

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”**

Факультет біомедичної інженерії

Кафедра біомедичної інженерії

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Владислав ШЛИКОВ

« ____ » _____ 2021р.

Дипломна робота

на здобуття ступеня бакалавра

**за освітньо-професійною програмою « Біомедичні прилади та
інформаційно-вимірювальні системи »**

спеціальності 152 « Метрологія та інформаційно-вимірювальна техніка »

на тему: « 4Рі мікроскоп для дослідження біологічних середовищ »

Виконав:

студент IV курсу, групи БП-71 Полуктов Сергій Олександрович

_____ (підпис)

Керівник:

ст.викл. каф. БМІ Савкіна Катерина Олександрівна

_____ (підпис)

Консультант з дипломного проектування:

д.т.н. доцент, професор каф. ВП Безуглий Михайло Олександрович

_____ (підпис)

Консультант з розділу «Охорона праці»:

к.т.н. доцент каф. ОПЦБ Демчук Гліб Вікторович

_____ (підпис)

Рецензент:

д.мед.н., проф.,завідувач кафедри, Худецький Ігор Юліанович

_____ (підпис)

Засвідчую, що у цій дипломній роботі
немає запозичень з праць інших авторів
без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2021 року

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”**

Факультет біомедичної інженерії

Кафедра біомедичної інженерії

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 152 «Метрологія та інформаційно-вимірвальна техніка»

Освітньо-професійна програма «Біомедичні прилади та інформаційно-вимірвальні системи»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Владислав ШЛИКОВ

«__» _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

Полуектову Сергію Олександровичу

1. Тема роботи «4Рі мікроскоп для дослідження біологічних середовищ», керівник роботи Савкіна Катерина Олександрівна, ст.викл каф БМІ, затверджені наказом по університету від «27» травня 2021 р. № 1661.
2. Термін подання студентом роботи: 06.06.2021 р.
3. Вихідні дані до роботи : принцип флуоресцентної мікроскопії, принцип 4Рі мікроскопії, відомості про просторове розсіювання і оптичні властивості біологічних середовищ.
4. Зміст роботи : принцип роботи флуоресцентних мікроскопів, механізми збудження флуорофорів, оптичні властивості біологічних середовищ, принцип флуоресцентної мікроскопії, розробка оптичної схеми 4Рі мікроскопу, підбір компонентів системи 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних середовищ,

габаритний розрахунок системи, розробка тримача і корпусу приладу, дослідження просторового розсіяння флуоресценції.

5. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо): презентація у MS PowerPoint.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
2, 3	д.т.н. доцент, професор каф. ВП Безуглий Михайло Олександрович		
4	к.т.н. доцент каф. ОПЦБ Демчук Гліб Вікторович		

7. Дата видачі завдання : 18 «травня» 2021 р.»

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Аналіз наукової літератури	квітень 2021 р.	
2	Розробка 4Рі мікроскопу	квітень/травень 2021 р.	
3	Дослідження просторового розсіяння флуоресценції	травень 2021 р.	
4	Оформлення розділу з «Охорони праці»	травень 2021 р.	
5	Оформлення ДР	червень 2021 р.	
6	Отримання рецензії та відгуку	червень 2021 р.	
7	Надання документів по ДР до захисту ЕК	червень 2021 р.	
8	Захист ДР	червень 2021 р.	

Студент

Сергій ПОЛУЕКТОВ

Керівник

Катерина САВКІНА

АНОТАЦІЯ

Тема дипломної роботи: “4Pi мікроскоп для дослідження біологічних середовищ”.

Обсяг дипломної роботи становить 55 сторінок, міститься 24 ілюстрацій, 14 таблиць. Загалом опрацьовано 27 джерел.

Актуальність дипломної роботи: З огляду на те, що метод флуоресценції на сьогодні прийнято вважати одним з найбільш чутливих методів, які дозволяють проводити дослідження об'єктів не руйнуючи їх, застосування його в багатьох областях актуально і поширене. Справа в тому, що не тільки в медицині, але і в біології, фізиці, криміналістиці та інших науках використання даного методу дослідження з кожним роком неухильно зростає. А з додаванням скануючої методики 4Pi, за допомогою якої стає можливо отримати 3D зображення об'єкту та збільшується роздільна здатність, цей прилад є незамінним при точних лабораторних дослідженнях біологічних структур. Серійно 4Pi мікроскопи, не виготовляються, це одиничні виробництва під замовлення, що робить цей прилад недосяжним для звичайних науковців, тому було вирішено розробити модель флуоресцентного скануючого 4Pi мікроскопу.

Мета дипломної роботи: 4Pi мікроскоп.

Завдання дипломної роботи:

1. Визначити основні функціональні елементи 4Pi мікроскопу.
2. Розробити оптичну схему приладу та провести габаритний розрахунок системи.
3. Розробити корпус розробленого 4Pi мікроскопу.
4. Зробити дослідження розсіяння флуоресценції біологічними зразками.

Ключові слова: 4Pi мікроскопія, система об'єктивів, флуоресценція, розсіяння, лазер, індикатриса.

ANNOTATION

Theme of graduate work: "4Pi microscope for biological environment study".

The volume of the thesis is 55 pages, contains 24 illustrations, 14 tables. A total of 27 sources were processed.

Relevance of the thesis: Given that the method of fluorescence is currently considered one of the most sensitive methods that allow the study of objects without destroying them, its application in many areas is relevant and widespread. The fact is that not only in medicine but also in biology, physics, forensics and other sciences, the use of this research method is growing every year. And with the addition of the 4Pi scanning technique, which makes it possible to obtain 3D images of objects and increase resolution, this device is indispensable in accurate laboratory studies of biological structures. Series 4Pi microscopes are not manufactured, they are single production to order, which makes this device unattainable for ordinary scientists, so it was decided to develop a model of a fluorescent scanning 4Pi microscope.

The purpose of the thesis: model 4Pi microscope.

Thesis tasks:

1. Identify the main functional elements of the 4Pi microscope.
2. To develop the optical scheme of the device and to carry out dimensional calculation of system.
3. Develop the body of the developed 4Pi microscope.
4. To study the scattering of fluorescence by biological media

Keywords: 4Pi microscopy, lens system, fluorescence, scattering, laser, indicatrix.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА	9
1.1 Флуоресцентна мікроскопія	9
1.2 Зсув Стокса.....	11
1.3 Методи контрастування в лазерній скануючій флуоресцентній мікроскопії	12
1.3 Розсіювальні властивості біологічних середовищ	15
1.4 Принцип роботи 4Рі мікроскопу	17
Висновки до розділу 1	18
РОЗДІЛ 2 РОЗРОБКА ПРИЛАДУ.....	19
2.1 Розробка оптичної схеми приладу.....	19
2.2. Вибір лазера	21
2.3. Вибір камери.....	22
2.4. Вибір системи з об'єктивів.....	24
2.5 Функціональна схема розробленого 4Рі мікроскопу.....	27
2.6 Габаритний розрахунок та моделювання системи	28
2.7 Розробка корпусу приладу	30
Висновки до розділу 2	32
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОСТОРОВОГО РОЗСІЯННЯ ФЛУОРИСЦЕНЦІЇ БІОЛОГІЧНИМИ ЗРАЗКАМИ.....	33

					БП71.13.2705.1661.ПЗ			
<i>Вим</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>	<i>Полукетов С.О.</i>				4Рі мікроскоп для дослідження біологічних середовищ	<i>Лім.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Савкіна К.О.</i>						6	56
<i>Реценз.</i>	<i>Худецький Ю.А.</i>					<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БП-71</i>		
<i>Н. Контр.</i>	<i>Андреев П.І.</i>							
<i>Затвердив</i>	<i>Шликов В.В.</i>							

Висновки до розділу 3	38
РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ	39
4.1. Характеристика 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних середовищ	39
4.1.1 Технічні характеристики компонентів 4Рі мікроскопу.....	39
4.1.2 Складові частини розробленої системи 4Рі мікроскопу	40
4.1.3 Характер взаємодії системи 4Рі мікроскопу в системі «людина – об’єкт»	41
4.2. Оцінка небезпек, що можуть виникнути через складові елементи розробленого 4Рі мікроскопу, та способи їх усунення	42
4.2.1 Небезпека ураження лазерним випромінюванням	42
4.2.2 Небезпека ураження електричним струмом.....	44
4.2.3 Інструкція з техніки безпеки при роботі з розробленим 4Рі мікроскопом	45
Висновки до розділу 4:	47
ВИСНОВОК.....	48
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	49
ДОДАТОК А.....	52
ДОДАТОК Б	55

ВСТУП

У сучасному світі все більше постає питання про вирішення проблеми руйнування дифракційного обмеження, та підвищення роздільної здатності. 4Рі мікроскопія наблизилась до максимально малої роздільної здатності у приблизно 50 нм, використовуючи переваги подвійних розташованих поруч об'єктивів [1,4].

З огляду на те, що метод флуоресценції на сьогодні прийнято вважати одним з найбільш чутливих методів, які дозволяють проводити дослідження об'єктів не руйнуючи їх, застосування його в багатьох областях актуально і поширене. Справа в тому, що не тільки в медицині, але і в біології, фізиці, криміналістиці та інших науках використання даного методу дослідження з кожним роком неухильно зростає. А з додаванням скануючої методики 4Рі, за допомогою якої стає можливо отримати 3D зображення об'єкту та збільшується роздільна здатність, цей прилад є незамінним при точних лабораторних дослідженнях біологічних структур [2,3]. Серійно 4Рі мікроскопи, не виготовляються, це одиничні виробництва під замовлення, що робить цей прилад недосяжним для звичайних науковців, тому було вирішено розробити модель флуоресцентного скануючого 4Рі мікроскопу.

Тема дипломної роботи: 4Рі мікроскоп для дослідження біологічних середовищ.

Мета дипломної роботи: модель 4Рі мікроскопу.

Задачі дипломної роботи:

1. Визначити основні функціональні елементи 4Рі мікроскопу.
2. Розробити оптичну схему приладу та провести габаритний розрахунок системи.
3. Розробити корпус розробленого 4Рі мікроскопу.
4. Зробити дослідження розсіяння флуоресценції біологічними зразками.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						8
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1.1 Флуоресцентна мікроскопія

Поглинання і подальше повторне випромінювання світла органічними і неорганічними зразками зазвичай є результатом добре відомих фізичних явищ, описуваних як флуоресценція або фосфоресценція. Випромінюється світло в процесі флуоресценції майже одночасно з поглинанням збуджуючого світла через відносно короткі тривалості затримки між поглинанням і випусканням фотона, зазвичай становить менше мікросекунди. Коли випромінювання зберігається довше після того, як збудливе світло згасло, це явище називається фосфоресценцією [5].

Флуоресцентна мікроскопія часто використовується для візуалізації специфічних особливостей невеликих зразків, таких як мікроби. Він також використовується для візуального поліпшення тривимірних об'єктів в невеликих масштабах.[5] Це може бути досягнуто шляхом прикріплення флуоресцентних міток до антитіл. Коли відбите світло і фонова флуоресценція фільтруються в цьому типі мікроскопії, цільові частини даного зразка можуть бути відображені. Схема роботи флуоресцентного мікроскопа зображена на рисунку 1.1.

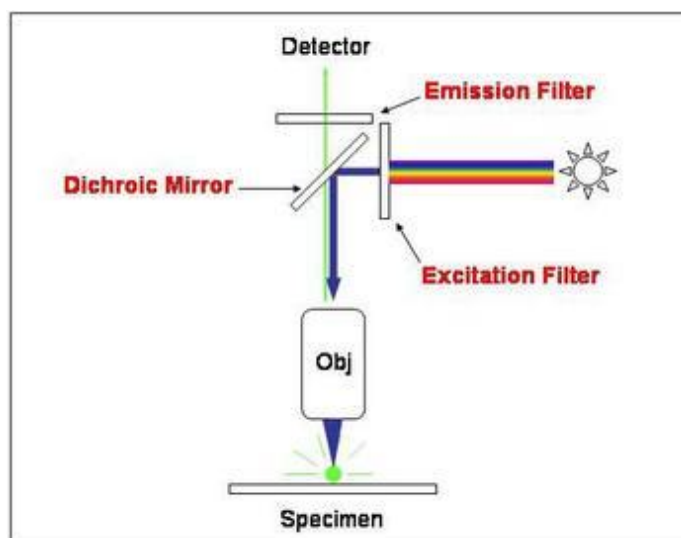


Рисунок 1.1 – Схема роботи флуоресцентного мікроскопа

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		9

У більшості випадків зразок позначається флуоресцентною речовиною, відомою як флуорофор, а потім висвітлюється через лінзу більш потужним джерелом енергії [6]. Випромінюване світло поглинається флуорофором (тепер прикріпленим до зразка) і змушує їх випромінюватись з меншою довжиною хвилі. Це флуоресцентне світло можна відокремитись від навколишнього випромінювання за допомогою фільтрів, призначених для цієї конкретної довжини хвилі, дозволяючи глядачеві бачити тільки те, що флуоресціює.

