

ARTUR WOLNY

*Pracownia Mikroskopii Konfokalnej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: a.wolny@nencki.gov.pl*

WIZUALIZACJE W ŚWIECIE MIKROSKOPII ŚWIETLNEJ

WSTĘP

Jedną z ogromnych zalet mikroskopów konfokalnych jest możliwość tworzenia, z optycznych sekcji fluorescencyjnych preparatów, trójwymiarowych wizualizacji i rekonstrukcji. Przestrzenne wizualizacje pozwalają na dokładniejszą analizę danych oraz umożliwiają uzyskanie czytelniejszych obrazów. Rozwój mikroskopów świetlnych oraz znaczący przyrost mocy komputerów umożliwia tworzenie łatwo interpretowalnych i realistycznie wyglądających wizualizacji. Pomaga w tym oprogramowanie dołączone bezpośrednio do mikroskopów, na których pracujemy, komercyjne programy firm trzecich

(np. Imaris, Image Pro, Amira, Autoquant itp.) oraz darmowe oprogramowanie tworzone na uczelniach i placówkach naukowych na całym świecie (np. Image Surfer, ImageJ, FluoRender). W celu uzyskania wysokiej jakości wizualizacji należy zarejestrować obraz badanej próbki przy odpowiednich ustawieniach mikroskopu, aby zapewnić jak najlepszą rozdzielczość. Prawidłowo dobrane parametry mikroskopowego systemu obrazującego są niezbędne do uzyskania, w procesie obróbki cyfrowej obrazu, optymalnego efektu.

PARAMETRY ZBIERANIA OBRAZU

Zbieranie danych pochodzących z mikroskopu konfokalnego polega na kompromisie pomiędzy rozdzielczością, czułością i szybkością rejestracji. W zależności od tego jaki mamy preparat (utrwalony, żywy, szybko wyświecający się) i co chcemy badać (morfologię, intensywność fluorescencji, zmiany w czasie), odpowiednio dobieramy każdy z parametrów (Ryc. 1). Niezbędna jest więc znajomość podstaw formowania się obrazu w mikroskopie konfokalnym.

ROZDZIELCZOŚĆ I PSF

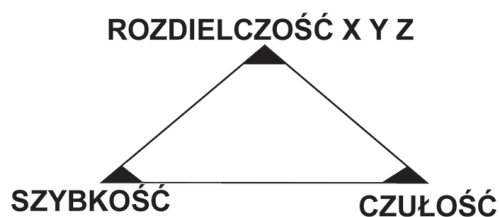
Ważnymi parametrami decydującymi o jakości obrazu z mikroskopu konfokalnego są rozdzielczość oraz kontrast. Rozdzielczość w mikroskopach ograniczona jest przez fizyczne współczynniki optyczne i zależy głównie

od rodzaju zastosowanego obiektywu: jego apertury numerycznej (ang. numerical aperture, NA) oraz długości fal emisji światła. Apertura numeryczna obiektywu jest miarą jego kąta widzenia i określa maksymalny kąt rozwarcia promieni światła trafiających do obiektywu oraz od współczynnika załamania światła ośrodka, w którym pracuje obiektyw. Opisana jest wzorem:

$$NA = n \sin \theta$$

gdzie:

n – m współczynnik załamania światła danego ośrodka (np. n powietrza = 1, n olejku immersyjnego = 1,55), θ – połowa maksymalnego kąta, pod którym światło może padać, ograniczonego kątem całkowitego wewnętrznej odbicia.



Ryc. 1. Trójkąt zależności pomiędzy rozdzielczością, czułością i szybkością dla zbierania obrazów z mikroskopów konfokalnych.

Czym większa wartość NA, tym większa rozdzielczość optyczna obiektywu. Większa rozdzielczość wiąże się jednak z mniejszą odległością roboczą oraz mniejszą głębią ostrości, którą oferuje obiektyw.

Tradycyjnie, zdolność rozdzielcza mikroskopu to najmniejsza odległość między dwoma punktami, które mikroskop pozwala odróżnić. Wyrażana jest ona wzorem podanym przez Abbego:

$$d = \lambda / 2NA$$

gdzie:

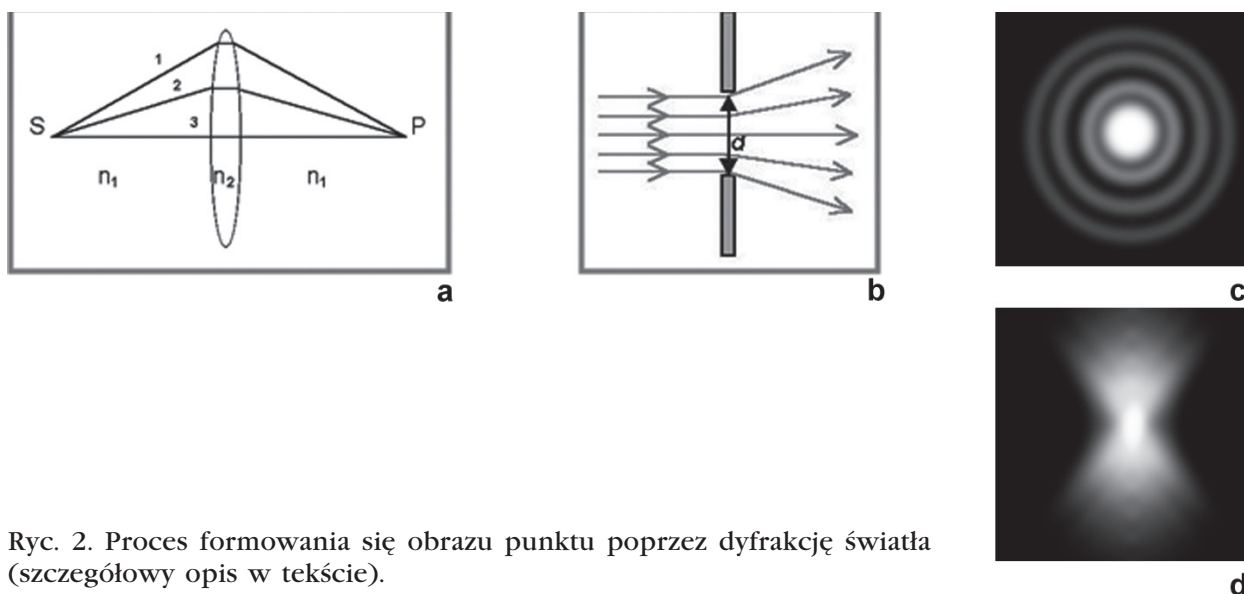
d – rozdzielczość, λ – długości fali emisji, NA – apertura numeryczna obiektywu.

