

Методологія наукових досліджень *Scientific research methodology*

Шановні колеги! У рубриці „Методологія наукових досліджень” редакція продовжує публікацію матеріалів, що пов’язані з найважливішими аспектами наукової і навчальної діяльності: організаційно-методичним забезпеченням наукових видань, загальними принципами статистичного, біометричного і математичного супроводження досліджень, а також оригінальними методичними підходами вітчизняних і зарубіжних морфологів.

**О.В. Градов
Ф.К. Орехов**

Институт Химической Физики им. Н.Н. Семенова РАН,
г. Москва, Российская Федерация

Надійшла:
07.04.2019
Прийнята:
14.06.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.2.81-93>

УДК: 611.018 + 681.723.21\24

ЛАЗЕРНАЯ ПОЛИПРОЕКЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИНТЕГРИРУЮЩЕЙ СФЕРЕ / ФОТОМЕТРИЧЕСКОМ ШАРЕ УЛЬБРИХТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЗЛИНЗОВЫХ МИКРОСКОПОВ С ASP-СЕНСОРАМИ НА БАЗЕ ПРИБОРОВ С ЗАРЯДОВОЙ СВЯЗЬЮ ИЛИ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ МЕТАЛЛ-ОКСИД-ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ МАТРИЦ

Gradov O.V. ✉, Orekhov F.K. Multiple Projection Laser Microscopy in the Ulbricht Integrating Sphere (MPLM-UIS) using lens-less microscopes with CCD and CMOS (active-pixel) sensors, including angle sensitive ones.

Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT. Microscopy with an integrating sphere (also known as the photometric Ulbricht sphere) is rarely used in histological and cytological practice due to the difficulties in manufacturing the integrating chamber with the technological holes for the sample placing, as well as the high cost of the modern commercially available Ulbricht spheres. The additional difficulties appear at the ultrastructural / submicroscopic level, especially when using near-field optical microscopy (SNOM) techniques determining the size of the integrating sphere. The required correspondence between the radius of the integrating sphere and the size of the specific sample / sample stage results in a physical and technical contradiction, which in principle can be overcome only if a number of conditions are met. The first and obvious one is the equal dimensions of the transmission window of the sample stage and the sample itself. The final condition is obtaining a wide-field image at the stationary position of the stage, since its displacement inside the integrating sphere will lead to the changes in the light-shadow (schlieren) structure of the registrogram. The same is true for the movement of the coordinate stage or a slide / sample itself, but for the sample *in vivo* / *in situ* perturbations of the optical field of the isotropic-integrating sphere can be used as an analytical signal. In a general case, when all the above planes and sections are located at the stationary position at the center of the Ulbricht sphere, the only possible solution is to use CCD / CMOS sensors with a simple printed circuit board, which act as an analytical chip with a function of a lensless projection microscope instead of the reduced conventional optical microscope.

Key words: microscopy with an integrating sphere, Ulbricht sphere, lens-less microscopy, angle-selective pixel tissue imaging, on-chip tissue imaging, Multiple Projection Laser Microscopy in the Ulbricht Integrating Sphere (MPLM-UIS).

Citation:

Gradov OV, Orekhov FK. [Multiple Projection Laser Microscopy in the Ulbricht Integrating Sphere (MPLM-UIS) using lens-less microscopes with CCD and CMOS (active-pixel) sensors, including angle sensitive ones]. *Morphologia*. 2019;13(2):81-93. Russian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.2.81-93>

✉ neurobiophys@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Введение

В практике физического эксперимента и материаловедения в последнее время, после сравнительного затишья с того периода, когда в начале текущего века впервые применили ближнепольную оптическую микроскопию с интегрирующей сферой [1], наступает эпоха широкомасштабного внедрения методов микроскопии с интегрирующей сферой в методы и протоколы тестирования. Это касается как микроскопического (либо мезоскопического) уровня, где в канонических и конвенционных методах широкопольной флуоресцентной / люминесцентной микроскопии с использованием дешевых диодных источников на основе гетероструктур [2] активно внедряется контроль с использованием интегрирующей сферы, так и чисто наноструктурных аспектов, таких, как исследования оптического поглощения наномерных солнечных батарей и фотовольтаических элементов [3], одиночных структур глубоко-субмикронного масштаба организации [4] и т.д. Очевидно, что использование для контактной регистрации LED [2] отличных спектрально-диапазонов не исчерпывает, с физических (оптических) позиций, возможности микроскопии в интегрирующей сфере – в силу того, что излучение LED может являться лишь частично когерентным, а диаграммы направленности диодного источника детерминируют угловые номенклатуры направлений проекции для каждого спектрально-диапазона конкретного источника. Интересным и перспективным является использование когерентных источников и исследование спекл-регистрации гистологических образцов, а также исследование на когерентных пучках в присутствии спекл-шумов диффузных поверхностей. Иными словами, необходимы схемы микроскопов с интегрирующей сферой с лазерными источниками, причём – расположение лазеров должно варьироваться для обеспечения ближнепольных и дальнепольных работ, в частности, реализуемых с использованием удлиненного тубуса. Отсутствие атмосферных / газодинамических помех на тракте лазерного пучка в последнем случае можно обеспечить путем вакуумирования колонны (тубуса, в котором распространяется пучок), а измерение, учитывающее их, для конкретной атмосферы (аналогично электронной микроскопии типа ESEM [5]), возможно реализовать путем напуска соответствующего газа в случае полной / «необходимой и достаточной» степени герметизации колонны. Общеизвестные стандарты вакуумных уплотнений, доступные для пользователя и конструктора инструментов такого типа, способны последовательно обеспечить как напуск, так и откачку / вакуумирование в подобных системах [6] (независимо от класса

задач лазерно-микроскопических измерений или безлинзовой микрофотографии в них).

Принципиальный для подобных задач вопрос скептиков состоит в применимости для лазерных измерений биологических рассеивающих структур интегрирующих сфер. Такого рода вопросы требуют, прежде всего, литературного обоснования применимости средства, физически обеспечивающего достижение цели, к объекту, потенциально не обладающему, в базе скептической аргументации, свойствами, достаточными для обеспечения целевых качеств, инструментально или объектно-ориентировано требующихся для этого средства в целевом модуле его применения к объекту как предмету исследования им. Иными словами – необходима аргументация как применимости инструмента / средства к физике объектов, подлежащих исследованию, так и применимости объекта к физике инструментов, которые постулируются как средства их исследования. В нашем случае необходимы аргументации: применения сфер Ульбрихта в лазерной физике и/или лазеров в фотометрической технике, с интегрированием светового потока; совместимости измерений в гетерогенных «мутных» средах, к которым относятся и частично упорядоченные биополимеры, и ультраструктура клеток, с когерентной направленной лазерной частью и диффузно интегрирующей частью схемы одновременно; прецедентности получения биомедицински-релевантных данных на подобных установках, особо – в целевом гистологическом аспекте.

