементов матрицы, приходящихся на период полос голограммной структуры. Период полос по сравнению с размером пиксела регистрирующей цифровой матрицы, должен быть таким, чтобы каждая полоса приходилась минимум на три регистрирующих пиксела, в противном случае, снижается качество восстановленного с голограммы изображения. Угол на разделение порядков при восстановлении схождения также влияет голограммы. Поскольку обработка осуществляется численным алгоритмом двойного Фурье-преобразования с фильтрацией в частотной плоскости, чтобы фильтрация не ограничивала разрешение восстановленного изображения, расхождение порядков должно быть не меньше максимальной пространственной частоты спектра объекта.

Применение объектива изменяет пространственные частоты объекта, регистрирующиеся матрицей. При рассмотрении синусоидального сигнала, без увеличения на один его период приходится n пикселей, а после увеличения в N раз, период сигнала также увеличится в N раз. После увеличения, n пикселей будут приходиться не на целый период сигнала, а на расстояние в N раз меньшее, следовательно частота дискретизации сигнала увеличивается.

Ограниченный физический размер матрицы, а также дискретизация меняют свойства регистрируемого изображения. Пусть размер матрицы $X_0 \ge Y_0$, с количеством пикселей $N_x \ge N_y$. Тогда размер пикселя равен $\delta x_0 \ge \delta y_0 = (X_0/N_x) \ge (Y_0/N_y)$. Пусть чувствительная зона пикселя равна $\gamma_x \delta x_0 \ge \gamma_y \delta y_0$, где γ – коэффициент заполнения.

Тогда функция, дискретизующая интенсивность голограммы, будет записываться следующим образом:

$$P(x_0, y_0) = \operatorname{rect}\left(\frac{x_0}{X_0}\right) \left[\amalg_{\delta x_0}(x_0) \circ \operatorname{rect}\left(\frac{x_0}{\gamma \delta x_0}\right) \right] \operatorname{rect}\left(\frac{y_0}{Y_0}\right) * \left[\amalg_{\delta y_0}(y_0) \circ \operatorname{rect}\left(\frac{y_0}{\gamma \delta y_0}\right) \right],$$
(1.1)

где rect(x) – функция прямоугольного окна; $\coprod_{\delta x}(x)$ – бесконечная последовательность б-функций, отстоящих друг от друга на δx , • - обозначает операцию свертки.

42

Распределение интенсивности голограммы дискретизируется светочувствительной матрицей и поступает на обработку в компьютер в виде двумерного массива чисел, соответствующего значениям интенсивностей, зарегистрированных пикселами. Разрешающая способность цифровых матриц ограничивает пространственные частоты. По теореме Котельникова-Шеннона для точного восстановления сигнала по его дискретизованной форме максимальная частота в нем не может превышать половину частоты дискретизации. При интерференции двух плоских волн с длиной волны λ , период интерференционных полос *d*, связан с углом между направлениями распространения волн 20:

$$2d\sin\theta = \lambda. \tag{1.2}$$

Налагая ограничения на величину d (1.2) через максимальную пространственную частоту f_{max} и несущую частоту f_s :

$$f_{max} = \frac{1}{d}; \tag{1.3}$$

$$f_{max} = \frac{f_s}{2}.\tag{1.4}$$

Получаем:

$$\sin \theta = \frac{1}{4} \lambda f_s. \tag{1.5}$$

Очевидно, что угол между опорным и предметным пучками в формуле (1.2) принимает максимальное значение. Выразим это значение:

$$\theta_{max} = \arcsin\left(\frac{\lambda f_s}{4}\right).$$
(1.6)

Таким образом, угол между интерферирующими пучками не может превышать значения, получающегося по формуле (1.6).

Проведен теоретический расчет оптимального угла схождения пучков для внеосевой голографии. Для расчетов были взяты параметры используемой для практической реализации в экспериментах бескорпусной камеры VEI-535 (ЭВС, Россия) светочувсивительным элементом КМОП-матрицей OV5610 co (OmniVision, США) формата 1/1.8 дюйма с 2592х1944пикселей и с размером Расстояние пиксела 2.2x2.2 мкм. между пикселями является периодом дискретизации. Используя формулу (1.6), получаем, что максимальный угол между опорным и предметным пучком в схеме получения внеосевых голограммбудет:

$$\theta_{max} = \arcsin\left(\frac{\lambda f_s}{4}\right) = (4,12 \pm 0,04)^{\circ}. \tag{1.7}$$

Для отладки было разработано вспомогательное приложение, позволяющее синтезировать цифровые голограммы с заданными углами схождения опорного и объектного пучков. Результаты моделирования подтвердили полученное значение, которое в дальнейшем было использовано для конструирования оптической схемы.

1.3. Алгоритм обработки цифровых внеосевых голограмм

Для восстановления классической аналоговой голограммы ее требуется осветить опорным пучком. В результате дифракции опорного пучка на голограммной структуре восстановится исходное изображение предмета. При восстановлении цифровой голограммы требуется провести рассчет дифракции, то есть осуществить преобразование голограммы, что даст восстановление комплексной амплитуды волны.

Рассмотрим формирование голограммы сфокусированного изображения. Пусть от объекта на плоскость фоторегистратора падает излучение с комплексной амплитудой O(x,y), где O - комплексная функция координат. Плоская опорная волны с комплексной амплитудой R(y) образует угол θ с предметной:

$$R(y) = R_0 \exp(-2\pi i \eta y), \qquad (1.8)$$

где η – пространственная частота, соответствующая углу θ.

При этом связь угла θ и пространственной частоты задается следующей формулой:

$$\eta = \frac{\sin\theta}{\lambda}.\tag{1.9}$$

Запишем интенсивность получающейся интерференционной картины:

$$I = R_0^2 + |O|^2 + OR_0 \exp(2\pi i \eta y) + O^* R_0 \exp(-2\pi i \eta y).$$
(1.10)

При линейной записи (1.10) описывает голограммную структуру.

Вычислим преобразование Фурье от этого выражения:

 $F(I) = F[R_0^2 + |O|^2] + F[OR_0 \exp(2\pi i \eta y)] + F[O^*R_0 \exp(-2\pi i \eta y)],$ (1.11) где символом F[] обозначена операция преобразования Фурье. При вычислении выражения (1.11) использовано свойство линейности преобразования Фурье. Далее, распишем слагаемые в правой части (1.11):

$$F[R_0^2 + |O|^2] = (R_0^2 + |O|^2) \otimes \delta(0);$$
(1.11a)

$$F[OR_0 \exp(2\pi i \eta y)] = F[O]R_0 \otimes \delta(f_y - \eta); \qquad (1.116)$$

$$F[O^*R_0 \exp(-2\pi i\eta y)] = F[O^*]R_0 \otimes \delta(f_y + \eta).$$
(1.11b)

Фурье-образ интенсивности голограммы состоит из трех отдельно стоящих компонент. Путем отсечения фурье-образов (1.11а) и (1.11в) и последующего обратного фурье-преобразования достигается возможность восстанавливать комплексную амплитуду волны в плоскости фокусировки изображения. Таким образом, последовательность действий в алгоритме такова:

1) Получение голограммы как двумерного распределения интенсивности;

2) Осуществление Фурье-преобразования над двумерным распределением интенсивности в плоскости голограммы;

3) Фильтрация в частотной области путем вырезания нужного порядка дифракции;

4)Оригинальной отлиичтельной особенностью предложенного алгоритма является сдвиг вырезанного участка спектра в начало координат для устранения дополнительного линейного фазового набега;

5) Обратное преобразование Фурье.

Согласно свойствам преобразования Фурье, сдвиг сигнала в частотной области приводит к линейному фазовому набегу сигнала. При получении фазового распределения этот факт является существенным. Согласно (1.11б), спектр комплексной амплитуды объектной волны имеет сдвиг в частотной плоскости, связанный с углом схождения. Соответственно, этот сдвиг даст линейный набег фазы и исказит ее. Следовательно, для фиксирования изменений фазового набега, связанных с физиологическими процессами, происходящими в клеточной структуре, необходимо устранять этот фазовый набег. Для устранения фазового набега необходимо переместить спектр комплексной амплитуды объектной волны в начало координат.

Метод двойного Фурье преобразования позволяет получить распределение амплитуд и фаз объектной волны в плоскости фокусировки линзы, а дальнейший рассчет дифракции позволит рассчитать результат в другой плоскости, благодаря регулярности функции.

При расчету дифракции на объекте с амплитудным пропусканием t(x,y), которое можно представить в виде ряда или интеграла Фурье:

$$t(x,y) = \sum_{l} \sum_{k} t_{lk} \exp(-2\pi i \xi_l x) \exp(-2\pi i \eta_k y)$$
(1.12)

$$t(x, y) = \iint T(\xi, \eta) \exp(-2\pi i \xi x) \exp(-2\pi i \eta y) d\xi d\eta$$
(1.13)

В случае, если плоская волна с амплитудой A_1 , распространяющаяся в положительном направлении оси z, падает на помещенный в плоскости z = 0 объект с амплитудным пропусканием (1.13), то спектр $S_2(\xi, \eta)$ комплексной амплитуды волны в плоскости z>0 имеет вид [75]:

$$S_{2}(\xi,\eta) = A_{1}T(\xi,\eta)\exp\left(-i\frac{2\pi z}{\lambda}(1-\lambda^{2}\xi^{2}-\lambda^{2}\eta^{2})^{1/2}\right).$$
 (1.14)

Амплитуда прошедшей волны <u>в плоскости *z*</u> представляет собой преобразование Фурье от спектра:

$$\tilde{\vec{A}}_{2}(x, y, z) = \tilde{\vec{A}}_{1} \iint \frac{T(\xi, \eta) \exp\left(-i\frac{2\pi z}{\lambda} (1 - \lambda^{2}\xi^{2} - \lambda^{2}\eta^{2})^{1/2}\right) \times}{\exp(-2\pi i\xi x) \exp(-2\pi i\eta y) d\xi d\eta}.$$
(1.15)

Задачу о дифракции можно решить и посредством применения интеграла Френеля-Кирхгофа. Решение в этом случае формулируется так: если плоская волна с амплитудой A_1 , распространяющаяся в положительном направлении оси z, падает на предмет с амплитудным пропусканием $t(x_1, y_1)$, помещенный в плоскости z = 0, то комплексная амплитуда света $A_2(x_2, y_2, z_2)$ имеет вид:

$$A_{2}(x_{2}, y_{2}, z_{2}) = \frac{iA_{1}}{\lambda} \int_{x_{1}=-\infty}^{+\infty} \int_{x_{2}=-\infty}^{+\infty} t(x_{1}, y_{1}) \times \frac{\exp\left\{-i\frac{2\pi}{\lambda}[z_{2}^{2}+(x_{2}-x_{1})^{2}+(y_{2}-y_{1})^{2}]^{1/2}\right\}}{[z_{2}^{2}+(x_{2}-x_{1})^{2}+(y_{2}-y_{1})^{2}]^{1/2}} \cos\theta \, dx_{1} dy_{1}.$$
(1.16)

Через θ обозначен угол между положительным направлением оси z и отрезком прямой, соединяющим точки ($x_1, y_1, 0$) и (x_2, y_2, z_2). Формулы (1.15) и (1.16) эквивалентны в параксиальном приближении [114]. Рассмотрим приближение формулы (1.16).

Если объект находится достаточно далеко, так, что лучи, исходящие от объекта практически параллельны оси *z*, то:

$$|x_2 - x_1| \ll z_2; |y_2 - y_1| \ll z_2.$$
(1.17)

Это позволяет упростить интеграл (1.16) до следующего вида путем разложения степенной функции под интегралом в ряд и отбрасыванием членов второго порядка и выше:

$$A_{2}(x_{2}, y_{2}, z_{2}) = \frac{iA_{1}}{\lambda d} \int_{x_{1} = -\infty}^{+\infty} \int_{x_{2} = -\infty}^{+\infty} t(x_{1}, y_{1}) \times \exp\left\{-i\frac{\pi}{\lambda d}\left[(x_{2} - x_{1})^{2} + (y_{2} - y_{1})^{2}\right]\right\} dx_{1} dy_{1}.$$
(1.18)

Формула (1.18) описывает дифракцию Френеля, или преобразование Френеля. Для численнного рассчета дифракции применялся метод углового спектра (Angular Spectrum) [115]. Исходное распределение комплексной амплитуды рассматривается в плоскости z=0. Рассмотрим поле как суперпозицию плоских волн с различными волновыми векторами:

$$S(\xi,\eta) = \iint \tilde{\vec{A}}_1 t(x,y) \exp(-2\pi i \xi x) \exp(-2\pi i \eta y) \, dx \, dy \qquad (1.19)$$

Тогда для каждой из этих волн применима формула (1.14). Следовательно, для рассчета дифракции произвольной волны, необходимо выполнить преобразование Фурье, воспользоваться формулой (1.14), записанной для частотного пространства, и выполнить обратное преобразование Фурье.

Соответственно, для рассчета дифракции на расстоянии z от плоскости распределения комплексной амплитуды, необходимо:

$$E_A(x, y, z) = F^{-1} \left\{ F[E_0] \exp\left[i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}z\right] circ(\frac{\sqrt{k_x^2 + k_y^2}}{k}) \right\},$$
(1.20)

где k_x, k_y – проекции волнового вектора на рассматриваемую плоскость; F[] – операция выполненеия преобразования Фурье; circ(x) – функция, равная нулю, если аргумент превышает 1, и равная единице в противном случае. Функция circ(x) необходима для того, чтобы показатель экспоненты в (1.20) оставался мнимым.

Для устранения искажений, вносимых оптическими элементами установки применяется цифровая интерферометрия. Для этого необходимо регистрировать голограммы объекта и без объекта, полученные при идентичных условиях. Для получения ОДП луча, проходящего через объект, необходимо вычислить разность фаз этих двух волн.

Для рассчета разности фаз рассмотрим распределения комплекных амплитуд двух объектных волн, записанных на одной и той же длине волны, для одинаковых размеров поля и одинаковых параметров дискретизации. Оба распределения представляют собой двумерное распределение коплексных чисел на одной и той же сетке.

Можно вычислить распределение фазы для каждого изображения. Для этого используется формула связи фазы комплексного числа и его мнимой и реальной частей:

$$\varphi = \operatorname{arctg}\left(\frac{\operatorname{im}}{r}\right),\tag{1.21}$$

где φ – фаза комплексного числа; *r*, *im* – реальная и мнимая части комплексного числа. Тогда разность фаз двух комплексных чисел равна:

$$\Delta \varphi_{1,2} = \operatorname{arctg}\left(\frac{im_1}{r_1}\right) - \operatorname{arctg}\left(\frac{im_2}{r_2}\right) \tag{1.22}$$

Формула (1.22) требует двукратного вычисления арктангенса. Если учесть, что используемые при реализации функции вычисления арктангенса возвращают

главное значение функции в пределах (- π , π), то можно сделать вывод, что эта формула мало пригодна для вычисления разности фаз, особенно для количества элементов, по порядку величины равному 10⁶.

Другой подход к вычислению разности фаз состоит в использовании следующего преоразования. Вычислим арктангенс от тангенса этой величины, что с точки зрения математики не изменит результат:

$$\Delta \varphi_{1,2} = \varphi_1 - \varphi_2 = \operatorname{arctg} \left(tg(\varphi_1 - \varphi_2) \right). \tag{1.23}$$

Записывая тангенс разности через тангенсы вычитаемого и уменьшаемого, получаем:

$$\Delta\varphi_{1,2} = \operatorname{arctg}\left(\frac{tg\varphi_1 - tg\varphi_2}{1 + tg\varphi_1 tg\varphi_2}\right) = \operatorname{arctg}\left(\frac{im_1r_2 - im_2r_1}{im_1im_2 + r_1r_2}\right).$$
(1.24)

Данная формула позволяет использовать однократное вычисление арктангенса.

Использование формулы (1.24) позволяет получить значение фазы, лежащее в интервале (- π ; π), что связанно с вычислением значения арктангенса по основному значению (по ветке, проходящей через начало координат). Однако фазовый набег может быть не ограничен какими-либо интервалами и иметь любое значение. Данная проблема хорошо известна, ее решение называется сшивкой фазы (unwrapping).

1.4 Программа для восстановления цифровых голограмм.

Реализована программа по восстановлению цифровых голограмм, в основе алгоритма которой лежат прямое и обратное преобразования Фурье. Тестирование программы проводилось, основываясь на свойствах преобразования Фурье. Созданы объекты для тестирования. Для проверки работоспособности программы, данные тест-объекты регистрировались на цифровую матрицу без опорного пучка, затем добавлялась референтная волна, и снова делалась запись изображения. Фактически, сначала записывалась фотография, а затем голограмма. В результате, фотография и восстановленное с голограммы интенсивности изображения должны совпадать.

Реализовано два эксперимента:

- фурье-образ известного простого объекта должен воспроизводиться программой как можно точнее;

- прямое и обратное преобразования Фурье в отсутствии фильтрации должны давать в итоге исходное изображение. Оба теста программа прошла. Результаты тестирования приведены на рисунках:



Рис.1.1. Простые тест-изображения для проверки правильности работы программы до применения Фурье-преобразования слева и после - справа.







Рис.1.2. Тест на взаимную компенсацию прямого и обратного Фурье-преобразований. Слева исходное изображение; Фурье-преобразование - центр; справа – обратное Фурье-преобразование центрального изображения.

Было создано приложение, позволяющее проводить расчет дифракции. При расчете дифракции применялась формула (1.20). Результаты дифракции на различных расстояниях показаны на рисунке 1.3.



Рис. 1.3. Расчет дифракции для изображения 256 х 256 пикселей; размер пикселя 2,2 мкм; длина волны 633 нм для следующих расстояний: 10,30,50,100,200 мкм.

1.5 Теоретическая оценка предельно достижимых параметров цифровой внеосевой голографии

Для цифровой внеосевой голографии проведена теоретическая оценка предельно достижимого значения пространственного разрешения в продольном и поперечном направлениях, а также глубины поля зрения и чувствительности определения набега фазы.

Пространственное разрешение голографической микроскопии находится на уровне используемой оптической схемы, а высокая чувствительность к фазовому набегу и оптической разности хода является главным преимуществом метода для количественных измерений.

Поперечное пространственное разрешение при регистрации на цифровую матрицу, определяется характеристиками линз, длинной волны лазера, на которой производится запись голограммы и пикселами цифровой матрицы.

