

УДК 618.177-089.888.11

В. Н. БОРОВИЦКИЙ, В. В. ЧЁРНАЯ

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДУЛЯЦИИ ОСВЕЩЕНИЯ В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

*Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт»,
03056, пр. Победы 37, г. Киев, Украина,
тел: +38 044 454 94 77, E-mail: vborovytsky@yahoo.com*

Аннотация. В работе приведен сравнительный анализ оптических микроскопов с пространственной модуляцией освещения, включая классификацию таких микроскопов и описание основных типов микроскопов с интерференционной и проекционной модуляцией. Особое внимание уделено изучению преимуществ, недостатков, ограничений и перспектив развития микроскопов с пространственной модуляцией освещения.

Анотація. В роботі представлений порівняльний аналіз оптичних мікроскопів з просторовою модуляцією світла, який включає класифікацію таких мікроскопів та опис основних типів мікроскопів з інтерференційною та проекційною модуляцією. Особливу увагу надано вивченню переваг, недоліків, обмежень та перспектив розвитку мікроскопів з просторовою модуляцією освітлення.

Abstract. The paper gives a comparative analysis of optical microscopes with spatial modulation of illumination and includes the classification of these microscopes. Special attention is paid to analysis of advantages and disadvantages, limitations and prospects of the microscopes with spatial modulation illumination improvement.

Ключевые слова: оптический микроскоп, пространственная модуляция освещения, трехмерное изображение образца, пространственная разрешающая способность.

ВВЕДЕНИЕ

Формирование равномерной освещенности поверхности образца всегда рассматривалось как неременное условие получения качественных изображений [1-2]. Особенно важным является формирование равномерной освещенности в цифровых оптических микроскопах, которые оснащены высокочувствительными мегапиксельными камерами [3-4]. Поэтому схема освещения по Келлеру, которая обеспечивает равномерное освещение поверхности образца при помощи параллельных световых пучков, получила широкое распространение в микроскопии [1-4].

Появление и распространение конфокальных микроскопов, в том числе лазерных сканирующих конфокальных микроскопов, показало, что неравномерное освещение имеет ряд преимуществ [5, 6]. В конфокальном микроскопе освещение формируется при помощи изображения одной точечной диафрагмы или множества точечных диафрагм, например на вращающемся диске Нипкова [5]. Соответственно в трехмерном пространстве предмета изображение каждой диафрагмы будет представлять собой трехмерное световое пятно малого размера. В лазерном сканирующем конфокальном микроскопе этим пятном сканируется трехмерное пространство предмета в пределах поля зрения и строится цифровая трехмерная карта образца [6]. В классическом конфокальном микроскопе вращающийся диск Нипкова размещается в плоскости согласованной с плоскостью предмета и экранирует пучки, поступающие с плоскостей, которые смещены относительно плоскости предмета. В результате этого существенно уменьшаются фоновые засветки и повышается контраст изображения. Также при этом повышается пространственная разрешающая способность, но главным преимуществом таких микроскопов безусловно является возможность получения трехмерных изображений образцов [6]. Такая возможность широко используется при наблюдении разноцветной флуоресценции прозрачных биологических объектов. Недостатком конфокальных микроскопов, который ограничивает их распространение, является сложность их конструкции и, как следствие, высокая цена.

Дальнейшее развитие оптической микроскопии связано с использованием пространственной модуляции освещения (ПМО) [7, 8]. Сущность ПМО заключается в том, что поверхность или объем образца освещаются неравномерно. В большинстве случаев используется одномерная, двумерная или

трехмерная гармоническая модуляция [10 – 12]. Микроскопы с ПМО имеют такие преимущества, которыми обладают и конфокальные микроскопы [6]:

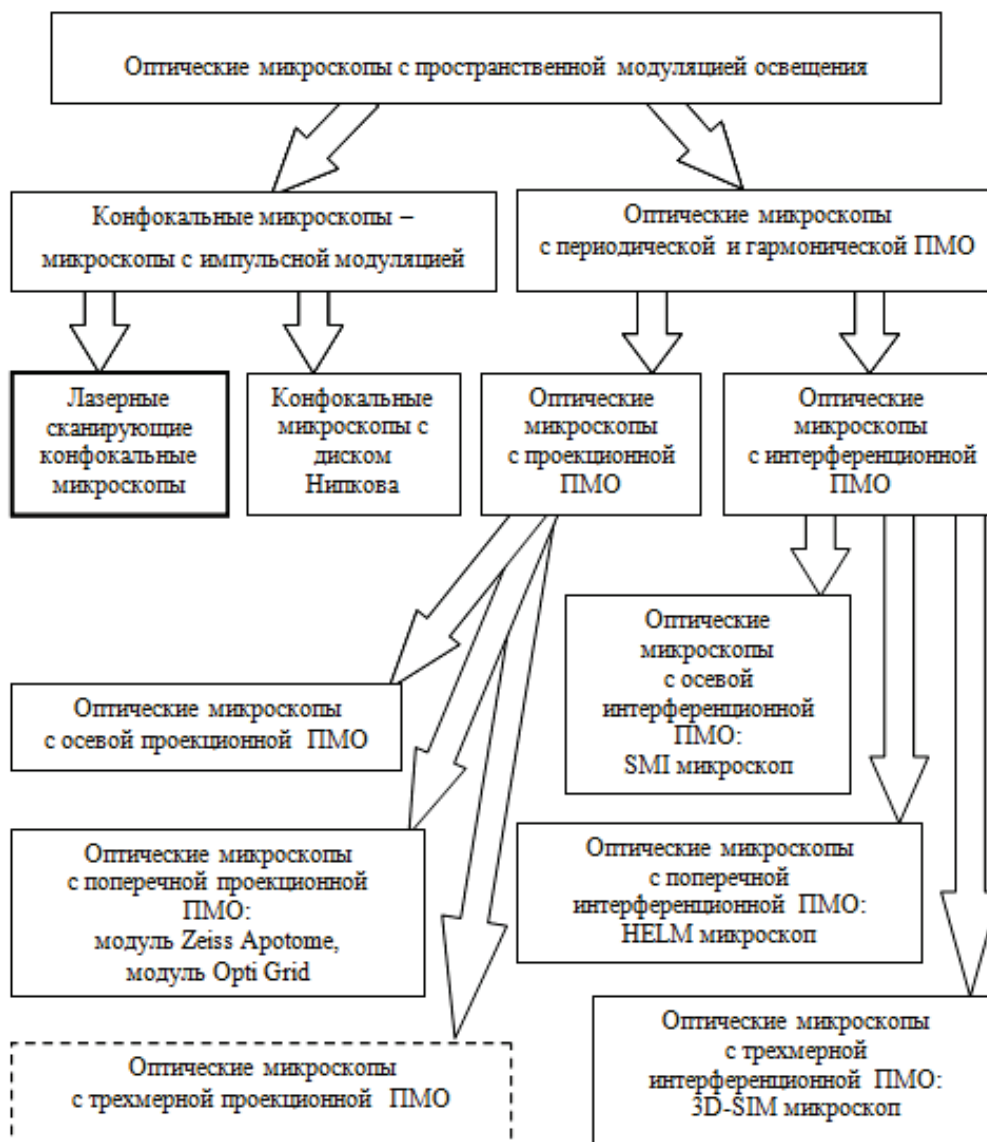


Рис.1. Классификация оптических микроскопов с ПМО

Целью данной статьи является сравнительный анализ оптических микроскопов с ПМО, включая классификацию таких микроскопов, описание конструкции и характеристик экспериментальных и серийно выпускаемых микроскопов и определение перспектив дальнейшего развития оптической микроскопии с ПМО. Авторы надеются, что данная статья будет полезна специалистам, которые эксплуатируют оптические микроскопы, занимаются их проектированием и модернизацией.

КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРОСКОПОВ С ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДУЛЯЦИЕЙ ОСВЕЩЕНИЯ

В общем случае микроскопы с ПМО можно разделить на две группы. Первая группа объединяет конфокальные микроскопы, которые можно рассматривать как микроскопы с импульсной модуляцией освещения. В эту группу следует включить лазерные сканирующие конфокальные микроскопы, которые осуществляют сканирование одним световым пятном в трехмерном объеме образца [6]. Также в эту группу следует включить классические конфокальные микроскопы с вращающимся диском Нипкова, которые сканируют многочисленными световыми пятнами в плоскости предмета [5].

Вторая группа содержит все возможные комбинации микроскопов с периодической или гармонической ПМО [7]. На практике ПМО может быть создана двумя способами – при помощи

интерференции и при помощи проекции в пространство предмета изображения транспаранта. При интерференционной ПМО модуляция осуществляется путем создания и перемещения интерференционной картины, которая создается двумя или большим количеством лазерных пучков и освещает объем образца. Проекционная ПМО означает, что в пространстве предмета формируется уменьшенное изображение транспаранта с периодической структурой, которое и освещает поверхность образца. Очевидно, что возможны различные ориентации ПМО:

- 1) поперечная одномерная или двумерная ПМО, которая создается в плоскости перпендикулярной оптической оси;
- 2) осевая ПМО, которая создается в плоскости содержащей оптическую ось;
- 3) трехмерная ПМО, которая формируется в объеме образца.

