

В исследованиях [5] также использована оптическая схема на базе интерферометра Майкельсона, которая работает с лазерным излучением сверхширокого спектра. На фазовых изображениях, реконструируемых методом Фурье, уровень пространственных шумов составляет 0,6 нм, временных 0,5 нм.

Выводы. Получена оценка уровня шумов при работе установки с тремя различными источниками излучения. Минимальный уровень достигнут в низкокогерентном излучении точечного светодиода: 1,2 нм для пространственных шумов, 0,5 нм для временных. Физический смысл данных параметров заключается в предельной чувствительности к изменению оптической разности хода как в пределах одного изображения, так и между изображениями в серии. Из приведенных результатов можно сделать вывод, что для получения фазовых изображений биологических объектов с малым уровнем шумов предпочтительно использовать источники низкокогерентного излучения. При работе в высококогерентном лазерном свете возникает спекл-структура, которая препятствует высокой детализации исследуемых объектов.

Потенциально можно еще снизить шумы, возникающие из-за недостаточной жесткости конструкции интерферометра, нестабильности источника напряжения светодиода, тепловых шумов ПЗС-матрицы и отсутствия обратной связи

пьезодвигателя, необходимой для четкого выставления фазовых шагов при многократно повторяющихся измерениях.

Л и т е р а т у р а:

1. Вишняков Г. Н., Левин Г. Г., Минаев В. Л., Цельмина И. Ю. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Экспериментальные результаты // Оптика и спектроскопия. 2014. Т. 116. № 1. С. 170—175.
2. Левин Г. Г., Вишняков Г. Н., Минаев В. Л. Автоматизированный интерференционный микроскоп для измерения динамических объектов // Приборы и техника эксперимента. 2014. № 1. С. 79—84.
3. Vishnyakov G., Levin G., Minaev V., Nekrasov N. Advanced method of phase shift measurement from variances of interferogram differences // Appl. Opt. 2015. V. 54. N. 15. P. 4797—4804.
4. Nguyen T. H., Popescu G. Spatial Light Interference Microscopy (SLIM) using twisted-nematic liquid-crystal modulation // Biomed. Opt. Express. 2013. V. 4. N. 9. P. 1571—1583.
5. Girshovitz P., Shaked N. T. Compact and portable low-coherence interferometer with off-axis geometry for quantitative phase microscopy and nanoscopy // Opt. Express. 2013. V. 21. N. 5. P. 5701—5714.

Дата принятия 27.07.2015 г.

681.723.26

Сдвиговой интерференционный микроскоп с расшифровкой дифференциальных фазовых изображений живых клеток методом фазовых шагов

М. И. ЛАТУШКО, Г. Н. ВИШНЯКОВ, Г. Г. ЛЕВИН

Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: latushko@vniiofi.ru

Предложена схема низкокогерентного интерференционного микроскопа, построенного на базе сдвигового интерферометра общего пути, для получения дифференциальных фазовых изображений биологических объектов. При реконструкции таких изображений использован метод фазовых шагов. Приведены результаты экспериментальных исследований эритроцитов крови человека.

Ключевые слова: метод фазовых шагов, сдвиговой интерферометр, интерференционный микроскоп, низкокогерентное излучение, живые клетки.

An optical circuit of low-coherent interference microscope based on a common path shearing interferometer for acquiring the differential phase images of biological objects is proposed. A phase steps method is used for reconstruction of differential phase image of an object. The results of human erythrocyte experimental study are presented.

Key words: phase steps method, shearing interferometer, interference microscope, low-coherence radiation, living cells.

Среди современных методов исследований биологических микрообъектов особое место занимают те, которые позволяют работать с живыми клетками без повреждения пос-

ледних. Большинство биологических объектов слабо поглощают проходящее через них излучение, поскольку являются прозрачными, т. е. фазовыми объектами. Ввиду незначитель-

ного поглощения клетки остаются невидимыми, если не применять окрашивание, которое приводит к изменениям в самой клетке.

Существуют неинвазивные методы, позволяющие представить изменение фазы зондирующего излучения в виде изображения, в каждой точке которого результирующая яркость зависит от оптической разности хода (ОРХ) двух интерферирующих световых пучков. Среди таких методов наиболее популярными в практике лабораторных биологических исследований стали фазовый контраст Цернике и микроскопия дифференциального интерференционного контраста [1].

