

**УДК 535.015**

*О.Є. Гудзь, аспірант гр. ПО-91ф, д.т.н., професор Боровицький В.М.  
КПІ ім. Ігоря Сікорського*

## **ОПТИЧНІ МІКРОСКОПИ ЗІ СТРУКТУРОВАНИМ ОСВІТЛЕННЯМ**

**Анотація.** У статті розглянуто класифікацію сучасних оптичних мікроскопів зі структурованим освітленням.

**Ключові слова:** мікроскоп, структуроване освітлення, імпульсне освітлення, гармонічне освітлення, конфокальний мікроскоп.

### **ВСТУП**

В наші дні для отримання якісного тривимірного зображення мініатюрного об'єкта з найвищою роздільною здатністю використовують мікроскопи з нерівномірним (структурованим) освітленням. Найкраще розділення дають конфокальні мікроскопи з імпульсним типом освітлення, але за останні роки з'явилося багато цікавих альтернатив.

### **СТРУКТУРОВАНЕ ОСВІТЛЕННЯ**

Узагальнена класифікація оптичних мікроскопів зі структурованим освітленням приведена в таблиці 1.

Таблиця 1. Мікроскопи зі структурованим освітленням

<b>Структуроване освітлення</b>	Імпульсне	Точкою
		Набором точок
		Лінією
	Гармонічне	Вздовж оптичної осі
		Перпендикулярно осі
		В просторі зразка
	Рандомним полем	

Класичний кофокальний лазерний скануючий мікроскоп (КЛСМ) здійснює сканування шляхом послідовного переміщення точки освітлення, що збуджує люмінофори на зразку. Точкові діафрагми мінімізують фонові засвітки та аберації. високий контраст і просторове розділення досягаються використанням точкової діафрагми (пінхол), яка розміщується в просторі зображення і обмежує потік паразитного фонового розсіяного світла, що дозволяє отримати серії зображень мікроскопічного об'єкта на різних глибинах фокусу (оптичне секційне зображення по глибині). Такі секційні зображення зазвичай потім програмно складаються у тривимірну картину.

Конструкція приладу забезпечує найвищу просторову роздільну здатність, але передбачає дорогу, високоточну та повільну систему переміщення скануючої системи.

В сучасних конфокальних мікроскопах з диском Нипкова сканування здійснюється одразу набором точок, що значно збільшує швидкість. Сучасний

аналог диска Нипкова (SDCM – Spinning Disk Confocal Microscopy) для таких задач містить близько 20 тис. отворів, розміщених по спіралі, а лазерний промінь фокусується на них за допомогою додаткового диску з 20 тис. мікролінз. При обертанні такого подвійного диску об'єкт сканується відразу багатьма світловими фокусами, забезпечуючи набагато швидше зчитування – 360 кадрів (площин) в секунду чи навіть 1 кадр в мілісекунду.

Але за рахунок відносно малого пропускання і контрасту, складності конструкції та управління диском, а також великих втрат випромінювання при проходженні через диск такі системи практично не використовуються.

Ще один конфокальний метод отримання тривимірних зображень – метод лінійного сканування. Принцип дії приладу схожий на КЛСМ, але система освітлення побудована таким чином, що у простір предмету проектується зображення рівномірно освітленої щільової діафрагми або використовується циліндрична лінза для сканування предметної області лінією. В прийомному каналі замість точкової діафраги відповідно встановлюється щілинна, яка відсікає промені з інших аксіальних площин.

Для отримання повного зображення проводиться пошарове сканування в одному напрямі. В якості приймача виступає ПЗС лінійка, перед якою встановлена друга щілинна діафрагма. Такі прилади володіють вищою швидкістю отримання зображення, однак мають значно менше розділення.

Загальним недоліком лазерних скануючих та конфокальних мікроскопів з диском Нипкова є суттєва фонові флуоресценція об'єктів, що знаходяться не в фокусі лазерного променя. Такі засвітки відфільтровуються пінхолом перед реєструючим пристроєм, але далеко не повністю.

Набагато більш контрастні зображення можливо отримати за допомогою мультифотонної мікроскопії (МРЕ – MultiPhoton Excitation). В таких мікроскопах флуорофори збуджуються лише в фокусі лазерного променя, де за рахунок високої концентрації фотонів можливо просумувати їх енергію (дивитись рисунок 1).

