

УДК 681.787.7

© А. Ф. Малый, В. А. Бабенко

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКИЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ МИКРОСКОП ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАЗОВЫХ ОБЪЕКТОВ

В статье показывается, что введение новых элементов в схему голографического интерференционного микроскопа для исследования фазовых микрообъектов позволяет более эффективно производить регулировку и перестройку микроскопа. Приводится математическое описание микроскопа и методика его настройки.

Кл. сл.: интерферометрия, фазовые объемные среды

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что голографическая интерференционная микроскопия позволяет визуализировать оптические неоднородности прозрачных микрообъектов или поверхностный рельеф непрозрачных микрообъектов в виде интерференционных полос. При этом у фазовых микрообъектов имеется возможность оценить их локальную толщину в направлении проходящего через них света по интерферограммам, которые являются картинами полос конечной ширины [1].

Характерным примером применения голографической интерференционной микроскопии является исследование клеток крови — эритроцитов [2–6]. Для изучения эритроцитов создавались различные модификации голографических интерференционных микроскопов (ГИМ) на основе схем интерферометров Майкельсона [1] и Маха—Цендера [3, 5]. Эритроцит является фазовым микрообъектом, т. е. прозрачным объектом, практически не отклоняющим проходящий через него световой поток [7, 8]. Поэтому локальный набег фазы света, проходящего через эритроцит, пропорционален его локальной толщине, что позволяет по интерферограмме, полученной в ГИМе, восстановить объемный поверхностный рельеф исследуемого эритроцита с помощью компьютерной обработки этой интерферограммы [9–11]. Полученная с помощью указанных схем интерферограмма соответствует просвечиванию объекта под фиксированным углом [8].

Затем объемное изображение фазового объекта, восстановленное с зарегистрированной интерферограммы, сравнивается с изображением, полученным с эталонного объекта. Различные отклонения от вида объемного изображения здорового

эритроцита дают возможность классифицировать ряд заболеваний пациентов [3, 9, 10].

В работах [1, 3, 5, 11] применяются схемы интерферометров, в которых не используется рассеиватель. При этом освещение объекта и голограммы оказывается неоднородным по интенсивности. Фрагмент такой голограммы восстанавливает часть объекта, а не весь объект, т. к. при получении голограммы световые лучи, прошедшие через разные участки объекта, попадают на определенные, соответствующие им участки голограммы [8]. Восстановленное изображение наблюдается на фоне светящейся точки, и достаточно контрастная интерференционная картина образуется во всей области перекрытия объектного и восстановленного пучков, что объясняется высокой когерентностью лазера. Оператор при настройке ГИМа не видит отчетливой интерференционной картины в целом, имеется паразитная подсветка наблюдаемого изображения и отсутствует фиксированная плоскость фокусировки объекта.

ОПИСАНИЕ ГОЛОГРАФИЧЕСКОГО ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА

В предлагаемой реализации ГИМа (рис. 1) [12] приведенные выше недостатки, характерные для интерферометра Маха—Цендера, использованного в работах с эритроцитами, устраняются с помощью рассеивателя (матового стекла), который устанавливается перед записываемой голограммой. При записи голограммы информация о каждой точке объекта распределяется по всей голограмме, вследствие чего появляется возможность наблюдения интерференционной картины на фоне освещенного диффузора.

