

Оценка уровня шумов фазовых изображений, получаемых с помощью сдвигового интерференционного микроскопа

М. И. ЛАТУШКО

Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: latushko@vniiofi.ru

Описана методика оценки уровней пространственных и временных шумов фазовых изображений, полученных на сдвиговом интерференционном микроскопе. Приведены экспериментальные результаты при работе микроскопа с когерентным лазерным и низкокогерентным светодиодным излучениями.

Ключевые слова: метод фазовых шагов, сдвиговый интерферометр, интерференционный микроскоп, уровень пространственных и временных шумов.

A method of estimation of spatial and temporal noise levels of phase images acquired by means of shearing interference microscope is described. Experimental results for microscope operating with coherent laser and low-coherent LED radiation are presented.

Key words: phase stepping method, shearing interferometer, interference microscope, spatial and temporal noise levels.

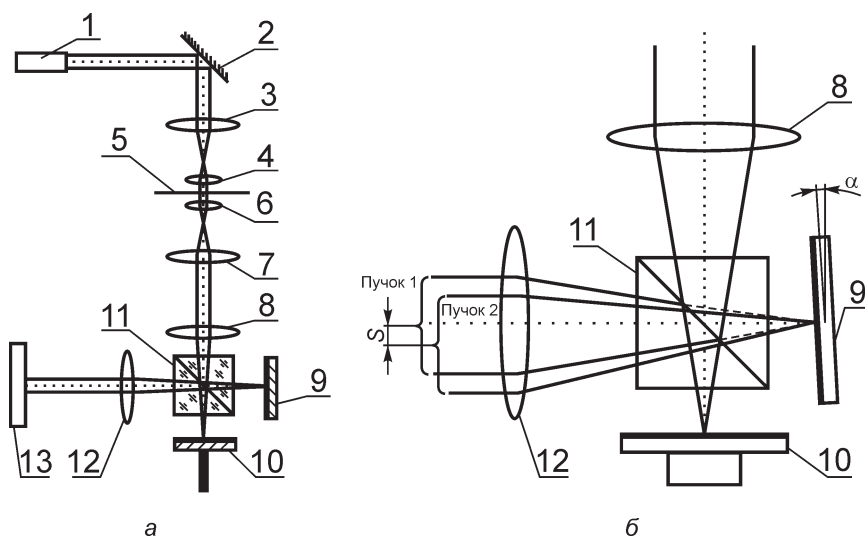
Исследуемые на интерференционных микроскопах фазовые объекты, прозрачные для излучения видимого оптического диапазона, широко распространены как в промышленности, так и биологии, медицине. К ним относят различные полимерные пленки, кристаллы, оптические микродегали, оптоволоконные изделия. Такие объекты практически не поглощают свет и характеризуются трехмерным пространственным распределением показателя преломления, связанным с плотностью, температурой, концентрацией и другими физическими параметрами. Особый интерес представ-

ляют как живые биологические клетки, так и фиксированные. Измерения характеристик подобных объектов методами интерференционной микроскопии подробно описаны в [1, 2].

Развитие оптической томографии клеток вызвало повышение требований к точности измерений. Один из способов удовлетворения подобных требований был предложен в [3], где описана работа сдвигового интерференционного микроскопа общего пути с расшифровкой интерферограмм методом фазовых шагов, позволяющего исследовать клетки в проходящем излучении.

Цель настоящей работы — оценка уровня пространственных и временных шумов фазовых изображений, получаемых при работе с различными источниками излучения в сдвиговом интерферометре. Оцениваемые параметры характеризуют точность восстановления оптической разности хода (ОРХ) и их необходимо учитывать во время длительных измерений определенной клетки или группы клеток.

Экспериментальная установка. На рисунке, а представлена схема сдвигового интерференционного микроскопа общего пути [3]. С помощью оптических компонентов 3, 4 формируется параллельный световой пучок, полученный от источника излучения 1, далее направляемый на исследуемый образец 5. Изображение образца на выходе микроскопа, состоящего из микрообъектива 6 и объектива 7, попадает на вход 4f-системы, образованной объективами 8, 11. Внутри 4f-системы в общей фокальной плоскости расположен сдвиговый интерферометр общего пути, конструктивно выполненный в виде светоделиителя 11, зеркала на пьезодвигателе 10 и зеркала в кинемати-



Принципиальные схемы интерференционного микроскопа (а) и сдвигового интерферометра общего пути (б):

1 — излучатель; 2 — зеркало; 3, 7, 8, 12 — объективы; 4, 6 — микрообъективы; 5 — исследуемый образец; 9 — зеркало в кинематической оправе; 10 — пьезозеркало; 11 — светоделиитель; 13 — ПЗС-матрица

ческой оправе 9, повернутого на малый угол α относительно оптической оси, что обеспечивает малый поперечный сдвиг S на выходе между пучками (см. рисунок, б). Сдвиговый интерферометр работает на бесконечно широкой интерференционной полосе и для реконструкции двумерного распределения градиента ОРХ вдоль направления сдвига интерферирующих пучков в фоновом изображении $\Delta(x, y)$ применяют метод фазовых шагов.

