

РАСЧЕТ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТОЛСТОГО СЛОЯ ФЛУОРОФОРА В МНОГОКАНАЛЬНОМ КОНФОКАЛЬНОМ МИКРОСКОПЕ

© 2015 г. В. П. Бессемельцев, канд. физ.-мат. наук; В. С. Терентьев, канд. физ.-мат. наук

Институт автоматик и электрометрии физики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

E-mail: terentyev@iae.nsk.su

В гауссовом приближении распространения лучей в оптической системе многоканального конфокального микроскопа проведено численное моделирование, позволяющее оценивать форму профиля изображения сфокусированного лазерного луча в толстом слое флуорофора. Предложенный метод создает возможность расчета отношения сигнала к шумовой (фоновой) засветке конфокальной системы в случае большого количества параллельных каналов без использования больших вычислительных ресурсов. Проведено сравнение с экспериментальными измерениями при последовательном сканировании толстого слоя флуорофоров по глубине.

Ключевые слова: многоканальный конфокальный микроскоп, гауссовые пучки.

Коды OCIS: 180.1790, 000.4430

Поступила в редакцию 25.02.2015

Введение

Одним из наиболее эффективных инструментов для получения трехмерных изображений биологических объектов является лазерный конфокальный сканирующий микроскоп (КСМ). Однако его существенным недостатком является сравнительно долгое время построения одного изображения (порядка секунд), что не позволяет наблюдать в реальном времени динамику процессов биологических объектов (порядка 10^{-3} с). При увеличении быстродействия уменьшается время экспозиции элемента изображения (10^{-6} с и менее), поэтому приходится увеличивать мощность излучения для получения хорошего отношения сигнал/шум, что ведет к деградации флуоресцентного сигнала от молекул флуорофора (фотовыцветание). Ускорить процесс получения изображения можно за счет использования многоканальной конфокальной системы сканирования (МКСС), в которой в построении изображения участвуют несколько лучей одновременно. В таких схемах для создания матрицы параллельных лучей могут применяться матрицы отверстий или микролинз, дифракционный светоделитель, диск Нипкова и, таким образом, характерные времена сканирования могут быть сокращены на два-три порядка по сравнению с КСМ [1–3].

Также было замечено, что МКСС имеет более мягкое воздействие на флуорофор, за счет чего скорость его фотовыцветания уменьшается.

Принципиальная оптическая схема МКСС на основе дифракционного светоделителя-мультплексора представлена на рис. 1. Свет от лазерного источника 1 попадает на дифракционный элемент 2, который разделяет его на матрицу $N \times N$ эквидистантных лучей и фокусирует в область многоканальной диафрагмы 3, проходя при этом через пропускающий свет источник фильтр 4. Далее формирующая (ту-

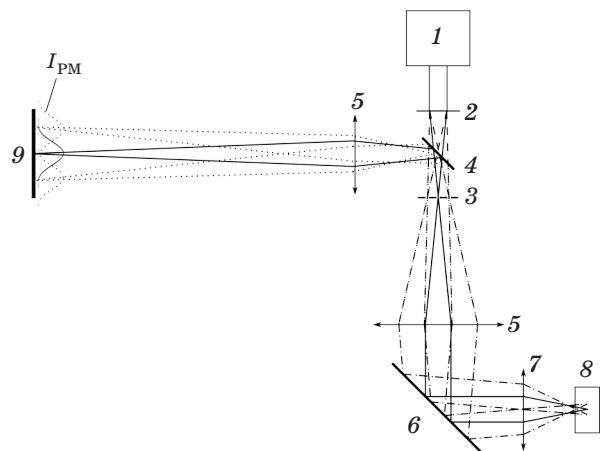


Рис. 1. Принципиальная схема оптической системы КСМ (МКСС). Пояснения в тексте.

бусная) линза 5 коллимирует матрицу лучей, которые, отразившись от зеркала 6, через объектив 7 фокусируются на объект 8. Флуоресцентный свет от объекта проходит последовательно в обратном направлении элементы 7, 6, 5, 3, отражается фильтром 4 и фокусируется на поверхности фотоматрицы 9. Перед фотоматрицей может размещаться конфокальная многоканальная диафрагма, наличие которой в некоторых схемах сканирования необязательно, так как фотоматрица может программно выполнять ту же роль (за счет опроса только определенных пикселов). Для получения полно- го изображения необходимо обеспечить сканирование матрицы лучей по объекту. Например, при вращении и синхронизации зеркала 6 и фильтра 4 так, чтобы изображение каждой точки, подсвеченной лазерным лучом, двигалось по фотоматрице в режиме телевизионной развертки, все пиксели фотоматрицы могут быть заполнены сигналом от соответствующих точек в $N \times N$ раз быстрее, чем в однолучевом варианте, и, соответственно, время сканирования объекта уменьшается в N^2 раз по сравнению с КСМ.

