

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри нанофізики конденсованих середовищ

проф. Валерій Антонович Скришевський

Протокол №____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023

**ШВИДКЕ СКАНУВАННЯ ПЛОЩИНОЮ В ІНТЕГРАЛЬНІЙ
РАМАНОВСЬКІЙ СПЕКТРОСКОПІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності

105 Прикладна фізика та наноматеріали

ОП «Високі технології (Прикладна фізика та наноматеріали)

Куріленко Марії Сергіївни

Науковий керівник

Професор кафедри нанофізики

конденсованих середовищ

д.ф.-м.н **Валерій Антонович Скришевський**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р

Анотація

Випускна кваліфікаційна робота викладена на 36 сторінках та ілюстрована 15 рисунками. Список використаних джерел включає 26 робіт.

У роботі описано методи інтегрально польової мікроскопії, сканування площинним фокусом та комбінаційного розсіювання світла та порівняно з Раманівською конфокальною спектроскопією. Надано протоколи підготовки зразків та схеми будови експериментальної установки. Описано програму аналізу даних. Побудовано зображення полімерних сфер та моноцитарних клітин лейкемії людини в Раманівському розсіянні та надано розшифровку наявних спектральних ліній.

Ключові слова: РАМАНІВСЬКА СПЕКТРОСКОПІЯ, ІНТЕГРАЛЬНО ПОЛЬОВА МІКРОСКОПІЯ, ПЛОЩИННИЙ ФОКУС, ПОЛІМЕРНІ СФЕРИ, СПЕКТРАЛЬНІ ЛІНІЇ.

Зміст

Вступ.....	5
1. Огляд літератури.....	6
1.1 Коливальна спектроскопія.....	6
1.2 Комбінаційне розсіяння світла.....	7
1.3 Інтерпретація спектрів.....	11
1.4 Інтегральна спектроскопія.....	13
1.5 Площинний фокус.....	14
1.6 Конфокальна спектроскопія.....	16
2. Матеріали і методи.....	18
2.1 Постановка задачі.....	18
2.2 Підготовка зразка.....	18
2.3 Параметри установки.....	20
2.4 Отримання зображень.....	22
2.5 Обробка зображень.....	23
3. Результати.....	27
4. Висновки.....	31
5. Бібліографія.....	33

Перелік умовних позначень

IFS – інтегрально польова спектроскопія (integral field spectroscopy)

LS – світлова площина (light sheet)

PS - полістерен

PMMA – Поліметилметакрилат (Органічне скло)

NFFT – нелінійне перетворення Фур'є

DFT – дискретне перетворення Фур'є

FFT – швидке перетворення Фур'є

PBS - Фосфатний буферний розчин

THP - лінія моноцитарних клітин лейкемії людини

EM – електро магнітний(а)

TAG - тригліцериди

PLP – фосфоліпіди

SNR – співвідношення сигнал-шум

CCD - Прилад із зарядовим зв'язком

1. Вступ

Раманівська мікроскопія широко використовується в біомедичних дослідженнях вже протягом останніх десятиліть. Основним комерційним методом Раманівської спектроскопії на даний момент є конфокальна мікроскопія. Але незважаючи на те, що цей метод забезпечує хороше оптичне розділення та хімічний контраст, швидкість отримання та якість зображень обмежені низькою часткою комбінаційно розсіяного світла, що також спричиняє низьке співвідношення сигнал/шум (SNR). Крім того, конфокальна мікроскопія створює нефокусне освітлення, що призводить до проблем фототоксичності в біологічних зразках.

Ця робота представляє новий підхід, який поєднує освітлення зразків площиною та використання методу інтегральної польової спектроскопії щоб позбавитись недоліків конфокальної спектроскопії та досягти більшої швидкості детекції. Використання площинного фокусу забезпечує більш ефективно збудження зразка. Такий спосіб освітлення не тільки дозволяє уникнути розфокусованого світла, але й усуває потребу в скануванні вздовж осей x та y , збільшуючи швидкість отримання інформації. Метод інтегрально польової спектроскопії, спочатку розроблений для вивчення астрономічних об'єктів, знаходить зараз своє використання і в інших галузях досліджень. Імплементований на основі матриці мікролінз, цей метод забезпечує розпаралелювання процесу детектування, щоб уникнути частотного сканування і прискорити отримання зображення завдяки можливості одночасного запису просторових координат x та y , та спектральних даних.

Перший розділ даної роботи розглядає методи LS та IFS, їх реалізацію у Раманівській спектроскопії та огляд вже отриманих досягнень за допомогою цих методів. У наступних розділах описується експериментальна система та її основні параметри, підготовка зразків та розробка програми аналізу отриманих зображень.

2. Огляд літератури

Цей розділ містить основні поняття необхідні для розуміння теоретичних основ методів використаних в даній роботі – LS, IFS та Раманівської спектроскопії, та описує набір інструментів, які в подальшому використовувались для практичної реалізації проекту.

2.1 Коливальна спектроскопія

При відмінних від нуля абсолютних температурах атоми молекул не знаходяться в положенні рівноваги. Відбуваються деформаційні (супроводжуються зміною кутів) та валентні (змінюються переважно довжини зв'язків) коливання атомів, а також обертальні коливання всієї молекули.

На Рис. 1 показано чотири основних типи деформаційних коливань (а - г) та два основні типи валентних коливань (д, е) на прикладі трьохатомного фрагмента молекули.

n-атомна молекула має $3n$ ступенів свободи – по 3 на кожен атом, що відповідає зміщенню атомів по трьом напрямкам у просторі (осям x, y, z). Однак не всі ступені свободи молекули відповідають коливанням. Три з них відповідають трансляційному рухові, ще 3 (для лінійних молекул 2) – обертанню молекули. Отже, коливанням відповідають $3n-6$ (для лінійних молекул $3n-5$) ступенів свободи молекули, а отже і така сама кількість нормальних коливань. Нормальними називаються коливання де відбувається незалежне зміщення атомів в молекулі, при якому положення центру маси не змінюється.

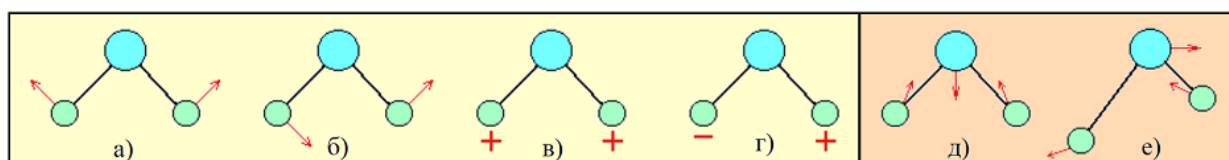


Рисунок 1 . На жовтому тлі показано деформаційні коливання метильної групи: а) ножицеві (scissoring) б) вієрні (wagging) в) крутильні (twisting) г) валентні (stretching)

маятникові (rocking). На помаранчевому тлі показано валентні коливання метильної групи δ) симетричні ε) асиметричні

Однак, кожне коливання як правило не є чисто валентним або деформаційним (за винятком коливань лінійних і плоских циклічних молекул) бо на коливання впливають також сусідні зв'язки та прилеглі кути.

Тому у випадку багатоатомних молекул коливання є досить складними: крім спектральних смуг, що відповідають нормальним коливанням, в спектрах спостерігаються смуги, частоти яких є сумою (складові частоти) чи різницею (різницею частоти) частот основних коливань чи їх обертонів [1]. Обертони з'являються внаслідок "порушення" квантового правила відбору, коли квантове число змінюється більш, ніж на одиницю. Але інтенсивність даних спектральних ліній на порядок менша ніж у нормальних коливань. Складові частоти виникають внаслідок абсорбції фотона одночасно на двох чи більше коливальних рівнях (збудження двох чи більше осциляторів одночасно). Різницею ж частоти виникають при поглинанні енергії одним осцилятором і одночасній емісії іншим. Енергія (і частота) поглинутого фотона дорівнює різниці енергій обох переходів. Також на спектрах проявляються сукупні коливання різних фрагментів молекули (наприклад групи CH_3 або бензольного кільця). Положення піків комбінаційного розсіювання може дещо зміщуватись в залежності від оточення окремо взятого хімічного зв'язка. Дослідженням переходів між коливальними станами молекул займається спектроскопія поглинання інфрачервоного (ІЧ) випромінювання та спектроскопія Раманівського розсіювання.

