

Сверхразрешение на сингулярных участках фазовых изображений

А.В.Кретушев, В.П.Тычинский

С помощью лазерного фазового микроскопа «Эйрискан» показана возможность локализации элементов структуры поверхности с большим градиентом высоты профиля и линейными размерами 25–40 нм, что соответствует превышению рэлеевского критерия в 10–15 раз. Оценка ширины элементов структуры проводилась по протяженности участка повышенной интенсивности флуктуаций фазы. В качестве тест-объекта использовалась металлизированная подложка компакт-диска с известной структурой поверхности. При периодическом сканировании поверхности измерялись флуктуации оптической разности хода, интенсивность которых возрастала на крутых участках профиля. Показано, что протяженность участка повышенной интенсивности флуктуаций фазы близка к измеренной ширине крутого участка профиля. Интенсивность флуктуаций увеличивалась с ростом квадрата градиента высоты, а их пространственная протяженность заметно уменьшалась при увеличении апертуры объектива. Эти измерения объясняют высокую чувствительность динамической фазовой микроскопии к флуктуациям оптической разности хода на участках с большим градиентом показателя преломления. Увеличение интенсивности на склонах профиля фазовой высоты и пространственно-временная корреляция флуктуаций наблюдались в митохондриях и других биологических объектах.

Ключевые слова: флуктуации оптической разности хода, метод динамической фазовой микроскопии, внутриклеточная динамика, сверхразрешение.

1. Введение

Сингулярными точками в фазовых или интерференционных изображениях принято называть такие точки, в окрестности которых амплитуда сигнала стремится к нулю, а фаза становится неопределенной. В экспериментальных условиях эти сингулярности могут возникать на участках поверхности объекта с большой крутизной высоты профиля и проявляться в виде дислокаций волнового фронта или в увеличении интенсивности фазовых флуктуаций.

Возросший в последние годы интерес к проблемам прижизненной микроскопии клеток и динамики макромолекул [1] стимулировал развитие и применение новых оптических методов, обеспечивающих высокое пространственное и временное разрешения. Действительно, по-видимому, почти все внутриклеточные процессы сопровождаются локальными изменениями показателя преломления, поэтому интерференционные методы, обладающие высокой чувствительностью к изменениям оптической разности хода (ОРХ), оказались полезными для получения новой информации [2, 3].

Метод динамической фазовой микроскопии (ДФМ) [2, 3] позволил измерять флуктуации ОРХ $h(x, y, t)$, которые в случае прозрачной среды могут быть связаны с проекцией на плоскость изображения x, y показателя преломления $n(x, y, z, t)$ или с движением объекта в целом. Флуктуации ОРХ могут быть обусловлены как син-

гулярностями поля и его внутренней структурой, так и различными внешними источниками шумов.

Для анализа изменений состояния объекта, представленного его динамическим изображением $h(x, y, t)$, в работе [2] был предложен ряд методов. Например, для выбранного положения линии сканирования в двумерном фазовом изображении объекта могли быть получены трек-диаграммы $h(x, t)$, которые содержали информацию, необходимую для вычисления пространственно-временных корреляционных функций, спектральных портретов, спектров Фурье, вейвлетов и т. п.

Фазовые изображения имеют ряд необычных свойств. Так, с помощью лазерного фазового микроскопа «Эйрискан» [2–4] при измерении тест-объектов была показана [5, 6] возможность увеличения разрешения в 3–5 раз. Разрешающая способность фазового микроскопа зависела не только от числовой апертуры объектива A_n , но также от структуры объекта и, в частности, от локального градиента ОРХ. В сингулярных точках фазовых изображений могут также наблюдаться дислокации волнового фронта [7, 8], связанные с неоднозначностью фазы в окрестности нулей интенсивности интерференционного поля. В этой окрестности крутизна профиля dh/dx в сечении фазового изображения может быть больше реальной «геометрической» крутизны dH/dx . Характерным признаком сингулярных точек является большой градиент фазы (или ОРХ) dh/dx , который возникает, как правило, вблизи структурной неоднородности объекта. В прозрачных средах физической причиной сингулярности может быть также большой градиент показателя преломления.

В окрестности сингулярных точек резко возрастает чувствительность к флуктуациям параметров объекта и влиянию внешних факторов. Аналогичное увеличение

Московский институт радиотехники, электроники и автоматики, Россия, 117454 Москва, просп. Вернадского, 78;
e-mail: kretushev@mail.ru; vladimir@tych.pvt.msu.su

интенсивности флуктуаций вблизи границ устойчивости хорошо известно во многих областях физики, например в теории колебаний и физике фазовых переходов.

