

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237684**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429994**

(22) Data zgłoszenia: **21.05.2019**

(51) Int.Cl.
G01N 21/41 (2006.01)
G01M 11/02 (2006.01)

(54)

Wzorzec rozkładu współczynnika załamania

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

30.11.2020 BUP 25/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MICHAŁ ZIEMCZONOK, Warszawa, PL
ARKADIUSZ KUŚ, Warszawa, PL
MAŁGORZATA KUJAWIŃSKA, Łomianki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Małgorzata Trejgis

PL 237684 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest trójwymiarowy wzorec rozkładu współczynnika załamania, który w swojej objętości zawiera szereg obszarów o różnych wartościach współczynnika załamania. Wzorec jest przeznaczony do zastosowania w procesie metrologicznej oceny wyników uzyskiwanych w urządzeniach pomiarowych czułych na współczynnik załamania.

Techniki ilościowego obrazowania fazowego 3D (ang. 3D quantitative phase imaging) służą do wizualizacji oraz pomiaru transparentnych, technicznych i biologicznych mikroobiektów na podstawie lokalnych różnic wartości współczynnika załamania w objętości pomiarowej. Do grupy technik ilościowego obrazowania fazowego 3D należy tomografia holograficzna (zwana również optyczną tomografią dyfrakcyjną lub optyczną tomografią fazową), która, w konfiguracji ze zmianą kierunku oświetlenia próbki (w ograniczonym zakresie kątowym projekcji), szybko zdobywa popularność, szczególnie w zastosowaniach biomedycznych, ze względu na związek współczynnika załamania z gęstością składników biochemicznych znajdujących się w komórkach lub tkankach. Na podstawie zestawu projekcji holograficznych zarejestrowanych przy różnym kierunku oświetlenia, rekonstruowany jest rozkład współczynnika załamania 3D mierzonego, nieznanego obiektu przezroczystego. Ze zrekonstruowanych trójwymiarowych rozkładów współczynnika załamania można wyodrębnić i zmierzyć wybrane struktury wewnątrzkomórkowe, a także śledzić zmiany w morfologii i statystyce rozkładu gęstości masy w czasie pod wpływem wewnętrznych procesów lub różnych bodźców zewnętrznych. Metoda ta jest stosowana w badaniach struktur biologicznych, takich jak pojedyncze komórki (np. komórki krwi i ludzkie komórki nowotworowe), kolonie komórek lub nawet tkanki. Wśród pozostałych zalet tej techniki należy wyróżnić możliwość pomiaru żywych mikrostruktur biologicznych bezpośrednio na szalce Petriego, brak konieczności stosowania dodatkowych barwników czy znaczników, a także wysoką rozdzielczość przestrzenną uzyskiwanych rekonstrukcji tomograficznych. Atrakcyjność niniejszej techniki pomiarowej jest odzwierciedlona w postaci niedawno wprowadzonych komercyjnych tomografów holograficznych do zastosowań biomedycznych, oferowanych przez NanoLive, Ltd. oraz TomoCube, Inc.

Tomografia holograficzna w konfiguracji z ograniczonym zakresem kątowym projekcji jest w przypadku wyżej wymienionych zastosowań najbardziej praktyczna, jednak jednocześnie obciążona jest szeregiem problemów. Informacja ilościowa, będąca jednym z kluczowych atutów tomografii holograficznej, jest obciążona błędami wprowadzanymi na każdym etapie procesu pomiarowego, związanymi między innymi z artefaktami wynikającymi z tzw. „brakującego stożka” (ang. missing cone) w danych reprezentujących informację o obiekcie (odniesienie do reprezentacji przedmiotowych częstości przestrzennych w trójwymiarowej przestrzeni Fouriera), anizotropową rozdzielczością, a także błędami mapowania częstości przestrzennych odzyskanych z poszczególnych projekcji na trójwymiarową przestrzeń Fouriera. Trudno jest eksperymentalnie zweryfikować dokładność rekonstrukcji, ponieważ struktura 3D danego obiektu biologicznego nie jest znana przed pomiarem.

Istnieje szereg rozwiązań technologicznych i numerycznych mających na celu minimalizację lub kompensację wpływu tych czynników na ostateczny wynik rekonstrukcji współczynnika załamania, jednakże ich skuteczność jest trudna do oceny ilościowej. Zarówno producenci urządzeń, jak i grupy badawcze rozwijające tę technikę pomiarową podejmują się zagadnienia związane z metrologiczną oceną błędów rekonstrukcji w oparciu o symulacje numeryczne lub wyniki eksperymentalne, jednakże dotychczasowe rozwiązania są niewystarczające z dwóch głównych powodów. W przypadku prac teoretycznych lub analiz numerycznych dane nie są obciążone błędami wynikającymi z niedoskonałości układu pomiarowego i samego procesu pomiaru i nie mogą być wykorzystane do pełnej charakteryzacji urządzenia. Drugim przykładem analizy metrologicznej układów spotykanym w literaturze są wnioski wyciągnięte na podstawie pomiarów obiektów nieznanymi (a więc brak odniesienia do oceny błędu pomiaru) lub zbyt prostych. Przedstawiane w literaturze rozwiązania opierają się na estymacji błędu współczynnika załamania na podstawie odchylenia standardowego wartości zintegrowanej fazy tła w poszczególnych projekcjach lub statystyki współczynnika załamania tła w rekonstrukcji tomograficznej, a także stosowaniu w roli obiektu testowego mikrokulek, które mogą służyć jako proste obiekty kalibracyjne, ale nie zapewniają wystarczającej złożoności, niezbędnej w celu eksperymentalnego zasymulowania skomplikowanej struktury wewnętrznej obiektów biologicznych. Inne techniki tomograficzne (np. tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny) do kalibracji i analiz metrologicznych korzystają z wzorców i fantomów, jednak do tej pory nie ujawniono analogicznego rozwiązania na potrzeby ilościowego obrazowania fazowego 3D, które byłoby wolne od wszystkich wad wymienionych powyżej.