2.2 Комбінаційне розсіювання світла

Коли електромагнітна хвиля взаємодіє з дискретною частинкою, електронні орбіти у атомах, що входять до складу частинки, періодично збурюються з тією ж самою частотою, що й електричне поле падаючої хвилі. Електричне поле можемо записується як:

$$\bar{E} = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1)$$

де ν_0 – частота (у Герцах) падаючої ЕМ хвилі

Коливання (або збурення) електронної хмари призводить до періодичного поділу заряду всередині молекули, що називається індукованим дипольним моментом. При незначній інтенсивності збуджуючого світла, можна вважати, що індукований дипольний момент p пропорційний до електричної компоненти поля E :

$$\tilde{p} = \alpha(\omega_L, \omega_k) \tilde{E} \quad (2)$$

де α - поляризованість молекули, ω_L - частота падаючого, ω_k - розсіяного світла

Оскільки здатність збурювати локальну електронну хмару молекули залежить від відносного розташування окремих атомів, кутів та довжин зв'язків між ними, то поляризованість є функцією миттєвого положення атомів. [2] Для будь-якого хімічного зв'язку окремі атоми обмежені певними режимами коливань, у яких рівні енергії коливань квантуються подібно до електронних енергій, або квантів світла. Енергію коливань певного режиму можна записати у вигляді:

$$E_{vib} = \left(j + \frac{1}{2}\right) h\nu_{vib} \quad (3)$$

Де j – коливальне (обертальне) квантове число, ν_{vib} – частота коливальної моди, h – константа Планка

Фізичне зміщення dQ атомів щодо їхнього положення рівноваги внаслідок коливань можна записати як:

$$dQ = Q_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (4)$$

де Q_0 – максимальне зміщення відносно положення рівноваги. Для типової двоатомної молекули (наприклад, N_2) максимальне зміщення

становить приблизно 10% довжини зв'язку. Для таких малих зміщень поляризованість може бути апроксимована розкладанням у ряд Тейлора:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} dQ = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} Q_0 \cos(2\pi \nu_{vib} t) \quad (5)$$

Підставляючи (5) в (1) та використовуючи формулу множення косинусів отримаємо вираз для дипольного моменту:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \frac{Q_0 E_0}{2} \right) \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t] \} \quad (6)$$

Коливальний індукований дипольний момент проявляється як джерело ЕМ-випромінювання, що призводить до розсіяного світла. З формули (6) бачимо, що індуковані дипольні моменти створюються на трьох різних частотах - ν_0 , $(\nu_0 - \nu_{vib})$ і $(\nu_0 + \nu_{vib})$, що призводить до розсіяного випромінювання на цих трьох частотах. Перша частота відповідає частоті падаючої ЕМ хвилі, отже, відповідає пружному розсіюванню (Мі чи Релея), якого зазвичай більшість, тоді як дві останні частоти зміщені до нижчих або вищих частот і відповідають за непружне розсіяння [3]. Більша частота створюється при додаванні до розсіяного фотона надлишкової енергії, що може статися коли частинка на якій розсіюється фотон вже знаходиться в ненульовому коливальному енергетичному рівні. Такі спектральні лінії носять назву Антистоксовий зсув. Менша ж частота досягається завдяки частковому поглинанню енергії падаючого фотона, тож в результаті частинка буде мати вищий коливальний рівень ніж до взаємодії з фотоном. Такі зміщення називаються Стоксовими. Різниця частот збудженого і розсіяного світла відповідає коливальним частотам даної молекули. (Рис. 2)

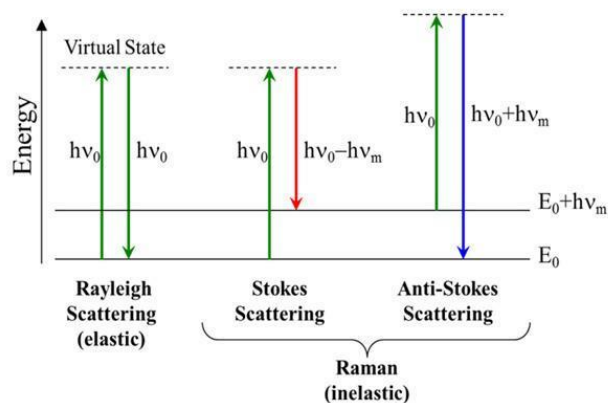


Рисунок 2 Переходи між енергетичними рівнями що відповідають раманівському та релеївському розсієнню.

Однак необхідно зауважити, що правилом відбору для комбінаційного розсієння є те, що член $\frac{\partial \alpha}{\partial Q}$ має бути відмінним від нуля, тоді дані коливальні моди будуть активні і можуть бути знайдені на спектрі. Ця умова може бути фізично інтерпретована наступним чином: зміщення атомів під час коливання, що відповідає певній моді, призводить до зміни поляризованості. У порівнянні з інфрачервоною спектроскопією, де правилом відбору є наявність ненульового дипольного моменту, комбінаційне розсієння світла має ширші можливості для отримання коливальних спектральних ліній.

Кількість молекул що знаходяться в тому чи іншому коливальному енергетичному рівні у термічному стані рівноваги описується законом Больцмана (нормальний розподіл), тому при різних температурах будемо мати різні розподілення за коливальними рівнями. Відносні інтенсивності ліній поглинання (для ІЧ спектроскопії) та розсієння (для Раманівської спектроскопії) прямо пропорційні відносним населеностям початкових коливальних рівнів.

КРС широко використовується зараз в нанотехнологіях (для дослідження типів наноструктур), геології, мінералогії, косметології та фармацевтиці [4]. Але основною галуззю використання є робота з біологічними зразками. Вона

є ідеальним методом досліджень біологічних зразків *in vivo* завдяки наступним перевагам:

- Неруйнівний метод;
- Не вимагає серйозної підготовки зразків
- Безконтактний та може працювати віддалено;
- Має можливість роботи з водними розчинами (немає накладення сигналу води на відміну від ІЧ спектроскопії);
- Можливість одночасного отримання спектрів КРС і фотолюмінесценції, тощо.

Хоча слід зазначити також такі недоліки КРС як:

- інтенсивність спектральних ліній Раманівського розсіяння набагато менша за інтенсивність джерела, тож для використання даного методу необхідне потужне джерело випромінювання, а також приймач з високою чутливістю. З іншого боку так як Раманівське розсіяння відбувається з дуже малою ймовірністю, можемо сказати що проблеми з багатоетапним розсіюванням (як при зображеннях в Релеївському розсіянні) немає.
- застосування лазера в якості джерела збуджуючого випромінювання може призвести до нагрівання і руйнування зразка.
- деякі сполуки можуть флуоресціювати під впливом лазерного випромінювання, перекриваючи спектральні лінії КРС.
- певні труднощі можуть виникнути при визначенні обертальних і обертально-коливальних спектрів з високою роздільною здатністю.

2.3 Інтерпретація спектрів

По осі y зазвичай відкладається кількість подій, які спектрометр виявляє для конкретного комбінаційного зсуву за секунду. По осі x – різниця частот падаючого і розсіяного світла. Оскільки довжина хвилі є зручнішою в обчисленні величиною ніж частота, більш розповсюдженим є описання комбінаційного зсуву за його оберненою довжиною хвилі (хвильовим числом).

Загальноприйнятою одиницею вимірювань є cm^{-1} (обернені сантиметри). Зазвичай нижня межа на спектрі становить 200 cm^{-1} , і пов'язана з експериментальними складнощами, хоча є експериментальні методики, які передбачають спектроскопічні вимірювання низькочастотних коливань [5].

Сам спектр Раманівського розсіяння можна поділити на три основні частини: область «відбитків пальців» ($600\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$), яка містить основні коливальні стани хімічної сполуки, в тому числі тих що містяться в біологічних зразках - нуклеїнових кислот, білків та ліпідів. Цей регіон містить унікальні відбитки для кожної молекули і найбільшу кількість інформації про її будову, а отже є найбільш важливим і досліджуваним в Раманівській спектроскопії. «Тиха» область ($1800\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$) відокремлює область «відбитків пальців» від області високих хвильових чисел, і зазвичай не має коливальних спектральних ліній, створених біомолекулами, утвореними природними ізотопами, але може включати смуги, створені стабільними ізотопами або потрійними зв'язками. Область високих хвильових чисел ($2800\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$) складається з двох основних піків: пік з центром при $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ виникає для мод розтягування груп CH , CH_2 і CH_3 і, отже, містить інформацію про наявність цих зв'язків, які є основою органічних хімічних сполук, другий основний пік при $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ виникає внаслідок режиму розтягування зв'язку OH і, таким чином, надає інформацію про вміст води в досліджуваному зразку [6].

Інтенсивність Раманівського сигналу відповідає кількості хімічних зв'язків що знаходяться в конкретному коливальному енергетичному рівні. Що в свою чергу описується нормальним розподілом, а отже залежить від температури. Положення ж спектральних ліній відносно один одного є незмінним і не залежить від частоти (довжини хвилі) падаючого випромінювання - чи збуджує молекулу зелена чи червона лазерна лінія, отримаємо однакову кількість піків та їх положення з комбінаційними зсувами, характерними для розсіювання світла на цій молекулі.