Использование интегрирующих сфер в лазерной физике и оптоэлектронике началось с 1960-х гг., непосредственно после появления и начала внедрения в физическую практику лазеров [7-10]. Периодически активизируясь или затухая, это продолжается до настоящего времени [11,12]. Использование подобного подхода для генерации спеклов является почти классическим, начиная, как максимум, с 1980-х гг. [12,13]. Метрологический потенциал в аспекте регистрации параметров пучка включает в себя рефлектометрические измерения и измерения излучаемой / поглощаемой мощности [7-10], длин волн или/и (как пересчетные величины) волновых чисел [12]. Метрологический потенциал в аспекте зондирования или измерения параметров сред / образцов / препаратов, в том числе – гетерогенного состава, с позиций магнитооптики и физики тонких пленок, ограничивается измерением их толщин, что обуславливается исключительно промышленными / технологическими потребностями [14]; но для гетерогенных и структурированных сред как таковых, характеризующихся, по большей части, известной мутностью или пористостью, анизотропией или ориентацией по

конкретным осям, в обобщенном случае, этого недостаточно, поэтому существует техника и физическая методология измерений мутных / гетерогенных и структурированных сред в интегрирующих сферах [15]. Очевидно, что, в силу гетерогенного распределения сечений, приведенных диаметров (без учета эллиптичности или же коэффициента прозенхимности, по Тахтаджяну) отдельных просцируемых структур (интегрально интерпретируемых как дисперсность), обуславливающих рассеяние лазерного пучка, характеристических для тех или иных лазерно-турбидиметрических / -нефелометрических спектров, диапазон и спектр дисперсности структуры должен зависеть от широкополосности и спектра источника. Это является хорошо совместимым с использованием интегрирующих сфер при терагерцовых, фемтосекундных измерениях в режиме суперконтинуума, а также с перестраиваемыми (по длине волны) лазерными источниками, широко распространенными в лазерной биофизике или фотобиологии и молекулярно-биохимической спектроскопии и спектрофлуориметрии (реже – цитометрии) за рубежом [16-18]. Биохимические исследования на интегрирующих сферах проводятся сравнительно редко, однако существуют даже клинико-биохимические методы (типа измерения глюкозы [19]), основанные на такой технике. Исследование в ней гомогенных сред не представляет существенного метрологического или диагностического интереса. Рассмотрим ряд работ по биомедицинскому применению интегрирующих сфер, реализуемому в практике работы с гетерогенными / структурированными биологическими объектами. Даже исключая чисто лазерно-терапевтические статьи (пример: [20]), остаются небезынтересными в пределах нашего рассмотрения публикации по коагуляции отличных по локальному биохимическому профилю тканей [21,22], фотодинамической терапии [23], оптоволоконному и микрорефлектометрическому скринингу тканей человека и животных [24,25].

Так как оптические взаимодействия пересекающихся и интерферирующих пучков когерентного излучения в клетках и тканях подчиняются общим закономерностям класса решенных задач для мутных сред [26], проблем с физической интерпретацией таких данных обычно не возникает. Следует отметить, что в большинстве наиболее доступных случаев с наиболее систематически-реализуемыми (однако не всегда воспроизводимыми) схемами и протоколами эксперимента уровня 1970-х-2000-х гг. в качестве источника используется не перестраиваемый по длине волны гелий-неоновый лазер (см., напр.: [24, 25]) или другой R-канальный (для систем регистрации с мозаиками Байера) лазер (см. напр.: [27]), включая элементарные диодные лазеры (лазерные диоды) и полупроводниковые

лазеры с диодной накачкой – DPSSL; если в статье не ставится целью анализ испаряемого лазером вещества [21, 22], когда используются YAG-лазеры, углекислотные лазеры и прочие мощные схемы, обладающие высоким энерговыделением.

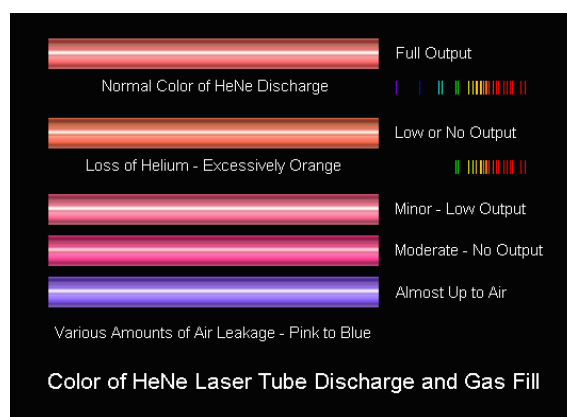


Рис. 1. Возможные спектральные девиации HeNe лазера.

Для того, чтобы подобные лазеры не сжигали на экстремуме мощности покрытие и поверхность интегрирующих сфер, существует техника нанесения стойких даже к действию углекислотных лазеров покрытий на интегрирующие сферы [28]. Однако, как правило, в силу требований техники безопасности, в лабораторно-биомедицинских условиях не идут на постановку эксперимента с интегрирующей сферой, если в ней будет фиксироваться горение биоматериала. Впрочем, использование обычных гелий-неоновых лазеров для измерений (но не манипуляций) при высоких температурах, в принципе, также возможно, о чем свидетельствуют даже самые ранние работы указанного интеграционно-фотометрического направления [9].

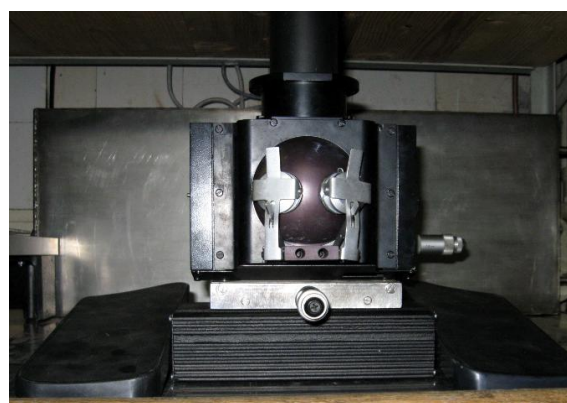


Рис. 2. Камера – интегрирующая сфера, в которую вводится образец.

Материалы и методы

Выбор лазера

Поэтому при выборе конкретных опорных лазеров мы исходим из ряда требований, в осно-

ве своей, диктуемых вышеперечисленными техническими и физическими критериями общего для всех подобных задач профиля: применимость в биомедицине, подтвержденная опорными референсными статьями, возможность «неразрушающего (и не повреждающего аналит или промеряемую структуру) контроля», доступность для воспроизведения схемы, учитывая распространенность различных классов лазеров. Из доступных лазеров является наиболее библиографически востребованным морально устаревший ЛГ-75, применявшийся в биомедицине для: воздействия на клетки патогенных (в т.ч. условно-) микроорганизмов [29], лечения нефротуберкулеза [30], лёгочных опухолей [31], тромбозов [32], многих проктологических заболеваний [33], посттравматического увеита [34]; коррекции крови по интравенозной фотостимуляционной схеме после инфарктов [35]; коррекции анастомозов после резекции желудка [36]; восстановление микроциркуляции и нейронной структуры в зоне с восстановленной гемодинамикой после ишемии [37] и репарации нейромышечного аппарата после нейротомии [38]. Часть работ с использованием ЛГ-75 была опубликована в переводимых на английский язык и зарубежных журналах [29-41], поэтому критический анализ соответствующих результатов доступен также и для зарубежного читателя. Как это известно из истории лазерной техники, лазер ЛГ-75 впервые был презентован в 1968 г. (о наиболее ранней дате – см. аннотацию в "Journal of Applied Spectroscopy", Vol. 8, №2, P. 230), а уже в 1971 году осуществлена его модернизация с переходом на холодные катоды и внедрением цилиндрической формы корпуса по технологии Седова-Базилева, и, к концу 1970-х гг., выведен в серию ЛГ-75-1 (см.: "Soviet Journal of Quantum Electronics", Vol. 9, № 1, P. 139). Эти лазеры заменили лазер ЛГ-34М, но унаследовали его хорошо известные и воспроизводимые спектральные особенности (как «классического» HeNe лазера) [42], а по стабилизационным характеристикам были сравнимыми с ним [43,44]. С метрологических позиций, между ЛГ-75 и ЛГ-75-1 не было различий по выходной (пиковой / стационарной) мощности, уровню расходимости пучка, а отличия имелись только в техническом плане (время жизни излучателя, размеры радиатора и источника питания и т.д.) [45]. Сохранны в работоспособном состоянии многие из использовавшихся (на протяжении прошедших 50-ти лет) устройств данной марки. Робастность подобных устройств позволяет использовать их как референсные во многих хрестоматийных установках, начиная со схем практикумов, заканчивая поверочными организациями. Поэтому технических проблем при выборе HeNe лазера данной марки как источника для лазерного микроскопа с интегрирующей сферой, в принципе, при штатном запуске оно-