В рассматриваемом ниже случае поверхности с субмикронной структурой предполагалось, что протяженность Δ области высокой интенсивности флуктуаций ОРХ $I(x)$ близка к ширине δx участка профиля с большим градиентом высоты. Поскольку $I(x)$ и Δ являются средними величинами за сравнительно большое время измерений, то ширина Δ статистически более достоверна, чем одна из реализаций измерения ширины профиля δx .

Естественно, что ширина Δ зависит от природы источника флуктуаций (может быть характеристикой конкретного микроскопа), числовой апертуры его объектива и пространственного разрешения при измерении динамических процессов. Соответствующий критерий разрешения для Δ по какому-либо принятому соглашению может существенно отличаться от критерия Рэля $R = 0.61\lambda/A_n$ [9, 10], определенного для модели двух идентичных некогерентных точечных источников. Для функциональных изображений, в том числе фазовых, нет общепринятых критериев разрешения. В рассматриваемом здесь случае мы предлагаем ввести определение параметра сверхразрешения в виде $S = R/\Delta \gg 1$, учитывающего оба фактора – локальность динамического процесса и числовую апертуру объектива.

Возможность сверхразрешения в указанном выше смысле далеко не очевидна. Цель приведенных ниже измерений – иллюстрация сверхразрешения и определение условий его реализации в модельном эксперименте на отражающей свет поверхности с субмикронной структурой. Значительно больший практический интерес эти результаты представляют для объяснения флуктуаций на биологических объектах, где на участках с большим градиентом ОРХ наблюдалось увеличение интенсивности и появление характерных метаболических сигналов [11, 12].

2. Результаты измерений

Создание искусственного объекта с субмикронным динамическим профилем достаточно проблематично, а естественные биологические объекты (клетки и органеллы) или нестабильны, или имеют недостаточно известные оптические характеристики. В связи с этим мы проводили измерения на структурированной металлической подложке компакт-диска, априорно предполагая, что на крутых склонах профиля будут наблюдаться более интенсивные флуктуации ОРХ, связанные с собственными шумами прибора.

На фазовом изображении подложки фиксировалось ортогональное к дорожкам положение линии сканирования. Затем при многократном сканировании профиля $h(x)$ в течение 30 с получалась трек-диаграмма $h(x, t)$ и вычислялось распределение интенсивности флуктуаций $I(x)$. Измерения проводились на лазерном фазовом микроскопе «Эйрискан» [2–4] с объективами $30\times/0.65$, $50\times/0.75$ и $100\times/0.95$. Вращением предметного стола можно было изменять кажущуюся крутизну профиля dh/dx на границе дорожки. Для регистрации крутых участков профиля $h(x)$ была необходима погрешность фокусировки не хуже 20 нм.

Из приведенного на рис.1,*a* профиля структуры дорожки видно, что шаг структуры был равен 1.6 мкм, ширина дорожки – 800 нм и высота выступа – 120 нм.

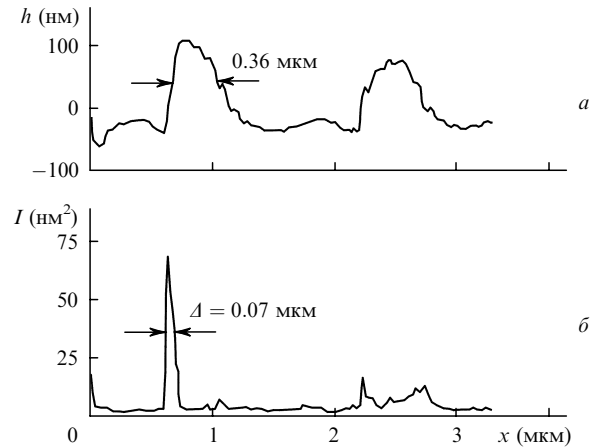


Рис.1. Измеренный вдоль линии сканирования профиль $h(x)$ поверхности компакт-диска, на котором видна характерная структура дорожки (*a*), и интенсивность $I(x)$ флуктуаций ОРХ, рассчитанная по трек-диаграмме, полученной при многократном сканировании профиля $h(x, t)$ (*b*).

