بیست و چهارمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک و
دهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۱۰ الی ۱۲ بهمن ۹۶ - دانشگاه شهرکرد
24th Iranian Conference on Optics and Photonics (ICOP 2018) and
9th Iranian Conference on Photonics Engineering and Technology (ICPET 2018)
Jan 30 - Feb 1 , 2018 - Shahrekord University

ابرتفکیک با نوردهی ساختاریافته در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو

یاسمن گنج‌خانی[۱]، احسان احدی اخلاقی[۱و۲]، محمد چهارسوقی[۱و۲]، علیرضا مرادی[۲و۳]
[۱]دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۶۶۷۳۱-۴۵۱۳۷
[۲] مرکز پژوهشی اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۶۶۷۳۱-۴۵۱۳۷
[۳] دانشکده علوم نانو، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، تهران، ایران کد پستی ۵۵۳۱-۱۹۳۹۵

چکیده – در این مقاله از نوردهی ساختاریافته برای افزایش توان‌تفکیک در میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی میرائو از طریق تصویر کردن توری‌های دوبعدی بر نمونه استفاده شده است. میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی روشی غیرمخرب و آسان برای تصویربرداری سه بعدی از اجسام فازی است. چیدمان شبه هم‌مسیر و خودمرجع میرائو به سبب سادگی و حساسیت کمتری که در مقابل ارتعاشات محیطی دارد، چیدمانی مناسب برای میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی است. شیئی‌های میرائو با گشودگی‌عددی بالا گران هستند و در مقابل شیئی‌های با گشودگی‌عددی پایین‌تر از توان تفکیک کم رنج می‌برند. نشان داده شده است که می‌توان با تصویر کردن توری یک بعدی با فرکانس مناسب بر روی نمونه توان تفکیک عرضی را در یک راستا افزایش داد و با چرخش توری می‌توان به افزایش توان‌تفکیک در تمام راستاها رسید. در این مقاله نشان می‌دهیم که با استفاده از توری‌های دوبعدی با طرح‌های شطرنجی و لانه‌زنبوری می‌توان بی‌نیاز از چرخش توری به ابرتفکیک در تمام راستاها رسید. استفاده از روش فوق به بهبود توان تفکیک چیدمان با نوردهی معمولی از ۱/۲۹۳ میکرومتر به ۰/۸۴ میکرومتر منجر شد و با استفاده از آن میکروکره‌ها در میان انبوهه‌هایی از آن‌ها که با نوردهی معمولی قابل آشکارسازی نبودند، تفکیک شدند.

کلید واژه- ابرتفکیک، میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی، میرائو، نوردهی ساختاریافته

Super-resolution by Structured Illumination in Mirau Digital Holographic Microscopy

Yasaman Ganjkhani[1], Ehsan A. Akhlaghi[1,2] , Mohammad A. Charsooghi[1,2] , and Ali-Reza Moradi[2,3]
[1]Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), 45137-66731, Zanjan , Iran
[2]Optics Research Center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), 45137-66731, Zanjan, Iran
[3] School of Nano Science, Institute for Research in Fundamental Sciences (IPM), PO Box 19395-5531, Tehran, 19395, Iran

Abstract- In this paper we apply structured illumination in Mirau digital holographic microscopy to improve the lateral resolution. Digital holographic microscopy (DHM) is an effective and non-contact technique for 3D imaging of phase objects. Among different DHM setups, Mirau DHM due to its simple and vibration-immune nature is of a high interest. Mirau objectives with high NA are expensive and low NA ones suffer from low lateral resolution. It has been shown that by imaging 1D gratings on the sample we can obtain super-resolution in DHM in 1 direction and to have super-resolution in all directions the gratings should be rotated. We demonstrate that by projecting 2D gratings, instead, super-resolved 3D images in all directions may be obtained. We apply the technique to resolve microparticles within aggregations of them which can never be resolved under uniform illumination of the Mirau DHM setup. The resolution power of the system was improved from 1.3 to 0.84 microns.

