

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

W Y D Z I A Ł M E C H A T R O N I K I

Rozprawa doktorska

(streszczenie)

mgr inż. Arkadiusz Kuś

**Aktywny tomograf holograficzny do pomiaru mikroobiektów
biologicznych**

Promotor

prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska

Promotor pomocniczy

dr hab. inż. Michał Józwik

Recenzenci

prof. dr hab. inż. L. Jaroszewicz, Wojskowa Akademia Techniczna

prof. dr hab. M. Wojtkowski, Instytut Chemii Fizycznej PAN

WARSZAWA, 2017

Spis treści

1. Wstęp i motywacja	2
2. Cel pracy	3
3. Udoskonalona technika tomografii holograficznej z obrotem próbki	4
4. Tomografia holograficzna z ograniczonym zakresem kątowym projekcji	7
4.1. Rozszerzenie dostępnego scenariusza pomiarowego	9
4.2. Poprawa jakości rekonstrukcji poprzez optyczne przeogniskowanie	12
5. Analiza błędów związanych z układem optycznym	14
6. Aktywne oświetlenie w układzie tomografu holograficznego	16
7. Podsumowanie	18
8. Przyszłe prace	19
9. Wykaz publikacji stanowiących przedmiot rozprawy	20
Bibliografia	22

1. Wstęp i motywacja

Jedną z istotniejszych standardowych procedur w biologii jest obserwacja komórek pod mikroskopem, których linie hodowli wykorzystywane są powszechnie w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej, we wczesnym etapie testowania leków, jak również w badaniu cytotoksyczności związków chemicznych, czy nanocząstek [1].

Ze względu na niską absorpcję w zakresie promieniowania widzialnego komórek zanurzonych w pożywce, powszechnie stosowane są techniki pozwalające wybarwiać struktury wewnątrz komórek np. hematoksyliną i eozyną w świetle białym, bądź z wykorzystaniem fluoroforów o zadanych parametrach, co stanowi podstawę mikroskopii fluorescencyjnej. Istnieje szereg technik zwiększających możliwości obserwacji znakowanych komórek, takich jak mikroskopia konfokalna, czy dwufotonowa. Podstawowym problemem przyżyciowego badania komórek za pomocą tych technik jest jednak konieczność modyfikacji obiektu badanego (dołączenie znaczników), czy zjawisko fototoksyczności, które przy zbyt dużym natężeniu promieniowania oświetlającego prowadzi do uszkodzenia obiektów. W związku z tym powszechnie wykorzystywane są metody, w których obserwacja bez wykorzystania znaczników możliwa jest dzięki zastosowaniu kontrastu fazowego - techniki, pozwalającej w sposób jakościowy uzyskać informację o lokalnych zmianach drogi optycznej, wprowadzanych przez komórkę. Zmiany drogi optycznej wynikają z obecności różnych struktur wewnętrznych, które charakteryzują się różnymi wartościami współczynnika załamania w obiekcie.

W wyniku rozwoju technik cyfrowych i postępującej digitalizacji danych pomiarowych, techniki jakościowe łączone są z cyfrową akwizycją danych, co mimo znacznego zwiększenia kosztów systemu w przypadku klasycznych metod kontrastu fazowego, nie dostarcza dodatkowej informacji o obiekcie. Z tego powodu w ostatnich latach obserwuje się nagły wzrost zainteresowania ilościowymi technikami obrazowania biologicznych obiektów fazowych. Świadczyć o tym może powstanie konferencji tematycznej dotyczącej ilościowego obrazowania fazy ("*Quantitative Phase Imaging*") na jednym z największych sympozjów naukowych dotyczących zastosowania optyki w biomedycynie, Photonics West BiOS w roku 2015. Jedną z najpopularniejszych technik obrazowania fazowego jest holografia cyfrowa, która pozwala zmierzyć zintegrowaną fazę obiektu transmisyjnego. Możliwości przetwarzania i reprezentacji danych, a także chęć dokładnego zlokalizowania struktur wewnątrz obiektów biologicznych tworzą potrzebę rozwijania technik obrazowania trójwymiarowego, czyli m.in. tomografii [2]. Dzięki wykorzystaniu holografii w procesie pozyskania widoków obiektu z wielu kierunków i rekonstrukcji tomograficznej możliwy jest pomiar trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania wewnątrz żywych komórek, pozwalający na uniknięcie procedur związanych z wykorzystaniem markerów. W celu wizualizacji pomiaru barwienie wykonywane jest cyfrowo, na wyniku, poprzez przypisanie odpowiednim wartościom współczynnika załamania barw. Natomiast informacja ilościowa o współczynniku załamania może być wykorzystana do diagnostyki chorób takich jak rak piersi i prostaty, z wykorzystaniem próbek histologicznych [3]. Trójwymiarowy rozkład współczynnika załamania pozwala przeanalizować objętość i powierzchnię komórek, a na tej podstawie można wnioskować na temat metabolizowania składników odżywczych przez komórki [4], jak również wyznaczyć suchą masę komórkową np. w celu identyfikacji linii komórkowych w próbce [5].

W tomografii holograficznej wyróżnić można dwa podejścia ze względu na zakres pozyskanych danych - w pełnym kącie projekcji z obrotem próbki, bądź w niepełnym kącie projekcji ze zmianą kierunku oświetlenia. Ze względu na metrologiczny charakter

techniki tomografii holograficznej, istotne jest z jednej strony wykorzystanie algorytmów oraz procedur korekcji numerycznej, pozwalających na minimalizację błędów przy rekonstrukcji rozkładu współczynnika załamania. Z drugiej strony, zarówno procedura akwizycji danych tomograficznych, jak i układ pomiarowy jest źródłem dodatkowych błędów, które w istotny sposób wpływają na jakość wyniku. Należy zauważyć, iż najczęściej uwagi w literaturze poświęcane jest procedurom numerycznej korekcji danych. Kwestie wpływu układu pomiarowego na wynik rekonstrukcji, jak również doboru i projektu układów optycznych, stosowanych w tomografii holograficznej są opisywane rzadko. Najczęściej stosowane jest podejście wynikające z rozwiązań spotykanych w klasycznej mikroskopii bez dokładnej analizy potencjalnych źródeł błędów.

2. Cel pracy

Celem pracy jest zaprojektowanie i zbudowanie tomografu holograficznego, który dzięki systematycznemu podejściu do zagadnień związanych z układem pomiarowym dostarczy możliwie największy zakres danych, ograniczy błędy rekonstrukcji, a także rozszerzy użyteczność techniki dzięki zastosowaniu przyjaznej użytkownikowi konfiguracji urządzenia. Ze względu na złożony charakter metody pomiarowej oraz silną zależność od rozwoju algorytmów rekonstrukcji tomograficznej, urządzenie zostanie przygotowane w dwóch etapach. W pierwszym z nich przygotowana zostanie konfiguracja układu tomograficznego z obrotem próbki, która posłuży do akwizycji danych referencyjnych.

W zakresie tomografii z obrotem próbki szczegółowym celem pracy jest:

- uproszczenie budowy układu pomiarowego do integracji z mikroskopem biologicznym;
- potwierdzenie stosowalności techniki do żywych obiektów biologicznych;
- pozyskanie referencyjnych danych pomiarowych dla rekonstrukcji w ograniczonym kącie projekcji.

W następnym kroku zbudowany zostanie układ dostosowany do pomiaru preparatów biologicznych (komórek na szalce Petri'ego) oraz histologicznych, z wykorzystaniem zmiany kierunku oświetlenia w ograniczonym kącie projekcji. Na tym etapie zrealizowane zostaną następujące cele szczegółowe:

- analiza konstrukcji układu optycznego tomografów holograficznych;
- systematyczna analiza błędów związanych z układem pomiarowym;
- opracowanie metody i przeprowadzenie pełnej korekcji błędów układu optycznego z wykorzystaniem aktywnych elementów optoelektronicznych;
- weryfikacja najkorzystniejszego rozkładu kątów oświetlenia próbki;
- zwiększenie głębi ostrości w objętości przedmiotu poprzez modyfikację układu optycznego.

Opracowana w ramach pracy metodyka pomiaru i kolejne udoskonalone układy tomografów holograficznych mają stworzyć podstawę do zaprojektowania w przyszłości zoptymalizowanego pod kątem funkcji pomiarowych systemu tomograficznego do zastosowań medycznych i biologicznych.

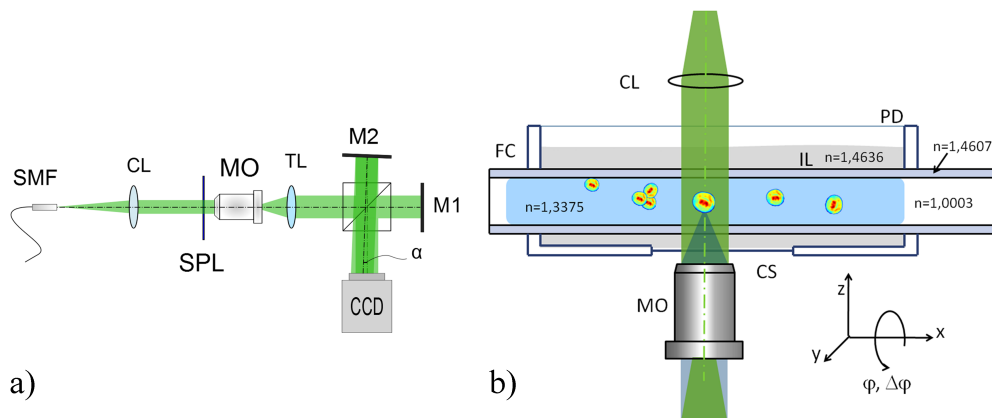
3. Udoskonalona technika tomografii holograficznej z obrotem próbki

Podstawową techniką pozyskiwania projekcji obiektu, zarejestrowanych z wielu kierunków oświetlenia, jest obrót obiektu zamocowanego w uchwycie obrotowym. Podejście to wywodzi się z tomografii komputerowej w zakresie promieniowania rentgenowskiego, gdzie bada się obiekty techniczne [6], które łatwo jest obrócić ze względu na charakter zbliżony do bryły sztywnej. Z drugiej strony tomografia komputerowa stosowana jest w medycynie, gdzie obracane są źródło oraz detektor, a nieruchomy pozostaje pacjent [7]. W przypadku badań obiektów biologicznych, mamy do czynienia z obiektami o wymiarach do $50\mu\text{m}$, a zatem konieczna jest obserwacja za pomocą układu mikroskopu. W związku z tym zastosowanie rozwiązania z obrotem źródła i detektora jest trudne do wykonania - spotykane w literaturze przykłady obejmowały jedynie nieliczne przypadki rekonstrukcji w układach tomografii projekcyjnej, a nie holograficznej, z obrotem próbki [8], a zatem nie było możliwe uzyskanie informacji o trójwymiarowym rozkładzie współczynnika załamania $n(x, y, z)$. Uzyskanie rozkładu $n(x, y, z)$ wymaga umieszczenia modułu z kapilarą obrotową i próbką w układzie mikroskopu holograficznego, na przykład zbudowanego na bazie interferometru Macha-Zehndera (MZ), w którym zapewnione jest odpowiednie powiększenie, a informację o rozkładzie pola optycznego uzyskuje się poprzez numeryczną propagację zespolonej amplitudy do środka obiektu. Jedno z zaproponowanych w literaturze rozwiązań polegało na umieszczeniu próbki na obrotowej mikropięcie [9]. Oznacza to jednak ingerencję w obiekt mierzony, a zatem jest sprzeczne z ideą nieniszczących badań obiektów biologicznych. Alternatywnym rozwiązaniem jest umieszczenie próbki wewnątrz kapilary, które po raz pierwszy przedstawione zostało w pracy [10], gdzie zademonstrowane zostały wyniki badania ziaren pyłków. Oznacza to, że istnieją praktyczne trudności, związane z realizacją tomografii na komórkach zwierzęcych z wykorzystaniem tego podejścia. W związku z tym w swojej pracy zaproponowałem wykorzystanie zmodyfikowanego układu mikroskopu holograficznego, przygotowanego do pracy z kapilarą oraz metodykę przygotowania próbek, pozwalającą wykonywać rekonstrukcje trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania wewnątrz komórek zwierzęcych [A1], [A2]. Badania zrealizowane zostały przy współpracy z CeBOP (Center for Biomedical Optics and Photonics, Muenster, Niemcy), gdzie zaprojektowany moduł obrotu próbki został zintegrowany z opracowanym w tym ośrodku mikroskopem holograficznym. W pracy [A1] rozwiązane zostały następujące zagadnienia:

- opracowanie uproszczonej konfiguracji mikroskopu holograficznego w zastosowaniu do tomografii;
- adhezja komórek do ścianek kapilary;
- minimalizacja błędów związanych z obrotem kapilary poprzez zastosowanie odpowiedniej kuwety na próbkę.

