

**Lakunaritás elemző, asztigmias 3Ds és többszínű  
képregisztrációs algoritmusok és eljárások fejlesztése  
lokalizációs mikroszkópai mérések kvantitatív  
kiértékelésére**

Doktori értekezés

Szerző:

**H. Kovács Bálint Barna**

Témavezető:

**Dr. Erdélyi Miklós**



Fizika Doktori Iskola  
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék  
Szegedi Tudományegyetem

2024  
Szeged



# Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>3</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>7</b>
<b>2. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK</b> .....	<b>8</b>
2.1. OPTIKAI MIKROSKÓPIA .....	8
2.2. FLUORESCENCIAMIKROSKÓPIA .....	9
2.3. KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA .....	11
2.4. OPTIKAI SZUPERREZOLÚCIÓ.....	14
2.5. DIRECT STOCHASTIC OPTICAL RECONSTRUCTION MICROSCOPY .....	16
2.5.1. 3D lokalizációs mikroszkópia.....	18
2.6. KVANTITATÍV KÉPELEMZÉS .....	23
2.7. LAKUNARITÁS.....	24
2.8. LAKUNARITÁSSZÁMÍTÓ ALGORITMUSOK.....	24
<b>3. CÉLKITŰZÉS</b> .....	<b>26</b>
<b>4. MÓDSZEREK ÉS ESZKÖZPARK</b> .....	<b>27</b>
4.1. HARDVEREK.....	27
4.1.1. Kivilágítás, lézerek.....	27
4.1.2. Mikroszkóp váz.....	28
4.1.3. Detektálás, kamerák .....	29
4.1.4. Kiértékelő számítógépek .....	30
4.2. SZOFTVEREK .....	30
4.2.1. TestSTORM .....	30
4.2.2. rainSTORM .....	31
4.2.3. LabView alapú programok .....	31
<b>5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	<b>32</b>
5.1. ASZTIGMIÁS 3D dSTORM RENDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS MODELLEZÉSE.....	32
5.1.1. Mátrixoptikai szimuláció kidolgozása .....	33
5.1.2. Fázisszeparált fehérjék 3D dSTORM mérése .....	42
5.1.3. Multimodális rendszer modellezése .....	44
5.1.4. Tézispont .....	48
5.2. TÖBBSZÍNŰ dSTORM RENDSZER OPTIMALIZÁLÁSA ÉS ALKALMAZÁSA .....	48
5.2.1. Rendszer optimalizálás.....	49
5.2.2. Ioncsatornák dSTORM és konfokális mérése.....	51
5.2.3. Képegysítő algoritmus írása .....	54
5.2.4. Tézispont .....	58
5.3. LAKUNARITÁS BEVEZETÉSE A dSTORM ADATSOROK KIÉRTÉKELÉSÉRE .....	59
5.3.1. Lakunaritás számítása pointillista képekre .....	59
5.3.2. Klasztereződési jelenségek vizsgálata szimulált adatsorokon.....	62
5.3.3. Klasztereződési jelenségek vizsgálata mért adatsorokon .....	69
5.3.4. Tézispont .....	74
5.4. LAKUNARITÁSSZÁMÍTÓ ALGORITMUSOK FEJLESZTÉSE ÉS ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE .....	74
5.4.1. Az irodalmi és újonnan fejlesztett algoritmusok leírása.....	74
5.4.2. Teszt adatsor és rendszer .....	85

## Tartalomjegyzék

5.4.3. Módszerek összehasonlítása .....	86
5.4.4. Tézispont .....	89
<b>6. ÖSSZEFOGLALÓ .....</b>	<b>90</b>
6.1. BEVEZETÉS.....	90
6.2. CÉLOK ÉS KUTATÁSI MÓDSZEREK .....	90
6.3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	91
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>94</b>
7.1. INTRODUCTION.....	94
7.2. OBJECTIVES AND METHODS .....	94
7.3. NEW SCIENTIFIC RESULTS.....	95
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>97</b>
<b>9. PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>99</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>101</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>4Pi:</b>	A teljes ( $4\pi$ ) térszögben detektálást alkalmazó szuperrezolúciós mikroszkóp technika
<b>AOTF:</b>	Hangolható akusztóoptikai szűrő (acousto-optic tunable filter)
<b>DBSCAN:</b>	Sűrűség alapú klaszteranalízis algoritmus (density-based spatial clustering of applications with noise)
<b>DNS:</b>	Dezoxiribonukleinsav
<b>DOF:</b>	Mélységélesség (depth of field)
<b>DSB:</b>	Kettős szálú törés, ebben a munkában kettős szálú DNS törés (double-strand break)
<b>(d)STORM:</b>	Egy lokalizáció alapú szuperrezolúciós technika (direct stochastic optical reconstruction microscopy)
<b>EMCCD:</b>	Kamera detektor (electron multiplying charge coupled device)
<b>EPI:</b>	Megvilágítási mód (epifluorescence)
<b>FOV:</b>	Látótér (field of view)
<b>HCN:</b>	Egy kation csatorna (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel)
<b>LD:</b>	Lakunaritás különbség (lacunarity difference)
<b>PAINT:</b>	Egy lokalizáció alapú szuperrezolúciós technika (point accumulation for imaging in nanoscale topography)
<b>PALM:</b>	Egy lokalizáció alapú szuperrezolúciós technika (photoactivated localization microscopy)
<b>PV</b>	Parvalbumin
<b>GSDIM:</b>	Egy lokalizáció alapú szuperrezolúciós technika (ground state depletion followed by individual molecule returne)
<b>MINFLUX:</b>	Egy lokalizáció alapú szuperrezolúciós technika (minimal photon flux)
<b>NA:</b>	Numerikus apertúra
<b>PFS:</b>	Egyes Nikon gyártotta mikroszkópokon a mintát automatikusan fókuszban tartó rendszer (perfect focus system)
<b>PSF:</b>	Pontátviteli függvény (point spread function)
<b>RNC:</b>	Riboszóma – naszcens fehérjelánc komplexek
<b>ROI:</b>	A mintán vizsgált terület vagy térfogat (region of interest)
<b>sCMOS:</b>	Kamera detektor (scientific complementary metal-oxide-semiconductor)

## Rövidítések jegyzéke

- SIM:** Struktúrált kivilágítás alapú szuperrezolúciós technika (structured illumination microscopy)
- SMLM:** Egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia (single molecule localization microscopy)
- STED:** Egy pásztázó szuperrezolúciós mikroszkóp technika (stimulated emission depletion)

## 1. Bevezetés

A minket körülvevő világ megértéséhez vezető út első lépése a megfigyelés. Az emberi szem, egy természet alkotta, csodálatra méltó optikai rendszer, ami kiválóan képes a  $100\ \mu\text{m}$ -nél nagyobb struktúrák vizsgálatára. Az ennél kisebb méretekkal rendelkező struktúrák megfigyeléséhez szükséges a szemnél jobb feloldást biztosító optikai rendszer használata. Már az ókorban is alkalmaztak kristályokból csiszolt lencsákat, azonban az első tudományos célokra fejlesztett mikroszkóp Anton von Leeuwenhoek nevéhez fűződik a 17. században. Ettől fogva, a kutatók részéről megfogalmazódott az igény az egyre nagyobb és nagyobb feloldású mikroszkópokra, ami maga után vonta a műszakilag egyre precízebb lencserendszerek kifejlesztését. Mindezek ellenére egy bizonyos feloldásnál nem sikerült jobbat elérni optikai úton. Ennek okára Ernst Abbe világított rá 1873-ban definiálva a mikroszkópok feloldási határát, az úgynevezett diffrakciós limitet. Az 1970-es években kezdtek kialakulni olyan technikák, amelyekkel optikai tartományon maradvá képesek vagyunk alámenni ennek az Abbe-féle limitnek. Az ilyen technikákat összefoglaló néven optikai szuperrezolúciós technikáknak nevezzük. Ezen eljárások egyike az úgynevezett lokalizációs mikroszkópia (SMLM), ami a mintát jelölő fluoreszkáló molekulák egyenkénti lokalizálásán alapszik. Sejten belüli organelumok és biológiai folyamatok vizsgálatára ez az egyik legalkalmasabb szuperrezolúciós technika a közel  $20\ \text{nm}$ -es feloldásának köszönhetően. Legyen azonban egy mikroszkópiás eljárás bármennyire fejlett, a tudományos diskusszióhoz elengedhetetlen a kinyerni kívánt információ számszerűsítése. A lokalizációs mikroszkópiában az ilyen eljárásokat kvantitatív képelemzésnek nevezik.

Doktori tanulmányaimat a Szegedi Tudományegyetem, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék, AdOptIm kutatócsoportjához csatlakozva végeztem. Itt elsajátítottam a lokalizációs mikroszkóp rendszerek tervezéséhez és alkalmazáshoz szükséges ismereteket. A megszerzett tudással pedig új eljárásokat dolgoztam ki, képelemző algoritmusokat fejlesztettem és biológus kollégákkal együttműködve új biológiai eredményeket értünk el. A kutatás mellett a tanszék oktató munkájában is jelentős részt vállaltam.

Doktori értekezésemben áttekintem a hagyományos optikai mikroszkópiától az optikai szuperrezolúcióhoz vezető utat, továbbá a munkásságomhoz kapcsolódó egyéb mikroszkópiai technikákat, valamint a kvantitatív képelemzés alapjait. Az elért új tudományos eredményeimet négy alfejezetben részletezem és ehhez kapcsolódóan négy tézispontot fogalmazok meg. A disszertációm ábrái a folyóiratokban megjelent formában és angol feliratokkal szerepelnek.

## 2. Tudományos előzmények

### 2.1. Optikai mikroszkópia

Optikai mikroszkópia az összefoglaló neve azon technikáknak, amelyekben egy adott mintát látható hullámhosszúságú fényel világítunk meg és a minta, valamint a megvilágító fény kölcsönhatásának eredményéből következtetünk a minta tulajdonságaira. Ez a kölcsönhatás megnyilvánulhat a mintáról visszatérő fény intenzitásának vagy polarizációjának változásaként, fluoreszcenciaként vagy egyéb más módokon is. Az első tudományos célokra alkalmazott optikai mikroszkópot Anton von Leeuwenhoek készítette a 17. század második felében [1]. Az egyszerű nagyító után a mikroszkóp volt az első olyan eszköz, ami lehetővé tette a mikrovilág megfigyelését. Az emberi szem számára két pont akkor különböztethető meg egymástól, ha azok a látásélesség határszögénél nagyobb szögben látszanak. Ez egy átlagos ember esetén kb. 1 ívperc, így a tisztalátás távolságában a legkisebb feloldható struktúra  $\sim 73 \mu\text{m}$ . Az átlagos állati és növényi sejt méret a 10 és 100  $\mu\text{m}$  tartományban található, ezért bár egyes nagy méretű sejtek meghaladhatják a szem feloldási határát, a sejtek jelentős része nem megfigyelhető. A baktériumok, vírusok és sejtalkotók vizsgálata pedig nem kivitelezhető szabad szemmel, mivel ezek mérete nagyságrendekkel kisebb, mint a szem feloldási határa. Ennek megfelelően a mikrovilág megfigyeléséhez elengedhetetlen a megfelelő nagyítás használata. A nagyítás mellett egy másik fontos tényező a numerikus apertúra, ami jellemzi a mintából legnagyobb szögben kilépő sugarakat, amelyek még részt vesznek a leképezésben.

A leképezésnek két fő elméleti leírása a geometriai optika és a hullámoptika. Geometriai optikai szimulációk végzésére általában a mátrixoptikát szokás alkalmazni míg fizikai optikai szimulációkhoz elterjedt a sugárkövetésen alapuló OSLO és Zemax szoftverek alkalmazása. Csak a geometriai optika alapján a nagyobb nagyítás mindig részletgazdagabb képet eredményezne azonban a valóságban azt tapasztaljuk, hogy a feloldás nem növelhető egy adott limitnél tovább. Bármilyen kifinomult és precíz lencserendszerből álló mikroszkópot is használunk egy feloldási határba ütközünk. Erre a limitre a fizikai optika és a fény hullámtermészete ad magyarázatot. Ernst Abbe definiálta ezt a feloldási határt ( $d$ ), másik nevén diffrakciós limitet, a fény hullámhossza ( $\lambda$ ) és a numerikus apertúra ( $NA$ ) függvényében [2]:

$d = \frac{\lambda}{2 NA}$	1.
----------------------------	----

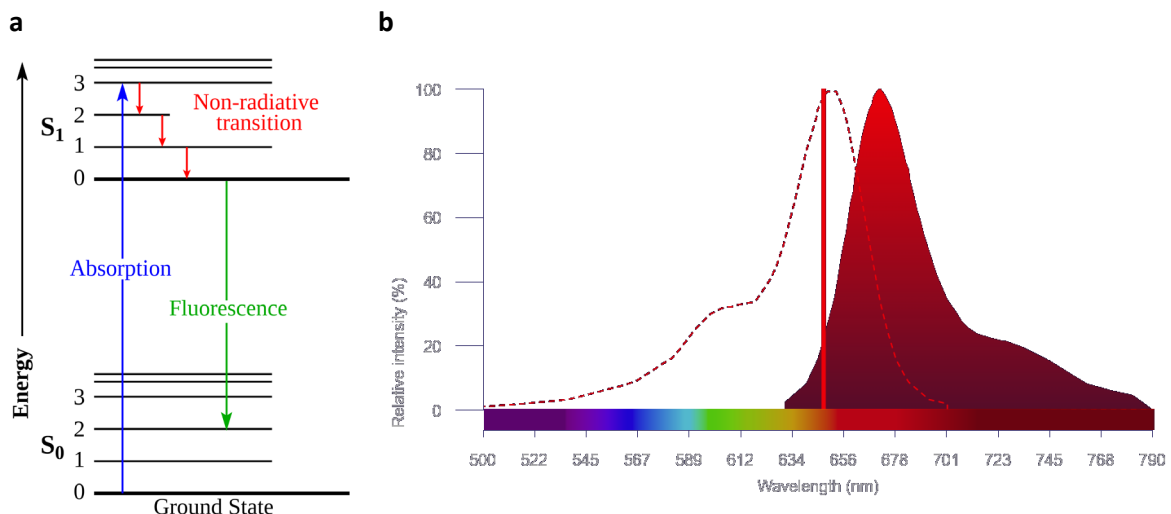
Léteznek egyéb feloldási határ definíciók is, mint például a Rayleigh [3] és a Sparrow [4] kritériumok. Ezek a rendszer pont átviteli függvénye (PSF) alapján definiálják a legkisebb feloldható struktúra



méretét [5]. A mikroszkóp rendszer pontátviteli függvénye az az intenzitás eloszlás, amit a detektorunkon észlelünk egy pontszerű tárgyat vizsgálva. Henger-szimmetrikus, aberráció mentes és kis numerikus apertúrájú rendszer esetén általában ez az úgynevezett Airy korong függvény [2].

## 2.2. Fluoreszcenciamikroszkópia

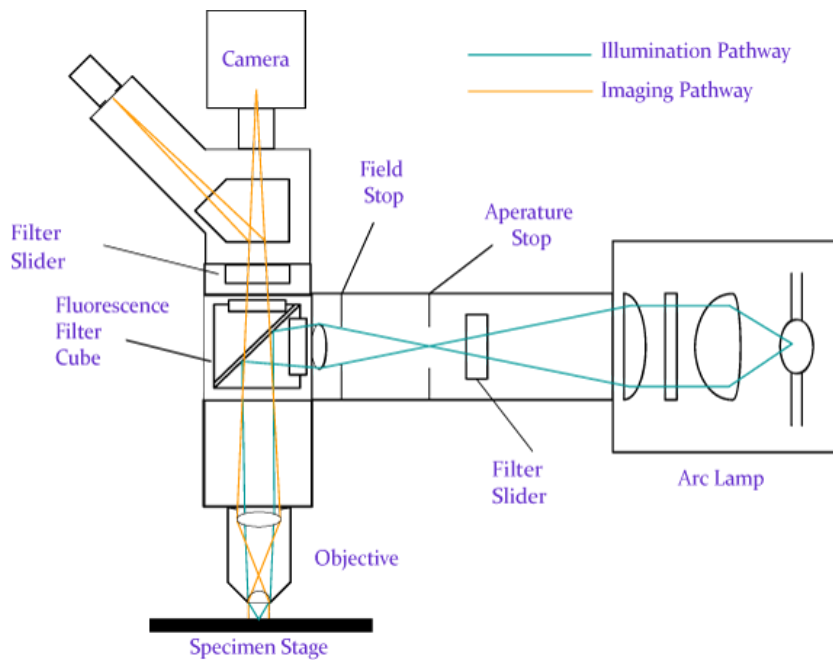
A fluoreszcenciamikroszkópia az úgynevezett nulla háttérű mikroszkópai technikák csoportjába tartozik. A módszert lehetővé tevő jelenség, a fluoreszcencia, a lumineszcencia egyik fajtája, melyben a lumineszkáló molekulákat fény segítségével hozzák gerjesztett állapotba. Ezek a gerjesztett molekulák pedig, bizonyos valószínűséggel, foton kibocsátásával térnek vissza alapállapotba. Ahhoz, hogy egy gerjesztő foton nagy hatásfokkal tudjon gerjeszteni egy molekulát szükséges, hogy a molekula abszorbeálja ezt a fotonot. Ez olyan foton energiákon tud megvalósulni, ahol a molekula egy gerjesztett állapotának energiaszintje és az alap állapot energiaszintje közötti különbség közel azonos a bejövő foton energiájával. Azt, hogy egy fluoreszkáló molekula mekkora valószínűséggel bocsát ki foton a relaxációs folyamat során az adott molekulára jellemző kvantumhatásfok írja le. A legtöbb festék esetén az emittált foton hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő fényé. Ezt a hullámhossz eltolódást Stokes-féle eltolódásnak nevezzük [6]. Mértékétől függően ez a hullámhossz eltolódás lehetővé teszi a gerjesztő és emittált fény hatékony spektrális szétválasztását. A hullámhossz eltolást, valamint az energiaszinteket szemlélteti az 1. ábra.



**1. Ábra. Fluoreszcencia jellemzése.** A fluoreszkáló molekula energiaszintjeit és a fluoreszcencia jelenségét szemléltető Jablonski-diagram (a) [7]. Az Alexa Fluor 647 festék abszorpciós és emissziós spektruma (b) [8]. A spektrumon piros függőleges vonal jelzi a gerjesztő 647 nm hullámhosszat.

## 2. Tudományos előzmények

A gerjesztő és emittált fény szétválasztására dikroikus tükröt szoktak alkalmazni. Az ilyen többrétegű dielektrikum rétegekből álló tükrök képesek keskeny hullámhossz tartományon belül a tükrözés és áteresztés között váltani [6]. Ennek köszönhetően olyan elrendezések is megvalósíthatók, ahol egyetlen dielektrikum tükör akár négy különböző fluoreszkáló festékhez tartozó gerjesztő és emittált fény szétválasztását is tudja biztosítani. Egy fluoreszcenciamikroszkóp sematikus rajza a 2. ábrán látható.



**2. Ábra. Fluoreszcenciamikroszkóp sematikus rajza.** A gerjesztési- és detektálásikarok spektrális szétválasztását biztosító dikroikus tükör a szűrőkockában foglal helyet. Az elrendezés lehetőséget biztosít kamera detektorral, valamint az okuláron keresztül, szabadszemmel végzett vizsgálatokra is. [9]

Általában a fluoreszkáló festékek egy keskeny hullámhossz sávban gerjeszthetők nagy hatékonysággal, ahogy az 1. ábrán is látható az Alexa Fluor 647 festék esetén. Emiatt olyan fényforrást érdemes használni, aminek nagy a spektrális intenzitása az adott hullámhossz tartományon, valamint alacsony a spektrális intenzitása az emisszió hullámhossz tartományában. A legelterjedtebb a lézeres gerjesztés, de emellett használhatók különböző LED-es kivilágítások, valamint megfelelő gerjesztési szűrőkkel higanygőz- vagy xenonlámpák is. [6]

Egy fluoreszkáló minta vizsgálata esetén a detektált intenzitás függ a gerjesztő fény intenzitásától, a detektorkarban lévő szűrő elrendezéstől, valamint a festékmolekulák fotofizikai jellemzőitől és sűrűségétől. Bár a természetben előfordulnak olyan minták, amelyek önmagukban is képesek fluoreszkálni ez nem jelenti azt, hogy a számunkra érdekes molekulák vagy struktúrák könnyen megfigyelhetőek. Az esetek nagy többségében valamilyen fluoreszkáló jelölésre van szükség. Biológiai minták jelölésére és vizsgálatára három jól elterjedt módszert is kidolgoztak. Az első a hagyományos fluoreszkáló jelölő molekulák alkalmazása, melyek természetüknél fogva kötődnek a vizsgálni kívánt molekulához. Ilyen például a DAPI, ami nagy affinitással kötődik a DNS bizonyos részeihez. A második az immunfluoreszcencia, melynél a vizsgálni kívánt fehérje antitestéhez kapcsolnak valamilyen fluoreszkáló molekulát. Másodlagos antitestek használatával egyetlen vizsgálni kívánt fehérjéhez többféle festék is kapcsolható, így ez a detektálás szempontjából egy igen flexibilis technika. A harmadik a fluoreszkáló fehérjék alkalmazása. A DNS megváltoztatásával elérhető, hogy egy adott fehérje expressziója során egy fluoreszcenciára képes alegységgel kiegészítve készüljön el. [6]

Mint minden technikának, a fluoreszcenciamikroszkópiának is megvannak a korlátjai. A fluoreszkáló festékek nem képesek örökké világítani. A folyamatos gerjesztés és emittálás idővel „károsítja” ezeket a molekulákat, amelyek így elvesztik fluoreszcencia képességüket. Ezt a jelenséget kifakulásnak, idegen szóval „photobleaching”-nek nevezzük. Egy másik fontos korlát főleg biológiai mintáknál, hogy élő szervezetekben sok olyan molekula található, amelyek fluoreszcencia képesek az alacsonyabb hullámhosszak (~400 nm) tartományában. Ezek úgynevezett autofluoreszcencia jelet adnak [6], ami képes jelentősen rontani a jel-zaj viszonyt és akár teljesen elnyomni a hasznos jelet.

### 2.3. Konfokális mikroszkópia

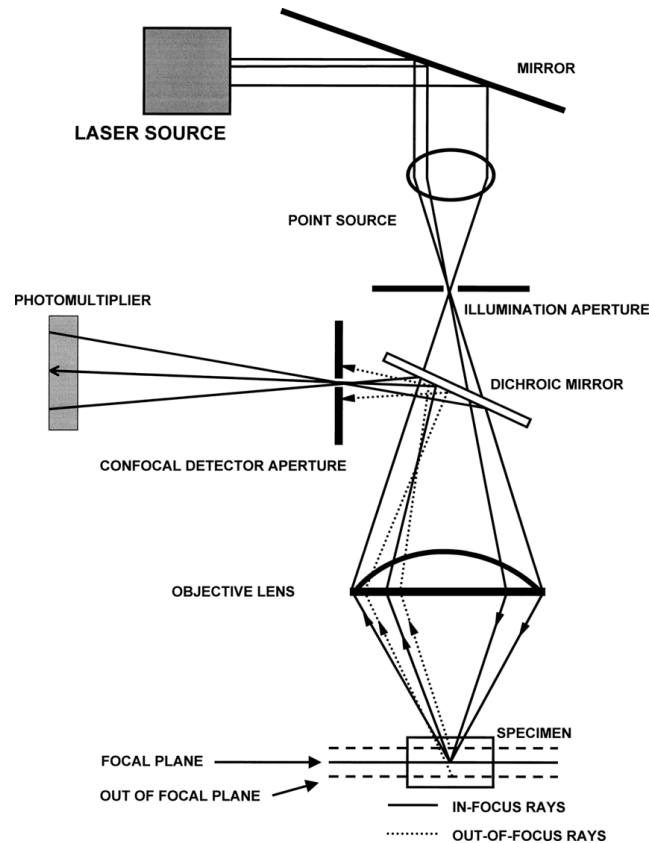
A konfokális mikroszkópia egy pásztázó fluoreszcenciamikroszkópiás eljárás [10], [11]. A megvalósításához két fontos feltételnek kell teljesülnie. Az első, hogy a gerjesztő nyaláb a minta egyetlen pontjára fókuszálódjon. Minél kisebb térfogat van kivilágítva annál jobb feloldás érhető el. A minimális folt méret érdekében monokromatikus, koherens gerjesztő nyalábokat szoktak használni, ennek megfelelően a gerjesztő fényforrás általában egy lézer. Ezt a lézert egy tüllyukra fókuszálják, amit pedig ezután az optikai rendszerrel a mintára képeznek, így intenzíven kivilágítva egy látható tartományon kb. 250 nm laterális és 800 nm axiális méretű ellipszoidot. Ezt az ellipszoidot konfokális térfogatnak vagy gerjesztési PSF-nek szokás nevezni. A minta ezen konfokális

## 2. Tudományos előzmények

térfogat felett és alatt is ki van világítva, bár kisebb intenzitás sűrűséggel. A második feltétel, hogy azon emittált fénysugarak, amik nem a konfokális térfogattól léptek ki ne ériék el a detektort. Ezt úgy valósítják meg, hogy a konfokális térfogatot az optikai rendszerrel egy túlyukra képzik, így csak a konfokális térfogattól kilépő sugarak jutnak át nagy hatékonysággal a túlyuk mögött elhelyezkedő detektorra. Ebben az elrendezésben a konfokális térfogattól laterálisan és axiálisan eltérő térfogattól érkező fénysugarak is ki vannak szűrve. A fénysugarakat megfordítva, ennek a gerjesztés oldali túlyuknak a mintán kirajzolódó képe a detektálási PSF. A konfokális technika feloldását a gerjesztési és detektálás oldali PSF-ek szorzata adja.

A konfokális térfogat kis mérete, illetve a túlyukkal történő apertúrázás miatt, a detektorra csak kis mennyiségű fény jut. Ennek orvoslása háromféleképpen valósítható meg. Megnövelhető a gerjesztő intenzitás, azonban ez a minta károsodását okozhatja. Beállítható hosszabb expozíciós idő, azonban ez a mérési idő megnövekedéséhez vezet. Alkalmazható érzékenyebb detektor, azonban ezek költségesebbek. A gyakorlatban mindhárom lehetőséget szokták használni megfelelő arányban. A konfokális mikroszkópok detektoraként általában valamilyen fotoelektron-sokszorozót vagy lavina fotodiódát használnak.

Ahhoz, hogy a minta egy síkjáról kép készüljön a konfokális térfogattal végig kell pásztázni a mintát laterálisan. Ezt általában egy tükör párral szokás megvalósítani. Ahhoz, hogy a tükrök elfordulásával arányos legyen a konfokális térfogat elmozdulása, úgynevezett f-theta lencsét alkalmaznak. Így megvalósítható, hogy a keletkezett kép pixelei egyenként helyezkedjenek el egyenletes szervomotor mozgásokkal. Egy konfokális mikroszkóp sematikus vázlatát a 3. ábra mutatja.



**3. Ábra. A konfokális mikroszkóp felépítésének vázlata.** A hagyományos fluoreszcenciamikroszkóphoz képesti főbb eltérések a pontszerű detektálás és gerjesztés, valamint a gerjesztő oldalon és a detektor oldalon elhelyezett túlyukak (az ábrán rendre „illumination aperture” és „confocal detector aperture”). [12]

Mivel a konfokális mikroszkópban a vizsgált sík feletti és alatti pontokból kilépő fénysugarak blokkolva vannak, ezért a technika jel-zaj viszonya lényegesen jobb, mint a hagyományos világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópos felvételeknek. Ez a tulajdonság emellett lehetőséget biztosít háromdimenziós felvételek készítésére is. Miután egy adott axiális pozíciónál elkészült egy kép a minta vagy az objektív axiális mozgásával egy új sík fókuszba hozható, ahol újabb kép kerül felvételre és így tovább. Az így készült felvételeket „z-stack”-nek szokás hívni, amiből pedig elkészíthető a 3D-s felvétel. A diffrakcióból adódóan a konfokális 3D képek laterális és axiális feloldása különböző. A z-stack felvételének kivitelezéséhez a mintát stabilan kell az adott axiális pozícióban tartani és nagy precizitással kell az axiális pozíciók között mozgatni. Erre a feladatra gyakran alkalmaznak piezokristályos z-eltolókat.

## 2. Tudományos előzmények

A konfokális mikroszkópokat elterjedten használják sejtbiológiai, genetikai és mikrobiológiai minták vizsgálatára. A technika nagy előnye a hagyományos világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópiával szemben a jobb jel-zaj viszony, valamint a lehetőség háromdimenziós képalkotásra. A technika egyik hátránya világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópiával szemben, hogy a készített képek pixel értékei nem egy időben kerültek felvételre. Így csak olyan rendszerek vizsgálhatók konfokális mikroszkóppal, amelyek a pásztázási idő alatt nem változnak, élő sejtek és időben gyorsan változó rendszerek nehezebben vizsgálhatók.

### 2.4. Optikai szuperrezolúció

Optikai szuperrezolúció azon mikroszkópiás technikák összefoglaló neve melyekkel a diffrakciós limitnél jobb feloldást lehet elérni a látható fény tartományában. Az 1970-es évektől mindmáig számos olyan technikát fejlesztettek ki, amelyek axiálisan, laterálisan vagy mindkét irányban képesek javítani a diffrakciós limit által szabott feloldáson [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26]. Az ilyen eljárások megvalósításához számos technikai, optikai és kémiai innovációra volt szükség. Néhány nevezetesebb szuperrezolúciós mikroszkóp technika:

4Pi [15]: Az egyik legelső szuperrezolúciós eljárás. A technika a konfokális mikroszkóphoz hasonlóan egy pontszerű gerjesztést használ, valamint pásztázással készít képet. A lényege, hogy 2db egymással szembefordított objektívet használnak. A minta e két objektív között foglal helyet úgy, hogy az optikai úthossz különbség a két objektíven keresztül a gerjesztő forrástól a mintáig, valamint a mintától a detektorig megegyezik. Ez a gerjesztő oldalon lehetővé teszi a koherens gerjesztést és álló hullám kialakítását a mintában, a detektor oldalon pedig a koherens detektálást. Ideális esetben a két objektív lehetővé teszi, hogy a minta minden oldalról, vagy másszóval a teljes térszögben ( $4\pi$ ) ki legyen világítva és detektálva. Ennek köszönhetően az axiális feloldás a konfokális mikroszkóp axiális feloldásához képest lecsökkenthető a laterális feloldás szintjére.

Structured illumination microscopy (SIM) [16], [17]: Magyar nevén strukturált kivilágítás mikroszkópia a világos látóterű mikroszkópiás eljárásra épül. Lényege, hogy egy térben periodikus gerjesztést alkalmazva feltérképezik a nagyobb, optikai rendszer által kiszűrt, Fourier komponenseit a vizsgált mintának. Ez a strukturált gerjesztés általában egy szinuszos mintázat. A minta Fourier síkjában ilyen gerjesztést alkalmazva a minta és a szinuszos gerjesztés Fourier transzformáltjainak a konvolúciója fog megjelenni. Így lényegében a szinuszos gerjesztés térbeli periódusától függően el lehet tolni a Fourier térben megfigyelt komponenseket. Több különböző irányból alkalmazva ezt a gerjesztést optimális esetben egy négyszer akkora terület térképezhető fel a Fourier síkban, mint

hagyományos kivilágításnál. Ennek eredményeképpen a legnagyobb frekvenciájú komponens kétszer akkora, így a feloldás is kétszeresére növelhető a világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópok feloldásához képest.

Stimulated emission depletion (STED) [18]: Magyar nevén stimulált emisszió kioltás a pásztázó mikroszkóp technikák csoportjába tartozik. Lényege, hogy a gerjesztést egy a konfokális eljáráshoz hasonló, mintába fókuszált lézer impulzussal valósítják meg, majd ezt követően igen rövid időn belül egy STED impulzussal stimulált emisszióra kényszerítenek minden festékmolekulát, ami nem pontosan a fókuszban található. Ez a STED impulzus térben tórusz, vagy szakkifejezéssel élve fánk alakú. Ennek következtében a középpontjában az intenzitás nullára esik, így ott nem okoz stimulált emissziót. A technika precizitása arányos a STED impulzus intenzitásával, emiatt a jellemző teljesítmény sűrűség kezdetben meghaladta az  $1 \text{ GW/cm}^2$ -t. Ezt egyéb optimalizációk segítségével sikerült azóta pontosság veszteség nélkül csökkenteni.

Single molecule localization microscopy (SMLM) [19]: Magyar nevén lokalizációs mikroszkópia a világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópiára épül. Lényege, hogy meghatározott módszerekkel eléri azt, hogy a mintát festő fluoreszkáló molekulákat egyesével tudják leképezni a detektorra. Ez általában speciális festékek, puffer oldatok és gerjesztés alkalmazását igényli. Amennyiben egyetlen fluoreszkáló molekula képét vizsgáljuk a detektoron a mikroszkóp rendszer pontátviteli függvénye fog megjelenni. Ennek oka, hogy a fluoreszkáló molekulák lényegesen kisebbek, mint a látható fényvel elérhető feloldási határ. A beérkező foton számtól függően ennek a PSF-nek a középpontja lényegesen nagyobb pontossággal meghatározható, mint a PSF félérték szélessége. Ezt kellő számú, mintát festő, fluoreszkáló molekulával elvégezve az egyes molekulák meghatározott pozícióiból rekonstruálható a minta képe. A PSF speciális módosításával további információ, vagy nagyobb precizitás is elérhető. Lokalizációs mikroszkópiában azért, hogy csupán egyetlen fluoreszkáló molekula jele detektálható legyen nagy numerikus apertúrájú objektíveket és érzékeny detektorokat szokás használni. A következő lokalizációs mikroszkópiái technikák a legismertebbek:

- (d)STORM: (direct) stochastic optical reconstruction microscopy [20], [21]
- PALM: photo activated localization microscopy [22], [23]
- PAINT: points accumulation for imaging in nanoscale topography [24]
- GSDIM: ground state depletion microscopy [25]
- MINIFLUX: minimal photon flux [26]

## 2. Tudományos előzmények

### 2.5. direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy

A dSTORM a lokalizációs mikroszkópiai eljárások családjába tartozik. A módszer során megfelelő festékek és puffer oldatok segítségével elérhető, hogy a festékmolekulák időben szeparálva világítsanak. A mintáról ezalatt egy videó felvétel készül. A felvett videóból nagy pontossággal rekonstruálható a minta geometriája. A hagyományos világos látóterű fluoreszcenciamikroszkópiához képest a dSTORM technika megvalósításához négy tényezőnek kell teljesülni a minta fotokémiájával, a detektorral és a képmegjelenítéssel kapcsolatban.

A minta előkészítés során a dSTORM technika megvalósításához olyan festékre van szükség, amely rendelkezik egy hosszabb élettartamú, nem fluoreszkáló, úgynevezett kikapcsolt (OFF) állapottal a gerjesztett- és az alapállapot mellett. Az ebbe az állapotba való átmenet valószínűsége arányos kell legyen a gerjesztő intenzitással. Amikor a molekula a gerjesztett és az alapállapot között folyamatosan gerjesztődik és emittál ezt pedig bekapcsolt (ON) állapotnak szokás nevezni. Az egyik igen elterjedt ilyen festék az Alexa Fluor 647. Ez egy igen intenzív, lassan kifakuló és jól kikapcsolható festék,  $2 \text{ kW/cm}^2$  intenzitás mellett gyakorlatilag maradéktalanul OFF állapotban vihető. Ilyenkor a detektoron az egyenként véletlenszerűen ON állapotba kapcsoló fluoreszkáló molekulák képe látható. A technika részben ezután a sztochasztikus visszakapcsolás után kapta a nevét.

Annak érdekében, hogy az egyes festékmolekulákhoz tartozó PSF-ek szétválaszthatóak legyenek egyetlen expozíciós idő alatt csak kevés molekula világíthat. Ennek eredménye, hogy egy dSTORM mérés alatt több tízezer képkocka elkészítése szükséges, ami akár 20 percig is tarthat. Ez idő alatt a festékek kifakulását minimalizálni kell. Az Alexa Fluor 647 megfelelő oxigén elvonást biztosító (glükóoxidáz) puffer oldatban képes akár 4 órán keresztül is használható jelet adni. Emellett a puffer oldatban található úgynevezett fluoreszcencia kioltó ( $\beta$ -merkaptóetanolt vagy merkaptóetilamint). Az ilyen puffer oldat fokozza az egyes ON állapotokhoz tartozó felvillanások erősségét is, így növelve a lokalizációk pontosságát. [27]

Egy molekula az ON állapot alatt tipikusan 3000 olyan fotont bocsát ki, ami részt vesz a leképezésben. Ennek a detektálására nagy érzékenységgű alacsony zajszintű kamerákat kell használni. Ilyen kamera például egy elektron-sokszorozó CCD (EMCCD). A termikus zaj csökkentésére ezeket alacsony hőmérsékleten üzemeltetik. Általános például a kamerák beépített hűtésével elérhető  $-75^\circ\text{C}$ . Egy másik lehetőség a tudományos CMOS (sCMOS) kamerák használata. Ezeket szintén lehűtve alkalmazzák. A kamerák pixelméretét és az optikai rendszert úgy szokás megválasztani, hogy az egy molekulához tartozó PSF intenzitásának jelentős része kb.  $3 \times 3$ -as pixel



területre essen. Ennek oka egyik oldalról az, hogy a PSF középpontja meghatározható legyen, annak legalább ennyi pixelre kell esnie. Másik oldalról, minél több pixelre van szétnyújtva a PSF, annál rosszabb a jel-zaj viszony. Megvizsgálva a lokalizációk pontosságát a PSF méret és pixel méret arányának függvényében az ideális arány az egy [28]. Az egy molekula egy képkockán megjelenő ON állapothoz tartozó képeket felvillanásoknak szokás nevezni.

A felvett több tízezer képkockából álló videón minden egyes felvillanásnak meg kell határozni a pontos helyzetét. Ez úgy végezhető el, hogy minden egyes felvillanásra matematikailag rá kell illeszteni a rendszer PSF-jét. A pontos PSF helyett viszont a legelterjedtebb illesztés a 2D-s Gauss görbe illesztés. Ennek három fő oka van. Az első, hogy Gauss görbe illesztése lényegesen kisebb számításigénnyel bír, így a kiértékelést jelentősen gyorsítja. A második, hogy a fluoreszkáló molekulák helyzetének meghatározása a fő cél, ennek megfelelően a PSF pontos alakja nem ad számunkra hasznos információt. A harmadik, hogy nagy numerikus apertúrájú rendszerekben a PSF jól közelíthető Gauss görbével. Ezt az illesztést minden egyes felvillanásra elvégezve adódik egy akár több millió koordinátapárból álló adatsort. A koordinátákon kívül az illesztési paramétereiből, valamint a precizitásból is kinyerhető további információ, ezért ezeket is érdemes elmenteni. Egyetlen lokalizációs illesztés precizitásának elméleti maximumát Thompson mutatta meg. Ezt a szerző után Thompson precizitásnak szokás hívni [28]. Képlete:

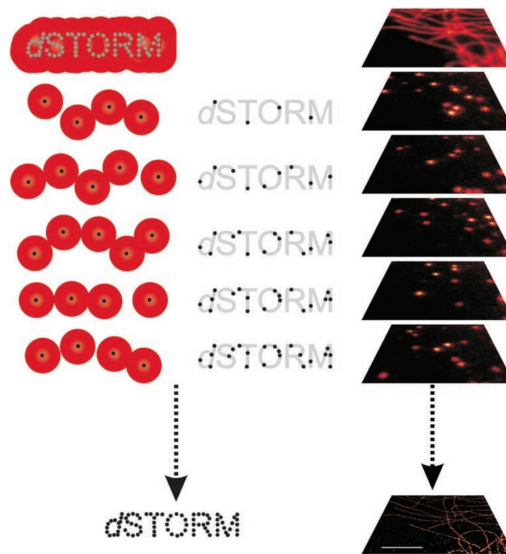
$\sigma_{Th.} = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}},$	2.
--	----

ahol a Thompson féle lokalizációs precizitás  $\sigma_{Th.}$ , az illesztett Gauss függvény szórása  $s$ , a pixelméret  $a$ , a háttérzaj fotonzámban vett értéke  $b$  és a felvillanáshoz tartozó fotonszám  $N$ . Léteznek más ilyen precizitás algoritmusok is mint pl. a Mortensen féle precizitás [29]. A valós precizitás általában rosszabb ennél mert a Thompson-féle precizitás nem veszi figyelembe a festékmolekulák mozgását és forgását, hanem csak a felvett kép adataiból dolgozik.

