

بیست و دومین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران و هشتمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران ۶ تا ۸ بهمن ماه ۱۳۹۴، دانشگاه یزد



# افزایش توان تفکیک عرضی در میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی میرائو

وحيد عباسيان <sup>(و۲</sup>، مصطفى آخته (<sup>۲۹</sup>، احسان احدى اخلاقى (<sup>۳۶</sup> و عليرضا مرادى <sup>۲۹۳</sup> و

<sup>۱</sup>دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی۶۶۷۳۱–۴۵۱۹۵ <sup>۲</sup>مرکز پژوهشی اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۶۶۷۳۱–۶۵۱۹۵ <sup>۳</sup>دانشکده فیزیک، دانشگاه زنجان، زنجان کد پستی ۳۱۳–۴۵۱۹۵ <sup>۲</sup>دانشکده فیزیک، دانشگاه بیلکنت، آنکارا، ترکیه

چکیده – از عدسی شیئی میرائو میتوان برای تمامنگاری دیجیتالی هممسیر استفاده کرد. با وجود مزایای فراوان، به علت عدم تناسب در توان تفکیک محوری و عرضی، استفاده از این عدسی برای تمامنگاری دیجیتالی چندان مورد استفاده قرار نگرفتهاست. در این مقاله، روشی ساده و مؤثر برای افزایش توان تفکیک عرضی در چیدمان میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی میرائو ارائه شدهاست. در این روش یک میکروکره در نزدیکی سطح نمونه قرار میگیرد که باعث افزایش گشودگی عددی و در نتیجه افزایش قدرت تفکیک عرضی سیستم میشود. مقایسه نتایج تجربی بهدست آمده برای بازسازی تمامنگاشتهای دیجیتالی ثبت شده، قابلیتهای این روش را به خوبی مشخص میسازد؛ بهطوری که با قرار دادن میکروکرهای از جنس سیلیکا با قطر ۸/۰ میلیمتر در مسیر باریکهی شیئی میتوان بزرگنمایی مؤثر را تا چهار برابر افزایش داد.

كليد واژه- تداخلسنج ميرائو، تصويربرداري وضوح بالا، ميكروسكوپي تمامنگاري ديجيتالي، ميكروكره.

# **Enhancement of Lateral Resolution of**

# Mirau Digital Holographic Microscopy

Vahid Abbasian<sup>1,2</sup>, Mostafa Aakhte<sup>1,2</sup>, Ehsan A.Akhlaghi<sup>1,2</sup> and Ali-Reza Moradi<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, PO Box 45195-1159, Zanjan, Iran <sup>2</sup>Optics Research Center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, PO Box 45137-66731, Zanjan, Iran <sup>3</sup>Department of Physics, University of Zanjan, PO Box 45195-313, Zanjan, Iran <sup>4</sup>Soft Matter Lab, Department of Physics, Bilkent University, Cankaya, 06800 Ankara, Turkey

Abstract - Mirau interferometric objectives can be employed as a common-path digital holographic microscopy (DHM) system. This system has several advantages including compactness and vibration-immune configuration. Nevertheless, due to their limited lateral resolution, with respect to the axial resolution, Mirau objectives have not been widely used for digital holography. In this paper, we provide a simple and effective method to enhance the lateral resolution of a Mirau based DHM. In this method a microsphere is inserted on the object light-path to increase the numerical aperture and hence the resolution. The experimental results from numerical reconstruction of the recorded digital holograms show that a microsphere of 0.5 mm size can increase the system's effective resolution by a factor of four.

Keywords: Digital Holographic Microscopy, Microsphere, Mirau interferometer, Super-resolution

