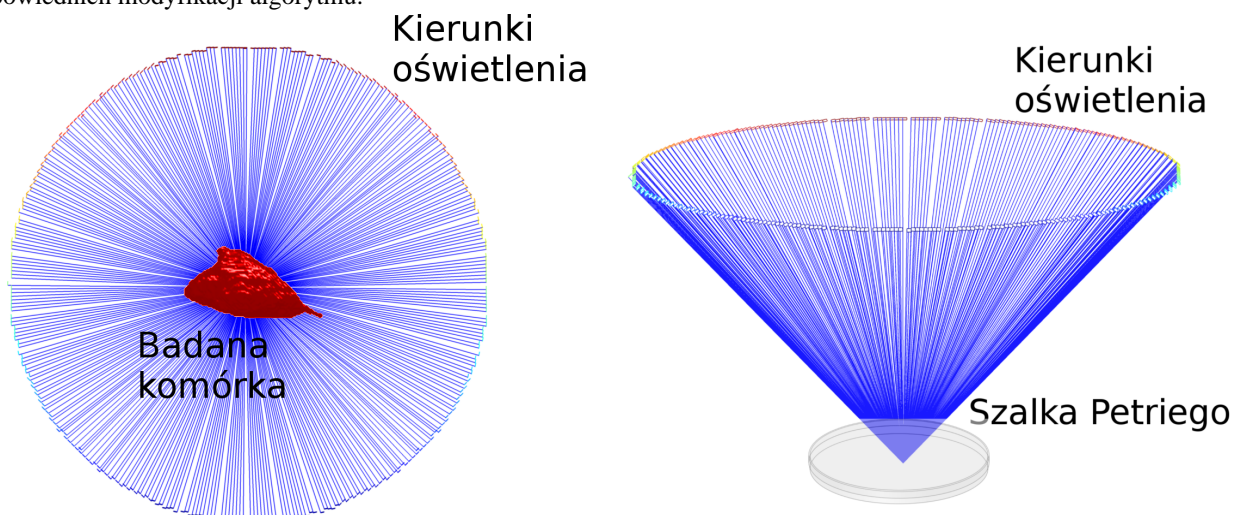


Analiza pojedynczych komórek biologicznych podlegających działaniu różnych warunków i substancji farmakologicznych od lat stanowi podstawę rozwoju farmacji i medycyny. Do tej pory, podstawową metodą wykorzystywaną do obserwacji komórek była klasyczna mikroskopia optyczna, w której badana próbka obserwowana jest wzrokowo przez obiektyw mikroskopowy. Metoda ta daje jedynie przybliżoną informację o tym, jak poszczególne struktury komórki pochłaniają światło – informację o absorpcji. Z czasem sama informacja o absorpcji stała się niewystarczająca. Powstała potrzeba wizualizowania grubości badanej struktury oraz rozkładu współczynnika załamania w jej wnętrzu. Współczynnik załamania mówi o tym, jak szybko światło porusza się w danym ośrodku. Ponieważ różne struktury komórki biologicznej cechują się różnymi wartościami współczynnika załamania (światło podróżuje w nich z różną prędkością), zobrazowanie tego współczynnika pozwoliłoby na analizę geometrii i budowy poszczególnych struktur, takich jak cytoplazma, jądro i błona komórkowa, wakuole itd. Dodatkowo, odstępstwa od prawidłowej wielkości współczynnika załamania dla odpowiednich struktur, mogą nieść informację m.in. o zmianach nowotworowych, infekcjach, procesach po prostu odpowiedzialnych za wywołanie zapalenia, czy wpływie substancji toksycznych na strukturę komórek. Jednym z pierwszych urządzeń, które dawało tak możliwości, był mikroskop optyczny z kontrastem Zernike. Użytkownik takiego mikroskopu dostawał dwuwymiarową, zintegrowaną informację o grubości próbki i średnim współczynniku załamania na drodze wiązki oświetlenia. Nie mógł więc dowiedzieć się, jaki jest współczynnik załamania danej struktury. Co więcej, informacja o współczynniku załamania była jakościowa (w przeciwieństwie do informacji ilościowej, informacji jakościowej nie da się wyrazić liczbowo – jedynie wzrokowo). Człowiekiem rozwiązaniem tego problemu okazała się mikroskopia holograficzna – technika, w której próbka oświetlana jest przez źródło laserowe. Wiązka światła po przejściu przez obiekt jest rejestrowana przez kamerę i zapisywana w pamięci komputera, po czym następuje proces komputerowej "rekonstrukcji" współczynnika załamania próbki na podstawie tak zarejestrowanego obrazu. Pomimo pozorowanej możliwości otrzymania informacji ilościowej o współczynniku załamania badanego obiektu, otrzymywane wyniki są bardzo trudne w interpretacji. Dodatkowo, informacja o współczynniku załamania i grubości obiektu dalej jest wymieszana. Aby oddzielić obie informacje od siebie, opracowano technikę tomografii optycznej. W technice tej obiekt dalej oświetlany jest przez źródło laserowe, analogicznie jak w mikroskopii holograficznej. Teraz jednak rejestruje się serię projekcji obiektu, przy czym obiekt jest obracany między kolejnymi projekcjami. Następnie stosuje się specjalne programy komputerowe realizujące zaawansowane algorytmy w celu uzyskania informacji o obiekcie. Proces odbywa się analogicznie do tomografii medycznej z tym różnicą, że w tomografii medycznej stosuje się promieniowanie rentgenowskie. W wyniku przeprowadzenia analizy metod tomografii optycznej otrzymuje się trójwymiarowy, ilościowy rozkład współczynnika załamania. Aby obliczona rekonstrukcja była poprawna, konieczne jest obrócenie obiektu o 360° podczas rejestrowania projekcji. Ponieważ bardzo trudne byłoby obracanie samych komórek, w praktyce umieszcza się je w szklanej rurce, którą dopiero się obraca. Kompikuje to jednak cały proces pomiarowy. Celem tego projektu jest:

