بهبود توان تفکیک میکروسکوپی جاروب لیزری هم‌کانون با روش مدولاسیون محوری روزنه‌ی آشکارسازی

محمد دلجور، مهدی مزدور دشتابی، رضا مسعودی

پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

چکیده – با ابداع میکروسکوپی هم‌کانون، علاوه بر اینکه توان تفکیک افزایش یافت، تصویربرداری سه بعدی از نمونه‌های ضخیم با پراکندگی بالا نیز ممکن گردید. در این مقاله، یک روش پردازش آنی داده‌برداری، با استفاده از مدولاسیون محوری روزنه‌ی آشکارساز متصل به یک تقویت کننده‌ی قفل‌شونده، به منظور افزایش توان تفکیک محوری در یک میکروسکوپ جاروب لیزری هم‌کانون ، معرفی شده است. به علاوه، این روش برش‌نگاری نوری را بهبود بخشیده و همچنین ابهام در مکان‌یابی نمونه (در بالا یا پایین صفحه‌ی جاروب)، موجود در میکروسکوپی هم‌کانون مرسوم را برطرف می‌کند.

کلید واژه- میکروسکوپی هم‌کانون، میکروسکوپی جاروب لیزری، مدولاسیون محوری روزنه‌ی آشکارسازی

Resolution enhancement of confocal laser scanning microscopy by detection pinhole axial modulation technique

Mohammad Deljoor, Mahdi Mozdoor Dashtabi, Reza Massudi

Shahid Beheshti University, G.C., Laser and Plasma Research Institute

Abstract – With the invention of confocal microscopy, in addition to the enhancement of resolution, 3D imaging of thick highly-scattering samples became possible. In this article, an instant data acquisition processing method is introduced using axial modulation of detection pinhole in order to increase the axial resolution of a laser scanning confocal microscope (SCM). This method, improves optical sectioning as well and also resolves the ambiguity of sample positioning (above or below the scanning plane) existing in conventional confocal microscopes.

Keywords: Confocal microscopy, Laser scanning microscopy, Detection pinhole axial modulation

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-05]

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

۱- مقدمه

میکروسکوپی نوری از ۳۵۰ سال پیش تاکنون ابزار مهمی در تحقیقات به شمار می‌رود. میکروسکوپ‌های نوری میدان گسترده، تنها قادر به تصویربرداری از نمونه‌های بسیار نازک هستند، چرا که در نمونه‌های ضخیم، مجموع اطلاعات نوری صفحات بالایی و پایینی نیز در تصویر صفحه‌ی مورد نظر دیده می‌شود. در این حالت کنتراست تصویر به شدت پایین می‌آید و در نتیجه از کیفیت تصویر و وضوح آن کاسته می‌شود.

با اختراع میکروسکوپ هم‌کانون توسط مینسکی در سال ۱۹۵۷ و با ترکیب این نوع میکروسکوپی با میکروسکوپی جاروب لیزری و گذاشتن یک روزنه در صفحه‌ی تصویر، جلوی آشکارساز، این مشکل تا حدودی حل و این گونه میکروسکوپ، به عنوان ابزاری بی‌نظیر در تحقیقات زیستی به کار گرفته شد. روزنه، با حذف نورهای خارج از کانون که از صفحات بالایی و پایینی به آشکارساز می‌رسد، باعث حذف پس‌زمینه و بالا رفتن وضوح تصویر می‌شود. توان تفکیک این میکروسکوپ حدود ۱,۴ برابر بیشتر از میکروسکوپ معمولی میدان گسترده است [1] و به واسطه‌ی این میکروسکوپ می‌توان اطلاعات مربوط به صفحات مختلف را به طور جداگانه دریافت کرد و به یک سیستم برش‌نگاری نوری دست یافت که در تصویربرداری سه بعدی از نمونه‌های زیستی کاربرد دارد.

با وجود توانایی میکروسکوپ هم‌کانون در افزایش توان تفکیک و توانایی تصویربرداری از نمونه‌های ضخیم، این ویژگی‌ها برای بسیاری از کاربردها کافی نیست. به همین دلیل روش‌های جدیدی از جمله، میکروسکوپی صفحه‌ی نور [4]، میکروسکوپی غیرخطی [5] و میکروسکوپی نوررسانی ساختارمند [6]، ابداع و به خدمت گرفته شد. این روش‌ها دارای معایب متعددی از جمله پیچیدگی و گران بودن تجهیزات تصویربرداری هستند.

