

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Разработка компактного флуоресцентного микроскопа для
прижизненной визуализации головного мозга лабораторных животных**

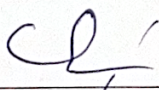
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 2224 группы
направления 03.04.02 «Физика»
профиль «Биофотоника»
Института физики

Мягкова Дмитрия Андреевича

Научный руководитель

доцент, кандидат ф.-м.н.
должность, ученая степень, уч. звание



подпись, дата

И.В. Федосов

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотоники

проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН
должность, ученая степень, уч. звание



подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2026 г.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы выпускной квалификационной работы обусловлена необходимостью создания компактных и доступных средств прижизненной оптической визуализации головного мозга лабораторных животных. Оптические методы позволяют наблюдать сосудистое русло, нейроваскулярную связь, сосудистые пульсации и процессы удаления метаболитов из ткани мозга, а флуоресцентные декстраны повышают контраст сосудистой сети. Практическая регистрация такого сигнала требует согласованной работы оптики, электроники, механики, программного обеспечения и алгоритмов обработки изображений.

В исследованиях головного мозга применяются конфокальная и двухфотонная микроскопия, лазерная спекл-контрастная визуализация, оптическая когерентная томография и другие методы. Эти системы информативны, но требуют дорогостоящего оборудования, сложной юстировки и специализированного программного обеспечения. Поэтому для первичной регистрации поверхностных сосудов и отработки протоколов наблюдения сохраняется потребность в компактной широкопольной флуоресцентной системе, способной сохранять исходные данные и обеспечивать их воспроизводимую обработку.

Разработка такой системы связана с инженерными и методическими ограничениями. Качество изображения определяется спектральной фильтрацией, уровнем паразитной засветки, чувствительностью камеры, светосилой оптического тракта и стабильностью механической конструкции. Дополнительные сложности создают неравномерность освещения, виньетирование, шум КМОП-матрицы, движение объекта, пульсации мозга и неоднозначность границ сосудов при автоматической сегментации.

Объект исследования — процесс прижизненной широкопольной флуоресцентной визуализации поверхностной сосудистой сети головного мозга лабораторных животных. Предмет исследования — аппаратно-программные средства и алгоритмы регистрации и обработки флуоресцентных изображений, обеспечивающие компактную и воспроизводимую визуализацию сосудистого русла. Цель работы — разработка и экспериментальная проверка прототипа компактного

флуоресцентного микроскопа для прижизненной регистрации поверхностных сосудов головного мозга лабораторных животных как инструментальной основы для дальнейших исследований сосудистой динамики и периваскулярного транспорта.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи: проанализированы физические основы флуоресцентной визуализации и особенности широкопольной регистрации; разработана конструкция прототипа компактного флуоресцентного микроскопа; реализован электронный канал управления источником возбуждения; создана программа для захвата, отображения и сохранения изображений, видео, журналов и метаданных; разработан алгоритмический контур предобработки, сегментации сосудистой сети и расчета технических параметров; проведена экспериментальная проверка работоспособности прототипа.

Материалами исследования служили флуоресцентные изображения сосудистой сети головного мозга лабораторных животных, зарегистрированные с помощью разработанного прототипа. Использовались изображения с разрешением 1920 x 1080 пикселей; камера работала с частотой видеопотока около 30 кадров/с, а программная частота сохранения кадров составляла 1, 2 или 10 кадров/с. В итоговый набор данных вошли 1191 изображение.

Методы исследования включали методы геометрической и волновой оптики, принципы флуоресцентной микроскопии, экспериментальную регистрацию изображений на собранном прототипе, цифровую обработку изображений, морфологический анализ, скелетизацию и статистическую обработку результатов. Программная часть была реализована на языке Python с использованием PySide6, OpenCV и scikit-image; управление источником возбуждения выполнено на платформе Arduino.

Научно-техническая новизна работы состоит в комплексной реализации доступной широкопольной флуоресцентной системы, объединяющей компактный оптический прототип, электронное управление источником возбуждения, специализированное программное обеспечение и воспроизводимый алгоритмический контур обработки сосудистых изображений. Практическая

значимость заключается в создании работоспособного прототипа, пригодного для дальнейшей модернизации устройства и улучшения алгоритмов анализа.

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка использованных источников. В первой главе рассмотрены теоретические основы метода, во второй — разработка аппаратно-программного комплекса, в третьей — условия и результаты экспериментальной проверки, ограничения системы и направления ее доработки.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе рассмотрены физические основы флуоресцентной визуализации и ограничения широкопольной регистрации сосудистой сети головного мозга. Флуоресцентная микроскопия позволяет регистрировать распределение молекулярных маркеров и получать специфический контраст тех областей, где присутствует флуорофор или флуоресцентно-меченая молекула. Для сосудистой визуализации головного мозга важным объектом являются поверхностные сосуды, которые при введении флуоресцеин-изотиоцианат-декстрана становятся контрастными на фоне окружающей ткани. Такой подход применим для демонстрационной проверки компактной системы, однако количественная интерпретация изображений требует учета оптических и алгоритмических ограничений.

