

ГОЛОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТРЕХМЕРНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФАЗОВЫХ МИКРООБЪЕКТОВ

© 2005 г. Т. В. Тишко; В. П. Титарь; Д. Н. Тишко

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

E-mail: Tatyana.V.Tishko@univer.kharkov.ua

В работе дан сравнительный анализ классических и голографических методов для решения задачи трехмерной визуализации фазовых микрообъектов. Рассмотрены голографический метод фазового контраста, основанный на сложении и вычитании волн в интерференционной полосе, и метод интерферометрии в полосах конечной ширины. Приведена оптическая схема голографического интерференционного микроскопа, реализующего эти методы. Экспериментально исследованы трехмерные изображения нативных эритроцитов крови человека и проведено сравнение возможностей голографического метода фазового контраста и метода интерферометрии в полосах конечной ширины.

Коды OCIS: 090.0090, 090.2880, 170.6900.

Поступила в редакцию 04.08.2004.

Введение

При решении ряда исследовательских и прикладных задач в биологии и медицине возникает необходимость трехмерной визуализации микрообъектов (МО) и измерения их морфологических параметров. Большинство биологических МО являются фазовыми, не изменяют интенсивности проходящего через них излучения и недоступны непосредственному наблюдению. В классической микроскопии известны такие методы визуализации фазовых МО, как метод фазового контраста Цернике и метод интерференционного контраста [1]. Однако задача трехмерной визуализации фазовых МО в классической микроскопии не решалась. Появление голографии открыло новые возможности в микроскопии фазовых МО и привело к появлению голографических аналогов классических методов [2, 3]. Сочетание голографических методов с методами компьютерной обработки изображений позволило решать задачу трехмерной визуализации фазовых МО. Данная работа посвящена рассмотрению голографических методов трехмерной визуализации фазовых МО: метода голографического фазового контраста и голографической интерферометрии. Проведено экспериментальное исследование этих методов для трехмерной визуализации таких биологических фазовых МО, как эритроциты крови.

Классические методы визуализации фазовых микрообъектов

Функция пропускания фазового объекта имеет вид:

$$F(x, y) = \exp[i\varphi(x, y)],$$

где $\varphi(x, y)$ – фазовый сдвиг, вносимый МО в проходящую через него волну. При наблюдении фазового

МО в плоскости изображения микроскопа интенсивность не модулируется фазовым рельефом МО.

При изучении таких МО в биологии и медицине применяют окрашивание препарата, что приводит к изменению свойств исследуемых МО. Кроме того, такой метод не позволяет получать трехмерные изображения клеток и измерять их параметры.

Электронная микроскопия позволяет получать изображения фазовых МО с высоким разрешением. Однако этот метод требует специальной подготовки препарата и не позволяет исследовать нативные МО. При изучении биологических препаратов методом электронной микроскопии происходит их разрушение. Поэтому данный препарат повторно не может быть изучен, можно исследовать только подобный ему препарат. Кроме того, данный метод не дает возможности определения морфологических параметров МО.

Основной недостаток неоптических методов изучения фазовых МО состоит в том, что воздействие производится на сам исследуемый МО.

Другой подход к изучению фазовых МО состоит в воздействии не на исследуемый препарат, а на прошедшую через него световую волну. Для этого необходимо применять специальные методы, которые смогли бы преобразовать фазовые изменения в изменение интенсивности.

Известны классические оптические методы наблюдения фазовых МО.

Так, согласно Э. Аббе [4], изображение в микроскопе является результатом интерференции дифрагирующей на МО волны и волны нулевого порядка. Дифрагировавшая волна сдвинута по фазе на $\pi/2$ относительно фазы волны нулевого порядка и имеет малую интенсивность по сравнению с интенсивностью волны нулевого порядка.

Ф. Цернике, основываясь на теории Э. Аббе, предложил метод визуализации фазовых МО, который получил название метода фазового контраста [4]. Суть метода фазового контраста состоит в том, что в нулевой порядок дифракции в микроскопе помещается фазовая пластинка, которая вызывает отставание или опережение фазы волны нулевого порядка на $\pi/2$. В результате между волной нулевого порядка и дифрагировавшей волной создается сдвиг фазы, равный 0 или π . В первом случае волны складываются в фазе, усиливая интенсивность изображения по сравнению с фоном, а во втором случае – в противофазе, ослабляя интенсивность изображения по сравнению с фоном. При этом интенсивность $I(x', y')$ в плоскости изображения фазового МО модулируется фазовым сдвигом $\varphi(x, y)$, внесенным МО в проходящую волну:

$$I(x', y') = |c|^2 \{1 + 2[1 - \cos\varphi(x, y) \pm \sin\varphi(x, y)]\},$$

где c – постоянная.