не должно быть. Известные дефекты, связанные, по большей части, с изменением содержания газовой смеси в лазере (см. рис. 1) встречаются, тем не менее, на многих старых газовых лазерах, в том числе – этой модели, особенно при наличии нескольких лет простоя без запуска. Поэтому подбор экземпляра осуществляли с использованием оптоволоконного спектрометра для контроля качества разряда.

Устройство микроскопа.

Конструктивно установка для проекционной микроскопии с интегрирующей сферой MPLM-UIS (Multiple Projection Laser Microscopy in the Ulbricht Integrating Sphere) имеет на данный момент три версии, каждая из которых стереотипно состоит из:

а) камеры – интегрирующей сферы, в которую вводится образец (рис. 2);

б) полумобильной метровой лазерной колонны цилиндрического форм-фактора, смонтированной на основе лазера ЛГ-75-1, с целью мобильности закрепленного на подвижной каретке, движущейся по горизонтальной уголкового рельсе (рис. 3);

в) детектирующего устройства – безлинзового микроскопа на базе CCD или CMOS-сенсора, регистрирующего сигнал;

г) системы позиционирования на базе вертикального и горизонтального микроскопических столов (хорошо видно на рис. 2); опционально – с пружинными демпферами;

д) сварного водяного корпуса радиатора с патрубками вывода на термостат MLW в случае сборки с удлиняющим тубусом либо простого корпуса радиатора для обвязки (как это показано на рис. 2); дополнительные диодные лазеры и охлаждаемый ПЗС-модуль (ПЗС-линейка) оптоволоконного спектрометра также могут быть интегрированы в ещё один радиаторный корпус (рис. 4);

е) в случае сборки с удлиняющим тубусом – модуля шлюзовой загрузки образца с герметизируемой технологической стенкой (как в электронном микроскопе);

ж) в случае сборки с удлиняющим тубусом – схемы прокачки с взаимозаменяемыми насосами, использование которых регламентируется протоколами эксперимента при использовании различных сред, а также – специально подобранного сосуда Дьюара и отдельно подводимых газовых баллонов с редукторами, поступление газа из которых можно контролировать;

з) в случае сборки с удлиняющим тубусом – системы регистрации, включающей в себя термометрический и манометрический модули (манометр или вакуумметр Пирани – как это показано на рис. 3, в схеме варианта микроскопа изобретенного на котором этот прибор не используется); это актуально в случае охлаждения (вплоть до лазерного охлаждения холодных ато-

мов [46]) в интегрирующей сфере или напуска газа (например – метана [47]) в неё, но не имеет смысла для большинства биологически-релевантных режимов.

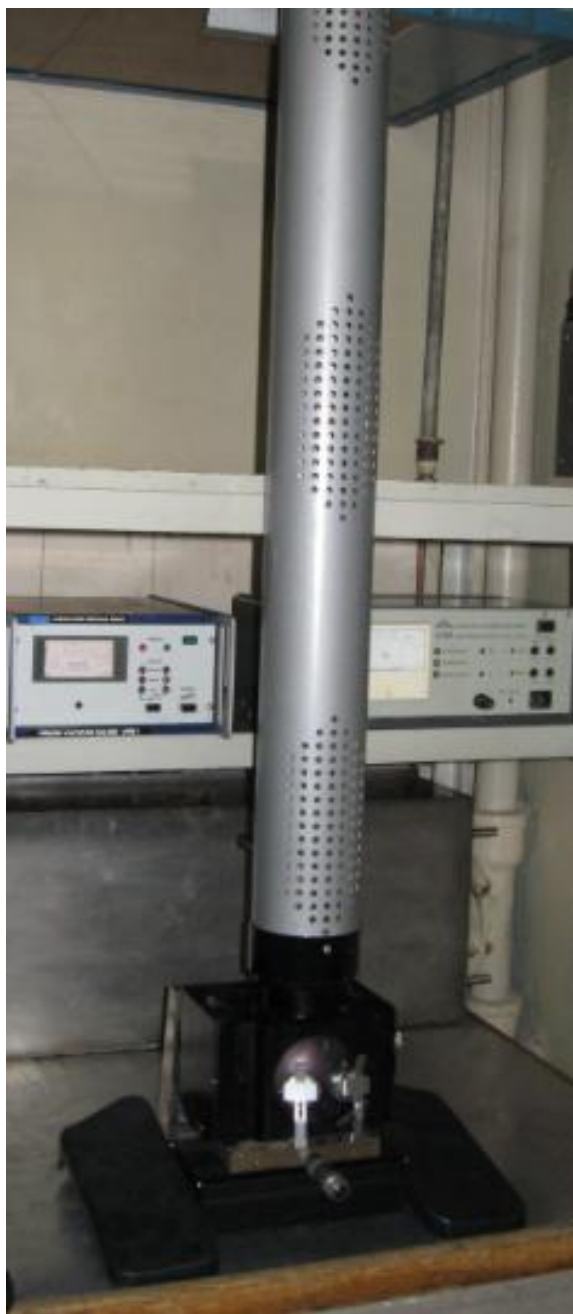


Рис. 3. Внешний вид колонны в сборе и вакуумметра Пирани на заднем плане.

Ниже рассматривается весь комплекс технологических узлов и модулей установки, понимание взаимосвязи которых требуется для построения аналогичных систем по DIY принципам. Вспомогательные устройства, такие как блок питания лазера, термостат и т.п. подробно не рассматриваются, однако их наличие в составе установки подразумевается, исходя из невозможности работы без таковых.

Используется стандартный блок питания, обеспечивающий напряжение 2,5 киловольт, необходимое для зажигания разряда на аноде в покрытом геттером-газопоглотителем капилляре при рабочем токе 25 мА, мощности 25 милливатт и потреблении энергии 100 ватт. Кабели от источника питания проведены через потолочный короб и подвижной кронштейн муфтовой формы к входным клеммам лазерной колонны (высоковольтный разъем серии ВВТ5) с запасом длины, поскольку движение колонны не должно препятствовать работе установки. Нить накала на 6.3 В прогревает катод перед поджигом, причем во время прогрева колонна пребывает на рельсе в статическом состоянии за счет механического стопорения каретки на узле крепления.