Główne trudności w uzyskaniu takiego wzorca wynikają z ograniczeń dostępnych technologii wytwarzania, a także konieczności weryfikacji uzyskanych parametrów wzorca.

Próbie rozwiązania tego problemu podjęli M. Zienczonok, A. Kuś, M. Nawrot, M. Kujawińska, (*Characterization of 3D phantom for holographic tomography produced by two-photon polymerization*, (SPIEDigitalLibrary.org/conference-proceedings-of-spie) – w publikacji opisano struktury o zmiennym współczynniku załamania wykonane metodą polimeryzacji dwufotonowej i pomiary tych struktur wykonane metodami 2D i tomografią holograficzną.

Polimeryzacja dwufotonowa (TPP) to jedna z technologii druku 3D, umożliwiająca tworzenie złożonych, przezroczystych struktur o rozdzielczości poniżej mikrometra. Struktury te są konstruowane z fotoreaktywnych, ciekłych prekursorów zawierających substancje chemiczne, które w reakcji na działanie światła zmieniają postać z ciekłej na stałą. Współczynnik załamania utwardzonego polimeru zależy od stopnia usieciowania monomeru, który odnosi się do zastosowanej dawki ekspozycji. W TPP, dzięki skanowaniu punkt po punkcie możliwe jest tworzenie struktury o dowolnym rozkładzie współczynnika załamania w przestrzeni trójwymiarowej. Nadanie strukturze zdefiniowanego, trójwymiarowego rozkładu wartości współczynnika załamania odbywa się poprzez utwardzanie materiału fotoczułego przez zogniskowaną wiązkę lasera w otoczeniu ogniska tejże wiązki, a następnie przemieszczaniu ogniska wiązki względem naczynia z materiałem aż do utwardzenia całej pożądanej objętości. W związku z tym, że prawdopodobieństwo procesu absorpcji dwufotonowej jest zależne od intensywności padającego promieniowania, materiał utwardzany jest w niewielkiej, ograniczonej w trzech wymiarach objętości i wyłącznie w otoczeniu tegoż ogniska. Wartość współczynnika załamania w dowolnym punkcie (wokselu) wzorca zależy od stopnia spolimeryzowania materiału i może być modyfikowana poprzez sterowanie parametrami procesu, w szczególności lokalną zmianę mocy lasera polimeryzującego, wydłużenie czasu naświetlania, zmianę prędkości skanowania lub zagęszczenie wokseli. Dodatkowo, wybrane obszary wzorca mogą pozostać nieutwardzone, co zwiększa dostępny zakres modulacji wartości współczynnika załamania, a także pozwala na uzyskanie struktur mniejszych, niż wynika to z rozmiaru wokseli.

Struktura opisana w publikacji M. Zienczonok i in. miała kształt piramidy, z różnym rozkładem współczynnika załamania w każdym ze stopni. Taka struktura nie jest przystosowana do ewaluacji układów pomiarowych przeznaczonych do zastosowań biomedycznych, ponieważ nie ma związku z mierzonym obiektem, takim jak np. komórka.

Celem wynalazku było zatem opracowanie wzorca rozkładu współczynnika załamania przeznaczonego do oceny układów pomiarowych do zastosowań biomedycznych.

Wzorzec rozkładu współczynnika załamania według wynalazku stanowi trójwymiarowy obiekt, który w swojej objętości zawiera ośrodek bazowy i obszary o zmiennej wielkości i odległości, o innym współczynniku załamania niż współczynnik załamania dla ośrodka bazowego, przy czym różnica współczynnika załamania tych obszarów względem współczynnika załamania ośrodka bazowego nie jest większa niż 0,04. Co najmniej jeden z obszarów stanowi zestaw co najmniej dwóch graniastostupów lub walców lub współosiowych pierścieni o zmiennej wielkości i odległości, o wymiarze przynajmniej w jednym kierunku zbliżonym do zdolności rozdzielczej układu pomiarowego oraz co najmniej jeden z obszarów ma kształt zbliżony do elipsoidy albo kuli.

Korzystnie co najmniej jeden obszar zbliżony do elipsoidy albo kuli jest umiejscowiony w innym obszarze o odmiennym współczynniku załamania względem obszaru zbliżonego do elipsoidy albo kuli i względem ośrodka bazowego.

Korzystnie obszar w formie współosiowych pierścieni zawiera pierścienie o zakresie średnic od 1 μm do 50 μm , korzystnie o grubości każdego z pierścieni zbliżonym do zdolności rozdzielczej układu pomiarowego podlegającego ocenie.

Korzystnie wzorzec zawiera zestaw co najmniej dwóch prostopadłościanów ułożonych względem siebie równolegle.

