

FLIM SYSTEM OPTIONS IN CONFOCAL MICROSCOPY

Jakub Petrula

Bachelor Degree Programme (3), FEEC BUT

E-mail: xpetru10@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Vratislav Čmiel

E-mail: cmiel@feec.vutbr.cz

Abstract: This paper deals with FLIM system options in confocal microscopy. It describes the principles of confocal microscopy, focused primarily on the Leica confocal microscope. The practical part includes working with a confocal microscope and acquisition of the intensity images. Resulting product of the practical part is a fluorescence lifetime image. The algorithm is designed in Matlab software.

Keywords: FLIM, confocal microscopy, TimeGate function

1. ÚVOD

Táto práca bližšie zoznamuje s využitím systému FLIM v konfokálnej mikroskopii a alternatívnym spôsobom realizácie FLIM metódou quasi FLIM. Zameriava sa na prácu s konfokálnym mikroskopom Leica TCS SP8 X a popisuje jeho výhody v podobe hybridných detektorov a funkcie TimeGate. Praktická časť práce zahŕňa zhotovenie sady fluorescenčných snímok na reze konvalinkou a snahu vytvoriť quasiflim pomocou TimeGate a hybridných detektorov. Zaoštané snímky boli následne spracované vlastnými algoritmi v prostredí Matlab. Výsledkom je pseudofarebný obrázok vyjadrujúci dobu života fluorescencie. Cieľom je vyvinúť a optimalizovať metódu quasi FLIM s využitím spomínaných hybridných detektorov v konfokálnej mikroskopii a porovnať výsledky so štandardnou metódou FLIM.

2. METÓDA FLIM A JEJ REALIZÁCIA

FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) je zobrazovacia metóda používaná v konfokálnej mikroskopii, pomocou ktorej sa meria čas, kedy fluorofor pretrváva v excitovanom stave, predtým ako sa vracia do stavu základného. FLIM kombinuje meranie trvania fluorescencie s grafickou distribúciou časových hodnôt. Jednotlivé časové úseky životnosti fluorescencie, obdržané na úrovni pixelov sú farebne kódované. Výsledkom je obraz pozorovanej štruktúry, ktorý nesie informáciu o priestorovom rozložení fluorescencie na základe rôznych časov jej životnosti, zároveň s informáciou o skúmanom prostredí. Doba trvania fluorescencie je závislá od okolitého prostredia. Takáto informácia môže byť prospešná predovšetkým pri analýze tkaniva. Príkladom je detekcia aterosklerózy, identifikácia štruktúr v rámci kože, alebo sietnice. Na molekulárnej úrovni je možné sledovať napríklad distribúciu proteínov, hodnoty pH, alebo lipofilitu prostredia. [1]

2.1. KONFOKÁLNA MIKROSKOPIA

Niektoré látky sú po ožiarení svetlom s kratšou vlnovou dĺžkou schopné emitovať svetlo vo viditeľnej oblasti. Tento jav sa nazýva fluorescencia. Pozorovanie, alebo zviditeľnenie rozdielov v štruktúre spôsobených fluorescenciou umožňuje konfokálny mikroskop. Pomocou konfokálneho mikroskopu je možné získať snímky, ktoré majú v porovnaní s fluorescenčným mikroskopom vysoké priestorové rozlíšenie (64 milión bodov a viac) a vykazujú veľmi úzky rez tkanivom. Práve tieto vlastnosti sú vhodné pre využitie k sledovaniu fluorescenčne značených štruktúr vo vysokých detailoch. Vysoká rozlišovacia schopnosť je dosiahnutá tým, že výsledný obraz je rekonštruovaný

