

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

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

Кафедра оптики и биофотоники

**Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп для исследования
биологических объектов**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 2224 группы

направления 03.04.02 «Физика»

профиль «Биофотоника»

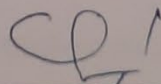
Института физики

Иноземцева Тимофея Сергеевича

Научный руководитель:

доцент кафедры оптики и биофото-
ники, к.ф.-м.н.

должность, уч. ст., уч. зв.



личная подпись, дата

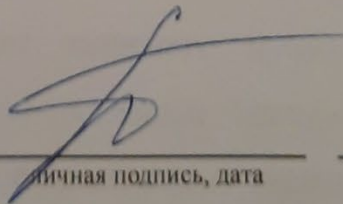
И.В. Федосов

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотони-
ки:

проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

должность, уч. ст., уч. зв.



личная подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Современная биология и биомедицина характеризуются переходом от качественных описательных исследований к строгому количественному анализу структурно-функциональной организации биологических объектов на микро- и наноуровне. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является золотым стандартом визуализации благодаря способности устранять внефокусную засветку и обеспечивать высокое контрастное и аксиальное разрешение при оптическом секционировании толстых образцов. Однако получение высококачественного изображения является лишь первым этапом исследования, в связи с чем ключевой проблемой современной микроскопии становится объективная, воспроизводимая и автоматизированная обработка больших массивов визуальных данных. Традиционные методы визуальной оценки уступают место алгоритмам компьютерного зрения, позволяющим извлекать точные биофизические параметры. Физические основы метода подробно описаны в классических трудах, а вопросы вычислительной микроскопии активно развиваются, однако методология применения открытых программных платформ для решения конкретных биофизических задач часто фрагментирована и требует систематизации, что обуславливает актуальность данного исследования. Целью работы является разработка и оптимизация комплексного методического подхода к получению и количественному биофизическому анализу изображений биологических объектов, полученных методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для достижения поставленной цели в работе решаются задачи по систематическому анализу физических принципов работы микроскопа, включая механизмы формирования лазерного пучка, роль пинхола в оптическом секционировании и современные алгоритмы расширенной глубины резкости, а также по оптимизации параметров регистрации многоканальных флуоресцентных изображений для минимизации артефактов. Кроме того, разрабатывается и апробируется алгоритмический конвейер предобработки изображений в программной среде Fiji, реализуются методы сегментации, бинаризации и морфометрического анализа, проводится

топологический анализ структур посредством скелетонизации и оценивается пространственное взаимодействие маркеров методами количественной ко-локализации с последующей статистической обработкой полученных биофизических данных.

В качестве объекта исследования выступают биологические объекты, подлежащие визуализации, а предметом являются методы конфокальной микроскопии и алгоритмы цифровой обработки флуоресцентных изображений для извлечения биофизических параметров. Научная новизна работы заключается в систематизации и адаптации комплексного протокола обработки конфокальных изображений, обеспечивающего высокую воспроизводимость морфометрических и топологических измерений, а также в обосновании выбора и оптимизации параметров алгоритмов сегментации и скелетонизации для корректного расчета биофизических параметров. Впервые для исследуемой модели проведена комплексная количественная оценка пространственной организации и ко-локализации флуоресцентных маркеров на основе предварительно очищенных от фона данных. Теоретическая значимость состоит в углублении представлений о взаимосвязи параметров настройки оптической системы и качества последующего математического анализа, а практическая значимость заключается в создании готового к применению методического подхода, позволяющего минимизировать субъективизм при анализе микроскопических данных и автоматизировать рутинные операции. Методологическую основу составили принципы оптики, биофизики и теории цифровой обработки изображений, с использованием методов флуоресцентного мечения, конфокальной микроскопии, цифровой фильтрации, бинаризации, скелетонизации и вариационной статистики. демонстрирующие преимущества конфокальной микроскопии в сочетании с компьютерным анализом.

Основное содержание

Представленная магистерская диссертация посвящена комплексному исследованию принципов работы, аппаратной реализации и методов вычислительной обработки изображений, получаемых с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ). Актуальность темы обусловлена переходом современной биомедицины от качественной визуализации к строгому количественному анализу биологических структур. КЛСМ является золотым стандартом в этой области благодаря возможности оптического секционирования и трехмерной реконструкции толстых образцов, однако получение изображения — лишь первый этап, требующий применения сложных алгоритмов цифровой обработки для извлечения биофизических данных. Целью работы является обзор физических основ КЛСМ, анализ современных методов расширения глубины резко изображаемого пространства (ГРИП) и демонстрация методологии количественного анализа изображений на примере сосудистой сети мозга мыши.

