

## Измерение дисперсии показателя преломления микроскопических объемов водного раствора БСА с помощью интерференционного микроскопа

© Г.В. Максимов<sup>1</sup>, А.Д. Иванов<sup>1,¶</sup>, А.А. Самойленко<sup>2</sup>, А.А. Голополов<sup>3</sup>, Г.Г. Левин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский технологический университет „МИСиС“,  
119049 Москва, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений (ФГУП „ВНИИОФИ“),  
119361 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет геодезии и картографии,  
105064 Москва, Россия

¶ e-mail: academi@ya.ru

Поступила в редакцию 21.08.2020 г.

В окончательной редакции 05.11.2020 г.

Принята к публикации 10.11.2020 г.

Рассмотрен метод измерения показателя преломления микроскопических объектов, основанный на интерференционной микроскопии. Показано, что особый интерес представляет анализ дисперсии показателя преломления малых объемов биологических жидкостей, что может позволить при исследовании живых клеток методами фазовой микроскопии разделить флуктуации размера объекта и его показателя преломления. Описан метод измерения дисперсии показателя преломления микроскопических объемов жидкостей с помощью автоматизированного интерференционного микроскопа МИА-1Д и измерительной кюветы с микролункой. Приведено описание алгоритма обработки получаемых изображений с целью вычисления показателя преломления. Приведены результаты измерения дисперсии показателя преломления бычьего сывороточного альбумина. Показано, что предложенный метод позволяет измерять показатель преломления жидкостей микроскопических объемов с точностью до 4–5-го знака после запятой.

**Ключевые слова:** рефрактометрия, показатель преломления, лазерная интерференционная микроскопия, альбумин.

DOI: 10.21883/OS.2021.03.50663.219-20

### Введение

Показатель преломления является одной из важнейших характеристик вещества, находящегося в любом из трех агрегатных состояний — твердом, жидком или газообразном. В связи с бурным развитием нанотехнологий, синтезом новых веществ и структур встала задача измерения показателя преломления малоразмерных объектов, например тонких пленок, а также малых количеств синтезированных веществ. Задача измерения сверхмалой концентрации веществ в растворах возникает при изучении строения веществ и межмолекулярного взаимодействия. Эти измерения несут ценную информацию о природе заместителей в молекулах (как органических, так и комплексных неорганических соединений), об их конформациях, внутреннем вращении и т. д.

Особый интерес вызывает измерение показателя преломления и его дисперсии для биологических объектов, таких как клетки и клеточные структуры. Анализ зависимости плотности биологических структур от концентрации белков и других сложных молекул в среде представляет также интерес при создании новых лекарственных препаратов. При исследовании живых клеток методами фазовой микроскопии разделение колебаний мембраны

клетки и флуктуаций плотности ее клеточных структур, определяемых показателем преломления, представляет собой очень важную задачу [1]. Решение этой задачи позволит по-новому интерпретировать результаты многочисленных экспериментальных исследований динамики живых клеток. Анализ дисперсии показателя преломления малых объемов жидкости позволяет построить двух-, трехдлинноволновый интерферометр и в сочетании с новыми алгоритмами обработки последовательности измерений решить эту задачу.

В то же время анализ зависимости плотности биологических структур от концентрации белков и других сложных молекул в среде представляет также интерес для исследования. Важной задачей является определение внутренней структуры отдельных клеток, которая решается методами оптической микротомографии. Показатель преломления разбавленных водных растворов белков, нуклеиновых кислот и других интересных в биологическом отношении высокомолекулярных веществ пропорционален концентрации этих растворов. Константы пропорциональности, которые иногда называют биологическими удельными инкрементами преломляемости, являются экспериментальными величинами, которые мало меняются в случае высокомолекулярных веществ,

но играют важную роль в исследовании трансформации белка внутри клеток и изменения ее сухого веса [2].

