НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
ФАКУЛЬТЕТ БІОМЕДИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ
КАФЕДРА БІОМЕДИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Владислав ШЛИКОВ
«___»_____2023 р.

Дипломна робота

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою Медична інженерія

спеціальності 163 Біомедична інженерія

на тему: «Флуоресцентний мікроскоп для лабораторних досліджень»

Виконав:
Студент IV курсу, групи БМ-92
Дуваров Юрій Вячеславович _____

Керівник:
Доцент каф. БМІ, к.б.н., доцент
Калашнікова Лариса Євгеніївна _____

Консультант з охорони праці:
Доцент каф. ОППЦБ, к.т.н., доцент
Демчук Гліб Вікторович _____

Рецензент:
Ст. викл. каф. ББЗЛ, к. мед. н.
Цанько Іван Іванович _____

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

Київ – 2023 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра біомедичної інженерії

Рівень вищої освіти	Перший (бакалаврський)
Спеціальність	163 Біомедична інженерія
Освітньо-професійна програма	Медична інженерія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Владислав ШЛИКОВ

«___»_____2023 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломну роботу студенту

Дуварову Юрію Вячеславовичу

1. Тема роботи «Флуоресцентний мікроскоп для лабораторних досліджень», керівник роботи Калашнікова Лариса Євгеніївна, к.б.н., доц. каф. БМІ, затверджені наказом по університету від « 31 » травня 2023 р. № 2106-с

2. Термін подання студентом роботи «9» червня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи: науково-технічна література, програмне забезпечення SolidWorks, Fritzing.

4. Зміст дипломної роботи: провести огляд літератури на тему методу флуоресцентної мікроскопії; побудувати макет спрощеного оптичного флуоресцентного мікроскопу; створити схему передачі зображення між двома пристроями.

5. Перелік ілюстративного матеріалу: презентація у форматі MS Power Point.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
3	Демчук Г.В., к.т.н., доцент кафедри ОППЦБ		

7. Дата видачі завдання 5 квітня 2023 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Отримання завдання на ДР	5 квітня 2023 р.	
2	Інструктаж з техніки безпеки та охорони праці	17-22 квітня 2023 р.	
3	Огляд літератури за темою	24-29 квітня 2023 р.	
4	Обробка та оформлення теоретичної інформації	1-6 травня 2023 р.	
5	Створення спрощеного флуоресцентного мікроскопа та схеми передачі зображення	8-13 травня 2023 р.	
6	Аналіз отриманих результатів, формування висновків	15-20 травня 2023 р.	
7	Підготовка розділу ДР «Охорона праці»	3 червня 2023 р.	
8	Проходження нормоконтролю по оформлення ДР	5 червня 2023 р.	
9	Подання ДР рецензенту. Отримання рецензії	7-8 червня 2023 р.	
10	Подання в електронному вигляді ДР та анотації до неї на сайт кафедри	9 червня 2023 р.	
11	Подання пакету документів по ДР до захисту в ЕК	13 червня 2023 р.	
12	Захист ДР в ЕК	19 червня 2023 р.	

Студент _____ Юрій ДУВАРОВ

Керівник роботи _____ Лариса КАЛАШНІКОВА

АНОТАЦІЯ

Тема дипломної роботи: «Флуоресцентний мікроскоп для лабораторних досліджень».

Обсяг дипломної роботи становить 53 сторінки, в якому міститься 5 таблиць, 20 рисунків. Загалом опрацьовано 20 джерел.

Актуальність. Персистуюча вірусна інфекція постійно перебуває в організмі людини і при цьому не викликає клінічних симптомів, поступово виснажуючи його, призводить до розвитку гіпоімунних станів. Зниження імунітету небезпечне приєднанням бактеріальної хронічної інфекції, туберкульозу тощо. До таких вірусів належать зокрема герпес, ЦМВ. Механізм, що запускає розвиток або активує персистуючу інфекцію, повністю залежить від того, в якому стані перебуває здоров'я людини, наскільки сильний організм. Латентну форму може мати інфекція, що не дозволяє виявити її за допомогою звичайних діагностичних заходів. Тому розробка ефективних експрес-тестів таких захворювань є необхідною для своєчасного та мовного моніторингу здоров'я людини.

Мета дипломної роботи: Спрощення конструкції флуоресцентного мікроскопу.

Задачі дипломної роботи:

1. Опрацювати теоретичну інформацію зі знайдених джерел про флуоресцентний метод дослідження вірусів.

2. Створити оптико-електронний пристрій для експрес аналізу флуоресценції вірусів у SolidWorks.

3. Розробити схему передачі сигналу між двома пристроями.

4. Провести аналіз інтенсивності флуоресценції за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

Ключові слова: флуоресцентна мікроскопія, флуоресценція, експрес-діагностика, аналіз, люмінісценція, персистуюча вірусна інфекція, сигнал.

SUMMARY

Subject of graduate work: «Fluorescent microscope for laboratory research».

The volume of work is 53 pages, which contains 5 tables, 20 illustrations. A total of 20 sources were processed.

Relevance. Persistent viral infection is constantly in the human body and at the same time does not cause clinical symptoms, gradually exhausting it, leads to the development of hypoimmune conditions. A decrease in immunity is dangerous due to the addition of chronic bacterial infection, tuberculosis, etc. Such viruses include, in particular, herpes, CMV. The mechanism that triggers the development or activates a persistent infection depends entirely on the state of a person's health and how strong the body is. An infection can have a latent form, which does not allow it to be detected with the help of ordinary diagnostic measures. Therefore, the development of effective rapid tests for such diseases is necessary for timely and linguistic monitoring of human health.

Objective: Simplification of the fluorescence microscope design.

Tasks:

1. To process theoretical information from found sources about the fluorescent method of virus research.
2. To create an optical-electronic device for rapid analysis of the fluorescence of viruses in SolidWorks.
3. To develop a signal transmission scheme between two devices.
4. To analyze fluorescence intensity using ImageJ software.

Key words: fluorescence microscopy, fluorescence, rapid diagnosis, analysis, luminescence, persistent viral infection, signal.

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ 8
РОЗДІЛ 1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА 10
1.1 Метод флуоресцентної мікроскопії 10
1.2 Переваги та особливості флуоресцентної мікроскопії 12
1.3 Недоліки флуоресцентного методу дослідження 14
1.4 Імунофлуоресцентний метод у лабораторній діагностиці інфекційних хвороб 15
Висновки до розділу 1 18
РОЗДІЛ 2 ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ МІКРОСКОП ДЛЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 19
2.1 Флуоресцентний метод для експрес-діагностики персистуючої вірусної інфекції 19
2.2 Створення спрощеного макету оптико-електронного пристрою для експрес аналізу флуоресценції вірусів у SolidWorks 22
2.3 Розробка схеми передачі зображення між двома пристроями 33
2.4 Оцінка інтенсивності світіння за допомогою програми ImageJ 42
Висновки до розділу 2 44
РОЗДІЛ 3 ОХОРОНА ПРАЦІ 45
3.1 Характеристика оптико-електронного приладу 45
3.2 Складові частини приладу 46
3.3 Характер взаємодії системи оптичного флуоресцентного мікроскопу в системі «людина – об’єкт» 47
3.4 Небезпека ураження електричним струмом 48
3.5 Інструкція з техніки безпеки при роботі із оптичним флуоресцентним мікроскопом 49
Висновки до розділу 3 50

ВИСНОВКИ 51
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ..... 52

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ЦМВ	–	Цитомегаловірус
МФА	–	Метод флуоресцентного аналізу
ДНК	–	Дизоксирибонуклеїнова кислота
РНК	–	Рибонуклеїнова кислота
ШІМ	–	Ширина імпульсу модуляції
АЦП	–	Аналогово-цифровий перетворювач

ВСТУП

У 2020 році людство постало перед новим викликом, пов’язаним зі спалахами емерджентних пандемічних інфекційних захворювань. Це ставило актуальним питання швидкої та точної діагностики патогену для ефективного лікування хворих. Відомо, що основою реакції флуоресценції є фізичне явище, відоме як люмінесценція - це надлишкове випромінювання світла тілом, яке перевищує теплове випромінювання того ж тіла в певній спектральній області та при певній температурі. Це світіння не припиняється негайно після зникнення причини, що його викликала. В залежності від тривалості світіння, розрізняють два типи люмінесценції речовин: флуоресценція - короткочасне світіння, яке припиняється майже миттєво після припинення впливу збуджуючого світла (10-9 секунд); фосфоресценція - тривале світіння, тривалість якого може становити від 10-9 секунд до кількох годин.

Тема дипломної роботи: Флуоресцентний мікроскоп для лабораторних досліджень.

Мета дипломної роботи: Спрощення конструкції флуоресцентного мікроскопу.

Задачі дипломної роботи:

1. Опрацювати теоретичну інформацію зі знайдених джерел про флуоресцентний метод дослідження вірусів.

2. Створити оптико-електронний пристрій для експрес аналізу флуоресценції вірусів у SolidWorks.

3. Розробити схему передачі сигналу між двома пристроями.

4. Провести аналіз інтенсивності флуоресценції за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

РОЗДІЛ 1
ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1.1 Метод флуоресцентної мікроскопії

Флуоресценція представляє собою одне з найпоширеніших фізичних явищ у біологічній та аналітичній мікроскопії, завдяки її високій чутливості та специфічності. Цей тип люмінесценції дозволяє використовувати мікроскопію для визначення розподілу окремих молекул, їх кількості та місцезнаходження всередині клітини. З його допомогою можна проводити дослідження колокалізації, взаємодії та спостерігати концентрацію іонів, а також різноманітні внутрішньо- та міжклітинні процеси [1]. Флуоресцентна мікроскопія надає можливість вивчати як власну (первинну) флуоресценцію речовин, так і вторинну, шляхом фарбування клітинних структур флуорохромами. Ці флуорохроми взаємодіють з різними компонентами клітини та забезпечують специфічне світіння відповідних структур [2].

Використання флуоресцентного мікроскопа базується на світловому стимулюванні об'єкта, що підлягає дослідженню. Це досягається за допомогою електромагнітної хвилі ультрафіолетового світла. За допомогою дзеркала, розташованого на штативі, світло спрямовується вертикально до об'єкта дослідження [3]. Ртутні або ксенонові лампи, які випромінюють високоінтенсивне світло в діапазоні 0,25-0,4 мкм (ближні ультрафіолетові промені) і 0,4-0,5 мкм (синьо-фіолетові промені), найчастіше використовуються як джерела флуоресцентного світла. Довжина хвилі світла, що виникає в результаті флуоресценції, завжди більша, ніж довжина хвилі збуджуючого світла, тому застосовуються світлофільтри для розділення і вивчення зображення об'єкта виключно у флуоресцентному світлі [4]. Структура оптичного мікроскопа наведена на рисунку 1.1.

Оцінка фотолюмінесценції клітин може проводитись за допомогою спектрофотометра, який вимірює світлове випромінювання клітин після їх

стимулювання. Процес оцінки фотолюмінесценції клітин може відрізнятися залежно від досліджуваного матеріалу та конкретної методики, яку використовують.

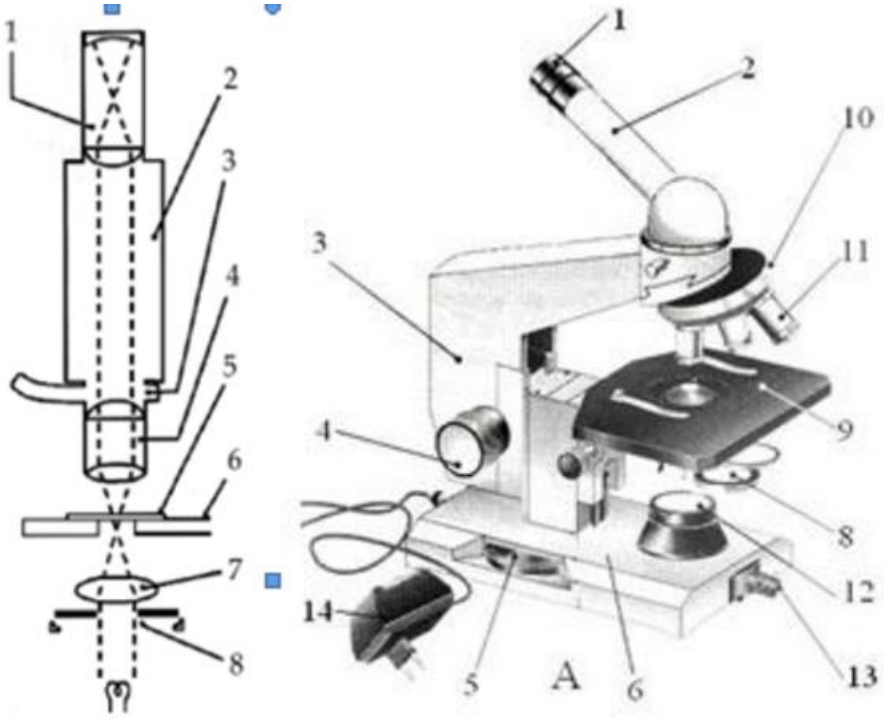

Рисунок 1.1 – Схема будови оптичного мікроскопа

Під номером 1 розташований окуляр, 2 – тубус, 3 – тримач тубусу, 4 – грубий навідний гвинт, 5 – мікрометричний гвинт, 6 – підставка, 8 – конденсор, світлофільтр, 9 – предметний стілець, 10 – револьверний пристрій, 11 – об'єктив, 12 – корпус колекторної лінзи, 13 – патрон з лампою, 14 – джерело електроживлення (це може бути вбудований акумулятор у саму оптичну систему мікроскопа або живлення з електромережі).

