

Grażyna GILEWSKA

## PRZYDATNOŚĆ RÓŻNYCH TECHNIK OBRAZOWANIA STRUKTUR BIOLOGICZNYCH WYKORZYSTUJĄCYCH ELEKTRONOWY MIKROSKOP SKANINGOWY<sup>\*)</sup>

**STRESZCZENIE** *W artykule przedstawiono stosowane metody obrazowania struktur szkliwa nazębnego z wykorzystaniem metody skaningowej mikroskopii elektronowej.*

*Otrzymane obrazy analizowano wykorzystując algorytmy cyfrowego przetwarzania obrazów. W rezultacie na wyodrębnionych pryzmatach struktury szkliwa dokonano pomiarów ich parametrów geometrycznych.*

*Porównano parametry statystyczne grup pryzmatów dla obrazów szkliwa uzyskanych za pomocą detekcji elektronów wtórnych oraz elektronów wstecznie rozproszonych.*

**Słowa kluczowe:** *obrazowanie, mikroskopia elektronowa, szkliwo nazębne, analiza*

---

<sup>\*)</sup>Praca wykonana w ramach zdań statutowych S/WE/1/10

---

**dr inż. Grażyna GILEWSKA**  
e-mail: gilg@pb.edu.pl

Wydział Elektryczny  
Politechnika Białostocka

## 1. WSTĘP

---

Obrazowanie obiektów biologicznych i ich struktur jest często zadaniem niełatwym. Wynika to z ograniczonej dostępności do tych obiektów bądź ich próbek lub krótkotrwałej ich żywotności.

Z drugiej strony przy małych wymiarach obiektów, ich próbek bądź analizowanych struktur, istnieje potrzeba uzyskania powiększeń rzędu kilkuset, kilku tysięcy razy. Podstawowe techniki obrazowania struktur obiektów nie umożliwiają osiągnięcia tak wysokich powiększeń, dlatego w takich przypadkach wykorzystuje się technologię mikroskopii elektronowej.

Zasada działania mikroskopu elektronowego jest podobna jak mikroskopu optycznego. Różnica tkwi w rodzaju fali jaka przenika badany obiekt i co za tym idzie w budowie mikroskopu. Wykorzystuje on do obrazowania wiązkę elektronów, która pozwala na dostrzeganie obiektów nawet milion razy cieńszych niż ludzki włos (0,1 nm). Im większa jest energia elektronów tym krótsza ich fala i większa rozdzielczość mikroskopu. Próbką znajduje się w próżni i najczęściej jest pokrywana cienką warstwą metalu co może być problemem w przypadku próbek biologicznych.

Mikroskopy elektronowe dzieli się zwykle na elektronowe mikroskopy transmisyjne oraz skaningowe mikroskopy elektronowe. W pierwszym typie jednocześnie analizowany jest duży obszar powierzchni preparatu i tworzony jest jego obraz. Natomiast w mikroskopie elektronowym skaningowym wiązka elektronów, skupiona na powierzchni badanej próbki w plamkę o bardzo małej średnicy (do 0,1 nm), omiata wybrany prostokątny obszar powierzchni ruchem skanującym.

W przypadku mikroskopii transmisyjnej próbkę badaną napyla się cienką warstwą metalu a następnie usuwa oryginalną próbkę i wykonuje obraz repliki. Zaś przy mikroskopii skaningowej próbkę również napyla się metalem, ale nie trzeba usuwać próbki właściwej. Zaletą tak uzyskanych zmodyfikowanych próbek jest ich trwałość i możliwość powtarzania obrazowania, co nie zawsze możliwe jest w innych metodach mikroskopowych.

## 2. WBÓR OBIEKTU BIOLOGICZNEGO

---

Obiektami biologicznymi mogą być części zarówno roślin jak i zwierząt. W przypadku takich obiektów obrazuje się strukturę ich elementów składowych (np. pyłki roślin, kończyny owadów) bądź strukturę obiektów w przekroju.