Korzystnie wzorzec zawiera zestaw graniastostupów ułożonych względem siebie w sposób analogiczny do gwiazdy Siemens.

Zestawy prostopadłościanów lub walców lub współosiowych pierścieni lub graniastostupów są przeznaczone do oceny rozdzielczości układu pomiarowego.

Korzystnie co najmniej jeden z obszarów ma gradientowy charakter zmienności współczynnika załamania, o maksymalnym zakresie zmienności współczynnika załamania równym 0,02. Korzystnie obszar o gradientowej zmianie współczynnika załamania ma kształt prostopadłościanu lub walca.

Korzystnie wzorec ma wymiary zewnętrzne w zakresie od 5 μm do 300 μm w każdym z trzech kierunków, dobierane zgodnie z optymalnym wykorzystaniem dostępnego pola widzenia badanego układu. Korzystnie każdy z obszarów wewnętrznych wzorca o innym współczynniku załamania ma wymiary w zakresie 50 nm – 250 μm w każdym z trzech kierunków.

Różnice współczynników załamania poszczególnych obszarów są w zakresie od 0,001 do 0,04 i są dobierane na podstawie czułości i zakresu pomiarowego rozważanego układu.

Korzystnie wzorec ma kształt zbliżony do wycinka elipsoidy.

Bezwzględne wartości współczynnika załamania materiału wzorca zawierają się w zakresie od 1,45 do 1,60.

W korzystnym wykonaniu wzorec reprezentuje struktury i zakresy zmienności współczynnika załamania spotykane w obiektach biologicznych, szczególnie komórkach. Wzorec posiada obszary reprezentujące kuliste jąderka, zawieszone w obszarze o niższym współczynniku załamania reprezentującym jądro komórkowe, co jest częstym przypadkiem w komórkach. Obszary te służą do weryfikacji poprawności wyodrębniania granic struktur wewnętrznych badanych obiektów, co z kolei pozwala na wyznaczenie istotnych parametrów, takich jak objętość, pole powierzchni czy średnia wartość współczynnika załamania wybranych struktur wewnętrznych.

Ponadto wzorec taki zawiera obszar w kształcie walca z gradientową zmiennością współczynnika załamania. Obszar ten reprezentuje naturalne, drobne wahania współczynnika załamania światła w komórkach i jest przydatny do oceny algorytmów rekonstrukcji tomograficznej, które mogą opierać się na niesłusznych założeniach co do charakteru zmienności współczynnika załamania wewnątrz obiektu. Na przykład, skuteczność poprawnego odtworzeniu takiego obszaru będzie niska w przypadku zastosowania algorytmu rekonstrukcji który zakłada, że współczynnik załamania w obiekcie jest obszarami stały.

Z kolei obszary przeznaczone do oceny rozdzielczości, przykładowo w kształcie prostopadłościaków, stanowią rozwiązanie analogiczne do tzw. testu USAF. W teście tym muszą być co najmniej dwa obszary służące do oceny rozdzielczości. Jeżeli wynik pomiaru pozwala na stwierdzenie obecności dwóch obszarów, to oznacza, że rozdzielczość układu w rozważanym kierunku jest co najmniej równa odległości między środkami tych obszarów. Stopniowe zwiększanie liczby obszarów wraz z ich szerokością i odległością pozwala na pokrycie większej liczby przypadków i tym samym łatwiejsze lub dokładniejsze określenie dolnej i górnej granicy rozdzielczości układu. Każdy z kierunków powinien być sprawdzany osobno, stąd we wzorcu znajdują się trzy zestawy obszarów do oceny rozdzielczości. Najkorzystniej jest, gdy zestawy są zorientowane wzdłuż osi X, Y, Z. Rozdzielczość układów w kierunku poosiowym (Z) jest zwykle gorsza (zarówno przy wydruku, jak i w rozważanych układach pomiarowych), dlatego też test w tym kierunku jest zazwyczaj nieco inny (o większej odległości elementów).

Najkorzystniej wzorec posiada trzy kuliste obszary o współczynniku załamania od 1,48 do 1,52 zawieszone w obszarze o współczynniku załamania od 1,50 do 1,52 oraz trzy zestawy obszarów w kształcie prostopadłościaków o współczynniku załamania od 1,48 do 1,52. W każdym zestawie prostopadłościaki są równoległe względem siebie, a zestawy są usytuowane w trzech prostopadłych kierunkach wzdłuż osi X, Y, Z. Ponadto w najkorzystniejszym przykładzie wzorec posiada jeden obszar w kształcie walca o gradientowej zmianie współczynnika załamania w zakresie od 1,50 do 1,52.

Wzorec według wynalazku zapewnia skomplikowany, trójwymiarowy rozkład współczynnika załamania, który służy do metrologicznej oceny układów do ilościowego obrazowania fazowego 3D na drodze porównania uzyskanych wyników pomiaru z dokładną specyfikacją wzorca.

Cechy użytkowe wzorca, takie jak jego kształt, wymiary zewnętrzne, struktury wewnętrzne (rozmiar, kształt, rozmieszczenie, kontrast współczynnika załamania względem otoczenia), zakresy wartości współczynnika załamania czy charakter zmienności współczynnika załamania wynikają z parametrów rozważanego układu pomiarowego (jego rozdzielczości, pola widzenia, czułości na współczynnik załamania), spodziewanego zastosowania układu (jakie parametry i cechy użytkowe będą reprezentatywne dla typowych obiektów mierzonych), a także możliwości i ograniczeń techniki wytwarzania. Ta dowolność cech użytkowych i możliwość przeskalowania czy dostosowania wzorca do konkretnych potrzeb jest niewątpliwą zaletą wynalazku.

