

Slikanje celic s fazno občutljivo mikroskopijo

Martin Šifrar

Mentor: doc. dr. Iztok Urbančič

Seminar, 3. letnik

Oddelek za fiziko, FMF, UL, 2022/2023

Povzetek

Fazno občutljiva mikroskopija je družina metod, ki brez uporabe barvil ali fluorescence omogočajo slikanje prozornih objektov. V seminarju opišemo mehanizem metode faznega kontrasta, nato pa manj podrobno še družino interferometrijskih metod. Predstavimo tudi idejo kvantitativnega faznega slikanja, vključno s nekaterimi trendi v razvoju metod. Za konec predstavimo dva primera uporabe teh metod v medicini.

Kazalo

1	Uvod	1
2	Fazni kontrast	2
2.1	Uklon skozi odprtino	2
2.2	Uklon skozi zbiralno lečo	4
2.3	Presevno osvetljen objekt	6
2.4	Slikanje faznega objekta	6
2.5	Uklonski redi v goriščni ravnini	7
2.6	Fazni kontrast	7
2.7	Fazni kontrast v praksi	9
3	DIC mikroskopija	9
4	Kvantitativno fazno slikanje	10
4.1	Masna koncentracija	10
4.2	Merjenje optične debeline	11
5	Primeri uporabe	11
5.1	Slike sečnih sedimentov	11
5.2	Diagnostični model raka na dojkah	11
6	Zaključek	12

1 Uvod

Raziskovanje v biologiji in medicini je pogojeno z orodji, ki so raziskovalcem na voljo za opazovanje življenjskih procesov. Izziv postavlja dejstvo, da je večina živalskih celic prozornih – svetlobe ne absorbirajo – in jih posledično s klasično presevno mikroskopijo ne moremo opazovati (glej sliko 1). V splošnem takim prozornim objektom pravimo fazni objekti, saj vplivajo le na fazo svetlobe.

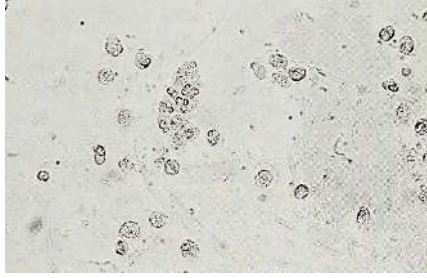
Za opazovanje lahko prozornim celicam dodamo barvilo, ki svetlobo absorbira¹. Dolgotrajno opazovanje živih celic omejuje, da so barvila za celice pogosto toksična. Metode fazno občutljivega slikanje tu predstavljajo dobro alternativo, saj omogočajo, da prozorne celice opazujemo brez uporabe barvil.

Za delovanje metod je ključna informacija, ki jo o opazovanem objektu nosi faza svetlobnega valovanja. Celica, ki jo opazujemo, je vsebovana v mediju z lomnim količnikom n_0 . Če ima tedaj celica lomni količnik različen od medija, bo žarek, ki potuje skozi celico, pridobil fazni zamik oz. optično debelino²

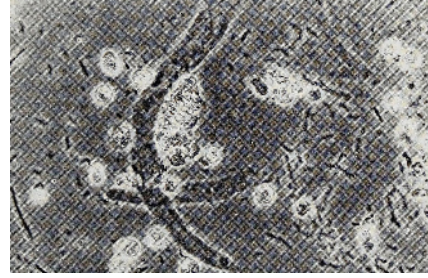
$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \int \Delta n(z) dz,$$

¹V mnogih modernih metodah je barvilo pravzaprav fluorescenčno, torej svetlobe ne absorbira, ampak jo oddaja.

²Optična debelina se tipično uporablja za vrednost eksponenta τ za prehod skozi kos absorpcijskega materiala, v katerem se signal zmanjša za faktor e^τ . V našem primeru je τ imaginarno število $i\phi$, z izrazom optična debelina pa bomo označevali kar sam ϕ .



(a)



(b)

Slika 1: Primerjava med presevnimi mikroskopskimi slikami (na levi) in slikami, posnetimi s faznim kontrastom (na desni). Posnete so bele krvne celice in bakterije, večji objekti pa so t. i. hyalinske tubule (ang. *hyaline casts*). Slike vzete iz [1].

pri čemer je λ valovna dolžina svetlobe, razliko $\Delta n(z) = n(z) - n_0$ pa imenujemo za inkrement lomnega količnika (ang. *refractive index increment*). Ker je v celicah lomni inkrement sorazmeren s koncentracijo suhe snovi (več v poglavju 4.1), lahko s površinsko integracijo ϕ izračunamo celično maso.

V nadaljevanju bomo opisali in razložili dve izmed fazno občutljivih metod – prvo metodo faznega kontrasta v odseku 2, nato pa v odseku 3 še metodo mikroskopije DIC. V odseku 4 nato predstavimo nadgradnjo z metodami kvantitativne faze, za konec pa v 5 prestavimo še dva primera uporabe fazno občutljivih metod.

2 Fazni kontrast

Fazni kontrast je metoda fazno občutljivega slikanja, ki jo je v 30. letih prejšnjega stoletja razvil Frits Zernike, ko se je eksperimentalno in teoretično ukvarjal z uklonskimi mrežicami [2]. Mehanizem je izjemno eleganten in predstavlja plod globokega razumevanja fizike uklona. Za razvoj metode je Zernike leta 1953 prejel tudi Nobelovo nagrado.