Проте загальна схема процедури оцінки може включати наступні етапи: підготовка зразків клітин або тканин; стимулювання клітин для отримання максимальної фотолюмінесценції; вимірювання світлового випромінювання клітин за допомогою спектрофотометра або іншого пристрою; аналіз отриманих результатів та інтерпретація даних [16, 17].

Також існує можливість застосування різних методів стимуляції. Важливим аспектом є коригування фонової фотолюмінесценції, яка може бути

спричинена наявністю незначних кількостей неактивних компонентів у зразку або флуоресценцією навколишнього середовища.

Використання оцінки фотолюмінесценції клітин може бути корисним у різних дослідженнях, таких як вивчення процесів клітинної сигналізації, механізмів транспорту речовин, аналіз патологічних процесів в клітинах та інше [18, 19].

1.2 Переваги та особливості флуоресцентної мікроскопії

Завдяки даному підходу вдається ефективно оцінити стан клітин з максимальною швидкістю. Крім того, він є швидким, точним і зручним.

Отримання зображення з використанням флуоресцентного мікроскопа пов'язане з введенням двох фільтрів в оптичну систему, які пропускають і змінюють напрямок світла [3].

Метод флуоресценції є одним з найчутливіших методів, який дозволяє проводити дослідження об'єктів без їх руйнування. Використання цього методу є актуальним і поширеним в багатьох галузях [6].

Отже, метод флуоресцентної мікроскопії має наступні переваги:

1. Висока чутливість - флуоресценція може бути виявлена навіть при дуже низьких концентраціях флуорофорів. Це дозволяє виявляти навіть слабкі сигнали та низькі кількості аналіту, що є важливим для ранньої діагностики хвороб або виявлення патологічних змін.

2. Висока специфічність – даний метод можна використати для маркування конкретних молекул або клітин. Завдяки використанню специфічних флуорофорів або антитіл, можна точно виявляти та локалізувати певні молекули або структури в організмі.

3. Чіткість та контрастність люмінісцентно-мікроскопічних картин.

4. Використання методу для виявлення і вивчення певних речовин не тільки у фіксованих, але й у живих клітинах та тканинах.

5. Зручність у проведенні кількісних досліджень.

6. У більшості випадках – простота методичних прийомів та доступність придбання реактивів [2].

7. Можливість проведення мультикомплексного аналізу - метод, який дозволяє одночасно виявляти та аналізувати багато молекул або клітин в одній пробі. Завдяки використанню різних флуорофорів з різними довжинами хвиль, можна одночасно вимірювати кілька параметрів або виявити декілька цільових молекул.

Сучасний оптичний флуоресцентний мікроскоп зображений на рисунку 1.2:

Рисунок 1.2 – Оптичний флуоресцентний мікроскоп [https://med-opt.ru/product/fluorescentnyj-mikroskop-microoptix-mx-300-tf/]

Флуоресценція не виявляє сильного впливу на клітини, що сприяє зручному відстеженню їх внутрішніх динамічних процесів [5].

1.3 Недоліки флуоресцентного методу дослідження

Найпоширенішими недоліками флуоресцентного методу дослідження є:

1. Залежність від обладнання – щоб проводити флуоресцентні дослідження потрібне спеціальне обладнання, таке як флуориметр або мікроскоп з флуоресцентною системою. Це може бути дорогим і недоступним для деяких дослідницьких лабораторій або клінік.

2. Фотоблекаут - такі дослідження потребують контролю небажаних флуоресцентних сигналів від позахвильових джерел світла. Це може бути достатньо проблематичним при роботі з великими пробами, де можуть бути значні фонові сигнали.

3. Недостатня роздільна здатність - флуоресцентний метод може мати обмежену роздільну здатність, особливо при роботі з пробами, що містять багато різних маркерів або флуорофорів, це може призвести до перекриття сигналів і ускладнити інтерпретацію результатів.

4. Фотоблекаут токсичних речовин - деякі флуорофори можуть бути токсичними для живих клітин або тканин, особливо при тривалому впливі і це може погано сказатись на життєздатності та функціональності досліджуваних об'єктів, що може призвести до неточних результатів.

5. Цей метод дослідження має обмежений діапазон детекції, що залежить від типу флуорофору та використовуваного обладнання. Деякі флуорофори можуть бути обмежені у своїй спроможності реагувати на певну довжину хвилі або обмежені у діапазоні енергій, які вони можуть поглинати або випромінювати [20]. Враховуючи ці обмеження, важливо вибрати підходящий флуорофор та налаштувати обладнання для досягнення оптимальних результатів дослідження.

1.4 Імунофлуоресцентний метод у лабораторній діагностиці інфекційних хвороб

Імунофлуоресценція виявилась надзвичайно перспективною в різних галузях біології і знайшла застосування в гістохімічних, імунологічних, онкологічних, мікробіологічних і вірусологічних дослідженнях. Метод флуоресцентних антитіл був успішно випробуваний для виявлення різних корпускулярних антигенів, таких як найпростіші, бактерії, рикетсії та віруси, як у чистих і змішаних культурах, так і в культурі тканин, зрізах органів і тканин, а також у виділеннях хворих та патологічному матеріалі.

Метод флуоресцентних антитіл застосовується в трьох основних модифікаціях: прямому, непрямому і непрямому методі з додаванням комплементу. Ці модифікації дозволяють досягти високої чутливості та специфічності детекції, а також дозволяють проводити одночасний аналіз декількох антигенів за допомогою флуорофорів різних довжин хвиль. Це робить метод флуоресцентних антитіл потужним інструментом для вивчення різноманітних біологічних процесів та патологічних станів. На рисунку 1.3 ми можемо побачити дослідження вірусу методом флуоресценції.

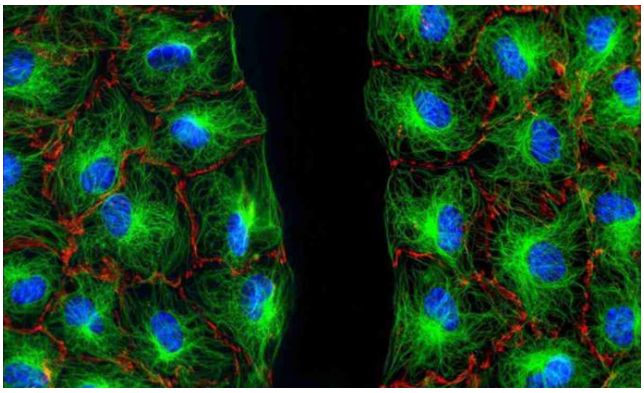

Рисунок 1.3 – Флуоресцентний метод дослідження вірусної інфекції [https://gazette.com.ua/images/2021/06/30/HM13_Schmoranzer-10854-1_large.jpg]

Зміст прямого методу імунофлуоресценції полягає в нанесенні мічених флуорохромом антитіл на мікропрепарат із фіксованим на ньому антигеном з

подальшою люмінесцентною мікроскопією [7, 8, 9, 10].

Прямий варіант МФА, зазаивчай виуористовується в рутинній роботі мікробіологів-практиків. Його широко застосовують щоб виявити та ідентифікувати патогенні мікроорганізми [7, 8]. Непрямий метод знаходить своє застосування переважно у наукових дослідженнях та різноманітних розробках, щоб виявити та титрувати специфічні антитіла [11]. Користуючись даним методом можна чітко виявляти поверхневі структури бактеріальної клітини, що не вдається зробити, коли використовуються інші методи досліджень [12].

Перевагою непрямого варіанту є те, що при його використанні відпадає необхідність мати великий набір різних специфічних флуоресціюючих антитіл, через те, що цей метод заснований на використанні мічених антивидових глобулінових антитіл.

Метод має такі недоліки:

1. Суб'єктивність (пов'язана з особистісною оцінкою головних критеріїв (характерна морфологія, розміри і розташування збудника в мазку; периферичний характер світіння об'єкта) при мікроскопії [13].

2. Наявність споріднених реакцій між близькими за антигенним складом мікроорганізмами, а також і між речовинами, що несумісні одна з одною [14].

3. Неспецифічна флуоресценція, в основі якої лежить або аутофлуоресценція антигену. Цей метод є універсальним, його використовують у різних напрямах сучасної діагностики [15]. Він дає достатньо точний морфологічний аналіз із чіткою роздільною здатністю, має високу чутливість.

Важливо зазначити, що імунофлуоресцентного аналізу є здатність виявляти на поверхні бактеріальних клітин антигени, які відображають певні властивості (біохімічні, токсичні, типоспецифічні) конкретних мікроорганізмів. Експрес-виявлення таких поверхневих маркерів на мікробних клітинах у зразках біоматеріалу (секрети, виділення, біоптати і т. д.) надає об'єктивну інформацію лабораторним працівникам і дослідникам для подальших

досліджень, а в діагностичних лабораторіях може бути використаний як експрес-метод діагностики інфекційних захворювань. Головна особливість імунофлуоресцентного методу полягає у використанні флуоресцентних маркерів для візуалізації імунореакції.

Існує алгоритм для імунофлуоресцентної діагностики інфекційних хвороб:

1. Збір проби - залежно від типу інфекційної хвороби, можуть збиратися різні проби, такі як кров, слина, сеча, ротова рідина, шкірні зразки тощо.

2. Підготовка проби - проба піддається попередній обробці, такій як розведення, очищення або концентрування для видалення забруднень та покращення ефективності тестування.

3. Підготовка маркерів - флуоресцентні маркери, які містять специфічні антитіла, готуються для маркування антигенів.

4. Інкубація - проба і маркери взаємодіють протягом певного періоду часу. Антитіла з маркерами реагують з антигенами, які присутні у пробі, утворюючи антиген-антитіло-маркерні комплекси.

5. Промивання - після інкубації проба промивається, щоб видалити неприкріплені маркери та забруднення.

6. Вимірювання - проба піддається аналізу за допомогою флуоресцентного мікроскопа або флуоресцентного аналізатора. Флуоресцентні маркери світяться під впливом світла спеціальної довжини хвилі, що дозволяє визначити наявність антигенів в пробі.

7. Аналіз результатів: - отримані дані аналізуються для визначення присутності або відсутності інфекційного агента. Результат може бути прочитаний як позитивний або негативний, а також може визначати кількість антигенів в пробі.

Висновки до розділу 1

У даному розділі був зроблений огляд літературних джерел та описано що являє собою метод флуоресцентної мікроскопії, показана схему будови оптичного мікроскопу та з яких елементів він складається. Навели основні переваги флуоресцентного методу діагностики, а також визначили необхідність проведення експрес аналізу персистуючої вірусної інфекції у сучасній реальності. Пояснили яким чином використовується імунофлуоресцентний метод в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб та наскільки він перспективний у різних галузях біології, навели його недоліки та навели певний алгоритм, за яким здійснюється імунофлуоресцентна діагностика інфекційних хвороб.

РОЗДІЛ 2
ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ МІКРОСКОП ДЛЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Флуоресцентний метод для експрес-діагностики персистуючої вірусної інфекції

Відкриття флуоресцентного світла та розробка перших ультрамікроскопів в XIX столітті, проведені вченими Г. Деві, Т. Едісоном, Н. Теслою, Ч. П. Штейнмецом та іншими, внесли значний внесок у розвиток цієї галузі. У 1903 році Г. Зідентопфом та Р. Зігмонді був створений перший ультрамікроскоп, а в 1908 році К. Келлер і Г. Зідентопф представили перший люмінесцентний мікроскоп "Келлер". В радянському науковому середовищі академіком С. І. Вавіловим були проведені дослідження та розроблені проекти для створення люмінесцентних мікроскопів.

У 1940-1950 роках в Медичній Школі Гарварду Альбертом Х. Кунсом, Мелвіном Х. Капланом та іншими науковцями був запропонований новий метод імунофлуоресценції, що ґрунтується на використанні флуоресцентних антитіл. Цей метод використовує реакцію антиген-антитіло, яка відбувається при зв'язуванні антигенів з флуоресцентними маркерами. Метод імунофлуоресценції став досить популярним і знайшов застосування у багатьох галузях, зокрема в гістохімічних, імунологічних, онкологічних, мікробіологічних та вірусологічних дослідженнях.У люмінесцентного або міченого антитіла з’являються притаманні тільки йому властивості – це здатність зв’язуватися з відповідним антигеном, утворювати комплекс, що світиться при розгляданні в люмінесцентному мікроскопі.

Експрес-діагностика вірусів за допомогою оптичного флуоресцентного мікроскопу є швидким, ефективним і надзвичайно важливим методом виявлення вірусних частинок у клінічних зразках. В порівнянні з традиційними методами діагностики, цей метод дозволяє отримувати результати набагато швидше, що дуже корисно в ситуаціях, коли необхідно негайно встановити

діагноз та прийняти відповідні медичні заходи.

