



УДК: 681.723.26

КОНСТРУИРОВАНИЕ И АПРОБАЦИЯ МОБИЛЬНОГО ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА

Александр С. Тимохин

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина,
Институт новых материалов и технологий, Россия, 620078, Свердловская обл.,
Екатеринбург, ул. Мира, 28

E-mail: sashatimokhin123@bk.ru

Аннотация

Целью данной работы является разработка, конструирование и апробация малогабаритного интерференционного микроскопа, который можно использовать на практике, в том числе в сфере образования, медицины и исследовательской деятельности. При этом устройство должно сохранить весь функционал, присущий микроскопам данного типа. В представленной научно-исследовательской работе приведено подробное описание малогабаритного интерференционного микроскопа, работающего в режиме микроизмерений. Данный гаджет представляет собой небольшое устройство, схожее по функционалу с лабораторными интерференционными микроскопами. Прибор крепится к задней части смартфона и использует его камеру в качестве фотодетектора, а от его аккумулятора получает необходимую для работы энергию. Расшифровка полученных данных также осуществляется на телефоне с помощью установленных на него программ, благодаря чему описываемое устройство является более автономным и мобильным, в отличие от своих аналогов. В представленной работе подробно описана конструкция данного устройства. Апробация описываемого устройства проводилась на примере изучения красной кровяной клетки – эритроцита. В результате проведенного исследования были представлены подробные описания опытов по измерению линейных размеров клетки – ее высоты, площади и объема, кроме того, был получен фокальный профиль клетки и построена ее трехмерная модель.

Ключевые слова: интерференционный микроскоп, лазерная интерференционная микроскопия

DESIGN AND TESTING OF A MOBILE INTERFERENCE MICROSCOPE

Alexander S. Timokhin

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of New Materials and Technologies, Russia, 620078, Sverdlovsk region, Yekaterinburg, st. Mira, 28

E-mail: sashatimokhin123@bk.ru

ABSTRACT

The aim of this work is the development, design and testing of a small-sized interference microscope that can be used in practice, including in the field of education, medicine and research. In this case, the device must retain all the functionality inherent in this type of microscope. The presented research work provides a detailed description of a small-sized interference microscope operating in the micro measurement mode. This gadget is a small device similar in functionality to laboratory interference microscopes. The device is attached to the back of the smartphone and uses its camera as a photo detector and receives the energy necessary for operation from its battery. Decryption of the received data is also carried out on the phone using the programs installed on it, due to which the described device is more autonomous and mobile, unlike its counterparts. The presented work describes in detail the design of this device. Approbation of the described device was carried out on the example of the study of a red blood cell - erythrocyte. As a result of the study, detailed descriptions of experiments on measuring the linear dimensions of the cell - its height, area and volume were presented, in addition, the focal profile of the cell was obtained, and its three-dimensional model was built.

Keywords: interference microscope, laser interference microscopy

Введение

В настоящее время интерферометры широко применяются в науке и промышленности для измерения малых смещений, показателя преломления, неровностей поверхности [1, 2]. Кроме того, интерференционная микроскопия используется для исследования различных биологических объектов, в том числе живых клеток [3]. Однако, проведенный опрос среди научных работников показал, что интерференционные микроскопы являются дорогостоящими, громоздкими и из-за этого довольно редкими научными приборами. Кроме того, они довольно сложны в эксплуатации и требуют особых навыков обращения. Вместе с тем явление интерференции является чрезвычайно востребованным во многих областях науки и техники, в том числе в биологии, медицине, машиностроении и оптическом приборостроении [4]. Интерференционные методы контроля малых величин являются наиболее чувствительными. Используя явление интерференции, можно оценить качество обработки поверхности изделия, измерить коэффициент преломления различных веществ, измерить линейные размеры клетки и узнать толщину тонкой пленки.

