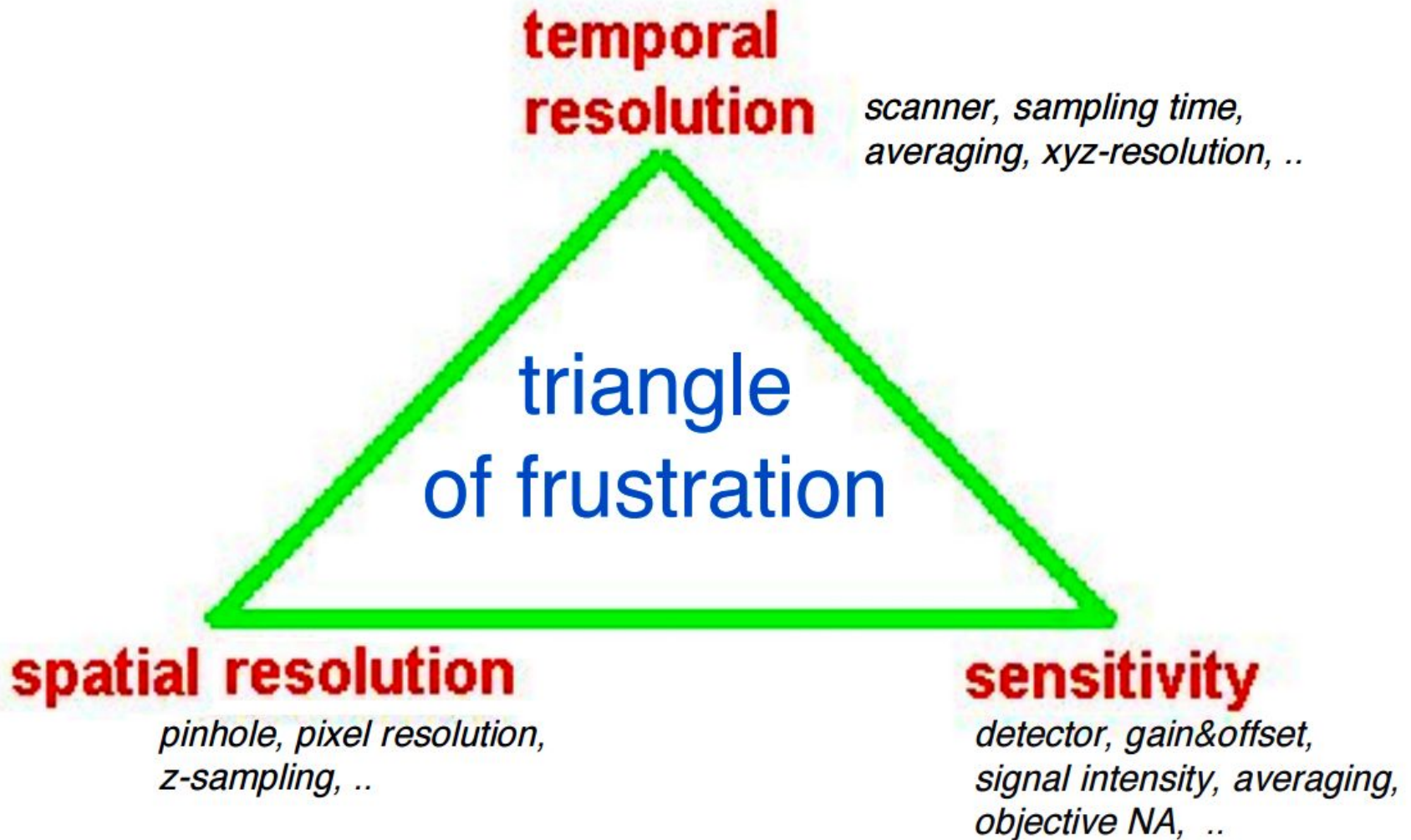
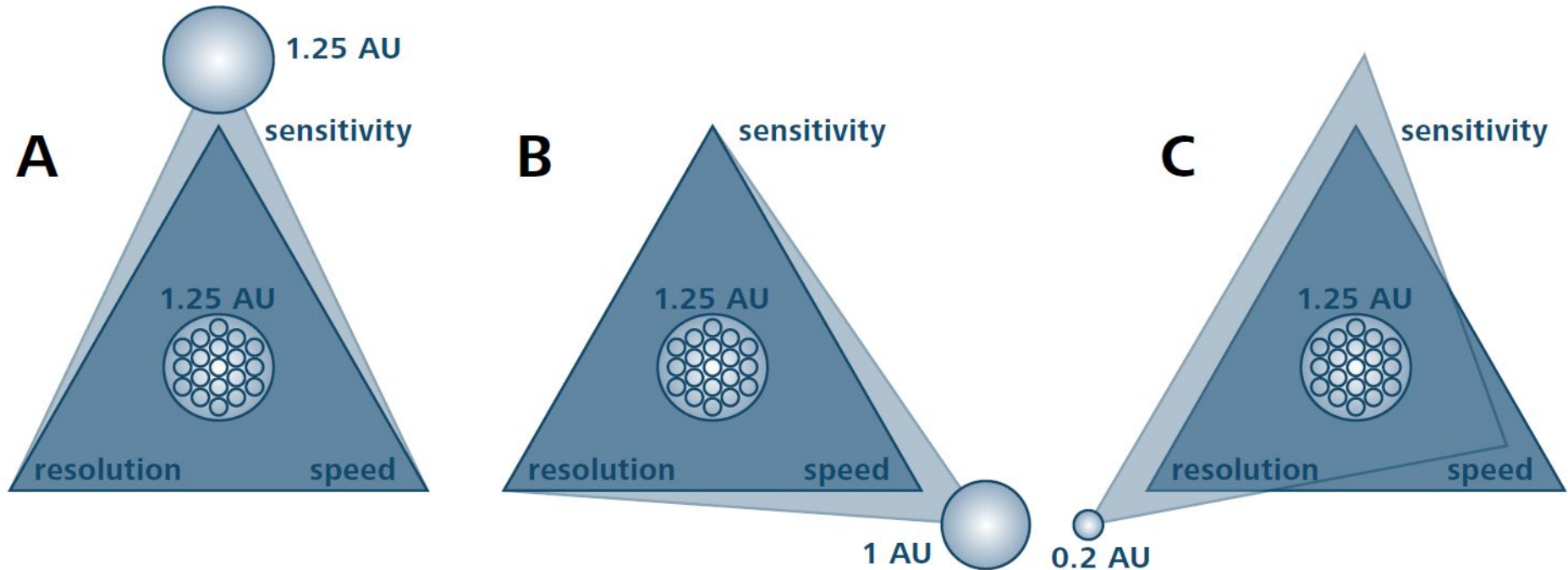


# Конфокальные компромиссы

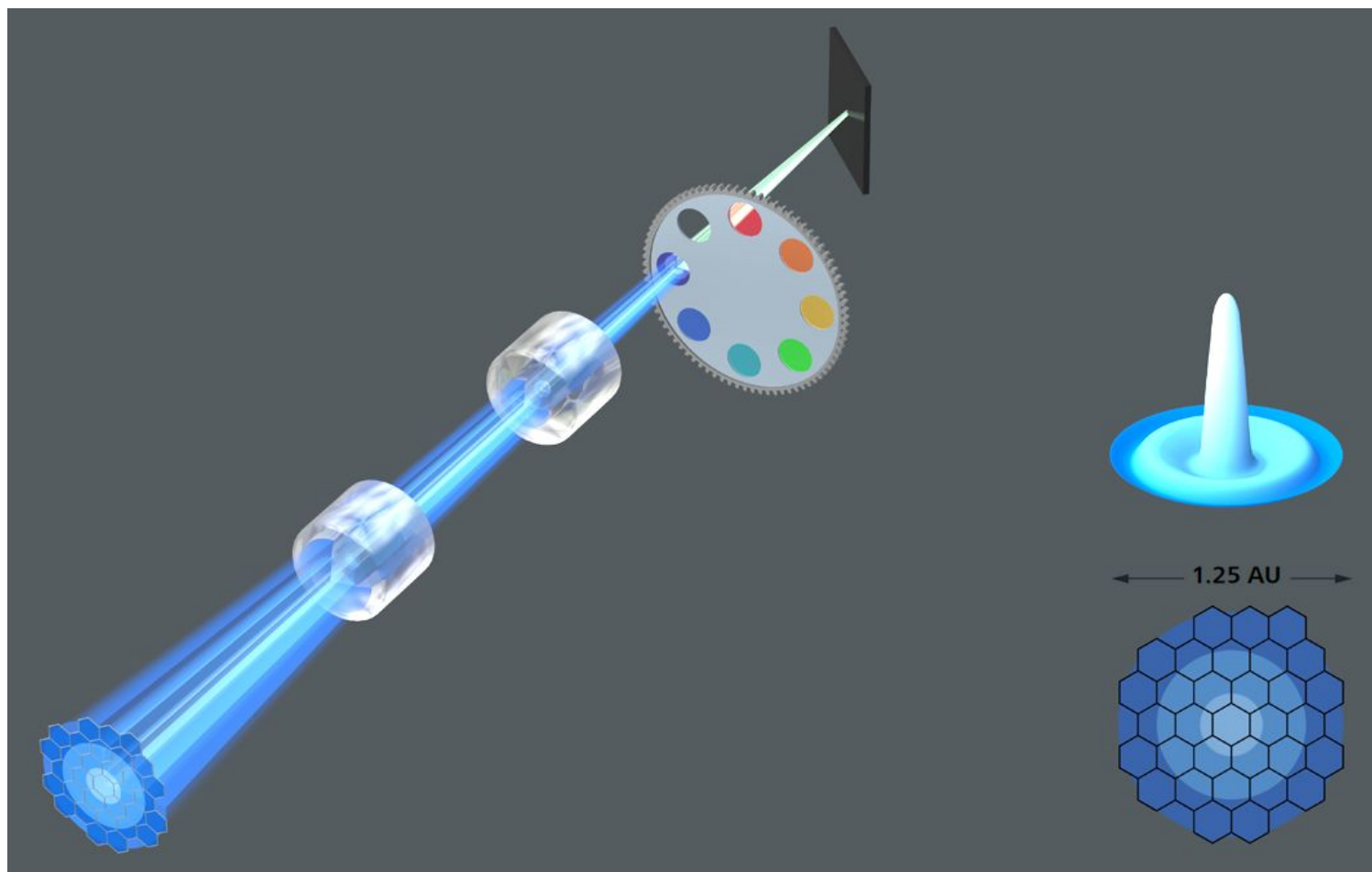


# Управление конфокальными компромиссами



(A) Для максимальной яркости диафрагма должна быть открыта на 1.25 AU, что дает некоторую потерю разрешения. (B) Лучшее разрешение достигается при 1 AU, но приводит к снижению скорости сканирования. (C) Для максимального разрешения диаметр диафрагмы должен составлять 0.2 AU, что приводит к значительному снижению отношения сигнал/шум (SNR) и снижению скорости сканирования.

# Фасеточный детектор - Airyscan



Детектор Airyscan позволяет улучшить разрешение, либо повысить отношение сигнал-шум. Эквивалентный размер всего детектора Airyscan равен 1,25 диска Эри, отдельный детектор в его составе имеет размер около 0,2 диска Эри.

# «Размерность» изображения в микроскопии

Двумерное изображение – ч/б изображение  
одиночного оптического среза.

Трехмерное изображение – серия срезов (стопки  
– stacks) или последовательность (временная –  
time-lapse) одиночных оптических срезов.

Четырехмерное изображение (4D) – трехмерная  
картина, записанная в динамике во времени.

Пятимерное изображение (5D) – трехмерная  
картина, записанная в динамике во времени и в  
нескольких цветовых каналах.

# Запись многомерного изображения в микроскопии

1. Запись 3D в одном поле зрения
2. Запись 3D соседних полей зрения с последующей сшивкой изображений в единый комплексный стек
3. 3D запись удаленных полей зрения

# Анализ изображения в формате 5D

1. Спектральное разделение каналов.
2. Сегментация изображения в каждом канале.
3. Построение треков объектов в каждом канале.
4. Регистрация и аннотирование изображений.
5. Расчет внутренних особенностей каждого канала и ассоциативных функций между каналами.

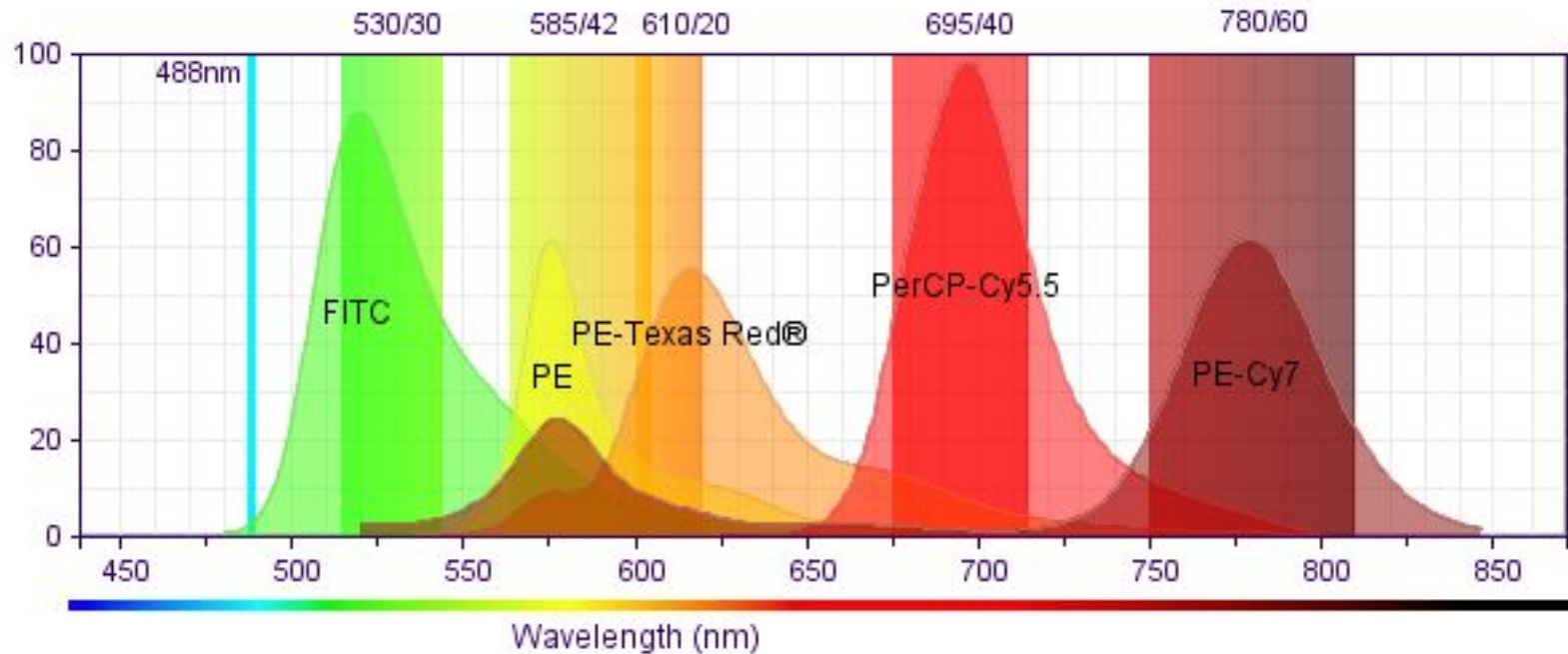
# Многоцветная конфокальная микроскопия

Запись изображения в двух и более  
флуоресцентных каналах –  
одновременная или последовательная?

«Затекание» сигналов и проблема  
разделения перекрывающихся спектров  
флуоресценции (spectral unmixing).

Использование кубиков светофильтров  
и/или спектрального детектора.

# Перекрывание спектров эмиссии



Перекрывание спектров эмиссии неизбежно при использовании нескольких красителей, возбуждаемых от разных лазеров, поскольку спектры возбуждения имеют достаточно большую ширину. Оно приводит к тому, что при одновременной окраске клетки несколькими красителями измеряемый каждым ФЭУ сигнал увеличивается за счет дополнительного сигнала от других красителей возбуждаемых тем же лазером.

Перекрывание для органических красителей асимметрично – коротковолновые красители дают большее «затекание» в следующий канал. Величина перекрывания возрастает по мере сближения максимумов флуоресценции и максимумов возбуждения.



# Компенсация

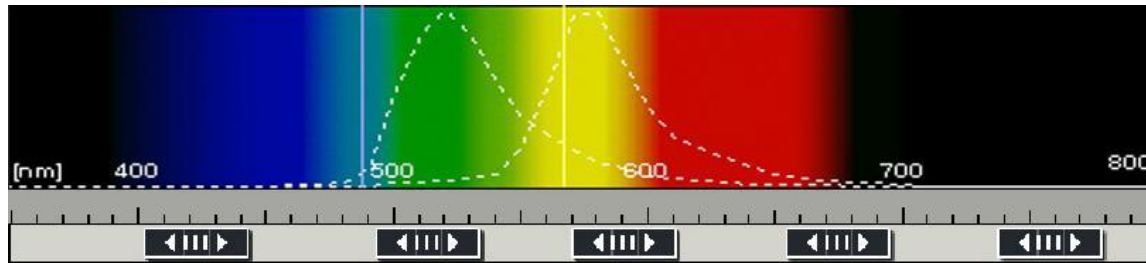
При использовании нескольких красителей возникает проблема перекрывания спектров флуоресценции. Проблема усугубляется с ростом числа красителей, когда различие между максимумами возбуждения и флуоресценции становится небольшим.

Для того, чтобы определить, является ли сигнал истинным, или обусловлен затеканием эмиссии от другого красителя, применяется специальная процедура под названием «компенсация».

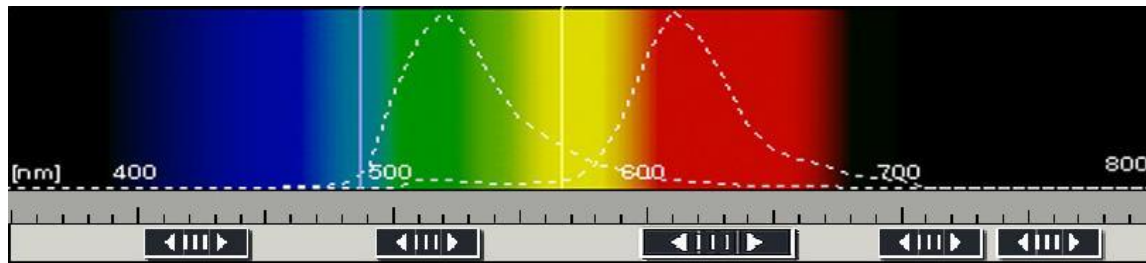
Компенсация в первом приближении означает вычитание одного сигнала, умноженного на некоторый коэффициент (как правило, от 1 до 100%) из другого.

Цифровая компенсация производится с помощью заранее подготовленной таблицы, которая рассчитывается на основании перекрывания спектров (при использовании лазеров), или вручную, путем эмпирического подбора коэффициентов.

# Сравнение пар красителей

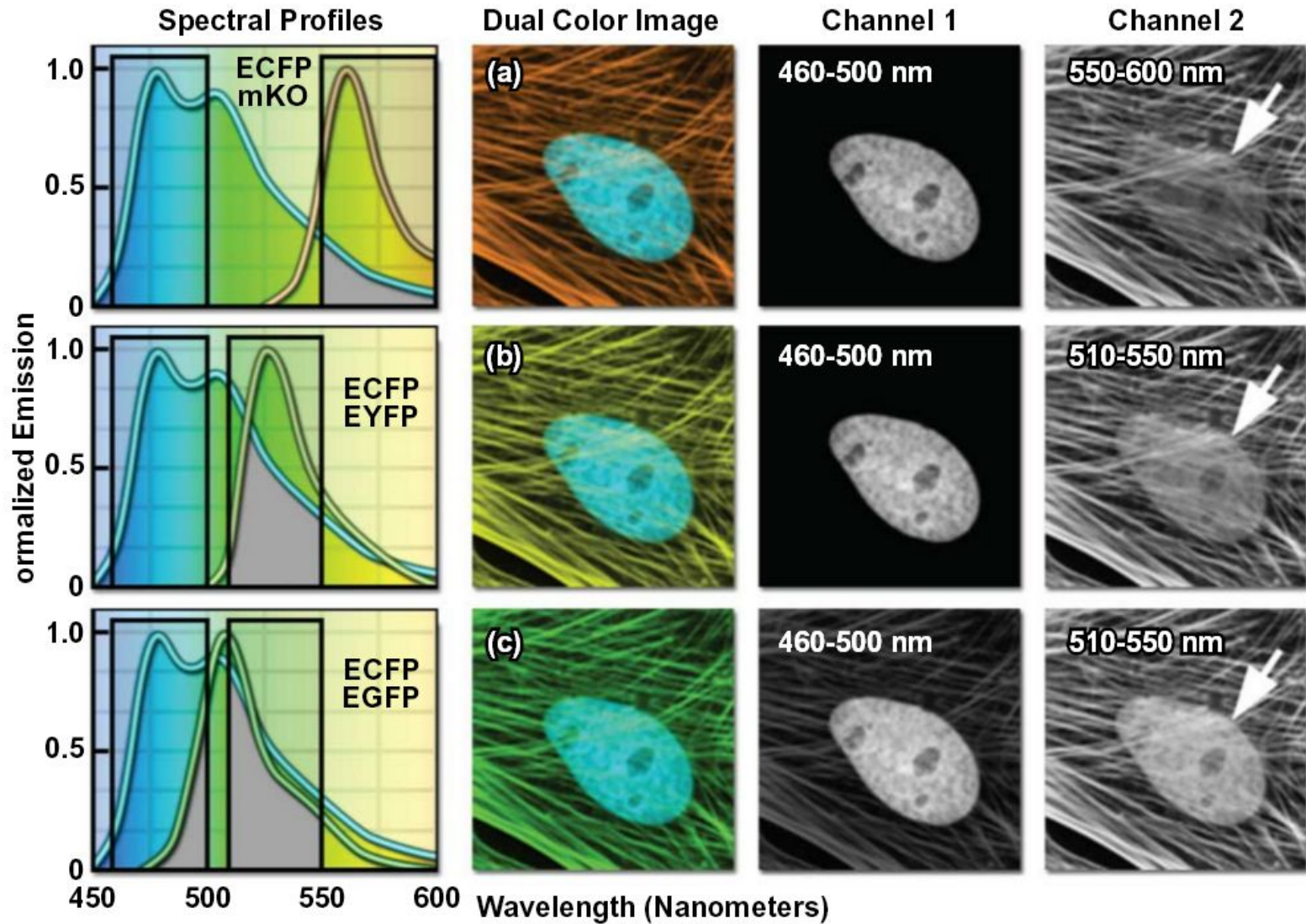


**FITC**  
**TRITC ~20%**



**FITC**  
**Texas Red ~3%**

# Затекание сигналов



# Затекание сигналов

## Как проверить наличие затекания:

Выключить возбуждение для длинноволнового красителя и сравнить картины.

## Как уменьшить затекание сигналов:

Использовать флуорохромы с дальше отстоящими спектрами. Например, FITC + Texas Red лучше, чем FITC + TRITC

Более слабый сигнал желательно пометить коротковолновым флуорохромом.

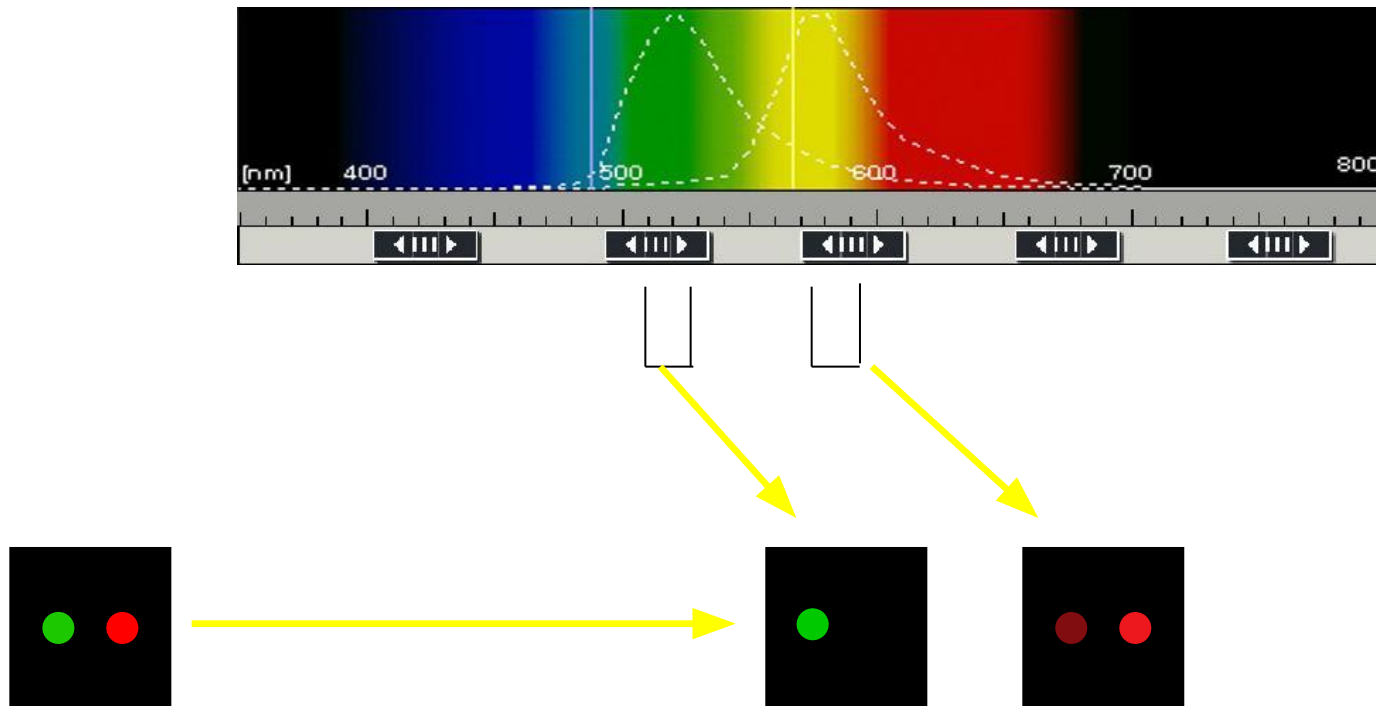
Последовательное, а не одновременное сканирование создает лучшие возможности для компенсации.

