

PhD-ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Vonalpásztázáson alapuló tomográfiás optikai mikroszkóp
elméleti és kísérleti vizsgálata**

Szerző:
GAJDÁTSY Gábor

Témavezetők:
Dr. ERDÉLYI Miklós és Prof. Dr. SZABÓ Gábor

Fizika Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

2010
Szeged

1. Bevezetés

Az optikai mikroszkópok kiemelkedő szerepet töltenek be az élő tudományok analitikai eszköztárában. Segítségükkel megfigyelhetők olyan pár mikron és párszáz nanométer nagyságrendjébe eső biológiai minták, melyek sértetlen vizsgálatára más képalkotó eszközökkel - pl. elektronmikroszkóp - nincs lehetőség. Ezen előnynek köszönhetően az optikai mikroszkópok képalkotó teljesítményének növelése, valamint új optikai leképező eljárások kidolgozása kitüntetett iránya a tudományos kutatásoknak.

Egy optikai leképező rendszer legfőbb jellemzője, a rendszer feloldóképessége, melynek értékét a fény hullámtermészetéből eredő diffrakció és a rendszerre jellemző aberráció korlátozza. Az aberráció hatása az optikai rendszer minőségének növelésével jelentősen csökkenthető. A diffrakcióból eredő feloldás határa a Rayleigh, vagy a Sparrow kritériummal adható meg. Optimális (Köhler) kivilágítás esetén a legkisebb, a rendszer által még feloldható méret jól közelíthető az alkalmazott hullámhossz felével, mely laterális irányban $\sim 200\text{nm}$, tengelyirányban $\sim 400\text{nm}$ környékére esik, látható tartományú fényforrást feltételezve. Ezen érték csökkentésére az utóbbi három évtizedben intenzív kutatómunka irányult, melynek eredményeképpen olyan képalkotó megoldások születtek, mint a konfokális mikroszkóp, 4Pi mikroszkóp, kép interferencia mikroszkóp, többfotonos mikroszkóp, STED mikroszkóp, pásztázó közeltér mikroszkóp, valamint a PALM és a STORM. A felsorolt módszerek egy részének feloldása pár százalékkal, míg egyes eljárásoké akár tízszeresével is meghaladhatja az említett kritikus méretet. A legtöbb megoldás azonban nem alkalmazható tetszőleges kiterjedésű és anyagú minták vizsgálatára, az esetek nagy részében jelzőmolekulák használata szükséges melyek fluoreszcenciáját mérik és értékelik ki a módszerek. A nemlineáris jelenségeken alapuló eszközök intenzív kivilágítást igényelnek, melyek roncsolhatják a biológiai mintákat (photobleaching).

A hagyományos mikroszkópokkal ellentétben, egyes képalkotó rendszerek a vizsgált tárgy egy belső metszetéről szolgáltatnak részletes információt. Ilyen, az optikai tartományban működő, pásztázó konfokális mikroszkóp, a TIRF, illetve az optikai projekciós tomográf (OPT). A konfokális mikroszkópia a legkorábbi olyan képalkotó eljárás, mely a feloldás határának növelését célozza, az optikai tengely irányában. A módszer hatékonyan szűri a tárgy vizsgálni kívánt szeletén kívülről érkező fényinformációt, így a még axiális irányban feloldható távolság megközelítőleg $\sqrt{2}$ -ed része a hagyományos optikai mikroszkópénak. Hátránya azonban, hogy a minta képét ponttal történő pásztázás segítségével állítja elő, ami időigényes folyamat. Az optikai projekciós tomográf az orvosi diagnosztikában

használt computer tomográf (CT) optikai tartományban működő megvalósítása. A CT eredeti elve esetén a vizsgált objektumot egy kollimált röntgennyaláb világítja át. Az objektumon átjutó röntgenintenzitás mérhető, miközben a sugárforrás és a vele szemben elhelyezkedő detektor egymással párhuzamosan mozog. A mérést több irányból megismételve, numerikus algoritmus segítségével (pl. szűrt-visszavetítés, FBP) az objektum belső szerkezetének egy síkja megjeleníthető. Az OPT a látható tartományba eső fényt fókuszál át a mintán és hasonlóan a CT-hez, az átjutó fényintenzitást méri. Lényeges különbség azonban, hogy míg a CT esetén az alkalmazott röntgen tartományban a sugarak keresztmetszete a tárgy teljes hosszában jóval kisebb, mint a rekonstrukciónál használt képelem mérete, addig a látható hullámhossztartományban nem elhanyagolható a diffrakció hatása. A diffrakció miatt a mintának, az optikai tengelytől távolabb eső részei is módosítják az átjutó fény intenzitását, ami a keletkező képen hibát okoz. Az előbbieket miatt az OPT nem képes a Rayleigh-féle feloldási kritérium környéki, vagy az alatti részletek megjelenítésére. További hátránya, hogy a használt minta nem lehet tetszőleges vastagságú és nem hengersizmetrikus minta esetén az optikai úthossz változik a pásztázás szögével.

