

Міністерство освіти і науки України
Луцький національний технічний університет
Факультет робототехніки та штучного інтелекту
Кафедра автоматизації та безпілотних систем

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ЗА СТУПЕНЕМ ВИЩОЇ ОСВІТИ «БАКАЛАВР»

ЛАЗЕРНИЙ СКАНУЮЧИЙ КОНФОКАЛЬНИЙ МІКРОСКОП
ZEISS LSM 510

CARL ZEISS LASER SCANNING MICROSCOPE ZEISS LSM
510

спеціальність 153 Мікро- та наносистемна техніка
(шифр і назва спеціальності)

освітня програма «Мікро-та наносистемна техніка»
(назва освітньої програми)

Виконав: здобувач вищої освіти
групи МНТ-41
ПАЛІЙ Валентина Олексіївна

(підпис)

Керівник:
К.т.н., доцент
ПТАШЕНЧУК Віталій Віталійович

(підпис)

Кваліфікаційну роботу
допущено до захисту
«__» _____ 2026 р.
К.т.н., доцент
Гарант освітньої програми:
ПТАШЕНЧУК Віталій Віталійович

(підпис)

Луцьк – 2026 року

ЛУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет: комп'ютерних та інформаційних технологій

Кафедра: автоматизації та комп'ютерно-інтегрованих технологій

Ступінь вищої освіти: бакалавр

Галузь знань: 15 Автоматизація та приладобудування

Спеціальність: 153 Мікро- та наносистемна техніка

Освітня програма: «Мікро- та наносистемна техніка»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри КАБС

к.т.н., доцент Олександр ПОВСТЯНОЙ

«__» _____ 2026 р.

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ ВИЩОЇ ОСВІТИ

ПАЛІЙ Валентина Олексіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема кваліфікаційної роботи: лазерний скануючий конфокальний мікроскоп мікроскоп ZEISS LSM 510

Керівник роботи: к.т.н., доцент ПТАШЕНЧУК Віталій Віталійович

затверджені наказом закладу вищої освіти від «31» 12 2025 р. №307101-04

2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи «01» червня 2026 р.

3. Вихідні дані до роботи: споживана потужність комплексу, ВА – 2000 - 7000; напруга живлення, В (частота, Гц) – 115 - 230 (50/60); робочі довжини хвиль лазерів, нм – 458 - 633; максимальна роздільна здатність сканування, пікс. – 2048 × 2048; базова швидкість сканування, кадрів/с – 5; мінімальний крок фокусування по осі Z, нм – 50.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, що потрібно розробити):

Анотація. Вступ. 1. Загальнотехнічна частина. 2. Розрахунково-конструкторська частина. 3. Спеціальна частина. 4. Висновки. 5. Список використаних джерел.

5. Перелік графічного (ілюстративного) матеріалу:

1. Загальний вигляд мікроскопу (1 лист формату А1). 2. Структурна схема мікроскопу (1 лист формату А1). 3. Принципова оптична схема та принципова електрична схема (1 лист формату А1). 5. Складальне креслення вузла тубусного з'єднання (1 лист формату А1) 5. Деталювання (1 лист формату А1).

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1. Загально-технічна частина	ПТАШЕНЧУК В. В.		
Розділ 2. Розрахунково-конструкторська частина	ПТАШЕНЧУК В. В.		
Розділ 3. Спеціальна частина	ПТАШЕНЧУК В. В.		
Висновки	ПТАШЕНЧУК В. В.		
Нормоконтроль	ЛАПЧЕНКО Ю. С.		
Гарант ОП	ПТАШЕНЧУК В. В.		
Показник запозичень тексту	2,9 %		
Академічна доброчесність	ЛАПЧЕНКО Ю. С.		

7. Дата видачі завдання «17» січня 2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи бакалавра	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Обґрунтування теми	До 20.01.2026 р.	
2.	Огляд літератури із досліджуваної проблеми	До 25.01.2026 р.	
3.	Розділ 1. Загально-технічна частина	До 01.02.2026 р.	
4.	Розділ 2. Розрахунково-конструкторська частина	До 15.02.2026 р.	
5.	Розділ 3. Спеціальна частина	До 25.02.2026 р.	
6.	Висновки	До 01.03.2026 р.	
7.	Список літератури	До 10.03.2026 р.	
8.	Формування списку використаних джерел	До 20.03.2026 р.	
9.	Креслення загального вигляду мікроскопу ZEISS LSM 510	До 01.04.2026 р.	
10.	Креслення структурної схеми мікроскопу ZEISS LSM 510	До 10.04.2026 р.	
11.	Креслення оптичної та електричної схеми мікроскопу ZEISS LSM 510	До 20.04.2026 р.	
12.	Креслення вузла тубусного з'єднання	До 01.05.2026 р.	
13.	Креслення мікроскопу ZEISS LSM 510	До 05.05.2026 р.	
14.	Формування додатків (специфікацій)	До 15.05.2026 р.	
15.	Нормоконтроль	До 25.05.2026 р.	
16.	Інструментальна перевірка на академічний плагіат	До 01.06.2026 р.	
17.	Представлення кваліфікаційної роботи бакалавра до захисту	До 05.06.2026 р.	

Здобувач вищої освіти

(підпис)(ПАЛІЙ В. О.)
(прізвище, ініціали)

Керівник кваліфікаційної роботи

(підпис)(ПТАШЕНЧУК В. В.)
(прізвище, ініціали)

АНОТАЦІЯ

Палій Валентина Олексіївна. Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Zeiss LSM 510. Рукопис.

Кваліфікаційна робота бакалавра ОП «Мікро- та наносистемна техніка» спеціальності 153 Мікро- та наносистемна техніка. Луцький національний технічний університет. Луцьк, 2026.

Кваліфікаційна робота бакалавра складається з вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел.

У роботі розглянуто конструкцію, принцип роботи та основні технічні характеристики лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510. Проведено аналіз існуючих аналогів, описано фізичні явища, покладені в основу функціонування приладу. Подано оптичну схему мікроскопа та складальне креслення тубусного спряження перископа зі сканувальною головкою. Наведено опис основних вузлів мікроскопа, розглянуто блок-схему приладу та алгоритм попиксельної реєстрації даних.

У роботі виконано розрахунок оптичної роздільної здатності та товщини конфокального зрізу. Описано методику підготовки мікроскопа до роботи. У спеціальному розділі подано відомості щодо технічного обслуговування, можливих експлуатаційних несправностей та методів проведення вимірювань за допомогою програмного забезпечення.

Ключові слова: мікроскоп, Zeiss LSM 510, конфокальна мікроскопія, лазерне сканування, роздільна здатність, пінхол, флуоресценція, оптичний зріз, детектор, безпека.

					ВР 241.00.00.000 ПЗ							
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп мікроскоп ZEISS LSM 510			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив	Палій											
Перевірив	Пташенчук									4	60	
								ЛНТУ, каф. автоматизації та безпілотних систем, МНТ-41				
Н. Контр	Лапченко											
Затв.	Гуменюк											

ANNOTATION

Paliy Valentyna Oleksiivna. Laser scanning confocal microscope Zeiss LSM 510. Manuscript.

Bachelor's Qualification Work, Educational Program "Micro- and Nanosystem Technology" Specialty 153 Micro- and Nanosystem Technology. Lutsk National Technical University. Lutsk, 2026.

The bachelor's thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions, and a list of references.

The thesis considers the design, operating principle, and main technical characteristics of the Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope. An analysis of existing analogues is carried out, and the physical phenomena underlying the operation of the device are described. The optical diagram of the microscope and the assembly drawing of the tube connection between the periscope and the scan head are presented. The main components of the microscope are described; the block diagram of the device and the algorithm for pixel-by-pixel data registration are considered.

The paper calculates the optical resolution and confocal slice thickness relevant to the operation of the Zeiss LSM 510 microscope. The method of preparing the microscope for operation is described. A special section provides information on maintenance, possible operational malfunctions, and methods of taking measurements using the software. The occupational safety section analyzes the risks associated with the operation of the device, in particular the impact of laser radiation, and proposes appropriate safety measures.

Keywords: microscope, Zeiss LSM 510, confocal microscopy, laser scanning, resolution, pinhole, fluorescence, optical slice, detector, safety.

					BP 241.00.00.000 ПЗ	Лист
						4
Зм	Лист	№ докум.	підпис	дата		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНО-ТЕХНІЧНА ЧАСТИНА.....	9
1.1 Технічні характеристики та службове призначення мікроскопа ZEISS LSM 510.....	9
1.2 Аналіз існуючих аналогів мікроскопа ZEISS LSM 510	14
1.3 Функціональні особливості та фізичні перетворення, які покладено в основу роботи мікроскопа ZEISS LSM 510.....	21
РОЗДІЛ 2 РОЗРАХУНКОВО-КОНСТРУКТОРСЬКА ЧАСТИНА.....	26
2.1 Конструкція лазерного скануючого конфокального мікроскопу мікроскопа ZEISS LSM 510.....	26
2.2 Опис функціональних, структурних, електричних та складальних схем окремих вузлів мікроскопа ZEISS LSM 510.....	31
2.3 Розрахунково-параметричний аналіз оптичної роздільної здатності та товщини конфокального зрізу мікроскопа ZEISS LSM 510.....	41
РОЗДІЛ 3 СПЕЦІАЛЬНА ЧАСТИНА. ЕКСПЛУАТАЦІЯ ТА ВИМІРЮВАННЯ	46
3.1 Технічне обслуговування та забезпечення конструктивної безпеки мікроскопа ZEISS LSM 510.....	46
3.2 Несправності під час роботи з приладом та алгоритми їх усунення.....	49
3.3 Процедура проведення вимірювань та програмне керування мікроскопом ZEISS LSM 510.....	52
ВИСНОВКИ.....	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	57
ДОДАТКИ	58

ВСТУП

Лазерний скануючий мікроскоп ZEISS LSM 510 є надзвичайно важливим приладом у галузі сучасної мікроскопії, біології, медицини та матеріалознавства, який надає користувачам безпрецедентну можливість отримувати зображення з дуже високою роздільною здатністю та контрастністю. На відміну від традиційної світлової мікроскопії, де зразок освітлюється рівномірно і часто страждає від розмиття через світло поза фокусом, принцип лазерної скануючої мікроскопії базується на фокусуванні точкового джерела світла (лазера) через об'єктив з високою числовою апертурою на певній площині об'єкта. Завдяки цьому прилад має здатність досліджувати внутрішню структуру зразків на мікро- та нанорівні у трьох вимірах, що робить його незамінним для вивчення найсучасніших матеріалів та складних біологічних систем.

Головною перевагою мікроскопа ZEISS LSM 510 є використання конфокальної діафрагми (пінхола) в оптичній схемі. Фокус всередині зразка та пінхол розташовані в оптично спряжених точках, що гарантує відсікання небажаного розсіяного світла або флуоресценції з ділянок, які знаходяться поза фокусом. Чим менший отвір пінхола, тим менше розсіяного світла потрапляє на детектор, що дозволяє генерувати зображення практично без розмиття. Ця особливість дозволяє дослідникам створювати покрокові серії зображень (Z-стеки) та формувати точні тривимірні реконструкції об'єктів.

Окрім класичної конфокальної мікроскопії, система ZEISS LSM 510 підтримує технологію багатофотонної лазерної скануючої мікроскопії (Multiphoton Laser Scanning Microscopy – MPLSM) із використанням нелінійної оптики (NLO). У цьому режимі флуоресценції молекули збуджуються шляхом одночасного поглинання двох або більше фотонів ближнього інфрачервоного діапазону (NIR). Багатофотонне збудження відбувається виключно у фокальній площині, що зменшує фотопошкодження зразка поза фокусом і дозволяє отримувати зображення глибоких шарів

тканини з високим співвідношенням сигналу і шуму. Ці передові можливості роблять мікроскоп ідеальним для вітального (прижиттєвого) дослідження клітин.

Об'єктом дослідження кваліфікаційної роботи виступає лазерний скануючий мікроскоп ZEISS LSM 510.

Предметом дослідження виступають оптичні характеристики, функціональні параметри мікроскопа ZEISS LSM 510, принципи побудови його конфокального та багатофотонного оптичного тракту, а також фізичні процеси (такі як флуоресценція, нелінійне збудження та дисперсія), що впливають на якість отриманого зображення.

Мета дослідження – розроблення комплексного огляду оптичних та метрологічних характеристик лазерного скануючого мікроскопа ZEISS LSM 510, вивчення особливостей його апаратної конструкції, фізичних принципів роботи ключових вузлів, проведення інженерних розрахунків та аналіз умов безпечної експлуатації приладу.