# Запись изображения в нескольких каналах

Варианты записи:

одновременно (хуже) или последовательно (лучше, но дольше).

Основная трудность – перекрывание сигналов в разных каналах детекции.



# Разделение перекрывающихся сигналов

Для уменьшения эффекта затекания применяются несколько подходов:

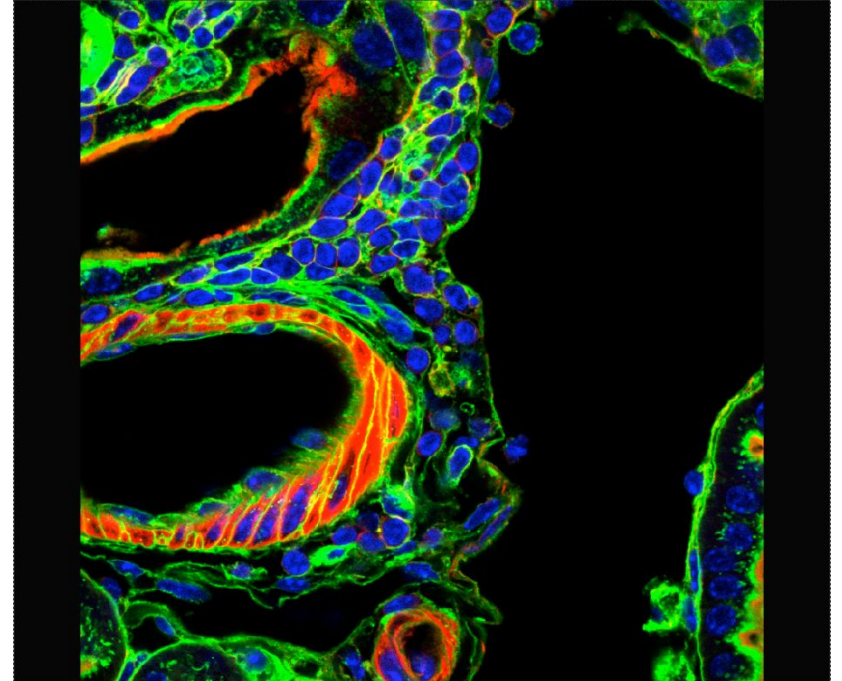
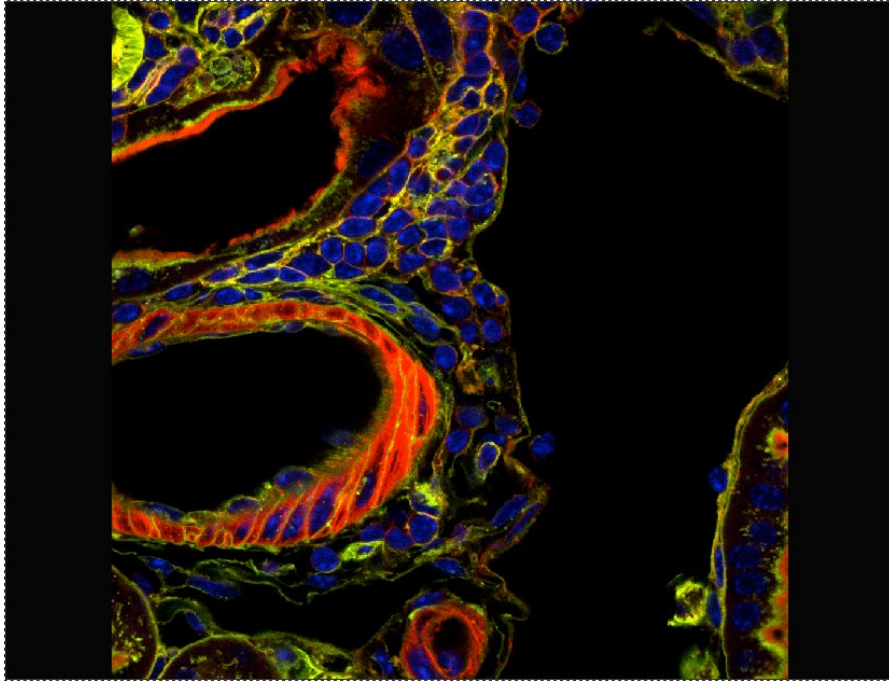
Сдвиг полосы пропускания детектора.

Использование дифракционной решетки для выделения узкой полосы сигнала.

Последовательное сканирование.

Разделение спектров может проводиться с помощью базы данных микроскопа.

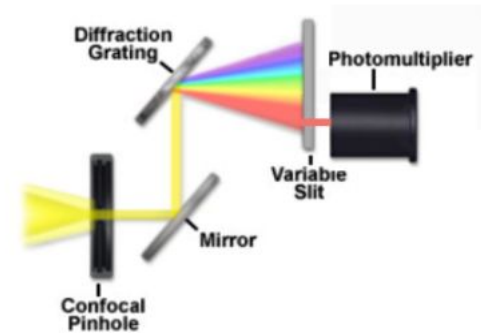
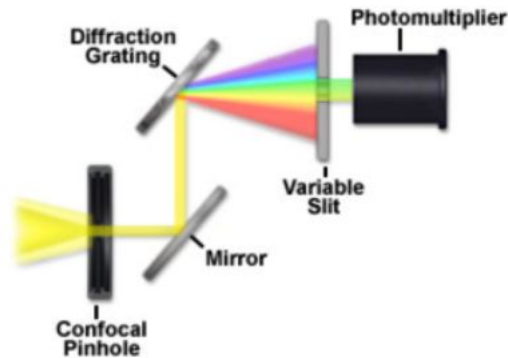
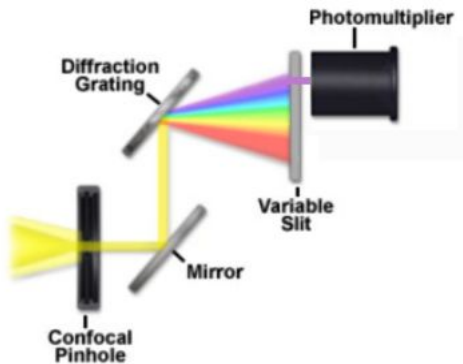
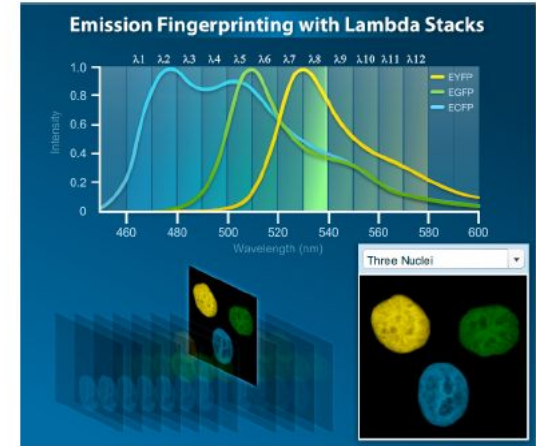
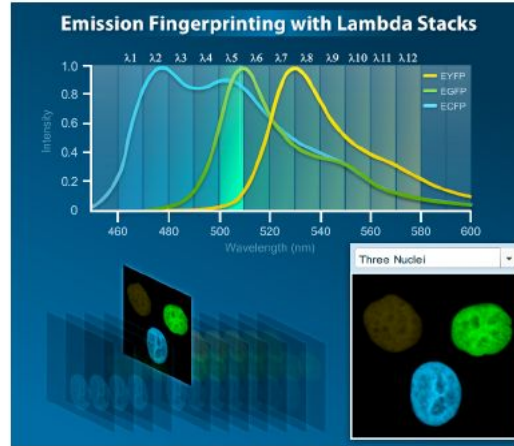
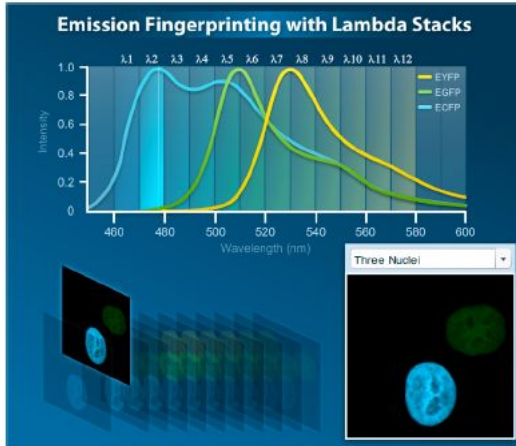
# Параллельное и последовательное сканирование



Слева: красный и зеленый каналы перекрываются, справа – каналы полностью разделены.



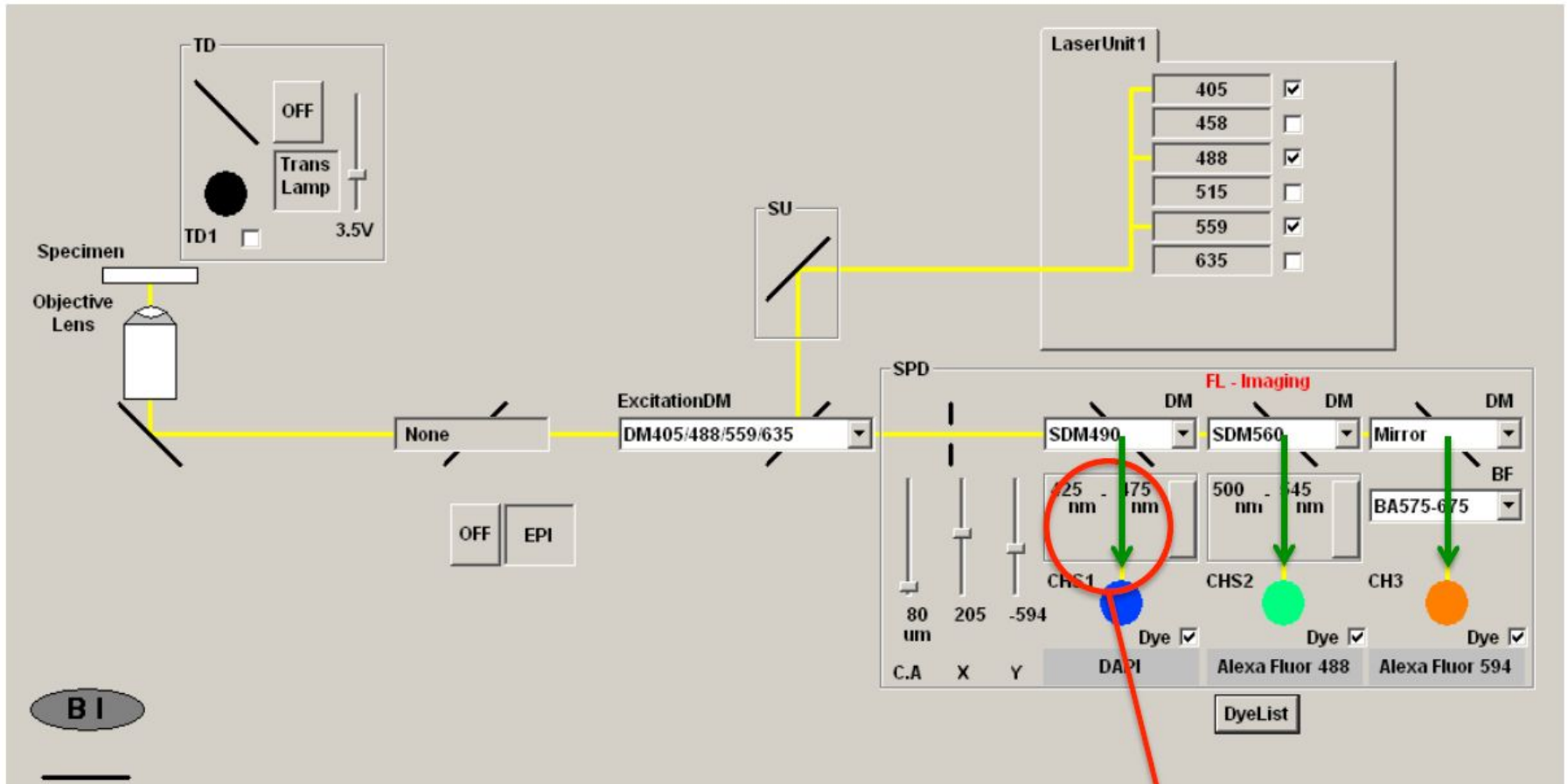
# Простейший щелевой детектор



Спектры флуоресценции снимаются последовательно при возбуждении несколькими лазерами.

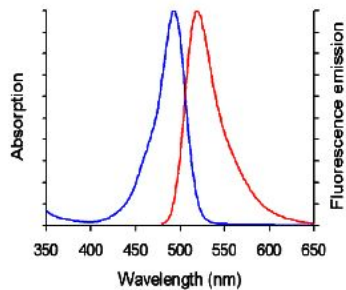


# Запись спектров с помощью щелевого детектора

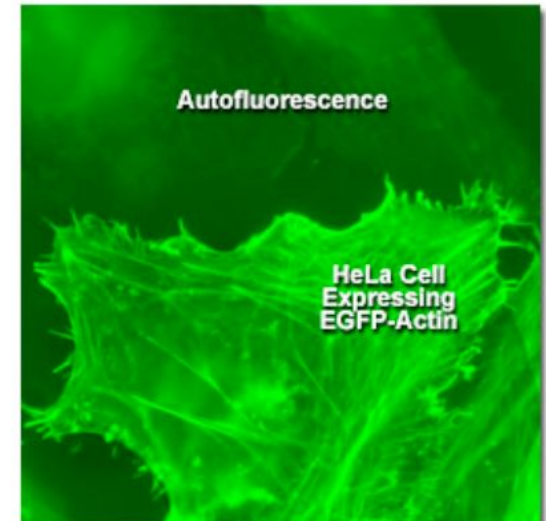
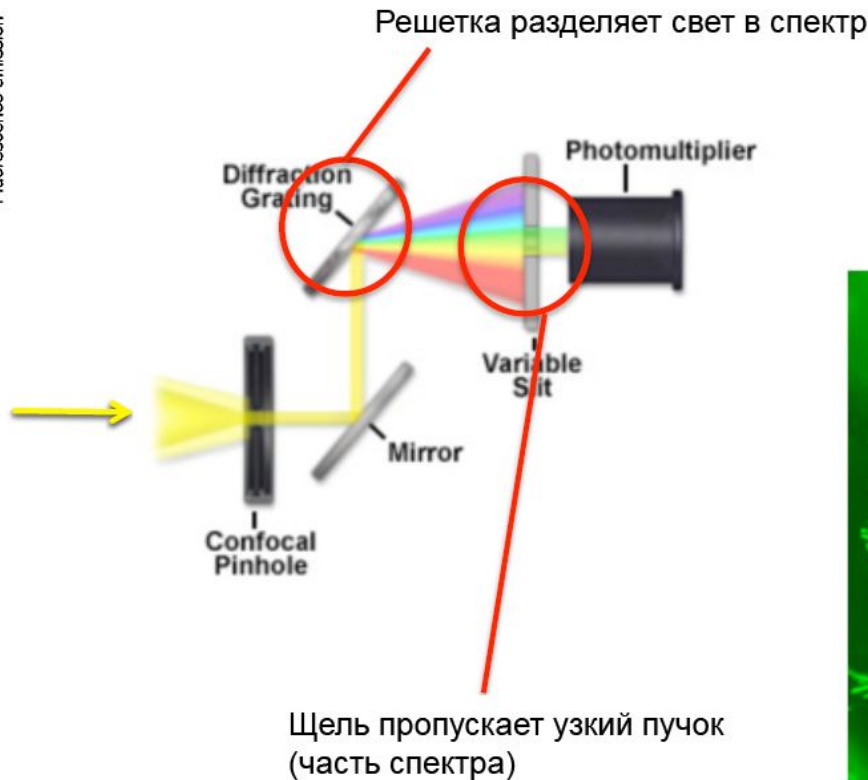


variable  
detector slit

# Запись спектров с помощью щелевого детектора

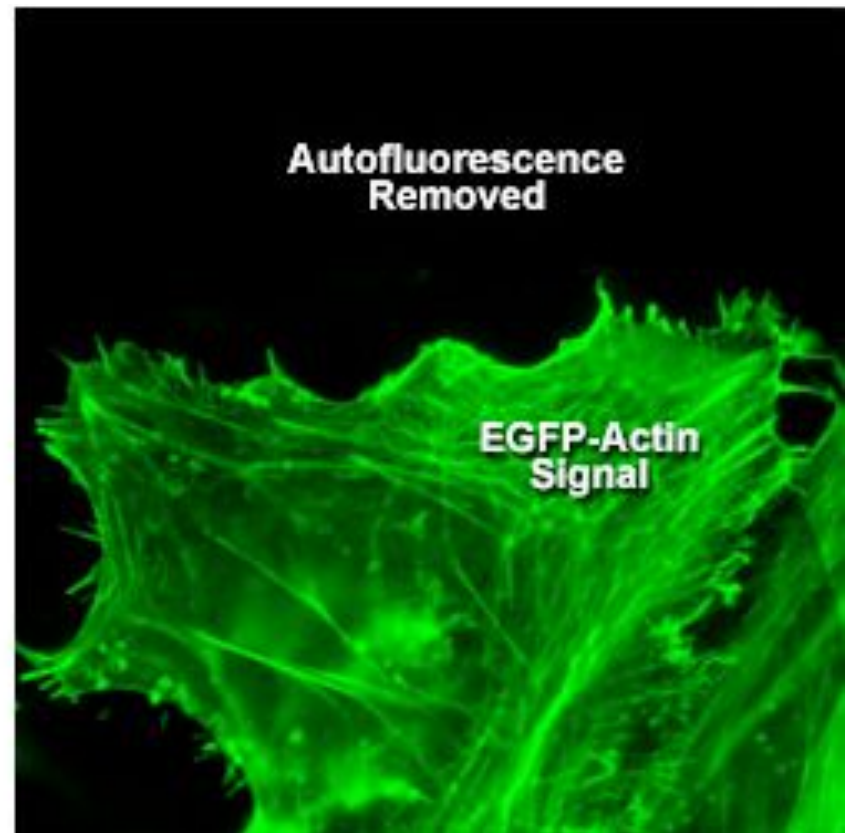
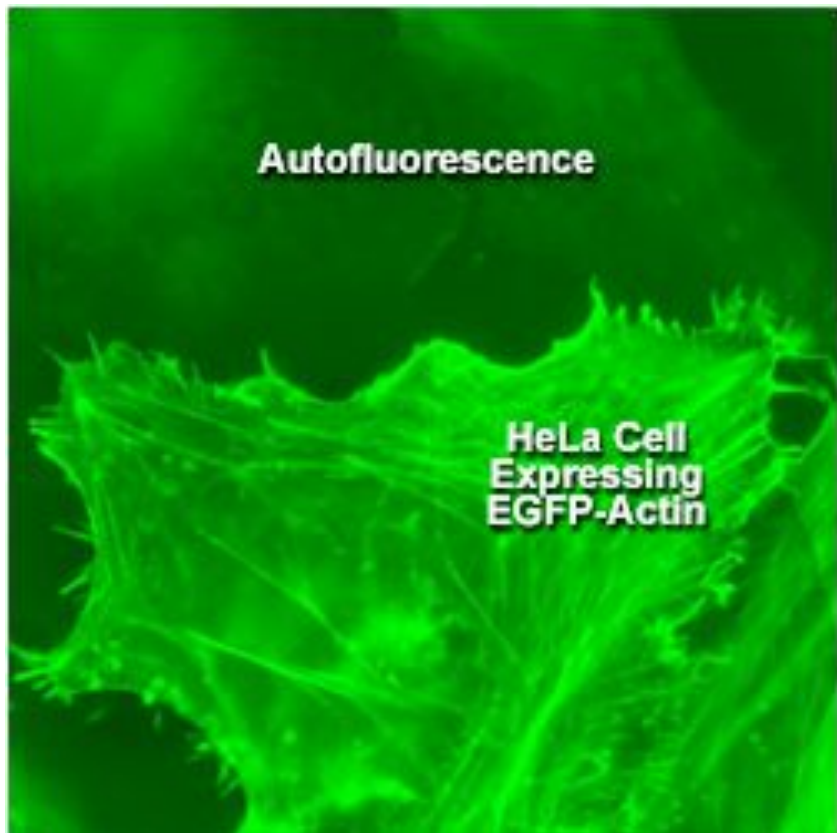


Суммарный свет флуоресценции



Ширина и положение щели перед детектором регулируются – таким образом возможно сканирование спектра флуоресценции.

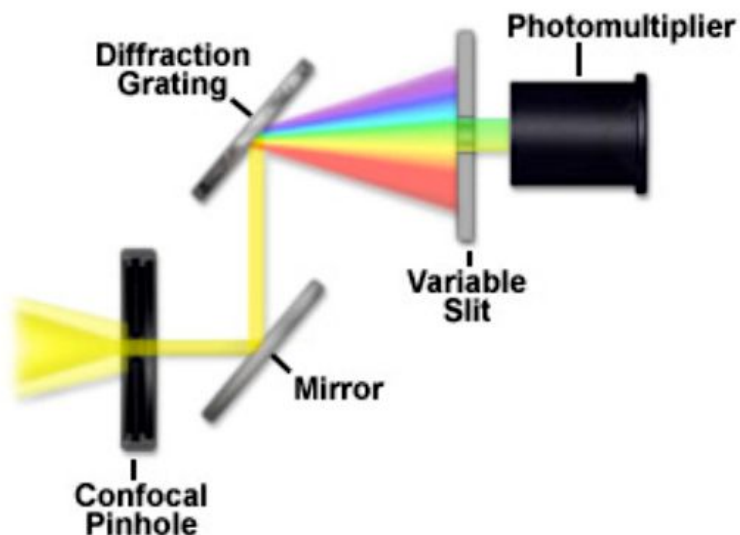
# Результаты разделения



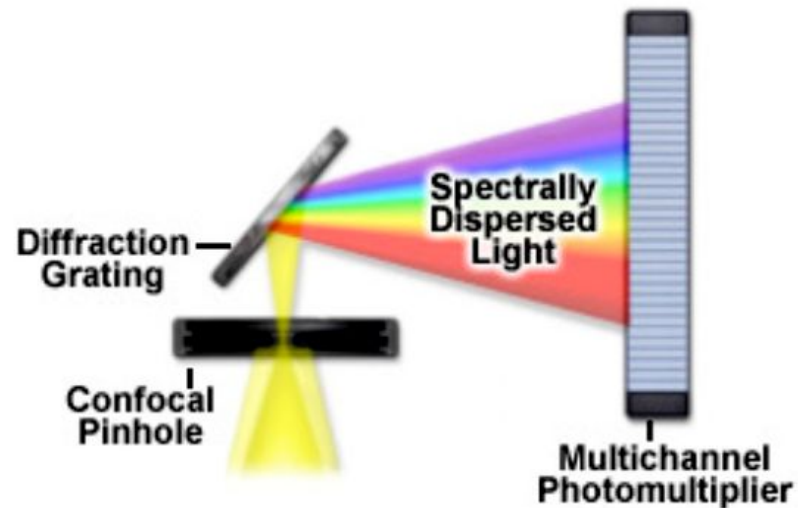
Слева – суммарная картина, справа – после вычитания спектра автофлуоресценции. Сохранен сигнал только от GFP.

