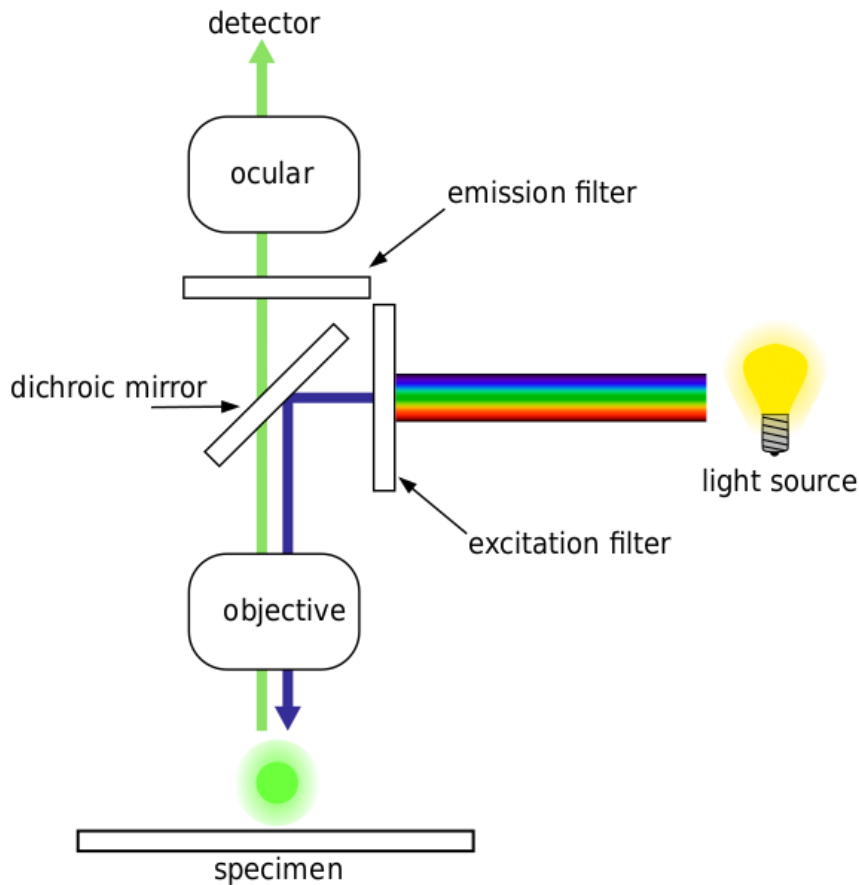


# Μικροσκοπία φθορισμού II

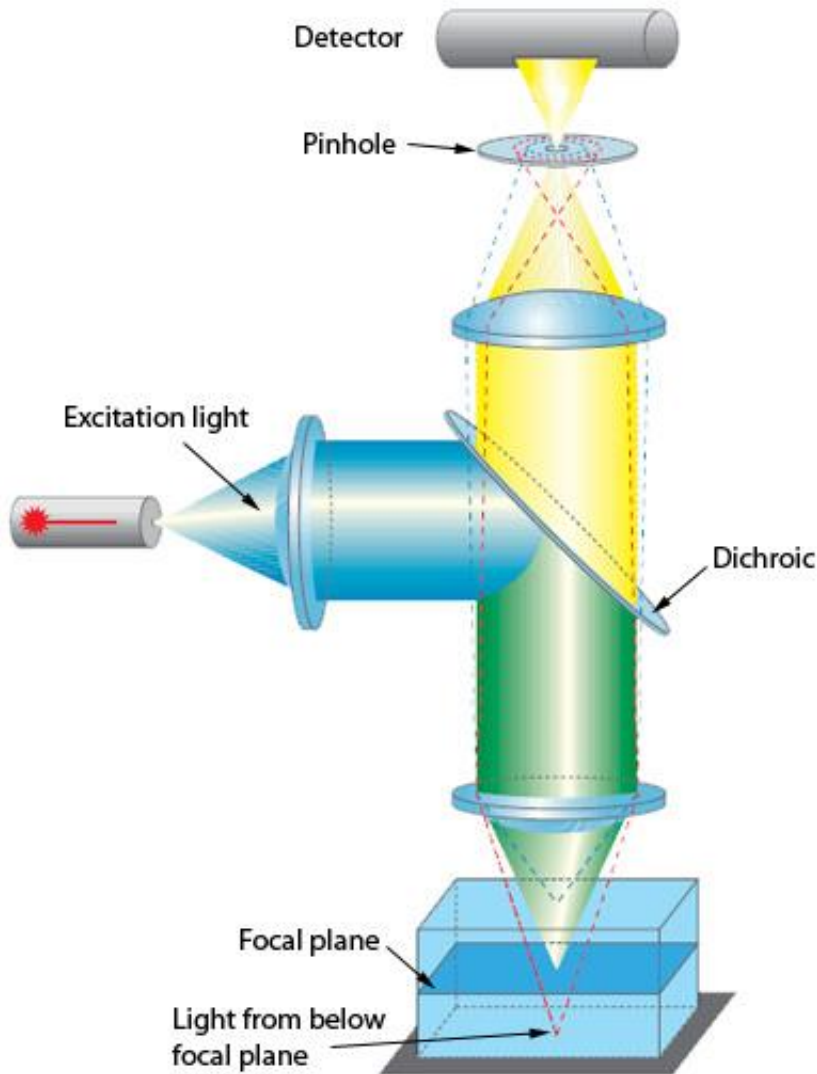


# Widefield μικροσκοπία φθορισμού



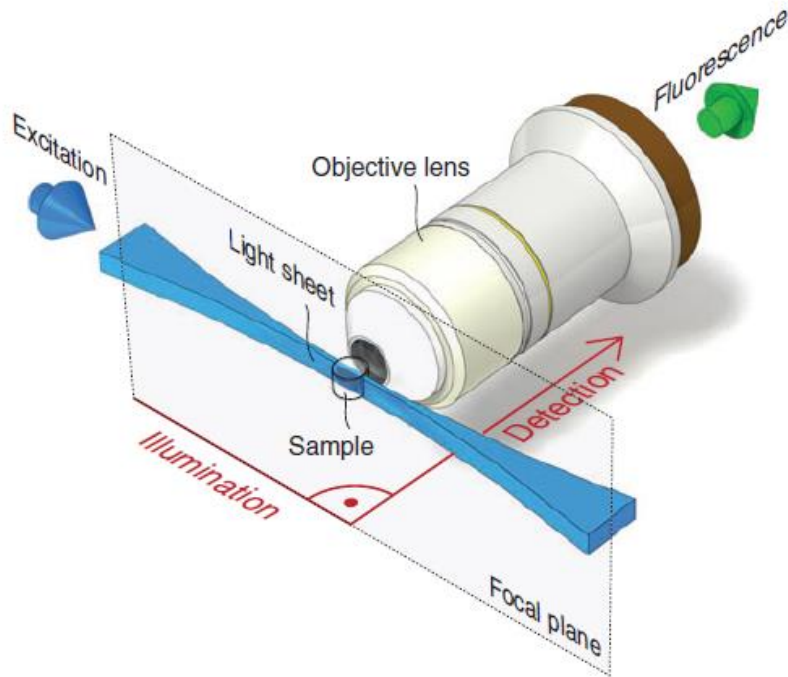
- Ομοιογενής φωτισμός του δείγματος μέσω λάμπας
- Συλλογή φθορισμού με χρήση κατάλληλου φίλτρου εκπομπής
- Εύκολη και οικονομική τεχνική απεικόνισης
- Ο φθορισμός εκτός εστιακού επιπέδου οδηγεί σε θολές εικόνες
- Δεν υπάρχει δυνατότητα καταγραφής οπτικής τομής
- Δεν υπάρχει δυνατότητα τρισδιάστατης απεικόνισης

