

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра радиофизики и нелинейной динамики

Проектирование лазерного сканирующего конфокального микроскопа

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ ВЫПУСКНОЙ
КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ**
студента 4 курса 422 группы
направления 11.03.02 «Инфокоммуникационные
технологии и системы связи» физического факультета

Агеева Василия Борисовича

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

И.В. Федосов

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

В.С. Анищенко

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Конфокальная микроскопия [1-5], успешно применяется в медицине, биологии, науке и технике. Средствами конфокальной и флуоресцентной микроскопии, стало возможно визуализировать процессы жизнедеятельности (*in vivo*) живого организма, без разрушения его структуры. Применяемые в конфокальном микроскопе методы растрового сканирования, позволяют получить массив данных. На основе которых можно производить 3D реконструкцию исследуемого образца, а серия «оптических срезов» успешно заменяет трудоемкие гистологические срезы [6-8].

Одним из ведущих направлений современной медицины, является применение неинвазивных органосохраняющих методов исследования. Благодаря научным разработкам в последнее десятилетие появились новые неинвазивные высокоразрешающие методы исследования структуры кожи и других тканей. К ним относятся оптическая когерентная томография, высокочастотное ультразвуковое сканирование, ядерно-магнитный резонанс, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Последний метод занимает особое место среди визуализирующих технологий, так как позволяет получить изображение эпидермиса и поверхностной части дермы с разрешением, приближенным к традиционной световой микроскопии [7-8].

Целью выпускной квалификационной работы является разработка оптической и инфокоммуникационной систем лазерного сканирующего конфокального микроскопа для прижизненных исследований.

Выпускная квалификационная работа содержит введение, две главы
1. Современная конфокальная микроскопия и её применение,
2. Проектирование лазерного сканирующего конфокального микроскопа,

закключение, список использованных источников и приложения. Общий объем работы 55 стр.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конструктивные особенности современных конфокальных микроскопов. Основоположником конфокальной микроскопии считается Марвин Мински. Сконструированный им, в середине 20 века конфокальный микроскоп, позволил повысить контраст изображения благодаря использованию специальной конфокально сопряженной оптической системы [1,2].

Конфокальная оптическая система устроена так, что позволяет выделить и зарегистрировать свет, который исходит из элементарного объема исследуемого образца. Это достигается путем установки в сопряженные плоскости промежуточного изображения источника и приемника конфокальных диафрагм. Конфокальная диафрагма выполняет роль пространственного фильтра [1,2].

Рабочая длина волны конфокального микроскопа выбирается в зависимости от свойств исследуемого образца. Для работы в отраженном свете с непрозрачными образцами, можно использовать различные длины волн. Но чаще всего на конфокальном микроскопе исследуются биологические ткани, которые имеют «окна прозрачности» только на определенных длинах волн. Окном прозрачности называют, диапазон длин волн, в котором поглощающая способность тканей минимальна [5-8].

Построение полного изображения исследуемого образца в конфокальном микроскопе, происходит только после последовательного сканирования всех элементарных объемов исследуемого образца.

В зависимости от конструкции конфокального микроскопа, построение изображения происходит либо благодаря свойству инерционности зрения при быстром сканировании, либо посредством использования фотоприемников и электронных запоминающих устройств [1,2,5,6].

«Таким образом, конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет фильтрации вне фокусных лучей. Для того, чтобы регистрировать свет только от одной точки, после объективной линзы располагается диафрагма малого размера таким образом, что свет, испускаемый точкой фокальной плоскости проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет идущий от точек расположенных выше или ниже фокальной плоскости, в основном задерживается конфокальной диафрагмой и ослабляется в десятки раз.

Вторая особенность, повышающая контрастность изображения, расположенного в фокальной плоскости, состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку (элементарного объема). Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, но при этом требуется, чтобы образец был прозрачным.