Istotną barierą rozwoju mikroskopii i tomografii holograficznej jest zwykle konieczność przeprowadzenia znaczących modyfikacji w torze optycznym istniejącego już mikroskopu, bądź konieczność zakupu nowego urządzenia. Najczęściej stosowana konstrukcja interferometru Macha-Zehndera ([9], [10], [A3]) wymaga (oprócz zastosowania źródła światła o odpowiedniej koherencji czasowej i przestrzennej) zbudowania drugiego toru optycznego dla wiązki referencyjnej. Jednym ze sposobów uproszczenia konstrukcji mikroskopu holograficznego, który jest niezbędny w opisywanej technice, jest zbudowanie interferometru wspólnej drogi przez wykorzystanie wiązki przedmiotowej, siatki dyfrakcyjnej i filtra otworkowego [11].

Znacznie prostszym rozwiązaniem jest wykorzystanie dużego poprzecznego rozdwojenia czoła fali przedmiotowej [A1] poprzez moduł wzorowany na interferometrze Michelsona (rys. 1a). W tym przypadku objętość zajmowana przez obiekt badany jest ściśle zdefiniowana przez

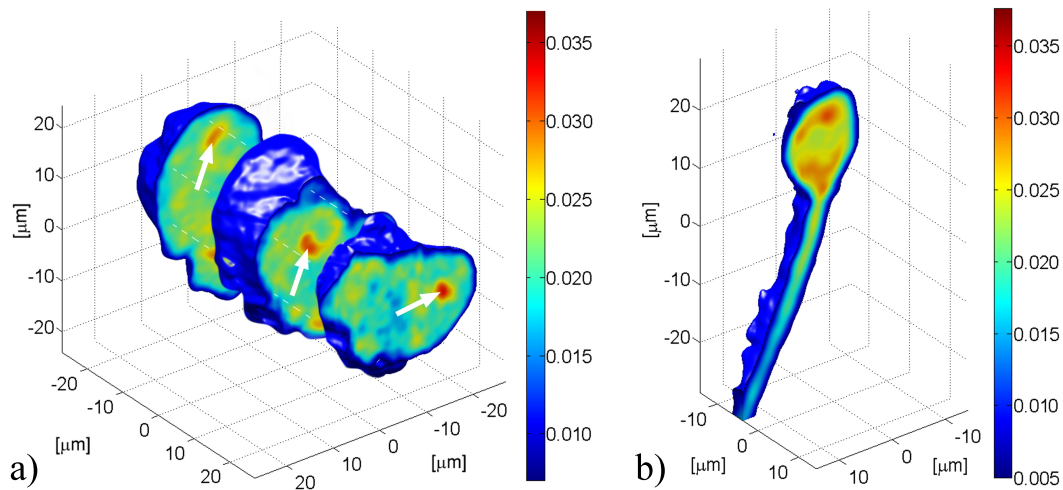


Rysunek 1. Układ mikroskopu holograficznego [A1], a) schemat konfiguracji z dużym poprzecznym rozdwojeniu czoła fali, b) schemat uchwytu na próbkę. SMF: światłowód jednomodowy, CL: soczewka kondensora, SPL: płaszczyzna próbki, MO: obiektyw mikroskopowy, TL: soczewka tubusowa, M1, M2: zwierciadła, CCD: detektor macierzowy, PD: szalka Petri’ego, CS: szkiełko nakrywkowe, FC: kapilara.

średnicę kapilary obrotowej, w której umieszczony jest przedmiot (rys. 1b). W wyniku dużego poprzecznego rozdwojenia czoła fali, część wiązki przedmiotowej, zajmowana przez obiekt badany, interferuje z fragmentem wiązki wolnym od obiektu. Rozwiązanie to jest korzystne ze względu na możliwość dołączenia do istniejących mikroskopów w postaci dodatkowego modułu, jeśli obiekt badany oświetlony jest skolimowaną wiązką lasera. Mimo uproszczenia konstrukcji układu rejestrującego projekcje, tomografia holograficzna wymaga dodatkowego podzespołu realizującego obrót obiektu badanego (uchwyt obrotowy dostępny handlowo), kapilary, w której umieszczona zostaje hodowla komórek oraz naczynia na olejki immersyjny (rys. 1b), którego współczynnik załamania dopasowany jest do materiału kapilary.

Problemy związane z kapilarą, a w szczególności adhezja komórek do ściany wewnętrznej, są istotnym ograniczeniem techniki. Ze względu na wartość apertury numerycznej obiektywu odwzorowującego obiekt badany, możliwe jest jedynie poprawne zarejestrowanie zespolonej amplitudy obiektu znajdującego się w odległości 0,75 promienia od środka kapilary. Większość badanych w publikacji [A1] komórek rakowych jest adherentna, typowo hodowana na płaskim podłożu, na którym wzrasta i po którym się przemieszcza. W praktyce, gdyby komórka została wyhodowana na ścianie kapilary, oznaczałoby to realizację tomografii jedynie w ograniczonym kącie projekcji i związane z tym faktem charakterystyczne zniekształcenia w rekonstrukcjach [A2], [12]. Aby tego uniknąć, zaproponowałem modyfikację wewnętrznej powierzchni kapilary 0,5% roztworem poli(alkoholu winylowego), co skutecznie zapobiega adhezji komórek i pozwala zarejestrować projekcje z pełnego zakresu kąтового. Zarejestrowane zespolone amplitudy badanych obiektów rekonstruowane były z wykorzystaniem algorytmu projekcji wstecznej z filtracją i transformaty Radona, która jest odpowiednia dla projekcji zebranych w zakresie 180°. Przykładowe wyniki rekonstrukcji względnego trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania (Δn) zaprezentowane są na rys. 2.

W publikacji [A1] współpracowałem z Michałem Dudkiem, który wyznaczył niepewność pomiaru współczynnika załamania w przypadku obrotu próbki. Jednym z ograniczeń zastosowanego w pracy podejścia jest brak uwzględnienia w rachunku niepewności błędów związanych z aberracjami wprowadzanymi przez kapilarę oraz warstwę cieczy między kapilarą, a szkiełkiem nakrywkowym kuwety z olejkim immersyjnym, a także błędów związanych z niedokładnością obrotu próbki. Co więcej, wykorzystany w pracy algorytm rekonstrukcji nie uwzględniał zjawisk związanych z dyfrakcją (podejście projekcyjne). W trakcie dalszych



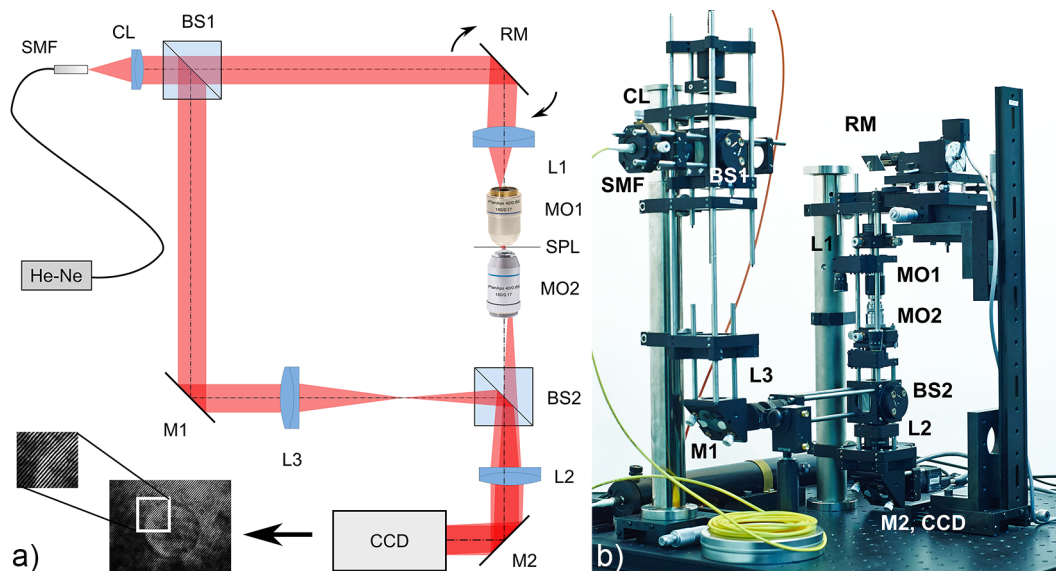
Rysunek 2. Przykładowe rekonstrukcje trójwymiarowego rozkładu względnego współczynnika załamania [A1], a) grupa komórek HT-1080, $\Delta n = 0,030 \pm 0.004$, b) pojedyncza komórka HT-1080, $\Delta n = 0,032 \pm 0.004$.

prac nad techniką tomografii zbudowałem drugi układ pomiarowy, zaprojektowany do prac nad algorytmami korekcji numerycznej wspomnianych błędów [A3], zrealizowanych przez Julianę Kostenką. System pomiarowy oparty został na konfiguracji interferometru Macha-Zehndera ze względu na całkowitą niezależność frontu falowego wiązki referencyjnej od wiązki przedmiotowej, konieczną na tym etapie rozwoju algorytmów. Oprócz rozwoju układu niezbędne było również przygotowanie fantomu - obiektu kalibracyjnego, który pozwoliłby zweryfikować jakość rekonstrukcji w różnej odległości od osi kapilary. W pracy [A3] zaprezentowane zostały wyniki pomiarów zaproponowanego i wykonanego przeze mnie fantomu fazowego w postaci mikrokulek z PMMA w kleju polimeryzowanym wewnątrz kapilary.

Pomimo znacznej poprawy jakości uzyskanej dzięki numerycznej korekcji [A3], poprawy architektury układu pomiarowego zaproponowanej w pracy [A1] i uniknięcia adhezji komórek do ścian kapilary, najważniejszym ograniczeniem stosowania tego typu układów na szeroką skalę jest długi czas pomiaru oraz konieczność specjalnego przygotowania próbki. Akwizycję projekcji przeprowadziłem z częstotnością 1 Hz, co oznacza, że czas konieczny na zarejestrowanie pełnej serii tomograficznej uniemożliwia pracę z żywymi komórkami w temperaturze 37°C ze względu na tempo wzrostu i przemieszczania się obiektów badanych (konieczne jest obniżenie temperatury otoczenia o co najmniej 12°C). Co więcej, mimo modyfikacji powierzchni zapobiegającej adhezji komórek do kapilary, nadal istniało duże prawdopodobieństwo, że części z wprowadzonych do kapilary komórek nie będzie można zbadać. Konieczny był zatem rozwój techniki pozwalającej skrócić czas akwizycji, a jednocześnie znacząco poprawić wygodę i niezawodność przygotowania próbek biologicznych. Przedstawione układy pomiarowe pozwoliły jednak zarejestrować dane referencyjne z izotropową rozdzielczością rekonstrukcji, dzięki czemu możliwy był rozwój algorytmów dedykowanych do tomografii w ograniczonym zakresie kątowym [A2], [12].