# Συνεστιακή (confocal) μικροσκοπία φθορισμού



- Διέγερση μέσω εστιασμένης δέσμης λέιζερ
- Καταγραφή σήματος φθορισμού έπειτα από φιλτράρισμα μέσω οπής (pinhole)
- Αφαίρεση φθορισμού εκτός εστιακού επιπέδου
- Σάρωση δέσμης σημείο προς σημείο (raster scan)
- Λήψη εικόνων μεγάλης ευκρίνειας από συγκεκριμένα οπτικά επίπεδα καθώς και δυνατότητα 3-Δ απεικόνισης
- Μικρό βάθος απεικόνισης, σχετικά αργή (1-2 fps), φωτολεύκανση, φωτοτοξικότητα

# Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM)



Huisken et al, Development, 2009

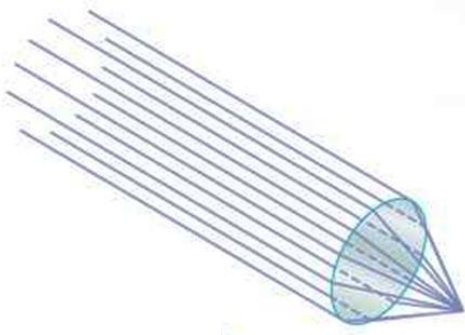


Πώς μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα λεπτό φύλλο φωτός (light sheet);

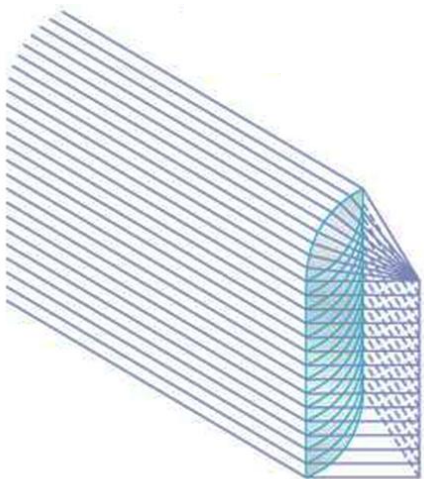
- Φωτισμός του δείγματος μέσω ενός πολύ λεπτού φύλλου φωτός
- Ο φωτισμός του δείγματος είναι κάθετος σε σχέση με την ανίχνευση
- Καταγραφή φθορισμού που προέρχεται μόνο από το φύλλο φωτός μέσω CCD camera
- Καταγραφή συνεχόμενων οπτικών τομών μέσω της κίνησης του δείγματος προς τον αντικειμενικό φακό
- Κατάλληλη τεχνική για παρακολούθηση γρήγορων βιολογικών διεργασιών (>30 fps)
- Σημαντικά λιγότερη φωτολεύκανση και φωτοτοξικότητα αλλά και μεγαλύτερο βάθος απεικόνισης σε σχέση με το confocal

# Εστίαση φωτός μέσω κυλινδρικού φακού

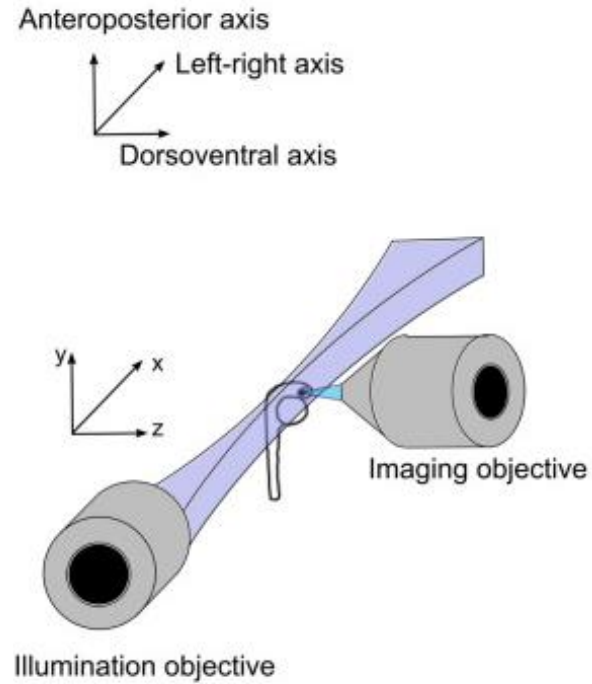
Εστίαση σε σημείο από θετικό σφαιρικό φακό



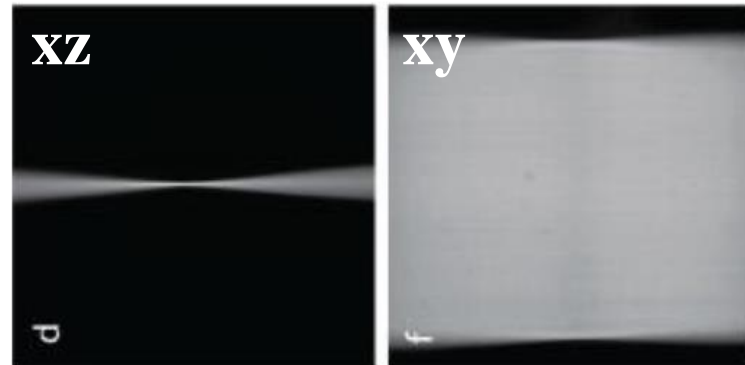
Εστίαση σε γραμμή από θετικό κυλινδρικό φακό



Young et al, Biomedical Optics Express, 2018



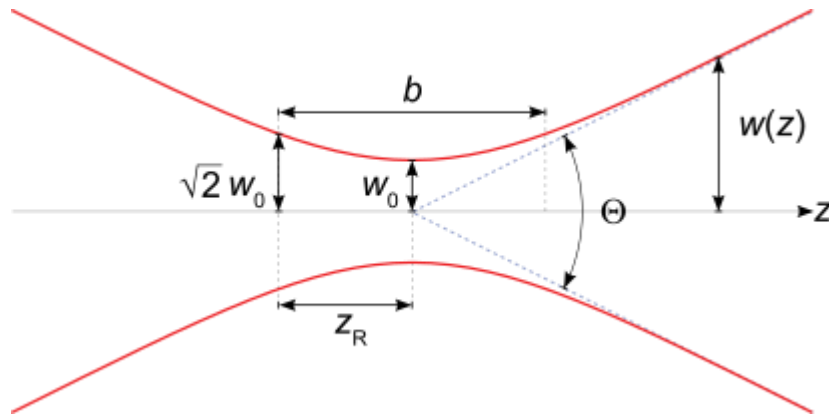
Keller et al, Science, 2008



Πως βλέπω το φύλλο φωτός από πάνω

Πως βλέπει το φύλλο φωτός ο imaging objective

# Χαρακτηρισμός φύλλου φωτός



## Παράμετροι Γκαουσιανής δέσμης λέιζερ

- $w_0$ : Beam waist (η ελάχιστη ακτίνα της δέσμης στην εστία)
- $z_R$ : Rayleigh length (η αξονική απόσταση από τη θέση του beam waist έως τη θέση όπου η ακτίνα μεγαλώνει κατά ρίζα 2)
- $b$ : Confocal parameter (ισούται με 2 φορές το  $z_R$ )
- $\Theta$ : Angular spread (γωνιακό άνοιγμα της δέσμης)
- $w(z)$ : Η ακτίνα της δέσμης σε απόσταση  $z$

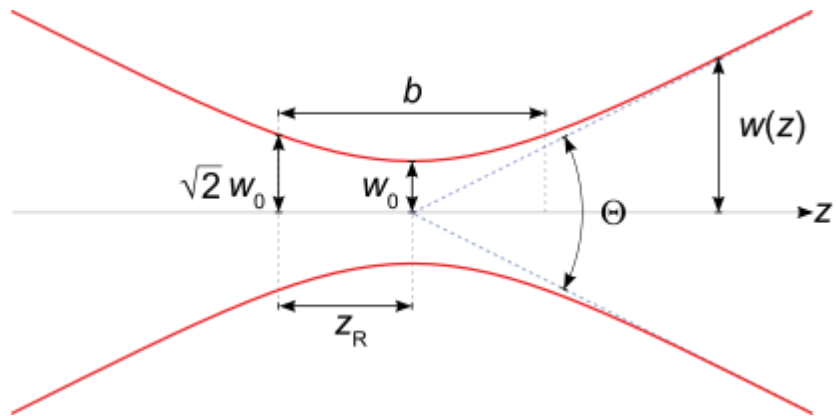
- Το  $w_0$  καθορίζει το πλάτος του φύλλου φωτός και συνεπώς την αξονική ανάλυση του SPIM
- Στο SPIM μας ενδιαφέρει να απεικονίσουμε με τη σχεδόν ομοιογενή περιοχή που βρίσκεται στο κέντρο της δέσμης
- Έξω από την περιοχή αυτή η δέσμη «ανοίγει» με συνέπεια τη μείωση της έντασης σήματος καθώς και της αξονικής ανάλυσης