Najprej bomo mehanizem razložili na nekaj analitično izračunljivih primerih, kot je to izvirno predstavil Zernike v [3, 4], nato pa nekaj povedali še o primeru kompleksnega faznega objekta.

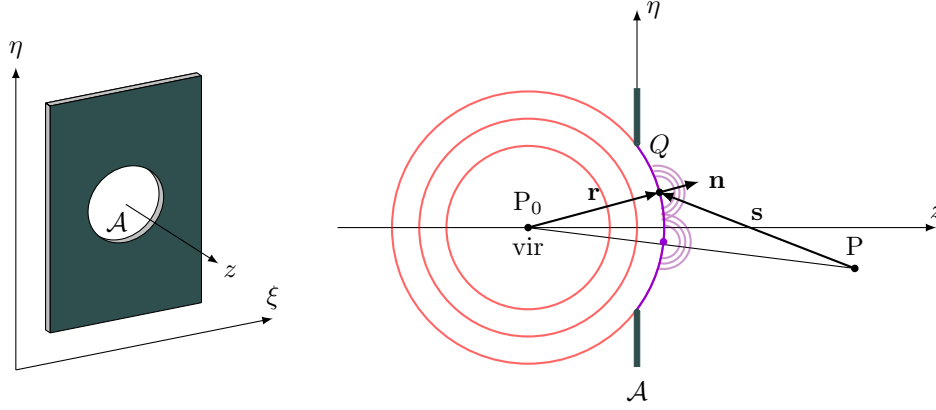
2.1 Uklon skozi odprtino

Preden mehanizem lahko razumemo, moramo povedati nekaj o uklonu skozi zbiralno lečo, npr. objektiv mikroskopa. Da to izpeljemo, začnemo s klasičnim uklonom na odprtini, ki ga opisuje Fresnel-Kirchhoffov uklonski integral

$$u(\mathbf{P}) = -i \frac{u_0}{2\lambda} \int_{\mathcal{A}} \frac{e^{ik(r+s)}}{rs} [\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) - \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s})] dS. \quad (1)$$

Integral opisuje uklon na odprtini za točkovni vir v $\mathbf{P}_0$ (glej sliko 2), z valovno dolžino λ in amplitudo u_0 . Razdalja r meri od izvora $\mathbf{P}_0$ do točke na odprtini, razdalja s pa od točke na odprtini $\mathcal{A}$ do opazovalca $\mathbf{P}$. S k označimo valovno število $k = 2\pi/\lambda$.

Uklonski integral v tej obliki izpeljemo (glej [5], stran 421) kot poseben primer Kir-



Slika 2: Krogelni val izvira v $\mathbf{P}_0$ in potuje skozi odprtino $\mathcal{A}$. Pri tem se ukloni, uklonjeni val pa opazujemo v točki $\mathbf{P}$. Valovanje v $\mathbf{P}$ obravnavamo kot interferenco sekundarnih valov, ki izvirajo na površini valovne fronte.

chhoffovega integralskega izreka

$$u(\mathbf{P}) = \frac{1}{4\pi} \oint_S \left[u \frac{\partial}{\partial \mathbf{n}} \left(\frac{e^{iks}}{s} \right) - \frac{e^{iks}}{s} \frac{\partial u}{\partial \mathbf{n}} \right] dS, \quad (2)$$

ki podaja rešitev valovne enačbe kot integral po zaprti površini $\mathcal{S}$ okoli $\mathbf{P}$. Izračunamo ga iz vhodnega vala, katerega vrednosti na odprtini poznamo. Za postavitev na sliki 2 je vhodni val krogelna valovna fronta točkovnega izvora v $\mathbf{P}_0$, oblike

$$u(r) = u_0 \frac{e^{ikr}}{r}, \quad (3)$$

uklon pa opisuje integral (1), ki poteka po površini uklonske odprtine. Integral lahko pravzaprav poteka po poljubni izmed površin, ki uklonsko odprtino zapirajo.

Uklonski integral v točni obliki bomo nadomestili s približkom Fraunhoferjevega uklona, ki velja, če je največji premer odprtine mnogo manjši od razdalje $d_{\max} \ll |\mathbf{P} - \mathbf{P}_0|$. V postavitvi na sliki 2 velja v takem približku

$$\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) - \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s}) \approx 2 \cos \vartheta, \quad (4)$$

pri čemer je ϑ kot med normalo na površino integracije $\mathbf{n}$ in vektorjem, ki kaže od vira k opazovalcu. Sedaj se nam splošen uklonski integral 1 poenostavi v integral za t. i. Fraunhoferjev uklon

$$u(\mathbf{P}) \approx -i \frac{u_0}{\lambda} \left(\frac{\cos \vartheta}{r_0 s_0} \right) \int_{\mathcal{A}} e^{ik(r+s)} dS. \quad (5)$$

Dodatno smo iz integrala izpostavili faktor $1/rs$, ki se pri sprehodu čez odprtino minimalno spreminja. Lahko ga zamenjamo s konstanto $1/r_0 s_0$, pri čemer sta r_0 in s_0 dolžini vektorjev $\mathbf{r}$ in $\mathbf{s}$ pri $(\xi, \eta) = 0$.