4. Tomografia holograficzna z ograniczonym zakresem kątowym projekcji

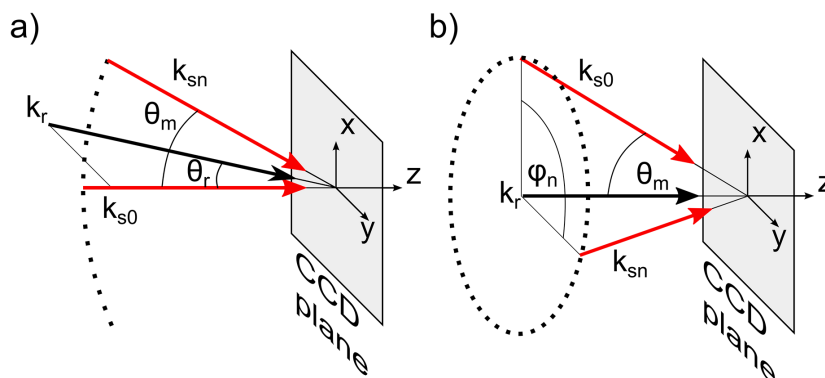
Odpowiedzią na konieczność skrócenia czasu pomiaru i ograniczenia ingerencji w obiekt badany jest tomografia wykonywana w ograniczonym zakresie kątowym projekcji przy wykorzystaniu układu zmieniającego kierunek wiązki oświetlającej, jednak z zachowaniem stacjonarnego detektora. Rozwiązanie to pozwala mierzyć próbki komórek wyhodowanych na szalkach Petri'ego bądź bezpośrednio na szkiełkach nakrywkowych, co znacząco ułatwia przygotowanie materiału do badań. Pierwszym etapem budowy tomografu była modyfikacja układu mikroskopu holograficznego w konfiguracji Macha-Zehndera [A3] poprzez wprowadzenie zwierciadła umieszczonego na silniku krokowym [A4], co zostało zaprezentowane na rysunku 3. Podstawowym założeniem było zapewnienie odpowiedniej częstości nośnej w hologramach, pozwalającej wykorzystać metodę transformacji Fouriera do odzyskania zespolonej amplitudy projekcji zamiast dotychczas stosowanej metody czasowej dyskretnej zmiany fazy [13], [14]. Prowadzi to do uproszczenia i obniżenia kosztu układu pomiarowego. Istotne w zbudowanym przeze mnie interferometrze jest zastosowanie obiektywów znacząco ograniczających zakres kątowy projekcji (do $\pm 41^\circ$). Są to obiektywy pracujące bez immersji, o aperturze numerycznej 0,85. Brak konieczności stosowania immersji znacząco przyczyni się do uproszczenia pomiaru z wykorzystaniem mikroskopu tomograficznego, jednak wymagana jest w tym przypadku korekcja artefaktów związanych z silnie ograniczonym zakresem kątowym projekcji za pomocą algorytmu rekonstrukcji. W tym zakresie współpracowałem z Wojciechem Krauze, który zaproponował algorytm w znacznym stopniu rozwiązujący wspomniany problem dla próbek, w których rozkład współczynnika załamania jest obszarami stały (*piecewise-constant*) [A4], np. krwinki czerwone.



Rysunek 3. Mikroskop tomograficzny pracujący z ograniczonym zakresem kątowym projekcji [A4], a) schemat układu, b) zdjęcie układu pomiarowego. SMF: światłowód jednomodowy, CL: kolimator, BS: kostka światłodzielnąca (50:50), L1, L2, L3: dublety achromatyczne SPL: płaszczyzna próbek, MO: obiektyw mikroskopowy, M1, M2: zwierciadła, CCD: detektor matrycowy.

W zbudowanym przeze mnie pierwszym układzie ze skanowaniem wiązką, zwierciadło (RM) pozwalało na zmianę kierunku oświetlenia jedynie w jednej płaszczyźnie zgodnie z liniowym scenariuszem oświetlenia przedstawionym na rys. 4a, co dodatkowo ograniczyło

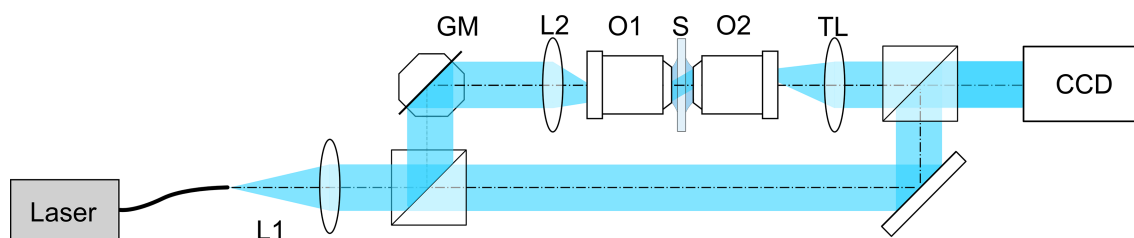
zakres dostępnych danych i utrudniło uzyskanie poprawnej rekonstrukcji tomograficznej. Wykorzystanie silnika krokowego oznacza dostęp do skończonej liczby dyskretnych wartości kątów oświetlenia. W przypadku zastosowanego powiększenia układu optycznego możliwe było zarejestrowanie 216 projekcji w zakresie 82° .



Rysunek 4. Podstawowe scenariusze oświetlenia w układach mikroskopów tomograficznych [A5], a) scenariusz liniowy, b) scenariusz kołowy (stożkowy).

Zwiększenie liczby projekcji nie spowodowałoby poprawy jakości rekonstrukcji. Decydujący wpływ będzie miało natomiast zwiększenie zakresu kąтового i zmiana scenariusza oświetlenia z liniowego (rys. 4a) na kołowy (rys. 4b).

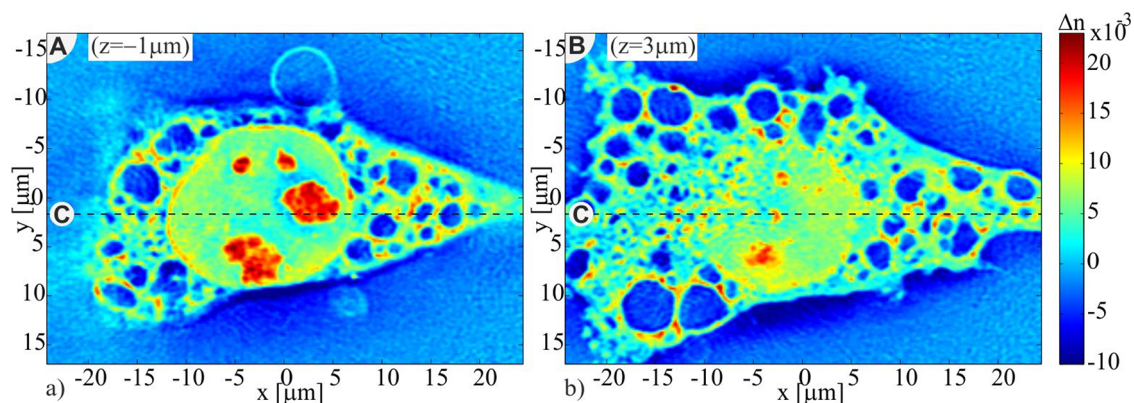
Zatem w celu zwiększenia ilości dostępnych danych oraz skrócenia czasu akwizycji zestawu projekcji tomograficznych zwierciadło, mocowane na silniku krokowym, zostało zastąpione dwuosiowym zwierciadłem galwanometrycznym (GM na rysunku 5). [A6].



Rysunek 5. Mikroskop tomograficzny pracujący z ograniczonym zakresem kątowym projekcji i zwierciadłem galwanometrycznym [A6]. L1: kolimator, L2, TL: dublety achromatyczne, O1, O2: obiektywy mikroskopowe, S: płaszczyzna próbki, CCD: detektor matrycowy.

Zmieniona została również budowa wiązki referencyjnej. W tej konfiguracji układ pracuje z wiązką referencyjną padającą normalnie do płaszczyzny detektora. Częstość prążków jest stała przy założeniu, że skanowanie odbywa się po tworzącej stożka (scenariusz kołowy) (rysunek 4b). Wtedy zmienia się jedynie orientacja prążków, w przeciwieństwie do układu z rys. 3, co ma swoje konsekwencje w uproszczeniu analizy hologramów metodą transformacji Fouriera.

W trakcie pracy w projekcie 3DPHASE Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, zbudowaną przeze mnie drugą wersję układu pomiarowego (rys. 5), przetransportowałem do laboratorium partnera projektu. Na miejscu, w Biomedical Technology Center na Uniwersytecie Muenster w Niemczech wykorzystałem układ do zarejestrowania serii pomiarowych komórek PaTu 8988 raka trzustki. Przykładowy wynik pomiaru, który został wykorzystany przez Julianę Kostenką do prac nad algorytmem rekonstrukcji tomograficznej [A6], zaprezentowany został na rysunku 6. Zmierzona przeze mnie próbka wyhodowana została bezpośrednio na szalce



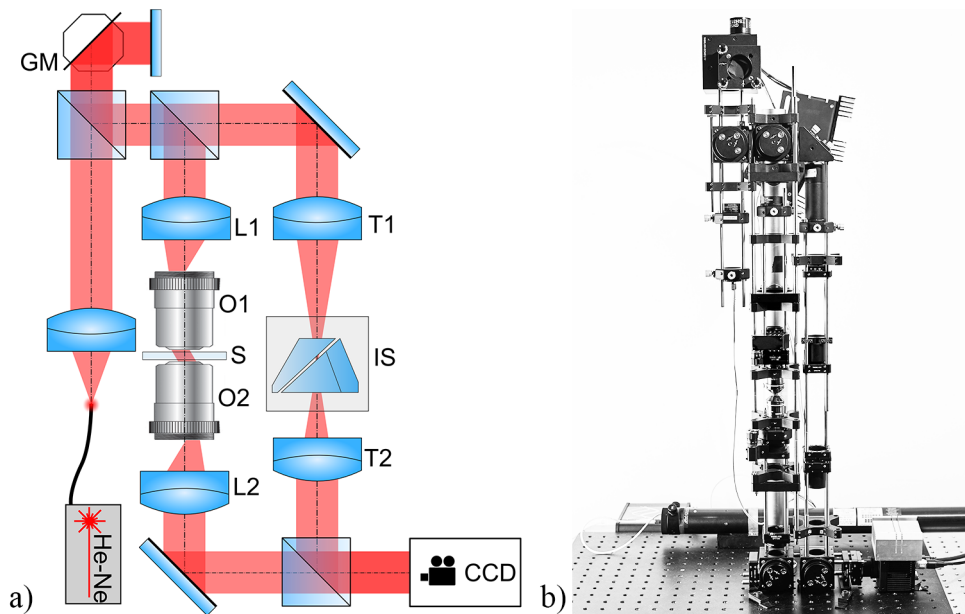
Rysunek 6. Dwa przekroje w płaszczyźnie XY trójwymiarowego rozkładu względnego współczynnika załamania w komórce PaTu 8988, wyznaczonego na podstawie danych zebranych w układzie z kołowym scenariuszem oświetlenia i zwierciadłem galwanometrycznym [A6], a) przekrój $-1\mu\text{m}$ od płaszczyzny ostrości, b) przekrój $3\mu\text{m}$ od płaszczyzny ostrości.

