

Секция У

AMPL-SCHOOL

УДК 535

Микроскопия со структурированным освещением с помощью синтезированного пучка

Е.В. Адамов, Е.А. Богач, В.В. Дудоров*Институт оптики атмосферы СО РАН
634055, Томск, Россия, пл. Академика Зюева, 1, adamov@iao.ru*

Оптическая микроскопия играет важную роль в биологических исследованиях благодаря возможности бесконтактного наблюдения и измерения живых образцов. Однако у обычной оптической микроскопии есть ограничения. Из-за дифракционного предела ее пространственное разрешение составляет около 200 нм. Применение структурированного освещения позволяет повысить пространственное разрешение более чем в 2 раза, а добавление управления поляризацией позволяет расширить систему на проведение исследования анизотропных прозрачных и непрозрачных объектов. Кроме того, структурированное освещение позволяет получить трехмерное изображение объекта. Последние достижения в области лазерной техники позволяют предложить новый подход к формированию структурированного освещения. В данной работе впервые численно показана возможность реализации микроскопии со структурированным освещением с помощью синтезированных пучков. В качестве источника выступает матрица когерентных лазеров позволяющая управлять распределением фазы, амплитуды и поляризации пучка. Предложенная экспериментальная схема не требует контура обратной связи для стабилизации фаз, что отличает ее от схемы когерентного сложения. Исследуемая поверхность была смоделирована численно. Со стороны алгоритма повышения разрешающей способности применен известный метод SIM-SR, хорошо зарекомендовавший себя в решении подобной задачи. Применение предложенного подхода для задач микроскопии со структурированным освещением позволит удешевить конструкцию микроскопа и увеличить скорость измерения объектов.

Ключевые слова: микроскопия со структурированным светом, синтезированные пучки, матрица волоконных излучателей; structured illumination microscopy, synthesized beams, fiber array.

Введение

Не так давно были разработаны методы сверхвысокого разрешения, которые позволяют обойти дифракционный предел и, таким образом, дают людям возможность наблюдать за субклеточными структурами в наномасштабе. Микроскопия со структурированным освещением (SIM) — один из известных методов получения изображений с разрешением выше дифракционного предела [1]. Метод основывается на последовательном освещении образца структурами света с последующей алгоритмической обработкой данных с камеры [1]. В качестве структуры освещения чаще всего используют полосы синусоидальной подсветки со сдвигом фаз, и значительно реже спеклы [2], шахматные [3] или даже случайные неизвестные узоры [4], в зависимости от различных целей, таких как сверхвысокое разрешение, оптическое сечение или измерение дальности. SIM метод требует минимальных изменений в конструкции обычного микроскопа, что делает его доступным при минимальных финансовых затратах, сохраняя при этом все преимущества обычной микроскопии: оптическая конфигурация, не требующая точечных сканирующих объектов (как в STED методе [5]); широкоугольная полнокадровая съемка с высокой скоростью записи; низкая доза света, не наносящая вреда живым образцам [1].

Недавние исследования показали эффективность добавления управления поляризацией в SIM метод. Поляризационная микроскопия со структурированным освещением (pSIM) позволяет одновременно получать пространственную структуру и ориентацию диполя посредством анализа в пространственно-угловом гиперпространстве. С помощью pSIM удалось успешно визуализировать ориентацию диполя цитоскелетных филаментов со сверхвысоким разрешением в фиксированных клетках, срезах тканей и живых клетках [6].

Несмотря на все преимущества, SIM и pSIM по-прежнему сталкивается с рядом технических проблем, которые препятствуют его практическому применению и широкому распространению в биомедицинском сообществе для получения изображений живых клеток в реальном времени. Как правило, высококачественные и надежные реконструкции SIM и pSIM в значительной степени зависят от алгоритмов постобработки и характеристики освещения, в частности от точной оценки параметров схемы освещения, таких как волновой

вектор, начальная фаза, поляризация, глубина и период модуляции [7]. Даже незначительные ошибки в параметрах могут сильно повлиять на результаты реконструкции, приводя к существенным артефактам [8]. Более того, эти параметры зависят от образца и окружающей среды, поэтому их нельзя компенсировать с помощью однократной калибровки [9], что значительно усложняет настройку в случае использования статических оптических компонентов, создающих структурированное освещение [1, 6].