Основне завдання флуоресцентного мікроскопа складається в тому, щоб дозволити збудливому світлу опромінювати зразок, а потім відсортувати набагато слабший випромінюване світло з зображення. По-перше, у мікроскопа є фільтр, що пропускає тільки випромінюване з певною довжиною хвилі, яка відповідає вашому флуоресцентного матеріалу.

Випромінювання стикається з атомами в зразку, і електрони збуджуються до більш високого рівня енергії. Коли вони розслабляються до нижчого рівня, вони випромінюють світло [6]. Щоб стати тим що виявляється (видимим людським оком), флуоресценція, що випускається зразком, відділяється від набагато більш яскравого збуджуючого світла в другому фільтрі. [7] Це працює, тому що випромінюване світло має більш низьку енергію і велику довжину хвилі, ніж світло, яке використовується для освітлення.

Більшість флуоресцентних мікроскопів, що використовуються сьогодні в біології, є епіфлуоресцентними мікроскопами, що означає, що і збудження, і спостереження флуоресценції відбуваються над зразком. Більшість з них використовують ксенонову або ртутну дугову лампу для більш інтенсивного джерела світла.

1.2 Зсув Стокса

Коливальна енергія втрачається, коли електрони релаксують із збудженого стану назад в основний стан. В результаті втрати енергії спектр випромінювання порушеного флуорофора зазвичай зміщується в бік більш довгих хвиль в порівнянні зі спектром поглинання або збудження, довжина хвилі змінюється обернено пропорційно енергії випромінювання) [8]. Це добре задокументоване явище відоме як закон Стокса або зсув Стокса. У міру збільшення значень стоксова зсуву стає легше відокремити збудження від світла, що випускається за рахунок використання комбінацій флуоресцентних фільтрів.

Пік інтенсивності випромінювання (або поглинання) флуорофора зазвичай менше по довжині хвилі і величиною, ніж пік збудження, а спектральний профіль випромінювання (крива) часто є дзеркальним відображенням (або майже дзеркальним відображенням) кривої збудження, але зміщеним в сторону більш довгих хвиль, як показано на рисунку 1.2 для Alexa Fluor 555, який поглинає світло в жовто-зеленій області і виробляє жовто-помаранчеве випромінювання.

Для досягнення максимальної інтенсивності флуоресценції флуорофор (часто званий барвником) зазвичай порушується на довжинах хвиль, близьких до піку кривої збудження або на його піку, і для виявлення вибирається максимально широкий діапазон довжин хвиль випромінювання, який включає пік випромінювання. Вибір довжин хвиль збудження і випромінювання зазвичай заснований на інтерференційних фільтрах [8].

Крім того, спектральний відгук оптичної системи мікроскопа також буде залежати від таких факторів, як ефективність пропускання через скло, кількість лінз і дзеркальних елементів, а також чутливість детекторної системи.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						11
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

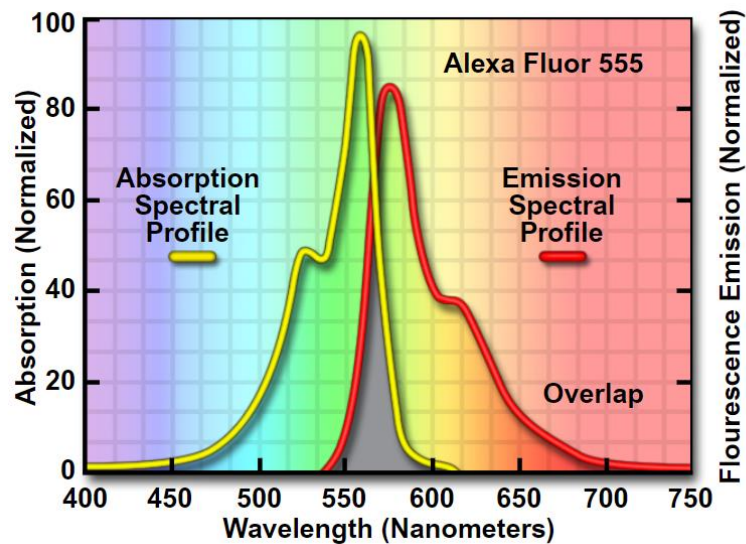


Рисунок 1.2 – Профілі поглинання і емісії флуорофора

Ефективність, з якою конкретний флуорофор поглинає фотон збуджуючого світла, є функцією молекулярного поперечного перерізу, а ймовірність поглинання відома як коефіцієнт екстинкції [9]. Більш високі коефіцієнти екстинкції вказують на те, що поглинання фотона (або кванта) в даній області довжин хвиль більш ймовірно. Квантовий вихід позначає відношення кількості випускаються квантів до кількості спожитих (і зазвичай становить від 0,1 до 1,0). Значення квантового виходу нижче 1 є результатом втрати енергії через безвипромінювальні шляхи, таких як тепло або фотохімічна реакція, а не через повторне випромінювання флуоресценції. Коефіцієнт екстинкції, квантовий вихід, середня сила світла джерела світла і час життя флуоресценції - все це важливі фактори, які впливають на інтенсивність і корисність флуоресцентного випромінювання.

1.3 Методи контрастування в лазерній скануючій флуоресцентній мікроскопії

Щоб молекула флуоресцувала, вона повинна поглинути фотон з відповідною кількістю енергії, достатнім для переходу молекули з основного

в збуджений стан. Схематичне зображення даного процесу показано на рисунку 1.3 а.

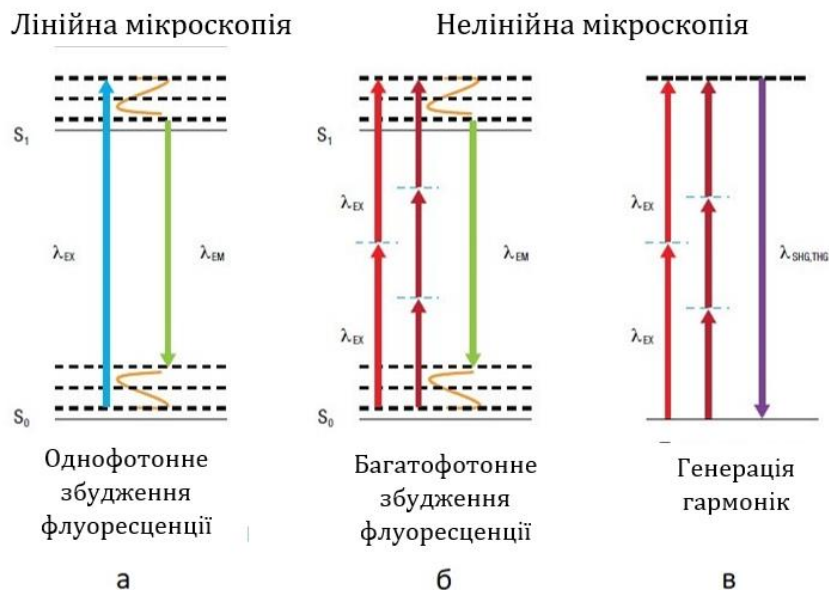


Рисунок 1.3 — Генерація сигналів в лазерній скануючій мікроскопії
(а) – однофотонне збудження, (б) – багатофотонне збудження, (в) – генерація гармонік

При вимушеному переході молекули із збудженого стану в стан рівноваги вона випускає квант світла. За рахунок природних втрат в процесі релаксації випромінений фотон має меншу енергію і, відповідно, велику довжину хвилі, ніж поглинений фотон. Кількість флуоресценції пропорційно інтенсивності (I) лазерного випромінювання, що висвітлює зразок, тому лазерну конфокальну мікроскопію часто називають методом лінійної візуалізації [10].

Багатофотонне збудження молекули (рисунок 1.3 б) відбувається, коли два (або більше) фотона, енергії яких в сумі задовольняють кількості енергії, необхідної для квантового переходу, поглинаються одночасно. При цьому два поглинені фотона матимуть меншу енергію, ніж випромінюється флуоресціюючий фотон [10].

Також існують схеми багатофотонного контрастування (рисунок 1.3 в), такі як генерація гармонік і генерація сумарної частоти. Ці процеси не

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

вимагають поглинання енергії [9]. При генерації гармонік падаючі фотони анігілюють, після чого створюється новий фотон, що володіє сумарною енергією. Дослідження в такому випадку відбувається шляхом спостереження за фізичним порядком генерації гармонік.

Двухфотонне збудження і генерація другої гармоніки - нелінійні процеси, так як випромінювання залежить від квадрата інтенсивності (I^2). Це означає, що для дослідження генерації другої і третьої гармонік необхідні високі щільності фотонів [8]. Для досягнення необхідної щільності потрібно використовувати потужні джерела лазерного випромінювання, часто застосовуються фемтосекундний імпульсні лазери з фазової синхронізацією (наприклад титан-сапфірові).

Ще одна відмінна риса лінійної мікроскопії - це певна довжина хвилі для збудження конкретної флуорофора. Для збудження більшості флуорофорів потрібні різні довжини хвиль при одно- і двухфотонних поглинаннях. Існують окремі спектри для цих видів поглинання, спектри двухфотонного поглинання часто значно ширше (> 100 нм) і не відповідає гладким полугаусовим кривим. Широкий спектр двухфотонного поглинання багатьох флуорофорів дозволяє порушувати кілька флуоресцентних молекул одним джерелом лазерного випромінювання, що робить можливим одночасне спостереження флуоресценції від декількох флуорофорів з різною довжиною хвилі збудження [11].

Порушувані в зразку флуорофори можуть мати різний пік збудження, але необхідно, щоб перетиналися довжини хвиль їх збудження. У більшості випадків збудження кількох флуорофорів досягається підбором компромісного джерела випромінювання, довжина хвилі якого збуджує всі флуорофори і забезпечує необхідний рівень їх ефективності.

Розглянемо тепер питання збільшення контрастності при використанні конфокальної оптичної схеми. По-перше, тому що в конфокальному

мікроскопі світло двічі проходить через об'єктив, то функція розмиття точки (далі позначається ФРТ) має наступний вигляд:

$$P_{conf}(\xi, \rho) = p(\xi, \rho) * p(\xi, \rho), \quad (1.1)$$

де P_{conf} — конфокальна функція розмиття точки, а p — звичайна функція розмиття точки [12].

Таким чином, досяжна товщина фокальної площини визначається в основному довжиною хвилі використовуваного випромінювання, поділеною на числову апертуру об'єктива, а також залежить від оптичних властивостей зразка. Завдяки тонкому оптичному зрізу ці типи мікроскопів особливо ефективні для 3D-візуалізації і поверхневому профілювання зразків.

Послідовні зрізи формують «z-стек», який може бути оброблений певним програмним забезпеченням для створення реконструйованого 3D-зображення або представлений в двомірному стеку для публікації, завдяки поширеній алгоритму пошуку максимуму інтенсивності.

1.3 Розсіювальні властивості біологічних середовищ

Біологічні тканини є оптично неоднорідними поглинаючими середовищами із середнім показником заломлення більшим, ніж у повітря, тому на межі поділу «біологічний об'єкт – повітря» частина випромінювання відбивається, а інша частина проникає в біотканину [13]. Об'ємне розсіяння є причиною поширення значної частки випромінювання в зворотному напрямку (зворотне розсіяння). Ця властивість істотно знижує можливості вимірювальних засобів, у тому числі томографічних систем, обмежуючи глибину зондування (максимальна відстань від поверхні середовища до неоднорідності того чи іншого типу, де вона ще може бути виявлена) і

мінімальний розмір об'єктів, зображення яких може бути отримане. Окрім того, для визначення оптимальної довжини хвилі і побудови алгоритмів вирішення зворотних задач томографії необхідні апіорні дані про оптичні властивості досліджуваних тканин [24]. Таким чином, дослідження просторового розсіяння лазерного світла в оптично мутних біологічних середовищах залишається актуальним.

Вимірювання індикатриси полягає в освітленні біологічного об'єкту пучком світла і реєстрації розсіяного випромінювання під різними кутами в межах повного тілесного кута (рисунок 1.4). Для задач біофотоніки найбільш прийнятним вважається застосування колімованого світла, тому доцільно використовувати лазерні джерела, що забезпечують значну направленість і високу інтенсивність випромінювання [24].

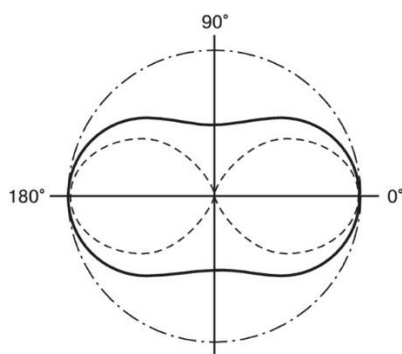


Рисунок 1.4 – Індикатриса релєєвського розсіяння

При розсіянні фотона напрямок його поширення змінюється на випадковий кут, який має певний розподіл ймовірності, яке і вважають фазовою функцією, тобто фазова функція визначає ймовірність того, що фотон, що летить в напрямку поширення світла, після розсіяння змінить свій напрямок з ймовірністю g [25]. Параметр g – фактор анізотропії розсіяння – характеризує фазову функцію ймовірності і є середнім косинусом кутів розсіяння. Значення g змінюється від -1 до 1 , причому $g = 0$ відповідає випадку ізотропного (розсіяння Релея) розсіяння, а $g = 1$ – повного розсіяння вперед (розсіяння Мі на великих частинках). Найбільш частою при моделюванні анізотропного розсіяння є фазова функція Хені-Грінштайна, яка безпосередньо включає фактор анізотропії [27].

