

Orvosbiológiai fénymikroszkópia és számítógépes képanalízis

**Ph.D. kurzus 1311
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola**

Dr. Kellermayer Miklós

**Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
2010**

A kurzus célja:

A fénymikroszkópos képalkotás, különleges és új mikroszkópos technikák elméleti alapjainak megbeszélése és gyakorlati bemutatása. A digitális képrögzítés, feldolgozás és megjelenítés elméleti alapjainak megbeszélése és gyakorlati aspektusainak bemutatása. A kurzus során a hallgatók önálló számítógépes munka során gyakorolhatják a digitális képanalízis lépéseit.

A kurzus tematikája:

1. Bevezetés, eligazítás, elvárások. Miért használjunk mikroszkópot? Egyszerű és összetett mikroszkóp. Geometriai optika.
2. A mikroszkópos képalkotás elméleti alapjai I: refrakció, diszperzió, nagyítás, feloldóképesség, kontraszt.
3. A mikroszkópos képalkotás elméleti alapjai II: diffrakció, numerikus apertura.
4. A fénymikroszkópia gyakorlati alapjai: Köhler megvilágítás, objektív lencsék, lencseaberrációk, mikroszkópos tárgy- és fedőlemez.
5. Kontrasztnövelés a fénymikroszkópban I: sötétlátótér, fázis kontraszt, interferencia kontraszt.
6. Kontrasztnövelés a fénymikroszkópban II: polarizáció, fluoreszcencia.
7. A klasszikus optikai felbontási határ leküzdése: konfokális mikroszkópia, "near field" optikai pásztázó mikroszkópia.
8. Különleges mikroszkópiák: teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópia, két-foton fluoreszcencia.
9. Erőkifejtés a fénymikroszkópban: a lézersipesz.
10. A látás élettana: a szem szerkezete, refrakció, akkomodáció, érzékenység, felbontás, kontraszt, moduláció transzfer függvény, színlátás.
11. A kép elektronikus detektálása, átvitele és megjelenítése. A video jel.
12. Kép digitalizálás. Digitális kamerák. A képalkotás hibáinak analóg és digitális korrekciója.
13. "Image enhancement I": a kontraszt transzfer függvény módosítása.
14. "Image enhancement II": konvolúció.
15. Szegmentáció és küszöbölés. Bináris képek feldolgozása.
16. Geometriai transzformációk.
17. Kvantitatív adatok extrahálása a digitális képből.
18. Képsorozatok analízise. Tomográfia. Háromdimenziós képanalízis.

Bemutatott mikroszkópiák:

Világos látótér mikroszkóp, Fáziskontraszt mikroszkóp, Epifluoreszcencia mikroszkóp, Polarizációs mikroszkóp, DIC mikroszkóp, Nagy érzékenységű videomikroszkópia, Konfokális mikroszkóp, Teljes belső visszaverődés fluoreszcencia (TIRF) mikroszkóp, Atomerőmikroszkóp, Lézersipesz

Kurzusvezető: Dr. Kellermayer Miklós (miklos.kellermayer@eok.sote.hu)

Ajánlott irodalom:

1. Delly, G. Photography through the microscope, Eastman Kodak Company, 1988.
2. Rawlins, D.J. Light microscopy, BIOS Scientific Publishers, Ltd., 1992
3. Slayter, E.M. & Slayter, H.S., Light and electron microscopy, Cambridge University Press, 1992.
4. Bernolák K., Szabó D. és Szilas L. A mikroszkóp. Zsebkönyv. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1979.
5. Häder, D-P. (editor) Image analysis in Biology. CRC Press, 1992.
6. Inoué, S. & Spring, K. Video microscopy. The fundamentals. (2nd ed.) Plenum Press, 1997.
7. Russ, J.C., The Image Processing Handbook (3rd ed.) CRC Press, Springer, IEEE Press, 1999.
8. Bovik, A. (editor) Handbook of Image Analysis. Academic Press, San Diego, etc., 2000.
9. NIH Image Manual. Magyarázó kézikönyv az NIH Image képanalízis programhoz. Letölthető az internetről: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.
10. Saxby, G. The Science of Imaging. Institute of Physics Publishing, Bristol, Philadelphia, 2002.
11. Spector, D.L. and Goldman, R.D. Basic Methods in Microscopy. Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2006.
12. Cox, G. Optical Imaging Techniques in Cell Biology. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2007.
13. Goldstein, D.J. Understanding the Light Microscope. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1999.

BEVEZETÉS

A fénymikroszkóp az egyik legelterjedtebb laboratóriumi és kutatóeszköz. Széles körben használják, de gyakran a működési elvek ismerete nélkül. A mikroszkóp működési elvének ismerete fontos a műszer helyes használata, az alkotott kép helyes interpretációja, és főleg az eredmények műterméktől való elkülönítése miatt. Az alábbi összefoglalás egyfajta *vázlatot*, vezérfonalat kíván adni a fénymikroszkópia és a digitális képanalízis tanulásához.

Miért használjunk mikroszkópot?

Klasszikusan a mikroszkópia célja a szemmel észre nem vehető részletek felfedése. Az alábbiak fontos mikroszkópos paraméterek.

Nagyítás vagy felbontás?

"Hasznos" nagyítás: elkülönülnek a részletek (felbontás).

"Üres" nagyítás: további részletek nem különülnek el.

Feloldóképesség: a mikroszkóp mint képalkotó eszköz egyik legfontosabb paramétere; az a legkisebb részlet, melyet egy mikroszkóp felold (felbont) egy ideális mintában.

Feloldás (felbontás): egy adott (nem ideális) mintában feloldott aktuális részlet.

Feloldható minimális távolság (d_{\min}): a feloldóképesség és a feloldás kvantitatív jellemzésére szolgáló paraméter (nagy feloldás, kis d_{\min}). A konvenció spektroszkópiai eredetű.

A fénymikroszkóp feloldóképessége $\sim 0.2 \mu\text{m}$ (hullámhossz-limitált, lásd később).

A fénymikroszkópia fejlesztésének céljai:

Feloldás növelése

Natív szerkezet megőrzése

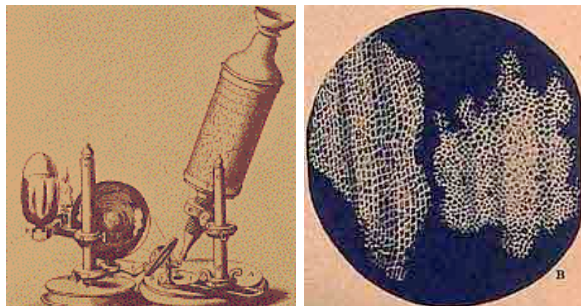
Mikroszkópos kép interpretációja, analízise

A MIKROSKÓPIA RÖVID TÖRTÉNETE

Ókori Róma: nagyítólencsék használata

1600-as évek eleje: Zacharias Jansen (holland optikus) nevéhez fűződik az első mikroszkóp.

1667: Robert Hooke (Royal Society titkára) cellulákat ír le parafában összetett mikroszkóp segítségével.



Robert Hooke mikroszkópja. "Cellulák" parafában.

1674: Antony van Leeuwenhoek (holland üzletember, Delft) élő mikróbákat figyel meg saját maga által csiszolt egyszerű mikroszkóp (**1. ábra**) segítségével.



Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)

1600-as évek vége: Newton; a fény korpuszkuláris elmélete

1801: Thomas Young; a fény hullámtermészetének bizonyítása interferenciasávok kimutatásával.

1818: Augustin Fresnel; számos optikai effektus leírása hullámelmélet segítségével.

1864: J. Clerk Maxwell; az elektromágneses tér matematikai elmélete

1873: Ernst Abbe; a felbontóképesség korlátozottságának elméleti felismerése



Ernst Abbe (1840 - 1905)

1873: Ernst Leitz 5 objektív lencsét magában foglaló forgó tartót (turret) épített.

1886: Ernst Abbe apokromát lencsét tervez, mely a vörös, sárga és kék színeket egy pontba fókuszálja. Az objektív 10 lencse-elemet tartalmazott.

1893: August Köhler; kidolgozza a róla elnevezett mikroszkópos megvilágítása technikát.

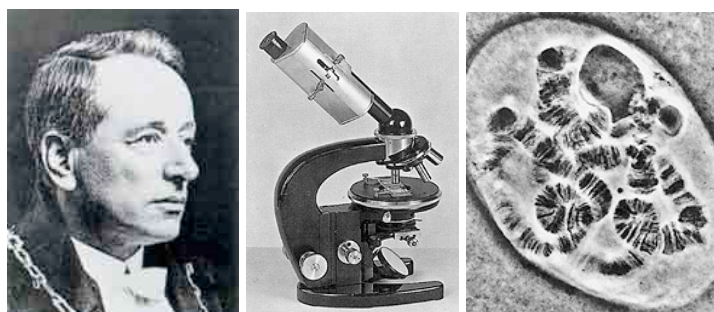


August Köhler (1866 - 1948)

1900: A felbontóképesség határának gyakorlati elérése

1904: A Zeiss gyárban megépítik az első kommerciális UV mikroszkópot, melynek feloldása a látható fényű mikroszkópénál kétszer olyan jó.

1930-as évek: Frits Zernike megépíti a fáziskontraszt-mikroszkóp



Frits Zernike, Nobel-díj 1953. A fázis-kontraszt mikroszkóp prototípusa (L-állvány, 1936). Az első felvétel élő sejt magjáról (1941).

1931: Max Knott és Ernst Ruska megépítik az első elektronmikroszkópot (Ernst Ruska 1986-ban Rohrer-rel és Binnig-gel, lásd alább, közösen Nobel-díjat kapott).

1933: Ruska megépíti az első elektronmikroszkópot, melynek feloldása meghaladja a fénymikroszkópét.

1937: Megépül az első pásztázó elektronmikroszkóp.

1939: A Siemens cég piacra dobja az első kommerciális elektronmikroszkópot.



Ruska elektronmikroszkópja. Elektronmikroszkóp az 1970-es évekből.

1970-es évek: Arthur Ashkin kidolgozza a lézercsipesz alkalmazását.

1982: Binnig és Rohrer (Nobel díj 1986) kidolgozza a pásztázó próbamikroszkópiát. Az első SPM alagútáramot mért (pásztázó alagúteffektus mikroszkóp).

1983: A lézer pásztázó konfokális mikroszkóp kommerciálisan elérhetővé válik.

1986: Az atomerőmikroszkóp feltalálása, melyben áram helyett mechanikai erő mérése történik.

1990-es évek: Near Field Scanning Optical mikroszkóp; Számítógépes képanalízis a mikroszkópiában
Ma: Különböző mikroszkópos technikák egyidejű, szinkronizált alkalmazása. Mikroszkópia kombinálása spektroszkópiás technikákkal (fluoreszcencia) AFM és lézercsipesz mint molekuláris mechanikai manipulációs eszköz.

MILYEN MIKROSKÓPOT HASZNÁLJUNK?

Megfontolandó tényezők:

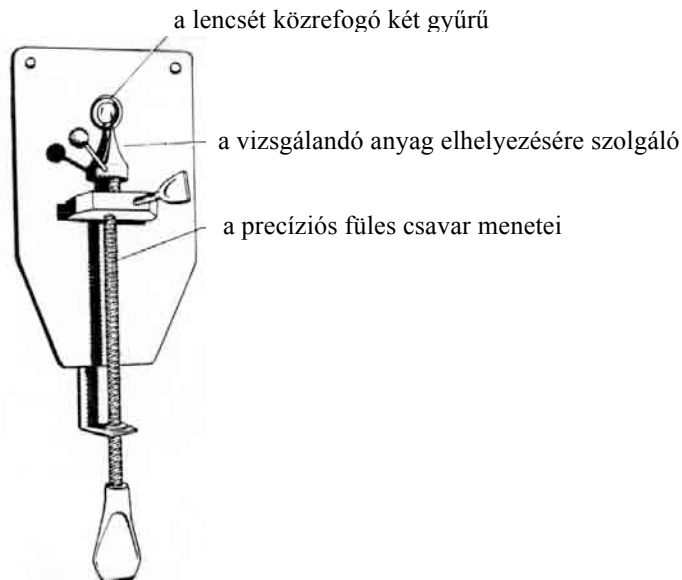
Mintaméret

Minta rögzítése

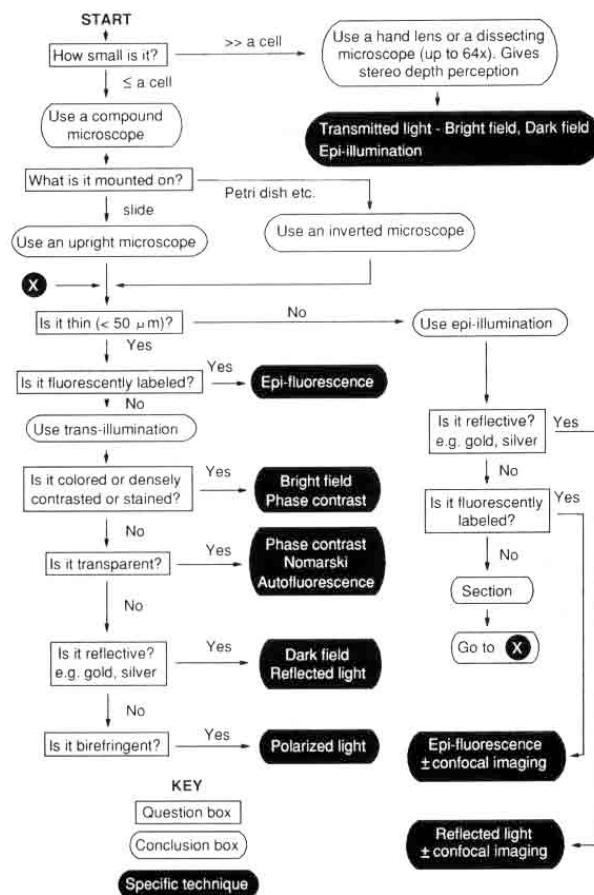
Minta vastagsága

A mintában fellelhető kontraszt

A megfelelő mikroszkópiás technika kiválasztásának lépéseit a **2. ábra** mutatja.

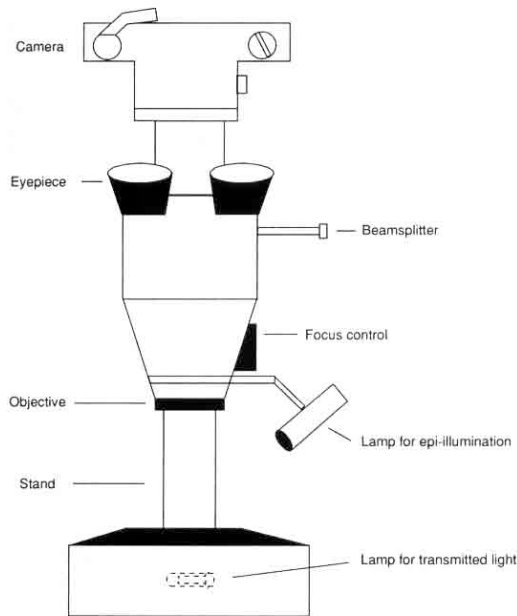


1. ábra. A. Leeuwenhoek kézben tartható mikroszkópja.

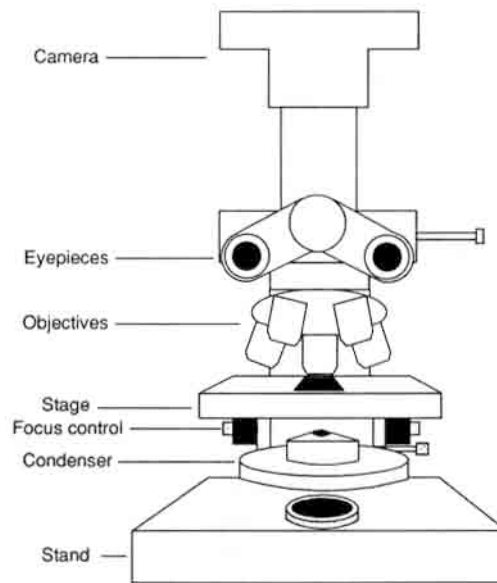


2. ábra. A megfelelő mikroszkópos módszer kiválasztásának lépései.

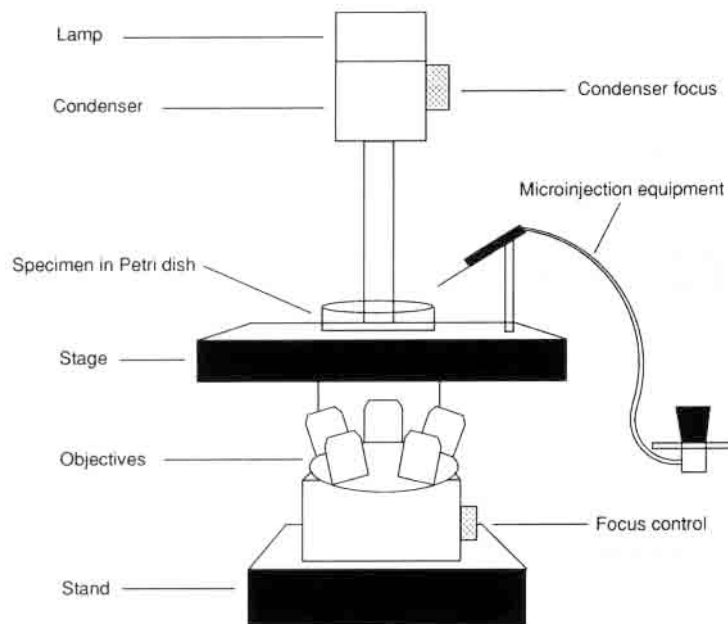
A ma már szinte mindenki számára jól ismert, különböző mikroszkóp típusok sémáit a **3-5. ábrák** mutatják.



3. ábra. Sztereo vagy operációs mikroszkóp.



4. ábra. "Upright" mikroszkóp.



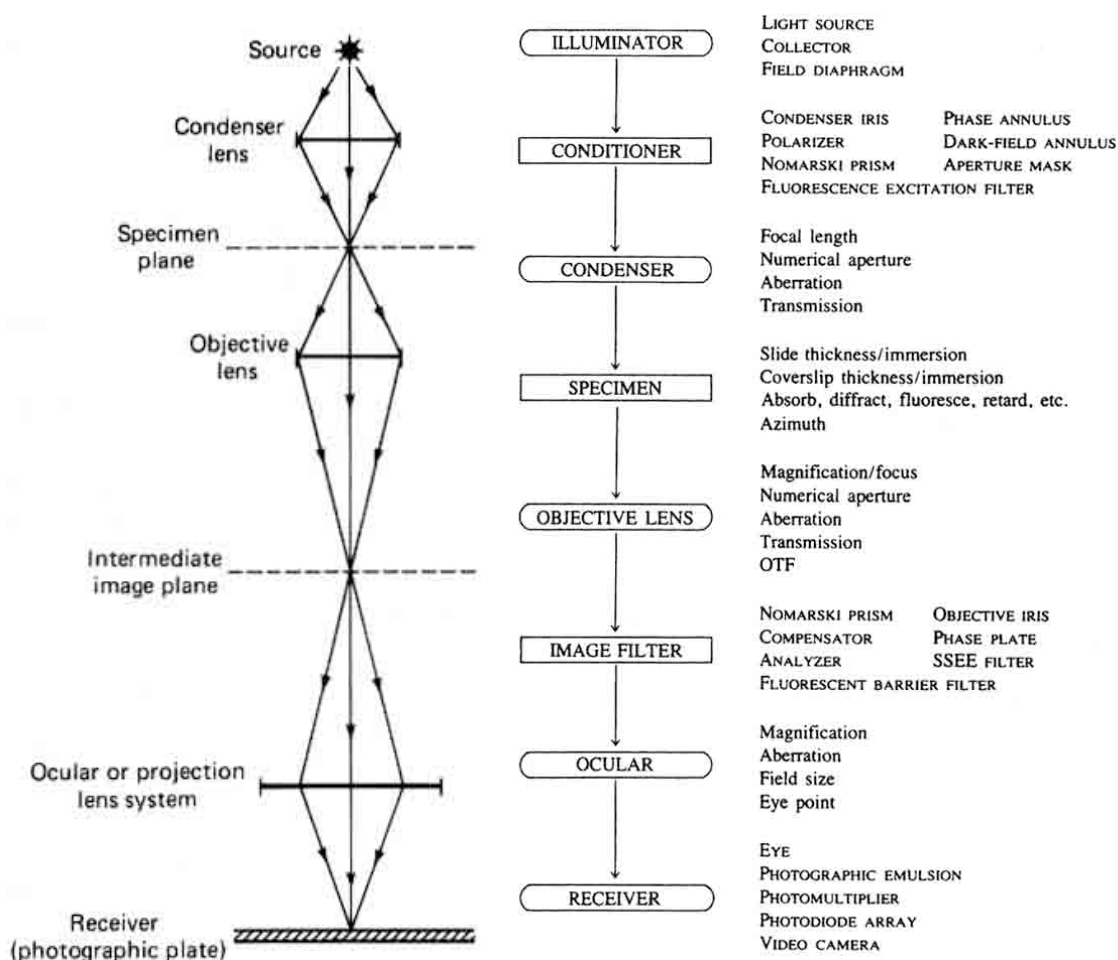
5. ábra. Inverz mikroszkóp

A MIKROSZKÓP FELÉPÍTÉSE, ALAPTÍPUSAI

A mikroszkóp részei vázlatosan

Fényforrás
Kondenzor
Objektív lencse
Okulár
Detektor

A mikroszkóp sugármenetét, részeit, és a sugármenetbe különböző helyeken illeszthető optikai komponenseket a **6. ábra** mutatja.

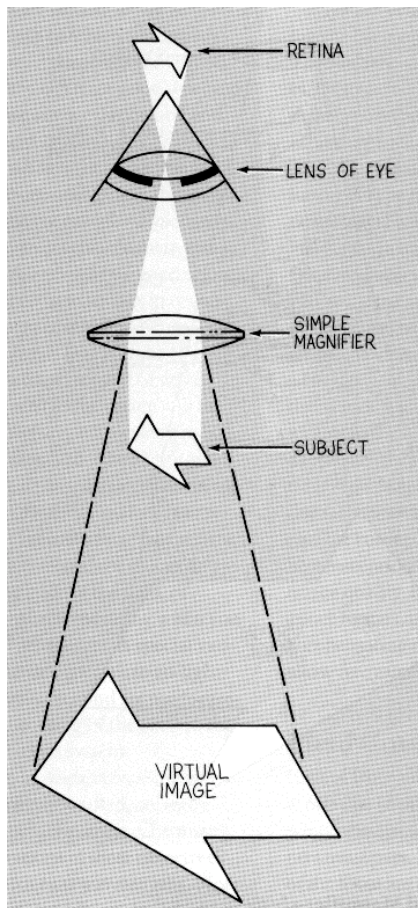


6. ábra. Sugármenet a mikroszkópban, feltüntetve a mikroszkóp fő elemeit (bal oldal). Az optikai útba különböző helyeken különböző komponensek illeszthetők (jobb oldal).

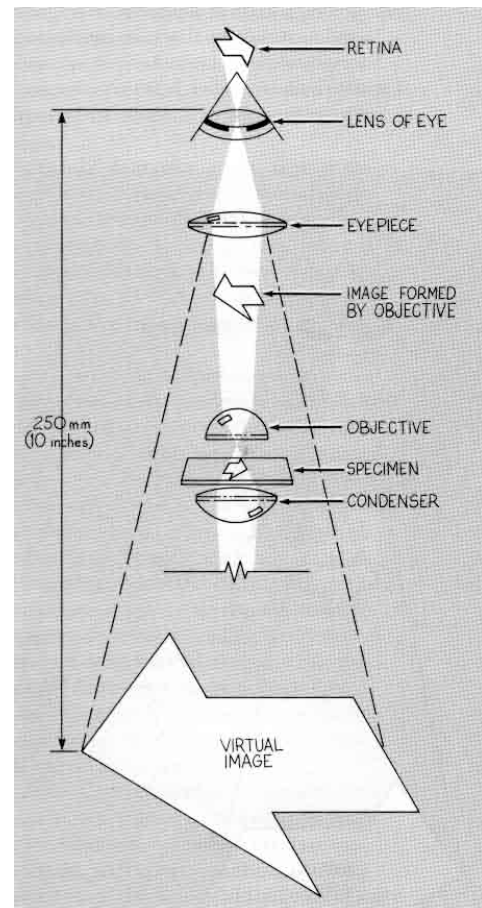
A fénymikroszkóp alaptípusai és a mikroszkópos képalkotás alapelvei

A. Egyszerű mikroszkóp

- egyetlen lencsét tartalmaz
- nagyított, virtuális képet állít elő (**7. ábra**).
- Pl: kézinagyító, Leeuwenhoek mikroszkópja (**1. ábra**).



7. ábra. Az egyszerű mikroszkóp felépítése és képződése.



8. ábra. Az összetett mikroszkóp részei és képződése.

B Összetett mikroszkóp:

-Nagyítás két lépésben (**8. ábra**):

- 1 Objektív lencse előállít egy nagyított, valós, primer (intermedier) képet.
2. Az okulár továbbnagyítja a primer képet, és előállít egy nagyított, virtuális képet.

A mikroszkóp fontos paraméterei:

- "Nagyítóerő": az objektív lencse paramétere
- "Vizuális nagyítás": (objektív nagyítás) x (okulár nagyítás)
- Optikai tubushossz: az objektív hátsó fókusz síkja és a primer kép közötti távolság
- Mechanikai csőhossz: az objektív foglalat és az okulár közötti távolság (ált. 160, 170 mm). A végtelenre korrigált mikroszkópok esetében ennek nincs jelentősége.
- Csőfaktor: az optikai tengelybe helyezett parallelizáló lencsék által okozott járulékos nagyítás; a teljes nagyítás számításakor figyelembe kell venni.
- Ramsden korong: az okulárból kilépő sugarak ide térnek össze. Jelentőség: a szemet ide helyezve a teljes látómező látható. A Ramsden korong és a virtuális kép közötti távolság kb. 250 mm. A mikroszkóp teljes nagyítása ezen távolságra van megadva.

GEOMETRIAI OPTIKA

A mikroszkóp nagyítása és általános képalkotási tulajdonságai megérthetők a geometriai optika segítségével. A geometriai optika a fény közvetlenül megfigyelhető viselkedésével foglalkozik anélkül, hogy a jelenségek természetét (a háttérben rejlő mechanizmusokat) részletesen megvizsgálná.

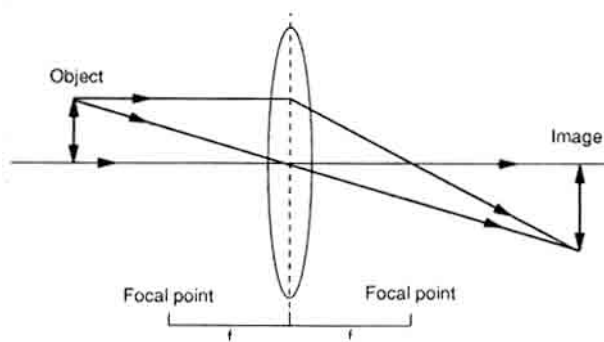
Sugárdiagram: a sugarak az energiatranszfer irányát jelképezik.

Reverzibilitás elve: egy adott optikai rendszerben a sugarak mindkét irányban ugyanazon az útvonalon haladnak. (Ez nem jelenti azt, hogy az átvitt energia mennyisége mindkét irányban ugyanakkora.)

