

УДК 535.822: 57.086.2: 57.08

© Э. И. Лежнев, И. И. Попова, С. В. Кузьмин, С. М. Слащев

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ: ПРИНЦИПЫ, УСТРОЙСТВО, ПРИМЕНЕНИЕ (ЧАСТЬ 1)

Работа освещает современное состояние конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Статья содержит историческую справку, анализ принципа работы, некоторые теоретические предпосылки, сведения об особенностях конструкций конфокальных микроскопов. В работе приведены достаточно подробные материалы о применении КЛСМ в биологии и медицине. Статья представлена двумя частями, из которых первая часть публикуется в настоящем номере. Работа адресована исследователям, инженерам, преподавателям и студентам для первоначального ознакомления с КЛСМ и ориентации в литературе.

В настоящее время конфокальные лазерные сканирующие микроскопы (КЛСМ) получили широкое распространение в практике биологических исследований и в методах медицинской диагностики. Достижения в области точной механики, оптики, вычислительной техники, флуоресцентной микроскопии, реализованные в КСЛМ, позволили значительно расширить возможности оптической микроскопии.

В КЛСМ оптическая система формирует светящееся пятно на заданной глубине микрообъекта, что дает возможность путем сканирования получать послойное изображение препарата с контрастированием внутренних структур.

Программное обеспечение КЛСМ обеспечивает визуализацию изображения, трехмерную реконструкцию объекта (3-D), различные виды анализа внутриклеточных структур, автоматизацию работы всех систем.

В конфокальном микроскопе путем послойного просматривания препарата достигнута возможность количественной оценки таких процессов, как морфокинетика клеточного деления, возможность исследования фрагментов цитоскелета, изучения адгезии и межклеточных взаимодействий, возможность концентрационных измерений в компартментах клетки, измерений проницаемости цитоплазматических и митохондриальных мембран, внутриклеточного pH и потенциалов на клеточных мембранах, возможность введения веществ в клетку и наблюдения их физиологического действия, осуществления тонких процедур по эмбриотехнологии, получения трехмерной реконструкции клетки и т.д.

Развитию КЛСМ предшествовали следующие обстоятельства. К 50-м годам было достигнуто соответствие теоретически достижимых значений основных характеристик оптических микроскопов,

таких как разрешение, глубина резкости, увеличение, отношение сигнал/шум — реальным характеристикам, полученным в лучших образцах оптических микроскопов. Однако запросы клеточной биологии, цитологии, гистологии, аналитической цитохимии и гистохимии, диагностической и экспериментальной медицины, а также многих промышленных технологий требовали более чувствительных и метрологически строгих методов анализа формы и пространственной структуры наблюдаемых объектов.

Это привело к развитию таких методов микроскопирования, принципиально отличающихся от принципов классической оптической микроскопии, как электронная микроскопия, туннельная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, сканирующая микроскопия.

К 80-м годам сформировалась база, которая позволяла искать новые пути в создании систем оптического анализа микрообъектов. Прежде всего, это работы в следующих направлениях:

- вычислительная томография,
- теория распознавания образов,
- вычислительная техника,
- сканирующая техника,
- когерентная светоптика,
- создание широкого спектра флуоресцентных зондов.

Совокупность достижений в этих направлениях и запросы исследователей привели к развитию новой области оптико-аналитического приборостроения — конфокальной сканирующей микроскопии.

Некоторые характеристики различных типов сканирующих микроскопов: акустического, электронного, туннельного, атомно-силового и конфокального — приведены для сравнения в табл. 1.

Теория и практика КЛСМ освещается в многочисленных журналах, сборниках, монографиях,

Табл. 1. Сопоставление различных способов микроскопирования

Характеристики	Конфокальный сканирующий оптический микроскоп	Сканирующий акустический микроскоп	Сканирующий электронный микроскоп	Сканирующий туннельный микроскоп	Атомно-силовой микроскоп
Аппроксимированное поперечное разрешение	0.2–10 мкм	10 нм – 2 мм	3–100 нм	0.1–1 нм	0.1 нм – 1 мкм
Размер кадра, 2000 точек/кадр	400 мкм – 2 см	10 мкм – 2 мм	6–200 мкм	0.2–1 мкм	0.2 мкм – 2 мм
Аппроксимированное разрешение по оси Z на уровне 3 дБ	0.3 мкм	10 нм – 5 мм	1 мкм	0.1 нм	0.5 нм
Преимущества	Не требуется вакуум, поперечные срезы, возможность получения изображения в реальном времени, непосредственное наблюдение в цвете. Режимы наблюдения: флюоресценция, поляризация, фазовый и интерференционный контрасты	Количественное исследование свойств материалов и веществ. Пригоден для многих самых различных образцов. Частично эффективен при исследовании больших объектов и больших объемов образцов	Высокое разрешение, большая глубина зрения и изображения. Является стандартным прибором для исследований в полупроводниковой промышленности	Разрешение на уровне атомов и атомных решеток. Дает информацию об объекте, которую невозможно получить при помощи других средств и методов	Разрешение на уровне атомов. Позволяет измерять магнитные и электростатические силы взаимодействия, Ван-дер-ваальсовы силы и силы трения. Позволяет формировать изображения поверхностей относительно крупных структур
Недостатки	Разрешение ограничено дифракцией. Невозможно количественное определение электрических параметров	Образец должен быть помещен в жидкую фазу или содержать ее. Медленное формирование изображения из-за механического сканирования	Требуется вакуум. Поэтому не может быть применен при исследовании многих биологических объектов. Может повреждать полупроводниковые образцы	Исследуемые структуры должны обладать свойством проводимости. Относительно медленное сканирование. Расстояние от иглы до образца очень малое. Образец легко повреждается	Относительно медленное сканирование. Расстояние от иглы до образца очень мало. Трудно исследовать поверхность глубоких отверстий. Игла легко повреждается

справочниках, материалах конференций и симпозиумов.

В отечественной литературе практически нет публикаций, освещающих состояние этой области научного приборостроения.

Авторы настоящего обзора не ставят своей целью изложить все, что известно о КЛСМ. Наши задачи значительно скромней, и мы адресуем представленный ниже материал исследователям, инженерам, преподавателям и студентам для первоначального ознакомления с КЛСМ и для ориентации в литературе при желании или необходимости более глубокого ее изучения.

В обзор включены следующие разделы:

- историческая справка,
- принцип работы КЛСМ,
- элементы теории КЛСМ,
- элементы конструкций КЛСМ,
- применение КЛСМ в биологии и медицине.

По каждому разделу приведена рекомендуемая литература.

1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Приоритет создания конфокального микроскопа по схеме, содержащей основные элементы КЛСМ последующих поколений, принадлежит известному специалисту в области искусственного интеллекта М. Минскому. Цель, поставленная М. Минским, состояла в разработке прибора, позволяющего установить пространственные межнейронные связи для выяснения механизмов функционирования мозга. В 1957–1961 гг. им был разработан, запатентован [1] и впоследствии описан [2] микроскоп, в котором были частично устранены причины, затрудняющие просматривать детали объемного препарата на некоторой его глубине из-за рассеяния и преломления светового потока на оптически неоднородных фрагментах.

Повысить контрастность наблюдаемого участка М. Минскому удалось благодаря фокусировке лу-

ча в глубине препарата и использованию специальной игольчатой диафрагмы, расположенной вблизи плоскости регистрации (pinhole). Для просматривания всего препарата им был использован принцип сканирования, описанный применительно к микроскопической технике Юнгом и Робертсом в 1951–1952 гг. [3, 4]

На рис. 1 представлена схема хода лучей в конфокальном микроскопе Минского.

М. Минским в патенте и статье были отмечены основные преимущества конфокального микроскопа:

- повышение качества сигнала за счет снижения уровня рассеянного света;
- увеличение эффективного разрешения;
- улучшение соотношения сигнал/шум;
- возможность исследовать объемные препараты и объекты, рассеивающие свет;
- возможность сканирования в плоскости XU больших объектов;
- возможность сканирования по оси Z ;
- выбор увеличения электронным способом;
- возможность количественного исследования оптических свойств препаратов;
- возможность применения различных способов микрофотографирования: темное поле, фазовый контраст, интерференционный контраст;
- простота контрастирования;
- возможность использования простых объектов из-за фокусировки луча в точку.

Эти возможности конфокального микроскопа обеспечивали послойное наблюдение фрагментов ткани с последующей трехмерной реконструкцией изображения.

Возможности конфокальной микроскопии были реализованы по мере прогресса в информатике, когерентной оптике, точной механике, лазерной технике, аналитической цитохимии.

1969 г. — П. Давидович использовал лазер в конфокальном сканирующем микроскопе [5, 6].

1979 г. — Г. Бракенгоф с сотрудниками создал первую конструкцию конфокального сканирующего светового микроскопа для биологических целей [7].

1980 г. — начало промышленного выпуска лазерных сканирующих микроскопов (фирмы Biorad, Leica, Nikon) с использованием унифицированного сканирующего модуля, допускающего сопряжение с современными световыми микроскопами.

1984 г. — реконструкция истинного трехмерного изображения. Бертеро и Гродтешом [8] применительно к проблемам конфокальной микроскопии решена задача реконструкции истинного изображения на основе методов регуляризации Тихонова и Арсенина. Кратко результат этой работы может быть сформулирован следующим образом:

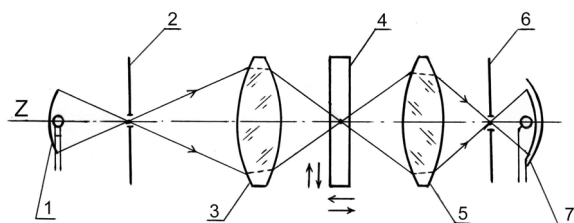


Рис. 1. Схема хода лучей в конфокальном микроскопе Минского. 1 — источник излучения; 2, 6 — игольчатые диафрагмы; 3, 5 — объективы; 4 — сканирующий столик; 7 — приемник излучения

установлено полное соответствие подлинной трехмерной структуры объекта со структурой реконструированного изображения (3-D—реконструкция).