В первой главе работы проведен фундаментальный теоретический обзор истории и оптики конфокальной микроскопии. Автор отмечает, что базовый принцип конфокальности, предложенный М. Мински в 1957 году, стал революционным благодаря использованию пространственного фильтра (пинхола), который позволяет отсекал внефокусное излучение. В работе подробно описан процесс формирования лазерного пучка (моды TEM₀₀) и его фокусировки через микроскопический объектив, где ключевую роль играет числовая апертура (NA) и функция рассеяния точки (PSF). Рассмотрены механизмы растрового сканирования: классические гальванометрические сканеры, обеспечивающие высокую точность и гибкость траекторий, и резонансные сканеры, позволяющие достигать скоростей в десятки кадров в секунду за счет работы на механической резонансной частоте, что критично для регистрации быстрых динамических процессов в живых клетках.

Особое внимание в теоретической части уделено фундаментальному ограничению классической КЛСМ — компромиссу между высоким латеральным разрешением и малой глубиной резкости. Использование высокоапертурных объективов приводит к тому, что в фокусе оказывается лишь ультратонкий срез (доли микрометра), что вынуждает исследователей применять метод Z-стекинга. Однако механическое сканирование по оси Z увеличивает время экспозиции, вызывает фотоблешинг и фототоксичность. Для преодоления этих ограничений автор подробно классифицирует и описывает современные методы расширения ГРИП (EDF). К ним относятся: волновое кодирование (WFC), использующее фазовые маски и последующую цифровую деконволюцию; методы глубокого обучения (DL-EDoF), где нейросети (например, U-Net) восстанавливают объемно-резкие изображения из расфокусированных данных или мультифокальных стеков; светопольная микроскопия (LFM), регистрирующая не только пространственное, но и угловое распределение света с помощью микролинзовых матриц; адаптивный фокус-стекинг, применяющий интеллектуальные алгоритмы для выбора только тех фокальных плоскостей, которые содержат полезную информацию; микроскопия со случайным освещением (EDF-RIM), основанная на статистическом анализе спекл-модулированных паттернов; а также использование бесселевых пучков и недифрагирующих световых полей, обладающих свойством самовосстановления и расширенной глубиной фокуса. Обзор показывает, что современная микроскопия все чаще представляет собой симбиоз оптического железа и вычислительных алгоритмов.

Вторая глава описывает аппаратную реализацию системы КЛСМ. Автор приводит структурную схему микроскопа, включающую лазерные модули, систему коллимации, блок дихроичных зеркал, сканирующие гальванометрические или резонансные зеркала, сканирующую и тубусную линзы, объектив, образец, систему выделения сигнала, конфокальную диафрагму (пинхол), набор эмиссионных фильтров и фотоприемник (фотоэлектронный умножитель). Описывается оптический путь луча: от

формирования дифракционно-ограниченного пятна на образце до пространственной фильтрации вторичного флуоресцентного излучения пинхолом и его последующей оцифровки.

Третья глава носит практический характер и посвящена методологии обработки и анализа изображений КЛСМ с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом Fiji (ImageJ). Автор подчеркивает, что предварительная обработка является критическим этапом, обеспечивающим воспроизводимость количественных данных. Алгоритмический конвейер начинается с проверки метаданных и калибровки масштаба (перевод пикселей в микрометры), разделения многоканальных изображений и настройки псевдоцветов (LUT). Для устранения неравномерного фона, вызванного автофлуоресценцией тканей, применяется алгоритм «катящегося шара» (Rolling Ball Background Subtraction). Для подавления фотонного шума используется слабое гауссово размытие. Автор делает важное методологическое предупреждение: алгоритмы нелинейного улучшения локального контраста (CLAHE) допустимы только для финальной визуализации, но неприменимы для количественного анализа интенсивности и ко-локализации, так как искажают линейный отклик детектора.

