

## Полнопольный оптический когерентный томограф на базе микропрофилометра МИИ-4 с использованием микрообъективов с воздушной иммерсией

© А.С. Абдурашитов<sup>1,2</sup>, О.В. Гришин<sup>1</sup>, А.А. Намыкин<sup>1</sup>, В.В. Тучин<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

<sup>3</sup> Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028 Саратов, Россия

e-mail: abdurashitov-optics@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2018 г.

В окончательной редакции 12.03.2019 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Представлен модернизированный микропрофилометр Линника (МИИ-4), позволяющий производить томографические исследования прозрачных и относительно мутных сред методами низкокогерентной интерферометрии. Конструкция референтного канала стандартного МИИ-4 переработана. Добавлена динамическая подстройка длины опорного плеча для компенсации эффекта расхождения фокального и когерентного объемов, а также сферической аберрации, возникающей при фокусировке оптической системы в глубокие слои объекта без использования иммерсионных микрообъективов. Проведен анализ существующих технических решений конструкций опорного плеча, указаны их основные недостатки. Описаны все этапы сборки и юстировки комплекса, продемонстрирована работа прибора при визуализации прозрачных и мутных слоистых объектов.

**Ключевые слова:** полнопольная низко-когерентная томография, когерентность, интерференция, автоматизация измерений.

DOI: 10.21883/OS.2019.08.48053.328-18

### Введение

Методы оптической когерентной томографии активно применяются в биомедицинских исследованиях для решения задач, требующих неинвазивной и бесконтактной диагностики, селекции сигнала по глубине и высокого пространственного разрешения. К таким проблемам можно отнести: микроангиографию [1], анализ гистологических образцов [2–4], эндоскопические и офтальмологические исследования [5,6], измерения показателя преломления рассеивающих объектов [7] и многие другие биомедицинские задачи [8–12].

В основе работы оптических когерентных томографов (ОКТ) лежат принципы низкокогерентной интерферометрии [13]. Использование тепловых или иных источников света с протяженным телом светимости и широким спектром позволяет получать изображения объектов без когерентных шумов (спеклов) и с высоким разрешением по глубине (до  $1 \mu\text{m}$ ). Типичный полнопольный ОКТ представляет собой интерферометр Майкельсона с двумя идентичными микрообъективами, помещенными в предметное и опорное плечи [2]. Такая оптическая схема известна, как микроинтерферометр Линника, сложность ее юстировки заключается

в необходимости обеспечения нулевой разности хода между плечами интерферометра с микронной точностью. Для этого, помимо механического перемещения плеча вдоль оптической оси, применяют компенсационную пластину или компенсационный клин, которые устанавливают в опорное плечо интерферометра для устранения дополнительной разности хода, возникающей из-за различной оптической толщины элементов (линз микрообъективов), установленных в плечах интерферометра [14]. Как правило, микроинтерферометр Линника используется в качестве микропрофилометра для измерения тонкой структуры профиля обрабатываемой поверхности, среднее положение которой можно обозначить как  $z = 0$ . Однако в подавляющем большинстве биомедицинских задач интерес представляют плоскости (слои), лежащие в глубине объекта, для которых  $z > 0$ .

Целью настоящей работы является модернизация опорного плеча микроинтерферометра Линника для обеспечения возможности визуализации глубоких слоев в прозрачных и мутных средах с показателем преломления, отличным от воздуха без использования иммерсионных микрообъективов.

