

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ КАЛЬЦИЕВЫХ СИГНАЛОВ

В. М. Шкрыль

*Институт физиологии им. О.О. Богомольца НАН Украины, ул. Богомольца 4, г. Киев, Украина
slava@biph.kiev.ua*

Поступила в редакцию 4 мая 2017 г.

Принята 14 сентября 2017 г.

Актуальность. Исследование быстрых процессов, протекающих в живых клетках, например, динамики ионов кальция или других ионов, является актуальным для современной биофизики, физиологии и медицины и может быть выполнено при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Конфокальная микроскопия как метод исследования биологических объектов имеет ряд особенностей, требующих понимания тонких механизмов, лежащих в ее основе.

Цель работы. Описание принципов и деталей проведения исследований кальциевых сигналов в живой клетке при использовании лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных индикаторов было целью работы.

Материалы и методы. В работе проведен анализ методических и практических аспектов исследований кальциевых сигналов методом конфокальной микроскопии.

Результаты. Конфокальная микроскопия позволяет исследовать изменения концентрации свободного кальция внутри клетки и даже малой ее части с использованием флуоресцентного красителя, что повышает контраст по сравнению с обычной флуоресцентной микроскопией за счет дополнительной конфокальной апертуры, расположенной перед детектором, а также использования лазерного источника освещения и сканирования объекта. Для регистрации кальциевых сигналов необходимо произвести выбор адекватных параметров, таких как: частота регистрации, размер единичного элемента сканирования (пикселя), чувствительность детектора, величины интенсивности облучения лазером, диаметра конфокальной щели, соответствующих фильтров для возбуждения и излучения используемого флуоресцентного красителя и соответствующего дихроичного зеркала. Важным этапом настройки конфокальной системы является определение величины функции рассеяния точки. Компенсация процесса выгорания красителя и уменьшения фототоксичности, минимизация процесса рассеяния изображения позволяют повысить воспроизводимость экспериментов.

Выводы. При использовании современных лазерных сканирующих конфокальных микроскопов для регистрации кальциевых сигналов от малой группы каналов (например риадиноновых рецепторов) или части клетки необходимо тщательно выбирать параметры аппаратной настройки, которые обусловлены природой объекта исследования и особенностями условий эксперимента. Это позволит получить достоверную информацию о функционировании как отдельных каналов, так и о механизмах Ca^{2+} -сигнализации целой клетки или ее части.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ca^{2+} ; флуоресцентный метод; флуоресцентный краситель; конфокальная микроскопия.

BASIC PRINCIPLES OF CONFOCAL MICROSCOPY OF CALCIUM SIGNALS

V. M. Shkryl

Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, 4 Bogomoletz Str., Kyiv, Ukraine

Background: The study of fast processes occurring in living cells, for example, the dynamics of calcium ions or other ions, is actual for modern biophysics, physiology and medicine and can be carried out by laser scanning confocal microscopy. Confocal microscopy as a method of studying biological objects has a number of features requiring an understanding of the delicate mechanisms underlying it.

Objectives: The aim of the work is the description of principles and details of measurements of calcium signals in the living cells using laser scanning confocal microscopy and fluorescent indicators.

Materials and methods: The analysis of the methodological and practical aspects of studies of calcium signals was carried out by confocal microscopy in the work.

Results: Confocal microscopy allows to study the changes in the concentration of free calcium within the cell and even a small part of it by a fluorescent dye, which increases the contrast in comparison with

conventional fluorescence microscopy through an additional confocal aperture located in the front of the detector and the use of laser light source and scanning the object. To register calcium signals it is necessary to make a selection of a number of adequate parameters: the registration frequency, the size of a single scanning element (pixel), the sensitivity of the detector, the intensity of laser irradiation, the diameter of the confocal gap, the corresponding filters for exciting and emitting the fluorescent dye used and the corresponding dichroic mirror. An important stage of a setup of a confocal system is the determination of the value of the scattering function of a point. Compensation of the process of bleaching of the fluorescence dye and reduction of phototoxicity, minimization of the scattering process of the image allow to increase a reproducibility of the experiments.

Conclusions: Using modern laser scanning confocal microscopes for registration of calcium signals from a small group of channels (for example, ryanodine receptors) or the cell part, it is necessary to carefully select the parameters of the hardware setup, which are determined by the nature of the object of study and the peculiarities of the experimental conditions. This will allow to receive the reliable information about the functioning of both individual channels and the mechanisms of Ca^{2+} signaling of the whole cell or its part.

KEY WORDS: Ca^{2+} ; fluorescent method; fluorescent dye; confocal microscopy.

ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ КОНФОКАЛЬНОЇ МІКРОСКОПІЇ КАЛЬЦІЄВИХ СИГНАЛІВ

В. М. Шкриль

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця 4, м. Київ, Україна

Актуальність. Дослідження швидких процесів, що протікають в живих клітинах, наприклад, динаміки іонів кальцію або інших іонів, є актуальним для сучасної біофізики, фізіології та медицини і може бути виконано за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Конфокальна мікроскопія як метод дослідження біологічних об'єктів має ряд особливостей, які потребують розуміння тонких механізмів, що лежать в її основі.

Мета роботи. Опис принципів і деталей проведення досліджень кальцієвих сигналів в живій клітині при використанні лазерної скануючої конфокальної мікроскопії з використанням флуоресцентних барвників було метою роботи.

Матеріали та методи. В роботі проведено аналіз методичних і практичних аспектів досліджень кальцієвих сигналів методом конфокальної мікроскопії.

Результати. Конфокальна мікроскопія дозволяє проводити дослідження змін концентрації вільного кальцію усередині клітини і навіть малої її частини з використанням флуоресцентного барвника, що збільшує контраст у порівнянні зі звичайною флуоресцентною мікроскопією за рахунок додаткової конфокальної апертури, розташованої перед детектором, а також використання лазерного джерела освітлення та сканування об'єкта. Для реєстрації кальцієвих сигналів необхідно провести вибір адекватних параметрів, таких як: частота реєстрації, розмір одиничного елемента сканування (пікселя), чутливість детектора, величини інтенсивності опромінення лазером, діаметр конфокальної щілини, відповідних фільтрів для збудження і випромінювання використовуваного флуоресцентного барвника та відповідного діхроїчного дзеркала. Важливими етапами налаштування конфокальної системи є визначення величини функції розсіювання точки. Компенсація процесу вигорання барвника й зменшення фототоксичності, мінімізація процесу розсіювання зображення дозволяють підвищити відтворюваність експериментів.