Завдяки відсутності позафокусної флуоресценції МРЕ-мікроскопи можуть працювати без звичного для фільтрації світла мікроотвору (пінхолу). В мультифокусних системах сканування при мультифотонному збудженні флуорофорів диск з отворами лишній, достатньо лише диску з мікролінзами.

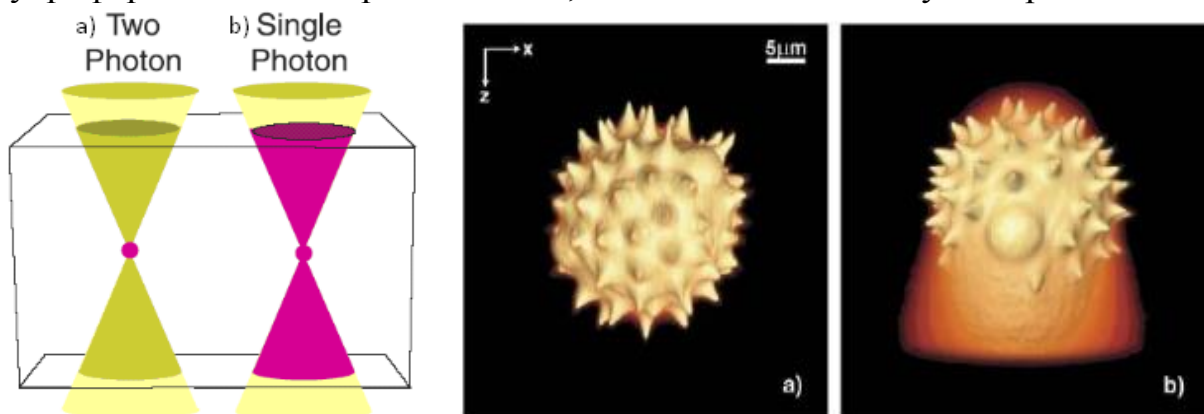


Рисунок 1. Відмінність збудження при двофотонній (а) та однофотонній (б) мікроскопії

Останнім часом з'являються нові ідеї та пристрої, роздільна здатність яких у тривимірному просторі наближається до рівня конфокальної мікроскопії, а будова є більш економічною (таблиця 1). До таких пристроїв належать мікроскопи з гармонічним освітленням, які вирізняються наявністю додаткової приставки до мікроскопа, яка проектує в простір предмета дифракційну ґратку (вздовж оптичної осі, ортогонально осі чи в просторі усього зразка) та на основі отриманих даних суміщення об'єкта і ґратки будує тривимірне зображення з підвищеною роздільною здатністю.

Ще одним варіантом мікроскопів зі структурованим освітленням є системи, які освітлюють зразок випадковим (рандомним) полем і потім на основі аналізу та синтезу даних отримують інформацію про його будову у просторі.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1]J. G. White, W. B. Amos, M. Fordham. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy // The Journal of Cell Biology. – 1987. – Vol. 105, iss. 1. – P. 41-48.
- [2]Diana Morgan. Confocal Microscopes Widen Cell Biology Career Horizons // The Scientist Magazine – 1990. – Vol.63, iss.3. – P.661-664.
- [3]M. David Egger, Mojmir Petran. New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells (англ.) // Science. – 1967. – Vol.157, iss. 3786. – P. 305-307.
- [4]Mojmír Petráň, Milan Hadravský, M. David Egger, Robert Galambos. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope\* (EN) // JOSA. – 1968. – Vol.58, iss.5. – P.661-664.
- [5]High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks"/ T. Tanaami, S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, H. Ishida // Applied Optics. – 2002. – Vol.41. – P.4704-4708.
- [6]United States patent 20080069467A1. UDC G02B 21/00 (2006.01) Methods and devices for images processing with higher harmonics of an illumination grating / Lutz Schafer, Dietwald Schuster, inventors; Carl Zeiss Microscopy GmbH, assignee. Appl. № 11/900,532; Filled: Sep. 12, 2007; Pub. Mar. 20, 2008.

*Наук. керівник – д.т.н., професор Боровицький В.М.*