Теоретический расчет приведен для длины волны 650нм. Числовую апертуру следует брать для объектива, который будет использоваться в микроскопе. В проведенном тестовом эксперименте это водно-иммерсионный объектив Achroplan (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и числовой апертурой NA равной 0.8. Тогда предельное теоретическое разрешение в поперечном направлении будет:

$$\Delta x_{min} = \frac{\lambda}{2NA} = 406 \, \text{hm} \,. \tag{1.25}$$

Для расчета более актуальной для голографии чувствительности определения фазы и соответствующей ей ОДП Δl для полученной при восстановлении голограммы разности фаз:

$$\Delta \ell = \lambda \Delta \varphi / 2\pi. \tag{1.26}$$

Поскольку для регистрации интерференции опорной и предметной волн используется цифровая матрица, то при оцифровывании будут налагаться ограничения. У выбранной цифровой матрицы сигнал регистрируется в восьми битном формате. Соответственно динамический диапазон имеет 256 градаций. Изменение фазы в пределах меньших одной интерференционной полосы, находящееся в диапазоне от $-\pi$ до $+\pi$, будут зафиксированы с точностью 1/256. Тогда точность будет равна:

$$Tочность = \frac{\Phi aзa}{Koличество} = \frac{2\pi}{256} = 0.008\pi .$$
(1.27)
градаций

Сейчас широко применяются цифровые матрицы с 12 и 16 битной глубиной, что соответственно могло бы обеспечить точность 0,0005π и 0,00003π, однако для адекватной работы алгоритма восстановления и разворачивания фазы в прямом измерении фазового набега сложно оптимально использовать весь имеющийся динамический диапазон. Для интерферометрического сравнения изменения фазового набега, являющегося малой величиной, при использовании 12 и 16 битных камер, действительно можно добиться соответствующей чувствительности. Соответственно:

$$\Delta \ell = \frac{650 \mu M * 0,008\pi}{2\pi} \approx 3\mu M.$$
(1.28)

Важно учесть, что при полученных значения разрешения большую роль будет играть и глубина поля зрения. Глубина поля зрения, для классической изображающей оптики, вычисляется по формуле:

$$\Delta Z = \frac{(\Delta x)^2}{\lambda}, \qquad (1.29)$$

где Δx - поперечное разрешение.

Таким образом, при выбранной длине волны света 650нм глубина поля зрения равна:

$$\Delta Z = \frac{(406\,\mu_M)^2}{650\,\mu_M} = 253\,\mu_M. \tag{1.30}$$

По сравнению с пространственными размерами средних клеток (около 10 микрон), такая глубина зрения была бы не совсем достаточной. А использование голографического подхода, дает теоретически бесконечную глубину поля зрения. Это, несомненно, является еще одним ключевым преимуществом для поставленной задачи расширения стандартных функций микроскопа получением трехмерной информации об объекте.

Для аналоговой регистрации использовались фотопластинки ПФГ-01 (Славич, Россия), с дифракционной эффективностью (η) не менее 40% и на пространственной частоте 1000 мм⁻¹ и голографической чувствительностью (H) 1 Дж/м² при максимальной дифракционной эффективности. Граница области спектральной сенсибилизации не более 650нм с максимумом на 625±10нм и толщиной фотослоя 7±1мкм, позволяющей регистрировать внеосевые голограмм вплоть до случая встречных пучков.

1.6 Расчет оптимальной мощности возбуждения флуоресценции для реализации BaLM метода

Ранее в работах с методом BaLM не было приведено количественной оценки необходимых параметров возбуждения ДЛЯ достижения максимального разрешения при минимальных временных затратах. В диссертации предложен метод вычисления мощности спектральной линии возбуждения. Для этого участвующих необходимо оценить количество молекул флуорофора. В

дифракционное пятно, из которого регистрируется вся информация, попадет флуоресценция от молекул, находящихся в дифракционном объеме (см. рис.1.4).



Рис. 1.4. Поперечное сечение объема образца, в котором возбуждается флуоресценция.

Проведя интегрирование по поверхности в пределах от 0 до z_R можно вычислить дифракционный объем V_d , в котором находятся излучающие молекулы, зависящий от длины волны возбуждения λ , числовой апертуры объектива *NA*.

Зная концентрацию n флуорофора в образце, можно подсчитать количество молекул N в объеме возбуждения. Мощность возбуждающего света P связана с количеством фотонов N_{γ} , излучаемых за время t, постоянной Планка h и частотой источника света v.

За время *t* между двумя последующими кадрами записи с частотой *f*, из источника вылетит $N_{\gamma f}^{\Sigma}$ фотонов. Через фокальный объем V_d пролетит $N_{\gamma d}$ фотонов, пропорциональное отношению площадей дифракционного пятна и площади лазерного пучка *S* после прохождения коллиматора. Из всех фотонов возбуждения, пролетающих через объем, молекулами флуорофора поглотиться лишь их часть. Соответственно необходимо оценить вероятность поглощения P_{σ} , зависящую от сечения поглощения флуорофора σ .

Тогда для выполнения главного условия для BaLM метода, чтобы в дифракционном пятне возбуждалась одна молекула флуорофора, необходимо выполнение условия, чтобы обратная величина квантового выхода флуорофора θ_F равнялась произведению вероятности поглощения на количество фотонов возбуждения, пролетающих через дифракционный объем. Из представленных соображений можно вывести формулу для необходимой мощности возбуждения. Для исключения перекрытия областей дифракционных пятен флуорофоров, необходимо ввести дополнительное ограничение на область от внешнего края ФРТ пятна флуорофора, с расстоянием равным диаметру. Дифракционный объем можно найти по формуле :

$$V_d = 2\int_0^{z_R} \pi W^2(z) \, dz = 2\pi W_0^2 \int_0^{z_R} \left[1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2\right] dz = 2\pi W_0^2 \left[z_R + \frac{1}{3}\frac{z_R^3}{z_R^2}\right] =$$

$$\frac{8\pi W_0^2 z_R}{3} = \frac{8\pi}{3} \left(\frac{\lambda}{2NA}\right)^2 \frac{\pi\lambda}{(NA)^2} = \frac{2}{3} \frac{\pi^2 \lambda^3}{(NA)^4}, \qquad (1.31)$$

где *V_d* – объем, в котором находятся излучающие молекулы, λ - длина волны возбуждения, NA- числовая апертура объектива.

Тогда, зная концентрацию n флуорофора в образце, можно подсчитать количество молекул N в объеме возбуждения по формуле:

$$N = V_d * n . \tag{1.32}$$

Мощность возбуждающего света Р будет равна:

$$P = \frac{N_{\gamma} * h\nu}{t},\tag{1.33}$$

где N_{γ} - количество фотонов, излучаемое за время *t*, *h* -постоянная Планка, ν – частота источника света.

Тогда за время t между двумя последующими кадрами записи с частотой f, из источника вылетит $N_{\gamma f}^{\Sigma}$ фотонов:

$$N_{\gamma f}^{\Sigma} = \frac{P}{h\nu * f} \,. \tag{1.34}$$

Через фокальный объем V_d пролетит $N_{\gamma d}$ фотонов:

$$N_{\gamma d} = \frac{P}{fhv} * \frac{\pi \left(\frac{\lambda}{2NA}\right)^2}{S},\tag{1.35}$$

где *S* – площадь лазерного пучка после прохождения коллиматора.

Из всех фотонов возбуждения, пролетающих через объем, молекулами флуорофора поглотится лишь их часть. Оценим вероятность поглощения P_{σ} :

$$P_{\sigma} = \frac{\sigma * nV_d}{\pi \left(\frac{\lambda}{2NA}\right)^2},\tag{1.36}$$

где σ – эффективное сечение поглощения флуорофора.

Тогда для выполнения главного условия для BaLM метода - чтобы в дифракционном пятне возбуждалась одна молекула флуорофора, необходимо выполнение условия:

$$\frac{1}{\theta_F} = P_\sigma * N_{\gamma d},\tag{1.37}$$

где θ_F – квантовый выход флуорофора.

Подставим в (1.37) выражения для $N_{\gamma d}$ и P_{σ} из формул (1.35) и (1.36):

$$\frac{1}{\theta_F} = \frac{\sigma * nV_d}{\pi \left(\frac{\lambda}{2NA}\right)^2} * \frac{P}{fh\nu} * \frac{\pi \left(\frac{\lambda}{2NA}\right)^2}{S} \quad . \tag{1.38}$$

Из уравнения (1.38) выразим мощность *P*, представив $\nu = \frac{c}{\lambda}$:

$$P = \frac{fh vS}{\theta_F \sigma n \lambda V_d} = \frac{3 fh c SNA^4}{2\theta_F \sigma n \lambda^4 \pi^2}.$$
 (1.39)

Необходимо учесть отсутствие перекрытия ФРТ на регистрируемых кадрах временной серии с распределением флуоресценции. Для этого вычислим площадь S_0 с радиусом R, вокруг ФРТ с диаметром d и радиусом r, в которой должен отсутствовать сигнал от других флуорофоров:

$$S_0 = \pi \left(R^2 - r^2 \right) = \pi \left[\left(\frac{3}{2} d \right)^2 - \left(\frac{1}{2} d \right)^2 \right] = 2\pi d^2.$$
(1.40)

Соответственно, мощность возбуждения должна быть уменьшена пропорционально отношению площадей ФРТ к площади области отсутствия перекрытия, которое составляет 8 раз.

Таким образом, оптимальная мощность возбуждения составит:

$$P_{onm} = \frac{3 fhcSNA^4}{16\theta_F \sigma n \lambda^4 \pi^2}.$$
(1.41)

Пользуясь выведенной формулой можно в каждом эксперименте подобрать оптимальную мощность возбуждения. Параметры θ_F , λ и σ зависят от

выбранного флуорофора. Концентрация *n* контролируется во время окраски препарата. Величина числовой апертуры *NA* зависит от выбранного объектива. А значение площади пучка *S* определяется используемым коллиматором для расширения лазерного пучка. От цифровой камеры вклад внесет частота съемки кадров *f*. Таким образом, можно вычислить мощность лазерной линии, необходимой для выполнения условий корректной работы флуоресцентного анализа BaLM для получения поперечного сверхвысокого разрешения.

Выполнены расчеты оптимальной мощности возбуждения для используемых в опытах коммерческих флуорофоров в широкопольном режиме получения данных для Alexa Fluor 647, Cy3 и DyLight 405 соответственно.

Использовались следующие значения параметров возбуждения и приема флуоресценции: $h = 6,6*10^{-34}$ Джс (кг[·]м²/с); $c = 3*10^8$ м/с; $S = \frac{\pi d^2}{4} = \frac{3,14 \cdot 7^2 \cdot 10^{-6}}{4} = 38,5 \cdot 10^{-6}$ м²

При использовании объектива Plan Apochromat 63х/1.4 (Carl Zeiss, Германия): $NA^4 = 3,84$. При использовании объектива Achroplan 40х/0.8 (Carl Zeiss, Германия): $NA^4 = 0,41$. При применении камеры Flea3 (Point Grey, Канада): *f*=20 кадров/с. При применении камеры VEI-435 (ЭВС, Россия): *f*=10 кадров/с. Для флуорофора Alexa Fluor 647: $\theta_F = 0,33$; *n*= 2 мкг/мл; $\sigma = 1*10^{-15}$ см²; $\lambda = 633$ нм. Для флуорофора Cy3: $\theta_F = 0,31$; *n*= 4.753 мкг/мл; $\lambda = 550$ нм $\sigma = 5.56*10^{-16}$ см². Для флуорофора DyLight 405: $\theta_F = 0,54$; *n*= 1.75 мкг/мл;

 σ =1.04*10⁻¹⁶ см²; λ = 405 нм.

Для широкопольного режима с регистрацией на камеру Flea3 (Point Grey, Kанада) и объективом Plan Apochromat 63х/1.4 (Carl Zeiss, Германия) для флуорофора Alexa Fluor 647: 11,7 мВт; для Су3:130мВт; для DyLight 405: 58,9 мВт.

Для широкопольного режима с камерой VEI-435 (ЭВС, Россия) и объективом Achroplan 40x/0.8 (Carl Zeiss, Германия) для флуорофора Alexa Fluor 647: 0,62 мВт.

1.7. Моделирование влияния шума на работу SHRImP алгоритма

Алгоритм SHRImP основан на анализе гашения или появления флуоресценции от одной светящейся молекулы. Общий принцип состоит в поочередном последовательном получении изображений путем вычитания соседних кадров временной серии. На следующем шаге усредняются «пустые» изображения и из изображения со светящимися флуорофором вычитается усредненное значение. После, для устранения шума проводится присвоение нулю интенсивности в пикселах ниже определенного динамически выбираемого порога. Далее находятся центры свечения, как центры масс. В случае дискретного сигнала, интегрирование сводится к интегрированию по пикселю (с постоянной массой) и последующему их суммированию. Если поставить начало координат в самый яркий пиксель точки (по сути, её примерный центр) то можем найти поправку к центру масс по формуле:

$$xi = \frac{\sum_{i=0}^{i=i+1} (2i+1)I_i[x] - \sum_{i=0}^{i=i-1} (2i-1)I_i[x]}{2\sum_j I_j[x]}$$
(1.42)

$$yi = \frac{\sum_{i=0}^{i=i+1} (2i+1)I_i[y] - \sum_{i=0}^{i=i-1} (2i-1)I_i[y]}{2\sum_j I_j[y]},$$

где $I_i[x]$ - интенсивность всех пикселей по у, при постоянном х, находящихся на расстоянии *i*-пикселей от начала координат, $I_i[y]$ - интенсивность все пикселей по *x*, при постоянном *y*, находящихся на расстоянии *i*-пикселей от начала координат.

Тогда координата центра будет рассчитываться по формуле:

$$xs = x - 0.5 + xi;$$

$$ys = y - 0.5 + yi.$$
(1.43)

Для переноса на новое изображение (с более высоким разрешением) необходимо пересчитать координаты цента по формуле:

$$xs' = xs * \alpha;$$

$$ys' = ys * \beta,$$
(1.44)

ГДе
$$\alpha = \frac{result_image_width}{init_image_width}; \beta = \frac{result_image_height}{init_image_height}$$

На новом изображении ставится «точка», используя формулу для интенсивности:

$$I[x, y] = \eta e^{-((x - xs')^2 + (y - ys')^2)},$$
(1.45)

где η = новая интенсивность.

Для проверки предельных режимов работоспособности алгоритма были созданы тестовые видеофрагменты, на каждом кадре которых гаснет по одному флуорофору. Соответственно задан массив координат положений моделируемых молекул флуорофора. Создана серия изображений, на каждом из которых помещен гауссов купол шириной больше половины расстояния между заданными линиями, с координатами центра соответствующими паре координат из заданного массива. Первым тестовым объектом служил видео фрагмент размером 200х200 пикселей, состоящий из произвольно распределённых гауссовых куполов с шириной, равной ФРТ, в каждом кадре которого гаснет одна светящаяся точка, имитирующая флуорофор в образце. Происходит произвольное гашение их флуоресценции по одной на каждом кадре, и каждый кадр имеет шумовое значение 4, интенсивность точек задается формулой

$$p[x, y] = 40e^{\left(\frac{-((x-x[i])^2 + (y-y[i])^2)}{2}\right)}.$$
 (1.46)

Общее соотношение сигнал/шум составляет 10. На рисунке 1.5 слева приведен кадр из тестового фрагмента, а справа восстановленное изображение после обработки алгоритмом, где разрешение кадра составило 800х800 пикселей.



Рис1.5. Кадр из тестового моделированного фрагмента с разрешением 200х200 пикселей (слева); восстановленное изображение после обработки SHRImP алгоритмом с разрешением 800х800. Соотношение сигнал/шум равно 10.

На областях 1 и 2, обозначенных стрелками, на тестовом изображении невозможно точно различить структуру светящихся точек и их количество. Область 1 представлена в виде одной ФРТ, а область 2 в виде протяженной линии. После обработки становится возможным различить, что область 1 представляет собой три близко стоящие точки, а область 2 состоит из двух точек. Тестовый видеофрагмент позволил протестировать работоспособность реализованного SHRImP алгоритма.

На рисунке 1.6. приведены результаты обработки при значении соотношения сигнал/шум равном 5.



Рис 1.6. Кадр из тестового моделированного фрагмента с разрешением 200х200 пикселей (слева); восстановленное изображение после обработки SHRImP алгоритмом с разрешением 800х800. Соотношение сигнал/шум равно 5.

На основании проведенного численного эксперимента можно сказать, что данный способ может работать при различных отношениях сигнал/шум (в опыте были использованы значения 5 и 10). Современная техника позволяет достичь более

высокие соотношения сигнал/шум, следовательно, этот метод может работать на реальных данных.

1.8 Моделирование влияния механической нестабильности на работу SHRImP алгоритма

Рассмотрено влияние механической нестабильности установки для двух предельных случаев:

- Случай короткой экспозиции соответствующий ситуации, когда время экспозиции много меньше периода колебаний элементов установки. В этом случае регистрируются смещённые относительно идеального случая ФРТ.
- Случай многократной экспозиции, когда время между первой и последней экспозициями больше периода колебаний элементов установки. В этом случае регистрируется смазанное изображение.

Созданы видео фрагменты, содержащие 500 точек и состоящие из 500 видеокадров. На рисунке 1.7 представлены первый кадр видео фрагмента и результат обработки в идеальном случае – в отсутствии шума и механической нестабильности установки.



Рис. 1.7. Исходное (верхнее) и обработанное (нижнее) изображение при отсутствии колебаний камеры.

В идеальном случае алгоритмом точно определяются положения молекул и восстанавливается изначально заданная структура объекта.

Рассмотрен случай короткой экспозиции с различными частотами и амплитудами колебаний (при частоте кадров 1 Гц w1=w3=50 рад/с, w2=70 рад/с, A1=A2= 1, A3=2.5) в сравнении с результатом обработки исходного (в отсутствии колебаний) изображения (см. рис. 1.8), а также многократной экспозиции (при w1=w3=5 рад/с, w2=10 рад/с, A1=A2=1, A3=2.5) (см. рис. 1.9).

Из результатов обработки видно, влияние колебаний камеры на объект и, соответственно, на результат обработки объекта с помощью предложенного алгоритма. При наличии механической нестабильности невозможно точно определить реальное положение флуорофора, а при большой нестабильности теряется возможность установления точной структуры объекта.



Рис. 1.8. Три случая короткой экспозиции с разными частотами и амплитудами колебания элементов установки. Левый столбец – исходное изображение, средний столбец – результат обработки, правый столбец – результат обработки изображения в отсутствии колебаний камеры. Первая и вторая строки – различные частоты (w1 = 50 paд/c, w = 70 paд/c, при амплитуде A = 1), первая и третья строки – различные амплитуды (A1 = 1, A3 = 2.5, при частоте w = 50 paд/c).



