Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет радіоелектроніки

Факультет Електронної та біомедичної інженерії
(повна назва)

Кафедра Фізичних основ електронної техніки
(повна назва)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
Пояснювальна записка

рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

ГОЛОГРАФІЧНА МІКРОСКОПІЯ

Виконав:
здобувач 4 року навчання,
групи МТІОЛС-21-1
Нікіта ВОДЯНИЦЬКИЙ
(власне ім'я, прізвище)

Спеціальність 152 Метрологія та інформаційно- вимірювальна техніка
(код і повна назва спеціальності)

Тип програми освітньо-професійна

Освітня програма «Інженерія оптоінформаційних та лазерних систем»
(повна назва освітньої програми)

Керівник ст. викл. каф. ФОЕТ Сергій КУХТІН
(посада, власне ім'я, прізвище)

Допускається до захисту

Завідувач кафедри ФОЕТ _____ Олександр ГНАТЕНКО
(підпис) (власне ім'я, прізвище)

2025 р.

Харківський національний університет радіоелектроніки

Факультет Електронної та біомедичної інженерії

Кафедра Фізичних основ електронної техніки

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 152 Метрологія та інформаційно-вимірювальна техніка
(код і повна назва)

Тип програми освітньо-професійна

Освітня програма «Інженерія оптоінформаційних та лазерних систем»
(повна назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ:
Зав. кафедри _____
(підпис)
«____»_____ 20 ___ р.

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ

здобувачеві Водяницькому Нікіті Віталійовичу
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Голографічна мікроскопія

затверджена наказом університету від « 23 » травня 2025 р. № 409 Ст
2. Термін подання здобувачем роботи до екзаменаційної комісії 15 липня 2025 р.
3. Вихідні дані до роботи
1. Фізичні основи голографії та голографічної мікроскопії.
2. Конструкція та функціонування голографічного мікроскопа.
3. Методи отримання голографічних зображень.
4. Обробка голограм та математчне моделювання.

4. Перелік питань, що потрібно опрацювати в роботі
1 Проаналізувати фізичні принипи інтерференції ти дифракції.
2 Розглянути процеси запису та реконструкції голограм у голографічній мікроскопії.
3 Вивчити основні типи голографічних мікроскопів та їх оптичні схеми.
4 Обробка голограм та математчне моделювання.
5 . Ознайомитись з методами цифрової обробки голограм і реконструкції зображень
6 Розглянути сучасні застосування голографічної мікроскопії

5. Перелік графічного матеріалу із зазначенням кресленików, схем, плакатів, комп'ютерних ілюстрацій
Демонстраційний матеріал – 11 слайдів
.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів роботи	Строк / терміни виконання етапів роботи	Примітка
1	Інформаційно-тематичний пошук та огляд літературних джерел про голографічну мікроскопію та її особливості	06.05.25–21.05.25	Виконано
2	Дослідження фізичних основ голографії та голографічної мікроскопії	22.05.25–30.05.25	Виконано
3	Огляд функціоналу голографічного мікроскопа та різновидів голограм й методів їх обробки	02.06.25–11.06.25	Виконано
4	Аналіз застосування та спеціальних технік цифрової голографічної мікроскопії	12.06.25–17.06.25	Виконано
5	Оформлення пояснювальної записки	18.06.25–27.06.25	Виконано
6	Оформлення демонстраційних матеріалів	28.06.25–02.07.25	Виконано
7	Проходження нормоконтролю та перевірки на академічний плагіат	03.07.25–11.07.25	Виконано
8	Отримання відгуку та рецензії	12.07.25–13.07.25	Виконано
9	Підготовка та захист кваліфікаційної роботи	14.07.25–16.07.25	

Дата видачі завдання 05 травня 2025 р.

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____ ст. викл. каф. ФОЕТ Сергій КУХТІН
(підпис) (посада, власне ім'я, прізвище)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка кваліфікаційної роботи: 54 с., 25 рис., 20 джерел, 1 додаток.

ВИПРОМІНЮВАННЯ, ГОЛОГРАФІЧНА ІНТЕРФЕРОМЕТРІЯ, КОГЕРЕТНІСТЬ, ЛАЗЕРНЕ ДЖЕРЕЛО, МІКРОСТРУКТУРА, ОБРОБКА ЗОБРАЖЕНЬ, ТРЬОХВИМІРНА РЕКОНСТРУКЦІЯ, ФАЗОВА ІНФОРМАЦІЯ, ФІЗИЧНІ ОСНОВИ, ЦИФРОВА ГОЛОГРАФІЯ, ЧИСЛОВА АПЕРТУРА

Об’єкт дослідження – методи і системи голографічної мікроскопії для дослідження мікроструктур об’єктів з високою просторовою та фазовою роздільною здатністю.

Метою кваліфікаційної роботи є дослідження фізичних принципів, конструкційних особливостей, оптичних властивостей та перспектив розвитку технологій голографічної мікроскопії.

Метод дослідження – теоретичний.

Для досягнення мети в роботі поставлено та вирішено наступні завдання.

1. Дослідити фізичні основи голографічної мікроскопії та принипи формування голограмм на основі когерентного випромінювання.
2. Вивчити технічні аспекти побудови оптичних схем голографічних мікроскопів, зокрема з використанням цифрових методів реєстрації.
3. Проаналізувати методи цифрової реконструкції зображення та обробки фазової інформації.
4. Розглянути особливості застосування голографічної мікроскопії у біологічних, медичних та матеріалознавчих дослідженнях.
5. Оцінити переваги, недоліки та перспективи розвитку голографічної мікроскопії порівняно з традиційними оптичними методами.

ABSTRACT

Explanatory note of the qualification work: 54 p., 25 fig. , 20 sources, 1 addition.

COHERENCE, DIGITAL HOLOGRAPHY, HOLOGRAPHIC INTERFEROMETRY, IMAGE PROCESSING, MICROSTRUCTURES,LASER SOURCE, NUMERICAL APERTURE, PHASE INFORMATION, PHYSICAL PRINCIPLES, RADIATION, THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION.

Object of the study – methods and systems of holographic microscopy for investigating microstructures of objects with high spatial and phase resolution.

The purpose of the qualification work is to investigate the physical principles, structural characteristics, optical properties, and development prospects of holographic microscopy technologies.

Research method – theoretical.

To achieve this aim, the following tasks were set and accomplished.

1. To explore the physical foundations of holographic microscopy and the principles of hologram formation based on coherent radiation.

2. To study the technical aspects of designing optical configurations of holographic microscopes, particularly with the use of digital recording methods.

3. To analyze methods of digital image reconstruction and phase information processing.

4. To examine the specific applications of holographic microscopy in biological, medical, and materials science research.

5. To assess the advantages, limitations, and development prospects of holographic microscopy in comparison with conventional optical methods.

ЗМІСТ

Вступ 7
1 Фізичні основи голографії та голографічної мікроскопії 9
1.1 Принципи інтерференції та дифракції 9
1.2 Принцип голографічного запису та реконструкції інформації 10
1.3 Типи голограм та їх властивості 14
1.4 In-Line; Off-Axis голографія. Різновиди голографії. 18
1.4.1 Голографія Габора 20
1.4.2 Голографія Фур'є (FPM) 21
1.4.3. Голографія площини 23
1.5 Переваги та обмеження цифрової голографічної мікроскопії 24
2 Конструкція та функціонування голографічного мікроскопа. Обробка голограм ьа математичне моделювання 28
2.1 Цифрова голографічна мікроскопія. Загальний опис цифрової голографічної мікроскопії. 29
3 Застосування та спеціальні техніки цифрової голографічної мікроскопії 39
3.1 Біомедична мікроскопія 39
3.2 Мікроскопія та метрологія мікроструктур 41
3.3 Голографічна томографія 42
3.4 Голографія з низькою когерентністю 43
3.5 Голографічна мікроскопія з повним внутрішнім відбиттям 43
3.6 Цифрова голографічна мікроскопія для застосування в біологічних науках 45
3.6.1. Візуалізація мікроорганізмів, морського планктону та водоростей 45
3.7. Візуалізація живих клітин та клітинних зразків 48
Висновки 51
Перелік джерел посилання 53
Додаток А Демонстраційний матеріал 55

ВСТУП

Голографія – це метод, який дозволяє записати хвильовий фронт, відбитий від об'єкта, та згодом відновити його навіть за відсутності самого об'єкта. У класичній голографії за Габором, голограми записуються фотографічно й відтворюються оптичним шляхом. Саме Габор уперше запропонував концепцію голографічної мікроскопії. Цей метод забезпечує висококонтрастні тривимірні зображення мікроскопічних зразків у глибині. Деніс Габор розробив голографію як спосіб покращення роздільної здатності електронного мікроскопа. Він зрозумів, що інтерференційна картина, утворена взаємодією хвилі, яка проходить через об'єкт або відбивається від нього (об'єктна хвиля), з початковою незбуреною хвилею (референтна хвиля), містить повну інформацію про зразок. Він назвав новий метод візуалізації голографією, оскільки він дозволяє зберігати всю оптичну інформацію

Електронний запис голограм і їх цифрова реконструкція відкрили широкі можливості для нових методів візуалізації. Коли амплітуда та фаза світлової хвилі фіксуються цифровим шляхом, згодом можна обробляти ці дані за допомогою різноманітних чисельних алгоритмів. Цифрова голографія передбачає отримання та обробку голограм за допомогою цифрових сенсорних матриць, таких як CCD або CMOS. Цифрова реконструкція електронно записаних голограм здійснюється за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення. У результаті отримується кількісна інформація про інтенсивність та фазовий розподіл відновленого хвильового поля. Швидка візуалізація можлива і обмежується лише частотою відеозапису.

Цифрова голографічна мікроскопія (DHM) – це передова технологія візуалізації, оскільки одна цифрова голограма містить усю необхідну інформацію для тривимірної реконструкції об'єкта. Чисельна реконструкція цифрових голограм забезпечує ефективну методологію віртуального

фокусування на всій глибині мікроскопічного зразка, що є унікальною особливістю DHM.

У процесі роботи довелося зануритися в фізику голографії, принципи побудови мікроскопів, дізнатись, як створюються та обробляються голограми, як вони зберігають інформацію про об’єм і фазу. І що ще цікавіше – як сучасні алгоритми дають змогу «розплутати» ці голограми й відновити справжню структуру об’єкта.

Загалом, ця робота не тільки про технологію – вона про те, як світло може розповісти історію про невидиме. І про те, як, озброївшись знаннями фізики та інженерії, можна побудувати вікно у мікросвіт.

1 ФІЗИЧНІ ОСНОВИ ГОЛОГРАФІЇ ТА ГОЛОГРАФІЧНОЇ МІКРОСКОПІЇ

1.1 Принципи інтерференції та дифракції

Фізичні явища інтерференції та дифракції лежать в основі функціонування будь-якої голографічної системи, включаючи голографічну мікроскопію. Вони забезпечують можливість запису та реконструкції повної інформації про світлове поле, зокрема його амплітуди та фази, що критично важливо для відтворення тривимірної структури об’єкта.

Інтерференція – це процес накладання когерентних світлових хвиль, у результаті якого утворюється характерна картина максимумів та мінімумів інтенсивності світла. У контексті голографії інтерференція виникає між двома хвильовими фронтами: опорною хвилею, яка несе лише еталонну інформацію (наприклад, йде прямо від лазера), та об’єктною хвилею, яка формується після розсіювання світла об’єктом і несе інформацію про його форму, глибину та фазові властивості. Взаємодія цих хвиль на світлочутливому носії або цифровому сенсорі створює інтерференційну картину – голограму, яка містить у собі повну інформацію про об’єкт.

Інтерференційна картина є результатом суперпозиції двох когерентних хвиль з різною фазовою структурою (рис.1.1).. Наприклад, опорна хвиля має рівномірний фронт, тоді як об’єктна хвиля має складну просторову структуру фази, пов’язану з формою об’єкта. При їх накладанні утворюється стійка інтерференційна структура, яку можна зафіксувати оптично або цифрово.

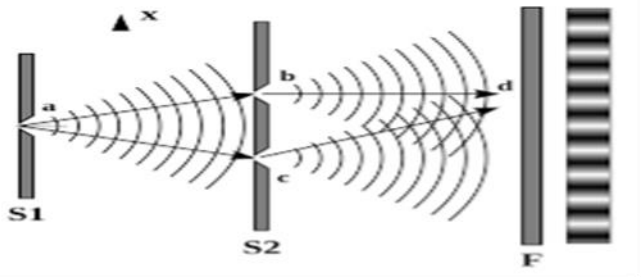


Рисунок 1.1 – Принцип явища інтерференції світла

Дифракція – є процесом розповсюдження хвиль за межі прямолінійного шляху. У голографії дифракція проявляється під час реконструкції зображення. Після запису голограми її можна знову освітити опорним пучком. Світло, проходячи через структуру голограми, дифрагує, і в результаті цього виникає відтворене зображення об’єкта. Воно може бути віртуальним (видимим в уявному просторі за голограмою) або реальним (зосередженим перед голограмою) (рис. 1.2). В природніх умовах дифракція світла спостерігається у вигляді нерізкої, розмитої межі тіні предмета, освітленого віддаленим джерелом [1].

