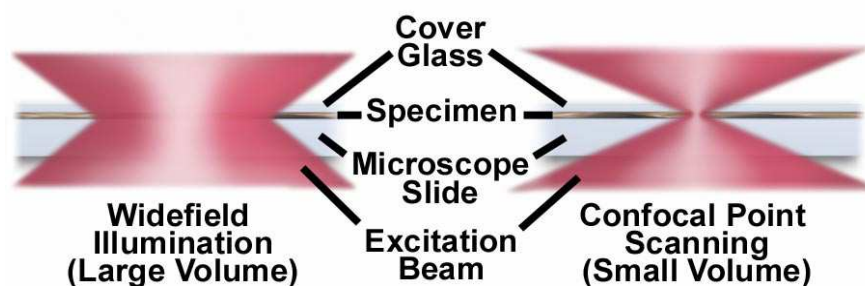


## 1.) Wstęp

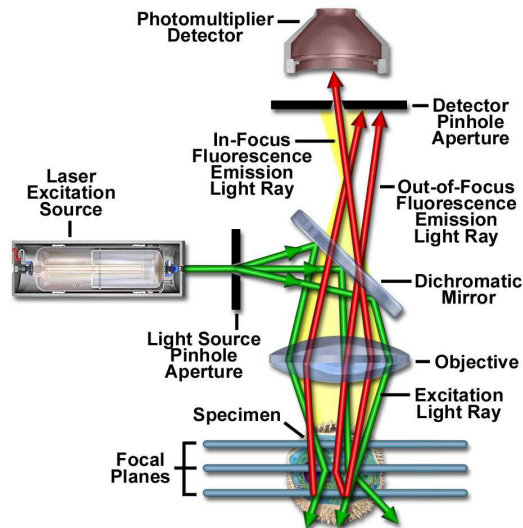
Lasery, konfokalny mikroskop laserowy stał się niezbędnym narzędziem w naukach biologicznych, biofizycznych, biomateriałowych i materiałowych. Nowoczesne mikroskopy są wyposażone w 3-5 systemów laserowych, kontrolowanych przez akustooptyczne filtry tunelujące, umożliwiające precyzyjną regulację długości fali i intensywności wzbudzonej. W połączeniu z fotopowielaczem, który posiada wysoką efektywność (sprawność) kwantową w bliskim ultrafiolecie, widzialnym i bliskiej podczerwieni regiony spektralne. Te mikroskopy umożliwiają analizę fluorescencyjną w zakresie 400 do 750 nanometrów.

Wielkość punktu konfokalnego jest determinowana budową mikroskopu, długością fali wiązki wzbudzającej, budową obiektywu, ustawieniem elementu skanującego, i próbką (Rys.



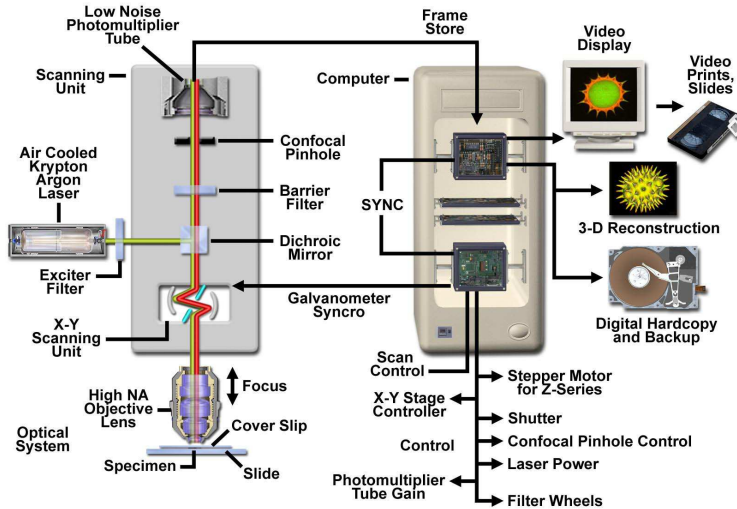
Rys. 1 Różnice pomiędzy szeroko polową i konfokalną mikroskopią

Koherentne światło laserowe (źródło wzbudzenia) przechodzi przez przesłone aperturową, ustawioną w płaszczyźnie konfokalnej z punktem skanującym na próbce oraz drugą przesłona aperturową umieszczoną na wejściu do detektora (Rys. 2). Promień laserowy jest odbijany od lustra dichroicznego i skanuje próbkę w zdefiniowanej płaszczyźnie ogniskowej. Wtórna fluorescencja, emitowana z punktów na próbce (w tej samej płaszczyźnie ogniskowej) przechodzi przez lustro dichroiczne i jest ogniskowana jako punkt konfokalny na przesłonie aperturowej detektora. Znacząca ilość fluorescencji z punktów poniżej i powyżej płaszczyzny ogniskowania nie jest konfokalna z przesłoną i formuje tzw dyski Airy.