## Обоснование необходимости модернизации интерферометра

При использовании микрообъективов без иммерсии фокусировка оптической системы в глубину объекта сопряжена с тремя основными проблемами, первая из которых заключается в появлении сферической аберрации тем большей, чем больше числовая апертура микрообъектива и глубина фокусировки  $Z$ ; вторая обусловлена расхождением объема когерентности и объема резко изображаемого пространства, что связано с внесением дополнительного фазового набег на объекте с показателем преломления большим, чем у воздуха; а третья состоит в дополнительной дисперсии света при его распространении в объекте. Зачастую эти проблемы решаются использованием микрообъективов с иммерсионной жидкостью, имеющей дисперсию показателя преломления, близкой к дисперсии показателя преломления объекта исследования. Например, для биологических тканей это вода, которая составляет 60–90% от их объема. Однако иммерсионные микрообъективы стоят существенно дороже своих безиммерсионных аналогов, а в некоторых случаях контакт иммерсионной жидкости с объектом нежелателен или невозможен. Кроме того, иммерсионные микрообъективы требуют сложной реконструкции опорного плеча. Авторам известны три основных технических решения по внедрению микрообъективов с водной иммерсией в конструкцию интерферометра Линника. Первый заключается в сборке вертикального опорного плеча интерферометра путем внесения в схему зеркала, наклоненного под углом в  $45^\circ$  к оптической оси системы [11]. Такой способ интуитивно понятен и удобен при использовании иммерсионной жидкости с малой вязкостью, такой как вода. Однако он вносит существенное число новых степеней свободы при юстировке оптической системы, что в совокупности с использованием дополнительных подвижных оптомеханических элементов, а не жестких заводских креплений, и суммарным удлинением плеч интерферометра может приводить к необходимости постоянной подстройки устройства. Второе техническое решение заключается в использовании твердых иммерсионных веществ с оптическими свойствами, схожими со свойствами воды, например, полиакрилат натрия или полидиметилсилоксан [15]. Данный способ перспективен, но имеет ряд существенных недостатков. Основные из них — это проблема достижения плотного прилегания поверхностей твердой иммерсии и передней линзы микрообъектива, наличие микропузырьков воздуха в объеме иммерсионного вещества. Необходимость сжатия или растяжения таких иммерсионных слоев для точного совмещения зеркала и фокуса микрообъектива способно привести к дополнительным фазовым набегам вдоль оптической оси из-за механических напряжений внутри твердого иммерсионного слоя. Третье решение представляет собой разработку специализированного резервуара, герметично закрепленного на теле опорного

микрообъектива [16]. Такое крепление отличается хорошей жесткостью, а также не требует удлинения плеч интерферометра. К недостаткам этого метода относится необходимость разработки и производства уникальных резервуаров для каждого микрообъектива в отдельности и затрудненный доступ к иммерсионной жидкости, что требует ее стерилизации и обеспечения полной герметизации блока.

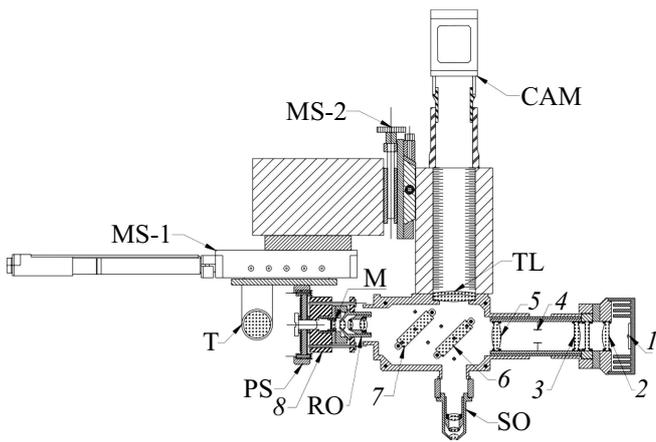
Наряду с вышеперечисленными решениями в большинстве работ взаимная фазовая задержка между интерферирующими полями вносится путем модуляции положения зеркала в опорном плече, иными словами, его периодической расфокусировкой [2,6,7,17]. Данный вид модуляции осуществляется при условии, что длина перетяжки пучка, выходящего из опорного микрообъектива, перекрывает максимальное смещение зеркала относительно положения наилучшего фокуса. Такое условие может и не выполняться при работе с высокоапертурными микрообъективами.

Теоретически было продемонстрировано, что появление дополнительной дисперсии света в одном из плеч интерферометра приводит в основном к деградации продольного разрешения системы [18]. Однако на глубине визуализации  $\sim 300 \mu\text{m}$  в объекте с отличной от воздуха дисперсией света потеря продольного разрешения составляет  $< 50\%$  от теоретического значения [18]. Зачастую на таких глубинах существенную роль уже играют рассеивающие и поглощающие свойства объекта исследования, что делает влияние дополнительной дисперсии достаточно малым при визуализации сравнительно неглубоких слоев.

При фокусировке на существенно большую глубину в объекте с отличным от воздуха показателем преломления лучи, идущие не по нормали к границе раздела сред, будут претерпевать преломление и формировать вытянутый вдоль оптической оси фокальный объем (сферическая аберрация). Наличие сильной сферической аберрации в предметном поле вносит существенную неидентичность хода лучей в плечах интерферометра. Для слабо рассеивающих объектов полезная информация сосредоточена в районе нулевой частоты пространственного спектра голограммы, что делает целесообразной компенсацию дополнительной разности хода для параксиальных лучей, в то время как для сильно рассеивающих объектов нужно принимать во внимание весь конус лучей величиной  $2NA$ , и производить динамическую подстройку длины опорного плеча до получения наилучшего качества изображения.

