

ОПТИЧЕСКИЕ ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 681.72

МНОГОКАНАЛЬНЫЙ КОНФОКАЛЬНЫЙ МИКРОСКОП
НА ОСНОВЕ ДИФРАКЦИОННОГО
ФОКУСИРУЮЩЕГО МУЛЬТИПЛИКАТОРА
С АВТОСИНХРОНИЗАЦИЕЙ РАЗВЁРТКИ*В. П. Бессмельцев, М. В. Максимов, В. В. Вилейко,
Н. В. Голошевский, В. С. Терентьев*Институт автоматики и электрометрии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1
E-mail: bessmelt@iae.nsk.su*

Представлена реализация сканирующего лазерного конфокального микроскопа, в котором сканирование образца производится матрицей освещающих пучков, что значительно увеличивает скорость построения изображений объекта. Формирование матрицы обеспечивается дифракционным оптическим элементом. Развёртка матрицы лазерных пучков по образцу выполняется гальванометрическими сканерами с подвижными рефрактивными плоскопараллельными пластинами. Применение такой схемы сканирования позволяет осуществить прохождение освещающих пучков в осветительном канале и сигнальных пучков в приёмном канале через одну неподвижную матрицу конфокальных диафрагм и обеспечить развёртку сканирующих пучков в плоскости образца и сигнальных пучков в плоскости фотоприёмной матрицы без использования дополнительной синхронизированной пары сканеров. Представленный конфокальный микроскоп может быть реализован в задачах, требующих высокого быстродействия.

Ключевые слова: многоканальный конфокальный микроскоп, дифракционный оптический элемент, сдвиговые плоскопараллельные пластины.

DOI: 10.15372/AUT20180601

Введение. Лазерные конфокальные сканирующие микроскопы применяются для послойного построения трёхмерного изображения флуоресцирующих объектов в биологии, отражающих объектов в профилометрии [1, 2]. Такие микроскопы позволяют существенно увеличить контраст и улучшить разрешение оптической микроскопии по латеральным (x, y) и по аксиальной (z) координатам [1]. Достигается это за счёт последовательного сканирования объекта сфокусированным лазерным лучом, фильтрацией отражённого или флуоресцентного света от объекта точечной диафрагмой, размещённой конфокально в плоскости промежуточного изображения, и дальнейшего построения из полученных данных изображения отсканированного слоя. Однако сам процесс последовательного получения данных при перемещении лазерного луча ограничивает быстродействие таких устройств (быстродействие, получаемое одноканальной системой, ограничено несколькими десятками кадров в секунду, например 30 кадр/с при разрешении 512×512 точек на кадр [3]). Для задач субмикронной профилометрии больших объектов (с площадью поверхности более 1 дм^2) и исследования живых биологических объектов в реальном времени

*Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства научных организаций (государственная регистрация № АААА-А17-117060810013-2).

естественным решением увеличения быстродействия конфокальной сканирующей техники является применение многоканального параллельного сканирования матрицей лазерных пучков, прошедших через матрицу конфокальных диафрагм, и параллельного приёма и обработки сигналов от образца [2, 4]. В качестве приёмника света могут использоваться матрица отдельных фотоприёмников, скоростная фотоприёмная ПЗС- или КМОП-матрица.

Задача формирования матрицы или линейки лазерных лучей решается с помощью микролинзового раstra [4], акустооптического или электрооптического мультипликатора [5, 6], киноформных элементов [7]. Сканирование может быть выполнено с помощью вращающихся многогранников или дисков, зеркальных сканеров на основе гальванометров, возможно также применение акусто- или электрооптических дефлекторов [1]. Известно несколько вариантов многоканальных систем на базе микролинзового раstra [4, 8, 9]. Наибольшее распространение получила конструкция на основе диска Нипкова с микролинзами [10]. Преимуществом схемы Нипкова является использование матрицы микролинз и матрицы соответствующих им конфокальных диафрагм, вращающихся вокруг одной оси. Это позволяет автоматически синхронизировать (автосинхронизировать) координатно-временную развёртку матрицы сфокусированных пятен в плоскости объекта и сигнала (отражённого или прошедшего) в плоскости фотоприёмной матрицы без дополнительных согласующих устройств. Недостаток такой компоновки состоит как в сложности изготовления диска с микролинзами (типичное количество микролинз 20000 [3]), так и в значительной потере ($\geq 50\%$) света в осветительном и приёмном каналах.

