

Голографический интерференционный микроскоп для исследования микрообъектов

© В.Б. Константинов, В.А. Бабенко, А.Ф. Малый

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: V.Konstantinov@mail.ioffe.ru

(Поступило в Редакцию 12 марта 2007 г.)

Сконструированный цифровой голографический интерференционный микроскоп позволяет получать в реальном времени трехмерные изображения фазовых микрообъектов и измерять их морфологические параметры. Прибор может найти применение в медицинских центрах и научных лабораториях.

PACS: 42.40.Kw, 07.60.Ly, 87.64.-t

Введение

Применение методов голографической интерферометрии в сочетании с микроскопией позволяет проводить качественную и количественную оценку внутренней структуры прозрачных микрообъектов, изменяющих фазу проходящего через них света. Одним из возможных применений голографической микроскопии является использование в биологии в частности, при изучении живых клеток [1–4].

Прозрачные микрообъекты можно различать по показателю преломления. Вследствие этого различия световая волна, прошедшая сквозь объект, претерпевает изменения по фазе и из-за сложной структуры объекта приобретает фазовый рельеф. Фазовые изменения не регистрируются ни глазом, ни фотопластинкой, и для возможности наблюдения таких микрообъектов фазовые изменения необходимо трансформировать в амплитудные. Для визуализации прозрачных микрообъектов в биологии и медицине применяют окрашивание препаратов, но это приводит к нарушению их свойств. Кроме того, такой метод визуализации не позволяет получать трехмерные изображения микрообъектов.

Кровь в организме человека является одной из важнейших систем поддержания гомеостаза организма. Исследования состояния клеток крови, и в первую очередь эритроцитов, представляет большой научный и медицинский интерес. Эритроцит — безъядерный форменный элемент крови, содержащий гемоглобин. Исследование эритроцитов прижизненно затруднено тем, что они практически не изменяют интенсивность проходящего через них излучения, поэтому остаются невидимыми при обычных методах микроскопии. Методы современной электронной микроскопии позволяют реконструировать трехмерные изображения фазовых микрообъектов, но только специальным образом подготовленные (фиксация, металлизация и т. д.).

Для решения указанной задачи с использованием голографической техники встает вопрос о мобильности измерительной или диагностирующей аппаратуры. В большинстве случаев голографические установки представ-

ляют собой громоздкие виброзащищенные комплексы для проведения стационарных исследований.

Необходимость сочетания голографической методики с условием портативности самой аппаратуры привела к созданию компактного голографического интерференционного микроскопа [5–8].

Целью настоящей работы является исследование возможностей метода голографической микроинтерферометрии для воссоздания трехмерных изображений эритроцитов крови человека.

Теоретический анализ

Во ВНИИ оптико-физических измерений (ОФИ) проводились медико-биологические исследования живых нефиксированных эритроцитов [1,9]. Целью исследований являлась разработка аппаратуры и методов лабораторной диагностики на основе лазерной техники и компьютерного анализа. Было показано, что метод количественной диагностики эритроцитов на основе голографической интерферометрии позволяет исследовать живые клетки крови без обработки одновременно по многим параметрам. Сравнительный анализ нового метода с традиционной световой и электронной микроскопией указал на дополнительные возможности микроинтерферометрии: количественная оценка поперечного сечения клетки, площади поверхности и объема эритроцита, сухого веса и концентрации гемоглобина.

В настоящее время голографические интерференционные методы в микроскопии находятся на уровне исследовательских работ и не имеют серийной аппаратурной реализации. Интерференционный микроскоп для измерения формы микрорельефа разработан в ОФИ (Г.Г. Левин). Лазерный интерференционный микроскоп для исследования микронеоднородностей в прозрачных средах был разработан на кафедре прикладной оптики Новосибирского государственного университета (проф. Н.А. Мещеряков). В МИФИ создан голографический интерференционный микроскоп для измерения смещения микрообъектов (Н.Н. Балан), безлинзовый цифровой голографический микроскоп для наблюдения объектов микронного

размера и измерения их трехмерных геометрических характеристик — в МГТУ им. Н.Э. Баумана (В.Л. Толстогузов). В [10] явления агрегации и дезагрегации эритроцитов исследуются спектроскопическими методами.