A lokalizációs illesztésekből származó adatsorok vizualizálására több lehetőség is van. Vannak úgynevezett pointillista ábrázolási technikák, amelyek megőrzik az egyedi lokalizációk pozícióit és azokat általában a lokalizációs pontossággal egyező méretű körökkel vagy ellipszoidokkal jelképezik. Az ilyen technikák nem járnak adatvesztéssel, viszont nyomtatásban nem alkalmazhatók effektíven. Egy másik lehetőség egy nagy feloldású pixelizált kép generálása. Ezek nyomtatásban, illetve belenagyítás nélkül is jól alkalmazhatók, cserébe információ veszteséssel járnak. A legelterjedtebb vizualizáció, hogy egy 20 nm-es pixelméretű szürke árnyalatú képen az egyes pixel

## 2. Tudományos előzmények

értékeknek a rájuk eső lokalizációk számát adják. A  $20\text{ nm}$  a dSTORM technikára jellemző lokalizációs pontosságból adódik. Egy bevett vizualizáció még, ahol a látványosság kedvéért, ezeket a szürkeárnyaltos képeket átkonvertálják színes képekké úgy, hogy az üres területek feketék maradnak a lokalizációkat tartalmazó pixelek pedig a lokalizációk számával növekedve a mély vöröstől a sárgán át a fehérig változnak. A dSTORM mikroszkópiás eljárás vázlatát a 4. ábra mutatja.

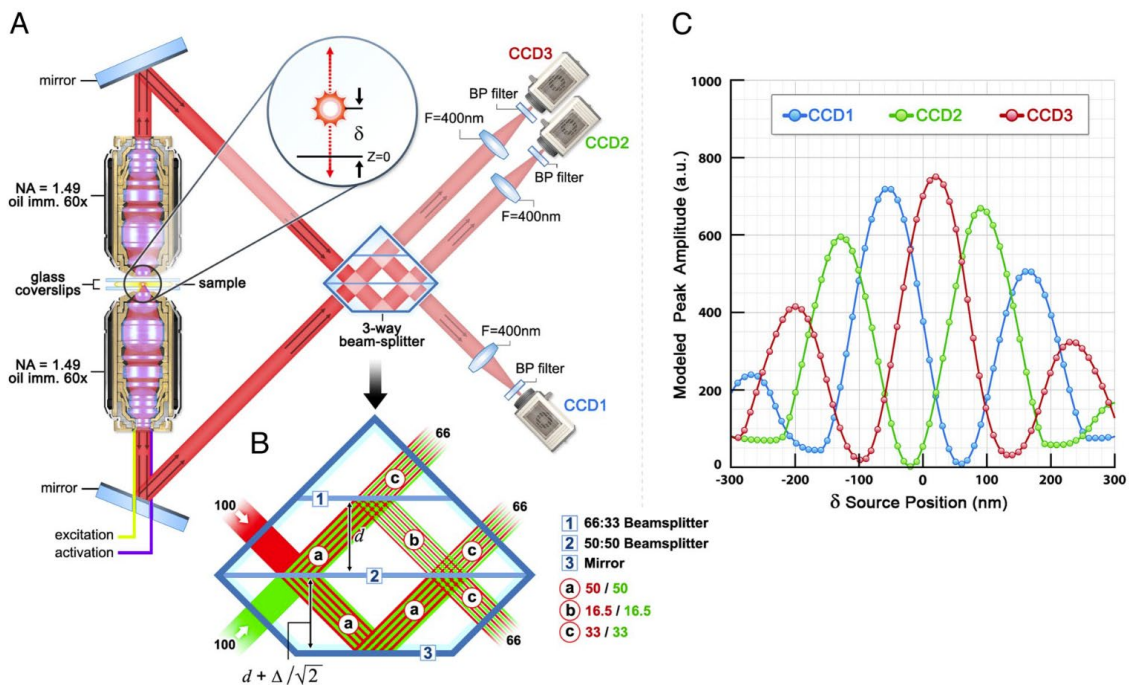


**4. Ábra. dSTORM mikroszkópia elve.** A mintáról készült videófelvétel minden képkockáján más és más fluoreszkáló molekulák világítanak. Az egyes molekulák lokalizálását követően az egyes képkockák egyesítésével rekonstruálják a szuperrezolúciós képet. Ennek eredményeképpen a diffrakció limitált leképezéshez képest közel egy nagyságrenddel javítható a laterális feloldás. [27]

### 2.5.1. 3D lokalizációs mikroszkópia

A dSTORM nagy laterális feloldást tesz lehetővé, akár  $20\text{ nm}$ -es pontossággal, azonban axiális irányban a feloldás lényegében megegyezik a mikroszkóp mélységélességével, ami a technikára jellemző nagy numerikus apertúrájú objektíveket alkalmazva körül-belül  $800\text{ nm}$ . Ennek az axiális feloldásnak a javítására számos technikát dolgoztak ki. Ezek három nagy csoportra oszthatók. Interferenciás [30], több síkú [31] és PSF manipulációs [32], [33], [34] technikák. Ezek mellett vannak egyéb, kevésbé elterjedt módszerek is [35], [36], [37], valamint a meglévő technikákat ötvözni lehet speciális megvilágítási módokkal a jel-zaj viszony további javítására [38], [39]. A pontos 3D lokalizációhoz elengedhetetlen az optikai aberrációk minimalizálása, így ezen a területen az adaptív optikai elemek jelentős relevanciára tettek szert az elmúlt években [40], [41], [42], [43].

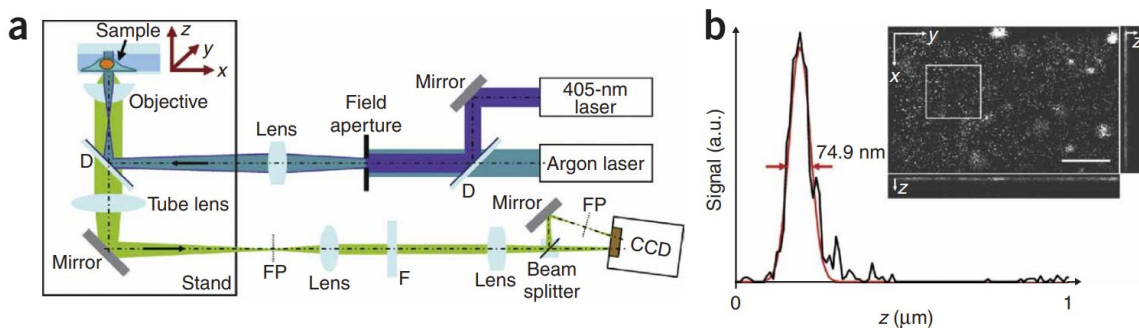
Az interferenciás módszerek általában két objektívet és legalább két detektort alkalmaznak [30]. Egy ilyen módszer vázlata látható az 5. ábrán. A technika során két szemben álló, egyező fókuszszíjú objektívet alkalmaznak. Egy fluoreszkáló molekula által kibocsátott fotonok a felső és az alsó objektíven keresztül is egy speciális háromágú nyalábosztóra jutnak, ahol interferencia lép fel a felső és alsó ág fotonjai között. Ezután a három detektorra jutnak az interferencián átesett jelek, ahol a mért intenzitásokból kiszámolható a fluoreszkáló molekula axiális pozíciója. Ennek oka, hogy az interferencia függ a felső és az alsó objektívekhez tartozó optikai úthosszak különbségétől, ami közvetlenül függ a molekula axiális pozíciójától. Az interferenciás módszerek előnyei, hogy a többi technikához képest relatívan nagy axiális pontosságot ( $<20 \text{ nm}$ ) biztosítanak, valamint  $4\pi$  térszögben begyűjtik a mintáról kilépő fényt, ami rendkívül hasznos a fotonszám érzékeny lokalizációs technikánál. Hátrányai, hogy a mintából kilépő fénynél a koherencia hossza alacsony, ezért csak nagyon vékony szeletben működik, rezgésekre nagyon érzékeny és a fotonszám három detektorra esik, ami rontja a pontosságot. Emellett a módszer technikai kivitelezése is bonyolult.



**5. Ábra. Interferometrius 3D lokalizációs mikroszkóp vázlata és működési elve.** A rendszer vázlata (A). A speciális háromágú nyalábosztó és az egyes felületeknél történő amplitúdó osztások (B). A három detektoron keletkező intenzitás a fluoreszkáló molekula,  $\delta$ -val jelölt, axiális pozíciójának függvényében (C). [30]

## 2. Tudományos előzmények

A többsíkú módszerek hasonlóan az interferenciás módszerekhez két optikai utat használnak. Egy ilyen módszer, az úgynevezett biplán módszer [31], vázlata látható a 6. ábrán. A technika során a vizsgált mintának két különböző, egymással párhuzamos síkját képezik le a detektorra. Legegyszerűbb megvalósításában ehhez egy darab objektívet alkalmaznak, a két különböző síkot pedig egy nyálábsztóval és egy extra lencsével hozzák létre. A detektor két különböző területén jelenik meg a két sík képe külön-külön, egymás mellett. Vannak két objektíves és két detektoros megvalósításai is ennek a technikának. Attól függően, hogy az egyes fókuszsíkoktól milyen távol van a fluoreszkáló molekula más és más lesz a kamerán detektált két felvillanás félértékisélessége. Ebből visszaszámolható a fluoreszkáló molekula axiális pozíciója. A technika előnye, hogy viszonylag egyszerű megvalósítani, valamint a kb. 75 nm-es axiális feloldás. Hátránya a fluoreszkáló molekulából kilépő fotonok kettéosztásából származó feloldás csökkenés.

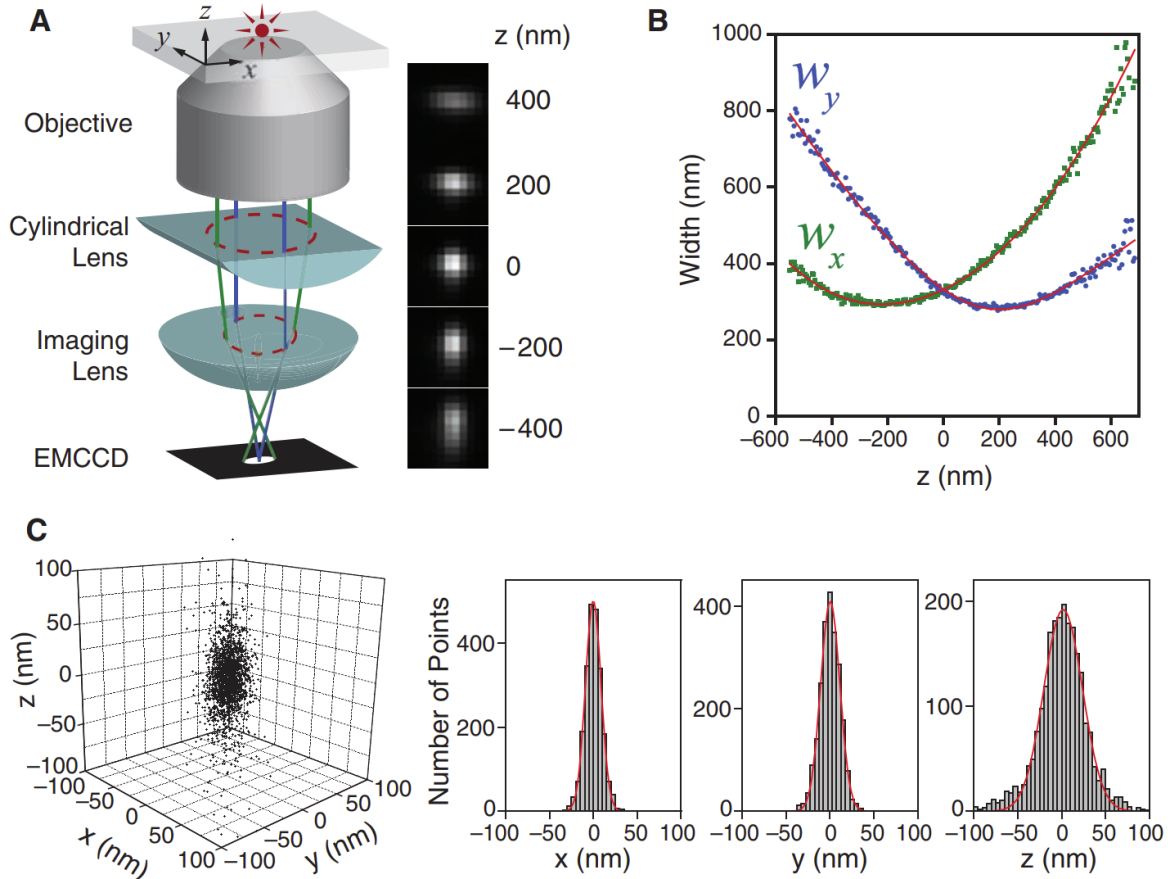


**6. Ábra. Többsíkú 3D lokalizációs mikroszkóp vázlata és működési elve.** Biplán lokalizációs rendszer vázlata (a). Fedőlemezre fixált fluoreszkáló molekulák axiális eloszlása (b). Méretskála: 2  $\mu\text{m}$ . [31]

A PSF manipulációra alapuló módszerek speciális optikai elemeket használva a PSF alakjába, orientációjába vagy méretébe kódolják a fluoreszkáló molekula axiális pozícióját. Ebből következően az ebbe a csoportba tartozó technikák a legváltozatosabbak.

A legegyszerűbb ezek közül az asztigmias 3D [32]. Egy ilyen rendszer vázlatát mutatja a 7. ábra. Az asztigmias 3D lényege, hogy a szuperrezolúciós rendszert kiegészítik egy asztigmias bevezető, általában hengerlencse, optikai elemmel. Ezt oly módon valósítják meg, hogy a detektor függőleges és vízszintes tengelyének megfelelő legyen az asztigmia iránya. A fluoreszkáló molekula axiális pozíciójától függően a detektoron megjelenő PSF ellipszis alakú lesz, melynek függőleges és vízszintes tengelyének méretéből meghatározható a molekula axiális helye. A technika előnyei az egyszerű megvalósítás és a kb. 60 nm-es axiális feloldás. A technika hátránya, hogy a lokalizációk

laterális pontossága különbözni fog a kamera vízszintes és a függőleges irányában. Ennek oka, hogy a PSF szélessége más lesz a függőleges és vízszintes irányokban így befolyásolva a PSF méret - kamera pixelméret arányt.

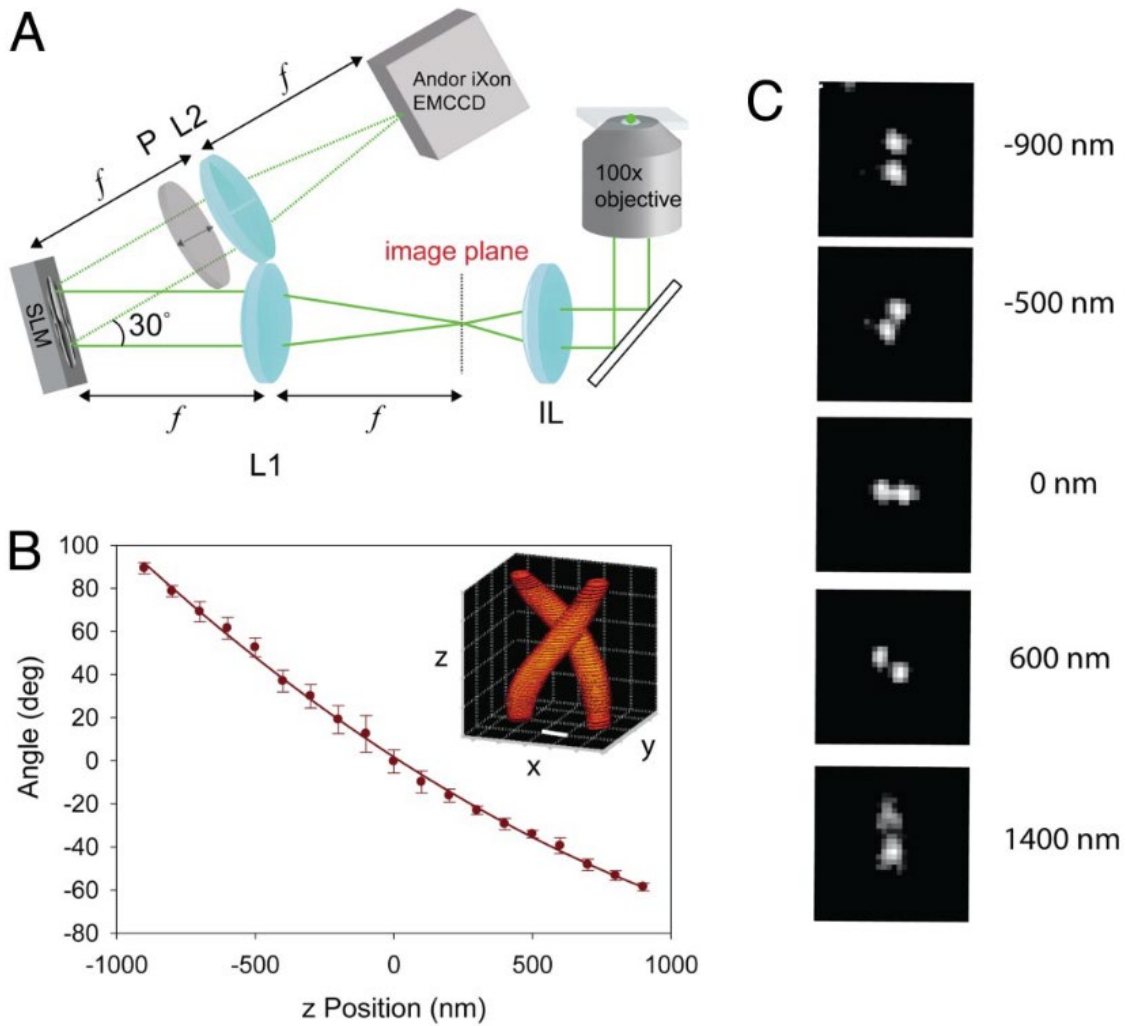


**7. Ábra. Asztigmás 3D lokalizáció működési elve.** A leképező rendszer vázlatja (A). A PSF függőleges ( $w_x$ ) és vízszintes ( $w_y$ ) félérték szélességének függése a molekula axiális pozíciójától (B). 145 db egymás tömegközpontjába mozgatott, egyedi fluoreszkáló molekulákhoz tartozó lokalizáció klaszterek képe és térbeli eloszlása (C). [32]

Egy másik PSF manipuláción alapuló módszer az úgynevezett kettős spirál technika [33]. Egy ilyen rendszer működését a 8. ábra szemlélteti. A technika lényege, hogy egy térbeli fénymodulátor (SLM) segítségével egy speciális fázismaszkon keresztül jut a detektorra a fluoreszcencia jel. Ez a fázismaszk eléri, hogy a PSF két foltból álljon és az ezen két folt által kifizített szakasz orientációja a fluoreszkáló molekula axiális pozíciójától függ. Háromdimenzióban vizsgálva az ilyen rendszer PSF-je egy axiális irányú kettős spirál, ahol a molekula axiális pozíciójától függ, hogy a detektor melyik síkban mintavételezi ezt a kettős spirált. A technika erről az alakról kapta a nevét. Előnye, hogy

## 2. Tudományos előzmények

vastagabb axiális tartomány vizsgálatát teszi lehetővé. Hátránya, a térbeli fénymodulátor használatából származó fényvesztés okozta pontosság csökkenés, valamint az elrendezés relatív bonyolultsága.



**8. Ábra. Kettős spirál technikájú 3D lokalizáció működési elve.** Az optikai rendszer detektorkarjának vázlatja (A). Egy jellegzetes kalibrációs görbe, ami a két folt által kifeszített szakasz orientációjának és a molekula axiális pozíciójának kapcsolatát mutatja (B). A kamerán detektált kép a fluoreszkáló molekula különböző axiális pozíciói mellett (C). [33]

### 2.6. Kvantitatív képelemzés

A lokalizációs adatsorok kvantitatív elemzése az utóbbi években jelentős érdeklődésre tett szert [44]. Az eltérő adatformátum (a lokalizációs adatsorok a fluoreszkáló molekulák koordinátáit adják meg) azonban új jósági tényezők meghatározását [45], [46], kiértékelő algoritmusok írását [47], [48] és vizualizációs módszerek kifejlesztését [49] igényli. Annak érdekében, hogy a biológiai minták vizsgálata során a korábbi hagyományos fluoreszcenciás, illetve konfokális eredményekkel összevethető adatokat lehessen kinyerni a lokalizációs adatsorokból számos új kvantitatív kiértékelő módszert vezettek be. Ezek az új módszerek jellemzőek az adott biológiai mintára, valamint az adott lokalizációs technika tulajdonságaira. Biológiai minták esetén jellemző, hogy bizonyos fehérjék csomósodásokba, úgynevezett klaszterekbe rendeződnek, amelyek a lokalizációs adatsorokban sűrű ponthalmazokként jelennek meg. Az ilyen mintákat klaszteranalízissel lehet elemezni. A két legelterjedtebb klaszteranalízist kivitelező eljárás a DBSCAN [50] és a Voronoi-tesszeláció [51]. Ezekkel a módszerekkel meghatározható a mintában kialakult fehérjeklaszterek száma, mérete, eloszlása és következtetéseket lehet levonni a vizsgált fehérje működésére. A lokalizációs technikára jellemző, hogy a jelölt fehérjék száma nem egyezik meg a lokalizációk számával. Ezt számos tényező befolyásolja, többek között a fehérjéhez kötődő antitestek száma, az antitesteken lévő festékszám vagy az egy festékhez tartozó felvillanások száma. Az ilyen tényezők statisztikai kezelésére az egyedülálló fluoreszkáló emitterek nyomának vizsgálatával van lehetőség [52]. Egy adott felvillanás több képkockán is látszódhat több pontatlanabb lokalizációt eredményezve. Ennek oka, hogy a molekulák nem feltétlenül az expozíciós idő kezdetekor kapcsolnak ON állapotba, valamint az expozíciós időn túl nyúlhat az ON állapot, így a felvillanáshoz tartozó kis fotonszám két képre oszlik. Ennek javítására úgynevezett trajektória illesztő algoritmusokat lehet használni, amelyek képesek feltárni az egy felvillanáshoz tartozó lokalizációkat és egyesíteni azokat egyetlen pontosabb lokalizációvá [53]. A kolokalizáció nem határozható meg az egyes színcsatornák pixeleinek intenzitásarányaiból. Az ezt a problémát megoldó és a lokalizációs mikroszkópia számára kvantitatív kolokalizációs elemzést biztosító technikák vagy a DBSCAN-alapúak, ahol a lokalizációs sűrűségek változása határozza meg a két csatorna közötti kapcsolatot [54], vagy a Voronoi-tesszelációra épülnek, ahol a kolokalizációt a Manders-koefficiensek segítségével határozzák meg [55]. Ezek mellett számos más kvantitatív képelemző módszert fejlesztettek és fejlesztenek a lokalizációs mikroszkópiában. Biológiai minták kiértékelésében ez továbbra is egy kulcsfontosságú kutatási terület.

## 2. Tudományos előzmények

### 2.7. Lakunaritás

A lakunaritás a fraktál geometriai matematikai módszerek családjába tartozó textúra jellemző technika. A szó a latin „lacuna” (jelentése: tó, hézag) szóból származik ezzel is utalva arra, hogy adatsorok térkitöltéséről és hézagosságáról ad információt. A fogalmat Mandelbrot "A természet fraktálgeometriája" című könyvében [56] vezette be 1983-ban azzal a céllal, hogy azonos dimenziójú, de eltérő textúrájú fraktálokat konzisztensen megkülönböztessen. Emellett a technika jól alkalmazható adathalmazokban lévő üres terek vagy üregek méret- és sűrűségeloszlásának jellemzésére, valamint a homogenitás vizsgálatára. A lakunaritás egy adathalmaz esetén bármilyen tetszőleges méretre kiszámolható, így lehetővé téve, hogy az adathalmaz különböző méretű tulajdonságait külön vizsgáljuk vele. Jele általában  $\lambda(\varepsilon)$  vagy  $\Lambda(\varepsilon)$  ahol  $\varepsilon$  egy tetszőleges méret. A fraktálgeometriából számos más tudományterületre áttért az alkalmazása. Többek között alkalmaznak lakunaritás elemzést a földtudomány [57], [58], a csillagászat [59], a mikro-CT elemzés [60] az onkológia [61], [62], [63], [64], [65], a neurológia [66] és a virológia [67] területein is.

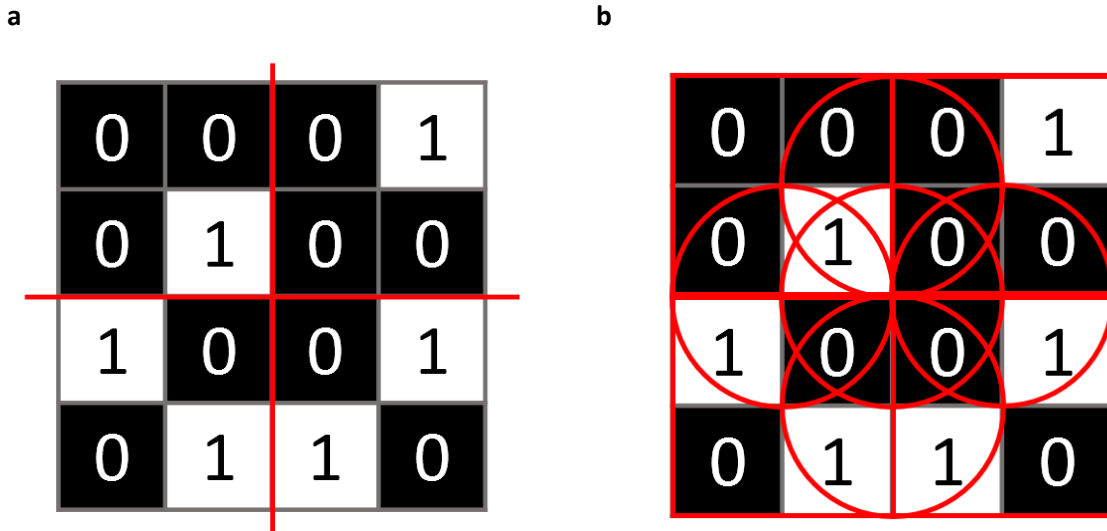
### 2.8. Lakunaritászámító algoritmusok

A lakunaritás számítására nincs bevett standard módszer, így több különböző lehetőség is van rá. Általában a vizsgált adatsort minden dimenzióban egyenlő méretű dobozokra szokás osztani és az ezen dobozokban elhelyezkedő adatpontok számainak átlagából és varianciájából szokás kiszámítani. Az egy adott dobozban lévő adatpontok számát a doboz súlyának szokás nevezni. A két legelterjedtebb lakunaritászámító módszer az úgynevezett fix grid metódus (FGM) [68], valamint a gliding-box metódus (GBM) [69]. Ez a két módszer igen hasonló egymáshoz, érdembeli különbség csupán a vizsgált adatsor dobozokra osztásában mutatkozik.

A fix grid metódus alkalmazásánál az adatsort úgy osztják fel, hogy a dobozok között ne lépjen fel átfedés. Ha a vizsgált adatsor egy kép, akkor ez azt jelenti, hogy a képet egy egyenlő beosztású hálóval osztjuk fel dobozokra. Ezt szemlélteti a 9.a ábra. A módszernek két fő hátránya, hogy a kép csak akkor vizsgálható manipuláció nélkül, ha a doboz méretének egészszámú többszöröse a kép mérete, valamint a nagyobb méretű dobozok (pl. ha a doboz mérete eléri a kép méretének egy tizedét) esetén a felosztás nagyon alacsony dobozszámot eredményez, így pontatlan lakunaritás értéket ad.



A gliding-box metódu alkalmazásánál az adatsor minden lehetséges pozíciójába elhelyezik az adott méretű dobozt és megvizsgálják hány adat pont esik bele. Ha a vizsgált adatsor egy kép akkor ez azt jelenti, hogy a doboz pixelről pixelre végig mozog a képen. Ezt szemlélteti a 9.b ábra. A módszer fő hátránya, hogy nagy adatsorok vizsgálata esetén rendkívül számításigényes.



**9. Ábra. Doboz számláló lakunaritás számítási elvek.** FGM (a) és GBM (b) módszerek megfelelő doboz felosztás egy 4x4-es képen 2-es dobozméretnél. Az FGM esetén a két vörös szakasz 4 db 2x2-es dobozra osztja az eredeti képet. A GBM esetén a 4 db FGM módszerrel megegyező dobozt 4 db 2x2-es vörös négyzet jelöli, míg a siklás során feldolgozott egyéb 5 dobozt vörös körök jelzik.

### 3. Célkitűzés

A lokalizáción alapuló szuperrezolúciós technikák továbbfejlesztésének egyik fő csapásiránya a laterális pontosság romlása nélkül további információ kinyerése az egyes lokalizált fluoreszkáló molekulákról. Ilyen információ lehet az axiális pozíció, amelyet különböző 3D technikákkal tudunk meghatározni. Egy másik fontos csapásirány pedig a kapott lokalizációs adatsorok számszerűsítése, amit összefoglaló néven kvantitatív kiértékelésnek nevezünk. Ilyen adatsorok geometriájának számszerűsítésére egy ígéretes eljárás a lakunaritás elemzés. Doktori munkásságom alatt célul tűztem ki a lokalizációs mikroszkóp rendszerek és technikák továbbfejlesztését, mind 3D lokalizáció, mind pedig lakunaritás elemzés megvalósításával.

Kutatási céljaim megvalósításának érdekében a következő feladatok elvégzését terveztem:

I. Egy multimodális egymolekula detektálásra alkalmas mikroszkóp rendszer asztigmias 3D modalitásának optimalizálása és modellezése. A tapasztalatok alapján az állandó mikroszkóp rendszerünk optimalizálása 3D dSTORM mérések elvégzésére. Az optimalizált rendszer segítségével biológiai rendszerek 3D struktúráinak feltárása.

II. A mikroszkóp rendszerünk optimalizálása többszínű dSTORM és konfokális felvételek készítésére, egyazon minta területről. Eljárás fejlesztése a dSTORM és konfokális képek egyesítésére és elemzésére. Több komponensű, komplex biológiai minták strukturális vizsgálata többszínű leképezéssel.

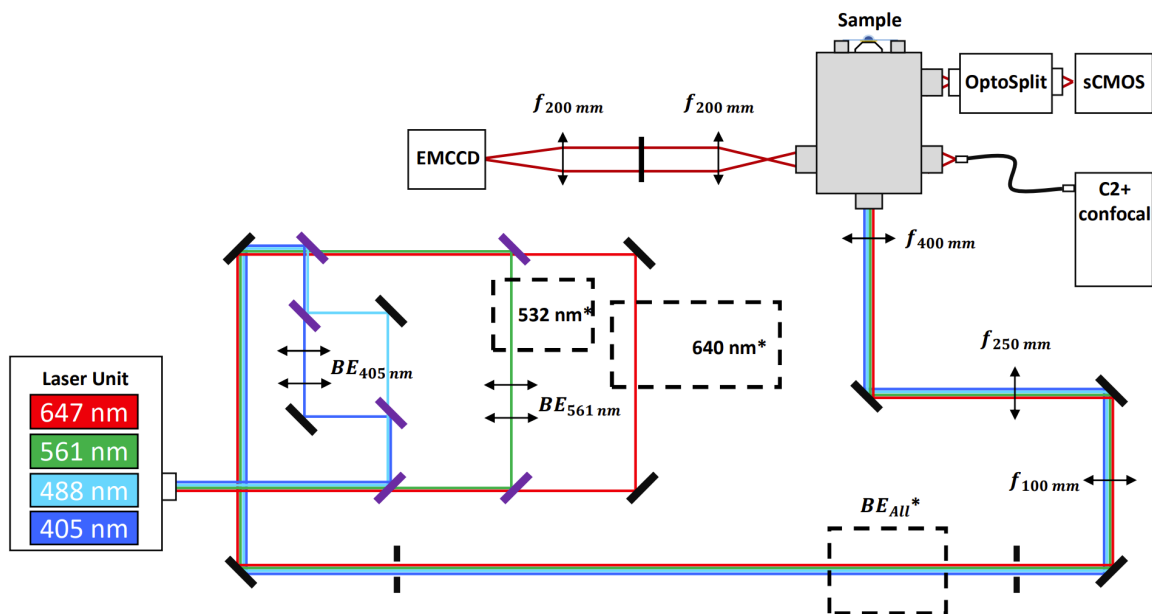
III. A lakunaritás bevezetése az egymolekula detektáláson alapuló, lokalizációs mikroszkópai technikák adatsorainak kvantitatív kiértékelésére. Lokalizációs adatsorok lakunaritás kiértékelésére alkalmas eljárás és szoftver fejlesztése. Az eljárás hitelesítése korábbi biológiai mintákon kimutatott eredmények és szimulációk segítségével.

IV. Lakunaritás értékek kiszámításának optimalizálása. A különböző nagy precizitású lakunaritászámító algoritmusok összegyűjtése. Új lakunaritászámító algoritmusok fejlesztése. Lakunaritászámító algoritmusok összehasonlítása teszt adatsorokon. Az adatsor specifikus, optimális lakunaritászámító algoritmus meghatározása.

## 4. Módszerek és eszközpark

### 4.1. Hardverek

Munkám során az Advanced Optical Imaging Group (AdOptIm csoport) egyedi építésű mikroszkóp rendszerét volt lehetőségem használni és fejleszteni. Ez egy rendkívül sokoldalú inverz mikroszkóp rendszer, ami többek között lehetőséget biztosít hagyományos fehér fényű, fázis kontraszt, DIC, konfokális, FLIM, FCS, fluoreszcencia anizotrópia, dSTORM, PALM és egyéb technikák alkalmazására. A rendszer sematikus vázlata az 10. ábrán látható. A mikroszkóp mellett a csoport saját szoftver rendszere is rendelkezésemre állt, amit számos saját fejlesztésű kóddal egészítettem ki.



**10. Ábra.** Az AdOptIm csoport mikroszkóp rendszerének sematikus vázlata. A csillaggal jelölt elemek opcionálisak. Az egyes lézerek kondicionálását végző nyalábtágítókat „BE” jelöli. Az alkalmazott lencsákat „f” jelöli jobb alsó indexben a fókusztávolságukkal.

#### 4.1.1. Kivilágítás, lézerek

A mikroszkóp rendszerünkben a kivilágítás két nagyobb csoportra osztható. Az első a hagyományos optikai technikák alkalmazását lehetővé tevő fehér fényű kivilágítás. Ez a mi elrendezésünkben egy felső kivilágítás, amit egy 100 W-os D-LH/HC halogén lámpa biztosít. Ez a fehér fényű kivilágítás kiegészíthető különböző szűrőkkel (polarizációs, fényerő, szín, stb.), valamint Köhler kivilágítás is megvalósítható a beépített kollektor és kondenzor lencséknek köszönhetően.

#### 4. Módszerek és eszközpark

A második csoport a különböző fluoreszkáló festékek gerjesztésére szolgáló lézerek. A rendszerünkben egyszerre négy darab különböző hullámhosszúságú lézer használható a szűrő elrendezéstől függően. A csoport számára a következő lézerek állnak rendelkezésre:

- 1064 nm, folytonos,
- 647 nm, folytonos, MPB Communications Ltd. 2RU-VFL-P-300-647-B1, 300 mW.
- 640 nm, folytonos, Cobolt Bolero, 300 mW.
- 634 nm, folytonos, Thorlabs HL63133DG, 170 mW. A dióda egy Thorlabs TCLDM9 fejben található, amit egy Thorlabs LDC500 vezérlő hajt meg.
- 561 nm, folytonos, Cobolt Jive, 300 mW.
- 532 nm, folytonos,
- 488 nm, folytonos, Coherent Sapphire 488 LP-200, 200 mW.
- 450 nm, folytonos, OSRAM PLS 450B, 80 mW. A dióda egy Thorlabs TCLDM9 fejben található, amit egy Thorlabs LDC500 vezérlő hajt meg
- 405 nm, folytonos, Nichia NDHV310APC, 70 mW. A dióda egy Thorlabs LDM9T fejben található, amit egy Thorlabs LDC205C vezérlő hajt meg.
- 405 nm, folytonos, Sony SLD3234VFI, 150 mW. A dióda egy Thorlabs LDM9T fejben található, amit egy Thorlabs LDC205C vezérlő hajt meg.

Az alábbi lézereket a PicoQuant: Picosecond Pulsed Driver Sepia II PDL828 egység vezérli:

- 640 nm, impulzus, PicoQuant: Picosecond Pulsed Laser, 10 mW, <100 ps
- 560 nm, impulzus, PicoQuant: Picosecond Pulsed Laser, 10 mW, <100 ps
- 485 nm, impulzus, PicoQuant: Picosecond Pulsed Laser, 10 mW, <100 ps
- 405 nm, impulzus, PicoQuant: Picosecond Pulsed Laser, 10 mW, <100 ps

A különböző hullámhosszú lézerfények intenzitását egy akusztóoptikai szűrő (AOTF) rendszer segítségével tudjuk számítógépesen vezérelni. Az egyes lézerek egyedi kondicionáláson mennek keresztül, majd az egyedileg kondicionált nyalábokat egyesítjük. A folytonos lézereink alkalmazhatók mind teljes látóterű kivilágítás, mind pedig konfokális elrendezésben. Az impulzus üzemű lézereinket, általában konfokális üzemmódban alkalmazzuk.

##### 4.1.2. Mikroszkóp váz

A mikroszkóp rendszerünk középpontjában a Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóp váz áll. A vázban helyet foglal 6 motorizáltan váltható objektív foglalat, 6 motorizáltan váltható szűrőköcka foglalat, 3 optikai

kimenet, valamint felső kivilágításhoz tartozó rendszer. A minta laterális és axiális mozgását motorizált asztal teszi lehetővé. A rendszer kiegészíthető egy nagy precizitású axiális piezo eltolóval (MadCity Labs Nano-Zseries) is.