1985–1988 гг. — создание конфокального микроскопа, работающего в реальном времени и позволяющего получить видимое изображение с использованием принципа растрового сканирования (М. Петран, М. Хадравский, М. Еггер и др. [9]; Г. Ксио, Т. Корл и Г. Кино [10]).

В 90-е годы в конфокальных микроскопах начато использование волоконной оптики (Т. Вильсон [11, 12], Т. Даббс, М. Гласс [13]).

С середины 80-х годов отмечается широкое внедрение КЛСМ, разработанных и выпускаемых зарубежными фирмами, в различные области исследований, и в первую очередь в биологию и медицину.

Фирма BioRad производит микроскопы MRC 600, MRC 800, MRC 1000, MRC 1024.

Широко известны микроскопы фирмы С. Zeiss LSM510 и LSM410. В настоящее время фирма выпускает персональный КЛСМ LSM5-Pascal, а также КЛСМ с многофотонным возбуждением LSM 510 NLO. Фирмой EG and Wallag создана двухдисковая микролинзовая сканирующая система Ultra-View, повышающая апертуру и чувствительность КЛСМ. Лаборатория Fluor Dynamics в своей разработке Asynchronous Pump-Probe Microscope использовала эффект асинхронной накачки и возбуждения флуоресценции и значительно улучшила латеральное разрешение, снизив его до 100 нм и менее. Фирма Leica разработала и поставляет на мировой рынок микроскопы Leica TCS SP.

Фирма Olympus выпускает микроскопы Fluor View, обеспечивающие получение конфокальных флуоресцентных изображений и изображений в интерференционном контрасте одновременно. Совершенствуют микроскопы с акустооптическими дефлекторами фирма Noran. Фирма WiTek разработала многофункциональный КЛСМ CRM200, позволяющий получать конфокальное изображение в рамановском спектре и работающий как флуоресцентный КЛСМ и КЛСМ отраженного света. Фирма WiTek разработала микроскоп α -SNOM, позволяющий формировать изображение в ближнепольном и конфокальном режимах, а также получать конфокальное изображение в рамановских спектрах.

Фирма BioRad Microscience разработала высокоэффективную, скоростную конфокальную систему формирования изображения Radiance 2000. Фирма Nicon (Япония) поставляет на рынок высокоскоростной КЛСМ PCM 2000.

Еще одним активно развивающимся направлением является мультифлуоресцентная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Микрообъекты окрашиваются несколькими флюо-

ресцентными красителями, например FITS, Texas Red (TR) и Cyanine 5, а возбуждение флуоресценции осуществляется одновременно несколькими длинами волн (488, 568, 647 нм). Метод позволяет получать объемные изображения микрообъектов в реальных цветах флуоресценции.

Получила свое теоретическое и практическое развитие мультифокальная многофотонная микроскопия. Этот вид оптической микроскопии позволяет формировать объемное изображение как в обычном флуоресцентном, так и конфокальном режиме.

За последнее время достигнуты значительные успехи в разработке алгоритмов и программ управления КЛСМ, регистрации и обработки изображений и данных.

Фирмы, разрабатывающие конфокальные системы, используют существующее программное обеспечение для управления КЛСМ и для формирования и анализа изображений или разрабатывают собственные программы. Так, например, фирма С. Zeiss для анализа изображений в лазерном сканирующем микроскопе разработала пакет программ для 3-D изображений, который может применяться в КЛСМ LSM 510 и LSM 310/410.

Фирма Applied Precision разработала программное обеспечение обработки трехмерного изображения клеток и субклеточных структур Soft WoRx TM Imaging Workstation для использования в академических и биотехнологических лабораториях.

Основные результаты по разработке КЛСМ были доложены в 1989 г. в Амстердаме на Первой Международной конференции по конфокальной микроскопии и Второй Международной конференции по формированию и анализу трехмерных изображений в микроскопии.

С 1989 по 2000 год проведено двенадцать конференций по конфокальной микроскопии и тринадцать конференций по обработке и анализу изображений в микроскопии, а также большое количество совещаний Общества по лазерной микроскопии. Регулярно проводятся совещания Американского микроскопического общества, конференции Английского Королевского микроскопического общества. Материалы этих конференций и совещаний дают представление о современном состоянии и путях развития КЛСМ.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ КЛСМ

Конфокальная микроскопия объединяет обширную группу приборов, отличающихся методами микроскопирования, конструктивными элементами, функциональными схемами и программным обеспечением. Схема КЛСМ с основными функциональными связями показана на рис. 2.

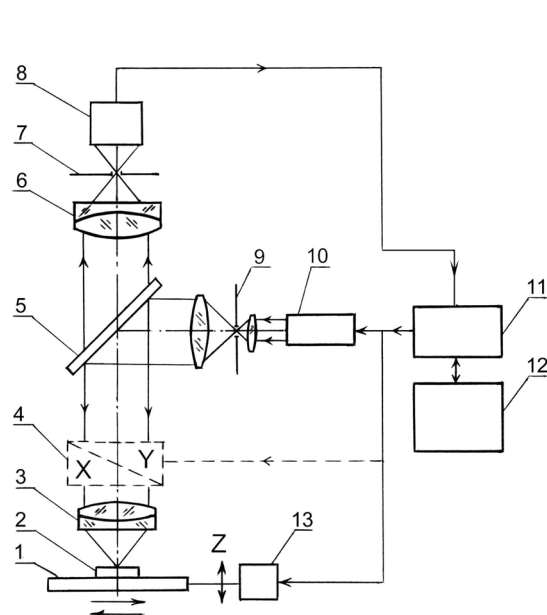


Рис. 2. Структурная схема КЛСМ с основными функциональными связями. 1 — сканирующий столик; 2 — исследуемый образец; 3, 6 — объективы; 4 — сканирующее устройство; 5 — светоделительная пластина; 7, 9 — игольчатые диафрагмы; 8 — приемник излучения; 10 — лазер; 11 — блок управления; 12 — компьютер; 13 — привод для сканирования столика по оси Z

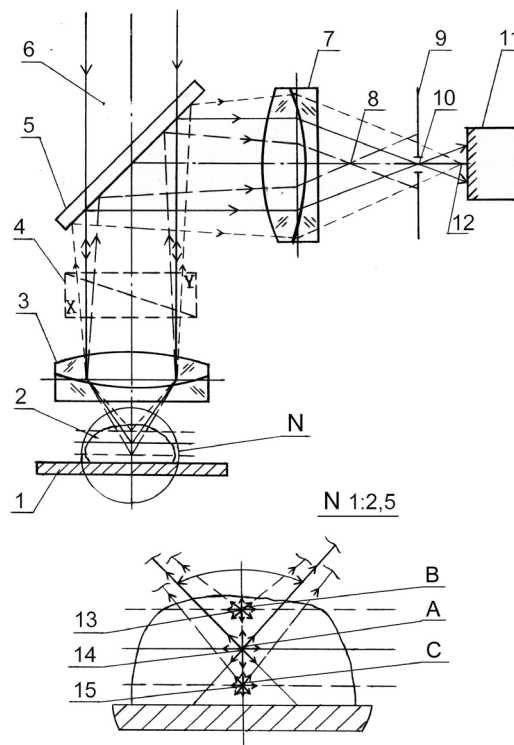


Рис. 3. Принципиальная схема, иллюстрирующая работу КЛСМ. 1 — сканирующий столик; 2 — исследуемый образец; 3, 7 — объективы; 4 — сканирующее устройство; 5 — светоделительная пластина; 6 — луч света от лазера; 8, 12 — изображение точек В и С; 9 — игольчатая диафрагма; 10 — изображение точки А в центре игольчатой диафрагмы; 11 — приемник излучения; 13, 15 — свечение точек В и С, находящихся вне фокуса объектива 3; 14 — свечение точки А, находящейся в фокусе объектива 3

В этой схеме могут быть выделены следующие блоки и системы:

- базовый микроскоп со сканирующим столиком и автофокусировкой;
- конфокальный блок;
- система освещения;
- система управления, визуализации, реконструкции объемного изображения и документирования.

Основная особенность КЛСМ состоит в возможности получения послойного изображения исследуемого объекта (например, клетки) с высоким разрешением и с низким уровнем шумов. Достигается это путем пошагового сканирования объекта сфокусированным пучком света от когерентного источника или столиком, использованием специфических флуоресцентных зондов и специальных методов ограничения световых потоков. Принцип работы КЛСМ иллюстрируется схемой, показанной на рис. 3, которая содержит все основные элементы оптической системы, обеспечивающей построение конфокального изображения, и является некоторым обобщением схем, представленных в работах [14, 15, 16].

