

میکروسکوپی لایه-نوری با بکارگیری باریکه‌های غیرپراشی

مصطفی آخته^۱، داریوش عبدالله‌پور^{۱*}

^۱ دانشکده فیزیک، مرکز تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان

چکیده - در این مقاله، میکروسکوپی لایه-نوری با بکارگیری باریکه‌های غیرپراشی بسل، ایری یک-بعدی و ایری دو-بعدی از طریق شبیه‌سازی عددی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این بررسی نشان می‌دهند که باریکه‌ی بسل نسبت به باریکه‌های ایری و گوسی، پراکندگی کمتری در تصویر ثبت شده ایجاد می‌کند، اما بدلیل دارا بودن حلقه‌های شدتی، کنتراست تصویر کمتری نسبت به باریکه‌های ایری و گوسی می‌سازد. از سویی دیگر باریکه‌های ایری دو-بعدی اسکن شده علاوه بر فراهم کردن پراکندگی کمتر در تصاویر، کنتراست مناسبی را نیز فراهم می‌کنند. علاوه بر این، نشان داده‌ایم که باریکه‌های ایری دو-بعدی و بسل اسکن شده، میدان دید و عمق نفوذ بیشتری نسبت به باریکه‌های دیگر دارند. در نتیجه باریکه‌ی ایری دو-بعدی اسکن شده و بسل اسکن شده نسبت به سایر باریکه‌ها می‌توانند سودمندی بیشتری در میکروسکوپ لایه نوری داشته باشد.

کلید واژه- میکروسکوپ لایه نوری، تصویر سازی، باریکه ایری، باریکه بسل.

Light-Sheet Microscopy Using Non-diffracting Beams

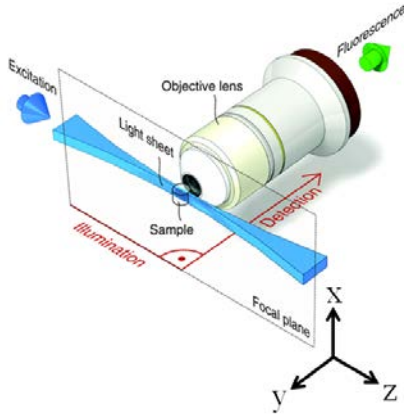
Mostafa Aakhte¹, Daryoush Abdollahpour^{1,*}

¹ Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan.
(*Corresponding author: dabdollahpour@iasbs.ac.ir)

Abstract- In this work, we have studied light-sheet microscopy using non-diffracting beam such as Bessel, and one- and two-dimensional Airy beams through numerical simulations. We have compared the effect of illumination by non-diffracting beams and a Gaussian beam. Our results reveal that the Bessel beams though provide microscopic images with lowest ghost due to scattering, suffer from a very low contrast due to the ring structure of the beam. On the other hand, scanned two-dimensional Airy beams are capable of providing microscopic images with a low ghost and a high contrast. Furthermore, we have also shown that scanned two-dimensional Airy and scanned Bessel beams have a wider field of view and depth of focus comparing to the other beams. Due to these aspects, we conclude that scanned two-dimensional Airy and Bessel beams are very promising for utilizing in light-sheet microscopy systems.

Keywords: light sheet microscopy, Imaging, Airy beam, Bessel beam

۱- مقدمه



شکل ۱. شمای کلی میکروسکوپ لایه نوری. در این شکل، باریکه آبی رنگ، باریکه نوردهی است که موجب تابش فلورسانسی از لایه‌ای از نمونه‌ی استوانه‌ای می‌شود. تابش فلورسانسی توسط یک شیئی دریافت شده و به سمت آشکارساز هدایت می‌شود. در این چیدمان، لایه نوری در صفحه xz وجود دارد و شیئی مشاهده‌گر تصویر این صفحه را در y های مختلف ثبت می‌کند [۱].