Висновки. При використанні сучасних лазерних скануючих конфокальних мікроскопів для реєстрації кальцієвих сигналів від малої групи каналів (наприклад ріанодінових рецепторів), або частини клітини необхідно ретельно обирати параметри апаратного налаштування, які обумовлені природою об'єкта дослідження й особливостями умов експерименту. Це дозволить отримати достовірну інформацію про функціонування як окремих каналів, так і про механізми Ca^{2+} -сигналізації цілої клітини або її частини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Ca^{2+} ; флуоресцентний метод; флуоресцентний барвник; конфокальна мікроскопія.

Ионы кальция играют важную роль в различных клеточных процессах. Визуализация Ca^{2+} сигналов позволяет исследовать временные и пространственные характеристики таких сигналов в клетках и тканях. Изучение кальциевой сигнализации имеет важное значение для понимания многих Ca^{2+} зависимых процессов протекающих в клетке, связанных с секрецией, сокращением, клеточной возбудимостью, экспрессией генов, синаптической передачей. Использование кальциевых флуоресцентных

индикаторов с применением метода визуализации, таким как конфокальная микроскопия, позволяет наблюдать клеточные Ca^{2+} сигналы с высокой степенью пространственного и временного разрешений, что было подробно рассмотрено ранее [1-3]. Широкое применение нашла именно конфокальная сканирующая микроскопия, которая широко используется для исследования как глобальных так и локальных кальциевых транзиентов. В этом методическом мини обзоре описаны важные аспекты проведения экспериментов по изучению кальциевых сигналов в клетке с использованием конфокальной микроскопии.

Общий принцип микроскопии

Микроскопия - это процесс получения на детекторе или окуляре микроскопа увеличенного изображения исследуемого объекта. Флуоресцентная микроскопия позволяет получать изображение от возбужденных, флуоресцирующих молекул объекта посредством кратковременного поглощения кванта света флуорофором с последующей быстрой эмиссией другого кванта света на другой длине волны. Возбуждение, поглощение и эмиссию фотонов света флуорофором хорошо описал Александр Яблонский в 1933 году посредством энергетических диаграмм [4]. В таких диаграммах состояние флуорофора на верхних энергетических уровнях соответствует его возбужденному состоянию со способностью испускать фотон. На нижних уровнях флуорофор находится в невозбужденном состоянии и не способен испускать фотон. При комнатной температуре большинство флуорофоров находятся на нижних энергетических уровнях и не способны испускать фотоны. Но при достаточном возбуждении, когда флуорофор накопил некоторое количество фотонов, он может переходить на более высокий уровень, когда уже возможно излучение фотонов. Абсорбция фотонов происходит за фемтосекунды, а их испускание возможно уже в пикосекундном интервале [5].

Для исследования живой клетки используются множество флуоресцентных красителей, способных при достаточном возбуждении изменять флуоресценцию, например при изменении концентрации определенного иона, который связывается этим красителем. При этом флуорофор избирательно чувствителен только к определенному иону и не изменяет своих свойств при наличии других ионов или имеет к ним низкую чувствительность (аффинность). Такая высокая аффинность к определенному иону позволяет использовать флуоресцентную микроскопию и флуоресцентный краситель для исследования изменения концентрации иона в присутствии других ионов. Большая разновидность флуоресцентных красителей позволяет исследовать различные клеточные процессы, такие как изменение концентрации ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ , АТФ и другие [6].

Предпочтительным подходом во флуоресцентной микроскопии является эпи-освещение. При таком освещении световой поток, отраженный от исследуемого объекта, собирается на детекторе. При этом объектив используется как для освещения, так и для получения изображения. Данный тип освещения позволяет исследовать образцы, которые не являются полупрозрачными или прозрачными, и которые могут быть отображены только с помощью эпи-освещения. Важным компонентом эпи-освещения является дихроичное зеркало (или дихроматический разделитель лучей), которое используется для отражения падающего, возбуждающего света в направлении образца, но является прозрачным для флуоресцентного излучения от возбужденного объекта и позволяет проходить ему на детектор. Таким образом, возбуждающий свет фокусируется линзой объектива на объект, а флуоресценция от изучаемого объекта тем же объективом микроскопа направляется на детектор. Выбор дихроичного зеркала

необходимо осуществлять в соответствии с используемым флуоресцентным красителем.

При конфокальной микроскопии ход светового потока практически повторяется как при обычной эпифлуоресцентной микроскопии. Однако конфокальная микроскопия позволяет получать более контрастные изображения по сравнению с обычным методом. Это достигается за счет трех дополнительных особенностей. Первым новым элементом является апертура (или диафрагма, или конфокальная щель; pinhole), которая устанавливается непосредственно перед детектором (что представлено на рис. 1) и убирает большую часть рассеянного света от исследуемого объекта. Второй отличительной особенностью является использование точечного источника освещения.