Материалы об исследованиях клеток крови содержатся в публикациях SPIE [Vol. 4296, 4399, 4416, 5945, 6087, 6163, 6189], Journal of Biomedical Optics [G. Popescu, 2005. Vol. 10; 2006. Vol. 11.] В некоторых работах представлены исследования клеток крови с использованием атомного силового микроскопа [11], дифракционного фазового микроскопа [12], в интерференционных полосах [13]. В Харьковском национальном университете им. В.Н. Каразина (Украина) создан лабораторный образец голографического интерференционного микроскопа [4,14]. Прибор работает только в лабораторных условиях, так как смонтирован на виброзащищенном стенде. Прибор имеет много техническо-эксплуатационных недостатков. Ранее нами была рассмотрена возможность голографической интерферометрии реального времени для анализа белков плазмы крови [15].

В специальной медицинской литературе описываются методики клинической диагностики. Исследования крови проводятся отработанными методами. Живые эритроциты не являются предметом тщательных исследований.

Ведущие фирмы мира (Leica Mikroskopie und System GmbH, Nikon GmbH, Olympus Optical Co. (Europe) GmbH, Carl Zeiss Mikroskopie), выпускающие оптические микроскопы, комплектуют на базе своих микроскопов рабочие станции, включающие в себя систему регистрации изображения и последующей его обработки. Подобные рабочие станции используются для различных задач, например, в изучении хромосом, в системах микроманипуляции и микроинъекции (фирма Olympus и Leica сотрудничают с известным лидером в этой области Eppendorf), для организации систем телемедицины. В университете Лозанны создан цифровой голографический микроскоп, позволяющий видеть живые клетки. Исследователи основали компанию Lyncsee Tec для производства и продвижения на рынок этой техники.

Предлагаемая в настоящей статье система телевизионного голографического интерференционного микроскопа создана по аналогии с техническими решениями разработанной ранее аппаратуры для исследований на борту орбитальных станций [16–18] с учетом необходимости требования мобильности аппаратуры.

Методика

Микроскоп с большим увеличением имеет небольшую глубину поля зрения, с его помощью можно одновременно наблюдать только небольшие участки, которые находятся в непосредственной близости от фокальной плоскости микроскопа. Для наблюдения всей сцены по глубине необходимо проводить перефокусировку микроскопа. Если предметом изучения являются движущиеся микробиологические объекты, например, живые организмы в некотором объеме жидкости, то за время перефокусировки микроскопа они могут переместиться в пределах сцены, что

может дать искаженное представление об изучаемых микробиологических объектах и их количестве.

Голографирование изучаемой области проводится через объектив микроскопа, имеющий большую глубину резкости, чем весь микроскоп в целом, с помощью импульсного источника излучения либо с помощью скоростной кинокамеры при непрерывном излучении. Полученное объемное изображение рассматривается через окуляр микроскопа, который можно фокусировать на различные плоскости полученной объемной картины. С помощью этого метода можно наблюдать жизнедеятельность простейших организмов, исследовать живые клетки, изучать свойства жидкостей и газов, содержащих примеси микробиологических частиц.

Фазовые микробиологические объекты вносят в волну фазовый сдвиг

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{z_1}^{z_2} \Delta n(x, y, z) dz, \quad (1)$$

где x, y — это плоскость изображений, z — направление распространения волны, λ — длина волны света, $\Delta n(x, y, z)$ — разность показателей преломления микробиологических объектов и окружающей среды. Если объект имеет однородное распределение показателя преломления, тогда $\Delta n = \text{const}$ и

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

где $t(x, y) = z_2 - z_1$ — толщина микробиологического объекта в точке (x, y) , тогда

$$t(x, y) = \varphi(x, y) \frac{\lambda}{2\pi \Delta n}. \quad (3)$$

В методе интерференционного контраста

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi h(x', y')}{T}, \quad (4)$$

где $h(x', y')$ — отклонение интерференционной полосы от первоначального направления на интерферограмме, T — период системы интерференционных полос, тогда

$$t(x, y) = \frac{h(x', y') \lambda}{T \Delta n}. \quad (5)$$

Измерение $h(x', y')$ и T на интерферограмме микробиологического объекта позволяет определять его толщину в каждой точке и восстанавливать трехмерное изображение объекта с помощью компьютерной обработки интерферограммы. Восстановленное трехмерное изображение микробиологического объекта позволяет измерять его различные морфологические параметры (размеры, площадь поверхности, объем).

