

39. Цифровой голографический микроскоп для записи структур сетчатки глаза человека в живую

С. Захаровас^{1,2}, М. Сухеймат¹, Д. А. Атчисон¹, Э. Дж. Ламберт³

¹ Квинслендский Технологический Университет, Брисбен, Квинсленд, Австралия

² Университет Де Монфорт, Лестер, Великобритания

³ Университет Нового Южного Уэллса, Канберра, Австралия

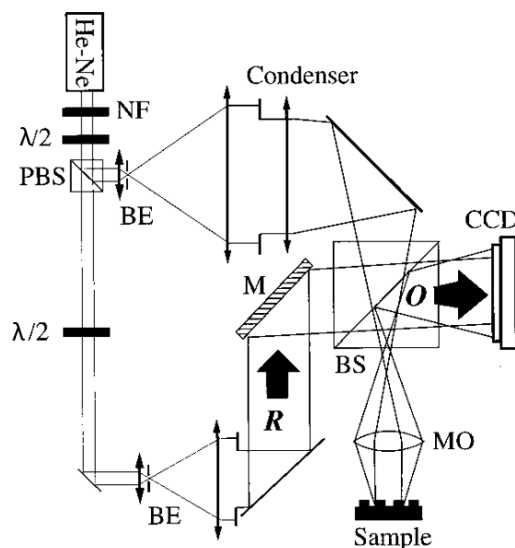
Мы представляем цифровой голографический микроскоп для записи в естественных условиях структур сетчатки глаза человека. Существующие технологии визуализации глаз не могут обеспечить изображения с разрешением менее 1 мкм на глубине до нескольких сотен микрометров. Это можно улучшить с помощью цифровой голографии, поскольку голограмма глаза, снятая цифровой камерой, содержит информацию о структурах на всей глубине глаза. Эта информация может быть реконструирована как оптически, так и численно. Сложности голографической записи структур сетчатки человеческого глаза в естественных условиях вызваны очевидным фактом, что объекты, подлежащие голографии, находятся за хрусталиком и роговицей. Наша схема записи голограммы использует принципы работы внеосевого цифрового голографического микроскопа, предназначенного для исследования отражающих микрообъектов. В качестве объектива микроскопа мы используем роговицу и хрусталик человеческого глаза. Это позволило нам записывать в естественных условиях цифровые голограммы сетчатки человеческого глаза с разрешением при реконструкции менее 1 мкм.

Ключевые слова: Цифровая голография, голографический микроскоп, сетчатка глаза, роговица, хрусталик глаза, изображение сетчатки глаза.

Цитирование: Захаровас, С. Цифровой голографический микроскоп для записи структур сетчатки глаза человека в живую / С. Захаровас, М. Сухеймат, Д. А. Атчисон, Э. Дж. Ламберт // HOLOEXPO 2020 : XVII международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2020. — С. 246–252.

Введение

Исследования человеческого зрения и диагностика глазных патологий в значительной степени зависят от оптической визуализации человеческого глаза. Существует несколько методов визуализации, различающихся по полю зрения, разрешению, контрасту и той части глаза, которая визуализируется [1]. Методы визуализации сетчатки, такие как фундус-камеры [2], сканирующая лазерная офтальмоскопия [3] и оптическая когерентная томография [4], могут сочетаться с адаптивной оптикой для получения изображений более высокого разрешения. Однако все известные методы визуализации глаз не могут одновременно предоставить изображения с разрешением ниже 1 мкм и на глубине до нескольких сотен микрометров. Более того, все упомянутые методы визуализации сетчатки основаны на сложном и дорогостоящем оборудовании, и существует необходимость в предоставлении экономически эффективных решений, позволяющих исследовать внутренние структуры человеческого глаза с таким же или лучшим разрешением и на большей глубине.