Для досягнення цієї мети потрібно виконати такі завдання:

- описати службове призначення та основні технічні характеристики мікроскопа ZEISS LSM 510;
- провести огляд аналогічних моделей конфокальних мікроскопів на ринку та здійснити їх порівняльний аналіз;
- дослідити функціональні особливості та фізичні процеси, що відбуваються під час роботи мікроскопа, включаючи конфокальний принцип та багатофотонне збудження;
- дослідити конструкцію мікроскопа, розробити та описати структурні і оптичні схеми проходження лазерного променя;
- провести інженерний розрахунок параметрів для окремого оптичного або лазерного елемента системи ZEISS LSM 510;
- ознайомитися з методикою технічного обслуговування, основними несправностями під час роботи приладу та вивчити алгоритм проведення вимірювань.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНО-ТЕХНІЧНА ЧАСТИНА

1.1 Технічні характеристики та службове призначення мікроскопа ZEISS LSM 510

Лазерний скануючий мікроскоп ZEISS LSM 510 (рис. 1.1) є високоточним оптико-електронним приладом дослідницького класу, призначеним для одержання тривимірних зображень мікро- та наноструктур біологічних об'єктів і твердотільних зразків із надвисокою роздільною здатністю та контрастністю. На відміну від класичної широкопольної мікроскопії, у конфокальній системі реалізовано пооб'єктне растрове сканування сфокусованим лазерним пучком, що дозволяє виключити вплив світлового випромінювання з ділянок зразка, розташованих поза площиною фокусу.



Рисунок 1.1 – Зовнішній вигляд лазерного скануючого мікроскопу ZEISS LSM 510 [1]

Основне службове призначення системи включає:

					ВР 241.00.00.000 ПЗ	Лист
Зм	Лист	№ докум.	підпис	дата		9

– високороздільна багатоканальна флуоресцентна мікроскопія: реєстрація слабких сигналів флуоресценції від специфічних барвників (флуорохромів) або автофлуоресценції матеріалів із чітким просторовим розділенням;

– конфокальна мікроскопія відбитого світла (Confocal Reflection Microscopy): дослідження топографії поверхонь, дефектів напівпровідникових структур, мікросхем та наноматеріалів за рахунок реєстрації відбитого лазерного випромінювання;

– конфокальний аналіз у прохідному світлі (Transmitted-light LSM): отримання конфокальних та дифракційно-контрастних (DIC) зображень у поєднанні з флуоресцентними каналами для комплексного вивчення морфології прозорих та напівпрозорих об'єктів;

– оптичне мікротомірування (Z-scanning): бездеструкційне покрокове сканування зразка за глибиною для створення стеків двовимірних зображень (Z-stacks);

– тривимірний аналіз та кількісна інспекція: вимірювання лінійних розмірів, площ поверхонь та об'ємів елементів нано- і мікроструктур на основі математичної реконструкції оптичних зрізів;

– багатофотонна мікроскопія (режим NLO): глибоке сканування живих тканин за допомогою ультракоротких інфрачервоних імпульсів, що забезпечує мінімальну фототоксичність та підвищене співвідношення сигнал/шум.

Базова конфігурація ZEISS LSM 510 поєднує передові оптичні компоненти Infinity Color-Corrected System (ICS) із цифровими керуючими модулями та прецизійною механікою.

Нижче наведено детальні технічні параметри основних підсистем мікроскопа відповідно до офіційної документації виробника.

1.1.1 Оптико-механічні параметри скануючого модуля

1. Тип скануючого пристрою: компактний скануючий модуль (Scan head), що жорстко інтегрується безпосередньо з оптичним портом мікроскопа за допомогою спеціального інтерфейсу безпеки.

2. Конструкція сканера: двотраєкторна оптична система, що містить 2 незалежно керовані гальванометричні дзеркальні сканери. Керування дзеркалами здійснюється за допомогою спеціального цифрового сигнального процесора (DSP) або електронного модуля реального часу.

3. Швидкість сканування: максимальна частота кадрів становить приблизно 5 кадрів на секунду за умов роздільної здатності поля 512×512 пікселів. Використання двоспрямованого (bi-directional) режиму сканування дозволяє подвоїти швидкість захоплення кадрів та мінімізувати часовий зсув при реєстрації динамічних процесів.

4. Роздільна здатність сканування: розмір скануючого поля вільно налаштовується програмним забезпеченням користувача в діапазоні від мінімального 4×1 піксель до максимального значення 2048×2048 пікселів індивідуально для кожної координатної осі.

5. Оптичний зум (Zoom): функція безперервного (плавного) масштабування зображення у діапазоні від 1 до 40 мм^2 , яка реалізується шляхом автоматичної зміни кута відхилення скануючих дзеркал без механічного переміщення елементів.

6. Поле зору (Field of view): максимальна лінійна область сканування на зразку становить $10 \times 10 \text{ мм}^2$ за умови застосування низькоапертурного об'єктива зі збільшенням $1,25 \times$.

7. Ротація поля сканування: електронна система забезпечує повний кутовий розворот растра сканування в площині XY на 360° без необхідності фізичного обертання самого досліджуваного зразка на предметному столику.

1.1.2 Канали детектування та оптичні діафрагми

1. Кількість оптичних каналів: базова система підтримує одночасну реєстрацію сигналів по 4 незалежних конфокальних каналах флуоресценції або відбиття (використовуються високочутливі фотоелектронні помножувачі – PMT).

2. Допоміжні канали: 1 трансмісійний канал (T-PMT) для збору некогерентного світла, що пройшло крізь зразок, та 1 опорний моніторний діод

для стабілізації та контролю потужності лазерного випромінювання.

3. Динамічний діапазон: кожен окремий канал детектування оснащений індивідуальним 12-бітним аналого-цифровим перетворювачем (АЦП), що забезпечує високу дискретизацію інтенсивності сигналу (4096 рівнів сірого).

4. Конфокальні діафрагми (Pinholes): система містить 4 індивідуальні змінні діафрагми з моторизованим керуванням діаметром (Variable Pinhole – VP). Кожен пінхол оптично прив'язаний до свого детектора і налаштовується автоматично під довжину хвилі та апертуру об'єктива за допомогою функції автоматичного комп'ютерного вирівнювання (automatic alignment).

1.1.3 Лазерна підсистема та джерела випромінювання

Мікроскоп комплектується двома основними лазерними модулями, оптичні виходи яких зводяться в єдиний пучок та транспортуються до скануючого модуля за допомогою одномодових світловодів із збереженням поляризації (polarization preserving fibers).

Лазерний модуль VIS (видимий спектральний діапазон). Гелій-неоновий лазер (HeNe), робоча довжина хвилі – 543 нм, вихідна оптична потужність – 1 мВт. Гелій-неоновий лазер (HeNe), робоча довжина хвилі – 633 нм, вихідна оптична потужність – 5 мВт. Аргоновий іонний лазер (Ar), мультилінійний, генерує довжини хвиль 458, 477, 488 та 514 нм, сумарна вихідна потужність – 30 мВт. Опціонально: Діодний лазер, довжина хвилі – 405 нм, потужність – 30 мВт.

Лазерний модуль UV (ультрафіолетовий діапазон) містить потужний газовий аргоновий УФ-лазер (Ar UV) з робочими лініями випромінювання на 351 та 364 нм, максимальна вихідна потужність – 80 мВт.

Керування інтенсивністю випромінювання відбувається через ослаблення та швидку модуляція лазерних ліній реалізованих на основі технології акустооптичних тюнованих фільтрів (VIS-AOTF та UV-AOTF), що дозволяє програмно змінювати потужність кожної хвилі від 0 до 100% з субмікросекундною швидкістю.

1.1.4 Підсистема Z-позиціонування та сумісні стенди

					ВР 241.00.00.000 ПЗ	Лист
Зм	Лист	№ докум.	підпис	дата		12

1. Вбудований Z-привід: моторизоване фокусування штатива здійснюється за допомогою DC-сервомотора з оптоелектронним кодуванням кроку. Мінімальний апаратний крок механізму фокусування становить 50 нм для стендів Axiovert 200 M та Axioplan 2, та 100 нм для систем Axioskop 2.

2. Прецизійний скануючий столик HRZ 200: гальванометричний стіл високої точності з максимальним робочим ходом по осі Z до 200 мкм, роздільною здатністю позиціонування 6 нм та абсолютною точністю відпрацювання траєкторії 40 нм. Столик дозволяє виконувати неперервне Z-сканування з частотою до 10 Гц.

3. П'єзоелектричний привід об'єктива (Piezo Objective Focus): моторизований одноелементний адаптер для об'єктивів із діапазоном переміщення від 100 до 250 мкм. Мінімальний дискретний крок становить 5-15 нм, що забезпечує ультрашвидкісний збір Z-стеків із частотою неперервного Z-сканування до 20 Гц.

1.1.5 Маса-габаритні та експлуатаційні вимоги

Маса основних вузлів складається з великого системного антивібраційного столу – 100 кг; скануючого конфокального модулю LSM 510 – 15 кг; оптичного штативу мікроскопа – 20 кг; стійки системної електроніки (System Electronic Rack) разом із лазерними джерелами – близько 300 кг.

Живлення здійснюється через трифазну промислову мережу напругою 230 В (струм 16 А) або 115 В (струм 32 А). Енергоспоживання стійки VIS становить до 2000 ВА, окрема лінія для УФ-лазера Coherent Enterprise вимагає підведення потужності до 7000 ВА.

Для забезпечення нормованих метрологічних характеристик та стабільності оптичної системи температура в приміщенні повинна підтримуватися на рівні 22 °С з максимально допустимим градієнтом не більше $\pm 0,5$ °С на годину безперервно протягом 24 годин.

Відносна вологість повітря не повинна перевищувати 65% за температури 30 °С. Максимальна висота експлуатації приладу над рівнем моря – 2000 м. Допустимі амплітуди коливань підлоги в лабораторії (вимоги до

віброізоляції) становлять не більше 5 мкм при частоті 5 Гц.

1.2 Аналіз існуючих аналогів мікроскопа ZEISS LSM 510

Розвиток лазерної скануючої мікроскопії стимулював провідних виробників оптичної техніки до створення систем, які вирішують ключові проблеми конфокального аналізу: підвищення швидкості сканування, покращення спектрального розділення та мінімізацію втрат світла. Для комплексного аналізу та визначення місця ZEISS LSM 510 на ринку високотехнологічного обладнання, розглянемо його найближчі аналоги: Leica TCS SP5, Olympus FluoView FV1000 та Nikon A1R.

Leica TCS SP5 (рис. 1.2) лазерний скануючий конфокальний мікроскоп – це високотехнологічний інструмент, що дозволяє науковцям та дослідникам здійснювати тривимірну візуалізацію та спектральний аналіз біологічних і матеріалознавчих зразків з надзвичайно високою точністю. Завдяки передовим оптико-електронним рішенням, використаним під час його проектування, цей мікроскоп забезпечує детальне дослідження внутрішніх структур на клітинному та субклітинному рівнях, що є критичним для багатьох сучасних наукових досліджень. Його інноваційні функції дозволяють не лише отримувати високоякісні зображення, але й гнучко налаштовувати спектральні діапазони реєстрації без використання класичних бар'єрних фільтрів. Використовується в таких галузях, як молекулярна біологія, нейроморфологія, біомедицина та нанотехнології.

Розглянемо детальніше його основні технічні характеристики:

1. Оптична система світлоділення – акустооптичний дільник променя (AOBS), який повністю замінює традиційні дихроїчні дзеркала та мінімізує втрати світла.

2. Система сканування – тандемний сканер, який об'єднує класичний гальванометричний привід (для високої роздільної здатності) та швидкісний резонансний сканер (для фіксації швидких динамічних процесів).



Рисунок 1.2 – Зовнішній вигляд мікроскопа Leica TCS SP5 [2]

3. Швидкість сканування – у резонансному режимі досягає до 28 кадрів/с при роздільній здатності поля 512×512 пікселів.

4. Максимальна роздільна здатність – до 8192×8192 пікселів на кадр, що забезпечує надвисоку цифрову деталізацію.

5. Система детектування – спектральний призматичний детектор із можливістю безперервного налаштування щілин збору емісії, підтримує до 5 конфокальних PMT або HyD каналів одночасно.

Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FluoView FV1000 (рис. 1.3) – сучасний прилад від японської компанії Olympus, призначений для високоточного аналізу просторової організації матеріалів та клітинних структур у наукових і промислових дослідженнях. Завдяки унікальній архітектурі оптичного тракту, прилад забезпечує стабільний та синхронізований пучок, що ідеально підходить для роботи з різними типами зразків – від напівпровідникових кристалів до чутливих біологічних тканин. FV1000 відзначається високим рівнем модульності та унікальними можливостями для одночасного проведення оптичних маніпуляцій та

реєстрації сигналу флуоресценції. Компактне компонування, інтуїтивний інтерфейс програмного забезпечення та стабільність характеристик зробили його популярним серед провідних академічних установ і комерційних лабораторій по всьому світу.



Рисунок 1.3 – Зовнішній вигляд «Olympus FluoView FV1000» [3]

Розглянемо детальніше його технічні характеристики:

1. Система світлоділення – класична турель із набором прецизійних дихроїчних дзеркал та бар'єрних фільтрів з комп'ютерним керуванням.
2. Система сканування – подвійний синхронізований SIM-сканер, який містить незалежний гальванометричний контур для зйомки та окремий контур для точкової лазерної активації.
3. Швидкість сканування – стандартний гальванометричний режим забезпечує від 5 до 10 кадрів/с при роздільній здатності 512×512 пікселів.
4. Максимальна роздільна здатність – становить 4096×4096 пікселів, що дозволяє детально аналізувати панорамні зображення великих об'єктів.
5. Конфокальна діафрагма – автоматизований моторизований пінхол з можливістю точного підлаштування під кожну довжину хвилі збудження.