Integral bomo v nadaljevanju naprej poenostavili. V ta namen bomo razdalji r in s razvili do drugega reda po kordinatah ξ, η . Če so koordinate opazovalca $\mathbf{P} = (x, y, z)$ in koordinate vira $\mathbf{P}_0 = (x_0, y_0, z_0)$, lahko razdalji zapišemo in razvijemo do drugega reda

$$r = \sqrt{(x_0 - \xi)^2 + (y_0 - \eta)^2 + z_0^2} \approx r_0 + \frac{x_0\xi + y_0\eta}{r_0} + \left[\frac{\xi^2 + \eta^2}{2r_0} - \frac{(x_0\xi + y_0\eta)^2}{2r_0^3} \right], \quad (6)$$

$$s = \sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + z^2} \approx s_0 + \frac{x\xi + y\eta}{s_0} + \left[\frac{\xi^2 + \eta^2}{2s_0} - \frac{(x\xi + y\eta)^2}{2s_0^3} \right], \quad (7)$$

Zanima nas pogoj, pri katerem lahko pri integraciji po odprtini upoštevamo le prvi red odvisnosti razdalj r in s . Neposredno iz razvoja razdalj to velja, ko je

$$\frac{1}{2}k \left| \left(\frac{1}{r_0} + \frac{1}{s_0} \right) (\xi^2 + \eta^2) - \frac{(p_0\xi + q_0\eta)^2}{r_0} - \frac{(p\xi + q\eta)^2}{s_0} \right| \ll 2\pi \quad (8)$$

pri čemer so p_0 , q_0 , p , q smerni sinusi odklona vektorjev $\mathbf{r}$, $\mathbf{s}$ od optične osi $p_0 := \frac{x_0}{r_0}$, $p := \frac{x}{s_0}$, $q_0 := \frac{y_0}{r_0}$ in $q := \frac{y}{s_0}$. Pogoj gotovo velja, če smo na dovolj veliki razdalji

$$r_0 \gg \frac{d_{\max}^2}{4\lambda}, \quad s_0 \gg \frac{d_{\max}^2}{4\lambda}, \quad (9)$$

pri čemer je $(d_{\max}/2)^2 = (\xi^2 + \eta^2)_{\max}$. Prvi red pa je zadosten približek tudi v nekoliko bolj zanimivem primeru. Po trikotniški neenakosti in dejstvu, da so vsi smerni sinusi absolutno manjši od 1, je drugi red zanemarljiv tudi v primeru

$$p_0^2, q_0^2, p^2, q^2 \ll \frac{4r_0\lambda}{d_{\max}^2}, \quad \frac{1}{r_0} + \frac{1}{s_0} = 0. \quad (10)$$

Prvi pogoj preprosto zahteva, da je kot z optično osjo majhen. Drugemu pogoju pa v trenutni postavitvi temu ni mogoče zadostiti, saj je razdalja nenegativna količina.

2.2 Uklon skozi zbiralno lečo

Vprašamo se, ali je lahko drugi izmed pogojev (10) vseeno izpolnjen. Spominja nas namreč na enačbo leče, v kateri so razdalje lahko tudi predznačene. In res bomo v nadaljevanju spoznali, da je pogoj izpolnjen, če namesto uklona krogelnega vala na odprtini gledamo interferenčno sliko v goriščni ravnini zbiralne leče, npr. objektiva v mikroskopu.

Na sliki 3 gledamo odprtino z lečo in objekt zaenkrat odmislimo. Predstavljajmo si uklon, ki je posledica sekundarnih valov, izsevanih iz krogelne valovne fronte s središčem v $\mathbf{P}_0$. Ta fronta nastane pri lomu ravnega vala osvetlitve, ki vpada pravokotno na lečo in konvergira proti gorišču v $\mathbf{P}_0$.

V tem primeru $\mathbf{P}_0$ ni več točka izvora, temveč točka konvergence. Valovna fronta se v času naprej proti $\mathbf{P}_0$ širi konkavno, ne konveksno stran od nje (primerjaj sliki 2, 3). Širjenje je torej časovno obrnjeno. Pri obratu $t \rightarrow -t$ se rešitev valovne enačbe kompleksno konjugira, kar v našem primeru pomeni, da se *vhodni* val spremeni kot

$$u_0 \frac{e^{ikr}}{r} \rightarrow u_0 \frac{e^{-ikr}}{r}, \quad (11)$$

Bolj pozoren bralec bo opazil, da se pri novi postavitvi (slika 3) spremeni tudi predznak $\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r})$, ki je prisoten v uklonskem integralu. V tem primeru približek (4) ni več veljaven, saj sta $\mathbf{P}$ in $\mathbf{P}_0$ na isti strani odprtine in sta oba kosinusa enako predznačena. Zares gre

Zapisali smo uklonski vzorec, ko je naš *vhodni* val preprosto lom enostavnega ravnega vala. Poglejmo, kaj se zgodi, če ta ravni val izhaja iz presevnno osvetljenega objekta, osvetljenega z enostavnim ravnim valom.