برای جبران این مشکلات، روش آشکارسازی مدولاسیون پیشنهاد می‌شود. مزیت اصلی این روش، توانایی آشکارسازی حساس به فاز است، که منجر به محدود شدن پاسخ سیستم آشکارسازی به یک بازه‌ی باریک در اطراف فرکانس مدولاسیون می‌شود. این روش، نخست در میکروسکوپی تولید هماهنگ سوم به کار گرفته شده است [2] و دارای ویژگی‌هایی مانند حذف پس‌زمینه در نمونه‌های با پراکندگی زیاد، افزایش توان تفکیک محوری و جایگزیدگی و رفع ابهام در مکان نمونه است [3].

در این مقاله، روش مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی را معرفی می‌کنیم، و از آن به منظور بهبود میکروسکوپی هم‌کانون بهره خواهیم برد.

۲- اصول و تئوری

در میکروسکوپی هم‌کانون، به منظور حذف نورهای خارج از کانون، یک روزنه جلوی آشکارساز قرار می‌گیرد. تصویربرداری در این مورد از دو بخش تشکیل می‌شود ۱) باریکه‌ی لیزر توسط عدسی شیئی روی نمونه کانونی می‌شود و ۲) سیگنال بازتابی از نمونه توسط عدسی شیئی روی روزنه‌ی جلوی آشکارساز تصویر می‌شود.

به دلیل اثرات پراش، باریکه‌ی لیزری که روی نمونه کانونی می‌شود، بصورت تک نقطه نخواهد بود و یک توزیع شدت سه بعدی خواهد داشت که به آن تابع توزیع نقطه‌ای نور-رسانی (PSF_{exc}) گفته می‌شود. به طور مشابه، سیگنال بازتابی از هر نقطه‌ی نمونه که به صفحه‌ی آشکارساز می‌رسد نیز یک توزیع شدت سه بعدی خواهد داشت که به آن تابع توزیع نقطه‌ای آشکارسازی ($PSF_{\det}$) گفته می‌شود. بنابراین کل فرایند نور-رسانی و آشکارسازی را می‌توان با یک تابع توزیع نقطه‌ای هم‌کانون (PSF_{conf}) بصورت زیر تعریف کرد.

$$PSF_{conf}(x,y,z) = PSF_{exc}(x,y,z).PSF_{\det}(x,y,z) \quad (۱)$$

در میکروسکوپ جاروب لیزری هم‌کانون، باریکه‌ی کانونی شده، روی نمونه جاروب می‌شود و سپس سیگنال بازتابی از هر نقطه توسط آشکارساز ثبت می‌گردد. تصویر، از پیچش بین تابع توزیع نقطه‌ای هم‌کانون با دامنه‌ی مختلط بازتابی از نمونه بدست می‌آید. بنابراین خواهیم داشت:

$$I(X,Y,Z) = |O(x,y,z) \otimes PSF_{conf}(x,y,z)|^2 \quad (۲)$$

که (X,Y,Z) و (x,y,z) مختصات فضا به ترتیب در صفحه‌ی تصویر و جسم هستند و $O(x,y,z)$ نشان‌دهنده‌ی دامنه‌ی مختلط بازتابی از نمونه است.

در میکروسکوپی هم‌کانون مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، مکان روزنه‌ی هم‌کانون با دامنه‌ی $2\delta_0$ در طول محور z با فرکانس f مدوله می‌شود. در

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

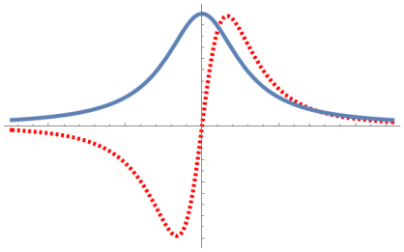
[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-05]

نتیجه، سیگنال ثبت شده توسط آشکارساز به صورت رابطه‌ی زیر خواهد بود:

$$I_s(X,Y,Z) = \\ |O(x,y,z) \otimes (PSF_{exc}(x,y,z) \\ \times PSF_{det}(x,y,z+\delta_0 \sin(2\pi ft)))|^2 \quad (۳)$$

معادله‌ی ۳ نشان می‌دهد که سیگنال ثبت شده توسط آشکارساز به ازای یک مکان z مشخص، در زمان مدوله شده است. مولفه‌ی فرکانسی f مربوط به I_s، $S_f(z)$، با عبور سیگنال الکتریکی خروجی آشکارساز از درون یک تقویت‌کننده‌ی قفل شونده که روی فرکانس f قفل شده است، به دست می‌آید، که متناسب با مشتق مرتبه‌ی اول $I_s(z)$ نسبت به z است [2,7].

به دلیل استفاده از باریکه‌ی گوسین به منظور نور-رسانی روی نمونه، با تقریب خوبی می‌توان فرض کرد که تابع توزیع نقطه‌ای نور-رسانی نیز بعد از عدسی شیئی و کانونی شدن، به صورت گوسین باقی خواهد ماند [1]. ضمن در نظر گرفتن این فرض، سیگنال‌های تئوری متناظر با یک فصل مشترک، برای دو حالت هم‌کانون معمولی (خط توپر) و حالت مدولاسیون روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی (نقطه‌چین) در شکل ۱ نشان داده شده است.

