

MIKROSKÓP OBJEKTÍV DISZPERZIÓJÁNAK MÉRÉSE

TDK DOLGOZAT

Készítette:

MECSEKI D. KATALIN

III. éves fizikus hallgató

Témavezető:

Dr. Kovács Attila

adjunktus

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
OPTIKAI ÉS KVANTUMELEKTRONIKAI TANSZÉK
SZEGED, 2006

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
I. Elméleti összefoglaló.....	5
I. 1. Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp működése	5
I. 2. Fényimpulzusok lineáris, diszperzív közegbeli terjedése.....	9
I. 3. Optikai elemek diszperziójának mérése.....	13
I. 3. 1. Diszperzió mérése kétfotonos fluoreszcenciával	13
I. 3. 2. Diszperzió mérése spektrális interferometriával.....	14
I. 3. 2. 1. Állandó fázisú pont	15
I. 3. 2. 2. Minimum-maximum módszer	18
I. 3. 2. 3. Fázismodulált szinuszfüggvény illesztése	19
II. Eredmények.....	20
II. 1. Kísérleti elrendezés.....	20
II. 2. Spektrális interferogramok kiértékelése	21
II. 2. 1. Kiértékelés az állandó fázisú pont meghatározásával	21
II. 2. 2. Minimum-maximum módszer	22
II. 2. 3. Kiértékelés fázismodulált szinuszfüggvény illesztésével.....	23
II. 3. Mérési módszerek összehasonlítása	24
II. 4. Mérési eredmények értékelése.....	25
III. Összefoglalás	28
Irodalomjegyzék.....	29
Köszönetnyilvánítás	30

BEVEZETÉS

A mikroorganizmusok megismerését a jó minőségű képet adó nagyítólencsék előállítása tette lehetővé. 1590 táján Hans és Zacharias Jansen lencséiket egy rézcső két végéhez illesztve ún. bolhanézó üvegecskéket (vitrum pulicarium) készítettek, s a csőbe helyezett bolhák felnagyított képével rémisztgették a vásárok közönségét. Egyesek szerint ez volt az első mikroszkóp – bár akkor még nem használták ezt az elnevezést, amelyet Bamberg 1624-ben adott a műszernek. Az egyre tökéletesebb lencsék és készülékek révén a XVIII. században felfedezték az eddig ismeretlen világot, a mikroorganizmusokat illetve a sejtet. Az egymást követő mechanikai fejlesztések egyre stabilabb, erősebb állványzatú készülékeket eredményeztek, de a mikroszkópok képe az optikai leképezési hibák miatt az egész században homályos maradt.

A mikroszkópkészítésben forradalmi változást hozott Karl Zeiss és Ernst Abbé fizikus működése. Abbé megoldja a szférikus aberráció problémáját, objektívjében a konvex lencserendszerhez egy konkáv lencsét illesztett, ezzel szétterítette a széli sugarakat és így sikerült egy síkba eső, mindenütt éles képet nyernie. Jénában, a Zeiss gyárban állították elő 1853-ban az első korszerű mikroszkópot. A XX. században a mikroszkópia robbanásszerű fejlődésen ment keresztül, számos új kontrasztnövelő eljárást dolgoztak ki. 1931-ben Maria Göppert-Mayer kimutatta a kétfoton abszorpció lehetőségét a doktori disszertációjában. Mivel a kétfoton abszorpció valószínűsége kis fényintenzitásoknál gyakorlatilag elhanyagolható, ezért csak a lézerek megjelenése után az 1960-as években sikerült kísérletileg is igazolni. Sheppard, Kompfner 1977-ben javasolták a jelenség felhasználásának lehetőségét mikroszkópokban, azonban ennek kísérleti megvalósítása egészen 1991-ig váratott magára, amikor Spence és munkatársai femtoszekundumos impulzusokat előállító lézerek segítségével elkészítették az első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópot.

A vizsgálandó mintát pl. agysejteket, fluoreszcenciára képes festékanyaggal festik meg, melynek gerjesztésére femtoszekundumos impulzusokat előállító, módusszinkronizált lézert használnak. A gerjesztés határfoka nagymértékben függ az impulzus időbeli alakjától, rövidegétől. A mikroszkóp legfontosabb eleme az objektív, mely a leképezést meghatározza. A rövidimpulzusú lézereknél azonban az impulzusok különböző hullámhosszúságú komponensei az objektívben eltérő sebességgel terjednek, melynek eredményeképpen az impulzus alakja megváltozhat. Ennek hatására a gerjesztés határfoka és a mikroszkóp képalkotásának pontossága jelentősen lecsökkenhet, ellentétben a monokromatikus fényt használó mikroszkópokkal, ahol ez nem okoz problémát. Ennek kompenzálására prizmás

vagy rácsos impulzuskompresszorokat alkalmaznak, melynek beállítását a mikroszkóp objektív diszperziójának a pontos ismerete nagyban megkönnyíti. Dolgozatomban az objektívek diszperziójának mérésével kapcsolatos eredményeimet mutatom be.

A dolgozat első fejezetében egy rövid elméleti áttekintést adok a fluoreszcencia mikroszkóp működéséről, a fényimpulzusok lineáris, diszperzív közegbeli terjedéséről. Ismertetem a kétfotonos fluoreszcenciával és a spektrális interferometriával történő diszperziómérési eljárásokat. A spektrális interferogramok három kiértékelési módszerét részletesebben tárgyalom. A dolgozatom második fejezetében ismertetem a MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben használt mikroszkóp objektív diszperziómérésével kapcsolatos mérési eredményeimet, és a dolgozatomat az elért eredmények összefoglalásával zárom.

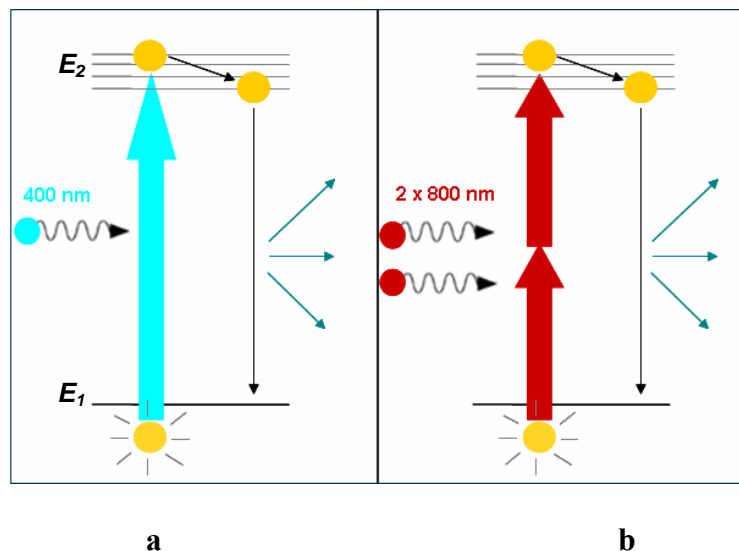
A méréseket a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékének TeWaTi laborjában végeztem.

I. ELMÉLETI ÖSSZEFOGLALÓ

I. 1. Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp működése

Egy- és kétfotonos abszorpció

Normál körülmények között, kis fényintenzitásoknál, ha az anyagot olyan fénysugárzás éri, amelyben a fotonok energiája megegyezik az atom két stacionárius állapota közötti energiakülönbséggel, akkor az anyag abszorbeálja a fotont (1. ábra). Ekkor az anyagot alkotó atomok vagy molekulák vegyértékelektronjai gerjesztett állapotba kerülnek. A gerjesztett állapot nem stabil, ezért az elektron rövid idő múlva visszakerül a stabilabb alapállapotba, azáltal hogy leadja az abszorbeált energiát, fotont bocsát ki (fluoreszcencia). A kibocsátott és az elnyelt foton frekvenciája a gyakorlatban nem egyezik meg, mert az elektron egy sugárzásmentes átmenettel (vibrációs relaxáció) egy alacsonyabb energiaszintre megy át, mielőtt az energiát kisugározva az alapállapotba kerülne. Mivel az abszorbeált fény energiájának egy részét a vibrációs relaxáció során az elektronok elveszítik, az emittált fény energiája kisebb, mint az abszorbeálté, ezért az emissziós spektrum általában a hosszabb hullámhosszak felé tolódik el.



1. ábra a.) Egy- és b.) kétfotonos abszorpció elve

Egyfotonos abszorpciónál (1.a ábra) - ha a foton abszorpciójával az elektron elegendő energiát kap a megfelelő gerjesztődéshez - a kibocsátott foton energiája közel megegyezik a

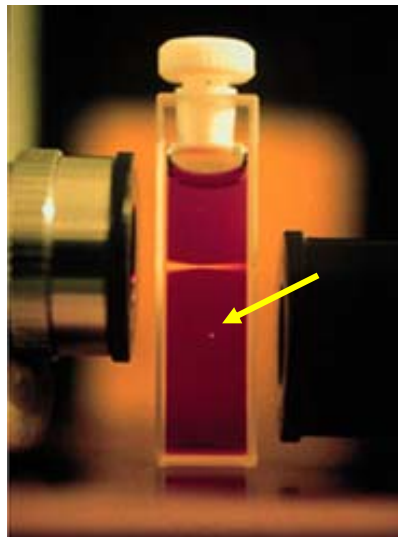
két energiaszint közötti különbséggel. Egyfotonos képalkotásnál az atomok, vagy molekulák gerjesztése 350-400 nm hullámhosszú fényvel történik, mivel a használt fluoreszcens indikátorok ezen a tartományon abszorbeálnak nagy hatásokkal.

Nagy fényintenzitásoknál azonban előfordulhat az is, hogy ha az érkező foton energiája éppen a fele az elektron gerjesztéséhez szükséges energiának, akkor két közel egyidőben (≈ 0.1 fs) érkező koherens foton hatására az elektron már elegendő energiát nyer a gerjesztődéshez, ez a jelenség a kétfotonos abszorpció (*1.b ábra*).

Az abszorbeált fotonok számát (n_a) az (1) egyenlet írja le [1]:

$$n_a = \frac{\sigma_{2F} P_0^2 \pi^2 NA^4}{0.664 \tau f^2 h^2 c^2 \lambda^2}, \quad (1)$$

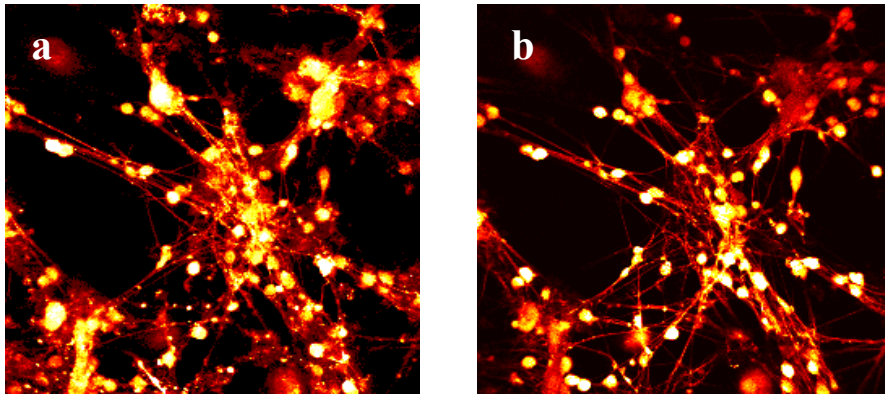
ahol σ_{2F} jelöli a kétfotonos abszorpció hatáskeresztmetszetét, P_0 az átlagteljesítmény, NA az objektív numerikus apertúrája, τ az impulzus időbeli félértékszélessége, f a lézer ismétlési frekvenciája, c a fénysebesség és λ a gerjesztő lézer hullámhossza.



