НИЗКОКОГЕРЕНТНАЯ ПОЛНОПОЛЬНАЯ ИНТЕРФЕРОМЕТРИЯ ОБЪЕМНОЙ СТРУКТУРЫ КРИСТАЛЛИЗОВАВШЕЙСЯ КАПЛИ СОЛЕВОГО РАСТВОРА БЕЛКА

Александр Леонтьевич Кальянов¹ (аспирант, e-mail: kalyanoval@yandex.ru),

Владислав Валерьевич Лычагов¹ (зав. лабораторией, e-mail: lychagov@optics.sgu.ru),

Лидия Игоревна Малинова² (с.н.с., e-mail: lidia.malinova@gmail.com),

Адхамжон Агзамович Пайзиев³ (с.н.с., e-mail: adxam_payziev@rambler.ru),

Владимир Петрович Рябухо¹ (профессор, e-mail: rvp@sgu.ru)

1 Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,

² ФГУ Саратовский НИИ кардиологии Росмедтехнологий,

³ Институт электроники Академии наук Узбекистана

Аннотация

Разработаны программный комплекс визуализации внутренней структуры прозрачного слоистого биологического объекта и алгоритмы измерения его оптических и физических свойств с использованием компьютеризированного метода низкокогерентной полнопольной интерферометрии. Показана возможность применения метода для исследования объемной пространственной структуры кристаллизовавшейся капли биологической жидкости, получаемой методом клиновидной дегидратации, и изучения динамики процессов ее структуризации. Представлены микротомограммы фрагментов капли, предложена методика измерения краевого угла и локального показателя преломления. Обнаружено значительное отличие локального показателя преломления участков исследуемого объекта. Продемонстрирована динамика изменения краевого угла капли в процессе высыхания.

<u>Ключевые слова</u>: полнопольная низкокогерентная интерферометрия, томография, интерференционные измерения, визуализация, клиновидная дегидратация белка.

Введение

Необходимость в ранней, доклинической диагностике различных форм внутренней патологии обусловливает разработку и развитие новых методов оценки функционального состояния отдельных органов и систем человеческого организма. Перспективными в этом отношении являются оптические методы в сочетании с компьютерными средствами обработки изображений [1-5].

В последние годы активно изучается функциональная морфология биологических жидкостей, определяющая закономерности структурных образований в биологических жидкостях, формирующихся при их самоорганизации в процессе перехода в твёрдую фазу [6-23]. К настоящему времени накоплен обширный фактографический материал, иллюстрирующий диагностические возможности изучения твердотельной структуры, образующейся в результате так называемой клиновидной дегидратации биожидкости [6-10]. В качестве основного инструмента использовался оптический микроскоп [6-11], в том числе с применением цифровых средств записи и анализа изображений, позволяющий изучать лишь квазиплоские изображения структурной организации фаций - стабильных морфологических препаратов биологических жидкостей. Однако процесс самоорганизации биологических жидкостей (плазма и сыворотка крови, моча, слюна, слезная жидкость и т.д.) является стадийным процессом упорядочения белково-солевой составляющей, приводящей к формированию сложной трехмерной пространственной структуры.

Указанные соображения предопределяют необходимость разработки для исследования процессов дегидратационной структуризации белка метода и инструмента, обеспечивающих достаточно высокое поперечное и продольное (по глубине объекта) пространственное разрешение, неразрушающий принцип зондирования и возможность регистрации изменений структуры исследуемого объекта в реальном времени. Таким методом может служить полнопольная низкокогерентная интерферометрия (НКИ) в белом свете [24-33], которая объединяет в себе принципы низкокогерентной оптической томографии и интерференционной микроскопии. Данный метод успешно применяется в ряде областей, особенно в биомедицинских исследованиях. В настоящее время известно несколько различных модификаций этого метода: метод спектральной полнопольной НКИ [34], метод поляризационно-чувствительной полнопольной НКИ [35], метод полноцветной полнопольной НКИ [36] и др.

В настоящей работе представлены результаты применения метода полнопольной НКИ к изучению пространственной структуры кристаллизовавшегося солевого раствора альбумина 10%, применение которого в качестве модели биологической жидкости в методе клиновидной дегидратации было предложено в работах [20]. Также представлена разработанная методика визуализации и интерпретации полученных данных, получены томограммы внутренней структуры кристаллизовавшегося раствора, предложен алгоритм определения локального показателя преломления, показана возможность изучения динамики процесса дегидратации на примере определения в динамике краевого угла капли. Исследование локального показателя преломления участков капли показало значительное отличие показателя преломления в центре периферийной части капли от показателя преломления остальных участков, что свидетельствует об изменении в этом месте химического состава и физического состояния исследуемого раствора. Полученные данные хорошо согласуются с результатами других авторов, но, в отличие от предыдущих исследований, предлагают неинвазивный инструмент для оценки изменений концентрационных соотношений белков и солей в исследуемом растворе по изменению показателя преломления. Предварительные исследования кристаллизовавшейся плазмы крови с помощью полнопольной НКИ показали эффективность этого метода и справедливость выводов о его диагностических возможностях, сделанных на основе экспериментов с модельными растворами альбумина 10%.

Методы и техника эксперимента

Использование в оптической интерферометрии, в том числе и в НКИ, цифровых систем записи изображений с матричными фотоприемниками позволяет реализовать параллельный прием и обработку интерференционных сигналов от массива элементов (пикселей) анализируемого оптического поля, в частности, изображения объекта. Такие полнопольные системы НКИ позволяют исключить поперечное сканирование контролируемого интерференционного изображения при сохранении необходимости в продольном сканировании [25-27, 29-32, 34-36]. Важное условие, которое должно выполняться в таких системах, состоит в необходимости пространственного разрешения системы интерференционных полос, формирующихся в анализируемом изображении. В полнопольных системах НКИ также возможно использование частично пространственно когерентного излучения протяженных источников света при исключении взаимного поперечного сдвига опорного и объектного интерферирующих полей.

