

ДЕФОКУСИРОВКА И ЧИСЛЕННАЯ ФОКУСИРОВКА В ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ С ШИРОКИМ ВРЕМЕННЫМ СПЕКТРОМ ПОЛЯ ОСВЕЩЕНИЯ

А.А. Гребенюк^{1,2}, В.П. Рябухо^{1,2}

¹Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов, Россия,

²Саратовский государственный университет, Саратов, Россия

Аннотация

Представлен анализ влияния освещения с широким временным спектром на свойства расфокусированного интерференционного сигнала и численно сфокусированной визуализации в интерференционной микроскопии. Показано, что отличия во влиянии дефокусировки на различные спектральные компоненты сигнала с широким временным спектром могут приводить к ухудшению изображений расфокусированных частей объекта, несмотря на использование численной фокусировки. Величина этих эффектов зависит от ширины временного спектра, числовой апертуры изображающей системы и величины дефокусировки. Рассмотрено влияние этих эффектов на свойства численно сфокусированной визуализации в оптической когерентной томографии/микроскопии в фурье-области.

Ключевые слова: интерференционная микроскопия, оптическая когерентная томография, методы восстановления изображений, численная фокусировка.

Цитирование: Гребенюк, А.А. Дефокусировка и численная фокусировка в интерференционной микроскопии с широким временным спектром поля освещения / А.А. Гребенюк, В.П. Рябухо // Компьютерная оптика. – 2016. – Т. 40, № 6. – С. 772-780. – DOI: 10.18287/2412-6179-2016-40-6-772-780.

Введение

Системы интерференционной микроскопии с цифровой записью интерференционных сигналов предоставляют возможность численной фокусировки, т.е. получения резких изображений расфокусированных объектов путем специальной численной обработки сигнала [1–17]. Численная фокусировка на основе различных подходов используется в различных методах интерференционной микроскопии, таких как цифровая голографическая микроскопия (ЦГМ) [1–4], оптическая когерентная томография/микроскопия (ОКТ/ОКМ) [5–16], дифракционная фазовая микроскопия (ДФМ) [17].

Одним из основных параметров в алгоритмах численной фокусировки является длина волны или временная частота волнового поля. Однако некоторые системы интерференционной микроскопии используют освещение с широким спектром временных частот (временным спектром) для селекции сигнала по глубине (ОКТ/ОКМ во временной области [6, 18, 19]) или снижения когерентных шумов (например, ДФМ [20, 21]). В этих системах численная фокусировка может быть использована для различных задач. Например, в ОКТ/ОКМ во временной области численная фокусировка может быть использована для решения проблемы расхождения положения окна временной когерентности и положения фокуса при визуализации внутренней структуры объекта, показатель преломления которого отличается от показателя преломления иммерсии [6].

В системах ОКТ/ОКМ в фурье-области записывается множество квазимонохроматических сигналов с различными центральными частотами. Это позволяет проводить численную фокусировку отдельно для каждого квазимонохроматического сигнала, комбинируя их после этого в результирующий сигнал с ши-

роким временным спектром, обладающий свойством продольной селекции [11, 14–16]. Однако такой подход требует большого объема вычислений для получения каждого трехмерного изображения. Для увеличения скорости вычислений могут быть использованы различные методы [8–10, 12–14, 16]. Значительного увеличения скорости вычислений можно добиться путем инверсии порядка этих операций: получить низкокогерентный сигнал с широким временным спектром на множестве глубин (путем фурье-преобразования массива данных по частоте), а затем к этому сигналу применить алгоритм численной фокусировки [12, 13].

Данная работа посвящена анализу влияния освещения с широким временным спектром на свойства расфокусированного интерференционного сигнала и численно сфокусированной визуализации в интерференционной микроскопии. В параграфе 1 проведен теоретический анализ формирования сигнала когерентности в интерференционном микроскопе с пространственно когерентным освещением объекта плоской волной с широким временным спектром, распространяющейся вдоль оптической оси (под сигналом когерентности понимается часть полного сигнала интерференционного микроскопа, соответствующая функции взаимной когерентности объектного и опорного полей). В параграфах 2 и 3 показано, что отличия во влиянии дефокусировки на различные спектральные компоненты сигнала с широким временным спектром могут приводить к ухудшению изображений расфокусированных частей объекта, несмотря на использование численной фокусировки. Величина этих эффектов зависит от различных параметров, таких как ширина временного спектра сигнала когерентности, величина числовой апертуры изображающей системы и величина дефокусировки.

1. Формирование сигнала когерентности с широким временным спектром

Рассмотрим изображающую часть системы интерференционного микроскопа, представленную на рис. 1.

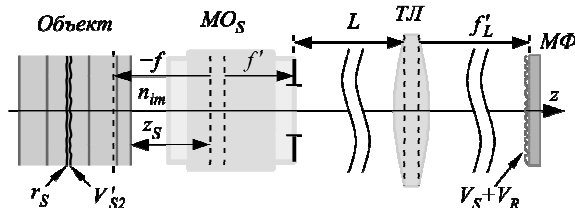


Рис. 1. Анализируемая часть системы интерференционного микроскопа

В случае схемы на отражение объект освещается плоской волной со стороны микрообъектива, что может быть достигнуто путем фокусировки освещающего поля в задний фокус микрообъектива МО_s (как, например, в [9, 12–14]). Отраженное от объекта поле проходит через микрообъектив МО_s с задним фокусным расстоянием f' , тубусную линзу ТЛ с задним фокусным расстоянием f'_L и падает на матричный фотодетектор МФ (n_{im} – показатель преломления иммерсии, f – переднее фокусное расстояние микрообъектива, z_s – расстояние между поверхностью объекта и передней главной плоскостью микрообъектива, L – расстояние между задней фокальной плоскостью микрообъектива (в которой также находится его выходной зрачок) и передней главной плоскостью тубусной линзы).