Jelen értekezés témája egy olyan optikai képalkotó eljárás elméleti és kísérleti vizsgálata, mely ötvözi a tomográfiában használt képrekonstrukció elvét, a vonallal pásztázó (line-scanning) konfokális mikroszkópok felépítésével.

2. Célkitűzések

Elsődleges céloom egy új leképező eljárás és mikroszkóp építése és annak kiterjedt kísérleti vizsgálata volt. Ez az eszköz a Tomográfiás Optikai Mikroszkóp (TOM), mely sikeresen ötvözi a tomográfiában alkalmazott képrekonstrukció és a vonalpásztázó konfokális mikroszkóp előnyeit. A TOM laterális feloldása meghaladhatja a hasonló felépítésű, ponttal pásztázó konfokális mikroszkópét, azonos kivilágító és detektáló optika használata mellett. Ennek igazoláshoz először számításokkal vizsgáltam az alkalmazott rekonstrukció paramétereinek képminőségre gyakorolt hatását. Ilyen paraméter a pásztázási lépés nagysága, valamint a mért projekciók száma. Ezt követően megépítettem az eszköz két változatát. Az első változat transzmisszióban méri a rekonstrukcióhoz szükséges fényinformációt miközben a minta síkjára képezett, nem áteresztő éllel pásztázza a minta vizsgált tartományát. A második változatban, a pásztázás a minta felszínére fókuszált fénycsíkkal történt és a reflektált fényintenzitást mértem. A pásztázási irány változtatását minta- és nyalábforgatással is megvalósítottam. A két változat által rögzített képek alapján szándékoztam megállapítani a TOM feloldását és jellemezni képalkotási tulajdonságait.

Az előzetes mérések és számolások megmutatták, hogy mindkét TOM változatnál kritikus feltétel, hogy a pásztázás irányát változtató mechanika forgástengelye egybeessen a rendszer kijelölt optikai tengelyével. Ez a feltétel csak bizonyos pontossággal teljesíthető, így megoldásként egy olyan eljárást terveztem, mely mérés közben (*in situ*) korigálja a tengelyhibát.

A tengelyhiba korrekciója jelentősen megnöveli a mérési időt és összetett jelfeldolgozó elektronika használatát igényli. A korrekció elhagyható a rendszerből olyan optikai elem használatával, mely képes előállítani és elforgatni a pásztázáshoz szükséges fénycsíkot és ezzel együtt érzéketlen a forgástengely laterális irányú elmozdulására. Ilyen optikai elem készíthető kettőtörő síkpárhuzamos lemez segítségével, melyen az áthaladó extraordinárius sugármenet erős asztigmatizmust vezet be. A kettőtörő lemezen történő átfókuszálás alkalmas a pásztázó nyaláb intenzitásprofiljának manipulálására is, mely ideális esetben az optikai rendszer feloldóképességének növekedéséhez vezethet. Az értekezésben megvizsgálom, hogyan függ a keletkező fókusz intenzitáseloszlása a használt kristály tulajdonságaitól, illetve a kivilágító nyaláb polarizációjától.

3. Alkalmazott módszerek és eszközök

A TOM optikai elrendezéseinek megépítése előtt numerikus szimulációkkal vizsgáltam a képalkotás menetét. MATLAB környezetben fejlesztett, saját kódokat használtam a képrekonstrukciós eljárás (szűrt-visszavetítés) és a felvett szinogram paramétereinek optimalizálásához. A számolás során figyelembe vettem a projekciók felvételének menetét – mind reflexiós, mind transzmissziós módban –, a kivilágító intenzitáseloszlás esetleges torzulását és a forgató mechanika tengelyhibájából származó hibákat is.

