

10;15

Комбинированная оптическая когерентная и спектральная микроскопия на основе перестраиваемых акустооптических фильтров изображений

© А.В. Висковатых, А.С. Мачихин, В.Э. Пожар,
В.И. Пустовойт, Д.А. Висковатых

Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН,
Москва

E-mail: aviskovatich@mail.ru

Поступило в Редакцию 14 октября 2013 г.

Предложена оптическая схема для проведения микроскопических исследований биообъектов, комбинирующая функции оптической когерентной и спектральной микроскопии. В основе системы лежит акустооптическая фильтрация изображения в приемном канале микроинтерферометра. Разработан и изготовлен макет данного прибора. Экспериментально показано, что акустооптическая фильтрация не нарушает интерференцию двух пучков, переносящих изображения, что позволяет получать информацию как о трехмерных пространственных, так и о спектральных свойствах объекта.

Для исследований микрообъектов в биомедицине все чаще применяются комплексные подходы, включающие анализ несколькими методами. При этом, как правило, важно, чтобы это делалось без смещения исследуемого объекта. Например, при флуоресцентном анализе с помощью туморотропных фотолюминесцентных меток важно для их локализации точно привязать получаемую картину к обычному цветному изображению. Примером реализации такого комплексного подхода могут служить двухмодальные установки [1,2], сочетающие в себе функции нескольких приборов. В частности, установка [1] является фактически совокупностью оптического когерентного томографа и флуоресцентного спектрометра. Однако по сути эти две многоэлементные подсистемы имеют в качестве общего оптического компонента лишь микрообъектив, а источники и приемники излучения различны. В то же время есть методы, для которых существует возможность значи-

тельно большей интеграции. К таким методам относятся, в частности, спектральная визуализация и оптическая когерентная микроскопия с регистрацией в спектральной области (ОКМ СО), в которых используются широкополосный источник света, монохромный матричный приемник и перестраиваемый спектральный элемент. В данной работе описана первая система, интегрирующая эти два метода, и приведены экспериментальные результаты, полученные с ее помощью.

Одним из перспективных методов исследования биообъектов является спектральная визуализация, которая во многих случаях позволяет эффективно контрастировать элементы, обладающие различными физико-химическими свойствами [3,4]. Схема изучения объектов данным методом содержит широкополосный источник света, микрообъектив, оптический фильтр и видеокамеру (рис. 1). Объект при этом располагается на микроскопическом столике в проходящем или отраженном свете. Особый интерес представляет использование перестраиваемого оптического фильтра, в качестве которого, как правило, используют акустооптический (АО) фильтр. Такой прибор позволяет регистрировать спектральные изображения в произвольных узких спектральных интервалах и при соответствующем учете их пространственно-хроматических искажений [5], вызываемых АО-взаимодействием, получать спектры в любых точках объекта. Для предварительного выбора исследуемого участка объекта или привязки найденных спектрально-контрастных элементов АО-фильтр с монохромной камерой могут быть заменены на цветную видеокамеру.

Среди методов ОКМ СО широко используются в настоящее время две следующие схемы: на основе перестраиваемого лазера [6] и на основе широкополосного источника света, перестраиваемого с помощью АО-фильтра [7] (рис. 2, *a*). Как видно, перемещение АО-фильтра из осветительного канала в канал регистрации (рис. 2, *b*) максимально приближает эту схему к схеме видеоспектрометра (рис. 1). Однако одного только перемещения недостаточно. В то время как в осветительном канале (рис. 2, *a*) единственная функция АО-фильтра — спектральная селекция излучения источника, в приемном канале (рис. 2, *b*) АО-фильтр должен обеспечить спектральную фильтрацию 2 интерферирующих пучков, переносящих изображение. Такая фильтрация требует, прежде всего, сохранения интерференции после дифракции на акустической решетке.