Альтернативой является, использование светоделительной пластинки, так чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом. Такая схема к тому же облегчает юстировку, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы).»

Существуют различные способы осуществления сканирования в конфокальном микроскопе. Расположим основные виды сканирующих систем применяемых к ЛСКМ, в порядке увеличения скорости сканирования:

- Сканирующая система осуществляющая перемещение исследуемого объекта относительно объектива микроскопа [1,2];
- Сканирующая система на основе электродинамических гальванометров;
- Сканирующая система на основе резонансного электродинамического гальванометра;
- Сканирующая система на основе диска Нипкова [3];
- Сканирующая система на основе диска Yokogawa [5];

Результаты и обсуждения. Основой проектируемого конфокального микроскопа является прямой микроскоп с микрообъективом планахроматом дающий увеличение 50х и числовой апертурой 0,8. Предел разрешения для данного объектива равен 406 нм. Данный объектив предназначен для работы в металлографическом микроскопе, с тубусной линзой, фокусное расстояние которой равно 190 мм. Фокусное расстояние объектива равно 3,8 мм. Рабочий отрезок 1,5 мм.

Цифровой микроскоп построен на базе камеры Thorlabs DCC1545C. Размер изображения 1280x1024 пикселей, размер пикселя 3,6 мкм. КМОП сенсор цифровой камеры Micron MT9M131 имеет размер 4,61x3,69 мм. В качестве тубусной линзы применен объектив «Гелиос», настроенный на «бесконечность» с фокусным расстоянием 58 мм. Эффективное увеличение цифрового микроскопа с данным объективом составило расчетное 15,26 крат (экспериментальное 11,52 крат). Поле зрения цифрового микроскопа с объективом 50х, равно 400 мкм.

Увеличение оптической системы конфокального микроскопа между фокальной плоскостью объектива и промежуточной фокальной плоскостью согласующей системы равно $120/3,8 = 31,57$ крат. Увеличение оптической системы в сопряженной плоскости качания гальванометров равно $31,57 \times 50 / 120 = 31,57 \times 0,41 = 13,15$ крат

Диаметр конфокальной диафрагмы равен 50 мкм.

По следующей формуле оценим толщину оптического среза, аксиальное разрешение конфокального микроскопа [6].

$$A = 0,8$$

$$\lambda_{\text{возб}} = 650 \text{ нм}$$

$$n = 1$$

$$D = 30 \text{ мкм}$$

$$\Gamma = 13,15$$

$$\Delta Z = \left(0,88 \times \frac{\lambda_{\text{возб}}}{n - (n^2 - A^2)^2} \right)^2 + 2 \times n^2 \times \left(\frac{D}{\Gamma} \right)^2 / A^2)^{0,5} = 4,086 \text{ мкм.}$$

Латеральное разрешение объектива равно $\Delta X = \Delta Y = \frac{0,51 \times 650 \text{ нм}}{0,8} = 0,4143 \text{ мкм. [4-10]}$

Шаг микрометрического винта узла фокусировки равен 0,5 мм, драйвер шагового двигателя настроен в микрошаговый режим с делением полного шага 1/8. На один оборот микрометрического винта будет приходиться 1600 шагов. Один микрошаг равен 0,3125 мкм.

На рисунке 1, представлен общий вид оптической части ЛСКМ.



Рисунок 1 - Оптическая схема ЛСКМ

Алгоритм работы программной части ЛСКМ в данное время реализует только режим вертикального построчного сканирования, в результате которого получается серия «оптических срезов», с фиксированным шагом по глубине, алгоритм программной части представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 - Блок схема программной части ЛСКМ

Основной блок (1), объединяет в себе следующие функциональные блоки:

- Блок (2) инициализации и получения изображения с видео камеры;
- Блок (3) задает параметры сканирования;
- Блок (4) осуществляет инициализацию аудиокарты, генерацию и вывод управляющих сигналов;
- Блок (5) отвечает за генерацию синхроимпульса, по приходу которого, микроконтроллер осуществляет перефокусировку объектива микроскопа на заданное в блоке (3) число шагов;
- Блок (6) синхронно с блоком (4) осуществляет получение сигнала поступающего с предварительного усилителя фотодиода;
- Блок (7) содержит цифровой полосовой фильтр;

- Блок (8) содержит демодулятор на основе преобразования Гилберта. Данный блок позволяет выделить низкочастотную (НЧ) огибающую из высокочастотного (ВЧ) амплитудно модулированного (АМ) колебания;
- Блок (9) осуществляет накопление и индикацию полученной информации, формируя конфокальное изображение;

На рисунке 3, показано действующий макет ЛСКМ.

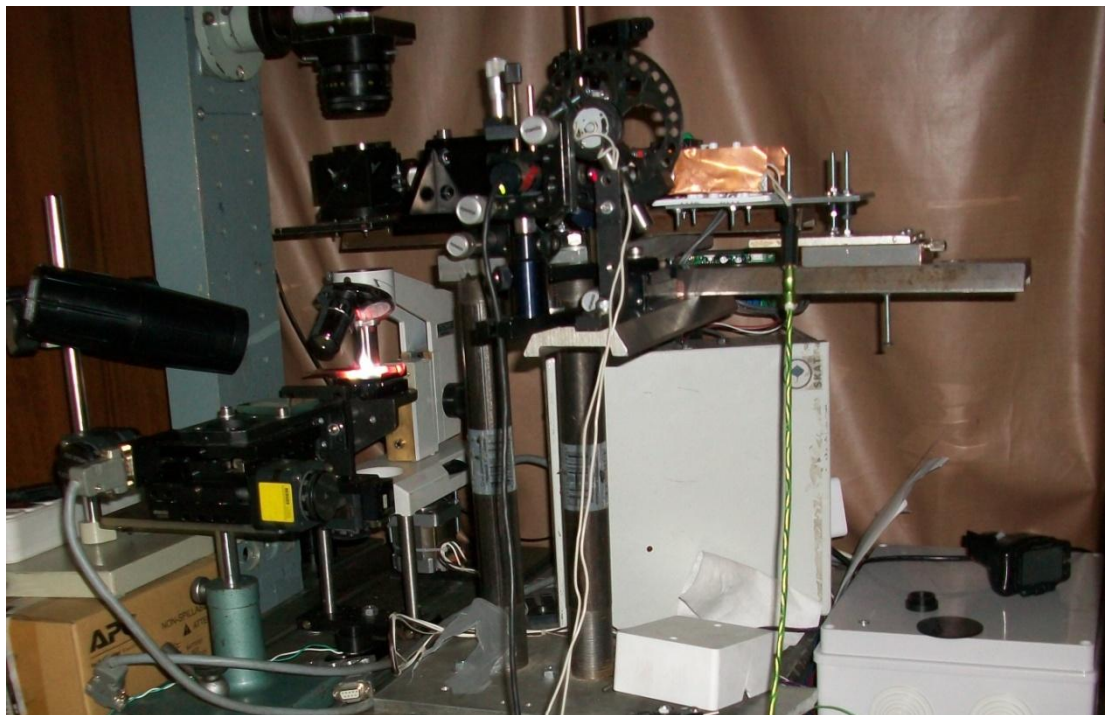


Рисунок 3 - Действующий макет ЛСКМ

Результаты сканирования: Сканирования проводились с объективом 10x / 0,2. Аксиальный шаг перефокусировки объектива выбран равным 3 мкм. Латеральное разрешение объектива составляет 4мкм.