2.3 Presevnno osvetljen objekt

Pred lečo postavimo z ravnim valom osvetljen objekt, določen s transmisijsko funkcijo $T(\xi, \eta)$, tako da je val za objektom oblike

$$u(\xi, \eta) = u_0 T(\xi, \eta). \quad (15)$$

Potem se val fazno zamakne v vsaki točki, iz katere sevajo interferirajoče valovne fronte. Predstavljamo si, da je odprtina $\mathcal{V}$ veliko večja od odprtine $\mathcal{A}$. Tako lahko uklonske pojave na odprtini $\mathcal{V}$ odmislimo in val tik po vzorcu res gledamo le kot vpadni val osvetlitve u_0 , pomnožen s kompleksno $T(\xi, \eta)$. Slika v goriščni ravnini se torej spremeni v

$$u(p, q) \approx \frac{u_0}{\lambda f^2} \int_{\mathcal{A}} T(\xi, \eta) e^{ik(p\xi + q\eta)} dS.$$

Če v integralu funkcijo T razširimo na celotno ravnino, tako da je izven odprtine $T = 0$, je integral preprosto

$$\begin{aligned} u(p, q) &\approx \frac{u_0}{\lambda f^2} \int_{\mathbb{R}^2} T(\xi, \eta) e^{ik(p\xi + q\eta)} dS \\ &= \frac{u_0}{f^2} \int_{\mathbb{R}^2} T(\xi, \eta) e^{i2\pi(p\xi + q\eta)} dS. \end{aligned} \quad (16)$$

Če zapisano jedrnato povzamemo – leča preko uklona v svoji goriščni ravnini blizu optične osi ustvari sliko, ki je enaka inverzni Fourierjevi transformiranki slike objekta

$$u(p, q) = \frac{1}{f^2} \mathcal{F}^{-1} \{u_0 T(\xi, \eta)\}, \quad (17)$$

Objektiv sliko objekta Fourierjevo transformira⁴ v goriščno ravnino, za tem pa okular izvede enako transformacijo. Zaporedje dveh enakih transformacij izvirno sliko T le prezrcali, v vmesni stopnji pa manipulacija žarka v goriščni ravnini omogoča, da se s sliko „poigramo“ na več zanimivih načinov. Kakšni so ti filtri in kaj nam omogočajo bomo opisali v nadaljevanju.

2.4 Slikanje faznega objekta

Recimo da skozi zbiralno lečo, objektiv, opazujemo čisti fazni objekt. Tak objekt svetlobe ne absorbira, temveč jo le fazno zamakne za ϕ . Pripada mu transmisijska funkcija oblike

$$T(\xi, \eta) = e^{i\phi(\xi, \eta)} \quad (18)$$

Če je optična debelina ϕ majhna, lahko zapišemo približek

$$T(\xi, \eta) = 1 + i\phi(\xi, \eta) + \mathcal{O}(\phi^2) \quad (19)$$

Najprej si bomo pogledali preprostejši primer periodičnega faznega objekta.

⁴Pravzaprav gre za inverzno Fourierjevo transformacijo, a tu vseskozi pišemo „Fourierjevo transformacijo“, saj je razlika v našem primeru stranskega pomena.

2.5 Uklonski redi v goriščni ravnini

Naj bo optična debelina objekta, ki ga slikamo, funkcija koordinate ξ , v smeri η pa je objekt translacijsko invarianten. Oblika je periodična s periodo 1, torej lahko $1 + i\phi$ razvijemo v Fourierjevo vrsto

$$1 + i\phi(\xi) = 1 + \sum_{m \neq 0} c_m e^{i2\pi m \xi}, \quad (20)$$

pri čemer smo ničti koeficient $c_0 = 1$ pisali posebej⁵. Sami koeficienti določajo uklonski vzorec $u(p)$ v goriščni ravnini objektiva, ki nastane kot Fourierjeva transformiranka $T = e^{ik\phi(\xi)}$. Ker pa je T periodična, njena transformiranka ni zvezna funkcija smeri p kot v izrazu (17), temveč vrsta. Če bi jo vseeno zapisali kot funkcijo, bi imela obliko Diracovega glavnika

$$u(p) = \frac{1}{f^2} \mathcal{F}^{-1} \{u_0 T(\xi)\} = \frac{u_0}{f^2} \sum_{m \neq 0} c_m \delta(p - p_m).$$

V goriščni ravnini $\mathcal{F}$ so za periodičen fazni objekt prisotni diskretni uklonski redi s koeficienti c_m . Posebej zapisan koeficient c_0 je koeficient ničtega reda, ki predstavlja povprečno absolutno vrednost naše transformirane T , ki je preprosto 1.

2.6 Fazni kontrast

Uklonski redi v goriščni ravnini so prostorsko ločeni. Če enega izmed njih npr. prestrežemo, smo s tem na nič nastavili koeficient c'_m v Fourierjevi vrsti slike $u(\xi')$, ki nastane, ko okular uklonski vzorec še enkrat Fourierjevo transformira

$$\frac{u(\xi')}{u_0} = c'_0 + \sum_{m \neq 0} c'_m e^{i2\pi m \xi'} = 1 + 2\phi(x) + \mathcal{O}(\phi^2).$$

A prestrezanje ni edini način, da modificiramo uklonske rede. Osnovna ideja faznega kontrasta je, da v goriščni ravnini uklonske rede modificiramo kot

