

ФИЗИКА НАШИХ ДНЕЙ

Сверхразрешение и сингулярности в фазовых изображениях

В.П. Тычинский

Критерий Рэлея и радиус Эйри r_0 не являются адекватными характеристиками пространственного разрешения в фазовых и в некоторых других функциональных изображениях. Одна из особенностей фазовых изображений состоит в возможности появления дислокаций волнового фронта, зависящих от положения в пространстве так называемых сингулярных линий ($I(x, y, z) = 0$), в окрестности которых градиент фазы $\text{grad } \varphi \approx I^{-1/2}$ возрастает и интенсивность стремится к нулю. Эта зависимость градиента фазы использована для обоснования критерия разрешения в фазовых изображениях в виде минимального расстояния L , зависящего от отношения сигнал/шум (S/N), и формулы для энергезависимого сверхразрешения $\Xi = r_0/L \cong 2(S/N)^{1/2}$. Измерения на когерентном фазовом микроскопе "Эйрискан" сферы из латекса диаметром 100 нм подтвердили возможность значительного ($\Xi \cong 5$) сверхразрешения.

PACS numbers: 42.30.-d, 42.79.-e, 87.64.Rg

DOI: 10.3367/UFNr.0178.200811c.1205

Содержание

1. Введение (1205).
 2. Модель фазового объекта (1207).
 3. Сингулярности и критерий разрешения в фазовых изображениях (1208).
 4. Сингулярности и дислокации волнового фронта в фазовых изображениях (1209).
 5. Пространственное разрешение в динамических фазовых изображениях (1211).
 6. Сингулярности и сверхразрешение в фазовых изображениях (1211).
 7. Заключение (1213).
- Список литературы (1214).

1. Введение

Проблема разрешения в оптике имеет давнюю историю и вновь привлекает к себе внимание в связи с применением в микроскопии биообъектов новых методов, основанных на свойствах функциональных изображений [1]. Критерий разрешения по Рэлею, являющийся, по существу, характеристикой числовой апертуры оптической системы [2] и основанный на распределении интенсивности в изображении точечного источника, не распространяется на функциональные изображения, к которым относятся флуоресцентные и спектральные [3–9], голо-

графические [10], интерференционные [11–17], поляризационные и др.

Публикации о реализации сверхразрешения порядка нескольких десятков нанометров в изображениях биообъектов [3–9] вызвали большой резонанс. Была показана возможность регистрации отдельных макромолекул [4] и определения их координат с точностью до нескольких нанометров [6]. Эти выдающиеся результаты достигнуты в устройствах с обычной оптикой благодаря маркированию биообъектов квантовыми точками (nanocrystal quantum dots) [3], различающимися по спектру флуоресцентными маркерами [6] и фотоактивированными белками [4], влиянию подложки на флуоресценцию [7] и подавлению флуоресценции белков при структурированном освещении [8]. В одном из этих методов [8] (STED — stimulated emission depletion) используется эффект обратимого насыщения радиационного перехода. Минимальный поперечный размер области, в которой регистрируется "отклик", имеет порядок величины $\Delta x \approx \lambda(\xi)^{-1/2}/\pi$, где $\xi \gg 1$ — параметр насыщения перехода, связанного с фотоиндуцированной флуоресценцией. Использование оптического астигматизма позволило определить координаты в трех измерениях отдельных флуорофоров с нанометровой точностью [9].

Из приведенных в работах [3–9] результатов следует, что использование флуоресцентных методов в микроскопии биообъектов, с одной стороны, дает выдающиеся по научному и практическому значению результаты, а с другой, приводит к размытию границы между общепринятыми понятиями пространственного разрешения и точности измерения координат.

Из этих работ также следует вывод, что пространственное разрешение (в том числе, сверхразрешение) зависит не только от числовой апертуры, но и от свойств объекта, алгоритмов измерений и обработки функциональных изображений, времени измерений и отношения

В.П. Тычинский. Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики, просп. Вернадского 78, 119454 Москва, Российская Федерация
Тел. (495) 434-67-92
E-mail: vtych@yandex.ru

Статья поступила 8 июня 2008 г.,
после доработки 29 августа 2008 г.

сигнал/шум. Поэтому возникает естественный вопрос: можно ли четко определить понятие сверхразрешения в функциональных изображениях вообще и во флуоресцентных и фазовых в частности? Этот вопрос затрагивает фундаментальные понятия физики, и его обсуждение, по нашему мнению, заслуживает внимания.

Интерференционные методы в микроскопии [11–17] также получили признание, поскольку они являются менее инвазивными и позволяют работать с неокрашенными естественными объектами. Их применение в микроскопии биообъектов дает возможность получать оцифрованные фазовые изображения, определять показатель преломления [13, 16] и регистрировать в реальном времени с высокой чувствительностью динамические процессы [14–16]. Однако алгоритмы получения фазовых изображений, основанные на восстановлении фазы по интерференционным картинам [11–17], не позволили получить сверхразрешения, регистрируемого во флуоресцентных изображениях.

В этой статье мы рассмотрим проблему сверхразрешения в фазовых изображениях, которая связана с их необычными свойствами, обычно интерпретируемыми в терминах так называемой сингулярной оптики [18–26]. Понятия дислокаций волнового фронта и сингулярных линий, на которых интенсивность равна нулю, введены в оптику Наем (Nye J.F.) и Берри (Berry M.V.) в основополагающей работе 1974 г. [18]. В последующих работах были определены такие необычные понятия, как рождение и аннигиляция сингулярных точек, природа винтовых дислокаций, величина топологического заряда [19, 24]. Сингулярные точки проявляются только в интерференционных изображениях или при восстановлении фазы (в фазовом изображении). В этом сравнительно новом направлении оптики выполнены экспериментальные и теоретические исследования [19–26], которые позволили значительно углубить понимание структуры оптического поля. Фундаментальное значение имел вывод [18, 22, 23] о том, что совокупность сингулярных линий является своего рода "скелетом" электромагнитного поля, а изображение объекта можно рассматривать как проекцию "скелета".

Дислокации волнового фронта внутри диска Эйри впервые были обнаружены [25, 26] в фазовых изображениях, полученных методом когерентной фазовой микроскопии. Однако в последующих работах по интерференционной микроскопии [10–17], в которых фазовые изображения получались с помощью других алгоритмов, например многошаговых [17], дислокации не обсуждались.

Принципиальное значение алгоритма и метода получения фазовых изображений стало очевидным после опубликования первых результатов о сверхразрешении [27, 28] в 1989 г. Действительно, отсутствие сверхразрешения в фазовых изображениях, получаемых методами оптической томографии [11], многошаговой интерферометрии [17], голографической [13] и гильберт-микроскопии [14–16], можно было объяснить только тем, что в этих работах использовались алгоритмы, основанные на регистрации распределения интенсивности. В этих методах записанные в память компьютера интерференционные изображения использовались для вычисления аргумента (фазы) комплексной амплитуды рассеянной объектом волны и для последующего представления фазы (или оптической разности хода) на мониторе компьютера в

виде двумерного распределения. Поскольку распределения интенсивности в интерференционных изображениях были ограничены дифракцией на апертуре объектива, то это, по нашему мнению, исключало возможность сверхразрешения в фазовом изображении.

Принципиально другой алгоритм использован в разработанном нами когерентном фазовом микроскопе "Эйрискан" [29, 30]. Оптическая разность хода объектной и референтной волн измерялась в каждом пикселе раstra компенсационным методом при последовательном сканировании интерференционного изображения. Двумерное распределение нормированной на длину волны оптической разности хода в этом методе интерпретировалось как фазовое изображение $\varphi(x, y)$ объекта. В изображениях тест-объектов было обнаружено сверхразрешение [27–30]. Мы считали сверхразрешение естественным следствием свойств фазовых изображений и не придавали тогда большого значения более адекватному физическому объяснению.

