

4. Методы низкокогерентной фазовой микроскопии для исследования трехмерных объектов

В. Л. Минаев¹, Г. Н. Вишняков^{1,2}, Г. Г. Левин^{1,2}

¹ ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений», Москва, Россия

² Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана, Москва, Россия

В докладе рассмотрены особенности измерения параметров фазовых объектов, как прозрачных, так и отражающих, с помощью методов низкокогерентной фазовой микроскопии. Использование низкокогерентного излучения позволяет получать высококачественные интерферограммы, а применение современных алгоритмов цифровой расшифровки интерферограмм дает возможность восстановления фазовых изображений с высокой точностью. По полученным фазовым изображениям можно вычислять локальные (распределение высот и показателя преломления) и интегральные (шероховатость, отклонение от плоскостности, массу сухого вещества и пр.) характеристики.

Ключевые слова: Фазовый объект, Низкокогерентный источник излучения, Фазовая микроскопия, Интерферометрия, Алгоритмы расшифровки интерферограмм, Оптическая томография.

Цитирование: Минаев, В. Л. Методы низкокогерентной фазовой микроскопии для исследования трехмерных объектов / В. Л. Минаев, Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин // HOLOEXPO 2019 : XVI международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2019. — С. 24–32.

Фазовыми называются такие объекты, которые изменяют фазу комплексной амплитуды волнового фронта зондирующего оптического излучения и описываются эйкональным приближением решения скалярного волнового уравнения [1]. Фазовые объекты широко распространены в науке и технике. К отражающим фазовым объектам можно отнести изделия микроэлектроники, МЭМС структуры, оптические зеркальные поверхности, подложки лазерных зеркал, структурированные покрытия, и пр. Примером прозрачных фазовых объектов могут служить оптические волокна, микрорезонаторы, оптические микродетали, а также биологических микрообъекты, такие как живые клетки, ткани, бактерии и т. п.

Возникающая при взаимодействии с такими объектами модуляция фазовой составляющей электромагнитного излучения связана с их пространственными локальными параметрами: трехмерным распределением показателя преломления для прозрачных объектов и двумерным распределением высот профиля поверхности (топограмма) для отражающих объектов. Исходя из локальных параметров, можно вычислить важные интегральные параметры, такие как шероховатость поверхности, морфологические характеристики клеток, массу сухого вещества клетки и пр.

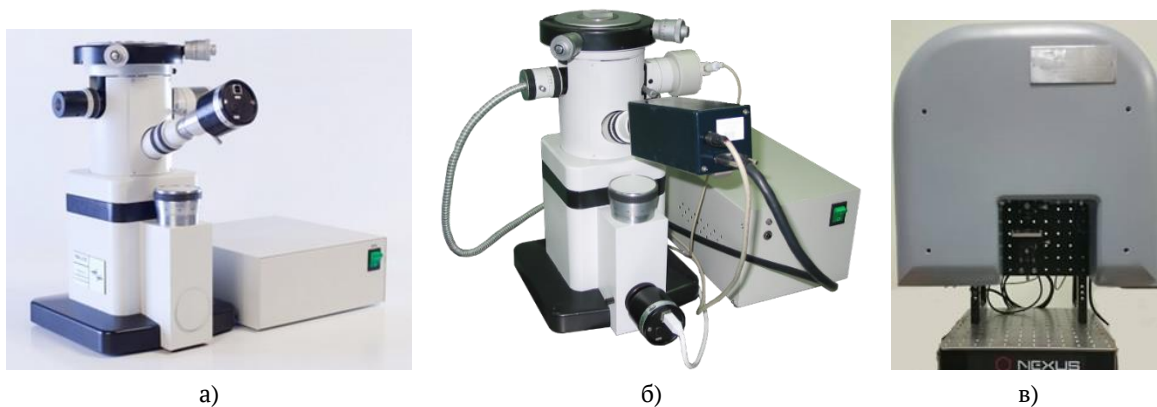
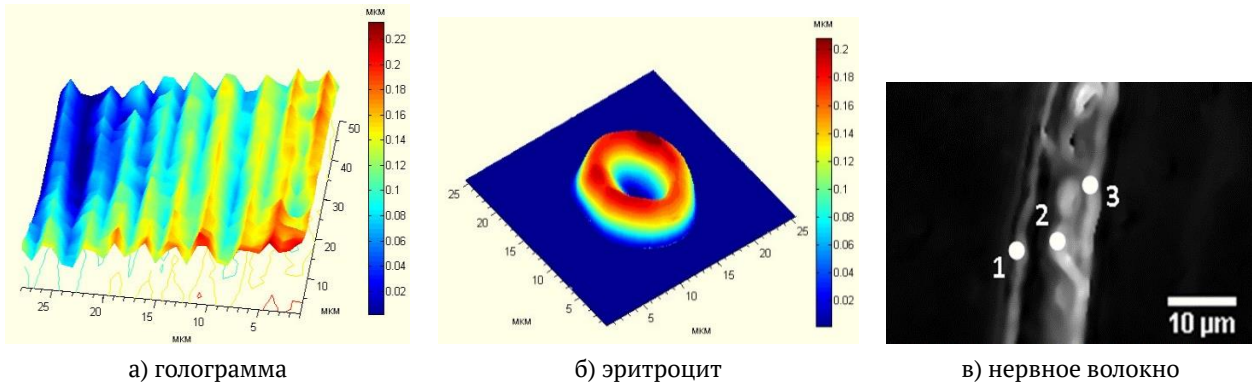