2. ábra Egyfotonos, valamint kétfotonos abszorpciónál (sárga nyíllal jelölve) a gerjesztett térfogat.

A hagyományos fluoreszcencia mikroszkópoknak az az egyik nagy hátrányunk, hogy mivel az abszorbeált fotonok száma a lézer átlagteljesítményétől lineárisan függ, így a fókuszpont előtt és után is gerjesztik a mintát (*2. ábra*). Ezért a detektor előtt egy kis nyílást kell használni, mely a konfokális elrendezésben lehetővé teszi a háttérből jövő fluoreszcenciafény kiszűrését. Ezzel szemben kétfoton abszorpció fluoreszcencia mikroszkópoknál nincs szükség erre a detektor előtt használt nyílásra sem, mert az (1)

egyenlet alapján a kétfotonabszorpció létrejöttének valószínűsége a megvilágítás intenzitásával négyzetesen arányos, ezért a gerjesztés csak a fókuszpontban, kis térfogatban jön létre (2. ábra), emellett a detektorba is több fény jut. A másik lényeges különbség a negyedrendű függés a mikroszkóp numerikus apertúrájától, ami egyfotonos abszorpciónál csak négyzetes.

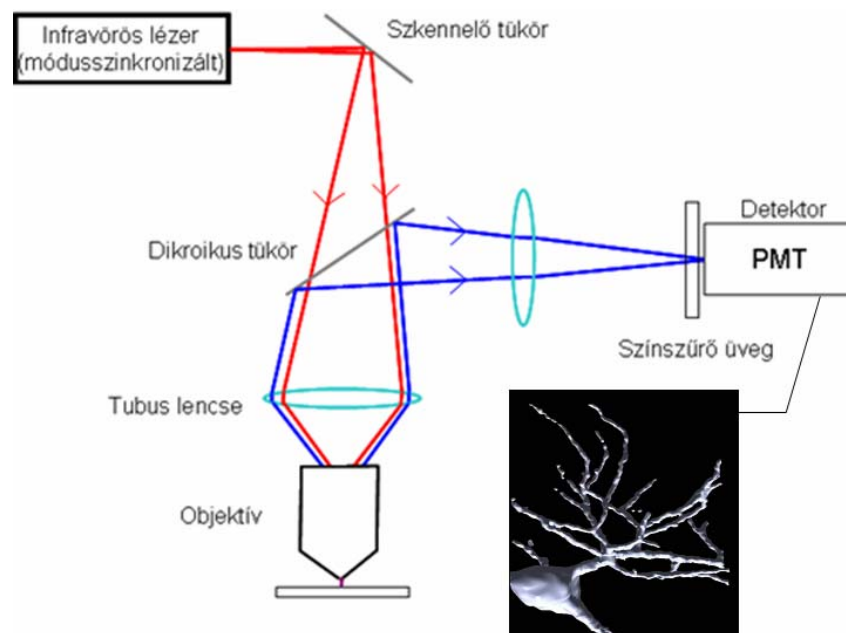


3. ábra Agysejtek képe a) egyfotonos b) kétfotonos képalkotással [2].

A 3. ábrán jól látható az egyfotonos és kétfotonos képalkotás közötti különbség agysejtről készült felvételeken. Az *a*) kép készítéséhez argon ion lézert használtak, és a detektor előtti apertúrát a lehető legkisebbre állították, a függőleges tengely menti felbontás növelése érdekében. A *b*) kép kétfoton abszorpciós eljárással, rövidimpulzusú Ti:Zafír lézerral készült. A kétfotonos képalkotással készült felvételen a függőleges tengely menti felbontás nagyobb. További előnye még a kétfotonos képalkotásnak, hogy az infravörös fény kevésbé szóródik, ezért mélyebben képes behatolni a szövetbe, így a felszíntől távolabb lévő sejteket is képes láthatóvá tenni [2,3].

A mikroszkóp működése

A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben használt mikroszkóp elvi felépítését mutatja a 4. ábra. A módusszinkronizált titánzafir lézertől ultrarövid (80-120 fs) impulzusok lépnek ki. A szkennelő tükör segítségével végigpásztazzák a mintát, amit előtte fluoreszcenciára képes anyaggal megfestettek. A minta festésének többféle módja lehet, például bizonyos sejteket egy sejtcsoportban, illetve egy adott sejten belül különböző sejtalkotókat, vagy akár kiszemelt molekulákat is megjelölhetnek fluoreszcens anyaggal.

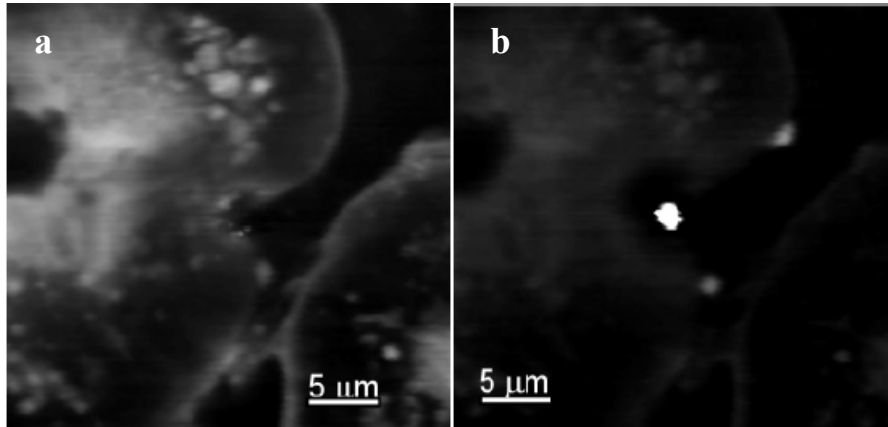


4. ábra A mikroszkóp elvi elrendezése egy sejt háromdimenziós rekonstruált képével [4].

A lézer által kiváltott kétfoton-gerjesztés után az emittált fluoreszcens fény az objektíven áthaladva rövidebb hullámhossza miatt reflektálódik a dikroikus tükrön és így a detektorba jut. A fókusz sík magassága (függőlegesen) változtatható az objektív mozgásával. Több, egymáshoz közeli sík végigpásztázása után számítógép segítségével az eredeti háromdimenziós szerkezet visszaállítható

Az objektív a mikroszkóp képalkotásának legkritikusabb része, a minősége és felépítése dönti el a kapott kép kontrasztját, felbontását, hogy mekkora részt tudunk egy képen vizsgálni stb. Azonban a rövid fényimpulzusok fókuszálásánál nagy gondot okoz, hogy az objektív rendszerint vastag üvegén áthaladva az impulzusok időben kiszélesednek. Ez csökkenti a kétfoton abszorpció hatásfokát, mivel a kétfoton abszorpció valószínűsége az impulzus időbeli hosszától függ, ahogy az (1) egyenletnél láttuk. Az 5. ábrán látható

felvételek egy egér veséjéről készültek. A bal oldali kép transzformlimitált impulzussal, míg a jobb oldali kompenzálatlan, időben kiszélesedett impulzussal készült. Amennyiben az kiszélesedést okozó közeg (jelen esetben a mikroszkóp objektív) diszperzióját jellemző értékeket ismerjük, a jelenség kompenzálható. Ezeket az adatokat azonban a gyártó cégek általában nem tüntetik fel sem az objektív házán, sem a katalógusban, ezért fontos ezen értékek pontos meghatározása.



5. ábra a) Transzformlimitált és **b)** kompenzálatlan, megnyúlt impulzus használatával felvett kép egy egérnek a veséjéről

I. 2. Fényimpulzusok lineáris, diszperzív közegbeli terjedése

A mikroszkópban használt lézer impulzusai több hullámhosszkomponenst tartalmaznak. Diszperzív közegben ezek a komponensek eltérő sebességgel terjednek, ezért az impulzusalak megváltozik. Ennek részletesebb matematikai vizsgálatához tekintsük az impulzus térerősségének időbeli alakját ($E_{be}(t)$), amit a különböző ω frekvenciájú $a_{be}(\omega)$ amplitúdóval és $\varphi_{be}(\omega)$ fázissal rendelkező monokromatikus komponensek szuperpozíciójával állíthatunk elő:

$$E_{be}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} a_{be}(\omega) e^{i(\omega t + \varphi_{be}(\omega))} d\omega . \quad (2)$$

A diszperzív közegen való terjedés után megváltozik a spektrális komponensek amplitúdója $A(\omega)$ amplitúdóátvitellel, a fázisa pedig $\varphi(\omega)$ fázisátvitellel tolódik el. A

megváltozott amplitúdójú és fázisú spektrális komponensek összegzésével megkapjuk a kimenő jel időbeli térerősségét:

$$E_{ki}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} A(\omega) a_{be}(\omega) e^{i(\omega t + \varphi_{be}(\omega) - \varphi(\omega))} d\omega. \quad (3)$$

A diszperzió hatásának és az impulzusok fázisszerkezetének jellemzéséhez fejtsük Taylor-sorba a $\varphi(\omega)$ fázisátvitelt az impulzus ω_0 központi frekvenciája körül:

$$\varphi(\omega) = \varphi(\omega_0) + \varphi'(\omega_0)(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \varphi''(\omega_0)(\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6} \varphi'''(\omega_0)(\omega - \omega_0)^3 + \dots, \quad (4)$$

ahol

$$\varphi'(\omega_0) = \left. \frac{d\varphi}{d\omega} \right|_{\omega=\omega_0}, \quad \varphi''(\omega_0) = \left. \frac{d^2\varphi}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0}, \quad \varphi'''(\omega_0) = \left. \frac{d^3\varphi}{d\omega^3} \right|_{\omega=\omega_0}. \quad (5)$$

Vizsgáljuk meg, hogy az egyes fázisderiváltaknak milyen fizikai hatásuk van az impulzus időbeli alakjára.

A $\varphi(\omega_0)$ fázis tag hatása csak nagyon rövid impulzusoknál mutatkozik meg jelentősebben, amikor is az impulzus térerősségének maximuma eltolódik a térerősség burkolójának maximumához képest (carrier-envelope phase, CEP).

A $\varphi'(\omega_0)$ idődimenziójú mennyiség, azt az időt jelenti, ami alatt az ω_0 központi frekvenciájú impulzus áthalad a közegen, ezért csoportkésettetésnek is nevezik (group delay, GD).

