

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЛЬЄФУ ПОВЕРХНІ БІОЛОГІЧНИХ МІКРООБ’ЄКТІВ В УЛЬТРАФІОЛЕТОВОМУ СКАНУВАЛЬНОМУ ТЕЛЕВІЗІЙНО-ОПТИЧНОМУ МІКРОСКОПІ

© Педан А.Д., Любинецька Б.І., 2011

Розглянуто використання в ультрафіолетовій сканувальній оптичній мікроскопії стереограмметричних методів визначення рельєфу поверхні. Для побудови цифрових моделей рельєфу мікрооб’єктів опорними точками стереопари слугують люмінесцентні наночастки.

Ключові слова: сканувальний оптичний мікроскоп, конфокальна мікроскопія, лазерне сканування, стереограмметрія, цифрова модель поверхні, люмінесцентні наночастки.

Use in ultra-violet scanning microscopy stereogrammetria methods of definition of a relief of a surface is considered. At construction of digital models of a relief of microobjects by reference points of stereo pair serve luminescent nanoparticle.

Key words: Scanning optical microscope, confocal microscopy, laser scanning, stereogrammetria, digital model of a surface, luminescent nanoparticle

Вступ

Завдання дослідження рельєфу поверхні біологічних мікрооб’єктів у оптичній мікроскопії виконують засобами конфокальної мікроскопії.

Конфокальна мікроскопія – це сучасний метод і незамінний інструмент для візуалізації та дослідження внутрішньо- і позаклітинних структур та аналізу клітинних процесів у біологічних та біомедичних дослідженнях. Характерними ознаками, що вирізняють конфокальну лазерну сканувальну мікроскопію з-поміж інших різновидів світлової мікроскопії, є її покращена просторова роздільна здатність та отримання тривимірного зображення об’єкта (так звана 3D-реконструкція). Конфокальна мікроскопія дозволяє отримувати “оптичні зрізи” живих та фіксованих препаратів завтовшки до 100 мкм і з інтервалом 0,3–0,5 мкм. Зазвичай сучасні конфокальні сканувальні мікроскопи обладнані трьома-п’ятьма лазерними системами, які контролюються акустично-оптичними фільтрами для точного регулювання довжини хвилі та інтенсивності лазерного випромінювання. Завдяки наявності фотопомножувачів із квантовою ефективністю в ультрафіолетовому діапазоні спектра, такі мікроскопи дають можливість проводити дослідження у діапазоні 400–759 нм.

Спрощена схема отримання зображення за допомогою лазерного сканувального конфокального мікроскопа виглядає так: лазерний промінь сканує флуоресцентний зразок; надалі точкова діафрагма затримує “шумове” світло і на чутливий детектор потрапляє лише світло від досліджуваного об’єкта у фокусі. Отримані дані об’єднуються у зображення вже під час опрацювання цифрових сигналів. Кінцеве зображення є тонким висококонтрастним оптичним зрізом зразка в площині ХУ з достатньо інформативною роздільною здатністю. Якщо фокусну площину зсувати відносно осі Z, то можна отримати тривимірне об’ємне зображення. Спеціальна система незалежних сканувальних дзеркал, розташованих у взаємно перпендикулярних площинах, дає змогу переміщувати лазерний фокус у середині зразка в площині ХУ. Змінена таким способом у кожній точці (пікселі) інтенсивність флуоресценції, надає можливості отримувати тонкий ХУ “оптичний зріз”. Завдяки позиційному переміщенню зразка уздовж осі Z з’являється можливість проводити крок за кроком пошарове Z-оптичне секціонування. Подальша комп’ютерне тривимірне оброблення “оптичних зрізів” та їхня реконструкція дає можливість отримати контрастне по всьому об’єму

тривимірне флуоресцентне зображення досліджуваного об'єкта. За цими параметрами можна відтворити зображення будь-якого "оптичного зрізу" зразка, навіть вертикального у поперечних площинах XZ або YZ, що абсолютно неможливо для звичайної світлової мікроскопії.

Однією з останніх модифікацій є конфокальний лазерний сканувальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 META [1].

