



میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی هم‌زمان با طیف‌سنجی تبدیل فوریه

مریم لطفی، مرضیه امانی و معصومه دشتدار*

دانشکده فیزیک، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پست الکترونیکی: m-dashtdar@sbu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵؛ دریافت نسخه نهایی: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵)

چکیده

میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی یک روش غیر مخرب و عاری از برچسب است که اطلاعات فازی کمی را در کاربردهای صنعتی و بیولوژیکی ارائه می‌دهد. منابع نوری با همدوسی بالا معمولاً در میکروسکوپ‌های تمام‌نگاری دیجیتالی استفاده می‌شوند. ایجاد فریزهای انگلی و الگوهای پیسه‌ای به دلیل استفاده از منابع با همدوسی بالا و همچنین خطاهای ناشی از چیدمان‌های پیچیده، باعث پایین آمدن دقت اندازه‌گیری فاز می‌شود. در این مقاله، میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتال هم‌مسیر بر مبنای منابع نور با همدوسی پایین به همراه طیف‌سنج تبدیل فوریه معرفی شده است. منبع نور با همدوسی پایین استفاده شده در اینجا LED و همچنین چیدمان هم‌مسیر ارائه شده، چیدمانی بر اساس تقسیم جبهه موج به وسیله دو منشور فرنل است. بازسازی تمام‌نگاشت با روش تبدیل فوریه تحلیل می‌شود. خط طیفی نور LED به طور هم‌زمان با تبدیل فوریه گرفتن از نمایانی فریزهای ثبت شده به دست می‌آید. توانمندی انجام هم‌زمان تصویربرداری کمی فازی و طیف‌سنجی تبدیل فوریه این سامانه را در مطالعه زمان واقعی نمونه‌های زیستی در ابعاد میکرونی منحصر به فرد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال، منابع نور با همدوسی پایین، هندسه هم‌مسیر، دو منشور فرنل، طیف‌سنجی تبدیل فوریه، خطای پیسه‌ای، فریزهای انگلی

۱. مقدمه

که فعالیت سلولی نقش مهمی در آسیب شناسی^۲ بیماری‌های انسانی دارد، میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی در پزشکی و زیست‌شناسی کاربرد فراوان دارد [۴]. در تمام‌نگاری دیجیتال معمولاً از لیزر به عنوان منبع استفاده می‌شود؛ ولی لیزر به علت همدوسی بالا باعث ایجاد فریزهای انگلی^۳ می‌شود که این به دلیل بازتاب‌های متعدد و نوفه پیسه‌ای^۴ ناشی از پراکندگی است [۵]

میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتال^۱ یک روش تصویربرداری فازی غیرمخرب است که اطلاعات دامنه و فاز یک نمونه شفاف را به‌طور هم‌زمان به دست می‌آورد [۱-۳]. به همین دلیل از آنجایی

۱. Digital holographic microscope

۲. Pathology

۳. Parasitic fringes

۴. Speckle noise

و [۶]. روش‌های آزمایشی و الگوریتم‌های پردازش متفاوتی ارائه شده است که از صافی‌های مختلفی استفاده کردند تا قسمتی از خطای پیسه‌ای را کاهش دهند، اما جزئیاتی مانند لبه‌ها و خطوط در تصاویر بازسازی شده از بین رفتند [۷]. برای حل خطاهای ناشی از فریزهای انگلی و الگوهای پیسه‌ای ناشی از منابع با همدوسی بالا می‌توان از منابع با همدوسی پایین مانند دیوهای نوری^۱ (LED) استفاده کرد [۸-۱۵]. به دلیل همدوسی پایین این منابع نوری، نوع چیدمان استفاده شده برای این نوع منابع بسیار حائز اهمیت است. از جمله این چیدمان‌ها می‌توان تداخل‌سنج‌های دوباریکه‌ای مانند تداخل‌سنج‌های مایکلسون و ماخ زندر^۲ را که بر اساس هندسه^۳ خارج از محور^۳ هستند نام برد که در آنها یک باریکه حاوی اطلاعات شیء و یک باریکه حاوی اطلاعات مرجع است ولی این چیدمان‌ها به دلیل دشواری در تنظیم اختلاف طول مسیر دو باریکه، برای ایجاد فریزهایی با تباین بالا در یک میدان دید بزرگ، انتخاب مناسبی نیستند [۱۶]. علاوه بر این، از آنجایی که دو باریکه مسیرهای مختلفی را طی می‌کنند و از اجزای اپتیکی مختلفی عبور می‌کنند ممکن است به وسیله^۴ اجزای اپتیکی گوناگون، سامانه دچار ابیراهی^۴ شود که بر دقت اندازه‌گیری تأثیر می‌گذارد. همچنین هرگونه ارتعاشات مکانیکی خفیف یا اختلالات محیطی کوچک در هر یک از بازوهای تداخل‌سنج منجر به کاهش پایداری فاز مکانی و زمانی می‌شود [۱۷]. به همین دلایل استفاده از هندسه^۵ خود محور مسیر مشترک^۵ پیشنهاد شده است. در این چیدمان، از بخشی از باریکه شیء که نمونه‌ای در آن قرار ندارد به عنوان مرجع استفاده می‌شود. به همین دلیل با این نوع چیدمان می‌توان پایداری مکانی و زمانی بالایی داشت و از آنجایی که در این روش دوباریکه هم‌مسیر هستند و راه نوری یکسانی را طی می‌کنند، این امکان فراهم می‌شود که به راحتی بتوان از نورهایی با همدوسی پایین استفاده کرد [۱۸-۲۴].

