

ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”
КАТЕДРА “ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ФИЗИКА”

ИЛИЯН ТОДОРОВ ПЕРУХОВ

***ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФИЗИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ
СТРУКТУРИ С ЦИФРОВ ЛИНЕЕН ХОЛОГРАФСКИ
МИКРОСКОП***

*АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН «ДОКТОР»*

Професионално направление:

4. «Природни науки, математика и информатика»

4. 1. «Физически науки»

Научна специалност:

**01.03.26.«Електрични, магнитни и оптични свойства на
кондензираната материя »**

Научен ръководител:

проф. д-р Емилия Михайлова

РЕЦЕНЗИИ ОТ:

1. проф. д-р Венцеслав Съйнов – ИМех – БАН

2. проф. д-р Теменужка Йовчева – ПУ „Паисий Хилендарски“

СТАНОВИЩА ОТ:

1. проф. д-р Емилия Михайлова - АУ Пловдив

2. доц. д-р Димана Назърва – ИОМТ – БАН

3. доц. д-р Тодорка Димитрова – ПУ „Паисий Хилендарски“

ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”
КАТЕДРА “ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ФИЗИКА”

ИЛИЯН ТОДОРОВ ПЕРУХОВ

***ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФИЗИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ
СТРУКТУРИ С ЦИФРОВ ЛИНЕЕН ХОЛОГРАФСКИ
МИКРОСКОП***

*АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН «ДОКТОР»*

Професионално направление:

4. «Природни науки, математика и информатика»

4. 1. «Физически науки»

Научна специалност:

**01.03.26.«Електрични, магнитни и оптични свойства на
кондензираната материя »**

Научен ръководител:

проф. д-р Емилия Михайлова

РЕЦЕНЗИИ ОТ:

1. проф. дфзн Венцеслав Съйнов – ИМех – БАН

2. проф. д-р Теменужка Йовчева – ПУ „Паисий Хилендарски“

СТАНОВИЩА ОТ:

1. проф. д-р Емилия Михайлова - АУ Пловдив

2. доц. д-р Димана Назърова – ИОМТ – БАН

3. доц. д-р Тодорка Димитрова – ПУ „Паисий Хилендарски“

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ ОСНОВНИ ОЗНАЧЕНИЯ И СЪКРАЩЕНИЯ

ССД - charge coupled device камера с висока разделителна способност

ЦХМ (ДНМ) - Цифровата холографска микроскопия

ОСХ - Оптичната сканираща холография

ЦИХ - Цифровата интерференчна холография

USAF – международен тест за разделителна способност

ДИН-РТV Проследяването на скоростта на частиците чрез Цифрова линейна холография

FFT-базиран алгоритъм – бърз Фурие алгоритъм

ДИНМ - Цифрова линейна холографска микроскопия

θ - ъгъл между опорния лъч и обектния лъч.

$O(x,y)$ - амплитуда на опорната вълна

$R(x,y)$ - амплитуда на вълната разсеяна от обекта

$k = \frac{2\pi}{\lambda}$ - вълново число

$\check{I}(r)$ - Интензитетът на контрастното изображение

NA - числова апертура на микроскопа

W - ширина на камерата

D - разстоянието от източника до екрана

$K(r)$ - реконструираната амплитуда

P_n - полиномите на Лежандър

a_n - вероятност за разсейване

I - интензитет на реконструираното изображение

Diacetone-Acrylamide-based (DA-based) ниско токсичен холографски фотополимер

TGS - триглицин сулфат

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. *Характеристики на USAF Test Target 1951*

Таблица 2. *Състав на Две композиции на diacetone acrylamide*

Таблица 3. *Размери на домените*

УВОД

Откритието на Денис Габор от 1948 [1], наречено холография, позволява да се запише и реконструира напълно оптичното вълново поле, разсеяно или създадено от даден обект, т.е. да се определи както амплитудата, така и фазата му. Техниките за реконструиране на образите на обектите се усъвършенстват в най-различни направления от създаването на метода и до днес. Най-голямо значение за напредъка на холографските технологии има изобретяването на ССД електрониката и компютърните технологии, което дава възможност традиционния процес на оптическа реконструкция да се извършва числено. Измерените данни за интензитета на холограмата се предават на компютър директно от ССД камерата и реконструкцията се извършва числено от подходящ софтуер [2].

Цифровата холографска микроскопия (ЦХМ) е метод, който се базира именно на тези последни успехи. Това е неразрушаващ метод, без маркиране на детайли от пробата, който позволява едновременното количествено измерване на амплитудата и фазата на електромагнитни вълни (от оптичския до рентгеновия диапазон) преминаващи през съответната проба, в цялото поле на наблюдение на обекта.

Методът намира многобройни приложения: например в областта на биомедицинската микроскопия, велосиметрията на частици, при изследване на технически микроструктури като мостове, мембрани и др. Холографията може да възпроизвежда оптичното 3-D поле на обекта, тъй като холографският образ на дадено разстояние съдържа не само изображението на фокус, но и приноси от такива детайли на обекта, които са извън фокалната равнина. Цифровата холография чрез количествен фазов анализ отчита натрупващите се фазови вариации по протежение на пътя на лазерния лъч през обекта и дава 3-D разпределението и вариациите на амплитудата на разсейване или на коефициента на пречупване в целия обем. Те са от значителен интерес при много приложения за биомедицински изследвания, метрологията, анализ на полето на скоростите и положенията на частици и др.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се създаде лабораторен прототип на Цифров холографски микроскоп и да се проучат възможностите за неговото иновационно приложение както във физиката, така и в биологичните науки.

За постигане на поставената цел бяха поставени следните задачи:

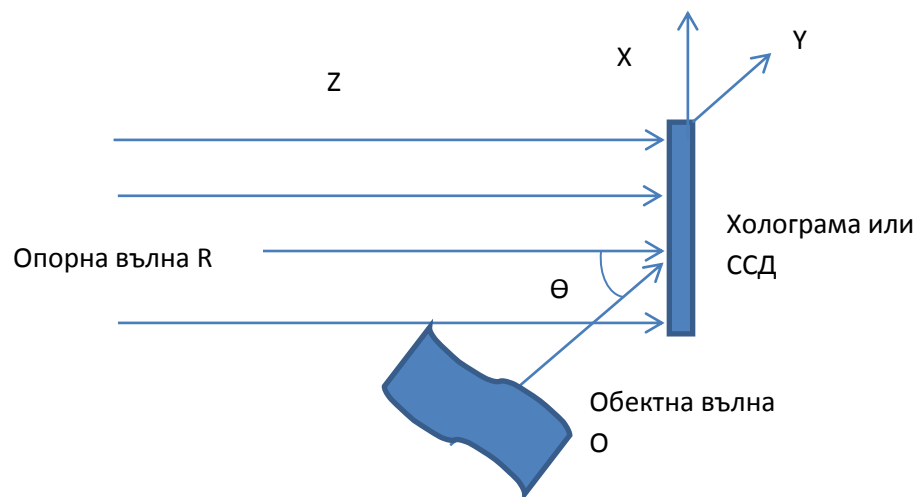
1. Библиографска справка за цифрова холографска микроскопия
2. Дизайн и конструиране на цифров холографски микроскоп
3. Калибриране на цифров холографски микроскоп и анализ на разделителната му способност
4. Изследване на разпределението на наночастици с цифров холографски микроскоп
5. Експериментални изследвания на структурата на полимерни решетки с цифров холографски микроскоп
6. Експериментални изследвания на доменна структура на триглицинсулфат – чист и с примеси на лантаниди с методите на цифровата холографска микроскопия
7. Изследване на морфологията и времеви анализ на живи клетки

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Основният принцип на холографията е записа на интерференчната картина от електромагнитна вълна, която е отразена или преминава през обект и опорна вълна, която най-често е плоска или сферична. Записаната интерференчната картина се нарича холограма. При класическата холография от холограмата, записана във холографски материал, след облъчване с опорната вълна, се възстановява образа на обекта. При цифровата холография възстановяването става чрез математично преобрауване на холограмата, записана в ССД камера.

Интерференция между опорна и обектна вълна

Възможни са две основни конфигурации по отношение разположението на опорния лъч и обектния лъч. Когато между двата лъча има ъгъл θ конфигурацията се нарича нелинейна (off-line), а когато ъгълът е $\theta = 0$ линейна (on-line). Исторически линейната конфигурация е въведена още чрез изобретението на Габор, а нелинейната по-късно от Лейт и Упатниекс [3].



Фигура 1. *Интерференция върху екран (CCD) на плоска опорна вълна $R(x,y)$ и дифракционна обектна вълна $O(x,y)$*

Тук разглеждам интерференцията върху екран (CCD) на плоска опорна вълна $R(x,y)$ и дифракционна обектна вълна $O(x,y)$, като θ е ъгълът между нормалите им.

На мястото на екрана обикновено е поставена регистрираща система (тук това е ССД камера). С $O(x,y)$ е означена опорната вълна (която за простота е плоска и колимирана), а с $R(x,y)$ е означена вълната разсеяна от обекта.

$$O(x, y) = |O(x, y)| \exp[i\varphi(x, y)] \exp(i2\pi\xi \cdot x) \quad (1)$$

$$R(x, y) = R \quad (2)$$

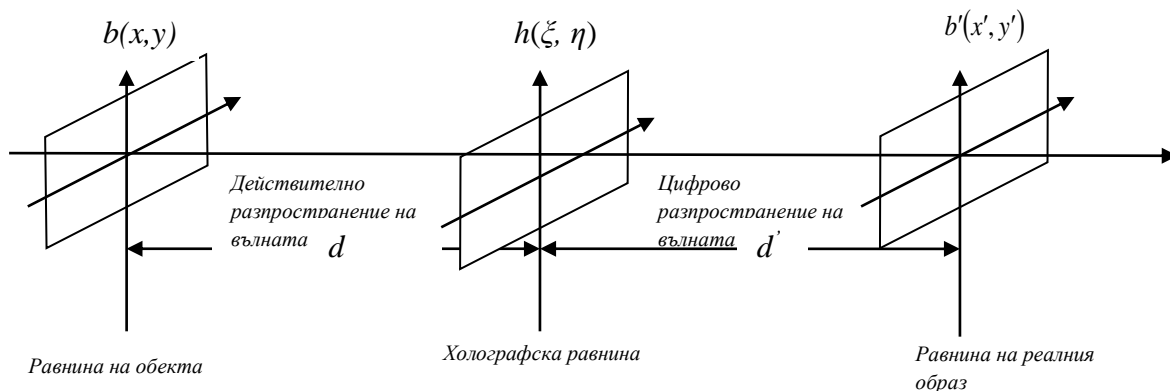
$$\xi_r = \frac{\sin\theta}{\lambda} \text{ е пространствената честота.} \quad (3)$$

Интерференцията между двете вълни дава на екрана (ССД) следния резултат:

$$\begin{aligned} H(x, y) &= |R(x, y) + O(x, y)|^2 = |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2 + \\ &+ R |O(x, y)| \exp[-i\varphi(x, y)] \exp(-i2\pi\xi R x) + R |O(x, y)| \exp[i\varphi(x, y)] \exp(i2\pi\xi R x) \\ &= R^2 + |O(x, y)|^2 + 2R \cdot |O(x, y)| \cos[2\pi\xi \cdot R \cdot x + \varphi(x, y)] \end{aligned} \quad (4)$$

Математически принципи на цифрова реконструкция

На фигура 2. е представен прост математически модел за запис и реконструкция на цифровите холограми.