В этой статье мы покажем, что возможность сверхразрешения в фазовых изображениях следует из результатов, хорошо известных в классической [2] и в сингулярной оптике [18–26]. Мы используем известное распределение интенсивности в изображении точечного источника, ограниченное дифракцией на апертуре оптической системы. Это распределение может быть представлено функцией $I(R) = (2J_1(R)/R)^2$, где $R = 2\pi Dr/\lambda F = Kr$, $K = 2\pi D/\lambda F = R_0/r_0 = 3,82/r_0$, где $r_0 = 0,61\lambda F/D$ — радиус диска Эйри, D , F , λ — диаметр апертуры, фокусное расстояние и длина волны соответственно, $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ — расстояние в плоскости изображения.

Физической моделью для критерия Рэля являются два идентичных точечных некогерентных источника, изображение которых ограничено дифракцией на апертуре оптической системы (рис. 1а) или нормированным радиусом диска Эйри $R_0 = 3,82$ (рис. 1б).

Нормированное расстояние $R_0 = 3,82$ между экстремумами в функции распределения интенсивности $I(R) = (2J_1(R)/R)^2$ двух идентичных точечных источников (рис. 1а) используется в качестве критерия разрешения по Рэлю [2] и численно равняется значению аргумента ($R_0 = 3,82$) для второго нуля $J_1(R_0) = 0$ функции Бесселя первого рода. Критерий Рэля с точностью до длины волны λ является эквивалентом числовой апертуры $NA = D/F$. Критерий Рэля энергонезависим, и его применение корректно только для двух идентичных некогерентных источников.

Показанную на рис. 1а модель двух точечных источников можно превратить в простую модель функционального изображения, в котором реализуется "сверхразрешение". Оно оказывается энергонезависимым и ограниченным точностью определения координат источников. Для этого достаточно предположить, что точечные источники с координатами R_1 и R_2 на рис. 1а различаются, например, спектральными характеристиками, измерения распределения их интенсивности $I_1(R)$ и $I_2(R)$ производятся независимо и в фотоприемнике используются согласованные светофильтры. В этих условиях могут быть определены координаты каждого источника. Статистическая погрешность δR определения координаты каждого из источников зависит от согласования спектров источников и светофильтров, чувствительности фотоприемника, числа независимых реализаций и других факторов, которые формально обычно характеризуются

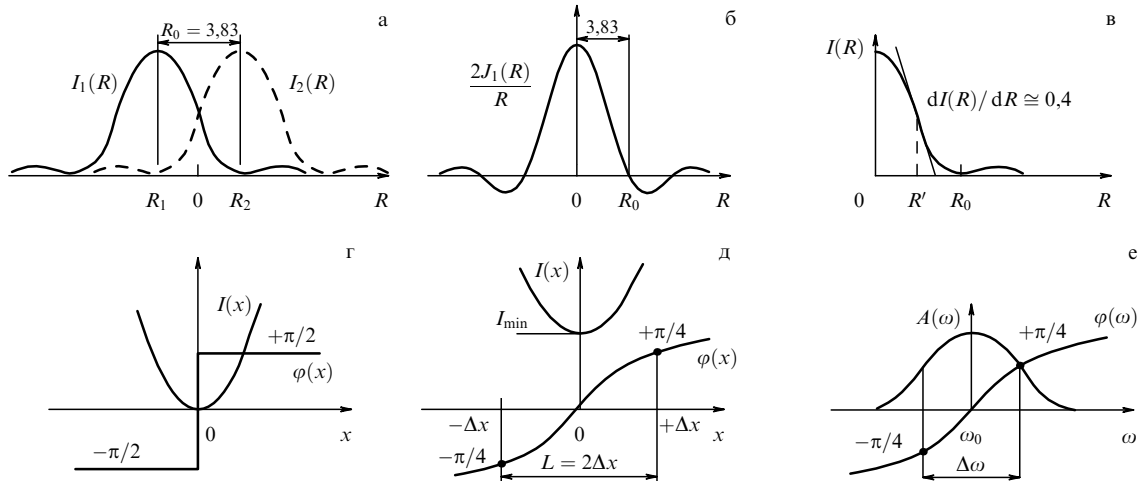


Рис. 1. Пространственное разрешение в амплитудных изображениях и в окрестности сингулярной точки. (а) Классический критерий Рэлея — расстояние между максимумами в изображении двух некогерентных точечных источников равно $R_0 = 3,83$, где $R = 2\pi D r / \lambda F = K r$ — безразмерная координата в плоскости изображения. (б) Аппаратная функция зрочка оптической системы с нормированным радиусом диска Эйри $R_0 = 3,83$. (в) Максимальный градиент интенсивности в окрестности точечного источника ограничен. (г) Интенсивность равна нулю в сингулярной точке $x = 0$. При ее пересечении возникает π -скачок фазы. (д) Квадратичное изменение интенсивности и конечное значение градиента фазы в окрестности сингулярной точки; расстояние $L = 2\Delta x$ между точками $\varphi(\pm\Delta x) = \pm\pi/4$ используется далее как параметр разрешения в фазовых изображениях. (е) Аналогия с фазово-частотной характеристикой колебательного контура $\varphi(\omega)$; полоса частот $\Delta\omega$ может быть определена как по амплитудно-частотной $A(\omega)$, так и по фазово-частотной $\varphi(\omega)$ характеристикам.

отношением сигнал/шум (S/N). После совмещения изображений источников статистически достоверное расстояние ($\Delta R \approx 2\delta R$) между центрами их дисков Эйри будет зависеть от точности измерений, т.е. будет в указанном выше смысле энергозависимым. В этом функциональном изображении можно формально определить понятие сверхразрешения как отношение $R_0/\Delta R \approx S/N$, но его значение далеко не очевидно и возможность его использования в других моделях требует обсуждения. Уже из этого примера видна необходимость более четкого определения пространственного разрешения, поскольку в некоторых функциональных изображениях стирается различие между понятиями разрешения и точности измерения координат.

Отметим еще одно принципиальное различие между "амплитудным" изображением точечного источника и его "фазовым" аналогом. Из определения нормированной интенсивности $I(R) = (2J_1(R)/R)^2$ в изображении точечного источника следует, что градиент интенсивности в его окрестности не может превышать определенной ($dI(R)/dR \leq 0,4$) величины (рис. 1в). В то же время в случае сингулярного источника с амплитудой $J_1(R)$ поле в точке $R = 0$ изменяет знак и фаза в окрестности $I(R) = 0$ испытывает π -скачок. Из этого следует, что в фазовых изображениях $\varphi(R)$ градиент фазы $d\varphi/dR$ в точке пересечения сингулярной линии с плоскостью изображения не ограничен. Такие π -скачки фазы регулярно наблюдались в виде кажущихся $\lambda/2$ -разрывов (дислокаций) поверхности в изображениях различных объектов [31–34] при измерениях объектов на микроскопе "Эйрискан" (см. раздел 6, рис. 4).

В связи с приведенным выше примером может возникнуть естественный вопрос: насколько функциональные изображения, в частности фазовые, адекватны реальным объектам и какую ценность может иметь содержащаяся в них информация? Обсуждение этой нетривиальной проблемы выходит за рамки данной статьи, и мы здесь только отметим, что из многочисленных публика-

ций следует положительный ответ на этот вопрос и высокая оценка информативности функциональных изображений [3–16], полученных новыми оптическими методами. Это замечание, в частности, также относится к изображениям, полученным методом когерентной фазовой микроскопии [29, 31, 34, 35]. Вполне реалистичские фазовые изображения получались при исследовании субволновых тест-структур (щелей и сфер) [27–29].

Основной целью настоящей статьи является привлечение внимания к проблеме сверхразрешения в фазовых изображениях и рассмотрение ее связи с сингулярной оптикой.

