

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Laterális feloldás és képminőség javítása
vonalpásztázó tomográfiás optikai mikroszkópban**

Szerző:

Dudás László

Témavezetők:

Prof. Dr. Szabó Gábor
egyetemi tanár

Dr. Erdélyi Miklós
egyetemi adjunktus

Fizika Doktori Iskola
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem,
Természettudományi és Informatikai Kar

2013

Szeged

1. Bevezetés

Egy optikai mikroszkóp feladata, hogy látható fény segítségével képet szolgáltatson egy olyan objektumról, amelynek részleteit az emberi szem, mint leképező rendszer nem képes feloldani. Mára az optikai mikroszkópok igen sok változata fejlődött ki. A különböző megoldások eltérő paraméterek javítását célozzák. A legfontosabb paraméterek között szerepel a laterális felbontóképesség, amely egy adott nagyítás mellett meghatározza a rögzített kép élességét. A legegyszerűbb, hagyományos mikroszkóp egy objektívől és egy okulárból áll, kiegészítve egy megfelelő kivilágítással (Köhler, Epi), és egy detektorral (szem, CCD). Ezen leképező rendszer *laterális feloldása* az a távolság, amely távolságra helyezve két tárgypontot azok a rögzített képen megkülönböztethetőek. Tehát a feloldás attól függ, hogy egy pontszerű objektumról mennyire kiterjedt foltot hoz létre a rendszer a képsíkban (pontátviteli függvény, PSF).

A feloldás hasonlóan értelmezhető pásztázó mikroszkópok esetén, amelyek egy meghatározott struktúrát (pont, vonal) fókuszálnak a mintába, és mozgatva a struktúrát pásztázzák azt. A laterális feloldás ekkor elsősorban a pásztázó pont (PSF) vagy vonal (LSF, line spread function) kiterjedésétől függ. Ponttal történő pásztázás esetén a fókuszfolt alakja kedvezően alakítható (keskenyebbé tehető laterális és/vagy axiális irányban) interferencia (4π , theta mikroszkóp), apertúra manipuláció (annuláris apertúra, bevonatos objektívek), vagy a polarizációs viszonyok befolyásolása (radiálisan poláros kivilágítás, VAE mikroszkóp) révén. Alkalmazható emellett többfotonos gerjesztés, vagy STED technika. Széles látómezős, leképezésen alapuló mikroszkópok esetén is számos technika terjedt el, amelyek célja a laterális feloldás növelése. Ilyen például a strukturált kivilágítást alkalmazó mikroszkóp (SIM) vagy a lokalizációs mikroszkópia (STORM, PALM).

Biológiai minták esetén gyakran fluoreszcens festést alkalmaznak (akár többszörös festést is), amely általában kontrasztosabb képeket eredményez. Ha a minta vastagabb a mikroszkóp mélységélességénél, akkor a fókuszsíkon kívülről származó fény jelentősen rontja a kép kontrasztját. Pásztázó mikroszkópok egy fontos előnye, hogy konfokális detektálás alkalmazásával a fókuszsíkon kívülről származó fény kiszűrhető és ezáltal a kép élesebbé tehető. Ez egyben azt is jelenti, hogy a minta

síkonként vizsgálható. Ez, az úgynevezett optikai szelelési tulajdonság megvalósítható egyéb módszerekkel széles látómezős technikáknál (SPIM, SIM, STORM).

A tomográfiai módszereket főként az orvosi diagnosztikában és preklinikai vizsgálatokban használják arra, hogy nem invazív módon jussanak információhoz a vizsgált emberi vagy állati szervezet belső struktúrájáról. A röntgenes számítógépes tomográfia során a testet több irányból világítják át röntgensugarakkal, mérik azok elnyelődését és számítógépes algoritmusok segítségével rekonstruáljuk ezen információból a szervezet belső felépítését. A tomográfias megközelítés közvetlenül átültethető optikai tartományba (OPT, optikai projekciós tomográfia) és alkalmazásával 3 dimenziós felvételek készíthetők néhány centiméter mérettartományba eső, viszonylag áttetsző minták esetén.

A vonalpásztázó tomográfias optikai mikroszkóp (LSTOM) egy olyan mikroszkópiás módszer, amely a vonalpásztázás pontátviteli függvényét izotróppá teszi, és a laterális feloldást növeli 18%-kal egy hagyományos ponttal pásztázó konfokális mikroszkóphoz képest. LSTOM mikroszkópban a tomográfias adatgyűjtés úgy valósul meg, hogy a mintát több irányban végigpásztázzuk egy fókuszált vonallal. Az ily módon rögzített adatokból (szinogram) kerül kiszámolásra (rekonstrukció) a minta képe. A vonalat és a pásztázási irányt egy képforgató prizmával forgatva azonban a röntgenes tomográfiasban tapasztalt rekonstrukciós hibákhoz hasonló hibák lépnek fel, amelyek jelentősen degradálhatják a felvett képet.