Фигура 2. Математически модел за запис и реконструкция на цифровите холограми

Обектът се намира в равнината xu , и дифракционното му поле на разстояние d се дава с $b(x, y)$. Тъй като там е разположена ССД камерата, която регистрира интензитета на интерфериращите вълнови полета, то $h(\xi, \eta)$ е интензитетът в равнината на холограмата.

$b'(x', y')$ е реконструираният образ на полето. Тъй като той е комплексна функция, получаваме едновременно и интензитета и фазата в желаната равнина на реконструкция.

Дифракционен интеграл на Зомерфелд-Релей

Дифракционното вълново поле в равнината на изображението се дава с дифракционната формула на Зомерфелд-Релей [4]:

$$b'(x', y') = \frac{1}{i\lambda} \iint h(\xi, \eta) \cdot r(\xi, \eta) \frac{e^{ik\rho}}{\rho} \cos \Theta d\xi d\eta \quad (5)$$

където:

$$\rho = \sqrt{d'^2 + (\xi - x')^2 + (\eta - y')^2} \quad (6)$$

е разстоянието от дадена точка от равнината на холограмата до точка в равнината на изображението. $r(\xi, \eta)$ е опорното вълново поле използвано за осветяване на холограмата. $\cos \Theta$ е фактор на отклонение, който нормално може да се положи за равен на единица, поради малките стойности за ъгъла Θ .

Известни са три основни метода за цифровото решаване на горният дифракционен интеграл (5).

При първия метод, наречен приближение на Френел, се замества ρ в делителя с разстоянието d' . Това приближение е валидно, когато разстоянието от източника до обекта е голямо в сравнение с размерите на ССД камерата.

При втория метод, наречен метод на Фурие трансформацията се използва сферична вълна, което опростява много математическия израз.

Друг метод е **методът на конволюция**, разглеждащ интеграла като конволюция. Като се приложи теоремата за конволюцията, интегралът може да се трансформира в произведение от права Фурие трансформация и обратна Фурие трансформация. Разгледани са и двата метода, заедно с условията, които опростяват пресмятането.

Цифрови алгоритми за реконструкция

Приближение на Френел

$$\text{Ако } z^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} [(\xi - x')^2 + (\eta - y')^2]^2 \quad (7)$$

ρ може да се замести с d' в делителя на (5). ρ в експонентата е бързо осцилираща пространствено фаза и би предизвикала неприемливи грешки, ако се замени с полином на Тейлор от 1 ред. Биномно развитие на квадратният корен в (2.6) дава:

$$\rho \cong d' \left[1 + \frac{1}{2} \frac{(\xi - x')^2}{d'^2} + \frac{1}{2} \frac{(\eta - y')^2}{d'^2} \right] \quad (8)$$

Когато се приложи горното приближение интегралът става:

$$b'(x', y') = \frac{1}{i\lambda d'} \left[e^{ikd'} e^{i\pi d' \lambda (v^2 + \mu^2)} \right] \iint h(\xi, \eta) \cdot r(\xi, \eta) e^{\frac{i\pi}{d'\lambda} [\xi^2 + \eta^2]} e^{-2\pi i [\xi v + \eta \mu]} d\xi d\eta \quad (9)$$

Координатите $v = \frac{x'}{d'\lambda}$ и $\mu = \frac{y'}{d'\lambda}$ са въведени в последните формули.

Когато резултатът се запише чрез тях, се установява, че двойният интеграл е Фурие-трансформацията на холограмата $h(\xi, \eta)$ умножена с опорната вълна $r(\xi, \eta)$ и експоненциална функция $w(\xi, \eta)$ дадена с:

$$w(\xi, \eta) = e^{\frac{i\pi}{d'\lambda} (\xi^2 + \eta^2)} \quad (10)$$

Интегралът е умножен с фазова функция

$$w(\xi, \eta) = e^{ikd'} e^{i\pi d' \lambda (v^2 + \mu^2)} \quad (11)$$

$z(v, \mu)$ се задава от физичните и геометрични свойства на холограмната апаратура и не зависи от индивидуалната холограма. В приложения свързани с холографска интерферометрия, където само разликите между фазите или интензитетите между две или повече холограми са от значение, този фактор може да се пренебрегне.

Когато уравнение (2.9) се препише с термините на новодефинираните функции, се достига до по опростен израз за приближението на Френел:

$$b'(x', y') \approx z(v, \mu) \cdot F \{ h(\xi, \eta) \cdot r(\xi, \eta) \cdot w(\xi, \eta) \} \quad (12)$$

Постоянният фактор $\frac{1}{id'\lambda}$ се изпуска, тъй като може само да доведе само до премащабиране на цялото разпределение на интензитета. Обикновено не се изискват точни количествени измервания на полето на интензитета.

Дискретизация:

ССД камерата е изградена от активни пиксели с крайни размери. Ако пикселите са $N \times M$ с размери $\Delta\xi$ и $\Delta\eta$ дискретния вид на (9) може да се запише като :

$$b' = e^{-\frac{i\pi d'\lambda}{NM} \left(\frac{n^2}{\Delta\xi^2} + \frac{m^2}{\Delta\eta^2} \right)} \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{M-1} h(k\Delta\xi, l\Delta\eta) \cdot e^{\frac{i\pi}{d'\lambda} (k^2 \Delta\xi^2 + l^2 \Delta\eta^2)} e^{2i\pi \left[\frac{kn}{N} + \frac{lm}{M} \right]} \quad (13)$$

Това е дискретна Фурие трансформация и може да се изчисли числово чрез FFT алгоритъм за скоростна Фурие трансформация .

Размери на пикселите в реконструираното изображение

Като се сравни непрекъснатото уравнение (9) с дискретната форма (13) се установява че произведението $\zeta v = kn\Delta\xi\Delta v$ и $\eta\mu = lm\Delta\eta\Delta\mu$

се заменят с $\frac{kn}{N}$ и $\frac{lm}{M}$ съответно. Като се комбинират с съотношенията $\Delta v = \frac{\Delta x'}{d'\lambda}$ и

$\Delta\mu = \frac{\Delta y'}{d'\lambda}$ определени в (9), получаваме израз за размерите на пикселите $\Delta x'$ и $\Delta y'$ в

реконструираното изображение:

$$\Delta x' = \frac{d\lambda'}{N\Delta\xi} \quad \text{и} \quad \Delta y' = \frac{d\lambda'}{M\Delta\eta} \quad (14)$$

Различията в размерите на пикселите в равнината на обекта и равнината на образа се дължат на това, че образът в (12) се оценява чрез една единствена Фурие трансформация.

Метод на Фурие трансформацията

Разходяща сферична вълна, която се разпространява от точка $(0, 0, -d)$ върху равнината се моделира с :

$$r_{sp}(\xi, \eta) = E_r \cdot e^{\frac{-i\pi}{d'\lambda} [\xi^2 + \eta^2]} \quad (15)$$

Ако се използва сферична вълна произведението $w(\xi, \eta) \cdot r_{sp}(\xi, \eta)$ в (12) става константа. Френеловата трансформацията се редуцира в Фурие трансформация и параметъра d' изчезва от израза. Този специален случай се нарича Фурие холография без лещи. То опростява много математическия израз и необходимите алгоритми за реконструиране на интензитета и фазата. Такава вълна би могла да се получи от изходната точка на оптически кабел. В настоящата работа се използва фокусирането на лазерен лъч върху микроотвор.

Метод на конволюцията

Дифракционният интеграл в (9) може да се запише във вида:

$$b'(x', y') = \frac{1}{i\lambda} \iint h(\xi, \eta) \cdot r(\xi, \eta) g(x', y', \xi, \eta) d\xi d\eta \quad (16)$$

Като въвеждаме функция импулсен отговор:

$$g(x', y', \xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda} \frac{e^{ik\sqrt{d'^2 + (\xi - x')^2 + (\eta - y')^2}}}{\sqrt{d'^2 + (\xi - x')^2 + (\eta - y')^2}} \quad (17)$$

Сега интегралът може да се запише като конволюция:

$$b'(x', y') = (h \cdot r) \otimes g \quad (18)$$

Използвайки теоремата за конволюциите която гласи, че:

$$F\{f \otimes g\} = F\{f\} \cdot F\{g\} \text{ за } b'(x', y') \text{ получаваме:}$$

$$b'(x', y') = F^{-1}\{F(h \cdot r) \cdot F(g)\} \quad (19)$$

g е импулсният отговор на системата и може да се разглежда като съвкупност от сферични вълни, които се разпространяват от всяка точка в холограмата. Те се сумират в равнината на образа съгласно принципа на Хюйгенс за да формират реконструираният образ.

Дискретната версия на импулсният отговор с произход в центъра на оста се дава с :

$$g(k, l) = \frac{1}{i\lambda} \frac{e^{ik\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{d'^2 + (k - N/2)^2 \Delta\xi^2 + (l - M/2)^2 \Delta\eta^2}}}{\sqrt{d'^2 + (k - N/2)^2 \Delta\xi^2 + (l - M/2)^2 \Delta\eta^2}} \quad (20)$$

Фурие трансформацията $G(n, m) = F\{g(k, l)\}$ може да се изчисли аналитично :

$$(n, m) = \exp \left\{ \frac{2i\pi d'}{\lambda} \sqrt{1 - \frac{\lambda^2 \left(n + \frac{N^2 \Delta\xi^2}{2d'\lambda} \right)^2}{N^2 \Delta\xi^2} - \frac{\lambda^2 \left(m + \frac{M^2 \Delta\eta^2}{2d'\lambda} \right)^2}{M^2 \Delta\eta^2}} \right\} \quad (21)$$

Това е функция пропагатор в свободното пространство и спестява една Фурие трансформация при реконструкцията:

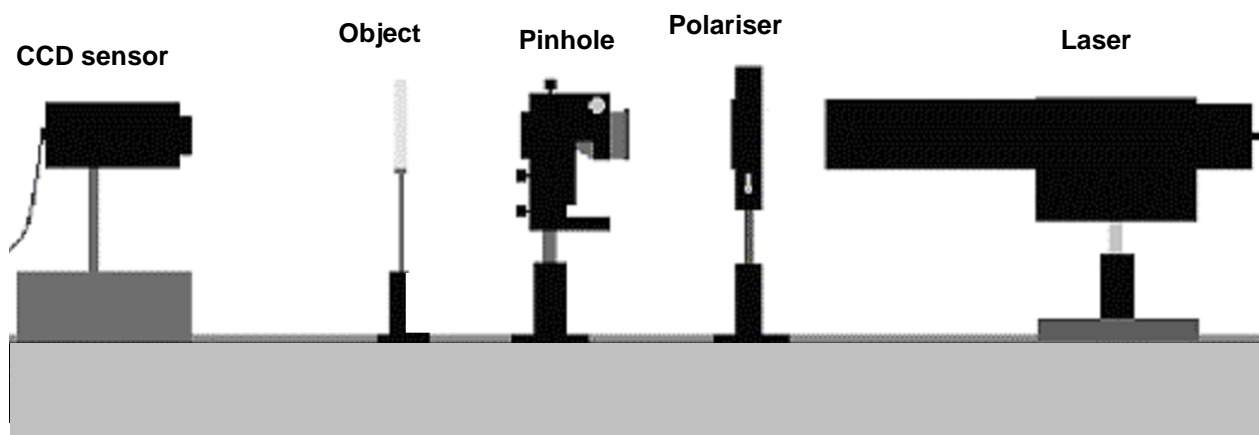
$$b'(x', y') = F^{-1}\{F(h \cdot r) \cdot G\} \quad (22)$$

Образът се връща отново в пространствената област чрез обратното Фурие преобразование за разлика от Френеловото приближение където изображението е във честотната равнина. Тъй като размерът на пикселите е изчислен като:

$$\Delta x' = \Delta \xi \text{ и } \Delta y' = \Delta \eta \quad (23)$$

образът изглежда сякаш се наблюдава през отвор с размери $N\Delta\xi \times M\Delta\eta$ (размерите на камерата). Деленето на (23) с (14) води до това, че само част от реконструираното поле на интензитета в приближение на Френел ще се вижда чрез конволюционния метод.

