

Ю.В. Баланюк, А.Д. Педан, В.І. Шклярський
Національний університет “Львівська політехніка”

СКАНУВАЛЬНИЙ ТЕЛЕВІЗІЙНИЙ ОПТИЧНИЙ УЛЬТРАФІОЛЕТОВИЙ МІКРОСКОП ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ МІКРООБ’ЄКТІВ

© Баланюк Ю.В., Педан А.Д., Шклярський В.І., 2009

Проаналізовано вимоги до сканувального телевізійного оптичного мікроскопа, придатного до використання для дослідження біологічних мікрооб’єктів в ультрафіолетовому діапазоні освітлення. Визначено вимоги до сканувальної електронно-променевої трубки, оптичного каналу та перетворювача світло-сигнал. Показана можливість роботи такого мікроскопа в реальному масштабі часу.

In article requirements to a scanning television optical microscope which can be used for research of biological microobjects in a ultra-violet range of a luminescence are analyzed. Requirements to a scanning electron beam tube, the optical channel and the converter a light – signal are determined. The opportunity of work of such microscope in real time is shown.

Вступ

Ультрафіолетова мікроскопія – розділ мікроскопії з методами спостереження мікрооб’єктів (МО), що ґрунтується на використанні побудованих на застосуванні ультрафіолетових (УФ) променів. В ультрафіолетовій мікроскопії невидиме око зображення досліджуваного МО, отримане в УФ-променях, перетворюється у видиме зображення різними методами. Перевагою УФ-мікроскопії є можливість підвищення роздільної здатності порівняно з класичною мікроскопією за рахунок меншої довжини хвилі УФ-випромінювання порівняно з видимим світлом та підвищення контрасту зображення досліджуваного МО внаслідок більшого коефіцієнта поглинання УФ-променів багатьма речовинами. УФ-мікроскопія використовується у біології, медицині, мінералогії, металографії, хімії тощо.

Особливо широко УФ-мікроскопія використовується в біології та медицині. Причиною цього є її ширші можливості для вирішення важливих проблем, пов’язаних з процесами, які проходять у живій клітині [1]. Відомо, що основні речовини клітин мають максимум поглинання в УФ-ділянці спектра: так, наприклад, нуклеїнові кислоти мають максимум поглинання за довжини хвилі $\lambda = 260$ нм, тоді як у видимій ділянці спектра вони повністю прозорі. Завдяки цьому за допомогою абсорбційної фотометрії в УФ-ділянці спектра є можливість отримати кількісну інформацію про незафарбовані препарати. Застосовуючи мікроспектрофотометричний метод сканування живої клітинки, можна вивчити розподіл та концентрацію нуклеїнової кислоти, яка має велике значення в життєдіяльності клітини [2]. Необхідно також відмітити, що характерний спектр поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектра має, наприклад, багато речовин, які знаходяться у рослинних та тваринних клітинах (пуринові та піримідові основи, більшість вітамінів, ароматичні амінокислоти, деякі ліпіди, тироксин тощо). Це обумовлює широке використання УФ-випромінювання в мікроскопії як одного з методів цитохімічного аналізу.

Успішному розвитку нових прогресивних методів дослідження в УФ-мікроскопії сприяють такі чинники: можливість визначення коефіцієнта поглинання, який залежить від довжини світла, концентрації речовини і товщини досліджуваного МО. Отже, якщо виміряти оптичну густину та товщину досліджуваного препарату, можна вирахувати концентрацію речовини в досліджуваній клітині.

Оскільки метод спостереження в УФ-променях дає змогу збільшити граничну роздільну здатність мікроскопа, тобто підвищити його граничне розділення, що залежить насамперед від довжини хвилі використовуваного опромінювача, то пропонується в сканувальному телевізійно-

оптичному мікроскопі використати спеціалізовану електронно-променеву трубку (ЕПТ) високої роздільної здатності з УФ-свіченням екрана.

Сканувальний телевізійно-оптичний ультрафіолетовий мікроскоп на базі ЕПТ надвисокої роздільної здатності може бути використаний як новий засіб досліджень наукового та прикладного характеру в біології, а також медицині та інших галузях науки і техніки, де використання ультрафіолетового випромінювання створює практичні переваги. Застосування таких мікроскопів дасть змогу отримати додаткову кількісну та якісну інформацію про характеристики таких мікрооб'єктів. При цьому максимально досягне збільшення сканувального телевізійно-оптичного мікроскопа сумірне з початковим значенням збільшення растрових електронних мікроскопів.

Принцип сканування біологічного мікрооб'єкта ультрафіолетовим зондом з подальшим комп'ютерним обробленням зображень має багато переваг порівняно з оптичною ультрафіолетовою мікроскопією: можливість проведення кількісних вимірювань у межах окремих фрагментів досліджуваних біологічних мікрооб'єктів; гнучкість керування процесом вимірювання; скорочення тривалості проведення дослідження; вища роздільна здатність порівняно з оптичними ультрафіолетовими мікроскопами. Ці переваги дають змогу широко використати новий метод дослідження біологічних мікрооб'єктів в ультрафіолетовому діапазоні опромінювання.

1. Визначення вимог до сканувальної електронно-променевої трубки, придатної для використання в ультрафіолетовій мікроскопії

Використовувана як джерело освітлення ЕПТ в сканувальному телевізійному оптичному ультрафіолетовому мікроскопі повинна забезпечувати:

- необхідний спектр свічення екрана в УФ-діапазоні;
- необхідну яскравість свічення екрана сканувальної ЕПТ, щоб отримати якісне зображення досліджуваного МО у видимому діапазоні спектра на екрані відеоконтрольного пристрою;
- необхідну роздільну здатність, щоб забезпечити можливість масштабування зображення досліджуваного МО на екрані відеоконтрольного пристрою зміною розміру сканувального растра на екрані трубки в широких межах без погіршення якості зображення.

