

ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2011 г. О. В. Егорова, канд. техн. наук; М. Ю. Егоров

ООО “Консалтинговая фирма “Микроскоп Плюс”, Санкт-Петербург

E-mail: microscope-plus@mail.ru

Представлены основные тенденции развития современных зарубежных световых микроскопов разрабатывающих и производящих компаний. Передовые технологии стимулируют создание новых оптоэлектронных, цифровых и моторизованных систем световых микроскопов и способствуют развитию естественных и технических наук. Стремление к повышению разрешающей способности световых микроскопов приводит к переходу на новый качественный уровень расчета всей оптической системы микроскопа, начиная от источника света и до чувствительного элемента воспроизведения изображения. Это же стремление приводит к появлению новых методов исследования, таких как рельефный контраст и методы на основе лазерных технологий. Переопределение производственных мощностей позволяет ведущим фирмам, определяющим тенденции развития световой микроскопии, концентрироваться на научноемких и высокоразрешающих моделях микроскопов.

Ключевые слова: световые микроскопы, люминесценция, рельефный контраст, лазерные технологии, цифровые микроскопы, диодные осветители.

Коды OCIS: 170.0170, 180.0180

Поступила в редакцию 04.06.2010

Началом эры современных световых микроскопов следует считать 50–60-е годы XX столетия. Именно в это время наблюдается рост научно-технического и технологического потенциала в области микроскопостроения практически по всему миру, особенно в Германии (*Carl Zeiss, Jena; Opton; Leitz*), Швейцарии (*Wild*), Австрии (*Reichert*), Японии (*Olympus, Nikon*), США (*Bash&Lomb, AO*), СССР (*ЛОМО*), Польше (*PZO*). Тенденции развития микроскопии этого времени связаны с разработкой методик расчета оптических элементов микроскопа [1], конструированием и освоением технологий: от воспроизведения микроскопов, созданных до войны, до создания новых конструкций с использованием технологий военного производства [2].

В связи с бурным развитием науки и техники к концу 60-х – середине 70-х годов произошел скачок в области микроскопии, связанный с развитием сложных научноемких систем [3]. Прежде всего, это коснулось микроскопов, обеспечивающих наблюдение в расширенном спектральном диапазоне. Причиной повышенного внимания стала не только необходимость наблюдения в ультрафиолетовой области (для биологии) и инфракрасной области (для матери-

аловедения и микроэлектроники) спектра, но и возможность увеличения разрешающей способности микроскопов. Новые технологии повлияли на усиленное внимание к люминесцентной и поляризационной микроскопии. Тогда же появились первые разработки экранных и дистанционных микроскопов.

Необходимость в фиксировании протекающих во времени процессов как в биологии, так и в материаловедении повлияла на создание систем, обеспечивающих документирование не только на фото-, но и на кинопленку со встроенными или вынесенными фото-, киноаппаратами. В это же время ведущие фирмы-разработчики вели работы по:

- унификации длины тубуса, высоты объективов и окуляров;
- созданию методик выравнивания положения выходных зрачков объективов, перераспределению хроматических aberrаций между объективом и окуляром для достижения компенсационного эффекта;
- выравниванию хроматической разности увеличения (ХРУ) для всего комплекта объективов [4].

В 80-е годы произошел подъем научно-технических разработок. Появилось большое ко-

личество американских, немецких и японских патентов, посвященных оптическим схемам объективов и окуляров микроскопа, бинокулярным насадкам, конденсорам и осветительным системам на базе не только стандартных стекол, но и с применением новых оптических сред [5]. Анализ патентного материала тех лет показал, что наметились тенденции, связанные с повышением таких параметров объективов, как увеличение ($150\text{--}200\times$ для проходящего и отраженного света); числовые апертуры (для проходящего света); рабочие расстояния (для различных толщин предметных и покровных стекол для нестандартной посуды и фотошаблонов). Аберрационные расчеты указывали на стремление разработчиков к созданию планоптики с минимумом хроматических aberrаций на линейных полях до 25–30 мм. Практически все оптические схемы объективов рассчитывались на длину тубуса “бесконечность” с тубусными системами, имеющими фокусные расстояния 164–250 мм.

Ряд запатентованных расчетов и оптических систем окуляров имели упрощенные схемы с асферическими поверхностями, вынесенными зрачками, без хроматической разности увеличения и с большими линейными и угловыми полями. Тщательный подход к аберрационному расчету осветительных систем с использованием асферических поверхностей в оптических схемах конденсоров указывал на подготовку к переходу на новый уровень развития световой микроскопии в целом.

Одним из первых новых разработок стал ряд микроскопов предприятия Карл Цейсс, Йена (ГДР) с оптикой “Jena-250”, рассчитанной на “бесконечность” и тубусной системой с фокусным расстоянием 250 мм, позволившей обеспечить наблюдение на максимальном линейном поле 32 мм без хроматических aberrаций. Увеличенное линейное поле было слишком большим для наблюдения глазом, а для систем документирования оно было явно избыточным. Кроме того, конструкции микроскопов были достаточно материалоемкими, но качество изображения отличалось высоким контрастом и разрешением по сравнению со старыми приборами. Практически в это же время фирма Opton (ФРГ) разработала микроскопы серии “Axio”. За счет применения ICS¹-оптики (рис. 1), рассчитанной на “бесконечность” с тубусной системой

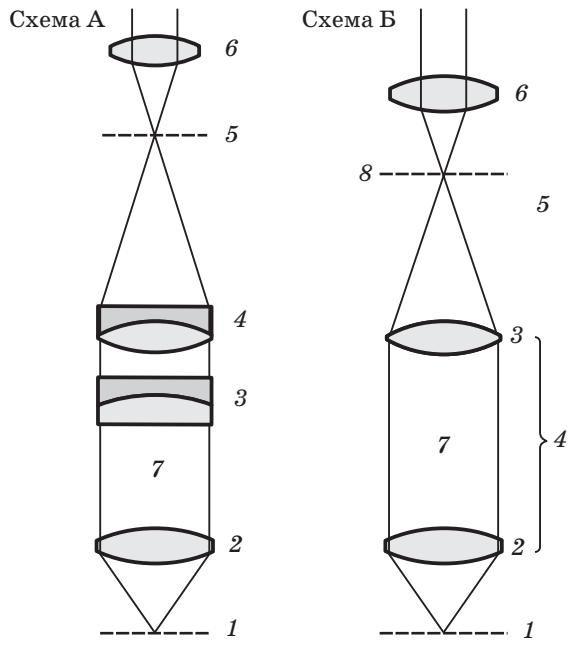


Рис. 1. Эволюция оптических систем микроскопов. Корректировка хроматических aberrаций систем, рассчитанных на “бесконечность” (на примере разработок фирмы *Carl Zeiss*).

Схема А. Микроскоп типа *Axiomat*: 1 – плоскость предмета; 2 – объектив, ХРУ = +1,2%; 3 – “корректор”, ХРУ = -1,2%; 4 – тубусная линза; 5 – главная промежуточная плоскость, ХРУ = 0%; 6 – окуляр, ХРУ = 0%; 7 – “бесконечность”, параллельный пучок лучей.

Схема Б. *ICS-оптика*: 1 – плоскость предмета; 2 – объектив, ХРУ = +1,1% до +1,9%; 3 – тубусная линза, ХРУ = -1,1% до -1,9%; 4 – система, обеспечивающая ХРУ = 0%; 5 – главная промежуточная плоскость, ХРУ = 0%; 6 – окуляр, ХРУ = 0%; 7 – “бесконечность”, параллельный пучок лучей; 8 – цветовая коррекция.

