

Işık Yayan Diyot Dizisi ile Işık Mikroskobunda Faz-Kontrast Görüntüleme

Nur Efsan KÖKSAL^{1*}, İlyas ÇANKAYA¹, Esra ŞENGÜN ERMEYDAN¹

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-posta: nekoks@aybu.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6046-8014>
e-posta: icankaya@ybu.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6072-3097>
e-posta: eermeydan@ybu.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5953-4301>

Geliş Tarihi: 02.08.2022 Kabul Tarihi: 02.03.2023

Öz

Anahtar kelimeler

Işık mikroskobu; LED dizisi; Faz-kontrast görüntüleme; 32x32 LED dizisi; eğik aydınlatma

Bu çalışmada, aydınlık-alan, karanlık-alan ve diferansiyel faz-kontrast görüntülerini aynı anda elde edebilen tek-kamerallı bir görüntüleme sistemi, programlanabilir bir ışık yayan diyot (LED) dizisi aracılığıyla farklı aydınlatma modelleri ile birlikte kullanılmıştır. Kullanılan LED dizisi, aydınlatma açılarının esnek bir şekilde modellenmesine olanak sağlamıştır. Sol-sağ, üst-alt ve eğik aydınlatmaların etkisi, hem yanak epitel hücresinde hem de soğan zarı hücresinde detaylı olarak gözlemlenmiştir. Aydınlık-alan, karanlık-alan ve diferansiyel faz-kontrast görüntüleri, 32x32 LED dizisinin desenleri değiştirilerek herhangi bir hareketli parça olmadan elde edilmiştir. Bu nedenle, kullanılan sistem basittir, düşük maliyetlidir ve geleneksel ışık mikroskobu ile uyumludur.

Phase-Contrast Imaging at an Optical Microscope utilizing a Light Emitting Diode Array

Keywords

Optical microscope, LED array; Phase-contrast imaging; 32x32 LED array; oblique illumination

Abstract

In this study, a single-camera imaging system that can simultaneously acquire bright-field, dark-field and differential phase-contrast images is used with different illumination patterns through a programmable light-emitting diode (LED) array. The LED array allows flexible modeling of illumination angles. The effect of left-right, top-bottom and oblique illumination was observed in detail both in the cheek epithelial cell and in the onion membrane cell. Bright-field, dark-field and differential phase-contrast images are obtained without any moving parts by changing the patterns of 32x32 LED array. Therefore, the system used is simple, low-cost and compatible with the conventional light microscopy.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi.

1. Giriş

Bireylerin sağlığı hakkındaki bilgilerin öğrenilmesine olanak sağlayan tanı ve teşhis yöntemleri, doktorlara ve laboratuvar uzmanlarına yardım eden bilgiler sağlar. Teşhis konusundaki standart yöntemler uzun adımlar içerir. Örneğin, kan hücresini kullanarak hastalık teşhis etmek için tam kan sayımı yapan bir cihaz kullanılır. Herhangi bir anormal durum olması halinde cihaz teknisyene uyarı verir. Uyarıdan sonraki adım ise mikroskobik inceleme adımıdır. Bazı hallerde, kan yaymadaki hücrel morfoloji hakkında yeterli bilgiyi elde edebilmek için ek testler de istenebilir. Kan yayması

gerekliliğini azaltan otomatik kan analiz cihazlarına rağmen kan yayması incelemesi, yaygın olarak anemi gibi hastalıkların ayırıcı tanısının yapılmasında, lenfoma ve lösemi teşhisinde, ileri tetkiklerin önerilmesinde ve bazı enfeksiyonların hızlı teşhisinde hala vazgeçilmez bir araçtır. Muayene için bir kan yayması hazırlamada ise kan hücreleri, metanol eklenerek korunur. Bu işleme *sabitleme işlemi* adı verilir. Sabitlenmiş kan filmi, çeşitli boya renklerinin karışımı ile boyanır, böylece hücreler mikroskop aracılığıyla incelendiği zaman tanınabilir. Fakat, boyama işlemi, kan yayması hazırlamada harcanan zamanın ve maliyetin büyük

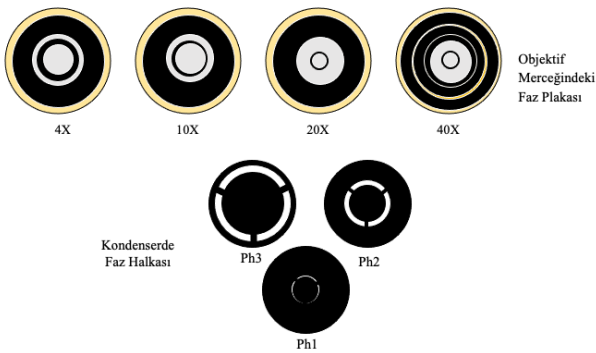
bölümünü oluşturur. İnceleme, kan yaymasından maksimum bilgi elde etmek için deneyimli ve yetenekli bir kişi, bir laboratuvar bilimcisi veya tıbbi olarak kalifiye bir hematolog veya patolog tarafından yapılmalıdır. Bu incelemeler, tüm kantitatif mikroskopi (quantitative mikroskopi) tabanlı yöntemlerin sahip olduğu, düşük verim ve gözlemci özelliği sınırlamalarına sahiptir. Bu nedenle; faz görüntüleme teknolojileri, mevcut klinik iş akışında bu sınırlamaların üstesinden gelme potansiyeline sahiptir. Bu teknikler, hücreleri etiketsiz (label-free) olarak görüntülediği için, boyamaya ayrılan hem zaman hem de kaynaklar korunur. Ayrıca, bu teknolojiler, standart iki aşamalı süreci tek adımlı otomatik mikroskobik analizle değiştirme potansiyeline sahiptir. Faz görüntüleme enstrümanları herhangi mevcut bir mikroskopiye kolayca eklenebilir ve klinik iş akışına entegre etmek için özel bir numune hazırlamaya gerek yoktur (Majeed *et al.* 2017).