Petri'ego, a następnie przykryta polimerowym separatorem [15] i szkiełkiem nakrywkowym, tworząc szczelną komorę pomiarową. Takie podejście podyktowane było zastosowaniem dwóch obiektywów, pracujących z olejkim immersyjnym. Istnieje jednak możliwość zrezygnowania z zamkniętej komory na próbkę kosztem zmniejszenia apertury numerycznej w wyniku użycia pożywki jako immersji dla obiektywu oświetlającego, bądź zastosowania komory z przepływem laminarnym [16].

4.1. Rozszerzenie dostępnego scenariusza pomiarowego

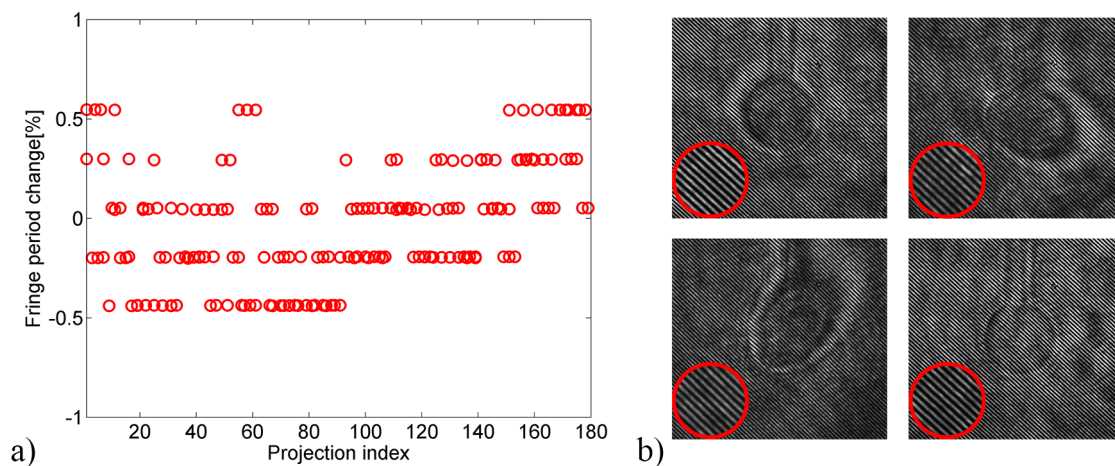
Jednym ze zidentyfikowanych przeze mnie ograniczeń opracowanych i zbudowanych układów tomograficznych była możliwość skanowania jedynie z wykorzystaniem dwóch scenariuszy (kołowy/stożkowy i liniowy). Jednocześnie jeden z nich - scenariusz kołowy - charakteryzuje się znacznie większą ilością możliwych do zarejestrowania danych. W literaturze zaproponowane zostało rozwiązanie tego problemu i realizacja dowolnego scenariusza oświetlenia poprzez umieszczenie dodatkowego, ruchomego zwierciadła w wiązce referencyjnej [5], bądź alternatywnie umieszczenie drugiej pary zwierciadeł galwanometrycznych za układem mikroskopu [17]. Modyfikacje przytoczonych rozwiązań wprowadzone zostały również po to, aby uniknąć zmiany częstości nośnej prążków w rejestrowanych hologramach. Właśnie taka sytuacja ma miejsce, jeśli w układzie [A6] oświetlimy obiekt badany wzdłuż osi optycznej - wynikiem będzie pole jednorodne, a wykorzystanie metod jednoramkowych rekonstrukcji pola optycznego - niemożliwe.

W związku z tym zaproponowałem układ pomiarowy [A7], w którym wiązka przedmiotowa i referencyjna odchylane są w płaszczyźnie detektora o taki sam kąt z wykorzystaniem tylko i wyłącznie jednego zestawu zwierciadeł galwanometrycznych (rysunek 7). Częstość nośna prążków w hologramach może zostać dowolnie dopasowana do warunków rejestracji projekcji (do rozmiaru piksela matrycy detektora). Rozwiązanie to wymaga zapewnienia takich samych powiększeń dla wiązki przedmiotowej, jak i referencyjnej przy tej samej długości układu między zwierciadłem GM, a kamerą CCD. W związku z tym zaprojektowałem dwie soczewki T1 i T2 (dublety achromatyczne), które zostały wykonane w Instytucie Mikromechaniki i Fotoniki. Aby uzgodnić znak powiększenia wiązki referencyjnej z wiązką przedmiotową, konieczne jest dodatkowo zastosowanie pryzmatycznego układu odwracającego IS (pryzmat Schmidt'a-Pechan'a, bądź typu Porro). W rezultacie implementacji tego rozwiązania uzyskano



Rysunek 7. Układ mikroskopu tomograficznego w konfiguracji wspólnego skanowania [A7], a) schemat układu, b) zdjęcie zbudowanego układu. L1, L2, T1, T2: dublety achromatyczne, S: płaszczyzna próbki, O1, O2: obiektywy mikroskopowe, IS: przyrządowy układ odwracający, CCD: detektor matrycowy.

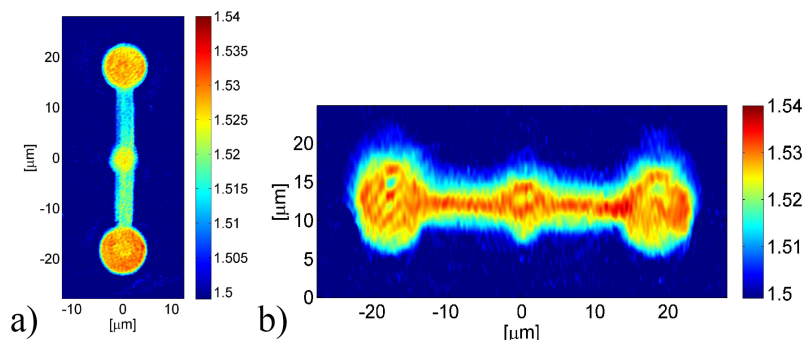
wysoką stabilność okresu prążków nośnych (ok. $\pm 0,5\%$) w hologramach, co zostało zaprezentowane na rysunku 8. Co więcej, wszelkie przypadkowe drgania zwierciadła galwanometrycznego, które w zwykłym układzie tomograficznym MZ [A6] powodowałyby utratę kontrastu prążków w hologramach, w tym układzie występują w obu gałęziach interferometru, a zatem nie powodują tego efektu.



Rysunek 8. Jakość skanowania w układzie zmodyfikowanego mikroskopu tomograficznego [A7], a) procentowa zmiana okresu prążków dla poszczególnych projekcji, b) przykładowe interferogramy dla projekcji zarejestrowanych w spiralnym scenariuszu skanowania.

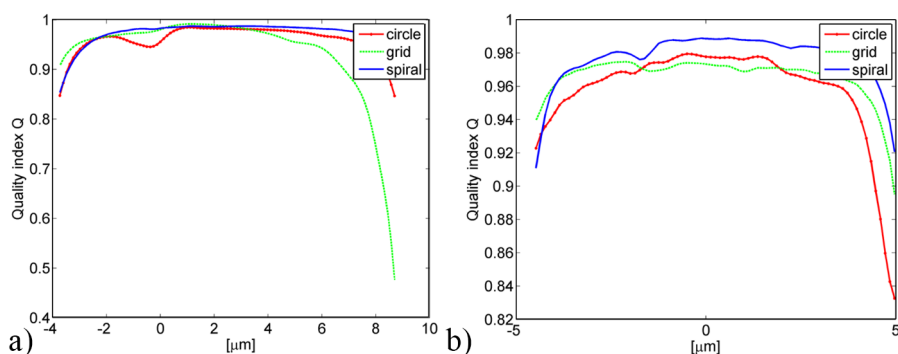
Dzięki tak zaprojektowanemu i zbudowanemu układowi pomiarowemu możliwe jest eksperymentalne sprawdzenie wpływu rodzaju scenariusza skanowania na jakość rekonstrukcji tomograficznej. W wyniku symulacji numerycznych, przeprowadzonych na danych syntetycznych przez Piotra Makowskiego i Wojciecha Krauze, można zauważyć, że

strategia skanowania nie ma istotnego wpływu na jakość rekonstrukcji tomograficznej [A7], [18]. Analizy te nie uwzględniały jednak wpływu aberracji układu i błędów związanych ze skanowaniem, które zwykle występują w eksperymencie i mogą mieć wpływ na wynik rekonstrukcji. Do porównania rekonstrukcji z wykorzystaniem różnych scenariuszy wykorzystano uniwersalny wskaźnik jakości Q [19], który osiąga wartości $Q \in \langle -1, 1 \rangle$, przy czym 0 oznacza brak podobieństwa między dwoma obrazami. Badania przeprowadzone zostały z wykorzystaniem obiektu wykonanego w technologii dwufotonowej polimeryzacji, który przygotowany został w Pracowni Nanostruktur Fotonicznych Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego przez Michała Nawrota. Przykładowe rekonstrukcje zaproponowanego przeze mnie obiektu kalibracyjnego przedstawione zostały na rysunku 9.



Rysunek 9. Rekonstrukcja współczynnika załamania wewnątrz fantomu wykonanego w technice dwufotonowej polimeryzacji [A7], a) przekrój X-Y, b) przekrój Y-Z.

Przetestowane zostały trzy rodzaje scenariuszy oświetlenia: kołowy (*circle*), siatkowy (*grid*) i spiralny (*spiral*) [A7]. Rekonstrukcje dla każdego ze scenariuszy porównane zostały z rekonstrukcją na podstawie połączonych wszystkich trzech serii projekcji (uznanych za referencję ze względu na największą ilość danych). W rezultacie najlepszym scenariuszem pomiarowym okazał się scenariusz spiralny $Q_{y-z} = 0.99$, a najgorszym - scenariusz siatkowy $Q_{y-z} = 0.97$.



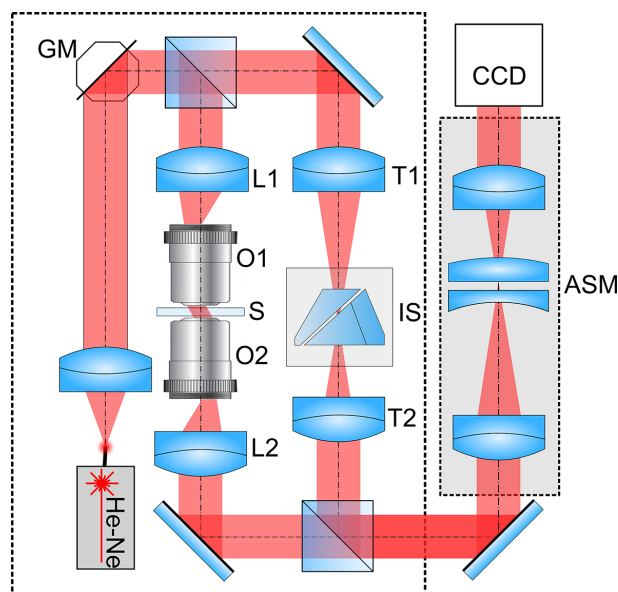
Rysunek 10. Wpływ scenariusza oświetlenia na jakość rekonstrukcji tomograficznej [A7], a) porównanie przekrojów XY, b) porównanie przekrojów YZ.

