

С.В. Немова

ООО «ИНТЕРО», Киев

МИР ИННОВАЦИЙ LEICA MICROSYSTEMS



Представлена информация о последних инновационных разработках компании «Leica Microsystems», Германия. Приведен обзор особенностей конструкции цифровых микроскопов и стереомикроскопов Leica и рассказывается о нескольких методах подготовки образцов в электронной микроскопии при помощи специализированного оборудования компании-производителя.

Ключевые слова: нанотехнологии, цифровой микроскоп, стереомикроскоп, анализ микроструктур, автоматическое управление.

Компания «Leica Microsystems» имеет давнюю и славную историю, начавшуюся в 1849 г. с основания Оптического института в г. Вецлар, Германия. В 1869 году компания переходит к Эрнсту Лайтцу, который не только дал ей свое имя, но и учредил основные принципы работы, воплощенные в девизе «с пользователем для пользователя» и сейчас являющийся основополагающей философией компании «Leica Microsystems».

Бренд Leica возник в 1990 г. после слияния материнской компании Wild Leitz с Cambridge Instruments и сегодня его используют 3 независимые компании: Leica Camera, Leica Geosystems и Leica Microsystems. На территории Украины «ИНТЕРО» представляет Leica Microsystems groupe — одну из ведущих компаний в мире в сфере производства оборудования для микроскопии, пробоподготовки, нанотехнологий, лабораторий контроля качества.

«Leica Microsystems» состоит из 3-структурных подразделений: Leica Biosystems, Life Science Division, Industry Division. Из тринадцати заводов окончательной сборки «Leica Microsystems» восемь находятся в Европе — три в

Германии, три — в Великобритании, по одному — в Австрии и Ирландии.

В настоящей статье очень кратко отмечены технические решения «Leica Microsystems», которые будут наиболее интересны с точки зрения применения в области научных исследований.

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

Электронный микроскоп — прецизионный прибор, который требует особых методов приготовления препаратов. Это необходимо для выявления отдельных компонентов изучаемых объектов (клетки, бактерии, вирусы и т. д.), а также для сохранения их структуры в условиях высокого вакуума под пучком электронов.

Пробоподготовка является наиболее трудным этапом электронно-микроскопических исследований. Различают два главных направления электронной микроскопии: *трансмиссионную* (просвечивающую, ПЭМ) и *растровую* (сканирующую, СЭМ), основанных на использовании соответствующих типов ЭМ. Соответственно и подготовка образцов для исследования зависит от того, какой тип прибора анализа используется.

«Leica Microsystems» является единственной компанией, производящей полный спектр

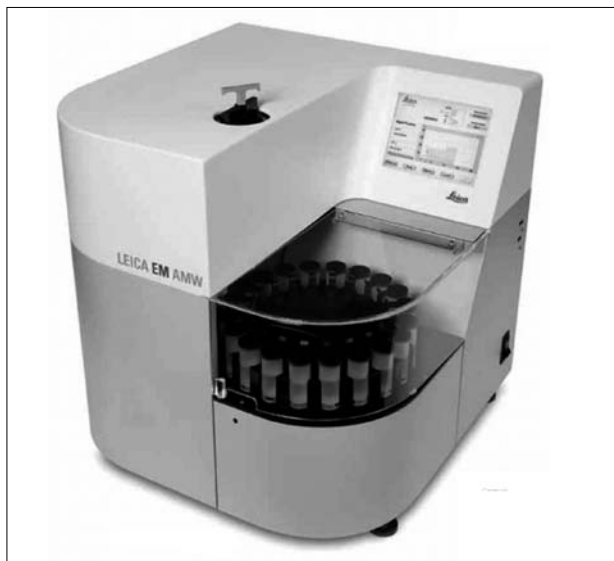


Рис. 1. Автоматический процессор Leica EM AMW



Рис. 2. Ультрамикротом Leica EM UC7

оборудования как для изготовления тонкопленочных образцов для ПЭМ, так и для изготовления реплик всех типов биологических и небиологических образцов для СЭМ.