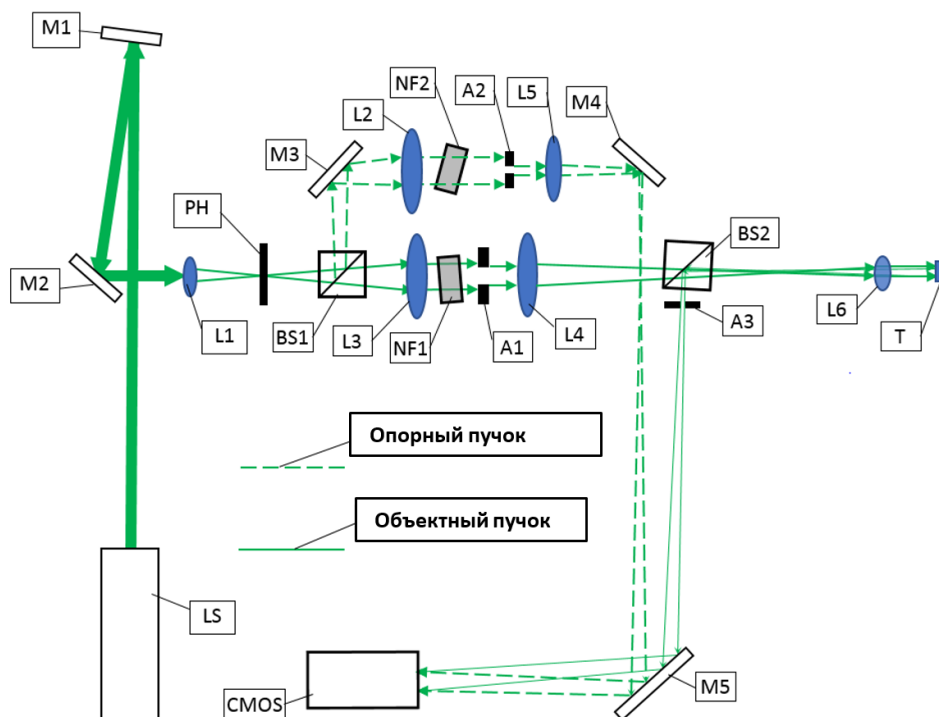
NF — фильтр нейтральной плотности, PBS — поляризационный делитель пучка, BE — расширитель пучка с пространственным фильтром, $\lambda/2$ — полуволновая пластина, M — зеркало, BS — делитель пучка, MO — объектив микроскопа, Condenser — конденсор, Sample — образец, O — объектный пучок, R — опорный пучок [10]

Рис. 1. Схема внеосевого голографического микроскопа для получения изображения отражающих объектов

В последнее время для визуализации сетчатки начали применяться методы цифровой голографии. Широкополосная лазерная доплеровская голография была применена для исследования кровотока сетчатки и выявила пульсацию сетчатки в человеческом глазу с временным разрешением 1,6 мс [5–7]. Абберационная объемная визуализация сетчатки в естественных условиях с помощью высокоскоростной ПЗС-камеры позволила получить осевое разрешение около 10 мкм и латеральное разрешение 2,6 мкм [8]. Детали одиночных фоторецепторов вблизи фовеолы были разрешены с помощью цифровой голографической записи в живую и последующей оптической реконструкции цифровых голограмм [9].

В настоящей работе по визуализации сетчатки человека мы применили принципы работы внеосевых цифровых голографических микроскопов. Классический внеосевой голографический микроскоп показан на рисунке 1 [10].

Для записи отражательных голограмм он содержит длиннофокусную линзу, которая помещается между расширителем пучка лазерного излучения и объективом микроскопа. Эта линза действует как конденсор, и ее положение регулируется таким образом, чтобы осветить образец коллимированным пучком. Этот конденсор очень важен для визуализации сетчатки, потому что, если мы будем использовать оптическую систему глаза в качестве микроскопического объектива — сетчатка будет находиться вблизи фокальной плоскости данного объектива. В этом случае расстояние между изображением сетчатки и объективом микроскопа бесконечно, голограмма записывается с помощью преобразования Фурье поля объекта, а реконструкция может быть выполнена простым вычислением преобразования Фурье голограммы.



LS — лазер, M1–M5 — зеркала, L1 — фокусирующая линза с пространственным фильтром, PH — пинхол, L2 и L3 — коллимирующие линзы пространственного фильтра, NF1 и NF2 — нейтральной фильтры, BS1 и BS2 — неполяризующие делители луча, A1–A3 — диафрагмы, L4 — конденсор, L5 — линза регулировки расходимости опорного пучка, L6 — линза имитирующая оптическую систему глаза или живой глаз, T — мишень или живая сетчатка, CMOS — камера с КМОП-матрицей

Рис. 2. Схема модифицированного голографического микроскопа для исследования отражающих объектов

1. Оптическая установка

Схема цифрового голографического микроскопа, показанная на рисунке 1, была модифицирована и адаптирована нами для записи голограмм сетчатки глаза человека, как показано на рисунке 2. В нашей установке оптика глаза (роговица и хрусталик) выступает в качестве объектива микроскопа. Для улучшения интерференционной картины на датчике, расходимости объектного и опорного пучка должны быть одинаковыми. Установка позволяет независимо регулировать расходимость опорного пучка так, чтобы она соответствовала расходимости объектного. На рисунке 2 показана принципиальная схема нашей установки.

