

ЧИСЛЕННАЯ ФОКУСИРОВКА И ПОЛЕ ЗРЕНИЯ В ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИА.А. Гребенюк^{1,2,3}, Д.М. Клычкова^{1,2}, В.П. Рябухо^{1,2}¹ Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов, Россия,² Саратовский государственный университет, Саратов, Россия,³ Лаборатория Кристиана Дюплера OPTRAMED,

Центр медицинской физики и биомедицинской техники Медицинского университета Вены, Вена, Австрия

Аннотация

Представлен анализ эффектов, возникающих на краях поля зрения при численно сфокусированной визуализации оптически расфокусированных объектов в системах интерференционной микроскопии с пространственно когерентным освещением объекта. Получены выражения, описывающие границы областей различного типа в численно сфокусированных изображениях в зависимости от параметров дефокусировки. Получены выражения для оценки допустимых пределов дефокусировки при численно сфокусированной визуализации. Проведено экспериментальное исследование эффектов, возникающих на краях поля зрения при численно сфокусированной визуализации оптически расфокусированных объектов в цифровом голографическом микроскопе с освещением на пропускание.

Ключевые слова: численная фокусировка, интерференционная микроскопия, цифровая голографическая микроскопия, оптическая когерентная микроскопия.

Цитирование: Гребенюк, А.А. Численная фокусировка и поле зрения в интерференционной микроскопии / А.А. Гребенюк, Д.М. Клычкова, В.П. Рябухо // Компьютерная оптика. – 2018. – Т. 42, № 1. – С. 28-37. – DOI: 10.18287/2412-6179-2018-42-1-28-37.

Введение

Методы интерференционной микроскопии, такие как цифровая голографическая микроскопия (ЦГМ), оптическая когерентная томография/микроскопия (ОКТ/ОКМ) и дифракционная фазовая микроскопия (ДФМ), позволяют получать резкие изображения расфокусированных объектов посредством численной фокусировки, т.е. специальной апостериорной обработки регистрируемого сигнала [1–15]. Для применения численно сфокусированной визуализации в интерференционной микроскопии представляют важность вопросы максимально допустимых пределов численной фокусировки, а также соответствия качества численно сфокусированных изображений оптически расфокусированных объектов качеству оптически сфокусированных изображений. В частности, вопрос о том, какова роль артефактов, которые, как известно, возникают в численно сфокусированных изображениях оптически расфокусированных объектов в периферийных частях поля зрения [16–17].

В ряде работ, например [18–19], был проведён анализ вопросов численного моделирования распространения оптических полей. В частности, в [18] была показана эффективность анализа свойств численного распространения поля на основе рассмотрения локальных частот в поперечном пространственном спектре поля. В [20] этот подход был объединён с выражениями [21] для формирования сигнала в интерференционном микроскопе, основанными на теоретическом подходе [22–23], для анализа свойств численно сфокусированной визуализации. Был проведён анализ уменьшения размеров корректно визуализируемой части поля зрения в численно сфокусированных изображениях оптически расфокусированных объектов при увеличении дефокусировки, и получены выражения для оценки этого эффекта. В данной работе представлен более подробный ана-

лиз эффектов, возникающих на краях поля зрения при численно сфокусированной визуализации оптически расфокусированных объектов в интерференционной микроскопии. В частности, получены выражения, описывающие границы визуализируемой области в численно сфокусированных изображениях оптически расфокусированных объектов за пределами поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям (определяемого размерами матричного фотодетектора). На основе выражений для размеров корректно визуализируемой части поля зрения в численно сфокусированных изображениях получены выражения для оценки допустимых пределов дефокусировки при численно сфокусированной визуализации. Проведено экспериментальное исследование эффектов, возникающих на краях поля зрения при численно сфокусированной визуализации оптически расфокусированных объектов в цифровом голографическом микроскопе с освещением на пропускание. Полученные результаты могут быть использованы для проектирования и применения различных систем интерференционных микроскопов (ОКТ/ОКМ, ЦГМ и ДФМ) с учётом возможностей численной фокусировки.

В данной работе анализируются системы интерференционной микроскопии с пространственно когерентным освещением объекта плоской волной, распространяющейся вдоль оптической оси. В силу сходства свойств соответствующего сигнала когерентности с сигналом когерентности в системах интерференционной микроскопии с пространственно частично когерентным освещением в случае достаточно малой числовой апертуры освещения NA_i полученные результаты также применимы для таких систем.

1. Анализ сигнала

Рассмотрим формирование сигнала в интерференционном микроскопе с освещением объекта плоской

волной (на отражение или на пропускание), распространяющейся вдоль оптической оси, в случае, когда объект состоит из плоскопараллельных слоёв, причём одна из границ раздела обладает поперечной структурой амплитудного коэффициента отражения $r_s(\omega; x_s, y_s)$ в случае схемы на отражение или поперечной структурой амплитудного коэффициента пропускания $t_s(\omega; x_s, y_s)$ в случае схемы на пропускание (рис. 1). Эта структурированная граница раздела расположена под N слоями объекта с толщинами $\{\Delta z_j\}$ и показателями преломления $\{n_j\}$. В объектном плече установлен микрообъектив MO_S с числовой апертурой NA с передним и задним фокусными расстояниями $-f$ и f' соответственно; $n_{im} = n_0$ – показатель преломления иммерсии; z_s – расстояние между поверхностью объекта и передней главной плоскостью микрообъектива; L – расстояние между задней фокальной плоскостью микрообъектива и передней главной плоскостью тубусной линзы TL ; f'_L – заднее фокусное расстояние тубусной линзы; $M\Phi$ – матричный фотодетектор, на который падают объектное и опорное поля V_S и V_R (структура опорного плеча может быть различной и не показана на рисунке).