Konieczne jest wówczas pobranie próbki z tych obiektów, co uniemożliwia realizację obrazowania na organizmach żywych.

W przypadku człowieka takim elementem, który możemy w dość prosty sposób pozyskać są np. elementy zębów, dla których ważnym składnikiem badawczym jest jego szkliwo.

Szkliwo nazębne jest najtwardszą, najbardziej odporną na ścieranie, a przy tym najbardziej kruchą tkanką spośród wszystkich tkanek twardych zęba. Jego twardość wynosi ok. 3250 HB, co przewyższa pod tym względem stopy szlachetne, hartowane (o twardości ok. 2500 HB), ustępuje zaś niektórym masom ceramicznym (do 4000 HB), wykorzystywanym przez stomatologów.

Szkliwo pokrywa koronę zęba w jego skład wchodzi 96-98% związków nieorganicznych oraz 2-4% substancji organicznych i woda. Zbudowane jest z pryzmatów szklivnych oraz spajającej je substancji międzypryzmatycznej. Na jeden ząb może przypadać 5-12 mln pryzmatów [3].

Na przekrojach poprzecznych mają one różny kształt (np. owalny, wieloboczny i inne), o którym zdają się decydować względy rozwojowe (w zależności od funkcji zęba, w którym występują).

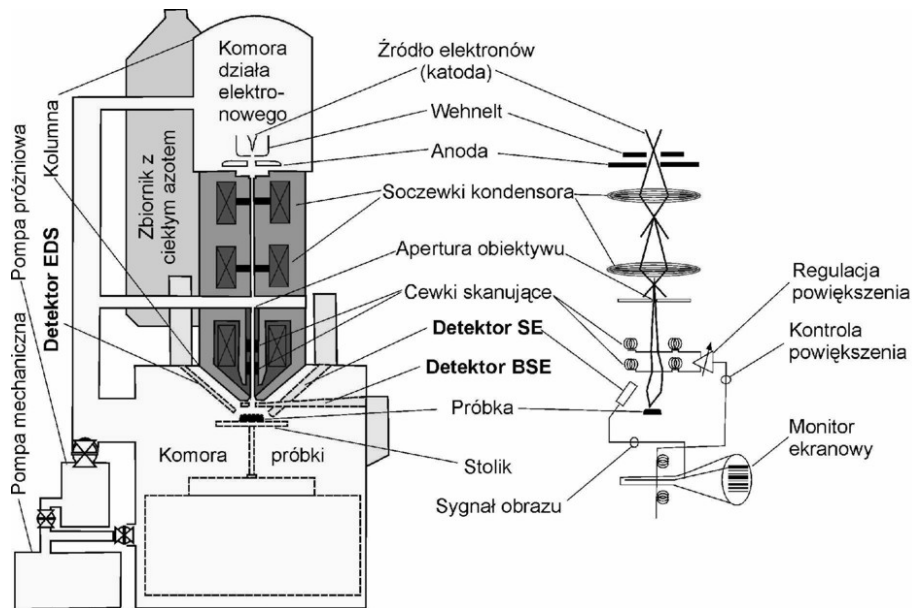
### 3. TECHNIKI OBRAZOWANIA ELEKTRONOWEGO MIKROSKOPU SKANINGOWEGO

---

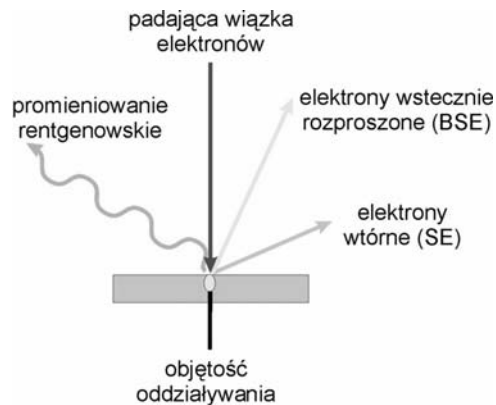
Wiązka elektronów, wytworzona w dziale elektronowym, jest przyspieszana w polu elektrycznym o potencjale ok. 30 kV i skupiana przez soczewki elektromagnetyczne (rys. 1). Cewki odchylające nadają jej ruch skanujący [1].

