

УДК 535.4

ЦИФРОВАЯ ГОЛОГРАФИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ ГОЛОГРАММ МИКРООБЪЕКТОВ

В.Г. Гендин, И.П. Гуров

Рассмотрены принципы цифровой голографии и голографической микроскопии и особенности регистрации голограмм. Представлены основные схемы записи цифровых голограмм микрообъектов, методы повышения разрешения в цифровой голографии и новые методы использования цифровой голографии для исследования микрообъектов.

Ключевые слова: цифровая голографическая микроскопия, разрешающая способность голограммы, нулевой порядок дифракции, биологический объект.

Введение

Цифровая голография применяется во многих областях науки и технологий для неразрушающих исследований различных объектов, в том числе физических неоднородностей, деформаций, трехмерной структуры объектов различной физической природы и др.

Методы наблюдения и анализа состояния трехмерной микроструктуры биологических объектов на клеточном микроуровне исключительно важны для различных областей исследований в биологии и медицине, где допускается только неинвазивная диагностика. Современные неинвазивные методы цифровой голографии имеют высокое разрешение и являются наиболее важными и перспективными для развития биомедицины. Они особенно активно развиваются в ведущих научных лабораториях мира в течение последних лет [1–7]. Использование современных видеокамер обеспечивает возможность регистрировать голограммы в электронной форме с повышенным разрешением и обрабатывать их на компьютере. При этом с помощью компьютера возможно получение точных количественных данных как об амплитуде, так и о фазе предметной волны, отраженной от исследуемого объекта или прошедшей через объект.

Методы цифровой голографической микроскопии (ЦГМ) позволяют значительно сократить затраты на дорогостоящие оптико-механические узлы, поскольку при использовании ЦГМ не требуется точная фокусировка на объекте исследования: запись голограммы производится при фиксированном положении объектива, а фокусировка на различных расстояниях осуществляется при использовании специальных вычислительных алгоритмов. Поскольку современное развитие вычислительной техники позволило при высоких вычислительных мощностях значительно сократить стоимость компьютеров по сравнению со стоимостью оптико-механических узлов, а также ввиду отсутствия в ЦГМ необходимости записи большого числа изображений различных слоев объекта указанные преимущества особенно важны при использовании ЦГМ для исследования объектов биологической природы.

В работе рассматриваются основные особенности цифровой регистрации и анализа голограмм, принципы, на которых основываются технологии записи голограмм микрообъектов, проблемы, возникающие при регистрации голограмм микрообъектов, и современные варианты их решения.

Теоретические основы цифровой голографии

Запись голограмм в цифровой голографии осуществляется при регистрации результирующего поля с помощью видеокамеры в форме суммы предметной волны, взаимодействующей с исследуемым объектом, и опорной волны. Объектная и опорная волны интерферируют в плоскости записи голограммы. Голограмма содержит полную информацию о трехмерном распределении оптического поля объектной волны в виде микроинтерференционных полос. При восстановлении изображения исходного объекта в классической голографии зарегистрированная интерференционная картина освещается таким же опорным пучком, как и при записи. В результате дифракции восстанавливается изображение объекта. Для реконструкции изображения из голограммы в цифровой голографии используются вычислительные методы, позволяющие в результате обработки голограммы определить значения амплитуды и фазы предметной волны [8–10].

Распределение интенсивности $I(x, y)$ в плоскости записи голограммы (x, y) есть квадрат модуля суммы комплексных амплитуд объектной $O(x, y)$ и опорной $R(x, y)$ волн, т.е.

$$I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + R(x, y)O^*(x, y), \quad (1)$$

где $R^*(x, y) = R(x, y)\exp(i\varphi_R(x, y))$ – комплексно-сопряженная величина для объектной волны; $O^*(x, y) = O(x, y)\exp(i\varphi_O(x, y))$ – комплексно-сопряженная величина для опорной волны.

Поскольку комплексная амплитуда объектной волны $R(x,y)$ заранее известна, восстановление изображения из голограммы осуществляется при вычислении произведения $R(x,y)$ и распределения интенсивности в голограмме $I(x,y)$, а именно

$$R(x,y)I(x,y) = R(x,y)|R(x,y)|^2 + R(x,y)|O(x,y)|^2 + O(x,y)|R(x,y)|^2 + R^2(x,y)O^*(x,y). \quad (2)$$

Первые два слагаемых в правой части уравнения (2) составляют нулевой порядок дифракции, или фоновую составляющую. Третье слагаемое представляет собой точную копию исходного поля $O^*(x,y) = O(x,y)\exp(i\varphi_o(x,y))$ и называется мнимым изображением объекта. Четвертое слагаемое относится к еще одному изображению объекта, «изображению-двойнику», которое называется действительным изображением. При этом их пространственное расположение зависит от угла между направлениями распространения опорной и объектной волн. Поскольку размер пикселя матрицы накладывает ограничение на максимальный допустимый угол, нулевой порядок дифракции частично перекрывает изображение объекта. Эта проблема решается различными способами.

