

МЕТОДЫ ПОДАВЛЕНИЯ СПЕКЛОВ ЛАЗЕРА ДЛЯ ВЫРАВНИВАНИЯ ОСВЕЩЕННОСТИ ПОЛЯ ЗРЕНИЯ МИКРОСКОПА В БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2015 г. В.Е. Барский, Ю.П. Лысов, Е.Е. Егоров, Д.А. Юрасов, Д.Д. Мамаев,
Р.А. Юрасов, А.В. Черепанов, А.В. Чудинов, О.В. Смолдовская,
А.С. Арефьева, А.Ю. Рубина, А.С. Заседателей

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: victorbarsky@gmail.com

Поступила в редакцию 07.07.15 г.

В результате проведенной работы по сравнению разных способов подавления спеклов было показано, что использование подавителя спеклов на основе жидких кристаллов приводит лишь к частичному ослаблению их выраженности. Более эффективным для количественной люминесцентной микроскопии оказывается применение механических устройств, размазывающих картину спеклов в поле зрения. Практически полное подавление спеклов достигается устройством, сочетающим кольцевой волоконно-оптический осветитель и вибратор, обеспечивающий перемещение торцов оптических волокон по отношению к лазерному диоду во время измерения. Приведен пример успешного подавления спеклов с помощью разработанного метода при микроскопическом анализе ячеек биочипа.

Ключевые слова: количественная люминесцентная микроскопия, когерентное излучение, подавление спеклов.

Многие десятилетия в люминесцентных микроскопах использовали мощные источники излучения, дающие свет в широком спектральном диапазоне от ближней ультрафиолетовой до инфракрасной области [1]. В основном для возбуждения люминесценции применяли дуговые лампы (ртутные, ртутно-ксеноновые, ксеноновые) или лампы накаливания. Главным недостатком этих источников освещения оказывался очень низкий процент энергии, используемой собственно для возбуждения люминесценции изучаемых объектов.

В настоящее время для возбуждения люминесценции в микроскопах, как правило, используют малогабаритные источники (лазерные диоды, светодиоды), излучающие свет в определенной спектральной области. К бесспорным достоинствам этих источников следует отнести практически мгновенное достижение полной мощности излучения при подаче питания, допускающее многократное включение–выключение. Это открывает дополнительные экспериментальные возможности, в частности, цейтраферную кино съемку люминесцирующих объектов, трудновыполнимую при использовании газоразрядных источников или ламп накаливания.

Светодиоды по сравнению с лазерными диодами дают более широкий спектр излучения,

и не являются точечными источниками света, следовательно они требуют более жесткого подхода к выбору используемой оптики и светофильтров. Лазерный диод излучает одну длину волны спектра в узком телесном угле, что облегчает выбор фокусирующей оптики и светофильтров.

Постоянное совершенствование лазерных диодов, промышленный выпуск все более мощных модификаций, излучающих в разных спектральных областях, дает основание предположить, что и в дальнейшем они будут широко использоваться для возбуждения люминесценции объектов, в том числе в люминесцентных микроскопах.

Особенностью лазерных диодов при использовании в микроскопах является когерентность излучения. Когерентный луч лазера при пространственном расширении пучка приводит к интерференции на облучаемом объекте, выражающейся в появлении так называемых спеклов – участков с большей или меньшей интенсивностью освещения [2,3].

Этот эффект затрудняет измерения интенсивностей свечения разных участков поля зрения люминесцентного микроскопа. Наличие спеклов снижает точность регистрации результатов анализов с помощью биологических микрочипов, на-

пример, с целью диагностики аллергии путем определения уровней специфических IgE (sIgE) в сыворотках крови пациентов на биологических микрочипах (биочипах) [4]. Ячейки таких биочипов содержат иммобилизованные белки аллергенов, а также антитела для построения калибровочной кривой («калибровочные» ячейки). Сигналы, полученные от «калибровочных» ячеек, используются в дальнейшем при пересчете люминесцентных сигналов от ячеек с иммобилизованными аллергенами для определения концентраций sIgE. Высокая выраженность спеклов приводит к ухудшению воспроизводимости регистрируемых сигналов от ячеек биочипа и, как следствие, нестабильности калибровочной кривой. В результате снижается воспроизводимость и точность определения уровней sIgE.