Световой поток возбуждения 6 от лазерного источника поступает через светоделительную пластину 5, сканирующую систему 4 на объектив 3 и фокусируется в точку А плоскости исследуемого препарата (например, клетки), находящейся в фокусе. Полагаем, что внутриклеточные структуры связаны с флуоресцентными зондами и точку А фокусировки пучка можно рассматривать как точечный источник света, поток флуоресценции от которого через объектив 3, светоделительную пластину 5, объектив 7 фокусируется в плоскости игольчатой диафрагмы 9 ("pinhole") и регистрируется фотодетектором 11. Освещенность потоком возбуждения фрагментов препарата, лежащих вне фокуса объектива вдоль оптической оси (точки В и С), ниже, чем в точке А. Следовательно, составляющая освещенности мишени детектора от точек В и С может быть существенно уменьшена. Пото-

ки флуоресценции, исходящие от точек В и С, лежащих вне фокуса, как видно из рис. 3, ограничиваются точечной диафрагмой и на детектор не попадают, либо попадает их малая часть. Таким образом, при сканировании препарата в плоскости XU детектором регистрируется сигнал, уровень которого определяется расстоянием от плоскости сканирования вдоль координаты Z . Совмещение фокуса объектива 3 с плоскостью сканирования и фокуса объектива 7 с игольчатой диафрагмой отражено в термине "конфокальность". Пошаговое перемещение плоскости сканирования вдоль оси Z позволяет получить серию контрастных послойных изображений и реконструировать внутреннюю трехмерную структуру (3-D) исследуемого объекта. Качество изображения, разрешение в плоскости XU и вдоль оси Z зависит от качества оптики, качества сканирующих систем, размеров и точности изготовления точечной диафрагмы, жесткости конструкции, эффективности используемых алгоритмов обработки сигналов, специфичности флуоресцентных зондов.

3. ЭЛЕМЕНТЫ ТЕОРИИ КЛСМ

Латеральное разрешение

Разрешающая способность определяет предел различимости деталей изображения и поэтому является одной из главных характеристик микроскопа.

В обычном микроскопе и КЛСМ механизмы формирования изображения различны, и это различие косвенно находит выражение в значении разрешающей способности.

Оценивается разрешающая способность по характеру дифракционных явлений, возникающих при микроскопировании близко расположенных точечных светящихся объектов. Критерии ее оценки основаны на анализе функции рассеяния точки. До настоящего времени не удалось избежать субъективности в выборе критериев, и поэтому для количественного описания разрешения оптических приборов используются различные критерии — Рэлея, Спарроу, Дау, Шустера и т.д. Наиболее распространены в применении к микроскопии критерии Рэлея и Спарроу [16, 17, 18, 19, 20].

Критерий Рэлея предполагает, что разрешение микроскопа определяется расстоянием между двумя некогерентными источниками света, при котором максимум отклика на один источник освещения совпадает с первым нулем отклика на другой [16, 19]. Разрешение по Рэлею численно равно радиусу диска Эри и для обычного микроскопа равно:

$$d_s(R) = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad (1)$$

где $d_s(R)$ — разрешение по Рэлею для стандартного микроскопа, λ — длина волны источника света в нм, NA — числовая апертура.

Критерий Рэлея формулируется следующим образом: две точки различимы, если в картине распределения интенсивности в средней точке между ними имеется провал на 26.5 % от максимального значения.

Критерий Спарроу получен в предположении, что интенсивность посередине между двумя точками равна полной интенсивности одной точки или

$$\frac{d^2}{dx^2} I(x)_{x=0} = 0, \quad (2)$$

где $I(x)$ — некогерентная сумма двух индивидуальных функций рассеяния точек.

Разрешение по критерию Спарроу обычного микроскопа составляет

$$d_s(S) = \frac{0.51\lambda}{NA}, \quad (3)$$

где $d_s(S)$ — разрешение по критерию Спарроу для стандартного микроскопа.

Используется также критерий разрешения, определяемый шириной функции рассеяния одной светящейся точки на уровне 3 дБ:

$$d_s(3 \text{ дБ}) = \frac{0.51\lambda}{NA}. \quad (4)$$

Ограничившись этими критериями, приведем формулы для определения аналогичных критериев разрешения для КЛСМ:

По Рэлею [19],

$$d_c(R) = \frac{0.56\lambda}{NA}, \quad (5)$$

где $d_c(R)$ — разрешение по Рэлею для КЛСМ.

По Спарроу [19],

$$d_c(S) = \frac{0.51\lambda}{NA}, \quad (6)$$

где $d_c(S)$ — разрешение по Спарроу для КЛСМ.

Разрешение на уровне 3 дБ [19]:

$$d_c(3 \text{ дБ}) = \frac{0.37\lambda}{NA}, \quad (7)$$

где $d_c(3 \text{ дБ})$ — разрешение на уровне 3 дБ для КЛСМ.

Сопоставляя приведенные соотношения для некогерентных источников, получаем:

$$\begin{aligned}\frac{d_s(R)}{d_c(R)} &= \frac{0.61}{0.56} = 1.08, \\ \frac{d_s(S)}{d_c(S)} &= \frac{0.51}{0.51} = 1.0, \\ \frac{d_s(3 \text{ дБ})}{d_c(3 \text{ дБ})} &= \frac{0.51}{0.37} = 1.38.\end{aligned}\quad (8)$$

Использование в КЛСМ точечной диафрагмы, размеры которой согласованы с увеличением микроскопа и длиной волны, дает возможность повысить разрешение немногим более чем на 10 %.

Очевидно, что разрешение КЛСМ и соответственно возможности анализа тонких структур могут превышать аналогичные возможности обычного микроскопа не более чем на 40 % в условиях сканирования препарата тонким лучом.

Разрешающая способность КЛСМ зависит от способа микроскопирования и освещения. Однако основные соотношения в оценке разрешающей способности обычных микроскопов и КЛСМ, приведенные выше, остаются в силе. Следует отметить также, что разрешение КЛСМ определяется как оптической системой, так и электронным трактом обработки информации. Поэтому в конструкции КЛСМ, его схемах должны быть согласованы такие параметры, как разрешение оптической системы, шаг сканирования, характеристики детектора, а также выбраны оптимальные алгоритмы обработки и соответствующее программное обеспечение.

Осевое разрешение и послойное изображение

Главная особенность КЛСМ по сравнению с обычным микроскопом состоит в том, что при дефокусировке препарата изображения его фрагментов, лежащие выше и ниже фокальной плоскости вдоль оси Z , не попадают на детектор благодаря применению игольчатой диафрагмы. В обычном световом микроскопе при смещении плоскости препарата относительно фокальной плоскости детали изображения теряют резкость и яркость, вследствие чего изображение становится неясным и размытым. При необходимости микроскопирования объемного препарата элементы препарата, удаленные от фокальной плоскости, создают шум, на фоне которого выделение отдельных деталей затруднено, а во многих случаях невозможно.

Для оценки глубины резкости обычного микроскопа используют формулу:

$$T = \left(\frac{\lambda n}{2(NA)^2} + \frac{1000 n}{7NA \cdot M} \right), \quad (9)$$

где M — полное увеличение микроскопа, T — глубина резкости в мкм.

Второе слагаемое уравнения — геометрическая глубина резкого изображения — учитывает остроту зрения при просматривании изображения на фотографии или экране. Очевидно, что в зависимости от величины дефокусировки латеральное разрешение будет ухудшаться. В КЛСМ количественная оценка разрешающей способности по глубине определяет качество реконструкции трехмерного изображения и уровень искажений, связанных со снижением латерального разрешения по глубине.

В общем случае глубина резкости КЛСМ зависит от апертуры, длины волны, когерентности источников света и размеров игольчатой диафрагмы.

Получены соотношения для оценки глубины резкости, учитывающие различные способы микроскопирования КЛСМ. Исходные предпосылки при выводе приведенных ниже соотношений найдены из анализа распределения освещенности вдоль оптической оси.

Глубина фокуса КЛСМ с бесконечно малым отверстием игольчатой диафрагмы при отражении луча от плоских отражающих поверхностей по уровню 3 дБ составляет:

$$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{plane}} = \frac{0.45 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)}, \quad (10)$$

где θ_0 — половина угла фокусировки луча на линзе объектива.

Глубина резкости КЛСМ с бесконечно малым отверстием игольчатой диафрагмы при отражении луча от точечного отражателя по уровню 3 дБ:

$$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{point}} = \frac{0.62 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)}. \quad (11)$$

В том случае, если наблюдаемый объект можно рассматривать как множество точечных отражателей, расположенных в исследуемом объеме хаотично, целесообразно пользоваться критерием Спарроу [19], согласно которому

$$d_z(S) = \frac{0.89 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)}. \quad (12)$$

Глубина резкости КЛСМ с бесконечно малым отверстием игольчатой диафрагмы при освещении флуоресцирующих плоских поверхностей [19] составляет:

$$d_z^F(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\lambda_1=\lambda_2} = \frac{0.67 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)}, \quad (13)$$

где λ_1 и λ_2 — длины волн источника возбуждения и флуоресценции соответственно.

И наконец, глубина резкости КЛСМ с щелевой диафрагмой составляет для отражающего зеркала и флуоресцирующей плоскости [19]

$$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\text{щ}} = \frac{0.54 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)} \quad (14)$$

и

$$d_z^F(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\text{щ } \lambda_1=\lambda_2} = \frac{0.95 \lambda}{n(1 - \cos \theta_0)} \quad (15)$$

соответственно.

Численные значения глубины резкости КЛСМ приведены в табл. 2, в которой значения $d_z(3 \text{ дБ})$ найдены для апертуры $NA = 0.95$ в зависимости от длин волн источника освещения. Из табл. 2 следует, что оценка возможности секционирования объекта при микрокопировании КЛСМ в значительной степени зависит от формы, размера и внутренней структуры объекта. Приведенные характеристики разрешения по глубине КЛСМ получены без учета размеров отверстий игольчатой или щелевой диафрагмы.

Влияние на разрешение КЛСМ диаметра игольчатой диафрагмы

Игольчатая диафрагма (ИД) является основным элементом конструкции, отличающим КЛСМ от других типов микроскопов. Игольчатые диафрагмы предназначены для создания условий максимальной или полной фильтрации света, попадающего в плоскость формирования изображения от точек, не совпадающих с фокальной плоскостью или находящихся рядом с анализируемым элементом объекта в фокальной плоскости.

