

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Оптическая микроскопия в когерентном режиме формирования
изображения слоистых объектов**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4082 группы
направления (специальности) 12.03.04 Биотехнические системы и технологии

Института физики
Фацевского Арсения Павлович

Научный руководитель (руководитель)

Зав. кафедрой, Профессор, д. ф-
м. н.

должность, уч. степень, уч. звание

 15.06.2023

подпись, дата

В. В. Тучин

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

Зав. кафедрой, Профессор, д. ф-
м. н.

должность, уч. степень, уч. звание

 15.06.2023

подпись, дата

В. В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2023 год

Содержание

Введение	3
Основная часть	5
Микроскопия как способ измерения толщины биологических объектов	5
Метод определения толщины биологического объекта	6
Экспериментальные исследования слоистых биологических объектов	7
Заключение	10
Библиографический список	12

Введение

Измерение толщины тонких объектов является задачей для различных отраслей науки. К ним относится как промышленность, где данные методы используются в качестве контрольно-измерительных, так и биологии и медицине. Существует широкий спектр методов определения толщин, включая визуальные. Такие методы основаны на визуальном наблюдении цветов, которые появляются вследствие различных факторов. К ним относятся, например, механическое воздействие на тонкие прозрачные объекты. Также к подобным методам можно отнести оптические методы.

В медицине существует ряд задач, которые возможно решить с помощью оптических методов. Анализ морфологии эритроцитов с помощью оптических методов измерения толщины позволяет выявить степень анизацитоза эритроцитов, что используется в медицине для диагностики сердечно-сосудистых патологий [1].

Оптические методы – группа методов, основанная на исследовании параметров объектов с помощью оптических приборов. Мы выделили 3 основных класса методик: оптическая микроскопия, интерференционная микроскопия с опорной волной и интерференционная микроскопия без опорной волны. В настоящей работе будут рассмотрены данные методики в применении к измерению толщины биологических объектов. Будут рассмотрены преимущества и недостатки каждого из них и метод интерференционной микроскопии без опорной волны в частности. Он основан на наблюдении цветов, появившихся в ходе интерференции волн отражённых от границ слоистого объекта. Этот визуальный метод определения толщин слоистых объектов возможно улучшить, если визуальный способ, основанный на наблюдении цветов с помощью глаза перенести в цифровой вид. В таком случае датчиком изображения будет фотодатчик, а толщины объектов по изображениям будет определять программа.

Целью данного исследования является разработка метода определения толщин слоистых объектов по цветным интерференционным изображениям.

Задачами данного исследования являются:

- формулирование математической модели формирования цветного интерференционного изображения слоистого объекта;
- разработка алгоритмов и программ по определению толщин слоистых объектов;
- анализ метрологических возможностей метода;
- анализ достоинств и недостатков метода;
- анализ микроскопа как биотехнической системы, которая снабжена функциями данного метода.

Основная часть

Микроскопия как способ измерения толщины биологического объекта

Существуют различные методики измерения толщины биологического объекта: с помощью методов оптической микроскопии, с помощью методов интерференционной микроскопии с опорной и без опорной волны. Для каждой из методик существует ряд ограничений. При измерении толщины биологического объекта с помощью оптического микроскопа большое влияние оказывают два взаимосвязанных фактора: aberrации и минимальное значение разрешающей способности микрообъектива микроскопа [2, 3, 4]. При измерении толщины с помощью микроинтерферометра [5, 6], то есть с использованием методов интерференционной микроскопии с опорной волной, необходимо, чтобы существовала некоторая ступенька, на которой по изменению положения интерференционных полос можно измерить толщину объекта. К методикам определения толщины биологического объекта относятся цифровая голографическая микроскопия и динамическая рефрактометрия. Первая совмещает в себе принципы микроскопии и голографии, что позволяет проводить томографию микрообъектов и определять их оптическую толщину [5, 7, 8]. Второй используется для визуализации и измерения динамических систем, то есть систем, которые находятся в непрерывном движении. После формирования трек-диаграммы можно определить распределение оптической разности хода в каждой точке изображения во времени. В дальнейшем это может быть использовано для определения толщины биологических объектов микронных размеров [7, 9]. При измерении толщины с помощью интерференционных методов без опорной волны (рисунок 1) необходимо учитывать, что толщина рассматриваемого объекта не должна превышать половины длины временной когерентности света источника излучения [8].

