

РАСЧЕТ, ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО ОПТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

УДК 612.84: 778.38

СОЧЕТАНИЕ МЕТОДОВ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО И ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО КОНТРАСТА ДЛЯ ТРЕХМЕРНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АНИЗОТРОПНЫХ МИКРООБЪЕКТОВ

© 2012 г. Т. В. Тишко; Д. Н. Тишко; В. П. Титарь, канд. физ.-мат. наук

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

E-mail: tishko@univer.kharkov.ua

Проведено теоретическое и экспериментальное исследование возможностей применения голографического метода поляризационного контраста для решения задачи трехмерной визуализации анизотропных микрообъектов. Экспериментальные исследования проводились с использованием цифрового голографического интерференционного микроскопа. Показано, что метод поляризационного контраста позволяет получать трехмерные изображения анизотропных микрообъектов с максимальным контрастом и высоким качеством, что повышает чувствительность и разрешение метода по сравнению с другими оптическими методами. Впервые исследовались возможности сочетания голографических методов поляризационного и интерференционного контраста для трехмерной визуализации анизотропных микрообъектов.

Ключевые слова: анизотропный микрообъект, цифровой голографический интерференционный микроскоп, голографический метод интерференционного контраста, метод поляризационного контраста.

Коды OCIS: 090.2880, 100.2000, 180.3170, 180.6900, 260.5430.

Поступила в редакцию 14.12.2011.

Введение

Особую группу микрообъектов составляют фазовые микрообъекты, которые не изменяют интенсивность проходящего через них излучения, вносят только фазовые изменения в проходящую через них волну и не доступны непосредственному наблюдению с помощью оптического микроскопа. Это клетки и ткани человеческого организма, кристаллы, тонкие пленки и т. п. Для наблюдения таких микрообъектов необходимо фазовые изменения, внесенные ими в проходящую через них волну, преобразовать в изменение интенсивности. Поэтому для визуализации фазовых микрообъектов применяются специальные методы. Это методы фазового и интерференционного контраста [1]. Но классическая оптическая фазово-контрастная микроскопия позволяет получать только двухмерные изображения фазовых

микрообъектов, измерение их морфологических параметров невозможно. Метод интерференционного контраста позволяет проводить количественные измерения, но этот метод использовался в основном для измерения толщин тонких пленок. Таким образом, проблема трехмерной визуализации фазовых микрообъектов не была решена в классической микроскопии. До настоящего времени электронная микроскопия была единственным методом трехмерной визуализации фазовых микрообъектов. Метод электронной микроскопии, хотя и позволяет получать изображения микрообъектов с высоким разрешением, является “разрушающим”, требует специальной предварительной подготовки препарата для исследования и не позволяет исследовать нативные или живые микрообъекты. Поэтому задача получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов оптическими методами оставалась актуальной.

Решая задачу улучшения разрешения электронного микроскопа, Д. Габор предложил метод голографии. Хотя идея Д. Габора в явном виде в микроскопии не реализована, изобретение голографии как метода записи и восстановления амплитуды и фазы световой волны привело к появлению голографических аналогов классических методов микроскопии. Предложенные голографические методы фазового и интерференционного контраста позволили применить методы интерферометрии в микроскопии для качественного и количественного исследования фазовых биологических и технических микрообъектов [2]. Развитие компьютеров и методов цифровой обработки изображений подняло световую микроскопию на качественно новый уровень. Проблема трехмерной визуализации фазовых микрообъектов была решена путем сочетания голографических методов с методами компьютерной обработки изображений. Первый цифровой голографический интерференционный микроскоп (ЦГИМ), позволяющий в реальном времени получать трехмерные изображения фазовых микрообъектов и измерять их геометрические параметры, использовался для исследования трехмерной морфологии эритроцитов крови и тонких пленок [3–10].