Выбор оптимального диаметра игольчатой диафрагмы важен для получения требуемых ха-

рактеристик прибора. Приведенные выше соотношения для оценки латерального разрешения и глубины резкости КЛСМ были получены в предположении, что игольчатая диафрагма имеет малое отверстие, являясь светящейся точкой. Реально размер игольчатой диафрагмы конечен, и от него зависят поперечное разрешение прибора, яркость освещенных элементов препарата, смещенных относительно фокальной плоскости по оси Z , и глубина резкости. При малых размерах диаметра игольчатой диафрагмы световой поток становится малым, что уменьшает отношение сигнал/шум и снижает контрастность. При больших диаметрах эффективность игольчатой диафрагмы снижается за счет уменьшения апертуры. Исследованию этого вопроса посвящен ряд работ [16, 19].

Оптимальное значение диаметра игольчатой диафрагмы получено из анализа осевого распределения интенсивности светового потока, исходящего от светящейся точки, расположенной в фокальной плоскости:

$$a_{(opt)} = \frac{0.25M \cdot \lambda}{NA}. \quad (16)$$

Показано [19], что глубина резкости КЛСМ зависит линейно от диаметра ИД и на уровне 3 дБ для плоских отражающих поверхностей может быть определена из формулы:

$$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{plane}} = \frac{\alpha \sqrt{2}}{M \cdot \sin \theta_0}. \quad (17)$$

Соотношения справедливы для КЛСМ с параксиальной оптикой и перемещением препарата сканирующим столиком.

В случае сканирования препарата лучом при использовании одной и той же игольчатой диафрагмы для прямого и отраженного лучей глубина резкости конфокального сканирующего микроскопа, работающего в реальном масштабе времени (КСМРВ), оценивается соотношением:

Табл. 2. Глубина резкости КЛСМ по различным способам микрокопирования

Длина волны λ , нм	$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}$, нм	$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{point}}$, нм	$d_z(S)$, нм	$d_z^F(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\lambda_1=\lambda_2}$, нм	$d_z(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\text{щ}}$, нм	$d_z^F(3 \text{ дБ})_{\text{plane}}^{\text{щ } \lambda_1=\lambda_2}$, нм
633	412	568	815	614	495	870
546	357	490	703	529	427	751
436	284	391	562	423	341	593
365	237	327	470	354	285	502
248	162	222.5	319	240	194	341

$$d_z(3\text{ дБ})_{\text{plane}} = \frac{7.4 \cdot a^2}{\lambda \cdot M^2}. \quad (18)$$

Таким образом, приняв, например, $\lambda = 546$ нм, объектив $100\times/NA=0.95$, получаем

$$a_{(\text{opt})} = 14.4 \text{ мкм.}$$

Для диафрагмы с диаметром отверстия 15 мкм имеем:

— глубина резкости КЛСМ составляет $d_z(3\text{ дБ})_{\text{plane}} \approx 0.225$ мкм;

— глубина резкости КСМРВ составляет $d_z(3\text{ дБ})_{\text{plane}} \approx 0.305$ мкм.

Как правило, в современных конфокальных микроскопах игольчатые диафрагмы размещены на вращающемся барабане и имеют размеры 2–8–10–20–40–100 мкм.

Выбор размера отверстия определяется скоростью сканирования, структурой объекта, апертурой и увеличением объектива, параметрами ФЭУ и рядом других факторов. Набор диафрагм установлен в поворотном диске. Выбор нужной диафрагмы осуществляется автоматически с помощью шагового двигателя. Поворотный диск устанавливается в измерительном модуле с возможностью юстировки по оси прибора и перпендикулярно ей.

Ориентировочно можно считать, что в КЛСМ глубина резкости приблизительно в 1.4–1.5 раза меньше, чем у обычного микроскопа, а латеральное разрешение в том же соотношении выше.

Следует отметить, что оценка разрешения КЛСМ и КСМРВ по уровню 3 дБ, заимствованная из акустической техники [18], не всегда является адекватной характеристикой системы, и в тех случаях, где это возможно, предпочтительней использовать критерии Рэлея или Спарроу.

Для биологических объектов особое значение приобретает использование конфокального принципа совместно с люминесцентными специфическими красителями — зондами, селективно связанными с отдельными клеточными органеллами и макромолекулами.

Это обстоятельство позволяет в плоскости изображения микроскопа наблюдать не картину, возникающую в результате наложения свечения от окрашенных деталей по всей толщине препарата (по всей клетке), а картину флуоресцирующих деталей в плоском сечении клетки.

Так как глубина резкости лежит в пределах величин от 0.162 до 0.414 мкм в зависимости от размеров отверстия игольчатой диафрагмы и апертуры объектива, то в этом диапазоне удастся получать послойное изображение объектов. Шаг по высоте может составить 50 мкм и более.

Следует отметить, что конфокальный путь — не единственная возможность получения тонких срезов образца. Достаточно напомнить, что аналогичные задачи решаются на макроуровне методами компьютерной томографии.

4. ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ — 3-D РЕКОНСТРУКЦИЯ

Трехмерная реконструкция исследуемых объектов методами конфокальной микроскопии направлена на решение двух задач:

- визуализации объемного изображения объекта, полученного путем "сборки" его оптических срезов;
- количественного анализа внутренних структур объекта.

Проблема 3-D реконструкции не является специфической проблемой конфокальной микроскопии. Методы 3-D реконструкции базируются на исследованиях, связанных с формированием и обработкой изображений в дифрактометрии, рентгеновской кристаллографии, рентгеновской томографии, электронной и акустической микроскопии, с секционированием объекта на промежуточных носителях и т.д.

Формированию изображений посвящена обширная литература (например, [21–26]), которая в значительной степени использована при создании теоретической базы конфокальной микроскопии. В КЛСМ элементарным объектом наблюдения является малый объем препарата в точке фокусировки падающего луча (voxel).

Реконструкция трехмерного изображения исследуемого объекта по результатам анализа его малых объемов в КЛСМ сопряжена с решением обратной задачи нахождения входного сигнала по импульсному отклику системы и с необходимостью устранения искажений, вносимых как оптическими, так и электрическими каналами передачи сигнала.

Эти искажения носят общий для электронно-оптических систем характер и вместе с тем отражают специфику различных методов конфокальной микроскопии (сканирование столиками и сканирование лучом, абберации оптической системы, способ микроскопирования и т.д.).

В рамках настоящего обзора нет необходимости, да и возможности приводить подробные сведения о реконструкции 3-D изображения применительно ко всем случаям использования КЛСМ. Значительная часть этих сведений содержится в литературе [27–29].

Задача реконструкции истинного изображения по экспериментальным результатам решается на основе методов регуляризации Тихонова и др. [30,

31]. Методы регуляризации применительно к проблемам конфокальной микроскопии были разработаны Бертеро и др. [32].

Общий же путь решения проблемы реконструкции 3-D изображения в конфокальной микроскопии освещен в работах Агарда [33], Хараока и др. [34] и состоит в следующем.

Наблюдаемое изображение объекта может быть представлено сверткой двух функций

$$i(x, y, z) = \iiint_{x' y' z'} \{O(x', y', z') \times \rho(x - x', y - y', z - z')\} dx' dy' dz', \quad (19)$$

где $i(x, y, z)$ — наблюдаемое изображение; $O(x', y', z')$ — объект, или истинное изображение; $\rho(x - x', y - y', z - z')$ — функция рассеяния точки; x, y, z , — координаты точки в плоскости препарата; x', y', z' — вспомогательные параметры интегрирования.

Или

$$i(x, y, z) = \rho(x, y, z) \otimes O(x, y, z).$$

В терминах Фурье-преобразования:

$$i(u, v, w) = \rho(u, v, w) \otimes O(u, v, w), \quad (20)$$

где u, v, w — переменные, сопряженные с координатами x, y, z , а $O(u, v, w)$ — оптическая передаточная функция (ОПФ). Для решения обратной задачи нахождения $i(x, y, z)$ необходимо знать трехмерную функцию рассеяния точки $O(x, y, z)$. В ряде работ приведена формула для аппроксимации двумерной ОПФ в зависимости от дефокусировки объектива $\rho_z(u, v)$.

Полная трехмерная ОПФ может быть найдена при помощи Фурье-преобразования:

$$\rho(u, v, w) = \int_z \rho(u, v) e^{i2\pi zw} dz. \quad (21)$$

При известной ОПФ для решения задачи 3-D реконструкции предложен ряд методов:

- аппроксимационные методы [30, 31],
- методы линейной фильтрации [35, 36],
- итеративные методы [33, 37], программы реализации которых составляют 10–20 % стоимости КЛСМ.

В случае некогерентного излучения точечных источников отраженного света (флуоресцирующий препарат) процедура свертки дифракционной картины с функцией рассеяния точки оптической системы значительно повышает разрешение. Это явление, характерное для КЛСМ, в литературе описано как сверхразрешение (super resolution)

[32], и его значение при высоких апертурах может достигать 4-кратного превышения по сравнению с разрешением микроскопа в обычных условиях.

5. СКАНИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Сканирующие системы КЛСМ принципиально не отличаются от аналогичных систем, применяемых в обычных сканирующих микроскопах. Однако высокое разрешение и необходимость сканирования по трем осям выдвигают жесткие требования к точности сканирования и быстродействию. Естественно также, что шаг сканирования в плоскости препарата и скорость сканирования должны быть согласованы с характеристиками детектора и учитывать особенности препарата. Эти обстоятельства послужили поводом для интенсивных исследований различных методов сканирования и сопоставления их достоинств и недостатков.