Уся область УФ-випромінювання для досліджень в біології поділяється на ближню (400...200 нм) і дальню, або вакуумну (200...10 нм); остання назва обумовлена тим, що дослідження проводять за допомогою вакуумних спектральних приладів. Оптичні властивості речовин в УФ-області спектра значно відрізняються від їх оптичних властивостей у видимій області. Характерною ознакою її є зменшення прозорості (збільшення коефіцієнта поглинання) більшості тіл, прозорих у видимій області. Наприклад, звичайне скло – непрозоре за довжини хвилі $\lambda < 320$ нм; в більш короткохвильових УФ-променях непрозорими стають всі відомі речовини, у тому числі і повітря.

Враховуючи необхідність проведення досліджень біологічних МО, спектр випромінювання використовуваної ЕПТ в сканувальному телевізійно-оптичному мікроскопі повинен знаходитися в ближній області (довжина хвилі 400...200 нм). Аналіз виконуваних робіт на оптичних мікроскопах показує, що найчастіше використовується під час біологічних досліджень УФ-випромінювання з довжиною хвилі 400...350 нм. Тому спектр свічення сканувальної ЕПТ повинен відповідати ближній області УФ-випромінювання.

Для визначення необхідної яскравості свічення сканувальної ЕПТ з метою отримання якісного зображення досліджуваного МО у видимому діапазоні спектра на екрані відеоконтрольного пристрою використано методику, наведену у [8]. У цій роботі показано, що якість відтворюваного на екрані зображення значною мірою залежить від помітності шумів, основними джерелами яких у сканувальному мікроскопі є формувач повного відеосигналу, фотоелектронний помножувач та сканувальна ЕПТ.

Своєю чергою, помітність шумів визначається відношенням сигнал-шум на виході формувача відеосигналу [9]. Як відомо, у телевізійних системах відношення сигнал-шум є тим більшим, чим вищою є освітленість об'єкта, за умови, що джерело світла можна вважати таким, яке не шумить. Відомим є метод визначення необхідної освітленості об'єкта для такого випадку [10]. Однак, використовуваним у сканувальному мікроскопі джерелом світла, як згадувалось вище, є ЕПТ. Для

усіх ЕПТ характерним є значний рівень шуму, і отже, до вибору ЕПТ для сканувального мікроскопа треба підходити з урахуванням шумів ЕПТ.

Структурну схему сканувального мікроскопа з точки зору формування відеосигналу показано на рис. 1. До її складу входять: сканувальна ЕПТ, перший оптичний канал ОК1, який проектує світний растр на ДО, другий оптичний канал ОК2, який збирає розсіяне світло ДО під час роботи сканувального мікроскопа на відбиття, або збирає світло, яке пройшло через ДО під час роботи сканувального мікроскопа на просвічування; фотоелектронний помножувач ФЕП, який перетворює світловий сигнал в електричний, та формувач відеосигналу ФС, який підсилює сигнал ФЕП до нормованої величини та замішує в ньому імпульси синхронізації та гасіння.

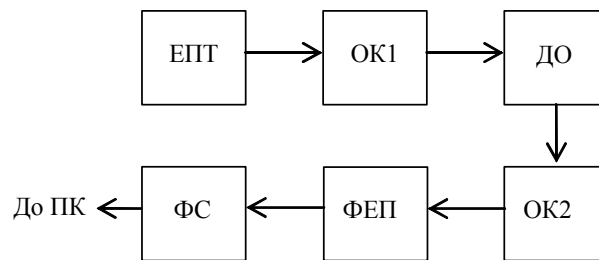


Рис. 1. Структурна схема сканувального мікроскопа з точки зору формування відеосигналу

Якщо на фотокатод ФЕП за допомогою конденсорної лінзи в оптичному каналі потрапляє світловий потік $\Phi_{ДО}$ від елемента досліджуваного об'єкта, то струм, який протікатиме на виході перетворювача, становитиме

$$I_{ФЕП} = \varepsilon \cdot \Phi_{ДО} \cdot P_{ОК2} \cdot \Omega_{ОК2} = \frac{\varepsilon \cdot \Phi_{ДО} \cdot P_{ОК2} \cdot S_{ОК2}}{L_{ОК2}^2}, \quad (1)$$

де ε – анодна чутливість ФЕП; $P_{ОК2}$ – коефіцієнт пропускання конденсорної лінзи в оптичному каналі; $\Omega_{ОК2}$ – тілесний кут, в межах якого світловий потік від об'єкта потрапляє на конденсорну лінзу; $L_{ОК2}$ – віддаль від досліджуваного об'єкта до конденсорної лінзи.

Відношення сигнал-шум на виході фотоелектронного помножувача і відповідно на вході формувача відеосигналу $\Psi_{ВХФС}$ з урахуванням лише власних шумів формувача сигналу можна визначити як

$$\Psi_{ВХФС} = \frac{\varepsilon \cdot \Phi_{ДО} \cdot P_{ОК2} \cdot S_{ОК2} \cdot \sqrt{R_H}}{L_{ОК2}^2 \cdot \sqrt{4k \cdot T \cdot \Delta F}}, \quad (2)$$

де R_H – опір навантаження фотоелектронного помножувача; k – стала Больцмана; T – температура, К; ΔF – смуга пропускання відеосигналу; $S_{ОК2}$ – площа вхідної зіниці конденсорної лінзи.