ХРУ – хроматическая разность увеличения.

мой фокусного расстояния 160 мм, эти микроскопы были малогабаритными, а за счет конструкции типа “пирамида” имели надежную устойчивость. Максимальное линейное поле без хроматической разности увеличения составляло 23–25 мм и было оптимально для наблюдения глазами. Наряду с этим велись работы по люминесцентной микроскопии, что создавало базу для проведения исследований в клеточной микробиологии.

В это же время немецкая фирма *Leitz* (ФРГ) разрабатывала микроскопы для развивающегося направления – микроэлектроники, требующей высокоточного оборудования для оснащения технологических процессов производства фотошаблонов и печатных плат. Для этой групп-

¹ ICS – оптика (Infinity Color Corrected Optical System) – оптическая система, рассчитанная на “бесконечность” и скорректированная по цвету.

пы микроскопов было необходимо наличие такого качества изображения, которое позволило бы на дифракционном уровне [6] получать разрешение субмикронных структур с высоким контрастом и цветопередачей. При этом требовалось обеспечить проведение измерений в автоматическом режиме с помощью регистрирующих систем.

Развитие направления “Стереоскопические микроскопы по схеме Аббе” определяли разработки фирм *Wild* (Швейцария) и *Bash&Lomb* (США), стереомикроскопы по схеме Грену. Кроме того, фирма *Wild* выпускала макроскопы для микроэлектроники. Обе фирмы предлагали на мировой рынок большой парк оборудования всех классов сложности с панкратическими системами, обеспечивающими плавную смену дополнительного увеличения с различными коэффициентами передачи, с разнообразными источниками света, предметными столами, стойками и принадлежностями.

Политические и экономические события 90-х годов привели к перераспределению производственных сил в мире. Прежде всего, это коснулось немецких фирм. Образовалось два сильных концерна: *Carl Zeiss*, объединивший восточное и западное производства (*Carl Zeiss, Jena* и *Opton*) [7], и *Leica*, поглотивший ряд производств, в том числе *Wild*, *Reichert* (Австрия), *Bash&Lomb*. Это привело к еще большему укреплению позиций немецких концернов в области научной микроскопии. С целью высвобождения промышленных площадей для внедрения новых технологий, часть технологического оборудования ведущих фирм Германии и Японии была продана в другие страны и, прежде всего, в Китай. Около 8 заводов в Китае производят микроскопы и узлы микроскопов, обеспечивая мир приборами невысокого и среднего уровня качества, заполняя нишу эконом-класса.

В это же время стали появляться небольшие фирмы с достаточно интересными разработками и постепенно налаживаемым производством:

– *Micros* (Австрия) – основное внимание фирма уделяет прямым биологическим микроскопам. В настоящее время выпускаются модели люминесцентных и инвертированных микроскопов проходящего света, а также стереоскопические микроскопы с панкратическими системами. Есть модель с экранной насадкой, встроенной цифровой камерой и мини-компьютером, имеющим простую программу обработки изображения и выполнения измерений (рис. 2) [8];

– *Meiji Techno* (Япония) – продукция фирмы включает микроскопы проходящего и отраженного света, инвертированные, стереоскопические, поляризационные и люминесцентные (рис. 3);

– *Motic* (Китай) – основной упор в разработках этой фирмы делается на микроскопы со встроенными цифровыми камерами. Это ряд прямых биологических (рис. 4) и стереоскопических микроскопов. Камеры имеют разрешение 3 мегапикселя и комплектуются простой программой для обработки изображения и выполнения измерений. Продукция фирмы включает люминесцентные, инвертированные, биологические и стереоскопические микроскопы [9, 10].

В настоящее время уровень выпускаемых микроскопов этих фирм с разной полнотой обеспечивается учебными и упрощенными моделями, а также рабочими и простыми лабораторными моделями. В полных каталогах этих фирм появляются и микроскопы, бывшие в продажах 80–90-х годов прошлого века американского производства.

Необходимость сокращения затрат на производство, с одной стороны, и создание новых рабочих мест в развивающихся странах, с другой стороны, привели в начале ХХI века к перераспределению процесса производства микроскопов из стран разработчиков Запада в страны-производители Востока и, прежде всего, в Китай и Таиланд. Под технологическим контролем специалистов фирм *Carl Zeiss, Leica, Olympus, Nikon* в Китае в настоящее время наложен выпуск микроскопов рабочего и лабораторного класса сложности [11].

Таким образом, к началу ХХI века рынок световых микроскопов формируется в основном продукцией фирм Германии, Японии, Австрии и Китая.

В табл. 1 представлены основные тенденции формирования современных моделей световых микроскопов по классам сложности с учетом групп и типов приборов. Рассуждая о современных оптических системах микроскопов, отметим следующее.

1. В конце ХХ века речь шла об оптических системах, рассчитанных с условием исправления хроматических aberrаций от плоскости предмета до главной промежуточной плоскости (плоскости изображения). Исправление хроматических aberrаций – одна из основных возможностей улучшить качество изображения за счет уменьшения влияния сферохроматических aberrаций на точность настройки (фокусиров-

Таблица 1. Характеристики и конструктивные особенности современных световых микроскопов

Параметры	Характеристики		
Класс сложности микроскопа по соотношению “цена – качество”	Учебный, упрощенный	Рабочий	Лабораторный
Длина тубуса	160 мм		“бесконечность”
Типы микроскопов	прямые, стереоскопические	прямые, инвертированные, стереоскопические	
Группы микроскопов	биологические (проходящего света); биологические, металлографические, поляризационные, люминесцентные		
Источник света:	галогенный 6 В, 20–30 Вт; диодный эквивалент 3 В, 6 Вт	галогенный 6 В, 30 Вт; диодный эквивалент 3 В, 6 Вт	галогенный 12 В, 50 Вт; диодный эквивалент 50 Вт
Источник света для люминесцентных исследований	—	для отраженного света: ртутная лампа 50–100 Вт; диодный эквивалент: 455 нм; (3 В, 6 Вт); для проходящего света диодный эквивалент: 365, 450, 480, 505, 535, 580, 630 нм	для отраженного света: ртутная лампа 50–100 Вт; ксеноновая лампа 75 Вт; диодный эквивалент: 365, 380, 400, 455, 470, 505, 530, 590, 615, 625 нм
Принцип освещения:			100 Вт (передача света по световодам); диодный эквивалент: 365, 380, 400, 455, 470, 505, 530, 590, 615, 625 нм
а) прямой	преднастроенный по Келеру	– проходящий свет: настраиваемый по Келеру;	настраиваемый по Келеру
б) инвертированный		– отраженный свет: преднастроенный по Келеру	
		– проходящий свет, люминесцентно отраженный:	настраиваемый по Келеру
		– преднастроенный по Келеру;	
		– отраженный свет:	
		настраиваемый по Келеру	
Линейное поле окуляра 10^{\times}	18 мм	20–23 мм	23–26,5 мм
Комплект окуляров	5^{\times} , 10^{\times} , 15^{\times} , 20^{\times}	10^{\times} , 16^{\times}	в окуляре
Размещение механизма диоптрийной наводки	на окулярной трубке	на окулярной трубке, в окуляре	
Бинокулярная насадка: угол наклона окулярных трубок	45° (30°)	30° (45°)	переменный: 0°–60°
Изображение	перевернутое	перевернутое	перевернутое, прямое
Деление светового потока:	100%:100%; 50%:50%		100%:100%; 50%:50%; 100%:-30%; 6:70%:-0%:100%
визуальное документирование	—		100%:0%; -50%:6:50%:-0%:100%