Цель данной работы заключается в создании малогабаритного интерференционного микроскопа, работающего в режиме микроизмерений. Описанный в данной работе аппарат представляет собой небольшое устройство, схожее по функционалу с лабораторными интерференционными микроскопами. Он прост в изготовлении и эксплуатации, что позволяет с легкостью проводить точные измерения и сделать данный вид измерительной техники более доступным. В отличие от своих аналогов, данный прибор является полностью автономным, так как не требует подключения к сети или компьютеру. Более того, разработанный аппарат можно адаптировать под практически любой смартфон.

Для апробации данного прибора был проведен эксперимент, в ходе которого исследовали эритроцит (красное кровяное тельце). При измерениях использовался объектив 40x с апертурой 0.75. Источником излучения в аппарате служила красная лазерная указка с длиной волны $\lambda=634$ нм и мощностью 5мВт. Размер регистрируемого

кадра составил 135×74 мкм. В ходе данного опыта была измерена площадь клетки, рассчитана ее фокальная высота, объем, а также был получен фазовый профиль клетки.

Результаты, полученные в ходе исследования, убедительно свидетельствуют о том, что сконструированный интерференционный микроскоп имеет те же функции, что и его современные аналоги.

1. Описание конструкции и работы созданного интерференционного микроскоп

Для получения и анализа интерференционной картины из подручных средств был собран оптический прибор, выполняющий функции интерференционного микроскопа.

Прибор состоит из следующих основных частей: источника монохроматических волн, пяти зеркал, одного полупрозрачного зеркала, двух линз, двух объективов, экрана и системы из шестерёнок, которая позволяет регулировать положения некоторых частей интерферометра в пространстве. Далее будут рассмотрены более подробнее характеристики и предназначения каждого элемента.

Из-за технических особенностей камеры телефона интерференционная картина должна отвечать следующим требованиям:

- картину должны образовывать не менее двух когерентных лучей света;
- как показывает практика, чтобы образовать четкую интерференционную картину, лучи должны пересекаться под как можно меньшим углом;
- картина не должна быть слишком яркой, чтобы не засвечивать матрицу камеры и тем самым не создавать лишних погрешностей;
- в то же время она должна быть достаточно яркой и хорошо различимой для человеческого глаза.

На рисунке №1 представлена схема собранного интерферометра, используемого в данном проекте. В качестве источника монохроматических волн выступает световой модуль красной лазерной указки (рис.1, позиция (поз.) 1) мощностью 5мВт. Модуль подключается к разъему для зарядки телефона и таким образом получает энергию для работы. Длина волны испускаемого электромагнитного излучения составила $\lambda=634$ нм. Из источника излучения лазерный луч попадает на зеркало (рис.1, поз.2), расположенное, по отношению к его траектории, под углом в 45° . Отразившись от зеркала, луч попадает на полупрозрачное зеркало (далее ППЗ) (рис.1, поз.3), пройдя сквозь него, световой пучок делится на две части. Одна из которых отражается от ППЗ, проходит через объектив с увеличением 40х и с апертурой 0.75 (поз.4), далее направляется к предметному зеркалу (рис.1 поз.5), отражается от него и следует по направлению к ППЗ. Стоит отметить, что предметное зеркало (поз.5) обращено отражающим покрытием к падающему на него лучу, иными словами, свет не проходит через толщу стекла, а сразу отражается от зеркальной поверхности. Второй луч лазера проходит через ППЗ, проходит через линзу, с оптической силой 25 дптр, (поз.7) и отражается от зеркала (поз. 8). Зеркала (поз.5 и 8) расположены перпендикулярно, направлению падающей на них, световых волн. Линза (поз.7) и объектив (поз.4) служат для создания и фокусировки интерференционной картины на экран. Затем лучи снова попадают на ППЗ и далее, после отражения и прохождения сквозь него, сливаются в один луч и следуют по направлению к объективу с увеличением 40х и с апертурой 0.75 (поз.10). Пройдя сквозь объектив, луч попадает на зеркало (поз.11), которое расположено под углом в 45° к траектории его движения. После чего на прозрачный, матовый экран (поз.12) проецируется изображение интерференционной картины. Также на рисунке 1 представлена фотография описываемого прибора.