В работе показано, что основная физическая задача флуоресцентного микроскопа состоит в выделении слабого эмиссионного сигнала на фоне значительно более интенсивного возбуждающего излучения. Качество изображения определяется не только чувствительностью камеры, но и эффективностью спектрального разделения, уровнем автофлуоресценции, рассеянием возбуждающего света, геометрией освещения и механической стабильностью системы. В компактном устройстве эти факторы особенно значимы, поскольку уменьшение габаритов ограничивает оптическую схему, светозащиту, рабочее расстояние и возможности точной юстировки.

Широкопольная флуоресцентная схема была выбрана как конструктивно более простая по сравнению с конфокальной и двухфотонной микроскопией. В такой схеме вся область наблюдения освещается одновременно, а изображение формируется на двумерной матрице без построчного сканирования. Это позволяет использовать КМОП-камеру, компактную механику и сравнительно доступные компоненты. Главным ограничением является регистрация не только света из плоскости фокуса, но и внефокусной флуоресценции, рассеяния и фоновых компонент. Поэтому широкопольная система лучше подходит для регистрации крупных и средних поверхностных сосудов, чем для надежного анализа капиллярной сети.

Особое внимание уделено оптическим, спектральным и детекторным ограничениям компактной системы. Рабочее расстояние, числовая апертура, увеличение, поле зрения и качество коррекции aberrаций определяют способность устройства различать сосудистые структуры. Спектральная фильтрация необходима для отделения зеленой флуоресценции от возбуждающего излучения, интенсивность которого обычно на порядки превышает полезный сигнал. При использовании флуорофоров на основе флуоресцеина требуется учитывать соответствие источника возбуждения спектру поглощения, полосу пропускания эмиссионного фильтра и его блокирующую способность в области возбуждения.

Анализ современных подходов к прижизненной нейровизуализации показал, что конфокальная и двухфотонная микроскопия обеспечивают высокую информативность и позволяют работать на микрососудистом уровне, но требуют сложных лазерных и сканирующих систем. Компактная широкопольная система не является прямой заменой таким методам; ее назначение состоит в более простой регистрации поверхностного сосудистого рисунка, проверке сосудистого контраста и подготовке данных для последующей обработки. Поэтому в работе отдельно подчеркивается необходимость осторожно разделять характеристики устройства и возможные биологические выводы.

Во второй главе разработан аппаратно-программный комплекс для широкопольной флуоресцентной визуализации сосудов головного мозга лабораторных животных. Система рассматривалась не как отдельный оптический

узел, а как полный контур регистрации и обработки изображений. В состав комплекса вошли механическая конструкция компактного микроскопа, оптический канал возбуждения и регистрации флуоресценции, электронный канал управления источником возбуждения, программа захвата изображений и набор алгоритмов цифровой обработки.

Архитектура системы построена по многоуровневому принципу. Механический уровень задает взаимное положение элементов, оптический уровень формирует изображение, электронный уровень управляет режимом возбуждения, программный уровень обеспечивает регистрацию и сохранение данных, а алгоритмический уровень преобразует исходные кадры в маски и технические показатели сегментированной сосудистой сети. Такой подход позволил оценивать не только факт получения флуоресцентного изображения, но и способность всей системы формировать полный набор экспериментальных данных.

Механическая часть прототипа была спроектирована как модульная система. В конструкции предусмотрены корпус, посадочные места для камеры, объектива, эмиссионного фильтра, лазерного модуля и крепежных элементов. Модель прототипа была подготовлена в FreeCAD, что позволило проверить взаимное расположение узлов до окончательной сборки. Регистрационный канал организован вдоль вертикальной оси: объект наблюдения, объектив, эмиссионный фильтр и камера располагаются последовательно. Возбуждающее излучение вводится сбоку под углом к области наблюдения, что уменьшает риск прямого попадания лазерного излучения на матрицу камеры.

Оптический уровень реализует широкопольную схему регистрации. В качестве источника возбуждения использовался лазерный модуль с длиной волны 450 нм. Объектив собирает флуоресцентное излучение от области наблюдения и формирует изображение на матрице камеры. Между объективом и камерой установлен эмиссионный фильтр, пропускающий зеленую область флуоресценции и подавляющий возбуждающее излучение. Такая схема ориентирована на регистрацию крупных и средних поверхностных сосудов, различимых в широкопольном изображении, и не заявляется как средство надежного анализа капиллярной сети.