1.4 Принцип роботи 4Рі мікроскопу

Поліпшення роздільної здатності досягається за рахунок використання двох протилежних лінз об'єктива, які фокусуються в одному і тому ж геометричному місці. Крім того, різниця в довжині оптичного шляху через кожен з двох лінз об'єктива ретельно поєднана, щоб бути мінімальною. За допомогою цього методу молекули, що знаходяться в загальній фокальній області обох об'єктивів, можуть когерентно висвітлюватися по обидві сторони, а відбите світло або світло що випромінюється також може бути когерентно зібране, тобто можливо когерентне накладення випромінюваного світла на детектор. Тілесний кут Ω , який використовується для освітлення і виявлення збільшується і наближається до свого максимуму. В цьому випадку зразок висвітлюється і детектується з усіх боків одночасно [14].

Режим роботи мікроскопа 4Рі показаний на рисунку 1.5. Лазерне світло розділяє світлоділник і направляє дзеркалами на дві протилежні лінзи об'єктива. У загальній фокусній точці відбувається накладення обох сфокусованих світлових променів. Збуджені молекули в цьому положенні випромінюють флуоресцентне світло, яке збирається обома лінзами об'єктива, об'єднується одним і тим же світлоділником і відхиляється дихроїчним дзеркалом на детектор. Тут знову може мати місце накладення обох випромінюваних світлових шляхів [15].

В ідеальному випадку кожна лінза об'єктива може збирати світло під тілесним кутом. З двома лінзами об'єктива можна збирати з усіх боків (тілесного кута). Назва цього типу мікроскопії походить від максимально можливого тілесного кута для збудження і виявлення. Практично для лінзи об'єктива можна отримати тільки апертурні кути близько 140° .

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						17
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2 РОЗРОБКА ПРИЛАДУ

Ідея, яку покладено в 4Рі-мікроскоп що розробляється, полягає в тому, щоб імітувати ситуацію, близьку до ідеальної, за рахунок когерентного використання двох протилежних лінз об'єктива, так що два хвильових фронти підсумовуються і об'єднують сили.

2.1 Розробка оптичної схеми приладу

У загальному випадку 4Рі стенд є складовою частиною конфокального сканера, для реєстрації флюоресценції. Проте було вирішено розробити прилад автономним і самодостатнім.

Було розроблено оптично-функціональну схему 4Рі мікроскопу (рисунок 2.1).

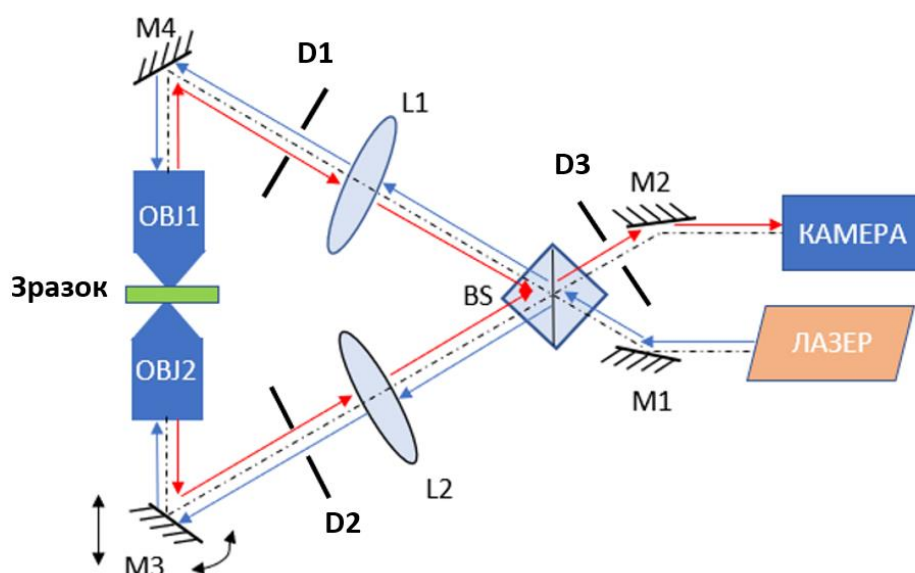


Рисунок 2.1 – Оптично-функціональна схема 4Рі мікроскопу

Для збудження флуорофора промінь лазера з синхронізацією мод вводиться в мікроскоп (сині стрілки), розділяється світлоділльником BS і

фокусується в тому ж місці протилежними лінзами об'єктива O1 і O2. Лінзи L1, L2 і дзеркала M1, M2, M3 і M4 утворюють проміжну оптичну систему, гарантуючи, що дві точки повороту сканування збігаються з вхідними зіницями двох лінз об'єктива. Флуоресценція (червоні стрілки) збирається обома лінзами, рекомбінує на BS і направляється до камери сканування.

Ірісові діафрагми D1, D2, D3 виконують роль апертурної діафрагми D1 і D2, польової D3, яка розташована у площині проміжного зображення після світлоділника BS. Апертурні діафрагми D1 і D2 обмежують розмір осьового пучка, а польова діафрагма D3 омежує розмір поля. Складаються з тонких металевих пластинок, які регулюють розмір отвору діафрагми, при зміні якого можлива регулювати світлосилу і добитися необхідної експозиції. Налаштування відбувається кожен раз перед використанням приладу

Довжина оптичного шляху двох променів у прямому і зворотному напрямку однакова, тому визначивши геометричні місця дзеркал та їх кути повороту, та розрахувавши лінзу для одного плеча, доцільно використовувати ці дані і для другого.

Кути повороту дзеркал були підібрані виходячи з основного закону оптики, про відбиття. Який каже, що кут падіння дорівнює куту відбиття.

Лазерний промінь у світлоділнику BS, ділиться на два промені де один проходить на заломлюючись, а інший заломлюється під кутом 90° (рисунок 2.2 в). Тобто два плеча та оптичний шлях де знаходяться об'єктиви утворюють прямокутний трикутник, що є зручним для подальшого габаритного розрахунку системи

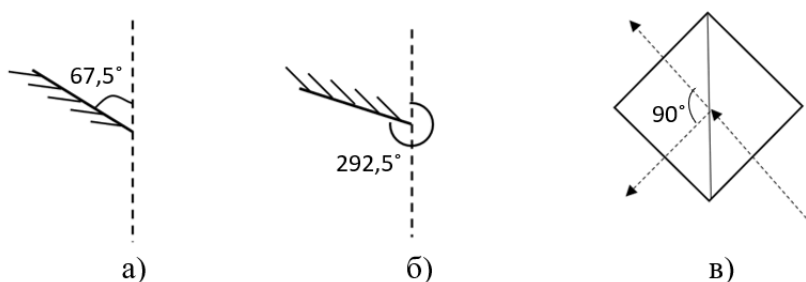


Рисунок 2.2 – Кути нахилу дзеркал M1 і M3 (а), M2 і M4(б) і геометрія проходження променя крізь світлоділник BS

2.2. Вибір лазера

У сучасні флуоресцентних мікроскопах використовують високочастотні лазери, що випускають імпульси тривалістю кілька десятків фемтосекунд, що забезпечує високу щільність фотонного потоку, яка необхідна для фотонного поглинання при 4Рі мікроскопії.

Серед серійних моделей, було обрано фемтосекундний переналаштовувемий титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs, технічні характеристики якого подані у таблиці 2.1 [17].

Таблиця 2.1 Технічні характеристики титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs

Технічні характеристики	
Характеристики лазера	
Діапазон налаштування	720 - 1060 нм
Ширина імпульсу	140 фс
Середня потужність	> 1,0 Вт при 720 нм > 2,3 Вт при 800 нм > 1,4 Вт при 920 нм > 0,5 Вт при 1000 нм > 0,3 Вт при 1040 нм
Шум ^a	<0,15% (середньоквадратичне значення)
Швидкість повторень	77 МГц (номінальний)
Діаметр променя (1 / e ²)	1,5 мм (номінальна)
M ²	<1,2 при 800 нм
Вказівка на стабільність під час налаштування	<50 мкрад на 100 нм
Електричні вимоги	
Вхідна напруга	100 - 240 В
Частота	50 - 60 Гц
Споживання енергії	1,2 кВт (макс.)
Екологічні вимоги	
Кімнатна температура	17-25 °С
Стабільність кімнатної температури	<3 °С протягом 24 годин
Розміри корпусу	29,38 "x 7,48" x 11,32 " (746,3 x 190,0 x 287,4 мм)

Зовнішній вигляд та габаритні розміри обраного титан-сапфірового лазера Tiberius® Thorlabs зображені на рисунку 2.3.

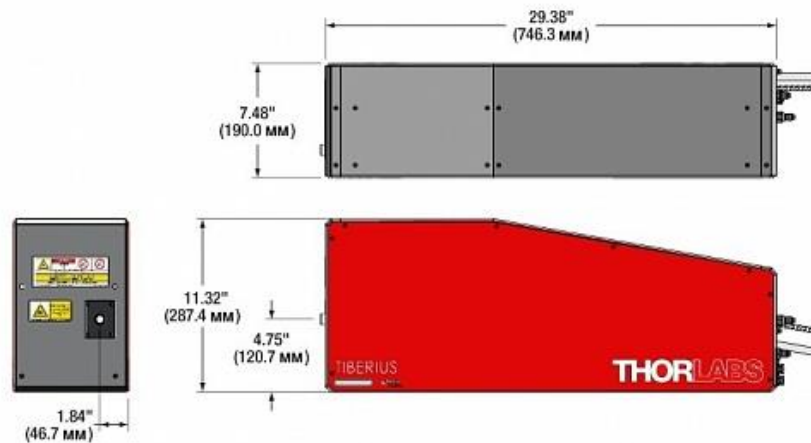


Рисунок 2.3 – Габаритні розміри фемтосекундного титан-сапфірового лазеру Tiberius® Thorlabs

Переваги обраного лазеру:

- широкий діапазон переналаштування довжини хвилі – від 720 до 1060 нм з точністю до 1 нм;
- надшвидкі імпульси тривалістю 140 фс;
- компактні розміри в половину від займаного простору конкуруючими лазерами;
- вбудований спектрометр для діагностики в реальному часі.

У комплект поставки кожного лазера Tiberius також входить лазерний контролер, лазерний контролер накачування, блок охолодження і блок циркуляції чистого повітря. Схеми з'єднання, налаштування та програмне забезпечення яке використовується для керування лазером надані у додатку А.

2.3. Вибір камери

Була обрана камера Leica DFC9000 sCMOS – монохромна камера мікроскопа з технологією сенсора CMOS (sCMOS) для флуоресцентної візуалізації дозволяє отримувати зображення клітин в умовах, близьких до природних (рисунок 2.4). Програмне забезпечення LAS X дозволяє керувати камерою, виводити зображення та робити 3D рендерінг, що необхідно для

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		22

шуму, висока однорідність, висока частота кадрів і високий динамічний діапазон. Все це забезпечує продуктивність в задачах флуоресцентної візуалізації або відеозйомки живих нефарбованих клітин при низькій освітленості. На рисунку 2.5 зображені зони квантової ефективності в залежності від довжини хвилі.

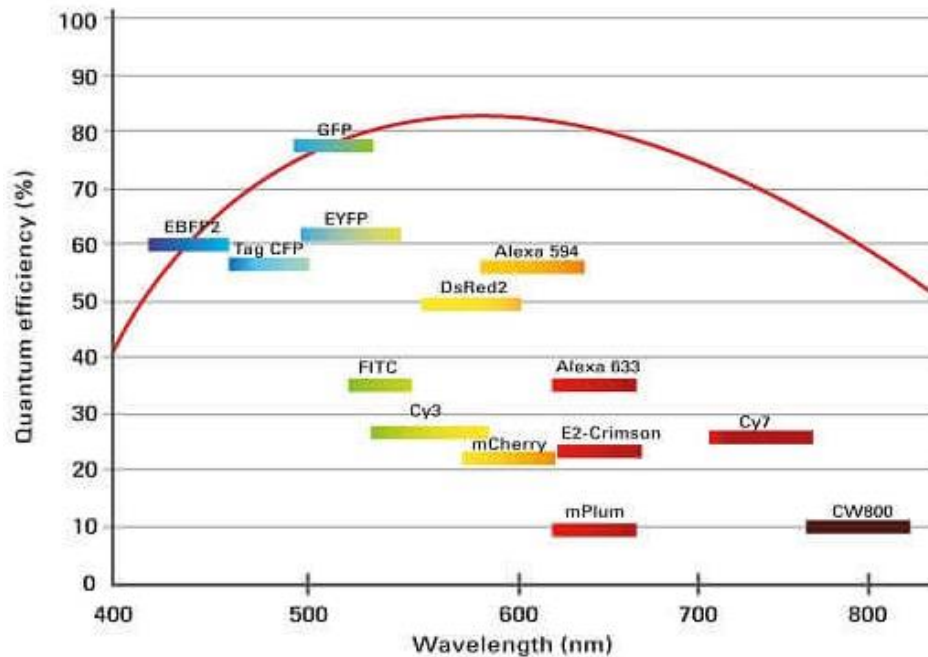


Рисунок 2.5 — Квантова ефективність камери Leica DFC9000 sCMOS

Можна помітити що зони квантової ефективності для випромінювання флуоресценції мають широкий діапазон довжин хвиль, що дозволяє мати широкий вибір флуорофорів для введення у зразок.