Рассмотрим компоненту отраженного от объекта поля с круговой временной частотой ω , соответствующую отражению от границы раздела с поперечной структурой амплитудного коэффициента отражения $r_s(\omega; x_s, y_s)$, расположенной под N плоскопараллельными слоями объекта с толщинами $\{\Delta z_j\}$ и показателями преломления $\{n_j\}$. Обозначим комплексную амплитуду поля, формируемого непосредственно после отражения от этой границы, через V'_{S2} . Комплексную амплитуду плоской волны, падающей на границу раздела r_s , обозначим через $V_0(\omega)B_S(\omega)$, где $V_0(\omega)$ соответствует комплексной амплитуде поля освещения в некоторой точке до разделения пучков на объектный и опорный (или после разделения при условии идентичности объектного и опорного полей), а $B_S(\omega)$ определяется амплитудно-фазовыми изменениями V_0 при распространении до границы r_s . Тогда

$$V'_{S2}(\omega; x_s, y_s) = V_0(\omega)B_S(\omega)r_s(\omega; x_s, y_s). \tag{1}$$

Связь комплексной амплитуды «эффektivного» поля в передней фокальной плоскости микрообъектива V_f с V'_{S2} можно описать в соответствии с [22, 23] следующим образом:

$$\begin{aligned} \tilde{V}_f(\omega; k_x, k_y) &= \tilde{V}'_{S2}(\omega; k_x, k_y) \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; k_x, k_y) \right] \times \\ &\times \exp \left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \sqrt{k^2 n_j^2 - k_x^2 - k_y^2} \right], \end{aligned} \tag{2}$$

где $k = \omega/c$, $n_0 = n_{im}$, $\Delta z_0 = z_s - |f|$, $t_{j,j-1}$ – амплитудный коэффициент пропускания границы раздела j и $j-1$ слоев, тильда обозначает поперечный пространственный спектр соответствующей функции.

Опорное поле может быть сформировано различными способами, для общности запишем выражение для его комплексной амплитуды в следующем виде:

$$V_R(\omega; x, y) = V_0(\omega)B_R(\omega; x, y), \tag{3}$$

где функция $B_R(\omega; x, y)$ определяется амплитудно-фазовыми изменениями V_0 при распространении в опорном плече до плоскости регистрации.

Выражения для спектральной плотности освещающего поля I_0 и взаимной спектральной плотности объектного и опорного полей в плоскости регистрации Γ могут быть записаны в виде [23]

$$\langle V_0(\omega)V_0^*(\omega') \rangle = 2\pi\delta(\omega - \omega')I_0(\omega), \tag{4}$$

$$\langle V_S(\omega; x, y)V_R^*(\omega'; x, y) \rangle = 2\pi\delta(\omega - \omega')\Gamma(\omega; x, y). \tag{5}$$

Используя выражения (1)–(5), а также выражение для связи комплексной амплитуды объектного поля в плоскости регистрации $V_S(\omega; x, y)$ с комплексной амплитудой «эффektivного» поля V_f из [22, 24], получим следующее выражение для взаимной спектральной плотности Γ :

$$\begin{aligned} \Gamma(\omega; x, y) &\approx I_0(\omega)B_S^*(\omega)B_R^*(\omega; x, y)\mu_i(\omega; x, y) \times \\ &\times (f'_L/k)^2 \iint \tilde{r}_s(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \times \\ &\times \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] \exp \left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \times \right. \\ &\times \sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} \left. \right] A(\omega; -f'_L(k_x/k), -f'_L(k_y/k)) \times \\ &\times \exp[i(k_x x + k_y y)] dk_x dk_y, \end{aligned} \tag{6}$$

где $M = f'_L / f'$ – поперечное увеличение изображающей части системы (по модулю), A – апертурная функция микрообъектива, μ_i – амплитудно-фазовый коэффициент [22, 24]. В выражении (6) и далее в данной статье используются бесконечные пределы интегрирования, если явно не указано иное. Использованное выражение для V_S не учитывает в явном виде фазовый набег, связанный с толщиной линз, а также спектральную зависимость пропускания некоторых оптических элементов в изображающей системе. Однако при необходимости это можно учесть дополнительным множителем; для краткости его произведение на $B_S(\omega)$ обозначено через $B'_S(\omega)$.

Далее будем считать, что интерференционный микроскоп отъюстирован таким образом, что у функции $B_R^*(\omega; x, y)\mu_i(\omega; x, y)$ нет поперечной структуры, т.е. зависимости от x и y , или, что такая структура была устранена численно, как, например, устраняется линейная фазовая модуляция при использовании режима внеосевой голографии.

Эффекты дефокусировки в интерференционной микроскопии могут проявляться совместно с эффек-

том продольной селекции сигнала (по глубине) окном временной когерентности (или, в немного другой терминологии, окном временного спектра [24]). Будем считать, что интерференционный микроскоп отъюстирован таким образом, что положение окна временной когерентности совпадает с плоскостью визуализируемой структуры в объекте, т.е.

$$B'_S(\omega)B_R^*(\omega;0,0)\mu_i(\omega;0,0)\exp\left[ik\sum_{j=0}^N n_j \Delta z_j\right] = \\ = \left|B'_S(\omega)B_R^*(\omega;0,0)\mu_i(\omega;0,0)\right|. \quad (7)$$

Отметим, что в ОКТ/ОКМ в фурье-области записывается множество квазимонохроматических сигналов с различными центральными частотами, каждый из которых можно приближенно (пренебрегая шириной спектра отдельного сигнала) считать пропорциональным $\Gamma(\omega; x, y)$ с соответствующей величиной ω . Это позволяет проводить численную обработку каждого из таких сигналов по отдельности – до комбинации в результирующий сигнал с широким временным спектром. Поэтому в случае ОКТ/ОКМ в фурье-области и устранение поперечной структуры в $B_R^*(\omega; x, y)\mu_i(\omega; x, y)$, и смещение положения окна временной когерентности на нужную глубину может быть произведено численно, без дополнительной юстировки оптической схемы.