Для устранения неоднородности освещения поля зрения в люминесцентном микроскопе используют различные устройства, позволяющие ослабить влияние спеклов или фактически совсем избежать их. Простейшим способом борьбы со спеклами является сканирование поля зрения микроскопа узким лазерным пучком. Именно на этом принципе работают конфокальные микроскопы [5]. Недостатком такого подхода является существенное увеличение времени получения изображения объекта и разница во времени между получением изображения разных участков поля зрения микроскопа. При необходимости анализировать все участки поля зрения одновременно приходится применять другие подходы для борьбы со спеклами.

Одним из способов уменьшения выраженности спеклов является применение волоконно-оптических осветителей с различающейся длиной индивидуальных волокон [6]. Благодаря различию в длине пути лазерного луча в разных волокнах, свет на выходе из волокон имеет разную фазу. Изменение соотношения длин оптических волокон формирует на объекте разную степень выраженности спеклов [7,8].

Другим способом борьбы со спеклами является применение жидкокристаллических фильтров с постоянно изменяющейся структурой [9]. Свет, проходя через такую структуру, частично теряет когерентность, что приводит к уменьшению выраженности спеклов.

К способам подавления спеклов относятся также механические устройства, позволяющие во время анализа перемещать расфокусированный лазерный луч по объекту. В результате меняется освещенность разных участков поля зрения, что при соответствующей экспозиции обеспечивает понижение влияния спеклов.

Целью настоящей работы является сравнение разных методов подавления спеклов в лю-

минесцентном микроскопе, в котором в качестве источника возбуждающего излучения используется расходящийся когерентный пучок лазерного диода.

МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве объектов исследования использовали мелкозернистую фотопленку, окрашенную флуоресцирующим красителем (синтезированный аналог красителя Cy5), флуоресцирующее красное стекло (КС-11) толщиной 1 мм и трехмерные биологические микрочипы, содержащие в ячейках иммобилизованный иммуноглобулин, меченный красителем Cy5 [4].

Сравнение разных методов подавления спеклов проводили с применением широкопольного люминесцентного микроскопа. Возбуждение люминесценции объекта осуществляли при длине волны 650 нм, изображение получали в свете люминесценции при длинах волн 680–740 нм. Люминесценцию возбуждали падающим лазерным лучом под углом 45° к плоскости объекта, а также с помощью кольцевого волоконно-оптического осветителя. В качестве детектора люминесцентного изображения в обоих случаях применяли ПЗС-камеру.

Конструкция волоконно-оптического осветителя позволяет освещать объект с помощью нескольких лазерных диодов, излучающих в разных спектральных областях. Осветитель содержит несколько пучков волокон, так что каждому лазерному диоду соответствует один пучок волокон. Со стороны объекта пучки волокон разветвлены и каждая ветвь вставлена в кольцевую опору. Концы волокон от разных лазеров расположены по окружности кольцевой опоры с чередованием и направлены в сторону анализируемого объекта таким образом, что объект освещается с разных сторон.

На рис. 1 показано изображение поверхности окрашенной фотопленки при освещении через кольцевой волоконно-оптический осветитель. Отчетливо видна структура спеклов. Похожая структура наблюдается при освещении объекта падающим лазерным лучом (рис. 2а). В обоих случаях спеклы настолько сильно выражены, что маскируют структуру объекта (не видны дефекты поверхности окрашенной фотопленки). Высокая выраженность картины спеклов приводит к увеличению разброса результатов измерений интенсивности люминесценции участков поля зрения при повторных измерениях, что связано с меняющейся картиной спеклов при каждой установке объекта.