В настоящей работе рассмотрена возможность применения интерференционных методов для измерения дисперсии показателя преломления сверхмалых объемов жидкости, соизмеримых с объемами клеток, так как они обладают наибольшей потенциальной чувствительностью. В связи с малыми размерами исследуемых объектов для измерения их показателя преломления надо применять лазерную интерференционную микроскопию (ЛИМ). В настоящее время приборы на основе различных модификаций ЛИМ широко используются при проведении медико-биологических исследований, в том числе динамики живой клетки, а также для решения различных материаловедческих задач [3–6].

Использование метода микроинтерферометрии для измерения показателя преломления малых объемов жидкости ставит в первую очередь две задачи. Во-первых, измерение распределения фазы волнового фронта, прошедшего через объект, с точностью, необходимой для определения дисперсии показателя преломления. Во-вторых, создание алгоритма обработки серии фазовых изображений, позволяющего разделять влияние геометрических размеров объекта и показателя преломления исследуемой среды и компенсировать фазовые шумы прибора, вызванные внешними вибрациями и микросмещением оптических элементов.

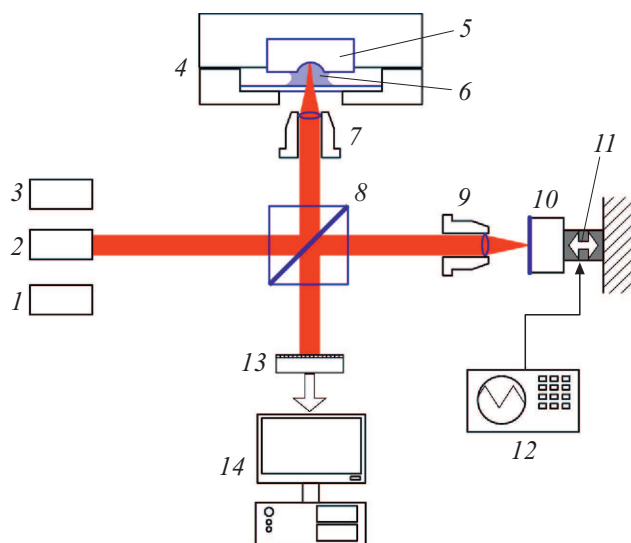
Целью настоящей работы были разработка метода измерения и его экспериментальная апробация для определения показателя преломления малых объемов жидкости на примере растворов белка (сывороточный бычий альбумин) для различных длин волн зондирующего излучения.

### Экспериментальная установка для измерения дисперсии показателя преломления микроскопических объемов жидкостей

За основу экспериментальной установки был взят автоматизированный интерференционный микроскоп МИА-1Д [7], разработанный во ВНИИОФИ (Москва, Россия), основанный на интерферометре Линника МИИ-4 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия), и измерительная кювета с микролункой, которая была создана в результате совершенствования эталона ГЭТ 138-2003 во ФГУП „ВНИИОФИ“ в период с 2007 г. по 2009 г. Оптическая схема установки приведена на рис. 1.

Конструкция осветителя установки позволяет подключать различные источники оптического излучения 1, 2, 3. Используемые в настоящем эксперименте источники приведены в табл. 1.

Излучение подключенного источника через матовое стекло и световод (на схеме не показаны) падает на



**Рис. 1.** Оптическая схема экспериментальной установки: 1–3 — лазеры накачки; 4 — измерительная кювета; 5 — металлическое зеркало с лункой; 6 — исследуемый объем жидкости; 7, 9 — микрообъективы; 8 — светоделитель; 10 — опорное зеркало; 11 — пьезодвижитель; 12 — генератор пилообразного сигнала; 13 — светочувствительная матрица; 14 — система регистрации.

светоделитель 8 и разделяется на два пучка — измерительный и опорный.

Измерительный пучок фокусируется микрообъективом 7 на поверхность микролунки сферической формы, изготовленной методом теснения. В качестве подложки было использовано полированное зеркало из нержавеющей стали 5. Микролунка помещена в измерительную кювету, которая имеет прозрачное окно и может быть заполнена исследуемой жидкостью 6. Микролунка имеет глубину  $2.1 \mu\text{m}$ , диаметр  $80 \mu\text{m}$  и площадь  $5024 \mu\text{m}^2$ .

