



где  $\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ .

Метод позволяет получать топограмму за одну экспозицию при использо-

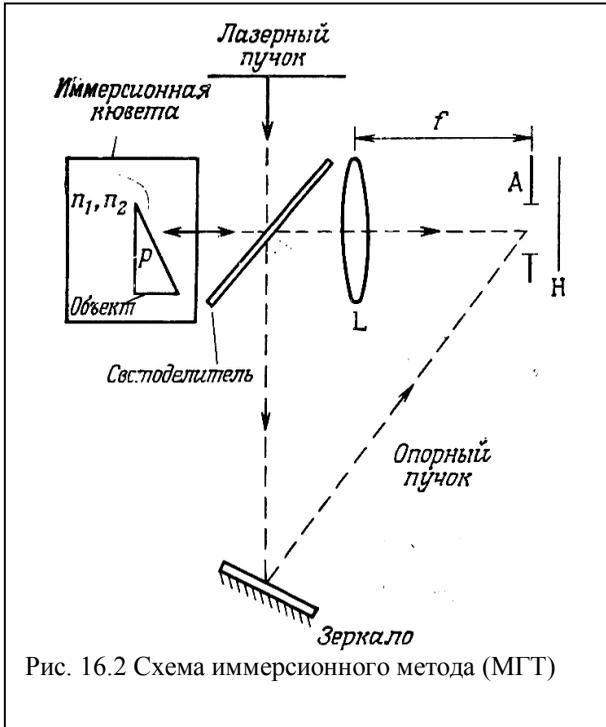


Рис. 16.2 Схема иммерсионного метода (МГТ)

вании, например, ионного аргонового лазера, излучающего две длины волны, отличающиеся на  $\Delta\lambda = 0,0115$  мкм (с центром около  $\lambda = 0,48$  мкм). При этом  $d = 0,01$  мм.

При иммерсионном методе (рис.16.2) объект помещают в кювету с жидкостью или газом с показателем преломления  $n_1$  и делают первую экспозицию голограммы. Затем кювету наполняют другим веществом с показателем преломления  $n_2$ , и второй раз экспонируют голограмму. При восстановлении изображения по-

верхность объекта будет покрыта сеткой интерференционных полос, расстояние между которыми по глубине равно

$$d = \frac{\lambda}{2\Delta n},$$

где  $\Delta n = n_1 - n_2$ . Чувствительность метода легко регулировать подбором веществ. Так, для пары азот - углекислый газ  $d = 2$  мкм, пары во да - глицерин  $d = 2,32$  мкм, а для сочетания азот - вода  $d = 0,95$  мкм.

Получение топограмм возможно также *методом двух источников*, при котором между экспозициями меняют угол падения пучка ОГК на объект. Однако он сложнее из-за необходимости строго фиксированных перемещений объекта относительно освещающего пучка. Для контроля объектов сложной формы голограмма образцового изделия может быть рассчитана на ЭВМ и синтезирована искусственно.

### Б) Метод спекл-интерферометрии (фотографической интерферометрии)

Этот метод основан на регистрации на одну и ту же фотопластинку двух изображений объекта в различных состояниях (например, исходном и деформированном) при освещении его лазерным светом. Как известно, изображение поверхности диффузных объектов в лазерном свете представляет собой своеобразную пятнистую структуру, состоящую из множества хаотически расположенных бликов (спеклов). Возникновение спекл-эффекта обусловлено усреднением диффузно-когерентных волновых полей в плоскости изображения, причём возникающая при этом интерференционная структура моделируется микрорельефом поверхности, представляющим собой случайную функцию координат.