# Системы спектральной детекции

Olympus FV1000

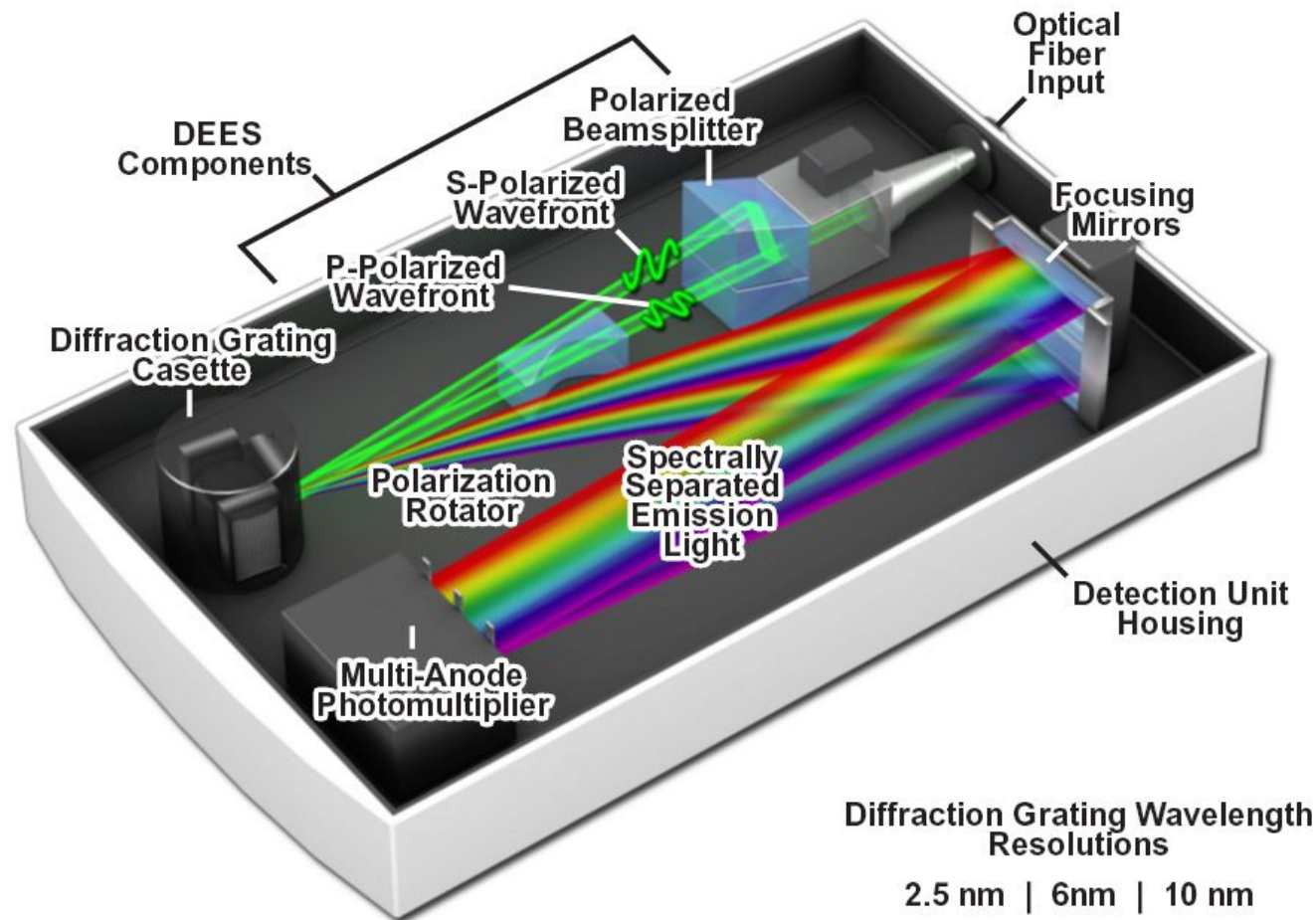


Zeiss 510 META



Слева – последовательная (за счет поворота решетки), справа – параллельная (панель с 32 детекторами предустановлена перед решеткой).

# Спектральный детектор Никон



**32-канальный детектор с регулируемой шириной щели – 2.5, 6 и 10 нм на канал. Возбуждение препарата возможно одновременно от всех 4 лазеров**



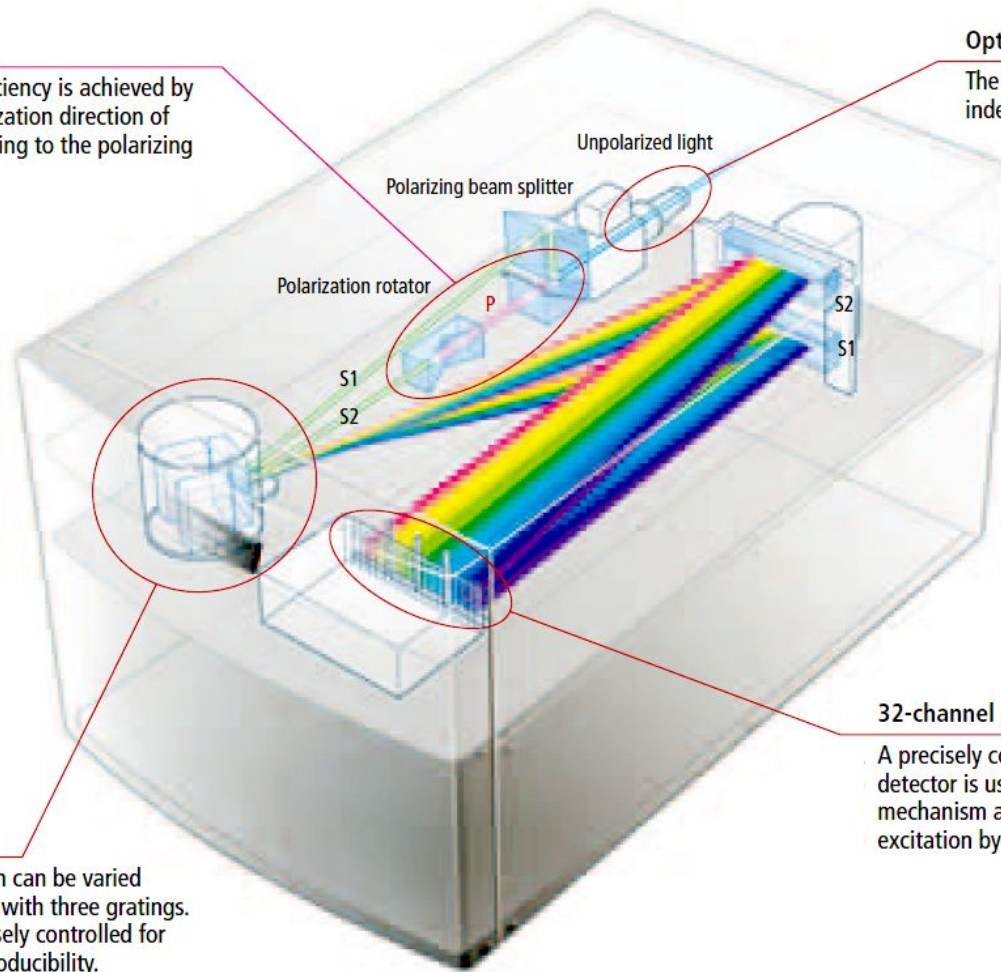
# Спектральный детектор

## DEES system

High diffraction efficiency is achieved by matching the polarization direction of light entering a grating to the polarizing light beam S.

## Optical fiber

The wavelength resolution is independent of pinhole diameter.



## Multiple gratings

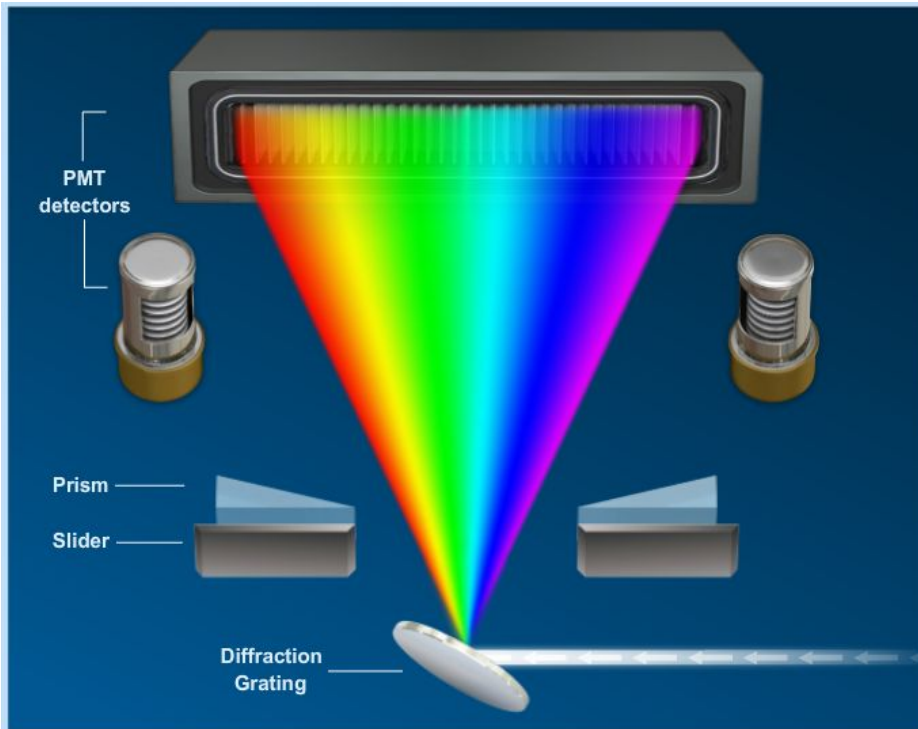
Wavelength resolution can be varied between 2.5/6/10 nm with three gratings. Each position is precisely controlled for high wavelength reproducibility.

## 32-channel detector

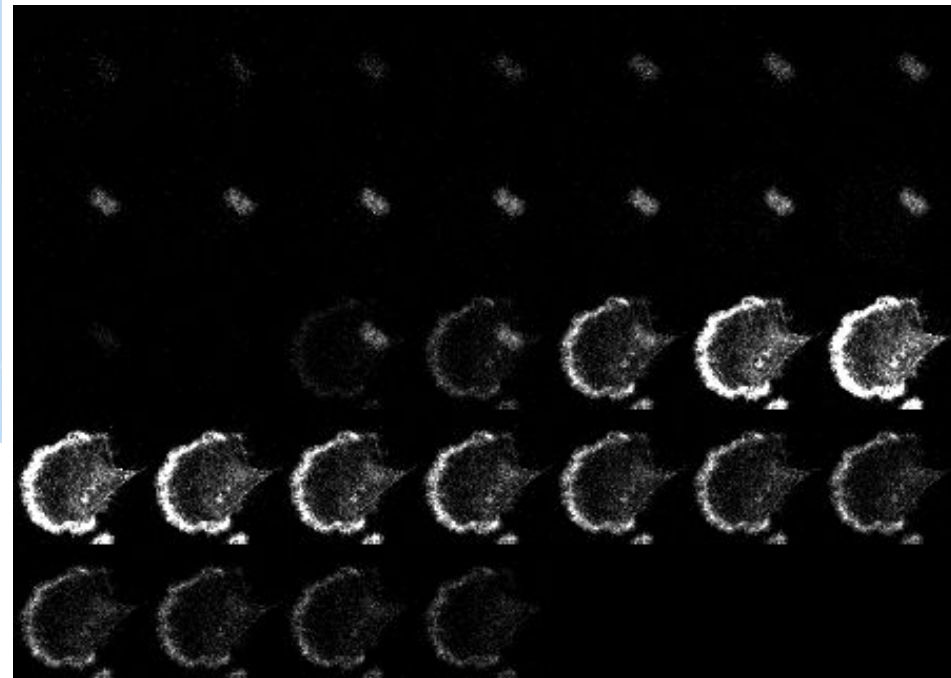
A precisely corrected 32-PMT array detector is used. A three-mobile-shielding mechanism allows simultaneous excitation by up to four lasers.

**Линейка из ФЭУ позволяет одновременно записывать сигнал в 32 каналах для последовательных длин волн (ширина канала устанавливается на 2,5, 5-6 или 10 нм)**

# Спектральный детектор

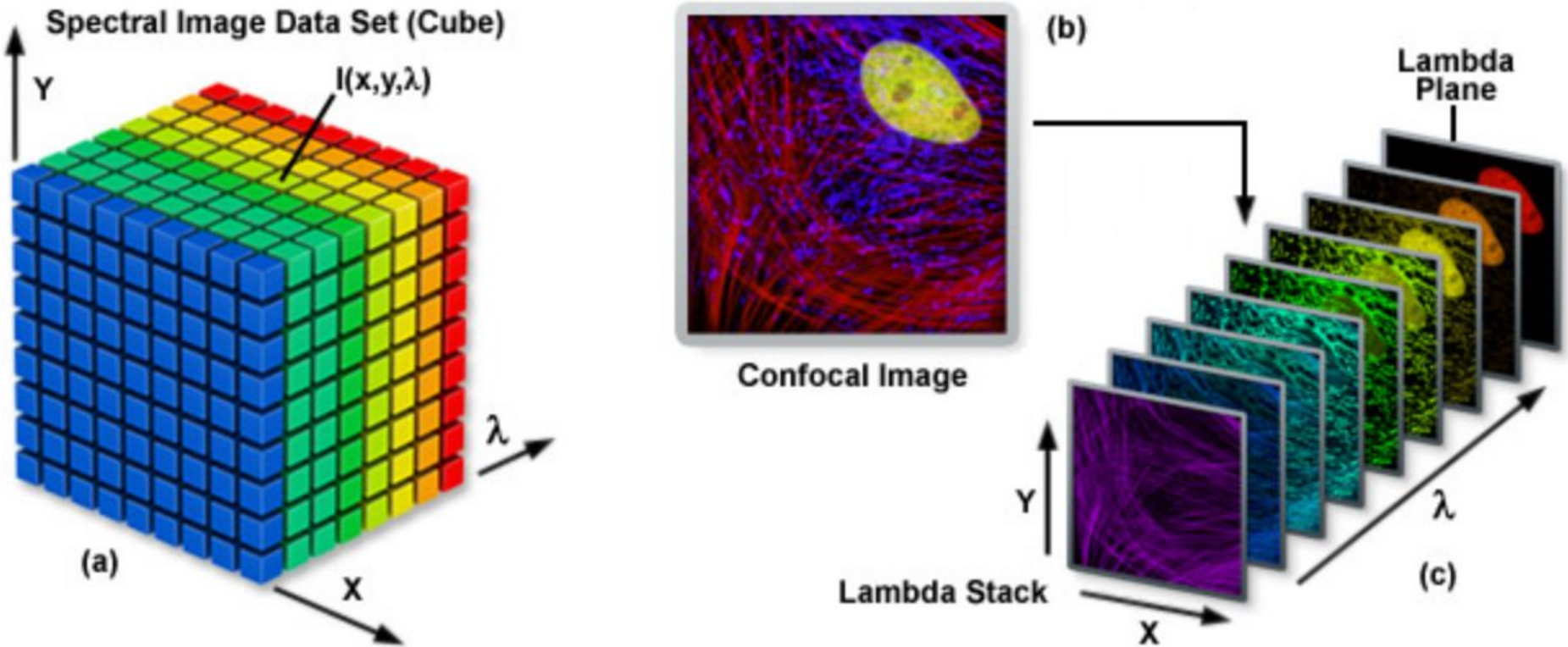


Галерея из 32 картинок  
препарата, окрашенного  
DAPI и Alexa 488



Регулируемый детектор  
позволяет выделять  
несколько каналов для  
одновременной записи

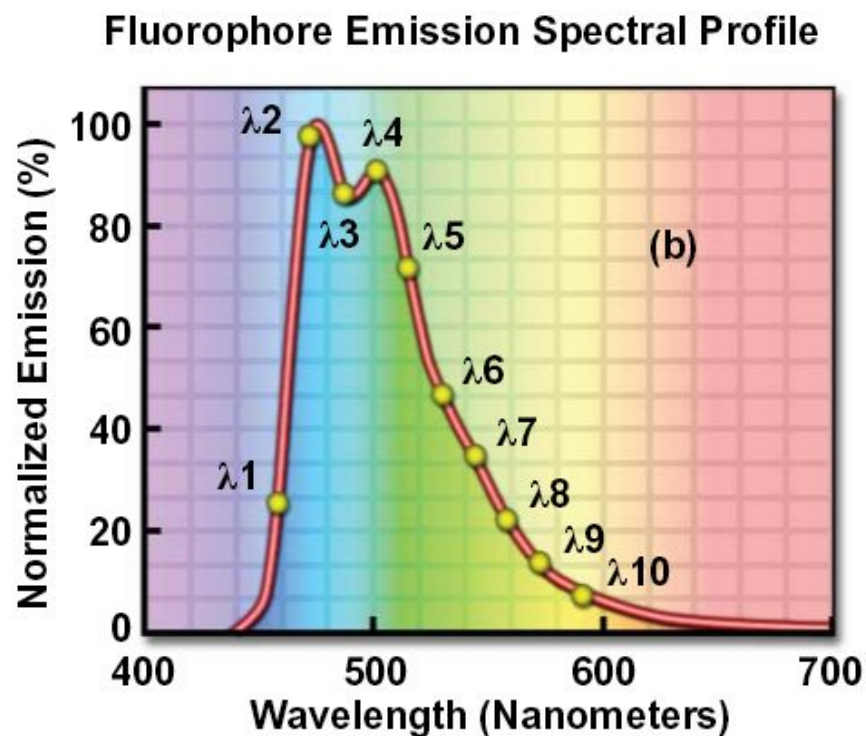
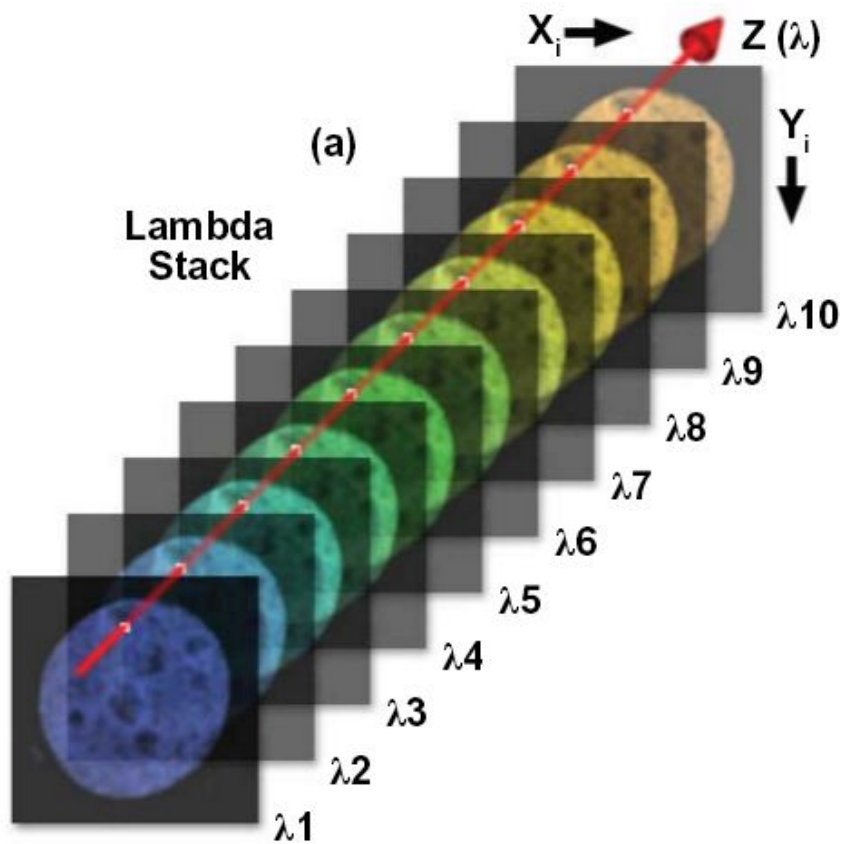
# Спектральный куб



Запись спектров широко используется в материаловедении. Она также может быть использована в микроскопии. В отличие от обычной записи изображения, здесь образуется «трехмерная» стопка изображений, где по третьей оси отложена длина волны. Поэтому спектральный «куб» может рассматриваться как стопка изображений, или как стопка интенсивностей при разных длинах волн для каждого пиксела.

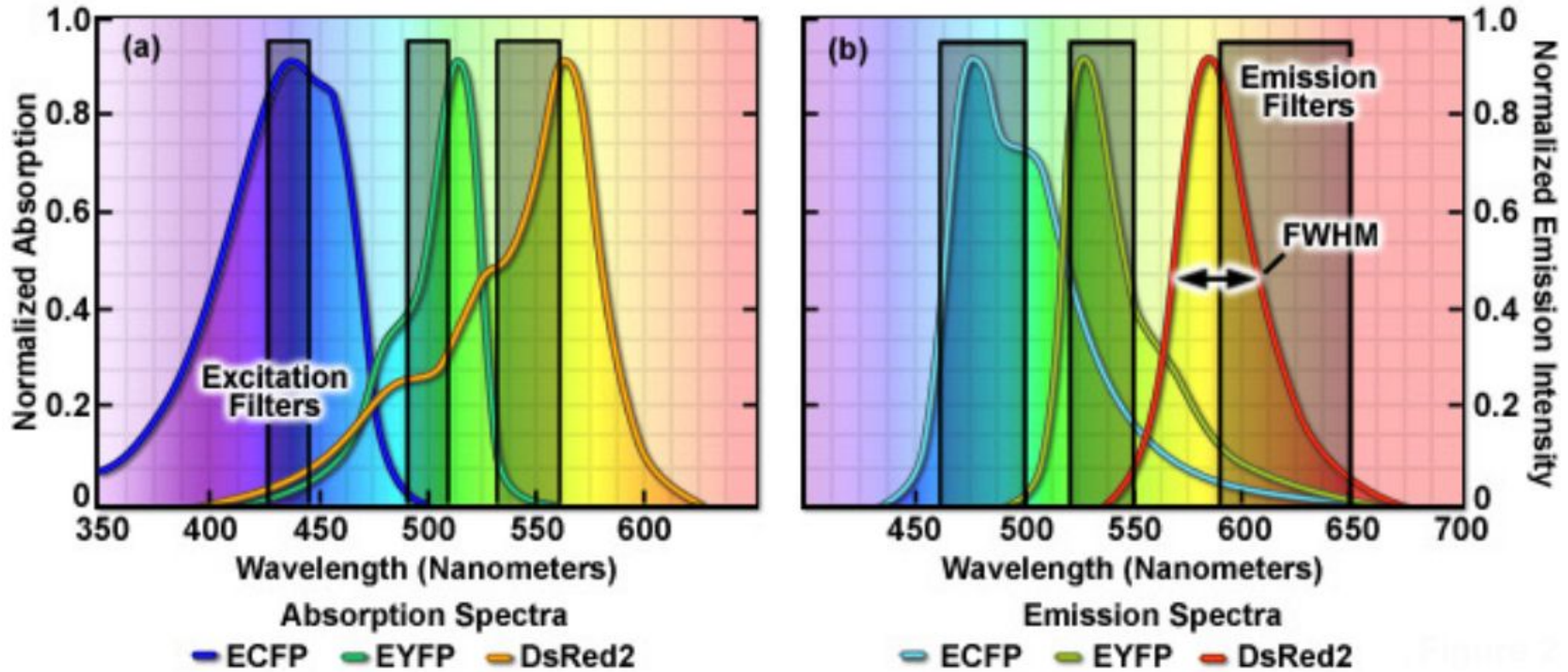


# Лямбда стек (Lambda stack)



Лямбда стек или спектральный куб – набор изображений, записанных при различных длинах волн. Он позволяет проследить за интенсивностью флуоресценции в каждом пикселе изображения в зависимости от длины волны.

# Спектры флуоресценции



Профили спектров эмиссии и возбуждения обычно несимметричны. Профиль эмиссии имеет более пологий склон в длинноволновой области. Ширина спектра на полувысоте (FWHM) составляет для органических красителей 20-50 нм, для флуоресцентных белков - 40-150 нм.



# Возможности спектрального детектора

Быстрая запись изображения в 32 каналах.

Возможность разделения перекрывающихся спектров (spectral unmixing). Разделение спектров проводится по базе данных.