Изменение интенсивности флуктуаций $I(x)$ вдоль линии сканирования показано на рис.1,*b*. Положение максимумов интенсивности $I(x)$ совпадало с крутыми склонами профиля, а их ширина Δ оказалась близкой к протяженности крутого участка склона δx . Ширины δx крутых участков и флуктуаций Δ , а также симметрию профиля можно было изменять вращением предметного стола с образцом относительно оптической оси.

Один из таких асимметричных профилей, измеренных с объективом $100\times/0.95$, показан на рис.2,*a*. На рис.2,*b* и *в* показаны изменения интенсивности $I(x)$ и крутизны dh/dx , подтверждающие совпадение положений их максимумов. Видно, что в данном случае ширины максимумов в пределах погрешности измерений ($\pm 20\%$) были равны: $\delta x \simeq \Delta = 25 \pm 5$ нм, что значительно меньше номинального разрешения объектива 400 нм. Аналогичные результаты получены при измерениях с другими объективами. При уменьшении числовой апертуры минимальная ширина профиля увеличивалась, а интенсивность флуктуаций падала. Результаты измерений с объективом $50\times/0.75$ приведены на рис.2,*г–e*.

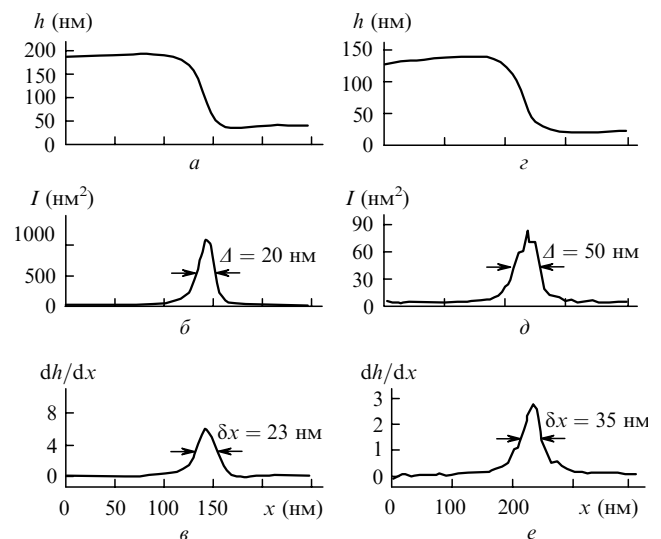


Рис.2. Асимметричный профиль $h(x)$ (*a*, *г*), зависимости интенсивности флуктуаций ОРХ $I(x)$ (*б*, *д*) и крутизны профиля dh/dx (*в*, *е*) от x при измерениях с объективом $100\times/0.95$ (*a–в*) и $50\times/0.75$ (*г–e*).

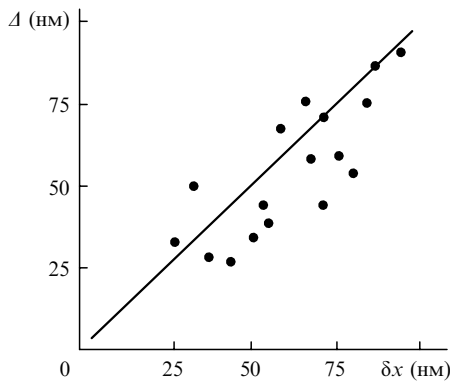


Рис.3. Зависимость ширины Δ областей высокой интенсивности флуктуаций ОРХ от ширины δx соответствующих участков склонов с большим градиентом высоты.

Линейная зависимость в виде приблизительного равенства $\delta x \simeq \Delta$ в широком интервале изменения крутизны следует из рис.3 и 4. Значительная дисперсия отсчетов, по-видимому, объясняется влиянием ряда неконтролируемых факторов (акустическими шумами, дрейфом интерферометра и т.п.). Интенсивность в максимуме оказалась пропорциональна квадрату крутизны dh/dx : $I_{\max} = C(dh/dx)^2$ (рис.4). Из приведенного на рис.5 спектра флуктуаций видно монотонное убывание спектральной плотности и отсутствие контрастных компонент.

3. Обсуждение и выводы

Увеличение интенсивности флуктуаций на участках большой крутизны имеет простое объяснение, и их случайный характер подтверждается монотонным убыванием спектральной плотности с частотой. Зависимость $I(x)$ можно было бы интерпретировать как изображение усредненного во времени распределения интенсивности флуктуаций, регистрируемых в окрестности случайно движущегося элемента поверхности с координатой x_0 и линейным размером δx .