В данной работе впервые численно показана возможность реализации микроскопии со структурированным освещением с помощью синтезированных пучков и предложена новая оптическая схема. В качестве источника выступает матрица когерентных лазеров, позволяющая управлять распределением фазы, амплитуды и поляризации пучка. Применение концепции полностью цифрового лазера [10, 11] потенциально позволяет адаптивно изменять характеристики пучка для разных условий SIM и pSIM, при использовании практически любой структуры освещения (не только синусоидальной) со значительно большей частотой модуляции, что позволит без потери пространственного разрешения значительно превысить известный результат в 188 Гц временного разрешения [12], который был получен за счет использования жидкокристаллического пространственного модулятора света.

Схема эксперимента

Для управления распределением интенсивности и поляризации структурированного освещения предложена схема эксперимента, представленная на рис. 1. В отличие от предыдущих наших разработок [10, 11], в этой схеме используются восемь субпучков и четыре фазовых модулятора, а также отсутствует контур обратной связи. Поскольку тепловые шумы вносят фазовый сдвиг значительно медленнее, чем частота кадров камеры, стабилизация фаз не требуется для проведения измерений.

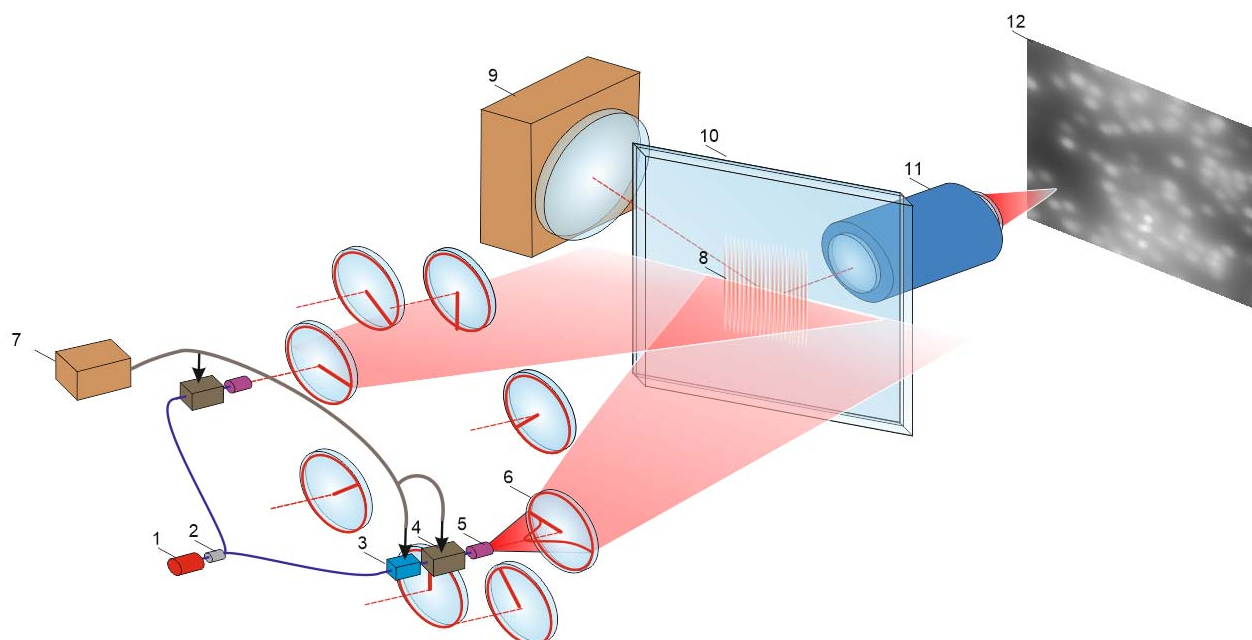


Рис. 1. Схема эксперимента: 1 — узкополосный задающий лазер, 2 — волоконный разветвитель 1×8 , 3 — фазовые модуляторы, 4 — модулятор амплитуды, 5 — волоконные коллиматоры с пьезоэлектрическим модулятором, 6 — отрицательная линза, 7 — контроллер управления, 8 — область формирования интерференционной картины, 9 — камера с объективом, 10 — пластина дихроичного светоделителя, 11 — микрообъектив, 12 — плоскость измерения