Uzyskana poprawa jakości rekonstrukcji mimo, iż jest znacząca ze względu na charakterystykę wskaźnika Q (spadek wartości już o 0,05 oznacza istotne różnice w rekonstrukcjach), nie wyklucza jednoznacznie możliwości zastosowania jednego z przetestowanych scenariuszy pomiarowych ($Q > 0,95$), szczególnie dla przekrojów XY. Wskazane jest jednak stosowanie scenariusza oświetlenia próbki, który umożliwia

zarejestrowanie oświetlenia normalnego (scenariusz spiralny), dzięki czemu możliwe jest porównanie uzyskanej rekonstrukcji z rozkładem fazy 2D. Jedynym istotnym ograniczeniem, wynikającym z zaproponowanej modyfikacji układu, jest brak dostępu do informacji o kącie oświetlenia, który w układzie zaprezentowanym na rys. 5 można obliczyć na podstawie prążków nośnych w hologramie. W związku z tym przy rekonstrukcji wykorzystywany jest kąt oświetlenia wyznaczony na podstawie wartości napięcia podanej do sterownika zwierciadła galwanometrycznego. Wpływ ewentualnego błędu wyznaczenia kąta oświetlenia na rekonstrukcję został opisany w rozdziale 5 [A8].

4.2. Poprawa jakości rekonstrukcji poprzez optyczne przeogniskowanie

Kolejnym sposobem na poprawę jakości rekonstrukcji trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania jest rozszerzenie głębi ostrości. Stosowane zazwyczaj obiektywy mikroskopowe o wysokiej aperturze numerycznej znacznie ograniczają głębię ostrości odwzorowanego obiektu. Przybliżenie Rytova, które stosowane jest do obiektów biologicznych, obowiązuje jedynie w pobliżu płaszczyzny ostrości dla projekcji. W przypadku obiektów transmisyjnych o większej grubości przy rekonstrukcji pojawia się problem zmiennej rozdzielczości wzdłuż osi optycznej. W literaturze istnieją prace, które demonstrowały rozwiązanie tego problemu za pomocą propagacji pola optycznego [20] wykonanej dla każdej projekcji, jednak jest to kosztowne obliczeniowo. W związku z tym we współpracy z Wojciechem Krauze zaproponowałem, a następnie zbudowałem moduł rozszerzający funkcjonalność podstawowego tomografu o przeogniskowanie sprzętowe z wykorzystaniem ciekłej soczewki zmiennoogniskowej sterowanej wartością prądu [A9].



Rysunek 11. Układ tomografu ze wspólnym skanowaniem z soczewką sterowaną prądem [A9]. ASM: moduł skanowania osiowego.

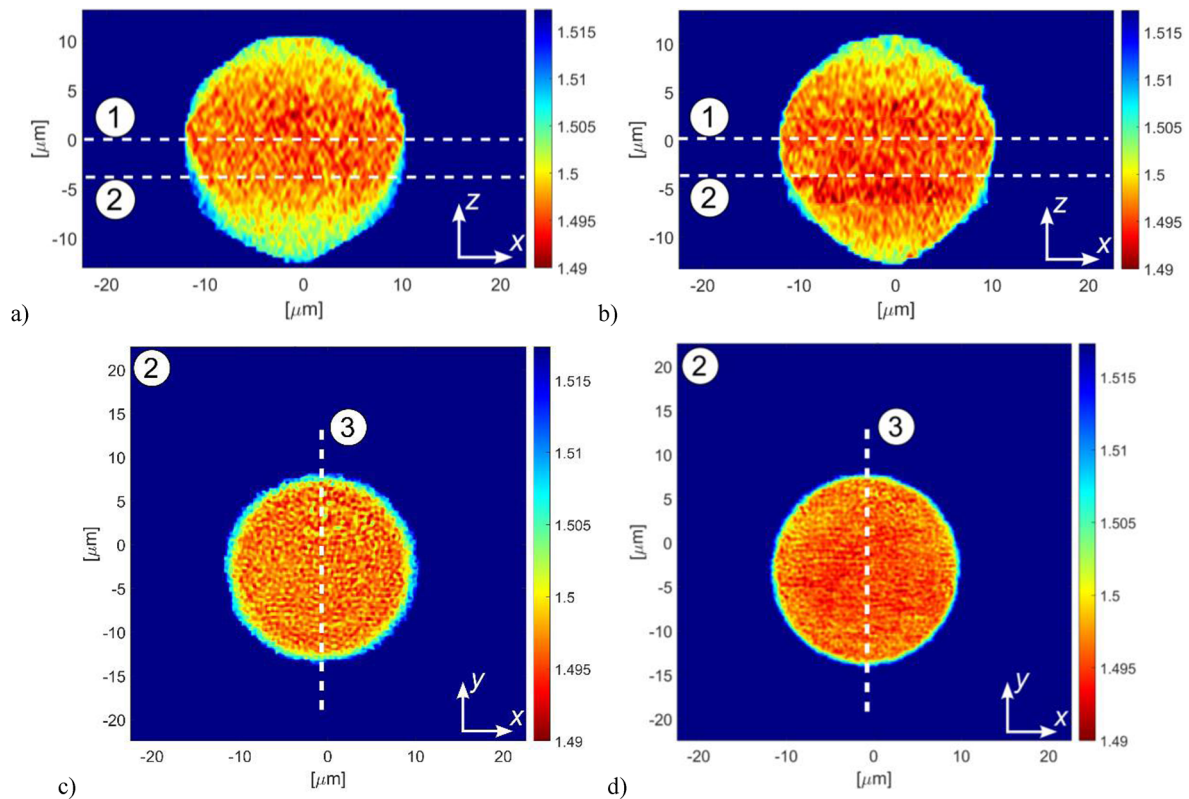
Przedstawiony na rysunku 11 moduł ASM składa się z dwóch dostępnych handlowo dubletów achromatycznych oraz soczewki sterowanej elektrycznie zestawionej z ujemnym singletem. Dublety tworzą układ 4f z zespołem soczewki umieszczonym w płaszczyźnie Fouriera. Podobne rozwiązanie dla przypadku pracy osiowej, stosowane jest w ilościowym obrazowaniu fazy z wykorzystaniem równania transportu intensywności (TIE) [21].

W publikacji [A9] przeanalizowałem wpływ modułu przeogniskowania na jakość frontu falowego układu w płaszczyźnie kamery. Obiecujące wyniki symulacji układu dostarczyły mi informacji na temat optymalnego wyjustowania układu i pozwoliły rozpocząć pracę nad częścią eksperymentalną, związaną z weryfikacją poprawy jakości rekonstrukcji tomograficznej złożonej z co najmniej trzech rekonstrukcji przy różnych wartościach przeogniskowania. Maksymalny dostępny zakres przeogniskowania z_c w układzie opisany jest wzorem 1:

$$z_c = \frac{D_{max} - D_{min}}{M^2} f_{T4}^2, \quad (1)$$

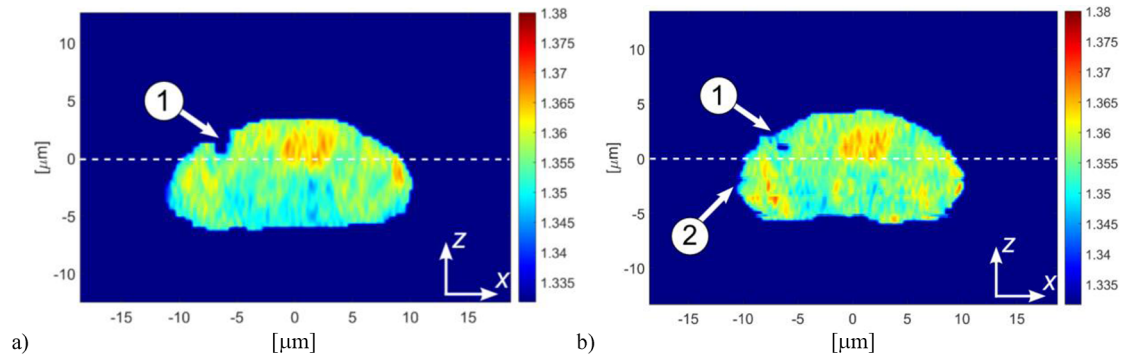
gdzie $D_{max} - D_{min}$ oznacza zakres dioptrii zespołu soczewki ciekłej z soczewką ujemną, M oznacza powiększenie układu tomografu (obiektywu mikroskopowego i soczewki tubusowej), a f_{T4} - ogniskową ostatniej soczewki modułu skanowania przed detektorem.

Ze względu na fakt, iż dane są łączone i dopasowane w dziedzinie rekonstrukcji, nie ma konieczności ustawienia dokładnej wartości prądu na soczewce i zmiany płaszczyzny ostrości z wysoką dokładnością, co stanowi zaletę metody. Poprawa jakości rekonstrukcji zademonstrowana została poprzez pomiar mikrokulki o średnicy $23,5\mu\text{m}$, wykonanej z PMMA (rys. 12). Jest to obiekt o stałym rozkładzie współczynnika załamania, który w wyniku wspomnianych problemów rekonstruowany jest w przypadku pojedynczego pomiaru tomograficznego z błędami, widocznymi na rysunkach 12a i 12c w postaci obniżenia wartości współczynnika załamania w pobliżu krawędzi obiektu w obszarze poza płaszczyzną ostrości (oznaczoną etykietą "1").



Rysunek 12. Poprawa jakości rekonstrukcji tomograficznej na przykładzie kulki wykonanej z PMMA [A9], przekroje rekonstrukcji współczynnika załamania, a) i c): dla pojedynczej płaszczyzny ostrości; b) i d): dla rozszerzonej optycznie głębi ostrości.

Dla porównania przedstawiłem wynik rekonstrukcji obliczony dla danych zarejestrowanych dla $\pm 4\mu m$ przeogniskowania w płaszczyźnie próbki, co stanowi 30% średnicy obiektu, jednak pozwala zaobserwować zasadę pracy zaprojektowanego modułu i efektywność jego działania. Zwiększenie dostępnego zakresu przeogniskowania wymaga zmiany parametrów układu optycznego, przy czym zgodnie z równaniem 1 najskuteczniejszym rozwiązaniem jest zmiana ogniskowej obiektywu mikroskopowego na dłuższą (zmiana powiększenia M).



Rysunek 13. Przekroje X-Z przez rekonstrukcję trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania wewnątrz komórki [A9], a) rekonstrukcja z pojedynczej płaszczyzny ostrości, b) rekonstrukcja na podstawie 6 płaszczyzn.

Następnie wykonałem pomiar obiektu biologicznego - żywej komórki fibroblastu mysiego z linii WEHI 164 przy temperaturze otoczenia $28^{\circ}C$ (rysunek 13) [A9]. Pomiar przeprowadziłem z wykorzystaniem scenariusza spiralnego [A7]. Na rysunku 13a zauważyć można oznaczone etykietą "1" zagłębienie w komórce, które nie jest artefaktem pomiarowym, natomiast jest trudne do interpretacji z biologicznego punktu widzenia. W przypadku metody z optycznym przeogniskowaniem (rys. 13b) ta sama cecha obiektu może zostać zidentyfikowana jako struktura o współczynniku załamania otaczającej obiekt pożywki, jednak znajdująca się wewnątrz komórki. Przyspieszenie czasu pomiaru możliwe jest poprzez zmniejszenie liczby projekcji dla każdego przeogniskowania, jednak konieczne jest przeprowadzenie dalszych analiz i rozwój algorytmu rekonstrukcji w tym kierunku.

