

УДК 535.241.13:534

МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЁ РАЗВИТИЯ

**А. И. Колесников¹, В. Я. Молчанов², И. А. Каплунов¹,
А. И. Иванова¹, С. Е. Ильяшенко³, Д. В. Друина¹**

¹ Тверской государственной университет
кафедра прикладной физики

² НТЦ Акустооптики НИТУ МИСИС (Москва)

³ Тверской государственной технический университет
кафедра технологии металлов и материаловедения

Рассмотрены основные схемы компоновки мультиспектральных микроскопов с использованием сменных или плавно перестраиваемых оптических фильтров и методологий спектральной визуализации с помощью спектрального или пространственного сканирования изучаемых объектов, а также фурье-спектроскопии их интерферограмм. Отмечен значительный рост интереса к мультиспектральной микроскопии в связи с перспективами её широкого применения в медицине, биотехнологиях, физическом материаловедении, химии, минералогии, криминалистике и многих других отраслях науки и техники.

Ключевые слова: *мультиспектральная микроскопия, перестраиваемые оптические фильтры, спектральная визуализация*

MULTISPECTRAL MICROSCOPY AND PERSPECTIVES OF ITS DEVELOPMENT

**A. I. Kolesnikov¹, V. Ya. Molchanov², I. A. Kaplunov¹,
A. I. Ivanova¹, S. E. Ilyashenko³, D. V. Druina¹**

¹ Tver State University
Chair of applied physics

² STC of Acoustooptics, NITU MISIS (Moscow)

³ Tver State Technical University
Chair of metal technology and materials science

A survey is given of the arrangement of multispectral microscopes making use of changeable or tunable optical filters and methods of spectral imaging with the aid of wavelength or spatial scanning of the objects under study as well as Fourier spectroscopy of their interferograms. Considerable increase of the interest to the multispectral microscopy related with prospects of its wide application in medicine, biotechnology, materials science, chemistry, mineralogy, criminalistics and many other fields of science and technology is pointed out.

Keywords: *multispectral microscopy, tunable optical filters, spectral visualization*

1. Введение. Мультиспектральная микроскопия основана на сочетании методов спектроскопии и визуализации микрообъектов. Рассматриваемые по отдельности эти хорошо известные методы разрабатывались в течение многих лет. При их комбинировании возникает задача создания трёхмерного набора данных, содержащих множество изображений одного и того же объекта и оцениваемых на разных длинах волн. Это приводит к значительным затратам вычислительных ресурсов и времени измерений, для оптимизации которых требуется адекватный инструментарий.

Качество изображений, которое оценивается по объёму получаемой информации, характеризуется рядом параметров, к числу которых относятся: пространственное разрешение; порог чувствительности, зависящий, в свою очередь, от квантовой эффективности фотоприёмника, измерительных шумов, качества оптики; динамический диапазон, который может значительно уменьшаться при низкой освещённости объекта; размеры поля зрения и др.

В табл. 1 приведены характерные параметры созданных к настоящему времени мультиспектральных микроскопов (видеоспектрометров). Приведённые типичные параметры зависят от многих конкретных деталей – метода фильтрации, качества элементов системы, схемных решений, алгоритмов обработки данных и ряда других факторов [1-5].

Т а б л и ц а 1. Характерные параметры мультиспектральных микроскопов

Функция	Параметр	Типичные значения
Визуализация	Пространственное разрешение	250 нм (в плоскости) на длине волны $\lambda = 500$ нм
	Поле зрения	~ 50 мкм (при большом увеличении)
	Динамический диапазон	256...65536 уровней интенсивности
	Порог чувствительности	Ограничен дробовым шумом
Спектроскопия	Спектральное разрешение	1...20 нм (может зависеть от λ)
	Спектральный диапазон	400-900 нм

2. Реализация спектральной визуализации. Комбинирование методологий визуализации и оптической спектроскопии приводит к концепции спектрального изображения в виде трехмерного набора ("куба") данных (рис. 1). Для получения такого изображения с помощью двумерных матричных фотоприёмников чаще всего применяют три алгоритма, описываемые ниже.