В рассматриваемой схеме восемь когерентных расходящихся гауссовых субпучков с линейной поляризацией образуют синтезированную апертуру в виде центрально симметричной решетки 5, 6. Два диаметрально противоположных субпучка образуют систему, позволяющую формировать синусоидальное распределение интенсивности 8 с управляемым сдвигом по фазе за счет установленного в каждой паре одного фазомодулятора 3 и управлять глубиной модуляции интерференционной картины за счет модуляторов амплитуды 4. Период интерференционной картины определится углом наклона волоконных коллиматоров, управление которыми осуществляется пьезоэлектрическими модуляторами 5. Для упрощения отображения схемы эксперимента на рис. 1 компоненты, входящие в каждую пару субпучков, показаны только один раз. Угол наклона интерференционных полос определяется выбором пары субпучков, для которых задаются ненулевые амплитуды. Контроль поляризации может осуществляться за счет управления направлением поляризации субпучков, однако это выходит за рамки данной работы. Излучения от двух субпучков, включая область интерференции 8, попадает на пластину дихроичного светоделителя 10, с покрытием, почти полностью преломляющим падающее лазерное излучение. После пластины 10 излучение проходит микрообъектив 11, ос-

вещающая поверхность измерения 12. В обратном направлении излучение от поверхности 12 через микрообъектов 11 и пластинку 10 попадает на камеру с объективом 9.

Исходя из характеристик оптических компонентов, важно отметить, что частота работы метода измерения будет ограничена самым медленным элементом, то есть характеристиками камеры.

Моделирование

Задание поверхности с микроскопическими элементами осуществилось согласно следующему алгоритму:

- 1) формируем плоскость случайных величин от 0 до 1 (рис. 2, *а*);
- 2) выделяем значения выше 0,99 и производим операцию свертки с супергауссовой функцией с заданным радиусом (рис. 2, *б*);
- 3) производим операцию свертки с функцией рассеяния точки (рис. 2, *в*).