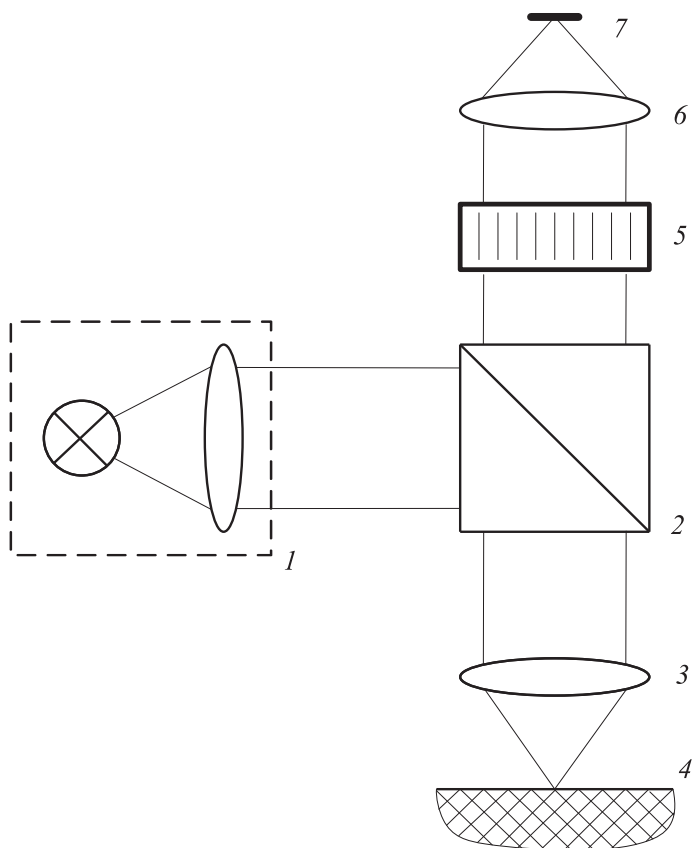


Рис. 1. Оптическая схема АО-видеоспектрометра: 1 — источник света, 2 — светоделитель, 3 — микрообъектив, 4 — исследуемый объект, 5 — АО-фильтр, 6 — выходной объектив, 7 — ПЗС-матрица.

Сама эта возможность неочевидна по нескольким причинам. Во-первых, дифракция происходит не на локальной поверхности, а распределена по всему кристаллу. Во-вторых, дифракционная решетка не является статической и соответственно сопровождается сдвигом частоты. В-третьих, решетка, создаваемая акустической волной, не