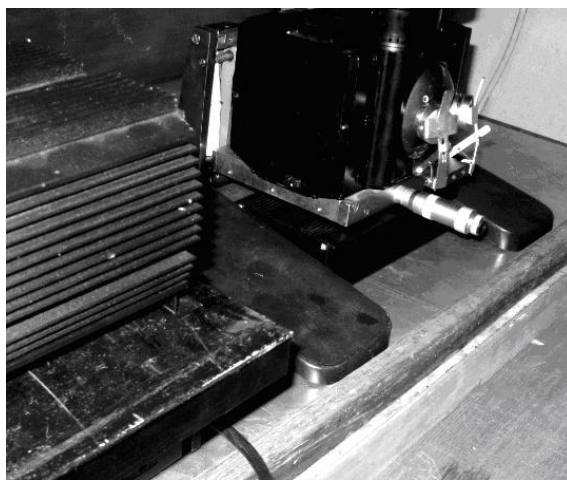


Рис. 4. Иллюстрация возможности интеграции оптоволоконного спектрометра и дополнительных диодных лазеров и лазеров с диодной накачкой в радиаторном блоке.

Принцип и механика действия

Узел крепления включает в себя рельс-балку, по которой поступательно движется каретка с фиксатором для закрепления штифта лазерной колонны, позиционируемого с помощью микрометрического винта с рассверленным винтовым упором. Движением в ортогональном к нормали лазерного источника направлении осуществляется совмещение выходного отверстия лазерного пучка с центром интегрирующего рефлектора камеры или отклонение от него на заданное значение. В фиксированном состоянии лазерная колонна идеально совмещена с раструбом камеры. Съёмная гибкая пружинная втулка на раструбе герметизирует зазор при опускании колонны и попадании её формованных шестигранных зубцов в пазы винтов настройки зеркала таким образом, что при несоответствии формы / ориентации зубца форме / ориентации шестигранника входение в паз не происходит и герметизация не осуществляется. Этот механизм позволяет юстировать зеркало с целью получения наиболее оптимального изображения при его

установке по окну Брюстера.

Существует также более поздняя компактная модификация с использованием более компактного HeNe-лазерного источника, однако в ней такая подвижность невозможна, по причине полной фиксации тубуса лазера в держателе (рис. 5).



Рис. 5. Более поздняя компактная модификация с неподвижным центрированным HeNe лазером. В данном случае наличие микровинтов практически бесполезно.

Образец, получение изображения которого является целью экспериментов на данной установке, исследуется в герметизируемой и потенциально вакуумируемой аналитической камере, размещенной непосредственно под колонной в случае сборки с удлиняющим тубусом либо в интегрирующей сфере Ульбрихта от спектрофотометра SPECORD (ГДР) без вакуумирования, герметизации и напуска специально комбинируемых атмосфер. Аналитическая камера, в первом случае оснащенная интегрирующей сферой собственного изготовления (на базе вакуумной масс-спектрометрической арматуры) и окном для ввода подвижного стержня препаратоводителя, имеет также возможность заполнения газом, в том числе криогазовой средой. Существуют две отличные системы ввода образца, основанные на: использовании шнекового винтового препаратоводителя, поступательное движение которого приводит к ротации образца и возможности визуализации его боковых или нижней сторон; либо на подвижном штоке, внедряемом в камеру через шлюз на задней стороне камеры. Различие состоит в позиционировании образца относи-

тельно фокуса фоторегистрирующей камеры и центра интегрирующей сферы.

Существуют также технологии предварительного ввода планарного препарата. Так, нами разработаны кольцеобразные препаратоводители для чашек Петри (работающие по теодолитному принципу), движение которых внутри камеры осуществляется вследствие скольжения шарико-подшипниковой платформы, подшипники которой размещены по всей окружности обода, в котором фиксируется чашка. Изготавливаются вкладки в "теодолит", допускающие использование альтернативных носителей различного типа, включая сетки для электронной микроскопии и аналитические чипы без смены аналитической камеры.

Нижняя часть аналитической камеры закреплена на подвижном предметном столике, управляемом одним микрометрическим винтом, допускающим движение аналитической камеры в продольном направлении. Позиционирование по вертикали, способствующее, в частности, герметизации и взаимно-однозначной фиксации колонны на раструбе камеры, осуществляется с помощью аналогичного предметного столика, микрометрический винт которого, в отличие от микрометрического винта для горизонтального позиционирования, имеет винтовой упор-фиксатор. Столик вертикального позиционирования, размещенный с тыловой стороны камеры, имеет два факультативных торцевых захвата, предназначенных для поддержания камеры при повышенной массе содержимого или при неравновесном её распределении. Содержание данного абзаца верно для установки с использованием ЛГ-75, но не соответствует устройству более поздней модификации с фиксированным лазером, что показана на рис. 5.

Детектирование изображения производится CMOS или CCD. Параллельно через технологические разъемы в колонну вводится оптоволоконный зонд, выводящий сигнал на USB-спектрометр "Ocean Optics" на базе оптической линейки, что позволяет получать информацию о состоянии рабочего тела лазера, сопоставляя его спектр / колориметрию известным функциональным и нефункциональным состояниям, изображенным на илл. 1. Также для ввода оптоволоконных зондов и экспериментальных микроманипуляторов для осуществления исследовательских микроопераций на образце предназначены два окна с партикулярно герметизирующими клапанами, размещенные на фронтальной полусфере аналитической камеры – интегрирующей сферы.

В нижней части установки лежит водно-охлаждаемый / нагреваемый радиатор, для монтажа оснастки которого в столе могут быть проделаны технологические отверстия для вывода и закрепления фитингов. Патрубки радиатора мо-

гут быть выведены под съёмные панели типа "слайдер" (подобные выпускавшимся когда-то для микроскопов типа МБС), расположенные по бокам для удобства доступа к микрометрическому винту вертикальной регулировки и функциональным точкам с торцов камеры.

Тубусная газонаполняемая, обогреваемая, вакуумируемая дальнепольная версия

Для третьей версии установки, в которой увеличение расходимости пучка достигают размещением между интегрирующей сферой и лазером оптического тубуса – вакуумного / газонаполняемого объёма, достижимо внедрение режимов, аналогичных принципу ESEM. При съёме клапанов при внедрении любых зондов внутрь сферы в случае сборки с таким тубусом необходимо предусмотреть герметизацию, препятствующую утере вакуума либо утечке газа. Для контроля в первом тестовом пуске может быть, в частности, использован масс-спектрометрический гелиевый течеискатель, но этот тип контроля течи не является единственным рациональным решением для пробных пусков установок данного типа. На рис. 6 показана часть данной (третьей версии) установки в том состоянии, в которой нами была завершена и приостановлена её сборка в связи с отсутствием кадрового состава для вакуумных и «газохимических» работ, а также индуцированным руководством переходом оставшейся штатной единицы на другую тематику. Демонтаж оборудования на детали, по причине передачи комнаты, предрешил судьбу данной версии, несмотря на то, что на ней можно было бы осуществить ряд крайне интересных технических режимов, в частности – режим управляемого программой / контроллером стробирования и рассеивания лазерного пучка лопатками турбомолекулярного насоса (рис. 7) – в конструировавшейся в чертежах и эскизах версии 3-А. В версии 3-Б с увеличенными размерами интегрирующей сферы при сохранении точности позиционирования также предусматривался гониометрический стол, обладающий перфорацией для крепления чипа – безлинзового микроскопа, элементарных стационарных микроманипуляторов-перфузоров (рис. 8 а), аналогичный стол с креплением матрицы чипа – безлинзового микроскопа в центре (рис. 8 б) и подъёмник стола (рис. 8 в).

О возможности интеграции со спектральным оборудованием

Основным назначением интегрирующих сфер используемого типа является анализ в определенных областях спектра. Поэтому очевиден вопрос: возможно ли интегрировать с данной микроскопией спектроскопию, получив микрофотометр с интегрирующей сферой? Для этого необходима качественная модернизация самой интегрирующей сферы и автоматизация соответствующего ей по форм-фактору спектро-

фотометра.