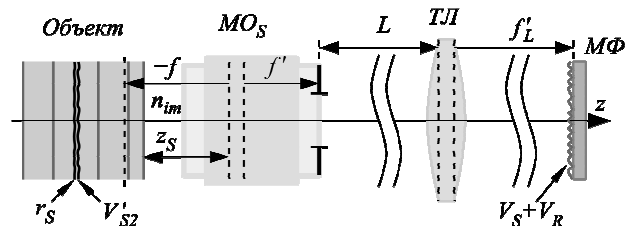


Рис. 1. Изображающая часть системы интерференционного микроскопа (рис. приведён из [24])

В случае анализа сигнала интерференционного микроскопа с квазимонохроматическим освещением компоненту сигнала, соответствующую функции взаимной когерентности объектного и опорного полей (сигнал когерентности), можно считать пропорциональной функции взаимной спектральной плотности объектного и опорного полей на центральной частоте [24–25] (центральную круговую временную частоту обозначим через ω).

Как было показано в [24] на основе теоретического подхода [22–23], функцию взаимной спектральной плотности объектного и опорного полей в этом случае можно записать в следующем виде:

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

где $I_0(\omega)$ – спектральная плотность освещающего поля, $B'_S(\omega) B_R^*(\omega; x, y) \mu_i(\omega; x, y)$ – комплексный коэффициент [24], $k = \omega / c$, $M = f'_L / f'$ – поперечное увеличение изображающей части системы (по модулю), k_x и k_y – поперечные круговые пространственные частоты, тильда обозначает поперечный пространственный спектр соответствующей функции, $t_{j,j-1}$ – амплитудный коэффициент пропускания границы раздела j и $j-1$ слоев, $\Delta z_0 = z_s - |f|$, A – апертурная функция микрообъектива.

При восстановлении сигнала когерентности, пропорционального $\Gamma(\omega; x, y)$, с зарегистрированной интерферограммы поперечная структура амплитудно-фазовой модуляции, обусловленная коэффициентом $B_R^*(\omega; x, y) \mu_i(\omega; x, y)$, может быть устранена численно. Будем считать, что её компоненты, за исключением линейной фазовой модуляции (которая может быть использована для создания режима внеосевой голографии), медленно изменяются по полю зрения (по x и y) и не вносят существенных изменений в пространственный спектр функции Γ . Соответствующий сигнал когерентности после предварительной обработки пропорционален величине:

$$\begin{aligned} \Gamma^{(t)}(x, y) \approx & G_0(\omega) (2\pi)^{-2} \iint \tilde{r}_S(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \times \\ & \times \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] \times \\ & \times \exp \left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} \right] \times \\ & \times A \left(\omega; -f'_L \frac{k_x}{k}, -f'_L \frac{k_y}{k} \right) \exp[i(k_x x + k_y y)] dk_x dk_y, \end{aligned} \quad (2)$$

где

$$G_0(\omega) \sim I_0(\omega) B'_S(\omega) B_R^*(\omega; 0, 0) \mu_i(\omega; 0, 0) (\lambda f'_L)^2, \quad (3)$$

$\lambda = 2\pi c / \omega$. Рассмотрим пространственный спектр функции $\Gamma^{(t)}(x, y)$,

$$\tilde{\Gamma}^{(t)}(k_x, k_y) = \iint \Gamma^{(t)}(x, y) \exp[-i(k_x x + k_y y)] dx dy, \quad (4)$$

в случае, когда поперечная структура r_s состоит из одного точечного рассеивателя, т.е.

$$r_s(\omega; x_s, y_s) \approx r_{sp}(\omega) \delta(x_s - x_p) \delta(y_s - y_p):$$

$$\begin{aligned} \tilde{\Gamma}^{(t)}(k_x, k_y) \approx & G_0(\omega) r_{sp}(\omega) \exp[iM(k_x x_p + k_y y_p)] \times \\ & \times \exp \left[i \sum_{j=0}^N \Delta z_j \sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)} \right] \times \\ & \times \left[\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y) \right] A \left(\omega; -f'_L \frac{k_x}{k}, -f'_L \frac{k_y}{k} \right). \end{aligned} \quad (5)$$

Проанализируем частотный состав этой функции. Функцию $\prod_{j=1}^N t_{j,j-1}(\omega; -Mk_x, -Mk_y)$ зачастую можно считать медленно меняющейся по пространственному спектру. Также и функцию A при отсутствии сильных aberrаций можно считать медленно меняющейся, за

исключением края апертуры, где происходит резкий скачок апертурной функции A до нулевого значения (это будет обсуждено ниже). Поэтому основной вклад в структуру такого пространственного спектра вносит фазовый множитель $\exp[i\Phi(k_x, k_y)]$, где

$$\Phi(k_x, k_y) = M(k_x x_p + k_y y_p) + \sum_{j=0}^N \Delta z_j \sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)}. \tag{6}$$

Используем подход с анализом локальных частот [18, 26]. Рассмотрим локальную круговую частоту ζ_x функции $\exp[i\Phi(k_x, k_y)]$ относительно переменной k_x в точке (k_x, k_y) :

$$\begin{aligned} \zeta_x(k_x, k_y) &= \frac{\partial \Phi(k_x, k_y)}{\partial k_x} = \\ &= M x_p - \sum_{j=0}^N \Delta z_j \frac{M^2 k_x}{\sqrt{k^2 n_j^2 - M^2(k_x^2 + k_y^2)}}. \end{aligned} \tag{7}$$

Анализ частоты вдоль направления k_y производится аналогично.

2. Поле зрения и пределы численной фокусировки

На практике сигнал $\Gamma^{(t)}(x, y)$ и его пространственный спектр $\tilde{\Gamma}^{(t)}(k_x, k_y)$ представляют собой матрицы чисел, к которым применяется дискретное преобразование Фурье на основе алгоритма быстрого преобразования Фурье (БПФ). Поэтому для корректного разрешения пространственного спектра соответствующей матрицей должен выполняться критерий Найквиста для локальных частот ζ_x и ζ_y во всех точках (k_x, k_y) , где существуют ненулевые компоненты пространственного спектра сигнала:

$$-\zeta_{xNq} \leq \zeta_x \leq \zeta_{xNq}, \tag{8}$$

$$-\zeta_{yNq} \leq \zeta_y \leq \zeta_{yNq}, \tag{9}$$

где ζ_{xNq} и ζ_{yNq} – частоты Найквиста матрицы пространственного спектра вдоль направлений k_x и k_y .