Несмотря на линейность метода фазового контраста Цернике, ореол, возникающий по периметру фазового изображения объекта, затрудняет анализ его границ. Метод дифференциального интерференционного контраста лишен подобного недостатка и отличается высокой чувствительностью к малым изменениям ОРХ. Даже в сравнении с классической микроскопией светлого поля дифференциально-интерференционный контраст позволяет лучше визуализировать области с амплитудным поглощением [2]. Однако этот метод нелинейный, поскольку информация о разности фаз является аргументом функции косинуса в интерференционном уравнении [3]. Очевидно, что извлечение количественной информации о фазе прошедшего излучения позволит вычислить ряд различных параметров клетки, но без каких-либо модификаций во всех перечисленных выше методах отсутствует возможность получения подобных данных.

В классической конструкции дифференциального интерференционного микроскопа поперечный сдвиг осуществляют с помощью призм Волластона или Номарского [3], установленных до и после образца. Первая призма разделяет входящий световой пучок на два идентичных — ортогонально-поляризованных и поперечно сдвинутых. Оба пучка проходят через исследуемый образец и совмещаются посредством второй призмы. Дополнительные поляризационные элементы служат для получения интерференционной картины, являющейся псевдотрехмерным рельефом биологической клетки, проявляющимся как чередование ярких и темных областей. Яркие области соответствуют увеличению ОРХ интерферирующих пучков, а темные — ее уменьшению. Другими словами, изображение не является истинно фазовым, а визуализирует градиент ОРХ в направлении сдвига световых пучков.

Управляя дополнительным фазовым сдвигом, можно изменять характер получаемых изображений, по набору которых в дальнейшем восстанавливается информация о фазе объекта [1]. В данном случае фазовый сдвиг вносится поперечным смещением призмы Волластона или добавлением в схему микроскопа четвертьволновой пластинки с последующим вращением поляризатора [2], что, в свою очередь, предполагает контроль угла поворота.

Существуют также иные методы получения производной ОРХ, основанные на интерферометрии поперечного сдвига с последующим восстановлением информации о фазе объекта. В [4] предложена оптическая схема сдвигового интерферометра Майкельсона для регистрации двух сдвиговых интерферограмм в ортогональных направлениях. В обоих плечах интерферометра установлены две пары оптических клиньев, каждая из них скреплена жидкой иммерсией с показателем преломления, идентичным показателю пре-

ломления материала клиньев. Таким образом, получается клин с двумя рабочими гранями, в котором одна половина неподвижна, а вторая может вращаться, позволяя выбирать направление сдвига, и перемещаться в диаметральном направлении, внося дополнительную ОРХ между интерферирующими пучками с целью восстановления фазы объекта. Для поочередной регистрации интерферограмм с различными направлениями сдвига установлены затворы. Интерферометр может работать только в лазерном свете с большой длиной когерентности, что вызывает высокий уровень шумов.

Авторами [5] предложена схема одновременной регистрации трех интерферограмм с различными фазовыми сдвигами. Основные элементы схемы — две параллельные дифракционные решетки и оптический клин. На входе лазерный световой пучок дифрагирует на паре решеток таким образом, что из 0-го и ± 1 -го порядков дифракции формируются три параллельных пучка, которые попадают на клин. Поскольку клин имеет переменную толщину, то оптическую длину пути, которую проходит преломленный пучок до отражения от дальней грани клина, определяют начальной точкой падения. Пучки до падения на клин пространственно разделены, поэтому возникают интерферограммы с различными фазовыми сдвигами, которые одновременно регистрируют и обрабатывают по трехшаговому алгоритму для восстановления фазового изображения. Существенный недостаток такой схемы — необходимость установки большой матрицы для одновременной регистрации всех интерферограмм, поскольку расстояние между ними составляет 20 мм [5].