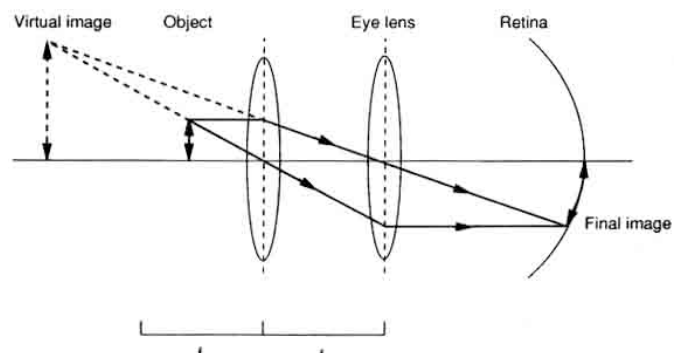
1. Képalkotás egyszerű konvex lencsével

a. tárgy a fókusz távolságon kívül (de a kétszeres fókusz távolságon belül): kép nagyított, fordított állású, valós (**9. ábra**).

b. tárgy a fókusz távolságon belül: kép nagyított, egyenes állású, virtuális. A virtuális kép közvetlenül meg nem jeleníthető; relaxált, nem akkomodált — végtelenbe tekintő — szemmel vizsgálható (**10. ábra**).



9. ábra.



10. ábra

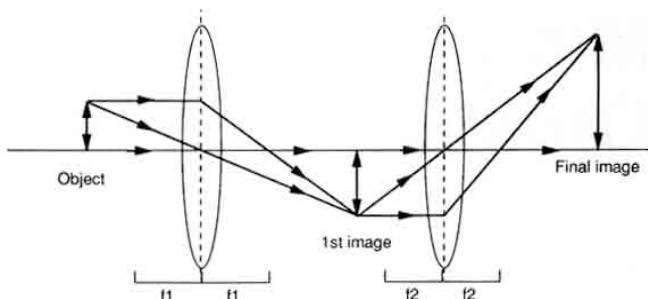
2. Képalkotás lencsekombinációval

a. tárgy a fókusz távolságon kívül: két lencse kombinációja nagyított, valós képet ad, de a kép egyenes állású (**11. ábra**).

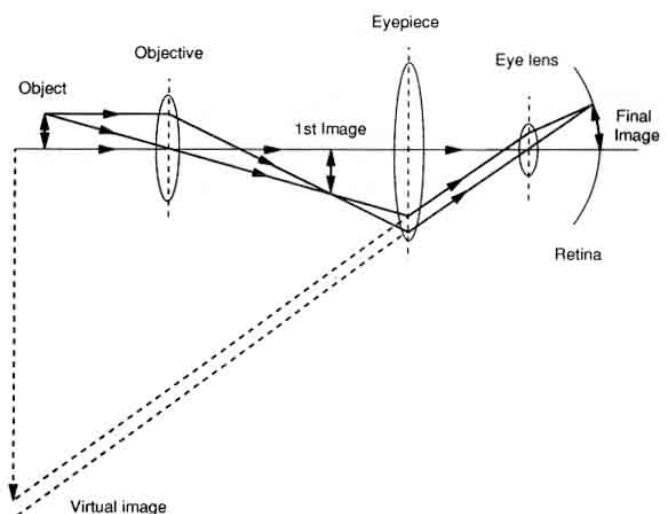
b. a fénymikroszkóp sémás sugárdiagramja (**12. ábra**):

első lencse: nagyított, fordított állású, valós kép

második lencse: nagyított, egyenes állású, virtuális kép



11. ábra



12. ábra

3. Geometriai optika részletesebb terminológiája (13. ábra)

Fókuszpont: az a pont, amelybe egy (konvex) lencse a paraxiális (optikai tengellyel párhuzamos, annak közelében haladó) fénysugarakat összegyűjti.

Fókusz távolság

a. Effektív fókusz távolság (Effective Focal Length, EFL, " f "): a fókuszpont és a lencse principális pont(a) közötti távolság.

b. Lencsefelületi pontokra vonatkoztatott fókusz távolság:

-Elülső fókusz távolság (Front Focal Length, FFL, " f_f ")

-Hátsó fókusz távolság (Back Focal Length, BFL, " f_b ")

Principális felszínek (vastag lencsék esetén):

a. Elsődleges

b. Másodlagos

Principális pontok:

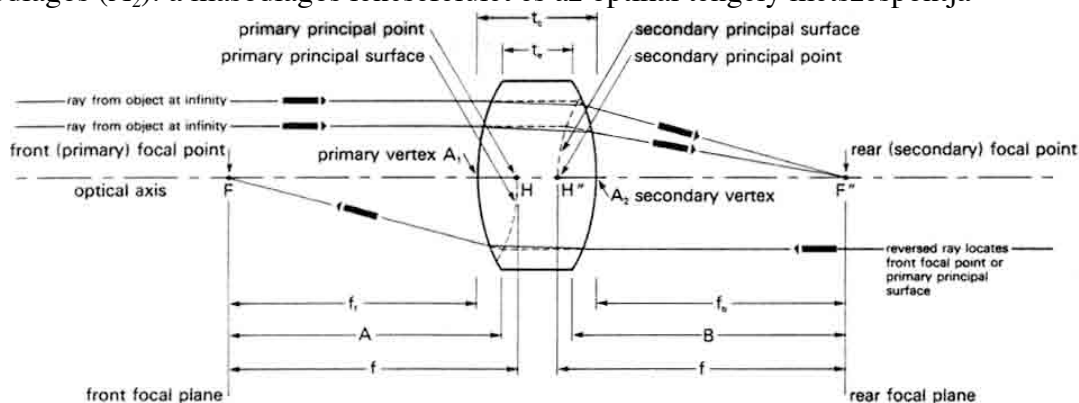
a. Elsődleges (H): az elsődleges principális felszín és az optikai tengely metszéspontja

b. Másodlagos (H''): a másodlagos principális felszín és az optikai tengely metszéspontja

Vertex:

a. Elsődleges (A_1): a primer lencsefelület és az optikai tengely metszéspontja

b. Másodlagos (A_2): a másodlagos lencsefelület és az optikai tengely metszéspontja



f = Effective focal length (EFL), may be positive (as shown) or negative

f_1 = Front focal length (FFL)

A = Front focus to front edge distance

t_1 = Edge thickness

f_2 = Back focal length (BFL)

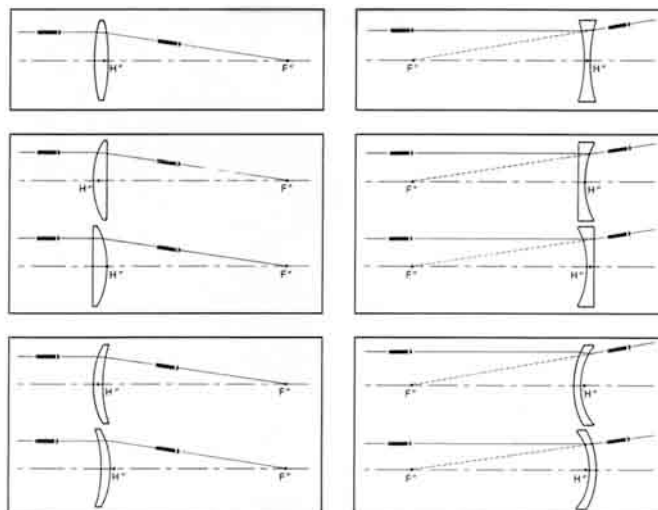
B = Rear edge to rear focus distance

t_2 = Center thickness

13. ábra. A konvex lencse fontos paraméterei.

4. Principális pont előfordulási helyei:

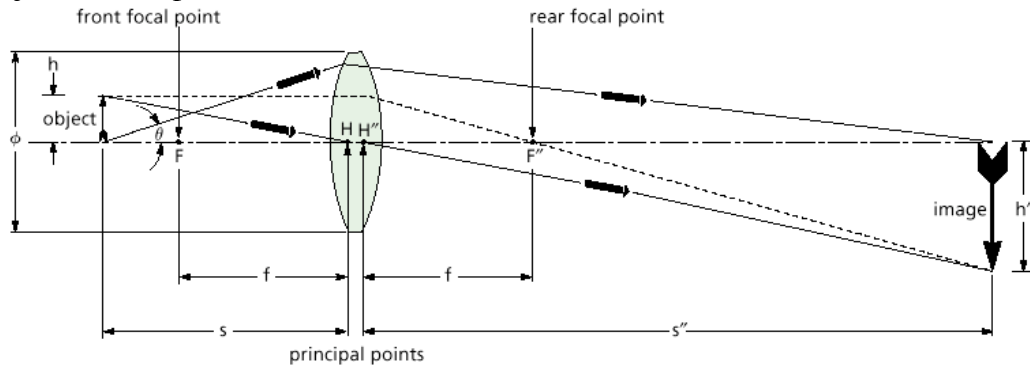
Függ a lencse törésmutatójától és a görbületi sugártól. A lencsén kívül is lehet (14. ábra)!



14. ábra. A principális pont különböző lencsék esetében.

5. Paraxiális képletek levegőben levő lencsékre:

Paraxiális sugarakra vonatkoznak: sugarak, melyek párhuzamosak az optikai tengellyel és ahhoz közel helyezkednek el. Következmény: a törésszögek (és ezek szinuszaik) kicsik; a szferikus aberráció (lásd később) nem játszik szerepet (15-16. ábra).



Note location of object and image relative to front and rear focal points.

ϕ = Lens diameter

$m = s''/s = h''/h$ = magnification or conjugate ratio, said to be infinite if either s'' or s is infinite

θ = $\text{Arcsin}(\phi/2s)$

h = object height

h'' = image height

s = Object distance, positive for object (whether real or virtual) to the left of principal point H

s'' = Image distance (s and s'' are collectively called conjugate distances, with object and image in conjugate planes), positive for image (whether real or virtual) to the right of the principal point H'

f = Effective focal length (EFL), may be positive (as shown) or negative. f represents both FH and H'F', assuming lens to be surrounded by medium of index 1.0

15. ábra. Képképzés egyszerű konvex lencsével.

SIGN CONVENTIONS

The validity of the paraxial lens formulas is dependent on adherence to the sign conventions shown here:

For lenses: (refer to Figure A1.1)

s is + for object to left of H (the first principal point)

s is - for object to right of H

s'' is + for image to right of H' (the second principal point)

s'' is - for image to left of H'

m is + for an inverted image

m is - for an upright image

For mirrors:

f is + for convex (diverging) mirrors

f is - for concave (converging) mirrors

s is + for object to left of H

s is - for object to right of H

s'' is - for image to right of H'

s'' is + for image to left of H'

m is + for an inverted image

m is - for an upright image

When using the thin lens approximation, we can just refer to the left and right of the lens.

16. ábra. A használt paraméterek előjel-konvenciói.

Optikai törőerő:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s} + \frac{1}{s''}$$

Méterben kifejezett fókusztávolság esetében dioptriában fejezzük ki (D).

Nagyítás:

$$m = \frac{s''}{s} = \frac{h''}{h}$$

A fenti képleteket átalakítva az alábbi összefüggéseket kapjuk:

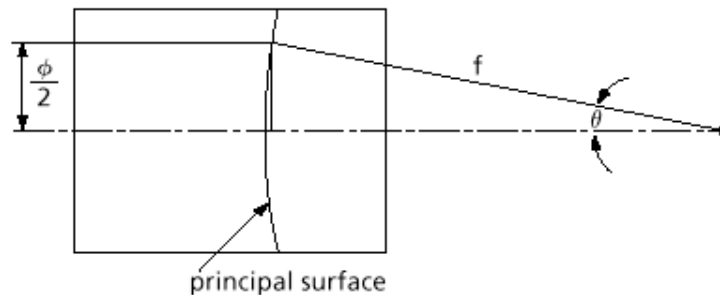
$$f = m \frac{(s + s'')}{(m + 1)^2}$$

$$f = \frac{sm}{m + 1}$$

$$f = \frac{s + s''}{m + 2 + \frac{1}{m}}$$

$$s(m + 1) = s + s''$$

Az "*f*-szám" (*f*-number) és a numerikus apertúra (*NA*) közötti összefüggés



17. ábra. Az *f*-szám kifejezéséhez használt paraméterek.

Az *f*-szám:

$$\text{f-number} = \frac{f}{\phi}$$

Numerikus apertúra (*NA*):

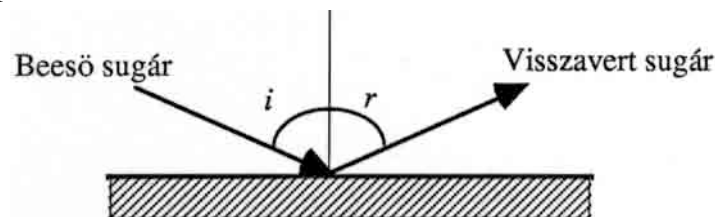
$$\text{N.A.} = \sin \theta = \frac{\phi}{2f}$$

A fenti két egyenletből:

$$\text{N.A.} = \frac{1}{2(\text{f-number})}$$

6. Reflexió (fényvisszaverődés).

A reflexió törvénye: $i = r$

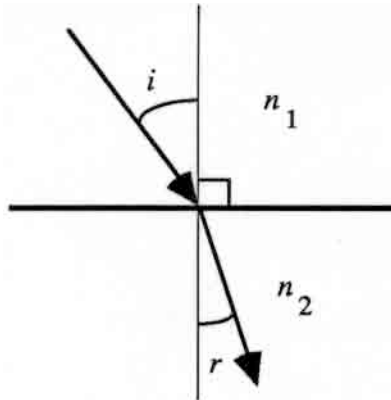


18. ábra. Fényvisszaverődés (reflexió).

7. Refrakció (fénytörés)

A legrövidebb idő Fermat-féle elve: két pont között az összes lehetséges út közül a fény azt az utat választja, amelynek megtételéhez a legrövidebb idő szükséges.

A refrakció alapja az elektromágneses sugárzás sebességének megváltozása, amint az egy új közegbe lép. A közeg tulajdonsága: törésmutató ("index of refraction," n) (**19. ábra**).



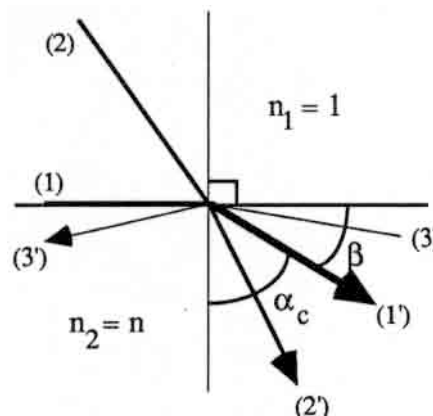
Néhány nevezetesebb közeg törésmutatója:

| | |
|------------------|--------------------------|
| vákuum | 1 |
| levegő | 1,0003 (gyakorlatilag 1) |
| víz | 1,33 |
| üveg | 1,515 |
| TiO ₂ | 2,4 |

19. ábra. Fénytörés, refrakció. A fénynyaláb nagyobb törésmutatójú közegbe lép.

A refrakció törvénye (Snellius-törvény): $\sin i / \sin r = n_2 / n_1$

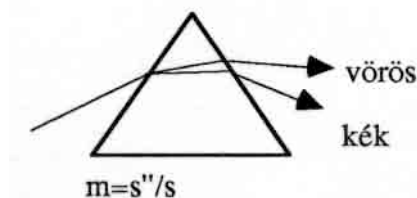
Teljes belső visszaverődés (20. ábra): a nagyobb törésmutatójú közegben eredő, és a kritikus szögnél (α_c) nagyobb szögben haladó sugarak teljes mértékben visszaverődnek (nem lépnek át a kisebb törésmutatójú közegbe, kivéve egy a hullámhossza összemérhető, ~150 nm vastagságú, ún. evaneszcens vagy tovatűnő mezőt).



20. ábra. A Snellius-törvény.

8. Diszperzió:

Egy adott közeg törésmutatója a hullámhossz függvényében változik. Példa: rövidebb hullámhosszú (kék) fény lassabban halad adott közegben — "nagyobb szögben törik". Az eredmény: a prizma hullámhossz függvényében elemeire bontja a fehér fénynyalábot (**21. ábra**).



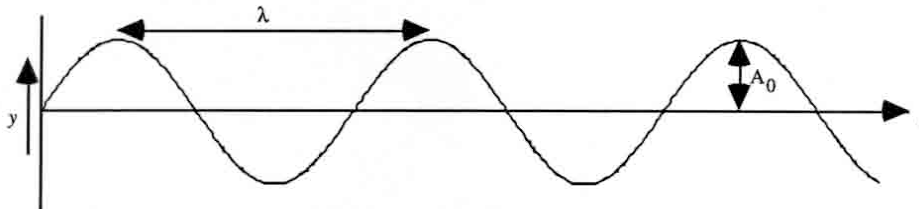
21. ábra. Diszperzió.

HULLÁMOPTIKA (FIZIKAI OPTIKA)

A képképzés mechanizmusa és a kép alapvető tulajdonságai a geometriai optika segítségével teljességgel nem érthetők meg. Alapvető fontosságú elmélet: hullámelmélet

A. A fény mint hullám

A fény transzverzális hullám: a periódikus kitérés a terjedési irányra merőleges. Harmonikus rezgőmozgással leírható: adott körpályán állandó sebességgel mozgó pont adott átmérőre eső projekciója idő függvényében. Matematikailag szinusz vagy koszinusz függvény (22. ábra).



22. ábra. A fény mint hullám.

Hullámegyenletek: a tovaterjedő hullámmozgás tulajdonságait írják le. A Maxwell egyenletekből (parciális differenciálegyenletek) vezethetők le.

B. A hullámmozgás tulajdonságai

1. Amplitudó és intenzitás

Amplitudó (A_0): a maximális elektromos (vagy mágneses) erővektor

Intenzitás (I): egységnyi területre eső energiaáramlási sebesség.

$I = (\text{sebesség}) \times (\text{energia sűrűség})$

$I \sim A^2$

2. Hullámhossz, frekvencia

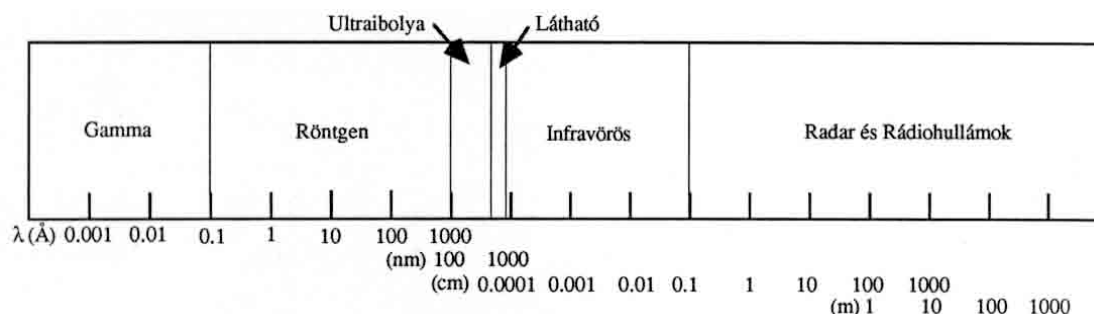
Frekvencia (ν): egységnyi időre eső periódusok száma (szögfrekvencia, $\omega = 2\pi\nu$)

Hullámhossz (λ): a hullám két periódusa közötti távolság

Frekvencia-hullámhossz összefüggés: $\nu = v/\lambda$

A frekvencia összefügg az energiával: $E = h\nu$ (h = Planck állandó)

A frekvencia/hullámhossz különbségeket a látórendszer színekként értelmezi (23. ábra).



23. ábra. Az elektromágneses spektrum

3. Fázis

A grafikus hullámgörbe P pontja és egy önkényesen definiált O kezdőpont közötti távolság. (Annak a mértéke, hogy a hullám mennyit haladt előre egy kiindulópontához képest.) Mérték: fázisszög. Mértékegység $^\circ$ vagy rad. $90^\circ = \pi/2$ rad; egy hullámhossznyi fáziseltolódás $= 2\pi$ rad.

Detektorok (fotonszámláló, szem, film) a fázist nem tudják közvetlenül érzékelni. Az ismeretlen fázisú fénysugarat ezért egy referenciasugárral kell interferáltatni, mely amplitudó- vagy színkontraszt növekedést eredményez (lásd fáziskontraszt mikroszkópia).

4. Monokromaticitás

A fénysugár frekvenciaösszetételére utal.

Fehér fény: a hullámhosszok széles kontinuumát tartalmazza (nemcsak látható).

Polikromatikus fény: több individuális hullámhosszt tartalmaz.

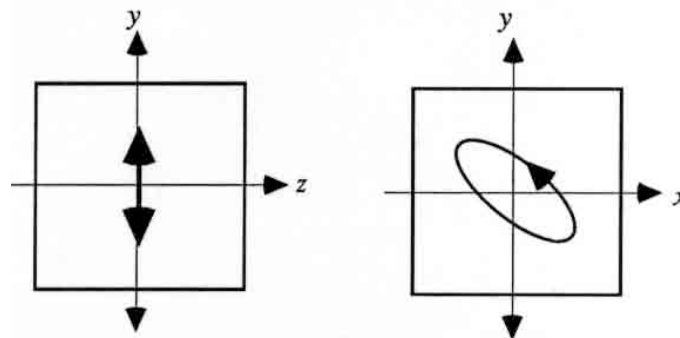
Monokromatikus fény: egy adott hullámhosszt tartalmaz. Némileg absztrahált; tkp. keskeny hullámhosszeloszlásról van szó.

5. Koherencia

Fénysugarak fázisa közötti kapcsolat mutatója. Koherens sugarak között határozott fázisösszefüggés mutatható ki: interferencia. Koordinált emisszió esetében különösen kifejezett: lézer.

6. Polarizáltság

Ha az elektromos erővektor egy (a haladási irányra merőleges) kitüntetett síkban helyezkedik el, a fény polarizált (24. ábra).



24. ábra. Lineárisan (bal oldal) és elliptikusan (jobb oldal) polarizált fény elektromos erővektorainak vetülete a terjedési irányra merőleges síkban.

A fény terjedési irányára merőleges sík (keresztmetszet) függvényében lehet:

- Lineáris (pl. függőleges, vízszintes),
- Cirkuláris (jobb, bal),
- Elliptikus. Az elliptikus a leggyakoribb.

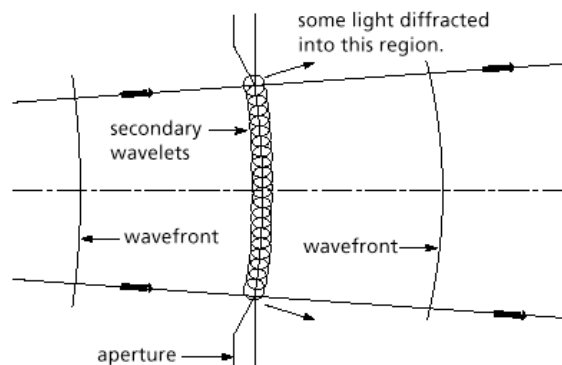
Paraméterei:

- azimutális (az ellipszis főtengelye és a vízszintes sík által bezárt szög)
- ellipticitás (az ellipszis tengelyaránya)
- forgásirány: óra járásával megegyező v. azzal ellentétes

C. A hullámok közötti kölcsönhatások

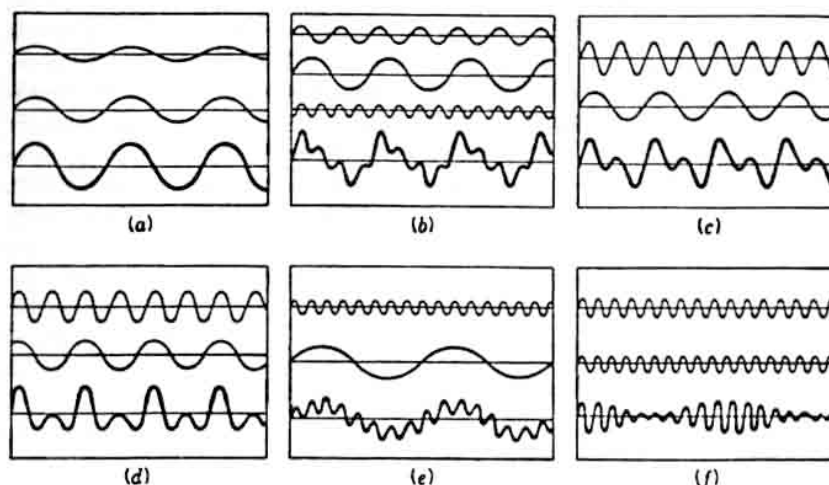
Szuperpozíció elve: ha egy adott pontra kettőnél több hullám hat, az összehatás az egyes hullámok hatásának összege; vagyis, a hullámok egymástól függetlenül fejtik ki hatásukat (egymás tulajdonságait nem változtatják meg).

Huygens elv: egy hullámfront minden pontja másodlagos hullámok forrása (25. ábra).



25. ábra. Huygens elv: másodlagos hullámok keletkezése a hullámfronton.

Fourier elv: bármely periódikus mozgós leírható szinusz függvénysorozat összegeként (**26. ábra**):



26. ábra. Különböző frekvenciájú harmonikus rezgőmozgások összegei.

A nem-periódikus objektumok egy végtelen hullámhosszú függvény egyetlen periódusaként foghatók fel. Ilyen függvények Fourier transzformja frekvencia-eloszlásokat tartalmaz.

A Fourier transzform néhány tulajdonsága:

- a. a Fourier transzform Fourier transzformja az eredeti függvényt eredményezi.
- b. a Fourier transzform tulajdonságai a kiinduló függvény inverz tulajdonságait mutatják (pl. kisebb rácsállandó - nagyobb távolság a Fourier transzform maximumai között).
- c. Konvolúciós tétel: két függvény szorzatának Fourier transzformja egyenlő a függvények Fourier transzformjai szorzatával.

Interferencia és diffrakció

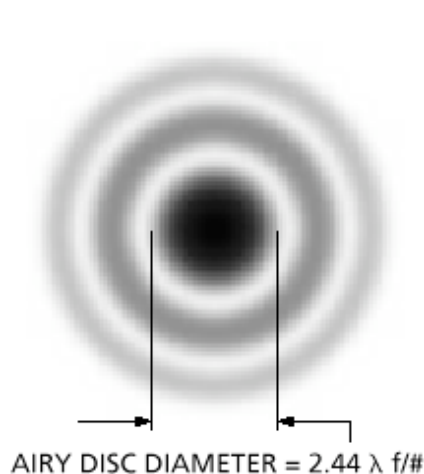
Diffrakció: keskeny sugárnyalábok elhajlása. Az elhajlott nyalábok interferálhatnak, mely egy adott mintázatot eredményez.

Interferencia: hullámfrontok széles területen történő átfedése esetén jelentkezik (konstruktív, destruktív)

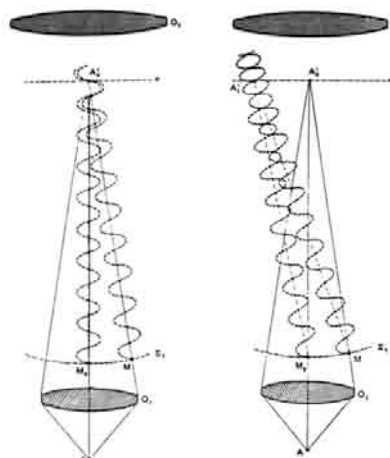
Fraunhofer-féle diffrakciós elmélet: a diffrakciós interferencia mintázat parallel és koherens sugarakból keletkezik (a tárgy és a kép végtelen távolságban van az optikai rendszertől).

Fresnel-féle diffrakciós elmélet: a diffrakciós interferencia mintázat divergens sugarakból keletkezik.

Kisméretű, körkörös apertúra diffrakciós mintázata: "Airy disk" (**27. ábra**). Az Airy disk keletkezése a **28. ábrán** látható.