Среди фазовых микрообъектов особую группу составляют микрообъекты, которые обладают свойством анизотропии и изменяют состояние поляризации проходящего через них излучения. Для изучения таких микрообъектов в оптической микроскопии применяют метод поляризационного контраста, который позволяет получать изображения микрообъектов с более высоким качеством и разрешением, которое не достигается в методе фазового и интерференционного контраста. В данной работе мы впервые исследуем возможность применения метода поляризационного контраста в сочетании с голографическим методом интерференционного контраста для получения трехмерных изображений анизотропных микрообъектов и измерения их геометрических характеристик.

Методы поляризационного и интерференционного контраста

Анизотропные микрообъекты, к которым принадлежит большинство твердых веществ (например, кристаллы, мягкие ткани и т. д.), имеют различные оптические и механические

свойства в различных направлениях, потому анизотропные материалы изменяют состояние поляризации света, проходящего через них. Это позволяет визуализировать такие фазовые микрообъекты благодаря их оптической анизотропии, используя метод поляризационного контраста. Для реализации метода поляризационного контраста в классической микроскопии оптический микроскоп должен быть оснащен двумя поляризаторами. Первый поляризатор располагается на пути света где-то до исследуемого препарата, второй поляризатор (который называется анализатором) расположен после объектива микроскопа перед камерой наблюдения.

Контраст изображения возникает при взаимодействии линейно поляризованного света, выходящего из поляризатора, с оптически анизотропным микрообъектом.

Две волны с взаимно ортогональными поляризациями, распространяющиеся в анизотропном кристалле, приобретают разность фаз $\Delta\varphi$ вследствие разности их показателей преломления. Кроме того, эта разность фаз зависит также от толщины кристалла и может быть определена как

$$\Delta\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n_{oe} t(x, y), \quad (1)$$

где $t(x, y)$ – толщина кристалла, λ – длина волны используемого излучения, Δn_{oe} – разность показателей преломления обыкновенной и необыкновенной волн, распространяющихся в анизотропном кристалле.

Обыкновенная и необыкновенная волны не могут интерферировать, так как имеют ортогональные поляризации. После прохождения через анализатор волны приобретают одинаковые поляризации и интерферируют, что делает кристалл видимым за счет интерференции.

Распределение интенсивности в картине интерференции $I(x, y)$ модулируется разностью фаз $\Delta\varphi$ и, следовательно, толщиной кристалла $t(x, y)$ и определяется как

$$\begin{aligned} I(x, y) &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\Delta\varphi = \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[(2\pi/\lambda)\Delta n_{oe} t(x, y)], \end{aligned} \quad (2)$$

где I_1 и I_2 – интенсивности взаимодействующих волн, прошедших через анализатор.

Таким образом, измерение распределения интенсивности $I(x, y)$ в изображении анизотропного микрообъекта, полученного методом поляризационного контраста, позволяет опре-

делить толщину микрообъекта в каждой точке и построить его трехмерное изображение при компьютерной обработке результатов. Это возможно для микрообъектов, которые вносят разность фаз до 2π , так как принципиальным недостатком метода поляризационного контраста является неоднозначность определения действительных характеристик микрообъекта, которая обусловлена периодичностью косинуса в формуле (2). Иными словами, метод поляризационного контраста не позволяет определить реальную толщину микрообъекта в точках, где вносимая разность фаз превосходит 2π . Кроме того, для проведения количественных измерений характеристик микрообъекта должны быть известны значения таких величин, как интенсивность падающего на микрообъект излучения, двулучепреломление, ориентация оптической оси кристалла. Поэтому компьютерная обработка изображения, полученного методом поляризационного контраста, может лишь качественно определить форму изучаемого анизотропного микрообъекта.