یکی دیگر از مزایای چیدمان هم‌مسیر استفاده از این روش در طیف‌سنجی است. از آنجایی که خطوط طیفی ناشی از نور انتشار داده شده از یک نمونه، اطلاعاتی در مورد ساختار و سطح انرژی آن نمونه را می‌دهد، مطالعه آن می‌تواند در مورد فشار، دما و پیوندهای شیمیایی و غیره^۶ یک نمونه اطلاعاتی به ما دهد [۲۵]. از این رو این چیدمان می‌تواند در حوزه‌های مختلف از جمله زیست‌شناسی، شیمی، پزشکی مورد استفاده قرار گیرد [۲۶-۲۸]. طیف را می‌توان با روش‌های طیف‌سنجی بازتابی (توری)، شکست (منشور) و تداخل‌سنجی اندازه‌گیری کرد [۲۹]. در طیف‌سنجی تداخل‌سنجی، می‌توان از طیف‌سنجی تبدیل فوریه^۶ (FTS) برای اندازه‌گیری طیف عبوری نمونه با تبدیل فوریه گرفتن از داده‌های فیزیکی استفاده کرد [۳۰]. چیدمان متداول برای FTS، تداخل‌سنج‌های مایکلسون هستند [۳۱]. البته استفاده از این نوع چیدمان به دلیل نیازمند بودن به حرکت آینه در مسافت طولانی برای تراز نگه داشتن چیدمان، سخت می‌شود. به همین دلیل استفاده از چیدمان هم‌مسیر به منظور کار با FTS برای منابع با همدوسی پایین می‌تواند گزینه^۶ مناسب‌تری نسبت به چیدمان مایکلسون باشد [۳۲].

در این مقاله، ما سعی کردیم روشی را پیشنهاد دهیم که نه تنها کمترین خطا در اندازه‌گیری‌های تجربی و در نتیجه افزایش دقت در اندازه‌گیری فاز را داشته باشد بلکه بتوان به وسیله^۶ آن به طور همزمان طیف‌سنجی هم انجام داد. برای رسیدن به هدفمان، در قدم اول برای کاهش خطاهای الگوی پیسه‌ای و فریزهای انگلی ناشی از منابع با همدوسی بالا، از LED استفاده کردیم. در قدم بعد، چیدمان میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی خود را بر اساس چیدمان هم‌مسیر با استفاده از یک دومنشور فرنل قرار دادیم. به این ترتیب توانستیم ضمن کاهش خطاهای ناشی از الگوهای پیسه‌ای و فریزهای انگلی و ارتعاشات مکانیکی، امکان بازیابی فاز را تنها با ثبت یک تمام‌نگاشت فراهم سازیم. در قدم آخر، نشان دادیم که با استفاده از چیدمان طراحی شده در این