A motorizált objektívtartóban a következő objektívek foglalnak helyet:

- 4x: CFI Plan Fluor, 4x, 0,13, száraz
- 20x: CFI Plan Fluor 20x, 0,45, száraz
- 50x: LU Plan, 50x, 0,55, száraz
- 60x: CFI Plan Apo, 60x, 1,4, olajimmerziós
- 100x: LU Plan, 100x, 0,80, száraz
- 100x: CFI Apo TIRF, 100x, 1,49, olajimmerziós

A motorizált szűrőkocka tartóban a következő szűrőkockák foglalnak helyet:

1. Semrock Di03-R405/488/561/635 + Semrock FF01-446/523/600/677
2. Semrock Di01-R405/488/532/635 + Semrock FF01-446/510/581/703
3. Semrock Di03-R635 + Semrock BLP01-647R
4. Chroma ZT458rdc + Chroma EP460lp

### 4.1.3. Detektálás, kamerák

A mikroszkóp vázból három optikai kimenet tesz lehetővé különböző detektorok beszerelését. A rendszerünkben a következő detektorok kaptak helyet:

- E100-as port: Ez egy mechanikusan, kézzel váltható kimenet az okulár és oldal port között. Az oldal portra egy Cairn OptoSplit II+Bypass rendszer van felszerelve lehetővé téve többszínű, egyidejű detektálást. Az OptoSplit rendszerre egy Andor Zyla 4.2 sCMOS kamera van felszerelve.
- L100-as port: Ez a port ki van egészítve egy mechanikus váltóval, amivel két különböző detektor rendszerbe irányítható a bejövő fény. Az egyik egy Nikon C2+ konfokális rendszer. A másik két darab PicoQuant PMA Hybrid 40/40 mod detektor lehetővé téve polarizáció vagy szín bontott detektálást. Ezzel a rendszerrel megvalósítható fluoreszcencia anizotrópia, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, fluoreszcencia élettartam mérés is.
- R100-as port: Ez a port ki van egészítve egy 4f rendszerrel lehetővé téve további optikai elemek beszerelését és a rendszer fejlesztését. Az alkalmazott detektor egy Andor iXon Ultra

## 4. Módszerek és eszközpark

897 EMCCD kamera. Ez a kamera képes egyedi molekulákhoz tartozó alacsony foton mennyiség detektálására, lehetővé téve a dSTORM technika megvalósítását. A termikus zaj minimalizálásának érdekében a kamerát  $-75^{\circ}\text{C}$ -on szoktuk használni. A 4f rendszer konjugált síkjában helyet foglal egy Thorlabs FW102C szűrő rendszer, ami lehetővé teszi 6 db emissziós szűrő motorizált váltását.

### 4.1.4. Kiértékelő számítógépek

Az átlagos dSTORM felvétel 20 000 egyedi képkockából áll. Doktori munkásságom során több százezer mikroszkópos felvétel elkészítését és kiértékelését végeztem el. Ezen kiértékeléseket a következő számítógépek tették lehetővé:

Labor gép:	Processzor:	Intel® Core™ i7-3820 3,6 GHz
	Memória:	16 GB DDR3 1866 9-10-9-9-27
	Háttértár:	PCIe 3.0 Samsung 870 EVO 500 GB SATA SSD
Irodai gép:	Processzor:	Intel® Core™ i7-6700K 4,2 GHz
	Memória:	16 GB DDR4 2666 15-17-17-17-35
	Háttértár:	PCIe 3.0 Samsung 850 EVO 250 GB NVMe M.2 SSD
PC 1:	Processzor:	AMD Ryzen™ 9 3900X 4,6 GHz
	Memória:	32 GB DDR4 3600 16-16-16-16-39
	Háttértár:	PCIe 4.0 Samsung 980 Pro 1 TB NVMe SSD
PC 2:	Processzor:	AMD Ryzen™ 7 5800X3D 4,5 GHz
	Memória:	32 GB DDR4 3800 16-8-18-16-32
	Háttértár:	PCIe 4.0 Samsung 980 Pro 1 TB NVMe SSD

## 4.2. Szoftverek

Munkám során alkalmaztam az AdOptIm csoport saját szimulációs és kiértékelő szoftver csomagját. Emellett számos kiértékelő programot írtam LabView programozási környezetben. A mikroszkóp rendszer vezérlésére a Nikon saját szoftverét a NIS Elements-et használtam.

### 4.2.1. TestSTORM

A kutató csoportunk központi szimulációs szoftvere a TestSTORM [70], [71], [72]. Ez a szoftver képes tetszőleges struktúrájú minták festését, a festékek villogását, valamint a kamerára érkező fotonok eloszlását valóságúen szimulálni. E mellett lehetséges benne az optikai rendszer paramétereinek,

a festékek paramétereinek, valamint a háttérzaj értékének egyedi beállítása. Képes a minta eltolódását úgynevezett drift-et is modellezni, valamint egyéb modalitások, mint például asztigmias 3D vagy több színű leképezés is modellezhetőek vele. A szimulációs eredmények valósághűségét korábbi gépitanuláson alapuló vizsgálatok is alátámasztják [73]. Ezeknek köszönhetően a TestSTORM jól alkalmazható a mikroszkóp rendszer, valamint a kiértékelő algoritmusok kalibrálására és az egyes mérési paraméterek optimalizálására.

### 4.2.2. rainSTORM

A kutatócsoport saját fejlesztésű lokalizációs kiértékelő szoftvere a rainSTORM [74], [75]. Ez a szoftver egy legkisebb négyzetek módszerével illesztett kétdimenziós Gauss-görbét képes illeszteni egy felvétel sorozat minden felvillanására automatikusan. A beérkezett fotonszámból, háttérzajból és az illesztett görbék félértékszélességéből képes kiszámolni az egyes felvillanások pozíciója mellett azok pontosságát is. A program bizonyította hatékonyságát egy lokalizációs kiértékelő programok között rendezett versenyen is [76]. A program lehetőséget biztosít elliptikus 2D Gauss-görbe illesztésére lehetővé téve az egyes PSF-ek ellipticitás analízisét, ami elengedhetetlen az asztigmias 3D kiértékeléshez. E mellett megvalósítható a lokalizációk szűrése pontosság, félértékszélesség intenzitás és egyéb paraméterek alapján. A szoftverben automatikus minta eltolódás korrekcióra is van lehetőség egy autokorrelációs algoritmus segítségével. Az illesztett lokalizációs adatok kimenthetőek egy táblázatban, valamint a program vizualizációra is képes. A készített szuperrezolúciós képek esetén az adott pixelek értéke a rájuk eső lokalizációk számától függ, megszokott a magma szín séma, valamint a technikára jellemző 20 nm-es szuperrezolúciós pixelméret.

### 4.2.3. LabView alapú programok

A LabView programozási környezet kísérleti eszközök vezérlése mellett jól alkalmazható kiértékelő programok írására is. Mivel ebben a környezetben vagyok a legjártasabb így a munkásságom során írt számos kiértékelő programot LabView-ban készítettem. Ezekről részletesebben az „Új tudományos eredmények” fejezetben írok.

## 5. Új tudományos eredmények

Doktori tanulmányaim során számos kutatási projektben vettem részt, így együttműködve orvosokkal, biológusokkal, kémikusokkal, fizikusokkal és informatikusokkal is. Ennek eredményeképpen számos tudományterületbe nyertem betekintést. Többek között foglalkoztam mikrofluidikai rendszerek tervezésével és építésével, optikai rendszerek tervezésével és építésével, szuperrezolúciós, konfokális és hagyományos fluoreszcenciás felvételek készítésével továbbá kiértékelésével, valamint kiértékelő és szimulációs programok írásával, alkalmazásával. A négy legfontosabb új tudományos eredményemet a következő fejezetekben részletezem. Ezek közül az első kettőt egy-egy orvosbiológus csapattal együttműködve értem el, míg az ezt követő két eredmény javarészt önálló munkám eredménye, ahogy azt a hozzájuk tartozó publikációk szerzői listáján betöltött helyem is tükrözi.

### 5.1. Asztigmia 3D dSTORM rendszerek fejlesztése és modellezése

A lokalizációs mikroszkópiában a kamerán detektált felvillanásokból nem csak a hozzájuk tartozó fluoreszkáló molekulák laterális pozícióját lehet meghatározni. A felvillanás alakja egyéb információkat is magában hordoz, amelyeket különböző technikákkal hatékonyan ki lehet nyerni. Egy ilyen lehetőség a PSF engineering-en alapuló asztigmia 3D [32] melynek lényege, hogy a PSF ellipticitásába kódolja a fluoreszkáló molekulák axiális pozícióját. Ezt leggyakrabban egy, a mikroszkóp detektorkarba épített, hengerlencsével szokták megvalósítani. Az ilyen rendszerek számtalan alkalmazással bírnak, így megtervezésük és felépítésük számos új tudományos eredmény feltárását teszi lehetővé. A rendszer felépítéséhez annak modellezése elengedhetetlen, szükségessé téve modellező szimulációs eljárások kidolgozását. A felépített rendszer reprodukálható alkalmazásához mérési protokollt kell készíteni.

A kutatás során feladatom volt a rendszermodellező eljárás kidolgozása és implementálása a rendszerünkön; a modell alapján az ideális hengerlencse fókusztávolság és pozíció meghatározása; a rendszerünkben a hengerlencse elhelyezése és a mérési protokoll kidolgozása; a Gajdos Tamás által létrehozott multimodális dSTORM rendszer modellezése és az optimális hengerlencse pozíció meghatározása; együttműködő partnereink által készített biológiai mintákon végzett 3D dSTORM mérések előkészítése és végzése.



### 5.1.1. Mátroxoptikai szimuláció kidolgozása

Az asztigmias 3D szuperrezolúciós eljárásoknál a PSF elliptikusságát okozó asztigmia arányos a szagittális és meridionális fókuszsíkok távolságával. Ez a távolság szimplán geometriai optikai számításokkal megkapható, ezért a rendszermodellező eljárás alapjául a mátrioxoptikát választottam, ami lehetővé teszi az optikai rendszerek tárgyalását a tárgyból kilépő fénysugarak pályájának meghatározásával. Az optikai rendszerek általános henger-szimmetriáját kihasználva az egyes fénysugarak jellemzéséhez elegendő az optikai tengellyel bezárt szögük, valamint az optikai tengelytől mért távolságuk. Ennek megfelelően egy fénysugár leírható egy kételemű vektorral. Az ilyen vektorokra ható optikai elemek ennek megfelelően 2x2-es mátrixokkal írhatók le. A továbbiakban a következő konvenciót használtam: A fénysugarakat leíró vektorok alakja

$\vec{r} = \begin{pmatrix} y \\ \alpha \end{pmatrix},$	3.
--	----

ahol  $y$  a sugár optikai tengelytől mért távolsága és  $\alpha$  a sugár optikai tengellyel bezárt szöge. Az optikai elemeket leíró mátrixok alakja:

$M = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix},$	4.
---	----

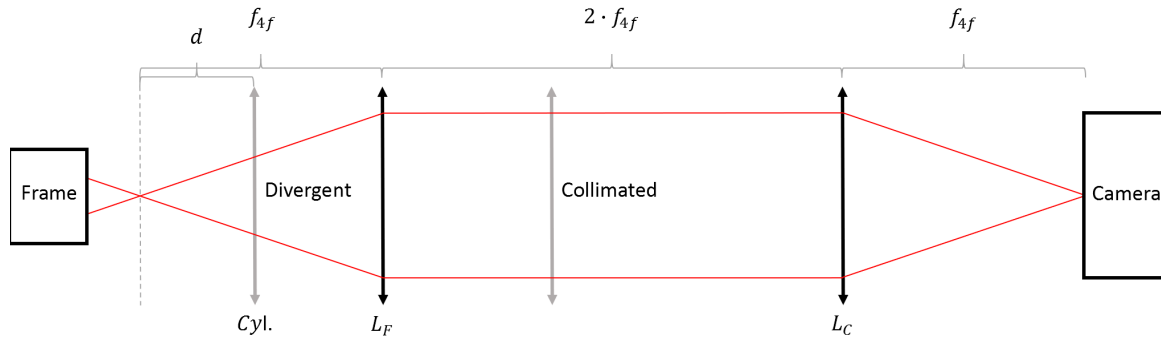
ahol  $A$ ,  $B$ ,  $C$  és  $D$  a megfelelő mátrixelemek. Ilyen tárgyalásban egy optikai elemre érkező tetszőleges fénysugár alapján az optikai elemből kilépő sugár a következőképpen számítható ki:

$\vec{r}' = M\vec{r} = \begin{pmatrix} Ay + B\alpha \\ Cy + D\alpha \end{pmatrix}$	5.
--	----

A mátrioxoptikában a szabadon terjedést is egy mátrix írja le.

A mikroszkóp rendszerünk vázlata a Módszerek és eszközpark fejezetben található. Az asztigmias 3D megvalósításához a szuperrezolúciós mérésekhez használt EMCCD kamerához tartozó detektorkarba kell behelyezni egy hengerlencsét. Ennek kivitelezése az ebben a karban elhelyezkedő  $4f$  rendszerben lehetséges. A  $4f$  rendszer vázlata a 11. ábrán megtekinthető.

## 5. Új tudományos eredmények



**11. Ábra. A detektorkarba épített 4f rendszer sematikus rajza.** A mikroszkópvázhoz közelebbi lencse ( $L_F$ ) és a kamerához közelebbi lencse ( $L_C$ ) fókusz távolsága is  $f_{4f} = 200 \text{ mm}$ . Ez az elrendezés lehetővé teszi a detektorkarban a PSF manipulálásának egyszerű megvalósítását.

A hengerlencse elhelyezésére a fényterjedés szempontjából két különböző tartományon van lehetőségem. A divergens nyalábszakaszban a mikroszkóp váz és a hozzá közelebbi lencse közötti részen, valamint a kamera és a hozzá közelebbi lencse közötti részen, vagy a kollimált nyalábszakaszban a 4f rendszer két lencséje között. A rendszer vizsgálatához mindkét tartományt modellezni kell.

Egy jó lehetőség az asztigmia modellezésére a szagitális és meridionális fókusz síkok távolságának kiszámítása. Ez mátrixoptikával úgy valósítható meg, hogy megvizsgáljuk az objektívet reprezentáló lencse előtt mekkora szabad terjedésen kell a tárgyból kilépő sugaraknak átesniük ahhoz, hogy a kamerára fókuszálódjanak. Ehhez össze kell állítani az objektívtől a kameráig tartó rendszert leíró mátrixot az egyes optikai elemek és szabad terjedések mátrixainak megfelelő szorzatával. Ezt a fénysugarak megfordíthatósága miatt érdemes a kamera irányából megtenni, így a kapott rendszerhez tartozó mátrixot már csak egy olyan  $k$  hosszúságú szabad terjedés mátrixával kell megszorozni, amivel képet alkot. Az egyértelmű tárgyaláshoz vezessük be a következő jelöléseket:

<b>1. Táblázat. A rendszerünket leíró paraméterek és jelöléseik.</b>		
Megnevezés:	Jele:	Értéke:
Objektív fókusztávolsága	$f_{obj}$	2 mm
Tubuslencse fókusztávolsága	$f_{tub}$	200 mm
Objektív és tubuslencse távolsága	$L$	300 mm
4f rendszer lencsék fókusztávolsága	$f_{4f}$	200 mm
Hengerlencse fókusztávolsága	$f_h$	1000/2000/4000 mm
Hengerlencse pozíciója	$d$	$\in [0 \text{ mm}, 800 \text{ mm}]$

A hengerlencse pozícióját a 4f rendszer elülső fókuszsíkjától mérjük. Az egyes optikai elemek mátrixait hasonló módon alsó indexben a fókusztávolságok jelöléséhez használt nevezéktan egyértelműsíti. A szabad terjedéshez tartozó mátrixoknál alsó indexben zárójelben szerepel a megtett távolság. Az alkalmazott mátrixok:

<b>2. Táblázat. A rendszer mátrixoptikai leírásában szereplő mátrixok.</b>	
Megnevezés	Mátrix
Szabad terjedés valamely távolságon	$M_{(távolság)} = \begin{pmatrix} 1 & távolság \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$
Objektív mátrixa	$M_{OBJ} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{obj}} & 1 \end{pmatrix}$
Tubuslencse mátrixa	$M_H = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{tub}} & 1 \end{pmatrix}$
4f rendszer lencséinek mátrixa	$M_H = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{4f}} & 1 \end{pmatrix}$
Hengerlencse mátrixa	$M_H = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_h} & 1 \end{pmatrix}$

A rendszer, objektív és kamera közötti részének, mátrixa függ az egyes optikai elemek sorrendjétől, így a különböző tartományokon elhelyezett hengerlencse pozíció esetén más és más mátrixot kapunk. Ezek a mátrixok a három lehetséges tartomány esetén a következő módon számíthatók ki:

## 5. Új tudományos eredmények

A mikroszkóp váz és a 4f rendszer között a divergens nyalábszakaszban:

$M_{rendszer} = M_{obj} \cdot M_{(300\text{ mm})} \cdot M_{tub} \cdot M_{(200\text{ mm}+d)} \cdot M_h \cdot M_{(200\text{ mm}-d)} \cdot M_{4f} \\ \cdot M_{(400\text{ mm})} \cdot M_{4f} \cdot M_{(200\text{ mm})}$	6.
---	----

A 4f rendszer lencségei közötti kollimált nyalábszakaszban:

$M_{rendszer} = M_{obj} \cdot M_{(300\text{ mm})} \cdot M_{tub} \cdot M_{(400\text{ mm})} \cdot M_{4f} \cdot M_{(d-200\text{ mm})} \\ \cdot M_h \cdot M_{(600\text{ mm}-d)} \cdot M_{4f} \cdot M_{(200\text{ mm})}$	7.
---	----

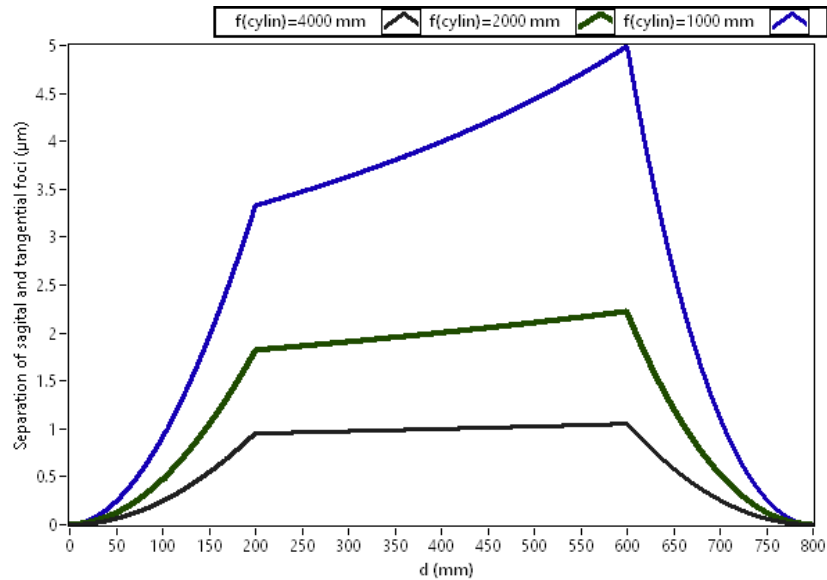
A 4f rendszer és a kamera között a divergens nyalábszakaszban:

$M_{rendszer} = M_{obj} \cdot M_{(300\text{ mm})} \cdot M_{tub} \cdot M_{(400\text{ mm})} \cdot M_{4f} \cdot M_{(400\text{ mm})} \cdot M_{4f} \\ \cdot M_{(d-600\text{ mm})} \cdot M_h \cdot M_{(800\text{ mm}-d)}$	8.
---	----

Annak érdekében, hogy kiszámoljuk a szagitális és meridionális fókuszsíkok távolságát, meg kell határozni, hogy a hengerlencsével kiegészített rendszer esetén milyen  $k$  távolságú szabad terjedéshez tartozó mátrixszal kell megszorozni a fentieknek megfelelően kiszámított rendszer mátrixát, hogy leképezés jöjjön létre. Ez akkor következik be, amikor az így kapott teljes (a mintától a kameráig terjedő) rendszer mátrixának  $B'$  mátrixeleme nulla. (Amennyiben a  $B'$  mátrixelem nulla az azt jelenti, hogy a rendszerbe egy ponton belépő sugarak szintén egy pontban fogják azt elhagyni, azaz a rendszer leképez.)

$M_{teljes\ rendszer} = \begin{pmatrix} A' & B' \\ C' & D' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & k \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot M_{rendszer} = \begin{pmatrix} 1 & k \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix}$	9.
---	----

A  $B'$  mátrixelem értéke  $B + k \cdot D$ . Ennek az elemnek a nulla értéke esetén képez le a rendszer, tehát a tárgy és az objektív távolsága:  $k = -\frac{B}{D}$  kell legyen. Így a szeparáció értéke  $\Delta s = |k - f_{obj}|$  ami arányos az asztigmia mértékével. A számítások eredményét a 12. ábra mutatja.



**12. Ábra. Mátroxoptikával szimulált fókusz sík szeparáció.** A mikroszkóp rendszerünk modelljében a szagittális és meridionális fókusz síkok távolsága a lencsepozíció függvényében. A rendelkezésemre álló 1000 mm, 2000 mm és 4000 mm fókusztávolságú hengerlencsék szimulációs eredményei rendre sötétkék, sötétzöld és fekete színekkel láthatók.

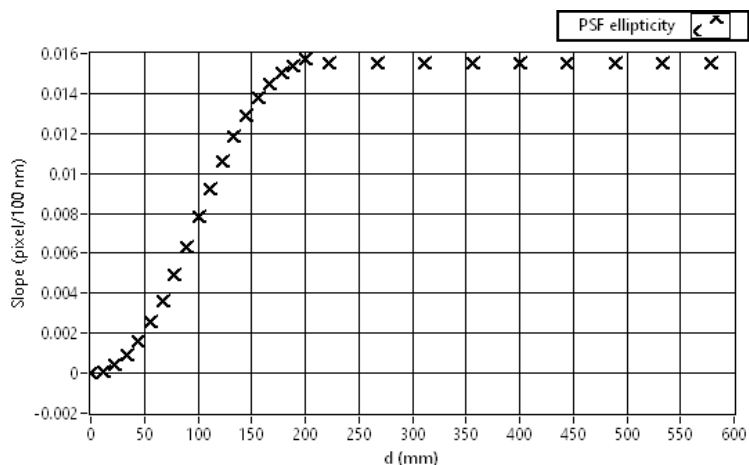
A szeparáció csak kis mértékben változik a kollimált nyalábszakaszhoz tartozó tartományon. Ennek előnye, hogy jó stabilitással bíró rendszer kiépítését teszi lehetővé, nem érzékeny az asztigmia a lencsepozícióra. Hátránya, hogy csak megfelelő fókusztávolságú lencse esetén alkalmazható. Túlzottan nagy asztigmia esetén a PSF nem lesz lokalizálható, míg túlzottan alacsony asztigmia esetén az axiális feloldás nem lesz pontos. A divergens nyalábszakaszhoz tartozó tartományokon a  $d$  hengerlencse pozíció négyzetével arányos a lencse kivilágítottsága, ezért a szeparációt is másodfokú függvény írja le. Ennek előnye, hogy hangolható a rendszer, egy darab hengerlencsével a pozíció változtatásával egy bizonyos limit alatt tetszőleges asztigmia megvalósítható. Hátránya, hogy a hengerlencse pozícióját precízen kell beállítani a reprodukálhatóság érdekében. Az irodalomban jellemző 500 nm-nél kisebb fókusz sík szeparáció a divergens nyalábszakaszon valósítható meg a rendelkezésemre álló lencsékkel. A három lencse közül a 4000 mm fókusztávolságú vezeti be a legkisebb asztigmiaét, ennek megfelelően az asztigmia lencsepozíció érzékenysége is ennél a lencsénél a legkisebb.

## 5. Új tudományos eredmények

A mátrixoptikai eljárás hitelesítésének és a mérési protokoll kidolgozásának érdekében modelleztem a rendszerünket az OSLO (Optics Software for Layouts and Optimization) sugárkövető szimulációs program segítségével is. Az alkalmazott objektívet a szabadalmának megfelelően felületről felületre modelleztem, míg az egyéb optikai elemeket tökéletes lencsékkel helyettesítettem. A rendszerünkben a kamera és a  $4f$  rendszer közé nem akartam behelyezni a hengerlencsét, mivel ezt a területet a portól a szokásosnál is jobban védeni kell, így a továbbiakban csak a másik két lehetséges tartománnyal foglalkoztam. A mátrixoptika adta fókusz sík szeparációs eredmények alapján a  $4000\text{ mm}$  fókusztávolságú lencsét vizsgáltam, mivel ez biztosítja a legjobb reprodukálhatóságot a divergens nyalábszakaszban. Az OSLO lehetőséget biztosít a PSF modellezésére, így a mérések során alkalmazott ellipticitás számítás tesztelésére és kidolgozására is alkalmas. Az ellipticitást a következő formula alapján definiáltam

$\varepsilon = w_x - w_y ,$	10.
-----------------------------	-----

ahol  $w_x$  és  $w_y$  a PSF-re illesztett 2D Gauss-görbe félértékszélessége. Ennek megfelelően a hengerlencsét is úgy kell beállítani, hogy az asztigmia a kamera függőleges és vízszintes irányában jelentkezzen. Az így definiált ellipticitás lényegében lineárisan változik az axiális pozíció függvényében, ennek megfelelően az OSLO szimulációban megvizsgáltam, hogy az egy adott lencsepozíciónál vizsgált PSF ellipticitás - axiális pozíció görbéknek mekkora a meredeksége. Ezt a meredekséget meghatároztam húsz különböző lencsepozíció esetén a divergens nyalábszakaszban és tíz különböző hengerlencse pozíció esetén a kollimált nyalábszakaszban. A szimulált minta egyetlen pontforrás volt egy standard  $170\ \mu\text{m}$  vastag fedőlemezen olajimmerzióval. Az eredményeket a 13. ábra mutatja.

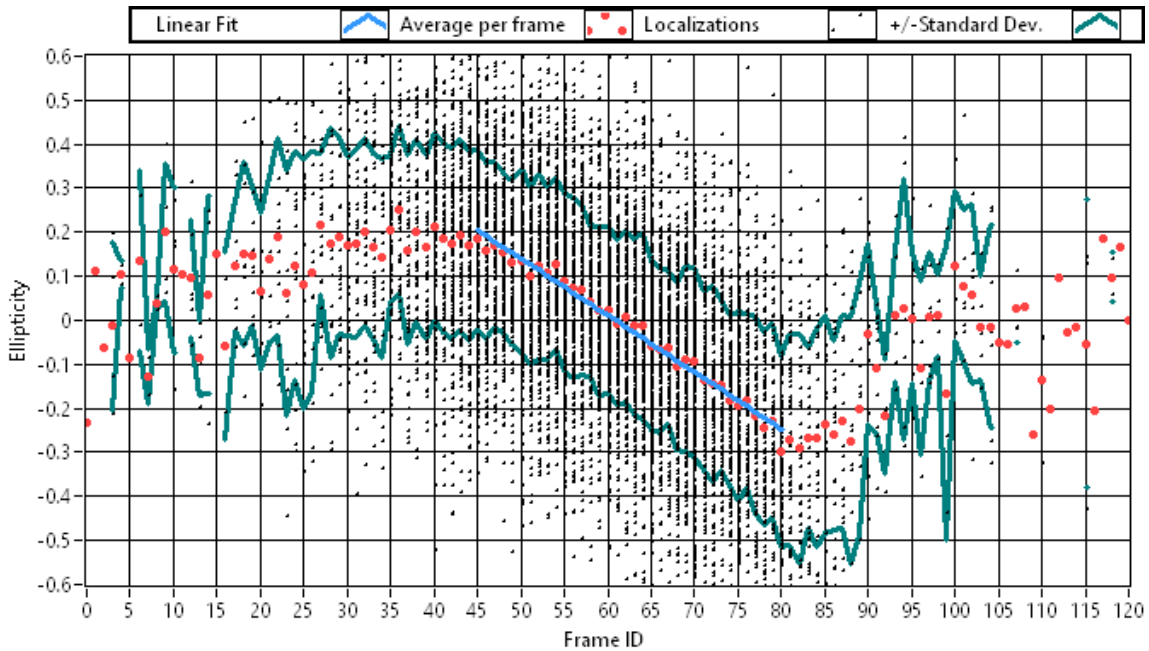


**13. Ábra. OSLO-val szimulált asztigmia.** Az ellipticitás formulából kapott ellipticitás-axiális pozíció görbék meredeksége (Slope) a hengerlencse pozíciójának ( $d$ ) függvényében.

Megfigyelhető ennél a szimulációnál is, hogy az asztigmia első sorban a hengerlencse kivilágítottságától függ. Alacsony kivilágítottság esetén ( $d < 100 \text{ mm}$ ) közel négyzetesen függ a lencse pozíciójától, míg a 4f rendszer lencségei között ( $200 \text{ mm} < d$ ) közel konstans. Mátrixoptikát alkalmazva a szagitális és meridionális fókuszsíkok távolsága nagyon hasonlóan változik a hengerlencse pozíciójának függvényében, mint az OSLO-s szimuláció esetén az ellipticitás-axiális pozíció görbék meredeksége. Ez jól mutatja a kettő kapcsolatát. Az OSLO szimuláció előnye, hogy lényegesen több paramétert vesz figyelembe így pontosabb eredményeket ad, valamint képes a PSF alakjáról is információt adni. Hátránya, hogy kivitelezése nehézkes lehet amennyiben az objektív felépítése nem publikus, valamint lényegesen lassabb a megvalósítása. A mátrixoptikás szimuláció előnye, hogy gyors és bármilyen rendszeren kivitelezhető. Hátránya, hogy a PSF alakjáról nem ad információt.

Az OSLO szimulációhoz hasonlóan megvizsgáltam a rendszerünkben apró fluoreszkáló gyöngyök segítségével az ellipticitás - axiális pozíció görbék meredekségének hengerlencse pozíció függését a  $4000 \text{ mm}$  fókusztávolságú lencse esetén. Egy ilyen ellipticitás - axiális pozíció görbét a 14. ábra szemléltet.

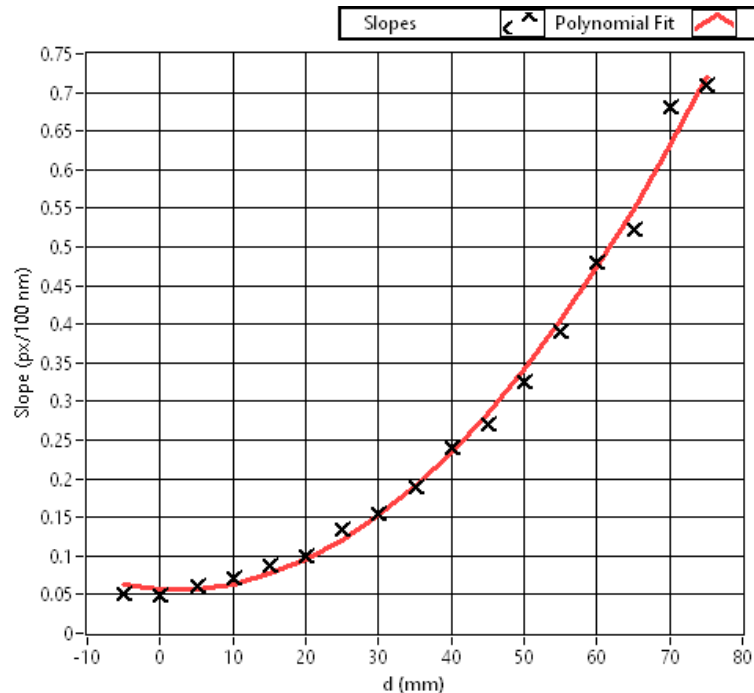
## 5. Új tudományos eredmények



**14. Ábra. Fluoreszcens gyöngyök képein mért ellipticitás.** Több száz, a fedőlemezen található fluoreszkáló gyöngy képeinek ellipticitása a mikroszkóp objektív axiális pozíciójának függvényében az AdOptIm kutatócsoport dSTORM-ra optimalizált mikroszkóp rendszerével lemérve. Az alkalmazott hengerlencse  $4000\text{ mm}$  fókusztávolságú. A hengerlencse pozíciója  $d = 60\text{ mm}$ . Az egyes síkokban az egyes gyöngyök ellipticitását kis fekete L alakok jelölik ezek átlagát a piros pontok, szórását a zöld görbe, valamint a rájuk illesztett egyenest a kék vonal reprezentálja. Az egyes képkockák (frame-ek) közötti axiális távolság  $25\text{ nm}$ .

Jól megfigyelhető, hogy a mélységélességen belül az ellipticitás gyakorlatilag lineárisan változik a gyöngyök axiális pozíciójának függvényében. Ezt a mérést elvégeztem a hengerlencsét  $5\text{ mm}$ -es lépésközzel a mikroszkóp váz és a 4f rendszerközötti divergens nyalábszakaszba helyezve  $0$  és  $80\text{ mm}$  közötti  $d$  értékeknél. Az eredményeket a 15. ábra mutatja.





**15. Ábra. Fluoreszcens gyöngyök képein mért asztigmia.** A félértékszélesség különbség-axiális pozíció függvényekre illesztett egyenesek meredekségének lencsepozíció függése (fekete). Az eredményekre illesztett másodfokú polinom (piros).

Jól megfigyelhető, hogy mind az OSLO-s, mind a mátrixoptikás szimulációhoz hasonlóan a divergens nyalábszakaszban, a nyalábnyakhoz közel, az asztigmia mértéke közel négyzetesen függ a lencse pozíciójától. A 15. ábrán illesztett polinom a következő:

$$0.000125 \cdot d^2 - 0,000561 \cdot d^1 + 0,056626 .$$

11.

Az illesztés reziduuma 0,000270. A mikroszkóp rendszer enyhe saját asztigmatizmusa miatt a  $d=0$  pozícióban sem nulla az asztigmia értéke. A 75 mm-nél nagyobb  $d$  értékek esetén a rainSTORM számára nehézkes a torz PSF-ek lokalizálása. Nagyobb asztigmatiát alkalmazva egyre csökken az axiálisan feloldható tartomány, de javul az axiális pontosság.

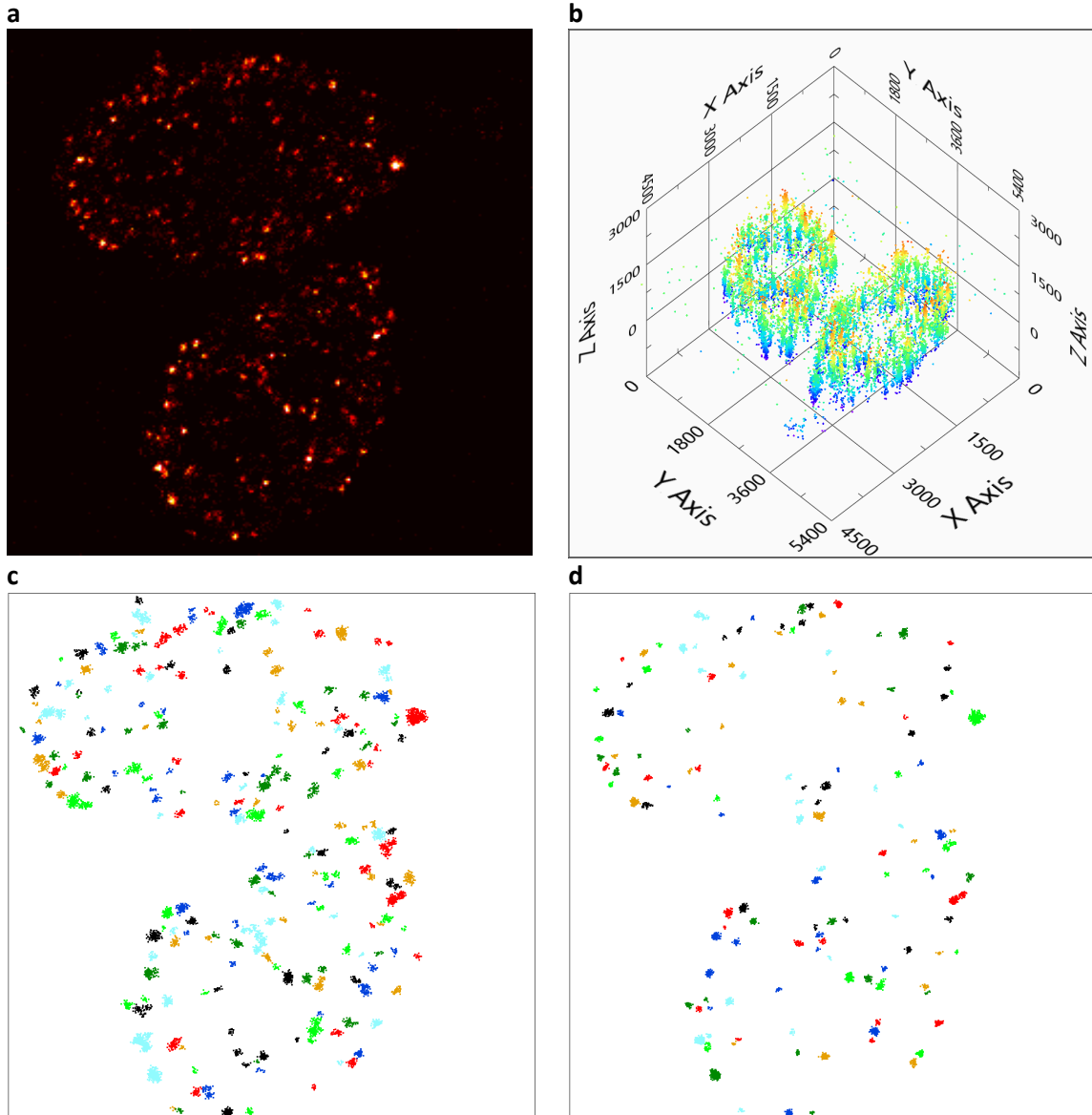
## 5. Új tudományos eredmények

A mátrixoptikás és OSLO-s szimulációk, valamint a teszt mérések alapján kidolgoztam a standard rendszerünkhöz a mérési protokollt. Ez alapján a 4000 *mm*-es fókusztávolságú hengerlencsét kell elhelyezni a  $d = 60$  *mm* pozícióba. Ez biztosítja a jó egyensúlyt az axiális és laterális pontosság között. Mintától és érdeklődésünktől függően alkalmazható nagyobb és kisebb asztigmatia is. Minden méréshez fluoreszkáló gyöngyök segítségével fel kell venni egy kalibrációs mérési sorozatot, hogy az ellipticitás értékekből vissza lehessen számolni az axiális pozíciókat. Ehhez a Módszerek és eszközpark fejezetben említett axiális piezokristályos eltolót kell használni 25 *nm*-es lépésközzel egy legalább 2 mikron vastag tartományon.

### 5.1.2. Fázisszeparált fehérjék 3D dSTORM mérése

Az irodalomban ismert, hogy a riboszóma – naszcens fehérjelánc komplexek (RNC-k) bizonyos esetekben fázisszeparálódott granulumokat alkotnak [77]. Ez általában a DNS károsodással járó stressz folyamatok javító fehérjéire jellemző. A granulum védelmet jelent az EDTA- és ribonukleáz okozta lebontó folyamatokkal szemben a translációban elakadt, stressz válaszban szerepet játszó fehérjék számára, hogy azok expressziója szükség esetén gyorsan újra beindulhasson. Ezen folyamat megismerése kulcs fontosságú a sugárkezelésnek ellenálló tumorsejtek esetén. A granulumok tipikusan 30 *nm*-es átmérője lehetővé teszi a dSTORM használatát. Az egyes granulumokból kiálló naszcens fehérjeláncokat megjelölve azok csoportosulásával nyomon követhetők a fázisszeparált komplexek. Annak érdekében, hogy a granulumokat vizsgálni tudjuk szét kell őket választani egymástól. Ezt és a granulumok statisztikai elemzését klaszteranalízissel lehet megvalósítani. Egy ilyen eljárás például a DBSCAN [50], ami az egymástól mért távolságuk alapján klaszterekbe rendezi a lokalizációkat.