Опорный пучок фокусируется микрообъективом 9 на поверхность опорного зеркала 10, которое может перемещаться с помощью пьезодвижителя 11. Управляющее напряжение подается на пьезодвижитель с генератора сигналов пилообразной формы 12.

Отраженные измерительный и опорный пучки складываются на светоделительном элементе 8 и падают на светочувствительную матрицу 13, на которой формируется интерферограмма. Диск матового стекла установлен на входе в световод для нарушения когерентности с целью предотвращения образования спекл-шумов на светочувствительной матрице. Матрица имеет разрешение 640 на 480 точек и быстродействие до 300 кадров в секунду. Информация с матрицы считывается системой регистрации 14 и записывается в компьютер для дальнейшей обработки. Фазовые изображения восстанавливаются из интерферограмм методом динамических фазовых шагов [8,9].

Метод динамических фазовых шагов, реализованный в нашем приборе, позволяет восстанавливать фазовое

Таблица 1. Используемые источники излучения

Тип источника излучения	Модель, тип	Длина волны $\lambda$ , nm
Лазерный диод	LDI-850FP-20/70-E3-SM05-FU-CW	850
Газовый лазер	He–Ne-лазер	633
Nd-лазер с диодной накачкой (DPSS)	Лазерный модуль KLM-A532-15-5	532

изображение с точностью 1.5 nm для пустой лунки, а для лунки, заполненной раствором БСА для длин волн 532, 633, 850 nm, точность составила соответственно 3.4, 1.4, 3.6 nm.

Большую погрешность вычисления показателя преломления на длине волны 850 nm можно объяснить более высокой степенью поглощения излучения в инфракрасном диапазоне раствором БСА, что приводит к меньшей контрастности интерференционной картины и, следовательно, к ошибкам в восстановлении фазы.

### Метод измерения абсолютного значения показателя преломления жидкости в микрообъемах

Для измерения показателя преломления исследуемой жидкости получают два фазовых изображения микролунки — с исследуемой жидкостью  $\Phi_s(i, j)$  и без нее  $\Phi_r(i, j)$ , где  $i, j$  — координаты точек на фазовом изображении. Поскольку светочувствительная матрица имеет разрешение 640 на 480 точек, координата  $i$  может принимать целые значения от 1 до 640 и соответствует оси  $x$  матрицы, а  $j$  проходит значения от 1 до 480 и соответствует оси  $y$ .

В работе использовалась специальная кювета, которая позволяла направлять малый объем раствора в микролунку, практически не смещая ее в поле зрения. Однако даже смещения изображения на 1–2 пиксела, а также фазовые шумы прибора, вызванные внешними вибрациями, которые всегда присутствуют [3], приводят к тому, что малые фазовые искажения не позволяют определить показатель преломления с требуемой точностью. Характерная толщина эритроцита человека составляет  $\sim 2 \mu\text{m}$ , а амплитуда колебания мембраны — десятки нанометров [3]. Поэтому минимальная необходимая для микробиологических исследований крови точность определения показателя преломления составляет 3 знака после запятой. Для определения показателя преломления жидкости следовало разработать специальный алгоритм субпиксельного совмещения фазовых изображений.

Нами был использован алгоритм попиксельного совмещения изображений, основанный на их трансформации с последующим сравнением. После того как изображения совмещены, показатель преломления исследуемой жидкости вычисляется из масштабного коэффициента трансформации в аксиальном направлении.

Опишем трансформацию фазового изображения  $\Phi(i, j)$  в  $\Phi^{\text{tr}}(i, j)$  следующим образом:

$$\Phi^{\text{tr}}(i, j) = F(\Phi(i, j), S_x, S_y, S_z, t_x, t_y, t_z, a_x, a_y), \quad (1)$$