Оптичний флуоресцентний мікроскоп забезпечує високу точність діагностики вірусних інфекцій. Для досягнення найкращих результатів у експрес-діагностиці, використовують спеціальні фарбувальні добавки, які допомагають візуалізувати вірусні структури та підсилити їх флуоресцентний сигнал. Це покращує чутливість та специфічність діагностики, а також дозволяє виявляти навіть дуже низькі рівні вірусного навантаження.

Застосування оптичного флуоресцентного мікроскопу в експрес-діагностиці вірусів дозволяє лабораторним працівникам швидко та точно встановлювати наявність вірусів у клінічних зразках. Це має велике значення для контролю інфекційних захворювань та прийняття рішень щодо лікування та превентивних заходів. Швидка і достовірна діагностика допомагає лікарям негайно реагувати на інфекційні загрози, встановлюючи правильний діагноз і призначаючи відповідне лікування [15].

Крім того, оптична флуоресцентна мікроскопія дозволяє проводити моніторинг захворюваності та оцінювати епідеміологічну ситуацію. Завдяки високій чутливості та специфічності методу, можна швидко виявляти віруси та вживати необхідні заходи для контролю та запобігання поширенню інфекції. Такий підхід дозволяє ефективно реагувати на епідеміологічні виклики та приймати належні заходи для збереження здоров'я громади.

Найчастіше використовують такі як:

1. Флуорохроми – вони є спеціальними речовинами, які мають здатність поглинати світло певної довжини хвилі та випромінювати його на більш довгій довжині хвилі. При експрес аналізі вірусної інфекції, флуорохроми можуть бути маркованими антитілами або специфічними для вірусних антигенів. Коли флуорохром-маркер зв'язується з вірусом або його компонентами, він випромінює світло під дією певної довжини хвилі. Це світло можна виявити та візуалізувати за допомогою оптичного флуоресцентного мікроскопу.

2. ДНК- або РНК-специфічні фарбувальні добавки - використовуються

для виявлення геномного матеріалу вірусу. Можуть бути специфічними для ДНК чи РНК та здатними зв'язуватися з ним. Після взаємодії з геномним матеріалом вірусу, фарбувальна добавка дає специфічну флуоресценцію, яка може бути виявлена за допомогою флуоресцентного мікроскопу.

3. Контрастні фарбувальні добавки – можуть бути використані для надання контрасту та покращення видимості вірусних частинок під час мікроскопічного аналізу. Дані фарбувальні добавки можуть бути структурними фарбами, які фарбують окремі частинки вірусу, такі як оболонка або ядро, роблячи їх більш помітними.

Завдяки цим спеціальним фарбувальним добавкам, які застосовуються у флуоресцентній мікроскопії, можна проводити ідентифікацію та виявлення вірусів у клінічних зразках. Під час аналізу з використанням оптичного флуоресцентного мікроскопу спостерігається флуоресцентний сигнал, що дозволяє лікарям швидко та точно встановлювати діагноз інфекційних хвороб.

Експрес-аналіз з використанням оптичного флуоресцентного мікроскопу має велике значення, оскільки дозволяє отримати результати дослідження швидко, зазвичай протягом кількох годин. Це відмінно від традиційних методів діагностики вірусних інфекцій, які можуть займати кілька днів. В сучасних умовах, коли час є важливим фактором, можливість негайного встановлення діагнозу та призначення належного лікування є надзвичайно корисною.

Оптична флуоресцентна мікроскопія має високу чутливість та специфічність, що дозволяє проводити моніторинг захворюваності. Це дозволяє більш ефективно оцінювати епідеміологічну ситуацію та приймати необхідні медичні заходи для контролю та запобігання поширенню інфекційних захворювань. Завдяки цим перевагам, флуоресцентна мікроскопія стає незамінним інструментом для діагностики та моніторингу інфекційних агентів на молекулярному рівні.

2.2 Створення спрощеного макету оптико-електронного пристрою для експрес аналізу флуоресценції вірусів у SolidWorks

В наш час досить важливим є проведення експрес діагностики персистуючої вірусної інфекції. Частіше за все час відіграє дуже значущу роль, тому ця тема є актуальною у будь-який момент.

Автоматизовані програми для після обробки при флуоресцентній мікроскопії вірусів можуть бути корисним інструментом для аналізу зображень, отриманих за допомогою мікроскопа. Для визначення інтенсивності флуоресценції, розміру та форми вірусних частинок, їх локалізації та розподілу в клітинах потрібна велика кількість обчислень та аналізу даних.

Для більш детального розуміння пропонується оптична схема флуоресцентного мікроскопа. Вона складається з декількох ключових компонентів, таких як:

1. Джерело світла: це може бути лампа ртуті, лазер або інші джерела світла, які випромінюють світло з відповідною довжиною хвилі, необхідною для стимуляції флуоресценції.
2. Фільтри: фільтри дозволяють пропускати тільки світло з необхідною довжиною хвилі.
3. Об'єктив: фокусує світло на об'єкті та збирає флуоресцентне світло, яке випромінюється.
4. Детектор: збирає флуоресцентне світло, яке випромінюється від об'єкта та перетворює його на електричний сигнал (це можуть бути різноманітні фотодіоди, фотоелектронні підсилювачі та камери).
5. Планшет із програмним забезпеченням: дозволяє збирати та обробляти зображення.

Оптична схема флуоресцентного мікроскопа показана на рисунку 2.1.

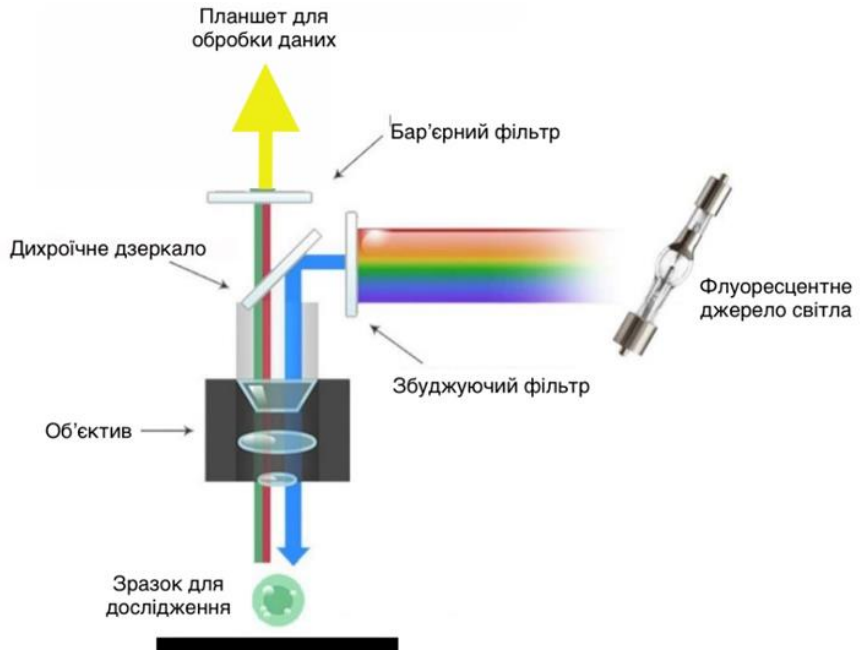

Рисунок 2.1 – Оптична схема флуоресцентного мікроскопа [https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/kak-deystvuet-fluorestsentnyy-mikroskop/]

Для отримання більш детальної інформації про зображення, отримане за допомогою оптичного флуоресцентного мікроскопу, використовують спеціалізовані програми обробки зображень. Ці програми дозволяють проводити різноманітні аналізи та вимірювання, такі як вимірювання яскравості та інтенсивності флуоресценції. Програми обробки зображень забезпечують можливість точного визначення значень світлових параметрів, таких як інтенсивність та яскравість, зображених об'єктів. Вони також дозволяють виконувати фільтрацію шуму, підвищення контрастності та вирівнювання кольорів, що покращує якість отриманих зображень. Для проведення аналізу флуоресцентних зображень можна використовувати різні методи, включаючи вимірювання інтенсивності пікселів, розрахунок середнього значення флуоресценції в заданій області, а також визначення розподілу яскравості та інтенсивності в залежності від координат.

Макет спрощеного оптичного флуоресцентного мікроскопу

побудованого у програмному середовищі SolidWorks зображено на рисунку 2.2:

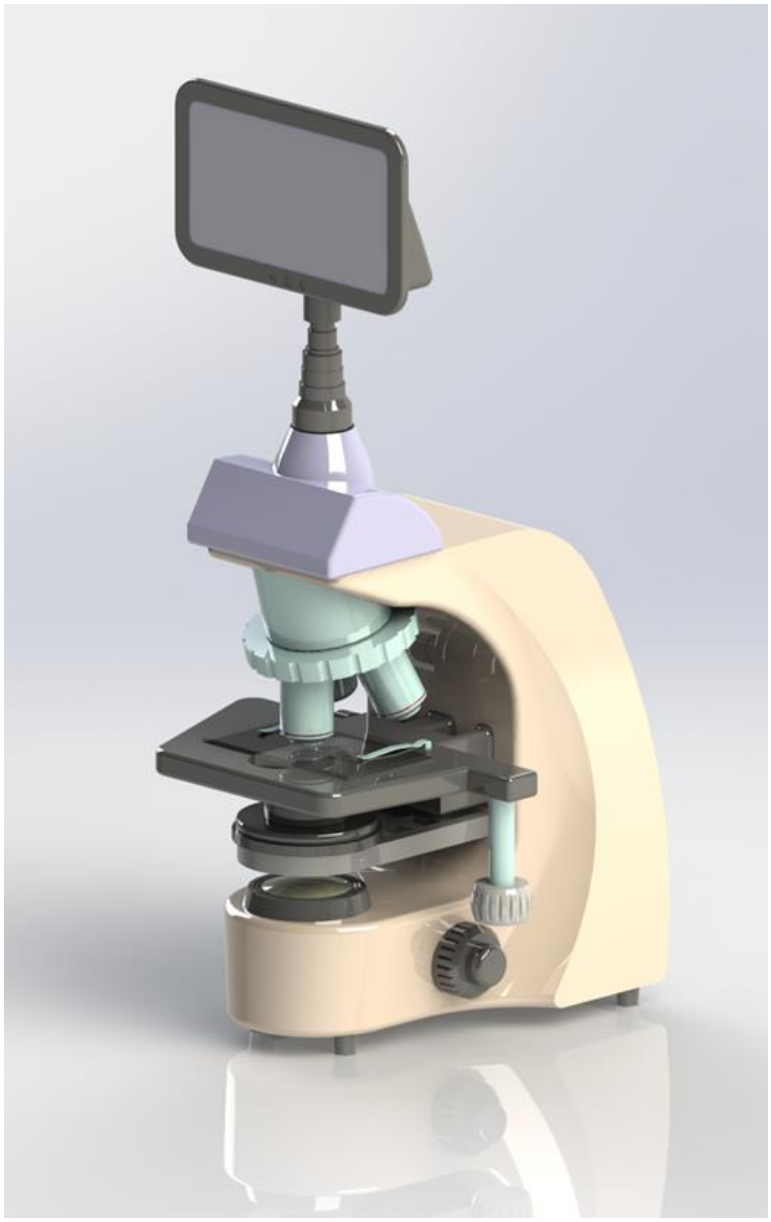

Рисунок 2.2 – Оптичний флуоресцентний мікроскоп створений у середовищі SolidWorks

Для нашої роботи була обрана програма ImageJ, яка має безліч корисних функцій, зручна для проведення експрес аналізу персистуючої вірусної інфекції. Вона встановлюється на планшет, котрий розміщений на оптичному флуоресцентному мікроскопі. Це дає змогу значно пришвидшити процес діагностики у будь-яких умовах.

Макет, що зображено на рисунку 2.2 є спрощеним оптичним

флуоресцентним мікроскопом, зверху до нього приєднаний планшет, на який передаються всі дані отримані з камери, яка в свою чергу розміщається на місці барабану.

Штатив перископу, що дозволяє регулювати висоту підйому планшету складається з двох основних елементів, таких як механізм підйому і фіксації, він потрібен для того, щоб висувати та скорочувати перископ. Труба, яка складається з декількох висувних елементів, вони з'єднані між собою засувками, що дозволяють рухатись кожному елементу уздовж один одного. Якщо потягнути планшет рукою вгору, штатив подовжиться і конструкція перископу піднімить екран на потрібну висоту, наприклад мінімальна становитиме 40 мм, а максимальна 300 мм (див. рисунок 2.3). Сам штатив виготовлений із пофарбованого карбонового волокна. Був обраний саме цей метаріл, тому що він дуже легкий, міцний та довговічний.