2.4. Вибір системи з об'єтивів

Розроблений 4Pi мікроскоп зосереджен навколо двох протилежних іммерсійних лінз об'єктива з числовий апертурою $100 \times / 1,35$ (NA) (Olympus, UPLSAPO 100XS), OBJ0 і OBJ1 [19]. Основною вимогою до яких було значення числової апертур та збільшення, які дозволять чітко розрізняти найдрібніші мікроструктури біологічної тканини (табл. 2.3).

Таблиця 2.3 – Технічні характеристики об’єктиву

Характеристика	Значення
Збільшення	100x
Числова апертура (NA)	1.35
Робоча відстань	0,2 мм
Імерсійна рідина	силіконна олія (n=1,4)
Число поля (FN)	22 мм

Зображення системи об’єктивів Olympus, UPLSAPO 100XS 100 × / 1,35 та габаритні розміри зображено на рисунку 2.6.

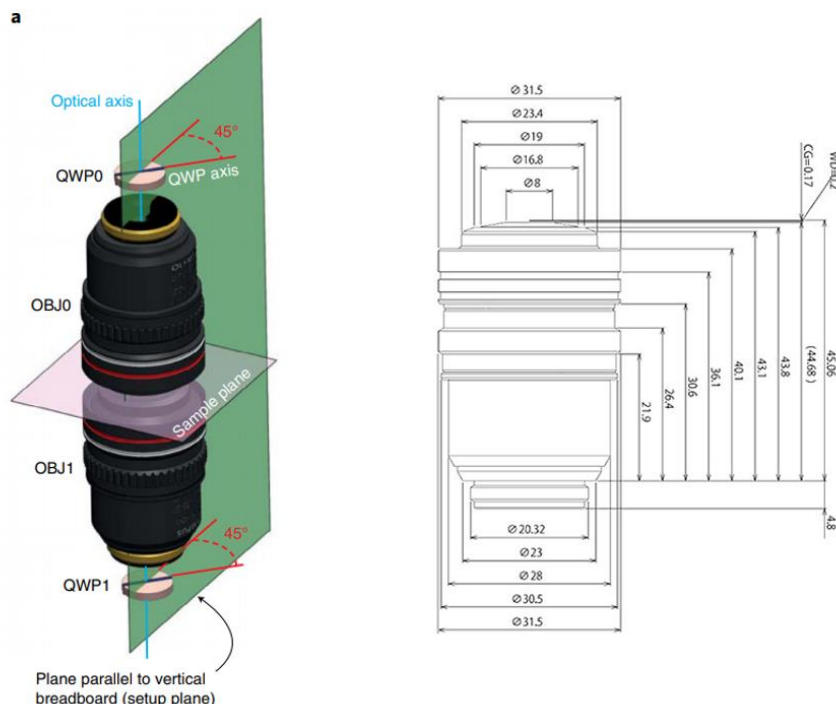


Рисунок 2.6 – Система об’єктивів Olympus, UPLSAPO 100XS 100 × / 1,35

Поле зору (FN) в мікроскопії визначається як діаметр області в проміжній площині зображення, яку можна спостерігати через окуляр. Число поля становить 22 мм, це вказує на те, що спостережувана площа зразка після збільшення лінзою об’єктива обмежується діаметром 22 мм. Лінза об’єктива має збільшення, 100x з FN 22 мм, можна спостерігати ділянку зразка діаметром 220 мкм [20].

Оптична роздільна здатність (d_A) можна визначити за формулою Аббе:

$$d_A = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{720 \text{ нм}}{2 * 1,35} \approx 423 \text{ нм},$$

де λ – довжина хвилі випромінювання (для прикладу була обрана можлива з діапазону обраного лазера), NA – числова апертура (1,35).

Очевидно, що збільшення об'єктива не впливає на оптичну роздільну здатність, щоб її зберегти при скануванні зразка, а також інтенсивність в цифровому зображенні, розмір елементів зображення, що проектується назад з зразка, повинен бути менше оптичної роздільної здатності. В іншому випадку цифрове зображення містить менше інформації, ніж оптичне. Відповідно, необхідний мінімальний розмір пікселя (d_p) можна розрахувати як:

$$d_p = \frac{\lambda}{4NA} = \frac{720 \text{ нм}}{4 * 1,35} \approx 133 \text{ нм},$$

У підібраній камері Leica DFC9000 sCMOS розмір пікселя 6,5 мкм, що є більшим за 133 нм і надає не максимальну точність, але достатню для дослідження необхідних біологічних структур.

Отже підібрані об'єктиви в значній мірі відповідають вимогам приладу. Та в технічних характеристиках зазначена робоча відстань 0,2 мм. Тому постає наступна проблема розташування біологічного зразка між двох протилежних об'єктивів. Для вирішення цього питання був розроблен нестандартний тримач (рис. 2.7). Система розміщення зразка складається з тримача, два покривних скла та двокомпонентного герметика, який надійно герметизує зразок і запобігає потраплянню повітря.

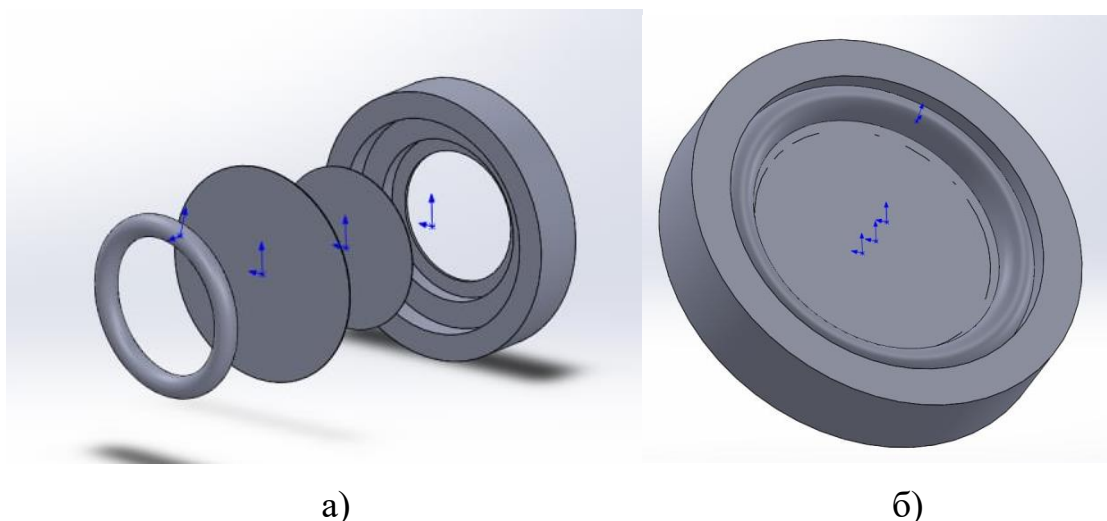


Рисунок 2.7 – Розроблений тримач зразка у середовищі SolidWorks:
 а) покомпонентно зображено тримач зразка і вузла покривного скла;
 б) результуюча геометрія тримача зразка

Тримач зразка кріпиться безпосередньо до системи об'єтивів і не потребує додаткового кріплення або предметного стола, що робить розташування зразка зручним, та виконує вимогу об'єктива з робочою відстанню (0,2 мм).

2.5 Функціональна схема розробленого 4Рі мікроскопу

Схема з'єднання та регулювання компонентами 4Рі мікроскопу наведена на рисунку 2.8.

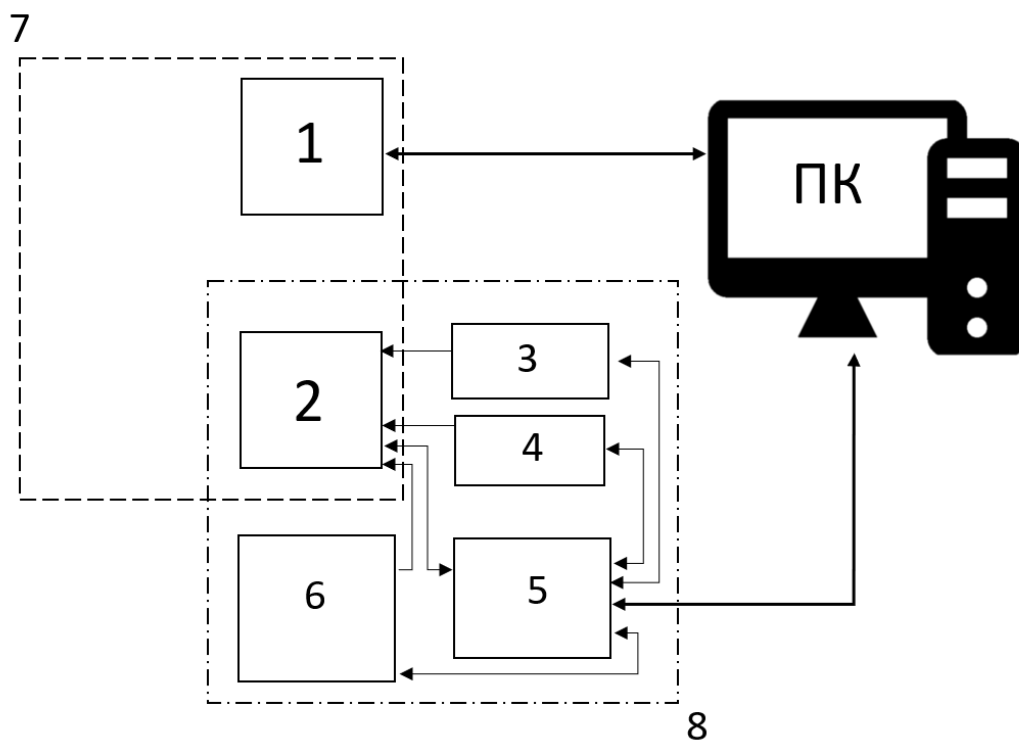


Рисунок 2.8 – Функціональна схема розробленого 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних середовищ

Розроблена структурна блок-схема системи 4Рі мікроскопу містить блок безпосередньо оптичний блок мікроскопу 7, який включає 1 – камера, 2 – лазерний випромінювач; блок лазера 8 з допоміжними компонентами: 3 – контролер лазерної накачки, 4 – циркулятор чистого повітря, 6 – чілер, 5 – лазерний контролер, який керує усіма компонентами лазерної системи. ПК –

персональний комп'ютер, який за допомогою спеціального програмного забезпечення керує камерою 1, та головним контролером 5.

Усі компоненти лазерного блоку мають зворотній зв'язок з лазерним контролером який містить індикацію порушень системи та зв'язок з ПК, для передавання помилок.

Допоміжні компоненти лазерної системи 8 запобігають перегріванню лазера. Камера 1, контролер 5 та ПК підключаються до мережі живлення 220В.

2.6 Габаритний розрахунок та моделювання системи

Система з об'єктивів кожен з яких має довжину 45,06 мм , збільшує систему, адже система об'єктивів та тримач зразка складають приблизно 95 мм.

Розроблений 4Рі мікроскоп скоригован на нескінченність, що дозволяє з мінімальними абераційними ефектами і расфокусуванням вставляти додаткові компоненти. Тому промені від флуорисценції які виходять з об'єктивів (OBJ1, OBJ2) паралельні, а область зображень знаходиться в нескінченності. Для формування проміжного зображення в тубус мікроскопа, між об'єктивом і окуляром, вставляється тубусна лінза (L1, L2).

Довжина тубуса в скоригованих на нескінченність мікроскопах називається опорною фокусною відстанню і лежить в інтервалі від 160 до 200 міліметрів в залежності від виробника. Фокусна відстань тубусної лінзи була обрана 200 мм, і місце фокусування є місцем проміжного зображення. Діаметр вихідного пучка об'єктиву дорівнює 20,32 мм, виконавши геометричний розрахунок на відстані 111,7 мм від фокусу діаметр зображення на матриці камери буде складати 11,7 мм , що менше ніж розміри матриці камери Leica DFC9000 sCMOS 13,3 x 13,3 мм. Тобто навіть якщо будуть незначні похибки при реалізації приладу, є запас точності (рисунок 2.9).