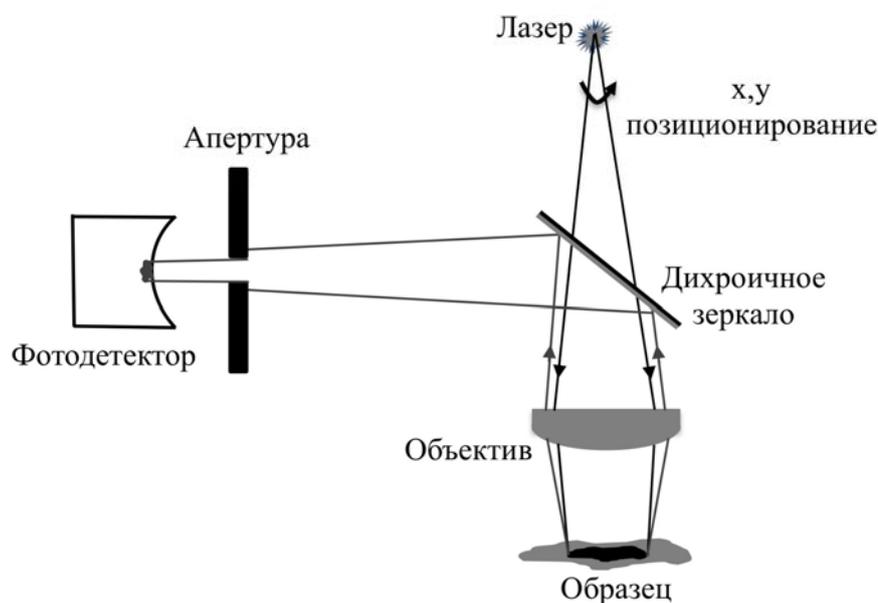


Рис. 1. Принципиальная схема конфокальной микроскопии (с модификацией [7]).

Точечным источником света для конфокальной микроскопии является лазер с длиной волны, соответствующей возбуждению молекул красителя. Преимущество лазеров по сравнению с ртутными или ксеноновыми лампами заключается в монохроматичности и высокой параллельности испускаемого пучка света. Также, лазер освещает на образце не все поле зрения, как при помощи ламп, а фокусируется в точку. Поэтому регистрируемая флуоресценция отображает оптический сигнал только от этой точки объекта. Для получения более детальной информации по всей площади или объему объекта необходимо производить сканирование — перемещение точечного освещения посредством системы позиционирования, с последующей визуализацией в одно-, двух- или трехмерное пространство (что будет оговорено ниже). Процесс сканирования является третьей особенностью конфокальной микроскопии.

Важно отметить, что подразумевается под конфокальностью. Так, фокальная плоскость — это плоскость, в которую фокусируется исследуемый объект, находящийся в фокусе объектива. Конфокальная плоскость — это часть фокальной плоскости, ограниченная апертурой, расположенной перед детектором. Другими словами, это часть информации, которая ограничена апертурой, сфокусированная на объекте, которая попадает на детектор.

Таким образом, лазерная конфокальная микроскопия позволяет убрать большую часть рассеянного сигнала вне фокуса. Такой свет, исходящий от препарата сверху или

снизу от фокальной плоскости, обрезается апертурой малого размера возле детектора, что позволяет улучшить контраст получаемого изображения и убрать рассеяние света. Такая дополнительная апертура позволяет регистрировать только конфокальную часть сигнала, что улучшает аксиальное (z) разрешение микроскопа.

Поток фотонов, излучаемый исследуемым объектом, регистрируется электронным детектором и преобразуется в полученное изображение, которое представляет собой массив данных, в который записывается этот сигнал за время сканирования.

Лазерный луч фокусируется в точку, размеры которой ограничены разрешающей способностью микроскопа, возбуждая при этом только малую область исследуемого объекта. Важно знать и помнить, что при обычном одноволновом возбуждении луч лазера может проникать в исследуемый объект на глубину не более 100 мкм (при 400–600 нм), что является пределом для лазерной конфокальной микроскопии при однофотонном возбуждении. С повышением длины волны возбуждения свет проникает глубже, так как уменьшается его рассеивание. Для еще более глубокого проникновения в исследуемый объект необходимо использовать так называемое двухфотонное возбуждение, когда возбуждение флуорофора происходит за счет двух фотонов и только в точке фокусировки двух фотонов, которые одновременно передают всю энергию флуоресцирующей молекуле. При этом свет может проникать на глубину до 300 мкм, а повреждение объекта при этом незначительно, что находит свое применение при работе со срезами мозга.

Как отмечалось выше, флуоресцентный краситель поглощает свет и при наличии связанного с ним иона вызывает испускание фотона. При этом эти два процесса можно разделить с помощью светофильтров, оставив только возбужденный свет, испускаемый красителем, который уже и попадает на детектор.

Важными характеристиками флуоресцентного красителя являются их спектры поглощения (абсорбции) и спектр возбуждения (эмиссии) с характерными пиками поглощения и возбуждения. Выбор соответствующих светофильтров осуществляется согласно с этими характеристиками. Например, такой кальциевый индикатор как Fluo максимально возбуждается светом с длиной волны 488 нм и имеет пик испускания на 510 нм. Но свечение красителя можно наблюдать и при меньшей длине волны, но с меньшей интенсивностью. Для того чтобы испускаемый флуорофором свет не перекрывался с поглощенным, флуоресцентный сигнал обрезается соответствующим фильтром на пути к детектору и регистрируется начиная с 510 нм.

Важной характеристикой флуорофора, используемого в качестве ионного индикатора, является его константа диссоциации (K_d) к чувствительному иону, например к кальцию. Используя значение K_d можно рассчитать рабочий диапазон концентраций чувствительности красителя к иону, что составляет от $0,1 K_d$ до $10 K_d$. Также величина константы диссоциации важна для вычисления свободной концентрации кальция из величины интенсивности флуоресценции [8].

Кальциевые флуоресцентные индикаторы, применяемые в конфокальной микроскопии

В работе Тсиен и др. (1980) [9] были впервые получены кальциевые флуоресцентные индикаторы, большинство из которых являются модификацией не флуоресцентных кальциевых хелаторов, таких как EGTA и ВАРТА. Такие кальциевые индикаторы являются в первую очередь буферами кальция, которые при связывании с ионом и при возбуждении светом способны испускать фотоны другой длины волны, отличной от длины волны возбуждения.

Такие кальциевые зонды как Fluo, Calcium Green, Calcium Orange, Rhod широко используются при конфокальной микроскопии, их характеристики представлены в таблице 1. По константе диссоциации красители можно разделить на высоко- и низкоаффинные. Так, например, краситель Fluo был синтезирован с разными значениями K_d . Fluo-4 имеет K_d равное 0,35 мкМ, Fluo-5F – 2,3 мкМ, Fluo-4FF – 9,7 мкМ, а Fluo-5N - 90 мкМ, что позволяет использовать соответствующий краситель в широком диапазоне исследуемых концентраций кальция. А если использовать одновременно два таких красителя, то можно существенно расширить диапазон чувствительности к кальцию, что было предложено в работе [10].

