

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**ЦИФРОВАЯ ГОЛОГРАФИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ
В РЕЖИМЕ НА ПРОПУСКАНИЕ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 434 группы
направления 03.03.02 «Физика»
физического факультета
Клычковой Дарьи Михайловны

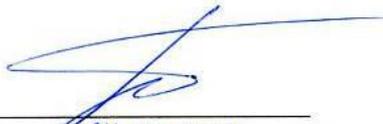
Научный руководитель
доцент кафедры оптики
и биофотоники, к.ф.-м.н.



24.05.2017

А. А. Гребенюк

Заведующий кафедрой
оптики и биофотоники
д.ф.-м.н., профессор



24.05.2017

В. В. Тучин

Саратов 2017

Введение

Визуализация клеток играет важную роль во многих исследованиях биологии и медицины. Наиболее распространённой является визуализация клеток посредством оптической микроскопии. Так как биологические клетки зачастую являются почти прозрачными в видимом диапазоне, изображения, получаемые посредством амплитудной визуализации, могут иметь низкий контраст [1, 2]. Фазовая визуализация в микроскопии на пропускание представляет собой отображение изменения фазы волны, вследствие прохождения через объект. Поэтому фазовые изображения могут иметь довольно высокий контраст даже при визуализации прозрачных объектов [1]. Вследствие этого фазовая визуализация клеток зачастую является предпочтительной. Наибольший интерес представляют методы количественной фазовой визуализации, поскольку они предоставляют не только качественную, но и количественную информацию и предоставляют следующие возможности [1–5]:

- измерение изменения оптической толщины клетки с точностью до долей длины волны;
- численная фокусировка, играющая важную роль при исследовании клеток в динамике;
- коррекция aberrаций.

Помимо достоинств у методов количественной фазовой визуализации есть и недостатки. Зачастую в экспериментальных схемах для их реализации используется когерентное освещение, что при наличии частиц пыли, царапин и т.п. на оптических элементах приводит к возникновению шумов в регистрируемом сигнале. Устранить этот недостаток можно при помощи снижения степени когерентности освещающего поля [6–10].

Одним из наиболее распространённых методов количественной фазовой визуализации является цифровая голографическая микроскопия (ЦГМ). В ЦГМ снижение шумов в сигнале возможно за счёт использования пространственно частично когерентного освещения [8–10]. Однако, как было показано при

помощи численного моделирования в работе [11], при визуализации расфокусированных объектов в ЦГМ на пропускание использование пространственно частично когерентного освещения может приводить к ослаблению высоких поперечных пространственных частот в сигнале когерентности, а, значит, к снижению поперечного пространственного разрешения численно сфокусированных изображений.

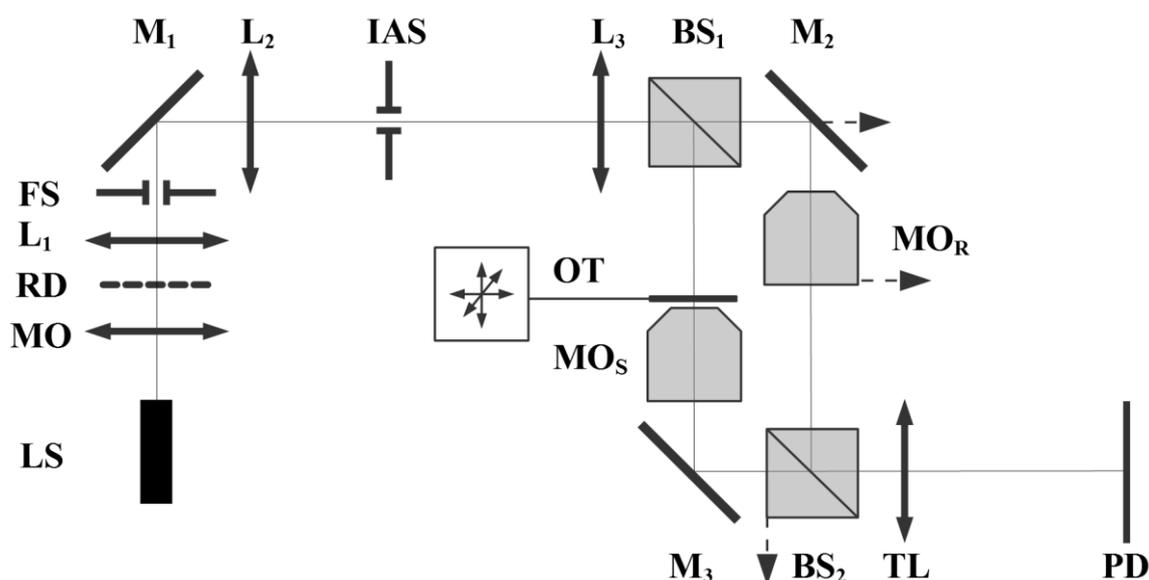
Целью данной работы являлось создание установки цифрового голографического микроскопа в режиме внеосевой голографии с квазимонохроматическим пространственно частично когерентным освещением на пропускание (включающее в себя сборку оптической схемы и написание программ обработки цифровых голограмм) и экспериментальное исследование с её помощью эффекта затухания высоких поперечных пространственных частот в пространственном спектре сигнала когерентности в ЦГМ на пропускание.