Наиболее существенное влияние на эксплуатационные характеристики и конструктивные особенности микроскопов оказывает способ перемещения луча, освещающего препарат, относительно препарата. По этому признаку все сканирующие системы подразделяются на системы сканирования лучом и системы сканирования столиком. При сканировании столиком достигается параксиальность оптической системы. Сканирование лучом, имея преимущество в скорости по сравнению со сканированием столиком, несколько уступает последнему в разрешении и уровне искажений, т.к. в первом случае неизбежно отклонение луча от главной оси оптической системы.

Большинство коммерческих конфокальных микроскопов оборудованы как системами сканирования лучом, так и сканирующими столиками. На рис. 4 приведена схема конфокального микроскопа РНОИБОС, оснащенного зеркальной сканирующей системой (на рисунке показан один канал сканирования). Поворот сканирующего зеркала относительно оси O обеспечивает перемещение светового пятна вдоль одной из осей в плоскости препарата.

Схема, показанная на рис. 5, иллюстрирует взаимное расположение сканирующих зеркал, при повороте которых относительно соответствующих осей достигается сканирование препарата в плоскости XY . Возможно перемещение светового пятна в плоскости препарата путем вращения зеркала относительно некоторого центра (так называемые однозеркальные сканирующие системы).

В зеркальных сканирующих устройствах управление положением зеркал в большинстве случаев осуществляется механизмами магнитоэлектрического (гальванометрического) действия, которые по конструктивному исполнению делятся на две группы [38]: рамочные (рис. 6, а) и петлевые (рис. 6, б).

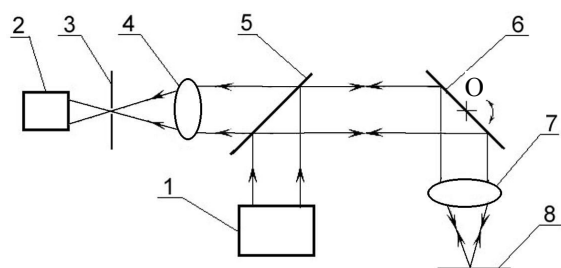


Рис. 4. Схема оптомеханического конфокального сканирующего лазерного микроскопа PNOIBOS. Показано только одно из сканирующих зеркал. 1 — аргонный лазер, 2 — фотоприемник, 3 — "игольчатая" диафрагма, 4 — окуляр приемника, 5 — светоделительная пластина, 6 — сканирующее зеркало, 7 — объектив, 8 — препарат

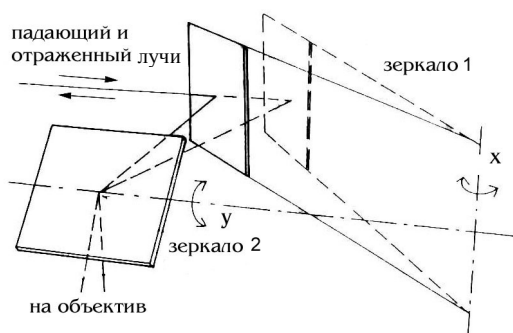


Рис. 5. Положение сканирующих зеркал, обеспечивающих перемещение луча в плоскости XY

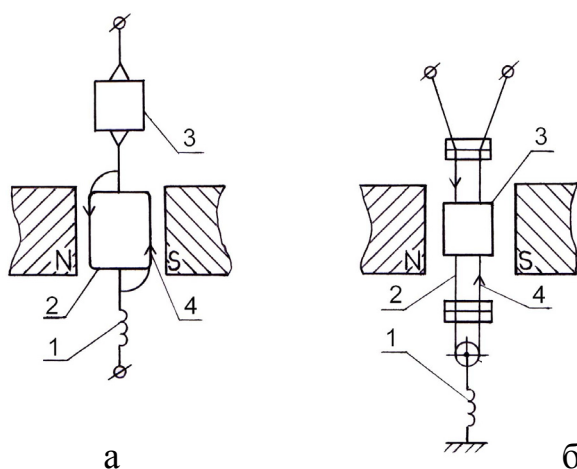


Рис. 6. Схема магнитоэлектрического принципа сканирования. 1 — возвращающая пружина; 2, 4 — токопроводящая рамка (а) или нить (б); 3 — сканирующее зеркало

В устройствах первой группы световой луч переводится на различные участки исследуемого объекта колеблющимся зеркалом 3, которое закреплено на токопроводящей рамке 2, находящейся в магнитном поле постоянного магнита. Угол поворота зеркала определяется направлением и величиной тока в рамке и упругостью пружины 1.

В устройствах второй группы зеркало 3 закреплено на струнах 2 из немагнитного сплава, образующих петлю, расположенную в поле постоянного магнита. При протекании через петлю тока создается вращающий момент, пропорциональный величине тока. Вращающий момент петли, как и в предыдущем случае, уравнивается моментом пружины 1, обеспечивая заданный угол поворота зеркала. Естественный недостаток таких систем состоит в сравнительно низком их быстродействии. Этот недостаток частично устранен в резонансных магнитоэлектрических системах, частота работы которых в КЛСМ обычно составляет 8 кГц и обеспечивает сканирование 30 кадров в секунду по 512×484 пиксела.

В ранних конструкциях сканирующих микроскопов использовались и другие способы управления положением зеркал (например, вращающиеся зеркальные барабаны).

Сканирование вращающимися дисками с отверстиями в непрозрачном экране осуществляется дисками Нипкова. Диски Нипкова в модифицированном варианте (рис. 7) нашли широкое применение в КЛСМ. На рис. 7 показана проекция луча 2 на диск 3. Диск имеет множество игольчатых диафрагм 1 такого диаметра, что их можно считать точечными источниками, засвечивающими исследуемый объект. На рис. 8 представлена картина хода лучей от двух игольчатых диафрагм 15 диска 7. Диск освещен лучом света 14 лазера 13. Игольчатые диафрагмы редуцируют этот луч в малые световые потоки возбуждения. Световые потоки люминисценции, пройдя через игольчатые диафрагмы, светоделительную пластину 8 и объектив 9, регистрируются приемником 10. Размещение игольчатых диафрагм на поверхности диска определяет закон сканирования. Использование диска Нипкова, вращающегося со скоростью 2400 об/мин дает возможность сканировать 640 кадров в секунду. Сканирующие системы с дисками Нипкова используются в конфокальных микроскопах реального времени. Их применение ограничено разрешением и вибрацией оптической системы микроскопа. Эти недостатки устранены в акустооптических дефлекторах.

В акустооптических дефлекторах под действием ультразвука изменяется плотность преломляющей среды, что в свою очередь приводит к пространственному изменению ее показателя преломления в результате упруго оптического эффекта. Рис. 9 иллюстрирует принцип работы акусто-

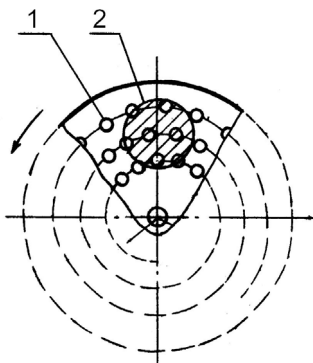


Рис. 7. Схема модифицированного диска Нипкова. 1 — "игольчатая" диафрагма, 2 — сечение пучка света от лазера.

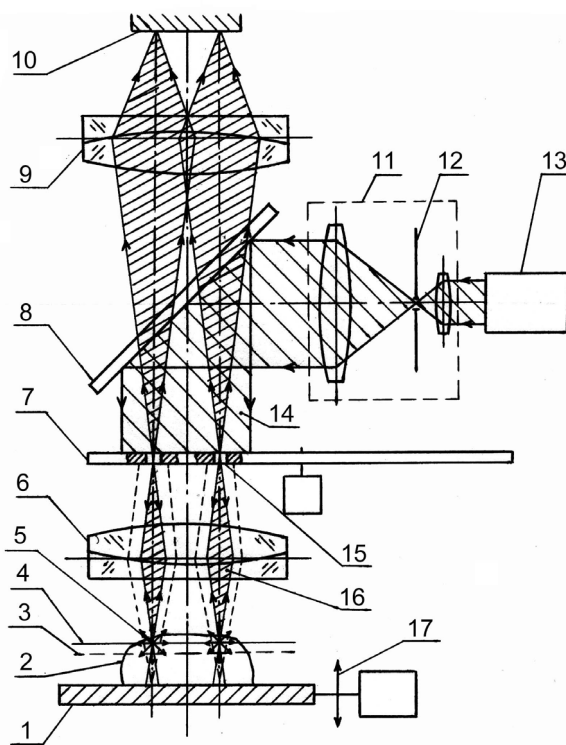


Рис. 8. Схема КЛСМ со сканирующим модифицированным диском Нипкова. 1 — сканирующий столик; 2 — исследуемый объект; 3 — плоскость среза В; 4 — плоскость среза А; 5 — флуоресцентное свечение частиц красителя; 6 — первый объектив; 7 — модифицированный диск Нипкова, сканирующий по плоскости ХУ; 8 — светоделительная пластина; 9 — второй объектив; 10 — приемник излучения; 11 — оптическая система преобразования лазерного пучка; 12 — игольчатая диафрагма; 13 — лазер; 14 — пучок света от лазера; 15 — "игольчатые" диафрагмы в диске; 16 — свет после игольчатой диафрагмы; 17 — сканирование столика по оси Z

оптического дефлектора. Луч света 3 от лазера через входное окно 4 попадает в ультразвуковую ячейку 2. Генерируемые генератором ультразвука 9 волны от излучателя 1 проходят через среду 8. Изменение показателя преломления среды под действием ультразвука приводит к изменению направления выходного луча 7 от первоначального направления на угол θ , причем

$$\theta = \arcsin\left(\frac{2\pi L \cdot \Delta n}{\lambda} \cdot \cos 2\pi f t\right), \quad (22)$$

где L — длина пути света в ячейке, λ и f — длина волны и частота ультразвука соответственно, Δn — максимальное изменение показателя преломления в ячейке под действием ультразвука.