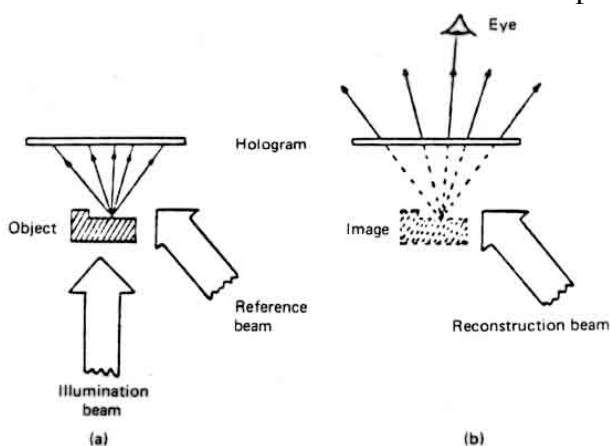


27. ábra. Az Airy disk képe.



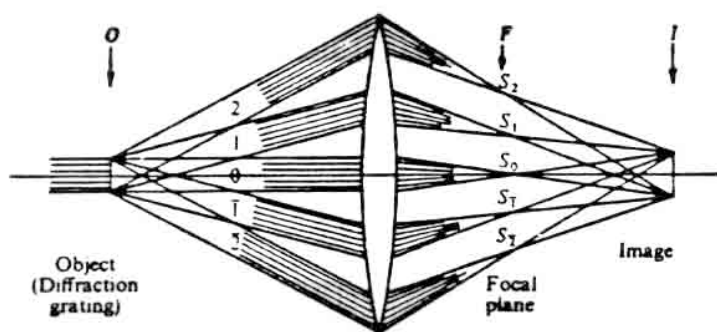
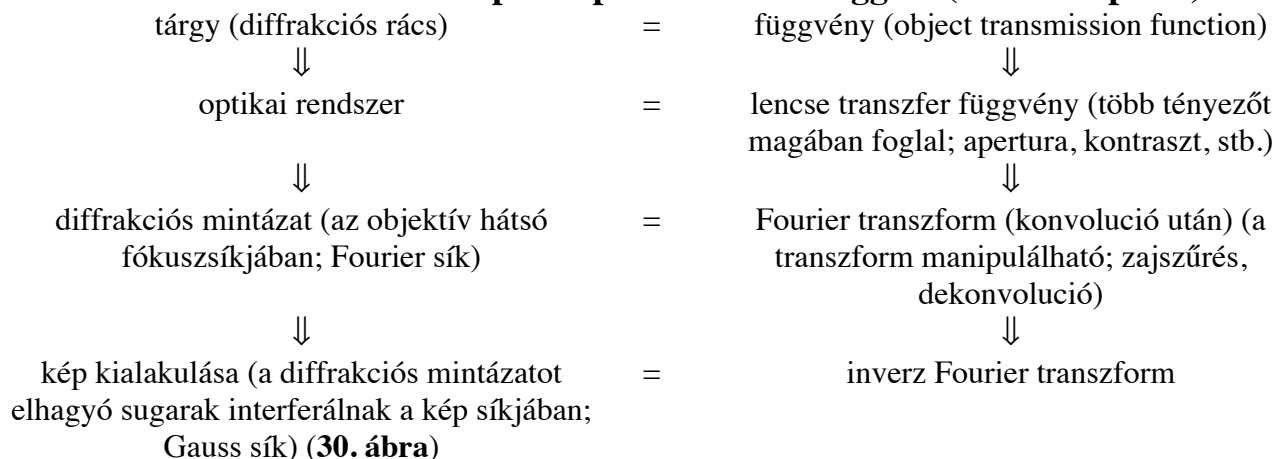
28. ábra. Az Airy disk keletkezése. A kép síkjában fázisban levő hullámok (bal oldal) diffrakciós maximumot, míg 180° -kal eltolódott hullámok minimumot hoznak létre (jobb oldal).

Holográfia (Gábor Dénes): interferencia effektusok segítségével háromdimenziós információ két dimenzióban rögzíthető. Nagy fokban koherens, mintamegvilágító és referencia fény nyalábok találkozása interferencia gyűrűket eredményez a filmen (amplitúdó és fázis információ). A film referencia nyalábbal történő megvilágítása után előtűnik a minta háromdimenziós képe (29. ábra).



29. ábra. A holográfia elve. Hologram létrehozása (a) és a háromdimenziós kép rekonstrukciója (b).

D. A diffrakció és a mikroszkópos képalkotás összefüggése (Fourier optika)



30. ábra. Diffrakciós interferenciamintázat létrejötte, és képalkotás a mikroszkópban.

A mikroszkóp objektív lencse funkciója a Fourier optika szerint:

- adott pontokba fókuszálja a diffrakciós maximumokat (a hátsó fókusz síkban)
- az összes diffrakciós maximumot képpé kombinálja

E. Kontraszt

A kontraszt a fény és a minta közötti kölcsönhatás térbeli változásának az eredménye. Ez teszi lehetővé, hogy a kép látható, azaz látószervünk számára közvetlenül érzékelhető!

1. Amplitúdó kontraszt: Mechanizmusai:

a. *Abszorpció* (festés): Lambert-Beer törvény: $\lg(I_0/I) = Kcx$

I_0 =beeső fény intenzitása, I =mintán áthaladt fény intenzitása, K = konstans, c =koncentráció, x =mintavastagság

b. *Reradiáció*: az abszorbeált kvantum kisebb energiával emittálódik. Fluoreszcencia, foszforeszcencia

c. *Fényszórás*: a nem szóródott sugarak kizárása, sötétlátótér mikroszkópia

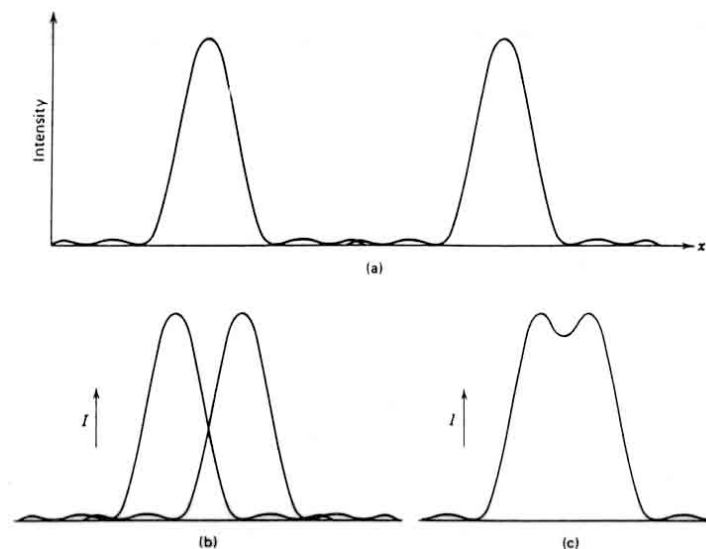
2. Fázis kontraszt: fáziskésés kimutatása. A mintán áthaladó fény nyaláb interferál egy referencia nyalábbal.

3. Polarizáció: optikai anizotrópia kimutatása.

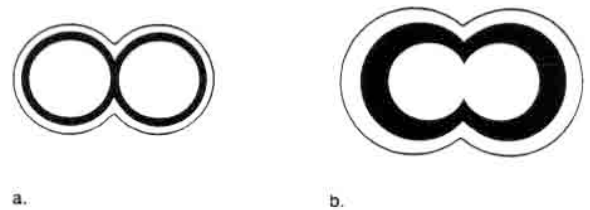
F. Feloldóképesség

Egy fénypont ideális optikai lencsével leképezett képe az Airy disk (elhajlási korong). Két Airy disk éppen elkülöníthető egymástól, ha a köztük levő távolság (d) egyenlő az Airy disk sugarával (r). Másképp, ha az egyik Airy disk centrális maximuma egybeesik a másik első minimumával (**31. ábra**).

Feloldható minimális távolság: $d_{\min} = 0.61\lambda/n\sin\alpha = 0.611/\text{NA}$



31. ábra. A feloldóképesség bemutatása Airy diskeken.



32. ábra. Hullámhossz hatása a d_{\min} -re. Az Airy diskek képe rövid (a) és hosszú hullámhossz esetén (b). Zöld fény és 1.4 NA objektív használata esetén $d_{\min} = 0.22 \mu\text{m}$.

AZ OPTIMÁLIS MIKROSKÓPOS KÉP

A. Az optimális megvilágítás feltételei

1. Maximális fényesség:
 - valós idejű ("real time") vizsgálat
 - kontraszt
 - a lehető legtöbb foton összegyűjtése a lehető legrövidebb idő alatt
2. Egyenletes megvilágítás
3. Lehető legkevesebb csillogás ("glare") a mintán kívüli tényezők miatt (pl. tubus)
4. A megvilágítási szög széles választéka (az objektív NA kihasználása miatt)

B. Kritikus megvilágítás (Nelson)

Lényege: A fényforrás képe fókuszálódik a tárgyra

Történeti jelentőség: akkor volt fontos, amikor gyertyalángot, illetve alacsony intenzitású fényforrást használtak.

Előny: maximális fényerő
néha ma is hasznos:

- a primer megvilágítás nem járul a végső képhez (pl. sötét látótér)
- a minta erős excitációjára van szükség (sötét látótér, fluoreszcencia)

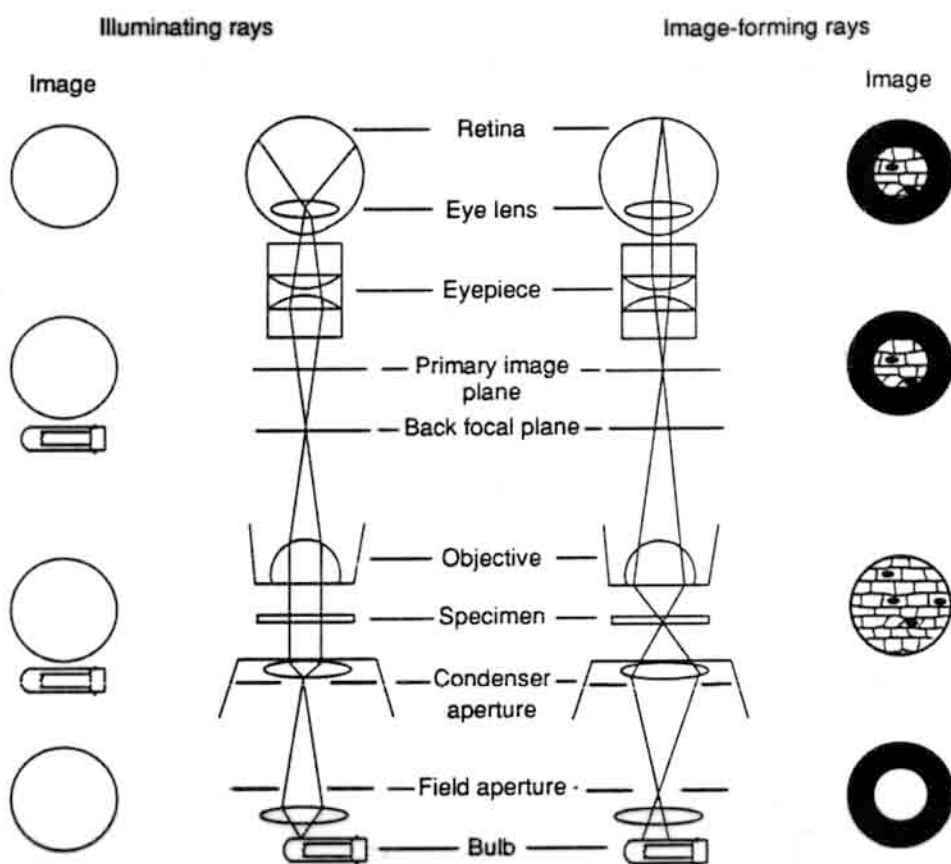
Hátrány: nem egyenletes megvilágítás
nem optimális feloldás

C. Köhler megvilágítás

August Köhler, XX. sz. eleje.

Ma szinte minden fénymikroszkópos alkalmazásnál ezt használják.

Könnyű megértés végett vizsgáljunk "megvilágító" és "képalkotó" sugarakat a mikroszkópban (33. ábra).



33. ábra. A Köhler megvilágítás

Megvilágító sugarak (illuminating rays):

- A (pontoszerű) fényforrásról a sugarak a kondenzor aperturára fókuszálódnak
- a mező apertura síkjában széles, egyenletes megvilágítás
- következő fókusz: objektív hátsó fókuszsíkja (Bertrand lencsével vizsgálhatjuk)
- a tárgy síkjában széles, egyenletes megvilágítás
- következő fókusz: szemlencse. Eredmény, széles megvilágítás

Képképző sugarak (image-forming rays):

- a széles területen megvilágított tárgyról az objektív a primer kép síkjába gyűjti a sugarakat (nagyított, fordított állású kép)
- az okulár megfordítja és továbbnagyítja a képet; éles kép a Ramsden korong síkjában.
- Fontos: a mező apertura a tárgy síkjában van fókuszban!

D. Kondenzor működése, beállítása:

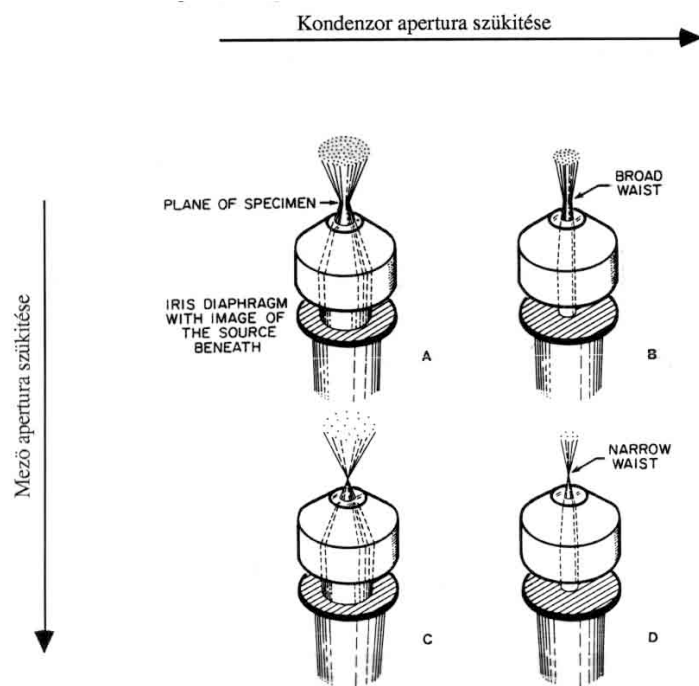
A kondenzor mindig Köhler megvilágításra legyen beállítva:

- mező apertura a minta síkjára fókuszálva
- kondenzor apertura az objektív hátsó fókuszsíkja fókuszálva

A kondenzor magasság változatlan a különböző objektíveknel; az aperturákat mindig állítani kell.

Mező diafragma (mező apertura, field diaphragm, FD): fő feladata a mikroszkópban jelentkező csillogás csökkentése (beállítása: az apertura széle látható legyen a mező szélén. DE: video mikroszkopiában NEM szabad látszania a mező aperturának a "fekete" szint automatikus beállítása miatt)

Kondenzor diafragma (kondenzor apertura): sugara a kondenzor aperturájával (bemeneti nyílás szélességével) függ össze (**34. ábra**).



34. ábra. A mezőapertúra, illetve a kondenzor apertúra szűkítésének hatása. A mezőaperturával a megvilágított terület nagyságát, a kondenzor aperturával a numerikus aperturát változtatjuk.

E. A feloldás gyakorlati korlátai:

- a mikroszkóp elemei által okozott konvolúciók
- aberrációk
- rossz jel-zaj viszony:
 - fényszórás a tárgy síkjában
 - fényszórás a tárgy síkja felett, illetve alatt

F. Lencseaberrációk

A lencse egyenletek, pl. $1/s + 1/s' = 1/f$ nagyvonalú feltevéseken alapulnak:

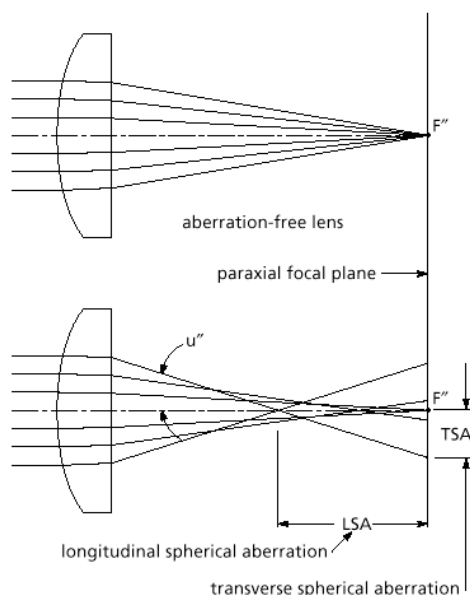
- a lencse anyagának (üveg, fluorit) törésmutatója egyenletes eloszlású
- nincs diszperzió
- a lencsefelületek szferikusak
- csak a paraxiális sugarak vesznek részt a képalkotásban

A valóság azonban eltér az ideálistól, és optikai aberrációkkal kell számolni.

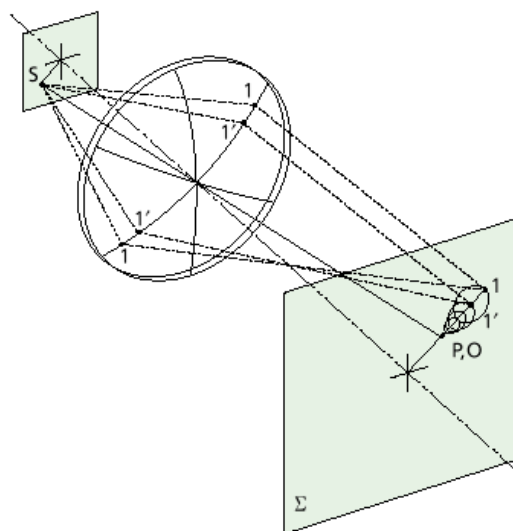
1. Monokromatikus aberrációk

a. *Szferikus aberráció*: tárgy pont képe diffúz folt.

Oka: a perifériás sugarak túlfókuszáltak (**35. ábra**).



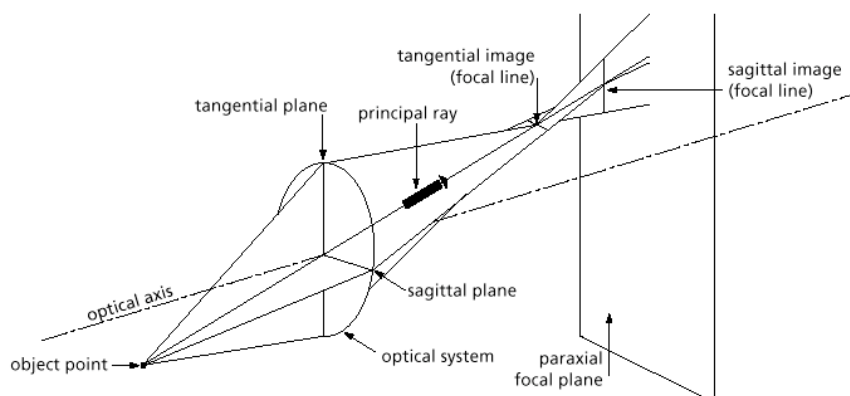
35. ábra. Szferikus aberráció egy plánkonvex lencse esetére.



36. ábra. Kóma.

c. *Astigmatizmus*: az optikai tengelytől távol eső tárgy pont két, a lencsétől különböző távolságra levő képbe képeződik le:

- tangenciális kép (tangenciális síkban; ez a sík tartalmazza mind az optikai tengelyt, mind pedig a tárgy pontot)
- szagittális kép (a szagittális síkban; ez a sík merőleges a tangenciális síkra) (**37. ábra**)



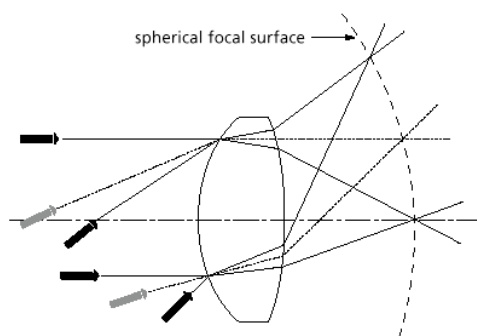
37. ábra. Astigmatizmus.

d. *Mező görbület (Field curvature)*: síkban fekvő tárgy képe görbült síkba képződik le—a képsík nem merőleges az optikai tengelyre (**38. ábra**).

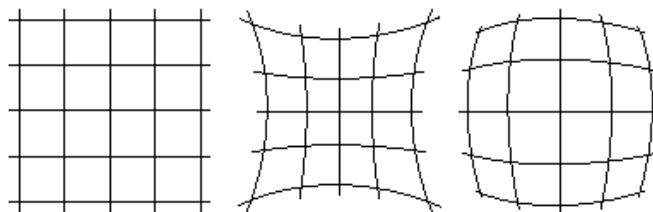
e. *Torzítás (Distorsion)*: a kép görbült az optikai tengelyre merőleges síkban (**39. ábra**).

-tűpárna torzítás (“pincushion”)

-hordó torzítás (“barrel”)



38. ábra. Mező görbület

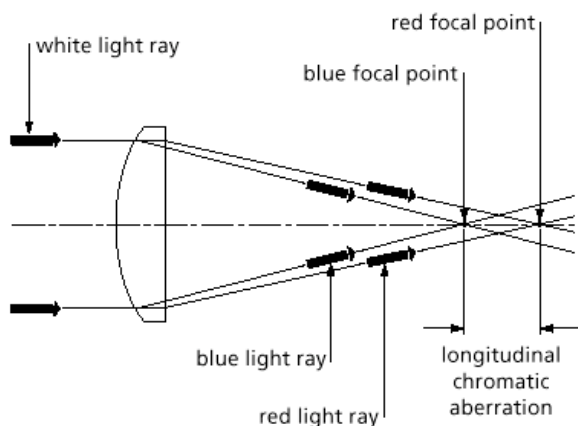


39. ábra. Torzítás.

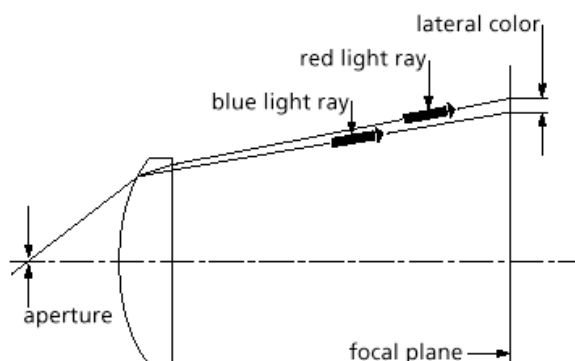
2. Kromatikus aberráció.

A monokromatikus aberráció foka más és más különböző hullámhossz esetén.

Oka: diszperzió (**40-41. ábra**)



40. ábra. Longitudinális kromatikus aberráció.



41. ábra. Laterális szín.

3. Lencseaberrációk korrigálása:

Lehetetlen az összeset korrigálni. Csak a legzavaróbbakat korrigálják.

-lencse szferikus alakjának megváltoztatása

-lencsesorozat használata: az egyes aberrációk kiegyenlítődnek (sokszorosán korrigált objektívek akár 10-20 lencseelemet is tartalmazhatnak).

A FÉNYMIKROSZKÓPIA GYAKORLATI ASPEKTUSAI

A. Objektív lencse

Az objektív lencsét az alábbi gyakorlati szempontok szerint különböztetjük meg:

- Nagyítóerő
- Numerikus apertura (NA)
- Optikai korrekció foka
- Optimális mechanikai tubushossz
- Optimális fedőlemez-vastagság
- Kép síksága (Flatness of Field)
- Fókusz távolság
- Immerziós közeg
- Végtelenre korrigált optika ("infinity corrected")

A fontos adatok az objektív oldalán vannak feltüntetve, pl.:

Planapo 63/1.4 Oil, 160/-

Jelentése:

Planapochromat lencse, 63x nagyítás / 1.4 NA, olajimmerzió, 160 mm optimális tubushossz / fedőlemezvastagság figyelmen kívül hagyható

1. Objektívkorrekció:

| Objektív lencse típusneve | Szferikus korrekció | Kromatikus korrekció | Sík mező | Hasznos hullámhossz tartomány |
|----------------------------|---------------------|----------------------|-----------|-------------------------------|
| Achromat | Zöld (Z) | Z, Kék (K) | nincs | 500-630 nm |
| Planachromat | Z | Z, K | igen | 500-630 nm |
| Semi-apochromat (fluorite) | Vörös (V), K | V, K | részleges | 450-650 nm |
| Apochromat | V, K | V, Z, K | részleges | 420-720 nm |
| Plan-apochromat | V, K | V, Z, K | jó | 420-720 nm |

2. A korrekció foka, a numerikus apertura és a feloldóképesség összefüggése (1. táblázat):

| Typical Objective Numerical Aperture (NA) By Degree of Correction | | | | |
|--|------|------------|---------|--|
| | 10X | 40X-50X | 100X | |
| Achromat | 0.25 | 0.65 | 1.2 | |
| Semiapochromat (Fluorite) | 0.30 | 0.70-0.85 | 1.2-1.3 | |
| Apochromat | 0.32 | 0.95 (dry) | 1.3-1.4 | |

| Resolving Power for Achromats (green light) | | | | | |
|---|------|------|------|------|----------|
| Magnifying Power | 4X | 10X | 20X | 45X | 100X oil |
| Numerical Aperture | 0.10 | 0.25 | 0.50 | 0.85 | 1.25 |
| Resolution (micrometres) | 2.75 | 1.10 | 0.55 | 0.32 | 0.22 |

| Resolving Power for Apochromats (green light) | | | | | |
|---|------|------|------|------|------------|
| Magnifying Power | 4X | 10X | 25X | 40X | 100X (oil) |
| Numerical Aperture | 0.16 | 0.32 | 0.65 | 0.95 | 1.40 |
| Resolution (micrometres) | 1.72 | 0.86 | 0.42 | 0.29 | 0.20 |

| Change in Resolution with Wavelength | | | | |
|--------------------------------------|-------|-------|-------------|--|
| | Green | Blue | Ultraviolet | |
| Wavelength (micrometres) | 0.546 | 0.436 | 0.365 | |
| Resolution (micrometres) | 0.195 | 0.156 | 0.130 | |

1. táblázat.