2. Модель фазового объекта

Поле сингулярного источника

$$E(x, y) \approx J_1(R) \exp(i\theta), \tag{1}$$

где $J_1(R)$ — функция Бесселя первого рода, можно представить комплексной амплитудой

$$E(x, y) = E(x, y) \exp[i\varphi(x, y)], \tag{2}$$

$$\theta = \varphi(x, y) = \arctan \frac{x}{y}.$$

В точке $x = y = 0$, где сингулярная линия ($I(x, y, z) = 0$) пересекает плоскость изображения Σ (см. раздел 4), интенсивность равна нулю, $I(x, y) = |E(x, y)|^2 = 0$. Фаза φ при обходе сингулярной точки против часовой стрелки изменяется на 2π .

На рисунке 1г показаны квадратичное возрастание интенсивности $I(x)$ вдоль линии $y = 0$ при удалении от сингулярной точки $x = y = 0$ и π -скачок фазы $\varphi(x)$ при ее пересечении. В точках на линии $y \neq 0$, не проходящей через сингулярную точку, градиент фазы имеет конечное значение (рис. 1д). Модель сингулярного источника (2) и изменение фазы $\varphi(x)$ в его окрестности будут использованы для обоснования критерия разрешения и параметра сверхразрешения, ограниченного отношением сигнал/

шум. В частности, в качестве линейного размера, характеризующего пространственное разрешение в фазовом изображении (см. раздел 3), будет использован интервал $L = 2\Delta x$ между точками с фиксированными значениями фазы

$$\varphi(\pm\Delta x) = \pm \frac{\pi}{4}. \tag{3}$$

В связи с этим определением интервала L отметим интересную аналогию между процессами во времени и пространстве. В радиотехнике для оценки спектрального разрешения временных сигналов используются характеристики колебательного LCR -контура. Крутизна его фазово-частотной характеристики $\varphi(\omega) = \arctan[2(\omega - \omega_0)/\Delta\omega]$ возрастает в окрестности резонансной частоты ($\omega \cong \omega_0$) (см. рис. 1е). При $\Delta\omega = 0$ фаза $\varphi(\omega)$ в точке ($\omega = \omega_0$) испытывает π -скачок. Полоса частот $\Delta\omega$, которая характеризует спектральное разрешение, может быть определена на уровне $[A(\Delta\omega)]^2 = 1/2[A(\omega_0)]^2$ в точках $\omega - \omega_0 = \pm\Delta\omega/2$ амплитудно-частотной характеристики $A(\omega)$ или по точкам $\varphi_0 = \pm\pi/4$ фазово-частотной характеристики $\varphi(\omega)$.

Мы используем отмеченную выше аналогию и принимаем интервал $L = 2\Delta x$ (рис. 1д) между точками с фиксированными значениями $\varphi(\pm\Delta x) = \pm\pi/4$ для определения пространственного разрешения в фазовом изображении $\varphi(x, y)$ сингулярного источника. Этот интервал $L = 2\Delta x$ является в некотором смысле аналогом полосы частот $\Delta\omega$ на рис. 1е. Мы покажем, что в отличие от классического критерия Рэлея [2], зависящего только от параметров оптической системы, новый критерий является энергозависимым.

3. Сингулярности и критерий разрешения в фазовых изображениях

Предположим, что в плоскости $\Sigma(x, y)$ изображения $\varphi(x, y)$ объекта находятся две сопряженные сингулярные точки A^+ , A^- (рис. 2) и в окрестности одной из них (A^-) комплексная амплитуда представлена формулой (1) в виде

$$E(R) = J_1(R) \exp(i\varphi) \tag{4}$$

с первым нулем при $R = 0$, вторым нулем при $R_0 = 3,82$ и промежуточным максимумом при $R_2 \cong 2$. Фаза в окрестности сингулярной точки $R = 0$ увеличивается на 2π при обходе против часовой стрелки [18–20].

В произвольной точке с координатой x на линии $y = v$, ортогональной отрезку A^+A^- , интенсивность и фаза поля, создаваемого источником A^- , представлена функциями $I_\psi(x, v)$ и $\varphi(x, v)$. Фаза

$$\varphi(x, v) = \arctan \frac{x}{v} \tag{5}$$

монотонно изменяется вдоль оси x , а интенсивность в окрестности сингулярной точки ($R \ll 1$) изменяется с квадратом расстояния:

$$I_\psi(x, v) = [J_1(R)]^2 \cong \left(\frac{R}{2}\right)^2 = \frac{(Kr)^2}{4} = \frac{K^2(v^2 + x^2)}{4}. \tag{6}$$

В качестве критерия разрешения в фазовых изображениях (рис. 1д) мы определим минимально различимое

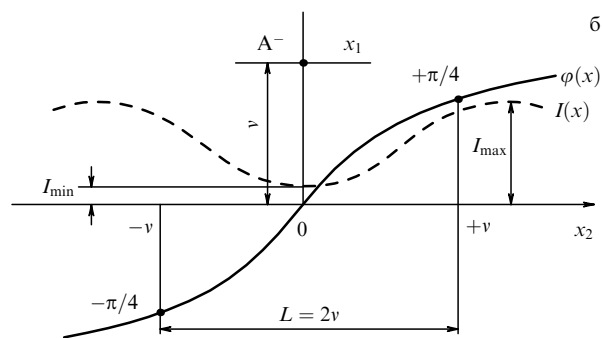
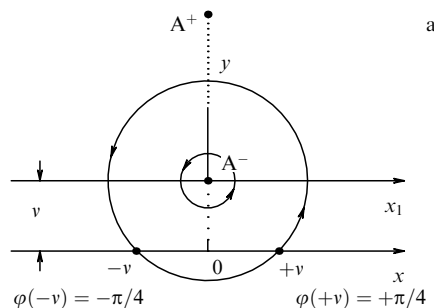


Рис. 2. Модель сингулярного источника в плоскости изображения и определение критерия пространственного разрешения в фазовом изображении. (а) A^+ и A^- — две сопряженные сингулярные точки в плоскости (x, y) изображения объекта. Сингулярный точечный источник A^- ($x_1 = y = 0$) с единичным топологическим зарядом создает поле с комплексной амплитудой $E(x, y) = |E(x, y)| \exp[i\varphi(x, y)]$, где $E(x, y) \approx J_1(R) \exp[i\varphi(x, y)]$, $J_1(R)$ — функция Бесселя, фаза при обходе сингулярной точки изменяется на 2π . Интенсивность $I(x) = |E(x, y)|^2$ и фаза $\varphi(x)$ поля имеют конечные значения на линии $(x, y = v)$. В точках $x = \pm v$ фазы различаются на $\pi/2$. (б) Расстояние $L = 2v$ между точками $x = \pm v$ со значениями фазы $\pm\pi/4$ используется в качестве критерия разрешения в фазовых изображениях. Равная уровню шумов $I_{\min}(0, v) = N$ минимальная интенсивность поля ограничивает расстояние $L = 2v$. В удаленной точке $x \cong 2/K \cong 0,5r_0 > v$ интенсивность максимальна: $I_{\max}(0,5r_0) = 0,36$.

расстояние $L = 2v$ между точками $x = \pm v$, в которых фаза имеет значения $\varphi_0 = \pm\pi/4$ (рис. 2б). В данном случае важно, что интенсивность $I_\psi(0, v)$ в формуле (6) убывает с приближением к сингулярной точке. Из этого следует, что должно существовать минимальное расстояние v_{\min} , при котором еще можно измерить сигнал в точках $x = \pm v_{\min}$. Это расстояние в реальных системах ограничено шумом в виде случайных флуктуаций интенсивности, создаваемых источниками различной природы. Чем больше превышение сигнала над шумом, тем меньшие значения интервала $L = 2v_{\min}$ могут быть измерены.