Использованный в настоящей работе полнопольный интерферометр в белом свете разработан на базе оптической схемы микроинтерферометра Линника (рис. 1). Исследуемый объект Оbj располагался на управляемом компьютером микрометрическом предметном столике ОР, обеспечивающем перемещение объекта вдоль оптической оси интерферометра. С помощью специального привода шаг перемещения мог изменяться от 0,015 до 0,1 мкм. Увеличенное изображение фрагмента поверхности образца формировалось на ПЗС-матрице линзой L (фокусное расстояние 308 мм). На оптическое поле изображения накладывалось опорное поле, формируемое с помощью опорного зеркала М и микрообъектива МО2, идентичного микрообъективу МО1 (фокусное расстояние 6,16 мм, апертура 0,65) в объектном канале интерферометра. Наклоном опорного зеркала создавалась система интерференционных полос конечной ширины с периодом ≈0,6 мкм. При использовании источника белого света (белого светодиода) наблюдалась система интерференционных полос низкого порядка, ограниченного длиной временной когерентности излучения. В нашем случае с использованием ПЗС-камеры наблюдалось ≈ 5 полос во всем поле интерференции, что соответствует максимальному порядку интерференции $m \approx 2$ и, соответственно, длине временной когерентности $l_C \approx 1$ мкм, величина которой определяет продольное разрешение системы [37-38]. Реальная часть функции временной когерентности излучения источника, рассчитанная с использованием соотношения Винера-Хинчина [39-40] по экспериментальному спектру источника (рис. 2*a*), приведена на рис. 2*б*.





Obj – объект, PC – персональный компьютер



Рис.2. Спектр излучения источника (а) и реальная часть функции временной когерентности излучения (б), рассчитанная из спектра

При каждом положении образца вдоль оптической оси микроскопа, то есть при различных значениях оптической разности хода света Δ в интерферометре, с помощью ПЗС-камеры записывалось микроизображение объекта с системой интерференционных полос конечной ширины в белом свете, наблюдаемое на выходе интерферометра. На рис. 3 представлен фрагмент интерференционного микроизображения кристаллизовавшейся капли модельного раствора. На изображении достаточно хорошо различимо микроскопическое изображение капли и особенно хорошо наблюдаются системы интерференционных картин, возникающих при наложении опорного поля на изображение.



Рис. 3. Отдельный кадр, полученный при сканировании образца

Рис. 3 иллюстрирует основные особенности микроинтерференционных изображений исследуемого объекта. Видны две системы интерференционных полос (**A** и **B** на рис. 3). Изогнутые полосы системы **A** в верхней части рисунка соответствуют верхней поверхности кристаллизовавшейся капли. Кривизна полос свидетельствует о кривизне поверхности – в рассматриваемом случае о вогнутости (впадинах) участков **A** поверхности, края которых вблизи трещин приподняты. Система полос **B** в нижней части изображения соответствует поверхности стеклянной подложки, видимой сквозь трещины в структуре кристаллизовавшегося раствора соли и белка.

Кроме этого существует еще как минимум одна система интерференционных полос, соответствующая границе раздела образец-подложка. Так как показатель преломления кристаллизовавшегося солевого раствора белка (или биологической жидкости) больше 1, то оптическая толщина образца больше чем его геометрическая толщина. Следовательно, интерференционные полосы, соответствующие границе образец-подложка, на интерферограмме будут смещены на величину, зависящую от толщины и показателя преломления образца, расположенного на подложке. В случае трещин толщина образца равна нулю и положение полос соответствует реальному положению подложки. Интерференционные полосы, соответствующие границе образец-подложка, расположены в шкале разности хода дальше полос, соответствующих границе воздух-подложка. Таким образом, при смещении образца вдоль оси Z наблюдается еще одна система полос, возникающая при интерференции опорной волны с излучением, отразившимся от подложки и прошедшим через толщу образца.

Вышеприведенные суждения справедливы для самого простого случая, когда объект состоит из двух поверхностей разделов сред: воздух-образец и образец-подложка. На рис. 3 вдоль трещин видны более светлые участки, чем остальная часть объекта. Это участки отслоения кристаллизовавшейся структуры от подложки. Здесь между образцом и подложкой возникает воздушная прослойка. Это означает, что появляется еще одна граница раздела сред и объект исследования можно условно представить в виде трех границ: воздух-образец, образец-воздух и воздух-подложка. Соответственно, в данной области возникает три системы интерференционных полос. Интерпретация таких интерферограмм может быть затруднена из-за слишком малой толщины воздушного зазора и наложения двух систем интерференционных полос друг на друга. Кроме того, в воздушном зазоре возникает своя интерференционная картина полос равной толщины, которые можно наблюдать в обычном микроскопе без использования опорной волны. Если угол клина достаточно мал, то период этих полос может быть значительным и сравнительно большие участки объекта будут иметь однородную цветную окраску интерференционной природы. Система этих полос позволяет измерять высоту и угол воздушного клина, используя только микроскоп без опорного канала.

С диагностической точки зрения, наличие и характер отслоений свидетельствуют о проявлении дефигурации белка, что связано с его исходными свойствами – с наличием или отсутствием патологических изменений, например, состава плазмы крови.

Обработка данных

Процедура цифровой обработки микроизображений с интерференционными полосами иллюстрируется на рис. 4а. Каждый пиксель ПЗС-матрицы может быть рассмотрен как отдельный фотоприемник, регистрирующий изменение средней интенсивности $I(\Delta)$ на своей апертуре в зависимости от оптической разности хода Δ в интерферометре. Таким образом, фотоэлектрический отклик каждого из пикселей камеры представляет собой элементарный А-скан одной точки исследуемого объекта вдоль нормали к поверхности объекта (здесь и далее используется принятая терминология, согласно которой А-сканом называется скан объекта по глубине (вдоль оси Z) в одной точке; В-сканом – скан объекта в плоскости XZ (YZ)). Полученная в результате сканирования серия кадров позволяет программно сформировать и визуализировать объемное томографическое изображение структуры объекта.

На рис. 46 представлен фрагмент А-скана, из которого можно оценить продольное разрешение системы как ≈ 1 мкм. Поперечное разрешение системы составляло также ≈ 1 мкм при размере кадра 421×316 мкм.