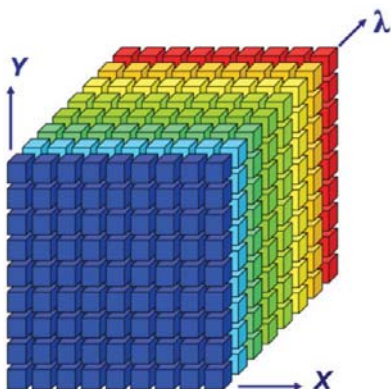


Рис. 1. Спектральная визуализация данных. Каждый пиксельный элемент куба характеризуется одним числом $I(x, y, \lambda)$, определяемым пространственными координатами x, y и длиной волны λ . Результат можно представлять в виде набора изображений $I(x, y)$ для заданных длин волн λ или в виде спектров $I(\lambda)$ для каждого пиксела

2.1. Спектральное сканирование. В простейшем случае спектральное изображение можно получить с помощью набора узкополосных интерференционных оптических фильтров с полосой пропускания порядка 5...10 нм (рис. 2, а, б). Такой подход может быть оправдан в случае небольшого числа контролируемых длин волн, но из-за низкой производительности он мало пригоден для детальных спектральных исследований.

Проблема повышения производительности решается путём применения электронно-перестраиваемых фильтров, к числу которых относятся жидкокристаллические [6] и акустооптические [7-11] фильтры (рис. 2, в, г). Важным достоинством этих фильтров является возможность перестраивания их рабочей частоты электронно-цифровыми методами. При использовании двумерного матричного фотоприёмника легко обеспечивается последовательная регистрация изображений всей поверхности изучаемого объекта с высоким разрешением на заданных длинах волн. Акустооптические перестраиваемые фильтры (АОПФ) обладают высокой температурно-временной стабильностью и превосходят жидкокристаллические фильтры (ЖКФ) по ряду параметров (см. табл. 2), в частности, по быстродействию (десятки мкс у АОПФ и 50...500 мс у ЖКФ), но имеют более высокую стоимость.

Спектральный диапазон в целом определяется как свойствами акустооптической ячейки (АОЯ), так и фотоприёмника (табл. 3).