Предположим далее, что измерения фазы производятся в точке $x = v_{\min}$ при некотором минимальном значении интенсивности поля

$$I_\psi(v_{\min}) = [J_1(Kv_{\min})]^2 \approx \frac{K^2 v_{\min}^2}{2}, \tag{7}$$

которое ограничено уровнем шума. Его природа в данном случае не имеет значения. При этом интенсивность поля имеет наибольшее значение $I_{\max} \cong 0,36$ в промежуточном максимуме ($R_2 \cong 2$) с координатой

$$r_2 \cong x_2 = \frac{2}{K} = \frac{\lambda F}{\pi D} \cong 0,5r_0 \gg v_{\min}. \tag{8}$$

В качестве минимального уровня сигнала S_{\min} обычно принимают уровень шума ($S_{\min} = N$). В наших обозначениях при $S = I_{\max}$ и $N = S_{\min} = I_{\psi}(v_{\min})$ это соответствует условию

$$\frac{S}{N} = \frac{I_{\max}}{I_{\psi}(v_{\min})} = \frac{0,36}{I_{\psi}(v_{\min})}. \quad (9)$$

С учетом (7) из (9) следует

$$\frac{S}{N} \cong \frac{0,72}{(Kv_{\min})^2} \quad (10)$$

или окончательная формула для параметра Ξ энергозависимого сверхразрешения

$$\Xi = \frac{r_0}{L} = \frac{r_0}{2v_{\min}} = \frac{1,9}{(0,72)^{1/2}} \left(\frac{S}{N}\right)^{1/2} \cong 2 \left(\frac{S}{N}\right)^{1/2}. \quad (11)$$

Следовательно, параметр сверхразрешения Ξ в принятой модели достаточно "универсален", поскольку не зависит от характеристик фазового объекта. Далее в разделах 4 и 6 мы обсудим связь разрешения с сингулярными линиями и реальными фазовыми изображениями. Здесь же отметим, что выбор модели, по-видимому, не является определяющим фактором. Действительно, формула (11) с точностью до коэффициента совпадает с полученным ранее [25, 33] выражением $w/L = (S/N)^{1/2}$ для модели гауссова пучка, если предположить равенство радиусов Эйри и перетяжки ($r_0 \cong w$).

4. Сингулярности и дислокации волнового фронта в фазовых изображениях

Структурированная отражающая поверхность или тонкий прозрачный, оптически слабонеоднородный объект при когерентном освещении производят незначительное искривление (модуляцию) волнового фронта падающей волны и создают в плоскости изображения оптической системы распределение интенсивности $I(x, y)$ и фазы $\varphi(x, y)$. Под фазовым изображением обычно понимают двумерное распределение оптической разности хода (ОРХ) $h(x, y) = \varphi(x, y) \lambda / 2\pi$, полученное с помощью

интерференционного микроскопа. Предположим, что структурированная отражающая поверхность представлена геометрическим профилем высоты $Z(X, Y)$, где X, Y — координаты в плоскости объекта. Тогда в плоскости его изображения x, y с точностью до масштаба координат и с ограниченной точностью в воспроизведении профиля выполняется равенство $Z(X, Y) \approx h(x, y)$ [31]. В другом случае, для тонких прозрачных объектов, в приближении геометрической оптики

$$Z(X, Y) = \int n(X, Y, Z) dZ \cong h(x, y), \quad (12)$$

где $n(X, Y, Z)$ — распределение показателя преломления. Ограниченная точность соответствия фазового изображения, представленного ОРХ, объекту $Z(X, Y) \approx h(x, y)$ связана как с фундаментальными причинами (дифракция на апертуре, абберации), так и с техническими (шум, ограниченная чувствительность, число уровней дискретизации и т.п.), детали которых мы здесь не обсуждаем.

В фазовом изображении, так же как и в других изображениях, информативны структурные элементы и положение их границ, на которых градиент фазы возрастает. Их положение, согласно теоретическим и экспериментальным работам по сингулярной оптике [19–26], зависит от структуры сингулярных линий $I(x, y, z) = 0$ в рассеянной объектом волне. Линии $I(x, y, z) = 0$ являются своего рода "скелетом" поля, и они связаны с граничными условиями на поверхности объекта. В точках пересечения линий с плоскостью изображения Σ фаза не определена и испытывает π -скачок. Если же сингулярная линия $I(x, y, z) = 0$ не пересекает плоскость Σ , то в близких к ее проекции точках наблюдается минимум интенсивности и увеличение градиента фазы. В этом смысле амплитудное $I(x, y)$ и фазовое $\varphi(x, y)$ изображения в плоскости Σ можно рассматривать как "проекцию" сингулярных линий на плоскость изображения.

Для иллюстрации этой зависимости на рис. 3а показана проекция AA сингулярной линии np, которая расположена ниже плоскости Σ на расстоянии $v_1 < 0$. При отсутствии пересечений ($v_1 < 0$) сингулярной линии np с плоскостью Σ интенсивность $I(x, y)$ во всех точках

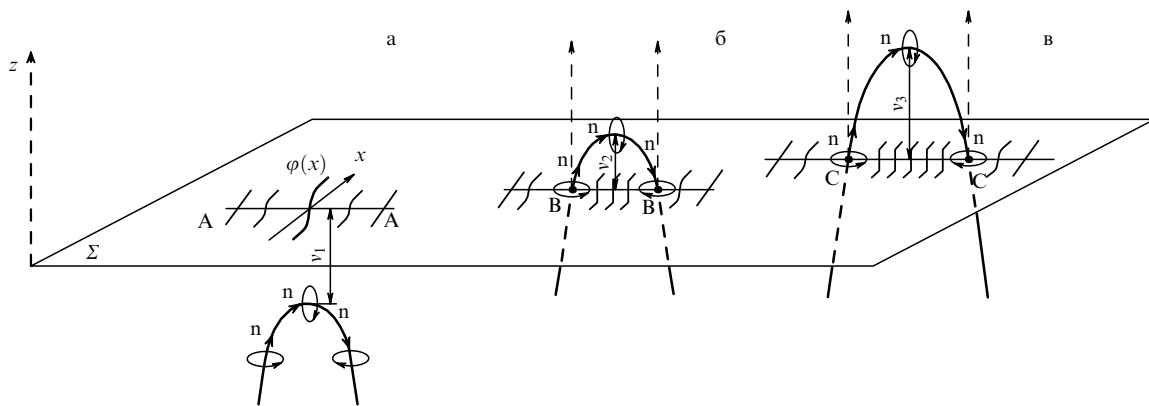


Рис. 3. Зависимость структуры поля в плоскости изображения от положения (v) сингулярной линии. (а) Когда сингулярная линия np не пересекает плоскость изображения Σ ($v_1 < 0$), в точках линии AA ("проекция" линии np) наблюдается локальное возрастание градиента фазы $\varphi(x)$. (б) При положительных высотах ($v_2 > 0$) сингулярная линия np пересекает плоскость изображения Σ в точках BB. С приближением к точкам BB градиент фазы увеличивается и при их пересечении фаза испытывает π -скачок. Кольца вокруг сингулярных точек в плоскости изображения Σ показывают направления возрастания фазы. (в) Расстояние между сингулярными точками CC увеличивается с высотой ($v_3 > v_2$). В фазовых изображениях на отрезке CC между сингулярными точками возникает $\lambda/2$ -скачок (дислокация) волнового фронта. При большом числе сингулярных точек исчезает соответствие изображения $\varphi(x, y)$ с объектом.