Устранение нулевого порядка дифракции

Для устранения нулевого порядка дифракции известно четыре основных подхода. Первый из них основан на цифровом устранении нулевого порядка дифракции, например, с применением фильтра высоких частот с малой частотой среза [8]. Второй метод состоит в вычитании средней яркости из исходной голограммы [8, 11]. Третий метод основывается на записи нескольких голограмм, зарегистрированных с заданными сдвигами фазы опорной волны. После совместной обработки набора голограмм можно реконструировать изображение, не содержащее нулевой порядок дифракции [4, 11, 12]. Четвертый метод основан на том, что можно зарегистрировать отдельно объектную и опорную волны и через известные преобразования получить голограмму нулевого порядка дифракции, который затем вычитается из голограммы [11].

Первые два метода устранения нулевого порядка дифракции применимы только для внеосевых голограмм, т.е. в случае, когда при регистрации голограммы существует некоторый угол между направлениями распространения предметной и опорной волн. Типичная схема записи внеосевых голограмм представлена на рис. 1 [1].

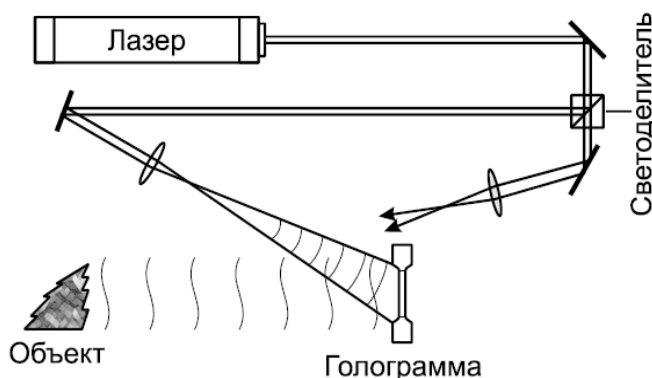


Рис. 1. Схема процесса записи голограмм

Однако при использовании внеосевой схемы регистрации голограмм появляется проблема неполного использования поля матрицы видеокamеры, на которую производится запись, что приводит к снижению разрешения реконструированного изображения [4, 12]. Способы устранения нулевого порядка дифракции на основе фазового сдвига и метода раздельной записи объектной и опорной волн обеспечивают более полное использование поля матрицы, однако для реконструкции голограммы требуется запись двух и более видеокadров, что накладывает некоторые ограничения при практическом использовании, например, оказывается затрудненной или невозможной регистрация голограмм быстропротекающих процессов.

На рис. 2 представлена схема регистрации голограмм пропускающих свет микрообъектов с использованием алгоритма фазового сдвига [13].

Здесь зеркало 32 закреплено на пьезоэлектрическом преобразователе, с помощью которого задаются малые изменения разности оптических длин путей опорной и объектной волн. Представленная на рисунке схема предлагается авторами для исследования микротрещин и дефектов под воздействием механических нагрузок, однако она может использоваться и для исследований биологических объектов.

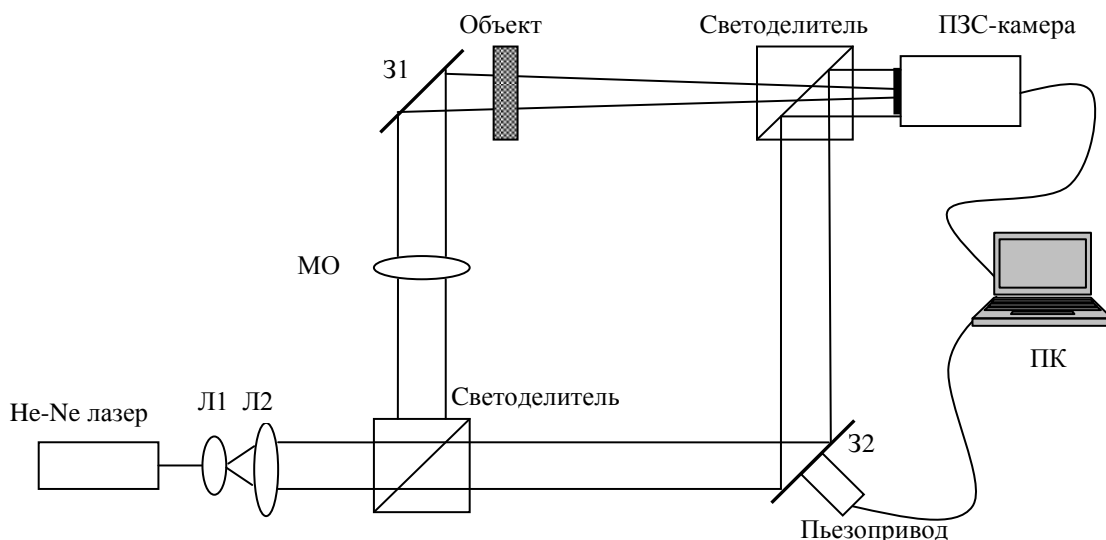


Рис. 2. Схема записи цифровых голограмм с фазовым сдвигом: Л1, Л2 – линзы; 31, 32 – зеркала; МО – микрообъектив; ПК – персональный компьютер