A 2D mérések klaszteranalízise estén számos műtermék okozhat problémát. Az egymáshoz laterálisan közeli, de axiálisan távoli klaszterek átfedhetnek így egyetlen klaszterként megjelenve a statisztikai elemzésben. Ez azt is eredményezheti, hogy olyan klaszterek, amelyek nem haladják meg a DBSCAN-ben meghatározott minimális elemszámra vonatkozó küszöbértéket más axiálisan távoli, de laterálisan átfedő klaszterekkel egybeolvadva hamis klasztereket alkotnak. Ezt ki lehet küszöbölni 3D lokalizációs eljárásokkal. A 16. ábrán látható két élesztő sejtről készült dSTORM kép 2D, illetve 3D kiértékelésben.



**16. Ábra.** Élesztősejtekben Alexa Fluor 647 fluoreszkáló molekulákkal jelölt Not1 2D és 3D dSTORM adatsorok klaszteranalízise. Az élesztősejtekről készült 2D szuperrezolúciós kép (a). Az élesztősejtekről asztigmias 3D eljárással készített 3D kép (b). A 2D adatsorról készített klaszteranalízis 24 *nm*-es sugár és 8 minimum pontszám mellett (c). A 3D adtasorról készített klaszteranalízis azonos sugár és minimum pontszám alkalmazásával (d).

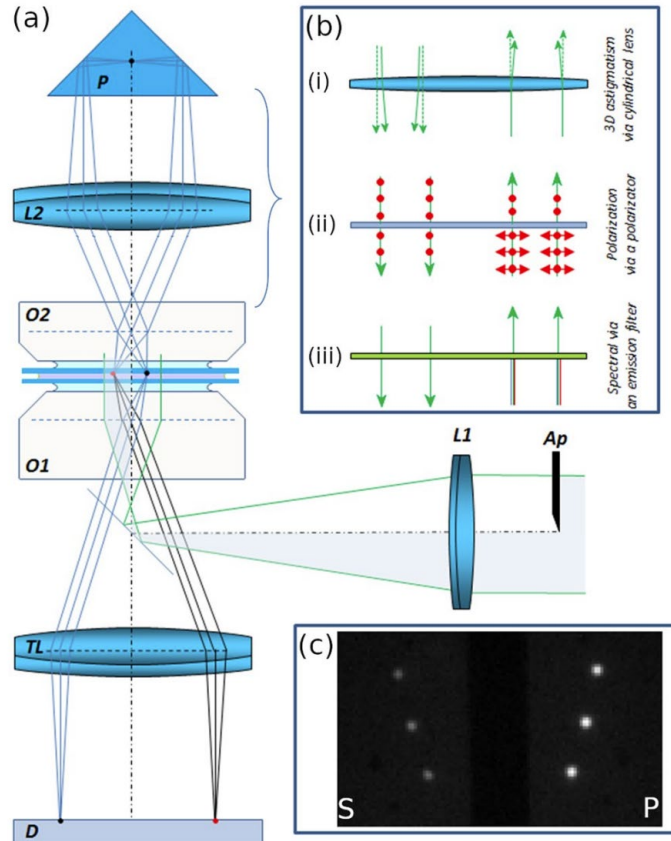
A mérések esetén 3D kiértékelést alkalmazva a klaszterek száma 40%-al csökkent. Ez az átfedések miatt egybeolvadt klaszterek felbomlásának, illetve dominánsan a hamis klaszterek kiszűrésének köszönhető. A 16. ábrán jól megfigyelhető, hogy a 3D analízist alkalmazva számos hamis klaszter kiszűrhető. Ez a technika egy lényegesen pontosabb statisztikai elemzést tesz lehetővé.

## 5. Új tudományos eredmények

A fázisszeparált fehérjelánc komplexek vizsgálatához készített felvételeket Varga Dániel kollégámmal felváltva készítettük. A rendszert és a 3D-s mérésekhez szükséges kalibrációs méréseket az általam kidolgozott asztigmias 3D lokalizációs protokollnak megfelelően állítottuk össze. A mérések során az Alexa Fluor 647 fluoreszkáló festékkel jelölt rendezetlen N-terminálist vizsgáltuk élesztő, illetve humán A548 sejtekben. A minták GLOX puffer folyadékban [27] hermetikusan lezárt fedőlemez-tárgylemez pár között helyezkedtek el. Egyetlen sejt mérése tipikusan 10 percig tartott. A mérés során 20 ms expozíciós időt alkalmazva 20 000 képkockából álló videót készítettünk. A mérési fájlokat a rainSTORM asztigmias 2D Gauss-görbe illesztő algoritmusával értékeltük ki. Az ezen kiértékelés és a kalibrációs mérések alapján egy általam írt LabView programmal meghatároztam az egyes lokalizációk axiális pozícióját, azoknak a kamerán mutatott függőleges és vízszintes szélességéből számított ellipticitásából. Az így kapott 3D adatsoron a klaszteranalízist Varga Dániel kollégám végezte. A 3D dSTORM technika és klaszteranalízis segítségével megmutattuk a fázisszeparált granulumok jelenlétét és viselkedését, így növelve a további módszerekkel kimutatott eredmények szignifikanciáját.

### 5.1.3. Multimodális rendszer modellezése

A mátrixoptikán alapuló asztigmias 3D rendszermodellező eljárásom segített az mmSTORM rendszerünkben az optimális hengerlencse fókusztávolság és pozíció meghatározásában. Ez a rendszer egy 4Pi elrendezésű rendszer, ahol a minta két darab azonos fókuszsíkú olajimmerziós objektív között foglal helyet. A mintát alulról támadó objektív a standard mikroszkóp rendszerünk objektívje, míg a mintát felülről támadó objektív egy új másodlagos karban foglal helyet. Ebben a karban az objektívet egy tubuslencse, valamint egy Porro prizma követik. Az elrendezés vázlata a 17. ábrán látható.



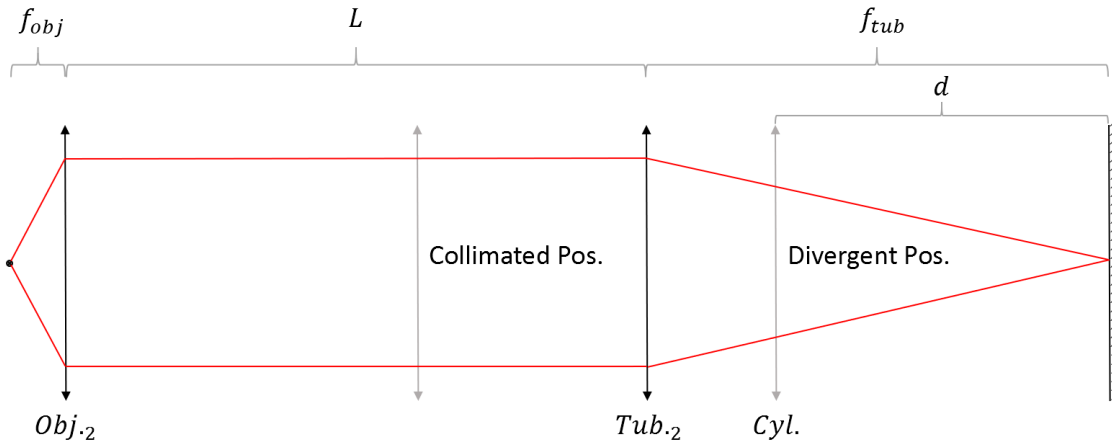
**17. Ábra. Az mmSTORM multimodális rendszer vázlata.** A prizmás kétobjektív elrendezésben a különböző modalitások csak a másodlagos leképző karban kerülnek alkalmazásra, így megőrizve az eredeti képen elérhető lokalizációs precizitást (a). A megvalósítható modalitásokat a (b) ábrarészlet mutatja. A rendszerrel egy fluoreszkáló gyöngyökről készített képet a (c) ábrarészlet mutat. A karok közötti intenzitás különbséget az optikai elemeken történő többszörös keresztülhaladás okozza. Forrása. [A1]

Ez az elrendezés lehetővé teszi a vizsgált képtér megkettőzését, ahol a kamerán egymás mellett jelenik meg a felső és az alsó ágakon keresztül leképezett tárgy. Ez természetesen az effektív látótér felére csökkenését eredményezi, viszont a felső ág külön kiépítése révén lehetőséget biztosít számos optikai elrendezés megvalósítására, azok szokásos hátrányai nélkül.

Az egyik ilyen lehetőség az asztigmás 3D, melynek megvalósításában a felső ágba kell elhelyezni egy hengerlencsét. Ennek eredményeképpen az egyes felvillanások asztigmamentes alsó ágon begyűjtött képei alapján nagy pontossággal meghatározható a helyzetük, míg a nagy asztigmával ellátott felső ágon begyűjtött képeik alapján nagy pontossággal meghatározható az axiális pozíciójuk. A paraxiális mátrixoptikán alapuló eljárásomat a hengerlencse fókusztávolságának

## 5. Új tudományos eredmények

és rendszerbe helyezési pozíciójának optimalizálására használtam. Az egyszerűsített optikai elrendezés a 18. ábrán látható. A rendszert leíró mátrix az egyes optikai komponensek mátrixainak szorzataként adható meg.



**18. Ábra. A felső kar sematikus rajza.** Az objektív fókusz távolság  $2\text{ mm}$  a tubuslencse fókusz távolsága  $250\text{ mm}$ . A lencse és az objektív távolsága  $250\text{ mm}$ . A Porro prizmás tükrözést a geometriai optika leírásához egy standard síktükör egyszerűsíti. [A1]

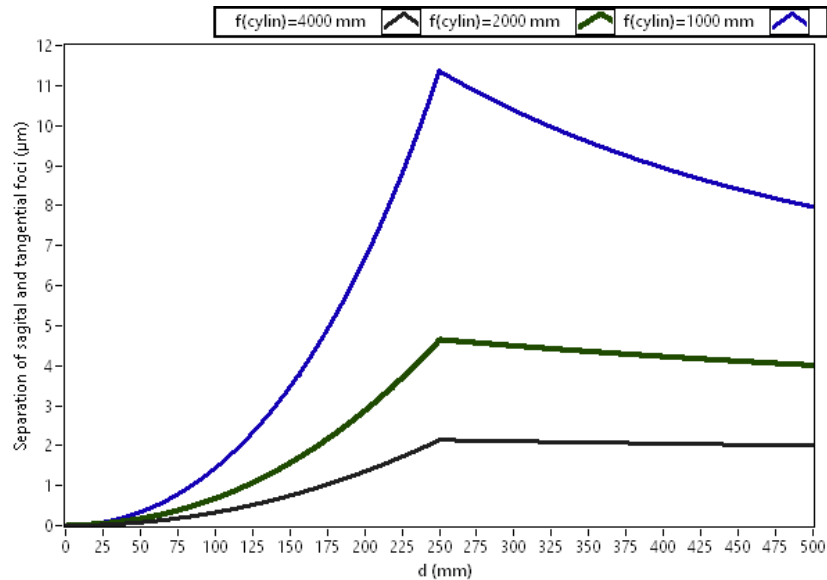
A hengerlencse rendszerbe helyezésére itt is két, a nyalábterjedés szempontjából különböző, tartományon van lehetőség. Az objektív és a tubuslencse között a kollimált nyalábszakaszba, valamint a tubuslencse és a Porro prizmat reprezentáló tükör között a divergens nyalábszakaszba. A behelyezett hengerlencse helyzetét a tükörtől mértük. Az elrendezésből következik, hogy bármilyen hengerlencse pozíció esetén a fénysugarak kétszer is (előre és hátra) át fognak haladni azon. Ennek eredményeképpen jelentősebb asztigmatizmust várunk, mint a standard rendszerünk esetén. Ez a fent említett tulajdonságok miatt előnyös a multimodális rendszerre nézve. Az egyes tartományokon a rendszert leíró mátrixok az alábbi egyenletek szerint adhatók meg. A kollimált nyalábszakaszban

$M_{rendszer} = M_{(k)} \cdot M_{obj} \cdot M_{(500\text{ mm}-d)} \cdot M_h \cdot M_{(d-250\text{ mm})} \cdot M_{tub} \cdot M_{(500\text{ mm})} \cdot M_{tub} \\ \cdot M_{(250\text{ mm}-d)} \cdot M_h \cdot M_{(500\text{ mm}-d)} \cdot M_{obj} \cdot M_{(2\text{ mm})}$	12.
---	-----

és a divergens nyalábszakaszban

$M_{rendszer} = M_{(k)} \cdot M_{obj} \cdot M_{(250\text{ mm})} \cdot M_{tub} \cdot M_{(250\text{ mm}-d)} \cdot M_h \cdot M_{(2d)} \cdot M_h$ $\cdot M_{(250\text{ mm}-d)} \cdot M_{tub} \cdot M_{(250\text{ mm})} \cdot M_{obj} \cdot M_{(2\text{ mm})}$	13.
---	-----

ahol,  $M_{obj}$ ,  $M_{tub}$  és  $M_h$  rendre az objektív, a tubuslencse és a hengerlencse mátrixai, hasonlóan a standard rendszer leírásához. A translációhoz, vagy másnéven szabad terjedéshez, tartozó mátrixok indexeiben zárójelben szerepel a megtett távolság.



**19. Ábra. Mátrixoptikával szimulált fókuszsík szeparáció az mmSTORM rendszer esetén.**

A multimodális mikroszkóp rendszer modelljében a szagittális és meridionális fókuszsíkok távolsága a lencsepozíció függvényében. A rendelkezésemre álló 1000 mm, 2000 mm és 4000 mm fókusztávolságú hengerlencsék eredményei rendre sötétkék, sötétzöld és fekete színekben láthatók. [\[A1\]](#)

A fókusztávolságokat a hozzájuk tartozó szabad terjedések mátrixaival a hengerlencse behelyezésével ( $k$ ) és anélkül ( $f_{obj}$ ) kiszámítottam. Ezek különbségét itt is a bevezetett asztigmia számszerűsítésére használtam. A fókuszok helyzetét itt is úgy határoztam meg, hogy az objektívtól mérve mekkora  $k$  szabad terjedés után képez le a rendszer, azaz mekkora  $k$  szabad terjedés után lesz a teljes rendszer mátrixának B eleme nulla. A 19. ábra ezen szagittális és meridionális fókuszsíkok elkülönülését mutatja az 1000, 2000 és 4000 mm fókusztávolságú hengerlencsék tükörtől mért ( $d$ ) helyzetének függvényében. Az objektív és a tubuslencse között a kollimált nyalábszakaszban az asztigmia értéke elsősorban a beillesztett hengerlencse fókusztávolságától

## 5. Új tudományos eredmények

függ, és csak mérsékelt függést mutat a tükrőtől mért pozíciójától. Ezzel szemben a tubuslencse mögött a hengerlencse kivilágítottága (effektív NA-ja) erősen függ annak helyzetétől, ezért az asztigmia négyzetesen függ a lencse tükrőtől mért pozíciójától. Ezek hasonló eredmények, mint a standard rendszerünk vizsgálata során kapott eredmények. Az optimális hengerlencse itt is a 4000 mm fókusztávolságú, ugyanis ez biztosítja a legnagyobb stabilitást a pozíció függvényében. Az optimális tartomány itt is a divergens nyalábszakasz, ugyanis csak itt állítható elő olyan kis asztigmia, ami mellett még lokalizálhatók a felvillanások.

### 5.1.4. Tézispont

Mátrixoptikára alapuló eljárást dolgoztam ki hengerlencsével megvalósított asztigmias 3D szuperrezolúciós rendszerek modellezésére LabView programozási környezetben. Modellezve a rendszerünket megvizsgáltam, hogyan függ az asztigmia nagysága a hengerlencse fókusztávolságától és pozíciójától. Megmutattam az egyes hengerlencse pozíció tartományok előnyeit és hátrányait reprodukálhatóság és az asztigmia beállíthatóságának szempontjából. A modellt OSLO szimulációkkal támasztottam alá. Kiegészítettem a rendszerünket egy, a modell alapján választott, hengerlencsével és tesztmintákon végzett mérésekkel is hitelesítettem a szimulációs eredményeket. Az optimalizált 3D rendszer számos együttműködésben került felhasználásra. Többek között a 3D képek felvétele lehetővé tette fázisszeparált riboszóma klaszterek pontosabb analízisét. Továbbá, a megvalósított eljárással modelleztem az mmSTORM lokalizációs mikroszkóp asztigmias 3D modalitását. Meghatároztam a multimodális rendszerben az asztigmia hengerlencse fókusztávolság és pozíció függésének jellegét.

Kapcsolódó publikáció(k): [\[A1\]](#), [\[A2\]](#)

## 5.2. Többszínű dSTORM rendszer optimalizálása és alkalmazása

A lokalizációs technika 20 nm-es laterális feloldásának köszönhetően lehetővé teszi az egyes sejtalkotók vizsgálatát. Ennek eredményeképpen a sejtbiológiai folyamatok feltárásának egy élenjáró eszköze a dSTORM. A különböző sejtalkotók sejten belüli vagy egymáshoz viszonyított helyzetét többszínű mérések segítségével nagy pontossággal meg lehet határozni. Kombinált hagyományos és lokalizációs technikával a korábbi mérésekkel nyert információk tovább pontosíthatók. Az ilyen mérések többek között lehetővé teszik az idegrendszer működéséhez elengedhetetlen ioncsatornák elhelyezkedésének vizsgálatát. A többszínű és kombinált mikroszkóp technikák azonban magukkal hordozzák saját kihívásaikat. Az egyes színcsatornák közötti áthallás összemoshatja azok képeit. A hagyományos feloldás méretskáláján színre korrigált optikai



rendszerek a szuperrezolúció által nyújtott feloldás szintjén színi hibával terheltek [78]. Több kamera alkalmazása esetén a képek összeolvasztását megnehezítheti a két kamera képe közötti torzulás. Az ilyen és ehhez hasonló problémák kezelése fontos az egyre pontosabb adatsorok kinyeréséhez.

A kutatás során feladatunk volt a mikroszkóp rendszerünk előkészítése többszínű dSTORM és konfokális képek felvételére; a megfelelő festékkombináció kiválasztása a többszínű mérésekhez; a konfokális-dSTORM összehasonlításhoz használt mérések elvégzése; a mért adatsorok kiértékelése; képegyesítő algoritmus írása.

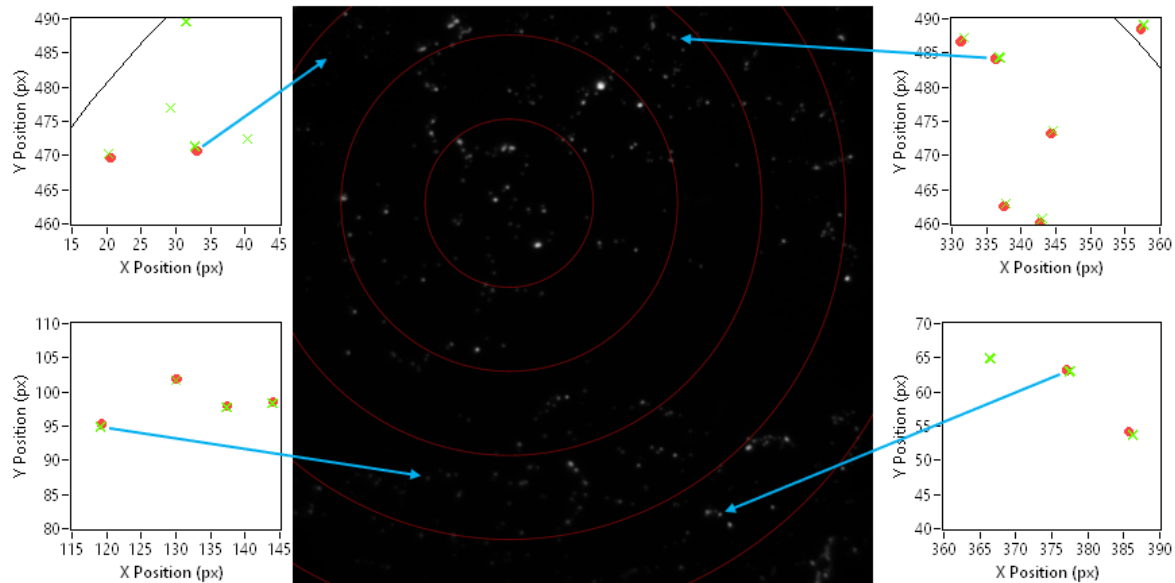
### 5.2.1. Rendszer optimalizálás

Többszínű mérések elvégzéséhez választott festékpár alkalmazhatóságát számos különböző fizikai jelenség limitálja. Az áthallás minimalizálásának érdekében olyan fluoreszkáló festékekre van szükség, melyek emissziója jól elkülöníthető egymástól. A kromatikus aberráció minimalizálásának érdekében a két festék emissziójának egymás melletti színtartományokba érdemes esnie, valamint ajánlott egy, a magasabb hullámhosszhoz tartozó párt választani (pl. vörös és narancs), ahol kisebb a diszperzió. A háttérzaj minimalizálásának érdekében a mintára jellemző autofluoreszcencia tartományán kívüli festékeket érdemes alkalmazni. A vizsgálni kívánt célmolekula antitestek jelölésének meg kell feleljen a festékpár, valamint a hozzájuk tartozó elsődleges, illetve, amennyiben szükséges, másodlagos antitest pár. Ezek mellett természetesen a dSTORM technika alkalmazásának feltételeit is teljesíteni kell a választott festékeknek.

dSTORM mérések kivitelezéséhez az egyik legalkalmasabb festék az Alexa Fluor 647. A kutatócsoportunk nagy tapasztalattal bír a festék alkalmazásával kapcsolatban, valamint eredményeink jelentős részét is ezzel a festékkal értük el. A biológus kollégákkal egyeztetve a rendelkezésre álló antitesteket, valamint a humán és egér agyi szeletekből álló minta tulajdonságait figyelembe véve a következő festékpárokat választottuk ki. Az emberi idegsejtekben a vizsgálni kívánt ioncsatornákat a dSTORM vizsgálatokra ideális Alexa Fluor 647 míg a konfokális képek elkészítéséhez a sejtek teljes térfogatát Cy3, vagy egyes mintáknál Alexa Fluor 488 jelölte. A génmódosított egér idegsejtekben a vizsgálni kívánt ioncsatornákat szintén a dSTORM vizsgálatokra ideális Alexa Fluor 647, míg a konfokális képek elkészítéséhez a sejtek teljes térfogatát tdTomato fluoreszkáló fehérje jelölte. Ezek a párosítások az alkalmazott szűrők mellett (1. szűrő konfiguráció) gyakorlatilag áthallás mentes detektálást tesznek lehetővé [8].

## 5. Új tudományos eredmények

A kromatikus aberráció kezelésének érdekében megvizsgáltam a mérések során alkalmazott színcsatornák közötti eltéréseket több színű fluoreszkáló gyöngyökkel. A minta fedőlemeze kikapadt TetraSpeck 0,1  $\mu\text{m}$  átmérőjű, négy színű fluoreszkáló gyöngyökből állt. A mérések során az EMCCD kameránk teljes területét feltérképeztem. A vörös 647 nm-es lézernkhöz tartozó 650 – 690 nm-es emissziós ablakú színcsatornától mért eltérését a zöld 561 nm-es lézernkhöz tartozó 580 – 620 nm-es emissziós ablakú színcsatornának a 20. ábra szemlélteti.



**20. Ábra. Laterális kromatikus aberráció mérése.** A teljes  $512 \times 512$  pixeles kamera területet felhasználva készített, többszínű fluoreszkáló gyöngyök pozícióit ábrázoló kép. A vörös körök 20 nm-es lépésekben szemléltetik a kromatikus hiba okozta eltérést. A négy felnagyított képen a 647-es csatornában vörös és az 561-es csatornában zöld mutatja a gyöngyök pozícióját.

A mérések alapján kiszámoltam a két csatorna közötti kromatikus aberrációból adódó transzformációt leíró vektor mezőt. Ezt a kromatikus aberrációra jellemző lineáris vektormezőt a 14. egyenlet írja le.

$\vec{r}_{561} = \alpha(\vec{r}_{647} - \vec{r}_{center}) + \vec{r}_{647}$	14.
--	-----

Itt egy adott fluoreszkáló gyöngy látszólagos pozícióját az 561-es csatornában  $\vec{r}_{561}$  vektor mutatja, míg a gyöngy pozícióját a 647-es csatornában  $\vec{r}_{647}$  vektor jelöli. Az  $\alpha$  a lineáris kromatikus aberrációs együttható. Az  $\vec{r}_{center}$  a transzformáció középpontjába mutató vektor. A mérések alapján a lineáris tag értéke  $0,00135 \pm 0,00002$  míg a transzformáció középpontjára mutató vektor  $\begin{pmatrix} 174 \pm 5 \text{ px} \\ 191 \pm 6 \text{ px} \end{pmatrix}$ .

Az EMMCD kamera pixelek a mintában  $160\text{ nm}$ -szer  $160\text{ nm}$ -es területnek felelnek meg. A kromatikus aberráció ilyen módon jellemezve az 561-es csatornában egy nagyobb nagyításként mutatkozik.

A sejtbiológiai alkalmazások tekintetében vizsgálandó minta mérete miatt tipikusan a kép közepétől mérve egy  $15\ \mu\text{m}$  sugarú körön belül található a megfigyelni kívánt elemek. Ennek megfelelően, ha a kamerán a vizsgált sejt közepe a kromatikus aberráció okozta transzformáció közepén helyezkedik el, akkor a legnagyobb eltérés a két csatorna között nem fogja meghaladni a  $20,25\text{ nm}$ -t. Ez gyakorlatilag megegyezik a dSTORM technika feloldásával, valamint lényegesen kisebb, mint a konfokális képek feloldása így a kromatikus aberráció a képek együttes kiértékelése során elhanyagolható.

### 5.2.2. Ioncsatornák dSTORM és konfokális mérése

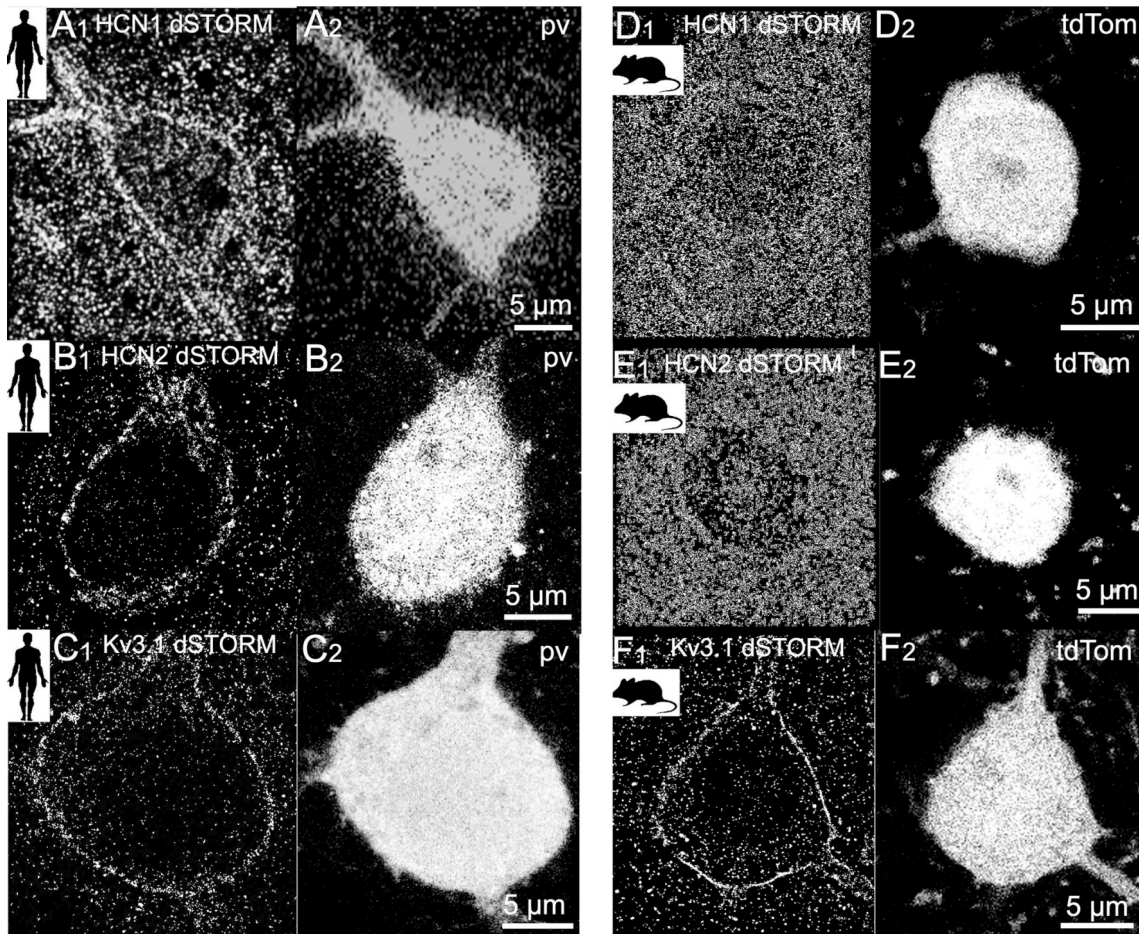
Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az emlős neuronok tulajdonságai között jelentős faji különbségek vannak, mégis az emberi agy információfeldolgozására vonatkozó elméletek nagymértékben a rágcsálókra és más kísérleti állatokon kapott eredményeken alapulnak [79], [80], [81]. Ezek a faji különbségek fokozottan fontosak a neocortex, a legösszetettebb és a legnagyobb evolúciós eltérést mutató agyterület megértése szempontjából. Itt a humán és egér gyorsan tüzelő GABAerg kosársejtek [82], [83], [84] elektrofiziológiai különbségeit vizsgáltuk. A kutatásunk fókuszában az úgynevezett hiperpolarizáció aktivált ciklikus nukleotid-kapcsolt kation (HCN) csatornák álltak. Több módszerrel megmutattuk, hogy a HCN csatornák nagy számban jelen vannak a humán neokortikális kosársejtek membránjában, míg ezek a csatornák nem, vagy csak alacsony számban lokalizálódnak a rágcsáló kosársejtjeinek membránjában. A csatornák blokkolásának vizsgálata kimutatta, hogy a HCN csatornák a humán neuronokban hozzájárulnak a nyugalmi membránpotenciál kialakításához és a sejtek gerjeszthetőségéhez, felgyorsítják a szomatikus membránpotenciál kinetikáját, és lerövidítik a késleltetést az excitatorikus poszt-szinaptikus potenciál és az akciós potenciál generálása között [85]. Azon humán sejtek, melyekben blokkolva vannak a HCN csatornák, lassú membránpotenciál-kinetikát mutatnak az egér gyorsan tüzelő idegsejtjeihez képest. A HCN csatornák felgyorsítják a humán sejtek membránpotenciál-kinetikáját, és segítenek elérni a rágcsáló sejtekéhez közeli bemeneti-kimeneti sebességet.

A csatornák pontos pozíciójának meghatározásához dSTORM technika segítségével nagy feloldású képeket készítettünk. A felvételek során kettős immunofluoreszcenciás jelölést alkalmaztunk. Az egyik színcsatornában a vizsgálni kívánt ioncsatornák voltak jelölve, míg a másik

## 5. Új tudományos eredmények

színcsatornában parvalbumin (pv), egy a neocortex gyorsan tüzelő interneuronjaiban található fehérje, volt jelölve. Annak köszönhetően, hogy a parvalbumin jelen van gyakorlatilag a vizsgált neuronok teljes térfogatában, jól alkalmazható a sejt határának meghatározására. A HCN csatornák közül a két legdominánsabb, HCN1 és HCN2 jelzésű csatornákat vizsgáltuk. A humán agyszövet minták agyműtéten átesett páciensekből származtak. A páciensek 20 és 80 év közötti életkorúak voltak és mindkét nem reprezentálva volt. A minták agybeli helyzetét tekintve mindkét agyféltekéből származó mintákkal dolgoztunk. A minták jelentős része a frontális kéregi lebenyből, valamint a temporális lebenyből származott, de egyes minták a neocortex más részeiről is származtak. Az egyes mintákból 350  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk melyeken az elektrofiziológiai mérések történtek. A mérések után az agyi metszeteket paraformaldehid-oldatban fixáltuk, majd 50  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítve immunohisztokémiai eljárással láthatóvá tettük a vizsgálni kívánt fehérjéket. Az összehasonlításhoz szolgáló egér agyszövet minták genetikailag módosított egerekből származtak. A minták előkészítése hasonlóan történt, mint a humán mintáké.

Annak érdekében, hogy a HCN1 és HCN2 ioncsatornák pozíciójának különbségeit nagy bizonyossággal meg tudjuk mutatni humán és egér idegsejtek között, egy harmadik ioncsatornát is vizsgáltunk. A Kv3.1 csatornákról ismert, hogy humán és egér idegsejtekben is túlnyomórészt a sejtmembránban lokalizálódnak [86], [87], [88]. A vizsgált humán sejtek esetén a parvalbumin jelölés jól megmutatta a sejtek pozícióját és a sejtmembrán határát. A humán sejtek esetén a HCN1, HCN2 és Kv3.1 ioncsatornákhöz tartozó fluoreszcencia jel egy keskeny sávot képezett a sejtek határán. Az egér sejtek esetén a parvalbuminhoz tartozó fluoreszcencia jel szépen mutatta a sejtek elhelyezkedését, azonban a HCN1 és HCN2 ioncsatornákhöz tartozó jel nem képezett egy vékony sávot a sejtek szélén. A csatornákhöz tartozó jel gyakorlatilag eloszlott a sejtek belsejében. Az eredmények a 21. ábrán láthatók. A HCN csatornák viselkedésével szemben a Kv3.1 csatornák egér sejtekben is a sejtmembránhoz csoportosultak egy vékony réteget alkotva hasonlóan a humán pv-sejtek Kv3.1 csatornáihoz.



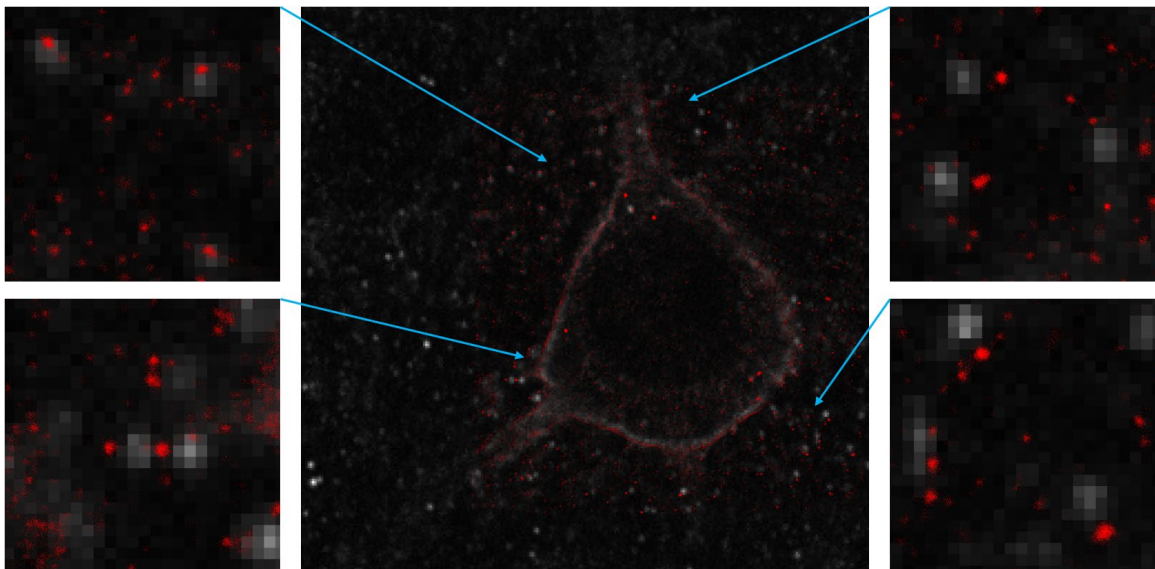
**21. Ábra.** A HCN1, HCN2 és Kv3.1 csatornák vizualizálása humán és egér pv-immunopozitív interneuronokban dSTORM és konfokális technikákkal. dSTORM szuperrezolúciós felvételek, amelyek a HCN1, HCN2 és Kv3.1 csatornákról készültek humán pv-immunopozitív sejtekben (A-C). A dSTORM képekkel párban a parvalbuminról készített konfokális képek láthatók. Az Alexa Fluor 647-tel jelölt HCN1 csatornák dSTORM képe (A1) és a hozzá tartozó Cy3-mal jelölt parvalbumin konfokális kép (A2). Az Alexa Fluor 647-tel jelölt HCN2 csatornák dSTORM képe (B1) és a Cy3-mal jelölt parvalbumin konfokális képe (B2). A CF568-cal jelölt Kv3.1 csatornák dSTORM képe (C1) és az Alexa Fluor 488-cal jelölt parvalbumin konfokális képe (C2). dSTORM szuperrezolúciós felvételek, amelyek a HCN1, HCN2 és Kv3.1 csatornákról készültek egér pv-immunopozitív sejtekben (D-E). Az Alexa Fluor 647-tel jelölt HCN1 csatornák dSTORM képe (A1) és a hozzá tartozó tdTomato fluoreszkáló fehérjével vizualizált parvalbumin konfokális képe (A2). Az Alexa Fluor 647-tel jelölt HCN2 csatornák dSTORM képe (B1) és tdTomato fluoreszkáló fehérjével vizualizált parvalbumin konfokális képe (F2). A Alexa Fluor 647-tel jelölt Kv3.1 csatornák dSTORM képe (C1) és a tdTomato fluoreszkáló fehérjével vizualizált parvalbumin konfokális képe (F2). [A3]

## 5. Új tudományos eredmények

A dSTORM mérések során az agyi szelet egy fedőlemez és egy tárgylemez közé volt szorítva, hermetikusan leszigetelve, GLOX switching puffer oldatban [27]. A mérés során először a konfokális képeket készítettem el, ugyanis ez gyakorlatilag fotoelhalványodás nélkül elvégezhető. Mindkét színcsatornában készítettem konfokális képet a későbbi képösszeolvasztáshoz. A konfokális képek felvétele után beváltottam a dikroikus tükröt, valamint átváltottam az EMCCD kamerára. A dSTORM képeket a megszokott  $2-4 \text{ kW/cm}^2$ -es intenzitás sűrűséggel készítettem el  $20 \text{ ms}$ -os expozíciós időt alkalmazva. Minden területről  $20\,000$  képkockát készítettem. Az így készült videófelveteleket a rainSTORM 2D Gauss-görbe illesztő algoritmusával értékeltem ki és ábrázoltam.

### 5.2.3. Képegyesítő algoritmus írása

A dSTORM és konfokális képek mutatta eredmények kihangsúlyozásának érdekében a képek egyesítése mellett döntöttem. A képek egymásra helyezését az ioncsatornákról készített dSTORM képek és az ioncsatornákról készített konfokális képek segítségével valósítottam meg. Ez a feladat több kihívást is tartalmazott, ugyanis a konfokális kamera képei és az EMCCD kamera képei között jelentős geometriai különbségek vannak. Pusztán egy korrelációs algoritmus alapján meghatározott vízszintes és függőleges eltolást alkalmazva megfigyelhető, hogy az ioncsatornákról készült dSTORM és konfokális kép nem helyezhető tökéletesen egymásra. Ezt az eltérést a 22. ábra szemlélteti. Az összeolvasztott kép elkészítéséhez a konfokális képet felnagyítottam úgy, hogy a konfokális kép egy pixeléből  $1089$  darab ugyanazzal az értékkel bíró pixelt készítettem. Ezt a technikát integer scaling-nek szokás nevezni. Ennek megfelelően a felnagyított képen egy pixel mérete kb.  $5 \text{ nm}$ . Ezután a felnagyított képen azokat a pixeleket, amiken a dSTORM adatsorból származó lokalizációk elhelyezkednek vörösre színeztem.