Для проверки работоспособности спроектированного ЛСКМ, проведем сканирования следующих объектов:

- Стопка покровных стекол;
- Штрих шкалы линейки;
- Участок монеты достоинством в 1 руб.;
- Канавку из изоляционной ленты на покровном стекле;

Результат сканирования стопки покровных стекол, толщиной 0.13 – 0.16 мм представлен на рисунке 4. Границы стекол видны яркими линиями даваемыми отражениями от поверхности стекла. Сканирование происходит сверху в низ, и первое стекло сканируется в размере 1:1. Толщины последующих покровных стекол становятся больше из-за действия преломления рассеянного света верхним покровным стеклом. Увеличение оптической толщины покровного стекла, на рисунке 4 хорошо заметны.

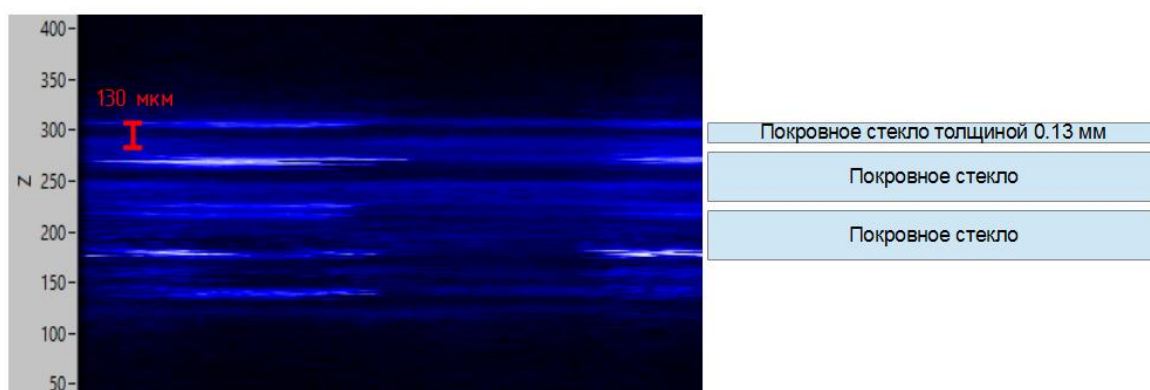


Рисунок 4 - Сканирование стопки покровных стекол

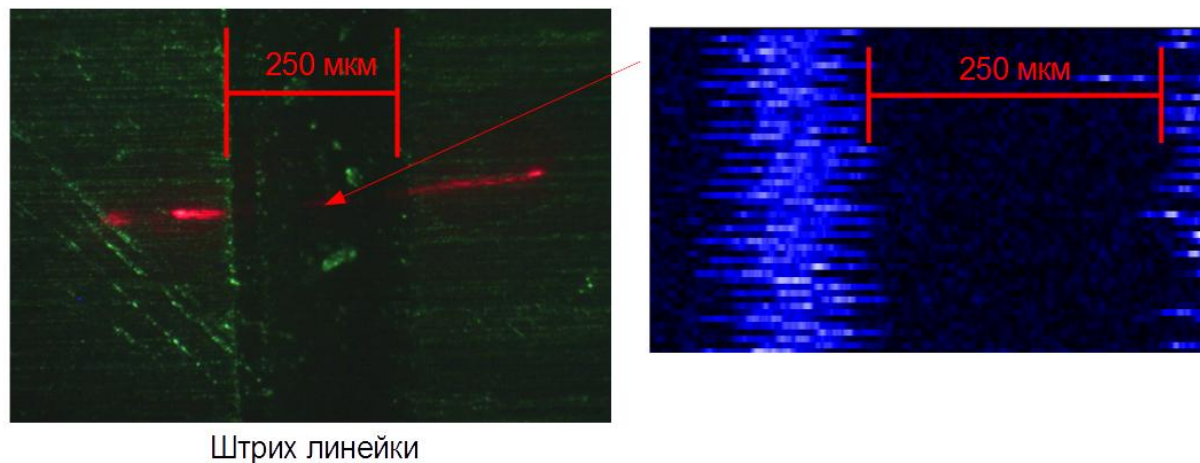


Рисунок 5 - Сканирование штриха линейки

На рисунке 5, произведено сканирование штриха шкалы линейки. При этом сканирование осуществлялось только некоторой высоте, на которую предварительно установили объектив. На рисунке 5, можно видеть четкую границу штриха. Изображение при сканировании значительно искажается вибрациями, это видно как дрожание линий.