Uklonski redi v goriščni ravnini so prostorsko ločeni. Če enega izmed njih npr. prestrežemo, smo s tem na nič nastavili koeficient c'_m v Fourierjevi vrsti slike $u(\xi')$, ki nastane, ko okular uklonski vzorec še enkrat Fourierjevo transformira

$$\frac{u(\xi')}{u_0} = c'_0 + \sum_{m \neq 0} c'_m e^{i2\pi m \xi'}.$$

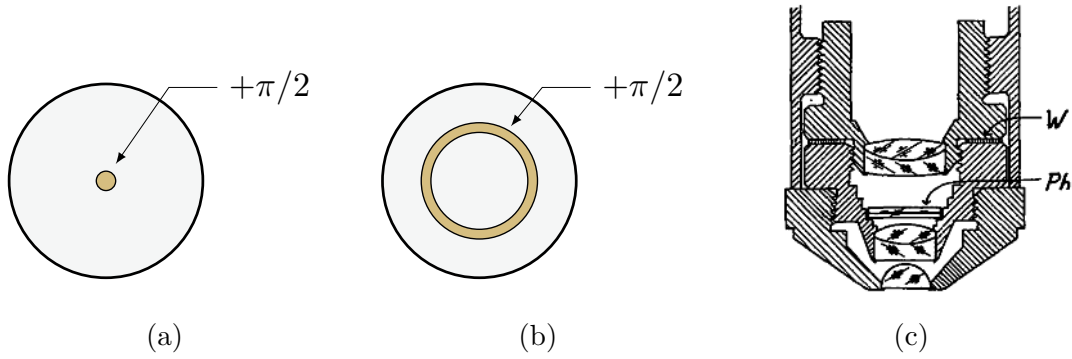
A prestrezanje ni edini način, da modificiramo uklonske rede. Osnovna ideja faznega kontrasta je, da v goriščni ravnini uklonske rede modificiramo kot

$$\text{fazni kontrast } F_f : \begin{array}{l} c_0 \mapsto ic_0 \\ c_m \mapsto c_m. \end{array} \quad (21)$$

Tedaj ima slika za okularjem obliko $i + i\phi$, njena intenziteta pa je

$$\frac{I(\xi')}{u_0^2} = |1 + \phi(\xi') + \mathcal{O}(\phi^2)|^2 = 1 + 2\phi(\xi') + \mathcal{O}(\phi^2). \quad (22)$$

⁵Predpostavili smo tudi, da je povprečje $\langle \phi \rangle = 0$, torej je povprečje $\langle 1 + i\phi \rangle = 1$.



Slika 4: (a) Fazna plošča, ki v osrednjem delu žarek zamakne naprej za $\pi/2$. (b) Fazna plošča z zakasnitvenim obročem namesto zakasnitvene pike. (c) Postavitev fazne plošče znotraj objektiva, v goriščni ravnini objektiva. Slika vzeta iz [3].

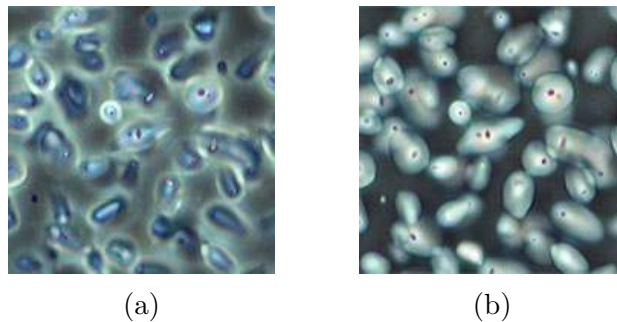
Vidimo torej, da slika za okularjem reproducira našo izvirno periodično $\phi(\xi)$. Če žarka ne bi prestregli, bi bila intenziteta po okularju točno

$$\frac{I(\text{brez f. k.})}{u_0^2} = |\mathcal{F}^{-1} \{ \mathcal{F}^{-1} T(x) \}| = |T(-x)| = 1,$$

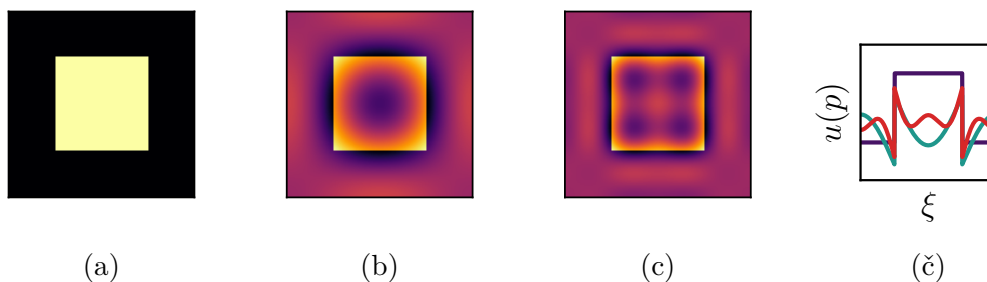
saj bi dvakratna Fourierjeva transformacija transmissijsko T preslikala nazaj samo vase, le v prezrcaljenih koordinatah. S filtrom faznega kontrasta smo torej razkrili drugače nevidno strukturo faznega objekta.

Za fazni kontrast je torej ničelni red potrebno fazno zamakniti kot $1 \mapsto i$. To dosežemo s fazno ploščo, ki v sredini vsebuje t. i. zakasnitveno piko. To je dodaten sloj optičnega materiala, ki žarek fazno zamakne za $\pi/2$ ali za $1/4$ valovne dolžine in omogoči, da fazni objekt postane viden (glej sliki 4a, 4b).

Glede na smer faznega zamika ločimo dve variaciji metode. Že omenjena, v kateri je fazni zamik pozitiven, je t. i. pozitivni fazni kontrast. Če pa je fazni zamik za $\pi/2$ negativen ali enakovredno enak $3\pi/2$, v okularju namesto $1 + 2\phi$ vidimo sliko $1 - 2\phi$. V tem primeru govorimo o negativnem faznem kontrastu. Za primerjavo glej sliko 5.