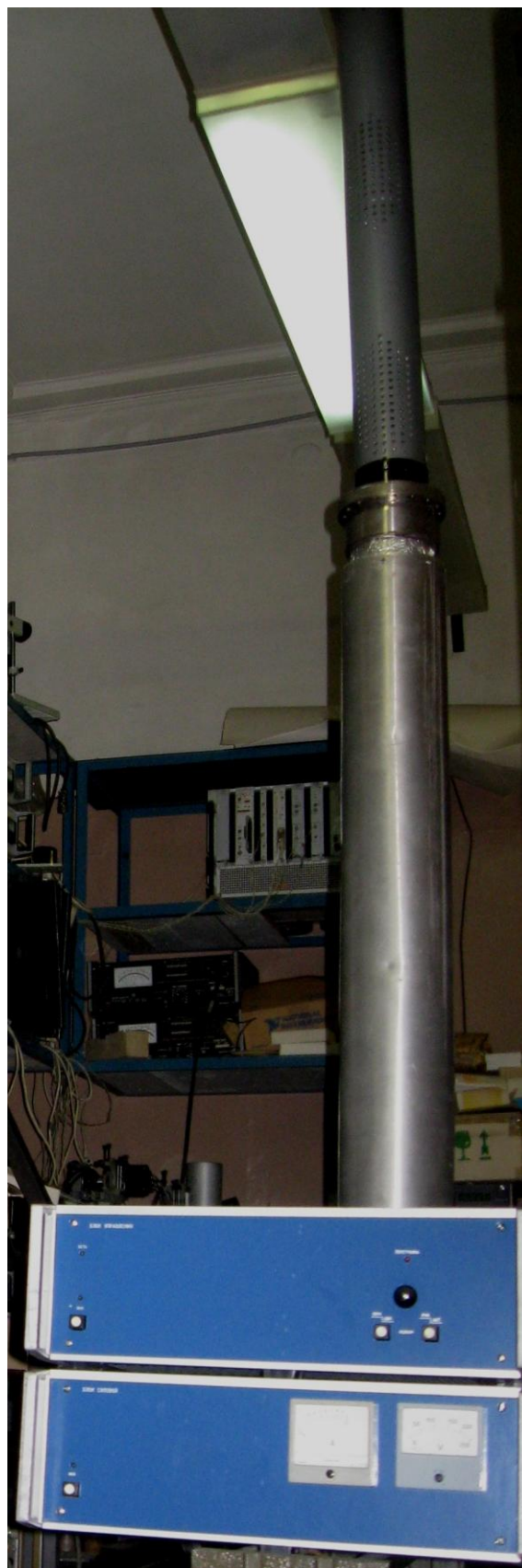


Рис. 6. Модификация микроскопа 3 в самом нача-

ле работ над ней.

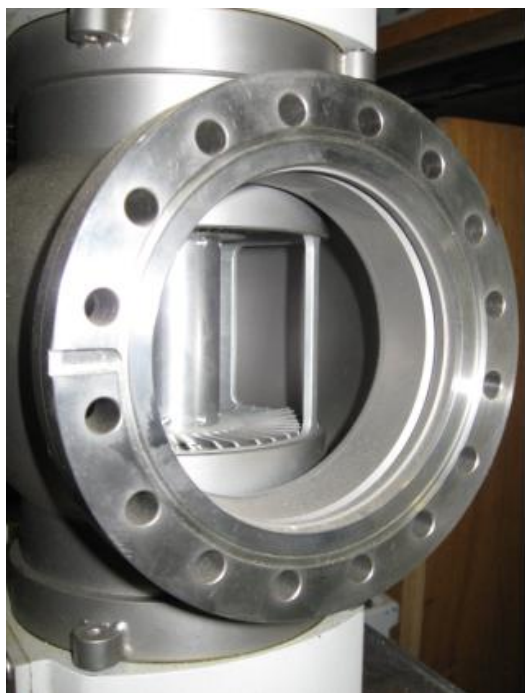


Рис. 7. Лопатки турбомолекулярного насоса планировавшейся модификации 3-А микроскопа с интегрирующей сферой.

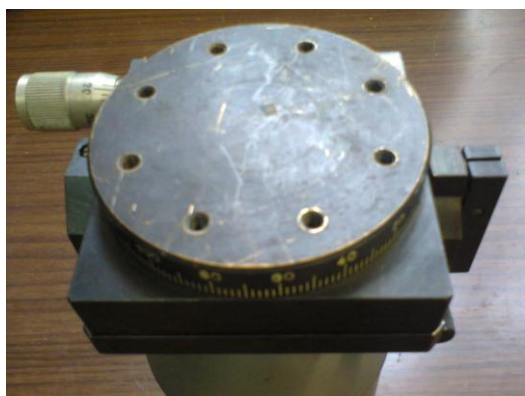


Рис. 8-а. Гониометрический стол, обладающий перфорацией для крепления чипа – безлинзового микроскопа и элементарных стационарных микроманипуляторов-перфузоров.



Рис. 8-б. Стол, обладающий перфорацией для крепления чипа – безлинзового микроскопа и элементарных стационарных микроманипуляторов-перфузоров

с креплением матрицы чипа – безлинзового микроскопа в центре.



Рис. 8-в. Подъёмник стола.

Нами было в 2017 году инициировано восстановление спектрофотометров SPECORD (особенно – М40), к которым этот типоразмер интегрирующих сфер подходит. Фрагменты видеоряда ролика о восстановлении и автоматизации («Тест + автоматизация спектрофотометра SPECORD М40 с интегрирующей сферой» - URL: <https://www.youtube.com/watch?v=qdwxK3qVnO4>) и тестировании («Тест программного-аппаратного комплекса на базе SPECORD М40» - URL: https://www.youtube.com/watch?v=RQV_uyyKJGQ)

задела SPECORD для описанной задачи приводятся на рис. 9, 10. Работы выполнены специалистами ООО «Химлабсервис» (ранее – «Эталон-ТЦ»). Единственная оговорка: система безлинзовой микроскопии будет в такой конфигурации работать не с лазерным источником излучения, а с лампами прибора.

Результаты и заключение

Были проведены следующие тестовые работы:

I. Тестирование спектрональных сенсоров безлинзовых микроскопов на основе приборов с зарядовой связью с использованием наносекундной (в предельном режиме) стробоскопической осциллографической и рефлектометрической техники с GPIB/HPIB (СК7-18). Данные структуры предназначались для фиксации в ротационном столе большого варианта микроскопа (см. Рис. 8б) или интегрирующей сфере [IEEE