Постоянное лазерное излучение с длиной волны 543,5 нм пространственно фильтруется линзой L1 и пинхолом PH. Затем оно расщепляется неполяризующим делителем пучка BS1, и два пучка коллимируются отдельно линзами L2 и L3. Интенсивность каждого пучка регулируется нейтральными фильтрами NF1 и NF2. Диафрагмы A1 и A2 позволяют независимо регулировать диаметр каждого пучка. Линза L4 имеет фокусное расстояние 400 мм и действует как конденсор, таким образом, лазерный луч, освещающий мишень коллимируется линзой L5. На пути к объективу L5 лазерный луч проходит через светоделительный куб BS2. Лазерный луч, отраженный от мишени и содержащий теперь информацию о форме мишени (объектный

пучок), отражается этим же светоделительным кубом BS2 в сторону зеркала M5, которое направляет объектный пучок на КМОП-камеру. Опорный пучок также направляется на КМОП-камеру зеркалами M4 и M5. Зеркала M3 и M4 позволяют точно настраивать углы между опорным и объектным пучками.

Интерференция двух световых волн на датчике камеры создает интерференционные полосы с интервалом d , определяемым следующим уравнением [11].

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\alpha}{2}}, \quad (1)$$

где λ — длина волны интерферирующих световых пучков, а α — угол между ними. Поскольку датчик нашей камеры имеет размер пикселя $6,5 \times 6,5$ мкм в диаметре, наибольший угол между объектным и опорным пучками для такого датчика не может быть больше $\approx 2,4^\circ$. Требуется точная настройка угла между Объектным и Опорным лучами — мы хотим иметь большее разделение между реконструируемыми реальным и виртуальным изображениями, что достигается за счет увеличения угла между вмешивающимися лучами; но в то же время мы хотим зарегистрировать более тонкую структуру интерференционных полос.

2. Настройка оптической установки

Для модифицированной оптической установки линза L6 имеет фокусное расстояние 16,67 мм, соответствующее фокусному расстоянию оптической системы глаза в воздухе [12]. В качестве мишеней для настройки установки мы использовали:

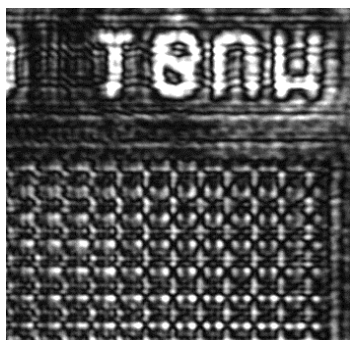
1. Положительную тестовую мишень R1L1S1P от Thorlabs, содержащую сетку с линиями шириной 1,5 мкм, расположенными на расстоянии 10 мкм.

2. Образец ткани печени человека, содержащий клетки известных размеров и формы.

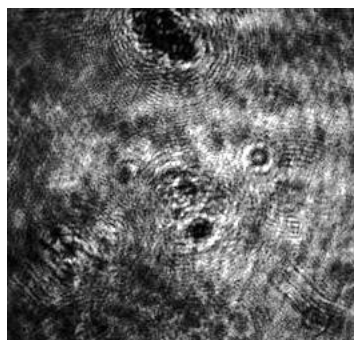
Коллимированный лазерный луч, освещающий мишени, имел диаметр ≈ 1 мм. Изображения мишеней фокусировались на сенсоре камеры, где хорошо видны детали всех мишеней (рисунок 3). Кроме того, изображение ткани печени, полученное при установке нашего цифрового микроскопа, сопоставимо с микрофотографией гепатоцитов печени [13]. Это означает, что линза, оптическая сила которой аналогична оптической силе человеческого глаза, может быть использована в цифровом голографическом микроскопе для получения изображений мишеней с разрешением лучше 1,5 мкм (толщина линий сетки на мишени R1L1S1P) без необходимости использования дополнительной оптики.