В случае гладких и непрерывных смещений поверхности объекта между экспозициями в пределах достаточно малой области происходит смещение образованных спеклами нерегулярных дифракционных решеток на постоянную величину, равную смещению между соответствующими точками поверхности. При освещении спекл-фотографии пучком лазера на экране возникает система параллельных полос с шагом

$$d = \frac{\lambda L}{m|S|},$$

где  $L$  – расстояние до экрана,  $m$  – масштаб изображения,  $S$  – вектор перемещения спеклов. Очевидно, что для получения трёх компонент вектора перемещения необходимы две спекл-интерферограммы, получаемые с помощью двух фотокамер. Оптические оси фотокамер обычно ортогональны, так как при этом вычисление компонент вектора перемещения в декартовых координатах, равных  $u = s \sin \beta$  и  $v = s \cos \beta$  ( $\beta$  – угол наклона полос к горизонтали), существенно упрощается.

Достоинство метода спекл-интерферометрии заключается в том, что он чувствителен *только* к составляющим поверхностного изменения, лежащим в одной плоскости.

## 16.2 Голографическая коррелометрия

В ряде процессов (релаксация полимеров, процессы диффузии и т.п.) необходимо оценить изменение подвижности и средний размер частей, составляющих среду, в различные моменты времени. Если эти процессы протекают медленно ( $1 \div 10^6$  с), то единственным способом контроля является метод голографической коррелометрии (МГК), который основан на получении голограммы рассеивающей среды в отраженном свете (при одностороннем доступе) с помощью двулучевой схемы.

Направление освещения между экспозициями меняется на угол  $\theta$ , что вызывает регулярный фазовый сдвиг  $\Delta\varphi_0$  на элементах рассеивателя и появление в изображении системы эквидистантных интерференционных полос. Так как состояние среды за время  $\tau$  между экспозициями изменится, уменьшится контраст полос.

Случайный сдвиг фазы отдельной частицы равен

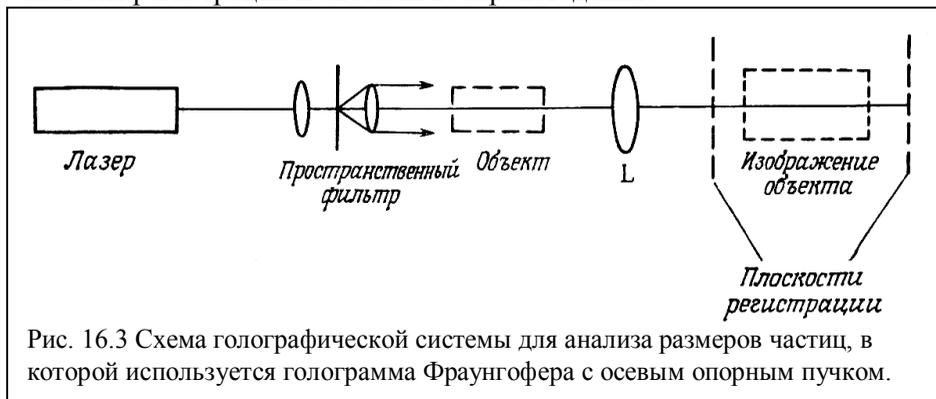
$$\Delta\varphi(\theta, \tau) = \mathbf{k}\Delta\mathbf{r}(\tau),$$

где  $\theta$  – угол между направлениями падающей и рассеянной волн;  $\Delta\mathbf{r}$  – вектор смещения частицы;  $\mathbf{k} = \frac{2\pi}{\lambda}(\mathbf{n}_0 - \mathbf{n}_s)$ , ( $k = \frac{2\pi}{\lambda} 2 \sin \frac{\theta}{\alpha}$ ) – вектор разности между векторами  $\mathbf{n}_0$  и  $\mathbf{n}_s$  падающей и рассеянной волн. Тогда, зная статистические характеристики среды и экспериментально снятые зависимости видности полос  $v(\tau)$  от времени анализа, можно оценить подвижность и размеры микрочастиц в диапазоне  $0,01 \div 1$  мкм.

### 16.3 Голографические методы анализа размеров частиц и структуры прозрачных объектов

Голографические методы эффективно используются для анализа размеров и относительного положения частиц в диапазоне  $5 \div 100$  мкм в различных газообразных и жидких средах. Подобные системы крайне необходимы для контроля окружающей среды, оценки качества двигателей, анализа процессов распыления жидкого топлива, анализа аэрозолей в ракетных двигателях.