Pod wpływem wiązki elektronów padającej na próbkę zostają wyemitowane różne sygnały, które są rejestrowane za pomocą odpowiednich detektorów, a następnie przetwarzane na obraz próbki lub widmo promieniowania rentgenowskiego. Mogą to być elektrony wtórne (SE), elektrony wstecznie rozproszone (BSE) oraz charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie (rys. 2).

W obrazie uzyskanym dzięki elektronom wtórnym kontrast związany jest z topografią próbki – partie wypukłe są jasne, natomiast partie wklęsłe są ciemne. Dzięki temu interpretacja obrazów SE jest dość łatwa. Wyglądają one podobnie jak odpowiadające im obrazy w świetle widzialnym (w skali szarości) – rysunek 3a. W obrazach BSE kontrast jest wynikiem różnicy średniej liczby atomowej pomiędzy poszczególnymi punktami próbki. Obszary próbki zawierające jądra pierwiastków o wysokiej liczbie atomowej rozpraszają wstecznie więcej elektronów dzięki czemu są odwzorowywane na obrazach BSE jako miejsca jaśniejsze (rys. 3b).

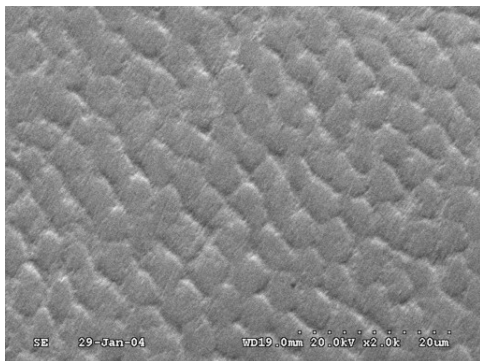


Rys. 1. Schemat budowy elektronowego mikroskopu skanującego (SEM) [2]

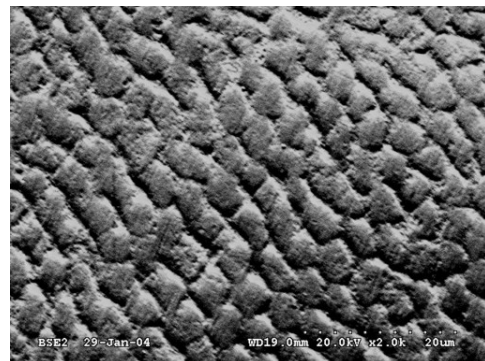


Rys. 2. Różne efekty wywołane przez padającą wiązkę elektronów [2]

a)



b)

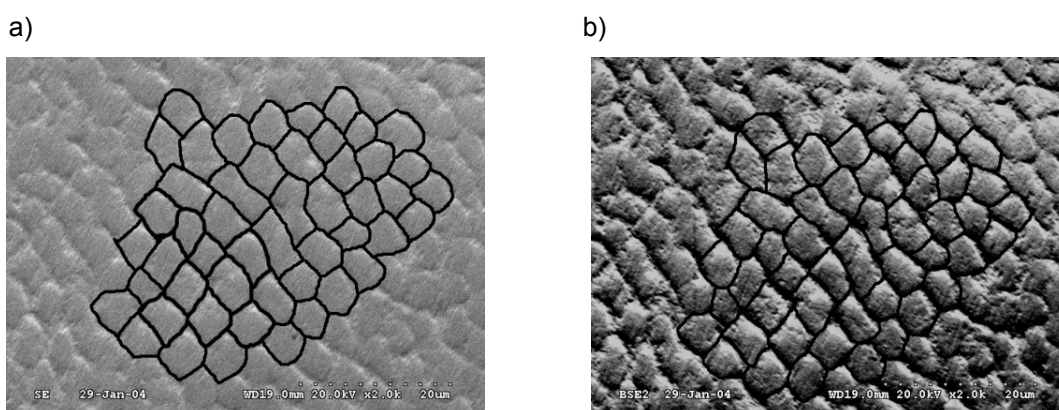


Rys. 3. Obraz szkliva nazębnego z mikroskopu skanującego powierzchnię szkliva powiększenie 2000 razy: a) detekcja elektronów SE, b) detekcja elektronów BSE