۱. Light-emitting diode

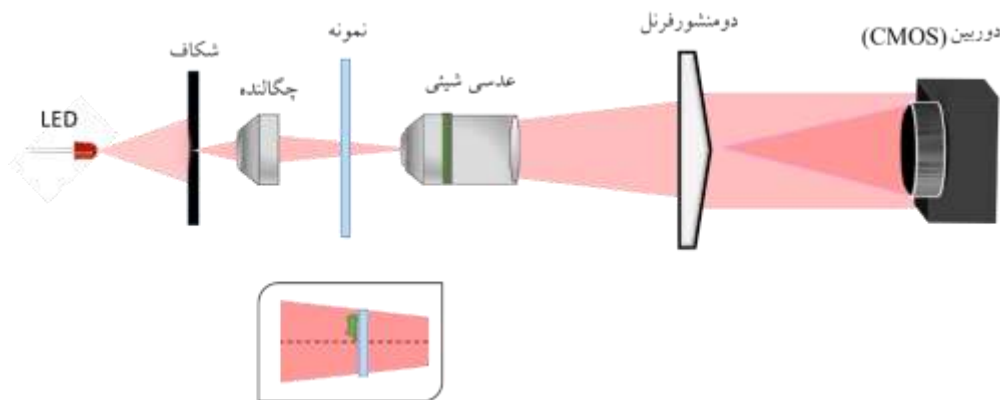
۲. Mach-Zehnder

۳. Off-axis

۴. Aberration

۵. Common path self-referencing

۶. Fourier transform spectroscopy



شکل ۱. طرح‌وارهٔ چیدمان میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتال با استفاده از LED.

$$\varphi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{\text{Im}[C(x, y)]}{\text{Re}[C(x, y)]} \right], \quad (3)$$

در این رابطه، Re و Im به قسمت موهومی و حقیقی تابع اشاره دارند [۳۳].

حال اگر با رویکردی دیگر به همان تمام‌نگاشت ثبت شده نگاه شود، از توزیع شدت ثبت شده می‌توان توزیع طیفی را به دست آورد؛ بدین صورت که توزیع شدت به شکل زیر نوشته می‌شود:

$$D(x) = \int_{\sigma_1}^{\sigma_2} B(\sigma) (1 + \cos(2\pi\sigma x)) d\sigma, \quad (4)$$

در اینجا، $B(\sigma)$ توزیع طیفی، σ عدد موج و عکس طول موج است. اگر توزیع طیفی متقارن باشد، نمایانی فریزها به صورت زیر به دست می‌آید:

$$V(x, y) = \frac{D_{max} - D_{min}}{D_{max} + D_{min}} = \frac{1}{I_0} \int_{\sigma_1 - \sigma_0}^{\sigma_2 - \sigma_0} B(\sigma_0 + \varepsilon) \cos(2\pi\varepsilon x) d\varepsilon, \quad (5)$$

در این رابطه، σ_0 عدد موج مرکزی توزیع طیفی و $\varepsilon = \sigma - \sigma_0$ همچنین I_0 به شکل زیر تعریف شده است:

$$I_0 = \int_{\sigma_1 - \sigma_0}^{\sigma_2 - \sigma_0} B(\sigma_0 + \varepsilon) d\varepsilon, \quad (6)$$

در نهایت می‌توان با یک عکس تبدیل فوریه کسینوسی گرفتن از تابع نمایانی در رابطه (۵) توزیع طیفی را به دست آورد.

۳. چیدمان آزمایش و نتایج تجربی

در شکل ۱ منبع نور استفاده شده یک LED با طول موج مرکزی ۶۰۰ nm و پهنای طیفی (FWHM) ۴۵/۷۶ nm است.

مقاله، می‌توان به طور همزمان با تمام‌نگاری دیجیتال ثبت شده، شکل خط طیفی چشمه را با استفاده از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه به دست آورد.