Рис. 1.9. Три случая многократной экспозиции с разными частотами и амплитудами колебания элементов установки. Левый столбец – исходное изображение, средний столбец –

результат обработки, правый столбец – результат обработки изображения в отсутствии колебаний камеры. Первая и вторая строки – различные частоты (w1 = 5 paд/c, w2= 10 paд/c при амплитуде A = 1), первая и третья строки – различные амплитуды (A1 = 1, A3 = 2.5 при частоте w = 5 paд/c).

Из последнего можно сделать вывод, что для получения более точных данных необходимо стремиться к уменьшению амплитуды колебаний элементов установки. При амплитуде колебаний установки большей 2,5 размера пикселей восстановление SHRImP алгоритмом затруднено

Применение многократной экспозиции не целесообразно только при колебаниях с частотой не выше 5 рад/с и с амплитудой в 1 пиксел регистрирующей матрицы.

1.9. Алгоритм SOFI для анализа флуоресцентных данных, полученных методом BaLM

Можно выделить два подхода для получения изображений со сверхвысоким разрешением алгоритмом SOFI: с помощью корреляционной функции n-ого порядка и с помощью семиинварианта n-ого порядка. Полный алгоритм обработки данных для получения результирующего изображение методом SOFI n-ого порядка состоит из следующих шагов:

1. необходимо получить изображение средней интенсивности *I*^(aver) по набору исходных данных:

$$I^{(aver)}(r) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^{N} I^{(k)}(r), \qquad (1.47)$$

где r – координаты пикселя (по вертикали и горизонтали), $I^{(k)}(r)$ – значение интенсивности пикселя с координатами r на изображении k, N – количество изображений в наборе исходных данных. Вертикальная и горизонтальная координаты пикселя лежат в диапазоне от 0 до вертикального и горизонтального размеров изображения соответственно;

2. расчет корреляции с 1-ого по п-ый порядок для каждого изображения из набора исходных данных по формуле:

$$G_{order}(r, \tau_1, \dots, \tau_{order-1}) =$$

= $\langle \delta F(r, t) \delta F(r, t + \tau_1) \cdots \delta F(r, t + \tau_{order-1}) \rangle_t,$ (1.48)

где $\delta F(r,t)$ – флуктуация сигнала в пикселе с координатами r в момент времени t, τ – временная задержка, *order* – текущий порядок корреляции (лежит в интервале [1, n]), < ... >_t – усреднение по времени.

$$\delta F(r,t) = I(r,t) - I^{aver}(r), \qquad (1.49)$$

где I(r,t) – значение интенсивности в пикселе с координатами r в момент времени t;

3. расчет кумулянта n-ого порядка для каждого изображения из набора исходных данных по формуле:

$$C_{n}(r,\tau_{1},...,\tau_{n-1}) = G_{n}(r,\tau_{1},...,\tau_{n}) - \sum_{i=1}^{n-1} {n-1 \choose i} C_{n-1}(r,\tau_{1},...,\tau_{n-1-i}) G_{i}(r,\tau_{1},...,\tau_{i-1}), \qquad (1.50)$$

где $\binom{x}{y}$ – биномиальный коэффициент, то есть количество всех подмножеств (выборок) размера *y* в -элементном множестве. Для неотрицательных целых чисел может быть вычислен по формуле:

$$\binom{x}{y} = \begin{cases} \frac{x!}{k!(n-k)!}, & y \le x\\ 0, & y > x \end{cases}.$$
 (1.51)

4. получение результирующего изображения *C*^{*aver*} путем усреднения кумулянтов, рассчитанных по набору исходных данных:

$$C_n^{(aver)}(r,\tau_1,\ldots,\tau_{n-1}) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N C_n^{(k)}(r,\tau_1,\ldots,\tau_{n-1}), \qquad (1.52)$$

где $C_n^{(k)}(r, \tau_1, ..., \tau_{n-1})$ – кумулянт n-ого порядка для k-ого изображения.

Для проверки работоспособности алгоритма SOFI была реализована модель, описывающая флуоресценцию двух точечных источников на расстоянии между центрами, меньшим диаметра ФРТ. Для этого генерировалась последовательность изображений, на которых происходит попеременное зажигание и гашение источников. Исходные и усредненное изображения представлены на рисунке 1.10.



Рис. 1.10. Исходные (1 – 3) и усредненное (4) изображения.

На рисунке 1.11 представлены результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 4, 16 и 32



Рис. 1.11. Результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 4 (1), 16 (2) и 32 (3) порядков.

Для более детального анализа работоспособности алгоритма SOFI была реализована модель, описывающая флуоресценцию источников, находящихся на различном расстоянии между ИХ центрами. Для ЭТОГО генерировалась последовательность изображений, на которых происходит попеременное зажигание и гашение источников. Расстояние последовательно изменялось в диапазоне от одного до трех диаметров ФРТ флуорофора с шагом 0,2 этого диаметра. Выбор максимального расстояния обусловлен возможностью разрешать два отдельных флуорофора по ширине профиля интенсивности сигнала на уровне половинной амплитуды.

На рисунке 1.12 представлено исходное усредненное изображение и результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 2, 4, 6 и 8 порядков.



Рис. 1.12. Усредненное изображение (1) и результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 2 (2), 4 (3), 6 (4) и 8 (5) порядков.

Видно, что после применения алгоритма SOFI 4 (и выше) порядка удается различать отдельные источники даже при минимальном расстоянии между их центрами.



Рис. 1.13. Профили интенсивности для исходного изображения (1) и результатов обработки с помощью алгоритма SOFI 2 (2), 4 (3), 6 (4) и 8 (5) порядков.

На рисунке 1.13 представлены профили интенсивности для данных в седьмой строке, где расстояние между центрами ФРТ источников равно 2,2 их диаметра. Можно сделать вывод, что алгоритм SOFI 2 порядка позволяет разрешать отдельные источники по уровню сигнала на половинной высоте. SOFI 8 порядка полностью разделяет отдельные источники.

1.10. Выводы

Рассмотрены особенности аналогового и цифрового принципа регистрации голограмм. Для внеосевой цифровой голографии определены оптимальные значения угла схождения опорного и предметного пучков. Теоретически оценены предельно достижимые параметры цифровой внеосевой голографии. Реализован и протестирован на синтезированных объектах алгоритм восстановления цифровых голограмм и расчёта разности фаз по результатам голографической интерферометрии.

Для BaLM метода впервые была теоретически выведена формула для определения оптимальной мощности возбуждения флуоресценции. Выполнены расчеты оптимальной мощности возбуждения для широкопольного режима с

67

камерой Flea3 (Point Grey, Канада) и объективом Plan Apochromat 63x/1.4 (Carl Zeiss, Германия) для используемых в опытах коммерческих флуорофоров Alexa Fluor 647: 11,7 мВт; для Cy3 : 130мВт; для DyLight 405 : 58,9 мВт соответственно.

Для тестирования SHRImP алгоритма были созданы несколько искусственных видеофрагментов, рассмотрены ситуации в отсутствии шума, при наличии шума, а так же несколько случаев симуляции колебаний элементов установки для короткой и многократной экспозиции с целью выявить устойчивость алгоритма к механической нестабильности. На основании проведенного анализа сделан вывод о возможности применения алгоритма, как при высоких, так и при низких отношениях сигнал/шум (5 и 10). Рассмотрены случаи многократной экспозиции с разными частотами и амплитудами колебания элементов установки при частоте кадров 1 Гц с частотами колебаний 5;10;50 и 70 рад/с и амплитудами колебаний 1 и 2.5. Случаи соответствуют условиям со временем экспозиции много меньшим периода колебаний элементов установки и временем между первой и последней экспозициями большим периода колебаний элементов установки.

Для проверки работоспособности алгоритма SOFI, была реализована модель, описывающая флуоресценцию точечных источников на различных расстояниях между их центрами, заданными в диапазоне от одного до трех диаметров флуорофора с шагом 0.2 этого диаметра. Показано, что SOFI алгоритм 4 порядка и выше успешно работает даже при минимальном расстоянии между их центрами.

Глава 2. Комбинированные методы голографической и флуоресцентной микроскопии

В данной главе выделены основные критерии оптических схем микроскопов ДЛЯ формирования подхода комбинированного применения методов голографической и флуоресцентной микроскопии. Сформулированы основные принципы включения осевой голографической микроскопии в конструкцию прямого и инвертированного микроскопов и проведены подтверждающие практические эксперименты. Проведено исследование фиксированных клеточных культур путем восстановления их фазовых портретов с помощью осевой голографической микроскопии. Представлено описание оптической схемы и экспериментальной установки получения аналоговых и цифровых голограмм. Проведено исследование и сопоставление изменений структуры и проявлений жизнедеятельности первичной культуры клеток мозга. Показана возможность детектирования и визуализации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток, на примере действия КСС на первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей с помощью голографического подхода.

Показана корреляция результатов параллельного изучения живой нейрональной клеточной культуры в нативном состоянии и при использовании блокаторов и ингибиторов активности с помощью кальциевого имиджинга и цифровой внеосевой голографии.

Основные результаты главы опубликованы в работах [A1], [A2], [A7], [A8], [A9], [A10], [A11], [A12], [A17], [A19], [A21], [A22], [A25], [A26], [A27], [A28], [A29], [A33], [A35].

2.1. Особенности устройства оптических микроскопов разных типов

Для комбинированного применения методов голографической и флуоресцентной микроскопии необходимо выделить основные группы оптических схем микроскопов для формирования комплементарных оптических схем.

Для комбинирования подойдут микроскопы плоского поля, так как имеют наиболее подходящую оптическую схему. Возможно использование как прямых, так и инвертированных микроскопов. Инвертированный микроскоп является наиболее предпочтительным, так как коллиматор освещения находится в верхней части микроскопа, а канал выхода сигнала флуоресцентной записи, с которой реализовано комбинирование голографической диагностики, находится снизу. Такое расположение оптического выхода в непосредственной близости от оптического стола, позволяет крепить дополнительную оптическую схему на минимальной высоте рейтеров. Это крайне важное условие для минимизирования механических колебаний, что в свою очередь обеспечивает более надежную механическую стабильность и уменьшает вклад в паразитный набег фазы при регистрации голографической информации. Микроскопы проходящего И отраженного света подходят для совмещения, однако следует учесть, что для микроскопа проходящего света возможно использование только голографической микроскопов схемы на прохождение, а для падающего света, только голографической схемы на отражение. Совмещение с высокотехнологичным микроскопом позволяет проводить сравнение со стандартными протоколами скрининговых исследований и флуоресцентным анализом, возможном на данном микроскопе, что расширяет возможности диагностирования патологических изменений тканей человека, в том числе и злокачественных новообразований на субклеточном уровне.

2.2. Принцип включения осевой голографической микроскопии в конструкцию прямого и инвертированного микроскопов

Метод включения осевой голографии для получения количественных фазовых измерений клеточных культур разработан для двух основных типов оптических лабораторных микроскопов: для прямого и инвертированного типа. В качестве основы использованы прямой конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 (Carl Zeiss, Германия), и инвертированный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 710 (Carl Zeiss, Германия).

Для освещения используется когерентное лазерное излучение, при освещении которым нет необходимости компенсировать дисперсию, возможна запись голограмм с большой глубиной сцены и имеет место однозначное соответствие фазового набега и ОРХ. Запись осевой голограммы путем введения в объектный луч полупрозрачной пластинки, наряду с записью обычного для микроскопии распределения интенсивности позволяет получить информацию о фазовом фронте зондирующего препарат лазерного излучения.

Предложенный подход использует аппаратную составляющую стандартного микроскопа и применяет программную обработку, компонуя ее из программного обеспечения этого прибора, что позволяет реализовать метод цифровой голографической интерферометрии.

Запись картины интерференции объектного и опорного пучков формирует цифровую голограмму. Визуализация фазовой структуры методом осевой цифровой голографии состоит из трех этапов.

На первом этапе происходит фокусировка на области изучаемой структуры. Регистрируемое изображение, представляющее собой распределение интенсивности зондирующего излучения в плоскости, оптически сопряженной с объектом (см. рис. 2.1а), дает информацию только о модуле амплитуды объектной волны *s*:

$$I = s^2 (2.1)$$

На втором этапе вводим в канал регистрации плоский опорный пучок $R=r\exp\{i0\}$. Для его формирования мы используем часть света, отраженную от полупрозрачной пластинки, помещенной непосредственно перед объективом по направлению распространения светового пучка от лазера. Регистрируя картину интерференции объектного S(x,y) и опорного пучков, фактически мы записываем осевую голограмму H (см. рис. 2.16). Здесь на фоне изображения есть добавление постоянного фона и интерференционных членов, содержащих информацию о фазовом фронте волны $\varphi(x,y)$:

$$H = |R + S(x, y)|^{2} = |r \exp\{i0\} + s(x, y) \exp\{i\varphi(x, y)\}|^{2} =$$

= $r^{2} + s(x, y)^{2} + rs(x, y) [\exp\{i\varphi(x, y)\} + \exp\{-i\varphi(x, y)\}]_{1}$ (2.2)

На третьем этапе вычитаем эти изображения (2.2) – (2.1), используя стандартные процедуры обработки изображения, предложенные в программном обеспечении микроскопа:

$$H - I = 2s(x, y)\cos\{\varphi(x, y)\} + 1$$
(2.3)

Вычитание цифровых изображений распределения интенсивности сигнала и осевой голограммы в значительной степени убирает модуляцию интенсивности, обусловленную различием коэффициента отражения и рассеяния по объекту, давая интенсивности, пропорциональное действительной распределение амплитуде объектной волны, модулированное косинусоидальным профилем с аргументом в виде фазы объектной волны (см. рис. 2.1в). Таким образом реализуется возможность производить визуализацию фазы, то есть фиксировать такие физические характеристики объекта, которые модулируют фазу волны. Фотометрирование изображения рис. 2.1в позволяет восстановить распределение фазового набега, а значит, в приближении постоянного коэффициента преломления можно восстановить форму, и наоборот, зная форму, построить распределение коэффициента преломления.

Восстановление фазы возможно стандартным голографическим способом [116], требующим изменения конструкции микроскопа [117]. При исследовании жизнедеятельности биологического объекта требуется оборудование для
циркуляции физиологического раствора, обогащенного специальной газовой его жизнеспособности и смесью с целью поддержания для введения Кроме стимулирующих И блокирующих веществ. того, стандартный голографический метод требует более сложного цифрового процесса восстановления, а добиваясь углового разделения информационного порядка и нулевого порядка дифракции на голограммной структуре, необходимо обеспечить, чтобы пространственная частота опорной волны как минимум втрое превышала ширину спектра пространственных частот объекта, что не позволяет добиться разрешения в восстановленном изображении, ограниченного только дифракционным пределом. Осевая голограмма лишена этого ограничения, а ее недостаток, состоящий в наложении распределения нулевого и информационного порядков преодолевается путем записи наряду с голограммой, обычного фотографического изображения и их несложной совместной обработкой.

2.3. Изучение живых и фиксированных культур с помощью осевой голографической микроскопии, включенной в конструкцию прямого и инвертированного микроскопов

На инвертированном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) осевая цифровая голография применена для изучения фиксированного среза стебля ландыша (см. рис. 2.1).



Рис. 2.1.Срез стебля ландыша. Фиксированный. Распределение интенсивности (а); осевая голограмма (б), распределение интенсивности, пропорциональное действительной амплитуде объектной волны, модулированное косинусоидальным профилем с аргументом в виде фазы объектной волны (в), фазовый портрет (г). Размер кадра 212х212мкм.

Осевая цифровая голография реализована на прямом конфокальном лазерном микроскопе LSM 510 (Carl Zeiss. Германия). Объектом сканирующем живая клеточная культура нейрональных исследования являлась клеток. осевой цифровой голографии В Временное разрешение предложенной конфигурации не позволяет зарегистрировать быстропротекающие изменения в живых культурах, так как на регистрацию одного поля зрения необходимо потратить время экспонирования двух кадров, между которыми необходимо поместить плоскопараллельную пластинку на чашку Петри с исследуемой культурой, что составляет в среднем порядка 60 сек. Однако осевая цифровая голография позволяет регистрировать медленные изменения в клеточной культуре, такие как программируемая гибель клетки – апоптоз, развивающийся в течение нескольких часов и сопровождающийся изменением формы клетки. В качестве примера на рис. 2.2 представлена одна из стадий этого процесса.



Рис. 2.2. Нейрональная клеточная культура *in-vitro*.Распределение интенсивности (а); осевая голограмма (б), распределение интенсивности, пропорциональное действительной амплитуде объектной волны, модулированное косинусоидальным профилем с аргументом в виде фазы объектной волны (в), фазовый портрет (г). Размер кадра 212х212мкм.

2.4. Оптическая схема и описание экспериментальной установки получения аналоговых и цифровых голограмм

В работе использована внеосевая схема Лейта-Упатниекса. Отличительной особенностью данной установки является то, что она предназначена для записи голограмм живых микрообъектов, находящихся в жидкой среде. Живые клеточные культуры, как правило, находятся в чашке Петри с питательным раствором. Поэтому принципиальным является горизонтальное положение объекта, предметный луч на него падает вертикально, вследствие этого конструктивно не удается разместить элементы схемы в одной плоскости и собой установка представляет трехмерную конструкцию. Также. из-за микроскопических размеров объекта, применяется водно-иммерсионный

объектив Achroplan (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и числовой апертурой *NA* равной 0.8, однако конструкция оптической схемы дает возможность установить объектив с любым доступным увеличением.

Принципиальная цифровых оптическая схема получения или для традиционных (аналоговых) физических голограмм представлена на рисунке 2.3. Для расширения пучка луч He-Ne лазера 1 с длиной волны 632,8 нм проходит через микрообъектив 2 и коллимирующую линзу 3, после чего, оставаясь параллельным, приобретает поперечный размер, достаточный для освещения исследуемой области. Затем луч попадает на светоделительную пластинку 4, где делится на опорный и предметный пучки. Предметный луч соответственно проходит через объект 6, затем через объектив 7, который строит увеличенное изображение объекта в плоскости регистрирующей среды (на фотопластинке или фотоэлектрической матрице) 9, проходя через диэлектрическое зеркало 8. Опорный луч после светоделительной пластинки 4 отклоняется на зеркало 5, которым направляется на то же полупрозрачное зеркало 8, с помощью которого опорный и предметный лучи совмещаются, образуя при этом угол сходимости, необходимый для разделения порядков восстановленного изображения, и их интерференционная картина плоскости регистрации 9 экспонирует В фотопластинку или оцифровывается матрицей, формируя, соответственно, аналоговую или цифровую голограмму. С помощью поворота зеркала 8 в этой схеме осуществляется регулировка угла схождения опорной и предметной волн. Регулировка угла необходима, чтобы соблюсти требования формулы (1.6).