2. Célkitűzések

A céloom a vonalpásztázó tomográfiás optikai mikroszkóp laterális feloldásának javítása és a képminőséget degradáló hibák vizsgálata és azok minimalizálása.

1. A képminőséget és a laterális feloldást jelentősen ronthatja a tomográfiás adatgyűjtés hibája, ami LSTOM esetén a képforgató prizma beállítási pontatlanságára és a prizmat forgató egység tökéletlen mivoltára vezethető vissza. Céloom egy, az optikai rendszer paramétereitől és a vizsgált mintától független kritérium megfogalmazása, amely garantálja, hogy a rekonstrukciós hibák hatása kísérleti szempontból elhanyagolható legyen. Céloom továbbá megvizsgálni elméleti és kísérleti úton, hogy a meghatározott kritérium egy adott kísérleti elrendezés esetén milyen feltételekkel, milyen beállítási pontosság mellett teljesíthető.
2. A rekonstrukciós hibák forrása a képforgató prizma, ezért céloom egy azt helyettesítő kivilágítási módszer kísérleti alkalmazhatóságának vizsgálata. Egy kettőtörő lemez segítségével vezetek be asztigmatizmust a rendszerbe, és vizsgálom, hogy segítségével megvalósítható-e a kellő pontossággal a létrejövő vonal forgatása, tehát alkalmazható-e LSTOM mikroszkópban.
3. Céloom az LSTOM mikroszkópot alkalmassá tenni fluoreszcens biológiai minták vizsgálatára. Ehhez szükséges a konfokális detektálás megvalósítása és a fényvesztések csökkentése. Megvizsgálom, hogy a változtatások befolyásolják-e a rendszer működését, és azt, hogy milyen optimalizálások lehetségesek LSTOM rendszerben.
4. Céloom egy vonalpásztázó rendszer laterális feloldását növelni. Ennek érdekében fázismanipulációt hajtok végre a kivilágításon és ezzel egyidejűleg konfokális detektálást alkalmazok. Elméletileg vizsgálom a rendszer eredő vonalátviteli függvényét(LSF) befolyásoló rendszerparamétereket, továbbá vizsgálom a megoldás kísérleti alkalmazhatóságát. Céloom a laterális feloldás kísérleti meghatározása és a módszer LSTOM-ban történő alkalmazhatóságának vizsgálata.

3. Alkalmazott módszerek és eszközök

A képminőséget vizsgáló számolásaimat Matlab környezetben végeztem. Pontszerű objektum és a Richardson csillag (Richardson test slide, US 2004/0227937A1) digitális képmása alapján számolt szinogramokat alkalmaztam a rekonstrukciós hiba okozta feloldáscsökkenés vizsgálatára. A kapcsolódó optikai számolásokhoz az OSLO program segítségével végeztem nyalábkövetést.

Több LSTOM elrendezést és egy vonalpásztázó rendszert építettem, amely rendszerek laterális felbontóképességét pontszerű objektumokkal (200nm festett polisztirol gömbök, ezüst nanorészecskék) és a Richardson csillaggal mértem. A feloldást különálló pontszerű objektumok esetén a rögzített vonalátviteli (LSF) és pontátviteli függvények (PSF) illesztése alapján határoztam meg, továbbá a Richardson csillag és nanorészecskéket tartalmazó minta esetén a modulációs transzferfüggvény alapján meghatározott levágási frekvenciából számoltam ki.

Az optikai tengely képforgató prizma általi eltérülését vizsgáltam több LSTOM elrendezés esetén. Ehhez a minta konjugált síkjába helyeztem el egy túlyukat és mögé egy szilícium alapú detektort. A túlyukról rögzített szinogram alapján határoztam meg az optikai tengely eltérülésének és az azt előidéző hibák mértékét. Emellett a fókuszáló objektív belépő apertúrájának síkjában rögzítettem a kivilágító nyaláb elmozdulását CCD segítségével.

Az asztigmias kivilágítás megvalósításához egy Zeiss (Neofluar M20x/0.4NA) objektívvel fókuszáltam át a kivilágító nyalábot egy p-típusú, 0.5mm vastag kalcit lemezen. A létrejövő asztigmias vonalat egy Olympus (M20x/0.4NA) objektív, egy teleszkóp, és egy Nikon (M50x/0.55NA) objektív segítségével fókuszáltam újra a Richardson tesztmintára. Asztigmias vonal forgatását a kalcit lemez és egy polarizátor együttes forgatásával, a pásztázást egy x-y-z piezo tömb segítségével valósítottam meg. A Richardson csillag segítségével vizsgáltam a képminőséget és a laterális feloldást.