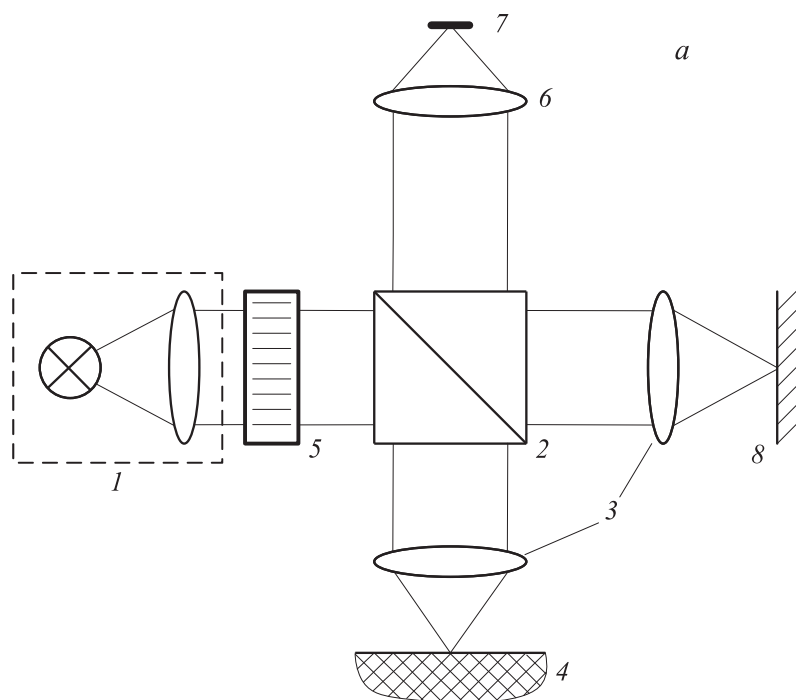


Рис. 2. Оптические схемы ОКМ СО: *a* — на основе перестраиваемого источника света с АО-фильтром в осветительном канале [7]; *b* — разработанная на основе перестраиваемого АО-фильтра изображений в канале регистрации. 1–7 — те же обозначения, что на рис. 1, 8 — референтное зеркало, 9 — подвижная заслонка. Пунктир — отраженный от зеркала световой пучок, интерферирующий на приемнике с отраженным объектом пучком.

является идеальной вследствие расходимости звуковой волны, ее сноса, переотражений. В-четвертых, возможные искажения пространственного распределения фаз каждого из интерферирующих световых пучков должны быть малы или коррелированы.

Кроме того, поскольку рассматривается реализация оптической когерентной микроскопии, т.е. томографии полного поля, необходимо обеспечить сохранение качественного изображения во всем поле зрения

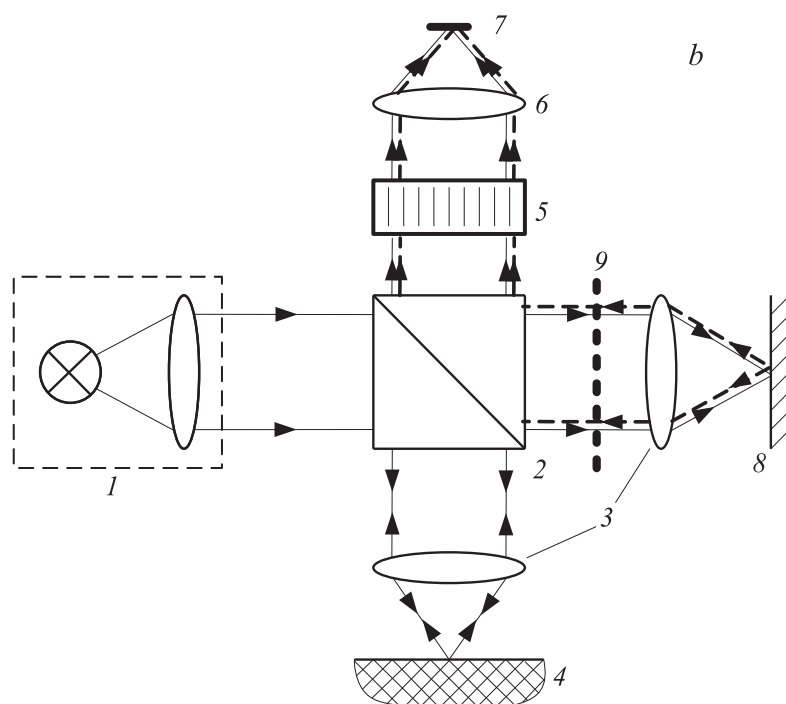


Рис. 2 (продолжение).

объектива микроскопа. Поэтому в качестве фильтрующего элемента был выбран двойной АО-монохроматор изображений [8,9], содержащий 2 идентичных АО-фильтра, расположенных последовательно таким образом, что второй в максимальной мере устраняет (компенсирует) искажения, вызванные первым.

В качестве основы разработанной системы (рис. 2, *b*) был использован микроинтерферометр Линника с двумя идентичными микрообъективами 3 в измерительном и референтном плечах (каналах). В канале регистрации перед выходным объективом 6 и чувствительной монохромной ПЗС-матрицей 7 установлен АО-фильтр 5. В используемом двойном АО-монохроматоре хроматический сдвиг в пределах всего рабочего спектрального интервала 800–900 nm и всего поля