Таким образом, в методе фазового контраста Цернике фазовый сдвиг, вносимый МО в проходящую через него волну, посредством интерференции преобразуется в изменение интенсивности его изображения. Но так как в методе фазового контраста взаимодействуют волны разной интенсивности, то сложение и вычитание волн не позволяет получить высокий контраст изображений, а следовательно, достичь высокой чувствительности метода. Для повышения контраста изображений используются поглощающие фазовые пластинки, при этом повышение чувствительности метода достигается при падении общей освещенности. Метод фазового контраста основан на возможности отдельно воздействовать на прямой свет, не изменяя света, дифрагировавшего на МО. Следовательно, он применим для наблюдения только малых объектов.

Таким образом, метод фазового контраста работает тем успешнее, чем меньше фазовый МО по оптической толщине и размерам.

Метод интерференционного контраста возможен в двух основных вариантах: интерферометрии в бесконечно широкой полосе и интерферометрии в полосах конечной ширины [2].

Интерферометрия в бесконечно широкой полосе решает ту же задачу, что и фазово-контрастная микроскопия. Однако здесь фазовый объект становится видимым за счет интерференции двух волн равной интенсивности, в одной из которых находится фазовый объект. Результирующая интенсивность в плоскости наблюдения в двулучевом интерферометре определяется основным уравнением интерференции:

$$I = 2I_0(1 + \cos\Delta\beta), \quad (1)$$

где I_0 – интенсивность каждой из взаимодействующих волн, $\Delta\beta$ – разность фаз между волнами. На-

стройкой интерферометра можно достичь такой разности хода лучей, чтобы $\Delta\beta$ равнялась 0 или π . Пусть в одном из лучей интерферометра находится фазовый объект. Тогда из (1) при сложении волн интенсивности фона и изображения равны соответственно:

$$I_{\phi+} = 4I_0, I_{\text{из}+} = 2I_0[1 + \cos\varphi(x, y)], \quad (2)$$

а при вычитании:

$$I_{\phi-} = 0, I_{\text{из}-} = 2I_0[1 - \cos\varphi(x, y)]. \quad (3)$$

В случае сложения волн фазовый объект наблюдается темным на светлом фоне, а в случае вычитания – светлым на темном фоне. Интенсивность в изображении объекта модулируется фазовым сдвигом, внесенным объектом в проходящую волну. Данный метод эквивалентен методу фазового контраста. Но хотя оба метода основаны на интерференции лучей, прошедших через фазовый объект и миновавших его, их отличие состоит в том, что в методе интерференционного контраста взаимодействуют волны равной интенсивности. Это позволяет достигнуть максимального контраста изображений, а следовательно, высокой чувствительности метода. Однако преимущества метода интерференционного контраста снижаются из-за сложности аппаратуры и трудности настройки интерферометра. Особенно сложной проблемой в классической интерферометрии является проблема получения двух идентичных волновых фронтов. Кроме того, интерферометрия в бесконечно широкой полосе невозможна с использованием сильных объективов.

В методе интерферометрии в полосах конечной ширины взаимодействуют волны, между которыми задается некоторый угол θ . При этом вместо однородного поля получается линейчатое, с равномерным чередованием максимумов и минимумов интенсивности. Распределения интенсивности в изображении объекта и фона имеют вид:

$$I_{\text{из}}(x', y') = 2I_0 \left\{ 1 + \cos \left[\Delta\beta + \varphi(x, y) - \frac{2\pi x}{T} \right] \right\},$$

$$I_{\phi}(x', y') = 2I_0 \left\{ 1 + \cos \left[\Delta\beta - \frac{2\pi x}{T} \right] \right\}, \quad (4)$$

где $T = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\theta}{2}}$ – период интерференционных полос,

λ – длина волны используемого излучения. Ось y направлена вдоль полос конечной ширины. Уравнение темных полос имеет вид:

$$\Delta\beta + \varphi(x, y) - \frac{2\pi x}{T} = (2m + 1)\pi,$$

а уравнение светлых полос:

$$\Delta\beta + \varphi(x, y) - \frac{2\pi x}{T} = 2m\pi,$$

где $|m| = 0, 1, 2, \dots$

Таким образом, фазовый силуэт объекта проявляется в изломе интерференционных полос.

Существует несколько видов классических интерференционных микроскопов. Они различаются в основном способом разделения и соединения пучков. При этом реализация различных методов интерферометрии требует отдельных устройств.

Голографические методы визуализации фазовых микрообъектов

С появлением и развитием голографической микроскопии для наблюдения изображений фазовых МО, восстановленных по голограмме, стал применяться метод фазового контраста. Впервые этот метод применен к восстановленному по голограмме изображению в работе [5]. Контрастные изображения фазовых МО получались путем помещения фазовой пластинки в нулевой порядок дифракционного спектра МО.