Do przeprowadzonych w dalszej części pomiarów i analiz wykorzystane były obrazy uzyskane z detektora elektronów SE oraz detektora elektronów BSE. Taki wybór obrazów był podyktowany dostępnością obrazów SE i BSE wykonywanych za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego Hitachi S-3000N, który znajduje się na Wydziale Mechanicznym Politechniki Białostockiej.

## 4. OBRÓBKA OBRAZÓW I REALIZACJA POMIARÓW

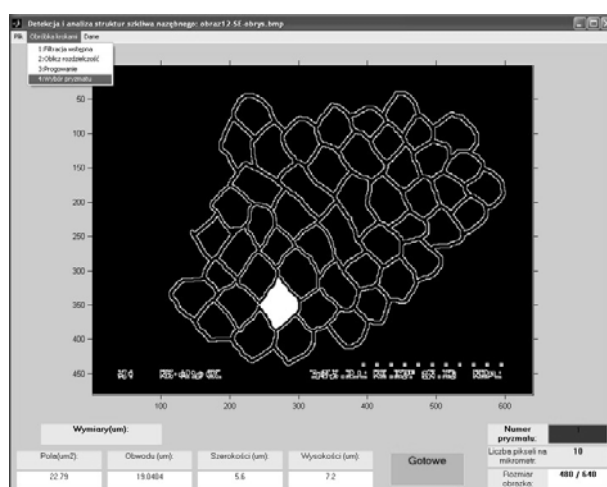
Ze względu na różny sposób zobrazowania struktury szkliva przez techniki SE i BSE powstało zagadnienie porównania tych dwóch technik obrazowania pryzmatów szkliva (rys. 4).



**Rys. 4. Przykładowy wynik wstępnego wyodrębnienia pryzmatów na obrazach: SE (a) oraz BSE (b)**

Do celów prowadzonych badań wykonany został pomocniczy program do przetwarzania obrazów w wybranym zakresie, wyodrębniania oraz dokonywania pomiarów wymiarów geometrycznych pryzmatów szkliva. Przykładowe okno, po przeprowadzeniu progowania krawędzi oraz wyodrębnieniu wybranego pryzmatu na obrazie przedstawia rysunek 5.

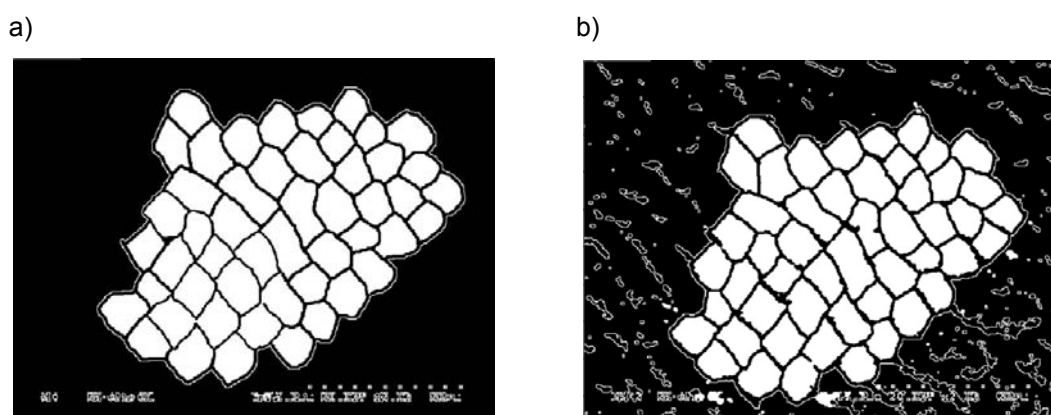
Opracowany program realizuje procedury wstępnej filtracji