Nikon A1R (рис. 1.4) – це лазерний скануючий конфокальний мікроскоп преміум-класу, створений для детального дослідження складних просторових та спектральних характеристик об'єктів. Завдяки електронно-оптичній системі з унікальною гібридною технологією відхилення променя, прилад забезпечує чіткі зображення й точний кількісний аналіз флуоресценції. Його

перевагами є гнучке налаштування лазерних ліній, стабільний електронний контроль, а також підтримка розширених спектральних інструментів для всебічного вивчення дослідних зразків. Дана модель виділяється високою автоматизацією функцій керування та можливістю адаптації оптичного тракту до специфічних потреб оператора. Цей прилад є незамінним для складних інженерних та наукових завдань у матеріалознавстві, напівпровідниковій промисловості та біомедицині.



Рисунок 1.4 – Зовнішній вигляд «Nikon A1R» [4]

Розглянемо детальніше його основні технічні характеристики:

1. Система світлоділення – комбінована система дихроїчних дзеркал із можливістю швидкої зміни блоків фільтрів.
2. Система сканування – гібридний скануючий блок, що поєднує високолінійні гальванометричні дзеркала та ультрашвидкісний резонансний сканер із частотою до 7,9 кГц.
3. Швидкість сканування – у резонансному режимі досягає від 30 кадрів/с (при 512×512 пікселів) до 420 кадрів/с при зменшенні вертикального поля сканування.
4. Максимальна роздільна здатність – у класичному гальванометричному режимі становить 4096×4096 пікселів.

5. Система детектування – стандартний 4-канальний PMT блок або спеціалізований 32-канальний спектральний GaAsP детектор для розділення спектрів флуоресценції, що сильно перекриваються (Advanced Linear Unmixing).

Розглянувши детально характеристики приладу та його існуючих аналогів, сформуємо таблицю 1.1, в якій проведемо порівняння за основними параметрами.

Таблиця 1.1 – Порівняння характеристик приладів за основними параметрами

Характеристики	Мікроскопи			
	ZEISS LSM 510	Leica TCS SP5	Olympus FV1000	Nikon A1R
1	2	3	4	5
Система світлоділення	Дихроїчні дзеркала та фільтри (MDBS, NFT)	Акустооптичний дільник променя (AOBS)	Дихроїчні дзеркала на моторизованій турелі	Дихроїчні дзеркала з електронним перемиканням
Конструкція сканера	2 незалежні гальванометричні дзеркальні сканери	Тандемний сканер (гальванометричний та резонансний)	Подвійний SIM-сканер (візуалізація та стимуляція)	Гібридний сканер (гальванометричний та резонансний)

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5
Максимальна роздільна здатність	2048×2048 пікселів на кадр	8192×8192 пікселів на кадр	4096×4096 пікселів на кадр	4096×4096 пікселів на кадр
Система оптичних діафрагм	4 індивідуальні змінні діафрагми (Variable Pinhole)	1 центральний автоматичний пінхол для спектрального блоку	Індивідуальний моторизований конфокальний пінхол	Автоматизований пінхол із комп'ютерним вирівнюванням
Кількість каналів детектування	4 конфокальних PMT + 1 трансмісійний + 1 моніторний діод	до 5 конфокальних (PMT/HyD) + 1 трансмісійний	4 конфокальних PMT + 1 трансмісійний	4 конфокальних (PMT/GaAsP) або 32-канальний спектральний
Керування потужністю лазера	Акустооптичні фільтри видимого та УФ діапазону (AOTF)	Інтегроване керування через систему AOBS	Моторизовані колеса нейтральних фільтрів (ND)	Акустооптичні модулятори (AOM)
Програмне забезпечення	Меню-контрольоване ПЗ LSM 5 (Expert Mode)	Leica LAS AF (Advanced Fluorescence)	Olympus FluView Software	Nikon NIS-Elements Advanced Research

Усі чотири лазерні скануючі конфокальні мікроскопи – ZEISS LSM 510, Leica TCS SP5, Olympus FluView FV1000 та Nikon A1R – є сучасними

високотехнологічними приладами, які відповідають найвищим стандартам наукових досліджень і промислових застосувань. Вони оснащені передовими оптичними системами для отримання деталізованих тривимірних зображень мікро- та наноструктур, що робить їх незамінними в матеріалознавстві, мікроелектроніці, нанотехнологіях та клітинній біології. Кожен із цих мікроскопів має унікальні переваги і недоліки.

Leica TCS SP5 виділяється інноваційною безфільтровою системою світлоділення AOBs, яка повністю виключає механічні втрати світла на скляних підкладках, та тандемним сканером, що дозволяє оперативно перемикатися між високороздільною інспекцією та швидкісною реєстрацією динамічних процесів клітини. Проте його призматична спектральна система та п'ятикінематичний оптичний привід мають підвищену складність налаштувань, вищу чутливість до температурних деформацій елементів у приміщенні лабораторії та дуже високу комерційну вартість обладнання й сервісного обслуговування.

Olympus FluoView FV1000 є спеціалізованим інструментом, оптимізованим для задач фотостимуляції, завдяки архітектурі подвійного SIM-сканера. Це дає можливість проводити локальне лазерне знесвітлення (bleaching) або активацію зразка без переривання процесу формування основного конфокального зображення. Проте базова швидкість сканування FV1000 обмежена лише гальванометричними приводами, а використання класичних дихроїчних дзеркал на турелі накладає обмеження на швидкість автоматичної зміни лазерних конфігурацій порівняно з акустооптичними системами.

Nikon A1R пропонує потужне гібридне рішення зі швидкістю сканування до 30-420 кадрів/с та унікальним 32-канальним спектральним GaAsP детектором, що робить його еталоном для високошвидкісного розділення флуоресцентних сигналів (unmixing), які сильно перекриваються за довжиною хвилі. Однак ультрависока швидкість резонансного сканера супроводжується значним падінням часу накопичення сигналу на один

піксель, що веде до зростання рівня шумів та вимагає використання вищих потужностей лазерного випромінювання, посилюючи фотодеструкцію чутливих наноструктур.

Наведені мікроскопи відображають прогрес у технологіях лазерної скануючої мікроскопії, пропонуючи дослідникам інструменти для вирішення складних завдань – від аналізу дефектів топографії напівпровідників до тривимірної візуалізації живих клітинних систем. Кожен з них поєднує високу точність із можливістю адаптації до різних типів зразків.

Проте мікроскоп ZEISS LSM 510 є поєднання двох повністю незалежних лінійних гальванометричних сканерів та індивідуальних моторизованих діафрагм забезпечує еталонну геометрію растра, високу лінійність сканування по всьому полю $10 \times 10 \text{ мм}^2$ та максимальну оптичну чистоту конфокальних зрізів. Керування інтенсивністю випромінювання Ar та HeNe лазерів за допомогою високошвидкісних акустооптичних фільтрів (AOTF) гарантує стабільність та точність дозування енергії, що вкрай важливо для стабільних та відтворюваних результатів. Оптична концепція ICS та гнучке меню-контрольоване програмне забезпечення LSM 5 роблять цей прилад максимально збалансованим, надійним та адаптованим для глибокого технічного аналізу нанорозмірних структур.

1.3 Функціональні особливості та фізичні перетворення, які покладено в основу роботи мікроскопа ZEISS LSM 510

В основі функціонування лазерного скануючого мікроскопа ZEISS LSM 510 лежить кардинальна зміна парадигми освітлення об'єкта порівняно з класичною широкопольною мікроскопією. Замість однорідного та одночасного опромінення всього поля зору, конфокальна технологія передбачає проектування когерентного випромінювання точкового джерела світла (лазера) через об'єтив із високою числовою апертурою (N_A) у досліджувану площину об'єкта, формуючи майже дифракційно-обмежений

фокус. Процес перетворення світлового потоку та формування інформативного цифрового сигналу в системі складається з кількох послідовних та взаємопов'язаних фізичних явищ.

Головною функціональною особливістю ZEISS LSM 510 є його здатність здійснювати бездеструкційне покрокове оптичне мікротомірування зразка за глибиною (по осі Z). У звичайному світловому мікроскопі світло флуоресценції, що генерується вище і нижче площини фокусу, вільно потрапляє в окуляр або на матрицю камери, створюючи інтенсивне фонове розмиття і критично погіршуючи контраст зображення. Для усунення цього деструктивного ефекту в оптичному тракті приладу застосовано метод просторової фільтрації за допомогою регульованої конфокальної діафрагми – пінхола (Variable Pinhole).

Фізичний механізм просторової фільтрації базується на тому, що фокальна точка всередині об'єкта та отвір діафрагми-пінхола розташовані в оптично спряжених (кон'югованих) площинах системи. Світлові промені (відбиті або флуоресцентні), що виходять безпосередньо з фокального об'єму, збираються об'єктивом і фокусуються точно в центрі отвору пінхола, безперешкодно проходячи до фотоелектронного детектора. Натомість промені, які генеруються позафокусними ділянками зразка (вище або нижче площини фокусування), після проходження крізь лінзову систему збираються у точках, розташованих ближче або далі відносно площини розташування діафрагми. Як наслідок, у площині самого пінхола позафокусне світло утворює широку розфокусовану пляму, і отвір діафрагми затримує (екранує) його переважну частину (рис. 1.5).

Математично інтенсивність позафокусного фону, що проникає крізь пінхол радіусом R_2 , описується складною функцією просторового затухання. Зменшення радіуса діафрагми програмними засобами мікроскопа призводить до відсікання фонові складові, що дозволяє отримати оптичний зріз, практично вільний від розмиття.

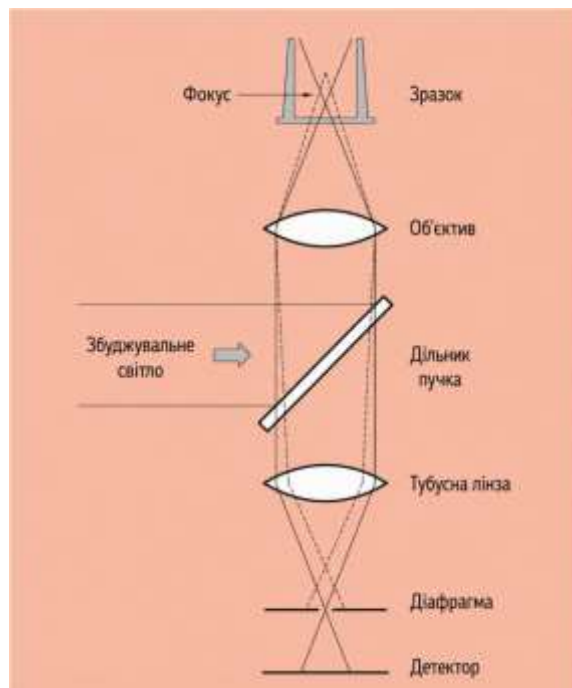


Рисунок 1.5 – Принцип конфокального формування зображення [5]

Оскільки лазерний промінь фокусується об'єктивом мікроскопа, мінімальний розмір світлової плями у зразку обмежений не геометричною оптикою, а явищами дифракції хвильової оптики. Сфокусований лазерний пучок утворює просторову дифракційну картину, відому як пляма Ейрі. Центр цієї картини (головний максимум інтенсивності) визначає межу просторової роздільної здатності системи.

В лазерному скануючому мікроскопі ZEISS LSM 510 латеральна роздільна здатність (в площині XY) визначається модифікованим критерієм Аббе (1.1), який враховує конфокальний ефект (двократне проходження світла крізь об'єктив – під час збудження та емісії):

$$\Delta x y \frac{0,51 * \lambda}{NA}, \quad (1.1)$$

де $\Delta x y$ – мінімальна відстань між двома точками в площині XY , при якій вони реєструються окремо (мкм);

λ – довжина хвилі лазерного випромінювання збудження (мкм);

NA – числова апертура об'єктива.

Аксіальна роздільна здатність (по осі Z), яка безпосередньо визначає мінімальну апаратну товщину оптичного зрізу, розраховується за формулою (1.2):

$$\Delta z = \frac{0.88 * \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}, \quad (1.2)$$

де Δz – аксіальна роздільна здатність або товщина конфокального зрізу (мкм);

n – показник заломлення імерсійної рідини (для повітря $n = 1,0$, для води $n = 1,33$, для олії $n = 1,515$).

Завдяки реалізації конфокального принципу в поєднанні з високоапертурною оптикою Infinity Color-Corrected System (ICS), мікроскоп дозволяє впевнено розділяти об'єкти розміром до 0,2 мкм у площині XY та фіксувати ізольовані перепади висот менше 0,1 мкм по осі Z без залучення складних інтерференційних схем.

Для дослідження глибоких шарів сильно розсіюючих або живих об'єктів мікроскоп ZEISS LSM 510 комплектується підсистемою нелінійної оптики (NLO) на основі фемтосекундного титан-сапфірового лазера. Фізична суть двофотонного збудження полягає в тому, що флуоресцентна молекула одночасно (протягом часового інтервалу порядку 10^{-16}) поглинає два довгохвильові фотони ближнього інфрачервоного діапазону (NIR). Сумарна енергія цих двох квантів еквівалентна енергії одного фотона ультрафіолетового спектра і виражається формулою (1.3):

$$E_{total} = E_{NIR1} + E_{NIR2} = \frac{h * c}{\lambda_{NIR1}} + \frac{h * c}{\lambda_{NIR2}} = \frac{h * c}{\frac{\lambda_{UV}}{VIS}}. \quad (1.3)$$

Звідси впливає чітке фізичне правило налаштування лазера: довжина хвилі ІЧ-збудження має бути приблизно вдвічі більшою за довжину хвилі класичного однофотонного збудження ($\lambda_{NIR1} \approx 2 * \lambda_{UV/VIS}$).