Классификационная схема микроскопов с ПМО, представленная на рис. 1, учитывает все возможные комбинации способа получения и ориентации ПМО.

МИКРОСКОПЫ С ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДУЛЯЦИЕЙ ОСВЕЩЕНИЯ

Один из первых микроскопов с двумерной поперечной интерференционной ПМО разработан в Технической школе г. Женева, Швейцария [9]. В этом микроскопе ПМО в виде интерференционной картины формируется двумя перпендикулярными группами стоячих волн от лазерного источника излучения. На рис. 2 показан только один из двух каналов для формирования стоячих волн в микроскопе HELM. Поэтому такой микроскоп получил название HELM микроскоп, что расшифровывается как Harmonic Excitation Light Microscope – световой микроскоп с гармоническим освещением (рис.2) [9]. На этом флуоресцентном микроскопе экспериментально подтверждено, что применение ПМО позволяет повысить поперечную пространственную разрешающую способность (ПРС) приблизительно в два раза по сравнению с ПРС аналогичным микроскопом без ПМО. [9] Это обусловлено тем, что пространственная частота ПМО была выбрана приблизительно равной полосе пропускания оптической системы, что обеспечивает ПРС порядка $0.08 - 0.10$ мкм. К недостаткам микроскопов, подобных микроскопу HELM, следует отнести сложность приспособления для создания двух перпендикулярно ориентированных подвижных систем стоячих волн и возможность работы только с прозрачными образцами.

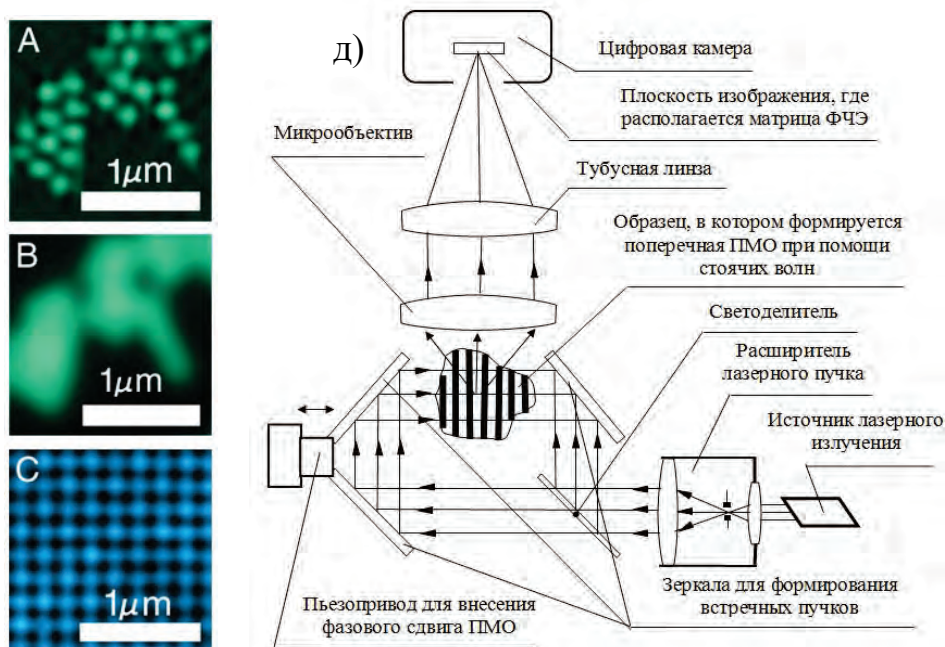


Рис. 2. Микроскоп HELM с двумерной поперечной интерференционной ПМО: а) изображение флуоресцентных сфер диаметром 200 нм, полученное с помощью HELM; в) изображение того же образца полученное с помощью обычного флуоресцентного микроскопа; с) интерференционная картина, формирующая ПМО; д) функциональная схема микроскопа HELM

Наиболее распространенным является 3D-SIM (3 Dimensional - Structural Illumination Microscope) микроскоп с трехмерной интерференционной ПМО, которая создается в объеме прозрачного образца [10]. В

этом микроскопе двумерная ПМО создается в плоскости, в которой находится оптическая ось, тремя параллельными пучками когерентного излучения, которые разделены при помощи фазовой дифракционной решетки (рис. 3, а). Параллельный пучок лазерного излучения разделяется на три части при помощи дифракционной решетки. Специальный объектив фокусирует эти пучки в задней фокальной плоскости конденсора. Конденсор формирует три параллельных пучка, которые пересекаются в объеме прозрачного образца и создают интерференционную картину (рис. 3, б). Эта картина используется для создания амплитудной модуляции в объеме образца. При наблюдении флуоресценции в объеме прозрачного образца дифракционная решетка, и соответственно, плоскость ПМО поворачивается вокруг оптической оси два раза на угол 120 градусов и тем самым модуляция осуществляется в трехмерном пространстве [10, 11].