В другой схеме многоканального лазерного конфокального сканирующего микроскопа (МЛКСМ) матрица конфокальных диафрагм неподвижна. В этом случае пространственная развёртка матрицы пучков осуществляется с помощью отклоняющих элементов, расположенных после матрицы конфокальных диафрагм. Отклоняющие элементы производят переменное угловое отклонение лучей в плоскости апертуры объектива [11]. Так как при этом требуется точная синхронизация развёртки луча изображения по фотоприёмной матрице и по объекту, то необходима дополнительная синхронная развёртка луча в приёмном канале, например, с помощью угловых гальванометрических сканеров, или синхронное перемещение в латеральных направлениях матрицы фотодетекторов непосредственно в области изображения [12]. Предложенная в [13] схема многоканального микроскопа на основе сканеров и массива микролинз в проходящем свете обеспечивает высокую (до 100 кадр/с) скорость при использовании уникальной сверхбыстродействующей линейной streak-камеры и специальной оптоволоконной матрицы, преобразующей $2D$ -изображение с общим разрешением 20×20 пикселей в линию.

Цель данного исследования — показать результаты разработки новой схемы МЛКСМ с простой системой мультиплицирования лучей на основе дифракционного оптического элемента (ДОЭ) и сканерного блока на базе двух гальванометрических дефлекторов с рефракционными отклоняющими элементами, обеспечивающими автосинхронизацию сканирования в плоскости объекта и плоскости фотоприёмника скоростной видеокамеры [14]. Кроме того, схема потенциально позволяет иметь быстродействие в сотни кадров в секунду при использовании сравнительно недорогих компонентов.

Оптическая схема МЛКСМ представлена на рис. 1. Свет линейно поляризованного лазерного источника 1 (обозначен сплошными линиями), пройдя через акустооптический модулятор (АОМ) 2, подаётся на специальный ДОЭ 3, мультиплицирующий пучок в массив $N \times N$ сходящихся пучков [5], отражается полупрозрачным зеркалом 4 (светоделительным кубиком) и фокусируется в плоскость матрицы $N \times N$ конфокальных диафрагм 5. Размер диафрагм согласован с размером сфокусированных пучков в соответствии с рекомендациями для оптимальных характеристик конфокальной микроскопии. Положение диафрагм выбрано такое, чтобы минимизировать интермодуляционное влияние каналов