Экран нужен для того чтобы прямой луч света не попадал в объектив камеры телефона, в противном случае он засвечивает матрицу (это связано с техническими особенностями камер телефонов) и получить четкое изображение не представляется

возможным. Для фокусировки на матрицу камеры изображения, полученного на экране, служит линза (поз.13). Из-за того, что камера телефона расположена перпендикулярно плоскости экрана, то на нее не проецируется изображение, полученное интерференцией лучей. Для решения этой проблемы, непосредственно над объективом камеры расположено (под углом в 45° к матрице объектива телефона) зеркало (поз.14). Положение объективов и линз внутри прибора регулируется системой (поз. 6, 9, 15, 16) из зубчатых колес, кареток и рукояток. С помощью последних можно вручную настраивать положение оптических элементов микроскопа.

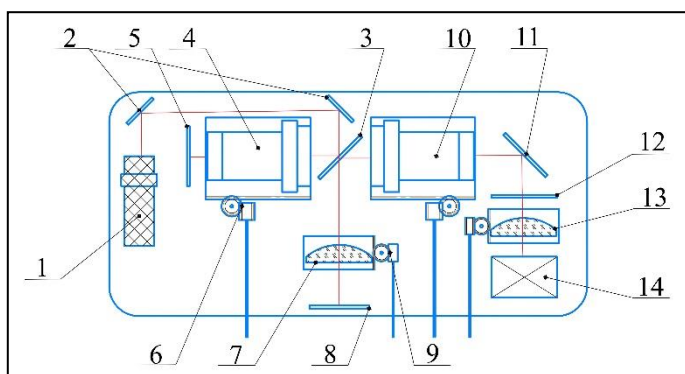


Рисунок 1

2. Исследование формы и состояния эритроцита

Известно, что с помощью лазерной интерференционной микроскопии возможно не только визуально наблюдать исследуемые образцы, но и определять распределение оптической плотности объекта, измерять его линейные размеры, такие как: высота, площадь поверхности и объем. Поэтому для апробации и проверки на работоспособность собранного интерференционного микроскопа был поставлен ряд опытов в ходе, которых исследовали живую клетку – эритроцит [5].

Кровь для исследований брали из пальца донора. Для изучения эритроцитов был приготовлен препарат «фиксированный мазок». Исследуемый образец помещали на поверхность зеркала (рис.1, поз. 5). Далее брали предметное стекло. Его краем под углом 45° касались капли крови. Кровь растекалась по краю шлифованного стекла, после чего быстрым движением этого стекла вперед делают мазок. Последний должен быть тонким (эритроциты не должны налегать друг на друга) и располагаются в средней части стекла. Измерения проводили при температуре 20-24°C.

Фазовую высоту клетки рассчитывали по формуле [3]:

$$\Phi = \frac{\Phi_0 - \Phi_{obj}}{2\pi} \cdot \frac{\lambda}{2} - \Phi_0 \quad (1)$$

где Φ_0 – начальная фаза (рад); Φ_{obj} – сдвиг фазы объектом (рад); λ – длина волны излучения (нм); Φ_0 – постоянный сдвиг, определяемый выбором начальной точки отсчета фазы.

Для нахождения значений Φ_{obj} и Φ_0 был реализован метод пошагового фазового сдвига [6]. Действительная величина фазовых сдвигов определялась путём анализа траектории интерференционных сигналов в двух произвольных точках А и В (рис.2 а) на интерференционной картине. Для определения начальной фазы (Φ_0) проводили анализ интерференционной картины, которую образовывали лучи, не прошедшие сквозь исследуемый препарат. Иными словами, сначала исследовали интерференционную картину, полученную без препарата, затем клали исследуемый образец на предметное зеркало, и затем исследовали (новую) получившуюся картину.