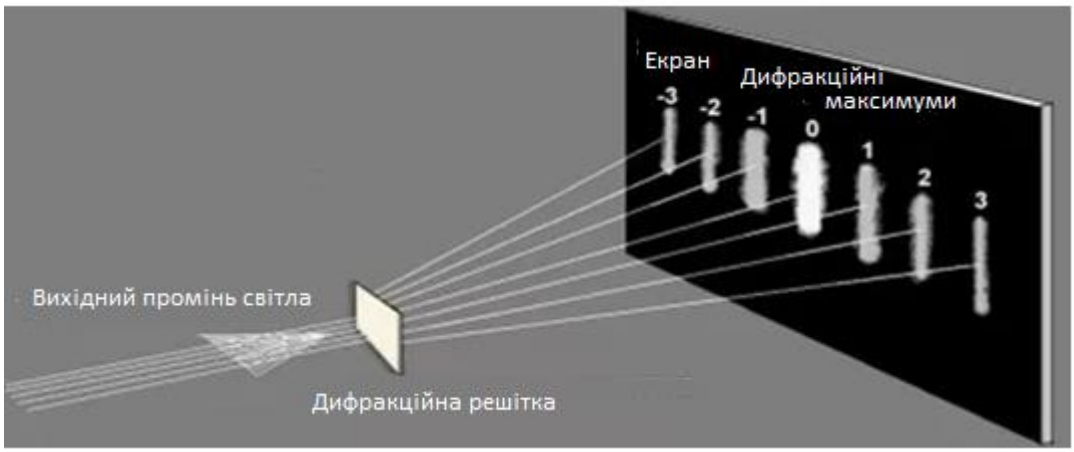


Рисунок 1.2 – Явище діфракції при проходженні світла через дефракційну решітку

1.2 Принцип голографічного запису та реконструкції інформації

Щоб зрозуміти, як працює голографічна мікроскопія, треба розібратись у двох ключових процесах: запис голограми та її реконструкція. Це два етапи одного явища – створення та зчитування хвильової «відбитки» об’єкта.

Запис голограми – коли об’єкт залишає світловий «відбиток».

Під час запису голограми відбувається накладання двох світлових пучків опорного (reference beam) – він йде прямо від лазера.

Об’єктного (object beam) – відбивається або проходить крізь об’єкт, несе інформацію про його структуру.

Обидва пучки падають на поверхню фоточутливого матеріалу (або цифрову камеру), де інтерферують – тобто накладаються у просторі. В результаті на площині запису утворюється інтерференційний малюнок – складна картина з чергуванням максимумів і мінімумів інтенсивності. Цей малюнок фіксується як голограма – свого роду «закодована» карта хвильових збурень, яка не схожа на сам об’єкт, але несе в собі всю його просторову (і фазову) інформацію.

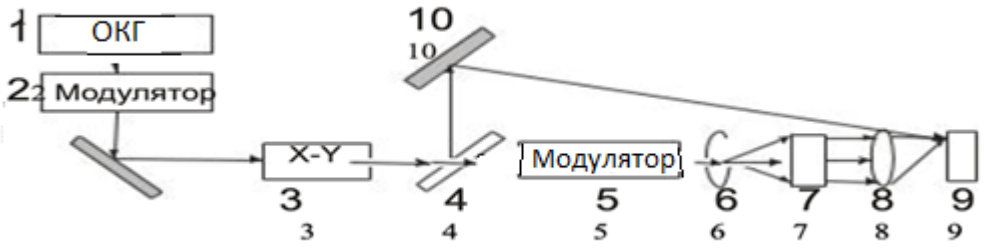
Голографічна пам’ять основується на записуванні інтерференційної картини, утвореної у результаті складання світлової хвилі, відбитої від деякого об’єкта або яка пройшла через цей об’єкт (об’єктна хвиля), та когерентної хвилі, яка безпосередньо йде від джерела світла (опорної хвилі). Якщо зафіксувати картину (голограму), а потім засвітити її опорним пучком світла, розміщеним відносно неї так само, як і при запису, то в результаті взаємодії опорної хвилі з голограмою в просторі утвориться хвиля, яка відновлює зображення об’єкта, що збігається з ним за формою та просторовим положенням. Взаємодіючі хвилі (опорні та об’єктні) обов’язково мають бути когерентними.

Важливо, що голограма, на відміну від фотографії, фіксує не тільки розподіл амплітуди, але і розподіл фаз об’єктної хвилі відносно опорної. Інформація про співвідношення фаз об’єктної та опорної хвиль закладена в рисунку та частоті інтерференційних смуг. За допомогою голограми, таким чином встановлюється амплітудно-фазовий розподіл хвильового поля, тобто створюється копія об’єктної хвилі, а не тільки світлоконтрастна характеристика об’єкта, як при звичайному фотографуванні. Цим пояснюється надзвичайно висока інформаційна ємність голографічного способу запису інформації.

Оскільки при записуванні світло від кожної точки об’єкта падає на всі точки голограми, то кожна її мала ділянка здатна відновити зображення

об’єкта, але чим менша ділянка, тим менший контраст у зображенні об’єкта, це значить, що втрачається відновлення дрібних деталей у структурі об’єкта. Оптична схема голографічного запису інформації показана на рис. 1.3 Однак, цей факт вказує на те, що при голографічному записуванні інформації якість запису залежить від різних дефектів – плям, пилу, подряпин тощо.

Голограми характеризуються дифракційною ефективністю, яка визначається відношенням інтенсивності відновленого об’єктного пучка до інтенсивності читаючого опорного пучка. Голограми, в основному, записуються на фотопластинах.



1 – лазер; 2,5 – оптичні затвори; 3 – дефлектор; 4 – напівпрозоре дзеркало; 6,8 – об’єктиви; 7 – оптичний транспарант; 9 – запам’ятовуюче середовище; 10 – дзеркало.

Рисунок 1.3 – Оптична схема голографічного запису інформації

Реконструкція голограми – коли з «закодованого» зображення знову з’являється об’єкт Після того як голограма записана, її можна освітити тим самим лазером – як у класичній голографії. Або ж, якщо голограму знято камерою, то вона обробляється цифровими методами. У будь-якому випадку відбувається дифракція: хвилі згинаються на структурі голограми, і в просторі з’являється зображення – відновлене [2].

При освітленні голограми опорною хвилею формується:

– реальне зображення – можна спостерігати в фокусі;

– віртуальне зображення – здається, що об’єкт «висять» за голограмою.

У цифровій голографії цей процес моделюється на комп’ютері за допомогою інтегралів Френеля або Фур’є, які дозволяють чисельно обчислити, яким був би розподіл світла після проходження через голограму.

Цифрова реконструкція (приклад): у цифровій мікроскопії отриману голограму обробляють за допомогою:

– швидкого перетворення Фур'є (FFT);

– фільтрації в частотній області для виділення потрібного порядку дифракції;

– зворотного перетворення Фур’є – для побудови зображення.

Це дає можливість отримати не лише амплітудне зображення (яскравість), а й фазову карту – тобто виміряти зміну товщини об’єкта, внутрішню структуру, градієнти показника заломлення тощо (рис. 1.4).

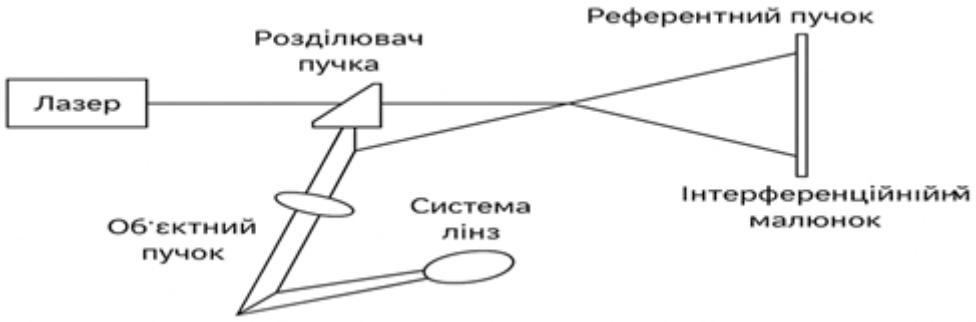


Рисунок 1.4 – Схема запису голограми

На рисунку 1.5 показано приклад застосування DHM для зображення водоростей Pseudokirchneriella subcapitata.

На рис. 1.5, а – цифрова голограма; на рис. 1.5, (б, г) – інтенсивності реконструйованих хвильових фронтів у трьох послідовних площинах. Відстань між площинами змінюється на 2 мкм.

Добре відомою особливістю голографії є те, що вона містить 3D-інформацію про зображення. В DHM однієї голограми достатньо, щоб відтворити оптичне поле на будь-якій відстані від площини голограми (в межах допустимих апроксимацій методу). Таким чином, з одного цифрового голографічного знімка можна обчислити зображення на різних глибинах, а потім обрати найкраще фокусоване.

Реконструйовані інтенсивності чітко демонструють унікальну здатність DHM спостерігати різні шари живої клітини з одного цифрового голографічного зображення. Це означає, що з одного голографічного знімка можна отримати серію «оптичних зрізів» живого об’єкта, що є надзвичайно потужною функцією [3].

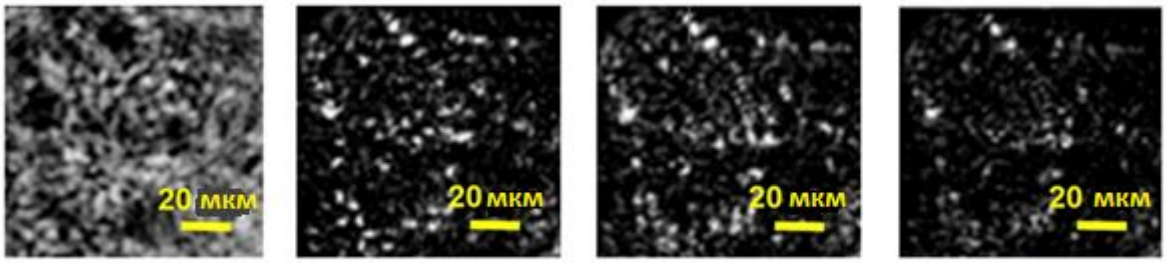


Рисунок 1.5 – Застосування DHM для зображення водоростей Pseudokirchneriella subcapitata

1.3 Типи голограм та їх властивості

На перший погляд здається, що голограма – це просто складна світлова картинка, яка створює ілюзію тривимірного зображення. Але насправді існує кілька типів голограм, і кожна має свої особливості, властивості, способи запису і навіть призначення. Від того, який тип голограми використовується, залежать і умови її освітлення, і якість реконструкції зображення, і навіть глибина простору, який вона здатна передати.

Голографічне зображення – голограма зазвичай записується на фотографічній пластині або плоскому шматку плівки, але створює тривимірне зображення. Крім того, створення голограми не передбачає запису зображення в традиційному розумінні. Щоб вирішити цю очевидну парадоксальність і зрозуміти, як працює голографія, ми повинні почати з перших принципів.

Унікальною особливістю голографії є ідея запису як фази, так і амплітуди світлових хвиль від об'єкта. Оскільки всі матеріали для запису реагують лише на інтенсивність зображення, необхідно перетворити інформацію про фазу в зміни інтенсивності. Голографія робить це за допомогою когерентного освітлення та введення, як показано на рис. 1.6, опорного променя, отриманого з того самого джерела. Фотоплівка записує інтерференційну картину, утворену цим опорним променем і світловими хвилями, розсіяними об'єктом. Запис голограми: записується інтерференційна картина, утворена опорною хвилею і хвилею об'єкта.

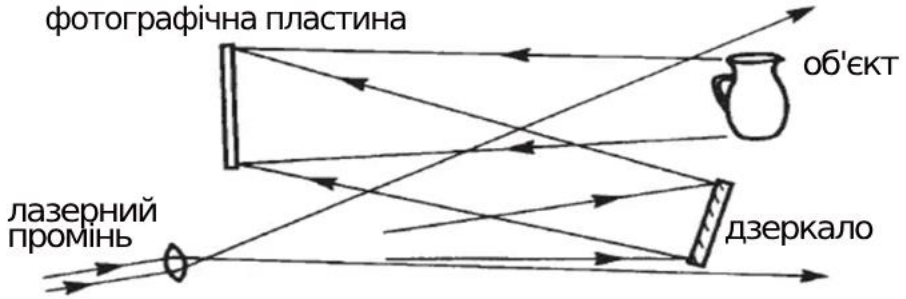


Рисунок 1.6 – Запис голограми:відновлюється інтерференційна картина, утворена опорною хвилею та хвилею об'єкта

Оскільки інтенсивність у будь-якій точці цієї інтерференційної картини також залежить від фази хвилі об'єкта, отриманий запис (голограма) містить інформацію як про фазу, так і про амплітуду хвилі об'єкта. Якщо голограму знову освітлити вихідною опорною хвилею, як показано на рис. 1.7, вона відновить вихідну хвилю об'єкта.

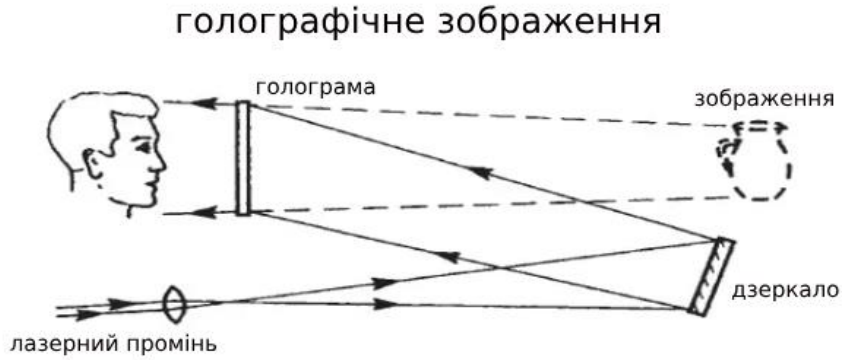


Рисунок 1.7 – Відновлення зображення: світло, дифраговане голограмою, відновлює хвилю об'єкта

За способом запису голограми бувають: аналогові та цифрові.