Slika 5: Zrna škroba, pridobljena iz korenike *Maranta arundinacea*. (a) Pozitiven fazni kontrast. (b) Negativen fazni kontrast. Sliki vzeti iz [6].



Slika 6: Vpliv povečevanja zakasnitvene pike v fazni plošči. (a) Slika z zakasnitveno piko, ki zajame le en diskreten osrednji red. (b) Slika s piko, ki zajame še 1 dodaten red in (c) 4 dodatne rede v vse smeri. Vseh diskretnih redov je 2048×2048 . Na sliki (č) vidimo vrednosti v sredinskem prerezu (vijolična, modra in rdeča za slike a, b in c).

2.7 Fazni kontrast v praksi

Metodo smo predstavili na preprostem primeru periodičnega objekta, ki ima v goriščni ravnini prisotne diskretne rede. Za splošno obliko faznega objekta (npr. živih celic) pa je Fourierjeva transformiranka zvezna funkcija v goriščni ravnini.

Ničelni red torej ni ostro ločen od višjih redov – končna velikost zakasnitvena pika bo neizogibno zamaknila tudi rede v neposredni okolici ničelnega reda. Učinek tega si pogledjmo na simuliranem primeru z diskretno Fourierjevo transformacijo. Na sliki 6 vidimo vpliv na sliko, ko večamo zakasnitveno piko, s tem pa zamikamo vedno več sosednjih redov. Če v diskretni sliki zamaknemo zgolj ničelni red, kot na sliki 6a, bo slika popolna reprodukcija faznega objekta. Ko pa zamikamo vedno več redov, se na sliki pojavijo artefakti v obliki svetlega ali temnega soja okoli opazovanega objekta. Ti artefakti so podobni tistim, ki jih vidimo v pravih slikah s faznim kontrastom, npr. okoli krvnih celic na sliki 1b.

Izkaže se, da vpliv teh artefaktov zmanjšamo, če uporabimo ozek podolgovat vir svetlobe v kombinaciji s fazno ploščo z ozkim zakasnitvenim trakom [4]. To v sistem vnese visoko mero neželene anizotropije, ki se ji delno izognemo, če namesto podolgovate oblike uporabimo obliko ozkega obroča. Dodatno nam obročasta zaslonka kondenzorja zagotovi boljšo resolucijo kot okrogla zaslonka (pokazano v [5], poglavje 8.6.2).

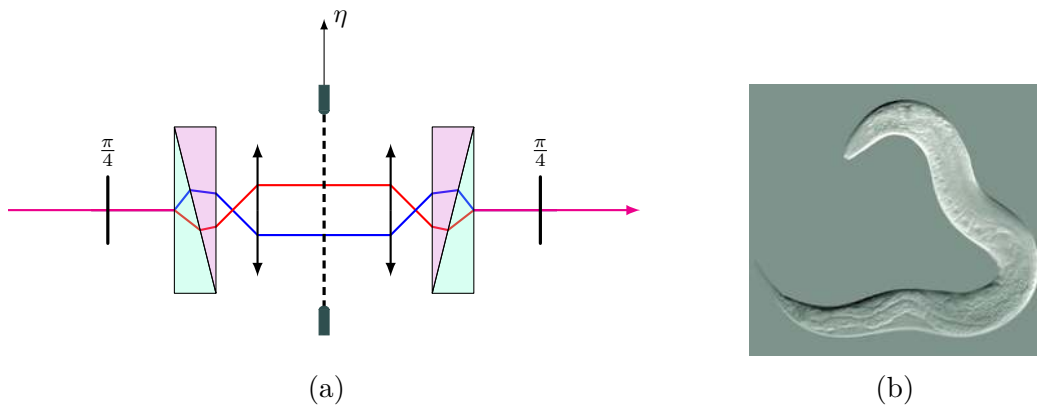
Kontrast slike lahko dodatno izboljšamo, če zakasnitveni obroč ni povsem prozoren, temveč del svetlobe absorbira. Za obroč, ki prepusti $\beta < 1$ svetlobne amplitude, bo slika v amplitudi oblike $i\beta + 2i\phi$, v intenziteti pa bo slika

$$\frac{I(\xi')}{u_0^2} \approx \beta^2 + 2\beta\phi(\xi'). \quad (23)$$

Če je β npr. 0.5, bo razmerje med ozadjem β^2 in signalom povečano za faktor $1/\beta = 2$. S absorpcijo v zakasnitvenem obroču torej povečamo kontrast, izgubimo pa nekaj celotnega signala.

3 DIC mikroskopija

Metodo kontrasta z diferenčno interferenco ali krajše DIC (ang. *differential interference microscopy*) je fazno občutljiva metoda, ki jo je v 1952 dokončno razvil Georges Nomarski.



Slika 7: Diagram mikroskopa DIC, ki informacijo o fazi zagotovi z interferenco dveh žarkov različnih polarizacij. Žarek se na prizmi razcepi na žarka polarizacij 0 in $\pi/2$, narisana z rdečo in modro. (b) Glista *C. elegans*, posneta z DIC mikroskopom. Slika vzeta iz [8].