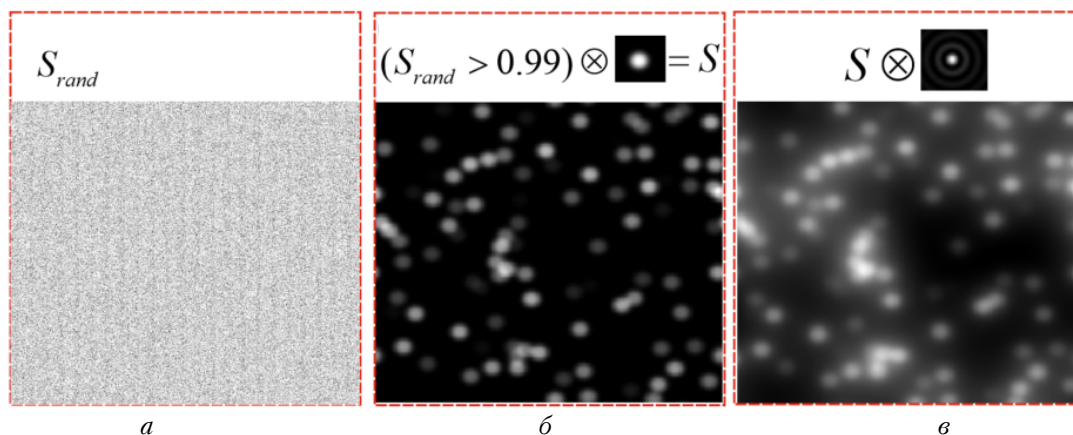


Рис. 2. Задание случайной поверхности: *а* — плоскость случайных величин от 0 до 1; *б* — результат операции свертки значений выше 0,99 и супергауссовой функции с заданным радиусом; *в* — результат операции свертки с функцией рассеяния точки

В свободном от aberrаций микроскопе функция рассеяния точки (PSF) обладает круговой симметрией и определяется выражением:

$$h(r) = \left\{ \frac{2}{r} J_1 \left(\frac{2\pi r NA}{\lambda} \right) \right\}^2, \quad (1)$$

где $h(r)$ — это функция рассеяния точки PSF, J_1 — функция Бесселя первого рода, NA — числовая апертура, λ — длина волны излучения, r — радиус-вектор.

Для исследования предложенного подхода применен известный метод SIM-SR. Он состоит в последовательном освещении образцов с помощью синусоидального распределения интенсивности под тремя разными углами относительно образца с тремя разными фазовыми сдвигами и дальнейшей обработке полученных данных согласно специальному алгоритму [1].

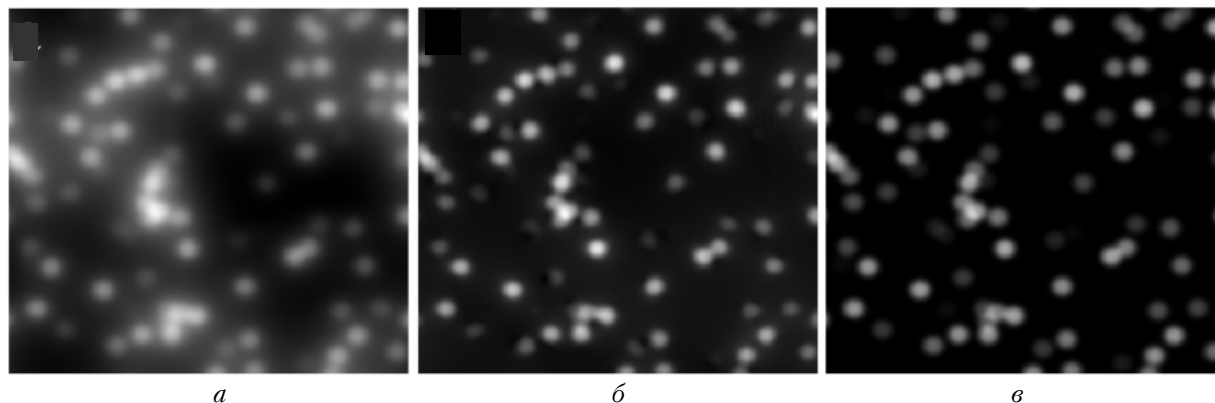


Рис. 3. Результаты моделирования микроскопии со структурированным освещением: *а* — образец после свертки с функцией рассеяния точки оптической системы; *б* — результат применения метода SIM-SR; *в* — заданный образец

Использование метода SIM-SR позволило существенно снизить влияние функции рассеяния точки системы (см. рис. 3, *а* и *б*). В результате полученное изображение практически идентично исходному образцу (см. рис. 3, *в*).

Заключение

В данной работе впервые численно показана возможность реализации микроскопии со структурированным освещением с помощью синтезированных пучков в предложенной оптической схеме. Результаты моделирования позволили в значительной мере устранить влияние функции рассеяния точки, что демонстрирует актуальность применения этого метода в реальном эксперименте. Применение данного подхода потенциально позволит существенно облегчить оптическую юстировку, исключив связанные с методом SIM-SR проблемы, а так же позволит увеличить скорость обработки данных при сохранении качества изображения. Кроме того, данный подход открывает новые горизонты в создании освещения любой сложности, включая не только распределение интенсивности, но и поляризацию, что позволит расширить возможности метода pSIM.