Ймовірність такого квантового переходу (рис. 1.6) залежить від

просторової густини фотонів, тому поглинання має виражену нелінійну (квадратичну) залежність від інтенсивності збуджуючого світла (I^2).

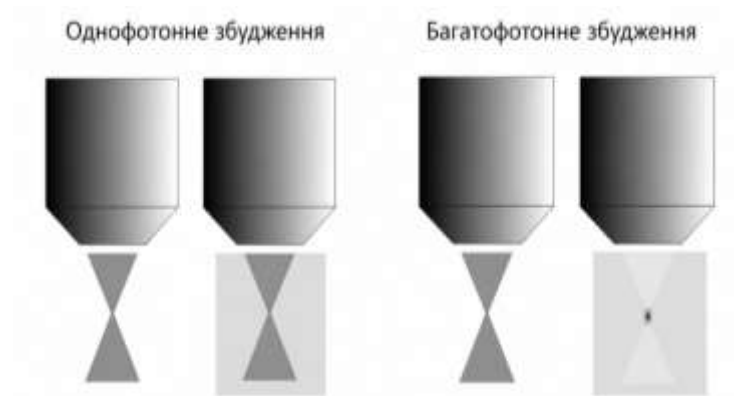


Рисунок 1.6 – Однофотонне та багатофотонне збудження [2]

Флуоресценція поза фокусом взагалі не генерується, що автоматично усуває фоновий шум і кардинально знижує сумарну фоторуйнацію зразка за межами площини дослідження. Окрім цього, використання інфрачервоного світла ($\lambda = 700 \dots 1000$ нм) забезпечує суттєве зменшення коефіцієнта розсіювання світла тканинами та матеріалами. Інтенсивність релєївського розсіювання (I_{scat}) обернено пропорційна четвертому степеню довжини хвилі (1.4):

$$I_{\text{scat}} \propto \frac{1}{\lambda^2}. \quad (1.4)$$

Завдяки цьому закону інфрачервоний пучок зазнає значно менших дифракційних втрат і здатний безперешкодно фокусуватися та проникати на значно більшу глибину всередину досліджуваного об'єкта без втрати просторової роздільної здатності.

РОЗДІЛ 2

РОЗРАХУНКОВО-КОНСТРУКТОРСЬКА ЧАСТИНА

2.1 Конструкція мікроскопа ZEISS LSM 510

Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп ZEISS LSM 510 є надзвичайно складним оптико-механічним та електронним комплексом, у якому кожен конструктивний елемент виконує строго визначену інженерну функцію задля забезпечення прецизійного проходження світлових хвиль, стабільності оптичної осі та субмікронної точності позиціонування об'єкта. На відміну від застарілих моноблочних приладів, архітектура цієї системи базується на високомодульному принципі, де головним опорним вузлом виступає високотехнологічний інвертований оптичний штатив Axiovert 200 M. Просторова побудова, взаємне інтегрування окремих блоків та органи керування конфокального комплексу детально представлені на складальному кресленні (рис. 2.1).

Основою всієї конструкції виступає масивна базова станина штатив Axiovert 200 M (рис. 2.1, деталь 1), яка відлита зі спеціалізованих сплавів із високим коефіцієнтом термічного розширення та демпфування. Станина забезпечує жорстку фіксацію всіх оптичних осей приладу та повністю нівелює внутрішні механічні напруження, що запобігає виникненню просторового зсуву (дрифту) між лінзовими компонентами під час тривалих вимірювань.

Безпосередньо до лівого бічного оптичного порту штатива за допомогою прецизійного жорсткого фланцевого з'єднання типу «ластівчин хвіст» фіксується конфокальний сканувальний модуль (рис. 2.1, деталь 2), який є головним аналітичним та реєструючим вузлом системи. Корпус скануючої головки LSM 510 має габарити 25×20×25 см та масу 15 кг, що вимагає високої механічної міцності від стінок базової станини мікроскопа. На корпусі модуля жорстко закріплені попереджувальні знаки лазерної безпеки (Laser Radiation Class 3B), оскільки всередині блоку відбувається відхилення та фокусування

високоінтенсивних когерентних пучків за допомогою гальванометричних дзеркал.

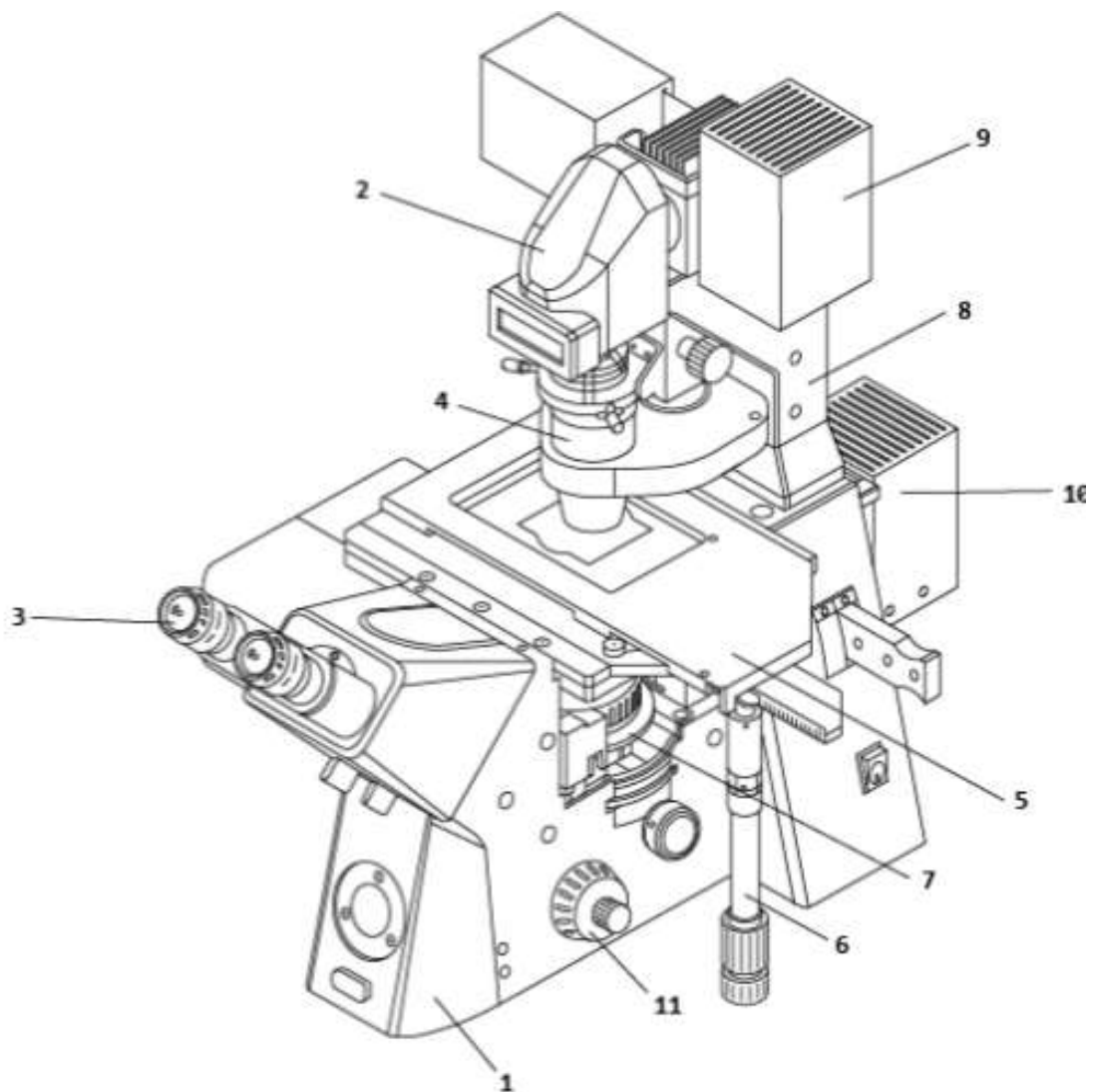


Рисунок 2.1 – Зовнішній вигляд приладу ZEISS LSM 510

Для попереднього візуального пошуку потрібних ділянок на досліджуваному препараті оператором використовується бінокулярна насадка з окулярами (рис. 2.1, деталь 3), розташована на передній похилій панелі штатива. Конструкція тубуса містить унікальний механізм захисту: під час переходу системи у безпосередній режим лазерного растрового сканування (LSM-mode) спеціальний внутрішній електромагнітний затвор (shutter) автоматично перекриває хід променів до окулярів, повністю спрямовуючи весь емісійний світловий потік у порт сканувального модуля та захищаючи

органи зору дослідника від випадкового потрапляння відбитих лазерних променів.

Під робочим простором предметного столика в середині штатива встановлено моторизований 5-позиційний револьвер об'єтивів (рис. 2.1, деталь 4), який використовує передову лінзову концепцію ICS (Infinity Color-Corrected System). Для проведення конфокальних та багатофотонних досліджень застосовуються спеціалізовані високоапертурні об'єктиви (наприклад, серії C-APOCHROMAT або Plan-Neofluar), які розраховані на максимальне пропускання світла у спектральному діапазоні від 350 до 800 нм і мінімізують хроматичні та сферичні аберації. Керування зміною об'єтивів повністю автоматизовано за допомогою програмного забезпечення LSM 5. З метою запобігання механічному пошкодженню дорогої фронтальної лінзи, конструкція револьвера реалізує алгоритм автоматичного опускання носової частини вниз перед кожним моторизованим поворотом турелі.

Досліджуваний зразок (препарат на склі або чашка Петрі) розміщується на плоскій платформі механічного предметного столика (рис. 2.1, деталь 5), яка має високу жорсткість та стійкість до температурних коливань у лабораторії. Для плавного ручного переміщення досліджуваного об'єкта у фокальній площині об'єктива мікроскоп оснащений коаксіальними рукоятками прецизійного переміщення столика (рис. 2.1, деталь 6), що звисають з правого боку під платформою. Верхня рукоятка забезпечує лінійне переміщення верхньої рухомої частини столика по координаті X, а нижня коаксіальна рукоятка зміщує його по координаті Y, що дозволяє виконувати точну панорамну інспекцію препарату однією рукою.

Покрокове вертикальне переміщення оптичної системи мікроскопа вздовж осі Z для формування стеків тривимірних зображень (Z-stacks) здійснюється за допомогою моторизованого маховика вертикального фокусування (рис. 2.1, деталь 7). Цей вузол являє собою Z-привід на основі DC-сервомотора з оптоелектронним кодуванням кроку, який забезпечує мінімальний апаратний крок фокусування (Z-interval) всього 50 нм. Для

виконання надвисокоточних та швидкісних вимірювань по глибині конструкція маховика може синхронізуватися з опціональним гальванометричним столиком HRZ 200 (з точністю 40 нм) або п'єзоелектричним приводом об'єктива, який має крок регулювання ходу 15 нм у діапазоні до 250 мкм.

Над предметним столиком мікроскопа на вертикальній освітлювальній стійці змонтовано опору освітлювача прохідного світла (рис. 2.1, деталь 8). Конструкція цієї опори містить вбудований контур безпеки (security circuit), який за допомогою мікроперемикачів відстежує положення стійки. Якщо оператор відкидає освітлювальну колонку назад для зміни препарату, контур безпеки миттєво активує внутрішній затвор (shutter) у станині штатива, повністю блокуючи вихід лазерного променя крізь об'єктив у відкритий простір, що гарантує повну безпеку праці персоналу.

На верхній рухомій частині освітлювальної колони закріплено кожух галогенового освітлювача HAL 100 (рис. 2.1, деталь 9), який оснащений галогенною лампою потужністю 12 В 100 Вт для спостереження зразка у світлому полі та в режимі диференційно-інтерференційного контрасту (DIC). Оскільки галогенна лампа під час тривалої роботи виділяє значну кількість теплової енергії, корпус освітлювача забезпечений масивними радіаторами пасивного охолодження та попереджувальним маркуванням термічної небезпеки («Гаряча поверхня»). Опора освітлювача також містить поворотний поляризатор, який під час сканування у DIC-режимі LSM працює як аналізатор, перекриваючи пряме лазерне світло.

Для реалізації класичних методів люмінесцентної мікроскопії на задній панелі штатива мікроскопа змонтовано ліхтар ртутного епіфлуоресцентного освітлювача НВО (рис. 2.1, деталь 10), який найчастіше використовує ртутну короткодугову лампу надвисокого тиску потужністю 50 Вт або 100 Вт. Цей блок генерує потужне випромінювання в ультрафіолетовому та видимому спектрі, а його корпус також має маркування високої термічної небезпеки. Для швидкого вибору потрібного спектрального діапазону перед джерелом НВО

встановлено механічний рефлекторний слайдер фільтрів (рис. 2.1, деталь 11), що містить турель із набором кубів збуджуючих та загороджувальних фільтрів (позиції 1-2-3). Під час роботи конфокальної системи у лазерному режимі, рефлекторний слайдер виводиться у порожню позицію («empty plate»), оскільки аналітичне розділення хвиль флуоресценції здійснюється безпосередньо всередині скануючого модуля за допомогою дзеркал NFT та фільтрів EF.