Bir faz görüntüleme aracı olan ışık mikroskobu, gözle ayırt edilemeyecek kadar küçük numunelerin incelenmesi ve gözlemlenmesi amacıyla medikal araştırmalarda kullanılan en temel ve en eski bilimsel araçlardan biridir. Çıplak göz ile ayırt edilemeyen küçük ve yoğun numuneleri, net bir şekilde ayırt edilebilir büyük boyutlara dönüştürebilir. Mikroskobik görüntülere daha fazla ayrıntı getirmek ve görünürlüğünü geliştirmek için yüzyılları aşkın bir süredir farklı tekniklerle çalışmalar yapılmaktadır (Abbe, 1873). Bu tekniklerden en yaygın olanı ise kontrast artırıcı tekniklerdir. Işığın, parlaklığın veya rengin absorpsiyonu ile üretilen kontrast, aydınlık-alan mikroskopunda numuneleri görüntülemenin bir aracıdır. Yapılar doğal olarak renkli olabilirler veya yapay olarak kimyasal renkli boyalar gibi kontrast maddeleri eklenerek renklendirilebilirler. Bu kontrast maddeleri, beyaz ışığın bir kısmını absorbe ederken diğer renkleri iletir veya yansıtır. Işığı tamamen veya kısmen absorbe eden bu numuneler *genlik nesnelidir* (amplitude objects). Fakat, özellikle canlı hücreler veya boyasız, çok ince numunelerden kontrast elde edilirken birçok engel ile karşılaşılır. Karşılaşılan en büyük engel ise, ışığın saçılması veya absorbe edilememesidir. Bunlar genelde *şeffaf* veya *faz nesnelidir*. Kimyasal

boyalar veya sabitleyiciler ile öldürerek veya işleyerek numunelerin yapısını değiştirmemek ise çok önemlidir. Faz nesneleri, numune tarafından kırılan ışığın fazını numuneden etkilenmeden geçen sapmasız, doğrudan ışığa kıyasla yaklaşık 1/4 dalga boyu oranında geciktirerek hafif bir şekilde değiştirir. Fakat, bu faz değişimi insan gözünün algılayabileceği bir fark oluşturmaz. Faz değişimi, yalnızca görünür spektrumun renklerine veya farklı ışık yoğunluğu seviyelerine (dalga genliği) daha duyarlıdır. Faz numunelerinde, doğrudan saçılmayan ışık numunenin içinden veya çevresinden sapma olmadan geçer. Bununla birlikte, numune tarafından kırılan ışığın genliği, ışık emici bir nesnede (genlik nesnesinde) olduğu gibi azalmaz, ancak numunenin kırılma indisi veya kalınlığı (veya her ikisi) nedeniyle numune tarafından yavaşlatılır. Yaklaşık 1/4 dalga boyu gerisinde kalan bu kırılan ışık, görüntü düzlemine faz farkıyla gelir, ancak girişimde esasen yoğunlukta azalmaz. Sonuç olarak, görüntünün ayrıntıları neredeyse görünmez kılacak kadar kontrasttan yoksundur (Davidson & Abramowitz, 2002). Kırılma indekslerinin uzaysal değişimden kaynaklanan faz kayması, mikroskopide uzaysal kontrast kaynağı olabilir. Numunenin fazı (θ), numunenin kalınlığının (t) ve kırılma indisinin (n) çarpımı ile belirlenir ($\theta = k_o \cdot (n - n_o) \cdot t$, k_o ışığın boşluktaki dalga vektörüdür.) (G. Popescu *et al.* 2008). Faz-kontrast görüntüleme, şeffaf numunelerdeki faz kaymasını kontrastı artırarak görünür hale getiren bir yöntemdir, etiketsiz bir teknik olması sebebiyle canlı hücrelerin görüntülenmesi başta olmak üzere birçok biyolojik numunenin görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılır (Vyas, Li, Lin, Yeh, & Luo, 2022).

Mikroskopide en çok kullanılan görüntüleme yöntemleri; aydınlık-alan (BF) mikroskopisi, karanlık-alan (DF) mikroskopisi ve faz-kontrast (PhC) mikroskopisidir (Karakoç, Ketani & Ketani, 2016, Liu, Tian, Liu, & Waller 2014). Öte yandan, BF görüntüleme, güçlü absorpsiyona sahip numuneleri gözlemlenmek için çok uygundur. BF görüntüleme, etiketlenmemiş hücreler ve ince doku örnekleri gibi yarı saydam örneklerin gözlemlenmesi için uygun değildir, çünkü bu örnekler görünür ışıkta güçlü bir zayıflama sergilemez. DF görüntüleme, numunelerin kenarlarına duyarlı olan ince numunelerin yüksek