Авторы работы [11] наряду с другими методами предлагают альтернативный метод устранения нулевого порядка дифракции. Проанализировав уравнение (1), можно показать, что голограмма, которая не содержит нулевой порядок дифракции, описывается выражением

$$I_n(x, y) = I(x, y) - |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2.$$

Значения $R(x, y)$ и $O(x, y)$ можно получить при записи двух видеок кадров с перекрытой соответственно измерительной и опорной ветвью в оптической системе. При этом требуется зарегистрировать на видеокамеру три изображения в различные моменты времени, что накладывает ограничения на регистрацию быстропротекающих процессов.

На рис. 3 представлен результат устранения нулевого порядка дифракции вышеописанным методом и методом фазового сдвига.

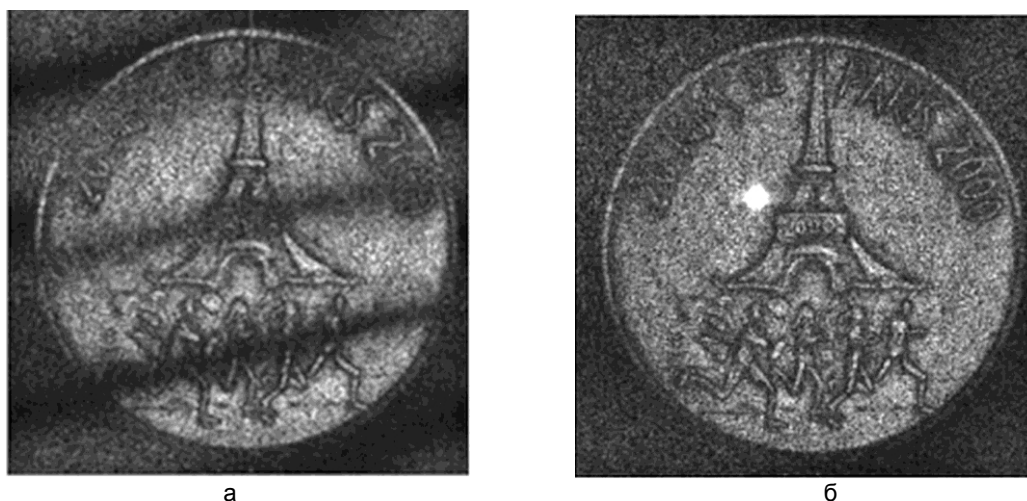


Рис. 3. Реконструированное изображение медали диаметром 50 мм с остаточным влиянием нулевого порядка дифракции (а) и с устраненным нулевым порядком дифракции (б)

На рис. 3, б, видно, что нулевой порядок устранен почти полностью, в отличие от изображения на рис. 3, а, где наблюдаются полосы, перекрывающие часть изображения, которые вызваны непараллельностью смещения опорного отражателя в методе фазового сдвига. Эти результаты позволяют сделать вывод о преимуществе в простоте реализации метода устранения нулевого порядка при записи отдельно объектной и опорной волн.

Нулевой порядок дифракции вносит искажения как в реконструированную амплитуду, так и в фазу исследуемого объекта, что может привести к снижению точности при исследовании различных объектов. Так, например, в работе [14] исследуется точность определения малого смещения объекта методом

цифровой голографии и сравнивается влияние метода устранения нулевого порядка дифракции на точность определения смещения объекта.

Для определения малого смещения объекта достаточно записать две голограммы в исходном и конечном состоянии. Далее восстанавливаются фазы обеих голограмм в виде

$$\varphi(\xi, \eta) = \arctg \left(\frac{\operatorname{Re}(Q(\xi, \eta))}{\operatorname{Im}(Q(\xi, \eta))} \right).$$

После этого вычисляется разность фаз

$$\Delta\varphi(\xi, \eta) = \varphi_1(\xi, \eta) - \varphi_2(\xi, \eta).$$

Расчет величины смещения в метрах производится с учетом того, что при смещении объекта оптическая длина пути увеличивается на величину, равную удвоенному смещению:

$$\Delta d = \frac{\lambda}{4\pi} \Delta\varphi.$$

Таким образом, удалось установить, что среднее квадратическое отклонение определения смещения для различных методов устранения нулевого порядка дифракции различно. Так, для метода с использованием фильтрации среднее квадратическое отклонение полученных смещений от заданных составляет 3,28 нм, а для метода фазового сдвига – 2,31 нм.