### Βασικές σχέσεις

$$w_0 = \frac{\lambda_0}{\pi NA} \quad b = \frac{2nw_0}{NA}$$

όπου  $\lambda_0$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας στο κενό,  $n$  ο δείκτης διάθλασης του μέσου και  $NA$  το αριθμητικό άνοιγμα του illumination objective

# Χαρακτηρισμός φύλλου φωτός



$\lambda_0 = 488 \text{ nm}$   
 $\text{NA} = 0.06$   
 $n = 1.33$

$w_0 = 2.59 \mu\text{m}$   
 $b = 114.82 \mu\text{m}$

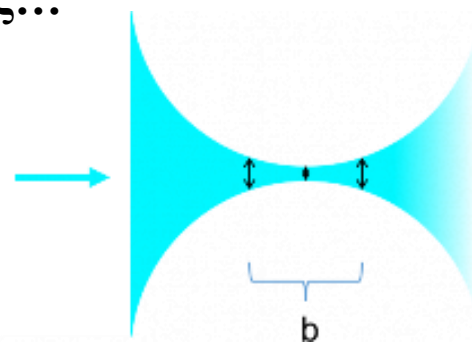
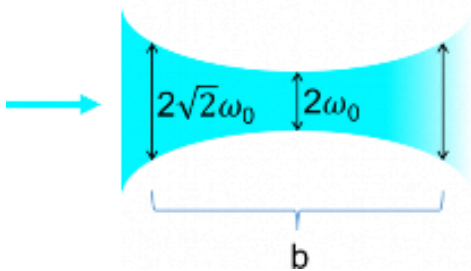


$\lambda_0 = 488 \text{ nm}$   
 $\text{NA} = 0.15$   
 $n = 1.33$

$w_0 = 1.04 \mu\text{m}$   
 $b = 18.44 \mu\text{m}$

$w_0 \rightarrow$  Σχετίζεται με την αξονική ανάλυση  
 $b \rightarrow$  Σχετίζεται με το πεδίο θέασης

Κάπου κερδίζεις, κάπου χάνεις...



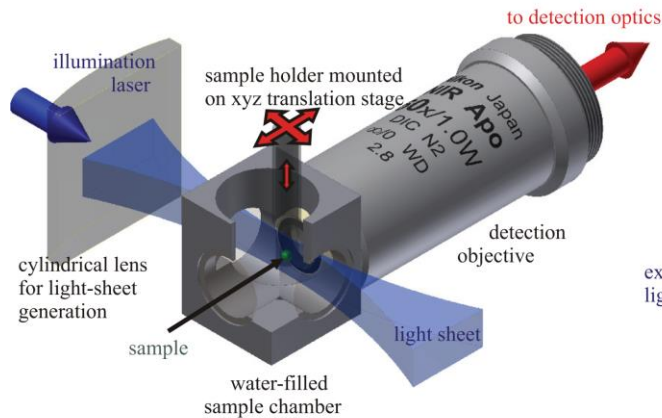
Μεγάλο πεδίο θέασης,  
 μικρή αξονική ανάλυση

Μικρό πεδίο θέασης,  
 μεγάλη αξονική ανάλυση

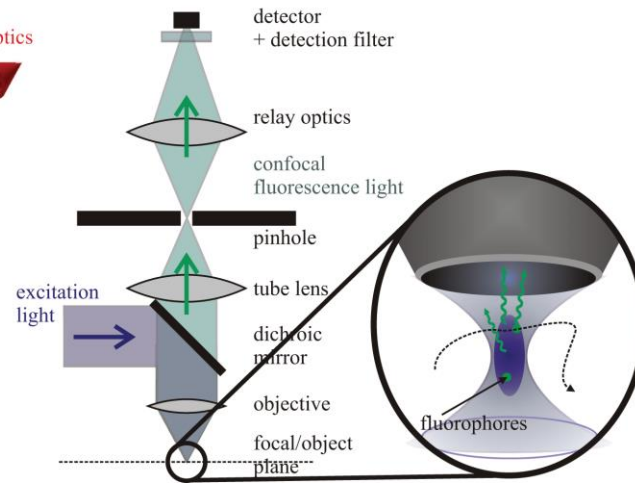
Η πλευρική ανάλυση της μικροσκοπίας SPIM είναι θεωρητικά παρόμοια με το widefield, ωστόσο στην πράξη είναι ελαφρώς καλύτερη λόγω της αυξημένης απεικονιστικής αντίθεσης

# Σύγκριση μικροσκοπίας SPIM με confocal

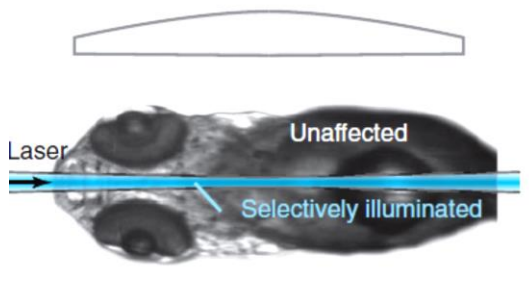
[A] schematic view of a SPIM



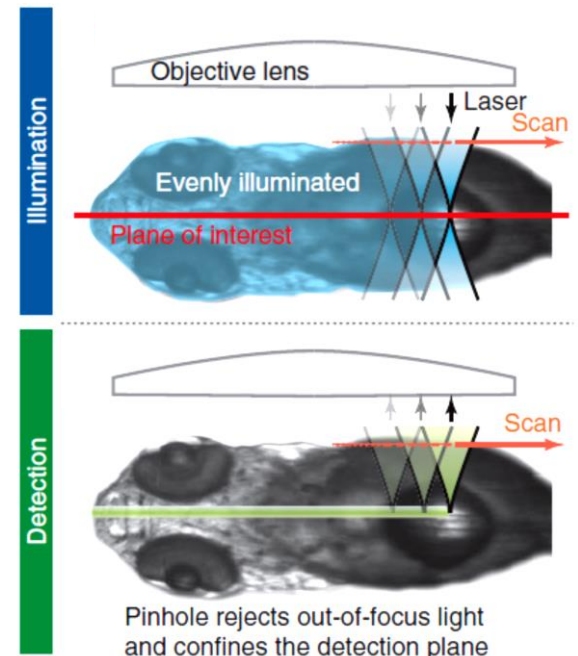
[B] schematic view of a confocal microscope



- Το SPIM παράγει φωτόνια φθορισμού μόνο στο εστιακό επίπεδο
- Σημαντικά λιγότερα φωτόνια «ξοδεύονται» σε περιοχές εκτός εστιακού επιπέδου
- Δραματικά μικρότερη ενέργεια λέιζερ για παρόμοιο λόγο σήματος προς θόρυβο
- Η φωτολεύκανση μειώνεται κατά ένα παράγοντα  $n$ , όπου  $n$  ο αριθμός των τομών
- Μείωση φωτοτοξικότητας που επιτρέπει μακροχρόνια παρατήρηση