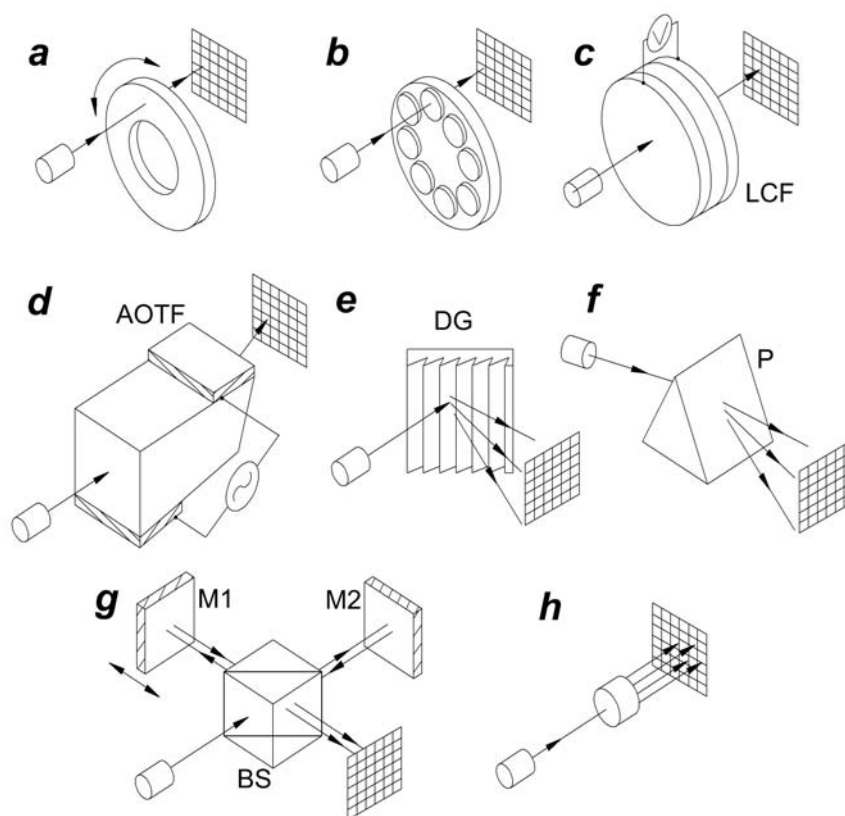


Рис. 2. Основные схемы мультиспектральных наблюдений: (a) с градиентным круговым фильтром; (b) с дискретным набором интерференционных фильтров; (c) с жидкокристаллическим перестраиваемым фильтром; (d) с акустооптическим перестраиваемым фильтром; (e) с дифракционной решёткой, (f) с призмой; (g) интерференционный метод с вычислением спектра каждого пикселя методом Фурье; (h) компромиссный метод с уменьшенным полем зрения и с уменьшенным числом спектральных интервалов (для повышения скорости измерений)

Для мультиспектральных микроскопов особое значение имеют широкоапертурные АОПФ на кристаллах парателлурита TeO_2 [7, 8]. Благодаря высокому акустооптическому качеству TeO_2 эффективность неколлинеарного фильтра превышает 90% при малой длине участка взаимодействия света и ультразвука ~ 10 мм и управляющей мощности менее 1 Вт. По этому параметру неколлинеарный фильтр существенно экономичнее коллинеарных АОПФ на кварце (см. табл. 4). Большой угол пространственного разделения $\sim 6^\circ$ позволяет работать без выходного поляризатора.

Т а б л и ц а 2. Некоторые характеристики оптических фильтров

Тип	Пропускание	Спектральное разрешение	Спектральный диапазон
Жидкокристаллический перестраиваемый фильтр	~ 55%	5...50 нм	300 нм
Интерференционные фильтры	~ 80%	~ 5 нм	произвольный
Дифракционная решётка	-	Высокое	ограничен
Градиентный круговой фильтр	~ 50%	~ 12 нм	300 нм
Акустооптический перестраиваемый фильтр	~ 45%	~ 2...10 нм	широкий
Фурье	~ 45%	высокое	широкий

Т а б л и ц а 3. Параметры акустооптических фильтров Army Research Laboratory [11]

Материал АОЯ	Апертура	Спектральный диапазон, мкм	Спектральное разрешение, нм	Матричный фотоприёмник
KDP, MgF ₂	1,2	0,22...0,48	1,4 нм ($\lambda = 0,3$ мкм)	ПЗС (Si), 300 К
TeO ₂	4,2	0,4...0,9	10 нм ($\lambda = 0,6$ мкм)	ПЗС (Si), 300 К
TeO ₂	8,4	0,9...1,7	10,4 нм ($\lambda = 1,3$ мкм)	InGaAs, 300 К
TeO ₂	3	2,0...4,5	77 нм ($\lambda = 3$ мкм)	InSb, 77 К
Tl ₃ AsSe ₃	7,75	7,8...10,5	80 нм ($\lambda = 0,3$ мкм)	HgCdTe, 77 К

Необходимо также отметить конструкцию неколлинеарного фильтра, в котором акустический пучок возбуждается несколькими независимо управляемыми пьезоэлектрическими преобразователями. На каждый из преобразователей поводится управляющий сигнал определённой мощности и с фазовым сдвигом по отношению к соседним элементам. Подбор уровня мощности питающего напряжения и значений фазового сдвига позволяет осуществить тонкую регулировку формы кривой пропускания фильтра. Кроме того, при этом удаётся заметно снизить интенсивность дифрагированного света вне полосы пропускания АОПФ. Благодаря высокому быстродействию АОПФ возможно также подавать на преобразователь сложные электрические сигналы, содержащие набор частот, что создаст новые уникальные возможности управления параметрами кривой пропускания [8].