Trzeba jednak pamiętać, że teoria Abbego została stworzona dla mikroskopii światła przechodzącego. W mikroskopie fluorescencyjnym widzimy punktowe źródło światła S, które powinno być rejestrowane na detektorze jako punkt P tej samej wielkości (Ryc. 2a). Jednak, ze względu na falową charakterystykę światła, na krawędziach obiektów, równych albo mniejszych od długości fali światła, zachodzi zjawisko dyfrakcji

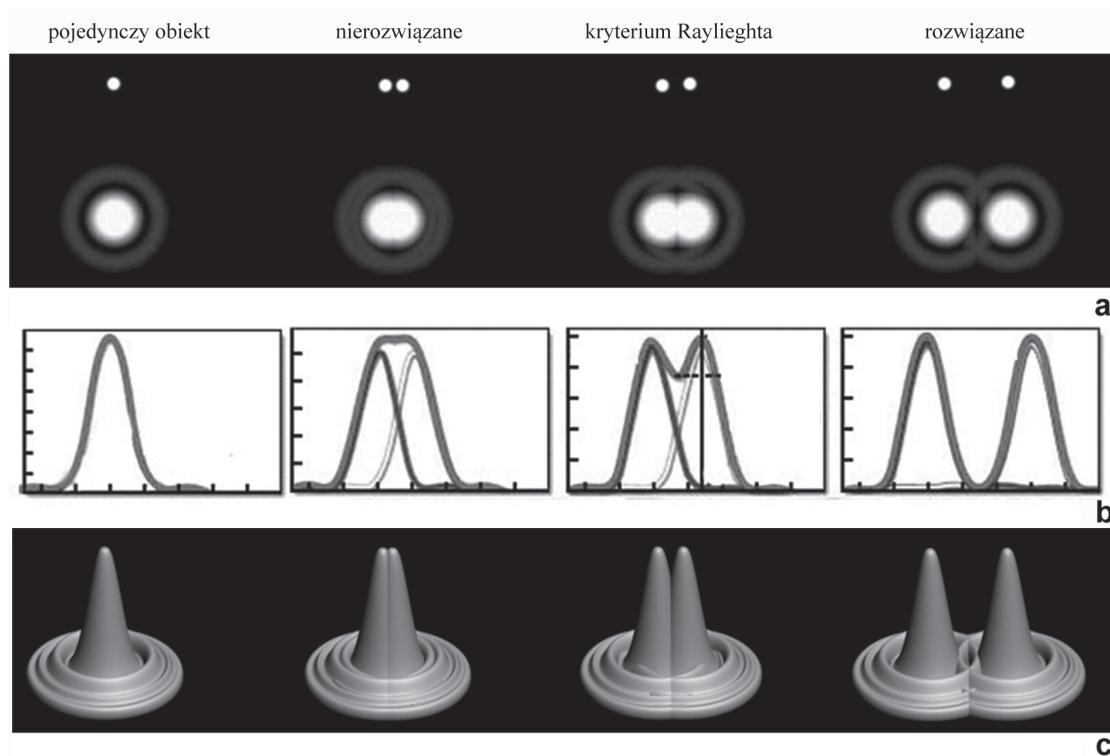
(załamania się światła) (Ryc. 2b) i obrazem punktu jest plama zwana dyskiem Airyego (Ryc. 2c). Otoczona jest koncentrycznymi jasnymi i ciemnymi kręgami w osiach X i Y oraz złożonymi, wydłużonymi stożkami światła w osi Z (Ryc. 2d). Przestrzenne rozchodzenie się światła od punkтового źródła zapisać można przy pomocy funkcji PSF (ang. point spread function).

Preparaty można traktować jako nałożenie się nieskończonej liczby punktów, które są mniejsze niż maksymalna rozdzielczość systemu. Rejestrowane są one jako rozkład intensywności PSF (Ryc. 3b, c) w planie ostrości, który opisany jest przez wzór Airyego (dysk Airyego) (Ryc. 3a). Punkty możemy rozróżnić od siebie stosując kryterium Rayleigha – obrazy dwóch różnych punktów są rozróżnialne, gdy maksimum jednego obrazu dyfrakcyjnego (dysku Airyego) znajduje się w miejscu minimum drugiego. Rozkład intensywności PSF w trzech płaszczyznach (Ryc. 3c) jest głównym czynnikiem determinującym rozdzielczość optyczną mikroskopu konfokalnego.

Obraz z mikroskopu zapisywany jest w postaci cyfrowej. Intensywność strumienia fotonów (fali świetlnej), pochodząca z danego skanowanego punktu, rejestrowana jest przez kamerę albo fotopowielacz (ang. photomultiplier tube, PMT) i zapisywana jako wartość piksela (najmniejszy pojedynczy punkt obrazu). Każdy piksel charakteryzuje się rozmiarem w osiach X i Y, zależnym od parametrów skanu. Mikroskop konfokalny skanuje wybrany obszar na preparacie znakowanym fluorescencyjnie, punkt po punkcie, rejestrując



Ryc. 2. Proces formowania się obrazu punktu poprzez dyfrakcję światła (szczegółowy opis w tekście).