2.4 Інтегральна спектроскопія

Це техніка гіперспектрального зображення, яка базується на просторовій дискретизації зображення для паралельного запису кожного спектру підзображення [7].

Вхідне зображення, розміщене у фокальній площині збільшується за допомогою телескопа. Це дозволяє матриці мікролінз розділити збільшене зображення просторово отримуючи суб-зображення. Матриця мікролінз знаходиться близько до площини зображення телескопа щоб сфокусувати вхідні колімовані промені на його фокальній площині. Ця площина містить матрицю фокусів і є вхідною площиною спектрометра, що починається з оптичної системи, яка колімує всі промені, що виходять з кожного фокуса мікролінз паралельно. Колімовані пучки проходять крізь диспергуючий елемент (призма або ґратка). Нарешті, об'єктив дозволяє відобразити дисперговані колімовані пучки на двовимірному зображенні на детекторі. Ці кроки показано на Рис 3.

Розроблений спочатку для вивчення астрономічних об'єктів, цей метод зараз також використовується в багатьох інших галузях, таких як біомедична наука та дистанційне зондування Землі. Завдяки можливості кодування всієї спектральної та просторової інформації в одній експозиції не залежить від флуктуацій навколишнього середовища, дозволяє знімати декілька об'єктів одночасно [8] і є доволі швидким методом, але також містить у собі такі недоліки як менше поле зору (в порівнянні з класичними методами як FPI (Fabry–Perot Interferometry) та необхідність фокусованого вхідного зображення. Останнє може бути досягнуто з використанням площинного фокусу.

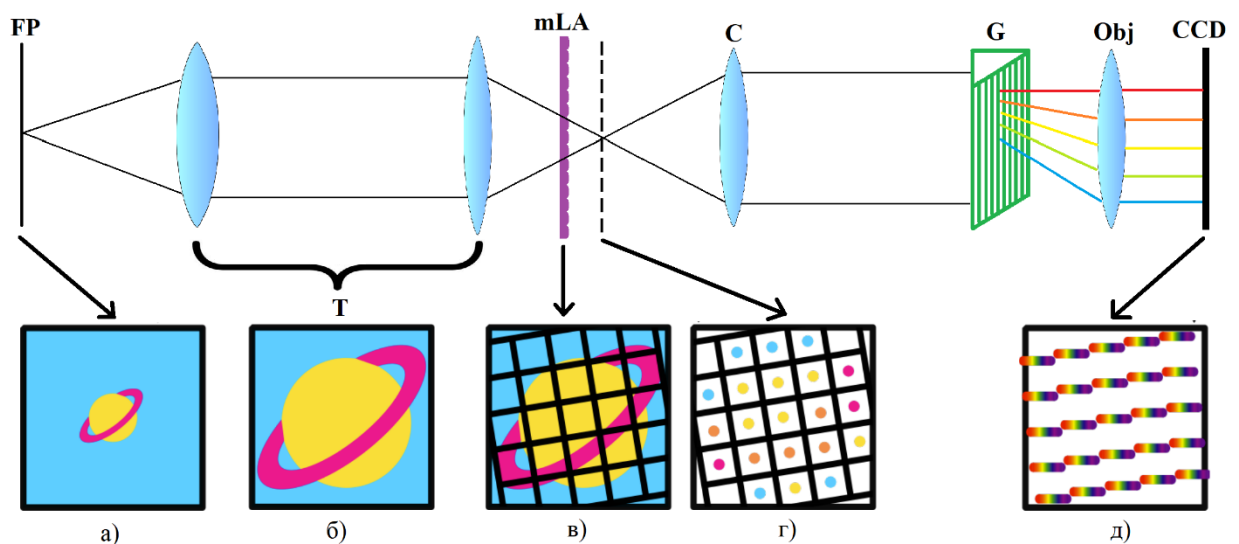


Рисунок 3 Спрощена схема інтегрального спектрографа (адаптація ...) FP – фокальна площина, T – телескоп, mLA – система мікролінз, C – коліматор, G – диспергуючий елемент, Obj – об’єктив, CCD – детектуючий прилад а) вихідне зображення, б) збільшене зображення, в) зображення розбите системою мікролінз на суб-зображення, г) сфокусовані субзображення у фокальній площині системи мікролінз д) зображення на детекторі

2.5 Площинний фокус

Цей метод також відомий як мікроскопія з селективним освітленням площини (SPIM) [9] і широко застосовується для освітлення зразків в флуорисцентній мікроскопії. Може отримувати зображення зі швидкістю, яка в 100-1000 разів перевищує швидкість, яку пропонують точкові методи сканування. Даний метод використовує два ортогонально розташованих об’єктиви для освітлення та детектування відповідно. Освітлювальний об’єктив збуджує зразок збоку еліптичним гаусівським променем, фокус якого витягнутий вздовж фокальної площини об’єктиву детектування (Рис. 4) [10]

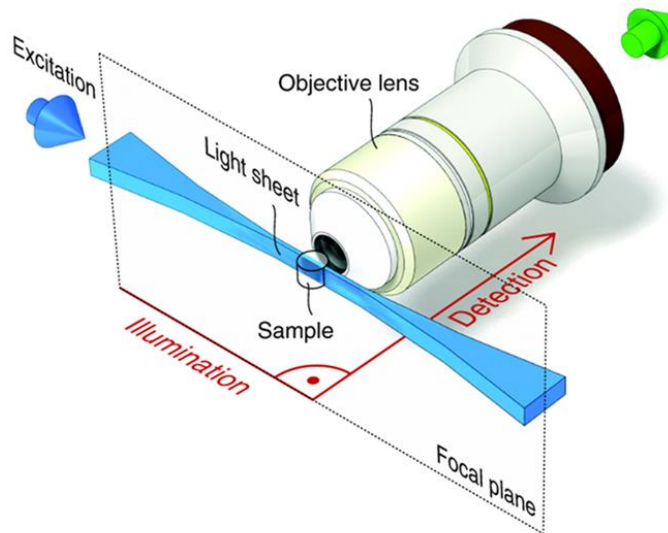


Рисунок 4 Схематичне зображення шляхів освітлення та детектування, а також геометричної форми площинного фокусу

На відміну від конфокальної мікроскопії, розподіл світла, який забезпечує мікроскопія LS, зменшує розфокусоване світло в зразку, нагрівання та фотознебарвлення. Цей метод також пропонує оптичне розділення, що дає змогу створювати зображення різних об'ємних зрізів зразків в Раманівському випромінюванні. І останнє, але не менш важливе: завдяки відсутності бокового сканування можна досягти високошвидкісного отримання зображень, але за рахунок нижчого SNR.

Одним з можливих недоліків даного методу, як і у випадку з більшістю методів що використовують площинний фокус, є вимога, щоб зразок був достатньо прозорим для збільшення глибини проникнення світла.

Відчутним покращенням даного методу є збільшення частки випромінюваного електричним диполем (молекулою) світла завдяки введенню поляризації падаючого променя. Як відомо, електричний диполь не випромінює у напрямку перпендикулярному дипольному моменту (Рис 5). Молекули, як диполі розташовані в просторі довільним чином, ізотропно, якщо не враховувати специфічні матеріали. Коли зразок освітлюється поляризованим світлом, ті молекули з дипольними моментами,

розташованими паралельно електричному вектору поляризованого збудження, мають найвищу ймовірність збудження. Це явище називається фотовідбором і має застосування у флуоресцентній мікроскопії. [11] Таким чином вибираючи молекули які мають найбільшу ймовірність випромінювання вздовж шляху детектування (перпендикулярно світловій площині) можна збільшити інтенсивність отриманого світлового потоку, а отже і покращити якість зображення. Щоб оптимізувати стан поляризації можна використати поворот на 90 градусів за допомогою ахроматичної напівхвильової пластини.

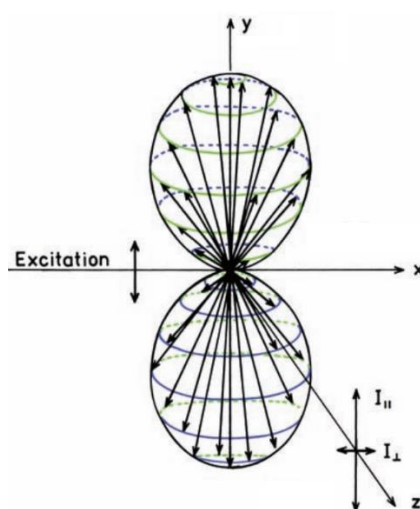


Рисунок 5 індукований за допомогою поляризованого світла диполь не випромінює у напрямку перпендикулярному дипольному моменту, а отже і напрямку перпендикулярному поляризації збуджуючої хвилі

2.6 Конфокальна спектроскопія

На даний момент конфокальна мікроскопія є основним комерційним методом що застосовується разом з Раманівською спектроскопією. Завдяки зменшенню кількості розфокусованого світла, метод має кращу роздільну здатність, співвідношення сигнал-шум та ступінь нагрівання зразка, що є основною причиною використовувати його у дослідженні біологічних об'єктів.