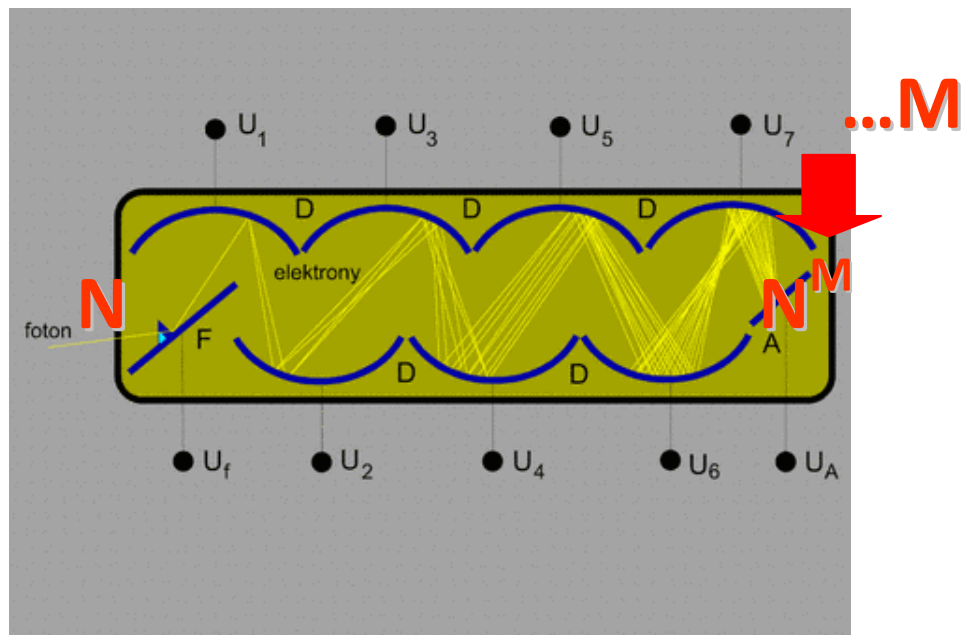
Rys. 2 Schemat budowy konfokalnego mikroskopu laserowego

Emisja fluorescencji jest zbierana przez obiektyw i powraca poprzez optyczny system konfokalny (Rys. 3). Prędkość zwierciadeł skanujących jest bardzo wolna, relatywnie do prędkości światła, dlatego emisja wtórna przechodzi drogę świetlną wzdłuż osi optycznej identycznej z oryginalną wiązką wzbudzającą.



Rys. 3 Schemat uzyskiwania obrazu

Układ detekcji- Fotopowielacz, detektor promieniowania elektromagnetycznego złożony z fotokatody, układu elektrod powielających dynody i anody (Rys. 4).



Rys. 4 Schemat fotopowielacza

Zasada działania jest oparta na zjawisku fotoelektrycznym. Elektron wybity przez foton z fotokatody dociera do pierwszej dynody i wybija z niej kolejne elektrony. Proces ten powtarzany jest na kolejnych dynodach, prowadząc do wzmocnienia sygnału o czynnik rzędu  $10^5 \div 10^9$  razy. Przy braku sygnału, na skutek fluktuacji, z fotopowielacza płynie mały prąd (tzw. prąd ciemny). Fotopowielacz zasilany jest wysokim napięciem, dzielonym pomiędzy kolejnymi elektrodami. Istnieje wiele rodzajów rozwiązań geometrii układu elektrod. Fotopowielacze charakteryzują się dużą szybkością przetwarzania sygnału (lepszą niż 10-9s)

Fotopowielacz jest urządzeniem, które zamienia strumień fotonów na impulsy elektryczne. Fotopowielacz składa się z fotokatody, z układu dynod oraz z anody. Dynody są wykonane z materiału o duży współczynniku wtórnej emisji elektronicznej  $N$  (musi być  $> 1$ ). Foton padając na fotokatodę wybija z niej elektron w wyniku zjawiska fotoelektrycznego. Elektron jest przyspieszany w kierunku pierwszej dynody wybijając z niej  $N$  elektronów.  $N$  elektronów jest przyspieszanych w kierunku drugiej dynody, gdzie każdy z  $N$  padających elektronów wybija  $N$  nowych elektronów. W sumie mamy więc  $N^2$  elektronów. Wybite elektrony są następnie przyspieszane do trzeciej dynody, itd. Po przejściu układu składającego się z  $M$  dynod uzyskamy impuls złożony z  $N^M$  elektronów.