3. Запись и восстановление голограмм

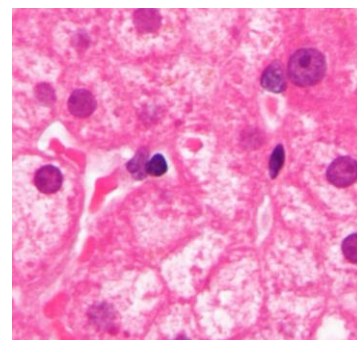
После добавления опорного пучка голограмма мишени R1L1S1P была записана и восстановлена в цифровом виде. Нам не удалось восстановить записанную голограмму образца ткани печени, так как ткань находилась между двумя стеклянными пластинками, на которые не было нанесено антибликового покрытия, что приводило к образованию четырех паразитных опорных волн по оси объектного пучка, препятствовавших правильному восстановлению. На



а) изображение сетки на мишени R1L1S1P

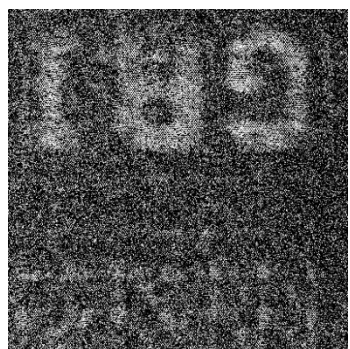


б) изображение образца ткани печени человека



в) изображение ткани печени человека из Wikilectures [13]

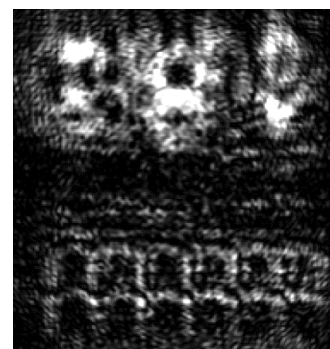
Рис. 3. Изображения, полученные на установке, показанной на рисунке 2 и из открытых источников



а) Изображение записанной цифровой голограммы



б) Восстановленная амплитуда голограммы, на расстоянии, где буквы находятся в фокусе



в) Восстановленная амплитуда голограммы, на расстоянии, где сетка находится в фокусе

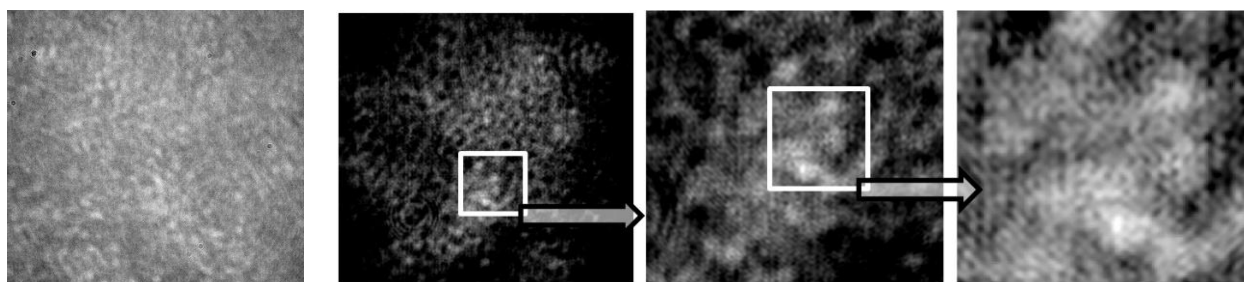
Рис. 4. Изображения голограммы части мишени R1L1S1P и ее восстановления

рисунке 4 показано изображение записанной голограммы, а также ее реконструкция на различных позициях вдоль оси Z. Буквы на мишени и сетка имеют разную высоту, а цифровая реконструкция голограммы позволяет заметить эту разницу высот.

Для численного восстановления голограмм мы использовали среду MATLAB и процедуры восстановления голограмм, аналогичные описанным в литературе [14, 15]

4. Запись и восстановление голограммы сетчатки глаза в живую

Убедившись, что голограмма мишени, расположенной за обычной линзой, имеющей оптическую силу равную оптической силе человеческого глаза, может быть успешно записана и восстановлена с точностью до 1,5 мкм, мы записали голограмму человеческой сетчатки на живом и восстановили ее в цифровом виде. Следует заметить, что мы не применяли средств для расширения зрачка. На рисунке 5 восстановленная амплитуда голограммы показана с тремя увеличениями. Колбочки сетчатки становятся видимыми на двух правых изображениях. На рисунке 6 показана структура фовеальных колбочек, снятая с помощью сканирующей световой



а) Изображение записанной цифровой голограммы

б) Изображения цифровой реконструкции голограммы с различными увеличениями

Рис. 5. Изображения записанной цифровой голограммы ее цифровой реконструкции с различными увеличениями

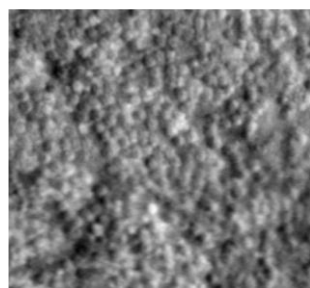


Рис. 6. Изображение конусов сетчатки, полученное методом адаптивной оптической сканирующей офтальмоскопии [16]

офтальмоскопии с применением адаптивной оптики (AOSLO) [16]. Очевидно, что наши первые результаты голографии сетчатки сравнимы с результатами гораздо более сложной и хорошо развитой сканирующей световой офтальмоскопии (AOSLO).