Рис. 4. Алгоритм обработки экспериментальных данных: 11, 12,..., IN – серия кадров, записанных при различных значениях оптической разности хода в микроинтерферометре (а); зависимость интенсивности света в одном пикселе кадра от оптической разности хода в интерферометре (б)

С целью увеличения соотношения сигнал/шум и исключения постоянной составляющей в сигнале, связанной с влиянием некогерентной засветки от участков объекта, находящихся за пределами длины когерентности, осуществлялась численная высокочастотная фильтрация выделенных из изображений сигналов.

Разработанный программный комплекс позволяет выделить из серии изображений зависимость интенсивности оптического сигнала от глубины и выделить интерференционные импульсы, соответствующие границам раздела сред. Дальнейшая обработка позволяет визуализировать полученные данные. Трехмерное изображение дает наглядное представление о внутренней структуре объекта, а Аи В-сканы удобно использовать для количественного анализа.

Для визуализации пространственной структуры объекта анализировался массив А-сканов. Для каждой точки *A_{i, j,k}* проверялось следующее условие:

$$A_{i,j,k} \ge M \ . \tag{1}$$

Здесь $A_{i, j, k}$ – значение сигнала в точке (i, j, k),

М – среднее значение сигнала по всему анализируемому объему, определяемое по формуле:

$$M = K \cdot \sum_{i=1..m} \sum_{j=1..n} \sum_{k=1..p} \frac{A_{i,j,k}}{m \cdot n \cdot p},$$
 (2)

где K – константа; $m \times n$ – размер кадра в пикселях, p – количество кадров, i=1..m, j=1..n, k=1..p.

Из всех точек объема, удовлетворяющих условию (1), формировался массив данных, на основании которых и проводилось построение трехмерного изображения объекта. Для этого использовалась функция scatter3 (MATLAB). В результате на экран выводилось трехмерное пространство, в котором были отмечены точки, соответствующие положению интерференционных сигналов от границ раздела сред внутри объекта. Причем цвет точки соответствовал ее координате по оси Z, а размер – амплитуде сигнала в этой точке [24]. Однако из-за зашумленности сигнала работа с таким изображением затруднена. На рис. 5 приведен пример трехмерного изображения внутренней структуры кристаллизовавшегося раствора альбумина 10%. В-скан позволяет с точность до 0,015 мкм определять положение отражающей поверхности (или границы раздела сред) и оптические расстояния между ними. Для его формирования использовались сигналы элементов ПЗС-матрицы, лежащие на отрезке, соединяющем точки $A_{i1,j1,k}$ и $B_{i2,j2,k}$. Здесь (i1, j1) и (i2, j2) – координаты точек на поперечной плоскости ХУ в пикселях, k – номер кадра в серии (рис. 3*a*). Таким образом анализируется плоскость, определяемая набором отрезков AB_k для k=1..p. После фильтрации каждого А-скана методом скользящего среднего для подавления случайных шумов датчика изображения



из данных выделяется переменная составляющая

Алгоритм дальнейшей обработки данных зависит от режима сканирования. При шаге сканирования 0,1 мкм одной интерференционной осцилляции соответствуют всего две точки сигнала. В этом случае наибольший контраст и информативность В-скана достигались при визуализации модуля первой производной сигнала вдоль оси Z:

$$S_{i,j,k} = A_{i,j,k+1} - A_{i,j,k} , \qquad (3)$$

где *S* –массив данных, выводимых на экран; $S_{i,j,k}$ – значение интенсивности в точке (i, j, k) отображаемого массива; $A_{i,j,k}$ – значение сигнала в точке (i, j, k).

При шаге 0,015 мкм на одну интерференционную осцилляцию приходилось 20 отсчетов. К переменной составляющей сигнала прибавлялся ее модуль. При этой операции происходило удвоение положительной составляющей сигнала, а отрицательная приравнивалась нулю. Это позволяло значительно контрастировать интерференционную картину, сохранив при этом случайные флуктуации интенсивности на низком уровне:

$$S_{i,j,k} = \frac{1}{2} \left(A_{i,j,k} - E_{i,j,k} + \left| A_{i,j,k} - E_{i,j,k} \right| \right), \tag{4}$$

где $E_{i,j,k}$ – постоянная составляющая сигнала в точке (i, j, k).

Такая обработка позволяет исключить низкочастотные флуктуации интерференционного сигнала, вызванные неравномерностью распределения интенсивности в микроскопическом изображении исследуемого фрагмента капли и дефокусировкой при сканировании этого фрагмента.

Экспериментальные результаты. Определение локального показателя преломления

На рис. 6а и 6б в качестве примера представлены изображения, полученные при сканировании фации, образованной раствором альбумина, а на рис. 66 - В-скан выделенного участка. Изображение трехмерной структуры этого участка представлено на рис. 5. Микроскопическое изображение с интерференционными полосами разделено на 4 участка трещинами. Наши исследования [24] и работы других авторов [6,8-12,20-23] показывают, что трещины, характерные для метода клиновидной дегидратации, достигают подложки, на которой лежит образец, то есть пронизывают фацию на всю ее высоту, разделяя ее на отдельные фрагменты. Сквозь эти трещины удается наблюдать интерференционный сигнал от подложки. Это позволяет определить локальную геометрическую (а не оптическую) толщину образца и, соответственно, коэффициент преломления, как показано ниже.

На рис. 6*а* в области фокусировки находится верхняя поверхность трех фрагментов фации – на них видны интерференционные полосы. Изгиб интерференционных полос вызван рельефом поверхности фрагментов и свидетельствует о небольшой вогнутости поверхности. Из В-скана (рис. 6*6*) видно, что высота данных фрагментов около 20-25 мкм.



Рис. 6. Микроскопические изображения с интерференционными полосами, полученные в ходе сканирования фации, образованной раствором альбумина (а, б), и построенный В-скан выделенного сечения (в), показанного прямыми линиями на изображениях а и б. Наклонная пунктирная линия показывает положение поверхности стеклянной подложки; буквами G отмечен сигнал от нее, полученный в местах трещин в образце; f – оптическая толщина фации на отмеченным участке; s – смещение сигнала от подложки, вызванное образцом с показателем преломления больше единицы Поверхность четвертого фрагмента находится значительно выше (около 55 мкм), поэтому на изображении, приведенном на рис. 6*a*, на этой части отсутствуют интерференционные полосы.