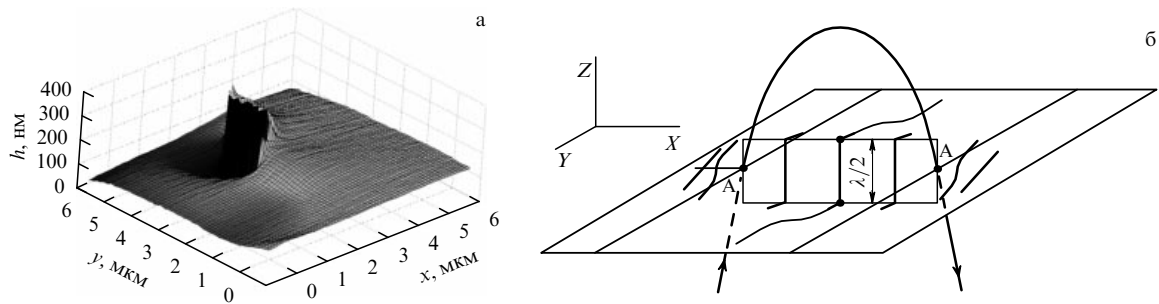


Рис. 4. Дислокации искажают фазовые изображения объектов. (а) 3D-изображение ядрышка клетки НСТ116 с кажущимся разрывом поверхности. (б) Интерпретация $\lambda/2$ -скачка в 3D-изображении ядрышка как следствия дислокации на отрезке AA между сингулярными точками.

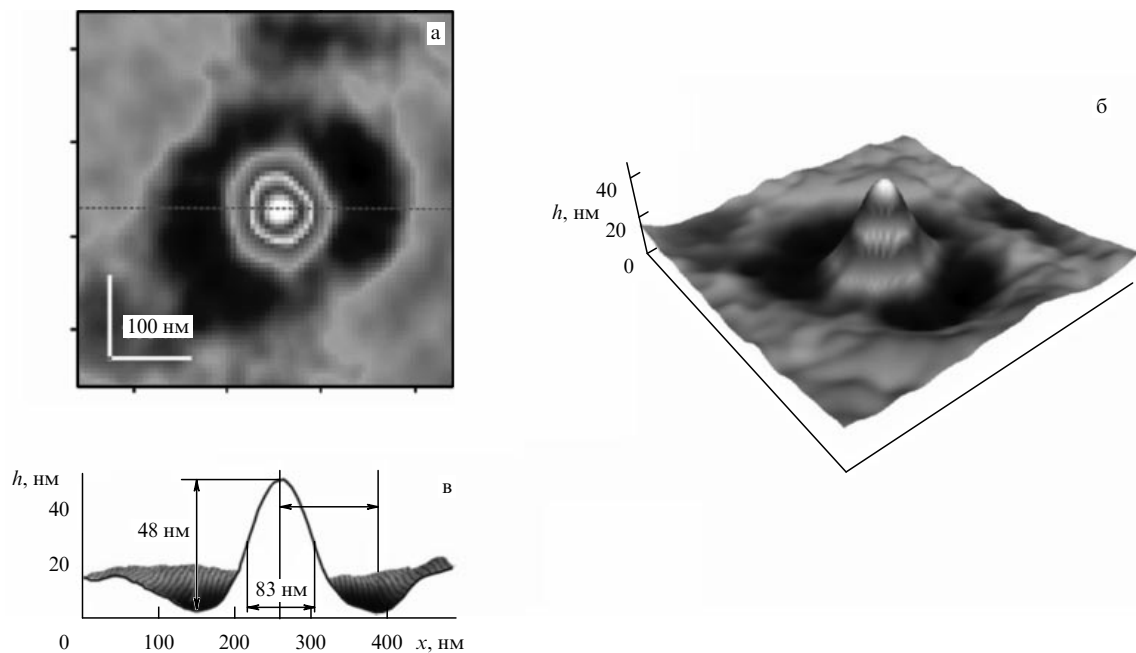


Рис. 5. Фазовое изображение сферы из латекса диаметром 100 нм иллюстрирует возможность сверхразрешения. Измерения производились на микроскопе "Эйрискан" с объективом 100/0,95, для которого радиус диска Эйри составлял $r_0 = 400$ нм. (а) Псевдоцветная топограмма $h(x, y)$. (б) 3D-изображение сферы с характерными для дифракции искажениями формы. (в) Профиль в диаметральном сечении топограммы, в котором были определены фазовая толщина ($\Delta h = 48$ нм) и диаметр ($d = 83$ нм) на уровне полувисоты.

плоскости конечна. Градиент фазы возрастает в точке пересечения оси x с линией проекции AA. Заметим, что показанные ранее на рис. 1д изменения интенсивности $I(x)$ и фазы $\varphi(x) = \arctan(x/v_1)$ соответствуют этому случаю. При увеличении оптической неоднородности объекта или по другим причинам сингулярная линия $I(x, y, z)$ приближается к плоскости Σ . В близких к проекции AA точках градиент фазы увеличивается, а интенсивность уменьшается. Наконец, при пересечении сингулярной линией плоскости изображения Σ на ней появляется пара сопряженных сингулярных точек (BB на рис. 3б) и на поверхности волнового фронта происходят "катастрофические" (в математическом смысле) изменения. При обходе сингулярных точек BB в направлениях, указанных стрелками на контурах, фаза изменяется на 2π . Фаза непрерывна на всей плоскости за исключением отрезка BB, но градиент фазы неограниченно возрастает с приближением к сингулярным точкам. В изображении, представленном в виде поверхности $\varphi(x, y)$, на отрезке BB возникает π -скачок — "дислока-

ция" (рис. 4). Следствием является нарушение соответствия между фазовым изображением $\varphi(x, y)$ и параметрами морфологии объекта, например структурой его поверхности $Z(X, Y)$. При увеличении оптической неоднородности объекта возрастает число сингулярных точек и расстояние между ними (рис. 3в). При большом числе сингулярных точек, в так называемых спекл-изображениях, исчезает однозначное соответствие между $\varphi(x, y)$ и объектом. Фазовое изображение перестает быть информативным.

Строгой теории фазовых изображений пока нет, поэтому большое значение имеют экспериментальные и теоретические исследования по сингулярной оптике, которые объясняют связь "скелета" со структурой поля. Из многих работ по фазовой микроскопии следует, что, несмотря на отмеченные выше факторы, во многих случаях (рис. 5) удавалось получать вполне правдоподобные изображения объектов [10–16], реализовать сверхразрешение [27–30, 34, 35] и регистрировать локальные динамические процессы [31, 34, 36].

5. Пространственное разрешение в динамических фазовых изображениях

Во введении отмечалось, что в функциональных изображениях точность измерения координат в отдельных случаях является синонимом пространственного разрешения. Это замечание справедливо также в ряде случаев для динамических фазовых объектов. В качестве простого примера динамического объекта можно принять движение границы структурного элемента. Целью измерений в этом случае может быть определение минимального перемещения границы структурного элемента в плоскости фазового изображения объекта.

Заметим, что в случае амплитудных изображений динамических объектов естественными факторами, ограничивающими возможность регистрации малых перемещений, являются малый градиент интенсивности dI/dR (рис. 1в) на границе структурного элемента и, как правило, недостаточно большое отношение сигнал/шум. Поэтому регистрируемое по изменению интенсивности минимальное перемещение границы обычно незначительно отличается от радиуса диска Эйри $r_0 = 0,61\lambda F/D$.

Однако в фазовых изображениях градиент $d\varphi/dR$ может быть большим, и это благоприятствует регистрации малых перемещений. В качестве динамического объекта мы используем показанную на рис. 2а модель, в которой сингулярный источник, представленный формулой (2), движется вдоль оси x_1 . При его перемещении $x_1(t)$ в фиксированной точке с координатой x на линии $y = v$ происходит изменение интенсивности и фазы поля. Эти изменения могут быть представлены формулами соответственно

$$I_\psi(t, x, v) \cong \frac{(Kr)^2}{4} = K^2 \frac{v^2 + (x + x_1(t))^2}{4},$$

$$\varphi(t, x, v) = \arctan \frac{x + x_1(t)}{v}. \quad (13)$$

При малых ($\Delta x_1 \ll v$) амплитудах смещения формулы для изменения фазы и интенсивности приобретают вид

$$\Delta\varphi(t, x, v) = \frac{d\varphi}{dx} x_1(t) \cong \frac{x_1(t)}{v} \left[1 + \left(\frac{x}{v} \right)^2 \right]^{-1},$$

$$I_\psi(x, v) \cong \frac{(Kr)^2}{4} \cong K^2 \frac{v^2 + x^2}{4}. \quad (14)$$

Наибольшая чувствительность к перемещению источника будет в точке $x = 0$, где градиент фазы $d\varphi/dx \cong 1/v$ максимален, а интенсивность $I_\psi(v) = K^2 v^2/4$ минимальна.