Ryc. 3. Zastosowanie kryterium Rayleigha, w celu odróżnienia od siebie dwóch osobnych obiektów, na przykładzie dysków Airygo (a), krzywa intensywności PSF (b) oraz PSF (c) w trzech wymiarach.

kolejno informacje o intensywności światła pochodzącego z każdego punktu. Wynikowy obraz jest matrycą złożoną z zebranych pikseli, które odpowiadają punktom z danego obszaru skanowania. Wykonanie prawidłowego skanu wymaga ustalenia odpowiedniej wielkości piksela dla uzyskania maksymalnej lateralnej rozdzielczości, który będzie odpowiadał strukturze próbki, spełniał będzie wymogi eksperymentu oraz parametry obiektywu. Zgodnie z teorią Nyquista, wielkość piksela powinna być 2–3 razy mniejsza niż teoretyczna maksymalna rozdzielczość obiektywu. Jako że obraz fluorescencyjny składa się ze źródeł światła, używamy wzoru wynikającego z zastosowania kryterium Rayleigh i otrzymujemy nieco inny niż poprzednio wzór:

$$d = 0,61\lambda/NA$$

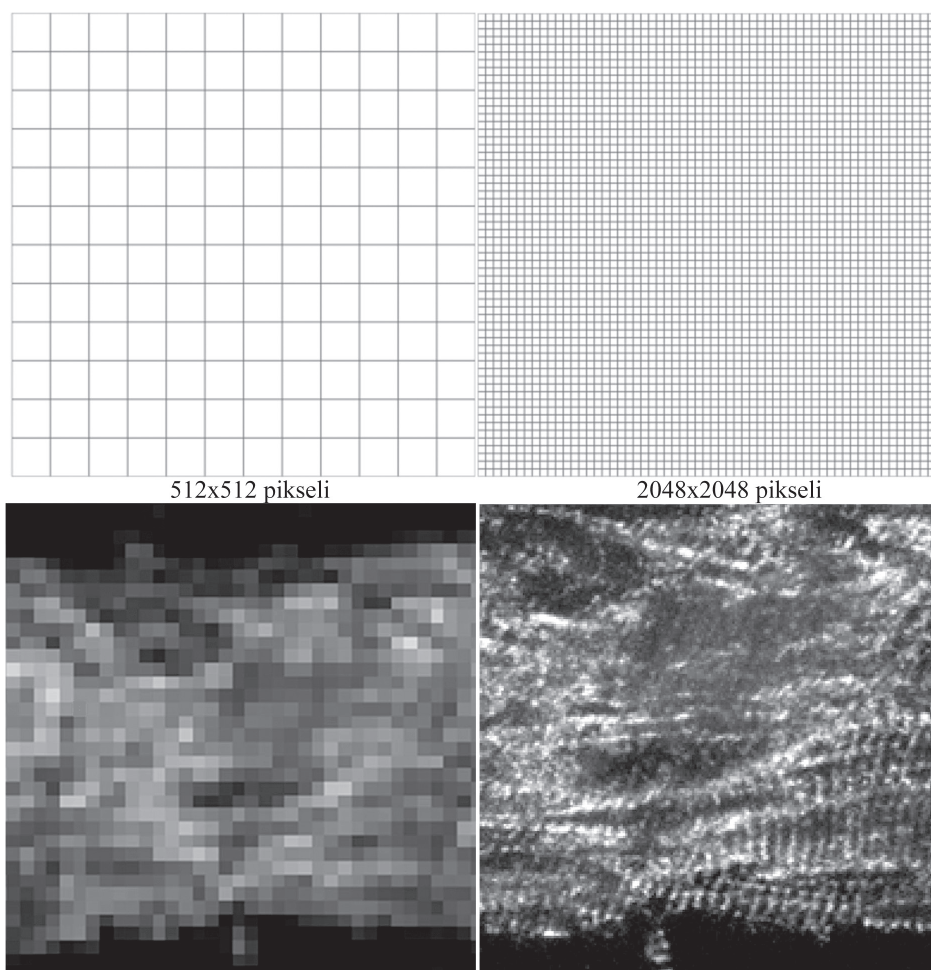
gdzie:

d – rozdzielczość, λ – długość fali emisji, NA – apertura numeryczna obiektywu.

Ustawienie parametrów formatu obrazu oraz funkcji zoom (dodatkowego powiększenia), zależne jest od wybranego do rejestracji obiektywu. Dobranie odpowiedniej wielkości piksela musi być zgodne ze zdolnością rozdzielczą osiąganą przy danych ustawieniach

mikroskopu. Dla obiektywu o powiększeniu wynoszącym 63x, aperturze numerycznej wynoszącej 1,4 i długości fali światła 488 nm, maksymalna rozdzielczość to ok. 210 nm, a więc prawidłowa wielkość piksela, którą możemy zastosować, aby uzyskać najlepszą rozdzielczość, powinna wynosić około 70 nm.

Otrzymany obraz składa się z określonej liczby linii oraz liczby próbek (pikseli) tworzących każdą z tych linii. Wartości te, określone często formatem obrazu, informują ile zostanie użytych pikseli w celu pokrycia wybranego obszaru. Na przykład, 512x512 oznacza, że dana powierzchnia skanowania pokryta zostanie siatką składającą się z 512 linii i każda z tych linii składać się będzie z 512 punktów, co stworzy siatkę wynoszącą 512 na 512 pikseli. Używając obiektywu 100x pole skanu wyniesie 155x155 mikrometrów. Zastosowanie formatu 1024x1024 spowoduje, że dany obszar wynoszący 155x155 μm pokryty zostanie 1024 liniami, z czego każda linia składać się będzie z 1024 pikseli. Rozmiar piksela wyniesie wtedy około 0,151 mikrometra, przez co nie zostanie uzyskana maksymalna rozdzielczość, na którą pozwala wybrany obiektyw. Zmieniając format na 2048x2048, to samo pole powierzch-



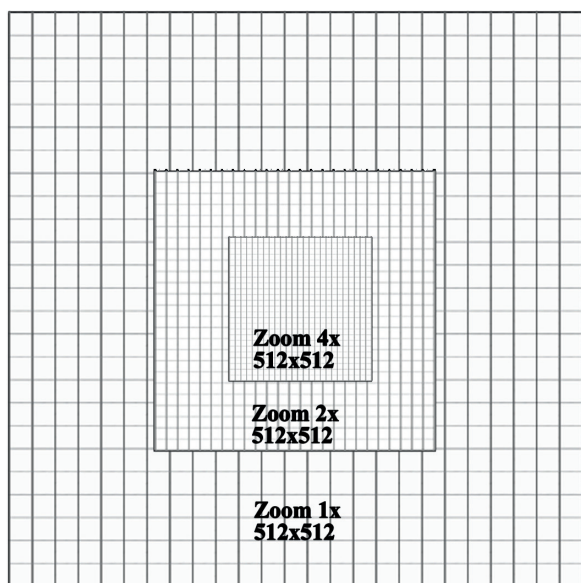
Ryc. 4. Ta sama wielkość obszaru skanowania, różniąca się zastosowanymi formatami skanu; 512x512 i 2048x2048 pikseli. Po zmianie formatu na większy.