На рисунке 6, представлен результат сканирования профиля рельефа. Место сканирования обозначено красной линией. Красной линией обведен профиль сканируемого рельефа.

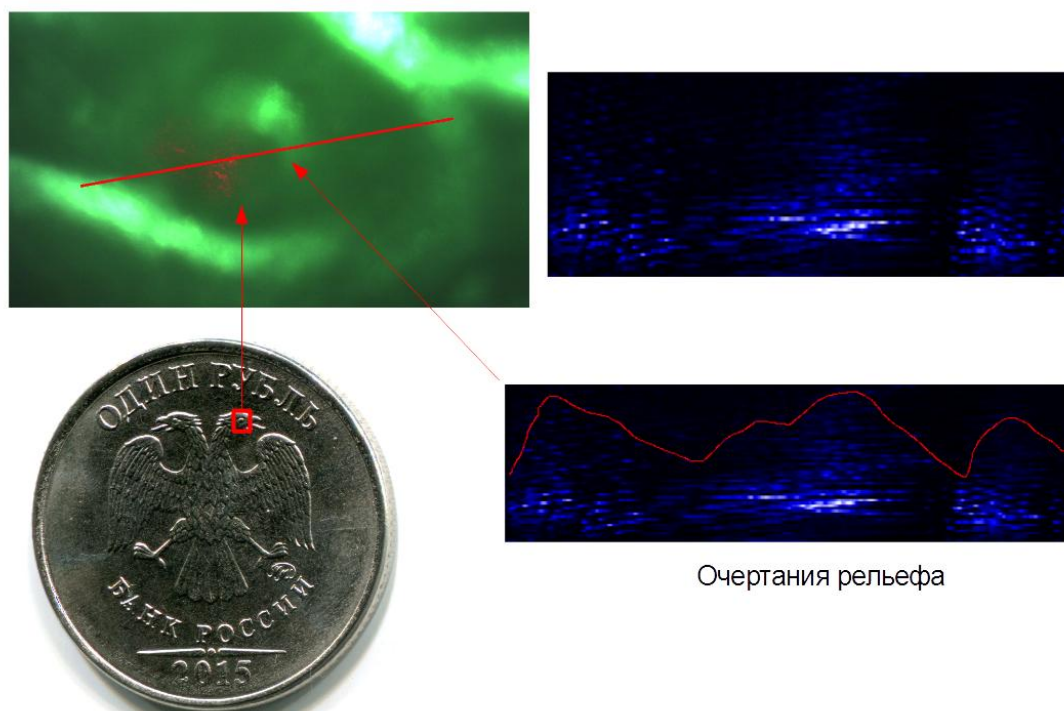


Рисунок 6 - Результат сканирования монеты

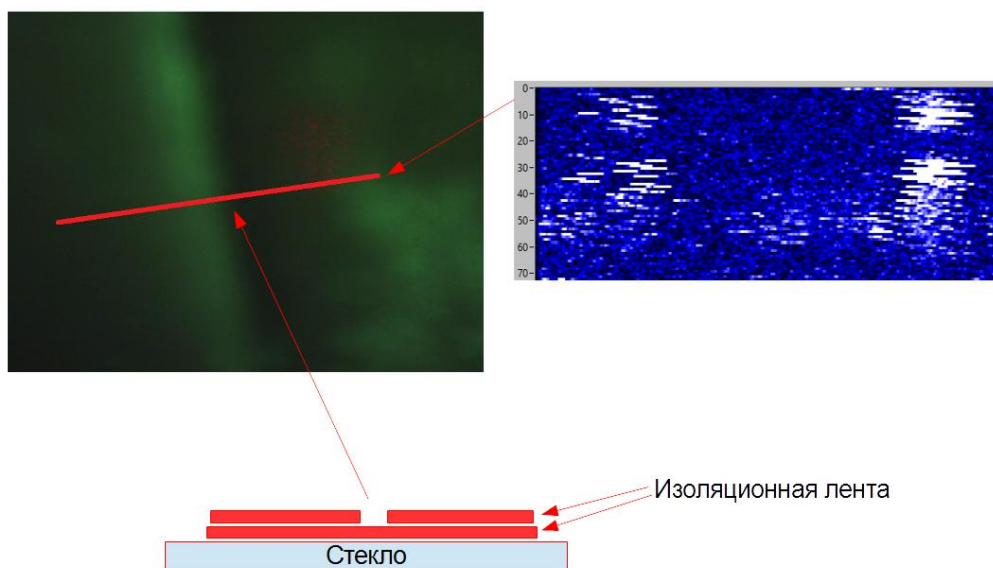


Рисунок 7 - Результат сканирования канавки

На рисунке 7, показан результат сканирования канавки, построенный из слоев изоляционной ленты, общий вид которой показан на рисунке. На конфокальном изображении четко видно границы стенок канавки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (ЛСКМ), является незаменимым инструментом при решении широкого круга задач биофизики, молекулярной и клеточной биологии. Флуоресцентная конфокальная микроскопия перспективная технология, позволяющая изучать механизмы клеточного транспорта, внутриклеточной локализации и механизмов действия биологических молекул. Средствами конфокальной микроскопии стало возможно производить 3D-реконструкцию исследуемых препаратов на микроуровне.

Основной недостаток ЛСКМ, является их высокая стоимость. И рядовому исследователю такой инструмент становится недоступен.

В данной выпускной квалификационной работе рассмотрены этапы проектирования основных систем ЛСКМ, разработаны аппаратные и программные средства. Построена лабораторная установка ЛСКМ, проведен натурный эксперимент, результаты которого показаны выше и оформлены в настоящей выпускной квалификационной работе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1]. Minsky M., Microscopy Apparatus, US Pat. 3,013,467, 1961.
