

Új színes, illetve önreferenciás holografikus képképző módszerek

PhD disszertáció tézislevele



Kiss Márton Zsolt

Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai Kar
Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Zarándy Ákos

Budapest, 2020

1. Bevezetés

A holografikus képalkotás adott hullámhosszú és koherens hullámok interferenciáján alapuló eljárás, így a többszínű, illetve fluoreszcens képek létrehozásához nem egyértelmű az alkalmazhatósága. Disszertációmban új megoldást adok színes, illetve fluoreszcens holografikus képalkotásokra egyaránt.

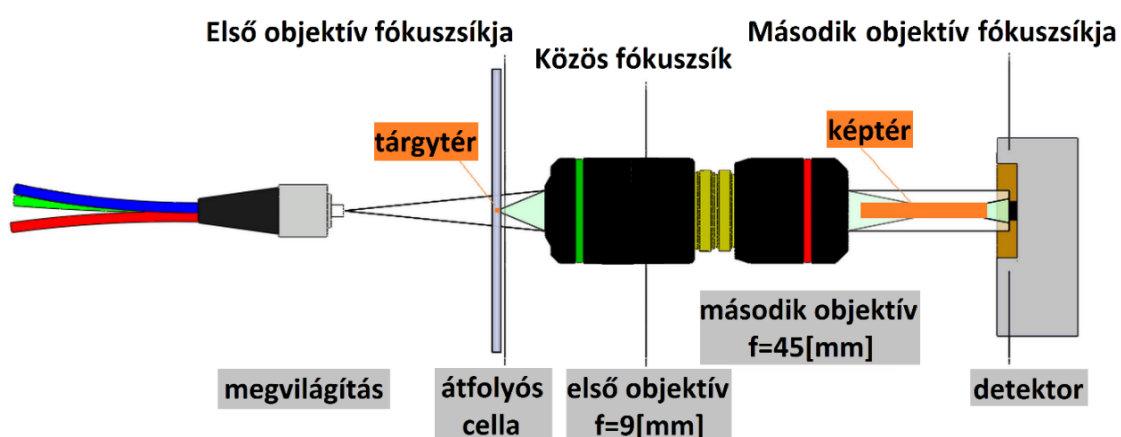
Szűkebb tématerületem a látható hullámhosszon működő *digitális holografikus mikroszkópia* (DHM), melyet szabadon úszó indikátor szervezetek (algák és férgek) felismerése céljából kutattam. Ezen lények felismerését nagyban segítik a képalkotás színes, illetve fluoreszcens változatai. Így lett kutatásomnak két fő területe.

A színes digitális holografikus mikroszkópia alapja egy összetett holografikus rendszer, melyben kettő vagy több különböző színű hologram-rekonstrukciókból illesztik össze a vizsgált objektum színes képét. A mozgó objektum magában foglalja azt az igényt, hogy a különböző színű hologramok egy időben keletkezzenek, és azonos perspektívából ábrázolják az adott objektumot azonos nagyítással, torzításokkal és pozícióval. A meglévő rendszerek - bár jó megoldásokat adtak - kiterjedt szerkezetük miatt nem eléggé biztosították a stabilitást. Munkám során egyforma súllyal kerestem a hardveres és a szoftveres megújulás lehetőségeit. Hardveres újításom volt a színes DHM-hez illesztett új megvilágítás mely nagyobb stabilitást és kisebb expozíciós időt biztosított az átfolyós mintát néző rendszernek. Szoftver oldalon, a holografikus képalkotás során gyakran jelentkező képszéli diffrakciót kezeltem le.

Az önreferenciás digitális holográfia -névéhez híven- az interferencia jelenségen alapul, amit a fény koherens természete tesz lehetővé. Amikor a fényforrás nem tipikusan koherens, például mikor a fluoreszcens tárgy maga a fényforrás, akkor nagyságrendekkel kisebb koherenciájú fény áll rendelkezésre az interferencia megvalósításához, ami a szokványostól eltérő geometriai elrendezést kíván. Kutatásomban eljutottam arra a felismerésre, hogy gyűrűs bifokális lencse (GyBL) segítségével is lehet az önreferenciás holográfiát a fluoreszcens mikroszkópia szolgálatába állítani, nem csak kiterjedt interferométerekkel, és drága fénymodulátorokkal. Kidolgoztam a gyűrűs bifokális lencse holografikus képalkotásának elvi hátterét, mely a leképzés mellett az öninterferenciához szükséges optikai úthossz különbségekkel is számol. Megterveztem és legyártattam a gyűrűs bifokális lencsét, mely hatékonyságát hagyományos mikroszkópba szerelve mérésekkel is bizonyítottam.

2. A színes DHM

Az első és második tézisem a színes digitális holografikus mikroszkóphoz köthető, mely berendezés biológiai ritkás folyadék minták -jelen esetben ivóvíz vagy természetes vizek-monitorozására lett megépítve. A berendezést az alábbi 1. ábra mutatja be.



1. ábra A színes digitális holografikus mikroszkóp optikai elrendezése.

A biológiai minta az átfolyós (0,8 mm vastag Ibidi®) cellán halad keresztül, miközben a színes DHM képet alkot a folyadékban úszó objektumokról. Látható, hogy a mintát nem kell két üveg közé egy síkba preparálni, mint hagyományos mikroszkópiában. Itt, a látott térfogat vastagsága kétszázszor is nagyobb, mint preparált esetben. A mélységnövekedést a holográfia teszi lehetővé, ami egy kétlépcsős eljárás. Első lépcső a tárgy képi információjának hologramban történő rögzítése, a második pedig a hologramból történő képrekonstrukció. A hologram írásához szükségünk van egy tárgy és egy referencianyalábra. Az itt bemutatott in-line rendszernél a megvilágítás azon fénye, mely a ritkás mintán szabadon áthalad a referencianyaláb, és azon fénye, mely a minta objektumain szóródik pedig a tárgynyaláb. A kettő interferenciája adja a hologramot, melyet a színes DHM optikája a detektorra illeszt. Így az optika által a Nyquist-Shannon tétel szerinti mintavétellel biztosítható. Az optika két (Olympus LUCPLFLN 20x és Olympus PLN 4x) objektív összeforgatásával lett úgy megalkotva, hogy azok hátsó fókuszai egybe essenek. A laterális nagyítása 5x. A második objektív fókuszában kap helyet az (EPIX SV9C10) kamera.