Т а б л и ц а 4. Типичные параметры неколлинеарных и коллинеарных АОПФ

Параметр	Неколлинеарный АОПФ (TeO ₂)	Коллинеарный (кварц)
Спектральный диапазон	0,38...5 мкм	0,2...1,0 мкм
Интервал перестройки	1 октава	1 октава
Оптическая апертура	0,1...1,5 см ²	0,1...5 см ²
Угловая апертура	5...15 градусов	2...5 градусов
Угловое отклонение	3...9 градусов	0
Дифракционная эффективность (входное излучение поляризовано)	10...90 %	20...90 %
Время установления	4...20 мкс	14...35 мкс
Коэффициент контрастности	> 1000	> 1000
Потребляемая ВЧ мощность	0,5...3 Вт	5...30 Вт
Рабочие частоты	20...200 МГц	50...220 МГц
Материал преобразователя	LiNbO ₃	LiNbO ₃

2.2. Пространственное сканирование. Этот метод основан на использовании дифракционной решётки или призм (рис. 2, д), которые широко применяются в оптико-механических спектрофотометрах. Одно линейное сканирование обеспечивает получение зависимости $I(x, \lambda)$ ($y = \text{const}$) и для охвата всей поверхности должно быть повторено n раз

для всех заданных u . Этот метод может быть полезным при исследованиях с помощью конфокальных сканирующих микроскопов [12]. Следует отметить, что в данном случае число фотоприёмных элементов значительно меньше, чем у двумерных ПЗС матриц, поэтому для получения сопоставимых результатов требуется увеличение времени измерений.

2.3. Фурье спектроскопия. В методе Фурье спектральный анализ осуществляется без применения фильтров путём анализа интерферограмм. Основным элементом системы является интерферометр Майкельсона (или одна из его разновидностей), который настраивается на получение в плоскости выходной диафрагмы интерференционной картины (рис. 2, *e*), характеризующей исследуемый объект, освещаемый источником сплошного спектра. Одно из зеркал (M_2) движется поступательно, приводя к модуляции исследуемого излучения с частотой, зависящей от скорости движения M_2 и длины волны излучения. Вычисление искомого спектра осуществляется через Фурье-преобразование интерферограммы [13-15].

3. Практическая значимость. Большой и быстро нарастающий поток публикаций по мультиспектральной микроскопии, появившихся в печати за последние 10...15 лет, свидетельствует о большой научной и практической значимости исследований в этой области. Большинство работ в этом направлении связано с медицинскими и биологическими исследованиями. К их числу относятся изучение раковых заболеваний [16], анализ клеточной структуры растений [17], исследование живых клеток [18], а также исследований в области химического анализа [19], окружающей среды [20] и многое другое.

Наметились тенденции слияния мультиспектральной микроскопией с флюоресцентными и люминисцентными методами анализа, конфокальной микроскопией, микроскопией ближнего поля, масс спектрометрией и др. [21]. Проводятся работы по метрологическому обеспечению (калибровке) мультиспектральной микроскопии [22]. Появились предложения об использовании для этих целей новейших источников излучения – волоконных лазерных источников белого света Supercontinuum, обеспечивающих пользователю доступ к полному спектру суперконтинуума от 400 нм до более чем 1750 нм [23, 24].

Сказанное подтверждает актуальность и практическую значимость методов спектральной визуализации в получении информации о строении материалов и биообъектов, которые трудно или невозможно получить другими средствами.

Работа поддержана проектом РФФИ 09-02-12400-офи_м и выполнена в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Список литературы