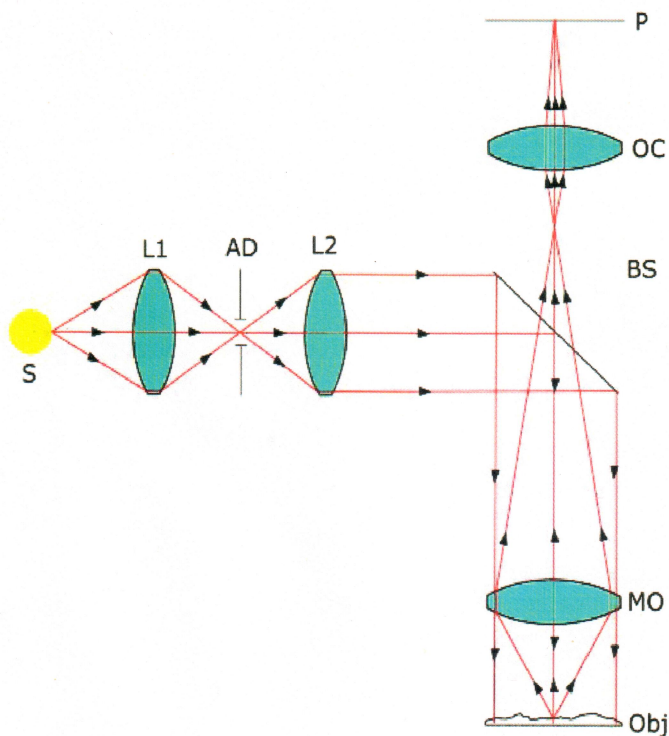


Рисунок 1 – оптический микроскоп в режиме на отражение. S – источник света, L1, L2 – линзы коллиматорной системы, AD – апертурная диафрагма, BS – делитель пучка, MO – микрообъектив, Obj – объект, OC – окуляр, P – плоскость изображения

Метод определения толщины биологического объекта

Была рассмотрена математическая модель [10, 11] формирования интерференционного изображения (1), которую использовали для создания компьютерной модели.

$$\begin{aligned}
 I(\rho) = & \sum_{i=1}^k R_1 g_i^2 \tau^2 f_{ch_i}^2 + \\
 & + \sum_{i=1}^k R_2 (1-R_1)^2 g_i^2 \tau^2 f_{ch_i}^2 + \\
 & + 2\text{Re} [\exp(j(\phi_1 - \phi_2)) \sum_{i=1}^k \sqrt{R_1 R_2} (1-R_1) \times \\
 & \times g_i^2 \tau^2 f_{ch_i}^2 \exp[j\omega \frac{\Delta(\rho)}{c}]],
 \end{aligned} \tag{1}$$

где k – количество элементов массива длин волн, f_{ch} – спектр пропускания одного из каналов RGB, g – спектр излучения источника света, τ – пропускание

всей оптической системы, R_1 , R_2 – коэффициенты отражения на границах воздух-объект и объект-подложка соответственно $\Delta(\rho)$ – оптическая толщина объекта в данной точке, c – скорость света, $\varphi_1 - \varphi_2$ – скачок фазы при отражении на границе объект-подложка.

Компьютерная модель необходима для получения зависимости интенсивности каналов RGB от толщины исследуемого объекта [12]. Полученная таблица зависимости значений интенсивности RGB каналов от толщины используется для определения толщины биологических объектов, которыми в настоящей работе являются эритроциты. На рисунке 2 изображена модель эритроцита на основе овалов Кассини [13].