**22. Ábra.** A konfokális és dSTORM képek összeolvastása esetén felmerülő különbségek. Egy egér interneuronban található Alexa Fluor 647-tel jelölt Kv3.1 ioncsatornákról készített „integer scaling” alkalmazásával felnagyított konfokális kép, rajta vörössel elhelyezve az ugyancsak Kv3.1 ioncsatornákról készített dSTORM kiértékelésből kapott lokalizációkat. Az egyesítés egy korrelációs algoritmussal történt. A képről négy jellegzetes terület felnagyítva is látható. A nyilak a felnagyított területek eredeti helyét mutatják. A kép egy  $33,3 \times 33,3 \mu\text{m}$  méretű területről készült.

Vizuálisan úgy tűnik, hogy a két kép egymáshoz képest el van forgatva. Annak érdekében, hogy a két kép közötti transzformációt számszerűsíteni tudjam meg kellett határozni a transzformáció típusát. Az optikai rendszerek közötti különbségek tekintetében azt várnánk, hogy ha a tárgy két szakasza párhuzamos, akkor az mindkét kamerával megfigyelhető, valamint a köztük lévő transzformáció valamilyen globális, egész képre ható transzformáció. A különbségek tekintetében azt várnánk, hogy felléphet nagyításbéli különbség, elforgatás, lineáris eltolás, valamint esetleg valamilyen torzítás jellegű különbség. Ennek megfelelően a két detektor képei között kapcsolatot teremtő transzformáció esetében az úgynevezett affine transzformációra esett a választásom [89]. Az ilyen transzformáció megfelel a várakozásaimnak, egyenest egyenesbe képez és tartja a párhuzamosságot, valamint kellően sokoldalú. A transzformációt 2D vektorokra értelmezve egy 3-szor 3-as mátrix írja le. Ennek köszönhetően a 2D vektorokat is ki kell egészíteni egy harmadik elemmel, ami minden vektor esetén egységnyi értékű. A transzformáció meghatározásához a 20. ábrán bejelölt jól beazonosítható közel Gauss-os eloszlású fényes foltokat használtam, amelyek mind a dSTORM mind a konfokális képek esetén jól alkalmazhatók az összeolvastáshoz. A dSTORM

## 5. Új tudományos eredmények

és konfokális képeken látható fényes foltok középpontjai között kapcsolatot teremtő transzformáció a 15. egyenletben látható.

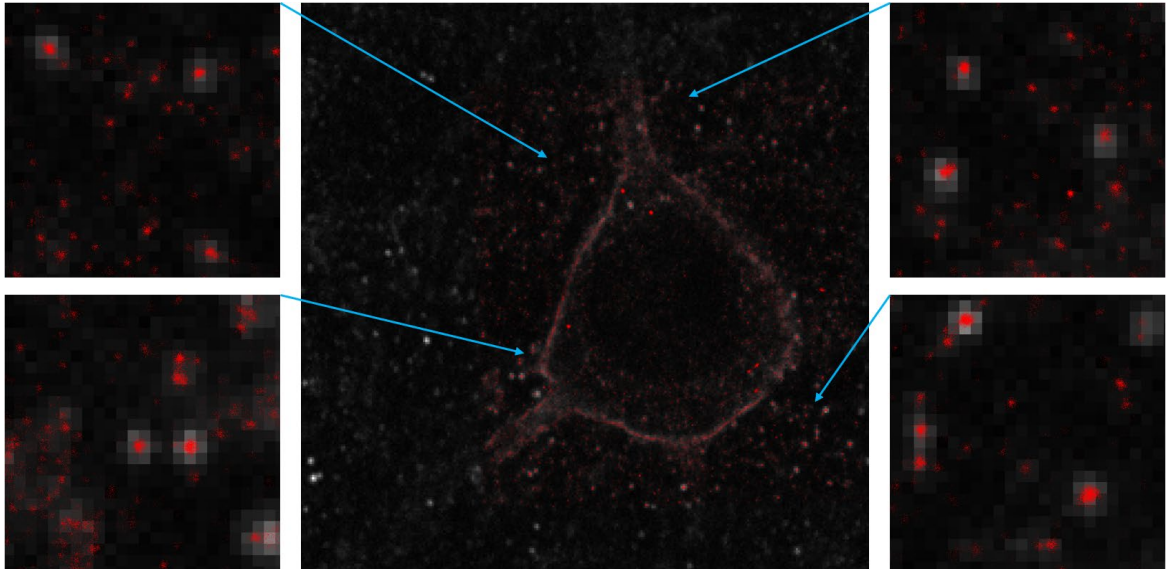
$\begin{pmatrix} x_{confocal} \\ y_{confocal} \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} A & B & S_x \\ C & D & S_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} x_{dSTORM} \\ y_{dSTORM} \\ 1 \end{pmatrix}$	15.
---	-----

Az egyenletben baloldalt szerepel a konfokális képen szereplő fényes folt középpontját leíró vektor. A vektor vízszintes koordinátája  $x_{confocal}$  és függőleges koordinátája  $y_{confocal}$ . Az egyenlet jobboldalán szerepel az affine transzformációt leíró mátrix. Ebben a mátrixban az  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , és  $D$  elemek felelősek a hagyományos 2D lineáris transzformációk leírásáért, valamint  $S_x$  és  $S_y$  felelős a lineáris eltolás leírásáért. Emellett szintén az egyenlet jobb oldalán szerepel a dSTORM képen szereplő ugyanazon fényes folt középpontját leíró vektor. A vektor vízszintes koordinátája  $x_{dSTORM}$  és függőleges koordinátája  $y_{dSTORM}$ . Hagyományos kétdimenziós transzformációkra bontva az egyenlet a következő alakban is felírható:

$\begin{pmatrix} x_{confocal} \\ y_{confocal} \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \begin{pmatrix} x_{dSTORM} \\ y_{dSTORM} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} S_x \\ S_y \end{pmatrix}$	16.
---	-----

Ezt a transzformációt minden egyes konfokális és dSTORM képpárra elvégeztem. Minden egyes olyan fényes foltpárt felhasználtam, amit képes voltam nagy bizonyossággal beazonosítani. Az affine transzformációt komponenseire bontva kijelenthetem, hogy a konfokális és dSTORM felvételek közötti transzformációban szerepel eltolás, forgatás, nagyítás, lineáris nyújtás és nyírás is. A korrigált kép a 23. ábrán látható.

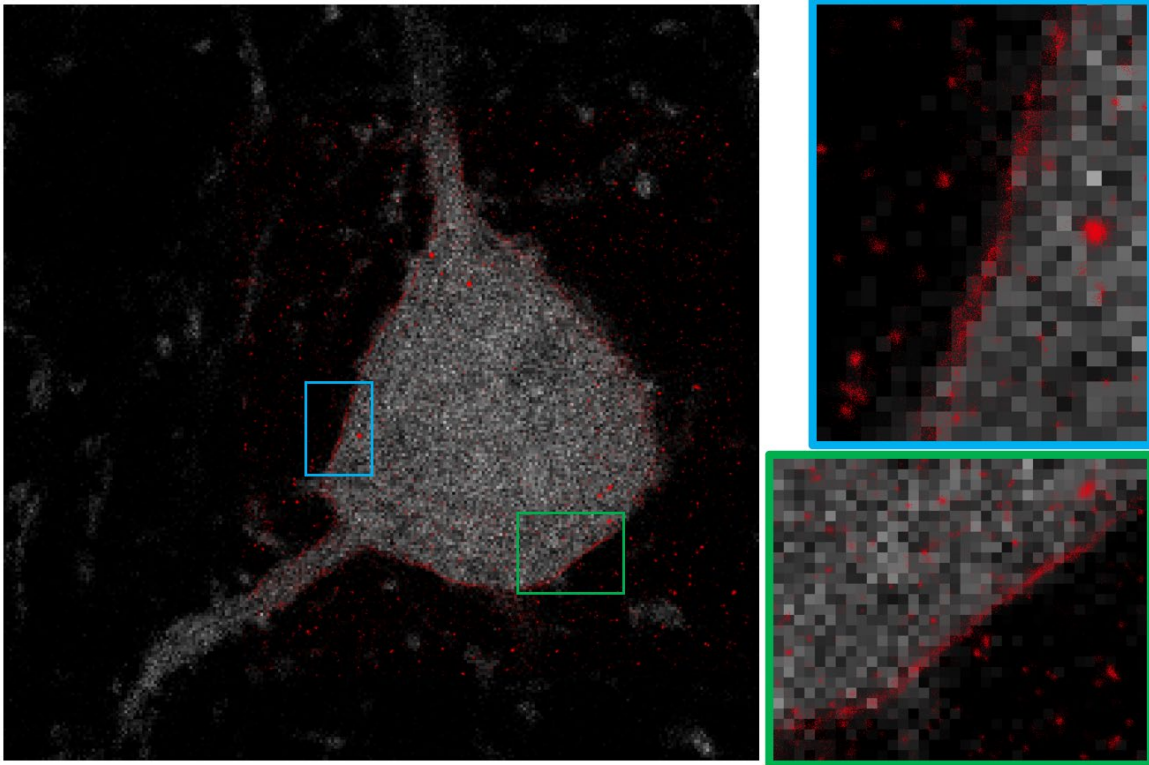




**23. Ábra. A konfokális és dSTORM képek összeolvasztása affine transzformáció alkalmazásával.** A 22. ábrán látható sejtről készített képek egyesítésének kijavított változata. A képről a 22. ábrán is megjelenített négy jellegzetes terület felnagyítva is látható. A nyilak a felnagyított területek eredeti helyét mutatják. A kép egy  $33,3 \times 33,3 \mu m$  méretű területről készült.

Miután sikerült nagypontossággal egymásra rakni az azonos színcsatornában az ioncsatornákról készült képeket, a dSTORM képeket az affine transzformáció alkalmazása mellett összeolvasztottam a másik színcsatorna parvalbuminról készült képeivel. Az eredményt a 24. ábra mutatja. Jól megfigyelhető, hogy a dSTORM segítségével nagypontossággal lokalizált ioncsatornák valóban a sejtek szélén a membránban csoportosulnak.

## 5. Új tudományos eredmények



**24. Ábra. Az ioncsatornák sejtmembránhoz viszonyított pozíciójának vizualizálása.** Egy egér interneuronban található tdTomato fluoreszkáló fehérjével együtt expresszálandó parvalbumin molekulákról készített „integer scaling” alkalmazásával felnagyított konfokális kép, rajta vörössel elhelyezve az Alexa Fluor 647-tel jelölt Kv3.1 csatornákról készített dSTORM kiértékelésből kapott lokalizációkat. A képről két jellegzetes terület felnagyítva is látható. A nyilak a felnagyított területek eredeti helyét mutatják. A kép egy  $33,3 \times 33,3 \mu\text{m}$  méretű területről készült.

### 5.2.4. Tézispont

Optimalizáltam a mikroszkóp rendszerünket többszínű dSTORM és konfokális képek együttes kiértékelésére és kolokalizációs információ kinyerésére. Konfokális és dSTORM képek egyesítésére saját kódot írtam LabView programozási környezetben. Kétszínű konfokális és dSTORM felvételeket készítettem emberi és egér agyi szeletekben található interneuronok HCN1, HCN2 és Kv3.1 ioncsatornáiról. A kétszínű konfokális felvételeken az egyik színcsatornában parvalbumin jelölés segítségével vizualizáltuk a sejt membrán határát míg a másik színcsatornában az adott ioncsatorna volt jelölve lehetővé téve a konfokális-dSTORM összehasonlítást. A nagy feloldású dSTORM mérések segítségével meghatároztuk az ioncsatornák pozícióját  $20 \text{ nm}$ -es pontossággal. Az általam készített kép egyesítő algoritmus segítségével, valamint dSTORM és konfokális képek vizuális

összehasonlításával megmutattuk a HCN1 és HCN2 csatornák eltérő viselkedését humán és egér interneuronokban.

Kapcsolódó publikáció(k): [\[A3\]](#)

### 5.3. Lakunaritás bevezetése a dSTORM adatsorok kiértékelésére

Annak érdekében, hogy egy tetszőleges minta geometriájáról tudományos megállapításokat tegyünk szükséges a geometria valamilyen eljárással vagy algoritmussal történő számszerűsítése. Egy ilyen technika az úgynevezett lakunaritás analízis, ami lehetőséget biztosít a minták térkitöltésének számszerűsítésére. Ez a technika számos tudományterületen bevett eljárás, azonban a mikroszkópiában eddig csak egyes sejtek térkitöltését vizsgálták vele [\[65\]](#), [\[90\]](#), [\[91\]](#), [\[92\]](#). A lokalizációs mikroszkópiában, ahol képek helyett pontfelhők alkotják az adatsort, pedig egyáltalán nem alkalmazták korábban. Ennek megfelelően egy lakunaritászámító algoritmus kidolgozása, tesztmintákon történő hitelesítése és biológiai minták vizsgálata egy új ígéretes alkalmazási terület. A biológiai minta tekintetében a kettős szálú DNS törések javító fehérjéire esett a választás csapatunk két korábbi publikációjából [\[52\]](#), [\[93\]](#). Ez egy, a csapatunk által jól ismert, korábban klaszteranalízissel kiértékelt minta, így a lakunaritás analízissel kapott eredmények könnyen összehasonlíthatóak korábbi eredményekkel.

A kutatás során feladatom volt a lakunaritászámító algoritmus és eljárás kidolgozása; a lakunaritás analízissel kapott eredmények prezentálása és egyeztetése a biológus kollégákkal; a lakunaritás analízissel kapott eredmények összehasonlítása a korábbi publikációk eredményeivel; valamint az új eredményeket és tudományos háttérrel összefoglaló cikk megírása.

#### 5.3.1. Lakunaritás számítása pointillista képekre

A 2D-s bináris képek kiértékelésére fejlesztett eredeti gliding-box (siklió doboz) algoritmust Allain és Cloitre publikálták 1991-ben [\[69\]](#). Ebben a módszerben a lakunaritás értékét egy adott, általában  $\varepsilon$ -al jelölt méretnél úgy határozzák meg, hogy egy  $\varepsilon$  méretű négyzetet helyeznek el a kép minden lehetséges különböző pozíciójában. Ezeket a négyzeteket dobozoknak szokták hívni, hogy a terminológia könnyen általánosítható legyen 3D-re. A dobozokban összeszámolják a tárgypixelet, amelyek bináris képek esetén a vizsgált struktúrához tartozó pixelek, így megkapva az egyes dobozok súlyát. A lakunaritás ezután úgy adódik, hogy elosztják a dobozsúlyok második momentumát a dobozsúlyok első momentumának négyzetével. Ez a technika általánosítható nem bináris képekre is, ahol a dobozok súlyát a bennük található pixelek értékeinek összege adja.

## 5. Új tudományos eredmények

A 2D SMLM-ben az adatok koordinátopárokból állnak, ezért a lakunaritás kiszámítását ennek megfelelően módosítani kell. Az 25.a ábra egy biológiai mintákra jellemző szimulált pointillista lokalizációs képet mutat, amely számos koordinátopár által meghatározott pontból áll egy  $L \times L$  méretű területen, ahol  $L$  a vizsgált terület (ROI) oldalhossza nanométerben. A lakunaritás kiszámításához újra kellett definiálnom a dobozok súlyát. Ezt úgy valósítottam meg, hogy egy doboz súlya a benne található lokalizációk száma legyen. Mivel a lokalizációs adatsorok alapvetően nem pixelizáltak, ezért a dobozok helyzetének meghatározásához, a technika nevében szereplő siklászhoz, meg kellett adnom egy  $s$  lépésméretet. Ennek következtében a legkisebb lehetséges vizsgálható dobozméret egyenlő lesz ezzel a lépésmérettel. A siklást a 25.b ábrán szemléltetem. A dobozok végig siklanak a képen, a bennük lévő lokalizációkat összeszámolva meghatározom a dobozok súlyát, az így kapott értékeket egy  $M(i, j)$  mátrixba rendezem a 25.c ábrának megfelelően. Ezt a mátrixot dobozsúlyoknak nevezik. A számítások felgyorsításának érdekében a lépésméret kiválasztása után a lokalizációs adatok pixelizálhatók egy  $N \times N$  méretű képbe, ahol

$N = \frac{L}{s},$	17.
--------------------	-----

a pixelek értékei pedig az egyes pixelekben található lokalizációk számával egyeznek meg. Egy ilyen négyzet alakú képen a dobozok száma egy adott  $\varepsilon$  dobozméretnél a következő

$B(\varepsilon) = (N - \varepsilon + 1)^2.$	18.
---	-----

Egy hasznos optimalizáció, amit Tolle 2008-ban [94] megmutatott, hogy a lakunaritást hatékonyabban lehet kiszámítani a dobozok súlyából a következőképpen

$\Lambda(\varepsilon) = \frac{B(\varepsilon) \cdot \sum_{i,j=1}^{N-\varepsilon+1} (M(i, j))^2}{\left(\sum_{i,j=1}^{N-\varepsilon+1} M(i, j)\right)^2}.$	19.
---	-----

Ezzel a módszerrel kikerülhető a dobozok súlyára vonatkozó valószínűségi eloszlás kiszámítása, valamint az első és második momentumok meghatározása így jelentős memória és számításgény csökkenést elérve. A számítások sebességének további növelésére megvalósítottam a Backes [95] által 2013-ban publikált ötletet, amely kihasználja, hogy egy már kiszámított súlyú doboz szomszédos dobozának súlyát kiszámíthatom csak a két doboz nem átfedő eleinek vizsgálatával. Ezek a változtatások lehetővé teszik, hogy szoftverünk 0,2 megapixel/másodperc sebességgel

számítsa ki a lakunaritást a hardverekre vonatkozó fejezetben említett „PC 1” jelzésű számítógépen, egy 12 magos AMD Ryzen 9 3900X rendszeren. A lakunaritás analízis elvégzése egy tipikus mintán, ami 1 300 000 lokalizációból áll egy  $10\ \mu\text{m}$ -szer  $10\ \mu\text{m}$ -es területen,  $s = 1\ \text{nm}$ -es lépésméretet használva, 341,32 másodpercet vesz igénybe, míg ugyanezen a mintán, ugyanezen a számítógépen a korábbi tanulmányainkban használt DBSCAN algoritmusnak 1687,92 másodpercre van szüksége. Az eredeti gliding-box módszert alkalmazva pedig ugyanennek a mintának a kiértékelése 45 órát venne igénybe, ez is mutatva a Bakes féle módszer előnyeit. A futási idő tovább gyorsítható például  $5\ \text{nm}$ -es lépésméret alkalmazásával, így a lakunaritás analízis csupán 2,53 másodpercet vesz igénybe, azonban az  $5\ \text{nm}$ -nél kisebb dobozméretekre vonatkozó információk elvesznek. A lakunaritás elemzés futási ideje a minta területével, míg a DBSCAN futási ideje a lokalizációk számával arányos. Sűrű, de kis méretű minták esetén ez lehetővé teheti, hogy a lakunaritás elemzés akár ezerszer gyorsabb legyen, mint a DBSCAN. A lokalizációs mikroszkópiában a tipikus pixelméret megegyezik az elért felbontással, ami körülbelül 20 nanométer. Ennek megfelelően érdemes az ennél kisebb vagy ezzel az értékkel megegyező lépésméretek használata.

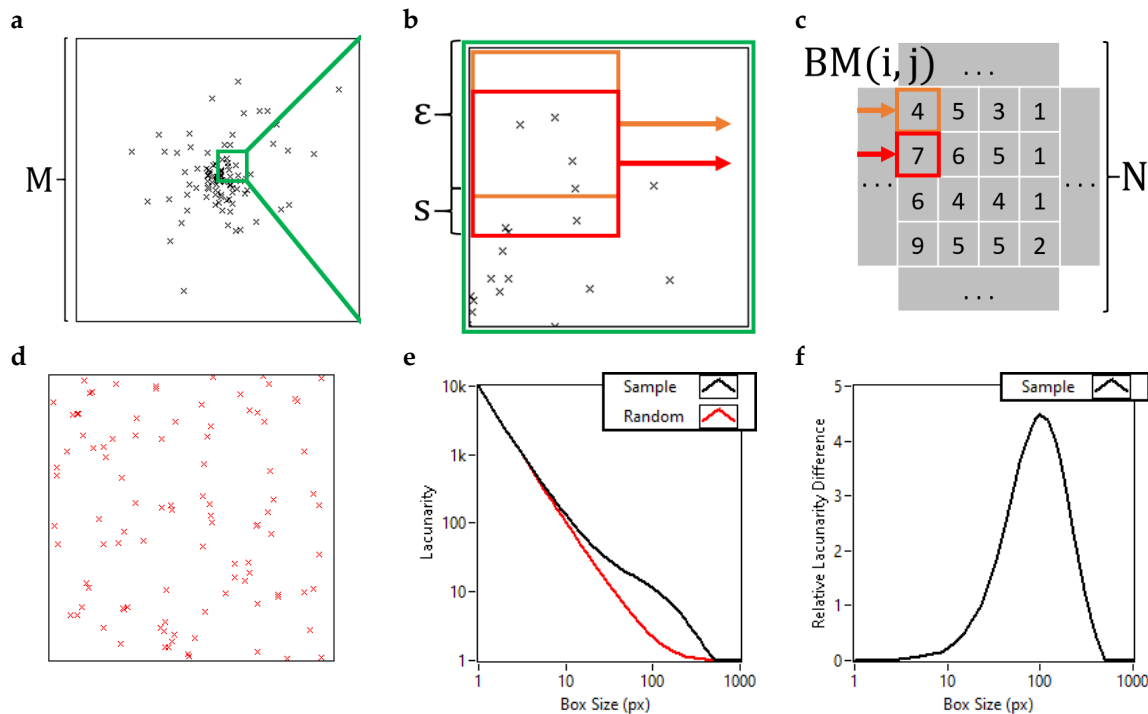
A különböző lokalizációs adatsorok lakunaritásának összehasonlításához új normalizálási módszert dolgoztam ki. Erre azért volt szükség, mert a bináris képekkel ellentétben az egy pixel dobozméretnél ( $\varepsilon = 1\ \text{pixel}$ ) a lakunaritás értéke matematikailag nem lesz azonos az egyező mennyiségű tárgypixelekkel rendelkező képek esetében. A javasolt új normálási módszer egy adott minta lakunaritás görbéjét (25.a ábra) hasonlítja össze egy szimulált véletlenszerű, azonos számú lokalizációval rendelkező adathalmazzal (25.d ábra). A mintára (fekete vonal) és a véletlenszerű adatokra (piros vonal) számított lakunaritási görbéket a 25.e ábra mutatja. A normalizálást a két lakunaritás görbe egyes pontjainak relatív eltéréseinek kiszámításával végezzük el a következő módon

$\text{Relatív Lakunaritás Eltérés}(\varepsilon) = \frac{\Lambda_{\text{minta}}(\varepsilon) - \Lambda_{\text{random}}(\varepsilon)}{\Lambda_{\text{random}}(\varepsilon)}$	20.
---	-----

Az eredmény, amelyet a minta lakunaritás eltérés (LD) görbéjének fogunk nevezni, a 25.f ábrán látható. Az így definiált normálás kiemeli azokat a dobozméretek, amelyeknél a heterogenitás eltér a véletlenszerű adathalmaztól. Az a dobozméret, amelynél az LD görbe maximális, azt a méretet mutatja, ahol a minta heterogenitása maximális. Bár ez a dobozméret nem egyezik meg számszerűen a klasztermérettel, mégis jellemzi a mintát, és a mintában történő változások okozta

## 5. Új tudományos eredmények

értékbéli és/vagy amplitúdóbéli eltolódása értékes információt adhat a mintában változó paraméterekről.



**25. Ábra. A lakunaritás számítási folyamat és annak megjelenítése.** Száz darab Gauss-os eloszlású klaszterben elhelyezkedő lokalizáció egy 1000 nm-szer 1000 nm-es területen (a). A síkló  $\epsilon$  méretű doboz mozgása a Gauss-os eloszlású mintán felnagyítva (b). A dobozsúlyok a felnagyított területen (c). Száz darab véletlenszerű eloszlású lokalizáció egy 1000 nm-szer 1000 nm-es területen (d). A Gauss-os (fekete) és a véletlenszerű (piros) eloszlású minták lakunaritás görbéi (e). A Gauss-os eloszlású minta relatív lakunaritás eltérés görbéje (f). [A4]

### 5.3.2. Klasztereződési jelenségek vizsgálata szimulált adatsorokon

A szimulált lokalizációs adatsorokat a TestSTORM [70], [71] nevű dSTORM szimulációs szoftverben hoztam létre oly módon, hogy a lokalizációk valós mintákhoz hasonló eloszlásban helyezkedjenek el. Ez azt jelentette, hogy a szoftverben beállítható célmolekulák nanofókuszokból (sűrű, 10-50 nm átmérőjű lokalizációs tömörülésekből álló gömbök) álló klasztereket alkotnak. Ez jellemző a kettős szálú DNS törések javító fehérjéinek eloszlására, ahogy azt Varga Dániel megmutatta [52]. A szimulált adatok létrehozásához 8000 képkockát generáltam a beépített „Disc Pattern” generátor módosított változatával, ami véletlenszerűen helyezi el a célmolekulákat egy kör alakú területen, meghatározott sűrűségben és orientációban. Ezeket a kör alakú klasztereket egy háromszor hármás rácsban helyeztem el. A nanofókuszokat célmolekulánként több jelölő festékkel, nagyobb összekötő

hosszúság beállításával hoztam létre. A festék paramétereit és a felvételi paramétereit az alapértelmezett értékeken hagytam, csak a „Non-spec. l. dens. (1/um<sup>3</sup>)” és a „Number of frames” paramétereit változtattam meg. Nem vezettem be minta mozgást, és Gauss-os PSF modellt használtam. Az így generált videókat a rainSTORM rekonstrukciós szoftverrel értékeltem ki a multi-Gaussian 2D elemzési algoritmust alkalmazva. A szimuláció során összesen harmincöt különböző adatsort állítottam elő, melyekben a következő hét mintaparamétert öt különböző értéken vizsgáltam:

- A klaszterek száma, ami a vizsgált területen lévő nagy struktúrák számát jelenti.
- A klaszterek mérete, ami a klaszterek sugarát jelenti.
- A klaszterek távolsága, ami a két szomszédos klaszter középpontja közötti távolságot jelenti.
- A nanofókuszok sűrűsége, ami a klasztereken belüli négyzet mikronra eső nanofókuszok számát jelenti.
- A nanofókuszok mérete, ami egyetlen nanofókusz sugarát jelenti.
- A lokalizációk száma nanofókuszonként, ami az egyetlen nanofókuszhoz tartozó festékmolekulák számát jelenti.
- A nemspecifikus lokalizáció sűrűség, ami a minta teljes területén köb mikronokban található nemspecifikus lokalizációk számát jelenti.

A fent felsorolt hét mintaparaméter alapján a TestSTORM-al generált szimulációs adatsorok három csoportra oszthatók. Az első csoportba tartoznak a klaszterekkel kapcsolatos paraméterek, azaz a klaszterek száma, a klaszterek mérete és a klaszterek távolsága. A második csoportba tartoznak a nanofókuszokkal kapcsolatos paraméterek, azaz a nanofókuszok sűrűsége, a nanofókuszok mérete és a nanofókuszonkénti lokalizációk száma. A harmadik csoportba a nem a mintára jellemző, nemspecifikus lokalizáció sűrűség kerül. A szimulációs eredményeket a pixelizált szuperrezolúciós képek és a lakunaritás eltérés görbék alapján mutatom be. Pár előzetes kettős szálú DNS töréses minta alapján meghatároztam egy alapértéket a fent említett hét mintaparaméterhez. Minden egyes szimulációnál a vizsgált mintaparaméteren kívüli összes többi paramétert az alapértékén hagytam. Az alapértékeket és a szimulált paramétertartományokat a 3. táblázat mutatja.

## 5. Új tudományos eredmények

Vizsgált paraméter	A paraméter alapértéke	A vizsgált tartomány
Klaszterszám	9	1 – 9
Klaszterméret ( <i>nm</i> )	560	140 – 980
Klasztertávolság ( <i>nm</i> )	2500	500 – 2500
Nanofókusz sűrűség (nanofókusz/ $\mu\text{m}^2$ )	40	10 – 70
Nanofókusz méret ( <i>nm</i> )	55	11 – 99
Nanofókuszonkénti lokalizációs szám (lokalizáció/ $\mu\text{m}^2$ )	150	10 – 290
Nemspecifikus lokalizáció sűrűség (lokalizáció/ $\mu\text{m}^3$ )	70	0 – 560

A szimulációk során az öt vizsgált klaszterszám érték az egy, három, öt, hét és kilenc volt. Az egy, öt és kilenc klaszterre vonatkozó szuperrezolúciós képek a 26.d-f ábrákon láthatók. Minél nagyobb a klaszterek száma, annál homogénebbé válik a kép, ezért a lakunaritás eltérés (LD) görbe ellaposodik (26.a ábra). Ezt a homogenizálódást az okozza, hogy a klaszterek a kép nagyobb részét egyenletesen lefedik, így a kép különböző részei egyre jobban hasonlítanak egymáshoz. Az LD görbe csúcsa azt a dobozméretet írja le, amelynél a homogén mintától való eltérés a legnagyobb. Megfigyelhető, hogy a csúcs a klaszterek számának növekedésével a kisebb dobozméreteket ( $127\text{ nm} \rightarrow 70\text{ nm}$ ) felé mozog (26.j. ábra). Ez azt jelenti, hogy a klaszterek számának növelésével a kép nagyobb dobozméreteknél jobban homogenizálódik.

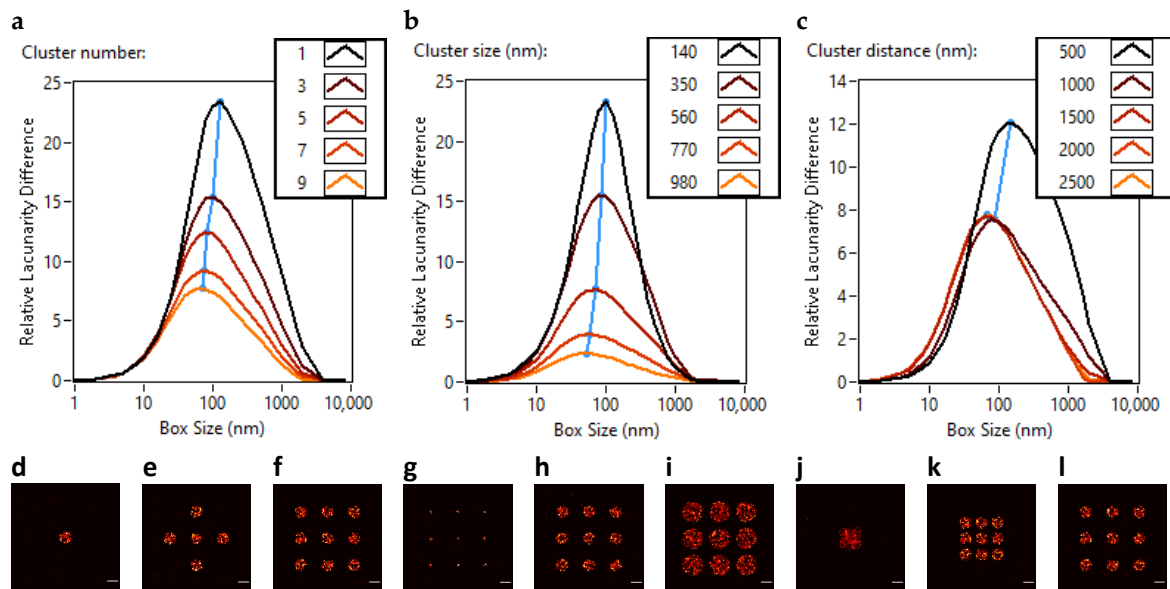
A kör alakú klaszterek méretét illetően az öt vizsgált érték a következő volt:  $140\text{ nm}$ ,  $350\text{ nm}$ ,  $560\text{ nm}$ ,  $770\text{ nm}$  és  $980\text{ nm}$ . A  $140\text{ nm}$ -es,  $560\text{ nm}$ -es és  $980\text{ nm}$ -es klaszterméretekre vonatkozó szuperrezolúciós képek a 26.g-i ábrákon láthatók. A nagyobb klaszterek a kép nagyobb részét egyenletesen fedik le, így növelve a homogenitást és ellaposítva az LD-görbét. A klaszterek méretének növekedésével a lakunaritás eltérés görbe csúcsa a kisebb dobozméreteket felé ( $100\text{ nm} \rightarrow 53\text{ nm}$ ) tolódik (26.b ábra). A klaszterméret vagy a klaszterek számának változása hasonló tendenciákat eredményez, mivel ezek növelik a klaszterek által lefedett területet a lokalizációs sűrűség fenntartása mellett.

A klasztertávolságok vizsgálatához a  $3 \times 3$ -as négyzetrács rácspontjaiba helyezett klaszterek távolságát a rácsállandó változtatásával valósítottam meg. Az öt, így vizsgált rácsállandó  $500\text{ nm}$ ,



1000 nm, 1500 nm, 2000 nm és 2500 nm volt. Az 500 nm-es, 1500 nm-es és 2500 nm-es klasztertávolságokra vonatkozó szuperrezolúciós képek a 26.j-l ábrákon láthatók. Az 500 nm-es és 1000 nm-es rácsállandóval bíró esetekben az alapbeállításnak megfelelő 560 nm sugarú klaszterek átfedik egymást, és egy összefüggő területet alkotnak. Ez az átfedés csökkenti a lefedett terület méretét és növeli a lokalizációs sűrűséget. Az LD-görbén ez az átfedés a heterogenitás erőteljes növekedését, és a csúcshoz a nagyobb dobozméret (143 nm és 85 nm) felé mozdulását eredményezi. A többi esetben, ahol a klaszterek jól elkülönülnek, az LD-görbe csúcsának amplitúdója és pozíciója lényegében változatlan marad (70 nm, 70 nm, 69 nm) (26.c ábra).

Az első kategóriát általánosságban úgy jellemezhetjük, hogy a klaszterek számának vagy méretének növelése homogénebbé teszi a képet, és az LD-görbe csúcsát a kisebb dobozméret felé tolja el. A klaszterek távolsága azonban nem befolyásolja jelentősen a lakunaritás eltérés görbét amennyiben a klaszterek térben elkülönülnek. Az egymást átfedő klaszterek jelentős inhomogenitást eredményeznek, és az LD görbe csúcsát a nagyobb dobozméret felé tolják el.



**26. Ábra. A klaszterekhez tartozó paraméterek változtatásának hatása a lakunaritás eltérés görbékre.** Lakunaritás eltérés görbéi TestSTORM-al generált különböző számú (a), méretű (b), illetve távolságú (c) klasztereket tartalmazó adatsoroknak. Minden vizsgált paraméter esetén az öt szimulált adatsorból a középsőről, illetve a két szélsőről készített szuperrezolúciós képek is megtekinthetők. Egy (d), öt (e) és kilenc (f) darab klasztert tartalmazó kép. 140 nm (g), 560 nm (h) és 980 nm (i) méretű klasztereket tartalmazó kép. 500 nm (j) 1500 nm (k) és 2500 nm (l) távolságú klasztereket tartalmazó kép. A méretskálák 1 μm hosszúak. [A4]

## 5. Új tudományos eredmények

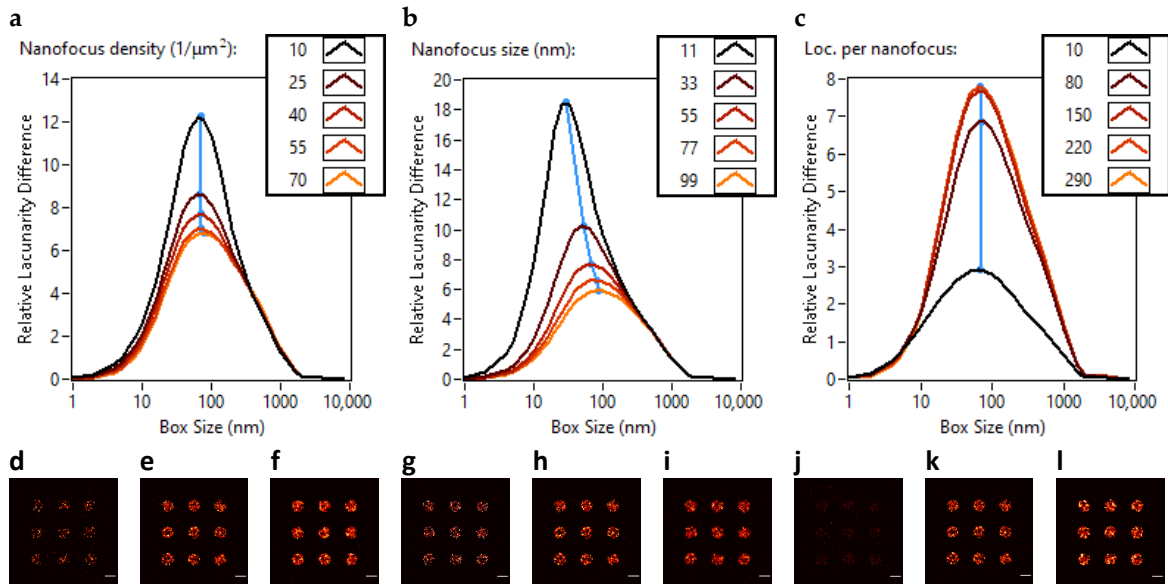
A második paraméter kategóriában a nanofókusz sűrűség esetén az öt vizsgált érték a következő volt: 10 *nanofókusz/μm<sup>2</sup>*, 25 *nanofókusz/μm<sup>2</sup>*, 40 *nanofókusz/μm<sup>2</sup>*, 55 *nanofókusz/μm<sup>2</sup>* és 70 *nanofókusz/μm<sup>2</sup>*. A 10/μm<sup>2</sup>, 40/μm<sup>2</sup> és 70/μm<sup>2</sup> nanofókusz sűrűségű szuperrezolúciós képek a 27.d-f ábrákon láthatók. A nanofókuszok sűrűségének növekedése növeli a klasztereken belüli lokalizációk számát. A lokalizációs sűrűség 3800 *lokalizáció/μm<sup>2</sup>*-ről 7200 *lokalizáció/μm<sup>2</sup>*-ra, 9700 *lokalizáció/μm<sup>2</sup>*-ra, 11 300 *lokalizáció/μm<sup>2</sup>*-ra és 12 500 *lokalizáció/μm<sup>2</sup>*-ra nő a vizsgált esetekben, ami egyenletesebb eloszlást eredményez a klasztereken belül. Ez a hatás a homogenitás növekedését eredményezi egy bizonyos pontig, amelyet a klaszter mérete és alakja határoz meg. A lakunaritás eltérés görbe csúcsa kissé eltolódik (69 nm → 78 nm) a nagyobb dobozméretetek felé, ami azt jelzi, hogy a homogenizációs hatás jelentősebb a kisebb dobozméretetek esetében (27.a ábra). Ez azzal magyarázható, hogy az új nanofókuszok megjelenése csak egy kis területen, a klasztereken belül, befolyásolja a képet.