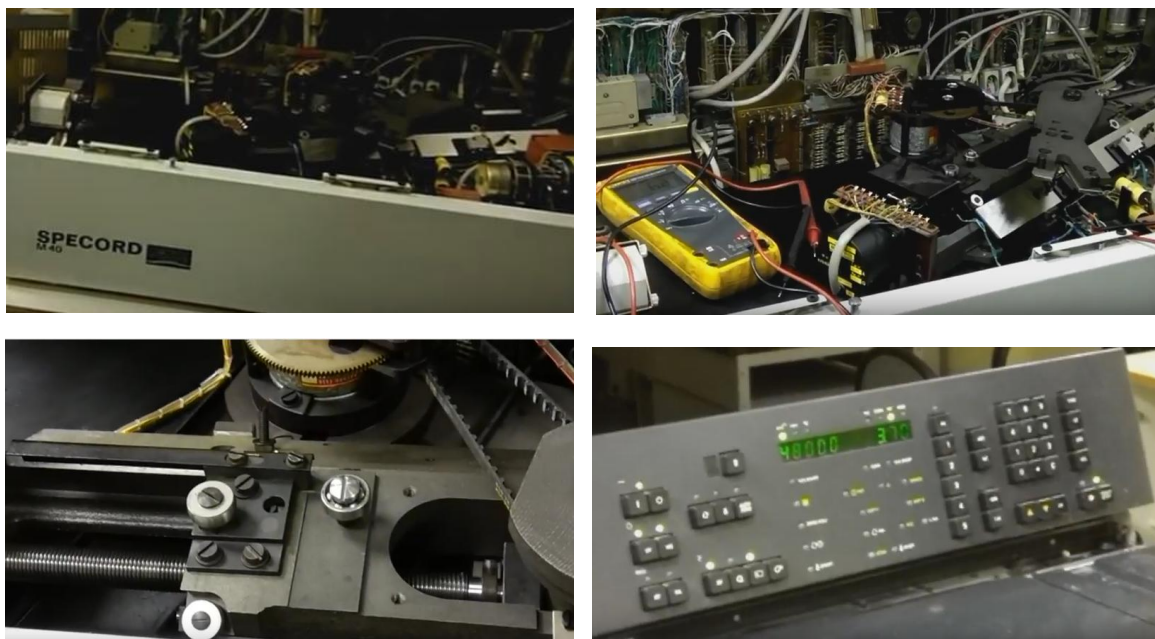


Рис. 9. Тестирование аппаратной части прибора.

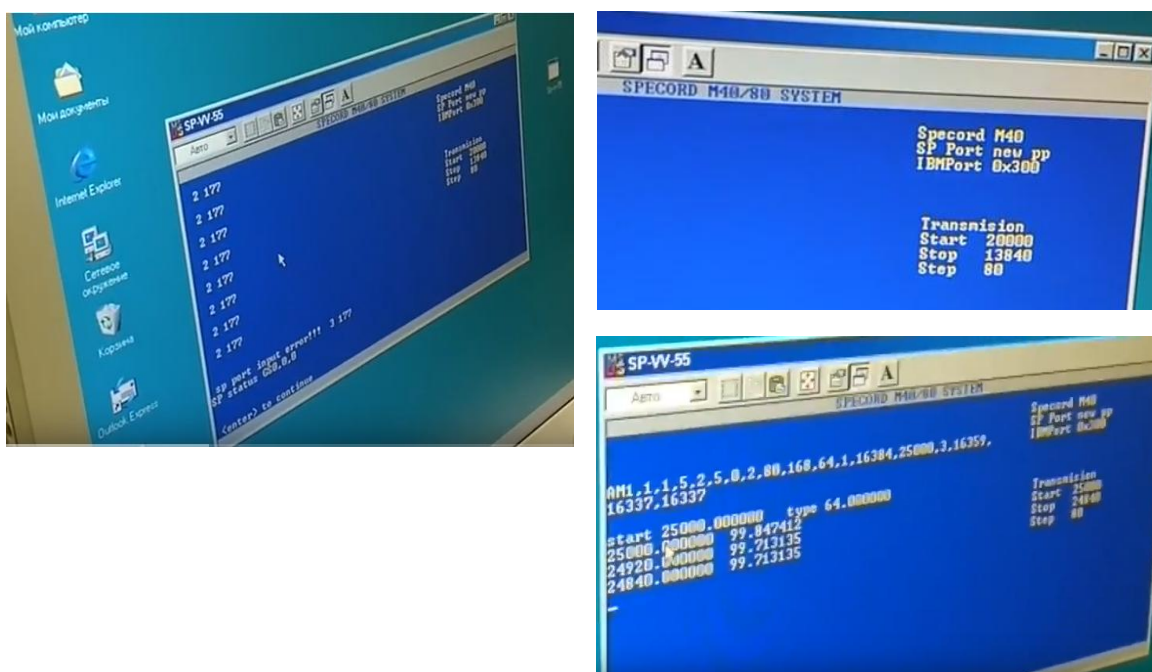


Рис. 10. Автоматизация сбора данных с помощью утилиты SPECORD M40/80 SYSTEM.

II. Тестирование спектрозональных сенсоров безлинзовых микроскопов на основе приборов с зарядовой связью на мегагерцовой характеристикографической установке [IEEE DataPort; DOI: 10.21227/n9ck-hg26].

III. Тестирование спектрозональных сенсоров безлинзовых микроскопов на основе приборов с зарядовой связью на трёхдиапазонном ра-

диоспектрометре или же, что корректнее, радиочастотном спектрометре СК4-56 с модулями высокой, низкой (Я4С-68) и промежуточной частоты [IEEE DataPort; DOI: 10.21227/bjdg-0f39].

IV. Тестирование спектрозональных сенсоров безлинзовых микроскопов на основе приборов с зарядовой связью на коллоидных образцах небιологического исходно происхождения – с

целью уточнения возможности использования установки на базе интегрирующей сферы для анализа нерегулярных или –квазирегулярных структур, к числу которых относятся биокolloидные структуры [Pangaea DOI: 10.1594/PANGAEA.895240].

V. На тестовой установке с различными углами некогерентного облучения чипа, на котором должно было производиться сепарирование клеток (разработка Шевченко Д. и Зайцева Ю., в инициативном порядке) [IEEE DataPort; DOI: 10.21227/dbzs-ze16], были проведены предварительные измерения в шпирен-режиме, включая методы получения виртуальных теплерограмм и наложение их на структуру бороздок / каналов чипа.

Изображения могут быть найдены в соответствующих датасетах в репозитории IEEE и, при необходимости, запрошены у авторов после истечения эмбарго.

Информация о конфликте интересов

Потенциальных или явных конфликтов интересов, связанных с этой рукописью, на момент публикации не существует и не предвидится.

Источники финансирования

Работы проводились частично в рамках гранта РФФИ 16-32-00914 "Создание новых физических методов комплексной биомедицинской диагностики, базирующихся на принципах пози-

ционно-чувствительного картирования с угловым разрешением на тканевом и клеточном уровне организации в аналитических чипах" ("Development of the novel physical methods for complex biomedical diagnostics based on position-sensitive mapping with the angular resolution at the tissue and cellular levels using analytical labs-on-a-chip"), завершено в 2017 году. После директивного уничтожения инфраструктуры проекта в 2016-2017 гг. и распада группы в 2018 г., не спасенной даже директивно требовавшимся переходом с научной на чисто прикладную приборостроительную деятельность, работы не могут быть продолжены, вследствие чего фиксируются без подробностей в текущем виде.

Благодарности

Авторы выражают благодарность всем коллегам, успевшим проявить интерес к данной работе в период активности описанного оборудования и, в особенности, коллегам из Киева и Херсона, участвовавшим в дистанционном обсуждении установки на этапе её создания, за плодотворные дискуссии и предложения, сыгравшие весомую роль в становлении идеологии данного программно-аппаратного комплекса как гистологической системы измерений. Авторы будут крайне признательны любым энтузиастам, способным воспроизвести данную систему и использовать её в своих исследованиях.