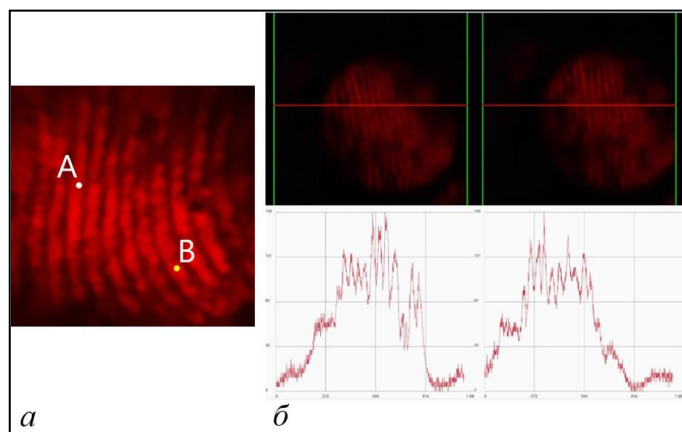


Рисунок 2

Измерение интенсивности проводили на используемом телефоне с помощью установленной на него программы «AspectraMini». На рисунке 2 б представлен процесс измерения интенсивности интерференционной картины.

На графике с осями I1, I2, откладываются значения интенсивностей первой и второй точек, соответствующих определенным фазовым сдвигам. При изменении углов сдвига от 0 до 2π точка на графике описывает некоторую траекторию, она представляет собой центральную кривую второго порядка (произвольно ориентированный эллипс). При идеальных условиях данная кривая будет описывать идеальную траекторию эллипса, однако из-за погрешности измерения интенсивностей, траектории реальных интерференционных сигналов в пространстве имеют следующий вид (рис 3а). На рисунке 3а представлен график (в условных единицах) измерения интенсивности света в двух точках интерференционной картины, а сплошная черная линия – результат аппроксимации. Затем находится угол начального сдвига фаз по формуле:

$$\varphi = 2\arctg\left(\frac{2b}{2a}\right)$$

где a – большая полуось эллипса (в условных единицах); b – малая полуось эллипса (в условных единицах).

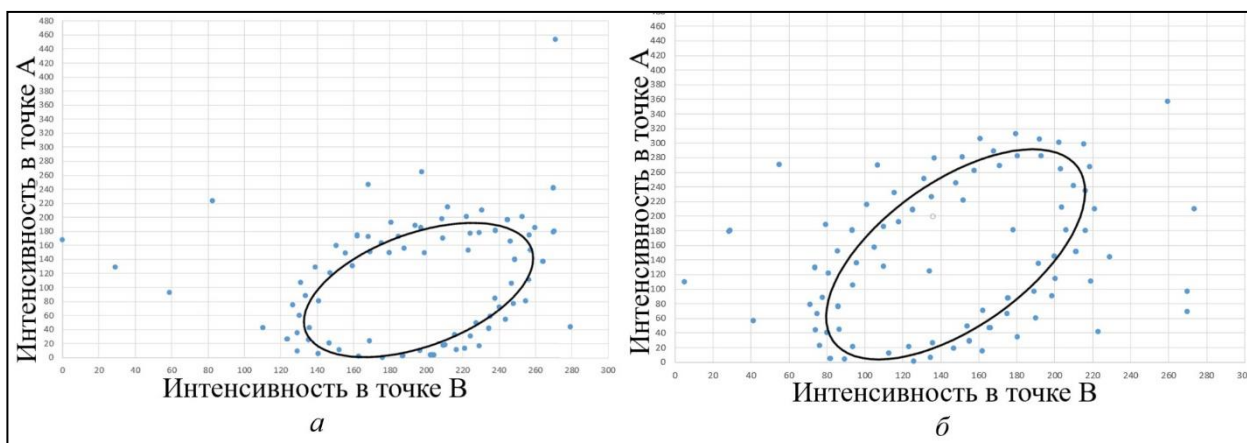


Рисунок 3

Далее на предметное стекло кладут препарат, получают еще один график с кривой второго порядка (эллипсом) (рис. 3б) и проводят вышеупомянутые вычисления еще раз. В результате получают два значения сдвига фаз:

$$\varphi_0 = \varphi_1 = 2\arctg\left(\frac{175}{369}\right) = 0,88568 \text{ (рад)} - \text{начальная фаза}$$