В рамках поставленной цели решались задачи сборки оптической схемы ЦГМ в режиме внеосевой голографии с пространственно частично когерентным освещением на пропускание, написания программы обработки цифровых голограмм для восстановления фазовых и амплитудных изображений, записи цифровых голограмм сильно рассеивающего объекта при различных величинах дефокусировки и анализа соответствующих пространственных спектров, численного моделирования для сравнения результатов экспериментального исследования с теорией.

Основная часть данной выпускной квалификационной работы состоит из трех разделов: «Принципы цифровой голографической микроскопии в режиме внеосевой голографии», «Экспериментальная установка цифрового голографического микроскопа» и «Экспериментальное исследование эффекта затухания высоких поперечных пространственных частот в сигнале когерентности в ЦГМ в режиме на пропускание».

Принципы цифровой голографической микроскопии в режиме внеосевой голографии. В данном разделе описаны принципы процессов записи цифровых голограмм и восстановления амплитудных и фазовых изображений в ЦГМ в режиме внеосевой голографии с освещением на пропускание.

Экспериментальная установка цифрового голографического микроскопа. Сборка цифрового голографического микроскопа осуществлялась по схеме, представленной на рисунке 1, аналогичной схеме, представленной в работе [12].



LS – гелий-неоновый лазер; MO – микрообъектив; RD – вращающийся рассеиватель; L_1 , L_2 , L_3 – линзы системы освещения; FS – полевая диафрагма системы освещения; IAS – диафрагма апертуры освещения; M_1 , M_2 , M_3 – зеркала; BS_1 , BS_2 – светоделительные кубики; OT – предметный столик с возможностью трёхмерного линейного перемещения; MO_S , MO_R – идентичные микрообъективы изображающей системы; TL – тубусная линза; PD – матричный фотодетектор

Рисунок 1 Схема цифрового голографического микроскопа в режиме внеосевой голографии с квазимонохроматическим пространственно частично когерентным освещением на пропускание

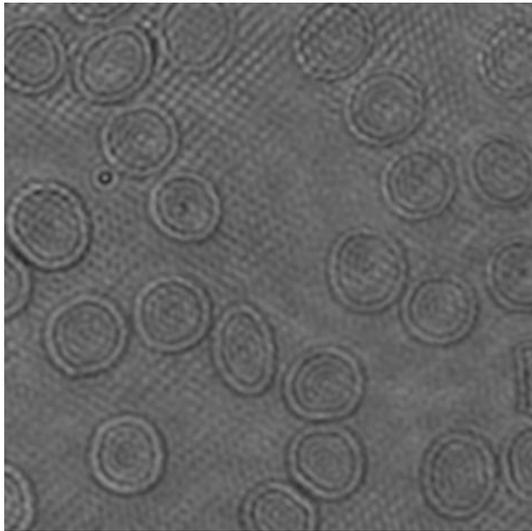
Для восстановления сигнала когерентности с цифровых голограмм и получения амплитудных и фазовых изображений в рамках данной работы была написана программа обработки цифровых голограмм на основе алгоритма, предложенного в [12]. Для устранения артефактов в виде полос в амплитудных и фазовых изображениях была рассмотрена возможность использования при Фурье-фильтрации вместо маски-круга (рис. 2а) специальной маски, изображённой на рисунке 2б, уничтожающей локальные максимумы пространственном спектре сигнала когерентности, возникающие, вероятно, вследствие наличия переотражений в оптических элементах схемы микроскопа. На рисунке 3 приведено сравнение амплитудных и фазовых изображений мазка крови, восстановленных при использовании маски-круга и специальной маски.