Все описанные методы устранения нулевого порядка дифракции пригодны как для традиционной цифровой голографии, так и для ЦГМ.

Схемы регистрации голограмм микрообъектов

В цифровой голографии можно выделить несколько различных видов голограмм. Основным из них являются голограммы Френеля и голограммы Фурье, которые, в свою очередь, могут быть осевыми и внеосевыми.

Голограмму Фурье можно определить как голограмму плоского объекта, записываемую с помощью опорного точечного источника, расположенного в плоскости объекта, параллельной плоскости голограммы. Голограмма Френеля – пропускающая голограмма, при записи которой регистрирующая среда находится в области дифракции Френеля рассеянного объектом излучения. Голограмма образуется как результат интерференции объектной волны в зоне дифракции Френеля с опорной плоской волной.

Осевые голограммы отличаются от внеосевых наличием угла между опорной и объектной волнами, т.е. в случае записи осевой голограммы опорная и объектная волны распространяются в одном и том же направлении, а в случае внеосевой голограммы – под некоторым малым углом. На значения угла между опорной и объектной волнами накладываются некоторые ограничения. В соответствии с критерием Найквиста, на каждый период интерференционной картины должны приходиться не менее двух отсчетов, т.е. светочувствительных ячеек (пикселей) оцифрованного изображения. Размер пикселя Δx ограничивает значение максимального угла α_{\max} при интерференции сферических вторичных волн от каждой точки объекта и опорной волны согласно условию [8]

$$\alpha_{\max} = \frac{\lambda}{2\Delta x}.$$

Следовательно, необходимо выбрать угол между опорной и предметной волнами так, чтобы, с одной стороны, выполнялся критерий Найквиста, а с другой – порядки дифракции были максимально отделены друг от друга.

Основная идея ЦГМ состоит в наличии дополнительной оптической системы (микрообъектива) между объектом и видеокамерой с формированием увеличенного изображения области, освещаемой объектной волной. Наличие микрообъектива является основной отличительной особенностью ЦГМ.

На рис. 4 представлена схема регистрации голограмм Фурье на основе интерферометра Маха-Цендера [15]. На этой схеме в качестве источника использован He-Ne лазер с длиной волны 632,8 нм, излучение которого ослабляется нейтральным светофильтром. В объектном плече установлен исследуемый образец, а в опорном – микрообъектив с диафрагмой, находящейся в его фокусе, которые совместно формируют сферическую волну, интерферирующую в плоскости ПЗС-матрицы с объектной волной. Пара полуволновых пластинок и поляризирующий светоделитель позволяют варьировать соотношение интенсивностей в опорном и объектном плечах.

На основе интерферометра Маха-Цендера возможна также запись голограмм Френеля. Например, в работе [16] авторы представили схему внеосевой записи голограмм с использованием 4f-системы (рис. 5). Использование такой системы для исследования микрообъектов позволяет избежать aberrаций, которые возникают при использовании микрообъектива, а также значительно расширить поле зрения.