Однако применение метода поляризационного контраста для трехмерной визуализации анизотропных микрообъектов оптическими методами имеет ряд преимуществ. В ряде случаев исследуемый микрообъект находится в некой среде и среди иных микрообъектов, которые также визуализируются при исследовании методами фазового или интерференционного контраста. Метод поляризационного контраста позволяет устранить фон и наблюдать яркое изображение микрообъекта на темном фоне, а также устранить изображения всех иных микрообъектов, которые обычно присутствуют в изучаемом препарате и играют роль шума (если они не изменяют состояние поляризации проходящего через них излучения). Все это повышает качество изображений, полученных методом поляризационного контраста, повышает чувствительность и разрешение метода по сравнению с методами фазового и интерференционного контраста. Таким образом, метод поляризационного контраста позволяет получать информацию о структуре микрообъектов, которая не может быть получена при использовании иных методов световой микроскопии.

Дополнение метода поляризационного контраста методом интерференционного контраста позволяет устранить неоднозначность определения толщины анизотропного микрообъекта и получить не только качественную информацию о его форме, но и измерить реальные

значения толщин микрообъектов в различных точках.

Как известно, интерферограмма фазового микрообъекта, полученная методом интерференционного контраста в полосах конечной ширины, позволяет определить реальную толщину микрообъекта в каждой точке и построить его трехмерное изображение при компьютерной обработке интерферограммы [3]:

$$t(x, y) = \lambda h(x', y') / T \Delta n. \quad (3)$$

Здесь $h(x', y')$ – отклонение интерференционной полосы в соответствующей точке интерферограммы, T – период системы интерференционных полос, λ – длина волны используемого излучения, Δn – разность показателей преломления микрообъекта и окружающей среды (воздуха).

Из проведенного теоретического рассмотрения следует, что сочетание метода поляризационного контраста и метода интерференционного контраста открывает новые возможности в исследовании анизотропных микрообъектов. Метод поляризационного контраста, обладающий высокой чувствительностью и высоким разрешением, дополняется возможностью проведения количественных измерений.

В данной работе анизотропные микрообъекты исследовались с помощью ЦГИМ, который позволяет реализовать в одном устройстве все голографические методы исследования фазовых микрообъектов: методы фазового, интерференционного и поляризационного контраста.

Исследование анизотропных микрообъектов с помощью ЦГИМ

Оптическая схема ЦГИМ представлена на рис. 1. При использовании ЦГИМ может быть реализован классический метод поляризационного контраста с использованием лазерного излучения и голографический метод поляризационного контраста. В голографическом методе поляризационного контраста при регистрации голограммы анизотропного микрообъекта роль анализатора выполняет поляризация опорного пучка [11, 12]. Если объектный пучок (проходящий через поляризатор 8 и микрообъектив 11) и опорный пучок (проходящий через поляризатор 6 и коллиматор 9) при регистрации голограммы 12 имеют ортогональные поляризации, то на голограмме регистрируется контрастное изображение анизотропного микрообъекта, которое можно рассматривать в оку-

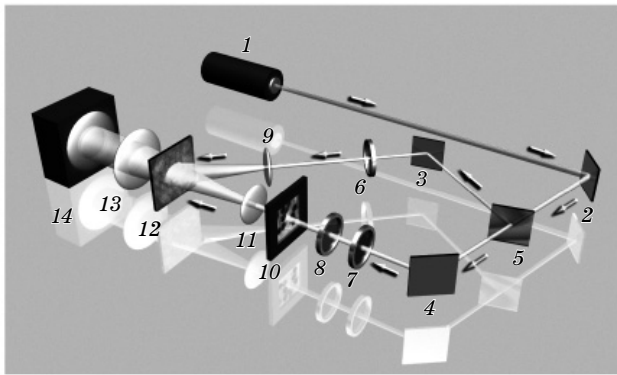


Рис. 1. Оптическая схема цифрового голографического интерференционного микроскопа. 1 – лазер, 2, 3, 4 – зеркала, 5 – полупрозрачное зеркало, 6, 7, 8 – поляризаторы; 9 – коллиматор, 10 – исследуемый образец, 11 – объектив микроскопа, 12 – голограмма, 13 – окуляр микроскопа, 14 – блок регистрации изображений (цифровая камера).