$\varphi_2 = 2 \arctg\left(\frac{219}{2}\right) = 0,911123$ (рад) – фаза после того, как на зеркала положили препарат.

Сдвиг фазы (φ_{obj}) изучаемым объектом находится через разность φ_1 и φ_2 :

$$\varphi_{obj} = \varphi_2 - \varphi_1 = 0,911123 - 0,88568 = 0,0254 \text{ (рад)}.$$

Постоянный сдвиг (Φ_0) составил 0 нм. Подставляем полученные значения в формулу (1) и получаем значение фазовой высоты эритроцита:

$$\Phi = \frac{0,88568 - 0,0254}{2\pi} \cdot \frac{634}{2} = 43.40295 \text{ нм} \approx 43.4 \text{ нм}$$

Известно, что фазовая высота эритроцита Φ зависит от коэффициента преломления эритроцита n и его толщины ΔH [7]:

$$\Phi = \Delta H(n - n_0) \quad (2)$$

где n_0 – показатель преломления буферного раствора. Для нахождения коэффициента преломления эритроцита n предлагается использовать двухиммерсионный метод измерения [8]. Суть это метода в том, что если известна оптическую разность хода $\Delta 1(x,y)$ излучения, прошедшего через среду с известным показателем преломления n_0 (первое измерение без эритроцитов, $n_0=1$), и оптическую разность хода $\Delta 2(x,y)$ излучения, прошедшего через среду с неизвестным показателем преломления n (второе измерение с измеряемым раствором), то искомый показатель преломления n может быть найден по формуле:

$$n = n_0 \frac{\Delta 1(x,y)}{\Delta 2(x,y)} = 1 \frac{0,911123}{0,88568} = 1.02873$$

Из уравнения (2) выражаем и находим ΔH :

$$\Delta H = \frac{\Phi}{n - n_0} = \frac{43.4}{1.02873 - 1} = 1510.61608 \approx 1510 \text{ нм} \approx 1.5 \text{ мкм}$$

Для получения изображения фазового профиля клетки нужно настроить прибор таким образом чтобы на экране появилось четкое изображение изучаемого микроорганизма. Затем следует активировать на телефоне приложение «AspectraMini» и в интерфейсе программы навести красную сканирующую линию (рис.4а) на интересующую область изображения, получаемого с камеры телефона, после чего в нижней части экрана появится график интенсивности падающего на матрицу света. Полученный график представляет собой зависимость интенсивности света, выраженной условных единицах (по оси ординат), и координаты изображения, выраженной в количестве пикселей (по оси