ni pokryte zostanie 2-krotnie większą liczbą linii (w sumie dając 4-krotnie większą liczbą pikseli), dzięki czemu zmniejszy się rozmiar piksela (wyniesie około $0,075\ \mu\text{m}$, tym samym spełniając wymogi kryterium Nyquista) i zwiększy się rozdzielczość obrazu (Ryc. 4). Zwiększenie formatu skanu pozwala na rejestrację tego samego obszaru za pomocą większej liczby pikseli, przez co zwiększa się rozdzielczość i, co za tym idzie, jakość zbieranego obrazu. Jednocześnie jednak znacząco wydłuża się czas potrzebny na skanowanie wybranego obszaru z preparatu.

Dodatkowe powiększenie (zoom), które oferuje mikroskop konfokalny, jest całkowicie odmienne od cyfrowego powiększenia obrazu, które tylko zmienia rozmiar obrazu poprzez zwiększenie wielkości każdego piksela albo liczby pikseli przy pomocy interpolacji (tworzenie nowych pikseli na podstawie już istniejących), w wyniku czego sama rozdzielczość nie ulega poprawie. Powiększa-

nie obrazu w mikroskopie konfokalnym przy pomocy funkcji zoom zmniejsza kąty pracy luster skanujących, w wyniku czego zmniejsza pole obszaru skanowania, przy jednoczesnym zachowaniu formatu skanu (Ryc. 5). Wiązka lasera skanuje mniejszy obszar preparatu, używając do tego tej samej liczby pikseli, zmniejszając przez to rozmiar piksela w osiach X i Y, co zwiększa rozdzielczość i poprawia jakość obrazu. Funkcja zoom pozwala na rejestrację większej ilości detali preparatu, niestety kosztem wielkości pola skanowanego obszaru.

Dobór odpowiednich parametrów formatu skanu oraz powiększenia, wymaga uwzględnienia dwóch dodatkowych kryteriów: podpróbkowania (ang. under-sampling) i nadpróbkowania (ang. over-sampling). Ustawienie powiększenia albo formatu skanu (lub obu naraz), przy których wielkość piksela jest większa niż ta, która zapewnia pełną rozdzielczość, prowadzi do nadpróbkowa-



Ryc. 5. Zmiana parametru zoom zmniejsza pole skanowania preparatu, zachowując taki sam format (512x512 pikseli) dla wszystkich jego wartości.

nia (CENTONZE i PAWLEY 2006). Nie zwiększa ono rozdzielczości, a co za tym idzie, liczby informacji, a jedynie powiększa rozmiar końcowego obrazu oraz powoduje zwiększone wyświetlanie się preparatu fluorescencyjnego. Nadpróbkowanie powinno stosować się tylko w przypadku obrazów, które poddane zostaną później procesowi dekonwolucji (techniki cyfrowej obróbki obrazu).

Podpróbkowanie zachodzi wtedy, kiedy rozmiar piksela skanowanego obszaru jest mniejszy niż ten, który zapewnia pełną rozdzielczość. Wynikiem tego jest mniejsza ilość informacji zawarta w końcowym obrazie (mniejsza rozdzielczość), a tym samym zmniejszona podatność na wyświetlanie się obiektów na preparacie, co jest wystarczające w sytuacjach, gdy ważny jest jedynie ogólny obraz próbki.

KONTRAST

Bardzo istotnym parametrem oprócz rozdzielczości, który ma wpływ na jakość uzyskiwanych obrazów w mikroskopach świetlnych, jest kontrast. Gdy rozdzielczość odpowiada za szczegółowość obrazu, kontrast pozwala na rozróżnienie poszczególnych elementów. Kontrast definiowany jest jako różnica w intensywności koloru i jasności pomiędzy dwoma obiektami w tym samym polu widzenia. Według kryterium Rayleigha rozdzielenie dwóch obiektów możliwe jest

tylko wtedy, kiedy różnica w kontraście między nimi wynosi min. 25%, nawet jeżeli nachodzą na siebie (Ryc. 3a). W celu optymalnego ustawienia kontrastu podczas zbierania obrazów ważne jest wykorzystanie pełnego zakresu intensywności, jaki daje nam detektor. Nowoczesne detektory, wykorzystywane w mikroskopach konfokalnych pozwalają na pracę w 8, 12 lub 16 bitowej głębi koloru. Określa ona liczbę tonalnych gradientów i poziomów szarości, od czarnego do białego, rozróżnialnych przez detektor. Zastosowanie 8 bitowej głębi pozwala na uzyskanie 256 poziomów intensywności szarości od 0 (czarny) do 255 (biały). Liczba ta wzrasta do 65 tys., gdy wykorzystamy głębię 16 bitową. Ponieważ ludzkie oko jest w stanie odróżnić zaledwie 60 poziomów szarości, aby prawidłowo ustawić pełny zakres intensywności, wykorzystuje się specjalną tabelę (ang. look-up table, LUT), w którą wyposażone jest oprogramowanie mikroskopu. Tabela ta przypisuje oddzielne kolory dla pikseli tła (intensywność 0) i przesycanych (intensywność 255), które mogą być różne w zależności od zastosowanego oprogramowania mikroskopu.

Na początku należy odpowiednio ustawić intensywność sygnału fluorescencji, regulując wzmocnienie detektora funkcją Gain oraz poziom mocy lasera, aż do uzyskania kilku (1–2) maksymalnie nasyconych pikseli. Zbyt dużo przesycanych pikseli oznacza spadek kontrastu i detali oraz uniemożliwia dalszą dokładną analizę i przestrzenną wizualizację preparatu. Ustawiając parametry intensywności należy pamiętać, aby na początku ustawić niską intensywność światła lasera. Im większa intensywność światła lasera, tym większy stopień wyświetlania się preparatu fluorescencyjnego. Regulacja parametrem Gain nie powoduje zwiększania się poziomu wyświetlania preparatu, jedynie ma wpływ na wzmocnienie sygnału docierającego do detektora. Dopiero po przekroczeniu pewnej wartości parametru Gain (w zależności od detektora zastosowanego w mikroskopie), kiedy to zaczyna pojawiać się szum generowany przez sam detektor albo po uzyskaniu maksymalnej jego wartości, należy zacząć zwiększać intensywność światła lasera.