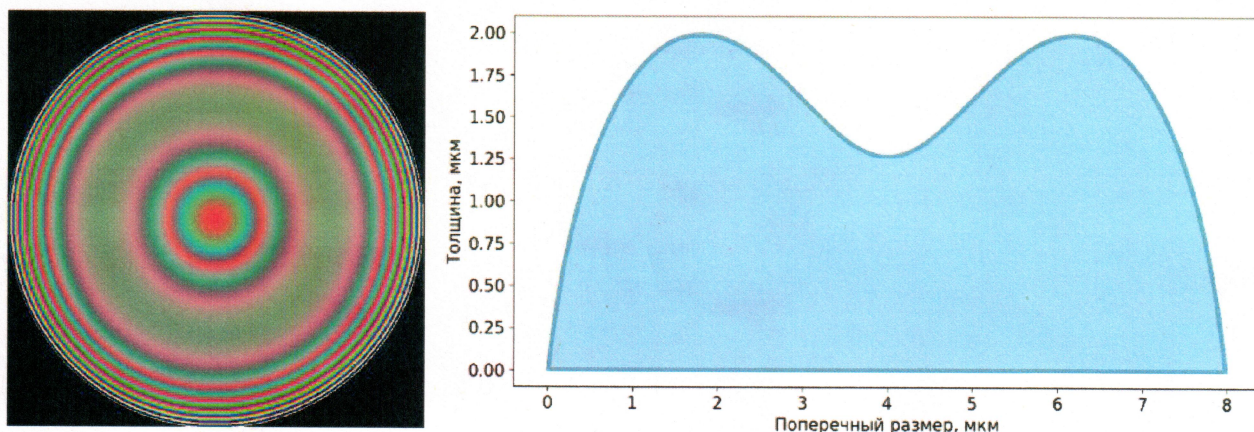


Рисунок 2 - Модель интерференционного изображения эритроцита.

Экспериментальные исследования слоистых биологических объектов

В качестве исследуемых объектов выступают высушенные эритроциты, находящиеся на высоко отражающей поверхности (рисунок 3)

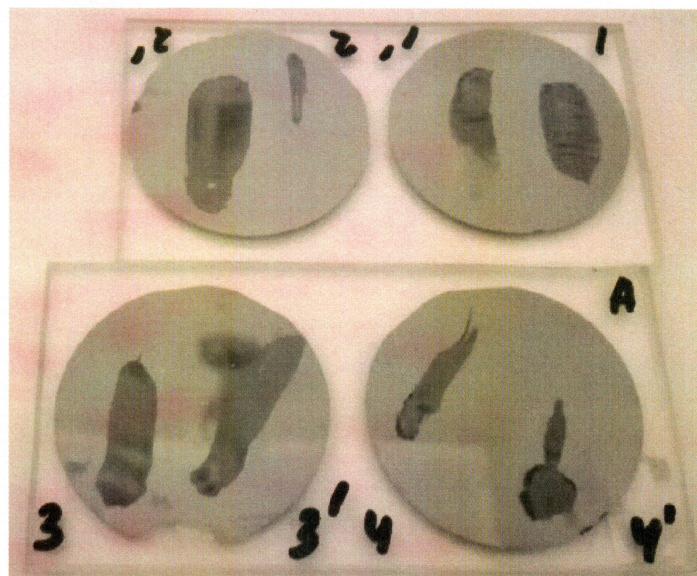


Рисунок 3 - Фотография мазков крови.

Была получена зависимость цветов, то есть значений каналов RGB, от оптической толщины объекта для компьютерной модели, которая была сделана с использованием реальных спектра излучения галогенной лампы и спектров пропускания фотодетектора. С помощью полученной зависимости значений каналов RGB от оптической толщины были рассчитаны оптические толщины реальных биологических объектов и получены следующие результаты для образцов на рисунке 4.