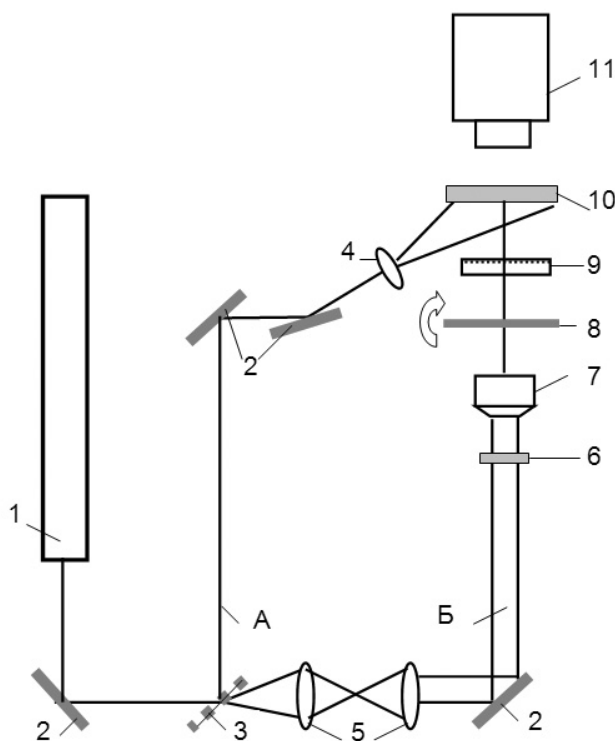


Рис. 1. Оптическая схема голографического интерферометра.

1 — лазер; 2 — зеркала; 3 — светоделитель; 4 — микролинза; 5 — коллиматор; 6 — объект; 7 — объектив; 8 — плоскопараллельная пластина; 9 — матовое стекло; 10 — узел регистрации голограммы; 11 — узел визуализации исследуемого объекта; А — опорный пучок; Б — объектный пучок

Интерференционная картина в ГИМе формируется в плоскости рассеивателя, что упрощает фокусировку объектива при регистрации интерферограммы фотоаппаратом или телекамерой [12]. Наличие матового стекла в отсутствие исследуемого объекта позволяет визуализировать и оценить оптические дефекты в оптической системе, которые могут сказываться на фазовом распределении, получаемом от исследуемого эритроцита в процессе экспериментов.

Для получения полос конечной ширины в ГИМах требуется либо изменить угол между предметным и опорным пучками, т. е. сместить элементы настроенной схемы, либо ввести клин в один из пучков, либо сместить записанную голограмму [3, 4]. Это снижает оперативность работы при исследовании набора однотипных объектов, т. к. приходится восстанавливать положение элементов схемы для работы с каждым объектом. Чтобы упростить данную операцию, предлагается

ввести в ГИМ (рис. 1) плоскопараллельную пластинку, расположенную перед матовым стеклом. При повороте этой пластинки после записи голограммы происходит смещение объектного пучка, что позволяет получить полосы конечной ширины необходимой частоты.

АЛГОРИТМ ПОЛУЧЕНИЯ ИНТЕРФЕРОГРАММ

Для получения интерферограмм, с которых восстанавливают объемное изображение объектов, требуется следующее.

1) Записать голограмму в ГИМе без присутствия объекта исследования в микроскопе (регистрируется распределение фаз собственно в ГИМе). Единожды записав фазовое распределение в ГИМе, можно производить дальнейшее изучение однотипных объектов без многократной записи их голограмм [13]. При этом визуализируются дефекты, имеющиеся в оптическом канале микроскопа.

2) Перезаписывать голограмму только при изменениях в оптической схеме ГИМа (замена объектива или его перефокусировка, например, при изменении толщины подложки, на которой находится эритроцит).

3) Изменять угол поворота плоскопараллельной пластинки 8 для получения необходимой частоты полос конечной ширины, чтобы не использовать клинья или микроподвижки.

4) До работы с эритроцитом выявить дефекты оптических элементов системы, которые проявляются в виде деформации вводимых интерференционных полос, что позволяет учитывать их при обработке интерферограмм с исследуемым эритроцитом [1, 3–5]. (На рис. 2 имеющийся в системе фазовый дефект сравним с исследуемым далее эритроцитом).