**Rys. 5. Widok działania programu po wyodrębnieniu pryzmatu na obrazie**

usuwającej szumy i drobne zakłócenia [4]. Wyznacza rozdzielczość wczytanego obrazu (czyli w przypadku tych obrazów ilość pikseli na mikrometr) na podstawie umieszczonego na nim wzorca, który jest widoczny np. na rysunku 3. Dzięki temu możliwe było obliczenie parametrów geometrycznych w jednostkach bezwzględnych, np. w  $\mu\text{m}$ .

Wyodrębniając kolejne pryzmaty na obrazach wykonanych w technikach SE i BSE zauważalne były istotne różnice między tymi samymi pryzmatami z różnych technik (rys. 6). Zauważyć można istotny wpływ zakłóceń występujących w technice BSE od pierwiastków o wysokiej liczbie atomowej, chociaż podczas wstępnej oceny obrazów BSE dawały one lepsze odwzorowanie struktury szkliva.



**Rys. 6. Wyodrębnione wszystkie pryzmaty na obrazach wykonanych w technikach SE (a) oraz BSE (b)**

Dla każdego wyodrębnionego pryzmatu dokonane zostały przy wykorzystaniu tego samego programu pomiary podstawowych parametrów geometrycznych: pola powierzchni, obwodu, szerokości i wysokości. W sumie wykonano pomiary 50 pryzmatów dla każdego obrazu w każdej z technik.

## 5. OCENA OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Porównując wyniki pomiarów z technik SE i BSE wyznaczono różnice między nimi dla każdego z parametrów geometrycznych z osobna. Można było stwierdzić, iż wyznaczone różnice dla większości przypadków nie mają jedynakowego charakteru, dla niektórych parametrów są dodatnie, zaś dla innych ujemne.

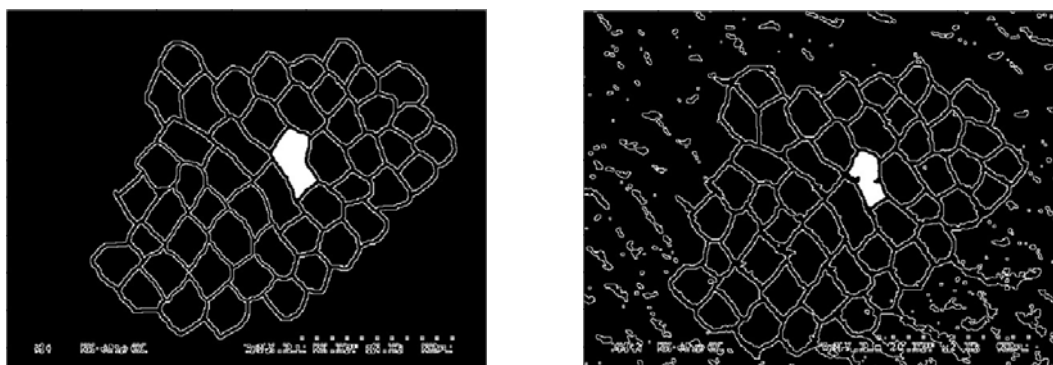
Szukając istotnych różnic między parametrami pryzmatów zobrazowanych różnymi technikami dokonano obliczeń mających na celu wyznaczenie błędów grubych (tab. 1).