Продолжение табл. 1

Параметры	Характеристики		
Насадки, кроме бинокулярной	—	двойная насадка	<ul style="list-style-type: none"> – двойная насадка; – система для дискуссии с участием до 21 наблюдателя; – рисовальный аппарат; – проекционная; – цифровая со встроенной камерой; – цифровая со встроенной камерой и мини-компьютером; – промежуточный тубус с фото-, видеовыходом
Дополнительное увеличение в микроскопах плоского поля	—	—	1,25 [×] ; 1,6 [×] ; 2 [×] ; 2,5 [×] ; 4 [×]
Крепление сменных светофильтровых блоков в устройстве, шт.	—	2, 3	4, 5, 6
Методы исследования и контрастирования:			6, 7, 8
а) прямые	проходящий свет: СП, ТП, ФК, ФК	проходящий свет: СП, ТП, ФК, Под, Люм; отраженный свет: СП/ТП, Пол, Люм	проходящий свет: СП, ТП, ФК, Плас-ДИК
б) инвертированные	—	проходящий свет: СП, ФК отраженный свет: СП, Пол	проходящий свет: СП/ТП, Пол, Люм, ДИК отраженный свет: СП/ТП, Пол, Люм, ДИК
в) стереоскопические	проходящий свет: СП падающий свет: СП	проходящий свет: СП, ТП, косое, Пол падающий свет: СП, ТП, Пол, Люм	проходящий свет: СП, ТП, косое, Пол падающий свет: СП, ТП, Пол, Люм проходящий свет: СП, ТП, косое, Пол падающий свет: СП, ТП, Пол, Люм проходящий свет: СП/ТП, Пол, Люм, ДИК
Тип оптической коррекции объективов	ахроматы, ахроматы с улучшенным качеством изображения	планахроматы (с исправлением хроматических aberrаций: оптика типа ICS, UIS, ICO, CCIS, ICOS)	планахроматы, планапохроматы, флюоритовые системы (с исправлением хроматических aberrаций: оптика типа ICS/IC ² S, UIS/USI2)
Увеличения объективов	от 4 [×] до 100 [×]	от 2,5 [×] до 100 [×]	от 2,5 до 100 [×]
Резьбовое соединение объектива	объективная 0,8 W	объективная 0,8 W	от 0,5 [×] (1 [×] ; 1,25 [×]) до 150 [×]
Количество объективов в револьверном устройстве, шт.	3–4	5	5–6
Управление микроскопом	ручное	ручное, моторизованный стол	ручное управление; моторизованное управление: джойстик, кнопочное, с TFT-экрана, установленного на панели, с компьютера
Настройка	ручная	ручная	ручная; кодировка элементов



Рис. 2. Биологический микроскоп с экранной насадкой, встроенной цифровой камерой и мини-компьютером (*Crocus II MCX100LCD*, *Micros*, Австрия).



Рис. 3. Люминесцентный микроскоп (MT6000, *Meiji Techno*, Япония).

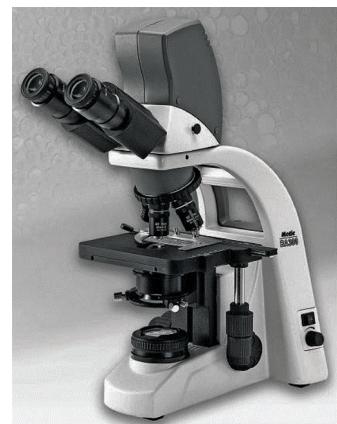


Рис. 4. Биологический микроскоп со встроенной цифровой камерой (*DM BA300*, *Motic*, Китай).

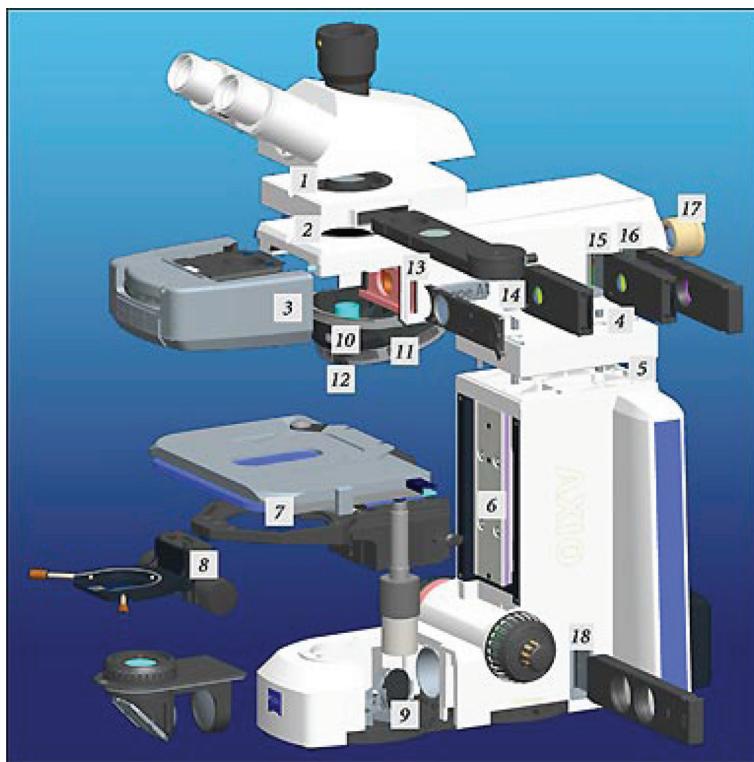


Рис. 5. Блок-конструктор многофункционального модульного микроскопа (*AxioScope A*, *Carl Zeiss*, Германия): 1 – визуальная насадка; 2 – промежуточный тубус с пазом для крепления модуля анализатора; 3 – модуль крепления светоделительных блоков; 4 – верхний модуль осветительной системы отраженного света; 5 – промежуточная пластина для увеличения свободного расстояния для высоких объектов (камер); 6 – штатив; 7 – предметный столик; 8 – узел крепления конденсора; 9 – револьверное устройство крепления светофильтров, встроенное в систему осветителя проходящего света; 10 – револьверное крепление объективов; 11 – паз для установки ДИК-призм; 12 – объектив; 13 – слайдер для крепления поляризатора в отраженном свете; 14 – съемный блок апертурной регулируемой диафрагмы отраженного света; 15 – съемный блок полевой регулируемой диафрагмы отраженного света; 16 – слайдер для крепления светофильтров; 17 – адаптер для крепления узла источников отраженного света; 18 – блок крепления светофильтров проходящего света.



Рис. 6. Микроскоп с диодным осветителем (DM 750, *Leica*, Германия).



Рис. 7. Моторизованный микроскоп (Axio Imager Z, *Carl Zeiss*, Германия).

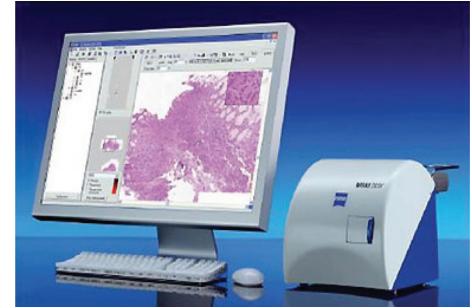


Рис. 9. Виртуальный микроскоп (MIRAX-SCAN, *Carl Zeiss*, Германия).



Рис. 10. Управление моторизованной системой микроскопа с помощью ЖК-экрана, закрепленного на штативе (*Carl Zeiss*, Германия).



Рис. 11. Блоки управления моторизованной системой стереоскопического микроскопа серии *StereoDiscovery/Lumar* (*Carl Zeiss*, Германия): а – внешний вид стереомикроскопа; б – блок управления НИР фокусировкой или плавной сменой увеличения; в – блок управления всей системы микроскопа SyCOP; г – информация, отображаемая на дисплее SyCOP.