3. Az objektív lencse munkatávolsága (working distance):

az objektív lencse elülső felülete és a tárgy felszíne közötti távolság (**2. táblázat**)

| Objective Type | Magnification | NA | Focal Length (mm) | Working Distance |
|----------------|---------------|------|-------------------|------------------|
| Achromat | 10X | 0.25 | 16 | 7.70 |
| Apochromat | 10X | 0.30 | 16 | 4.85 |
| Achromat | 20X | 0.50 | 8 | 1.60 |
| Apochromat | 20X | 0.65 | 8.3 | 0.50 |
| Achromat | 45X | 0.85 | 4 | 0.30 |
| Apochromat | 47.5X | 0.95 | 4 | 0.18 |
| Achromat | 97X oil | 1.25 | 1.8 | 0.13 |
| Apochromat | 90X oil | 1.30 | 2.0 | 0.12 |

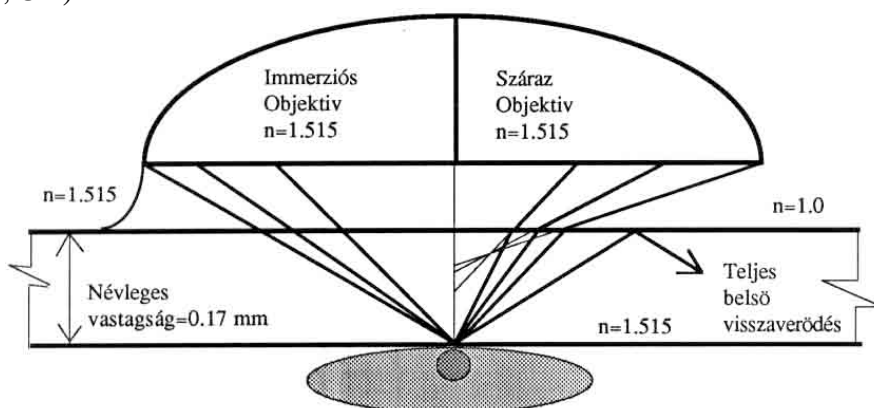
2. táblázat

4. Optimális fedőlemezvastagság

A szferikus aberráció (és korrekciója) miatt a fedőlemezvastagság jelentősen befolyásolja a képi minőséget (**42. ábra**). Az objektív lencsék ezért bizonyos fedőlemezvastagságra korrigáltak:

0.17 mm (Európa, Ázsia)

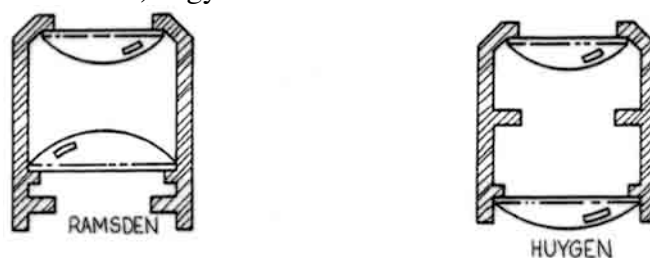
0.18 mm (USA, UK)



42. ábra. Fedőlemezvastagság hatása a sugármenetre.

B. Okulár lencse

A primer képet továbbnagyítja virtuális képpé vizuális inspekció céljából (lehet projektor lencse is, amely valós képet vetít ki fényképezés vagy video számára). Általában elmondható, hogy adott objektív adott okulárral használatos (korrekció miatt). Egyszerű okulárok két lencséből állnak (**43. ábra**):



43. ábra. Az okulárok alaptípusai.

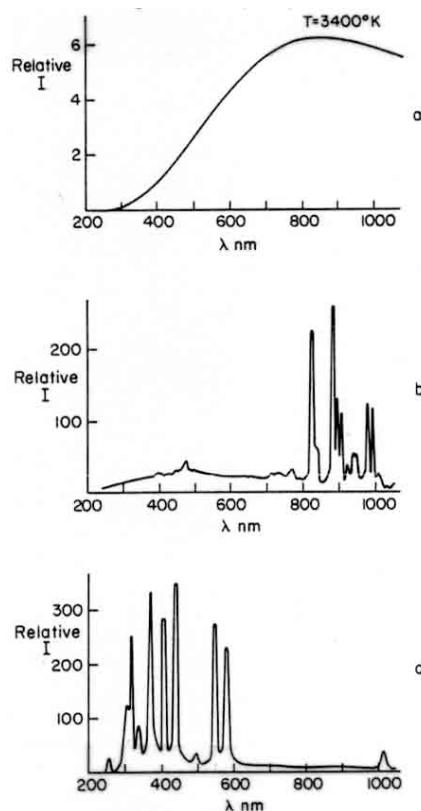
C. Fényforrás

1. **Wolfram.** Wolfram-szál egy részlegesen evakuált üvegburában. Tápfeszültség alacsony. Intenzitás alacsony. "Meleg" (vörös, infravörös) spektrum. Ma már ritkán használt. Olcsó.

2. **Wolfram-halogén/Kvarc-halogén.** Wolfram szál egy halogén gázzal töltött kvarc burában. Nyomás 40 atm! Nagy intenzitás. "Hűvösebb" (kékebb) spektrum. Közelebb áll a napfényhez, mint a wolfram lámpa. Intenzitás elektronikusan szabályozható. Teljesítmény: 20-100 W. Standard megvilágítóeszköz manapság.

3. *Higanygőz ívlámpa*. Szén vagy fém elektródok egy higanygőzzel töltött kvarc búrában. Nyomás 40 atm, működés közben növekszik! Nagy intenzitás, de egyenlőtlen spektrális eloszlás. Spektrális csúcsok 365, 405, 546, 575 nm-nél. Egyenáramú tápegység. Az intenzitás nem csökkenthető, csak neutrál (ND) szűrővel. A lámpa robbanhat!

4. *Xenon ívlámpa*. Fém elektródok egy xenon gázzal töltött kvarc burában. Nyomás kb. 40 atm. Laposabb és egyenletesebb látható spektrum. Nagyfokú infravörös emisszió. Hőszűrő használata ajánlott. Egyenáramú tápegység. Az intenzitás elektronikusan nem csökkenthető, csak neutrál szűrővel. Robbanhat!



44. Ábra. Különböző fényforrások emissziós spektrumai.

5. *Lézerek*. Monokromatikus, nagy intenzitású koherens fényforrások. A nagyfokú interferenciakészség miatt hagyományos (Köhler) megvilágításra nem alkalmasak, legfeljebb optikai szálonkeresztül (lásd optical scambler lejjebb). Különleges mikroszkópiákban (konfokális, TIRFM, lásd később) gyakran használt fényforrások.

D. Kondenzor lencse

Típusai:

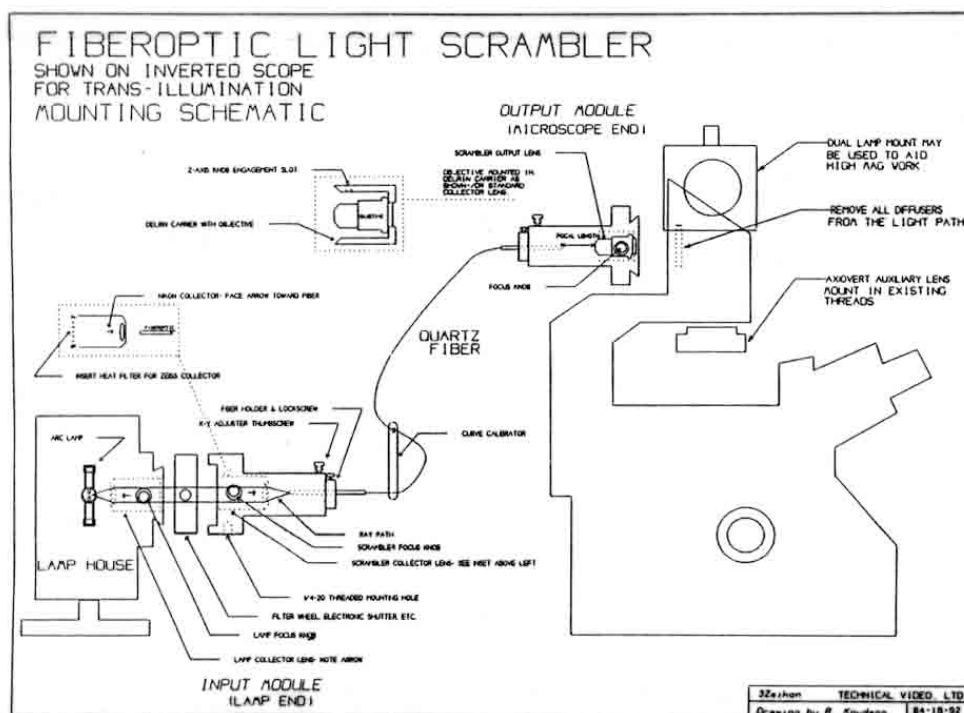
| Type | Aberrations Corrected | |
|----------------------|-----------------------|-----------|
| | Spherical | Chromatic |
| Abbe | — | — |
| Aplanatic | X | — |
| Achromatic | — | X |
| Aplanatic-achromatic | X | X |

3. táblázat.

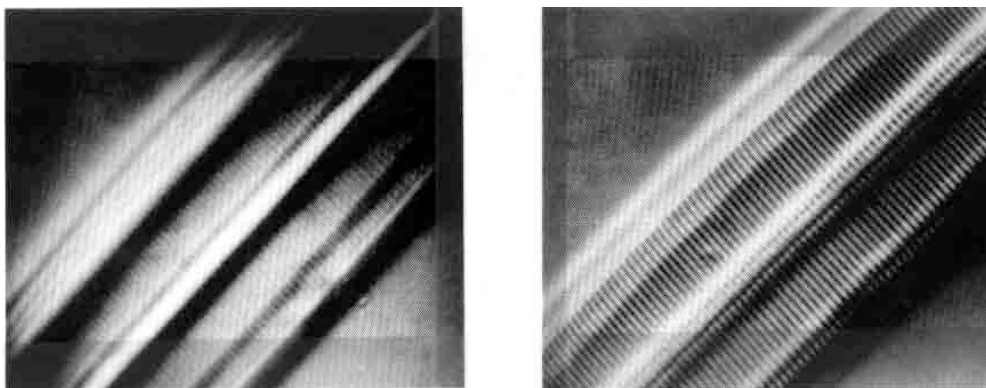
Léteznek nagy munkatávolságú kondenzorok; invertált mikroszkópokban használják ezeket.

E. Optical scrambler:

A fényforrásból eredő nyaláb tranverzális módusait (tranzverz síkban fellelhető intenzitásmaximumait) randomizálja. Eredmény: rendkívül egyenletes megvilágítás. A módszerrel lézerfényt is lehet mikroszkópos megvilágításra használni.



45. ábra. "Optical scrambler" egy invertált mikroszkópon (ZEISS Axiovert).



46. ábra. "Optical scrambler" használatának hatása a mikroszkópos képre.

F. Egyéb szempontok:

Optikai kamrák; Környezeti kontroll:

- plánparallel üvegből készült kamrák
- hőmérséklet-szabályzás
- nyomásszabályzás
- perfúzió

KONTRASZT NÖVELÉSE A MIKROSKÓPBAN

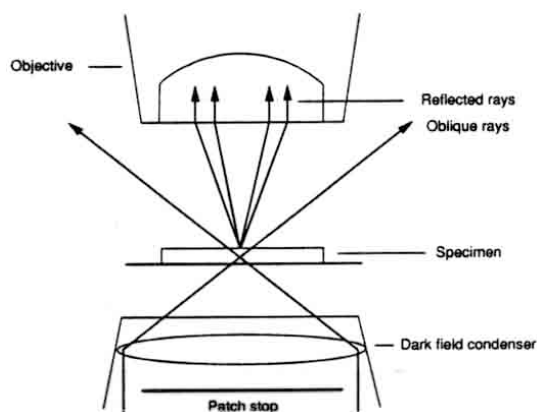
A. Sötétlátótér mikroszkópia

Használata: kisméretű, reflektív objektumok esetén (itt a világos háttér miatt nem tudnánk elkülöníteni a tárgyat).

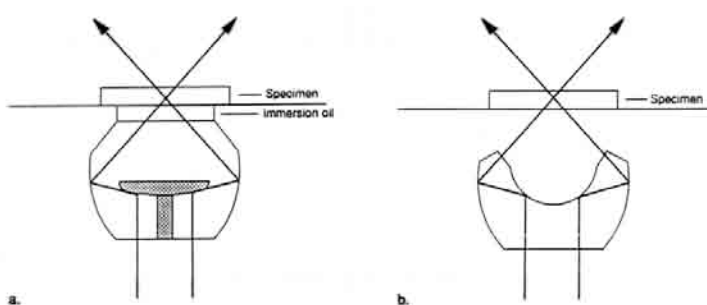
Megoldás: háttérintenzitás eliminálása, képalkotás csak a szórt sugarakkal.

Fourier-optikai mechanizmus: a nem szórt, nulladrendű sugarat eltávolítjuk a diffrakciós képből, és a képalkotásban csak a szórt maximumok játszanak szerepet. (A Fourier-optikai magyarázatra lásd a **49. ábrát**).

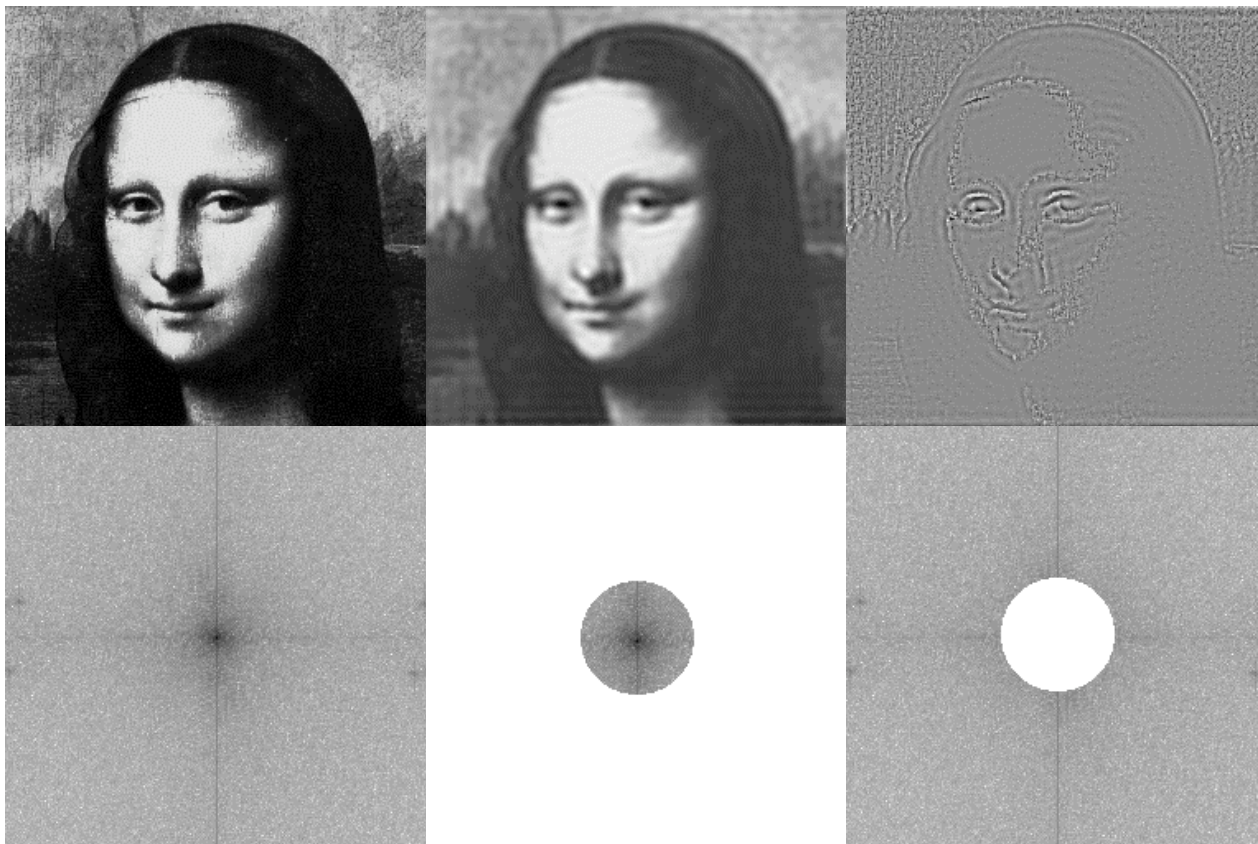
Megvalósítás: minta-megvilágító sugarak útjába egy centrális korongot helyezünk, mely kizárja a centrális sugarakat. Csak a nagy szögben érkező sugarak jutnak a tárgyig (**47. ábra**).



47. ábra. A sötétlátótér mikroszkópia alapelve.



48. ábra. Speciális sötétlátóteres kondenzorok.

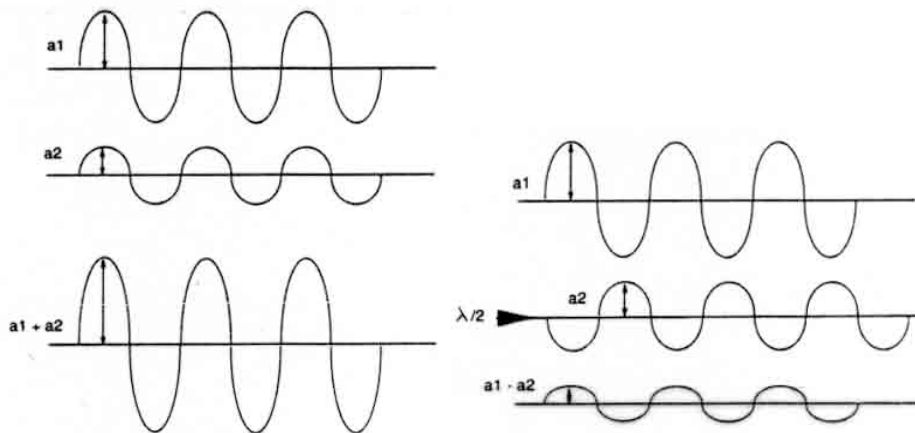


49. ábra: A képsíkban regisztrált mikroszkópos kép (balra fent). A nagy szögben szórt sugarak kitakarásával nyert kép: a részletek elmosódtak (középen fent). A nulladik rend kitakarásával nyert kép = sötétlátóteres kép; a finom részletek megjelennek (jobbra fent). A mikroszkópos kép 2D Fourier transzformált alakja (diffrakciós képe, balra lent). A diffraktált sugarak eltakartak (középen lent). A nulladik diffrakciós rend eltakart (jobbra lent).

B. Fáziskontraszt mikroszkópia

Olyan minták esetén hasznos, amelyek megváltoztatják a megvilágító sugárzás fázisát, de egyébként kontrasztszegények (pl. típusos biológiai minta).

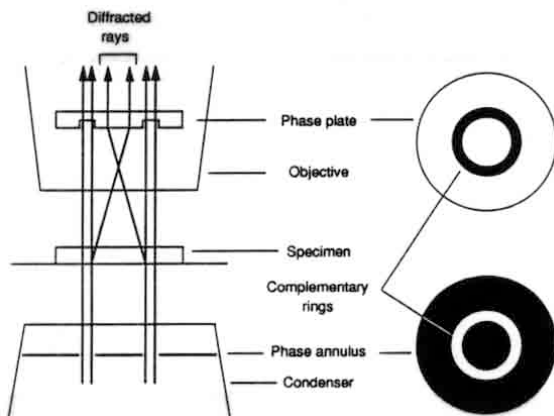
Alapja: interferencia (**50. ábra**). A minta által diffraktált fénysugarak fáziskésésbe (vagy előnybe) kerülnek a nem diffraktált sugarakhoz képest; ez konstruktív vagy destruktív interferenciát hoz létre, mely kontrasztnövekedésben jelentkezik.



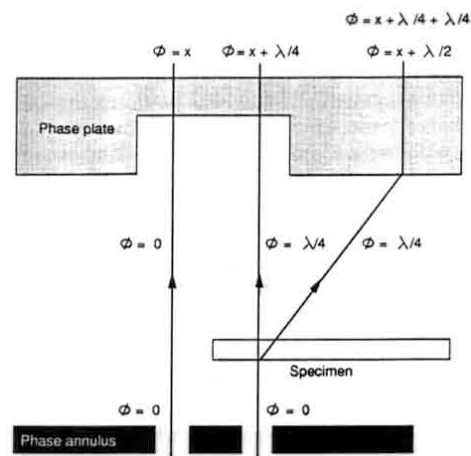
50. ábra. Konstruktív (bal oldal) és destruktív (jobb oldal) interferencia.

Megvalósítás:

- a megvilágítás hasonló a sötétlátótérhez: centrális korong kitakarja a centrális sugarakat
- az objektív hátsó fókusz síkjában fázislemez; rajta a kondenzor fázisgyűrűjével komplementer gyűrű (**51. ábra**).
- a minta által diffraktált és a fázislemezen áthaladt sugarak $\lambda/2$ fáziskésésben vannak a nem diffraktált, objektív-fázisgyűrűn áthaladt sugarakhoz képest = kontrasztnövekedés (**52. Ábra**).



51. ábra. A fáziskontraszt mikroszkópos megvilágítás optikai elemei.



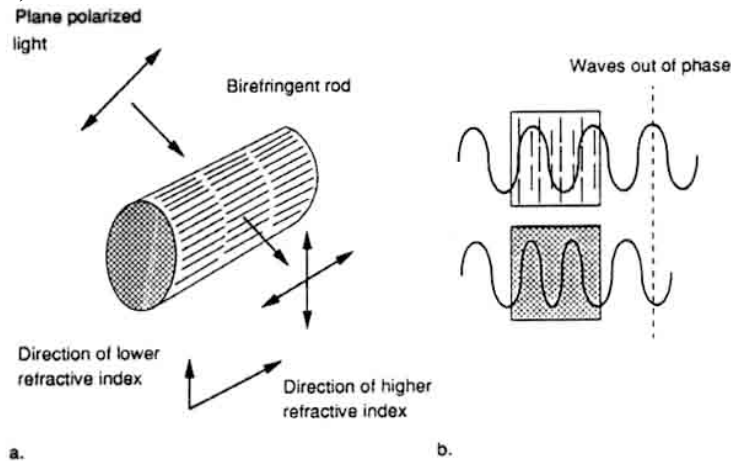
52. ábra. A fázislemez és fázisgyűrű működése. A mintában fellépő fáziskésés felerősödik, ha a diffraktált nyalábok áthaladnak a fázislemez vastagított peremén. A fáziskülönbségek interferencia miatt amplitudó különbségekké alakulnak.

C. Polarizációs mikroszkópia

Optikailag aktív, kettősen törő (birefringent) anyagok mikroszkópos vizsgalatára alkalmas.

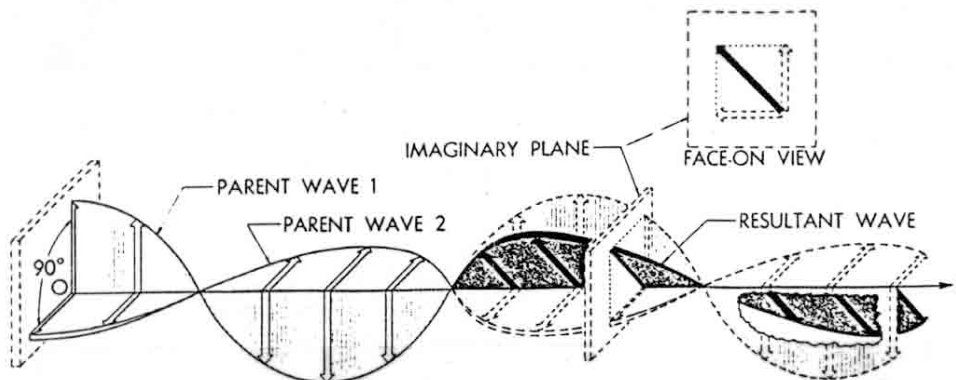
Kettős törő anyagok: olyan anyagok, amelyeknek két különböző törésmutatójuk van, egymásra merőleges irányban. Például, cellulóz rost longitudinális irányba eső törésmutatója különbözik a tranzverzális irányba esővel.

Ha lineárisan polarizált (síkpolárizált) fénnel megvilágítunk egy kettősen törő anyagot, akkor abban két sugár keletkezik. Az egyes sugarak rezgési síkja párhuzamos a megfelelő törésmutató irányával. A különböző törésmutatók miatt az egyes sugarak más-más fáziskésést szenvednek (nagyobb törésmutató, nagyobb késés) (53. ábra).



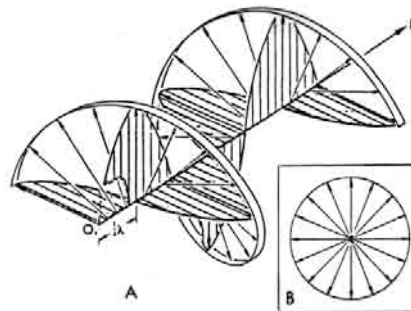
53. ábra. A kettős törés.

A két sugár újraegyesülésekor nem alakul ki interferencia, mert a rezgési síkok egymásra merőlegesek. Ehelyett kialakul egy helikális (dugóhúzó) menetű sugár (54. ábra).



54. ábra. Két, egymással 90°-ot bezáró rezgéssíkú nyaláb rekombinációja.

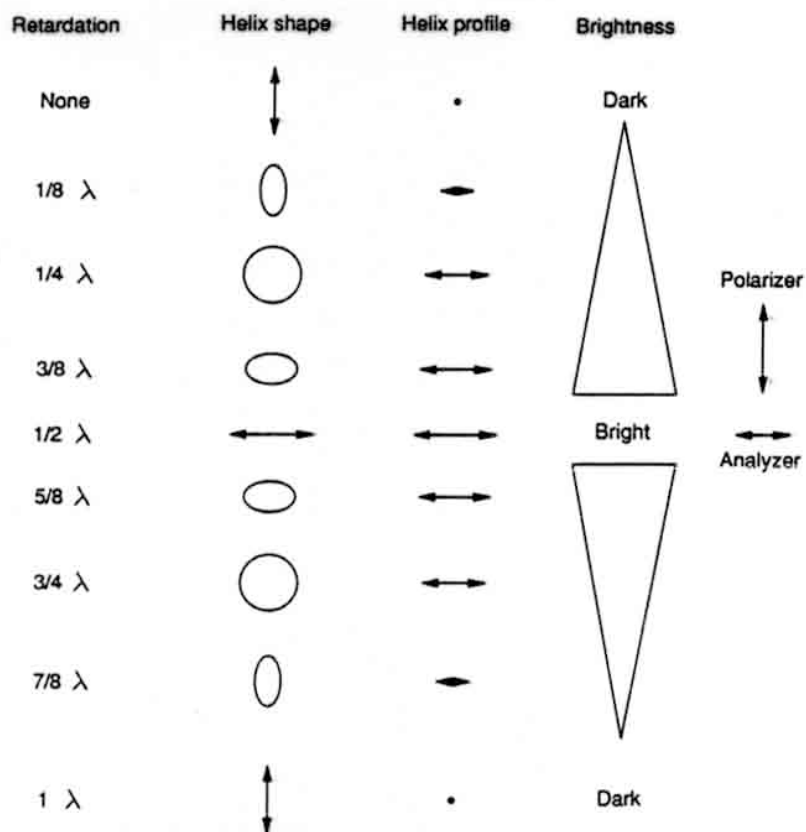
A helix alakja (keresztmetszeti síkban) a két sugár közötti fáziskülönbségtől függ. Például, $\lambda/4$ különbség (retardáció) esetén a helix keresztmetszete kör (cirkuláris polarizáció) (55. ábra).



55. ábra. Cirkuláris polarizáció.

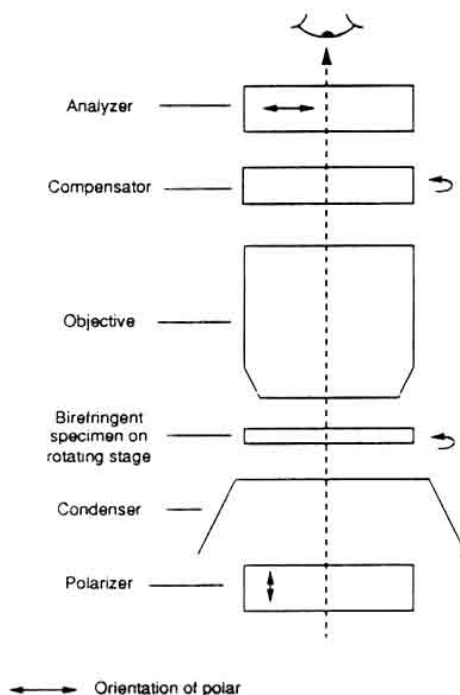
Ahhoz, hogy láthatóvá tegyük a kettősen törő anyag hatását a polarizált fényre, még egy polár szűrőt be kell iktatni a fény útjába = analízátor. A polarizátor és az analízátor fedésbe hozása (90°) extinkciót,

kioltást eredményez (sötétség). A fáziskésés, hélix-alak, és a fényintenzitás közötti összefüggést az **56. ábra** mutatja (polarizátor és analízátor fedésben):



56. ábra. A retardáció hatása az intenzitásra.