Проте такий інструмент доступний лише Центрам колективного користування коштовними приладами унікального обладнання (згідно з Розпорядженням № 104 Президії НАН України від 18 лютого 2005 року) у зв'язку з високою вартістю та необхідністю висококваліфікованої обслуги.

Сканувальні методи визначення рельєфу

Питаннями визначення рельєфу поверхонь в макромасштабі займається геодезія, зокрема, методами фотограмметрії та лазерного сканування, які дозволяють одержати вихідні дані для побудови цифрових моделей рельєфу – впорядкованого набору висот точок поверхні в цифровому вигляді плюс інтерполяційний алгоритм, який дає змогу обчислити висоту будь-якої точки об'єкта з достатньою точністю [2].

Найприйнятнішими способами одержання вихідних даних є топографічне аерофотознімання та лазерне сканування з літального апарата, який рухається за певним маршрутом.

Ідея лазерного сканування полягає в тому, що на борту літака встановлюється лазер, який посиляє імпульс до точки об'єкта та приймає відбитий сигнал. Фактично вимірюється віддаль від лазера до точки місцевості (як відбувається в лазерних дальномірах). Лазерний промінь завдяки дзеркалу відхиляється від свого початкового положення у напрямку, поперечному до лінії маршруту, так що одержується ряд просканованих точок місцевості. За рахунок переміщення літака, отримують виміри відстаней для сукупності рядів точок, які репрезентуватимуть цифрову модель рельєфу. Синхронно з лазером функціонує бортова станція GPS, яка фіксує місце перебування літака та інерціальна система, яка фіксує кутову орієнтацію лазера.

Подальше сумісне опрацювання даних лазерного сканування, GPS та інерціальної системи дозволяє для кожної точки місцевості визначити її висоту, тобто будувати цифрову модель рельєфу.

Подібний алгоритм закладений і в сканувальному оптичному мікроскопі – світловий промінь сканує мікрооб'єкт вздовж відрізка прямої (рядкова розгортка), який покроково зміщується ортогонально до відрізка (кадрова розгортка), що імітує поступальний рух літака [3]. Єдина істотна відмінність у алгоритмах полягає в тому, що в лазерному скануванні спостерігається імпульсна модуляція лазерного випромінювання, яка дає можливість за затримкою відбитого сигналу визначити лінійну віддаль від лазера до точки відбиття, а в сканувальному оптичному мікроскопі – світловий промінь безперервний. У зв'язку з цим відбитий сигнал несе інформацію тільки про кількість відбитого світла і не несе інформації про відстань до точки відбиття. Синхронізований з розгорткою цей сигнал дає можливість сформувати тільки зображення об'єкта, як під час аерофотознімання, з тією лише різницею, що точка знімання залишається незмінною і тому ракурс знімання теж залишається незмінним, що унеможливує одержання стереопари.

Для одержання стереопар у сканувальній мікроскопії можуть бути використані два методи. Перший полягає в паралельному переносі об'єкта між двома послідовними експозиціями. Цей метод паралельного переносу або зсуву, подібний до методу, що його використовують у фотограмметрії під час аерофотознімання. Об'єкт переміщується поперек в полі зору так, що довільна задана неоднорідність відображається в різних частинах растра. Зміщення між мікрофотографіями досягається механізмами зміщення предметного столика. Спільна для обох мікрофотографій ділянка перекриття може спостерігатися стереоскопічно. Для того, щоб одержати стереоскопічне зображення з достатнім ефектом глибини, необхідне доволі велике зміщення. Тому цей метод непридатний у разі використання великих збільшень, оскільки робоче поле об'єктива становить кілька десятків мікрон і взаємне необхідне зміщення об'єкта сканування та інструмента сканування приведе до зникнення об'єкта з поля зору.