Поскольку речь идёт о частотном анализе пространственного спектра, такие частоты соответствуют пространственным координатам исходного сигнала, а соответствующие частоты Найквиста вдоль направлений k_x и k_y запишутся в виде:

$$\zeta_{xNq} = \frac{n\Delta x}{2} \text{ и } \zeta_{yNq} = \frac{m\Delta y}{2}, \tag{10}$$

где Δx и Δy – периоды пиксельной структуры вдоль осей x и y , $n \times m$ – количество пикселей в матрице, которой задан сигнал $\Gamma^{(t)}(x, y)$. Иными словами, ζ_{xNq} и ζ_{yNq} соответствуют половине размера поля зрения по матричному фотодетектору в направлениях x и y .

Рассмотрим случай круговой апертурной функции. В случае, когда фазовая модуляция $\Phi(k_x, k_y)$ обусловлена преимущественно дефокусировкой, а не аберрациями, связанными с визуализацией через слоистую среду, модуль второго слагаемого в (7) принимает максимальное значение при максимальном значении модуля k_x , при котором все ещё существуют ненулевые компоненты пространственного спектра.

Оно соответствует точке на краю круга, определяемого апертурной функцией, с $|k_x|_{max} = NA \cdot k / M$ и $k_y = 0$. Используя неравенства (8,9) с учётом того, что k_x может принимать значения как $|k_x|_{max}$, так и $-|k_x|_{max}$, получим:

$$-\frac{n\Delta x}{2M} + d \leq x_p \leq \frac{n\Delta x}{2M} - d, \tag{11}$$

$$-\frac{m\Delta y}{2M} + d \leq y_p \leq \frac{m\Delta y}{2M} - d, \tag{12}$$

где

$$d = \left| \sum_{j=0}^N \Delta z_j \frac{NA}{\sqrt{n_j^2 - NA^2}} \right|. \tag{13}$$

Полученные соотношения (11–13) означают, что размеры области поля зрения в оптически расфокусированном изображении, для которой сохранена информация о сигнале и возможна численно сфокусированная визуализация с сохранением качества, становится меньше полного размера поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям, на величину $2d$ в обоих направлениях x и y .

Рассмотрим также другое условие: чтобы хотя бы некоторые компоненты пространственного спектра сигнала были сохранены в расфокусированном изображении. Этот случай соответствует неравенствам

$$-\frac{n\Delta x}{2M} - d \leq x_p \leq \frac{n\Delta x}{2M} + d, \tag{14}$$

$$-\frac{m\Delta y}{2M} - d \leq y_p \leq \frac{m\Delta y}{2M} + d. \tag{15}$$

Размеры области, определяемой неравенствами (14, 15), наоборот, больше размеров поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям, на величину $2d$ в обоих направлениях x и y .

Иными словами, в численно сфокусированном изображении оптически расфокусированного объекта может наблюдаться два типа областей: центральная область с сохранением качества изображения и периферийная область с постепенным ухудшением качества изображения при удалении от границы центральной области. Эта периферийная область не обрывается на границе поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям, а располагается также за его пределами. Этот эффект связан с увеличением размера импульсного отклика (функции распределения точки) сигнала когерентности в поперечном направлении при дефокусировке. Часть такого импульсного отклика может быть зарегистрирована на интерферограмме даже в том случае, когда его центр лежит за пределами поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям.

Отметим, что при проведении частотного анализа пространственного спектра в данной работе не учи-

тывался резкий скачок апертурной функции до нуля на её границе. Это означает, что качество численно сфокусированных изображений оптически расфокусированных объектов может быть снижено по сравнению с изображениями оптически сфокусированных объектов во всем поле зрения. Однако величина таких эффектов, как правило, мала и в этом смысле можно говорить о сохранении качества в численно сфокусированном изображении оптически расфокусированного объекта в пределах центральной области.

На практике удобно иметь простой критерий для оценки допустимых пределов дефокусировки при численно сфокусированной визуализации. В качестве такого критерия можно использовать требование сохранения размеров части поля зрения, в которой визуализация происходит без потери качества, не менее определённой величины. Например, если использовать критерий сохранения при дефокусировке качества изображения не менее чем в половине линейного размера поля зрения в направлениях x и y , получим следующие соотношения:

$$d \leq \frac{n\Delta x}{4M} \text{ и } d \leq \frac{m\Delta y}{4M}. \tag{16}$$

В простейшем случае отсутствия слоистой структуры $j=0$ (визуализация расфокусированной поверхности в иммерсии с показателем преломления n_0) получим

$$|\Delta z_0| \leq \frac{n\Delta x}{4M} \frac{\sqrt{n_0^2 - NA^2}}{NA}, \tag{17}$$

$$|\Delta z_0| \leq \frac{m\Delta y}{4M} \frac{\sqrt{n_0^2 - NA^2}}{NA}. \tag{18}$$

3. Экспериментальное исследование

Как было показано в [14, 27], сигнал когерентности систем ЦГМ и ОКТ/ОКМ с пространственно частично когерентным освещением при $NA_i \rightarrow 0$ соответствует сигналу при пространственно когерентном освещении. Поэтому сделанные выше выводы также применимы для систем ОКМ и ЦГМ [14, 27, 28] в случае достаточно малых NA_i .

Для экспериментального исследования использовался ЦГМ с квазимонохроматическим пространственно частично когерентным освещением на пропускание, схема которого представлена на рис. 2. Эта схема соответствует описанной в работе [28], с заменой второго делителя зеркалом $M5$. В качестве матричного фотодетектора использовалась камера с 1280×1024 пикселями и периодом пиксельной структуры $5,2 \text{ мкм}$ в направлениях x и y . Числовая апертура микрообъективов $NA = 0,75$, числовая апертура освещения $NA_i \approx 0,004$, увеличение изображающей части системы $M \approx 45,5$. В качестве объекта использовался мазок крови на стеклянной пластинке. Для компенсации изменения стеклянной пластинкой фазовой модуляции поперечного пространственного спектра поля освещения в объектном плече, в опорном плече было немного уменьшено расстояние между линзой

$L4$ и микрообъективом MO_R за счёт смещения микрообъектива MO_R и зеркала $M3$, как показано на рис. 2. Однако можно отметить, что в случае очень малой NA_i это изменение фазовой модуляции не играет существенной роли.