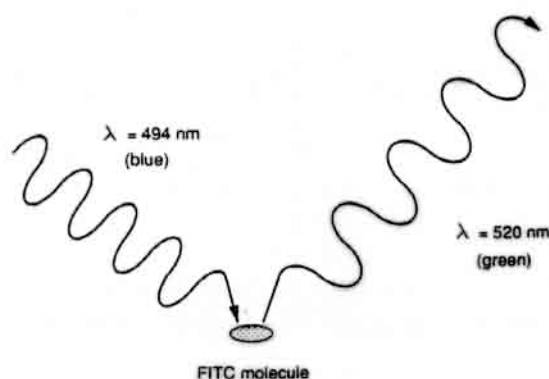
Ismert optikai aktivitású anyag ("kompenzátor") optikai útba való helyezésével az ismeretlen kettős törő anyag tulajdonságait mérni tudjuk. A kompenzátort úgy forgatjuk, hogy maximális (vagy minimális) kioltást kapjunk. Eközben az elfordulás szögét mérjük (**57. ábra**).



57. ábra. A polarizációs mikroszkóp részei.

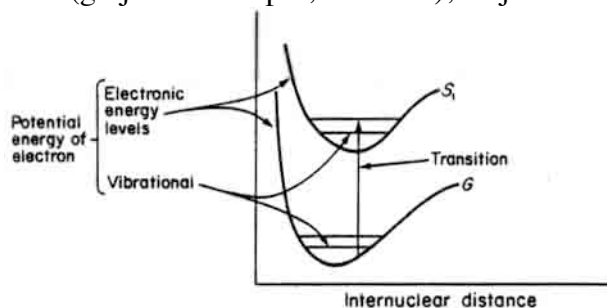
D. Fluoreszcencia mikroszkópia

A fluoreszcencia egy relaxációs folyamat, mely a fény abszorpciójával kezdődik, és emissziójával végződik; az emittált fény energiája (frekvenciája) kisebb, mint az abszorbeálté (**58. Ábra**).

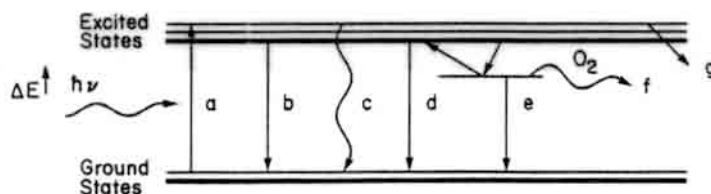


58. ábra. Fluoreszcencia. Kék fénnel gerjesztjük a FITC molekulát, amely zöld fényt emittál.

Ha egy atomi vagy molekuláris rendszer egy fotont abszorbeál, akkor abban egy vegyérték-elektron magasabb energiájú pályára kerül (gerjesztett állapot, **59. ábra**), majd de-excitálódik (**60. ábra**).

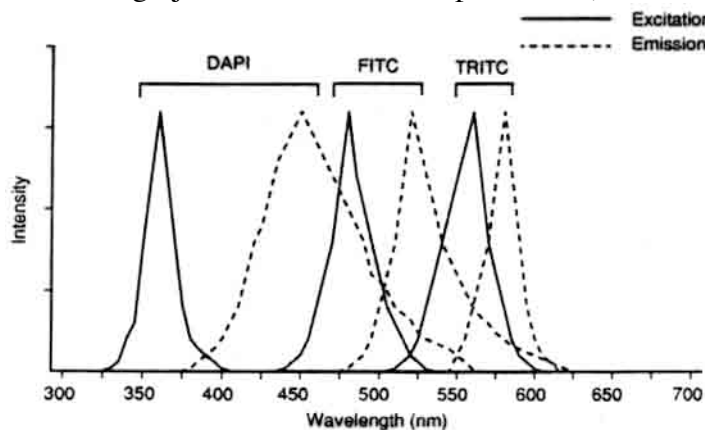


59. ábra. Elektronok energiája az alap-, illetve az első gerjesztett, szinglet állapotban.



60. ábra. A de-excitáció lehetséges útjai. (a) abszorpció, (b) fluoreszcencia, (c) sugárzásmentes energiavesztés, (d) késleltetett fluoreszcencia, (e) foszforeszcencia, (f) photobleaching, és (g) kémiai reakció.

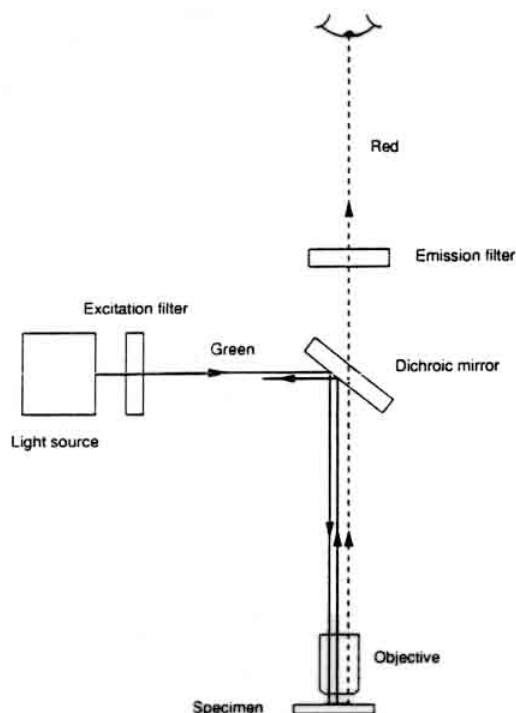
Fluoreszcencia mikroszkópban adott abszorpciós és emissziós maximumokkal rendelkező festékeket használunk. A festékek biomolekulákhoz specifikusan köthetők, ezáltal a biomolekulák vizsgálatára nyílik lehetőség. Néhány fluorofór gerjesztési és emissziós spektruma (**61. ábra**):



61. ábra. Néhány fluorofór spektruma.

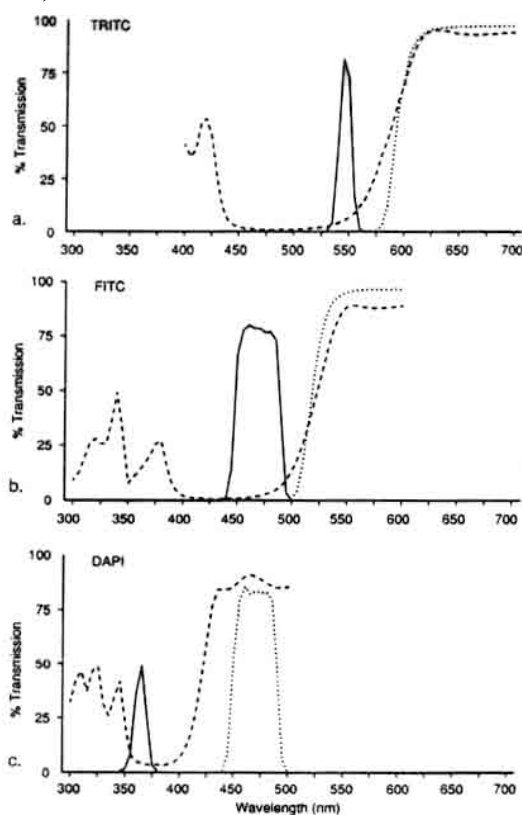
Mikroszkópos felállítás: ma leginkább epifluoreszcencia mikroszkóp.

A fény útja: forrás (Hg v. Xe) - gerjesztési szűrő - dichroikus tükör (rövidebb hullámhossznál reflektál, hosszabbnál átenged) - objektív - minta - objektív - emissziós szűrő - fluoreszcencia mikroszkópos kép (62. ábra)



62. ábra. Az epifluoreszcencia mikroszkóp vázlatos diagrammja.

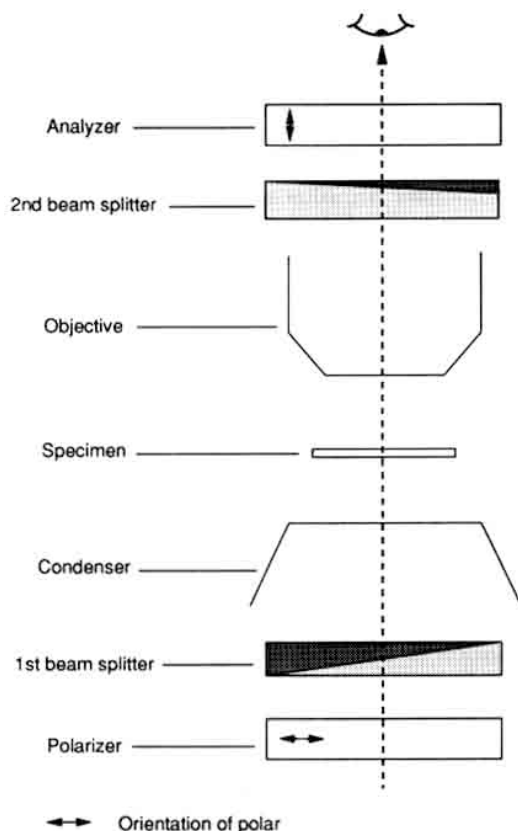
Az epifluoreszcencia mikroszkópban interferencia szűrőkészleteket használunk, melyek specifikusak egy adott fluoroforra. Például (63. ábra):



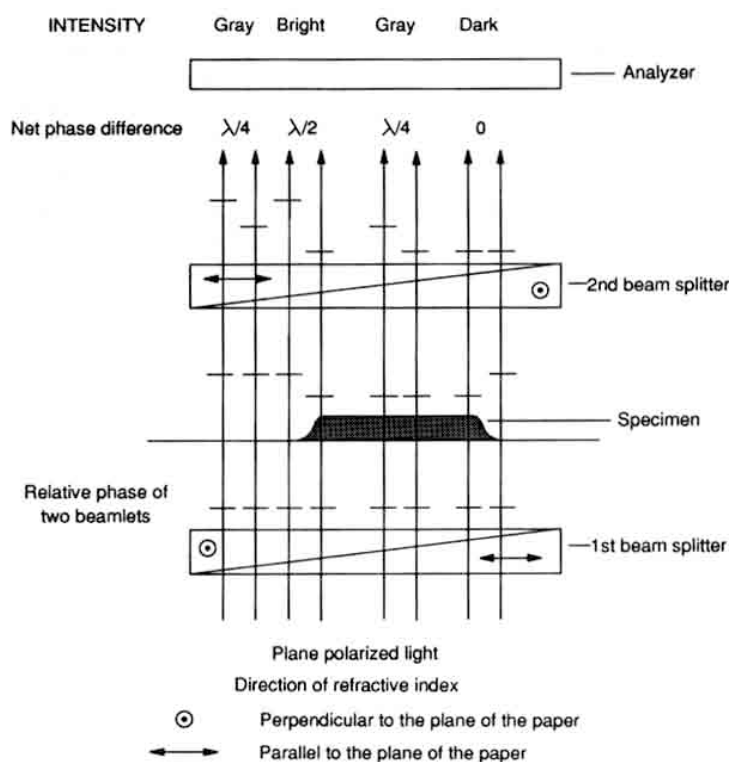
63. ábra. Néhány fluorofór esetében használt szűrőkészlet transzmissziós karakterisztikája. Folytonos vonal, gerjesztési szűrő; szaggatott vonal, dichroikus tükör; pontozott vonal, emissziós szűrő.

E. Differenciál Interferencia Kontraszt (DIC vagy Nomarski) mikroszkópia

A DIC mikroszkópia felszíni topográfiára emlékeztető, ún. "relief" képet ad a vizsgát tárgyról. Nagy az axiális felbontása. A DIC mikroszópot úgy lehet felfogni, mint a polarizációs és fáziskontraszt mikroszkóp kombinációját. A DIC mikroszkópban a mintát két, egymással párhuzamosan, egymás közelében kis távolságra (az Airy disk átmérőjénél kisebb távolságra) haladó, síkpolarizált fénynyalábbal világítjuk meg, ahol a nyalábok polarizációs síkja egymásra merőleges. A DIC mikroszkóp optikai elemeit a **64. ábra** mutatja.



64. ábra. A DIC mikroszkóp elemei.



65. ábra. Kontrasztképződés a DIC mikroszkópban.

A megvilágító fény nyaláb először egy polarizátoron halad át, amely síkpolarizált fénynyalábot állít elő. A nyaláb ezután áthalad az első különleges nyalábosztón, az ún. Wollaston prizmán ("1st beam splitter" a **64. ábrán**), amely a nyalábot két, egymástól térben elválasztott, párhuzamos, polarizációs síkjaik által 90°-ot bezáró nyalábra osztja. Miután a nyalábok áthaladnak a kondenzoron, a mintán és az objektíven, egy újabb, de ellentétes állású Wollaston prizmán majd pedig egy keresztállású (extinkciót eredményező) analizátoron haladnak át. A második prizma egyrészt újabb fázisretardációt eredményez, másrészt rekombinálja a két nyalábot. A kontrasztképződés lépéseit a **65. ábra** mutatja, feltüntetve a különböző optikai síkokban tapasztalható polarizáltságot, fáziskésést, illetve intenzitást.

F. Hoffman moduláció kontraszt.

A Hoffman moduláció kontraszt mikroszkópia a "szegény ember DIC mikroszkópja". Itt is felszíni topográfiára emlékeztető relief képet kapunk, szintén polarizált fény segítségével, de a drága nyalábosztók helyett az objektív hátsó aperturájába helyezett változtatható optikai réseket alkalmaz.

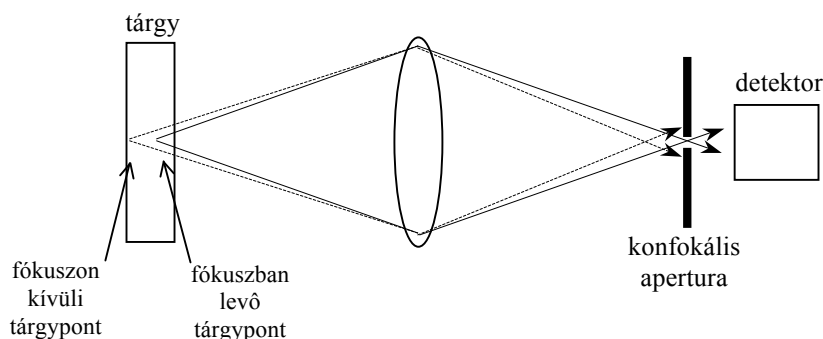
KÜLÖNLEGES MIKROSKÓPIÁK

A különleges mikroszkópos technikák legfontosabb közös tulajdonsága az a törekvés, hogy az optikai felbontás határait kitoljuk, vagy valahogyan "megerősöljük".

A. Konfokális mikroszkópia

A fénymikroszkóp felbontásának határt szab az Abbé-féle elv, mert a fénynyalábot nem lehet minden határon túl fókuszálni, és egy elemi tárgyponthoz képest elmosódott lesz (Airy disk, elhajlási korong). Könnyen belátható, hogy az elemi képpont képsíkban történő diffrakció miatti elmosódottsága, "elkentsége" nem csupán az X-Y síkban jön létre, hanem a Z-tengely (optikai tengely) mentén is. Ez arra vezethető vissza, hogy nem csupán a mintával egy síkban levő, hanem a vele szomszédos síkokból eredő fénynyalábok is részt vesznek a kép kialakításában. Összességében tehát a képminőség és felbontás javítása érdekében ki kellene küszöbölnünk 1) az optikai tengely mentén szomszédos síkokból, illetve 2) a képsíkban a szélső területekről érkező fénynyalábokat. **(Lásd még Függelék)**

1. A nem képsíkból eredő nyalábok kiküszöbölése: konfokális elv. A konfokális mikroszkópban egy apertúra (konfokális apertúra) segítségével takarjuk ki a nem fókusz síkból eredő fénynyalábokat, így a fénydetektorba csupán a fókusz síkból eredő nyalábok jutnak **(66. ábra)**.



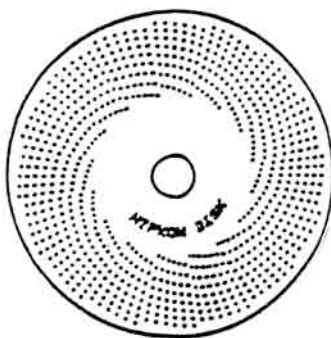
66. ábra. A konfokális elv.

2. A tárgysík szélső területeiről érkező nyalábok kiküszöbölése: pásztázás. Az egész minta helyett a minta egy pontját világítjuk meg.

A pásztázás gyakorlati megoldási lehetőségei:

a. Mintaasztal mozgatása. Lassú, pontatlan, nem használatos (DE: visszacsatolt PZT tárgyasztalok esetében jó az eredmény).

b. Nipkow korong **(67. és 68. ábra)**

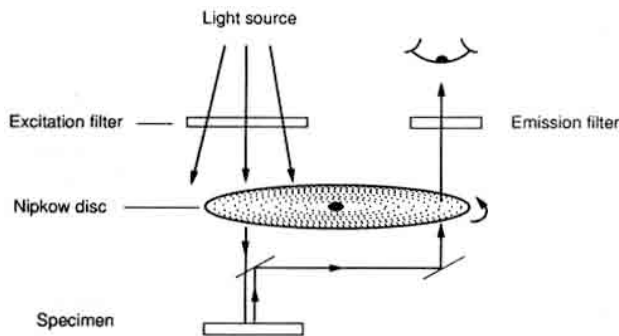


67. ábra. Nipkow korong.

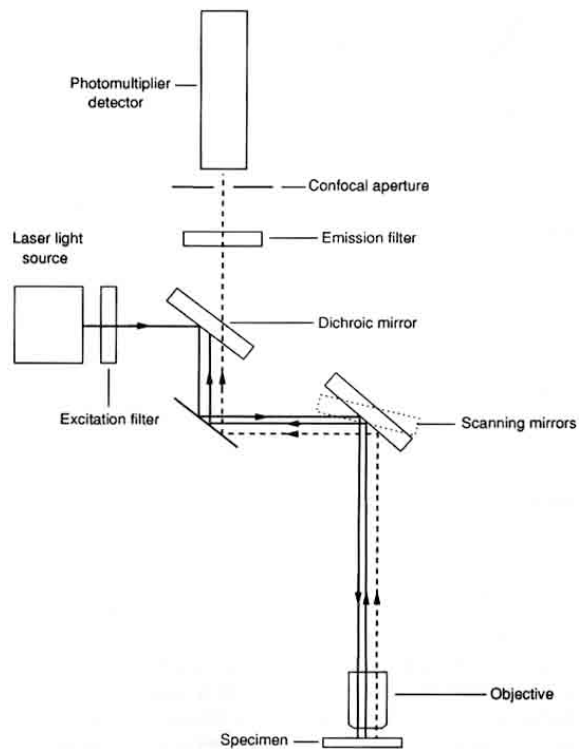
c. Pásztázás lézernyalábbal. Manapság ez a legelterjedtebb **(69. ábra)**.

A konfokális mikroszkóp típusai:

1. Tandem pásztázó mikroszkóp (*Tandem scanning microscope, TSM*) (68. ábra)
2. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (*Confocal laser scanning microscope, CLSM*) (69. ábra)



68. ábra. A Tandem pásztázó mikroszkóp elemei.



69. ábra. A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp elemei.

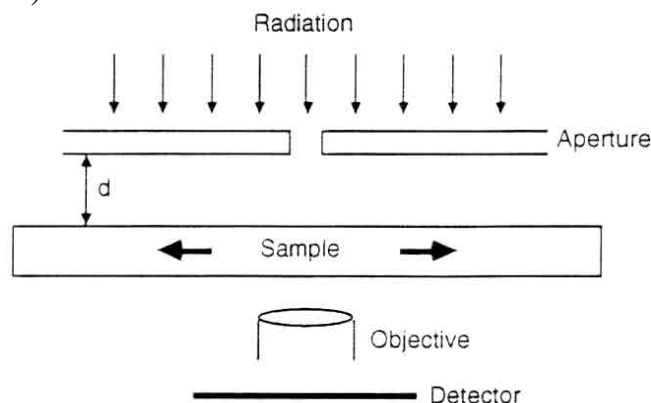
3. Dekonvolúciós konfokális mikroszkóp (*Deconvolution Confocal Microscope*). A mikroszkópos kép nem kívánatos részeit dekonvolúciós algoritmusok segítségével távolítjuk el (lásd Fourier optika).

B. Near-Field Scanning Optical Microscope (NSOM)

Az NSOM-et tulajdonképpen már a pásztázó próbamikroszkópokhoz lehet sorolni (lásd alább. Alapjelenség: a megvilágító aperturától egy hullámhosszynyi távolságon belül ("near field" vagy közeli mező tartomány) a diffrakció miatti problémák nem jelentkeznek. Ebben a tartományban a feloldást az apertúra átmérője határozza meg (20-300 nm). Az eddigi legjobb elért feloldás: 12 nm.

Az NSOM különböző működtetési módjai:

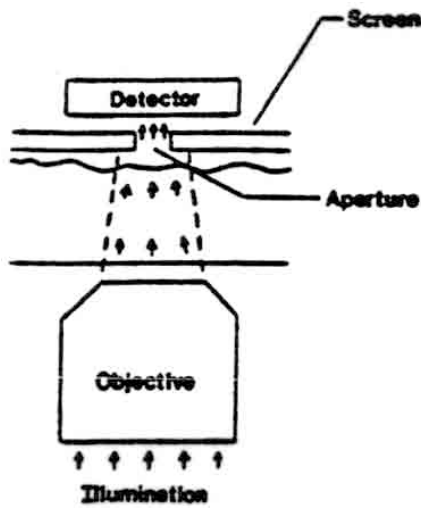
a. Megvilágító mód (70. ábra)



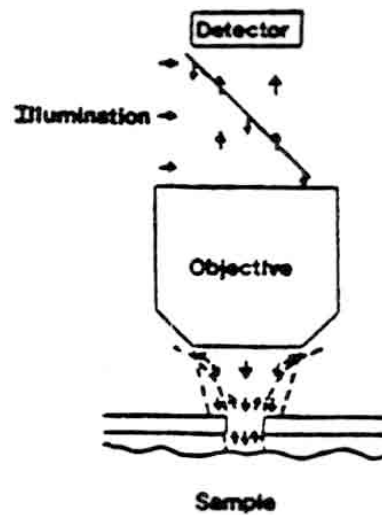
70. ábra.

b. Kollektív mód (71. ábra)

c. Reflexiós mód (72. ábra)



71. ábra



72. ábra

Az NSOM műszeres egységei:

- "Probe": mikropillár (üveg) vagy üvegszál
- Feedback kontrol (z-síkú pozícióbeállítás)
- Mikropozíció-beállítás (x-y sík)

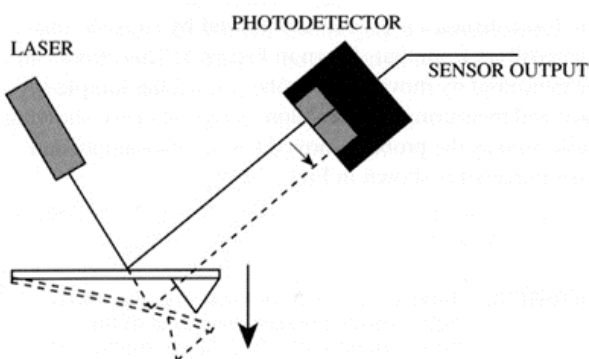
C. Pásztázó Próba Mikroszkópok

1. Pásztázó alagút effektus mikroszkóp (Scanning Tunneling microscope, STM)

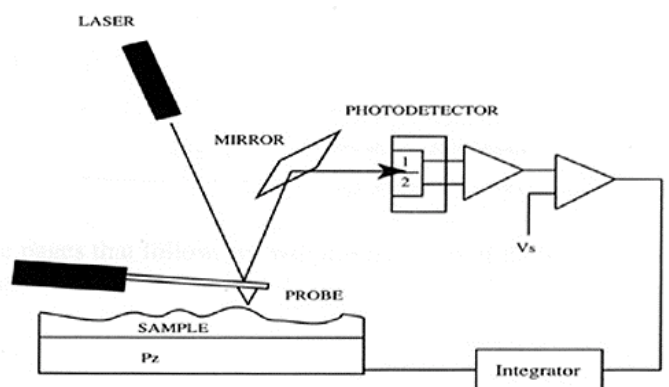
Alapjelenség: alagúteffektus ("tunneling effect"). Szubnanométeres távolságra levő, potenciálkülönbséggel rendelkező pontok között az elektronok csak egy nagy valószínűséggel jellemzett "csatornán" keresztül közlekedhetnek. Elektronáram = alagútáram. Az STM-ben az alagútáram állandó szinten tartásához szükséges próbaelmozdítást mérik a minta felszínének tapogatása közben.

2. Atomi erőmikroszkóp (Atomic Force microscope, AFM)

A minta felszíne és a próba atomjai közötti vonzó- és taszítóerők miatt a próba elmozdul. A próbaelmozdulást a próbára vetített és arról visszavert lézernyaláb pozíciójának detekálásával mérjük (73. ábra). A gyakorlatban azt a próba elmozdulást mérjük, amely az atomi erő állandó szinten tartásához szükséges (74. ábra).



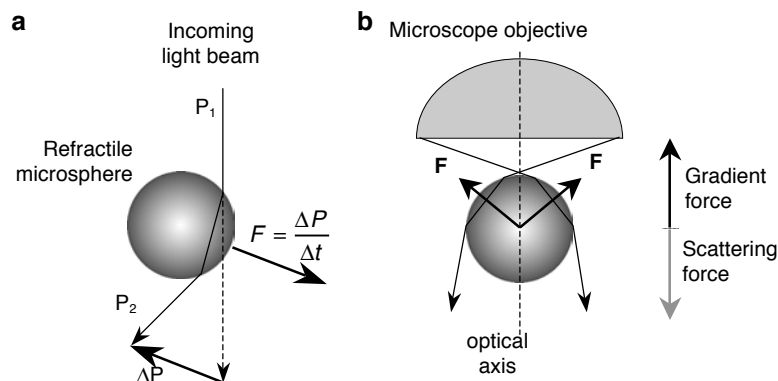
73. ábra. Próbaelmozdulás mérése az AFM-ben.



74. ábra. Visszacsatolás az AFM-ben.

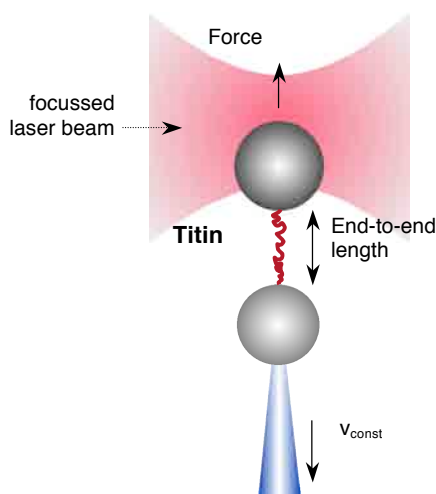
MECHANIKAI MANIPULÁLÁS ÉS ERŐMÉRÉS FÉNYMIKROSZKÓPPAL: A LÉZERCSIPESZ

Egy fénynyaláb és egy dielektromos (elektromosan polarizálható) részecske kölcsönhatása során mechanikai erő lép fel, ami a fénnyel való impulzusváltással kapcsolatos (**75.a ábra**). A lézercsipeszben egy nagy energiájú (wattos nagyságrend) lézernyalábot fókuszálunk nagy numerikus aperturájú mikroszkóp objektívvel egy diffrakció által limitált pontba, ahol jellemző a rendkívül nagy fényintenzitás-grádiens. A intenzitás-grádiens mind a laterális (X-Y tengely) tengelyek, mind az optikai (Z-) tengely irányában fenn áll. A grádiens-erő az, ami a mikroszkópos részecskét mintegy fogva tartja. Az optikai csipesz erejét végső soron a grádiens erő (gradient force) és a szóró erő (scattering force) egyensúlya határozza meg (**75.b ábra**).