Наличие спеклов влияет на точность измерений интенсивности люминесценции разных уча-

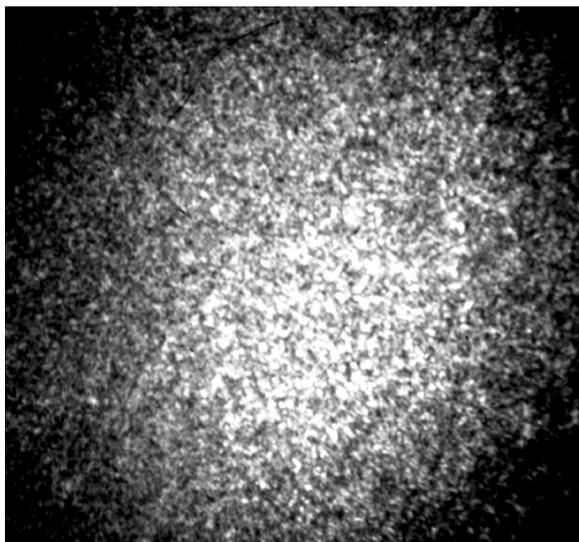


Рис. 1. Изображение люминесцирующей окрашенной фотопленки при кольцевом волоконно-оптическом осветителе. Спеклы скрывают изображение поверхности фотопленки.

стков поля зрения. При использовании стандартного кольцевого осветителя разброс при измерении одного и того же участка поля зрения как при измерениях люминесценции красного стекла, так и при измерениях свечения отдельных ячеек биологического микрочипа при повторной установке объекта в держатель составляет 6% вследствие меняющейся картины спеклов.

На рис. 2б показано изображение участка поверхности окрашенной фотопленки после включения коммерческого подавителя спеклов на основе жидкокристаллического фильтра. Этот подавитель уменьшает выраженность спеклов, однако структура фотопленки по-прежнему не видна.

Существенно более сильное подавление спеклов наблюдается при использовании механических устройств, перемещающих картину спеклов во время измерений. Одним из таких устройств является вращающееся зеркало, которое перемещает расфокусированный лазерный луч по объекту во время измерения, при этом вся картина спеклов описывает эллипсы. На рис. 2в показано изображение окрашенной фотопленки, полученное при выдержке 1000 мс и использовании зеркала, вращающегося со скоростью около 2000 об/мин. На изображении видны концентрические круги, получаемые при размазывании спеклов вращающимся зеркалом. Вместе с тем на этом изображении хорошо видна структура фотопленки, а разница в интенсивности люминесценции между более яркими и более темными участками изображения, вызванными размазанными спеклами, лежит в пределах $\pm 3\%$.