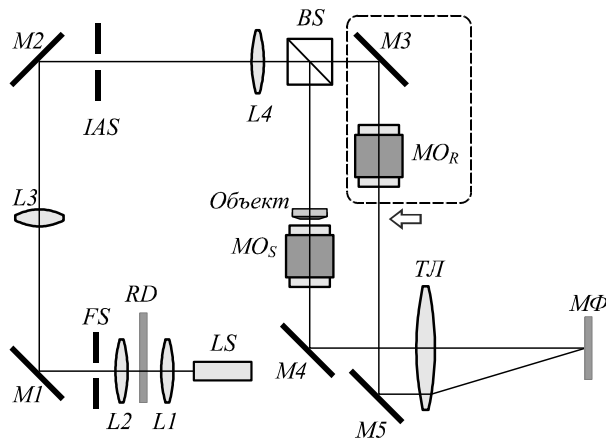


Рис. 2. Схема ЦГМ, использованного для проведения экспериментов. LS – гелий-неоновый лазер, L1–L4 – линзы системы освещения, RD – вращающийся рассеиватель, FS – полевая диафрагма системы освещения, IAS – диафрагма апертуры освещения, M1–M5 – зеркала, BS – делитель, MO_S , MO_R – объектный и опорный микрообъективы, TL – тубусная линза, МФ – матричный фотодетектор

Обработка записанных голограмм производилась в соответствии с [28], с добавлением численной фокусировки. Полученные голограммы делились на «фоновый» сигнал когерентности (полученный в отсутствие объекта [28]) и дополнялись пикселями с нулевыми значениями до размеров 2048×2048 , после чего производилось двумерное преобразование Фурье этого массива. Далее в полученном массиве пространственного спектра обнулялись все компоненты, за исключением пространственного спектра сигнала когерентности. Полученный массив умножался на функцию [13, 15]

$$\Psi(k_x, k_y) = \exp \left[-i\Delta z_0 \left(\sqrt{k^2 - (k_x^2 + k_y^2)M^2} - k \right) \right]. \tag{19}$$

Далее производилось обратное преобразование Фурье; модуль и аргумент полученного массива представляют собой амплитудное и фазовое изображения.

На рис. 3–4 представлены изображения, для получения которых была использована лишь левая часть полной голограммы размером 1024×1024 пикселей (как показано на рис. 5). Изображения на рис. 3в, г соответствуют положению объекта в фокусе (аналогично рис. 5). Изображения на рис. 3а, б и рис. 4 получены из голограмм, записанных при дефокусировке объекта. Определение величины дефокусировки для этих изображений производилось путём получения ряда численно сфокусированных изображений с различными величинами Δz_0 и выбора изображений наилучшего качества (рис. 3а, б соответствует $\Delta z_0 = -24 \text{ мкм}$, рис. 4а, б соответствует $\Delta z_0 = 22 \text{ мкм}$, рис. 4д, е соответствует $\Delta z_0 = 40,5 \text{ мкм}$).