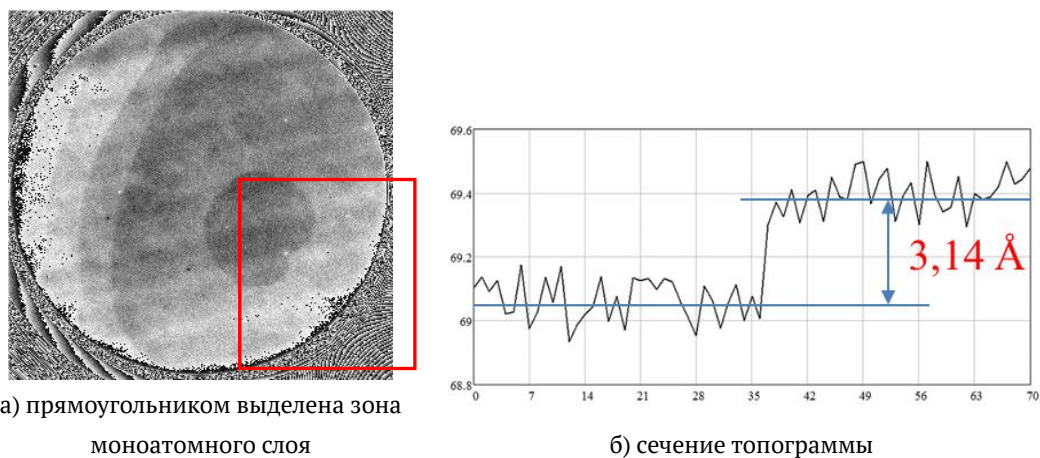
Рис. 1. Автоматизированные микроскопы для исследования отражающих объектов: МИА-1М (а), МИА-Д (б), МИА-2 (в)

Современный уровень развития науки и техники требует бесконтактных измерений локальных и интегральных параметров статических и динамических фазовых объектов с высокой разрешающей способностью и точностью, что является актуальной проблемой. Так, при производстве лазерных зеркал необходимо измерять форму поверхности и шероховатость на уровне единиц ангстрем [2]. При производстве оптических волокон и их заготовок измерение профиля или пространственного распределения показателя преломления также является важной задачей. В настоящее время актуально исследование внутренней структуры прозрачных изделий, изготовленные методами аддитивных технологий [3]. Отдельной важной задачей является исследование биологических объектов — живых клеток, представляющие собой прозрачные динамические трехмерные объекты со сложной внутренней структурой. При этом необходимо исследовать не только их интегральные характеристики (объем, вес, параметры формы), но и пространственные распределения различных веществ внутри них в динамике. Например, изменение формы эритроцита при воздействии на него различных веществ [4] или изменение структуры нейрона при проведении через него нервного импульса [5] и пр.