Основной недостаток МКСС состоит во взаимном влиянии (интермодуляционное влияние) соседних лучей в области изображения, которые своими пространственными “крыльями”, возникающими во всем объеме слоя, засвеченном сфокусированным возбуждающим лучом, создают дополнительный паразитный фон на детектирующих элементах, соответствующих соседним каналам. Схематически это проиллюстрировано на рис. 1 в виде суммарного профиля I_{PM} , который получается в результате перекрытия “хвостов” профилей изображения от каждого из трех изображенных лучей. При определенных условиях данное перекрытие может создавать значительный уровень фона, что ведет к искажению результирующего изображения и ухудшению разрешения МКСС. В работах по расчету многоканальных конфокальных систем [1, 4] численными методами исследовалось отношение сигнала к шуму и фоновой засветке для различных типов КСМ: однолучевого, щелевого детектирования, освещения линией и многоканального на основе диска Нипкова, а также обычного неконфокального. Авторы основывали расчет на представлении световых лучей, распространяющихся в слое флуорофора в виде лучей с формой профиля Эри, которые получаются при дифракции пло-

ской волн на круглом экране [5]. При этом рассматривались частные случаи расчета при выборе размера конфокальных диафрагм для оптимизации соотношения сигнал/шум или снижения уровня фона. Данные вычисления используются для приблизительной оценки реальных МКСС. Кроме того, метод расчета на основе интеграла Френеля–Кирхгофа требует большого объема вычислений. Например, при использовании ПЭВМ на базе процессора Intel Pentium i7 с тактовой частотой 2,4 ГГц при количестве лучей 10^3 продолжительность моделирования составит несколько часов.

В настоящей работе предлагается метод расчета параметров системы МКСС, основанный на гауссовом приближении распространения лучей с профилем распределения интенсивности Эри в поперечном сечении в толстых флуоресцирующих образцах, что приводит к существенному ($> 10^3$ раз) ускорению численных расчетов.

Численное моделирование

На рис. 2 более подробно проиллюстрирован процесс построения изображения. Обозначим координаты в оптически связанных областях: объектной 8 – (r_{ob}, z_{ob}) и фотоматрицы 9 – (r_t, z_t) . В основе оптической системы две линзы – объектив с малым фокусным расстоянием (f_{ob}) и тубусная линза с фокусным расстоянием (f_t), много большим, чем у объектива. В объектной плоскости расположен флуоресцирующий объект толщиной более длины перетяжки возбуждающего лазерного луча (штриховая линия), проходящего через 45-градусный интерференционный фильтр 4.

Считаем, что каждая точка возбужденного столба флуорофора испускает некогерентный свет. Тогда свет от точки внутри флуорофора,

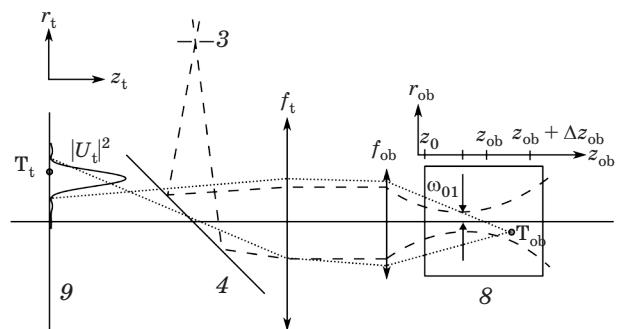


Рис. 2. Схема построения изображения. Пояснения в тексте.

пройдя оптическую систему по пути, изображеному пунктиром, в плоскости матрицы формирует распределение с латеральным профилем ($|U_t|^2$). Если точка находится в фокальной плоскости объектива, то это распределение будет иметь профиль Эри. Внеосевые точки (T_{ob}) будут создавать распределения Эри вне осевой области системы в плоскости 9 и тем самым могут значительно увеличивать размеры пятна в плоскости изображения. В многоканальном случае это приводит к взаимному влиянию сигнала от точки T_{ob} одного пучка на область (детектор), предназначенную соседнему пучку. Для оценки этого влияния необходимо получить распределение интенсивности одного пучка, что означает суммирование интенсивностей от каждой точки светящегося флуорофора в плоскости 9.