Однако в данном случае объект был неподвижен, а латеральное движение имитировалось собственными шумами прибора. Оценку среднеквадратичной амплитуды δx_0 флуктуаций латеральных смещений можно получить, если принять во внимание квадратичную зависимость интенсивности флуктуаций ОРХ от крутизны профиля: $I_{\max} = C(dh/dx)^2$. Для дисперсии $\langle (\delta x_0)^2 \rangle = 30 -$

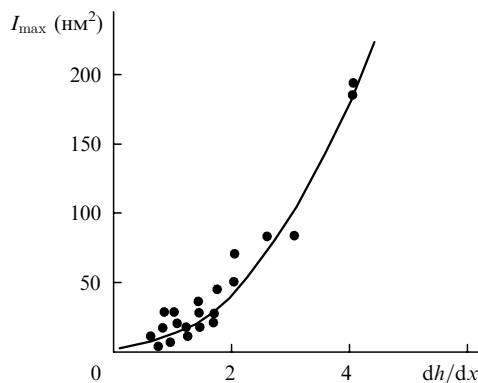


Рис.4. Зависимость максимальной интенсивности флуктуаций ОРХ для различных участков профиля от соответствующей крутизны dh/dx .

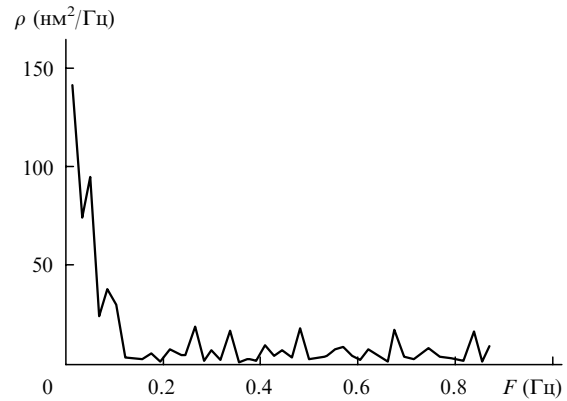


Рис.5. Зависимость спектральной плотности флуктуаций ρ от частоты F (контрастные компоненты отсутствуют).

40 nm^2 (при $I_{\max} \simeq 900 \text{ nm}^2$ и $dh/dx \simeq 5.5$ из рис.2,б–в) имеем среднеквадратичную амплитуду смещения точки x_0 объекта $\delta x_0 \simeq 6 \text{ nm}$ и расчетную оценку ширины функции распределения $\sim 12 \text{ nm}$. Непосредственно измеренная ширина $\Delta = 20 \text{ nm}$ оказалась близкой к этому значению.

Для измерений с 50-кратным объективом такого соответствия не наблюдалось, что могло быть связано с меньшей разрешающей способностью. Влияние числовой апертуры на крутизну профиля фазовой высоты вполне закономерно, если принять во внимание субволновые размеры элементов структуры. Однако очень резкая зависимость сверхразрешения от числовой апертуры – $S = 1.5$ при $A_n = 0.65$, $S = 10$ при $A_n = 0.75$ и $S = 16$ при $A_n = 0.95$ – оказалась неожиданной. Ее объяснение потребует дополнительных исследований.

Приведенные выше результаты иллюстрируют особенности фазовых изображений, возможности ДФМ и указывают на необходимость уточнения критерия разрешения в фазовых изображениях.

Проблеме сверхразрешения посвящено огромное число работ, но публикаций по разрешению в функциональных изображениях мало. При измерениях субмикронных структур фазовыми методами неизбежны систематические и случайные погрешности [6, 7], связанные с высокими требованиями к точности фокусировки, влиянием поляризационных и дифракционных искажений и другими техническими факторами. Соответствие фазовых изображений реальному объекту предполагает знание его оптических параметров, поэтому интерпретация результатов измерений далеко не всегда однозначна.

Несмотря на указанные ограничения, фазовые методы благодаря высокой чувствительности находят широкое применение в научном приборостроении. Одним из перспективных применений фазовой микроскопии, в частности ДФМ, являются измерения внутриклеточных динамических процессов.