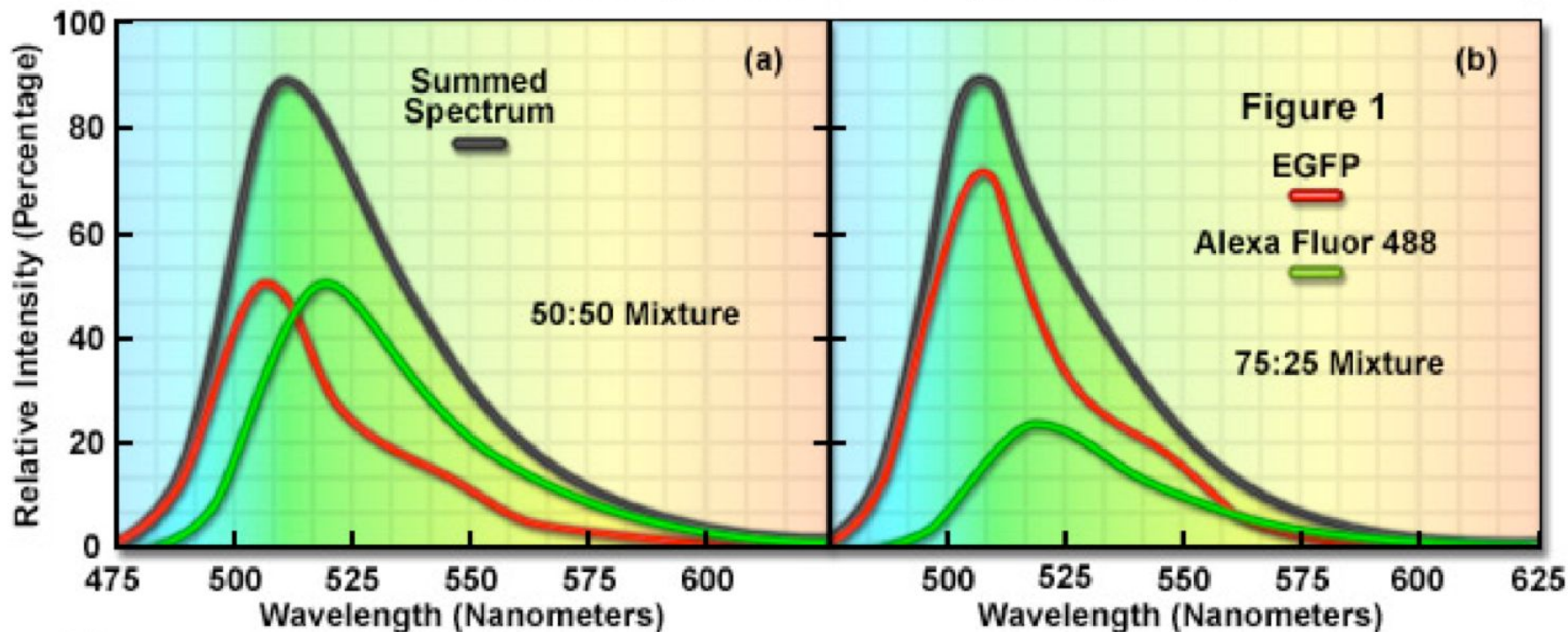
Регулировки спектрального детектора:

- изменение ширины канала (2, 5 или 10 нм) – достигается заменой дифракционной решетки
- сдвиг всей рамки (500-820 нм) – производится поворотом решетки
- объединение изображений с нескольких каналов.



# Анализ спектров

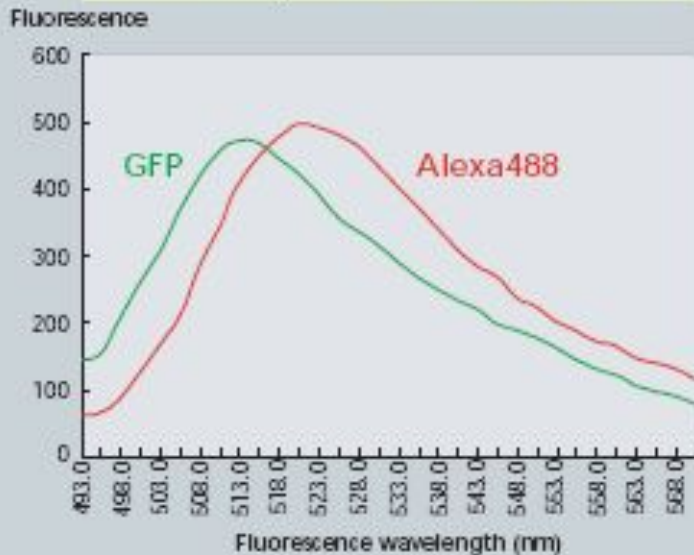
Additive Properties of Fluorophore Spectra



Спектры анализируются для каждой точки изображения и сравниваются со спектрами из библиотеки (записанной в программе).

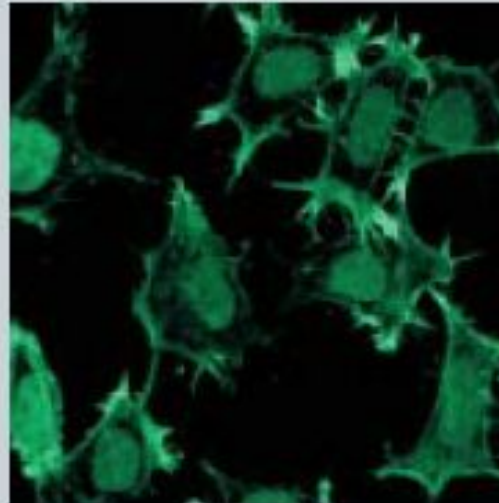
# Разделение спектров

Fluorescence spectra of GFP and Alexa 488



Separation of GFP and Alexa 488 spectra

GFP expressed in HeLa cell nuclei and actin stained with Alexa 488. Excitation wavelength 488 nm.



Combined 32 channel True Color image obtained with 2.5 nm wavelength resolution in 493-570.5 nm range

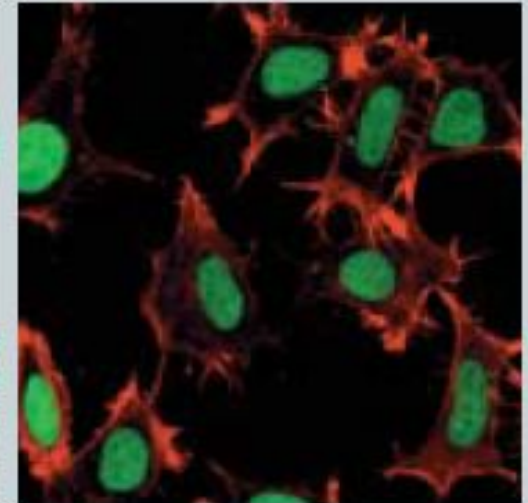


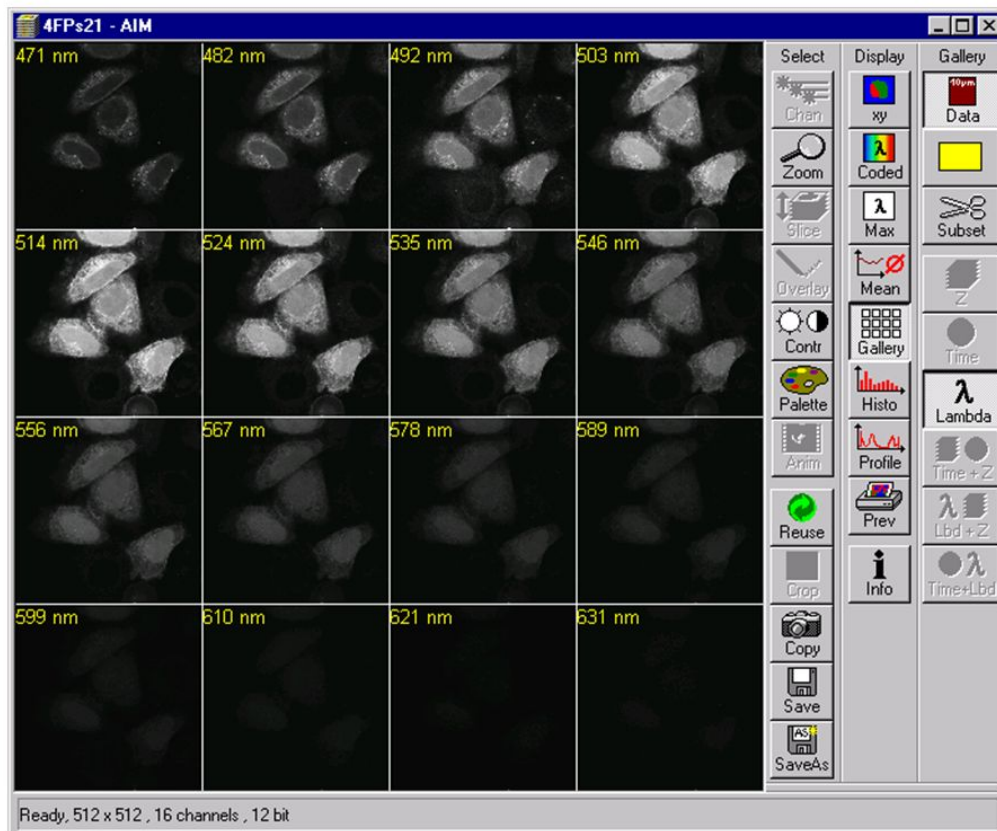
Image with separated spectra after using unmixing software

Можно разделить спектры, максимумы которых отстоят не менее, чем на 6-10 нм при условии, что красители пространственно разделены (хотя бы частично). Для разделения близких спектров необходимо использовать минимальную ширину щели детектора (2-2.5 нм).

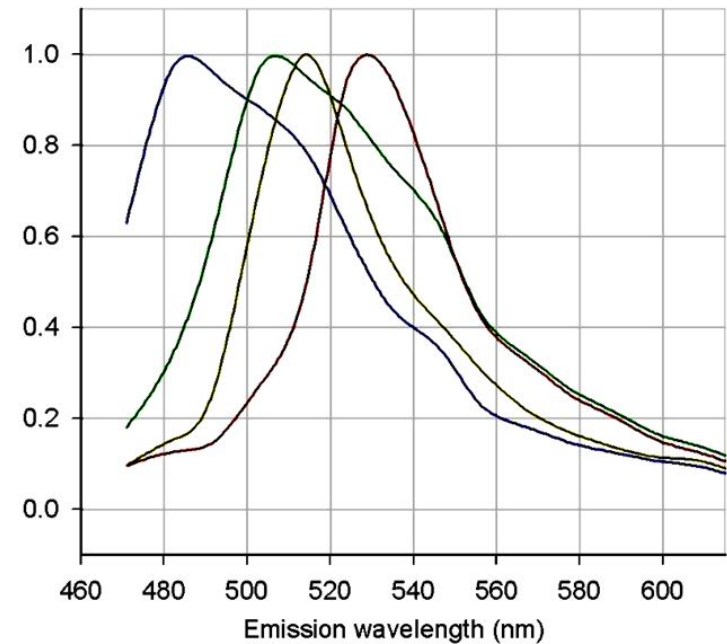
# Разделение спектров - стек

## CFP, CGFP, GFP and YFP

Cultured cells expressing 4 FPs in ER, nuclei, plasma membranes and mitochondria, respectively



rel. Intensity



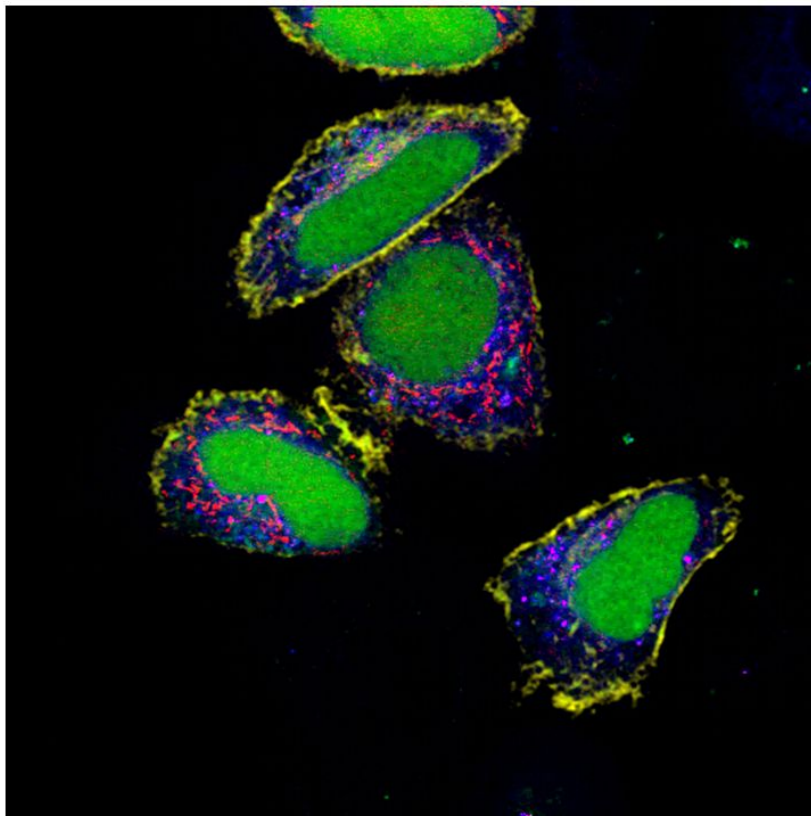
CFP : — CGFP : — GFP : — YFP : —

Sample: Drs. Miyawaki, Hirano, RIKEN, Wako, Japan

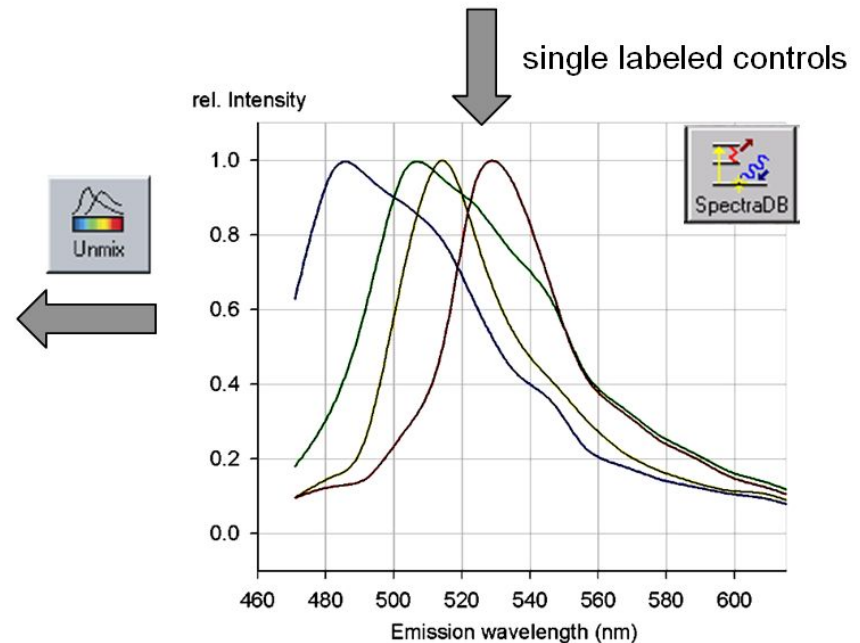
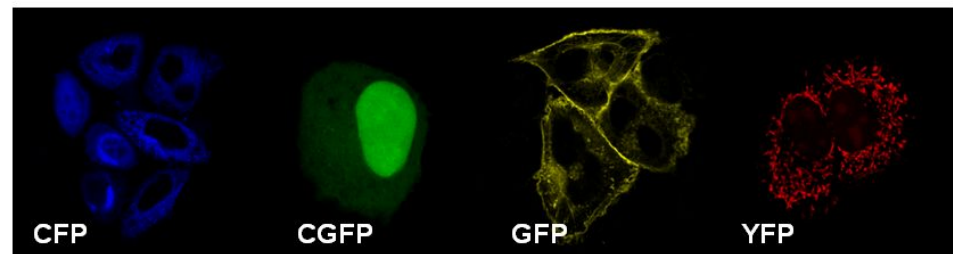
# Разделение спектров - результат

## CFP, CGFP, GFP and YFP

Cultured cells expressing 4 FPs in ER, nuclei, plasma membranes and mitochondria, respectively

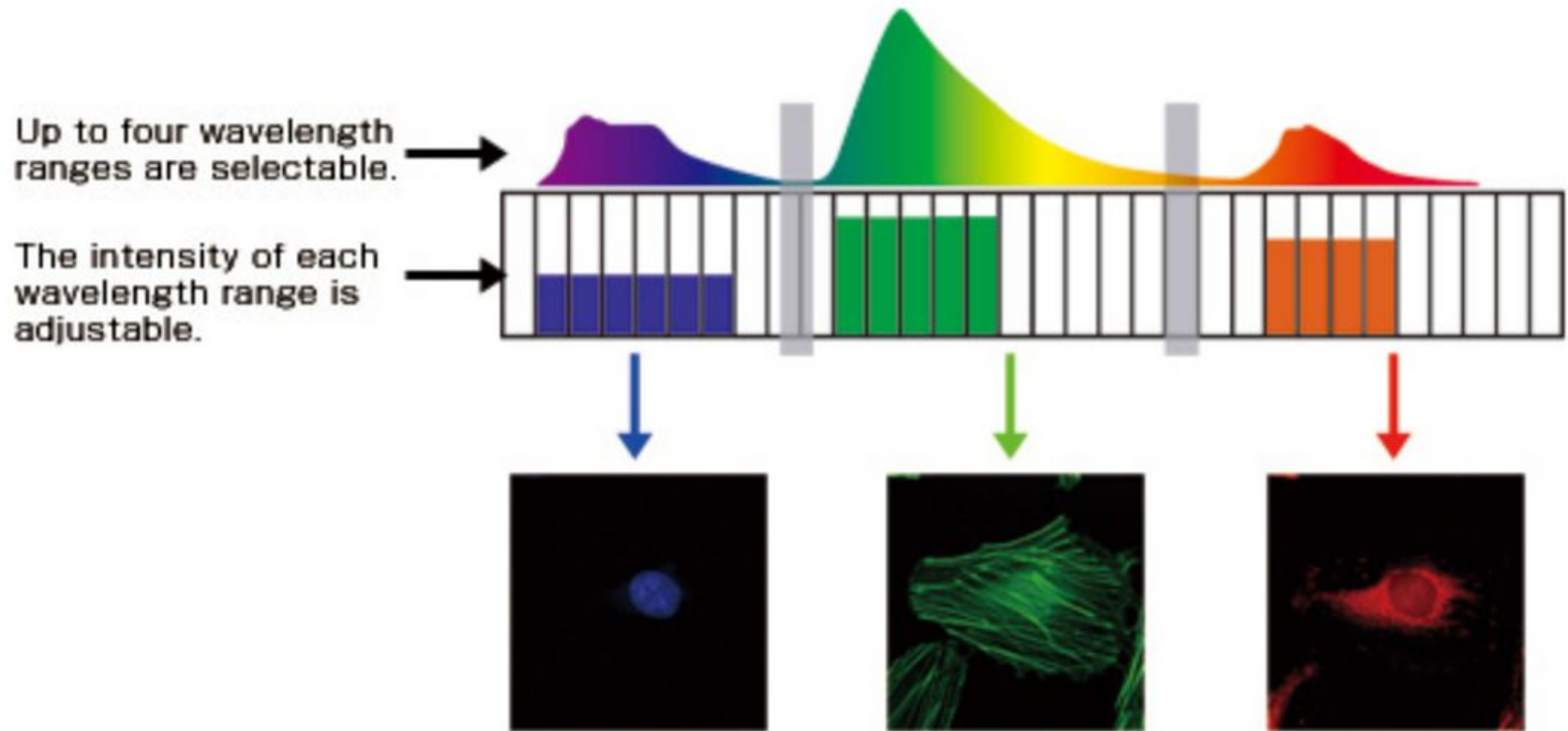


Sample: Drs. Miyawaki, Hirano, RIKEN, Wako, Japan





# Виртуальный фильтр на базе 32-канального детектора

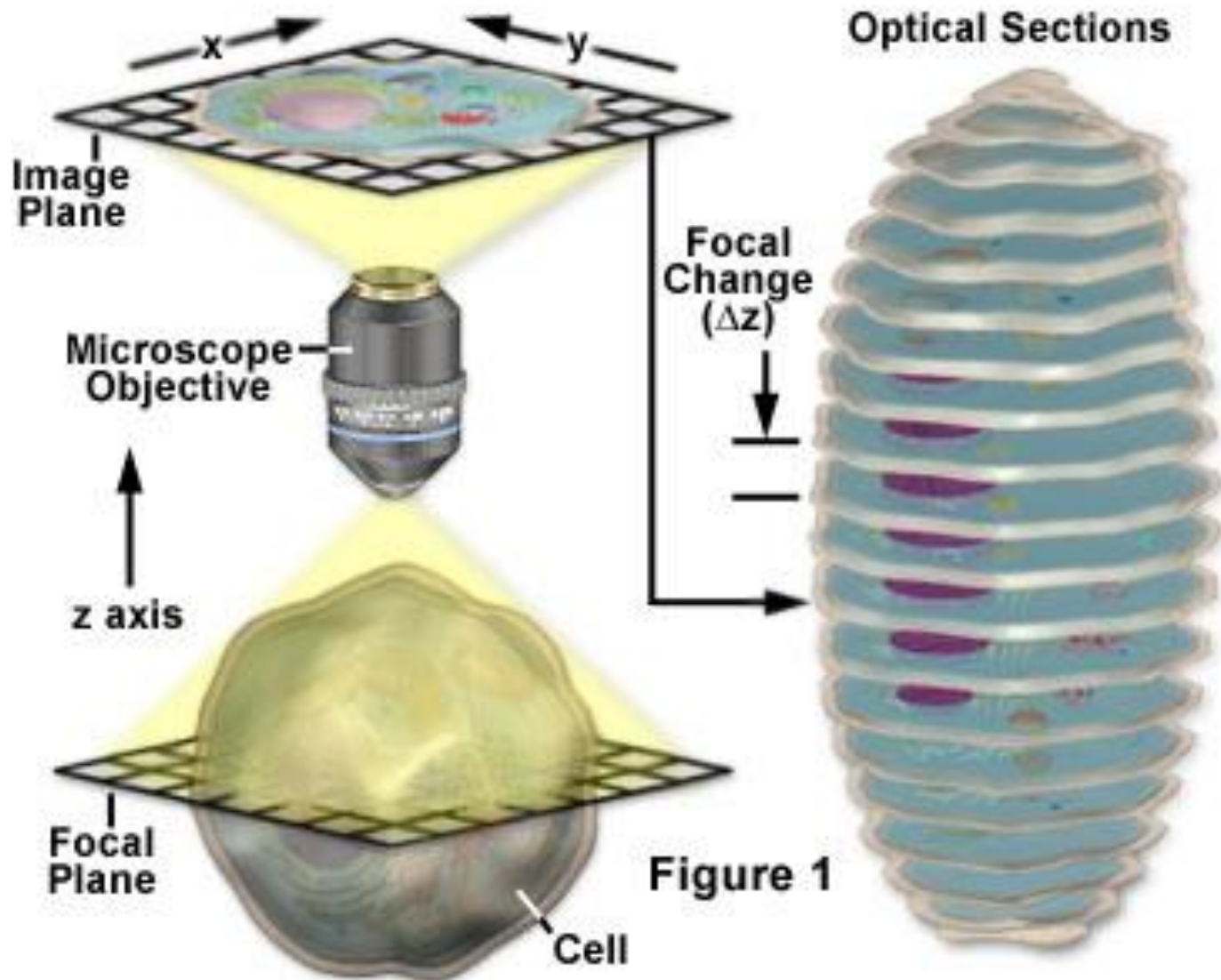


Выбирая каналы на детекторе, можно получить до четырех различных флуоресцентных сигналов. Чувствительность регулируется числом каналов, сигналы от которых можно объединять по выбору.