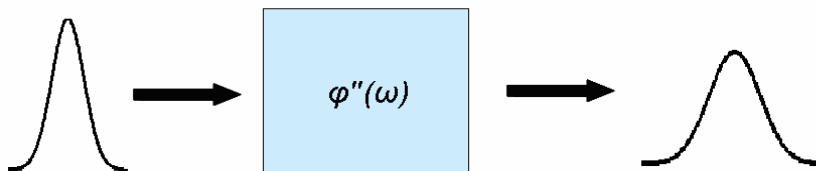
A $\varphi''(\omega_0)$ második derivált az impulzus megnyúlásáért felelős. A kimenő jel térerőssége, amennyiben csak ezt a tagot vesszük figyelembe:

$$E_{ki}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{\tau_0^2}{8 \ln 2} (\omega - \omega_0)^2} e^{i\left(\omega t - \frac{\varphi''(\omega_0)}{2} (\omega - \omega_0)^2\right)} d\omega = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\left(\frac{\tau_0^2}{8 \ln 2} + i \frac{\varphi''(\omega_0)}{2}\right) (\omega - \omega_0)^2} e^{i\omega t} d\omega. \quad (6)$$

Ekkor az impulzus időbeli félérték szélessége:

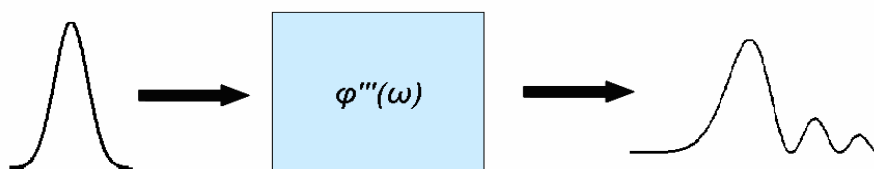
$$\tau = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{4 \ln 2 \cdot \varphi''(\omega_0)}{\tau_0^2}\right)^2}. \quad (7)$$

A (7) egyenletből láthatjuk, hogy amennyiben a $\varphi''(\omega_0)$ tag nullától különböző, az impulzus a *GDD* nagyságától függően időben kiszélesedik (6. ábra). Ezt a fázisderiváltat csoportkésettetés-diszperzióknak (group-delay dispersion, *GDD*) nevezzük.



6. ábra A csoportkésettetés diszperzió hatása az impulzusalakra.

A $\varphi'''(\omega_0)$ harmadik derivált az időbeli alakban bekövetkező asszimetriáért, illetve a mellékimpulzusokért felelős (third-order dispersion, *TOD*). (7. ábra) [5].



7. ábra A harmadrendű diszperzió hatása az impulzusalakra.

A továbbiakban határozzuk meg egy L hosszúságú, n törésmutatójú üveghasáb esetén a csoportkésettetés-diszperzió értékét. Tudjuk, hogy az üveghasáb által okozott fázistolás:

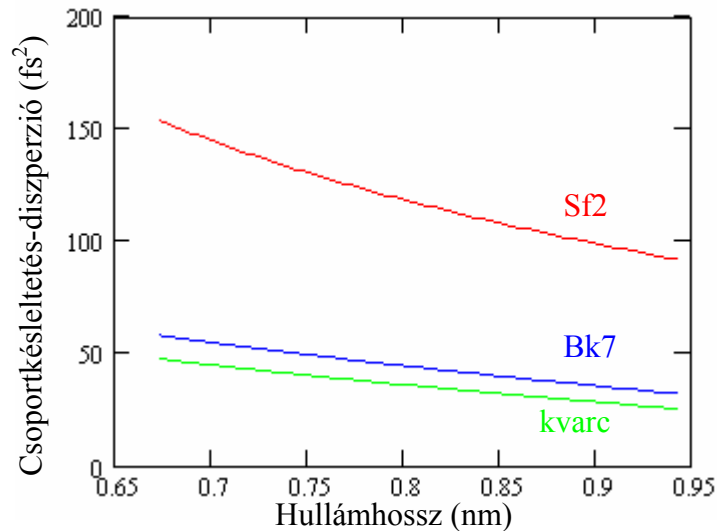
$$\varphi(\omega) = \frac{\omega \cdot L \cdot n(\omega)}{c}, \quad (8)$$

ahol c a fénysebesség, melyből a csoportkésettetés-diszperzióra kapjuk, hogy

$$\frac{d^2\varphi}{d\omega^2} = \frac{L}{c} \left(2 \cdot \frac{dn}{d\omega} + \omega \frac{d^2n}{d\omega^2} \right). \quad (9)$$

A (9) egyenletben szereplő $dn/d\omega$ és $d^2n/d\omega^2$ mennyiségek az üvegekre a normális diszperzió tartományában – azaz amikor a hullámhossz csökkenésével (a körfrekvencia növekedésével) a törésmutató növekszik – pozitívak. Ez azt eredményezi, hogy a csoportkésettetés-diszperzió értéke is pozitív. Ha szemléletes képet akarunk hozzá társítani, akkor a pozitív csoportkésettetés-diszperzió azt jelenti, hogy a csoportkésettetés értéke a körfrekvenciával nő. Ha a rövid impulzusunkat úgy fogjuk fel, mintha több különböző

vivőfrekvenciájú hullámsomagból állna, akkor azt mondhatjuk, hogy az üvegből előbb a vörös színű hullámsomagok jönnek ki, és később a rövidebb hullámhosszú kék hullámsomagok. A 8. ábrán háromféle, optikai elemekben alkalmazott üvegfajtára jellemző csoportképletelés-diszperzió - hullámhossz grafikon látható.



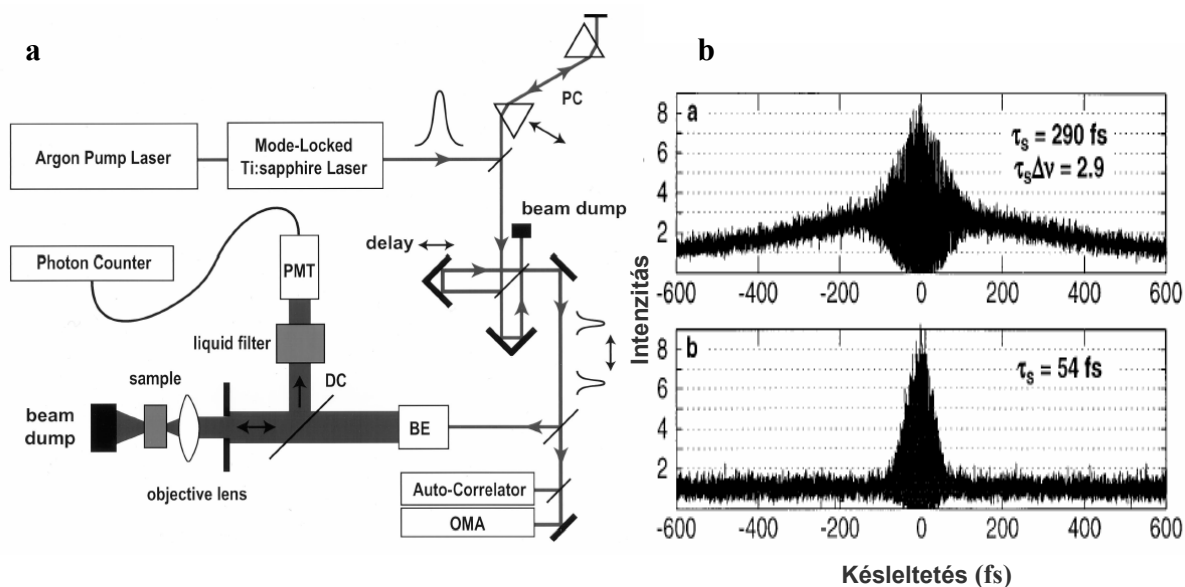
8. ábra A csoportképletelés-diszperzió hullámhosszfüggése különböző optikai elemeknél használt üvegfajtáknál

Ez a pozitív csoportképletelés-diszperzió ún. prizmás impulzuskompresszorokkal kikompenzálható a két prizma egymáshoz képesti helyzetének változtatásával [6]. Azonban a harmadrendű fázisderivált kompenzálása is fontos. Sajnos az üvegek esetében a csoportképletelés-diszperzió és a harmadrendű diszperzió aránya eltér a prizmás kompresszorokétól. A kompresszor prizmáinak az anyagát, törőszögét megfelelően választva ez az eltérés minimalizálható, és így közel tökéletes kompenzáció érhető el. Ehhez azonban szükséges a fázistorzulást okozó optikai elem, jelen esetben a mikroszkóp objektív diszperziójának minél pontosabb ismerete.

I. 3. Optikai elemek diszperziójának mérése

I. 3. 1. Diszperzió mérése kétfotonos fluoreszcenciával

Guild és munkatársai 1997-ben ismertettek egy, a kétfotonos fluoreszcencián alapuló eljárást optikai elemek diszperziójának meghatározására [7]. Az elrendezés a 9.a ábrán látható, a méréshez módusszinkronizált Ti:zafir lézert használtak. Az eljárás során a kettéosztott nyaláb egyik részét közvetlenül egy autokorrelátorba irányították, majd prizmas impulzuskompresszorral a lehető legrövidebbre állították az impulzus hosszát. Az így felvett autokorrelációs görbét referenciaként használták később.

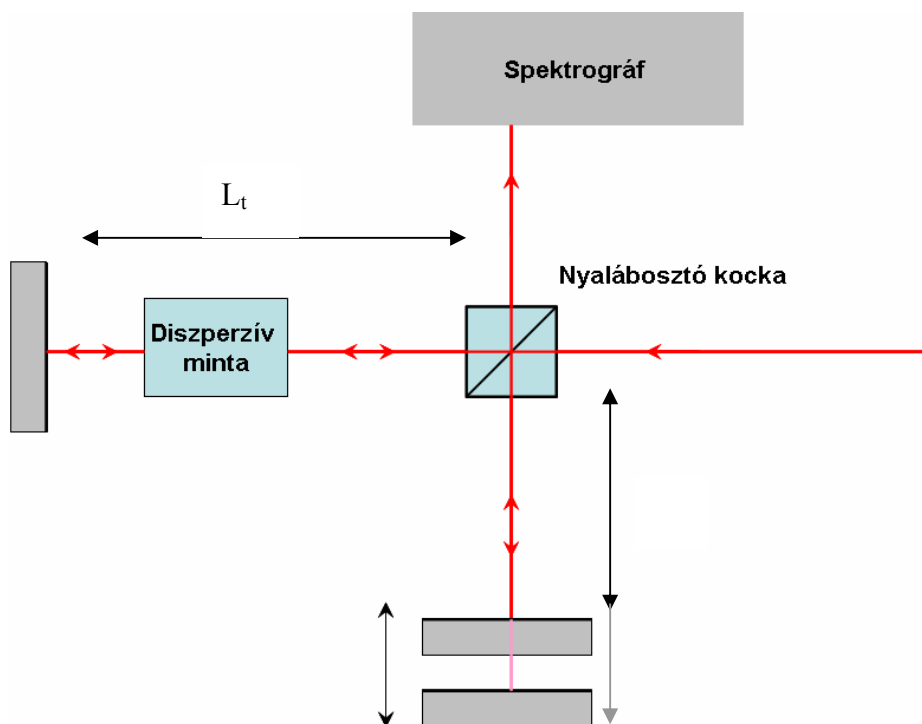


9. ábra a) Diszperzió mérése kétfotonos fluoreszcenciával. b.) Mért autokorrelációs görbék [7].