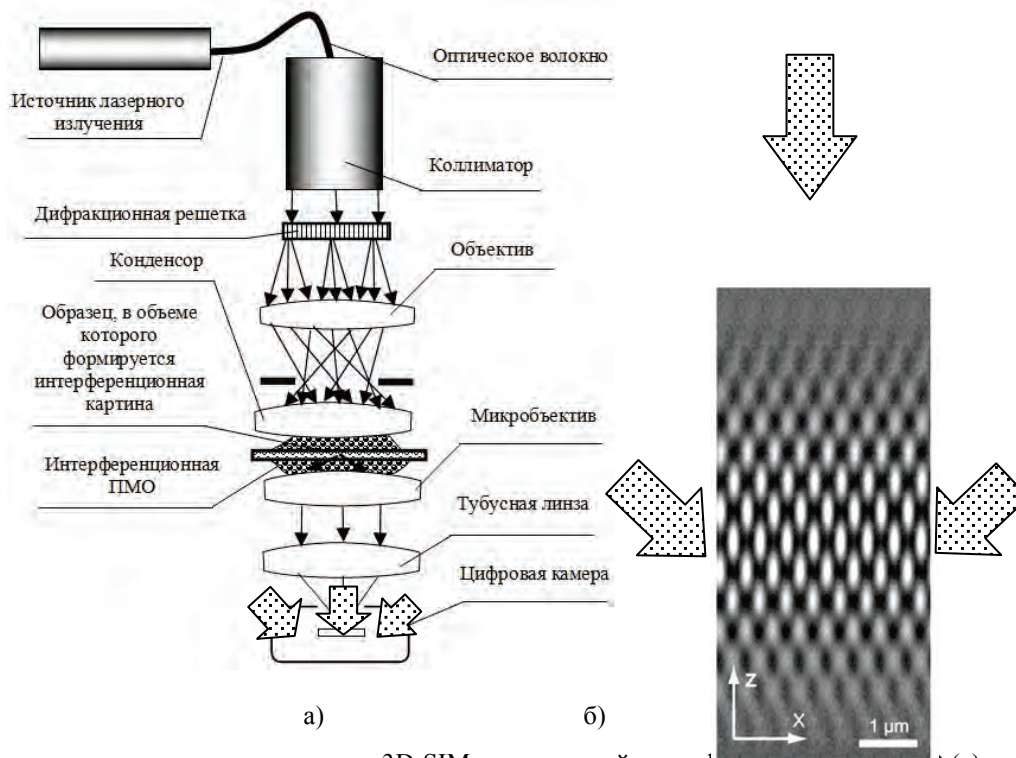


Рис. 3. Функциональная схема микроскопа 3D-SIM с трехмерной интерференционной ПМО (а) и интерференционная картина, сформированная тремя пучками лазерного излучения в этом микроскопе (б)

Очевидно, что такой микроскоп не может быть использован для наблюдения непрозрачных образцов: пленки и неровности на поверхности образца будут существенно искажать интерференционную картину. Во всех вариантах приспособление для создания интерференционной ПМО устанавливается на только инвертированном микроскопе вместо штатного осветителя.