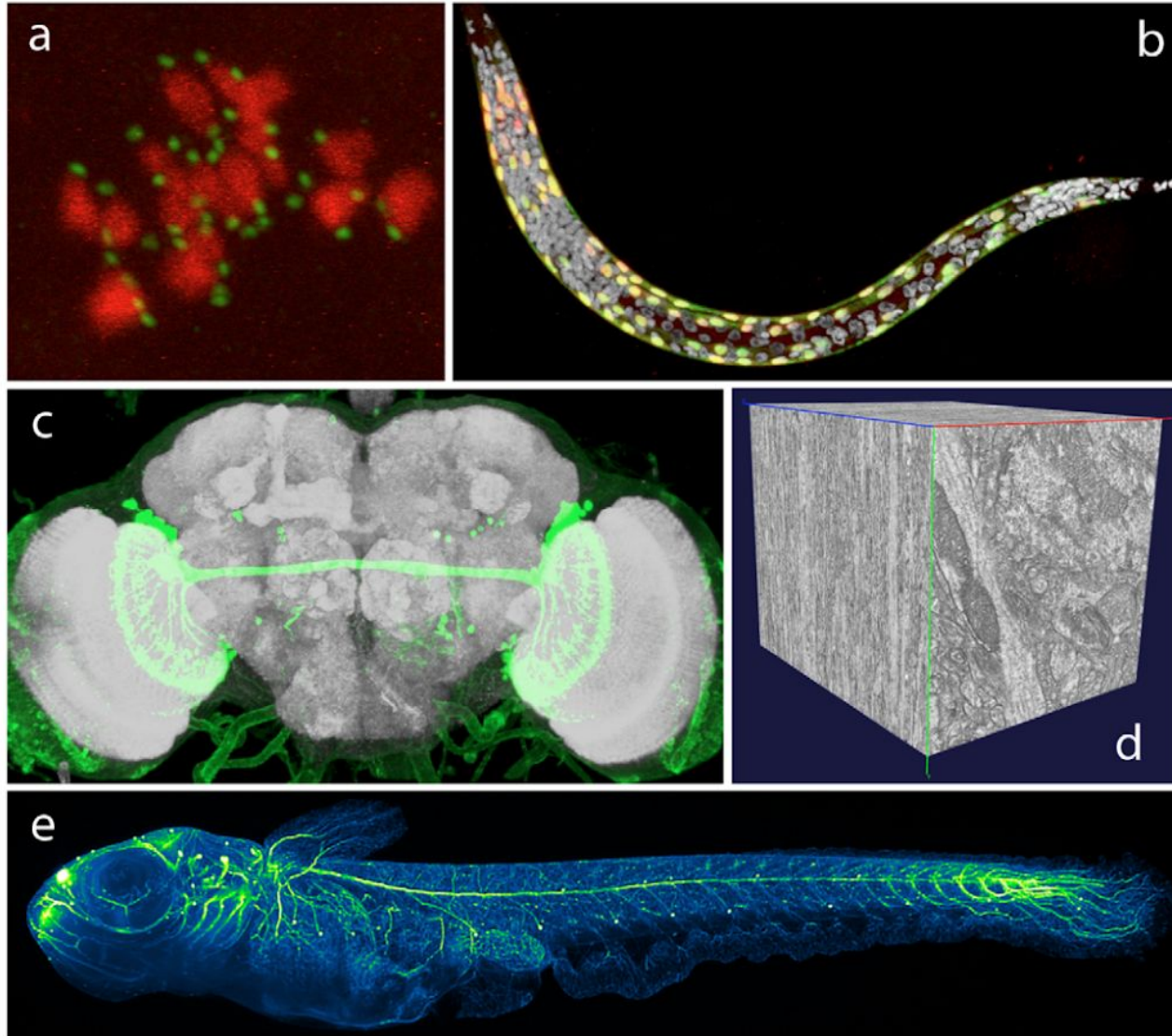
# Трехмерная широкопольная микроскопия:

появление аберраций;  
ФРТ и отношение сигнал/шум

# Принцип трехмерной микроскопии



# Примеры трехмерных изображений



а) Кинетохоры и хромосомы в мейозе ооцита

б) Первая личиночная стадия *C.elegans* (DAPI/миобласты)

с) мозг взрослой дрозофилы

е) развитие головного и спинного мозга рыбы (ацетилированный тубулин, микроскопия с плоским

# Параметры съемки стека в микроскопии

Для полноценной реконструкции объекта необходимо получение оптических срезов с частотой, по крайней мере вдвое превышающей разрешение микроскопа по оси z.

Учитывая, что изображение придется обрабатывать, плотность съемки должна быть еще выше.

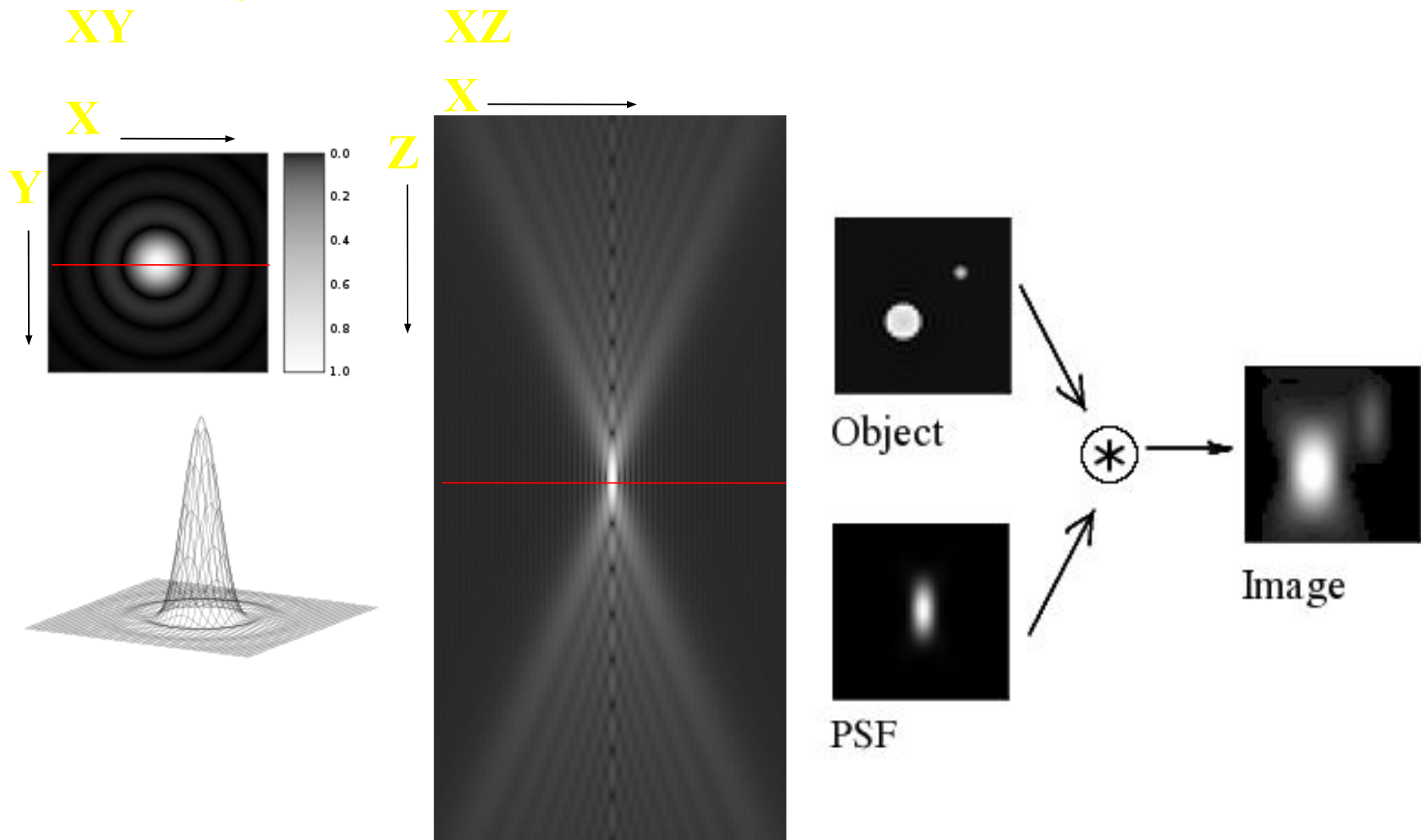
Для иммерсионных объективов ( $NA=1.4$ ) рекомендуемый сдвиг для получения серии оптических срезов составляет около 0,3 мкм.

# Параметры съемки трехмерного стека

Параметры съемки (объектив)			Рекомендуемое расстояние по оси Z (μм)		
Увел.	Ч.А.	Показатель преломления	DAPI (синий)	FITC (зеленый)	Rhodamine (оранжевый)
10	0.3	1.0 (воздух)	4,650	5,900	6,750
20	0.5	1.0 (воздух)	1,650	2,100	2,400
40	0.75	1.0 (воздух)	0,700	0,950	1,050
40	1.3	1.51 (масло)	0,350	0,450	0,500
40	1.2	1.33 (H <sub>2</sub> O)	0,350	0,450	0,550
63	1.4	1.51 (масло)	0,300	0,400	0,450
63	1.2	1.33 (H <sub>2</sub> O)	0,350	0,450	0,550
100	1.4	1.51 (масло)	0,300	0,400	0,450

Расстояния между оптическими срезами зависят от длины волны – ориентироваться надо на минимальное значение

# Формирование изображения во флуоресцентной микроскопии



# Расчёт идеальной ФРТ

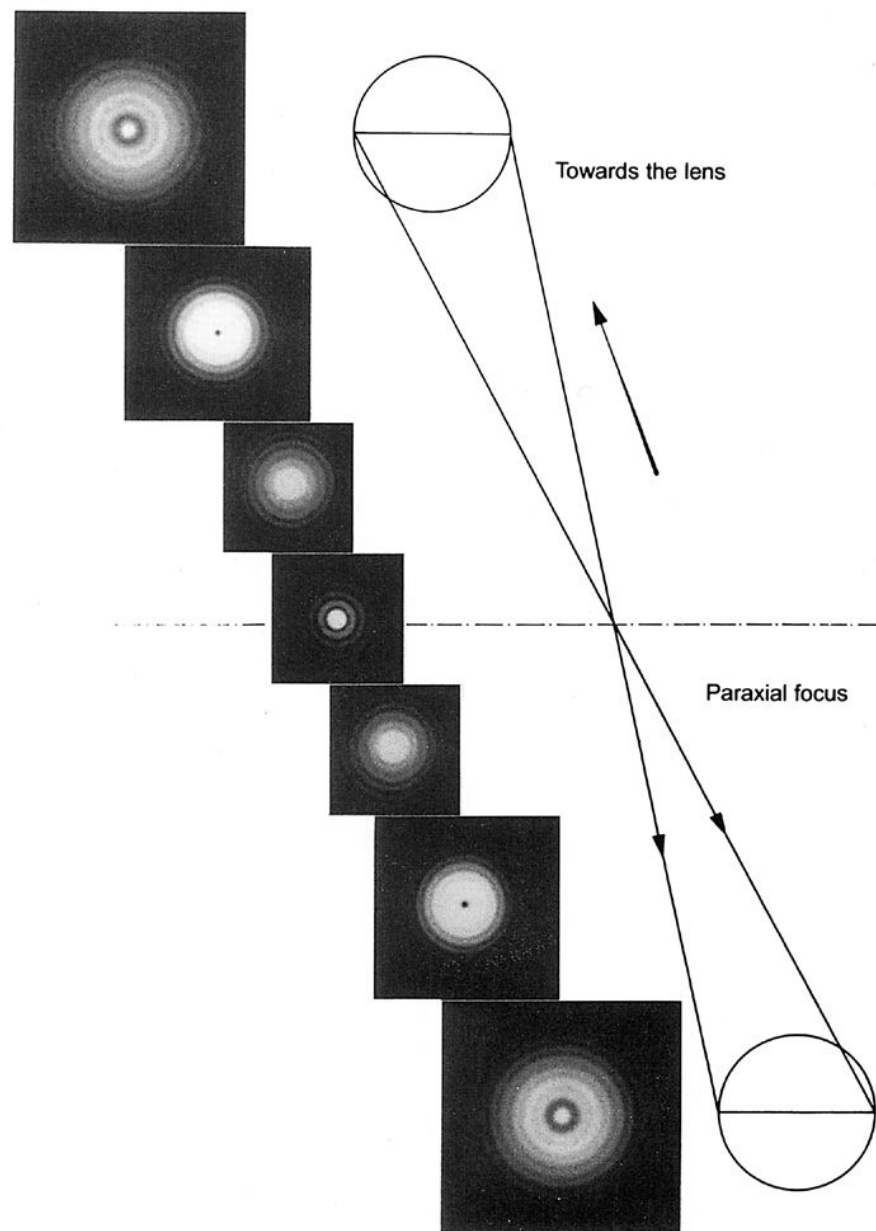
Аргументы (простейший случай, 1950е годы):

- Апертура объектива
- Увеличение объектива
- Длина волны света флуоресценции объекта

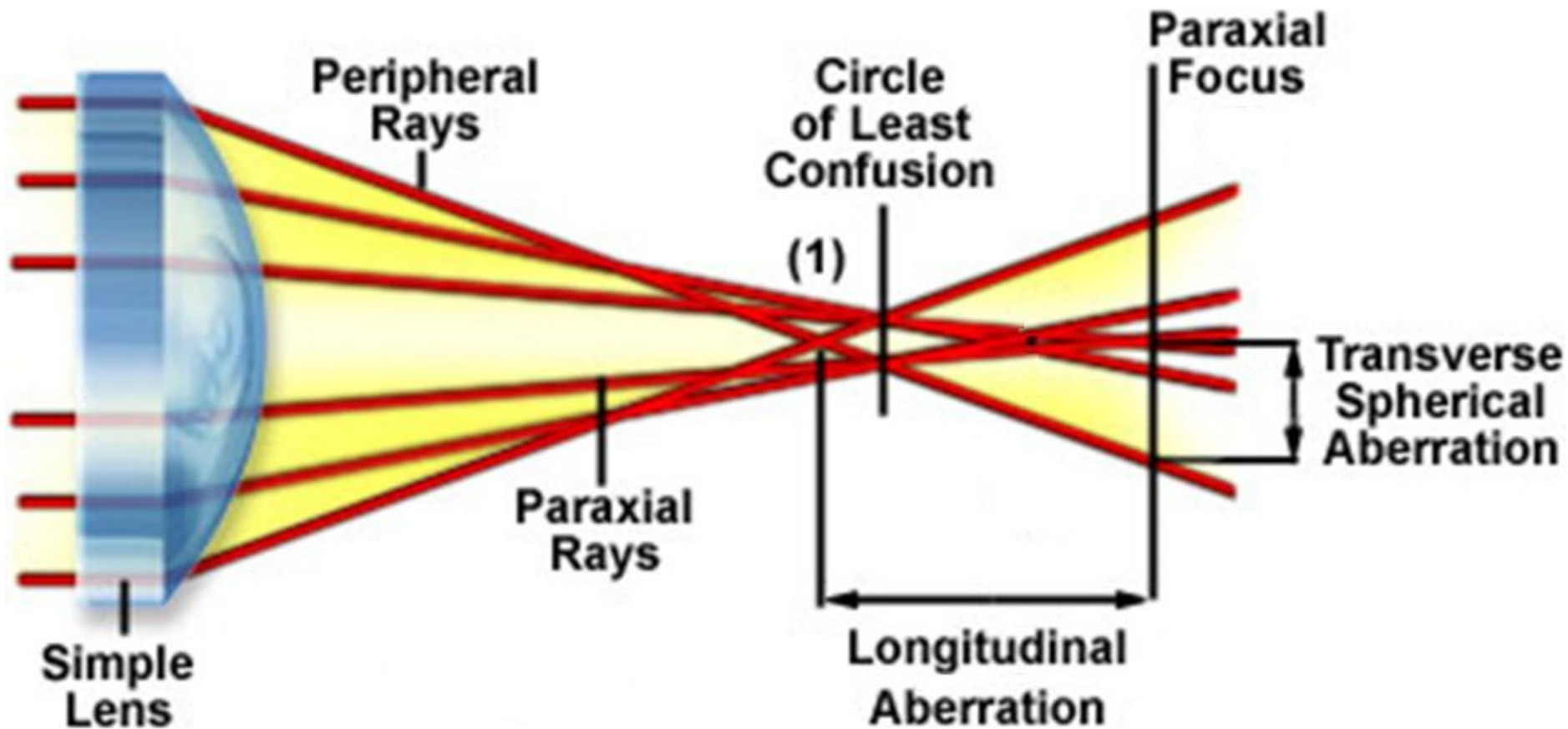
Дополнительно учитывается лучепреломление объектива и препарата



**Объемное  
изображение точки  
(функция  
рассеяния точки –  
PSF)  
в идеальной  
оптической  
системе**



# Сферические aberrации



Кружок нерезкости, возникающий в результате сферических aberrаций, всегда больше, чем диск Эри.

Поперечная и продольная aberrации связаны примерным соотношением  $TA = R/2f_* LA$

# Возникновение сферических аберраций в микроскопии

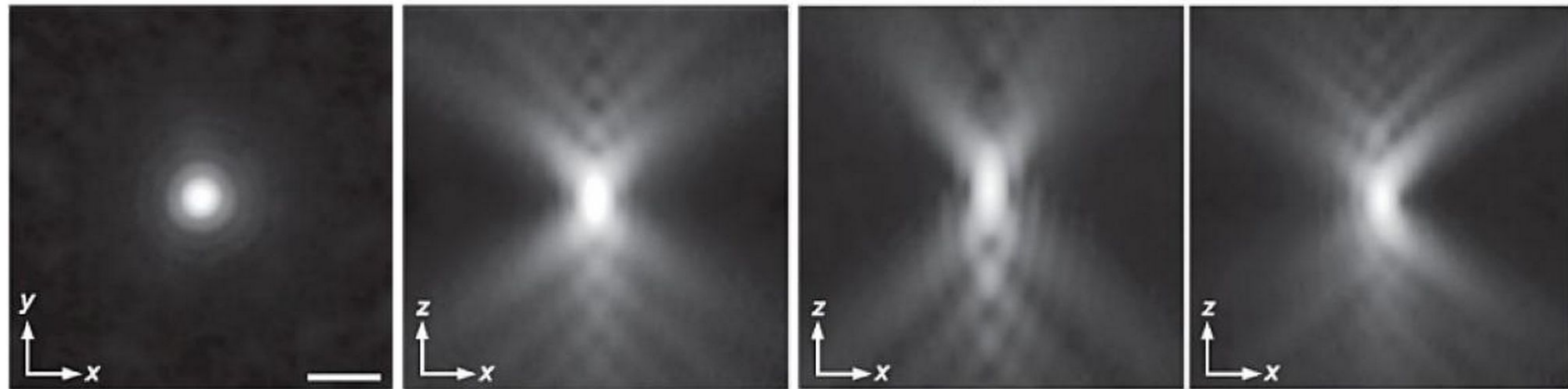
Все микроскопические объективы рассчитываются на создание безаберрационного изображения только для одной оптической плоскости (где соблюдается условие синусов Аббе).

При отклонении положения оптического среза от данной плоскости возникают сферические и хроматические аберрации. Они возрастают по мере того, как увеличивается это отклонение.

Решение данной проблемы (устранение аберраций) возможно численными методами, но только для некоторых изображений, или с использованием адаптивной оптики.

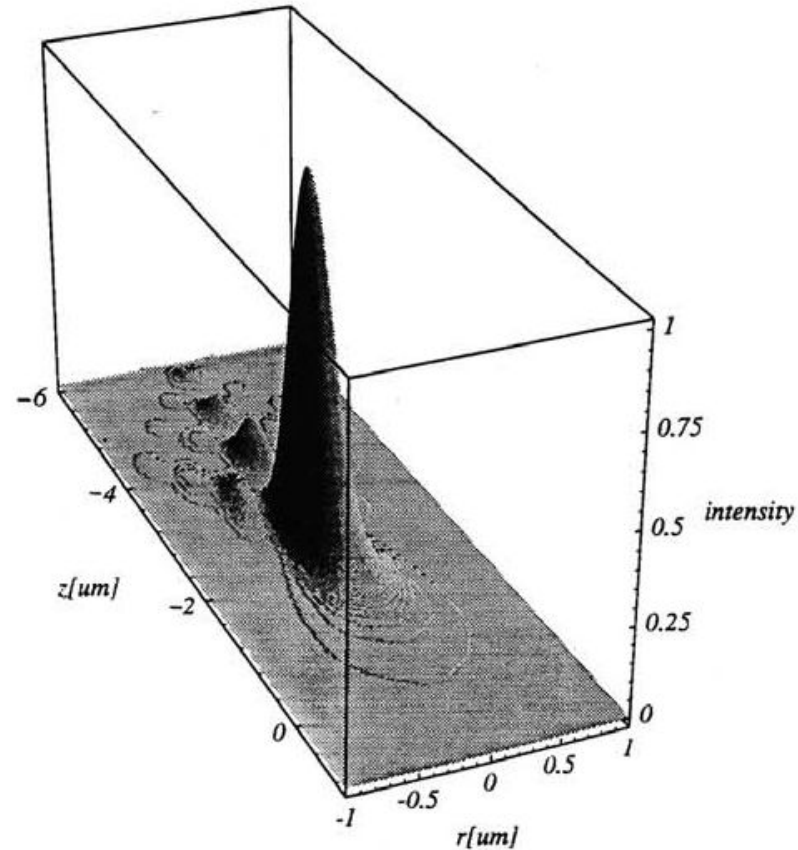
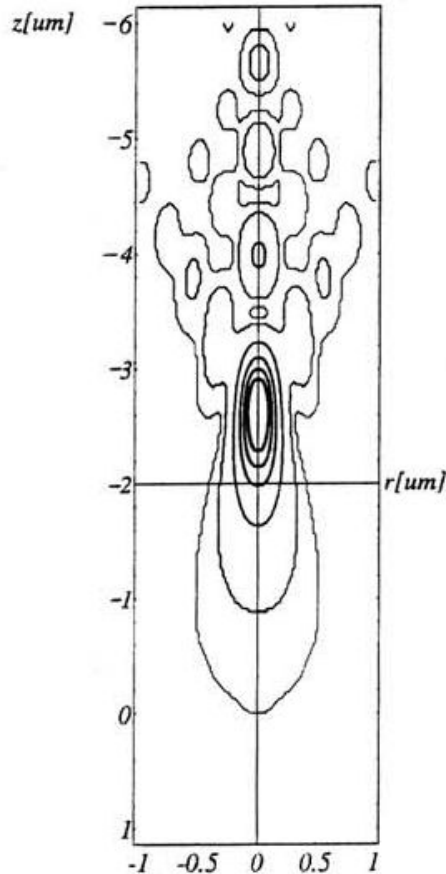
Последнее направление получает постепенно развитие в микроскопии, но пока не вышло за стадию экспериментов.

# ФРТ при наличии aberrаций



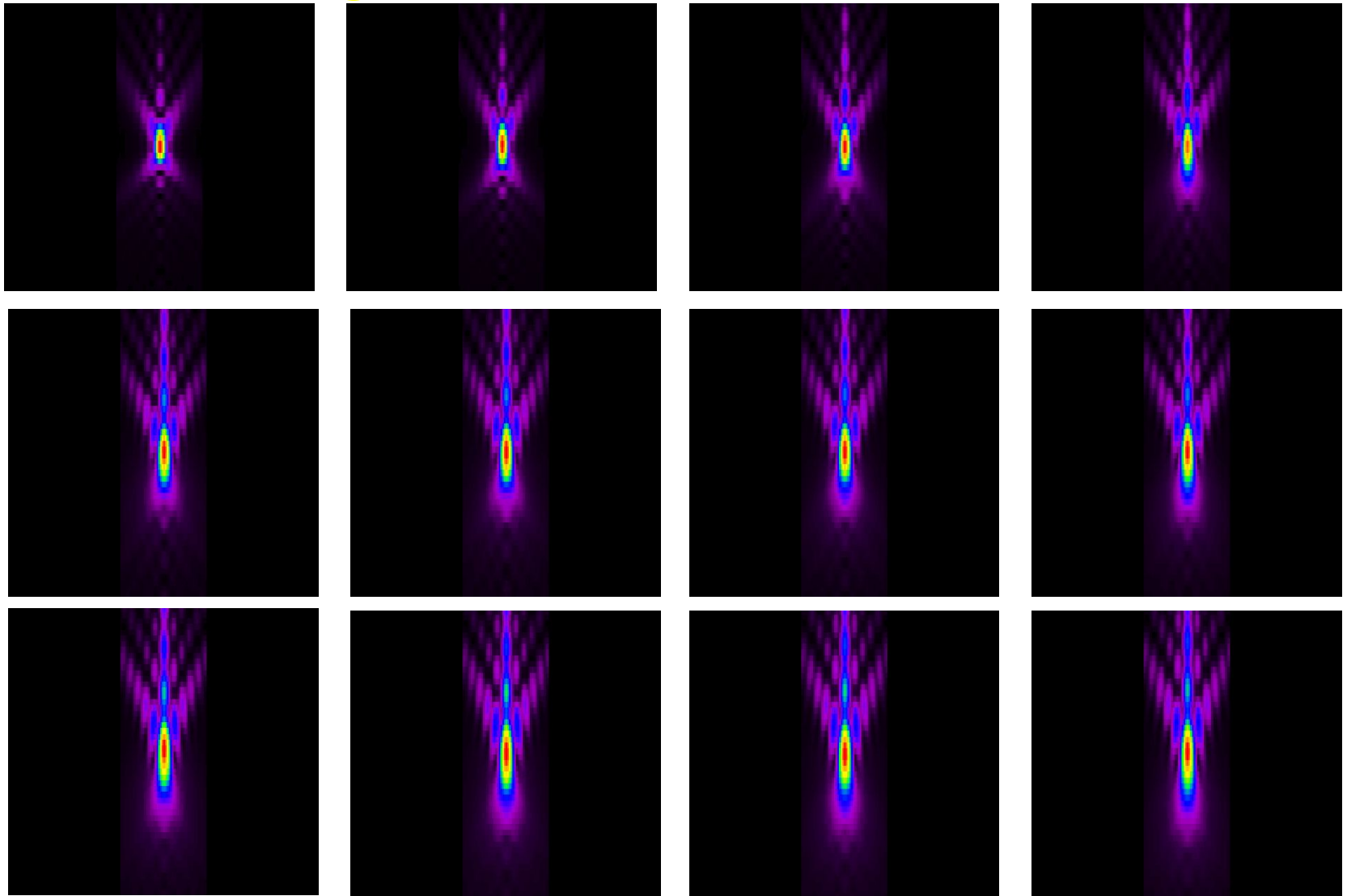
Слева – нормальная ФРТ. Справа – ФРТ при наличии сферической aberrации (асимметрична по оси  $z$ ) и комы (асимметрична в плоскости  $x$ - $y$ ).