Widefield detection with a CCD camera



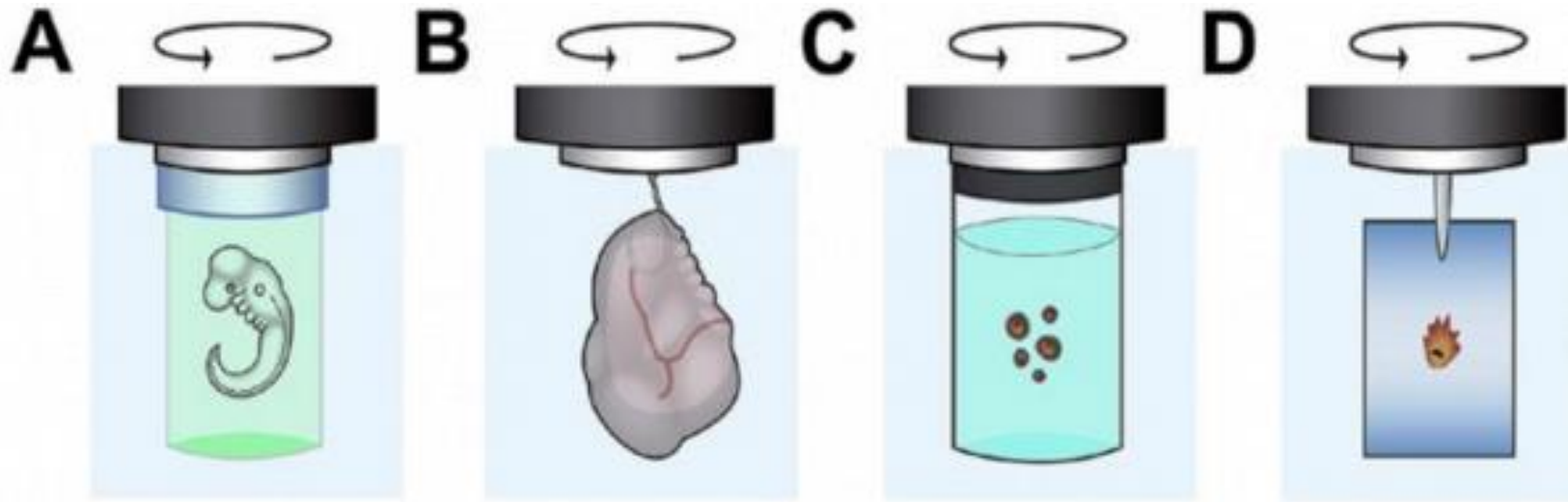
Pinhole rejects out-of-focus light and confines the detection plane

Huisken et al, Development, 2009

<https://cbis.nus.edu.sg/thorsten-wohland/>



# Παραδείγματα τοποθέτησης ζωντανών δειγμάτων



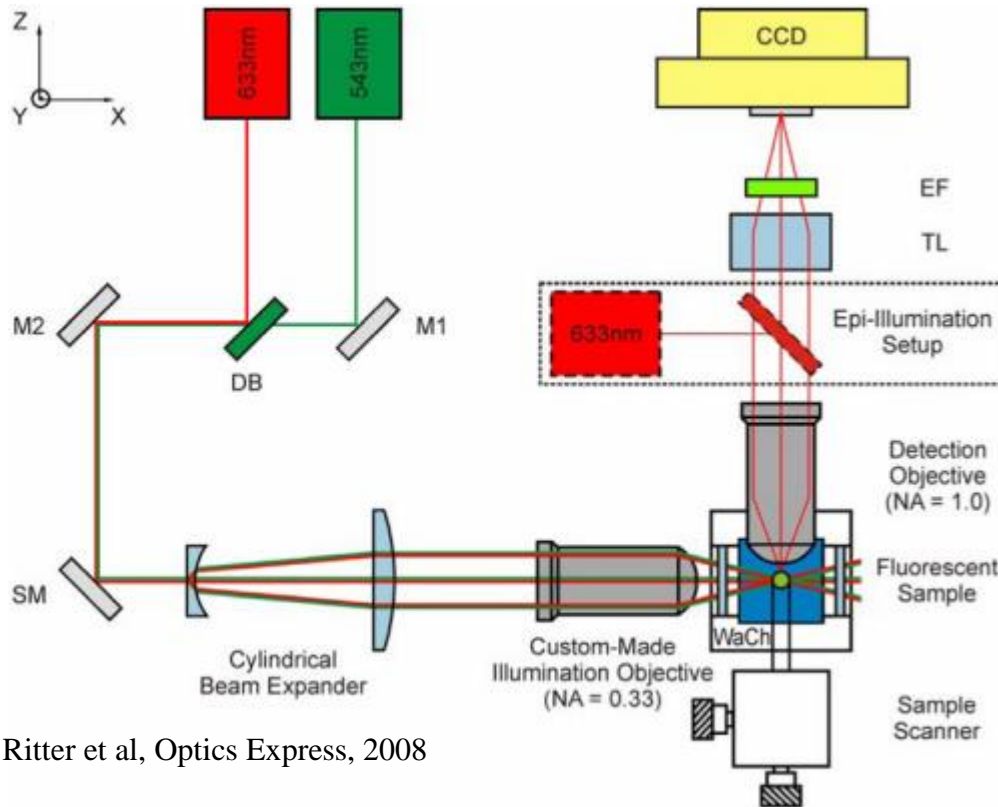
Χρήση αγαρόζης για απεικόνιση εμβρύου Zebrafish

Χρήση γάντζου για την απεικόνιση οργάνου

Σφαιροειδή σε διάφανο δοχείο PTFE (Teflon)

Κύτταρο προσκολλημένο σε coverslip

# Βασική διάταξη SPIM



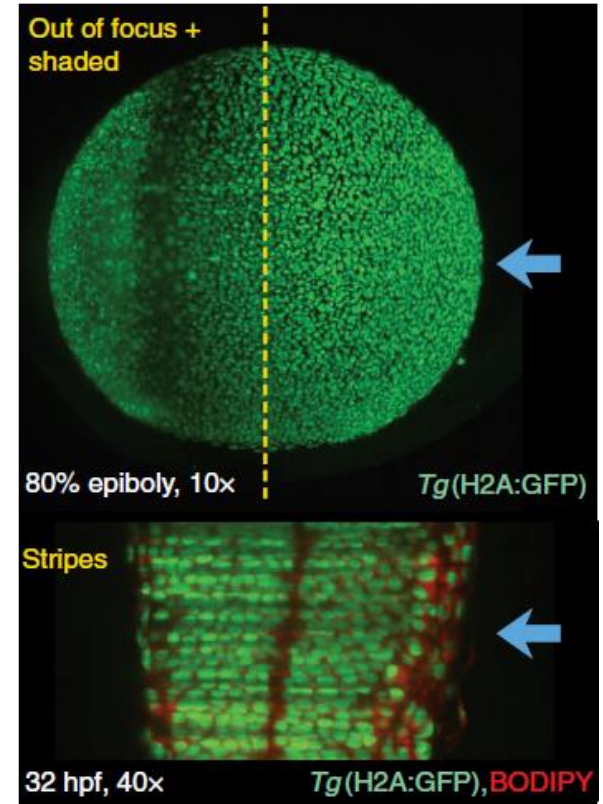
Ritter et al, Optics Express, 2008

- M1, M2: Mirrors
- DB: Dichroic Beamsplitter
- SM: Scanning Mirror
- WaCh: Water Chamber
- TL: Tube Lens
- EF: Emission Filter



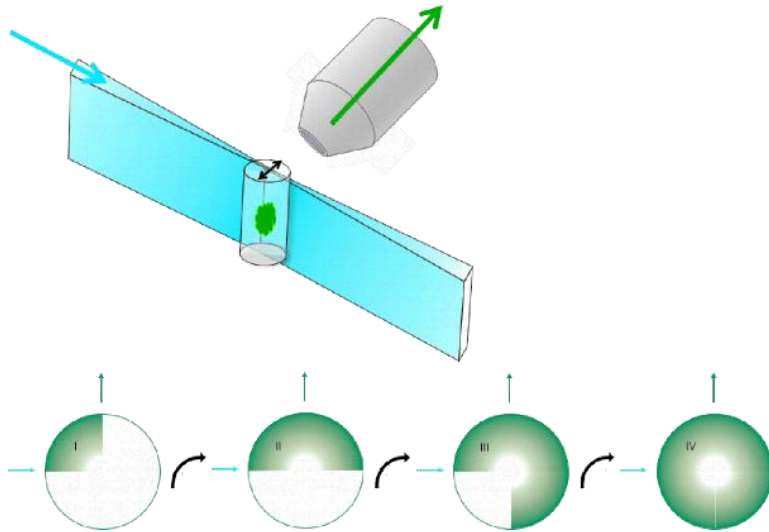
- Το σχήμα του φύλλου φωτός αλλοιώνεται και η έντασή του μειώνεται καθώς αυτό περνά μέσα από το δείγμα λόγω σκέδασης / απορρόφησης
- Σχηματισμός σκοτεινών ριγών (stripes) λόγω δομών έντονης απορρόφησης