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						28
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

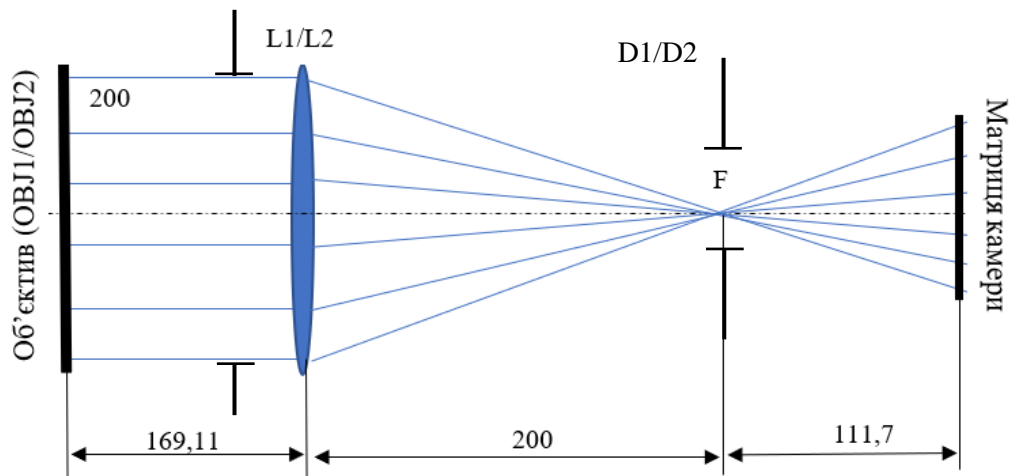


Рисунок 2.9 – Габаритні відстані оптичної системи одного з інтерферометричних плеч

Було розраховано радіуси кривизни для фокусної відстані 200 мм. Обидві сферичні поверхні опуклою стороною знаходяться у повітрі, оптично менш щільному середовищі, отже, радіуси кривизни поверхонь увійдуть в формулу для розрахунку зі знаком «+».

$$\frac{1}{F} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \frac{(n-1)d}{nR_1R_2} \right) \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{200} = (1,5 - 1) \left(\frac{1}{202} + \frac{1}{202} + \frac{(1,5 - 1)10}{1,5 * 202 * 202} \right)$$

Коефіцієнт заломлення був обран $n = 1,5$ – невітончене скло, яке є найдоступнішим матеріалом для лінз. Та радіуси кривизни, однакові і дорівнюють 202 мм, товщина лінзи складає 10 мм.

Вірність розрахунків кутів нахилу дзеркал, та підбір габаритних розмірів системи були спроектовані в програмному забезпеченні для оптичного моделювання 3DOptix [21]. Також у системі було зроблено підбір дзеркал та тримачів оптичних елементів з можливістю їх юстування і заміни (рис. 2.10 – 2.11).

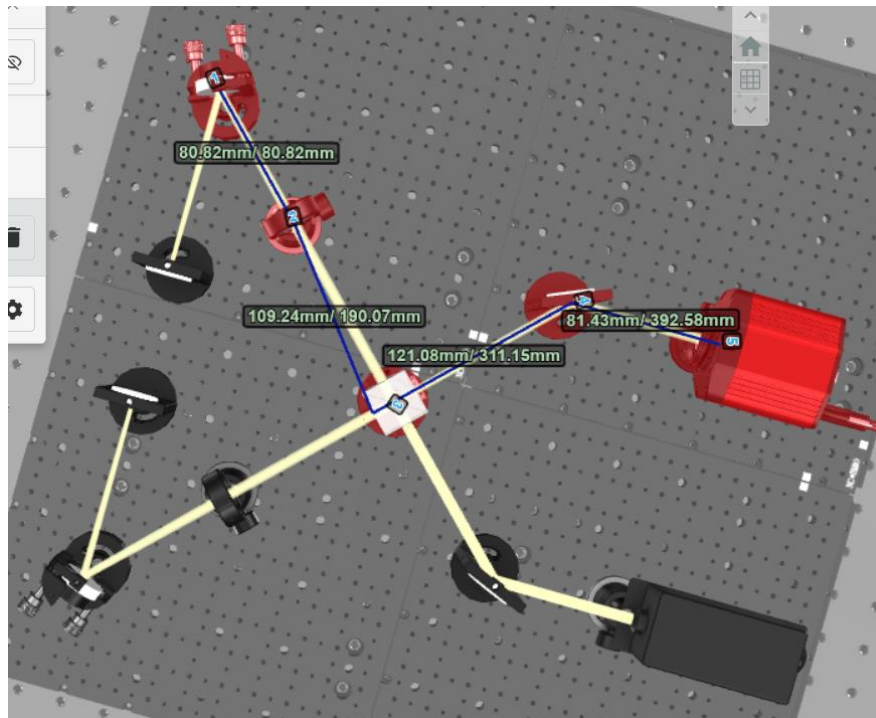


Рисунок 2.10 – Габаритні розміри спроектованої система 4Pi мікроскопу без об’єтивів в середовищі 3DOrtix

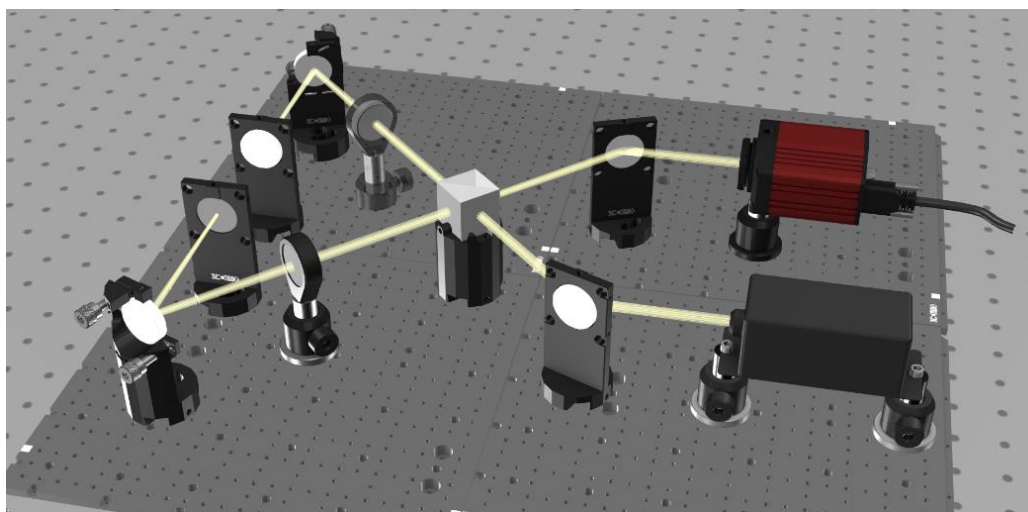


Рисунок 2.11 – Спроекована система 4Pi мікроскопу без об’єтивів (вид збоку) в середовищі 3DOrtix

2.7 Розробка корпусу приладу

У середовищі для моделювання SolidWorks2008, враховуючі габаритні розміри системи та її компонентів був спроектован корпус розробленого 4Pi

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		30

мікроскопу (рисунок 2.12), адже потрапляння світла, пилу та інших механічних завад погано впливає на точність і загальну роботу системи

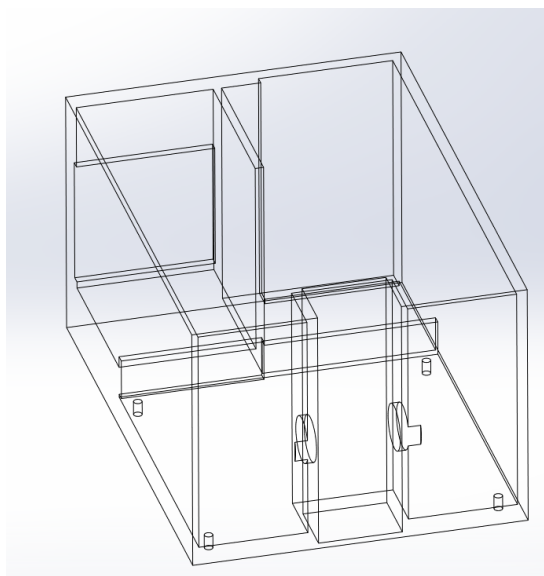


Рисунок 2.12 – Спроектований корпус 4Pi мікроскопу середовище SolidWorks

Для лазера і камери були спроектовані комірочки, з обмежувачими порогами, для точного встановлення елемента. Задні панелі яких будуть знаходитись у відповідних отворах, тому що на них розташовані вентиляційні отвори, що запобігає перегріванню приладу (рисунок 2.12 – 2.13) .

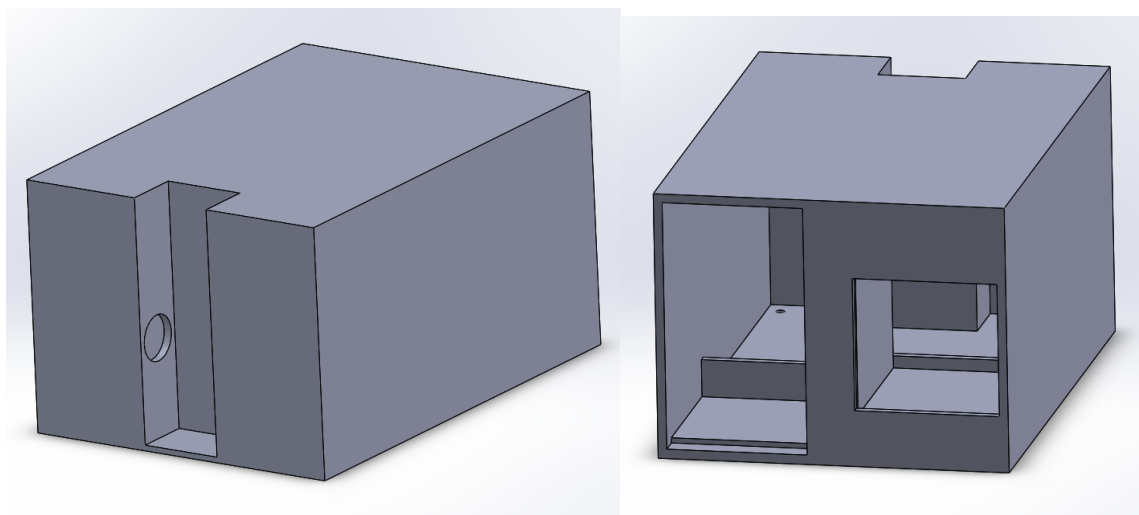


Рисунок 2.13– Спроектований корпус 4Pi мікроскопу середовище SolidWorks

Елементи оптичної системи кріпляться на монтажній платі (рисунок 2.10 – 2.11), а сама плата прикручується болтами у відповідно зроблені отвори, що дає можливість робити заміну елементів, та робити їх юстування.

Висновки до розділу 2

У даному розділі було виконано моделювання флуоресцентного 4Рі мікроскопу, а саме: спочатку була розроблена оптична схема приладу та визначені основні компоненти системи. Враховуючі особливості флуоресцентної мікроскопії і маючи на меті розширити область застосування приладу, були підібрані найбільш влучні компоненти, а саме лазер , камера і система об'єктивів. Обрані елементи дають можливість використання широкого діапазону флуорофорів, та розрізняти найдрібніші біологічні структури.

Проведено габаритний розрахунок системи з урахуванням корекції мікроскопу на нескінченність та стандартів розташування, фокусної відстані тубусних лінз та розміри чутливої матриці камери. Розраховану систему було спроектовано у системі для оптичного моделювання 3DOptix, та перевірено вірність розрахунків.

Також було спроектовано корпус приладу у середовищі інженерного 3D моделювання SolidWorks, з урахуванням габаритного розрахунку та конструктивних особливостей компонентів.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						32
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОСТОРОВОГО РОЗСІЯННЯ ФЛУОРИСЦЕНЦІЇ БІОЛОГІЧНИМИ ЗРАЗКАМИ

Для моделювання просторового розсіяння, необхідно знати кількість фотонів яку випромінює лазер за певний проміжок часу [22]. Лазер в розробленій установці працює в імпульсному режимі тому використовуємо формулу:

$$N_{ph}^{imp} = \frac{P*t*\lambda}{h*c*N'} \quad (3.1)$$

де P – паспортна потужність лазера; t – час випромінювання; h – стала Планка; c – швидкість світла у вакуумі; N' – кількість імпульсів в секунду.

Необхідні параметри були взяті з технічних характеристик обраного фемтосекундного титан-сапфірового лазера Tiberius® Thorlabs та занесені до таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Параметри та результати розрахунку кількості фотонів лазерного випромінювання

λ (м)	0,0000008	0,000001
P (Вт)	1	0,3
t (с)	10	
N	$7,143*10^{12}$	
h	$6,63*10^{-34}$	
c (м/с)	299792458	
N_{ph}^{imp} (800 нм)	5634755,9	
N_{ph}^{imp} (1000 нм)	2113033,5	

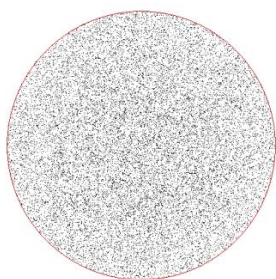
Для розрахунку було узято дві крайні довжини хвилі (800 нм і 1000 нм) лазера для яких було знайдено необхідні оптичні параметри біологічних тканин. Кількість фотонів флуоресценції складає приблизно 1% від фотонів випромінювання лазера. Тому для моделювання просторового розсіяння берем значення в сто разів менші, а саме 56348 для 800 нм і 21130 для 1000 нм.