A másik nyaláb a mikroszkóp objektívon áthaladt, majd a festékanyag gerjesztése után a detektorba jutott. A prizmas impulzuskompresszorral ekkor kikompensálták az objektív által okozott diszperziót, úgy, hogy a detektoron észlelhető kétfotonos jel a legerősebb legyen. Ezután ennél is rögzítették a másik (túlkompensált) nyaláb autokorrelációs görbét 9.b ábra. Ily módon meghatározták több különböző objektív csoportkésleltetés diszperzióját, melyek az $1000-4000 \pm 100 \text{ fs}^2$ nagyságrendbe estek.

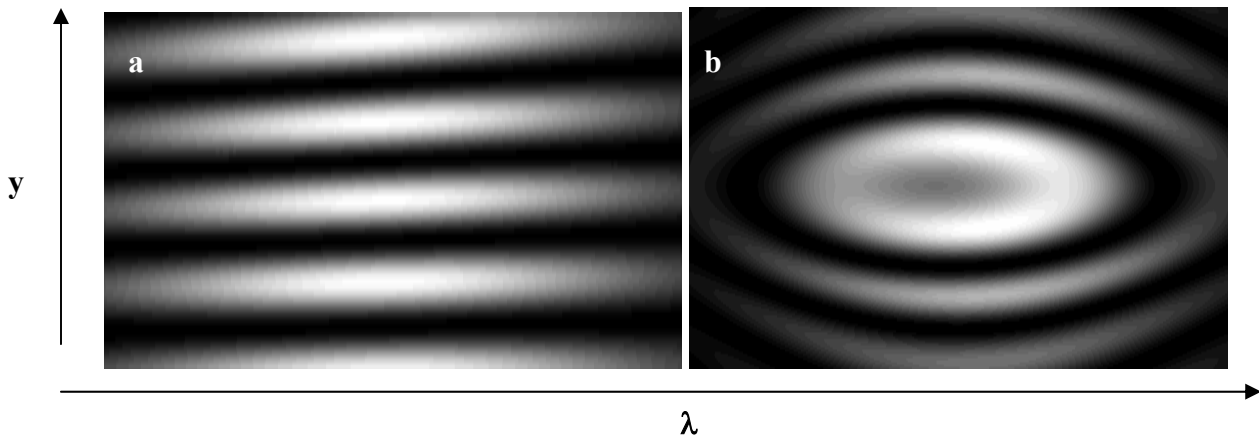
I. 3. 2. Diszperzió mérése spektrális interferometriával

A spektrálisan bontott interferometria nagy pontosságú mérési eljárás, ami többek között alkalmas különböző optikai elemek diszperziójának meghatározására [8-12]. A vizsgálandó mintát tartalmazó interferométert széles spektrumú fényforrással világítjuk ki (10. ábra). Az interferométer kimenetén a referenciakar hosszának megfelelő beállításakor megjelenő interferenciacsíkokat egy spektrográffal bontjuk fel. A spektrográf képsíkján egy CCD chipet elhelyezve, a felvett interferogramokat számítógép segítségével analizálhatjuk.



10. ábra Spektrálisan bontott Michelson-interferométer.

A spektrográf kimenetén megjelenő interferenciaképet több tényező határozza meg. Tételezzük fel, hogy az üres interferométert síkhullámmal világítjuk ki, valamint a tükrök függőlegesen állnak. Ebben az esetben a kimeneten 11.a ábrán látható képet kapjuk (a függőleges tengely a térkoordináta, a vízszintes pedig a hullámhossz). A 11.b képhez hasonló ellipszisekből álló gyűrűrendszert kapunk gömbhullámmal kivilágított interferométer esetén. A felvett képek kiértékeléséhez különböző módszereket használhatunk.



11. ábra Spektrális interferogram **a)** síkhullám, **b)** gömbhullám megvilágítás esetén.

A spektrográf kimenetén kapott interferogram egy tetszőleges pontjában detektált intenzitás a következőképpen adható meg:

$$I(\omega, y) = I_1(\omega, y) + I_2(\omega, y) + 2\sqrt{I_1(\omega, y) \cdot I_2(\omega, y)} \cos(\phi(\omega, y)), \quad (10)$$

ahol I_1 és I_2 az interferométer két karjából érkező fény intenzitása, ϕ pedig a fáziskülönbség a két kar között. Ahhoz, hogy a fázist az ω körfrekvencia függvényében megkapjuk, rendezzük át a (10) egyenletet:

$$\cos(\phi(\omega, y)) = \frac{I(\omega, y) - I_1(\omega, y) - I_2(\omega, y)}{2\sqrt{I_1(\omega, y) \cdot I_2(\omega, y)}}. \quad (11)$$

A (11) egyenlettel leírt ún. normált spektrális interferogramok kiértékelésére háromféle módszer elméleti hátterét ismertetem a következő fejezetekben.

I. 3. 2. 1. Állandó fázisú pont

Vegyük a *11.b ábrán* látható interferogram elliptikus gyűrűrendszerének közepén átmenő, a frekvenciatengellyel párhuzamos metszetét. Legyen ekkor az $y = 0$. Az előző fejezetben szereplő (11) egyenletnek szélsőértéke ott lehet, ahol a $\cos(\phi(\omega, 0))$ függvény ω szerinti első deriváltja eltűnik, azaz ahol:

$$\frac{d \cos(\phi(\omega, 0))}{d\omega} = -\sin(\phi(\omega, 0)) \cdot \frac{d\phi(\omega, 0)}{d\omega} = 0. \quad (12)$$

A feltétel teljesülésének egyik lehetősége, ha $d\phi(\omega,0)/d\omega = 0$. Azon ω értéknél, melyre ez megvalósul, kialakul az ún. állandó fázisú pont, melyet a 12. ábrán nyíllal jelöltem.



12. ábra Spektrális interferogram frekvenciatengely menti metszete

Az elnevezés arra utal, hogy a pont környékén a fázis lassan változik. Az interferométer kimenetén a karok közötti fáziskülönbséget a:

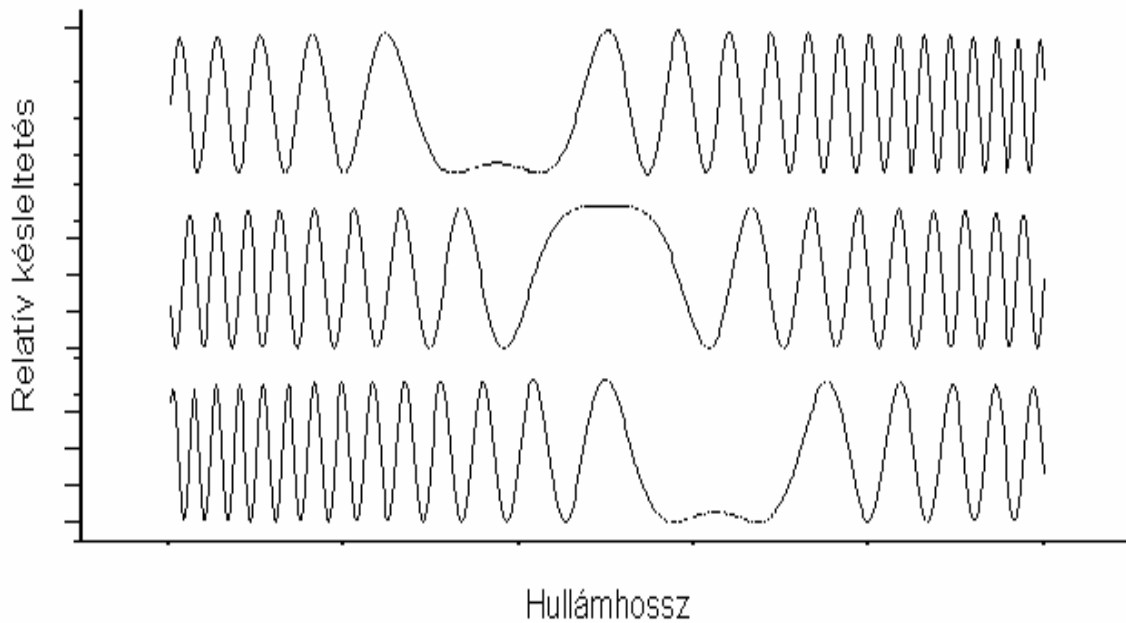
$$\phi(\omega,0) = \varphi(\omega,0) + \frac{\omega}{c} 2(L_t - L_r - L_m) = \varphi(\omega,0) - \omega\tau \quad (13)$$

egyenlet írja le, ahol L_t a tárgykar hossza, L_r a referenciakar hossza, L_m pedig a vizsgált minta hossza, $\varphi(\omega,0)$ a vizsgált minta fázistolása oda-vissza úton. Az $(L_t-L_r-L_m)/c$ mennyiséget τ -val jelöljük. Az állandó fázisú pont kialakulásának feltétele, hogy $d\phi/d\omega=0$, azaz:

$$\frac{d\phi}{d\omega} = \tau. \quad (14)$$

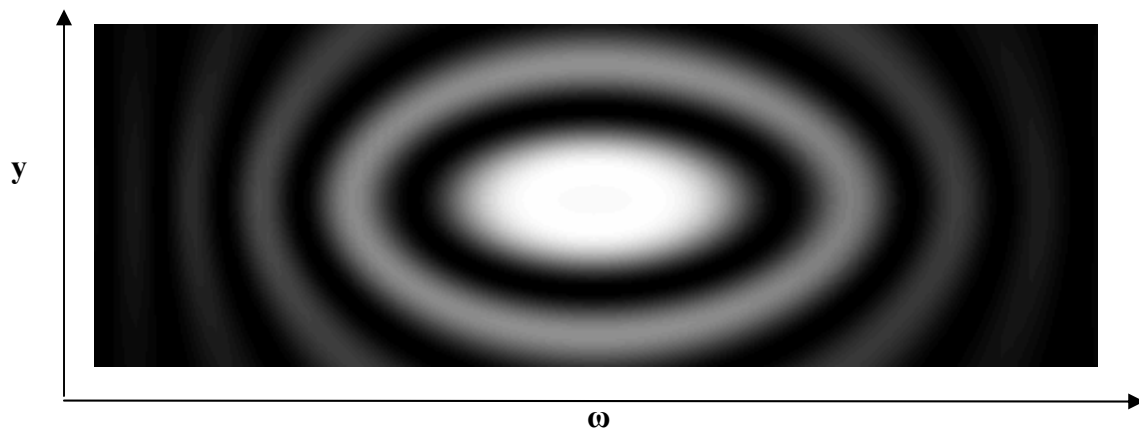
Ebből látszik, hogy a késleltetés változtatásával az állandó fázisú pont feltétele más és más hullámhosszra teljesül, ezért a helye is változik az interferogramon (13. ábra).