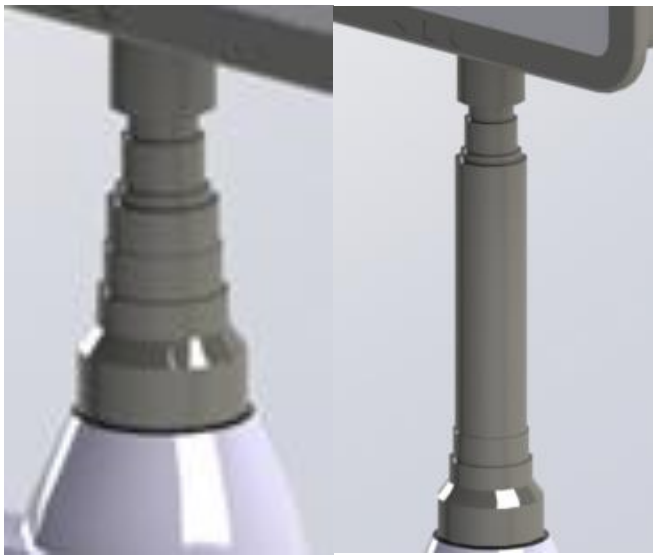

Рисунок 2.3 – Штатив перископу для регулювання висоти планшету. Створений у SolidWorks

3Д-макет оптичного флуоресцентного мікроскопу був виготовлений використовуючи всі можливості та функції програмного забезпечення SolidWorks, на рисунку 2.4 наведено кілька кроків побудови макету. Цей прилад є спрощеним варіантом стандартного оптичного флуоресцентного мікроскопа, його можна використовувати для проведення експрес-даігностики вірусної

інфекції у польових умовах, що робить це вкрай актуальним на сьогоднішній день. Незважаючи на його невеликі розміри та компактність, він повністю зберігає свою функціональність та точність.

Габарити даного приладу становлять:

1. Висота: 250мм (без прикріпленого планшету), 350мм (із планшетом та штитовом-перископом).

2. Ширина: 150мм.

Нижче наведено декілька кроків побудови мікроскопу для проведення експрес аналізу персистуючо вірусної інфекції:

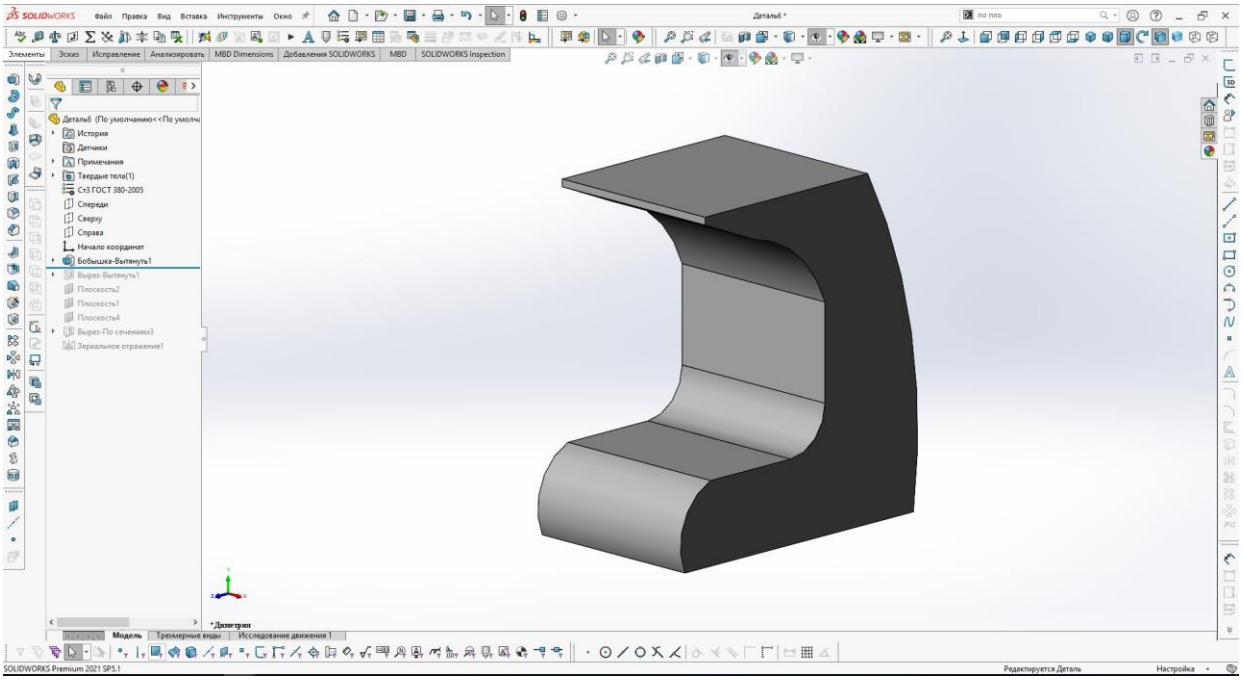

Рисунок 2.4 – Перший етап побудови оптичного флуоресцентного мікроскопа у програмному забезпеченні SolidWorks

Після вибору існуючої моделі оптичного флуоресцентного мікроскопа та використання її як основи, в програмному середовищі SolidWorks було створено основну конструкцію корпусу макету мікроскопа. За допомогою вбудованих функцій програми, можна було точно відтворити форму та розміри корпусу, враховуючи всі необхідні деталі та елементи.

Процес створення бобишки корпусу макету включав в собі використання інструментів моделювання для створення основних геометричних форм, таких

як прямокутники, круги та циліндри. Завдяки тому, що програма має бізліч опцій, ми мали можливість до найменшої деталі створити прилад, який уявляли.

На другому етапі скорегували форму корпусу приладу (див. рисунок 2.5).

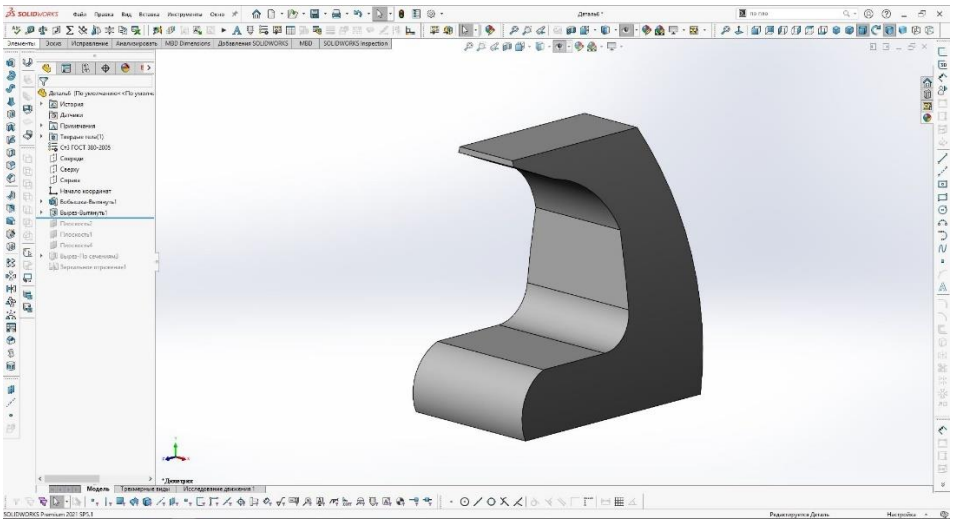

Рисунок 2.5 – Другий етап побудови оптичного флуоресцентного мікроскопа у програмному забезпеченні SolidWorks

На рисунку 2.6 показаний третій етап побудови макету.

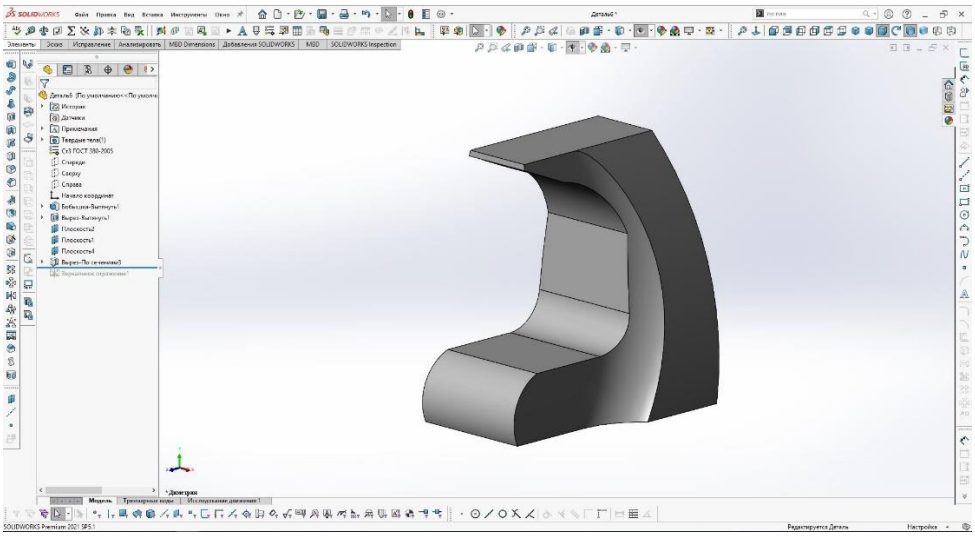

Рисунок 2.6 – Третій етап побудови оптичного флуоресцентного мікроскопа у програмному забезпеченні SolidWorks

Після цього було змінено колір корпусу на довільний і додано елемент, до якого в подальшому лікар зможе кріпити окуляр.

Четвертий етап побудови (див. рисунок 2.7).

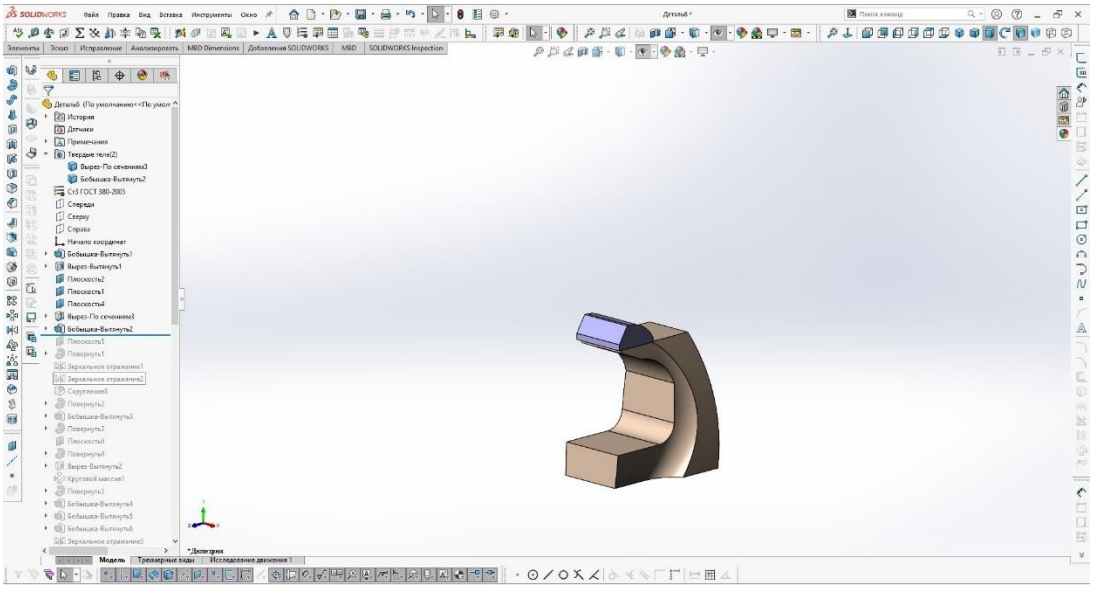

Рисунок 2.7 – Четвертий етап побудови оптичного флуоресцентного мікроскопа у програмному забезпеченні SolidWorks

П’ятий етап побудови макету (див. рисунок 2.8).

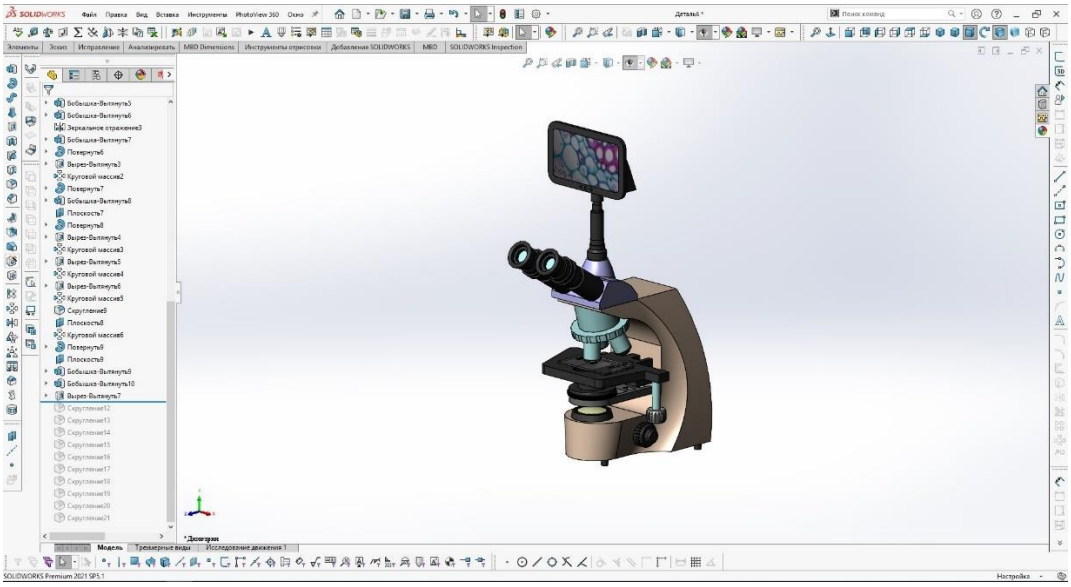

Рисунок 2.8 – П’ятий етап побудови оптичного флуоресцентного мікроскопа у програмному забезпеченні SolidWorks

На рисунку 2.8 при побудові було також виконано моделювання окуляру, хоча через камеру на планшет можна отримати зображення у реальному часі або у дуже гарній якості, все ж таки, за необхідності, можна приєднавши

користуватись також одним окуляром, якщо необхідно роздивитись зразок власними очима.