З виразу (2) можна знайти світловий потік від досліджуваного МО $\Phi_{ДО}$, який необхідний для того, щоб виконувалось задане відношення сигнал/шум на виході ФЕП, яке в подальшому забезпечуватиме задану якість зображення на екрані відеоконтрольного пристрою:

$$\Phi_{ДО} = \frac{\Psi_{ВХФС} \cdot L_{ОК2}^2 \cdot \sqrt{4k \cdot T \cdot \Delta F}}{\varepsilon \cdot P_{ОК2} \cdot S_{ОК2} \cdot \sqrt{R_H}}. \quad (3)$$

З іншого боку, світловий потік від досліджуваного МО $\Phi_{ДО}$ залежить від яскравості свічення елемента світного растра ЕПТ $B_{ЕПТ}$, площі цього елемента $S_{ЕПТ}$, коефіцієнта оптичного пропускання мікроскопного об'єктива $P_{ОК1}$, розташованого в першому оптичному каналі ОК1, тілесного кута $\Omega_{ОК1}$, в якому світло від скануючої ЕПТ потрапляє через мікроскопний об'єктив на досліджуваний МО:

$$\Phi_{ДО} = B_{ЕПТ} \cdot S_{ЕПТ} \cdot P_{ОК1} \cdot \Omega_{ОК1} = \frac{B_{ЕПТ} \cdot S_{ЕПТ} \cdot P_{ОК1} \cdot S_{ОК1}}{L_{ОК1}^2}, \quad (4)$$

де $S_{ОК1}$ – площа вхідної зіниці мікроскопного об'єктива; $L_{ОК1}$ – віддаль від площини екрана ЕПТ до мікроскопного об'єктива.

Прирівнюючи праві частини виразів (3) і (4), можна знайти мінімальну величину яскравості свічення елемента сканувальної ЕПТ $B_{ЕПТ}$, необхідну для забезпечення заданого відношення сигнал-шум на вході формувача сигналу:

$$B_{ЕПТ} = \frac{\Psi_{ВХФС} \cdot L^2_{ОК1} \cdot L^2_{ОК2}}{\varepsilon \cdot P_{ОК1} \cdot P_{ОК2} \cdot S_{ОК1} \cdot S_{ОК2} \cdot S_{ЕПТ}} \sqrt{\frac{4k \cdot T \cdot \Delta F}{R_H}}. \quad (5)$$

Цей вираз дає змогу визначити мінімально необхідну величину яскравості свічення ЕПТ, яка забезпечить вибране відношення сигнал/шум на виході формувача електронного сигналу зображення.

Очевидно, що визначене у такий спосіб значення яскравості свічення елемента світного растра не дає остаточного розв'язку поставленої задачі, оскільки ще не враховані шуми ЕПТ, ФЕП та резистора навантаження ФЕП. Врахувати вплив ЕПТ на якість формованого зображення досліджуваного об'єкта можна, скориставшись [8]:

$$\bar{U}_{ШЕПТ}^2 = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{B_0}{2\pi \cdot v \cdot \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{r^2 \cdot \omega^2}{v}\right) d\omega, \quad (6)$$

де $\bar{U}_{ШЕПТ}$ – середньоквадратичне значення напруги шуму на виході ФЕП, викликане шумом ЕПТ за умови, що шуми ФЕП відсутні; B_0 – коефіцієнт, який визначається відповідно до такого виразу:

$$B_0 = J_0^2 \cdot A \cdot R_H^2 \cdot \delta^3 \cdot P_{ОК1}^2, \quad (7)$$

де J_0 – середня густина емісійного струму катода; A – коефіцієнт, який враховує зміну світловіддачі люмінофора по полю екрана ЕПТ (за малих кутів відхилення, близького до 1); δ – коефіцієнт вторинної емісії ФЕП; r – радіус кросовера ЕПТ; ω – просторова частота; vv – швидкість сканування екрана променем ЕПТ.

Вплив ФЕП на якість формованого зображення досліджуваного об'єкта можна визначити, скориставшись виразом для середньоквадратичного значення шумового струму на виході ФЕП:

$$\bar{I}_{ШФЕП}^2 = 2e \cdot I_0 \cdot \Delta F \cdot \frac{\delta^{2p+1}}{\delta-1} - 2e \cdot \frac{I_{ФЕП}}{\delta^2} \cdot \Delta F \cdot \frac{\delta^{2p+1}}{\delta-1}, \quad (8)$$

де e – заряд електрона; I_0 – струм першого динода ФЕП; $I_{ФЕП}$ – струм на виході ФЕП за умови, що шуми останнього відсутні; ΔF – смуга частот; p – кількість динодів ФЕП.

Вплив опору резистора навантаження R_H на якість формованого зображення врахуємо за допомогою відомого виразу

$$\bar{U}_{ШR_H}^2 = 4k \cdot T \cdot R_H \cdot \Delta F, \quad (9)$$

де k – стала Больцмана; T – температура.