Трехмерная форма эритроцита характеризуется коэффициентом сферичности k , который определялся как отношение толщины эритроцита в его центре к толщине на половине радиуса. Коэффициент сферичности вычислялся для каждого эритроцита при компьютерной обработке интерферограмм.

В медицинской литературе отсутствуют данные по трехмерной морфологии эритроцитов в норме и патологии.

Экспериментальная часть

Технические и эксплуатационные характеристики микроскопа позволяют использовать его для исследования стационарных объектов и медленно протекающих процессов. В голографическом интерференционном микроскопе (в отличие от интерференционного) нет необходимости точно подбирать парные оптические детали в каждой ветви, поскольку используются волны, прошедшие по одному и тому же пути в разные моменты времени. В основе технического решения лежат разработанные малогабаритные приборы, с помощью которых проводились исследования процессов растворения кристаллов [16], электрофоретического разделения веществ в условиях микрогравитации [17], распределения скоростей в потоках жидкостей, сжимаемости жидкости [19], контроля наружной поверхности иллюминаторов космических аппаратов [18].

Идея изготовления интерференционного микроскопа в виде единого каркаса, на котором жестко закреплены все компоненты, является оригинальной (рис. 1). Для регистрации голограмм использовались фотопластинки ПФГ-03. Источник излучения — He-Ne-лазер HRP050 с линейной поляризацией и выходной мощностью 5 mW. Диаметр лазера 44,5, длина 425 mm. В состав интерферометра входит биологический микроскоп. Голографический интерференционный комплекс состоит из оптического блока, источника излучения с блоком питания, регистратора голограмм, системы считывания и обработки информации. Оптический блок включает голографический интерферометр, систему микроскопа и электронную камеру. Оптический блок может работать в режиме голографической микроскопии и режиме телевизионной электронной спекл-интерферометрии.

В работе [20] продемонстрировано использование голографического микроскопа для обнаружения фазовых неоднородностей высокопреломляющих материалов.

Для получения количественной информации из интерференционных картин требуется компьютерная обработка. Проводится фильтрация изображения с устранением мультипликативных и аддитивных шумов. Выделяются скелетные линии интерференционных полос, отвечающих максимумам или минимумам интенсивности. Качество выделения скелетных линий не зависит от ориентации и конфигурации полос. Проводится автоматическая нумерация полос. С интерферограммами в полосах конечной ширины проводится расчет их сдвига относительно положения на изображении, принятом за начальное. Получаемые результаты позволяют рассчитать физические характеристики объекта.

Создана специальная программа для быстрой обработки регистрируемых спекл-картин [21], (язык C++, среда Visual Studio 2005, библиотека MFC), которая позволяет сохранять результаты обработки и спектр интенсивности; разработан гибкий интерфейс. Входные данные могут быть представлены в любом графическом формате, поддерживаемом Windows. На рис. 2 представлено рабочее окно программы с результатом обработки



Рис. 1. Внешний вид конструкции голографического интерференционного микроскопа.

двух спекл-картин. В невозмущенном состоянии получена первая картина, вторая была зарегистрирована при введении газового потока перед рассеивателем, след от которого виден на рисунке.

При изучении микрообъектов, размеры которых сравнимы с длиной волны излучения, возникает проблема когерентного шума, который снижает качество изображений, поэтому особое внимание должно уделяться чистоте оптических поверхностей и качеству стекла, на



Рис. 2. Результат обработки двух спекл-картин.

которое наносится исследуемый препарат. Определив по интерферограммам толщину микрообъекта в различных его точках, можно восстановить трехмерное изображение микрообъекта. Компьютерная обработка результатов и построение изображений эритроцитов проводится с помощью программного пакета ORIGIN 4.0 при использовании режима усреднения матрицы.

Результаты и их обсуждение

Голографический интерференционный микроскоп как прибор, позволяющий получать интерферограммы микрообъектов и по оцифрованным интерферограммам восстанавливать трехмерные изображения этих микрообъектов, может быть использован для исследования эритроцитов крови человека. Сочетание устройства голографического интерферометра с видеосистемой считывания информации и системой компьютерной обработки позволит получать информацию о динамике изменения микрообъектов микропроцессов [22].