Также важно отметить, что флуоресцентный краситель существует в двух формах, в виде соли или сложного ацетокси-метил эфира (АМ-форма). Первая, как правило, не может проникать через мембрану клетки и поэтому используется в специфических условиях, когда проницаемость мембран увеличивается искусственно [11]. АМ-форма красителя позволяет ему легко проникать в клетку через неповрежденную мембрану.

Таблица 1

Характеристики кальциевых флуоресцентных индикаторов

Краситель	E_x (нм)	E_m (нм)	K_d (нМ)	ЕС ($\text{см}^{-1} \text{М}^{-1}$)
Calcium Green-1	506	530	190	81000
Calcium Orange	549	575	185	80000
Fluo-4	491	520	390	82000
Fura-2	340/380	510	140	28000
Rhod-2	549	581	570	81000

Примечание: E_x – длина волны возбуждения, поглощения красителя; E_m – длина волны испускания, свечения красителя; ЕС – коэффициент экстинкции

Рассчитать концентрацию красителя можно используя массу красителя и его молярный вес (например: 50 мкг Fluo-4, АМ поделенное на 1097 г/моль и на 1 мл объема раствора с красителем, что равняется 4,6 мкМ). Более точно концентрацию красителя можно определить используют спектрофотометр. Тогда концентрация красителя может быть рассчитана как отношение полученного значения на спектрофотометре к коэффициенту экстинкции (коэффициент ослабления света при распространении в среде за счет процессов поглощения и рассеяния), поделенное на толщину кюветы. При этом необходимо задать соответствующую длину абсорбции (обычно для этих красителей 350 нм) и толщину кюветы (обычно 1 см). Данная операция часто используется для флуоресцентного красителя в форме соли, так как для АМ-формы достаточно расчета по простой формуле с использованием массы и молекулярного веса.

Также возможно использовать два красителя одновременно, когда не происходит перекрывания спектров испускания и поглощения выбранных красителей. Так возможно использовать такие индикаторы как Fluo-4 и Mag-rhod-2, с возбуждением на 491 / 556 нм, и испусканием на 506/579 нм соответственно, что более детально описано в работе [12].

Используемые аргоновые или аргон-криптоновые лазеры (или более современные диодные лазеры, называемые полупроводниковыми лазерами) для возбуждения в конфокальных системах хорошо подходят для возбуждения этих красителей на 488, 512 и 568 нм.

Так как флуоресцентный краситель является также кальций-связывающим буфером, необходимо использовать такую его концентрацию, при которой не

происходило бы значительного изменения буферной емкости клетки и кальциевого гомеостаза. На практике концентрация индикатора не должна превышать 100 мкМ. При использовании концентрации свыше 200 мкМ происходит не только нарушение гомеостаза клетки, но и ее функции, например, наблюдается отсутствие сокращения мышечной клетки при достаточном возбуждении. Необходимо выбирать минимальную концентрацию красителя, которая была бы достаточной для достоверной регистрации полезного сигнала, и, следовательно, определения концентрации исследуемого иона.

Получение изображения флуоресцентного объекта с конфокальной плоскости исследуемого объекта при сканировании кальциевого сигнала

Вход кальция через кальциевые каналы плазматической мембраны или высвобождение из внутриклеточного Ca^{2+} депо может быть визуализировано с помощью быстрой конфокальной микроскопии [13]. Для проведения таких исследований необходимо точно выбрать режим регистрации. Опишем эти режимы.

Существует несколько режимов сканирования флуоресцентного сигнала при конфокальной микроскопии. Одним из наиболее распространенных является построчное или $x-t$ режим. В $x-t$ режиме изображение получается посредством сканирования объекта, то есть перемещением сканирующего луча в направлении x или y вдоль одной строки, и последующего повторения сканирования той же строки во времени. Обычно каждую точку строки регистрируют посредством трубки фотоумножителя (РМТ), регистрируя все фотоны, которые попали в фотоумножитель. При этом регистрируется информация о координате и величине сигнала этой точки. В результате получается массив данных, как двумерная матрица значений точек линии во времени, где временные строки обозначаются как $x-t$ или $y-t$. Это позволяет полностью визуализировать и записать конфокальное изображение в фокусируемой плоскости. Посредством соединения отсканированных изображений в плоскости $x-y$ можно получить двумерное изображение флуоресцирующего объекта. В этом случае изображение получается последовательным, поточечным перемещением возбуждения в одной строке (в координате x) и с последующим шагом в координате y и сканирования в других строках. При данном сканировании информация также сохраняется в виде двумерной матрицы. А если повторять эту процедуру во времени, то можно регистрировать изменения целого двумерного изображения. Данное сканирование называется $x-y-t$. Информация записывается при этом как трехмерная матрица данных, или же, как четырехмерный массив данных, с учетом амплитуды сигнала.

Таким образом, чтобы получить информацию об исследуемом объекте, необходимо производить сканирование объекта посредством последовательного перемещения лазерного возбуждающего луча через объект. Поэтому данная микроскопия получила название сканирующей. Однако нужно помнить, что полученное изображение является неким искажением исследуемого объекта, так как оно “размыто” в плоскости сканирования и растянуто в аксиальном направлении (что будет более детально описано ниже).

При использовании некоторых конфокальных систем, таких как LSM 5-LIVE или 7-LIVE (Zeiss, Germany), возбуждение происходит непосредственно сразу в целой строке (Achromatic Beam Splitter), что позволяет получать изображение целой линии без поточечного перемещения лазера. Такой тип возбуждения позволяет уменьшить время сканирования строки и получать временное разрешение до 16 мкс. Данный метод позволяет получать двумерные изображения до 1000 изображений в секунду [13].

Преимуществами конфокальной флуоресцентной микроскопии по сравнению с обычным эпифлуоресцентным освещением являются небольшие размеры ($\sim 300 \text{ нм} \times$

300 нм × 800 нм) облученного объекта в трехмерном пространстве (т.е. вокселя), низкий уровень шума детектора и быстрое время регистрации.