## Экспериментальная часть

Полнопольный оптический когерентный микроскоп (ОКМ) был разработан на основе микропрофилометра МИИ-4, в котором был полностью переработан блок



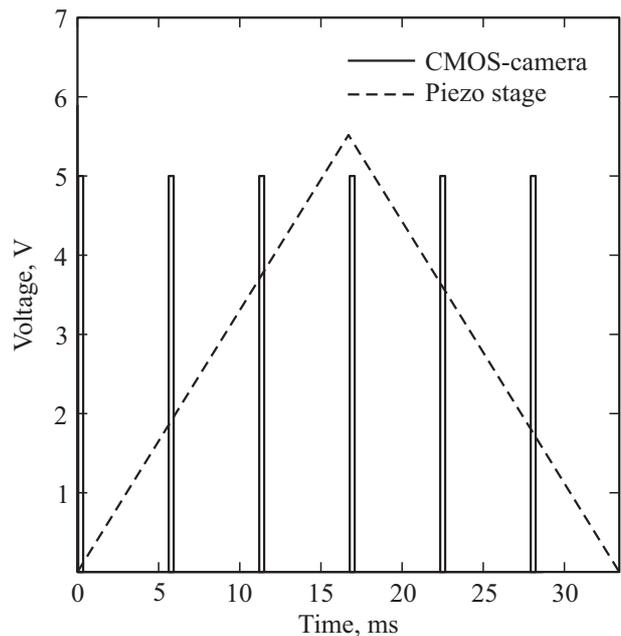
**Рис. 1.** Эскиз ОКМ, собранного на базе микроинтерферометра МИИ-4.

опорного плеча. На рис. 1 представлена схема модернизированного устройства ОКМ. Линзы 2 и 3 составляют  $4f$ -систему и формируют изображение источника света  $I$  в плоскости апертурной диафрагмы 4, которая, в свою очередь, с помощью линзы 5 и делительной пластины 6 отображается в задние фокальные плоскости идентичных опорного и предметного микрообъективов  $40\times$ , NA0.65 (RO и SO) соответственно. Компенсационная пластина 7 служит для уравнивания оптических путей в двух плечах интерферометра. В переднюю фокальную плоскость RO помещено зеркало M с коэффициентом отражения  $\sim 4\%$ . Тубусная линза TL формирует изображение зеркала и объекта на фоточувствительной матрице CAM. Оптический блок опорного плеча, включающий в себя RO и зеркало, представляет собой единый модуль 8, который размещен на пьезоэлементе PS для реализации алгоритма фазовых шагов. Весь узел целиком закреплен на прецизионной автоматизированной подвижке MS-1 для точной установки заданной разности хода между плечами интерферометра. В свою очередь, подвижка MS-1 базируется на подвижке с ручным приводом MS-2, которая позволяет осуществлять перемещение в плоскости, перпендикулярной оптической оси. Данное перемещение необходимо для получения интерференционных полос, если оптическая ось опорного микрообъектива имеет сдвиг относительно оптической оси тубусной линзы, или интерференционных колец, если они концентричны. На MS-1 закреплена мишень T для оптического контроля положения опорного плеча. Мишень представляет собой черное перекрестие, нанесенное на стеклянную основу. Толщина штриха мишени —  $30\ \mu\text{m}$ . Перемещение мишени отслеживается с частотой 30 Hz путем корреляционного анализа ее изображения, полученного с помощью отдельного микроскопа с объективом  $20\times$ , NA0.4. Диапазон отслеживаемых перемещений составляет  $230\ \mu\text{m}$  и  $180\ \mu\text{m}$  в горизонтальном и вертикальном направлениях соответственно. Следящий

микроскоп закреплен статично и не перемещается в процессе эксперимента, а ОКМ в сборе — на прецизионной моторизованной подвижке MS-3 (на эскизе не указана) для обеспечения точной фокусировки на объект исследования. В качестве источника освещения в ОКМ используется инфракрасный светодиод с центральной длиной волны  $940\ \text{nm}$  и шириной полосы на уровне половины интенсивности  $50\ \text{nm}$ , что соответствует продольному разрешению системы  $18\ \mu\text{m}$ . Такое разрешение не является наилучшим по сравнению с аналогичными системами, но вполне достаточным для демонстрации эффектов и ряда практических применений.