На рис. 10 представлена схема КЛСМ с акустооптическим дефлектором. Луч от лазера 5, пройдя через оптическую систему преобразования лазерного луча 6, светоделительную пластину 8, попадает на двумерную акустооптическую ячейку 12 и далее через объектив 13 на исследуемую точку в плоскости фокусировки луча 2 в препарате 1. Поток флуоресцентного излучения, направляемый оптической системой микроскопа, поступает на приемник излучения 11. Несмотря на то что динамические показатели акустооптических дефлекторов высоки, их применение ограничено небольшим углом отклонения луча и сложностью оптической системы. Поэтому в большинстве КЛСМ применяются комбинированные системы сканирования, обеспечивающие оптимальное использование преимуществ различных способов.

Системы сканирования в КЛСМ можно классифицировать следующим образом.

А. Сканирование лучом.

— Зеркальные системы: однозеркальные [39], двухзеркальные, резонансные магнитоэлектрические [40].

— Световолоконные системы: одноволоконные [41], многоволоконные [42].

— Сканирование объективом:

- пьезоэлектрическое перемещение объектива по осям X , Y [43],
- пьезоэлектрическое перемещение объектива по оси Z [44].

— Акустооптические дефлекторы луча: два акустооптических дефлектора для сканирования по осям X и Y [45].

— Дисковые системы:

- односпиральные односторонние [46, 47, 48] и двухсторонние [49],
- многоспиральные односторонние [50] и двухсторонние [49].

— Комбинированные системы: акустооптический дефлектор по оси Y и сканирование зеркалом по оси X [51].

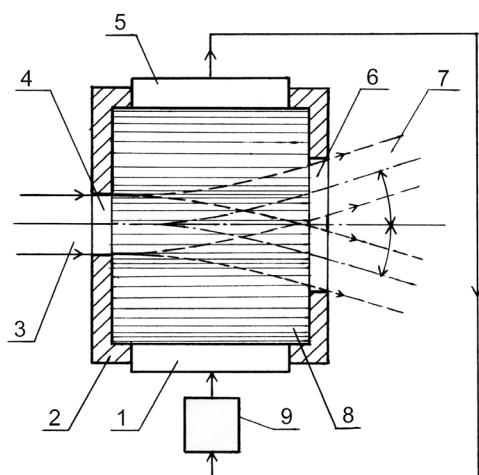


Рис. 9. Отклонение луча в акустооптическом дефлекторе. 1 — излучатель ультразвука, 2 — корпус жидкостной УЗ-ячейки, 3 — лазерный луч, 4 — входное окно, 5 — приемник ультразвука, 6 — выходное окно, 7 — отклоненный луч, 8 — среда УЗ-ячейки (спирт), 9 — генератор ультразвука

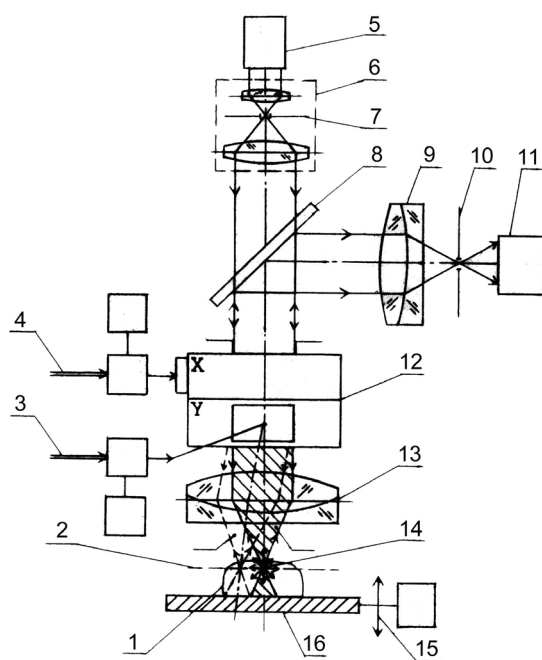


Рис. 10. Схема КЛСМ с акустооптическим дефлектором. 1 — исследуемый образец; 2 — плоскость среза на образце; 3, 4 — генераторы ультразвука по осям Y и X соответственно; 5 — лазер; 6 — оптическая система преобразования лазерного пучка; 7, 10 — игольчатые диафрагмы; 8 — светоделительная пластина; 9 — объектив; 11 — приемник излучения; 12 — двумерная акустооптическая ячейка (сканирование в плоскости XY); 13 — объектив; 14 — флуоресцентное свечение частиц красителя; 15 — сканирование по оси Z ; 16 — сканирующий столик

Б. Сканирование столиком.

— Шаговый привод: сканирующий столик с шаговыми двигателями по осям X , Y , Z [52, 53].
— Комбинированный привод: сканирующий столик с шаговым двигателем по осям X , Y и пьезоэлектрический привод по оси Z [52, 53].

Практически все КЛСМ оснащены сканирующими столиками, обеспечивающими поиск объекта наблюдения, позиционирование, фокусировку и сканирование в тех случаях, когда необходимо исследовать препарат с минимальными оптическими искажениями. В качестве приводов сканирующих столиков широко используются шаговые двигатели и пьезокерамические двигатели. Обычный режим шагового перемещения столика может быть охарактеризован шагом, величина которого лежит в диапазоне 0.1–1.0 мкм при частоте шагового двигателя 500 гц. Однако известны коммерческие сканирующие столики, величина шага у которых составляет 1.0 нм. Следует отметить, что в настоящее время сканирующие столики выпускаются в виде самостоятельных модулей универсального применения, которыми комплектуются различные типы микроскопов, в том числе и КЛСМ.

Перечисленные выше системы не охватывают всего разнообразия используемых методов сканирования. Развитие методов сканирования в КЛСМ продолжает совершенствоваться и в настоящее время.

Завершающая часть статьи, содержащая сведения об источниках освещения, флуоресцентных красителях и применении КЛСМ в биологии и медицине, будет опубликована в одном из следующих номеров журнала "Научное приборостроение".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. 3013467 США. Microscopy apparatus / Mynsky M. 19.12.57.
2. Minsky M. // Scanning. 1988. V. 10. P. 128–138.
3. Roberts F., Young J.Z. // Nature. 1951. V. 167. P. 231.
4. Roberts F., Young J.Z. // Proc. JEE. 1952. Pt IIIA. P. 747–757.
5. Davidovits P., Egger M.D. // Appl. Opt. 1971. V. 10. P. 1615–1619.
6. Davidovits P., Egger M.D. // Nature. 1969. V. 223. P. 831.
7. Brakenhoff G.J., Blom P., Barends P. // J. Microscopy. 1979. V. 117. P. 219–232.
8. Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J. et al. // J. Microscopy. 1990. V. 157. P. 3–20.
9. Petran M., Hadrawsky M., Egger M.D. et al. // J. Opt. Soc. Am. 1968. V. 58. P. 661–664.
10. Xiao G.A., Kino G.S. // Proc. 4th Int. Symp. Optical and Optoelectronic Applied Science and