Аналогові голограми (АН) – це класичні голограми, які записуються на фотопластинку або інший світлочутливий матеріал. Для їх створення потрібен лазер, оптична схема з дзеркалами, розділювачами пучка, фотоматеріал, темна кімната та багато стабільності (буквально – на антивібраційному столі).

У таких голограмах інтерференційний малюнок фіксується хімічно (фотореакцією), і після проявлення голограма здатна відтворювати зображення при освітленні відповідним пучком світла.

Цифрові голограми (DH) – це сучасні варіанти, в яких інтерференційна картина записується безпосередньо на ПЗЗ- або CMOS-матрицю. Тут не потрібно плівки чи проявлення – усе працює через камеру і комп’ютер. Після запису програма може чисельно реконструювати зображення за допомогою алгоритмів Фур’є або Френеля.

Це ідеальний варіант для голографічної мікроскопії: швидко, без хімії, і з можливістю в реальному часі змінювати фокус або знімати відео.

За типом оптичного поля голограми бувають: трансмісійні та відбиті

Трансмісійні (просвітні) голограми – це ті, через які проходить світло. Вони створюються так, щоб при реконструкції опорна хвиля просвічувала через голограму й відновлювала об’єкт.

Цей тип найбільш часто використовується в лабораторних умовах і в цифровій мікроскопії.

Відбиті голограми – працюють навпаки: опорна хвиля відбивається від голограми. Зображення ніби «з'являється» у повітрі перед плівкою. Саме такі голограми часто використовуються у захисті банкнот, документів, паспортів – як «блискучі» голограми з 3D-ефектом.

У науковій мікроскопії цей тип рідше застосовується, бо вимагає спеціальної конфігурації оптики.

За конфігурацією пучків: in-line, off-axis, гібридні.

Цей поділ важливий саме для голографічної мікроскопії (рис. 1.8):

а) In-line голограми – опорна й об'єктна хвиля співпадають за напрямком. Такий тип вперше запропонував Д. Габор (той самий, що отримав за це Нобелівську премію).

Плюси: проста оптична схема, немає потреби в розділювачах пучка.

Мінуси: на реконструйованому зображенні завжди з'являються «артефакти» – так звані двійникові зображення, які накладаються одне на одне;

б) Off-axis голограми – опорна хвиля падає на площину запису під кутом. Завдяки цьому компоненти зображення в частотному просторі (оригінал, спряження, нульовий порядок) розносяться, і при цифровій реконструкції можна легко виділити потрібний сигнал.

Плюси: чиста реконструкція, без двійників.

Мінуси: складніша оптична схема;

в) гібридні або мультиплексні голограми – це коли записується одразу кілька голограм з різними умовами: кутом, довжиною хвилі, поляризацією. Такі структури дозволяють отримувати багатошарові або спектрально змінні зображення, або навіть зчитувати дані залежно від умов освітлення. Це вже ближче до складної оптики і фотоніки.

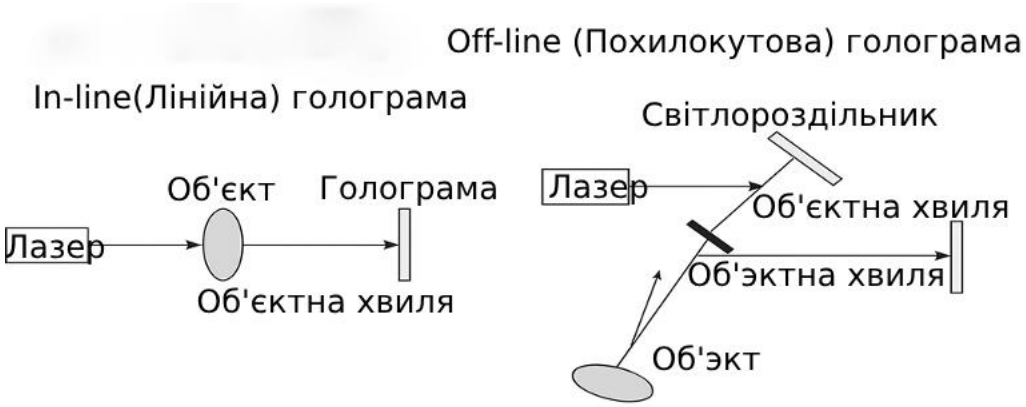


Рисунок 1.8 – Голограми за конфінгурацією пучків in-line, off-axis, гібридні

За відновленням інформації голограми поділяються на : амплітудні та фазові.

У цифровій мікроскопії часто говорять про те, яку саме інформацію ми хочемо отримати:

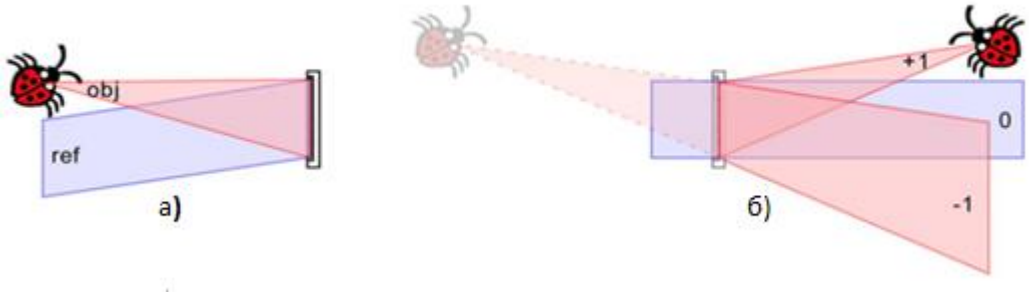
– амплітудна голограма – дозволяє побачити «яскравість» об’єкта, як у звичайному фото;

– фазова голограма – дозволяє виміряти товщину, показник заломлення, внутрішню структуру. Це особливо корисно для аналізу біооб’єктів (наприклад, клітин), які прозорі й не мають контрасту у звичайному світлі.

1.4 In-Line; Off-Axis голографія. Різновиди голографії

Огляд основних типів конфігурацій інтерферометрів, що використовуються в цифровій голографії, наведен. По-перше, голографія Френеля відноситься до конфігурації, де об'єкт знаходиться на скінченній відстані від площини голограми, а еталоном, як правило, є плоска хвиля. Тоді зображення формуються при положенні об'єкта та його дзеркальному положенні відносно голограми, з одиничним збільшенням, як показано на рис. 1.9.

Розміщення на достатньо великій відстані і використання перетворення Френеля дозволяють отримати зображення об'єкта, більшого за розмір ПЗЗ-матриці. Крім того, об'єктив може бути використаний для формування збільшеного або розмагніченого зображення об'єкта, яке потім поширюється на площину голограми.



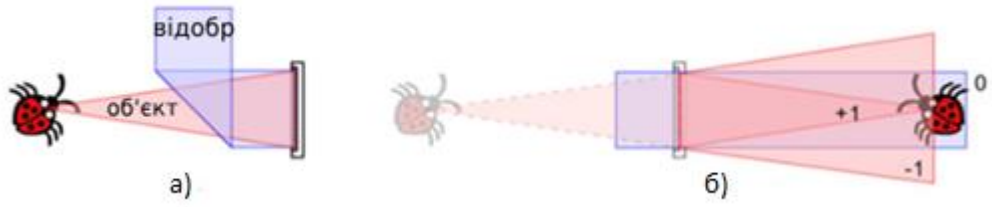
а) запис; б) реконструкція.

Рисунок 1.7 – Off-axis голографія Френеля. Синім позначено опорні промені, а червоним - поширення від точки на об'єкті

Позаосьова голографія необхідна для того, щоб уникнути перекриття нульового і голографічного зображень. Але це фактично зменшує інформаційний вміст голограми до однієї чверті від кількості пікселів, що є перевагою цифрової голографії. При потоковій голографії поле об'єкта знаходиться в загальному вирівнюванні з опорним променем, і використовується вся кількість пікселів голограми, що також призводить до скорочення мінімальних відстаней для реконструкції Френеля і більш високої роздільної здатності результуючого зображення [4] (рис. 1.8).

Було запропоновано і продемонстровано низку методів зменшення або усунення ефекту зображення нульового порядку і двійника,. Нульовий член (або постійний струм) можна частково придушити, просто віднімаючи середню інтенсивність всієї голограми, або, як альтернатива, беручи перетворення Фур'є голограмиі застосовуючи фільтр високих частот поблизу

нульової частоти. Ефективність високочастотної фільтрації залежить від спектрального складу об'єкта.



а) послідовна суперпозиція об'єктного та опорного пучків;
б) реконструкція накладених зображень нульового порядку та двійника.

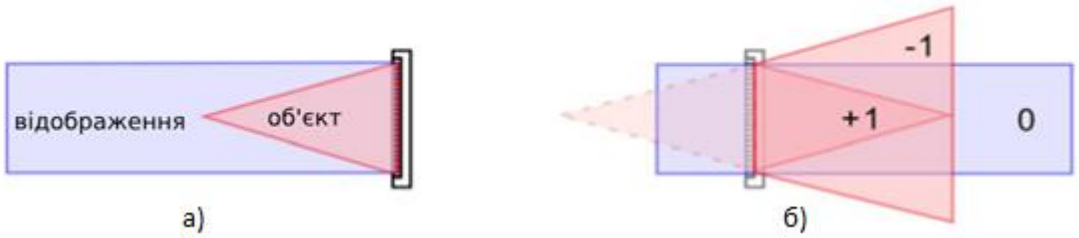
Рисунок 1.8 – In-Line (послідовна) голографія

1.4.1 Голографія Габора

У габорівській голографії об'єкт освітлюється одним променем світла і немає окремої опорної хвилі (рис. 1.9).

Частина світла, яка розсіюється об'єктом, є хвилею об'єкта, а решта, яка не піддається розсіюванню, діє як опорна хвиля. Цей метод є більш ефективним, чим менший об'єкт, щоб опорна хвиля не була надмірно порушена. Через це обмеження та простоту оптичної установки голографія Габора є особливо корисною для аналізу зображень частинок, а також для тонких волокон.

Цифрова голографія Габора (DGH) може надати нові можливості для ширшого застосування цієї простої конфігурації. Наприклад, різниця між двома послідовними голограмами у голографічному фільмі повністю віднімає фон, одночасно виявляючи рух частинок або мікроорганізмів. Для мікроскопічних частинок проблема подвійного зображення часто є незначною, оскільки навіть на відносно коротких відстанях виконується умова Фраунгофера, і подвійне зображення повністю розфокусоване.



а) запис шляхом суперпозиції опорної та її розсіяної складової від точкового об'єкта; б) реконструкція точкового зображення та його розфокусованого двійника.

Рисунок 1.9 – Габорівська голографія

Коли було взято похідну полінома другого порядку, що відповідає профілям інтенсивності, координати положення X, Y і Z частинок можна було визначити з точністю до 50 нм. Підводний пристрій використовував DGH для дослідження частинок, бактерій, парамецій та інших плаваючих мікроорганізмів, а детальне поле потоку копепода, що харчується, було виміряно за допомогою DGH. Конфігурація DGH також є вбудованою, але в цьому огляді вбудована голографія означає таку, що має окрему опорну хвилю. З DGH об'єкт повинен заповнювати лише невелику частину поля, тоді як вбудована голографія з опорними хвилями не має такого обмеження. З вбудованою конфігурацією важливим є віднімання нульового порядку та подвійних членів, тоді як з DGH ці члени, ймовірно, мають незначний вплив [5].

1.4.2 Голографія Фур'є (FPM)

Як відомо, поле в задній фокальній площині є Фур'є-перетворенням поля об'єкта в передній фокальній площині. Голограма записується за допомогою плоскої опорної хвилі (рис. 1.10, а) . При реконструкції плоска опорна хвиля і лінза створюють обернене перетворення, яке є зображенням (рис. 1.10, б). Альтернативно, безлінзова Фур'є-голографія можлива шляхом

розміщення точкового джерела опорного випромінювання в площині об'єкта (рис. 1.10, в), а реконструкція відбувається таким самим чином, як і раніше . Але в цифровій голографії реконструкція є особливо простою, оскільки вона вимагає лише одного перетворення Фур'є записаної голограми.