Рис. 2.3. Принципиальная оптическая схема голографической установки с

возможностью смены типа регистрирующей среды. 1- Не-Ne лазер, 2 – микрообъектив, 3 -

коллимирующая линза, 4- светоделительная пластинка, 5,5' – зеркало, 6- объект,7 -

объектив, 8- диэлектрическое зеркало, 9 - регистрирующая среда.

Проведена серия экспериментов по записи аналоговых и цифровых внеосевых голограмм живых клеточных культур. Объектом исследования являлись первичные клеточные культуры клеток гиппокампа мозга мышей.

Запись аналоговой голограммы требует долгой экспозиции, затем, требуется обработка фотореактивами и высушивание. На рисунке 2.4 показан пример записанной аналоговой голограммы живой клеточной культуры и ее увеличенный фрагмент, на котором можно видеть интерференционные полосы голограммной структуры.





Рис. 2.4. Фотография аналоговой голограммы без увеличения (а) и увеличенное изображение интерференционных полос (б).

Для восстановления аналоговых голограмм использовалась та же оптическая схема, в который опорный пучок используется для восстановления записанной голограммы. Для изменения оптического пути опорного пучка и освещения голограммы используется призма (см. рис. 2.5), которая изменяет оптическую схему (см. рис. 2.3).



Рис. 2.5. Оптическая схема для восстановления внеосевых аналоговых голограмм.



Рис. 2.6. Пример восстановления внеосевой аналоговой голограммы.



Рис. 2.7. Разделение порядков дифракции при восстановлении аналоговой голограммы. При восстановлении наблюдается расхождение нулевого и плюс, минус первого порядков (см. рис.2.7). Восстановленное изображение можно наблюдать как невооруженным глазом, так и фиксировать на фотоаппарат, подстраиваясь по глубине поля зрения. Недостатком аналоговой голографии является невозможность выполнения процессов в режиме реального времени.

На рисунке 2.8 и 2.9 представлено распределение интенсивности объектной волны, восстановленное с голограмм живых и фиксированных клеточных культур.



Рис.2.8. Восстановленные аналоговые голограммы живых клеточных культур.



Рис. 2.9. Восстановленная аналоговая голограмма фиксированной клеточной культуры.

Запись временной серии цифровых голограмм и контроля с помощью аналоговой записи позволила минимизировать артефакты дискретизации и конечной ширины спектра цифровых голограмм. Восстановленное изображение физической голограммы легко перестраивается по глубине, что дает возможность проверить соблюдение фокусировки изображения в плоскости регистрации. Однако киноголография имеет низкое временное разрешение, связанное с заменой регистрирующей среды [118-120], тогда как запись временной серии цифровых голограмм нестационарного объекта осуществляется с частотой регистрации кадров используемой камеры.

В ходе эксперимента с цифровым носителем записи производилась запись видефайла, каждый кадр которого является цифровой внеосевой голограммой.

Рассмотрим пример восстановленного с цифровой внеосевой голограммы распределения интенсивности и фазового набега объектной волны (см. рис. 2.10). Такое распределение интенсивности можно наблюдать и с помощью световой микроскопии.



Рис. 2.10. Распределение интенсивности объектной волны, восстановленное с голограммы (а) и распределение фазового набега объектной волны, восстановленного

с голограммы (б).

Для получения интерферограмм и восстановления динамики ОРХ объекта производилась также регистрация голограммы в отсутствии объекта (см. рис. 2.11). Методами цифровой голографической интерферометрии измерялось изменение фазы объектной волны в случае нестационарного объекта.

Представленное на рисунке 2.10 распределение фазового набега соответствует значению фазы, лежащему в интервале (-*π*;*π*).

Для определения изменения ОДП используем:

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{0}^{h} \Delta n_{i} dz = \frac{2\pi}{\lambda} \langle \Delta n_{i} \rangle h = \frac{2\pi}{\lambda} l_{onm}, \qquad (2.4.)$$

$$\Delta l_{onm} = \frac{\Delta \varphi \lambda}{2\pi}, \qquad (2.5)$$

где h – толщина клетки, $<\Delta n_i > -$ средний относительный показатель преломления, $\Delta n_i = n_i - n_m$, n_i – показатель преломления внутриклеточного содержимого, n_m – показатель преломления питательной среды, в которой находится культура.



Рис. 2.11. Цифровая внеосевая голограмма объекта (слева)и голограмма, записанная в отсутствии объекта (справа) для получения интерферограмм и восстановления динамики оптической разности хода (фазовых портретов) объекта.

Для дальнейшего исследования была выбрана область, показанная на рисунке 2.12. Для этой области было произведено сшивание фазы. Также для более наглядного представления данных было использована 3D-графика. На рисунке 2.13 показано распределение фазы для выбранной области без сшивания фазы и со сшиванием фазы.



Рис. 2.12. Выбранная для исследования область.



Рис. 2.13. Фазовый портрет без сшивания фазы (слева) и со сшиванием фазы (справа).



Рис. 2.14. Пример распределения фазового набега, соответствующее одной из серии последовательно зарегистрированных голограмм. Вертикальная ось фазового набега.
 Цена деления по вертикальной оси составляет π радиан. Цена деления пространственных осей составляет 10 мкм.

В ходе экспериментов была изучена динамика клеточной культуры и построены графики изменения разности фаз зондирующего излучения через разные клетки (см. рис. 2.15, 2.16). Для каждого графика на этом рисунке на рисунке 2.15 отмечена область усреднения. На рисунке 2.14 приведен пример распределения набегов фазы одной из выбранных областей.



Рис. 2.15. Области, по которым проводилось усреднение для получения временных



Рис. 2.16. Зависимость разности хода от времени для различных областей.

Разработанная методика в приложении к исследованию первичных нейронных морфофункциональной культур делает возможным изучение взаимосвязи, клеточной внутриклеточных И динамики активности, процессов что В совокупности с биологической интерпретацией результатов способствует пониманию принципов работы нейроглиальных сетей мозга.

2.5. Изучение распространения потенциала действия в живых нейронных клеточных культурах с помощью цифровой голографии

В нервных волокнах сигналы передаются с помощью потенциалов действия, которые представляют собой быстрые изменения мембранного потенциала, быстро распространяющиеся вдоль мембраны нервного волокна. Потенциал действия (ПД) является физиологической основой нервного импульса. Движущееся по нервам возбуждение представляет собой нервные импульсы, а не потенциалы действия. Но в физиологической литературе в качестве синонима для нервного импульса принято использовать также и термин "потенциал действия", хотя потенциал действия - это только электрический компонент нервного импульса, характеризующий изменения электрического заряда (потенциала) на локальном участке мембраны во время прохождения через него нервного импульса. Нервный импульс - это сложный структурно-электро-химический процесс, распространяющийся по мембране нейрона в виде бегущей волны изменений в состоянии мембраны. Она включает в себя структурные изменения (открытие и закрытие мембранных ионных каналов), химические (изменяющиеся трансмембранные потоки ионов) и электрические (изменения электрического потенциала мембраны: деполяризацию, позитивную поляризацию И реполяризацию). На данный момент, потенциалы действия регистрируются с помощью микроэлектродов вводимых в клетку, поэтому такие методы, с одной стороны, не могут считаться неинвазивными, с другой – способны регистрировать ПД лишь в весьма ограниченном количестве точек, что не позволяет использовать

их для наблюдения распространения сигналов по сети нейронов. Для исследования возможности голографической регистрации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток, были использованы первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей на пятнадцатом и двадцать втором дне культивирования в нейробазальной среде.

Генерация и распространение потенциалов действия происходит за время порядка единиц миллисекунд, что требует для голографической записи этих процессов регистрирующих камер со временем экспозиции не более 1 мс и частотой кадров порядка килогерц.

Были зарегистрированы серии голограмм (см. рис. 2.17) из 200 кадров с временем экспонирования 0,2 мс, и временем между кадрами 0,62 мс в нативном состоянии клеточных культур и после аппликации хлорида калия до концентрации в нейробазальной среде 60 mM, что стимулирует непрерывную генерацию потенциалов действия.



Рис. 2.17. Пример регистрируемой на CMOS камеру голограммы нейрональной клетки с отростком.

В нативном состоянии ни на одной из 25 голограмм, записанных в произвольные моменты времени, не оказались зарегистрированными достаточные изменения, коррелирующие по своим временным параметрам с нервными импульсами. Это говорит о том, что в таком состоянии генерация ПД происходит достаточно редко.



Рис. 2.18. Восстановленные фазовые портреты клетки с отростком: а – начало измерений, б - 40-я мс записи, в- 124-я мс записи. Здесь х, у– пространственные координаты в микрометрах, Δ*l*_{opt} – в нанометрах.

На фазовых портретах (см. рис. 2.18), восстановленных с голограмм клеток с отростками после действия КСІ, наблюдались изменения ОДП сигнальной волны на участках аксонов. Увеличение ОДП на 20 нм за время 1,5 – 2 мс 2 – 3 раза в течение временных серий длительностью 124 мс сопоставимо с временными характеристиками КСІ-стимулированных потенциалов действия, проводимых аксонами гиппокампа мозга мышей. В одной из культур на двадцать втором дне культивирования в нейробазальной среде через полчаса после аппликации КСІ было зафиксировано резкое увеличение ОДП в аксоне примерно в 6 раз. После

скачкообразного появления сигнала, величина амплитуды плавно снижалась в течение 100 мс. После чего ОДП приблизилась к первоначальным значениям.

Таким образом, предложенный способ голографической регистрации, показал возможность детектирования и визуализации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток, на примере действия КСL на первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей.

2.6 Принцип совмещения методов оптической микроскопии и цифровой внеосевой голографии

Голография, являясь интерференционным методом, весьма требовательна к механической стабильности установки, поэтому для улучшения точности получаемых результатов, необходимо увеличивать механическую прочность схемы. Более того, на точность оказывают влияние оптические элементы установки. Учитывая данные факторы, цифровая внеосевая голография была применена на базе прямого конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия), находящегося на оптическом виброизоляционном столе. Использовался откалиброванный оптический тракт микроскопа со всеми особенностями построения увеличенного изображения, т.е расположение предметной плоскости исследуемого образца уже выбраны с учетом фокальной плоскости объектива и конденсора микроскопа, а оптический тракт микроскопа, в значительной степени, лишен искажений и аберраций. Луч He-Ne лазера 1 разделяется светоделителем 4 на опорный и предметный пучки. Предметный луч проходит через микроскоп 10 и, соответственно, через объект 2, изображение которого передается объективом 3 на цифровую камеру 5 - VEI-435 (ЭВС, Россия) со светочувствительным элементом КМОП-матрицей OV5610 (OmniVision, США) формата 1/1.8 дюйма с 2592х1944 пикселей.



Рис. 2.19. Принципиальная схема оптической установки, собранной на основе лазерного сканирующего микроскопа, использованной для записи голограмм.

Опорный луч при помощи системы оптических элементов 6 расширялся, коллимировался и заводился зеркалом 7 и 9 на оптический клин 8, сквозь который проходил также предметный пучок. Применяемая цифровая камера регистрирует серию голограмм в формате видеофайла. Для обработки видеофайл разбивался на отдельные голограммы. Для восстановления цифровых голограмм используется, описанная в Главе 1 программа, основанная на методе двойного преобразования Фурье с фильтрацией в частотной плоскости. В результате программной обработки происходит восстановление фазовых портретов (распределение фазы восстановленной объектной волны в поперечной плоскости), и впоследствии, сравнивая фазовые портреты, записанные в различные моменты времени, может быть проведена оценка изменений, происходивших в объекте исследования.

2.7. Параллельное изучение живых нейронных культур с помощью кальциевого имиджинга и цифровой внеосевой голографии

В качестве примера применения предлагаемой методики были исследованы первичные культуры клеток гиппокампа мозга мышей, высаженные в питательную среду и поддерживаемые в процессе эксперимента в живом состоянии длительное время с помощью перфузии. Регистрировалась клеточная активность как протяженный во времени процесс. В качестве метода исследования клеточной активности применена методика кальциевого имиджинга нейрональных культур основанная на использовании кальций-зависимого красителя Oregon Green BAPTA 1. Информацию об изменении концентрации ионов кальция в клетках дает характер изменения интенсивности флуоресценции.

Для обработки временных серий изображений использовались анализ по выделенным областям (ROI – region of interest). Анализ динамики флуоресценции проводился по расчету среднего значения интенсивности пикселей в каждой области выделения отдельно для каждого кадра из серии. После этого строится график, на котором по горизонтальной оси – время измерения (в кадрах или секундах), а по вертикальной – средняя интенсивность флуоресценции в данной области выделения. Полученные зависимости были нормированы на максимум (Рис 2.20).



Рис. 2.20. Динамика внутриклеточной концентрации ионов кальция по выделенной области. Динамика внутриклеточной концентрации ионов кальция (кальциевые осцилляции), определяемая по изменению интенсивности флуоресценции введенных в тела и отростки клеток кальциевых индикаторов, служит надежным показателем функциональной активности нейронов и нейронных сетей.

По восстановленным цифровым внеосевым голограммам в результате программной обработки были получены фазовые портреты. Была проведена оценка изменений, происходивших в клеточной культуре путем сравнивая фазовых портретов, записанных в различные моменты времени. Пример восстановленных фазовых портретов, показывает квазипериодическое изменение ОДП (см. рис. 2.21). Измерение фазового набега объектного пучка в клетках и межклеточном пространстве позволяет вычислить ОДП по отдельным клеткам (см. рис. 2.22), определяемую изменениями размеров и показателя преломления, содержащих информацию о динамике морфологии и внутриклеточного состава.



Рис. 2.21. Интерферограммы (а, б, в) и реконструкция ОДП (г, д, е) первичной культуры гиппокампа мозга мыши на примере 4х выделенных клеток, подвергнутой гипоксии с блокированием рецепторов SR2 через 20 с (б, д) и 58 с (в, е) после момента времени,

соответствующего состояниям (а и г).

Пример таких интерферограмм для трех моментов времени: на первой, двадцать первой и пятьдесят девятой секунде записи - и соответствующих им фазовых портретов приведен на рисунке 2.21.



Рис. 2.22. График изменения ОДП во времени выбранной клетки первичной культуры гиппокампа мозга мыши, подвергнутой гипоксии с блокированием рецепторов SR2 в течение

58 c.

Анализ временного ряда интерферограмм (фазовых портретов) в сравнении с кальциевой динамикой (см. рис. 2.23) показывает наличие характерных

одиночных кальциевых осцилляций с длительностью порядка нескольких минут для нативного состояния клеточной культуры, и, соответстветственно медленных изменений оптической разности хода.



Рис. 2.23. Корреляция динамики кальциевых осцилляций (а, в) и изменений оптической ОДП (б, г) различных клеток нейрональной культуры (а, б – спонтанная активность, в, г – после введения блокатора натриевых каналов).

Введение нейромодулятора (арахидоноилдофамина) [121] приводит К комплексных возникновению сверхмедленных кальциевых осцилляций длительностью от 30 до 60 с [122]. При этом фазовые измерения показывают квазипериодическое изменение оптической разности хода от клеток на сопоставимых с этими временных масштабах, что может быть вызвано изменением формы клеток или их биохимического состава, влияющего на показатель преломления (см. рис. 2.23). Такой патологический процесс, как гипоксия (недостаточное снабжение кислородом) также приводит к появлению комплексных кальциевых осцилляций, но еще более длительных – характерное время порядка 100 с. А морфологические (или биохимические) изменения убыстряются – период колебаний ОДП составляет 10-15 секунд. Введение блокаторов укорачивает длительность комплексных осцилляций и замедляет колебания ОДП, как показано на рисунке 2.23.

Установленная корреляция результатов анализа изменения фазового набега и кальциевой активности дала возможность применения цифровой голографической интерферометрии как самостоятельного подхода анализа кальциевой активности. Данный подход является менее фототоксичным и позволяет проводить более длительный и объективный мониторинг живых клеточных культур из-за меньшей мощности лузерного пучка используемого для голографии по сравнению с той, что используется для флуоресцентного кальциевого имиджинга. Более высокая стабильность получения результатов с помощью цифровой голографии обусловлена тем, что количественная интерпретация результатов кальциевого имиджинга может со временем наблюдения копить ошибку вследствии отбеливания молекул флуорофора.

2.8 Выводы

Исследованы конструкции и принципы стандартных лабораторных микроскопов, с целью определения особенностей оптических схем для совмещения голографической микроскопии и стандартной флуоресцентной микроскопии.

Для повышения точности и расширения возможностей регистрации фазовых изменений разрабатывались методы голографической микроскопии. Для этого разработана и собрана схема для записи аналоговых и цифровых голограмм в одной конфигурации, позволяющая сравнивать результаты, полученные тем и иным способом и взаимно дополнять их. Схема демонстрирует преимущества аналоговых и цифровых подходов и имеет удобную настройку и контроль параметров для регистрации серии аналоговых или цифровых голограмм. Программная обработка полученных результатов позволяет получить информацию об интегральной ОДП изучаемых препаратов, визуализировать и количественно измерять изменения в живых нейронных культурах. Проведено исследование И сопоставление изменений структуры И проявлений жизнедеятельности первичной культуры клеток мозга.

91

Выявлено, что у цифровой и аналоговой голографии есть ряд неоспоримых преимуществ, однако совмещение этих двух методов записи в одной схеме дает наилучший результат. Быстрота смены регистрирующей среды дает возможность на любом этапе вернуться к аналоговой голографии и, например, посмотреть полученную дифракционную решетку под микроскопом, убедиться в правильности расчета угла, достоверно измерить период между полосами.

При использовании цифровой внеосевой голографии, для исследования клеток гиппокампа мозга крысы после действия КСІ, наблюдались изменения ОДП сигнальной волны на участках аксонов. Увеличение ОДП на 20 нм за время 1,5–2 мс 2–3 раза в течение временных серий длительностью 124 мс сопоставимо с временными характеристиками КСІ-стимулированных потенциалов действия, проводимых аксонами гиппокампа мозга мышей. На двадцать втором дне культивирования в нейробазальной среде через полчаса после аппликации КСІ было зафиксировано резкое увеличение ОДП в аксоне примерно в 6 раз. После скачкообразного появления сигнала, величина амплитуды плавно снижалась в течении 100 мс, с дальнейшим асимптотическим приближением ОДП к первоначальным значениям.