75. ábra. A lézercsipesz működésének alapjai.

Molekuláris erők mérése is elvégezhető a lézercsipesz segítségével, ugyanis a lézercsipesz felfogható egy mikroszkopikus erőmérő berendezésként ("force transducer") (**76. ábra**). Nyugalmi állapotban, azaz olyan körülmények között, amikor a gömböcskére nem hat külső erő, a gömböcske az optikai csipesz által definiált potenciálvölgy legalacsonyabb pontján (a fókusz középpontjában) helyezkedik el. Külső erő hatására a gömböcske elmozdul a fókuszpont közepétől. Az elmozdulás mértéke egyenesen arányos a gömböcskére ható erővel. Vagyis, a gömböcske pozíciójának megméréseével meg tudjuk mérni a gömböcskére ható erőt.



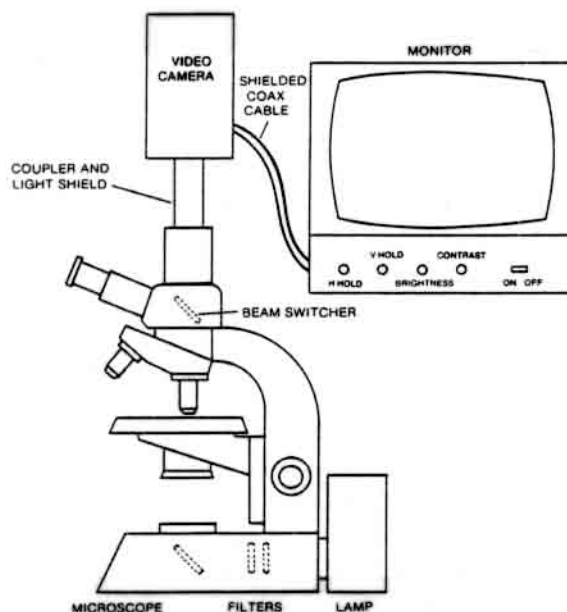
76. ábra. Egyetlen molekula manipulálása és a molekuláris erők megmérése lézercsipesz segítségével.

VIDEOMIKROSKÓPIA

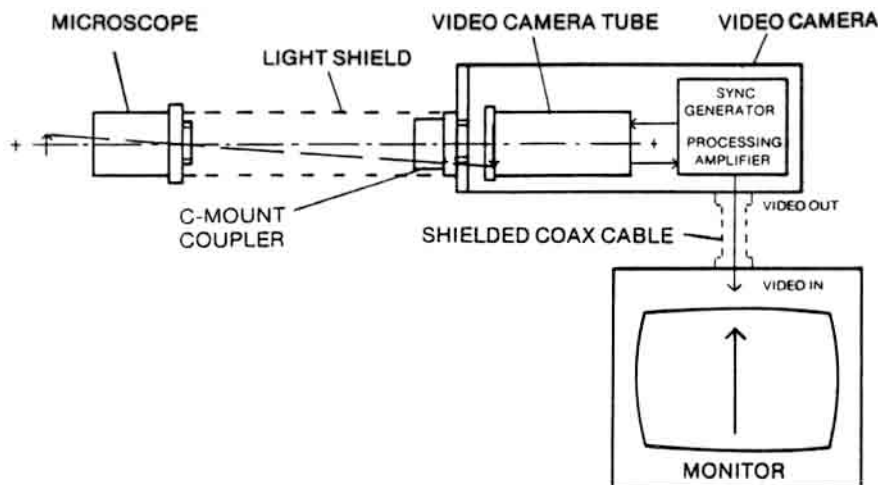
A videomikroszkópia lényege: fénymikroszkópban keletkező képet elektronikus jellé alakítunk át tárolás, illetve további analízis céljából.

A. A videomikroszkópia alapelemei

A videomikroszkópiához szükséges minimális berendezésben egy videodetektort kapcsolunk megfelelő tubus segítségével a mikroszkóphoz (77. ábra). A regisztrált videojelet egy koaxiális kábelon továbbítjuk egy videomonitorhoz (78. ábra).



77. ábra. A videomikroszkópiához szükséges minimális eszközpark.

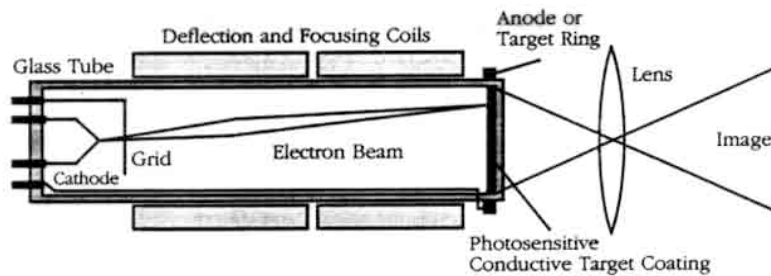


78. ábra. A mikroszkópos kép videojellé alakításának és megjelenítésének diagrammja.

B. A videojel detektálása

A videojelet megfelelő videodetektorral detektáljuk.

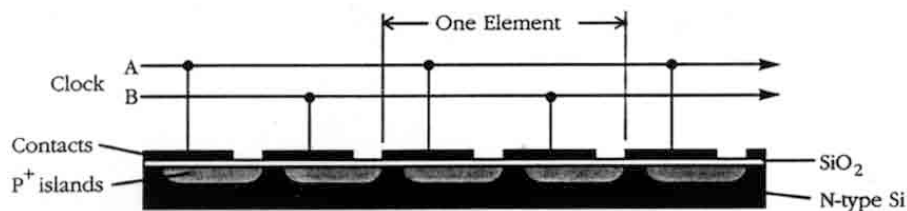
1. *Vákuumcsöves kamerák (Vidicon):* régebbi típus (79. ábra). A különböző elnevezések általában a különböző elektronikai cégek által használt regisztrált nevek. A beérkező fény megváltoztatja a kamera frontfelületén levő bevonat vezetőképességét. A bevonatot elektronsugár tapogatja le, miközben az ellenállás változásból származó jeltől rekonstruálható a kép. Hátrány: rossz időfelbontás, lassú relaxáció, "lag".



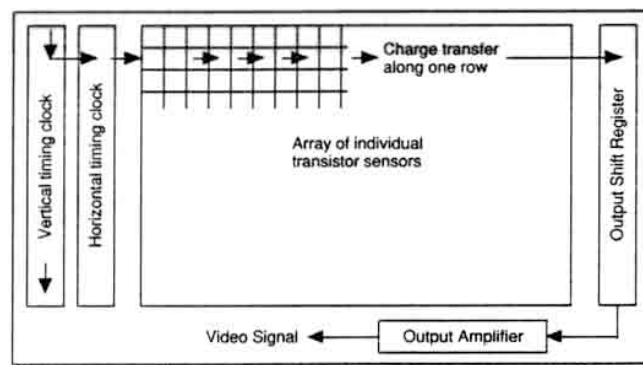
79. ábra. Egy vidicon cső funkcionális diagramja.

2. Solid State szilícium alapú kamerák

CCD=Charge Coupled Device; CID=Charge Injection Device. Ma a leggyakrabban használtak. A CCD chipen levő elemi detektorban töltésfelhalmozódás zajlik (**80. ábra**). A töltés időközönként, elektronikus úton, nondestruktív módon "lehívható" (**81. ábra**). A lehívott jelből elektronikus úton rekonstruálható a kép.



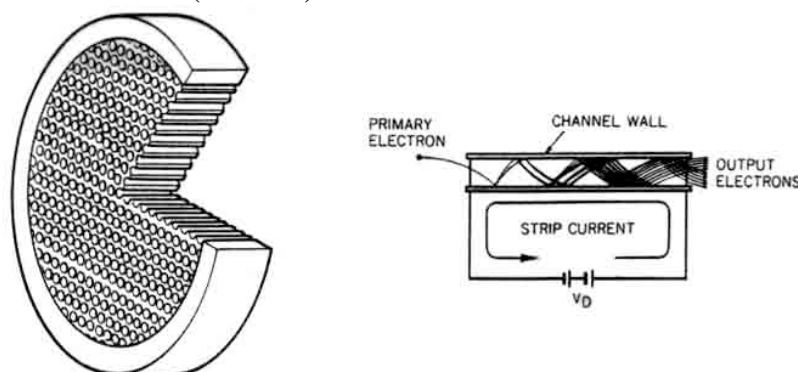
80. ábra. Egy CCD chip keresztmetszete vázlatosan. Minden egyes érzékelő elem a ráeső fényintenzitást detektálja, benne az intenzitással arányos töltésfelhalmozódás lép fel.



81. ábra. A CCD chip működése. A vertikális órajel kiválasztja a megfelelő horizontális elemi detektorsort. A vízszintes órajel minden egyes elemi detektor tartalmát eltolja a szomszédja irányába, ezáltal lépésenként kiürül a detektorsor egy regiszterbe, majd egy erősítőbe. Az erősítő előállítja az idő függvényében változó analóg feszültségjelet (videojel).

3. Csatornalemezes fotoelektronsokszorozó (Microchannel Plate, MCP):

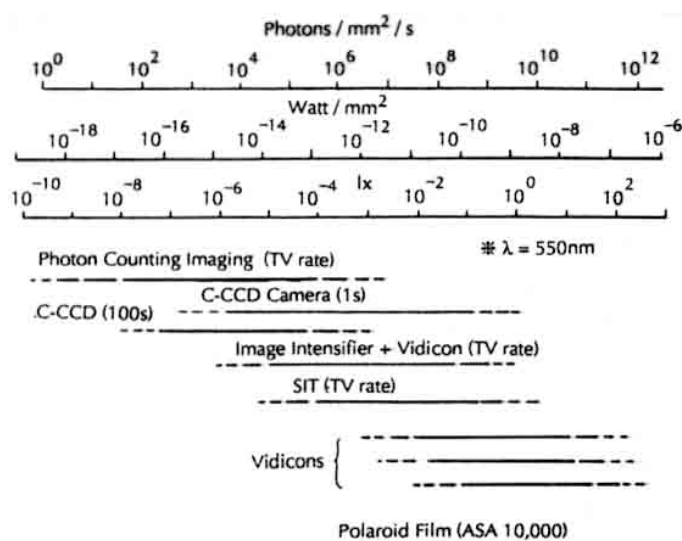
A video detektor elé helyezve használatos. A beérkező fény intenzitását kb. egymilliószorosára erősíti fel, a térbeli (2-dimenziós) információ megtartása mellett. Az MCP-t felépítő kapillárisok mint megannyi fotoelektronsokszorozó működnek (**82 ábra**).



82 ábra. A csatornalemezes fotoelektronsokszorozó szerkezete és működése.

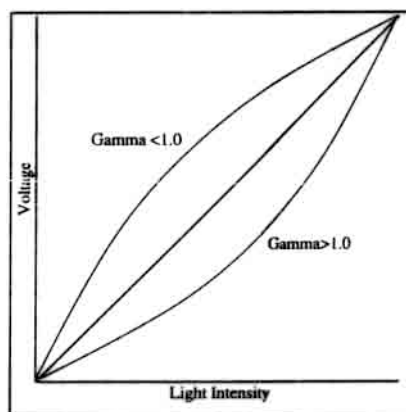
4. A videodetektorok jellemzői:

a. *Érzékenység*: az egyes detektorok más és más fényintenzitás-tartományban érzékenyek (**83. ábra**).



83. ábra. Különböző videodetektorok érzékenysége az optikai teljesítmény függvényében.

b. *Kiváltott elektronikus válasz*: "kontraszt transzfer függvény. Minél meredekebb, annál nagyobb a kontraszt (**84. ábra**):

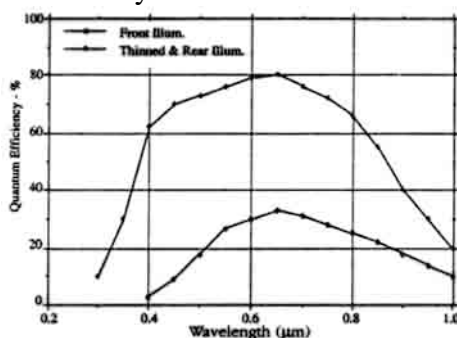


84. ábra. A detektorra eső fényintenzitás és a kimenő feszültségjel közötti összefüggés.

c. *Torzítás (Distorsion)* A videodetektorokra, különösen a korai változataira, jellemző a geometriai torzítás, amely lehet:

- tűpárna (pincushion)
- hordó (barrel)

d. *Spektrális válasz*: a CCD kamerák érzékenyebbek a vörös és infravörös tartományban (**85. ábra**).



85. ábra. CCD kamera spektrális érzékenysége a megvilágítási mód függvényében.

e. Videodetektorok néhány jellemző adata (4. táblázat)

| | Sb ₂ S ₃ vidicon | PbO vidicon | CdSe vidicon | Silicon vidicon | SIT camera tube | SEC camera tube | Image orthicon | Isocon |
|--|---|---------------------------------|--|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| Image diagonal (mm) | 16 | 21 | 11 | 16 | 25 | 25 | 45 | 35 |
| Typical faceplate illuminance (lx) ^a | 20 | 3 | 1 | 0.5 | 2×10^{-3} | 0.035 | 0.2 | 0.02 |
| Responsivity (μA/lm ²) | 250 | 350 | 2750 | 4350 | 2.9×10^5 | 1.35×10^4 | 4×10^4 | 9.2×10^5 |
| Typical signal level (nA) | 300 | 300 | 200 | 300 | 300 | 150 | 8000 | 4000 |
| Limiting center resolution, TV lines PPH (aspect ratio 4:3) | 1100 | 600 | 700 | 700 | 750 | 600 | 750 | 1100 |
| Lag, third field (%) ^d | 18 | 3 | 12 | 8 | 10 | 3 | 3 | 3 |
| Output dark current (nA) | 20 | 0.5 | 1 | 8.5 | 10 | 0.001 | — | — |
| Intrascene dynamic range ^e | 350:1 | 50:1 | 60:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 100:1 ^f | 1000:1 ^g |
| Photoconductor material, or spectral response | Sb ₂ S ₃ | PbO | CdSe | Si | S-20 | S-20 | S-10 | S-20 |
| Tube type | SIT | Isocon | SEC | ISIT | I-Isocon | I-SEC | | |
| General Data | | | | | | | | |
| Photocathode diameter (mm) | 40 | 35 | 40 | 40 | 35 | 40 | | |
| Responsivity (A/lm) | 0.4 | 0.9 | 0.015 | 12 | 27 | 0.45 | | |
| Intrascene dynamic range ^e | 50:1 | 1000:1 | 100:1 | — | — | — | | |
| Usable light range of illuminance ^h | 10,000:1 | 2000:1 | 200:1 | 10 ⁵ :1 | 20,000:1 | 2000:1 | | |
| Exposure damage limit (lx-sec) | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | — | — | — | | |
| Typical performance at normal highlight | | | | | | | | |
| Output current (nA) | 500 | 3000 | 150 | 500 | 3000 | 150 | | |
| Faceplate illuminance to obtain typical output current (lx) | 2×10^{-3} | 1.5×10^{-2} | 3×10^{-2} | 7×10^{-3} | 5×10^{-4} | 1×10^{-3} | | |
| Lag after 50 msec (%) | 10 | 4 | 2 | 10 | 4 | 2 | | |
| Limiting resolution, 100% contrast (TV lines) | 1100 | 1100 | 600 | 1000 | 1000 | 500 | | |
| 400-line amplitude response (%) | 56 | 75 | 20 | 41 | 56 | 13 | | |
| Tube type | SIT | Isocon | SEC | ISIT | I-Isocon | I-SEC | | |
| Performance at 10 ⁻⁴ lux faceplate illuminance | | | | | | | | |
| Output (nA) | 35 | 20 | Not usable; signal is very low; picture would be very laggy and noisy | 500 | 600 | 25 | | |
| Limiting resolution (TV lines) | | | | | | | | |
| 100% contrast | 700 | 250 | | 900 | 900 | 300 | | |
| 30% contrast | 600 | 175 | | 550 | 600 | 250 | | |
| Lag after 50 msec (%) | 30 | Not usable because of lag | | 10 | 13 | 18 | | |
| S/N (4-MHz bandwidth) | 3 | 2 | | 3 | 3 | 3 | | |
| Performance at 10 ⁻⁵ lux faceplate illuminance | | | | | | | | |
| Output current (nA) | | | | 100 | 60 | | | |
| Limiting resolution (TV lines) | | | | | | | | |
| 100% contrast | | Low signal | Very laggy | 800 | 450 | Not usable (low signal) | | |
| 30% contrast | | | | 350 | 250 | | | |
| Lag after 50 msec (%) | | Very laggy | | 25 | Not usable (very laggy) | Very laggy | | |

^aCourtesy of RCA, from *RCA Electro-Optics Handbook*, 1974, pp. 189, 207.

^b1 lx = 0.0929 fc.

^cIllumination from a tungsten lamp, 2856°K color temperature.

^dMeasured at the indicated typical signal level.

^eLarger than the signal current and increases with excess beam current.

^fDark current is equivalent to 10% of the signal current. Dark current is uniform and independent of temperature.

^gIlluminance range on the faceplate for a 50:1 (34 dB) signal range. Details may be observed in the total range.

^hThere is a useful compression of the signal above the knee for wide variations of scene luminance.

ⁱIntrascene dynamic range is here defined as the range of illuminance in a single scene such that the output signal level has a range of 50:1.

^jUsable light range is the total range of illuminance that can be accommodated by variation of gain within the tube as well as by the inherent intrascene dynamic range capability.

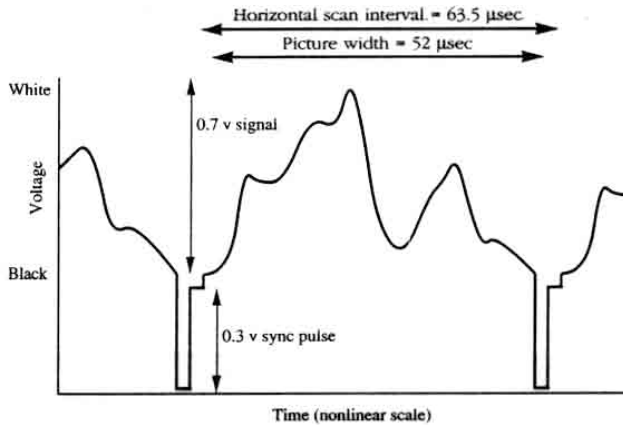
4. táblázat

C. A videojel

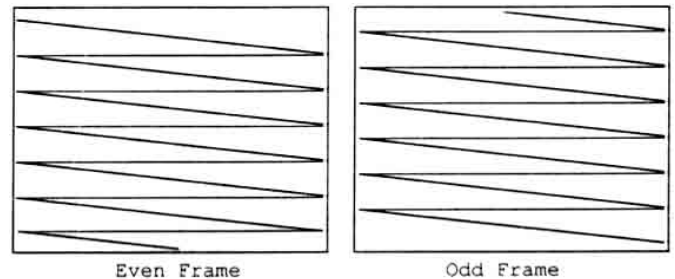
Jellemzői:

1. *Analóg feszültségjel.* A feszültség 0.7 voltos tartományban mozog a minimum és maximum intenzitás között (**86. ábra**).

2. *Pásztázás:* 525 vonal/frame. Interlacing: egy kocka (frame) két mezőből (páratlan, páros) tevődik össze. Az egyes mezőkre 1/60 s (NTSC), illetve 1/50 s (PAL/SECAM) jut (**87. ábra**).

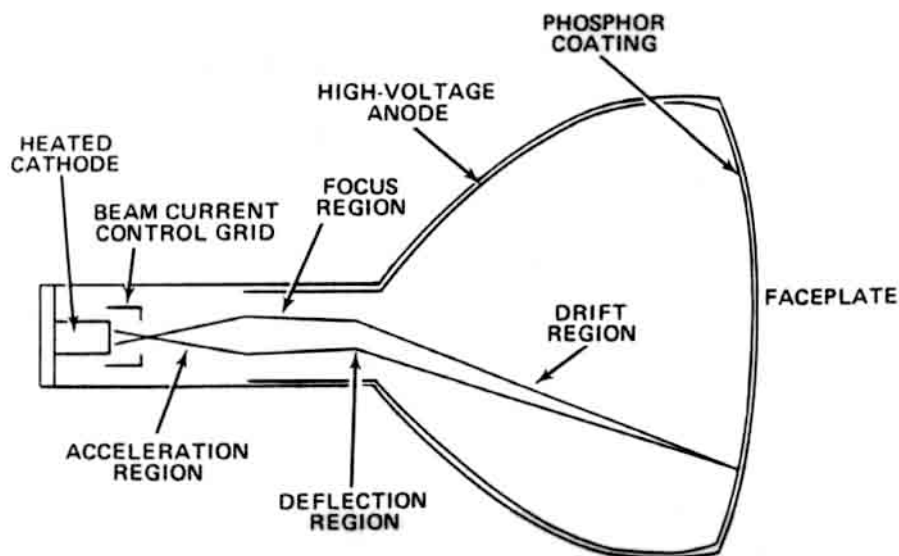


86. ábra. Az összetett (kompozit) videojel (USA időviszonyok).



87. ábra. Interlacing.

D. A videojel képi megjelenítése: video monitoron=katódsugárcső (88. ábra)

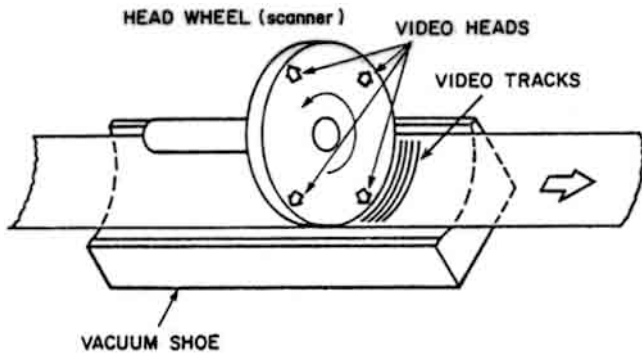


88. ábra. Videomonitor, mint katódsugárcső, oldalnézetben.

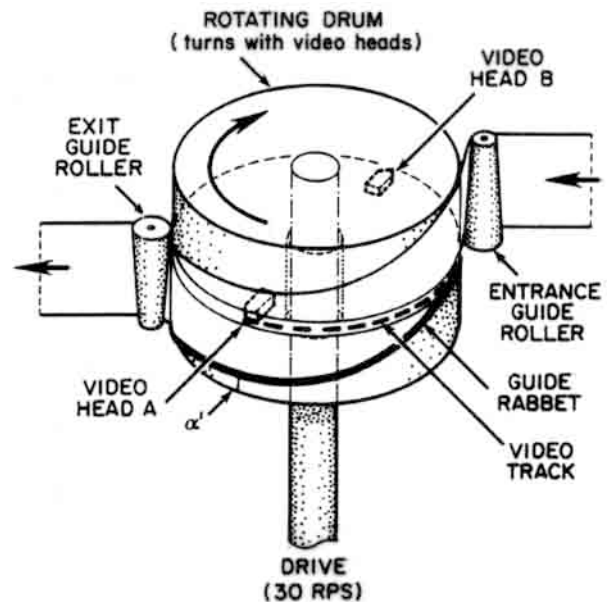
E. A videojel rögzítése:

1. Mágneses közeg: magnószalag

A videojelet egy forgó dobbon levő mágneses fej vagy fejek mozgó mágneses szalagra írja (vagy írják) sávok (track) formájában, a szalagra merőleges (szegmentális rögzítés, **89. ábra**) vagy helikális (nem-szegmentális rögzítés, **90. ábra**) irányban.



89. ábra. Négyfejes szegmentális videorögzítés.



90. ábra. Helikális rögzítés.

2. Optikai közeg (Optical Memory Disk Recorder, OMDR). Fénnyel aktiválható lemezen analóg videojel rögzítése. Többnyire csupán egyszeri felvétel lehetséges.

3. Digitális video. Manapág leginkább terjedő videomegjelenítési és rögzítési mód. A módszer lehetővé teszi, hogy a TV standardok által behatárolt térbeli és időbeli felbontást meghaladjuk. Videodetektálás digitális kamerával, amely eleve digitális jelet bocsát ki (lásd később). Rögzítés: DVD

KÉP DIGITALIZÁLÁS

A. Vizuális információátvitel

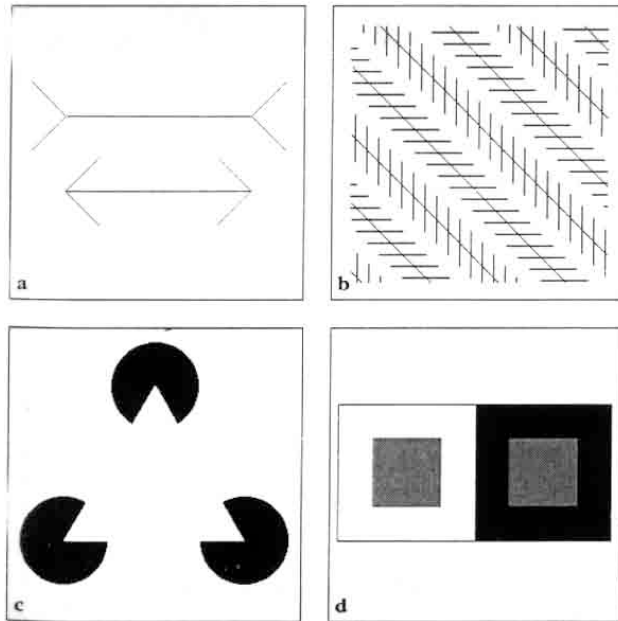
Emberi látórendszer: óriási sávszélesség (információátviteli képesség)

Kép: Gestalt vs. részletek

Illúziók (91. ábra):

91. ábra. Illúziók, optikai
érzékcshalódások.

Arra utalnak, hogy látórendszerünk
bonyolult képanalízist végez.



A digitális képfeldolgozás fejlesztésének igénye az emberi látórendszer óriási információátviteli képességének kiaknázása miatt jelentkezik.

Képtípusok:

Felszíni projekció: ilyen a szemünkbe érkező mindennapos képi információ

Diffrakció által limitált kép

Felszíni pásztázás (scanning)

B. Digitalizálás: képi információ digitálissá konvertálása (92. ábra)

A. Analóg video -> frame grabber kártya

B. Pásztázás: scanning

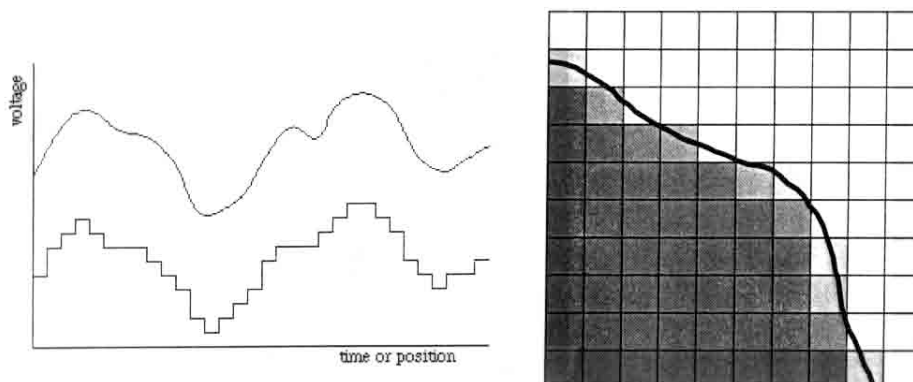
1. Síkpásztázás

2. Pásztázó mikroszkópok (AFM, konfokális)

C. Digitális video

Kommersz digitális kamerák, professzionális kamerák

Digital Video, transfer protokoll: IEEE 1394 protocol: "Firewire"



92. ábra. A videojel (bal oldal) digitális jellé konvertálása. Végeredményként diszkrét elemi képpontok formájában jelenik meg a 2D kép (jobb oldal).