Kolejnym krokiem jest odpowiednie ustawienie poziomu tła za pomocą funkcji (Offset) dla detektora. Parametr ten sprowadza najniższe wartości intensywności sygnału do zera, dzięki czemu nie są one widoczne na obrazie. Pozwala to na pozbycie się moż-

liwych szumów z tła oraz niespecyficznej autofluorescencji preparatu, które przeważnie posiadają najniższą intensywność fluorescencji. W przypadku jednak, gdy poziom intensywności tła przewyższa właściwy sygnał fluorescencji, może okazać się, że redukcja tła za pomocą funkcji Offset odcina równocześnie istotne dane z sygnału. Odpowiednie dobranie parametrów Gain, Offset i intensywności światła lasera pozwala na uzyskanie dobrze zbalansowanego pod względem intensywności (pełny zakres dynamiczny detektora) i szumu tła obrazu preparatu fluorescencyjnego.

UŚREDNIANIE

Bardzo istotnym parametrem podczas zbierania obrazów z mikroskopu konfokalnego jest uśrednianie. Uśrednianie pozwala skanować tę samą optyczną warstwę określoną

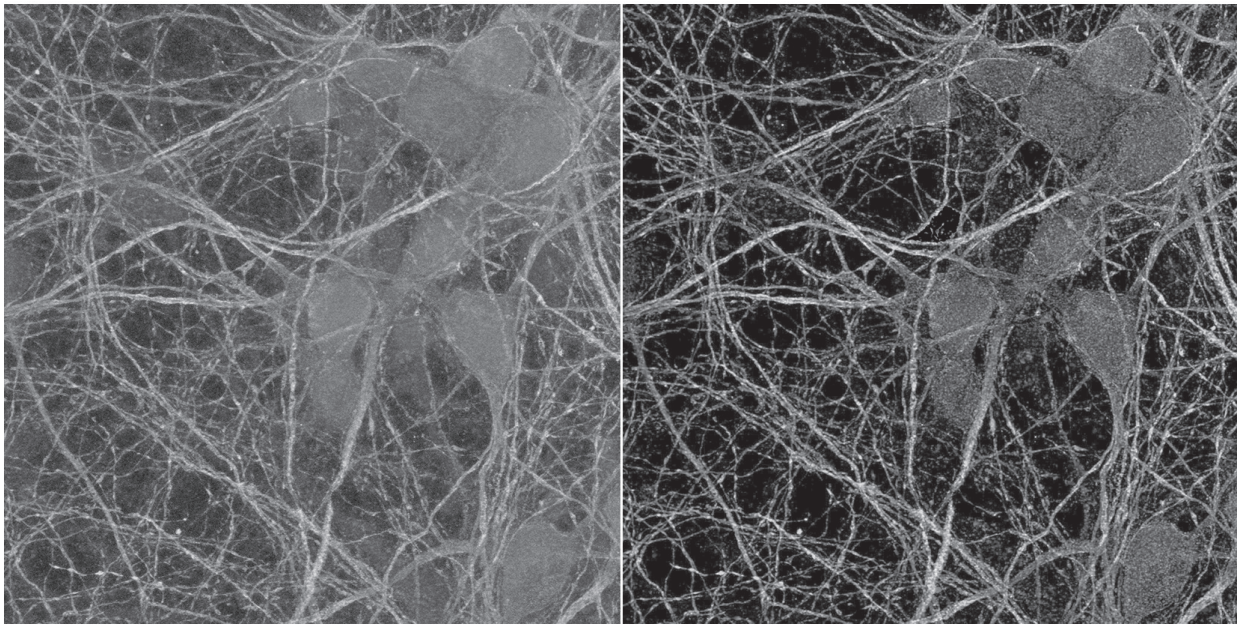
ilość razy (od 2 do 32) i automatycznie oblicza średnią wartość zebranych pikseli, co znacząco redukuje szum tła i poprawia jakość obrazu. Oprogramowanie mikroskopu posiada dwie opcje uśredniania: uśrednianie po linii i uśrednianie po ramce. Istnieje też możliwość łączenia obu sposobów uśredniania. W pierwszym przypadku mikroskop skanuje tę samą linię danej ramki wybraną ilość razy (od 2 do 32), uśredniając wartości intensywności pikseli po każdym powtórzeniu. W uśrednianiu po ramce, oprogramowanie operuje na całych ramkach zamiast linii. Uśrednianie wartości pikseli następuje dopiero po zebraniu kolejny raz (od 2 do 32) tej samej warstwy. Wadą uśredniania jest to, że znacząco wydłuża czas skanowania oraz powoduje wyświecanie się preparatu, w szczególności, jeżeli operuje na dużej ilości warstwach w osi Z.

CYFROWA OBRÓBKA DANYCH

Następnym krokiem, po prawidłowym zebraniu zdjęć z mikroskopu, jest zastosowanie na nich odpowiedniej cyfrowej filtracji w celu redukcji szumu i poprawy jakości poddawanych obróbce obrazów. Filtry stosowane na obrazach pochodzących z mikroskopów konfokalnych, powinny operować we wszystkich płaszczyznach przestrzeni, nie tylko na dwuwymiarowych warstwach (WHITE 2006). Wcześniejsze zastosowanie kryterium Nyquista podczas akwizycji obrazu pozwala zebrać obraz odpowiedniej jakości, dzięki czemu można na nich zastosować np. cyfrowy filtr gaussowski 3D albo przeprowadzić proces dekonwolucji (Ryc. 6).