در تصویر سازی، علاوه بر $I_{det}(r)$ که ناشی از شیئی تصویرساز است. انتشار باریکه فرودی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. تصویرسازی سه بعدی از یک جسم با ابعاد چندصد میکرومتری نیازمند مطالعه بیشتر درباره انتشار باریکه‌ی نوردهی (تابانده شده) و مفاهیم برهمکنش نور و ماده است. کنترل پراکنش در حین انتشار باریکه نور از میان یک ماده، که تاثیر زیادی بر روی کیفیت تصویر دارد، بسیار دشوار است. شی می‌تواند نور فرودی را پراکنده و یا مانع از انتشار آن شود و در نتیجه باعث می‌شود که تصویری مصنوعی (غیر واقعی) از جسم ساخته شود. این تصویر مصنوعی که به تصویر شبیح معروف است با تصویر ایده‌آل ترکیب می‌شود و تصویر واقعی را می‌سازد. تصویر شبیح، در همه روش‌های میکروسکوپی و همچنین در میکروسکوپ لایه نوری وجود می‌آید. یک میکروسکوپ لایه‌نوری ایده‌آل دارای یک لایه نوری با توزیع شدت یکنواخت است. اما در واقعیت، این لایه نوری پس از انتشار در نمونه مورد نظر، به برهم‌نهی نورهای پراکنده شده و پراکنده نشده از شی تبدیل خواهد شد و در نتیجه توزیع شدت آن از حالت یکنواختی خارج خواهد شد. که این توزیع شدت نایکنواخت را می‌توان به شکل زیر نوشت:

$$I_{ill}(r) = |E_{tot}(r)|^2 = |E_{nonsca}(r) + E_{sca}(r)|^2 \quad (2)$$

$$= I_{nonsca}(r) + I_{sca}(r),$$

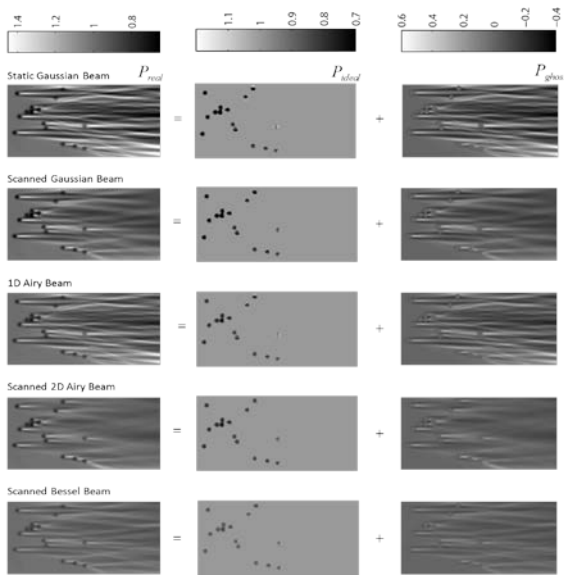
یکی از روش‌های میکروسکوپی نوین و کارآمد که می‌تواند تصویر سه بعدی میکروسکوپی از اجسام نسبتاً درشت تولید کند، میکروسکوپ لایه-نوری است [۱]. در چیدمان رایج این میکروسکوپ، قسمت‌های نوردهی و تصویر ساز عمود بر هم قرار می‌گیرند و نوردهی، بوسیله یک لایه‌ی نوری، تنها به یک لایه از جسم که از آن تصویربرداری می‌شود انجام می‌گیرد. در چیدمان‌های فلورسانسی، لایه‌ی نوری تابانده شده، موجب گسیل فلورسانسی از جسم در زاویه 90° می‌شود که توسط شیئی مشاهده‌گر دریافت می‌شود (شکل ۱). یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای ایجاد لایه نوری استفاده از عدسی استوانه‌ای است. علاوه بر این روش ایستا، می‌توان لایه نوری را با اسکن یک باریکه لیزری در جهتی خاص بوجود آورد. به دلیل اسکن کردن باریکه در این روش و همپوشانی باریکه‌های پراش-یافته، تصاویر حاصله از آن نسبت به روش ایستا دارای کیفیت بهتری خواهند بود. با این حال امکان تولید تصاویری نزدیک به ایده‌آل از یک شی، تحت نوردهی با باریکه‌های مختلف، نیازمند یک بررسی کمی از میزان تفکیک پذیری، کنتراست و عمق نفوذ سیستم است.