Wzorec według wynalazku zawiera struktury pozwalające ocenić rozdzielczość układu pomiarowego. Na podstawie rekonstrukcji rozkładu współczynnika załamania możliwa jest ocena zdolności rozdzielczej z wykorzystaniem wybranego, jakościowego lub ilościowego kryterium. Obszary o różnych wartościach współczynnika załamania tworzą trójwymiarową strukturę wewnętrzną, jak na przykład elipsoidy o wyższym współczynniku załamania zawieszone w większej elipsoidzie o mniejszym współczyn-

niku załamania, zawierającej się w objętości wzorca. Struktury te służą do oceny zdolności układu pomiarowego do wyodrębnienia granic struktur wewnętrznych, a także błędu otrzymanej wartości współczynnika załamania.

Wspomniane struktury wewnętrzne mogą mieć ściśle zadany rozkład współczynnika załamania, w tym skokowy lub gradientowy charakter jego zmian, gdyż algorytmy rekonstrukcji tomograficznej lub stosowane procedury regularyzacyjne mogą przyjmować założenia, których obiekt nie spełnia lub spełnia tylko częściowo. Wzorzec umożliwia więc eksperymentalną analizę błędów pochodzących od takiego niedopasowania elementów techniki pomiarowej do cech obiektu mierzonego (ang. object-dependent artifacts).

Wzorzec według wynalazku jest wykonywany na substracie, np. na szkiełku nakrywkowym o wysokiej precyzji, następnie jest otaczany immersją o wybranym współczynniku załamania (np. powietrze, kropla wody czy oleju, ewentualne przykrycie drugim szkiełkiem nakrywkowym) i umieszczany w układzie badanym. Następnie przeprowadza się pomiar i rekonstrukcję zgodnie z odpowiednią dla układu procedurą, po czym porównuje się wyniki (poszczególnych struktur, cech) z rozkładem zaprojektowanym lub zmierzonym technikami referencyjnymi.

Wzorzec według wynalazku wykonany jest w technologii polimeryzacji dwufotonowej, w której sterowanie parametrami wytwarzania wiąże się z lokalną zmianą współczynnika załamania. Technologia wytwarzania umożliwia przystosowanie wzorca do pomiarów na potrzeby uzyskania danych referencyjnych poprzez umieszczenie go na szkiełku nakrywkowym (mikroskopia elektronowa, spektroskopia, tomografia holograficzna w ograniczonym kącie) lub na czole włókna światłowodowego (obserwacja z innej perspektywy, tomografia z obrotem próbki mierzonej).

Polimery do celów polimeryzacji dwufotonowej są dobrze znane specjalistom, np. z publikacji Alexandras Selimis, Vladimir Mironov, Maria Farsari, Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing, *Microelectronic Engineering* 132 (2015) 83–89. Ogólnie rzecz biorąc, materiał nadający się do strukturyzowania za pomocą polimeryzacji dwufotonowej obejmuje co najmniej dwa składniki: (i) monomer lub mieszaninę monomery/oligomery, z których tworzy się końcowy polimer i (ii) fotoinicjator, który absorbuje światło laserowe. Końcowy polimer może być wybrany z grupy fotopolimerów akrylowych, epoksydowych, silikonowych, naturalnych i syntetycznych hydrożeli, takich jak glikol polietylenowy czy naturalne białka usieciowane kwasem hialuronowym, a także może to być polikaprolakton lub polilaktyd. Korzystnie w celu wytworzenia wzorca stosuje się rozgałęziony monomer akrylowy i α -aminoketon jako fotoinicjator, niemniej każdy polimer przeznaczony do polimeryzacji dwufotonowej może być stosowany.

Ogólnie rzecz ujmując materiałem wzorca może być każdy polimer spełniający następujące kryteria:

- ulega polimeryzacji/utwardzeniu pod wpływem promieniowania UV,
- ma wystarczającą transmisję promieniowania używanego w procesie TPP, zwykle o energii fotonu dwukrotnie mniejszej niż przy polimeryzacji jedno fotonowej (UV); innymi słowy wiązka nie jest silnie absorbowana przez objętość materiału pomiędzy obiektywem mikroskopowym a jej ogniskiem, w związku z czym maksimum intensywności wiązki znajduje się w jej ognisku,
- ma transmisję bliską 100% dla promieniowania stosowanego w badanym układzie pomiarowym (fazowy charakter obiektu, pożądany w rozważanych technikach pomiarowych).

Korzystne jest stosowanie materiałów zalecanych przez producentów systemów wytwarzania ze względu na ich dodatkową optymalizację pod względem właściwości fizykochemicznych, w tym ich jednorodności, skurczu, a także dostępnych zaleceń co do ewentualnych kroków niezbędnych podczas przygotowania do wydruku (np. odparowanie rozpuszczalnika) lub po wydruku (usunięcie nadmiaru materiału, wygrzewanie).

Wzorzec według wynalazku został przedstawiony w przykładach wykonania na rysunku, na którym: Fig. 1 przedstawia wzorzec według pierwszego przykładu wykonania wraz z przekrojami, Fig. 2 przedstawia wzorzec według drugiego przykładu wykonania wraz z przekrojami, Fig. 3 przedstawia wzorzec według trzeciego przykładu wykonania wraz z przekrojami, Fig. 4 przedstawia wzorzec według czwartego przykładu wykonania.