Варто зазначити, що для DIC-спостережень у конфокальному режимі класичний аналізаторний слайдер, розташований під об'єктивом, також має бути повністю виведений з оптичного шляху, оскільки лазерне випромінювання вже є лінійно поляризованим. На задній панелі штатива додатково розведені роз'єми інтерфейсу безпеки (Safety-Box) та цифрової шини CAN-Bus для інтеграції мікроскопа з загальною системою електронного контролю.

Конструкція конфокального комплексу завершується прецизійним волоконно-оптичним кабелем доставки лазерного випромінювання, який входить у верхню частину сканувального модуля. Оскільки газові аргоніві (Ar) та гелій-неонові (HeNe) лазерні джерела, а також блоки їхнього високочастотного живлення та вентилятори винесені в окрему стійку (System Electronic Rack) для мінімізації теплових та віброакустичних наведень на мікроскоп, доставку когерентного світла реалізовано через гнучкі одномодові оптичні волокна із жорстким збереженням поляризації (polarization preserving fibers). Це інженерне рішення дозволяє повністю ізолювати оптичний штатив мікроскопа Axiovert 200 M від зовнішніх деструктивних чинників лазерних установок та забезпечити високу просторову точність конфокальних вимірювань.

2.2 Опис функціональних, структурних, електричних та складальних схем окремих вузлів мікроскопа ZEISS LSM 510

Технічний аналіз лазерного скануючого конфокального мікроскопа ZEISS LSM 510 вимагає розбору його внутрішньої структурної організації, оптичної архітектури, електричних зв'язків та алгоритмів електронного керування. Взаємодія всіх механічних, оптико-електронних та цифрових підсистем забезпечує точне функціонування приладу в режимах нанометрового просторового сканування, оптичного зрізання та попіксельної реєстрації квантів світла.

Конфокальний комплекс ZEISS LSM 510 є розподіленою автоматизованою системою, де керування виконавчим обладнанням інтегровано з цифровими контурами збору даних. Структурно-функціональна схема (рис. 2.2) приладу об'єднує п'ять основних взаємопов'язаних апаратних блоків:

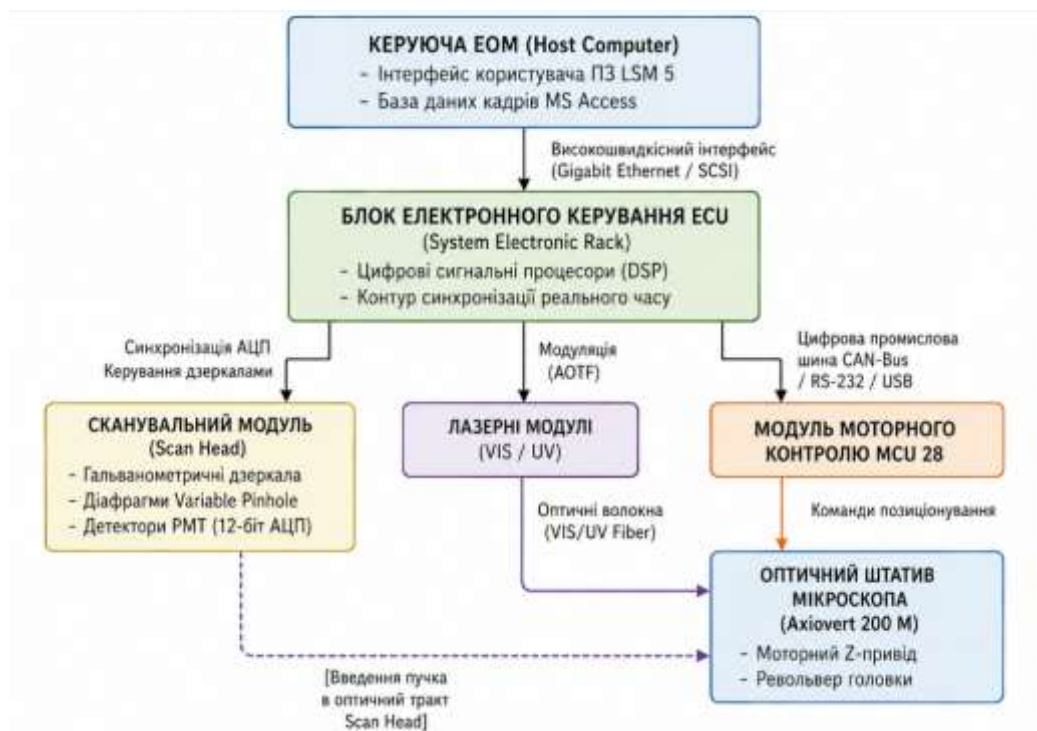


Рисунок 2.2 – Структурно-функціональна схема приладу ZEISS LSM 510 [5]

1. Керуюча ЕОМ (Host Computer): високоефективна комп'ютерна станція під керуванням операційної системи Windows, на якій розгорнуто

спеціалізоване меню-контрольоване програмне забезпечення LSM 5. Комп'ютер є вищим рівнем ієрархії керування – він забезпечує інтерфейс користувача (зокрема режими Expert Mode), задає конфігурації сканування, параметри лазерів, геометрію растра та виконує збереження кадрів у реляційну базу даних.

2. Блок електронного керування ECU (Electronic Control Unit): системна стійка (System Electronic Rack), яка містить цифрові сигнальні процесори (DSP) та мікроконтролерні плати реального часу. Блок ECU здійснює безпосереднє апаратне керування приводами скануючих дзеркал, синхронізацію АЦП, модуляцію лазерних ліній та контроль затворів безпеки.

3. Модуль моторного контролю MCU 28: окремий електронний блок, інтегрований у системну стійку, який відповідає за керування кроковими та сервомоторами прецизійного предметного столика мікроскопа (у випадках застосування моторизованих столик-систем).

4. Лазерні модулі (Laser Modules VIS/UV): блоки генерації когерентного випромінювання, що містять газові та діодні лазери, оптичні дільники та об'єднувачі пучків, а також системи акустооптичної модуляції (AOTF).

5. Сканувальний конфокальний модуль (Scan Head): оптико-механічний блок, закріплений безпосередньо на штативі мікроскопа, який виконує просторову розгортку променя, фокусування світла, конфокальну фільтрацію пінхолами та квантове детектування флуоресценції за допомогою фотопомножувачів.

Зв'язок між керуючою ЕОМ та блоком ECU реалізовано за допомогою високошвидкісного інтерфейсу Gigabit Ethernet або спеціалізованої SCSI-шини, що гарантує безперебійну передачу великих масивів цифрових даних у реальному часі. Внутрішній обмін командами між блоком ECU, моторами штатива мікроскопа та модулем MCU 28 здійснюється через промислову заводстійку цифрову шину CAN-Bus та послідовні інтерфейси зв'язку RS-232 та USB, комутація яких виконується на задній панелі спеціалізованого комутаційного блоку (Interface Control).

Центральною частиною приладу, де відбуваються основні фізичні перетворення світлових потоків, є оптичний тракт сканувальної головки. Для детального аналізу траєкторії променя та взаємодії оптичних компонентів використовується принципова оптична схема ходу променів (Optical path, schematic).

Опишемо алгоритм проходження світлових променів крізь елементи оптичної схеми, розділивши шлях на два зустрічні світлові тракти. Оптичний тракт збудження (направлений від лазерів до зразка):

1. Випромінювання від газових аргонного та гелій-неонових лазерів, розташованих у модулі видимого світла, поєднується в один колінеарний пучок і проходить крізь високошвидкісний акустооптичний фільтр AOTF. Фільтр AOTF здійснює амплітудну модуляцію та селекцію потрібних ліній збудження.

2. Очищений пучок заводиться в гнучкий одномодовий світловод VIS Fiber і транспортується до вхідного порту сканувального модуля, де за допомогою лінзового коліматора (Collimator) перетворюється на плоскопаралельний світловий потік із фіксованим діаметром пучка.

3. Якщо конфігурація мікроскопа передбачає роботу в ультрафіолетовому спектрі, промінь від УФ-лазера проходить крізь свій світловод UV Fiber, колімується та просторово поєднується з видимим світлом на дихроїчному об'єднувачі пучків DBC.

4. Далі інтегральний лазерний пучок проходить крізь плоскопаралельну скляну пластину (Plate), яка відгалужує незначну частину світла (близько 1–2%) через систему фільтрів LSF та NDF на опорний фотодіод Monitor Diode. Цей контур необхідний для безперервного моніторингу та зворотного зв'язку за потужністю лазера.

5. Основна частина лазерного випромінювання падає на головне дихроїчне дзеркало MDBS (Main Dichroic Beam Splitter). Дзеркало MDBS має спеціальне багат шарове інтерференційне покриття, яке повністю відбиває

короткі хвилі лазерного збудження під кутом 90° та спрямовує їх у контур сканування.

6. Промінь потрапляє на двоосьовий гальванометричний сканер (Scanner X, Y), дзеркала якого здійснюють його високолінійне растрове відхилення.

7. Відхилений пучок проходить крізь скануючу лінзу (Scan Lens), тубусну лінзу мікроскопа (Tube Lens) і фокусується об'єктивною лінзою (Objective) у дифракційно-обмежену крапку (пляму Ейрі) всередині досліджуваного зразка (Specimen).

Та оптичний тракт конфокальної емісії (направлений від зразка до PMT детектора):

У точці лазерного фокусу всередині препарату генерується корисний сигнал флуоресценції. Світлові кванти емісії збираються тим самим об'єктивом мікроскопа і прямують у зворотному напрямку крізь тубусну лінзу штатива та дзеркала сканера Scanner X, Y. Цей процес проходження через дзеркала розгортки у зворотний бік називається дескануванням (descanning) – він повністю компенсує динамічний рух лазерного променя і переводить емісійний пучок у статичний стан.

Статичний пучок флуоресценції падає на головне дзеркало MDBS з протилежного боку. Оскільки довжина хвилі флуоресценції є зміщеною в довгохвильову область (стоксов зсув), інтерференційне покриття MDBS є абсолютно прозорим для емісії, і промінь проходить крізь нього без втрат, прямуючи в аналітичну зону детектування.

Промінь проходить через фокусуючу оптику пінхола (Pinhole Optics), яка фокусує світло точно в площині розташування конфокальних регульованих діафрагм VP1...VP4 (Variable Pinholes). Тут відбувається механічне відсікання всіх розмитих світлових променів, що походять з позафокусних шарів препарату.

Очищений від завад колінеарний спектральний потік розділяється на окремі канали за допомогою каскадної системи вторинних дихроїчних дзеркал дільників спектра (DBS1, DBS2, DBS3). Наприклад, дзеркало DBS1 відбиває

зелену складову спектра, а прозора частина променя прямує далі до дзеркал DBS2 та DBS3 для виділення червоного та інфрачервоного діапазонів.

У кожному окремому каналі виділений пучок проходить крізь свій індивідуальний моторизований бар'єрний емісійний фільтр VP / EF (Emission Filter), який виконує фінальну тонку селекцію спектральної лінії флуорохрома та повністю поглинає випадкові залишки розсіяного лазерного світла. Очищений корисний оптичний сигнал фокусується безпосередньо на фотокатод фотоелектронного помножувача (PMT1 ... PMT4), де кванти світла трансформуються в електричний струм.

За наявності додаткового каналу прохідного світла, світло лазера, що пройшло крізь товщу препарату (Specimen), збирається конденсорною лінзою мікроскопа (Condensor) і фокусується на окремому трансмісійному фотопомножувачі T-PMT, генеруючи оптично-диференційне або світлопольне конфокальне зображення об'єкта.

Стабільність спектрального розділення та високе співвідношення сигнал/шум у мікроскопі ZEISS LSM 510 досягається за рахунок прецизійної конструкції змінних інтерференційних блоків та кодувань світлових трактів.

Розглянемо особливості конфігурації фільтрів на основі офіційного Beam path Configuration Guide виробника.

Конструкція головних дільників MDBS (HFT): Головні дзеркала світлоділення монтуються на моторизованій лінійній каретці або турелі всередині Scan Head. Вони маркуються як HFT (Hauptfarbteiler). Для роботи з кількома лазерами одночасно використовуються багатолінійні дихроїчні дзеркала, наприклад, модифікація HFT 488/543/633 або HFT 405/488/561. Вони мають вузькі зони відбиття точно на довжинах хвиль відповідних лазерів та широкі зони пропускання між ними. При переході мікроскопа в конфокальний режим відбиття світла (Reflection mode) замість дихроїка автоматично встановлюється нейтральна світлодільна пластина NT 80/20 (пропускає 80% емісії та відбиває 20% лазера).

Каскадна система вторинних дільників NFT: для просторового розділення змішаного потоку флуоресценції перед детекторами використовується триступеневий каскад вторинних дихроїчних дзеркал, які в німецькій інженерній номенклатурі ZEISS маркуються як NFT (Nebenfarbteiler). Вони встановлюються у моторизовані гнізда NFT1, NFT2 та NFT3. Наприклад, в типовій багатоколірній конфігурації в гніздо NFT1 встановлюється дзеркало NFT 545 (відбиває хвилі коротші за 545 нм у канали PMT1/PMT2 та пропускає довші хвилі в канали PMT3/PMT4). Подальше тонше розділення виконується за допомогою NFT-елементів з іншими пороговими значеннями (наприклад, NFT 565 або колірні короткохвильові фільтри KP 650 / KP 700).