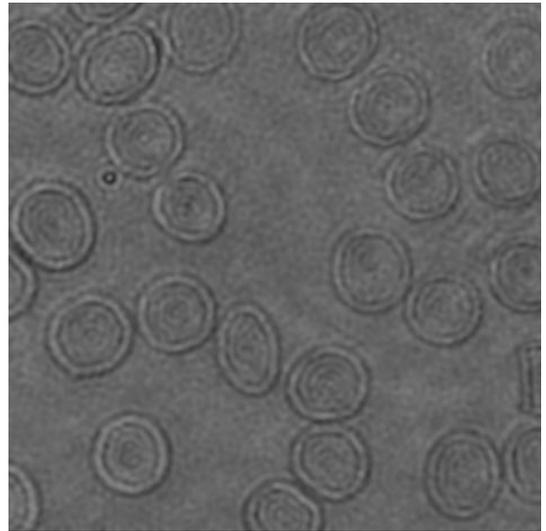
Рисунок 2 а) маска-круг; б) маска, используемая для устранения артефактов

Экспериментальное исследование эффекта затухания высоких поперечных пространственных частот в сигнале когерентности в ЦГМ в режиме на пропускание. Экспериментальное исследование состояло из записи фоновой голограммы и объектных голограмм при различных величинах дефокусировки ($\Delta z = 0, 10, 20, 30$ мкм) и вычисления модуля зависимости $\alpha^{\text{эксп.}}(k_r)$ (1) на основании полученных экспериментальных данных (рис. 4).

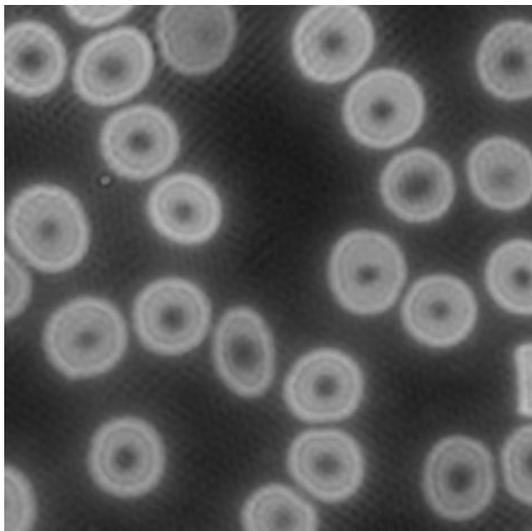
$$\alpha^{\text{эксп.}}(k_r) = \frac{\tilde{\Gamma}_0(\Delta z; \omega; k_r)}{\tilde{\Gamma}_0(\Delta z = 0; \omega; k_r)} \quad (1)$$



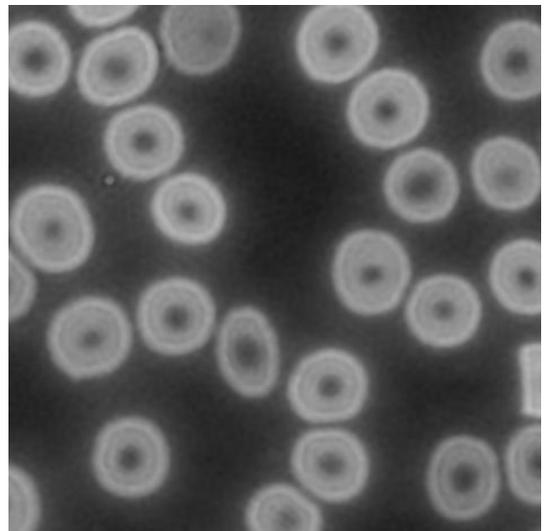
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3 а) амплитудное изображение, полученное при использовании маски-круга; б) амплитудное изображение, полученное при использовании маски, уничтожающей локальные максимумы; в) фазовое изображение, полученное при использовании маски-круга; г) фазовое изображение, полученное при использовании маски, уничтожающей локальные максимумы