Pozitív diszperziónál ($GDD>0$), a késleltetés növelésével az állandó fázisú pont helye az interferogramon a rövidebb hullámhosszak felé tolódik el, ahogyan azt várjuk is. A csoportkésleltetés-frekvencia függvényre másodfokú polinomot illesztünk, akkor az együtthatóiból megkapjuk a GDD és a TOD értékét.



13. ábra A referenciakar hosszának változtatásával létrehozott késleltetéseknél kapott spektrális interferogramok.

Ennek a módszernek az előnye, hogy közvetlenül a csoportkésleltetés- ω függvényt kapjuk a mérésből. Hátránya viszont, hogy a minél pontosabb méréshez sok interferogramot kell felvenni, és az interferogramokon egyenként kell leolvasni az állandó fázisú pont helyét, ami nagyon időigényes. Az állandó fázisú pont pontos helyének a meghatározása nehézkes lehet bizonyos fázisainál (amennyiben az állandó fázisú pont fázisa közel megegyezik a közvetlenül mellette levő két intenzitásmaximummal, illetve minimummal), a mérés pontatlansága ezért jelentősebben mutatkozik. Ez könnyen belátható a *14. ábra* alapján, melyen az állandó fázisú pont geometriai közepe szemmel nehezen határozható meg.



14. ábra Az állandó fázisú pont fázisa közel megegyezik a mellette levő két intenzitásmaximum fázisával, ezért pontos helye nehezen állapítható meg.

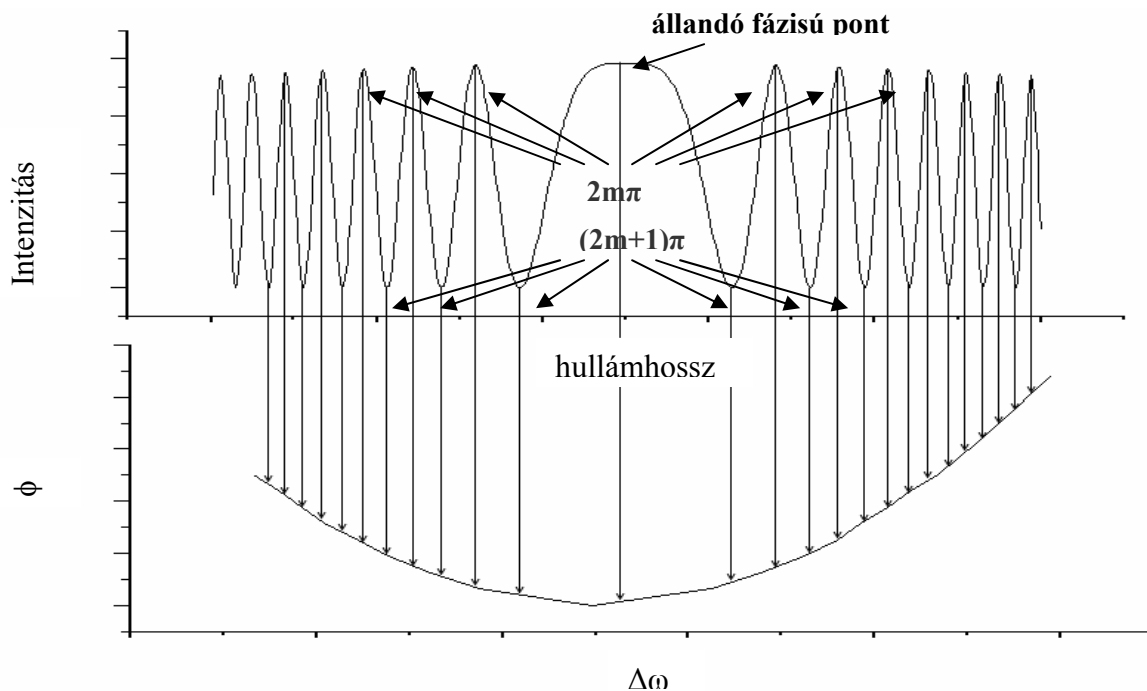
I. 3. 2. 2. Minimum-maximum módszer

Ennek, az előbbinél pontosabb a módszernek az alapja a (12) egyenlet teljesülésének másik feltétele, azaz $\sin(\phi(\omega,0)) = 0$. A kiértékeléshez elegendő mindössze egyetlen interferogram felvétele is, melyen azon ω -knál van szélsőérték, ahol a fázis $\phi(\omega,0) = m \cdot \pi$, (m egész szám). Maximumértékek helye $2m \cdot \pi$ -nél, míg a minimumhelyek $(2m+1) \cdot \pi$ -nél vannak. Kiértékeléskor a (11) egyenlet szerint normált interferogram állandó fázisú pont közepénél vett frekvenciatengely menti sormetszetén leolvassuk a minimum és maximumhelyeket (15. ábra), valamint az állandó fázisú pont helyét.

Az állandó fázisú pont fázisának meghatározása a leolvasott érték korrigálásával történhet a (15) egyenlet alapján:

$$\arccos(x_{korr}) = \arccos \left\{ x - \underbrace{\left(\min + \frac{\max - \min}{2} \right)}_{\frac{\max + \min}{2}} \cdot \left(\frac{\max - \min}{2} \right)^{-1} \right\}, \quad (15)$$

ahol max és min a sormetszeten a maximumok és minimumok értékei.



15. ábra A felvett interferogram sormetszete (fent), a fázispontok a frekvencia függvényében és az illesztett harmadrendű polinom (lent).

Az így kapott fázispontokat ábrázoljuk a frekvencia függvényében, figyelembe véve, hogy minden egyes újabb maximum az előbbi ponthoz képest 2π fázistolást jelent. Harmadfokú polinomot illesztünk rá, akkor az illesztett görbe együtthatói megadják a csoportkésleltetés-diszperzió és a harmadrendű diszperzió értékeit. Ez látható a 15. ábrán, az ábra alsó részében láthatóak az ábrázolt fázispontok, a függőleges tengely a fázis.

A mérés pontossága növelhető a gyűrűk sűrűségének növelésével (szélesebb spektrumú fényforrás használatával), habár ez egyben a kiértékelés meghosszabbodását is eredményezi.

I. 3. 2. 3. Fázismodulált szinuszfüggvény illesztése

Ez a leggyorsabb módszer, ennél szintén egy normált interferogramot használunk. A felvett és normált interferogram egyik sormetszetére fázismodulált szinuszfüggvényt illesztünk, amely a következő alakú:

$$I_{ill} = a_1 + a_2 \cdot \cos(a_3 + a_4 \cdot x + a_5 \cdot x^2 + a_6 \cdot x^3), \quad (16)$$

ahol $a_1, a_2 \dots$ illesztési paramétereket jelölnek, x pedig $\Delta\omega$ -nak felel meg. Az illesztett függvény paramétereiből meghatározhatjuk a $GDD = 2 \cdot a_5$ és $TOD = 6 \cdot a_6$ értékeket. A 16. ábrán egy sormetszet, és pirossal az illesztett szinuszfüggvény látható.



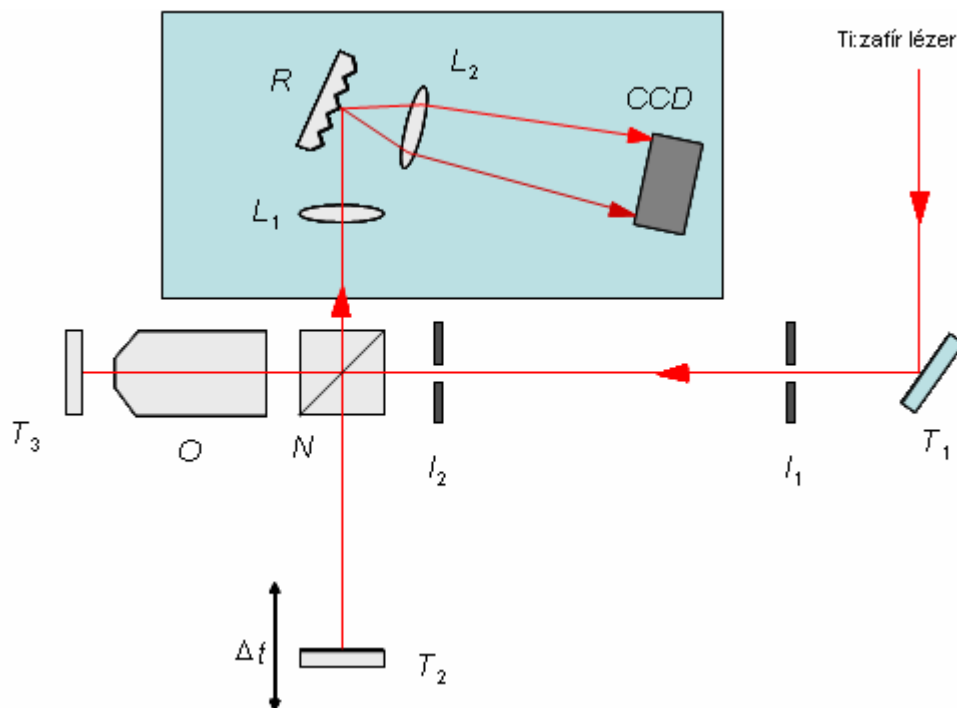
16. ábra Normált spektrális interferogram intenzitás eloszlása Sormetszet (fekete) és illesztett szinuszfüggvény (piros)

II. EREDMÉNYEK

Ebben a fejezetben bemutatom a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben használt mikroszkóp objektív diszperziójának mérésével kapcsolatos eredményeimet.

II. 1. Kísérleti elrendezés

A O mikroszkóp objektívet egy Michelson interferométer egyik karjába (tárgykar) helyeztem úgy, hogy a fókuszpontja közelítőleg a T_3 tükrön legyen (17. ábra). A másik kar (referenciakar) hossza változtatható volt. Az interferométerbe Ti:zafír lézerrel vagy halogén lámpával világítottam bele. Az interferogramokat spektrálisan bontottam egy házilag általam készített rácson spektrográf segítségével. A CCD chipre érkező interferenciaképet számítógéppel vettem fel. Először 60nm-es sávszélességű fénnel készült interferogramokat, majd a spektrográf átépítése után 120 nm-es sávszélességű interferogramokat készítettem. A módszer hátránya Ti:zafír lézer használata esetén (a nagyobb koherenciahossza miatt), hogy bár az interferencia könnyen megtalálható, a tükröződő felületek miatt felesleges csíkok is megjelenhetnek, ami mérési hibát okozhat. A kísérletet ezért halogén lámpával is megismételtem az átépített spektrográffal.