Оборудование для подготовки биологических образцов для ПЭМ исследования при комнатной температуре:

1. Обработка материала проводится с помощью автоматического процессора с микроволновым облучением Leica EM AMW (рис. 1). За

несколько часов образец химически фиксируется, заливается смолой и полимеризуется для последующего анализа. Новая примененная технология — это однорежимная конструкция микроволновой камеры, которая направляет энергию микроволнового излучения в определенную область и обеспечивает однородность характера поля, окружающего препарат.

2. Подготовка к секционированию — устройство Leica EM Trim2 позволит провести тримминг мягких тканей.

3. Изготовление сверхтонких срезов образцов — это самый сложный этап пробоподготовки. Ультрамикротом Leica EM UC7 (рис. 2) изготавливает высококачественные полутонкие и ультратонкие срезы с идеально гладкой поверхностью. Уникальная черта ультрамикротомов Leica — моторизованное продольное перемещение ножа, что позволило запатентовать такие функции, как режим автотримминга, поперечное измерение расстояния и автоматический выбор нужного сегмента ножа.

4. Контрастирование с помощью устройства Leica EM AC20 ускоряет повседневную работу лаборатории и исключает кропотливые и требующие времени задачи, связанные с традиционными способами контрастирования. Заранее расфасованные (по 200 мл) растворы обеспечивают превосходные результаты контрастирования без соприкосновения пользователя с токсичными реактивами. В устройстве использован шланговый насос и бесконтактные клапаны, а это значит, что реактивы по пути в камеру, где находятся сетки, не соприкасаются ни с чем, кроме шлангов.

Как альтернатива химической фиксации может быть применен метод криозамещения в сочетании с криофиксацией (рис. 3). При этом хорошо сохраняются как антигенность, так и ультраструктура образца. Высокое давление в 2100 бар, приложенное к препарату в процессе замораживания, подавляет образование и рост кристаллов, а холодное обездвиживание предотвращает повреждение структуры препарата. Криозамещение позволяет полимеризовать

препарат в метаноле, ацетоне или любой другой среде в устройстве Leica AFS2.

Основным прибором для подготовки биологических образцов для ЭМ исследования в условиях низких температур является ультрамикротом с криокамерой Leica EM UC7/FC7 для низкотемпературной резки. Технологически этот прибор превышает имеющиеся аналоги. Запатентованные функции криоприспособки Leica EM FC7:

- ✦ присоединяемый микроманипулятор, который обеспечивает точное позиционирование сеточки, что упрощает сбор срезов;
- ✦ система светодиодной подсветки позволяет освещать нож и образец под различными углами, что обеспечивает отличный контраст и удобство работы.

Ультрамикротом Leica EM UC7 позволяет оптимизировать использование дорогостоящих алмазных ножей. Прибор сохраняет информацию о 100-а различных ножах. Каждый нож делится на сегменты, которые автоматически устанавливаются напротив образца по нажатию кнопки. Данная функция также запатентована.

МИКРОСКОПЫ И СТЕРЕОМИКРОСКОПЫ

Инструментарием, незаменимым для исследователя в различных отраслях науки, являются микроскоп и стереомикроскоп, как правило, в цифровом варианте, т.е. базирующиеся на анализе изображений, получаемых с помощью цифровых комплексов.

В этой связи хочется обратить внимание на новое поколение Leica Digital Microscopes (цифровых микроскопов Leica): серия Leica DM 4000 B – DM6000 B для наук о жизни и серия Leica DM4000 M – Leica DM6000 M для материаловедения (рис. 4).