Другий метод полягає в нахилі об'єкта між двома послідовним експозиціями. Він дає дві переваги: по-перше, він може використовуватися при всіх збільшеннях мікроскопа і, по-друге, в цьому

разі використовується вся площа кадру. Залежно від збільшення, зазвичай, оптимальною є різниця в куті нахилу між двома експозиціями від 5° до 10° . Така різниця в кутах нахилу може бути одержана також поворотом об'єкта в площині предметного столика, який має незмінний нахил відносно осі опромінення. Кут повороту R об'єкта в площині предметного столика, нормаль якої становить з віссю опромінення кут нахилу θ , зв'язаний з кутом паралаксу P співвідношенням $\sin R = \sin P / \sin \theta$.

Так, наприклад, при куті нахилу $\theta = 34^\circ$ і бажаному куті паралаксу $P = 6^\circ$, кут повороту R повинен дорівнювати 11° .

У практичній реалізації цього методу деякі суто технологічні проблеми пов'язані з необхідністю розташування зони експонування об'єкта строго в точці перетину осей опромінення та повороту. Точність розташування повинна становити одиниці мкм.

Конструктивне вирішення такого предметного столика зображено на рис. 1. Механізми зміщення в площині предметного столика мікроскопа вздовж осей X (1) та Y (2) зі своїми шкалами відліку жорстко фіксуються на мікроскопі. Рухома каретка (3) містить на собі поворотний (на кут $R = 0 \div 360^\circ$) препаратний столик (4), горизонтальна вісь якого (5) дозволяє здійснювати нахил площини препарату (6) на кут $\theta = 0 \div 45^\circ$. Препаратний столик виконано у вигляді кільцевого магніту з осьовим магнітопроводом, вісь повороту якого ортогональна площині препарату, а предметне скло препарату споряджено феромагнітним диском (7), що дозволяє зміщувати препарат в нахилений відносно осі об'єктива площині до суміщення досліджуваного фрагмента з робочим полем об'єктива.

Процедура просторового юстування магнітного препаратного столика полягає в суміщенні осі повороту столика з оптичною віссю об'єктива на рівні площини препарату, що досягається зміщенням рухомої каретки вздовж осей X та Y . Критерієм досягнення з'юстованості є відсутність зміщення зображення вибраного мікрооб'єкта на екрані монітора сканувального оптичного мікроскопа у разі зміни кута повороту препаратного столика.



*Рис. 1. Предметний гоніометричний столик мікроскопа:
1 – механізм зміщення вздовж осі X ; 2 – механізм зміщення вздовж осі Y ;
3 – рухома каретка; 4 – магнітний поворотний препаратний столик;
5 – горизонтальна вісь препаратного столика; 6 – препарат; 7 – феромагнітний диск*

Стереogramетрія в растровій електронній мікроскопії

На кафедрі фотограмметрії та геоінформатики Національного університету “Львівська політехніка” у межах наукової тематики кафедри з застосування методів фотограмметрії для розв’язання прикладних задач було розроблено метод стереogramетрії в растровій електронній мікроскопії [4].

Одним з надзвичайно ефективних та наочних, але водночас технічно і теоретично складних методів дослідження кількісних параметрів мікроповерхонь різноманітних об’єктів є стереофотограмметричний, який базується на опрацюванні знімків, отриманих з використанням растрових електронних мікроскопів (РЕМ). Суть його полягає в отриманні та вимірюванні просторової математично визначеної моделі мікроповерхні досліджуваного об’єкта за його плоскими РЕМ-зображеннями. Велика глибина фокусування зображення, різноманітні технічні удосконалення сучасних РЕМ дозволяють отримувати за їх допомогою високоякісні фотографічні з хорошими метричними характеристиками РЕМ-знімки, які хоч і поступаються класичним знімкам, отриманим за допомогою фізичної оптики, проте з використанням фотограмметричних приладів і розроблених математичних методів їх оброблення, дають можливість отримувати усю необхідну якісну та кількісну інформацію про мікроповерхню об’єктів з високою достовірністю та точністю.

Розроблений метод отримання та фотограмметричного опрацювання РЕМ-зображень, дозволяє встановлювати оптимальні параметри РЕМ-знімання, виявляти характер і величини геометричних спотворень РЕМ-зображень та можливість їх врахування, а також забезпечує швидке та оперативне отримання просторових кількісних характеристик мікроповерхонь досліджуваних об’єктів з необхідною точністю, використовуючи фотограмметричні прилади та засоби обчислювальної техніки.

