

В.І. Шклярський, Ю.М. Матієшин, Ю.В. Баланюк, Б.В. Гудзь
Національний університет "Львівська політехніка"

ТОЧНІСТЬ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ДВОХ ДИНАМІЧНИХ МІКРООБ'ЄКТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕЛЕВІЗІЙНОГО СКАНУВАЛЬНОГО ОПТИЧНОГО МІКРОСКОПА

© Шклярський В.І., Матієшин Ю.М., Баланюк Ю.В., Гудзь Б.В., 2013

V.I. Shkliarskyi, Yu.M. Matiieshyn, Yu.V. Balanyuk, B.V. Hudz
Lviv Polytechnic National University

ACCURACY OF DETERMINATION OF TWO DYNAMIC MICROOBJECTS PARAMETERS WITH TELEVISION SCANNING OPTICAL MICROSCOPE

© Shkliarskyi V.I., Matiieshyn Yu.M., Balanyuk Yu.V., Hudz B.V., 2013

At the present stage of technological development there are more problems associated with micro- and nanotechnology. Among such problems occupy an important place task analysis of dynamic processes and several dynamic microobjects (MO) parameters simultaneously in view of the microscope in different fields (medicine, microbiology, ecology, microelectronics etc.). Identification number of dynamic parameters (for example, mobility) of some living cells and their components occurs mainly by using optical microscopy methods. To determine the mobility is most often used in two ways: 1) the method of fluorescence microphotographs analysis; 2) the method of quantitative fluorescence confocal laser scanning microscopy. Using these methods were quantitatively and qualitatively describes the process of intracellular transport, particularly cytoplasm-nuclear, kinetic accumulation in the nucleus of cells of different types of proteins, localization of drugs aimed at developing ways to intracellular delivery of anticancer drugs. To solve these and many such important tasks in the fields of medicine and microbiology can be successfully used television scanning optical microscope (TSOM) based on cathode ray tubes ultrahigh resolution, as provided in this scan resolution up to 0.1 ... 0.2 micron. This article contains analysis of the capabilities of this microscope in the case of the simultaneous study of several MO, which are move randomly - with variable speed and direction of motion. The basic principles of TSOM work in determining the dynamic parameters of separate MO and averaged parameters of several MO are submitted. Track each individual MO occurs by the use of scan mode of miniraster, the center of which the current frame is formed with coordinates that correspond to coordinates of the center of the MO in the previous frame scan. Interval of definition of coordinate position of each MO in sight of TSOM corresponds to the duration of one frame scanning at a constant speed scanning. Dimensions of the scanning raster should be reduced to the values 1...10 % of the full-scale raster, while receiving miniraster. However, a scan should be used for MO of proportionate size with minimal scanning spot that move randomly at high speed. Among the MO for which the use of the scanning mode is not appropriate, you can select one or several MO simultaneously with large size (5...40 % of the full-scale raster in the plane of study). For such MO should be used only scanning with a full-scale square raster. Based on these considerations, we construct a mathematical model of the scanning process and analyze the significance of dynamic parameters which can be determined by TSOM using scan mode with a full-scale raster and tracking each MO by miniraster.

Key words: television scanning optical microscopy, parameters of microobjects group, scanning miniraster.

Розглядаються питання використання телевізійного сканувального оптичного мікроскопа для визначення різних параметрів динамічних мікрооб'єктів, які перебувають у групі, із застосуванням режимів сканування повноформатним растром та слідування за кожним окремим мікрооб'єктом за допомогою сканувального мінірастра. Наведені принципи роботи мікроскопа, що забезпечують визначення параметрів як окремих динамічних мікрооб'єктів, так і групи загалом.

Ключові слова: телевізійна сканувальна оптична мікроскопія, параметри групи динамічних мікрооб'єктів, сканувальний мінірастр.

Вступ

На сучасному етапі розвитку техніки виникає все більше задач, які пов'язані із мікро- та нанотехнологіями. Серед них важливе місце посідають задачі аналізу динамічних процесів та параметрів одночасно декількох динамічних мікрооб'єктів (МО) у полі зору мікроскопа у різних галузях народного господарства (медицина, мікробіологія, екологія, мікроелектроніка тощо).