Одним из количественных методов получения информации о фазовой модуляции электромагнитного поля исследуемым объектом является метод интерферометрии. Информация о фазовом изображении закодирована в интерферограммах, получаемых с помощью фазового микроскопа. С момента появления методы фазовой микроскопии, такие как метод фазового контраста Цернике, метод дифференциального интерференционного контраста Номарского, носили качественный характер. В середине 60-х годов начинают появляться отдельные алгоритмы расшифровки интерферограмм, бурное развитие которых приходится на середину 80-х годов и связано с появлением доступных ПЭВМ и систем захвата изображений. Однако, использование когерентных источников излучения приводило к большому уровню шумов и низкому качеству интерферограмм. С начала 2000-х годов стали разрабатываться схемы с использованием источников света, имеющих низкую когерентность. Объединение этих двух достижений позволило вывести фазовую микроскопию на высокий уровень точности измерения фазовой составляющей комплексной амплитуды волнового фронта.



а) голограмма б) эритроцит в) нервное волокно
 Рис. 2. Топограмма и фазовые изображения различных объектов, полученных с помощью микроскопов МИА-1М и МИА-Д



а) прямоугольником выделена зона моноатомного слоя б) сечение топограммы
 Рис. 3. Топограмма моноатомной структуры кремния (поле зрения 150×150 мкм)

Работы по созданию методов и аппаратуры для исследования фазовых объектов проводятся во ФГУП «ВНИИОФИ» уже долгое время. Для исследования отражающих и прозрачных фазовых объектов (на отражение) были разработаны автоматизированные микроскопы по схеме Линника (МИА-1М, МИА-Д, МИА-2 — рисунок 1). Схема Линника имеет преимущество в том, что позволяет работать как с точечным, так и протяженным низкокогерентным источником.

Микроскопы МИА-1М и МИА-Д разработаны на базе микроинтерферометра МИИ-4М. Автоматизация микроскопов заключалась в замене штатного осветителя на лазерный с низкой пространственной когерентностью (но высокой временной когерентностью), использовании управляемого от ПЭВМ фазосдвигающего устройства на базе пьезоактюатора, а также видеокамеры. Отличия микроскопов заключается в использовании разных по частоте захвата видеокамер: для МИА-1М — 7 к/с, для МИА-Д — 300 к/с и соответственно разных алгоритмов для реконструкции фазовых изображений. Микроскоп МИА-1М предназначен для исследования статических фазовых объектов [6], а МИА-Д — динамических [7]. Оба микроскопа внесены в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений (№ 48171-11, № 48172-11). На рисунке 2 представлены примеры, фазовых изображений различных объектов, полученных с помощью микроскопа МИА-1М и МИА-Д.

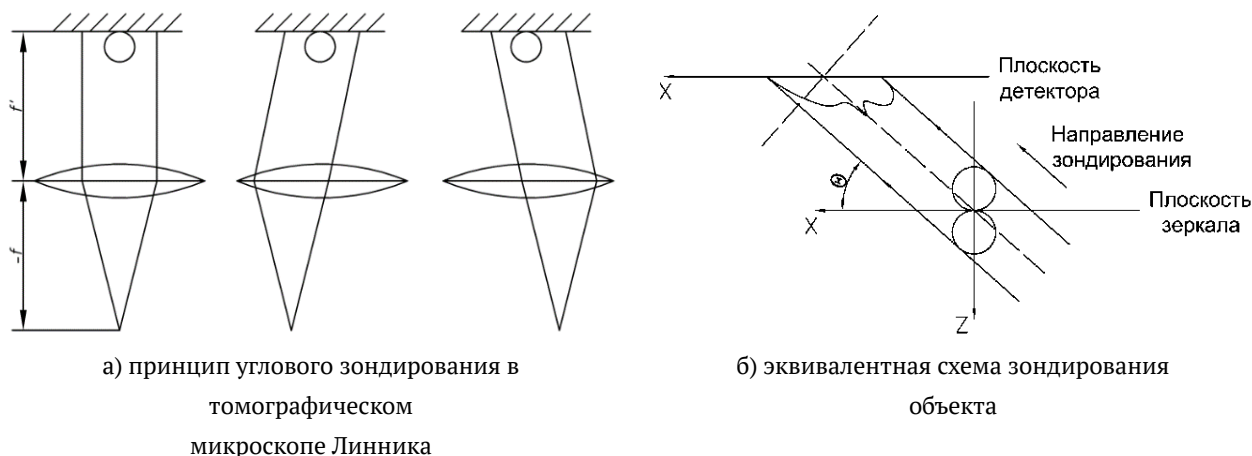


Рис. 4.