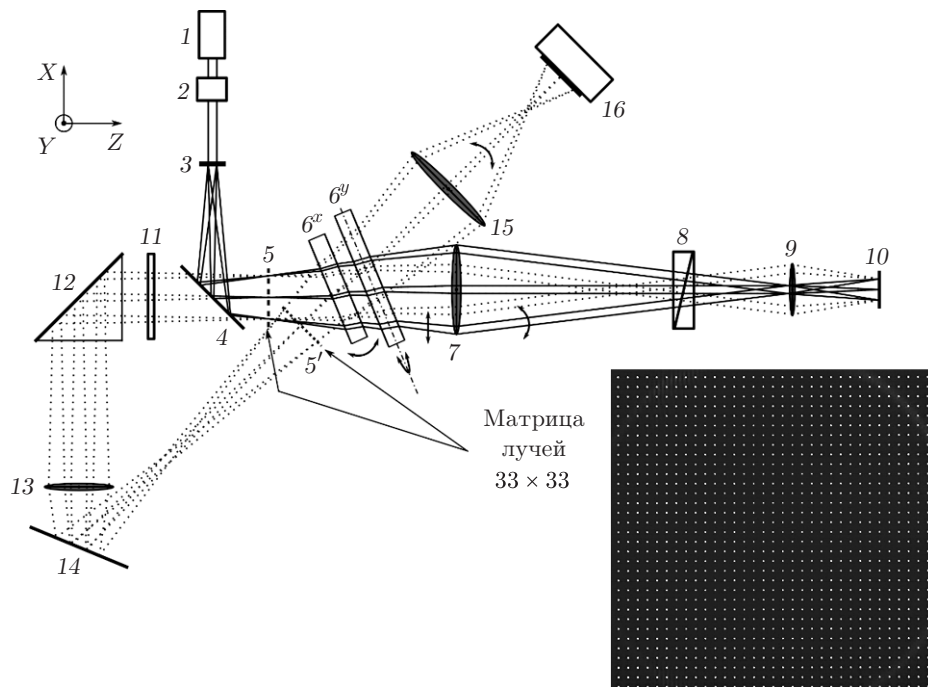


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема МЛКСМ

друг на друга. При этом отношение диаметра отверстий к расстоянию между ними находится в диапазоне $0,1-0,2$ [1, 2]. Матрица диафрагм для освещающих пучков осуществляет пространственную фильтрацию паразитных дифракционных порядков, сформированных ДООЭ. Далее лучи проходят через две подвижные рефрактивные плоскопараллельные пластины 6^x и 6^y , каждая из которых закреплена на вращающейся оси оптического углового сканера на основе гальванометра. Оси гальванометров ориентированы ортогонально. В зависимости от угла поворота пластинки смещают падающие лучи латерально по двум ортогональным координатным осям. После элементов 6^x и 6^y пучки проходят через тубусную линзу 7, двулучепреломляющую ($\lambda/4$) пластину 8, микрообъектив 9 и фокусируются в объектной плоскости 10.

Отражённый или флуоресцентный свет от объекта (пунктирные линии) распространяется до светоделителя 4 в обратном направлении по отношению к осветительным пучкам и через рефрактивные дефлекторы 6^x и 6^y проходит сквозь соответствующие отверстия матрицы диафрагм 5 независимо от углового положения рефрактивных пластинок 6. При этом проходить матрицу конфокальных диафрагм с минимальными потерями будут только световые пучки, идущие от объектов, находящихся в фокусе микрообъектива. После разделительного зеркала 4 свет попадает на поляризатор 11, настроенный на подавление излучения с поляризацией лазерного источника. Сигнальный свет от объекта благодаря элементу 8 имеет ортогональную поляризацию, проходит без ослабления через прямоугольную призму с крышей 12, объектив 13, зеркало 14 и формирует действительное зеркальное изображение матрицы сфокусированных пучков $5'$ из плоскости матрицы диафрагм 5 (см. вставку на рис. 1). Изображение $5'$ через плоскопараллельные пластины 6^x и 6^y фокусируется объективом 15 на фотоприёмную матрицу высокоскоростной камеры 16.

Таким образом, при отклонении пластин 6^x и 6^y на угол θ_x и/или θ_y происходит перемещение матрицы сфокусированных пучков в плоскости 10 по координатам x, y соответственно. Отражённый или флуоресцентный свет в приёмном канале после плоскости $5'$ ещё раз проходит через отклоняющие пластины, обеспечивая развёртку матрицы сигнальных пучков по поверхности фотоприёмной матрицы 16 синхронно с развёрткой матрицы

осветительных пучков по поверхности объекта в плоскости 10. При этом для покрытия лазерными пучками всего поля 10 микрообъектива 9 и поверхности фотоматрицы 16 требуется в N раз меньший угол отклонения пучков, чем в одноканальном варианте.

Особенность данной оптической схемы — возможность появления паразитных переотражений на плоскопараллельных пластинках и интерференционных шумов. Свет от объекта 10 может отражаться от граней пластинок 6^x , 6^y и попадать в приёмный канал сразу после тубусной линзы 7, создавая паразитную динамическую засветку на камере 16. Для значительного уменьшения шума использовались просветление граней пластинок, а также пространственное диафрагмирование в приёмном канале. Применение широкополосного источника излучения (порядка 0,1–1 нм) исключает наличие интерференционных помех.

Плоскопараллельные пластинки вносят в оптическую систему малые хроматические aberrации, которые для крайних точек диапазона (400–800 нм) приводят к смещению светового пятна в области фокусировки на 1–2 % от диаметра пятна Эйри.

Описание работы электронного блока управления. На рис. 2 представлена блок-схема МЛКСМ, включающая в себя вышерассмотренные элементы (заштрихованные блоки на рис. 1): светоделитель поляризационный, содержащий светоделительное зеркало 4 и поляризатор (поляризатор) 11, сканерный модуль — дефлекторы 6^x , 6^y по координатам x , y на основе плоскопараллельных пластин и объектив 15, оборачивающий модуль — прямоугольную призму с крышей 12, объектив 13 и зеркало 14.