Схема четырехволнового сдвигового интерферометра, описанная в [6], исключает какие-либо подвижные компоненты. За основу взят микроскоп светлого поля, работающий в проходящем излучении галогеновой лампы. На выходной порт микроскопа перед ПЗС-камерой устанавливают модифицированную маску Хартмана, состоящую из амплитудной и фазовой дифракционных решеток. С ее помощью входящий пучок делят на две пары, одновременно формирующие сдвиговые интерферограммы в ортогональных направлениях. Несмотря на возможность восстановления фазы объекта по единственному изображению, в методе применяется сложная математическая обработка полученных результатов.

В настоящей статье описана предложенная авторами оригинальная схема оптического интерференционного микроскопа поперечного сдвига для исследования живых клеток, работающего по схеме общего пути в низкокогерентном излучении светодиода. Применение светодиода обеспечивает низкий уровень шумов в отличие от схем с лазерным источником излучения. Основой микроскопа является интерферометр поперечного сдвига, конструктивно выполненный в виде светоделительной бипризмы Дове и зеркала, угол наклона которого определяет поперечный сдвиг между интерферирующими пучками. Вследствие малой длины когерентности излучения светодиода интерферометр может работать на бесконечно широкой полосе.

Для восстановления производной фазового изображения в направлении сдвига при помощи ПЗС-матрицы регистрируют набор сдвиговых интерферограмм. Для внесения дополнительной ОРХ между интерферирующими пучками бипризму Дове перемещают на линейном моторизованном

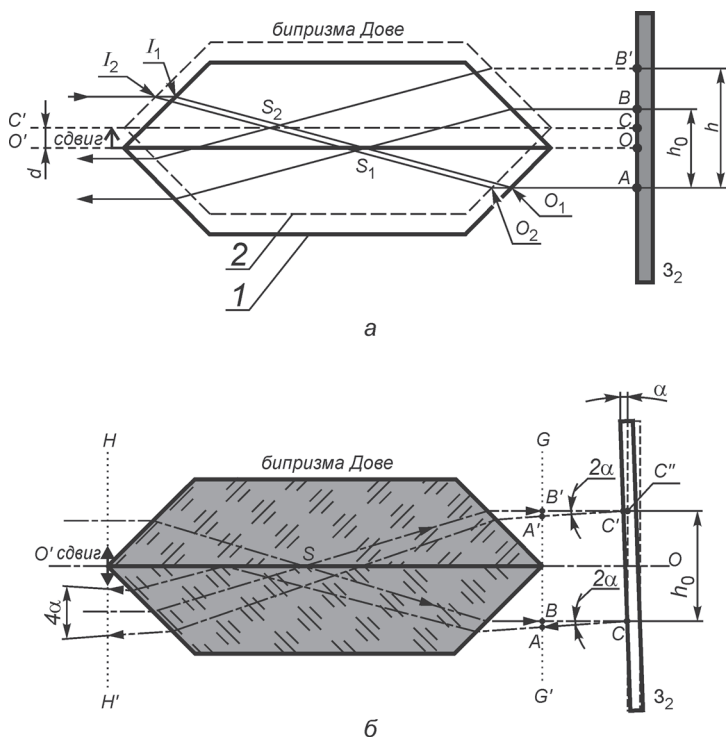
L_1 — L_5 — линзы; Z_1 — Z_4 — зеркала; O_1 , O_2 — объективы; D — диафрагма; $ИО$ — исследуемый образец; $ПИ$ — промежуточное изображение; $ЛТ$ — линейный транслятор; $БД$ — бипризма Дове; $ВН$ — винт наклона; $ПЗС$ — приемник излучения на основе приборов с зарядовой связью; $ПК$ — персональный компьютер

Экспериментальная установка. Схема установки приведена на рис. 1. В качестве осветителя использован светодиод LED (Thorlabs M530D1, 530нм, Германия), излучение ко-