ляр 13 и регистрировать с помощью цифровой камеры 14. Расположение голограммы между объективом и окуляром микроскопа позволяет проводить дополнительную фокусировку по глубине зарегистрированной сцены и по полю зрения.

При реализации метода интерференционного контраста ЦГИМ работает в режиме голографического интерферометра. В схеме используется голограмма 12, на которой с помощью опорного пучка зарегистрирована “пустая” объектная волна, прошедшая через микрообъектив 11 при отсутствии микрообъекта. Эта голограмма играет роль оптического элемента ЦГИМ. Интерферограмма микрообъекта возникает в результате интерференции двух идентичных объектных волн, прошедших по одному пути, но в разные моменты времени. Это реальная объектная волна, прошедшая через исследуемый микрообъект 10 и микрообъектив 11, и “пустая” объектная волна, восстановленная с помощью голограммы 12 при использовании опорного пучка. Между волнами задается малый угол, который определяет период системы фоновых интерференционных полос. Интерферограммы микрообъектов регистрируются при одинаковых поляризациях объектного и опорного пучков, которые задаются поляризаторами 8 и 6. Вращением поляризатора 7 можно плавно регулировать интенсивность объектной волны для получения максимального контраста интерферограмм.

В качестве источника излучения в ЦГИМ использовался He–Ne-лазер с длиной волны излучения $\lambda = 0,63$ мкм. В схеме микроскопа использовались микрообъектив $40\times 0,65$ и окуляр $10\times$. Интерферограммы и поляризационно-контрастные изображения регистрировались с помощью цифровой камеры и передавались в компьютер, где применялись специальные математические алгоритмы обработки результатов для получения трехмерных изображений изучаемых микрообъектов.

Алгоритм для компьютерного восстановления трехмерного изображения анизотропного микрообъекта по его голографическому изображению, полученному методом поляризационного контраста, рассматривает массив значений интенсивности на изображении как массив значений третьей координаты (толщины) в соответствии с формулой (2). Алгоритм для компьютерного восстановления трехмерного изображения микрообъекта по его интерферограмме, полученной методом голографического интерференционного контраста, рассматривает массив значений отклонений интерференционных полос на его интерферограмме как массив значений третьей координаты (толщины) в соответствии с формулой (3).

В качестве объекта исследования использовался микрокристалл, который был получен кристаллизацией из водного раствора каменной соли на стеклянной подложке.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены поляризационно-контрастное изображение микрокристалла, восстановленное по голограмме, полученной методом голографического поляризационного контраста (а), и интерферограмма этого микрокристалла, полученная методом голографической интерферометрии в полосах конечной ширины (б). Размер микрокристалла по диагонали около 10 мкм.

На рис. 3 представлены трехмерные изображения микрокристалла, восстановленные по голографическому поляризационно-контрастному изображению (а) и по интерферограмме микрокристалла (б).

Исзуемые микрообъекты обычно находятся на стеклянной подложке в окружении или на фоне других микроскопических объектов (нерегулярности и дефекты подложки, пыль, царапины и т. п.), размеры которых сравнимы с размерами микрообъектов. Дифракция коге-