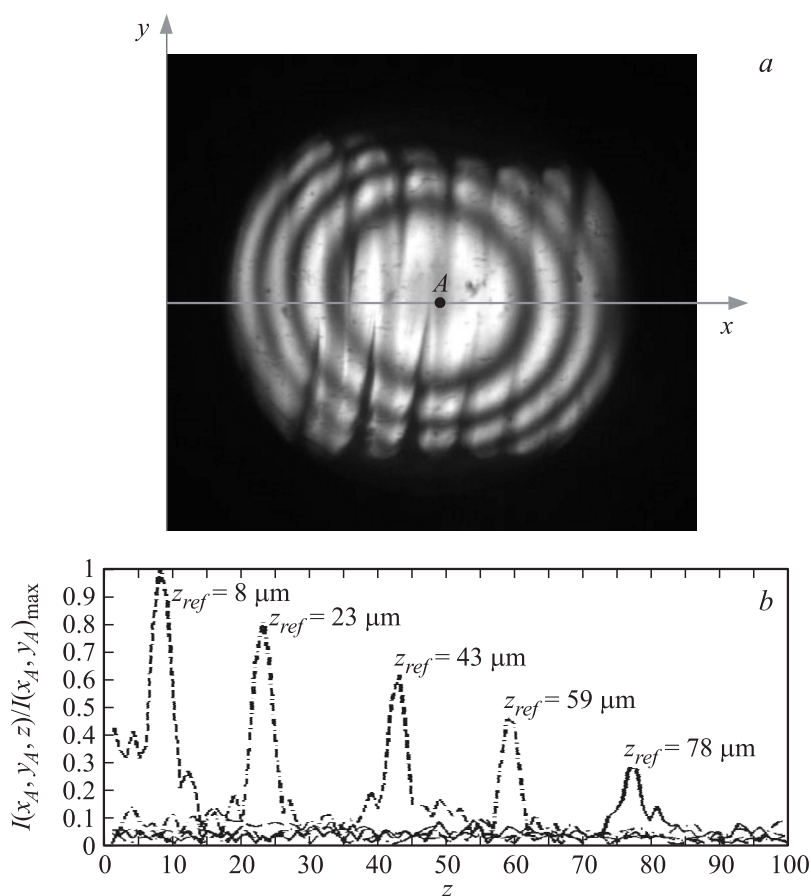


Рис. 3. Интерференционное изображение спирали лампы накаливания на длине волны $\lambda = 850 \text{ nm}$ (a) и вычисленная в точке $A(x_A, y_A)$ относительная величина осевого распределения отраженного сигнала $I(z)$ при различных положениях референтного зеркала z_{ref} (b).

зрения не превышает примерно половины пиксела, что обеспечивает достаточно качественное изображение и не требует его коррекции [10].

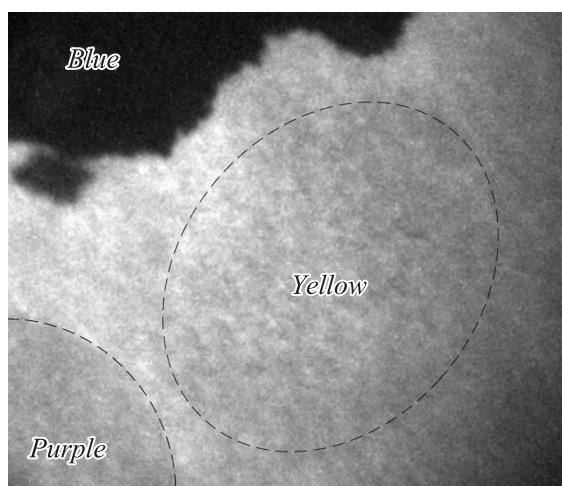


Рис. 4. Спектральное изображение чернил принтера на длине волны $\lambda = 700$ nm.

На созданном макете системы были получены интерференционные изображения тестового объекта, в качестве которого использовалось плоское зеркало, располагавшееся в пяти разных положениях относительно плоскости нулевой разности хода интерферометра. На рис. 3, *a* приведена одна из 100 зарегистрированных с шагом 1 nm в диапазоне 800–900 nm интерференционных картин исследуемой области размером $300 \times 300 \mu\text{m}$. Сканирование по частоте ν сопровождается изменением интерференционных картин, совокупность которых содержит информацию об объемной структуре $I(x, y, z)$ исследуемого объекта.