Для повышения точности измерений в субнанодиапазоне был разработан прямой микроскоп по схеме Линника МИА-2 [8]. В данном приборе был использован источник с высокой пространственной когерентностью (но низкой временной когерентностью) — точечный светодиод, а в качестве опорного зеркала была использована кремниевая наноструктура, представляющая собой моноатомный слой с шероховатостью 0,05 нм диаметром 200 мкм [9]. Это позволило проводить измерения с высокой аксиальной разрешающей способностью. На рисунке 3 представлена топограмма наноструктуры кремния, состоящей из набора моноатомных слоев и сечение топограммы, на котором видна ступень в один моноатомный слой.

Фазовое изображение несет информацию об интегральных и локальных параметрах исследуемого фазового объекта. Фазовое изображение отражающего объекта связано с его топограммой, по которой могут быть определены различные интегральные параметры такие как шероховатость поверхности, отклонение от плоскостности и пр. Для прозрачных фазовых объектов их фазовые изображения могут быть использованы для вычисления различных параметров формы, а также для определения массы сухих веществ (для клеток). Также особенностью фазового изображения прозрачного объекта является то, что оно является его томографической проекцией. По набору полученных под разными углами проекций с помощью методов вычислительной томографии можно восстановить локальный параметр — трехмерное пространственное распределение показателя преломления. Это позволяет сочетать методы фазовой микроскопии и оптической томографии и открывает новое направление — томографическая фазовая микроскопия, а фазовый микроскоп со встроенной системой углового зондирования становится томографическим микроскопом.

Для создания томографического микроскопа необходимо решить несколько задач:

- 1) восстановить фазу волнового фронта, прошедшего через объект с максимальной точностью, т. к. решается некорректная задача томографической реконструкции;
- 2) получить проекции в максимально возможном угловом диапазоне (от 0 до 180 град), который ограничен числовой апертурой микрообъектива;
- 3) обеспечить максимальное число проекций за малый период времени.