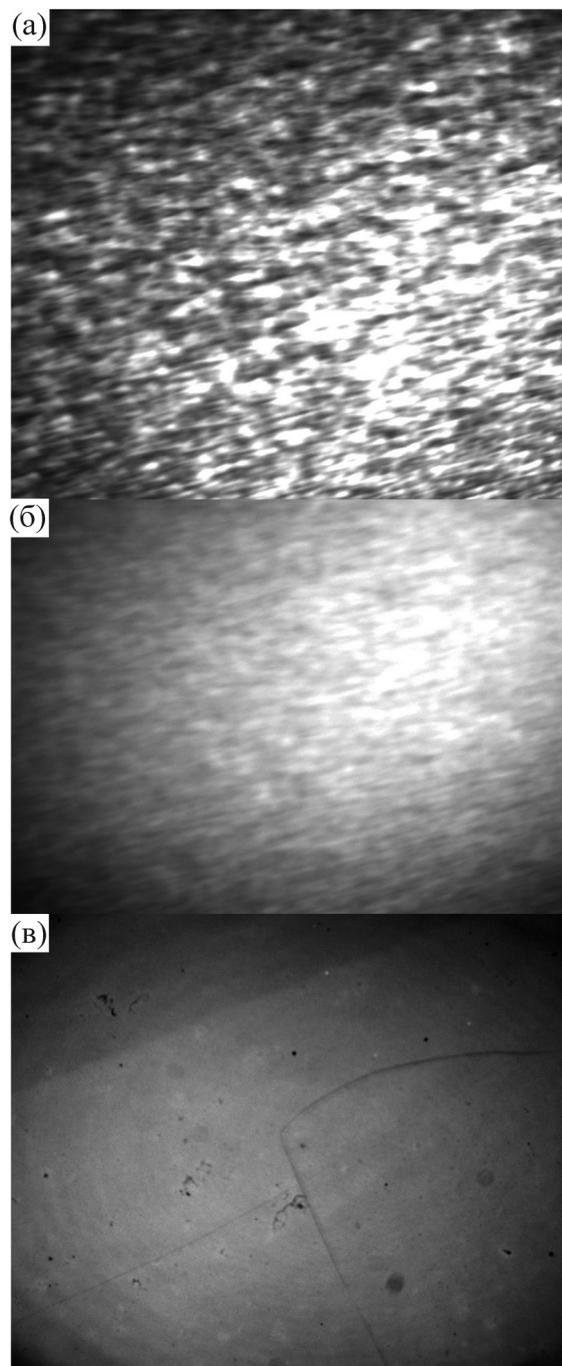


Рис. 2. Изображение люминесцирующей окрашенной фотопленки при освещении расширенным лазерным пучком, падающим под углом 45° к плоскости объекта. (а) – Исходное изображение; (б) – изображение при подавлении спеклов жидкокристаллическим подавителем; (в) – изображение при подавлении спеклов с помощью вращающегося зеркала. На (а) и (б) структура поверхности фотопленки не видна, на (в) – на фоне размытых спеклов (в виде эллипсов) видна структура поверхности фотопленки.

Более полного подавления спеклов можно добиться путем сочетания механического устрой-