На рис. 66 в области фокусировки находится подложка под объектом. Изгибы интерференционных полос вызваны локальным изменением толщины фрагментов объекта над подложкой. Интерференционный сигнал формируется от поверхности подложки под всеми четырьмя наблюдаемыми фрагментами, что говорит об их примерно равной толщине. При этом положении образца не наблюдается сигнал внутри трещин, так как разность хода опорной и отраженной от подложки волн для этих областей оказывается больше длины временной когерентности.

По сформированной томограмме сечения фации на рис. 6в можно восстановить его пространственную структуру. В первую очередь, обращает на себя внимание тот факт, что фрагменты частично отслоились от подложки, существует воздушная прослойка между участками фации и стеклом. Аналогичный эффект наблюдался во всех наших экспериментах [24], а также в работах других авторов [6, 8, 20-23]. Причем высота этой прослойки может быть существенной. Так фрагмент, изображенный справа, поднят над подложкой на 30 мкм, что превышает толщину самой фации на этом участке. В то же время центральный фрагмент практически не имеет отслоения и плотно прилегает к стеклу.

На примере фрагмента, изображенного слева на томограмме (рис. 6в), можно изучить структуру сигнала, получаемого от участка фации с отслоением. Самая верхняя граница раздела сред с различным показателем преломления - граница воздух-поверхность фации. Именно сигнал от этой границы расположен сверху на томограмме на уровне 20 мкм. Ниже расположена граница раздела фация-воздушная прослойка (7 мкм). Зная положение этих границ, можно определить оптическую толщину фации на этом участке – 13 мкм (обозначена f на рис. 6в). Затем следует граница воздух-стекло (2 мкм). Оптическая толщина воздушной прослойки – 5 мкм. Следует учитывать, что толщина каждого слоя на томограмме есть произведение его геометрической толщины на показатель преломления. Соответственно толщина воздушной прослойки действительно составляет 5 мкм, а толщина фации в этом месте не равна 13 мкм.

Еще один эффект, вызванный показателем преломления фации, – это смещение интерференционного сигнала от поверхности подложки под фацией. Величину смещения можно измерить относительно несмещенного участка – дна трещины. В случае рассматриваемого фрагмента смещение составляет около 7 мкм (обозначено *s* на рис. 6*в*).

Используя эти данные, можно определить локальный показатель преломления вещества, образующего фацию, а также изучить характер его изменения в различных участках фации. На рис. 7*а* показан профиль поверхности кристаллизовавшейся капли модельного раствора биологической жидкости (10% альбумин), полученный с помощью интерференционных измерений. Вертикальные линии показывают положения трещин в слое фации. На рис. 7*б* показаны экспериментальные значения показателя преломления различных участков фации, измеренные с точностью до 2 знака после запятой. Точность определения показателя преломления ограничена точностью измерения толщин соответствующих слоев в капле. Изменение коэффициента преломления может свидетельствовать об изменении состава вещества и плотности в различных участках.



Рис. 7. Профиль поверхности фации, образованной модельным раствором (альбумин 10%) (а), и показатель преломления различных участков фации (б)

Алгоритм определения локального показателя преломления можно рассмотреть на примере фрагмента фации, томограмма которого представлена на рис. 6 ϵ . Пунктиром отмечено положение верхней поверхности подложки, определенное по интерференционным сигналам от дна трещин (отмечено буквами G на рисунке). Измеряя оптическую толщину f объекта в некоторой точке и величину смещения сигнала от подложки s, можно определить средний показатель преломления фации в этой точке по формуле:

$$n = \frac{f}{f - s},\tag{5}$$

где n – средний показатель преломления в локальном участке фации; f – оптическая толщина фации в данной точке; s – величина смещения сигнала от подложки относительно ее реального положения.

Наличие воздушных зазоров проявляется в режиме наблюдения обыкновенного микроскопического изображения (без использования опорного пучка света) в виде нескольких окрашенных интерференционных полос или в виде одной полосы того или иного цвета. По этим полосам, по их цветовой окраске можно определить величину воздушного зазора, которая, как правило, равна 0,1-0,5 мкм. Воздушные зазоры большей величины уже не проявляются в обычном микроскопическом изображении, наблюдаемом в белом свете, изза предельно малой длины временной когерентности такого излучения. Использование одноцветного излучения позволяет наблюдать полосы более высокого интерференционного порядка от зазоров в несколько микрометров. Однако определить величину такого зазора по микроскопическому изображению уже нельзя, поскольку отсутствует цветовая окраска и, как правило, нет определенности в положении интерференционной полосы нулевого порядка. Измерения толщины зазора, как установлено в нашей работе, возможно в режиме микроинтерферометра с использованием белого света для обеспечения предельно высокой разрешающей способности (см., например, рис. 6в).

Определение локального угла наклона поверхности

Метод полнопольной микроинтерферометрии также позволяет измерять локальные углы наклона поверхности фации. В работе была исследована динамика изменения краевого угла капли раствора альбумина 10% в процессе дегидратации. Краевой угол - это угол между подложкой и касательной к поверхности капли в точке, лежащей на границе капли, измеренный вдоль направления, перпендикулярного этой границе [21,41]. Исходя из увеличения, даваемого системой, можно считать, что вблизи границы капли (50-100 мкм) радиус кривизны ее поверхности принимается бесконечно большим (рис. 8а и 8в). Тогда краевой угол можно определить непосредственно как угол между поверхностью подложки и поверхностью капли (рис. 8а и 8в). Вскан и соответствующее микроскопическое изображение с системой интерференционных полос в начальный момент времени и спустя 1 час 20 мин показаны на рис. 8, где прямой белого цвета на интерференционных изображениях показано направление В-скана. На рис. 8а и 8в пунктирными линиями показаны углы, формируемые подложкой и поверхностью капли.