# Искажение ФРТ при несоответствии показателей преломления



При использовании иммерсионного объектива ( $NA=1.3$ ) и зеленого света (514 nm) изображение по оси  $z$  по мере углубления в воду постепенно «сжимается», и контраст падает.

# Изменение ФРТ при погружении в препарат

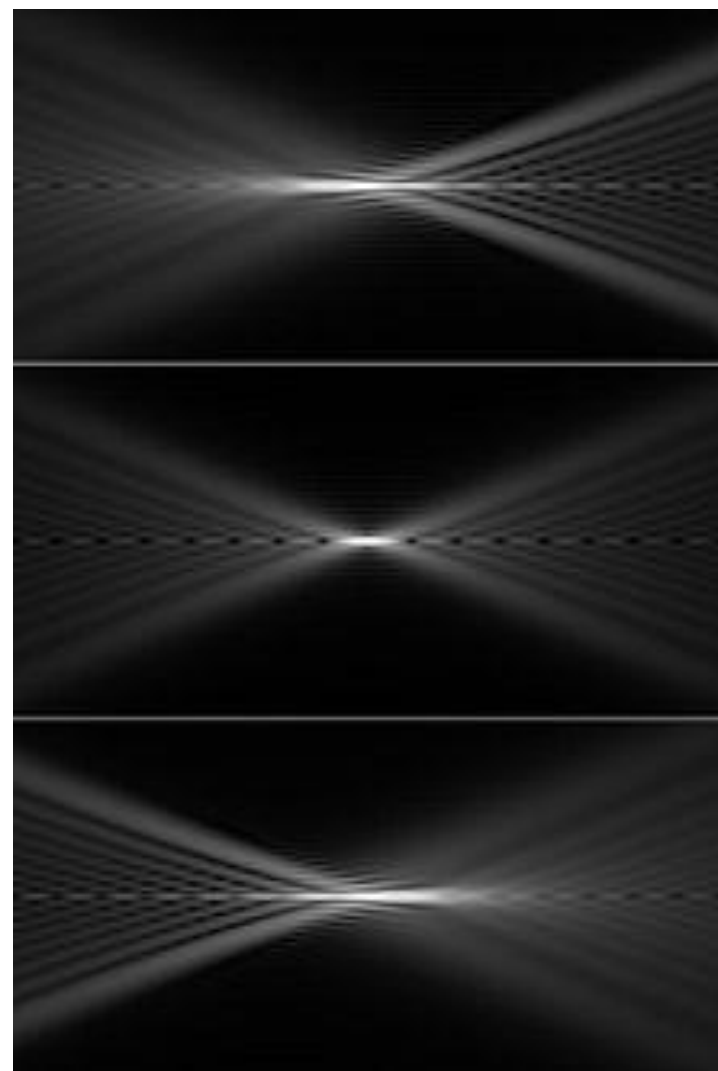
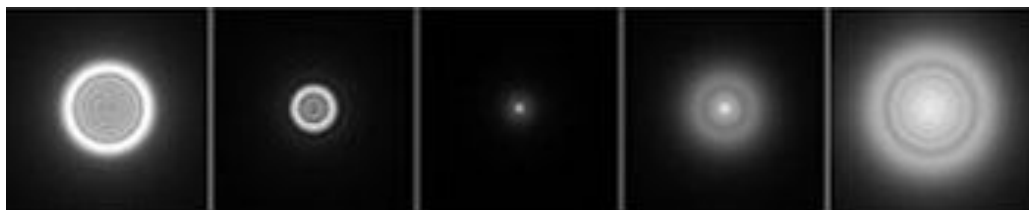
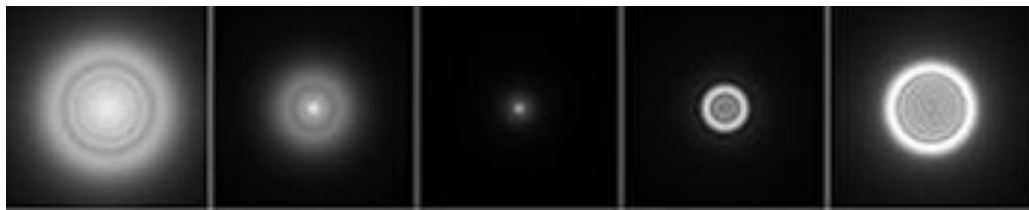




# Сферическая абберрация в трехмерной микроскопии

Отрицательная сферическая абберрация - наиболее частый практический случай. Встречается при съёмке препаратов с низким показателем преломления заливочной среды (вода, глицерин или Moviol) при использовании объектива с масляной иммерсией. Величина отрицательной сферической абберрации возрастает по мере «углубления» оптического среза в препарат.

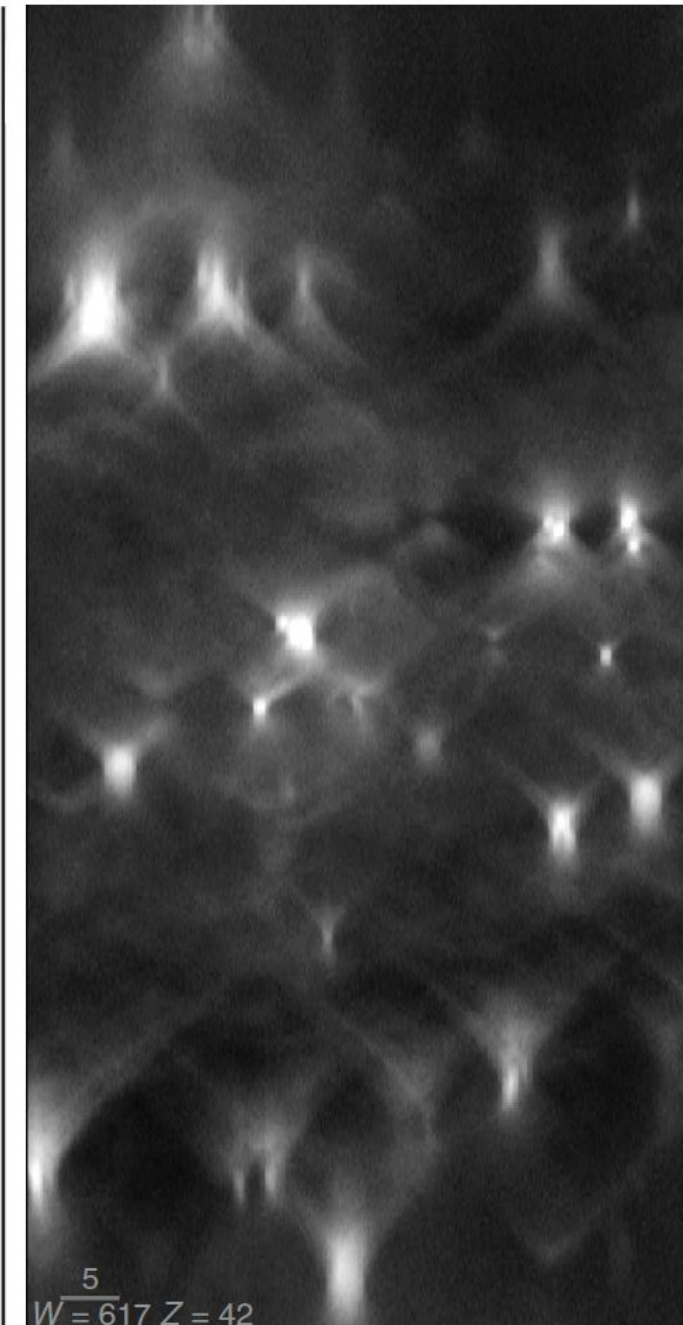
Положительная сферическая абберрация встречается реже: при съёмке препаратов, заключённых в канадский бальзам с помощью сухих объективов или объектива с глицериновой иммерсией. Вторым вариантом – при совпадении показателей преломления иммерсии и заливочной среды, когда сам объект, имеет высокий показатель преломления (свыше 1,55).



На фотографиях представлены сверху вниз: отрицательная сферическая aberrация, отсутствие сферической aberrации и положительная aberrация. Левая панель: оптические срезы снизу вверх по оптической оси (слева – недофокус, справа – перефокус). Правая панель: XZ-проекции соответствующих случаев, объектив располагается слева. Для появления сферической aberrации достаточно несовпадения индексов лучепреломления иммерсии объектива и препарата в 0,06.

Slide

150  $\mu\text{m}$



**Положительная  
сферическая  
абберация**

Range of minimal  
spherical aberration

**Отрицательная  
сферическая  
абберация**

Cover glass

# Причины возникновения сферической аберрации

Наименьшая сферическая аберрация наблюдается при использовании линзы объектива с большим радиусом, высоким (1,55-1,60) лучепреломлением, и рекомендованных производителем объектива покровных стёкол и иммерсии.

У препарата, имеющего минимальную сферическую аберрацию, индексы лучепреломления среды и изучаемого объекта совпадают с таковым у иммерсионного масла, а область, представляющая интерес, непосредственно прилегает к покровному стеклу.

Понятно, что все эти требования невозможно соблюсти в случае трёхмерной микроскопии живых клеток с помощью масляно-иммерсионных объективов: показатель преломления культуральных сред составляет 1,34-1,35, самих животных клеток - 1,36-1,43, а толщина объекта – не менее нескольких микрон.

# Факторы, влияющие на сферические аберрации

- Лучепреломление линз объектива,
- Радиус поверхности фронтальной линзы объектива,
- Лучепреломление иммерсионной жидкости,
- Толщина покровного стекла над препаратом,
- Лучепреломление среды препарата (в т.ч. заливочной),
- Лучепреломление собственно препарата,
- Расстояние от покровного стекла до точки фокуса. Большинство объективов сконструированы так, чтобы давать наилучшее изображение непосредственно под покровным стеклом, но эту точку можно изменить с помощью подбора иммерсионного масла или коррекционной оправы объектива.

---

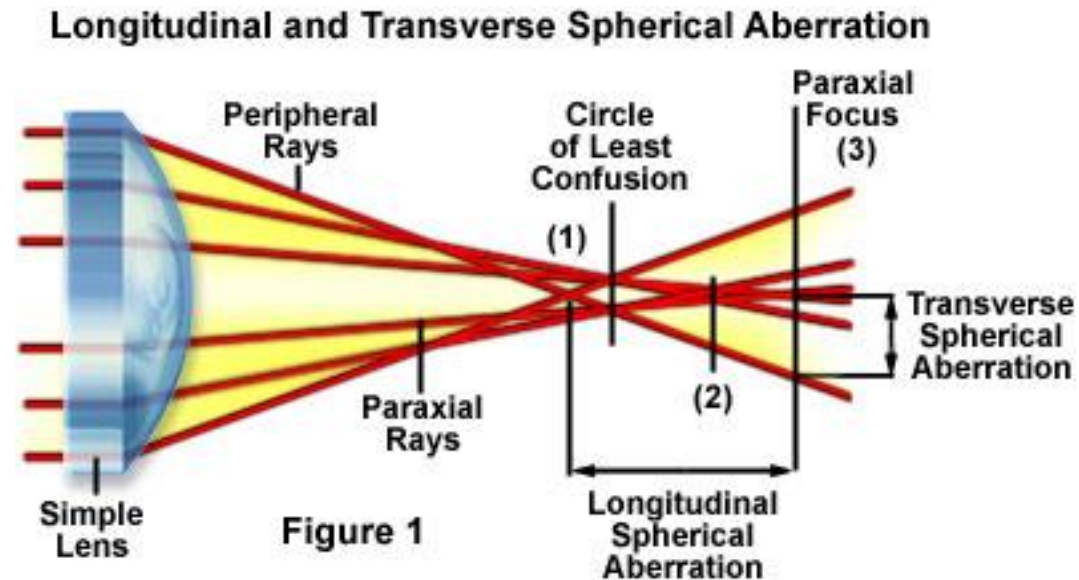
В зависимости от сочетаний этих параметров сферическая аберрация может становится положительной либо отрицательной.

# Методы минимизации сферической аберрации

Аппаратные:

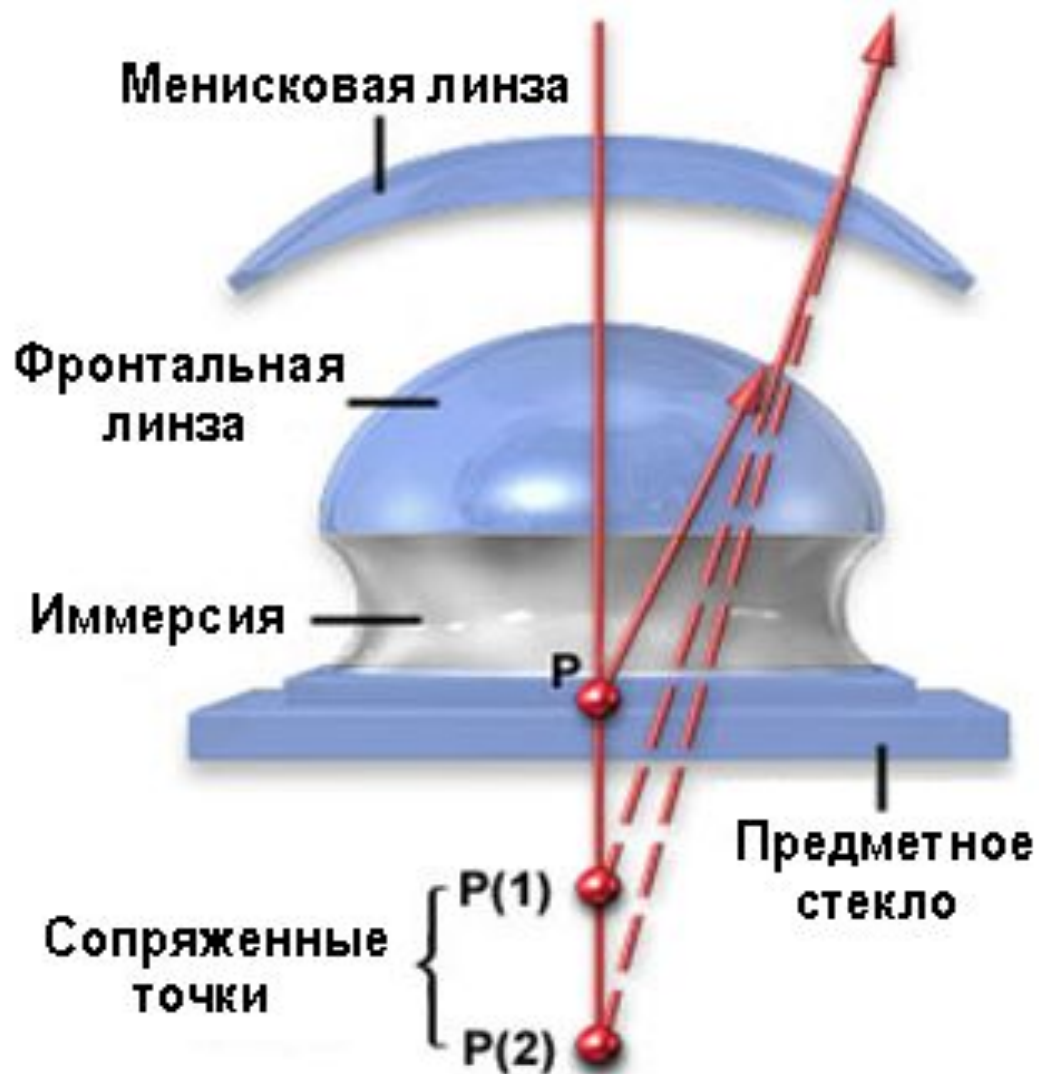
- Диафрагмирование
- «Дефокусировка»
- Использование вспомогательного телескопа
- Использование коррекционной оправы
- Использование адаптивной оптики

Программные -  
деконволюция





# Ход лучей в иммерсионном объективе



# Типы иммерсии

Водная –  $n=1,333$  ( $NA \leq 1,25$ ). Вместо воды может использоваться специальная вязкая жидкость с таким же показателем преломления.

Глицериновая –  $n=1,470$  ( $NA \leq 1,25$ ).

Гомогенная масляная –  $n=1,515 \pm 0,003$  ( $NA \leq 1,49$ ).

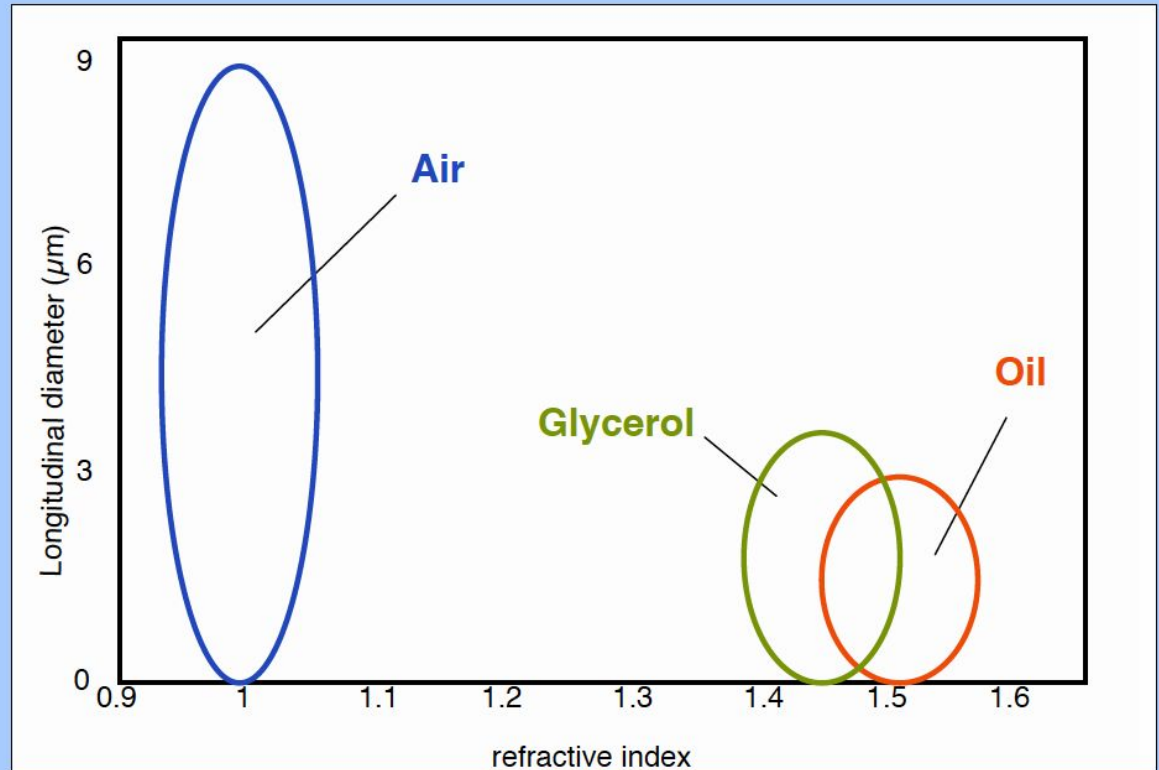
Образцы масляной иммерсии могут существенно отличаться по своей вязкости.

Современные объективы разных изготовителей рассчитаны на немного различные показатели преломления масляной иммерсии.

# Влияние показателя преломления на кажущуюся форму частицы

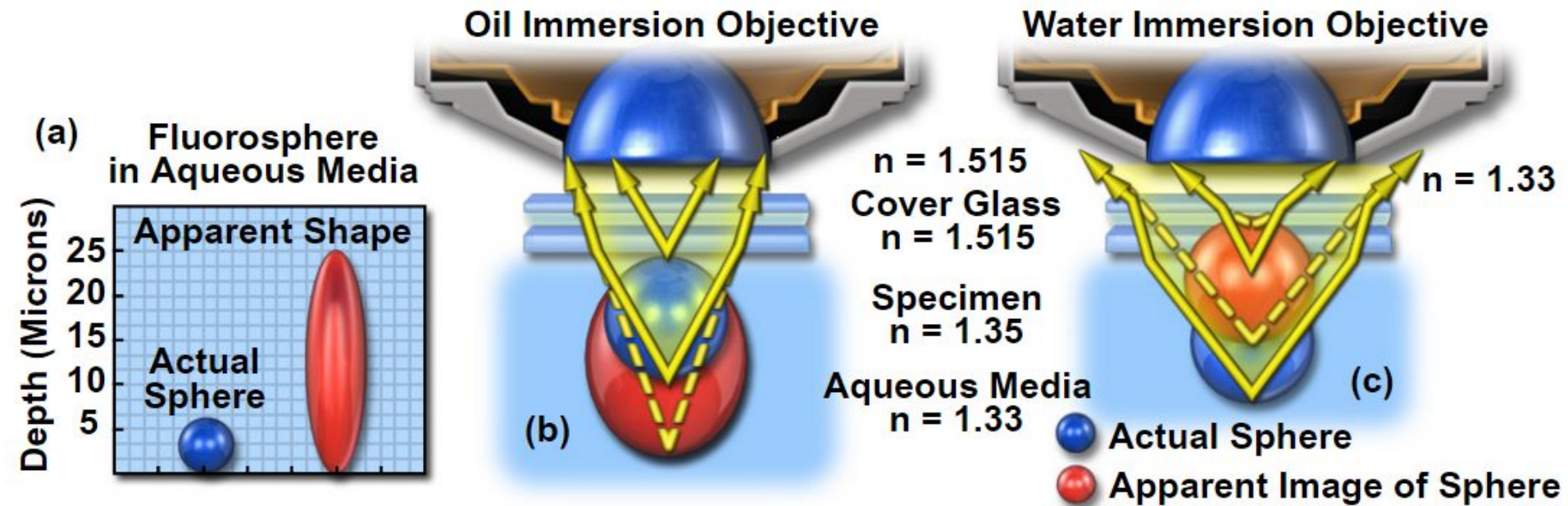


*Spherical aberration is one of the most commonly observed problems in confocal microscopy!*



Side view (xz plane) of the  $2.76 \mu\text{m}$  fluorescent microspheres embedded in different media with known refractive indices. The spheres immersed in oil appear to be more spherical than the others.

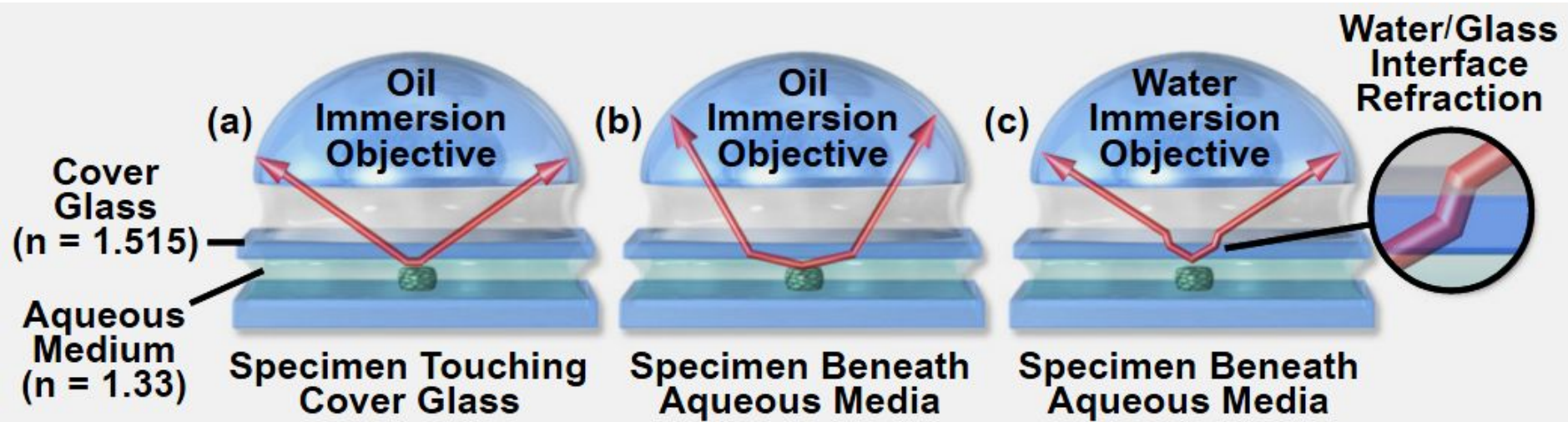
# Дисторсия изображения при использовании масляной иммерсии



Искажения, вносимые масляной иммерсией, становятся значительными при толщине водного слоя (наблюдаемого объекта) 15 мкм и более и приводят к продольной дисторсии (удлинению) объекта вдоль оси z. .

Объектив для водной иммерсии не дает дисторсии, но очень чувствителен к толщине покровного стекла и к его расположению.