Рассмотрим подробнее как возникает дополнительная ОРХ. Пусть начальному положению светоделителя соответствует позиция 1 (см. рис. 2, а), когда световой пучок входит в призму в точке I_1 . В точке S_1 он разделится на два, распространяющиеся далее по путям $S_1 - O_1 - A$ и $S_1 - B$. Расстояние между осями пучков в точках падения на зеркало в начальном положении обозначим h_0 . После смещения светоделителя на известную величину d в положение 2, световой пучок будет входить в бипризму в точке I_2 . На границе двух призм в точке S_2 он также разделится на два пучка, пути распространения которых отмечены как $S_2 - B'$, $S_2 - O_2 - A$. Расстояние между осями пучков в точках падения на зеркало после смещения бипризмы обозначим h . Для обоих положений бипризмы световой пучок, распространяющийся по путям $I_1 - S_1 - O_1 - A$ до смещения и $I_2 - S_2 - O_2 - A$ после смещения, приходит в одну и ту же точку A зеркала, потому что для данного пучка бипризма работает как плоскопараллельная пластина, которая лишь сдвигает оптическую ось в поперечном направлении. Световой пучок, отраженный от светоделительной грани бипризмы до и после ее смещения, приходит в разные точки зеркала Z_2 : в положении 1 в точку B и в положении 2 в точку B' ; причем расстояние между лучами

$$h(d) = AB' = 2AC = 2(AO + OC), \quad (1)$$

где d — поперечный сдвиг бипризмы; AB' — расстояние между лучами на зеркале в положении 2; AC — расстояние между оптической осью и лучом на зеркале; OC — поперечный сдвиг бипризмы. Учитывая, что расстояние между оптической осью и точкой A в положении 1 будет $AO = h_0/2$ и $OC = d$, перепишем (1) как $h(d) = h_0 + 2d$. Поскольку искомой является зависимость относительного изменения расстояния между



Измерительная техника № 11, 2015

ду осями световых пучков от поперечного смещения бипризмы, окончательно получим

$$\Delta h(d) = h(d) - h_0 = 2d, \quad (2)$$

отсюда следует, что при смещении бипризмы на величину d расстояние между осями световых пучков Δh изменится в два раза.

Как было сказано выше, ОРХ $\Delta_{\text{ОРХ}}$ между интерферирующими пучками возникает только при наклоне зеркала Z_2 на малый угол α , что следует из геометрических соображений. Обозначим ось симметрии светоделителя как OO' , а входную и выходную плоскости HH' , GG' . Плоскость, в которой лежит ось OO' , является светоделительной гранью. Световой пучок делится на два идентичных в точке S . Ввиду симметрии оптические пути лучей от точки S до выходной плоскости GG' равны.

Если зеркало Z_2 наклонено на некоторый угол α , то на участке $GG' - Z_2 - GG'$ у световых пучков возникнет

$$\Delta_{\text{ОРХ}} = (BC + CA) - (B'C' + C'A'). \quad (3)$$

Преобразуем (3):

$$\Delta_{\text{ОРХ}} = (CA - C'A') + (BC - B'C') = (CA - C'A') + C'C'',$$

где $CA = BC/\cos(2\alpha)$, $C'A' = (BC - C'C'')/\cos(2\alpha)$, $C'C'' = h_0 \tan \alpha$. Для неподвижной призмы

$$\Delta_{\text{ОРХ}}(\alpha) = h_0 k(\alpha), \quad (4)$$

где $k(\alpha) = 2 \tan \alpha / (1 - \tan^2 \alpha)$.

В общем случае h_0 неизвестно, подставляя (2) в (4), получаем зависимость ОРХ от смещения бипризмы и угла наклона зеркала Z_2 : $\Delta_{\text{ОРХ}}(d, \alpha) = 2d k(\alpha)$. Перейдем от разности хода к разности фаз интерферирующих пучков $\Delta\varphi(d, \alpha) = 2\pi \Delta_{\text{ОРХ}}(d, \alpha)/\lambda$, где λ — длина волны излучения.

При $\alpha \neq 0$ при обратном ходе лучей на участке от плоскости GG' до плоскости HH' возникает постоянная разность фаз $\Delta\varphi_0(\alpha)$, зависящая только от угла α наклона зеркала, поскольку оптические пути обоих световых пучков не равны, но в то же время остаются постоянными величинами, не зависящими от смещения светоделителя. Последнее обстоятельство позволяет пренебречь данной величиной.

Распределение интенсивности в плоскости ПЗС-камеры для идентичных интерферирующих пучков описывают уравнением

$$I(x, y) = I_0(1 + \cos[\Delta\varphi(d, \alpha) + \Delta\varphi_0(\alpha)]),$$

где $I_0 = 2(E(x, y))^2$ — интенсивность излучения.