A laterális feloldásnövekedés kimutatásához két TOM változatot építettem. A transzmissziós változatnál egy nem áteresztő élt képeztem a minta felszínére. Az él pozícióját léptetve, a minta mögött mértem az áthaladó fény intenzitását. A mérést a léptetési irány változtatása mellett megismételve rögzíthető a minta szinogramja. Az él képét egy SLM (Spatial Light Modulator) segítségével állítottam elő. Mintának egy különböző periódusú, reflektáló rácsvonalakat tartalmazó üveglapot használtam. A mintán áthaladó fényintenzitást egy mikroszkóp objektívvel ($M = 4$, $NA = 0,1$) gyűjtöttem össze és továbbítottam a detektorba. Az objektív és egy elmozdítható tükör segítségével az elrendezés koherens fényvel kivilágított, hagyományos optikai mikroszkópként is használható volt. A transzmissziós módban működő TOM és a hagyományos mikroszkóp feloldását az általuk rögzített képek alapján hasonlítottam össze.

Reflexiós mód esetén, egy vonallal pásztázó konfokális mikroszkóphoz hasonlóan valósítottam meg a kivilágítást és nyalábpásztázást. Egy változtatható szélességű rést világítottam ki frekvencia kétszeresített Nd:YAG lézer fényével. Az így keletkező hengernyalábot egy változtatható vastagságú fedőlemez korrekciójára képes *Zeiss LD 'Plan-Neofluar'* objektívvel ($M = 20$, $NA = 0,4$) fókuszáltam a minta felszínére. Mivel az objektív hátsó apertúráját a rés által létrehozott elhajlási kép nulladrendje világította ki, a mintán létrejövő intenzitáseloszlás egy diffrakció limitált fénycsík volt. Ezt a fénycsíkot egy galvanométerrel hajtott pásztázó tükör léptette a minta felszínén, míg a pásztázási irány változtatása egy Pechan prizma segítségével volt megoldva. A forgató mechanika tengelyhibájának kiküszöbölésére egy *in situ* korrekciós eljárást fejlesztettem és használtam. A képalkotás minőségének vizsgálatához egy erre alkalmas teszt mintáról (*Richardson Test Slide, Bio-Microtech, US 2004/0227937 A1*) készítettem felvételeket. Ezeket két, kereskedelmi forgalomban kapható, ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp (*Zeiss Axiovert*

135M, Olympus Fluoview FV1000) által, ugyanarról a mintáról és ugyanazzal az objektívvel készített képekkel hasonlítottam össze.

A tengelyhibára érzéketlen, kettőtörő elemet tartalmazó és a diffrakció limitált csík előállítására is alkalmas optikai rendszert OSLO sugárkövető szoftverrel terveztem és vizsgáltam. A program segítségével különböző típusú objektívek polarizációtartó képességét is modelleztem. A kettőtörő lemezen történő átfokuszálás következtében létrejövő polarizáció és intenzitás viszonyok számolása szintén OSLO-val történt. Az így modellezett optikai elrendezést megépítettem és a számolási eredményeket mért intenzitáseloszlás adatokkal vettem össze.

4. Új tudományos eredmények

1. Szimulációkkal megvizsgáltam a TOM által rekonstruált kép minőségének függését a projekciók számától és a pásztázási lépés nagyságától. Megmutattam, hogy a pásztázási lépés csökkentésével (Δn) a rekonstruált kép részletessége egy határon túl már nem növelhető, míg rekonstrukcióhoz szükséges számolási idő a lépések számának négyzetével emelkedik. A projekciók számának növelésével, azaz a szögelfordulás ($\Delta\phi$) mértékének csökkentésével együtt nő a rekonstruált kép kontrasztja. A két paraméter (Δn , $\Delta\phi$) együttesen a rekonstruált kép frekvencia felbontását határozza meg a Fourier térben. Ha a tárgy Fourier spektruma egy adott frekvenciahatáron felül nem hordoz információt a tárgyról, akkor az összes részlet feloldásához olyan kicsi Δn választása szükséges, hogy a Shannon-féle mintavételi kritérium teljesüljön. Ahhoz hogy a képen ne jelenjen meg a rekonstrukcióból származó hamis moduláció, végtelen projekció rögzítése szükséges, azaz $\Delta\phi$ nullához kell tartson. [T1, T2]
2. Kísérlettel igazoltam, a TOM feloldóképessége transzmissziós üzemmódban, a minta forgatásával meghaladja a koherens fényel kivilágított, hagyományos mikroszkópok feloldóképességét, amennyiben a pásztázásra használt struktúra kisebb, mint az alkalmazott mikroszkóp objektív által még feloldható kritikus méret. Hagyományos mikroszkóppal és TOM-mal is felvételeket készítettem egy $4\mu\text{m}$ periódusú ekvidisztáns rácstről. Mindkét eszközben ugyanazt az objektívet használtam a képképzés során ($\text{NA} = 0.1$) és a kivilágító fény hullámhossza (660nm) is azonos volt a két esetben. A hagyományos mikroszkóp felvételei alapján az eszköz által feloldott kritikus méret (CD) nagyobbak bizonyult, mint $2\mu\text{m}$. Ez a méret a képen még megfigyelhető legkisebb moduláció periódusának fele. A TOM felvételeken ez az érték $2\mu\text{m}$ -nél kisebbnek adódott. A rács modulációja a hagyományos mikroszkóp CCD felvételein nem volt látható, de a TOM felvételeken igen. A felvett képek Fourier analízise során a spektrumban csak a TOM esetén volt látható a $4\mu\text{m}$ -nek megfelelő karakterisztikus frekvenciacsúcs. [T1]
3. A gyorsabb pásztázás érdekében a rendszert nyalábpásztázási üzemmódra alakítottam át. A kivilágító struktúra forgatását és a pásztázási irány forgatását két különböző módon, nyalábforgatással és tárgyforgatással oldottam meg. Mindkét esetben a forgató mechanika