Огляд та аналіз літератури

Визначення низки динамічних параметрів (наприклад, рухливості) деяких живих клітин та їх елементів відбувається, переважно, за допомогою мікроскопів з використанням оптичних методів дослідження [1, 2]. Для визначення рухливості найчастіше застосовують два методи: 1) метод флуоресцентного мікрофотоаналізу; 2) метод кількісної флуоресцентної лазерної конфокальної сканувальної мікроскопії. З використанням цих методів кількісно та якісно описано процеси внутрішньоклітинного транспортування, зокрема, цитоплазменно-ядерного, кінетика накопичення в ядрі клітини різних видів білків, локалізація ліків під час розроблення шляхів спрямованої внутрішньоклітинної доставки протипухлинних препаратів.

Постановка задачі та її зв'язок з важливими науковими завданнями

Для виконання вищенаведених та багатьох подібних важливих завдань у галузях медицини та мікробіології можна успішно застосовувати телевізійний сканувальний оптичний мікроскоп (ТСОМ) на основі електронно-променевої трубки надвисокої роздільної здатності, оскільки забезпечується роздільна здатність сканування до 0,1–0,2 мкм [3, 4]. Ця стаття містить аналіз можливостей цього мікроскопа у випадку одночасного дослідження декількох МО, що рухаються хаотично – зі змінними швидкістю та напрямком руху. Наведено основні принципи роботи ТСОМ при визначенні динамічних параметрів як окремих МО, так і усереднених параметрів декількох МО загалом.

Математична модель сканування двох динамічних МО

Визначення динамічних параметрів руху МО є непростим завданням, оскільки при цьому необхідно відслідковувати послідовні в часі положення МО, що одночасно перебувають у полі зору мікроскопа. Інтервал визначення окремих положень кожного МО у полі зору ТСОМ відповідає тривалості одного кадру сканування при незмінній швидкості сканування. Враховуючи ці міркування, побудуємо математичну модель процесу сканування та проаналізуємо похибки динамічних параметрів, які можна визначити за допомогою ТСОМ.

На рис. 1 наведено найпростіший випадок аналізу групи з двох динамічних МО.

Досліджувані МО I та МО II мають однакові розміри та круглу форму. На рисунку показано ділянки їх траєкторій руху від початку процесу аналізу до виходу кожного МО за межі поля зору мікроскопа, що має квадратну форму. Характер руху обох МО є нерівномірним та нелінійним. Траєкторії руху МО перетинаються, тому на рисунку траєкторії руху позначено різними типами ліній. Проаналізуємо на цій моделі можливості ТСОМ при визначенні динамічних параметрів кожного з цих МО.

Розглянемо детальніше траєкторії руху кожного з МО. Як бачимо, існує декілька точок перетину траєкторій між собою, а також багато змін напрямку руху кожного з МО. Для цього випадку зручно проводити аналіз кожного з МО за допомогою окремого квадратного растра зменшених

розмірів, розміри якого є істотно меншими за розміри повноформатного растра. Квадратна форма растрів забезпечує однакову ймовірність виходу МО за межі поля зору мікроскопа у кожному з чотирьох основних напрямків його руху (вздовж напрямку формування рядкової розгортки, проти напрямку формування рядкової розгортки, вздовж напрямку формування кадрової розгортки, проти напрямку формування кадрової розгортки). У разі застосування растра іншої форми (наприклад, прямокутної), необхідно додатково враховувати різні розміри його сторін введенням додаткових коефіцієнтів при розрахунках динамічних параметрів МО. Ці коефіцієнти зрівнюють масштаб координатних осей x та y , вздовж яких відбувається сканування та визначення поточних координат МО. Чим меншим є растр зменшених розмірів порівняно з повноформатним при однаковій роздільній здатності, тим більшим є вигреш у розширенні діапазонів визначення динамічних параметрів кожного з МО із одночасним збереженням точності вимірювань. При цьому потрібно також додатково враховувати співвідношення розмірів МО та сканувального растра, а також співвідношення швидкостей руху МО та сканування, адже ці співвідношення впливають на те, чи буде досліджуваний МО постійно перебувати у межах сканувального растра. Наприклад, для повноформатного та зменшеного растрів із співвідношенням сторін 1:10 відповідна кількість окремих положень сканувального елемента (СЕ) у растрі зменшених розмірів є у 100 разів меншою. Це дає вигреш у часі формування растра зменшених розмірів у 100 разів, тобто, відповідно, розширює діапазон визначення динамічних параметрів МО.