где индексы  $x$  и  $y$  указывают на соответствующие координаты в латеральном направлении, индекс  $z$  соответствует аксиальному направлению,  $S_x, S_y, S_z$  — масштабные коэффициенты вдоль соответствующих координат,  $t_x, t_y, t_z$  — смещение вдоль соответствующих координат,  $a_x, a_y$  — наклон вдоль соответствующих координат. Латеральное смещение (параметры  $t_x, t_y$ ) необходимо потому, что при заполнении кюветы неизбежно происходит сдвиг микролунки. Из-за сдвига возникает явление параллакса, что приводит к изменению масштаба изображения в латеральном направлении (параметры  $S_x, S_y$ ). Методом фазовых шагов фазовые изображения восстанавливаются с точностью до произвольной плоскости. Таким образом, для совмещения двух различных фазовых изображений необходимо также подобрать плоскость, которая задается параметрами  $t_z, a_x, a_y$ .

Для совмещения двух фазовых изображений с использованием преобразования (1) необходимо составить функцию, которая является мерой схожести одного изображения на другое. Нами была выбрана следующая функция:

$$E = \frac{\sum_{i,j} |\Phi_s(i, j) - F(\Phi_r(i, j), S_x, S_y, S_z, t_x, t_y, t_z, a_x, a_y)|}{N}, \quad (2)$$

где  $N$  — число хороших точек на фазовом изображении; суммирование осуществляется только по хорошим точкам. Здесь следует пояснить, что для успешного восстановления в заданной точке фазового изображения из набора интерферограмм необходимо, чтобы выполнялся ряд следующих условий [8]. В данной точке образец должен быть отражающим; наклон образца в точке должен быть таков, чтобы на интерферограммах разрешались интерференционные полосы; освещенность на всех интерферограммах в данной точке не должна выходить за динамический диапазон матрицы. Если перечисленные условия не выполняются, то фаза в такой точке не может быть корректно восстановлена и эта точка маркируется как плохая.

Кроме того, преобразование (1) приводит к тому, что два фазовых изображения, разность между которыми вычисляется в формуле (2), перекрываются не полностью. Соответственно точки фазовых изображений, в

**Таблица 2.** Начальные значения параметров трансформации

Наименование параметра	$S_x$	$S_y$	$S_z$	$t_x$	$a_x$	$a_y$
Значение параметра	1	1	1	0	0	0

которых не происходит перекрытия, также маркируются как плохие.

Деление на  $N$  необходимо для того, чтобы исключить влияние количества хороших точек, попавших в сумму в формуле (2), на значение  $E$ . Затем  $E$  минимизируется путем варьирования параметров трансформации  $S_x, S_y, S_z, t_x, t_y, t_z, a_x, a_y$ . Все перечисленные операции осуществлялись численно. Для работы функции, минимизирующей  $E$ , необходимо задать начальные значения всех параметров трансформации. В качестве таковых использовались значения, приведенные в табл. 2.

Все значения, приведенные в табл. 2, соответствуют отсутствию трансформации. В данной таблице не указаны параметры  $t_x$  и  $t_y$ , которые соответствуют смещению центра микролунки. Значения этих параметров вычислялись следующим образом. Минимальная глубина фазового изображения микролунки (при длине волны 850 nm и пустой кювете) в единицах фазы составляет приблизительно 30 rad. На фазовом изображении отсекались точки, в которых значение фазы не превышало 20 rad. Такой порог был выбран потому, что для всех полученных нами фазовых изображений максимальные флуктуации фона были на полпорядка ниже данного значения. Таким образом, оставшиеся точки принадлежали дну микролунки, координаты центра которой необходимо оценить. У этих точек вычислялись координаты центра тяжести, при этом в качестве весов использовались значения фазы в этих точках. Координаты центра вычислялись для каждого фазового изображения из пары  $\Phi_s(i, j)$  и  $\Phi_r(i, j)$ . Значения параметров  $t_x$  и  $t_y$  вычислялись как разности этих координат.

Для совмещения фазовых изображений  $\Phi_s(i, j)$  и  $\Phi_r(i, j)$  программа, изменяя параметры трансформации, находила минимум  $E$  и выдавала значения параметров, при которых достигается минимум.