Конструиране и изработка на цифров линеен микроскоп



Фигура 3. Оптическа схема на цифров линеен холографски микроскоп

В катедрата по Математика, Информатика и Физика при Аграрния Университет със средства по вътрешно финансиране „Тема 13И“ бяха закупени необходимите оптични елементи и беше разработена схема за цифров линеен холографски микроскоп (Фиг.3) [5] .

Като източник на кохерентна светлина е използван диоден лазер (Lasiris) дължина на вълната 673,2 нанометра с мощност от 6.98 mW. За контролиране на интензитета на лазерното лъчение се използва поляризатор. Светлината от лазера чрез система от лещи се фокусира върху микро-отвор (пинхол) с диаметър 20 μm , който създава сферична вълна. Тя попада върху обекта на изследване. Малка част от сферичната вълна се разсейва от образеца в следствие на взаимодействието си с него, а по-голяма част преминава без взаимодействие. Така след образеца има две вълни – опорна (сферична) вълна и обектна вълна създадена от образеца, в съответствие с локалния му коефициент на поглъщане. т.е. реализира се класическата схема за получаване на холографски образ. Интерференцията на двете вълни се регистрира върху обектива на ССД камера и холографският образ се записва като файл в компютър, свързан с електрическия изход на камерата. Разстоянието между пинхола и обекта е между 4-8

ст, а разстоянието между обекта ССД камера е между 15-20 см. Чрез съответен софтуер съгласно теорията на холографията, разгледана в глава II, може да се получат различни образи на обекта: реална и имагинерна част на холограмата, интензитета или фазата.

Процесът се отличава със следните характеристики:

- не се извършва ръчна обработка на холограмите
- различни равнини от обекта могат да се реконструират от една единствена холограма чрез числени методи
- формирането на изображението не изисква лещи , т.е. елиминира се аберацията при изобразяването
- съществува възможност да се реконструира фазата, т.е. фазовите разлики могат да се изчислят директно от холограмата, без да се създават интерферограми и да се обработват.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФИЗИЧНИ СТРУКТУРИ

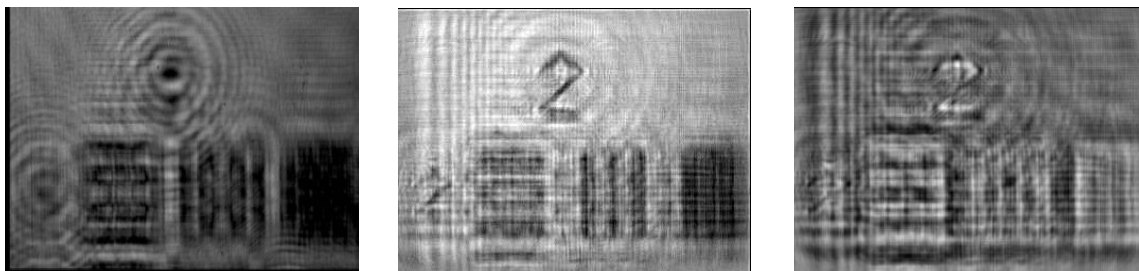
Калибриране на цифров линеен микроскоп

Холографският микроскоп беше калибриран чрез използване на USAF Test Target 1951 чийто елементи са дадени в таблица 1.

Ширина на линията в микрометри на USAF Test Target 1951									
Номер на групата									
El.	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6
1	2000.00	1000.00	500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81
2	1785.71	891.27	446.43	223.21	111.36	55.68	27.86	13.89	6.96
3	1587.30	793.65	396.83	198.41	99.21	49.50	24.80	12.41	6.20
4	1416.43	707.21	354.61	176.68	88.34	44.25	22.10	11.04	5.52

Таблица 1

Характеристики на USAF Test Target 1951



Фигура 3. Холограма на USAF 1951 (група 2 елемент 2) Фигура 4. Реконструкция на амплитудата на холограмата от фигура 3. (ширина на елемента 10 микрометра) Фигура 5. Реконструкция на фазата на холограмата от фигура 3.

Анализ на разделителната способност на използвания цифров холографски микроскоп

Разделителната способност на холографската цифрова изобразяваща система се ограничава от четири фактора: цифровата апертура, дължаща се на размерите на микроотвора (което е свойство на конструкцията сама по себе си), разделителната способност поради дифракция и някои аспекти на самата реконструкция (т.е. на нейния алгоритъм) при цифрова холография от ефективния размер на пикселите на ССД камерата и накрая от дължината на вълната.

Всяко от тези ограничения е определено аналитично. В тази глава от дисертацията са разгледани индивидуалните и комбинирани ефекти на тези фактори чрез аналитичен анализ и чрез цифрова симулации на холограми и техните реконструкции. . Резултатът от този анализ е съвкупност от критерии, които могат да се използват за оптимизиране на конструкцията на цифровия холографски микроскоп.

Разделителната способност при Цифровата Линейна Холографска Микроскопия зависи от няколко подлежащи на контрол фактора, а именно:

За да се изучава проблемът с разделителната способност в областта на Цифровата Линейна Холографска Микроскопия се използва модел, удовлетворяващ критериите на Релей и Спероу за разделителната способност. Критерият на Релей важи за два точкови източника с равни интензитети. Според Релей два точкови източника могат да бъдат идентифицирани, ако първия максимум на интензитета на единия съвпада с първия минимум на втория. Критерия на Спероу е за нееднакви по интензитетът източници и гласи, че първата и втора производна на интензитета по отношение на линията, съединяваща двата точкови източника трябва да клони към нула.

В случая на Цифровата Линейна Холографска Микроскопия тези критерии са приложими за реконструираното изображение и въпросът е, какви типове от условия те налагат на производящите ги холограми, чрез които са получени реконструкциите. Казано по друг начин, трябва да се установи, колко интерференчни пръстена трябва да се запишат и с какви подробности, за да се изпълнят критериите на Релей и Спероу. Моделът за Цифровата Линейна Холографска Микроскопия се състои от идеален точков източник, който излъчва сферична вълна.

$$A_{\text{опорн}}(r) = A_0 r^{-1} e^{ikr} \quad \text{със вълново число } k = 2\pi/\lambda \quad (31)$$

В допълнение имаме две точки от обекта, моделирани като точкови източници и позиционирани в r_1 и r_2 и от тях се разпространяват разсеяни сферични вълни. Тогава пълното вълново поле ще бъде:

$$A(r) = A_0 r^{-1} e^{ikr} + A_1 [r - r_1]^{-1} e^{ik[r - r_1]} + A_2 [r - r_2]^{-1} e^{ik[r - r_2]} \quad (32)$$

Интензитетът на контрастното изображение ще стане тогава:

$$\begin{aligned} \check{I}(r) = I(r) - \frac{A_0}{r^2} = & \frac{A_1^2}{[r - r_1]^2} + \frac{A_2^2}{[r - r_2]^2} + \\ & + 2 \frac{A_1 A_2}{[r_1 - r_2]^2} \cos [k[r - r_1] - |r - r_2|] + \\ & + \left\{ \begin{aligned} & 2 \frac{A_1 A_2}{r[r - r_1]} \cos [kr - |r - r_1|] + \\ & 2 \frac{A_1 A_2}{r[r - r_2]} \cos [kr - |r - r_2|] \end{aligned} \right\} \quad (33) \end{aligned}$$

Първите два члена отговарят на разсейване от изолирани обекти и имат гладко вариращ фон. Третият член представя класическа интерференция на два обекта, като членовете в големите скоби се дължат на интерференцията между източника и всеки обект и представляват холографската интерференция. За да може да са реализира холографското изображение амплитудите на разсеяните вълни трябва да са много по малки от тази на опорната вълна A_1 и A_2 , което води до това, че класическият

интерференчен член, който е квадратичен по отношение на разсеяните вълни, да клони към нула.

Тъй като векторите $|r - r_1|$ и $|r - r_2|$ са със сравними дължини в една типична апаратура за Цифрова Линейна Холографска Микроскопия, пространствената честота на класическата интерференция ще бъде много по-малка от колкото приноса на холографските членове. По такъв начин следва, че записът на фини пространствени детайли от холограмата е задължително условие за реконструкция с висока разделителна способност.

Получаването на оптимално идентифициране на холограмата изисква поради посочените по горе причини, подходящо позициониране на камерата от източника за зададен размер на пикселите. Тъй като за малки обекти тяхната амплитуда на разсейване е малка в сравнение с амплитудата на опорната вълна $A_1, A_2 \ll A_0$ осигурявайки холограмните членове да са много по-изразени на холограмата по амплитуда.

Разгледани са и серия от експериментални резултати, които тестват и потвърждават теоретичния анализ. Разделителна способност дава възможност да се наблюдават сфери, мехурчета и бактерии, които са в диапазона на 1 микрометър и са отдалечени на няколко микрометра, като се движат със скорости от 100 микрометра в секунда.

Надлъжна разделителна способност

В този параграф ще разгледаме и получим критерии за надлъжна разделителна способност чрез геометрични параметри при Цифровата Линейна Холографска Микроскопия. Този критерий след това ще бъде демонстриран с числови симулации. За простота ще предположим, че експерименталната установка има камера, която е перпендикулярно на оптичната ос, която свързва източника с центъра на камерата. Обектът се състои от два точкови източника, позиционирани симетрично на оптичната ос и в на линия перпендикулярна на камерата. Така че, $|r_1| = |r_2|$. Тогава холографският член в (4) може да се пренапише във вида:

$$\check{I}(r) = 4 \frac{A_1 A_0}{r |r - r_1|} \cos \left[\frac{k(2r - [r - r_1] - |r - r_2|)}{2} \right] \times$$

$$\times \cos \left[\frac{k(|r - r_1| - |r - r_2|)}{2} \right] \quad (34)$$

Вторият косинусов член води до модулация на холографския интерференционен образ и има максимум когато аргумента е $2n\lambda$. За да се възстанови необходимата информация от този член, трябва да се осигури най-малкото запис на максимумите от първи и от втори порядък чрез ССД камерата. Затова следва, че две точки могат да се разделят напречно, когато тяхното напречно разделяне удовлетворява:

$$|r - r_1| \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad (35)$$

Където цифровата апертура на микроскопа се дава с:

$$NA = \sin \theta_m = (W/2) [(W/2)^2 + D^2]^{1/2} \quad (36)$$

като W е ширината на камерата, а D е разстоянието от източника до екрана. Това е същият критерий както в класическата оптика, въпреки че произходът му е доста по различен. За да е по-обвързващо с холограмата, трябва да се има в предвид, че при ранните изследвания на електронната холография, трансформацията на Кирхоф - Хелмхолц, която дава реконструираната амплитуда, може да получи аналитично и се дава, ако се ограничим до разсейване само на s -вълните, както е подходящо за електромагнитните вълни, както следва:

$$K(r) = A \sum_i \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^{n/2} a_n P_n \left(\frac{z - z_i}{|r - r_i|} \right) j_n(k|r - r_i|) \quad (37)$$

Точковите обекти (атоми в случая на лазерна холография) са поставени в r_i . P_n и j_n са полиномите на Лежандър и съответно сферичните Беселовите функции. Коефициентът A е пропорционален на вероятността за разсейване, а:

$$a_n = (n + 1/2) \int_{\cos \theta_m}^1 P_n(t) dt \quad (38)$$

отговаря на числовата апертура:

$$\cos^2 \theta_m = 1 - (NA)^2 \quad (39)$$

Като имаме предвид, че само сферичните Беселови функции от нулев порядък имат максимум, когато аргументът е нула, следва че само членът $n = 0$ дава максимум на

мястото на оригиналната позиция на обекта. Използвайки, че интензитета на реконструираното изображение се дава с:

$$I = [K(r)]^2 \quad (40)$$

приравняваме първата и втората производни по отношение на линията свързваща двата обекта (което не е проблем в разглежданата геометрия), за да приложим критерия на Спероу за разделителната способност.