Клеточная была флуоресцентного активность изучена с помощью кальциевого имиджинга с использованием кальций-зависимого красителя Oregon Green BAPTA 1 и анализа временного ряда фазовых портретов. Показано, что наличию одиночных кальциевых осцилляций, характерных для нативного состояния культуры, соответствуют медленные (порядка нескольких минут) изменения оптической разности хода в клетках и межклеточной среде. Введение (арахидоноилдофамина) нейромодулятора приводит к возникновению сверхмедленных комплексных кальциевых осцилляций длительностью от 30 до 60 с. При этом фазовые измерения показывают квазипериодическое изменение оптической разности хода в клетках на сопоставимых с этими временных масштабах, что может быть вызвано изменением формы клеток или их биохимического состава, влияющего на показатель преломления. Гипоксия также приводит к появлению комплексных кальциевых осцилляций, но еще более

длительных – характерное время порядка 100 с. А морфологические (или биохимические) изменения убыстряются – период колебаний ОДП составляет 10-15 секунд. Введение блокаторов укорачивает длительность комплексных осцилляций и замедляет колебания ОДП.

Глава3. Комбинированное применение голографической и флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения

В Главе 3 рассмотрены принципы совмещения цифровой внеосевой голографии и флуоресцентной локализационной микроскопии. Обсуждаются основные параметры, влияющие на достижение максимально возможного разрешения. Реализован метод локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения BaLM для визуализации окрашенных фиксированных и живых клеточных культур и фиксированных срезов тканей. Алгоритмы SHRImP и SOFI применены для анализа флуоресцентных данных от фиксированных клеточных культур.

Введен коэффициент эффективности работы SOFI алгоритма. Предложена комбинирования локализационной принципиальная И оптическая схемы сверхразрешающей и внеосевой цифровой голографической микроскопии, на базе которой изучены живые клеточные культуры. На примере живой культуры клеток линии кератиноцитов Het-1А в ходе их обычного развития при культивировании в питательной при воздействии фармакологического ингибитора среде И пролиферации клеток, методом голографической и BaLM микроскопии получена динамика их морфо-функционального развития.

Основные результаты главы опубликованы в работах [А3], [А4], [А5], [А13], [А23], [А24], [А30], [А31], [А36], [А37], [А39].

3.1. Реализация метода BaLM в широкопольном и лазерном сканирующем режиме для окрашенных живых и фиксированных клеточных культур и срезов тканей

Для реализации BaLM метода получения флуоресцентных данных можно использовать как когерентный источник освещения, так и широкополосное освещение. В качестве широкополосного источника можно использовать ртутную, галогеновую или металлогалоидную лампы С применением соответствующей спектральной селекции и, соответственно, лазеры как с высокой, так и с низкой пространственной и временной когерентностью для возбуждения флуоресценции в образце с помощью узкой спектральной линии. В настоящее время сбор BaLM данных был реализован только в широкопольном режиме, а для расширения применения метода впервые предложено использовать и сканирующий режим регистрации флуоресцентных данных.

При получении BaLM данных в широкопольном режиме с некогерентным источником возбуждения от окрашенных фиксированных и живых клеточных культур флуоресценция возбуждалась с помощью ртутной лампы X-cite 120 рсq. В качестве регистрирующей среды использовалась CMOS (7, 8) камера Flea3 (Point Grey, Kaнaдa) с размером пикселя 1.55 мкм, что делает возможным регистрировать дифракционное пятно от молекулы на площади не менее 9 пикселей при использовании масляно-иммерсионного объектива Plan Apochromat (Carl Zeiss, Германия) с увеличением 63 и числовой апертурой 1.4. Тестирование канала приема проводилось на тестовом объекте. В качестве калибровочного образца использовался микрометр ОМ-П. С помощью установленной микросетки была произведена подстройка расположения цифровой камеры для соблюдения соответствующей ориентации изображений, получаемых на ФЭУ микроскопа и на цифровую матрицу камеры. Была произведена калибровка плотности записи. Размер поля зрения для выбранного участка матрицы 1920х1080 пикселей составил 75х42 микрона. А значит, на один пиксел приходится порядка 39 нм в

области образца, что означает, что для выбранных флуорофоров, ФРТ приходится в среднем на 5х5 пикселей матрицы.

Впервые получены BaLM данные от фиксированных тканей. В качестве образца исследования были использованы фиксированные крио-срезы полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм. Был исследован срез интактного мозга мыши, в котором ядра клеток были прокрашены с помощью красителя Hoechst в концентрации 5 мкг/мл. Спектральная селекция проводилась с помощью фильтра на возбуждение (450-490 нм), дихроичного зеркала на 510 нм и фильтра на эмиссию, пропускающего длины волн более 515 нм. Изображения строились с помощью воздушного объектива с увеличением 40 и числовой апертурой 0.8. Размер изображений составлял 309х231 мкм (1392х1040 пикселей).

Также в качестве образца для исследования микроструктуры ткани были использованы фиксированные крио-срезы полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм, окрашенные с помощью первичных антител кролика к структуре МАР2, к которым были коньюгированы вторичные антитела с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647. Спектральная селекция проводилась с помощью фильтра с возбуждением в полосе (490-510 нм), дихроичного зеркала на 515 нм и эмиссионного фильтра с полосой (520-550 нм). Изображения строились с помощью воздушного объектива с увеличением 40 и числовой апертурой 0.8. Размер изображений составлял 309х231мкм (1392х1040 пикселей).

Лазерный сканирующий режим регистрации флуоресцентных BaLM данных произведен с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Исследовалась структура микротрубочек отростков нейрона с помощью антител, маркированных флуорофором Alexa Fluor 647, прикрепленных к MAP2. Флуоресценция возбуждалась с помощью He-Ne лазера с длинной волны 633 нм с мощностью возбуждения 0,43 мкВт. Изображения построены попиксельно с временем сканирования пиксела 0,32 мкс и с использованием водно-иммерсионного объектива C-Apochromat (Carl Zeiss, Германия) с увеличением 63х и *NA* равной 1.2. Поле зрения составило 25х25 мкм, на один пиксел приходится порядка 24 нм в плоскости образца.

полученным результатам и особенностям работы сформулированы По причины, снижающие эффективность работы метода BaLM на срезах тканей. Основная проблема состоит в худшем качестве окраски образца с помощью красителей из-за большей плотности ткани, что соответственно приводит к более низкому проникновению антител и красителей в структуры, в сравнении с клеточными культурами. Этап отмывки препаратов от красителей, также затруднен, что соответственно увеличивает фоновый сигнал. Еще одним вкладом флуоресцентный сигнал В шумовой оказывается сильная тканевая автофлуоресценция. Таким образом, получение сверхразрешения методом BaLM от тканей имеет ряд ограничений по сравнению с работой с клеточными культурами.

3.2. Применение алгоритма SHRImP для анализа флуоресцентных BaLM данных в широкопольном и лазерном сканирующем режиме от окрашенных фиксированных клеточных культур

В качестве примера работы алгоритма сбора данных BaLM изучена первичная диссоциированная культура нейронов гиппокампа мозга эмбриона мыши. В такой культуре клетки располагаются на подложке в виде монослоя. При использовании водно-иммерсионного объектива Achroplan (Carl Zeiss, Германия) С сорокакратным увеличением и числовой апертурой NA равной 0.8, в поле зрения цифровой камеры попадало сразу несколько нейронных клеток и их отростков. Образец был прокрашен с помощью вторичных антител, маркированных флуорофором Alexa Fluor 647, ассоциированных к первичным антителам, специфичным к МАР2. Для возбуждения флуоресценции был использован гелийнеоновый лазер с длиной волны 633 нм.

Применяя стохастического мерцания отбеливания анализ И молекул флуорофора, описанный в п.1.9, получаем новое изображение поперечного строения 3.1). культуры (см. рис. Это флуоресцентное изображение

97

микротрубочек дендрита нейрона с разрешением в 10 раз выше исходного, то есть, на порядок превосходящим дифракционный предел (см. рис. 3.2).



Рис. 3.1. Широкопольный режим получения данных. Флуоресцентное изображение микротрубочек отростков нейрона с помощью антител, маркированных флуорофором Alexa Fluor 647, прикрепленных к MAP2 (а). Разрешение ограничено дифракционным пределом. Изображение сверхвысокого разрешения, полученное в результате обработки SHRImP

алгоритмом (б).



Рис. 3.2. Профили интенсивности по линии, выделенной на рисунке 3.1 для исходного изображения (слева) и результат обработки с помощью алгоритма SHRImP (справа).

Впервые SHRImP алгоритм был применен к BaLM данным, полученным в лазерном сканирующем режиме (см. рис. 3.3) с использованием объектива С-Аросhromat (Carl Zeiss, Германия) с увеличением 63х и *NA* равной 1.2.



Рис. 3.3. Лазерный сканирующий режим получения данных. Флуоресцентное изображение микротрубочек отростков нейрона с помощью антител, маркированных флуорофором Alexa Fluor 647, прикрепленных к MAP2 (а). Разрешение ограничено дифракционным пределом.



Рис. 3.4. Профили интенсивности по линии, выделенной на рисунке 3.3 для исходного изображения (слева) и результат обработки с помощью алгоритма SHRImP (справа).

2 Distance (мкм)

1.5 2.0 Distance (мкм)

В результате обработки получено субдифракционное изображение (см. рис. 3.36, 3.4).

3.3. Применение алгоритма SOFI для анализа флуоресцентных данных от фиксированных клеточных культур

Алгоритм SOFI применен к данным, полученным при регистрации сигнала от флуорофора Су3 (возбуждение 533-557 нм, эмиссия в диапазоне 570-640 нм). Исходное изображение с выделенной областью интереса представлено на рисунке 3.5.



Рис. 3.5. Исходное изображение структур перинейрональной сети вокруг интернейронов клеточной культуры мозга мыши, меченных флуорофором Су3.

На рисунке 3.6а представлены результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 2, 4 и 8 порядков для области интереса, выделенной на рисунке 3.5.



Рис. 3.6. Исходное изображение структур перинейрональной сети вокруг интернейронов клеточной культуры мозга мыши, меченных флуорофором Су3 и результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 4 (2), 16 (3) и 25 (4) порядков с применением эквализации . Профили интенсивности для исходного изображения (1) и результатов обработки с помощью алгоритма SOFI 2 (2), 4 (3) и 8 (4) порядков.

На рисунке 3.6 представлены профили интенсивности вдоль выделенной прямой.

При переходе к обработке полноразмерных изображений была обнаружена проблема, связанная с растяжением динамического диапазона. Как следствие, становится невозможно обрабатывать данные, на которых присутствуют слишком яркие области, так как при расчете корреляций большие значения интенсивности дают быстрый рост корреляционной функции. Результат обработки для полноразмерных изображений (см. рис. 3.5) представлен на рисунке 3.7.



Рис. 3.7. Результат обработки полноразмерных изображений с помощью алгоритма SOFI 2 порядка.

Для устранения данного эффекта была добавлена эквализация гистограммы или выравнивание каждого исходного изображения при расчете средней интенсивности. Цель эквализации состоит в том, чтобы все уровни яркости имели бы одинаковую частоту, а гистограмма соответствовала равномерному закону распределения. Если задано изображение в оттенках серого с разрешением NxM пикселей, количество уровней квантования яркости пикселей или число битов составляет J, тогда в среднем на каждый уровень яркости должно выпадать количество пикселей, равное

$$n_{aver} = \frac{NM}{J}.$$
 (3.1)

Необходимо сопоставление двух распределений. Пусть x, y – случайные величины, описывающие изменение интенсивности пикселей на изображениях, $\omega_x(x)$ – плотность распределения интенсивности исходного изображения, $\omega_y(y)$ – желаемая плотность распределения. Необходимо найти преобразование плотностей распределения y = f(x), позволяющее получить желаемую плотность:

$$\omega_{y}(y) = \begin{cases} \frac{1}{y_{\max} - y_{\min}}, y_{\min} \le y \le y_{\max} \\ 0, \begin{bmatrix} y < y_{\min} \\ y > y_{\max} \end{bmatrix} \end{cases}.$$
(3.2)

Обозначим через $F_x(x)$ и $F_y(y)$ интегральные законы распределения случайных величин x и y. Из условия вероятностной эквивалентности следует, что $F_x(x) = F_y(y)$. Интегральный закон распределения по определению:

$$F_{x}(x) = F_{y}(y) = \int_{y_{\min}}^{y_{\max}} \omega_{y}(y) dy = \frac{y - y_{\min}}{y_{\max} - y_{\min}}.$$
(3.3)

Отсюда получаем, что

$$y = (y_{\text{max}} - y_{\text{min}})F_x(x) + y_{\text{min}}$$
 (3.4)

Осталось выяснить, как оценить интегральный закон распределения $F_x(x)$. Для этого необходимо сначала построить гистограмму исходного изображения, затем

нормализовать полученную гистограмму, разделив величину каждого бина на общее количество пикселей *NxM*. Значения бинов можно рассматривать как приближенное значение функции плотности распределения $\omega_x^*(x), 0 \le x \le 255$.

Таким образом, значение интегральной функции распределения можно представить как сумму следующего вида:

$$F_{x}^{*}(x) = \sum_{j=0}^{x} \omega_{x}^{*}(j).$$
(3.5)

Построенную оценку можно использовать для вычисления новых значений интенсивности.

Однако, такой подход значительно сокращает возможности алгоритма по повышению разрешения. Следствием применения эквализации является изменение формы ФРТ для каждого источника излучения от Гауссовой формы распределения к более прямоугольной форме распределения. В силу этого, для получения незначительного повышения разрешения необходимо использовать алгоритм достаточно высокого порядка (≥ 16). На рисунке 3.8 представлены результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 4, 16 и 25 порядков с применением эквализации для области интереса, выделенной на рисунке 3.6.



Рис. 3.8. Исходное изображение области интереса (1), результаты обработки с помощью алгоритма SOFI 4 (2), 16 (3) и 25 (4) порядков с применением эквализации. Профили интенсивности для исходного изображения (1) и результатов обработки с помощью алгоритма SOFI 4 (2), 16 (3) и 25 (4) порядков с применением эквализации.

На рисунке 3.8 представлены профили интенсивности вдоль прямой, изображенной на рисунке 3.6.

Рисунки 3.9а,б,в демонстрируют результаты обработки полноразмерных изображений (см. рис. 3.5) с помощью алгоритма SOFI 4, 16 и 25 порядков с применением эквализации.



Рис. 3.9. Результат обработки полноразмерный изображений с помощью алгоритма SOFI 4 порядка с применением эквализации (а), 16 порядка (б) и 25 порядка (в).

На рисунках 3.9 и 3.10 представлены результаты обработки данных от фиксированных клеточных культур, полученные при регистрации сигнала от микротрубочек, меченых флуорофора Alexa Fluor 647 (возбуждение 625-655нм, эмиссия 675-715нм).



Рис. 3.10. Исходное изображение фиксированных клеточных культур. Микротрубочки МАР2, меченые флуорофором Alexa Fluor 647. Указано выделенное сечение, вдоль которого строились профили интенсивности (а). Результат обработки полноразмерных изображений с помощью алгоритма SOFI 2 порядка (б) и SOFI 4 порядка (в).



Рис. 3.11. Результат обработки полноразмерных изображений с помощью алгоритма SOFI 4 порядка с применением эквализации, 16 порядка (б) и 25 порядка (в).

104



Рис. 3.12. Профили интенсивности для исходного изображения (1); результатов обработки с помощью алгоритма SOFI 2 (2), 4 (3) порядков без применения эквализации; 4 (4), 16 (5) и 25 (6) порядков с применением эквализации.

В качестве улучшения алгоритма, для повышения его разрешающей способности, использовалось изображение локальной средней интенсивности. Для этого последовательность исходных изображений разбивается на несколько блоков, для каждого из которых рассчитывается своё значение средней интенсивности. Далее, при расчете флуктуаций сигнала для кадров внутри каждого блока используется свое изображение средней интенсивности (формула 1.50 раздел 1.9). Наибольший эффект данная адаптация показывает при разбиении на блоки с наименьшей длиной, равной двум кадрам. На рисунке 3.13 представлено выбранное из серии флуоресцентное изображение Alexa Fluor 647, полученное на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе, и результаты обработки с помощью классического и улучшенного SOFI 2 и 4 порядков.



Рис. 3.13. Выбранное из серии флуоресцентное изображение фиксированной культуры Alexa Fluor 647 (1), результаты обработки с помощью классического (сверху) и улучшенного (снизу) SOFI 2 (2, 4) и 4 (3, 5) порядков.

Впервые алгоритмом SOFI для BaLM данных были обработаны фиксированные срезы тканей.

Флуоресцентное изображение из временной серии фиксированного крио-среза полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм, прокрашенного красителем Hoechst, и результат обработки временной серии (см. рис. 3.12) а также профили распределения интенсивности выбранной области (см. рис. 3.13).



Рис. 3.12. Флуоресцентное изображение фиксированного крио-среза полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм, прокрашенного красителем Hoechst (слева) и результат обработки SOFI алгоритмом 4 порядка (справа). Поле зрения 309х231мкм (1392х1040 пикселей).



Рис. 3.13. Профили интенсивности для исходного изображения фиксированного крио-среза полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм, прокрашенного красителем Hoechst (слева) и результат обработки SOFI алгоритмом 4 порядка (справа).

Пример флуоресцентного изображения и обработанного результата с визуализацией микроструктуры ткани по исследованным фиксированным криосрезам полушарий мозга мыши, толщиной 10 мкм, окрашенных с помощью первичных антител кролика к структуре MAP2 к которым были конъюгированы вторичные антитела с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647, представлен на рисунке 3.14. Изменения профилей распределения интенсивности выбранной области приведены на рисунке 3.15.



Рис. 3.14. Флуоресцентное изображение фиксированного крио-среза полушарий интактного мозга мыши, толщиной 10 мкм, прокрашенного первичными антителами кролика к структуре MAP2 со вторичными антителами с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (слева) и результат обработки (справа). Поле зрения 309х231мкм (1392х1040 пикселей).



Рис. 3.15. Профили интенсивности для исходного изображения (слева); результата обработки с помощью алгоритма SOFI 2 порядка (справа).

Вследствие отсутствия унимодального распределения интенсивности ПО профилям на рисунках 3.13 и 3.15, можно сделать вывод о выбранным невозможности выделения профиля ФРТ для структур на изображении 3.12 и 3.14 без применения специальных алгоритмов аппроксимации искомым распределением. Соответственно, затруднительно применять количественный коэффициент эффективности при исследовании тканей.