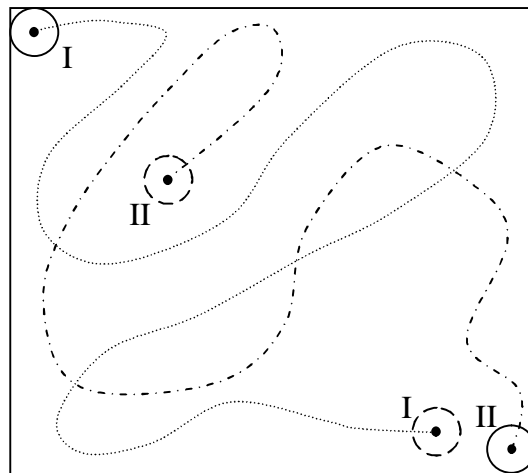


Рис. 1. Аналіз групи з двох динамічних МО

Розміри сканувального растра доцільно зменшувати до значень 1–10 % від розмірів повноформатного растра, отримуючи при цьому мінірастр. Одночасно з цим додатково використовується режим стеження за положенням центра МО у кожному наступному скануванні [5]. Однак таке сканування доцільно використовувати для МО, співрозмірних із мінімальним розміром сканувальної плями, які рухаються хаотично з великою швидкістю. Серед МО, для яких використання цього режиму сканування є недоцільним, можна виокремити одиничні чи декілька МО одночасно великих розмірів (5–40 % розміру повноформатного растра у площині дослідження). Для таких МО доцільніше використати сканування тільки за допомогою повноформатного квадратного растра. Тому проаналізуємо та порівняємо обидва цих методи сканувань з погляду їх граничних можливостей при визначенні динамічних параметрів МО.

Методи сканування декількох динамічних МО

На рис. 2 зображено два методи сканування групи з двох динамічних МО. Як видно з рис. 2, розміри сканувальних мінірастрів відповідають розмірам МО, що забезпечує максимальне розширення діапазону визначення динамічних параметрів, за умови забезпечення режиму стеження за МО (центр кожного сканувального мінірастра у поточному кадрі сканування формується у положенні

СЕ, що відповідає положенню центра відповідного МО у попередньому кадрі сканування). Цей метод сканування передбачає наявність початкових координат центрів всіх МО у полі зору мікроскопа, які повинні бути визначені при першому скануванні повноформатним сканувальним растром. Це можна зарахувати до обмежень цього методу сканування.

Цих обмежень немає у методі з використанням сканування повноформатним растром для визначення послідовних в часі положень всіх динамічних МО у полі зору ТСОМ, проте цей метод має значно вужчий діапазон визначення параметрів динамічних МО через порівняно велику тривалість формування одного кадру зображення T_k .

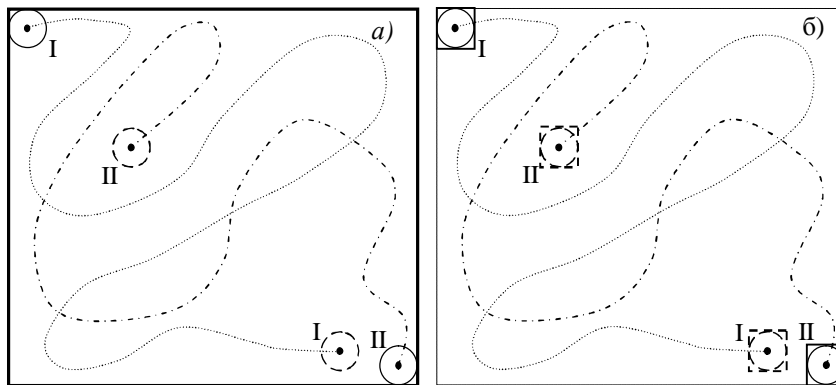


Рис. 2. Сканування групи з двох динамічних МО за допомогою:
а) повноформатного сканувального растра; б) двох сканувальних мінірастрів