tengelyhibájából adódóan jelentősen romlott a rekonstruált képek minősége. A tengelyhiba szétválasztható ún. szinkron és aszinkron mozgásra, melyek közül a szinkron mozgás a tengely laterális vándorlásának átlaga, több körbefordulás után. Ebből a mozgásból eredő tengelypozíció hiba korrigálható, mivel az elmozdulás pályája mérhető és utólag az elcsúszott projekciók helyretolhatók. A véletlenszerűen változó elmozdulás, más szóval az aszinkron hiba hatása csak az elmozdulás valós idejű mérésével kompenzálható a szinogramon. Az aszinkron hiba kiküszöbölésére mérési és korrekciós eljárást dolgoztam ki mind tárgyforgatás mind nyalábforgatás esetén. A tárgyforgatást használó TOM elrendezésben a hiba mérése egy optikai-száliba csatoló rendszer segítségével történt. A mintát tartalmazó tárgylemez mögé egy második mikroszkóp objektívet tettem, mely első fókuszpontjának síkja egybeesett a tárgy síkjával. A fókuszot a minta mellé, a pásztázási tartományon belülré pozicionáltam. Az objektív hátsó fókuszába egy egymódusú optikai szálat raktam. A projekciók felvétele során a diffrakció limitált pásztázó csík fényének egy része a minta mögötti objektíven keresztül az optikai száliba csatolódt. A maximális fénytéljesítmény akkor jutott a száliba, amikor a kivilágító csík éppen a minta mellé pozicionált fókuszpontba esett. Az így mért pozíciókkal megadható egy virtuális forgásközpont a tárgy síkjában, melyhez minden mért projekció utólag hozzáigazítható. Nyalábforgatás esetén a korrekció menete hasonló. A mintát kivilágító nyaláb egy részét nyalábosztó hártya segítségével kicsatoltam. A kicsatolt karban a fényt egy túlyukon átfókuszáltam és mértem az átjutó intenzitást. Tengelyhiba-mentes esetben az így mért intenzitás maximális volt. Amint a tengelyhiba következtében a forgató elem eltolta a nyalábot, a túlyuk után nem volt mérhető intenzitás. A pásztázó tükröt addig pozicionáltam, míg a túlyukon újra maximális fény jutott át. Ekkor a rendszer virtuális forgástengelye kijelölhető és az így mért pozíció körül a projekció rögzíthető. A fenti két eljárás segítségével a szinkron és aszinkron tengelyhibákból eredő képminőség romlás mértékét a TOM feloldási határa alá tudtam szorítani. [T2]

4. Kísérletileg megmutattam, hogy a vonallal pásztázó, reflexiós TOM feloldóképessége meghaladja a kereskedelmi forgalomban kapható, ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp feloldóképességet, azonos fókuszáló objektív használata mellett. Ehhez először megmértem a kivilágító objektív által létrehozott intenzitás eloszlás félértékszélességét (FWHM) a fókuszban, mely $0,664 \pm 0,014 \mu\text{m}$ -nek adódott. A mért FWHM jól egyezik az elméleti értékkel, mely $0,5\lambda/\text{NA} = 0,665 \mu\text{m}$, ahol $\text{NA} = 0,4$, $\lambda = 532\text{nm}$. Ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp esetén a kivilágító apertúra által létrehozott fókuszbeli