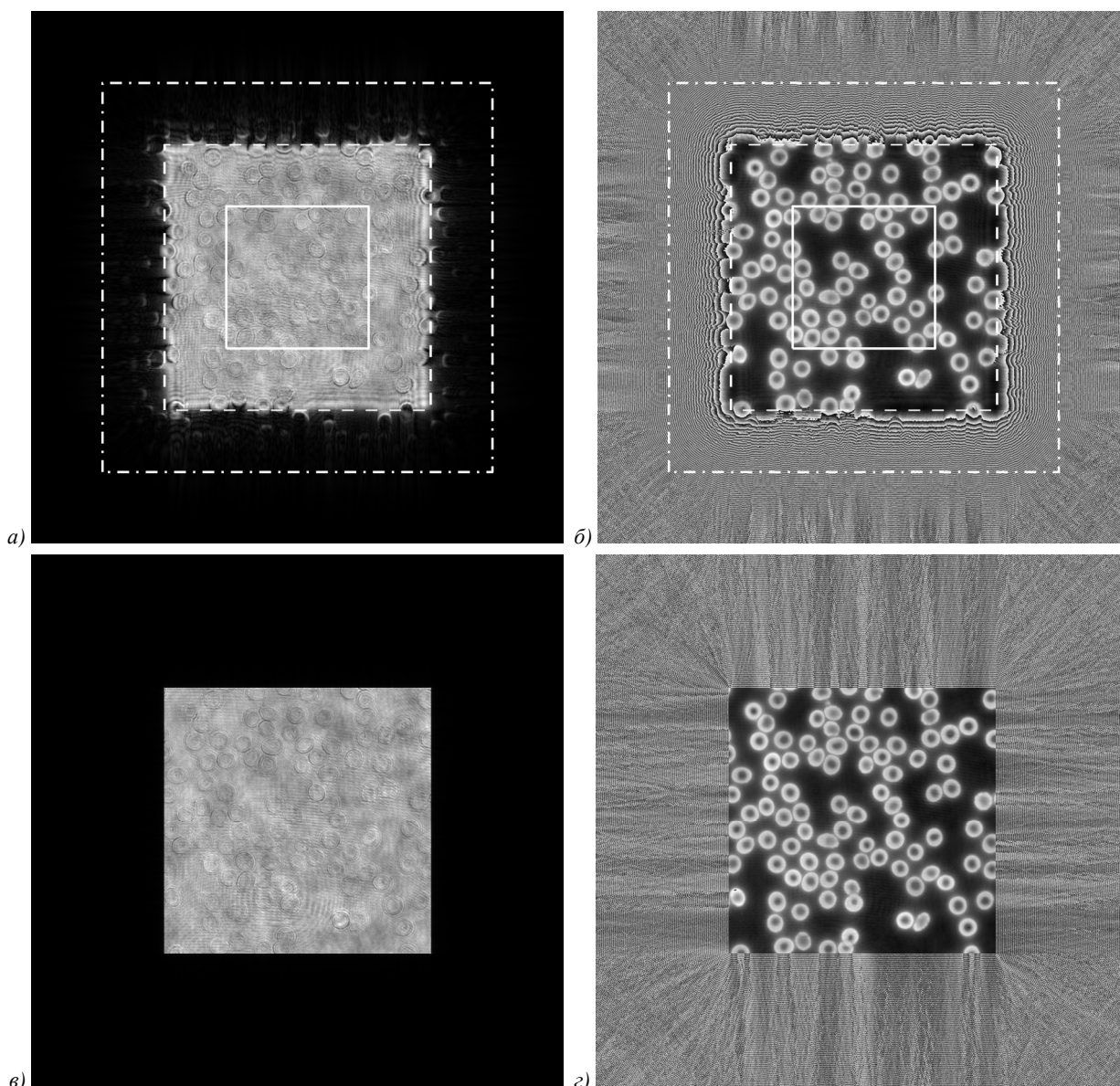


Рис. 3. Амплитудные (а, в) и фазовые (б, з) изображения, полученные при расфокусированном положении объекта после применения численной фокусировки (а, б) и при положении объекта в фокусе (в, з)

Сплошной, штриховой и штрихпунктирной линиями на изображениях, соответствующих дефокусировке (рис. 3а, б и рис. 4), обозначены границы различных областей. Центральная область (ограниченная сплошной линией) определяется неравенствами (11, 12) и соответствует сохранению качества изображения по сравнению с оптически сфокусированным изображением. Штриховая линия соответствует границе поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям. Штрихпунктирная линия ограничивает область, определяемую неравенствами (14, 15).

На рис. 5 представлены изображения, соответствующие положению объекта в фокусе. Для получения этих изображений использовался полный размер матричного фотодетектора 1280×1024 пикселей (область, соответствующая дополнению нулями до размеров 2048×2048 при преобразованиях Фурье, не показана). Область голограммы, использованная для получения

изображений, представленных на рис. 3–4, обозначена штриховой линией.

Как видно из рис. 3–4, с увеличением дефокусировки увеличивается размер периферийной области поля зрения с потерей части информации о структуре объекта. Визуально это выражается в появлении полос, искажающих структуру изображения. Область, в которой наблюдается изображение, хотя и с потерей качества, не обрывается на границе поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям, а располагается также и за её пределами. Так, на рис. 3а, б и рис. 4 видны изображения эритроцитов, расположенных за пределами поля зрения, соответствующего оптически сфокусированным изображениям. Как видно из сравнения с рис. 5, обладающим большим полем зрения, это реальные эритроциты, оказавшиеся за пределами поля зрения обрезанных матриц данных, использованных для получения изображений на рис. 3–4.