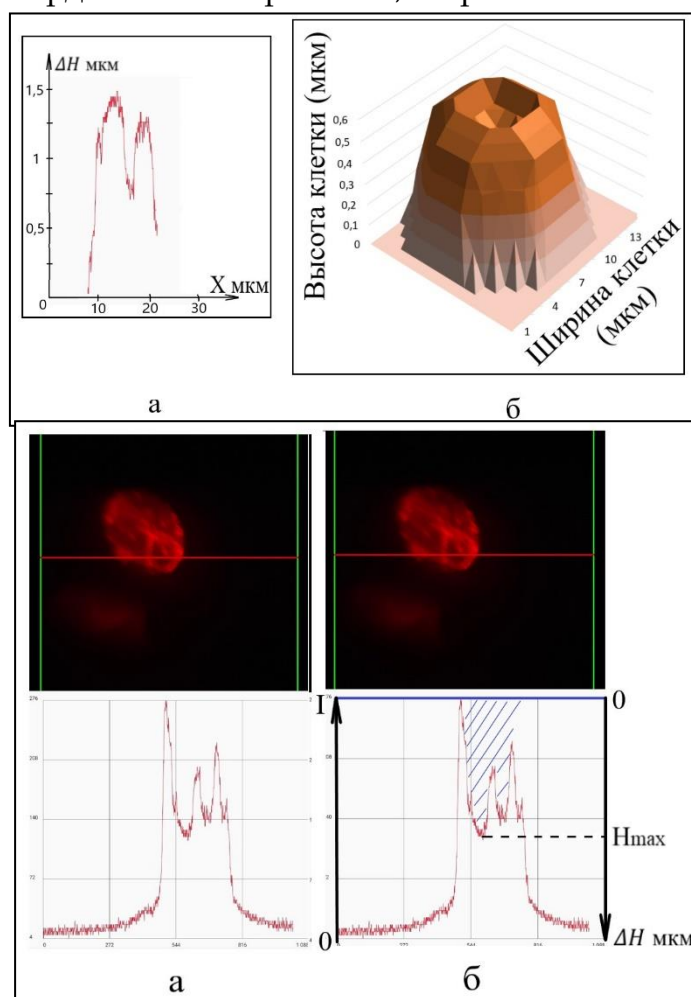


Рисунок 4

абсцисс). Фигура, образованная графиком и осью абсцисс (рис. 4а), является реверсивным сечением клетки. Чтобы это исправить находим $I_{\max}$ – наивысшую точку графиков функций (в данном случае $I_{\max}=276$ уе), далее через эту точку проводим прямую параллельную оси абсцисс (рис. 4б). Из-за того, что интенсивность света, проходящего сквозь клетку в данной точке, обратно пропорциональна ее толщине в этом месте, следовательно свет, который пройдет мимо клетки будет иметь большую интенсивность, чем тот который пройдет через саму клетку. Следовательно, нас интересует область между полученным графиком и той прямой которую провели чуть ранее (на рис. 4б эта область обозначена синей штриховкой). Перевернув заштрихованную область, получаем фазовый профиль изучаемой клетки (рисунок 5а).

В заключении найдем площадь и фазовый объем изучаемой клетки. Площадь клетки S легко находится по полученному ранее графику фазового профиля клетки (если

учесть тот факт, что эритроциты имеют круглую форму). Так как диаметр исследуемой клетки равен 9 мкм, то ее площадь равна $S \approx 63.62 \text{ мкм}^2$. Фазовый объем клетки рассчитывали как площадь клетки, умноженную на ее среднюю высоту, используя формулу:

$$V = \Delta H \times S = 1.5 \times 63.62 = 95.43 \text{ мкм}^3$$

Также при помощи вышеупомянутых вычислений можно построить трёхмерную гистограмму изучаемой клетки (рисунок 5б). Полученные в ходе исследования результаты соответствуют табличным значениям для данного вида клеток.

Заключение

Интерферометры широко применяются в науке и промышленности для определения структуры рельефа поверхности материала, для измерения малых смещений и показателя преломления [9]. Также с помощью лазерной интерференционной микроскопии возможно измерять неровности поверхности и исследовать различные биологические объекты, в том числе и живые клетки. Поэтому интерференционные микроскопы очень востребованы в науке, производстве и медицине. Однако большинство видов такой измерительной техники представляет собой громоздкие и дорогостоящие аппараты, из-за чего они стали довольно редкими. В ходе данного исследования было предложено решение этой проблемы. В ходе данной работы описана конструкция малогабаритного интерференционного микроскопа, работающего в режиме микроизмерений, была подробно описана конструкция данного устройства, представлены опыты по измерению линейных размеров клетки (высоты, площади и объема) и получен ее фазовый профиль.