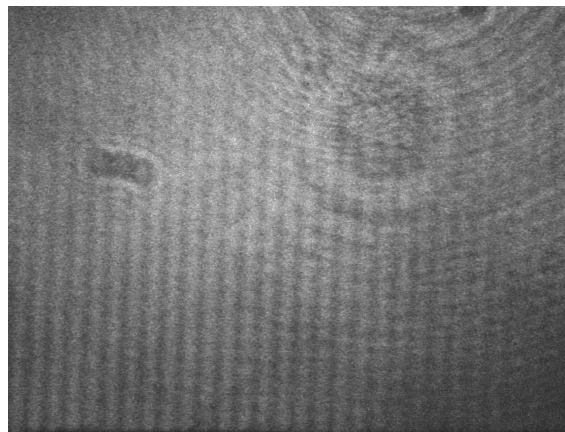


Рис. 2. Полосы конечной ширины, полученные на выходе ГИМ в отсутствие объекта

Процесс регистрации голограммы в ГИМе происходит следующим образом. Перед записью голограммы объектив фокусируется на объект исследования, находящийся на предметном стекле, т. е. изображение эритроцитов, находящихся на предметном стекле в ГИМе, проецируется объективом 7 на матовое стекло 9 и далее в плоскость записи голограммы 10. После этого предметное стекло с объектом удаляется. Далее осуществляется запись голограммы фазового распределения ГИМа. Наблюдаемый объект (эритроциты на предметном стекле) помещается в поле зрения объектива 7. После чего необходимые полосы конечной ширины вводят поворотом плоскопараллельной пластинки 8.

В приведенном на рис. 1 ГИМе для получения полос конечной ширины используется суперпозиция двух плоских волн одинаковой частоты. Она дает картину интерференции в виде параллельных прямых линий. Интенсивность света в каждой точке в плоскости регистрации зависит от фаз пришедших в нее волн, но вдоль прямых линий эти фазы одинаковы, поэтому фазовый объект, введенный в область распространения одной из плоских волн, приведет к изменению общей картины интерференции в виде искривления линий. Величина отклонения от прямой линии позволяет рассчитать распределение фазы в объекте. Предметное стекло в области наблюдения имеет практически параллельные плоскости, поэтому не вносит искажения в изображение полос конечной ширины (происходит их параллельное смещение). Таким образом, регистрируемые на выходе ГИМ деформации интерференционных полос связаны только с исследуемым объектом (при отсутствии фазовых дефектов в оптической системе) и позволяют восстановить его объемное изображение.

ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ПОЛОС В ГИМ

Положим, что плоскопараллельная пластинка 8 в ГИМ стоит перпендикулярно распространению лазерного пучка. Объект исследования — эритроцит с подложкой — отсутствует. Осуществляется запись голограммы фазового распределения оптической части микроскопа, включая матовое стекло. За матовым стеклом мы будем иметь распределение, математическое описание которого аналогично описанию, приведенному в работе [14].

Источник света — лазер создает на матовом стекле 9 амплитуду E_0 . Коэффициент передачи матового стекла выражается линейным оператором $L(E_0)$.

Так как матовое стекло не нарушает когерентности света, поскольку его толщина мала по сравнению с длиной когерентности лазера, рас-

пределение $L(E_0)$ создает в плоскости записи голограммы 10 амплитуду

$$E_1 = L(E_0) * d, \quad (1)$$

где $*$ обозначает свертку, а d — градиент функции Грина, описывающий дифракцию (в первом приближении это функция Френеля). У опорной волны в плоскости 10 амплитуда E_p . Голограмма фиксирует интенсивность

$$I_1 = |E_1 + E_p|^2, \quad (2)$$

т. е. записывается голограмма матового стекла. В ГИМе поворот пластинки 8 и/или введение фазового объекта 6 создает разность фаз φ , поэтому амплитуда света, падающего на матовое стекло, запишется в виде $E_0 e^{i\varphi}$. Соответственно после матового стекла амплитуда прошедшей волны будет описываться выражением

$$E_2 = L(E_0 e^{i\varphi}). \quad (3)$$

При освещении голограммы 10 опорным пучком восстанавливается волновое распределение $L(E_0)$, и в плоскости матового стекла возникает суперпозиция двух волн. Полагаем, что амплитуды восстановленной и приходящей волн равны, тогда с учетом линейности оператора L суперпозиция двух волн описывается выражением

$$L(E_0) + L(E_0 e^{i\varphi}) = L[E_0(1 + e^{i\varphi})], \quad (4)$$

что физически представляет собой проекцию на матовое стекло интерферограммы $E_0(1 + e^{i\varphi})$ фазового объекта.