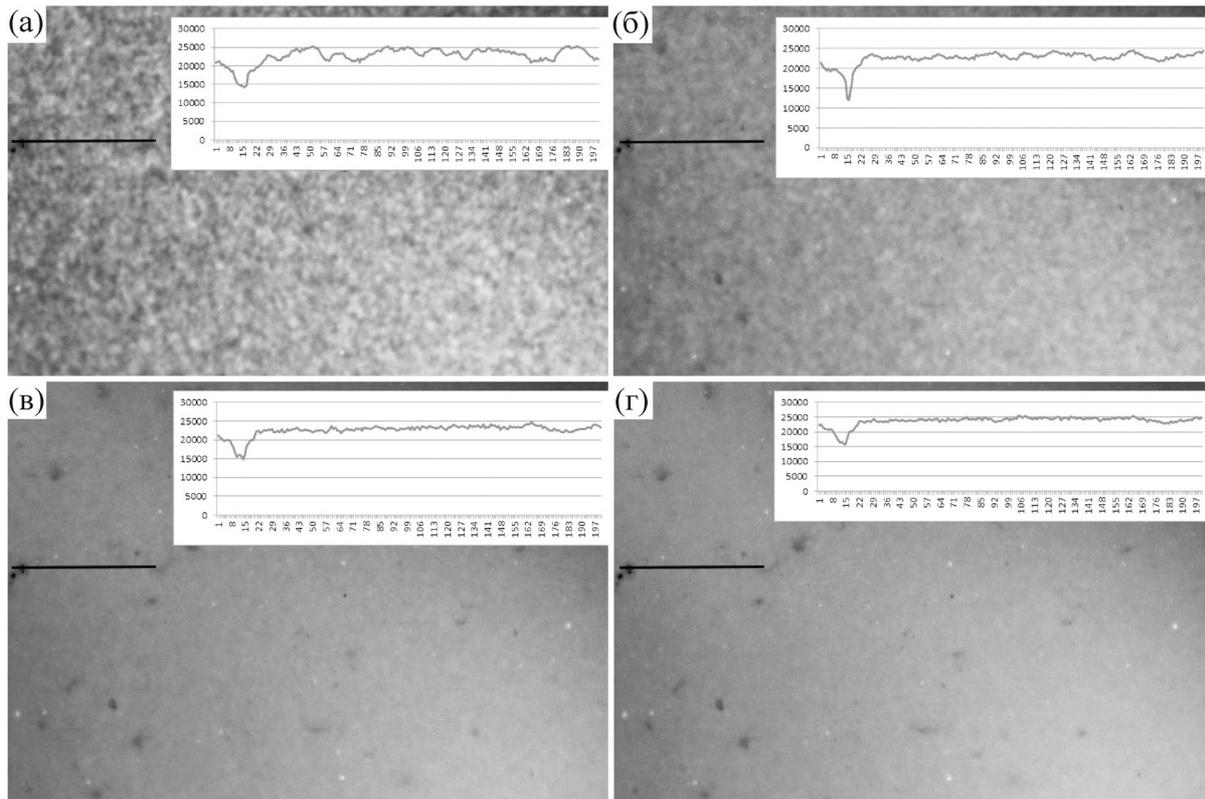


Рис. 3. Изображения окрашенной фотопленки в свете люминесценции. Результат «размазывания» спеклов сочетанием кольцевого волоконно-оптического осветителя и вибратора: (а) – вибратор выключен, (б) – напряжение 6 В (минимальная амплитуда перемещения), (в) – напряжение 8 В, (г) – напряжение 12 В (максимальная амплитуда перемещения). При увеличении амплитуды работы вибратора выраженность спеклов уменьшается и проявляется структура фотопленки. На вкладках показаны значения интенсивности сигналов участка фотопленки вдоль прямой.

ства, перемещающего картину спеклов, и кольцевого осветителя. В этом случае торцы волокон волоконно-оптического осветителя, направленные к лазерному диоду, перемещают с высокой частотой (мы использовали частоту 40 гц) во время получения изображения с помощью вибратора. В результате такого перемещения на конце пучка волокон, идущего к лазеру, возникает постоянно меняющаяся картина спеклов, а на объекте спеклы размазываются настолько сильно, что становятся все менее и менее заметны. На рис. 3а–г показано изображение одного и того же участка фотопленки при подаче на вибратор различного напряжения. По мере повышения напряжения, увеличивающего амплитуду перемещения волокон, идущих к лазеру, спеклы становятся все менее выраженными, а структура фотопленки видна четче. На вкладках в рисунках показана кривая изменения интенсивности люминесценции участка фотопленки вдоль прямой, ограниченной стрелками. Видно, что по мере уменьшения выраженности спеклов разброс величин сигналов становится меньше.

Влияние спеклов было нами также продемонстрировано при получении изображения биологических микрочипов, содержащих в ячейках меченый иммуноглобулин. На рис. 4а показано изображение, полученное на микроскопе с кольцевым осветителем, на рис. 4б – изображение того же биочипа, полученное при использовании подавителя спеклов, основанного на вибрации торца волоконно-оптического осветителя. Сравнение этих изображений демонстрирует эффективность подавления спеклов разработанным нами устройством.