Для регистрации изображения в ОКМ используется CMOS-камера BaslerAca2040-180km с частотой записи 180 кадров в секунду при 8-битном формате пикселя. У камеры была активирована опция биннинга по шестнадцати пикселям, т.е. суммирование зарядов соседних пикселей с последующим однократным усилением. Данная опция повышает светочувствительность и улучшает соотношение сигнал/шум. Плата захвата изображений NIPCI-1433 используется для настройки параметров камеры и записи изображений в оперативную память персонального компьютера для их дальнейшей обработки.

Многофункциональный модуль PXI ввода-вывода NI PXIe-6341 используется для синхронизации работы пьезоэлемента PS, контроля платы захвата изображений, а также системы освещения. Временная диаграмма работы ОКМ представлена на рис. 2. На обкладку пьезоэлемента подается треугольный сигнал с амплитудой 5.5 V. Значение амплитуды было подобрано эмпирически: в плоскость предмета помещалось зеркало, напряжение



**Рис. 2.** Временная диаграмма синхронной работы пьезоэлемента PS и CMOS-камеры.

Технические характеристики полнопольного оптического когерентного микроскопа (ОКМ)

Центральная длина волны источника	940 nm
Ширина спектра на половине интенсивности	50 nm
Поперечное разрешение системы	< 1 $\mu\text{m}$
Продольное разрешение системы	18 $\mu\text{m}$
Частота получения томограмм	30 Hz

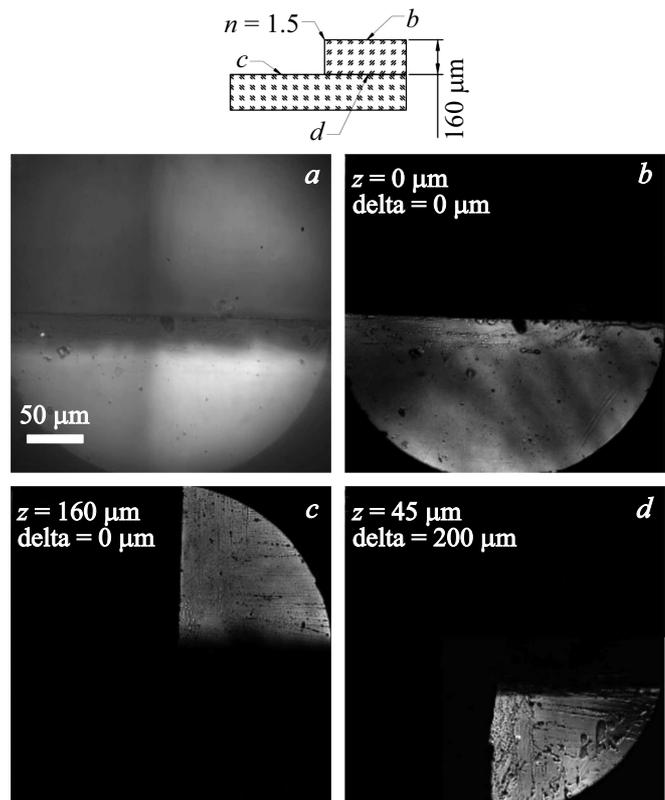
на обкладках пьезоэлемента изменялось по амплитуде до достижения желаемого смещения интерференционных полос, которое соответствовало фазовой задержке в  $3\pi/2$  между опорным и предметным фронтами при вершине сигнала (оранжевая штриховая линия на рис. 3). Захват изображений осуществлялся подачей прямоугольного сигнала на триггерный вход камеры (синяя сплошная линия на рис. 3). Изображения, записанные на прямом и обратном ходе пьезоэлемента, усреднялись для достижения максимального соотношения сигнал/шум. Итоговая скорость получения полнопольных томограмм размером  $512 \times 512$  пикселей составляет 30 Hz. В большом количестве задач нет необходимости в получении трехмерных (3D) томограмм. Значительный интерес представляют так называемые „en-face“ томограммы с конкретной глубины (топограммы) [19]. Для сравнения при использовании коммерческого спектрального ОКТ с частотой следования А-сканов 100 kHz требуется 2.5 s для получения аналогичного по размерам изображения, которое необходимо будет вычленив из данных для 3D-томограммы. К тому же восстановление томографического изображения в системах ОКТ включает в себя несколько сложных математических операций, таких как аподизация, интерполяция спектра, быстрое преобразование Фурье и др. [20], в то время как в ОКМ производятся простейшие операции сложения и вычитания, которые с легкостью могут быть выполнены в реальном времени даже на относительно маломощных компьютерах. Технические характеристики разработанного ОКМ приведены в таблице.