Разделителна способност в дълбочина

Тук е разгледан проблема със разделителна способност в дълбочина. Подобно на случая с напречната разделителна способност е установено, че 2 точки могат да се наблюдават разделно, ако:

$$[r - r_1] \geq \frac{\lambda}{2(NA)^2} \quad (42)$$

Очевидно е по-трудно да се получи разделителна способност в дълбочина, и само ако холограмата е записана с по-голяма плътност на пикселите може да се получи оптимална разделителна способност както напречно, така и в дълбочина.

Проблемът със ниската разделителна способност по дълбочина също така се появява и при фотоелектронна и ниско енергетична електронна холография. Корекция е предложена и успешно приложена чрез използване на суперпозиция на реконструирани образи на няколко различни дължини на вълната.

Оценка на точността на измерванията чрез статистическата грешка

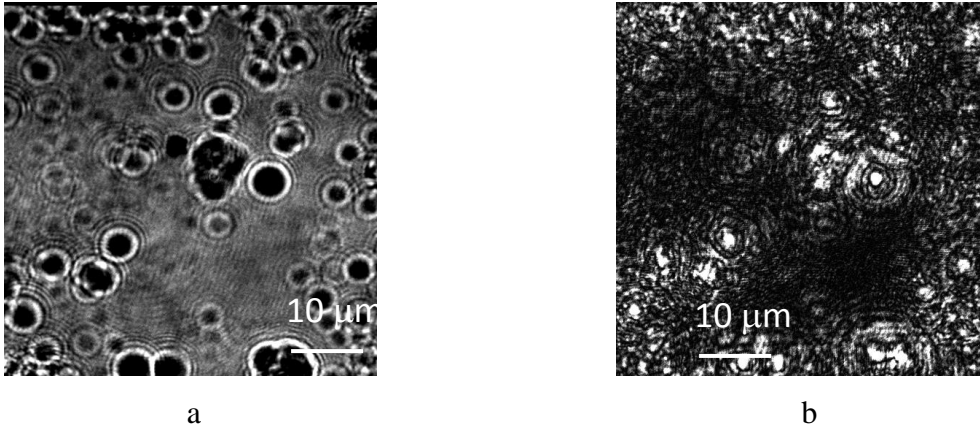
Заснети са 100 микрочастици с диаметър $2 \mu m$ и е определен размерът на получените образи. Определена е средното квадратично отклонение по Гаус, за което е получено $0,3 \mu m$. Относителната точност е 15 %.

Резултати и методика за изследване разпределението на наночастици

Визуализация на микрочастици

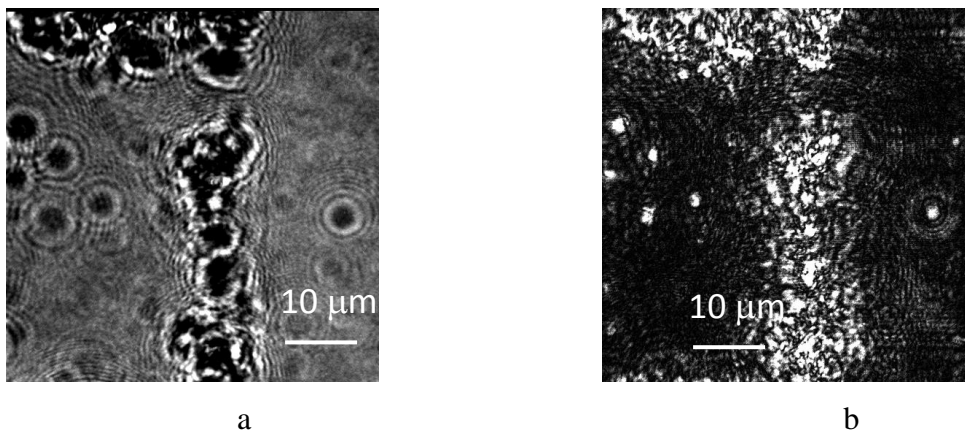
Цифровият линеен микроскоп е използван за визуализация на микрочастици с диаметър два микрона (2 ± 0.13) μm , предоставени от *Microparticles GmbH – Germany*. Холографските реконструкции са получени чрез използване на

компютърна програма. Фигури 11 и 12 показват цифрови холограми и техните реконструкции на интензитета. Показано е, че цифровият холографски микроскоп може да даде количествени изображения обекти с размери 1-2 микрона, без да се маркират обектите по никакъв начин с химичен агент и е подходящ за изследвания на микрочастици и наночастици.



Фигура 6. Изображения на частици с диаметър $(2 \pm 0.13) \mu m$

а) цифрова холограма; б) интензитет на вълновия фронт на обекта



Фигура 7. Изображения на частици с диаметър $(2 \pm 0.13) \mu m$

а) цифрова холограма б) интензитет на вълновия фронт на обекта

Анализ на резултатите

Проведените експерименти с микрочастици показват, че цифровата холографска микроскопия е метод за изобразяване с високи потенциални възможности, защото: Една единствена холограма съдържа информацията необходима да се реконструира обекта в целия обем.

Цифровата реконструкция осигурява ефикасен начин за виртуално фокусиране в дълбочина на микроскопски образец, което всъщност е уникално качество на метода. Може да се получи количествена информация за разпределението на интензитета и фазата на цифрово реконструираното вълново поле от цифровата холограма.

Изследване на периодични микроструктури, фотоиндуцирани в диацетон-акриламидни холографски полимери

Описаната схема на експерименталната установка за ЦХМ (Фигура 3) е използвана за характеризирание на периодичните структури на фотополимер на базата на диацетон акриламид – чист и с примеси на зеолитни наночастици AgBEA.

Наскоро разработения Diacetone-Acrylamide-based (DA-based) ниско токсичен холографски фотополимер е атрактивен нов материал. Авторите докладват diacetone acrylamide фотополимер, който е модифициран с включване на глицерол (glycerol). Той позволява модулиране на коефициента на пречупване от 2.2×10^{-3} , с дифракционна ефективност от 90 % в 100 μm слой. Две композиции на състава са описани в Таблица 2.

Photopolymer Compositions		
	DA0	DAG
PVA 10% wt/vol (ml)	20	20
TEA (ml)	2	2
Diacetone Acrylamide (g)	1	1
Bisacrylamide (g)	0.2	0.2
Erythrosin B 0.11% wt/vol (ml)	4	4
Glycerol (ml)	-	1

Таблица 2. Състав на Две композиции на diacetone acrylamide

Реални изображения на индуцирани със светлина периодични наноструктури в DA-базиран фотополимер са реконструирани цифрово. Реконструкцията на холограмите

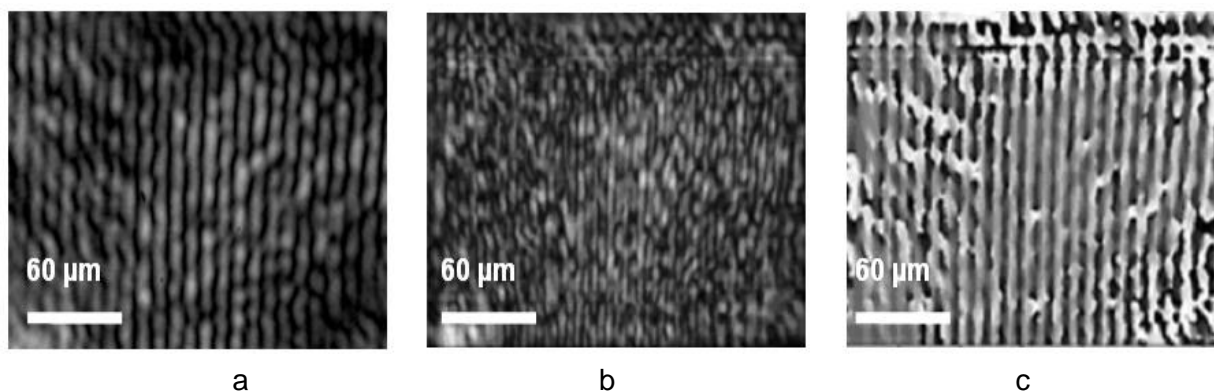
показват, че зеолитните наночастици AgBEA се концентрират в кластери подредени в ред и имащи същата пространствена честота каквато има дифракционната решетка. Цифрова линейна холографска микроскопия (ЦЛХМ) се оказва ефикасен нов подход за визуализация на индуцирани със светлина периодични наноструктури в фотополимери.

За пръв път, доколкото ни е известно, се докладва използване на цифрова линейна холографска микроскопия (DILHM) за визуализация на индуцирани със светлина периодични наноструктури в фотополимери.

След като холограмата се запише цифрово се използват цифрови процеси за обработка на изображенията за да се получи информация по желание.

Както е добре известно, може да се получи както амплитудата, така и фазата като се използват холографските методи. Затова е възможно да се получат както 3D образи, така и серия от 2D образи.

Записани са холограми от типа DA-based полимерни мрежи с 100 линии на mm Чрез използване на софтуер са възпроизведени разпределението на интензитета и фазата.



Фигура 8.

Изображения на 100 l/mm (1 на 10 μm) дифракционна решетка записана на DA-based фотополимер с включен 0,5% AgBEA:

Реконструкцията на холограмата показва, че зеолитните наночастици AgBEA се концентрират в кластери, които се подреждат в редове и имат същата пространствена

Фигура 8.

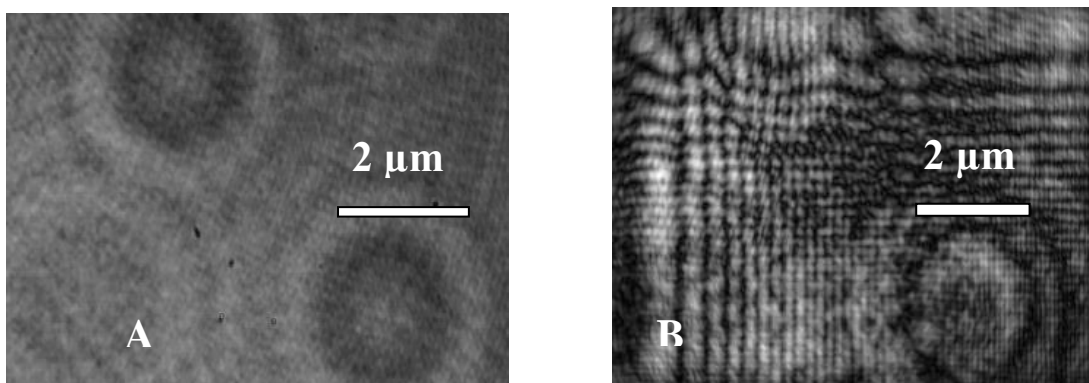
Изображения на 100 l/mm (1 на 10 μm) дифракционна решетка записана на DA-based фотополимер с включен 0,5% AgBEA:

Реконструкцията на холограмата показва, че зеолитните наночастици AgBEA се концентрират в кластери, които се подреждат в редове и имат същата пространствена честота, каквато има дифракционната решетка.