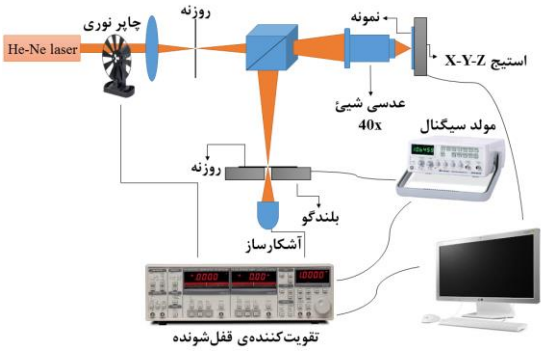


شکل ۱: سیگنال تئوری میکروسکوپی هم‌کانون معمولی (خط ممتد) و مدولاسیون روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی (نقطه چین)

در میکروسکوپی هم‌کانون، بیشترین مقدار سیگنال به ازای آن سطحی از نمونه‌ی مورد مطالعه که در صفحه‌ی کانون عدسی شیئی قرار دارد (صفحه‌ی همیوغ مختلط با روزنه) به دست می‌آید. به دلیل تقارن تابع پراکنش نقطه‌ای در راستای z، تشخیص مکان نمونه در میکروسکوپی هم‌کانون معمولی دارای ابهام است و واضح نیست که نمونه در بالای صفحه‌ی جاروب قرار دارد و یا در زیر آن. اما در روش مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، به هنگام گذر از صفحه‌ی جاروب (صفحه‌ی همیوغ با روزنه)، علامت $S_f(z)$ تغییر می‌کند. در نتیجه، مکان نمونه نسبت به صفحه‌ی جاروب در راستای z قابل تشخیص است. بنابراین می‌توان از این ویژگی برای بهبود برش‌نگاری و جایگزیدگی استفاده کرد. همچنین از آنجا که پهنای هر یک از نواحی (مثبت و منفی) سیگنال مربوط به حالت مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، نسبت به حالت میکروسکوپی هم‌کانون معمولی کمتر است، توان تفکیک محوری افزایش خواهد یافت. با انجام محاسبات، این افزایش توان تفکیک محوری به اندازه‌ی ۱٫۶ برابر بدست می‌آید.

۳- نتایج تجربی

شماتیک چیدمان تجربی برای میکروسکوپی هم‌کانون معمولی و مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: شماتیک چیدمان تجربی

برای حالت معمولی، از یک تقویت کننده‌ی قفل‌شونده که سینگال مرجع آن توسط یک چاپر نوری تامین می‌شود، جهت رفع نویز و داده‌برداری استفاده شده است، اما برای تبدیل چیدمان معمولی به یک چیدمان مدولاسیون روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، چاپر حذف شده و روزنه با یک بلندگو که توسط یک مولد سیگنال راه‌اندازی می‌شود، حول محور z نوسان داده می شود.

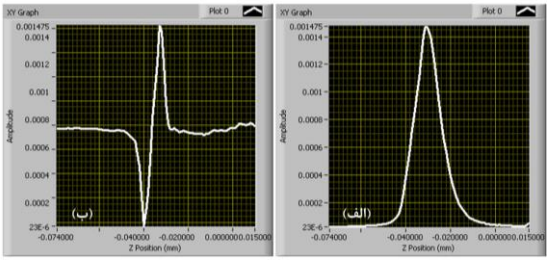
شکل ۳، سیگنال ثبت شده از یک لام شیشه‌ای که در طول محور z از بالای نقطه‌ی کانونی عدسی شیئی به سمت پایین (به سمت آشکارساز) حرکت می‌کند، با روش معمولی (الف) و مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی (ب)، را نشان می دهد.

مقایسه‌ی شکل‌های ۱و۳ نشان می‌دهد که داده‌های تئوری و تجربی در تطابق خوبی با یکدیگر هستند. همچنین از شکل ۳، می‌توان دید که سیگنال مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، بصورت متناسب با مشتق

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-05]

مرتبه‌ی اول سیگنال ثبت شده به روش معمولی است. در شکل ۳، ناحیه‌ی مثبت به ازای حالتی است که لام بالای صفحه‌ی جاروب قرار دارد و هر چه به سمت عدسی شیئی حرکت می‌کنیم ابتدا سطح سیگنال صفر شده (قرار گرفتن لام روی سطح کانون عدسی شیئی) و سپس منفی می‌شود.