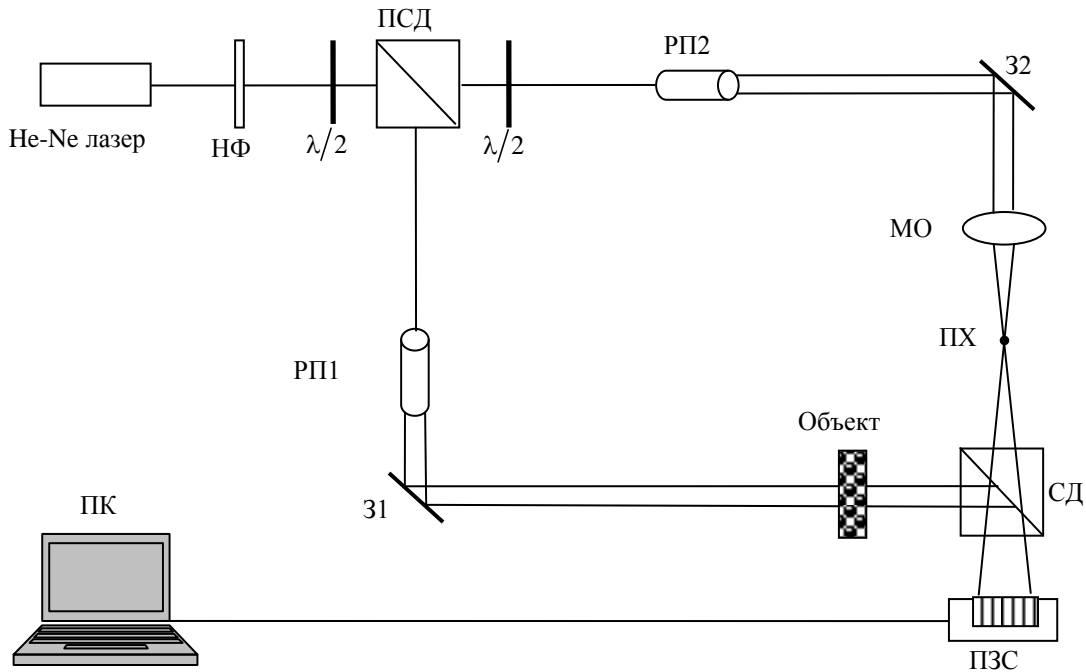


Рис. 4. Схема записи голограмм Фурье [15]: НФ – нейтральный светофильтр; ПСД – полярирующий светоделительный кубик; $\lambda/2$ – полуволновая пластинка; РП1, РП2 – расширители пучка; 31, 32 – зеркала; МО – микрообъектив; ПХ – пинхол; СД – неполяризационный светоделительный кубик; ПЗС – ПЗС-видеокамера; ПК – компьютер

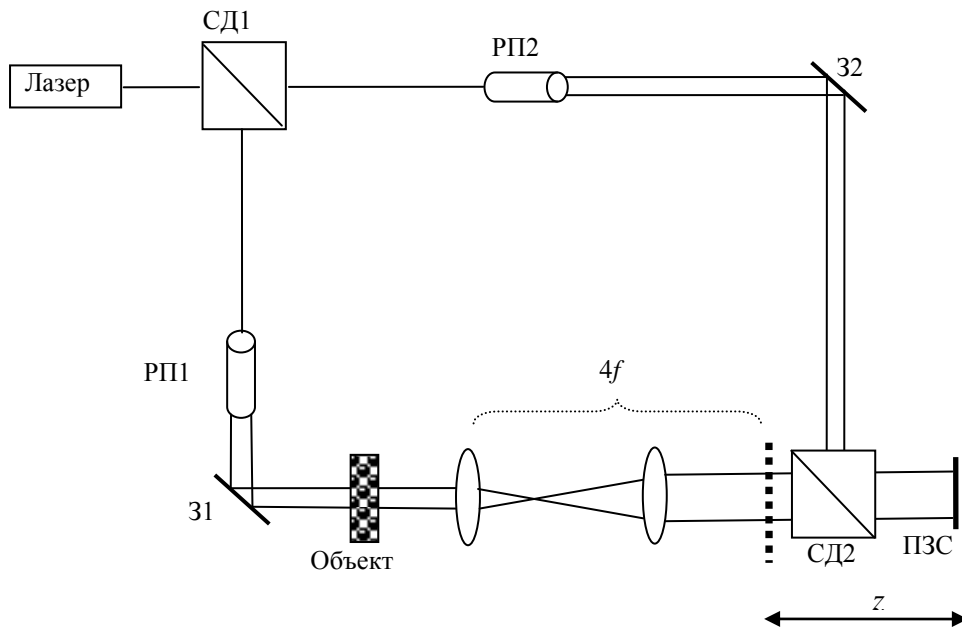


Рис. 5. Схема регистрации голограмм Френеля с $4f$ -системой: СД1, СД2 – светоделители; 31, 32 – зеркала; РП1, РП2 – расширители; $4f$ – $4f$ -система; ПЗС – ПЗС-видеокамера

Объект помещается в фокальную плоскость $4f$ -системы и освещается плоской волной, которая формирует геометрически увеличенное изображение, аналогичное положению самого объекта на расстоянии z . Результирующее поле голограммы формируется в плоскости ПЗС-матрицы в результате интерференции увеличенной области объектной волны с опорной волной.

Помимо интерферометра Маха–Цендера, широко используются системы регистрации голограмм на основе интерферометра Майкельсона [6, 7]. Пример реализации схемы записи голограмм на основе интерферометра Майкельсона представлен на рис. 6.