Типовой голографической анализатор частиц состоит из двух систем – системы регистрации и системы воспроизведения.



В системе регистрации (рис.16.3) импульсный лазер (обычно рубиновый) освещает исследуемый объект, экспонируя голограмму. Малая длительность импульса лазера ( $10^{-8} - 10^{-9}$  с) обеспечивает практическую неподвижность частиц, дает возможность одновременно зарегистрировать размер и относительное положение частиц в объеме с большим разрешением и большой глубиной поля зрения.

В системе воспроизведения голограмма освещается гелиево-неоновым лазером, работающем в непрерывном режиме. При этом образуется видимое изображение порции частиц (например, тумана). Наблюдение и измерение размеров и положения частиц в различных плоскостях исследуемого объема проводят с помощью телевизионной камеры. Используя различные длины волн для записи и восстановления голограмм, можно дополнительно повысить разрешающую способность системы.

Принципиально возможна регистрация голограмм с помощью пучка электронов ( $\lambda \approx 4 \cdot 10^{-9}$  м) при восстановлении лучом видимого диапазона. При этом можно различить частицы размером порядка  $10^{-5}$  мм и менее.

В *голографических анализаторах структуры прозрачных объектов* используется схема получения голограмм фазовых прозрачных объектов. Она отличается от подобных систем для непрозрачных сред геометрией просвечивания объекта, а также методикой интерпретации результатов. Методы голографической интерпретации (в том числе и фильтрации) успешно применяются и для контроля однородности показателя преломления, наличия двулучепреломления в оптически прозрачных средах.

## 16.4 Голографическая эндоскопия

Для контроля дефектов участков изделий, находящихся в труднодоступных местах, перспективен метод голографической эндоскопии. В отличие от традиционных способов эндоскопии с помощью волоконно-оптических элементов (ВОЭ) здесь появляется возможность получения объемных изображений внутренних полостей изделий при углах обзора, близких к предельным. Для систем голографической эндоскопии разработаны специальные ВОЭ, обеспечивающие малые потери лазерного излучения и сохранение его когерентности. Применение лазеров в эндоскопии позволило также использовать эффект квантового усиления света с помощью ВОЭ из оптически активных материалов для резкого (в  $10^3 \div 10^4$  раз) увеличения яркости изображения, улучшения его контрастности. При этом накачка ВОЭ производится с помощью одиночных импульсных ламп, а объект освещается лазерным светом с длиной волны, соответствующей резонансной частоте световодов.

Метод применяется для решения самых различных задач, связанных с измерениями размеров частиц и аэрозолей, например, к исследованию энергетических аэрозолей и работы форсунок ракет. Другими примерами служат исследования частиц в камерах Вильсона, частиц морского планктона, выхлопа ракетных двигателей, двухфазных потоков, стекловолокна, пылевой эрозии, снежинок и кристалликов льда, а также записи информации электронным лучом.

Разработка различных применений голографического метода для исследования частиц привела к необходимости дополнительного изучения самого голографического процесса и в результате к расширению диапазона его применимости; например, голографический метод стали использовать для исследования очень больших и совсем маленьких частиц, а также эффектов, связанных с изменениями показателя преломления.