Основний принцип конфокальної мікроскопії полягає в тому, що оптика освітлення та детектування фокусується на одній і тій самій дифракційно обмеженій плямі, яка переміщується над зразком для створення повного зображення на детекторі. Позбавлення розфокусованого світла досягається використанням точкової апертури на спряженій фокальній площині елементів освітлення та детектування, що робить їх «конфокальними». [12]

Але так як конфокальна спектроскопія використовує лише сканування точкою, вона доволі повільна. Довге освітлення може негативно вплинути на біологічний зразок і, навіть зруйнувати його. Також конфокальне зображення дуже залежить навіть від невеликих зсувів зразка і підходить лише для добре зафіксованих клітин та речовин.

В інших дослідженнях на дану тематику було показано, що методи моментальних знімків (такі як спектроскопія інтегрального поля) мають максимальне значення SNR порівняно з методами фільтрації, дисперсії та інтерферометричними методами, при однаковій кількості записаних спектрів. [13] Тобто теоретично поєднання IFS з методом LS дає відносно високий SNR порівняно з конфокальною мікроскопією [14]

3. Матеріали і методи

В даному розділі описується дизайн та процес роботи експериментальної установки, протоколи приготування зразків, отримання зображень та порядок обробки даних.

3.1 Постановка задачі

Метою даного проекту є використання Раманівського спектроскопа з імплементованими методами інтегральної спектроскопії та сканування площиною для дослідження біологічних об'єктів *in vivo*. По-перше, за допомогою цієї установки плануються дослідження внутрішньоклітинних бактеріальних інфекцій та стратегії внутрішньоклітинної адаптації патогених бактерій на прикладі *S. Aureus*. [15] Як модель для такої системи буде використано моноцитарні клітини людини з поміщеними всередину частинками мікропластика. Для цього спочатку необхідна калібровка та модернізація експериментальної установки, а також написання програми для аналізу отриманих зображень. Калібровка установки та апробація програми буде проходити з використанням тестових зразків якими було вибрано пластикові мікро сфери з полістерену та PMMA, спектри яких відомі з табличних даних та мають інтенсивні спектральні лінії.

Позитивним результатом роботи буде пришвидшення отримання зображення (що включає в себе затрачений час на отримання та обробку зображення) за допомогою метода описаного в даній роботі у порівнянні з конфокальною скануючою спектроскопією. [16] При цьому бажано щоб якість зображення та співвідношення сигнал шум не зазнали погіршень.

3.2 Підготовка зразка

Приготування агарозного гелю

1) 200 мг порошка агарози розміщується в 10 мл дистильованої води при кімнатній температурі

2) склянка з диспергованою у воді агарозою поміщається на нагрівну плиту з температурою 160 °С

3) після досягнення агарозою температури плавлення (90 – 95 °С), що також можна встановити за зміною прозорості розчину (стає повністю прозорою), температура нагрівної плити знижується до 100 °С, що відповідає температурі 34 - 38 °С розчину.

На всіх стадіях використовується перемішування агарозного гелю за допомогою магнітного стрижня поміщеного у розчин. Останній пункт протоколу важливий при роботі з біологічними зразками.

Приготування розчину зі зразком:

Концентрований розчин зі зразком розводиться дистильованою водою у необхідній пропорції і розміщується використовуючи вібраційний струшувач не менше 5 хвилин для рівномірного розподілення зразка в об'ємі розчину та запобігання утворення агломерацій зразка. Як зразок використовувались PS (polystyren) сфери діаметром 6 мкм та PMMA (Poly(methyl methacrylate)) сфери діаметром 2 мкм в різних пропорціях та зафіксовані у PBS моноцитарні клітини лейкемії людини (THP1).

На тримач (Рис. 6) наноситься шар агарозного гелю так, щоб він утворював плоску поверхню (за допомогою покривного скла). Після затвердіння агарози наноситься шар з розчином зразка. Після його повного висихання за допомогою піпетки наноситься покривний шар агарози.



Рисунок 6: 1 – агарозний гель, 2 – зразок, 3 – отвори в тримачі зроблені для кращого закріплення гелю, 4 – зачіпка за механічний переміщувач

Тримач зі зразком розташований вертикально, та поміщений у ємність з водою. Тримач було викрашено у чорний колір для запобігання розсіяння світла на тримачі.

3.3 Параметри установки

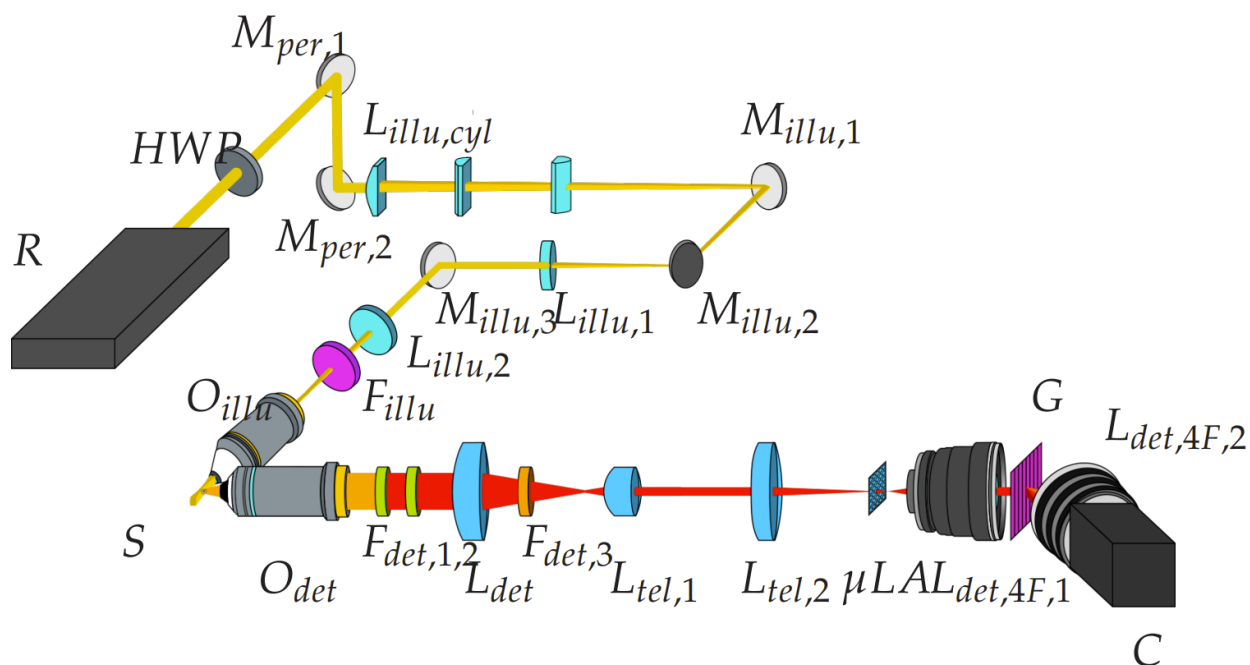


Рисунок 7: Схематичне зображення установки

Перша частина установки, так звана частина освітлення, показана на Рис. 7 жовтим променем і містить в собі такі елементи:

Джерело випромінювання R генерує лазерний промінь з довжиною хвилі 577,8 нм, поляризація якого змінюється за допомогою напівхвильової пластини HWP та направляється за допомогою перископа (MP,1 і MP,2) на систему з трьох циліндричних лінз (L_{cyl}) що трансформують точковий фокус у площинний фокус. Промінь фокусується системою циліндричних лінз в площині дзеркала M_{illu,2}. Система лінз L_{illu,1} та L_{illu,2} повторно відображає профільований промінь на задній фокальній площині освітлювального об'єктива O_{illu}. Спектрально селективний фільтр F_{illu} доданий для отримання більш чистої довжини хвилі лазера. Об'єктив O_{illu} створює світлову площину на зразку.

Друга частина установки – виконує функцію детектування Раманівського розсіяного світла та показана на Рис. 7 помаранчевим (все розсіяне зразком світло) та червоним (Раманівське розсіяне світло) променем.