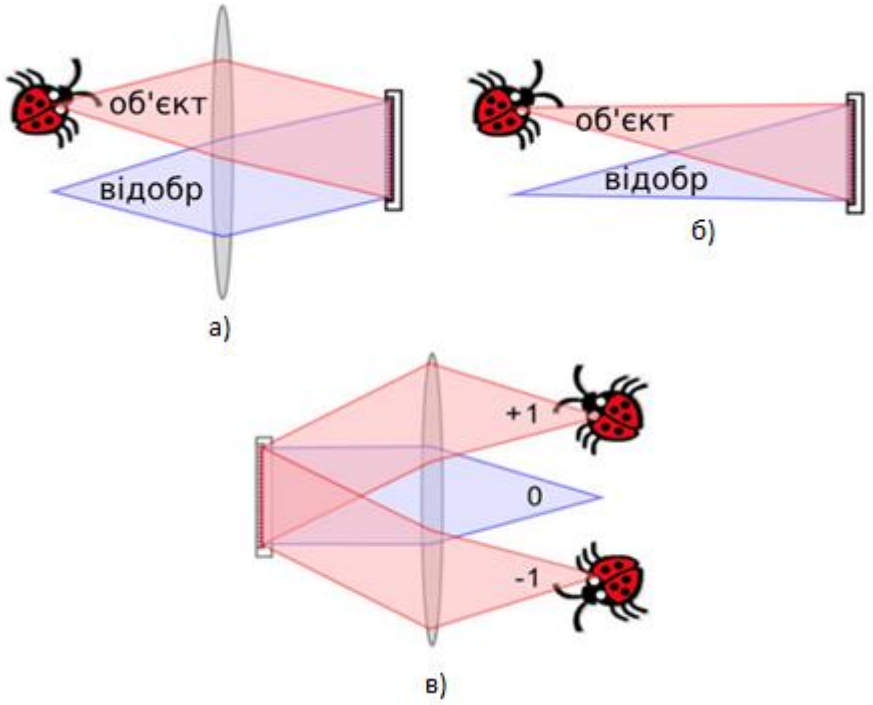


Рисунок 1.10 – Фур'є-голографія та безлінзова Фур'є-голографія: а) запис Фур'є-голограми за допомогою лінзи; б) запис безлінзової Фур'є-голограми; в) реконструкція за допомогою Фур'є-перетворення, представлена за допомогою Фур'є-лінзи

У безлінзовій Фур'є-мікроголографії об'єкт можна розмістити близько до датчика, що збільшує числову апертуру та покращує роздільну здатність. Але це призводить до аберації у реконструкції через порушення вимоги частоти Найквіста. Голограма розширюється та інтерполюється, після чого множиться на передавальну функцію перед перетворенням Фур'є, щоб отримати зображення з високою роздільною здатністю без аберації [6].

1.4.3 Голографія площини

Об'єкт можна розмістити близько до площини голограми , так що зображення формується поблизу площини голограми в положенні об'єкта. У реальній голографії це корисно для створення голограм, які можна переглядати за допомогою світла з низькою когерентністю, оскільки відстань до зображення не дуже велика порівняно з довжиною когерентності. У мікроскопічній голографії це не буде корисно, оскільки немає збільшення, якщо тільки не використовувати мікроскоп для перегляду голограми. З іншого боку, об'єктив можна використовувати для формування поблизу площини голограми збільшеного зображення об'єкта, і голографічне зображення відтворить збільшене зображення (рис. 1.11, а). Зображення буде правильно відтворювати профіль амплітуди об'єкта, але не профіль фази. Як альтернатива, об'єктив можна використовувати для формування збільшеного зображення голографічної інтерференції, включаючи як об'єкт, так і записувальний еталон (рис. 1.11, б). У реальній просторовій голографії реконструкція з використанням тієї ж довжини хвилі з збільшеної голограми дасть незбільшене зображення оригінального розміру об'єкта.

Щоб зберегти збільшення, доведеться використовувати довжину хвилі, довшу на той самий коефіцієнт збільшення, але така довга довжина хвилі буде в далекому інфрачервоному або мікрохвильовому діапазоні.

У цифровій голографічній мікроскопії ця конфігурація є особливо гнучкою, оскільки отриману голограму можна масштабувати чисельно відповідно до фізичних розмірів об'єкта, незалежно від розміру зображення на ПЗС. Фактично, зменшена матриця ПЗС розміщується поблизу положення об'єкта [7].

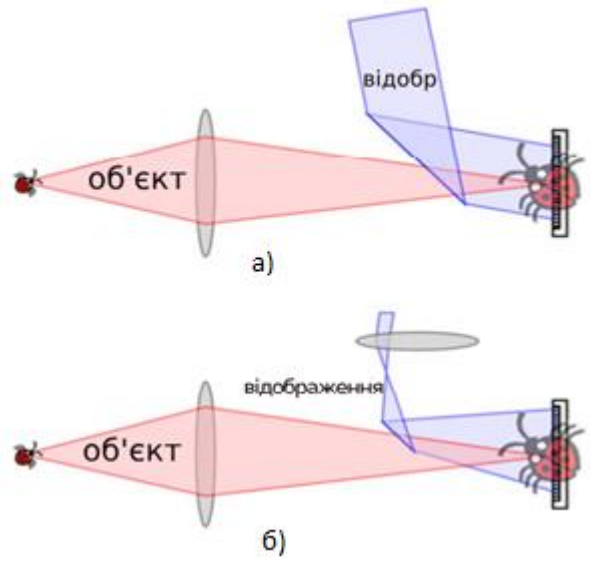


Рисунок 1.11 – Запис голограм площини зображення шляхом проєкції збільшеного зображення об'єкта на площину голограми в суперпозиції з плоскою опорною хвилею (а) або опорною хвилею, узгодженою з хвильовим фронтом (б)

1.5 Переваги та обмеження цифрової голографічної мікроскопії

Існує ряд істотних відмінностей між аналоговою (АН) та цифровою (DH) голографією. Найбільш очевидною є те, що DH не передбачає фотохімічної обробки. Тому DH є на багато швидшою і може виконуватися зі швидкістю відео. Додаткове обладнання, необхідне для DH, це CCD-камера та комп'ютер, тоді як необхідність у темній кімнаті та запасі хімікатів відпадає. Крім того, завдяки високій чутливості CCD порівняно з фотографічною емульсією, час експозиції скорочується на кілька порядків.

Наприклад, піксель CCD площею 100 мкм^2 може виявити лише кілька фотонів, тоді як аналогічна площа високочутливої фотографічної пластини вимагає багатьох мільйонів фотонів. Короткий час експозиції, в свою чергу, означає значно менші вимоги до механічної стабільності апарату. Важкі оптичні столи з віброізоляцією часто не є критичними. З іншого боку, головною проблемою DH є низька роздільна здатність. Типовий піксель CCD

має розмір у кілька мікрон, тоді як зерна на фотографічній емульсії можуть бути на 2 порядки дрібнішими. Це обмежує просторову частоту смуг і, отже, кутовий розмір об'єкта до декількох градусів для DH, тоді як для AH можливі повні 180°. Знайомий ефект паралакса дисплейних голограм AH в даний час неможливий в DH. Однак справжня сила DH полягає в цілому ряді потужних чисельних методів, які можна застосувати після введення голограми в комп'ютер. Після того, як комп'ютер зчитає голограму в масив, потрібно лише вказати розмір поля зору та довжину хвилі і приступити до обчислення чисельної дифракції. Однак в AH, щоб правильно зчитати збільшену або зменшену голограму, довжину хвилі також потрібно пропорційно масштабувати, що є як мінімум дуже обтяжливим завданням і в більшості випадків нездійсненним.

Іншим прикладом є голографічна інтерферометрія з використанням декількох довжин хвиль. В інтерферометрії AH створюється декілька голограм, які точно переміщуються, і в ідеалі кожна голограма повинна освітлюватися різною довжиною хвилі, що може бути фізично неможливим. Найчастіше накладені голограми освітлюються однією довжиною хвилі, і в результаті виникають неминучі аберації. Однак в DH накладення просто полягає в додаванні декількох числових масивів. Немає обмежень щодо кількості масивів, і, крім того, існують способи попередньої обробки масивів для компенсації хроматичних та інших аберацій, якщо вони присутні.

Завдяки своїй чутливості та технічній універсальності, кількісна фазова мікроскопія є дуже важливою та активною областю досліджень і застосувань у цифровій голографії. Багатохвильове оптичне розгортання фази дозволяє отримувати зображення з нанометровою точністю в діапазоні багатьох мікрометрів без багатьох проблем, пов'язаних із звичайними програмними методами розгортання. Біомедична мікроскопія є областю, яка може значно виграти від нових можливостей цифрової голографії, надаючи безмітні, мінімально інвазивні та високочутливі методи візуалізації тонких змін у фізичному та фізіологічному стані клітин і тканин [8].

Основні переваги цифрової голографічної мікроскопії (DHM): DHM є новою методикою в галузі оптичної мікроскопії, яка має унікальні можливості, зокрема:

– немаркерна (безміткова) візуалізація: на відміну від флуоресцентної мікроскопії, DHM не потребує використання барвників, флуорофорів або інших міток. Це дозволяє досліджувати клітини й тканини в природному, живому стані, не порушуючи їх фізіології;

– кількісна фазова інформація: на основі фазового зсуву світлової хвилі, що проходить через зразок, DHM дозволяє обчислювати:

– оптичну товщину;

– показник заломлення;

– морфологію та об’єм об'єктів;

– віртуальне фокусування (рефокусування): одна цифрова голограма дозволяє чисельно відновити хвильове поле в будь-якій площині вздовж осі *z*, тобто після зйомки можна «перенастроїти фокус» без повторного сканування;

– тривимірна реконструкція з одного знімка**.** Оскільки голограма містить як амплітуду, так і фазу хвильового поля, можливо побудувати 3D-зображення об'єкта з єдиного кадру;

– висока швидкість візуалізації. DHM дозволяє швидкісне сканування живих об’єктів — обмеження накладаються лише частотою відеозапису камери (до сотень кадрів на секунду);

– простота конструкції: порівняно з іншими мікроскопічними системами, DHM може бути реалізована з мінімальним набором компонентів: лазер, оптика, камера, комп’ютер;

– можливість моніторингу в реальному часі.

Основні обмеження DHM: чутливість до вібрацій та нестабільності середовища.

Оскільки DHM базується на інтерференції, вона чутлива до:

– механічних коливань;

– температурних змін;

– турбулентності повітря.

Обмежена глибина проникнення в щільні тканини.

У щільних біологічних середовищах (наприклад, кісткова тканина) розсіювання світла знижує якість реконструкції.

Необхідність чисельної реконструкції: для отримання зображення потрібне програмне забезпечення та обчислювальні ресурси. Це ускладнює застосування в польових умовах або в режимі реального часу, якщо обчислювальна потужність недостатня.

Наявність артефактів і шумів: при записі голограми можуть виникати побічні сигнали, дублікати (twin images), шумові зони. Потрібна фільтрація у спектральній області або застосування off-axis конфігурацій.

Висока когерентність лазера спекл-шум. Когерентне джерело (лазер) створює спекл-шум, який може знижувати контрастність зображення, особливо у біологічних об’єктах з неоднорідною поверхнею.

2 КОНСТРУКЦІЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГОЛОГРАФІЧНОГО МІКРОСКОПА. ОБРОБКА ГОЛОГРАМ ТА МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

Цифрова голографія (DH) – це нова технологія, що відкриває нові можливості в галузі загальних застосувань зображення. Замінивши фотохімічні процедури традиційної голографії електронним зображенням, відкриваються широкі можливості для нових застосувань. Хоча багато чудових властивостей голографії відомі вже протягом десятиліть, їх практичне застосування було обмеженим через громіздкі процедури та суворі вимоги до обладнання. Процес у реальному часі є неможливим, за винятком фоторефракційних та інших спеціальних матеріалів і ефектів. У цифровій голографії голографічна інтерференційна картина генерується оптично шляхом суперпозиції об'єктного та опорного променів, яка цифровим чином зчитується камерою з зарядовим зв'язком (CCD) і передається на комп'ютер у вигляді масиву чисел. Поширення оптичних полів повністю і точно описується теорією дифракції, що дозволяє чисельно відтворити зображення у вигляді масиву комплексних чисел, що представляють амплітуду і фазу оптичного поля. Цифрова голографія має ряд значних переваг, таких як можливість швидкого отримання голограм, доступність повної інформації про амплітуду та фазу оптичного поля, а також універсальність інтерферометричних та методів обробки зображень. Дійсно, цифрова голографія за допомогою чисельної дифракції оптичних полів дозволяє використовувати методи візуалізації та обробки зображень, які є складними або неможливими в голографії реального простору.

Для багатьох областей застосування робота в режимі реального часу має вирішальне значення, але є складною за допомогою традиційної голографії. Навіть фоторефрактивні та інші нелінійні оптичні системи вимагають значного обладнання та технічного догляду для їх реалізації і мають лише обмежене практичне застосування. Цифрова голографія замінює

фізичні та хімічні процеси запису електронними, а процес оптичної реконструкції – чисельними обчисленнями.

2.1 Цифрова голографічна мікроскопія. Загальний опис цифрової голографічної мікроскопії

Базова установка для цифрової голографічної мікроскопії (DHM) складається з джерела освітлення, інтерферометра, цифрової камери та комп'ютера з необхідними програмами. Найчастіше для освітлення використовується лазер з необхідною когерентністю для створення інтерференції. Використовуються різні типи лазерів, від поширених HeNe-лазерів і діодних лазерів до діодних і подвоєних YAG-лазерів (часто званих просто твердотільними лазерами), аргонових лазерів, а також настроюваних барвних лазерів і Ti: сапфірових фемтосекундних лазерів. Для багатохвильових методів два або більше різних лазерів можуть бути з'єднані в інтерферометр, або може бути використаний настроюваний лазер.

Основний принцип голографії полягає в записі інтерференційної картини електромагнітної хвилі, яка проходить через об’єкт або відбивається від нього (так звана об’єктна хвиля), та опорної хвилі, що походить з того самого джерела лазерного випромінювання (рис. 2.1). Отриманий інтерференційний малюнок називається голограмою. У класичній голографії зображення об’єкта відновлюється шляхом освітлення голограми тією ж самою опорною хвилею, але в цифровій голографії відновлення здійснюється математичним перетворенням голограми, записаної камерою CCD або сенсором CMOS [9].