В голографической микроскопии возникает проблема, связанная с использованием высококогерентных источников излучения. Это когерентный шум и спекл-структура голографических изображений, которые становятся тем более существенными помехами, чем меньше исследуемый МО. Спекл-структура и когерентный шум приводят к падению контраста и снижению качества изображений. Поэтому применение метода Цернике в голографической микроскопии не является эффективным.

Как было показано выше, метод интерференционного контраста в бесконечно широкой полосе является более эффективным для наблюдения фазовых МО. И если в классической микроскопии преимущества этого метода нейтрализуются сложностью настройки интерферометра и невозможностью использовать сильные объективы, то применение метода голографии позволяет снять эту проблему. Это объясняется тем, что на голограмме можно записать и восстановить волновой фронт, который является копией объектного волнового фронта. Поэтому проблема получения двух идентичных волновых фронтов полностью снимается. В голографическом интерферометре взаимодействуют волны, прошедшие по одному пути, но в разные моменты времени. Одна из этих волн должна быть зарегистрирована и восстановлена по голограмме. Настройка интерферометра на фоновые интерференционные полосы производится поперечным сдвигом голограммы из ее исходного положения.

Однако в силу определенных сложностей метод голографической интерферометрии в бесконечно

широкой полосе не применялся для получения изображений фазовых объектов. Сложность заключалась в обеспечении сложения и вычитания волн. Теоретически эта задача решается просто. Фаза волны, зарегистрированной и восстановленной по амплитудной голограмме (негатив исходной интерференционной картины), сдвинута на π относительно фазы исходной волны. Поэтому объектная волна и ее противофазная копия, восстановленная по голограмме, при одновременном их наблюдении должны гасить друг друга (вычитание волн). Эта возможность вычитания волн для получения разностного изображения предсказана еще в ранних работах Д. Габора [6]. С другой стороны, при регистрации на одной голограмме невозмущенной и возмущенной МО волн должно наблюдаться сложение волн в силу того, что фазы обеих этих волн будут сдвинуты на π относительно фазы исходной волны. Однако вследствие фазовых сдвигов, возникающих при обработке фотоэмульсии, и очень высокой чувствительности метода к вибрациям в таком эксперименте ранее не удавалось получить сложения и вычитания волн, и проблема получения синфазных и противофазных волн оставалась открытой, как и проблема осуществления фазового контраста в голографической микроскопии.

Впервые проблема осуществления фазового контраста в голографической интерферометрии фазовых МО была решена в работе [7], в которой был предложен метод сложения и вычитания волн в интерференционной полосе. Суть этого метода состоит в том, что между взаимодействующими невозмущенной и возмущенной МО волнами, одна из которых зарегистрирована и восстановлена по голограмме, вводится малый угловой сдвиг, такой, чтобы в возникшей системе интерференционных полос их период значительно превосходил размер изображений фазовых МО. При этом в пределах темной интерференционной полосы автоматически создаются условия противофазности волн (вычитание волн) и наблюдаются светлые изображения фазовых МО на темном фоне, а в пределах светлой интерференционной полосы – условия синфазности волн (сложение волн) и наблюдаются темные изображения МО на светлом фоне. Распределение интенсивности в изображениях фазовых МО определяется соответственно выражениями (2) и (3). Изменением угла между взаимодействующими волнами путем малого поперечного сдвига голограммы из ее исходного положения можно регулировать период интерференционных полос. Проведенные экспериментальные исследования с использованием голографического интерференционного микроскопа [8] подтвердили эффективность применения предложенного метода для получения контрастных изображений фазовых

МО. В качестве объектов исследования использовались нативные эритроциты крови человека.

Метод голографической интерферометрии в полосах конечной ширины использовался в ряде работ для изучения различных фазовых МО и процессов, в частности, для изучения клеток крови [2, 9]. Применение этого метода позволило получить количественную информацию о трехмерных параметрах исследуемых МО. Однако задача получения трехмерных изображений фазовых МО по их интерферограммам не решалась.

Сдвиги полос или изменение интенсивности на интерферограмме фазового МО обусловлены набегом фазы просвечивающей волны через всю толщину объекта

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{z_1}^{z_2} \Delta n(x, y, z) dz,$$

где $\Delta n(x, y)$ – разность показателей преломления объекта и окружающей среды. Поэтому интерферограмма дает возможность увидеть фазовый профиль объекта. Если объект имеет однородное распределение показателя преломления, т. е. $\Delta n = \text{const}$, то

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n t(x, y),$$

где $t(x, y) = z_2 - z_1$ – толщина объекта в точке (x, y) . Отсюда

$$t(x, y) = \varphi(x, y) \frac{\lambda}{2\pi \Delta n}. \quad (4)$$

В методе интерферометрии в полосах конечной ширины согласно (4) фазовый набег равен:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi h(x', y')}{T}, \quad (6)$$

где $h(x', y')$ – отклонение интерференционной полосы от первоначального направления на интерферограмме микрообъекта, T – период системы интерференционных полос.