Соответствующий сигнал взаимной спектральной плотности можно записать в следующем виде:

$$\Gamma'(\omega; x, y) \approx I_{0\Gamma}(\omega)(M/(2\pi)^2) \times \\ \times \left[\int \tilde{r}_S(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] \times \\ \times \exp\left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \left(\sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} - kn_j \right) \right] \times \\ \times A\left(\omega; -f'_L \frac{k_x}{k}, -f'_L \frac{k_y}{k} \right) \exp[i(k_x x + k_y y)] dk_x dk_y, \\ I_{0\Gamma}(\omega) = I_0(\omega) \left| B'_S(\omega) B_R^*(\omega; 0, 0) \right| \eta(\omega), \quad (8) \quad (9)$$

$\eta(\omega)$ – спектральная чувствительность фотодетектора.

Полный сигнал когерентности, получаемый при использовании освещения с широким временным спектром или в результате численной комбинации множества квазимонохроматических сигналов (как в ОКТ/ОКМ в фурье-области), представляет собой массив отсчетов, пропорциональных [23, 24]

$$\Gamma^{(i)}(x, y) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\infty \Gamma'(\omega; x, y) d\omega. \quad (10)$$

В случае ОКТ/ОКМ в фурье-области вместо интеграла в (10) следовало бы записать сумму конечного количества отсчетов Γ' , однако, поскольку в рамках данной работы эффекты дискретизации не представляют первоочередного интереса, для простоты анализа здесь и далее используются непрерывные преобразования.

Отметим, что выражения, аналогичные (8)–(10), можно получить при рассмотрении схемы на пропускание с плоской волной освещения, падающей слева на объект на рис. 1. В этом случае вместо амплитудного коэффициента отражения визуализируемой границы $r_S(\omega; x_S, y_S)$ необходимо подставить ее амплитудный коэффициент пропускания $t_S(\omega; x_S, y_S)$.

Кроме того, сходные выражения можно получить и в случае ДФМ с пространственно когерентным освещением (или с очень малой числовой апертурой освещения [21]) (с точностью до некоторых отличий, таких как дополнительный переворот и дополнительное увеличение изображения в дифракционном фазовом модуле). В ДФМ условие (7) выполняется в силу самой конструкции схемы.

2. Влияние дефокусировки на сигнал когерентности с широким временным спектром

Рассмотрим пространственный спектр сигнала когерентности $\Gamma^{(i)}(x, y)$:

$$\tilde{\Gamma}^{(i)}(k_x, k_y) = \iint \Gamma^{(i)}(x, y) \exp[-i(k_x x + k_y y)] dx dy. \quad (11)$$

Для анализа дефокусировки и численной фокусировки представим $\tilde{\Gamma}^{(i)}(k_x, k_y)$ в виде произведения поперечного пространственного спектра визуализируемой структуры на некоторый множитель (т.е. предположим инвариантность импульсного отклика в поперечном направлении в пределах рассматриваемой части поля зрения). Для этого используем следующее приближение:

$$r_S(\omega; x_S, y_S) \approx r_{S\omega}(\omega) r'_S(x_S, y_S) \quad (12)$$

(условие (12) должно выполняться только в пределах ненулевых значений $I_{0\Gamma}(\omega)$). Получим

$$\tilde{\Gamma}^{(i)}(k_x, k_y) \approx \tilde{r}'_S(-Mk_x, -Mk_y) \Xi_B(k_x, k_y), \quad (13)$$

$$\Xi_B(k_x, k_y) = \frac{M}{2\pi} \int_0^\infty I'_{0\Gamma}(\omega) A\left(\omega; -f'_L \frac{k_x}{k}, -f'_L \frac{k_y}{k} \right) \times$$

$$\times \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] \times \quad (14)$$

$$\times \exp\left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \left(\sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} - kn_j \right) \right] d\omega,$$

$$I'_{0\Gamma}(\omega) = I_{0\Gamma}(\omega) r_{S\omega}(\omega). \quad (15)$$

Функция $\Xi_B(k_x, k_y)$ определяет пространственный спектр импульсного отклика (функции рассеяния точки (ФРТ)) в поперечном направлении сигнала когерентности. Как видно из выражения (14), при равенстве нулю величины $k_\perp = (k_x^2 + k_y^2)^{1/2}$ экспонента в подынтегральном выражении в (14) обращается в единицу. При увеличении k_\perp эта экспонента создает фазовую модуляцию по ω , что может привести к уменьшению величины интеграла по ω , т.е. ослаблению высоких поперечных пространственных частот с дефокусировкой и, соответственно, снижению поперечного разрешения. Эта фазовая модуляция по ω для

$k_{\perp} > 0$ может быть частично скомпенсирована изменением разности хода плеч, соответствующим положению окна временного спектра, отличающемуся от определяемого выражением (7) (частично, т.к. эта фазовая модуляция не является линейной по ω). Это означает, что в системах ОКТ/ОКМ высокие поперечные пространственные частоты не пропадают в дефокусированном сигнале полностью – искажается положение соответствующих компонент сигнала в получаемом трехмерном изображении в продольном направлении (по глубине).

Для проведения численной фокусировки для центральной временной частоты необходимо умножить $\tilde{\Gamma}^{(t)}(k_x, k_y)$ на фазовый множитель

$$\exp \left[-i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \left(\sqrt{k_0^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} - k_0 n_j \right) \right], \quad (16)$$

где $k_0 = \omega_0 / c$, ω_0 – центральная частота для $I'_{0\Gamma}(\omega)$, а затем выполнить двумерное преобразование Фурье полученной функции (точнее, полученного массива). Соответствующий пространственный спектр запишется в виде, аналогичном (13), где вместо $\Xi_B(k_x, k_y)$ необходимо записать

$$\begin{aligned} \Xi_{Bnf}(k_x, k_y) &= \frac{M}{2\pi} \int_0^{\infty} I'_{0\Gamma}(\omega) A \left(\omega; -f'_L \frac{k_x}{k}, -f'_L \frac{k_y}{k} \right) \times \\ &\times \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] \times \\ &\times \exp \left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \left(\sqrt{k_0^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} - kn_j - \right. \right. \\ &\left. \left. - \sqrt{k_0^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} + k_0 n_j \right) \right] d\omega. \end{aligned} \quad (17)$$

Из выражения (17) видно, что коррекция фазовой модуляции в подынтегральном выражении произошла только для центральной частоты ω_0 ; для других частот ω может наблюдаться остаточная фазовая модуляция по (k_x, k_y) , которая также может приводить к снижению поперечного разрешения в сигнале когерентности.