Известно, что плоскопараллельная пластинка смещает луч света параллельно самому себе на расстояние

$$l = h \sin i \left(1 - \sqrt{\frac{1 - \sin^2 i}{n^2 - \sin^2 i}} \right), \quad (5)$$

где h — толщина пластинки, i — угол падения луча, n — относительный показатель преломления материала.

Таким образом, если пластинка изначально стояла перпендикулярно лучу, то на это расстояние сместилось изображение источника света, а также изменилась фаза проходящей через пластинку волны.

Пространственная частота полученной структуры ν зависит от угла α , под которым сходятся интерферирующие волны и который в свою очередь определяется величиной смещения изображения источника света l , т. е.

$$\nu = \frac{2 \sin(\alpha/2)}{\lambda} = \frac{2 \frac{l}{2r}}{\lambda} = \frac{l}{r\lambda}, \quad (6)$$

где r — расстояние от плоскопараллельной пластинки до матового стекла.

На рис. 2 показаны полосы конечной ширины, полученные поворотом плоскопараллельной пластинки 9 и визуализированные на матовом стекле в отсутствие объекта. Полосы параллельны и находятся на одинаковом расстоянии друг от друга, т. е. радиусы фронтов волн, их образующих, достаточно велики, и эти волны можно рассматривать как плоские. Поэтому в области суперпозиции волн в точке Р их можно записать в виде

$$\begin{aligned} E_1 &= E_0 \cos(\omega t - k r_1 + \varphi_1), \\ E_2 &= E_0 \cos(\omega t - k r_2 + \varphi_2), \end{aligned} \quad (7)$$

где E_1 и E_2 — волны при перпендикулярной лучу и повернутой плоскопараллельной пластинке соответственно; $k = 2\pi/\lambda$; r_1 и r_2 — расстояния до точки Р при двух положениях плоскопараллельной пластинки, а φ_1 и φ_2 — начальные фазы; ω — частота интерферирующих волн; t — время.

Поле E , создаваемое суммарным колебанием, определяется выражением

$$\begin{aligned} E &= E_1 + E_2 = 2E_0 \cos \frac{k(r_2 - r_1) - (\varphi_2 - \varphi_1)}{2} \times \\ &\times \cos \left(\omega t - \frac{k(r_1 + r_2) + \varphi_1 + \varphi_2}{2} \right). \end{aligned} \quad (8)$$

Обозначим $r_2 - r_1 = \Delta$ — разность хода, а $\varphi_2 - \varphi_1 = \delta$ — разность фаз приходящих в точку Р волн. Из выражения (8) выделяем амплитуду суммарного колебания

$$2E_0 \cos \frac{k(r_2 - r_1) - (\varphi_2 - \varphi_1)}{2} = 2E_0 \cos \frac{k\Delta - \delta}{2}. \quad (9)$$

Интенсивность света пропорциональна квадрату амплитуды

$$I = 4E_0^2 \cos^2 \left(\frac{k\Delta - \delta}{2} \right) = 2E_0^2 [1 + \cos(k\Delta - \delta)]. \quad (10)$$

Исследуем это выражение:

$$\begin{aligned} I_{\max} &= 4E_0^2 \text{ достигается при } k\Delta - \delta = 2m\pi, \\ I_{\min} &= 0 \text{ достигается при } k\Delta - \delta = (2m+1)\pi, \end{aligned} \quad (11)$$

где $|m| = 0, 1, 2, \dots$ Здесь m называется порядком интерференции.

Поскольку разность δ постоянна, то положение линий узлов и пучностей, определяемых формулами (11), остается неизменным в пространстве, т. е. наблюдается картина интерференции двух плоских волн [8].