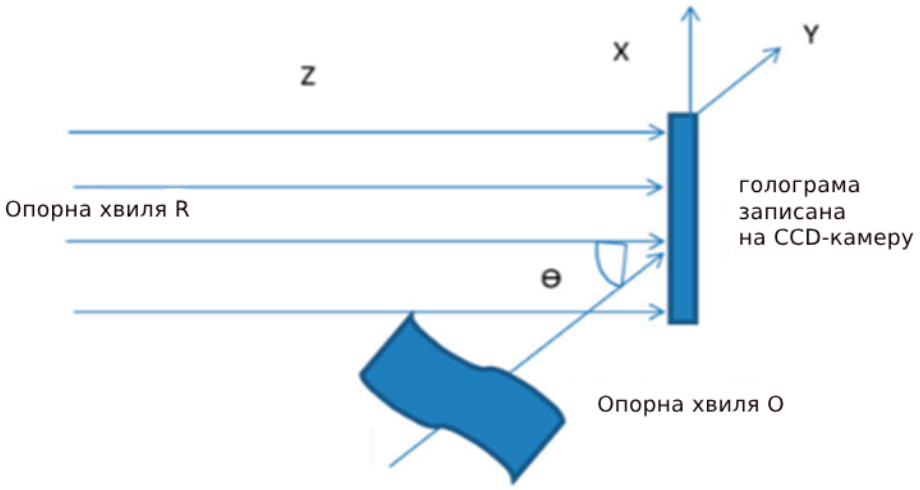


Рисунок 2.1 – Інтерференція на екрані CCD-камери плоскої опорної хвилі R(x,y) та хвилі об'єкта O(x,y)

Якщо R (x,y) позначає опорну хвилю (яка для простоти вважається плоскою і колімованою), а O (x,y) позначає хвилю, розсіяну об'єктом, то маємо:

$$O(x,y) = |\, O(x,y) \,| \cdot \exp[i\,\varphi(x,y)] O(x,y)\,],$$

$$R(x,y) = |\, R(x,y) \,| \cdot \exp[i\,2\pi\zeta x]\,,$$

$$\zeta = \frac{\sin\theta}{\lambda} \text{ — це просторова несуча частота.}$$

Інтерференція двох хвиль дає наступний розподіл інтенсивності на екрані (ПЗЗ):

$$H(x,y) = |\, R(x,y) + O(x,y) \,|\, 2 = |\, R(x,y) \,|\, 2 + |\, O(x,y) \,|\, 2 +$$

$$+ R(x,y) \cdot O \times (x,y) + R \times (x,y) \cdot O(x,y) =$$

$$= R2 + |\, O(x,y) \,|\, 2 + 2R \cdot |\, O(x,y) \,| \cdot \cos\big(2\pi\zeta x + \varphi(x,y)\big).$$

Реконструкція хвильового поля виконується чисельними методами. Чисельний процес реконструкції базується на інтегралі Френеля-Кірхгофа, який описує дифракцію реконструюючої хвилі на мікроструктурі голограми.

У процесі чисельної реконструкції з цифрової голограми можна обчислити не тільки інтенсивність, але й фазовийрозподіл збереженого хвильового поля. Це відкриває нові можливості для різноманітних застосувань.

Представимо дві класичні інтерферометричні конфігурації, які найчастіше використовуються на практиці.

Одна з основних цифрових голографічних мікроскопічних установок складається з джерела освітлення, поляризатора, цифрової камери та комп'ютера з необхідною програмою для реконструкції цифрових голограм (рис. 2.2).

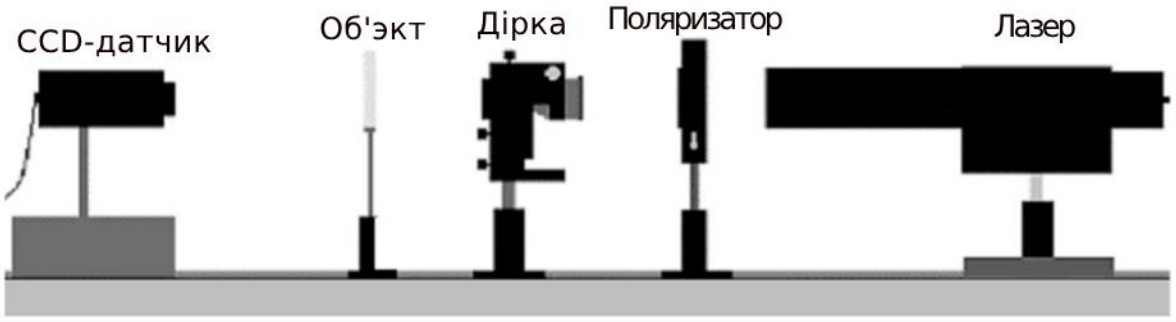


Рисунок 2.2 – Оптична схема цифрового In-Line (Послідовного) голографічного мікроскопа

Часто для освітлення використовується лазер, який має необхідну когерентність для створення інтерференції. Ця оптична установка називається цифровим інлайн-голографічним мікроскопом, оскільки всі оптичні компоненти вирівняні в одну лінію . Назва «лінійний» походить від того, що лазерний промінь, який проходить через напівпрозорий зразок, безпосередньо відображається на датчику зображення (наприклад, CCD або CMOS). Таким чином, зображення складається з перекриття нерозсіяного лазерного світла (опорного променя) та світла, розсіяного зразком (об'єктним променем). Це накладання створює голографічну інтерференційну картину.

Зазвичай для запису та оцифрування голографічної інтерференційної картини використовуються CCD- або CMOS-камери. Записана голограмна картина оцифровується та вводиться в комп'ютер у вигляді 2D-масиву цілих чисел з високою роздільною здатністю у відтінках сірого.

Друга класична інтерферометрична конфігурація, що використовується в схемі DHM, представлена на рис. 2.3. Вхідний лазерний промінь розділяється на два промені за допомогою світлодільника (BS). Переданий промінь освітлює об'єкт, що досліджується. Дифрагований хвильовий фронт збільшується мікроскопічною лінзою на CCD-сенсор. Відбитий промінь на BS, найближчому до CCD-сенсора, забезпечує опорний промінь для позаосьової голографічної запису приінтерференції з об'єктом.

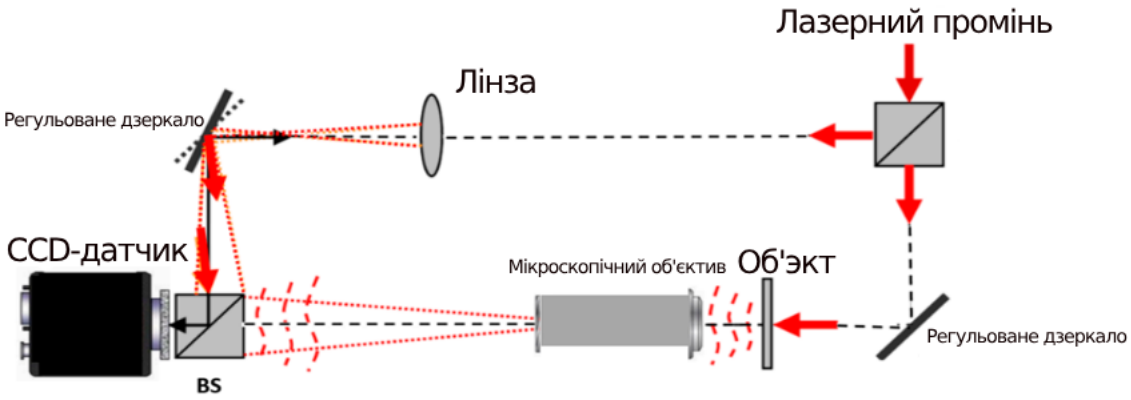
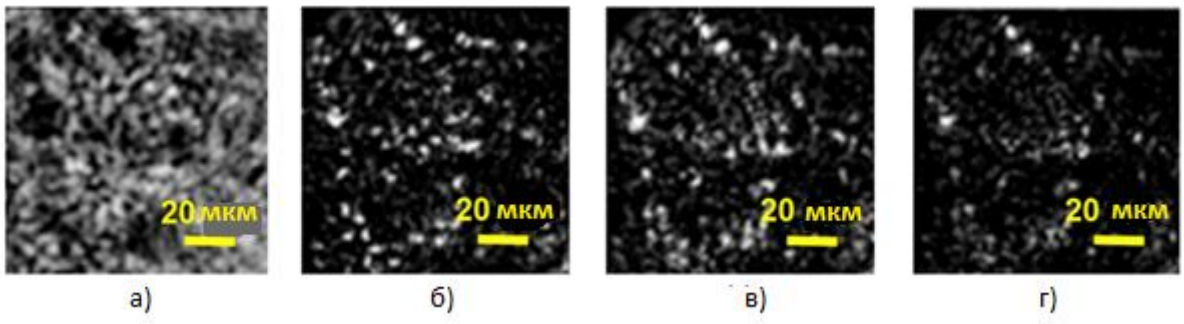


Рисунок 2.3 – Основна схема цифрового голографічного мікроскопа на основі інтерферометричної конфігурації Match-Zehnder

Джерелом світла є діодний лазер (Lasiris) з довжиною хвилі 673,2 нм і потужністю 7 мВт. Лазерне випромінювання фокусується на отворі, після чого інтенсивність контролюється поляризатором. Після отвору сферична хвиля проходить через об'єкт, який розташований на предметній скельці мікроскопа: хвиля, дифрагована об'єктом, і недифрагована хвиля інтерферують і реєструються як голограма на CCD-сенсорі. Інтенсивність і фаза реконструюються чисельно.

Приклад застосування DHM для візуалізації водоростей показано на рис. 2.4. На рис. 2.4, а показано голограму і три відтворені інтенсивності її хвильового фронту (рис. 2.4 (в–г)) для представлення об'єкта. Відтворення виконується в трьох послідовних площинах з відстанню між ними, що змінюється на 2 мкм. Відомою особливістю голографії є 3D вміст інформації зображення. У DHM одна голограма використовується для реконструкції оптичного поля на будь-якій відстані від голограми, в межах обмежень використовуваного методу апроксимації.

Відновлені інтенсивності ілюструють унікальну здатність DHM дозволяти спостереження різних зрізів живої клітини, отриманих лише з однієї цифрової голограми. Це дає можливість отримати багато зрізів одного живого об'єкта з однієї цифрової голограми об'єкта.



а) зображення цифрової голограми водоростей Pseudokirchneriella subcapitata; (б–г) відновлені інтенсивності на чотирьох послідовних площинах. Відстань між площинами змінюється на 2 мкм.

Рисунок 2.4 – Приклад застосування DHM для візуалізації водоростей

Один цифровий голограм містить інформацію, необхідну для мікроскопічної реконструкції об'єму об'єкта.

Кількісну інформацію про інтенсивність і розподіл фаз чисельно реконструйованого хвильового поля можна отримати з цифрових голограм. На рис. 2.5 показано, що чисельна реконструкція цифрових голограм

забезпечує ефективний метод віртуального фокусування по всій глибині мікроскопічного зразка, що унікальною особливістю DHM [10]. На рис. 2.5, а показано інтерферометр Міхельсона для цифрової голографічної мікроскопії відбивних зразків. На рис. 2.5, б – інтерферометр Маха-Цандера для цифрової голографічної мікроскопії пропускаючих зразків.