3. Численное моделирование сигнала когерентности с широким временным спектром

Для более подробного анализа влияния ширины временного спектра освещения (точнее, ширины функции $I'_{0\Gamma}(\omega)$, определяемой помимо спектра освещения свойствами оптических элементов, спектральной чувствительностью фотодетектора и свойствами визуализируемого объекта) было проведено численное моделирование, результаты которого представлены на рис. 2–7. Для моделирования использовалась прямоугольная функция $I'_{0\Gamma}(\omega)$ с параметрами, соответствующими центральной длине волны $\lambda_0 = 850$ нм и ширине в шкале длин волн $\Delta\lambda = 40$ нм (рис. 2а, 3а, 4а и 5а) и $\Delta\lambda = 100$ нм (рис. 2б, 3б, 4б, 5б, 6а, 6б и 7). Числовая апертура микрообъек-

тива $NA = 0,4$, в качестве апертурной функции $A(\omega; x_0, y_0)$ рассматривалась функция-круг (относительно (x_0, y_0)), не зависящая от ω . Анализировалась визуализация структуры, расположенной под одним слоем объекта толщиной Δz_1 с показателем преломления $n_1 = 1,33$; поверхность объекта расположена в передней фокальной плоскости микрообъектива (т.е. $\Delta z_0 = 0$). Зависимость $t_{1,0}$ от $(\omega; k_x, k_y)$ не учитывалась.

На рис. 2 представлены зависимости модуля функции Ξ_B от нормированной поперечной пространственной частоты, определенной аналогично [16], $k'_\perp = Mk_\perp / k_0$. На рис. 3 представлены аналогичные зависимости для аргумента функции Ξ_{Bnf} . На рис. 4 и 5 представлены зависимости модуля импульсного отклика в поперечном направлении, масштабированного к пространству предметов, от $\rho_s = (x_s^2 + y_s^2)^{1/2}$ при численной фокусировке в соответствии с выражениями (16) и (17) в двух вариантах нормировки.

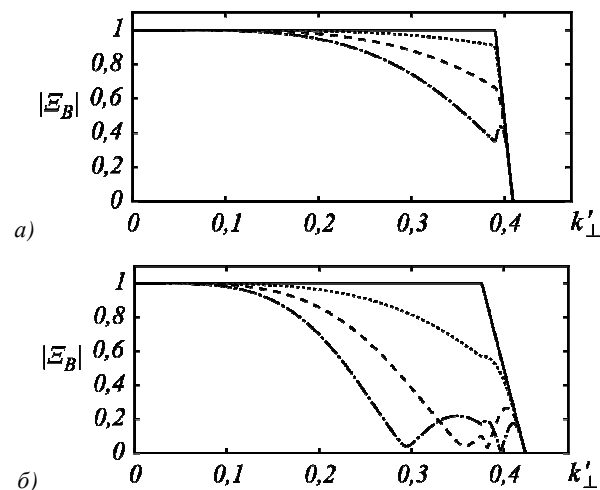


Рис. 2. Зависимость модуля Ξ_B от нормированной поперечной пространственной частоты

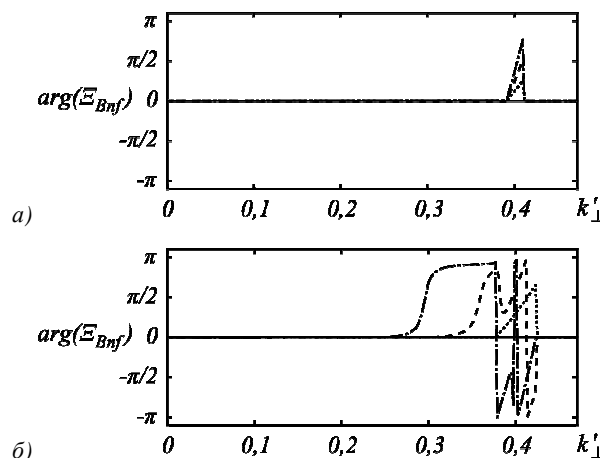


Рис. 3. Зависимость аргумента Ξ_{Bnf} от нормированной поперечной пространственной частоты

На всех рис. 2–7 сплошная линия соответствует $\Delta z_1 = 0$ (т.е. отсутствию дефокусировки), пунктирная линия: $\Delta z_1 = 70$ мкм, штриховая линия: $\Delta z_1 = 140$ мкм, штрихпунктирная линия: $\Delta z_1 = 210$ мкм.

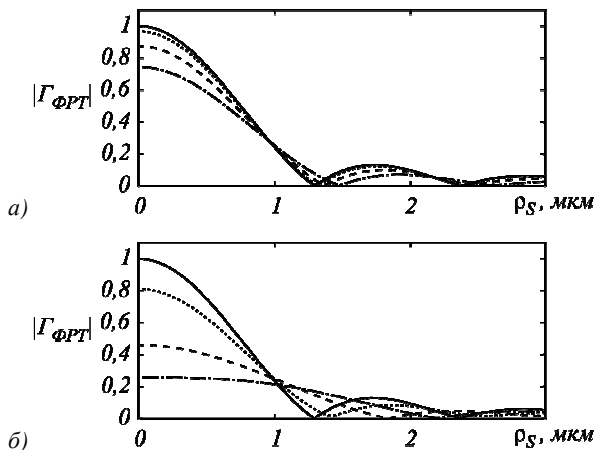


Рис. 4. Форма импульсного отклика в поперечном направлении, масштабированного к пространству предметов (нормировка на единичный максимум при $\Delta z_1 = 0$)