В голографическом методе фазового контраста (интерферометрия в бесконечно широкой полосе) фазовый набег согласно (2) и (3) равен:

$$\varphi(x, y) = \arccos \left[\pm \left(1 - \frac{I_{\text{из}}(x', y')}{2I_0} \right) \right], \quad (7)$$

где $I_{\text{из}}(x', y')$ – интенсивность изображения МО на его интерферограмме, I_0 – интенсивность каждого из взаимодействующих пучков; $I_0 = I_{\phi+}/4$, где $I_{\phi+}$ – интенсивность фона при сложении волн. Знак “+” – соответствует случаю вычитания волн, а знак “–” – сложению волн.

Таким образом, оба метода голографической интерферометрии позволяют определять толщину МО в различных его точках и восстанавливать его трехмерное изображение.

С развитием методов компьютерной обработки изображений появилась возможность решить задачу трехмерной визуализации фазовых МО, которая была ранее доступна лишь методам электронной микроскопии.

Впервые трехмерные изображения фазовых МО были получены при исследовании эритроцитов крови пациентов, больных гемолитической анемией [10]. Исследовалось изменение трехмерной формы эритроцитов крови у пациента с серповидно-клеточной анемией при снижении содержания кислорода в крови [11]. Влияние гамма-радиации в сверхлетальной дозе на форму эритроцитов крови крыс *in vivo* и *in vitro*, а также изменение формы эритроцитов артериальной и венозной крови крыс представлены в работе [12]. Метод голографической интерферометрии в полосах конечной ширины с последующей компьютерной трехмерной визуализацией эритроцитов крови использовался для исследования влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови пациентов, страдающих нейросенсорной тугоухостью [13].

Для компьютерного восстановления трехмерного изображения фазового МО по его интерферограмме, полученной при использовании голографического метода фазового контраста, может быть использован следующий алгоритм.

Изображение преобразуется в массив значений интенсивности $I_{\text{из}}$ в каждой его точке. Затем находят среднее значение интенсивности фона $I_{\phi+}$ (средняя интенсивность в выбранном оператором или самой программой фрагменте изображения) и начальная интенсивность $I_0 = I_{\phi+}/4$.

Далее рассчитываются значения сдвига фазы по формуле (7) для каждой точки изображения и формируется массив, соответствующий фазовому рельефу волнового фронта, прошедшего через МО. Если МО имеет однородное распределение показателя преломления и, следовательно, набег фазы является линейной функцией толщины МО, алгоритм построения трехмерного изображения рассматривает массив значений набег фазы как массив значений третьей координаты (высоты) с учетом формулы (5).

Алгоритм математической обработки интерферограммы, полученной методом голографической интерферометрии в полосах конечной ширины, состоит в интерпретации величины отклонения интерференционной полосы как значения высоты МО в соответствии с формулами (5) и (6) с последующей трехмерной визуализацией МО, а также определением его морфологических параметров.

Задача подобного рода не имеет точного математического решения, однако допускается использование приближенного алгоритма при условии, что вносимая им погрешность не превосходит погрешности, вносимой в изображение принципиальными недостатками физического эксперимента (когерентный шум, спекл-структура и т. д.). Более того, задача снижения влияния подобных помех на качество изображения также может быть решена при компьютерной обработке интерферограмм.

В данной работе впервые представлены результаты применения голографического метода фазового контраста для трехмерной визуализации нативных эритроцитов крови человека. Проведено экспериментальное сравнение возможностей голографического метода фазового контраста (интерферометрия в бесконечно широкой полосе) и голографического метода интерференционного контраста (интерферометрия в полосах конечной ширины).

Экспериментальная часть

Как упоминалось выше, одно из преимуществ голографических методов изучения фазовых МО состоит в возможности реализации всех методов интерферометрии в одном устройстве. Оптическая схема голографического интерференционного микроскопа (ГИМ) приведена на рис. 1.