Введем фазовый объект $\varphi(x, y)$ в проходящую волну. Уравнение для E_2 примет вид

$$E_2 = E_0 \cos[\omega t - k r_2 + \varphi_2 + \varphi(x, y)]. \quad (12)$$

Соответственно изменятся формулы (11):

$$\begin{aligned} I_{\max} &= 4E_0 \text{ — при } k\Delta - \delta + \varphi(x, y) = 2m\pi, \\ I_{\min} &= 0 \text{ — при } k\Delta - \delta + \varphi(x, y) = (2m+1)\pi. \end{aligned} \quad (13)$$

Очевидно, что фазовый объект $\varphi(x, y)$ изменяет полученную ранее линейчатую структуру, смещая полосы от параллельности на величины, соответствующие локальному набегу фаз по полю объекта.

В фазовом объекте отсутствует рефракция зондирующего его луча света, поэтому набег фазы по полю объекта зависит от его локальной толщины и определяется по формуле

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{z_1}^{z_2} [n(x, y, z) - n_0] dz, \quad (14)$$

где $n(x, y, z)$ — показатель преломления в исследуемом объекте; n_0 — показатель преломления в отсутствие объекта; z — направление распространения волны. Если распределение показателя преломления в исследуемом объекте однородно, то величина $n(x, y, z) - n_0 = \Delta n = \text{const}$. Тогда формула (14) приобретает вид

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n t(x, y), \quad (15)$$

где $t(x, y) = z_2 - z_1$ — толщина исследуемого объекта в точке (x, y) . Следовательно,

$$t(x, y) = \varphi(x, y) \frac{\lambda}{2\pi \Delta n} = N(x, y) \frac{\lambda}{\Delta n}, \quad (16)$$

где $N(x, y)$ — число полос, на которое смещают прямые параллельные линии интерференционной картины двух плоских волн соответствующие точки фазового объекта.

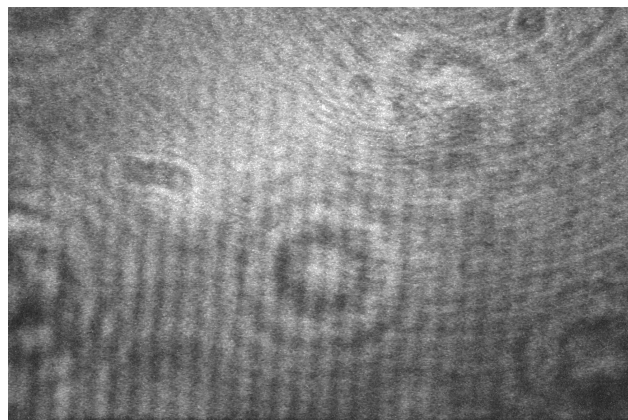


Рис. 3. Интерференграмма эритроцита на предметном стекле на выходе ГИМ

Расчет по формуле (16) позволяет восстановить поверхностный рельеф фазового объекта (в применении к эритроцитам, т. к. в условиях проведенного эксперимента эритроцит просвечивался в одном направлении и плавал в плазме крови).

У здорового человека эритроцит имеет диаметр 7–8 микрон и максимальную толщину 2 мкм. Показатель преломления у эритроцита $n_s = 1.352$ [4].

На рис. 3 представлена интерферограмма эритроцита на предметном стекле, полученная на выходе ГИМа. Объектом исследования являлся свежий мазок крови. По интерферограмме видно:

1) что эритроцит практически утоплен в плазме крови;

2) внутренняя его часть имеет небольшую вогнутость;

3) отклонения от параллельности у полос невелики (максимальные — порядка половины периода), но заметны по периметру эритроцита.