На графиках, представленных на рисунке 4, отражающих зависимость $|\alpha^{\text{экс.}}|$ от k_r' при различных величинах дефокусировки Δz , наблюдается эффект затухания с дефокусировкой высоких поперечных пространственных частот в пространственном спектре сигнала когерентности (который в рассматриваемом

случае квазимонохроматического освещения соответствует функции взаимной спектральной плотности объектного и опорного полей).

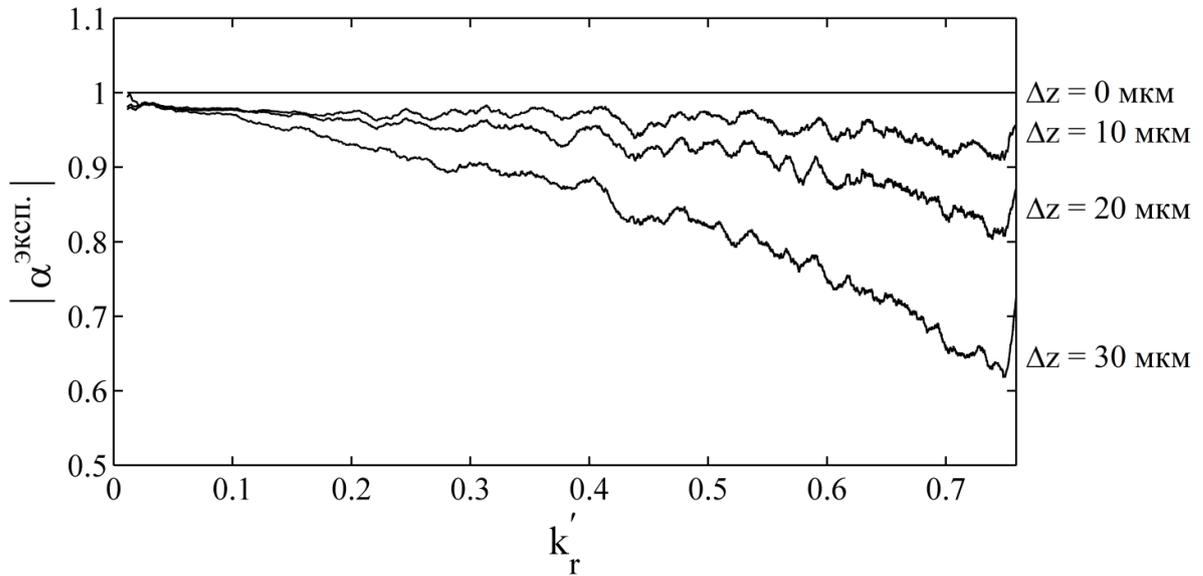


Рисунок 4 Зависимость модуля $\alpha^{\text{эксп.}}$ от нормированной поперечной пространственной частоты $k'_r = M \times k_r / k$ при различных величинах дефокусировки Δz и величине числовой апертуры освещения $NA_i \approx 0.01$

Теоретические зависимости $\alpha^{\text{теор.}}$ (2) были получены при помощи численного моделирования на основании теории, представленной в работе [10]. Соответствующие результаты представлены на рисунке 5.

$$\alpha^{\text{теор.}}(k_r) = \frac{\Xi_a(\Delta z; \omega; k_r)}{\Xi_a(\Delta z = 0; \omega; k_r)}, \quad (2)$$

Сравнение результатов теоретического и экспериментального исследований проводилось на основании следующего соотношения:

$$\frac{\tilde{\Gamma}_0(\Delta z; \omega; k_x, k_y)}{\tilde{\Gamma}_0(\Delta z = 0; \omega; k_x, k_y)} = \frac{\Xi_a(\Delta z; \omega; k_x, k_y)}{\Xi_a(\Delta z = 0; \omega; k_x, k_y)}, \quad (3)$$

где $k_r = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$.