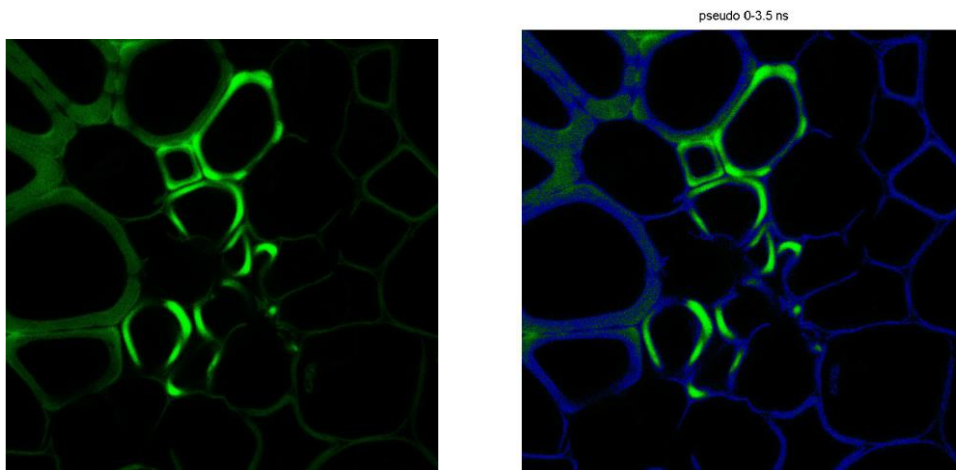
bod po bode s vysokou hustotou skenovaných bodov. Detekcia svetla prebieha len z ohniskovej roviny mikroskopu. Nežiaduce rozptýlené svetlo tak neznižuje kvalitu obrazu. Svetlo emitované vzorok ďalej smeruje k bodovej clone, ktorá prepúšťa lúče pochádzajúce z ohniska a tie sa zhromažďujú na fotonásobiči, kde ďalej prebieha rekonštrukcia obrazu. Konfokálny mikroskop vyžaduje použitie svetla s vysokou intenzitou. V súčasnej dobe sú využívaným zdrojovým svetlom lasere, ktorých výhoda spočíva v dostupnosti širokého rozsahu vlnových dĺžok. [2][3]

2.2. KONFOKÁLNY MIKROSKOP LEICA TCS SP8 X

Mikroskop Leica TCS SP8 X sa vďaka svojej presnosti a vysokorýchlostnému snímaniu využíva v biomedicínskom výskume na najvyššej úrovni. Je vybavený piatimi spektrálnymi detekčnými kanálmi, vďaka čomu je prispôsobiteľný veľkej škále meraní a zabezpečuje tak vysokú spektrálnu slobodu a voľbu fluorescenčného farbiva v širokom rozsahu. V rámci praktickej časti práce boli využité výhody mikroskopu v podobe funkcie TimeGate a hybridných detektorov. Hybridné detektory v spojení s funkciou TimeGate umožňujú také nastavenie mikroskopu, aby zber signálu neprebíhal počas laserového pulzu a teda detekcia fluorescencie sa deje iba v čase medzi svetelnými pulzami. Nastavením požadovaného časového okna pomocou funkcie TimeGate sa tak odstráni neželaný signál z obrazových dát a nežiaduca fluorescencia. Týmto spôsobom je možné získať vysoko kontrastný snímok bez vedľajších rušení. [3]

3. MERANIE KVAZI FLIM POMOCOU FUNKCIE TIME GATE

Praktická časť práce je zameraná na prácu so systémom FLIM a spracovanie intenzitných snímkov. Tie boli zhotovené na konfokálnom mikroskope Leica. Pri práci s mikroskopom boli využité jeho výhody a pomocou pulzného ladiateľného laseru, funkcie TimeGate a hybridných detektorov boli zriadené fluorescenčné snímky rezu konvalinkou v rôznych časových oblastiach. Časové odstupy boli definované postupne od 0-3.5 ns po hodnotu 3.6-7.1 ns, vždy s odstupom 0.3 ns. Týmto spôsobom tak bolo vyhotovených 13 snímkov. Pozorovaný preparát vykazoval fluorescenciu v zelenej oblasti spektra, pričom jej intenzita s rastúcim časom klesala v každej oblasti preparátu.