Литературные источники References

1. Kiguchi M, Kato M. Near-field optical microscopy using an integrating sphere. *Applied Physics B*. 2001;73(7):727-730.
2. ul Rehman A, Anwer AG, Goldys EM. Programmable LED-based integrating sphere light source for wide-field fluorescence microscopy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2017;20:201-206.
3. Mann S, Oener S, Cavali A, Haverkort JEM, Bakkens EPAM, Garnett E. Integrating sphere microscopy to quantify losses and limits in nanoscale solar cells. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 2017;253:111-112.
4. Mann SA, Sciacca B, Zhang Y, Wang J, Kontoleta E, Liu H., Garnett EC. Integrating Sphere Microscopy for Direct Absorption Measurements of Single Nanostructures. *ACS nano*. 2017;11(2):1412-1418.
5. Gradov OV, Gradova MA. Methods of electron microscopy of biological and abiogenic structures in artificial gas atmospheres. *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*. 2016;52(1):117-125.
6. Roth A. *Vacuum Sealing Techniques*. AIP Press. New York. 1994. 845 p.
7. Fligsten KE, Wolbarsht ML. A diffusely transmitting, integrating sphere for measuring laser output with a phototransistor. *Proceedings of the IEEE*. 1966;54(8):1109-1110.
8. Kneissl GJ, Richmond JC. A laser-source integrating sphere reflectometer, NBS Tech. Note {US National Bureau of Standards: for sale by the Supt. of Docs., US Govt. Print. Off.}. 1968; 439.
9. Kneissl GJ, Richmond JC, Wiebelt JA. A laser source integrating sphere for the measurement of directional, hemispherical reflectance at high temperatures. In: *Thermophysics of Spacecraft and Planetary Bodies*, 1967:177-202.
10. Wonnell LD. Integrating sphere photodetector for measurement of continuous-wave and peak laser power. Rep. "Bendix Corp.", Kansas City, Mo.(USA). 1976;BDX-613-1419:1-22. <https://www.osti.gov/servlets/purl/7179667>
11. Qiuyun X, Xiaobing Z, Jianjun L. Development of laser illuminated integrating sphere source. *Optics and Precision Engineering*. 2009;17(4):738-744.
12. Metzger NK, Spesyvtsev R, Miller B, Maker G., Malcolm G., Mazilu M., Dholakia K. Integrating sphere based speckle generation for wavelength determination and laser stabilization. *Frontiers in Optics / OSA Technical Digest*. 2016: FTh4C-4.

13. Boreman GD, Sun Y, Centore AB. Generation of laser speckle with an integrating sphere. *Optical Engineering*. 1990;29(4):339-343.
14. Leung WC, Crooks W, Rosen H, Strand T. An optical method using a laser and an integrating sphere combination for characterizing the thickness profile of magnetic media. *IEEE Transactions on Magnetics*. 1989;25(5):3659-3661.
15. Morales-Cruzado B, Pérez-Gutiérrez FG, de Lange DF, Romero-Méndez R. Study of the effect introduced by an integrating sphere on the temporal profile characterization of short laser pulses propagating through a turbid medium. *Applied optics*. 2015;54(9):2383-2390.
16. Venkatesh CG, Eng RS, Mantz AW. Tunable diode laser-integrating sphere systems: a study of their output intensity characteristics. *Applied optics*. 1980;19(10):1704-1710.
17. Wang L, Sharma S., Aernouts B, Ramon H, Saeys W. Supercontinuum laser based double-integrating-sphere system for measuring optical properties of highly dense turbid media in the 1300-2350 nm region with high sensitivity. *Proc. SPIE*. 2012; 8427:84273B-1– 84273B-6.
18. Yasuji Y. Development of a spectral response calibration system using a wavelength-tunable laser and an integrating sphere. *Proceedings of the 41st SICE Annual Conference SICE 2002*. 2002;4:2082-2087.
19. Werth A, Liakat S, Dong A, Woods CM, Gmachl CF. Implementation of an integrating sphere for the enhancement of noninvasive glucose detection using quantum cascade laser spectroscopy. *Applied Physics B*. 2018;124(5):75.
20. Zakharov SD, Timofeev YP, Tugov II. Use of a light-integrating sphere in low-intensity laser therapy. *Bulletin of the Lebedev Physics Institute*, 2008;35(9):269.
21. Wei H, Xing D, Wu G, Gu H, Lu J, Shen X, Jin Y. Optical properties of native and coagulated human liver tissues at argon ion laser – an in vitro study using the double-integrating-sphere technique. *Proc SPIE*. 2005;5630:789-796.
22. Honda N, Nanjo T, Ishii K, Awazu K. Optical properties measurement of laser coagulated tissues with double integrating sphere and inverse Monte Carlo technique in the wavelength range from 350 to 2100 nm. *Proc. SPIE*. 2012;8221:82211F-1–82211F-8.
23. Austerlitz C, Campos D, Allison R, Sheng C, Bonnerup C, Sibata C. Short and long term stability of the Diomed 630PDT laser evaluated with integrating sphere, power meter, and calorimeter. *Proc. SPIE*. 2009;380:73804L-1–73804L-8.
24. Singh M, Periasamy A, Chitra T. Development of an optical fibre technique for He– Ne laser screening of human body and its comparison with the integrating sphere method. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1982;20(1):111-112.
25. Xu J, Wei H, Li X. Integrating-Sphere System for Measuring Diffuse Reflection Characteristics of He-Ne Laser Irradiation for Rats Tissues at Different Aperture of Diaphragm in Vitro. *Acta Laser Biology Sinica*. 2002;11(4):244-246.
26. Morales-Cruzado B, Pérez-Gutiérrez FG, de Lange DF, Romero-Méndez R. Effect of an integrating sphere measurement on the distortion of a laser pulse propagating through a turbid medium. *Proc. SPIE*. 2014;8941:894100-1–894100-11.
27. Lukins PB. A 650 nm Diode Laser-based Integrating Sphere System for Absolute Radiometry. Australian Government, National Measurement Institute report NMI-TR. 2006;NMI-TR-10:1-15. <https://www.measurement.gov.au/Publications/TechnicalReports/Documents/NMI%20TR%2010.pdf>.
28. Qi ZHS, Tougkun WCS. [Development of integrating sphere Coating for high power CO₂ laser]. [*Laser Journal*]. 1985;5;004.
29. Agurkova TN. [Action of laser radiation on the properties of staphylococci]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1979;(5):101-103. [in Russian]
30. Shkuratov SI, Kul'chavenia EV. [Laser therapy of tuberculous cystitis]. *Probl Tuberk*. 1990;(5):9-11. [in Russian]
31. Grubnik VV, Tkach IuG, Shipulin PP, Potapenkov MA, So Bon Ho. [Use of laser irradiation in the treatment of lung tumors]. *Klin Khir*. 1992;(5):15-18. [in Russian]
32. Dudenko GI, Zaliubovskii VI. [Treatment of acute thrombophlebitis of the lower limbs with laser irradiation]. *Khirurgiia (Mosk)*. 1989;(9):97-99. [in Russian]
33. Matsiak IuA. [Device for monitoring the emitter of helium-neon laser LG-75 in proctologic practice]. *Klin Khir*. 1984;(5):61-62. [in Russian]
34. Vin'kova GA, Ionin AP, Ionina GI. [The treatment of posttraumatic uveitis with low-intensity laser radiation]. *Vestn Oftalmol*. 1999;115(5):20-21. [in Russian]
35. Olesin AI, Maksimov VA, Mazhara IuP, Golub VI, Golub IaV, Skorodumova EA. [Laser irradiation of venous blood for prevention of reperfusion syndrome in myocardial infarction]. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 1992;(5-6):20-23. [in Russian]
36. Kalish IuI, Sadykov RA, Dolgushkin AN. [The use of low-intensity laser irradiation in the immediate postoperative period in patients with gastroduodenal ulcer]. *Klin Khir*. 1991;(9):58-60. [in Russian]
37. Mel'man EP, Del'tsova EI. [Effect of helium-neon laser radiation on restoration of the structure of the microcirculatory bed and neurocytes of the small intestine following experimental ischemia]. *Arkh Anat Gistol Embriol*. 1987;92(5):39-45. [in Russian]
38. Rakhishev AR. [Reaction of the peripheral nervous system elements to the action of laser irra-

diation]. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1976;70(2):5-13. [in Russian]

39. Mansurov KK, Dzhuraev KK, Barakaev SB, Kharina TP, Pulatov DI. Effect of a helium-neon laser on the physicochemical properties of bile. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1990;110(2):1052-1055.