A nanofókuszok méretét a TestSTORM-ban a „Lenght of linker” paraméterrel állítottam be. Az öt vizsgált érték 11 nm, 33 nm, 55 nm, 77 nm és 99 nm volt. A 11 nm-es, 55 nm-es és 99 nm-es nanofókusz méretekhez tartozó szuperrezolúciós képek a 27.g-i ábrákon láthatók. A nanofókuszok méretének növelése lényegében a klaszterek területén belül homogenizálja a képet, azonban a nanofókusz mérete enyhén befolyásolja az effektív klaszterméretet, azaz a homogenitás növekedése nem áll meg hirtelen. A lakunaritás eltérés görbe csúcsa (30 nm → 88 nm) a nagyobb dobozméretetek felé mozdul el (27.b ábra). A nanofókusz sűrűségének vagy a nanofókusz méretének változása hasonló hatással van a lakunaritásra, mivel mindkettő befolyásolja a klasztereken belüli kép homogenitását. Következésképpen ezek a paraméterek nagyobb hatással vannak a kisebb dobozméretetekre.

A nanofókuszonkénti lokalizációk számát 10, 80, 150, 220 és 290 lokalizáció esetén vizsgáltam. A nanofókuszonkénti 10, 150 és 290 lokalizációra vonatkozó szuperrezolúciós képek a 27.j-l ábrákon láthatók. Nanofókuszonként 10 lokalizációnál a klaszterek beleolvadnak a nem specifikus lokalizációkba, ami alacsony heterogenitást eredményez. A nanofókuszonkénti 80 lokalizációnál magasabb értékek nem eredményeznek változást a heterogenitásban, mivel a kép geometriája nem változik. Ez azt jelenti, hogy mind a csúcsérték, mind a csúcs dobozmérete változatlan marad a lakunaritás eltérés görbén, amint az a 27.c ábrán látható.

A második kategóriában a nanofókuszok sűrűségének vagy méretének növekedése a heterogenitás csökkenését eredményezi, és ez a hatás a kisebb dobozméretelnél kifejezettebb, ami

a lakunaritás eltérés görbe csúcsát a nagyobb dobozméretetek felé tolja. A nanofókuszokénti lokalizációk számának megváltoztatása nem vezet a geometria változásához, így nincs hatása a lakunaritás eltérés görbére, ha a jel-zaj arány elegendően jó.

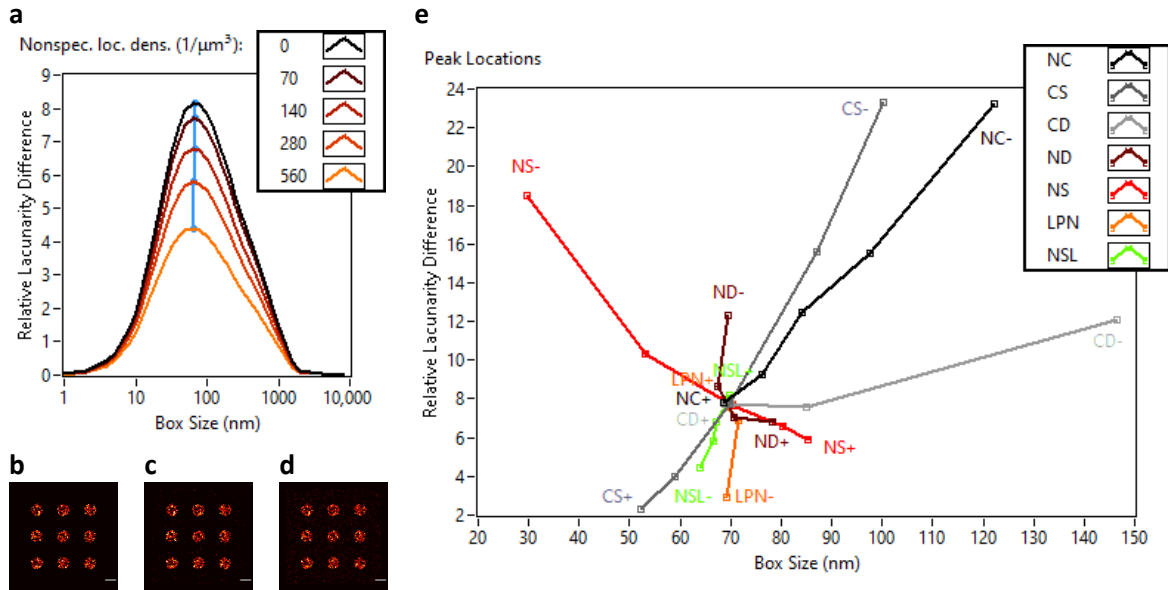


**27. Ábra. A nanofókuszokhoz tartozó paraméterek változtatásának hatása a lakunaritás eltérés görbékre.** Lakunaritás eltérés görbéi TestSTORM-al generált különböző nanofókusz sűrűségű (a), nanofókusz méretű (b), illetve lokalizáció számmal bíró (c) nanofókuszokat tartalmazó adatsoroknak. Minden vizsgált paraméter esetén az öt szimulált adatsorból a középsőről, illetve a két szélsőről készített szuperrezolúciós képek is megtekinthetők. 10/ $\mu\text{m}^2$  (d), 40/ $\mu\text{m}^2$  (e) és 70/ $\mu\text{m}^2$  (f) nanofókusz sűrűségű kép. 11 nm (g), 55 nm (h) és 99 nm (i) méretű nanofókuszokat tartalmazó kép. 10 (j) 150 (k) és 290 (l) darab lokalizációt tartalmazó nanofókuszokkal bíró kép. A méreetskálák 1  $\mu\text{m}$  hosszúak. [A4]

A nonspecifikus lokalizáció sűrűségét  $0/\mu\text{m}^3$ ,  $70/\mu\text{m}^3$ ,  $140/\mu\text{m}^3$ ,  $280/\mu\text{m}^3$  és  $560/\mu\text{m}^3$  értékeken vizsgáltam. A  $0/\mu\text{m}^3$ ,  $140/\mu\text{m}^3$  és  $560/\mu\text{m}^3$  nonspecifikus lokalizációs sűrűségekre vonatkozó szuperrezolúciós képek a 28.b-d ábrákon láthatók. A nagyobb nonspecifikus lokalizációs sűrűségek egyenletesen homogenizálják a teljes képet, míg a görbe csúcsa csak nagyon kis mértékben ( $69\text{ nm} \rightarrow 64\text{ nm}$ ) mozdul el a kisebb dobozméretetek felé (28.a ábra).

## 5. Új tudományos eredmények

Az LD görbe csúcsának mind amplitúdójában, mind pozíciójában bekövetkező elmozdulását értékelve következtetéseket lehet levonni a mögöttes mechanizmusokra és a változó paraméterekre vonatkozóan. Amint az a 28.e ábrán látható, minden egyes különböző paraméter az LD görbe csúcsát különböző görbéken mozgatja a relatív lakunaritás eltérés - dobozméret térben. Míg egy bizonyos paramétert nehéz lenne elkülöníteni, a különböző paramétercsoportok (klaszter és nanofókusz) jól elkülöníthetőek. Ezek a változások nem specifikusak az általunk választott klaszterformákra. Más alakú, de hasonló alstruktúrával bíró minták (például nanofókuszokból álló klaszterek) esetében a lefedett terület növekedése, akár a struktúra méretének, akár a struktúrák számának növekedése révén, hasonló homogenizálódást eredményezne. A struktúrák távolsága nem befolyásolná a lakunaritást, amíg átfedés nem jelentkezik. A sűrűségben vagy méretben növekvő alstruktúrák hatása homogenizálná a nagyobb struktúrák belsejét, míg az alstruktúrákenti lokalizációk száma nem lenne észrevehető hatással sem a geometriára, sem a lakunaritásra. A nemspecifikus lokalizáció sűrűség növekedése mindig homogenizálja a képet. Ezek a következtetések a lakunaritás tulajdonságaiból és számítási módjából vezethetők le.



**28. Ábra. A nemspecifikus lokalizációk változtatásának hatása a lakunaritás eltérés görbékre, valamint az egyes paraméterek hatásának összegzése.** Lakunaritás eltérés görbéi TestSTORM-al generált különböző nemspecifikus lokalizációs sűrűséggel bíró adatsoroknak (a). Minden vizsgált paraméter esetén az öt szimulált adatsorból a középsőről, illetve a két szélsőről készített szuperrezolúciós képek is megtekinthetők. Ezek rendre  $0/\mu\text{m}^3$  (b),  $140/\mu\text{m}^3$  (c) és  $560/\mu\text{m}^3$  (d) nemspecifikus lokalizációs sűrűségű képek. A méretskálák  $1 \mu\text{m}$  hosszúak. Az összes szimuláció esetén a lakunaritás eltérés görbék csúcsának magassága és pozíciója sorrendben (e). A jelölt mennyiségek: klaszter szám (NC), klaszterméret (CS), klasztertávolság (CD), nanofókusz sűrűség (ND), nanofókusz méret (NS), nanofókuszonkénti lokalizáció szám (LPN) és nemspecifikus lokalizáció sűrűség (NSL). [A4]

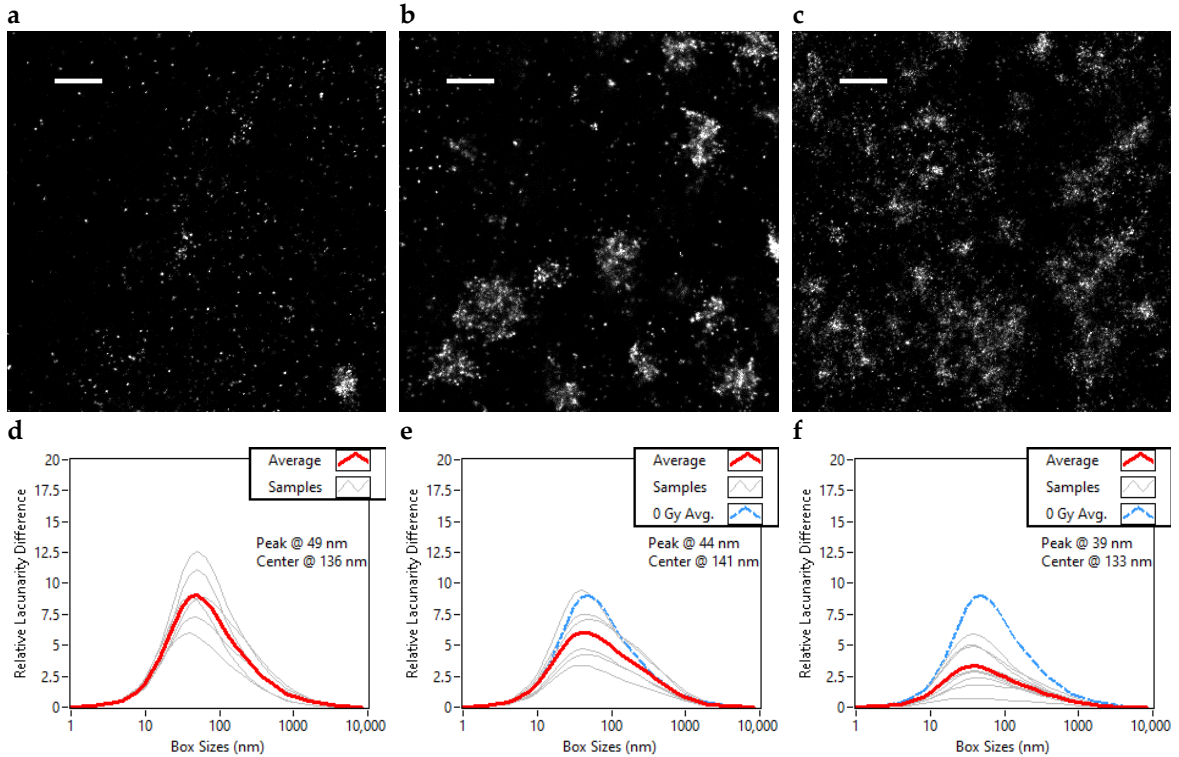
### 5.3.3. Klasztereződési jelenségek vizsgálata mért adatsorokon

A kettős szálú DNS törés javító fehérjéről készített dSTORM adatsorokat, amelyeket a lakunaritás elemző technika hatékonyságának demonstrálására használtam, kutatócsoportunk korábbi eredményeiből választottam ki. Ezekben a vizsgálatokban a kettős szálú töréseket mesterségesen indukálták és a sejtmagokban a kettős szálú szakadás markerként használt Ser139-nél foszforilált H2AX (a továbbiakban  $\gamma\text{H2AX}$ ) segítségével vizualizálták [96]. A sugárkezelt U251, a neocarzinostatinnal (NCS) kezelt U2OS és a 4-hidroxitamoxifennel (4-OHT) kezelt DIVA sejtvonalakat (U2OS sejtvonalon alapuló rendszerek, amelyek 4-OHT hozzáadásakor az AsiSI endonukleázt expresszálják és aktiválják [97]) a Brunner 2021 [93], illetve a Varga 2019 [52] publikációkban vizsgáltuk korábban.

## 5. Új tudományos eredmények

A biológiai mintákhoz három adathalmazt választottam ki a kettős szálú DNS törés javítási mechanizmus különböző aspektusainak tanulmányozására. Az elsőben olyan sejtek sejtmagjait vizsgáltam, amelyeket különböző dózisu röntgensugárzással kezeltek. A második halmaz esetében azt vizsgáltam, hogyan változik a kettős szálú DNS törést javító fókuszok kialakulása a sugárzási eseményt követően időben. A harmadik sorozatban különböző kettős szálú DNS törést indukáló vegyületek hatását elemeztem. Mint korábban, most is csak a magok azon területének szuperrezolúciós képeit mutatom be, amelyen a lakunaritás elemzést végrehajtottam, valamint a lakunaritás eltérésgörbéket. Az adott mintacsoportokhoz tartozó lakunaritás eltérés görbék átlaga (pirossal), valamint ennek az átlagos lakunaritás eltérés görbének a csúcspontjához (Peak) és a tömegközéppontjához (Center) tartozó dobozméretek ki vannak emelve az adott grafikonokon.

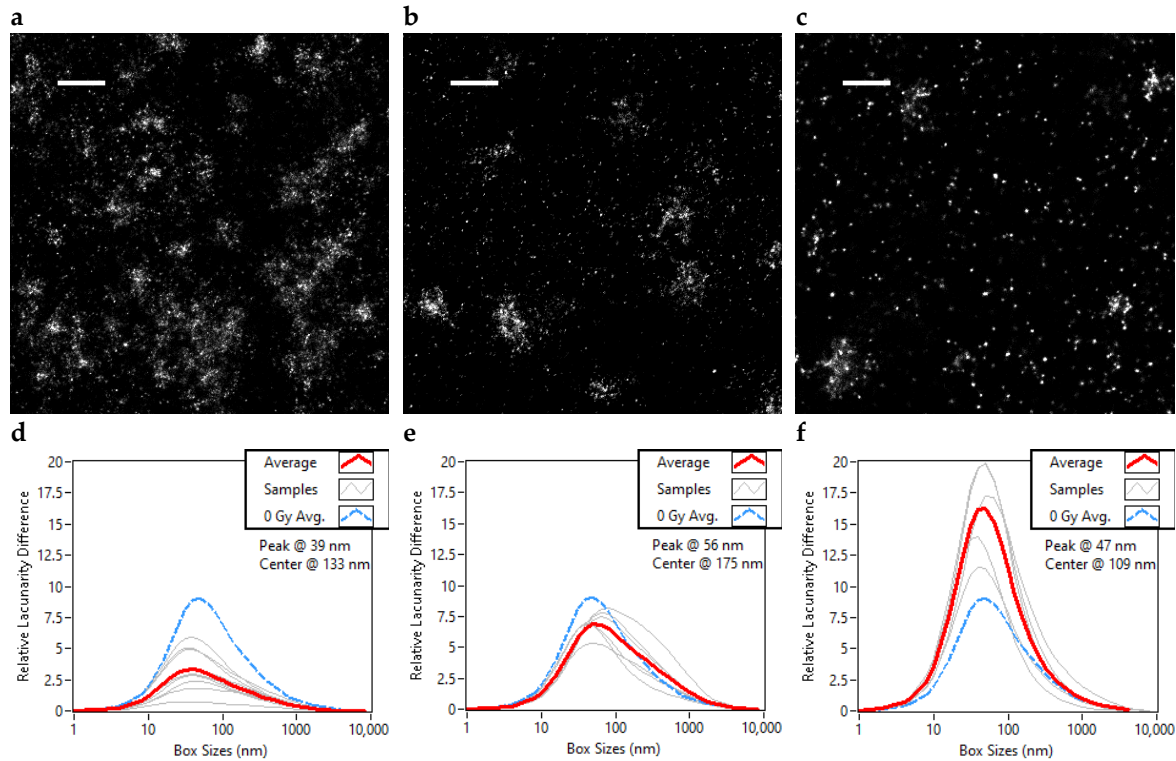
A röntgensugárzással kezelt sejtvonal dóziszfüggő lakunaritás elemzése során a sugárdózist tekintve a 0 Gy (vagy kontroll), 2 Gy és 5 Gy sejtcsoportokat választottam ki, amelyeket 30 perccel a sugárzás okozta károsodás után fixáltak. Megfigyelhető, hogy minél nagyobb a dózis, annál nagyobb a kettős szálú DNS törések várható száma, ami több javítási fókuszt eredményez. Az egyes dóziscsoportok reprezentatív területeinek szuperrezolúciós képei a 29.a-c ábrákon láthatók. A 29.d-f ábrákon megfigyelhetjük, hogy a nagyobb sugárdózisok hatására a lakunaritás eltérés görbe ellaposodik. A képek homogénebbé válnak a fókuszok számának növekedésével. A homogenitás növekedésével a lakunaritás eltérés görbe csúcsa a kisebb dobozméretek felé mozdul el. Ez azt jelzi, hogy a nagyobb sugárdózisok okozta változás a fókuszok, és nem a nanofókuszok mérettartományában következik be. Amint azt a szimulációs adatok esetében kimutattam, ezt a viselkedést a klaszterek számának vagy méretének növekedése okozza.



**29. Ábra. Szuperrezolúciós képek és lakunaritás eltérés görbék Alexa 647 fluoreszkáló festékkel jelölt  $\gamma$ H2AX fehérjékről sugárdózis szerint csoportosított U2OS sejtek sejtmagjaiban.** Az egyes sejtek 30 perccel a fixálás előtt 0 Gray (a,d), 2 Gray (b,e) valamint 5 Gray (c,f) sugárdózisnak voltak kitéve. A méretskálák  $1 \mu\text{m}$  hosszúak. A vizsgált sejtek száma rendre 6, 7 és 9. Az egyes lakunaritás eltérés grafikonokon az egyes sejtek görbéi szürkével, a görbék átlaga pedig pirossal van feltüntetve. A szaggatott kék görbe a kezeletlen, kontrol csoport átlaga. [A4]

Az időbontott lakunaritás elemzést az 5 Gy sugárdózisnak kitett sejteken végeztem el, amiket 30 perccel, 24 órával és 72 órával a kezelés után fixáltak. Az egyes időcsoportok reprezentatív területeinek szuperrezolúciós képei a 30.a-c ábrákon láthatók. A 30.d-f ábrákon látható, hogy a lakunaritás eltérés görbe csúcsa a kettős szálú DNS törések kijavításával emelkedik, valamint a sejtmagok egyre jobban hasonlítanak a kontrollhoz. A nagyobb dobozméret felé elmozduló csúcsból, ahogy a heterogenitás növekszik, arra következtethetünk, hogy a fókuszok száma és mérete csökken, ahogy a törések kijavítása megtörténik. Azt látjuk, hogy míg a lakunaritás eltérés görbe csúcsa visszatér a kontrollmintán tapasztalthoz, addig a heterogenitás a besugárzás és a javítási folyamat után nagyobb lesz, mint a kontrollminta esetében. Ez azt jelenti, hogy a sejtmagok maradandó változásokon mentek keresztül.

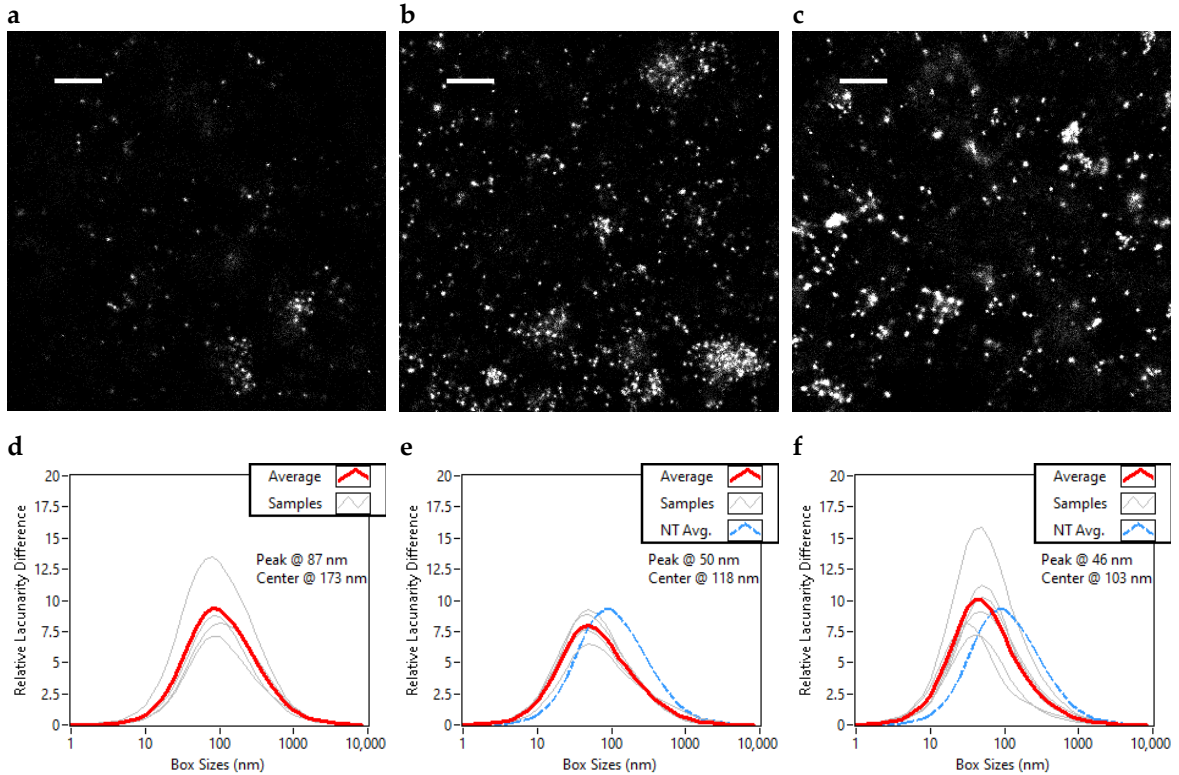
## 5. Új tudományos eredmények



**30. Ábra.** Szuperrezolúciós képek és lakunaritás eltérés görbék Alexa 647 fluoreszkáló festékkel jelölt  $\gamma$ H2AX fehérjékről sugárkezelés után eltelt idő szerint csoportosított U2OS sejtek sejtmagjaiban. Az egyes sejtek 5 Gray sugárdózisnak voltak kitéve és a kezelés után fél (a,d), 24 (b,e), valamint 72 (c,f) órával kerültek fixálásra. A méreetskálák  $1 \mu\text{m}$  hosszúak. A vizsgált sejtek száma rendre 9, 6 és 5. Az egyes lakunaritás eltérés grafikonokon az egyes sejtek görbéi szürkével, a görbék átlaga pedig pirossal van feltüntetve. A szaggatott kék görbe a kezeletlen, kontrol csoport átlaga. [A4]

A kémiaailag kezelt sejtcsoportok az U2OS kontroll, a neocarzinostatinnal (NCS) kezelt U2OS és a 4-hidroxitamoxifennel (4-OHT) kezelt DivA sejtekből álltak. Az egyes kezeléscsoportok reprezentatív területeinek szuperrezolúciós képei a 31.a-c ábrákon láthatók. Az NCS-nal kezelt U2OS sejteknél enyhe homogenizálódás volt megfigyelhető, de a kezeléseknél a legdominánsabb változás a lakunaritás eltérés görbe csúcsának eltolódása volt, amint az a 31.d-f ábrákon látható. A kontrollhoz képest mindkét kezelésben a heterogenitás csökkent a nagyobb dobozméreteknél, míg a kisebb dobozméreteknél növekedett, aminek következtében a csúcs jelentősen eltolódott a kisebb dobozméretek felé. Ez a jelenség azt jelzi, hogy a fókuszok száma és mérete nőtt, míg a nanofókuszok mérete vagy sűrűsége csökkent.





**31. Ábra. Szuperrezolúciós képek és lakunaritás eltérés görbék Alexa 647 fluoreszkáló festékkel jelölt  $\gamma$ H2AX fehérjékről DNS károsító kezelés szerint csoportosított U2OS és DiVa sejtek sejtmagjaiban.** Kezeletlen U2OS (a,b), NCS kezelt U2OS (c,d), valamint 4-OHT kezelt DiVa (e,f) sejtek. A méretskálák  $1 \mu\text{m}$  hosszúak. A vizsgált sejtek száma rendre 4, 5 és 6. Az egyes lakunaritás eltérés grafikonokon az egyes sejtek görbéi szürkével, a görbék átlaga pedig pirossal van feltüntetve. A szaggatott kék görbe a kezeletlen, kontrol U2OS csoport átlaga. [A4]

A korábbi DBSCAN segítségével kinyert eredmények és a biológus kollégákkal tartott konzultáció alapján kijelentem, hogy a lakunaritás analízissel kapott eredmények jó egyezést mutatnak a korábbi eredményekkel. A lakunaritás eltérés görbe alkalmas a minták heterogenitásának jellemzésére, a kapott eredményekből következtetni lehet a mintában végbemenő folyamatokra. Az eljárás sebességénél fogva (különösképpen, ha az 5.4-es fejezethez tartozó új tudományos eredményemet is figyelembe vesszük) a DBSCAN kiértékelésnél lényegesen nagyobb számú minta kiértékelésére alkalmas. Természetesen megvannak a technikának a hátrányai is. A kapott eredmények értelmezése összetettebb a DBSCAN adta eredményeknél.

## 5. Új tudományos eredmények

### 5.3.4. Tézispont

Kifejlesztettem egy lakunaritás alapú eljárást lokalizációs mikroszkópos felvételek geometriájának kvantitatív kiértékelésére. Bevezettem a lakunaritás eltérés görbét, ami normált lakunaritás értékek ábrázolásával hatékonyan képes megjeleníteni 2D és 3D struktúrák homogenitását különböző méretskálákon. TestSTORM szimulációs szoftverrel generált szintetikus adatsorok segítségével megmutattam hogyan lehet a lakunaritás eltérés görbék alapján következtetni különböző klasztereződési folyamatokra, valamint a klaszterek paramétereire (pl. klaszterméret, klaszterszám klasztersűrűség, stb.). Kettős szálú DNS törések javító fehérjéről készült dSTORM felvételeken bemutattam, hogy a lakunaritás eltérés görbékkel kapott eredmények egyezést mutatnak korábbi DBSCAN-es klaszteranalízises eredményekkel. Megmutattam, hogy a lakunaritás alapú kiértékelések ötször gyorsabban elvégezhetők, mint a DBSCAN.

Kapcsolódó publikáció(k): [\[A4\]](#)

### 5.4. Lakunaritászámító algoritmusok fejlesztése és összehasonlító elemzése

A lakunaritás pontos számítása az eredeti gliding-box algoritmust használva jelentős számításigénnyel bír. Az 5.3-as fejezetben leírt új tudományos eredményemben megmutattam, hogy a Bakes által bevezetett módszer képes akár 450-szer gyorsabban kiszámolni ugyanazokat a lakunaritás értékeket. A Bakes féle módszer mellett más gliding-box lakunaritászámító algoritmusok is léteznek, de ezek megtalálása nehézkes, mivel a lakunaritás nagyon széleskörben használt, így az oceanográfiától a csillagászaton át az orvostudományig más-más algoritmusokat használnak. Új, hatékony és sokoldalú algoritmusok fejlesztésére, valamint azok általánosítására, 3D adatsorok kiértékelésére, is jelentős az igény. Az egyes tudományterületeken alkalmazott lakunaritászámító algoritmusok összegyűjtése, pontos leírása és összehasonlítása fontos feladat.

A kutatás során feladatom volt a lakunaritászámító algoritmusokkal kapcsolatos irodalom mély áttekintése; a különböző algoritmusok összegyűjtése és általánosítása 3D adatsorok kiértékelésére; új algoritmusok fejlesztése és leírása; az így összegyűjtött algoritmusok reprodukálható összehasonlítása; az összehasonlítás alapján az egyes algoritmusok előnyeinek és hátrányainak meghatározása; a kapott eredmények alapján a publikáció megírása.

#### 5.4.1. Az irodalmi és újonnan fejlesztett algoritmusok leírása

A lakunaritás kiszámítása az eredeti gliding-box algoritmuson [\[69\]](#) alapuló bármely módszerrel három lépésre osztható. Az első lépésben kondicionálni kell a vizsgálandó adathalmazt úgy, hogy az

adott algoritmus hatékonyan tudjon futni. Ez a lépés egy adathalmaz esetén egyszer elvégzendő így számításigénye elhanyagolható a későbbi lépésekhez képest. A második lépésben meg kell határozni az adathalmazon végig sikló dobozok súlyát. Ezt minden egyes vizsgálni kívánt dobozméretnél el kell végezni, valamint a dobozok méretének és számának függvényében számos operáció szükséges az elvégzéséhez, így ez, a folyamat legszámításigényesebb lépése. A harmadik lépésben a meghatározott dobozsúlyokból ki kell számolni a lakunaritás értékét. Ezt a lépést is el kell végezni minden vizsgálni kívánt dobozméret esetén, azonban ez lényegesen kisebb számításigényű, mint a második lépés. Míg az első két lépés között erős a kapcsolat, addig a harmadik lépés leválasztható és külön kezelhető. A következőkben részletesen ismertetek öt különböző algoritmust, amelyek a lakunaritás kiszámításának első és második lépését képesek elvégezni, miközben összehasonlítom őket futásidő, memória igény és kód komplexitás szempontjaiból. Bemutatok továbbá egy optimalizált algoritmust a lakunaritás számítás harmadik lépésének elvégzésére. Az egyszerűség kedvéért a különböző algoritmusokat minden dimenzióban azonos méretű szürkeárnyalatos képek kiértékelésével hasonlítom össze. Egy szürkeárnyalatos képen objektum képpontnak tekintünk minden olyan képpontot, amelynek értéke nagyobb, mint nulla. Az algoritmusok egyértelmű tárgyalásának érdekében a következő jelöléseket vezetem be:

<b>4. Táblázat. Jelöléseket tartalmazó táblázat.</b>		
$N$	Az adott szürke árnyalatos teszt kép mérete minden dimenzióban.	Egy pozitív integer.
$\varepsilon$	A doboz mérete.	Egy pozitív integer, ami kisebb vagy egyenlő, mint a kép méret.
$B(\varepsilon)$	A dobozok száma $\varepsilon$ dobozméret esetén.	Egy pozitív integer.
$\Lambda(\varepsilon)$	Lakunariás értéke $\varepsilon$ dobozméret esetén.	Egy double-precision floating point szám.
$D$	A szürkeárnyalatos kép dimenziója.	Egy pozitív integer. Jelen esetben 2 vagy 3.
$S$	Az eredeti szürkeárnyalatos kép.	Egy $D$ dimenziós $N$ hosszúságú integerekből álló tömb.
$\hat{S}$	Az eredeti szürke árnyalatos kép gyors Fourier transzformáltja (FFT-je).	Egy $D$ dimenziós $N$ hosszúságú double-precision komplex floating-point számokból álló tömb.

## 5. Új tudományos eredmények

$E$	Egydimenziós $\varepsilon$ méretű konvolúciós kernel.	Egy egydimenziós $N$ hosszúságú double-precision floating-point számokból álló tömb.
$\hat{E}$	Az egydimenziós konvolúciós kernel FFT-je.	Egy egydimenziós $N$ hosszúságú double-precision komplex floating-point számokból álló tömb.
$M$	A dobozsúlyok.	Egy $D$ dimenziós $N-\varepsilon+1$ hosszúságú integerekből vagy double-precision floating-point számokból álló tömb.
$V$	A tárgypixelek értékei.	Egy egydimenziós integerekből álló tömb, melynek hossza a tárgypixelek száma.
$P_r$	Sor pozíciója az egyes tárgypixeleknek.	Egy egydimenziós integerekből álló tömb, melynek hossza a tárgypixelek száma.
$P_c$	Oszlop pozíciója az egyes tárgypixeleknek.	Egy egydimenziós integerekből álló tömb, melynek hossza a tárgypixelek száma.
$P_p$	Oldal pozíciója az egyes tárgypixeleknek.	Egy egydimenziós integerekből álló tömb, melynek hossza a tárgypixelek száma.
$I$	Kibővített integrál kép az eredeti szürkeárnyalatos képnek.	Egy $D$ dimenziós $N+1$ hosszúságú integerekből vagy double-precision floating-point számokból álló tömb.

A számítás harmadik lépését, amely a dobozok súlyából a lakunaritás értékek kiszámításáért felelős, eredetileg úgy végezték el, hogy minden egyes dobozméretre kiszámították a súlyok eloszlását. Bináris képek esetében ez egy elvégezhető, de memóriaigényes folyamat. Szürkeárnyalatos képek esetében a legnagyobb dobozsúly a bitmélységgel skálázódik, így hatalmas mértékben megnövelve mind a számítás, mind a memória igényt. Tolle bevezetett egy optimalizált algoritmust [94], amely 2D-s adathalmazok esetén a dobozsúlyokból közvetlenül kiszámítja a lakunitás értékét egy adott dobozméretnél (21. egyenlet).

$\Lambda(\varepsilon) = \frac{B(N, \varepsilon) \cdot \sum_{i,j=1}^{N-\varepsilon+1} (M(i, j))^2}{\left(\sum_{i,j=1}^{N-\varepsilon+1} M(i, j)\right)^2}$	21.
---	-----

Itt  $M(i, j)$  az  $i$ -edik sorban és  $j$ -edik oszlopban lévő doboz súlyát jelenti,  $B(N, \varepsilon)$  az  $\varepsilon$  méretű dobozok száma egy  $N \times N$ -es képen, ami  $B(N, \varepsilon) = (N - \varepsilon + 1)^2$ . 3D-s adathalmazok esetén az egyenlet a következőképpen írható fel:

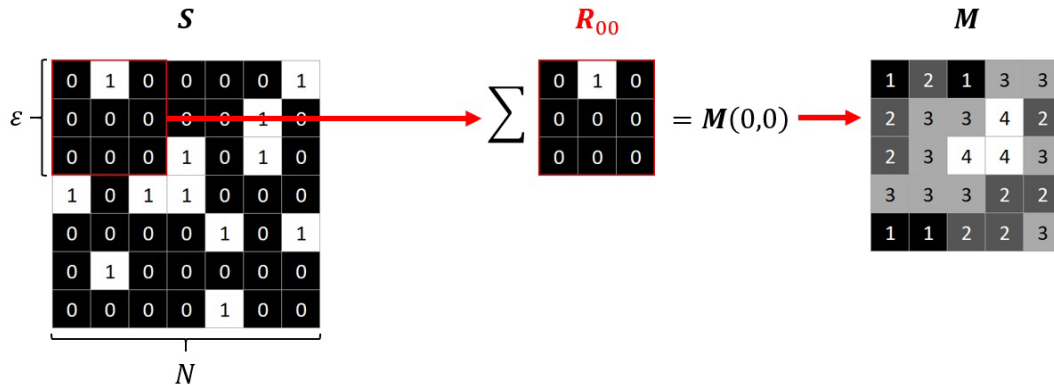
$\Lambda(\varepsilon) = \frac{B(N, \varepsilon) \cdot \sum_{i,j,k=1}^{N-\varepsilon+1} (M(i, j, k))^2}{\left(\sum_{i,j,k=1}^{N-\varepsilon+1} M(i, j, k)\right)^2},$	22.
--	-----

ahol  $M(i, j, k)$  a doboz súlyát jelenti az  $i$ -edik sorban és  $j$ -edik oszlopban, valamint a  $k$ -adikban a harmadik dimenzióban, amelyet oldalnak fogok nevezni;  $B(N, \varepsilon)$  az  $\varepsilon$  méretű dobozok száma egy  $N \times N \times N$ -es képen, amely  $B(N, \varepsilon) = (N - \varepsilon + 1)^3$ .

Az első módszer az eredeti gliding-box módszer. Ezt a módszert Alain és Cloitre [69] vezette be. Az adatkondicionálás abból áll, hogy a szürkeárnyaltos képet olyan adattípussá alakítják át, amely képes nagyszámú elem összeadására túlcsoordulás nélkül. A dobozsúlyok kiszámításához az egyes dobozokban lévő összes elemet összeadják.

Ezzel a módszer 2D képek esetén az egyes dobozok súlyának kiszámítási folyamata a 32. ábrán látható. A dobozok száma  $(N - \varepsilon + 1)^2$  és az egyes dobozokban  $\varepsilon^2$  pixel helyezkedik el. Ez azt jelenti, hogy a módszer számításigénye:

$O_{Original\ 2D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^2 \cdot \varepsilon^2$	23.
---	-----



**32. Ábra. Az eredeti gliding-box módszert szemléltető ábra.** Az eljárás bemutatását egy  $N = 7$  pixel méretű képen  $\varepsilon = 3$  pixel méretű doboz siklásán részletezem. Az eredeti képen ( $S$ ) minden lehetséges 3-szor 3-as régióban ( $R_{ij}$ ) összeadjuk a pixelek értékét, minek eredményekén megkapjuk a dobozsúlyokat ( $M$ ). [A5]

## 5. Új tudományos eredmények

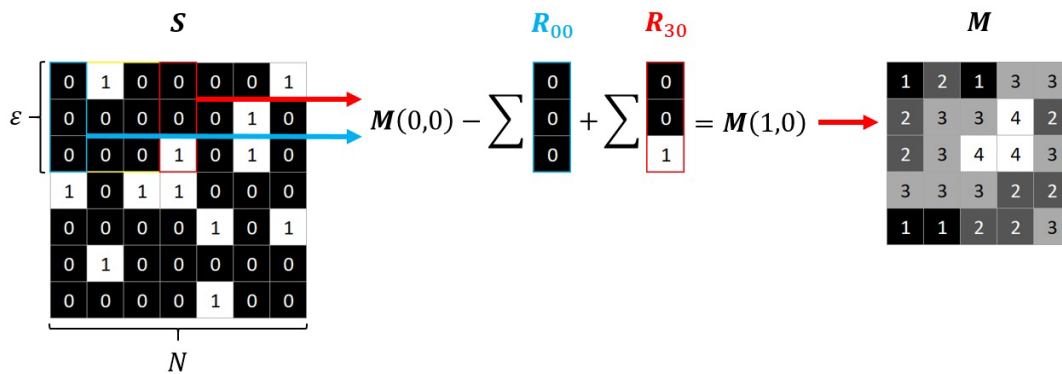
Az eredeti gliding-box módszert alkalmazva 3D-s képek esetében a dobozok száma  $(N - \varepsilon + 1)^3$ , és minden dobozban  $\varepsilon^3$  pixel van. Ez azt jelenti, hogy a számításigény:

$O_{Original\ 3D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^3 \cdot \varepsilon^3$	24.
---	-----

Az algoritmust, amelyre sides gliding-box módszerként hivatkozok, Backes vezette be [95]. A dobozok súlyának kiszámítása az egymással szomszédos dobozok átfedésének kihasználásával hatékonyabbá tehető. Az adatkondicionálás a szürkeárnyaltos kép olyan adattípussá alakításából áll, amely képes nagyszámú elem összeadására túlcsondulás nélkül.