Оптична система мікроскопа складається з об’єктива та окуляра, які служать для того, щоб збільшити та сфокусувати зображення.

Принцип, за яким все працює:

1. Зображення спочатку формується на об’єктиві мікроскопу. Вірусна інфекція, яку ми досліджуємо, розташовується на об’єктиві мікроскопа, і оптична система об’єктива збирає і фокусує на ньому світло, що відбивається від об’єкта.

2. Далі сформоване зображення потрапляє на окуляр, воно проходить через його систему, яка додатково зібльшує це зображення.

3. Фотокамера відображає зображення окуляра, вона фіксує світло, яке проходить через окуляр і перетворює його на електричний сигнал.

4. Отриманий електричний сигнал буде одразу переданий на планшет, котрий прикріплений зверху мікроскопу і далі буде проводитись експрес аналіз вірусу.

Процес роботи фотокамери у мікроскопі полягає в тому, що світло, відображене об'єктом на об'єктиві мікроскопа, проходить через об'єктив фотокамери і падає на датчик зображення. Датчик зображення перетворює світло на електричний сигнал, який потім перетворюється на цифрове зображення АЦП та обробляється процесором фотокамери.

Основні компоненти фотокамери фірми Andor (рисунок 2.9), яку ми використовуємо у нашому приладі включають наступне:

1. Об’єктив фотокамери фокусує світло на датчику зображення. Він має можливість налаштовувати фокусну відстань яка нам потрібна для досягнення бажаної глибини різкості.

2. Датчик зображення (КМОП-матриця), що знаходиться за об’єктивом фотокамери, що падає на нього, перетворює світло на електричний сигнал.

3. Аналогово-цифровий перетворювач (АЦП), у камері перетворює аналоговий сигнал у цифровий.

4. Процесор фотокамери обробляє цифрові дані з датчика зображення, виконує корекцію кольору, налаштування контрасності та інші обробки для покращення якості зображення.

5. Порт USB для під’єднання камери до планшету. Це забезпечує швидку передачу всіх отриманих зображень на пристрій обробки даних і дозволяє миттєво проводити експрес-діагностики вірусної інфекції. Також за допомогою планшету з’являється можливість провести повне швидке налаштування фотокамери.

Фотокамера фірми Andor, яка підключається до мікроскопу зображена на рисунку 2.9:

Рисунок 2.9 – Фотокамера для мікроскопу Andor iStar 334T

Фільтр збудження використовується для стмулювання флуоресцентного світіння в зразку під дослідженням. Основна функція збуджуючого фільтра полягає в пропусканні певного діапазону світла, яке ефективно збуджує флуорохроми (флуоресцентні барвники або маркери), що присутні в зразку.

За допомогою збуджуючого фільтра можна блокувати небажані довжини

хвиль світла, які можуть спотворити флуоресцентне зображення.

Оптична схема флуоресцентного мікроскопу показана на рисунку 2.10.

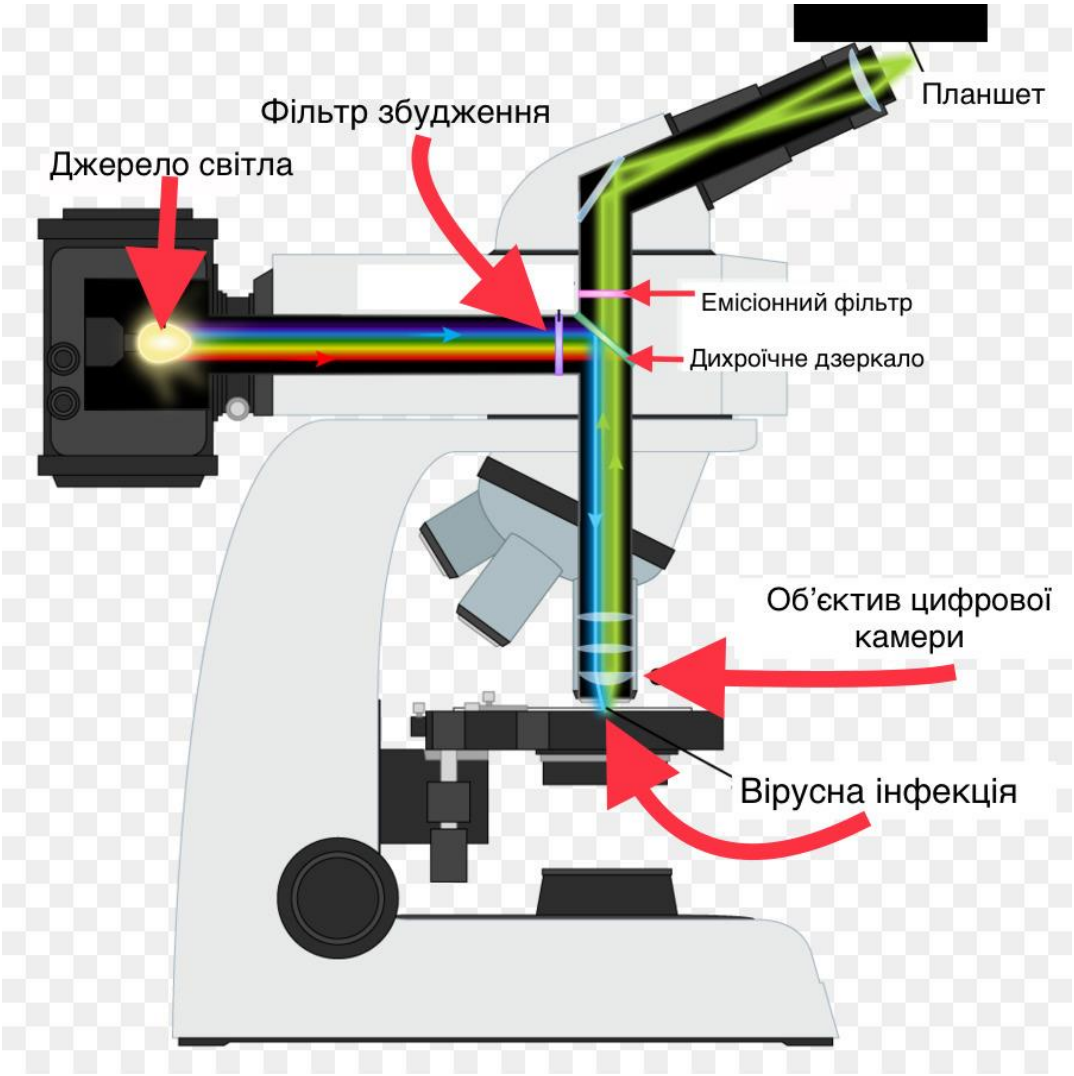

Рисунок 2.10 – Оптична система флуоресцентного мікроскопу [https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/kak-deystvuet-fluorestsentnyy-mikroskop/]

Цей фільтр пропускає тільки збуджувальне світло, що сприяє покращенню якості та контрастності флуоресцентного зображення. Крім того, він дозволяє використовувати високоінтенсивне світло для збудження флуорохромів, що допомагає отримати яскраве і контрастне флуоресцентне зображення.

Емісійний фільтр використовується для блокування збуджувального

світла і пропускає тільки флуоресцентне, яке випромінюється флуорофорами після збудження. Основна його функція – це щоб флуоресцентне світло досягло спостерігача, тим самим створюючи чітке та контрастне флуоресцентне зображення. Використання емісійного фільтра має декілька причин:

1. Блокування збуджувального світла, яке використовується для збудження флуорохромів. Це дозволяє уникнути проникнення збуджувального світла до спостерігача, що може спотворити флуоресцентне зображення і зменшити контрастність.

2. Пропускає флуоресцентне світло, яке випромінюється флуорохромами після збудження. Це дозволяє флуоресцентному світлу досягати спостерігача, що створює яскраве і контрастне флуоресцентне зображення без перешкод збуджувальним світлом.

3. Фільтр допомагає видалити фоновий шум, який може бути присутнім на зображенні.

Дихроїчне дзеркало (фільтр розділення або ще називається фільтр сплеску) – воно використовується для розділення розділення збуджувального світла, яке використовується для збудження флуорохромів, від флуоресцентного світла, яке випромінюється флуорохромами після збудження. працює на принципі інтерференції світла. Дзеркало має спеціальне покриття, яке має властивість відбивати світло в певному діапазоні довжин хвиль, а пропускати світло в іншому діапазоні довжин хвиль.

У флуоресцентному мікроскопі дихроїчне дзеркало розташоване на шляху світла між об'єктивом та окуляром або детектором. Цей компонент виконує важливу функцію в процесі спостереження флуоресцентного зображення. При роботі з мікроскопом застосовується збуджувальне світло, яке проходить через об'єктив і потрапляє на дихроїчне дзеркало. Дихроїчне дзеркало має спеціальне покриття, яке відбиває збуджувальне світло, але пропускає флуоресцентне світло більшої довжини хвилі, яке випромінюється флуорохромами.

Таким чином, збуджувальне світло, яке має коротшу довжину хвилі, відбивається дихроїчним дзеркалом, а флуоресцентне світло, яке має довшу довжину хвилі, проходить крізь дзеркало і потрапляє до окуляру або детектора. Це дозволяє спостерігати флуоресцентне зображення зразка, оскільки тільки флуоресцентне світло, а не збуджувальне, досягає спостерігача. Дихроїчне дзеркало допомагає покращити контрастність та якість флуоресцентного зображення, дозволяючи лише флуоресцентному світлу пройти через нього.

2.3 Розробка схеми передачі зображення між двома пристроями

Для передачі зображення, отриманого з камери, на планшет ми скористались програмним забезпеченням Fritzing, де створили схему на базі плати Arduino Uno.

Схема перетворення оптичного сигналу із електронною системою для реєстрації флуоресценції буде включати в себе наступні етапи:

1. Збір сигналу: оптичний сигнал, що випромінюється від флуорофорів, збирається за допомогою об'єктива флуоресцентного мікроскопу. Збірний сигнал містить інформацію про флуоресцентні забарвлення, які використовуються для виявлення вірусів.
2. Розділення сигналу: збірний оптичний сигнал розділяється за допомогою пасивного або активного оптичного розділювача на окремі канали, що відповідають різним флуоресцентним забарвленням.
3. Фільтрація сигналу: кожен канал оптичного сигналу проходить через відповідні фільтри, які дозволяють пропустити тільки специфічну довжину хвиль світла, що випромінюється флуорофорами.
4. Детекція сигналу: оптичний сигнал попадає на фотодетектори (наприклад, фотопомножувачі або фотодіоди), які перетворюють його в електричний сигнал.
5. Підсилення та обробка сигналу: електричний сигнал підсилюється

та обробляється електронною системою, що включає посилювачі, фільтри, аналого-цифрові перетворювачі та інші компоненти.

6. Аналіз та візуалізація електричного сигналу.

7. Проведення експрес-діагностики за допомогою планшету.