Конструкция оптической системы микроскопа является критерием, определяющим его качество. Самым важным оптическим элементом микроскопа являются объективы. В конструкцию объектива входит комплект сферических линз. В качестве материала для производства линз используется только стекло. Более



Рис. 3. Автоматическая система криозамещения Leica EM AFS2



Рис. 4. Цифровые микроскопы Leica DM4000 M – Leica DM6000 M

100 тщательно отобранных высококачественных типов стекол служат сырьем для производства линз, призм, фильтров. Оптический центр Leica при производстве линз использует собственные стандарты: радиус и сферическая форма линз производится с точностью $1/1000$ толщины человеческого волоса ($0,000014$ мм — $1/20\lambda$). Чтобы компенсировать такие aberrации, как кривизну поля, хроматическую разность увеличения и фокуса, необходимо точно настроить угол расположения линз по отношению друг к другу и изменение пространства между ними. Позиция каждой линзы должна быть точно зафиксирована. Пространство между линзами должно быть выверено с точностью $3/1000$ мм, исключая изменения наклона или перемещение. Точность настройки угла — 1 арксеканс ($1/3600$ градуса). Все шаги по точной настройке делаются вручную, а проверка изготовления осуществляется с помощью интерферометрической техники. Весь процесс занимает до 6 ч для каждого объектива, в заключение для каждого объектива выпускается сертификат, подписанный мастером.

Перед монтажом линзы подвергаются очистке и покрытию специальными веществами под высоким давлением. Так линзам придаются специальные оптические свойства и химически-механическая стабильность. Leica самостоятельно производит покрывные системы, уникальные для каждого типа объективов, иногда для достижения необходимых свойств требуется до 50 покрытий с каждой стороны. Точность финального покрытия 1 нм (тысячная микрона).

В цифровых микроскопах Leica была впервые внедрена концепция **разумной автоматизации**, которая предоставляет пользователю высокотехнологичный инструментарий для формирования цифрового изображения.

К главным положениям концепции относятся:

- ✦ автоматическое воспроизводство и сохранение правильных оптических параметров, яркости и установок диафрагм для комбина-

ции используемого объектива и метода контрастирования;

- ✦ все автоматические настройки освещения легко модифицируются пользователем с созданием и сохранением индивидуальных пользовательских профилей;
- ✦ в моделях DM5500, DM6000 моторизованное z-перемещение позволяет также автоматическую настройку парфокальности, сохранение уровней фокусировки и автоматическое позиционирование z-уровней.

Реализуется концепция с помощью инновационных моторизованных верхушек конденсоров и автоматизированной оси проходящего света.

Конденсор определяет, какой объектив находится в световом луче и какая техника контрастирования требуется. Все правильные компоненты настройки устанавливаются конденсором автоматически.

Автоматизированная ось проходящего света состоит из автоматизированного управления освещением по Келлеру и запатентованного модуля Leica Constant Color Intensity Control (модуля Контроля постоянной интенсивности цвета). Наилучшие значения апертуры, полевой диафрагмы и интенсивности света для объектива и метода контрастирования устанавливаются автоматически, при этом яркость изображения образца остается постоянной при переключении объективов. Модуль контроля интенсивности цвета генерирует постоянную температуру цвета (3200 K), независимо от мощности лампы.

Никогда еще не было пользование микроскопа таким простым: пользователю необходимо только установить образец на предметном столике и сфокусироваться. Цифровые микроскопы Лейка определяют тип выбранного объектива, автоматически настраивают верхушку конденсора, безошибочно открывают и закрывают апертурную и полевую диафрагмы и подбирают интенсивность света. Автоматизированное управление яркостью также отфильтровывает красную и оранжевую

составляющие света, создавая постоянный фон образца.

«Leica Microsystems» предлагает также широкий модельный ряд стереомикроскопов, производящихся как по принципу Грену (это схема, при которой объект наблюдается под разными углами с помощью 2-х монокулярных микроскопов, наклоненных под углом 12–17° друг к другу), так и по телескопическому принципу (принцип СМО — главного объектива).