A sides gliding-box algoritmus 2D-s változatában egy már kiszámított doboz melletti doboz súlyának kiszámításához csak azokat az éleket kell megvizsgálni, amelyek nem fedik egymást. Ezt a 33. ábra mutatja. Ezzel a módszerrel az eredeti gliding-box módszerhez képest átlagosan  $2\varepsilon$  elemet kell összeadni minden egyes dobozban  $\varepsilon^2$  helyett, így a számításigény összesen:

$O_{Side\ 2D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^2 \cdot 2 \cdot \varepsilon$	25.
---	-----



**33. Ábra. A sides gliding-box módszert szemléltető ábra.** Az eljárás bemutatását egy  $N = 7$  pixel méretű képen  $\varepsilon = 3$  pixel méretű doboz siklásán részletezem. Az eredeti képről ( $S$ ) a dobozsúlyok ( $M$ ) iteratíván vannak kiszámolva a megfelelő 3-szor 1-es doboz élek ( $R_{ij}$ ) az előző doboz értékéből történő levonásával és hozzáadásával. [A5]

A sides gliding-box algoritmus 3D-s változatában egy már kiszámított doboz szomszédos doboz súlyának kiszámításához csak a nem átfedő lapokat kell megvizsgálni. Ez azt jelenti, hogy az eredeti gliding-box módszerhez képest átlagosan csak  $2\varepsilon^2$  elemet kell összeadni minden egyes dobozban  $\varepsilon^3$  helyett, így a számításigény:

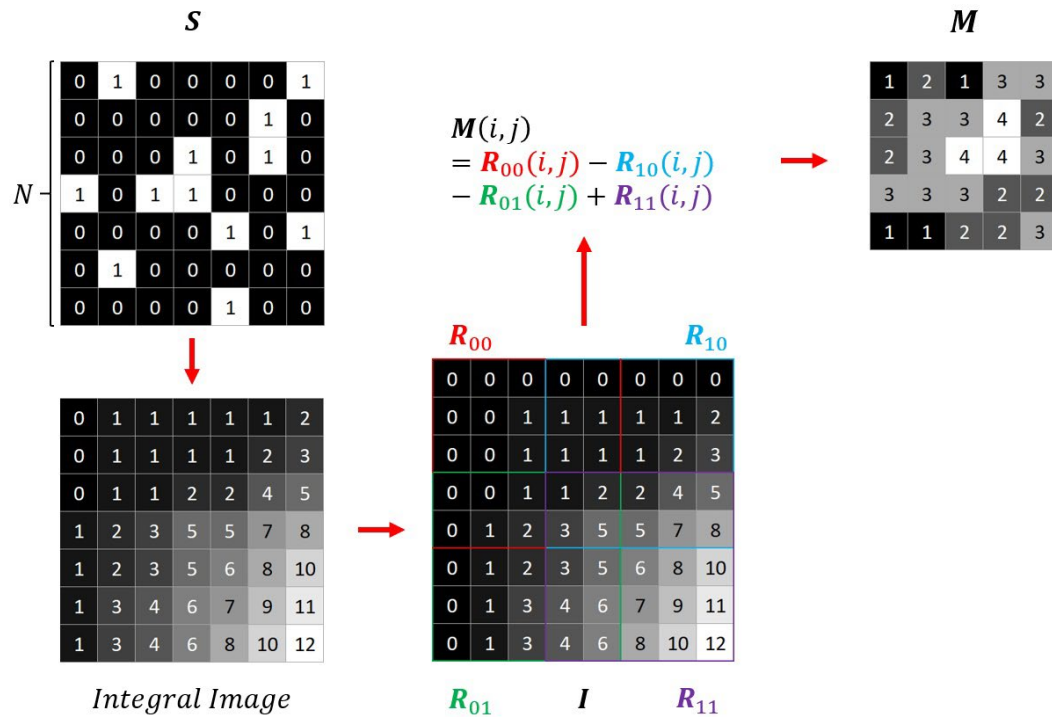
$O_{Side\ 3D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^3 \cdot 2 \cdot \varepsilon^2$	26.
---	-----

Az algoritmust, amelyet integrál gliding-box módszernek nevezek, először Williams mutatta be a lakunaritás kiszámítására [98]. Ez a módszer optimalizálja az eredeti algoritmust, speciális adatstruktúrát, úgynevezett integrál képet használva, amely lehetővé teszi a téglalap alakú dobozokban található pixelek összegének gyors kiszámítását [99]. Az adatkondicionálás a szürkeárnyaltos kép nagy számok kezelésére alkalmas adattípussá történő átalakításából és az integrálkép létrehozásából áll.

Az integrál algoritmus 2D-s képeken való alkalmazása során az eredeti szürkeárnyaltos képből egy integrálkép előállítására a következő módon történik. Az integrálkép minden egyes  $(i, j)$  helyén a pixel értéke megegyezik az eredeti szürkeárnyaltos képen az  $i$ -nél kisebb egyenlő sor indexű és  $j$ -nél kisebb egyenlő oszlop indexű ( $\leq i, \leq j$ ) összes pixelérték összegével. A dobozsúlyok kiszámítása némileg egyszerűbbé tehető, ha az integrálképet úgy bővítjük, hogy minden értéket eggyel magasabb sor- és oszlophelyzetbe tolunk, azaz bevezetünk egy új, csak nullákból álló első sort és oszlopot. Ezen az új, kibővített integrálképen az összes doboz súlyát úgy lehet kiszámítani, hogy a kibővített integrálkép négy sarkából négy  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$ -es tömböt veszünk. A főátló sarkaiból származó két tömböt elemenként összeadjuk, és a 34. ábrán látható mellékátló sarkaiból származó tömböket pedig elemenként kivonjuk. A számításigény ebben az esetben:

$O_{Integral\ 2D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^2 \cdot 4$	27.
---	-----

## 5. Új tudományos eredmények



**34. Ábra. Az integrál gliding-box módszert szemléltető ábra.** Az eljárás bemutatását egy  $N = 7$  pixel méretű képen  $\varepsilon = 3$  pixel méretű doboz siklásán részletezem. Az eredeti képből ( $S$ ) egy integrál kép készül úgy, hogy az integrál kép minden pixel értéke az eredeti képen attól a pixeltől balra és felfele lévő pixelértékek összege (beleértve a vizsgált pixelt is). Az így kapott integrál képet kiegészítem egy csupa nulla első sorral és oszloppal, megkapva a kibővített integrál képet ( $I$ ). A dobozsúlyokat ( $M$ ) a kibővített integrál kép négy sarkából származó tömbök ( $R_{ab}$ ) megfelelő előjellel vett összege adja. [A5]

Az integrál módszer 3D-s változatánál az integrálkép előállítását az eredeti szürkeárnyaltos képből a következő módon történik. Az integrálkép minden egyes  $(i, j, k)$  helyén az érték megfelel az összes olyan pixelérték összegének, amik az eredeti szürkeárnyaltos képen kisebb egyenlő sor indexszel, kisebb egyenlő oszlop indexszel és kisebb egyenlő oldal indexszel bírnak mint rendre  $i, j$  és  $k$ . A dobozsúlyok számítását itt is némileg egyszerűbbé teszi, ha az integrálképet kibővítjük úgy, hogy az összes értéket eggyel magasabb sor-, oszlop- és oldalpozícióba toljuk, azaz bevezetünk egy új, csak nullákból álló első sort, oszlopot és oldalt. Ezen az új, kibővített integrálképen az összes dobozsúlyt úgy lehet kiszámítani, hogy a kibővített integrálkép nyolc sarkából nyolc  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$ -es tömböt veszünk, és azokat megfelelő előjelekkel összeadjuk. Az egyes tömbök előjele a következő azonosság segítségével szemléltethető:



$(x - 1)^3 = x^3 - 3x^2 + 3x - 1$ ,	28.
-------------------------------------	-----

ahol az 1 jelképezi a negatív előjelű  $(0, 0, 0)$  elemet tartalmazó sarkból származó tömböt. A  $3x$  az  $(N + 1, 0, 0)$ , a  $(0, N + 1, 0)$  és a  $(0, 0, N + 1)$  elemet tartalmazó három sarkot jelképezi. Ezek a sarkok a  $(0, 0, 0)$  elemet tartalmazó sarokkal szomszédosak és pozitív előjelűek. A  $3x^2$  a  $(0, N + 1, N + 1, N + 1)$ , az  $(N + 1, 0, N + 1)$  és az  $(N + 1, N + 1, 0)$  elemeket tartalmazó három sarkot jelöli. Ezek a sarkok negatív előjelűek. Végül az  $x^3$  az  $(N + 1, N + 1, N + 1)$  elemet tartalmazó pozitív előjelű saroknak felel meg. Ez az analógia magasabb dimenziókra is alkalmazható. A számításigény a következő:

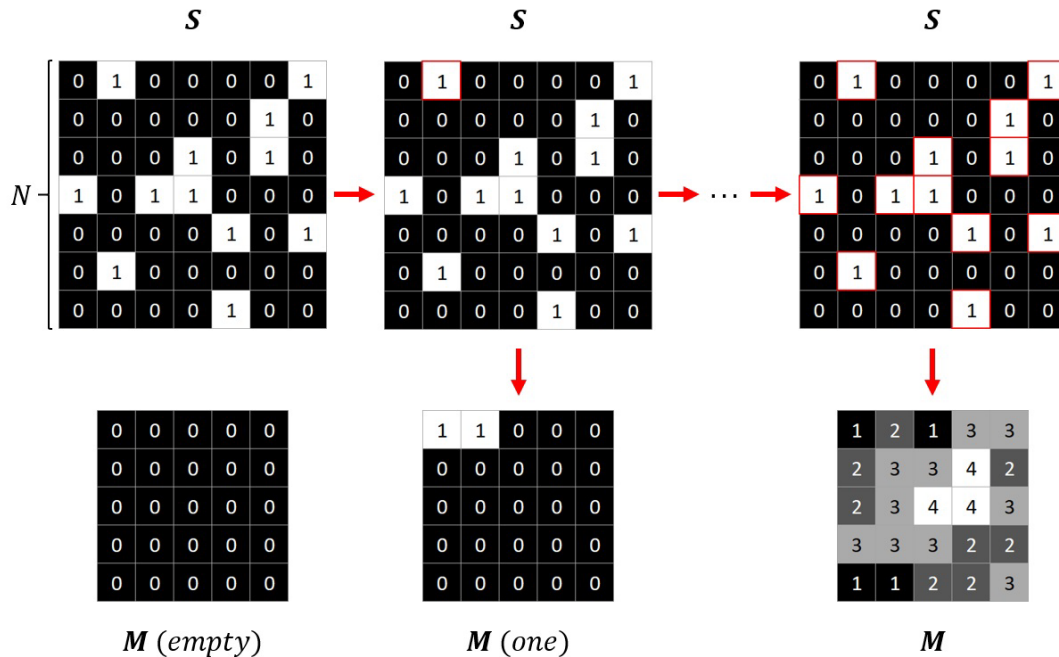
$O_{Integral\ 3D}(N, \varepsilon) \sim (N - \varepsilon + 1)^3 \cdot 8$	29.
---	-----

Az általam kidolgozott első algoritmust trace gliding-box módszernek neveztem el. Ez az algoritmus visszafelé haladva optimalizálja az eredeti módszert. A dobozokban lévő elemek megszámlálása helyett egy adott tárgypixel tartalmazó dobozok értékét növeli annak a tárgypixelnek az értékével. Az adatkondicionálás egy üres dobozsúly tömb létrehozását és a tárgypixel indexeinek és értékeinek összegyűjtését jelenti.

A 2D-s trace módszer esetében az összes tárgypixel értékét  $V$ , valamint sor- és oszlopindexeit kell összegyűjteni  $P_r, P_c$ . A dobozsúlyok kiszámítása úgy történik, hogy létrehozunk egy olyan tömböt, amelynek mérete a dobozsúlyokat tartalmazó tömb méretével egyezik  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$  és minden eleme nulla. Ez után az adott tárgypixel tartalmazó dobozok értékét megnöveljük az adott tárgypixel értékével a 35. ábrán látható módon. Miután ezt minden egyes tárgypixelre elvégeztük, megkapjuk a dobozsúlyokat. Ha a tárgypixellek száma  $C$ , a művelet számításigénye:

$O_{Trace\ 2D}(N, \varepsilon) \sim C \cdot \varepsilon^2$	30.
--	-----

## 5. Új tudományos eredmények



**35. Ábra. A trace gliding-box módszert szemléltető ábra.** Az eljárás bemutatását egy  $N = 7$  pixel méretű képen  $\varepsilon = 3$  pixel méretű doboz siklásán részletezem. Egy üres, a dobozsúlyokat tartalmazó tömb méreteivel bíró tömbben, az összes olyan doboz súlyát megnövelem egy, az eredeti képről ( $S$ ) származó tárgypixel értékével, amely dobozokban ez a tárgypixel benne van. Ezt minden egyes tárgypixelre elvégezve adódik a dobozsúlyokat tartalmazó tömb ( $M$ ). [A5]

A 3D-s trace gliding-box algoritmushoz összegyűjtjük az összes tárgypixel értékét  $V$ , valamint a sor-, oszlop- és oldalindexeiket  $P_r$ ,  $P_c$  és  $P_p$ . A dobozsúlyok kiszámítása úgy történik, hogy létrehozunk egy olyan tömböt, amelynek mérete a dobozsúlyokat tartalmazó tömb méreteivel egyezik meg  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$  és minden eleme nulla. Ez után az adott tárgypixelt tartalmazó dobozok értékét megnöveljük az eredeti szürkeárnyaltos képen lévő pixel értékével. Miután ezt minden egyes tárgypixelre elvégeztük, megkapjuk a dobozok súlyát. Ha a tárgypixelek száma  $C$ , akkor ez a következő műveleti költséget eredményezi:

$O_{Trace\ 3D}(N, \varepsilon) \sim C \cdot \varepsilon^3$	31.
--	-----

A második általam fejlesztett algoritmust konvolúciós gliding-box módszernek neveztem el. Alapja a konvolúciós tétel, amely kimondja, hogy két függvény konvolúciója egyenlő a két függvény Fourier-transzformációjának pontonkénti szorzatának inverz Fourier-transzformációjával. Ennél a

módszernél az adatkondicionálás az eredeti szürkeárnyaltos kép Fourier-transzformáltjának előállítását jelenti.

A 2D konvolúciós módszerhez az eredeti szürkeárnyaltos kép 2D Fourier-transzformáltját hozzuk létre  $\hat{S}$ . A dobozsúlyok kiszámításához létre kell hoznunk egy a dobozméret paramétereivel bíró kernelt, amellyel a konvolúciót végezzük. Kihhasználva azt a tényt, hogy a kép mérete mindkét dimenzióban egyenlő, az  $E$  kernelt egy  $N$  hosszúságú egydimenziós tömbként definiáljuk, amelynek első  $\varepsilon$  darab eleme egy, a többi pedig nulla. A kernel 1D Fourier-transzformáltja  $\hat{E}$ . Ezután, hogy megkapjuk a komplex dobozsúlyok Fourier-transzformáltját, összeszorozzuk a megfelelő elemeket

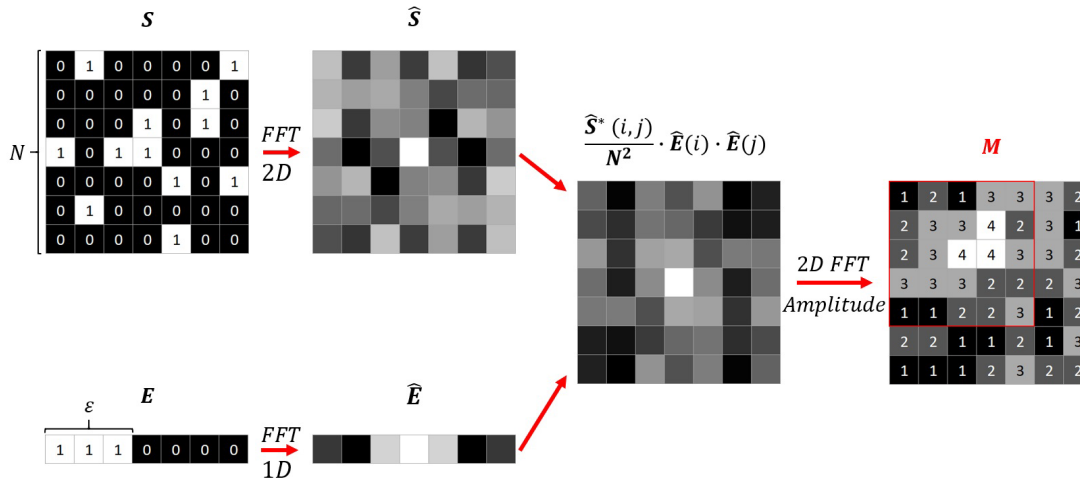
$\hat{M}_c(i, j) = \hat{S}(i, j) \cdot \hat{E}(i) \cdot \hat{E}(j) ,$	32.
---	-----

ahol  $\hat{M}_c(i, j)$  az  $i$ -edik sorban és  $j$ -edik oszlopban lévő elem a komplex dobozsúlyok Fourier-transzformáltjának tömbjében. Ezután az  $M_c$  komplex dobozsúlyok kiszámításához az  $\hat{M}_c$  2D inverz Fourier-transzformáltját vesszük. Az utolsó lépésben kiszámítjuk a komplex dobozsúlyok amplitúdóit, hogy megkapjuk a tényleges dobozsúlyokat  $M$ . Fontos megjegyezni, hogy ebben a módszerben az  $M$ ,  $M_c$  és  $\hat{M}_c$  mind  $N \times N$ -es tömbök, így ki kell vágnunk ennek a tömbnek az első  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$ -es részét, hogy megkapjuk a dobozsúlyokat. Ez a folyamat a 36. ábrán látható. Ennek a gyors Fourier-transzformációt alkalmazó módszernek a számításigénye:

$O_{Fourier\ 2D}(N, \varepsilon) \sim 4 \cdot N^2 \cdot \log_2 N + 7 \cdot N^2 + N \cdot \log_2 N$	33.
--	-----

Az FFT számításigényét Cochran mutatta ki [100]. Az általam leírt módszer számításigényének három része sorrendben a kép 2D FFT-je, a komplex szorzás, valamint az amplitúdószámítás és a kernel 1D FFT-je.

## 5. Új tudományos eredmények



**36. Ábra. A konvolúciós gliding-box módszert szemléltető ábra.** Az eljárás bemutatását egy  $N = 7$  pixel méretű képen  $\varepsilon = 3$  pixel méretű doboz siklásán részletezem. Az eredeti szürkeárnyaltos kép ( $S$ ) és a dobozméret paramétereivel bíró kernel ( $E$ ) Fourier transzformáltjait kiszámítom ( $\hat{S}$  és  $\hat{E}$ ). Ezeket összeszorozom az ábrán látható formula szerint, ahol a csillag a komplex konjugálást jelenti. Az így elvégzett szorzás eredményét Fourier transzformálok és kiszámolom az amplitúdókat. Az így kapott tömb bal felső sarkában foglalnak helyet a dobozsúlyok ( $M$ ). [A5]

A konvolúciós módszer 3D-s változatában az adatok kondicionálása az eredeti szürkeárnyaltos kép 3D Fourier-transzformáltjának előállítását jelenti. A dobozsúlyok kiszámításához létre kell hoznunk egy kernelt a dobozméret paramétereivel, amellyel a konvolúciót elvégezzük. Kihhasználva azt a tényt, hogy a kép mérete mindkét dimenzióban egyenlő, az  $E$  kernelt egy  $N$  hosszúságú egydimenziós tömbként definiáljuk, amelynek első  $\varepsilon$  darab eleme egy, a többi pedig nulla. A kernel 1D Fourier-transzformáltja  $\hat{E}$ . Ezután, hogy megkapjuk a komplex dobozsúlyok Fourier-transzformáltját, összeszorozzuk a megfelelő elemeket

$$\hat{M}_c(i, j, k) = \hat{S}(i, j, k) \cdot \hat{E}(i) \cdot \hat{E}(j) \cdot \hat{E}(k) , \quad 34.$$

ahol  $\hat{M}_c(i, j, k)$  az  $i$ -edik sor,  $j$ -edik oszlop és  $k$ -edik oldalán lévő elem a komplex dobozsúlyok Fourier-transzformáltjának tömbjében. Ezután az  $M_c$  komplex dobozsúlyok kiszámításához az  $\hat{M}_c$  3D inverz Fourier-transzformációját vesszük. Az utolsó lépésben kiszámítjuk a komplex dobozsúlyok amplitúdóit, hogy megkapjuk a tényleges dobozsúlyokat  $M$ . Fontos megjegyezni, hogy ebben a módszerben az  $M$ ,  $M_c$  és  $\hat{M}_c$  mind  $N \times N \times N$ -es tömbök, így a dobozsúlyok megszerzéséhez ki kell vágnunk ennek a tömbnek az első  $(N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1) \times (N - \varepsilon + 1)$ -es részét.

Ennek a gyors Fourier-transzformációt alkalmazó módszernek a műveleti költsége:

$O_{\text{Fourier } 3D}(N, \varepsilon) \sim 6 \cdot N^3 \cdot \log_2 N + 9 \cdot N^3 + N \cdot \log_2 N$	35.
---	-----

A műveleti költség három része sorrendben a kép 3D FFT-je, a komplex szorzás, valamint az amplitúdószámítás és a kernel 1D FFT-je.

#### 5.4.2. Teszt adatsor és rendszer

Az öt leírt módszer teljesítményének összehasonlításához az algoritmusokat LabView-ban implementáltam. A kódokat úgy írtam meg, hogy csak egyetlen szálát használjanak. Különböző méretű tesztfájlokat készítettem, hogy megvizsgáljam az egyes algoritmusok viselkedésének függését a dobozmérettől ( $\varepsilon$ ) és a képmérettől ( $N$ ), kettő és három dimenzióban is. Az egyetlen képtextúrától függő módszer, amelyet leírtam, a trace módszer volt. Ahhoz, hogy következetesen össze tudjuk hasonlítani a többivel, olyan bináris képeket választottam tesztfájlnak, amelyeknél a pixelértékek 25%-a 1, 75%-a pedig 0 volt. Ez azt jelenti, hogy a tárgypixelek száma ( $C$ )  $N^2/4$ . A tesztparamétereket az 5. táblázat tartalmazza.

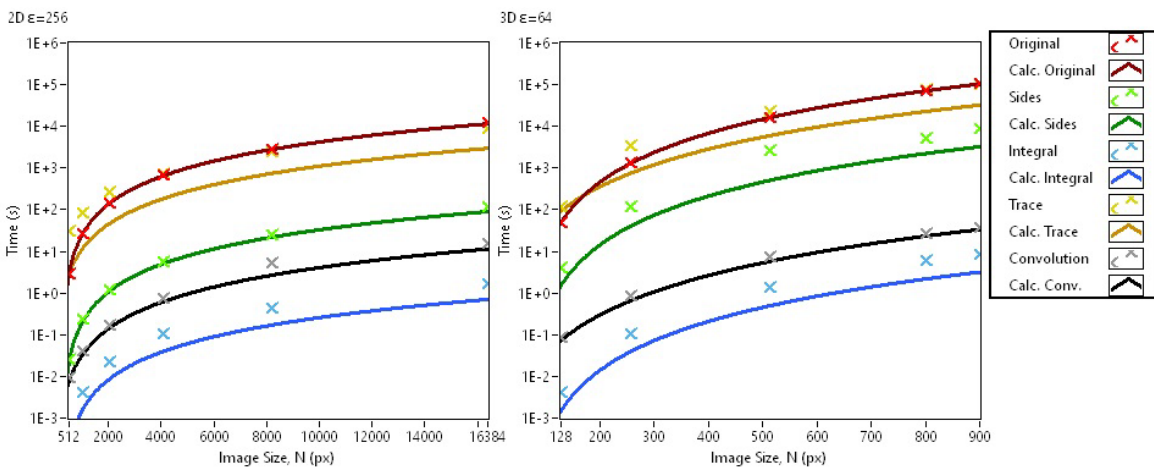
<b>5. Táblázat. Teszt paraméterek.</b>			
Vizsgált képméretek:		Vizsgált dobozméretek:	
2D	3D	2D	3D
$N$ (px):	$N$ (px):	$\varepsilon$ (px):	$\varepsilon$ (px):
512	128	2	2
1024	256	4	4
2048	512	8	8
4096	800	16	16
8192	900	32	32
16 384		64	64
		128	128
		256	256
		512	512
		1024	
		2048	
		4096	
		8192	

## 5. Új tudományos eredmények

Az operációs rendszer és más programok által bevezetett hibák kiküszöbölésének érdekében minden tesztet háromszor futtattam le. A három futtatás közül a leggyorsabbat választottam ki, mint reprezentatív érték. Minden olyan tesztet, amely több mint 30 percig tartott volna, leállítottam, és a teljes futás időt a kiszámított dobozméretek alapján extrapoláltam. A tesztrendszer a hardvereket tartalmazó fejezetből az „PC 2” kódnevű 8 magos AMD Ryzen 7 5800X3D alapú rendszer volt. A futási idők mérése mellett minden egyes méréshez készítettem egy elméleti becslést a számításigények alapján. Ezt úgy végeztem el, hogy kiszámoltam egyetlen művelet mennyi időt vesz igénybe. A becsléshez egy darab double-precision floating point összeadáshoz szükséges órajelciklusok számát (3) elosztottam a processzor működési frekvenciájával (4450 MHz). Ez azt eredményezi, hogy egy összeadás  $6,74 \cdot 10^{-10}$  másodpercet vesz igénybe. Bár nem minden művelet összeadás, ezek a számítások megmutatják, hogy a kódok mennyire (nem) optimálisak.

### 5.4.3. Módszerek összehasonlítása

A számított és mért futási idők a képméret függvényében mind az öt algoritmus esetében, mind a 2D-s, mind a 3D-s képek esetében a 37. ábrán láthatók.

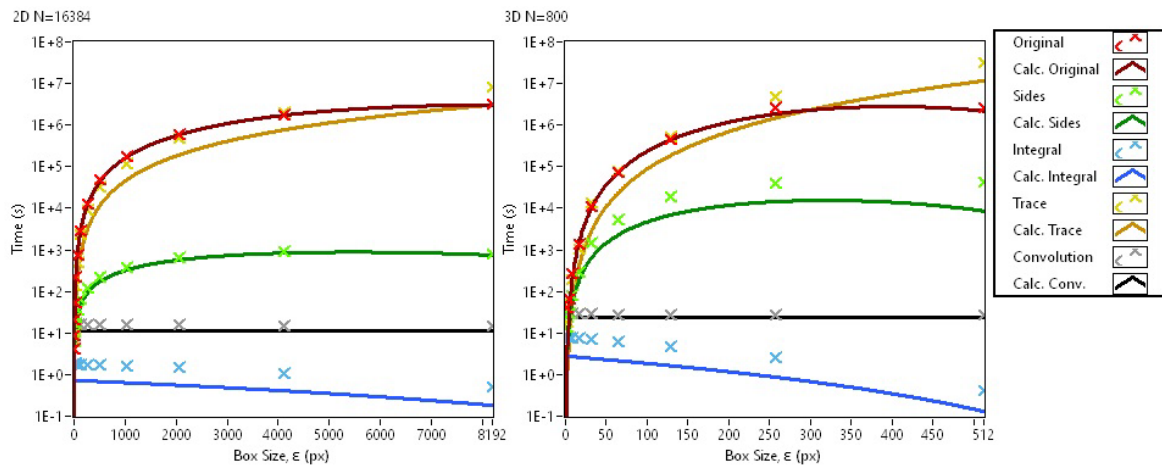


**37. Ábra. Lakunaritásszámító algoritmusok futás idejének képméret függése.** Mért és becslött futás idők az eredeti gliding-box (piros, vörös), a sides gliding-box (zöld, sötét zöld), az integrál gliding-box (világos kék, sötét kék), a trace gliding-box (sárga, narancs) és a konvolúciós gliding-box (szürke, fekete) algoritmus esetén különböző méretű képeket vizsgálva. 2D esetben 256 pixeles dobozméretnél és 3D esetben 64 pixeles dobozméret esetén. [A5]

A számított és a mért futási idők mind az öt esetben hasonló görbét követnek. A becslések és a mérések közötti különbségek leginkább a kódok optimalizálatlanságából és a memória kezelés hiányosságából adódnak. A memória tekintetében azonban a processzor 96 MB-os L3 gyorsítótára

jelentősen hozzájárul a mért és számolt értékek közelségéhez. A legnagyobb különbséget az integrál módszer mutatta, ahol a mért futási idő körülbelül háromszorosa volt a számított futási időnek. Mind az öt módszer hasonlóan skálázódik a képmérettel. A trace gliding-box módszer esetében a skálázódást az okozza, hogy a tesztképeken a tárgypixelek száma arányos a képek méretével. A sebességet tekintve az integrál módszer felülmúlta riválisait; a konvolúciós és a sides gliding-box módszer a második, illetve a harmadik helyen végzett. Ez a három technika nagyságrendekkel gyorsabb volt az eredeti módszernél. A trace-módszer nem nyújtott jobb eredményt az eredetinel.

A számított és mért futási idők a dobozméret függvényében mind az öt algoritmus esetében, mind a 2D-s, mind a 3D-s képek esetében a 38. ábrán láthatók.



**38. Ábra. Lakunaritásszámító algoritmusok futás idejének dobozméret függése.** Mért és becsült futás idők az eredeti gliding-box (piros, vörös), a sides gliding-box (zöld, sötét zöld), az integrál gliding-box (világos kék, sötét kék), a trace gliding-box (sárga, narancs) és a konvolúciós gliding-box (szürke, fekete) algoritmus esetén különböző dobozméreteket vizsgálva. 2D esetben 16384 pixeles képméretnél és 3D esetben 800 pixeles képméret esetén. [A5]

A számított és a mért eredmények jó egyezést mutatnak a különböző dobozméretek esetében is. A különbségek is hasonlóak, mivel a kód és a memória teljesítményéből adódnak. A képméretek összehasonlításával ellentétben a dobozméretek összehasonlításánál a módszerek a skálázás szempontjából három csoportba sorolhatók. Az első csoportba a pozitívan skálázódó módszerek tartoznak, amelyekben a futási idő a dobozmérettel együtt nő. Ezen módszerek közül a trace-módszer monoton növekvő, és nagyobb dobozméretek esetén mindig magasabb futási idővel rendelkezik. Az eredeti módszer maximuma a képméret felénél van, míg a sides módszer maximuma a képméret egyharmadánál van 2D képek esetén, kétötödénél 3D képek esetén. Ez a két módszer

## 5. Új tudományos eredmények

az előbb említett maximum futásidőig egyre lassul, majd elkezdnek egyre gyorsabban futni, ahogy tovább növekszik a dobozméret. Az eredeti módszer estén szimmetrikusan, a sides módszer esetében pedig aszimmetrikusan. A második csoport az állandó módszereket tartalmazza, amelyek futás ideje minden dobozméret esetén azonos. Jelen esetben csak a konvolúciós módszer tartozik ide. A harmadik csoportba a negatív skálázódású módszerek tartoznak, amelyek nagyobb dobozméreteknél gyorsabbá válnak. Vizsgálatomban az egyetlen ilyen módszer az integrál módszer.

A 6. táblázat a LabView teljesítmény- és memóriaprofilozó eszköze által az egyes algoritmusok futása alatt jelentett maximális egyidejű memóriahasználatot és blokkszámot mutatja egy 16 384-szer 16 384-es méretű 2D-s kép esetében 16-os dobozméret mellett, valamint egy 800-szor, 800-szor 800-as méretű 3D-s kép esetében 8-as dobozméret mellett.

	2D kép $N: 16\ 384$ , $\varepsilon: 16$		3D kép $N: 800$ , $\varepsilon: 8$	
	Memória (MB)	Blokkok	Memória (MB)	Blokkok
Eredeti	5 130	30	9627	52
Sides	5131	31	9632	58
Integrál	11 574	48	13 753	56
Trace	8352	32 809	16 797	4882
Konvolúciós	18 016	51	26 016	75

A legnagyobb memóriafoglalást a konvolúciós módszer esetében tapasztaltam, ami a double-precision komplex floating point számok használatának köszönhető. A trace és az integrál módszer nagyobb memóriahasználatot mutatott, mint az eredeti módszer. A sides módszer memóriahasználata hasonló volt az eredeti módszeréhez.



Az általam bevezetett, illetve az irodalomban tárgyalt lakunaritásszámító algoritmusok előnyeit és hátrányait a 7. táblázat foglalja össze.

<b>7. Táblázat. Az egyes algoritmusok erősségeinek és gyengeségeinek összefoglalása.</b>					
<u>Kategória</u>	<u>Eredti</u>	<u>Sides</u>	<u>Integrál</u>	<u>Trace</u>	<u>Konvolúciós</u>
Komplexitás:	<i>Alacsony</i>	<i>Magas</i>	<i>Közepes</i>	<i>Alacsony</i>	<i>Medium</i>
Futásidő:	<i>Hosszú</i>	<i>Közepes</i>	<i>Rövid</i>	<i>Változó*</i>	<i>Rövid</i>
Memória:	<i>Alacsony</i>	<i>Alacsony</i>	<i>Közepes</i>	<i>Közepes</i>	<i>Magas</i>
Flexibilitás:			<i>Csak téglalap alakú doboz.</i>	<i>Képkitöltés függő futásidő.</i>	<i>Bármilyen doboz forma egyszerűen.</i>

Ezek alapján a legtöbb esetben az integrál módszer adja a legjobb eredményeket. Nem téglalap alakú struktúrák esetén a konvolúciós módszer a leggyorsabb nagy memória igény mellett. A trace módszer alacsony kitöltésű minták és kis dobozméretek esetén képes versenybe szállni a konvolúciós és az integrál módszer sebességével, azonban más esetekben rossz teljesítményt nyújt. A sides módszer kevés memóriával rendelkező számítógépek esetén optimális.

#### **5.4.4. Tézispont**

Kifejlesztettem egy a konvolúciós tételre és egy az eredeti módszer megfordítására épülő új lakunaritásszámító algoritmust, melyek képesek gliding-box lakunaritás értékeket nagyságrendekkel gyorsabban kiszámolni, mint az eredeti gliding-box algoritmus. Az új algoritmusokat 2D és 3D adatsorok kiértékelésére is implementáltam. Az eredeti gliding-box valamint két darab optimalizált 2D algoritmust tovább fejlesztettem 3D adatsorok kiértékelésére. Ezen három irodalomból ismert algoritmust és a két új általam bevezetett algoritmust összehasonlítottam 2D és 3D szintetikus adatsorok kiértékelésével futás idő, memória igény és kód komplexitás szempontjából. Megmutattam az egyes algoritmusok előnyeit és hátrányait, valamint adott mintákhoz és hardver konfigurációkhoz meghatároztam az optimális lakunaritásszámító algoritmust.

Kapcsolódó publikáció(k): [\[A5\]](#)

## 6. Összefoglaló

### 6.1. Bevezetés

Az emberi szem feloldásánál kisebb struktúrák vizsgálatát és megértését a mikroszkópok és a fejlesztésükkel foglalkozó mikroszkópia tudományága teszi lehetővé. A mikrovilág struktúráinak felnagyítását leggyakrabban optikai mikroszkópokkal valósítják meg, amik az emberi szem számára is látható fényt alkalmaznak. A fény hullámtermészetéből fakadóan a legkisebb feloldható struktúra méretét a diffrakció limitálja. Egy nagy numerikus apertúrával bíró, látható tartományon működő rendszer esetén ez tipikusan  $250\text{ nm}$ . További lehetőségek a feloldás javítására a hullámhossz csökkentése, vagy részecskék használata. Ezek a módszerek, azonban magával vonják az optikai rendszer teljes átépítését. Amennyiben egy látható fényre optimalizált optikai rendszerrel akarunk nagyobb feloldást elérni más megoldásra van szükség. Ezt a problémát kezelő, illetve megoldó technikák összefoglaló neve az optikai szuperrezolúció. A különböző szuperrezolúciós technikák lehetővé teszik a feloldás növelését látható fény alkalmazása mellett. Ezen technikák közül az úgynevezett egymolekula lokalizációs technika (SMLM) biztosítja a legjobb feloldást ( $20\text{ nm}$ ). Ez a feloldás lehetővé teszi sejteken belüli organelumok és biológiai folyamatok megfigyelését, így a technika nagy népszerűségnek örvend a biológia és az orvostudomány területén. A lokalizációs technikák egyes alcsoportjai akár élő sejteken is alkalmazhatók. Természetesen, mint minden technikának, a lokalizációs mikroszkópiának is megvannak a hátrányai. A kiértékelt lokalizációs mérési adatok pontthalmazok, melynek következtében az eredmények összevetése korábbi, képekből álló, eredményekkel nehézkes. Ennek orvoslására olyan algoritmusokat és eljárásokat dolgoztak ki melyek képesek a lokalizációs technikára jellemző pontthalmazokból álló mérési eredményekből további információkat kinyerni. Az ilyen algoritmusok jelentősen elősegítették a lokalizációs eredmények konzisztens összevetését a korábbi hagyományos fluoreszcenciás, illetve konfokális eredményekkel, azonban továbbra is jelentős az igény új kvantitatív kiértékelő módszerek fejlesztésére, korábbi módszerek felgyorsítására, valamint a lokalizációs adathalmazokból további információk kinyerésére.

### 6.2. Célok és kutatási módszerek

Kutatásom fő célkitűzése a lokalizációs mikroszkóp technika kiegészítése, illetve továbbfejlesztése volt olyan módszerekkel és kiértékelő algoritmusokkal, amelyek lehetővé teszik a vizsgált fluoreszkáló molekulák laterális helyzetén túlmutató információk kinyerését. További célom volt az új eljárások alkalmazása sejtbiológiai problémák feltárására. Ezt a célt két csapásirány mentén

terveztem elérni. Az egyik a hardveres, ahol a lokalizációs mikroszkópot új modalitásokkal, vagy más technikákkal együttesen alkalmazva nyerek ki több információt. A másik a már meglévő adatok kvantitatív kiértékelése új algoritmusokkal. Konkrét céljaim a következők voltak:

A dSTORM rendszerünkben megvalósítani egy asztigmiaán alapuló 3D lokalizációs eljárást. Az ehhez az eljáráshoz szükséges mérési protokoll kidolgozása. A 3D szuperrezolúciós rendszer segítségével biológiai rendszerek 3D struktúráinak feltárása. A csapatunkban fejlesztett multimodális mikroszkóp rendszer asztigmias 3D modalitásának modellezése.

A mikroszkóp rendszerünk optimalizálása többszínű dSTORM és konfokális felvételek készítésére, egyazon minta területről. Eljárás fejlesztése a dSTORM és konfokális képek egyesítésére és elemzésére. Több komponensű, komplex biológiai minták strukturális vizsgálata többszínű leképezéssel.

A lakunaritás bevezetése az egymolekula detektáláson alapuló, lokalizációs mikroszkópiai technikák adatsorainak kvantitatív kiértékelésére. Lokalizációs adatsorok lakunaritás kiértékelésére alkalmas eljárás és szoftver fejlesztése. Az eljárás hitelesítése korábbi biológiai mintákon kimutatott eredmények és szimulációk segítségével.

Lakunaritás értékek kiszámításának optimalizálása. A különböző nagy precizitású lakunaritászámító algoritmusok összegyűjtése. Új lakunaritászámító algoritmusok fejlesztése. Lakunaritászámító algoritmusok összehasonlítása teszt adatsorokon. Az adatsor specifikus, optimális lakunaritászámító algoritmus meghatározása.