Электронный канал обеспечивает управление активными элементами комплекса. Камера подключается к компьютеру по USB и передает видеопоток в программу захвата. Управление лазерным каналом реализовано через Arduino Uno и внешний драйвер лазерного модуля: микроконтроллер формирует только управляющий логический сигнал, а ток лазерного диода задается отдельным исполнительным узлом. Такое разделение снижает риск повреждения микроконтроллера и повышает стабильность работы источника возбуждения.

Программный уровень реализован в виде настольного приложения для захвата изображений. Программа обеспечивает выбор камеры, отображение изображения в режиме реального времени, настройку длительности регистрации и частоты кадров, управление режимом лазерного канала при подключенной Arduino Uno, сохранение изображений, видео, логов и метаданных эксперимента. Важной особенностью является разделение предварительного просмотра и научных данных: настройки яркости, контраста, гамма-коррекции и измерительной сетки используются для контроля изображения, но не записываются в сохраненные кадры как необратимые изменения.

Алгоритмический контур включает предобработку, сегментацию и расчет технических параметров сосудистой сети. На этапе предобработки из цветного кадра выделяется зеленый канал, соответствующий области регистрации флуоресцентного сигнала, выполняется коррекция темного кадра, подавление шумовой составляющей и нормализация яркости. Для повышения локального контраста и подготовки изображения к сегментации применяются операции, позволяющие уменьшить влияние фона и неоднородности освещения. Все шаги обработки организованы так, чтобы сохранять исходные данные и формировать отдельные проверяемые промежуточные результаты.

Сегментация сосудистой сети основана на сочетании обработки крупных ярких сосудистых областей и выделения мелких и средних структур с помощью многомасштабного фильтра сосудистости. Итоговая маска формируется после нормализации интенсивности, пороговой обработки, морфологической очистки, заполнения отверстий и исключения краевых артефактов. После формирования

бинарной маски при необходимости выполняется скелетизация, позволяющая представить сосудистую область в виде однопиксельной центральной линии и рассчитать суммарную длину сети и число точек ветвления.

Расчет параметров выполняется по бинарной маске и скелету сосудистой сети. Площадь сосудистой маски определяется как количество пикселей, отнесенных алгоритмом к сосудистой области, а относительная доля маски показывает долю поля зрения, занятую сегментированными сосудистыми и сосудисто-подобными областями. Длина скелета рассчитывается с учетом горизонтальных, вертикальных и диагональных связей между соседними пикселями. Плотность сосудистой сети может быть пересчитана в физические единицы при наличии коэффициента пространственной калибровки. Число точек ветвления определяется по скелету и характеризует сложность выделенной сети, но зависит от качества маски.

В третьей главе приведена экспериментальная проверка разработанного прототипа. Ее основная цель заключалась не в проведении полного биологического исследования микроциркуляции, а в подтверждении того, что собранный аппаратно-программный комплекс обеспечивает получение флуоресцентного сигнала, сохранение изображений, формирование метаданных и последующую программную обработку зарегистрированного массива данных. В качестве проверочного объекта использовались флуоресцентные изображения сосудистой сети головного мозга лабораторных животных.

В экспериментах использовались самцы мышей C57BL/6 весом 25-28 г и возрастом 3 месяца. Процедуры проводились с учетом требований к работе с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета, протокол N 8 от 18.04.2023. Сосудистая визуализация применялась как демонстрационная задача, позволяющая проверить полный путь данных: от оптической регистрации до формирования бинарных масок и расчета количественных параметров.

Регистрация изображений выполнялась с разрешением 1920 x 1080 пикселей. Камера работала с частотой видеопотока около 30 кадров/с, при этом программная частота сохранения кадров составляла 1, 2 или 10 кадров/с в зависимости от серии.

Длительность одной записи составляла 10 с. В итоговый набор данных вошли 1191 изображение, использованное для предобработки, сегментации и расчета параметров. Перед обработкой были подготовлены исходные изображения, темновые кадры и калибровочные кадры плоского поля; для формирования усредненного темнового кадра использовались 20 изображений.

Экспериментальная регистрация показала, что разработанный прототип позволяет получать кадры с различным сосудистым рисунком. На исходных снимках видны крупные и часть средних поверхностных сосудистых структур, а также характерные для широкопольной схемы артефакты: неоднородный фон, локальные яркие области, градиент освещения и различия контраста по полю зрения. Полученный сигнал оказался достаточным для инженерной проверки канала регистрации, однако исходные изображения требовали последующей предобработки перед автоматической сегментацией.