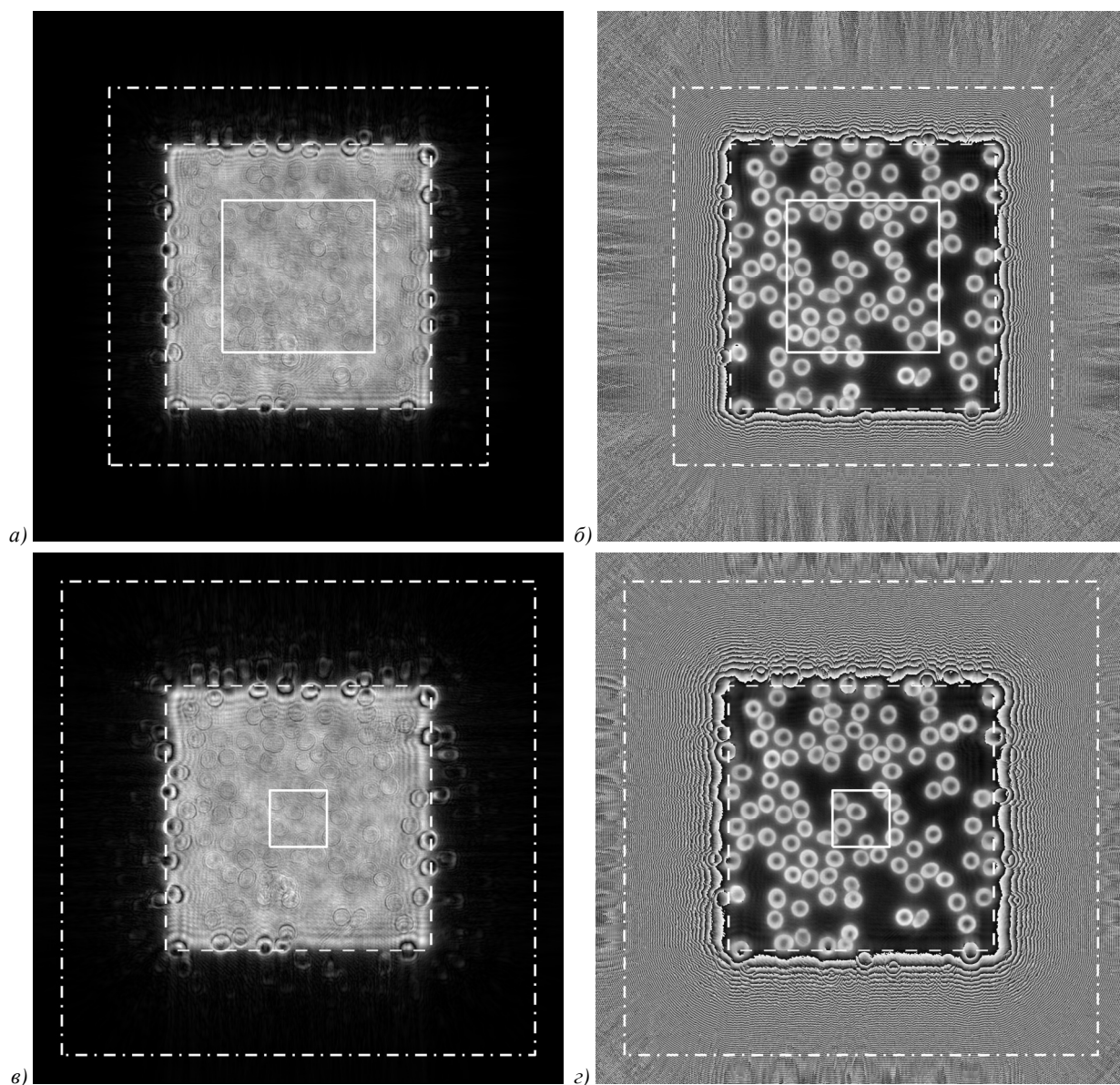


Рис. 4. Амплитудные (а, в) и фазовые (б, г) изображения, полученные при различных величинах дефокусировки после применения численной фокусировки

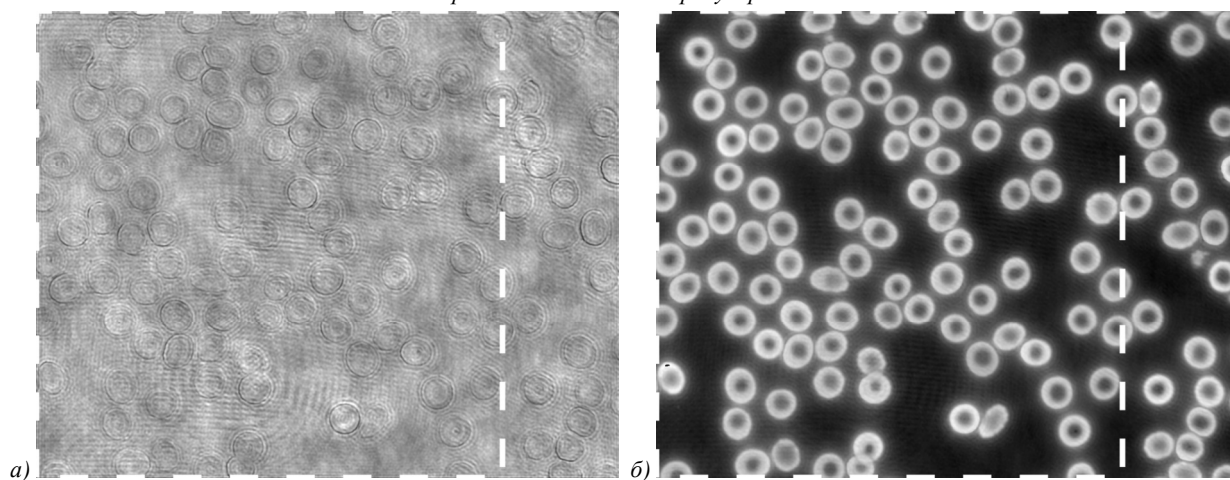


Рис. 5. Амплитудное (а) и фазовое (б) изображения, восстановленные с полной голограммы, соответствующей положению объекта в фокусе

Заключение

В данной работе представлен анализ эффектов, возникающих на краях поля зрения при численно сфокусированной визуализации оптически расфокусированных объектов в системах интерференционной микроскопии с пространственно когерентным освещением объекта. Получены выражения, описывающие границы областей различного типа в численно сфокусированных изображениях в зависимости от параметров дефокусировки.

Получены выражения для оценки допустимых пределов дефокусировки при численно сфокусированной визуализации, основанные на критерии сохранения в численно сфокусированных изображениях качества изображения в половине линейного размера поля зрения. Отметим, что в работе [29] были ранее получены выражения для максимальной дистанции численной фокусировки в ЦГМ, однако выражения, полученные в настоящей работе, основаны на более подробном анализе и отличаются от полученных в [29].

Проведено экспериментальное исследование изменения с дефокусировкой размеров областей различного типа в численно сфокусированных изображениях оптически расфокусированных объектов в цифровом голографическом микроскопе с освещением на пропускание.

Полученные результаты могут быть использованы для проектирования и применения различных систем интерференционных микроскопов (ОКТ/ОКМ, ЦГМ и ДФМ) с учётом возможностей численной фокусировки.