Выводы

Методы цифровой голографии впервые были применены для записи живой структуры колбочек сетчатки и ее цифрового восстановления.

Методы цифровой внеосевой голографии могут быть применены для исследования человеческого глаза на живо без дополнительного расширения зрачка.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Австралийского исследовательского совета. Грант: Открытие DP 190103069.

Список источников

- [1] **Masters, B. R.** [Optical devices in Ophthalmology and Optometry: technology, design principles and clinical applications](#) / B. R. Masters // Journal of Biomedical Optics. — 2014. — Vol. 19. — №7. — P. 079901. — DOI: 10.1117/1.JBO.19.7.079901.
- [2] **DeHoog, E.** [Fundus camera systems: a comparative analysis](#) / E. DeHoog, J. Schwiegerling // Applied Optics. — 2009. — Vol. 48. — P. 221-8. — DOI: 10.1364/ao.48.000221.

- [3] **Kotecha, A.** [Ultrastructural Imaging](#) / A. Kotecha, G. Roberti, F. Fitzke // *Glaucoma* (Second Edition). — 2015. — Vol. 1. — P. 666–673. — DOI: 10.1016/B978-0-7020-5193-7.00065-0.
- [4] **Campbell, J.** [Detailed vascular anatomy of the human retina by projection-resolved optical coherence tomography angiography](#) / J. Campbell, M. Zhang, T. Hwang, et al. // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — P. 42201. — DOI: 10.1038/srep42201.
- [5] **Puyo, L.** In vivo laser Doppler holography of the human retina / L. Puyo, M. Paques, M. A. Fink, J.-A. Sahel, M. Atlan // *Biomedical Optics Express*. — 2018. — Vol. 9. — P. 4113–4129.
- [6] **Puyo, L.** Ultrafast digital holography for in vivo retinal blood flow imaging and assessment of flow resistance / L. Puyo, M. Paques, M. A. Fink, J.-A. Sahel, M. Atlan // *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging 2019 : OSA Technical Digest*. — 2019. — P. Th1A.2.
- [7] **Rivet, J.** Motion compensation in digital holography for retinal imaging / J. Rivet, G. Tochon, S. Meimon, et al. // *16th International Symposium on Biomedical Imaging*. — 2019. — P. 1428–143.
- [8] **Hillmann, D.** [Aberration-free volumetric high-speed imaging of in vivo retina](#) / D. Hillmann, H. Spahr, C. Hain, et al. // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — P. 35209. — DOI: 10.1038/srep35209.
- [9] **Suheimat, M.** In-vivo holographic imaging and reconstruction of the human eye / M. Suheimat, A. J. Lambert, D. A. Atchison // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2018. — Vol. 59. — №9. — P. 5864–5864.
- [10] **Cuche, E.** Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms / E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge // *Applied Opt.* — 1999. — Vol. 38. — P. 6994–7001.
- [11] **Ostrovsky, Y. I.** *Interferometry by Holography* / Y. I. Ostrovsky, M. M. Butusov, G. V. Ostrovskaya // *Springer Series in Optical Sciences*. — 1980. — Vol. 20. — P. 11.
- [12] **Atchison, D. A.** *Optics of the human eye* / D. A. Atchison, G. Smith. — Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000. — P. 253–254.
- [13] URL: www.wikilectures.eu/w/Cells_of_Liver#/media/File:Ground_glass_hepatocytes_high_mag_cropped.jpg (06.05.2020).
- [14] **Seifi, M.** HoloRec3D: A free Matlab toolbox for digital holography / M. Seifi, C. Fournier, L. Denis. — 2012.
- [15] **Latychevskaia, T.** Practical algorithms for simulation and reconstruction of digital in-line holograms / T. Latychevskaia, H.-W. Fink // *Applied Optics* — 2015. — Vol. 54. — P. 2424–2434.
- [16] **Langlo, C.** [Repeatability and longitudinal assessment of foveal cone structure in Cngb3-associated achromatopsia](#) / C. Langlo, L. Erker, M. Parker, et al. // *Retina* (Philadelphia, Pa.). — 2017. — Vol. 37. — №10. — DOI: 10.1097/IAE.0000000000001434.