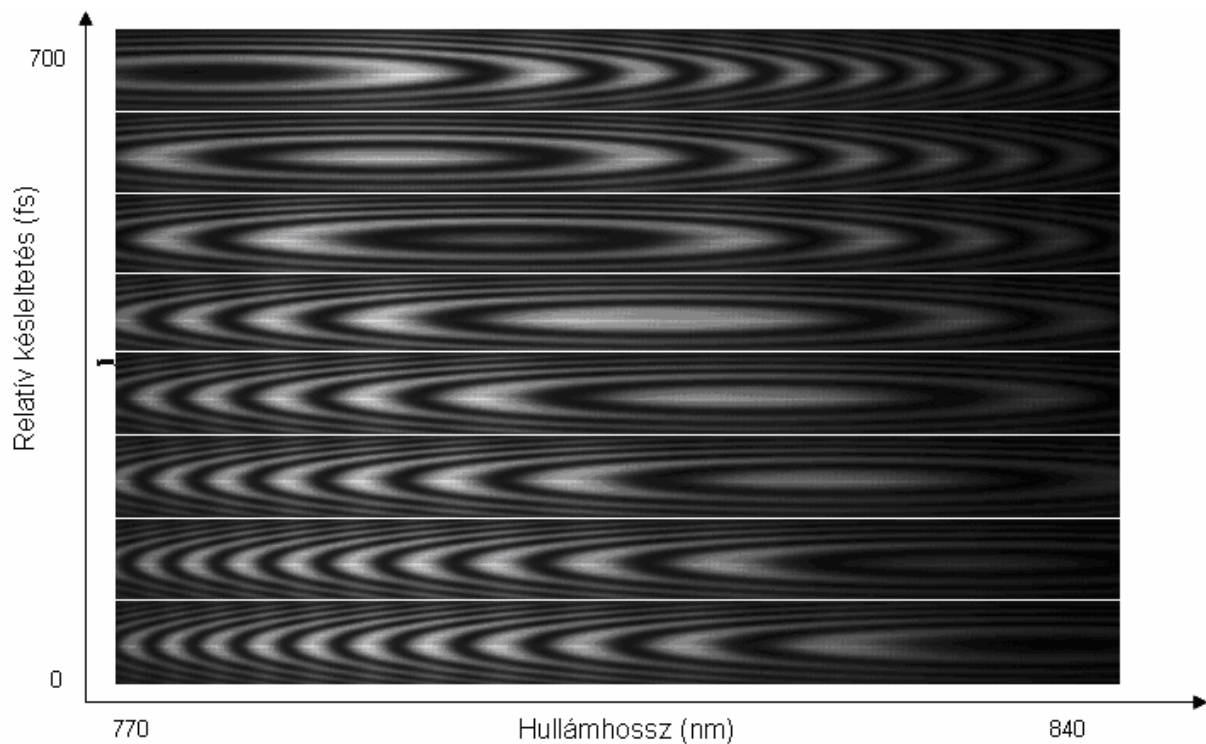
17. ábra Kísérleti elrendezés Ti:zafír lézerrel kivilágítva.

II. 2. Spektrális interferogramok kiértékelése

II. 2. 1. Kiértékelés az állandó fázisú pont meghatározásával

Először a titán-zafír lézerrel készült képek kiértékeléséből adódó eredményeimet ismertetem. A későbbiekben az állandó fázisú pont meghatározásán alapuló módszerre, mint 1. módszerre hivatkozok.

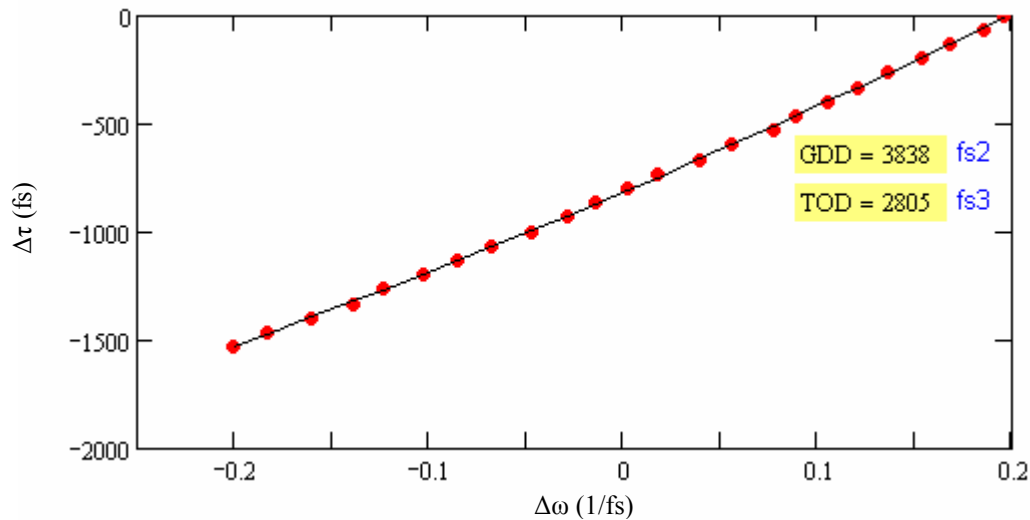
A referenciakar tükrének helyzetét változtatva az állandó fázisú pont helye (a gyűrűk közepe) a késleltetés növekedésével a rövidebb hullámhosszak felé tolódott el (18. ábra), azaz a hosszabb hullámhosszú komponensek az objektívől, ahogy azt várjuk is, hamarabb lépnek ki, mint a rövidebb hullámhosszúak. Azonos késleltetésekkel felvettem több, mint 20 interferogramot. A felvett interferogramokat Mathcad program segítségével beolvastam és meghatároztam az állandó fázisú pontot minden képen.



18. ábra Az állandó fázisú pont helyének elmozdulása a késleltetés változtatásakor

A mikrométercsavar helyzetéből a késleltetés kiszámolható, melyet azután ábrázoltam az állandó fázisú pontok helyének megfelelő $\Delta\omega$ relatív körfrekvenciák függvényében. A relatív körfrekvenciákat minden esetben a 800 nm-es hullámhosszra vonatkoztatva számoltam. A mérési pontokra másodfokú polinom illesztése után, a polinom együtthatóiból

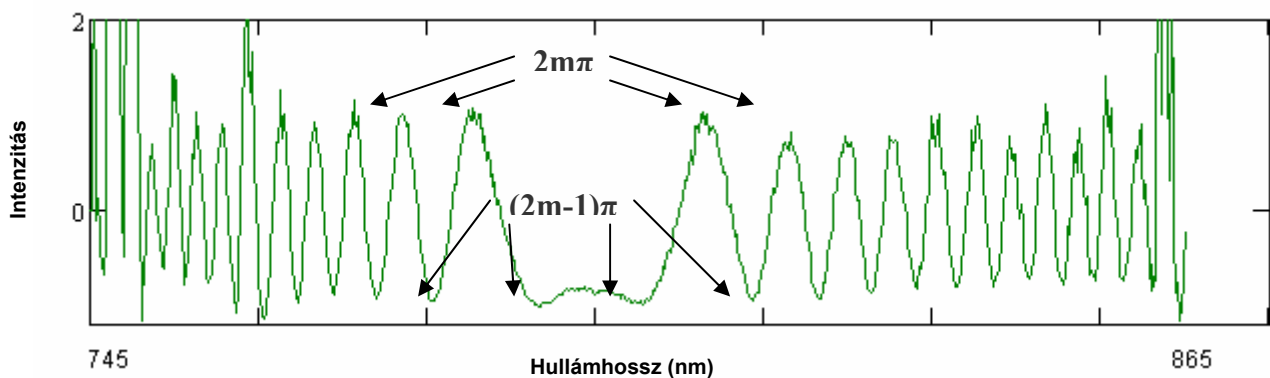
következtethetünk a *GDD* és *TOD* értékekre. A 19. ábrán látható csoportkésleltetés-relatív körfrekvencia függvényt már egy átépített spektrográffal kaptam, ahol a vizsgálható hullámhossztartomány 120 nm volt.



19. ábra Az állandó fázisú pont helye a késleltetés változtatásakor

II. 2. 2. Minimum-maximum módszer

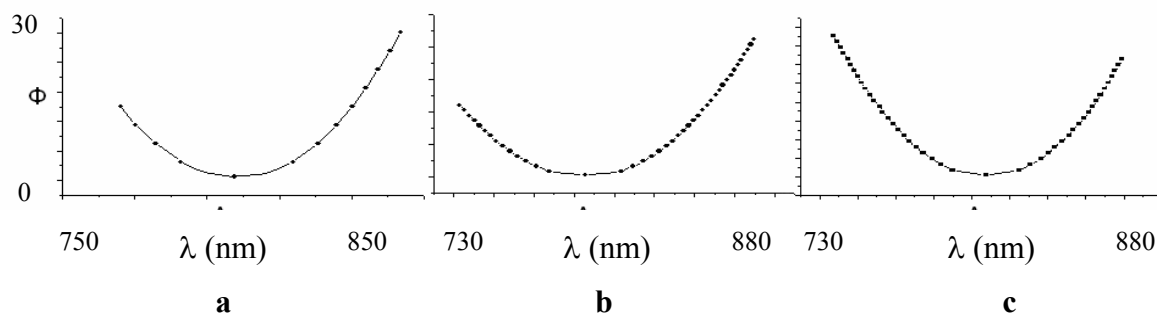
Ebben a fejezetben ismertetem a 2. módszerrel kapott eredményeimet. A felvett interferogram egyik sormetszetén (amely az állandó fázisú pont közepén áthalad) leolvastam az intenzitásminimumokhoz és -maximumokhoz, továbbá az állandó fázisú ponthoz tartozó hullámhosszakat. Majd hozzárendeltem a fázisukat úgy, hogy amennyiben az állandó fázisú pont utáni első szélsőérték minimum, a minimumokhoz $(2m-1)\pi$, a maximumokhoz pedig $2m\pi$ tartozzon, ahol m egész szám, a minimum vagy maximum sorszáma (20. ábra).



20. ábra Spektrálisan bontott interferogram hullámhossztengely menti sormetszetén a minimum és maximumhelyekhez rendelt fázis

Ha pedig az állandó fázisú pont utáni első szélsőérték maximum, akkor m a maximum vagy minimum sorszámánál eggyel kisebb számot jelöl, és a minimumokhoz rendelt fázis $(2m+1)\pi$. Az állandó fázisú pont fázisát az elméleti összefoglalóban leírtak szerint határoztam meg.

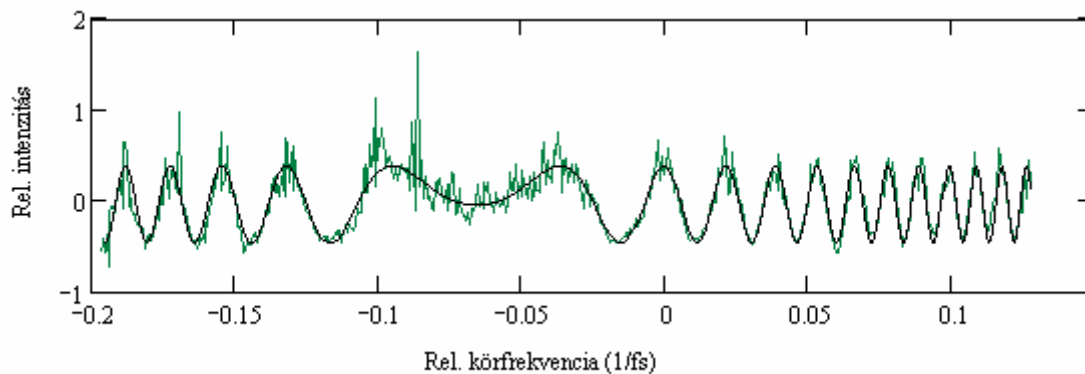
A kapott pontokat ábrázolva egy parabolához hasonló görbét kaptam. A GDD és TOD értékét megkaphatjuk, ha a kapott görbére harmadrendű polinomot illesztünk. A 21. ábrán látszik, hogy szélesebb spektrális tartományon felvett interferogramok pontjaira az illesztett görbe pontosabb, mivel több a rendelkezésre álló adat, ezért ezekből pontosabban meghatározhatóak a GDD és a TOD értékei.