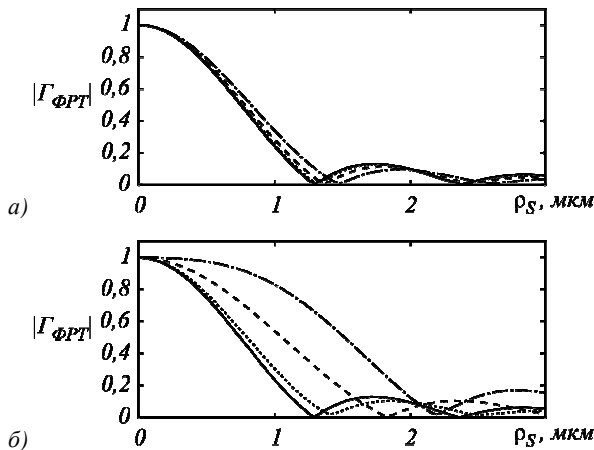


Рис. 5. Форма импульсного отклика в поперечном направлении, масштабированного к пространству предметов (нормировка на единичный максимум для каждой величины Δz_1)

Как видно из рис. 2, отличие фазовых модуляций пространственного спектра компонент с различной временной частотой может приводить к ослаблению пространственного спектра результирующего сигнала с широким временным спектром на высоких пространственных частотах. С увеличением диапазона детектируемых поперечных пространственных частот (а значит, с увеличением числовой апертуры используемого микрообъектива) значение этого эффекта возрастает. Кроме того, как видно из рис. 3, численная фокусировка на основе коррекции фазы для центральной временной частоты может не приводить к полной коррекции фазовой модуляции поперечного пространственного спектра в случае использования широкого временного спектра.

Эти эффекты ведут к ослаблению сигнала (рис. 4) и расширению импульсного отклика в поперечном направлении, т.е. снижению поперечного разрешения (рис. 5).

Для более эффективной численной фокусировки такого сигнала возможно использование подхода с

полной коррекцией фазовой модуляции Ξ_B , по аналогии с [15, 16, 25]. Для этого необходимо умножить пространственный спектр сигнала $\tilde{\Gamma}^{(i)}(k_x, k_y)$ на функцию коррекции

$$\Psi_B(k_x, k_y) = \begin{cases} \frac{\Xi_B^*(k_x, k_y)}{|\Xi_B(k_x, k_y)|}, & \text{если } |\Xi_B(k_x, k_y)| > 0, \\ 0, & \text{если } |\Xi_B(k_x, k_y)| = 0, \end{cases} \quad (18)$$

и выполнить двумерное преобразование Фурье полученной функции (массива).

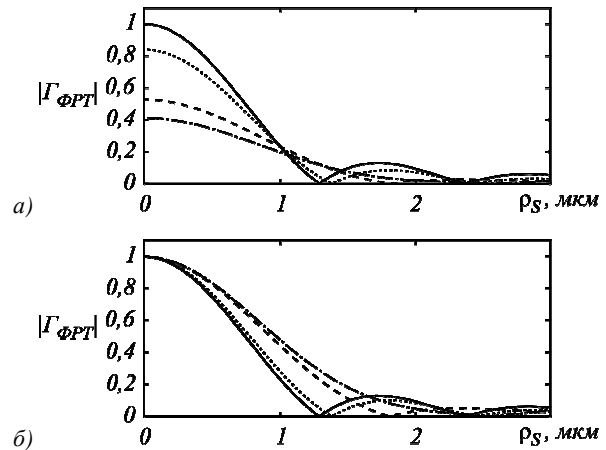


Рис. 6. Форма импульсного отклика в поперечном направлении, масштабированного к пространству предметов, при использовании численной фокусировки (18)

На рис. 6 приведены графики, иллюстрирующие использование такого подхода к численной фокусировке ($\Delta\lambda = 100$ нм). Рис. 6а соответствует нормировке на единичный максимум при $\Delta z_1 = 0$, а рис. 6б – нормировке на единичный максимум для каждого Δz_1 . Как видно из рис. 6, данный подход к численной фокусировке сигнала может быть более эффективным, однако не приводит к полной коррекции сигнала.

Результаты моделирования, представленные на рис. 2–6, соответствуют равенству оптических длин объектного и опорного плеч в соответствии с равенством (7). В ДФМ это соотношение определяется конструкцией схемы и не изменяется в процессе визуализации. В системах ОКТ/ОКМ, использующих сканирование разности хода (механическое или численное), эти эффекты приобретают более сложный характер. Как было отмечено выше, в случае дефокусировки положение окна временного спектра, соответствующее равенству (7), может не быть оптимальным для высоких поперечных пространственных частот. Рассмотрим случай немного отличающегося положения окна временного спектра путем внесения в подынтегральное выражение в (14) дополнительного множителя $\exp[-ik2n_1\Delta z_1]$ (в ОКТ/ОКМ это соответствует изменению глубины анализа сигнала в среде с показателем преломления n_1 на Δz_1). Соответствующие распределения модуля Ξ_B при $\Delta\lambda = 100$ нм представлены на рис. 7.

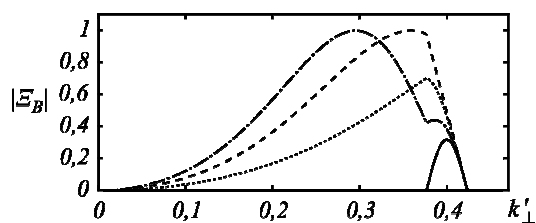


Рис. 7. Зависимость модуля E_B от нормированной поперечной пространственной частоты при смещении окна временного спектра ($\Delta z_1 = 2,7$ мкм)

Как видно из рис. 2 и 7, с точки зрения ОКТ/ОКМ дефокусировка привела не столько к исчезновению компонент сигнала, соответствующих высоким поперечным пространственным частотам, сколько к смещению соответствующего им сигнала по глубине, т.е. специфическому размытию сигнала в продольном направлении. При трехмерной визуализации объектов в ОКТ/ОКМ это может приводить к смещению высоких поперечных пространственных частот с одной глубины объекта и низких – с другой.

Отметим, что этот эффект размытия сигнала связан именно с дефокусировкой. В ОКТ/ОКМ эффекты дефокусировки связаны с изменением оптической разности хода и могут проявляться наряду с эффектами дисперсии, которые в данной работе не рассматривались.