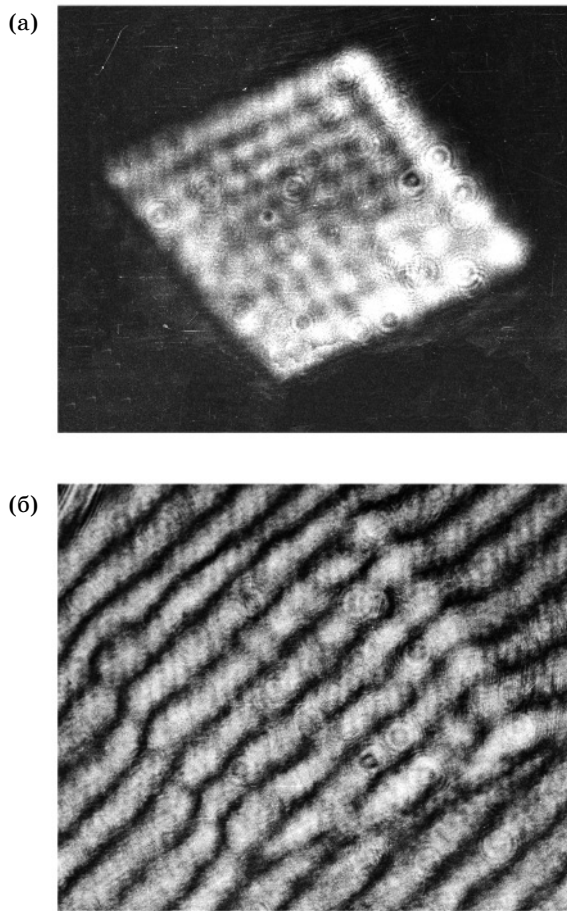


Рис. 2. Поляризационно-контрастное изображение микрокристалла (а) и интерферограмма микрокристалла (б). Размер микрокристалла по диагонали около 10 мкм.

рентного излучения на таких шумовых микрообъектах приводит к появлению когерентного шума, который ухудшает качество изображений и интерферограмм фазовых микрообъектов. Чем меньше исследуемый микрообъект, тем более существенной помехой является когерентный шум. Проблема не может быть решена при использовании методов фазового и интерференционного контраста, так как шумовые микрообъекты также визуализируются. Как правило, шумовые микрообъекты не изменяют состояние поляризации прошедшего через них излучения, что позволяет произвести поляризационную фильтрацию шумовых микрообъектов и получить изображения исследуемого анизотропного микрообъекта с максимальным контрастом и высоким разрешением. Так, на поляризационно-контрастном изображении микрокристалла (рис. 2а) четко различаются элементы структуры, размеры

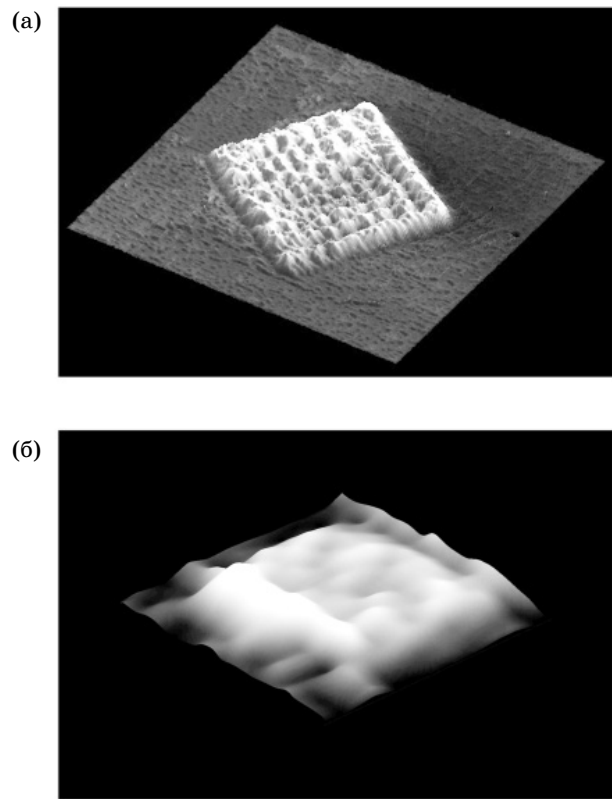


Рис. 3. Трехмерные изображения микрокристалла; восстановленные по голографическому поляризационно-контрастному изображению микрокристалла (а) и по интерферограмме микрокристалла (б).

которых порядка длины волны используемого излучения. На трехмерном изображении микрокристалла (рис. 3а) видна четкая ячеистая структура. Трехмерное изображение микрокристалла, полученное по его поляризационно-контрастному изображению, дает наглядное представление о форме микрокристалла.