Предположим далее, что источник совершает медленные периодические движения с амплитудой Δx_1 и при этом регистрируются изменения фазы $\Delta\varphi(t, x, v)$. Минимальная измеряемая амплитуда Δx_1 будет ограничена двумя факторами — чувствительностью

$$\langle \varphi \rangle \cong \left(\frac{\Delta x_1}{v} \right)_{\min} \quad (15)$$

измерительного устройства к изменениям фазы (например, числом уровней дискретизации или фазовыми шумами), а также уровнем амплитудных шумов в точке $x = 0$

$$S(x = 0) = I_\psi(v_{\min}) = K^2 \frac{v_{\min}^2}{4} = N. \quad (16)$$

Напомним, что согласно формуле (9) $S/N = I_{\max}/I_\psi(v_{\min}) = 0,36/I_\psi(v_{\min})$. Тогда из формул (9) и (16) следует выражение для минимального расстояния до сингулярной точки

$$v_{\min} = 0,72 \frac{(S/N)^{-1/2}}{K} = 0,19 r_0 \left(\frac{S}{N} \right)^{-1/2}. \quad (17)$$

Принимая во внимание определение (15), из (17) можно получить формулу для нормированной на r_0 минимальной амплитуды смещения

$$\Xi^{-1} = \left(\frac{\Delta x_1}{r_0} \right)_{\min} \cong 0,19 \langle \varphi \rangle \left(\frac{S}{N} \right)^{-1/2}. \quad (18)$$

При удалении точки регистрации ($|x| \neq 0$) от источника минимальная измеряемая амплитуда увеличивается с квадратом расстояния

$$\Xi^{-1} = \left(\frac{\Delta x_1}{r_0} \right)_x \cong 0,19 \langle \varphi \rangle \left[1 + \left(\frac{x}{v} \right)^2 \right] \left(\frac{S}{N} \right)^{-1/2}. \quad (19)$$

Из сравнения (11) и (18) видно, что в фазовых изображениях может быть очень высокая чувствительность к движению сингулярных точек. В разделе 6 приведены результаты измерений, иллюстрирующие возможность регистрации очень малых амплитуд движения границы структурного элемента.

6. Сингулярности и сверхразрешение в фазовых изображениях

Обстоятельный анализ работ и современного состояния "сингулярной оптики" приведен, например, в статьях [18–26]. Отметим, что в обычных изображениях сингулярности не наблюдаются. Характерными признаками сингулярных точек и дислокаций являются "вилки" (forks) — смещения интерференционных полос, которые обычно наблюдают в интерференционных изображениях синтезированных или естественных фазовых транспарантов, регистрируемых при когерентном освещении. Однако зависимость положения сингулярных точек (или ДВФ) от структуры микрообъектов в общем случае неизвестна. Ранее мы уже отмечали, что дислокации, которые регулярно наблюдались в изображениях сравнительно толстых клеток на когерентном фазовом микроскопе "Эйрискан", обычно рассматривались как нежелательные искажения, затрудняющие идентификацию объекта.

Характерная для биологических микрообъектов дислокация в виде $\lambda/2$ -скачка фазовой толщины $h(x, y)$ в изображении ядрышка клетки человека показана на рис. 4а. Кажущийся разрыв поверхности ядрышка наблюдается на отрезке, ограниченном сингулярными точками. Заметим, что характер дислокации и расстояние между сингулярными точками зависят не только от свойств объектов, но и от числовой апертуры объектива, точности фокусирования и других факторов. На рисунке 4б дана интерпретация линии дислокации как проекции сингулярной линии, пересекающей плоскость изображения в точках АА.

Следующий пример мы приводим для иллюстрации вполне адекватного изображения субволнового объекта и возможности сверхразрешения [29]. Для сферы из латекса диаметром 100 нм характерные топограмма и

трехмерное (3D) изображение показаны на рис. 5а, б. В профиле (рис. 5в), полученном в диаметральном сечении топограммы, видно искажение, связанное, по-видимому, с дифракцией, и размеры — поперечный $d = 83$ нм на уровне полувысоты и максимальная фазовая толщина $\Delta h = 48$ нм. Поперечный размер $d = 83$ нм, который оказался приблизительно вдвое меньше расстояния (≈ 140 нм) от минимума до максимума в профиле фазовой толщины, может быть принят в данном случае в качестве характеристики пространственного разрешения. Формально этот результат можно интерпретировать как иллюстрацию пятикратного ($\mathcal{E} = r_0/d \approx 5$) сверхразрешения в фазовом изображении конкретного тест-объекта [29]. При измерениях с объективом ($NA = 0,95$) для длины волны $\lambda = 633$ нм радиус диска Эйри $r_0 = 400$ нм. Отметим также, что если рефрактерность $\Delta n = n - 1 = \Delta h/d \approx 0,6$ определить как отношение фазовой толщины к диаметру [31], то можно получить оценку для показателя преломления латекса $n = 1,6$, близкую к реальному значению $n = 1,55$.

Интерпретация результатов измерений динамических объектов значительно более сложна и менее однозначна, поскольку для них нет общепринятой терминологии и критерия разрешения. С одной стороны, хорошо известна огромная чувствительность (малые доли нанометра) интерференционных методов к изменениям оптической разности хода в аксиальном направлении. С другой стороны, почти нет работ по измерениям малых тангенциальных перемещений и сведений о факторах, влияющих на их точность. Из общих соображений можно предполагать, что чувствительность к тангенциальным смещениям значительно меньше, поскольку их минимальные амплитуды ограничены не только отношением сигнал/шум, но и контрастом границы структурного элемента движущегося объекта.

Мы здесь приводим результаты измерений [32], которые показывают возможность пространственного "сверхразрешения" в изображении динамического объекта, с оговоркой на отмеченную ранее условность этого понятия. В качестве объекта в [32] использовалась поверхность компакт-диска с известной структурой микрорельефа. В профиле фазовой высоты (рис. 6а), измеренном с помощью объектива с $NA = 0,95$, видна часть выступа $\Delta h \approx 150$ нм и склон шириной около 20–30 нм на его границе. Более точное значение ($\Delta x = 23$ нм) ширины склона получено дифференцированием профиля $h(x)$ (см. рис. 6б). Измерения большой (≈ 300) серии профилей фазовой высоты производились методом динамической фазовой микроскопии [31]. Установлено, что высота профиля $h(x)$ флуктуирует за малые доли секунды. Основными источниками флуктуаций в данном случае являлись различные технические причины (нестабильность развертки, вибрации прибора и акустические шумы). Наибольшая чувствительность к флуктуациям проявлялась на крутом участке склона, и это подтверждается положением максимума их интенсивности (I [нм²]) (рис. 6в). Флуктуации фазовой высоты были локализованы на крутом участке профиля протяженностью около 20 нм, близком к ширине склона $\Delta x = 23$ нм.