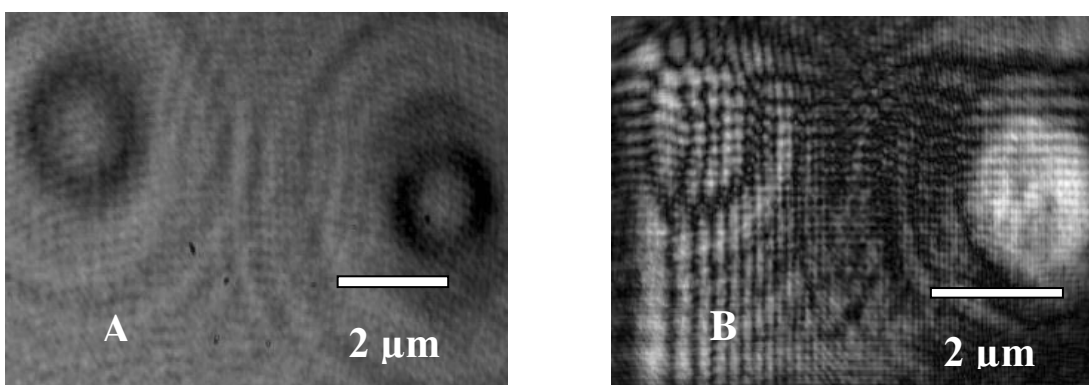
Визуализация на структурата на домените на монокристали на триглицин сулфат без примеси

Калибриране на цифровият линеен холографски микроскоп за визуализация на обекти с размери от 1 μm

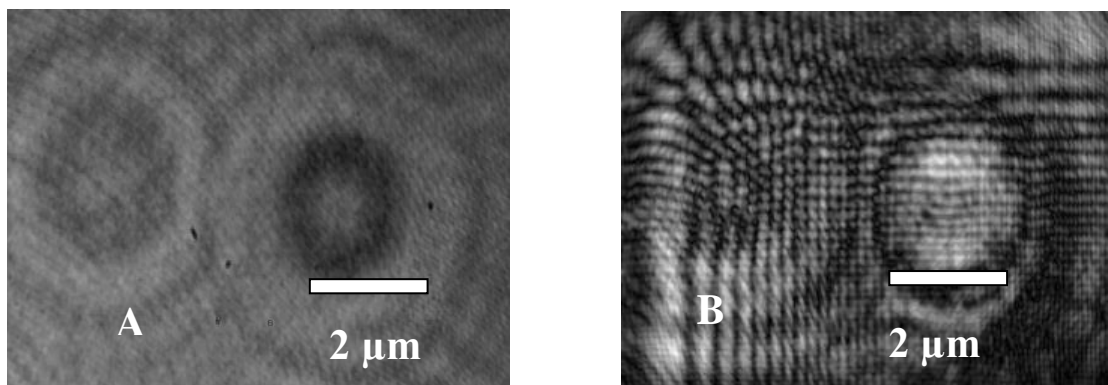
Микрочастици със среден диаметър $d = (2.06 \pm 0,13) \mu\text{m}$, получени от *Microparticles GmbH (Berlin, Germany GmbH)* са използвани за целите на калибриране на микроскопа. Разстоянието между частиците и микроотвора е 5 cm, а разстоянието от камерата до микроотвора в 27 cm. Холограмите и съответните реконструкции са показани на Фиг.26-28.



Фигура 9. А) холограма на микрочастици В) Амплитудна реконструкция на холограмата



Фигура 10. А) Втора холограма на микрочастици В) Амплитудна реконструкция на холограмата



Фигура 11. А) Трета холограма на микрочастици В) Амплитудна реконструкция на холограмата

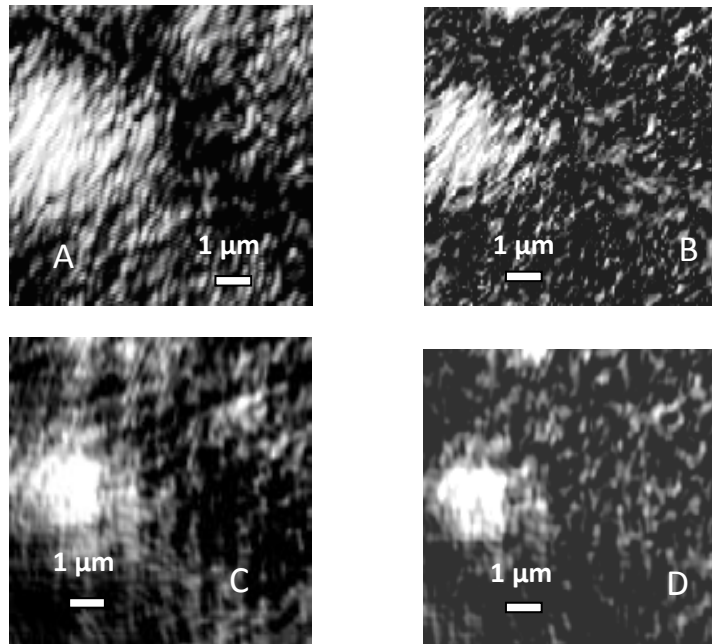
Изследване на доменната структура на монокристал от TGS чрез цифровия линеен холографски микроскоп

Триглицин сулфатът $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{H}_2\text{SO}_4$ (TGS) е един от най-интензивно изследваните сегнетоелектрици, защото притежава изключителни сегнетоелектрични и пироелектрични свойства. Единичните кристали TGS се смятат за един от най-подходящите материали за конструиране на пироелектрични инфрачервени сензори. След откриването на сегнетоелектричните свойства на TGS от Mathias, Miller and Remeika много изследователи са изследвали неговите физични свойства и структурата на домените му. Hoshino, Okaya, and Pepinsky са описали детайлно кристалната структура на чист TGS. След това различни изследователи са докладвали резултати относно доменната структура на чист и легиран TGS при различни физични условия (топлина, електрични полета и т.н.), чийто списък е даден от Nakatani.

Единични TGS кристали са израснати чрез динамичен метод в фероелектрична фаза. Всички образци, използвани в тези експерименти са получени от воден разтвор.

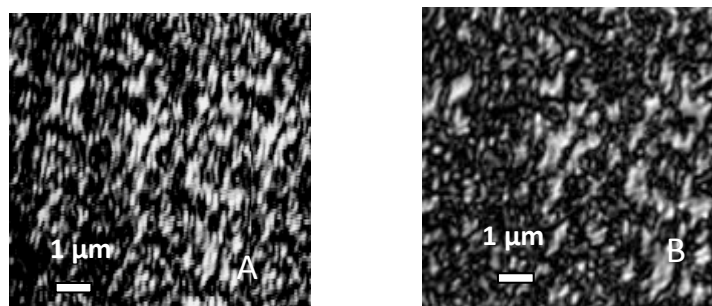
Показани са 4 примера за приложението на цифровият линеен холографски микроскоп за изследване на доменната структура в TGS. Петте холограми и техните амплитудни реконструкции са дадени на Фиг. 28-32. Холограмите на образците от TGS кристали са снети със същите параметри, като холограмите на микрочастиците (разстоянието между TGS образца и микроотвора е 5 cm, докато разстоянието от камерата до микроотвора е 27 cm). Този подход дава възможността да се получат правилните размери на изследваните области от TGS монокристалите. Всички линии на Фиг. 8-12 са равни на 1 μm .

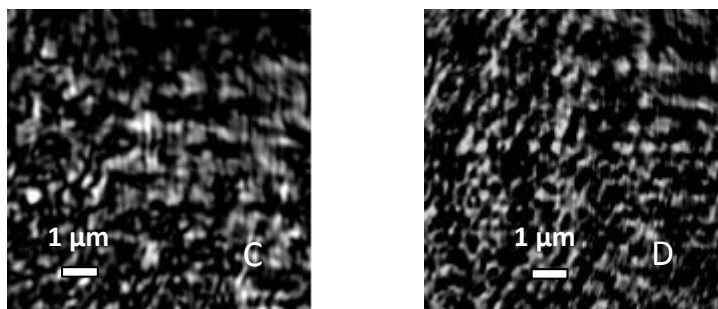
Важно е да се подчертае, че използвайки образци във формата на плоскости с дебелина от 0.2 mm, разцепени перпендикулярно на полярната ос на монокристал, трябва да се наблюдават сеченията на домените в TGS образците. Известно е, че домените в TGS са паралелни на сегнетоелектричната им ос .



Фигура 12. *A* – цифрова холограма на TGS монокристал, *B* – реконструкция на интензитета от холограмата *A* на повърхността на образеца, *C* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 1 μm дълбочина вътре TGS образеца и *D* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 2 μm дълбочина вътре TGS образеца.

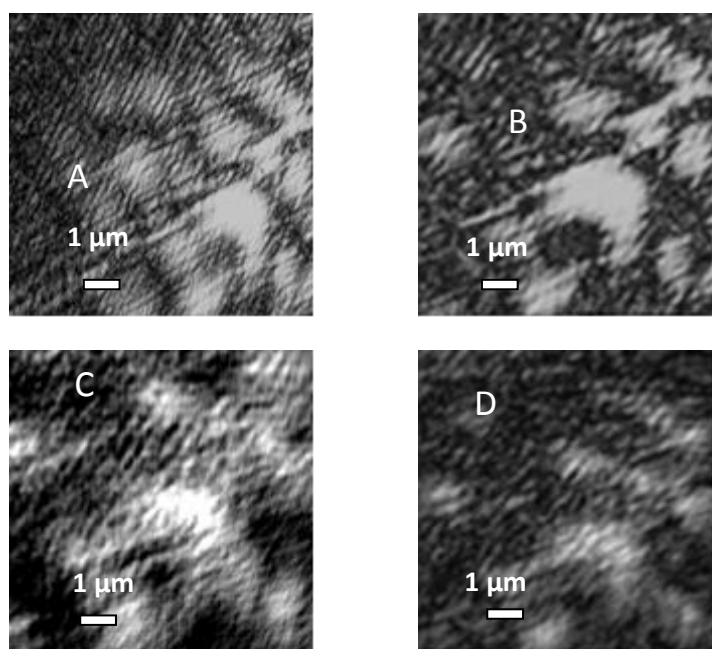
Фигури 12B, 12C and 12D показват, че диаметрите на единчните домени (сеченията) в чист TGS монокристал варират между 0.3 μm and 0.5 μm. Такъв резултат е получен по-рано от Nakatani .





Фигура 13. *A* – цифрова холограма на TGS монокристал, *B* – реконструкция на интензитета от холограмата *A* на повърхността на образеца, *C* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 1 μm дълбочина вътре TGS образеца и *D* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 2 μm дълбочина вътре TGS образеца.