kontrastlı görüntülerini üretir. DF görüntüleme, optik görüntüleme sistemlerinin yakalayabileceği maksimum açının ötesinde eğik ışık aydınlatması kullanır, böylece numuneden kırılan ışığı toplarken saçılmamış arka planı en aza indirir. PhC mikroskopisi, doğrudan ışık (direct light) ve kırılan ışık (diffracted light) tarafından üretilen girişim eğrisi kontrastını kaydırarak ilişkili fazı artırır. PhC mikroskopisi, şeffaf ve boyasız biyolojik numuneler için kullanılır. Zernike faz kontrast veya ayrımlı girişim kontrast mikroskobu (DIC), ve *kantitatif faz* örnekleri gibi faz kontrast için bir çok seçenek mevcuttur. Görüntülerin faz bilgisi, yapıların hem kalınlık hem de kırılma indisi hakkında bilgi verir (Gabriel Popescu, 2011, Frits Zernike 1942, F. Zernike 1955). BF mikroskopi, DF mikroskopi ve faz-kontrast görüntüleri, numuneler hakkında detaylı bilgiler sunsa da; faz kontrast görüntüleme, halka şeklindeki yoğunlaştırıcılar ve özel objektif lensler gibi özel optik elemanlar (Şekil.1) ve ayrı bir optik düzenleme gerektirdiğinden bu görüntülerin eşzamanlı olarak alınması geleneksel mikroskoplarda mümkün değildir. Ayrıca, görüntüleme yöntemleri arasındaki dönüşüme zaman ve ek optik elemanlardaki masraflar eşlik eder (Kheireddine, Smith, Nicolau, & Wachsmann-Hogiu 2019, Lee, Ryu, Kim, Jung, & Joo 2015, F. Zernike 1935, Zuo, Sun, Feng, Hu, & Chen 2016). Bahsedilen nedenlerden ötürü, örneğin canlı bir numunenin gerçek zamanlı görüntüsünün BF, DF ve faz-kontrast görüntülemesinin birlikte yapılması geleneksel ışık mikroskoplarında mümkün olmamaktadır.



Şekil 1. Faz kontrast optik elemanları

Mikroskopide, numunenin uygun şekilde aydınlatılması, yüksek çözünürlüklü ve yüksek

kaliteli görüntüler elde etmede önemli bir faktördür. Çoğu modern laboratuvar mikroskobu, ilk olarak 1893'te August Köhler tarafından tanıtılan ve şu anda çoğu mikroskop üreticisi tarafından önerilen *Köhler aydınlatma düzeni* ile donatılmıştır. Son yıllarda daha gelişmiş aydınlatma şemaları da önerilmektedir. Bunlardan birisi de ışık yayan diyotların (LED) kullanıldığı yapılarıdır. LED teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, ışık mikroskopisi için ışık kaynağı olarak LED'lerin kullanılması, maliyeti önemli ölçüde azaltmış ve kullanım avantajları da getirmiştir. Önerilen LED ışık kaynağı sayesinde, BF mikroskopisi, ışığın nümerik açıklığı ile objektif lenslerin nümerik açıklığının eşleşmesi ile elde edilir. DF mikroskopisi, basitçe kenardaki LED'lerin açılması orta kısımdaki LED'lerin kapatılması ile elde edilir. Yani, bu durumda, ışığın nümerik açıklığı objektif lenslerin nümerik açıklığından fazladır. Ayrıca, sırayla her bir LED'i açabilir ve bir dizi numune görüntüsü yakalanabilir. Bu görüntüler, farklı görüş açıları için bilgi içerir ve bu nedenle, numuneyi farklı derinliklere dijital olarak yeniden odaklamak için bunlar sonradan işlenebilir. Bu bahsedilen görüntüleme şemaları, tek bir LED tarama işlemi ile aynı anda gerçekleştirilebilir. Ayrıca, önerilen şemada hiçbir mekanik hareketli parça yoktur, uygun maliyetlidir ve çoğu geleneksel ışık mikroskobu ile de uyumludur (Zheng, Kolner, & Yang, 2011). BF ve DF haricinde ise PhC görüntülerinin bu sistemde ayrıca herhangi bir donanım değişikliği olmadan da elde edilebileceği de gösterilmiştir (Liu *et al.* 2014). Diğer bir deyişle, halihazırdaki geleneksel bir ışık mikroskobu piyasada hazır olarak bulunabilen LED dizisi kullanılarak başka bir donanıma ihtiyaç duymadan, BF görüntülemenin yanında hem DF görüntüleme hem de PhC görüntüleme yapabilme kabiliyeti kazanır. PhC görüntüleme için, tamamlayıcı aydınlatma açılarından yalnızca iki görüntü yakalamanın gerekli olduğu asimetrik aydınlatma diferansiyel faz kontrastı (DPC) kullanılmaktadır (Hamilton & Sheppard 1984, Hamilton, Sheppard, & Wilson 1984). Farklı aydınlatma koşulları altında çekilen üç görüntü (veya beş görüntü), aydınlık-alan, karanlık-alan ve faz-kontrast modunun tümünü elde etmek için yeterlidir. Her iki dik(ey) yön boyunca faz

kontrast elde edilmek isteniliyorsa dört adet görüntü kullanılmalıdır (Liu *et al.* 2014).