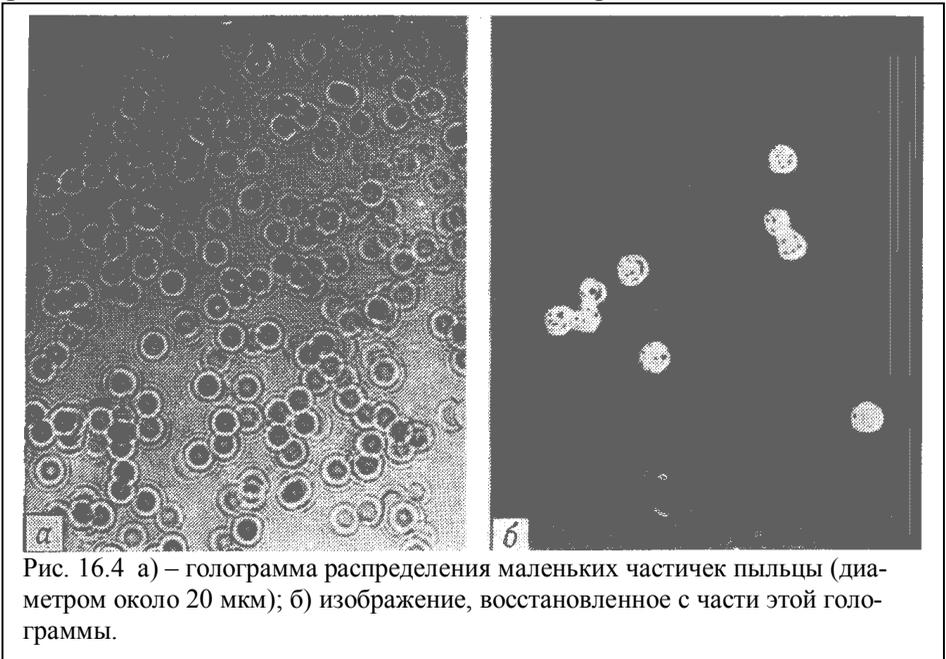


Рис. 16.4 а) – голограмма распределения маленьких частичек пыльцы (диаметром около 20 мкм); б) изображение, восстановленное с части этой голограммы.

На рис.16.4 а) представлена голограмма ансамбля небольших частиц пыльцы растений диаметром около 20 мкм. Изображение, восстановленное с части этой голограммы, показано на рис.16.4 б). Хорошая резкость края частиц свидетельствует о том, что было получено разрешение порядка 1 мкм.

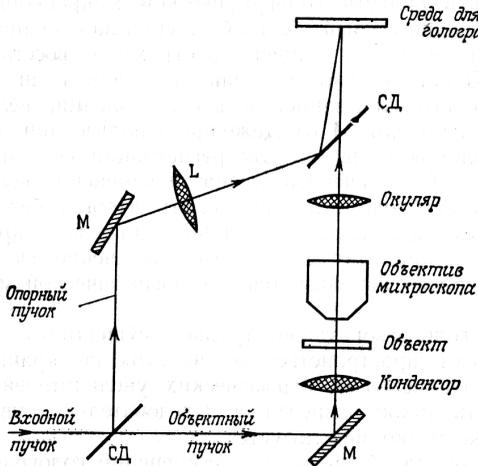


Рис. 16.5 Схема голографического микроскопа с предварительным увеличением в обычном микроскопе (М – зеркало; СД – светоделиТЕЛЬ; L – линза)

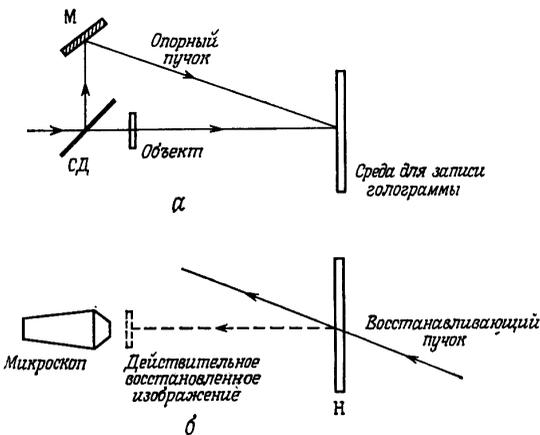


Рис. 16.6 Применение последующего увеличения с помощью обычного микроскопа. а – схема записи голограммы; б – схема восстановления изображения с голограммы. М – зеркало; СД – светоделиТЕЛЬ; Н – голограмма.