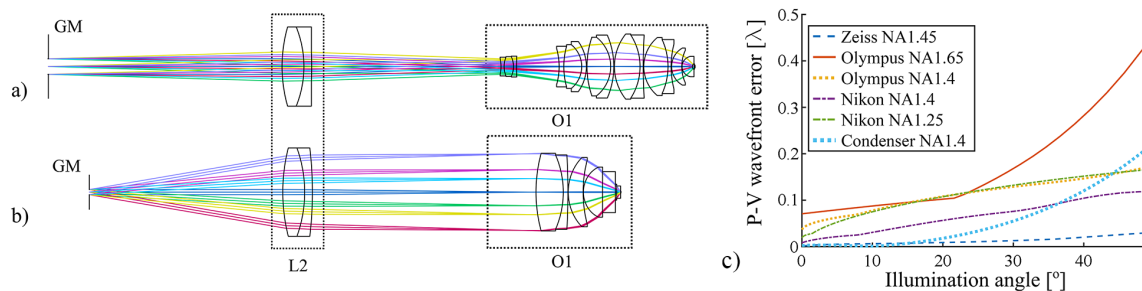
5. Analiza błędów związanych z układem optycznym

Na jakość rekonstrukcji tomograficznej wpływa szereg czynników, które podzielić można na dwie główne grupy - związane z układem eksperymentalnym oraz związane z przetwarzaniem danych, algorytmem rekonstrukcji i błędami numerycznymi. Błędy układu pomiarowego można korygować w znacznym stopniu numerycznie [A3], [A6]. Z analizy literatury wynika, że większość prac prowadzonych jest w kierunku zwiększenia rozdzielczości ograniczonej przez układ odwzorowujący poprzez wykonanie operacji dekonwolucji [15], [22]. Podejście to może jednak prowadzić do pojawienia się w rekonstrukcji artefaktów utrudniających interpretację wyniku [22].

Istotnym sposobem poprawy jakości rekonstrukcji jest wyeliminowanie błędów, związanych z systemem pomiarowym poprzez odpowiednią konstrukcję układu optycznego. Kluczowe z punktu widzenia rekonstrukcji pomiaru tomograficznego jest aby rozproszenie na obiekcie mierzonym pochodziło od fali płaskiej - zgodnie z założeniem teorii tomografii dyfrakcyjnej (rozdział ??), a oprócz tego rozmieszczenie projekcji w dziedzinie częstości przestrzennych w procesie rekonstrukcji powinno odpowiadać ściśle kierunkom oświetlenia

w eksperymencie (poprawny kierunek wektora k dla każdej projekcji). W związku z tym ważnym aspektem prowadzonych przeze mnie prac jest analiza układu optycznego i skanującego tomografu holograficznego w celu ograniczenia błędów związanych z generacją projekcji i wprowadzanych przez układ oświetlający. Układ odwzorowujący próbkę również ma istotny wpływ na wynik pomiaru, jednak podstawowym założeniem prac zarówno w przypadku obrotu próbki, jak i skanowania oświetlenia, było dokonanie w pierwszym etapie numerycznej korekcji aberracji związanych z układem odwzorowującym. Oznacza to jedynie konieczność zarejestrowania hologramu referencyjnego, który nie zawiera obiektu badanego, a następnie odjęcia fazy referencyjnej od fazy obiektu mierzonego. Front falowy, który oświetla próbkę, będzie jednak w tym przypadku obarczony aberracjami, których nie ma możliwości w prosty sposób usunąć. W związku z tym próbka nie zostanie oświetlona falą płaską, lecz falą zaberowaną - niezgodnie z teorią tomografii. W wyniku tego dochodzi do złożonego rozproszenia na obiekcie, które powoduje błędy rekonstrukcji.

W pracy [A8] przeanalizowałem dwie grupy układów optycznych, które mogą zostać wykorzystane do oświetlenia próbki w tomografii z ograniczonym kątem projekcji. Typowo wykorzystywane są obiektywy mikroskopowe (rys. 14a), bądź kondensory o wysokiej aperturze numerycznej (rys. 14b). Różnice w budowie obu typów układów sprowadzają się do mniejszego powiększenia kątownego układów kondensatorów przy większej średnicy elementów optycznych, ale mniejszej liczbie soczewek. Maksymalna odchyłka płaskości frontu falowego

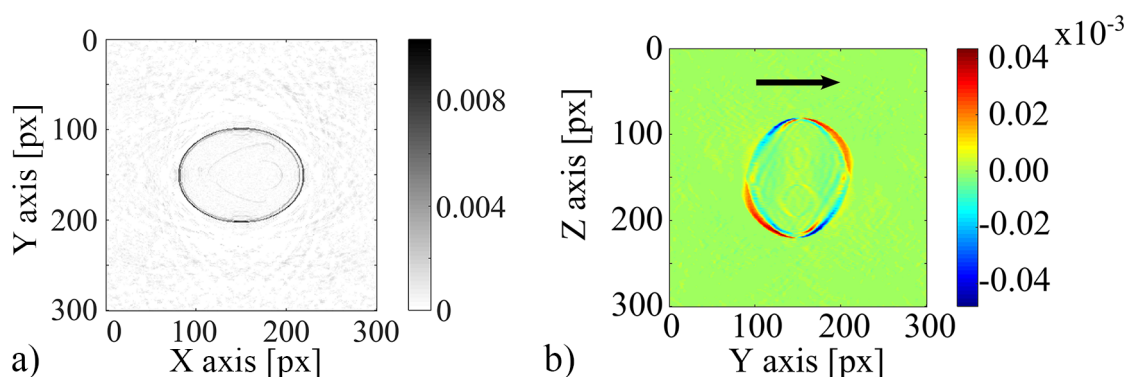


Rysunek 14. Układy oświetlające w tomografii holograficznej [A8], a) z wykorzystaniem obiektywu mikroskopowego, b) z wykorzystaniem kondensora, c) jakość frontu falowego w płaszczyźnie próbki dla obu klas układów optycznych.

wynosi, dla większości przeanalizowanych układów optycznych, mniej niż $\lambda/2$ przy długości fali $\lambda = 632,8nm$. W rzeczywistym układzie należy uwzględnić dodatkowo odchyłkę płaskości zwierciadeł galwanometrycznych o wartości ok. 1λ .

Symulacje wpływu aberracji na jakość rekonstrukcji przeprowadziłem dla dwóch klas obiektów pomiarowych: obiektów przedziałami stałych i z gradientowym rozkładem współczynnika załamania. Stwierdziłem, że maksymalny błąd wartości współczynnika załamania sięga $|\delta n| = 0.009$ dla drugiej grupy, a nawet $|\delta n| = 0.025$ dla pierwszego typu obiektów. Błędy rekonstrukcji zlokalizowane są na krawędziach obiektów mierzonych. Najlepszą metodą poprawy jakości rekonstrukcji w tym przypadku jest zastosowanie ciekłokrystalicznego przestrzennego modulatora światła (SLM) i aktywna modyfikacja (z pomocą SLM) frontu falowego wiązki oświetlającej na podstawie rozkładu fazy zarejestrowanego w płaszczyźnie sprzężonej z płaszczyzną próbki [A5]. Aberracje układu oświetlającego związane ze zwierciadłem galwanometrycznym mogą zostać ograniczone do wartości 0.5λ przez zastosowanie kondensora zamiast obiektywu mikroskopowego, dzięki wykorzystaniu znacznie mniejszej średnicy zwierciadła. Zastosowanie modulatora do aktywnej

korekcji frontu falowego zapewnia jednak zmniejszenie aberracji wiązki oświetlającej do wartości ograniczonej jedynie przez jakość układu odwzorowującego.

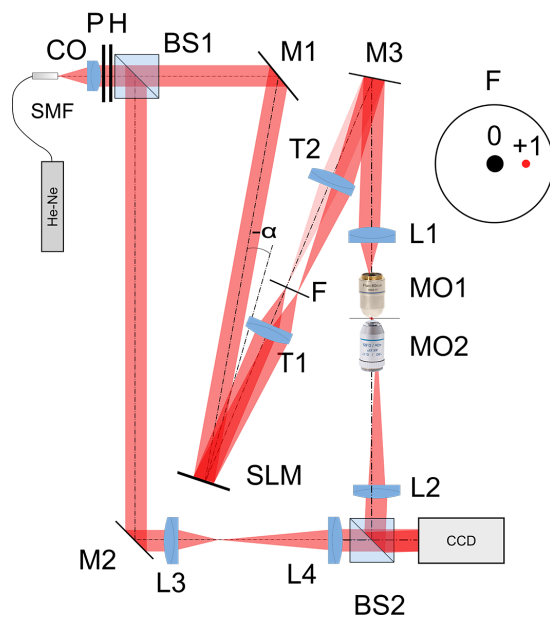


Rysunek 15. Wpływ układu oświetlającego na błędy rekonstrukcji trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania obiektu obszarami stałego [A8], a) przekrój X-Y przez macierz błędu rekonstrukcji - wpływ przypadkowych niedokładności skanowania mniejszych niż $0,5^\circ$, b) przekrój Z-Y przez macierz błędu rekonstrukcji, pochylenie scenariusza oświetlenia o $2,5^\circ$.

Następnym etapem przeprowadzonej analizy było wyznaczenie wpływu błędów skanowania na jakość rekonstrukcji tomograficznej, które są rezultatem różnic między zadany, a faktycznym kątem oświetlenia próbki. Błędy wynikają z trzech głównych przyczyn: powtarzalności położenia kąтового zwierciadeł galwanometrycznych, wyjustowania elementów układu optycznego i niewłaściwego powiększenia. Już dla błędu położenia $0,5^\circ$, zarówno dla obiektów przedziałami stałych, jak i gradientowych, w wyniku symulacji stwierdziłem obecność błędu rozkładu współczynnika załamania $|\delta n| = 0.01$ (rys. 15a). Błąd rekonstrukcji zlokalizowany jest głównie na brzegach obiektu badanego, przy czym współczynnik Q [19], [A8], zastosowany do oceny jakości rekonstrukcji, pozostaje dla tej wartości błędu równy 1 w całej objętości obiektu badanego.