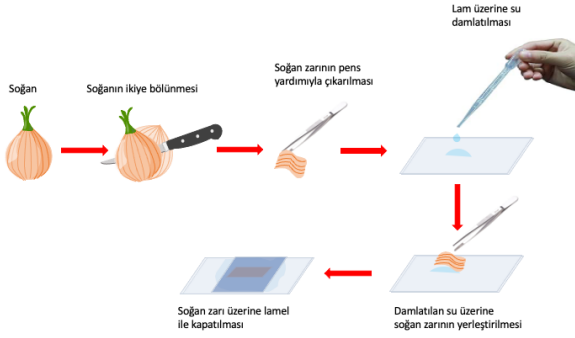
Bu zamana kadar birçok bilim insanı faz görüntüleme üzerine yoğunlaşmıştır ve hala da bu konu üzerine yapılan çalışmalar gelişerek devam etmektedir. İlk olarak Hollandalı fizikçi olan Zernike, 1935'te faz kontrastın mikroskopide kullanımını açıklamıştır. Bu çalışmasıyla kültürdeki canlı hücrelerin düşük kontrast sorununu çözerek Nobel Fizik Ödülü'nü kazanmıştır (F. Zernike, 1935). 1943'te Zeiss fabrikasındaki araştırmacılar, çekirgelerin spermatogenezindeki mayotik bölünmelerin hızlandırılmış bir film kaydı gerçekleşmiştir. Bu film, faz-kontrast mikroskopiye ticari ilgiyi artırmıştır (Masters, 2008). 1956'da Nomarski, kültürdeki canlı hücrelerin kontrastını da geliştiren diferansiyel kontrast mikroskobu icat etmiştir. Bu yöntem *Nomarski girişim veya farksal girişim kontrast (DIC) mikroskopisi* olarak adlandırılır (Nomarski, 1955). Dekkers and de Lang, 1974'te, optik mikroskopide kullanım için bölünmüş-detektöre dayalı bir yöntem önermiştir (Dekkers & de Lang, 1974). Hoffman, 1977'de, hücre zarlarının yakınındaki faz gradyanlarından yararlanarak canlı materyaldeki kontrastı artırmanın başka bir yöntemini tanıtmıştır. Bu teknik şimdi *Hoffman Modülasyon Kontrastı* olarak adlandırılmaktadır ve çoğu modern mikroskopta isteğe bağlı ekipman olarak mevcuttur (Hoffman, 1977). Herman, 2001'de basit bir LED ışık kaynağının birçok uygulamada karmaşık ve pahalı lazer sistemlerinin yerine geçebileceğini göstermiştir (Herman, Maliwal, Lin, & Lakowicz, 2001). 2007'de ise Bormouth, LED aydınlatmanın DIC için yeterli olduğunu göstermiştir (Bormuth, Howard, & Schäffer, 2007). 2008'de Albeanu, LED tabanlı aydınlatma kaynaklarını standart bir geniş alan mikroskobuna bağlamak için basit prosedürler sunmuştur (Albeanu, Soucy, Sato, Meister, & Murthy, 2008). 2011'de, Zheng, daha fazla görüntüleme esnekliği ve işlevselliği elde etmek için bir kondansörün programlanabilir bir LED dizisi aracılığıyla değiştirilebileceğini göstermiştir (Zheng *et al.* 2011). 2014 yılında, Liu ve arkadaşları, dinamik biyolojik örneklerin BF, DF ve PhC görüntülerini gerçek zamanlı olarak aynı anda elde edebilen tek-kamerallı bir görüntüleme sistemini LED dizisi kullanarak herhangi bir hareketli parça kullanmadan

sergilemişlerdir (Liu *et al.* 2014). Tian ve arkadaşları ise aynı yıl, çeşitli aydınlatma açılarıyla deve kılı örneğinin yoğunluk görüntülerini yakalayarak programlanabilir bir LED dizisiyle hesaplamalı-aydınlatmaya dayalı 3-boyutlu DPC mikroskobunu tanıtmışlardır. Önerilen yöntem; basit ve ucuzdur, ayrıca hareketli parça içermemektedir (Tian, Wang, & Waller, 2014). Renk-kodlu ve çoklu-kontrast mikroskop, LED dizisi kullanılarak çeşitli şeffaf biyolojik örneklerin görüntülerinin aynı anda hem BF, hem DF hem de DPC görüntülerini elde etmek için Lee ve arkadaşları tarafından sunulmuştur (Lee *et al.* 2015). 2015 yılına gelindiğinde ise Philips ve arkadaşları, CellScope mobil-mikroskopi platformu için programlanabilir, kubbeli bir LED dizisi donanımı ve yazılımının şeffaf hücrelerin ve mikroorganizmaların etiketsiz görüntülenmesi için faz görüntüleme yöntemlerine olanak sağladığını göstermişlerdir (Phillips *et al.* 2015). 2016 yılında, Chen ve arkadaşları, farklı odak düzlemlerinde asimetric ve kısmen uyumlu aydınlatma ile görüntüleri yakalayan yeni bir quantitative üç boyutlu faz görüntüleme tekniği önermişlerdir (Chen, Tian, & Waller, 2016). Jung ve arkadaşları, 2017 yılında, akıllı telefon platformunda ince biyolojik örneklerin aydınlık-alan, karanlık-alan ve diferansiyel faz-kontrastlı görüntülerini üretebilen, portatif ve çoklu kontrast mikroskobunu önermişlerdir (Jung *et al.* 2017). 2018 yılında ise, Chen ve arkadaşları, DPC için farklı aydınlatma kaynağı modellerine sahip 4 görüntü kullanarak algoritmik bir kendi kendine kalibrasyon yöntemi önermişlerdir. Bu da dijital olarak sapma düzeltilmesini (aberration correction) sağlar (Chen, Phillips, & Waller, 2018).

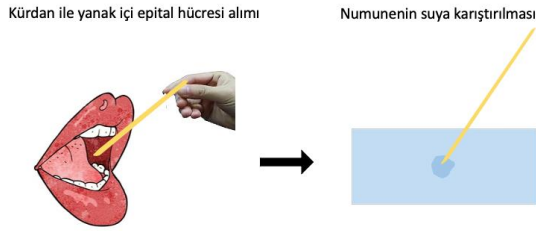
Sunulan çalışmada, düşük maliyetli bir ışık mikroskobunda, programlanabilir 32x32 LED dizisi ile aydınlatılmış ve çoklu-kontrast modelleri kullanılmıştır. Sol-sağ, üst-alt ve eğik aydınlatmaların etkisi hem yanak epitel hücresinde hem de soğan zarı hücresinde detaylı olarak gözlemlenmiştir ve karşılaştırma yapılmıştır. Aynı numunenin BF, DF ve değişik açılardan elde edilen DPC görüntüleri sunulmaktadır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada mikroskop görüntüsünü incelemek için örnek olarak soğan zarı ve yanak epitel hücreleri seçilmiştir. Soğan zarı numunesi hazırlanırken, öncelikle bir soğan ikiye kesilmiştir. Dış kısımdaki şeffaf ve çok ince soğan zarı pens yardımı ile alınmıştır. Lamel, lam üzerine bir damla su konularak dış kısmı yukarı bakacak şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan numune, objektif yardımıyla incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Soğan zarı numunesi hazırlama işlemi Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. Soğan zarı elde etme işlemi