Режим $x-t$ может быть использован для сканирования как локального, миниатюрного, так и глобального кальциевого сигнала. При регистрации Ca^{2+} сигналов, как кальциевые вспышки (Ca^{2+} spark; [14]), в режиме $x-t$, было установлено, что параметры Ca^{2+} вспышек (амплитуда, пространственные и временные характеристики) регистрируются с ошибкой. Такая ошибка обусловлена невозможностью определения положения сканирующей линии по отношению к кластеру риадиноновых рецепторов (где наблюдается Ca^{2+} вспышка, [15]). При использовании режима $x-y-t$ Ca^{2+} вспышки регистрируются уже в двухмерной области и ошибка практически устраняется, а неопределенность остается только в аксиальном направлении (z). Для полного устранения этой неопределенности необходимо производить быструю регистрацию Ca^{2+} сигнала в трех плоскостях. Для этого сканирование производится сначала в верхнем слое области $x-y$ с последовательным перемещением в нижние слои (z_1, z_2, \dots, z_n) и последовательным возвращением в верхний. После чего все повторяется во времени. Технически это реализуется за счет быстрого изменения положения фокусировки в аксиальном направлении со скоростью до 100 Гц, за счет пьезокристалла. Такой режим, $x-y-z-t$, позволяет регистрировать параметры кальциевой вспышки, что было показано в работе [16].

Интересно, что визуализация одного и того же сигнала в разных режимах будет иметь разный вид. Процесс регистрации Ca^{2+} сигнала, который распространяется из периферии клетки в центр, будет иметь разный вид в режимах $x-t$ и $y-t$. Так например, если расположить линию сканирования вдоль кардиомиоцита предсердия, то регистрируемый Ca^{2+} сигнал в режиме $x-t$ (линия расположена перпендикулярно большей стороне миоцита) имеет вид дуги и отличается от Ca^{2+} сигнала, зарегистрированного в режиме $y-t$ (когда линия выбирается параллельно большей стороне миоцита), где сигнал однородный. При регистрации в режиме $x-y-t$ мы имеем более полную информацию об изменении кальция. Так, например, Ca^{2+} сигнал в миоците предсердия (в режиме $x-y-t$) появляется сначала в отдельных местах на периферии клетки, с постепенным увеличением кальция сначала у мембраны клетки, но и последующим распространением во внутрь клетки, во все области миоцита (более детально смотри [13, 17]). Из массива данных, полученных в режиме $x-y-t$, можно выделить часть информации, соответствующей режиму $x-t$, просто зафиксировав линию с выбранной координатой y . Необходимо помнить, что для устранения неопределенностей, выбор линии сканирования должен осуществляться с учетом особенностей морфологии и физиологии клетки.

Ограничения флуоресценции

Важно помнить, что с увеличением интенсивности возбуждения может происходить насыщение энергетического состояния флуоресцентной молекулы, что приводит к нечувствительности такой молекулы к дополнительному возбуждению. Повышение возбуждения флуоресцентной молекулы может и не приводить к абсорбции фотонов красителем. Также, флуоресцентная молекула может возбуждаться не бесконечное количество раз, после чего она становится неактивной (этот процесс напрямую зависит от присутствия кислорода и ускоряется с увеличением его концентрации). Эффект понижения интенсивности излучения красителя называется процессом выгорания красителя, который необходимо учитывать. Чтобы уменьшить процесс выгорания красителя необходимо уменьшать интенсивность облучения до

уровня обеспечения достаточного сигнала на детекторе, при условии его достоверного разграничения с уровнем шума.

Процесс выгорания красителя необходимо минимизировать, а если это невозможно – то произвести компенсацию. Для этого есть несколько подходов. Проводится контрольный эксперимент, цель которого – выяснить, насколько происходит процесс выгорания Ca^{2+} красителя. Полученные результаты можно использовать для компенсации данного процесса в последующих экспериментах. Следующим вариантом компенсации является подход, когда выбирается участок флуоресцентного сигнала, который находится вне исследуемой клетки. С этого выбранного участка регистрируют необходимый сигнал. Полученную функцию выгорания красителя можно использовать для компенсации процесса выгорания красителя непосредственно на исследуемой клетке.

Теорема Найквиста

Как известно в теории коммуникации согласно теореме Найквиста оцифровка сигнала волнового вида должна осуществляться с удвоением числа минимальных интервалов по сравнению с максимальной частотой исследуемой волны. Данная теорема должна применяться и в конфокальной микроскопии, чтобы не потерять информацию при сканировании. Этот принцип применяется не только к временной, но и к пространственной составляющей. Таким образом, определяется нужный интервал сканирования и размер пикселя (т.е. минимального элемента сканирования) изображения. Минимально-допустимые временные и пространственные интервалы должны быть определены с учетом разрешения микроскопа. Таким образом, размер пикселя должен быть равен половине разрешающей способности микроскопа.

Минимальный допустимый размер пикселя можно определить по формуле:

$$d = 0.25 \frac{\lambda}{N.A.}, \text{ где } \lambda - \text{длина волны возбуждения, } N.A. - \text{числовая апертура объектива.}$$

Получение изображений с большим размером пикселя называется субдискретизацией, при этом часть тонких структур будет утеряна. Иногда это допустимо – при необходимости получить более широкую область исследуемого объекта. Когда же изображение получается с более сильной дискретизацией, намного меньше d , то произойдет также искажение получаемого изображения. С другой стороны, чем меньше выбранный размер пикселя, тем меньшее количество фотонов может быть зарегистрировано за единицу времени, и тем сложнее выделить полезный сигнал из уровня шума. В таких случаях необходимо увеличить время сканирования каждой временной точки или же размер пикселя, хотя и с потерей некоторой пространственной информации.

Выбор более медленной скорости сканирования приводит к искажению кальциевого сигнала. При регистрации быстрых процессов, таких как Ca^{2+} вспышки, необходимо выбрать скорость сканирования не меньше 500 Гц. Для регистрации глобального Ca^{2+} транзientа достаточно использовать регистрацию в 100 Гц. При более медленном сканировании как амплитуда так и временные параметры кальциевого сигнала будут искажены.