В расчетах авторов публикации [1] предполагалось, что отверстие диафрагмы 3 равномерно заполнено светом (луч с П-образным распределением интенсивности). Однако в реальных современных системах, например в системах с диском Нипкова, для увеличения лучевой эффективности используется предварительная фокусировка света с помощью матрицы микролинз в отверстия матрицы диафрагм. Это приводит к распространению лучей с неравномерным профилем интенсивности в системе [5]. То же самое происходит в случае создания матрицы пучков с дифракционного оптического элемента. Далее данные лучи диафрагмируются апертурой объектива при фокусировке. В итоге их можно рассматривать как некие эффективные квазигауссовы лучи, что значительно упрощает расчетные формулы за счет аналитических преобразований.

Если рассматривать нормированную на единицу по интенсивности компоненту поля E_{ob} , проходящего через отверстие диафрагмы 3, а затем через апертуру объектива, то распределение поля в цилиндрических координатах вблизи фокальной плоскости объектива в условиях аксиальной симметрии может описываться формулой [5]

$$U_{ob}(u, v) = -i \frac{2\pi f_{ob}}{\lambda_l} NA_{ob}^2 \exp(iu / NA_{ob}^2) \times \times \int_0^1 E_{ob} \left(\frac{D}{2} \rho \right) J_0(v\rho) \exp(-iup^2 / 2) \rho d\rho, \quad (1)$$

$$u = \frac{2\pi}{\lambda_l} NA_{ob}^2 z_{ob} / n, v = \frac{2\pi}{\lambda_l} NA_{ob} r_{ob}, \quad (2)$$

$$NA_{ob} = \frac{D}{2f_{ob}} n',$$

где λ_l – длина волны света осветителя (лазера), D – апертура объектива, f_{ob} – его фокусное расстояние, $r_{ob} = (x^2 + y^2)^{1/2}$ – расстояние от оптической оси объектива, z_{ob} – расстояние от фокальной плоскости. Если объектив иммерсионного типа, то n' – коэффициент преломления иммерсионной жидкости. Коэффициент преломления n относится к среде, в которой фокусируется лазерный пучок ($n = 1,33$). Формула (1) достаточно точна при $NA_{ob} < 0,8$ ($n' = 1$) [6]. В случае иммерсионного объектива это значение надо умножить на коэффициент преломления иммерсионной жидкости. Быстрое вычисление интеграла (1) от произвольного распределения E_{ob} может быть выполнено методом суммирования ряда бесселевых функций, например дискретным преобразованием Ханкеля нулевого порядка [7] или прямым суммированием с помощью интерполяционных многочленов.

Освещаемый участок раствора флуорофора, расположенный вблизи фокуса, становится источником некогерентного света в некотором спектральном диапазоне с максимумом на длине волны $\lambda > \lambda_l$. Рассмотрим простую оптическую систему, состоящую из тонких линз – объективной и тубусной с фокусными расстояниями f_{ob} и f_t соответственно (рис. 2), согласно работам [4, 5]. Увеличение такой системы $M = f_t/f_{ob}$. Таким образом, имеется два оптически сопряженных пространства, связанных соотношениями, которые можно получить, используя матричный метод параксиальной оптики [8] для рассматриваемой оптической системы

$$r_{ob} = -r_t / M, z_{ob} = z_t n / M^2, \quad (3)$$

где индекс “t” относится к координатам относительно фокуса тубусной линзы, а “ob” – относительно фокуса объектива, n – коэффициент преломления флуоресцирующего слоя или объекта. Сопряженность позволяет в формулах делать подстановку соотношений (3) для упрощения выражений и облегчения анализа. Как следует из формул, в аксиальном направлении положение изображения в плоскости z_t будет изменяться в n раз медленнее по сравнению со случаем воздуха, а в латеральном – не зависит от n . В условиях аксиальной симметрии для интенсивности dI_T изображения некогерентного протяженного источника [5] (с бесконечно малой толщиной по оси z в области объекта) в точке $T_t(r_t, z_t)$

можно записать следующую формулу в общем виде

$$dI_T(r_t, z_t) = A \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} |U_{ob}(r_{tt}/M, z_t n/M^2)|^2 \times \\ \times |U_t(|\vec{r}_{tt} - \vec{r}_t|, z_t)|^2 r_{tt} dr_{tt} d\theta_{tt}, \quad (4)$$

$$U_t(r, z) = -i \frac{2\pi f_t}{\lambda} N A_t^2 \exp(i u_t(z)/N A_t^2) \times \\ \times \int_0^1 J_0(v_t \rho) \exp(-i u_t(z) \rho^2/2) \rho d\rho,$$

$$u_t = \frac{2\pi}{\lambda} N A_t^2 z_t, v_t = \frac{2\pi}{\lambda} N A_t r_t, N A_t = \frac{D}{2f_t},$$