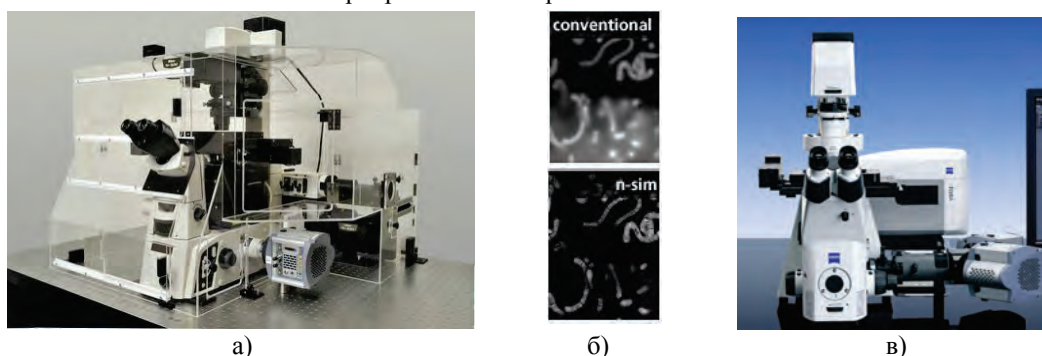


Рис. 4. Оптические микроскопы с интерференционной ПМО 3D-SIM и их цифровые изображения: а) общий вид модуля микроскопа с ПМО Nikon N-SIM; б) цифровые изображения с микроскопа ПМО Nikon N-SIM, полученные без ПМО (слева) и с ПМО (справа); в) общий вид модуля микроскопа с ПМО Zeiss Elyra S.1

Такие микроскопы выпускают компании Zeiss (Германия), Nikon (Япония) и Applied Precision (США), при этом компания Applied Precision выпускает свою продукцию на основе микроскопов

японской компании Olympus (рис. 4, табл. 1) [13 - 16]. Из флуоресцентных микроскопов эти модели обладают наивысшей ПРС при формировании трехмерных изображений. Сверхвысокая ПРС достигается таким образом: освещенность в объеме образца гармонически модулируется по амплитуде [10, 11]. При амплитудной модуляции высокочастотные пространственные гармоники, которые располагались за пределами полосы пропускания оптической системы, смещаются в пределы этой полосы [10]. Известные методы цифровой демодуляции позволяют выделить эти высокочастотные пространственные гармоники в цифровых изображениях и переставить их на исходное место за пределами полосы пропускания амплитуды [9, 10, 12]. В результате этого полоса пропускания тракта микроскопа расширяется, высокочастотные гармоники, которые несут информацию об объектах малого размера, регистрируются и ПРС микроскопа повышается. Следует отметить, что обработка трехмерных цифровых изображений, полученных с этих микроскопов, требует мощных вычислительных машин и дорогостоящего программного обеспечения.

В этом разделе также следует отметить SMI (Spatial Modulation Illumination) микроскоп с одномерной осевой интерференционной ПМО [17, 18]. В этом микроскопе ПМО используется не для повышения ПРС, а для точного измерения координат и диаметра флуоресцентных частиц диаметром 10 – 100 нм в трехмерном объеме живых клеток (рис. 5) [17].

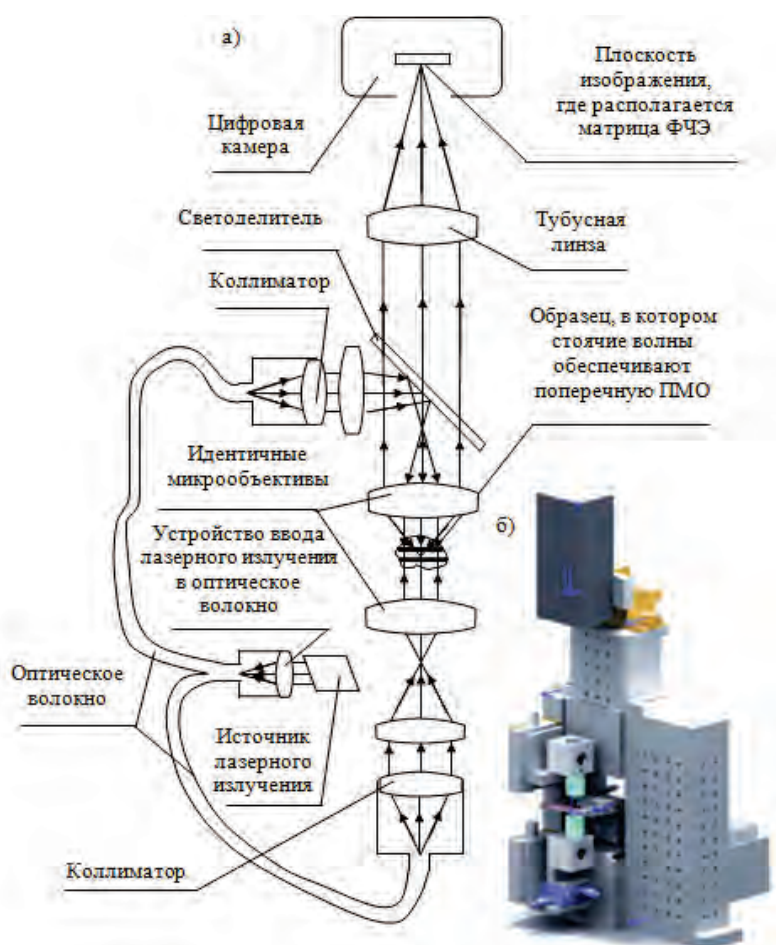


Рис. 5. Функциональная схема микроскопа (а) и конструкция (б) SMI микроскопа с осевой интерференционной ПМО