Keywords: Super-resolution, Digital Holographic Microscopy, Mirau, Structured Illumniation

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

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Black, (Complex) Persian (Iran)

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-13]

Formatted: Font: 12 pt

۱- مقدمه

توان‌تفکیک بنا به حد آبه طبق رابطه $\lambda/2NA$ با طول‌موج نور و گشودگی عددی سیستم تصویرساز (NA) محدود می‌شود [۱]. به تمام روش‌هایی که بر این محدویت غلبه کنند، روش‌های تصویرگیری ابرتفکیک می‌گویند. برخی از این روش‌ها بر به کارگیری امواج میرا استوارند و میکروسکوپی میدان نزدیک نامیده می‌شوند [۲]. در روش‌های میدان دور، شامل ایده‌های نوآورانه را می‌توان در روش‌هایی نظیر مانند میکروسکوپی STED و میکروسکوپی با نوردهی ساختاریافته (SIM) یافت [۳]. در میکروسکوپی با نوردهی ساختاریافته نمونه با باریکه‌ای با ساختار معلوم روشن می‌شود. به این ترتیب نور ساختاریافته اطلاعات آن دسته از ساختارهای ریز که با نوردهی معمولی قابل آشکار نبودند را بر خود سوار کرده و طی عملیات جداسازی در هنگام بازسازیِ تصاویر قابل‌مشاهده می‌کند. این روش برای اولین بار توسط نیل و همکارانش ابداع شد [۴]. گوستافسون در سال ۲۰۰۰ آن را به منظور افزایش توان‌تفکیک در میکروسکوپی فلوئورسانس به کار برد [۵]. تاکنون جوانب مختلف کار با نوردهی ساختاریافته بررسی شده است.

میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی (DHM) روشی آسان، غیرمخرب و غیرتماسی برای تصویربرداری سه بعدی از اجسام فازی و نمایه سطوح بازتابان است [۶]. چیدمان متداول برای میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی چیدمان ماخ‌زندر است که در آن با ایجاد قدری زاویه میان دو باریکه مرجع و شیئ می‌توان تمام‌نگاشت‌های خارج‌محور داشت و تصاویر حقیقی، مجازی و باریکه پراش نیافته را از هم جدا کرد. اما همین امر چیدمان را در مقابل ارتعاشات مکانیکی و محیطی حساس خواهد کرد. از این رو چیدمان‌های هم‌مسیر و خودمرجع برای میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. از چیدمان‌های مناسب خودمرجع می‌توان به آن‌هایی که از شیئی‌های تداخلی نظیر مایکلسون، لینیک و میرائو استفاده می‌کنند اشاره کرد. در این پژوهش ما از شیئی میرائو استفاده کرده‌ایم. در این نوع شیئی تداخلی باریکه مرجع از آینه کوچکی که درون شیئی تعبیه شده است بازتاب می‌شود. میرائوهای با بزرگ‌نمایی زیاد قیمت‌های بالایی دارند و در مقابل در میرائوهای با بزرگ‌نمایی کم نسبت توان‌تفکیک عرضی به محوری بسیار کمتر است.

توان‌تفکیک در DHM به توان‌تفکیک سیستم تصویرساز آن، مشخصات دوربین ثبت تمام‌نگاشت‌ها و نیز به اندازه پنجره پالایه فوریه در حین بازسازی بستگی دارد. غالب روش‌هایی را که برای ابرتفکیک در میکروسکوپی به کار می‌رود می‌توان برای DHM هم بکار برد. از جمله ترکیب نوردهی ساختاریافته با چیدمان DHM می‌تواند جالب توجه باشد. برای مثال Ma و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از توری معمولی با فرکانس متغیر برای افزایش توان تفکیک در DHM استفاده کرده‌اند [۷]. در [۸] گروهی دیگر از توری‌های یک‌بعدی با جهات مختلف که بر روی مدوله‌کننده فضایی نور (SLM) ایجاد شده‌اند، برای ابرتفکیک استفاده کرده‌اند. قبلا با وارد کردن یک میکروکره شفاف در طول‌کار فاصله‌کار میرائو افزایش بزرگ‌نمایی و توان تفکیک را نشان داده شده و از آن برای تشخیص گلبول‌های سرخ مبتلا به تالاسمی نوع خفیف و نیز برای بررسی ناهمواری سطح نانوکامپوزیت‌های پلیمری استفاده کرده‌ایم [۹و۱۰]. در این مقاله چیدمان هم‌مسیر میرائو را با نور ساختاریافته دوبعدی روشن کرده‌ایم و نشان داده‌ایم که با آن توان‌تفکیک عرضی سیستم زیاد می‌شود.