Для подальшого аналізу заданої моделі сканування групи з двох динамічних МО за допомогою математичних методів введемо такі позначення параметрів розрахунку: 1) D_1, D_2 – діаметри першого та другого динамічних МО відповідно; 2) V_1, V_2 – швидкості першого та другого МО відповідно; 3) $X_{Ц1}, Y_{Ц1}$ – поточні координати центра першого МО; 4) $X_{Ц2}, Y_{Ц2}$ – поточні координати центра другого МО; 5) $d_{СЕ}$ – діаметр СЕ (сканувальної плями); 6) $t_{СЕ}$ – тривалість формування одного положення СЕ; 7) $T_{ПР}, T_{ПК}$ – тривалості прямого ходу рядкової та кадрової розгортки; 8) $T_{ЗР}, T_{ЗК}$ – тривалості зворотного ходу рядкової та кадрової розгортки; 9) V_C – швидкість сканування, яка для дискретного способу формування положень СЕ може бути виражена формулою: $V_C = d_{СЕ}/t_{СЕ}$, а для лінійного – $V_C = L/T_{ПР}$; 10) $L \times L$ – розміри квадратного повноформатного сканувального растра, де $L = N \cdot d_{СЕ}$; 11) $I \times I$ – розміри квадратного сканувального мінірастра, де $I = n \cdot d_{СЕ}$; 12) $N \times N$ – загальна кількість положень СЕ в повноформатному сканувальному растрі; 13) $n \times n$ – загальна кількість положень СЕ в сканувальному мінірастрі; 14) R – роздільна здатність повноформатного сканувального растра, яка для дискретного способу формування положень СЕ визначається за формулою: $R = L/N$; 15) r – роздільна здатність сканувального мінірастра, яка для дискретного способу формування положень СЕ визначається за формулою: $r = I/n$; 16) X_L, Y_L – поточні координати центра повноформатного сканувального растра; 17) X_t, Y_t – поточні координати центра сканувального мінірастра; 18) Δ – поточна віддаль між координатами центрів МО (центрів сканувальних мінірастрів), яка визначається за формулою: $\Delta = \sqrt{(X_2 - X_1)^2 + (Y_2 - Y_1)^2} = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2}$; 19) W – сумарна швидкість руху групи з двох динамічних МО.

Похибки визначення параметрів групи динамічних МО

Розміри повноформатного сканувального растра та розміри мінірастра співвідносяться як 32:1, тобто мінірастр за своїми розмірами становить 3 % від розміру повноформатного растра, а

за площею – 0,1 %. Через це виникає необхідність постійного відслідковування положення центра динамічного МО у поточному кадрі сканування для забезпечення можливості коректного визначення його поточних координат, а отже, і динамічних параметрів до моменту виходу відповідного МО за межі поля зору відповідного мінірастра. Похибка визначення динамічних параметрів (наприклад, швидкості руху) виникає саме під час цього процесу. Величина цієї похибки залежатиме від співвідношення сумарної швидкості руху групи з двох динамічних МО W та швидкості сканування V_C . Чим меншим є значення співвідношення W/V_C , тим меншою є похибка визначення положення центрів МО, а, отже, і величини швидкості руху МО. Якщо $V_C \gg W$, тоді похибка визначення положень центрів МО прямує до 0. З використанням конкретних значень параметрів розрахунку ($D_1 = D_2 = 125$ ел.; $d_{CE} = 1$ ел.; $t_{CE} = 1 \cdot 10^{-6}$ с; $T_{3P} = T_{3K} = 1,4 \cdot 10^{-5}$ с; $V_1 = 0 \dots 2000$ ел./кадр; $V_2 = 0 \dots 2000$ ел./кадр; $V_C = 1,6 \cdot 10^7$ ел./кадр; $N = 4000$ ел.; $n = 125$ ел.; $L \times L = 4000 \times 4000$ ел.; $I \times I = 125 \times 125$ ел.; $0 \leq \Delta \leq 5480$ ел.; $W = 0 \dots 4000$ ел./кадр) побудовано графіки похибок визначення параметрів динамічних МО за допомогою повноформатного сканувального растра та мінірастра (рис. 3).