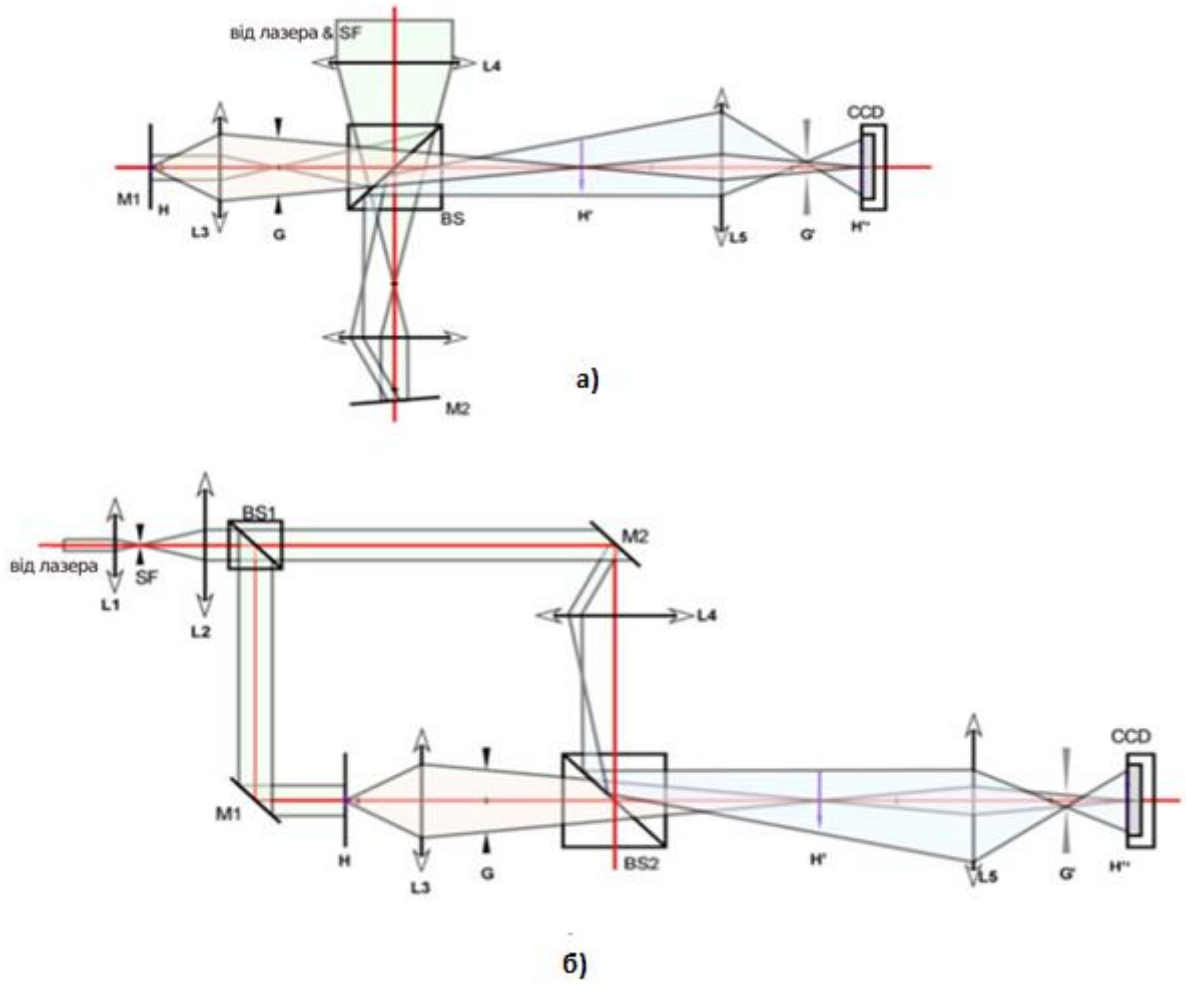
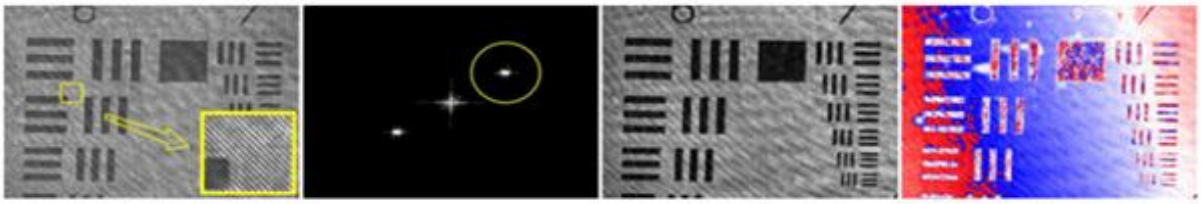


Рисунок 2.5 – Чисельна реконструкція цифрових голограм
(BS: світлодіоди; L: лінзи)

Можна використовувати лазер з короткими імпульсами (пікосекундними або фемтосекундними) або перетворити настроюваний лазер на широкосмугове джерело, видаляючи настроювальний елемент. Навіть світлодіод зазвичай має довжину когерентності близько 10 мкм, що

може бути достатнім для голографічної мікроскопії. Було продемонстровано DHM з використанням інфрачервоного лазера CO_2 (10,6 мкм), глибокого УФ (193 нм) та м'якого рентгенівського випромінювання 32 нм. Два основні типи інтерферометрів, інтерферометр Міхельсона для відбивних об'єктів та інтерферометр Маха-Цандера для пропускаючих об'єктів, зображені на рис. 2.6. На кожній діаграмі світло-зелені промені є вхідними від лазера, світло-блакитні є еталонними променями, а світло-червоні зображують формування зображення точки об'єкта. В обох конструкціях об'єкт освітлюється плоскою хвилею, а еталонний промінь досягає площини CCD з такою ж кривизною хвильового фронту, як і хвиля об'єкта, за винятком зміщення кута падіння для позаосьової голографії.



а) б) в) г)

а) голограма, з деталями, показаними на вставці; б) кутовий спектр, з жовтою обведеною областю, відфільтрованою для реконструкції; в) амплітудне зображення; г) фазове зображення.

Рисунок 2.6 – Процес цифрової голографічної мікроскопії (цільова роздільна здатність) (FOV = 200 × 150 мкм; 1024 × 768 пікселів)

Інтерферометри типу Маха-Цандера вимагають більше компонентів, але забезпечують більшу гнучкість у вирівнюванні, особливо при використанні мікроскопічної оптики для отримання зображень. Інтерферометри також можуть включати різні апертури, атенюатори та поляризаційну оптику для контролю співвідношення інтенсивності еталонного та об'єктного променів. Поляризаційна оптика також може

використовуватися для явної мети візуалізації двопроменезаломлення. Також можуть бути різні типи модуляторів, такі як п'єзомонтажна оптика, рідкокристалічні фазові модулятори, акустооптичні або електрооптичні модулятори для створення модульованих сигналів. Такі техніки, як безлінзова конфігурація Фур'є-голографії, можуть використовуватися для збільшення, але на практиці досяжне збільшення є обмеженим, і явне більшення за допомогою об'єктивів мікроскопа є кращим і необхідним. Інша лінза може використовуватися в опорному плечі для узгодження кривизни хвильових фронтів об'єкта та еталону [11].

У цифровій голографії існує багато універсальних технік, які компенсують різні типи аберацій та недосконалостей оптичної, і тому, порівняно з традиційною голографією, оптичні та механічні вимоги можуть бути значно менш суворими.

Зазвичай для зйомки та оцифрування голографічного інтерференційного малюнка використовуються CCD-камери, а останнім часом – CMOS-камери. Розмір пікселя цих пристроїв становить кілька мікрон, а кількість пікселів – близько 10002. Ці параметри є основними обмежувальними факторами роздільної здатності DHM і визначають діапазон застосування, але можна очікувати, що в найближчі роки вони будуть продовжувати поліпшуватися. Знята голограмна картина оцифровується камерою або пристроєм захоплення кадрів і вводиться в комп'ютер у вигляді двовимірного масиву цілих чисел з роздільною здатністю 8 біт або вище в градаціях сірого.

Основним завданням комп'ютера є виконання чисельної дифракції для обчислення голографічного зображення у вигляді масиву двовимірних комплексних чисел. Крім того, комп'ютерна програма виконує ряд інших завдань, таких як попередня та подальша обробка зображень, візуалізація та зберігання зображень, а також синхронізація та інші необхідні функції управління апаратом.

Приклад процесу DHM показано на рис. 2.7 з використанням мішені з роздільною здатністю з полем зору (FOV) = 200 × 150 мкм^2. Рис. 2.7, а – це голограма, деталі якої показано на вставці, де видно інтерференційні смуги.

Рис. 2.7, б – кутовий спектр (перетворення Фур'є), що показує піки нульового порядку та подвійні піки зображення. Один із подвійних членів вибирається за допомогою числового смугового фільтра (жовте коло). Відфільтрована голограма потім використовується для числової дифракції на відповідній відстані, що дає реконструйоване голографічне зображення у вигляді 2-D масиву комплексних чисел.

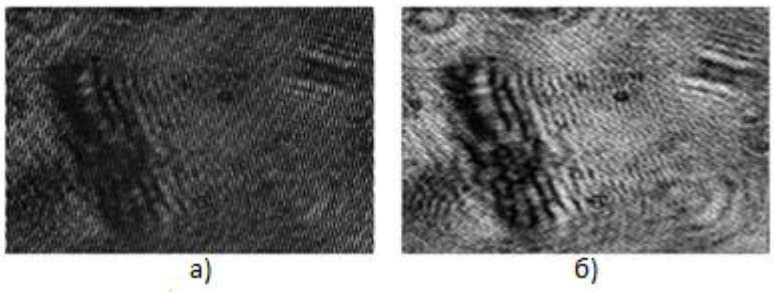
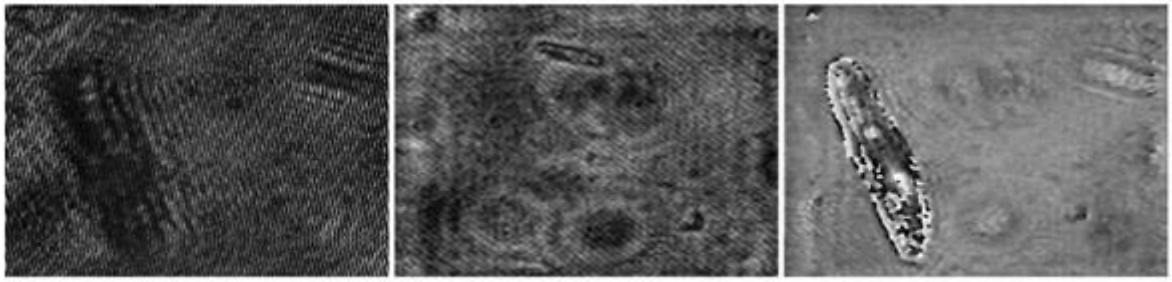


Рисунок 2.7 – Чисельне фокусування DHM на парамеції: а) окремий голограм, знятий камерою (FOV = 250 × 250 мкм, 464 × 464 пікселів); б) відео серії голографічних зображень, розрахованих на різних відстанях

За допомогою DHM голографічний фільм обробляється шляхом обчислення зображень з одночасним коригуванням відстаней реконструкції для відстеження конкретного зразка, який плаває вгору і вниз у 3-D об'ємі об'єкта. Фільми з обчисленими таким чином зображеннями амплітуди та фази показані на рис. 2.8, б та 2.8, с відповідно. Фактично, голографічний фільм є повним 4-D просторово-часовим записом об'єму об'єкта.



а) голограми (відео); б) амплітудні зображення (відео);
в) фазові зображення (відео); (FOV = 250 мкм× 250 мкм, 464 × 464 пікселів).

Рисунок 2.8 – Голографічні фільми про парамецію та евглену:

За допомогою DHM голографічний фільм обробляється шляхом обчислення зображень з одночасним коригуванням відстаней реконструкції для відстеження конкретного зразка, який плаває вгору і вниз у 3-D об'ємі об'єкта. Фільми з обчисленими таким чином зображеннями амплітуди та фази показані на рис. 2.8, б та 2.8, с відповідно. Фактично, голографічний фільм є повним 4-D просторово-часовим записом об'єму об'єкта.

3 ЗАСТОСУВАННЯ ТА СПЕЦІАЛЬНІ ТЕХНІКИ ЦИФРОВОЇ ГОЛОГРАФІЧНОЇ МІКРОСКОПІЇ

3.1 Біомедична мікроскопія

Цифрова голографія пропонує ряд нових можливостей для біомедичної мікроскопії. Кількісна фазова мікроскопія за допомогою цифрової голографії (DH-QPM) застосовується для отримання зображень різних типів клітин, включаючи клітини раку яєчників SKOV-3, фібробласти, тестатні амеби, скелети діатомових водоростей та еритроцити . Вона також використовується для дослідження різних клітинних динамік, таких як зміни в клітинах пухлини підшлункової залози, викликані ліками. DHM використовується для моніторингу лазерної мікрохірургії еритроцитів (RBC), епітеліальних клітин нирок щурів-кенгуру (PTK2) та паличок сітківки золотих рибок для кількісної оцінки пошкодження та відновлення клітин і клітинних органел у реальному часі.

Внески фізичної товщини та показника заломлення в оптичну товщину роз'єднуються за допомогою фазового картування з двома перфузійними розчинами з різними показниками заломлення. Показник заломлення еритроцитів виміряно як $n = 1{,}394 \pm 0{,}008$. Деформація фосфоліпідних везикул у мікроканальному потоці вимірювалася за допомогою DH-QPM як модель еритроцитів у капілярному потоці.

Змінні в часі клітинні та субклітинні особливості зображуються з субмікронною, дифракційно обмеженою роздільною здатністю. Фільми з голографічними амплітудними та фазовими зображеннями живих мікроорганізмів та клітин, таких як парамеція, що плаває серед інших мікроорганізмів, та фібробласти в процесі міграції, створюються з серії голограм і реконструюються з цифровим регулюванням фокусу.

Іншою примітною технікою для кількісної фазової мікроскопії є фазовий мікроскоп Фур'є (3.5), який має конфігурацію, що нагадує фазовий мікроскоп Зерніке, але з фазовим фільтром, заміненим просторовим

модулятором світла, що дозволяє отримувати зображення з фазовим зсувом в інтерферометрі зі спільним трактом, як показано на рис. 3.1.

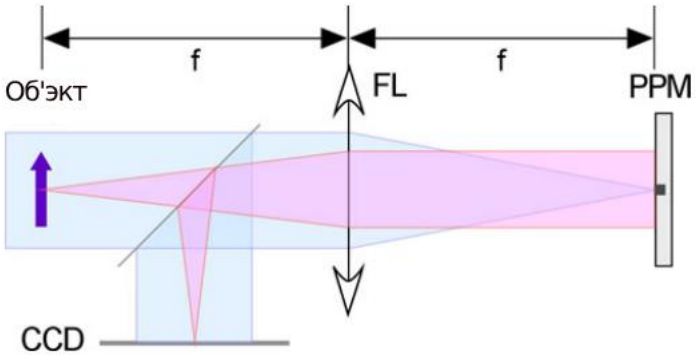


Рисунок 3.1 – Мікроскоп Фур'є. FL: лінза Фур'є; PPM: програмований фазовий модулятор

3-D положення копепод і частинок-трасерів можна визначити за допомогою чисельної реконструкції голограми, але осьова роздільна здатність (~500 мкм) набагато гірша, ніж поперечна роздільна здатність (~7,4 мкм). Розбіжність у роздільній здатності долається за допомогою нахиленого дзеркала, яке утворює подвійнізображення з перпендикулярними видами (рис. 3.2), забезпечуючи таким чином ізотропну 3-D роздільну здатність.