A DIGITÁLIS KÉP

A. A digitális kép jellemzői: Elemi képpontok 2D hálózata

1. *Elemi képpont: pixel (pix=kép; element)*
2. *Pixelhez rendelt információ:*
 - a. XY lokalizáció: térbeli felbontással összefüggő koordináta értékek
 - b. "Színmélység": színelbontással összefüggő intenzitás érték
3. *Térbeli felbontás (spatial resolution):*

Az X és Y irányban elkülöníthető pixelek száma
4. *Színelbontás (grayscale/color depth):*

Az elkülöníthető szín (vagy szürkeintenzitás) értékek száma
(De: a szín nem feltétlenül valódi színnek felel meg; lásd AFM)

B. Színinformáció

1. LookUp Table: LUT.

Függvény, mely leírja, hogy adott intenzitás értékhez milyen szín tartozik.
Korrekció: histogram equalization

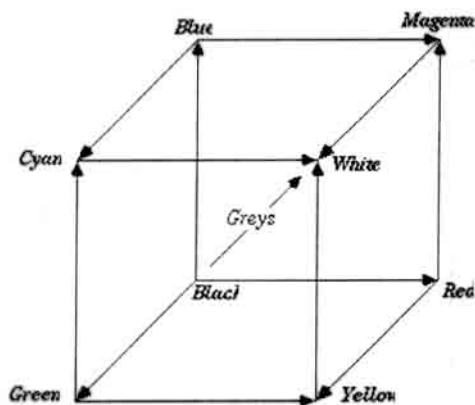
2. *Hardware-orientált színkódolás (93. ábra)*

- a. Composite video: RGB (red-green-blue) vagy komplementer CMY (cyan-magenta-yellow)
- b. Component video (S-video): Y/C (Y = luminancia, fényesség, C= chrominancia, színesség) innen YIQ színkódolás

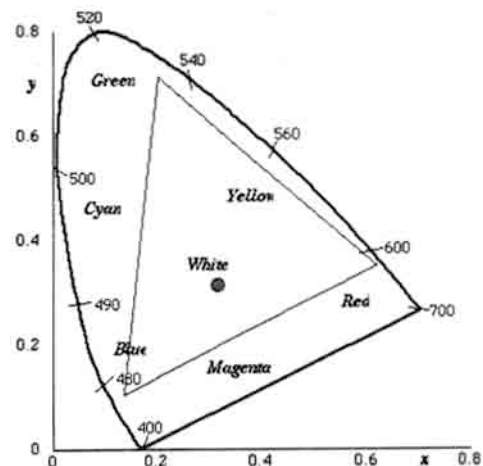
3. *CIE kromaticitási diagram (Commission Internationale de L'Éclairage) (94. ábra)*

Kétdimenziós diagram, mely segítségével bármely szín definiálható
(a harmadik tengely a luminancia, fényesség)

A CIE diagram sem a hardware-hez, sem az emberi színlátáshoz nem viszonyul szorosan.



93. Ábra. RGB Szín-tér vagy szín mező.



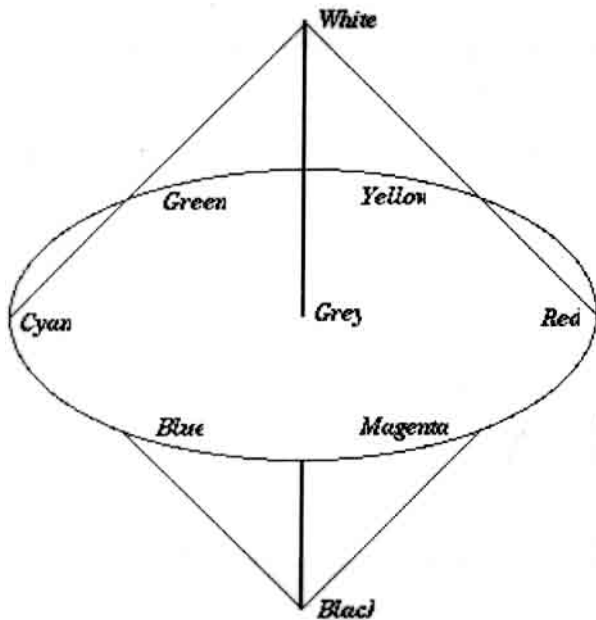
94. Ábra. CIE szín mező.

4. *Színlátás-orientált színkódolás:(95. ábra)*

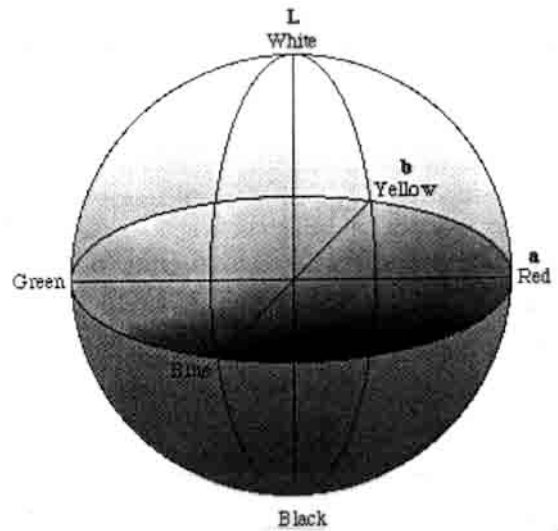
HSV (hue, saturation, value), HSI (hue, saturation, intensity), HLS (hue, lightness, saturation)
A festők szín-árnyalat-tónus koncepciójához hasonlít
Hue: hullámhosszal kifejezhető szín (pl. vörös vagy sárga)
Szaturáció: a szín mennyisége (pl. vörös vagy rózsaszín)
Világosság: fény mennyiség (pl. világos vagy sötétvörös)
Reprezentáció: két, alapjával egymásnak fordított kúp

5. *L.a.b. szín tér (96. ábra)*

HSV-hez hasonló színkódolás, gömb alakú szín-tér



95. ábra. HSV szín mező



96. ábra. *L.a.b.* szín mező

C. A digitális kép megjelenítése

1. CRT: katódsugárcső. Vált: SONY Trinitron (foszfor függőleges csíkokban)
2. LCD: passzív- aktív mátrix
3. Digitális fénymodulációs technológia (TI):
elemi képpontok: apró tükrök ON-OFF pozícióban
4. Elektrolumeszcencia, plazmakisülés

A DIGITALIZÁCIÓS HIBÁK KORREKCIÓJA

A kép digitalizálása közben fellépő defektusok (pl. imperfekt detektor, egyenlőtlen vagy elégtelen megvilágítás, nem megfelelő nézőpont)

A. Jel-zaj viszony javítása

Több kép átlagolása, integrálása. Feltétel: időben álló kép.

B. "Neighborhood averaging"

Szomszédos pixelek átlagolása

"Kernel" műveletek (kernel=mag, bél). Konvolúciós műveletek, melynek megvannak a frekvencia (Fourier) doménben az analógjai.

Simítás (smoothing):

$$P_{x,y}^* = \frac{\sum_{i,j=-m}^{+m} W_{i,j} \cdot P_{x+i,y+j}}{\sum_{i,j=-m}^{+m} W_{i,j}}$$

P=eredeti pixel intenzitás érték

x,y=azon pixel koordinátái, amelyen a műveletet végezzük

P*=módosult pixel intenzitás érték

$\pm m$ =a kernel mérete (x,y koordinátától mért távolság)

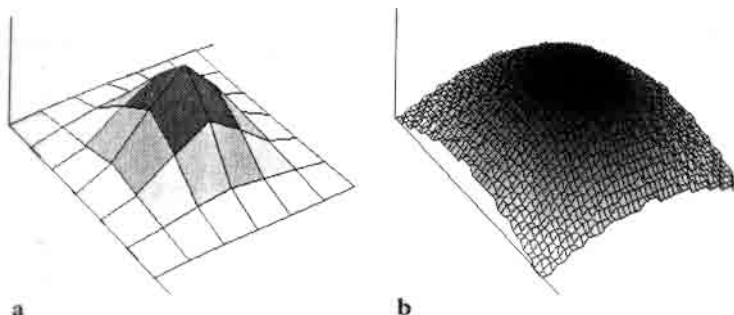
W=a kernel "súly értéke" egy adott, i,j ponton

i,j=a kernelen belüli koordináták (egész számok -m és +m között)

Példa a simító kernelre:

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 |
| 1 | 1 | 1 |
| 1 | 1 | 1 |

A kernel "alakja" (melyet a súly értékek határoznak meg) változó, gyakran különleges lehet (97. ábra):



97. ábra. Kis (a) és nagyméretű (b) konvolúciós kernel.

C. "Neighborhood ranking"

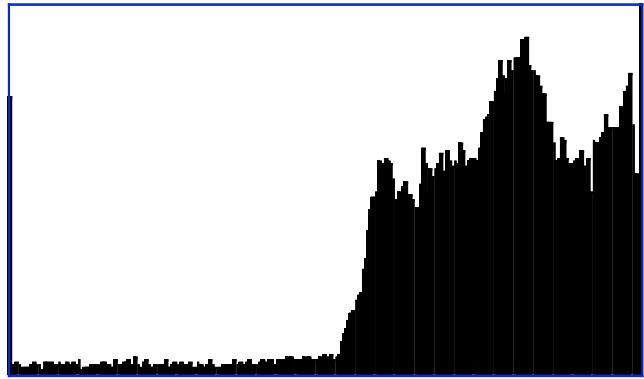
Szomszédos pixelek rangsorolása.

Medián szűrés: a pixel értékét kicseréljük a kernel által definiált pixelkörnyezet mediánjára

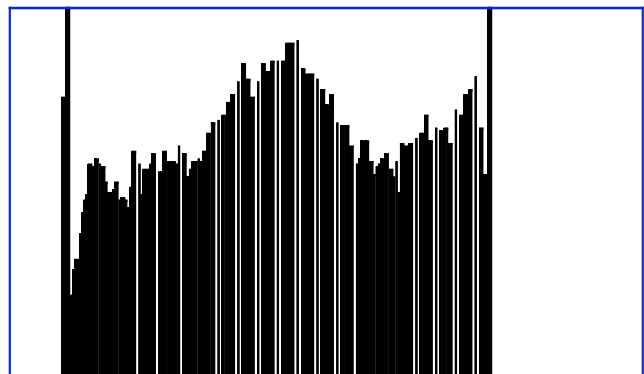
Medián=rangsorolt mintában található középső érték

D. Kontraszt expanzió, hisztogram equalizáció

Célunk a rendelkezésre álló színelbontás lehető legjobb kihasználása, ami nem mindig sikerül. Utólagos korrekció lehetőségét jelenti a kontraszt expanzió és hisztogram equalizáció. Például, a **98. ábrán** látható MRI felvétel szürkeintenzitás hisztogramja arra utal, hogy a képen bizonyos intenzitástartományok előfordulása dominál. Hisztogram equalizáció után a szürkeintenzitás értékek szélesebb skálája reprezentált, egyenletesebb eloszlásban (**99. ábra**). A hisztogram equalizációt lásd még később.



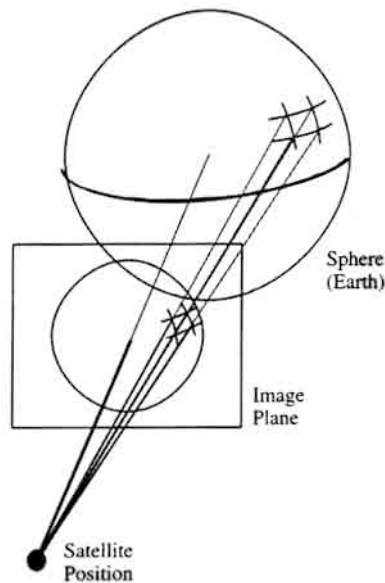
98. ábra. Eredeti MRI felvétel és szürkeintenzitás hisztogramja (a 0-tól 255-ig terjedő értékek gyakorisága a képen).



99. ábra. Az MRI kép és hisztogramja a hisztogram equalizáció után

E. Geometriai korrekciók

Vegyük figyelembe, hogy a hagyományos digitális kép kétdimenziós, még akkor is, ha háromdimenziós objektumról készült (**100. ábra**). Ilyenkor az objektum vetületét látjuk csupán, ami nehézségeket jelenthet a kép kiértékelésénél. Típusos eset a Föld felszínéről készített műholdfelvétel. Valójában az 1970-es években az űrprogram kezdetével, a kaliforniai Jet Propulsion Laboratory-ban indult útjára a digitális képanalízis, az ilyen jellegű problémák megoldása céljából.



100. ábra. Egy gömb alakú testről (pl. Föld) távoli pontból (pl. műholdról) készített kétdimenziós kép csupán egy vetület.

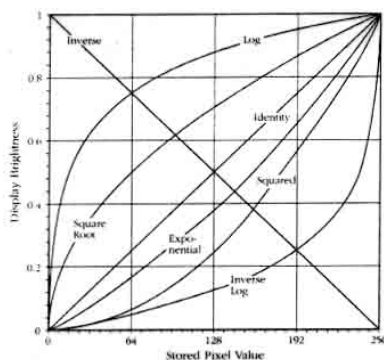
"IMAGE ENHANCEMENT": KÉPI INFORMÁCIÓ KIEMELÉSE

Az "image enhancement" célja a felhasználó számára érdekes képi információ kiemelése, extrahálása. Ilyenek lehetnek a kis kontrasztkülönbségű képterületek elkülönítése, élek, határok kimutatása, felerősítése, mintázat vagy textúra kimutatása, jellemzése, fedésbe hozható képek közötti hasonlóság vagy különbség kimutatása. A gyakorlati, szoftveres, megvalósításra való utalás érdekében az egyes metodikák után az NIH Image program kézikönyvéből vett részletek olvashatók. Az "image enhancement" metodikái közé tartoznak: A. kontraszt manipuláció, B. Él (határ) detektálás (kernel műveletek), C. Rang operációk, D. Textura analízis, E. Képi matematika.

A. kontraszt manipuláció

1. Display transfer függvény

Az összefüggés leírja a tárolt pixel intenzitás értékek és a prezentált intenzitás értékek közötti függvényszerű kapcsolatot (**101. ábra**). Lehet egyszerű függvényszerű kapcsolat (pl. log, -log, x^2), de lehet bonyolult összefüggés is. Képanalízis programokban gyakran szabad kézzel módosítható a matematikai görbe. Cél: lokális kontraszt felerősítése.



101. ábra. A display transfer függvény.

2. Hisztogram equalizáció.

Olyan kontraszt manipuláció, melyben a display transfer függvény a kép kumulatív hisztogramja. Számítása:

$$k = \sum_{i=0}^j N_i / T$$

k=a pixelhez rendelt új intenzitás érték

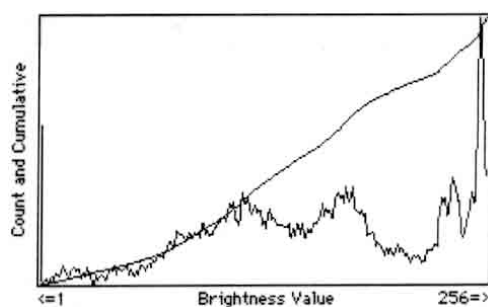
j=az aktuális intenzitás érték (0 és 255 között mozog 8 bites kép esetében)

i=egész szám 0 és j között

N=az i intenzitású pixelek száma a képen

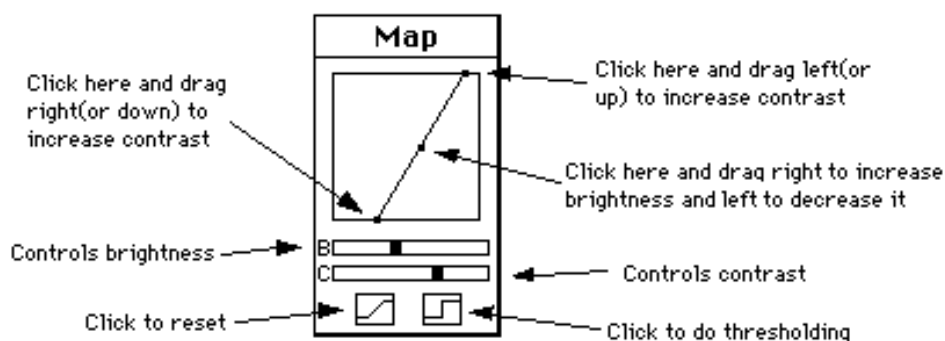
T=össz pixel szám a képen

Cél: a rendelkezésre álló pixel intenzitástartomány lehető legteljesebb kihasználása (**102. ábra**).



102. ábra. Szürkeintenzitás hisztogram és kumulatív hisztogram.

Megvalósítás az NIH Image-ben:



Use the Map window to optimize the brightness and contrast of images by modifying the video look-up table. To vary brightness, click and drag inside the frame. This moves the plot (a piece-wise linear transformation function) horizontally, changing the Y-intercept while maintaining a fixed slope. Brightness can also be altered using the 'B' slide control. To change contrast, click and drag in the margin to move the two end-points that define the function, or use the 'C' slide control. A good strategy for optimizing the contrast of an image is to click (outside the frame) in the lower left hand corner, then drag horizontally to the right until the image starts to saturate. Similarly, click in the upper right hand corner, and drag horizontally to the left.

B. Él (határ) detektálás (kernel műveletek)

A műveletekkel a képben található éleket, határokat (vonal mentén jelentkező helyi kontraszt) erősítünk fel. Ezek kernel műveletek. Emlékeztető:

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 1 |
| 2 | 4 | 2 |
| 1 | 2 | 1 |

A fenti 3x3 (simító) kernel esetében a következő számítás történik:

1. Az éppen kiválasztott pixel (mely a kernel centrális pixelére esik) értékét megszorozzuk 4-gyel.
2. A szomszédos pixel értékeket megszorozzuk a kernel rájuk eső pixel értékeivel.
3. A számított intenzitás értékeket összeadjuk, és elosztjuk a kernel összértékével (16).
4. A kiválasztott pixelhez (központi pixel) hozzárendeljük a számított értéket.

Megvalósítás az NIH Image-ben:

Convolve

Does spatial convolutions using kernels read from a text file or text window. Kernels can be up to 63 x 63 in size. Output pixel values are clipped to 8-bits unless *Scale Convolutions* is checked in the Preferences dialog box. Use *Image*'s built-in text editor to create or examine these kernels.

As an example, use the New command to open a blank text window, enter (or paste) the following kernel, then use the Convolve command to try it out.

| | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | -1 | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -1 | 0 |
| 0 | -1 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0 |
| -1 | -3 | -3 | 6 | 13 | 6 | -3 | -3 | -1 |
| -1 | -3 | -1 | 13 | 24 | 13 | -1 | -3 | -1 |
| -1 | -3 | -3 | 6 | 13 | 6 | -3 | -3 | -1 |
| 0 | -1 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0 |
| 0 | -1 | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -1 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 |

This is a 9 x 9 “Mexican hat” filter which will do both smoothing and edge detection in one operation. Each line should be terminated with a carriage return, and the coefficients should be separated by one or more spaces, or a tab. Note that kernels, such as this one, can be opened and displayed as an image using the Import (Text) command, scaled to a reasonable size using Scale and Rotate, and plotted using the Surface Plot command.

Különböző kernel műveletek

1. Sharpen: Élesítés

Típusos kernel:

```
-1  -1  -1
-1   9  -1
-1  -1  -1
```

NIH Image:

Sharpen - Increases contrast and accentuates detail in the selection, but may also accentuate noise. To minimize this problem, you can Smooth and/or *Reduce Noise* before using Sharpen. Hold the option key down for increased sharpening.

```
-1  -1  -1      -1  -1  -1 (If option key down)
-1  12  -1      -1   9  -1
-1  -1  -1      -1  -1  -1
```

2. Laplace

Kernel:

```
-1  -1  -1
-1   8  -1
-1  -1  -1
```

A Laplace operátor esetében homogén intenzitású terület értékei 0-ra módosulnak. A negatív pixel értékek elkerülése érdekében gyakran egy közepes intenzitás értéket (+128) adunk a pixel értékhez.

3. Derivatív kernel

Az intenzitás térbeli (X-Y) változását erősíti fel.

Példa egy X irányú intenzitás változást felerősítő kernelre:

```
1   0  -1
2   0  -2
1   0  -1
```

4. Sobel & Kirsch operátor

A derivatív eljárásához hasonlít.

NIH Image:

Find Edges - Performs a Sobel edge detection operation. Two convolutions are done using the kernels shown below, generating vertical and horizontal derivatives. The results are then combined by using the square root of the sum of the squares of the two derivatives.

```
1  2  1      1  0 -1
0  0  0      2  0 -2
-1 -2 -1     1  0 -1
```

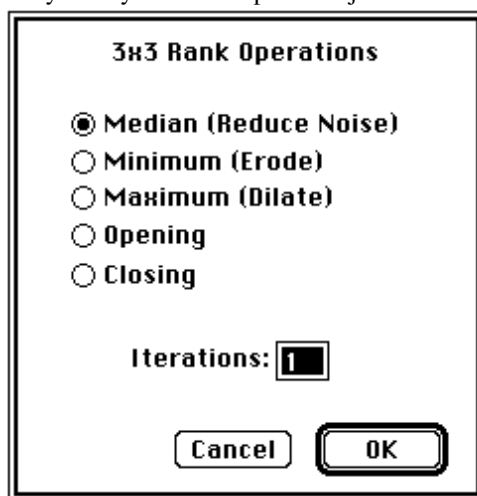
C. Rang operációk

Elv: a pixel értéket kicseréljük a kernel által definiált környezetben található valamely pixel értékre (min, max, medián)

NIH Image:

Rank Filters

These filters rank (sort) the nine pixels in each 3 x 3 neighborhood and replace the center pixel with the median, minimum (lightest), or maximum (darkest) value. Use the Median filter to reduce noise. The Minimum filter erodes (shrinks) objects in grayscale images similar to the way binary erosion shrinks objects in binary images. The Maximum filter dilates (expands) objects in grayscale images similar to the way binary dilation expands objects in binary images.



Select *Median* and each pixel will be replaced with the median value in its 3 x 3 neighborhood. This is a time consuming operation because, for each pixel in the selection, the nine pixels in the 3x3 neighborhood must be sorted and the center pixel replaced with the median value (the fifth). To demonstrate the effectiveness of median filtering, try removing random spot noise generated using the spray can tool with the diameter set to 50 or greater.

Select *Minimum* and each pixel is replaced with the minimum value in the 3 x 3 neighborhood. With binary images, this produces the same result as the Binary/Erode filter with count set to one.

Select *Maximum* and each pixel is replaced with the maximum value in the 3 x 3 neighborhood. With binary images, this produces the same result as the Binary/Dilate filter with count set to one.

Select *Opening* and *Iterations* erosion operations are performed, followed by *Iterations* dilations. Select *Closing* and *Iterations* dilation operations are performed, followed by *Iterations* erosions.

D. Textura analízis

Elv: a képi mintázatot jellemezzük. Kernel művelet. Az intenzitás értékekben mérhető helyi változást fejezzük ki.

1. Range: A pixel értéket kicseréljük a kernel által definiált pixelkörnyezetben számított statisztikai tartomány (range) értékére.

2. RMS ("root mean square")

A pixel értéket kicseréljük a kernel által definiált pixelkörnyezetben számított variancia értékére. Variancia: a centrális pixel és a szomszédos pixelek közötti különbség négyzeteinek összege.

3. Fraktál analízis

Fraktál: komplex geometriai alakzat, melyre jellemző az ön hasonlóság (self similarity).

"fractus": tört, fragmentált.

Jellemző a skálázási szimmetria. Az alakzat szimmetrikus a felnagyított vagy kicsinyített alakzatra.

A kép esetében kiszámíthatunk egy fraktál dimenziót (a mintázat fraktál viselkedését jellemző matematikai szám): Hurst együttható.

E. Képi matematika

Elv: különböző (azonos méretű) képek azonos helyein található pixelek intenzitás értékei között elvégzett matematikai alpműveletek (+, -, *, /) illetve logikai (Boolean) műveletek. Emellett tetszőleges matematikai műveletek is elvégezhetők a pixeleken.

1. Kivonás

Mozgásdetektálás

2. Összeadás

Ugyanarról a mintáról különböző módszerrel készített mikroszkópos képek szummációs megjelenítése (pl. konfokális mikroszkópia)

3. Szorzás/osztás

4. Logikai (Boolean) operációk (OR, NOR, XOR)

NIH Image:

Arithmetic

The commands in this sub-menu add (subtract, multiply, etc.) a constant to each pixel in the current rectangular selection, or if there is no selection, the entire image.

If *Real Result* is checked, calibrated pixel values are used and the result is stored, in a new window, as both 32-bit real and scaled 8-bit images. The 8-bit image is calibrated using a linear calibration function so that commands in *Image* that only “see” the 8-bit image (currently everything except Arithmetic, Image Math and FFT) will use approximations of the real pixel values.

Add - Adds a constant to each pixel in the selection. Results greater than 255 are set to 255.

Subtract - Subtracts a constant from each pixel in the selection. Results less than 0 are set to 0.

Multiply - Multiplies each pixel in the selection by a constant. Results greater than 255 are set to 255.

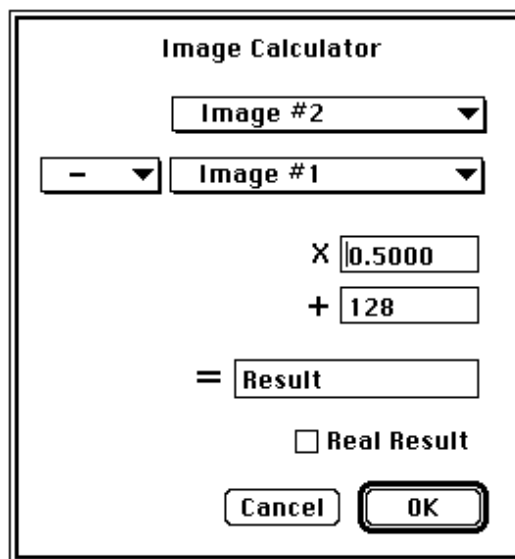
Divide - Divides each pixel in the selection by a constant.

Log - Replaces each pixel (V) in the selection with $\ln(V) * 255.0 / \ln(255.0)$, where $\ln(V)$ is the natural logarithm(\log_e) of V. The result is set to 0 if V is equal to 0.

AND, OR, XOR - Performs the selected Boolean operation on each pixel in the selection.

Image Math

Performs arithmetic and logical operations between two images selected from pop-up menus. The operation to be performed is also selected from a pop-up menu.



The Image Calculator dialog box is titled "Image Calculator". It contains the following elements:

- A dropdown menu labeled "Image #2" with a downward arrow.
- A dropdown menu labeled "-" with a downward arrow.
- A dropdown menu labeled "Image #1" with a downward arrow.
- A multiplier input field labeled "X" with the value "0.5000".
- An offset input field labeled "+" with the value "128".
- A result label "Result" preceded by an equals sign "=".
- A checkbox labeled "Real Result" which is currently unchecked.
- Two buttons at the bottom: "Cancel" and "OK".

For each pixel, the arithmetic operation is performed, the result is multiplied by the scale factor, the offset value is added, and the final result is clipped to 8-bits (0-255). The operations are carried out in the upper left corner of each image using the largest common rectangle.