۲- مبانی نظری

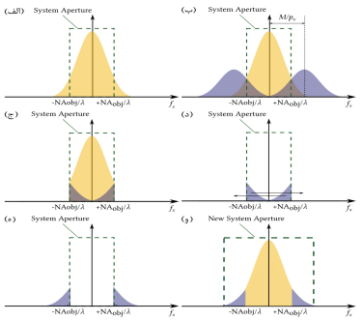
در ساده‌ترین شکل نوردهی ساختاریافته در چیدمان تمام‌نگاری میکروسکوپی، نمونه با تصویر یک توری رانکی سینوسی روشن می‌شود. شکل ۱(الف) طرح‌واره‌ای از طیف فوریه یک نمونه شامل فرکانس‌های پایین و بالا، همانند آنچه در مرحله بازسازی تمام نگاشت‌ها دیده می‌شود، را نشان می‌دهد. مستطیل خط‌چین محدوده فرکانسی را که طول‌موج و گشودگی سیستم مجاز می‌دانند، نشان می‌دهد. در نوردهی معمولی سیستم فقط به فرکانس‌های بازه $[-NA/\lambda, NA/\lambda]$ اجازه عبور می‌دهد. وقتی که سیستم با نوردهی ساختاریافته روشن شود، بخشی از فرکانس‌های بالا سوار بر مراتب ۱ و۱- پراش توری می‌شوند و به اندازه زاویه پراش مرتبه اول که با گام توری P_x و بزرگ‌نمایی سیستم M مشخص می‌شود، نسبت به پراش مرتبه صفر که مربوط به فرکانس‌های پایین است جابجا می‌شوند (شکل۱(ب)). گام توری‌ها باید طوری انتخاب شود که حتی‌الامکان مراتب

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Black, (Complex) Persian (Iran)

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

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-13]

۱ و ۱- همپوشانی نداشته باشند. شکل ۱(ج) همپوشانی فرکانس‌های بالا و پایین قابل‌مشاهده توسط سیستم را نشان می‌دهد.

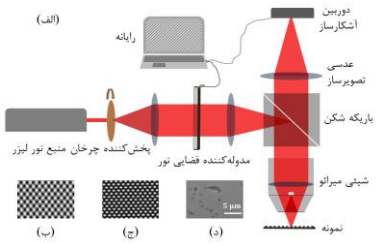


شکل ۱ طرحی از نحوه افزایش توان‌تفکیک با استفاده از نوردهی ساختاریافته

برای از بین بردن این همپوشانی و انتقال فرکانس‌های بالا به مکان درست خود ابتدا فرکانس مرتبه صفر که معادل نوردهی معمولی است از طیف فرکانسی نمونه کسر می‌شود (شکل ۱(د)). سپس فرکانس‌های مراتب بالا به اندازه M/P_x در فضای فرکانسی جابجا می‌شوند تا در جای درست خود قرار گیرند (شکل ۱(ه)). این معادل حالتی است که سیستم دارای گشودگی عددی بزرگ‌تر (NA_{eff}) باشد که نظیر شکل ۱(و) از رابطه $NA_{eff} = NA + NA_{SI}$ به‌دست می‌آید. در این رابطه $NA_{SI} = \sin\theta_{SI} = M\lambda / P_x$ گشودگی عددی است که نوردهی ساختاریافته به سیستم افزوده و برابر با پراش مرتبه اول توری تصویرشده بر نمونه است. به این ترتیب حد تفکیک سیستم با نوردهی ساختاریافته از رابطه $\delta = \kappa\lambda / NA_{eff}$ به‌دست می‌آید که در آن κ از پارامترهای تجربی نظیر نرخ سیگنال به نوفه دوربین به‌دست می‌آید. تمام این مراحل باید در هنگام بازسازی تمام‌نگاشت‌ها نیز اجرا شوند. ما برای بازسازی از روش انتشار طیف زاویه‌ای استفاده می‌کنیم که دامنه و فاز میدان را به‌دست می‌دهد. برای افزایش توان‌تفکیک در تمام جهت‌ها لازم است توری یک‌بعدی دست کم در دو جهت دیگر بر نمونه تصویر شود و تمام مراحل بالا بر تک‌تک جهت‌ها اعمال شود. اما اگر به جای توری یک‌بعدی، از توری دوبعدی با ساختارهای مختلف نظیر شطرنجی یا لانه-زنبوری (Hexagonal) با گام‌های به حد کافی کوچک استفاده شود، می‌توان روش را از چرخش‌های زیاد توری بی‌نیاز کرد.