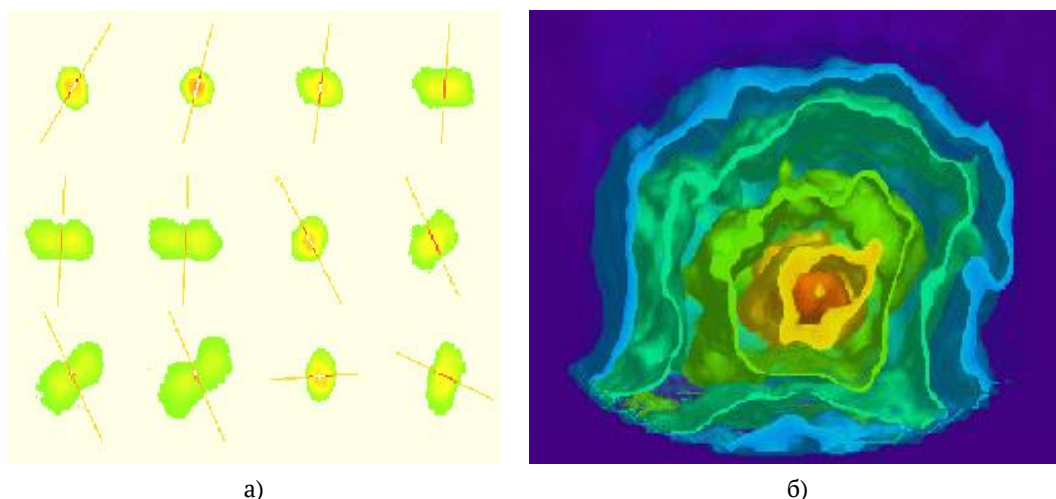


Рис. 5. Проекции (а) и 3D томограмма (б) лимфоцита

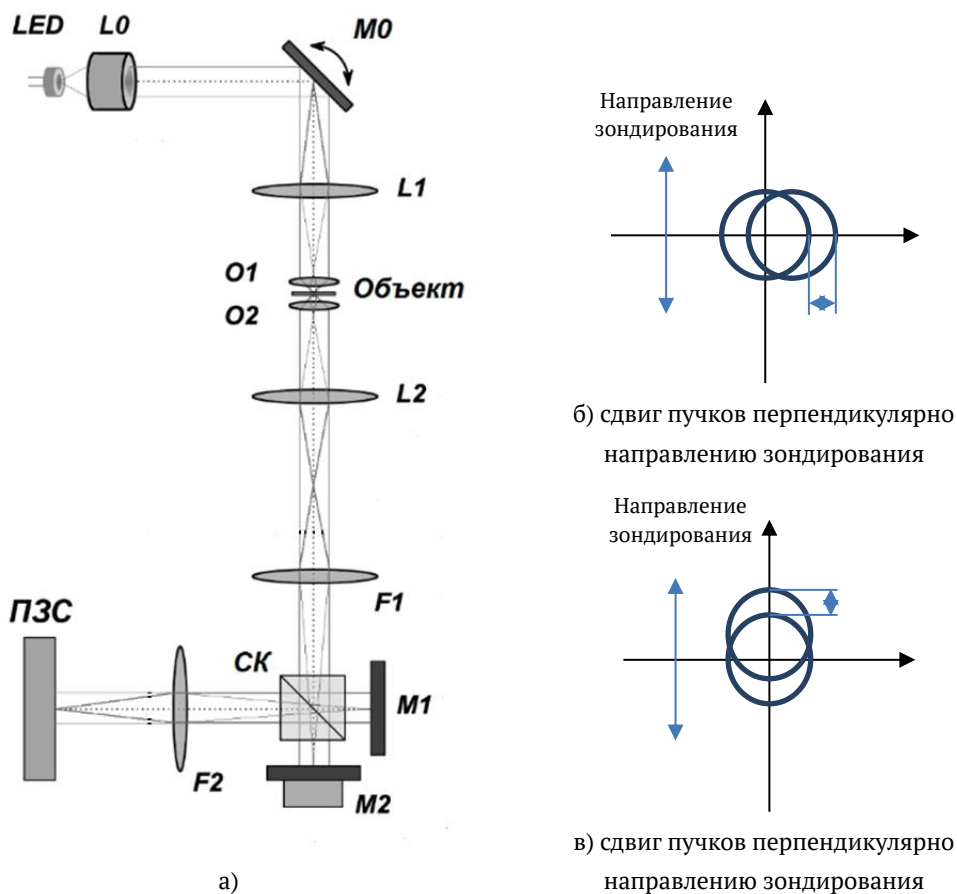
Для повышения качества фазовых изображений необходимо использовать низкокогерентное излучение. Такое излучение используется в микроскопе Линника. Поэтому был разработан томографический микроскоп, построенный по этой схеме с пространственно-некогерентным источником монохроматического излучения [10]. Для обеспечения углового зондирования объекта параллельным пучком изображение источника смещается в передней фокальной плоскости микрообъектива (рисунок 4а). При этом диапазон углов ограничен его числовой апертурой.

В работе представлены результаты экспериментов с живыми клетками – лимфоцитами. Клетки находились в физиологическом растворе между покровным стеклом и зеркалом. Они сканировались по двумерной траектория типа «квадрат». Диапазон изменения угла зондирования по углу θ для составил $\pm 45^\circ$. Всего было зарегистрировано 43 двумерные проекции на сетке 256×256 при размере кадра 23×23 мкм. Погрешность реконструкции фазы волнового фронта 0,25 нм.

Для получения проекций был использован метод фазовых шагов, а для реконструкции томограммы комбинированный итерационный алгоритм sART. На рисунке 5 приведены проекции и 3D реконструкция внутренней структуры лимфоцита в виде изображения трех изоповерхностей оптической плотности 22 %, 50 %, 82 % от максимального значения. Реконструкция выполнена В. В. Пикаловым (Институт теоретической и прикладной механики СО РАН) [11].

Основной недостаток данной схемы связан с тем, что она работает на «отражение» — исследуемый объект располагается на зеркале и излучение дважды проходит через него, это приводит к усложнению объекта реконструкции (рисунок 4б). Для решения этой проблемы была разработана схема «на просвет» с однократным прохождением излучения через объект на основе микроскопа со сдвиговым интерферометром (рисунок 6а) [11].