На рис. 3, *b* приведены графики зависимости относительной интенсивности отраженного сигнала $I(x_A, y_A, z)/I_{\text{max}}(x_A, y_A)$ в точке $A(x_A, y_A)$, показанной на рис. 3, *a* при 5 различных смещениях референтного зеркала z_{ref} и соответственно различных расстояниях до него от плоскости нулевой разности хода. Эта зависимость вычислялась посредством преобразования Фурье спектральной зависимости зарегистрированной интенсивности в этой точке. Положение пиков с точностью до ширины пика соответствует положению референтного

зеркала в каждой серии измерений, контролировавшемуся с помощью микрометрического винта. Полуширина пиков, определяющая разрешение по глубине, составляет около $\Delta z = (\ln 2/\pi)/(\lambda^2/\Delta\lambda) = 2 \mu\text{m}$. Интенсивность измеренного сигнала падает при смещении от плоскости нулевой разности хода, что согласуется с теоретическими оценками [11]. Пространственное разрешение в эксперименте составляло $2 \mu\text{m}$.

Разработанная система может работать и в режиме регистрации спектральных изображений, для чего необходимо перекрыть референтный канал подвижной непрозрачной заслонкой 9 (рис. 2, *b*). На рис. 4 представлено для примера одно из спектральных изображений.

Таким образом, созданная в данной работе новая схема спектрального интерференционного микроскопа позволяет в одной установке реализовать три различных типа измерений: регистрация пространственного распределения интенсивности $I(x, y)$, регистрация спектральных изображений $I(x, y, \lambda)$ и измерение трехмерного распределения интенсивности $I(x, y, z)$.

Следует также отметить, что в отличие от классической схемы ОКМ СО (рис. 2, *a*) разработанная и исследованная схема позволяет использовать различные источники света: лазеры, суперлюминесцентные диоды и широкополосные источники излучения.

Реализованная схема основана на экспериментально продемонстрированной эффективной дифракции двух интерферирующих световых пучков на объемной решетке, созданной бегущей акустической волной с сохранением достаточно высококачественного изображения объекта.

Список литературы

- [1] Park J., Jo J., Shrestha S., Pande P., Wan Q., Applegate B. // Biomedical optics express. 2010. V. 1. N 1. P. 186.
- [2] Lewis E., Levin I., Treado P. Spectroscopic imaging device employing imaging quality spectral filters. / U.S. Patent № 5, 377, 003 dd. 27.12.1994.
- [3] Kutuza I., Pozhar V., Pustovoi V. // Proc. SPIE. 2005. V. 5143. P. 165.
- [4] Wachman E., Pannell C. // Proc. SPIE. 2008. V. 6966. P. 6966–6967.
- [5] Мачихин А.С., Пожар В.Э. // ЖТФ. 2010. Т. 80. В. 10. С. 101.
- [6] Chinn S., Swanson E., Fujimoto J. // Opt. Lett. 1997. V. 22. P. 340.
- [7] Považay B., Unterhuber A., Hermann B., Sattmann H., Arthaber H., Drexler W. // Opt. Express. 2006. V. 14. P. 7661.

- [8] Мазур М.М., Пожар В.Э., Пустовойт В.И., Шорин В.Н. // Успехи современной радиоэлектроники. 2006. № 10. С. 19.
- [9] Мачихин А.С., Пожар В.Э. // Электромагнитные волны и электронные системы. 2009. Т. 14. № 11. С. 63.
- [10] Мачихин А.С., Пожар В.Э. // Приборы и техника эксперимента. 2009. № 6. С. 92.
- [11] *Handbook of optical coherent tomography* / Ed. by B. Bouma, G. Tearney. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. 519 p.