Приклад оброблення мікрооб’єкта розробленим методом показано на рис. 2.

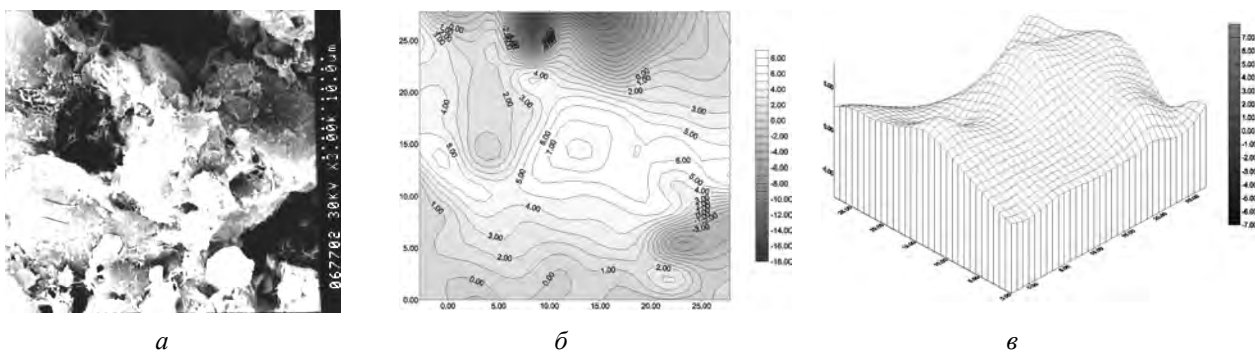


Рис. 2. Приклад РЕМ-зображення та його графічне зображення:
а – РЕМ-знімок мікроповерхні лесового ґрунту; б, в – мікроплан в горизонталях
та в аксонометричній проекції поверхні лесового ґрунту

Стереogramетрія в сканувальній оптичній мікроскопії

Розроблений для растрової електронної мікроскопії метод може бути з успіхом застосований і для зображень, одержаних в цифровій формі за допомогою сканувального телевізійно-оптичного мікроскопа.

На рис. 3 показано лабораторний макет ультрафіолетового сканувального телевізійно-оптичного мікроскопа.

У класичному оптичному ультрафіолетовому мікроскопі (1) замість опромінювача на ртутній лампі високого тиску використано сканер (2) на проєкційній ЕПТ високої роздільної здатності з монокристалічним люмінесцентним екраном зі спектром випромінювання типу Л (максимум випромінювання припадає на 400 нм), на якому формується сканувальний растр в телевізійному стандарті.

Світловий потік з екрана ЕПТ, відбиваючись від інтерференційного дзеркала (3), скеровується вздовж оптичної осі об’єктива (4), який фокусує його на препарат біологічного мікрооб’єкта, розташованого на магнітному поворотному препаратному столику предметного гоніометричного стола (5) мікроскопа.

Процедура одержання стереопари полягає в експозиції біологічного мікрооб'єкта при двох різних значеннях кута R повороту препаратного столика.

Побудова цифрової моделі рельєфу

Побудова цифрової моделі рельєфу передбачає визначення кореляційних функцій двох цифрових зображень.

Завдання автоматизації фотограмметричних процесів можна розбити на такі складові частини:

- автоматичний пошук на знімках образів, для яких наперед відоме їхнє стандартне зображення (координатні позначки, хрести, замарковані штучним або натуральним способом точки знімків або місцевості);
- автоматичний пошук чітких контурних точок на сусідніх знімках (стереопари);
- автоматичний пошук ідентичних точок на лівому та правому знімках стереопари.