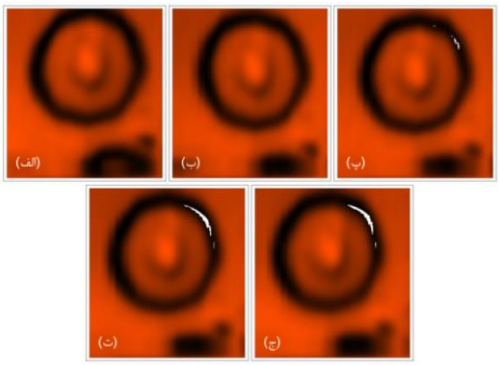
شکل ۳: شکل سیگنال تجربی بدست آمده برای میکروسکوپی هم‌کانون معمولی (الف) و مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی (ب).

برای نشان دادن بهبود جایگزیدگی و بهبود تفسیر سیگنال در یک نمونه‌ی زیستی، از یک گلبول قرمز با هر دو روش معمولی (شکل ۴) و مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی (شکل ۵)، تصویربرداری کرده‌ایم.

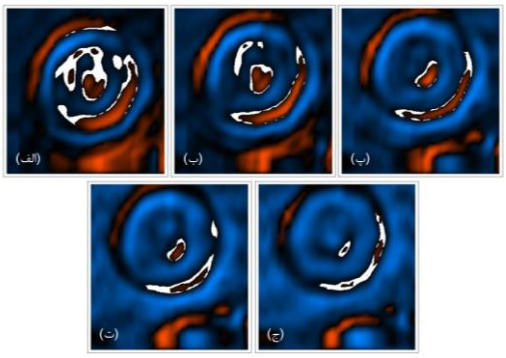
همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود، میکروسکوپی هم‌کانون معمولی، قادر به تمایز بین ۵ میکرومتر جابجایی محوری موجود در ۵ تصویر نیست. اما تکنیک مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، (شکل ۵)، می‌تواند بین نقاط نمونه که در بالا (قرمز) و زیر (آبی) سطح جاروب قرار دارد، تمایز قائل شود. همانطور که سطح جاروب از پایین سلول(شکل ۵ الف) به سمت بالای آن حرکت می‌کند، از نواحی قرمز کاسته شده و نواحی آبی رنگ افزایش می‌یابند. نواحی سفید رنگ نشان‌دهنده‌ی بخش‌هایی از نمونه است که بر روی صفحه‌ی جاروب قرار دارند.

۴- نتیجه‌گیری

میکروسکوپی هم‌کانون مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی، علاوه بر افزایش توان تفکیک محوری به اندازه‌ی ۱,۶ برابر نسبت به میکروسکوپی هم‌کانون معمولی و بهبود برش‌نگاری نوری، امکان تفسیر بهتر سیگنال دریافتی از نمونه را میسر می‌کند. از این ویژگی می‌توان در تصویربرداری از نمونه‌های زیستی ضخیم و با پراکندگی بالا به ویژه تصویربرداری از مغز، بهره جست.



شکل ۴: تصاویر برش نگاری ثبت شده از گلبول قرمز با گام یک میکرومتر در طول محور z با میکروسکوپی هم‌کانون معمولی.



شکل ۵: تصاویر برش نگاری ثبت شده از گلبول قرمز با گام یک میکرومتر در طول محور z با روش مدولاسیون محوری روزنه‌ی هم‌کانون آشکارسازی.

مراجع

[1] R. H. Webb, “Confocal optical microscopy,” Reports on Progress in Physics, vol. 59, no. 3, p. 427, 1996.

[2] M. M. Dashtabi and R. Massudi, “Nonlinear optical microscopy improvement by focal-point axial modulation,” Journal of biomedical optics, vol. 21, no. 5, pp. 056006–056006, 2016.

[3] M. Mozdoor Dashtabi, A. S. Arabanian, and R. Massudi, “Axial resolution enhancement of third harmonic generation microscopy by harmonic focal point axial modulation,” Applied Physics Letters, vol. 110, no. 7, p. 071106, 2017.

[4] P. Mahou, J. Vermot, E. Beaurepaire, and W. Supatto, “Multicolor two-photon light-sheet microscopy,” Nature methods, vol. 11, no. 6, pp. 600–601, 2014.

[5] S. Yue, M. N. Slipchenko, and J.-X. Cheng, “Multimodal nonlinear optical microscopy,” Laser & photonics reviews, vol. 5, no. 4, pp. 496–512, 2011.

[6] M. Saxena, G. Eluru, and S. S. Gorthi, “Structured illumination microscopy,” Advances in Optics and Photonics, vol. 7, no. 2, pp. 241–275, 2015.

[7] W. Demtröder, Laser spectroscopy: basic concepts and instrumentation. Springer Science & Business Media, 2013

[8]

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-05]