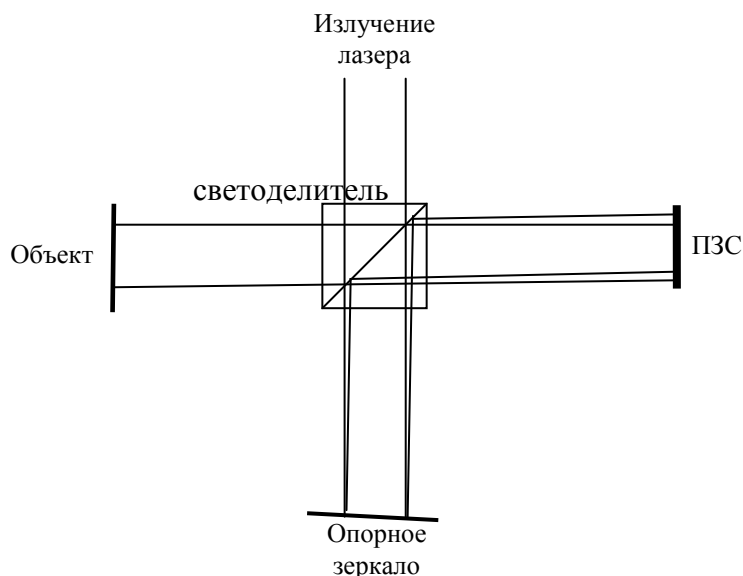


Рис. 6. Схема записи голограмм на основе интерферометра Майкельсона

Важное отличие схем на основе интерферометров Маха–Цендера и Майкельсона в цифровой голографии состоит в возможности исследования образцов различных видов. В первом случае удобнее исследовать прозрачные образцы в проходящем свете, а во втором – в отраженном свете.

В цифровой голографии могут использоваться не только лазерные источники излучения, но также источники с малой степенью когерентности [5, 17, 18]. На рис. 7 представлена схема записи голограмм с использованием суперлюминесцентного диода.

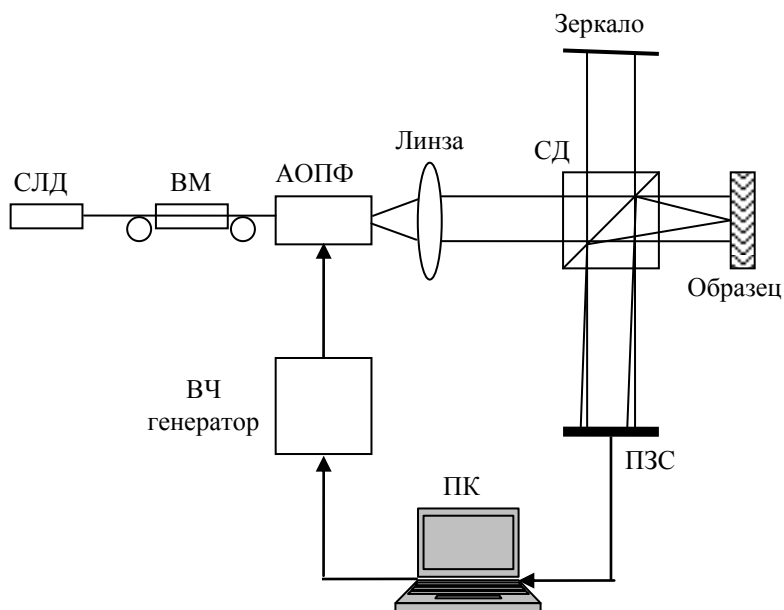


Рис. 7. Схема регистрации голограмм Френеля: СЛД – суперлюминесцентный диод; ВМ – волоконнооптический соединитель; АОПФ – акустооптический перестраиваемый фильтр; СД – светоделительный кубик; ПЗС – ПЗС-видеокамера; ПК – компьютер

Изображенная на рис. 7 схема предоставляет возможность получать томографические изображения методом цифровой голографии. Акустооптический модулятор позволяет выделять требуемые длины волн и записывать серию голограмм за малый промежуток времени. Методика получения трехмерного изображения внутренней микроструктуры объекта основывается на поперечном сканировании объекта, записи серии двумерных голограмм, их реконструкции и последующем совмещении. При этом каждая из голограмм содержит информацию о внутренней структуре объекта в поперечном сечении в текущем продольном положении.

На рис. 8 представлен пример трехмерного изображения среды, полученного с помощью цифровой голографии.

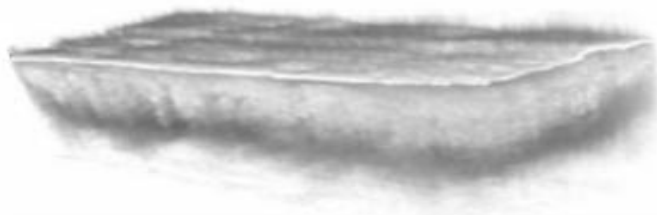


Рис. 8. Результат реконструкции томографического изображения методом цифровой голографии с источником излучения малой когерентности ($1,5 \times 15$ мм) [18]

Повышение разрешения в цифровой голографии

Одно из основных направлений исследований в области цифровой голографии в настоящее время состоит в повышении разрешающей способности. Предложен ряд методов повышения разрешения реконструированных изображений как на этапе записи цифровых голограмм, так и на этапе реконструкции изображений [1–3, 19].

Известно, что рассеянный объектом свет лишь частично попадает в поле регистрирующей матрицы, что снижает разрешение при записи голограмм. Применение дифракционной решетки позволяет большему количеству рассеянного объектом света попадать на светочувствительную матрицу. При этом обеспечивается более высокое разрешение.