На рис. 9 представлена зависимость краевого угла высыхающей капли раствора альбумина 10% от времени. Как видно из графика, основное изменение краевого угла происходит в первые 15-20 мин. после нанесения раствора на подложку. После этот угол продолжает изменяться незначительно и стремится к некоторому постоянному значению. Вместе с тем установлено, что положение края капли не изменяется при высыхании. Другими словами, площадь капли не меняется в процессе высыхания.



Рис. 8. В-скан и кадр интерференционного изображения из серии, полученной при сканировании капли сразу после нанесения модельного раствора на подложку (a, б) и через 1 час 20 мин (в, г)

Разработанная методика позволяет определять значение краевого угла с точностью до 1 градуса, причем есть возможность измерять наклон поверхности на произвольном удалении от края фации.



Рис. 9. Изменение краевого угла капли модельного раствора в процессе высыхания

Как видно на рис. 8, наблюдаются существенные изменения структуры высыхающего раствора со временем. Примерно через 30 минут после нанесения жидкости на предметное стекло образуются трещины на всю глубину фации. Сеть трещин со временем развивается и усложняется. Сразу после появления трещин возникают и отслоения фации от подложки. Эти участки отслоения локализованы вдоль трещин, а с течением времени (до нескольких часов) они увеличиваются в размерах (возрастает и площадь, и высота отслоений).

Обсуждение и заключение

Проведенные экспериментальные исследования наглядно продемонстрировали возможность использования современного метода низкокогерентной микроинтерферометрии полного поля в белом свете для исследования внутренней структуры дегидратированного солевого раствора белка. Основными преимуществами метода являются высокое разрешение (как в продольном, так и в поперечном направлениях) и высокое быстродействие. Так, разрешение разработанной системы составляло по всем трем осям XYZ ~1 мкм. В то же время, благодаря полнопольному режиму быстродействие системы остается на высоком уровне. Сканирование объекта происходит по всему полю зрения одновременно, что исключает необходимость сканирования вдоль поверхности исследуемого объекта. Скорость определяется только сканированием по глубине. Это позволяет значительно повысить быстродействие системы по сравнению с одиночным детектором и исследовать нестационарные объекты.

Высокое разрешение системы позволяет проводить исследование и определение с высокой точностью таких характеристик объекта, как показатель преломления, оптическая и геометрическая толщина его фрагментов, угол наклона поверхности. Режим полного поля значительно сокращает время сканирования объекта и позволяет проводить исследования в реальном времени.

Отличительной особенностью исследований, результаты которых изложены в настоящей работе, является объективизация пространственной организации фаций: показатель преломления, оптическая и геометрическая толщина ее фрагментов, угол наклона поверхности. Каждый из перечисленных параметров связан с индивидуальными особенностями состава биологической жидкости: соотношение грубо- и мелкодисперсных белков, преимущественный характер их организации, присутствие ксенобиотиков, что и позволяет проводить клинические параллели. С другой стороны, диагностическая значимость перечисленных параметров в клинической кардиологии еще не вполне изучена, что определяет необходимость продолжения исследований.

Представленные в работе результаты использования техники полнопольной НКИ для изучения процесса клиновидной дегидратации показали ее эффективность для данного рода исследований. Полнопольный микроинтерферометр в белом свете может стать удобным и функциональным инструментом для повышения информативности метода клиновидной дегидратации и применения его в клинической практике. Однако возможности метода полнопольной НКИ в биомедицинских исследованиях гораздо шире и не ограничиваются лишь одной рассмотренной областью его применения. Полученные в работе результаты и разработанный программный комплекс могут быть использованы для изучения различных прозрачных и полупрозрачных объектов, в том числе большого класса биологических объектов, и динамических процессов, протекающих в них.

Предварительные исследования кристаллизовавшейся плазмы крови методом полнопольной НКИ показали перспективность его применения в кардиологии. Широкое исследование фаций плазмы крови здоровых пациентов и пациентов, страдающих различными кардиологическими заболеваниями, позволит оценить его эффективность и информативность.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» и при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 08-02-90275-Узб_а).

Литература

- Матюнин, С.А. Моделирование состояния эндотелиальных клеток по их фотоизображению / С.А. Матюнин, Н.С. Селиверстова // Компьютерная оптика. – 2002. – Т. 24. – С. 173–177.
- Куприянов, А.В. Оценивание диагностических параметров сосудов на изображениях глазного дна в области диска зрительного нерва / А.В. Куприянов, Н.Ю. Ильясова, М.А. Ананьин // Компьютерная оптика. – 2006. – Т. 29. – С. 141-145.
- Ильясова, Н.Ю. Метод выделения центральных линий кровеносных сосудов на диагностических изображениях / Н.Ю. Ильясова, А.О. Корепанов, П.М. Чикулаев // Компьютерная оптика. – 2006. – Т. 29. – С. 146-150.
- 4. **Жулькова, Е.С.** Технология выделения лейкоцитов на изображениях препаратов крови / Е.С. Жулькова,

Н.Ю. Ильясова, А.В. Куприянов // Компьютерная оптика. – 2007. – Т. 31. -№ 2. – С. 77-81.