При измерениях методом ДФМ поверхностей митохондрий и других органелл [2, 3, 11] на крутых склонах профиля фазовой высоты практически всегда наблюдалось увеличение интенсивности флуктуаций. Кроме того, в спектрах флуктуаций ОРХ присутствовали контрастные спектральные компоненты. Иногда линейный размер области флуктуаций (50–100 nm) оказывался близким к размеру пикселя. При малых размерах изолированных органелл, например в суспензии митохондрий с диаметром менее микрометра, кроме эндогенных био-

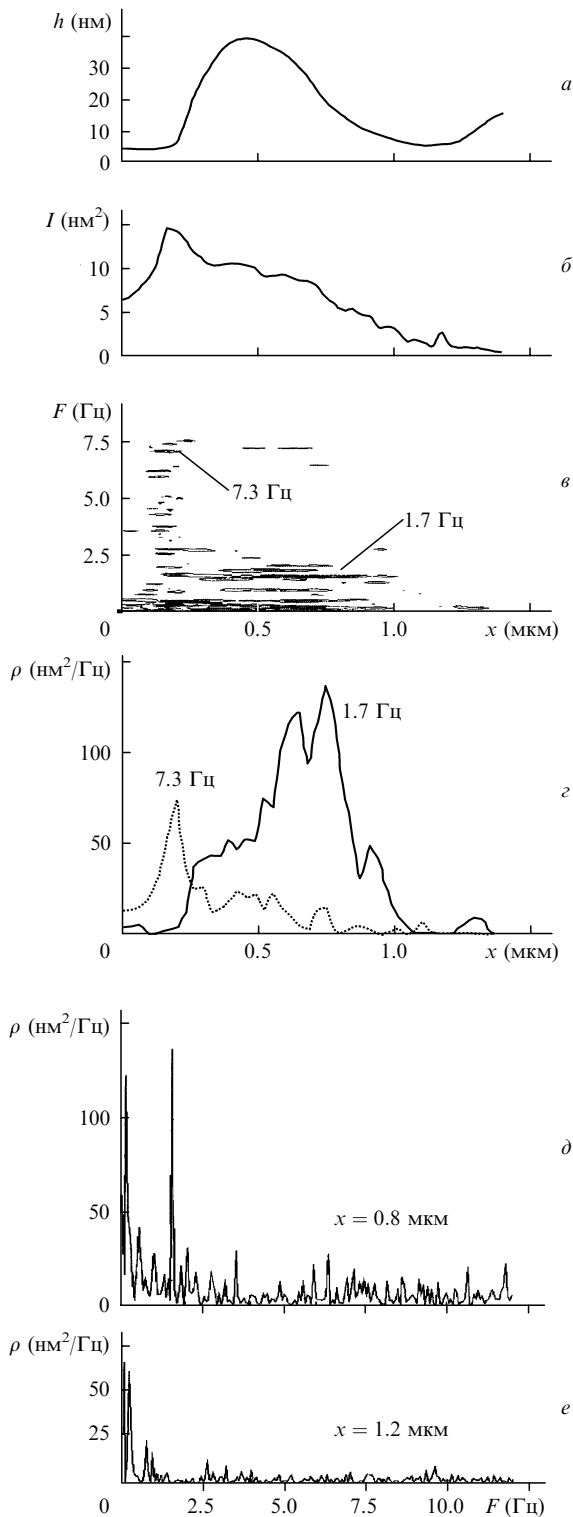


Рис.6. Измерения флуктуаций ОРХ в митохондриях: профиль фазовой высоты, по которому определялись диаметр митохондрии (~500 нм) и крутизна склонов ($dh/dx < 0.2$) (а), интенсивность флуктуаций в окрестности крутого склона профиля высоты (б), спектральный портрет флуктуаций на плоскости F, x , на котором видны протяженные низкочастотные ($F < 1.2$ Гц) и сравнительно короткие высокочастотные компоненты (в), максимумы спектральной плотности ρ компонент с $F = 1.7$ и 7.3 Гц, расположенные вблизи крутых участков профиля (г), и спектры флуктуаций при $x = 0.8$ (д) и 1.2 мкм (е).

физических процессов, связанных с работой ферментов, заметный вклад в флуктуации давало броуновское движение органелл. В спектральных портретах этому дви-

жению соответствовали низкочастотные компоненты, протяженность которых вдоль линии сканирования была близка к диаметру митохондрии. Спектральная плотность флуктуаций в этих случаях быстро убывала с частотой. Эндогенным процессам, связанным с активностью ферментов, соответствовали менее протяженные линии с контрастными компонентами в спектрах.