Список литературы

1. Neil M.A.A., Juškaitis R., Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. 1997. V. 22, Iss. 24.
1. Dan D., Yao B., Lei M. Structured illumination microscopy for super-resolution and optical sectioning. In Chinese Science Bulletin // Science in China Press. 2014. V. 59, Iss. 12. P. 1291–1307. <https://doi.org/10.1007/s11434-014-0181-1>.
2. Heintzmann R., Benedetti P.A. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation // Applied Optics. 2006. V. 45, N 20. P. 5037–5045.
3. Fedosseev R., Belyaev Y., Frohn J. et al. Structured light illumination for extended resolution in fluorescence microscopy // Opt Lasers Eng. 2005. 43:403–414.
4. Mudry E., Belkebir K., Girard J., Savatier J., le Moal E., Nicoletti C., Allain M., Sentenac A. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns // Nature Photonics. 2012. V. 6, N 5. P. 312–315. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.83>.
5. Jeong S., Kim J., Koh D., & Lee J.-C. Simultaneously enhancing the resolution and signal-to-background ratio in STED optical nanoscopy via differential depletion // Optics Express. 2023. V. 31, N 23. P. 37549. <https://doi.org/10.1364/oe.505430>.
6. Zhanghao K., Chen X., Liu W. et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy // Nat Commun. 2019. 10, 4694. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12681-w>.
7. Wen G., Li S., Wang L. et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering // Light Sci Appl. 2021. 10, 70. <https://doi.org/10.1038/s41377-021-00513-w>.
8. Demmerle J., Innocent C., North A. et al. Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy // Nat Protoc. 2017. 12, P. 988–1010. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.019>.
9. Qian J., Cao Y., Bi Y., Wu H., Liu Y., Chen Q., Zuo C. Structured illumination microscopy based on principal component analysis // ELight. 2023. V. 3, N 1. <https://doi.org/10.1186/s43593-022-00035-x>.
10. Adamov E.V., Aksenov V.P., Dudorov V.V., Kolosov V.V., Levitskii M.E. Controlling the spatial structure of vector beams synthesized by a fiber laser array // Optics & Laser Technology. 2022. 154, 108351. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2022.108351>.
11. Adamov E.V., Bogach E.A., Dudorov V.V., Kolosov V.V., Levitskii M.E. Controlling the polarization structure of vector beams synthesized by a fiber laser array // Optics Communications. 2024. 559, 130399. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2024.130399>.
12. Huang X., Fan J., Li L. et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy // Nat Biotechnol 36, 451–459 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4115>.

E.V. Adamov, E.A. Bogach, V.V. Dudorov. Structured illumination microscopy using synthesized beams.

Optical microscopy plays an important role in biological research due to the possibility of non-contact observation and measurement of living samples. However, conventional optical microscopy has limitations. Due to the diffraction limit, its spatial resolution is about 200 nm. The use of structured illumination increases the spatial resolution by more than 2 times, and the addition of polarization control makes it possible to expand the system's capabilities for studying anisotropic transparent and opaque objects. Moreover, three-dimensional image of an object can be obtained using structured illumination. The latest advances in laser technology allow us to propose a new approach to formation of structured illumination. This article shows numerically the possibility of using structured illumination microscopy with synthesized beams for the first time. The source of the light is a coherent laser array that allows controlling the distribution of phase, amplitude, and polarization of the beam. Unlike the coherent combining method, the proposed experimental scheme does not need a feedback loop for phase stabilization. The target surface being studied was modeled numerically, and the well-known SIM-SR algorithm was applied to enhance the resolution. The application of this approach to structured illumination microscopy tasks reduces the cost of microscope design and increases the speed of object measurement.