6. Aktywne oświetlenie w układzie tomografu holograficznego

Korekcja wszystkich źródeł błędów układu eksperymentalnego, przedstawionych w rozdziale 5, możliwa jest dzięki wyeliminowaniu ruchomych elementów oraz wprowadzeniu aktywnej korekcji aberracji przed obiektem mierzonym. Zbudowany przeze mnie układ pomiarowy przedstawiony został na rys. 16. Tomograf jest modyfikacją układu MZ [A4], [A6], w którym oprócz korekcji frontu falowego, funkcję zwierciadła pełni ciekłokrystaliczny (*liquid crystal on silicon*) fazowy przestrzenny modulator światła (LCoS SLM), pracujący w odbiciu. Zaproponowane przeze mnie rozwiązanie zostało zaprezentowane na konferencji Photonics West 2015 [23] i było pierwszym, w którym zmiana kierunku oświetlenia w tomografii odbywała się bez udziału elementów mechanicznych. Taki sposób skanowania rozwiązuje problem pojawiających się błędów położenia zwierciadeł galwanometrycznych, opisanych w publikacji [A8]. W układzie możliwe jest zastosowanie zarówno scenariusza oświetlenia w płaszczyźnie (liniowego, rys. 4a), jak i na stożku (kołowego, rys. 4b). Zastosowanie dodatkowych scenariuszy bez wykorzystania ruchomych elementów możliwe jest tylko poprzez implementację SLM w układzie wspólnego skanowania [A7], zaprezentowanym w rozdziale 4.1. Zmiana komponentu skanującego na SLM [A5] (rys. 16) ułatwia dodatkowo wyjustowanie oświetlenia w układzie tomografu, ponieważ skanowanie realizowane jest symetrycznie



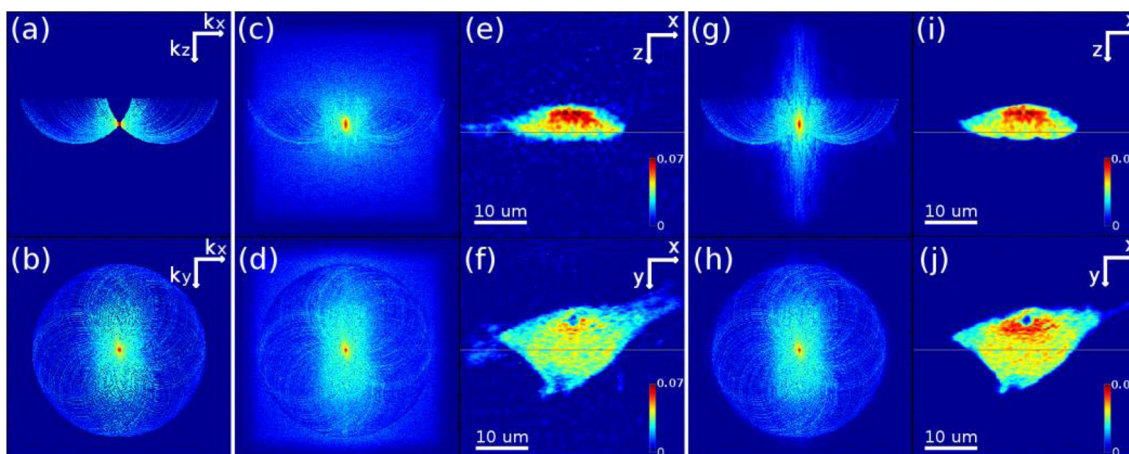
Rysunek 16. Schemat układu tomografu holograficznego z aktywnym oświetleniem [A5]. SMF: światłowód jednomodowy, CO: kolimator, BS: kostka światłdzieląca (50:50), T1, T2, L1, L2, L3, L4: dublety achromatyczne, M: zwierciadło płaskie, F: filtr częstości przestrzennych, MO: obiektyw mikroskopowy, CCD: detektor matrycowy.

względem normalnej do płaszczyzny modulatora. Oznacza to możliwość wykorzystania odbicia od SLM w celu ustawienia oświetlenia osiowego próbki badanej, w rezultacie czego usunąłem błędy związane z pochyleniem scenariusza oświetlenia (rys. 15b) [A8].

Korekcja frontu falowego wiązki oświetlającej odbywa się na podstawie pomiaru frontu falowego w płaszczyźnie detektora, przez co wiązka w płaszczyźnie próbki nie jest ściśle płaska, ale jest obarczona takimi aberracjami, jakie wynikają z jakości układu L2-MO2 na rysunku 16. Oznacza to, że przy zastosowaniu wysokiej jakości układu odwzorowującego próbkę (pracującego w sposób dyfrakcyjnie ograniczony), niskiej jakości układ oświetlający może zostać w pełni skorygowany. Oprócz korzyści, związanych z poprawą jakości rekonstrukcji, dodatkowym atutem zastosowania aktywnego skanowania jest możliwość akwizycji więcej niż jednej projekcji dla pojedynczego hologramu poprzez zastosowanie oświetlenia strukturalnego. Rozwiązania te zostały zaimplementowane przez inne zespoły naukowe zarówno dla matrycy mikrozwierciadeł (DMD) [24], jak i modulatora fazowego [25].

Dane pomiarowe zarejestrowane w zbudowanym układzie pomiarowym zostały wykorzystane do rozwoju algorytmów przeznaczonych do pracy z ograniczonym kątem projekcji [A10] i badania obiektów biologicznych (rysunek 17).

Wadą zbudowanego układu jest konieczność odwzorowania modulatora w płaszczyźnie obiektu, usunięcia dodatkowych rzędów dyfrakcyjnych wynikających z okresowej struktury modulatora, a także konieczność usuwania rzędu zerowego poprzez zastosowanie filtra F w płaszczyźnie Fouriera układu 4f (T1-T2 na rysunku 16). Możliwe jest jednak zastosowanie metody dokładnej charakteryzacji modulatora i usunięcie rzędu zerowego numerycznie [26], co pozwoli uprościć układ pomiarowy.



Rysunek 17. Przekrój przez rekonstrukcję trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania komórki C2C12 (mysiego mioblastu) [A10]; a)-d) oraz g), h): widmo częstości przestrzennych rekonstrukcji, e), f) oraz i), j): rozkład względnego współczynnika załamania dla obiektu badanego odpowiednio bez oraz z maskowaniem obiektu w trakcie rekonstrukcji.

7. Podsumowanie

Rozprawa składa się z ośmiu publikacji w czasopismach z listy JCR i dwóch publikacji w materiałach konferencyjnych. Prace prowadzone przeze mnie w trakcie realizacji doktoratu ukierunkowane były na poprawę jakości rekonstrukcji tomograficznej poprzez modyfikację układów pomiarowych w zakresie architektury systemu oraz sposobu rejestracji projekcji. Cel pracy w zakresie tomografii z obrotem próbki osiągnąłem poprzez rozwiązania zaprezentowane w publikacjach [A1] i [A2], gdzie z wykorzystaniem uproszczonej konfiguracji mikroskopu holograficznego potwierdziłem możliwość wykorzystania obrotu próbki do przyżyciowych badań obiektów biologicznych. Dodatkowo, dzięki zarejestrowanym danym [A1] i przygotowaniu fantomu [A3], możliwe było przeprowadzenie prac nad algorytmami korekcji danych w projekcie 3D Phase.

W zakresie tomografii w ograniczonym kącie projekcji, cel pracy osiągnąłem poprzez przeprowadzenie systematycznej analizy błędów związanych z układem optycznym i ich występowania w typowych systemach pomiarowych [A8]. Zaproponowałem układ pomiarowy, który umożliwił korekcję wszystkich błędów związanych z oświetleniem [A5]. Dzięki zaprojektowaniu nowego typu architektury interferometru Macha-Zehndera ze wspólnym skanowaniem [A7], możliwa była weryfikacja najkorzystniejszego rozkładu kątów oświetlenia próbki badanej. Analiza wykonana została na nowym typie obiektu testowego - fantomie wykonanym w technologii dwufotonowej polimeryzacji, który ma szansę w przyszłości stać się standardowym obiektem kalibracyjnym. Ostatnią funkcjonalnością poprawiającą jakość rekonstrukcji tomograficznej był zbudowany przeze mnie moduł skanowania osiowego [A9], dzięki któremu znacznie zwiększona została głębia ostrości.

Najważniejsze rezultaty moich badań to:

- Opracowanie metodyki i przeprowadzenie systematycznej analizy wpływu konstrukcji układu optycznego na jakość rekonstrukcji tomograficznej, ze szczególnym uwzględnieniem błędów układu oświetlającego [A8];
- Analiza wpływu błędów skanowania (niewłaściwego kierunku wektora k projekcji) na jakość rekonstrukcji tomograficznej [A8];

- Zaproponowanie i budowa aktywnego układu skanowania, który zmienia kierunek oświetlenia bez użycia elementów mechanicznych oraz pozwala korygować zidentyfikowane źródła błędów systematycznych [A5];
- Opracowanie koncepcji układu realizującego dowolny scenariusz oświetlenia z wykorzystaniem tylko jednego zespołu zwierciadeł galwanometrycznych i zapewniającego stałość okresu i orientacji prążków nośnych [A7];
- Badania żywych komórek z wykorzystaniem udoskonalonej tomografii z obrotem próbki [A1] oraz pozyskanie danych referencyjnych do rozwoju algorytmów [A2];
- Wstępne prace nad fantomami kalibracyjnymi dedykowanymi zarówno do tomografii z obrotem próbki, jak i ze skanowaniem oświetlenia [A3], [A7];
- Opracowanie koncepcji pomiaru zwiększającego sprzętowo głębię ostrości rekonstrukcji oraz budowa modułu optomechanicznego, umożliwiającego jej realizację [A9];
- Pomiar 3D rozkładu współczynnika załamania żywych komórek z wykorzystaniem tomografii ze zmianą kierunku oświetlenia [A6], [A9].

8. Przyszłe prace

W trakcie pracy nad rozprawą zidentyfikowałem szereg dalszych kierunków rozwoju:

- **Pełna analiza metrologiczna układów tomograficznych w oparciu o fantomy kalibracyjne:** dotychczasowe wstępne prace nad fantomami do trójwymiarowych technik fazowych nie pozwalały na przeprowadzenie pełnej analizy metrologicznej ze względu na zbyt małą zbieżność fantomu z modelem numerycznym (stałość i kontrolowana zmienność współczynnika załamania) i typowymi obiektami pomiarowymi - komórkami (gradientowy rozkład współczynnika załamania). Wobec braku alternatywnych obiektów wzorcowych konieczny jest dalszy rozwój tego typu próbek;
- **Wprowadzenie modułu przeogniskowania optycznego do układu z aktywną korekcją frontu falowego:** zaproponowane przez mnie w pracy rozwiązanie testowane było z układem podstawowym - wyposażonym w zwierciadła galwanometryczne. W związku z tym w celu osiągnięcia ostatecznych rezultatów konieczna jest integracja obu rozwiązań;
- **Opracowanie układu tomografu do badań zjawisk dynamicznych:** z równoczesną lub quasi-równoczesną rejestracją projekcji;
- **Systematyczne prace w zakresie interpretacji wyników pomiarów:** przy współpracy ze środowiskiem medycznym konieczne jest znalezienie odpowiednich korelacji między 3D rozkładem współczynnika załamania, a tradycyjnymi metodami mikroskopii i mikroskopii fluorescencyjnej.