3.4 Оценка эффективности работы SOFI алгоритма

Для эффективности работы метода по достижению сверхвысокого разрешения необходимо использовать количественную оценку. В настоящее время в работах по методам флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, в отличие от стандартных методик оценки разрешения на изображениях, используется, в основном, наглядное представление результатов, без количественной оценки. Это показательный вариант представления результатов обработки, который, однако, затрудняет объективную оценку эффективности работы метода и делает невозможным сравнивать результаты работы разных методик между собой. В ряде работ с количественной оценкой используются теоретические оценки, а не практические измерения. Так для RESOLFT микроскопии оценивается размер эффективной ФРТ, как отношение ФРТ, ограниченной дифракционным пределом,
к квадратному корню из суммы единицы и отношения пиковой интенсивности лазера истощения к интенсивности насыщения для флуорофора [79]. Самым распространенным подходом к количественной оценке результата работы сверхразрешающих методик является проведение профиля интенсивности на исходном и результирующем изображениях и оценка расстояния между двумя соседними максимумами[123].

Поэтому для оценки эффективности работы алгоритма получения изображений со сверхвысоким разрешением введен коэффициент, рассчитываемый по формуле:

$$K = \frac{FWHM_{before}}{FWHM_{after}},$$
(3.6)

где *FWHM*_{before} и *FWHM*_{after} – полная ширина на половинной амплитуде сигнала вдоль выделенного направления на исходном и результирующем изображениях соответственно. Структуры, по которым строятся профили интенсивности, должны обладать выделенным направлением, чтобы было возможно провести перпендикулярное, либо близкое к нему, сечение.

Безразмерность коэффициента позволяет сравнивать эффективность различных методов микроскопии сверхвысокого разрешения, применяемых как к одним, так и к разным исходным данным. На рисунке 3.16 представлены теоретический и практический графики зависимости *К* от порядка алгоритма SOFI. Данная связь позволяет выбрать необходимую эффективность алгоритма в зависимости от требований к будущим результатам.



Рис. 3.16. Зависимость коэффициента улучшения *К* от порядка алгоритма. Синим цветом – практическая кривая, зеленым – теоретическая.
Полученные отсчеты аппроксимируются функцией x^{0,52} (Алгоритм Левенберга — Марквардта) которая представлена синим цветом. Зеленым цветом представлена теоретическая кривая, которая выражается через степенную функцию √n (n – порядок алгоритма). Коэффициент корреляции составил 0,996.

Таким образом, теоретического предела разрешающей способности алгоритма нет, но на практике серьезные ограничения накладывает проблема сильного растяжения динамического диапазона.

На рисунке 3.17 представлен график зависимости *К* от порядка алгоритма SOFI с использованием эквализации гистограммы интенсивности каждого исходного изображения.



Рис. 3.17. Зависимость коэффициента улучшения К от порядка алгоритма с использованием эквализации.

Применение коэффициента эффективности позволило оценить применение эквализации гистограммы интенсивности при обработке исходных данных с широким динамическим диапазоном интенсивности. Однако такой подход значительно сокращает возможности алгоритма по повышению разрешения. 3.17 Рисунок демонстрирует, получения заметного улучшения ЧТО для разрешения необходимо использовать SOFI высоких порядков. Это объясняется тем, что при эквализации происходит изменение формы функции рассеяния точки от нормального распределения Гаусса к прямоугольному виду, и эффективность алгоритма сильно падает.

На рисунке 3.18 представлена зависимость отношения коэффициентов улучшения для классической реализации алгоритма и с использованием изображения локальной средней интенсивности с длиной блока два кадра (1 – $K/K_{efficiency}^{local mean}$) от порядка SOFI.



Рис. 3.18. Зависимость отношения $K/K_{efficiency}^{local mean}$ от порядка алгоритма.

Видно, что эффективность данного улучшения падает с повышением порядка алгоритма: примерно, 30% для SOFI 2 до 10% для SOFI 8. Таким образом, применение изображения локальной средней интенсивности целесообразно для алгоритма SOFI не выше 6 порядка.

3.5. Принцип комбинирования голографической и BaLM микроскопии

Предложена оптическая схема, использующая методы внеосевоой цифровой голографии и локализационной флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Такое сочетание позволяет проводить исследования динамических изменений биологических объектов. В живых результате применения голографического метода записи и последующего восстановления фазовой и информации об объекте, появилась амплитудной возможность проводить визуализацию динамических изменений в живых биологических образцах. Применение голографического подхода позволяет получать сверхвысокую чувствительность к продольным изменениям оптической длины пути. Поперечное разрешение остается ограничено дифракционным пределом. Для преодоления

этого ограничения можно комбинировать голографический метод с одним из улучшения поперечного разрешения локализационной подходов для микроскопией. И в зависимости от биологического объекта можно подобрать оптимальный метод анализа данных для корректного восстановления последовательности флуоресцентных изображений.

Реализация совмещения в одной оптической схеме преимуществ цифровой внеосевой голографической микроскопии с применением интерферометрического сравнения восстановленных изображений и метода микроскопии BaLM была проведена на базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). Данная модификация дополняет широкие возможности способом лабораторного микроскопа дополнительным сбора данных И значительным увеличением разрешения. Было использовано приложение цифровой внеосевой голографии к флуоресцентному микроскопу, так как для метода BaLM необходим именно флуоресцирующий образец. Тогда такое совмещение требует небольших конструктивных изменений и дает возможность изображений сверхвысоким разрешением получения co параллельно И использовать стандартные функции микроскопа.

Схема собрана на виброзащищенном основании RS 2000 (Newport, США) базового микроскопа. На рисунке 3.19 представлено принципиальное расположение оптических элементов для реализации голографической записи. Для устранения перекрытия дифракционных порядков на этапе восстановления использована внеосевая голографическая схема Лейта–Упатниекса. На рисунке 3.20 представлена схема для метода BaLM-микроскопии. Конструктивно элементы схемы подобраны таким образом, что для перехода от одного метода к другому требуются минимальные изменения.

Рассмотрим особенности голографической части схемы (см. рис. 3.19). Для голографии необходимо когерентное освещение, а для возбуждения флуоресценции в методе BaLM это не обязательно (например, подходит ксеноновая или ртутная лампы). Для компактности в обоих методах в качестве осветителя использовался гелий-неоновый лазер 1 с длинной волны 633 нм,

113

который может быть заменен на лазер с любой другой длиной волны в зависимости от поставленных задач. С помощью светоделительной призмы 4 мы получаем два когерентных световых пучка. Один из них, предметный, проходя оптический тракт микроскопа, освещает объект через исследования 2, изображение которого проецируется на фоторегистратор 5. Другой пучок при помощи оптического клина заводится на регистрирующую среду 5 в качестве опорного пучка. Для того, чтобы при сведении пучки имели одинаковые поперечные размеры, опорный пучок расширяется с помощью коллиматора с диафрагмой 6, а предметный расширяется после прохождения микрообъектива. Также необходимо уравнять интенсивности интерферирующих пучков. Предметный пучок ослабляется за счет прохождения через исследуемый препарат, поэтому необходимо поставить соответствующий фильтр на опорный луч. При конфигурировании схемы также соблюдалось равенство оптических путей предметного и опорного пучков. В качестве фоторегистратора для голограмм использовалась цифровая КМОП-камера VEC-545, имеющая матрицу формата 1/2,5 дюйма с числом пикселов 2592х1944, размером 2,2 микрона.

флуоресцентных изображений для При записи серии метода BaLM микроскопии конструктивно используется та же схема. Для возбуждения флуоресценции в исследуемом образце можно использовать когерентный источник излучения, поэтому для возбуждения флуорофоров с полосой поглощения вблизи 633 нанометров используется тот же гелий неоновый лазер. Опорный пучок не нужен – он перекрывается (или удаляется светоделитель 4 (см. рис. 3.19.)). Пучок, освещающий образец, теперь возбуждает флуоресценцию в препарате. В такой конфигурации следует учесть, что вместе с интересующим нас эмиссионным излучением на регистрирующую цифровую матрицу также будет приходить и большее по интенсивности возбуждающее излучение. Для того, чтобы отсечь слишком интенсивное на этом этапе излучение накачки, необходимо после образца, но перед матрицей поставить интерференционный фильтр на его длину волны. В противном случае на фоне излучения,

используемого для возбуждения, невозможно будет детектировать более слабое по интенсивности длинноволновое мерцание флуорофоров.



Рис. 3.19. Принципиальная схема записи голограмм в широкопольном режиме работы микроскопа. 1-лазер, 2-объект, 3- коллиматор, 4- светоделительная призма 5 -цифровая матрица, 6 -коллиматор с диафрагмой, 7,9-зеркало, 8-оптический клин, 10-микроскоп.



Рис. 3.20. Принципиальная схема записи данных BaLM микроскопии. 1-лазер, 2-объект, 3коллиматор, 4- спектральный фильтр, 5 - цифровая матрица, 6- микроскоп.

В результате применения голографического метода записи и последующего восстановления фазовой и амплитудной информации объекта, появляется возможность проведения визуализации динамических изменений в живых биологических образцах. Для обработки BaLM данных может быть использован как метод SOFI, так и SHRImP алгоритм. Это зависит от типа флуорофоров

(эндогенный или экзогенный), необходимой скорости восстановления, периода изменения объекта и типа самих получаемых данных.

3.6 Изучение живых клеточных культур с помощью комбинированных методов BaLM и голографической микроскопии

При совмещении методов BaLM-микроскопии и голографической микроскопии выполнено мультимодальное исследование живых клеточных культур. Проведен анализ морфологической и функциональной динамики биообъектов на основе полученных данных. Анализ динамики структуры и функционального состояния биообъектов на основе данных, полученных при совместном использовании методов BaLM-микроскопии и голографической микроскопии, был проведен на культурах клеток линии кератиноцитов Het-1A в ходе их обычного развития при культивировании в питательной среде и при воздействии фармакологического ингибитора пролиферации клеток. Известно, что аппликация в среду выбранного фармакологического агента вызывает угнетение пролиферации клеток линии кератиноцитов Het-1A в ходе.

Фазовые портреты клеток культуры при фармакологическом воздействии (см. рис. 3.21) и при нормальном развитии (см. рис. 3.22) в начале наблюдения (а) – через полчаса после перемещения препарата из стационарного инкубатора в компактный на столике микроскопа (и введении в среду ингибитора пролиферации клеток в 1-ом случае), через 8 часов (б) и через 16 часов (в) выявляют, что фармакологическое воздействие вызывает снижение плотности внутриклеточных компонент, что показывает уменьшение ОРХ. Через 8 часов остается лишь небольшое плотное образование, а через 16 часов по всему объему клетки плотность существенно снижается по сравнению с контрольной серией, в которой в процессе развития происходят структурные изменения, отражающиеся в перераспределении плотности, но в среднем она остается на прежнем уровне.



Рис. 3.21. Динамика ОРХ клетки линии Het-1А в среде с добавлением ингибитора пролиферации.



Рис. 3.22. Динамика ОРХ клетки линии Het-1А при культивировании в питательной среде.

Вероятно, что динамика оптической плотности вызвана изменением структуры внутриклеточных органелл, в частности, микротрубочек, которые хорошо видны на флуоресцентных изображениях со сверхвысоким разрешением, полученных при параллельном применении методики BaLM.

Для получения флуоресцентных изображений использовали иммуноцитохимический метод маркирования белка микротрубочек. Четкая структура микротрубочек клетки в питательной среде сохраняется на протяжении всего эксперимента (см. рис. 3.23), тогда как с течением времени структура микротрубочек клетки, подвергшейся воздействию ингибитора пролиферации, нарушается (см. рис. 3.24).



Рис. 3.23. Микротрубочки клетки линии Het-1А в питательной культуральной среде через 8 час. наблюдения.



Рис. 3.24. Микротрубочки клетки линии Het-1А в питательной культуральной среде с добавлением ингибитора пролиферации через 8 час. наблюдения.

Результаты показывают, что при мультимодальном (голографическом, совмещенным с BaLM-методикой сверхвысокого разрешения) исследовании живых систем можно получить уникальные прижизненные данные о динамике морфо-функционального состояния живых культур и тканей с субклеточным разрешением.

3.7. Выводы

Были совмещения голографии флуоресцентной рассмотрены пути И локализационной микроскопии. Обсуждаются основные параметры, влияющие на возможного разрешения. Реализован достижение максимально метод локализационной сверхразрешающей микроскопии BaLM для визуализации окрашенных фиксированных и живых клеточных культур и фиксированных тканей. Алгоритмы SHRImP SOFI срезов И применены для анализа флуоресцентных данных от фиксированных клеточных культурах.

Введен коэффициент эффективности работы SOFI алгоритма. Для SOFI коэффициент корреляции Пирсона между теоретической и практической зависимостями составила 0,996. Применение коэффициента эффективности

позволило оценить использование эквализации гистограммы интенсивности и выявило необходимость использования порядка SOFI больше 8. Показано, что эффективность использования изображения локальной средней интенсивности падает с повышением порядка алгоритма: примерно, 30% для SOFI 2 и до 10% для SOFI 8. образом, применение изображения локальной Таким средней интенсивности целесообразно для алгоритма SOFI не выше 6 порядка. Предложена принципиальная оптическая комбинирования И схемы локализационной и внеосевой цифровой голографической микроскопии, на базе которой изучены живые клеточные культуры. На примере живой культуры клеток линии кератиноцитов Het-1A в ходе их обычного развития при культивировании в питательной воздействии фармакологического среде И при ингибитора пролиферации клеток, методом голографической и BaLM микроскопии получена динамика их морфо-функционального состояния.

Заключение

Сформируем кратко основные результаты диссертации.

- Теоретически оценены предельно достижимые параметры цифровой внеосевой голографической микроскопии. Реализован и протестирован в численном эксперименте на синтезированных объектах алгоритм восстановления цифровых голограмм и расчёта разности фаз по результатам голографической интерферометрии.
- 2. Для локализационной флуоресцентной микроскопии BaLM впервые выведено теоретическое выражение для расчета оптимальной мощности возбуждения флуоресценции. Выполнены расчеты оптимальной мощности возбуждения для ряда коммерческих флуорофоров.
- 3. Разработаны физические основы оптических схем для совмещения аналоговой и цифровой голографической регистрации, а также цифровой осевой и внеосевой голографии с флуоресцентной микроскопией, и цифровой внеосевой голографии и методом BaLM микроскопии сверхвысокого разрешения
- Получены характерные времена распространения потенциалов действия в аксонах нейронов гиппокампа мозга крысы после действия катализатора KCl с помощью цифровой внеосевой голографии
- 5. Получены характерные периоды спонтанной и индуцированной нейрональной активности параллельными методами флуоресцентного кальциевого имиджинга и анализа временного ряда фазовых портретов.
- 6. Для оценки эффективности работы алгоритмов микроскопии сверхвысокого разрешения предложено использование коэффициента, равного отношению

ширин на полувысоте профилей распределения интенсивности структур на исходном и обработанном изображениях. Применение SOFI 2 порядка превышает дифракционный предел в 1,48±0,22 раза, SOFI 4 порядка в 2,02±0,23, SOFI 6 порядка в 2,46±0,27, SOFI 8 порядка в 3,03±0,39 раза. Проблема растяжения динамического диапазона при использовании SOFI алгоритма распределения интенсивностей исходных данных решена эффективность применением эквализации. Показана применения изображений локальной средней интенсивности, равная 29,1±2,6% для SOFI 2 и 10,2±7,3% для SOFI 8 порядка.

Список сокращений

ДИК (DIC) – дифференциально-интерференционный контраст

КМОП – комплементарная структура металл-оксид-полупроводник

ЛСМ – лазерная сканирующая микроскопия

ОДП – оптическая длина пути

ОРХ – оптическую разность хода

ПД – потенциал действия

ПЗС – прибор с зарядовой связью

ФРТ – функция рассеяния точки

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель,

ЦГМ – цифровая голографическая микроскопия

3B – Bayesian analysis of blinking and bleaching

BaLM – bleaching /blinking assisted localization microscopy

CCD - charge-coupled device

CLEM – correlated light and electron microscopy (корреляционная световая и электронная микроскопия)

CMOS - complementary metal-oxide-semiconductor

DMD – digital micromirror devices

NSOM (SNOM) – near-field scanning optical microscopy или scanning near-field optical microscopy

PALM – photo-activated localization microscopy (фотоактивируемая локализационная микроскопия)

RESOLFT – reversible saturable optical linear fluorescence transitions (микроскопия обратимого насыщенного оптического линейного флуоресцентного перехода)

SHRImP - single-molecule high-resolution imaging with photobleaching

SIM – structured illumination microscopy (микроскопия структурированного освещения)

SMLM – single-molecule localization microscopy (локализационная микроскопия одиночных молекул)

SOFI - super-resolution optical fluctuation imaging

STED – stimulated emission depletion microscopy (микроскопия на основе истощения флуоресценции вынужденным излучением)

STORM – stochastic optical reconstruction microscopy (микроскопия стохастической оптической реконструкции)

Литература

- Cogswell, C. J. Fluorescence microtomography: multiangle image acquisition and 3D digital reconstruction / C.J. Cogswell, K.G. Larkin, H.U. Klemm // Electronic Imaging: Science and Technology. 1996. – Vol. 2655. P. 109.
- Barer, R. Determination of Dry Mass, Thickness, Solid and Water Concentration in Living Cells / R. Barer // Nature. – 1953. – Vol. 172, N. 4389. – P. 1097.
- Kim, T. Gradient field microscopy for label-free diagnosis of human biopsies [Invited] / T. Kim, S. Sridharan, A. Kajdacsy-Balla, K. Tangella, G. Popescu // Applied Optics. – 2013. – Vol. 52, N. 1. – P. A92.
- Creath, K. Phase-shifting speckle interferometry / K. Creath // Applied Optics. 1985. – Vol. 24, N. 18. – P. 3053.
- Levin, G. G. Application of computerized interference microscope for monitoring oscillations of dry cell weight and morphology of living cells / G.G. Levin, T.V. Bulygin, E. Kalinin, G.N. Vishnyakov // SPIE. / SPIE, Editor., 2001. Vol. 4260. P. 149.
- Kozinets, G. I. Blood cell research using methods of microinterferometry / G.I. Kozinets, J.K. Novoderzhkina, E.A. Streletskaya, G.G. Levin, G.N. Vishnyakov // BiOS. 1997. – Vol. 2982. P. 490.
- Tychinskii, V. P. Coherent phase microscopy of intracellular processes / V.P. Tychinskii // Physics-Uspekhi. – 2001. – Vol. 44, N. 6. – P. 617.
- Waters, J. C. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy / J.C. Waters // The Journal of Cell Biology. – 2009. – Vol. 185, N. 7. – P. 1135.