Враховуючи (6), (7) і (8), середньоквадратичне значення струму на виході ФЕП визначимо як

$$\bar{I}_{ФЕП\Sigma}^2 = \bar{I}_{ФЕП}^2 + (\bar{U}_{ШR_H}^2 + \bar{U}_{ШЕПТ}^2) / R_H^2, \quad (10)$$

а відношення сигнал/шум на виході ФЕП:

$$\Psi_{ФЕП} = I_{ФЕП} / \sqrt{\bar{I}_{ФЕП\Sigma}^2} = \frac{I_{ФЕП} \cdot R_H \cdot \sqrt{\delta-1}}{\sqrt{2e \cdot I_{ФЕП} \cdot \Delta F \cdot R_H^2 \cdot \delta^{p+1} + (4k \cdot T \cdot R_H \cdot \Delta F + \bar{U}_{ШЕПТ}^2) \cdot (\delta-1)}}. \quad (11)$$

Для забезпечення заданої якості відтворення зображення досліджуваного об'єкта повинна виконуватися умова: $\Psi_{ФЕП} > \Psi_{ВХФС}$.

Кількісна оцінка доданків під коренем у знаменнику виразу (11) показує, що найбільший вплив на значення відношення сигнал-шум $\Psi_{ФЕП}$ має середньоквадратичне значення шуму струму ФЕП за відповідного значення коефіцієнта вторинної емісії δ . Графік залежності $\Psi_{ФЕП} = f(\delta)$ з опором навантаження $R_H = 100$ кОм і смугою пропускання $\Delta F = 6,5$ МГц показаний на рис. 2 [8]. За коефіцієнта шуму формувача сигналу $\Psi_{ФС} = 1,2$ і $\Psi_{ВХФС} = 30$ (добра якість зображення) $\Psi_{ВХФС} = 36$. Для забезпечення $\Psi_{ФЕП} > \Psi_{R_H}$ відповідно до рис. 2 [8] значення коефіцієнта вторинної емісії ФЕП δ не повинно перевищувати 1,8. Цей розрахунок показує, що для забезпечення необхідної якості

відтворення зображення досліджуваного об'єкта необхідно використовувати фотоелектронні помножувачі за знижених напруг живлення.

Якщо, наприклад, орієнтуватись на використання фотоелектронного помножувача типу R3896 виробництва японської фірми HAMAMATSU [11], у якого анодна чутливість $\varepsilon = 500$ А/лм, то відповідно до (5) мінімально необхідна яскравість свічення сканувальної ЕПТ за $\Psi = 30$; $\Psi_{ВХФС} = 1,2$; $L_{OK1} = 0,5$ м; $L_{OK2} = 0,01$ м; $P_{OK1} = 0,8$; $P_{OK2} = 0,8$; $S_{OK1} = 2 \times 10^{-5}$ м² (діаметр вхідної зіниці мікроскопного об'єктива 5 мм); $S_{OK2} = 8 \times 10^{-5}$ м² (діаметр вхідної зіниці конденсора 10 мм); $S_{ЕПТ} = 1 \times 10^{-10}$ м² (площа одного елемента світного растра за розміру світного растра на екрані сканувальної ЕПТ 20×20 мм² і роздільної здатності 2000×2000 елементів); $\Delta F = 6,5$ МГц; $k = 1,37 \cdot 10^{-23}$ Дж/град; $T = 290$ К; $R_{НФЕП} = 100$ кОм становитиме 18000 кд/м². Спеціальні сканувальні проєкційні ЕПТ, як правило, забезпечують таку яскравість. Однак ЕПТ, які можна використати в сканувальному мікроскопі, наприклад У4ТП1И, мають значно меншу яскравість свічення екрана. Тому для забезпечення необхідної якості, формованого на екрані відеоконтрольного пристрою зображення МО, необхідно йти шляхом зменшення швидкості сканування, збільшення опору навантаження ФЕП. За рахунок переходу роботи сканувального мікроскопа в малокадровий режим (наприклад, період повтору кадрової розгортки 20 с) необхідна смуга пропускання тракту формування відеосигналу зменшиться до 6,5 кГц, а резистор навантаження ФЕП збільшиться до 1 МОм. Це приведе до зменшення необхідної яскравості свічення екрана ЕПТ до $180/683 = 0,259$ Вт/срм². Отже, за необхідності забезпечення вищої якості відтворення зображення досліджуваного мікрооб'єкта необхідно йти шляхом вибору ФЕП з більшою катодною чутливістю, збільшення опору резистора навантаження ФЕП у межах, дозволених з точки зору смуги пропускання ФС, та шляхом зменшення швидкості розгортки променя сканувальної ЕПТ.

Під час визначення необхідної роздільної здатності сканувальної ЕПТ необхідно врахувати:

- роздільну здатність відтворюваного зображення досліджуваного об'єкта на екрані відеоконтрольного пристрою;
- необхідний діапазон зміни масштабу зображення шляхом зміни розмірів сканувального растра;
- мінімально можливий діаметр сканувальної плями на екрані трубки за вибраного коефіцієнта модуляції яскравості свічення;
- максимально можливі розміри сканувального растра на екрані сканувальної трубки;
- роздільну здатність елементів, що входять до складу оптичного каналу.

Мінімально можливі розміри сканувального растра на МО визначаються розмірами растра на екрані сканувальної ЕПТ, а також використовуваним об'єктивом та конструктивними розмірами оптичного каналу ОК, який формує сканувальний растр на МО. Під час вибору ЕПТ потрібно передбачити, щоб її роздільна здатність не погіршувала необхідної роздільної здатності загалом, тобто повинна виконуватись умова

$$D_{ПСК} \leq D_{ПК} / q \cdot q_1, \quad (12)$$

де $D_{ПСК}$ – діаметр світної плями сканувальної трубки; $D_{ПК}$ – діаметр світної плями кінескопа, використовуваного ВКП; q – лінійне збільшення телевізійної системи мікроскопа, яке дорівнює відношенню ширини растра зображення на відеоконтрольному пристрої $b_{ПК}$ до ширини скануючого растра на екрані сканувальної ЕПТ $b_{ПСК}$; q_1 – коефіцієнт телевізійного збільшення внаслідок зменшення растра на екрані сканувальної трубки (зменшення розмірів растра сканувальної трубки дає змогу пропорційно збільшувати загальний коефіцієнт збільшення мікроскопа):

$$q_1 = b_{ПСК_{МАХ}} / b_{ПСК_{МИН}}, \quad (13)$$

де $b_{ПСК_{МАХ}}$ – максимальний розмір ширини растра на екрані сканувальної трубки; $b_{ПСК_{МИН}}$ – мінімальний розмір ширини растра на екрані сканувальної трубки.