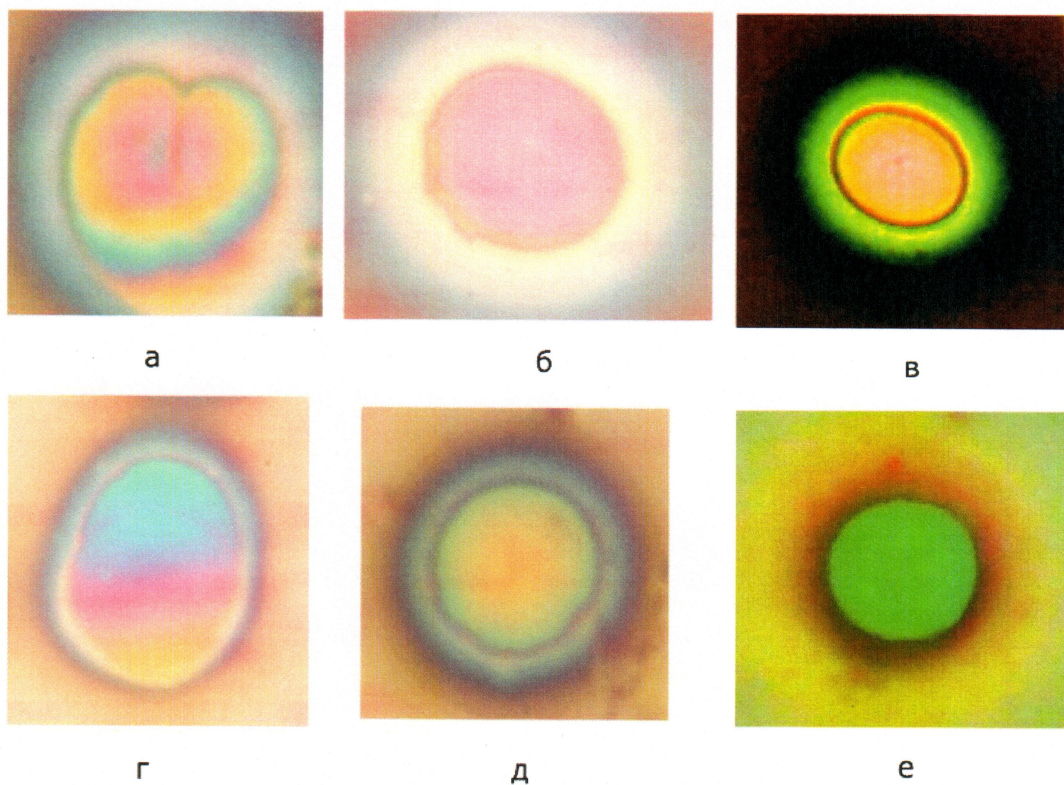


Рисунок 4 - Исследуемые эритроциты.

- 1) Средняя оптическая толщина составила $d_a \approx 300$ нм
- 2) Средняя оптическая толщина составила $d_b \approx 300$ нм
- 3) Средняя оптическая толщина составила $d_v \approx 250$ нм
- 4) Средняя оптическая толщина составила $d_r \approx 500$ нм
- 5) Средняя оптическая толщина составила $d_d \approx 600$ нм
- 6) Средняя оптическая толщина составила $d_e \approx 800$ нм

Были рассмотрены факторы, которые влияют на точность измерения оптической толщины рассматриваемым методом.

Заключение

Измерение толщин биологических объектов является актуальной задачей в медицине. Подобные измерения необходимы в первую очередь для диагностики сердечно-сосудистых патологий. Это возможно благодаря достаточно точному определению толщин эритроцитов, что позволяет диагностировать возможную патологию.

Существует широкий спектр методов определения толщин биологических объектов. В данной работе было выделено три основных группы таких методов: метод оптической микроскопии, метод интерференционной микроскопии с опорной волной и метод интерференционной микроскопии без опорной волны. Первый метод сильно зависит от двух факторов: аберраций и осевой разрешающей способности использованного микроскопа. При увеличении числовой апертуры ведёт к увеличению аберраций и улучшению осевого разрешения, вместе с тем уменьшение числовой апертуры ведёт к обратному. Второй метод нуждается в существовании ровной поверхности подложки без существенных дефектов, так как для определения толщины объекта необходимо, чтобы он представлял из себя ступеньку, то есть необходимо существование изменения высоты относительно подложки. Третий метод — низкокогерентный метод исследования толщины объекта, так как в качестве источника выступает полихроматический источник излучения для получения цветной интерференционной картины. Одно из главных ограничений данного метода связано с тем, что толщина рассматриваемого объекта не должна превышать половины длины временной когерентности падающего на объект света.