где A – нормировочный множитель, $r_{tt}^2 = |\vec{r}_{tt}|^2$. Так как интегрирование ведется в плоскости изображения (индекс “tt”), то в функции U_{ob} стоят сопряженные координаты. Функция U_t играет роль функции пропускания оптической системы. В силу аксиальной симметрии U_{ob} распределение $dI_T(r_t, z_t)$ не зависит от угла θ_t , т.е. от направления вектора \mathbf{r}_t . Интеграл $dI_T(r_t, z_t)$ показывает распределение интенсивности от бесконечно тонкого слоя $z_t + dz_t$, а интеграл от слоя конечной толщины – от z_{ob} до $z_{ob} + \Delta z_{ob}$

$$I_T(r_t, z_{ob}, \Delta z_{ob}) = \int_{z_1(z_{ob})}^{z_2(z_{ob})} dI_T(r_t, z_{tt}) dz_{tt}, \quad (5)$$

где Δz_{ob} – толщина слоя флуорофора, $z_1(z_{ob}) = z_{ob} M^2/n$, $z_2(z_{ob}) = (z_{ob} + \Delta z_{ob}) M^2/n$. Аксиальный размер среды (толщина) эффективно становится в n раз меньше, что связано с меньшей угловой расходимостью излучения в среде. Четырехмерный интеграл (5) достаточно сложен для анализа и расчета, кроме того, даже при использовании производительных вычислительных средств расчеты достаточно продолжительны. Например, авторы работы [9], ссылаясь на очень большое машинное время, требуемое для вычислений, не проводили моделирование при большом количестве пучков (более 100) в схеме с диском Нипкова. Некоторое усложнение может быть и в определении распределения напряженности поля E реальных пучков: если измерение амплитуды поперечного сечения пучка не представляет особых затруднений, измерение фазового профиля является непростой задачей. Не определив распределение напряженности поля на апертуре объектива, сложно затем правильно описывать распространение пучка вблизи фокуса объектива.

Интеграл (5) может быть существенно упрощен, если использовать гауссово приближение, в котором распространение пучка Эри моделируется распространением эффективного гауссова пучка [10]. Основной вклад в интеграл будут вносить точки, расположенные вблизи оси оптической системы, что определяется радиусом пятна в заданной плоскости z_{ob} . Радиус пятна будет меняться вдоль оси z в зависимости от расстояния до фокальной плоскости. Если рассмотреть распространение поля вблизи фокальной плоскости линзы, то можно определить характерный радиус пятна, в котором содержится основная часть энергии (>90%), и угол расходимости при удалении от фокуса. Пусть в практически важном случае, когда на объектив падает излучение с профилем распределения интенсивности, близким к гауссову, радиус по уровню интенсивности $1/e^2$ равен апертуре объектива a_{ob} . Можно показать численным моделированием с помощью формулы (1), что расчетное поле будет иметь профиль, очень близкий к гауссову, и одинаковую угловую расходимость с эффективным гауссовым пучком, имеющим перетяжку [10]

$$\omega_0 = 0,43 \frac{\lambda_l}{N A_{ob}} \approx \frac{d_{Airy}}{2\sqrt{2}},$$

$$\omega(z_{ob}) = \omega_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda_l z_{ob}}{n \pi \omega_0^2} \right)^2 \right]^{1/2},$$

где d_{Airy} – диаметр Эри, λ_l – длина волны возбуждающего света (лазера). Примечательно, что угловая расходимость данного гауссова пучка будет совпадать и с пучком Эри, который получается при равномерном освещении объектива с апертурой a_{ob} . Отличие будет только в форме радиального профиля интенсивности и фазы. При этом в круге радиусом 2ω содержится более 99% энергии, что определяет конечные пределы для численного интегрирования. Целесообразно для аналитического упрощения функцию $|U_{ob}|^2$ из выражения (4) заменить на эквивалентную функцию в гауссовом приближении

$$|U_{ob}|^2 \rightarrow I_1(r_{ob}, z_{ob}) =$$

$$= \frac{A_l \omega_{0l}^2}{\omega_{0l}^2(z_{ob})} \exp\left(-2r_{ob}^2/\omega_{0l}^2(z_{ob})\right), \quad (6)$$

$$\omega_l(z_{ob}) = \omega_{0l} \left[1 + m_l^4 \left(\frac{\lambda_l z_{ob}}{n \pi \omega_{0l}^2} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad \omega_{0l} = 0,43 \frac{\lambda_l}{N A_{ob}} m_l,$$

где ω_l – радиус эквивалентного гауссова пучка на глубине z_{ob} , m_l^2 – параметр реального лазерного пучка, характеризующий его качество (в литературе именуемый “критерием m^2 ”) [11].