Подавление спеклов механическим перемещением лазерного луча (зеркалом или вибрацией) обеспечивает воспроизводимость измерений при повторных установках объекта (красное стекло, окрашенная фотопленка, ячейки биочипа) в держателе в пределах $\pm 2\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные измерения показали, что картина спеклов, возникающая при освещении объ-

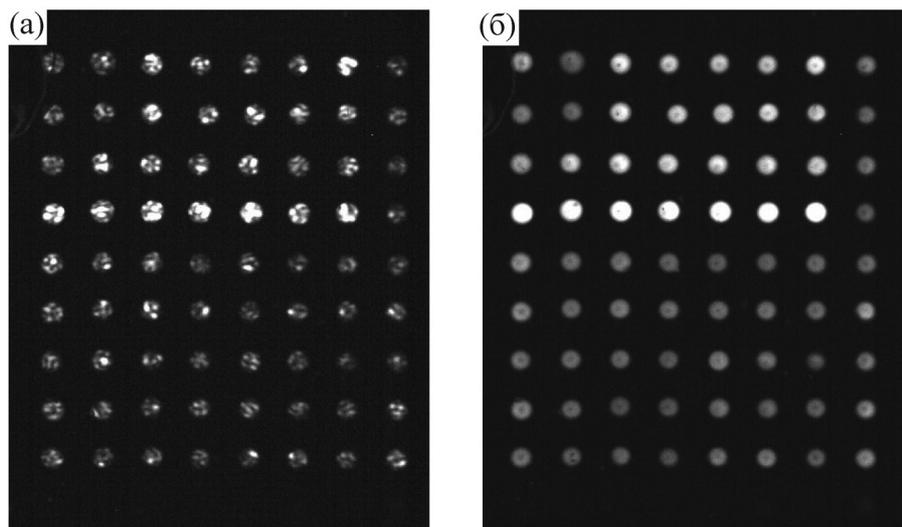


Рис. 4. Люминесцентное изображение биочипа: (а) – без подавления спеклов, (б) – подавление спеклов с помощью сочетания кольцевого волоконно-оптического осветителя и вибратора.

екта когерентным излучением лазерных диодов, может существенно исказить результаты измерений в люминесцентных микроскопах. Коммерческие подавители спеклов, в которых используются жидкие кристаллы, не приводят к полному подавлению спеклов. Более эффективными оказываются механические способы подавления спеклов на основе вращающегося зеркала или вибратора, которые размывают когерентное лазерное излучение во время измерения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Федин, *Микроскопы, принадлежности к ним и лупы*, под ред. Г. А. Иоффе (Оборонгиз, М., 1961).
2. М. Франсон, *Оптика спеклов*, пер. с франц. (М., 1980).
3. *Laser speckle and related phenomena*, Ed. by J. C. Dainty, 2 ed. (1984).
4. G. U. Feyzkhanova, M. A. Filippova., V. O. Talibov, et al., *J. Immunol. Methods* **406**, 51 (2014).
5. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. by J. B. Pawley (Plenum Press, New York, 1995).
6. D. S. Mehta, D. N. Naik, R. K. Singh, and M. Takeda, *Applied Optics* **51**, 1894 (2012).
7. T. Tsuji, T. Asakura, and H. Fujii, *Opt. Quant. Electron.* **16**, 197 (1984).
8. <http://www.optotune.com/products/laser-speckle-reducers>.

Methods for Reducing Laser Speckles to Achieve Even Illumination of the Microscope Field of View in Biophysical Studies

V.E. Barsky, Yu.P. Lysov, E.E. Yegorov, D.A. Yurasov, D.D. Mamaev, R.A. Yurasov, A.V. Cherepanov, A.V. Chudinov, O.V. Smoldovskaya, A.S. Arefieva, A.Yu. Rubina, and A.S. Zasedatelev

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The aim of this work was to compare different speckle reduction techniques. It was shown that the use of devices based on liquid crystals only leads to partial reduction of speckle contrast. In quantitative luminescent microscopy an application of the mechanical devices when a laser beam is spread within the field of view turned out to be more efficient. Laser speckle noise was virtually eliminated with the developed and manufactured mechanical device comprising a fiber optic ring light guide and the vibrator that permits movement of optical fiber ends towards the laser diode during measurements. The method developed for the analysis of microarrays was successfully applied to the problem of speckle reduction.

Key words: quantitative luminescent microscopy, coherent illumination, speckle reduction