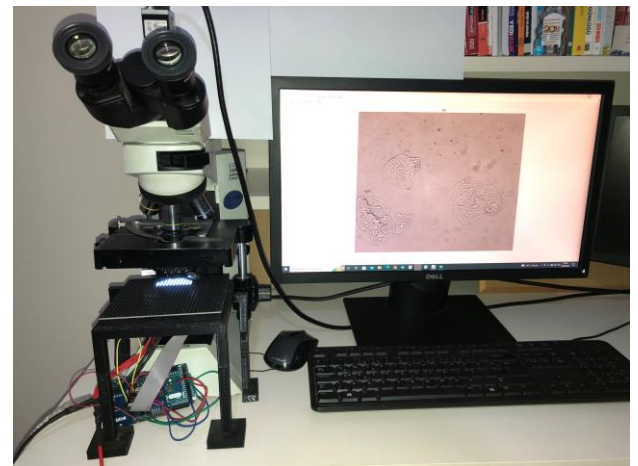
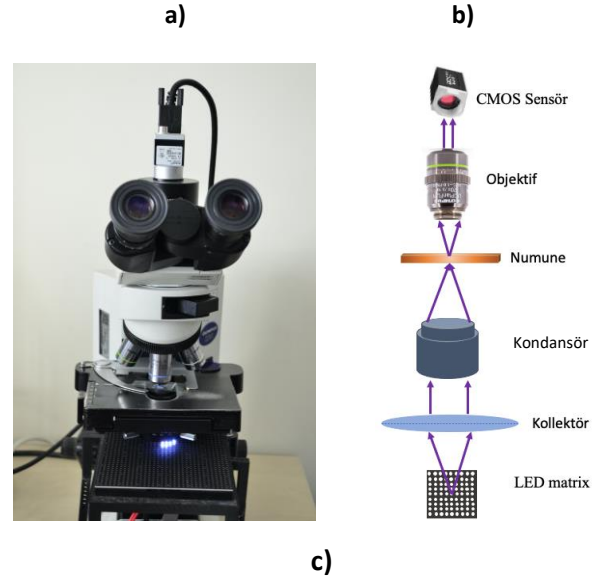


Şekil 3. Yanak epitel hücreleri elde etme işlemi

Şekil 3' te ise yanak içi epitel hücreleri elde etme işlemi gösterilmektedir. Lam üzerine küçük bir damla su damlatılmıştır. Kürdan yanak içine hafif bir şekilde sürülmüştür. Bu sırada yanak içini zedelememeye özen gösterilmiştir. Temiz kürdan yardımı ile yanak içerisinden alınan numune, lam üzerindeki suya karıştırılmıştır. Üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirilmiştir.

Şekil 4, geleneksel bir ışık mikroskopunu ve şematik diyagramını (Olympus CX41) göstermektedir. Bu mikroskopun ışık kaynağı çıkartılarak yerine numuneden yaklaşık 58 mm aşağıda olacak şekilde 32x32 LED dizisi (RGB LED Matrix Panel, 4 mm aralıklı, Adafruit 607, A.B.D.) yerleştirilmiştir. 32x32 LED dizisi için Adafruit sürücü devresi kullanılmıştır.

Mikroskopun objektif lensi 20X büyütme oranında, nümerik açıklığı (numerical aperture) 0.40 değerindedir. LED dizisi, Arduino (ATMega 2560, İtalya) ile kontrol edilmektedir. Sony IMX264 CMOS sensöre (çözünürlük 2448 x 2048, çerçeve frekansı (frame rate) 35 fps) sahip Basler acA2440-35uc USB 3.0 kamera, görüntü toplamak için mikroskopun üst kısmına yerleştirilmiştir. Veri Pylon Viewer programı aracılığıyla bilgisayara (Intel(R) Xeon(R) CPU) transfer edilmiştir. Elde edilen görüntüler, herhangi bir görüntü işleme adımı uygulanmamış ham görüntülerdir. Yalnızca, BF ve DPC görüntüleri elde etmek için (1-3) denklemleri MATLAB programı yardımıyla hesaplama işlemi için kullanılmıştır. DF görüntüsü elde etmek için ise herhangi bir hesaplama yapılmamıştır.



Şekil 4. a) Yakın çekim mikroskop, b) LED dizisi ile aydınlatılan ışık mikroskopunun şematik gösterimi ve c) mikroskop sistemi