При $\alpha = 0$ оптические пути обоих пучков полностью совпадают в пространстве и смещение бипризмы не приведет к изменению интерференционной картины.

Результаты измерений. Объект исследований — эритроциты крови человека. Препарат помещали в раствор хлорида натрия между двух покровных стекол, расположенных между микрообъективами O_1 , O_2 (см. рис. 1). Далее последовательно регистрировали набор сдвиговых интерферограмм. На каждом следующем шаге между интерферирующими пучками вносили дополнительный фазовый сдвиг, равный $\pi/2$. Полученные сдвиговые интерферограммы

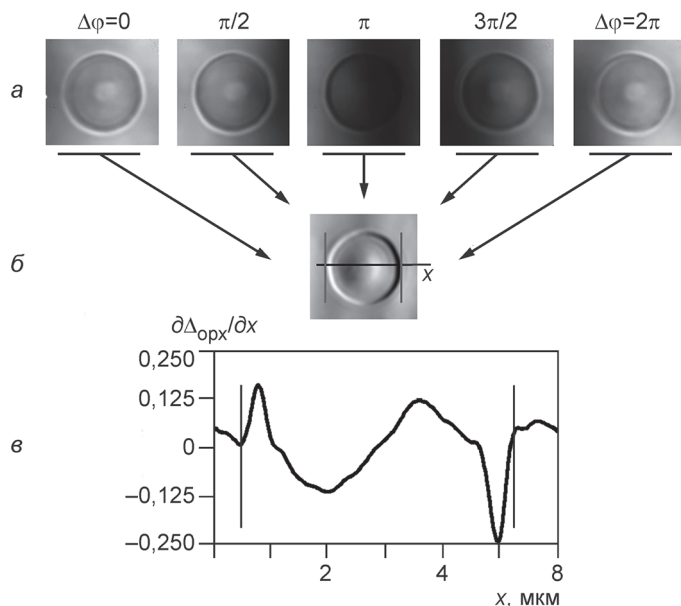


Рис. 3. Сдвиговые интерферограммы (а), производная фазового изображения эритроцита (б) и профиль производной ОРХ $\partial\Delta_{\text{ОРХ}}/\partial x$ вдоль направления сдвига (в): $\Delta\varphi$ — фазовый сдвиг

(рис. 3, а) обрабатывали по алгоритму Швайгера — Харихарана [7], получая производную фазового изображения вдоль горизонтального направления (рис. 3, б).

Отметим, что показатель преломления раствора, в котором находились клетки, был ниже показателя преломления клеток, а оптическая толщина эритроцита на его краях оказалась больше, чем в центре. Соответствующие вариации ОРХ вдоль направления сдвига демонстрируют профиль производной фазового изображения, показанный на рис. 3, в. При переходе от меньшего показателя преломления к большему значению производной возрастает и наоборот. Характер изображения подчеркивает сходство между предложенным методом и микроскопией дифференциального интерференционного контраста.

Выводы. Разработана схема сдвигового интерферометра, предназначенная для работы в низкокогерентном излучении обычного светодиода, что позволяет добиться значительного снижения уровня шумов, поскольку на изображении отсутствуют спеклы. Производную фазового изображения живой клетки восстанавливают методом фазовых шагов по набору сдвиговых интерферограмм, что дает более точный результат, чем преобразование Фурье по единственной интерферограмме. При конструктивной реализации метода фазовых шагов для внесения дополнительной ОРХ между интерферирующими пучками достаточно перемещать бипризму Дове ортогонально оптической оси микроскопа, что исключает необходимость установки дорогостоящих фазосдвигающих устройств. Полученные результаты для эритроцита крови человека отражают соответствующие вариации оптической толщины клетки вдоль направления сдвига.

Л и т е р а т у р а:

1. Kou S. S., Sheppard C. J. R. Quantitative phase restoration in differential interference contrast (DIC) microscopy // Proc. SPIE. 2008. V. 7000. P. 700005-1—700005-8.

2. Cogswell C. J., Smith N. I., Larkin K. G., Hariharan P. Quantitative DIC microscopy using a geometric phase shifter // Proc. SPIE. 1997. V. 2984. P. 72—81.