Τυπικά προβλήματα φωτισμού από μία μόνο πλευρά (μία λήψη)



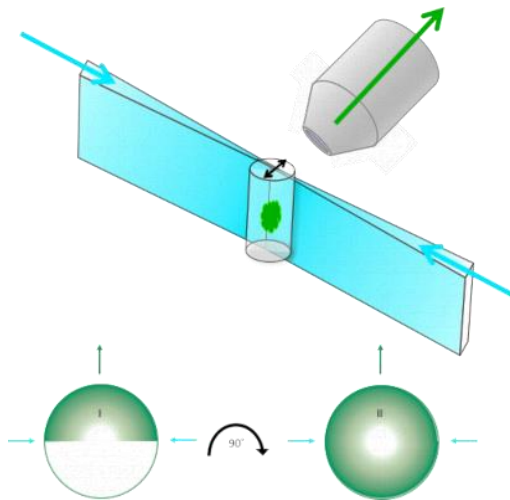
# Τυπικά είδη απεικονιστικών διατάξεων SPIM

## L-SPIM



- Φωτισμός από τη μία πλευρά
- Υψηλή ευκρίνεια εικόνας μόνο στο πρώτο μισό της εικόνας
- Διαδοχική περιστροφή του δείγματος κατά  $90^\circ$  ώστε να καλυφθεί το σύνολο του όγκου του
- Συνδυασμός των εικόνων μέσω ειδικών αλγορίθμων

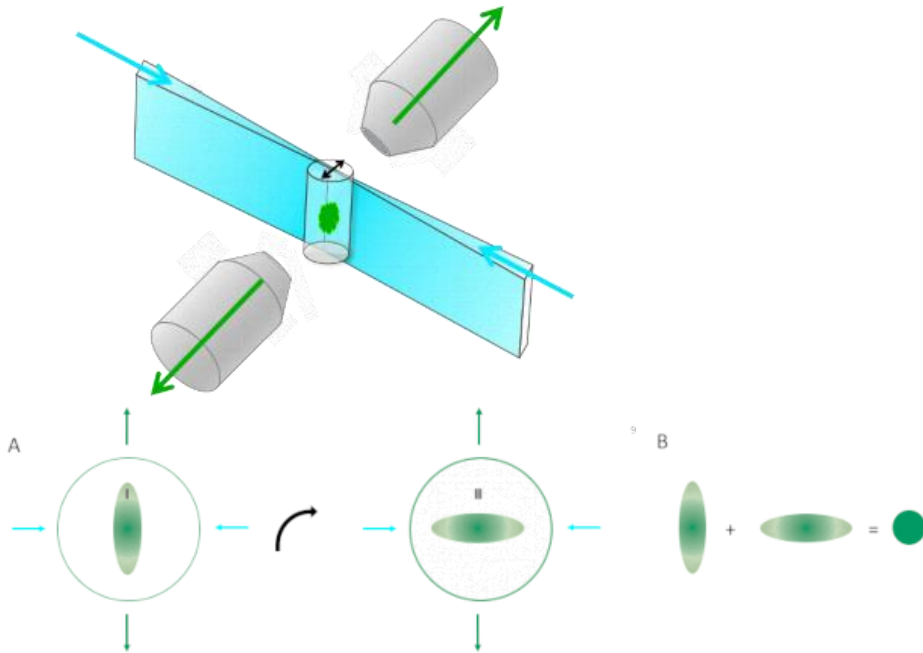
## T-SPIM



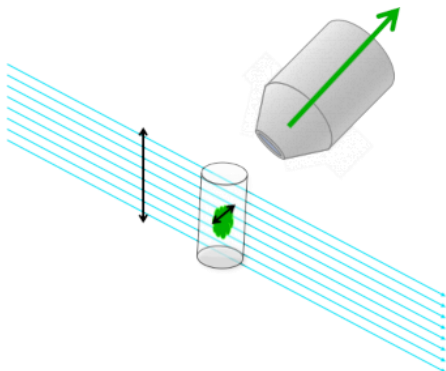
- Ο φωτισμός από δύο πλευρές ταυτόχρονα παρέχει ένα ομοιογενές φύλλο φωτός
- Τα επίπεδα του δείγματος που βρίσκονται μακριά από τον αντικειμενικό απεικονίζονται θολά λόγω σκέδασης
- Περιστροφή του δείγματος κατά  $180^\circ$  και συνδυασμός των εικόνων μέσω ειδικών αλγορίθμων

# Τυπικά είδη απεικονιστικών διατάξεων SPIM

## 4-lens SPIM



## Scanning beam SPIM

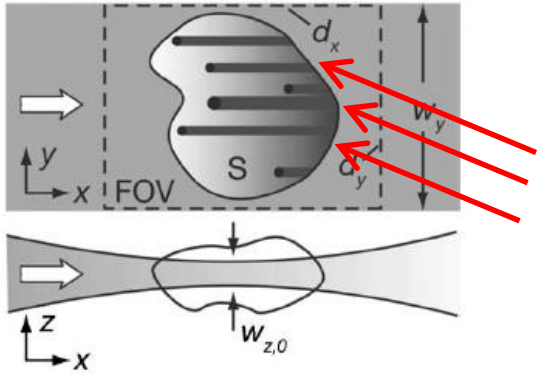


- Φωτισμός από δύο πλευρές και ανίχνευση από δύο πλευρές
- Περιστροφή του δείγματος κατά  $90^\circ$  ώστε να καταγραφεί δεύτερη σειρά εικόνων
- Συνδυασμός των εικόνων μέσω ειδικών αλγορίθμων
- Παροχή ομοιογενούς χωρικής ανάλυσης σε όλες τις διαστάσεις
- Βελτίωση αξονικής ανάλυσης κατά 3X

- Δε γίνεται χρήση κυλινδρικού φακού
- Ταχεία κατακόρυφη σάρωση δείγματος μέσω εστιασμένης δέσμης
- Δημιουργία εικονικού φύλλου φωτός
- Παροχή εικόνων υψηλής ποιότητας λόγω ακριβέστερου χειρισμού της CCD camera γραμμή προς γραμμή

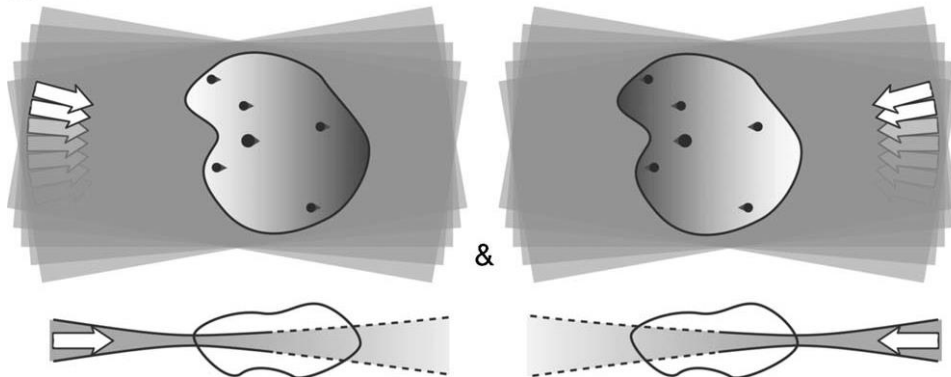
# Multidirectional SPIM (mSPIM)