Процес проходження лазерного пучка та випромінювання флуоресценції було змодельовано у програмному забезпеченні VT_mod яке використовує метод Монте-Карло для моделювання [23]. Симуляція проводилась для зразків епідермісу, м'язів та білої мозкової речовини, товщина яких була визначена як максимальна робоча відстань обраних об'єктивів, а саме 0,2 мм.

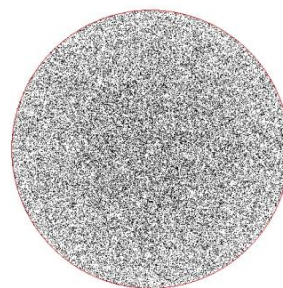
Обрані зразки біологічних тканин для обраних довжин хвиль мають такі оптичні властивості: коефіцієнти розсіювання μ_s та поглинання μ_a , показник заломлення n і фактор анізотропії розсіювання g – середній косинус кута розсіювання (таблиця 3.2) [24, 25]. Діаметр пучка за технічними характеристиками лазеру у 4Рі мікроскопі – 1,5 мм (рисунок 3.1).

Таблиця 3.2 – Оптичні параметри епідермісу

λ	Епідерміс		М'язи		Біла мозкова речовина	
	800 нм	1000 нм	800 нм	1000 нм	800 нм	1000 нм
n	1,37	1,43	1,34		1,4	
μ_a (см ⁻¹)	1,71	0,45	0,54	0,51	0,08	0,1
μ_s (см ⁻¹)	36,8	30,6	66,7	83,3	14	29,6
g	0,8		0,93		0,89	



а)



б)

Рисунок 3.1 – Профіль розподілу інтенсивності пучка діаметром 1,5 мм при запуску 21000 (а) та 56000 (б) фотонів (середовище VT_mod)

Для наочного відображення просторового розсіювання флуоресценції світла було застосовано перетин фотометричної поверхні площиною на кут 0°, 60° і 120° за допомогою програмного забезпечення 2dVectorPlot. З отриманих даних було пораховано середне значення по усім перетинам, та у середовище Mathcad у полярній системі координат побудовані графіки середнього значення зміни індикатриси розсіювання флуоресценції для довжин

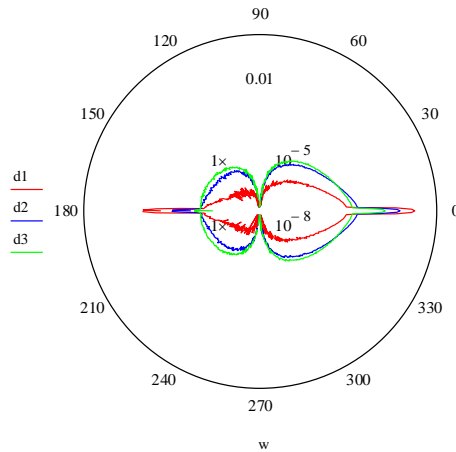


Рисунок 3.3 – Індикатриса світлорозсіяння зразками епідермісу товщиною $d_1=3.5$ мкм, $d_2=38$ мкм та $d_3=72.6$ мкм при факторі анізотропії розсіяння $g=0.83$

Індикатриса розсіяння має чітку залежність від товщини зразка, а зі збільшенням фактору анізотропії для епідермісу людини ця залежність стає більш явною. Тому якщо б робоча відстань об'єктивів була б більшою за 0,2 мм, як і товщина зразка, то більша частини флуоресценції не зареєструвалась би. Це відбувається через те, що епідерміс містить колагенові фібрили, які мають поперечну смугастість – чергування темних і світлих ділянок з періодом повторюваності 64–70 нм, показник заломлення яких 1.44–1.47, а базова речовина яка заповнює проміжки між клітинами 1.33–1.36 [27]. Ця різниця між показниками n є основною причиною розсіяння. Тому, виходячи з опису будови біотканини, можна сказати, що вона володіє оптичною анізотропією, для якої характерне розсіяння Мі.

Дуга перетину яка була задана у програмному забезпеченні 2dVectorPlot дорівнює 2,4 мм, а ділянка зразка яку можна спостерігати об'єктивами діаметром 220 мкм (див. підрозділ 2.4). Для визначення того чи зареєструвалась флуоресценція необхідно визначити апертурний кут обраного об'єктиву через його числову апертуру:

$$NA = n * \sin\alpha, \quad (3.2)$$

Визначенні кути були занесені до таблиці 3.3 для порівняння з апертурним кутом, якщо кут α чи β більше за апертурний $62,87^\circ$, то флуоресценція зареєструється не в повному обсязі.

Таблиця 3.3 – Кути розсіяння флуоресценції біологічними зразками

λ	Епідерміс		М'язи		Біла мозкова речовина	
	800 нм	1000 нм	800 нм	1000 нм	800 нм	1000 нм
α	$32,12^\circ$	$62,136^\circ$	$37,676^\circ$	$43,353^\circ$	$37,602^\circ$	$42,084^\circ$
β	$37,52^\circ$	$71,57^\circ$	$62,53^\circ$	$58,9^\circ$	$62,64^\circ$	$58,85^\circ$

З таблиці 3.3 помітно, що усі кути менші апертурного, окрім кута β який більший за нього на $8,7^\circ$ для зразка епідермісу на довжині хвилі 1000 нм. Тобто для зразків м'яза та білої мозкової речовини на довжині хвилі 800 і 1000 нм та епідермісу на 800 нм уся флуоресценція зареєструється обраною системою з об'єтивів Olympus, UPLSAPO100XS. У випадку зразка епідермісу на 1000 нм, мала частина флуоресценції не зареєструється, чим можна знехтувати, або при необхідності пересувати зразок шляхом повороту розробленого тримача.

Також можна помітити, що для всіх зразків зі збільшенням довжини хвилі розсіювальні властивості збільшились, а найбільший просторовий розподіл флуоресценції у епідермісу і м'язів на довжині хвилі 1000 нм.

Висновки до розділу 3

У даному розділі було проведено дослідження просторового розподілу флуоресценції зразком епідермісу при опроміненні його лазером Tiberius® Thorlab на довжині хвилі 800 нм і 1000 нм. Враховуючі технічні характеристики об'єтивів та результати проведеного дослідження, можна зробити висновок, що все випромінювання флуоресценції буде зареєстровано обраною системою об'єтивів Olympus, UPLSAPO 100XS, що підтверджує вибір компонентів розробленого 4Pi мікроскопу.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Дипломна робота виконується на базі НТУУ «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського». Метою та основним завданням дипломної роботи є розробка 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних зразків.

Основною метою цього розділу є оцінка та виявлення шкідливих та потенційно небезпечних факторів, які можуть виникнути при використанні розробленого приладу, та розробити заходи щодо їх уникнення.

4.1. Характеристика 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних середовищ

4.1.1 Технічні характеристики компонентів 4Рі мікроскопу

Мікроскоп спроектован на основі фемтосекундного титан-сапфірового лазеру Tiberius®Thorlabs та камери Leica DFC9000 sCMOS. Допоміжними компонентами є циркулятор чистого повітря, чілер, контролер лазерної накачки та лазерної системи в цілому і персональний комп'ютер (табл. 4.1)

Таблиця 4.1 – Характеристики компонентів 4Рі мікроскопу.

№	Найменування компонентів 4Рі мікроскопу	Основні характеристики	Кількість	Позиція на рисунку
1	Фемтосекундний титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs	Клас способу захисту – III, Живлення: вхідна напруга 100...220В; Частота 50...60Гц; Споживана потужність 1,2 кВт; Діапазон випромінювання: 720 – 1060 нм, середня потужність випромінювання 0,3 – 2,3 Вт; Тривалість імпульсу: 140 фс; Клас лазеру: 4;	1	8
2	Камера Leica DFC9000 sCMOS	Клас способу захисту – I, Джерело живлення постійного струму 3,3 В	1	2

		Вимоги до живлення: При навантаженні 75 Ом: 30 мА Без навантаження: 20 мА		
3	Корпус	Пластик ABS	1	
4	Оптична система	Лінза: кварц, показник заломлення 1.5, радіуси кривизни 202 мм	2	7
		Дзеркало з покриттям з золота для ІЧ діапазону Ø 20 мм	4	
		Світлодіодник N-SF1 Ø 20 мм	1	
		Об'єктив Olympus, UPLSAPO 100XS 100X/1,35NA, імерсійна рідина – силіконна олія (n=1,4)	2	
		Апертурна діафрагма	2	

Класи способу захисту були визначені згідно ДСТУ EN 61140:2015. Клас лазера був визначен виробником згідно міжнародних стандартів: IEC 60825-1: 2014 та ISBN 978-2-8322-1499-2.

Також до лазерної системи висувається додаткова вимога щодо температури приміщення яка повинна знаходитись у діапазоні 17 – 25 °С, та оптичний стіл з віброізоляцією що забезпечує стабільність роботи системи.

4.1.2 Складові частини розробленої системи 4Рі мікроскопу

Схема з'єднання компонентів 4Рі мікроскопу наведена на рисунку 4.1.

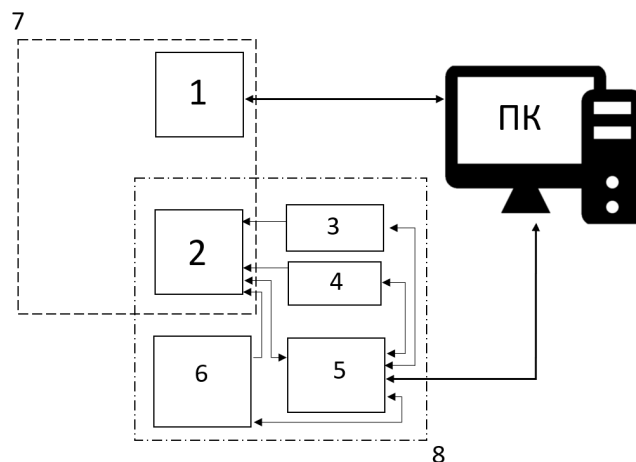


Рисунок 4.1 – Функціональна схема розробленого 4Рі мікроскопу для дослідження біологічних середовищ

Розроблена структурна блок-схема системи 4Pi мікроскопу містить блок безпосередньо оптичний блок мікроскопу 7, який включає 1 – камера, 2 – лазерний випромінювач; блок лазера 8 з допоміжними компонентами: 3 – контролер лазерної накачки, 4 – циркулятор чистого повітря, 6 – чілер, 5 – лазерний контролер, який керує усіма компонентами лазерної системи. ПК – персональний комп'ютер, який за допомогою спеціального програмного забезпечення керує камерою 1, та головним контролером 5.

Усі компоненти лазерного блоку мають зворотній зв'язок з лазерним контролером який містить індикацію порушень системи та зв'язок з ПК, для передавання помилок. Допоміжні компоненти лазерної системи 8 запобігають перегріванню лазера. Камера 1, контролер 5 та ПК підключаються до мережі живлення 220В.

4.1.3 Характер взаємодії системи 4Pi мікроскопу в системі «людина – об'єкт»

Способи сповіщення користувача про стан підключення та дієздатності приладу наведені у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. – Взаємодія приладу у системі «людина – об'єкт»

№	Найменування компонентів 4Pi мікроскопу	Вид сповіщення користувача	Кількість
1	Фемтосекундний титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs	Індикатор підключення живлення – світлодіод, підключення всіх компонентів системи лазера можна побачити через повідомлення та індикатори у спеціалізованому програмному забезпеченні на ПК.	1
2	Камера Leica DFC9000 sCMOS	Індикатор підключення живлення – світлодіод, індикація у програмному забезпеченні на ПК	1

4.2. Оцінка небезпек, що можуть виникнути через складові елементи розробленого 4Pі мікроскопу, та способи їх усунення

Лазери класу 4, такі як Tiberius, можуть викликати пошкодження шкіри, а також очей. Ці небезпеки можуть також відбутися при непрямих або відбитих променях, навіть, від явно матових поверхонь. При роботі з цими лазерами необхідно дотримуватися особливої обережності.

Небезпека ураження лазерним випромінюванням та електричним струмом є найвагомішими, через близьке розташування до користувача.