Рис. 3. Макет ультрафіолетового сканувального телевізійно-оптичного мікроскопа на базі проекційної ЕПТ високої роздільної здатності: 1 – класичний оптичний ультрафіолетовий мікроскоп; 2 – сканер на проекційній ЕПТ; 3 – інтерференційне дзеркало; 4 – об'єктив; 5 – предметний гоніометричний столик; 6 – фотоелектронний помножувач; 7 – підсилювач-формувавч відеосигналу

Для підвищення якості кореляції відеосигналу використовують так звану “підгонку” стандартного образу до пошукового на рівні субпіксельної області. Це означає, що піксел ділиться на кілька субпікселів, а далі оптичні щільності подають сумою постійної та випадкової складових.

Автоматичний пошук чітких контурів на сусідніх знімках полягає в ієрархічній багато-рівневій кореляції лівого та правого зображень. На нульовому (початковому) рівні виконуються

вирівнювання фотофону з використанням фільтра Гаусса. При переході на рівень 1 відбувається об'єднання кожних чотирьох пікселів в один; так само діють у разі переходу на рівень 2, рівень 3 і т.д. У такий спосіб виконується локалізація елементів зображень, тобто істотно зменшується пошукова зона, в якій лежать ідентичні контури на сусідніх знімках, і це пришвидшує процес ідентифікації точок із застосуванням методу кореляції.

Автоматичний пошук ідентичних точок на лівому та правому знімках стереопари зводиться до знаходження максимального значення коефіцієнта кореляції між опорними точками на обох знімках.

Опорні точки відшукуються та вимірюються автоматично, коли вони замарковані перед аерофотозніманням маркувальним знаком деякого стандартного образу (хрест, квадрат, Г- або Т-подібної форми тощо). Можливий варіант автоматичного використання фотоабрису опорної точки.

Висновки

В ультрафіолетовій сканувальній телевізійно-оптичній мікроскопії опорними точками можна використати фотолюмінесцентні наночастки, розміри яких становлять десятки нанометрів [5]. Осаджені на поверхню мікрооб'єкта із суспензії наночасток в летючій рідині, вони дають світловий відгук під час сканування їх сфокусованим ультрафіолетовим зондом у вигляді короткотривалого інтенсивного спалаху, який дає імпульс відеосигналу з певних координат поверхні мікрооб'єкта. Під час сканування мікрооб'єкта в другому ракурсі координати цієї ж наночастки будуть відмінними від попередніх. Програмна обробка координат однієї і тієї самої наночастки на поверхні мікрооб'єкта, згідно з наведеним вище розробленим методом отримання та фотограмметричного опрацювання РЕМ-зображень, забезпечує швидке та оперативне отримання просторових кількісних характеристик мікроповерхонь та визначення просторових координат наночастки в прив'язці до мікрооб'єкта загалом.

1. Блюм Я.Б. Конфокальна мікроскопія у центрі користування унікальними приладами при інституті харчової біотехнології та геноміки НАНУ / Я.Б. Блюм, Я.О. Шеремет, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець // *Наука та інновації. Науково практичний журнал* – 2009. – Т. 5, №2. – С. 82 – 91.
2. Дорожінський Л.О. Аналітична та цифрова фотограмметрія /Л.О. Дорожінський. – Львів: Вид-во Нац. ун-ту «Львівська політехніка», 2002. – 163 с.
3. Грицьків З. Питання створення кольорового телевізійного скануючого оптичного мікроскопа / З. Грицьків, А. Педан // *Вісник держ. ун-ту “Львівська політехніка*. – 2000. – № 387 : *Радіoeлектроніка та телекомунікації*. – С. 365–369.
4. Іванчук О.М. Фотограмметричний метод оперативного опрацювання РЕМ-стереопар для кількісної оцінки мікроповерхонь твердих тіл / О.М. Іванчук // *Вісник геодезії та картографії, К.* – 1998. – № 2 – С. 51–53.
5. Zaichenko A. Oligoperoxide Based Physically Detectable Nanocomposites for Cell Targeting, Visualization and Treatment / A. Zaichenko, N. Mitina, O. Shevchuk, O. Shapoval, N. Boiko, R. Bilyy, R. Stoika, A. Voloshinovskii, D. Horak // *AIP Conference Proceedings*. – V. 1275. – 2010. – P. 178–182.