Рассмотрим работу МЛКСМ. Для общего управления системой, а также приёма и хранения собранных данных применяется высокопроизводительный компьютер (сервер) с установленным фреймграббером, связанным с высокоскоростной камерой интерфейсом Cameralink. Компьютер напрямую также управляет включением лазера и драйвером пьезоподвижки, которая перемещает микрообъектив по оси Z . Управление всеми электро- и оптико-механическими элементами МЛКСМ осуществляет специализированный контроллер микроскопа на основе процессора с архитектурой ARM A9 и программируемой логической интегральной схемы (ПЛИС) 110000 LE(K). Процессор (32-разрядный 2-ядерный) используется для организации взаимодействия с персональным компьютером по каналу USB. Функции управления исполнительными модулями системы реализованы в ПЛИС. Контроллер также подключён к драйверу, управляющему двухкоординатным столом, на который помещается исследуемый объект.

Для получения кадра изображения объекта, установленного в плоскости фокуса микрообъектива 9, с выхода контроллера через драйвер сканеров на дефлектор по оси X (6^x на рис. 1) сканерного модуля подаётся сигнал пилообразной формы (рис. 3, *a*). Одновременно подаётся сигнал на запуск формирования кадра видеокamerой (сигнал $U_{\text{кам}}$ на рис. 3, *d*, запуск формирования кадра видеокamerы происходит по положительному фронту $U_{\text{кам}}$). При этом пластинка 6^x поворачивается на угол θ_x , пропорциональный поданному на вход его драйвера сигналу, при котором матрица освещающих лазерных пучков перемещается в плоскости 10 на расстояние немногим более расстояния между соседними пучками S_x . После указанного перемещения по оси Y гальванометр по сигналу (рис. 3, *b*) поворачивает пластину 6^y на угол $2\theta_{y\text{max}}/k$, здесь k — задаваемое пользователем число строк в субкадре (зоне, ограниченной расстояниями S_x и S_y , где S_y — расстояние между соседними пучками по оси Y), а угол $2\theta_{y\text{max}}$ равен углу, при котором матрица освещающих пучков перемещается на расстояние S_y . При этом на АОМ поступает последовательность импульсов, соответствующих заданному количеству точек в строке (сигнал $U_{\text{АОМ}}$ на рис. 3, *c*), начало которой синхронизировано с координатой начала субкадра, а конец — с положением луча, соответствующим S_x . После повторения k циклов такой операции на матрице видеокamerы формируется полный кадр изображения объекта в плоскости 10. Далее подаётся