Блок-схема передачі сигналу для реєстрації флуоресценції показана на рисунку 2.11:

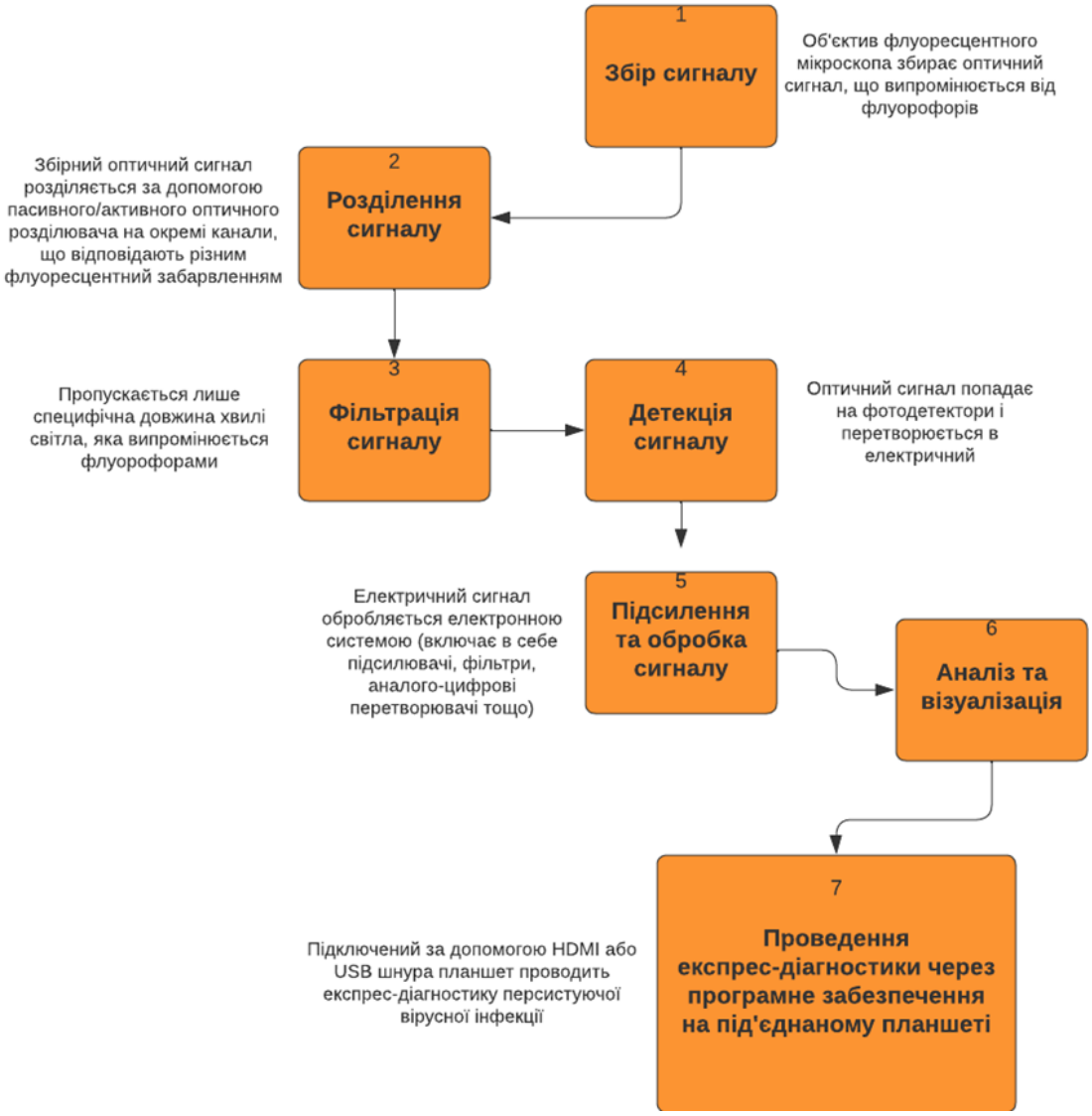

Рисунок 2.11 – Блок-схема передачі сигналу для реєстрації флуоресценції. Створено за допомогою конструктора блок-схем Lucidchart

Після отримання флуоресцентного зображення за допомогою оптичного флуоресцентного мікроскопу, зображення зберігається та піддається подальшій обробці у спеціалізованій програмі.

Використання програмного забезпечення дозволяє нам працювати зі знятими зображеннями, проводити їх аналіз та отримувати додаткову інформацію.

Було обрано програмне забезпечення Fritzing для побудови схеми передачі сигналу між декількома пристроями. Використовуючи цю програму, було створено схему комутації цифрової камери та планшету, використовуючи мікроконтролер Arduino Uno.

Схема передачі зображення від цифрової камери на планшет зображено на рисунку 2.12:

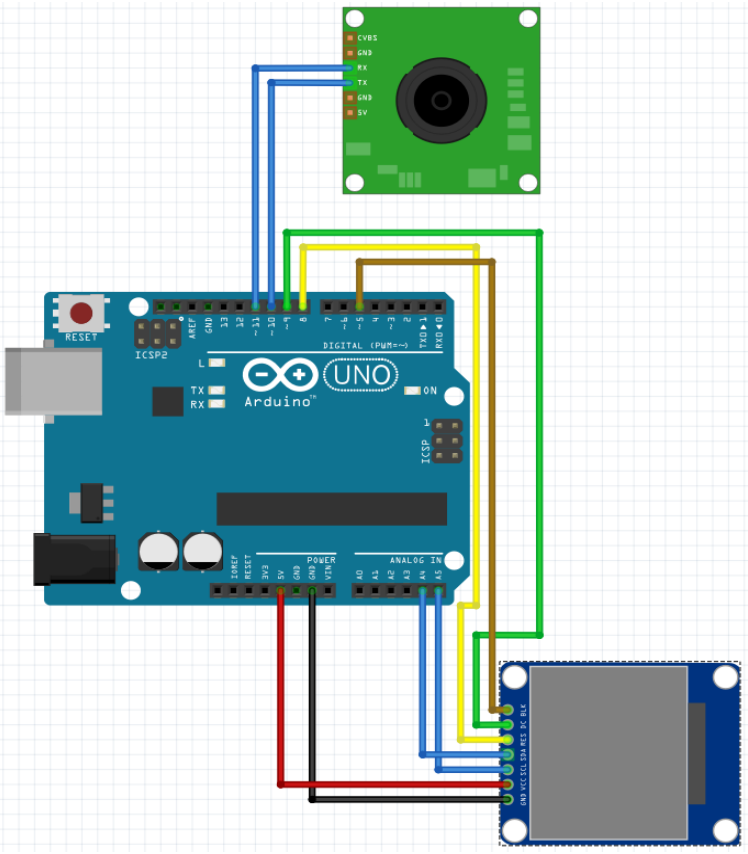

Рисунок 2.12 – Схема передачі даних від камери на планшет. Створено у програмному середовищі Fritzing

Для даної схеми було обрано мікроконтролер Arduino Uno, тому що вона є дешевшою за своїх аналогів (наприклад, плата Raspberry Pi), і хоча вона є дещо слабшою по деяким характеристикам за конкурентів, вона повністю справляється зі своєю задачею. Також можна сказати, що вона достатньо проста

у використанні та програмуванні. Arduino Uno має легкий у інтерфейс, що робить її ідеальною для всіх категорій користувачів. Вона працює на основі простої мови програмування, яка базується на мові C / C++, існує безліч готових бібліотек, які спрощують розробку проектів. Arduino Uno має широкий вибір вхідних та вихідних пінів, і це дозволяє нам підключати різноманітні сенсори, та будь-які інші пристрої, які будуть потрібні для розробки електричних схем.

Крім того, можна використовувати розширювальні дошки, які додають додаткові можливості та функціональність до плати Arduino Uno.

Характеристики плати Arduino Uno:

1. Мікроконтролер – ATmega328.

2. Робоча напруга – 5 В.

3. Вхідна напруга (рекомендована) – 7-12 В.

4. Вхідна напруга (максимальна) – 6-20 В.

5. Цифрові входи / виходи – 14 (6 з яких можуть використовуватись як виходи ШІМ).

6. Аналогові входи – 6.

7. Постійний струм через вхід / вихід – 40 мА.

8. Постійний струм для виходa 3.3 В – 50 мА.

9. Флеш-пам’ять – 32 Кб (ATmega328).

10. ОЗУ – 2 Кб (ATmega328).

11. EEPROM – 1 Кб (ATmega328).

12. Тактова частота – 16 МГц.

Камера Andor iStar 334T, яку ми будемо використовувати у спрощеному мікроскопі має такі характеристики:

1. Зображувальна матриця – 1024 х 256 пікселів.

2. Розмір пікселя – 26 х 26 мкм.

3. Динамічний діапазон – більше 16 біт.

4. Інтерфейс – USB 2.0.

5. Швидкість зчитування – до 4 МГц.

6. Максимальна швидкість зйомки – до кількох сотень кадрів в секунду, що більш ніж достатньо для проведення точної експрес-діагностики вірусної інфекції.

7. Режими роботи – звичайний, збереження зображення, фокусування, часова діагностика.

8. Чутливість – до 45% квантового виходу на фотон у видимому діапазоні.

9. Діапазон довжини хвилі – від 200 до 1100 нм.

Саме камера фірми Andor була обрана тому що вона оснащена зображувальною матрицею з форматом CCD (зарядово-зв'язана пристрій). Це дозволяє захоплювати зображення з високою роздільною здатністю та деталізацією. Камера має великий площинний кут зйомки, що дозволяє захоплювати широкі області зображення зберігаючи високу якість та деталізацію, вона має потужний мікропроцесор, який дозволяє робити швидку серійну зйомку. Це особливо важливо, коли необхідно відстежувати швидкі події та досягти мінімального фото пошкодження зразку. Висока чутливість до світла надає можливість захопити дуже слабкі сигнали і провести дослідження з високою точністю. І на кінец, камера підтримує найсучасніше програмне забезпечення та має гнучке налаштування. Це є одной з найцінніших її переваг серед інших аналогів, так як планшет, на якому ми будемо проводити експрес аналіз вірусної інфекції може мати будь яку систему або може бути встановлений будь-якої фірми і незважаючи на це все буде працювати бездоганно.

Варто також зазначити недоліки камери. Перше і найголовніше – це висока вартість у порівнянні з іншими моделями. Незважаючи на це, шляхом заміни плати з Raspberry Pi на плату Arduino Uno, ми компенсували цю витрату, тому що врахували, що найкращим варіантом буде не тільки зберегти якість та швидкість діагностики, але й покращити деталізацію знімків. Другий недолік – якщо доведеться працювати в дуже специфічному діапазоні хвиль (що

перевищує 1100 нм) або короткими хвильовими діапазонами (менше 200 нм), ця камера може бути обмеженою.

Характеристики ЖК екрану, який використовується для прикладу у схемі передачі зображення від камери на дисплей:

1. Назва пристрою – 1.3” IPS LCD full-color display with a high resolution of 240x240 pixels.

2. Роздільна здатність – 240x240 пікселів.

3. Розмір екрану – 1.3 дюйми.

4. Кут огляду – приблизно 80 градусів.

5. Драйвер – ST7789 із SPI інтерфейсом.

Так як в нашій роботі буде використовуватись лазер із довжиною хвилі 488 нм, то ці недоліки не матимуть значення і камера цілком підходить для виконання поставленої задачі.

Код, що використаний для програмування мікроконтролера Arduino Uno, щоб отримане зображення з камери виводилось на екран:

```
#include <Adafruit_GFX.h>
#include <Adafruit_ILI9341.h>
#include <SoftwareSerial.h>
SoftwareSerial cameraSerial(10, 11); // Піни для зв’язку з камерою (RX, TX)
Adafruit_ILI9341 tft = Adafruit_ILI9341(9, 8, A5, A4, D9, D8, D5); // Піни для зв’язку з екраном
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  cameraSerial.begin(38400); // Налаштування швидкості передачі даних камери
  tft.begin(); // Ініціалізація екрану
  // Очистити екран
  tft.fillScreen(ILI9341_BLACK);
}
void loop() {
  // Захват зображення з камери
  cameraSerial.write(0x56); // Команда для початку передачі зображення на екран з камери
  cameraSerial.write(0x00);
  cameraSerial.write(0x11);
  cameraSerial.write(0x00);
  delay(100); // Затримка для стабілізації передачі даних
  // Прийом та відображення фото на екрані
  while (cameraSerial.available()) {
    uint8_t data = cameraSerial.read();
    // Вивід даних на екран
```

```
    tft.write(data);
  }
}
```

Код написаний у програмі Arduino IDE зображено на рисунку 2.13:

```
#include <Adafruit_GFX.h>
#include <Adafruit_ILI9341.h>
#include <SoftwareSerial.h>

SoftwareSerial cameraSerial(10, 11); // Піни для зв'язку з камерою (RX, TX)
Adafruit_ILI9341 tft = Adafruit_ILI9341(9, 8, A5, A4, D9, D8, D5); // Піни для зв'язку з екраном

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  cameraSerial.begin(38400); // Налаштування швидкості передачі даних камери

  tft.begin(); // Ініціалізація екрану

  // Очистити екран
  tft.fillScreen(ILI9341_BLACK);
}

void loop() {
  // Захват зображення з камери
  cameraSerial.write(0x56); // Команда для початку передачі зображення на екран з камери
  cameraSerial.write(0x00);
  cameraSerial.write(0x11);
  cameraSerial.write(0x00);

  delay(100); // Затримка для стабілізації передачі даних

  // Прийом та відображення фото на екрані
  while (cameraSerial.available()) {
    uint8_t data = cameraSerial.read();

    // Вивід даних на екран
    tft.write(data);
  }
}
```

Рисунок 2.13 – Код для роботи мікроконтролера Arduino Uno

При побудові схеми були обрані наступні компоненти:

1. Мікроконтролер Arduino Uno який було запрограмовано під конкретну задачу.

2. Камера Adafruit TTL Serial JPEG Camera. Вона була використана при побудові, тому що у бібліотеці самої програми та на офіційному сайті Fritzing не була знайдена модель камери, яку ми плануємо застосовувати в нашому спрощеному флуоресцентному мікроскопі (а саме модель камери Andor iStar 334T), тому було вирішено використати стандартну модель екрану «1.3” IPS LCD full-color display with a high resolution of 240x240 pixels» із бібліотеки.