Если пара  $\Phi_s(i, j)$  и  $\Phi_r(i, j)$  совмещена по всем смещениям и плоскости, то данные фазовые изображения связаны следующим соотношением:

$$\frac{\Phi_s(i, j)}{\Phi_r(i, j)} = \frac{n_s}{n_r}, \quad (3)$$

где  $n_s$  и  $n_r$  — показатели преломления исследуемой жидкости и воздуха соответственно. Если принять  $n_r = 1$ , то из (3) и определения  $S_z$  следует, что

$$n_s = S_z.$$

Таким образом, получая параметры трансформации при совмещении пары фазовых изображений микролунки с исследуемой жидкостью и без нее, производилось измерение показателя преломления жидкости.

Здесь следует отметить, что полученные при минимизации  $E$  значения могут относиться к локальному минимуму и не соответствовать максимально возможному совпадению фазовых изображений. Поэтому для повышения точности измерений получали серии из нескольких фазовых изображений пустой микролунки и микролунки с жидкостью. Затем вычисляли серию наборов параметров трансформации для всех полученных пар изображений. Результат совмещения оценивался визуально, и выбирался набор параметров с наилучшим совпадением. Затем проводился второй цикл совмещений для всех пар, при этом в качестве начальных значений использовался выбранный набор параметров. Такая двухступенчатая процедура обработки результатов измерений позволила снизить разброс получаемых значений показателя преломления на порядок.

## Измерения показателя преломления бычьего сывороточного альбумина

Изложенным выше методом были проведены измерения показателя преломления бычьего сывороточного альбумина (БСА, BSA), а также физиологического раствора. Для этого были приготовлены растворы БСА в дистиллированной воде в 4 концентрациях: 1, 2,5, 5 и 10%.

Для каждой концентрации было записано 120 интерферограмм. Количество интерферограмм было выбрано из следующих соображений. Было необходимо получить не менее 10 корректно восстановленных фазовых изображений. Согласно методу динамических фазовых шагов, запись интерферограмм происходила одновременно со смещением опорного зеркала по пилообразному закону. Для корректного восстановления фазового изображения необходимо записать по 10 интерферограмм, при этом все эти интерферограммы должны находиться на временной шкале на одном линейном участке перемещения опорного зеркала. Такая серия интерферограмм, относящаяся к одному фазовому изображению, называется пачкой. Таким образом, из 120 интерферограмм возможно получить до 12 фазовых изображений. Однако генератор, управляющий смещением опорного зеркала, никак не синхронизован с моментом начала записи изображений со светочувствительной матрицы. Следовательно, первая и последняя пачки могли быть неполными и не использовались.

Затем из полученных пар фазовых изображений воздух–раствор были вычислены показатели преломления, по 10 измерений на каждую комбинацию концентрации раствора и длины волны. Пример восстановленного фазового изображения микролунки приведен на рис. 2. Результаты измерений приведены в табл. 3. Измеренные кривые дисперсии показаны на рис. 3.

Из значений, приведенных в табл. 3, видно, что описанный метод позволяет измерять показатель преломле-

Таблица 3. Измеренные значения показателей преломления раствора БСА

Концентрация, %		1		2.5		5		10	
		Среднее значение	СКО	Среднее значение	СКО	Среднее значение	СКО	Среднее значение	СКО
Длина волны, nm	532	1.3575	0.013%	1.3584	0.013%	1.3623	0.050%	1.3688	0.083%
	633	1.3529	0.016%	1.3565	0.015%	1.3614	0.007%	1.3697	0.007%
	850	1.3437	0.048%	1.3515	0.118%	1.3576	0.073%	1.3640	0.139%

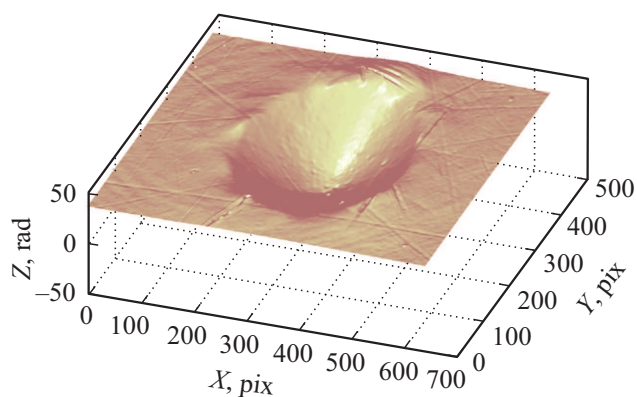


Рис. 2. Восстановленное фазовое изображение микролунки.