Разрешающая способность и конфокальность

Запишем формулы, с помощью которых можно рассчитать разрешающие характеристики конфокальной микроскопии. Последние могут быть рассчитаны

следующим образом: $x, y = 0.5 \frac{\lambda}{N.A.}$ и $z = \frac{0.9 \cdot \lambda}{\sqrt{n^2 + N.A.^2} - n}$ [18] где λ – длина волны

возбуждения [нм]; n – отражающий индекс ($n = 1$ для воздуха; 1,5 для иммерсионного масла и, также, стекла); $N.A.$ – числовая апертура объектива, равная половине угла обзора объектива, $N.A. = n \cdot \sin \alpha$.

Рассчитаем эти величины при 488 нм для двух объективов: 40x/0,75 воздушный и 40x/1,4 масляно-иммерсионный, тогда величина z составит 1,76 и 0,8 мкм, соответственно. А разрешающая способность для x и y составит 0,33 и 0,17 мкм, соответственно. Как здесь видно, при одинаковой кратности увеличения этих двух объективов их разрешающие способности различаются существенно. Подбор нужного объектива является важным этапом подготовки к исследованиям.

При прохождении света через конфокальную щель наблюдается дифракция с характерным узором, имеющем яркую область по центру, известную как диск Эйри. Диаметр такой яркой области является важной характеристикой и обозначается как 1

AU. Величина 1 AU определяется по формуле: $1.2 \frac{\sqrt{\lambda_{ex} \cdot \lambda_{em}}}{N.A.}$, где λ_{ex} длина волны возбуждения, а λ_{em} – длина волны излучения красителя.

Размер конфокальной щели также влияет на разрешающую способность конфокального микроскопа (преимущественно в аксиальном направлении). С размером щели больше диаметра 1 AU происходит ухудшение разрешающей способности. Оптимальное разрешение наблюдается при величине диафрагмы в 0,25 AU. Хотя, чем меньше размер диафрагмы, тем меньше будет величина сигнала, что приведет к затруднению его регистрации детектором.

Контрастность получаемого изображения можно выразить через величину толщины оптического среза. Данная величина является удобной для оценки качества конфокальной микроскопии. Толщину оптического среза, как ширину сигнала при половинной амплитуде сигнала, можно вычислить по формуле:

$$d = \sqrt{2 \cdot \left(\frac{n \cdot h}{N.A.} \right)^2 + z^2}$$

где h – диаметр конфокальной щели.

Как видно из этого выражения, оптическая толщина среза, а поэтому и контраст, будут ухудшаться с увеличением диаметра конфокальной щели. Также видно, что эта величина зависит от величины z – разрешения в аксиальном направлении. Чем больше величина d , тем больше будет уровень сигнала, но хуже контраст изображения.

При полной открытой конфокальной щели появляется возможность использовать конфокальный микроскоп как обычный флуоресцентный, но с возможностью пошагового сканирования и использования лазера как точечного источника света для освещения. Данная конфигурация позволяет собрать весь свет в аксиальном направлении в условиях слабого контраста, что часто применяется, например, на культуре клеток, когда их толщина не превышает 10-20 мкм. При этом возможно фокусирование на нижнюю поверхность клетки или даже на покровное стекло, что обеспечит повышенный контраст по сравнению с фокусированием на среднюю часть клетки (данный принцип может быть применен и в обычной эпифлуоресцентной микроскопии).

На качество исследования влияет не только размер выбранного пикселя, но и размер апертуры перед детектором. Все эти параметры играют ключевую роль в получении контрастного, четкого изображения и должны быть точно определены при исследовании объектов с размерами, близкими к разрешающим способностям конфокального микроскопа, таких как отдельные структурные элементы клетки, например митохондрии, аксоны или дендриты нейронов.

Для регистрации Ca^{2+} вспышек необходимо использовать иммерсионный объектив с числовой апертурой не хуже 1,2. При этом размер пикселя выбирается не меньше 100 мкм, но не более 300 мкм в зависимости от используемого объектива.

Определение функции рассеяния точки при флуоресцентной микроскопии

Величину разрешающей способности флуоресцентного микроскопа можно получить не только арифметически, используя описанные выше формулы, но и экспериментально, посредством определения функции рассеяния точки (ФРТ). Способ ее получения был описан Агардом с соавторами (1989) [19]. Для этого используются флуоресцентные, симметричные частицы с размером меньше величины разрешающей способности (обычно диаметром 0,1 мкм). Для уменьшения неточности применяются все те настройки (скорость сканирования, коэффициент оптического увеличения, диаметр конфокальной щели), которые будут использоваться и в дальнейших экспериментах. Важно также, чтобы эти флуоресцентные частицы были обездвижены, обычно 4 % раствором агарного геля. Такой раствор практически соответствует экспериментальным условиям, например регистрациям в срезах ткани. ФРТ получается экспериментально посредством нескольких сканирований x - y оптических слоев в аксиальном (z) направлении посредством пошагового сдвига на 50-100 нм. Так как оптическое разрешение принято считать при половинной амплитуде сигнала, то в полученном изображении измеряется полная ширина при половинной амплитуде (FWHM) для трех координат, которая и характеризует оптическое разрешение оптической системы. Иногда для описания получаемой информации используется обобщенный (радиальный) размер флуоресцентной частицы ($r = \sqrt{x^2 + y^2}$; [15]). В этом приближении сигнал может быть аппроксимирован как продукт двух функций Гаусса:

$P = G(r) \cdot H(z)$, где $G \approx e^{-\frac{r^2}{2 \cdot \sigma_{xy}^2}}$ и $H \approx e^{-\frac{z^2}{2 \cdot \sigma_z^2}}$, где σ – среднеквадратическое отклонение соответствующей координаты. Также, возможна более сложная трехмерная аппроксимация этими же функциями. После аппроксимации легко определить σ_{xy} , σ_z и ширину кривой при половинной амплитуде, а значит, и разрешение микроскопа.