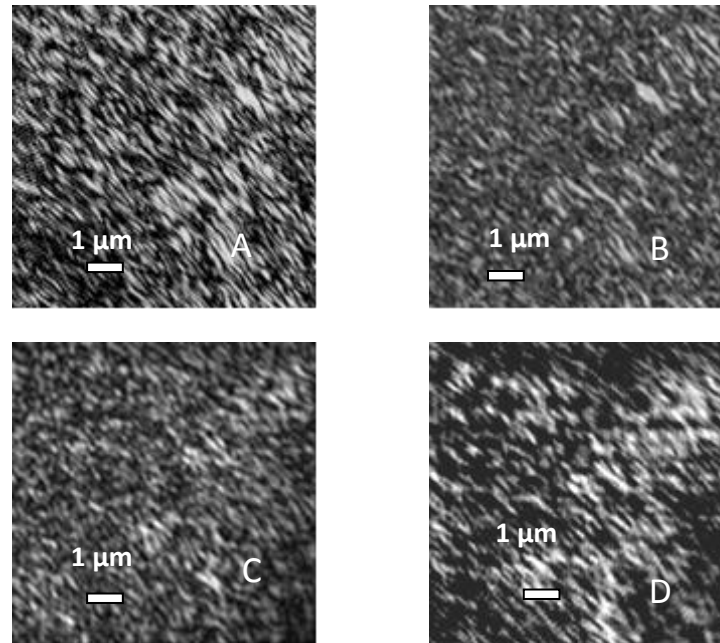
Фигури 13B, 13C and 13D показват много домени с диаметри от 1 до 1.5 μm. Вижда се също, че тези домени са много равномерно разпределени в равнината - 3 или 4 domains за квадратен микрометър.



Фигура 14. *A* – цифрова холограма на TGS монокристал, *B* – реконструкция на интензитета от холограмата *A* на повърхността на образеца, *C* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 1 μm дълбочина вътре TGS образеца и *D* - реконструкция на интензитета от холограмата *A* на 2 μm дълбочина вътре TGS образеца.

Фиг. 14.B, 14.C и 14.D показват TGS доменна структура, която е много подобна на тази, която се вижда на Фигури 13.B, 13.C и 13.D. Специално се виждат няколко

домени с диаметри от $(1,5 \pm 0,2)$ μm и един по-голям домен с диаметър около $3,5$ μm , който от своя страна се състои от малки домени с лентовидна форма с размери $0,3 - 0,5$ μm ширина на $3-5$ μm дължина.



Фигура 15. А – цифрова холограма на TGS монокристал, В – реконструкция на интензитета от холограмата А на повърхността на образеца, С - реконструкция на интензитета от холограмата А на 1 μm дълбочина вътре TGS образеца и D - реконструкция на интензитета от холограмата А на 2 μm дълбочина вътре TGS образеца.

Фиг. 15.В, 15.С и 15.Д потвърждават резултатите, показани на Фиг. 14.В, 14.С и 14.Д.

Заключение относно визуализацията на чистия TGS

Доменната структура на чист TGS беше визуализирана чрез цифрова линейна холографска микроскопия за пръв път. Методът позволява образците да се използват без никаква специална подготовка от повърхността на триглицин сулфатни кристали. Беше установено, че диаметрите на отделни домени варират от $0,3$ μm до $0,5$ μm . По-големи доменни образувания с диаметри $3 - 3,5$ μm също са наблюдавани. Беше установено, че те се състоят от по-малки лентовидни домени с размери $0,3-0,5$ μm ширина на $3-5$ μm дължина, като са равномерно разпределени в равнината на разцепване: 3 или 4 домени на квадратен микрометър.

Цифровата линейна холографска микроскопия е използвана успешно за наблюдение на TGS домени в дълбочина. Цифровото виртуално фокусиране вътре в TGS

кристала, показва същите размери за по-малките и за по-големите фероелектрични домени, като тези наблюдавани на повърхността на образците.

От направените изследвания може да се заключи, че цифровата линейна холографска микроскопия е обещаващ нов метод за визуализация на домени и лесно може да се използва за картографиране на домените на прозрачните фероелектрици.

Визуализация на структурата на домените на монокристали триглицин сулфат с примеси на ниодим

Структурата на домените е много важен параметър на фероелектриците и много методи са развити за наблюдение на те в различни диелектрици.

Целта на такива проучвания е да потвърдят предсказанията за микроструктурата на теоретичните модели и да се усършенстват, за да могат да обяснят физичните свойства на материалите. Чрез комбиниране на измерванията на макроскопичните свойства с микроскопските наблюдения може да се постигне цялостно разбиране на микроструктурата на фероелектриците във връзка с физичните им свойства.

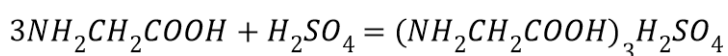
Независимо от значителните усилия за визуализация на домените във фероелектриците, те все още не се визуализират рутинно.

В материалознанието, малките времена на разпознаване на сигнала на ЦХМ и добрата разделителна способност се използват за измерване на механичен стрес и вибрации, за определяне на коефициенти на пречупване и директно за визуализация. Изброените по-горе предимства на ЦХМ доведоха до експериментална проверка на способността и за наблюдение на фероелектрични ТГС.

Визуализиране на доменна структура на монокристали ТГС с примеси на ниодим с цифров холографски микроскоп

Израстване на кристали ТГС

Големи кристали на триглицинсулфат се израстват от водни разтвори. Изходният материал, необходим за израстване на тези монокристали, се олучава в резултат на реакция на воден разтвор на глицина със сярна киселина H_2SO_4 :



Получената сол се пречиства чрез многократно прекристализиране. Монокристали ТГС с различна концентарция на неодим са били израстнати по динамичния метод

от водни разтвори. Този метод осигурява хомогенно разпределение на добавените йони в кристала. Концентрацията на солите в разтвора са 4%, 11% и 30% тегловни процента. Солите са внесени под формата на сулфати $Nd_2(H_2SO_4)_3$. Кристалите са израстнали при постоянна температура от 42°C (315K) в pH=2,1 във фероелектретна фаза от разтвори с три различни концентрации:

TGS + 4 w. % $Nd_2(SO_4)_3$

TGS + 11 w. % $Nd_2(SO_4)_3$

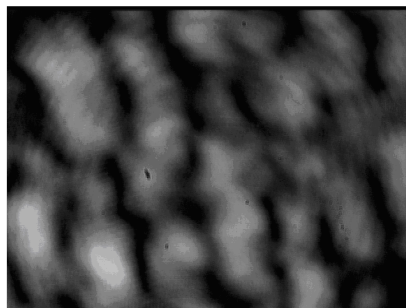
TGS + 30 w. % $Nd_2(SO_4)_3$

Предварителна обработка на образците

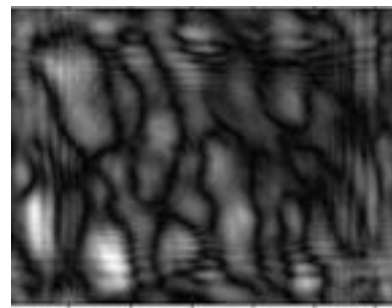
Образците за доменната структура са отрязани с дебелина 0.25 mm. Те са механически закрепени за микроскопско стъкло.

Експериментални резултати и дискусия

Долу са представени резултатите, на които ясно се виждат домените.



Фигура 16. Холограма TGS+4 % Nd



Фигура 17. Реконструкция на амплитудата

Заклучение

Цифровият линеен холографски микроскоп е използван, за да се визуализира доменната структура на кристали на TGS с примеси на Nd. Получени са холограми на тънки монокристални слоеве. Цифрово са реконструирани реални изображения на монокристалната структура. Домените на TGS са подредени в редове с форма на плочи с ширина 25 μm и дължина от 100 μm (+/-15%). ЦЛХМ се оказва ефикасен метод за визуализация на доменната структура на TGS кристали. Експерименталните данни показват, че увеличаването на концентрацията на Nd води до намаляване и разпръскване на домените в обема на кристала.

Domain dimensions, μm		
TGS+1 % Nd	TGS+11 % Nd	TGS+30 % Nd
2-6	4-10	6-15

Таблица 3. Размери на домените

2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИ СТРУКТУРИ

Линейна холографска микроскопия на биологични образци (in-line)

Бързият прогрес в областта на електронната детекция и контрол, цифровата обработка на образи и числените методи обаче, води също до изключително развитие на модерната микроскопия. Цифровата холографска микроскопия (ЦХМ) е метод, който се базира именно на тези последни успехи. Той е нова област на задълбочени изследвания, която се разви значително през последното десетилетие. Това е неразрушаващ, без маркиране на детайли от пробата метод, който позволява едновременното количествено на електромагнитни вълни (от оптичeskия до рентгеновия диапазон), преминаващи през биологични проби, в цялото поле на наблюдение на обекта.

Методът може да осигури количествени изображения на прозрачни и отразяващи повърхности, както и бърз анализ на живи клетки при обичайни лабораторни условия.

Тук са разгледани някои от последните, по-интересни постижения в прилагането на холографския микроскоп при биологични проби.

Kim M. K. [6] е предложил нов цифров холографски метод, който позволява увеличаване на напречната резолюция на обекта чрез наслагване на известен брой числено реконструирани дифракционни оптични полета от цифрови холограми, които са получени при различни дължини на вълната. Този принцип на цифрова интерференционна холография със сканиране по дължина на вълната е приложен за изобразяване на 3D обекти с дифузни повърхности, каквито именно са много биологични проби.

Представена е главата на малко насекомо с размер от няколко милиметра с напречна резолюция от 120 микрона и резолюция в равнината от 20 микрона. От

томографските данни е генериран анимиран 3D цифров модел на структурата на повърхността на обекта с добра точност.

Експериментите са извършени с помощта на стандартна холографска апаратура. Излъчването на приблизително 50 mW лазер се разширява до около 10 мм в диаметър и пространствено се филтрира. Лъчът се пропуска през отвор от 5 мм в диаметър и осветява пробата. Разсеяната светлина от обекта се комбинира с опорния лъч. Увеличителна леща изобразява оптичното поле в безкрайност. Цифровата камера е фокусирана в безкрайност, така че да записва увеличеното изображение на оптичната интензивност. Важно е да се филтрира на лъча през обекта, така че да осветява само тази област, която трябва да се изобрази, в противен случай паразитното разсейване може сериозно да повлияе на качеството на картината.

Цифровият холографски микроскоп в режим на преминаване, разработен от Parraz [7] е адаптиран за количествено изследване на клетъчна динамика. Живи клетки в култура са изследвани оптически чрез изчисляване на фазовото отместване на преминалият вълнов фронт. Високата стабилността във времето на фазовия сигнал и краткото време за обработката му, позволяват да се наблюдава динамиката на клетъчните процеси. Представена е експериментална процедура, която позволява от отместването на фазата да се изчисли, както интегралния показател на пречупване, така и дебелината на клетката (морфометрия). Методът е бил приложен за изследване динамиката на неврони в култура по време на хипотоничен стрес. Такъв стрес предизвиква намаляване на фазата, която може да бъде напълно определена чрез прилагане на методологичен подход, описан в статията. Фазата на сигнала зависи както от дебелината, така и от коефициента на пречупване на пробата. В действителност обаче методът позволява да се определят независимо дебелината и интегралния показател на пречупване на клетките. За да се разграничат тези две компоненти се прилага процедура, наречена от авторите "разделителна процедура". Динамичните количествени фазови изображения, съдържащи информация и за морфометрията на клетката и за интегралния показател на пречупване, може да се интерпретират еднозначно благодарение на отделянето чрез предложената процедура. Локалното измерване дебелината на клетката може да се извършва с точност от 1 микрон. Пространственото осредняване позволява измерване на средна дебелина на клетъчни области, съответстващи на размера на типичните невронните тела, т.е. $170 \mu\text{m}^2$, с точност до няколко десетки нанометра. От друга страна, за пространствените вариации на интегралния показател на пречупване се оценяват на

0.005 и средния интегрален показател на пречупване може да се измерва с точност до 0,0003. Клетъчният показател на пречупване е слабо изучен параметър, който е свързан с вътреклетъчното съдържание и е подходящ за тълкуване на функционалното светлинно изображение, което е резултат на многоетапен процес на разсейване в биологичните тъкани.