Wzorce według wynalazku zostały wykonane techniką polimeryzacji dwufotonowej z wykorzystaniem urządzenia Photonics Professional GT (Nanoscribe GmbH), charakteryzującego się następującymi parametrami: obiektyw mikroskopowy x100 1,4 NA, pozycjonowanie ogniska wiązki względem fotorezystu przy pomocy 3-osiowego stolika piezoelektrycznego, światłowodowy laser femtosekundowy

(czas trwania impulsu 100 fs, powtarzalność impulsów 80 MHz, centralna długość fali: 780 nm); druk kolejnych warstw struktury odbywa się w kierunku obiektywu.

Przykład 1

Wzorzec przedstawiony na Fig. 1 ma kształt wycinka elipsoidy o rozmiarze $30 \times 25 \times 11 \text{ }\mu\text{m}$ (długość, szerokość, wysokość). Materiał bazowy 1 ma współczynnik załamania 1,52. W przestrzeni wzorca znajdują się:

- obszar 2 o współczynniku załamania 1,50 i rozmiarze $9 \times 6 \times 6 \text{ }\mu\text{m}$,
- rozmieszczone wewnątrz obszaru 2 trzy elipsoidalne wtrącenia 3 o współczynniku załamania 1,52 i rozmiarach od 2 do $4 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 4 w kształcie zestawu prostopadłościanów o współczynniku załamania 1,48 i rozmiarze $4 \times 1,5 \times$ od 0,3 do $0,7 \text{ }\mu\text{m}$, rozstawionych w odległościach od 0,6 do $1,4 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 5 w kształcie zestawu prostopadłościanów o współczynniku załamania 1,48 i rozmiarze $4 \times 1,5 \times$ od 0,3 do $0,7 \text{ }\mu\text{m}$, rozstawionych w odległościach od 0,6 do $1,4 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 6 w kształcie zestawu prostopadłościanów o współczynniku załamania 1,48 i rozmiarze $3 \times 3 \times$ od 0,8 do $1,4 \text{ }\mu\text{m}$, rozstawionych w odległościach od 1,5 do $2 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 7 o gradientowym charakterze zmian współczynnika załamania, zmieniającym się w zakresie od 1,50 do 1,52 i rozmiarze $4,5 \times 4,5 \times 3 \text{ }\mu\text{m}$.

Obszary 4, 5 i 6 stanowią testy rozdzielczości w kierunku X (5), Y (4) i Z (6).

Wzorzec przedstawiony na Fig. 1 został otrzymany z materiału dostępnego komercyjnie pod nazwą IP-L 780 (Nanoscribe GmbH).

Wzorzec przedstawiony na Fig. 1 został otrzymany w następujący sposób:

1. Na środek szkiełka nakrywkowego o wysokiej płaskości i równoległości, o grubości $170 \text{ }\mu\text{m}$, nałożono kroplę polimeru IP-L 780, które następnie umieszczono w uchwycie urządzenia do druku 3D metodą polimeryzacji dwufotonowej.
2. Po zogniskowaniu układu optycznego urządzenia na interfejsie szkła i polimeru rozpoczęto procedurę wytwarzania linii po linii i warstwa po warstwie zgodnie z numeryczną definicją struktury, w której skład wchodzi kolejne punkty w układzie współrzędnych urządzenia oraz lokalne i globalne parametry procesu.
3. Na parametry użytkowe wzorca wpływają przede wszystkim następujące parametry procesu: moc lasera polimeryzującego, prędkość skanowania i odstęp między kolejnymi wokselami, liniami i warstwami. Podane wartości współczynnika załamania osiągnięto dla następującego zestawu parametrów: średnia moc lasera równa 0 mW dla obszarów o współczynniku załamania 1,48, 13 mW dla obszarów o współczynniku załamania 1,50 oraz 20 mW dla obszarów o współczynniku załamania 1,52, prędkość skanowania wynosi $70 \text{ }\mu\text{m/s}$, odległość między wokselami równa 200 nm w płaszczyźnie XY (interfejsu szkło-polimer) oraz 300 nm w kierunku Z (wzdłuż osi układu optycznego urządzenia). Analogiczne obszary wzorca o współczynnikach załamania 1,50 i 1,52 można otrzymać na przykład przy stałej mocy lasera równej 18 mW i zmiennej prędkości skanowania w zakresie odpowiednio od 150 do $50 \text{ }\mu\text{m/s}$.
4. Po zakończeniu procesu wydruku szkiełko nakrywkowe ze strukturą oczyszczono z resztek nieutwardzonego polimeru poprzez zanurzenie go w alkoholu izopropylowym przez 15 minut.