Камера захватывала изображения в точках с взаимной разностью фаз  $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$  между интерферирующими полями, что необходимо для реализации алгоритма фазовых шагов [21]. Четырехступенчатый алгоритм был выбран исходя из условия, что восстанавливается интенсивность отраженной объектом волны, а не ее фаза, что снимает некоторые ограничения на помехоустойчивость метода. Зарегистрированные интерферограммы подвергались математическому преобразованию согласно формуле [21]:

$$I_{\text{res}} = \frac{(I_0 - I_\pi)^2 + (I_{\pi/2} - I_{3\pi/2})^2}{4(I_0 + I_\pi + I_{\pi/2} + I_{3\pi/2})}. \quad (1)$$

Программное обеспечение (ПО) было разработано в графической среде программирования LabView с использованием подключаемых библиотек NI-DAQ и NI-IMAQ для работы с мультимедийной платой ввода/вывода и КМОП-камерой соответственно. ПО позволяет производить расчет полнопольных томограмм в реальном масштабе времени, а также настраивать все необходимые параметры, такие как напряжение на обкладках пьезоэлемента, экспозицию камеры, текущее положение опорного плеча относительно нулевой разницы хода в интерферометре, а также производить запись результатов на жесткий диск.

Для апробации экспериментальной установки были произведены измерения двух тест-объектов. Первый представляет собой два покровных стекла, наложенных друг на друга, и служит для демонстрации необходимости компенсации длины опорного плеча при использовании безиммерсионных микрообъективов. Второй — мишень, помещенная под рассеивающий слой, толщиной 210  $\mu\text{m}$ , для подтверждения возможности работы прибора в мутных средах. Два покровных стекла толщиной 160  $\mu\text{m}$  и показателем преломления 1.5 были



**Рис. 3.** Демонстрация работы модернизированного интерференционного микроскопа МИИ-4 в качестве полнопольного томографа (оптического когерентного микроскопа, ОКМ), способного получать томограммы объекта на определенной глубине: (a) изображение тест-объекта в режиме микроскопа, (b), (c), (d) — изображение тест-объекта в режиме полнопольного томографа (ОКМ) с демонстрацией селекции сигнала по глубине.

наложены друг на друга так, как это показано на рис. 3. Была произведена визуализация плоскостей *b*, *c* и *d*, томограммы которых приведены на рис. 3, *b*, 3, *c* и 3, *d* соответственно. Рисунок 3, *a* демонстрирует изображение объекта в режиме обычного микроскопа светлого поля. Граница *b* совмещена с нулевой разностью хода  $\Delta = 0$  и принята за начало отсчета фокусировки  $z = 0$ , что в режиме ОКМ позволит отделить данную плоскость от остальных. Границы *c* и *d* геометрически лежат в одной плоскости, однако при перемещении положения фокуса на  $160 \mu\text{m}$  выделяется только граница *c*. Это происходит из-за того, что лучи, идущие от плоскости *d*, претерпевают дополнительный фазовый набег, пропорциональный оптической толщине верхнего покровного стекла. Из-за высокой числовой апертуры микрообъектива при визуализации границы *d* имеет место существенная сферическая aberrация и расхождение фактической и теоретической фокальных плоскостей на величину, рассчитываемую по формуле, выведенной на основе закона Снеллиуса и геометрической оптики:

$$\Delta f = m \left( n_{\text{med}} \frac{\cos \theta_2}{\cos \theta_1} - 1 \right), \quad (2)$$

где  $n_{\text{med}}$  — показатель преломления среды, в которой происходит фокусировка,  $m$  — фактическое смещение микрообъектива относительно границы раздела сред,  $\theta_1$  и  $\theta_2$  — углы падения и преломления соответственно.