- Пластинин, А.И. Разработка методов формирования цвето-текстурных признаков для анализа биомедицинских изображений / А.И. Пластинин, А.В. Куприянов, Н.Ю. Ильясова // Компьютерная оптика. – 2007. – Т. 31, № 2. –С. 82-85.
- Шабалин, В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. - М.: Хризостом, 2001. – 304 с.
- Рапис, Е.Г. Изменение физической фазы неравновесной пленки комплекса белков плазмы крови у больных с карциномой / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. – 2002. – Т. 72. -№ 4. – С. 139–142.
- Яхно, Т.А. О существовании регулярных структур в жидкой сыворотке (плазме) крови человека и фазовых переходах в процессе ее высыхания / Т.А. Яхно, О.А. Седова, А.Г. Санин, А.С. Пелющенко // Журнал технической физики. – 2003. – Т.73. -№4. 23–27.
- Малинова, Л.И. Диагностическое значение дегидратационной самоорганизации плазмы крови больных ишемической болезнью сердца / Л.И. Малинова, Ю.В. Сергеева, Г.В. Симоненко, Т.П. Денисова, П.Я. Довгалевский, В.В. Тучин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – №10. – С. 14-16.
- Функциональная морфология сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца: атлас / сост.: Л.И. Малинова, А.А. Свистунов, Т.П. Денисова, Ю.В. Сергеева. Саратов: Новый ветер, 2008. 56 с.
- Тарасевич, Ю.Ю. Качественный анализ закономерностей высыхания капли многокомпонентного раствора на твердой подложке / Ю.Ю. Тарасевич, Д.М. Православнова // Журнал технической физики. 2007. Т. 77. -№ 2. С. 17–21.
- 12. Рапис, Е.Г. Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка / Е.Г. Рапис // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14. -№ 17. С. 1560–1564.
- Рапис, Е.Г. Автоволновой процесс в динамике фазового перехода в пленке белка / Е.Г. Рапис, Г.Ю. Гасанова // Журнал технической физики. – 1991. – Т. 61, № 4. – С. 62–71.
- 14. Рапис, Е.Г. Свойства и виды симметрии твердотельной кластерной фазы белка. / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. 2001. Т. 71. -№ 10, С. 104–111.
- 15. Рапис, Е.Г. К проблеме нуклеации (образования клеток) при самоорганизации наноструктур белка in vitro и in vivo / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. – 2005. – Т.75. -№. 6. – С. 107–113.
- 16. Гольбрайх, Е. О формировании узора трещин в свободно высыхающей пленке водного раствора белка / Е. Гольбрайх, Е.Г. Рапис, С.С. Моисеев // Журнал технической физики. – 2003. – Т.73. -№ 10. – С. 116–121.
- Рапис, Е.Г. Самоорганизация и супермолекулярная химия пленки белка от нано- до макромасштаба / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. – 2004. – Т. 74. -№ 4. – С. 117–122.
- Рапис, Е.Г. Неравновесное состояние наноструктур белка при его самоорганизации / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. – 2006. – Т. 76. -№ 2. – С. 121– 127.
- Рапис, Е.Г. Самосборка кластерных пленок белка в процессе конденсации (аллотропная неравновесная некристаллическая форма) / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. – 2000. – Т. 70, № 1. – С. 122–133.

- Тарасевич, Ю.Ю. Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации / Ю.Ю. Тарасевич, А.К. Аюпова // Журнал технической физики. – 2003. – Т. 73, № 5. – С. 13–18.
- Терасевич, Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей / Ю.Ю. Тарасевич // Успехи физических наук. –2004. – Т. 174, № 7. – С. 779–790.
- 22. Яхно, Т.А. Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле / Т.А. Яхно, В.Г. Яхно, А.Г. Санин, О.А. Санина, А.С. Пелюшенко // Журнал технической физики. – 2004. – Т. 74, № 8. – С. 100– 108.
- 23. Яхно, Т.А. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей / Т.А. Яхно, В.Г. Яхно // Журнал технической физики. 2009. Т. 79, № 8. С. 133–141.
- 24. Лычагов, В.В. Низкокогерентная микроинтерферометрия внутренней структуры кристаллизовавшейся плазмы крови / В.В. Лычагов, А.Л. Кальянов, В.П. Рябухо / Оптика и спектроскопия. – 2009. – Т. 107, № 6. – С. 909–916.
- Dubois, A. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope / A. Dubois, L. Vabre, A. Boccara, E. Beaurepaire // Applied Optics. – 2002. – Vol. 41, N. 4. – P. 805–812.
- Vabre, L. Thermal-light full-field optical coherence tomography / L. Vabre, A. Dubois, A.C. Boccara // Optics Letters. – 2002. – Vol. 27, N. 7. – P. 530–532.
- Laude, B. Full-field coherence tomography with thermal light / Laude B., De Martino A., Dravillon B., Benattar L., Schwartz L. // Applied Optics. – 2002. – Vol. 41, N. 31. – P. 6637–6645.
- Вишняков, Г.Н. Томографическая микроскопия трехмерных фазовых объектов в частично когерентном свете / Г.Н. Вишняков, Г.Г. Левин, В.Л. Минаев // Оптика и спектроскопия. – 2003. – Т.95, № 1. – С. 142– 146.
- Oh, W.Y. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy using InGaAs camera / Oh W.Y., Bouma B.E., Iftimia N., Yun S.H., Yelin R., Tearney G.J. // Optics Express. – 2006. – Vol.14, N. 2. – P. 726–735.
- Ohmi, M. Ultra-high resolution optical coherence tomography (OCT) using a halogen lamp as the light source / M. Ohmi, M. Haruna. // Optical Review. – 2003. – Vol. 10, N. 5. – P. 478–481.
- Akiba, M. In vivo video-rate cellular-level full-field optical coherence tomography / M. Akiba, Kin Pui Chan. // Journal of biomedical optics. – 2007. – Vol. 12, N. 6. – P. 064024.
- Dubois, A. Ultrahigh-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography / A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, C. Boccara // Applied Optics. – 2004. – Vol. 43, N. 14. – P. 2874–2883.
- 33. Angelsky, O.V. Optical correlation diagnostics of rough surfaces with large surface inhomogeneities / O.V. Angelsky, A.P. Maksimyak, P.P. Maksimyak, S.G. Hanson // Optics express. – 2006. – V. 14, N. 6. – P. 7299–7311.
- Dubois, A. Spectroscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy / A. Dubois, J. Moreau, C. Boccara // Optics Express. – 2008. – Vol. 16, N. 21. – P. 17082–17091.
- 35. Moneron, G. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography / G. Moneron, A.C. Boccara,