3. Bulgular

BF, DF ve PhC görüntülerini elde etmek amacıyla farklı LED desenleri ile zaman aralıklı görüntüler elde edilmiştir. Bu LED desenleri Şekil 5'de verilmiştir. Şekil 5.a, aydınlık-alan görüntüleri (BFI) elde etmeyi sağlayan desendir. Şekil 5.b, karanlık-alan görüntüleri (DFI) elde etmek için kullanılan desendir. Objektifin nümerik açıklığı, BF'den DF LED'lerine geçişi tanımlayan dairenin yarıçapını belirler. DF LED'leri ile aydınlatma yapılırken kameraya ulaşan tek ışık, örnekten saçılan ışıktır; bu da bir DF görüntüsü meydana getirir. Şekil 5.c ve Şekil 5.d ise DPC görüntülerini elde etmek için kullanılan LED desenleri gösterir. PhC görüntüsü, sol-sağ ve üst-alt taraftan ışıklandırma ile elde edilen görüntülerin farkının normalize edilmesiyle elde edilir. BF ve DPC görüntüsü elde etmek için aşağıdaki denklemler kullanılır (1-3) (Jung *et al.* 2017),

$$I_{BF} = I_{sol} + I_{sağ} \quad (1)$$

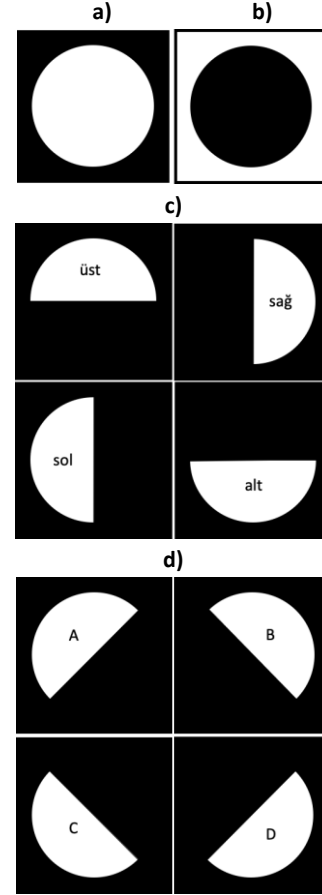
$$I_{DPC,solsağ} = \frac{I_{sol} - I_{sağ}}{I_{sol} + I_{sağ}} \quad (2)$$

$$I_{DPC,üstalt} = \frac{I_{üst} - I_{alt}}{I_{üst} + I_{alt}} \quad (3)$$

$I_{BF}, I_{sol}, I_{sağ}, I_{üst}, I_{alt}, I_{DPC,solsağ}$ ve $I_{DPC,üstalt}$ sırasıyla aydınlık-alan görüntüsü, sol, sağ, üst, alt aydınlatma ile çekilen görüntüler, sol-sağ DPC ve üst-alt DPC görüntülerini ifade eder.

Yanak epitel hücrelerinin BF, DF ve DPC görüntüleri Şekil 6'da gösterilmektedir. Şekil 6a'daki BF ve Şekil 6b'deki DF görüntülerini incelersek oldukça şeffaf olan yanak epitel hücreleri BF görüntülerde daha iyi gözlemlenirken DF görüntülerde, yanak epitel hücrelerinin gözlemlenmesi mümkün değildir. Çünkü BF görüntüleme, numune kontrastı numunedeki ışığın soğurulmasından gelirken DF görüntüleme, numune kontrastı numune tarafından saçılan ışıktan gelir. Doğal olarak renksiz olan ve şeffaf olan numuneler iyi görülemez. Yanak epitel hücreleri de oldukça şeffaf olduğu için DF ve BF görüntüleme numuneyi gözlemlenmek için yeterli değildir. Şekil 6c ve d ise, tipik olarak, DPC' nin aydınlatmaları, ortogonal yönler boyunca 2 eksenli (yani 4 görüntü) ölçümleri olan tamamlayıcı bir yarım-daire pupil ile tasarlanır. DPC görüntüsünün, desenler dikey yön

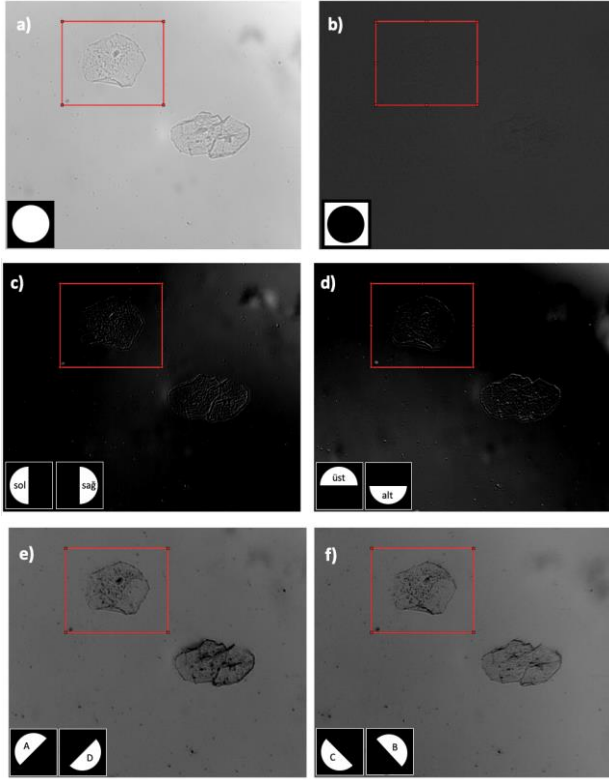
boyunca bölündüğü için yatay yön boyunca bir gölgeleme etkisi gösterdiği görülmektedir (Şekil 6c). Faz kontrast görüntü için hem yatay hem de dikey yönlerde görüntü elde etmek oldukça faydalıdır.