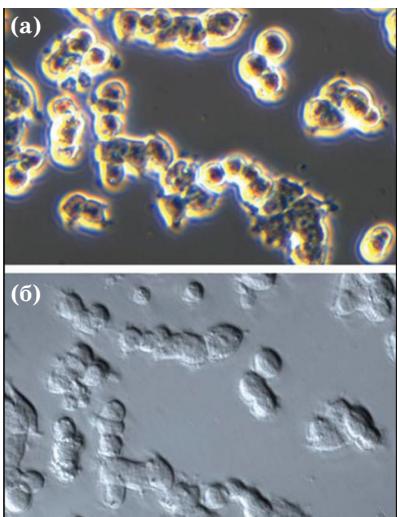


Рис. 12. Клетки, снятые с использованием разных контрастов: а – фазовый контраст; б – дифференциальный и интерференционный контраст (DIC).

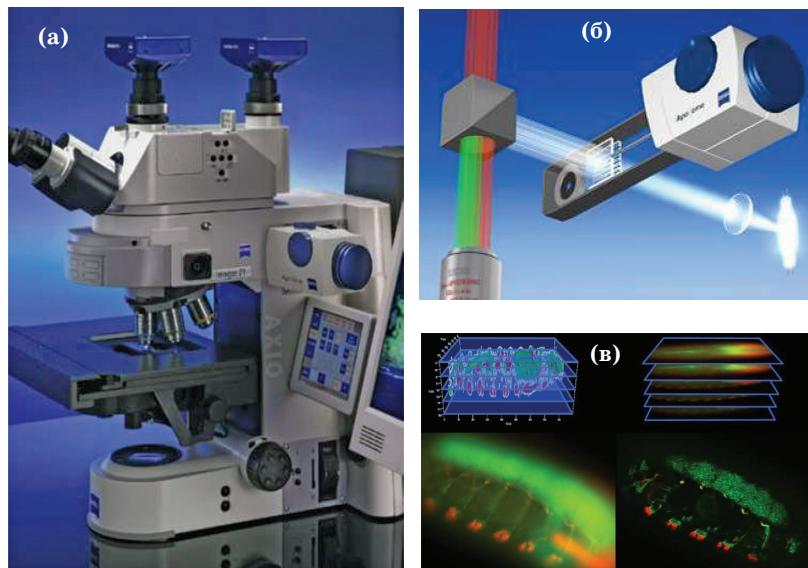


Рис. 13. Система *ApoTome*: а – микроскоп с системой *ApoTome*; б – схема работы устройства *ApoTome*; в – принцип получения оптических срезов.

ки) в плоскости наилучшей установки; увеличение разрешающей способности за счет повышения контраста и т. д.

Развитие микроэлектроники и повышенные требования к контрасту и разрешению в субмикронных диапазонах, а также развитие медицины (цитологические исследования в онкологии) и биологии (люминесцентная микроскопия прижизненных исследований), связанные с требованиями к оценке цветовых оттенков в изображении и свечении, все это в сочетании с необходимостью использования аналого-цифровых систем документирования потребовали перехода на оптику нового поколения. Таковыми стали оптические системы типа ICS-оптика *Zeiss*, UIS-оптика *Olympus*.

В настоящее время речь идет об оптической системе микроскопа, полностью скорректированной по хроматическим аберрациям – от источника света до плоскости изображения (IC²S – оптика *Zeiss*, USI2 – оптика *Olympus*, CFI60 – оптика *Nikon* и т. д.). При этом отмечается, что осветительная система имеет апохроматическую коррекцию, как в системе проходящего света, так и в системе отраженного света, в том числе и для люминесценции.

В это же время “второй эшелон” фирм от систем с конечной длиной тубуса (160 мм) перешли к микроскопам с оптическими системами, рассчитанными на длину тубуса “бесконечность” и с соответствующей одноступенчатой цветовой коррекцией, например, ICO-оптика *Micros*, CCIS-оптика *Motic*, ICOS-оптика *Meiji*. Конечная длина тубуса осталась у самых простых и дешевых микроскопов для колледжей и рутинных работ в биологии, а также как товар широкого потребления, которым может воспользоваться каждый.

2. Современные конструкции микроскопов имеют высокий уровень модульности. Например, микроскоп *Axio Scope A1* (рис. 5) имеет 23 конфигурации за счет разнообразного сочетания модулей.

С другой стороны, в простых моделях отмечается использование “литых” конструкций, как например, в микроскопах серии DM 500, 750 *Leica* (рис. 6), *Primestar Carl Zeiss*.

Однако какой бы модульностью не обладала конструкция микроскопа, важнейшими показателями являются его устойчивость и способность к сохранению настроек в течение длительного времени.

В настоящее время ряд моторизованных микроскопов ведущих фирм в автоматическом

режиме осуществляют поддержку не только парфокальности (сохранение резкости при переходе от одного объектива к другому), но и парцентрировки (сохранение точки центра поля при переходе от одного объектива к другому). Современные штативы моторизованных универсальных микроскопов обеспечивают сохранение резкости изображения при длительном сканировании большого объема препаратов. При этом точность перефокусировки может осуществляться с шагом 10 нм, в том числе и при использовании предметных столов весом до 9 кг (рис. 7).

3. Современные группы микроскопов, за счет разделения их с учетом применяемых технологий визуализации изображений, представлены группами, показанными на схеме (рис. 8). Особенности групп приведены в табл. 2.

Появление новых групп микроскопов связано с развитием цифровой техники и компьютерной обработки изображения, а также с разработкой новых технологий исследований, применяющих лазерные системы [12–14]. Это позволяет повысить информативность и разрешающую способность светового микроскопа.

Новые группы приборов привели к решению одной из задач рациональной организации технологического процесса рутинных исследований. Создание “виртуальных” микроскопов позволило уменьшить количество лаборантов, занятых в рутинной работе по просмотру большого количества препаратов. В процессе работы создается банк просканированных и оцифрованных изображений препаратов, которые в любой момент времени могут быть “вынуты”, цифровым способом увеличены или уменьшены, продемонстрированы во время обучения, заново проанализированы, сравнены с другими препаратами или отправлены по Интернету для консультации или обучения. Сложность реализации этого процесса состоит в получении резкого изображения при поступлении препарата из загрузочной камеры в плоскость сканирования и поддержание резкого изображения за все время сканирования. Следует отметить, что режим сканирования и документирования происходит в закрытом сканере (рис. 9) с помощью объектива конкретного увеличения (20, 40 или 100[×]). Подобные сканеры предлагаются такими фирмами как *Carl Zeiss*, *Leica*, *Nikon*.