Przykład 2

Wzorzec przedstawiony na Fig. 2 ma kształt wycinka elipsoidy o rozmiarze $60 \times 50 \times 15 \text{ }\mu\text{m}$. Materiał bazowy 1 ma współczynnik załamania 1,50. W przestrzeni wzorca znajdują się:

- siedem obszarów elipsoidalnych 2 o współczynniku załamania 1,52 i rozmiarze od 1 do $10 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 3 w kształcie 4 współosiowych pierścieni o średnicach w zakresie od 5 do $8 \text{ }\mu\text{m}$, grubości od 0,3 do $1 \text{ }\mu\text{m}$ i o współczynniku załamania 1,52,
- obszar 4 w kształcie zestawu prostopadłościanów o współczynniku załamania 1,48 i rozmiarze $6 \times 6 \times$ od 1,5 do $3 \text{ }\mu\text{m}$, rozstawionych w odległościach od 3 do $5 \text{ }\mu\text{m}$,
- obszar 5 w kształcie prostopadłościanu o wymiarach $12 \times 10 \times 4 \text{ }\mu\text{m}$ i o gradientowym charakterze zmian wartości współczynnika załamania w zakresie 1,50–1,52.

Obszary 3 i 4 stanowią testy rozdzielczości w kierunku X (3), Y (3) i Z (4).

Przykład 3

Wzorzec przedstawiony na Fig. 3 ma kształt wycinka elipsoidy o rozmiarze $30 \times 25 \times 11 \mu\text{m}$. Materiał bazowy 1 ma współczynnik załamania 1,52. W przestrzeni wzorca znajdują się:

- obszar 2 w kształcie zestawu prostopadłościanów o współczynniku załamania 1,48 i rozmiarze $3 \times 3 \times$ od 0,8 do $1,5 \mu\text{m}$, rozstawionych w odległościach od 2 do $2,5 \mu\text{m}$,
- obszar 3 w kształcie elipsoidy o wymiarach $18 \times 18 \times 8 \mu\text{m}$ i współczynniku załamania 1,51, w obrębie znajdują się obszary 4 i 5,
- obszar 4 w kształcie 2 elipsoid o współczynniku załamania 1,50 i rozmiarach w zakresie od 0,5 do $4 \mu\text{m}$,
- obszar 5 w kształcie zestawu graniastostupów o wymiarach $2 \times 5 \times 4 \mu\text{m}$, ułożone względem siebie na podobieństwo gwiazdy Siemens, o współczynniku załamania 1,50.

Obszary 2 i 5 stanowią testy rozdzielczości w kierunku X (5), Y (5) i Z (2).

Przykład 4

Wzorzec przedstawiony na Fig. 3 składa się z trzech wzorców przedstawionych na przykładzie 1, wykonanych obok siebie i zachodzących na siebie, na podobieństwo kolonii komórek.

Zastrzeżenia patentowe

1. Wzorzec rozkładu współczynnika załamania w formie trójwymiarowego obiektu który w swojej objętości zawiera ośrodek bazowy i obszary o zmiennej wielkości i odległości, o innym współczynniku załamania niż współczynnik załamania dla ośrodka bazowego, **znamienny tym**, że różnica współczynnika załamania tych obszarów względem współczynnika załamania ośrodka bazowego nie jest większa niż 0,04, co najmniej jeden z obszarów stanowi zestaw co najmniej dwóch graniastostupów lub walców lub współosiowych pierścieni o zmiennej wielkości i odległości, o wymiarze przynajmniej w jednym kierunku zbliżonym do zdolności rozdzielczej układu pomiarowego podlegającego ocenie oraz co najmniej jeden z obszarów ma kształt zbliżony do elipsoidy albo kuli.
2. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że co najmniej jeden obszar zbliżony do elipsoidy albo kuli jest umiejscowiony w innym obszarze o odmiennym współczynniku załamania względem obszaru zbliżonego do elipsoidy albo kuli i względem ośrodka bazowego.
3. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obszar w formie współosiowych pierścieni zawiera pierścienie o zakresie średnic od $1 \mu\text{m}$ do $50 \mu\text{m}$, o grubości każdego z pierścieni zbliżonej do zdolności rozdzielczej układu pomiarowego podlegającego ocenie.
4. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera zestaw co najmniej dwóch prostopadłościanów ułożonych względem siebie równolegle.
5. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera zestaw graniastostupów ułożonych względem siebie w sposób analogiczny do gwiazdy Siemens.
6. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że co najmniej jeden z obszarów ma gradientowy charakter zmienności współczynnika załamania, o maksymalnym zakresie zmienności współczynnika załamania równym 0,02.
7. Wzorzec według zastrz. 6, **znamienny tym**, że obszar o gradientowej zmianie współczynnika załamania ma kształt prostopadłościanu lub walca.
8. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ma wymiary zewnętrzne w zakresie od $5 \mu\text{m}$ do $300 \mu\text{m}$ w każdym z trzech kierunków.
9. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że każdy z obszarów wewnętrznych wzorca o innym współczynniku załamania ma wymiary w zakresie $50 \text{ nm} - 250 \mu\text{m}$ w każdym z trzech kierunków.
10. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że różnice współczynników załamania poszczególnych obszarów są w zakresie od 0,001 do 0,04.
11. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wartości współczynnika załamania materiału wzorca zawierają się w zakresie od 1,45 do 1,60.
12. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ma kształt zbliżony do wycinka elipsoidy.
13. Wzorzec według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wzorzec reprezentuje komórkę biologiczną lub kolonię komórek.