В общем случае неподвижный биологический объект в буферном растворе с показателем преломления n_0 можно рассматривать как оптическую неоднородность $n(x, y, z, t)$ с геометрической аксиальной толщиной $H(x, y, t)$. В весьма грубом приближении геометрической оптики фазовое изображение объекта можно представить в виде $h(x, y, t) = H(x, y, t)[n(x, y, z, t) - n_0]$. Градиент ОРХ $dh/dx = Hdn/dx + (n - n_0)dH/dx$ в такой прозрачной среде зависит как от изменений показателя преломления $n(x, y, z, t)$, так и от геометрической толщины H . На крутых склонах профиля возможно увеличение интенсивности флуктуаций и появление в спектрах компонент с характерными для $H(x, y, t)$ и $n(x, y, z, t)$ частотами. Разделение вкладов этих двух факторов и отождествление сигналов в общем случае является далеко не тривиальной задачей. Однако при наличии априорной информации о структуре объекта сигналам $h(x, y, t)$ можно с известной долей уверенности дать биофизическую интерпретацию.

В качестве примера на рис.6 приведены результаты измерений флуктуаций в митохондрии [2, 11]. Усредненный за время измерений 30 с профиль фазовой высоты (см. рис.6,а) не отражает сложной внутренней структуры митохондрии. Измеренный на полувысоте диаметр митохондрии был равен 0.5 мкм. В распределении интенсивности фазовых флуктуаций $I(x)$ на рис.6,б видна заметная неравномерность с максимумом на левом крутом участке профиля. Из спектрального портрета, приведенного на рис.6,в, видно, что низкочастотные компоненты ($F < 1.2$ Гц) имеют большую протяженность, а более высокочастотные – меньшую по сравнению с поперечным размером митохондрии.

Спектральная плотность компонент с частотами 1.7 и 7.3 Гц показана на рис.6,г. Максимумы интенсивности компонент находятся вблизи крутых участков профиля высоты. Заметные изменения спектральной плотности происходили на отрезках линии сканирования $\delta x_m = 50 - 80$ нм, значительно меньших ширины склона $\Delta x_m = 200$ нм. В спектре флуктуаций в точке $x = 0.8$ мкм на рис.6,д видна контрастная компонента с $F = 1.7$ Гц и шириной линии около 0.1 Гц. Соизмеримая с диаметром митохондрии протяженность компоненты с $F = 1.7$ Гц дает основания для предположения, что в значительной части митохондрии на этой частоте происходили синхронные колебания, связанные, например, с регулярными изменениями мембранного потенциала. Наличие более локальных компонент можно объяснить активностью отдельных групп ферментов. Из интенсивности основной компоненты $I_{\max} = 10$ нм² в предположении, что суммарная аксиальная толщина мембран митохондрии $H \approx 100$ нм, можно получить вполне реалистичную оценку амплитуды изменения показателя преломления митохондрии: $\delta n = I_{\max}^{1/2}/H = 0.03$.

Таким образом, в сингулярных участках изображений фазовых и, в частности, динамических объектов возможно получение значительного сверхразрешения.

Работа проводилась при поддержке грантом Innovationskolleg-27 Университета г.Росток (Германия).

1. Mehta A.D., Rief M., Spudich J.A., Smith D.A., Simmons R.M. *Science*, **283**, 1689 (1999).
2. Тычинский В.П. *УФН*, **171**, 649 (2001).
3. Weiss D.G., Tychinsky V.P., Steffen W., Budde A. *Digital light microscopy techniques for the study of living cytoplasm in image analysis: methods and applications* (Boca Raton, CRC Press, 2000).
4. Tychinsky V., Masalov I., Pankov V., Ublinsky D. *Opt. Commun.*, **74**, 37 (1989).
5. Тычинский В.П., Тавров А.Б., Шепельский Д.В., Щучкин А.Г. *Письма в ЖТФ*, **17**, 80 (1991).
6. Тычинский В.П., Куфаль Г.Э., Вышенская Т.В., Переведенцева Е.В., Никандров С.Л. *Квантовая электроника*, **24**, 754 (1997).
7. Tychinsky V.P. *Opt. Commun.*, **80**, 1 (1991).
8. Totzeck M., Tiziani H.J. *Opt. Commun.*, **138**, 365 (1997).
9. Солимено С., Крозиньяни Б., Ди Порто П. *Дифракция и волноводное распространение оптического излучения* (М.: Мир, 1989).
10. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М.: Наука, 1970).
11. Тычинский В.П., Вайсс Д., Вышенская Т.В., Ягужинский Л.С., Никандров С.Л. *Биофизика*, **45**, 870 (2000).
12. Tychinsky V., Tavrov A., Shepelsky D., Vyshenskaja T. *Proc. SPIE Int. Opt. Eng.*, **1647**, 96 (1992).