21. ábra Fázispontok ábrázolva, harmadfokú illesztett polinommal, **a)** Ti:S lézerrel 60nm-en **b)** 120nm-en **c)** fehér fényel készült kép kiértékelése

II. 2. 3. Kiértékelés fázismodulált szinuszfüggvény illesztésével

Ez a kiértékelési módszer (3. módszer) a leggyorsabb. A spektrális interferogram egyik kiválasztott sormetszetére Mathcad programmal illesztettem szinuszfüggvényt (22. ábra). A szinuszfüggvény argumentumában szereplő harmadfokú polinom együtthatói adják meg a keresett értékeket.



22. ábra Spektrális interferogram sormetszetére fázismodulált szinuszfüggvény illesztése (fekete)

II. 3. Mérési módszerek összehasonlítása

Ebben a fejezetben a különböző módszerekkel felvett és kiértékelt interferogramokból adódó mérési eredményeimet hasonlítom össze. Az 1. táblázatban összefoglaltam a kapott értékeket. Nagyságrendileg hasonló értékeket kaptam az objektív csoportképletelés-diszperziójára, mint Guild és munkatársai az 1.3.1 fejezetben ismertetett módon végzett méréseikből. A mérés hibája azonban esetünkben számottevően kisebb. Míg Guild 100 fs² pontossággal tudta csak megmérni a diszperziót, addig az általam kapott értékek mérési hibája a legpontatlanabb első módszerrel is mindössze ± 50 fs² volt. Vegyük észre, hogy a táblázatban szereplő értékek a mikroszkóp objektíven kétszer áthaladó impulzusra adódtak.

Az első módszer pontatlansága onnan ered, hogy a *GDD* és *TOD* értékeinek meghatározására csak több felvett interferogram kiértékelése után van csak módunk.

Fényforrás típusa	$\Delta\lambda_{ff}$ (nm)	$\Delta\lambda_{spekt}$ (nm)	Módszer	GDD (fs²)	TOD (fs³)
Ti:zafír lézer	40	60	1.	3900 ± 100	800 ± 3000
			2.	3850 ± 60	2100 ± 2800
			3.	3850 ± 20	1800 ± 1100
	90	120	1.	3950 ± 100	2900 ± 1000
			2.	3810 ± 20	1600 ± 200
			3.	3870 ± 40	2000 ± 700
Halogén lámpa	120	1.	3850 ± 100	2800 ± 1000	
		2.	3850 ± 40	1500 ± 200	
		3.	3870 ± 50	2100 ± 400	

1. táblázat Spektrális interferometrián alapuló diszperzió mérésére kapott értékek a három különböző módszer szerint.

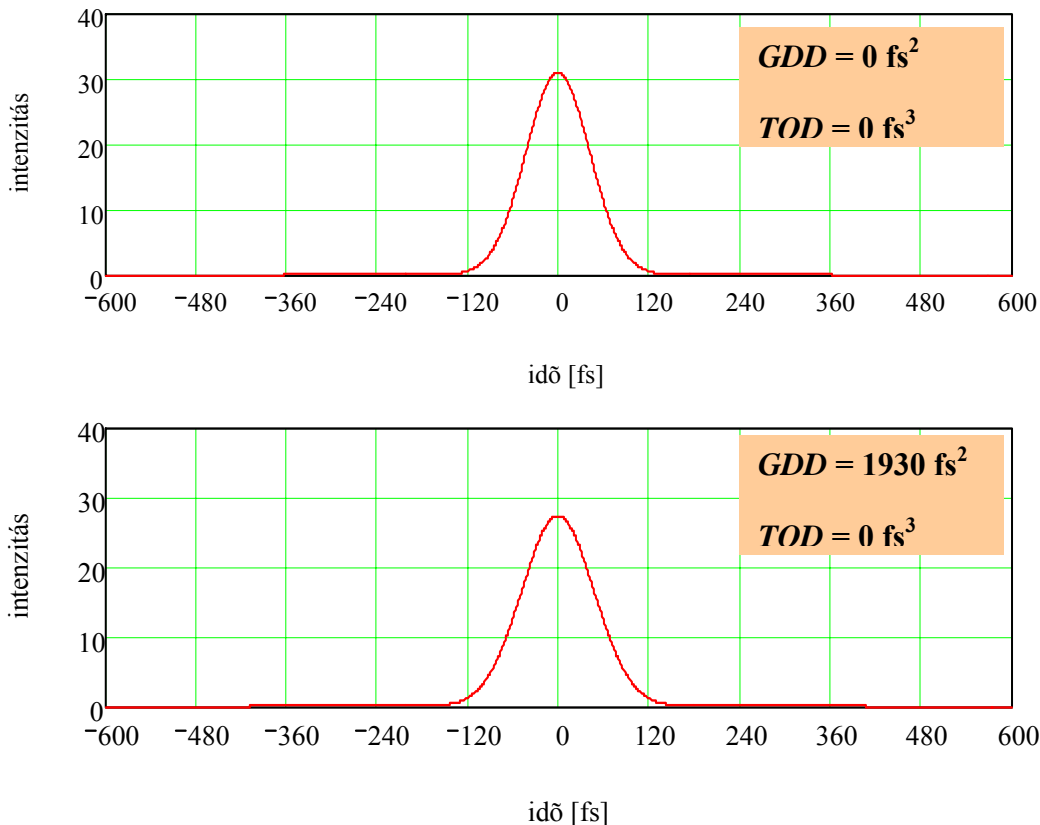
A második és harmadik módszer pontossága jelentősen növekedett szélesebb tartományt látó spektrográffal felvett képek kiértékelésekor (főleg a *TOD* értékének meghatározásakor).

Végeredményként az objektív csoportképletelés-diszperziójára: $GDD = 1930 \pm 30 \text{ fs}^2$, a harmadrendű diszperzióra: $TOD = 1000 \pm 500 \text{ fs}^3$ adódott a 800 nm-es hullámhosszra és egyszeri áthaladásra vonatkoztatva.

II. 4. Mérési eredmények értékelése

Ebben a fejezetben a kapott GDD és TOD értékek hatását szemléltetem a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben található mikroszkóphoz használt Ti:zafír lézer által kiadott 100 fs-os, 800 nm központi hullámhosszú impulzusokra.

A 23. ábrán látható egy 100 fs-os impulzus időbeli alakja, amennyiben a GDD és TOD értéke 0 fs^2 , majd ugyanez az impulzus, ha a GDD értéke 1900 fs^2 .

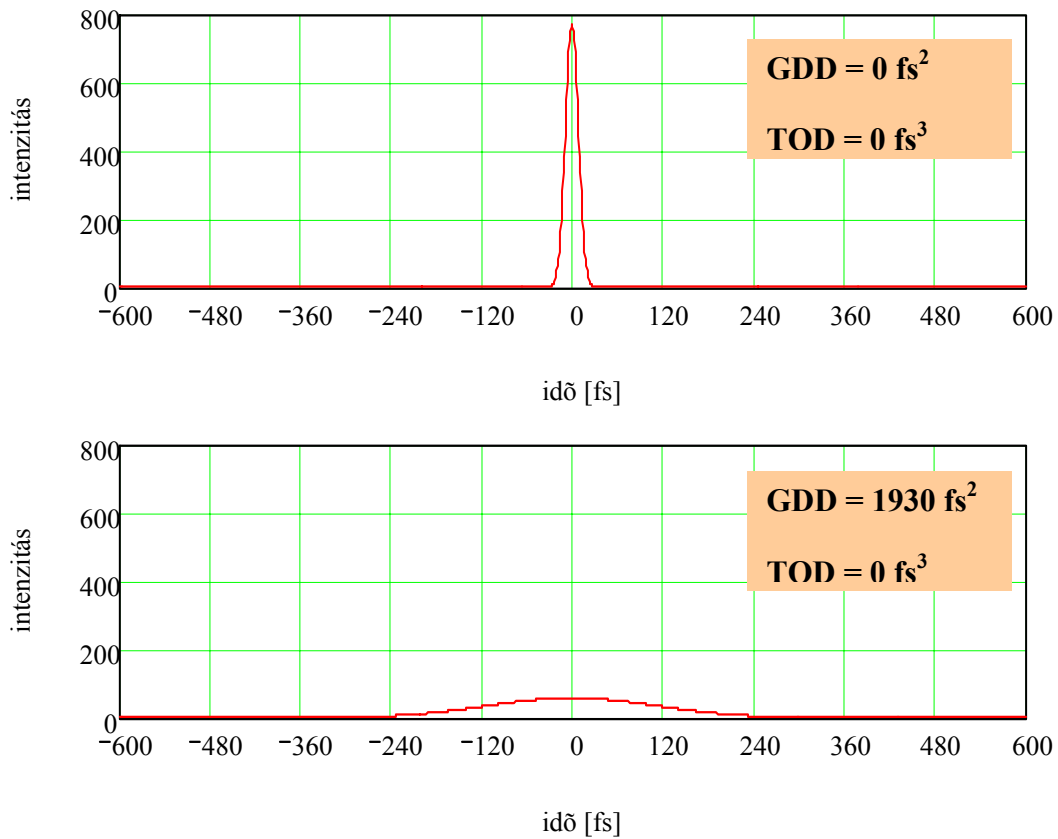


23. ábra Egy 100 fs-os transzformlimitált impulzus időbeli alakja az objektív előtt (fent) és utána (lent), ha csak a csoportképletelés-diszperzióval számolunk ($GDD = 1930 \text{ fs}^2$).

Az ábrából látható, hogy az impulzus időbeli alakjának változása 100 fs-os impulzus esetén nem jelentős, ezért a diszperziós értékek kikompenzálása nem javíthatja jelentősen a mikroszkóp felbontóképességét.