### 6.3. Új tudományos eredmények

**T1:** Mátrixoptikára alapuló eljárást dolgoztam ki hengerlencsével megvalósított asztigmias 3D szuperrezolúciós rendszerek modellezésére LabView programozási környezetben. Modellezve a rendszerünket megvizsgáltam, hogyan függ az asztigmia nagysága a hengerlencse fókusztávolságától és pozíciójától. Megmutattam az egyes hengerlencse pozíció tartományok előnyeit és hátrányait reprodukálhatóság és az asztigmia beállíthatóságának szempontjából. A modellt OSLO szimulációkkal támasztottam alá. Kiegészítettem a rendszerünket egy, a modell alapján választott, hengerlencsével és tesztmintákon végzett mérésekkel is hitelesítettem a szimulációs eredményeket. Az optimalizált 3D rendszer számos együttműködésben került felhasználásra. Többek között a 3D képek felvétele lehetővé tette fázisszeparált riboszóma klaszterek pontosabb analizését. Továbbá, a megvalósított eljárással modelleztem az mmSTORM

## 6. Összefoglaló

lokalizációs mikroszkóp asztigmias 3D modalitását. Meghatároztam a multimodális rendszerben az asztigmia hengerlencse fókusz távolság és pozíció függésének jellegét. [A1, A2]

**T2:** Optimalizáltam a mikroszkóp rendszerünket többszínű dSTORM és konfokális képek együttes kiértékelésére és kolokalizációs információ kinyerésére. Konfokális és dSTORM képek egyesítésére saját kódot írtam LabView programozási környezetben. Kétszínű konfokális és dSTORM felvételeket készítettem emberi és egér agyi szeletekben található interneuronok HCN1, HCN2 és Kv3.1 ioncsatornáiról. A kétszínű konfokális felvételeken az egyik színcsatornában parvalbumin jelölés segítségével vizualizáltuk a sejt membrán határát míg a másik színcsatornában az adott ioncsatorna volt jelölve lehetővé téve a konfokális-dSTORM összehasonlítást. A nagy feloldású dSTORM mérések segítségével meghatároztuk az ioncsatorna pozícióját 20 nm-es pontossággal. Az általam készített kép egyesítő algoritmus segítségével, valamint dSTORM és konfokális képek vizuális összehasonlításával megmutattuk a HCN1 és HCN2 csatornák eltérő viselkedését humán és egér interneuronokban. [A3]

**T3:** Kifejlesztettem egy lakunaritás alapú eljárást lokalizációs mikroszkópos felvételek geometriájának kvantitatív kiértékelésére. Bevezettem a lakunaritás eltérés görbét, ami normált lakunaritás értékek ábrázolásával hatékonyan képes megjeleníteni 2D és 3D struktúrák homogenitását különböző méretskálákon. TestSTORM szimulációs szoftverrel generált szintetikus adatsorok segítségével megmutattam, hogyan lehet a lakunaritás eltérés görbék alapján következtetni különböző klasztereződési folyamatokra, valamint a klaszterek paramétereire (pl. klaszterméret, klaszterszám, klasztersűrűség, stb.). Kettős szálú DNS törések javító fehérjéiről készült dSTORM felvételeken bemutattam, hogy a lakunaritás eltérés görbékkel kapott eredmények egyezést mutatnak korábbi DBSCAN-es klaszteranalízises eredményekkel. Megmutattam, hogy a lakunaritás alapú kiértékelések ötször gyorsabban elvégezhetőek, mint a DBSCAN. [A4]

**T4:** Kifejlesztettem egy a konvolúciós tételre és egy, az eredeti módszer megfordítására épülő új lakunaritászámító algoritmust, melyek képesek gliding-box lakunaritás értékeket nagyságrendekkel gyorsabban kiszámolni, mint az eredeti gliding-box algoritmus. Az új algoritmusokat 2D és 3D adatsorok kiértékelésére is implementáltam. Az eredeti gliding-box valamint két darab optimalizált 2D algoritmust tovább fejlesztettem 3D adatsorok kiértékelésére. Ezen három irodalomból ismert algoritmust és a két új általam bevezetett algoritmust összehasonlítottam 2D és 3D szintetikus adatsorok kiértékelésével futás idő, memória igény és kód komplexitás szempontjából.

Megmutattam az egyes algoritmusok előnyeit és hátrányait, valamint adott mintákhoz és hardver konfigurációkhoz meghatároztam az optimális lakunaritáásszámító algoritmust. [\[A5\]](#)

## 7. Summary

### 7.1. Introduction

The study and understanding of structures smaller than the resolution of the human eye is made possible by microscopes and the discipline of microscopy, which is concerned with their development. The most common way to magnify structures in the micro-world is with optical microscopes, which use light that is visible to the human eye. Due to the wave properties of light, the size of the smallest structure that can be resolved is limited by diffraction. Utilizing a high numeric aperture optical microscope, it is typically  $250\text{ nm}$ . Further improvements in resolution can be achieved using light or particles of smaller wavelengths. These methods, however require a complete re-design of the optical system. If a higher resolution is to be achieved with an optical system optimized for visible light, another solution is needed. The term optical superresolution is the general name for the techniques that address or solve this problem. The different superresolution techniques allow to increase the resolution while using visible light. Of these techniques, the so-called single molecule localization microscopy (SMLM) provides the best resolution ( $20\text{ nm}$ ). This resolution allows the observation of intracellular organelles and biological processes, making the technique very popular in the fields of biology and medicine. Some subsets of localization techniques can even be applied to living cells. Of course, like all techniques, localization microscopy has its drawbacks. The localization measurement data evaluated are point sets, which makes it difficult to compare the results with previous results that consist of images. To remedy this, algorithms and procedures have been developed that can extract additional information from point sets of measurements specific to the localization technique. Such algorithms have greatly facilitated the consistent comparison of localization results with previous conventional fluorescence or confocal results, but there remains a significant need to develop new quantitative evaluation methods, to accelerate previous methods and to extract additional information from localization data sets.

### 7.2. Objectives and methods

The main objective of my research was to complement and further develop the localization microscope technique with methods and evaluation algorithms that allow the extraction of information beyond the lateral position of the fluorescent molecules under investigation. I also aimed to apply the new techniques to the investigation of cell biological systems. I planned to achieve this goal along two strands. One is through hardware, where I use the localization

microscope with new modalities or in combination with other techniques to extract more information. The other is through software with the quantitative evaluation of existing data using new algorithms. My specific goals were:

Implementation of an astigmatism-based 3D localization procedure in our dSTORM system. Development of a measurement protocol for this procedure. Exploration of 3D structures of biological systems using the 3D superresolution system. Modeling the astigmatic 3D modality of the multimodal microscope system developed in our team.

Optimization of our microscope system for multicolor dSTORM and confocal imaging of the same sample area. Development of a procedure to merge and analyze dSTORM and confocal images. Structural analysis of multi-component complex biological samples using multicolor imaging.

Introduction of lacunarity for quantitative evaluation of data sets from localization microscopy techniques based on single molecule detection. Development of a procedure and software for the evaluation of lacunarity of localization data sets. Validation of the method using results and simulations on previous biological samples.

Optimization of the calculation of lacunarity values. Collection of different high-precision lacunarity calculation algorithms. Development of new lacunarity calculation algorithms. Comparison of lacunarity computing algorithms on test data sets. Determination of a dataset specific optimal lacunarity computing algorithm.

### **7.3. New scientific results**

**T1:** I have developed a matrix optics-based method for modelling astigmatic 3D superresolution systems with cylindrical lenses in the LabView programming environment. By modelling our system, I investigated how the magnitude of astigmatism depends on the focal length and position of the cylindrical lens. I have shown the advantages and disadvantages of each cylinder lens position range in terms of reproducibility and adjustability of astigmatism. The model was supported by OSLO simulations. I supplemented our system with a cylinder lens chosen from the model and validated the simulation results by measurements on test samples. The optimized 3D system has been used in several collaborations. Among other things, the inclusion of 3D images allowed a more accurate analysis of phase-separated ribosome clusters. Furthermore, I used the implemented procedure to model the astigmatic 3D modality of the mmSTORM localization microscope. I determined the

## 7. Summary

nature of the dependence of the focal length and position of the astigmatic cylinder lens in the multimodal system. [\[A1, A2\]](#)

**T2:** I have optimized our microscope system for the comparative evaluation of multicolor confocal and dSTORM images and for the gathering of colocalization information. I have written a LabView code for the merging of confocal and dSTORM images. I have taken dual-color confocal and dSTORM images of the HCN1, HCN2 and Kv3.1 ion channels of interneurons found in human and mouse brain samples. On the dual-color confocal images in one channel we visualized the cell membrane with labeling parvalbumin, while in the other one the ion channels were labeled enabling the confocal-dSTORM comparison. Using the high resolution dSTORM measurements we localized the positions of the ion channels with a precision of 20 *nms*. Using the image merging algorithm I made and the visual comparison of the dSTORM and confocal images we have shown the different behavior of HCN1 and HCN2 channels in human and mouse interneurons. [\[A3\]](#)

**T3:** I have developed a lacunarity-based method for quantitative evaluation of the geometry of localization microscopy data sets. I introduced the lacunarity divergence curve, which can efficiently visualize the homogeneity of 2D and 3D structures at different scales by representing normalized lacunarity values. Using synthetic data sets generated using TestSTORM simulation software, I showed how the lacunarity divergence curves can be used to infer different clustering processes and cluster parameters (e.g. cluster size cluster number cluster density etc.). Using dSTORM recordings of DNA double-strand break repair proteins, I have shown that the results obtained with the lacunarity divergence curves are in agreement with previous DBSCAN cluster analysis results. I have shown that lacunarity-based evaluations can be performed five times faster than DBSCAN. [\[A4\]](#)

**T4:** I have developed two new lacunarity computation algorithms one based on the convolution theorem and one based on the inversion of the original method, both of which are capable of computing gliding-box lacunarity values orders of magnitude faster than the original gliding-box algorithm. The new algorithms have also been implemented for the evaluation of 2D and 3D data sets. I further improved the original gliding-box and two optimized 2D algorithms for the evaluation of 3D data sets. I compared these three algorithms known from the literature and the two new algorithms I implemented with the evaluation of 2D and 3D synthetic data sets in terms of runtime, memory requirements and code complexity. I have shown the advantages and disadvantages of each algorithm and determined the optimal lacunarity computing algorithm for given samples and hardware configurations. [\[A5\]](#)



## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Erdélyi Miklósnak a doktori tanulmányaim alatt nyújtott, nélkülözhetetlen munkáját, amivel támogatta előre haladásom. A tudományos munkához való hozzáállása példaértékű volt számomra és segítségével az Optikai és Kvantumelektronikai Tanszéken folyó oktatómunkába is mélyebben be tudtam kapcsolódni. Az általa alapított AdOptIm kutatócsoport egy igen magas színvonalú, barátságos és segítőkész környezetet teremtett a kutatómunka végzéséhez. A csoport minden tagjának köszönettel tartozom, akiket a következőkben név szerint is kiemelek.

Köszönöm Dr. Varga Dánielnek a számos közös projektünkben végzett munkáját. Legyen szó biológus kollégákkal végzett együttműködésekről vagy kvantitatív kép analízisről, munkám során mindig számíthattam a segítségére.

Köszönöm Dr. Gajdos Tamásnak az optikai rendszerek tervezésével és építésével kapcsolatos tanácsait, valamint a számítási gyakorlatok oktatásának módszertanában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Novák Tibornak a számítástechnikai és matematikai problémák megoldásában adott tanácsait. Segítsége nélkülözhetetlen volt a csapatunk által korábban fejlesztett programok alkalmazásának elsajátításában.

Köszönöm Bíró Péternek, hogy mindig számíthattam rá legyen szó tudományos vagy adminisztratív bonyodalmakról, nem volt olyan probléma, aminek ketten ne tudtunk volna a végére járni.

Köszönöm Ponyeczkiné Czvik Elvirának, hogy a biológiai minták előkészítésében és a szuperrezolúciós mikroszkópia kémiai hátterének biztosításában mindig számíthattam rá.

Köszönöm a Bolyai épület 223-as PhD szobában dolgozó többi kollégának, első sorban Horváth Gábornak, Körmöczy Andornak és Tankó Szilárd Lázárnak, a jó hangulat megteremtését és a különböző adminisztrációs feladatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetemnek és oktatóinak, hogy egy remek kutatói környezetet teremtettek és felkészítettek a tudományos munkára.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm édesapámnak, H. Kovács Benedeknek, és édesanyámnak, Bálint Erikának, a kitartó és önzetlen támogatásukat, mely lehetővé tette, hogy teljes erővel a tudományos munkára tudjak koncentrálni.

Köszönöm együttműködő partnereinknek kitartó munkájukat és a számos felmerülő biológia témájú kérdésekre adott válaszaikat.

Köszönöm Dr. Bálint Erzsébetnek a disszertációm nyelvi és szakmai lektorálásában nyújtott segítségét.

Végezetül pedig köszönöm középiskolai fizika tanáromnak Dr. Mező Tamásnak a kitartó munkáját, amivel elindított ezen a fizikusi pályán.

A doktori tanulmányaim folyamán az Optikai és Kvantumelektronikai Tanszéken végzett munkámat a következő pályázati források támogatták: University of Szeged Open Access Fund; GINOP2.3.2-15-2016-00036; Innovációs és Technológiai Minisztérium (TKP2021-NVA-19); Nemzeti Agykutató Program: 2017-1-2-1-NKP-2017-00002; EFOP-3.6.1-16-2016-00008.

## 9. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10071753

### Tézispontokhoz kötődő publikációk:

[A1] Tamás Gajdos, Zsófia Cserteg, Szilárd Szikora, Tibor Novák, Bálint Barna H. Kovács, Gábor Szabó, József Mihály, és Miklós Erdélyi. "mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy." Scientific Reports 9,1 (2019): 798. **Q1**, IF: **4,6**; doi: 10.1038/s41598-018-37341-9

[A2] Orsolya Németh-Szatmári, Ádám Györkei, Dániel Varga, Bálint Barna H. Kovács, Nóra Igaz, Kristóf Német, Nikolett Bagi és mtsai. "Phase separated ribosome nascent chain complexes paused in translation are capable to continue expression of proteins playing role in genotoxic stress response upon DNA damage" bioRxiv. **Q-**, IF: **0**; doi: 10.1101/2022.03.16.484567

[A3] Viktor Szegedi, Emőke Bakos, Szabina Furdan, Bálint H. Kovács, Dániel Varga, Miklós Erdélyi, Pál Barzó, Attila Szücs, Gábor Tamás, és Karri Lamsa. "HCN channels at the cell soma ensure the rapid electrical reactivity of fast-spiking interneurons in human neocortex." Plos Biology 21,2 (2023): e3002001. **Q1**, IF: **9,8**; doi: 10.1371/journal.pbio.3002001

[A4] Bálint Barna H. Kovács, Dániel Varga, Dániel Sebők, Hajnalka Majoros, Róbert Polanek, Tibor Pankotai, Katalin Hideghéty, Ákos Kukovecz, és Miklós Erdélyi. "Application of Lacunarity for Quantification of Single Molecule Localization Microscopy Images." Cells 11,19 (2022): 3105. **Q1**, IF: **7,666**; doi: 10.3390/cells11193105

[A5] Bálint Barna H. Kovács, és Miklós Erdélyi. "Methods for calculating gliding-box lacunarity efficiently on large datasets." Expert Systems With Applications, BÍRÁLAT ALATT. **Q1**, IF: **8,5**; ssrn: <https://ssrn.com/abstract=4516313> vagy <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4516313>

## 9. Publikációs lista

### Tézispontokhoz nem felhasznált publikációk:

[A6] Tibor Novák, Dániel Varga, Péter Bíró, Bálint Barna H. Kovács, Hajnalka Majoros, Tibor Pankotai, Szilárd Szikora, József Mihály, és Miklós Erdélyi. "Quantitative dSTORM superresolution microscopy." *Resolution and Discovery* 6,1 (2022): 25-31. **Q-**, IF: **0**; doi: 10.1556/2051.2022.00093

[A7] Orsolya Németh-Szatmári, Bence Nagy-Mikó, Ádám Györkei, Dániel Varga, Bálint Barna H. Kovács, Nóra Igaz, Bence Bognár és mtsai. "Phase-separated ribosome-nascent chain complexes in genotoxic stress response." *RNA* 29,10 (2023): 1557-1574. **Q1**, IF: **4,5**; doi: 10.1261/rna.079755.123

### Konferenciák:

[K1] Bálint Barna H. K., D. Varga, D. Sebők, H. Majoros, R. Polanek, T. Pankotai, K. Hideghéty, Á. Kukovecz, M. Erdélyi, P. Bíró és N. Tibor. "Application of Lacunarity for Quantification of Single Molecule Localization Microscopy Images." FOM, 2023.04.02.-05., Porto, Portugália

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] W. J. Croft, *Under the microscope: a brief history of microscopy*. in Series in popular science, no. 5. Hackensack, NJ: World Scientific, 2006.
- [2] M. Born és E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, 6th ed. Oxford ; New York: Pergamon Press, 1980.
- [3] Lord Rayleigh, „Investigations in optics, with special reference to the spectroscope”, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, köt. 8, sz. 49, o. 261–274, 1879.
- [4] C. M. Sparrow, „On Spectroscopic Resolving Power”, *ApJ*, köt. 44, o. 76, szept. 1916, doi: 10.1086/142271.
- [5] K. Rossmann, „Point Spread-Function, Line Spread-Function, and Modulation Transfer Function: Tools for the Study of Imaging Systems”, *Radiology*, köt. 93, sz. 2, o. 257–272, aug. 1969, doi: 10.1148/93.2.257.
- [6] J. R. Lakowicz, Szerk., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [7] Wikipedia,  
„[https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence#/media/File:Jablonski\\_Diagram\\_of\\_Fluorescence\\_Only-en.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence#/media/File:Jablonski_Diagram_of_Fluorescence_Only-en.svg)”, jan. 2024.
- [8] Thermo Fisher Fluorescence SpectraViewer,  
„<https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/#!/>”, jan. 2024.
- [9] CHROMA, „<https://www.chroma.com/knowledge-resources/about-fluorescence/fluorescence-microscopy/the-fluorescence-microscope>”, jan. 2024.
- [10] M. Minsky, „Memoir on inventing the confocal scanning microscope”, *Scanning*, köt. 10, sz. 4, o. 128–138, jan. 1988, doi: 10.1002/sca.4950100403.
- [11] J. B. Pawley, Szerk., *Handbook of biological confocal microscopy*, 3rd ed. New York, NY: Springer, 2006.
- [12] S. Mahmudi-Azer, P. Lacy, és R. Moqbel, „Tracing Intracellular Mediator Storage and Mobilization in Eosinophils”, in *Human Airway Inflammation*, köt. 56, New Jersey: Humana Press, 2001, o. 367–381. doi: 10.1385/1-59259-151-5:367.
- [13] G. Donnert és mtsai., „Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, köt. 103, sz. 31, o. 11440–11445, aug. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604965103.

## 10. Irodalomjegyzék

- [14] T. H. Samuel, Thanu P. K. Girirajan, és Michael D. Mason, „Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy”, *Biophysical journal*, köt. 91, sz. 11, o. 4258–4272, 2006, doi: <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- [15] S. Hell és E. H. K. Stelzer, „Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope”, *J. Opt. Soc. Am. A*, köt. 9, sz. 12, o. 2159, dec. 1992, doi: [10.1364/JOSAA.9.002159](https://doi.org/10.1364/JOSAA.9.002159).
- [16] M. G. L. Gustafsson, „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy: SHORT COMMUNICATION”, *Journal of Microscopy*, köt. 198, sz. 2, o. 82–87, máj. 2000, doi: [10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x).
- [17] R. Heintzmann, T. M. Jovin, és C. Cremer, „Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement”, *J. Opt. Soc. Am. A*, köt. 19, sz. 8, o. 1599, aug. 2002, doi: [10.1364/JOSAA.19.001599](https://doi.org/10.1364/JOSAA.19.001599).
- [18] S. W. Hell és J. Wichmann, „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”, *Opt. Lett.*, köt. 19, sz. 11, o. 780, jún. 1994, doi: [10.1364/OL.19.000780](https://doi.org/10.1364/OL.19.000780).
- [19] M. Lelek és *mtsai.*, „Single-molecule localization microscopy”, *Nat Rev Methods Primers*, köt. 1, sz. 1, o. 39, jún. 2021, doi: [10.1038/s43586-021-00038-x](https://doi.org/10.1038/s43586-021-00038-x).
- [20] M. J. Rust, M. Bates, és X. Zhuang, „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, *Nat Methods*, köt. 3, sz. 10, o. 793–796, okt. 2006, doi: [10.1038/nmeth929](https://doi.org/10.1038/nmeth929).
- [21] M. Heilemann és *mtsai.*, „Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes”, *Angew Chem Int Ed*, köt. 47, sz. 33, o. 6172–6176, aug. 2008, doi: [10.1002/anie.200802376](https://doi.org/10.1002/anie.200802376).
- [22] E. Betzig és *mtsai.*, „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”, *Science*, köt. 313, sz. 5793, o. 1642–1645, szept. 2006, doi: [10.1126/science.1127344](https://doi.org/10.1126/science.1127344).
- [23] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, és W. E. Moerner, „On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein”, *Nature*, köt. 388, sz. 6640, o. 355–358, júl. 1997, doi: [10.1038/41048](https://doi.org/10.1038/41048).
- [24] A. Sharonov és R. M. Hochstrasser, „Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, köt. 103, sz. 50, o. 18911–18916, dec. 2006, doi: [10.1073/pnas.0609643104](https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104).
- [25] J. Fölling és *mtsai.*, „Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return”, *Nat Methods*, köt. 5, sz. 11, o. 943–945, nov. 2008, doi: [10.1038/nmeth.1257](https://doi.org/10.1038/nmeth.1257).

- [26] F. Balzarotti és mtsai., „Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes”, *Science*, köt. 355, sz. 6325, o. 606–612, febr. 2017, doi: 10.1126/science.aak9913.
- [27] S. Van De Linde és mtsai., „Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes”, *Nat Protoc*, köt. 6, sz. 7, o. 991–1009, júl. 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.336.
- [28] R. E. Thompson, D. R. Larson, és W. W. Webb, „Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes”, *Biophysical Journal*, köt. 82, sz. 5, o. 2775–2783, máj. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X.
- [29] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, és H. Flyvbjerg, „Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy”, *Nat Methods*, köt. 7, sz. 5, o. 377–381, máj. 2010, doi: 10.1038/nmeth.1447.
- [30] G. Shtengel és mtsai., „Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, köt. 106, sz. 9, o. 3125–3130, márc. 2009, doi: 10.1073/pnas.0813131106.
- [31] M. F. Juetten és mtsai., „Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples”, *Nat Methods*, köt. 5, sz. 6, o. 527–529, jún. 2008, doi: 10.1038/nmeth.1211.
- [32] B. Huang, W. Wang, M. Bates, és X. Zhuang, „Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”, *Science*, köt. 319, sz. 5864, o. 810–813, febr. 2008, doi: 10.1126/science.1153529.
- [33] S. R. P. Pavani és mtsai., „Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, köt. 106, sz. 9, o. 2995–2999, márc. 2009, doi: 10.1073/pnas.0900245106.
- [34] A. Aristov, B. Lelandais, E. Rensen, és C. Zimmer, „ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range”, *Nat Commun*, köt. 9, sz. 1, o. 2409, jún. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04709-4.
- [35] S. Nanguneri, B. Flottmann, H. Horstmann, M. Heilemann, és T. Kuner, „Three-Dimensional, Tomographic Super-Resolution Fluorescence Imaging of Serially Sectioned Thick Samples”, *PLoS ONE*, köt. 7, sz. 5, o. e38098, máj. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038098.

## 10. Irodalomjegyzék

- [36] O. Mandula, M. Kielhorn, K. Wicker, G. Krampert, I. Kleppe, és R. Heintzmann, „Line scan - structured illumination microscopy super-resolution imaging in thick fluorescent samples”, *Opt. Express*, köt. 20, sz. 22, o. 24167, okt. 2012, doi: 10.1364/OE.20.024167.
- [37] A. Vaziri, J. Tang, H. Shroff, és C. V. Shank, „Multilayer three-dimensional super resolution imaging of thick biological samples”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, köt. 105, sz. 51, o. 20221–20226, dec. 2008, doi: 10.1073/pnas.0810636105.
- [38] F. Cella Zanacchi, Z. Lavagnino, M. Faretta, L. Furia, és A. Diaspro, „Light-Sheet Confined Super-Resolution Using Two-Photon Photoactivation”, *PLoS ONE*, köt. 8, sz. 7, o. e67667, júl. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067667.
- [39] Y. S. Hu és mtsai., „Light-sheet Bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells”, *Opt Nano*, köt. 2, sz. 1, o. 7, dec. 2013, doi: 10.1186/2192-2853-2-7.
- [40] R. McGorty, J. Schnitzbauer, W. Zhang, és B. Huang, „Correction of depth-dependent aberrations in 3D single-molecule localization and super-resolution microscopy”, *Opt. Lett.*, köt. 39, sz. 2, o. 275, jan. 2014, doi: 10.1364/OL.39.000275.
- [41] D. Burke, B. Patton, F. Huang, J. Bewersdorf, és M. J. Booth, „Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy”, *Optica*, köt. 2, sz. 2, o. 177, febr. 2015, doi: 10.1364/OPTICA.2.000177.
- [42] I. Izeddin, M. El Beheiry, J. Andilla, D. Ciepielewski, X. Darzacq, és M. Dahan, „PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking”, *Opt. Express*, köt. 20, sz. 5, o. 4957, febr. 2012, doi: 10.1364/OE.20.004957.
- [43] M. Booth, D. Andrade, D. Burke, B. Patton, és M. Zurauskas, „Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy”, *Microscopy*, köt. 64, sz. 4, o. 251–261, aug. 2015, doi: 10.1093/jmicro/dfv033.
- [44] Y.-L. Wu, A. Tschanz, L. Krupnik, és J. Ries, „Quantitative Data Analysis in Single-Molecule Localization Microscopy”, *Trends in Cell Biology*, köt. 30, sz. 11, o. 837–851, nov. 2020, doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.005.
- [45] P. Sengupta, T. Jovanovic-Taliman, D. Skoko, M. Renz, S. L. Veatch, és J. Lippincott-Schwartz, „Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis”, *Nat Methods*, köt. 8, sz. 11, o. 969–975, nov. 2011, doi: 10.1038/nmeth.1704.



- [46] D. M. Owen és mtsai., „PALM imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface”, *Journal of Biophotonics*, köt. 3, sz. 7, o. 446–454, júl. 2010, doi: 10.1002/jbio.200900089.
- [47] P. R. Nicovich, D. M. Owen, és K. Gaus, „Turning single-molecule localization microscopy into a quantitative bioanalytical tool”, *Nat Protoc*, köt. 12, sz. 3, o. 453–460, márc. 2017, doi: 10.1038/nprot.2016.166.
- [48] J. A. Pike és mtsai., „Topological data analysis quantifies biological nano-structure from single molecule localization microscopy”, *Bioinformatics*, köt. 36, sz. 5, o. 1614–1621, márc. 2020, doi: 10.1093/bioinformatics/btz788.
- [49] D. Baddeley, M. B. Cannell, és C. Soeller, „Visualization of Localization Microscopy Data”, *Microsc Microanal*, köt. 16, sz. 1, o. 64–72, febr. 2010, doi: 10.1017/S143192760999122X.
- [50] M. Ester, H. P. Kriegel, J. Sander, és X. Xu, „A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise”, *KDD-96 Proceedings*, köt. 34, o. 226–231, 1996.
- [51] L. Andronov, I. Orlov, Y. Lutz, J.-L. Vonesch, és B. P. Klaholz, „ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy”, *Sci Rep*, köt. 6, sz. 1, o. 24084, ápr. 2016, doi: 10.1038/srep24084.
- [52] D. Varga, H. Majoros, Z. Ujfaludi, M. Erdélyi, és T. Pankotai, „Quantification of DNA damage induced repair focus formation *via* super-resolution dSTORM localization microscopy”, *Nanoscale*, köt. 11, sz. 30, o. 14226–14236, 2019, doi: 10.1039/C9NR03696B.
- [53] M. Sun és mtsai., „Superresolution microscope image reconstruction by spatiotemporal object decomposition and association: application in resolving t-tubule structure in skeletal muscle”, *Opt. Express*, köt. 22, sz. 10, o. 12160, máj. 2014, doi: 10.1364/OE.22.012160.
- [54] S. V. Pigeon, P. R. Nicovich, M. Mollazade, T. Tabarin, és K. Gaus, „Clus-DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data”, *MBoC*, köt. 27, sz. 22, o. 3627–3636, nov. 2016, doi: 10.1091/mbc.e16-07-0478.
- [55] F. Levet és mtsai., „A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy”, *Nat Commun*, köt. 10, sz. 1, o. 2379, máj. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10007-4.
- [56] B. B. Mandelbrot, *The fractal geometry of nature*, Updated and augm. Ed. New York: W. H. Freeman, 1986.

## 10. Irodalomjegyzék

- [57] R. E. Plotnick, R. H. Gardner, W. W. Hargrove, K. Prestegard, és M. Perlmutter, „Lacunarity analysis: A general technique for the analysis of spatial patterns”, *Phys. Rev. E*, köt. 53, sz. 5, o. 5461–5468, máj. 1996, doi: 10.1103/PhysRevE.53.5461.
- [58] C. C. Drăghici és *mtsai.*, „Spatial evolution of forest areas in the northern Carpathian Mountains of Romania”, *Acta Montanistica Slovaca*, köt. 22, sz. 2, o. 95–106, 2017.
- [59] J. E. García-Farieta és R. A. Casas-Miranda, „Effect of observational holes in fractal analysis of galaxy survey masks”, *Chaos, Solitons & Fractals*, köt. 111, o. 128–137, jún. 2018, doi: 10.1016/j.chaos.2018.04.018.
- [60] D. Sebők, L. Vásárhelyi, I. Szent, R. Vajtai, Z. Kónya, és Á. Kukovecz, „Fast and accurate lacunarity calculation for large 3D micro-CT datasets”, *Acta Materialia*, köt. 214, o. 116970, aug. 2021, doi: 10.1016/j.actamat.2021.116970.
- [61] P. Waliszewski, „The Quantitative Criteria Based on the Fractal Dimensions, Entropy, and Lacunarity for the Spatial Distribution of Cancer Cell Nuclei Enable Identification of Low or High Aggressive Prostate Carcinomas”, *Front. Physiol.*, köt. 7, febr. 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00034.
- [62] B. Sanghera és *mtsai.*, „Reproducibility of 2D and 3D Fractal Analysis Techniques for the Assessment of Spatial Heterogeneity of Regional Blood Flow in Rectal Cancer”, *Radiology*, köt. 263, sz. 3, o. 865–873, jún. 2012, doi: 10.1148/radiol.12111316.
- [63] O. S. Al-Kadi és D. Watson, „Texture Analysis of Aggressive and Nonaggressive Lung Tumor CE CT Images”, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, köt. 55, sz. 7, o. 1822–1830, júl. 2008, doi: 10.1109/TBME.2008.919735.
- [64] L. A. Neves és *mtsai.*, „Multi-scale lacunarity as an alternative to quantify and diagnose the behavior of prostate cancer”, *Expert Systems with Applications*, köt. 41, sz. 11, o. 5017–5029, szept. 2014, doi: 10.1016/j.eswa.2014.02.048.
- [65] P. Borys, M. Krasowska, Z. J. Grzywna, M. B. A. Djamgoz, és M. E. Mycielska, „Lacunarity as a novel measure of cancer cells behavior”, *Biosystems*, köt. 94, sz. 3, o. 276–281, dec. 2008, doi: 10.1016/j.biosystems.2008.05.036.
- [66] M.-V. Nichita, M. A. Paun, V. A. Paun, és V. P. Paun, „Fractal analysis of brain glial cells. Fractal dimension and lacunarity”, *Sci. Bull. Ser. A Appl. Math*, köt. 81, sz. 1, o. 273–284, 2019.

- [67] M.-A. Paun, P. Postolache, M.-V. Nichita, V.-A. Paun, és V.-P. Paun, „Fractal Analysis in Pulmonary CT Images of COVID-19-Infected Patients”, *Fractal Fract*, köt. 7, sz. 4, o. 285, márc. 2023, doi: 10.3390/fractalfract7040285.
- [68] T. G. Smith, G. D. Lange, és W. B. Marks, „Fractal methods and results in cellular morphology — dimensions, lacunarity and multifractals”, *Journal of Neuroscience Methods*, köt. 69, sz. 2, o. 123–136, nov. 1996, doi: 10.1016/S0165-0270(96)00080-5.
- [69] C. Allain és M. Cloitre, „Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractal sets”, *Phys. Rev. A*, köt. 44, sz. 6, o. 3552–3558, szept. 1991, doi: 10.1103/PhysRevA.44.3552.
- [70] J. Sinkó és *mtsai.*, „TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy”, *Biomed. Opt. Express*, köt. 5, sz. 3, o. 778, márc. 2014, doi: 10.1364/BOE.5.000778.
- [71] T. Novák, T. Gajdos, J. Sinkó, G. Szabó, és M. Erdélyi, „TestSTORM: Versatile simulator software for multimodal super-resolution localization fluorescence microscopy”, *Sci Rep*, köt. 7, sz. 1, o. 951, ápr. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01122-7.
- [72] TestSTORM, „[http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page\\_id=183](http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=183)”, jan. 2024.
- [73] D. Varga és *mtsai.*, „Machine learning framework to segment sarcomeric structures in SMLM data”, *Sci Rep*, köt. 13, sz. 1, o. 1582, jan. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-28539-7.
- [74] E. J. Rees, M. Erdelyi, G. S. K. Schierle, A. Knight, és C. F. Kaminski, „Elements of image processing in localization microscopy”, *J. Opt.*, köt. 15, sz. 9, o. 094012, szept. 2013, doi: 10.1088/2040-8978/15/9/094012.
- [75] rainSTORM, „[http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page\\_id=582](http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=582)”, jan. 2024.
- [76] D. Sage és *mtsai.*, „Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software”, *Nat Methods*, köt. 16, sz. 5, o. 387–395, máj. 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0364-4.
- [77] O. O. Panasencko és *mtsai.*, „Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblyosomes”, *Nat Struct Mol Biol*, köt. 26, sz. 2, o. 110–120, febr. 2019, doi: 10.1038/s41594-018-0179-5.
- [78] M. Erdelyi és *mtsai.*, „Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy”, *Opt. Express*, köt. 21, sz. 9, o. 10978, máj. 2013, doi: 10.1364/OE.21.010978.
- [79] R. Chittajallu és *mtsai.*, „Activity-dependent tuning of intrinsic excitability in mouse and human neurogliaform cells”, *eLife*, köt. 9, o. e57571, jún. 2020, doi: 10.7554/eLife.57571.

## 10. Irodalomjegyzék

- [80] G. Testa-Silva és mtsai., „High Bandwidth Synaptic Communication and Frequency Tracking in Human Neocortex”, *PLoS Biol*, köt. 12, sz. 11, o. e1002007, nov. 2014, doi: 10.1371/journal.pbio.1002007.
- [81] L. Campagnola és mtsai., „Local connectivity and synaptic dynamics in mouse and human neocortex”, *Science*, köt. 375, sz. 6585, o. eabj5861, márc. 2022, doi: 10.1126/science.abj5861.
- [82] H. Hu, J. Gan, és P. Jonas, „Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function”, *Science*, köt. 345, sz. 6196, o. 1255263, aug. 2014, doi: 10.1126/science.1255263.
- [83] K. C. Wood, J. M. Blackwell, és M. N. Geffen, „Cortical inhibitory interneurons control sensory processing”, *Current Opinion in Neurobiology*, köt. 46, o. 200–207, okt. 2017, doi: 10.1016/j.conb.2017.08.018.
- [84] K. A. Pelkey, R. Chittajallu, M. T. Craig, L. Tricoire, J. C. Wester, és C. J. McBain, „Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons”, *Physiological Reviews*, köt. 97, sz. 4, o. 1619–1747, okt. 2017, doi: 10.1152/physrev.00007.2017.
- [85] B. E. Kalmbach és mtsai., „h-Channels Contribute to Divergent Intrinsic Membrane Properties of Supragranular Pyramidal Neurons in Human versus Mouse Cerebral Cortex”, *Neuron*, köt. 100, sz. 5, o. 1194-1208.e5, dec. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.012.
- [86] E. M. Goldberg, H.-Y. Jeong, I. Kruglikov, R. Tremblay, R. M. Lazarenko, és B. Rudy, „Rapid Developmental Maturation of Neocortical FS Cell Intrinsic Excitability”, *Cerebral Cortex*, köt. 21, sz. 3, o. 666–682, 2011, doi: 10.1093/cercor/bhq138.
- [87] T. F. Freund és G. Buzsáki, „Interneurons of the hippocampus”, *Hippocampus*, köt. 6, sz. 4, o. 347–470, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.
- [88] J. Du, L. Zhang, M. Weiser, B. Rudy, és C. McBain, „Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus”, *J. Neurosci.*, köt. 16, sz. 2, o. 506–518, jan. 1996, doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-02-00506.1996.
- [89] M. Hazewinkel, *Encyclopaedia of mathematics*. Dordrecht Boston London: Kluwer, 1988.
- [90] I. Pantic, L. Harhaji-Trajkovic, A. Pantovic, N. T. Milosevic, és V. Trajkovic, „Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis”, *Journal of Theoretical Biology*, köt. 303, o. 87–92, jún. 2012, doi: 10.1016/j.jtbi.2012.03.013.

- [91] M. Manera, B. S. Dezfuli, C. Borreca, és L. Giari, „The use of fractal dimension and lacunarity in the characterization of mast cell degranulation in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)”, *Journal of Microscopy*, köt. 256, sz. 2, o. 82–89, nov. 2014, doi: 10.1111/jmi.12160.
- [92] J. Pribic és mtsai., „Fractal dimension and lacunarity of tumor microscopic images as prognostic indicators of clinical outcome in early breast cancer”, *Biomarkers in Medicine*, köt. 9, sz. 12, o. 1279–1277, dec. 2015, doi: 10.2217/bmm.15.102.
- [93] S. Brunner és mtsai., „Analysis of Ionizing Radiation Induced DNA Damage by Superresolution dSTORM Microscopy”, *Pathol. Oncol. Res.*, köt. 27, o. 1609971, nov. 2021, doi: 10.3389/pore.2021.1609971.
- [94] C. R. Tolle, T. R. McJunkin, és D. J. Gorsich, „An efficient implementation of the gliding box lacunarity algorithm”, *Physica D: Nonlinear Phenomena*, köt. 237, sz. 3, o. 306–315, márc. 2008, doi: 10.1016/j.physd.2007.09.017.
- [95] A. R. Backes, „A new approach to estimate lacunarity of texture images”, *Pattern Recognition Letters*, köt. 34, sz. 13, o. 1455–1461, okt. 2013, doi: 10.1016/j.patrec.2013.05.008.
- [96] I. Berzsenyi, V. Pantazi, B. N. Borsos, és T. Pankotai, „Systematic overview on the most widespread techniques for inducing and visualizing the DNA double-strand breaks”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, köt. 788, o. 108397, júl. 2021, doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108397.
- [97] J. S. Iacovoni és mtsai., „High-resolution profiling of  $\gamma$ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome”, *EMBO J*, köt. 29, sz. 8, o. 1446–1457, ápr. 2010, doi: 10.1038/emboj.2010.38.
- [98] D. P. Williams, „Fast Unsupervised Seafloor Characterization in Sonar Imagery Using Lacunarity”, *IEEE Trans. Geosci. Remote Sensing*, köt. 53, sz. 11, o. 6022–6034, nov. 2015, doi: 10.1109/TGRS.2015.2431322.
- [99] P. Viola és M. Jones, „Robust real-time object detection”, *International Journal of Computer Vision*, köt. 57, sz. 2, o. 137–154, 2004.
- [100] W. T. Cochran és mtsai., „What is the fast Fourier transform?”, *Proc. IEEE*, köt. 55, sz. 10, o. 1664–1674, 1967, doi: 10.1109/PROC.1967.5957.