A kamera Bayer-pattern színszűrői és a színes megvilágítás segítségével három különböző hullámhosszon lehet ugyan arról az objektumról egy időben azonos nézetből hologramot felvenni, melyekből az objektum színes képe rekonstruálható.

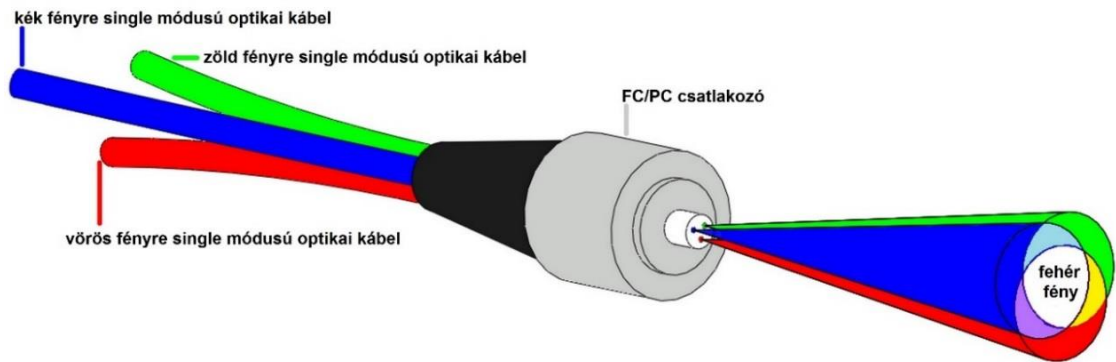
3. A DHM megvilágítása

A megvilágítás minősége meghatározza a képminőséget is. A megvilágítással megegyező referencianyaláb hullámfrontja és a hologramot rekonstruáló nyaláb hullámfrontja közti különbség képalkotási hibát eredményezhet, jobb esetben csak nagyításkülönbséget. A színes DHM numerikus rekonstrukció során sík rekonstruálónyalábot alkalmaz, így a sík hullámfrontú referencianyaláb elérése a cél. Lézer alkalmazásánál ez single módusú Gauss-nyalábot jelent, mely görbületi sugara nagyságrendekkel nagyobb a megvilágított terület átlójánál. A sík hullámfrontot az optika is segíti elérni, mely longitudinális nagyításából fakadóan 25x távolabb helyezi a megvilágítást, növelve ezzel a megvilágítás hullámfrontjának görbületi sugarát a detektoron.

A single módusú Gauss-nyalábot pinhole vagy single módusú száloptika által végrehajtott térfrekvencia szűréssel lehet egy általános lézerfényből elérni.

A színes megvilágításnál feladat a különböző hullámhosszú fények összevezetése, hogy egy irányból világíthassák meg a tárgyat. Ezt dikroikus tükrökkel, vagy száloptikai nyalábegyesítőkkal szokták megoldani. Minél több fényforrás van jelen, annál kiterjedtebb a rendszer, növelve ezzel a fényvesztést és az instabilitást, mely a hullámfrontok aberrációját okozhatják.

Munkám során arra jöttem rá, hogy érdemes a single-módusú száloptika előnyeit kihasználni, és az ismert nyalábegyesítőket elkerülni. Ha minden fényforrás a rá specifikus single módusú optikai szálba van csatolva, és az optikai szálak kimeneti végeik csak szorosan egymás mellé vannak illesztve egy szálcsatlakozó adapteren belül, akkor a térben létrejön a vonalas spektrumú fehér megvilágítás a kívánt hullámfrontminőséggel. Különböző számú és hullámhosszú fényforrásokra könnyen illeszthető ez az új koncepciójú megvilágítás, melynek képét az alábbi 2. ábra mutatja be.



2. ábra Új színes megvilágítás holografikus képalkotó berendezések számára. A különböző színre tervezett single-módusú optikai szálak egy szálcsatlakozóban vannak szorosan egymás mellé kötegelve. Kis fényvesztésű és jó minőségű stabil hullámfrontú Gauss-nyalábokat biztosít.