В качестве когерентного источника излучения в ГИМ используется He-Ne-лазер с длиной волны излучения 0,63 мкм. Излучение лазера 1 полупрозрачным зеркалом 5 делится на два пучка: объектный и опорный. Объектный пучок проходит через объектив микроскопа 11 и направляется на фотопластинку (голограмму) 12. Опорный пучок проходит через коллиматор 9 и также направляется на голограмму 12. Для поворота лучей в схему введены зеркала 3 и 4. Опорный пучок играет в схеме вспомогательную роль. Он необходим для записи и восстановления по голограмме объектной волны. На фотопластинке 12 регистрируется голограмма объектного пучка в отсутствие изучаемого препарата перед объективом микроскопа. Проявленная и отфиксированная голограмма возвращается в исходное положение. Специальный держатель позволяет перемещать голограмму относительно ее первоначального положения. Голограмма 12 расположена между объективом 11 и окуляром 13. Так как на голограмме регистрируется несфокусированное изображение, то такое расположение голограммы позволяет увеличить поле зрения микроскопа за счет возможности перемещения окуляра в плоскости, ортогональной направлению наблюдения, и проводить дополнительную фокусировку по глубине наблюдаемой сцены. Исследуемый препарат помещается перед объективом микроскопа.

При одновременном распространении восстановленной по голограмме с помощью опорного пучка невозмущенной объектной волны и возмущенной объектной волны, прошедшей через исследуемый препарат, с помощью окуляра 13 можно наблюдать картину их интерференции, то есть интерферограмму. Необходимый период фоновых интерференционных полос для получения интерферограммы в бесконечно широкой полосе или в полосах конечной ширины формируют поперечным сдвигом голограммы из ее исходного положения с помощью микрометрических винтов держателя.

Зарегистрированная для данного объектива голограмма может использоваться постоянно при работе с данным объективом. Как известно, качество и контраст голограммы и интерферограммы определяются такой величиной, как глубина модуляции ин-

терференционной картины $\mu = \frac{2\sqrt{b} \cos \phi}{1+b}$, где b – от-

ношение интенсивностей интерферирующих волн, а ϕ – угол между направлениями линейной поляризации этих волн. Как следует из этого выражения, максимальное значение $\mu = 1$ получаем в том случае, когда интерферирующие волны имеют одинаковые интенсивности и поляризации. Для выравнивания интенсивностей и поляризаций взаимодействующих волн в схему введены поляризаторы 6, 7, 8. Поляризаторы 6 и 8 задают одинаковые направления плоскости линейной поляризации взаимодей-

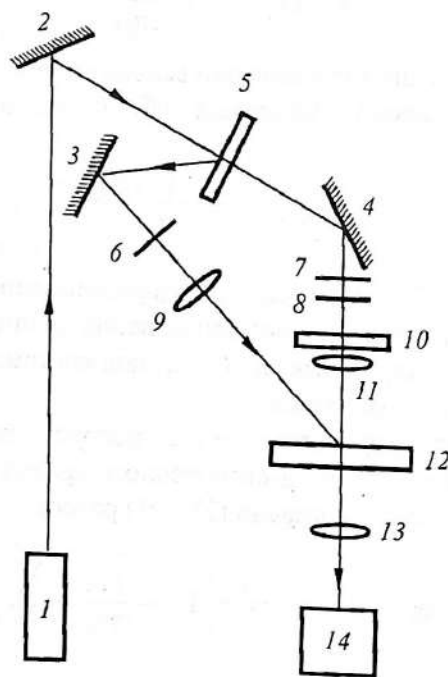


Рис. 1. Оптическая схема голографического интерференционного микроскопа. 1 – лазер; 2, 3, 4 – зеркала; 5 – полупрозрачное зеркало; 6, 7, 8 – поляризаторы; 9 – коллиматор, 10 – исследуемый препарат, 11 – объектив, 12 – голограмма, 13 – окуляр, 14 – блок регистрации изображения.

ствующих волн, а вращением плоскости поляризации поляризатора 7 выравниваются интенсивности взаимодействующих волн.

Интерферограммы исследуемых МО регистрируются с помощью блока регистрации изображений 14, содержащего фотоаппарат или цифровую камеру. Зафиксированные интерферограммы передаются в компьютер для дальнейшей обработки.

В эксперименте в схеме использовался объектив $40\times 0,65$ и окуляр $10\times$. Голограммы регистрировались на пластинках ПФГ-03. Для обработки голограмм использовался проявитель ГП-2.

В качестве объектов исследования использовались эритроциты крови человека. Для этого готовились нативные мазки крови на стеклянной подложке.

Изучение взаимодействия живого организма с окружающей средой на клеточном уровне представляет большой научный интерес. Клетка является той единицей живого организма, которая отражает и определяет состояние и функционирование биологической системы как целого. В последние годы появился ряд работ, в которых установлено, что основной мишенью воздействия различных физических и химических факторов внешней среды, а также внутренних патологий и даже психических состояний живых организмов являются плазматические клеточные мембраны. Изменение упругих свойств клеточных мембран под влиянием различных воздействий неизбежно должно проявляться в изменении формы клеток. Особый интерес представляют клетки крови. Кровь объединяет работу и функционирование всех органов живого организма. Красные кровяные клетки (эритроциты) выполняют функцию снабжения всех тканей организма кислородом. Функциональные способности эритроцита крови определяются отношением площади поверхности эритроцита к его объему, т. е. формой клетки. Кроме того, эритроцит доступен наблюдению как отдельная клетка живого организма. Поэтому форма эритроцитов крови и изменение этой формы под влиянием различных внешних воздействий и внутренних патологий являются интегральным параметром, который определяет состояние живого организма и его биологический отклик на внешние воздействия и внутренние патологии. Красные кровяные клетки, как и другие клетки живого организма, являются прозрачными, фазовыми МО. Поэтому задача изучения морфологии эритроцитов крови в целях медицинской диагностики ставит задачу трехмерной визуализации фазовых МО и измерения их геометрических параметров.