4.2.1 Небезпека ураження лазерним випромінюванням

Лазер у системі є найнебезпечнішим компонентом для людини, тому причини та наслідки можливих небезпек наведені у таблиці 4.3

Таблиця 4.3 – Оцінка небезпек ураження лазерним випромінюванням

№	Найменування компонентів 4Pі мікроскопу	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Фемтосекундний титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs	Лазерне випромінювання	Порушення цілісності корпусу	Опіки шкіри, очей та інших частин тіла які не захищенні
			Невірність розташування оптичних елементів 4Pі мікроскопу	
			Поламка складових частин лазера	

Реальні та нормативні значення небезпек наведені у таблиці 4.4

Таблиця 4.4 – Реальні та нормативні фактори лазерної небезпеки

№	Фактор небезпеки	Реальне значення	Нормативне
1	Вихідна потужність лазерного випромінювання	0,3 – 2,3 Вт	20 мВт
2	Вихідна щільність потоку	16 – 128 Вт/ см ²	250 мВт/см ²

Як можна побачити з таблиці 4.4 всі реальні значення вищі за безпечні допустимі які були узяті з регулюючих документів з лазерної безпеки, а саме: ІЕС 60825-1 та ІЕС 62471.

Для запобігання створення небезпек для життя і здоров'я користувача були розроблені заходи, які знижують вірогідність виникнення шкідливих факторів (див. таблицю 4.5).

Таблиця 4.5 – Заходи із забезпечення охорони праці щодо безпеки лазерного випромінювання

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій заходу
1	Технічні засоби	Наявність системи рідинного та повітряного охолодження	Запобігає перегріванню і виходу з ладу приладу
		Термостійкий пластик корпусу	Зменшення вірогідності порушення цілісності корпусу під впливом лазерного випромінювання
		Наявність ключа, для блокування лазерної системи	Запобігання використанню приладу неосвіченою людиною
2	Організаційні засоби	Ознайомлення з інструкцією користувача для людей які знаходяться у контакті з приладом	Навчання персоналу з питань лазерної безпеки
3	Режимні засоби	Регулярна перевірка (раз на місяць) та технічне обслуговування спеціалістом	Запобігання технічних несправностей лазера, які можуть наразити на небезпеку
4	Експлуатаційні засоби	Перевірка цілісності корпусів лазерної системи та 4Рі мікроскопу кожен раз перед використанням	Запобігання виходу лазерного випромінювання з оптичної системи
		Вимикати лазер при відсутності необхідності його використання	
		Не носити прикрас та об'єктів які можуть відбити та розсіяти лазерне випромінювання	
5	Засоби індивідуального захисту	Носіння захисних окуляр LSG-14 від лазера	Захист очей від термічного опіку
		Носити лабораторний халат з натуральних тканин, який максимально закриває шкіру	Захист шкіри від термічного опіку

Заходи, що описані у таблиці 4.5 значно знижують вірогідність виникнення небезпечних ситуацій при експлуатації 4Рі мікроскопу.

4.2.2 Небезпека ураження електричним струмом

Компоненти системи 4Pі мікроскопу знаходяться під напругою, через що може виникнути небезпека ураження електричним струмом. Аналіз причин та наслідків наведена у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Оцінка небезпек ураження електричним струмом

№	Найменування компонентів 4Pі мікроскопу	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Фемтосекундний титан-сапфіровий лазер Tiberius® Thorlabs	підвищена напруга	не під'єднання дротів блоку керування	Порушення роботи 4Pі мікроскопу та перегрівання системи що може призвести до короткого замикання та термічних опіків при фізичному контакті з дротами
		постійний струм	потрапляння води у електричні компоненти системи	
			порушення ізоляції дротів	
2	Камера Leica DFC9000 sCMOS	постійний струм	Потрапляння води в систему	Порушення роботи камери та мікроскопу в цілому. Можливе ураження електричним струмом та термічні опіки
			Порушення ізоляції	

Реальні та нормативні значення небезпек наведені у таблиці 4.7

Таблиця 4.7 – Реальні та нормативні фактори електричної небезпеки

№	Фактор небезпеки	Реальне значення	Нормативне
1	Постійний струм	16А	10 мА
2	Підвищена напруга	220 В	6-20 В

Нормативні значення були визначені згідно ДСТУ EN 61140:2015 «Захист проти ураження електричним струмом. Загальні аспекти щодо установок та обладнання».

Реальні значення всіх факторів перевищують нормативні які не мають небезпеки для людини, що вимагає створення заходів, для зменшення вірогідності виникнення небезпек для людини (див. таблицю 4.8)

Таблиця 4.8 – Заходи із забезпечення охорони праці щодо безпеки електричного струму.

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій заходу
1	Технічні засоби	Гумова ізоляція КГ для дротів підключення	Запобігання потрапляння води на оголені дроти. Зменшення вірогідності контакту користувача з оголеними дротами та ураження електричним струмом
		Використання вилок стандарту С-М	Належний захист від перенапруги (220 В) Запобігає виникненню коронних розрядів між струмопровідними жилами при потраплянні вологи
		Екранування дрота типом STP	
2	Організаційні засоби	Ознайомлення з інструкцією з техніки безпеки	Навчання персоналу з питань безпеки електричного струму
3	Режимні засоби	Регулярно перевірка (раз на місяць) справності електричної системи	Запобігання виникнення внутрішніх проблем електричної системи приладу
4	Експлуатаційні засоби	Візуальний контроль за цілісністю системи кожен раз перед використанням	Забезпечення коректної та безпечної роботи з 4Рі мікроскопом

Заходи, що описані у таблиці 4.8 значно знижують вірогідність виникнення небезпечних ситуацій при експлуатації 4Рі мікроскопу.

4.2.3 Інструкція з техніки безпеки при роботі з розробленим 4Рі мікроскопом

Загальні обов'язки, що стосуються користувача приладу для забезпечення техніки безпеки кожен користувач зобов'язаний:

- перед роботою з приладом пройти інструктаж з техніки безпеки. У кабінет де знаходиться 4Рі мікроскоп особи які не пройшли інструктаж не допускаються;
- не змінювати відстані між оптичними елементами та власноруч проводити ремонт та повірку системи;

- при роботі з приладом одягати спецодяг і захисні окуляри;

Технічні вимоги щодо виконання заходів з охорони праці та техніки безпеки:

- перед початком роботи впевнитися, що усі необхідні дроти під'єднанні і на немає конструктивних порушень ізоляції дротів;
- перевірити конструктивні елементи системи 4Рі мікроскопу на наявність механічних порушень;
- перевірити рівень охолоджуючої рідини в лазерній системі;
- впевнитися, що корпус приладу повністю зачинен;
- при підключенні перевірити індикатори на наявність червоного кольору, при його наявності користування приладом забороняється;
- перевірити наявність помилок через спеціалізовані програмні забезпечення на ПК;
- по можливості використовувати лазерне випромінювання з найменшою вихідною потужністю;
- після закінчення роботи з приладом всі конструктивні елементи вимикаються від живлення і лазер обов'язково повинен блокуватися на ключ і відповідному роз'ємі.

Особливості технічного обслуговування 4Рі мікроскопу:

- встановлювати систему 4Рі мікроскопу та проводити відповідні підключення може лише кваліфікований спеціаліст. Обов'язково проводити регулярне технічне обслуговування компонентів не рідше ніж кожні пів року;
- Проводити ремонт при виявленні несправності може лише спеціалізований персонал.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		46

Висновки до розділу 4:

У даному розділі було виявлено потенційні небезпеки та шляхи їх уникнення. Небезпека ураження лазерним випромінюванням та електричним струмом є найвагомішими, оскільки прилад знаходиться на невеликій відстані від користувача та може наражати його на небезпеку. Для забезпечення безпеки користувача були розроблені заходи з охорони праці щодо зниження вірогідності виникнення небезпечних факторів. Була розроблена інструкція з техніки безпеки при роботі з розробленим 4Рі мікроскопом та висунуті технічні вимоги щодо використання виробу.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						47
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

У результаті аналізу літератури були визначені основні принципи роботи флуоресцентних мікроскопів та шляхи збудження флуорофорів. Визначено основні оптичні властивості біологічних середовищ.

Визначено основні компоненти системи 4Pi мікроскопу, які були підібрані на ринку світових лідерів галузі з обґрунтуванням критеріїв їх вибору.

Було розроблено оптичну та функціональну схему 4Pi мікроскопу. За результатами габаритного розрахунку було зроблено проектування оптичної системи у середовищі 3DOptix для підтвердження зроблених розрахунків, та розроблен корпус приладу, з урахуванням технічних вимог компонентів.

Було проведено дослідження просторового розподілу флуоресценції крізь зразки епідермісу, м'яза та білої мозкової речовини на довжині хвилі 800 і 1000 нм. Побудовано індикатриси розсіяння флуоресценції цими зразками, та визначено кути просторового розподілу флуоресценції. Отримані результати підтверджують вибір системи об'єктивів і доводять те що уся флуоресценція буде зареєстрована.

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		48

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Liu, S., Huang, F. Enhanced 4Pi single-molecule localization microscopy with coherent pupil based localization. *Commun Biol* 3, 220 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0908-2>
2. Böhm, U., Hell, S. & Schmidt, R. 4Pi-RESOLFT nanoscopy. *Nat Commun* 7, 10504 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms10504>
3. X. Hao, Y. Li, S. Fu, Y. Li, Y. Xu, C. Kuang, X. Liu, Review of 4Pi Fluorescence Nanoscopy, *Engineering* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.07.028>
4. Zhang, Yongdeng Schroeder, Lena Lessard (2020). Nanoscale subcellular architecture revealed by multicolor three-dimensional salvaged fluorescence imaging. *Nature Methods*. 17. 1-7. [10.1038/s41592-019-0676-4](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0676-4).
5. Robert H. Webb "Confocal optical microscopy" *Rep. Prog. Phys.* 59 (2016) 427-471
6. Richards B. and Wolf E. "Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system" *Proc. R. Soc. A* 253 (2019) 358-379.
7. Kino G. S. and Corle T. R., 2017 Confocal scanning optical microscopy *Phys. Today* 42 55–62
8. Handbook of Biological Confocal Microscopy / J.B. Pawley. — 3rd ed. — Berlin : Springer, 2006. — 985 p. — ISBN 0-387-25921-X. — doi:10.1007/978-0-387-45524-2.
9. Barry R. Masters. Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy: The Genesis of Live Cell Imaging. — SPIE Press, 2006-01-01. — 234 с. — ISBN 9780819461186.
10. Guy Cox. Optical Imaging Techniques in Cell Biology, Second Edition. — CRC Press, 2012-06-04. — 319 с. — ISBN 9781439848258

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
						49
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

11. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. 2006;313:1642–1645.
12. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 2011;14:1481–1488.
13. Полуектов, С. О. Вплив фактору анізотропії на світлорозсіяння епідермісом при фотометрії еліпсоїдальними рефлекторами //м. Київ, Україна : збірник праць конференції. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – С. 317-320. – Бібліогр.: 6 назв.
14. Ding, Yichen Xi, Peng Ren, Qiushi. (2011). Hacking the optical diffraction limit: Review on recent developments of fluorescence nanoscopy. *Chinese Science Bulletin*. 56. 1857-1876. 10.1007/s11434-011-4502-3.
15. Davis, Brynmor, Dogan, Mehmet, Goldberg, Bennett (2008). 4Pi spectral self-interference microscopy. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*. 24. 3762-71. 10.1364/JOSAA.24.003762.
16. Kässens M. et al. *Basics of Light Microscopy & Imaging*. – GIT Verlag GmbH & Co. KG, 2006. – 52 p.
17. URL:<https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=TIBERIUS>
18. URL:<https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-cameras/p/leica-dfc9000/>
19. URL: <https://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/uplsapo/>
20. ISO19012-1 Microscopes -- Designation of microscope objectives -- Part 1: Flatness of field/Plan <https://www.iso.org/standard/61652.html>
21. URL: <https://3doptix.com/>

					БП71.13.2705.1661.ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		50

22. И. М. Пеливанов, С. А. Белов, В. С. Соломатин, Т. Д. Хохлова, А. А. Карабутов (2006) Прямое измерение пространственного распределения интенсивности лазерного излучения в биологических средах in vitro опико-акустическим методом.//Квантовая электроника, том 36, номер 12, 1089–1096

23. Безуглий, М. О. Еліпсоїдальні рефлектори для фотометрії біологічних середовищ : дис. д-ра техн. наук : 05.11.17 – біологічні та медичні прилади і системи / Безуглий Михайло Олександрович. – Київ, 2020. – 425 с.

24. A. N. Bashkatov, E. A. Genina & V. V. Tuchin Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review/ Journal of Innovative Optical Health Sciences Vol. 4, No. 1 (2011) DOI: 10.1142/S1793545811001319

25. Tom Lister,a,b Philip A. Wright,a and Paul H. Chappellb. Optical properties of human skin // Journal of Biomedical Optics 17(9), 090901 (September 2012)

26. Безугла Н.В. Просторова фотометрія біологічних середовищ // Безугла Н.В., Безуглий М.О., Тимчик Г.С., Шаргородський В.А. // Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. – 2015. – Т30, №2, – С.40-49.