Таким образом, поверхностный рельеф у данного плавающего эритроцита значительно меньше одного микрона, т. е. половины его толщины. Изображение интерферограммы эритроцита идентично изображениям интерферограмм, приведенным в литературе [3–5, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что введение в схему голографического интерференционного микроскопа, использующего принцип работы интерферометра Маха—Цендера, дополнительных элементов расширяет функциональные возможности микроскопа, улучшая его рабочие характеристики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Snow K., Vandewarker R. An application of holography to interference microscopy // *Appl. Optics*. 1968. Vol. 7, no. 3. P. 549–554.
2. Соколов А.В. Применение методов оптической голографии для исследования биологических микрообъектов. В сер. Методы физиологических исследований. Л.: Наука, 1978. 72 с.
3. Гинзбург В.М., Степанов Б.М. Голографические измерения. М.: Радио и связь, 1981. 296 с.
4. Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н. Голографиче-

ские методы трехмерной визуализации фазовых микрообъектов // *Оптический журнал*. 2005. Т. 72, № 2. С. 48–55.

5. Rappaz B., Barbul A., Charrière F. et al. Erythrocytes volume and refractive index measurement with a digital holographic microscope // *Proc. SPIE 6445, Optical Diagnostics and Sensing VII*, 644509 (February 14, 2007). doi:10.1117/12.700463.
6. Ricardo J.O., Muramatsu M., Palacios F. et al. Digital holography microscopy in 3D biologic samples analysis // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2011. Vol. 274, no. 1. 012066. doi:10.1088/1742-6596/274/1/012066.
7. Вест Ч. Голографическая интерферометрия. М.: Мир, 1982. 504 с.
8. Островский Ю.И. и др. Голографическая интерферометрия. М.: Наука, 1977. 336 с.
9. Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н. // *Вестн. Харьковского нац. универ. им. В.Н. Каразина. Сер. радиофизика и электроника*. 2006. Т. 10, № 712. С. 52.
10. Тишко Т.В. и др. // *Вест. Харьковского нац. универ. им. В.Н. Каразина. Сер. биология*. 2006. Т. 3, № 729. С. 281.
11. Rappaz B., Barbul A., Emery Y. et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer // *Cytometry. Part A*. 2008. Vol. 73A, no. 10. P. 895–903.
12. Бабенко В.А., Малый А.Ф. Патент на полезную модель № 89690. Патентообладатель УРАН ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН. Приоритет ПМ от 16.06.2009.
13. Бабенко В.А., Малый А.Ф. Метод получения интерферограмм фазовых микрообъектов // *В мире научных открытий*. 2010. № 3-1. С. 118–119.
14. Ловенталь С., Бельво И. Пространственная фильтрация и голография — новое в когерентной оптике. М.: Энергия, 1970. 72 с.

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, г. Санкт-Петербург

Контакты: Бабенко Вероника Андреевна,
babenko@mail.ioffe.ru

Материал поступил в редакцию 24.10.2013

MODIFIED HOLOGRAPHIC INTERFERENCE MICROSCOPE FOR PHASE OBJECT STUDIES

A. F. Malyi, V. A. Babenko

Ioffe Physical Technical Institute of the RAS, Saint-Petersburg, RF

It is shown that the introduction of new elements into the scheme of a holographic interference microscope for studying phase microobjects allows one to adjust the microscope more efficiently. The mathematical description and procedure of its adjustment is presented.

Keywords: interferometry, phase volume environments

REFERENCES

1. Snow K., Vandewarker R. An application of holography to interference microscopy. *Appl. Optics*, 1968, vol. 7, nu. 3, pp. 549–554.
2. Rappaz B., Barbul A., Charrière F. et al. Erythrocytes volume and refractive index measurement with a digital holographic microscope. *Proc. SPIE 6445, Optical Diagnostics and Sensing VII*, 644509 (February 14, 2007). doi:10.1117/12.700463.
3. Ricardo J.O., Muramatsu M., Palacios F. et al. Digital holography microscopy in 3D biologic samples analysis. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2011, vol. 274, nu. 1, 012066. doi:10.1088/1742-6596/274/1/012066.
4. Rappaz B., Barbul A., Emery Y. et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer. *Cytometry. Part A.* 2008, vol. 73A, nu. 10, pp. 895–903.

Contacts: Babenko Veronika Andreevna,
babenko@mail.ioffe.ru

Article arrived in edition: 24.10.2013