Эритроциты крови человека представляют собой МО размером 7–8 мкм и максимальной толщиной около 2 мкм. Это МО с малой оптической плотностью и однородным распределением показателя пре-

ломления, прозрачные для излучения He-Ne-лазера. Оптическая однородность эритроцитов позволяет использовать формулы (5) для вычисления толщины эритроцитов в различных точках. В формулу (5) входит величина Δn , равная разности показателей преломления МО и окружающей среды. Так как в эксперименте использовались сухие мазки крови, то $\Delta n = n_z - n_v$, где n_z – показатель преломления эритроцитов, n_v – показатель преломления воздуха. Показатель преломления крови определялся с помощью рефрактометра Аббе при использовании He-Ne-лазера и был равен 1,352. Это значение было взято как показатель преломления эритроцитов n_z .

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены интерферограммы фрагмента нативного мазка крови при сложении (а) и вычитании (б) волновых фронтов и восстановленные по этим интерферограммам изображения эритроцитов (в).

На рис. 3 представлены интерферограммы в полосах конечной ширины отдельных эритроцитов (а) и восстановленные по интерферограммам изображения эритроцитов (б).

На рис. 4 представлены фрагмент интерферограммы нативного мазка крови в полосах конечной

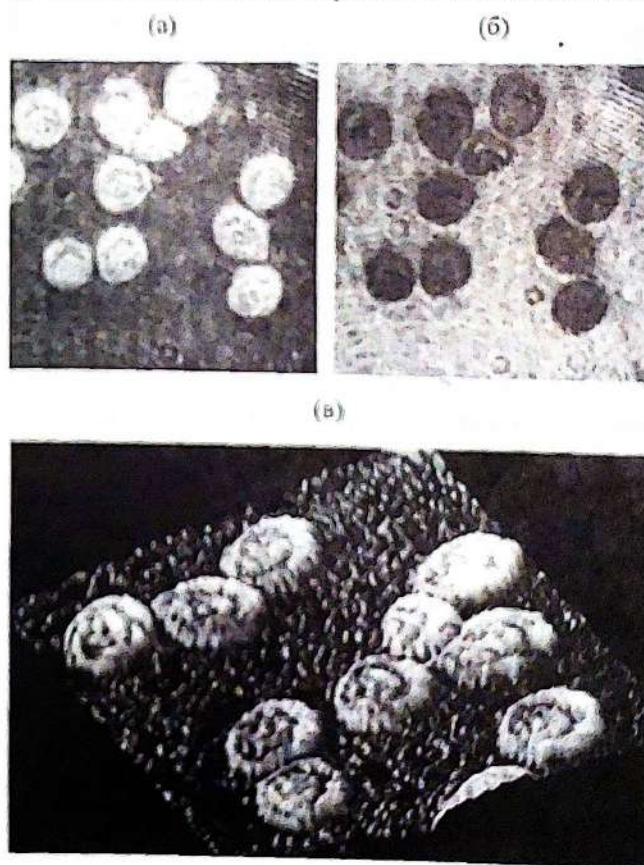


Рис. 2. Интерферограммы фрагмента нативного мазка крови при сложении (а) и вычитании (б) волновых фронтов и восстановленные по этим интерферограммам изображения эритроцитов (в).

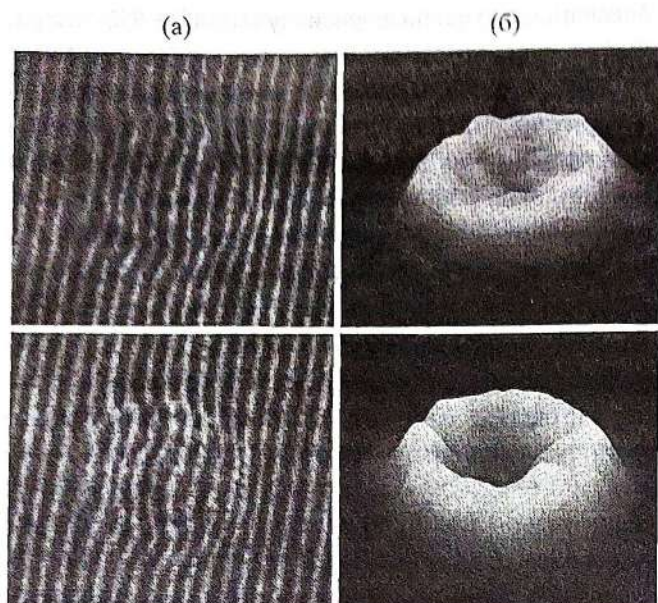


Рис. 3. Интерферограммы отдельных эритроцитов (а) и восстановленные по ним изображения (б).