Интеграл (4) может быть и далее упрощен, если подынтегральную функцию U_t заменить на эквивалентную экспоненциальную

$$|U_t|^2 \rightarrow I_t(r_t, z_t) = \frac{A_t \omega_0^2}{\omega^2(z_t)} \exp\left(-2r_t^2 / \omega^2(z_t)\right), \quad (7)$$

$$\omega^2(z_t) = \omega_0^2 \left[1 + \left(\frac{\lambda z_t}{\pi \omega_0^2} \right)^2 \right], \quad \omega_0 = 0,43 \frac{\lambda}{NA_t},$$

$$\begin{aligned} I_e(r_t, z_{ob}, \Delta z_{ob}) &= A \int_{z_1(z_{ob})}^{z_2(z_{ob})} dz_{tt} \int_0^{2\pi} d\theta_{tt} \int_0^\infty \Omega(z_{tt}) \exp(F_1(r_{tt}, z_{tt})) r_{tt} dr_{tt} = \\ &= A \int_{z_1(z_{ob})}^{z_2(z_{ob})} dz_{tt} \int_0^{2\pi} d\theta_{tt} \int_0^\infty \Omega(z_{tt}) \exp(F_2(r_{tt}, z_{tt})) r_{tt} dr_{tt} = \\ &= A \int_{z_1(z_{ob})}^{z_2(z_{ob})} dz_{tt} \Omega(z_{tt}) \exp\left(-\frac{2r_t^2}{\omega^2(z_{tt})}\right) \int_0^\infty \exp\left(-\frac{2r_{tt}^2}{W^2(z_{tt})}\right) 2\pi I_0\left(\frac{4r_{tt}r_t}{\omega^2(z_{tt})}\right) r_{tt} dr_{tt}, \\ \Omega(z_{tt}) &= \frac{A_t A_l \omega_0^2 \omega_{0l}^2}{\omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) \omega^2(z_{tt})}, \quad W^2(z_{tt}) = \frac{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) \omega^2(z_{tt})}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) + \omega^2(z_{tt})}, \\ F_1(r_{tt}, z_{tt}) &= -\frac{2r_{tt}^2 / M^2}{\omega_l^2 (z_{tt} n / M^2)} - \frac{2|\vec{r}_{tt} - \vec{r}_t|^2}{\omega^2(z_{tt})}, \quad F_2(r_{tt}, z_{tt}) = -\frac{2r_{tt}^2}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2)} - \frac{2[r_{tt}^2 + r_t^2 - 2r_{tt}r_t \cos(\theta_{tt} - \theta_t)]}{\omega^2(z_{tt})}. \end{aligned} \quad (8)$$

Интеграл по r_{tt} в формуле (8) дает выражение, содержащее гамма-функции и функцию Уиттекера (гипергеометрическая функция), и в данном случае упрощается до экспоненциальной функции (см. Приложение).

$$I_e(r_t, z_{ob}, \Delta z_{ob}) = A \frac{\pi}{2} \int_{z_1(z_{ob})}^{z_2(z_{ob})} \frac{A_l A_t M^2 \omega_{0l}^2 \omega_0^2 \exp\left(-\frac{2r_t^2}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) + \omega^2(z_{tt})}\right)}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) + \omega^2(z_{tt})} dz_{tt}. \quad (9)$$

Как видно из выражения (9), в данном приближении остался только одинарный интеграл. Вычислить его в известных элементарных или специальных функциях пока не удалось. Тем не менее, эта формула приводит к существенному уменьшению времени счета (быстрее в 10^4 раз). Интеграл (8), полученный на предыдущем шаге, также может быть использован при расчете распределения от осесимметричного объекта с конечным радиусом и отличным от окружающего пространства люминесцентным откликом.

$$I_\gamma = A \frac{\pi}{2} \int_{z_1}^{z_2} \frac{A_l A_t M^2 \omega_{0l}^2 \omega_0^2}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) + \omega^2(z_{tt})} \exp\left(-\frac{2r_t^2}{M^2 \omega_l^2 (z_{tt} n / M^2) + \omega^2(z_{tt})} - \gamma(z_{tt} - z_{t0})n / M^2\right) dz_{tt}, \quad (10)$$

где λ – длина волны флуоресцентного света, ω – радиус эквивалентного гауссова пучка, A_t – нормировочная амплитуда. Примем, что от каждой точки из объектной области на апертуре тубусной линзы объективом формируется равномерный профиль интенсивности, который аппроксимируется гауссовым пучком (7). Тогда в данном случае статистический параметр пучка не учитывается ($m^2 = 1$). Если подставить выражения (6) и (7) в формулу (5), полагая пределы интегрирования по радиусу бесконечными и используя результаты работ [12, 13], имеем