Συμβατικό SPIM  
φωτισμού μίας πλευράς

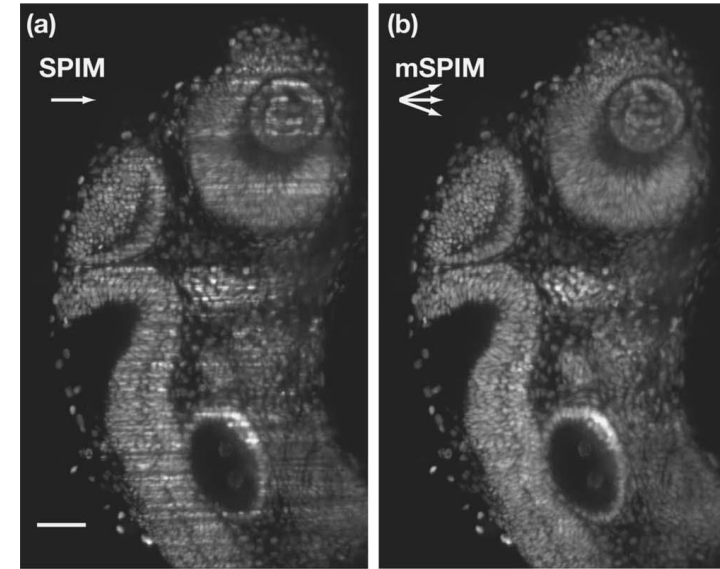


Σκιάσεις (ρίγες)  
λόγω υψηλής  
απορρόφησης

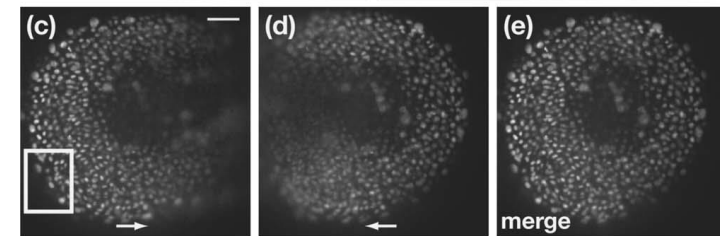
Προσέγγιση  
multidirectional SPIM



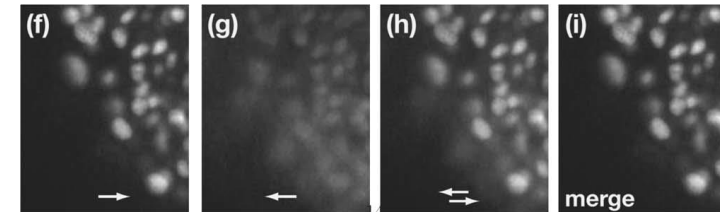
35h Zebrafish  
embryo



10h Zebrafish  
embryo



Zoom-in

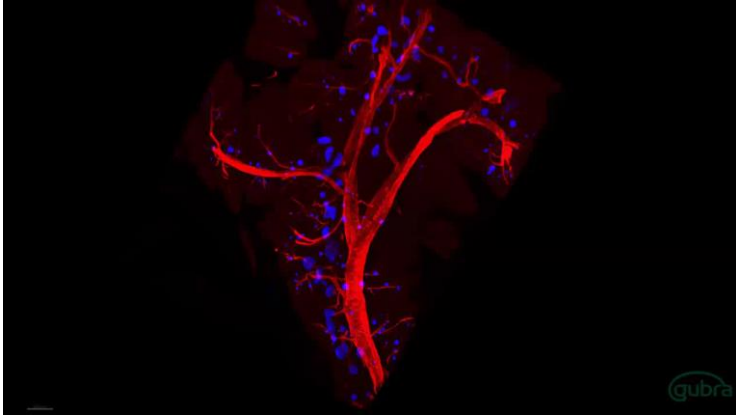


Huisken et al, Optics Letters, 2007

- Αλλαγή κλίσης του φύλλου φωτός μέσω χρήσης scanning mirror
- Διαδοχικός φωτισμός από δύο πλευρές
- Συνδυασμός εικόνων με αποτέλεσμα την εξάλειψη των σκιάσεων

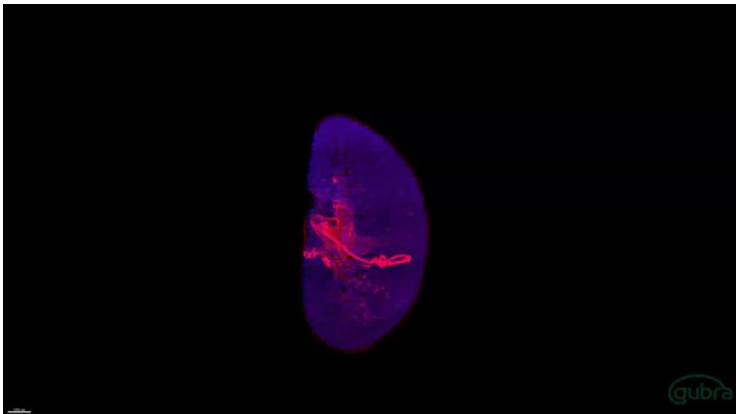
# Εφαρμογές μικροσκοπίας SPIM

A normal adult mouse pancreas stained for Insulin (blue), smooth muscle actin (red) and Tyrosine hydroxylase (green)



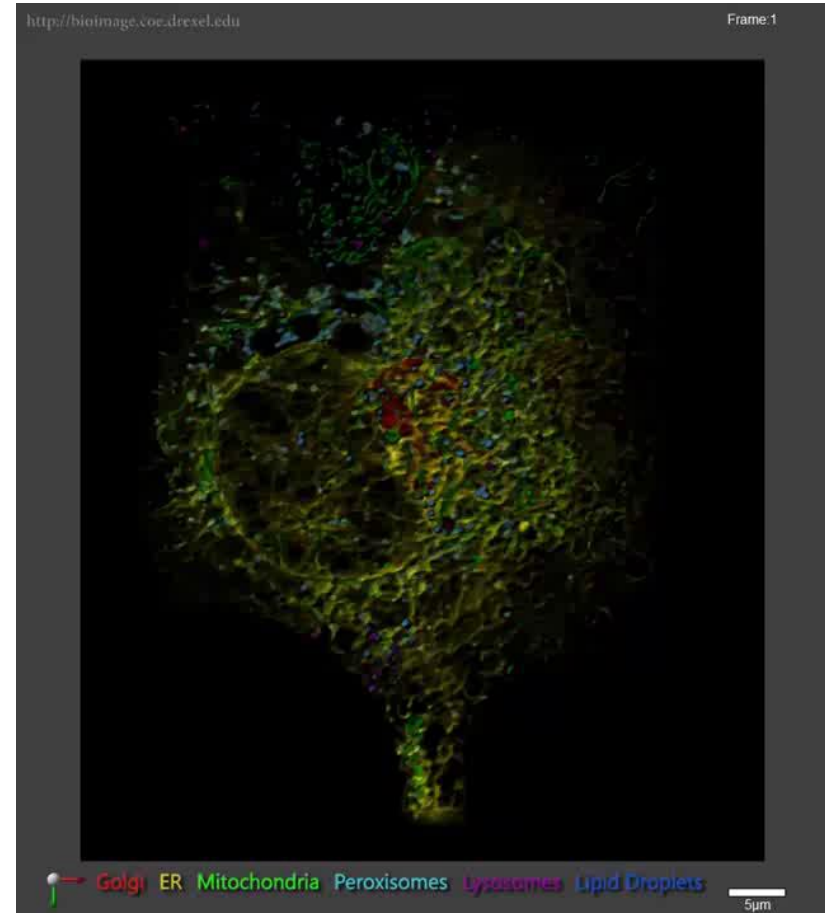
<https://www.youtube.com/watch?v=GHEixBKnmWc>

A normal adult mouse kidney stained for Podocin 1 (blue) and smooth muscle actin (red)