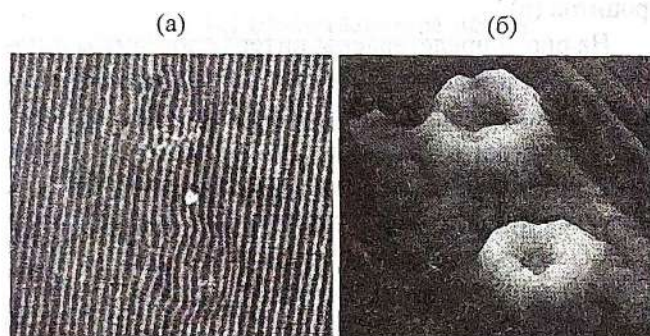


Рис. 4. Фрагмент интерферограммы нативного мазка крови в полосах конечной ширины (а) и восстановленное трехмерное изображение (б).

ширины (а) и восстановленное трехмерное изображение этого фрагмента (б).

Для сравнения методов были получены интерферограммы одного и того же объекта при сложении и вычитании волновых фронтов и в полосах конечной ширины. Результаты представлены на рис. 5.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что голографический метод сложения и вычитания волн в интерференционной полосе (рис. 2) и метод интерферометрии в полосах конечной ширины (рис. 3) могут быть эффективно использованы для трехмерной визуализации фазовых МО. Трехмерные изображения фазовых МО не только дают наглядную качественную информацию о форме этих объектов, но и позволяют проводить различные количественные измерения таких геометрических параметров этих МО, как линейные размеры, коэффициент сферичности, площадь поверхности, объем. При изучении таких МО, как красные кровяные клетки, морфологические параметры имеют важное значение для медицинской диагностики.

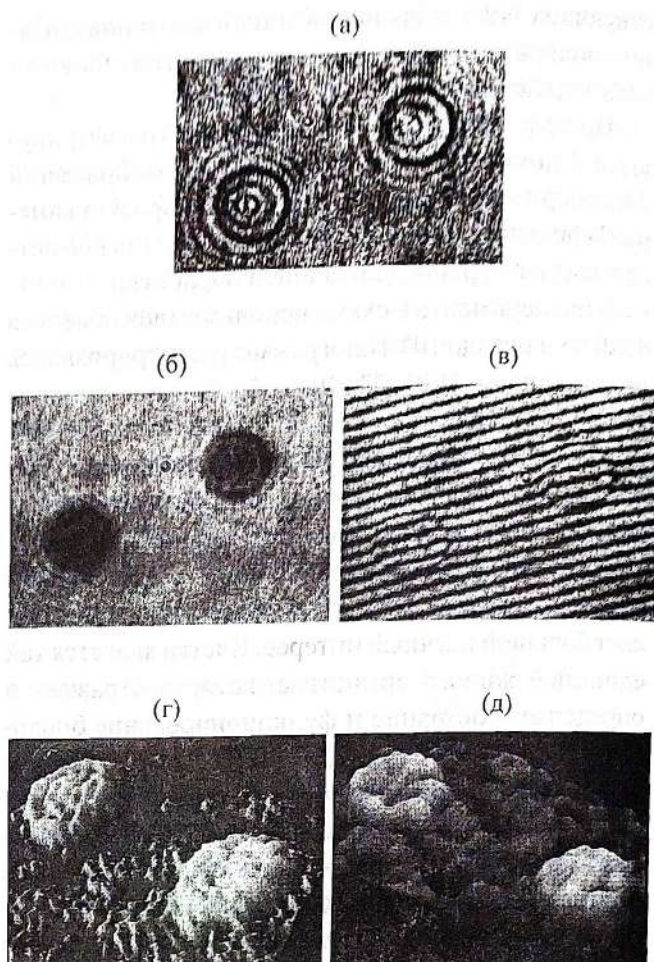


Рис. 5. Сравнение голографических методов трехмерной визуализации фазовых микрообъектов. а – фотография эритроцитов, б – изображение эритроцитов при сложении волновых фронтов, в – интерферограмма эритроцитов в полосах конечной ширины; г, д – восстановленные по интерферограммам изображения эритроцитов.

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки для решения задачи трехмерной визуализации фазовых МО, на которых необходимо остановиться.