Емісійні бар'єрні фільтри EF (BP / LP): фінальні змінні фільтри встановлюються в моторизовані фільтрові колеса безпосередньо перед отворами пінхолів каналів 1 і 2. Конструктивно вони розділяються на два класи:

1. Смугові фільтри (Bandpass – BP) – пропускають світло лише у вузькому нормованому інтервалі хвиль. Наприклад, емісійний фільтр BP 505-530 оптимізований для реєстрації зеленого сигналу флуорохрома FITC або білка EGFP, повністю відсікаючи шуми суміжних спектрів.

2. Довгохвильові фільтри (Longpass – LP) – пропускають усе світло, довжина хвилі якого більша за граничну частоту зрізу. Наприклад, фільтр LP 560 або LP 585 використовується для реєстрації широких спектрів випромінювання червоних барвників типу Rhodamine B або TRITC.

Всі оптичні характеристики встановлених дихроїчних дзеркал та емісійних фільтрів жорстко закодовані в заводській флуоресцентній базі даних програмного забезпечення мікроскопа (DsFluorescenceDatabase), що дозволяє системі автоматично розраховувати оптимальне положення всіх коліс та кареток при виборі користувачем конкретного типу барвника в меню мікроскопа.

Надійне функціонування високотехнологічних вузлів мікроскопа забезпечується жорстко регламентованою схемою розподілу електричного живлення всередині системної стійки Laser Module VIS (модель блока живлення № 453025).

Принципова електрична схема розподілу живлення за фазами наведена на рисунку 2.3.

Відповідно до електричної схеми (рис. 2.3), вхідна трифазна силова лінія комутується через двополіусний головний автоматичний вимикач захисту (Main Breaker) та розділяється на три незалежні силові фазові контури, що забезпечує стабільність напруги та захист від перевантажень.

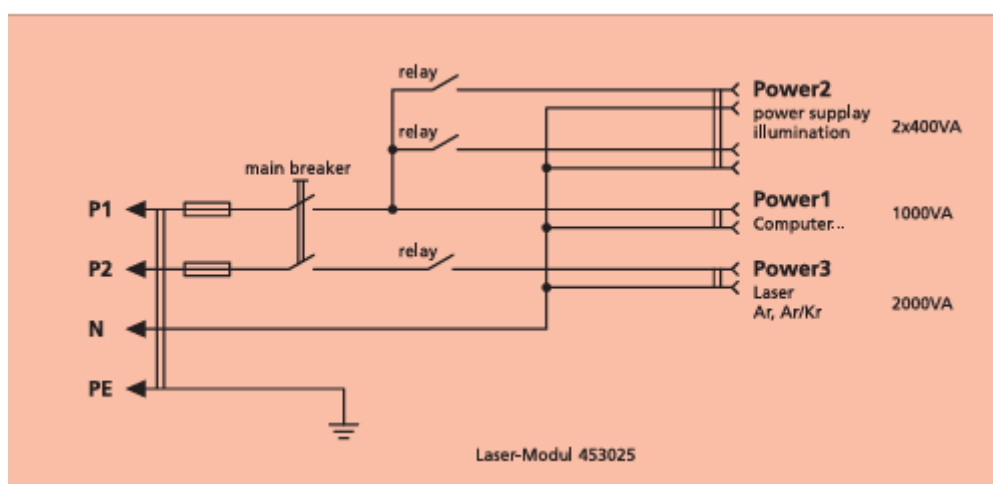


Рисунок 2.3 – Електрична схема ZEISS LSM 510 [5]

Контур Фази 1 (P1) призначений для живлення цифрових та прецизійних вузлів комплексу з низьким рівнем споживання струму. Через спеціалізований силовий вихід (Power1) з розрахованою потужністю трансформації до 1000 ВА (1000VA) здійснюється стабільне живлення: хост-комп'ютера користувача разом із монітором (Computer...), електронних плат оптичного штатива мікроскопа, модуля крокових двигунів предметного столика MCU 28, а також малопотужних Helium-Neon (HeNe) газових лазерів лінії 543/633 нм.

Контур Фази 2 (P2): призначений для живлення вузлів освітлення та інтенсивних лазерних джерел видимого спектра. Контур містить електронні

силові реле (relay), які через лінію (Power2) (потужність $2 \times 400 \text{ VA}$ ($2 \times 400 \text{ VA}$)) забезпечують стабільний запуск та роботу галогенової лампи HAL 100 та ртутної дугової лампи HBO 100 мікроскопа (power supply illumination). Паралельна силова лінія (Power3) із виділеною потужністю трансформації до 2000 VA (2000VA) здійснює живлення багатолінійного газового Аргонового (Ar) або Аргон-Криптонового (ArKr) лазера (Laser Ar, Ar/Kr), який потребує підвищених пускових струмів та енергії для утримання стабільного плазмового розряду в трубці.

У контурі окремого підключення (Separate Connection) повністю винесена силова лінія, розрахована на максимальне споживання потужності до 7000 VA (цей контур відсутній на наведеній схемі Laser-Modul 453025). Вона використовується виключно для забезпечення роботи високоінтенсивного ультрафіолетового аргонового лазера Ar UV (моделі Coherent Enterprise 653 II), що містить власну силову систему водяного або примусового повітряного охолодження та блоки стабілізації плазми.

Всі заземлювальні контури системи зводяться в єдину точку на корпусі стійки за допомогою масивного мідного провідника заземлення (PE) калібру AWG 10 з характерним зелено-жовтим маркуванням ізоляції, що повністю нівелює ризик появи блукаючих струмів та знижує рівень електричних шумів на детекторах мікроскопа. Загальне замикання кола для всіх виходів забезпечується нейтраллю (N).

Для зниження випадкових пуассонівських шумів світлового потоку та флуктуацій електроніки, блок ECU підтримує апаратні алгоритми накопичення та усереднення сигналу (Scan Average).

Для забезпечення жорсткої колінеарності оптичних осей та надійної світлоізоляції лазерного тракту (особливо для систем NLO з лазерами Chameleon або Verdi Mira) в конструкції мікроскопа ZEISS LSM 510 застосовано спеціалізований вузол тубусного з'єднання (рис 2.3).

На Рисунку 2.4 представлено складальне креслення цього вузла, який здійснює безпечне транспортування лазерного пучка від системи доставки до сканувального модуля.

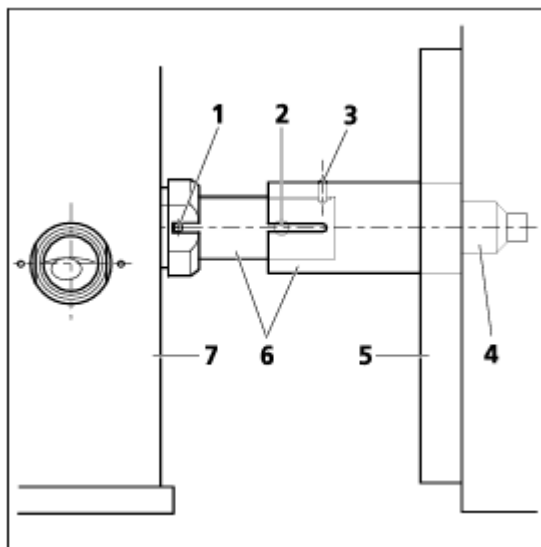


Рисунок 2.4 – Вузол тубусного з'єднання

Відповідно до офіційної інструкції з технічного обслуговування приладу та підписів на складальному кресленні (рис. 2.4), процес монтажу та вирівнювання цього світлового контуру реалізується за допомогою наступних конструктивних елементів:

1 – паз на кільці перископа являє собою спеціальну напрямну виїмку, розташовану на фланці з боку перископа. Вона використовується для точного позиціонування бічного штифта внутрішньої трубки під час збирання вузла, що запобігає осьовому прокручуванню оптичного тракту.

2 – паз зовнішньої трубки це відповідний напрямний проріз на зовнішній трубці, який також взаємодіє з фіксуючим штифтом для забезпечення правильного кутового положення телескопічних трубок одна відносно одної.

3 – затискний гвинт є фіксуючим елементом, який жорстко стягує зовнішню трубку з внутрішньою. Його затягування повністю фіксує

телескопічний механізм після вибору оптимальної відстані між блоками, унеможливлуючи люфти.

4 – з'єднувальна різьбова муфта зовнішньої трубки елемент, за допомогою якого тубус безпосередньо прикручується до чорної трубки, що жорстко зафіксована на вхідному вікні сканувальної головки. Це забезпечує герметичне та світлонепроникне з'єднання.

5 – сканувальна головка, згідно з офіційним підписом до креслення, це масивний корпус головного аналітичного модуля праворуч, усередині якого розміщені гальванометричні дзеркала та детектори.

6 – з'єднувальний тубус являє собою телескопічний вузол, що складається з внутрішньої та зовнішньої трубок. Він виконує функцію механічного кожуха, який надійно захищає відкритий лазерний промінь від впливу зовнішнього середовища лабораторії.

7 – корпус перископа, згідно схеми, це вертикальний блок ліворуч, з якого виходить від'юстований лазерний промінь для подальшої передачі у сканер.

Завдяки прецизійному виконанню телескопічної муфти, напрямних пазів та затискних елементів досягається жорстка фіксація оптичної осі та повне збереження площини поляризації лазерного пучка при його транспортуванні від перископа до сканувальної головки.

Повна ізоляція внутрішнього світловодного об'єму від пилу, повітряних потоків та паразитного фонового світла лабораторії є передумовою для усунення оптичних завад і деградації флуоресцентного сигналу. Це дозволяє повністю реалізувати високий потенціал конфокального зрізання та досягти проектної нанометрової роздільної здатності мікроскопа під час побудови високоточних тривимірних моделей досліджуваних мікро- та наноструктур.

2.3 Розрахунково-параметричний аналіз оптичної роздільної здатності та товщини конфокального зрізу мікроскопа ZEISS LSM 510

Ключовими метрологічними та аналітичними характеристиками будь-якої конфокальної лазерної скануючої системи є її просторова роздільна здатність. Вона визначає фундаментальну межу розмірів мікро- та наноструктур, які можуть бути ідентифіковані як окремі об'єкти на отриманому цифровому зображенні. У конфокальній мікроскопії просторова роздільна здатність розглядається у двох незалежних площинах: латеральній (в горизонтальній площині сканування XY) та аксіальній (по вертикальній осі Z , що відповідає за товщину оптичного зрізу).

Метою даного розрахунково-параметричного підпункту є визначення теоретичних меж просторової роздільної здатності лазерного скануючого мікроскопа ZEISS LSM 510. Розрахунки будуть проведені для двох стандартних довжин хвиль лазерного збудження (аргонового та гелій-неонового лазерів) у комбінації з двома типами реальних об'єктивів, що входять до специфікації приладу.

Для проведення об'єктивного аналізу були обрані реальні апаратні компоненти мікроскопа ZEISS LSM 510, зазначені в офіційній технічній документації виробника.

Роздільна здатність мікроскопа прямо пропорційно залежить від довжини хвилі світла, що використовується для збудження флуоресценції. Чим коротша хвиля, тим менший розмір дифракційної плями (плями Ейрі) утворюється у фокусі. Для розрахунку беремо дві найпоширеніші лінії видимого спектра:

1. Випромінювання аргенового лазера (Ar), лінія синього спектра: $\lambda_1 = 488 \text{ нм}$ (0,488 мкм);
2. Випромінювання гелій-неонового лазера (HeNe), лінія зеленого спектра: $\lambda_2 = 543 \text{ нм}$ (0,543 мкм).

Здатність об'єктива збирати розсіяне зразком світло визначається його числовою апертурою (N_A). Вона розраховується як добуток показника заломлення середовища між фронтальною лінзою та зразком (n) на синус напівкута захоплення світла ($\sin\alpha$). Для комплексного порівняння використаємо два об'єктиви з різними імерсійними середовищами:

Об'єктив Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil. Високоапертурний об'єктив, оптимізований для максимальної роздільної здатності. Використовує імерсійну олію. Згідно зі специфікацією, його числова апертура $NA = 1,3$, а показник заломлення стандартної мікроскопічної олії становить $n = 1,515$.

Об'єктив: IR-Achroplan 40x/0.8 W. Спеціалізований водний об'єктив, призначений для глибокого сканування живих тканин у водному фізіологічному розчині (зокрема у режимах NLO). Його числова апертура $N_A=0,8$, показник заломлення води становить $n=1,333$.