Вторая схема была разработана в 1957 г. Американской Оптической Компанией и реализована в микроскопе Cycloptic®. В современном алюминиевом корпусе помещались две оптические параллельные ветви с системой линз и большой главный объектив — принцип был назван *телескопическим* или СМО (Common Main Objective) и используется для производства модульных, высококачественных микроскопов. Этот принцип компания Leica воплотила в микроскопы М-серии, создав широчайшую номенклатуру от рутинных до научно-исследовательских моделей (рис. 5).

Существует несколько критериев качества стереомикроскопов — диапазон увеличений и зуммирования, поле объекта, рабочее расстояние. Остановимся на двух: *глубине поля* (резкости) и *оптическом разрешении*.

В микроскопии глубина поля часто рассматривается как эмпирический параметр. На практике это определяется как корреляция между числовой апертурой, разрешением и увеличением. Для наилучшего возможного визуального впечатления настройки свойств современных микроскопов предоставляют баланс между глубиной поля и разрешением — двумя параметрами, находящимися в обратно пропорциональной зависимости. В случае стереомикроскопа чаще всего было необходимо искать компромисс в пользу большей глубины поля — это требование продиктовано именно необходимостью отображения третьего z-измерения объемных объектов.

FusionOptics™ — это разработка от «Leica Microsystems», нейтрализующая обратную за-



Рис. 5. Стереомикроскопы Leica М-серии

висимость между глубиной поля и разрешением в стереомикроскопии. Она заключается в том, что один световой пучок, проходящий через глаз наблюдателя, образует изображение высокого разрешения при низкой глубине поля. С помощью второго пучка света другой глаз видит изображение этого же объекта при низком разрешении и большой глубине поля. Мозг человека комбинирует два отдельных изображения в одну оптимальную цельную картинку, имеющую черты двух: высокое разрешение и большую глубину поля. Практически FusionOptics™ дает экстравысокое качество изображения, благодаря достижению высоких уровней оптического разрешения и глубины поля. По сравнению с имеющимися на рынке традиционными стереомикроскопами оптическое разрешение стереомикроскопов Leica выше на 25 %, а глубина поля на 65 %, что дает возможность наблюдать структуры размером 476 нм с разрешением 1050 л/мм.

Роль осветительной системы в стереомикроскопе невозможно переоценить, поскольку именно она как бы извлекает для наблюдателя все черты исследуемого образца посредством отражения от объекта контрастного света. Leica также свершила техническую революцию и в конструкции осветительной системы для стереомикроскопов, первой из производителей внедрив светодиодные (LED) осветители. В этом году в производство были выпущены два типа новых, абсолютно уникальных на рынке светодиодных осветителей для стереомикроскопов Leica LED3000 и Leica LED5000.



Рис. 6. Светодиодные осветители LED3000

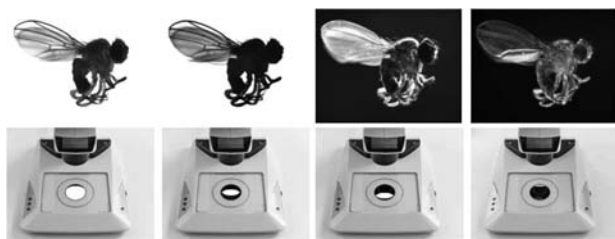


Рис. 7. Платформа проходящего света



Рис. 8. Видеомикроскоп Leica DVM5000

Эти осветители являются полностью интегрированными в стереомикроскоп без дополнительных модулей, размещаемых на рабочем столе. Разнообразие видов осветителей помогает пользователю подобрать наиболее оптимальный для своей научной задачи, в зависимости от особенностей исследуемого образца (рис. 6). Например, кольцевые осветители Leica LED3000 RL и Leica LED5000 RL являются наилучшим решением, если работать в светлом поле. Этот тип осветителя обеспечивает в 2–2,5 раза больше уровень яркости по сравнению с другими моделями. В конструкцию осветителя входит светодиодная фронтальная линза высокой гомогенности; температура цвета осветителя – 5600 К. В качестве аксессуаров осветитель может комплектоваться диффузором и поляризатором. Кольцевой осветитель незаменим для исследования объектов, где особенно важно понятие яркости освещения (напр., в материаловедении).