<https://www.youtube.com/watch?v=nToqLEUIdB8>

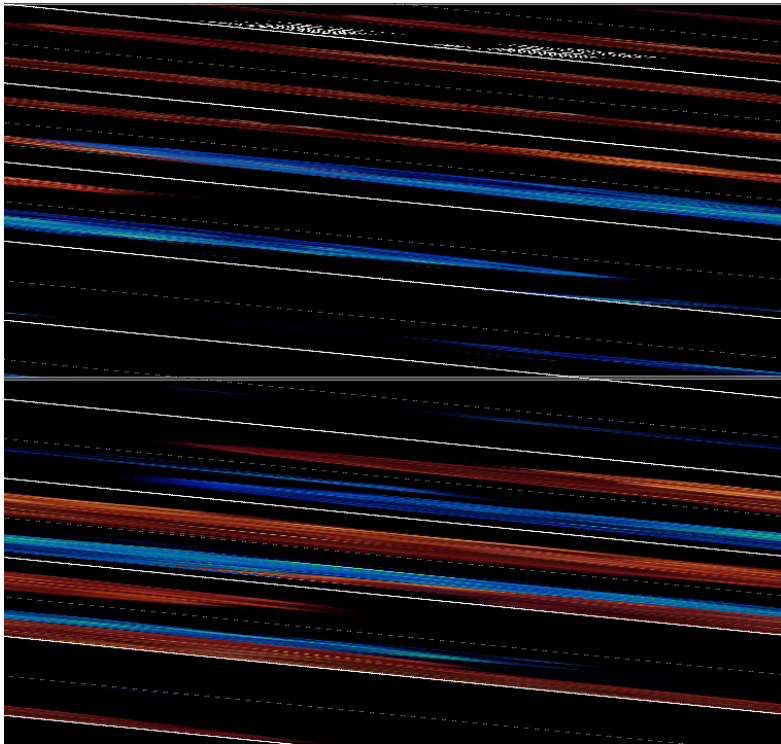
Dynamics and interactions of six organelles in live cells



<https://www.youtube.com/watch?v=iHyh3aVgYJ0>

# Εφαρμογές μικροσκοπίας SPIM

Interaction of a T-cell (orange) with  
a target cell (blue)



<https://www.youtube.com/watch?v=sKN8rRZhym0>

First days of a mouse embryo's life



<https://www.youtube.com/watch?v=iu3q-CfHveY>

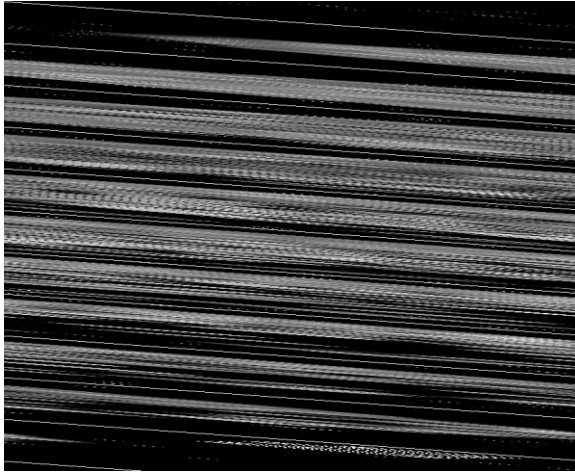
Tracking cell families in mouse embryo



<https://www.youtube.com/watch?v=2LY8hObVAZI>

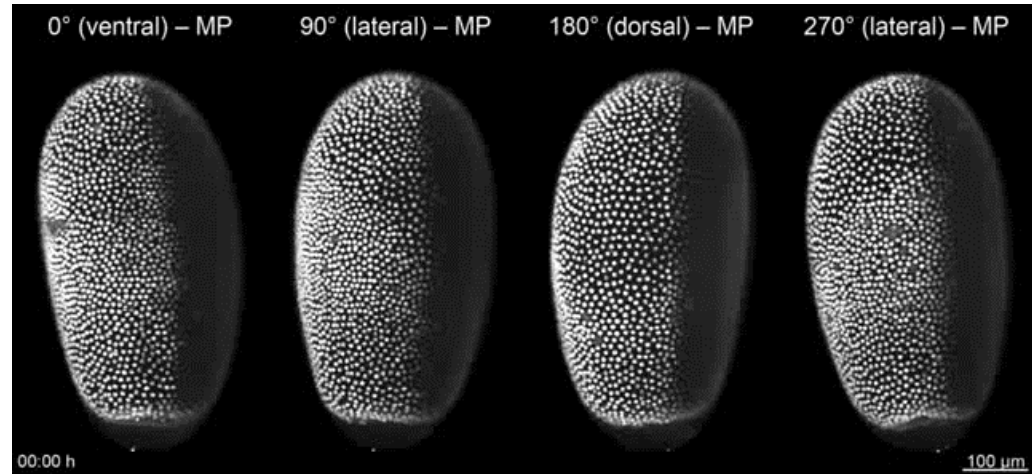
# Εφαρμογές μικροσκοπίας SPIM

## Morphogenesis of amphipod *Parhyale hawaiiensis*



[https://www.youtube.com/watch?v=86Gr5Mtn\\_nQ](https://www.youtube.com/watch?v=86Gr5Mtn_nQ)

## Embryogenesis of *Tribolium castaneum* beetle



<https://www.youtube.com/watch?v=cAMNQA75Pwg>



## Drosophila Embryo Development

### What is it?

Transgenic line expressing His2Av-mCherry as fluorescent nuclear reporter. The fruit fly embryo was imaged for two days (200 slices and two orthogonal views every 30 seconds).

### Courtesy of:

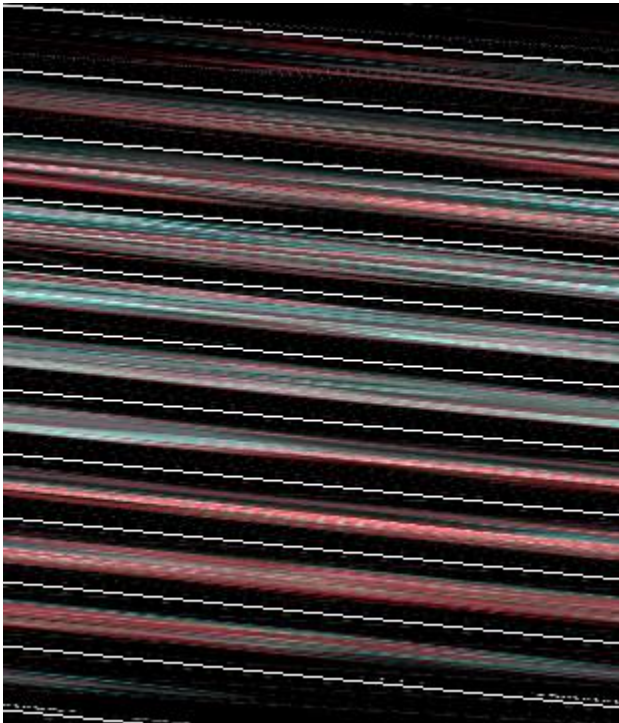
Dr. Lars Hufnagel  
European Molecular Biology Laboratory (EMBL)  
Heidelberg, Germany

<https://www.youtube.com/watch?v=Y97evSXgePM>



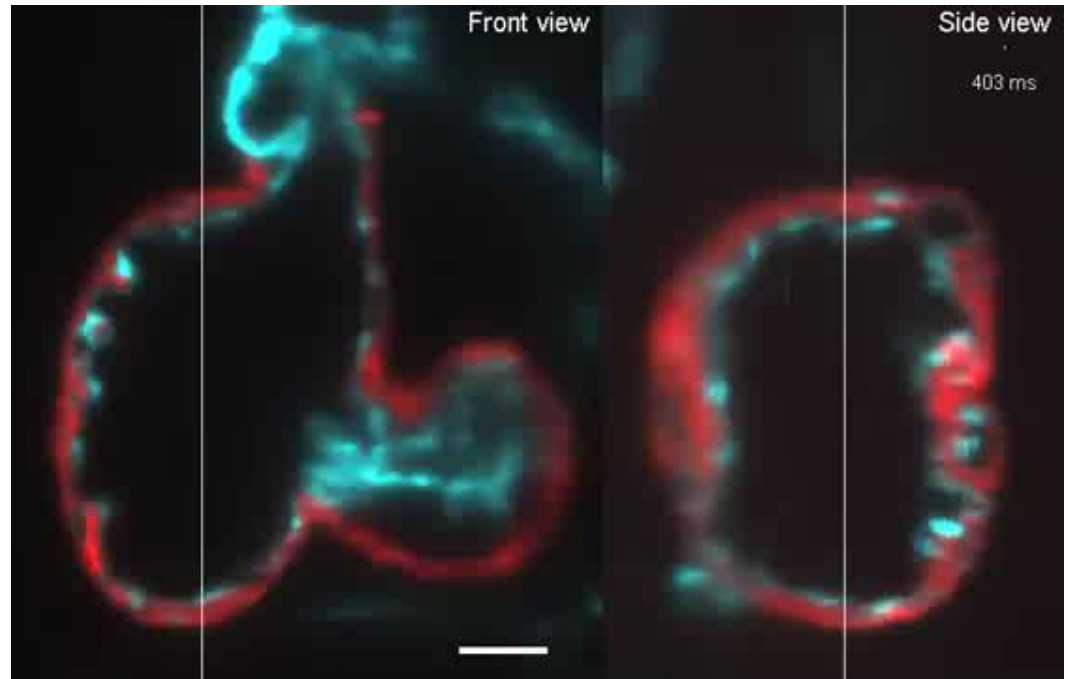
# Εφαρμογές μικροσκοπίας SPIM

3D reconstruction of a 3-day-old beating zebrafish heart and the surrounding vasculature