Об'єктив детектування Odet перпендикулярний до світлового листа та спрямовує раманівське розсіяне світло далі на систему детектування: Сигнал Релея фільтрується двома режекторними фільтрами Fdet,1,2 зробленими у вигляді моторизованих обертальних колес, що дозволяє дивитись на зображення не тільки в раманівському розсіяному світлі. Щоб заблокувати Раманівський сигнал води, додатковий фільтр Fdet,3 розміщується після лінзи Ldet. Телескоп (Ltel,1 і Ltel,2) збільшує зображення. У площині зображення телескопу розміщується масив мікролінз LA. Фокальна площина LA містить матрицю фокусів, які колімовані, розсіяні та повторно зображені за допомогою об'єктивів Ldet4F,1 Ldet4F,2 та ґраткою G на площині Фур'є. Нарешті, CCD камера C (ORCA-Flash4.0 C11440), розташована в площині зображення об'єктиву Ldet4F,2, записує сигнал.

Освітлювальна частина та частина детекції з'єднані між собою 3D-друкованою камерою для зразка. У камеру наповнену водою герметично запаєні два імерсійні об'єктиви Oillu та Odet під кутом 90 градусів один до одного, між якими розташовується тримач для зразка, прикріплений до моторизованого штатива для переміщення зразка. Переміщення може відбуватись за допомогою трансляції вздовж трьох просторових напрямків (x, y, z) та обертання зразка навколо вертикальної осі. [17]

На додаток було встановлено допоміжну а Basler acA3088-57um камеру між двома режекторними фільтрами. Цей оптичний шлях (показаний червоним на Рис. 8) дозволяє отримувати поле зору $740 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ у площині зразка та слугує для визначення місцезнаходження зразка в режимі широкого поля, розміщення його на фокальній площині об'єктиву детектування, а потім для вирівнювання центральної осі світлової площини в зразку (для калібрації установки). Зміна оптичного шляху відбувається за допомогою дзеркала M що

вставляється або прибирається за необхідністю. Експериментальна установка знаходиться на базі Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena, Germany.

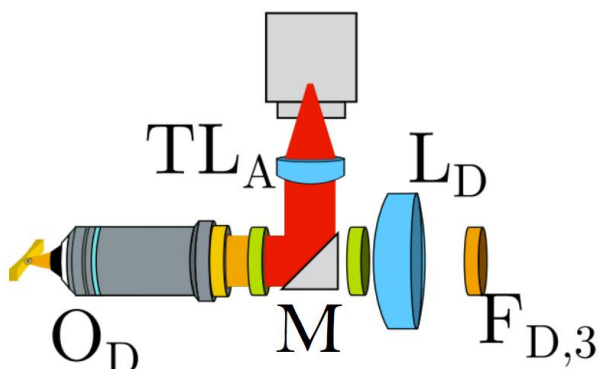


Рисунок 8 Оптичний шлях показаний червоним променем дозволяє додатковій камері робити зображення зразка. Зміна оптичного шляху відбувається завдяки дзеркала M , розташованого між об'єктивом O_D та фільтром Релеївського розсієння $F_{D,3}$

3.4 Отримання зображень

Для полегшення знаходження об'єкта була встановлена додаткова камера як на (рис). Це дозволяє швидше і простіше знайти досліджуваний об'єкт завдяки більшому полю зору встановленої камери. На рис представлено зображення в Раманівському розсієному світлі без використання водного фільтра де порівняно поле зору додаткової камери та основної (помічено червоним). Освітлена частина всередині зображення є світінням агарози в фокусі площини. Тінь від об'єкта що розташовується зліва показує що напрямок падаючого променя – зліва направо.

Досліджуваний об'єкт розташовувався в центрі поля зору додаткової камери що також відповідало центру поля зору основної (Рис. 9). Зразки були освітлені лазерним променем потужністю 1,25 Вт, що відповідає густині потужності 19.1 мВт/мкм². Дана потужність була вибрана з урахуванням подальшого використання наявної Раманівської установки для дослідження біологічних зразків *in vivo* так як не досягає межі пошкодження зразка але є

достатньою для запису спектрів з достатнім рівнем співвідношення сигнал-шум.

Для поліпшення якості вихідного зображення було зроблено 6 окремих зображень об'єкта з часом експозиції 10 с, що відповідає загальному часу експозиції в 1 хв. Також було зроблено 3 зображення з закритим затвором камери та незмінним часом експозиції - темні зображення.



Рисунок 9 Порівняння поля зору додаткової камери та основної (виділено червоним)

3.5 Обробка зображень

Обробка зображень була здійснена за допомогою динамічної програмної мови Julia.

Головна мета обробки зображень полягає в зміні розмірності вхідного файлу таким чином, щоб кожна лінія що кодує спектр на 2Д зображенні була переведена в іншу розмірність, утворюючи таким чином 3Д гіперкуб даних, де кожній просторовій точці на 2Д зображенні відповідає спектр в даній точці.

Було вирішено записувати лише частину спектра Раманівського розсіяння – регіон “відбитків пальців” ($500 - 1900 \text{ cm}^{-1}$), так як він містить основну та найважливішу інформацію щодо хімічної будови речовини. Частина спектра з

хвильовими числами вище зазначеної межі майже не містить цікавих піків і займає зайве місце на детекторі, а отже не досліджується.

Спочатку було здійснено попередню обробку зображення:

- Кожне зображення було знешумлене використовуючи медіану сусідніх пікселів що були ідентифіковані як спайки. Тобто зображення було позбавлено шумів що залежать від зовнішніх параметрів таких як високоенергетичні космічні фотони. (Рис. 10, б))
- Було знайдено медіану для кожного пікселя між усіма знешумленими зображеннями.
- Від отриманого зображення було віднято усереднене в кожному пікселі темне зображення що містить шуми пов'язані з дефектами камери як то теплові шуми. (Рис. 10, в))

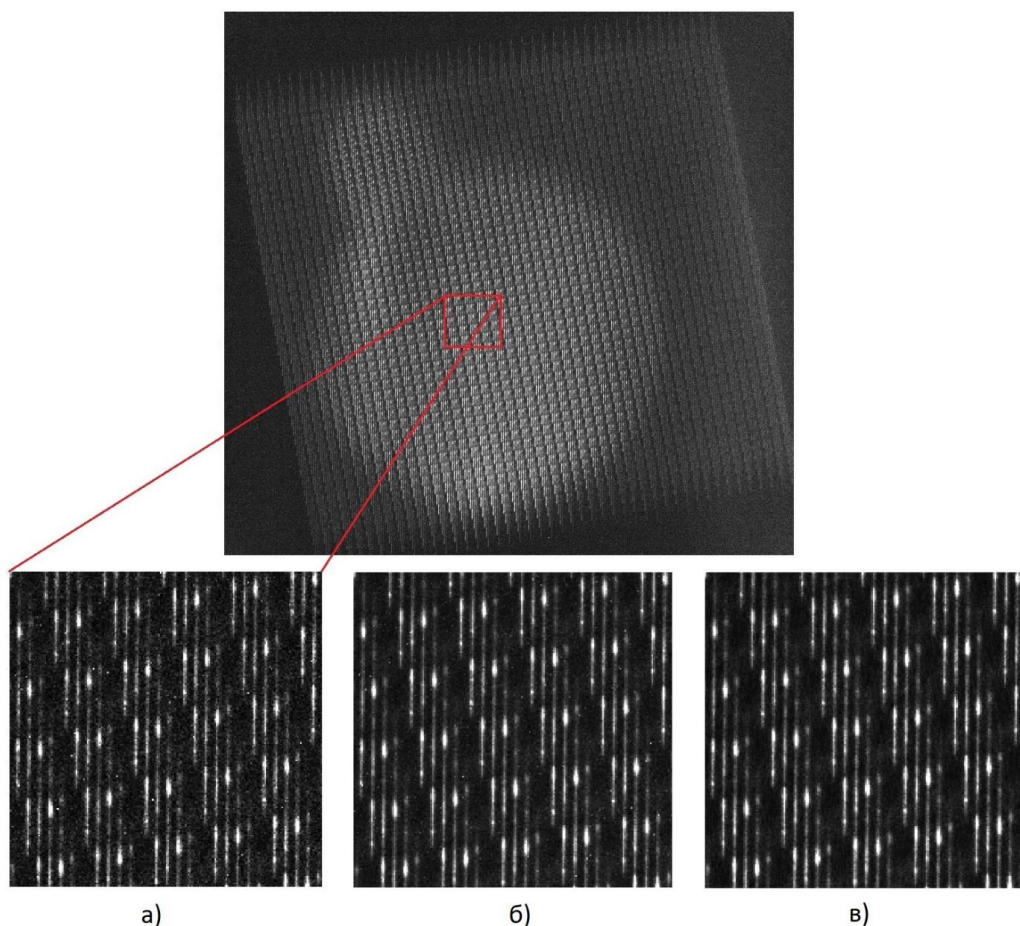


Рисунок 10: а) наближене сире зображення, б) наближене програмно знешумлене зображення в) зображення з віднятим темним зображенням

Основна обробка зображень була реалізована за допомогою метода NFFT (Non-Uniform Fourier Transform) [18].