- Engineering. The Hague, Netherlands. 1987. P. 87–88.
11. *Wilson T.* // J. Opt. Soc. Am. 1993. V. A10. P. 1535–1543.
 12. *Wilson T.* // Appl. Opt. 1991. V. 30. P. 2143–2150.
 13. *Dabbs T., Glass M.* // Appl. Opt. 1992. V. 31. P. 3030–3035.
 14. *Wilson T., Sheppard C.J.R.* Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. London: Academic Press, 1984. 213 p.
 15. Scanned Image Microscopy / Ed. E.A. Ash. London: Academic Press, 1980. 461 p.
 16. Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1990. 233 p.
 17. *Born M., Wolf E.* Principles of optics. Oxford, U.K.: Pergamon, 1997. 836 p.
 18. *Wilson T., Sheppard C.J.R.* Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. New York—London: Academic Press, 1984. 213 p.
 19. *Corle T.R.R., Kino G.S.* Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems. San Diego—London: Academic Press, 1996. 335 p.
 20. *Pluta M.* Advanced light microscopy, V. 1: Principles and basic properties. Warszawa: PWN-Polish Scientific Publishers, Amsterdam—Oxford—New York—Tokyo: Elsevier, 1988. 465 p.
 21. *Chisholm J.S.R.* Vectors in Three-Dimensional space. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978. 293 p.
 22. *Albert A.* Regression and the Moore-Penrose Pseudoinverse. New York: Academic Press, 1972. 180 p.
 23. *Gill P.E., Murray W., Wright M.H.* Practical Optimization. New York: Academic Press, 1981. 401 p.
 24. *Mascarenhas N.D.A., Pratt W.K.* // IEEE Trans. Circuits and Systems. 1975. V. 3, CAS-22. P. 252–266.
 25. *Pratt W.K., Davarian F.* // IEEE Trans. Computers. 1977. V. 6, C-26. P. 571–580.
 26. *Pratt W.K.* // IEEE Trans. Computers. 1972. V. 7, C-21. P. 636–641.
 27. *Wilson T.* // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 161–169.
 28. *Van der Voort H.T.M., Brakenhoff G.J., Janssen G.C.A.M. et al.* // Proc. Soc. Photo-Optical Instrument Eng. (SPIE). V. 809. P. 138–143.
 29. *Brakenhoff G.J., Van der Voort H.T.M., Van Spronsen E.A. et al.* // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 151–159.
 30. *Тихонов А.Н., Арсенин В.Я.* Методы решения некорректных задач. М.: Наука, 1974. 224 с.
 31. *Тихонов А.Н., Арсенин В.Я., Тимонов А.А.* Математические задачи компьютерной томографии. М.: Наука, 1987. 160 с.
 32. *Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J.* // J. Microscopy. 1990. V. 157. Pt 1. P. 3–20.
 33. *Agard D.A.* // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1984. V. 13. P. 191–219.
 34. *Hiraoka Y., Sedat J.W., Agard D.A.* // Biophys. J. 1990. V. 57. P. 325–333.
 35. Обработка изображений и цифровая фильтрация / Ред. Т. Хуанг. М.: Мир, 1979. 318 с.
 36. *Прэнтт У.* Цифровая обработка изображений. М.: Мир, 1982. В 2-х т. Т. 2. С. 312–792.
 37. *Fay F.S., Fogarty K.E.* Optical Methods in Cell Physiology / Eds P.E. Weer, B. Salszberg. New York etc.: Wiley, 1986. 480 p.
 38. *Ребрин Ю.К.* Управление оптическим лучом в пространстве. М.: Сов. радио, 1977. 336 с.
 39. *Masters B.R.* // Opt. Eng. 1995. V. 34. P. 684–692.
 40. *Tsien R.Y., Backsai B.J.* // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York: Plenum press, 1995. P. 267–279.
 41. *Kimura S., Wilson T.* // Appl. Opt. 1991. V. 30. P. 2143–2150.
 42. *Gmitro A.F., Aziz D.* // Opt. Lett. 1993. V. 18. P. 565–567.
 43. *Hanulton D.K., Wilson T.* // J. Phys. E.: Sci. Instrum. 1986. V. 19. P. 52–54.
 44. *Petroll W.M., James V.J., Cavanagh H.D.* // Scanning. 1994. V. 16. P. 131–149.
 45. *Tsien R.Y., Backsai B.J.* // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York: Plenum Press, 1995. P. 267–279.
 46. *Petran M., Hadravsky M., Eggar M.D. et al.* // J. Opt. Soc. Am. 1968. V. 58. P. 661–664.
 47. *Xiao G.Q., Corle T.R., Kino G.S.* // Applied Phys. Lett. 1988. V. 53. P. 716–718.
 48. Пат. 3936500 США / Fresch A., Korth H.E. 16.12.75.
 49. *Petran M., Boyde A., Hadravsky M.* // In Confocal microscopy / Ed. T. Wilson. New York: Academic Press, 1990. 448 p.
 50. *Petran M., Hadravsky M., Boyde A.* // Scanning. 1985. V. 7. P. 97–108.
 51. *Draijer A., Houpt P.M.* // SPIE. 1987. V. 809. P. 85–88.
 52. *Brakenhoff G.J.* // J. Microscopy. 1979. V. 117. P. 233–242.
 53. *Brakenhoff G.J., Van der Voort H.T.M., Van Spronsen E.A. et al.* // Ann. New York: Acad Sci., 1986. V. 483. P. 405–414.

Рекомендуемая литература по теме раздела 1

1. *Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J. et al.* Three-dimensional imaging restoration and super resolution in fluorescence confocal microscopy // J. Microscopy. 1990. V. 157. P. 3–20.

2. Box H.C., Freund H. Flying spot microscope adapted for quantitative measurements // *Rev. Sci. Instrum.* 1959. V. 30. P. 28–30.
3. Brakenhoff G.J. Imaging modes in confocal scanning light microscopes // *J. Microscopy.* 1979. V. 117. P. 232–242.
4. Brakenhoff G.J., Blom P., Barends P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses // *J. Microscopy.* 1979. V. 117. P. 219–232.
5. Carlsson K., Liljeborg A. PHOIBOC, a confocal laser microscope scanner for digital recording of optical serial sections // *Proc. Roy. Micr. Soc.* 1987. V. 22. P. 91.
6. Cox I.J. Scanning optical fluorescence microscopy // *J. Microscopy.* 1983. V. 133. P. 149–154.
7. Cox I.J., Sheppard C.J.R. Scanning optical microscope incorporating a digital frame store and microcomputer // *Appl. Opt.* 1983. V. 22. P. 1474–1478.
8. Dabbs T., Glass M. Fiber optic confocal microscope — FOCON // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 3030–3035.
9. Davidovits P., Egger M.D. Scanning laser microscope for biological investigations // *Appl. Opt.* 1971. V. 10. P. 1615–1619.
10. Davidovits P., Egger M.D. Scanning laser microscope // *Nature.* 1969. V. 223. P. 831.
11. Dixon A.J., Pang T.M. 3-D imaging applications of the Lasersharp CLSM // *Proc. Roy. Micr. Soc.* 1987. V. 22. P. 99.
12. Egger M.D., Petran M. New reflected light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells // *Science.* 1967. V. 157. P. 305–307.
13. König K., Simon U., Halbhauer K.J. 3-D Resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope // *Cellular and Molecular Biology.* 1996. V. 42, No 8. P. 1181–1194.
14. Petran M., Hadrawsky M., Benes J. et al. The tandem scanning reflected light microscope (Part. 1: The principle and its design) // *Proc. Roy. Micr. Soc.* 1985. V. 20. P. 125–129.
15. Petran M., Hadrawsky M., Egger M.D. et al. Tandem-scanning reflected light microscopy // *J. Opt. Soc. Am.* 1968. V. 58. P. 661–664.
16. Roberts F., Young J.Z. A flying spot microscope // *Nature.* 1951. V. 167. P. 231.
17. Roberts F., Young J.Z. The flying microscope // *Proc. JEE.* 1952. Pt IIIA. P. 747–757.
18. Scanned Image Microscopy / Ed. E.A. Ash. London: Academic Press. 1980. 461 p.
19. Sheppard C.J.R., Wilson T. Image formation in confocal scanning microscopes // *Optic.* 1980. V. 55. P. 331–342.
20. Sheppard C.J.R., Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscopy // *J. Microscopy.* 1981. V. 124. P. 107–117.
21. Suzuki T., Horikawa Y. Development of real time scanning laser microscope for biological use // *Appl. Opt.* 1986. V. 25. P. 4115–4121.
22. Wilson T. Image formation in two-mode fiber-based confocal microscopes // *J. Opt. Soc. Am.* 1993. V. A10. P. 1535–1543.
23. Wilson T., Hamilton D.K. Difference confocal scanning microscopy // *Optica Acta.* 1983. V. 31. P. 453–465.
24. Wilson T., Sheppard C.J.R. Theory and practice of scanning optical microscopy. London: Academic Press. 1983. 213 p.
25. Wilson T. Confocal scanning optical microscopes using single mode fiber for signal detection // *Appl. Opt.* 1991. V. 30. P. 2143–2150.
26. Пат. 3013467 СССР. Microscopy apparatus / Mynsky M. 19.12.57.

Рекомендуемая литература по теме раздела 2

1. Brakenhoff G.J. Imaging modes in confocal scanning light microscopes // *J. Microscopy.* 1979. V. 117. P. 232–242.
2. Brakenhoff G.J. Imaging modes in confocal scanning light microscopy (CLSM) // *Proc. JCO-11 Conference.* Madrid, Spain, 1978. P. 219–222.
3. Brakenhoff G.J. Imaging modes in confocal scanning light microscopy (CLSM) // *Proc. 1st Int. Conf. Confocal Microscopy.* Amsterdam, March 1989. P. 119–127.
4. Brakenhoff G.J., Blom P., Barends P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses // *J. Microscopy.* 1979. V. 117. P. 219–232.
5. Draaijer A., Houpt P.M. A standard video-rate confocal laser scanning reflection and fluorescence microscope // *Scanning.* 1988. V. 10. P. 139–145.
6. Goldstein S. A no-moving-parts video rate laser team scanning type 2 confocal reflected/transmission microscope // *J. Microscopy.* V. 153. P. RP1–RP2.
7. Hamilton D.K., Matthews H.J. The confocal interference microscope as a surface profilometer // *Optic.* 1985. V. 71. P. 31–34.
8. Hamilton D.K., Sheppard C.J.R. A confocal interference microscope // *Optica Acta.* 1982. V. 29. P. 1573–1577.
9. Hamilton D.K., Wilson T. Scanning optical microscopy by objective lens scanning // *J. Phys. E: Sci. Instrum.* 1986. V. 19. P. 52–54.

10. Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York, London: Plenum Press, 1990. 233 p.
11. *Minsky M.* Memoir on inventing the confocal scanning microscope // *Scanning*. 1988. V. 10. P. 128–138.
12. Scanned Image Microscopy / Ed. E.A. Ash. London: Academic Press, 1980. 461 p.
13. *Van der Voort H.T.M., Brakenhoff C.J., Valkenburg J.A. et al.* Design and use of a computer controlled confocal microscope for biological applications // *Scanning*. V. 7. P. 66–78.
14. *Wilson T.* Confocal light microscopy // *Ann. New York: Acad. Sci.*, 1986. V. 483. P. 416–427.
15. *Wilson T., Carlini A.R.* Three-dimensional imaging in confocal imaging systems with finite detectors // *J. Microscopy*. 1988. V. 149. P. 51–66.
16. *Wilson T., Hamilton D.K.* Dynamic focussing in the confocal scanning microscope // *J. Microscopy*. 1982. V. 128. P. 139–143.
17. *Wilson T., Sheppard C.J.R.* Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. London: Academic Press, 1984. 213 p.
18. *Wilson T.* Three-dimensional imaging in confocal systems // *J. Microscopy*. 1989. V. 153. P. 161–169.
19. *Xiao G.A., Kino G.S.* A real-time confocal scanning optical microscope // *Proc. 4th Int. Symp. "Optical and Optoelectronic Applied Science and Engineering"*. The Hague, Netherlands, 1987. P. 87–88.
7. *Kintner E.C., Sillitto R.M.* Two-point resolution criteria in partially coherent imagery // *Optica Acta*. 1973. V. 20. P. 721–728.
8. *Lewin R.* New horizons for light microscopy // *Science*. 1985. V. 230. P. 1258–1262.
9. Пат. 3013467 США. Microscopy apparatus / *Minsky M.* 19.12.57.
10. *Sirohi K.S., Bhatnagar G.S.* Effect of partial coherence on the resolution of a microscope // *Optica Acta*. 1970. V. 17. P. 839–842.
11. *Sheppard C.J.R.* Axial resolution of confocal fluorescence microscopy // *J. Microscopy*. 1989. V. 154. P. 237–241.
12. *Sheppard C.J.R.* Super-resolution in confocal imaging // *Optik*. 1988. V. 80. P. 53–54.
13. *Sheppard C.J.R., Wilson T.* Depth of field in the scanning microscope // *Optics Lett.* 1978. V. 3. P. 115–117.
14. *Sheppard C.J.R., Wilson T.* Image formation in scanning microscopes with partially coherent source and detector // *Optica Acta*. 1978. V. 25. P. 315–325.
15. *Som S.C.* Influence of partially coherent illumination and aberration on microscope resolution // *J. Opt. Soc. Am.* 1971. V. 61. P. 681.
16. *Som S.C.* Influence of partially coherent illumination and spherical aberration on microscope resolution // *Optica Acta*. 1971. V. 18. P. 597–608.
17. *Wilson T.* Imaging properties and applications of scanning optical microscopes // *Appl. Phys.* 1980. V. 22. P. 119–125.
18. *Wilson T., Carlini A.R.* The effect of aberrations on the axial response of confocal systems // *J. Microscopy*. 1989. V. 154. P. 243–256.
19. *Wilson T., Sheppard C.J.R.* Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. New York, London: Academic Press, 1984. 213 p.
20. *Xiao G.Q., Corle T.R., Kino G.S.* Real time confocal scanning optical microscope // *Applied Phys. Lett.* 1988. V. 53. P. 716–718.

Рекомендуемая литература по теме раздела 3

1. *Born M., Wolf E.* Principles of optics. Oxford, U.K.: Pergamon, 1997. 836 p.
2. *Brakenhoff G.J., Blom P., Barends P.* Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses // *J. Microscopy*. 1979. V. 117. P. 219–232.
3. *Corle T.R., Chou C.H., Kino G.S.* Depth response of confocal optical microscopes // *Optics Lett.* 1986. V. 11. P. 770–772.
4. *Cox I.J., Sheppard C.J.R., Wilson T.* Super-resolution by confocal fluorescence microscopy // *Optik*. 1982. V. 60. P. 391–396.
5. *Cremer Ch., Cremer Th.* Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field // *Microscopica Acta*. 1978. V. 81. P. 31–44.
6. *Hamillton D.K., Wilson T., Sheppard C.J.R.* Experimental observations of the depth-discrimination properties of scanning microscopes // *Optics Lett.* 1981. V. 6. P. 625–626.

Рекомендуемая литература по теме раздела 4

1. *Agard D.A.* Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1984. V. 13. P. 191–219.
2. *Albert A.* Regression and the Moore-Penrose Pseudoinverse. New York: Academic press, 1972. 180 p.
3. *Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J.* Three-dimensional image restoration and super-resolution in fluorescence confocal microscopy // *J. Microscopy*. 1990. V. 157. Pt 1. P. 3–20.
4. *Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A. et al.* Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning

- microscopy // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 151–159.
5. Chisholm J.S.R. Vectors in Three-Dimensional space. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978. 293 p.
6. Cox I.J., Sheppard C.J.R., Wilson T. Super-resolution by confocal fluorescence microscopy // Optik. 1982. V. 60. P. 391–396.
7. Fay F.S., Fogarty K.E. Analysis of molecular distribution in single cells using a digital imaging microscope // Optical Methods in Cell Physiology / Eds P.E. Weer, B. Salszberg. New York: Wiley, 1986. 480 p.
8. Gill P.E., Murray W., Wright M.H. Practical Optimization. New York: Academic press, 1981. 401 p.
9. Hiraoka Y., Sedat J.W., Agard D.A. // Biophys. J. 1990. V. 57. P. 325–333.
10. Mascarenhas N.D.A., Pratt W.K. Digital Image Restoration Under a Regression Model // IEEE Trans. Circuits and Systems. 1975. V. 3, CAS-22. P. 252–266.
11. Pratt W.K. Generalized Wiener Filter Computation techniques // IEEE Trans. Computers. 1972. V. 7, C-21. P. 636–641.
12. Pratt W.K., Davarian F. Fast Computational techniques for Pseudoinverse and Wiener Image Restoration // IEEE Trans. Computers. 1977. V. 6, C-26. P. 571–580.
13. Van der Voort H.T.M., Brakenhoff G.J., Janssen G.C.A.M. et al. Confocal scanning fluorescence and reflection microscopy: measurements of the 3-D image formation and application in biology // Proc. Soc. Photo-Optical Instrument Eng. (SPIE). 1987. V. 809. P. 138–143.
14. Wilson T. Three-dimensional imaging in confocal systems // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 161–169.
15. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. Методы решения некорректных задач. М.: Наука, 1974. 224 с.
16. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я., Тимонов А.А. Математические задачи компьютерной томографии. М.: Наука, 1987. 160 с.
- imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 151–159.
4. Carlsson K., Aslund N. Confocal imaging for 3-D digital microscopy // Appl. Opt. 1987. V. 26. P. 3232–3238.
5. Carlsson K., Liljeborg A. A confocal laser microscope scanner for the digital recording of optical serial sections // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. 171–180.
6. Goldstein S. A no-moving-parts video rate laser beam scanning type 2 confocal reflected/transmission microscope // J. Microscopy. 1989. V. 153. P. RP1–RP2.
7. Hamillton D.K., Wilson T. Scanning optical microscopy by objective lens scanning // J. Phys. E: Sci Instrum. 1986. V. 19. P. 52–54.
8. Horikawa Y., Yamamoto M., Dosaka S. Laser scanning microscope: differential phase images // J. Microscopy. 1987. V. 148. P. 1–10.
9. Lewin R. New horizons for light microscopy // Science. 1985. V. 230. P. 1258–1262.
10. Petran M., Hadrawsky M., Benes J. et al. The tandem scanning reflected light microscope (Part. 1: The principle and its design) // Proc. Roy. Micr. Soc. 1985. V. 20. P. 125–129.
11. Petran M., Hadrawsky M., Egger M.D. et al. Tandem-scanning reflected light microscopy // J. Opt. Soc. Am. 1968. V. 58. P. 661–664.
12. Sheppard C.J.R., Choudhury A. Image formation in the scanning microscope // Optica Acta. 1977. V. 24. P. 1051–1073.
13. Sheppard C.J.R. Scanning optical microscopy // Adv. Opt. Electron Microsc. 1987. V. 10. P. 1–98.
14. Sheppard C.J.R., Wilson T. Image formation in scanning microscopes with partially coherent source and detector // Optica Acta. 1978. V. 25. P. 315–325.
15. Sheppard C.J.R., Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscopy // J. Microscopy. 1981. V. 124. P. 107–117.
16. Shoemaker R.L., Bartels P.H., Hillman D.W. et al. An ultrafast laser scanner microscope for digital image analysis // JEE Trans. biomed. Eng. (BME). 1982. V. 29. P. 82–91.
17. Takamatsu T., Flujita S. Microscopic tomography by laser scanning microscopy and its three-dimensional reconstruction // J. Microscopy. 1988. V. 149. P. 167–174.
18. Van der Voort H.T.M., Brakenhoff G.J., Janssen G.C.A.M. et al. Confocal scanning fluorescence and reflection microscopy: measurements of the 3-D image formation and application in biology // Proc. Soc. Photo-Optical Instrument Eng. (SPIE). V. 809. P. 138–143.
19. Van der Voort H.T.M., Brakenhoff G.J., Valkenburg J.A.C. et al. Design and use of a computer controlled confocal microscope for

**Рекомендуемая литература
по теме раздела 5**

1. Awamura D., Ode T., Yonezawa M. Color laser microscope // Proc. Soc. Photo-Optical Instrument Eng. (SPIE). 1987. V. 765. P. 53–60.
2. Boyde A., Hadrawsky M., Petran M. et al. Tandem scanning reflected light microscopy: how it works and applications // Proc. 44th Ann. Meeting Electron microscop. Soc. Am. / Ed. G.W. Bayley. San Francisco: Press Inc., 1986. P. 84–87.
3. Brakenhoff G.J., Van der Voort H.T.M., Van Spronsen E.A. et al. Three-dimensional

- biological applications // Scanning. 1985. V. 7. P. 66–78.
20. Wilke V. Optical scanning microscopy — the laser scan microscope // Scanning. 1985. V. 7. P. 88–96.
21. Wilson T. Scanning optical microscopy // Scanning. 1985. V. 7. P. 79–87.
22. Xiao G.Q., Corle T.R., Kino G.S. Real time confocal scanning optical microscope // Applied Phys. Lett. 1988. V. 53. P. 716–718.
- Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино*

Материал поступил в редакцию 24.03.2001.

CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY: PRINCIPLES, ARRANGEMENT, APPLICATION (PART 1)

E. I. Lezhnev, I. I. Popova, S. V. Kuzmin, S. M. Slashchev

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

The paper illustrates the current state of confocal laser scanning microscopy (CLSM). The article includes historical information, the analysis of the principle of operation, some theoretical background, design features of confocal microscopes. The fairly detailed information on the application of CLSM in biology and medicine is given. The paper is presented in two parts. The first one is published in the present issue. The work is addressed to researchers, engineers, teachers, and students as an introduction to CLSM and as a guide in the related scientific literature.