Zanim promienie świetlne, pochodzące ze skanowanego preparatu fluorescencyjnego, dotrą do detektora mikroskopu tworząc obraz, ulegają różnym zniekształceniom na swojej drodze. Zniekształcenia te można opisać za pomocą funkcji PSF. Przy założeniu, że dla każdego punktu ze skanowanego obszaru funkcja ta jest taka sama, formowany obraz końcowy jest wynikiem konwolucji (splotu) obrazu rzeczywistego z tą funkcją. Dekonwolucja, inaczej rozplot, polega na odtworzeniu rzeczywistego obrazu z obrazu końcowego, poprzez usunięcie PSF. Funkcję tę określić można za pomocą teoretycznych wyliczeń (do estymacji PSF brane są pod uwagę parametry skanowania i właściwości preparatu) albo zmierzyć wykonując pomiary na specjal-

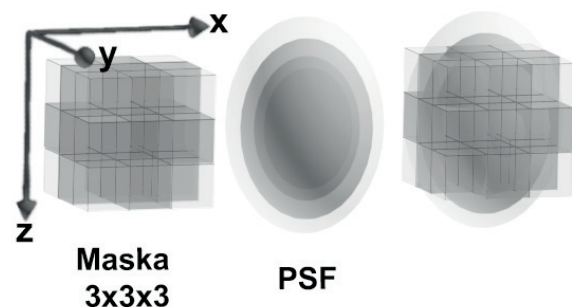
nych ziarenkach fluorescencyjnych (uzyskany z nich obraz jest traktowany jako funkcja PSF punktowego źródła światła). Dekonwolucja usuwa światło z nad i spod planu ostrości, redukuje szum, usuwa tło, poprawia rozdzielczość i kontrast. Wadą dekonwolucji jest to, że przy złych ustawieniach programu możliwe jest powstawanie artefaktów oraz, że usuwanie rozmycia obrazu może spowodować zmniejszenie poziomu sygnału. Dane poddane procesowi dekonwolucji należy zebrać wcześniej, stosując nadpróbkowanie, aby w pełni wykorzystać możliwości danego algorytmu do dekonwolucji. Algorytmy te można podzielić na dwie klasy: usuwające rozmycie (ang. deblurring) i odtwarzające obraz (ang. image restoration). Pierwsze z nich polegają na oszacowaniu stopnia rozmycia w dwóch wymiarach i odjęcia go od wszystkich pojedynczych warstw z trójwymiarowej serii. Algorytmy te operują na pojedynczych, dwuwymiarowych warstwach, płaszczyzna po płaszczyźnie, poddając warstwy tym samym obliczeniom. Przeprowadzenie tych operacji zajmuje mało czasu i nie potrzebuje dużej mocy obliczeniowej komputera. Wadą ich jest to, że zmniejszą poziom sygnału fluorescencji oraz dodają do siebie szum z kilku warstw z serii. Stosować te algorytmy należy ostrożnie i raczej przy dobrej jakości obrazach. Algorytmy odtwarzające obraz bazują na tym, że rozmycie zachodzi w trzech wy-



Ryc. 6. Obróbka obrazu metodą dekonwolucji. Zdjęcie z lewej przedstawia surowe dane zebrane z mikroskopu. Z prawej, te same dane poddane algorytmowi dekonwolucji.

miarach, a nie w dwóch, jak w przypadku algorytmów usuwających rozmycie. Ponieważ końcowy obraz jest wynikiem splotu obiektu i funkcji PSF, algorytmy te starają się odtworzyć obiekt poprzez usunięcie PSF, zamiast usunąć tylko rozmycie. Obiekt ten nie może być dokładnie odtworzony, ze względu na fundamentalne limity w systemie. Algorytm rekonstrukcji określa jedynie w przybliżeniu obiekt, bazując na podanych informacjach, które mają wpływ na proces formowania się obrazu (<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconalgorithms.html>).

Działanie filtra Gaussa 3D polega na tym, że do obliczenia nowej wartości piksela, brane są pod uwagę wartości pikseli z jego otoczenia. Każdy piksel z otoczenia ma swoją wagę, która wpływa na wynik na przeprowadzanego obliczenia. Wagi te zapisywane są w postaci maski, która posiada określone rozmiary np. 3x3x3, 5x5x5 itp. Rozmiar 3x3x3 informuje, że maska składa się z bloku o szerokości 3 piksele na 3 piksele w osiach X i



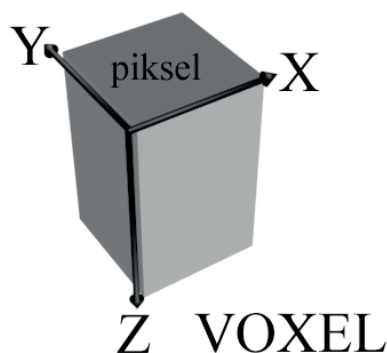
Ryc. 7. Po lewej maska filtra Gaussa 3D 3x3x3. W środku przestrzenny obraz funkcji PSF. Po prawej nałożenie maski filtra na funkcję PSF.

Y i wysokości 3 piksele w osi Z. Funkcja PSF obiektywu w mikroskopii konfokalnej ma podobny rozkład do tego, jaki ma maska filtra Gaussa 3D (Ryc. 7), dzięki temu zastosowanie tego filtra ma podobny efekt jak zastosowanie algorytmów dekonwolucji, w szczególności w odniesieniu do redukcji szumu.

WIZUALIZACJE

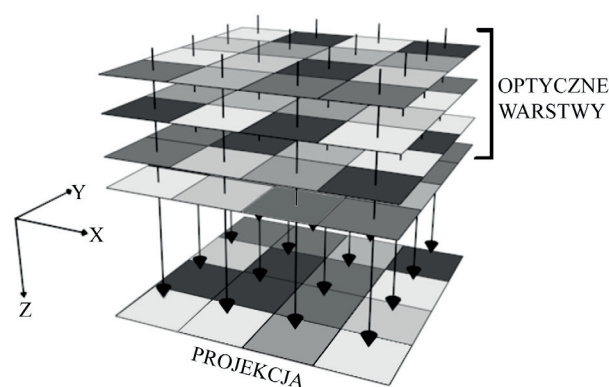
Typowa seria skrawków optycznych (ang. Z-stack), pochodząca z mikroskopu konfokalnego, składa się z określonej liczby pojedynczych, optycznych warstw o wyznaczonej

„grubości”. Warstwy te zbierane są w równomiernych odstępach (ang. step-size) w osi Z, przez co tworzą przestrzenne dane. Piksele składające się na każdą z tych płaszczyzn są



Ryc. 8. Reprezentacja woksela stworzonego z dwuwymiarowego piksela poprzez dodanie głębokości w osi Z.