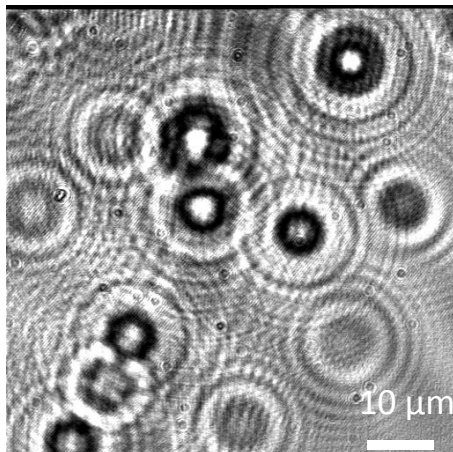
Langehanenberg P. и др. [8] предлагат метод за автофокусиране на изображения с цифров фазово - контрастен холографски микроскоп за чисти фазови обекти на живи клетки. Традиционните техники за пасивно оптично автофокусиране се основават на надлъжно сканиране на изображението в дълбочина посредством механична корекция на лещата или на статива на микроскопа, за да се намери максималния контраст на изображението. В цифровата холография, този процес на сканиране се извършва числено чрез вариране на изминатото от вълната разстояние, базирайки се на решаване на уравненията за разпространение на вълната чрез различните модификации на дифракционната формула на Киркхоф.

Наблюдаване на растежа и пролиферацията на algae *Chlorella vulgaris*

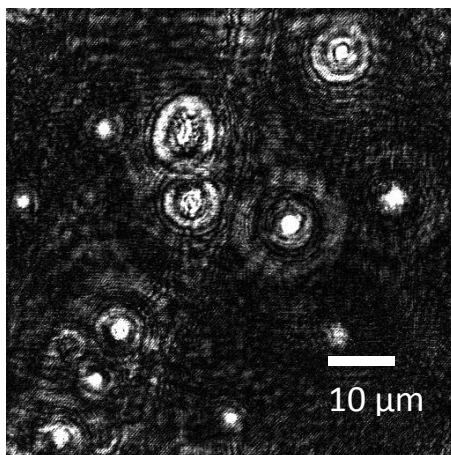
Цифровата холографска микроскопия е особено полезна за получаване на изображения на биологични образци и даже за запис на динамични процеси, защото е необходимо само една холограма. Образът може да се изчисли на фокус от холограмата, без да е необходимо изискващото много време механично сканиране, използвано в конвенционалната микроскопия. Освен това Цифровата холографска микроскопия не изисква предварителна подготовка на образците и може да бъде използвана за изучаване на живи обекти. Този нов тип микроскопия е с големи преимущества, тъй като позволява получаването на триизмерен обемен образ от една холограма. Новата техника бе успешно използвана за наблюдаване на растежа и пролиферацията на algae *Chlorella vulgaris*. ДИМ се прилага за визуализиране на живи клетки от водорасли *Chlorella* вулгарис, без предварителна подготовка. Цифровата реконструкция на записаните модели смущения се осъществява с помощта на подходящ софтуер . Тук методът е използван за наблюдаване на морфологията и времеви анализ на живи клетки.

Фигура 32 показва цифрова холограма и реконструиран интензитет на клетките. Реконструираният интензитет илюстрира възможността за наблюдение на

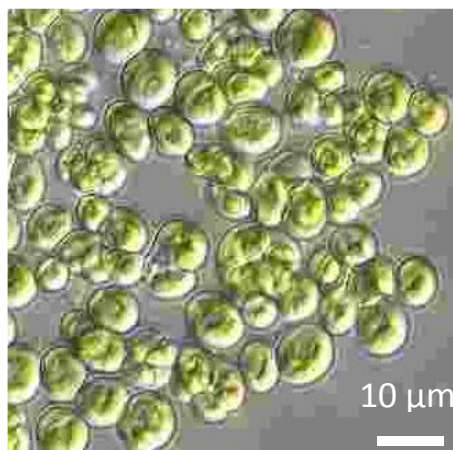
структурата и морфологията на живи клетки. Тези експерименти показват способността на DHM за неинвазивно визуализиране и количествено определяне на биологични клетки и тъкани. Ето защо DHM може успешно да се използва за: преброяване на клетките, наблюдение на клетъчния растеж и пролиферация. и т.н.



Фигура 25. Цифрова холограма на водорасли Хлорела вулгарис с диаметър приблизително 5-8 микрометра

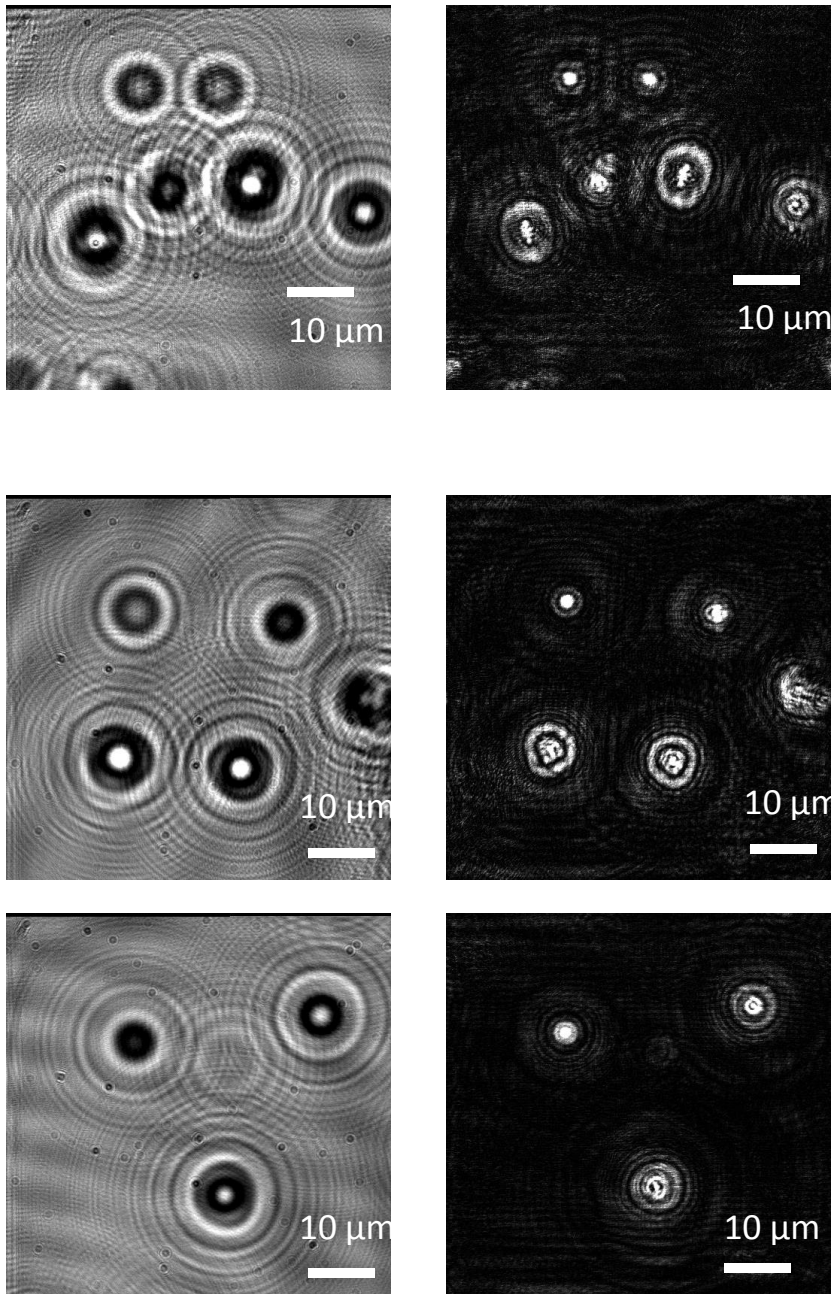


Фигура 26. Числено реконструиран интензитет на Фигура 26.



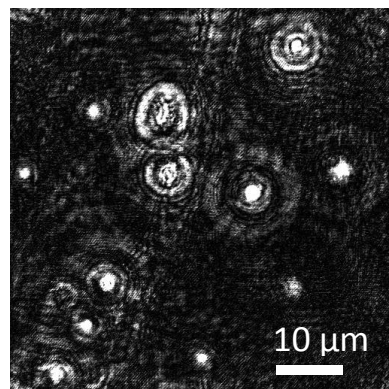
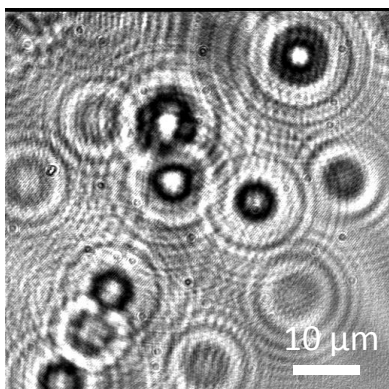
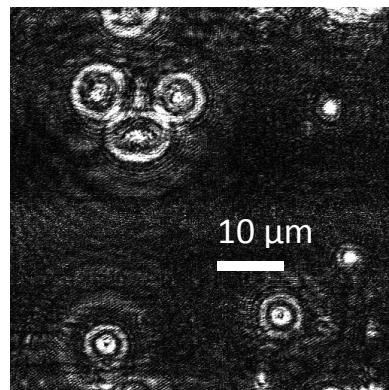
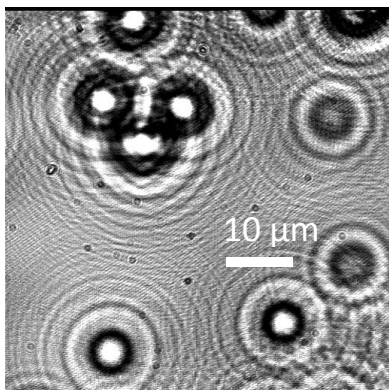
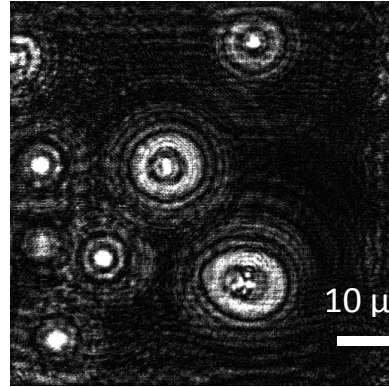
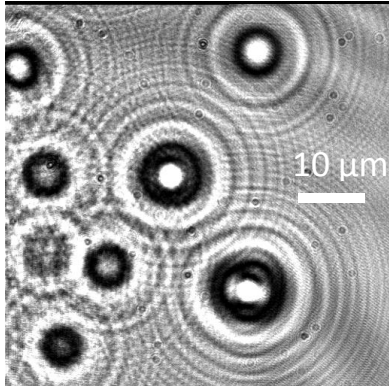
Фигура 27. Изображение от светлинен микроскоп

Фигури 28-30 са цифрови холограми на клетки на водорасли Хлорела вулгарис взети на различни етапи от жизнения им цикъл и реконструирания интензитет на тези холограми. Морфологията на клетките се вижда на снимките, показващи реконструирания интензитет.