Формула (9) дает хорошее приближение и по ней можно оценивать интермодуляционное влияние и фоновый сигнал от группы (матрицы) пучков. Также в нее может быть введен коэффициент ослабления пучка при углублении в слой флуорофора. Данная проблема особенно важна при большой концентрации флуорофора, когда объект сканируется по слоям вдоль аксиальной оси [14]. Если ввести коэффициент ослабления в толще флуорофора γ , то формула (9) преобразуется в

$$z_{t0} = z_0 M^2 / n, \quad z_1 = \begin{cases} z_{t0}, & z_1 < z_{t0} \\ z_1, & z_1 > z_{t0} \end{cases}.$$

Параметр γ может оказывать влияние на форму профиля, например, при большом значении γ и углублении перетяжки пучка в толще флуорофора “крылья” профиля изображения будут завышены. Положение границы подложка–раствор определяется параметром z_0 (см. рис. 2), т.е. $|z_0|$ – это расстояние от фокальной плоскости до границы подложка–флуорофор.

Сравнение с экспериментальными данными

Для анализа характеристик МКСС используется экспериментальный метод сканирования толстого слоя флуорофора (“sea response” – в англоязычной литературе) [9]. Это эквивалентно z -сканированию: изменению z_{ob} при фиксированном Δz_{ob} в интегралах (5) и (10) для нескольких пучков, пространственно отстоящих друг от друга. Следуя за авторами работы [9], предположим, что отверстия в случае диска Нипкова упорядочены гексагонально. Тогда вокруг одного луча расположены шесть параллельных в первом слое, во втором – двенадцать, в третьем – восемнадцать и так далее, увеличиваясь на шесть отверстий в каждом ряду. Тогда эквивалентная суммарная мощность сигнала Q_{eq} на одном детекторе может быть оценена интегрированием вклада от собственного и всех соседних пучков по площади в области этого детектора. Влияние собственного пучка Q_c получается из формулы (10) интегрированием по площади детектора круглой формы диаметром d

$$\begin{aligned} Q_c &= 2\pi \int_0^{d/2} I_\gamma dr_{tt} = \\ &= A \frac{\pi^2}{2} \int_{z_1}^{z_2} A_l A_t \omega_0^2 \omega_{0l}^2 \sinh \left[\frac{(d/2)^2}{M^2 \omega_l^2 + \omega^2} \right] \times \\ &\times \exp \left[-\frac{n\gamma(z_t - z_{t0})}{M^2} - \frac{(D/2)^2}{M^2 \omega_l^2 + \omega^2} \right] dz_t. \quad (11) \end{aligned}$$

Влияние боковых пучков, находящихся на расстоянии a от центрального, можно оценить, посчитав интеграл по площади сектора, в который вписывается площадка фотодетектора круглой формы

$$Q_j = \int_{-\varphi}^{\varphi} \int_{r_1}^{r_2} I_\gamma d\varphi dr_{tt} =$$

$$\begin{aligned} &= A \int_{z_1}^{z_2} \left(\frac{4}{5} \right) \frac{\pi}{2} A_l A_t \arctan \left(\frac{d}{2a} \right) \omega_0^2 M^2 \omega_{0l}^2 \times \\ &\times \sinh \left(\frac{2da}{M^2 \omega_l^2 + \omega^2} \right) \times \\ &\times \exp \left[-\frac{n\gamma(z_t - z_{t0})}{M^2} - \frac{2(a^2 + (D/2)^2)}{M^2 \omega_l^2 + \omega^2} \right] dz_t, \quad (12) \\ \varphi &= \arctan \left(\frac{d}{2a} \right), \quad r_1 = a - d/2, \quad r_2 = a + d/2. \end{aligned}$$

Нормировочный множитель $4/5$ введен потому, что площадь детектора, который представляет собой круг радиуса $d/2$, и площадь сектора, в который он вписан и по которому берется интеграл (12), не равны между собой. Полная мощность в области детектора с учетом гексагональной симметрии

$$Q_{eq} \approx Q_c + \sum_{j=1}^N 6 \sum_{k=0}^{j-1} Q_j \left(a \sqrt{j^2 + k^2 - jk} \right), \quad (13)$$

где N – количество рядов сетки. Можно построить профили такого отклика по формуле (13) от слоя флуорофора толщиной 30 мкм для различного количества пучков с параметрами системы, которые выбраны в предыдущем пункте. На рис. 3 показано, как изменяется форма профиля z -сканирования. При увеличении количества пучков боковые “крылья” растут, а форма в области максимума становится ближе к плоской. Расчеты выполнены при $\gamma = 0$, т.е. данные профили соответствуют равномерно светящемуся по глубине слою. В практически важном случае эти кривые должны быть асимметричны, так как часть лазерного света поглощается флуорофором при распространении внутри слоя.