- Tychinsky, V. P. Interference Microscopy in Cell Biophysics. 1. Principles and Methodological Aspects of Coherent Phase Microscopy / V.P. Tychinsky, A.N. Tikhonov // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2010. – Vol. 58, N. 3. – P. 107.
- Островский, Ю.И. Голографическая интерферометрия / Ю.И. Островский. , 1977of.
- Prikryl, I. Holographic interferometry of transparent media using light scattered by embedded test objects / I. Prikryl, C.M. Vest // Applied Optics. – 1982. – Vol. 21, N. 14. – P. 2554.
- Hansen, R. S. Deformation measurements of specularly reflecting objects using holographic interferometry with diffuse illumination / R.S. Hansen // Optics and Lasers in Engineering. – 1997. – Vol. 28, N. 4. – P. 259.
- Toh, S. L. Time-average shearography in vibration analysis / S.L. Toh, C.J. Tay, H.M. Shang, Q.Y. Lin // Optics & Laser Technology. – 1995. – Vol. 27, N. 1. – P. 51.
- Kumar, U. P. Time-average TV holography for vibration fringe analysis / U.P. Kumar, Y. Kalyani, N.K. Mohan, M.P. Kothiyal // Applied Optics. 2009. Vol. 48, N. 16. P. 3094.
- Pedrini, G. High-speed digital holographic interferometry for vibration measurement / G. Pedrini, W. Osten, M.E. Gusev // Applied Optics. – 2006. – Vol. 45, N. 15. – P. 3456.
- Tiziani, H.J. Digital Double-Pulse Holographic Interferometry for Vibration Analysis / H.J. Tiziani, G. Pedrini // Shock and Vibration. – 1996. – Vol. 3, N. 2.
- Poittevin, J. Multi-point vibrometer based on high-speed digital in-line holography / J. Poittevin, P. Picart, C. Faure, F. Gautier, C. Pézerat // Applied Optics. – 2015. – Vol. 54, N. 11. – P. 3185.
- Schnars, U. Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms / U. Schnars // Journal of the Optical Society of America A. – 1994. – Vol. 11, N. 7. – P. 2011.

- Camacho, L. Quantitative phase microscopy using defocusing by means of a spatial light modulator / L. Camacho, V. Micó, Z. Zalevsky, J. García // Optics Express. – 2010. – Vol. 18, N. 7. – P. 6755.
- 20. Гусев, М.Е. Применение методов цифровой голографической интерферометрии для регистрации наноперемещений / М.Е. Гусев, И.Ю. Гусева, И.В. Алексеенко, В.С. Гуревич, А.М. Исаев, В.И. Редкович // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Физико-математические и технические науки. 2011. N. 5. Р. 5.
- Kreis, T. Digital holographic interference-phase measurement using the Fouriertransform method / T. Kreis // Journal of the Optical Society of America A. – 1986. – Vol. 3, N. 6. – P. 847.
- Herráez, M.A. Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path / M.A. Herráez, D.R. Burton, M.J. Lalor, M.A. Gdeisat // Applied Optics. 2002. Vol. 41, N. 35. P. 7437.
- 23. Karray, M. Comparison between Digital Fresnel Holography and Digital Image-Plane Holography: The Role of the Imaging Aperture / M. Karray, P. Slangen, P. Picart // Experimental Mechanics. 2012. Vol. 52, N. 9. P. 1275.
- Vijayakumar, A. Coded aperture correlation holography–a new type of incoherent digital holograms / A. Vijayakumar, Y. Kashter, R. Kelner, J. Rosen // Optics Express. – 2016. – Vol. 24, N. 11. – P. 12430.
- Zhang, T. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography /
 T. Zhang, I. Yamaguchi // Optics Letters. 1998. Vol. 23, N. 15. P. 1221.
- Yamaguchi, I. Phase-shifting digital holography / I. Yamaguchi, T. Zhang // Optics Letters. – 1997. – Vol. 22, N. 16. – P. 1268.
- Yun, H. Y. Interframe intensity correlation matrix for self-calibration in phase-shifting interferometry / H.Y. Yun, C.K. Hong // Applied Optics. 2005. Vol. 44, N. 23. P. 4860.

- 28. Guo, P. Digital microscopy using phase-shifting digital holography with two reference waves / P. Guo, A.J. Devaney // Optics Letters. 2004. Vol. 29, N. 8. P. 857.
- Liu, J. Two-step-only quadrature phase-shifting digital holography / J. Liu, T. Poon // Optics Letters. 2009. Vol. 34, N. 3. P. 250.
- 30. Tahara, T. Parallel phase-shifting digital holographic microscopy / T. Tahara, K. Ito, T. Kakue, M. Fujii, Y. Shimozato, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, T. Kubota, O. Matoba // Biomedical Optics Express. 2010. Vol. 1, N. 2. P. 610-616.
- Guo, C. Phase-shifting error and its elimination in phase-shifting digital holography / C. Guo, L. Zhang, H. Wang, J. Liao, Y.Y. Zhu // Optics Letters. – 2002. – Vol. 27, N. 19. – P. 1687-1689.
- Wang, Z. Advanced iterative algorithm for phase extraction of randomly phaseshifted interferograms / Z. Wang, B. Han // Optics Letters. – 2004. – Vol. 29, N. 14. – P. 1671-1673.
- Xu, X. F. Simple direct extraction of unknown phase shift and wavefront reconstruction in generalized phase-shifting interferometry: algorithm and experiments / X.F. Xu, L.Z. Cai, Y.R. Wang, X.F. Meng, W.J. Sun, H. Zhang, X.C. Cheng, G.Y. Dong, X.X. Shen // Optics Letters. – 2008. – Vol. 33, N. 8. – P. 776-778.
- 34. Choi, W. Tomographic phase microscopy / W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R.R. Dasari, M.S. Feld // Nat Meth. 2007. Vol. 4, N. 9. P. 717-719.
- Ichioka, Y. Direct Phase Detecting System / Y. Ichioka, M. Inuiya // Applied Optics. – 1972. – Vol. 11, N. 7. – P. 1507-1514.
- Mertz, L. Real-time fringe-pattern analysis / L. Mertz // Applied Optics. 1983. –
 Vol. 22, N. 10. P. 1535-1539.
- Liebling, M. Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram / M. Liebling, T. Blu, M. Unser // Journal of the Optical Society of America A. 2004. Vol. 21, N. 3. P. 367-377.

- Carl, D. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis / D. Carl, B. Kemper, G. Wernicke, G. von Bally // Applied Optics. – 2004. – Vol. 43, N. 36. – P. 6536-6544.
- Leith, E. N. Reconstructed Wavefronts and Communication Theory / E.N. Leith,
 J. Upatnieks // Journal of the Optical Society of America. 1962. Vol. 52, N.
 10. P. 1123-1130.
- Coquoz, O. Performances of endoscopic holography with a multicore optical fiber / O. Coquoz, R. Conde, F. Taleblou, C. Depeursinge // Applied Optics. – 1995. – Vol. 34, N. 31. – P. 7186-7193.
- 41. Schnars, U. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction / U. Schnars, W. Jüptner // Applied Optics. 1994. Vol. 33, N. 2. P. 179-181.
- 42. Takeda, M. Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computerbased topography and interferometry / M. Takeda, H. Ina, S. Kobayashi // Journal of the Optical Society of America. – 1982. – Vol. 72, N. 1. – P. 156-160.
- 43. Cuche, E. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms / E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge // Applied Optics. 1999. Vol. 38, N. 34. P. 6994-7001.
- 44. Digital Holography Configurations / M.K. Kim // In: Kim, M. K. Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications / Edited by New York, NY: Springer New York, 2011. – P. 55-69.
- 45. Colomb, T. Polarization microscopy by use of digital holography: application to optical-fiber birefringence measurements / T. Colomb, F. Dürr, E. Cuche, P. Marquet, H.G. Limberger, R. Salathé, C. Depeursinge // Applied Optics. 2005. Vol. 44, N. 21. P. 4461-4469.
- Kim, Y. Polarization holographic microscopy for extracting spatio-temporally resolved Jones matrix / Y. Kim, J. Jeong, J. Jang, M. Kim, Y. Park // Optics Express. – 2012. – Vol. 20, N. 9. – P. 9948-9955.

- 47. Kühn, J. Real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a single hologram acquisition / J. Kühn, T. Colomb, F. Montfort, F. Charrière, Y. Emery, E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge // Optics Express. 2007. Vol. 15, N. 12. P. 7231-7242.
- Cuche, E. Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography / E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge // Applied Optics. 2000. Vol. 39, N. 23. P. 4070-4075.
- 49. Colomb, T. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation / T. Colomb, E. Cuche, F. Charrière, J. Kühn, N. Aspert, F. Montfort, P. Marquet, C. Depeursinge // Applied Optics. 2006. Vol. 45, N. 5. P. 851-863.
- Colomb, T. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram / T. Colomb, J. Kühn, F. Charrière, C. Depeursinge, P. Marquet, N. Aspert // Optics Express. – 2006. – Vol. 14, N. 10. – P. 4300-4306.
- Kühn, J. Axial sub-nanometer accuracy in digital holographic microscopy / J. Kühn, F. Charrière, T. Colomb, E. Cuche, F. Montfort, Y. Emery, P. Marquet, C. Depeursinge // Measurement Science and Technology. 2008. Vol. 19, N. 7. P. 074007.
- 52. Kemper, B. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy / B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke, G. von Bally // Journal of Biomedical Optics. 2006. Vol. 11, N. 3. P. 034005.
- 53. Rappaz, B. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy / B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuche, Y. Emery, C. Depeursinge, P.J. Magistretti // Optics Express. 2005. Vol. 13, N. 23. P. 9361-9373.
- 54. Marquet, P. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength

axial accuracy / P. Marquet, B. Rappaz, P.J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, C. Depeursinge // Optics Letters. – 2005. – Vol. 30, N. 5. – P. 468-470.

- 55. Farinas, J. Cell volume and plasma membrane osmotic water permeability in epithelial cell layers measured by interferometry / J. Farinas, A.S. Verkman // Biophysical Journal. – 1996. – Vol. 71, N. 6. – P. 3511-3522.
- Vishnyakov, G. N. Interferometric-computed microtomography of 3D phase objects / G.N. Vishnyakov, G.G. Levin, C.S. Zakarian // BiOS 1997. Vol. 2984.
 P. 64.
- Vishnyakov, G. N. Optical tomography of living cells using a phase-shifting Linnik microscope / G.N. Vishnyakov, G.G. Levin // SPIE. 1999. – Vol. 3568. P. 197.
- Matula, P. Precise 3D image alignment in micro-axial tomography / P. Matula, M. Kozubek, F. Staier, M. Hausmann // Journal of Microscopy. – 2003. – Vol. 209, N. 2. – P. 126.
- 59. Takeda, M. Fourier transform profilometry for the automatic measurement of 3-D object shapes / M. Takeda, K. Mutoh // Applied Optics. 1983. Vol. 22, N. 24. P. 3977.
- Mir, M. Optical measurement of cycle-dependent cell growth / M. Mir, Z. Wang,
 Z. Shen, M. Bednarz, R. Bashir, I. Golding, S.G. Prasanth, G. Popescu //
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
 America. 2011. Vol. 108, N. 32. P. 13124.
- Tetard, L. Imaging nanoparticles in cells by nanomechanical holography / L. Tetard, A. Passian, K.T. Venmar, R. Lynch, B.H. Voy, G. Shekhawat, V.P. Dravid, T. Thundat // nature nanotechnology. 2008. Vol. 3. P. 501.
- Stanislav, K. Light Microscopy in Biological Research / K. Stanislav // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88, N. 6. – P. 3741.
- Erhardt, A. Reconstructing 3-D light-microscopic images by digital image processing / A. Erhardt, G. Zinser, D. Komitowski, J. Bille // Applied Optics. 1985. Vol. 24, N. 2. P. 194.

- Lichtman, J.W. Fluorescence microscopy / J.W. Lichtman, J. Conchello // Nat Meth. – 2005. – Vol. 2, N. 12. – P. 910.
- Cody, S. H. A simple method allowing DIC imaging in conjunction with confocal microscopy / S.H. Cody, S.D. Xiang, M.J. Layton, E. Handman, M.H.C. Lam, J.E. Layton, E.C. Nice, J.K. Heath // Journal of Microscopy. – 2005. – Vol. 217, N. 3. – P. 265.
- Wilson, T. Spinning-Disk Microscopy Systems / T. Wilson // Cold Spring Harbor Protocols. – 2010. – Vol. 2010, N. 11. – P. 88.
- Kudalkar, E. M. Single-Molecule Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy / E.M. Kudalkar, T.N. Davis, C.L. Asbury // Cold Spring Harbor Protocols. – 2016. – Vol. 2016, N. 5. – P. 077800.
- Mattheyses, A. L. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist / A.L. Mattheyses, S.M. Simon, J.Z. Rappoport // Journal of Cell Science. – 2010. – Vol. 123, N. 21. – P. 3621.
- Fu, Y. Axial superresolution via multiangle TIRF microscopy with sequential imaging and photobleaching / Y. Fu, P.W. Winter, R. Rojas, V. Wang, M. McAuliffe, G.H. Patterson // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Vol. 113, N. 16. – P. 4368.
- Schermelleh, L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy / L.
 Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt // The Journal of Cell Biology. –
 2010. Vol. 190, N. 2. P. 165.
- 71. Chung, E. Two-Dimensional Standing Wave Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: Superresolution Imaging of Single Molecular and Biological Specimens / E. Chung, D. Kim, Y. Cui, Y. Kim, P.T.C. So // Biophysical Journal. – 2007. – Vol. 93, N. 5. – P. 1747.
- 72. Тучин, В.В. Оптическая Биомедицинская диагностика / В.В. Тучин // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2005. – Vol. 5, N. 1. – Р. 15.

- 73. Betzig, E. Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit / E. Betzig, J.K. Trautman // Science.
 1992. Vol. 257, N. 5067. P. 189.
- Dunn, R. C. Near-Field Scanning Optical Microscopy / R.C. Dunn // Chemical Reviews. – 1999. – Vol. 99, N. 10. – P. 2891.
- Alu, A. Cloaked Near-Field Scanning Optical Microscope Tip for Noninvasive Near-Field Imaging / A. Alu, N. Engheta // Physical Review Letters. – 2010. – Vol. 105, N. 26. – P. 263906.
- 76. Fernandez-Suarez, M. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells / M. Fernandez-Suarez, A.Y. Ting // Nat Rev Mol Cell Biol. 2008. Vol. 9, N. 12. P. 929.
- van Zanten, T. S. A nanometer scale optical view on the compartmentalization of cell membranes / T.S. van Zanten, A. Cambi, M.F. Garcia-Parajo // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 2010. Vol. 1798, N. 4. P. 777.
- Gustafsson, M. G. L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy / M.G.L. Gustafsson // Journal of Microscopy. – 2000. – Vol. 198, N. 2. – P. 82.
- Huang, B. Super resolution fluorescence microscopy / B. Huang, M. Bates, X. Zhuang // Annual review of biochemistry. 2009. Vol. 78. P. 993.
- Lakadamyali, M. Super-Resolution Microscopy: Going Live and Going Fast / M. Lakadamyali // ChemPhysChem. – 2014. – Vol. 15, N. 4. – P. 630.
- 81. Schermelleh, L. Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy / L. Schermelleh, P.M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M.C. Cardoso, D.A. Agard, M.G.L. Gustafsson, H. Leonhardt, J.W. Sedat // Science (New York, N.Y.). 2008. Vol. 320, N. 5881. P. 1332.
- Fitzgibbon, J. Super-Resolution Imaging of Plasmodesmata Using Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy / J. Fitzgibbon, K. Bell, E. King, K. Oparka // Plant Physiology. – 2010. – Vol. 153, N. 4. – P. 1453.

- 83. Gustafsson, M. G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution / M.G.L. Gustafsson
 // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. Vol. 102, N. 37. P. 13081.
- 84. Li, D. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics / D. Li, L. Shao, B. Chen, X. Zhang, M. Zhang, B. Moses, D.E. Milkie, J.R. Beach, J.A. Hammer, M. Pasham, T. Kirchhausen, M.A. Baird, M.W. Davidson, P. Xu, E. Betzig // Science. 2015. Vol. 349, N. 6251. P. aab3500.
- Hell, S. W. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy / S.W. Hell, J. Wichmann // Opt Lett. – 1994. – Vol. 19, N. 11. – P. 780.
- 86. Klar, T. A. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission / T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S.W. Hell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2000. – Vol. 97, N. 15. – P. 8206.
- 87. Vicidomini, G. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating / G. Vicidomini, G. Moneron, K.Y. Han, V. Westphal, H. Ta, M. Reuss, J. Engelhardt, C. Eggeling, S.W. Hell // Nat Meth. 2011. Vol. 8, N. 7. P. 571.
- Nägerl, U. V. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy / U.V.
 Nägerl, K.I. Willig, B. Hein, S.W. Hell, T. Bonhoeffer // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105, N. 48. P. 18982.
- Lauterbach, M. A. Comparing video-rate STED nanoscopy and confocal microscopy of living neurons / M.A. Lauterbach, J. Keller, A. Schönle, D. Kamin, V. Westphal, S.O. Rizzoli, S.W. Hell // Journal of Biophotonics. 2010. Vol. 3, N. 7. P. 417.
- Berning, S. Nanoscopy in a Living Mouse Brain / S. Berning, K.I. Willig, H. Steffens, P. Dibaj, S.W. Hell // Science. 2012. Vol. 335, N. 6068. P. 551.
- 91. Hell, S. W. Toward fluorescence nanoscopy / S.W. Hell // Nat Biotech. 2003. Vol. 21, N. 11. P. 1347.

- 92. Schwentker, A. M. Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescent protein photoswitching / A.M. Schwentker, H. Bock, M. Hofmann, S. Jakobs, J. Bewersdorf, C. Eggeling, S.W. Hell // Microscopy Research and Technique. – 2007. – Vol. 70, N. 3. – P. 269.
- 93. Hofmann, M. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins / M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, S.W. Hell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. Vol. 102, N. 49. P. 17565.
- 94. Testa, I. Nanoscopy of Living Brain Slices with Low Light Levels / I. Testa, N.T. Urban, S. Jakobs, C. Eggeling, K. Willig, S.W. Hell // Neuron. 2012. Vol. 75, N. 6. P. 992.
- 95. Bewersdorf, J. Comparison of I5M and 4Pi-microscopy / J. Bewersdorf, R. Schmidt, S.W. Hell // Journal of Microscopy. 2006. Vol. 222, N. 2. P. 105.
- 96. Rust, M. J. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) / M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang // Nat Meth. – 2006. – Vol. 3, N. 10. – P. 793.
- 97. Huang, B. Three-dimensional Super-resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy / B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang // Science (New York, N.Y.). – 2008. – Vol. 319, N. 5864. – P. 810.
- 98. Betzig, E. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution / E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess // Science. 2006. Vol. 313, N. 5793. P. 1642.
- 99. Hess, S.T. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy / S.T. Hess, T.K. Girirajan, M.D. Mason // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 91, N. 11. – P. 4258.
- Huang, B. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution / B. Huang, S.A. Jones, B. Brandenburg, X. Zhuang // Nat Meth. 2008. Vol. 5, N. 12. P. 1047.