- Opracowanie nowej metody, nazwanej DTVIC (Diffraction-based Total Variation Iterative Constraint), do pomiaru komórek biologicznych. Nowa metoda bazuje na dotychczasowych osiągnięciach z dziedziny tomografii optycznej. Pozwoli ona na zrekonstruowanie trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania komórek biologicznych umieszczonych bezpośrednio na szalce Petriego, na której są zwykle hodowane. Nie będzie potrzeby wprowadzania komórek do szklanych rurek, co znacznie przyspieszy cały proces pomiarowy. Dodatkowo zamiast obrotu obiektu, obracana będzie wiązka oświetlenia obiektu.
- Przeanalizowanie z których kierunków najlepiej jest oświetlać badany obiekt, aby zrekonstruowany rozkład współczynnika załamania był najlepszy jakościowo. Ponieważ komórki umieszczone bezpośrednio na szalce Petriego, nie będzie możliwe obracanie oświetlenia o 360°. Zamiast tego, konieczne będzie obracanie wiązki oświetlenia w ramach stożka, jak pokazano na rysunku 1. W ramach tego stożka możliwych jest kilka scenariuszy oświetlenia, jak np. oświetlenie komórki z kierunków leżących na tworzącej stożka lub równomiernie rozłożonych w całym stożku.
- Opracowanie algorytmu obliczającego tego trójwymiarowego rozkład współczynnika załamania z projekcji, które zarejestrowane zostaną z ograniczonego zakresu kątowego (ze stożka). Standardowe algorytmy potrzebują projekcji zebranych z 360°, w przeciwnym razie obliczone za ich pomocą rozkłady współczynnika załamania są mocno zniekształcone. Opracowanie nowego algorytmu pozwoli na skompensowanie tego zniekształcenia.
- Uwzględnienie różnic między promieniowaniem rentgenowskim a laserowym w nowo-opracowywanym algorytmie rekonstrukcji. Standardowe metody zakładają, że promienie w drodze do kamery przechodzą przez obiekt w liniach prostych. Założenie to jest prawdziwe dla promieniowania rentgenowskiego. W przypadku promieniowania laserowego, prowadzi ono do znacznych błędów w obliczonym rozkładzie współczynnika załamania. Aby temu zapobiec, konieczne jest zastosowanie odpowiednich modyfikacji algorytmu.