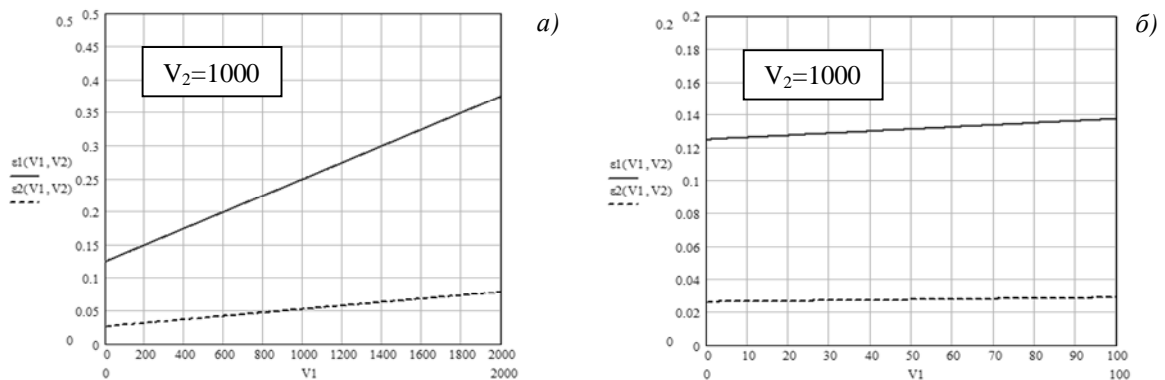


Рис. 3. Відносні похибки визначення параметрів МО повноформатним растром та мінірастром

Як бачимо з рис. 3, похибки визначення параметрів динамічних МО у випадку сканування повноформатним сканувальним растром (суцільна лінія) та мінірастром (штрихова лінія) з однаковими роздільною здатністю ($R = r$), швидкістю сканування ($V_C = \text{const}$) та характером руху обох МО є різними, тобто залежать від розмірів та принципу формування сканувального растра. Значення похибок на початкових ділянках графіків (рис. 3б) відрізняються не так істотно як на кінцевих ділянках (рис. 3а). Це пояснюється більшим впливом зростаючої сумарної швидкості руху обох МО на точність визначення положень центрів МО повноформатним сканувальним растром. Отже, у разі забезпечення однакових тривалостей рядкової та кадрової розгортки (функціональний тип розгортки) та постійного утримання МО в полі зору мікроскопа метод сканування за допомогою мінірастрів забезпечує меншу похибку визначення параметрів руху.

На рис. 4, а та 4, б наведено порівняння графіків похибок визначення параметрів динамічних МО з використанням сканувального мінірастра (I) та за допомогою повноформатного сканувального растра (II) залежно від величини сумарної швидкості руху двох МО. У разі збільшення швидкості другого МО та, відповідно, сумарної швидкості обох МО W , похибка визначення параметрів динамічних МО зростає (див. рис. 4, а). При зменшенні сумарної швидкості руху МО W незалежно від характеру зміни величини швидкості кожного з МО (наприклад, у випадку руху МО в одному напрямі), похибка зменшується та, навіть, може сягати значень 0, коли значення швидкостей V_1 та V_2 є рівними за модулем (див. рис. 4, б).

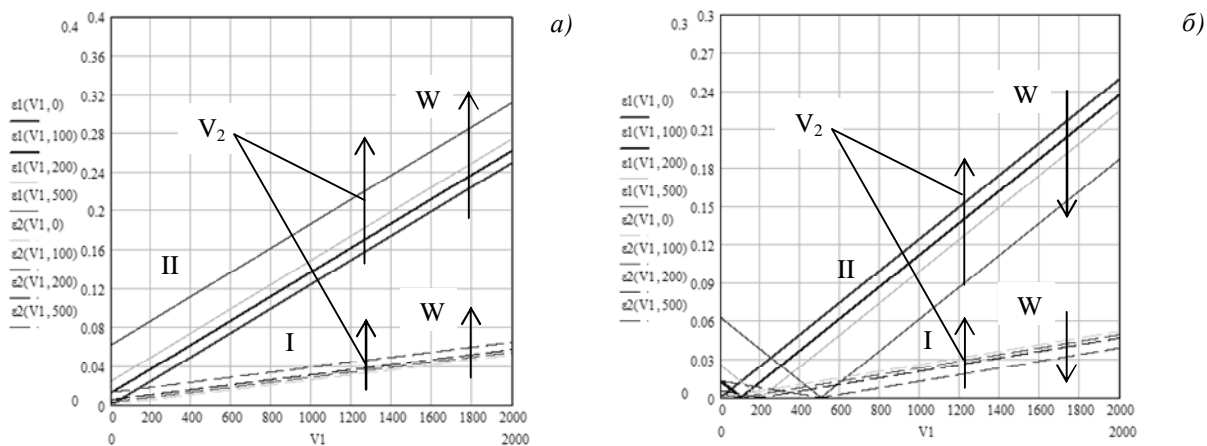


Рис. 4. До впливу швидкості руху МО на похибку визначення параметрів динамічних МО