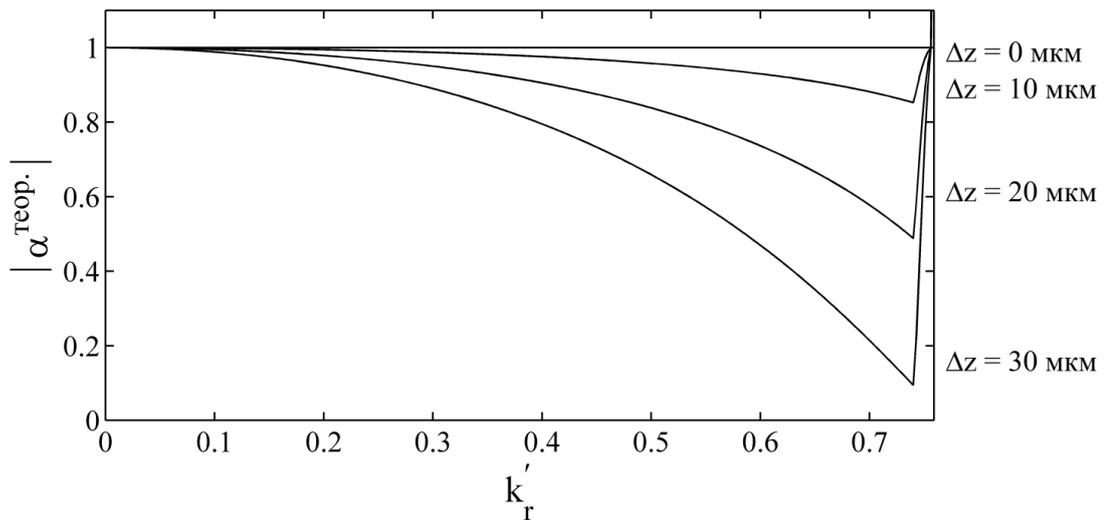


Рисунок 5 Зависимость модуля $\alpha^{\text{теор.}}$ от нормированной поперечной пространственной частоты $k_r' = M \times k_r / k$ при различных величинах дефокусировки Δz и значении числовой апертуры освещения $NA_i = 0.01$

Как видно из графиков, представленных на рисунке 6, теоретические $|\alpha^{\text{теор.}}|$ и экспериментальные $|\alpha^{\text{эсп.}}|$ зависимости имеют качественное сходство, однако различаются количественно. Количественное различие экспериментальных и теоретических зависимостей, вероятно, обусловлено тем, что в эксперименте распределение интенсивности в сечении освещающего пучка имело более сложную форму, по сравнению с той, которая использовалась при численном моделировании (при численном моделировании предполагалось, что распределение интенсивности освещающего поля по диафрагме апертуры освещения является равномерным). Это, в частности, означает, что "эффективная" величина числовой апертуры освещения NA_i могла быть меньше. Поэтому было также проведено численное моделирование при меньшей величине числовой апертуры освещения $NA_i = 0.007$ и сравнение его результатов с результатами эксперимента (рис. 7).

Из графиков, представленных на рисунке 7, видно, что теоретические зависимости $|\alpha^{\text{теор.}}|$, полученные при помощи численного моделирования при величине числовой апертуры освещения $NA_i = 0.007$, имеют большее

количественное сходство с экспериментальными зависимостями $|\alpha^{\text{эксп.}}|$, чем теоретические зависимости $|\alpha^{\text{теор.}}|$, полученные при величине числовой апертуры освещения $NA_i = 0.01$.