Методика оценки уровня шумов. В ходе многократно повторяющихся измерений фазового объекта необходимо определить, с какой погрешностью воспроизводится значение ОРХ в произвольной точке поля зрения. Для этого оценивают уровень пространственно-временных шумов, называемый пространственно-временной стабильностью [4, 5]. При отсутствии неоднородностей ОРХ будет постоянна для двух плоских волн, сходящихся под нулевым углом. Как следствие, яркость интерференционной картины в любой точке ПЗС-матрицы (x, y) будет одинаковой. В реальном эксперименте невозможно добиться равномерной яркости интерференционной картины, поскольку возникают искажения волновых фронтов интерферирующих пучков, которые могут носить как постоянный, не зависящий от времени, так и случайный характер.

Пространственные искажения обусловлены аберрациями оптических элементов системы и различными загрязнениями. Временные искажения возникают при отклонении параметров пьезоэлемента от заданного значения, а также из-за температурных флуктуаций воздуха в плечах интерферометра. Для оценки уровня пространственных шумов в пределах одного фазового изображения k размером $N \times M$ рассчитывают среднее квадратическое отклонение (СКО) ОРХ:

$$\Omega_S^k = \sqrt{\frac{1}{NM} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M [\Delta^k(x, y) - \bar{\Delta}^k]^2},$$

где $\Delta^k(x, y)$ — ОРХ в точке с координатами (x, y) на k -м изображении; $\bar{\Delta}^k = \frac{1}{NM} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M \Delta^k(x, y)$ — среднее значение ОРХ

в пределах k -го изображения.

Затем по всем полученным фазовым изображениям вычисляют среднее значение СКО ОРХ, которое является уровнем пространственных шумов:

$$\Omega_S = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \Omega_S^k. \quad (1)$$

Уровень временных шумов в точке с фиксированными координатами (x, y) , рассчитанный по всем полученным фазовым изображениям $k = 1, 2, \dots, K$:

$$\Omega_T(x, y) = \sqrt{\frac{1}{K} \sum_{k=1}^K [\Delta^k(x, y) - \bar{\Delta}_{x,y}]^2}, \quad (2)$$

где $\bar{\Delta}_{x,y} = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \Delta^k(x, y)$ — среднее значение ОРХ в данной точке по всем полученным изображениям.

Для оценки уровня временных шумов значение (2) усредняют по всем точкам:

$$\Omega_T = \frac{1}{NM} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M \Omega_T(x, y). \quad (3)$$

Для экспериментальной оценки уровня шумов предварительно устанавливают покровное стекло без клеток; затем получают набор интерферограмм, по которым восстанавливают фазовое изображение фона.

Экспериментальные результаты. Были выполнены три измерения, каждое из которых содержало 50 фазовых изображений фона. В качестве источников излучения в каждом измерении соответственно использовали лазер, излучающий на длине волны 532 нм, тот же лазер, но с дополнительным быстровращающимся матовым диском на пути лазерного пучка, точечный светодиод KED080RAXH 650 нм (Kyosemi, Japan).

После обработки по формулам (1), (3) фазовых изображений, полученных при работе в лазерном свете, уровни пространственных шумов составили 8,2 нм, временных 1,5 нм. Когда лазерное излучение проходит через быстровращающийся матовый диск уровень пространственных шумов снижается до 2,4 нм, временных до 1,3 нм. При переходе на излучение светодиода уровень пространственных шумов падает еще в два раза до 1,2 нм, а между фазовыми изображениями ОРХ в каждом пикселе до 0,5 нм. Такое отличие объясняется тем, что для лазерного излучения характерна большая длина временной когерентности, приводящая к возникновению спекл-структуры на фазовом изображении. Из-за этого появляются ощутимые вариации ОРХ в пределах одного фазового изображения. Установкой быстровращающегося матового диска снижают уровень пространственных шумов, однако при этом усложняется оптическая схема и появляется вибрация, негативно сказывающаяся на работе всей оптической системы.

Применение точечного светодиода, являющегося источником низкокогерентного излучения, уменьшает почти на порядок уровень пространственных шумов. Уровень временных шумов не имеет ощутимого разброса при работе с различными источниками излучения, поскольку оптические неоднородности во времени не изменяются, следовательно в любой момент времени в конкретной точке будет фиксироваться одно и то же искажение волнового фронта. Кроме того, временные шумы обусловлены гистерезисом пьезодвигателя, у которого отсутствует обратная связь, что приводит к несоответствию между задаваемым и действительным значениями фазовых шагов при работе алгоритма.