Metoda za tvorbo slike uporabi dva vzporedna žarka, ločena z majhno razdaljo, primerljivo z ločljivostjo mikroskopa [7]. Preko interference tedaj merimo razliko optične debeline med točkama, ki ji žarka prebadata. Metoda je v primerjavi s klasičnimi pristopi mnogo enostavnejša za implementacijo.

Mehanizem je prikazan na sliki 7a. Žarek koherentne svetlobe skozi polarizator vstopa v prizmo posebne izdelave. To je prizma Nomarskega, narejena iz dvolomnega materiala, v katerem je lomni količnik odvisen od polarizacije svetlobe. Prizma žarek loči na žarek polarizacije 0 (na sliki z modro) in žarek polarizacije $\pi/2$ (na sliki z rdečo).

Ločena žarka kondenzor [9] kolimira. Dobimo torej polarizacijsko pravokotna vzporedna žarka, ločena z majhnim razmikom. V ravnini vzorca $\mathcal{V}$ oba žarka potujeta skozi objekt in sta fazno zamaknjena za optični debelini $\phi(\xi_1)$ in $\phi(\xi_2)$, katerih razlika je

$$\Delta\phi = \phi(\xi_1) - \phi(\xi_2) \quad (24)$$

V drugi prizmi se žarka združita. A ker sta po polarizaciji pravokotna, ne interferirata. Interferirata šele po drugem polarizatorju, ki obe komponenti projicira na smer $\pi/4$. Tako prej pravokotno polarizirani komponenti kažeta v isto polarizacijsko smer in kot taki interferirata.

Signal ki ga zajamemo, je tako v intenziteti sorazmeren kvadratu razlike optičnih debelin $\Delta\phi$. Slika torej prikazuje odvod optične debeline, primer lahko vidimo na sliki 7b.

4 Kvantitativno fazno slikanje

Metode fazno občutljivega slikanja niso nujno zgolj mehanizmi, ki izboljšajo kontrast opazovanega objektu. Fazni zamik oz. optično debelino lahko obravnavamo kot samostojno kvantitativno količino, preko katere lahko sklepamo o lastnostih objekta, ki ga opazujemo. Najbolj osnovna izmed teh količin je masna koncentracija snovi, tipično beljakovin.

4.1 Masna koncentracija

Metode kvantitativne faze izkoriščajo dejstvo, da je lomni inkrement Δn premo sorazmeren masni koncentraciji snovi v raztopini. Sorazmernostni koeficient imenujemo specifičen

lomni inkrement (ang. *specific refraction increment*) in ga označimo kot

$$\alpha = \frac{\Delta n}{w},$$

pri čemer je w masna koncentracija snovi v raztopini. Snovi, ki nas zanimajo v povezavi z živalskimi celicami, so v največji meri beljakovine, v manjši meri tudi genetski material, sladkorji in lipidi. Lomni inkrementi teh beljakovin so dovolj podobni, da v literaturi že dolgo obstaja neformalen dogovor o srednji vrednosti, ki je navadno

$$\alpha_{\text{dogovor}} = 0.185 \text{ mL/g}$$

Ta priročen dogovor, predlagan v viru [10] je podprt tudi v bolj trenutnem pogledu. Specifični lomni inkrementi človeških beljakovin so npr. porazdeljeni po relativno ozki Gaussovki, s povprečjem v 0.190 mL/g in standardno deviacijo $\sim 2\%$ te vrednosti [11]. Dogovorjena vrednost specifičnega lomnega inkrementa je torej priročen in precej robusten nadomestek za bolj natančno določanje sestave organizmov, ki jih preučujemo.

4.2 Merjenje optične debeline

Pristopi, ki se vpricho dostopnosti osredotočajo na prilagoditev obstoječih metod, tipično sestojijo iz razvoja boljših algoritmov za rekonstrukcijo faze (ang. *phase retrieval*) iz intenzitetnih slik.

Kvantitativno fazno slikanje je obudilo tudi zanimanje za interferometrijskih metodah z ločenim referenčnim žarkom, saj te v osnovi ponujajo kvantitativne meritve faze. Obetavne so tudi metode digitalno holografije, interferometrijske metode z belo ali nekoherentno svetlobo ter predvsem metode, ki združujejo dva ali več osnovnih mehanizmov, integriranih preko vedno bolj sofisticiranih algoritmov za rekonstrukcijo [12]. Ena taka metoda je npr. mikroskopija SLIM, ki združuje metodo faznega kontrasta z digitalno holografijo [13] (v poglavju 5.2 si ogledamo aplikacijo te metode).

5 Primeri uporabe

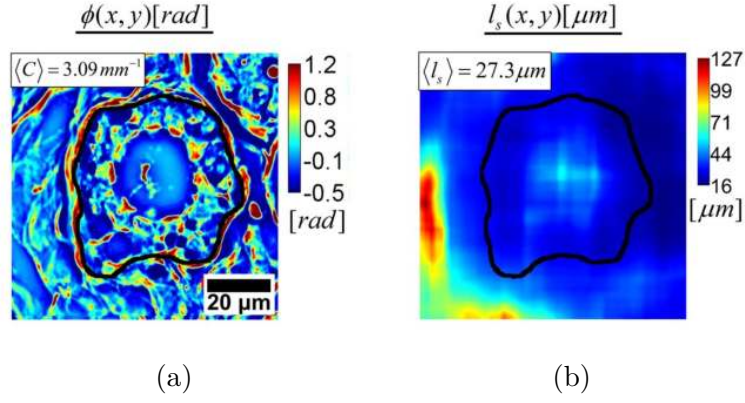
5.1 Slike sečnih sedimentov

Kako veliko izboljšavo predstavlja fazni kontrast, pogledjmo na primeru. Monografija [1] vsebuje primerjavo na množici slik sečnih sedimentov; posnetimi prvo z navadnim mikroskopom in nato s faznim kontrastom (slika 1).