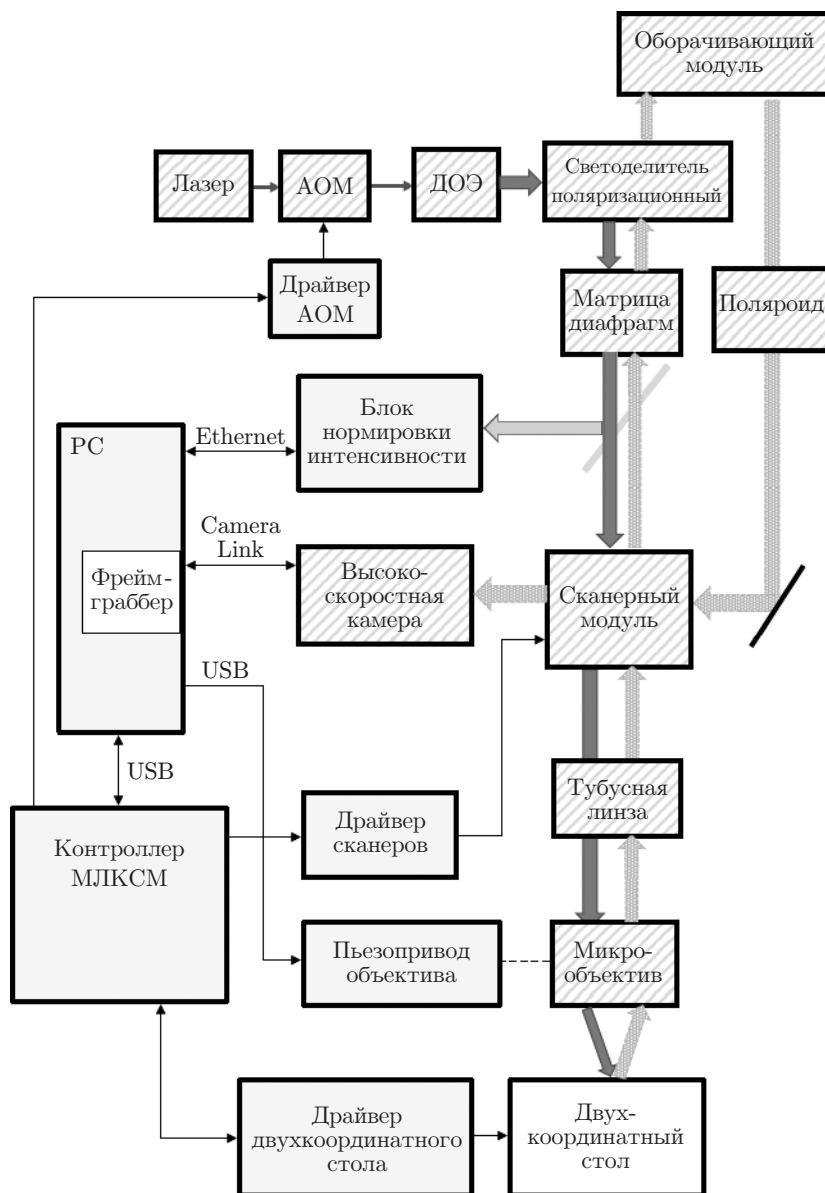


Рис. 2. Блок-схема МЛКСМ

сигнал перемещения микрообъектива на заданное расстояние по оси Z и после накопления набора кадров формируется двумерное (в режиме оптимального фокуса) или трёхмерное изображение. Для нормировки и калибровки интенсивности освещающих пучков используется блок нормировки интенсивности. Он состоит из проекционного объектива и регистрирующей фотоприёмной матрицы. Здесь могут фиксироваться относительные значения интенсивностей света каждого пучка, применяющиеся в дальнейшей обработке полученного изображения.

Обсуждение результатов эксперимента. В качестве ДОЭ использован дифракционный фокусирующий мультипликатор, рассмотренный в [5], со следующими характеристиками: материал подложки — кварц, тип фазового профиля — многоуровневый, диаметр активной зоны — 8 мм, количество пучков — 33×33 , пучки фокусируются в виде квадратной матрицы точек ($7,2 \times 7,2$ мм) в плоскости 5 (см. рис. 1) с расстоянием между пучками 225 мкм. Матрица диафрагм с диаметром отверстий 50 мкм имеет размеры, соот-