Weźmy sobie prosty przykład. Typowe fotopowielacze mają 13 dynod. Załóżmy, że współczynnik wtórnej emisji elektronicznej dla pojedynczej dynody wynosi  $N=6$ . Przy takich założeniach jeden foton spowoduje powstanie impulsu złożonego z  $6^{13} \approx 10^{10}$  elektronów.

Wielkość impulsu (czy też prądu elektrycznego) zależy nie tylko od liczby fotonów padających na fotokatodę. Fotony o różnych długościach fali niosą ze sobą różną energię. Czułość fotokatody zależy od energii padającego fotonu. W rezultacie czułość fotopowielacza zależy od długości fali promieniowania padającego na fotokatodę. Należy o tym pamiętać

jeżeli chcemy porównywać ze sobą natężenia promieniowania z różnych części widma. Przykładowa zależność czułości fotopowielacza od długości fali jest pokazana poniżej.

Oprócz rzeczywistego sygnału w fotopowielaczu generowane są również szумы. Podstawowym szumem jest tzw. prąd ciemny. Prąd ciemny jest generowany przez elektrony emitowane z dynod i fotokatody w wyniku efektu termoelektrycznego. Najprostszym sposobem pozbycia się tego prądu jest schłodzenie fotopowielacza. Innym sposobem na eliminację prądu ciemnego jest modulacja sygnału wejściowego i rejestracja tylko tej części sygnału wyjściowego powielacza, która zmienia się z taką samą częstością jak sygnał modulujący wiązkę światła.

## 2.) Opis mikroskopu- parametry

### 2.1 Aparatura

Na Rys. 5 przedstawiono zdjęcie mikroskopu konfokalnego.



Rys. 5 Skaningowy, konfokalny mikroskop laserowy

- Modul konfokalny LSM 5 Exciter, dwa kanały, RGB
- Laser HeNe 633nm 5mW
- Laser HeNe 543nm 1mW
- Laser argon 458/488/514nm, 25mW
- Laser diodowy V 405nm
- Main Beam Splitter turret PASCAL
- Oprogramowanie ZEN 2008 LSM 5 EXCITER
- Dzielnik światła (405, 458, 488, 514, 543 nm)
- Filtr BP 505-530
- Filtr BP 505-600
- Filtr BP 530-600
- Filtr BP 560-615
- Filtr LP 420
- Filtr BP 420-480

- System ECU LSM 5 EXCITER
- Moduł DIC I/0,9 z polaryzatorem
- Detektor światła przechodzącego T-PMT LSM 710
- Wkładka grzewcza

## 2.2 Oprogramowanie

Główny program sterujący- ZEN 2008 (Rys. 6)



Rys. 6 Program sterujący

- Deconvolution ZEN 2008
- Pakiet Physiology ZEN 2008
- Pakiet Topography

Program obliczeniowy- AxioVision Rel. 4.8 (Rys. 7)



Rys. 7 Program obliczeniowy

- Pakiet oprogramowania AxioVision 4 Module AutoMeasure  
Generator makr wykonawczych dla pomiarów automatycznych. Generator wykonawczy:
    - Funkcje podstawowe obróbki obrazu - Całkowita lub lokalna segmentacja granic obiektów, progowanie przy pomocy histogramu
    - Automatyczna segmentacja obiektów oraz interaktywna obróbka masek pomiarowych
    - Pomiary geometryczne i densytometryczne pojedynczych obiektów. - Zaznaczanie obiektów mierzonych, przedstawianie wyników w płaszczyźnie obrazu.
    - Zapisywanie obrazów w formacie \*.CSV kompatybilnym dla plików Excell
- Wykonywanie programów pomiarowych: -
- Grupowanie procesów dla dowolnej liczby zdjęć.

- Aktywowanie i dezaktywowanie jak również zmiany parametrów  
mierzonych podczas wykonywania pomiarów.

- Pakiet oprogramowania AxioVision 4 Module AutoMeasure Plus. Segmentacja, binarna obróbka obrazu i pomiary automatyczne. Segmentacja: - Progowanie przy pomocy histogramu (manualne, automatyczne, dynamiczne)
  - Identyfikacja regionów zbieżnych - Detekcja krawędzi
  - Identyfikacja ciemnych linii na jasnym tle ("Valleys") Obróbka binarna: - Zmiany morfologiczne obiektów (erozja, dylatacja, "Open", "Close")
  - Uzupełnianie „dziur”, usuwanie obiektów binarnych; operacje logiczne (AND, OR, XOR, NOT)
  - Skeletonizacja obiektów wyseparowanych Pomiary automatyczne: - Pomiary geometryczne i densytometryczne