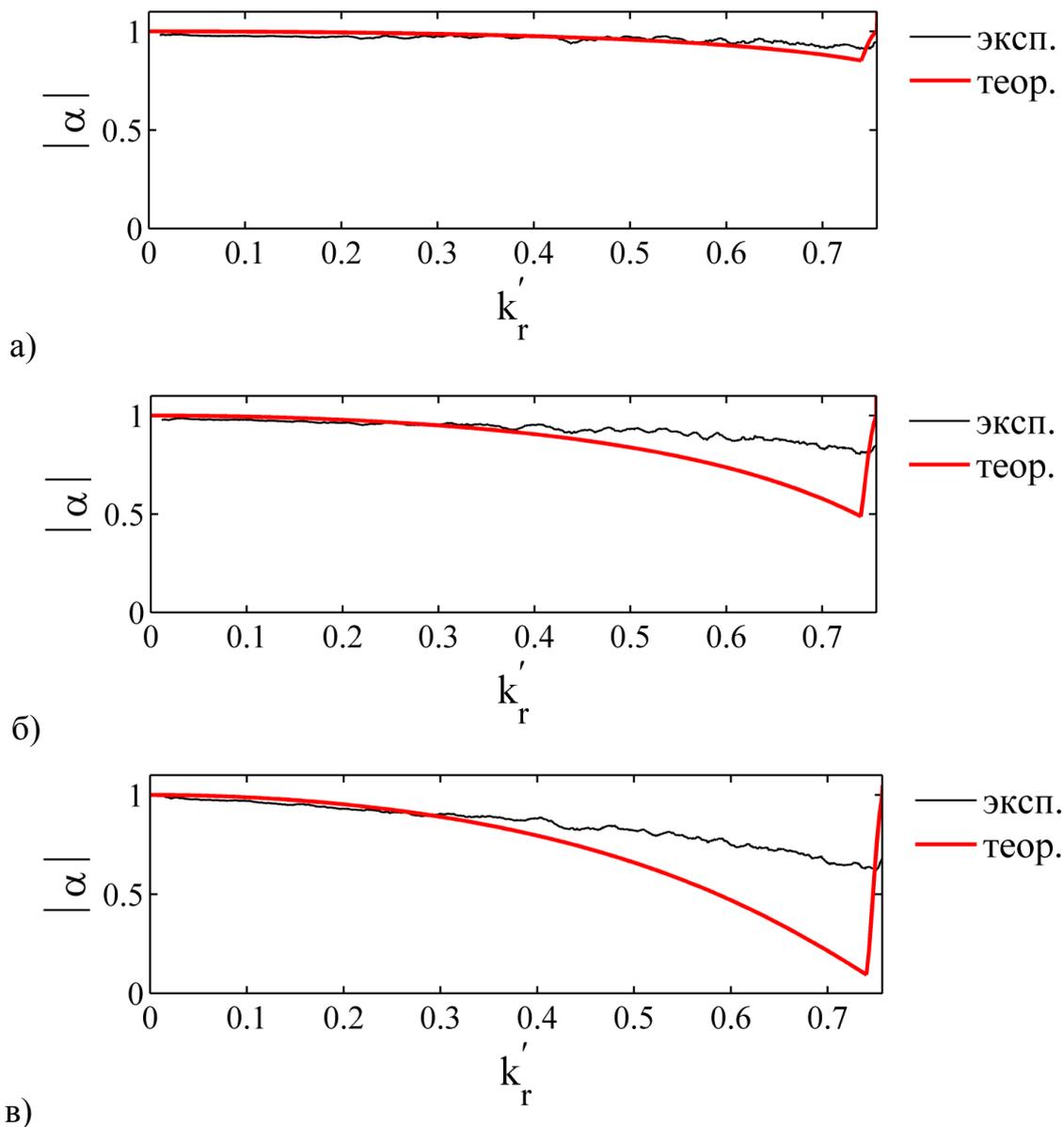


Рисунок 6 Сравнение результатов эксперимента и численного моделирования при различных величинах дефокусировки Δz и величине числовой апертуры освещения $NA_i = 0.01$: а) $\Delta z = 10 \text{ мкм}$; б) $\Delta z = 20 \text{ мкм}$; в) $\Delta z = 30 \text{ мкм}$