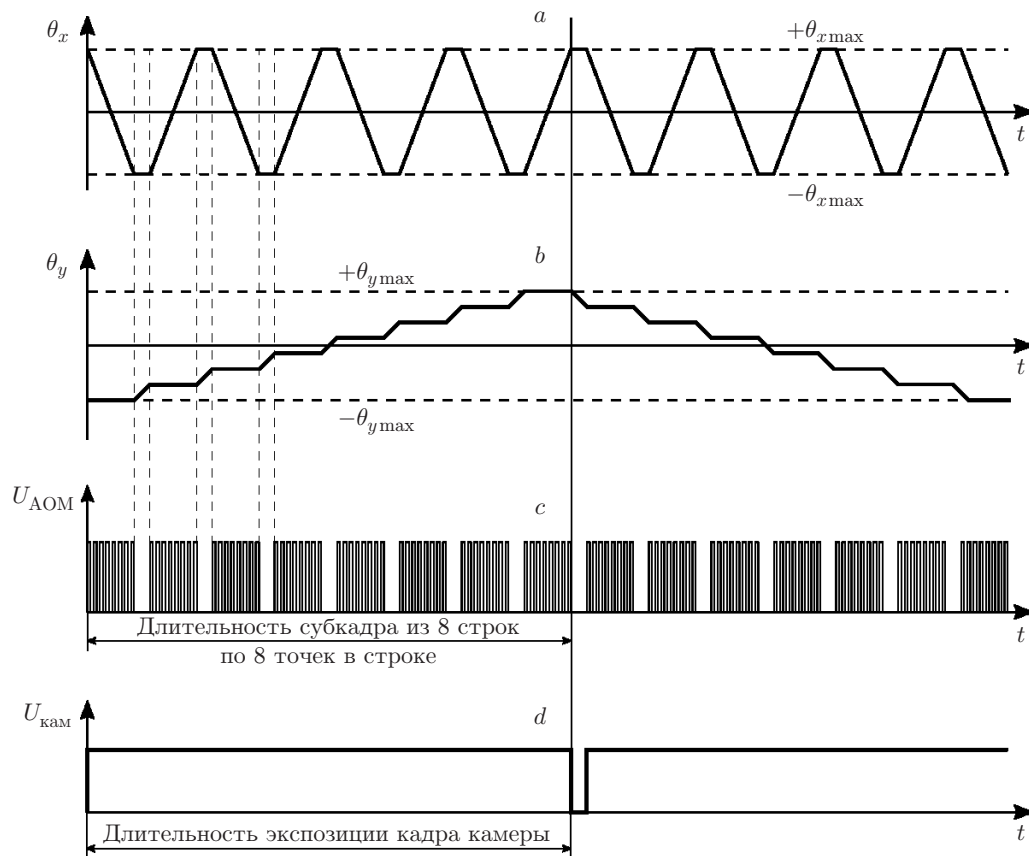


Рис. 3. Временные диаграммы углов поворота сканеров (θ_x, θ_y) и напряжений на АОМ ($U_{\text{АОМ}}$) и видеоматрице ($U_{\text{кам}}$): a — сигнал управления дефлектором 6^x , b — сигнал управления 6^y , c — сигнал управления АОМ, d — сигнал синхронизации видеокамеры

ветствующие размерам матрицы пучков. Дифракционный мультипликатор, совмещённый с фокусирующей оптикой, обеспечивает высокую лучевую эффективность осветительного канала. Свыше 90 % света лазера может быть равномерно распределено в матрице лучей. Применяемые в других многоканальных системах микроскопии оптические системы имеют меньшую лучевую эффективность (например, системы с фокусирующими линзами диска Нипкова <50 %). В экспериментальной установке применена высокоскоростная камера EoSens MC 1362, имеющая формат изображения 1280×1024 пикселей и быстродействие 500 кадр/с при полном разрешении.

В системе сканирования использованы гальванометрические сканеры СТІ 6240, которые при выбранных в текущей реализации углах поворота пластинок ($\pm 5,5^\circ$) и размерах кварцевых пластинок 6^x ($5 \times 20 \times 20$ мм), 6^y ($5 \times 25 \times 25$ мм) обеспечивают скорость сканирования до 800 строк/с. Таким образом, при количестве сканируемых строк между соседними осветительными пучками, равном 10 (смещение между строками на образце 0,375 мкм), быстродействие системы составляет около 80 кадр/с. Быстродействие данной схемы определяется частотами сканирования подложек, скоростью фотоматрицы и может достигать сотен кадров в секунду, как и в схеме Нипкова.

Максимальная мощность твердотельного лазера с длиной волны $\lambda = 532$ нм составляла 200 мВт. Регулировка мощности лазерного пучка и его модуляция производятся акустооптическим модулятором Gooch & Housego 3080-120.

Грубая фокусировка объектива выполняется моторизованным механическим приводом с диапазоном перемещения 25 мм и разрешением 2,5 мкм. Для точной фокусировки и быстрого перемещения объектива по координате z в режиме послойного сканирования образца взят пьезопривод MCL NanoF 200WS, имеющий диапазон перемещения ± 100 мкм, разрешение 0,4 нм и резонансную частоту 500 Гц. Латеральные перемещения образца выполняются с помощью прецизионного двухкоординатного стола Aerotech's PlanarDL-200XY с диапазоном перемещения по осям X и Y 200 мм и точностью $\pm 0,5$ мкм. Характеристики стола позволяют реализовать режим шивки смещённых по осям X, Y кадров изображения для получения изображения большой размерности.

В схеме использовался объектив Nikon CFI60 100X ($NA = 0,8$), в качестве тубусной линзы — Zeiss 1x с эффективным фокусным расстоянием 165 см. Латеральное увеличение составило 90. Размер одной области сканирования 80×80 мкм. Характеристики аппаратной функции данного конфокального микроскопа определяются приведёнными параметрами матрицы диафрагм и объектива. Оценка латерального разрешения объектива $R_{lat} \approx 1,2\lambda/NA = 0,8$ мкм. Аксиальное разрешение зависит от размера отверстий диафрагм. В нашем случае размеру отверстий (50 мкм) соответствует 0,62 диска Эйри и аксиальное разрешение $R_{axial} \approx \lambda/NA^2 = 0,83$ мкм. Выбор размера отверстия особенно важен для МЛКСМ, так как влияет на лучевую эффективность системы и на эффект перекрёстного проникновения сигнала от соседних областей объекта в соответствующие соседние отверстия (интермодуляции между каналами), что было показано расчётами и экспериментально для диска Нипкова [1]. Специальное измерение параметров интермодуляционного влияния в данной работе не проводилось. Для демонстрации качества получаемых изображений приведены области сканирования объектов со структурой, близкой к разрешающей способности МЛКСМ (рис. 4). В качестве тест-объекта использовалась синтезированная голограмма — структура, представляющая собой систему дифракционных решёток шириной 25 мкм с разным шагом, выполненная на полимерной плёнке толщиной 25 мкм с односторонним металлическим напылением. Период линий дифракционных решёток составлял 1,2 и 0,75 мкм. Структура выполнена со стороны металлического напы-