Аналогичная задача может быть решена с помощью “цифровых” микроскопов. В рассматриваемой системе базой является стандартный световой микроскоп, который вместо визуаль-

Таблица 2. Основные особенности групп световых микроскопов

Групп- па	Наименова- ние группы	Подгруппа	Особенности	Примеры		
				Carl Zeiss	Leica	Olympus
1.	Базовые световые микроскопы	Микроскопы для обучения	Биологические микроскопы эконом-класса с тенденцией перехода на диодные источники света	PrimoStar	DM 500, 750, 1000	CX 21, 31
	Микроскопы для лабораторных исследований		Прямые и инвертированные биологические микроскопы проходящего и отраженного света, в т. ч. люминесцентные рабочего, лабораторного и исследовательского класса сложности	PrimoStar, Axioscope A, AxioImager A/D/M/Z; PrimoVert, AxioObserver A/D/Z	DM 1000 LED, 2500, 3000, 4000; DM II LED, DMI 3000B, 4000B	CX41, BX 45, 51, 61; СКХ 31, 41, IX 51, 71, 81
	Микроскопы для исследований на живых биологических объектах		Биологические инвертированные и прямые микроскопы исследовательского и универсального классов сложности с использованием лазерных технологий. Выпускаются в виде специализированных микроскопов и с комплектующими модулями для установки на микроскопы	Система PALM на базе AxioObserver	AM TIRF MC, MM AF, LMD 7000	TIRFM, CellCut Plus, SmartCut
	Микроскопы для технических целей:		Металлографические, прямые и инвертированные микроскопы отраженного и проходящего света. Поляризационные микроскопы проходящего и отраженного света для количественного и качественного анализа	Axioscope Am, AxioImager Am/Dm/ Mm/Zm, Axiovert 40Mat, AxioObserver Am/ Dm/Zm, Axioscope A Pol, AxioImager Pol	FS 4000 (сравнения); DM 2500 МН, 2500 М, 4000М, 6000М; DMI 3000М, 5000М; DMI ILM; DMI 2500Р, 4500Р; Leica Telatom (дистанционный)	BXFМ, BX 41М, BX51М, BX61; MX51, 61; GX 41, 51, 71
	1. Микроскопы металлографические					
	2. Микроскопы промышленные					
	3. Микроскопы для материалаоведения, в т. ч. и поляризационные					
	4. Микроскопы сравнения					
	Стереомикроскопы и макроскопы		Стереоскопические микроскопы и микроскопы с макрообъективами большого поля и больших рабочих расстояний. Стереомикроскопы комплектуются объективами для получения плоского изображения большого разрешения	Stemi DV4, Stemi 2000; Stereo Discov- ery.V8, V12,V20; Stereo Lumar.V12	Микроскопы: S4 E, S6 E, MZ6, MZ10F, M80, S8 APO, M125, M165C/FC, M205 C/FA, Макроскопы: Z16 APO, Z6 APO A, MacroFluor	MVX10, SZ51, 61 SZX 7, 10, 16

Продолжение табл. 2

Группа	Наименование группы	Подгруппа	Особенности	Примеры		
				Carl Zeiss	Leica	Olympus
2.	Конфокальные и лазерные сканирующие микроскопы		Специализированные лазерные системы на базе световых исследовательско-универсальных моделей проходящего и отраженного света (прямые и инвертированные) с использованием оптико-электронных устройств и лазеров разных длин волн для выделения тонких оптических срезов, их регистрации с дальнейшей цифровой обработкой по осям XYZ (3D), а также во времени (4D), с учетом скорости (5D) и длины волны (6D). Использование программ обработки изображений, регистрации и измерений	для биологии: серия LSM: 700, 7MP, 780, 710, 710 NLO, 710 Confocal3, 7 DUO, 7LIFE, Axio CSM 700	для биологии: серия TCS: STED CW, SP5 II, SP5 MP, SP5 X, CTED, LCI (на базе макроскопа), SPE, серия TCS SMD: FCS, FLIM, FLCS, для материала- ведения (комбиниро- вание конфокаль- ной и интерфери- метрической технологий): DSM 3D	FV 1000MPE для биологии (без визуальной насадки): FluoView FV10i, для материала- ведения (без визуальной насадки): LEXIT OLS 3100, 4000
3.	Цифровые микроскопы		Микроскопы с цифровой визуализацией изображения (без визуальной насадки)	для биологии: Primo Vert	для биологии: DMD108 для материала- ведения: DVM 5000, 30000, 2000	—
4.	Виртуальные микроскопы, сканеры для слайдов		Системы цифрового сканирования изображения с возможностью дальнейшего наблюдения виртуального изображения (цифровое увеличение, перемещения по препарату, передача информации по Интернету)	MIRAX viewer	SCN 400	—

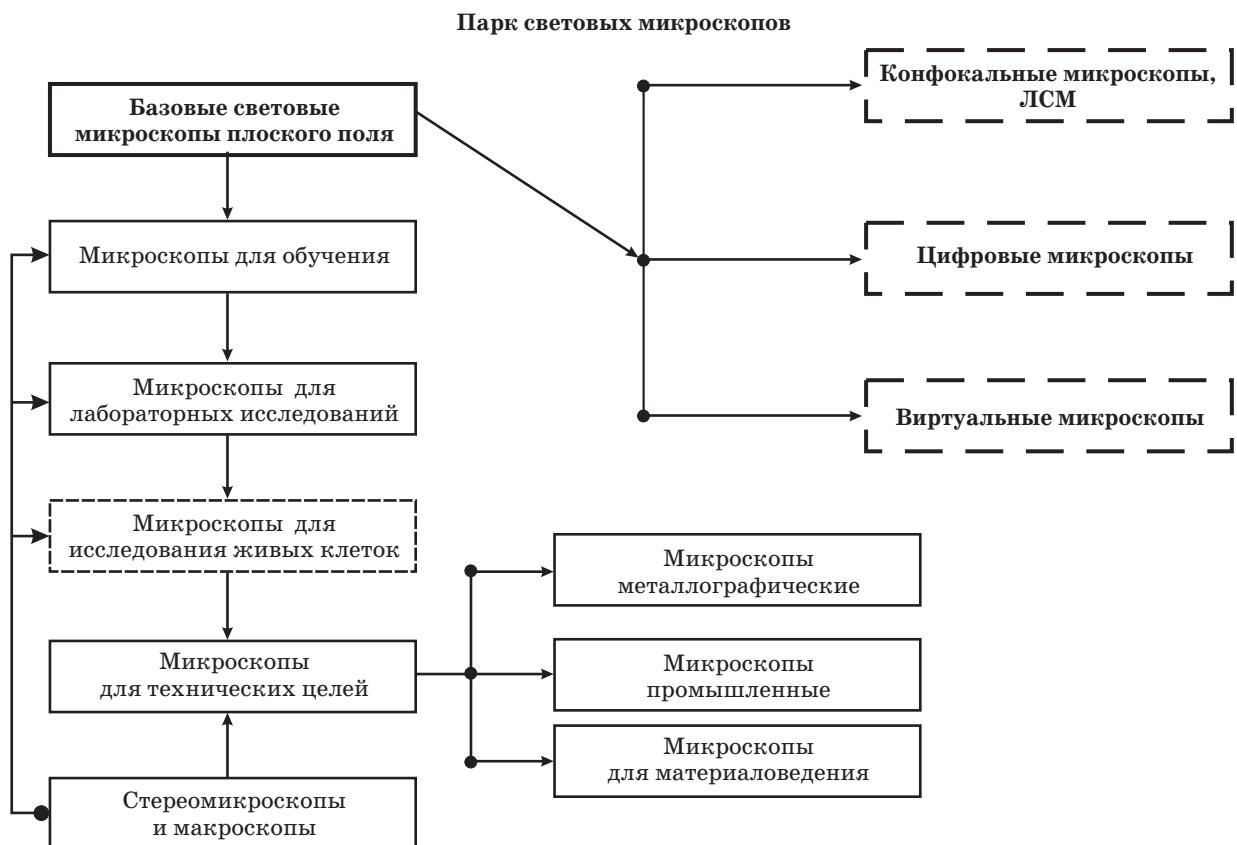


Рис. 8. Современный парк световых микроскопов, включая и новые группы микроскопов, появившихся в начале XXI века.