МИКРОСКОПЫ С ПРОЕКЦИОННОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДУЛЯЦИЕЙ ОСВЕЩЕНИЯ

Наиболее простой в реализации является схема поперечной проекционной ПМО, при которой изображение прозрачного ПМО создается на поверхности образца (рис. 6) [7, 8, 19]. Перемещение прозрачного ПМО будет приводить к смещению ПМО на поверхности образца, что необходимо для осуществления в дальнейшей цифровой демодуляции. Приспособление для поперечной проекционной ПМО в виде небольшого модуля с прозрачным ПМО и его приводом может быть установлено на оптическом микроскопе с цифровой камерой, при этом модуль ПМО и цифровая камера должны быть

подключены к компьютеру. Работа такого приспособления заключается в следующем: под управлением компьютера с цифровой камеры считываются 3 цифровых изображения поверхности образца при различных фазовых сдвигах ПМО за счет перемещения транспаранта. После этого программное обеспечение выполняет цифровую обработку полученных кадров и формирует одно результирующее цифровое изображение повышенного качества. В результирующем изображении контраст объектов повышается, фоновые засветки существенно снижаются, а само изображение приближается к виду изображения, формируемого конфокальным микроскопом. Важнейшим преимуществом такого метода формирования изображения является возможность построения трехмерной формы объекта, которая рассчитывается по данным о распределении амплитуды ПМО по полю зрения микроскопа. Поэтому такие приспособления широко применяются в медико-биологических исследованиях, в том числе для построения трехмерных изображений объектов в живых клетках. Однако следует подчеркнуть, что из-за малой пространственной частоты одномерной ПМО такие приспособления не способны значительно повысить поперечную ПРС.

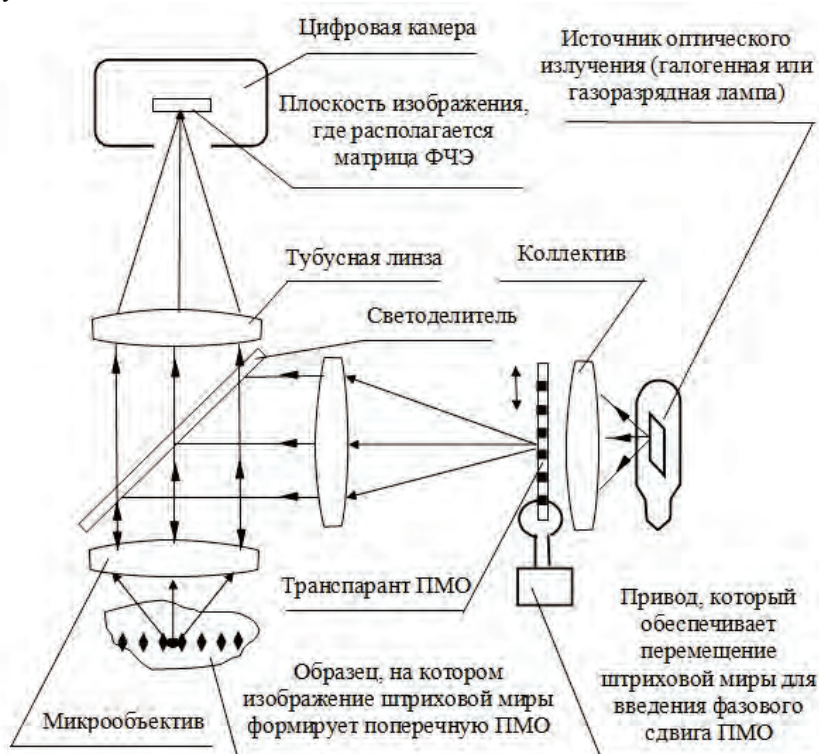


Рис. 6. Функциональная схема микроскопа с поперечной проекционной ПМО

В настоящее время такие модули для формирования одномерной ПМО при наблюдении флуоресценции носят названия Zeiss Apotome и OptiGrid и выпускаются компаниями Zeiss MicroImaging и Thales Optem Inc. соответственно (рис. 7, а-г) [20, 21]. Модуль OptiGrid с автоматической фокусировкой также используется в микроскопах компании Leica-Microsystems в составе системы Leica Intelligent SIM (Leica Structured Illumination microscopy) (рис. 7, е) [22]. С 2008 года компания Zeiss выпускает оптический микроскоп Zeiss Axio CSM 700 (Zeiss Axio Color Scanning Microscope 700), работающий по принципу Zeiss Apotome и способный формировать цветные изображения трехмерной поверхности микрообъектов как конфокальный микроскоп [23]. Этот микроскоп позиционируется как цветной аналог конфокального микроскопа, способный формировать цветные трехмерные карты образцов [23].