Учитывая тот факт, что визуализируются плоские границы, а их пространственные спектры изображений сосредоточены возле нулевой частоты, динамическую подстройку оптической разности хода целесообразно производить для параксиальных лучей, приобретающих

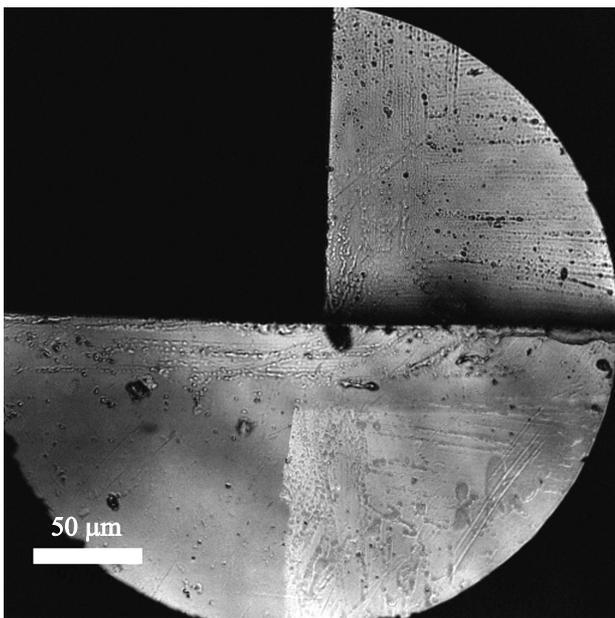


Рис. 4. Комбинированное томографическое изображение границ *b*, *c*, *d*.

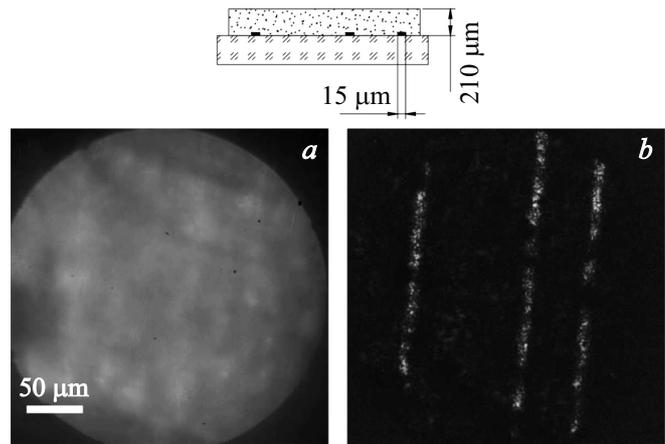


Рис. 5. Работа ОКМ в условиях мутной среды с полным коэффициентом ослабления  $100 \text{ cm}^{-1}$  на длине волны  $940 \text{ nm}$ : (а) — изображение тест-объекта в режиме микроскопа на отражение; (б) — восстановленная „en-face“ томограмма на глубине  $210 \mu\text{m}$ .

фазовый набег, приближенно равный  $n_{\text{med}}m$ . Приняв во внимание эти два эффекта, удалось получить томографическое изображение границы *d*. На рис. 4 приведена суперпозиция томографических изображений всех трех границ тест-объекта „в фокусе“, а также без автокорреляционной компоненты и интерференционной модуляции. Селекция сигнала происходит за счет сравнительно малого объема когерентности используемого источника излучения. По этой причине в формировании полезного интерференционного сигнала, обобщенно записанного в виде формулы (3), участвуют лучи, прямо отраженные от локализованной по глубине области объекта, находящейся в когерентном объеме:

$$I(x, y) = I_{\text{obj}}^2(x, y) + I_{\text{ref}}^2(x, y) + 2I_{\text{ref}}(x, y)I_{\text{obj}} \cos[\Delta(x, y)], \quad (3)$$

где  $I_{\text{obj}}$  и  $I_{\text{ref}}$  — интенсивность света в предметном и опорном плечах соответственно;  $\Delta\varphi$  — дополнительная разность фаз, вносимая микрорельефом визуализируемой поверхности или слоя. Метод фазовых шагов необходим для подавления первого и второго слагаемых в уравнении (3), т.е. сигналов автокорреляционной составляющей и косинусоидной модуляции кросскорреляционной компоненты.

На рис. 5 представлена восстановленная „en-face“ томограмма объекта, помещенного под рассеивающим слоем с полным коэффициентом ослабления  $100 \text{ cm}^{-1}$  на длине волны света  $940 \text{ nm}$ . Конфигурация тест-объекта представлена в верхней части рис. 5. Отчетливо наблюдается селекция сигнала по глубине с полным подавлением засветки от участков объекта вне когерентного объема.