Заключение

В данной работе проведен теоретический анализ влияния освещения с широким временным спектром на свойства расфокусированного интерференционного сигнала и численно сфокусированной визуализации в интерференционной микроскопии. Показано, что при слишком большой ширине временного спектра и значительной дефокусировке отличия в изменении различных спектральных компонент сигнала при дефокусировке могут приводить к ухудшению изображений расфокусированных частей объекта, несмотря на использование численной фокусировки. Например, как видно из рис. 2 и 3, при $NA = 0,4$, $\lambda_0 = 850$ нм и ширине временного спектра $\Delta\lambda = 40$ нм искажение поперечного пространственного спектра сигнала когерентности осталось небольшим при всех рассмотренных величинах дефокусировки. При $\Delta\lambda = 100$ нм существенное искажение поперечного пространственного спектра произошло уже при величине дефокусировки $\Delta z_1 = 140$ мкм. Чем выше числовая апертура микрообъектива, тем меньше величина дефокусировки, при которой начинают проявляться эти эффекты.

При равенстве оптических длин объектного и опорного плеч в соответствии с (7) использование освещения с широким временным спектром может приводить к ослаблению высоких поперечных пространственных частот в сигнале когерентности от расфокусированных объектов и снижению поперечного разрешения. Этот эффект может проявляться, например, в системах ДФМ с микрообъективами с большими числовыми апертурами и ши-

роким временным спектром освещения, такими как в [21].

Этот эффект также можно рассматривать в качестве одного из механизмов снижения когерентных шумов при использовании освещения с широким временным спектром. Наличие частиц пыли или микроцарапин на оптических элементах приводит к появлению паразитных дифракционных картин в формируемых изображениях. Однако, если эти частицы удалены от положения фокуса (т.е. предметной плоскости), высокие поперечные пространственные частоты в соответствующих дифракционных картинах могут быть ослаблены за счет использования освещения с широким временным спектром.

При отклонении от равенства оптических длин объектного и опорного плеч использование широкого временного спектра может, наоборот, приводить к сохранению высоких поперечных пространственных частот при ослаблении низких (рис. 7). При трехмерной визуализации объектов в системах ОКТ/ОКМ это может приводить к смещению в получаемом 3D-изображении высоких поперечных пространственных частот с одной глубины объекта и низких – с другой, т.е. к ухудшению продольного разрешения.

В этом случае предпочтительным с точки зрения сочетания качества изображения и скорости обработки сигнала в ОКТ/ОКМ в фурье-области может быть комбинированный подход к обработке сигнала:

- 1) получение трехмерного сигнала с численной фокусировкой в С-режиме аналогично [10, 14];
- 2) дополнительная численная фокусировка полученного на первом шаге сигнала с широким временным спектром.

Иными словами, в этом случае индивидуальная коррекция дефокусировки для каждой спектральной компоненты производится лишь на первом этапе процедуры, т.е. для небольшого количества глубин. Для большей части глубин результирующего 3D-изображения численная фокусировка производится уже после применения фурье-преобразования по временной частоте, т.е. для сигнала с широким временным спектром. При этом отклонение от положений численных фокусов первого этапа процедуры оказывается достаточно небольшим. Отметим, что эффекты дисперсии также могут быть скорректированы в процессе обработки с численной фокусировкой в С-режиме для выбранных глубин.

В данной работе был проведен анализ свойств сигнала в интерференционных микроскопах с освещением объекта плоской волной, распространяющейся вдоль оптической оси. Сделанные выводы также справедливы для некоторых систем ЦГМ и ОКТ/ОКМ с пространственно частично когерентным освещением [16, 25] при малых числовых апертурах освещения NA_i (в силу сходства соответствующих сигналов при $NA_i \rightarrow 0$). В случае других типов освещения влияние широкого временного спектра освещения на свойства сигнала когерентности требует специального исследования.

Благодарности

Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-19-10528).