#### ۱– مقدمه

در تمامنگاری، اطلاعات فازی و دامنهای جبههی موج مربوط به یک جسم، به طور همزمان ثبت و به صورت یک تصوير با اطلاعات سەبعدى بازسازى مىشود [٦]. امروزه با پیشرفت علم و فناوری، از یک دوربین دیجیتال با توان تفکیک بالا برای ثبت طرح تداخلی ناشی از دو موج مرجع و جسم، استفاده می شود و فرایند بازسازی، به صورت عددی در یک رایانه انجام می گیرد. این روش به تمامنگاری دیجیتالی موسوم است [۳]. یکی از کاربردهای تمامنگاری دیجیتالی، تصویربرداری میکروسکوپی با وضوح بالاست که اخیرا نقش قابل توجهی در مطالعهی نمونههای زیستی و شفاف داشتهاست [۴]. اغلب از دو تداخلسنج مایکلسون و ماخ زندر برای تمامنگاری استفاده می شود. این ابزارها به تنظیمات بسیار دقیقی برای اصلاح ابیراهی کروی و ایجاد اختلاف راه نوری مناسب (بهخصوص وقتی از یک منبع نوری با طول همدوسی پایین استفاده میشود) نیاز دارند. وجود ابیراهیها در تمامنگاری اغلب به عدسی شیئی به کار رفته در تداخل سنجها مربوط می شود [۵]. استفاده از شیئی میرائو در تمامنگاری، از مزایای بسیاری از جمله: فشرده بودن چيدمان، عدم حساسيت بالا به نوسانات خارجي، اصلاح ابیراهی کروی و کاهش جملههای ابیراهی درجه دوم، پایداری فاز بالا، هندسهی ساده و قابلیت تنطیم آسان به علت داشتن تنها یک عدسی، برخوردار است [۵ و۶]. میکروسکوپ تمامنگاری میرائو اغلب برای بزرگنماییهای متوسط (۱۰x تا ۵۰x) به کار می رود و از منابع نوری با طول همدوسی پایین استفاده می شود [۵]. استفاده از منابع نوری با همدوسی بالا مثل لیزر، سبب ایجاد طرحهای پراش و مزاحم ناشی از سطح نمونه و سایر عوامل موجود در مسیر نور می شود که کیفیت تصویربرداری از نمونه را پایین آورده و تحلیل دادهها را با مشکل مواجه می سازد. تمامنگاری میرائو برای سطوح بازتابی کاربرد دارد و قدرت تفکیک عرضی آن نسبت به قدرت تفکیک عمودی پایین است. تصویربرداری میکروسکوپی بدون محدودیت پراش و زیر طول موج، یک موضوع مهم و مورد توجه در چند دههی اخیر بودهاست. سیستمهای میکروسکوپی مبتنی بر میکروکره به علت توانایی بالا در کانونی کردن نور و پایین آوردن

حد پراش سیستمهای میکروسکوپی، انتخاب مناسبی برای این منظور و رسیدن به یک تصویربرداری با وضوح بالا، بهشمار میروند [۷ و۸]. در این مقاله روشی برای افزایش توان تفکیک عرضی در چیدمان میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی میرائو ارائه شدهاست. در این روش با قراردادن یک میکروکره در نزدیکی سطح مورد بررسی، قدرت تفکیک عرضی سیستم افزایش یافتهاست.



شکل ۱: طرح کلی تمامنگاری میرائو. L- عدسی شیئی میرائو، STM-باریکهشکن شیئی، OS- صفحهی نمونه و RM- آینهی مرجع شیئی.

### ۲- مبانی نظری

شکل ۱، طرح کلی تمامنگاری میرائو را نمایش میدهد. جبههی موج مختلط (ψ) با عبور از عدسی، تحت تاثیر انتقال فازی برابر با

:تقسیم می شود و شدت طرح تداخلی عبارتست از  $I(x,y) = |O(x,y)|^2 + |R(x,y)|^2 + O(x,y)R^*(x,y) + O(x,y)^*R(x,y).$ (۲)

که جملات اول و دوم به ترتیب شدت موج جسم و مرجع و جملات سوم و چهارم به ترتیب تصویر واقعی و مزدوج را نشان میدهند. روشهای مختلفی برای تحلیل نوارهای تداخلی و بازسازی تمامنگاشتها وجود دارد. در این مقاله، از روش تبدیل فوریه برای تحلیل نوارها و اندازه گیری فاز استفاده شده است. میتوان رابطهی (۲) را به صورت زیر فرض کرد:

 $I(x,y) = a(x,y) + b(x,y) \cos [\phi(x,y) + 2\pi f x],$  (۳) که در آن b(x,y) شدت زمینه، b(x,y) دامنهی

مدولاسیون و  $\phi(x,y)$  اختلاف فاز باریکههای تداخلی و

*f*، متوسط بسامد فضایی طرح تداخلی است. با معرفی تابع (x, y) بهصورت زیر: (۴)  $c(x, y) = \frac{1}{2}b(x, y)\exp[i\phi(x, y)]$ (باطهی (۳) را میتوان بهصورت زیر نوشت:  $I(x, y) = a(x, y) + c(x, y)\exp(2\pi f x) +$  $c^*(x, y)\exp(-2\pi f x).$ (۵) با تبدیل فوریه نسبت به x خواهیم داشت:

 $\hat{l}(f_x, y) = \hat{a}(f_x, y) + \hat{c}(f_x, y)\delta(f_x - f) +$  $c^*(f_x, y)\delta(f_x + f)$  (7)