27. И. М. Пеливанов, С. А. Белов, В. С. Соломатин, Т. Д. Хохлова, А. А. Карабутов (2006) Прямое измерение пространственного распределения интенсивности лазерного излучения в биологических средах in vitro опико-акустическим методом.//Квантовая электроника, том 36, номер 12, 1089–1096

ДОДАТОК А

Схема підключення лазера Tiberius, лазерного контролера, лазерного контролера накачування, блока охолодження і блок циркуляції чистого повітря.

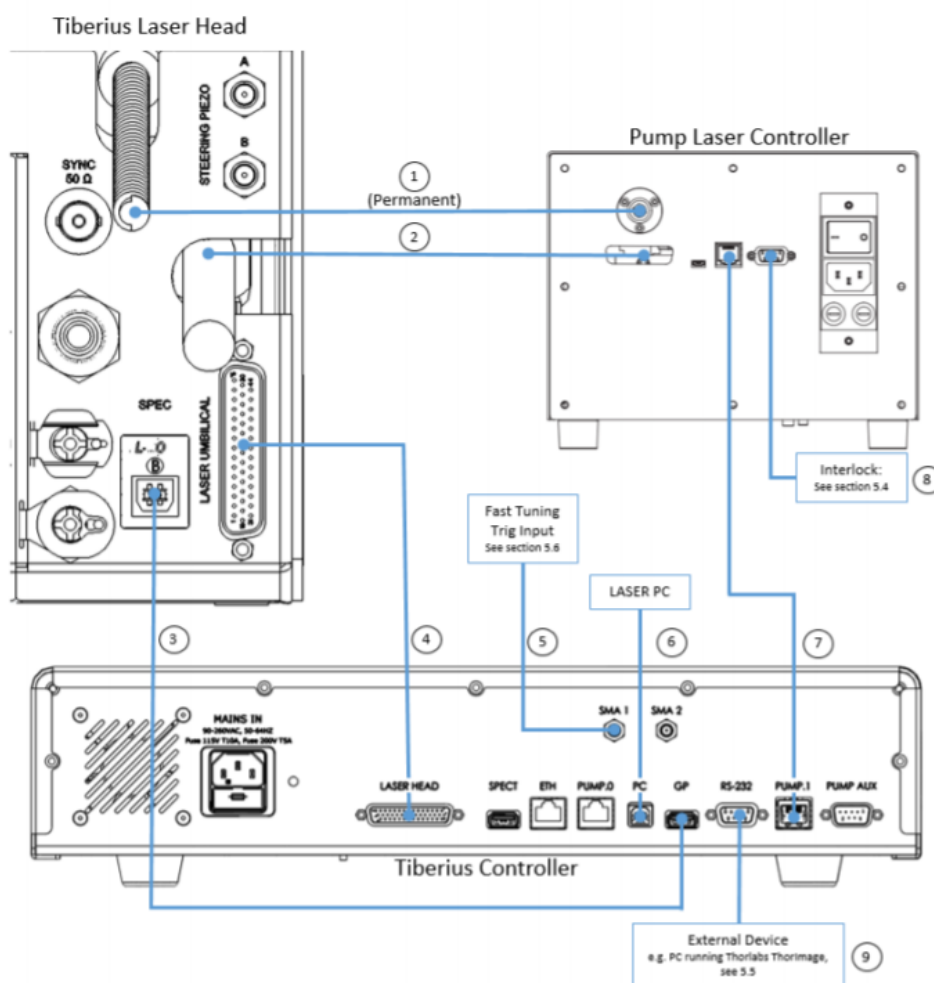


Рисунок А.1– Схема підключення компонентів лазера

1. Підключення живлення лазера накачування
2. Підключення контролера лазера насоса.
3. Підключення бортового спектрометра Tiberius Controller.
4. Підключення контролера Tiberius.
5. Вхід тригера швидкого налаштування
6. Підключення контролера Tiberius до ПК.
7. Підключення контролера лазера накачування / контролера Tiberius.
8. Блокування
9. Підключення зовнішнього пристрою.

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

БП71.13.2705.1661.ПЗ

Лист

52

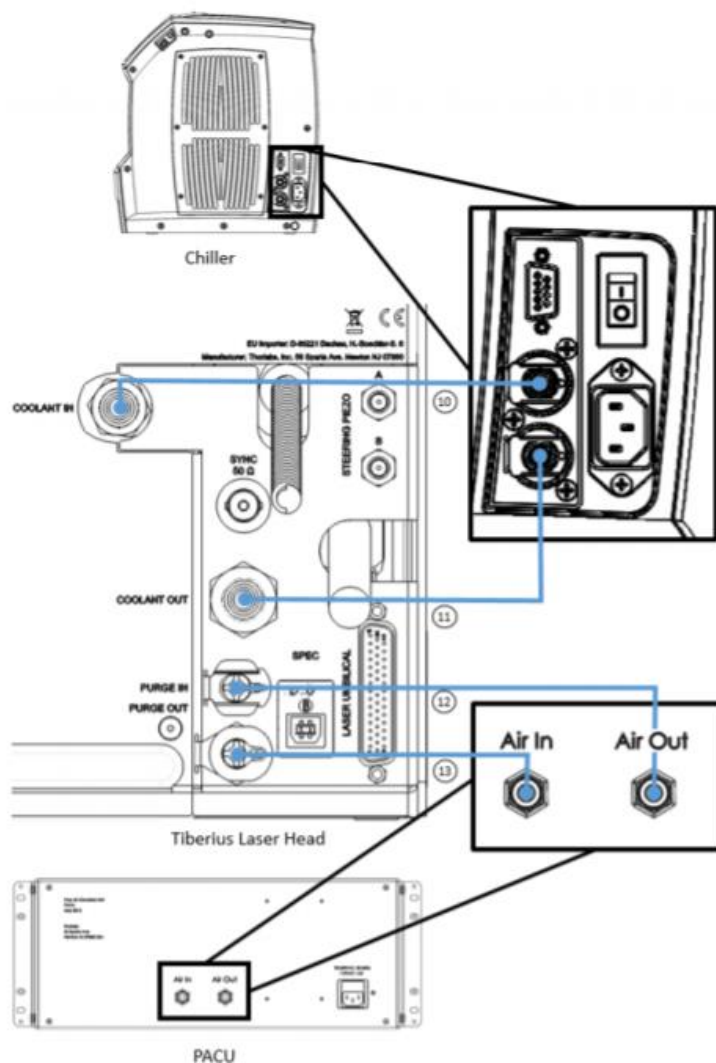


Рисунок А.2– Схема підключення компонентів лазера

10.Охолоджуюча рідина в Tiberius, подача охолоджувача (білі роз'єми).

11.Охолоджуюча рідина з Tiberius, повернення (бежеві роз'єми)

12.Видалення повітря в Tiberius, блок живлення PACU (білий роз'єм).

13.Збезповітря Tiberius, повернення PACU (бежевий роз'єм)

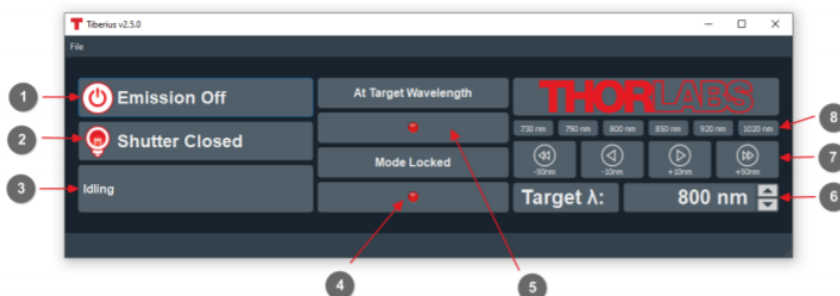


Рисунок А.3– Схема керування лазером через фірмове програмне забезпечення

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
------	------	----------	--------	------

1. Контроль викидів – Стан вимкненого випромінювання позначається червоним значком. Стан Emission On позначається зеленим значком. Поточний стан випромінювання на ній показується.
2. Управління затвором – Натисніть кнопку для перемикання затвора закрито / відкрито. Стан закритого затвора позначається червоним значком. Стан відкриття затвора позначається зеленим значком.
3. Стан лазера – Показує поточний робочий стан лазера. Коли випромінювання включено, лазер знаходиться на цільовій довжині хвилі, а лазер синхронізований, стан пусте.
4. Стан блокування режиму – Вказує на стан заблокованого режиму лазера. Червоний колір означає, що лазер відсутня синхронізація по модам. Зелений колір означає, що лазер синхронізований по модам.
5. У стані цільової довжини хвилі – Вказує, чи налаштований лазер на цільову довжину хвилі Червоний колір означає, що довжина хвилі лазера не відповідає заданій. Зелений колір означає, що лазер знаходиться на цільовій довжині хвилі.
6. Контроль цільової довжини хвилі – Вказує цільову довжину хвилі і дозволяє вводити цілочисельні значення. Цільову довжину хвилі можна змінювати за кроком в один нанометр, клавіатурі.
7. Стрілки настройки – Натисніть кнопку, щоб змінити цільову довжину хвилі на які відображаються збільшення.
8. Ярлики настройки – Натисніть, щоб перейти до цільової довжині хвилі, зазначеної на відповідному ярлику.

ДОДАТОК Б

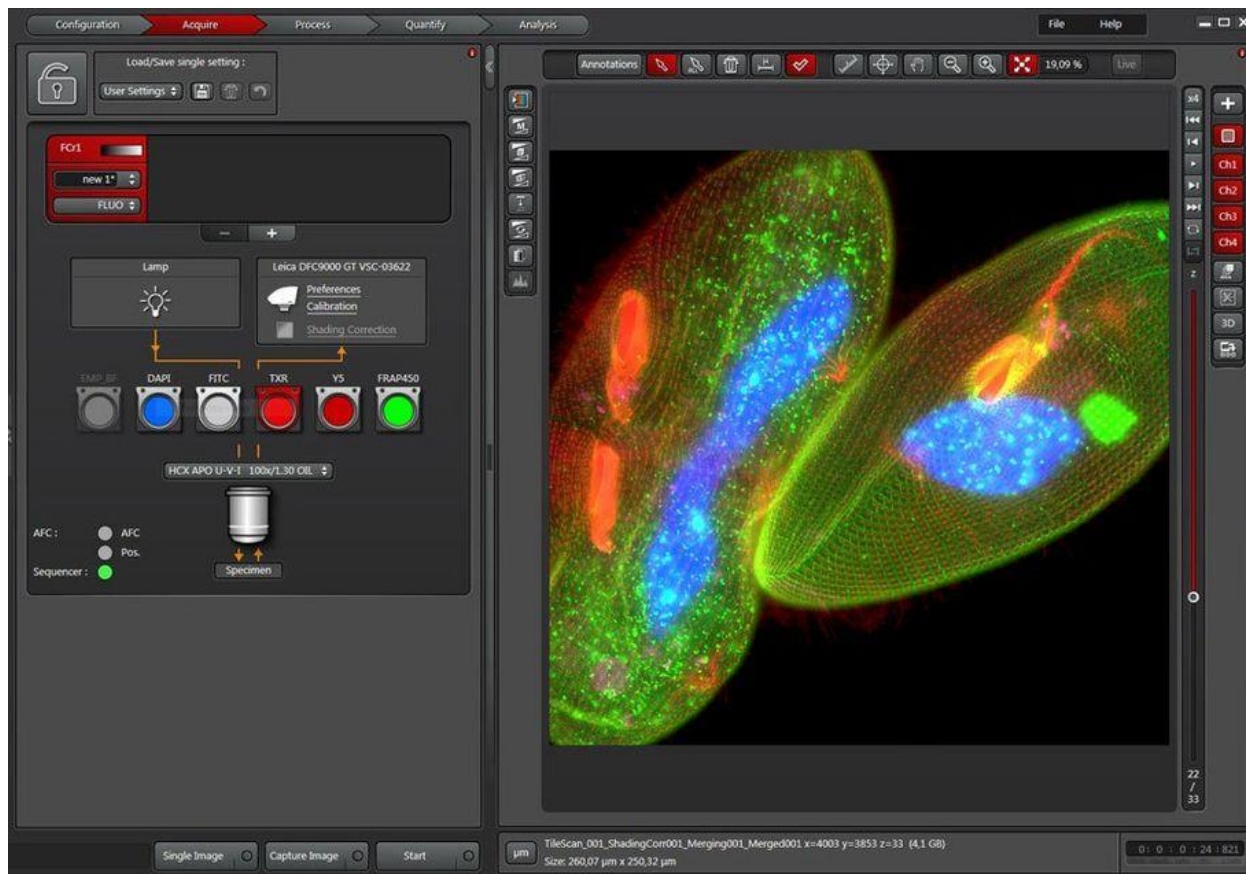


Рисунок Б.1 – Програмне забезпечення

Широкий спектр інструментів з програмного забезпечення LAS X, доступного з Leica DFC9000, забезпечує універсальність для легкого документування живих клітин і фіксованих зразків.

- Високошвидкісна покадрова зйомка в реальному часі
- Збільшена глибина різкості
- деконволюції
- 3D-рендеринг і аналіз