Литература

- 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. – Vol. 38(34). – P. 6994-7001. – DOI: 10.1364/AO.38.006994.
- 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. – Vol. 13(22). – P. 8693-8698. – DOI: 10.1364/OPEX.13.008693.
- 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. – Vol. 43(5). – P. 1131-1139. – DOI: 10.1364/AO.43.001131.
- Kemper, B.** Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection / B. Kemper, G. von Bally // *Applied Optics*. – 2008. – Vol. 47(4). – P. A52-A61. – DOI: 10.1364/AO.47.000A52.
- Massatsch, P.** Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy / P. Massatsch, F. Charrière, E. Cuche, P. Marquet, C.D. Depeursinge // *Applied Optics*. – 2005. – Vol. 44(10). – P. 1806-1812. – DOI: 10.1364/AO.44.001806.
- Min, G.** Numerical correction of distorted images in full-field optical coherence tomography / G. Min, J.W. Kim, W.J. Choi, B.H. Lee // *Measurement Science and Technology*. – 2012. – Vol. 23(3). – 035403 (9 p). – DOI: 10.1088/0957-0233/23/3/035403.
- Yu, L.F.** Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method / L.F. Yu, M.K. Kim // *Optics Letters*. – 2005. – Vol. 30(16). – P. 2092-2094. – DOI: 10.1364/OL.30.002092.
- Ralston, T.S.** Interferometric synthetic aperture microscopy / T.S. Ralston, D.L. Marks, P.S. Carney, S.A. Boppart // *Nature Physics*. – 2007. – Vol. 3. – P. 129-134. – DOI: 10.1038/nphys514.
- Marks, D.L.** Inverse scattering for frequency-scanned full-field optical coherence tomography / D.L. Marks, T.S. Ralston, S.A. Boppart, P.S. Carney // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2007. – Vol. 24(4). – P. 1034-1041. – DOI: 10.1364/JOSAA.24.001034.
- Hillmann, D.** Holography-holographic optical coherence tomography / D. Hillmann, C. Lührs, T. Bonin, P. Koch, G. Hüttmann // *Optics Letters*. – 2011. – Vol. 36(13). – P. 2390-2392. – DOI: 10.1364/OL.36.002390.
- Shabanov, D.V.** Broadband digital holographic technique of optical coherence tomography for 3-dimensional biotissue visualization / D.V. Shabanov, G.V. Geliknov, V.M. Gelikonov // *Laser Physics Letters*. – 2009. – Vol. 6(10). – P. 753-758. – DOI: 10.1002/lapl.200910052.
- Kumar, A.** Subaperture correlation based digital adaptive optics for full field optical coherence tomography / A. Kumar, W. Drexler, R.A. Leitgeb // *Optics Express*. – 2013. – Vol. 21(9). – P. 10850-10866. – DOI: 10.1364/OE.21.010850.
- Kumar, A.** Numerical focusing methods for full field OCT: a comparison based on a common signal model / A. Kumar, W. Drexler, R.A. Leitgeb // *Optics Express*. – 2014. – Vol. 22(13). – P. 16061-16078. – DOI: 10.1364/OE.22.016061.
- Grebenyuk, A.A.** Numerical correction of coherence gate in full-field swept-source interference microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Optics Letters*. – 2012. – Vol. 37(13). – P. 2529-2531. – DOI: 10.1364/OL.37.002529.
- Grebenyuk, A.A.** Numerical reconstruction of 3D image in Fourier domain confocal optical coherence microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies 2012*. – Bern Open Publishing. – 2013. – P. 1-5. – DOI: 10.12684/alt.1.60.
- Grebenyuk, A.** Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination / A. Grebenyuk, A. Federici, V. Ryabukho, A. Dubois // *Applied Optics*. – 2014. – Vol. 53(8). – P. 1697-1708. – DOI: 10.1364/AO.53.001697.
- Talaikova, N.A.** Numerical focusing in diffraction phase microscopy / N.A. Talaikova, A.A. Grebenyuk, A.L. Kalyanov, V.P. Ryabukho // *Proceedings of SPIE*. – 2016. – Vol. 9917. – 99171V. – DOI: 10.1117/12.2229881.
- Dubois, A.** Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2 μm wavelength region / A. Dubois, G. Moneron, C. Boccara // *Optics Communications*. – 2006. – Vol. 266(2). – P. 738-743. – DOI: 10.1016/j.optcom.2006.05.016.
- Federici, A.** Full-field optical coherence microscopy with optimized ultrahigh spatial resolution / A. Federici, A. Dubois // *Optics Letters*. – 2015. – Vol. 40(22). – P. 5347-5350. – DOI: 10.1364/OL.40.005347.
- Pham, H.V.** Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy / H.V. Pham, C. Edwards, L.L. Goddard, G. Popescu // *Applied Optics*. – 2013. – Vol. 52(1). – P. A97-A101. – DOI: 10.1364/AO.52.000A97.
- Edwards, C.** Effects of spatial coherence in diffraction phase microscopy / C. Edwards, B. Bhaduri, T. Nguyen, B.G. Griffin, H. Pham, T. Kim, G. Popescu, L.L. Goddard // *Optics Express*. – 2014. – Vol. 22(5). – P. 5133-5146. – DOI: 10.1364/OE.22.005133.
- Grebenyuk, A.A.** Theoretical model of volumetric objects imaging in a microscope / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Proceedings of SPIE*. – 2012. – Vol. 8430. – 84301B (10 p). – DOI: 10.1117/12.922198.
- Grebenyuk, A.A.** Coherence effects of thick objects imaging in interference microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Proceedings of SPIE*. – 2012. – Vol. 8427. – 84271M (10 p). – DOI: 10.1117/12.922108.
- Grebenyuk, A.A.** Theory of imaging and coherence effects in full-field optical coherence microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho. – In: *Handbook of full-field optical coherence microscopy* / ed. by A. Dubois. – Singapore: Pan Stanford Publishing, 2016. – Chapter 2. – P. 53-89. – ISBN: 9789814669160.
- Grebenyuk, A.A.** Numerical focusing in digital holographic microscopy with partially spatially coherent illumination in transmission / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Proceedings of SPIE*. – 2014. – Vol. 9031. – P. 903119 (8 p). – DOI: 10.1117/12.2052837.

Сведения об авторах

Гребенюк Антон Александрович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного университета и старший научный сотрудник лаборатории проблем

когерентно-оптических измерений в точной механике Института проблем точной механики и управления РАН. Область научных интересов: оптическая когерентная томография/микроскопия, количественная фазовая микроскопия. E-mail: GrebnyukAA@yandex.ru.

Рябухо Владимир Петрович, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного университета и заведующий лабораторией проблем когерентно-оптических измерений в точной механике Института проблем точной механики и управления РАН. Область научных интересов: интерферометрия, голография, когерентность. E-mail: rvp-optics@yandex.ru.

ГРНТИ: 29.31.29.

Поступила в редакцию 23 ноября 2016 г. Окончательный вариант – 6 декабря 2016 г.

DEFOCUS AND NUMERICAL FOCUSING IN INTERFERENCE MICROSCOPY WITH WIDE TEMPORAL SPECTRUM OF ILLUMINATION FIELD

A.A. Grebnyuk^{1,2}, V.P. Ryabukho^{1,2}

¹Institute of Precision Mechanics and Control of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia,

²Saratov State University, Saratov, Russia

Abstract

This paper presents an analysis of the influence of illumination with wide temporal spectrum on the properties of a defocused interference signal and numerically focused imaging in interference microscopy. It is shown that the differences in defocus influence on different spectral components of a signal with wide temporal spectrum may lead to degradation of the images of defocused sample parts, in spite of the use of numerical focusing. The magnitude of these effects depends on the temporal spectrum width, the numerical aperture of the imaging system and the amount of defocus. The influence of these effects on the properties of numerically focused imaging in Fourier domain optical coherence tomography/microscopy is considered.

Keywords: interference microscopy, optical coherence tomography, image reconstruction techniques, numerical focusing.

Citation: Grebnyuk AA, Ryabukho VP. Defocus and numerical focusing in interference microscopy with wide temporal spectrum of illumination field. *Computer Optics* 2016; 40(6): 772-780. DOI: 10.18287/2412-6179-2016-40-6-772-780.

Acknowledgements: This research was funded by a grant of the Russian Science Foundation (project No. 16-19-10528).