۲. مبانی نظری

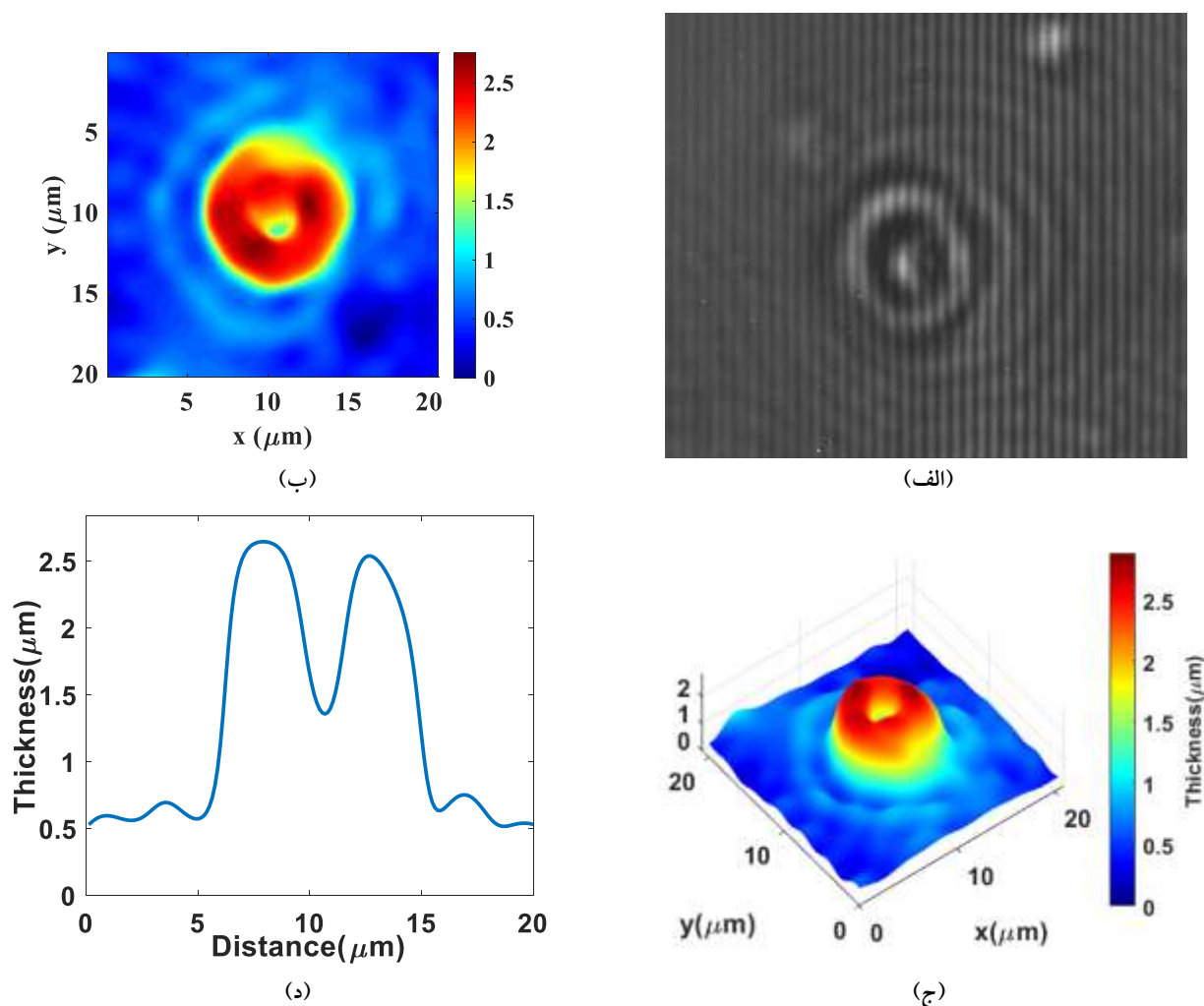
هنگامی که یک تمام‌نگاشت دیجیتال ثبت می‌شود، توزیع شدت آن تمام‌نگاشت به شکل زیر نوشته می‌شود:

$$I(x, y) = |O|^2 + |R|^2 + C(x, y)e^{ifx} + C(x, y)e^{-ifx}, \quad (1)$$

در اینجا O و R به ترتیب توزیع‌های دامنهٔ حقیقی باریکه‌های عبوری از شیء و مرجع را نشان می‌دهند و f بسامد فریز ناشی از زاویهٔ بین باریکهٔ جسم و باریکهٔ مرجع است. همچنین در این رابطه، C شامل جملهٔ فازی است و به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$C(x, y) = |O| \cdot |R| e^{i\varphi(x, y)}, \quad (2)$$

جملهٔ اول و دوم در رابطه (۱) نشان‌دهندهٔ موج پراش نشده‌ای هستند که از تمام‌نگاشت عبور می‌کند (پراش مرتبهٔ صفر). جملهٔ سوم و چهارم جملات تداخلی هستند که اطلاعاتی در مورد جسم را در خود دارند. طیف زاویه‌ای این عبارت را می‌توان با تبدیل فوریه گرفتن از آن به دست آورد. سپس با صاف کردن یکی از جملات سوم یا چهارم در فضای فوریه و با عکس فوریه گرفتن از آن جمله، فاز جسم را می‌توان از رابطهٔ زیر استخراج کرد:



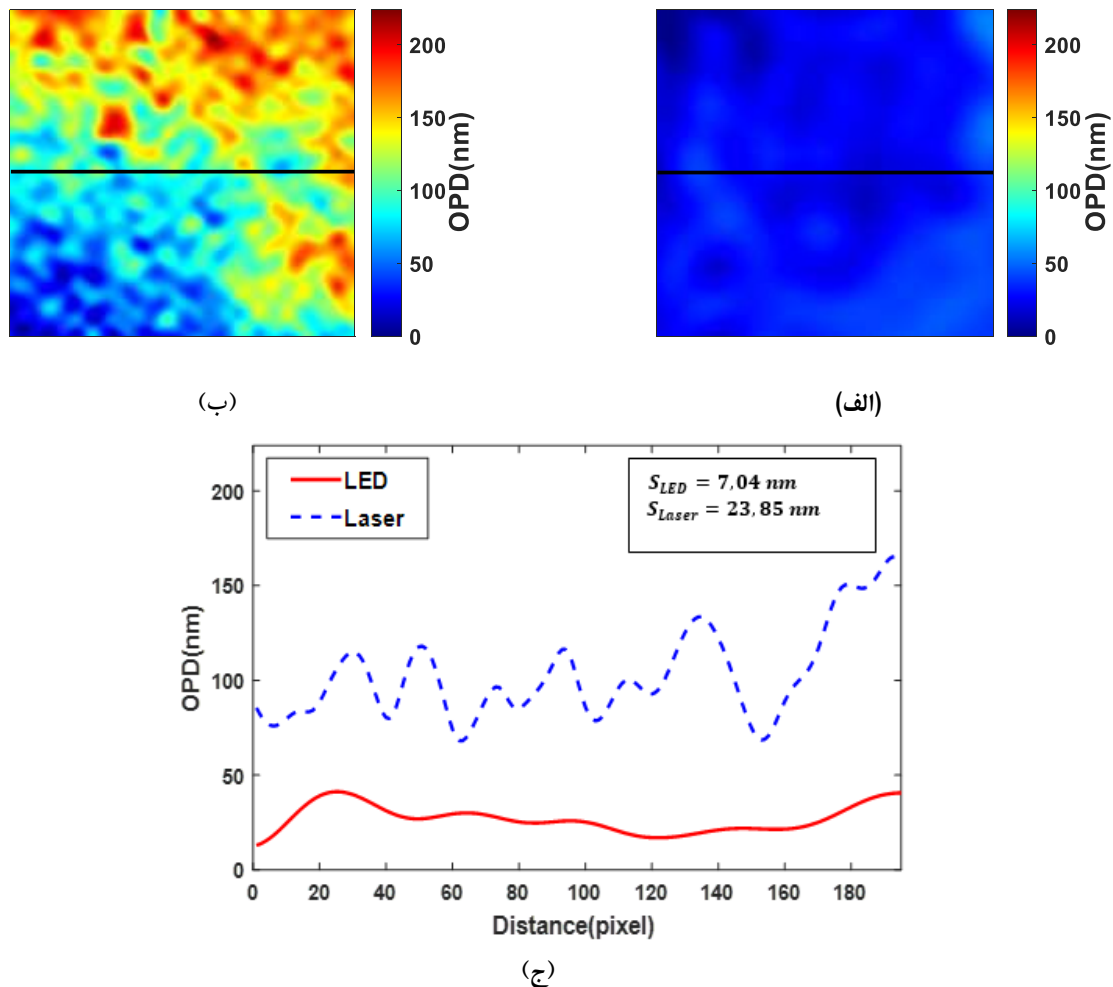
شکل ۲. نتایج اندازه‌گیری مربوط به گلبول قرمز. (الف) ثبت تمام‌نگاشت، (ب) بازسازی فاز در دو بعد، (ج) بازسازی ضخامت نمونه در سه بعد، و (د) نمودار دوبعدی مربوط به سطح مقطع ضخامت.

۳.۱. به‌دست آوردن تصویر کمی فاز

بعد از چیدمان آزمایش، از روش پیشنهادی، برای تصویربرداری کمی فاز از گلبول قرمز استفاده شد. برای بررسی و مطالعه نمونه گلبول قرمز از روش اسمیر کردن استفاده شد. در این روش یک لایه نازک از نمونه گلبول قرمز بر روی تیغه شیشه‌ای گسترده می‌شود. در شکل ۲. الف تمام‌نگاشت ثبت شده از گلبول قرمز نشان داده شده است. برای به‌دست آوردن فاز از روش انتشار طیف زاویه‌ای استفاده شده است [۳۴].

شکل ۲. ب نمای سه بعدی فاز بازسازی شده را نشان می‌دهد.