ной насадки имеет встроенную цифровую камеру и удаленный компьютер или встроенные камеры и мини-компьютер, которые позволяют оцифровывать изображение и передавать его на экран встроенного или удаленного монитора. При наличии сканирующего стола эта система играет роль визуального (не виртуального) сканера. Она имеет как преимущества – комплект объективов выбирается исследователем, так и недостатки – обязательное присутствие оператора. Понятие “цифровая микроскопия” может быть применено и к системам телемедицины. С помощью телекоммуникационных технологий и специальных компьютерных программ консультант на удаленном доступе управляет моторизованной системой микроскопа со сканирующим столом.

Иногда понятие “цифровые микроскопы” употребляется не совсем корректно. Это в том случае, если речь идет либо об автоматическом управлении базовой модели микроскопа, либо о микроскопе со встроенной цифровой камерой, работающей совместно с визуальной насадкой.

Современные универсально-исследовательские микроскопы имеют автоматический или

полуавтоматический режимы управления. Встроенные жидкокристаллические экраны (рис. 10) обеспечивают автоматическое управление микроскопом: установку в ход лучей объектива, автофокусировку, настройку освещения по принципу Келера, установку в ход лучей светофильтровых блоков для реализации люминесцентного метода или блоков для реализации темного поля, поляризации, дифференциально-интерференционного контраста. Моторизованные апертурная и полевая диафрагмы осветителей обеспечивают автоматическую регулировку контраста и освещенности как в отраженном, так и в проходящем свете. Для надежности воспроизведения система позволяет сохранять и в любой момент восстанавливать настройки диафрагм для конкретных объективов.

Система ACR (*Automatic Component Recognition*) представляет собой инновационную концепцию автоматического распознавания объективов и светофильтровых модулей в моделях *Axio Imager.Z2* (*Carl Zeiss*) с помощью чипа. При замене блока система немедленно регистрирует новый компонент в системе управления и в последующих настройках микроскопа

участвуют параметры уже нового элемента. Преимуществом данного способа является отсутствие ошибок и сложного процесса программирования управления.

Если для микроскопов плоского поля моторизованное управление существовало еще в конце 90-х годов и было реализовано практически во всех исследовательских вариантах моделей ведущих фирм, то для стереомикроскопов управление такими функциями, как фокусировка и регулировка плавной смены увеличения (zoom), реализованное в микроскопах серии *StereoDiscovery/Lumar* (рис. 11а), представляет интерес [15]. Моторизованное управление микроскопом ведется двумя способами.

Способ 1. Осуществляется с помощью двух блоков управления НИР (*Human Interface Panel*, рис. 11б), устанавливаемых на оптической головке микроскопа и на фокусировочном механизме.

Способ 2. Обеспечивает управление и контроль с помощью вынесенного блока SyCoP (*System Control Panel*, рис. 11в, г). Блок обеспечивает полное управление микроскопом: фокусировку, изменение увеличения, регулировку освещенности в плоскости предмета, установку блоков люминесцентных светофильтров и объективов (при наличии револьверного устройства). На ЖК-экране отображается информация о текущем моменте: общее увеличение, линейное поле на предмете, разрешающая способность, глубина резкого видения, информация об освещенности в плоскости предмета. Обычно информация об основных параметрах стереомикроскопа в текущий момент времени затруднена из-за неопределенности увеличения при работе с zoom-системами. Это приводит к усложненному расчету поля на предмете и разрешающей способности стереомикроскопа. Глубину резкости обычно определяли “на глазок”. Фиксированные параметры стереомикроскопа обеспечивают точность воспроизведения эксперимента, с одной стороны, а с другой – позволяют сравнивать эталонный образец с разными экземплярами или анализировать размеры и состояние объекта в динамике [16].

4. Новый этап развития стереоскопических микроскопов связан не только с моторизацией основных элементов управления, но и с изменением самих параметров микроскопа. Наметились тенденции к увеличению коэффициента плавной смены увеличения с одновременным увеличением разрешающей способности. Например, в стереомикроскопе *Stereo Discovery*.

V20 (*Carl Zeiss*) коэффициент увеличения составляет 1:20, при этом на единой базе обеспечивается стереоизображение и плоское изображение большого увеличения и разрешения с объективом PlanApoS3,5x топо большой числовой апертуры. Общее увеличение микроскопа при этом находится в диапазоне 65,6–1312,5[×]; рабочее расстояние остается постоянным во всем диапазоне изменения увеличения и равно 16 мм; линейное поле на предмете в зависимости от увеличения меняется в диапазоне 0,18–3,5 мм. В аналогичных микроскопах разных фирм одновременно может быть закреплено 2 объектива на салазках или 3 объектива в револьверном устройстве.

По другому пути идут разработки *Leica*. Микроскоп M205 с коэффициентом панкратики 1:20,5 имеет интересную двухканальную систему *FusionOptics*, которая одновременно создает изображение и с высоким разрешением, и с большой глубиной резкости.

5. Развитие инвертированных микроскопов полностью подчинено биотехнологии и исследованиям живой клетки [17]. Инвертированные микроскопы делятся по классам сложности на рабочие, лабораторные, исследовательские и универсальные модели. Конструктивно они могут быть выполнены для работы в проходящем или отраженном свете или быть микроскопами смешанного типа.

Упрощенный тип инвертированного микроскопа проходящего света обычно выпускается третьими странами. В этих моделях, как правило, не реализуется люминесцентный метод исследования в отраженном свете (и они автоматически не относятся к металлографическим инвертированным микроскопам отраженного света); фазовый контраст настраивается на заводе-изготовителе; конденсор с большим расстоянием имеет числовую апертуру порядка 0,2–0,3; комплект объективов стандартно имеет увеличение 4–20[×].

Представляет интерес оптика современных инвертированных универсально-исследовательских моделей, являющихся базой для лазерных сканирующих микроскопов и новых систем с использованием лазерных технологий типа TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* – технология полного внутреннего отражения в люминесцентной микроскопии).

Например, фирма *Carl Zeiss* предлагает к использованию в люминесцентной микроскопии такие объективы, как LCI Plan-NEOFLUAR 25[×]/0,80 и 63[×]/1,30 Imm Korr, предназначенные

специально для визуализации живых клеток и созданные в расчете на работу в определенном интервале температур.

Широкое распространение получили комплекты объективов водной иммерсии, применяемые как в физиологии, так и в клеточной люминесцентной микроскопии.

Развитие репродукционной и клеточной микроскопии привело к развитию рельефных методов контрастирования. Эти методы (Hoffman-contrast, Varel-contrast, DIC, Plas-DIC и т. д.) в отличие от фазового контраста, позволяют визуализировать нативные (неокрашенные) клетки в подвижном состоянии. В этих методах контрастирования отсутствует стандартный галоэффект, ухудшающий качество изображения (рис. 12).

6. Во вновь разрабатываемых микроскопах наблюдается переход на энергосберегающие источники света – светодиодные осветители (LED) со сроком службы около 100 тыс. часов. В настоящее время осветители со светодиодами устанавливают в микроскопы проходящего света с традиционными методами исследования, в том числе и в стереомикроскопы, а также используют для люминесцентных методов исследования в проходящем и отраженном свете.