Методы визуального определения параметров сред по цветам в прозрачных средах широко используются в контрольно измерительных целях промышленных и производственных объектов и биологии. Для улучшения подобных методов решили перейти к их цифровизации и использованию компьютеров. В связи с желанием автоматизировать процесс определения

толщины биологических объектов было решено разработать метод моделирования цветного интерференционного изображения объекта, чтобы в дальнейшем использовать полученную модель для определения толщин реальных биологических объектов. Первым этапом было формулирование математической модели цветной интерференционной картины объекта. На основе математической модели была разработана программа для создания компьютерной модели цветного интерференционного изображения. Она необходима для создания таблицы зависимости между оптической толщиной объекта и цветов, которые представлены в виде каналов RGB. Полученная зависимость цветов изображения от высоты использовалась во второй программе, которая по цветам полученных в ходе эксперимента изображений определяла толщину объекта.

В ходе эксперимента были использованы спектр излучения галогенной лампы и спектры пропускания каналов RGB фотокамеры 1/2-Inch 3-Megapixel CMOS Digital Image Sensor для получения модели цветового интерференционного изображения линейного клина. Полученная зависимость цветов изображения от оптической толщины объекта использовалась для определения толщин эритроцитов, находящихся на высокоотражающей поверхности. В ходе эксперимента были выявлены факторы, влияющие на точность измерения толщин эритроцитов.

Следующим шагом по развитию данного метода является улучшение точности определения толщин объектов. Так, следует выявить порядок необходимых действий для повторяемости эксперимента и унифицировать сбор данных. Необходимо решить проблему конвертации значений интенсивности каналов для красного, зелёного и синего частей спектра в цветовые координаты RGB. Также необходимо сформулировать математическую модель, которая учитывала бы влияние углового спектра освещающего поля [14].

Библиографический список

1. Дьяченко А. А. Метод интерференции белого света в тонких плёнках для анализа морфологии эритроцитов //Известия вузов. Физика. – 2015. – Т. 58. – №. 11/3. – С. 116-119.
2. Lawlor D. Introduction to light microscopy: tips and tricks for beginners. – Springer, 2019 — С — 171.
3. Ландсберг Г. С. Оптика: Учеб. пособие для вузов.–6-е изд //М.: Физматлит. – 2003 — С — 848.
4. Davidson M. W., Abramowitz M. Optical microscopy //Encyclopedia of imaging science and technology. – 2002. – Т. 2. – №. 1106-1141. – С. 120.
5. Ferraro P., Wax A., Zalevsky Z. (ed.). Coherent light microscopy: Imaging and quantitative phase analysis. – Springer Science & Business Media, 2011. – Т. 46.
6. Gale D. M., Pether M. I., Dainty J. C. Linnik microscope imaging of integrated circuit structures //Applied optics. – 1996. – Т. 35. – №. 1. – С. 131-148.
7. Park Y. K., Depeursinge C., Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine //Nature photonics. – 2018. – Т. 12. – №. 10. – С. 578-589.
8. de Groot P. Principles of interference microscopy for the measurement of surface topography //Advances in Optics and Photonics. – 2015. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-65.
9. Хунговна Д. Т. Л., Семин П. А., Кретушев А. В. Динамическая рефрактометрия живых клеток //Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2023. – №. 4-1 (79). – С. 83-87.
10. Дьяченко А. А., Рябухо В. П. Определение оптических толщин слоистых объектов по интерференционным цветам изображений в микроскопии белого света //Компьютерная оптика. – 2017. – Т. 41. – №. 5. – С. 670-679.
11. Борн М., Вольф Э. Основы оптики/М //Борн, Э. Вольф–М.: Наука. – 1973. – С — 719.

12. Лычагов В. В. Низкокогерентная интерферометрия слоистых структур в полихроматическом свете с цифровой записью и обработкой интерферограмм //Компьютерная оптика. – 2010. – Т. 34. – №. 4. – С. 511-524.
13. Angelov B., Mladenov I. M. On the geometry of red blood cell //Proceedings of the International Conference on Geometry, Integrability and Quantization. – Bulgarian Academy of Sciences, Institute for Nuclear Research and Nuclear Energy, 2000. – Т. 1. – С. 27-47.
14. Дьяченко А. А., Максимова Л. А., Рябухо В. П. Проявление эффектов углового спектра освещающего поля в полихроматической интерференционной микроскопии слоистых объектов //Компьютерная оптика. – 2018. – Т. 42. – №. 6. – С. 959-969.

 15.06.2023