که  $f_x$ ، مختصات بسامد فضایی در فضای بسامدها است. جمله یاول مربوط به مرتبه ی صفر و جملات دوم و سوم مربوط به تصاویر واقعی و مجازی حاصل از بازسازی تمام نگاشت است. با انتخاب جمله ی دوم در فضای فوریه و استفاده از تبدیل فوریه ی وارون، توزیع فاز مربوط به نمونه از رابطه ی زیر به دست می آید:

(۲)  $\frac{Im[c(x,y)]}{Re[c(x,y)]}$  (۲) برای تعیین ضریب افزایش توان تفکیک عرضی یک سیستم میکروسکوپی مبتنی بر میکروکره، میتوان از تعریف کلاسیکی توان تفکیک فضایی بر اساس مفهوم تابع پخشیدگی نقطه بهره گرفت. بهکارگیری میکروکره باعث افزایش مخروط نوری شامل باریکههایی که وارد سیستم موثر سیستم میشوند و در نتیجه افزایش گشودگی عددی موثر سیستم میشود. طبق رابطهی ذاتی بین گشودگی عددی و تابع پخشیدگی نقطه، توان تفکیک و بزرگنمایی سیستم بیشتر میشود. بنابراین با اندازهگیری ضریب افزایش بزرگنمایی، بهبود توان تفکیک عرضی قابل محاسبه خواهد بود.

۳- شرح آزمایش و نتایج

۳-۱- چیدمان آزمایش

شکل ۲، طرحی کلی از چیدمان آزمایش را نمایش میدهد. باریکهی لیزر هلیوم-نئون ( $\lambda = 877$ nm) پس از گذر از پخشکنندهی چرخان، از طریق یک باریکهشکن وارد شیئی میرائو ۱۰x (WD= ۷/۴ mm، Nikon) میشود. باریکه توسط باریکهشکن موجود در شیئی، به دو قسمت تقسیم میشود. باریکهی مرجع از شیئی، به دو قسمت تقسیم میشود. باریکهی مرجع از آزمون توسط یک میکروکرهی شیشهای (سیلیکا، ازمون توسط یک میکروکرهی شیشهای (سیلیکا،

بازتاب از سطح آن و عبور از میکروکره، برای تداخل با باریکه مرجع، وارد شیئی میرائو می شود. طرح تداخلی تشکیل شده پس از ثبت در دوربین ( Thorlabs DCC 1545C) برای بازسازی وارد رایانه می شود. به منظور رسیدن به هندسهی تمامنگاری خارج محوری، نمونه به اندازهی زاویهی کوچکی (کمتر از ۶ درجه) کج قرار داده شدهاست. استفاده از نور لیزر به علت همدوسی فضایی بالا، موجب ایجاد نوارهای ناخواسته و طرحهای پراش مزاحم شده و کیفیت تصویر را به شدت پایین می آورد. برای رفع این مشکل، در مسیر باریکهی لیزر، از یک یخش کنندهی چرخان استفاده شدهاست تا همدوسی فضایی کاهش یابد. برای نگهداشتن و کنترل مکانیکی میکروکره، از یک رشته فیبر استفاده شده بهطوری که میکروکره به انتهای آن چسبیده شده است و محل میکروکره با جابجاگر میکرونی x-y-z که انتهای دیگر فیبر به آن متصل است، کنترل می گردد.



شکل ۲: طرح کلی چیدمان تمامنگاری میرائو به همراه میکروکره.

#### ۲-۳- نتایج تجربی

در شکل ۳، تمامنگاشتهای ثبت و بازسازی شده از یک صفحهی آزمون میکروسکوپ ( USAF1951 1x Test Target Positive)، نمایش داده شدهاست. شکل ۳(الف) تمامنگاشت ثبت شده از صفحهی آزمون را در غیاب میکروکره و شکل ۳(ب) بخش مشخص شده در شکل ۳(الف) را بهصورت بزرگ شده نمایش میدهد. در شکل ۳(د) تمامنگاشت نمونه در حضور میکروکره نمایش داده شدهاست. شکلهای ۳(ج) و ۳(ه) بهترتیب مربوط به تمامنگاشتهای مرجع ۳(ب) و ۳(د) است. تمامنگاشت مرجع، بدون حضور نمونه ثبت می شود و در مرحلهی بازسازی عددی برای کاهش اثرات مزاحم

در قطعات اپتیکی روی تصویر بازسازی شده مورد استفاده قرار می گیرد. همان طور که از تصاویر مشخص است، به کار گیری میکرو کره باعث افزایش بزر گنمایی در تمامنگاشت ثبت شده می شود. در شکل ۳(و) طیف فوریه ی مربوط به تمامنگاشت نمونه در حضور میکرو کره نمایش داده شده که مرتبه های ۱ و ۱ – مربوط به تصاویر مجازی و حقیقی، همچنین شدت مرکزی (مرتبه ی صفر) مربوط به نور پراشیده نشده از نمونه، در آن مشخص است. یکی از مرتبه های ۱ و ۱ – برای بازسازی فاز ناشی از نمونه، به کار گرفته شده است. شکل ۳(ز)، تصویر شدتی بازسازی شده ی تمامنگاشت ۳(د) را نمایش می دهد.