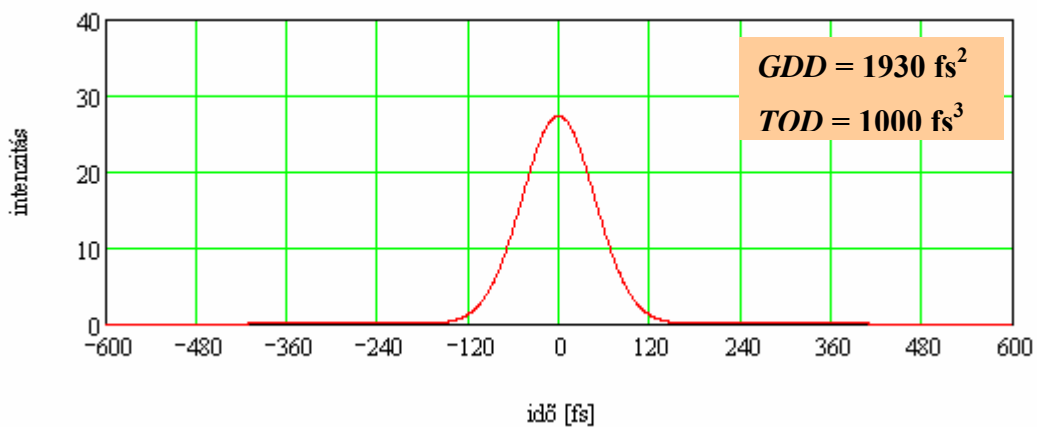
Azonban a legutóbbi kutatások eredményei szerint rövidebb impulzusokat ($10\text{-}20 \text{ fs}^2$) használva a mikroszkóp képalkotása javulhat [13]. Amint az (1) egyenletből is látszik, a fluoreszcens festékanyag által abszorbeált fotonok száma fordítottan arányos az impulzus időbeli szélességével, és egyenesen arányos a lézer intenzitásának négyzetével, ezért az

impulzus rövidségével a festékanyag gerjesztésének hatásfoka növelhető. Vizsgáljuk meg, hogy milyen hatással van ugyanez a mértékű diszperzió 20 fs-os impulzusokra.

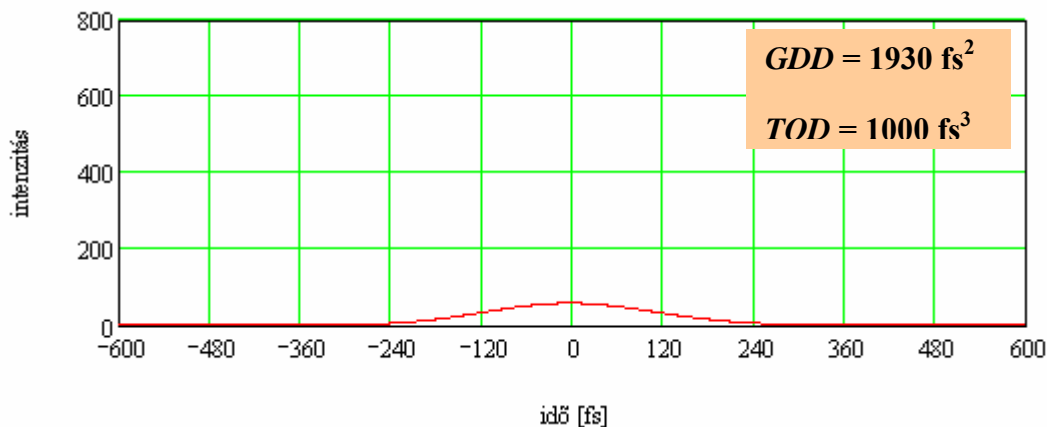


24. ábra 20fs impulzus, $GDD = 0 \text{ fs}^2$, $TOD = 0 \text{ fs}^3$ (fent), $GDD = 1930 \text{ fs}^2$ (lent).

Most vizsgáljuk meg, hogy a harmadrendű diszperzió jelenléte mennyire befolyásolja az impulzus alakját 100 fs-os és 20 fs-os impulzusoknál.



25. ábra 100 fs impulzus, $GDD = 1930 \text{ fs}^2$, $TOD = 1000 \text{ fs}^3$.



26. ábra 20 fs impulzus, $GDD = 1930 \text{ fs}^2$, $TOD = 1000 \text{ fs}^3$.

A 24. ábrán látható, hogy a másodrendű diszperzió 20 fs-os impulzusoknál nagyon jelentős torzulást okoz, míg a harmadrendű diszperzió 1000 fs^3 nagyságú értéke nem befolyásolja jelentősen az impulzus alakját egyik impulzusidőnél sem (25. és 26. ábra). 20 fs-os impulzusok esetén már célszerű impulzuskompresszort használni, és ennek pontos beállításához a diszperzió megfelelő komponenseit ismerni.

A fentiekből látszik, hogy a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben használt kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp felbontásának a várt értéktől való eltérését alapvetően nem az objektív anyagi diszperziója miatti impulzuskiszélesedés okozza. A felbontóképesség javításához meg kell vizsgálni az impulzusok fókuszálása során fellépő leképezési hibák hatásait. Az objektív szférikus illetve kromatikus hibája okozhatja az impulzus jelentős időbeli kiszélesedését a fókuszban [14-16]. Ha feltételezzük, hogy e két hibára a vizsgált objektív jól korrigált, akkor is van egy gyakorlatilag kompenzálhatatlan hiba, ez az ún. terjedési időkésés (PTD) [17,18]. Ennek lényege, hogy az impulzus a lencse közepén több anyagon halad keresztül, mint a szélek felé haladva, azaz az optikai tengelytől mért távolságtól függő csoportkésleltetés lép fel, ami azt eredményezi, hogy a fókuszba a szélről előbb érkezik az impulzus, mint az optikai tengely mentén középen haladó része, ami jelentős időbeli kiszélesedést okozhat.

III. Összefoglalás

Az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben 100 fs körüli impulzusokat alkalmaznak a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp kivilágítására, a fluoreszcens festékanyag gerjesztésére. A felbontást az impulzusok időbeli szélessége is jelentősen befolyásolja, mivel a detektált jel az impulzus intenzitásának négyzetével arányos. A mikroszkópban az impulzusok fókuszálásához használt objektív anyagi diszperziója okozhatja az impulzusok megnyúlását, és ily módon a felbontás csökkenését.

Jelen dolgozat célja volt az említett mikroszkópban alkalmazott objektív anyagi diszperziójának kísérleti meghatározása minél nagyobb pontossággal. A diszperzió mérésére a spektrális interferometriát alkalmaztam, melynek során az objektívet egy Michelson-interferométer egyik karjába helyeztem úgy, hogy a fókuszpontja nagyjából a tükrön legyen. A karok közötti késleltetést változtattam, és az interferométer kimenetén megjelenő interferenciaképet spektrálisan bontottam. A felvett spektrális interferogramok kiértékeléséhez háromféle módszert alkalmaztam. Egyik esetben az ún. állandó fázisú ponthoz tartozó hullámhosszt határoztam meg a referenciakar különböző késleltetéseivel. Az így kapott csoportkésleltetés-hullámhossz függvényből polinomillesztéssel adódtak az objektív diszperzióját jellemző fázisderiváltak. Egy másik, ennél pontosabb módszer volt, amikor a referenciakar egy adott késleltetésénél az interferencia minimumokhoz és maximumokhoz tartozó hullámhosszak alapján határoztam meg a fázisderiváltakat. A harmadik módszer esetében pedig egy fázismodulált szinuszfüggvényt illesztettem a spektrális interferogram egy hullámhossz-tengellyel párhuzamos metszetére.

A három különböző mérési módszerrel egyenként meghatároztam az objektív csoportkésleltetés- és harmadrendű diszperzióját. Összevettem a három módszerrel elért mérési pontosságot, és azt találtam, hogy a leggyorsabb és legpontosabb módszer amikor egy fázismodulált szinuszfüggvényt illesztettem a spektrális interferogram egy sormetszetére. Az elért pontosság a csoportkésleltetés-diszperzió illetve a harmadrendű diszperzió esetében 2 % illetve 50 % volt. Megállapíthatjuk, hogy a mérési pontosság a Guild és munkatársai által ismertett módszernél jobb, különös tekintettel arra, hogy a harmadrendű diszperzió értékét nem tudták mérni. Az is megállapítható, hogy 100 fs-os impulzusoknál a mért csoportkésleltetés- illetve a harmadrendű diszperzió szinte alig okoz impulzusalak-torzulást. A mikroszkópnál kísérletileg tapasztalt, a vártnál rosszabb felbontóképesség oka vagy az objektív által bevezetett aberrációk lehetnek vagy az ún. sugárfüggő terjedési időkéésés. Tervezem ezen lehetséges okok kísérleti vizsgálatát.

Irodalomjegyzék

- [1] http://www.fz-juelich.de/ibi/ibi-1/Two-Photon_Microscopy/
- [2] <http://www.bris.ac.uk/Depts/Anatomy/research/neuro/OneTwoPhoton/TwoPhoton.htm>
- [3] A. Diaspro ed., *Confocal and two-photon microscopy*, Wiley-Liss (2002)
- [4] Szipőcs R., Rózsa B., Katona G., Lendvai B., Vizi E. Sz., *Kétfoton mikroszkópia térben és időben, új mérési módszerek a kétfoton mikroszkópiában*
<http://picasso.elte.hu/microscopy/katona.pdf>
- [5] Kovács A., *Optikai elemek fázistulajdonságainak interferometrikus vizsgálata* (PhD értekezés, Szeged, 2000)
- [6] R. L. Fork, O. E. Martinez, and J. P. Gordon, *Opt. Lett.* **9**, 150-152 (1984).
- [7] Jeffrey B. Guild, Chris Xu, Watt. W. Webb, *Appl. Opt.*, **36**, 397-401 (1997)
- [8] J. Calatroni, J.C. Vienot: *Appl. Opt.* **20**, 2026 (1981)
- [9] C. Sainz, J.E. Calatroni, G. Tribillon: *Meas. Sci. Technol.* **1**, 356 (1990)
- [10] A.P. Kovács, K. Osvay, Z. Bor, R. Szipőcs: *Optics Letters* **20** 788-790 (1995)
- [11] K. Osvay, P. Dombi, A.P. Kovács, Z. Bor: *Appl. Phys. B* **75** 649-654 (2002)
- [12] A.P. Kovács, K. Osvay, G. Kurdi, M. Görbe, J. Klebniczki, Zs. Bor: *Appl. Phys. B* **80** 165-170 (2005)
- [13] J. M. Gunn, S. Bonner, *Ultrafast Phenomena 2006*, Pacific Grove, California, USA, paper ThC2
- [14] Zs. Bor, *Opt. Lett.* **14**, 119 (1989)
- [15] Zs. Bor, Z. L. Horváth, *Opt. Commun.* **94** 249-258 (1992)
- [16] M. Kempe, W. Rudolph, *Opt. Lett.* **18**, 137 (1993)
- [17] J. Jasapara, W. Rudolph, *Opt. Lett.* **24**, 777-779 (1999)
- [18] S. Szatmári, G. Kühnle, *Opt. Commun.* **69** 60-65 (1988)

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Attilának a dolgozat elkészítésében, a mérések kivitelezésében és a kiértékelési módszerek kidolgozásában nyújtott segítségéért, türelméért. Köszönöm a TeWaTi laborban dolgozóknak, hogy felmerülő problémák esetén készségesen segítségemre voltak.

Ezt a munkát az NKTH és a KPI támogatta az NKFP1-00007-2005. számú Femtobiológia projekten keresztül.