در این مقاله اثر نوردهی با باریکه‌های مختلف نظیر باریکه‌ی گاوسی، بسل و ایری [۲] در تصویرسازی توسط میکروسکوپ لایه-نوری، با استفاده از شبیه سازی عددی، مورد بررسی قرار گرفته است.

تصویرسازی غیر همدوس از یک شی با توزیع فلورسانسی را می‌توان به صورت کانولوشن توزیع فلورسانسی و تابع پاسخ ضربه سیستم تصویر ساز به شکل زیر نوشت [۳ و ۴]:

$$P(r) = (I_{ill}(r) \times c(r)) * I_{det}(r), \quad (1)$$

که در این رابطه * نماد کانولوشن، $P(r)$ تصویر ثبت شده، $I_{ill}(r)$ توزیع شدت باریکه تابانده شده به جسم و $I_{det}(r)$ تابع پاسخ ضربه سیستم تصویر ساز به یک شی نقطه‌ای را نشان می‌دهند. در این رابطه عبارت $I_{ill}(r) \times c(r)$ میزان توزیع فلورسانسی روشن شده توسط باریکه فرودی را توصیف می‌کند و می‌توان آن را با $c_{ill}(r)$ نشان داد.



شکل ۲. تصاویر ثبت شده از شبیه سازی میکروسکوپ لایه نوری در صفحه x-z. در این شبیه سازی ذرات کروی با شعاع یک میکرومتر و غیر فلورسانی با ضریب شکست ۱/۴۴ در یک مایع فلورسانی با ضریب شکست ۱/۳۳ به شکل ثابت قرار گرفته‌اند. ستون سمت چپ تصاویر حقیقی ثبت شده از باریکه‌های مختلف را نشان می‌دهد. ستون دوم و سوم نیز بترتیب تصاویر ایده‌آل و شبح را که از تصاویر حقیقی بدست آمده‌اند نمایش می‌دهند.

اولین گام برای مطالعه این تصاویر می‌تواند به این هدف باشد که تصویر حقیقی به چه میزان از تصویر ایده‌آل فاصله گرفته است و یا به عبارتی دیگر، به چه میزان تصویر شبح ایجاد شده است. برای این بررسی، می‌توانیم از رابطه واریانس بهنجار شده به شکل زیر استفاده کنیم.

$$\hat{S}_{real}^2(z) = \left(\frac{S_{real}(z)}{P_{real}(z)} \right)^2 \quad (4)$$

$$= \frac{1}{\bar{P}_{real}^2(z)} \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\bar{P}_{real}(z) - P_{real}(x_i, z))^2$$

در این رابطه N تعداد پیکسل‌های محور x و $\bar{P}_{real}(z)$ میانگین شدت‌ها بر روی محور z را نشان می‌دهد. با استفاده از رابطه‌های ۳ و ۴ می‌توان با تقریب نسبتاً خوبی رابطه زیر را نوشت [۶].

$$\hat{S}_{real}^2(z) \approx \hat{S}_{ideal}^2(z) + \hat{S}_{ghost}^2(z) \quad (5)$$

که در این رابطه $\hat{S}_{ideal}^2(z)$ و $\hat{S}_{ghost}^2(z)$ بترتیب واریانس تصویر ایده‌آل و تصویر شبح است. میزان شبح تولید شده بوسیله باریکه‌ها در شکل (۳) قابل مشاهده

که در این رابطه، $E_{nonsca}(r)$ و $E_{sca}(r)$ بترتیب میدان‌های پراکنده نشده و پراکنده شده هستند. با توجه به روابط ۱ و ۲، رابطه تشکیل تصویر را می‌توان به شکل زیر نوشت:

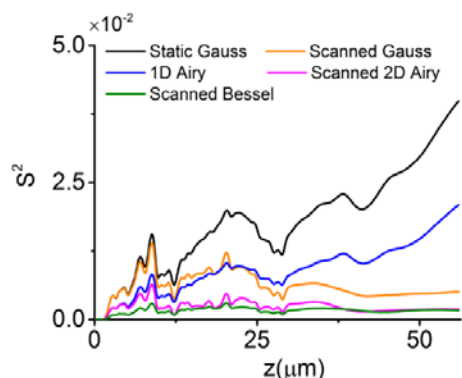
$$P_{real}(r) = [(I_{nonsca}(r) + I_{sca}(r)) \times c(r)] * I_{det}(r) \quad (3)$$

$$= P_{ideal}(r) + P_{ghost}(r),$$

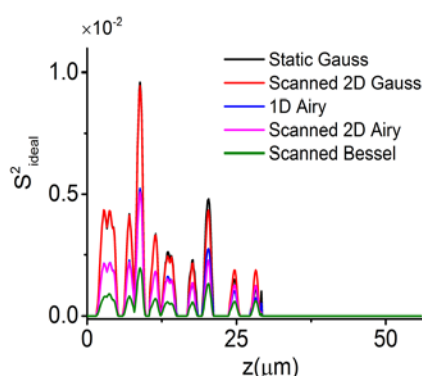
در این رابطه، $[I_{nonsca}(r) \times c(r)] * I_{det}(r)$ تصویر پراکنده نشده (تصویر ایده‌آل) و $[I_{sca}(r) \times c(r)] * I_{det}(r)$ تصویر پراکنده شده و یا تصویر شبح را توصیف می‌کنند. برای بدست آوردن یک تصویر ایده‌آل، می‌بایست تفاضل تصویر واقعی و ایده‌آل به سمت صفر میل کند و یا به عبارت دیگر، میزان تصویر شبح یا پراکنده‌گی به میزان حداقلی خود برسد. که برای این منظور می‌توان از اسکن کردن باریکه‌های غیرپراشی در جهتی خاص برای تولید لایه نوری و کم کردن پراکنده‌گی استفاده کرد.

۲- شبیه‌سازی

در این قسمت شبیه سازی میکروسکوپ لایه نوری با استفاده از باریکه‌های مختلف ارائه شده است. در این شبیه‌سازی‌ها از باریکه‌های گاوسی استاتیک، ایری یک-بعدی، گاوسی اسکن شده، ایری دو-بعدی اسکن شده و بسل اسکن شده استفاده شده است. برای معادل سازی باریکه‌ها، پهنای قسمت اصلی آنها برابر با ۲ میکرومتر در نظر گرفته شده است. همچنین از ذرات غیرفلورسانی با شعاع ۱ میکرومتر و با ضریب شکست ۱/۴۳ و محیطی فلورسانی با ضریب شکست ۱/۳۳ به عنوان نمونه، استفاده شده است. شبیه‌سازی با استفاده از روش طیفی انجام شده‌اند، که جزییات آن در مرجع [۵] آورده شده است. تصاویر ثبت شده بوسیله میکروسکوپ لایه نوری در صفحه x-z و در یک عمق دلخواه در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شبیه‌سازی از باریکه‌های مختلف استفاده شده است و تصویر ثبت شده در صفحه عرضی با $P_{real}(r)$ نامگذاری شده‌اند. می‌توان به کمک ماتریس توزیع ذرات و رابطه ۳، تصاویر $P_{ideal}(r)$ و $P_{ghost}(r)$ را برای هر لایه نوری از یکدیگر جدا نموده و مطالعه کرد.



شکل ۳. مقایسه‌ای از واریانس تصاویر حقیقی همه باریکه‌ها.



شکل ۴. کنتراست تصاویر بدست آمده از واریانس تصاویر ایده‌آل ثبت شده از باریکه‌های مختلف.