Благодарности

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

Литература

1. **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, Issue 34. – P. 6994-7001. – DOI: 10.1364/AO.38.006994.
2. **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, Issue 22. – P. 8693-8698. – DOI: 10.1364/OPEX.13.008693.
3. **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, Issue 5. – P. 1131-1139. – DOI: 10.1364/AO.43.001131.
4. **Kemper, B.** Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection / B. Kemper, G. von Bally // *Applied Optics*. – 2008. – Vol. 47, Issue 4. – P. A52-A61. – DOI: 10.1364/AO.47.000A52.
5. **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, Issue 10. – P. 1806-1812. – DOI: 10.1364/AO.44.001806.
6. **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, Issue 16. – P. 2092-2094. – DOI: 10.1364/OL.30.002092.
7. **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.
 8. **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 Optical Society of America A*. – 2007. – Vol. 24, Issue 4. – P. 1034-1041. – DOI: 10.1364/JOSAA.24.001034.
 9. **Hillmann, D.** Holography-holographic optical coherence tomography / D. Hillmann, C. Lührs, T. Bonin, P. Koch, G. Hüttmann // *Optics Letters*. – 2011. – Vol. 36, Issue 13. – P. 2390-2392. – DOI: 10.1364/OL.36.002390.
 10. **Shabanov, D.V.** Broadband digital holographic technique of optical coherence tomography for 3-dimensional biotissue visualization / D.V. Shabanov, G.V. Gelikonov, V.M. Gelikonov // *Laser Physics Letters*. – 2009. – Vol. 6, Issue 10. – P. 753-758. – DOI: 10.1002/lapl.200910052.
 11. **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, Issue 9. – P. 10850-10866. – DOI: 10.1364/OE.21.010850.
 12. **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, Issue 13. – P. 16061-16078. – DOI: 10.1364/OE.22.016061.
 13. **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, Issue 13. – P. 2529-2531. – DOI: 10.1364/OL.37.002529.
 14. **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, Issue 8. – P. 1697-1708. – DOI: 10.1364/AO.53.001697.
 15. **Talaikova, N.A.** Numerical focusing in diffraction phase microscopy / N.A. Talaikova, A.A. Grebenyuk, A.L. Kalyanov, V.P. Ryabukho // *Proceedings of the SPIE*. – 2016. – Vol. 9917. – 99171V. – DOI: 10.1117/12.2229881.
 16. **Cuche, E.** Aperture apodization using cubic spline interpolation: application in digital holographic microscopy / E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge // *Optics Communications*. – 2000. – Vol. 182, Issues 1-3. – P. 59-69. – DOI: 10.1016/S0030-4018(00)00747-1.
 17. **Dubois, F.** Border processing in digital holography by extension of the digital hologram and reduction of the higher spatial frequencies / F. Dubois, O. Monnom, C. Yourasowsky, J.-C. Legros // *Applied Optics*. – 2002. – Vol. 41, Issue 14. – P. 2621-2626.
 18. **Kozacki, T.** Numerical errors of diffraction computing using plane wave spectrum decomposition / T. Kozacki // *Optics Communications*. – 2008. – Vol. 281, Issue 17. – P. 4219-4223. – DOI: 10.1016/j.optcom.2008.05.023.
 19. **Matsushima, K.** Band-limited angular spectrum method for numerical simulation of free-space propagation in far and near fields // K. Matsushima, T. Shimobaba // *Optics Express*. – 2009. – Vol. 17, Issue 22. – P. 19662-19673. – DOI: 10.1364/OE.17.019662.
 20. **Grebenyuk, A.A.** Field of view of numerically focused images in digital holographic microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // *Saratov Fall Meeting 2013 – 1st Interna-*

- tional Symposium on Optics and Biophotonics, 2013, Saratov, Russia. – 2013.
21. **Гребенюк, А.А.** Numerical reconstruction of volumetric image in swept-source interference microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // AIP Conference Proceedings. – 2013. – Vol. 1537. – P. 147-154. – DOI: 10.1063/1.4809704.
 22. **Гребенюк, А.А.** Theoretical model of volumetric objects imaging in a microscope / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // Proceedings of the SPIE. – 2012. – Vol. 8430. – 84301B. – DOI: 10.1117/12.922198.
 23. **Гребенюк, А.А.** Coherence effects of thick objects imaging in interference microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho // Proceedings of the SPIE. – 2012. – Vol. 8427. – 84271M. – DOI: 10.1117/12.922108.
 24. **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.
 25. **Гребенюк, А.А.** Theory of imaging and coherence effects in full-field optical coherence microscopy / A.A. Grebenyuk, V.P. Ryabukho. – In Book: Handbook of full-field optical coherence microscopy / ed. A. Dubois. – Chapter 2. – Singapore: Pan Stanford Publishing, 2016. – P. 53-89. – ISBN: 978-981-4669-16-0.
 26. **Goodman, J.W.** Introduction to Fourier optics / J.W. Goodman. – 2nd ed. – New York: McGraw-Hill, 1996. – 441 p. – ISBN: 978-0-07-024254-8.
 27. **Гребенюк, А.А.** 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. – 903119 (8 p.). – ISBN: 10.1117/12.2052837.
 28. **Гребенюк, А.А.** An off-axis digital holographic microscope with quasimonochromatic partially spatially coherent illumination in transmission / A.A. Grebenyuk, Y.V. Tarakanchikova, V.P. Ryabukho // Journal of Optics. – 2014. – Vol. 16, Issue 10. – 105301 (6 p.). – DOI: 10.1088/2040-8978/16/10/105301.
 29. **Dubois, F.** Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence / F. Dubois, L. Joannes, J.-C. Legros // Applied Optics. – 1999. – Vol. 38, Issue 34. – P. 7085-7094. – DOI: 10.1364/AO.38.007085.

Сведения об авторах

Гребенюк Антон Александрович, кандидат физико-математических наук, работал доцентом кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного университета и старшим научным сотрудником лаборатории проблем когерентно-оптических измерений в точной механике Института проблем точной механики и управления РАН. В настоящее время работает в лаборатории Кристиана Допплера OPTRAMED Центра медицинской физики и биомедицинской техники Медицинского университета Вены. Область научных интересов: оптическая когерентная томография/микроскопия, количественная фазовая микроскопия.

E-mail: GrebenyukAA@yandex.ru.

Клычкова Дарья Михайловна, магистрант кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного университета, стажер-исследователь лаборатории проблем когерентно-оптических измерений в точной механике Института проблем точной механики и управления РАН. Область научных интересов: оптическая микроскопия, интерферометрия, цифровая голография. E-mail: daryaklychkova@mail.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, интерференционная микроскопия, когерентность.

E-mail: rvp-optics@yandex.ru.

ГРНТИ: 29.31.29

Поступила в редакцию 30 ноября 2017 г. Окончательный вариант – 19 января 2018 г.

NUMERICAL FOCUSING AND THE FIELD OF VIEW IN INTERFERENCE MICROSCOPY

A.A. Grebenyuk^{1,2,3}, D.M. Klychkova^{1,2}, V.P. Ryabukho^{1,2}

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

² Saratov State University, Saratov, Russia,

³ Christian Doppler Laboratory OPTRAMED, Center for Medical Physics and Biomedical Engineering, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Abstract

This paper presents an analysis of the effects occurring at the borders of the field of view in numerically focused imaging of optically defocused objects in interference microscopy systems with spatially coherent illumination of an object. Equations describing the borders of regions of different types in numerically focused images with respect to the defocus parameters are obtained. Equations for estimating the acceptable limits of defocus in numerically focused imaging are obtained. Experimental investigation of the effects, occurring at the borders of the field of view in

numerically focused imaging of optically defocused objects in a digital holographic microscope with illumination in transmission is performed.