Якщо орієнтуватися на використання у відеоконтрольному пристрої кінескопа з діагоналлю 21" (54 см), а у сканувальній частині – проєкційної трубки, яка має робочий розмір екрана $d = 30$ мм, діаметр світної сканувальної плями $D_{ПСК} = 10$ мкм та формат растра $k = 4/3$, який

вписується в екран сканувальної трубки, то розміри растра на екрані сканувальної трубки за формату, який вписується в задане робоче поле, будуть:

– для ширини растра

$$b_{CK_{MAX}} = \frac{d \cdot k}{\sqrt{1+k^2}} = \frac{30 \cdot 1,33}{\sqrt{1+1,33^2}} = 24 \text{ мм}; \quad (14)$$

– для висоти растра

$$h_{CK_{MAX}} = b_{CK_{MAX}} / k = 24 / 1,33 = 18 \text{ мм}. \quad (15)$$

Горизонтальний розмір растра відеоконтрольного пристрою під час використання кінескопа з діагоналлю 21' (54 см) становить $b_E = 340$ мм. Мінімальне збільшення телевізійної частини мікроскопа при цьому буде

$$q = b_E / b_{CK_{MAX}} = 340 / 24 = 14. \quad (16)$$

За необхідності з виразу (12) можна знайти діапазон зміни сканувального растра на екрані сканувальної трубки без погіршення якості формованого зображення МО на екрані відеоконтрольного пристрою.

2. Визначення вимог до оптичного каналу сканувального телевізійно-оптичного ультрафіолетового мікроскопа

В арсеналі оптичної мікроскопії є доволі широкий спектр приладів, які, використовуючи той самий принцип дії (створення за допомогою лінз збільшеного зображення МО), відрізняються окремими характеристиками, що дають можливість одержати додаткову інформацію про МО або обійти певні труднощі, накладені умовами дослідження. Для глибшого вивчення процесів у клітинах та кількісних прижиттєвих досліджень застосовуються люмінесцентні мікроскопи [12; 23], ультрафіолетові [13; 25; 26] та інфрачервоні мікроскопи [14], поляризаційні [15], фазоконтрастні [16], інтерференційні [17], мікроскопи темного поля [18], стереоскопічні мікроскопи [19; 24; 27], мікроскопи порівняння [20], телевізійні мікроскопи [22; 24; 25], високотемпературні [21] та багато інших – усі вони відрізняються переважно особливостями оптичного каналу.

Ультрафіолетовий сканувальний оптичний мікроскоп, який завдяки закладеному в нього принципу сканування мікрооб'єкта зондом електромагнітного випромінювання в ультрафіолетовому та видимому діапазонах, дає змогу перевищити класичну дифракційну межу роздільної здатності [28], може з успіхом функціонувати замість багатьох згаданих вище модифікацій. Для цього відповідно повинні бути сформульовані вимоги до оптичного каналу мікроскопа, а саме: забезпечення прямого та інвертованого режиму роботи мікроскопа; робота в режимі світла, яке проходить через досліджуваний МО, та відбитого світла; робота в режимі темного поля та в режимі наведеної люмінесценції.

Відповідно до вибраних режимів роботи структурні схеми оптичного каналу виглядають такими, як показано на рис. 2:

– робота в прямому режимі (рис. 2, а): світло від джерела випромінювання С (монокристалічний екран ЕПТ сканера) через комутуючі та стаціонарні дзеркала Дз опромінює зверху через об'єктив О сфокусованим світловим зондом досліджуваний об'єкт МО на предметному столі. Світло, що пройшло крізь препарат, через конденсор К потрапляє на дзеркало під ним і спрямовується на перетворювач випромінювання – сигнал (ФЕП);

– робота в інвертованому режимі (рис. 2, б): світло при відведеному комутуючому дзеркалі через стаціонарне дзеркало скеровується на предметний столик знизу через об'єктив, розташований замість конденсора. Світло, яке пройшло через препарат, потрапляє на перетворювач випромінювання-сигнал, розташований замість бінокулярної головки;

– робота у відбитому світлі (рис. 2, в): при розташуванні дзеркал у прямому режимі перед епіоб'єктивом ЕО вводиться дзеркало центральної зони світлового пучка, яке освітлює лінзову компоненту об'єктива. Розсіяне препаратом світло збирається дзеркальною компонентою і направляється на перетворювач випромінювання-сигнал, розташований замість бінокулярної головки;

– робота в режимі темного поля (рис. 2, в): в прямому режимі штатний конденсор мікроскопа замінюється на конденсор темного поля КТП (ОИ-13 А-1,5). Пряме світло від зонда затримується цим конденсором, а розсіяне препаратом проходить через конденсор на перетворювач випромінювання-сигнал.