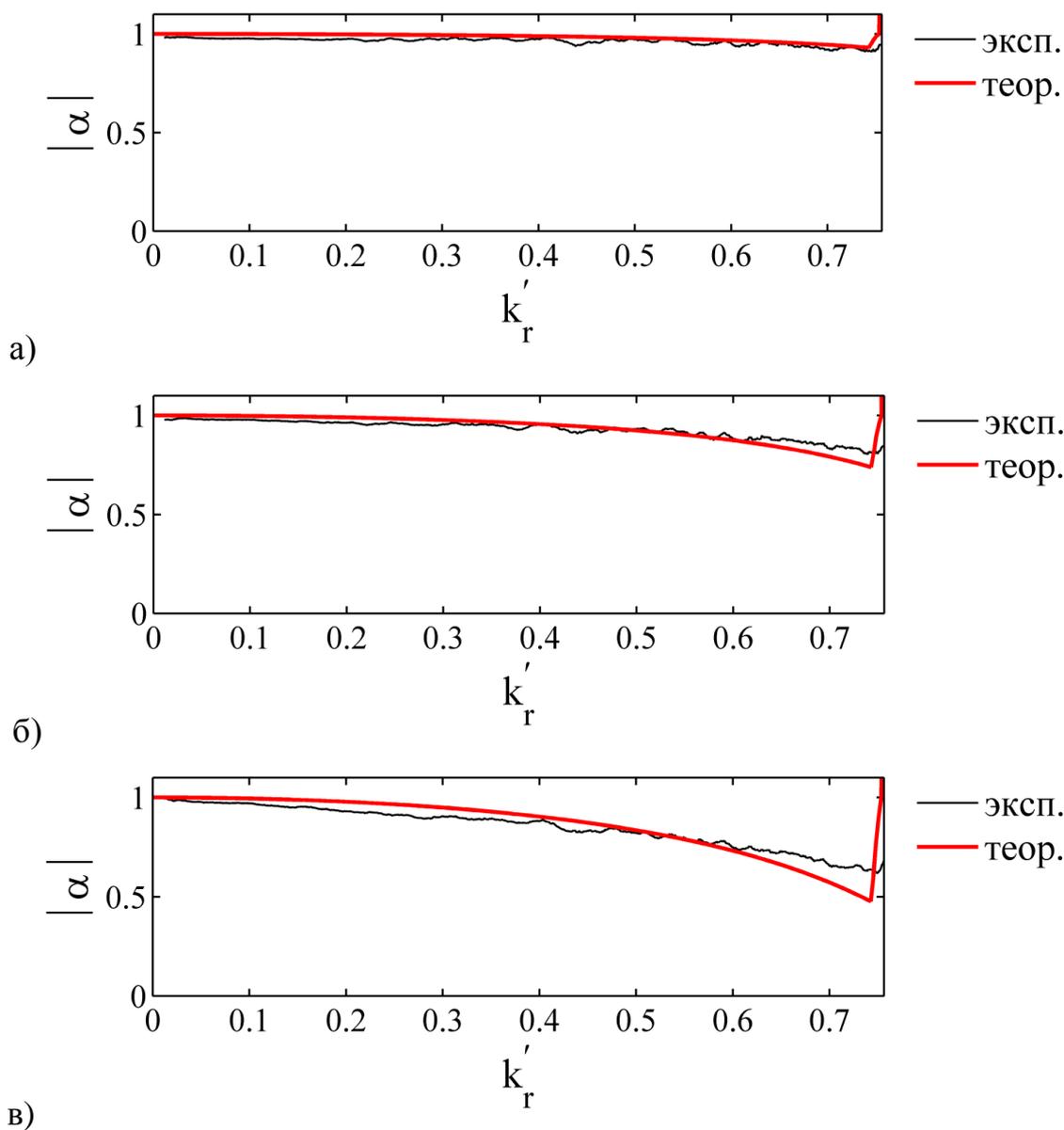


Рисунок 7 Сравнение результатов эксперимента и численного моделирования при различных величинах дефокусировки Δz и величине числовой апертуры освещения при моделировании $NA_i = 0.007$: а) $\Delta z = 10$ мкм ; б) $\Delta z = 20$ мкм ; в) $\Delta z = 30$ мкм

Заключение

В ходе данной выпускной квалификационной работы была собрана установка цифрового голографического микроскопа в режиме внеосевой голографии с квазимонохроматическим пространственно частично когерентным освещением на пропускание и написано программное обеспечение для восстановления сигнала когерентности с цифровых голограмм и получения амплитудных и фазовых изображений объектов. Данная установка

может быть использована для изучения различных объектов, в первую очередь, биологических клеток, в т.ч. в динамике.