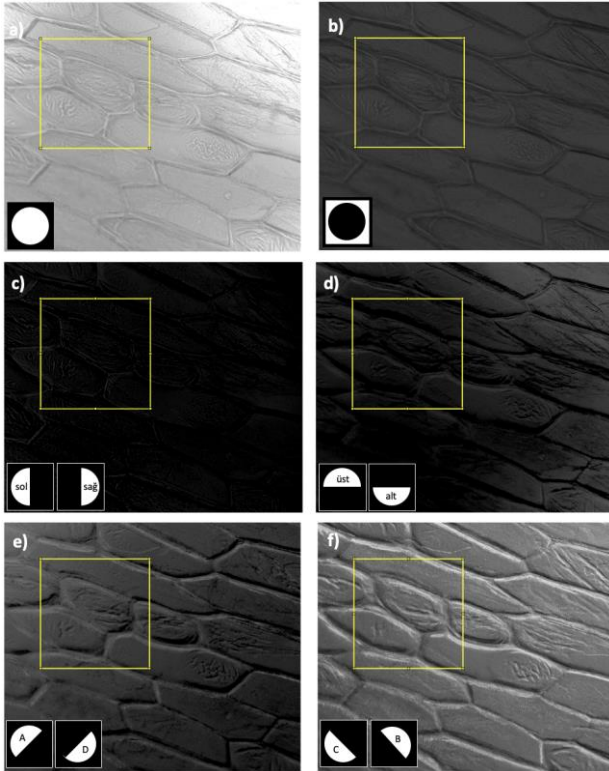
Şekil 5. LED aydınlatma desenleri ile çoklu-kontrast görüntüleri; sırasıyla a) BFI b) DFI, c) üst, sağ, sol ve alt, d) A, B, C ve D.

LED dizisi ile desenlemenin esnekliği sayesinde ilgilenilen özellikleri vurgulamak için istenen herhangi bir asimetri yönü kullanılabilir. DPC tarafından elde edilen faz-kontrast, aydınlatma modellerinin asimetrisinden gelir. Tek bir asimetrik aydınlatma modeli tek başına yakalanan görüntülerde iyi bir faz kontrastı sağlar, ancak her iki modeli birlikte kullanmak bilgiyi quantitative faz ile ilişkilendirmemize izin verir. Faz değişimi olmayan gerçek bir örnek, simetrik bir Fourier düzleme sahiptir ($I_{sol} = I_{sağ}$). Sol ve sağ gibi tamamlayıcı aydınlatma desenine sahip görüntüler, tüm gerçek (absorpsiyon) etkiler için aynı olacaktır. Böylece kaynağın her iki tarafından iki görüntünün çıkarılmasıyla elde edilen kontrast, sadece numunenin faz bilgisinden gelir. Aslında, iki DPC görüntüsünün arasındaki fark, örneğin asimetrik

eksendeki fazın birinci türevi ile doğru orantılıdır (Liu *et al.* 2014, Tian *et al.* 2014).



Şekil 6. İnsan yanak epital hücrelerinin **a) BFI b) DFI c) sol ve sağ d) üst ve alt e) A ve D f) B ve C** LED desenleri ile aydınlatılmasıyla elde edilen DPC görüntüleri



Şekil 7. Soğan zarı hücrelerinin **a) BFI b) DFI c) sol ve sağ d) üst ve alt e) A ve D f) B ve C** LED desenleri ile aydınlatılmasıyla elde edilen DPC görüntüleri

Şekil 6c ve Şekil 6d incelendiği zaman, Şekil 6c'de soldan sağa doğru gölgeleme etkisi olduğundan dolayı sol-sağ yönlü detaylar daha belirgindir. Şekil 6d'de ise yukarı-aşağı doğru gölgeleme etkisi olduğundan yukarı-aşağı yönlü detaylar daha belirgindir. Şekil 6e ve f ise eğik açıyla aydınlatma yapılarak elde edilen LED desenlerinin asimetric modelinden elde edilmiştir. Gölgeleme etkisi Şekil 6e'de, sol üstten sağ alta doğru ve Şekil 6f'de sağ üstten sol alta doğrudur. Eğik açıyla yapılan aydınlatmalarda detaylar daha belirgin olarak gözlemlenebilmektedir. Aynı özellikler Şekil 7'de soğan zarı hücresi için de gözlemlenmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Özetlemek gerekirse, bu makalede uygun maliyetli, programlanabilir 32x32 boyutlarındaki LED dizisine dayanan mikroskop aydınlatma şemaları önerilmiştir. Önerilen şemalarda faz kontrast görüntüsünü daha detaylı elde edebilmek amacıyla diğer basit modellerin yanında özellikle eğik aydınlatmaya yer verilmiştir. Sonuçlar, bir kişinin, görüntüleri aydınlık-alan, karanlık-alan ve diferansiyel faz-kontrastı aynı anda görselleştirmesini ve karşılaştırmasını sağlamıştır. Elde edilen görüntülere herhangi bir görüntü işleme adımı uygulanmamıştır. LED dizili mikroskop kurulumunun basitliği ve sağladığı çeşitli görüntüleme yetenekleri nedeniyle, LED dizi aydınlatıcısı çeşitli uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın ilerleyen aşamasında, renkli-çoğullamalı aydınlatma ile hem elde edilen görüntülerin kalitesinin artırılması hem de DPC'de daha az görüntü ile sonuca gidilmesi amaçlanmaktadır. Böylece, hem DPC'nin zamansal çözünürlüğü artacak hem de gerçek zamanlı görüntü elde edilmesi olanağı doğacaktır.

Çoklu ölçümler, DPC'nin zamansal çözünürlüğünü azaltır ve yüksek hızlı bir olayın gözlemlenmesini engeller. Görüntüleme verimliliğini artırmak için, renkli LED dizisi ile birlikte bir renkli kamera kullanılarak 4 desenin 2 görüntüye kodlandığı DPC'de renkli-çoğullamalı aydınlatma seçilen

çalışmalar vardır. Ayrıca, üç-modlu aydınlatma kullanarak veya çok-renkli bir filtre ekleyerek tek çekim DPC mekanizmaları geliştirmeye yönelik bazı çalışmalar da yapılmıştır. Bu yöntemler, yakalanan görüntülerin sayısını tek bir pozlamaya indirger; bununla birlikte, faz rekonstrüksiyonu için zayıf faz kontrastına ve zayıf sinyal-gürültü oranına (SNR) yol açar (Fan *et al.* 2019).