Границу выступа в данном случае можно рассматривать как "динамический" объект, совершающий слабые хаотические перемещения, а область локальных флуктуаций в фазовом изображении границы на рис. 6в — как его

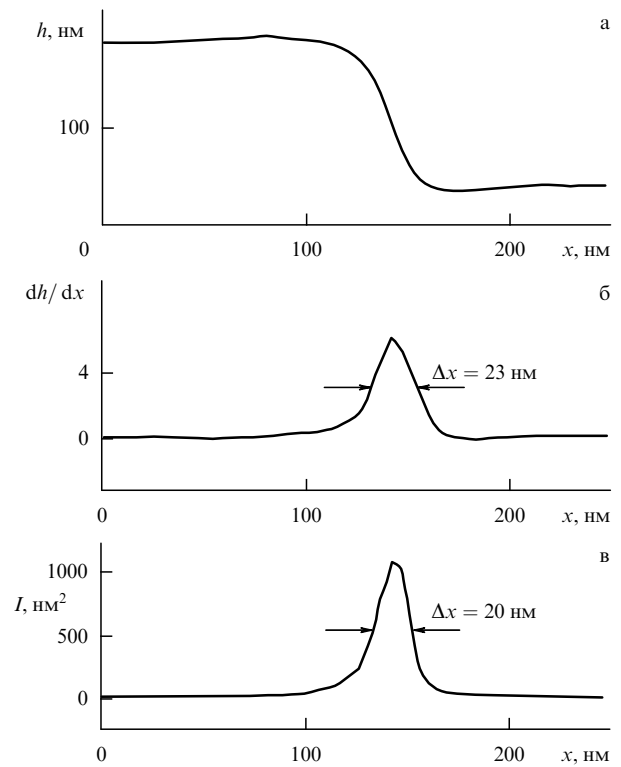


Рис. 6. Локальные флуктуации фазовой высоты на границе структурного элемента. (а) Фрагмент профиля компакт-диска с перепадом фазовой высоты ≈ 150 нм. (б) Определение точного значения ($\Delta x = 23$ нм) ширины склона дифференцированием профиля $h(x)$. (в) Иллюстрация возможности "сверхразрешения" в фазовых изображениях динамических объектов. В данном случае локальное ($\Delta x = 20$ нм) увеличение интенсивности флуктуаций $I(x)$ фазовой высоты на склоне профиля связано с техническими факторами.

флуктуационный "портрет". С учетом замечаний об условности терминологии этот результат можно интерпретировать как иллюстрацию двадцатикратного ($\mathcal{E} = r_0/\Delta x = 17,5$) "сверхразрешения" в изображении динамического объекта.

Несмотря на дискуссионный характер определения "сверхразрешения" в данном случае этот результат имеет конкретное практическое значение. Оно состоит в объяснении причин возрастания интенсивности флуктуаций, наблюдаемых при измерениях живых биологических объектов [31]. Увеличение интенсивности флуктуаций и присутствие контрастных компонент в спектре регулярно наблюдалось в окрестности крутых участков профиля фазовой толщины. Зависимость интенсивности и спектров флуктуаций от ингибиторов и стимуляторов указывала на их связь с метаболическими процессами [31–35]. В ряде случаев область локализации флуктуаций (≈ 50 – 100 нм) оказывалась близка к ширине профиля, составляя малую долю от радиуса Эйри. Локальность флуктуаций фазовой толщины такого же порядка ($\Delta x \approx 50$ – 100 нм) наблюдалась в биологических объектах при регистрации растровым методом [35]. Из наших измерений динамических объектов [29–35] следовал важный для применений вывод о возможности регистрации на крутых участках фазового профиля очень слабых (порядка нескольких ангстрем) флуктуаций различной природы.

В связи с приведенными на рис. 6 результатами измерений условного динамического объекта представ-

ляют интерес метрологически более обоснованные измерения на объекте с контролируемыми тангенциальными перемещениями. С целью проверки методики и для оценки предельного разрешения измерения производи-

лись на динамическом объекте в виде узкой (≈ 200 нм) риски на поверхности транслятора, периодическое движение которого контролировалось внешним источником напряжения [36]. В трансляторе "Нанотестер" для контролируемого тангенциального перемещения использовался пьезоэффект на кристалле ниобата лития.

Два профиля фазовой высоты риски с максимальной крутизной профиля $S = dh/dx \approx 0,5$ изображения, смещенные в плоскости на $\Delta x = 20$ нм приложенным к кристаллу напряжением, показаны на рис. 7. При последовательном во времени уменьшении напряжения амплитуда смещения убывала. Зависимость амплитуды смещения от приложенного напряжения в двойном логарифмическом масштабе показана на рис. 8. Минимальная амплитуда периодического тангенциального движения на частоте 1 Гц при измерении в течение ≈ 200 с составила 0,06 нм [36]. Оценка по формуле (18) для $r_0 = 400$ нм, $\langle \varphi \rangle \approx 0,01$ рад согласуется с этим значением для $S/N \approx 100$.

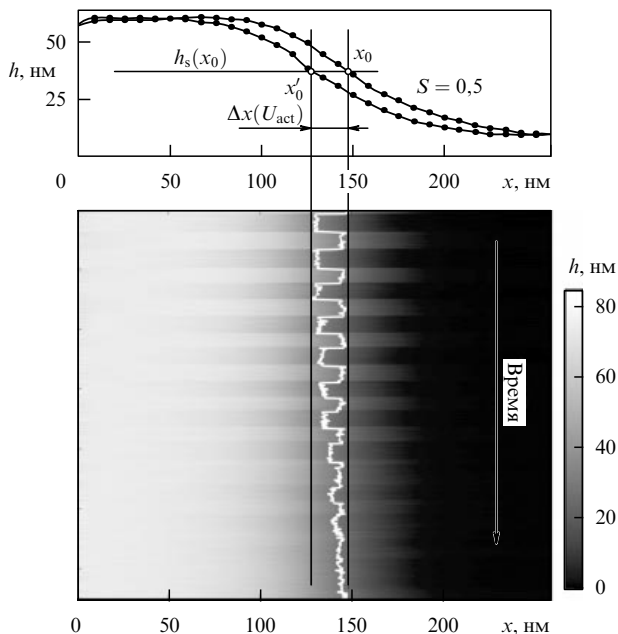


Рис. 7. Измерения амплитуды контролируемых нанометровых латеральных смещений. Трансляционное смещение ($\Delta x = 20$ нм) риски на поверхности пьезотранслятора "Нанотестер" [36] при подаче напряжения. Последовательное снижение во времени напряжения на пьезотрансляторе сопровождалось уменьшением амплитуды смещения границы структурного элемента.

7. Заключение

Распространение понятия пространственного разрешения на функциональные изображения привело к необходимости ревизии классического критерия и интерпретации термина "сверхразрешение". Мы здесь ограничимся в основном обсуждением методического аспекта применительно к фазовым изображениям. Их уникальные свойства могут быть объяснены в терминах сингулярной оптики. На качественном уровне мы считаем достаточно наглядной модель, в которой структуры в фазовом изображении интерпретируются как "след" от "спрятанных" сингулярных линий (рис. 3а), поскольку строгой теории фазовых изображений пока не существует.

Основной результат данной статьи состоит в обосновании энергозависимого критерия разрешения и измерениях, иллюстрирующих возможность сверхразрешения в фазовых изображениях. В последние годы в связи с проблемами биофизики, нанотехнологии молекулярной медицины возрос интерес к проблемам сверхразрешения в оптике. Удивительно, что эта важная проблема не обсуждалась в известных нам работах по интерференционной микроскопии [10–17]. Одна из причин этого парадокса, по-видимому, состоит в различии алгоритмов, лежащих в основе методов измерений фазы. Компенсационный метод, используемый в когерентном фазовом микроскопе "Эйрискан" [29, 30], позволил реализовать в фазовых изображениях сверхразрешение, которое отсутствовало при измерениях другими методами [10–17].