– робота в режимі наведеної люмінесценції (рис. 2, б): в прямому режимі після штатного конденсора розташовуються вузькосмугові інтерференційні фільтри ІФ на довжину хвилі досліджуваної люмінесценції. У разі використання перетворювачів випромінювання-сигнал з вузькими смугами спектральної чутливості, які доцільно використовувати під час дослідження слабких світлових потоків, оптичний канал передбачає їх оперативну заміну залежно від досліджуваної ділянки спектра люмінесценції.

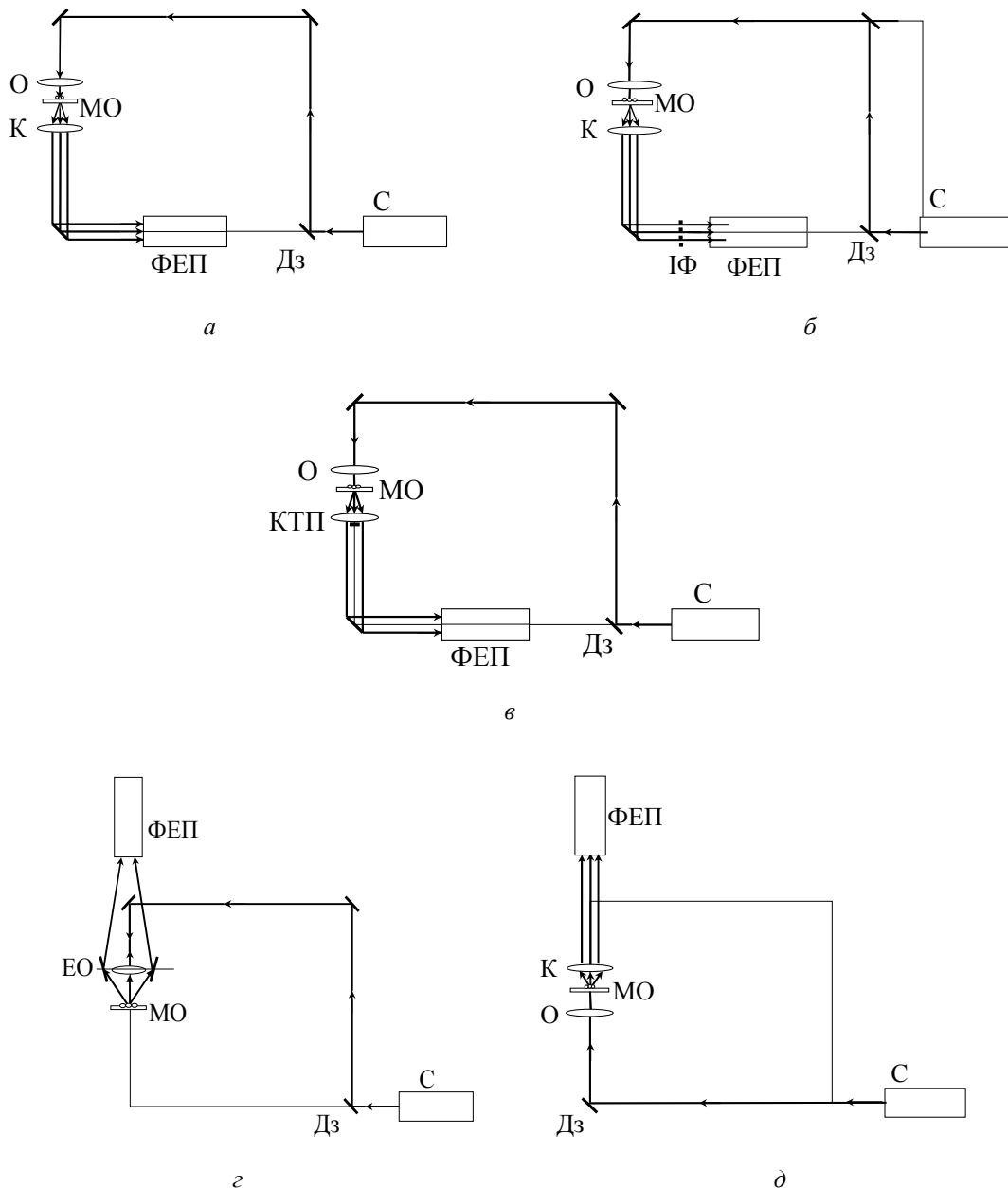


Рис. 2. Варіанти структурної схеми оптичного каналу сканувального оптичного мікроскопа:
 а – за роботи в прямому режимі; б – за роботи в режимі наведеної люмінесценції;
 в – за роботи в режимі темного поля; г – за роботи в режимі відбитого світла;
 д – за роботи в інвертованому режимі

З точки зору забезпечення ефективності використання випромінюваного світлового потоку важливе значення має коректний вибір типу перетворювача випромінювання-сигнал. Як відомо, МО досліджуються опроміненням їх ультрафіолетовими променями в області довжин хвиль 250–400 нм з подальшим перетворенням світла, що проходить, та відбитого світла в електричний сигнал за допомогою перетворювача випромінювання-сигнал. У зв'язку з малими значеннями величин світлових потоків перетворювачі повинні мати високу чутливість. Цей параметр і зумовив вибір типу перетворювачів – фотоелектронні помножувачі ФЕП. Під час використання ультрафіолетового спектра першим критерієм відбору повинна бути спектральна характеристика фотокатода. З конструктивних міркувань бажано мати перетворювач з рівномірною чутливістю в усьому діапазоні освітлювання МО від 250 до 700 нм. Аналіз перетворювачів, поширених на теренах країн СНД, показав, що немає жодного перетворювача, який би перекривав згаданий вище діапазон за достатньої рівномірності чутливості. Тому під час вибору конкретного перетворювача для сканувального мікроскопа необхідно враховувати ті смуги спектра за максимальної чутливості, в яких проводитимуться дослідження МО.