Далее в работе описывается процесс превращения полутоновых изображений в биофизические данные через сегментацию и бинаризацию. С помощью пороговых алгоритмов (Otsu, Triangle) создается бинарная маска сосудов, которая подвергается морфологической очистке (операции Open и Close) для удаления шума и заполнения разрывов. Для оценки плотности сосудистой сети применяется морфометрический анализ (измерение площади, периметра, диаметра Ферета). Топологический анализ ветвления осуществляется методом скелетонизации, при котором бинарная маска редуцируется до одно-пиксельного скелета. Анализ скелета позволяет извлечь такие параметры, как количество ветвей, узлов ветвления (junctions), тупиков (endpoints), замкнутых петель и общую длину сети. Эти показатели характеризуют зрелость и сложность сосудистого русла. Завершается анализ оценкой пространственного

взаимодействия структур методами ко-локализации (построение scatter plot и расчет коэффициентов Пирсона и Мандера).

В качестве практической демонстрации автор представляет анализ изображения кровеносных сосудов верхней части мозга мыши, окрашенных флуоресцентным красителем Evans blue. Размер исходного изображения составил 3636×3636 пикселей при калибровке 6,2148 мкм/пиксель. После прохождения этапов бинаризации и скелетонизации была рассчитана общая длина ветвей кровеносных сосудов, которая составила 654 590,45 мкм. Площадь исследуемого изображения была вычислена как 82 162 738,54 мкм². На основе этих данных автором получен ключевой биофизический параметр — плотность длины сосудов, составившая 0,0079 мкм/мкм². Данный пример наглядно демонстрирует, как сырые оптические данные трансформируются в строгую количественную метрику, пригодную для статистического сравнения различных экспериментальных групп.

В заключении работы автор резюмирует, что освоение методов цифровой обработки конфокальных изображений позволяет глубже понять преимущества КЛСМ перед классической широкопольной микроскопией. Ключевыми отличиями являются работа с трехмерными массивами данных (Z-стеками), необходимость отдельной обработки спектральных каналов и опора на линейность отклика детектора для точного расчета коэффициентов ко-локализации. Использование пинхола обеспечивает отсутствие внефокусного размытия, что позволяет четко сегментировать отдельные капилляры в толще ткани. Разработанный и описанный в работе алгоритмический конвейер обработки данных в среде Fiji является универсальным инструментом, который минимизирует субъективизм исследователя и открывает возможности для решения сложных междисциплинарных задач в клеточной биологии, гистологии и нейробиологии.

Таким образом, магистерская диссертация представляет собой завершенное научно-исследовательское произведение, объединяющее глубокий

теоретический анализ современной оптики и вычислительной микроскопии с практическим руководством по количественному анализу биологических тканей. Материалы работы могут быть использованы в научно-исследовательской практике лабораторий, занимающихся биофизической визуализацией и морфометрией микроструктур.

Заключение

В результате выполнения магистерской диссертации на тему «Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп для исследования биологических объектов» был проведен комплексный анализ теоретических основ, аппаратной реализации и методов вычислительной обработки изображений, получаемых с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Работа охватила широкий спектр вопросов — от исторических аспектов развития метода до современных достижений в области вычислительной оптики и количественного анализа биологических структур.

В теоретической части работы была систематизирована информация о физических принципах конфокальной микроскопии, начиная с фундаментальной концепции оптического секционирования, предложенной Марвином Мински в 1957 году, и заканчивая современными модификациями метода, включая многофотонную микроскопию, STED-микроскопию и Image Scanning Microscopy. Подробно рассмотрены механизмы формирования лазерного пучка в фундаментальной моде TEM₀₀, процессы коллимации и фокусировки излучения микроскопическим объективом, а также формирование функции рассеяния точки (PSF), определяющей предельное пространственное разрешение системы. Особое внимание уделено сравнению гальванометрических и резонансных сканеров, их преимуществ и ограничений для различных типов биологических исследований.

Ключевым достижением теоретического анализа стало детальное рассмотрение фундаментального ограничения классической конфокальной микроскопии — компромисса между высоким латеральным разрешением и малой глубиной резко изображаемого пространства. Для преодоления этого ограничения в работе проведен обширный обзор современных методов расширения глубины резкости (EDF), включающих волновое кодирование (WFC) с фазовыми масками и последующей цифровой деконволюцией, методы глубокого обучения (DL-EDoF) на основе архитектур U-Net и гибридных сетей, светопольную микроскопию (LFM) с микролинзовыми