На трехмерном изображении, восстановленном по интерферограмме микрокристалла, элементы ячеистой структуры не разрешаются (рис. 3б). Хотя голографический метод интерференционного контраста не позволяет выявить ячеистую структуру микрокристалла по его интерферограмме, его применение позволяет оценить реальную толщину исследуемого микрокристалла. Минимальная толщина кристалла составляет около 0,2 мкм, а максимальная – около 0,75 мкм.

Выводы

Теоретический анализ и экспериментальные результаты показывают, что метод поля-

ризаационного контраста может эффективно использоваться для решения задачи трехмерной визуализации анизотропных микрообъектов. Метод поляризационного контраста позволяет получать изображения анизотропных микрообъектов с максимальным контрастом и высоким качеством за счет устранения фона и фильтрации всех шумовых микрообъектов. Это повышает чувствительность и разрешение метода по сравнению с методами фазового и интерференционного контраста. Таким обра-

зом, метод позволяет получить информацию о структуре микрообъекта, которую невозможно получить при использовании других методов световой микроскопии. Сочетание метода поляризационного контраста с методом интерференционного контраста открывает новые возможности в исследовании анизотропных микрообъектов, позволяя получить не только качественную информацию о форме микрообъекта, но и проводить количественные измерения.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Франсон М. Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы. М.: Госиздат физ.-мат. лит-ры, 1961. 250 с.
2. Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н. Голографические методы трехмерной визуализации фазовых микрообъектов // Оптический журнал. 2005. Т. 72. № 2. С. 48–55.
3. Новицкий В.Л., Рязанцева Н.В., Степовая А.Е., Шевцова Н. М., Миллер А.А., Зайцев Б.Н., Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н. Теория и практика микроскопии эритроцита. Томск: Печатная мануфактура, 2008. 148 с.
4. Тишко Д.Н., Тишко Т.В., Титарь В.П. Применение цифровой голографической интерференционной микроскопии для исследования тонких прозрачных пленок // Оптический журнал. 2009. Т. 76. № 3. С. 40–43.
5. Tishko T.V., Titar V.P., Tishko D.N., Nosov K.V. Digital holographic interference microscopy in the study of 3D morphology and functionality of human blood erythrocytes // Laser Physics. 2008. V. 18. № 4. P. 1–5.
6. Tishko T.V., Tishko D.N., Titar V.P. Holographic method for blood cells imaging // Imaging and Microscopy. 2009. № 3. P.46–49.
7. Tishko D.N., Tishko T.V., Titar V.P. Application of the digital holographic interference microscopy for thin transparent films investigation // Prakt. Metallogr. 2010. V.47. № 12. P. 719–731.
8. Tishko T.V., Tishko D.N., Titar V.P. 3D morphology of phase microscopic objects by the digital holographic interference microscopy method // Geomorphology and Plate Tectonics / Ed. by Ferrari D.M. and Guiseppi A.R. N.Y.: Nova Publishers, 2009. P. 345–357.
9. Tishko T.V., Tishko D.N., Titar V.P. 3D imaging of phase microscopic objects by digital holographic method // 3D Imaging: Theory, Technology and Application / Ed. by Duke E.H. and Aquirre S.R. N.Y.: Nova Publishers, 2010. P. 51–92.
10. Tishko T.V., Tishko D.N., Titar V.P. Holographic methods for phase micro-objects study // Microscopy: Science, Technology, Application and Education / Ed. by Mendez-Vilas A. and Alvarez J.D. Formatex research center, 2010. V. 3. P. 2117–2128.
11. Сафронов Г.С., Тишко Т.В., Гарагатая А.М. Поляризационная фильтрация в голографической микроскопии // Укр. физич. журнал. 1983. Т. 28. № 10. С. 1472–1475.
12. Сафронов Г.С., Тишко Т.В., Гарагатая А.М. Голографический поляризационный микроскоп // ПТЭ. 1984. № 1. С. 237.