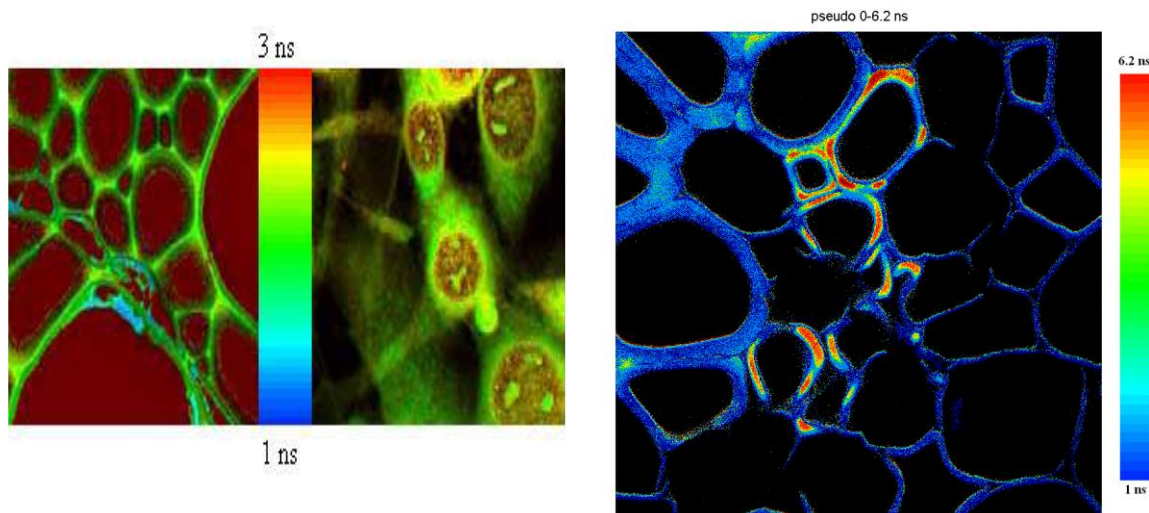


Obrázok 1: Intenzitný snímok v časovej oblasti 0-3.5 ns (vľavo) a ukážka farbenia podprahových hodnôt (vpravo).

3.1. SPRACOVANIE V PROSTREDÍ MATLAB

Z vyhotovených snímkov, ktoré sa líšia rozdielnym časom detekcie, bol následne vytvorený jeden snímok, na ktorom je pomocou pseudofarieb vyobrazená doba, počas ktorej bola fluorescencia prítomná v jednotlivých oblastiach preparátu. V prvom kroku bol zvolený vhodný intenzitný prah, ktorý je spoločný pre všetky snímky. Táto prahová hodnota predstavuje hranicu intezity, ktorá oddeľuje dve vedľajšie pseudofarby. Využívané sú šedotónové snímky s rozsahom intezity jasú 0-255. Na intezitnej škále mal zvolený prah hodnotu 80.

Algoritmus postupne prechádza snímkom, pričom každej podprahovej hodnote v danom pixeli priradí rovnakú pseudofarbu. Po priradení pseudofarby v prvom obrázku prejde na snímok nasledujúceho časového úseku. V tomto snímku v porovnaní s predchádzajúcim poklesli hodnoty intenzity jasu jednotlivých pixelov. Algoritmus teda opäť prejde celý snímok a všetkým podprahovým hodnotám, ktorým nebola priradená farba v predošlom kroku, priradí ďalšiu pseudofarbu v poradí. Rovnakým spôsobom je priradená zodpovedajúca farba všetkým zhotoveným snímkom, čoho výsledkom je jeden snímok, na ktorom je pseudofarebne vyobrazená doba života fluorescence v závislosti na čase. Na pseudofarbenie bola použitá farebná mapa typu JET. Konečný výsledok je zobrazený na obrázku 2.



Obrázok 2: Snímky zo štandardnej metódy FLIM (vľavo) a snímok spracovaný metódou quasi FLIM (vpravo).

4. ZÁVER

V práci bola dosiahnutá realizácia quasiflim využitím funkcie TimeGate a hybridných detektorov konfokálneho mikroskopu Leica. V programovom prostredí Matlab bol navrhnutý algoritmus pre spracovanie intenzitných snímok v rozličných časových oblastiach. Na základe určeného prahu intenzity bol vytvorený výsledný snímok, ktorý zobrazuje dobu života fluorescence vo všetkých oblastiach preparátu.

V nadväzujúcej časti práce bude nasledovať vytvorenie grafického užívateľského prostredia, ktoré umožní jednoduchý import a spracovanie snímok. V ďalších experimentoch budú použité živočíšne bunky vykazujúce oproti súčasnému príkladu väčšiu variabilitu doby života fluorescence a výsledné snímky quasi FLIM sa budú vyznačovať vyššími detailami. Algoritmus bude optimalizovaný pre toto využitie. Tieto experimentálne zriadené snímky spracované metódou quasi FLIM budú porovnané s výsledkami dosiahnutými štandardnou metódou FLIM.

REFERENCIE

- [1] LEICA MICROSYSTEMS. FLIM - The Method. [online]. [cit. 2014-02-27]. Dostupné z: <<http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/confocal-methods/flim/>>
- [2] SEMWOGERERE Denis, Eric R. WEEKS. Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2005, s. 1-9. DOI: 10.1081/E-EBBE-120024153 [online]. 2012 [cit. 2014-02-26]. Dostupné z: <<http://www.physics.emory.edu/~weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>>
- [3] Spectral Characterization of Images Leica TCS SP8 X. *Leica microsystems* [online]. [cit. 2014-02-28]. Dostupné z: <<http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/details/product/leica-tcs-sp8-x/>>