**TABELA 1**

Statystyka różnic między parametrami geometrycznymi przyrządów wyodrębnionych technikami SE i BSE

	Pole [ $\mu\text{m}^2$ ]	Obwód [ $\mu\text{m}$ ]	Szerokość [ $\mu\text{m}$ ]	Wysokość [ $\mu\text{m}$ ]
Wartość średnia (m)	1,11	-0,31	0,15	0,21
Odchylenie standardowe (SD)	2,117	1,787	0,393	0,498
m+3*SD	7,46	5,05	1,33	1,70
m-3*SD	-5,24	-5,67	-1,03	-1,28

Kryteria błędów grubych spełniały tylko przypadki o nadanych numerach 28 dla pola powierzchni oraz 47 dla obwodu. Analizując je wizualnie można było określić ich niektóre przyczyny, które mogą wynikać z dodatkowych obszarów zakwalifikowanych obrazie BSE przez algorytm programu do obszaru międzypryzmatycznego (rys. 7), bądź zakwalifikowania dodatkowych obiektów do jednego przypadku. Tutaj wymagana byłaby dodatkowa interwencja operatora bądź modyfikacja parametrów algorytmu programu.



**Rys. 7. Wyodrębniony przypadek nr 28 na obrazach wykonanych w technikach SE (a) oraz BSE (b)**

Rozpatrując osobno przypadki pomiarów dla technik SE oraz BSE w kierunku znalezienia przypadków znacznie odbiegających od wartości średniej, można było dla pomiarów zrealizowanych z wykorzystaniem techniki SE z pięćdziesięciu przypadków tylko jeden znacznie odbiegał od pozostałych na zasadzie błędu grubego, natomiast dla pomiarów zrealizowanych na obrazie z techniki BSE dwa inne przypadki można było określić jako błędy grube.

## 6. WNIOSKI

Obrazowanie struktur obiektów biologicznych przy wykorzystaniu technik elektronowego mikroskopu skaningowego jest może trudne ze względu

na konieczność specjalnego przygotowania próbki, ale umożliwia uzyskanie bardzo dużej głębi ostrości obrazów. Na podstawie zgromadzonych obrazów nie można było ocenić lepszej przydatności którejs z wykorzystywanych technik SE czy BSE.

Możliwości obrazowania obiektu takiego jak szkliwo nazębne w ośrodkach badawczych mogą być dostępne. Potrzeby takiego obrazowania również występują, zgłaszane przez biomechaników oraz specjalistów z zakresu biomateriałów.

Przydatne byłoby porównanie zmierzonych parametrów geometrycznych elementów szkliwa z ich parametrami mechanicznymi, jak również poszerzone badania liczniejszej grupy obiektów.

## LITERATURA

1. Barbacki A.: Mikroskopia elektronowa, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań, 2003.
2. <http://www.chemia.uj.edu.pl/~lojewski/wykladySP/Techniki%20mikroskopowe.pdf>
3. Lehmann K.M., Hellwig E.: Propedeutyka stomatologii zachowawczej i protetyki, Urban & Partner, Wrocław, 1994.
4. Zieliński K.W., Strzelecki M.: Komputerowa analiza obrazu biomedycznego, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.

*Rękopis dostarczono, dnia 26.03.2010 r.*

**Opiniował: prof. dr hab. inż. Władysław Dybczyński**



USEFULNESS OF VARIOUS IMAGING  
BIOLOGICAL STRUCTURES TECHNIQUES  
WHICH MAKING USE THE SCANNING  
ELECTRON MICROSCOPE

Grażyna GILEWSKA

**ABSTRACT** *This article presented applied methods of illustrating enamel structures using the scanning electron microscope method.*

*Received images were analyzed by digital image processing algorithms. As a result on separated prisms of enamel structure were made the measurement of their geometric parameters.*

*Statistic parameters of prism's groups were compared for enamel images gotten by secondary electrons and back scattered electrons detection.*



**Dr inż. Grażyna GILEWSKA** ukończyła studia na wydziale Elektroniki Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej na specjalności Elektronika Biomedyczna. Od 1992 roku jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym Politechniki Białostockiej, na Wydziale Elektrycznym, na którym obroniła doktorat w roku 2003 z dziedziny metrologia w elektrotechnice.