Проведенные консалтинговой фирмой “Микроскоп Плюс” апробации микроскопов с LED-источниками разных фирм показали, что:

– высокая яркость источника хороша для биологических объектов, но для сильно отражающих объектов есть опасность появления точечных бликов, особенно в падающем свете при наблюдении в стереомикроскопах при малом увеличении. Требуется наличие матовых или диффузных светофильтров для смешивания точечных источников при наблюдении как больших полей при малом увеличении, так и малых полей при большом увеличении;

– устанавливаемые в упрощенные и лабораторные модели LED-источники имеют смещение спектральной кривой в синюю область спектра, что меняет привычную для российского пользователя желто-белую окраску фона. Для изменения этой ситуации фирма Carl Zeiss предлагает в комплекте Axio Scope A1 желтый светофильтр или установку светодиода White LED. В то же время, в микроскопе CX21 Olympus подобной проблемы не существует. Следует отметить, что при этом освещаемое линейное поле (10×18) в микроскопе Olympus меньше, чем в микроскопе Zeiss (10×23), что является немаловажным фактором. Чем больше освещаемое линей-

ное поле, тем больше требуется усилий для получения яркого равномерного освещения. Чаще всего диоды собирают в пакеты, как растревые элементы, и затем с помощью диффузора или коллекторной системы, включающей диффузор, обеспечивают освещение больших полей;

– в люминесцентных микроскопах применение светодиода аналогично применению лазера, т. е. источника с определенной длиной волны, что в отличие от ртутной лампы с линейчатым спектром, накладывает определенные ограничения. Линейчатый спектр имеет более широкую полосу пропускания в максимуме. В этом случае один источник света имеет несколько максимумов в широком спектральном диапазоне: от УФ до ближней ИК области. В то же время, при работе с LED требуется переключение с одного светодиода на другой, если требуется переход от одной длины волны к другой;

– основным положительным фактором использования LED является “чистое”, контрастное изображение, получаемое как в светлом поле, так и в свете люминесценции. Отмечается отсутствие фоновой засветки, которая наблюдается при использовании галогенной или ртутной лампы, обладающих большим рассеивающим эффектом при проникновении света в стекло и препарат. При работе в свете люминесценции препарат медленнее выцветает, т. к. есть возможность регулирования яркости светодиода;

– однако, кроме эпи-люминесцентных осветителей, современный рынок предлагает люминесцентный диодный модуль проходящего света фирмы FRAEN, разработанный для моделей микроскопов эконом-класса. Существует 2 варианта модуля: с одним светодиодом и с тремя светодиодами. В наблюдении препарата с помощью люминесценции проходящего света свет проходит через объект и светящиеся структуры более четко выделяются в изображении объекта. С другой стороны, люминесцентный микроскоп отраженного света имеет преимущество, связанное с тем, что есть возможность просматривать препарат в обычном проходящем свете с использованием, например, фазового или рельефного контраста (ДИК). В любом случае при выборе того или иного типа микроскопа следует учитывать особенности решаемых задач.

По результатам апробаций стало ясно, что для люминесцентного метода исследования при подборе светодиода с определенной длиной волны требуется более тщательно учитывать тип красителя и состав комплекта запирающих светофильтров.

К энергосберегающим источникам света относятся и металло-галогенные лампы, например, HXP-120, применяемые в люминесцентной микроскопии практически всеми фирмами. Они имеют такой же спектр излучения, как и лампы НВО, но не так сильно нагревают штатив, т. к. передают свет через световод. Такие источники особенно подходят для наблюдения живых клеток при флуоресцентном освещении.

Светодиодный осветитель *Colibri* (*Carl Zeiss*) отличается точной настройкой интенсивности свечения и гибкостью комбинирования различных длин волн. Осветитель обеспечивает включение в течение микросекунд. Он удобен для проведения комплексных исследований при максимальных скоростях прохождения реакций. Наибольший интерес представляет совместное применение HXP-120 и *Colibri*. Таким образом, могут возбуждаться те красители, для которых сегодня еще не существуют светодиоды.

7. Освещение больших полей актуально не только в осветительных системах с диодами. Например, в микроскопах *Nikon*, где используются объективы малых увеличений ($0,5^{\times}-2^{\times}$), в исследовательских моделях предлагается применение системы "a fly-eye lens". Около 300 микролинз по типу сетчатки глаза муhi составляют растровую систему, обеспечивающую проекцию и смешение излучения точечных источников света в плоскости предмета. Этим достигается улучшенная освещенность и равномерность в центре и по периферии поля, что гарантирует комфорт при наблюдении во всем диапазоне увеличения. Это имеет особое значение для цифровой обработки изображений. По сравнению с человеческим глазом, цифровые датчики более чувствительны к различиям в интенсивности и равномерности освещения.

8. Документирование и анализ процессов, происходящих с объектом, все то, что ведет к дифференциации, регенерации или росту клеток, тканей и организмов, предъявляют особенно высокие требования к системе микроскопа [17]. Высокое качество изображения гарантируют: идеальное однородное освещение в плоскости предмета при использовании распространенных методов контрастирования в проходящем или отраженном свете; наилучшее оптическое разрешение и люминесцентное освещение, щадящее пробы, при оптимальном соотношении сигнал/шум. Современные компьютерные программы для визуализации и анализа изображения в совокупности с новыми оптическими

системами микроскопа, а также моторизацией микроскопов обеспечивают эффективную и воспроизводимую визуализацию, а также позволяют фиксировать исследуемые процессы с высоким разрешением не только пространственно, но и во времени, а также с разными скоростными режимами.

Это же относится к технической микроскопии. Автоматизация процессов измерения сводится к применению специализированных компьютерных программ, обеспечивающих анализ образцов по принятым в материаловедении стандартам: неметаллические включения, выявление и определение величины зерна, в т. ч. определение размера ферритного или аустенитного зерна и т. д. Это предъявляет особые требования к конструкции металлографических микроскопов, мало чем отличающихся от требований к биологическим микроскопам, в том числе и моторизованным. Наряду со стандартными методами контрастирования (светлое поле, темное поле и поляризация), в настоящее время все больше для исследований применяют рельефный контраст – дифференциально-интерференционный контраст – повышающий точность измерений и информативность результатов изучения объекта [18].

9. Повышение разрешающей способности всегда было основной проблемой при создании оптических систем микроскопов и их конструкций. Актуальность этого возрастала по мере повышения интереса к люминесцентным методам исследования.

Когда в процессе проведения экспериментов используются наборы светофильтров, обеспечивающих близкие спектры возбуждения и эмиссии, то появляется перекрестная связь этих спектров, что влияет на получаемую общую картину. Это серьезная проблема в количественной микроскопии. Многоканальное разделение свечений решает эту проблему без дополнительных аппаратных средств. Решить проблему можно с помощью компьютерных программ обработки, например, модулем *Axio-Vision Widefield Multichannel Unmixing* (широкопольное многоканальное разделение свечений). Этот модуль удаляет перекрестную связь между различными красителями в каналах и освобождает от задачи поиска подходящих комбинаций красителей. Это происходит через калибровку системы с чистыми красителями или альтернативно посредством *Automatic Component Extraction Carl Zeiss*. Даже цветовые комбинации частично совмещенных краси-

телей, например, CFP и GFP или YFP и DsRed, дают достаточно устойчивый результат наблюдения без перекрещивания в пределах образца. Кроме того, (авто)флуоресценция, возникающая в образце и типичная для определенных клеток или тканей, или вызванная определенными веществами, может быть удалена.

Другие проблемы связаны с наблюдением толстых образцов и в настоящее время для решения подобной задачи существует несколько направлений:

- создание оптико-механических модулей, позволяющих “очищать” световой поток, отраженный от объекта, от “вредного” света, находящегося выше или ниже плоскости наилучшей установки на препарате;
- создание систем, создающих “оптические срезы” в плоскости изображения;
- использование полного внутреннего отражения для выделения тонкого слоя в препарате.

А). В начале XXI века фирма *Carl Zeiss* предложила новую технологию *ApoTome* – создание структурированного освещения, позволяющего получать тонкие оптические срезы, с удалением дополнительных свечений выше и ниже фокальной плоскости объектива. За счет этого в изображении улучшается контраст и повышается разрешение.