40. Askaryan GA. Enhancement of transmission of laser and other radiation by soft turbid physical and biological media. *Sov. Journ. Quant. Electron.* 1982;12(7):877-880.

41. Gamaley NF, Skivka LM, Fedorchuk AG. Effect of helium-neon laser irradiation on antitumor activity of LAK and IL-2 in mice with Lewis lung carcinoma. *Experimental Oncology.* 2003;23(4):301-303.

42. Gordeev DV, Ostapchenko EP, Teselkin VV. The spectrum of a gas laser. *Journ. Appl. Spectrosc.* 1967;6(3):211-215.

43. Belogol'skii VA, Kubarev AV. Passive power stabilization for gas lasers. *Meas. Tech.* 1971;14(3):504-505.

44. Koltun VL, Kravets MV, Leont'ev VG,

Lipskii VV, Nadol'skii EY, Ostapchenko EP. Investigation of output-power instability in a helium–neon laser with a planospherical resonator. *Sov. Journ. Quant. Electron.* 1981;11(8):1066-1067.

45. Burnashev MN, Privalov VE, Tkachenko LP. Standardization of metrological gas-discharge lasers. *Meas. Techn.* 1988;31(2):121-124.

46. Wang X, Cheng H, Xiao L, Zheng B, Meng Y, Liu L, Wang Y. Laser cooling of rubidium 85 atoms in integrating sphere. *Chinese Optics Letters.* 2012. 10(8): 080201-1-080201-3. [王旭成, 戚华东, 肖玲, 郑本昌, 孟艳玲, 刘亮, & 王育竹. (2012). Laser cooling of rubidium 85 atoms in integrating sphere. *中国光学快报: 英文版*, 10(8), 1-3].

47. Davis NM, Hodgkinson J, Francis D, Tatam RP. Sensitive detection of methane at 3.3 μm using an integrating sphere and interband cascade laser. *Proc. SPIE.* 2016. 9899: 98990M.

Градов О.В., Орехов Ф.К. Лазерна поліпроекційна мікроскопія в інтегруючій сфері / фотометричній кулі Ульбріхта з використанням безлинзової мікроскопів з asp-сенсорами на базі приладів із зарядним зв'язком або комплементарних метал-оксид-напівпровідникових матриць.

РЕФЕРАТ. Мікроскопія з інтегруючою сферою, що відома також як сфера Ульбріхта або фотометрична куля Ульбріхта, досить рідко застосовується в гістологічній або цитологічній практиці, що пов'язано з трудомісткістю виготовлення інтегруючої (з тими чи іншими отворами для введення препарату), що містить зразок-мікропрепарат камери, і дорожчею сучасних промислово виготовлених сфер Ульбріхта, в ультраструктурному / субмікроскопічному випадку, особливо - при використанні методів і технологій ближнепольної оптичної мікроскопії (СБОМ) - ускладнюється також розмірами відповідного пристрою. Необхідність в узгодженні розмірів сфери з розміром предметного столика, з одного боку, і з розмірами конкретного препарату, з іншого боку, являє собою технічне і фізичне протиріччя, яке, в принципі, уникається тільки при: рівності розмірів трансмісійного вікна предметного столика і препарату; взаємно-однозначному дотриманні поля освітленості (конденсора або довільного колімірованого джерела випромінювання) з розмірами мікропрепарату і контактено поєднаного з ним предметного столу; отриманні широкопольні картинки в стаціонарному стані столу (так як зміщення положення його всередині інтегруючої сфери призведе до зміни світлотіньової структури реєстрограми), тобто взаємно-однозначної відповідності між розмірами поля зору і препарату, трансмісійного вікна столу і реєстрованого пучка в перетині, а також перетину останнього і поля зору. У генеральному випадку з поєднанням всіх перерахованих вище площин і перетинів на стаціонарній позиції в центрі сфери Ульбріхта єдиним можливим рішенням є використання не редукованого стандартного оптичного мікроскопа усіченої конструкції, але ПЗС- або КМОП- матриці з елементарної об'язкою, яка виконує роль аналітичного чіпа з функцією безлинзового проекційного мікроскопа.

Ключові слова: мікроскопія в інтегруючій сфері, сфера Ульбріхта, безлинзова мікроскопія, картування тканин з використанням сенсорів з кутковою чутливістю, мікроскопія на чіпі, MPLM-UIS.

Градов О.В., Орехов Ф.К. Лазерная полипроекционная микроскопия в интегрирующей сфере / фотометрическом шаре ульбрихта с использованием безлинзовых микроскопов с asp-сенсорами на базе приборов с зарядовой связью или комплементарных металл-оксид-полупроводниковых матриц.

РЕФЕРАТ. Микроскопия с интегрирующей сферой, известной также как сфера Ульбрихта или фотометрический шар Ульбрихта, достаточно редко применяется в гистологической или цитологической практике, что связано с трудоёмкостью изготовления интегрирующей (с теми или иными отверстиями для ввода препарата), содержащей образец-микропрепарат камеры, и дороговизной современных промышленно изготавливаемых сфер Ульбрихта, в ультраструктурном / субмикроскопическом случае, особенно – при использовании методов и технологий ближнепольной оптической микроскопии (СБОМ) – ослож-

няемой также размерами соответствующего устройства. Необходимость в согласовании размеров сферы с размером предметного столика, с одной стороны, и с размерами конкретного препарата, с другой стороны, представляет собой техническое и физическое противоречие, которое, в принципе, снимаемо только при: равенстве размеров трансмиссионного окна предметного столика и препарата; взаимно-однозначном соответствии поля освещенности (конденсора или произвольного коллимируемого источника излучения) с размерами микропрепарата и контактно совмещенного с ним предметного стола; получении широкопольной картинка в стационарном состоянии стола (так как смещение положения его внутри интегрирующей сферы приведет к изменению светотеневой структуры регистрограммы), то есть взаимно-однозначного соответствия между размерами поля зрения и препарата, трансмиссионного окна стола и регистрируемого пучка в сечении, а также сечения последнего и поля зрения. В генеральном случае с совмещением всех вышеперечисленных плоскостей и сечений на стационарной позиции в центре сферы Ульбрихта единственным возможным решением является использование не редуцированного стандартного оптического микроскопа усеченной конструкции, но ПЗС- или КМОП- матрицы с элементарной обвязкой, выполняющей роль аналитического чипа с функцией безлинзового проекционного микроскопа.

Ключевые слова: микроскопия в интегрирующей сфере, сфера Ульбрихта, безлинзовая микроскопия, картирование тканей с использованием сенсоров с угловой чувствительностью, микроскопия на чипе, MPLM-UIS.