После предобработки изображения были приведены к форме, более пригодной для сегментации. Выделение зеленого канала и вычитание усредненного темнового кадра уменьшили вклад постоянной фоновой составляющей камеры, а нормализация по устойчивым процентилям повысила сопоставимость кадров внутри серии. На предобработанных изображениях сосудистые структуры визуально отделялись от фона лучше, чем на исходных кадрах. Это подтвердило необходимость включения предобработки в общий путь данных компактной флуоресцентной системы.

Сегментация формировала бинарные маски сосудистой сети для каждого кадра. Наиболее устойчиво алгоритм выделял крупные и средние сосудистые структуры с достаточным контрастом относительно фона. Слабоконтрастные тонкие элементы выделялись менее надежно, что связано с ограничениями широкопольной схемы, неоднородностью освещения и шумом CMOS-матрицы. Контроль качества выполнялся по изображениям с наложением маски на исходный или предобработанный кадр; такой способ позволял оценить совпадение выделенных областей с реальным флуоресцентным сосудистым рисунком.

Количественный анализ был выполнен по итоговому набору из 1191 обработанного кадра. Основные рассчитанные параметры включали площадь

сегментированной маски, долю маски в поле зрения, долю крупных сосудистых областей, длину скелета, плотность сети и число точек ветвления. Типичное значение площади сегментированной маски по серии составило 629 403 пикселя, что соответствует 30,35 % площади кадра. Типичная доля крупных сосудистых областей составила 32,06 %, длина скелета — 26 182 пикселя, плотность сосудистой сети при рабочем коэффициенте пространственной калибровки 1,85 мкм/рх — 6,82 мм/мм², а число точек ветвления — 154 на кадр.

Ограничения прототипа связаны с широкопольной схемой регистрации, ограниченной светосилой объектива, неравномерным освещением, неполным подавлением паразитного возбуждающего излучения, шумами CMOS-матрицы и механической стабильностью устройства. Дополнительное влияние оказывает использование источника возбуждения с длиной волны 450 нм, который не является оптимальным для возбуждения FITC-декстрана по сравнению с областью 488-490 нм. Автоматическая экспозиция и баланс белого удобны при первичной настройке, но затрудняют воспроизводимое количественное сравнение кадров.

Основные направления доработки включают улучшение светозащиты корпуса и оптического тракта, подбор более подходящего источника возбуждения, применение эмиссионного фильтра с более высоким подавлением возбуждающей длины волны, использование камеры с большей чувствительностью и меньшим уровнем шума, фиксацию параметров съемки, калибровку пространственного масштаба по тест-объекту и формирование набора вручную проверенных масок для валидации алгоритма. Таким образом, созданный прототип является работоспособной инженерной основой для дальнейшего развития компактной системы флуоресцентной визуализации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выпускной квалификационной работы был разработан и экспериментально проверен прототип компактной системы флуоресцентной визуализации сосудов головного мозга лабораторных животных. Выполнен анализ физических принципов флуоресцентной регистрации, ограничений широкопольной

оптической схемы, требований к источнику возбуждения, фильтрации, камере и программному контуру получения изображений.

Разработана конструкция аппаратного прототипа, включающая оптический канал регистрации, лазерный канал возбуждения, эмиссионную фильтрацию, USB-камеру и электронный контур управления лазерным модулем через Arduino Uno. Показано, что микроконтроллер используется только для низкоуровневого управления лазерным каналом, тогда как регистрация, сохранение и обработка изображений выполняются на ПК.

Создана программа захвата изображений, обеспечивающая подключение камеры, отображение live-view, настройку параметров регистрации, сохранение кадров, видео, журналов и метаданных эксперимента. В программе предусмотрено разделение визуальной live-коррекции и сохраняемых научных данных, что позволяет использовать интерфейс для настройки изображения без подмены исходных кадров.

Разработаны алгоритмы предобработки и сегментации флуоресцентных изображений. Предобработка включает выделение зеленого канала, темновую коррекцию, подавление шумовой составляющей и нормализацию яркости. Сегментация формирует бинарные маски сосудистой сети, изображения с наложением маски, скелеты и выходные таблицы параметров. На основе масок рассчитаны площадь сосудистой области, доля сегментированной маски, суммарная длина скелета, плотность сети и число точек ветвления.

Экспериментальная проверка подтвердила, что разработанный прототип позволяет регистрировать флуоресцентные изображения крупных и средних поверхностных сосудов, выполнять их первичную обработку и получать технические показатели по серии кадров. По итоговому набору были обработаны 1191 кадр, построены маски сосудов, графики распределений и сводные таблицы. Полученные результаты подтверждают работоспособность аппаратно-программного комплекса как инженерной основы.