Rysunki

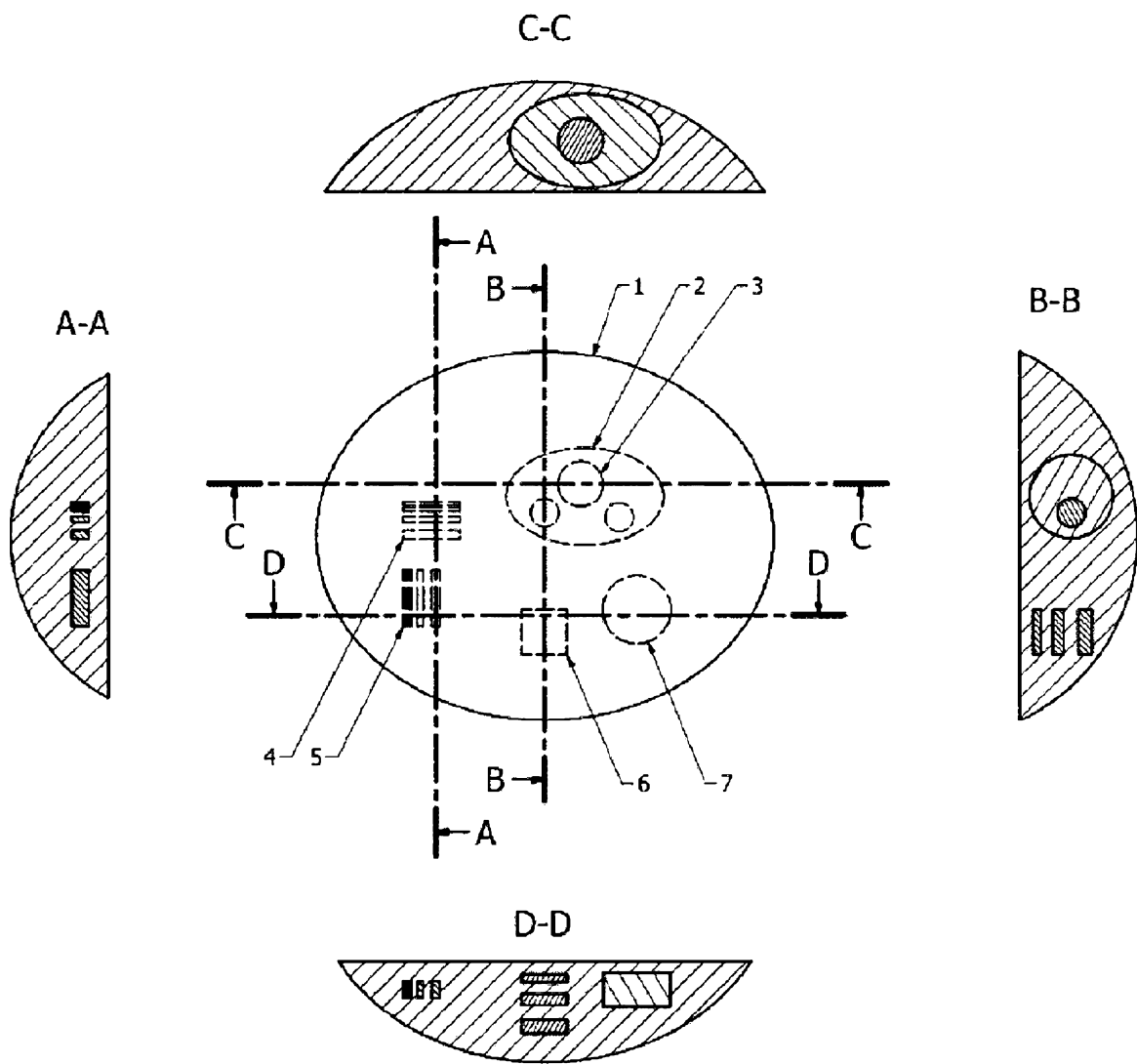
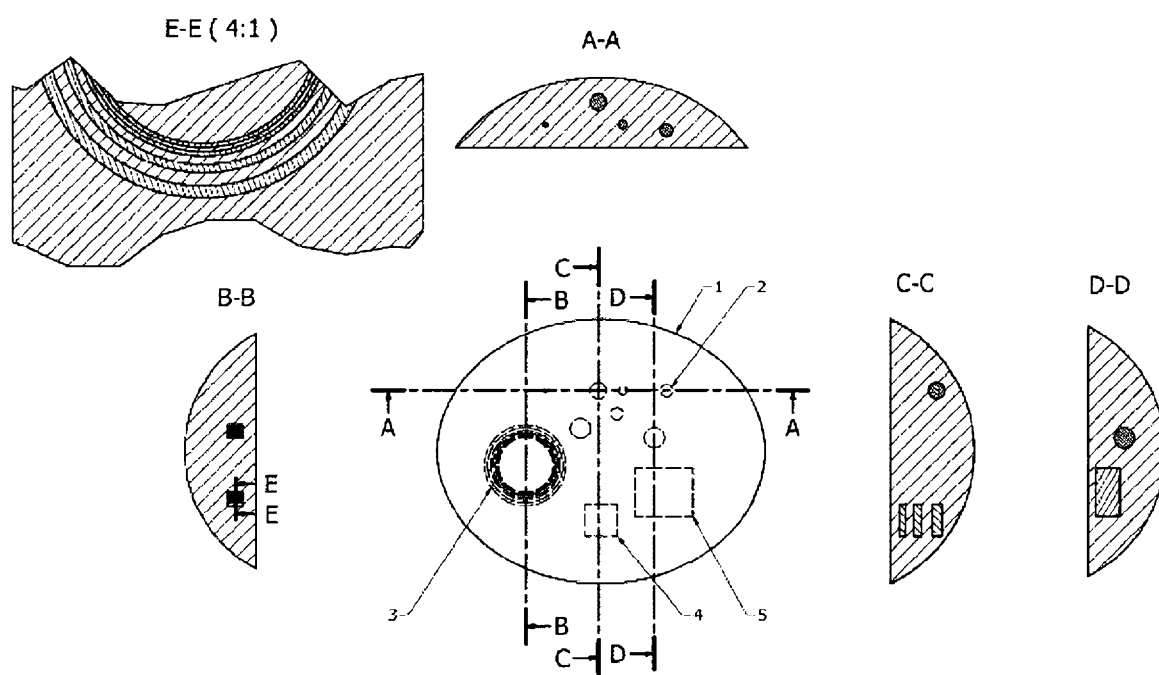