## 16.5 Голографическая микроскопия

Интересно, что именно микроскопия послужила поводом для изобретения голографии. Д. Габор разработал голографию, пытаясь улучшить разрешение и увеличить глубину поля изображения, создаваемого электронным микроскопом. Успешные применения голографии в микроскопии привели к созданию широко используемых методов, в которых лучшие качества обычной микроскопии усиливаются голографией.

Если необходимо получить высокое разрешение в небольшом поле зрения, используется предварительное увеличение обычным микроскопом

(рис. 16.5). Для согласования пространственной частоты голограммы с разрешающей способностью пленки угол падения опорного пучка можно изменять.

В этом случае объектом для голографии служит действительное увеличенное изображение объекта. Опорный пучок представляет собой, как правило,

плоскую волну, и угол его падения на фотопленку может изменяться. При восстановлении в зависимости от геометрии схемы можно изучать объектные волновые фронты, сходящиеся в действительное изображение или расходящиеся из мнимого изображения.

Недостаток метода: регистрируемый объем объекта ограничивается глубиной поля зрения микроскопа, т.к. на голограмме нельзя записать большей глубины или поперечных размеров, чем имеет изображение.

Метод применяется, когда исследуемый объект представляет собой тонкий образец или разыскиваемое событие лежит в очень узком диапазоне глубин.

В сочетании с голографической интерферометрией применяется при контроле роста кристаллов и формирования полимеров (путём записи последовательных голограмм и восстановления изображения с наложенных друг на друга голограмм).

В тех случаях, когда надо получить высокое разрешение по большому полю зрения, применяют *последующее увеличение изображения с помощью обычного микроскопа* (рис.16.6). В этом случае голограмма записывается с опорной плоской волной в ближней или дальней зоне объекта. Угол падения опорного пучка и разница в длинах путей опорного и объектного пучков могут меняться (согласование пространственной частоты голограммы и разрешающей способности пленки с длиной когерентности лазера). При восстановлении голограммы поле объекта, производящее действительное изображение объекта, можно исследовать с помощью обычного микроскопа.

Метод обеспечивает большую глубину поля зрения, записываемую голограммой, но часто не обеспечивает максимального разрешения. Его применение полезно в тех случаях, когда ОК толстый или рассматриваемое событие находится в слое на большой глубине. Например, тонкие кровеносные сосуды под ногтем пальца нельзя наблюдать с помощью обычного микроскопа. Чтобы проверить, как течёт кровь по этим сосудам надо иметь большое увеличение, но заглянуть под ноготь невозможно, однако в микроскоп можно направить объектное поле изображения ногтя пальца.

## **16.6 Применение лазеров в медико-биологической диагностике**

### **А) Спектроскопические методы**

Основными признаками живой природы является находящееся в динамическом равновесии, оптимально приспособленное к окружающей среде и регулируемое совместное действие реакционных цепей и циклов, объединенных в общую сеть. Их исследование и описание относится к биохимии.

мии, в которой для диагностики кинетики реакций и структурного анализа широко используются *спектроскопические методы*. Эти методы, благодаря применению лазеров могут быть улучшены по чувствительности, спектральному и пространственному разрешению и существенно расширены путём использования новых методик.

Приведём некоторые типичные примеры ОНК с помощью лазерной спектроскопии.

*Классификация и сортировка клеток, бактерий, вирусов:* лазерная система идентифицирует активные к флуоресценции клетки путём регистрации рассеянного света и флуоресценции раствора, который облучён излучением аргонового лазера. Возбужденные клетки отделяются в электрическом поле. Метод позволяет получить данные о форме, типе и природе клеток.

*Лазерный измеритель вирусов по изменениям рассеянного света,* нарушенного полного отражения и флуоресценции выдаёт данные о форме концентрации, структуре и типу молекул ДНК и РНК. Раствор с вирусами при этом облучается аргоновым лазером, результаты обрабатываются на компьютере. Аналогичный прибор существует для контроля свойств лейкоцитов.