Упоминание микроскопа с осевой ПМО, которое получено методом проекции штриховой миры, приводится в работе [7]. В этом микроскопе осветительная система формирует узкий пучок оптического излучения перпендикулярно оптической оси изображающего канала при помощи цилиндрической линзы. Схема трехмерной проекционной ПМО является теоретически возможной, однако упоминание о такой схеме ПМО в литературе найти не удалось.



Рис. 7. Модули ПМО для оптических микроскопов и микроскопы с проекционной поперечной ПМО:
 а) общий вид модуля ПМО Zeiss APOtome;
 б) формирование ПМО на поверхности образца и результирующее цифровое изображение.
 в) общий вид модуля ПМО OptiGrid;
 г) цифровое изображение без использования модуля ПМО OptiGrid;
 д) цифровое изображение при использовании модуля ПМО OptiGrid;
 е) общий вид модуля ПМО OptiGrid с автофокусировкой в системе Leica Intelligent SIM;
 ж) микроскоп с ПМО Zeiss Axio CSM 700

Среди микроскопов с проекционной ПМО наиболее перспективным являются микроскопы с поперечной одномерной ПМО. По качеству изображения они приближаются к дорогостоящим лазерным конфокальным микроскопам. Но при этом они существенно дешевле и область использования шире из-за возможности наблюдения прозрачных и непрозрачных образцов, включая наблюдение флуоресценции. Это объясняется тем, что на современный микроскоп можно установить компактный и недорогой модуль ПМО и тем самым превратить его в микроскоп с ПМО. Такие модули ПМО выпускаются ведущими компаниями Zeiss и Leica-Microsystems. Очевидно, что для расширения области применения таких микроскопов необходимо существенно упростить конструкцию и, соответственно, стоимость модуля ПМО, а также разработать бесплатное программное обеспечение для цифровой обработки изображений с ПМО и получения качественного результирующего изображения. Следует подчеркнуть, что различные варианты модулей ПМО могут производиться на украинских оптических предприятиях, а соответствующее бесплатное программное обеспечение может быть разработано в украинских университетах на кафедрах оптики.

Таблица 1.

Серийные микроскопы с интерференционной ПМО

Модель микроскопа	OMX	Zeiss ELYRA S.1	Nikon N-SIM
Стоимость	~ \$ 1.43 млн.	~\$750.000	
Производитель	Applied Precision Inc (США)	Carl Zeiss MicroImaging (Германия)	Nikon (Япония)
Начало производства	Январь 2009, модернизация май 2010	Октябрь 2009	2010
Типы микроскопов	Инвертированный микроскоп DeltaVision OMX	Стандартный микроскоп с технологией SR-SIM	Инвертированный микроскоп ECLIPSE Ti-E
Программное обеспечение	SoftWoRx 4.0	ZEN	NIS-Elements Ar
Длины волн лазеров	405 нм, 488 нм, 514 нм, 592.5 нм, 642 нм	на выбор 4 длины волны	488 нм, 561 нм
Тип ПМО	3D-SIM		3D-SIM, 2D-SIM
Разрешение по плоскости (XY)	90-120 нм (в зависимости от длины волны излучения)		
Разрешение по оси (Z)	~200-250 нм (в зависимости от длины волны излучения)		

ВЫВОДЫ

В работе предложена классификация микроскопов с ПМО, которая объединяет конфокальные микроскопы, как микроскопы с импульсной ПМО, и микроскопы с периодической и гармонической ПМО.

В работе показано, что среди микроскопов с интерференционной ПМО наиболее перспективным является микроскоп 3D-SIM, модели которого выпускают компании Zeiss и Nikon с 2009 – 2010 годов. Главным достоинством этого микроскопа является возможность получения трехмерных изображений образцов с два раза большей ПРС. Однако высокая стоимость препятствует широкому внедрению таких микроскопов. Также следует отметить, что микроскоп 3D-SIM пригоден только для наблюдения флуоресценции прозрачных образцов в проходящем свете.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микроскопы / Скворцов Г. Е., Панов В. А., Поляков Н. И., Федин Л. А.; под ред. Н. И. Полякова. – Ленинград: Машиностроение, 1967. – 512 с.
2. Kapitsa H. G. Microscopy from the very beginning. 2nd revised edition / H. G. Kapitsa. – Carl Zeiss: Jena, 1997. – 48 p.
3. Schonenborn J. The illumination optics in the new Leica DM R HCS microscope system / J. Schonenborn // Leica – Microsystems Scientific and Technical Information. – 1988. – Edition CDR 1. – № 8. – P. 37 – 46.
4. Borovytsky V. N. Comparison analysis of illumination systems for digital light microscope according to