Латеральна (горизонтальна) роздільна здатність визначає мінімальну відстань між двома точковими об'єктами в площині препарату, за якої вони реєструються як два окремі піксельні масиви. Для класичної конфокальної системи з ідеально малим (закритим до 1 Airy Unit) отвором пінхола, латеральна роздільна здатність описується модифікованим критерієм Релея-Аббе (2.1). Завдяки тому, що в конфокальній схемі функція розмиття точки (PSF) підноситься до квадрата (через подвійне проходження світла: туди як освітлення і назад як емісія), коефіцієнт 0,61 зменшується до 0,51:

$$\Delta_{xy} = \frac{0.51 * \lambda}{NA}. \quad (2.1)$$

Проведемо розрахунок для обраних об'єктивів та лазерів для масляного об'єктива Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil ($N_A = 1,3$):

при збудженні Аргоновим лазером ($\lambda_1=0,488$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,488} = \frac{0,5*0,488}{1,3} = \frac{0,24888}{1,3} = 0,191 \text{ мкм} = 191 \text{ нм}.$$

При збудженні HeNe лазером $\lambda_2 = 0,543$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,543} = \frac{0,5 * 0,543}{1,3} = \frac{0,27693}{1,3} = 0,213 \text{ мкм} = 213 \text{ нм.}$$

Для водного об'єктива IR-Achroplan 40x/0.8W ($N_A=0,8$):

– при збудженні Аргоновим лазером ($\lambda_1=0,488$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,488} = \frac{0,5 * 0,488}{0,8} = \frac{0,24888}{0,8} = 0,311 \text{ мкм} = 311 \text{ нм.}$$

– при збудженні HeNe лазером $\lambda_2=0,543$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,543} = \frac{0,5 * 0,543}{0,8} = \frac{0,27693}{0,8} = 0,346 \text{ мкм} = 346 \text{ нм.}$$

Аксіальна роздільна здатність є критичним параметром для 3D-реконструкції, оскільки вона визначає мінімальну апаратну товщину оптичного зрізу (Z-slice). Вона сильно залежить від показника заломлення імерсійного середовища, оскільки різниця між показником заломлення скла об'єктива та середовища викликає сферичні аберації, що «розтягують» фокальну пляму вздовж осі Z.

Теоретична формула (2.2) для розрахунку конфокальної аксіальної роздільної здатності має вигляд:

$$\Delta_z = \frac{0,88 * \lambda}{n - \sqrt{n^2 + NA^2}}. \quad (2.2)$$

Для масляного об'єктива Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil ($n = 1.515$, $NA = 1.3$). Спершу знайдемо знаменник формули, який є константою для даного об'єктива:

$$\begin{aligned} n - \sqrt{n^2 + NA^2} &= 1,515 - \sqrt{1,515^2 + 1,3^2} = 1,515 - \sqrt{2,952 - 1,69} = \\ &= 1,515 - \sqrt{0,605} \approx 1,515 - 0,7779 = 0,7371. \end{aligned}$$

– при збудженні Аргоновим лазером ($\lambda_1=0,488$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,488} = \frac{0,88 * 0,488}{0,7371} = \frac{0,4294}{0,7371} = 0,583 \text{ мкм} = 583 \text{ нм.}$$

– при збудженні HeNe лазером $\lambda_2=0,543$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,543} = \frac{0,88 * 0,543}{0,7371} = \frac{0,4778}{0,7371} = 0,648 \text{ мкм} = 648 \text{ нм.}$$

Для масляного об'єктива IR-Achroplan 40x/0,8W ($n=1,333$, $NA=0,8$). Спершу знайдемо знаменник формули, який є константою для даного об'єктива:

$$n - \sqrt{n^2 + NA^2} = 1,333 - \sqrt{1,333^2 + 0,8^2} = 1,333 - \sqrt{1,368 - 0,64} = \\ = 1,33 - \sqrt{1,368} \approx 1,33 - 1,0662 = 0,2668.$$

– при збудженні Аргоновим лазером ($\lambda_1=0,488$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,488} = \frac{0,88 * 0,488}{0,2668} = \frac{0,4294}{0,2668} = 1,609 \text{ мкм} = 1609 \text{ нм.}$$

При збудженні HeNe лазером $\lambda_2=0,543$ мкм):

$$\Delta_{xyOil,543} = \frac{0,88 * 0,543}{0,2668} = \frac{0,4778}{0,2668} = 1,791 \text{ мкм} = 1791 \text{ нм.}$$

Зведемо результати математичних розрахунків просторової роздільної здатності до узагальнюючої таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 - Розрахункові показники просторової роздільної здатності системи ZEISS LSM 510 [5]

Тип об'єктива мікроскопа	Імерсія / Показник n	Апертура NA	Тип та хвиля лазера (λ)	Латеральна роздільна здатність Δ_{xy}	Аксіальна товщина зрізу Δ_z
Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil	Олія / 1,515	1,3	Аргон (Ar), 488 нм	191 нм	583 нм
			Гелій-Неон, 543 нм	213 нм	648 нм

Продовження таблиці 2.1

IR- Achromplan 40x/0.8 W	Вода / 1,333	0,8	Аргон (Ar), 488 нм	311 нм	1609 нм
			Гелій- Неон, 543 нм	346 нм	1791 нм

Детальний параметричний аналіз підтверджує, що конфігурація мікроскопа ZEISS LSM 510 дозволяє гнучко адаптувати прилад під різні інженерні та біологічні завдання. Використання імерсійної олії та високоапертурного об'єктива ($N=1,3$) забезпечує системі еталонну оптичну роздільну здатність – менше 200 нм у латеральній площині. Водночас формується ультратонкий конфокальний зріз товщиною близько 0,6 мкм, що ідеально підходить для побудови високоточних 3D-моделей внутрішньоклітинних структур та топографії напівпровідників.

Натомість, застосування водного об'єктива зі зниженою апертурою ($N_A=0.8$) призводить до пропорційного збільшення розмірів фокальної плями (роздільна здатність падає до 311-346 нм, а товщина зрізу зростає до 1,6-1,8 мкм). Проте така оптична схема є технологічно виправданою: збільшення товщини зрізу дозволяє захоплювати більше світла з глибоких шарів розсіюючих живих зразків і є оптимальним для задач багатофотонної (NLO) мікроскопії. Зміна довжини хвилі лазера (перехід від синього до зеленого світла) очікувано призводить до зниження роздільної здатності приблизно на 11%, що є прямим наслідком законів хвильової оптики.

РОЗДІЛ 3

СПЕЦІАЛЬНА ЧАСТИНА. ЕКСПЛУАТАЦІЯ ТА ВИМІРЮВАННЯ

3.1 Технічне обслуговування та забезпечення конструктивної безпеки мікроскопа ZEISS LSM 510

Технічне обслуговування (ТО) лазерного скануючого конфокального мікроскопа ZEISS LSM 510 є пріоритетним комплексом інженерних заходів, спрямованих на збереження субмікронної точності вимірювань, запобігання роз'юстуванню оптичних шляхів та оптимізацію робочого ресурсу високовартісних компонентів системи. Конфокальний комплекс належить до класу прецизійних оптико-електронних приладів, тому будь-які регламентні або очисні роботи вимагають суворого дотримання інструкцій виробника та правил техніки безпеки.

Згідно з інструкцією виробника, будь-які регламентні роботи, що вимагають доступу до внутрішніх електронних або оптичних вузлів, мають виконуватися виключно авторизованим сервісним персоналом ZEISS. Проведення ТО звичайним користувачем обмежується зовнішнім очищенням, заміною імерсійних середовищ, моніторингом справності захисних контурів та контролем кліматичних умов.

Для забезпечення безпеки під час експлуатації та технічного догляду, конструкція мікроскопа забезпечена розгалуженою мережею попереджувальних та інформаційних етикеток. Кожна етикетка маркує конкретну зону небезпеки, доступ до якої під час ТО вимагає спеціальних запобіжних заходів.

Згідно зі схемою (рис. 3.1), технічний догляд має проводитися з урахуванням таких типів маркувань:

1. Лазерна безпека (Клас 3B): етикетки «Laser Radiation Class 3B» розташовані на бінокулярному тубусі мікроскопа та бічних портах. Під час

робіт у цих зонах (наприклад, заміна окулярів) існує небезпека для зору у випадку випадкового відбиття лазерного променя.

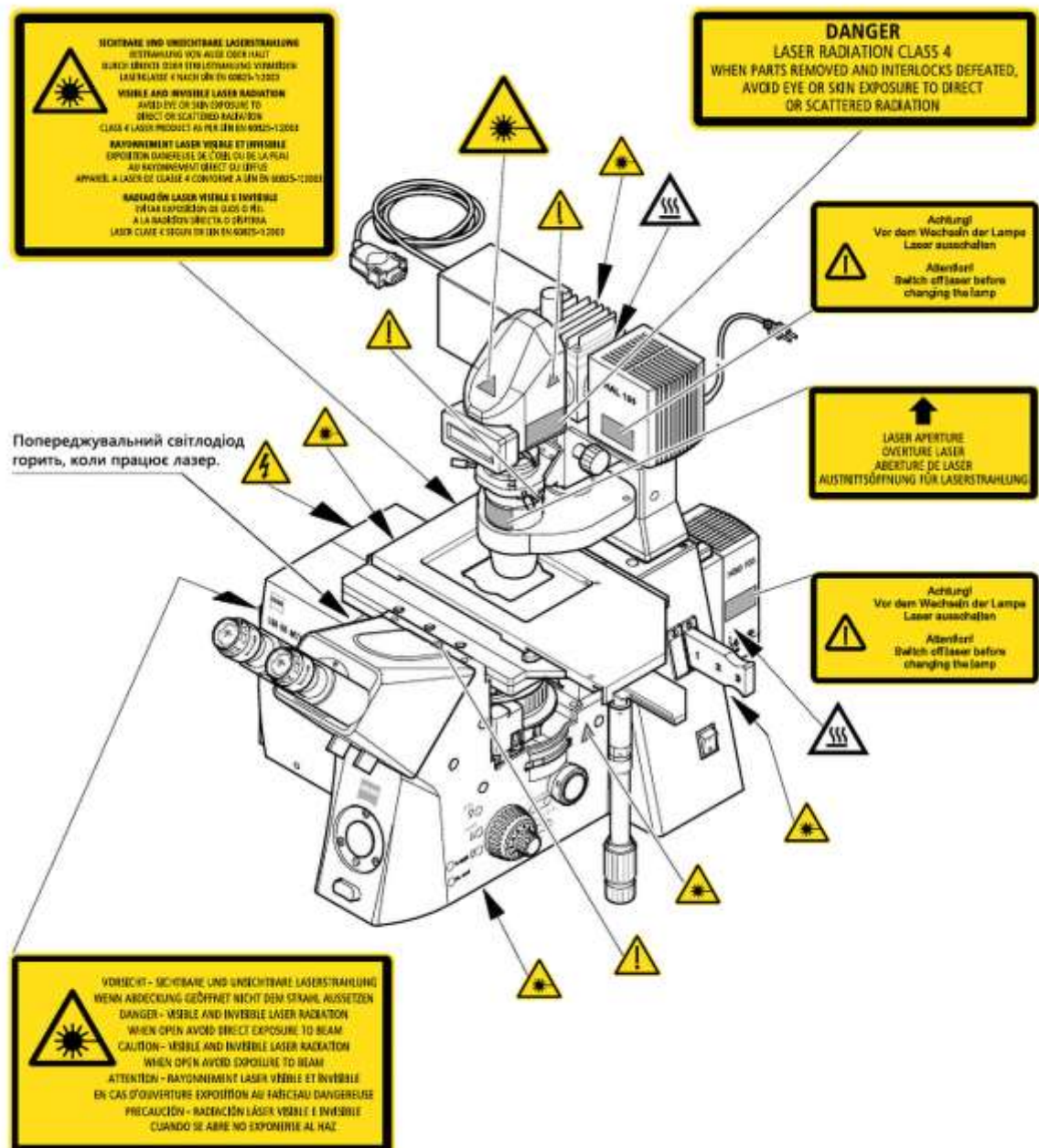


Рисунок 3.1 – Загальна схема розміщення попереджувальних та інформаційних етикеток [5]

2. Лазерна безпека (Клас 4): найвищий рівень небезпеки зафіксований на сканувальному модулі (Scan head) та на колоні освітлювача HAL 100. Будь-який несанкціонований доступ до внутрішніх дзеркал сканера або демонтаж

з'єднувальної трубки створює пряму загрозу для зору та ризик опіків шкіри. ТО в цій зоні вимагає повного апаратного блокування лазерів.

3. Термічна безпека: етикетки із символом гарячої поверхні маркують блоки ртутної (НВО 100) та галогенної (HAL 100) ламп. ТО в цих зонах (заміна ламп, юстування колектора) повинно проводитися виключно після повного охолодження блоків.

4. Апертури лазерного виходу: маркування «LASER Exit aperture» вказує на отвори виходу лазерного пучка. Контроль чистоти цих апертур є обов'язковою частиною ТО.

Конструктивна надійність джерел когерентного випромінювання прямо залежить від стабільності теплового режиму та параметрів живлення.

Категорично забороняється перекривати радіаторні грати та витяжні вентилятори на стійці System Electronic Rack. Блокування повітряного потоку призводить до локального перегріву лазерних трубок, дрейфу потужності випромінювання та деформації оптичних резонаторів.

Для Аргонного (Ar) лазера критично важливим є використання режиму прогріву та очікування. Перед повноцінним вимкненням лазера його необхідно перевести в режим Standby щонайменше на 5–10 хвилин, щоб вентилятори плавно знизили температуру газорозрядної трубки, запобігаючи виникненню термічних мікротріщин.

Струм трубки Аргонного лазера має підтримуватися на рівні близько 4 А (що відповідає 50% від максимальної потужності). Робота на граничних струмах прискорює деградацію катода.