Данная схема имеет ряд преимуществ. В ней используется немонохроматический пространственно-когерентный источник излучения (точечный светодиод), что позволяет получать интерферограммы высокого качества и добиваться погрешности реконструкции фазы



LED — точечный светодиод; L0 — коллимирующий объектив; M0 — гальваническое зеркало; M1 — зеркало; L1 и L2 — линзы; O1 и O2 — микрообъективы; F1 и F2 — Фурье-объективы; СК — светоделительный кубик; M2 — зеркало на пьезоприводе; ПЗС — ПЗС-камера

Рис. 6. Схема томографического фазового микроскопа

волнового фронта до 0,1 нм. Для создания наклонного пучка используется одноосевое гальваническое зеркало и иммерсионные микрообъективы с числовой апертурой 1,3, что обеспечивает максимальный угол зондирования 67 град. При этом плоскость xz в которой лежат волновые вектора зондирующих плоских пучков является плоскостью зондирования. Для получения интерферограмм используется сдвиговый интерферометр, что значительно упрощает конструкцию, однако, при этом восстанавливаются не сами фазовые изображения, а производные от них — т. н. дифференциальные проекции.

Сдвиг пучков обеспечивается за счет наклона зеркала M1. При этом возможно два варианта сдвига: перпендикулярно (рисунок бб) и параллельно (рисунок бв) плоскости зондирования.

По дифференциальным проекциям, полученным при сдвиге перпендикулярном направлению зондирования, восстанавливается распределение $DIC(x, y, z)$ представляющее собой частную производную 1-го порядка от исходной функции $n(x, y, z)$ по направлению сдвига. Для реконструкции томограмм такого объекта, которую можно назвать DIC-томограммой,

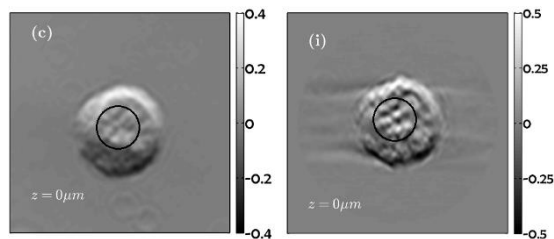


Рис. 7. Сравнение DIC изображения (слева) и 2D сечения 3D DIC томограммы (справа) одной и той же центральной плоскости $z = 0$

можно использовать инверсное преобразование Радона. Восстановленная томограмма представляет собой набор DIC изображений, поэтому это направление оптической микротомографии было названо DIC томографией [12].

Для экспериментальной апробации были проведены эксперименты по DIC томографии нейтрофила. Для получения проекций использовался метод фазовых шагов, реализуемый за счет перемещения опорного зеркала M2 с помощью пьезопривода. Для реконструкции DIC томограммы применялся итерационный алгебраический ART алгоритм. На рисунке 7 представлены результаты сравнения DIC изображения, полученного для $z = 0$ и сечения DIC томограммы, полученного для того же значения z . Из него видно, что при сравнении одной и той же области, DIC томограмма имеют лучшую детализацию и контраст.

Во втором случае: (рисунок 6в) при сдвиге вдоль плоскости зондирования, получают проекции, для которых нельзя использовать инверсное преобразование Радона, но можно использовать т. н. локальные алгоритмы. Это оказывается очень полезно при исследовании динамических объектов, т. к. дает возможность быстрого вычисления искомого распределения показателя преломления в интересующей точке или области без проведения полной реконструкции.

В работе был рассмотрен локальный томографический алгоритм суммирования обратных проекций [13]. Рассмотренный алгоритм был численно промоделирован на фантоме (рисунок 8а), имеющем оболочку и две неоднородности. Для проверки локальности были получены суммарные изображения из «широких» (рисунок 8б) и «узких проекций» (рисунок 8в), которые совпали. Моделирование также показало, что на суммарном изображении хорошо видны основные элементы фантома с выделенными границами присутствующей резкой неоднородности и хорошей передачей плавной неоднородности. Также было проведено экспериментальное исследование по локальной томографии эритроцита лягушки. Получены его дифференциальные проекции (рисунок 8г), из которых составлена синограмма, из нее выделены «узкие проекции» (рисунок 8д) и суммарное изображение (рисунок 8е). Красным овалом выделена область ядра клетки, на которой отчетливо видна его мелкая структура. Таким образом, данный метод открывает новые возможности для исследования динамических процессов внутри живых клеток.