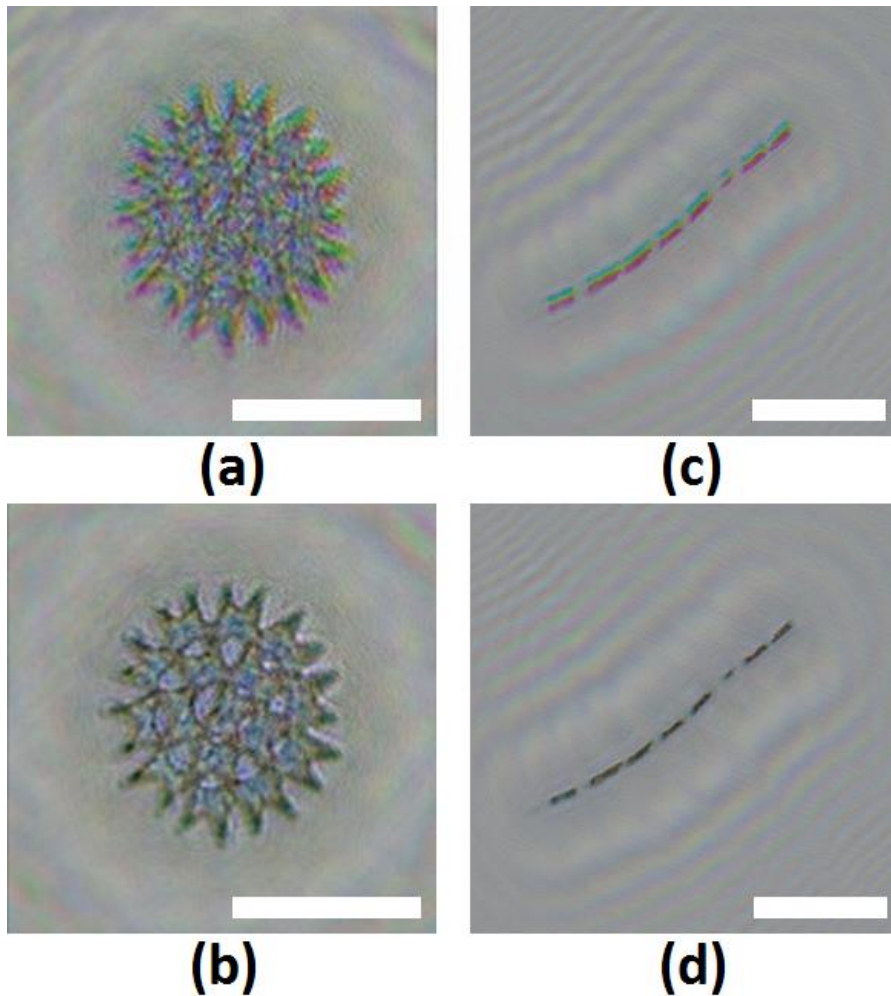
1. Tézis

Új megvilágítást dolgoztam ki színes digitális holografikus képalkotás számára. Bebizonyítottam, hogy különböző hullámhosszokra tervezett single-módusú optikai szálak kimeneti végeiknek egy optikai szálcsatlakozóba való egymással párhuzamos és szoros illesztésével színes holográfia számára robusztus, könnyen kezelhető és pozícionálható, tisztántartható és különböző hullámhosszú single-módusú Gauss-nyalábokat biztosító megvilágítás építhető egynézetű képalkotáshoz. Az optikai szálak önálló szabad végeikre kívánt fényforrások illeszthetőek. A megvilágítás szabadalmaztatásra került, és alkalmazást nyert egy forgalomba állított színes digitális holografikus mikroszkópban.

Kapcsolódó szabadalom, folyóirat publikáció és konferenciaelőadások: [S1, F1, K1, K2]

4. A színeskép-rekonstrukció

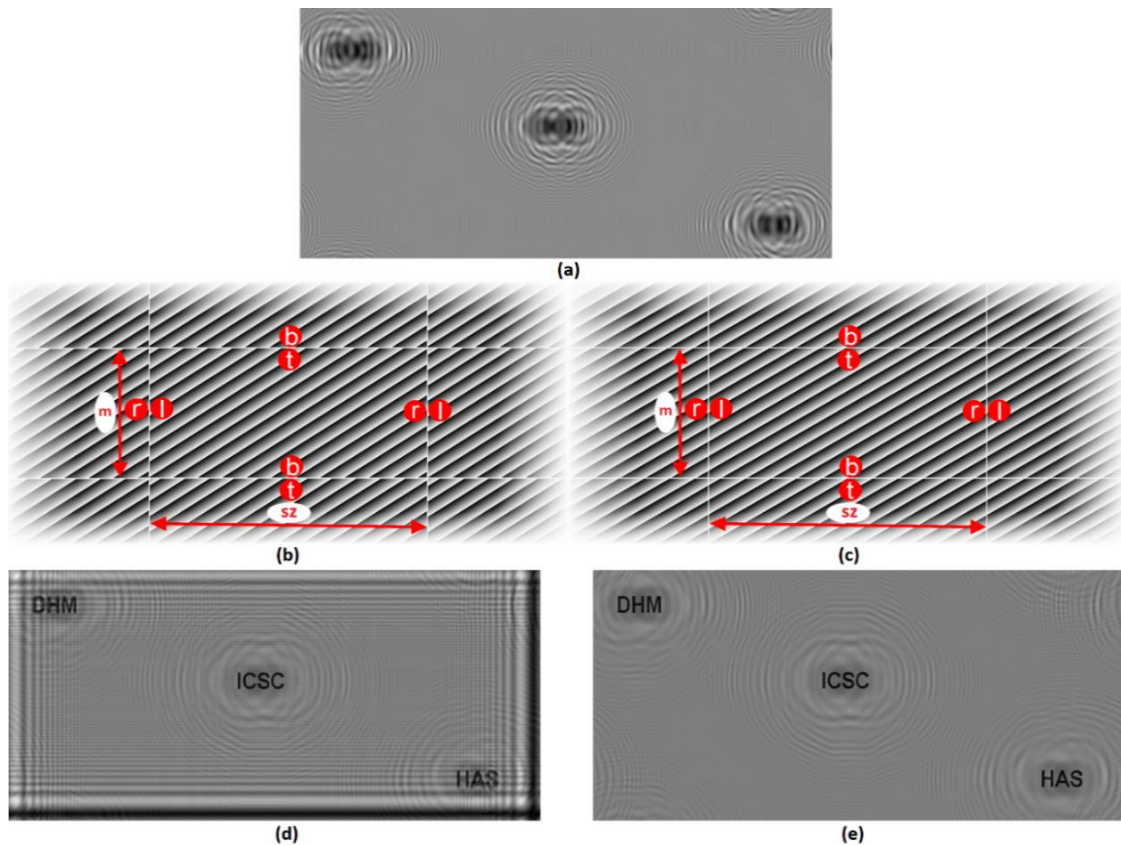
A detektor által egyszerre rögzített színes hologram rekonstrukciója színcsatornánként történik az Angular Spectrum Methoddal. Egy színes hologram színcsatornáit tekintve, egymással párhuzamos, sík rekonstruálónyalábok használata esetén a színcsatornák rekonstrukciói nincsenek fedésben, mint ahogy a következő 3. ábra a), c) képe mutatja. Ez a színhiba az új megvilágítás használatával, de dikroikus tükrökön alapuló nyalábegyesítések során is keletkezhet. Korrigálása numerikusan egyszerű: a különböző színű rekonstruálónyalábok által bezárt szögek legyenek egyenlők a megvilágítónyalábok által bezárt szögekkel, de a referencia- és a hozzá tartozó rekonstruálónyaláboknak nem kell párhuzamosaknak lenniük. A korrekciót alkalmazva a színhiba eltűnik, mint ahogy az alábbi 3. ábra b), d) képein látható.