матрицами и вычислительной реконструкцией, адаптивный фокус-стекинг с интеллектуальным выбором кадров, микроскопию со случайным освещением (EDF-RIM) на основе статистического анализа спекл-паттернов, а также использование бесселевых пучков и недифрагирующих световых полей. Анализ показал, что современная микроскопия все больше представляет собой симбиоз оптического оборудования и вычислительных алгоритмов, где аппаратные методы комбинируются с нейросетевой обработкой для достижения сверхразрешения и объемной визуализации в реальном времени. В аппаратной части работы представлена структурная схема конфокального лазерного сканирующего микроскопа, включающая все ключевые узлы: лазерные модули, систему коллимации, блок дихроичных зеркал, сканирующие гальванометрические или резонансные зеркала, сканирующую и тубусную линзы, микроскопический объектив, конфокальную диафрагму (пинхол), набор эмиссионных фильтров и фотоприемник. Описан оптический путь луча от формирования дифракционно-ограниченного пятна на образце до пространственной фильтрации вторичного флуоресцентного излучения пинхолом и последующей оцифровки сигнала.

Практическая часть работы была посвящена разработке и апробации методологии количественного анализа конфокальных изображений с использованием программного обеспечения Fiji (ImageJ). На примере изображения кровеносных сосудов верхней части мозга мыши, окрашенных флуоресцентным красителем Evans blue (размер изображения 3636×3636 пикселей, калибровка 6,2148 мкм/пиксель), был реализован полный алгоритмический конвейер обработки данных. Предварительная обработка включала проверку метаданных и калибровку масштаба, разделение многоканальных изображений, настройку псевдоцветов (LUT), вычитание неравномерного фона методом катящегося шара (Rolling Ball Background Subtraction) и слабое гауссово размытие для подавления фотонного шума. Особо подчеркнуто, что алгоритмы нелинейного улучшения локального контраста (CLANE) допустимы только для финальной визуализации, но

неприменимы для количественного анализа интенсивности и ко-локализации, так как искажают линейный отклик детектора.

Процесс превращения полутоновых изображений в биофизические данные включал сегментацию и бинаризацию с использованием пороговых алгоритмов Otsu и Triangle, морфологическую очистку масок (операции Open и Close) для удаления шума и заполнения разрывов. Морфометрический анализ позволил измерить площадь, периметр, диаметр Ферета и дескрипторы формы сосудистых структур. Топологический анализ ветвления осуществлялся методом скелетонизации, при котором бинарная маска редуцировалась до одно-пиксельного скелета, сохраняющего топологическую структуру сети. Анализ скелета с использованием плагина Analyze Skeleton (2D/3D) позволил извлечь такие параметры, как количество ветвей, узлов ветвления (junctions), тупиков (endpoints), замкнутых петель и общую длину сети.

В результате скелетонизации изображения кровеносных сосудов мозга мыши были получены следующие количественные показатели: общая длина ветвей кровеносных сосудов составила 654 590,454 мкм, площадь исследуемого изображения — 82 162 738,54 мкм², плотность длины сосудов — 0,007967 мкм/мкм². Эти данные демонстрируют, как сырые оптические данные трансформируются в строгую количественную метрику, пригодную для статистического сравнения различных экспериментальных групп и биологических моделей.

Завершающим этапом анализа стала оценка пространственного взаимодействия структур методами ко-локализации, включая построение диаграмм рассеяния (scatter plot) и расчет коэффициентов Пирсона и Мандера. Эти методы позволяют количественно оценить степень перекрытия флуоресцентных сигналов различных маркеров, что критически важно для изучения молекулярных взаимодействий и пространственной организации биологических структур.

Основные выводы работы заключаются в следующем. Во-первых, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия остается золотым стандартом биомедицинской визуализации благодаря способности устранять внефокусную засветку и обеспечивать высокое контрастное и аксиальное разрешение при оптическом секционировании толстых образцов. Во-вторых, получение высококачественного изображения является лишь первым этапом исследования; ключевой проблемой современной микроскопии становится объективная, воспроизводимая и автоматизированная обработка больших массивов визуальных данных. В-третьих, разработанный в работе алгоритмический конвейер обработки данных в среде Fiji обеспечивает высокую воспроизводимость морфометрических и топологических измерений, минимизирует субъективизм исследователя и позволяет автоматизировать рутинные операции. В-четвертых, современные методы расширения глубины резкости, особенно в сочетании с алгоритмами глубокого обучения, открывают перспективы для быстрой трехмерной визуализации динамических биологических процессов без механического сканирования по оси Z.

Г.И.И.