- [2]. Minsky M., Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscopy, Scanning 1988; 10: 4: 128—138.
- [3]. Egger M.D., Petran M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cell // Science. 1967. V. 157. P. 306-307.
- [4]. Цифровая оптическая микроскопия / сост. П.Е.Тимченко, Е.В.Тимченко. – Самара: Изд-во Самар. гос. аэрокосм. ун-та, 2015. -104 с.
- [5]. Лазерная конфокальная микроскопия: метод. указания / сост. П.Е.Тимченко, Е.В.Тимченко. – Самара: Изд-во Самар. гос. аэрокосм. ун-та, 2014. -76 с.
- [6]. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая Конфокальная микроскопия в биологических исследованиях / А.В. Феофанов // Успехи биологической химии. 2007. т.47, с. 371-410.
- [7]. Штейн Г.И., Кудрявцев Б.Н. Использование конфокальной микроскопии для микрофлуориметрических исследований в клеточной биологии / Г.И. Штейн // Цитология. 2018. т.60, №9, с. 686-692.
- [8]. И.А. Волков, Н.В. Фриго, Л.Ф. Знаменская, О.Р. Катунина. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биологии и медицине / И.А. Волков // Вестник дерматологии и венерологии. 2014, №1, с. 17-24.
- [9]. Штейн Г. И. Руководство по конфокальной микроскопии. – Изд-во Политехнического ун-та, 2007.
- [10]. Лукашева Н. Н. и др. Прижизненная отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: история создания, принцип работы, возможности применения в дерматологии //Клиническая дерматология и венерология. – 2008. – Т. 5. – С. 10-15.