References

- [1] Cuche E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Applied Optics* 1999; 38(34): 6994-7001. DOI: 10.1364/AO.38.006994.
- [2] Mann CJ, Yu L, Lo C-M, Kim MK. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics Express* 2005; 13(22): 8693-8698. DOI: 10.1364/OPEX.13.008693.
- [3] Dubois F, Requena M-LN, Minetti C, Monnom O, Istasse E. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source. *Applied Optics* 2004; 43(5): 1131-1139. DOI: 10.1364/AO.43.001131.
- [4] Kemper B, von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied Optics* 2008; 47(4): A52-A61. DOI: 10.1364/AO.47.000A52.
- [5] Massatsch P, Charrière F, Cuche E, Marquet P, Depeursinge CD. Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy. *Applied Optics* 2005; 44(10): 1806-1812. DOI: 10.1364/AO.44.001806.
- [6] Min G, Kim JW, Choi WJ, Lee BH. Numerical correction of distorted images in full-field optical coherence tomography. *Measurement Science and Technology* 2012; 23(3): 035403. DOI: 10.1088/0957-0233/23/3/035403.
- [7] Yu LF, Kim MK. Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method. *Optics Letters* 2005; 30(16): 2092-2094. DOI: 10.1364/OL.30.002092.
- [8] Ralston TS, Marks DL, Carney PS, Boppart SA. Interferometric synthetic aperture microscopy. *Nature Physics* 2007; 3: 129-134. DOI: 10.1038/nphys514.
- [9] Marks DL, Ralston TS, Boppart SA, Carney PS. Inverse scattering for frequency-scanned full-field optical coherence tomography. *JOSA A* 2007; 24(4): 1034-1041. DOI: 10.1364/JOSAA.24.001034.
- [10] Hillmann D, Lührs C, Bonin T, Koch P, Hüttmann G. Holography-holographic optical coherence tomography. *Optics Letters* 2011; 36(13): 2390-2392. DOI: 10.1364/OL.36.002390.
- [11] Shabanov DV, Geliknov GV, Gelikonov VM. Broadband digital holographic technique of optical coherence tomography for 3-dimensional biotissue visualization. *Laser Physics Letters* 2009; 6(10): 753-758. DOI: 10.1002/lapl.200910052.
- [12] Kumar A, Drexler W, Leitgeb RA. Subaperture correlation based digital adaptive optics for full field optical coherence tomography. *Optics Express* 2013; 21(9): 10850-10866. DOI: 10.1364/OE.21.010850.
- [13] Kumar A, Drexler W, Leitgeb RA. Numerical focusing methods for full field OCT: a comparison based on a common signal model. *Optics Express* 2014; 22(13): 16061-16078. DOI: 10.1364/OE.22.016061.
- [14] Grebnyuk AA, Ryabukho VP. Numerical correction of coherence gate in full-field swept-source interference mi-

- croscopy. Optics Letters 2012; 37(13): 2529-2531. DOI: 10.1364/OL.37.002529.
- [15] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Numerical reconstruction of 3D image in Fourier domain confocal optical coherence microscopy. Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies 2012. Bern Open Publishing 2013. DOI: 10.12684/alt.1.60.
- [16] Grebenyuk A, Federici A, Ryabukho V, Dubois A. Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination. Applied Optics 2014; 53(8): 1697-1708. DOI: 10.1364/AO.53.001697.
- [17] Talaikova NA, Grebenyuk AA, Kalyanov AL, Ryabukho VP. Numerical focusing in diffraction phase microscopy. Proc SPIE 2016; 9917: 99171V. DOI: 10.1117/12.2229881.
- [18] Dubois A, Moneron G, Boccara C. Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2 μm wavelength region. Optics Communications 2006; 266(2): 738-743. DOI: 10.1016/j.optcom.2006.05.016.
- [19] Federici A, Dubois A. Full-field optical coherence microscopy with optimized ultrahigh spatial resolution. Optics Letters 2015; 40(22): 5347-5350. DOI: 10.1364/OL.40.005347.
- [20] Pham HV, Edwards C, Goddard LL, Popescu G. Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy. Applied Optics 2013; 52(1): A97-A101. DOI: 10.1364/AO.52.000A97.
- [21] Edwards C, Bhaduri B, Nguyen T, Griffin BG, Pham H, Kim T, Popescu G, Goddard LL. Effects of spatial coherence in diffraction phase microscopy. Optics Express 2014; 22(5): 5133-5146. DOI: 10.1364/OE.22.005133.
- [22] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Theoretical model of volumetric objects imaging in a microscope. Proc SPIE 2012; 8430: 84301B. DOI: 10.1117/12.922198.
- [23] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Coherence effects of thick objects imaging in interference microscopy. Proc SPIE 2012; 8427: 84271M. DOI: 10.1117/12.922108.
- [24] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Theory of imaging and coherence effects in full-field optical coherence microscopy. in: Dubois A, ed. Handbook of full-field optical coherence microscopy. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2016. Chap 2: 53-89. ISBN: 9789814669160.
- [25] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Numerical focusing in digital holographic microscopy with partially spatially coherent illumination in transmission. Proc SPIE 2014; 9031: 903119. DOI: 10.1117/12.2052837.

Authors' information

Anton Alexandrovich Grebenyuk, Candidate of Physical-Mathematical Sciences, is a Docent at the Department of Optics and Biophotonics of Saratov State University and a Senior researcher at the Laboratory of Problems of Coherent-Optical Measurements in Precision Mechanics of the Institute of Precision Mechanics and Control of the Russian Academy of Sciences. Research interests: optical coherence tomography/microscopy, quantitative phase microscopy. E-mail: GrebenyukAA@yandex.ru.

Vladimir Petrovich Ryabukho, Doctor of Physical-Mathematical Sciences, Professor, is a Professor at the Department of Optics and Biophotonics of Saratov State University and the Head of the Laboratory of Problems of Coherent-Optical Measurements in Precision Mechanics of the Institute of Precision Mechanics and Control of the Russian Academy of Sciences. Research interests: interferometry, holography, coherence. E-mail: rvp-optics@yandex.ru.

Received November 23, 2016. The final version – December 6, 2016.