1. Garini Y., Young I.T., McNamara G. Spectral imaging: Principles and applications // *Cytometry Part A*. V. 69A (8). P. 735–747.
2. Levenson R.M., Hoyt C. Spectral imaging and microscopy // *Am. Lab.* 2000. V. 32. P. 26–33.
3. Levenson R., Cronin P.J., Pankratov K.P. Spectral imaging for brightfield microscopy // *Proc. SPIE*. 2003.V. 4959. P. 27–33.
4. Levenson R.M., Wachman E.S., Niu W., Farkas D.L. Spectral imaging in biomedicine: A selective overview // *Proc. SPIE*. 1998. V. 3438. P. 300–312.
5. Levenson R.M., Mansfield J.R. Multispectral imaging in biology and medicine: Slices of life // *Cytometry Part A*. 2006. V. 69A (8). P. 748-758.
6. Hoyt C. Liquid crystal tunable filters clear the way for imaging multiprobe fluorescence // *Biophoton Int.* 1996. V.3. P. 49–51.
7. Магдич Л.Н., Молчанов В.Я. Акустооптические устройства и их применение. М.: Сов. Радио, 1978.
8. Балакший В.И., Парыгин В.Н., Чирков Л.Е. Физические основы акустооптики. М.: Радио и связь, 1985.
9. Мазур М.М., Пожар В.Э., Пустовойт В.И., Шорин В.Н. Двойные акустооптические монохроматоры // *Успехи современной радиоэлектроники*. 2006. №10. С. 19-30.
10. Kutuza I.B., Pozhar V.E, Pustovoit V.I. AOTF-based Imaging Spectrometers for Research of Small-Size Biological Objects // *Proc. SPIE*. 2006. V.5143. P.165 -169.
11. Gupta N. Hyperspectral imager development at Army Research Laboratory // *Proc. SPIE*. 2008. V. 6940. P. 69401P-1...H. 69401P-7.
12. Dickinson M.E., Bearman G., Tille S., Lansford R., Fraser S.E. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy // *Biotechniques*. 2001. V. 31. P. 1272-1278.
13. Malik Z. Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology // *Journ. Microscopy*. 1996. V. 182. P. 133-140.
14. Garini Y., Macville M., du Manoir S., Buckwald R.A., Lavi M., Katzir N., Wine D., Cabib D., Ried T. Spectral karyotyping // *Bioimaging*. 1996. V. 4. P. 65–72.
15. Huth U., Wieschollek A., Garini Y., Schubert R., Peschka-Süss R. Fourier transformed spectral bio-imaging for studying the intracellular fat of liposomes // *Cytometry Part A*. 2004. V. 57A. P. 10-21.
16. Barber P.R., Vojnovic B., Atkin G., Daley F.M., Everett S.A., Wilson G.D., Gilbey J.D. // Applications of cost-effective spectral imaging microscopy in cancer research // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V.36. P. 1729-1738.
17. Berg R.H. Evaluation of spectral imaging for plant cell analysis // *J Microsc* 2004;214:174–181.

18. Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy // FEBS Lett. 2003. V.546. P. 87–92.
19. Bei L., Dennis G.I., Miller H.M., Spaine T.H., Carnahan J.W. Acousto-optic tunable filters: fundamentals and applications as applied to chemical analysis techniques // Progress in Quantum Electronics. 2004. V.28. P.67–87.
20. Vila J., Calpe J., Pla F., Gomez L., Connell J., Marchant J., Calleja J., Mulqueen M., Munoz J., Klaren A. SmartSpectra: Applying multispectral imaging to industrial environments // Real-Time Imaging. 2005. V. 11. P. 85–98.
21. Wu Q., Merchant F., Castleman K.R. Microscope Image Processing. Elsevier, 2008. 550 p.
22. Lerner J.M., Zucker R.M. Calibration and validation of confocal spectral imaging systems // Cytometry. 2004. V. 62A. P. 8–34.
23. Schlachter S., Elder A., Frank J.H., Grudnin A., Kaminski C.F. Spectrally resolved confocal microscopy with a supercontinuum laser // Microscopy and Analysis. 2008. No. 113. P. 11-13.
24. <http://forc-photonics.ru>

Об авторах:

КОЛЕСНИКОВ Александр Игоревич - кандидат физ.-мат наук, доцент кафедры прикладной физики ТвГУ, Alexander.Kolesnikov@tversu.ru;

МОЛЧАНОВ Владимир Яковлевич - кандидат физ.-мат наук, главный научный сотрудник, зам. директора НТЦ акустооптики НИТУ МИСИС;

КАПЛУНОВ Иван Александрович – доктор техн. наук, профессор кафедры прикладной физики ТвГУ, Ivan.Kaplunov@tversu.ru;

ИВАНОВА Александра Ивановна – соискатель, вед. программист, ассистент кафедры прикладной физики ТвГУ;

ИЛЬЯШЕНКО Светлана Евгеньевна – кандидат физ.-мат наук, доцент кафедры технологии металлов и материаловедения ТГТУ, SvIlyashenko@yandex.ru;

ДРУИНА Дарья Викторовна – магистрант кафедры прикладной физики ТвГУ, sabiomoon@mail.ru.