Endocardium is depicted in cyan, Myocardium and blood cells in red

Front and Side view reconstruction of endo and myocardium in a 5 day-old zebrafish

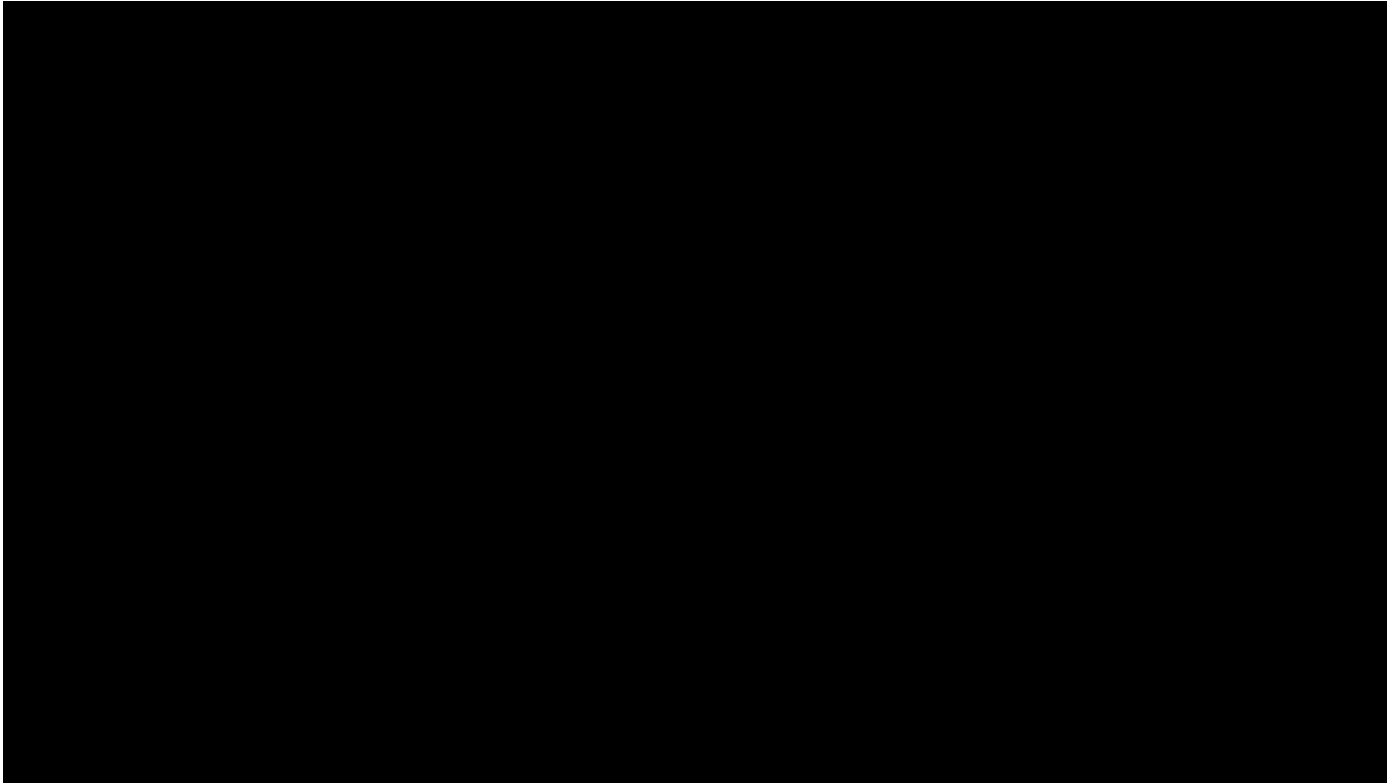


<https://www.youtube.com/watch?v=i8yvgqEeCRs>

<https://www.youtube.com/watch?v=18GA9IORImM>

# Εφαρμογές μικροσκοπίας SPIM

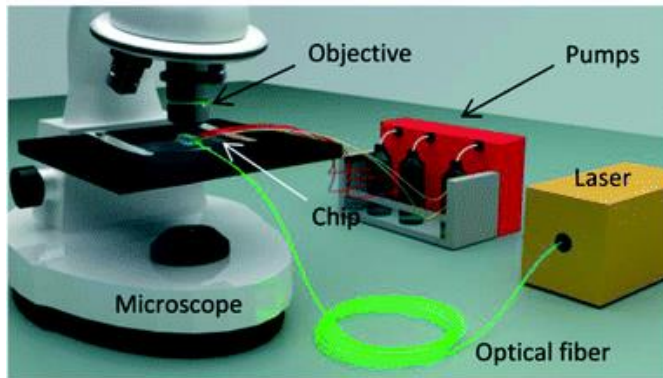
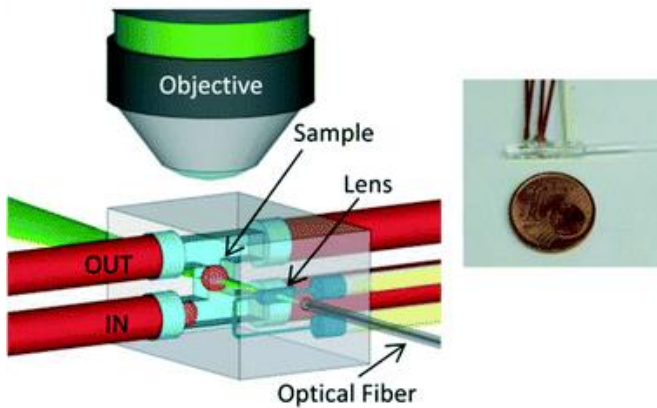
Imaging of optically cleared mouse brains / embryos



- Tyrosine Hydroxylase staining in an adult mouse brain
- ChAT-cre , Ai14 stained for Tomato, to reveal the cholinergic system in an intact adult mouse brain
- Hb9-GFP embryo stained for TrkA and GFP, to reveal motor and nociceptive fibers.

# Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;

## SPIM on a chip



Paie et al, Lab Chip, 2016

- Ποια είναι η βασική αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας SPIM;
- Ποια είναι τα πλεονεκτήματα του SPIM σε σύγκριση με το confocal / widefield;
- Πως μπορούμε να παράξουμε ένα φύλλο φωτός;
- Ποιες είναι οι βασικές παράμετροι των γκαουσιανών δεσμών και πως σχετίζονται μεταξύ τους;
- Πως συνδέεται το πεδίο θέασης με το πλάτος του φύλλου φωτός;
- Από τι εξαρτάται η πλευρική και αξονική ανάλυση στο SPIM;
- Ποια είναι τα κύρια προβλήματα που παρουσιάζονται στο SPIM με φωτισμό από μία μόνο πλευρά;
- Ποιες είναι οι πέντε κύριες προσεγγίσεις μικροσκοπίας SPIM;
- Ποιες είναι οι σπουδαιότερες εφαρμογές της μικροσκοπίας SPIM;