Fig. 1

**Fig. 2**

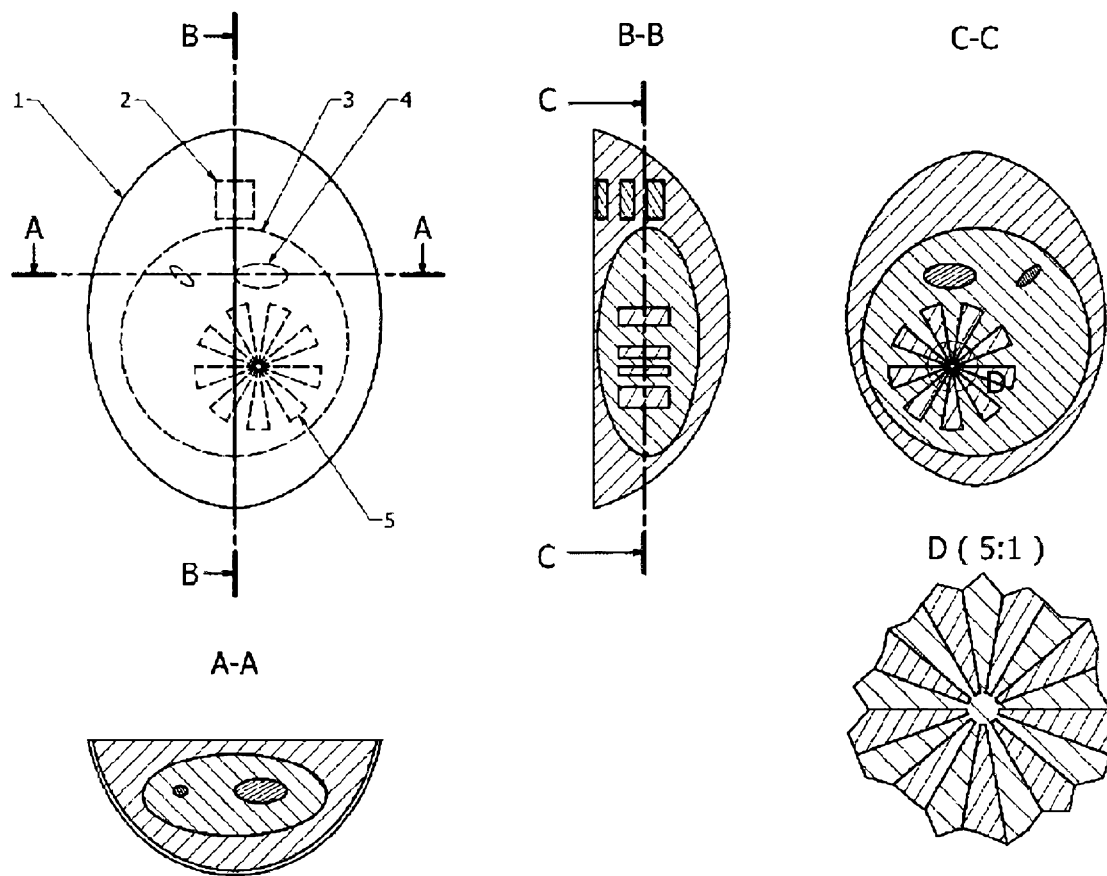


Fig. 3

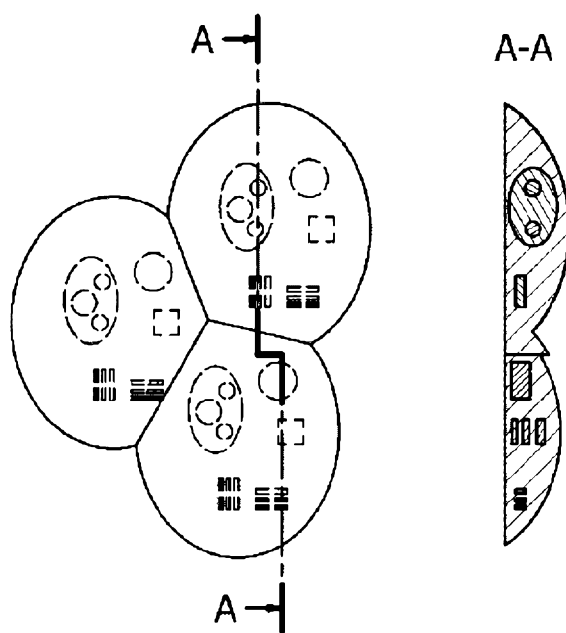


Fig. 4