نور پس از عبور از شکاف به منظور افزایش همدوسی فضایی نور، توسط عدسی چگالنده بر روی نمونه متمرکز می‌شود. نمونه توسط یک عدسی میکروسکوپ شیئی (بزرگنمایی $\times 40$ و گشودگی عددی 0.65) بزرگنمایی می‌شود. باریکه‌ای که از عدسی شیئی خارج می‌شود، به دو منشور فرنل برخورد می‌کند و پس از عبور از دو منشور، جبهه موج به دو قسمت تقسیم می‌شود که باهم برهم‌نهی می‌کنند. در نهایت فریزهای تداخلی تشکیل شده، توسط آشکارساز CMOS ($200\text{--}1300\ \mu\text{m}$) Basler acA با اندازه پیکسل $4/8$ میکرومتر ثبت می‌شوند.



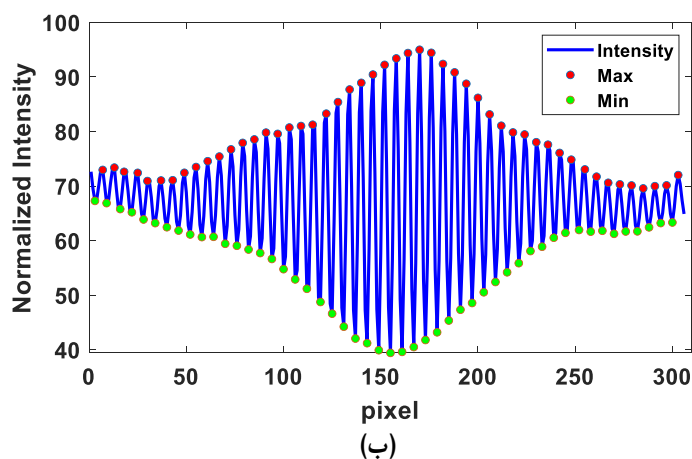
شکل ۳. (الف) تصویر دوبعدی اختلاف راه نوری برای LED، (ب) تصویر دو بعدی اختلاف راه نوری برای لیزر و (ج) تصویر مربوط به انحراف استاندارد اختلاف راه نوری.

۲.۳. پایداری مکانی

به دلیل استفاده از منبع LED که هم‌دوسی پایینی دارد، انتظار می‌رود پایداری مکانی که به خطای پس‌زمینه بستگی دارد، افزایش یابد و در نتیجه پس‌زمینه صاف‌تر و خطای ناشی از الگوی پیسه‌ای کمتری وجود داشته باشد. انحراف معیار از اختلاف راه نوری^(۱) (OPD) می‌تواند به عنوان کمیت پایداری مکانی معرفی شود و از رابطه زیر به دست می‌آید:

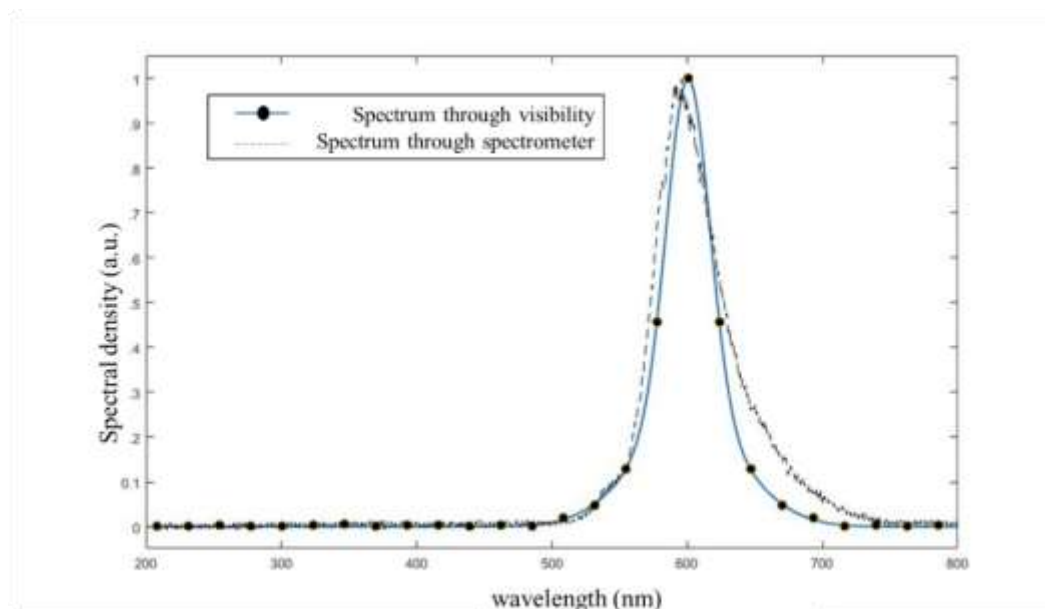
$$S = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}, \quad (7)$$