A. Dubois // Optics letters. - 2007. - Vol. 32, N. 14. - P. 2058-2060.

- Lingfeng, Yu Full-color three-dimensional microscopy by wide-field optical coherence tomography / Yu Lingfeng, M.K. Kim // Optics Express. – 2004. – Vol. 12, N. 26. – P. 6632–6641.
- 37. Ахманов, С.А. Введение в статистическую радиофизику и оптику / С.А. Ахманов, Ю.Е. Дьяков, А.С. Чиркин М.: Наука. 1981. 640 с.
- 38. Гудмен, Дж. Статистическая оптика / Дж. Гудмен; пер. с англ. М.: Мир, – 1988. – 528 с. (J.W. Goodman. Statistical optics. John Wiley & Sons, New York, 1985).
- 39. Fercher, A. F. Optical coherence tomography principles and applications / A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, T. Lasser // Report Prog. Phys. – 2003. – Vol. 66. N. 2.– P. 239–303.
- 40. Гуров, И.П. Оптическая когерентная томография: принципы, проблемы и перспективы / И.П. Гуров // В кн.: Проблемы когерентной и нелинейной оптики, под ред. И.П. Гурова и С.А. Козлова. – СПб :СПбГУ ИТ-МО. – 2004. – С. 6-30.
- 41. Бородин, С.А. Автоматизированное устройство для оценки степени чистоты подложки по динамическому состоянию капли жидкости, наносимой на ее поверхность / С.А. Бородин, А.В. Волков, Н.Л. Казанский // Компьютерная оптика. – 2005. – Т. 28. – С. 69-76.

References

- Matunina, S.A. Endothelial cells status modeling using its photos / S.A. Matunina, N.S. Seliverstova // Computers optics. – 2002. – Vol. 24. – P. 173-177.
- Kupriyanov, A.V. Diagnostic parameters of eye grounds blood vessels near optic disk estimation / A.V. Kupriyanov, N.Yu. Il'yasova, M.A. Anan'in // Computers optics. – 2006. – Vol. 29. – P. 141-145.
- Il'yasova, N.Yu. Method of central lines of blood vessels separation on diagnostic images / N.Yu. Il'yasova, A.O. Korepanov, P.M. Chikulaev // Computers optics. – 2006. – Vol. 29. – P. 146-150.
- Gul'kova, E.S. Technique of leukocyte separation on images of blood preparation / E.S. Gul'kova, N.Yu. Il'yasova, A.V. Kupriyanov // Computers optics. – 2007. – Vol. 31, N. 2. – P. 77-81.
- Plastinin, A.I. Develop of methods of color and texture characters forming for biomedical images analyzing / A.I. Plastinin, A.V. Kupriyanov, N.Yu. Il'yasova // Computers optics. – 2007. – Vol. 31, N. 2. – P. 82-85.
- Shabalin, V.N. Morphology of human biological liquids / V.N. Shabalin, S.N. Shatohina – Moscow, Hrizostom, 2001. – 304 p. – (in Russian).
- Rapis, E. A change in the physical state of a nonequilibrium blood plasma protein film in patients with carcinoma / E. Rapis // Technical Physics. – Vol. 47, N. 4. – P. 510– 512.
- Yakhno, T.A. On the existence of regular structures in liquid human blood serum (plasma) and phase transitions in the course of its drying / T.A. Yakhno, O.A. Sedova, A.G. Sanin, A.S. Pelyushenko // Technical Physics. – 2003. – Vol. 48, N. 4. – P. 399–403.
- Malinova, L.I. Diagnostic significance of plasma dehydration self-organization of patients with hart ischemia disease / L.I. Malinova, Yu.V. Sergeeva, G.V. Simonenko, T.P. Denisova, P.Ya. Dovgalevskii, V.V. Tuchin // Clinical Laboratory Diagnostic. – 2007. – N. 10. – P. 14-16. – (in Russian).

- Fundamental morphology of blood serum of patients with hart ischemia disease / edited by L.I. Malinova, A.A. Svistunov, T.P. Denisova, Yu.V. Sergeeva. – Saratov, Novii Veter, 2008. – 56 p. – (in Russian).
- Tarasevich, Yu.Yu. Drying of a multicomponent solution drop on a solid substrate: Qualitative analysis / Yu.Yu. Tarasevich, D.M. Pravoslavnova // Technical Physics. –2007 – Vol. 52, N. 2. – P. 159–163.
- Rapis, E.G. Regular structure formation of drying protein film / E.G. Rapis // Technical Physics Letters. – 1988. – Vol. 14, N. 17. – P. 1560–1564. – (in Russian).
- Rapis, E.G. Autowave process of protein film phase change / E.G. Rapis // Technical Physics. – 1991. – Vol. 61, N. 4. – P. 62–71. – (in Russian).
- Rapis, E. Properties and symmetry of the solid cluster phase of protein / E. Rapis // Technical Physics. – Vol. 46, N. 10. – P. 1307–1313.
- Rapis, E. On the problem of nucleation (cell formation) in self-organization of protein nanostructures in vitro and in vivo / E. Rapis // Technical Physics. – Vol. 50, N. 6. – P. 780–786.
- Golbraikh, E. On the crack pattern formation in a freely drying protein film / E. Golbraikh, E.G. Rapis and S.S. Moiseev // Technical Physics. – Vol. 48, N. 10. – P. 1333–1337.
- Rapis, E. Self-organization and supramolecular chemistry of protein films from the nano-to the macroscale / E. Rapis // Technical Physics. – Vol. 49, N. 4. – P. 494–498.
- Rapis, E. Nonequilibrium state of self-organized protein nanostructures / E. Rapis // Technical Physics. – Vol. 51, N. 2. – P. 268–273.
- Rapis, E.G. Self-assembly of cluster protein films (allotropic nonequilibrium noncrystalline modification) during the process or their condensation / E.G. Rapis // Technical Physics. – 2000. – Vol. 45, N. 1. – P. 121–131.
- Tarasevich, Yu.Yu. Effect of diffusion on the separation of components in a biological fluid upon wedge-shaped dehydration / Yu.Yu. Tarasevich, A.K. Ayupova // Technical Physics. –2003. – Vol. 48, N. 5. – P. 535–540.
- Tarasevich, Yu.Yu. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids / Yu.Yu. Tarasevich // Physics-Uspekhi. – 2004. – Vol. 47, N. 7. – P.717.
- Yakhno, T.A. Protein and salt: Spatiotemporal dynamics of events in a drying drop / T. A. Yakhno, V. G. Yakhno, A. G. Sanin, O. A. Sanina and A. S. Pelyushenko // Technical Physics. -2004. - Vol. 49, N. 8. - P. 1055-1063.
- Yakhno, T.A. Structural evolution of drying drops of biological fluids / T.A. Yakhno, V.G. Yakhno // Technical Physics. 2009. –Vol. 54, N. 8. 1219–1227.
- Lychagov, V.V. Low_Coherence Interference Microscopy of the Internal Structure of Crystallized Blood Plasma / V.V. Lychagov, A.L. Kalyanov, V.P. Ryabukho // Optics and Spectroscopy. – 2009. – Vol. 107, N. 6. – P. 859–865.
- Dubois, A. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope / A. Dubois, L. Vabre, A. Boccara, E. Beaurepaire // Applied Optics. – 2002. – Vol. 41, N. 4. – P. 805–812.
- Vabre, L. Thermal-light full-field optical coherence tomography / L. Vabre, A. Dubois, A.C. Boccara // Optics Letters. – 2002. – Vol. 27, N. 7. – P. 530–532.
- Laude, B. Full-field coherence tomography with thermal light / Laude B., De Martino A., Dravillon B., Benattar L., Schwartz L. // Applied Optics. – 2002. – Vol. 41, N. 31. – P. 6637–6645.