Для трансформації сигналу цим методом (розтягування, стискання, зсуву) нам необхідно відновити вихідний сигнал і семплувати його новими координатними точками.

Під час процесу перевибірki координат алгоритм NFFT розділяє простір даних на регулярну сітку та обчислює дискретне перетворення Фур'є (DFT) у точках сітки: [19]

$$F(k) = \sum_{j=0}^{N-1} f_j \cdot e^{-2\pi i k x_j / M} \quad (7)$$

$F(k)$ - k -та частотна складова DFT

f_j — значення вхідної функції в позиції x_j з нерівномірною вибіркою

M — загальна кількість точок на регулярній сітці

N — кількість неоднорідних проб

Потім він використовує вагові коефіцієнти інтерполяції, обчислені за допомогою функції перетворення, визначеної користувачем, щоб інтерполювати значення даних у сітку. Алгоритм NFFT використовує переваги швидкого перетворення Фур'є (FFT) для прискорення обчислень.

- Переформатування зображення з метою мати спектри однакової довжини, з рівною кількістю пікселів між ними (Рис. 11, а, б))
- Групування (сумування) кожних 7 стовпчиків. В результаті маємо спектри в кожному стовпчику.
- Розташовуємо спектри в ряд, один біля одного для легшого згортання у 3Д матрицю. (Рис. 11 в, г))
- Запис спектрів в 3Д матрицю

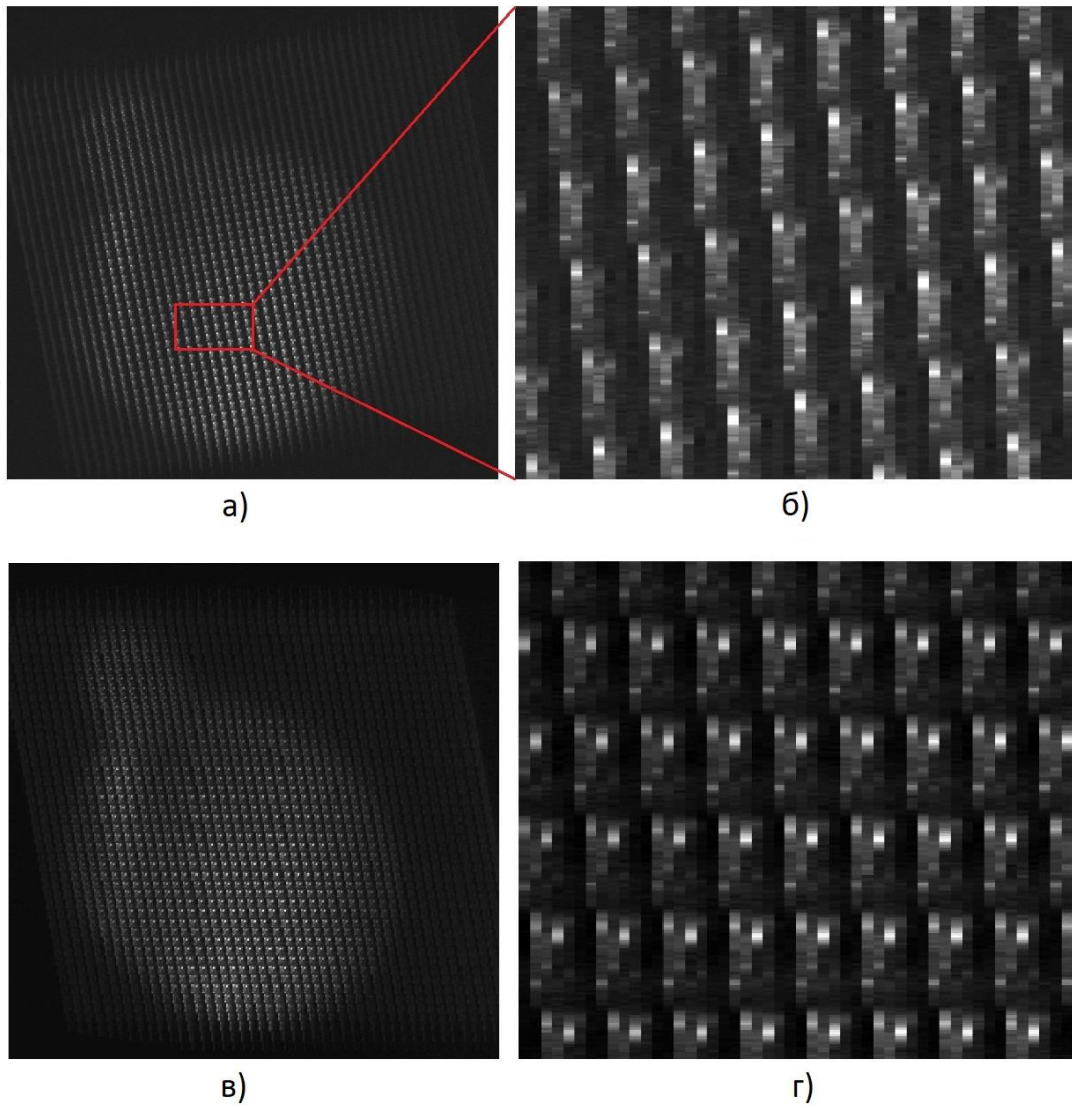


Рисунок 11 а, б) – звичайне та збільшене зображення після трансформації вздовж осі x в, г) – звичайне та збільшене зображення після трансформації вздовж осі y

4. РЕЗУЛЬТАТИ

В результаті програмної обробки зображень отримали гіперкуб даних в якому кожному пікселю відповідає спектр. На Рис. 12 показано оброблене зображення пластикових сфер розфарбоване за наявності унікальних для кожного матеріалу піків. Такі піки можна визначити аналізуючи хімічну будову матеріалів зразка. Наявність хімічних зв'язків між атомами в різних радикальних групах (наприклад CH_3 або бензольне кільце) призводить до різного зсуву Раманівських піків.

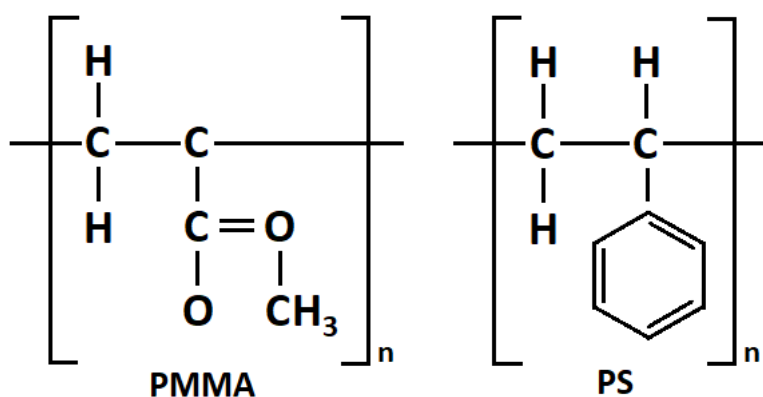


Рисунок 12 Хімічна будова PS PMMA

Пік 1603 cm^{-1} позначено червоним кольором на спектрі PS на Рис. 13, б) що відповідає скелетним коливанням розтягування бензольного кільця, що притаманне лише хімічній будові PS. Спектр PS також містить наступні важливі піки [20]:

1000 cm^{-1} - Одне з синфазних коливань C-C (симетричний рух) розтягування кільця, називається «диханням кільця». У цій вібрації відбувається зміщення атомів, яке схоже на роботу серця під час дихання. Усі зв'язки «C-C» стягуються й розслаблюються одночасно.

1583 cm^{-1} – розтягування C=C зв'язків

1602 cm^{-1} – розтягування скелетних C-C зв'язків бензольного кільця

Пік 1460 cm^{-1} позначено зеленим кольором на спектрі РММА на Рис. 13, в) що відповідає вієрним коливанням С-Н зв'язків в O-CH_3 яких не міститься в будові PS. Серед інших важливих спектрів РММА також можна виділити [21]:

813 cm^{-1} – симетричне розтягування С-О-С зв'язка

990 cm^{-1} – маятникові коливання О-С зв'язків

1736 cm^{-1} – симетричні розтягування С=О зв'язків

Спектральні лінії 1123 cm^{-1} та 1332 cm^{-1} містяться в обох спектрах та відповідають за скелетні коливання розтягування С-С та крутильні коливання CH_2 відповідно.