В заключение отметим фундаментальный результат, который имеет, по-видимому, достаточно общий характер для волновых полей. Из формул (14) и (16) для градиента фазы $d\varphi/dx \cong 1/v$ и интенсивности $I_\psi(v) = K^2 v^2/4$ следует зависимость $d\varphi/dx \cong |\text{grad}\varphi| \cong KI^{-1/2}/2$. Этот результат можно обобщить для всего пространства и сформулировать в виде "соотношения неопределенности" для интенсивности и фазы: неопределенность фазы неограниченно возрастает с приближением к линиям с нулевой интенсивностью поля.

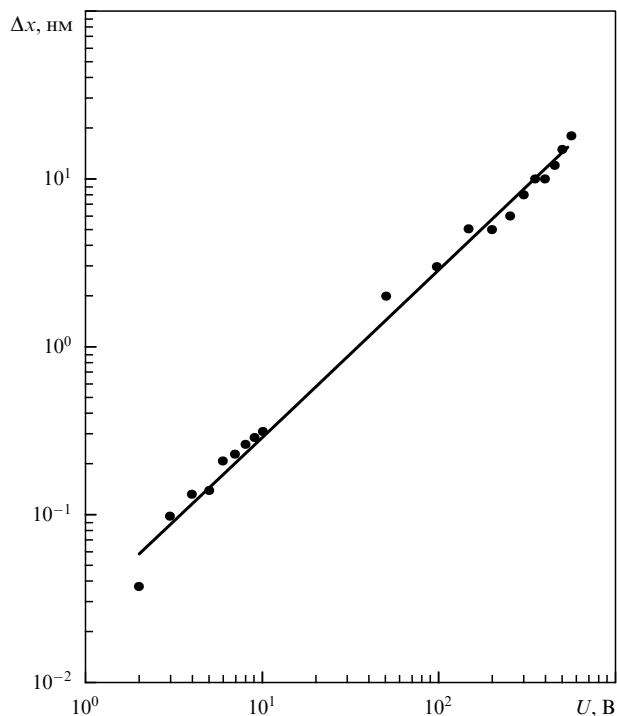


Рис. 8. Измерения в широком динамическом диапазоне показали линейную зависимость амплитуды смещения от приложенного напряжения [36]. Минимальная измеренная амплитуда 0,06 нм.

Благодарности. Приведенные в статье результаты получены в лаборатории когерентной оптики МИРЭА в течение 1987–2008 гг. Автор выражает глубокую благо-

дарность сотрудникам, принимавшим участие в разработке микроскопа "Эйрискан", И. Мазалову, Д. Ублинскому, С. Клушину. В исследовании фазовых изображений принимали участие А. Тавров, Г. Куфаль, Е. Переведенцева, Т. Вышенская. А. Кретушев внес заметный вклад в разработку математического обеспечения и улучшение параметров прибора. Автор благодарит А. Штиля, А. Тихонову, Л. Ягужинского, И. Василенко и Д. Вайсса за плодотворное сотрудничество. Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-00473.

Список литературы

- Peng H *Bioinformatics* **24** 1827 (2008)
- Born M, Wolf E *Principles of optics* (Oxford: Pergamon Press, 1965)
- Lacoste T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 9461 (2000)
- Betzig E et al. *Science* **313** 1642 (2006)
- Bates M et al. *Science* **317** 1749 (2007)
- Agrawal A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 3298 (2008)
- Wu D et al. *Nano Lett.* **8** 1159 (2008)
- Hell S W *Phys. Lett. A* **326** 140 (2004)
- Huang B et al. *Science* **319** 810 (2008)
- Carl D et al. *Appl. Opt.* **43** 6536 (2004)
- Vyshnyakov G et al. *Eur. J. Microsc. and Analysis* **87** 19 (2004)
- Langoju R, Patil A, Rastogi P *Opt. Express* **13** 7160 (2005)
- Rappaz B et al. *Opt. Express* **13** 9361 (2005)
- Popescu G et al. *J. Biomed. Opt.* **10** 060503 (2005)
- Ikeda T et al. *Opt. Lett.* **30** 1165 (2005)
- Popescu G et al. *Opt. Lett.* **31** 775 (2006)
- Millerd J E et al. *Proc. SPIE* **5531** 304 (2004)
- Nye J F, Berry M V *Proc. R. Soc. London A* **336** 165 (1974)
- Баженов В Ю, Васнецов М В, Соскин М С *Письма в ЖЭТФ* **52** 1037 (1990) [Bazhenov V Yu, Vasnetsov M V, Soskin M S *JETP Lett.* **52** 429 (1990)]
- Berry M V, Dennis M R *Proc. R. Soc. London A* **457** 2251 (2001)
- Leach J et al. *New J. Phys.* **7** 55 (2005)
- Soskin M S, Vasnetsov M V "Singular Optics", in *Progress in Optics* Vol. 42 (Ed. E. Wolf) (Amsterdam: North-Holland, 2001) p. 219
- Баранова Н Б и др. *Письма в ЖЭТФ* **33** 206 (1981) [Baranova N B et al. *Sov. JETP Lett.* **33** 195 (1981)]
- Angelsky O V et al. *Phys. Rev. E* **65** 036602 (2002)
- Tychinsky V *Opt. Commun.* **81** 131 (1991)
- Tavrov A V, Tychinsky V P *Proc. SPIE* **2004** 332 (1994)
- Tychinsky V P *Opt. Commun.* **74** 41 (1989)
- Тычинский В П и др. *Письма в ЖТФ* **17** (22) 80 (1991) [Tychinskii V P et al. *Sov. Tech. Phys. Lett.* **17** 815 (1991)]
- Тычинский В П и др. *Квантовая электроника*. **24** 754 (1997) [Tychinskii V P et al. *Quantum Electron.* **27** 735 (1997)]
- Tychinsky V P et al. *Opt. Commun.* **74** 37 (1989)
- Тычинский В П *УФН* **177** 535 (2007) [Tychinskii V P *Phys. Usp.* **50** 513 (2007)]
- Кретушев А В, Тычинский В П *Квантовая электроника*. **32** 66 (2002) [Kretushev A V, Tychinskii V P *Quantum Electron.* **32** 66 (2002)]
- Tychinsky V P, Velzel C H F, in *Current Trends in Optics* (Ed. J C Dainty) (San Diego: Academic Press, 1994)
- Tychinsky V P et al., in *Technical Proc. of the 2006 NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show, Boston, May 7–11, 2006* Vol. 2 (2006), Ch. 1, CDROM
- Иванов А Б и др. *Российские нанотехнологии* **2** (5–6) 120 (2007)
- Tychinsky V P, Kretushev A V, Luskinovich P N, physics/0608093

Super-resolution and singularities in phase images

V.P. Tychinskii

Moscow State Institute of Radio Engineering, Electronics and Automatics,
 prosp. Vernadskogo 78, 119454 Moscow, Russian Federation
 Tel. (7-495) 434-6792
 E-mail: vtych@yandex.ru

The Rayleigh criterion and the Airy radius are not adequate to characterize spatial resolution in phase and some other functional images. An essential feature of phase images is a possible formation of wavefront dislocations, which depend on the position in space of the so-called singular lines ($I(x, y, z) = 0$), in the neighborhood of which the phase gradient $\varphi \approx I^{-1/2}$ increases and the intensity tends to zero. Based on this gradient phase behavior, the minimal length L dependent on the signal-to-noise (S/N) ratio is proposed as the phase resolution criterion, and a formula for the energy-dependent super-resolution, $\Xi = r_0/L \cong 2(S/N)^{1/2}$, is obtained. Measurements on a 100-nm-diameter latex sphere using a coherent phase microscope 'Airyscan' confirmed that a marked ($\Xi \cong 5$) super-resolution can be achieved.

PACS numbers: **42.30.-d**, **42.79.-e**, 87.64.Rr

DOI: 10.3367/UFNr.0178.200811c.1205

Bibliography — 36 references

Received 8 June 2008, revised 29 August 2008

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **178** (11) 1205–1214 (2008)

Physics – Uspekhi **51** (11) (2008)