dwuwymiarowe, posiadają rozmiar w osiach X i Y. Poprzez dodanie do piksela z dwuwymiarowej warstwy dodatkowej informacji w postaci głębokości w osi Z, powstaje woksół (ang. voxel) (Ryc. 8). Głębokość woksół i grubość całej pojedynczej optycznej warstwy definiowana jest poprzez optykę mikroskopu (apertura numeryczna) oraz przysłonę konfokalną (ang. pinhole) i wynosi połowę maksymalnej rozdzielczości piksela. Woksół, trójwymiarowy odpowiednik piksela, oprócz informacji o wymiarze w trzech płaszczyznach, posiada również pewną wartość intensywności przejętą z bazowego piksela, z którego jest stworzony, oraz objętość, definiowaną jako iloczyn powierzchni piksela (X razy Y) i odległości pomiędzy warstwami optycznymi. Na podstawie informacji zebranych z każdego woksół wchodzącego w skład trójwymiarowej serii, odpowiednie oprogramowanie jest w stanie przeprowadzić rekonstrukcję i stworzyć trójwymiarową mapę powierzchni badanego obiektu. Można powiedzieć, że woksół to cegiełka, dzięki której budujemy model 3D. O ile o grubości warstwy konfokalnej decydują parametry optyczne używanego mikroskopu konfokalnego, o tyle już o odległościach między kolejnymi warstwami i gęstości skanowanego preparatu w osi Z (grubość całej serii) decyduje użytkownik. Zapewnienie maksymalnej ilości informacji o preparacie w osi Z wymaga, aby odstęp pomiędzy kolejnymi warstwami optycznymi (gęstość skanu) był, zgodnie z kryterium Nyquista, 2-3 razy mniejszy niż głębokości pojedynczej warstwy z danej serii. Skanowanie preparatu z większą gęstością prowadzi do nadpróbkowania, które przydatne będzie jedynie w celu przeprowadzenia dekonwolucji na zebranych danych. Jeżeli dane zostaną



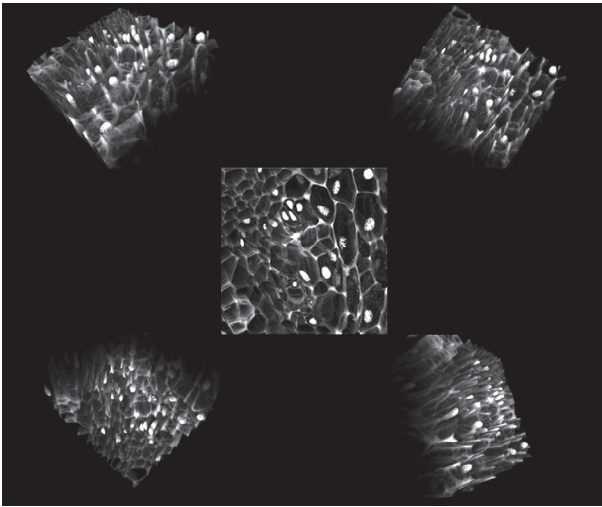
Ryc. 9. Tworzenie maksymalnej projekcji z kilku warstw optycznych. Dla każdej pozycji X i Y piksela zbierane są informacje o intensywnościach z wszystkich płaszczyzn i na podstawie odpowiedniego kryterium (np. maksymalna wartość) wybrana wartość jest rejestrowana na projekcji 2D tych warstw.

zebrane z mniejszą gęstością, spowoduje to podbróbkowanie, co przekłada się na utratę informacji o preparacie w osi Z.

Wizualizacja, to proces tworzenia przestrzennego obrazu z konfokalnej serii optycznych sekwencji, poprzez łączenie warstw z tej serii w pojedynczy obraz, strukturę, animację. Przestrzenne zbiory danych mogą zostać zrekonstruowane i zwizualizowane na wiele sposobów. Istnieją trzy podstawowe metody do reprezentacji danych 3D: projekcje, rendering objętościowy i rekonstrukcja powierzchni.

Projekcje, to proste techniki wyświetlające trójwymiarowe informacje w formie dwuwymiarowego rzutu. Obraz ten tworzony jest na podstawie informacji zebranych z całej serii z mikroskopu konfokalnego. Polega na znalezieniu na przykład najjaśniejszego piksela, czyli maksymalnej wartości z każdej linii, przechodzącej przez wszystkie warstwy, i wyświetleniu ich na pojedynczym, dwuwymiarowym obrazie (Ryc. 9). Uzyskany obraz nie jest trójwymiarowym obiektem, zawiera on jedynie prezentację całego obiektu z konkretnego punktu widzenia, czyli perspektywę (TRUSK 2011).

Rendering objętościowy (ang. volume rendering) jest techniką wizualizacji trójwymiarowych informacji poprzez tworzenie ich dwuwymiarowych półprzezroczystych projekcji (Ryc. 10). Każdy woksół można opisać pewnymi przestrzennymi koordynatami, X, Y i Z, oraz intensywnością fluorescencji. Aby zobrazować przestrzenne dane z od-

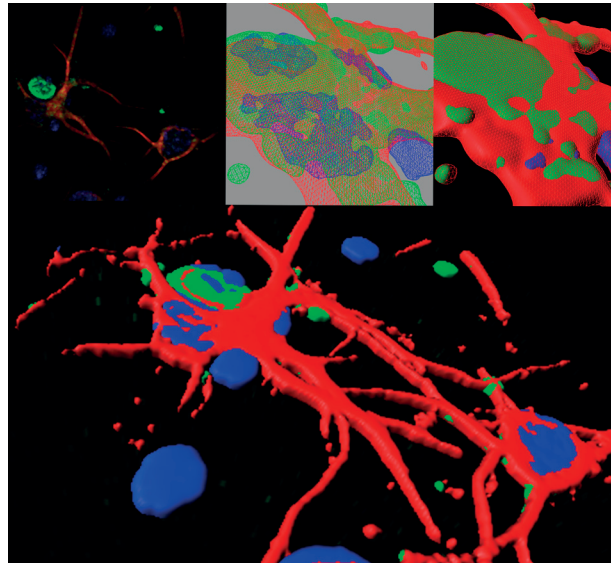


Ryc. 10. Reprezentacja rendering objętościowego. Centralne zdjęcie pokazuje widok na preparat w osiach X i Y. Pozostałe zdjęcia przedstawiają ten sam preparat z różnych perspektyw.