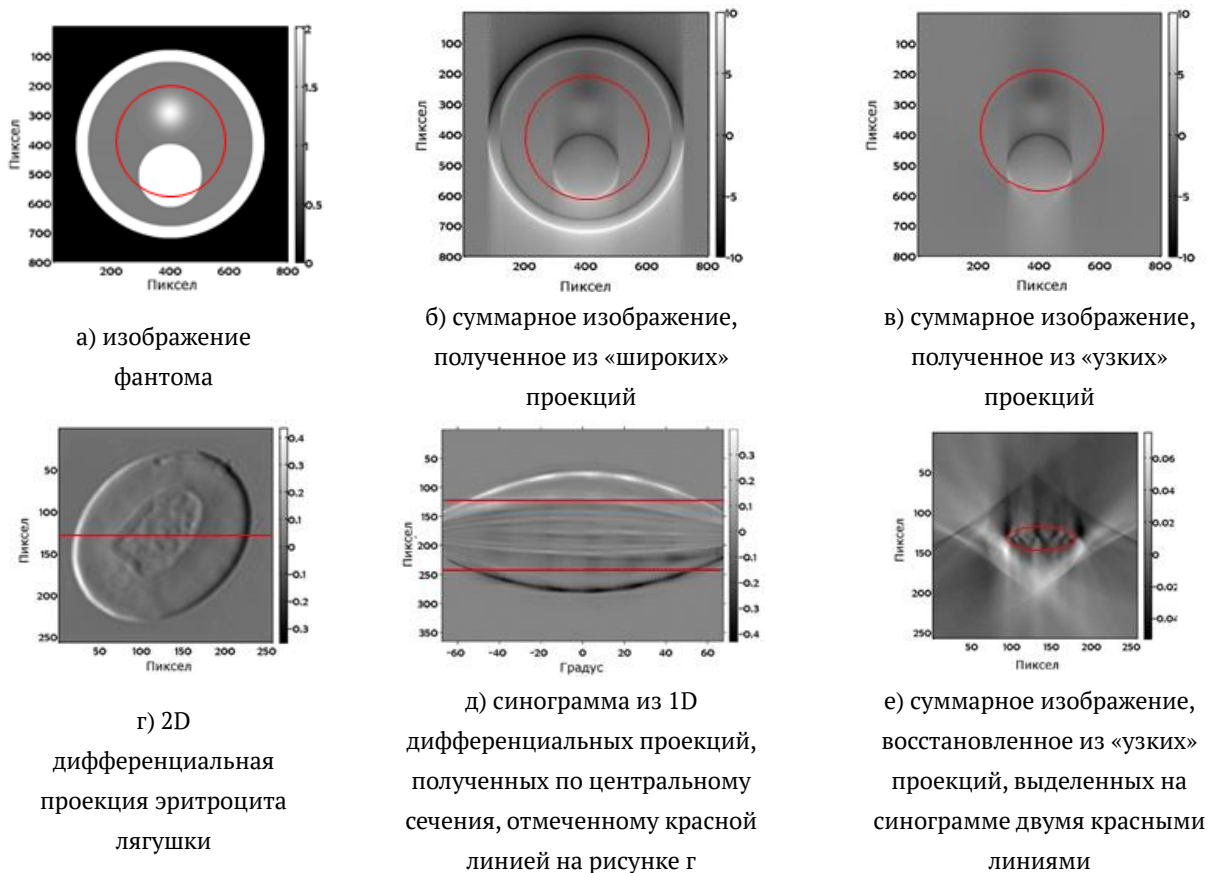


Рис. 8



Рис. 9. Томографический микроскоп DIC-TOMO

Для реализации рассмотренной схемы (рисунок 6а) был разработан томографический микроскоп DIC-TOMO, который может работать как в режиме DIC томографии, так и по локальном алгоритму (рисунок 9).