می‌توان ضخامت نمونه گلبول قرمز را از بازسازی فاز با استفاده از رابطه $d = \lambda \Delta\phi / 2\pi(n_{RBC} - n_{bp})$ به دست آورد. در این رابطه d ضخامت نمونه، $\Delta\phi$ فاز بازسازی شده، λ طول موج مرکزی برای LED، $n_{RBC} = 1/41$ ضریب شکست متوسط گلبول قرمز و $n_{bp} = 1/34$ ضریب شکست متوسط پلاسمای خون است. شکل ۲. ج و ۲. د به ترتیب نمای دو بعدی و سطح مقطع توزیع ضخامت را نمایش می‌دهند که به خوبی با شکل واقعی گلبول قرمز تطابق دارند و صحت انجام کار ما را نشان می‌دهد.



(الف)

شکل ۴. (الف) تداخل نگاشت ثبت شده توسط طیفسنج، (ب) نمایه یک بعدی شدت و نقاط بیشینه و کمینه جهت محاسبه نمایانی.



شکل ۵. مقایسه طیفستج تبدیل فوریه با طیفسنج تجاری (Spectrometer HR ۲۰۰ V).

شده است.

شکل ۳. ج انحراف معیار مربوط به OPD تک بعدی را برای لیزر

و LED مقایسه می کند. انحراف معیار برای لیزر، S_{Laser} و برای LED، $S_{LED} = 7/0.4$ است.

انحراف معیار لیزر تقریباً سه برابر انحراف معیار LED به دست آمد. انحراف معیار کمتر در LED نشان دهنده پایداری فضایی بیشتر آن نسبت به منبع لیزر است. بنابراین پایداری فضایی به وسیله LED نسبت به لیزر بیش از سه برابر افزایش می یابد.

در اینجا، N تعداد داده ها، x_i مقدار هر داده و \bar{x} میانگین داده ها را نشان می دهند.

برای مقایسه پایداری مکانی منبع LED از یک لیزر با طول موج 650 nm به عنوان منبع با همدوسی بالا استفاده شد. به منظور مقایسه انحراف معیار دو منبع نوری، تمام نگاشت هایی بدون حضور نمونه به وسیله دو منبع لیزر و LED ثبت و بازسازی شد. شکل ۳. الف و شکل ۳. ب به ترتیب تصویر سه بعدی OPD پس زمینه برای LED و لیزر را نشان می دهند. OPD تک بعدی برای هر دو منبع با خط مشکی در هر کدام از شکل ها مشخص

۳.۳. به‌دست آوردن شکل خط طیفی چشمه LED

برای به‌دست آوردن شکل خط طیفی چشمه LED مورد استفاده در چیدمان ارائه شده، از روش طیف‌سنجی تبدیل فوری استفاده شد که دقیق‌ترین و متداول‌ترین روش برای تعیین نمایه خط طیفی است [۳۰]. تکنیک ارائه شده یک روش تبدیل فوری‌ای است که بر اساس روش نمایانی، با ثبت یک تداخل‌نگاشت، سپس تبدیل فوری گرفتن از منحنی نمایانی، شکل خط طیفی چشمه را به‌دست می‌آورد.

همان‌طور که در شکل ۴ الف مشاهده می‌شود به‌منظور تعیین شکل خط طیفی LED، یک تداخل‌نگاشت ثبت شد و در شکل ۴ ب نمایه یک‌بعدی شدت رسم و نقاط بیشینه و کمینه شدت جهت محاسبه نمایانی توسط نرم‌افزار MATLAB به‌دست آمد. شکل ۵ نشان‌دهنده شکل خط طیفی LED است که یک بار با تبدیل فوری گرفتن از منحنی نمایانی با پهنای طیفی (FWHM) LED، ۴۵/۷۶ نانومتر و بار دیگر با استفاده از طیف‌سنج تجاری (Spectrometer HR V۲۰۰,۸۵۰ - ۳۵۰nm) به‌دست آمد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، نمایه طیفی تجربی به‌دست آمده با استفاده از طیف‌سنج طراحی شده، توافق خوبی با نمایه به‌دست آمده از طیف‌سنج تجاری دارد.