Фигура 28. Снимки на водорасли Хлорела вулгарис, с диаметър приблизително 5-8 микрометра

- а) цифрова холограма на клетки на един ден*
б)реконструиран интензитет на а)
в) цифрова холограма на клетки на един ден
г) реконструиран интензитет на в)
д) цифрова холограма на клетки на един ден клетки;
е) реконструиран интензитет на д)

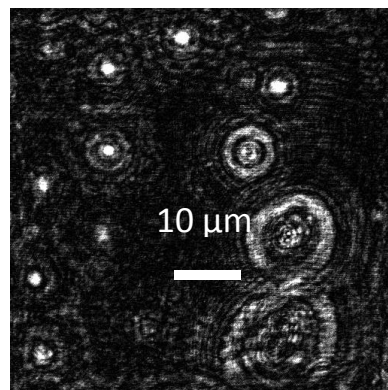
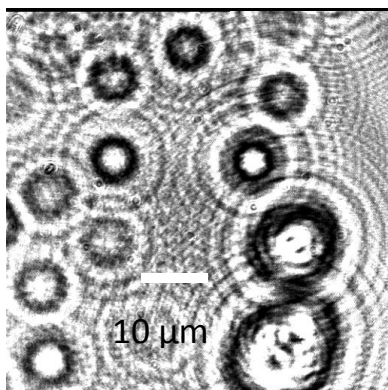
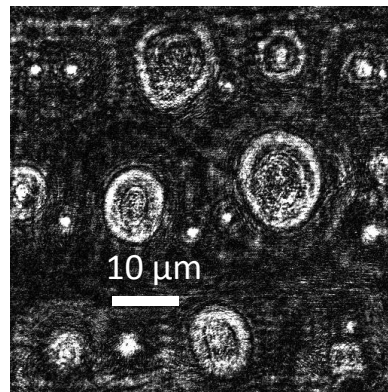
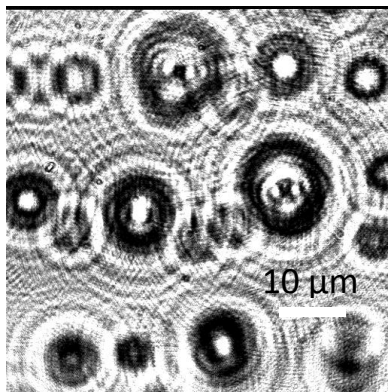


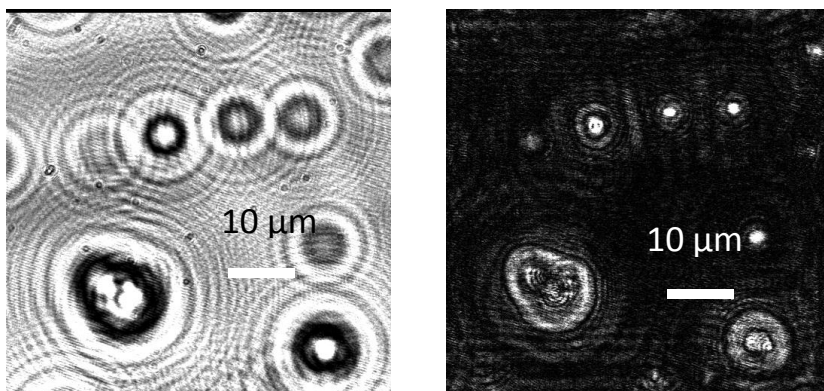
Фигура 29. Снимки на водорасли *Хлорела вулгарис*, с диаметър приблизително 5-8 микрометра

- а) цифрова холограма на клетки на 5 дни
- б) реконструиран интензитет на а)
- в) цифрова холограма на клетки на 5 ден
- г) реконструиран интензитет на в)
- д) цифрова холограма на клетки на 5 дни
- е) реконструиран интензитет на д)

Тези експерименти показват способността на ДИМ за:

- изследване на морфология на клетки без маркирането им
- изследване на клетъчното делене и миграция без маркиране
- изследване на субклетъчно движение в живите тъкани без маркиране





Фигура 30. Снимки на водорасли *Хлорела вулгарис*, с диаметър приблизително 5-8 микрометра

- а) цифрова холограма на клетки на 8 дни
- б) реконструиран интензитет на а)
- в) цифрова холограма на клетки на 8 ден
- г) реконструиран интензитет на в)
- д) цифрова холограма на клетки на 8 дни
- е) реконструиран интензитет на д)

Изводи: Показано е, че цифровият холографски микроскопия може да служи за визуализиране на живи клетки с размери от няколко микрометра без предварителна подготовка. Голямо предимство на новата техника е, че тя може да се използва за динамична количествена визуализация на деформации на живи клетки и да се проучва взаимодействието им с други частици, както и с околната среда. Това прави ДНМ ценна техника за много приложения в биологичните науки. Показано е, че цифрова холографска микроскопия може да осигури количествена информация без маркиране на прозрачни микрообекти, както и за бърз анализ на живите клетки при нормални лабораторни условия. Новата техника е успешно приложена за да се наблюдава растежа и пролиферацията на водорасли *Хлорела вулгарис*.

ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Разработена е схема за цифров линейен холографски микроскоп, като се реализира класическата схема за получаване на холографски образ, а именно линейна конфигурация, предложена от Габор. Използва се цифрова обработка и следователно няма ръчна обработка на холограмите. Методът позволява да

се реконструират различни равнини от обекта от една единствена холограма чрез съответни числени методи. Формирането на изображението не изисква лещи, т.е. елиминира се аберацията при изобразяването.

2. Холографският микроскоп е калибриран чрез използване на USAF Test Target 1951
3. Цифровият линеен микроскоп е използван за визуализация на микрочастици с диаметър два микрона (2 ± 0.13) μm . Показано е, че цифровият холографски микроскоп може да даде количествени изображения обекти с размери 1-2 микрона, без да се маркират обектите по никакъв начин с химичен агент и е подходящ за изследвания на микрочастици и наночастици.
Показано е, че цифровата реконструкция осигурява ефикасен начин за виртуално фокусиране в дълбочина на микроскопски образец.
4. Докладва се използване на цифрова линейна холографска микроскопия (DILHM) за визуализация на индуцирани със светлина периодични наноструктури в фотополимери. Записани са дифракционни решетки върху DA-базиран полимер: с пространствена честота 100 линии на mm. Чрез използване на софтуер f са реконструирани разпределението на интензитета и фазата.
5. Доменната структура на чист TGS е визуализирана чрез цифрова линейна холографска микроскопия за пръв път. Методът позволява образците да се изследват без никаква специална подготовка от повърхността на триглицин сулфатни монокристали. Беше установено, че диаметрите на отделни домени варират от 0.3 μm до 0.5 μm . По-големи доменни образувания с диаметри 3 – 3.5 μm също са наблюдавани. Беше установено, че те се състоят от по-малки лентовидни домени с размери 0.3-0.5 μm ширина на 3-5 μm дължина, които са равномерно разпределени в равнината на разцепване: 3 или 4 домени на квадратен микрометър. Цифровата линейна холографска микроскопия е използвана успешно за наблюдение на TGS домени в дълбочина. Цифровото виртуално фокусиране вътре в TGS кристала, показва същите размери за по-малките и за по-големите фeroелектрични домени, като тези наблюдавани на

повърхността на образците. От направените изследвания може да се заключи, че цифровата линейна холографска микроскопия е обещаващ нов метод за визуализация на домени и лесно може да се използва за картографиране на домените на прозрачните фероелектрици.

6. Цифровия линейен холографски микроскоп е използван, за да се визуализира доменната структура на монокристали на TGS. Получени са холограми на тънки монокристални слоеве. Чрез съответна софтуерна програма са реконструирани реални изображения на кристалите. Домените на TGS са подредени в редове с форма на плочи с ширина 25 μm и дължина от 100 μm . ЦЛХМ се оказва ефикасен метод за визуализация на доменната структура на TGS кристали. Може да се направи извод, че увеличаването на концентрацията на Nd води до намаляване на размерите на домените и тяхното разпръскване в обема на кристала.
7. Показано е, че цифровият холографски микроскопия може да служи за визуализиране на живи клетки с размери от няколко микрометра без предварителна подготовка. Голямо предимство на новата техника е, че тя може да се използва за динамична количествена визуализация на деформации на живи клетки и да се проучва взаимодействието им с други частици, както и с околната среда. Показано е, че цифрова холографска микроскопия може да осигури количествена информация без маркиране на прозрачни микрообекти, както и за бърз анализ на живите клетки при нормални лабораторни условия. Новата техника е успешно приложена за наблюдение на растежа и пролиферацията на водорасли *Chlorella Vulgaris*.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] D. Gabor, *Nature*, 161, 777-778 (1948).
- [2] U. Schnars and W. Juptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction," *Appl. Opt.* **33**, 179–181 (1994).
- [3] E. Leith and J. Upatnieks, *Microscopy by wavefront reconstruction*, *Journal of Optical Society of America* 55, p569–570 (1965)

- [4] J. W. Goodman – Introduction to Fourier Optics. McGraw-Hill Companies, Inc., New York, Second Edition 1996.
- [5] Peruhov I. and Mihaylova E., “Observation of nanoparticles by digital in-line holographic microscopy”, Fourth International Symposium on Advanced Micro- and Mesoporous Materials, Varna, Bulgaria, September 6-9, 2011
- [6] M. K. Kim, “Tomographic three-dimensional imaging of a biological specimen using wavelength -scanning digital interference holography”, *Optics Express* **7** (9), 305-310 (2000).
- [7] Rappaz B., Marquet P., Cuche E., Emery Y., Depeursinge C., Magistretti P.J., “Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy”, *Optics Express* **13**, 9361-9373 (2005).
- [8] Langehanenberg P., Kemper B., Dirksen D., and von Bally G., “Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging”, *Applied Optics* **47**(19), D176-D182 (2008).
-

СПИСЪК НА АВТОРСКИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, ВКЛЮЧЕНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- 1. Piyan Peruhov and Emilia Mihaylova, “Observation of nanoparticles by digital in-line holographic microscopy”, *Topics in Chemistry and Material Science*, Volume 6, 73-76, 2012.**
- 2. Piyan Peruhov and Emilia Mihaylova, “Applications of holographic microscopy in life sciences”, Chapter 13 in HOLOGRAPHY – BASIC PRINCIPLES AND CONTEMPORARY APPLICATIONS, pp 319-333, *Publisher: Intech*, 2013 (глава от книга на английски език)**
- 3. I. T. Peruhov and E. M. Mihaylova, “Characterization of photoinduced periodic microstructures by digital in-line holographic microscopy “, *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 48, Special Issue G (pp. 67-70) 2016 (IF 0.229)**
- 4. I. T. Peruhov and E. M. Mihaylova, “In-depth visualisation of Triglycine-Sulfate’s domain structure”, *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 48, Special Issue G (pp. 71-74) 2016 (IF 0.229)**

5. E.Mihaylova, I.Peruhov, “Cell observation of algae *chlorella vulgaris* by digital holographic microscopy”, Scientific Works of the Agricultural University, Academic Publishing House of the Agricultural University, Plovdiv, 2016, ISSN 1312-6318 (Print), ISSN 2367-5845 (Online)
6. I.Peruhov, E.Mihaylova, “Domain structure Investigation of triglycine sulfate by digital in-line holographic microscopy”, *Ferroelectrics*, Vol. 493, Issue 1, pages 172-182, March 2016 (IF 0.53)
7. I.Peruhov, E.Mihaylova, “High magnification digital holographic microscope”, Scientific Works of the Agricultural University, Academic Publishing House of the Agricultural University, Plovdiv, 2016, ISSN 1312-6318 (Print), ISSN 2367-5845 (Online)