If *Real Result* is checked, the calibrated pixel values for the two input images are used and the result is stored, in the same window, as both 32-bit real and scaled 8-bit images. The 8-bit image is calibrated using a linear calibration function so that commands in *Image* that only "see" the 8-bit image (currently everything except Arithmetic, Image Math and FFT) will use approximations of the real pixel values. Notice that the name in the result window's title bar is enclosed in angle brackets to indicate that the it contains a real image. Also note the white diamond, indicating that the scaled 8-bit result is density calibrated.

KÉP ANALÍZIS FREKVENCIA (FOURIER) TÉRBEN

Fourier elv

Bármely függvény előállítható egy szinuszfüggvény és felharmonikusai összegeként.

Fourier transzformáció

$$f(x) \rightarrow F(u)$$
$$F(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) e^{-2\pi i u x} dx$$

$F(u)$ = az adott frekvenciakomponens mértékét adja meg (komplex függvény)

x = valós változó (tér vagy idő)

$$i = \sqrt{-1}$$

Vegyük figyelembe (Euler formula):

$$e^{-2\pi i u x} = \cos(2\pi u x) - i \sin(2\pi u x)$$

$F(u)$ komplex függvény valós és imaginárius függvény összege:

$$F(u) = R(u) + iI(u)$$

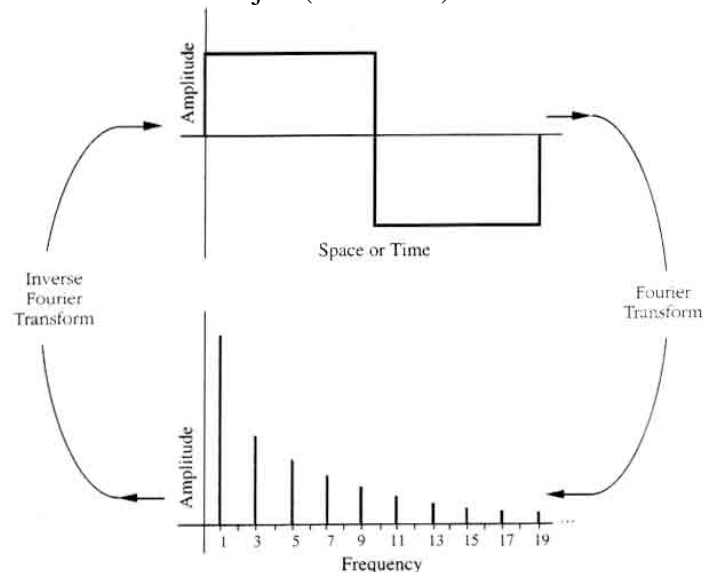
Poláris koordinátarendszerben ábrázolva $F(u)$ -nak magnitúdó (F) és fázis (f) komponense van:

$$F(u) = |F(u)| e^{i\phi(u)}$$

A magnitúdó négyzete: "power spectrum" (spektrális sűrűség):

$$P(u) = |F(u)|^2$$

A gyakorlatban a spektrális denzitást ábrázoljuk (103. ábra).



103. ábra.

2D Fourier transzform

Pontszimmetrikus kvadránsokból áll. X és Y tengelyen: frekvencia. Az adott frekvenciánál feltüntetett érték a frekvencia járulékát fejezi ki.

Alkalmazások

1. Periodikus zaj szűrése

A periodikus zaj mint kitüntetett frekvencia jelentkezik az FFT-ben. Maszkok és inverz FFT segítségével a zajmentes kép rekonstruálható.

2. Konvolúció és Korreláció

A kernel műveletek a Fourier térben gyorsabban elvégezhetők. Konvolúció a Fourier térben: (Kép FFT) X (Kernel FFT).

Korreláció: két kép FFT-je közötti szorzat. (Autokorreláció, keresztkorreláció)

NIH Image:

FFT - Computes the Fourier transform and displays the power spectrum. Requires a square, power of two size image or selection. The transformed frequency domain image is stored in a 32-bit real buffer attached to the window displaying the power spectrum. The only commands in *Image* that currently recognize this real image are “Inverse FFT”, “Redisplay Power Spectrum” and “Image Math”. All other commands “see” only the 8-bit power spectrum.

A helpful trick to remember when attempting to make power of two sized selections is to hold down the shift key, which forces the selection to be square. Or, even easier, use the macros for creating power of two sized selections in the “FFT Macros” file distributed with *Image*. The “FFT Macros” file also contains macros for high and low pass filtering.

Inverse FFT - Computes the inverse Fourier transform. You can filter or mask spots on the transformed (frequency domain) image and do an inverse transform to produce an image which only contains the frequencies selected or which suppresses the frequencies selected. Use *Image*'s editing and selections tools to draw black or white areas that mask portions of the transformed image. Black areas (pixel value=255) will pass the corresponding frequencies and white areas (pixel value=0) will filter out the corresponding frequencies. It is not, however, possible to both pass and filter during the same inverse transform. The “fft_example.bin” test image in the images directory on zippy.nimh.nih.gov provides an example of FFT editing and filtering.

Redisplay Power Spectrum - Recomputes the power spectrum from the real frequency domain image. This command allows you to start over if you mess up while editing the power spectrum display.

Swap Quadrants - Swaps quadrants 1 and 3 and quadrants 2 and 4 of the active image. Requires an 8-bit image whose height and width are equal and a power of two. Quadrant swapping is performed automatically every time a power spectrum is computed. In the normal, un-swapped, state, the power spectrum's central peak is distributed among the four corners of the image. While this is the format used in all computations, it doesn't correspond to nature's FFT analog, the diffraction pattern. This command is useful because cross and auto-correlation operations (the “cMul” operator in Image Math) result in inherently un-swapped space domain images, yet like power spectra, correlation functions are often displayed in quadrant swapped format. The Swap Quadrants command lets you choose the format you desire.

The transformed frequency domain images created by the FFT command are stored as 32-bit real images. The name in the window's title bar is enclosed in angle brackets (e.g., “<<FFT 2>>”) to indicate that the window includes a real image. Note that frequency domain images require 5 times as much memory as normal 8-bit images - 4 bytes/pixel for the real image and 1 byte/pixel for the power spectrum image. The only commands in *Image* that currently recognize real images are “FFT”, “Inverse FFT”, “Redisplay Power Spectrum” and “Image Math”. All other commands “see” only the 8-bit power spectrum.

The Image Math command supports arithmetic operations on the real images created by the FFT command. You can use it for multiplication (convolution), division (deconvolution) and conjugate multiplication (crosscorrelation and autocorrelation) of frequency domain images. There are macros in the “FFT Macros” file for doing autocorrelation. See the ImageFFT documentation and “The Image Processing Handbook” by John Russ for examples of how these operations can be used to analyze images.

THRESHOLDING ÉS SZEGMENTÁCIÓ

A leggyakrabban alkalmazott image processing eljárások közé tartoznak a thresholding (küszöbölés) és a szegmentáció. A lényegük: bizonyos szempontok alapján területekre osztjuk a képet.

"Foreground/Background" szétválasztási műveleteknek is nevezik őket, ami arra utal, hogy az eljárás a kép egy adott tulajdonságára koncentrál, és a többit eldobja.

A "foreground/background eljárás különösen érvényes a szemre: lásd optikai csalódások (91. ábra). Az ember vizuális rendszere nem képes egyszerre koncentrálni a kép különböző információtartalmára.

A. A thresholding művelet lényege és megvalósítása

1. Kiválasztjuk a kép egy bizonyos szürkeintenzitás tartományát
2. az ebbe a tartományba eső pixelek alkotják a "foreground-ot" (előtér)
3. a többi pixel alkotja a "background-ot" (háttér)

Az *eredmény*: bináris kép

Az előtér vagy fehér vagy fekete (általában)

A thresholding-ra a hisztogram szolgál útmutatásul. Különböző szürkeintenzitás értékek kiválasztásával megváltozik a képi információ.

A *thresholding módszerét felhasználhatjuk*:

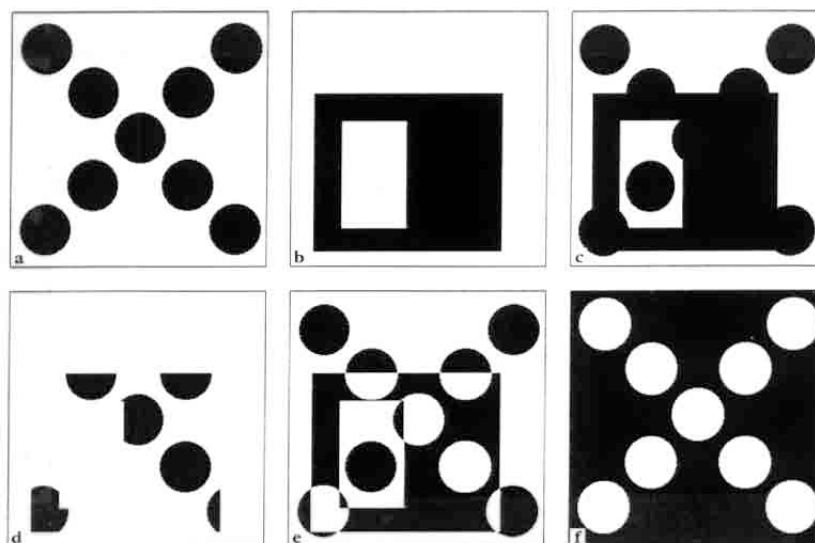
1. textúra analízis
2. határvonalak kiemelése
3. képi alapjellegzetességek (feature) kiemelése
4. kép előkészítése további mérésekre

B. Bináris képek analízise

Bináris kép: csak két különböző pixel-értéket tartalmazó kép. A thresholding módszerével állítható elő.

1. Boole-féle logikai műveletek (104. ábra)

- a. A OR B: az A és B kép (mint halmaz) uniója (c ábra)
- b. A AND B: az A és B kép metszete (d ábra)
- c. A NOR B: az A és B kép uniója - metszet (e ábra)
- d. NEM A: az A kép ellentettje (f ábra)



104. ábra. Boole-féle műveletek két bináris (a és b) képen.

2. Erózió és dilatáció

"Neighborhood" műveletek. Az egyes pixeleken történő műveletek figyelembe veszik a szomszédos pixelek tulajdonságait (**105. ábra**).

Erózió: eltávolít olyan pixeleket, amelyek az előtérben vannak, és áthelyezi őket a háttérbe. A "klasszikus" erózió eltávolítja azokat a pixeleket, melyek a háttér részét képező pixelekkal érintkeznek. Hatása: a képi objektum periferiájáról egy réteg pixelt eltávolít.

Dilatáció: az erózió ellentéte. Olyan háttér-pixelt, mely a képi objektum pixeljeivel érintkezik, az előtérbe hoz. Hatása: egy réteg pixel rakódik rá a képi objektum periferiájára.

3. Nyitás és zárás (opening és closing)

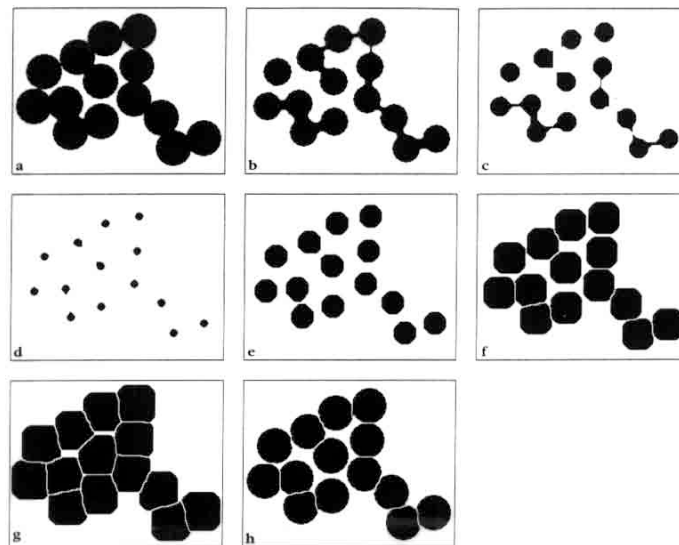
Az erózió és a dilatáció kombinációi.

Nyitás: erózió + dilatáció (a sorrend fontos!)

Hatása: éppen érintkező képi objektumok között megnyitja a teret.

Zárás: dilatáció + erózió

Hatása: izolált lyukakat, réseket bezár.

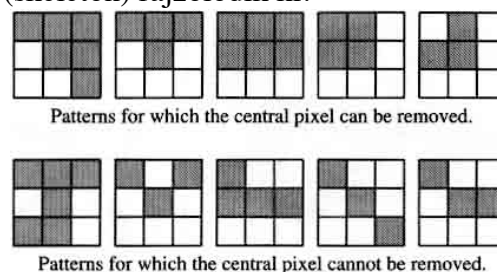


105. ábra.. Egymással érintkező képi területek szétválasztása erózió/dilatáció segítségével. **a.** Eredeti kép. **b.** Két ciklus erózió. **c.** Négy ciklus. **d.** Hét ciklus. **e.** Négy ciklus dilatáció a **d** képen. **f.** Hét ciklus dilatáció. **g.** Kilenc ciklus dilatáció. **h.** Boole-féle AND operáció a **g** és **a** képek között.

D. Szkeletonizáció

Az erózió speciális formája. Ismételt eróziót hajtunk végre bizonyos szabályok betartásával. A szabály az egymással érintkező szomszédos pixelek viszonyára vonatkozik. Nevezetesen, ha a szomszédos (érintkező) pixelek nem alkotnak egy kontinuos csoportot, akkor a centrális pixel nem eltávolítható (**106. ábra**).

Hatása: a képi objektum váza (skeleton) rajzolódik ki.



106. ábra. Reprezentatív pixelmintázatok, amelyek esetében megengedett (felső sor) vagy tiltott (alsó sor) a középső pixel eltávolítása.

E. Körvonalazás (Outline)

Bináris képi objektum körvonalát rajzolja ki (**107. ábra**).



107. ábra. Eredeti kép

Thresholding

Szkeletonizáció

Körvonalazás

Megvalósítás az NIH image programban:

Binary

The commands in this sub-menu are used to convert grayscale images to binary (i.e. black and white only), and to process these binary images. Note that Erode and Dilate do not perform erosion and dilation with structuring elements as described in the literature of classical mathematical morphology. However, several of the Mac image processing programs listed in Appendix D, such as "Alice", do support mathematical morphology.

Make Binary - Converts the current grayscale image to binary by setting pixels that have been highlighted by either density slicing or by thresholding to black (255), and all other pixels to white (0).

Erode - Removes pixels from the edges of objects in a binary images, where contiguous black areas in the image are considered objects, and background is assumed to be white. A pixel is removed (set to white) if four or more of its eight neighbors are white. Erosion separates objects that are touching and removes isolated pixels.

Dilate - Adds pixels to the edges of objects in a binary images. A pixel is added (set to black) if four or more of its eight neighbors are black. Dilation connects discontinuous objects and fills in holes.

Open - Performs an erosion operation, followed by dilation, which smoothes objects and remove isolated pixels.

Close - Performs a dilation operation, followed by erosion, which smoothes objects and fill in small holes.

Set Count... - Allows you to specify the number of adjacent background or foreground pixels necessary before a pixel is removed from or added to the edge of objects during erosion or dilation operations. The default is four.

Set Iterations... - Allows you to specify the number of times erosion, dilation, opening, and closing are performed. The default is one.

Outline - Generates a one pixel wide outline of objects in a binary image.

Skeletonize - Repeatably removes pixels from the edges of objects in a binary image until they are reduced to single pixel wide skeletons. Type command-period to abort.

Distance Map - Generates a Euclidian distance map (EDM). Each foreground (black) pixel in the binary image is replaced with a gray value equal to that pixel's distance from the nearest background (white) pixel. To reduce rounding errors, intermediate EDM values are stored as 16-bit values.

Ultimate Points - Generates the ultimate eroded points (UEPs) of the EDM. Requires a binary image as input. The UEPs represent the centers of particles that would be separated by segmentation. The UEP's gray value is equal to the radius of the inscribed circle of the corresponding particle. Note that the EDM is automatically smoothed when doing watershed segmentation but not when generating UEPs. You can force EDM smoothing, however, by holding down the option key while selecting the "Ultimate Points" command. Smoothing the EDM results in fewer noise induced errors but causes the gray values of the UEPs to be slightly lower, i.e. it slightly reduces the estimated particle sizes. Requires free ram equal to 2-5 times the image size.

Watershed - Separates touching convex particles. Requires free ram equal to 2-5 times the image size. Hold down the option key to disable EDM smoothing.

MÉRÉSEK DIGITÁLIS KÉPEKEN

A digitális képen számos mérést végezhetünk el térbeli, illetve denzitás kalibráció után. Itt utalunk az NIH Image programra.

Megvalósítás az NIH Image programban:

Area - Area of selection in pixels. Area is in calibrated units, such as square millimeters, if Set Scale has been used to spatially calibrate the image.

Mean - Average gray value within the selection. This is the sum of the gray values of all the pixels in the selection divided by the number of pixels. Reported in calibrated units (e.g., optical density) if the Calibrate command has been used to calibrate the image.

Standard Deviation - Standard deviation of the gray values used to generate the mean gray value.

X-Y Center - Center of the best fitting ellipse, measured from either the upper left or lower right corner of the image, depending on the status of the *Invert Y Coordinates* check box in the Preferences dialog box. This is the geometric center of the selection, not the density weighted center. This option is automatically enabled when the cross hair tool is used.

Modal Value - Most frequently occurring gray value within the selection. Corresponds to the highest peak in the histogram.

Perimeter/Length - Length around the outside of the selection, or line length for line selections. The perimeter is not computed for composite selections created using the control and option keys. This option is automatically enabled when Measuring a line selection.

Major/Minor Axis - Lengths of the major and minor axes of the best fitting ellipse.

Angle - Angle between the major axis and a line parallel to the x-axis of the image, or an angle measured using the angle tool. This option is automatically enabled when the angle tool is used.

Integrated Density - Sum of the gray values in the selection, with background subtracted. Use to measure the size (volume) of spots or bands in electrophoresis gels. It is computed using the following formula:

$$\text{IntegratedDensity} = N * (\text{Mean} - \text{Background})$$

where N is number of pixels in the selection, and Background is the modal gray value (most common pixel value) after smoothing the histogram. Note that this formula assumes that the background is lighter (has lower pixel values) than the object being measured. The background level may be computed incorrectly if there isn't a well defined peak in the histogram. This can happen if not enough background is included within the selection or the background is not very uniform.

Min/Max - Minimum and maximum gray values within the current selection.

HÁROMDIMENZIÓS KÉPANALÍZIS

Háromdimenziós digitális kép elemi képpontja: "voxel" (vox=volumen, el=element)

Háromdimenziós képi információ felvétele:

Tomográfia (CT, MRI)

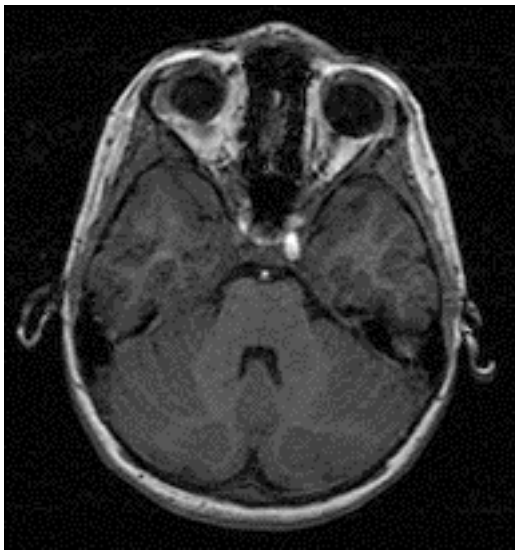
Sorozatmetszet (mikroszkópia)

Optikai metszet (konfokális mikroszkópia)

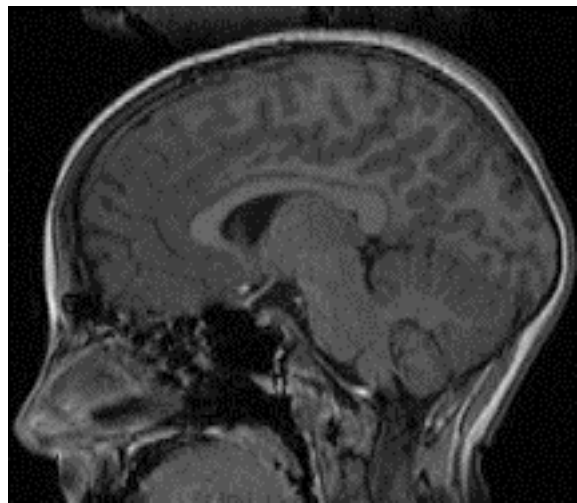
N.B.: harmadik dimenzió lehet akár az idő (mozgóképek) vagy a denzitás (felszíni topográfiai kép) is

Háromdimenziós kép megjelenítése, analízise

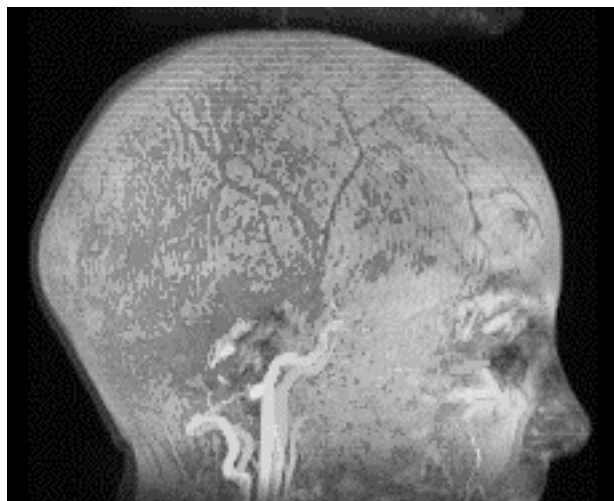
Képi metszetek (slice) "zsákban" (stack) (**108-110. ábra**)



108 . ábra. Eredeti MRI képszelet



109. ábra. A 3D képanyag újraszzeletelésével nyert kép



110. ábra. 3D képrekonstrukció: a 3D informácóból projekcióval nyert kép.
Egyetlen kép tartalmaz az egész térfogatra vonatkozó információt.

Megvalósítás az NIH Image programban:

Project...

Generates an animation sequence by projecting through a rotating 3D data set onto a plane. Each frame in the animation sequence is the result of projecting from a different viewing angle. To visualize this, imagine a field of parallel rays passing through a volume containing one or more solid objects and striking a screen oriented normal to the directions of the rays. Each ray projects a value onto the screen, or projection plane, based on the values of points along its path. Three methods are available for calculating the projections onto this plane: nearest-point, brightest-point, and mean-value. The choice of projection method and the settings of various visualization parameters determine how both surface and interior structures will appear.

This routine was written by Michael Castle (e-mail: mike.castle@umich.edu) and Janice Keller of the University of Michigan Mental Health Research Institute (MHRI).

| | |
|---|--|
| Distance Between Slices: | <input type="text" value="1.0"/> |
| Initial Angle(0-359°): | <input type="text" value="0"/> |
| Total Rotation(0-360°): | <input type="text" value="360"/> |
| Rotation Angle Increment: | <input type="text" value="10"/> |
| Lower Transparency Bound: | <input type="text" value="0"/> |
| Upper Transparency Bound: | <input type="text" value="254"/> |
| Surface Opacity (0-100): | <input type="text" value="0"/> |
| Surface Depth-Cueing (0-100): | <input type="text" value="100"/> |
| Interior Depth-Cueing (0-100): | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="checkbox"/> Save Projections to Disk | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Minimize Window Size | |
| Axis of rotation: | Projection Method: |
| <input type="radio"/> X-Axis | <input checked="" type="radio"/> Nearest Point |
| <input checked="" type="radio"/> Y-Axis | <input type="radio"/> Brightest Point |
| <input type="radio"/> Z-Axis | <input type="radio"/> Mean Value |
| <input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="OK"/> | |

Distance Between Slices is the interval, in pixels, between the slices that make up the volume. *Image* projects the volume onto the viewing plane at each *Rotation Angle Increment*, beginning with the volume rotated by *Initial Angle* and ending once the volume has been rotated by *Total Rotation*.

The *Lower and Upper Transparency Bound* parameters determine the transparency of structures in the volume. Projection calculations disregard points having values less than the lower threshold or greater than the upper threshold. Setting these thresholds permits making background points (those not belonging to any structure) invisible. By setting appropriate thresholds, you can strip away layers having reasonably uniform and unique intensity values and highlight (or make invisible) inner structures. Note that you can use density slicing to set the transparency bounds.

Sometimes, the location of structures with respect to other structures in a volume is not clear. The *Surface Opacity* parameter permits the display of weighted combinations of nearest-point projection with either of the other two methods, often giving the observer the ability to view inner structures through translucent outer surfaces. To enable this feature, set *Surface Opacity* to a value greater than zero and select either *Mean Value* or *Brightest Point* projection.

Depth cues can contribute to the three-dimensional quality of projection images by giving perspective to projected structures. The depth-cueing parameters determine whether projected points originating near the viewer appear brighter, while points further away are dimmed linearly with distance. The trade-off for this increased realism is that data points shown in a depth-cued image no longer possess accurate densitometric values. Two kinds of depth-cueing are available: *Surface Depth-Cueing* and *Interior Depth-Cueing*. *Surface Depth-Cueing* works only on nearest-point projections and the nearest-point component of other projections with opacity turned on. *Interior Depth-Cueing* works only on brightest-point projections. For both kinds, depth-cueing is turned off when set to zero (i.e. 100% of intensity in back to 100% of intensity in front) and is on when set at

$0 < n \leq 100$ (i.e. $(100-n)\%$ of intensity in back to 100% intensity in front). Having independent depth-cueing for surface (nearest-point) and interior (brightest-point) allows for more visualization possibilities.

The *Minimize Window Size* option allows you to save memory by making projection windows as small as possible given the size of the volume and the axis of rotation. If this box is not checked, projection windows for a given set of slices will be the same size regardless of the axis of rotation (convenient for animation sequences using multiple axes of rotation).

Select *Nearest Point* projection to produce an image of the surfaces visible from the current viewing angle. At each point in the projection plane, a ray passes normal to the plane through the volume. The value of the nearest non transparent point which the ray encounters is stored in the projection image. *Brightest Point* projection examines points along the rays, projecting the brightest point encountered along each ray. This will display the brightest objects, such as bone in a CT (computed tomographic) study. *Mean Value* projection, a modification of brightest-point projection, sums the values of all transparent points along each ray and projects their mean value. It produces images with softer edges and lower contrast, but can be useful when attempting to visualize objects contained within a structure of greater brightness (e.g. a skull).

Several macros (in the file “Stacks”) are available for performing various operations on the slices making up a volume prior to using the Project command. Use “Smooth” to reduce noise in a volume. Since the projection routine assumes volumes contain one or more objects within a black background, use “Invert” to invert volumes with a white background. For low contrast volumes, increase the contrast using the controls in the Map window and then apply the look-up table to the volume using the “Apply LUT” macro. The “Remove 0 and 255” macro changes pixel values of 0 and 255 to 1 and 254 respectively. This is sometimes useful when pseudocoloring projections. Use “Replicate Slices” to eliminate the gaps seen in projections of volumes with a slice interval greater than one by increasing the number of slices. The “Make Cone” macro creates a 64^3 volume containing a cone with two rods inside that is very useful for understanding the effect of various projection parameters.

Reslice

Reconstructs a 2D image from the image volume contained in the current stack. Use the straight line selection tool to select where the reconstruction will be done. You will be prompted for the slice spacing (displacement between slices in the stack) in pixels if this information has not been previously entered. For experimenting with the Reslice command, a sample MRI volume consisting of 27 5mm slices is available from the NIH Image Web site (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Macros are available (in the file “Stacks”) for repetitive reslicing of image volumes, for example, to generate a set of coronal slices from an MRI volume consisting of sagittal slices.

FÜGGELÉK, JEGYZETEK