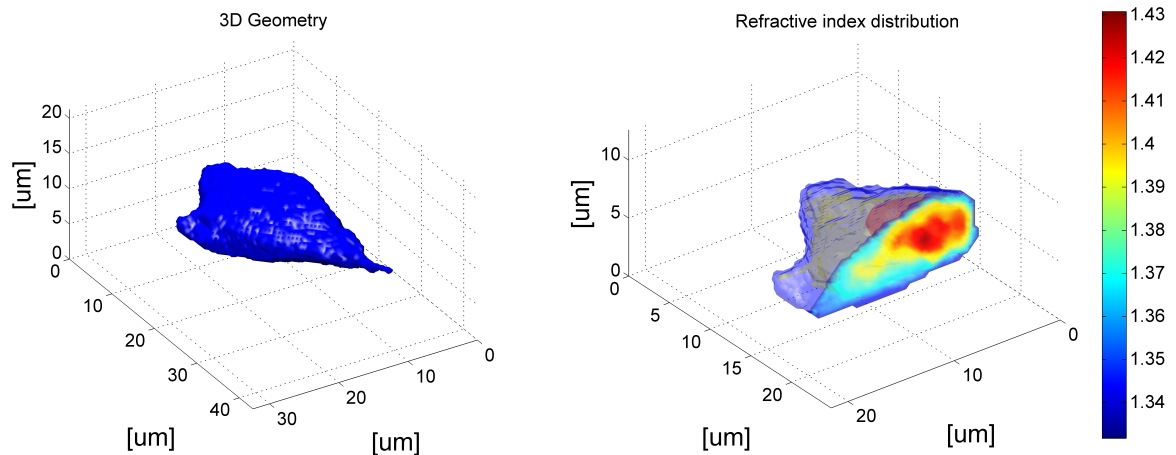


Rys.1. Wizualizacja kierunków oświetlenia komórki. Niebieskie linie reprezentują kierunki oświetlenia: po lewej w przypadku

klasycznej tomografii, gdzie komórka jest oświetlona z  $360^\circ$ , a kierunki oświetlenia ułożone są na jednej płaszczyźnie, natomiast w tomografii z ograniczonym kątem projekcji, gdzie komórka umieszczona jest na szalce Petriego a kierunki oświetlenia dostępu są jedynie w zakresie stożka.

W ramach projektu realizowane będą badania podstawowe dotyczące dokładnego poznania i zrozumienia procesu formowania obrazu w tomografii w sytuacji, gdy źródłem jest laser (co w konsekwencji oznacza odejście od założenia prostoliniowego biegu promieni przez obiekt) oraz gdy projekcje badanej struktury, w szczególności komórki biologicznej, zarejestrowane zostały jedynie w ograniczonym zakresie kątowym.

Postanowiłem podjąć daną tematykę badawczą, ponieważ połączenie tomografii ze źródłem laserowym z tomografią, w której projekcje dostępu są w ograniczonym kącie, przy kompletnej analizie wpływu rozkładu kierunków oświetlenia będzie kamieniem milowym w optycznej metrologii mikrostruktur biologicznych. Pozwoli to na szybsze, łatwiejsze i bardziej precyzyjne badanie komórek biologicznych, które hodowane są na szalkach Petriego. Moje dotychczasowe badania wykazały, że osiągnięcie powyżej opisanych celów jest możliwe. Opracowałem technikę TVIC, na której będzie się bazował podczas realizacji projektu. Technika ta nie uwzględnia jeszcze faktu, że promienie światła nie biegną w liniach prostych przez obiekt, ale częściowo kompensuje jej ograniczony kąt z którego rejestrowane są projekcje próbki. Wstępne testy tej metody na komórkach C2C12 (komórka mięśnia myszy) oraz HeLa (komórka raka szyjki macicy) pokazują, że możliwe jest osiągnięcie trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania o wysokiej jakości. Przykładowa rekonstrukcja pokazana jest na rysunku 2.



Rys. 2.

Rekonstrukcja komórki C2C12 metodą TVIC. Po lewej rekonstrukcja trójwymiarowej geometrii, po prawej rekonstrukcja trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania dla przykładowego przekroju przez komórkę.