3. Cogswell C. J., Sheppard C. J. R. Confocal differential interference contrast (DIC) microscopy: including a theoretical analysis of conventional and confocal DIC imaging // J. Microscopy. 1992. V. 165. N. 1. P. 81—101.

4. Lee H. H., You J. H., Park S. H. Phase-shifting lateral shearing interferometer with two pairs of wedge plates // Opt. Lett. 2003. V. 28. N. 22. P. 2243—2245.

5. Song J. B., Lee Y. W., Yang H. S. Instantaneous Phase-Shifting Lateral-Shearing Interferometer // J. Kor. Phys. Soc. 2008. V. 52. N. 4. P. 1004—1009.

6. Bon P., Maucourt G., Wattellier B., Monneret S. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells // Opt. Exp. 2009. V. 17. N. 15. P. 13080—13094.

7. Malacara D., Servín M., Malacara Z. Interferogram Analysis for Optical Testing. USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005.

8. Пат. № 2536764 РФ. Способ интерференционной микроскопии / Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин, М. И. Латушко // Изобретения. Полезные модели. 2014. № 36.

9. Пат. № 2527316 РФ. Интерференционный микроскоп / Г. Н. Вишняков, Г. Г. Левин, М. И. Латушко // Изобретения. Полезные модели. 2014. № 24.

Дата принятия 03.09.2015 г.

535.247.3

Определение квантовых характеристик счетчика фотонов с помощью калиброванного по мощности лазерного излучения

А. А. КОВАЛЕВ, А. А. ЛИБЕРМАН, А. С. МИКРЮКОВ, С. А. МОСКАЛЮК,
М. В. УЛАНОВСКИЙ

Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: mrsergik@mail.ru

Разработана экспериментальная установка, позволяющая с высокой точностью измерять мощность излучения в диапазоне порядка 10^{-18} — 10^{-15} Вт. Применение в конструкции калиброванного призматического френелевского ослабителя позволило минимизировать погрешность определения среднего числа фотонов в каждом импульсе излучения. Представлены результаты измерений положительного оператора меры фотозлектронного умножителя Hamamatsu H7422-40.

Ключевые слова: лазерное излучение, квантовый детектор, квантовая эффективность, положительный оператор меры, френелевский ослабитель.

The experimental installation providing the high accuracy radiation power measurements in the range of about 10^{-18} — 10^{-15} W is developed. The application of the calibrated Frenel attenuator allows to minimize the determination error for average photons number in each radiation pulse. The results of measurements of positive measure operator for photomultiplier Hamamatsu H7422-40 are presented.

Key words: laser radiation, quantum detector, quantum efficiency, positive measure operator, Frenel attenuator.

В последнее десятилетие интенсивно разрабатываются квантовые детекторы, способные разрешать количество поглощенных фотонов [1, 2]. Использование фотозлектронного умножителя (ФЭУ) в качестве счетчика фотонов — частный случай применения этих детекторов. Для наиболее полного описания любого детектора необходимо определить его положительный оператор меры (ПОМ). Процедура измерения ПОМ называется томографией квантового детектора [3]. Для томографии детектора не нужно обращения к какой-либо физической модели его функционирования. После определения ПОМ можно предсказать реакцию детектора на воздействие фотонов в любом квантовом состоянии, необязательно когерентном — например, фоковском, тепловом, сжатом и т. п. Такие параметры детектора, как квантовая эффективность и уровень шумов, можно найти из его

ПОМ. Результаты томографических измерений являются объективным критерием для наиболее адекватного сравнения детекторов различного типа. В ближайшей перспективе указанная процедура калибровки подобных устройств может стать стандартной.

Томографию квантовых детекторов неоднократно обсуждали в литературе [3—6], однако вопрос о проведении измерений с высокой точностью не рассматривали. В большинстве публикаций не упоминается способ создания калиброванного потока когерентного излучения, а, например, в [3] использованы измеритель мощности с погрешностью измерений приблизительно 5 % и нейтральные светофильтры с суммарным коэффициентом ослабления порядка 10^{-9} .

В настоящей работе представлена экспериментальная установка, позволяющая измерять ПОМ для потоков излуче-