- uniformity of irradiance distribution // Proceedings of SPIE. – 2005. – Vol. 5942. – P. 312 – 320.
5. HSEB CSM-UV. Confocal Scan Module for AxioTron 2 inspection microscope : product description. – Dresden: HSEB, 2007. – 6 p.
 6. Wilhelm S. Confocal laser scanning microscopy. Optical Image Formation. Electronic Signal Processing / S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz. – Gottingen: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 2006. – 37 p.
 7. Garini Y. From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy / Y. Garini, B. J. Vermolen, I. T. Yong // Current Opinion I Biotechnology. – 2005. – № 6. – P. 3 – 12.
 8. Боровицкий В.Н. Классификация современных оптических микроскопов / В. Н. Боровицкий // Вимірювальна та обчислювальна техніка в технологічних процесах. – 2006. – № 2. – С. 27 – 32.
 9. Frohn J. T., Super-Resolution Fluorescence Microscopy by Structured Light Illumination : dissertation Doctor of technical sciences / Jan Tillman Frohn. – Zurich, 2000. – 143 p.
 10. Gustafsson M. G. L., Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination./ M. G. L., Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, R. C. J. Wang and etc. // Biophysical Journal. – Vol. 94. – June. – 2008. – p. 4957 – 4970.
 11. Haase S., OMX – A Novel High Speed and High Resolution Microscope and its Application to Nuclear Chromosomal Structure Analysis: dissertation ... Doctor of mathematic - nature science/ Sebastian Haase – Berlin, 2005. – 144 p.
 12. Borovytsky V. N. Two dimensional digital demodulation for optical microscopes with spatial modulation of illumination / V. N. Borovytsky // Semiconductor physics, quantum electronics and optoelectronics. – 2010. – Т. 13. – № 1. – С. 98 – 102.
 13. Applied Precision Delta Vision OMX. 3D-SIM Super-Resolution Imaging. Product description. – Issaquah: Applied Precision, Inc., 2009. – 8 p.
 14. ELYRA Enter the World of Superresolution. Product description. – Jena: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 2009. – 8 p.
 15. Optical Sectioning Microscopy. Product description. – Jena: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 2010. – 36 p.
 16. Super Resolution Microscope N-SIM. Product description. – Tokyo: Nikon Co, 2010. – 5 p.
 17. Albrecht B. Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in nanometer range/ B. Albrecht, A. Failla, A. Schweitzer, C. Cremer // Applied Optics.– 2002.– Vol. 41. – № 1. – P. 80 – 87.
 18. 3D Single Molecule Imaging/Localization microscopy Vertigo-SMI: Spatially Modulated Illumination : Product description. – Karlsruhe: Nechnology-Lizenz-Buro (NLB), 2008. - 2 p.
 19. Karadaglic D. Image formation in structured illumination wide- filed microscopy / D. Karadaglic, T. Wilson // Journal of Microscopy. – 2008. – Vol. 39. – № 7. – P. 808 – 818.
 20. Zeiss Apotome. Microscopy from Carl Zeiss: product description. – Gottingen: Carl Zeiss Light Microscopy, 2005. – 20 p.
 21. OPTIGRID structured - illumination microscopy: product description. – Fairport: Qioptiq Imaging Solution, 2006. – 8 p.
 22. Leica Microsystems' Intelligent structural Illumination Microscopy: The Integrated System Solution with OptiGrid for Upright and Inverted Research Microscopes – Wetzlar: Leica-Microsystems GmbH, 2010. – 6 p.
 23. Axio CSM 700 True Color Confocal Microscopy with High Resolution: product description. – Jena: Carl Zeiss Microimaging GmbH, 2008. – 8 p.

Надійшла до редакції 21.11.2011р.

БОРОВИЦКИЙ ВЛАДИМИР НИКОЛАЕВИЧ – дипломированный инженер, д.т.н., доцент, доцент кафедры оптических и оптико-электронных приборов, приборостроительный факультет, Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Киев, Украина.

ЧЁРНАЯ ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА – магистр кафедры оптических и оптико-электронных приборов, приборостроительный факультет, Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Киев, Украина.