Найближчий до УФ діапазон спектральної чутливості має перетворювач випромінювання-сигнал типу ФЭУ-116 (діапазон спектральної характеристики 200–365 нм за максимальної спектральної чутливості у межах 260–300 нм) [29]. Серед інших перетворювачів необхідно відмітити ФЕП типу ФЭУ-99 (діапазон спектральної характеристики 150–320 нм за максимальної чутливості в межах 220–260 нм), ФЭУ-133 (діапазон спектральної характеристики 145–365 нм за максимальної чутливості у межах 220–260 нм).

Доцільним є вибір фотоперетворювачів за трьома зонами видимого спектра з точки зору можливого синтезу кольорового зображення на моніторі шляхом попереднього спектрального аналізу світла, що проходить крізь МО, або відбитого від нього. Крім того, в люмінесцентних дослідженнях при використанні “маркерів”, які мають різні кольори свічення і різну спорідненість до певних типів білків, доцільно разом з використанням вузькосмугового оптичного фільтра використовувати і відповідний ФЕП для впевненої індикації незначної люмінесценції “маркера”.

Необхідно також відмітити, що в сканувальному оптичному УФ-мікроскопі потрібно передбачити оперативність заміни ФЕП з врахуванням його електричного режиму роботи залежно від поставлених дослідницьких завдань. Така процедура вимагає ускладнення конструкції певних вузлів мікроскопа.

3. Аналіз можливості роботи сканувального телевізійно-оптичного ультрафіолетового мікроскопа в реальному масштабі часу

Для забезпечення роботи сканувального телевізійно-оптичного УФ-мікроскопа в реальному масштабі часу він повинен забезпечувати формування сканувального растра в площині досліджуваного МО в телевізійному або малокадровому режимі роботи і формування зображення на екрані відеоконтрольного пристрою, яким може бути телевізійний монітор або монітор персонального комп'ютера. Під час сканування МО в телевізійному режимі електричний сигнал, який відповідає його зображенню, може вводитися в персональний комп'ютер за допомогою телевізійного відеобластера. Така реалізація є простою з точки зору технічного виконання, однак має багато недоліків:

- при повноформатному формуванні сканувального растра на екрані сканувальної ЕПТ не повністю використовується роздільна здатність використовуваної сканувальної ЕПТ, яка є значно вищою від роздільної здатності використовуваного стандартного телевізійного монітора (роздільна здатність сканувальної ЕПТ не менша, ніж 2000 елементів по кожній координаті: діаметр сканувальної плями не перевищує 10 мкм за розміру сканувального растра на екрані сканувальної трубки 22×22 мм);

- при формуванні мінірастра на екрані сканувальної ЕПТ телевізійного монітора формується зображення лише фрагмента досліджуваного МО, якщо він має великі розміри. Крім того, формування мінірастра з подальшим його зміщенням у будь-яку точку екрана ЕПТ вимагає складних схемотехнічних рішень. При цьому необхідно відмітити, що є велика перевага при

формуванні мінірастра, яка полягає у тому, що на екрані телевізійного монітора можна спостерігати зображення досліджуваного МО малих розмірів у збільшеному масштабі без погіршення роздільної здатності зображення;

– при введенні телевізійного зображення досліджуваного МО в персональний комп'ютер погіршується зображення внаслідок того, що стандартні відеобластери мають обмежену смугу пропускання тракту відеосигналу, що погіршує передачу дрібних деталей зображення досліджуваного МО. Відомими є відеобластери спеціального призначення, які мають значно кращі характеристики з роздільної здатності передавального сигналу, однак їх вартість здебільшого перевищує на порядок вартість самого персонального комп'ютера;

– проведений аналіз відповідно до (11) показує, що під час сканування досліджуваного МО в телевізійному стандарті важко забезпечити необхідне відношення сигнал-шум через недостатню максимальну яскравість свічення використовуваної сканувальної ЕПТ та широкої смуги пропускання сигнального тракту.

Переваги використання малокадрового режиму роботи сканувального телевізійно-оптичного мікроскопа полягають у наступному:

– можливість використання значно меншої швидкості сканування МО, що дасть змогу підвищити якість формованого зображення;

– можливість формування сканувального растра внаслідок використання цифрового способу формування сигналів розгортки з кроком, який відповідає реальній роздільній здатності використовуваної сканувальної ЕПТ, наприклад, 2048×2048 елементів розкладу зображення досліджуваного МО;

– можливість використання персонального комп'ютера для формування сканувального растра зменшених розмірів з високою роздільною здатністю;

– можливість введення зображення в персональний комп'ютер через USB-порт, що значно спростить завдання введення великих масивів інформації в реальному масштабі часу.

Недолік використання малокадрового режиму роботи полягає у тому, що не можна за малої швидкості сканування виводити зображення на екран стандартного телевізійного монітора. Такий варіант є можливий лише під час використання двопортової пам'яті, в яку інформація записується повільно зі швидкістю сканування, а зчитується швидко згідно з параметрами телевізійного стандарту.