- 28. Vishnyakov, G.N. Tomographic microscopy of threedimensional phase objects in spatially incoherent light / G.N. Vishnyakov, G.G. Levin, V.L. Minaev // Optics and Spectroscopy. -2003. - Vol. 95, N. 1. - P. 134-138.
- 29. Oh, W.Y. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy using InGaAs camera / Oh W.Y., Bouma B.E., Iftimia N., Yun S.H., Yelin R., Tearney G.J. // Optics Express. - 2006. - Vol.14, N. 2. - P. 726-735.
- 30. Ohmi, M. Ultra-high resolution optical coherence tomography (OCT) using a halogen lamp as the light source / M. Ohmi, M. Haruna. // Optical Review. - 2003. - Vol. 10, N. 5. – P. 478–481.
- 31. Akiba, M. In vivo video-rate cellular-level full-field optical coherence tomography / M. Akiba, Kin Pui Chan. // Journal of biomedical optics. - 2007. - Vol. 12, N. 6. - P. 064024.
- 32. Dubois, A. Ultrahigh-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography / A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, C. Boccara // Applied Optics. -2004. - Vol. 43, N. 14. - P. 2874-2883.
- 33. Angelsky, O.V. Optical correlation diagnostics of rough surfaces with large surface inhomogeneities O.V. Angelsky, A.P. Maksimyak, P.P. Maksimyak, S.G. Hanson // Optics express. - 2006. - V. 14, N. 6. - P. 7299-7311.
- 34. Dubois, A. Spectroscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy / A. Dubois, J. Moreau,

C. Boccara // Optics Express. - 2008. - Vol. 16, N. 21. -P. 17082-17091.

- 35. Moneron, G. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography / G. Moneron, A.C. Boccara, A. Dubois // Optics letters. - 2007. - Vol. 32, N. 14. - P. 2058-2060.
- 36. Lingfeng, Yu Full-color three-dimensional microscopy by wide-field optical coherence tomography / Yu Lingfeng, M.K. Kim // Optics Express. - 2004. - Vol. 12, N. 26. - P. 6632-6641.
- 37. Ahmanov, S.A. Introduction in statistic radiophysics and optics / S.A. Ahmanov, Yu.E. D'yakov, A.S. Chirkin -Moscow, Nauka. – 1981. – 640 p.
- 38. Goodman, J.W. Statistical optics / J.W. Goodman John Wiley & Sons, New York, 1985.
- 39. Fercher, A. F. Optical coherence tomography principles and applications / A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, T. Lasser // Report Prog. Phys. – 2003. – Vol. 66. N. 2.- P. 239-303.
- 40. Gurov, I.P. Optical coherence tomography: principles, problems and perspectives / I.P. Gurov // Problems of coherence and nonlinear optics, edited by I.P. Gurov, S.A. Kozlova. - Sent-Petersburg, SPbGU ITMO. - 2004. - P. 6-30. - (in Russian).
- 41. Borodin, S.A. Automated device for substrate cleanness estimation using dynamic status of liquid drop on substrate surface / S.A. Borodin, A.V. Volkov, N.L. Kazansky // Computers optics. 2005. - Vol. 28. - P. 69-76.

LOW-COHERENCE FULL-FIELD INTERFEROMETRY OF VOLUME STRUCTURE OF CRYSTALLISED SOLINE SOLUTION OF PROTEIN

Alexandr Leont'evich Kalyanov¹ (post graduate, e-mail: kalyanoval@yandex.ru), Vladislav Valer'evich Lychagov¹ (head of laboratory -mail: lychagov@optics.sgu.ru), Lidiya Igorevna Malinova² (senior researcher, e-mail: lidia.malinova@gmail.com), Adhamgjon Agzamovich Paiziev³ (senior researcher, e-mail: adxam_payziev@rambler.ru), *Vladimir Petrovich Ryabukho¹ (prof., e-mail: rvp@sgu.ru)* ¹ Saratov State University named after N.G.Chernyshevsky, ² FGE Saratov SII cardiology Rosmedtechnologii,

³ Institute of Electronic of Uzbekistan Academy of Sciences

Abstract

Low-coherence full-field interferometry method is proposed to investigate inner structure of transparent layered biological objects. Visualization program and algorithm of optical and physical property measurements were worked out. It was shown in the paper that this method can be used in volume structure of crystallized drop of biological liquid investigation in static and dynamic process. Microtomograms of fragments of the drops are shown. Methods of contact angle and local refractive index measurements are investigated. Significant differences of local refractive index of different parts of drops are detected. Dynamic of contact angle of drying drop are shown.

Key words: full-filed low coherence interferometry, tomography, interference measurements, visualization, wedge dehydration of protein.

В редакцию поступила 31.11.2009 г.