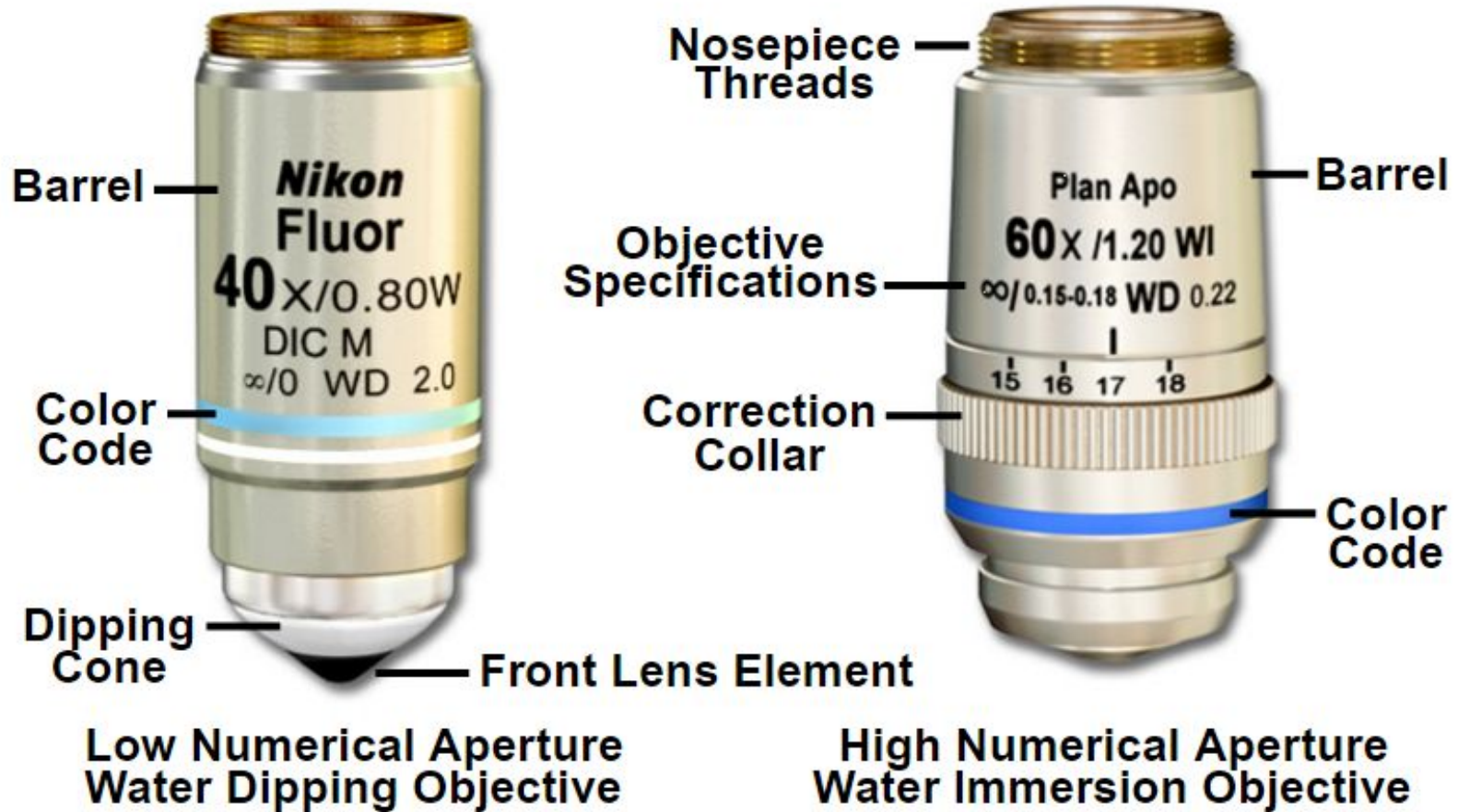
# Ход лучей в масляно иммерсионном и водно иммерсионном объективах



Когда объект располагается в толще препарата (b), лучи света испытывают несколько преломлений, и полностью апертура иммерсионного объектива не используется (из-за наличия явления полного внутреннего отражения на границах раздела фаз). При этом возрастает сферическая aberrация, и она дополнительно ограничивает разрешение микроскопа. Величина сферической aberrации растет пропорционально толщине водного слоя.



# Водноиммерсионные объективы

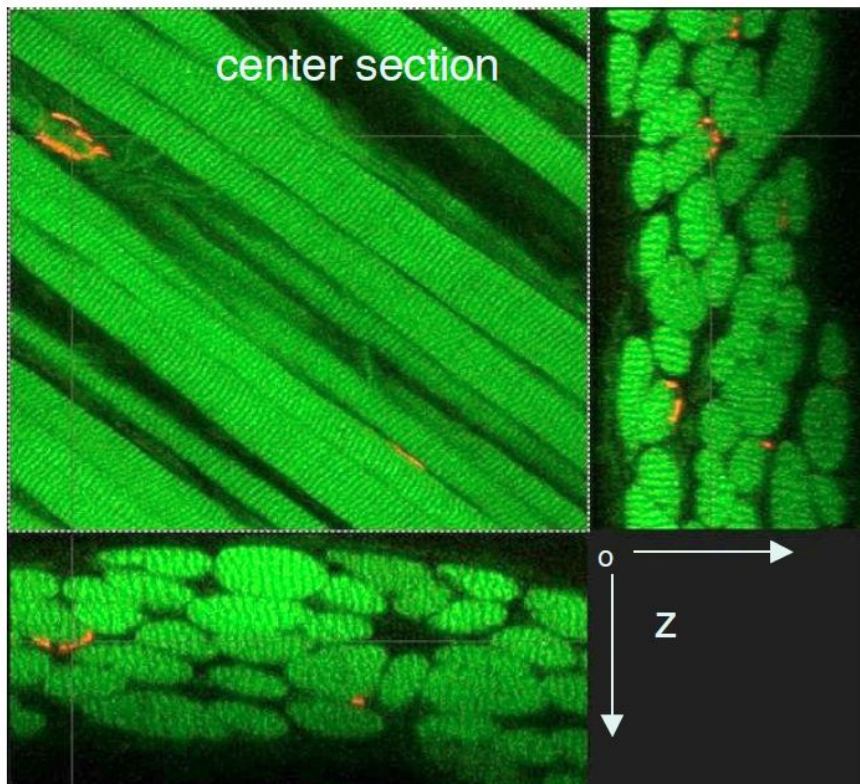


Высокоапертурный объектив (справа) имеет коррекционную оправу на толщину покровного стекла (150-180 мкм). Как планапохромат он имеет высокую степень коррекции хроматических aberrаций от фиолетового до красного света.



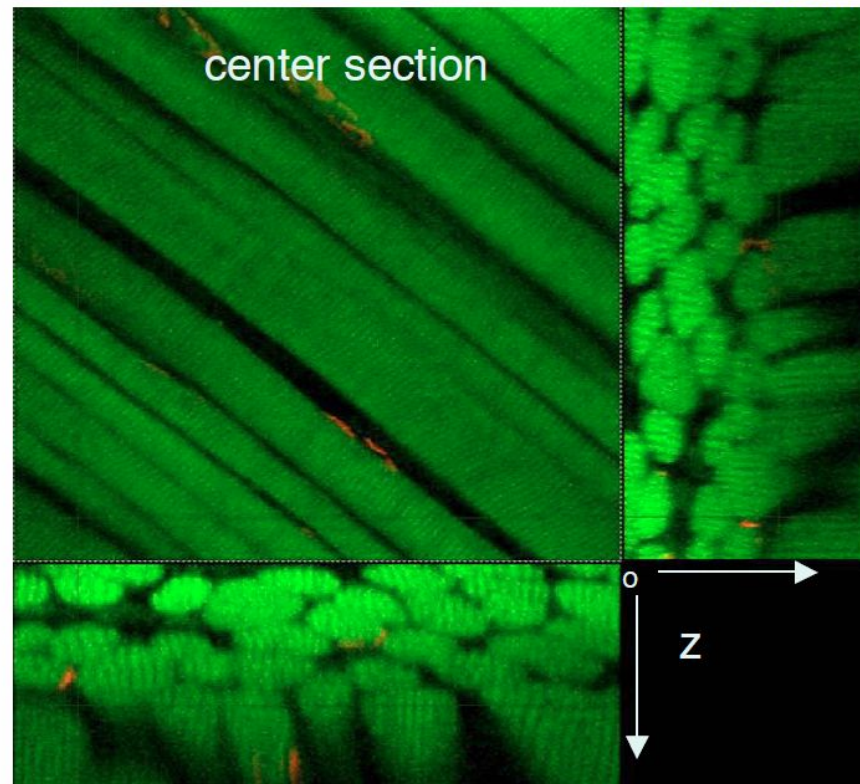
# Глицериновая иммерсия дает лучшие результаты в толстых срезах

match



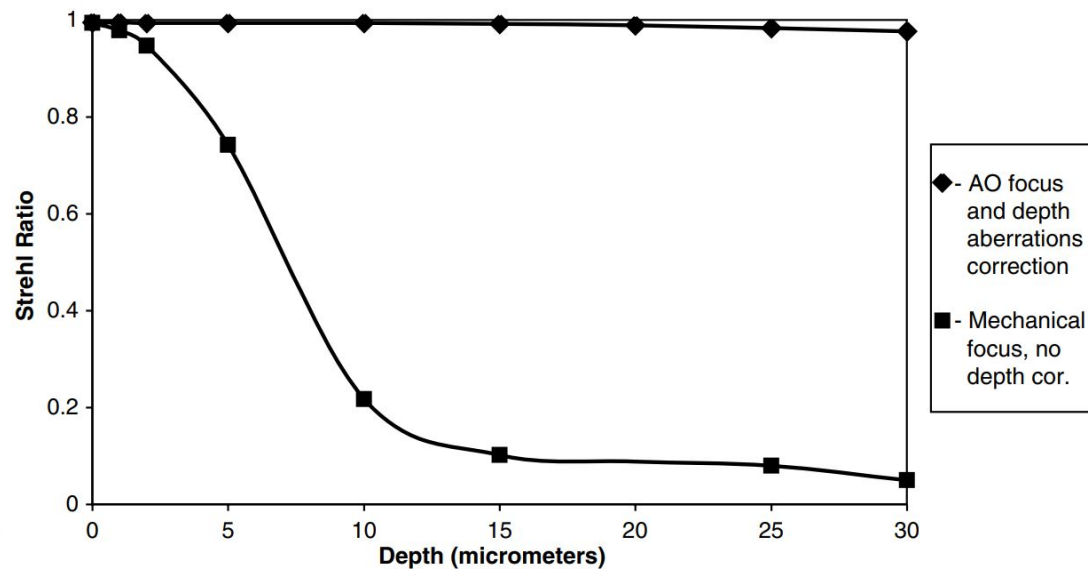
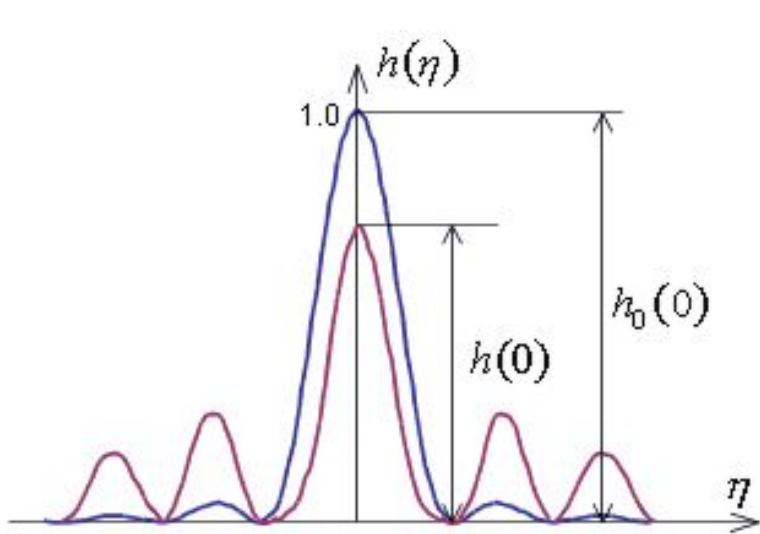
Glycerol Objective PL APO 63x1.3

mismatch



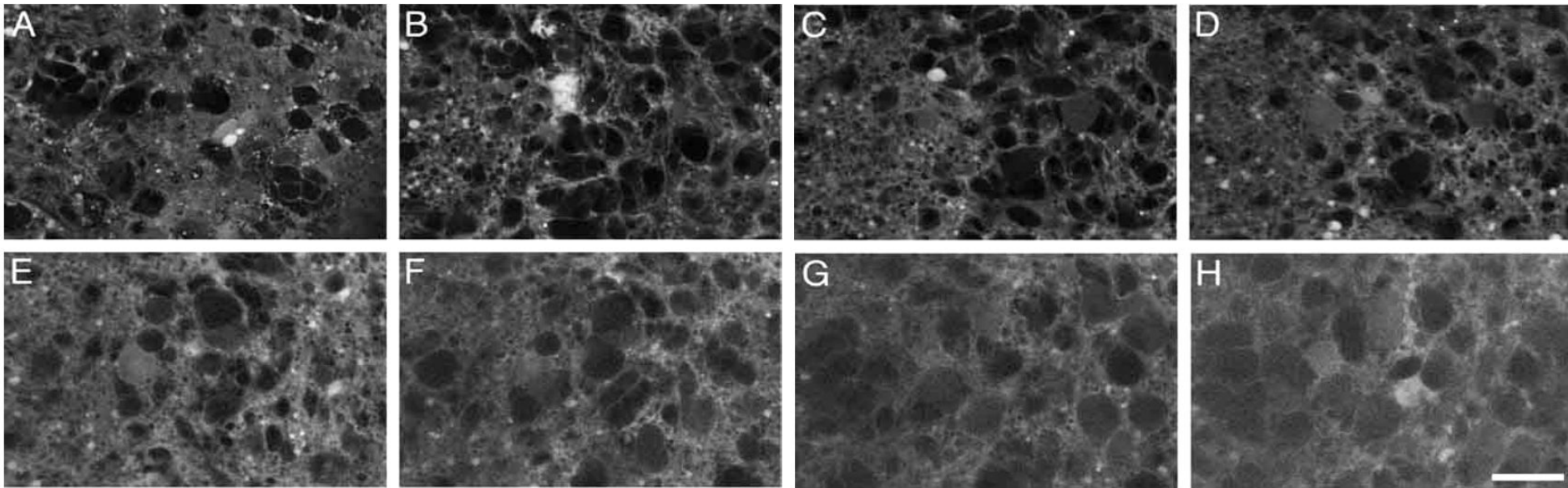
Oil Objective PL APO 63x1.32

# Ухудшение контраста изображения в препарате



При использовании масляно-иммерсионного объектива контраст изображения (число Штреля –  $S=h/h_0$ ) быстро снижается по мере удаления фокальной плоскости в препарате, заключенном в водную среду, от поверхности покровного стекла.

# Изменение контраста по глубине



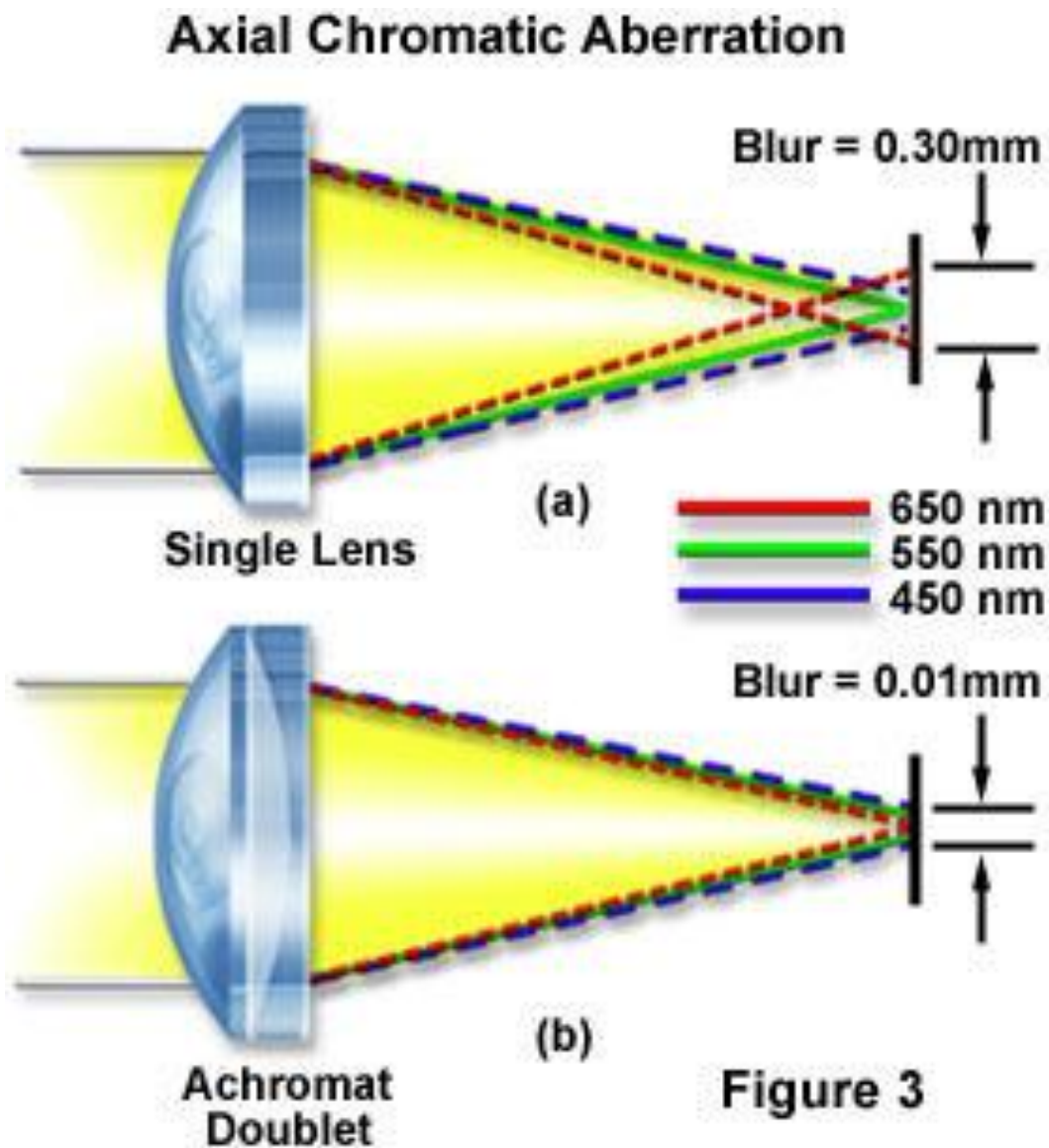
A tissue section was optically sectioned every 10  $\mu\text{m}$ .

On each section a different situation in the very same tissue context can be imaged.

**При углублении в препарат контраст изображения быстро снижается – оптические срезы толстого гистологического препарата получены на конфокальном микроскопе с шагом в 10 мкм.**



# Хроматические aberrации



# Типы объективов и сопутствующие аберрации

Тип объектива	Сферические аберрации	Хроматические аберрации	Кривизна поля зрения (исправление)
Achromat	1 цвет	2 цвета	Нет
PlanAchromat	1 цвет	2 цвета	Да
Fluorite	2-3 цвета	2-3 цвета	Нет
PlanFluorite	3-4 цвета	2-4 цвета	Да
PlanAprochromat	3-5 цветов	4-5 цветов	Да

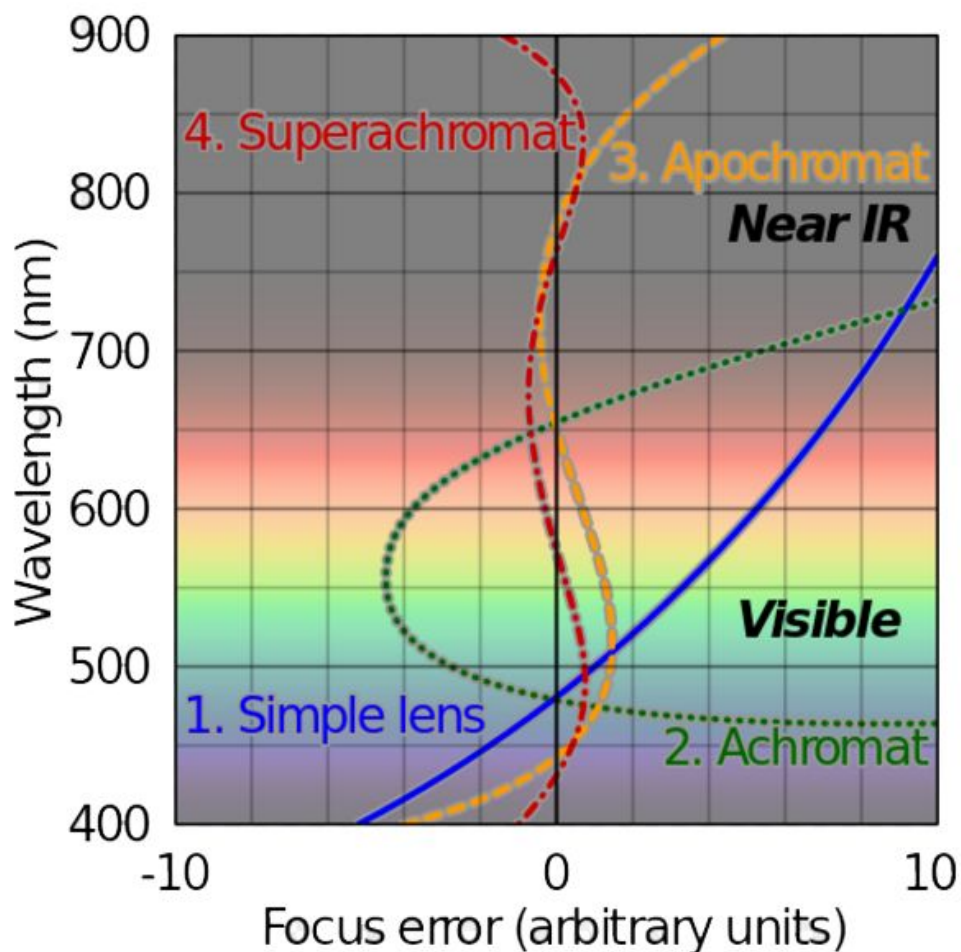
# Исправление хроматических aberrаций

Хроматическая коррекция  
для видимой и ближней  
инфракрасной длин  
волн.

Горизонтальная ось  
показывает степень  
аббераций.

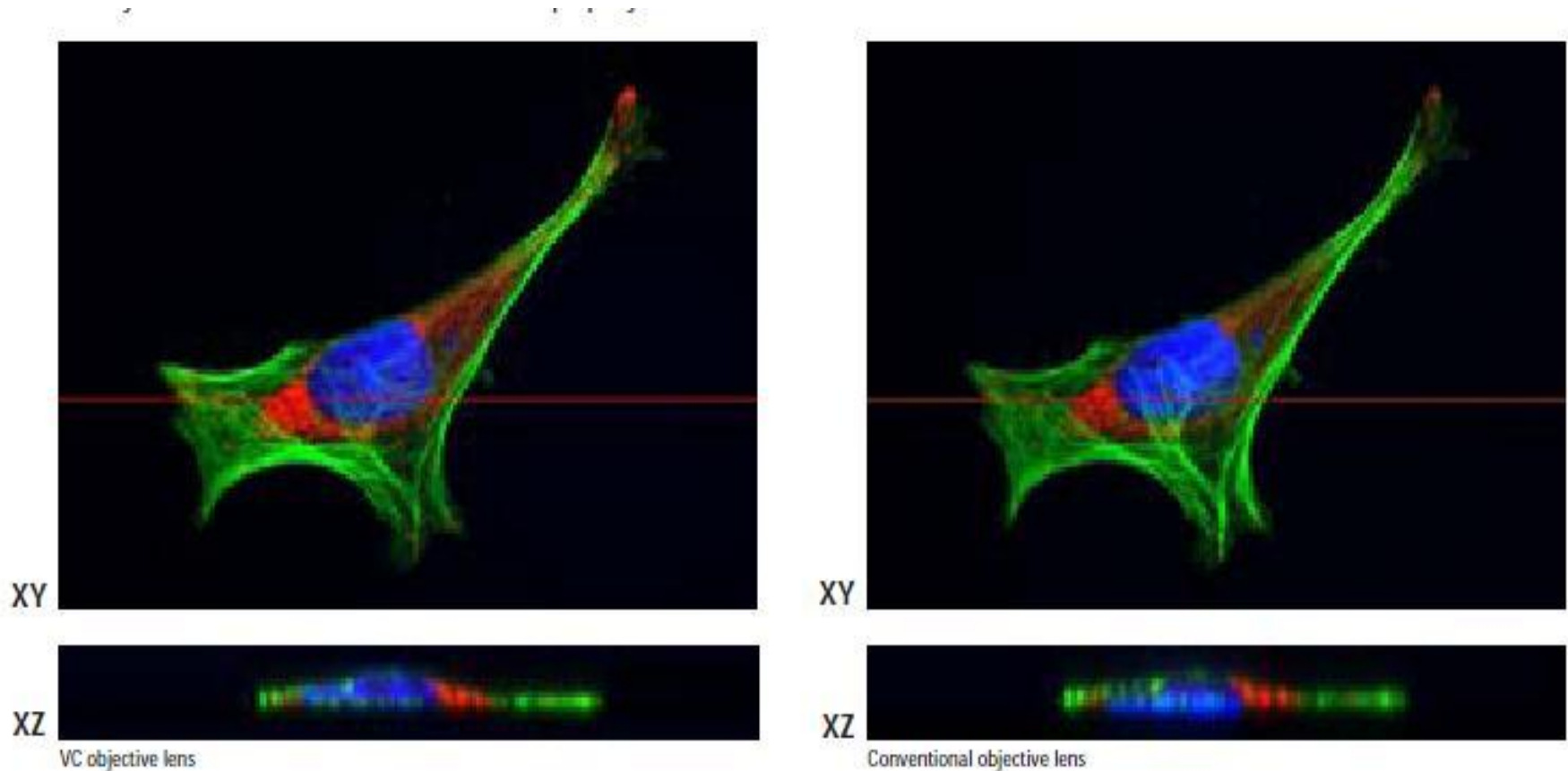
0 - нет аббераций. Линзы:

1: простые, 2:  
ахроматический дублет,  
3: апохроматические  
объективы 4: новейший  
суперахромат.