Teşekkür

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Fazlı ERDOĞAN hocamıza mikroskop temininde yapmış oldukları katkılardan ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne, AYBU-2018-BAP-4981 numaralı projeye vermiş olduğu maddi destekten dolayı teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

Abbe, E. 1873, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, **9 (1)**, 413-468.

Albeanu, D. F., Soucy, E., Sato, T. F., Meister, M., & Murthy, V. N. 2008, LED arrays as cost effective and efficient light sources for widefield microscopy. *PLoS One*, **3 (5)**, e2146.

Bormuth, V., Howard, J., & Schäffer, E. 2007, LED illumination for video-enhanced DIC imaging of single microtubules. *Journal of microscopy*, **226 (1)**, 1-5.

Chen, M., Phillips, Z. F., & Waller, L. 2018, Quantitative differential phase contrast (DPC) microscopy with computational aberration correction. *Opt Express*, **26 (25)**, 32888-32899.

Chen, M., Tian, L., & Waller, L. 2016, 3D differential phase contrast microscopy. *Biomed Opt Express*, **7 (10)**, 3940-3950.

Davidson, M. W., & Abramowitz, M. 2002, Optical microscopy. *Encyclopedia of imaging science and technology*, **2 (120)**, 1106-1141.

Dekkers, N. H., & de Lang, H. 1974, Differential Phase Contrast in a STEM. *Optik*, **41 (4)**, 452-456.

Fan, Y., Sun, J., Chen, Q., Pan, X., Trusiak, M., & Zuo, C. 2019, Single-shot isotropic quantitative phase microscopy based on color-multiplexed differential phase contrast. *APL Photonics*, **4 (12)**, 121301.

Hamilton, D. K., & Sheppard, C. J. R. 1984, Differential phase contrast in scanning optical microscopy. *Journal of Microscopy*, **133 (1)**, 27-39.

Hamilton, D. K., Sheppard, C. J. R., & Wilson, T. 1984. Improved imaging of phase gradients in scanning optical microscopy. *Journal of Microscopy*, **135 (3)**, 275-286.

Herman, P., Maliwal, B., Lin, H. J., & Lakowicz, J. 2001. Frequency-domain fluorescence microscopy with the LED as a light source. *Journal of Microscopy*, **203 (2)**, 176-181.

Hoffman, R. 1977. The modulation contrast microscope: principles and performance. *Journal of Microscopy*, **110 (3)**, 205-222.

Jung, D., Choi, J.-H., Kim, S., Ryu, S., Lee, W., Lee, J.-S., et al. 2017, Smartphone-based multi-contrast microscope using color-multiplexed illumination. *Scientific Reports*, **7 (1)**, 1-10.

Karakoç, Z., Ketani, M. A., & Ketani, Ş. 2016, Mikroskopların çalışma mekanizması ve çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1**, 1-6.

Kheireddine, S., Smith, Z. J., Nicolau, D. V., & Wachsmann-Hogiu, S. 2019. Simple adaptive mobile phone screen illumination for dual phone differential phase contrast (DPDPC) microscopy. *Biomed Opt Express*, **10 (9)**, 4369-4380.

Lee, D., Ryu, S., Kim, U., Jung, D., & Joo, C. 2015, Color-coded LED microscopy for multi-contrast and quantitative phase-gradient imaging. *Biomed Opt Express*, **6 (12)**, 4912-4922.

Liu, Z., Tian, L., Liu, S., & Waller, L. 2014, Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope. *J Biomed Opt*, **19 (10)**, 106002.

Majeed, H., Sridharan, S., Mir, M., Ma, L., Min, E., Jung, W., et al. 2017, Quantitative phase imaging for medical diagnosis. *J Biophotonics*, **10 (2)**, 177-205.

- Masters, B. R. 2008, History of the Optical Microscope in Cell Biology and Medicine, *eLS*.
- Nomarski, G. 1955, Microinterféromètre différentiel à ondes polarisées. *J. Phys. Rad.*, **16**, 95-135.
- Phillips, Z. F., D'Ambrosio, M. V., Tian, L., Rulison, J. J., Patel, H. S., Sadras, N., et al. 2015, Multi-Contrast Imaging and Digital Refocusing on a Mobile Microscope with a Domed LED Array. *PLoS One*, **10** (5), e0124938.
- Popescu, G. 2011, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues*: McGraw-Hill Education.
- Popescu, G., Park, Y., Lue, N., Best-Popescu, C., Deflores, L., Dasari, R. R., et al. 2008, Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*, **295** (2), C538-544.
- Tian, L., Wang, J., & Waller, L. 2014, 3D differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an LED array. *Opt Lett*, **39** (5), 1326-1329.
- Vyas, S., Li, A.-C., Lin, Y.-H., Yeh, J. A., & Luo, Y. 2022, Isotropic quantitative differential phase contrast imaging techniques: a review. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **55** (18), 183001.
- Zernike, F. 1935, Phase Contrast, *Z Tech Physik*, **16**, 454
- Zernike, F. 1942, Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, **9** (7), 686-698.
- Zernike, F. 1955, How I Discovered Phase Contrast. *Science*, **121** (3141), 345-349.
- Zheng, G., Kolner, C., & Yang, C. 2011, Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array. *Optics Letters*, **36** (20), 3987-3989.
- Zuo, C., Sun, J., Feng, S., Hu, Y., & Chen, Q. 2016, Programmable Colored Illumination Microscopy (PCIM): A practical and flexible optical staining approach for microscopic contrast enhancement. *Optics and Lasers in Engineering*, **78**, 35-47.