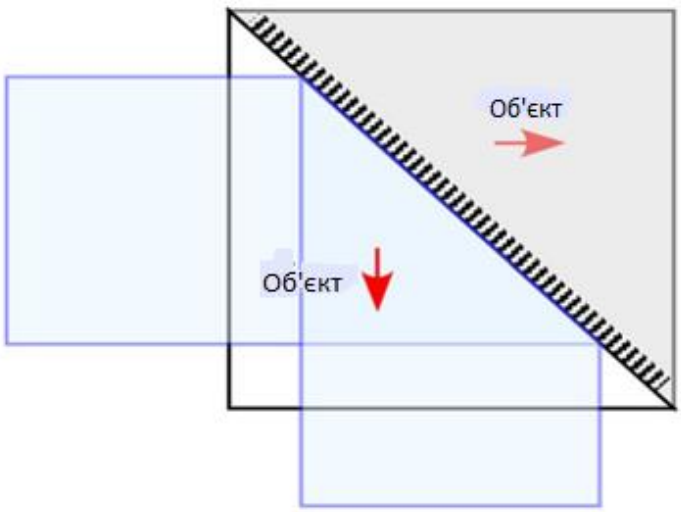


Рисунок 3.2 – Оптична схема для подвійного перегляду габорівської голографії [10]

Аналіз голографічних фільмів виявив поле швидкості та траєкторії частинок, захопленихкопеподом, що мають рециркуляційний характер у системі відліку копепода. Цей характер викликаний тим, що копепод занурюється зі швидкістю, яка є нижчою за його кінцеву швидкість занурення, через рушійну силу, що генерується потоком живлення. Рушійна сила, що генерується його харчовимипридатками, була виміряна як $1{,}8 \times 10^{-8}$ Н [12].

3.2 Мікроскопія та метрологія мікроструктур

DHM є особливо корисним для характеристики MEMS завдяки відносно гладкому та чітко визначеному профілю поверхні. Мікрокантилеверні балки, мости та мембрани відображаються за допомогою кількісної фазової голографії. Багатохвильове оптичне розгортання фази фазових зображень дає можливість вимірювати форму та деформацію з субмікронною точністю в діапазоні багатьох мікрон. Різні оптичні методи, включаючи цифрову голографію,для характеристики пристроїв MEMS розглядаються в роботі.

Кількісна фазова мікроскопія за допомогою DH також є унікальним інструментом для моніторингу нелінійних оптичних процесів, таких як фероелектричні кристалічні домени.

Цифрова голографія використовувалася для вимірювання змін показника заломлення під час фемтосекундного лазерного запису хвилеводів у сапфірі, легованому Ti3+, а також хвилеводах, записаних на скляних підкладках за допомогою Ti:сапфірового лазера. DH використовується у високоточних 3-D вимірюваннях кута шляхом аналізу кутового спектру голографічної інтерференції. Була отримана точність 0,005 кутових секунд. Настроювані масиви рідких мікролінз характеризуються за допомогою цифрової голографії.

Двопроменезаломлення матеріалу можна візуалізувати за допомогою двох опорних хвиль з ортогональною поляризацією. Дві опорні хвилі мультиплексуються за кутом, як у двохвильовій голографії, щоб отримати дві пари спектрів у області Фур'є [13].

3.3 Голографічна томографія

Хоча голографія відтворює тривимірне оптичне поле об'єкта, голографічне зображення на певній відстані містить не тільки зображення в фокусі, але й внески від площин, що знаходяться поза фокусом.

Кількісна фазова мікроскопія за допомогою DHM також профілює накопичену фазову варіацію у напрямку поширення світла. З іншого боку, тривимірна амплітуда розсіювання або варіація показника заломлення по об'єму об'єкта представляє великий інтерес у багатьох застосуваннях в біомедичній візуалізації, метрології, аналізі поля частинок тощо.

Існує два основних підходи для отримання таких томографічних зображень. Один з них полягає в отриманні пропущеного оптичного поля з багатьох різних напрямків і об'єднанні проекцій за допомогою алгоритму зворотного поширення. Інший полягає у використанні ефектів інтерференції з низькою когерентністю для ізоляції взаємодії світлаз поперечним перерізом об'єму об'єкта.

Аналогічно до комп'ютерної рентгенівської томографії (КРТ), голографічна томографія 3-D фазової структури була досягнута шляхом обертання клітинного зразка в об'ємі об'єкта. На відміну від проекції тіні в інших методах томографії, цифрова голографія дозволяє зворотне поширення, що включає ефекти дифракції для більш точної реконструкції з вищою роздільною здатністю, що також називається оптичною дифракційною томографією [14].

3.4 Голографія з низькою когерентністю

Використання світла з низькою когерентністю в загальній голографії має довгу історію, і воно застосовується в цифровій голографії головним чином з двома цілями: зменшення стороннього когерентного шуму та створення томографічних або топографічних зображень. Коротка довжина когерентності може використовуватися в томографічній або топографічній візуалізації шляхом вилучення лише тієї частини об'єкта, яка знаходиться в межах довжини когерентності відносно опорного променя.

Для томографічної та топографічної візуалізації глибина роздільної здатності визначається довжиною когерентності лазера. Наприклад, спектральна ширина лазера 30 нм відповідає приблизно 10 мкм довжині когерентності. Топографічна візуалізація з глибиною роздільної здатності 20 мкм була продемонстрована з використанням діодного лазера. На відміну від інтерференційної візуалізації з низькою когерентністю, голограма або камера фокусуються на довільній відстані від площини об'єкта, а зображення об'єкта реконструюється за допомогою чисельного поширення. Тому інтерференційну візуалізацію можна вважати особливим випадком голографії.

Іншим корисним ефектом світла з низькою когерентністю є зменшення паразитного інтерференційного шуму від частин оптичної системи, які не знаходяться в межах довжини когерентності. Джерело світла з керованою просторовою когерентністю можна отримати, фокусуючи лазерне світло на обертовій дифузійній скляній пластині. Цей метод застосовується для аналізу поля частинок та вимірювання концентрації рідини [15].

3.5 Голографічна мікроскопія з повним внутрішнім відбиттям

Мікроскопія клітинної адгезії важлива для глибшого розуміння клітинного руху та морфогенезу.

Основними інструментами для візуалізації та вивчення цих поверхневих процесів є флуоресцентна мікроскопія з повним внутрішнім відбиттям (TIRFM) та інтерференційна мікроскопія з відбиттям.

У TIRFM еванесцентне поле використовується для вибіркового освітлення контактного шаруклітини. На відміну від цього, в TIR-голографічній мікроскопії (TIRHM) взаємодія еванесцентного поля з контактним шаром призводить до модуляції фазового профілю в TIR-відбитому світлі. Потім фазова модуляція виявляється і відображається за допомогою кількісної фазової мікроскопії DHM. Цей метод є неінвазивним, не вимагає флуорофорів і повною мірою використовує вхідну інтенсивність випромінювання.

Геометрія оптичної системи вимагає чисельного відображення над площиною під великим кутом нахилу, але, як і раніше, цифрова голографія надає унікальну можливістьдля реконструкції над похилою площиною, як описано раніше. Зазначимо, що TIR також використовується для освітлення об'єкта в цифровій голографії для мікроскопії в темному полі.

Прилад TIRHM на основі інтерферометра Маха-Цандера зображений на рис. 3.3, а приклад набору зображень амеби протеус показаний на рис. 3.4. [16].

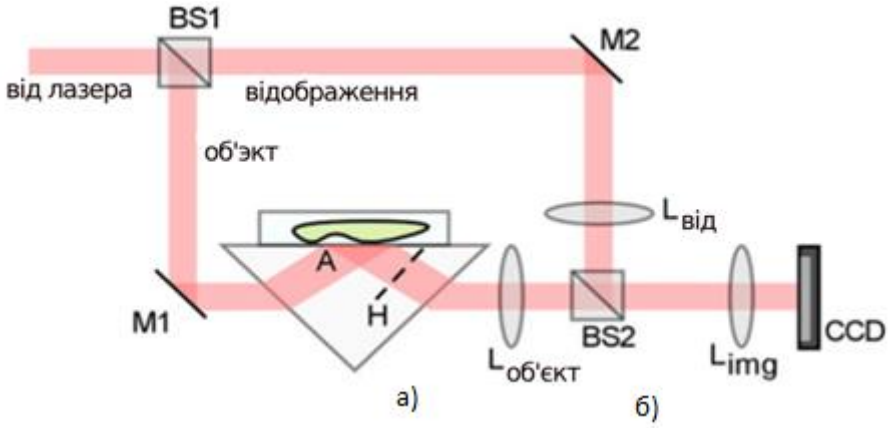


Рисунок 3.3 – Пристрій для TIRHM: а) BS: світлоділи; M: дзеркала; A: площина об'єкта; H: площина голограми; б) деталь призми TIR

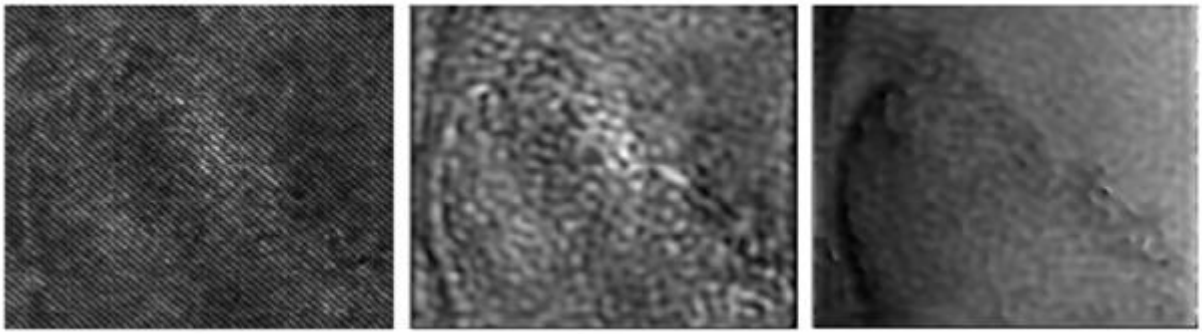


Рисунок 3.4 – Зображення TIRHM живої амеби протеус: (а) голограма, (б) амплітудне зображення та (в) фазове зображення. Поле зору = 250 мкм (з компресією нахилу) × 125 мкм [164] [17]

3.6 Цифрова голографічна мікроскопія для застосування в біологічних науках

Кількісна фазова мікроскопія за допомогою цифрової голографії застосовувалася для спостереження за різними типами клітин, включаючи клітини раку яєчників SKOV-3, фібробласти, амеби , скелет діатомових водоростей та еритроцити. Вона також використовувалася для моніторингу динаміки клітин під час введення ліків у клітини пухлини підшлункової залози [18].

3.6.1 Візуалізація мікроорганізмів, морського планктону та водоростей

Цифрова голографія забезпечує чудовий механізм для візуалізації 3D-розподілу точкоподібних мікроорганізмів. Спостерігаючи за різницею між послідовними кадрами часової серії голографічних фотографій, можна відстежувати рух мікроорганізмів. Водночас ця диференціальна техніка ефективно пригнічує побічні ефекти в зображенні. В іншому застосуванні

голографічної техніки були сконструйовані підводні прилади для спостереження за морським планктоном та іншими частинками.

Цифрова голографія Габора (див. рис. 3.2) також використовувалася для дослідження поля швидкості потоку, що генерується органелами ракоподібних.

Мікроскопія клітинної адгезії важлива для глибшого розуміння руху клітин та морфогенезу. Основним інструментом для вивчення цих поверхневих процесів є мікроскопія з повним внутрішнім відбиттям флуоресценції та мікроскопія з відбиттям інтерференції.

Еванесцентне граничне поле використовується для вибіркового освітлення поверхневого шару клітини. У голографічному варіанті цього методу взаємодія загасаючої частини поля з контактним шаром призводить до модуляції фази поля світла, відбитого в повній внутрішній відбитті. Потім фазова модуляція виявляється і візуалізується за допомогою кількісної фазової мікроскопії. Метод є неінвазивним, не вимагає флуорофорів і використовує виключно вхідне випромінювання.

Фазові зображення з нанометровою осьовою точністю були цифровим чином реконструйовані з голограм, знятих при різних орієнтаціях зразка; потім тривимірний показник заломлення був розрахований за допомогою оберненого перетворення Радона. Була продемонстрована точність 0,01 для показника заломлення і роздільна здатність в мікрометровому діапазоні.

Tetraselmis suecica та інтенсивності хвильового фронту відповідних зображень (рис. 3.5).

Морфологія клітин чітко видна на зображеннях, показаних на рисунку 2.8, з точки зору відновлених інтенсивностей.

Застосування цифрової голографічної мікроскопії для візуалізації біологічних зразків є надзвичайно привабливим, оскільки досліджувані об'єкти повинні бути лише прозорими або напівпрозорими, щоб розсіювати лазерне світло і таким чином формувати промінь об'єкта.