## Обсуждение и заключение

Была успешно проведена модернизация микропрофилометра МИИ-4, позволяющая производить томографические измерения прозрачных и рассеивающих слоистых объектов. Описаны все технические решения по конструированию блока опорного плеча. Следует отметить тот факт, что динамической подстройкой длины опорного плеча невозможно скомпенсировать дополнительную дисперсию света, обусловленную объектом, однако при небольших глубинах зондирования ее влияние на видность интерференционной картины не является существенным [17]. Частично дополнительную дисперсию можно скомпенсировать путем наклона компенсационной пластины, однако возникнет смещение пучка относительно оси опорного микрообъектива, что может привести к локализации интерференционных полос и тем самым к ограничению поля зрения установки. В данном случае лучше применять две призмы, перемещаемые вдоль своих гипотенуз.

Помимо вышеизложенных факторов, одним из недостатков использования безиммерсионных микрообъективов является наличие прямого отражения от верхней границы объекта с амплитудой, превосходящей амплитуду света, отраженного от глубинных слоев объекта. Наличие данного эффекта налагает строгое требование на динамический диапазон детектора, используемого для регистрации интерференционных полос. Динамический диапазон должен быть достаточно большим для разрешения низкоамплитудного интерференционного сигнала на фоне сильной постоянной составляющей.

Несмотря на такое количество ограничений, которые необходимо принять во внимание, сравнительно небольшая доработка опорного плеча интерферометра МИИ-4 дает уникальную возможность преобразования микропрофилометра в оптический когерентный микроскоп, способный производить томографические исследования объектов с использованием широкого набора безиммерсионных микрообъективов с различным увеличением и числовой апертурой.

## Благодарность

Авторы выражают благодарность И.В. Федосову за советы при проектировании микроскопа, а О.В. Семячкиной-Глушковской за мотивацию данной работы.

## Финансирование работы

Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-75-20069.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Zhang A. et al. // J. Biomed. Opt. 2015. V. 20. N 10. P. 100901.
- [2] Dubois A. et al. // Appl. Opt. 2002. V. 41. N 4. P. 805–812.
- [3] Dubois A. et al. // Appl. Opt. 2004. V. 43. N 14. P. 2874–2883.
- [4] Fujimoto J.G. et al. // Nat. Med. 1995. V. 1. P. 970–972.
- [5] Latrive A., Boccara C. Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy: Technology and Applications, Chapter 9: Full-Field OCM for Endoscopy / Ed. by Dubois A. Pan Stanford, 2016. 790 p.
- [6] Grieve K. et al. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. N 9. P. 96–104.
- [7] Binding J. et al. // Opt. Express. 2011. V. 19. N 6. P. 4833–4847.
- [8] Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М.: Физматлит, 2012. 818 с.
- [9] Dalimier E., Salomon D. // Dermatology. 2012. V. 224. P. 84–92.
- [10] Assayag O. // TCRT Express. 2013. V. 1. N 1. P. 21–34.
- [11] Thouvenin O. et al. // Appl. Sci. 2017. V. 7. N 236. P. 91–118.
- [12] Assayag O. et al. // NeuroImage Clin. 2013. P. 549–557.
- [13] Борн М., Вольф Э. Основы оптики. Наука, 1973. 720 с.
- [14] Захарьевский А.Н. Интерферометры. Оборонгиз, 1952. 296 с.
- [15] Mukhtar H. et al. // Optical Micro-and Nanometrology VII. 2018. V. 10678. P. 1067816.
- [16] Ogien J. Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau. Université Paris-Saclay, 2017.
- [17] Dubois A. et al. // Appl. Opt. 2004. V. 43. N 14. P. 2874.
- [18] Dubois A. // Appl. Opt. 2017. V. 56. N 9. P. 142–150.
- [19] Dubois A. Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy: Technology and Applications / Ed. by Dubois A. Pan Stanford, 2016. 790 p.
- [20] Izatt J.A., Choma M.A., Dhalla A.-H. // Optical coherence tomography / Ed. by Drexler W., Fujimoto J.G. Springer, 2015. P. 65–94.
- [21] Локишин Г.Р. Основы радиооптики. Интеллект, 2014. 344 с.