Pechan prizmát és galvo tükörrel történő pásztázást alkalmazó LSTOM rendszert alakítottam át fluoreszcens és konfokális vizsgálatokhoz. Ehhez dikroikus nyalábosztóval csatoltam ki a minta által emittált fényt. A nyalábot egy emissziós

szűrőn átvezetve a nyalábot átfókuszáltam egy résen és az átjutó fényt fotoelektron-sokszorozóval detektáltam. A feloldást és a pontátviteli függvény izotróp mivoltát festett polisztirol gömbön, a képminőséget és az optikai szelektív tulajdonságot pedig *Convallaria majalis* tesztmintán vizsgáltam Zeiss (M20x/0.4NA) objektív használata mellett.

Vonalpásztázó mikroszkópot építettem, amelyben a pásztázó vonalat egy hengerlencse segítségével hoztam létre, a pásztázást pedig piezo tömbbel valósítottam meg. A kivilágító nyaláb fázisviszonyait egy SLM (Spatial light modulator) segítségével módosítottam úgy, hogy a nyaláb középső részében π fázistolást vezettem be. Ekkor, megfelelő kitöltési tényező esetén finomabb struktúra világítja ki a mintát, amely 3 csúccsal rendelkezik a vonalra merőleges irányban. A középső csúcs által megvilágított térrészből érkező fotonokat detektáltam konfokálisan. Ehhez egy CCD pixelsorát alkalmaztam vonaldetektorként. A rendszer feloldását ezüst nanorészecskék alkotta mintával vizsgáltam Nikon (M100x,1.49NA) olaj immerziós objektív használata mellett.

A fényforrás minden elrendezés esetén egy diódapumpált frekvenciakétszerezett Nd:YAG lézer (Roithner DPSSL-532) volt, amelyet 10 kHz 5V TTL jellel modulálva Lock-in detektálást alkalmaztam. Az adatok beolvasását egy NI PXIe-6356 típusú adatgyűjtő kártya végezte. A mérések vezérlését Labview, a mérések kiértékelését Matlab környezetben valósítottam meg.

4. Új tudományos eredmények

1. *Vonallal pásztázó tomográfiás optikai mikroszkópban (LSTOM) alkalmazott képforgató prizma hibás beállításának és forgatásának a képalkotásra gyakorolt hatását vizsgáltam optikai nyalábkövetés és numerikus szimulációk alkalmazásával. Kritériumot határoztam meg, mely szerint, ha a pásztázó vonal elmozdulása nem haladja meg a laterális feloldás $1/10$ -ét, akkor a rekonstruált kép laterális feloldásának romlása nem haladja meg a 2%-ot.*

LSTOM mikroszkópban kritikus pont a pásztázó vonal és a pásztázási irány forgatása ugyanis, ha a tomográfiás adatgyűjtés során a projekciókat nem egy pont körül rögzítjük, akkor a rekonstruált kép minőségromlást szenved. Ilyen hibát eredményez, ha az LSTOM rendszerben használt képforgató prizma a beállítás pontatlansága vagy a forgató hibája miatt eltéríti az optikai tengelyt. Az ezzel kapcsolatos hibákat vizsgáltam optikai nyalábkövetéssel, és szimulációkkal. Azt találtam, hogy ha a pásztázó vonal elmozdulása nem haladja meg a laterális feloldás (R) $1/10$ -ét, akkor a rekonstruált kép laterális feloldásának romlása nem haladja meg a 2%-ot. Ezen kritérium megvalósíthatóságát vizsgáltam elméletileg és kísérletileg több LSTOM elrendezés esetén. [T1]

2. *Kettőstörő lemez segítségével létrehozott asztigmias vonalat alkalmaztam LSTOM mikroszkópban, ezáltal stabilabb forgatást valósítva meg, mint képforgató prizmával.* Asztigmia vezethető be egy p-típusú kalcit lemezen átfókuszálva egy lineárisan polarizált nyalábot. A fókuszban létrejövő vonal forgatható a lemez és a polarizációs irány együttes forgatásával. A módszer előnye, hogy a pásztázó vonal laterális pozíciója független a kettőstörő lemez eltolásától, és a lemez dőlésszögét is elegendő nagyságrendileg 0.01° pontosan beállítani, ezáltal kevésbé érzékeny a beállításra és a forgatásra, mint a képforgató prizma. Kísérletileg megvalósítottam az asztigmias kivilágítást LSTOM mikroszkópban. A rögzített kép izotróp és rekonstrukciós hibáktól mentes, ami az jelenti, hogy a vonal hibamentesen forgatható. Emellett 10% feloldásjavulást tapasztaltunk a hagyományos mikroszkóp elvi feloldásához képest. [T2]