Рассмотрено влияние выбора маски при проведении Фурье-фильтрации в ходе процедуры восстановления амплитудных и фазовых изображений с внеосевых цифровых голограмм. Показано, что некоторые шумы, присутствующие в восстанавливаемых амплитудных и фазовых изображениях, могут быть снижены путем выбора специальной формы маски.

С использованием собранной установки ЦГМ проведено экспериментальное исследование эффекта затухания высоких поперечных пространственных частот в пространственном спектре сигнала когерентности в ЦГМ в режиме на пропускание. Экспериментально показано, что при использовании пространственно частично когерентного освещения, в пространственном спектре сигнала когерентности наблюдается эффект затухания с дефокусировкой высоких поперечных пространственных частот. Также проведено сравнение полученных экспериментальных результатов с результатами численного моделирования, показавшее качественное сходство. Более детальное измерение формы функции апертуры освещения может позволить получить большее количественное сходство для дальнейшей проверки и развития теории ЦГМ.

Список использованных источников

1. Holography, Research and Technologies / ed. by Joseph Rosen: Rijeka: InTech, 2011. 466 p.
2. Park, Y. K. Quantitative Phase Imaging Techniques for the Study of Cell Pathophysiology: From Principles to Applications / K. R. Lee, K. Kim, J. Jung, J. H. Neo, S. Cho, S. Lee, G. Chang, Y. G. Jo, H. Park, Y. K. Park // Sensors. – 2013. – V. 13. – P. 4170-4191.
3. CuChe, E. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms / E. CuChe, P. Marquet, C. Depeursinge // Applied Optics. – 1999. – V. 38. – P. 6994-7001.

4. Mann, C. J. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography / C. J. Mann, L. Yu, C.-M. Lo, M. K. Kim // Optics Express. – 2005. – V. 13. – P. 8693-8698.
5. Langehanenberg, P. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy / P. Langehanenberg, L. Ivanova, I. Bernhardt, S. Ketelhut, A. Vollmer, D. Dirksen, G. Georgiev, G. von Bally, B. Kemper // J. Biomed. Opt. – 2009. – V. 14. – P. 014018 1-7.
6. Popescu, G. Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy / H. V. Pham, C. Edwards, L. L. Goddard, G. Popescu // Applied Optics. – 2013. – V. 52. – P. A97-A101.
7. Goddard, L. L. Effects of spatial coherence in diffraction phase microscopy / C. Edwards, B. Bhaduri, T. Nguyen, B. Griffin, H. Pham, T. Kim, G. Popescu, L. L. Goddard // Optics Express. – 2014. – V. 22. – P. 5133-5146.
8. Dubois, F. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source / F. Dubois, M.-L. N. Requena, C. Minetti, O. Monnom, E. Istasse // Applied Optics. – 2004. – V. 43. – P. 1131-1139.
9. Slabý, T. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope / T. Slabý, P. Kolman, Z. Dostál, M. Antoš, M. Lošťák, R. Chmelík // Optics Express. – 2013. – V. 21. – P. 14747-14762.
10. Grebenyuk, A. A. Numerical focusing in digital holographic microscopy with partially spatially coherent illumination in transmission / A. A. Grebenyuk, V. P. Ryabukho // Proc. of SPIE. – 2014. – V. 9031. – P. 903119 1-8.
11. Гребенюк, А. А. Формирование сигнала и свойства визуализации в интерференционной микроскопии : диссертация на соискание ученой степени к.ф.-м.н. / А. А. Гребенюк ; науч. рук. В. П. Рябухо ; Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского. Саратов, 2014. 165 с.
12. Grebenyuk, A. A. An off-axis digital holographic microscope with quasimonochromatic partially spatially coherent illumination in transmission / A. A. Grebenyuk, Y. V. Tarakanchikova, V. P. Ryabukho // Journal of Optics. – 2014. – V. 16. – P. 105301 1-6.


24.05.17