Нативные мазки крови на стеклянных подложках, обычно используемые при проведении лабораторного анализа крови в медицинской практике, помещались в голографический интерференционный микроскоп, где система интерференционных полос создавалась интерференцией двух идентичных световых волн, прошедших через микрообъектив по одному пути, но в различные моменты времени. Одна из этих волн регистрировалась и восстанавливалась по голограмме с помощью опорного пучка. Фазовые сдвиги, вносимые изучаемыми микрообъектами в проходящую через них волну, преобразовывались в искривления интерференционных полос. Интерферограммы микрообъектов регистрировались с помощью цифровой видеокамеры. Оцифрованные интерферограммы передавались в компьютер, где в результате обработки интерферограмм восстанавливались трехмерные изображения эритроцитов крови.

Заключение

Морфология эритроцитов претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологии различного генеза и отражает состояние всего организма. Исследование трехмерной морфологии эритроцитов может стать частью общего гематологического анализа.

Относительная простота и доступность голографических интерференционных методов, реализуемых в одном устройстве микроскопа, делает его оперативным прибором различных медицинских исследований. Определение формы клеток крови и их изменений при различных заболеваниях представляет не только научный интерес, но и может явиться методом оперативной диагностики, дополняющим уже известные методы клинических исследований.

Разработанный голографический микроскоп позволяет получать объемные изображения исследуемых микрообъектов, расширяет возможности исследования прозрачных микрообъектов.

Грант РФФИ № 06-08-00219.

Список литературы

- [1] Гинзбург В.Н., Степанов Б.М. Голографические измерения. М.: Радио и связь, 1981. 296 с.
- [2] Соколов М.Э. Современные методы визуализации фазовых объектов. Голографические методы и аппаратура, применяемые в физических исследованиях. М.: Наука, 1987. 259 с.
- [3] Франсон М. Фазово-контрастный и интерференционный микроскоп. М.: Гос. изд-во физ.-мат. лит., 1960. 180 с.
- [4] Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н. // Оптич. журн. 2005. Т. 72. № 2. С. 48–55.
- [5] Babenko V.A., Konstantinova E.V., Konstantinov V.B. // Proc. SPIE. 1995. Vol. 2329. P. 379–381.
- [6] Babenko V.A., Grebenovskaya L.F., Konstantinova E.V. и др. // ПТЭ. 1999. № 1. С. 159–160.
- [7] Babenko V.A., Grebenovskaya L.F., Konstantinova E.V. и др. // Физич. образов. в вузах. 2000. Т. 6. № 1.
- [8] Babenko V.A., Konstantinov V.B., Mal'iy A.F. // Письма в ЖТФ. 2007. Т. 33. Вып. 7. С. 77–80.
- [9] Степанов Б.М., Вельтищев Ю.Е., Метелкин А.Н. и др. // Сов. медицина. 1983. Т. 5.
- [10] Ладеманн Дж., Вайгманн Х.-Дж., Кайзеветтер Х. и др. // Автометрия. 2000. № 5.
- [11] Nowakowski R. // Biochim. Biophys. Acta 1514, 2001.
- [12] Popescu G. // Opt. Lett. 2006. Vol. 31.
- [13] Bushuk S.B. // J. Opt. A: Pure Appl. Opt. 2005. 7.
- [14] Сафронов Г.С., Тишко Т.В. // ПТЭ 1987. № 2. С. 249.
- [15] Ганжерли Н.М., Гуревич С.Б., Катушкина Н.В., Константинов В.Б. и др. Применение методов оптической обработки изображений. Л., 1985. С. 88–90.
- [16] Константинов В.Б. и др. // ЖТФ. 1982. Т. 52. Вып. 2. С. 2192–2197.
- [17] Баранников А.Л. и др. // Письма в ЖТФ. 1983. Т. 9. Вып. 2. С. 659–661.
- [18] Babenko V.A. et al. // Fringe 2001. Elsevier. 2001. P. 635–640.
- [19] Babenko V.A., Gurevich S.B., Konstantinov V.B. и др. // Письма в ЖТФ. 2003. Т. 29. Вып. 12. С. 83–88.
- [20] Babenko V.A., Gurevich S.B., Konstantinov V.B., Малхасян Л.Г. // Дефектоскопия. 2000. № 9. С. 100–102.
- [21] Babenko V.A., Konstantinov V.B., Карпенко А.Н. // Молодые ученые — промышленности северо-западного региона. Политехнический симпозиум 2006 г. СПб, 2006. С. 70–71.
- [22] Babenko V.A., Konstantinov V.B., Mal'iy A.F. Российские технологии для индустрии. Нанотехнологии и оптоэлектроника в биологии, медицине и экологии. СПб, 2006. С. 49.