3. ábra Tilt-kompenzáció nélküli (a, c) és a kompenzációs (b, d) hologram-rekonstrukciók. Ahol (a, b) *Pediatrum algatelep*, és (c, d) pedig fonalas *Melosira*. (A méretvonal hossza 20 μm .)

A rekonstruálónyalábok (a megvilágítónyaláb szögei alapján történő) egymással való relatív szögeinek beállítása azt eredményezi, hogy a rekonstruálónyaláb hullámfrontjának fáziseloszlása a hologram síkjában immáron nem homogén, hanem csíkos szerkezetű. A numerikus rekonstrukció során alkalmazott Discrete (Fast) Fourier Transzformáció a referencianyaláb hullámfront-eloszlásával (is) kicsempézi a végtelenített teret. Ez a csempézés a kép széleinek illeszkedéseinél fázisugrást eredményez (4. b) ábra), melyen a diffrakciós zaj létrejön (4. d) ábra).

Irodalmakból látható, hogy ezen diffrakciós zaj eltüntethető a képező apertúrázásával, a zaj önálló kiszámolásával és annak a rekonstrukcióból történő kivonásával, vagy például a képméret oly módú csökkentésével, hogy a tapétázott képtérben az illeszkedéseknél folytonosság keletkezzen, amihez hasonlót a 4. c) ábra is mutat. Ezen megoldásoknál kisebb műveletigényű és eredeti méretet megtartó megoldást adtam azzal, hogy a képek illeszkedéseinél található folytonosságot a hullámfront ferdeségének kerekítésével értem el.



4. ábra Rekonstruáló nyaláb általános ferdeségének (tilt) a hatása a széleken megjelenő diffrakciós csík, mely a tilt pontos beállításával korrigálható. a) Egy hagyományos in-line hologram. b) A rekonstruáló nyaláb fázisa, mely általános tilt-et tartalmaz. c) Oldalhossz alapján módosított tilt, hogy a rekonstruáló nyaláb a gyors Fourier-transzformáció során ne szenvedjen fázisugrást a széleken. d) és e) pedig rendre a „b”, illetve a „c” fázisú rekonstruáló nyalábbal történt rekonstrukciók.

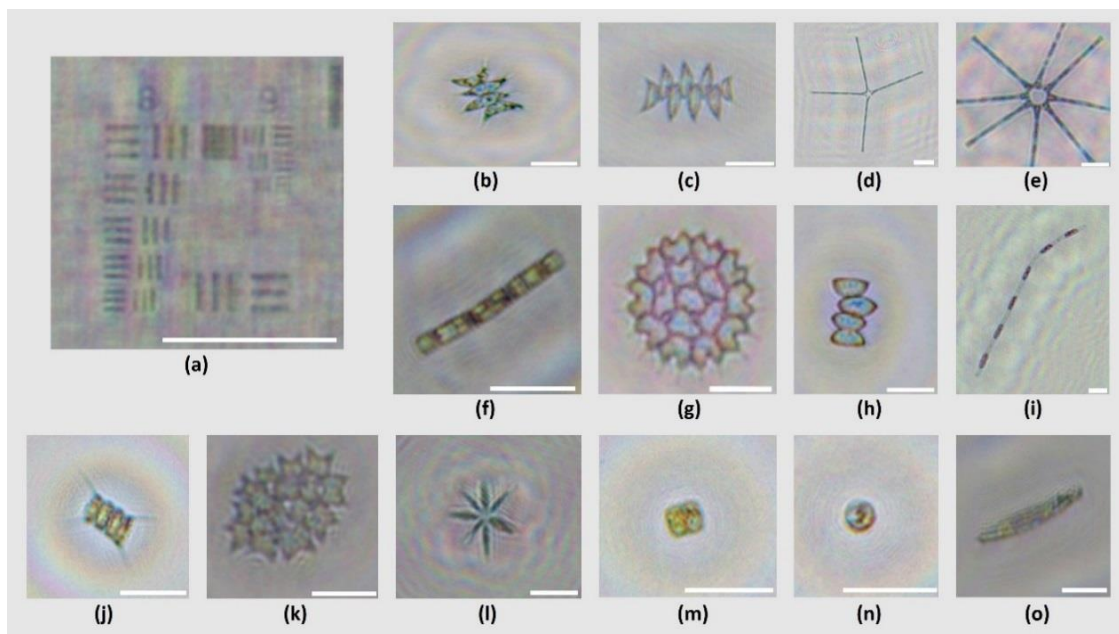
Minél nagyobb egy rekonstruálónyaláb ferdesége, ezen kerekítés annál kisebb szögmódosítással jár. Mivel a különböző hullámhosszú rekonstruálónyalábok közt relatív szögmódosítást kell tartani, együttesen annyira meg lehet dönteni őket, hogy a ferdeség kerekítése gyakorlatilag ne változtassa meg relatív szögüket.