Це означає, що немає необхідності в попередній підготовці, маркуванні або використанні флуоресцентних барвників. Це також означає, що можна здійснювати пряму візуалізацію рухомих об'єктів.

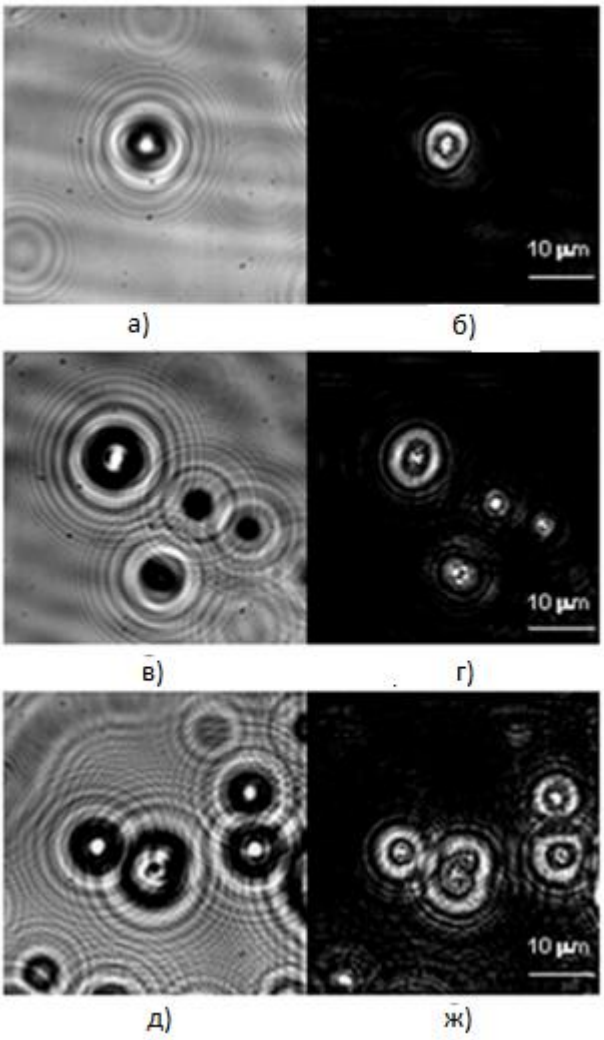


Рисунок 3.5 – Зображення водоростей Tetraselmis suecica: (а, в, д) цифрові голограми; б, г, ж) інтенсивність хвильового фронту відповідних зображень. Розмір клітини становить 10,3 мкм ± 9,5 %.

Результати демонструють потенціал цифрової лінійної голографії для візуалізації та кількісного дослідження моделей поведінки рухомих спор поблизу поверхні.

Ця техніка може дозволити проникнути в механізми колонізації поверхні спорами та личинками у відповідь на зміни властивостей поверхні.

1. Просте обладнання мікроскопа: DIHM – це мікроскопія без об'єктивів.

Необхідне обладнання для неї – це лазер, отвір і CCD-камера. Для підводної версії DIHM використовуються ті самі елементи, що містяться в герметичному корпусі, придатному для занурення.

2. Одна голограма містить всю інформацію про об'єкт, включаючи його 3D-структуру.

3. Оптимальна роздільна здатність порядку довжини хвилі лазера може бути легко досягнута.

4. Немає фарбування і немає розділення біологічних зразків: живі клітини і зразки можуть бути спостережені в глибині. Для підводного цифрового голографічного мікроскопа не потрібна підготовка зразків, а інформацію про живі організми можна отримувати в режимі реального часу. Досягається роздільна здатність порядку довжини хвилі світла. Таким чином, можна відстежувати дрібні організми, такі як бактерії та планктон у воді [19].

3.7 Візуалізація живих клітин та клітинних зразків

Цифрова голографічна мікроскопія (DHM) дозволяє проводити кількісну, мультифокальну, фазово-контрастну візуалізацію, яка підходить для перегляду та кількісної візуалізації живих клітин. Поєднання DHM із швидким та стабільним алгоритмом автофокусування дозволяє автоматизувати фокусування за допомогою чисельного поширення реконструйованої голографічної хвилі об'єкта. У поєднанні з каліброваною оптичною системою візуалізації отримані дані кількісно визначають осьові положення досліджуваного об'єкта. Оцінка кількісних фазово-контрастних зображень дозволяє ефективно визначати бічні зміщення клітин. Результати досліджень осадження еритроцитів і клітин фібросаркоми HT-1080 в

колагеновій тканині демонструють, що DHM дозволяє автоматично здійснювати кількісне, безмаркерне і динамічне 3D-відстеження клітин без механічного регулювання фокусу.

Багато біологічних об'єктів є переважно прозорими і слабо розсіюють світло, тому спосіб спостереження їх зображень полягає в спостереженні за змінами показника заломлення. Було запропоновано метод, який дозволяє отримувати 3D-зображення розподілу показника заломлення за допомогою томографічного підходу. Показано великі можливості отримання 3D-зображень за допомогою дифракційної томографії в біології.

Хоча цифрова голографія забезпечує високоточну морфологічну інформацію, додавання флуоресцентної інформації надає специфічність, необхідну для ідентифікації клітинних компонентів. Застосовуючи цифрову голографію на декількох довжинах хвиль, можна отримати повні дані про хвильовий фронт у реальному часі. Продемонстровано потенціал цього подвійного режиму для візуалізації в дослідженнях живих клітин.

Для вивчення морфології та динаміки живих еритроцитів у осіб, які страждають на серпоподібну анемію (SCA) (генетичне захворювання, що впливає на структуру та механічні властивості еритроцитів), для спостереження застосовується широкопольова цифрова інтерферометрія (WFDI). WFDI – це безконтактна оптична мікроскопія без маркування, яка дозволяє отримати кількісні профілі товщини еритроцитів та виміряти коливання мембрани в нанометровому масштабі, що корелює з їх жорсткістю. Було виявлено, що еритроцити осіб із SCA є значно жорсткішими, ніж еритроцити здорових осіб. Крім того, було показано, що ця техніка є достатньо чутливою, щоб розрізняти класи еритроцитів при SCA, включаючи еритроцити серпоподібної форми з нормальною морфологією, порівняно з більш жорсткими еритроцитами півмісяцевої форми. Очікується, що цей підхід буде корисним для діагностики SCA та визначення ефективності терапевтичних засобів.

Еритроцити є привабливим типом клітин в організмі людини для різних досліджень. Вони рухаються по всій кровоносній системі, доставляючи кисень до всіх органів тіла. Форма та об'єм еритроцитів можуть використовуватися для клінічної діагностики.. На рисунку 3.6 показано візуалізацію еритроцитів людини за допомогою цифрового голографічного мікроскопа [20].

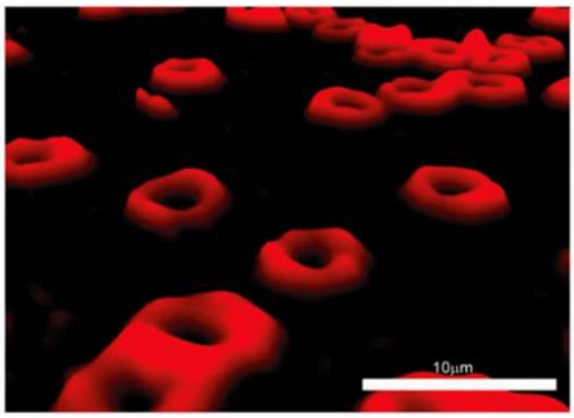


Рисунок 3.6 – Здорові, свіжі еритроцити людини, зняті за допомогою цифрової голографічної мікроскопії. Клітини мають товщину 2–3 мкм

ВИСНОВКИ

У цій кваліфікаційній роботі було проведено комплексний теоретичний аналіз сучасного стану, фізичних основ, технічної реалізації та перспектив розвитку цифрової голографічної мікроскопії (DHM) як інноваційного методу дослідження мікроструктур.

У першому розділі розглянуто фізичні основи голографії, зокрема принципи інтерференції та дифракції, які є базовими для формування голограм. Було детально пояснено механізми запису та реконструкції голографічної інформації, а також відмінності між аналоговими та цифровими голограмами. Проведено класифікацію голограм за типом відновлення, конфігурацією пучків і способом фіксації інформації. Показано, що цифрова голографія дозволяє здійснювати фазову реконструкцію хвильового поля та є особливо ефективною для мікроскопічного аналізу.

У другому розділі досліджено оптичні схеми та конструктивні особливості голографічних мікроскопів. Було охарактеризовано конфігурації in-line та off-axis, а також їх переваги й недоліки для застосування у біомедичних дослідженнях. Розглянуто схеми освітлення, типи лазерних джерел, особливості цифрової реєстрації голограм за допомогою CCD/CMOS-матриць. Також проаналізовано алгоритми реконструкції (перетворення Френеля, Фур’є) та чисельні методи обробки фазової інформації.

У третьому розділі детально проаналізовано застосування DHM у біомедичних науках. Розглянуто приклади реального використання DHM для візуалізації водоростей, клітин крові, епітеліальних тканин, а також у динамічному спостереженні за поведінкою клітин in vitro. Показано, що DHM дозволяє отримати кількісну фазову інформацію про об'єкти без потреби в маркуванні чи фарбуванні, що робить метод незамінним у живій біології. Особливо акцентовано увагу на здатності цифрової голографії

виконувати 3D-реконструкцію структури зразка з однієї голограми та проводити автоматизоване фокусування зображення.

Ми представляємо огляд частини досліджень і розробок у галузі цифрової голографії, зосередившись на мікроскопічних техніках і застосуваннях. За відносно короткий час інтерес і активність у цій галузі зросли в геометричній прогресії, про що свідчить побіжний погляд на статистику публікацій. Все більше дослідників – не тільки в галузі оптичної фізики та оптичної інженерії, але й у різних сферах застосування, таких як мікробіологія, медицина, морська наука, аналіз частинок, мікроелектромеханіка та метрологія – усвідомлюють нові можливості цифрової голографії.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1) Гудзь С. С., Бабич В. М. Оптика та оптоелектроніка: навчальний посібник. К.: Національний авіаційний університет, 2017. 292 с

2) Принцип голографічного запису інформації https://studfile.net/preview/5259889/page:16/ (дата звернення 25.05.2025)

3) Kim, M. Principles and techniques of digital holographic microscopy. SPIE Rev. 2010, 1, 018005. [CrossRef]

4) Hariharan P, Optical Holography: Principles, Techniques, and Applications. 2 ed. Cambridge University Press2012.

5) Haddad W.S., Cullen D., Solem J.C. Fourier-transform holographic microscope. // Appl. Opt. 1992. Vol. 31 P. 4973–4978.

6) Pedrini G., Froning P., Tiziani H.J. Shape measurement of microscopic structures using digital holograms // Opt. Commun. 1999. 164 P. 257–268.

7) Dubois F., Callens N., Yourassowsky C. et al. Digital holographic microscopy with reduced spatial coherence for three-dimensional particle flow analysis // Appl. Opt. 2006. Vol. 45 P. 864–871.

8) Kim M.K., Yu L.F., Mann C.J. Digital holography and multi-wavelength interference techniques," in Digital Holography and Three Dimensional Display: Principles and Applications, pp. 51–72 (2006).

9) Schnars, U.; Juptner, W. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. Appl. Opt. 1994, 33, 179–181.

10) Kim, M. Principles and techniques of digital holographic microscopy. // SPIE Rev. 2010. No 1. 018005.

11) Torok P., Kao F.J. Optical Imaging and Microscopy: Techniques and Advanced Systems. Eds. Springer-Verlag. Berlin. 2003. URL: https://www.researchgate.net/publication/321590642_Optical_Imaging_and_Microscopy_Techniques_and_Advanced_Systems (дата звернення 27.05.2025).

12) Sheng J., Malkiel E., Katz J. Single beam two-views holographic particle image velocimetry // Appl. Opt. 2003. Vol. 42. P. 235–250.

13) Colomb T., Dahlgren P., Beghuin D. et al. Polarization imaging by use of digital holography // Appl. Opt. 2002. Vol. 41. P. 27–37.

14) Lobera J. Coupland J.M. Optical diffraction tomography in fluid velocimetry: the use of a priori information Meas. Sci. Technol. 2008. No 19. 074013.

15) Nomura T., Okamura M., Nitanai E., Numata T. Image quality improvement of digital holography by superposition of reconstructed images obtained by multiple wavelengths // Appl. Opt.2008. No 47.

16) Schilling B.W., Poon T.C., Indebetouw G. B. Storrie, K. Shinoda, Y. Suzuki, and M.H. Wu, et al. Three-dimensional holographic fluorescence microscopy // Opt. Lett. 1997. No 22. P. 1506– 1508.

17) Ash W.M., Krzewina L.G., Kim M.K. Quantitative imaging of cellular adhesion by total internal reflection holographic microscopy // Appl. Opt. 2009. No 48. H144-H152.

18) Xu W.B., Jericho M.H., Meinertzhagen I.A., Kreuzer H.J. Digital in-line holography for biological applications // Sci. USA. 2001 No 98. P. 11301–11305.

19) Garcia-Sucerquia J., Xu W.B., Jericho S.K. et al. Digital in-line holographic microscopy // Opt. 2006. P. 836–850.

20) Persson S., Digital Holography and Cell Studies. In Holography-Basic Principles and Contemporary URL: https://www.intechopen.com/chapters/13853 (дата звернення 04.06.2025).