На основании результатов наблюдений и измерений в процессе работы можно сделать следующие выводы:

1. Имеется возможность самостоятельно разработать и создать модель не дорогого малогабаритного интерференционного микроскопа, работающего в режиме микроизмерений;
2. Доказано, что с помощью собранного интерференционного микроскопа можно измерять линейные размеры клетки, толщину тонкой пленки, коэффициент преломления различных прозрачных сред;
3. Доказано, что с помощью собранного интерференционного микроскопа можно построить фазовый профиль эритроцита.

Итоги работы:

1. Исследована теоретическая база и проверена на практике;
2. Создан и апробирован интерференционный микроскоп в домашних условиях;
3. Доказана его работоспособность;
4. Предложено практическое применение.

В заключении хотелось бы добавить, что в данный момент ведутся работы по продвижению описанного проекта с целью найти потенциально заинтересованных людей в реализации (изготовлении, производстве) разработанного интерференционного микроскопа. Принимаются участия в различных конференциях, форумах всероссийского и международного уровня, на которых представленный доклад занимает призовые места. Кроме того, автор публикует статьи в различных научно-технических журналах. В будущем планируется и дальше развивать представленный проект.

Список литературы

1. Егоров В.А. Оптические и щуповые приборы для определения шероховатости поверхностей. – Москва: Государственное научно-техническое издательство машиностроительной литературы, 1961. – 156 с.; 20 см
2. Мозес Е.Н. Цеховые контрольные оптические приборы. – Ленинград. – Москва: Госмашметиздат, 1933. – Обл., 61, [3] с.; 20 см
3. Юсипович А.И. Новиков С.М., Казанова Т.А., и др. // Квант. электроника. 2006. Т. 36. №9. С. 874-878.
4. Франсон М. Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы. – Москва: Государственное издательство Физико-математической литературы, 1960. – 180 с.; 21 см.
5. Юсипович А.И., Брызгалова Н.Ю., Паршина Е.Ю., и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Том 145. №3.
6. Гужов В.И., Ильиных С.П., Кузнецов Р.А., и др. Алгоритмы расшифровки интерференционных картин методом пошагового фазового сдвига. Автоматика и программная инженерия. 2012. №2(2)
7. Брызгалова Н.Ю., Браже Н.А., Юсипович А.И., и др. // Биофизика, 2009. Том 54. Вып.3. С.442-447
8. Минаев В.Л. Низкокогерентная фазовая микроскопия для исследования трехмерных объектов. Москва, 2018.
9. Фролов В. С. Ф11 Волшебное зеркало (Современные методы и средства голографии). - М.: «Знание», 1979.

References

1. Egorov V.A. Optical and probe devices for determining the roughness of surfaces. - Moscow: State Scientific and Technical Publishing House of Engineering Literature, 1961. - 156 p. ; 20 cm
2. Moses E.N. Workshop optical control devices. - Leningrad. - Moscow: Gosmashmetizdat, 1933. - Obl., 61, [3] p. ; 20 cm
3. Yusipovich A.I. Novikov, S.M., Kazanova, T.A., et al., Kvant. electronics. 2006. T. 36. No. 9. S. 874-878.
4. Franson M. Phase contrast and interference microscopes. - Moscow: State Publishing House of Physical and Mathematical Literature, 1960. - 180 p. ; 21 cm.
5. Yusipovich AI, Bryzgalova N.Yu., Parshina E.Yu., et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008. Volume 145. No3.
6. Guzhov VI, Ilinykh SP, Kuznetsov RA, et al. Algorithms for decoding interference patterns by the step-by-step phase shift method. Automation and software engineering. 2012. No2 (2)
7. Bryzgalova N.Yu., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., et al. // Biophysics, 2009. Volume 54. Issue 3. P.442-447
8. Minaev V.L. Low-coherence phase microscopy for the study of three-dimensional objects. Moscow, 2018.
9. Frolov VS F11 Magic mirror (Modern methods and means of holography). - M. : "Knowledge", 1979.