2. Tézis

Új, a jelenlegiekénél hatékonyabb algoritmikus megoldást dolgoztam ki, amely a ferde síkhullámmal történő numerikus rekonstrukciók során, a képtér szélén az FFT numerikus artefaktjaként keletkező diffrakciókat küszöböli ki azzal, hogy a ferde síkhullám ferdeségét úgy korrigálja, hogy a kép oldalainak hosszai megegyezzenek a velük párhuzamos hullámszámvektor-komponensekből származtatható hullámhosszak egész számú szorzataival. Az új eljárás megtartja a hologramok és a rekonstrukciók eredeti méreteit, és kellő paraméterezés mellett nincs hatással a képalkotásra, ugyanakkor számítás és műveletigénye is elenyésző a rekonstrukcióéhoz képest.

Kapcsolódó szabadalom és folyóiratpublikáció: [S1,F1]

A színes DHM-hez kötődő részek lezárásaként álljon itt még néhány általa készített színeskép.



5. ábra A DHM-el készített színes képek. USAF teszt tárgy holografikus képe (a) és színes rekonstrukciók algákról. Scenedesmus (b, c, h, j), Asterionella (d, e), Melosira (f, i), Pedicellina (g, k), Ankistrodesmus (l), Thalassiosirales (m, n), és Bacillariophyceae (o). (A méretvonal hossza 20 μm .)

5. Önreferenciás holográfia

Biológiai minták fluoreszcens vizsgálata előnyt jelent például az élő- és élettelen megkülönböztetésében. A színes DHM fluoreszcens mérésre nem alkalmas. A holográfiából fakadó preparálás nélküli átfolyó minta vizsgálatának lehetősége viszont olyan előny, melyről nem szívesen mondtam volna le. Így került figyelmem középpontjába az önreferenciás holográfia.

Az interferencia jelensége –melyen a holográfia is alapul- egy fényforrás fényeivel tud csak megvalósulni. Egy közös fényforrás esetén biztosítható a tárgy- és a referencianyaláb közti koherencia. Önreferenciás holográfiánál a fényforrás nem önálló „optikai elem”, hanem maga a tárgy. A tárgyról jövő (pl fluoreszcens) fényt kell kettéválasztani referencia- és tárgynyalábbá, külön modulálni őket, majd interferáltatni őket egymással. Az interferencia akkor lehetséges, ha a fény koherenciahossza nagyobb mint a két fényút *optikai úthosszkülönbsége* (OPD). Fluoreszcens fény esetén ez a hossz 10 μm -es nagyságrendbe is eshet.

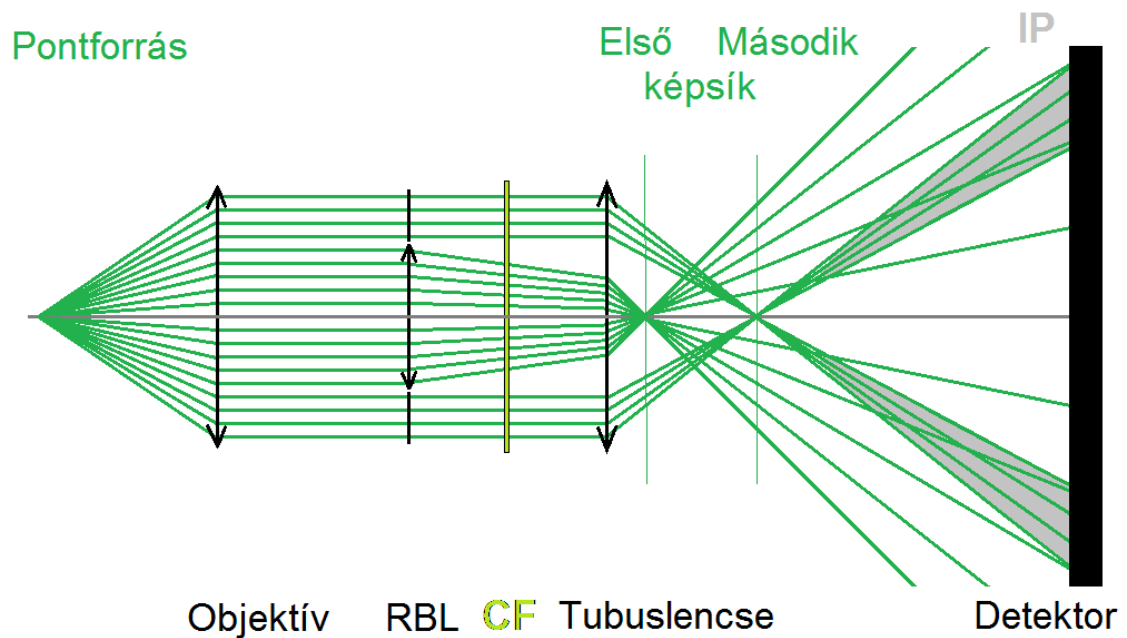
Gondolati, vagy megvalósítási szinten megvalósult önreferenciás holografikus rendszerek két csoportra oszthatóak: az interferométer, illetve a bi-multifokális optikai elem alapú elrendezésekre. Az elsőhöz tartozik a például Hariharan-Sen, Mach-Zehnder vagy Linnik interferométer alapú elrendezés, a másodikhoz a Briefringent lencse, diffrakciós lencse, vagy térbeli fénymodulátor (SLM) alapú elrendezések. Az elsők hátránya a nagy kiterjedés, mely méretbeli, és rezgésérzékenységi problémákat okoznak, illetve az általuk használt nyalábegyesítők szükségszerűen fényintenzitás veszteséget okoznak, mely a kis intenzitású fluoreszcens félynél külön hátrány. A második csoportba soroltak hátránya például a nagy költség, vagy a polarizátor használata, mely szintén fényvesztést okoz, de előnyük a kompaktság.