۳- آماده‌سازی نمونه و چیدمان آزمایش

در شکل ۲(الف) طرح کلی از چیدمان مورد استفاده در این کار آمده است. باریکه لیزر هلیوم-نئون (شرکت پویا فرآزما، ۲ mW، طول موج ۶۳۲٫۸ nm) ابتدا از پخش‌کننده چرخان که به منظور کاهش نوفه و فریزهای مزاحم از طریق کم کردن همدوسی فضایی بر سر راه نور تعبیه شده می‌گذرد. عدسی اول (f=۲۵ mm) جبهه موج خروجی از پخش‌کننده را بر مدوله‌کننده فضایی نور (SLM) تصویر می‌کند. طرح توری‌های مناسب بر روی SLM سوار شده‌اند که از طریق عدسی دوم (f=۵۰ mm) و باریکه‌شکن و شیئی میرائو (Nikon, NA=۰/۳, ۱۰X) بر نمونه تصویر می‌شوند. در داخل میرائو بخشی از باریکه از باریکه‌شکنی که در دهانه آن نصب شده عبور کرده و از نمونه برمی‌گردد. بخش دیگری از باریکه از روی باریکه‌شکن به داخل شیئی بازتابیده شده و سپس به آینه مرجع که در داخل شیئی تعبیه شده برخورد می‌کند و از آن بازتابیده می‌شود. این باریکه نقش باریکه مرجع را ایفا می‌کند. دو باریکه پس از خروج از میرائو با هم تداخل می‌کنند. این باریکه‌های تداخلی از طریق عدسی سوم (f=۱۶۰ mm) به سمت آشکارساز هدایت می‌شوند و تمام‌نگاشت حاصل بر آشکارساز، ثبت می‌شود. برای داشتن تمام‌نگاری خارج‌محور در این چیدمان کافی است میزچه نمونه قدری زاویه داشته باشد. تصاویری از توری‌های دوبعدی شطرنجی و لانه‌زنبوری مورد استفاده در شکل‌های ۲(ج) و (د) نمایش داده شده‌اند.



شکل ۲ (الف) طرحواره چیدمان آزمایش؛ (ب) طرح فازی شطرنجی و (ج) لانه‌زنبوری سوارشده بر SLM؛ (د) تصویر میکروسکوپی از نمونه

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

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Black, (Complex) Persian (Iran)

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-13]

در این کار از میکروکره‌های ۱ میکرونی به عنوان نمونه استفاده کردیم. این میکروذرات در محلول الکل پلی‌وینیل رقیق‌شده مخلوط شده و سپس بر روی یک لام با لایه‌نشانی آلومینیومی در هوای آزاد خشک شدند. ذرات بر روی لام به طور تصادفی توزیع شده‌اند. برخی از آن‌ها طوری در کنار هم قرار گرفته‌اند که امکان دارد تک‌ذره‌ها توسط شیئی ما آشکار نشوند. چنین نواحی از نمونه مورد نظر ما بوده‌اند. در شکل ۲(ه) تصویری از میکروسکوپی با شیئی ۴۰X از این نمونه آمده است.