В плоскость полевой диафрагмы осветителя отраженного света устанавливается подвижный контур, управляемый с помощью специальной программы. Изображение сетки проецируется непосредственно в плоскость препарата. Если сетка неподвижна, то ее изображение можно видеть через окуляры и с помощью камеры.

Изображение регистрируется камерой в трех положениях сетки (перемещение сетки в плоскости препарата). Область, в которой изменение яркости высокое, относится к фокальной плоскости; там, где яркость меняется не значительно, – сигналы из плоскости вне фокуса удаляются (рис. 13). Таким решением достигаются:

- увеличение осевого разрешения в 2 раза,
- улучшенное соотношение “сигнал–фон” (контраст),
- удаление из фокуса лишнего света,
- оптическая предпосылка для 3D изображения и 3D реконструкций.

Б). Сегодня трудно представить научные институты без лазерных сканирующих или конфокальных систем. Опто-электронная система с лазерным блоком обеспечивает сканирование

объекта по осям *XYZ*. Важным элементом является точечная диафрагма (регулируемая в зависимости от числовой апертуры объектива), расположенная в плоскости изображения и сопряженная (конфокальная) с точкой фокуса объектива. Для создания изображения более чем из одной точки зоны фокуса требуется проведение сканирования по осям. Полученное точечное изображение содержит информацию только из зоны фокуса, которое регистрируется детектором. Таким образом формируется оптический срез. В зависимости от поставленной задачи количество лазеров и детекторов может быть разным. Сканирование можно проводить с помощью вращающихся дисков для обычной флуоресцентной микроскопии, или с использованием лазерного луча в установке конфокального лазерного сканирующего микроскопа (LSM). С помощью компьютерной обработки изображения проводятся геометрические и оптические измерения, регистрация сигналов, создание объемных реконструкций. В настоящее время лазерные системы созданы как для медико-биологических исследований, так и для материаловедения.

В) Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF-метод) используется при изучении взаимодействия отдельных молекул или мембранных процессов. Для создания изображения используется тонкий образец (около 200 нм) и луч возбуждения, направленный под углом полного внутреннего отражения, проникающий на небольшую глубину. Числовая апертура объектива 100 \times должна быть более 1,45 (рис. 14). Объективы *Carl Zeiss* α *Plan-APOCHROMAT* 100 \times /1,46 *Oil* и 100 \times /1,57 *HI Oil*, имеющие сверхвысокие числовые апертуры, дают максимальное разрешение как при люминесцентных методах исследования, так и в комбинации с методом DIC. Следует отметить, что фирмы имеют разные по степени исправления полевых aberrаций объективы, обеспечивающие эту методику.

Достаточно популярна еще одна технология с использованием лазера. Это микродиссекция – выделение интересующего элемента (например, живой клетки, хромосомы, макромолекулы определенного вида) из имеющегося биологического материала без его загрязнения и повреждения. Эта же технология позволяет производить изъятие интересующего элемента и транспортировку его с помощью специального контейнера.

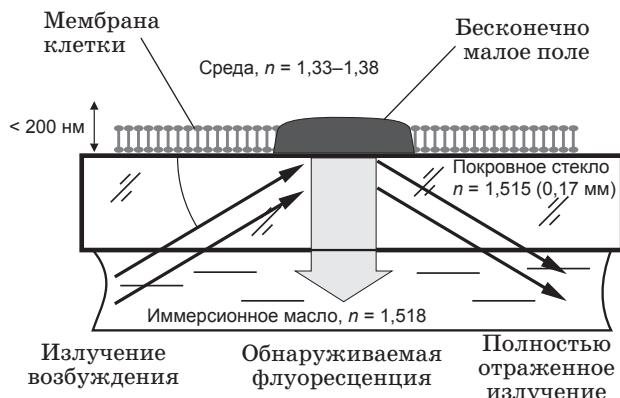


Рис. 14. Принципиальная схема проведения исследований по методу TIRF (флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения).

Заключение

Анализ состояния современной световой микроскопии первого десятилетия XXI века позволяет определить следующие основные тенденции:

- производство микроскопов эконом-класса ведущих фирм разработчиков налажено в основном в Китае, микроскопы высокого качества изображения – в стране разработчика;
- появились новые фирмы Австрии, Китая, Японии, заполняющие нишу упрощенных и рабочих моделей микроскопов разных типов, в том числе микроскопов со встроенными цифровыми камерами;
- современные микроскопы проходящего и отраженного света разных типов и классов сложности выпускаются с единой длиной тубуса “бесконечность” и с оптикой, скорректированной по хроматическим аберрациям;
- в конструкции микроскопов наблюдается высокий уровень модульности, обеспечивающий гибкость при компоновке моделей;
- появились новые группы микроскопов, такие как виртуальные микроскопы, цифровые микроскопы, лазерные сканирующие микроскопы;
- расширился круг методов исследования за счет появления рельефных контрастов и в первую очередь дифференциально-интерференционного контраста Плас-ДИК, применяемых в биологии, репродукционной медицине и в металлографии;
- все больше внедряются светодиодные осветители для проходящего света и люминесценции;

– новые технологии и, прежде всего, использование лазерной технологии расширяют информативное поле об объектах исследования и их свойствах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вопросы микроскопии. Сборник статей / Под ред. Захарьевского А.Н. М.-Л.: Машиностроительная литература, 1956. 163 с.
2. Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов. Л.: Машиностроение, 1976. 427 с.
3. Федин Л.А., Барский И.Я. Микрофотография. Л.: Наука, 1971. 214 с.
4. Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов. Л.: Машиностроение, 1976. 430 с.
5. Егорова О.В. Методы оценки технологичности и контроля качества оптических систем нового поколения объективов микроскопа // Автореф. канд. дис. СПб.: СПбГУ ИТМО, 1995. 139 с.
6. Михель К. Основы теории микроскопа. М.: ГИТТЛ. 1955. 274 с.
7. Егорова О.В. Этапы большого пути длиной в 160 лет // Лабораторная диагностика. Terra medica. 2006. № 3. С. 15–22.
8. Егорова О.В. Комплект световых микроскопов фирмы Motic для эмбриологии // Проблемы продукции. 2008. В. 14. С. 44–47.
9. Егорова О.В. Рабочие микроскопы фирмы Motic для клинических исследований // Российский вестник Акушера-Гинеколога. 2009. № 1. С. 30–35.
10. Егорова О.В., Егоров М.Ю. Современные помощники для клинической лаборатории // Медицинский алфавит. Лаборатория. 2010. № 2. С. 5–8.
11. Егорова О.В. Новая продукция на российском рынке световых микроскопов // Медицинская картотека. 2008. № 11. С. 4–12.
12. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем: Пер. с англ. / Под ред. Хромова-Борисова Н.Н. М., 2005. 254 с.
13. Кларк Э.Р., Эберхардт К.Н. Микроскопические методы исследования материалов: Пер. с англ. / Под ред. Баженова С.Л. М., 2007. 371 с.
14. Basics of Light Microscopy& Imaging // Imaging&Microscopy. 2005. 53 с.
15. Егорова О.В. Современные стереоскопические микроскопы // Оборудование. Инструмент для профессионалов. 2008. № 4. С. 112–114.
16. Егорова О.В. Техническая микроскопия. С микроскопом на “ты”. М., 2007. 200 с.
17. Егорова О.В. С микроскопом на “ты”. Шаг в XXI век. Световые микроскопы для биологии и медицины. М., 2006. 406 с.
18. Пантелеев В., Егорова О., Клыкова Е. Компьютерная микроскопия. М., 2005. 303 с.