Електрична схема передачі зображення від камери на екран (рисунок 2.14):

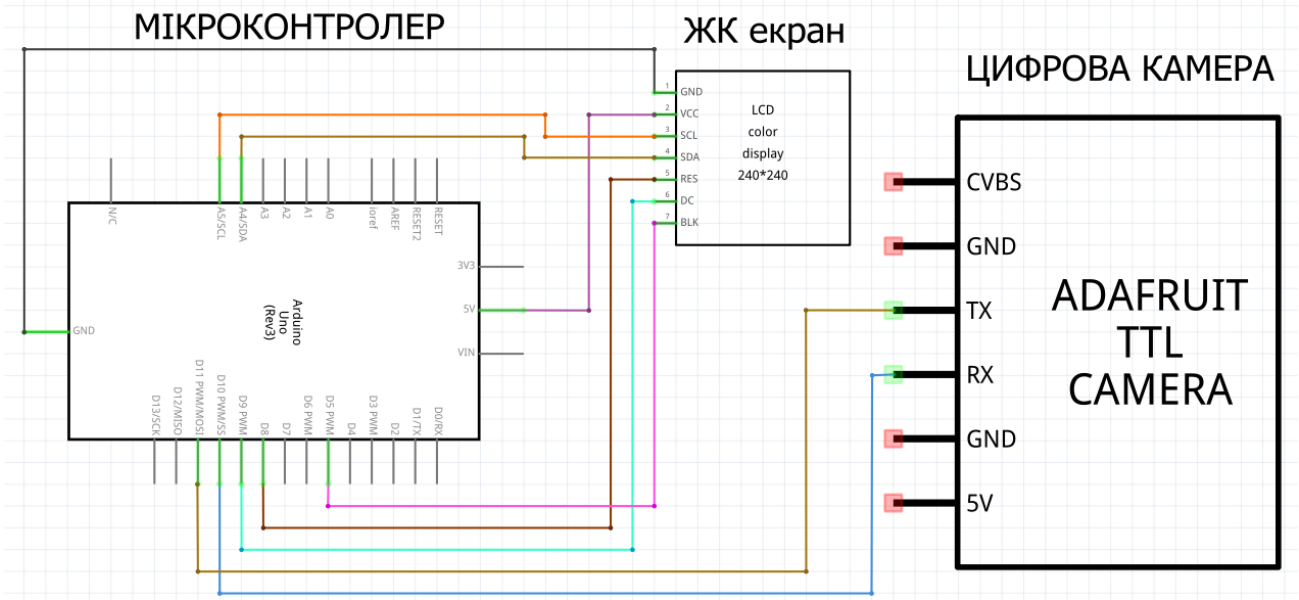

Рисунок 2.14 – Електрична схема передачі зображення. Створено за допомогою програмного забезпечення Fritzing

Друкована плата, зображена на рисунку 2.15, є важливою складовою всього проекту. Вона використовується для створення прототипу нашої схеми і можливості в подальшому за необхідності виготовити реальну модель. Після цього буде можливість використовувати схему у спрощених мікроскопах для проведення експрес-діагностики.

Отриману друковану плату можна використовувати для збирання і тестування прототипу схеми. Це дозволяє перевірити працездатність та ефективність схеми перед виготовленням реальної моделі.

Після успішного тестування прототипу ми можемо виробити реальну модель, використовуючи друковану плату. Цей процес включає встановлення всіх необхідних електронних компонентів на плату і з'єднання їх за допомогою припою або інших методів з'єднання.

Система, вбудована на друковану плату, забезпечує необхідні функції для аналізу зразків і зчитування результатів. Це дозволяє швидко та ефективно

проводити діагностику вірусної інфекції за допомогою мікроскопічного аналізу.

Загалом, друкована плата є важливою технологічною складовою для розробки і виробництва пристроїв. Вона дозволяє створити прототипи, виготовити реальні моделі і використовувати їх для проведення різних досліджень та діагностики.

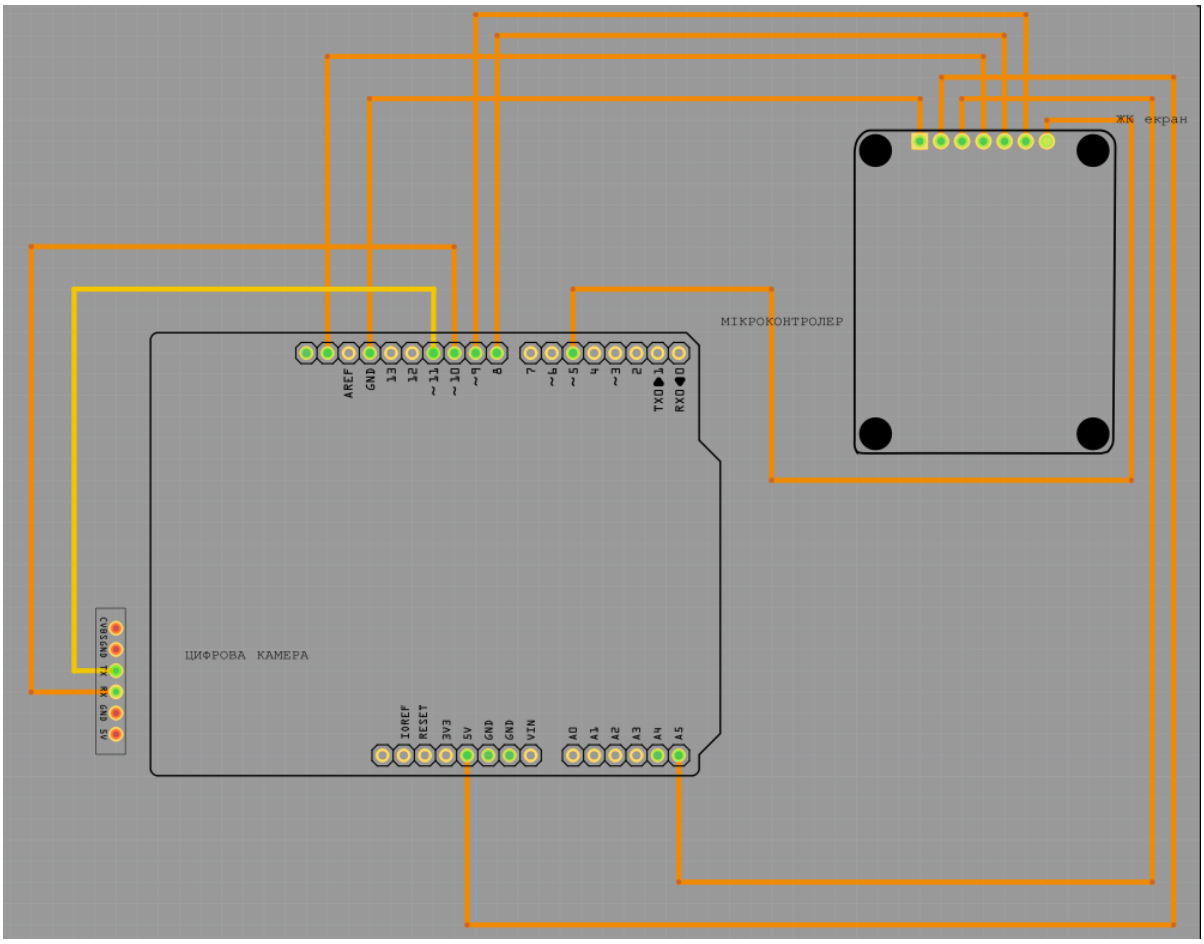

Рисунок 2.15 – Друкована плата. Створено у програмному забезпеченні Fritzing

Для живлення оптичного флуоресцентного мікроскопа можна використовувати декілька варіантів, це все буде залежати від умов у яких проводиться експрес аналіз.

По-перше, можна використати електричну мережу. За допомогою стандартного кабелю живлення є можливість підключити наш прилад до розетки.

По-друге, так як даний прилад є компактною системою, тому в ньому є вбудований Li-ion акумулятор. При неможливості підключитись до мережі, можна використовувати акумулятор для живлення мікроскопу. Для комфортного та довготривалого використання мікроскопа було запропоновано встановити акумулятор ємністю 30000 мА×год, який матиме напругу 12 В. Цього цілком достатньо щоб проводити до кількох десятків аналізів від одного заряду, враховуючи те, що цей акумулятор буде також живити підключений до мікроскопа планшет.

2.4 Оцінка інтенсивності світіння за допомогою програми ImageJ

Для оцінки інтенсивності світіння у флуоресцентному мікроскопі можна скористатись програмою ImageJ (див. рисунок 2.16), для цього необхідно відкрити зображення, вибрати інструмент "ROI Manager" та обрати область інтересу, для якої буде вимірюватися інтенсивність флуоресценції. Після цього, необхідно обрати інструмент "Measure" та програма автоматично виміряє інтенсивність флуоресценції в зазначеній області. Це все можна зробити за декілька кроків через приєднаний до мікроскопу планшет, що значно пришвидшує діагностику.

Приєднання планшета до флуоресцентного мікроскопу можна здійснити за допомогою двох основних кроків:

1. Підключити планшет до флуоресцентного мікроскопа по USB-кабелю, встановивши його на штатив для його надійного кріплення зверху корпусу мікроскопу.
2. Запустити програму експрес-діагностики ImageJ та встановити параметри експерименту (налаштувати експозицію, частоту кадрів та інші необхідні функції камери під окремий тип досліджуваного зразка).

Програма має широкий набір функцій для обробки та аналізу зображень, включаючи підтримку флуоресцентних зображень. Можна вимірювати

інтенсивність сигналу флуоресценції, використовуючи різні підходи, наприклад, обрізати регіони інтересу, обчислювати середнє значення інтенсивності пікселів у цих областях, а також аналізувати інтенсивність у певних каналах кольору.

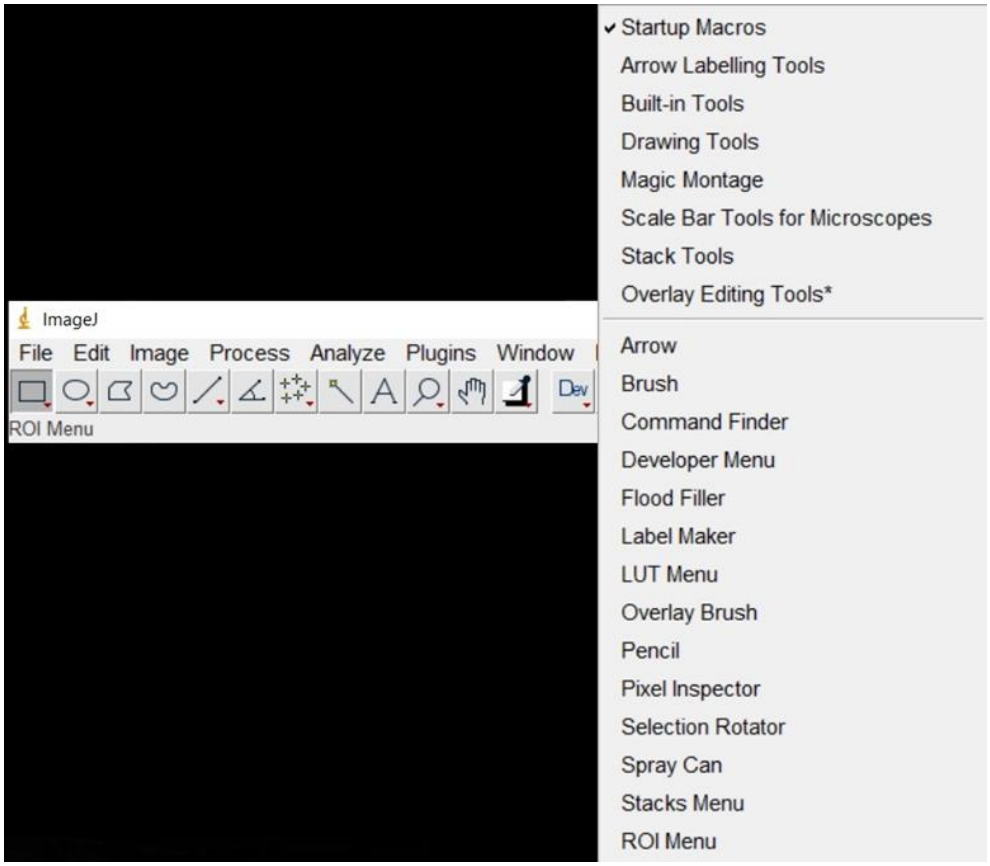

Рисунок 2.16 – Панель налаштувань у програмі ImageJ

Спочатку потрібно відкрити зображення в форматі, яке ми отримали з оптичного флуоресцентного мікроскопу, потім за необхідністю виправити шум, корекцію фону. Вибрати регіони інтересу, котрі треба дослідити або виміряти інтенсивність флуоресценції по всьому зображенню, використовуючи вбудовані функції програмного забезпечення ImageJ для обчислення інтенсивності флуоресценції.

Наприклад, користуємось інструментом ROI Manager, який дозволяє обчислити середню інтенсивність флуоресценції для кожної області.

Щоб використовувати ROI Менеджер необхідно виконати наступні дії:

1. Відкрити потрібне зображення.

2. Вибрати інструмент вибору ROI, який відповідає нашим потребам (прямокутник, еліпс, круг).

3. Виділити бажану область на зображенні.

4. Натиснути кнопку «Додати».

5. Повторити дії з пунктів 2-4 для всіх областей інтересу, які треба дослідити.

6. Після того, як всі ROI додані до ROI Менеджер, необхідно відкрити ROI Менеджер, натиснувши на кнопку «Плагіни», потім ROI Менеджер і «Показати менеджер».

7. Вибрати всі ROI або окремі ROI в ROI Менеджері, які аналізуємо.

8. Натиснути кнопку "Виміряти" у ROI Менеджері, щоб обчислити середню інтенсивність флуоресценції для кожного ROI.