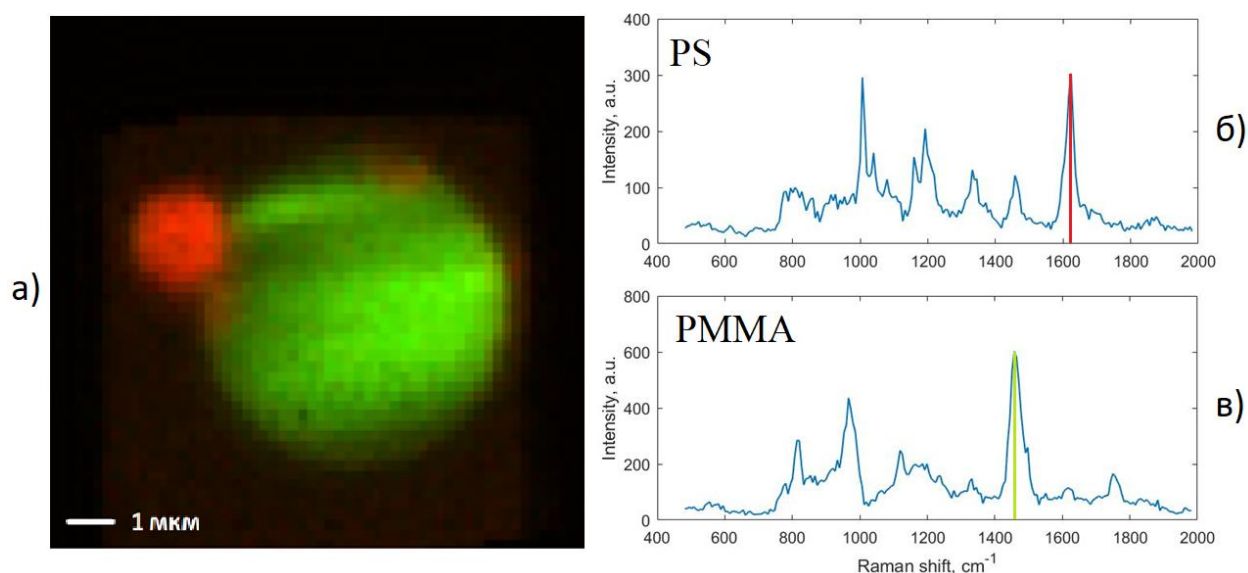


Рисунок 13 а) комбіноване зображення пластикових сфер розфарбоване за наявністю піків б) в)

Наступним кроком для покращення системи буде можливість сканування великих 3Д зображень за допомогою площини. Для цього було проаналізовано рух зразка при використанні моторизованого рухомого штативу.

На Рис. 14, а) показані області зображення що переміщувались кожен раз на 5 позицій вправо (переміщення зразка на одну позицію відповідає переміщенню на 1.5 мкм). Використовуючи положення центрів пластикових сфер було визначено що переміщення зразка на 5 позицій вправо переміщує зображення

зразка на 15 пікселів вправо та 5 пікселів вгору, також відбувається зсув фокусу що виражено в зміні яскравості та радіусу зображених сфер. Це означає що штатив не вирівняний відносно світлової площини, що врешті решт обмежує максимальну площу сканування.

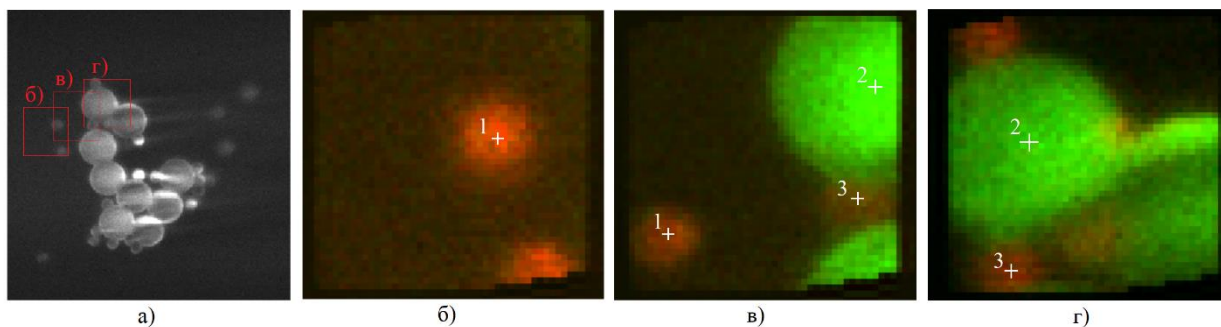


Рисунок 14 а) зображення агломерації пластикових сфер в розсіяному світлі з позначенням використаних регіонів б, в, г) зображення регіонів позначених на (а) в раманівському розсіяному світлі з позначенням центрів пластикових сфер

Як референс для подальшого дослідження клітин з частинками мікропластику було досліджено чисті клітини TMP1 та отримано раманівські спектри цитоплазми та ліпідів (тригліцеридів (TAG), фосфоліпідів (PLP)) Рис. 15 [22, 23]

TAG присутні в щільних ліпідних тільцях цитоплазми, що можна спостерігати на Рис. 15 (б). Екстраговані спектри цитоплазми показують типові смуги фенілаланіну та амідю, очікувані від клітинних структур. Ліпіди ж демонструють сильні обертальні (1290 см^{-1}) та деформаційні (1420 см^{-1}) коливання. Спектри TAG також демонструють характерне рознягування ароматичного кільця (1605 см^{-1} , 1630 см^{-1}). [24]

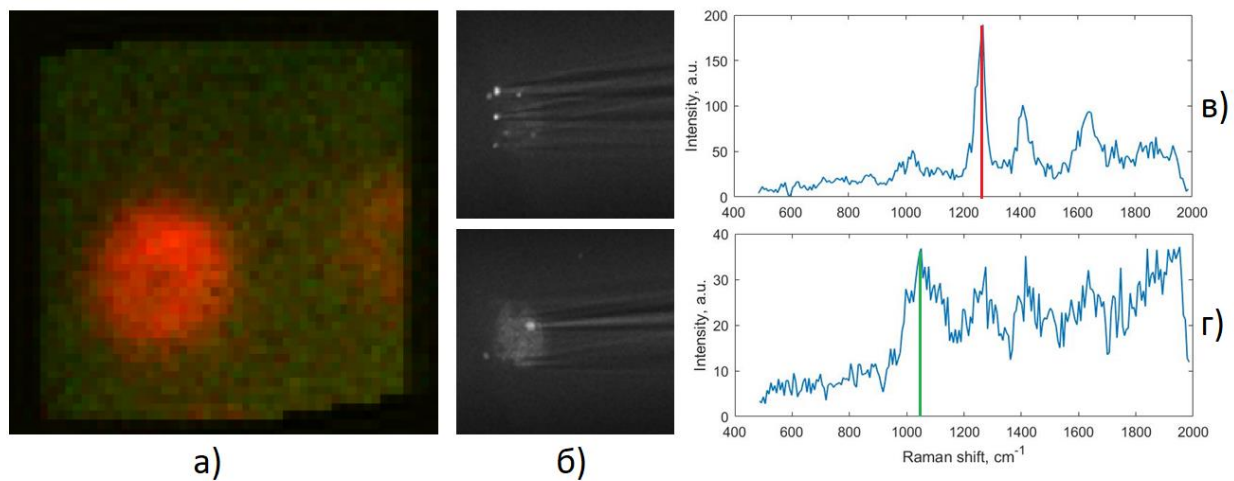


Рисунок 15 а) розфарбоване зображення частини клітини за основними піками в) ліпідів, г) цитоплазми; б) зображення клітини у світловому потоці зроблене додатковою камерою

5. ВИСНОВКИ

В цій роботі було вивчено, модифіковано та повністю відкалібровано експериментальну установку - раманівський спектроскоп з імплементами методами IFS та LS. Незважаючи на обмежене поле зору (8,2 мкм) і спектральний діапазон (лише область “відбитків пальців”), методика здатна характеризувати, просторово та хімічно, полімерні сфери та біологічні зразки зі спектральною роздільною здатністю 6.6 см^{-1} на довжині хвилі 577 нм.

Для аналізу отриманих за допомогою даного методу даних було написано програму для обробки зображень яка трансформує 2Д зображення у 3Д гіперспектральний куб даних.

Були розшифровані спектри зразків та виявлені основні коливальні піки для кожної речовини. Також було порівняно результати з іншими роботами в даній галузі.