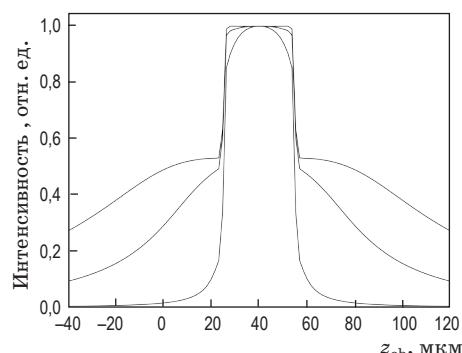


Рис. 3. Расчетные профили z -сканирования слоя толщиной 30 мкм. Пояснения в тексте.

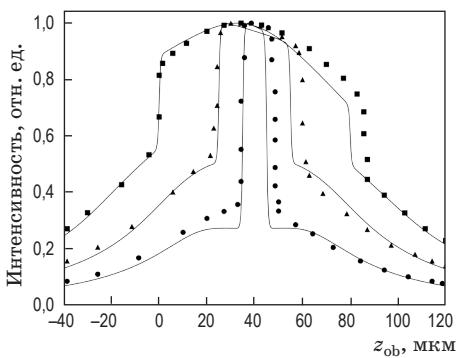


Рис. 4. Сравнение экспериментальных и расчетных профилей z -сканирования слоев флуорофора различной толщины при $a = 250$ мкм, $d = 50$ мкм. Толщина слоев обозначена: 80 мкм – квадратами, 30 мкм – треугольниками, 10 мкм – кружками.

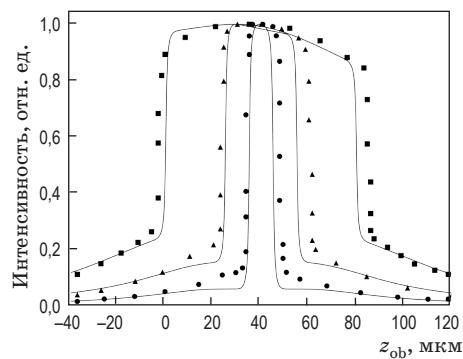


Рис. 5. Сравнение экспериментальных и расчетных профилей z -сканирования слоев флуорофора различной толщины при $a = 580$ мкм, $d = 55$ мкм. Толщина слоев обозначена: 80 мкм – квадратами, 30 мкм – треугольниками, 10 мкм – кружками

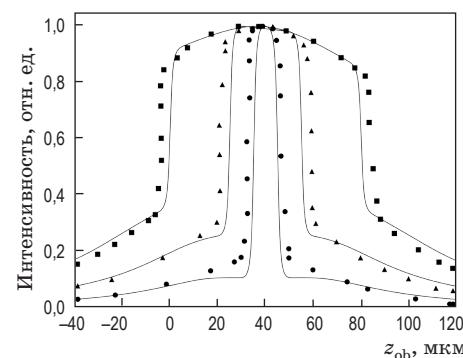


Рис. 6. Сравнение экспериментальных и расчетных профилей z -сканирования слоев флуорофора различной толщины при $a = 580$ мкм, $d = 100$ мкм. Толщина слоев обозначена: 80 мкм – квадратами, 30 мкм – треугольниками, 10 мкм – кружками.

Для моделирования профилей экспериментального z -сканирования слоев флуорофора с толщиной 10, 30 и 80 мкм использовались типичные параметры сканирующего модуля *Yokogawa Electric Corporation CSU-X1*. Характеристики указанного устройства приведены в дополнительной информации [15] к работе [3]. В данной работе использовался иммерсионный объектив UPLSAPO60XS с $NA_1 = 1,3$. Эффективное фокусное расстояние такого объектива можно пересчитать по формуле $f_1 = f_{ob}NA_{ob}/NA_1$. Апертуру примем равной $D_1 = D = 5,4$ мм, увеличение оптической системы – $M_1 = 60$, а критерий качества пучка – $m_1 = 1$. Эти величины определяют характерный размер пятна в фокальной плоскости и угловую расходимость излучения вне ее. Сообщается, что диск содержал 20000 отверстий и такое же количество фокусирующих микролинз диаметром 250 мкм. Таким образом, расстояние между отверстиями диафрагмы было равно 250 мкм. Диаметр отверстий – 50 мкм в одном из случаев. Количество пучков, попадающих под за- светку и одновременно освещая объект, около 400 при данной апертуре D_1 , что соответствует 11 поясам в случае гексагонального расположения. Именно при этом количестве поясов “крылья” профилей приобретают схожую форму с экспериментальными (рис. 4). Все профили асимметричны, по их асимметрии можно определять концентрацию флуорофора в растворе, если известны его характеристики.