Для пространственных шумов наблюдается больший разброс значений при работе с разными излучателями. Отклонение ОРХ в различных частях волнового фронта в пределах поля зрения варьируется, поэтому среднее отклонение в пределах одного изображения оказывается больше, чем отклонение во времени в фиксированной точке по набору фазовых изображений, полученных в разные моменты времени.

В [4] приведены оценки уровня пространственных и временных шумов, составившие 0,3 и 0,03 нм, соответственно. Авторы проводили исследования биологических объектов на модифицированном фазово-контрастном микроскопе Цернике в свете галогеновой лампы, где в качестве фазосдвигающего устройства применяли жидкокристаллический модулятор.

В исследованиях [5] также использована оптическая схема на базе интерферометра Майкельсона, которая работает с лазерным излучением сверхширокого спектра. На фазовых изображениях, реконструируемых методом Фурье, уровень пространственных шумов составляет 0,6 нм, временных 0,5 нм.

Выводы. Получена оценка уровня шумов при работе установки с тремя различными источниками излучения. Минимальный уровень достигнут в низкокогерентном излучении точечного светодиода: 1,2 нм для пространственных шумов, 0,5 нм для временных. Физический смысл данных параметров заключается в предельной чувствительности к изменению оптической разности хода как в пределах одного изображения, так и между изображениями в серии. Из приведенных результатов можно сделать вывод, что для получения фазовых изображений биологических объектов с малым уровнем шумов предпочтительно использовать источники низкокогерентного излучения. При работе в высококогерентном лазерном свете возникает спекл-структура, которая препятствует высокой детализации исследуемых объектов.

Потенциально можно еще снизить шумы, возникающие из-за недостаточной жесткости конструкции интерферометра, нестабильности источника напряжения светодиода, тепловых шумов ПЗС-матрицы и отсутствия обратной связи

пьезодвигателя, необходимой для четкого выставления фазовых шагов при многократно повторяющихся измерениях.

Л и т е р а т у р а:

1. Вишняков Г. Н., Левин Г. Г., Минаев В. Л., Цельмина И. Ю. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Экспериментальные результаты // Оптика и спектроскопия. 2014. Т. 116. № 1. С. 170—175.
2. Левин Г. Г., Вишняков Г. Н., Минаев В. Л. Автоматизированный интерференционный микроскоп для измерения динамических объектов // Приборы и техника эксперимента. 2014. № 1. С. 79—84.
3. Vishnyakov G., Levin G., Minaev V., Nekrasov N. Advanced method of phase shift measurement from variances of interferogram differences // Appl. Opt. 2015. V. 54. N. 15. P. 4797—4804.
4. Nguyen T. H., Popescu G. Spatial Light Interference Microscopy (SLIM) using twisted-nematic liquid-crystal modulation // Biomed. Opt. Express. 2013. V. 4. N. 9. P. 1571—1583.
5. Girshovitz P., Shaked N. T. Compact and portable low-coherence interferometer with off-axis geometry for quantitative phase microscopy and nanoscopy // Opt. Express. 2013. V. 21. N. 5. P. 5701—5714.

Дата принятия 27.07.2015 г.

681.723.26

Сдвиговой интерференционный микроскоп с расшифровкой дифференциальных фазовых изображений живых клеток методом фазовых шагов

М. И. ЛАТУШКО, Г. Н. ВИШНЯКОВ, Г. Г. ЛЕВИН

Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: latushko@vniiofi.ru

Предложена схема низкокогерентного интерференционного микроскопа, построенного на базе сдвигового интерферометра общего пути, для получения дифференциальных фазовых изображений биологических объектов. При реконструкции таких изображений использован метод фазовых шагов. Приведены результаты экспериментальных исследований эритроцитов крови человека.

Ключевые слова: метод фазовых шагов, сдвиговой интерферометр, интерференционный микроскоп, низкокогерентное излучение, живые клетки.

An optical circuit of low-coherent interference microscope based on a common path shearing interferometer for acquiring the differential phase images of biological objects is proposed. A phase steps method is used for reconstruction of differential phase image of an object. The results of human erythrocyte experimental study are presented.

Key words: phase steps method, shearing interferometer, interference microscope, low-coherence radiation, living cells.

Среди современных методов исследований биологических микрообъектов особое место занимают те, которые позволяют работать с живыми клетками без повреждения пос-

ледних. Большинство биологических объектов слабо поглощают проходящее через них излучение, поскольку являются прозрачными, т. е. фазовыми объектами. Ввиду незначитель-