۴. نتیجه‌گیری

در این مقاله، ما میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی را بر مبنای استفاده از منبع LED به عنوان منبعی با همدوسی پایین و چیدمانی بر اساس چیدمان هم‌مسیر، پیشنهاد و بدین‌وسیله خطای ناشی از الگوهای پیسه‌ای و فریزهای انگلی را تا حد زیادی کاهش دادیم. برای اثبات ادعای خود، پایداری مکانی چیدمان خود را در زمانی که از LED به عنوان منبعی با همدوسی پایین استفاده شد با زمانی که از لیزر با طول‌موج **nm** ۶۵۰ در همان هندسه استفاده شد، مقایسه کردیم. انحراف معیار ناشی از LED حدوداً سه برابر از انحراف معیار لیزر کمتر بود و بدین‌وسیله خطای سامانه با منبع LED حداقل سه برابر کاهش پیدا کرد. سپس با استفاده از هندسه پیشنهادی خود توانستیم طیف LED را با تبدیل فوری گرفتن از تابع نمایانی سامانه به‌دست آوریم. سپس نشان دادیم که این طیف به‌دست آمده از تبدیل فوری تطابق خوبی با طیف به‌دست آمده از طیف‌سنج تجاری دارد. بدین‌وسیله نشان دادیم که میکروسکوپ تمام‌نگاری پیشنهادی هم‌زمان طیف‌سنجی هم انجام می‌دهد.

مراجع

1. W Choi, C Fang-Yen, K Badizadegan, S Oh, N Lue, R R Dasari, and M S Feld, *Nat. Methods* **4** (2007) 717.
2. V Singh, S Tayal, and D S Mehta, *OSA Contin.* **1** (2018) 48.
3. P Marquet, et al., *Opt. Lett.* **30** (2005) 468.
4. M K Kim, *SPIE Reviews* **1** (2010) 018005.
5. H. Meng, et al., *J. Opt. Soc. Am. A* **10** (1993) 2046.
6. J C Dainty ed. *Springer Science & Business Media*, (2013).
7. J Garcia-Sucerquia, J A H Ramirez, and D V Prieto, *Optik* **116** (2005) 44.
8. M León-Rodríguez, et al., *JOSA A* **29** (2012) 498.
9. M C Potcoava and M K Kim, *Appl. Opt.* **48** (2009) H9.
10. S Shin, et al., *Opt. Lett.* **40** (2015) 5407.
11. F Dubois, L Joannes, and J C Legros, *Appl. Opt.* **38** (1999) 7085.
12. Y Mori and T Nomura, *Appl. Opt.* **52** (2013) 3838.
13. J Garcia-Sucerquia, *Appl. Opt.* **52** (2013) A232.
14. M Joglekar, et al., *Opt. Express* **30** (2022) 29234.
15. K Tajbakhsh, S Ebrahimi, and M Dashtdar, *Appl. Opt.* **61** (2022) 398.
16. P Girshovitz and N T Shaked, *Light Sci. Appl.* **3** (2014) e151.
17. P Hosseini, et al., *Opt. Lett.* **30** (2016) 1656.

18. B Kemper, et al., (2011). *J. Biomed. Opt.* **16** (2011) 026014.
19. N T Shaked, *Opt. Lett.* **37** (2012) 2016.
20. P Bon, et al., *Opt. Express* **17** (2009) 13080.
21. J Di, et al., *Appl. Opt.* **55** (2016) 7287.
22. S Ebrahimi, et al., *Appl. Phys. Lett.* **11** (2018).
23. S Ebrahimi and M Dashtdar, *Appl. Phys. Lett.* **20** (2019) 115.
24. S Ebrahimi and M Dashtdar, *Opt. Lett.* **46** (2021) 3516.
25. W Demtröder, *Laser spectroscopy*, vol. 2 (Springer, 1973).
26. B H Bransden and C. J. Joachain, *Phy. Atom. Mol*, 2nd ed. (Pearson, 2003).
27. M H Niemz, “*Laser-tissue interactions*” (Springer -Verlag, 2007).
28. P N Prasad, “*Introduction to biophotonics*” (John Wiley & Sons, 2004).
29. D W Ball, *Field guide to spectroscopy*, vol. 8 (Spie Press Bellingham, Washington, 2006)
30. G A Vanasse and H Sakai, “*Vii fourier spectroscopy*,” in *Progress in Optics*, vol. 6 (Elsevier, 1967), pp. 259–330.
31. J C Albergotti, *American. J. Phys.* **40** (1972) 1070.
32. A Jabbari, K Hassani, and M T Tavassoly, *Appl. Opt.* **58** (2019) 5353.
33. D Malacara, “*Optical shop testing*”, vol. 59 (John Wiley & Sons, 2007).
34. A Anand, V K Chhaniwal, and B Javidi, *J. Dis. Technol.* **6** (2010) 500.