Подальший аналіз можливостей ТСОМ при визначенні параметрів динамічних МО, які перебувають у групі, повинен полягати в удосконаленні математичної моделі, яка відобразить процес визначення параметрів трьох та більше МО, що одночасно знаходяться у полі зору ТСОМ. Також потрібне розроблення методів відображення визначених динамічних параметрів як окремих МО (переміщення, напрям руху, швидкість руху, прискорення, швидкість зміни розмірів тощо), так і усереднених значень параметрів групи динамічних МО загалом (середнє, максимальне та мінімальне значення переміщення МО у групі; переважаючий напрям руху МО у групі; середнє, максимальне та мінімальне значення швидкості руху МО у групі; середнє, максимальне та мінімальне значення прискорення МО у групі; середнє, максимальне та мінімальне значення швидкості зміни розмірів МО у групі тощо).

Важливим завданням під час аналізу групи динамічних МО, які одночасно перебувають у полі зору ТСОМ, є розрізнення кожного з МО. Траєкторії МО під час руху перетинаються, що може призводити до неоднозначностей у визначенні їх поточних координат, а, отже, і динамічних параметрів. Це завдання можна виконати за допомогою аналізу геометричних характеристик кожного з МО (розмірів, форми, геометричного центра, площі тощо). Іноді розрізнення МО може відбуватися шляхом аналізу фізичних властивостей МО (прозорість, коефіцієнт відбиття, однорідність тощо). Наведені вище методи розрізнення МО потребують присутності оператора, навіть у разі наявного алгоритму та чітких критеріїв розрізнення МО у пам'яті комп'ютера.

Висновки

Наведені принципи роботи телевізійного сканувального оптичного мікроскопа під час визначення параметрів динамічних мікрооб'єктів, які перебувають у групі, є актуальними з точки зору використання в галузях медицини, мікробіології, екології тощо, оскільки в цих галузях часто досліджують мікрооб'єкти такого типу. Однак існує необхідність в подальшому вдосконаленні наведеної моделі процесу сканування групи з двох динамічних мікрооб'єктів з метою її застосування для аналізу більшої кількості динамічних мікрооб'єктів, що одночасно перебувають в полі зору мікроскопа. Також потрібно розробити принципи відображення результатів аналізу параметрів як групи динамічних мікрооб'єктів, так і параметрів окремих мікрооб'єктів, що перебувають у групі.

1. Соболев А.С. Как измеряют подвижность макромолекул в живых клетках / А.С. Соболев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 2–6. – Режим доступа: <http://www.issep.rssi.ru/journal>. 2. Молекулярная биология клетки: учебн. пос. в 3-х т. / [Б. Албертс,

Д. Брей, Дж. Льюис и др.] ; пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – Т. 2. – 539 с. 3. Педан А.Д. Сканирующий оптический микроскоп для биомедицины и нанотехнологий / А.Д. Педан, И.Н. Прудюс, В.И. Шклярский // Актуальные вопросы и организационно-правовые основы сотрудничества Украины и КНР в сфере высоких технологий: IV междунар. научн.-практ. конф., 2007 г.: тезисы докл. – К.: КиевЦНТЭИ. – 2007. – С. 167–170. 4. Hrytskiv Z. D. Television Scanning Optical Stereomicroscope for Surface Architectonics of Blood Cells Research / Z. D. Hrytskiv, A. D. Pedan // Conference of Electronics Faculty of Electrical Engineering University of Banjaluka : Int. Conf., May 2004: Proceedings. – Banjaluka (Serbia and Montenegro), 2004. – Vol. 8, № 1. – P. 41–43. 5. Матієшин Ю. Вимірювання швидкості руху мікрооб'єкта телевізійним оптичним сканувальним мікроскопом у кадровому режимі роботи / Ю. Матієшин, В. Шклярський // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка” Комп'ютерні системи та мережі. – 2007. – № 603. – С. 128–136.