- 101. Xu, K. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton / K. Xu, H.P. Babcock, X. Zhuang // Nat Meth. – 2012. – Vol. 9, N. 2. – P. 185.
- 102. Shtengel, G. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure / G. Shtengel, J.A. Galbraith, C.G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J.M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C.M. Waterman, P. Kanchanawong, M.W. Davidson, R.D. Fetter, H.F. Hess // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106, N. 9. P. 3125.
- 103. Wang, Y. Sub-diffraction imaging with confocal fluorescence microscopy by stochastic photobleaching / Y. Wang, C. Kuang, H. Cai, S. Li, W. Liu, X. Hao, J. Ge, X. Liu // Optics Communications. – 2014. – Vol. 312. – P. 62.
- 104. Burnette, D.T. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules / D.T. Burnette, P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, B. Kachar // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108, N. 52. – P. 21081.
- 105. Simonson, P. D. Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores / P.D. Simonson, E. Rothenberg, P.R. Selvin // Nano letters. – 2011. – Vol. 11, N. 11. – P. 5090.
- 106. Gordon, M.P. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching / M.P. Gordon, T. Ha, P.R. Selvin // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004. Vol. 101, N. 17. P. 6462.
- 107. Dertinger, T. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) / T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, J. Enderlein // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, N. 52. – P. 22287.
- 108. Dertinger, T. Superresolution Optical Fluctuation Imaging with Organic Dyes / T. Dertinger, M. Heilemann, R. Vogel, M. Sauer, S. Weiss // Angewandte Chemie International Edition. 2010. Vol. 49, N. 49. P. 9441.

- 109. Cox, S. Super-resolution imaging in live cells / S. Cox // Developmental Biology.
 2015. Vol. 401, N. 1. P. 175.
- 110. Geissbuehler, S. Comparison between SOFI and STORM / S. Geissbuehler, C. Dellagiacoma, T. Lasser // Biomedical Optics Express. 2011. Vol. 2, N. 3. P. 408.
- 111. Cox, S. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics
 / S. Cox, E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D.T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G.E. Jones, R. Heintzmann // Nat Meth. 2012. Vol. 9, N. 2. P. 195.
- 112. Cox, S. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics
 / S. Cox, E. Rosten, J. Monypenny of Pitmilly, T. Jovanovic-Talisman, D.T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G.E. Jones, R. Heintzmann // NATURE METHODS. 2012. Vol. 9, N. 2. P. 195.
- 113. Ikeda, T. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems / T. Ikeda, G. Popescu, R.R. Dasari, M.S. Feld // Optics Letters. 2005. Vol. 30, N. 10. P. 1165.
- 114. Кольер, Р. Оптическая голография / Р. Кольер, К. Беркхарт, Л. Лин. –, 1973of.
- 115. Wang, Z. Phase Reconstruction with Automatic Angular-Spectrum Filtering in Dual-Wavelength Digital Holography / Z. Wang, Z. Jiang, Y. Chen, Y. Wan // Imaging and Applied Optics 2014. Optical Society of America. - Seattle, Washington, 2014. – Vol. P. JTu4A.26.
- 116. Колфилд, Г Оптическая голография / Г. Колфилд. М.: Мир, 1982. 376 с.
- 117. Dieterlen, A. Recent advances in 3-D fluorescence microscopy: tomography as a source of information / A. Dieterlen, M. Debailleul, A. De Meyer, B. Simon, V. Georges, B. Colicchio, O. Haeberlé, V. Lauer // Eighth International Conference on Correlation Optics. 2007. – Vol. 7008. P. 70080S-70080S-8.
- 118. Захаров, Ю.Н. Применение сканирующих интерферометров Фабри Перо в задачах регистрации быстропротекающих процессов / Ю.Н. Захаров, С.Н. Менсов // ЖТФ. – 1982. – Vol. 52, N. 5. – Р. 992.

- 119. Захаров, Ю.Н. Мультиплексные киноголограммы эволюции оптического разряда / Ю.Н. Захаров, Ю.М. Сорокин, Ф.Г. Сучкин // Применение методов голографии в науке и технике. – 1987. – Р. 78.
- 120. Захаров, Ю.Н. Миллисекундная киноголография коллективного оптического разряда / Ю.Н. Захаров, С.Н. Менсов, Ю.М. Сорокин // Оптика атмосферы. – 1989. – Vol. 2, N. 2. – Р. 180.
- 121. Ведунова, М. В. Влияние N-арахидоноилдофамина на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа при моделировании гипоксии / М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина, Т.А. Сахарнова, М.Ю. Бобров, В.В. Безуглов, Л.Г. Хаспеков, И.В. Мухина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Vol. 156. – Р. 447.
- 122. Zakharov, Yu. N. Fluorescence analysis of the metabolic activity patterns of a neuronal–glial network / Y.N. Zakharov, E.V. Mitroshina, M.V. Vedunova, S.A. Korotchenko, Y.I. Kalintseva, I.V. Mukhina, A.V. Potanina // Journal of Optical Technology. – 2012. – Vol. 79, N. 6. – P. 348.
- 123. Dempsey, G. T. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging / G.T. Dempsey, J.C. Vaughan, K.H. Chen, M. Bates, X. Zhuang // NATURE METHODS. – 2011. – Vol. 8, N. 12. – P. 1027.

Список публикаций по теме диссертации

[A1] Lobyntseva (Dudenkova), V. V. Phase Visualization in the Study of Cellular Structures by Confocal Microscopy / V. V. Lobyntseva (Dudenkova), Yu. N. Zakharov// Physics of Wave Phenomena. – 2011. –Vol. 19. No. 1. P. 10.

[A2] Рыбников, А.И. Применение цифровых внеосевых голограмм для исследования изменений состояния живых нейронных культур / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, Ю.Н. Захаров // Оптический журнал. –2013. –Т. 80 (7).– С. 66.

[А3] Муравьева, М.С. Параллельный мониторинг живых клеточных культур при помощи цифровой голографической и флуоресцентной микроскопии / М.С. Муравьева, В.В. Дуденкова, А.И. Рыбников, Ю.Н. Захаров // Известия вузов. Радиофизика. –2014. Т. 57. №8-9. – С. 646.

[А4] Дуденкова, В.В. Получение сверхвысокого разрешения при измерении оптической длины пути и статистической локализации флуорофоров в голографической и флуоресцентной микроскопии / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, А.И. Рыбников, Ю.Н. Захаров // Известия вузов. Радиофизика. –2014.– Т. 57. №8-9.– С. 617.

[А5] Дуденкова, В.В. Регистрация нервных импульсов с помощью скоростной голографической микроскопии / В.В. Дуденкова, Ю.Н. Захаров // Известия высших учебных заведений. Физика.– 2015. –Т. 58. № 11-3. –С. 43.

[А6] Будников, Н.С. Голографический метод количественного измерения фотолитографических реплик толстых рельефных дефектов поверхности / В.В. Дуденкова, В.Е. Котомина, О.А. Морозов, В.В. Семенов // Письма в ЖТФ.– 2017.– Т. 43 (11).–С. 81.

Публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций

[А7] Лобынцева (Дуденкова), Применение цифровой голографии для исследования клеточных структур / В.В. Лобынцева (Дуденкова), Ю.Н. Захаров // XIII Международная телекоммуникационная конференция студентов и молодых ученых "Молодежь и наука». Тезисы докладов. Ч.З. М.: НИЯУ МИФИ, 2010.– С. 128-129.

[A8] B.B. Лобынцева (Дуденкова), Лазерная сканирующая трехмерная микроскопия с использованием цифровой голографии / В.В. Лобынцева (Дуденкова), Ю.Н. Захаров // Сборник трудов Международной конференции и семинаров.Т.1. «Фундаментальные проблемы оптики – 2010»: СПб., 2010. – С. 371 [А9] Захаров, Ю.Н. Визуализация фазы при исследовании клеточных структур с помощью конфокальной микроскопии / Ю.Н. Захаров, B.B. Лобыниева (Дуденкова) // Труды XIV научной конференции по радиофизике, посвященной 80-й годовщине со дня рождения Ю.Н. Бабанова (Нижний Новгород, 7 мая 2010 г.); под ред. С.М. Грача, А.В. Якимова – Нижний Новгород: ННГУ, 2010. – С. 177-178.

[А10] Лобынцева (Дуденкова), В.В. Визуализация фазы при исследовании клеточных структур с помощью конфокальной микроскопии / В.В. Лобынцева (Дуденкова), Ю.Н. Захаров // Труды школы-семинара "Волны-2010"–Москва : МГУ, 2010.–С.14-15.

[А11] Захаров, Ю.Н. Восстановление волнового фронта микроскопических изображений в условиях записи голограмм с нерегулярными фазовыми искажениями сканирующего сигнального луча / Ю.Н. Захаров, В.В. Лобынцева (Дуденкова), М.С. Муравьева // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. Серия Радиофизика. –2011.– № 5(3). – С. 135.

[A12] Лобынцева (Дуденкова), В.В. Разработка метода голографического исследования клеточных культур на конфокальном оптическом микроскопе / В.В. Лобынцева (Дуденкова), Ю.Н. Захаров // Научная сессия НИЯУ МИФИ. Научно-

техническая конференция-семинар по фотонике и информационной оптике: Сборник научных трудов – Москва : НИЯУ МИФИ, 2011. – С. 41-42.

[А13] Мухина, И.В. Исследование мобильности мембран и плотности цитоплазмы клеток нейрональных культур методами голографической интерферометрии / Мухина И.В., Захаров Ю.Н., Лобынцева (Дуденкова) В.В., и др. // ГолоЭкспо-2011. Голография. Наука и практика, 8 Международная научно-практическая конференция; под ред. Л.В.Танина. – Минск, 2011.– С. 240-241.

[А14] Лобынцева (Дуденкова), В.В. Компенсация нерегулярных фазовых искажений изображений сканирующей голографической микроскопии. В.В. Лобынцева (Дуденкова), М.С. Муравьева, Ю.Н. Захаров // Сборник трудов Международной конференции и семинаров. Т.1. «Оптика-2011»; под ред. проф. В.Г. Беспалова, проф. С.А. Козлова.– СПб: НИУИТМО, 2011. – С. 174-176.

[A15] Захаров, Ю. Н. Разработка метода голографического исследования в лазерной сканирующей микроскопии / Ю.Н. Захаров, В.В. Лобынцева (Дуденкова) // Труды XV научной конференции по радиофизике, посвященной 110-й годовщине со дня рождения А.А. Андронова; под ред. С.М. Грача, А.В. Якимова – Нижний Новгород: ННГУ, 2011. – С. 138-139.

[А16] Муравьева, М.С. Исследование нестабильности оптической длины тракта освещения объектов сканирующей лазерной микроскопии голографическим методом / М.С. Муравьева, В.В. Лобынцева (Дуденкова), Ю.Н. Захаров // Всероссийская конференция по фотонике и информационной оптике: Сборник научных трудов.– Москва, 2012.– С. 227-228.

[А17] Мравьева, М.С. Применение аналоговых голограмм для исследования биологических культур на субклеточном уровне / М.С. Мравьева, В.В. Дуденкова, А.И. Рыбников, Ю.Н. Захаров // Труды XVI научной конференции по радиофизике, посвященной 100-летию со дня рождения А. Н. Бархатова; под ред. С.М. Грача, А.В. Якимова – Нижний Новгород: ННГУ, 2012.– С. 165-166.

[A18] Дуденкова, В.В. Сравнение преимуществ аналоговых и цифровых голограмм при исследовании биологических культур с разрешением на субклеточном уровне / В.В. Дуденкова, М.С. Мравьева, А.И. Рыбников, Ю.Н.

Захаров // Труды XVI научной конференции по радиофизике, посвященной 100летию со дня рождения А. Н. Бархатова; под ред. С.М. Грача, А.В. Якимова – Нижний Новгород: ННГУ, 2012.– С. 164-165.

[A19] Mukhina, I. Full field and scanning technique based holography combined with fluorescent microscopy in living cell morphological and functional dynamics / I. Mukhina, O. Shirokova, M. Muravyeva, et.al. // Photonics North 2012.–Montreal, Canada, 2012.–P.86.

[A20] Захаров, Ю.Н. Широкопольная и сканирующая голографическая микроскопия. Особенности конструкции микроскопов, процесса записи и обработки голограмм / Ю.Н. Захаров, В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева и др. // Сборник трудов 9-й Международной конференции «ГолоЭкспо-2012» Голография. Наука и практика.– Суздаль, 2012.– С. 43-45.

[A21] Рыбников, А.И. Применение цифровых внеосевых голограмм для исследования изменений состояния микрообъектов / А.И. Рыбников, В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева и др. // Сборник трудов Международной конференции «Фундаментальные проблемы оптики – 2012». – Санкт-Петербург, 2012. –525 с.

[A22] Муравьева, М.С. Формирование дискретных голограмм в сканирующем режиме записи / М.С. Муравьева, В.В. Дуденкова, Ю.Н. Захаров // Сборник трудов Международной конференции «Фундаментальные проблемы оптики – 2012». – Санкт-Петербург, 2012. –С. 538-539.

B.B. [A23] Дуденкова, Трехмерное сверхразрешение при совмещении голографической и ЗВ микроскопии / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, А.И. Рыбников // Сборник Международной И др. трудов конференции «Фундаментальные проблемы оптики – 2012». – Санкт-Петербург, 2012. – 536 с.

[A24] Дуденкова, В.В. Оптимизация записи изображения при совмещении голографической и ЗВ микроскопии / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, А.И. Рыбников и др. // Сборник трудов Международной конференции и семинаров. VIII Международная конференция молодых ученых и специалистов «Оптика-2013».–Санкт-Петербург, 2013.–364 с.

[A25] Zakharov, Yu. Investigation of neuronal culture cell alteration with the help of digital holographic interferometer attached to laser scanning microscope / Yu. Zakharov, A. Rybnikov, V. Dudenkova et.al. // Optics in the Life Science.– Hawaii, 2013.– JT2A.22

[A26] Муравьева, М.С. Исследование живых клеточных нейрональных культур с помощью широкопольной цифровой голографической микроскопии, совмещенной с кальциевым имиджингом / М.С. Муравьева, В.В. Дуденкова, А.И. Рыбников и др. // Сборник трудов Международной конференции и семинаров. VIII Международная конференция молодых ученых и специалистов «Оптика-2013».–Санкт-Петербург, 2013.– 374с.

[А27] Дуденкова, В.В. Совершенствование многоканальных систем оптической микроскопии при использовании цифровой голографии / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, А.И. Рыбников // Сборник трудов 10-й Международной конференции «ГолоЭкспо–2013» Голография. Наука и практика.– Москва, 2013.– С. 222-228.

[А28] Дуденкова, В.В. Анализ искажений волнового фронта в схеме голографической сканирующей микроскопии / В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева, Ю.Н. Захаров // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2014. –№4(1). – С. 92.

[А29] Захаров, Ю.Н. Оптическая сканирующая голография и голографическая сканирующая микроскопия / Ю.Н. Захаров, В.В. Дуденкова, М.С. Муравьева // Труды 11-й Международной конференции «ГолоЭкспо–2014». Голография. Наука и практика. – Сочи, 2014.– С. 124-131.

[А30] Дуденкова, В.В. Особенности использования мерцания флуорофоров для получения сверхвысокого разрешения при совмещении с голографическим измерением оптической толщины / В.В. Дуденкова, Б.И. Киселев, Ю.Н.Захаров // III Всероссийская конференция по фотонике и информационной оптике. Сборник научных трудов.– Москва: НИЯУ МИФИ, 2014.– С. 124-127.

[A31] Дуденкова, В.В. Оценка мощности лазерной линии для получения сверхвысокого разрешения флуоресцентных образцов методом BaLM / B.B.

Дуденкова, Ю.Н. Захаров // XVIII научная конференция по радиофизике, посвященной Дню радио. – Нижний Новгород: ННГУ, 2014.– С. 158-159.

[A32] Дуденкова, В.В. Теоретический расчет оптимальной мощности возбуждения для получения сверхразрешения нейронных культур методом BaLM/ В.В. Дуденкова, Ю.Н. Захаров // XIX НИЖЕГОРОДСКАЯ СЕССИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ. Естественные, математические науки. - Н. Новгород: НИУ РАНХИГС. – 2014. – С. 30-33.

[A33] Mukhina, I. Interferometric detection of Ca2+ signals in dissociated hippocampal culture / I. Mukhina, E. Mitroshina, V. Dudenkova, et.al. Biomedical Optics– Miami, 2014. – BS3A.41.

[А34] Дуденкова, В.В. Теоретический расчет оптимальной мощности возбуждения для получения сверхвысокого разрешения с помощью BaLM метода / В.В. Дуденкова, Ю.Н. Захаров // IV Международная конференция по фотонике и информационной оптике: Сборник научных трудов.– Москва: НИЯУ МИФИ, 2015.– С. 128-129.

[A35] Dudenkova, V.V. Holographic and fluorescent technique for 3d optical microscopy / V.V. Dudenkova, Yu.N. Zakharov // V International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS : Institute of Applied Physics RAS, 2015.– P. 44-45.

[A36] Dudenkova, V.V. Superresolution imaging system on innovative localization microscopy technique with commonly using dyes and CMOS camera / V.V. Dudenkova, Yu.N. Zakharov // Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials II.– Munich, 2015.– P. 95290V.

[АЗ7] Дуденкова, В.В. Совмещение BaLM и голографического методов в одной оптической схеме для получения сверхвысокого разрешения при изучении полупрозрачных объектов / В.В. Дуденкова, Ю.Н. Захаров. – Москва: НИЯУ МИФИ, 2016.– С.189-190.

[АЗ8] Дуденкова, В.В. Оценка мощности лазерной линии для получения сверхвысокого разрешения флуоресцентных образцов методом BaLM / B.B.

Дуденкова, Ю.Н. Захаров // XVIII научная конференция по радиофизике, посвященной Дню радио. – Нижний Новгород: ННГУ, 2014. – С. 158-159.

[A39] Dudenkova, V.V. Multimodal combinational holographic and fluorescence fluctuation microscopy to obtain spatial super-resolution / V.V. Dudenkova, Y. N. Zakharov // Journal of Physics: Conference Series. –2016.–№737.– P. 012069.