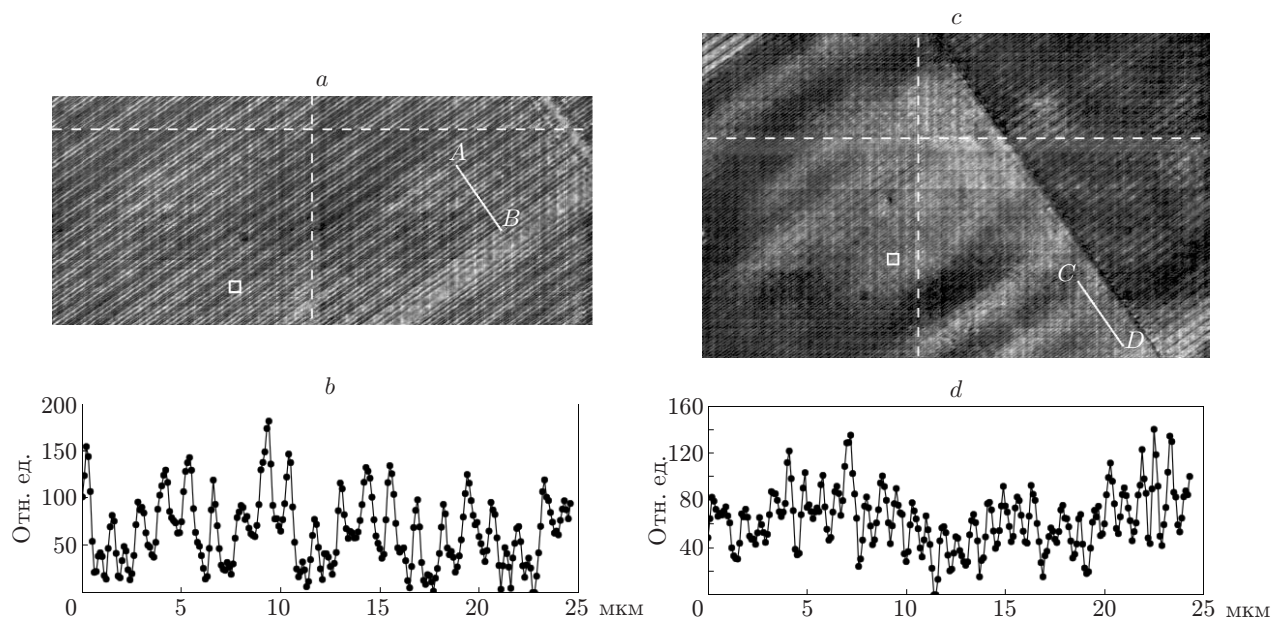


Рис. 4. Изображения объектов, представляющих собой структуры на основе дифракционных решёток: a, c — с шагами 1,2 и 0,75 мкм соответственно; b, d — относительные распределения интенсивности вдоль отрезков AB и CD

ления, глубина структуры решётки составляла около 200 нм. Сканирование поверхности объекта проводилось с неметаллизированной стороны объекта, т. е. через полимерную плёнку толщиной 25 мкм, что существенно затрудняет получение изображений структуры объекта вследствие внесения плёнкой значительных aberrаций при использовании объективов с высокой числовой апертурой, а также из-за паразитных интерференционных явлений.