شکل ۳: تمامنگاشتهای ثبت و بازسازی شده از صفحهی آزمون میکروسکوپ؛ الف) در غیاب میکروکره، ب) بخش بزرگ شدهی نمایش دادهشده از (الف)، ج) تمامنگاشت مرجع مربوط به (ب)، د) تمامنگاشت از نمونه در حضور میکروکره، ه) تمامنگاشت مرجع مربوط به (د)، و) طیف فوریه مربوط به نمونه در حضور میکروکره، ز) شدت بازسازی شده مربوط به (د).



شکل ۴: الف) طرح فاز حاصل از بازسازی تمامنگاشت شکل ۳(د)، ب) رویهی دوبعدی از تمامنگاشت شکل ۳(د)، ج) تصویر سهبعدی با وضوح بالا از تمامنگاشت شکل ۳(د)، د) نمایهی یک بعدی مرتبط با خط مشخص شده در شکل ۳(ب).

شکل ۴(الف) طرح فاز ناشی از بازسازی تمامنگاشت ۳(د) را نمایش میدهد. شکل ۴(ب) رویهی دو بعدی تصویر بازسازی شدهی تمامنگاشت نمونه را در حضور میکروکره و شکل ۴(ج) تصویر سهبعدی آن را نمایش میدهد. در شکل ۴(د)، نمایهی مربوط به خط واصل بین دو نقطهی مشخص شده در شکل۴(ب)، نمایش داده شدهاست. نتایج بهدست آمده نشان میدهد، توان تفکیک عرضی بهبود داده شده، به طوری که بزرگنمایی مؤثر در حضور میکروکره ۴ برابر افزایش یافته است.

### ۴- نتیجهگیری

در این پژوهش، یک روش جدید برای تصویربرداری سهبعدی با وضوح بالا ارائه شد. تمامنگاری میرائو با وجود مزایای بسیار، با مشکل پایین بودن توان تفکیک عرضی نسبت به توان تفکیک عمودی همراه است. در این مقاله، برای بهبود توان تفکیک عرضی، از یک میکروکره در چیدمان میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی میرائو صفحهی آزمون میکروسکوپ بهعنوان نمونه نشان میدهد به کارگیری میکروکره موجب افزایش گشودگی عددی و در نتیجه افزایش توان تفکیک عرضی سیستم شده و بزرگنمایی را با ضریب ۴x بهبود می بخشد.

#### مراجع

[1] D. Gabor, "A new microscopic principle", Nature, Vol. 161, No. 4098, pp. 777-778, 1948.

[2] E. N. Leith, J. Upatnieks, "*Reconstructed wavefronts and communication theory*", JOSA, Vol. No. 10, pp. 1123-1128, 1962.

[3] U. Schnars, W. Jüptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction", App. Opt., Vol. 33, No. 2, pp.179-181, 1994.

[4] N. Fatahi, A. R. Moradi, M. Habibi, D. Vashaee, L. Tayebi, "Digital holographic microscopy of the myelin figure structural dynamics and the effect of thermal gradient", Bio. Opt. Exp., Vol. 4, No. 6, pp.950-957, 2013.

[5] M. Leon-Rodriguez, R. Rodriguez-Vera, J. A. Rayas, S. Calixto, "Digital holographic microscopy through a Mirau interferometric objective", Opt. Las. Eng., Vol. 51, No. 3, pp. 240-245, 2013.

[6] T. Anna, V. Srivastava, D. S. Mehta, C. Shakher "*High* resolution full-field optical coherence microscopy using a Mirau interferometer for the quantitative imaging of biological cells", Appl. Opt., Vol. 50, No. 34, pp. 6343-6351, 2011.

[7] A. Darafsheh, C. Guardiola, A. Palovcak, J. C. Finlay, A. Carabe, "*Optical super-resolution imaging by high-index microspheres embedded in elastomers*", Opt. Lett., Vol. 40, No. 1, pp. 5-8, 2015.

[8] TX. Hoang, Y. Duan, X. Chen, G. Barbastathis, "Focusing and imaging in microsphere-based microscopy", Opt. Exp., Vol. 23, No. 9, pp. 12337-12353, 2015.

[9] J. W. Goodman, Introduction to Fourier Optics, McGraw-Hill, 1996.