5.2 Diagnostični model raka na dojkah

Fazne slike tkiva so v [14] uporabili kot osnovo za razvoj diagnostičnih meril raka na dojkah. Celice mlečnih žlez, na podlagi katerih se diagnoza izvaja, so prozorne. Za potreben kontrast je namesto standardnega para histoloških barvil hematoxylin-eosin uporabljena metoda SLIM (ang. *spatial light interference microscopy*) [13].

Slike optične debeline služijo kot vhodni podatek za razvoj novega diagnostičnega modela, v katerem nastopajo tri značilke. Značilke so izračunane na podlagi zajetih slik, njihove vrednosti po površini celice vidimo na sliki 8. Prva značilka je geometrijska



Slika 8: Značilki za diagnostični model raka na dojkah za benigno celico. (a) Optična debelina z izračunano povprečno ukrivljenostjo. (b) Izračunana $\langle l_s \rangle$, povprečna prosta pot svetlobe, ki se sipa v tkivu. Slike vzete iz [14].

ukrivljenost optične debeline, izračunana neposredno iz fazne slike. Druga značilka je povprečna prosta pot za sipanje $\langle l_s \rangle$, ki jo po [15] iz fazne slike izračunamo kot

$$\langle l_s \rangle = \frac{d}{\text{var} \{ \phi(\xi, \eta) \}},$$

pri čemer je d debelina vzorca, v imenovalcu pa imamo varianco fazne slike. Tretja značilka je osnovana na notranji organizaciji celičnih komponent, ki jih lahko prepoznamo kot spremembo v teksturi zajete slike. Značilke, označene s znanimi diagnozami, so uporabljene kot podatkovna množica za model LDA (ang. *linear discriminant analysis*). V članku z vzorci tkiva 68 pacientov (34 malignih in 34 benignih) pri 3-kratno navzkrižnem preverjanju kot maligne pravilno zaznajo 94% malignih primerov (občutljivost) in kot benigne zaznajo 85% benignih primerov (specifičnost).

6 Zaključek

Področje fazno občutljivih metod je aktivno področje raziskav, tako v razvoju novih metod kot tudi uvajanju že uveljavljenih. Posebej popularne so metode kvantitativnega faznega slikanja, preko katerih lahko merimo maso, podrobno morfologijo in mehanske lastnosti živih celic. Že zdaj je mogoče trditi, da so znatno prispevale k našemu kolektivnemu razumevanju življenjskih procesov.

Literatura

- [1] E. Spencer in I. Pedersen. *Hand Atlas of the Urinary Sediment: Bright-field, Phase-contrast, and Polarized-light*. let. 2. University Park Press, 1977. ISBN: 9788716024213.
- [2] F. Zernike. „How I discovered phase contrast“. V: *Science* 121.3141 (1955), str. 345–349.
- [3] F. Zernike. „Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects“. V: *Physica* 9.7 (1942), str. 686–698.
- [4] F. Zernike. „Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II“. V: *Physica* 9.10 (1942), str. 974–986.
- [5] M. Born in E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 2019. ISBN: 9781108477437.
- [6] D. B. Murphy in sod. *Positive and Negative Phase Contrast*. URL: <https://www.microscopyu.com/tutorials/positive-and-negative-phase-contrast> (pridobljeno 6. 4. 2023).
- [7] W. Lang in sod. *Nomarski differential interference-contrast microscopy*. Carl Zeiss Oberkochen, 1982.
- [8] S. UK. *A guide to Differential Interference Contrast*. URL: <https://www.scientificauk.com/learning-zone/differential-interference-contrast> (pridobljeno 6. 4. 2023).
- [9] Wikipedia. *Condenser (optics)*. 2023. URL: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Condenser%20\(optics\)&oldid=1081661439%7D](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Condenser%20(optics)&oldid=1081661439%7D) (pridobljeno 18. 4. 2023).
- [10] R. Barer in S. Joseph. „Refractometry of Living Cells. Part I. Basic Principles“. V: *Journal of Cell Science* s3-95.32 (1954), str. 399–423.
- [11] H. Zhao, P. H. Brown in P. Schuck. „On the distribution of protein refractive index increments“. V: *Biophysical journal* 100.9 (2011), str. 2309–2317.
- [12] T. L. Nguyen in sod. „Quantitative Phase Imaging: Recent Advances and Expanding Potential in Biomedicine“. V: *ACS nano* 16.8 (2022), str. 11516–11544.
- [13] Z. Wang in sod. „Spatial light interference microscopy (SLIM)“. V: *Optics express* 19.2 (2011), str. 1016–1026.
- [14] H. Majeed in sod. „Label-free quantitative evaluation of breast tissue using Spatial Light Interference Microscopy (SLIM)“. V: *Scientific reports* 8.1 (2018), str. 6875.
- [15] Z. Wang, H. Ding in G. Popescu. „Scattering-phase theorem“. V: *Optics letters* 36.7 (2011), str. 1215–1217.