۴- نتایج تجربی

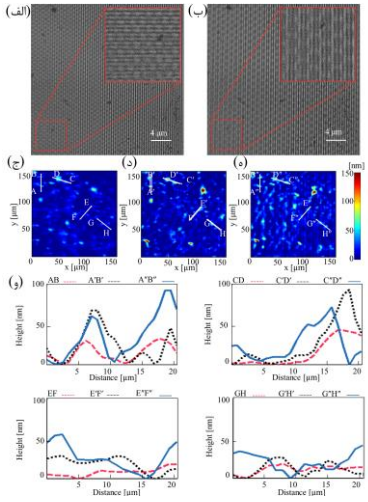
شکل۳ نتایج بازسازی تمام‌نگاشت‌های تحت نوردهی معمولی و نوردهی ساختاریافته دوبعدی را نشان می‌دهد. شکل‌های ۳(الف) و (ب) به ترتیب تمام‌نگاشت‌های نمونه تحت نوردهی شطرنجی و لانه‌زنبوری هستند. تصاویر بازسازی دوبعدی از این نمونه در شکل‌های ۳(ج) تا (ه) به ترتیب برای نوردهی معمولی، شطرنجی و لانه‌زنبوری آورده شده است. در شکل ۳(و) نیز نمایه‌های یک‌بعدی در راستای خطوط با جهت‌گیری‌های متفاوت نشان داده شده در تصاویر دوبعدی، رسم شده‌اند. با مقایسه نتایج بین نوردهی-های معمولی و دوبعدی افزایش توان‌تفکیک در جهات مختلف با استفاده نوردهی دوبعدی قابل مشاهده است. گشودگی عددی شیئی میرائو ۱۰X معادل ۰/۳ است، بنابراین حدتفکیک سیستم تحت نوردهی معمولی صرف‌نظر از نوفه‌ها و خطاهای موجود معادل ۱/۲۹ میکرون است. گشودگی عددی حاصل از توری‌های مورد استفاده برابر با ۰/۱۶ است که باعث بهبود حدتفکیک سیستم به ۰/۸۴ میکرون می‌شود، که این عدد با نتایج تجربی مطابقت دارد.

۵- نتیجه‌گیری

در این پژوهش افزایش توان تفکیک در میکروسکوپی تمام-نگاری دیجیتالی میرائو با نوردهی ساختاریافته انجام گرفت. نشان داده شد که استفاده از نور ساختاریافته با طرح توری دو بُعدی، توان تفکیک در تمام جهات زیاد می‌شود و نیازی به ثبت تمام‌نگاشت‌های بیشتر در جهت‌های مختلف نیست. این امر به افزایش سرعت داده‌گیری می‌انجامد که می‌تواند برای تصویربرداری از نمونه‌های پویا مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای یوسف پورویس برای کمک در تحلیل داده‌ها سپاسگزاری می‌کنند.



شکل ۳ نتایج تجربی تحت نوردهی ساختاریافته دوبعدی؛ هولوگرام شیئ تحت نوردهی با طرح (الف) شطرنجی (ب) لانه‌زنبوری؛ بازسازی-های دوبعدی تحت نوردهی (ج) معمولی، (د) شطرنجی و(ه) لانه-زنبوری؛ (و) نمایه‌های یک‌بعدی در راستای خطوط مشخص‌شده در تصاویر دوبعدی (ج)، (د) و (ه).

مراجع

[1] E. Abbe, "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung", Archiv für mikroskopische Anatomie, p. 413-418, 1873.
[2] A. V. Zayats and V. Sandoghdar, "Apertureless scanning near-field second-harmonic microscopy", Optics communications, p. 245-249, 2000.
[3] S. W. Hell, et al., "The 2015 super-resolution microscopy roadmap", Journal of Physics D: Applied Physics, p. 443001, 2015.
[4] M. A., R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope", Optics letters, p. 1905-1907, 1997.
[5] M. G. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy", Journal of microscopy, p. 82-87, 2000.
[6] K. M. Kim, *Digital Holographic Microscopy*, Vol. 162, Springer, New York, NY: Springer Series in Optical Sciences, 2011.
[7] J. Ma et al., "Resolution enhancement in digital holographic microscopy with structured illumnaition", Chinese Optics Letters, p. 090901, 2013.
[8] P. Gao, G. Pedrini, and W. Osten, "Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy", Optics letters, p. 1328-1330, 2013.
[9] M. Aakhte, et al., "Microsphere-assisted super-resolved Mirau digital holographic microscopy for cell identification", Applied Optics, p. D8-D13, 2017.
[9]
[10] V. Abbasian, E. A. Akhlaghi, M. A. Charsooghi, M. Bazzar, and A. R. Moradi, "Digital Holographic Microscopy for 3D Surface Characterization of Polymeric Nanocomposites", to appear in Ultramicroscopy 2017.

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

Formatted: Font: 12 pt
Formatted: Centered
Formatted: Font: 7 pt, Complex Script Font: 9 pt
Formatted: Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 1, 2, 3, … + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0" + Tab after: 0.25" + Indent at: 0.25"
Formatted: Font: 12 pt, Font color: Black

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-13]