intenzitáseloszlás átmérője az elmélet szerint $0,61\lambda/NA$. Ez az eloszlás megegyezik a kivilágító apertúra pontátviteli függvényével (PSF). Konfokális rendszer esetén az eredő PSF a kivilágító és detektáló apertúrák pontátviteli függvényeinek szorzata. Ugyanazt a numerikus apertúrát feltételezve a kivilágító és detektáló nyalábmenetekben, a mért FWHM érték alapján a TOM laterális feloldása meghaladja egy ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp laterális feloldását. A jóslott feloldásnövekedés kimutatásához felvételeket készítettem a TOM-mal és egy ponttal pásztázó konfokális eszközzel (*Zeiss Axiovert 135M*). A felvételek alapján, a TOM által feloldott kritikus méret $0,443\mu\text{m}$ ($\lambda = 532\text{nm}$), míg a konfokális eszköz esetén $0,517\mu\text{m}$ ($\lambda = 543\text{nm}$) volt. Megállapítottam, hogy a TOM 15%-al nagyobb feloldást tesz lehetővé a konfokális eszközhöz képest, a kissé eltérő hullámhosszak figyelembe vétele mellett is. [T2]

5. Céлом volt egy, a tengelyhibára érzéketlen, kettőtörő elemet tartalmazó és a diffrakció limitált csík előállítására is alkalmas optikai rendszer tervezése és megépítése. Ehhez először különböző típusú objektívek polarizációtartó képességét és fókusz szeparációját vizsgáltam. Kimutattam, hogy kettőtörő lemezen keresztül történő fókuszálásnál (a kristály tengelye merőleges az optikai tengelyre) az ordinárius és extraordinárius fókuszok nem gerjeszhetőek szeparáltan lineárisan polarizált beeső nyalábbal, nagy NA esetén. A fókuszáló objektív elforgatja a polarizáció irányát az ideálistól, az apertúra negyedeinek szélén jelentősen. Ennek következtében a rendszeren áthaladó fény intenzitása 10%-kal csökken, valamint a létrejövő inhomogén kivilágítás miatt torzul a fókusz intenzitásprofilja és a sérült hengersizmetria miatt aberrációk lépnek fel. A fókuszfoltok szeparációja javítható katadioptrikus optika használatával (intenzitás csökkenés 2%). Ebben az esetben a kettőtörő plánparallel lemez vezet be aberrációt. [T3]
6. Kettőtörő lemezen átfókuszálva radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábot alítottam elő. Ha az alkalmazott kristály tengelye merőleges a kristály felszínére, (s-típusú kristály) akkor a keletkező ordinárius és extraordinárius fókuszban a polarizáció azimutális és radiális szimmetriát mutat. OSLO sugárkövető programmal kiszámoltam, hogy lineárisan polarizált kivilágító nyaláb esetén a keletkező fókuszfolt hengeres szimmetriája sérül, míg cirkulárisan poláros kivilágító nyalábot használva nem változik intenzitás eloszlás szimmetriája a fókuszban. A számolási eredményeket kísérlettel igazoltam. A keletkező azimutális és radiális fókuszok szeparációja a kettőtörő kristály vastagságától és anyagi tulajdonságától függ. (Fázishelyes, radiálisan polarizált nyaláb fókuszálhatósága jobb,

mint a lineárisan vagy cirkulárisan poláros nyalábé, így optikai képalkotó rendszerben történő használatával nagyobb laterális feloldás érhető el.) [T4]

5. Publikációk

A tézispontokhoz kapcsolódó referált folyóiratcikkek és szabadalom:

- [T1] Szabó G., Erdélyi M., Gajdátsy G., Dudás L., Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object, *Patent Application WO/2009/030966* (2009).
- [T2] Gajdátsy G., Dudás L., Erdélyi M., Szabó G., Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function, *Journal of Optics* **12**(11) 115505 (2010).
- [T3] Gajdátsy G., Erdélyi M., Analysis of focus distortion based on birefringence, *Journal of Optics A* **9** pp.: 982–987 (2007).
- [T4] Erdélyi M., Gajdátsy G., Radial and azimuthal polarizer by means of a birefringent plate, *Journal of Optics A* **10** (2008).

Egyéb referált folyóiratcikkek:

- [1] Erdélyi M., Bereznai M., Gajdátsy G., Bor Zs., Three-dimensional focus manipulation by means of a birefringent plate, *Optics Communications* **281** pp.: 4807-4811 (2008).
- [2] Gajdátsy G., Benedek F., Kokavec J., Szabó G., Kornis J., Improved fiber optic device for in situ determination of electrolyte stratification in lead-acid batteries, *Review of Scientific Instruments* **80** 125108 (2009).