9. Результати відображаються в таблиці, де можна бачити середню інтенсивність та інші параметри для кожного ROI.

Висновки до розділу 2

Флуоресцентна мікроскопія дозволяє виявляти та вивчати інфекційні агенти, досліджувати біологічні процеси на молекулярному рівні. Експрес-діагностика за допомогою флуоресценції є перспективною технологією в біології та медицині, забезпечуючи швидкі та точні результати. Цей метод має високу специфічність і чутливість, він дозволяє виявити віруси навіть у низьких концентраціях.

Ці переваги роблять експрес-діагностику за допомогою методу флуоресценції потужним інструментом для діагностики інфекційних хвороб.

РОЗДІЛ 3
ОХОРОНА ПРАЦІ

Дипломна робота виконується на базі НТУУ «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського».

Метою даного розділу є оцінка та виявлення потенційно небезпечних та шкідливих виробничих факторів, що створюються конструкцією об’єкту, який проектується, та заходи їх усунення.

3.1 Характеристика оптико-електронного приладу

Схема передачі сигналу спроектована на базі мікроконтролера Arduino Uno та камери TTL Serial JPEG Camera та цифрового екрану (планшету, який кріпиться до мікроскопу). Технічні характеристики основних компонентів наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Характеристики компонентів схеми, яка проектується

№	Найменування компонентів	Основні характеристики	Кількість	Позиція на рисунку
1	Цифрова камера TTL Serial JPEG Camera	клас виробу за способом захисту – I, клас виробу за ступенем захисту – IP 30, споживана потужність – до 50 мВт, напруга живлення – 3.3 В максимальний струм живлення – 200 мА	1	1
2	Плата Arduino Uno	клас виробу за способом захисту – I, клас виробу за ступенем захисту – IP 30, споживана потужність – до 75 мВт, напруга живлення – 3.3…5 В, максимальний струм живлення – 15 мА	1	2
3	Цифровий екран 1.3” IPS LCD full-color display	споживана потужність – 500 мВт, напруга живлення – 5 В, максимальний струм живлення – 1 А, роздільна здатність – 240x240 пікселів	1	3

Продовження таблиці 3.1

4	Літій-іонний акумулятор	клас виробу за ступенем захисту – IP 20, споживана потужність – 500 мВт, напруга живлення – 3.3…12 В, максимальний струм живлення – до 3А	1	4

Класи використаних компонентів за способом та ступенем захисту були зазначені відповідно до ДСТУ EN 61140:2015 «Захист проти ураження електричним струмом. Загальні аспекти щодо установок та обладнання» та ДСТУ EN 60529:2018 «Ступені захисту, забезпечувані кожухами». До приладу, що проектується не висувається вимог про освітлення, вологості повітря, тиску та температури.

3.2 Складові частини приладу

На рисунку 3.1 електричні зв’язки показані стрілками, для забезпечення роботи всіх компонентів використовується літій-іонний акумулятор 4, що живить плату Arduino Uno 2, камеру 1 та екран (планшет) 3.

Також живлення мікроскопу може відбуватись від мережі 220 В, а якщо він використовується у польових умовах тоді від вбудованого у корпус акумулятора.

Схема комутації компонентів системи зображена на рисунку 3.1.

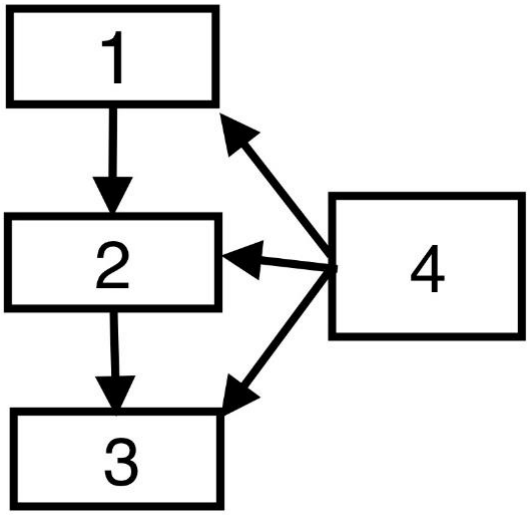

Рисунок 3.1 – Функціональна схема взаємозв’язку компонентів системи

3.3 Характер взаємодії системи оптичного флуоресцентного мікроскопу в системі «людина – об’єкт»

Способи сповіщення користувача про стан підключення та дієздатності приладу наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Взаємодія пристрою в системі «людина – об’єкт»

№	Найменування компонентів флуоресцентного мікроскопу	Вид сповіщення працівника	Кількість
1	Цифрова камера TTL Serial JPEG Camera	Індикація на екрані планшету – текстове сповіщення	1
2	Мікроконтролер Arduino Uno	Індикатор підключення живлення - світлодіод	1
3	Екран 1.3” IPS LCD full-color display	Очі працівника	1

3.4 Небезпека ураження електричним струмом

Щоб користування приладом було безпечним слід дотримуватись вимог безпеки, які в нашому випадку встановлюються для запобігання ураження електричним струмом та виникнення пожежі. Усунення небезпеки при використанні приладу є вкрай важливим, оскільки прилад має літій-іонний акумулятор і безпосередньо використовується у приміщенні із медичним персоналом протягом усього робочого дня, тому оцінка джерел та потенційних небезпек, наслідків є важливою.

Оцінка та аналіз джерел, причин та наслідків небезпек електричного характеру наведена у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Оцінка небезпек електричного характеру

№	Найменування компоненту мікроскопу	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Літій-іонний акумулятор	постійний струм	Порушення ізоляції дротів	Коротке замикання і повний вихід з ладу акумулятора
2	Цифрова камера TTL Serial JPEG Camera	постійний струм	Потрапляння води на прилад	Коротке замикання призведе до неможливості в подальшому працювати з ним

Компоненти системи оптичного флуоресцентного мікроскопа знаходяться під напругою і через це може виникнути небезпека ураження струмом.

Реальні та нормативні фактори небезпеки були визначені згідно ДСТУ EN 61140:2015 «Захист проти ураження електричним струмом. Загальні аспекти щодо установок та обладнання».

Таблиця 3.4 – Реальні та нормативні фактори електричної небезпеки

№	Фактори небезпеки	Реальне значення	Нормативне значення
1	Постійний струм	16 А	10 мА

Реальні значення факторів небезпеки перевищують нормативні, що вимагає створення заходів для зменшення вірогідності виникнення небезпек для людини (див. таблицю 3.5).

Таблиця 3.5 – Заходи для забезпечення охорони праці щодо безпеки електричного струму.

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій заходу
1	Технічні	Гумова ізоляція дротів для підключення, Екранування дрота типом STP	Запобігання потраплянню вологи та води на систему, При потраплянні вологи екранування захистить дроти
		Використання вилки типом С	Стандартний тип вилок для роботи від джерела живлення 220 В
		Заземлення	Запобігання ураження електричним струмом працівників, а також забезпечення безпечної експлуатації пристрою
2	Організаційні	Ознайомлення із технікою безпеки та правилами користування пристроем	Перед початком роботи дати інструкцію з користування медичному персоналу
3	Режимні	Раз на місяць проводити перевірку справності електричної системи	Запобігання виникнення проблем системи шляхом сервісного регулярного обслуговування
4	Експлуатаційні	Контроль за якістю роботи та цілісністю системи	За призначенням використовувати оптико-електронний прилад

3.5 Інструкція з техніки безпеки при роботі із оптичним флуоресцентним мікроскопом

Загальні правила користування оптико-електронним приладом, перед використанням якого персонал має обов’язково ознайомитись:

1. Перед роботою з приладом пройти інструктаж та розписатись за

техніку безпеки.

2. Не проводити ремонтні заходи самостійно. Це може робити лише висококваліфікований персонал.

3. При роботі з електронним приладом знімати верхній одяг, за необхідності використовувати спецодяг та маску.

4. Перед початком роботи із мікроскопом перевірити цілісність його елементів.

5. Впевнитись, що пристрій знаходиться на достатній відстані від води або вогню.

6. Через прикріплений планшет впевнитись, що не виникли помилки у роботі мікроскопу та камери.

7. Після роботи із оптичним флуоресцентним мікроскопом візуально перевірити стан приладу та відключити його від мережі (якщо підключений до розетки), попередньо вимкнувши його.

Висновки до розділу 3

У даному розділі було виявлено потенційні небезпеки та шляхи їх уникнення. Небезпека, пов’язана із електричним ураженням електричним струмом була найвагомішою проблемою, тому що персонал протягом всієї роботи із мікроскопом знаходиться поруч і це наражає його на небезпеку.

Для того, щоб забезпечити безпечну роботу приладу були розроблені заходи з охорони праці для зниження вірогідності виникнення небезпек при користуванні приладом. Також була написана інструкція з техніки безпеки, яка зазначає на що саме потрібно звернути увагу на початку користування мікроскопом та наприкінці.

ВИСНОВКИ

В ході написання дипломної роботи було виконано всі поставлені завдання, що дозволило отримати значні результати в дослідженні флуоресцентного методу діагностики вірусної інфекції.

1. Була опрацювана та проаналізована літератури, що стосується флуоресцентного методу дослідження клітин, це дало змогу отримати необхідні теоретичні знання та розуміння його ефективності.

2. За допомогою програмного забезпечення SolidWorks був створений макету оптико-електронного приладу. Він забезпечує можливість підключення планшету та проведення експрес-діагностики вірусної інфекції навіть у польових умовах. Такий зручний та переносний прилад дозволить лікарям оперативно виявляти та діагностувати інфекційні захворювання з високою точністю.

3. Для забезпечення передачі зображення між камерою та планшетом була розроблена схема, використовуючи мікроконтролер Arduino Uno. Ця схема показує як ефективно передавати отримані дані від камери на планшет для подальшого їх аналізу.

4. Для оцінки інтенсивності світіння флуоресценції було використано програму ImageJ, яка надає можливість вимірювати яскравість та інтенсивність флуоресцентного сигналу.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Böhm U., Hell S., Schmidt R. 4Pi-resolft nanoscopy, 2016.
2. Принцип роботи флуоресцентного мікроскопа [Електронний ресурс]. URL: https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/kak-deystvuet-fluorestsentnyy-mikroskop/ (дата звернення: 19.04.2023).
3. Дзержинський М.Е., Вороніна О.К., Скрипник Н.В., Гарматіна С.М., Пазюк Л.М. Загальна цитологія. Практикум: навчальний посібник. Київ: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2011. - 126 с.
4. Воробьев А.А., Быков А.С. (ред.). Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. - 236 с.
5. Флуоресцентна мікроскопія [Електронний ресурс]. URL: https://intergen.ru/blog/fluoresczentnaya-mikroskopiya (дата звернення: 14.05.2023).
6. Hao Y., Li S., Fu Y., Li Y., Xu C., Kuang X. Review of 4Pi Fluorescence Nanoscopy Engineering. 2020.
7. Бойко О.П., Бусол В.О., Мандигра М.С., Бойко П.К., Кучерявенко Р.О. Виготовлення діагностикуму для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації Pseudomonas aeruginosa. Київ: ВЦ НУБіП, 2010. - 20 с.
8. Бойко П.К., Бусол В.О., Мандигра М.С., Коваленко Л.В., Бойко О.П. Застосування імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби. Методичні рекомендації. Київ: НУБіП, 2010. - 16 с.
9. Бойко О.П. Епізоотологія та діагностика псевдомонозної інфекції тварин і птиці: дисертація ... канд. вет. наук, спец. 16.00.03. Одеса: Одеський ДАУ, 2011. - 117 с.

10. Бусыгин К.Ф. Люминесцентная диагностика инфекционных болезней животных. Колос, 1975. - 10-11 с.
11. Пундяк Т.О. Ретроспективний серологічний скринінг сальмонельозу великої рогатої худоби у західних областях України: автореф. дис. ... канд. вет. наук, спец. 16.00.03. Київ, 2015. - 19 с.
12. Бусол В.О., Мандигра М.С., Бойко П.К., Бойко О.П., Кучерявенко Р.О. Імунофлуоресцентний метод в експрес-діагностиці інфекційних захворювань тварин. ВМУ, 2012. - Т. 9. - С. 26-30.
13. Левина Е.Н. Иммунолюминесценция в медицине. Медицина, 1977. - 239 с.
14. Бойко П.К. Иммунофлуоресцентная индикация и идентификация возбудителя эмфизематозного карбункула: автореф. дис. ... канд. вет. наук, М.: МВА, 1982. - 23 с.
15. Herman B. Fluorescence Microscopy, 2nd ed. Garland Science: London, 2020. - 188 p.
16. J. B. Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Springer Science and Business Media, 2013.
17. Principles of Fluorescence Spectroscopy, J.R. Lakowicz, Springer Science & Business Media, 2013.
18. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis. Molecular Biology of the Cell, 6th Edition. Garland Science, 2015.
19. Стратегії суперроздільної мікроскопії на основі флуоресценції для дослідження хроматину [Електронний ресурс]. URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s00412-023-00792-9 (дата звернення: 01.05.2023).
20. Порівняльний аналіз модульності в біологічних системах [Електронний ресурс]. URL: https://www.researchgate.net/publication/228362684_Comparative_Analysis_of_Modularity_in_Biological_Systems (дата звернення 31.05.2023)