Сканирование поверхности осуществлялось методом послойного сканирования на заданную глубину (± 2 мкм) с числом слоёв 10. Для поиска слоя, расположенного в фокусе, применялся метод расширенного фокуса [15]. Данный слой сохранялся в памяти, затем объект смещался латерально на размер области сканирования, и процедура повторялась. Изображения полученных отсканированных областей сшивались (показано пунктирными линиями) путём совмещения их границ. Для примера на рис. 4, *a* приведены две совмещённые области сканирования с итоговым размером 80×160 мкм, содержащие линии с периодом 1,2 мкм. На рис. 4, *b* изображено распределение интенсивности по пикселям вдоль отрезка *AB*, среднеквадратичное отклонение которой составляет 37. На рис. 4, *c* показаны линии с периодом 0,75 мкм, среднеквадратичное отклонение интенсивности точек вдоль отрезка *CD* (рис. 4, *d*) составляет 25, т. е. в 1,5 раза меньше, что обусловлено падением разрешающей способности при приближении к пределу частотно-контрастных характеристик объектива. Белым квадратным контуром на рис. 4, *a, c* очерчены области сканирования одним лучом. На рис. 4, *a, c* и распределениях интенсивности на рис. 4, *b, d* наблюдается низкочастотная огибающая сигнала, связанная со свойствами образца.

Заключение. Применение оригинальной оптической схемы с многоканальной системой сканирования и автосинхронизацией развёртки лучей по объекту и видеоматрице при неподвижной матрице конфокальных диафрагм позволило, используя сравнительно недорогие компоненты, создать скоростную конфокальную систему для отражательной или флуоресцентной микроскопии [14]. Это достигается за счёт тройного прохождения матрицы лазерных пучков плоскопараллельных прозрачных пластин, установленных на оси гальванометрических сканеров. Кроме того, к достоинству схемы можно отнести максимально возможную лучевую эффективность за счёт использования ДОО [5], так как в данном случае будет использоваться свыше 90 % излучения лазера для освещения объекта, что превышает другие известные методы.

Экспериментальные исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Спектроскопия и оптика» в Институте автоматизации и электротехники СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Pawley J. B.** Handbook of Biological Confocal Microscopy. Boston: Springer US, 2006. 632 p.
2. **Свищев Г. М.** Конфокальная микроскопия и ультрамикроскопия живой клетки. М.: Физматлит, 2011. 120 с.
3. **Каталог оборудования.** Высокоскоростной лазерный конфокальный 3D микроскоп NS-3000. URL: <http://axalit.ru/catalog/konfokalnye> (дата обращения: 21.05.2018).
4. **Ishihara M., Sasaki H.** High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope // Opt. Eng. 1999. **38**, N 6. P. 1035–1040.
5. **Бессмельцев В. П., Завьялов П. С., Корольков В. П. и др.** Дифракционный фокусирующий мультипликатор для параллельного многоканального секвенатора // Автометрия. 2017. **53**, № 5. С. 48–56.
6. **Pat. 6248988 B1 US.** Conventional and confocal multi-spot scanning optical microscope / M. C. Krantz. Publ. 19.06.2001.

7. **Pat. 0051976 A1 US.** Confocal microscope with diffractively formed virtual pinhole array / J. Karin, M. Golub. Publ. 18.03.2004.
8. **Shimozawa T., Yamagata K., Kondo T. et al.** Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. **110**, N 9. P. 3399–3404.
9. **Бессмельцев В. П., Терентьев В. С.** Форма профиля флуоресценции от толстого слоя флуорофора в многоканальном конфокальном микроскопе // Оптический журнал. 2015. **82**, № 6. С. 58–65.
10. **Tanaami T., Otsuki S., Tomosada N. et al.** High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks // Appl. Opt. 2002. **41**, N 22. P. 4704–4708.
11. **Pat. 6856457 B2 US.** Single and multi-aperture, translationally-coupled confocal microscope / W. Vogt, M. Szulczewski, D. Wolf. Publ. 15.02.2005.
12. **Kagawa K., Seo M.-W., Yasutomi K. et al.** Multi-beam confocal microscopy based on a custom image sensor with focal-plane pinhole array effect // Opt. Express. 2013. **21**, N 2. P. 1417–1429.
13. **Tsikouras A., Berman R., Andrews D. W., Fang Q.** High-speed multifocal array scanning using refractive window tilting // Biomed. Opt. Express. 2015. **6**, N 10. P. 3737–3747.
14. **Пат. 2649045 РФ.** Многоканальный конфокальный микроскоп / В. П. Бессмельцев, В. С. Терентьев, М. В. Максимов. Опубл. 15.03.2018, Бюл. № 8.
15. **Piccinini F., Tesei A., Zoli W., Bevilacqua A.** Extended depth of focus in optical microscopy: Assessment of existing methods and a new proposa // Microscopy Res. Techn. 2012. **75**, N 11. P. 1582–1592. DOI: 10.1002/jemt.22104.

Поступила в редакцию 25 мая 2018 г.