Устранение размытости изображения (deblurring)

Любая флуоресцентная частица или микрообъект будут иметь нечеткие границы и увеличенные размеры флуоресцентного сигнала из-за рассеивания света. Размытость изображения особенно критична для малых объектов с размерами, близкими к разрешающей способности микроскопа. При этом полученное изображение будет иметь кажущиеся увеличенные размеры и уменьшенную пиковую светимость по сравнению с оригиналом. Размытие изображения уменьшается вплоть до исчезновения с увеличением размера объектов.

Устранение размытости изображения является важным процессом в конфокальной микроскопии. Опишем вкратце общие принципы. Обозначим $F(x,y,z)$ как детектируемую флуоресценцию в пространстве изображения, а $f(x,y,z)$ обозначим как действительную флуоресценцию исследуемого объекта при условии отсутствия рассеивания света. Тогда можно записать:

$$F(x, y, z) = \iiint f(x, y, z) \cdot P(x, y, z) \cdot dx \cdot dy \cdot dz \quad (1)$$

где P является функцией рассеивания, которую для точечного объекта можно записать как трехмерную функцию Гаусса:

$$P = \frac{1}{\sigma_x \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_x^2}} \cdot \frac{1}{\sigma_y \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}} \cdot \frac{1}{\sigma_z \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}} \quad (2)$$

В математике существует функция свертки, которая показывает схожесть одной функции по отношению к другой. Результатом этой свертки является операция над двумя функциями, при которой получается третья функция; последняя может рассматриваться как модифицированная версия одной из первоначальных функций.

Уравнение (1) можно переписать посредством теоремы функции свертки как продукт двух функций f и P , каждая из которых трансформируется посредством преобразования Фурье в частотный интервал, тогда:

$$F = f \otimes P + n \quad (3)$$

где n – это шум, регистрируемый в системе; \otimes – оператор свертки.

Для трехмерного пространства можно записать $F(x, y, z) = f(x, y, z) \otimes P + n$. Тогда действительная флуоресценция $f(x, y, z)$ в простом приближении может быть определена как:

$$f(x, y, z) = \frac{F(x, y, z) - n}{P} \quad (4)$$

Данная операция производится в частотном интервале с последующим обратным преобразованием в пространственно-временной интервал [20]. На практике, однако, этот принцип не применяется, так как при делении сильно увеличивается шум, что затрудняет использование полученного результата.

Чтобы получить преобразование с приемлемым шумом, была предложена модификация уравнения (4), как $f(x, y, z) = \frac{F(x, y, z) - n}{P^2 + k}$, где k – аддитивный корректирующий фактор, добавление которого приводит к ограничению шума [21].

Существуют и другие алгоритмы, например, максимальной вероятности [22], когда полученные изображения в исправленной от искажений форме представляются посредством вероятности определенных участков объектов, используя дополнительные модели шума, добавляемые при преобразовании. Иногда применяется алгоритм Janson-van Cittert [23] с основным уравнением: $f^{k+1} = f^k + \alpha \cdot (F - (f^k \otimes P))$, где α – это критерий правильного результата, с помощью которого можно получить результат наиболее соответствующий действительности.

Данные операции по устранению размытости позволяют уменьшить артефакты рассеивания при микроскопии объектов с малыми размерами, а также скомпенсировать изменения интенсивности свечения флуоресцентного объекта. Описанные протоколы являются, однако, достаточно сложной процедурой для повседневной практики. Необходимость получения точных, скорректированных изображений исследуемых флуоресцентных объектов обусловила появление коммерчески доступных программ для обработки оптических данных.

Для точного перерасчета кальциевого сигнала в величину потока ионов кальция или перерасчет в величину протекающего тока необходимо сначала определить величину функции рассеяния точки экспериментально или рассчитать по выше представленным формулам. Используя полученную величину ФРТ произвести устранение размытости изображения. Эта процедура необходима для миниатюрных сигналов, соизмеримых с разрешающей способностью конфокального микроскопа. Ошибка в величине амплитуды сигнала может составить 20 %, а пространственные характеристики будут увеличены [16, 24].

Современные конфокальные микроскопы позволяют регистрировать сигналы от малой группы каналов, например риаудиновых рецепторов, и позволяют получать достоверную информацию, позволяющую точно определить физиологическую функцию как отдельных каналов, так и Ca^{2+} сигнала в целом. Необходимо точно производить настройку конфокальной системы и при необходимости производить компенсацию изменяющихся параметров для устранения неоднородности.

ВЫВОДЫ

Вкратце обобщим те важные моменты, о которых необходимо помнить при проведении конфокальной микроскопии. Первым важным шагом, как отмечалось выше, является выбор соответствующей длины волны излучения лазера для возбуждения красителя, адекватного дихроичного зеркала, которое должно соответствовать выбранному красителю или даже нескольким красителям, выбор нужного светофильтра перед детектором для отсекающего возбуждающего света. Выбор нужного размера диаметра конфокальной щели является важным шагом, так как величина щели влияет на контраст изображения.

Следующим важным этапом является правильный выбор величины пикселя (минимального размера изображения), что осуществляется по описанной выше теореме Найквиста. Согласно этой теореме и особенностям эксперимента подбирается также частота сканирования. Нужно помнить, что уменьшение размера пикселя приводит к уменьшению полезного регистрируемого сигнала (количества фотонов, испущенных в заданном объеме), и даже к его “слиянию” с шумом. В такой ситуации можно увеличить пиксель или же время сканирования. Альтернативой может быть также использование большей концентрации красителя (но не выше 200 мкМ), или увеличить размер конфокальной щели с ухудшением контрастности.