Таким образом, использование методов низкокогерентной фазовой микроскопии позволяет получать фазовые изображения высокого качества с низким уровнем шумов. Получаемые фазовые изображения могут быть использованы для вычисления по ним различных интегральных и локальных параметров. Это продемонстрировано с использованием различных типов фазовых микроскопов, разработанных во ФГУП «ВНИИОФИ».

Благодарность

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения соглашения № 14.625.21.0041 от 26.09.2017г. (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI62517X0041).

Список источников

- [1] **Рытов, С. М.** Введение в статистическую радиофизику. Ч. 2. Случайные поля / С. М. Рытов, Ю. А. Кравцов, В. И. Татарский // М.: Наука, 1978.
- [2] **Барышева, М. М.** Особенности изучения шероховатости подложек для многослойной рентгеновской оптики методами малоугловой рентгеновской рефлектометрии, атомно-силовой и интерференционной микроскопии / М. М. Барышева, Ю. А. Вайнер и др. // Известия РАН. Серия физическая. — 2011. — Том 75. — № 1. — С. 71–76.
- [3] **Klein, J.** Additive manufacturing of optically transparent glass / J. Klein et al // 3D printing and additive manufacturing. — 2015. — Vol. 2. — № 3. — P. 92–105. — DOI:10.1089/3dp.2015.0021.
- [4] **Yusipovich, A. I.** Laser interference microscopy in erythrocyte study / A. I. Yusipovich, E. Y. Parshina, N. Y. Brysgalova, A. R. Brazhe, N. A. Brazhe, A. G. Lomakin // J Appl Phys. — 2009. — Vol. 105. — № 10. — DOI:10.1063/1.3116609.
- [5] **Юсипович, А. И.** Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии / А. И. Юсипович, С. М. Новиков, Т. А. Казакова, Л. А. Ерохова, Н. А. Браже, Г. Л. Лазарев et al. // Квант электроника. — 2006. — Том 36. — № 9. — 874–8.
- [6] **Минаев, В. Л.** Интерференционный микроскоп для измерения формы поверхности в микро и нанодиапазонах / В. Л. Минаев // Метрология — 2012. — № 7. — С. 19–24.
- [7] **Минаев, В. Л.** Динамический интерференционный микроскоп для измерения параметров живых биообъектов / В. Л. Минаев // Метрология — 2012. — № 8. — С. 24–27.
- [8] **Минаев, В. Л.** Интерференционный микроскоп с низкокогерентным источником и супергладким опорным зеркалом / В. Л. Минаев, Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин // Приборы и техника эксперимента — 2018. — № 6. — С. 79–84.
- [9] **Патент (Россия) № 2371674** / Д. В. Щеглов, С. С. Косолюбов, Е. Е. Родякина, А. В. Латышев, — Оpubл. 27.10.2009.
- [10] **Вишняков, Г. Н.** Томографический микроскоп Линника для исследования оптически прозрачных объектов / Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин // Изм. техника. — 1998. — № 10. — С. 18–22.
- [11] **Вишняков, Г. Н.** Фазовая томография трехмерных биологических микрообъектов: численное моделирование и экспериментальные результаты / Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин, А. В. Лихачев, В. В. Пикалов // Оптика и спектроскопия. — 1999. — Том 87. — № 3. — С. 448–454.
- [11] **Levin, G.** Shearing interference microscopy for tomography of living cells / G. Levin, G. Vishnyakov, V. Minaev, M. Latushko, V. Pickalov, V. Belyakov, V. Sukhenko, A. Demyanenko // Advanced Microscopy Techniques IV and Neurophotonics II. Proc. of SPIE. — 2015. — Vol. 9536. — P. 95360G. — DOI:10.1117/12.2183717.
- [12] **Vishnyakov, G.** Differential interference contrast tomography / G. Vishnyakov, G. Levin, V. Minaev, M. Latushko, N. Nekrasov, V. Pickalov // Optics Letters. — 2016. — Vol. 41. — № 13. — P. 3037–3040. — DOI:10.1364/OL.41.003037.
- [13] **Вишняков, Г. Н.** Локальная томографическая фазовая микроскопия по дифференциальным проекциям / Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин, В. Л. Минаев // Оптика и спектроскопия. — 2016. — Том 121 — № 6. — С. 1020–1028. — DOI:10.7868/S0030403416120278.