# Новые объективы



Fluorescence image of actin (green: Alexa 488, excitation: 488nm), mitochondria (red: Mito Tracker Organe, excitation: 543nm) and nucleus (blue: DAPI, excitation: 408nm) of HeLa cell. Consecutive cross-sectional XY and XZ images acquired with a confocal laser microscope and CFI Plan Apo VC 100x oil objective lens.

**Объективы с исправленной хроматической разностью увеличений позволяют проводить правильную трехмерную реконструкцию для разных длин волн.**

# Что влияет на форму ФРТ?

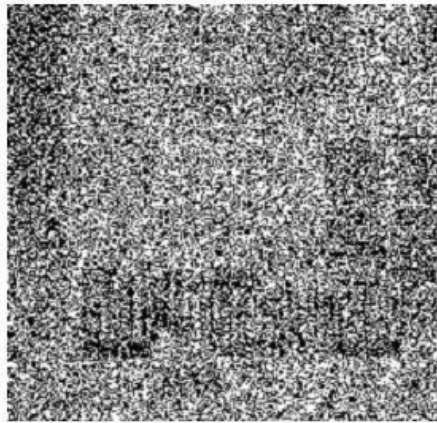
Зависят только от оборудования:

- Апертура и увеличение объектива
- Длина волны испускаемого света
- Лучепреломление иммерсии объектива
- Лучепреломление покровного стекла.
- Толщина и положение покровного стекла
- Степень коррекции кривизны поля зрения и астигматизма
- Эквивалентный размер пиксела камеры.

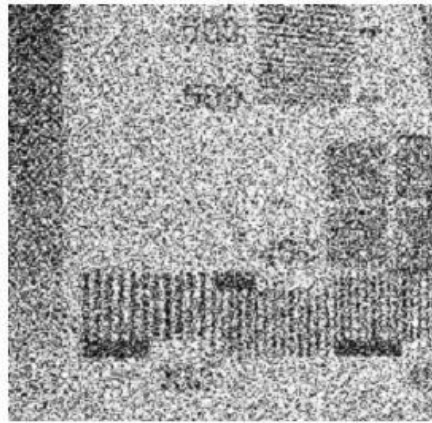
Опосредованы условиями съёмки:

- Расстояние от фронтальной линзы объектива до объекта по оптической оси
- Сферическая абберрация (нарастает с углублением в препарат)
- Хроматическая абберрация (нарастает с углублением в препарат)
- Лучепреломление препарата.
- Расстояние от точки изображения до центра фронтальной линзы объектива в плане изображения.

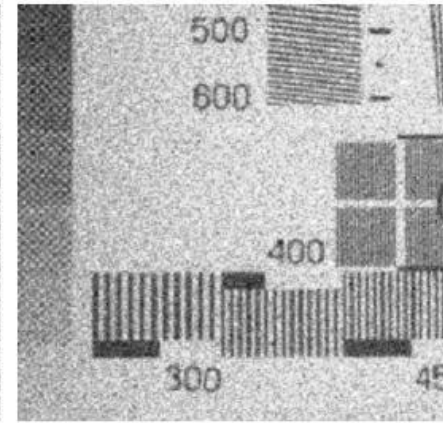
# Отношение сигнал/шум



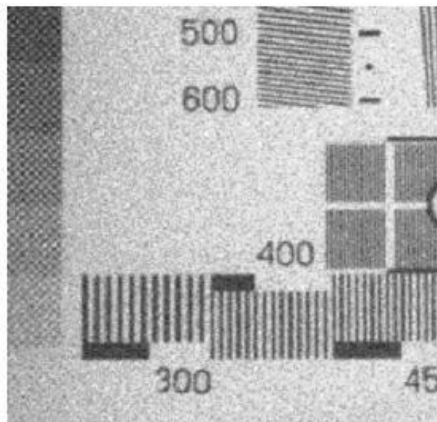
**S/N=1**



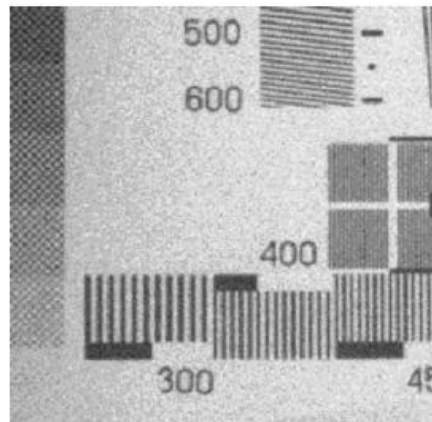
**S/N=2**



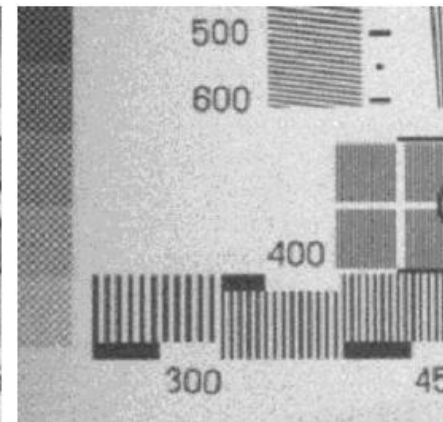
**S/N=4**



**S/N=8**



**S/N=16**



**S/N=32**

Для отношения  $S/N=1$  получается два уровня серого, которые соответствуют бинарному изображению. Для больших соотношений шкала полутонов линейно расширяется.



# Отношение сигнал/шум

Неравномерность сигнала определяется функцией распределения Пуассона, которое стремится к нормальному распределению, когда в построении изображения участвует достаточно большое число фотонов.

Распределение Пуассона обладает тем свойством, что его среднее значение равно дисперсии. Так как дробовый шум эквивалентен квадратному корню из дисперсии, то для сигнала, состоящего из  $n$  фотонов, отношение сигнал-шум определяется по формуле:

$$\text{Signal-to-Noise (S/N)} = n/(n^{1/2}) = n^{1/2}$$

Данное простое соотношение работает, когда отсутствует фоновый сигнал (абсолютно черный фон). В реальной микроскопии, при наличии шума фона, его необходимо учитывать, и это снижает конечное соотношение между сигналом и шумом.

# Дробовый шум

Дробовый шум эквивалентен квадратному корню из дисперсии светового потока. Для сигнала, состоящего из  $n$  фотонов, отношение сигнал-шум определяется по формуле:

$$S/N = \frac{n_p}{\sqrt{n_p}} = \sqrt{n_p} \quad \text{или} \quad S/N = \frac{Q_E n_p}{\sqrt{Q_E n_p + n_n^2}}$$

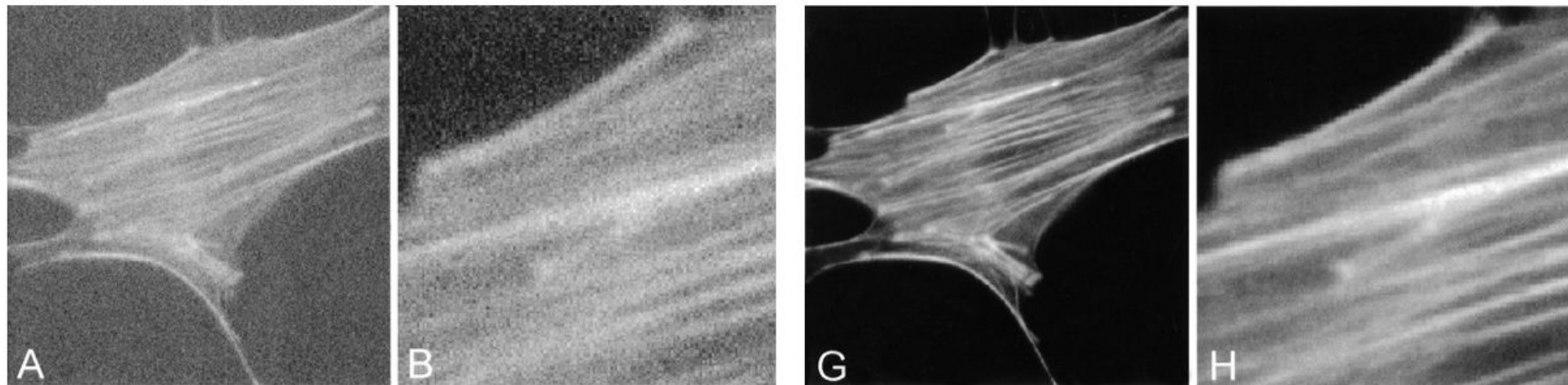
В последнем случае учитываются квантовый выход и погрешность детектора.

**Квантовый выход** – отношение числа поглощенных фотонов к числу накопленных электронов на матрице.

**Погрешность детектора** – ограничение числа уровней яркости (градаций серого), получаемых на выходе с аналого-цифрового преобразователя детектора.



# Роль экспозиции



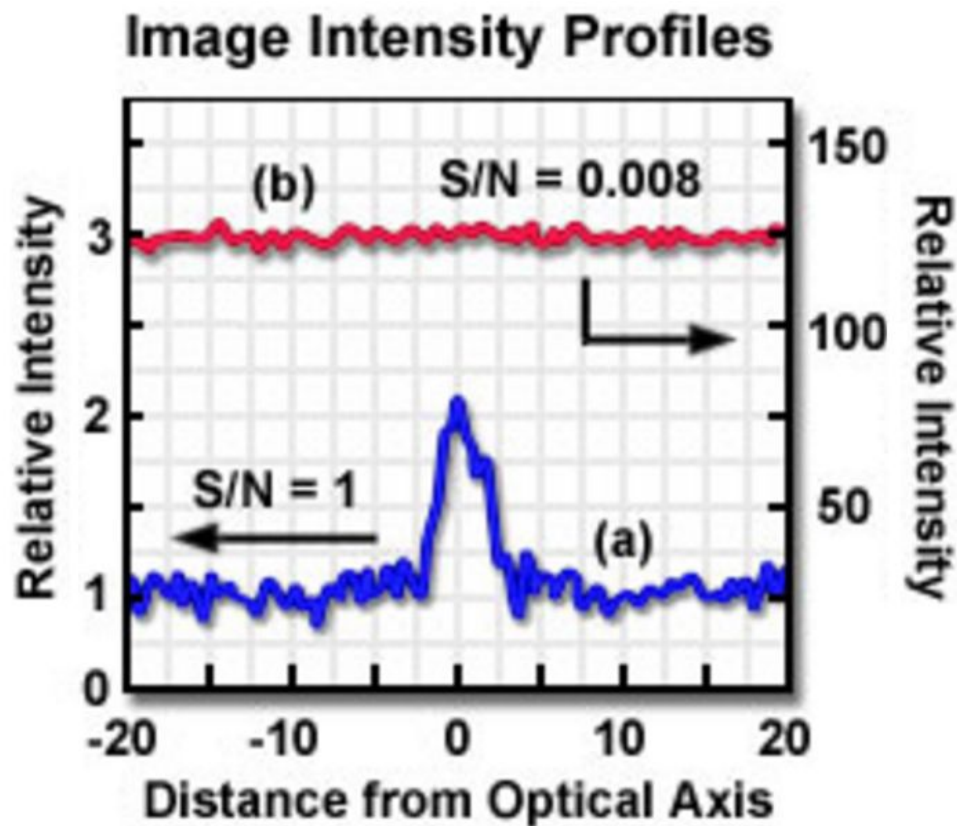
Слева – 20 мс, справа – 200 мс.

Отношение сигнал/шум (сравните В и Н) при увеличении экспозиции в 10 раз возрастает примерно в 3,2 раза (квадратный корень из увеличения времени экспозиции)

# Роль дробового и фоновых шумов

Если отношение сигнала к фону велико, почти все регистрируемые фотоны представляют информацию об изображении, и отношение сигнал-шум приближается к величине, представленной исходным уравнением (a).

Если вклад фона велик (малое отношение сигнала к фону), искомый сигнал может потеряться в высоком уровне дробовых шумов, в результате чего отношение сигнал-шум приближается к



# Фоновый шум

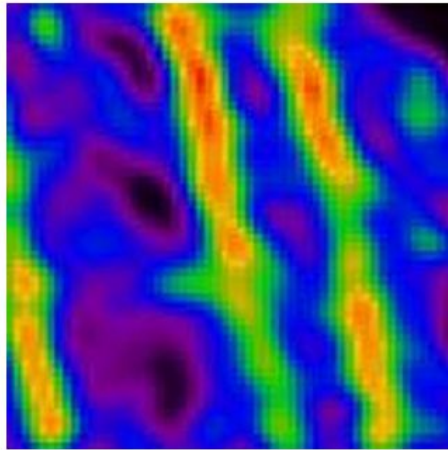
Фоновый шум определяется как детектором, так и образцом.

Существуют две модели описания фонового шума: равномерный сигнал по всему полю (фактически – только электронный шум) и сигнал от равномерно светящегося бесконечно большого объема, находящегося вне фокуса объектива (соответствует, например, автофлуоресценции).

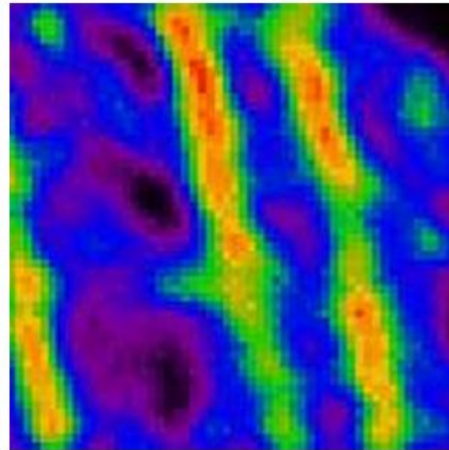
Во второй модели граница шума оказывается условной, но она позволяет точнее определить реальное соотношение.

Расчетная формула для  $S/N$  приобретает более сложный вид и учитывает долю светового потока, попадающего на детектор.

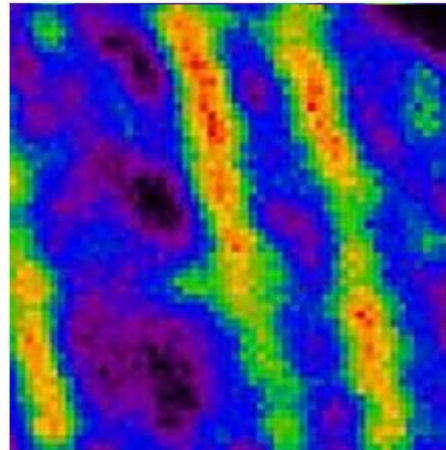
# Отношение сигнал/шум (SNR)



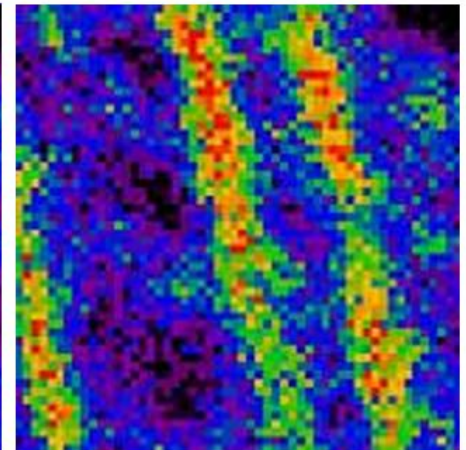
Original



SNR = 30



SNR = 15



SNR = 5

Правильная оценка шума (точнее, отношения сигнал/шум) необходима для правильной деконволюции (цифровой коррекции изображения). Если отношение невелико, то в результате исправленное изображение содержит также усиленный шум, который может приводить к появлению псевдоструктур.

Ориентировочные параметры: «хорошее» изображение имеет отношение сигнал/шум более 50. На нем деконволюция эффективна. «Плохое» микроскопическое изображение имеет отношение сигнал/шум менее 20.

# Запись изображения

Шумы: дробовый шум (флуктуации потока фотонов), отношение сигнал/шум самой цифровой камеры (матрицы и системы считывания сигнала); «горячие» пиксели матрицы, темновой ток.

Дробовый шум пропорционален квадратному корню из интенсивности – для его уменьшения надо увеличивать общее число фотонов. Это достигается увеличением экспозиции, либо увеличением яркости.

Параметры камеры нельзя изменить. Если есть возможность провести считывание сигнала с матрицы камеры с меньшей скоростью (например, 1 МГц вместо 5 МГц), то это позволяет уменьшить шум считывания примерно в 1,5 раза.

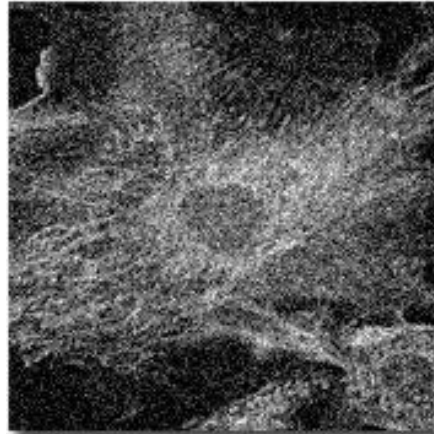
«Горячие» пиксели – в основном проблема КМОП камер. Их влияние можно уменьшить, используя коррекцию на плоское поле зрения. В камерах EMCCD «горячих» пикселей практически нет.

Темновой ток в современных охлаждаемых камерах настолько мал, что его влиянием можно пренебречь при экспозициях менее 5 секунд.

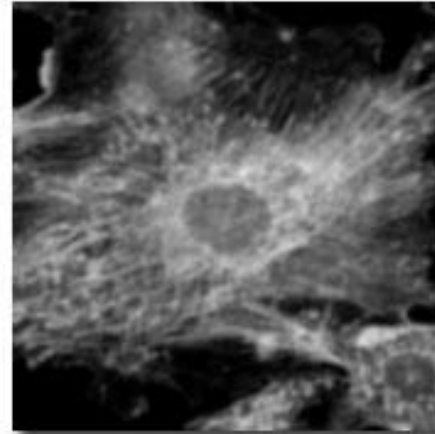
# Причины ухудшения снимка

«Соль и перец»

- шум камеры



(a)

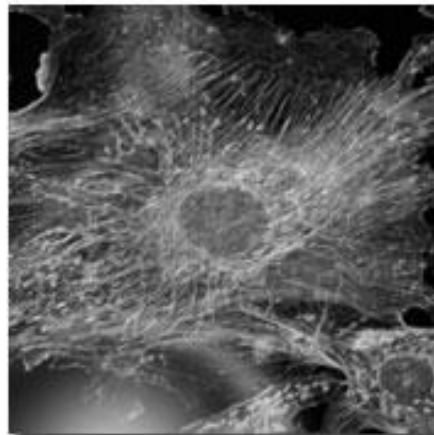


(b)

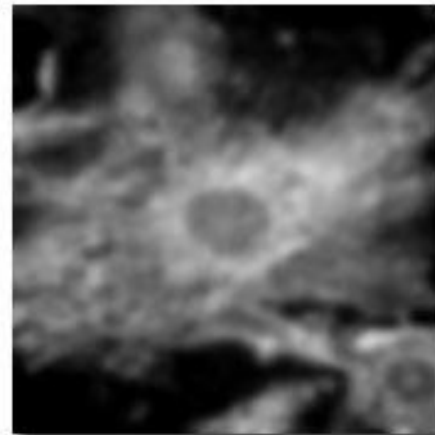
Рассеивание -  
ошибка съёмки  
или пробо-  
подготовки

Блики

- неполадки в  
оптическом пути  
микроскопа



(c)



(d)

Размывание  
- законы  
физики



**In a WF microscope, imperfectly matched filter sets and lens chromatic aberration**

**lead to wavelength-dependent axial and lateral image shifts and differences in magnification, with only minimal effect on image intensity. However, in spot scanning or spinning disk confocals, image shifts are minimal but image intensity is severely affected by chromatic aberration.**

For a 1.4 NA objective lens in a WF microscope, a focus error of 0.1  $\mu\text{m}$  would decrease the peak pixel intensity by ~15%.

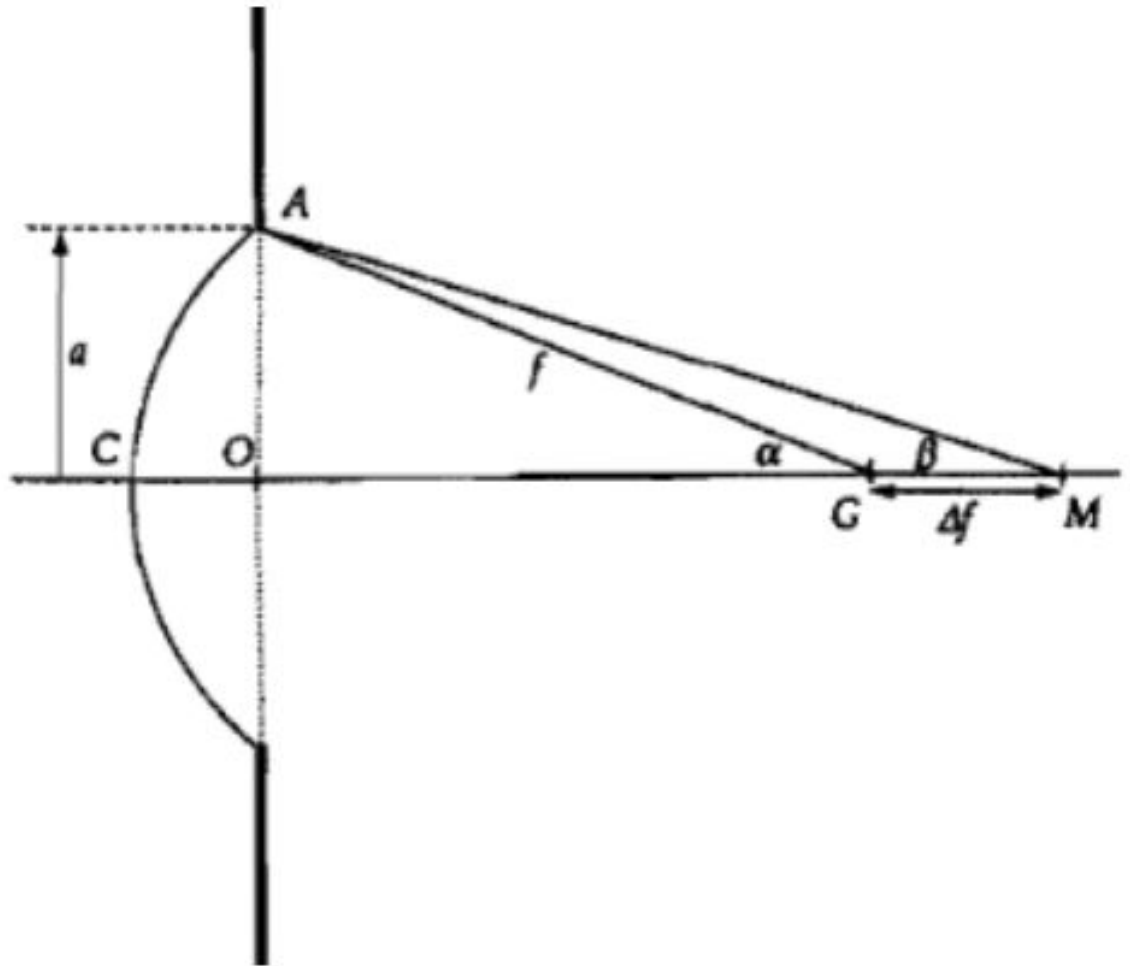
# Фоновый шум

Фоновый шум определяется как детектором, так и образцом.

Существуют две модели описания фонового шума: равномерный сигнал по всему полю (фактически – только электронный шум) и сигнал от равномерно светящегося бесконечно большого объема, находящегося вне фокуса объектива (соответствует, например, автофлуоресценции).

Во второй модели граница шума оказывается верхней по числу передаточных элементов:

$$S/N = \frac{Q_E n_p F(v_d)}{\sqrt{Q_E n_p [F(v_d) + a v_d^2 / 4 + B_{N2}(v_d)] + n_n^2}} \quad :$$



[https://www.researchgate.net/publication/234846705\\_Effects\\_of\\_Fresnel\\_number\\_in\\_focusing\\_and\\_imaging](https://www.researchgate.net/publication/234846705_Effects_of_Fresnel_number_in_focusing_and_imaging)