Важно также помнить, что при облучении лазером исследуемого объекта происходит не только фотовыгорание красителя, но и повреждается сам объект (фототоксичность). Эти процессы необходимо учитывать и, в частности, проводить компенсацию фотовыгорания зонда. Длительный эксперимент лучше разделить на части, чем накладывать много действий в одном. Разумно и необходимо также проводить контрольные регистрации для исключения данных вредных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rochefort N.L., Jia H., Konnerth A. Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine // *Trends Mol Med*. 2008. V. 14. P. 389-399.
2. Russell J.T. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology // *Br J Pharmacol*. 2011. V. 163. P. 1605-1625.
3. Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D. [et al.] Measurement of intracellular calcium // *Physiol Rev*. 1999. V. 79. P. 1089-1125.
4. Jablonski A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes // *Nature*. 1933. V. 131. P. 839-840.
5. Lichtman J.W., Conchello J.A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods*. 2005. V. 2. P. 910-919.
6. Yuste R. Fluorescence microscopy today // *Nature Methods*. 2005. V. 2. P. 902-904.
7. Minsky M. Microscopy Apparatus: U.S. Patent #3013467A; filed Nov 7, 1957; granted Dec 19, 1961.
8. Bootman M.D., Rietdorf K., Collins T. M. Ca^{2+} -sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca^{2+} imaging // *Sanderson Cold Spring Harb. Prot.* 2013. № 2. P. 83-99.
9. Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures // *Biochemistry*. 1980. V. 19 (11). P. 2396-2404.
10. Figueroa L., Shkryl V.M., Blatter L.A. [et al.] Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range // *PloS One*. 2013. V. 8 (2). P. e55778.
11. Isaeva E.V., Shkryl V.M., Shirokova N. Mitochondrial redox state and Ca^{2+} sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle // *J. Physiol*. 2005. V. 565 (Pt 3). P. 855-872.
12. Shkryl V.M., Shirokova N. Transfer and tunneling of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281 (3). P. 1547-1554.

13. Shkryl V.M., Blatter L.A. Ca²⁺ release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging // *PloS One*. 2013. V. 8 (4). P. e61525.
14. Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle // *Science*. 1993. V. 262. P. 740-744.
15. Rios E., Stern M.D., Pizarro G. [et al.] Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle // *J. Gen. Phys.* 1999. V. 114 (1). P. 31-48.
16. Shkryl V.M., Blatter L.A., Rios E. Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle // *Gen Physiol*. 2011. V. 139. P. 189-207.
17. Blatter L.A., Kockskamper J., Sheehan K.A. [et al.] Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes // *J Physiol*. 2003. V. 546. P. 19-31.
18. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии // ИИЦ РАН Санкт-Петербург. 2007. С. 77.
19. Agard D.A., Hiraoka Y., Shaw P. [et al.] Fluorescence microscopy in three dimensions // *Meth. Cell Biol*. 1989. V. 30. P. 353-377.
20. Holmes F.J., O'Connor N.J. Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs // *J Microsc.* 2000. V. 200 (Pt2). P. 114-127.
21. Shaw P.J., Rawlins D.J. Three-dimensional fluorescence microscopy // *Prog. Bioph. Mol. Biol*. 1991. V. 56 (3). P. 187-213.
22. Holmes T.J., Liu Y.H. Richardson-Lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing // *Appl. Optics*. 1989. V. 28 (22). P. 4930-4938.
23. Agard D.A. Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions // *Ann. Rev. Bioph. Bioeng*. 1984. V. 13. P. 191-219.
24. Soeller C., Cannell M.B. Estimation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ sparks // *Biophys J*. 2002. V. 82. P. 2396-2414.

REFERENCES

1. Rochefort, N. L., Jia, H., & Konnerth, A. (2008). Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends Mol Med*, 14(9), 389-399. doi:10.1016/j.molmed.2008.07.005
2. Russell, J. T. (2011). Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 163(8), 1605-1625. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x
3. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79(4), 1089-1125.
4. Jablonski, A. (1933). Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, 131, 839-840. doi:10.1038/131839b0
5. Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 910-919. doi:10.1038/nmeth817
6. Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2(12), 902-904. doi:10.1038/nmeth1205-902
7. Minsky M. (1961). Microscopy Apparatus: U.S. Patent #3013467A; filed Nov 7, 1957; granted Dec 19, 1961.
8. Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S., & Sanderson, M. (2013). Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harb Protoc*, 2013(2), 83-99. doi:10.1101/pdb.top066050
9. Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396-2404.
10. Figueroa, L., Shkryl, V. M., Blatter, L. A., & Rios, E. (2013). Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range. *PLoS One*, 8(2), e55778. doi:10.1371/journal.pone.0055778
11. Isaeva, E. V., Shkryl, V. M., & Shirokova, N. (2005). Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 565(Pt 3), 855-872. doi:10.1113/jphysiol.2005.086280
12. Shkryl, V. M., & Shirokova, N. (2006). Transfer and tunneling of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 281(3), 1547-1554. doi:10.1074/jbc.M505024200
13. Shkryl, V. M., & Blatter, L. A. (2013). Ca²⁺ release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging. *PLoS One*, 8(4), e61525. doi:10.1371/journal.pone.0061525
14. Cheng, H., Lederer, W. J., & Cannell, M. B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262(5134), 740-744.
15. Rios, E., Stern, M. D., Gonzalez, A., Pizarro, G., & Shirokova, N. (1999). Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol*, 114(1), 31-48.
16. Shkryl, V. M., Blatter, L. A., & Rios, E. (2012). Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle. *J Gen Physiol*, 139(3), 189-207. doi:10.1085/jgp.201110709

17. Blatter, L. A., Kockskamper, J., Sheehan, K. A., Zima, A. V., Huser, J., & Lipsius, S. L. (2003). Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *J Physiol*, 546(Pt 1), 19-31.
18. Shtejn G.I. (2007). Rukovodstvo po konfokal'noj mikroskopii. (pp 19-21). INC RAN Sankt-Peterburg.
19. Agard, D. A., Hiraoka, Y., Shaw, P., & Sedat, J. W. (1989). Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol*, 30, 353-377.
20. Holmes F.J., O'Connor N.J. (2000). Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs. *J Microsc.*, V. 200 (Pt2), 114-127.
21. Shaw, P. J., & Rawlins, D. J. (1991). Three-dimensional fluorescence microscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, 56(3), 187-213.
22. Holmes, T. J., & Liu, Y. H. (1989). Richardson-Lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing. *Appl Opt*, 28(22), 4930-4938. doi:10.1364/ao.28.004930
23. Agard, D. A. (1984). Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 13, 191-219. doi:10.1146/annurev.bb.13.060184.001203
24. Soeller, C., & Cannell, M. B. (2002). Estimation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ sparks. *Biophys J*, 82(5), 2396-2414. doi:10.1016/s0006-3495(02)75584-7