На рис. 9 представлена схема для получения цифровых голограмм Фурье со сверхразрешением [19]. Для этого используется дифракционная решетка, размещенная после объекта.

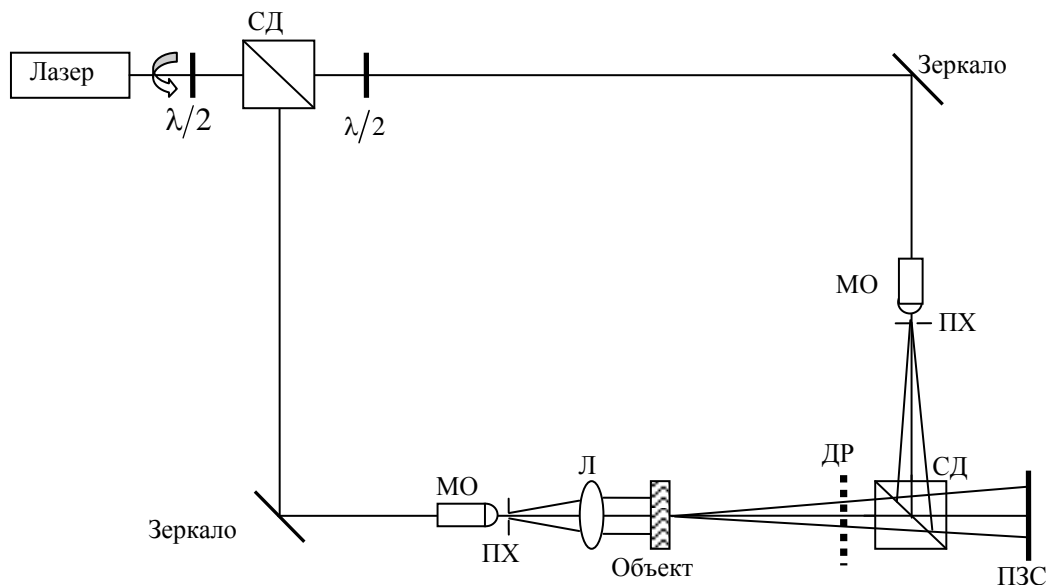


Рис. 9. Схема записи голограмм со сверхразрешением: СД – светоделиватель; $\lambda/2$ – полуволновые пластинки; МО – микрообъектив; ПХ – пинхол; Л – линза; ДР – дифракционная решетка; ПЗС – ПЗС-видеокамера

Дифракционная решетка устанавливается между образцом и плоскостью регистрации. Известно, что свет, проходящий через дифракционную решетку, разлагается на три составляющие (порядка дифракции), одна из которых сохраняет свое направление (нулевой порядок), а две другие (в первых порядках дифракции) направлены под углом к исходному направлению, примерно равным $\pm\lambda/p$, где p – период дифракционной решетки. На рис. 10 представлен ход лучей без дифракционной решетки и с использованием дифракционной решетки. Из рис. 10 видно, что без использования дифракционной решетки (рис. 10, а) только малая часть света, рассеянного объектом, попадает в плоскость матрицы, тогда как в случае использования дифракционной решетки (рис. 10, б) большая часть света попадает в область регистрации.

Предлагается использовать два вида решеток – одномерные и двумерные. В первом случае может быть улучшено только латеральное разрешение. Во втором случае можно улучшить разрешение по всем координатам. Таким образом, использование двумерных дифракционных решеток для повышения разрешения в цифровой голографии является более эффективным.

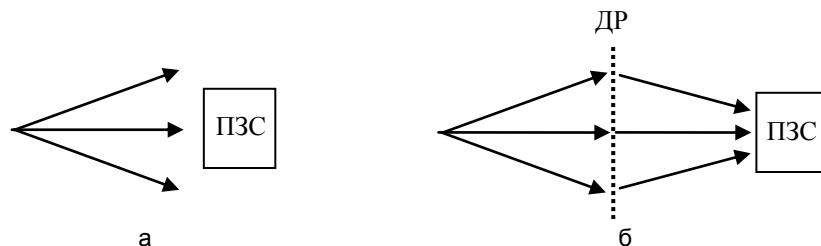


Рис. 10. Ход лучей объектной волны без использования дифракционной решетки (а) и с использованием дифракционной решетки (ДР) (б)

Заключение

Методы цифровой голографии и голографической микроскопии позволяют эффективно исследовать биологические и другие объекты с разрешающей способностью, определяемой длиной волны оптического излучения, параметрами оптической системы и регистрирующей среды.