Спотовые осветители LED3000 SLI и LED 5000 SLI относятся к высококонтрастным осветителям и состоят из 2-х световодов типа «гусиная шея» (приблизительно 50 см. каждый). Спотовые осветители обеспечивают близко расположенное к образцу освещение с температурой цвета 5600 К и специально предназначены для легкой настройки и смены контрастности падающего света.

Мультиконтрастные осветители LED3000 MCI и LED5000 MCI особенно важны там, где исследуется структура объекта (напр., в электронике, биологии, реставрационных работах). Конструктивно мультиконтрастные осветители состоят из 2-х или 3-х арок, генерирующих свет под разными углами и с нескольких сторон.

Для работы в проходящем свете производитель также предлагает платформу со встроенным светодиодным осветителем и автоматической апертурой, которая позволяет исследовать образцы в однородном ярком поле и при косом освещении по методу Роттерманна и в темном поле (рис. 7).

ЦИФРОВАЯ ВИДЕОМИКРОСКОПИЯ И КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

За последние два года «Leica Microsystems» представила новые разработки в области видеомикроскопии и конфокальной микроскопии. Это цифровые видеомикроскопы **Leica DVM** и конфокальная система сверхвысокого разрешения **Leica Super Resolution**.

В видеомикроскопах Leica DVM (рис. 8) изображение отображается напрямую на мониторе высокого разрешения и поэтому, благодаря специальной конструкторской разработке, возможны неdestructивные исследования даже больших стационарных объектов и плохо видимых поверхностей объекта. Кроме высококачественной оптики исследователю предлагаются широкие возможности для анализа — от количественного 2D-анализа до 3D-измерений поверхности.

Система сверхвысокого разрешения Leica SR GSD расширяет возможности конфокальной микроскопии и позволяет получать изображения с разрешением 80–20 нм. Она вошла в список наиболее значимых инструментов для научной деятельности за прошлый год, определяемый журналом «The Scientist» — Top Ten Innovations 2011. Микроскоп Leica SR GSD использует технологию GSDIM (Ground State Depletion followed by Individual Molecule return), которая обеспечивает максимально достижимое на сегодняшний день разрешение 20 нм для световых микроскопов. Одна из ключевых возможностей этой технологии — это использование стандартных флуоресцентных красителей, используемых для флуоресцентной микроскопии.

Прелаягая исследователю как можно более высокотехнологичный и совершенный инструмен-

тарий для визуализации и анализа микроструктур, компания-производитель реализует еще один свой девиз «*Step beyond infinity*» — «Выход за грани возможного». Оборудование должно позволить пользователю иметь наивысшую производительность труда и не оказывать при этом вредного влияния на его здоровье.

«Leica Microsystems» в полной мере обеспечивает требуемые условия работы, а ООО «ИНТЕРО» как представитель производителя на территории Украины готово оказать всю необходимую техническую и консультационную поддержку.

С.В. Немова

СВІТ ІННОВАЦІЙ LEICA MICROSYSTEMS

Надається інформація щодо останніх інноваційних розробок компанії «Leica Microsystems», Німеччина. Подано огляд особливостей конструкції цифрових мікроскопів та стереомікроскопів Leica та розповідається про декілька методів підготовки зразків у електронній мікроскопії за допомогою спеціалізованого обладнання компанії-виробника.

Ключові слова: нанотехнології, цифровий мікроскоп, стереомікроскоп, аналіз мікроструктур, автоматичне управління.

S. Niemova

LEICA MICROSYSTEMS INNOVATION WORLD

Information on recent innovations of «Leica Microsystems» (Germany) is presented. Design features of Leica digital microscopes and stereomicroscopes and several methods of electron microscope specimen preparation with the help of special equipment of the manufacturer company are observed.

Key words: nanotechnology, digital microscope, stereomicroscope, microstructure analysis, automatic control.

Стаття надійшла до редакції 24.12.12