Приводятся также два профиля z -сканирования при других расстояниях между конфокальными отверстиями (580 мкм) и их диаметрах 55 (рис. 5) и 100 мкм (рис. 6) в модифицированном модуле CSU-MP. Характерно, что ширина всех экспериментальных профилей z -сканирования немного превышает расчетную. На всех графиках (рис. 4–6) форма профиля слоя толщиной 10 мкм существенно отличается от остальных, причем около границ слоя расчетная кривая имеет большее отличие. При выборе толщины слоев 14, 35 и 86 мкм совпадение расчетных и экспериментальных профилей становится еще точнее.

Заключение

На основе гауссова приближения получена формула профиля свечения флуоресценции толстого слоя флуорофора в оптической системе

конфокального многолучевого сканирующего микроскопа. Для подтверждения применимости полученной формулы было выполнено сравнение с экспериментально измеренными про-

филями z -сканирования. Представленные формулы могут быть использованы для быстрой оценки характеристик многоканальных конфокальных систем.

Приложение 1

На основании таблиц из публикации [12] (№ 6.614.3) интеграл

$$\int_0^{\infty} \exp(-\alpha x) I_{2v}(2\sqrt{\beta x}) dx = \frac{\exp(\beta/2\alpha)}{\sqrt{\alpha\beta}} \frac{\Gamma(v+1)}{\Gamma(2v+1)} M_{-1/2,v}\left(\frac{\beta}{\alpha}\right),$$

где $\operatorname{Re}(\alpha) > 0$, $\operatorname{Re}(v) > -1$, $\Gamma(z)$ – гамма-функция, $M_{\lambda,\mu}(z)$ – функция Уиттекера. Последняя функция определяется через вырожденную гипергеометрическую функцию

$$M_{\lambda,\mu}(z) = z^{\mu+1/2} \exp(-z/2) \Phi(\mu - \lambda + 1/2, 2\mu + 1; z).$$

В нашем случае при $\mu = v = 0$, $\lambda = -1/2$

$$M_{-1/2,0}(z) = z^{1/2} \exp(-z/2) \Phi(1, 1; z) = z^{1/2} \exp(z/2),$$

так как если два первых аргумента функции одинаковы, то $\Phi(a, a, z) = \exp(z)$.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Pawley J.B. Handbook of biological confocal microscopy. 2nd ed. Boston: Springer US, 1995. 632 p.
2. Kagawa K., Seo M.W., Yasutomi K., Terakawa S., Kawahito S. Multi-beam confocal microscopy based on a custom image sensor with focal-plane pinhole array effect // Opt. Exp. 2013. V. 21. № 2. P. 1417–1429.
3. Shimozawa T., Yamagata K., Kondo T., Hayashi T., Shitamukai A., Konno D., Matsuzaki F., Takayama J., Onami S., Nakayama H., Kosugi Y., Watanabe T.M., Fujita K., Mimori-Kiyosue Y. Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 9. P. 3399–3404.
4. Sandison D.R., Webb W.W. Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes // Appl. Opt. 1994. V. 33. № 4. P. 603–615.
5. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1973. 720 с.
6. Sheppard G.J.R., Matthews H.J. Imaging in high-aperture optical systems // J. Opt. Soc. Am. A. 1987. V. 4. № 8. P. 1354–1360.
7. Johnson F. An improved method for computing a discrete Hankel transform // Computer Physics Communications. 1987. V. 43. P. 181–202.
8. Kogelnik H., Li T. Laser beams and resonators // Appl. Opt. 1966. V. 5. № 10. P. 1550–1567.
9. Egner A., Andresen V., Hell S.W. Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment // Journal of Microscopy. 2001. V. 206. № 1. P. 24–32.
10. Zhang B., Zerubia J., Olivo-Marin J.-C. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models // Appl. Opt. 2007. V. 46. № 10. P. 1819–1829.
11. Johnston T.F. Beam propagation (M2) measurement made as easy as it gets: the Four-cuts method // Appl. Opt. 1998. V. 37. № 21. P. 4840–4850.
12. Градштейн И.С., Рыжик И.М. Таблицы интегралов, сумм, рядов и произведений. Изд. 4-е. М.: Государственное издательство физико-математической литературы, 1963. 1100 с.
13. Абрамович М., Стиган И. Справочник по специальным функциям. М.: Наука, 1979. 832 с.
14. Guan Y.Q., Cai Y.Y., Zhang X., Lee Y.T., Opas M. Adaptive correction technique for 3D reconstruction of fluorescence microscopy images // Microscopy Research and Technique. 2008. V. 71. P. 146–157.
15. <http://www.pnas.org/content/suppl/>