Світловий листовий мікроскоп виявився особливо корисним для швидкого отримання зображень товстих зразків у реальному часі, оскільки засвітлення менш виражене, а запис зображення виконується паралельно в просторовому та спектральному діапазонах цифровою камерою. Поглинання в напрямку z не є проблемою, оскільки освітлення однакове в усіх положеннях z , на які воно фокусується. Однак випромінюване світло має проходити через зразок, як у звичайному мікроскопі, що може певною мірою погіршити зображення на товстих, або не дуже прозорих зразках. Також, існує ефект тіні в латеральному напрямку: світло спочатку поглинається з того боку, де світло потрапляє на зразок, і, таким чином, кількість розсіяного світла, а з ним і сигнал на детекторі тьмяніє на протилежному боці.

Одною з можливостей для подальшого вдосконалення установки є отримання більшого поля зору за допомогою ширшої системи мікролінз. А також покращення просторової роздільної здатності, використовуючи більш високоточні оптичні компоненти та більшу щільність лінз у масиві мікролінз.

Перспективним напрямком буде також імплементація методів томографії для отримання 3д зображення зразка [25]. Це можливо завдяки наявності не тільки трансляційної але й обертальної функції в рухомому штативі до якого прикріплено зразок. Але це також потребуватиме використання ускладнених методів реконструкції даних що використовуються у томографії. Ще одним з варіантів є комбінація методу сканування площиною з конфокальною спектроскопією, що може бути здійснено шляхом встановлення додаткової камери навпроти об'єктива ілюмінації. [26]

5. БІБЛІОГРАФІЯ

- [1] Л. Л. Казицына, Н. Б. Куплетская, “Применение УФ-, ИК-, ЯМР и МАСС спектроскопии в органической химии”, 2-е издание, 1979
- [2] David W. Hahn, “Raman Scattering Theory”, 2009
- [3] M. Kerker, “The scattering of light and other electromagnetic radiation”, *Academic, New York*, 1969
- [4] P. Y. Hou, J. Ager, J. Mouglin, A. Galerie, “Limitations and Advantages of Raman Spectroscopy for the Determination of Oxidation Stresses”, *Oxidation of Metals*, vol. 75, pp. 229–245, 2011
- [5] J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, “Handbook of vibrational spectroscopy, Theory and instrumentation”, *John Wiley & Sons Ltd*, vol.1 pp. 84-100, 2002
- [6] Jiabao Xu, Tong Yu, Christos E. Zois, Ji-Xin Cheng, Yuguo Tang, Adrian L. Harris, Wei E. Huang, “Unveiling Cancer Metabolism through Spontaneous and Coherent Raman Spectroscopy and Stable Isotope Probing”, *Cancers*, vol. 13(7), pp. 1718, 2021, url: <https://doi.org/10.3390/cancers13071718>
- [7] R. Bacon, Y. Copin, G. Monnet, Bryan W. Miller, J.R. Allington-Smith, M. Bureau, C. Marcella Carollo, Roger L. Davies, Eric Emsellem, Harald Kuntschner, Reynier F. Peletier, E.K. Verolme, P. Tim de Zeeuw, “The SAURON project – I. The panoramic integral-field spectrograph”, *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, vol. 326(1), pp. 23-35, 2001, url: <https://doi.org/10.1046/j.1365-8711.2001.04612.x>
- [8] S. Minardi, R. J. Harris, L. Labadie, “Astrophotonics: astronomy and modern optics”, *The Astronomy and Astrophysics Review*, vol. 29(6) 2021

- [9] Christoph J. Engelbrecht, Ernst H. K. Stelzer, “Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM)”, *Optics Letters*, vol. 31(100), pp. 1477-1479, 2006, url: <https://doi.org/10.1364/OL.31.001477>
- [10] B.-C. Chen, W. R. Legant, K. Wang, L. Shao, D.E. Milkie, M.W. Davidson, C. Janetopoulos, X.S. Wu, J.A. Hammer, Z. Liu, B.P. English, Y. Mimori-Kiyosue, D.P. Romero, A.T. Ritter, J. Lippincott-Schwartz, L. Fritz-Laylin, R.D. Mullins, D.M. Mitchell, J.N. Bembenek, A.C. Reymann, R. Böhme, S.W. Grill, J.T. Wang, G. Seydoux, U.S. Tulu, D.P. Kiehart, E. Betzig, “*Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution*”, *Science*, vol. 346, pp. 1257998, 2014
- [11] J.R. Lakowicz, “Fluorescence Anisotropy”, In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Boston, MA: springer US, 2006
- [12] Amicia D. Elliott, “Confocal microscopy: Principles and modern practices”, *Current Protocols in Cytometry*, vol. 92, 2020, url: <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
- [13] R. Glenn Sellar, Glenn D. Boreman “Comparison of relative signal-to-noise ratios of different classes of imaging spectrometer”, *Applied Optics*, vol. 44(9), pp. 16141624, 2005
- [14] Walter Müller, Martin Kielhorn, Michael Schmitt, Jürgen Popp, and Rainer Heintzmann, “Light sheet Raman micro-spectroscopy”, *Optica*, vol. 3(4), pp. 452-457, 2016, url: <https://doi.org/10.1364/OPTICA.3.000452>
- [15] Christina Große, Norbert Bergner, Jan Dellith, Regine Heller, Michael Bauer, Alexander Mellmann, Jürgen Popp, and Ute Neugebauer, “Label-Free Imaging and Spectroscopic Analysis of Intracellular Bacterial Infections”, *Anal. Chem.*, vol. 87(4), pp. 2137–2142, 2015, url: <https://doi.org/10.1021/ac503316s>

- [16] Zabihullah Abdul Aziz, “Raman-spektroskopische Charakterisierung von Zellen und Gewebe nach Exposition mit Nanoplastik”, Bachelor Thesis (Westfälische Hochschule Zwickau), 2022
- [17] Elia Alejandra Zegarra Valverde, Light Sheet Integral Field Raman Microspectroscopy, 2022
- [18] Sheng-Chun Yang, Hu-Jun Qian, Zhong-Yuan Lu, “A new theoretical derivation of NFFT and its implementation on GPU”, *Applied and Computational Harmonic Analysis*, vol. 44(2), pp. 273-293, 2018, url: <https://doi.org/10.1016/j.acha.2016.04.009>
- [19] Melanie Kircheis, Daniel Potts, Manfred Tasche, “Nonuniform fast Fourier transforms with nonequispaced spatial and frequency data and fast sinc transforms”, *Numerical Algorithms*, vol. 92, pp. 2307–2339, 2023, url: <https://doi.org/10.1007/s11075-022-01389-6>
- [20] Michael Mazilu, Anna Chiara De Luca, Andrew Riches, C. Herrington, Kishan Dholakia, “Optimal Algorithm for Fluorescence Suppression of Modulated Raman Spectroscopy”, *Optics express*, vol. 18, pp. 11382-95, 2010, url: <https://doi.org/10.1364/OE.18.011382>
- [21] Jiayao Chen, Jing Li, Lirong Xu, Wei Hong, Yuzhao Yang, Lihb Ygyibnb Oigiviy, “The Glass-Transition Temperature of Supported PMMA Thin Films with Hydrogen Bond”, *Plasmonic Interface. Polymers*, vol. 11(4), pp. 601, 2019, url: <https://doi.org/10.3390/polym11040601>
- [22] Charalambos Kallepitis, Mads S. Bergholt, Manuel M. Mazo, Vincent Leonardo, Stacey C. Skaalure, Stephanie A. Maynard, Molly M. Stevens, “Quantitative volumetric Raman imaging of three dimensional cell cultures”, *Nature Communications*, vol. 8, pp. 14843, 2017, <https://doi.org/10.1038/ncomms14843>;

[23] Christian Matthäus, Gero Bergner, Christoph Krafft, Benjamin Dietzek, Stefan Lorkowski, Jürgen Popp, “Monitoring intra-cellular lipid metabolism in macrophages by Raman- and CARS-microscopy”, Proc. SPIE 7715, *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II*, pp. 771511, 2010, url: <https://doi.org/10.1117/12.854244>

[24] Batirtze Prats, Mateu Marie-Theres Hauser, Antonio Heredia, Notburga Gierlinger, “Waterproofing in Arabidopsis: Following Phenolics and Lipids In situ by Confocal Raman Microscopy”, *Front Chem.*, vol. 4, 2016

[25] A. H. Voie, D. H. Burns, F. A. Spelman, “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens”, *Journal of Microscopy*, vol. 170, pp. 229-236, 1993

[26] Rolf T. Borlinghaus, Dr. Petra Haas, “Confocal and Light Sheet Imaging”, 2015