Így fogalmazódott meg bennem a kérdés, miszerint *lehet-e gyűrűs bifokális lencsével önreferenciás holográfiát művelni?*

A Gyűrűs bifokális lencse

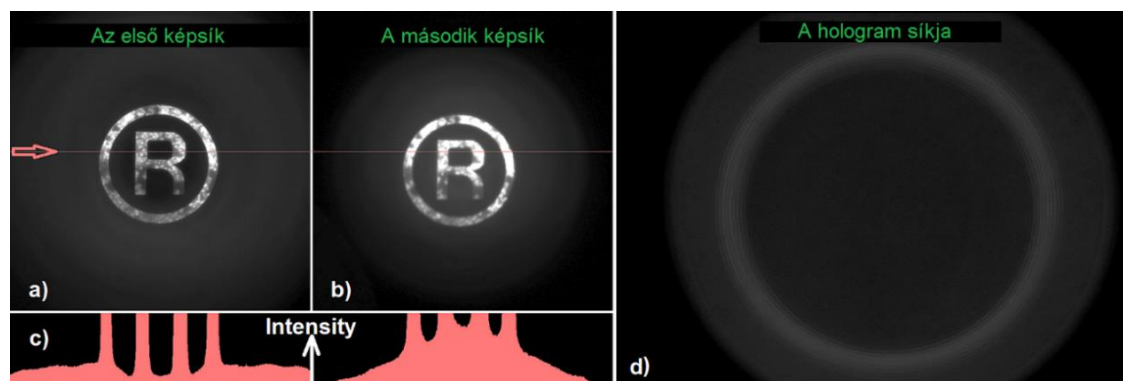
A *gyűrűs bifokális lencse* (GyBL) egy kör és egy azt körbe ölelő gyűrű keresztmetszetű mezőből áll, így a lencsét elhagyó nyalábok keresztmetszetei is kör és gyűrű alakúak. Ebből következik, hogy a két nyaláb közös metszete által rajzolt hologram is gyűrű alakú. A kérdés, biztosítható-e, hogy a gyűrűs metszetben helyezkedjen el a tárgy- és referencianyalábok nulla OPD-je?

A GyBL-t hagyományos mikroszkópba is terveztem beépíteni, melynek optikai paraméterei nem beszerezhetőek. A GyBL-t úgy kellett terveznem, hogy a koherenciahossznál kisebb, de inkább nulla OPD-t biztosítson a tárgytól a hologram gyűrűjéig. E célból a GyBL tervezésénél a képsíkok és a detektor egymáshoz viszonyított távolságainak (6. ábra) ismeretéből indultam ki, és sugáoptikai módszerekkel dolgoztam.



6. ábra A megépített önreferenciásholografikus mikroszkóp elvi vázlata. A pontforrás képét egy objektív bontja fel. A fénynyalábot a bifokális lencse (RBL) választja ketté térben. A színszűrő (CF) a gerjesztő fényt szűri ki, és a fluoreszcens fény sávzélességét típusától függően csökkenti. A Tubuslencse a nyalábok divergenciáját állítja be, és a detektor a hologramot rögzíti. A két nyaláb metszete az interferencia csíkrendszer (IP) megjelenési helye.

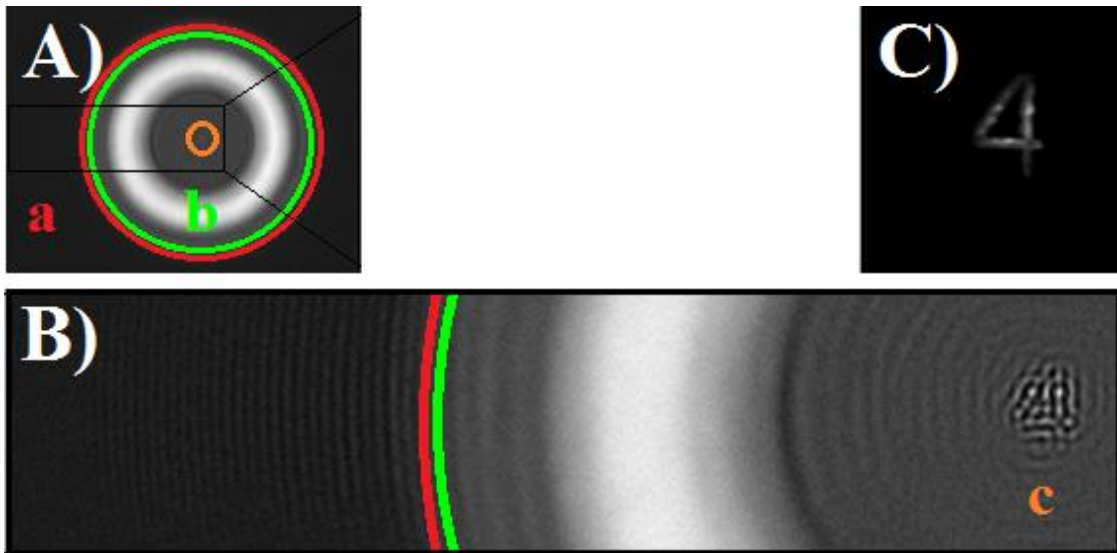
Az általam megtervezett GyBL-t egy Olympus IX71-es mikroszkópba építettem be. Vele, a használt USAF fluoreszcens testtárgy[®] védjegyeről a különböző síkokban az alábbi intenzitáseloszlást kaptam:



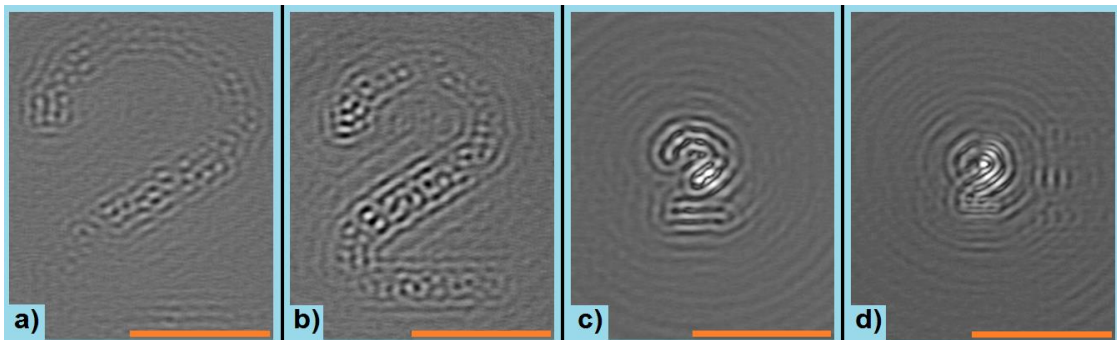
7. ábra a) A tengely menti nyaláb képe és a gyűrűs nyaláb defókuszált képe, míg b)-nél fordítva. c) intenzitáseloszlás a piros csík mentén d) Hologram.

Mérési eredmények

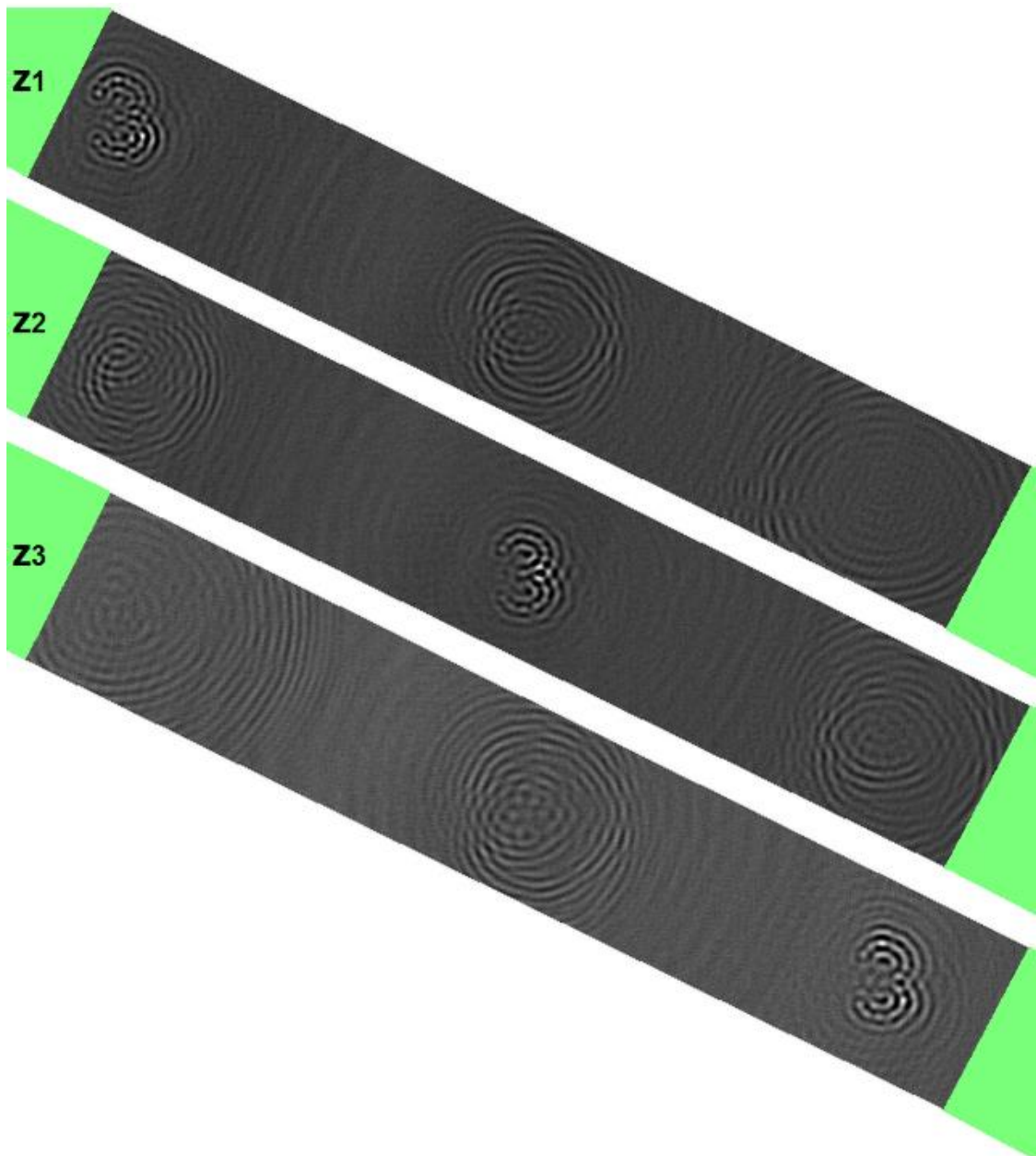
Méréseim során arra voltam kíváncsi, hogy a GyBL rajzol-e hologramot, melyekből a tárgy adott minőségű képei rekonstruálhatóak-e (8. ábra)? Méréseim során főleg az USAF fluoreszcens tesztárgy különböző részleteit használtam fel tárgyként, melyek különböző méretűek voltak (9. ábra), és melyeket különböző mélységekbe is elhelyeztem (10. ábra).