9. Wykaz publikacji stanowiących przedmiot rozprawy

Nr	Publikacja	Udział %	Impact factor	Punkty MNiSW	Cyt. (WoS)
A1	A. Kuś, M. Dudek, B. Kemper i in., "Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures.", <i>Journal of biomedical optics</i> , t. 19, nr. 4, s. 46 009, 2014, ISSN: 1560-2281	60	2,859	35	33
A2	M. Kujawińska, W. Krauze, A. Kuś i in., "Problems and Solutions in 3-D Analysis of Phase Biological Objects by Optical Diffraction Tomography", <i>International Journal of Optomechatronics</i> , t. 8, nr. 4, s. 357–372, 2014, ISSN: 1559-9612	20	0,9	15	5
A3	J. Kostencka, T. Kozacki, A. Kuś i in., "Accurate approach to capillary-supported optical diffraction tomography", <i>Optics Express</i> , t. 23, nr. 6, s. 7908–7923, 2015, ISSN: 10944087	25	3,148	40	10
A4	W. Krauze, A. Kuś i M. Kujawińska, "Limited-angle hybrid optical diffraction tomography system with total-variation-minimization-based reconstruction", <i>Optical Engineering</i> , t. 54, s. 054 104, 2015, ISSN: 0091-3286	45	0,984	20	4
A5	A. Kuś, W. Krauze i M. Kujawińska, "Active limited-angle tomographic phase microscope", <i>Journal of Biomedical Optics</i> , t. 20, nr. 11, s. 111 216, 2015, ISSN: 1083-3668	65	2,559	35	9
A6	J. Kostencka, T. Kozacki, A. Kuś i in., "Holographic tomography with scanning of illumination: space-domain reconstruction for spatially invariant accuracy", <i>Biomedical optics express</i> , t. 7, nr. 10, s. 4086–4100, 2016	20	3,337	35	5
A7	W. Krauze, P. Makowski, M. Kujawińska i in., "Generalized total variation iterative constraint strategy in limited angle optical diffraction tomography", <i>Optics Express</i> , t. 24, nr. 5, s. 4924–4936, 2016	10	3,148	40	8
A8	A. Kuś, "Illumination-related errors in limited-angle optical diffraction tomography", <i>Applied Optics</i> , t. w druku, 2017	100	1,65	30	0

A9	A. Kuś , P. Makowski i M. Kujawińska, "Advances in design and testing of limited angle optical diffraction tomography system for biological applications", <i>Proc. of SPIE</i> , t. 9718, s. 1–9, 2016	70	-	15	0
A10	A. Kuś , W. Krauze i M. Kujawińska, "Focus-tunable lens in limited-angle holographic tomography", <i>Proc. of SPIE</i> , t. 10070, s. 1–9, 2017	70	-	15	0

Bibliografia

- [A1] **A. Kuś**, M. Dudek, B. Kemper, M. Kujawińska i A. Vollmer, “Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures.”, *Journal of biomedical optics*, t. 19, nr. 4, s. 46 009, 2014, ISSN: 1560-2281.
- [A2] M. Kujawińska, W. Krauze, **A. Kuś**, J. Kostencka, T. Kozacki, B. Kemper i M. Dudek, “Problems and Solutions in 3-D Analysis of Phase Biological Objects by Optical Diffraction Tomography”, *International Journal of Optomechatronics*, t. 8, nr. 4, s. 357–372, 2014, ISSN: 1559-9612.
- [A3] J. Kostencka, T. Kozacki, **A. Kuś** i M. Kujawińska, “Accurate approach to capillary-supported optical diffraction tomography”, *Optics Express*, t. 23, nr. 6, s. 7908–7923, 2015, ISSN: 10944087.
- [A4] W. Krauze, **A. Kuś** i M. Kujawińska, “Limited-angle hybrid optical diffraction tomography system with total-variation-minimization-based reconstruction”, *Optical Engineering*, t. 54, s. 054 104, 2015, ISSN: 0091-3286.
- [A5] **A. Kuś**, W. Krauze i M. Kujawińska, “Active limited-angle tomographic phase microscope”, *Journal of Biomedical Optics*, t. 20, nr. 11, s. 111 216, 2015, ISSN: 1083-3668.
- [A6] J. Kostencka, T. Kozacki, **A. Kuś**, B. Kemper i M. Kujawińska, “Holographic tomography with scanning of illumination: space-domain reconstruction for spatially invariant accuracy”, *Biomedical optics express*, t. 7, nr. 10, s. 4086–4100, 2016.
- [A7] **A. Kuś**, P. Makowski i M. Kujawińska, “Advances in design and testing of limited angle optical diffraction tomography system for biological applications”, *Proc. of SPIE*, t. 9718, s. 1–9, 2016.
- [A8] **A. Kuś**, “Illumination-related errors in limited-angle optical diffraction tomography”, *Applied Optics*, t. w druku, 2017.
- [A9] **A. Kuś**, W. Krauze i M. Kujawińska, “Focus-tunable lens in limited-angle holographic tomography”, *Proc. of SPIE*, t. 10070, s. 1–9, 2017.
- [A10] W. Krauze, P. Makowski, M. Kujawińska i **A. Kuś**, “Generalized total variation iterative constraint strategy in limited angle optical diffraction tomography”, *Optics Express*, t. 24, nr. 5, s. 4924–4936, 2016.
- [1] D. D. Allen, R. Caviedes, A. M. Cardenas, T. Shimahara, J. Segura-Aguilar i A. Caviedes, Pablo, “Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, t. 31, nr. 2, s. 757–768, 2005.
- [2] A. C. Kak i M. Slaney, *Principles of computerized tomographic imaging*. Philadelphia: Society for Industrial i Applied Mathematics, 2001.
- [3] Z. Wang, K. Tangella, A. Balla i G. Popescu, “Tissue refractive index as marker of disease”, *Journal of Biomedical Optics*, t. 16, nr. 11, s. 116 017, 2011.
- [4] W. M. Lewis, “Surface/Volume Ratio: Implications for Phytoplankton Morphology”, *Science*, t. 192, nr. 4242, s. 885–887, 1976.
- [5] Y. Sung, W. Choi, N. Lue, R. R. Dasari i Z. Yaqoob, “Stain-free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy.”, *PLoS ONE*, t. 7, nr. 11, e49502, 2012.
- [6] D. Chen, H. Li, Q. Wang, P. Zhang i Y. Zhu, “Computed tomography for high-speed rotation object”, *Optics express*, t. 23, nr. 10, s. 13 423–13 442, 2015.

- [7] J. Hsieh, *Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances*, ser. SPIE Press Monograph Series. SPIE, 2015.
- [8] M. Fauver, E. Seibel, J. R. Rahn, M. Meyer, F. Patten, T. Neumann i A. Nelson, “Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography.”, *Optics express*, t. 13, nr. 11, s. 4210–4223, 2005.
- [9] F. Charrière, N. Pavillon, T. Colomb, C. Depeursinge, T. J. Heger, E. a. D. Mitchell, P. Marquet i B. Rappaz, “Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba.”, *Optics express*, t. 14, nr. 16, s. 7005–7013, 2006.
- [10] F. Charrière, A. Marian, F. Montfort, J. Kuehn, T. Colomb, E. Cucho, P. Marquet i C. Depeursinge, “Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy.”, *Optics letters*, t. 31, nr. 2, s. 178–80, 2006.
- [11] G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari i M. S. Feld, “Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics”, *Opt. Lett.*, t. 29, nr. 21, s. 2503–2505, 2004.
- [12] W. Krauze i M. Kujawinska, “Limited-angle tomography applied to biological objects”, *Photonics Letters of Poland*, t. 5, nr. 4, s. 149–151, 2013.
- [13] V. Lauer, “New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope.”, *Journal of microscopy*, t. 205, nr. 2, s. 165–176, 2002.
- [14] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari i M. S. Feld, “Tomographic phase microscopy.”, *Nature methods*, t. 4, nr. 9, s. 717–719, 2007.
- [15] Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet i C. Depeursinge, “Marker-free phase nanoscopy”, *Nature Photonics*, t. 7, s. 113–117, 2013.
- [16] C. Fang-Yen, W. Choi, Y. Sung, C. J. Holbrow, R. R. Dasari i M. S. Feld, “Video-rate tomographic phase microscopy.”, *Journal of biomedical optics*, t. 16, nr. 1, s. 011 005, 2011.
- [17] Y. Kim, H. Shim, K. Kim, H. Park, S. Jang i Y. Park, “Profiling individual human red blood cells using common-path diffraction optical tomography”, *Scientific Reports*, t. 4, s. 6659, 2014.
- [18] W. Krauze, P. Makowski i M. Kujawińska, “Total variation iterative constraint algorithm for limited-angle tomographic reconstruction of non-piecewise-constant structures”, *Proc. of SPIE*, t. 9526, 95260Y, 2015.
- [19] Z. Wang i A. C. Bovik, “A Universal Image Quality Index”, *IEEE Signal Processing Letters*, t. 9, nr. 3, s. 81–84, 2002.
- [20] W. Choi, C. Fang-yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari i M. S. Feld, “Extended depth of focus in tomographic phase microscopy using a propagation algorithm”, *Optics Letters*, t. 33, nr. 2, s. 171–173, 2008.
- [21] C. Zuo, Q. Chen, W. Qu i A. Asundi, “High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens”, *Optics express*, t. 21, nr. 20, s. 2586–2589, 2013.
- [22] Y. Cotte, M. F. Toy i N. Pavillon, “Microscopy image resolution improvement by deconvolution of complex fields”, *Optics express*, t. 18, nr. 19, s. 19 462–19 478, 2010.
- [23] A. Kuś, W. Krauze i M. Kujawińska, “Limited-angle, holographic tomography with optically controlled projection generation.”, *Proc. of SPIE*, t. 9330, s. 933 007, 2015.

- [24] K. Lee, K. Kim, G. Kim, S. Shin i Y. Park, “Time-multiplexed structured illumination using a DMD for optical diffraction tomography”, *Optics letters*, t. 42, nr. 5, s. 999–1002, 2017.
- [25] S. Chowdhury, W. J. Eldridge, A. Wax i J. A. Izatt, “Structured illumination multimodal 3D- resolved quantitative phase and fluorescence sub-diffraction microscopy”, *Biomedical optics express*, t. 8, nr. 5, s. 2496–2518, 2017.
- [26] E. Ronzitti, M. Guillon, V. D. Sars, V. Emiliani, U. P. Descartes, S. P. Cité i S. Pères, “LCoS nematic SLM characterization and modeling for diffraction efficiency optimization , zero and ghost orders suppression”, t. 20, nr. 16, s. 17 843–17 855, 2012.
- [27] B. Kemper, D. Carl, J. Schneidenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke i G. von Bally, “Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy.”, *Journal of biomedical optics*, t. 11, nr. 3, s. 34 005, 2006.
- [28] M. Pluta, *Mikroskopia optyczna*. PWN, Warszawa, 1982.
- [29] Z. Wang, L. Millet, M. Mir, H. Ding, S. Unarunotai, J. Rogers, M. U. Gillette i G. Popescu, “Spatial light interference microscopy (SLIM)”, *Optics express*, t. 19, nr. 2, s. 1016–1026, 2011.
- [30] K. Kim, H. Yoon, M. Diez-Silva, M. Dao, R. R. Dasari i Y. Park, “High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography.”, *Journal of biomedical optics*, t. 19, nr. 1, s. 011 005, 2014.
- [31] E. Wolf, “Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data”, *Optics Communications*, t. 1, nr. 4, s. 153–156, 1969.
- [32] R. Dandliker i K. Weiss, “Reconstruction of the three-dimensional refractive index from scattered waves”, *Optics Communications*, t. 1, nr. 7, s. 323–328, 1970.
- [33] Y. Sung, W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari i M. S. Feld, “Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging”, *Optics Express*, t. 17, nr. 1, s. 266–277, 2009.
- [34] C. J. R. Sheppard i S. S. Kou, “3D Imaging with Holographic Tomography”, *AIP Conference Proceedings*, t. 1236, nr. 1, s. 65–69, 2010.
- [35] M. Habaza, B. Gilboa, Y. Roichman i N. T. Shaked, “Tomographic phase microscopy with 180° rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers”, *Optics letters*, t. 40, nr. 8, s. 1881–1884, 2015.
- [36] B. Simon, M. Debailleul, M. Houkal, C. Ecoffet, J. Bailleul, J. Lambert, A. Spangenberg, H. Liu, O. Soppera i O. Haeberlé, “Tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution”, *Optica*, t. 4, nr. 4, s. 460–463, 2017.
- [37] P. Hosseini, Y. Sung, Y. Choi, N. Lue, Z. Yaqoob i P. So, “Scanning color optical tomography (SCOT)”, *Optics Express*, t. 23, nr. 15, s. 19 752–19 762, 2015.
- [38] N. Leith i J. Upatnieks, “Reconstructed Wavefronts and Communication Theory”, *Journal of Optical Society of America*, t. 52, nr. 10, s. 1123–1130, 1962.
- [39] M. Takeda, H. Ina i S. Kobayashi, “Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry”, *Journal of the Optical Society of America*, t. 72, nr. 1, s. 156, 1982.