همچنین با شبیه‌سازی اثر باریکه‌های مختلف نشان دادیم که باریکه ایری دو-بعدی و بسل میدان دید و عمق نفوذ بیشتری نسبت به باریکه‌های دیگر دارند. بنابراین، در میکروسکوپی لایه-نوری، نوردهی با باریکه‌های ایری دو-بعدی و بسل اسکن شده علاوه بر اینکه میدان دید را وسیعتر کرده و عمق نفوذ را افزایش می‌دهد، به تولید تصاویر با کیفیت‌تر (با کنتراست مناسب و شیب کمتر) نیز منجر می‌شود.

مراجع

- [1] J. Huisken, et al. *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*, Science, p 1007-1009, 2004.
- [2] T. Etenburg, et al. *Light-sheet microscopy using an Airy beam*, Nature methods, p 541-544, 2014.
- [3] A. Rohrbach, et al. *Artifacts resulting from imaging in scattering media: a theoretical prediction*, Optics letters, p 3041-3043, 2009.
- [4] F. O. Fahrbach, *Microscopy with self-reconstructing beams*, Nature Photonics, p 780—785, 2010.
- [5] Couairon, A, et al. *Practitioner's guide to laser pulse propagation models and simulation*, The European Physical Journal Special Topics, p 5-76, 2011.

است. این نمودار بیانگر این واقعیت است که هر چقدر میزان واریانس کمتر باشد، میزان شیب و یا پراکندگی کمتری وجود دارد. واضح است که بیشترین و کمترین شیب ایجاد شده بترتیب مربوط به باریکه گاوسی استاتیک و بسل اسکن شده است. باریکه ایری دو-بعدی اسکن شده نیز با فاصله بسیار کمی نسبت به باریکه بسل قرار دارد. علاوه بر آن، می‌توان مشاهده کرد که تغییرات واریانس برای باریکه ایری دو-بعدی و بسل در اواخر طول انتشاری ثابت است و این نشان می‌دهد که این باریکه‌ها به دلیل دارا بودن خاصیت خودترمیمی، می‌توانند عمق بیشتری در ماده نفوذ و تصویر برداری کنند. همچنین باریکه گاوسی اسکن شده و ایری یک بعدی نیز تقریباً شبیه به یکدیگر عمل کرده‌اند. نکته قابل توجه دیگر، کنتراست تصاویر است. برای بررسی کنتراست تصاویر می‌توان از واریانس تصاویر ایده‌آل کمک گرفت. همانطور که می‌دانیم زمانی کنتراست تصویر در حالت بیشینه خود قرار دارد، واریانس نزدیک به یک باشد. شکل (۴) واریانس تصویر ایده‌آل از باریکه‌های مختلف را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که باریکه‌های گاوسی با بیشترین کنتراست، باریکه‌های ایری با کنتراست متوسط و باریکه بسل با حداقل کنتراست، تصویر نهایی را خواهند ساخت. دلیل پایین بودن کنتراست در تصاویر بدست آمده از باریکه بسل، وجود حلقه‌های توزیع شدت به دور هسته اصلی این باریکه است، که باعث می‌شود محیط فلوروفوری اطراف لایه نوری نیز روشن شود و سیگنال اضافی به آشکارساز برسد. اما این پدیده به دلیل نامتقارن بودن باریکه‌های ایری یک بعدی و دوبعدی به مراتب کمتر دیده می‌شود.

۳- نتیجه‌گیری

در این مقاله، اثر باریکه‌های مختلف در تصویرسازی توسط یک میکروسکوپ لایه-نوری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده کردیم که تصاویر حاصل از نوردهی با باریکه بسل علیرغم داشتن میران پراکندگی کمتر (تصویر شیب) کنتراست کمتری دارند. در حالی که تصاویر تهیه شده با باریکه ایری دو-بعدی اسکن شده، علاوه بر متاثر شدن ناچیز از پراکندگی، کنتراست مناسبی نیز دارند.

[6] F. O. Fahrbach, et al. *Microscopy with self-reconstructing beams*, *PhD thesis*, University of Freiburg, 2013