8. ábra Gyűrűs bifokális lencse segítségével felvett gyűrűs hologram rekonstrukciója. A) Teljes rekonstrukció. B) Rekonstrukció kiemelt részlete, ahol jól látható, hogy az eredeti hologram helyéről (a fényes gyűrűből) kidiffraktálódtak az interferencia csíkok, így az ikerkép a piros körön kívülre került, a kép a „4”-es minta pedig a gyűrű középre, azaz a kép és ikerkép térben szétválik. C) Az eredeti fluoreszcens tesztárgy fényképe. Megfigyelhető, hogy az intenzitáseloszlás a rekonstrukción és a fényképen korrelál, azaz a „4”-esnek nem csak az alakja, hanem a szerkezete is visszakapható. Ugyanakkor a képek alapvető „stílus” különbségei is megfigyelhetők, mint például a háttér és a diffrakciós csíkok jelenléte.



9. ábra a), b), c) és d) Azonos mélységben különböző méretű fluoreszcens „2”-es tesztárgyak holografikusan rekonstruált képei, ahol az egyforma hosszú narancssárga szakaszok 200 μm-t jelölnek.



10. ábra Mélységvizsgálat. Ugyan az a „3”-as az objektív (nem a mikroszkóp) fókuszába (z_2), azon belülre $0,5\text{mm}$ -rel (z_1) és kívülre 1mm -rel (z_3) (és különböző laterális pozíciókban is) lett elhelyezve hologramok rögzítéséhez. Az így kapott három hologramot összeadva egy hologrammá, háttérsimítása után rekonstruáltam. A hologram különböző z távolságokba történő rekonstrukciói láthatóak.

Összefoglaló

Kigondoltam, megterveztem és legyártattam a gyűrűs bifokális lencsét, melyet hagyományos mikroszkópba szereltem. Gyűrűs bifokális lencsével kiegészített mikroszkóppal elsőként alkottam önreferenciás holografikus képet fluoreszcens objektumokról. Ezzel bebizonyítottam a gyűrűs bifokális lencse önreferenciás holografikus használatának lehetőségét.

3. Tézis

Önreferenciás holografikus képalkotásra elsőként javasoltam gyűrűs bifokális lencse (GyBL) használatát. A GyBL-t megterveztem, és a gyártmányt beépítettem egy hagyományos mikroszkópba. A GyBL által rajzolt hologram gyűrű alakú. Mérésekkel igazoltam, hogy a GyBL alkalmas kis koherenciahosszú fénnel, mint például fluoreszcens fénnel is az önreferenciás holografikus képalkotásra, illetve, hogy a GyBL-vel megépített optikai rendszer a vele hasonló hagyományos leképezésű optikánál nagyságrenddel nagyobb mélységet is képes egy expozícióval átlátni. A gyűrűs hologramból való rekonstrukció síkjában a kép és az ikerkép térben szétválik, így azok nem fedik át egymást. Bebizonyítottam, hogy a GyBL alkalmazásával lehetőség nyílik egy egyszerű, kompakt, robusztus és olcsó önreferenciás holografikus mikroszkóp megépítésére.

Kapcsolódó folyóirat és konferencia publikációk: [F3, K3, K4]

A szerző publikációi

szabadalom

[S1] **Kiss Márton**, Szatmári István, Orzó László, Göröcs Zoltán, Tőkés Szabolcs; "Háromdimenziós színes képet alkotó berendezés" HU000229591B1, 2011.

folyóirat publikáció

[F1] **M. Z. Kiss**, B. J. Nagy, P. Lakatos, Z. Göröcs, S. Tőkés, B. Wittner, and L. Orzó, "Special multicolor illumination and numerical tilt correction in volumetric digital holographic microscopy," *Opt. Express*, vol. 22, pp. 7559–7573, Apr 2014.

[F2] **M. Z. Kiss**, "Ring-shaped bifocal lens used for fluorescent self-referenced holographic imaging" EOS-JRP, 2016.

[F3] P. Bawuah, **M. Z. Kiss**, P. Silfsten, C.-M. Tåg, P. A. C. Gane, and K.-E. Peiponen, "Far infrared (THz) absorption spectra for the quantitative differentiation of calcium carbonate crystal structures: Exemplified in mixtures and in paper coatings," *Optical Review*, vol. 21, no. 3, pp. 373–377, 2014.

konferencia publikáció

[K1] Z. Göröcs, L. Orzó, **M. Kiss**, V. Tóth, and S. Tőkés, "In-line color digital holographic microscope for water quality measurements," 2010.

[K2] Z. Göröcs, **M. Kiss**, V. Tóth, L. Orzó, and S. Tőkés, "Multicolor digital holographic microscope (DHM) for biological purposes," in *BiOS*, p. 75681P, International Society for Optics and Photonics, 2010.

[K3] **M. Z. Kiss**, "A new compact self-referenced holographic setup tested on a fluorescent target," in *Digital Holography & 3-D Imaging Meeting*, p. DTh1A.7, Optical Society of America, 2015.

[K4] **M. Kiss**, Z. Gorocs, and S. Tokes, "Self-referenced digital holographic microscopy," in *Cellular Nanoscale Networks and Their Applications (CNNA), 2012 13th International Workshop on*, pp. 1–4, Aug 2012.

[K5] **M. Zs. Kiss**, "Proper autofocus for better particle measurements," *International Society for Optics and Photonics, Practical Holography XXXIII: Displays, Materials, and Applications, (SPIE)*, pp 107-115, 2019