Висновок

Сканувальний телевізійний оптичний мікроскоп на основі ЕПТ високої роздільної здатності з УФ-свіченням екрана дасть змогу проводити дослідження біологічних МО в реальному масштабі часу за дуже малої потужності опромінювання, що відкриває широкі перспективи для його використання порівняно з лазерними мікроскопами, які мають значну потужність опромінювання МО, та електронними, які уможливають проводити дослідження лише після попереднього оброблення та у вакуумі, що унеможливує їх застосування під час дослідження живих МО. Найдоцільнішим для практичної реалізації необхідно вважати використання такого сканувального мікроскопа, який може одночасно забезпечити реалізацію двох режимів роботи: телевізійного та малокадрового з малим або змінним кроком сканування.

1. Скворцов Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. *Микроскопы* / Под ред. Н.И. Полякова. – Л.: Машиностроение, 1969. – 502 с.
2. Федин Л.А. *Микрофотография*. – Л.: Наука, 1971. – 220 с.
3. *Краткая медицинская энциклопедия*. – 2-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1989. – 860 с.
4. Бейкер А., Беттеридж Д. *Фотозлектронная спектроскопия* // Пер. с англ. – М.: Мир, 1975. – 320 с.
5. Самойлова К.А. *Действие ультрафиолетовой радиации на клетку*. – Л.: Медицина, 1967. – 240 с.
6. Зайдель А.Н., Шрейдер Е.Я. *Спектроскопия вакуумного ультрафиолета*. – М.: 1967. – 180 с.
7. Столяров К.П. *Химический анализ в ультрафиолетовых лучах*. – М. – Л.: 1965. – 440 с.
8. Грицьків З., Шклярський В. *Визначення яскравості ЕПТ скануючого оптичного мікроскопа з урахуванням шумів* // Вісник Національного університету “Львівська політехніка”. – 2002. – № 428. – С. 54–58.
9. Крейнгель Н.С. *Шумовые параметры радиоприемных устройств*. – Л.: Энергия, 1969. –

168 с. 10. Орловский Е.Л., Халфин А.М., Хазов Л.Д., Заварин Г.Д., Круссер Б.В., Шелованов Л.Н. Теоретические основы электрической передачи изображений. Телевидение и фототелеграфия / Под ред. А.В. Таранцова. – М.: Советское радио, 1962. – 728 с. 11. <http://sales.hamamatsu.com/en/products/system-division/bio-imaging-instruments/eu>. 12. vetfac.nsau.edu.ru/new/uchebnic/microbiology/stu/bacter/l_microscop.htm. 13. Yu. Balanjuk. Uv illumination scanning optical microscope / Yu. Balanjuk // *Electronic and Telecommunications Conference of Students and Young Scientific Workers SECON-2007: VIII intern. conf. 7 – 8 November 2007: proceed. of the intern. conf. – Warsaw-Poland. 2007. – P. 10.* 14. http://www.microscopy.org.ua/index.php?option=com_content&task=view&id. 15. www.pu.if.ua/depart/f_re/mint/course/PrOpt_metodu.html. 16. www.theorphys.psu.ru/physcalendar.htm 17. www.rpd.univ.kiev.ua/med/molekular.php.htm 18. www.farmacolog.ru/main/diagnostics/13-razrabotan-metod-povyshenija-kachestva.html. 19. www.medved.com.ua/referatik/law/6_object6183.html. 20. www.cntei.ck.ua/index.php?view=rozzr. 21. www.uazakon.com/big/text15/pg25.htm/. 22. Прудюс І.Н. Скануючий оптичний мікроскоп для клінічної лабораторної діагностики / І.Н. Прудюс., В.І. Шклярський, А.Д. Педан // *Прикладна радіоелектроніка. Стан і перспективи розвитку МРФ'2008: 3-й Міжн. радіоелектр. форум 23 – 25 жовтня 2008: Тези доповідей – Харків, 2008. – Т. 4. – С. 127–131.* 23. Bogdana Lubinecka, Anatoliy Pedan. Luminescent scanning optical microscope with lowered doze irradiation of preparation // *Modern Problem of Radio Engineering Telecommunications and Computers Science: Proceedings of the International Conference TCST'2008. Lviv-Slavske. Ukraine. Febryary 19 – 23. 2008. – P. 248–250.* 24. Z.D. Hrytskiv, Y. Zorenko, V. Gorbenko, A.D. Pedan, W.I. Shkliarskyi. Single crystalline film screens for cathode-ray tubes: new life of television scanning optical microscopy // *Radiation measurements. – 2007. – V 4. – P 933 – 936.* 25. Z.D. Hrytskiv, A.D. Pedan, V.I. Shkliarskyi. Back to television scanning optical microscopy? // *Proceedings of the Biomedical Optics Technical Digest. USA. Florida. March 19-22. 2006. – P. 26.* 26. Yuriy Balanjuk, Anatoliy Pedan, Ivan Prudyus, Volodimir Shkljarskyi. Scanning optical microscope on base CRT with a ultraviolet luminescence of the screen // *Modern Problem of Radio Engineering Telecommunications and Computers Science: Proceedings of the International Conference TCST'2008. Lviv-Slavske. Ukraine. Febryary 19 – 23. 2008. – P. 246– 247.* 27. Вибір основних параметрів скануючого телевізійного стереомікроскопа / З.Д. Грицьків, Г.О. Туркінов, В.І. Шклярський // *Вісник Національного університету “Львівська політехніка” “Радіоелектроніка та телекомунікації”. – 2002. – №443. – С. 150 – 159* 28. Грицьків З.Д., Педан А.Д. Порівняльний аналіз впливу дифракції на якість зображення у камерному та сканувальному телевізійних мікроскопах // *Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. – 2007. – № 1 (9). – С. 26–31.* 29. Аксененко М.Д., Бараночников М.Л. Приемники оптического излучения: Справочник. – М.: Радио и связь, 1987. – 396 с.