

Optik Mikroskopide Nicel Faz Görüntülemesi

Muhammed Fatih Toy

mftoy@medipol.edu.tr

Yenilikçi Mikroskop Teknolojileri Merkezi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul Medipol Üniversitesi 34810, İstanbul, Türkiye

Günümüzde optik mikroskoplar üretimden yaşam bilimlerine kadar geniş bir spektrumda yaygınlıkla kullanılmaktadır. Yaşam bilimleri ve klinik uygulamalarında incelenen mikroskopik örnek genellikle bir hücre kültürü veya doku kesiti olmaktadır. Bu iki durumda da örneklerin kalınlıkları ve kimyasal yapıları nedeniyle görünür bantta oldukça geçirendirler. Bu nedenle ışık geçirgen mikroskop görüntülemesi ile bu tür örneklerden yeterli karşıtlık ve bilgi eldesi mümkün olmamaktadır. Tarihsel olarak bu karşıtlık probleminin çözülebilmesi için faz karşıtlıklı mikroskoplar ilk olarak Frits Zernike tarafından önerilmiştir. Örnek tarafından kırınıma uğratılan dalgalar ile kırınıma uğramayan dalgalar arasında $\pi/2$ kadar faz farklı oluşturularak girişim yapmalarına izin verilen bu yaklaşım ile yüksek karşıtlık eldesi mümkün olmaktadır. Fakat hale tipi hata, azalan çözünürlük ve kalınlık – soğurum bilgisinin karışık olması nedeniyle elde edilen görüntüler nicel bilgi vermekten oldukça uzaktır. Diferansiyel girişim karşıtlığı (DIC) prensibi ile çalışan mikroskoplarda elde edilen görüntüler görece daha iyi olsa da doğrusal olmayan faz cevabı ve faz genlik bilgisinin karışmış yapısı bu yaklaşımın kullanımını sadece empirik yorumlamalara sınırlamaktadır. Floresan işaretçilerin kullanımı ile yaşam bilimleri için yüksek kimyasal seçicilik elde edilebilmiştir. Floresan mikroskop görüntülemesi bu seçicilik ve arka plansız yapısı ile en önemli teknik olagelmıştır. Fakat işaretçilerin ağarması nedeniyle nicel veri elde ancak oransal yaklaşımlarla yapılabilmektedir. Ayrıca canlı örneklerin mutasyon veya işaretleme gereksinimi hem zaman alıcı olup hem de klinik uygulama senaryolarını sınırlamaktadır. Tüm bunların yanında yüksek şiddetli uyarım ışığı nedeni ile canlı örneklerde uzun süreli incelemeler foto-toksik etkilere yol açmaktadır.

Nicel faz mikroskop yaklaşımları genel olarak diferansiyel girişim karşıtlığında doğrusal olmayan faz cevabının doğrusallaştırdığı ve genlik bilgisinden ayrılarak sayısal olarak ifade edilebildiği tekniklerdir. Bu sayede örnek fazı yüksek hassasiyet ile örnek kalınlığı veya kırılma indis değişimine ilintilenebilir. Zamansal kimyasal yapı değişimi (örneğin protein sentezi), veya 3 boyutlu morfolojik değişimler gerçek zamanlı olarak takip edilebilir. Takip edilebilen kalınlık değişim hassasiyeti tipik olarak su içindeki örneklerde $<5\text{nm}$ seviyesindedir. Yapısal olarak nicel faz mikroskopları girişim temelli olanlar ve olmayanlar olarak ikiye ayrılabilir. Girişim temelli mikroskoplarda genel olarak örnek kırınımı dalga alanı ile bilinen bir dalga alanı girişime uğrayarak kamera üzerinde görüntülenir. Yaygınlıkla dijital holografi prensibi kullanılarak bu girişim deseninden örnek faz ve genlik bilgisi ayrık ve nicel olarak elde edilebilir. Girişim temelli olmayan tekniklerde ışık şiddetinin iletimi veya kromatik aberasyon değişimi gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır. Nicel faz mikroskoplarından elde edilen faz ve genlik bilgisi bir karmaşık dalga alanı bilgisine karşılık gelmektedir. Bu alanın Fresnel veya açısız spektrum numerik ilerletim yani dijital netleştirme yapılabilmektedir. Bilinen bir örnek kullanımı ile sistem aberasyon kontrolü, karakterizasyonu ve düzeltimi yapılabilmektedir. Mikro üretim teknikleri ile elde edilen bir noktasal obje ($\text{çap} < \lambda/6$) yardımı ile karmaşık dekonvolüsyon yapılabilir. Klasik ışık şiddeti temelli dekonvolüsyon ters problem çözümü gerektirirken, karmaşık dalga ifadeli dekonvolüsyon ile buna gerek kalmadan kolaylıkla Abbe limitinde görüntü elde edilebilir. Bunun yanında aydınlatma açısız taranması ile açıklık sentezlemeli süper çözünürlük eldesi mümkündür ve deneysel olarak $\lambda/4$ 'den daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Açıklık sentezleme, dalgaboyu sentezleme veya örnek yeniden konumlandırılması ile karmaşık dalga bilgileri optik kırınım tomografisi prensibi ile 3 boyutlu uzaya geri yayılabilir. Geri yayılım sonucunda tomografik 3 boyutlu kırılma indisi görüntülemesi mümkün olmaktadır. Takip edilen yaklaşıma bağlı olarak frekans uzayında kayıp koni veya elma merkezi şeklinde eksik hacimler oluşmaktadır. Tümüyle özel tasarlanmış görüntüleme sistemlerinin yanında ticari mikroskoplara eklenebilir modül formunda yaklaşımlar da mevcuttur. Bu yaklaşımlarda genel olarak örnek kırınımına uğrayan dalgadan bilinen dalga formları oluşturularak ortak yol girişimölçerleri oluşturulur. Bu konuşmada nicel faz numerik geri yayılımı, kırınım tomografisi ve kompakt nicel faz mikroskopları alanında yaptığımız çalışmaların genel bir özeti sunulacaktır.