*In-vivo флуорометрия ферментов при обмене веществ,* например NAD (амидадениннуклеотид никотиновой кислоты), который выполняет функции переносчика кислорода в цепи процесса дыхания. Спектры поглощения и флуоресценции окисленной ( $\text{NAD}^+$ ) и восстановленной (NADH) форм чётко различаются на длинах волн 0,250 мкм, 0,340 мкм и 0,480 мкм, так что оба состояния можно хорошо различать посредством измерения поглощения, отражения и флуоресценции исследуемых частей ткани. Применяемая измерительная система состоит из азотного лазера, лазера на красителе, оптических кабелей, фотоприёмника и электрического блока обработки данных. Помехи сигнала флуоресценции, возникающие из крови ткани, исключаются путём учёта длин волн поглощения окислённого и восстановленного гемоглобина. Таким образом, становится возможным исследование внутриклеточного обмена веществ различных органов человеческого тела (in vivo и in-situ – живых и по месту).

В клинической биохимии как правило необходимо *обнаруживать малые концентрации химических элементов, химических соединений, вирусов или бактерий* (последние часто на основе продуктов их обмена веществ). В качестве материала для исследований используются моча, кал, мокроты, слюна, кровь, желудочный сок, вдыхаемый воздух и т.п. Для количественного анализа в соответствии с различными методами разделения (реакции

осаждения и отфильтровывания, хроматография и др.) используются классические спектроскопические методы: абсорбционная фотометрия, флуоресцентная фотометрия, измерение рассеянного микроскопическими частицами света (мутность), атомная абсорбционная спектрометрия. Практически все эти методы можно улучшить, применяя лазеры. Примеры применения ОНК в клинической биохимии:

- исследование метаболических связей в локальных субструктурах живой клетки с помощью быстрой микроспектрофлуориметрии;
- резонансное комбинационное рассеяние на гемоглобине;
- цитофлуорометрия с помощью импульсных перестраиваемых по частоте лазеров.

*Б) Специальные методы клинической диагностики*

Принцип действия приборов для *экспресс-диагноза обменных процессов в живых тканях* (рис.16.7) основан на измерении спектра излучения перерассеянного в предельном угле полного отражения.



Лазерный пучок (обычно от  $\text{CO}_2$ -лазера) падает на АТР-измерительную призму так, что он отражается в предельном угле полного отражения на параллельных сторонах призмы. Объект контроля прижимается к одной из параллельных сторон и поглощает в зависимости от своей поглощательной способности часть световых волн, проникающих в оптически менее плотную среду при полном отражении. Могут быть выявлены метаболиты, спирты, холестерин, глюкоза, мочевина и др. Это позволяет быстро диагностировать опасность инфаркта миокарда, сахарного диабета, подагры и др. Преимуществами метода переизлучательной спектроскопии на основе АТР –призмы являются: очень высокая чувствительность (в 100 раз выше по сравнению с традиционными методами), высокая разрешающая способность, независимость от толщины слоя, незначительная тепловая нагрузка на объект применения. Последнее определяет предпочтительность метода при контроле биологических тканей *in vivo*.

*Использование лазерной стекл-структуры для измерения сферических и цилиндрических аберраций человеческого глаза, включая подбор корректирующих линз.* Метод является экспрессным, и его точность порядка 1/8 дптр (для сравнения обычный подбор очковых линз имеет точность 1/4 дптр). С этим методом вы могли познакомиться в лабораторной работе.

*Испытание сетчатки, заблокированной катарактой.* Когерентный свет образует интерференционную картину на сетчатке. Если пациент видит картину, то сетчатка в норме и имеет смысл делать операцию по удалению катаракты.

*Получение голографических изображений различных внутренних структур глаза.* По ним можно, например, определить расстояние между характерными точками глаза.

*Контроль тока крови в глазе с помощью доплеровского измерителя скорости.* Кровеносные сосуды облучаются лазером. Регистрируется излучение, рассеянное эритроцитами. В качестве источника применяются газовые лазеры. Малый диаметр лазерного пучка позволяет получить высокое пространственное разрешение.