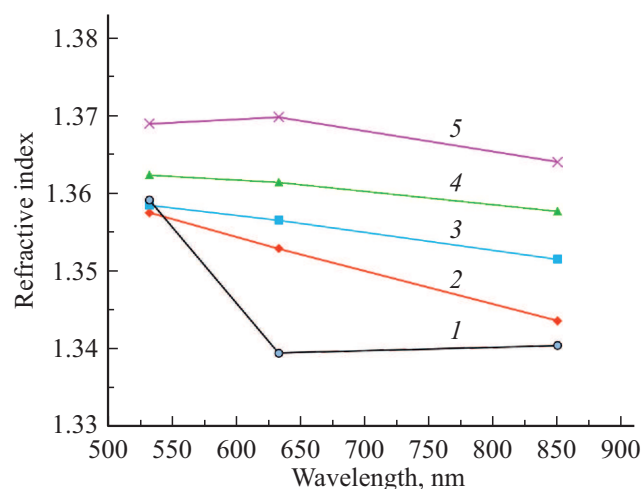


Рис. 3. Кривые дисперсии растворов 0.9% NaCl (1) и 1% (2), 2.5% (3), 5% (4), 10% (5) БСА.

ния жидкостей микроскопических объемов с точностью до 4–5-го знака после запятой.

## Выводы

Предложенный метод измерения показателя преломления малых объемов жидкости, основанный на микроинтерферометрии прозрачных объектов с использованием нескольких длин волн зондирующего излучения, дает новые возможности для исследования свойств био-

логических сред. Данный метод позволяет не только измерять дисперсию биологических сред, но и анализировать их состояние при воздействии различных внешних раздражителей. Использование специализированной кюветы с возможностью ввода различных веществ в процессе эксперимента позволяет анализировать динамику конформаций сложных молекул в реальном времени. Несомненно, представляет интерес измерение инкремента показателя преломления в зависимости не только от концентрации белка или других биологических молекул, но и от их конформационного состояния. Реализация данного метода на серийном приборе МИА-1Д позволит существенно расширить экспериментальные возможности анализа структуры биологических сред с высокой точностью.

## Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-79-30062).

## Список литературы

- [1] Rappaz B., Barbul A., Hoffmann A., Boss D., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.J., Marquet P. // Blood Cells Mol. Dis. 2009. V. 42. N 3. P. 228. doi 10.1016/j.bcmd.2009.01.018
- [2] Levin G., Bulygin T., Kalinin E., Vishnyakov G. // Proc. SPIE. 2001. V. 4260. P. 149. doi 10.1117/12.426766
- [3] Popescu G., Park Y., Choi W., Dasari R.R., Feld M.S., Badizadegan K. // Blood Cells Mol. Dis. 2008. V. 41. N 1. P. 10. doi 10.1016/j.bcmd.2008.01.010
- [4] Minaev V.L., Yusipovich A.I. // Meas. Tech. 2012. V. 55. P. 839. doi 10.1007/s11018-012-0048-2
- [5] Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1708. N 3. P. 362. doi 10.1016/j.bbabo.2005.04.002
- [6] Vishnyakov G., Levin G. // Meas. Tech. 1998. V. 41. N 10. P. 906. doi 10.1007/BF02503961
- [7] Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Ломакин А.Г. Динамический интерферометр // Патент на полезную модель (Россия) № 96234 от 17.02.2010. Бюл. № 20.
- [8] Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Цельмина И.Ю. // Опт. и спектр. 2014. Т. 16. № 1. С. 170. doi 10.7868/S003040341401022X
- [9] Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. // Измерительная техника. 2015. № 11. С. 34.