powiedniej perspektywy trzeba wyświetlić obraz w sposób, który pozwoli na poprawną obserwację całej wewnętrznej struktury obiektu. Aby to osiągnąć, dodawany jest do każdego woksela parametr przezroczystości. Dzięki temu na obraz wynikowy mają wpływ wszystkie piksele, a nie, jak w zwykłej projekcji, ich pewne wybrane wartości. Pozwala to na przedstawienie obiektu jako składającego się z elementów o zróżnicowanym stopniu przezroczystości. Niestety, ten sposób prezentacji danych jest powolny i wymaga dużej mocy obliczeniowej komputera. Technika ta pozwala tylko na obserwację preparatu w całości pod różnymi kątami, z wybranych perspektyw oraz na tworzenie animacji ruchu.

Rekonstrukcja powierzchni (ang. surface reconstruction) jest to metoda, która tworzy trójwymiarową powierzchnię obiektu z serii z mikroskopu konfokalnego (Ryc. 11).

Algorytmy tworzą strukturę powierzchni, wyznaczając granice otaczające wybrany zakres wokseli. Powierzchnia ta budowana jest z siatki wielokątów na podstawie progu



Ryc. 11. Na górze etapy tworzenia rendering powierzchniowego. Od lewej – seria z mikroskopu, środek – tworzenie siatki 3D z wokseli, po prawej – nałożona powierzchnia na siatkę. Na dole reprezentacja całej powierzchni 3D preparatu.

intensywności wokseli, tzn.: woksela poniżej wybranego progu (zakresu) intensywności nie brane są pod uwagę w procesie wyznaczania granic do rekonstrukcji powierzchni.

Algorytmy rekonstrukcji powierzchni należą do szybkich, ze względu na to, że odnoszą się tylko do powierzchni, nie biorąc pod uwagę wewnętrznych struktur (co jest ich zasadniczą wadą), redukując tym samym ilość przetwarzanych danych. Dzięki tej technice nie tylko tworzona jest wizualizacja powierzchni, ale możliwa jest również analiza obrazowanych obiektów. Można obliczać powierzchnię, objętość, gęstość oraz ich zmiany w czasie, a także wiele innych czynników, w zależności od oprogramowania, które zostanie do tego użyte. Przy użyciu kilku barwień, można pokazać np., że dana struktura z jednego kanału znajduje się fizycznie wewnątrz struktury z drugiego kanału albo na jej powierzchni.

PODSUMOWANIE

Wizualizacje, to potężne narzędzia do przedstawiania i analizowania danych pochodzących z mikroskopów konfokalnych. Dzięki nim możliwe jest obserwowanie i re-

konstrukcja morfologii obiektów, analiza ich struktur oraz funkcji. Wizualizacje umożliwiają obserwację obiektów pod różnymi kątami, z perspektyw nieosiągalnych w samym mi-

kroskopie konfokalnym. Znajomość podstaw działania aparatury obrazującej oraz jej możliwości pozwala prawidłowo ustawić parametry zbierania obrazu, przez co rejestrowany jest on z maksymalną rozdzielczością i ze związaną z tym jakością. Tym samym, nie zostają pominięte informacje o strukturze, a sama rekonstrukcja jest dokładniejsza i bar-

dziej odpowiada fizycznej charakterystyce obiektów (np. przy zbyt małej gęstości skanu, pominięte zostają informacje o preparacie w osi Z). Dodatkowo, zastosowanie cyfrowych filtrów lub dekonwolucji usuwa z tła niepożądany szum oraz poprawia jakość sygnału pochodzącego z fluorescencyjnego preparatu.

WIZUALIZACJE W ŚWIECIE MIKROSKOPII ŚWIETLNEJ

Streszczenie

Wizualizacje i rekonstrukcje w mikroskopii świetlnej, pozwalają na lepszą analizę i obserwację preparatów. Przed przystąpieniem do wizualizacji należy właściwie dobrać parametry skanowania mikroskopu, aby możliwie jak najdokładniej odwzorować struktury obiektów. Niniejszy artykuł przedstawia i omawia podstawowe zagadnienia, z którymi użytkownik spotyka się podczas akwizycji obrazów. Dotyczą one właściwego ustawienia rozdzielczości,

rozmiaru piksela i woksela, szybkości skanowania, wielkości zoom oraz formatu skanu. Przedstawione zostały także możliwości filtracji obrazu oraz dekonwolucja, a także metody reprezentacji trójwymiarowych danych: projekcje, rendering objętościowy i rendering powierzchniowy oraz możliwość dodatkowej ingerencji w wygląd końcowy obiektów za pomocą programów do modelowania i animacji 3D.

VISUALIZATIONS IN THE WORLD OF LIGHT MICROSCOPY

Summary

Visualization and reconstruction in light microscopy allow us to better analyze and observe our specimens. Prior to the visualization microscope scanning parameters should be selected to reproduce as closely as possible the structure of objects. This article presents and discusses the fundamental issues with which you meet in image acquisition, i.e.: resolution, pixel and voxel size, scan speed,

zoom, scan size. The author outlines possible image filtering and deconvolution. At the end, the three methods were discussed for three-dimensional representation: projections, volume rendering, surface rendering and the possibility of additional interference with the final appearance of objects using the software for 3D modeling and animation.

LITERATURA

- CENTONZE V., PAWLEY J. B., 2006. *Tutorial on Practical Confocal Microscopy and Use of the Confocal Test Specimen*. [W:] *Handbook of biological confocal microscopy*. PAWLEY J. B. (red.). Springer-Verlag US, Springer, 627–647.
- TRUSK T. C., 2011. *3D Reconstruction of Confocal Image Data*. [W:] *Basic Confocal Microscopy*. PRICE R. L., GRAJ J. (red.). Springer Science+Business Media, Nowy Jork, 280–315.
- WHITE N. S., 2006. *Visualization Systems for Multi-Dimensional Microscopy Images*. [W:] *Handbook of biological confocal microscopy*. PAWLEY J. B. (red.). Springer-Verlag US, Springer, 280–315.