Оскільки конфокальний мікроскоп працює на межі дифракційної роздільної здатності, будь-яке забруднення фронтальних лінз об'єтивів призводить до критичного розсіяння лазера та спотворення фокальної плями:

– Очищення від імерсійної олії: після роботи з високоапертурним об'єктивом Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil необхідно видаляти залишки олії за допомогою спеціалізованих безворсових серветок та сертифікованих розчинників (наприклад, суміші ефіру та абсолютowanego спирту у пропорції

7:3). Використання агресивних хімікатів заборонено, оскільки вони можуть розчинити прецизійний клей лінзи;

– Догляд за водними об'єктивами: при роботі з об'єктивами водної імерсії (IR-Achroplan 40x/0.8 W) дозволяється застосовувати лише дистильовану або деіонізовану воду. Звичайна водопровідна вода залишає кальцієвий наліт, що безповоротно руйнує оптичні характеристики лінзи.

Для підтримання нанометрової стабільності траєкторії сканування регламент ТО обов'язково включає перевірку умов робочого приміщення. Мікроскоп має експлуатуватися у приміщенні з прецизійним клімат-контролем. Допустиме коливання температури під час сканування становить не більше $\pm 0,5$ °C. Температурні стрибки викликають лінійні розширення металевих деталей штатива, що руйнує точність 3D-реконструкції.

Необхідно регулярно перевіряти стан пневматичних опор або пасивних демпферів системного столу (Anti-vibration table). Гранітна плита столу має «плавати» і не повинна торкатися захисних бортів чи стін кімнати, щоб унеможливити передачу зовнішніх вібрацій на оптичний тракт.

3.2 Несправності під час роботи з приладом та алгоритми їх усунення

У процесі експлуатації складного конфокального комплексу ZEISS LSM 510 можуть виникати нештатні ситуації, коли система не формує очікуваного зображення, демонструє високий рівень шумів або апаратно блокує роботу лазерів. Як свідчить інженерна практика та технічна документація виробника, переважна більшість таких експлуатаційних «несправностей» не пов'язана з фізичним виходом з ладу обладнання. Найчастіше вони є наслідком спрацювання апаратних контурів безпеки (Interlocks) або некоректного просторового та програмного налаштування оптичного тракту користувачем.

Для мінімізації часу простою обладнання та запобігання помилковому втручанню у внутрішні вузли приладу, нижче наведено систематизований

					ВР 241.00.00.000 ПЗ	Лист
						49
Зм	Лист	№ докум.	підпис	дата		

перелік типових експлуатаційних проблем. У Таблиці 3.1 узагальнено їхні фізичні причини та наведено покрокові інженерні алгоритми усунення згідно з регламентом виробника.

Таблиця 3.1 – Перелік помилок і рекомендацій для роботи з ZEISS LSM 510 [5]

Ознака нештатної ситуації	Ймовірна технічна причина	Протидія
1	2	3
Відсутній лазерний сигнал на зразку (повністю чорне зображення на екрані)	1. Слайдер аналізатора штатива (для DIC) знаходиться в робочому положенні (всунутий). Оскільки лазерне світло є лінійно поляризованим, аналізатор його повністю блокує. 2. Не відкрито електронний затвор AOTF у програмі.	1. Перевірити оптичний штатив: для переходу в конфокальний режим (LSM-mode) шток аналізатора обов'язково має бути повністю витягнутий з оптичного шляху. 2. У вікні Laser Control перевірити рівень потужності (Transmission %) для вибраної лазерної лінії.
Система раптово блокує вихід лазерного випромінювання (закрився Shutter)	Спрацював контур безпеки (security circuit). Це відбувається, коли верхня освітлювальна стійка прохідного світла (HAL 100) відкинута назад для заміни препарату.	Повернути освітлювальну опору у вертикальне робоче положення над предметним столиком до характерного кліку мікроперемикача. Затвор відкриється автоматично.

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
Перехресне засвічення каналів флуоресценції (Bleed-through / Cross-talk)	Одночасне сканування (Simultaneous scanning) зразка кількома лазерами, якщо спектри емісії флуорохромів сильно перекриваються (наприклад, FITC та Rhodamine).	Перевести систему у режим послідовного сканування (Multi-Tracking). Програма LSM 5 буде вмикати лазери та зчитувати детектори по черзі (по рядках або по кадрах), що фізично усуне змішування сигналів.
Надзвичайно високий рівень растрового шуму (низьке співвідношення сигнал/шум)	1. Діаметр конфокального пінхола занадто малий (менше 1 Airy Unit), що блокує корисні кванти. 2. Занадто висока швидкість сканування (Scan speed). 3. Висока напруга на PMT	1. Натиснути кнопку «1 AU» у вікні налаштування пінхола для встановлення оптимального діаметра. 2. Знизити швидкість розгортки (Scan speed) або збільшити параметр апаратного усереднення.
Некоректне або «рване» фокусування по осі Z (збивається Z-stack)	Невідповідність заданого кроку Z-мотора числовій апертурі об'єктива, або спроба використання п'єзоприводу за межами його лінійного діапазону.	У меню Z-Stack натиснути кнопку «Optimal» – програма автоматично розрахує мінімально необхідний крок Z відповідно до критерію Найквіста для поточного об'єктива та довжини хвилі.
Лазерні модулі або сканер не активуються при включенні	Порушено сувору послідовність подачі живлення на електронні стійці (System Electronic Rack).	Запуск має відбуватися строго за порядком: 1) Головний вимикач, 2) System/PC (Електроніка), 3) Components (Лазери та сканер).

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
Лазерний промінь нерівномірно освітлює поле зору (затемнення по краях)	Неточне юстування вхідного коліматора або зміщення волоконно-оптичного кабелю після механічного впливу на з'єднувальний тубус.	Проблема вимагає сервісного втручання. Необхідно викликати інженера для виконання тонкого юстування торця волокна та дзеркал перископічного тракту.

Підсумовуючи наведені в таблиці дані, можна стверджувати, що стабільність роботи системи ZEISS LSM 510 безпосередньо залежить від кваліфікації оператора. Суворе дотримання алгоритмів ініціалізації та розуміння фізичних принципів проходження світла в оптичному тракті дозволяють швидко діагностувати та усувати більшість експлуатаційних перешкод без залучення сервісних фахівців.

3.3 Процедура проведення вимірювань та програмне керування мікроскопом ZEISS LSM 510

Отримання якісного цифрового конфокального зображення на мікроскопі ZEISS LSM 510 вимагає чіткого дотримання регламентованого алгоритму підготовки приладу до роботи та прецизійного налаштування параметрів сканування. Керування всіма апаратними та моторизованими вузлами здійснюється централізовано через спеціалізоване програмне забезпечення LSM 5. Для виконання наукових досліджень найчастіше застосовується режим експертного контролю (Expert Mode), який надає оператору повний доступ до конфігурації оптичного тракту.

Процедура підготовки до роботи розпочинається з апаратного запуску електронних систем комплексу. Спочатку на передній панелі стійки керування (System Electronic Rack) вмикається головний мережевий вимикач. Далі

активується перемикач контуру електроніки, що забезпечує подачу живлення на базовий штатив мікроскопа, внутрішню цифрову шину CAN-Bus та керуючу комп'ютерну станцію. Після успішного завантаження операційної системи вмикається перемикач компонентів, який ініціює запуск сканувальної головки та високовольтних блоків живлення лазерних модулів.

Наступним етапом є ініціалізація та термостабілізація лазерних джерел випромінювання. У програмному інтерфейсі оператор переходить до панелі керування лазерами, де обирає необхідний для поточного дослідження лазерний модуль (наприклад, газовий аргонний лазер). Для забезпечення тривалого ресурсу роботи газорозрядної трубки, лазер спочатку переводиться у режим очікування (Standby) для прогріву катода. Після досягнення системою статусу повної готовності лазер перемикається в робочий режим, при цьому потужність випромінювання програмно регулюється таким чином, щоб робочий струм трубки становив близько 4 А.

Паралельно з прогрівом лазерів проводиться підготовка оптичного штатива мікроскопа. Оптичний тракт повністю переводиться у режим лазерного сканування: з оптичного шляху обов'язково виводиться стрижень аналізатора для диференційно-інтерференційного контрасту, а рефлекторний слайдер із флуоресцентними фільтрами перемикається у порожню позицію. Це необхідно для запобігання фізичному блокуванню лінійно поляризованого лазерного пучка. Напрямок світлового потоку за допомогою моторизованої призми перемикається з візуального спостереження через окуляри на вхідний порт сканувального модуля.

Безпосереднє налаштування параметрів реєстрації сигналу здійснюється у меню конфігурації сканувального тракту. Оператор програмно встановлює віртуальний шлях променя: обирає тип головного дихроїчного дільника (MDBS), активує необхідні канали високочутливих фотопомножувачів (PMT), налаштовує вторинні спектральні дільники та емісійні бар'єрні фільтри відповідно до спектрів флуорохромів у зразку. Для досягнення максимальної просторової роздільної здатності діаметр конфокальної діафрагми (Pinhole)

встановлюється на рівні однієї одиниці Ейрі (1 AU) для кожного активного каналу детектування.

На фінальному етапі в меню параметрів сканування задається просторова геометрія растра (найчастіше використовується матриця 1024×1024 пікселі) та встановлюється оптимальна швидкість розгортки променя. Для мінімізації впливу пуассонівських шумів світлового потоку та флуктуацій електроніки застосовується функція апаратного усереднення сигналу по рядках або кадрах. За допомогою моторизованого приводу фокусування налаштовується координата робочої площини по осі Z. У разі необхідності отримання тривимірної моделі препарату (Z-stack), задаються верхня та нижня межі сканування з автоматично розрахованим мінімальним кроком. Після виконання всіх налаштувань ініціюється процес збору даних, результати якого автоматично зберігаються у базі даних для подальшої цифрової обробки, вимірювань та 3D-реконструкції.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі було вирішено важливу прикладну задачу, а саме проведено комплексний аналіз конструкції, принципу дії, метрологічних характеристик та особливостей експлуатації лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510. Дослідження технічних параметрів приладу та його порівняння з існуючими світовими аналогами підтвердило, що поєднання двох повністю незалежних лінійних гальванометричних сканерів та індивідуальних регульованих діафрагм забезпечує мікроскопу еталонну геометрію раstra, високу лінійність сканування по всьому полі та максимальну оптичну чистоту конфокальних зрізів.

Під час роботи було детально вивчено фізичні явища, що лежать в основі функціонування комплексу. Це стосується механізму просторової фільтрації некогерентного позафокусного світла за допомогою пінхола, розташованого в оптично спряженій площині з фокусом об'єкта, а також теоретичних засад нелінійної оптики при двофотонному збудженні флуоресценції інфрачервоними фемтосекундними імпульсами лазера, що дозволяє суттєво зменшити розсіювання світла тканинами та збільшити глибину проникнення пучка всередину зразка.

В рамках конструкторської частини розроблено та детально описано структурно-функціональну, принципову оптичну та електричну схеми розподілу живлення за фазами. Особливу увагу приділено подетальному інженерному аналізу механіко-складальної схеми прецизійного тубусного спряження між корпусом перископа та сканувальною головкою, що забезпечує жорксту фіксацію оптичної осі та повну ізоляцію світловодного тракту від зовнішніх завад чи конвекційних потоків повітря в лабораторії.

Проведений розрахунково-параметричний аналіз просторової роздільної здатності для різних довжин хвиль лазерного збудження та реальних об'єктів підтвердив високу метрологічну ефективність мікроскопа. Математичні розрахунки показали, що використання

високоапертурного масляного об'єктивного компонента Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil дозволяє досягти граничної латеральної роздільної здатності у 191 нм та аксіальної товщини зрізу у 583 нм, що повністю задовольняє вимоги до наноструктурного аналізу матеріалів та наносистемної техніки.

Разом з тим, у роботі було систематизовано правила технічного обслуговування приладу, вимоги до стабілізації параметрів навколишнього середовища, включаючи прецизійний клімат-контроль та пневматичне демпфування антивібраційного столу, а також правила догляду за ICS-оптикою. Складена узагальнена інженерна матриця типових експлуатаційних помилок і несправностей, серед яких ефекти перехресного засвічення каналів і растрового шуму, разом із покроковими алгоритмами їх усунення та методикою проведення вимірювань у програмі LSM 5 в Expert Mode, має безпосередню практичну цінність для операторів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Інструкція з експлуатації та технічний опис лазерного скануючого мікроскопа ZEISS LSM 510 (Operating Manual). Carl Zeiss MicroImaging GmbH.
2. Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп Leica TCS SP5. URL: <https://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/> (дата звернення: 25.04.2026).
3. Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FluoView FV1000. URL: <https://www.olympus-lifescience.com/en/laser-scanning/> (дата звернення: 07.05.2026).
4. Надшвидкісна конфокальна система Nikon A1R. URL: <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/confocal-microscopes/a1r> (дата звернення: 26.04.2026).
5. Посібник користувача програмного забезпечення LSM 5 Expert (Software Manual). Carl Zeiss MicroImaging GmbH.
6. Колобродов В. Г., Тимчик Г. С., Колобродов М. С. Когерентні оптичні спектроаналізатори: монографія. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. 240 с.
7. Чиж І. Г., Колобродов В. Г. Теорія оптичних систем: підручник. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. 425 с.
8. Коваль В. М. Фізичні основи сенсорики: навч. посіб. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. 130 с.