Keywords: numerical focusing, interference microscopy, digital holographic microscopy, optical coherence microscopy.

Citation: Grebenyuk AA, Klychkova DM, Ryabukho VP. Numerical focusing and the field of view in interference microscopy. *Computer Optics* 2018; 42(1): 28-37. DOI: 10.18287/2412-6179-2018-42-1-28-37.

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

References

- [1] Cuhe E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl Opt* 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. *Opt 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. *Appl Opt* 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. *Appl Opt* 2008; 47(4): A52-A61. DOI: 10.1364/AO.47.000A52.
- [5] Massatsch P, Charrière F, Cuhe E, Marquet P, Depeursinge CD. Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy. *Appl Opt* 2005; 44(10): 1806-1812. DOI: 10.1364/AO.44.001806.
- [6] Yu LF, Kim MK. Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method. *Opt Lett* 2005; 30(16): 2092-2094. DOI: 10.1364/OL.30.002092.
- [7] Ralston TS, Marks DL, Carney PS, Boppart SA. Interferometric synthetic aperture microscopy. *Nature Physics* 2007; 3: 129-134. DOI: 10.1038/nphys514.
- [8] 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.
- [9] Hillmann D, Lührs C, Bonin T, Koch P, Hüttmann G. Holography-holographic optical coherence tomography. *Opt Lett* 2011; 36(13): 2390-2392. DOI: 10.1364/OL.36.002390.
- [10] Shabanov DV, Geliknov GV, Gelikonov VM. Broadband digital holographic technique of optical coherence tomography for 3-dimensional biotissue visualization. *Laser Phys Lett* 2009; 6(10): 753-758. DOI: 10.1002/lapl.200910052.
- [11] Kumar A, Drexler W, Leitgeb RA. Subaperture correlation based digital adaptive optics for full field optical coherence tomography. *Opt Express* 2013; 21(9): 10850-10866. DOI: 10.1364/OE.21.010850.
- [12] Kumar A, Drexler W, Leitgeb RA. Numerical focusing methods for full field OCT: a comparison based on a common signal model. *Opt Express* 2014; 22(13): 16061-16078. DOI: 10.1364/OE.22.016061.
- [13] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Numerical correction of coherence gate in full-field swept-source interference microscopy. *Opt Lett* 2012; 37(13): 2529-2531. DOI: 10.1364/OL.37.002529.
- [14] Grebenyuk A, Federici A, Ryabukho V, Dubois A. Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination. *Appl Opt* 2014; 53(8): 1697-1708. DOI: 10.1364/AO.53.001697.
- [15] Talaikova NA, Grebenyuk AA, Kalyanov AL, Ryabukho VP. Numerical focusing in diffraction phase microscopy. *Proc SPIE* 2016; 9917: 99171V. DOI: 10.1117/12.2229881.
- [16] Cuhe E, Marquet P, Depeursinge C. Aperture apodization using cubic spline interpolation: application in digital holographic microscopy. *Optics Communications* 2000; 182(1-3): 59-69. DOI: 10.1016/S0030-4018(00)00747-1.
- [17] Dubois F, Monnom F, Yourassowsky C, Legros J-C. Border processing in digital holography by extension of the digital hologram and reduction of the higher spatial frequencies. *Appl Opt* 2002; 41(14): 2621-2626.
- [18] Kozacki T. Numerical errors of diffraction computing using plane wave spectrum decomposition. *Opt Commun* 2008; 281(17): 4219-4223. DOI: 10.1016/j.optcom.2008.05.023.
- [19] Matsushima K, Shimobaba T. Band-limited angular spectrum method for numerical simulation of free-space propagation in far and near fields. *Opt Express* 2009; 17(22): 19662-19673. DOI: 10.1364/OE.17.019662.
- [20] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Field of view of numerically focused images in digital holographic microscopy. *Saratov Fall Meeting 2013 – 1st International Symposium on Optics and Biophotonics*; 2013.
- [21] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Numerical reconstruction of volumetric image in swept-source interference microscopy. *AIP Conf Proc* 2013; 1537: 147-154. DOI: 10.1063/1.4809704.
- [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. 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.
- [25] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Theory of imaging and coherence effects in full-field optical coherence microscopy. In Book: Dubois A, ed. *Handbook of full-field optical coherence microscopy*. Chap 2. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2016: 53-89. ISBN: 978-981-4669-16-0.
- [26] Goodman JW. *Introduction to Fourier optics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1996. ISBN: 978-0-07-024254-8.
- [27] Grebenyuk AA, Ryabukho VP. Numerical focusing in digital holographic microscopy with partially spatially coherent illumination in transmission. *Proc SPIE* 2014; 9031: 903119. ISBN: 10.1117/12.2052837.
- [28] Grebenyuk AA, Tarakanchikova YV, Ryabukho VP. An off-axis digital holographic microscope with quasimono-

chromatic partially spatially coherent illumination in transmission. *J Opt* 2014; 16(10): 105301. DOI: 10.1088/2040-8978/16/10/105301.

[29] Dubois F, Joannes L, Legros J-C. Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. *Appl Opt* 1999; 38(34): 7085-7094. DOI: 10.1364/AO.38.007085.

Author's information

Anton Alexandrovich Grebenyuk, Candidate of Physical-Mathematical Sciences, has worked as 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. Currently he is with the Christian Doppler Laboratory OPTRAMED, Center for Medical Physics and Biomedical Engineering, Medical University of Vienna. Research interests: optical coherence tomography/microscopy, quantitative phase microscopy. E-mail: GrebenyukAA@yandex.ru .

Daria Mikhailovna Klychkova is a master student at the Department of Optics and Biophotonics of Saratov State University and an Intern 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 microscopy, interferometry, digital holography. E-mail: daryaklychkova@mail.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, interference microscopy, coherence. E-mail: rvp-optics@yandex.ru .

Received November 30, 2017. The final version – January 19, 2018.