В последние годы проведены активные исследования, направленные на совершенствование методов и средств цифровой голографии. Перспективные исследования в области цифровой голографии направлены на повышение разрешения и достоверности получаемых результатов. Как видно из ряда публикаций, созданы методы повышения разрешения в цифровой голографии [1–3] вплоть до 40 линий на миллиметр [19]. Методы устранения нулевого порядка дифракции также активно совершенствуются, становятся менее ресурсоемкими и более эффективными [11], что позволяет получать более достоверные изображения исследуемых объектов без мешающего влияния нулевого порядка дифракции.

Большой интерес представляет также использование цифровой голографической микроскопии для реконструкции томографических изображений микрообъектов. Совместное использование голографического и томографического подходов позволяет достигнуть нового качества в исследовании биообъектов, т.е. получать амплитудную и фазовую информацию о различных слоях объекта, не прибегая к длительному сканированию образцов в аксиальной плоскости [18].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Swoger J., Corral M.M., Huisken J., Stelzer H.K. Optical scanning holography as a technique for high-resolution three-dimensional biological microscopy // *J. Opt. Soc. Am. A.* – 2002. – V. 19. – P. 1910–1918.
2. Mico V., Zalevsky Z., García-Martínez P., García J. Synthetic aperture superresolution with multiple off-axis holograms // *J. Opt. Soc. Am. A.* – 2006. – V. 23. – P. 3162–3170.
3. Hillman T.R., Gutzler T., Alexandrov A.S., David D.D. High-resolution, wide-field object reconstruction with synthetic aperture Fourier holographic optical microscopy // *Opt. Express.* – 2009. – V. 17. – P. 7873–7892.
4. Zhang Y., Lu Q., Ge B., Zhao H., Sun Y. Digital holography and its applications // *Proc. of SPIE.* – 2005. – V. 5636. – P. 200–211.
5. Dubois F., Debeir O., Kiss R. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration // *Journal of Biomedical Optics.* – 2006. – V. 11 – № 5. – P. 054032.
6. Zhou W., Yu Y., Duan Y., Asundi A. Phase reconstruction of live Human Embryonic Kidney 293 cells based on two off-axis holograms // *Proc. of SPIE.* – 2009. – V. 7375. – P. 737502.
7. Kim M.K. Principles and techniques of digital holographic microscopy // *SPIE Rev.* – 2010. – V. 1. – P. 018005-1-50.
8. Балтийский С.А., Гуров И.П., Де Никола С., Коппола Д., Ферраро П. Современные методы цифровой голографии // *Проблемы когерентной и нелинейной оптики.* – СПб: СПбГУ ИТМО, 2004. – С. 91–117.
9. Schnars U., Jüptner W. Digital recording and numerical reconstruction of holograms // *Meas. Sci. Technol.* – 2002. – V. 13. – R85–R101.
10. Lingfeng Yu, Yingfei An and Lilong Cai. Numerical reconstruction of digital holograms with variable viewing angles // *Opt. Express.* – 2002. – V. 10. – P. 1250–1257.
11. Junchang L., Qinghe S., Patrice T., Pascal P. Eliminating Zero-order Diffraction in the Digital Holography Wavefront Reconstruction with Adjustable Magnification // *Proc. of SPIE.* – 2010. – V. 7848. – P. 78481Y.
12. Dong E., Kang X., Chi J., He X. Phase shifting technique in digital holography // *Proc. of SPIE.* – 2009. – V. 7375. – P. 73749.
13. Sakaue K., Suzuki S., Takashi M. Recording caustic images by phase-shifting digital holography // *Optical Engineering.* – 2006. – V. 45. – № 11. – P. 115802.

14. Гендин В.Г. Определение малых смещений объектов методом цифровой голографии с использованием метода фазового сдвига и метода фильтрации высоких частот // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2012. – № 2 (78). – С. 28–32.
15. Chen Zh., Liu F., Gong W., Wang H. Microscopy based on digital lensless Fourier transforms holography // Proc. of SPIE. – 2010. – V. 7848. – P. 784834.
16. Lu Q., Ge B., Chen Y., Zou J. Microstructure Testing with Digital Holography // Proc. of SPIE. – 2009. – V. 7511. – P. 751105.
17. Sheoran G., Dubey S., Anand A., Mehta D.S., Shakher C. Swept-source digital holography to reconstruct tomographic images // Opt. Lett. – 2009. – V. 34. – № 12. – P. 1879–1881.
18. Yu L., Chen Zh. Multi-wavelength digital holographic tomography based on spectral interferometry // Proc. of SPIE. – 2009. – V. 7184. – P. 1840.
19. Paturzo M., Merola F., Grilli S. De Nicola S., Ferraro P. Digital holography in combination with diffraction grating to get super-resolution // Proc. of SPIE. – 2008. – V. 6995. – P. 699505.

Гендин Владислав Геннадьевич – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, vlad.gendin@gmail.com

Гуров Игорь Петрович – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой, gurov@mail.ifmo.ru