3. *Fluoreszcens biológiai minták vizsgálatára alkalmas konfokális LSTOM mikroszkópot építettem. A rögzített képek rekonstrukciós hibáktól mentesek és a laterális feloldás 17%-kal haladja meg a hagyományos mikroszkóp feloldását.*

Fluoreszcens mérésekre alkalmas LSTOM rendszert építettem és tesztminták segítségével vizsgáltam a mikroszkóp képalkotását. *Convallaria Majalis* mintáról rögzített képek rekonstrukciós hibáktól és aberrációktól mentesek, továbbá demonstrálják a mikroszkóp optikai szelektív tulajdonságát. Festett 200nm polisztirol gömbről készült felvétel alapján elmondható, hogy a rendszer pontátviteli függvénye izotróp, és az ez alapján számolt, Rayleigh értemben vett laterális feloldás ($0.67\mu\text{m}$ [$\lambda_{\text{gerj}}=532\text{nm}$, $\text{NA}=0.4$]) jó egyezésben van az elméleti értékkel ($0.665\mu\text{m}$). Ez alapján a laterális feloldás 17%-kal haladja meg a hagyományos mikroszkóp feloldását. [T1]

4. *Vonallal pásztázó mikroszkópban 37%-os laterális feloldásjavulást valósítottam meg a kivilágítás fázismanipulációja és konfokális detektálás alkalmazása révén.*

A kivilágító nyaláb fázisviszonyainak megváltoztatásával finomabb vonalszerű struktúrát hoztam létre egy vonallal pásztázó mikroszkóp fókuszában. Ehhez a nyaláb közepén π fázistolást vezettem be. A speciális kivilágítást konfokális detektálással kombináltam, ezzel eliminálva a kivilágítás mellékcsúcsaiból származó fényt. Elméletileg vizsgáltam a fázistolás kitöltési tényezőjének, és a konfokális rés szélességének hatását a rendszer eredő vonalátviteli függvényére. A kitöltési tényező optimális értéke ≈ 0.15 , és a rés szélessége nem haladhatja meg a 0.5 Airy egységet. Méréseket végeztem ezüst nanorészecskékből álló mintán, és azt találtam, hogy 532nm hullámhosszúságú kivilágítás és 1.49 numerikus apertúrájú objektív alkalmazása mellett a laterális feloldás (a Rayleigh kritérium alapján) 115nm. Ugyanezen rendszerben a manipuláció és konfokális detektálás nélkül 183nm mérhető, amelyhez viszonyítva a feloldásjavulás 37%. A javulás mértéke 36% a hagyományos vonalpásztázó mikroszkóp (179nm) és 47% hagyományos mikroszkóp (218nm) esetén, az azonos hullámhossz és numerikus apertúra mellett számolt, elvi értékekhez viszonyítva. A módszer elméletileg alkalmazható LSTOM rendszer feloldásának növeléséhez. [T3]

5. Publikációk

A tézispontokhoz kapcsolódó referált folyóiratcikkek:

- [T1] L. Dudás, G. Gajdátsy, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Szabó: "*Correction of error motion in a line-scanning tomographic optical microscope*" Appl. Opt. 51, 6319 (2012);
I: 1.689
- [T2] J. Sinkó, L. Dudás, G. Gajdátsy, M. Erdélyi, G. Szabó: "*Map-free line-scanning tomographic optical microscope*", Opt. Let. 36, 4011-4013 (2011)
I: 3.385
- [T3] L. Dudás, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Szabó: "*Confocal line-scanning microscope with modified illumination*" Opt. Let. 37, 4293 (2012)
I: 3.385

Egyéb referált folyóiratcikkek és szabadalom:

- [E1] G. Gajdátsy, L. Dudás, M. Erdélyi, G. Szabó, "*Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function*", Journal of Optics 12 (11) 115505 (2010)
I: 1.99
- [E2] G. Szabó, M. Erdélyi, G. Gajdátsy, L. Dudás, "*Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object*", Patent Application WO/2009/030966 (2009)
- [E3] M. Erdelyi, E. Rees, D. Metcalf, G. S. Kaminski Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. E. Knight, and C. F. Kaminski: „Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy” Opt. Exp., Vol. 21, Issue 9, pp. 10978-10988 (2013)
I: 3.546

Konferenciák:

- [E4] L. Dudás, "*Line-scanning tomographic optical microscope*", előadás, 11th international ELMI meeting, Alexandroupolis, Görögország (2011)
- [E5] L. Dudás, M. Erdélyi, J. Sinkó, G. Gajdátsy, G. Szabó: "*Line-scanning tomographic optical microscope*" poszter prezentáció, Focus on Microscopy (FOM) konferencia, Szingapúr (2012)
- [E6] L. Dudás, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Gajdátsy, G. Szabó: "*Line-scanning tomographic optical microscope*" poszter prezentáció, 12th International ELMI meeting on Advanced Light Microscopy Leuven, Belgium (2012)