При использовании метода сложения и вычитания в интерференционной полосе для компьютерной обработки интерферограмм могут использоваться достаточно простые точные алгоритмы обработки. Однако так как в этом методе используются абсолютные значения интенсивности, то для адекватной трехмерной визуализации необходимо, чтобы передаточная функция блока регистрации изображения была линейной.

На этапе регистрации интерферограммы этот метод предъявляет очень высокие требования к виброустойчивости интерферометра.

Задача трехмерной визуализации фазовых МО при использовании метода интерферометрии в полосах конечной ширины не имеет точного математического решения, однако допускается использование приближенных алгоритмов обработки, при условии

что вносимая ими погрешность не превосходит погрешности, вносимой принципиальными недостатками физического эксперимента (спекл-структура, когерентный шум). Более того, компьютерная обработка позволяет использовать дополнительные алгоритмы, направленные на снижение влияния этих недостатков (фильтрация спекл-дефектов, усреднение когерентного шума). На этапе регистрации интерферограммы нет высоких требований к виброустойчивости установки, в таком режиме интерферометр может работать без специальных мер виброзащиты.

Высокий уровень соответствия изображений, полученных методом интерферометрии в полосах конечной ширины и методом сложения и вычитания в бесконечно широкой интерференционной полосе (рис. 4г, 4д), позволяет сделать вывод, что используемые методы компьютерной обработки адекватно отображают получаемую экспериментальную информацию и вполне пригодны для решения подобных общих задач.

Выводы

Показано, что для решения задач трехмерной визуализации фазовых микрообъектов голографические методы имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими методами.

Экспериментальные исследования голографических методов сложения и вычитания в интерференционной полосе и метода интерферометрии в полосах конечной ширины подтвердили эффективность их применения для трехмерной визуализации нативных биологических микрообъектов.

Использование компьютерной обработки интерферограмм, полученных с помощью голографического интерференционного микроскопа, позволяет не только визуализировать такие фазовые микрообъекты, как клетки крови, но и проводить измерение их морфологических параметров.

Развитие математических методов обработки, а также использование современной вычислительной техники позволят расширить возможности физических методов визуализации и анализа структуры фазовых микрообъектов.

Голографический интерференционный микроскоп может найти широкое применение в биологии и медицине для исследования взаимодействия живого организма с окружающей средой на клеточном уровне, а также для решения задач медицинской диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Франсон М. Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы. М.: Госиздат физ.-мат. литер., 1960. 180 с.
2. Гинзбург В.М., Степанов Б.М. Голографические измерения. М.: Радио и связь, 1981. 296 с.
3. Бабенко В.А., Гребеневская Л.Ф., Константинова Е.В., Константинов В.Б., Левушкин В.М. Малогабаритный голографический интерференционный микроскоп // ПТЭ. 1999. № 1. С. 159–160.
4. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1973. 719 с.
5. Barer R., Cosslett V.E., Pluta M. Microscopy by reconstructed wave fronts. Academic Press London-New-York // J. Advances of Optical and Electron Microscopy. 1975. V. 6. P. 126–128.
6. Gabor D.J. A new microscopy principle // Nature. 1948. V. 161. May. P. 777–778.
7. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Получение контрастных изображений фазовых микрообъектов путем суммирования волновых фронтов // Украинск. физич. журнал. 1985. Т. 30. № 3. С. 334–337.
8. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Фазово-контрастный голографический микроскоп // ПТЭ. 1987. № 2. С. 249.
9. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Голографическая интерферометрия фазовых микрообъектов // Украинск. физич. журнал. 1985. Т. 30. № 7. С. 994–997.
10. Тишко Т.В., Титарь В.П., Панфилов Д.А., Тишко Д.Н. Применение метода голографической интерферометрии для определения формы эритроцитов крови человека // Биологический вестник. 1998. Т. 2. № 1. С. 107–110.
11. Тишко Т.В., Титарь В.П., Некрасов В.И., Шпаченко О.В. Определение патологий эритроцитов при серповидноклеточной анемии методом голографической интерферометрии // Материалы 14 Междунар. научно-практич. конф.: Применение лазеров в медицине и биологии. Харьков, 2000. С. 16.
12. Tishko T.V., Titar V.P. Investigation of gamma radiation influence on rat blood erythrocytes *in vivo* and *in vitro* by holographic interference method // Proc. of 4 International Workshop on Laser and Fiber-Optical Networks Modeling. 2002. P. 266–268.
13. Тишко Т.В., Титарь В.П., Бархоткина Т.М., Набока А.М., Некрасов В.И., Кудь А.А. Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови человека // Вестник Харьковского университета. Серия "Биофизический вестник". 2000. № 497. Т. 2 (7). С. 103–111.