

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



NANOMETRE MERTEBESİNDE OPTİK CİMBİZLAMA  
KALİBRASYONU İÇİN YENİ YÖNTEMLER

Harun YÜCEL

DOKTORA TEZİ

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**NANOMETRE MERTEBESİNDE OPTİK CİMBİZLAMA  
KALİBRASYONU İÇİN YENİ YÖNTEMLER**

**Harun YÜCEL**

**FİZİK ANABİLİM DALI**

**SAMSUN  
2017**

**Her hakkı saklıdır.**

## TEZ ONAYI

**Harun YÜCEL** tarafından hazırlanan **NANOMETRE MERTEBESİNDE OPTİK CİMBİZLAMA KALİBRASYONU İÇİN YENİ YÖNTEMLER** adlı tez çalışması 29.12.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **FİZİK ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fizik Anabilim Dalı

### Jüri Üyeleri

**Başkan** Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fizik Anabilim Dalı .....

**Üye** Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fizik Anabilim Dalı .....

**Üye** Prof. Dr. Necati MENEK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Kimya Anabilim Dalı .....

**Üye** Prof. Dr. Rıza OĞUL  
Selçuk Üniversitesi  
Nükleer Fizik Anabilim Dalı .....

**Üye** Doç. Dr. Filiz Korkmaz GÖRÜR  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi  
Fizik Anabilim Dalı .....

**Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../ 2016**

.....

**Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK**  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.



29.12.2016

.....

Harun YÜCEL



# ÖZET

Doktora Tezi

## NANOMETRE MERTEBESİNDE OPTİK CIMBIZLAMA KALİBRASYONU İÇİN YENİ YÖNTEMLER

Harun YÜCEL

Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU

Mikro sistemlerin mekaniksel özelliklerinin belirlenebilmesi için mikro, nano ve nanoaltı boyutta kuvvet ve döndürücü kuvvet ölçüm yöntem ve sistemlerine ihtiyaç vardır. Ghislain ve arkadaşlarının 1993'te geliştirdikleri optiksel tuzaklanmış bir mikro küreyi prob olarak kullanan taramalı mikroskop sistemi bu ihtiyacı karşılayan önemli bir sistemdir. Daha sonra Fotonik Kuvvet Mikroskobu olarak da adlandırılan bu sistem kısaca, optiksel tuzağın oluşturduğu potansiyel kuyusunda tuzaklanan mikro boyutlu probun hareketinin izlenerek analiz edilmesine dayanır. Probonun hareketi pozisyon algılama sistemi yardımı ile takip edilir ve hareketin analizi sonucu parçacık üzerine etki eden yerel kuvvetler hakkında bilgi edinmemiz sağlanır. Probonun hareketinin izlenmesi için çeşitli yöntemler vardır. Bunların başında, prob olarak kullanılan mikro küreden ileri veya geri saçılan lazer demetini pozisyona duyarlı fotodetektör ile takip etmek gelir. Ancak bu teknik birden fazla mikro kürenin prob olarak kullanıldığı sistemler için yetersizdir. Bu durumda probun hareketinin izlenmesinde dijital video mikroskobu (DVM) kullanılmaktadır ve tuzaklanmış mikro kürenin, beyaz ışık aydınlatması altında dijital kamera ile alınan mikroskop görüntüsü incelenmektedir. Bu tezde dijital video kamera ile alınan bir yada daha fazla mikro kürenin görüntüsü üzerinde parçacıkların pozisyonlarının belirlenmesi ve izlenmesi için yöntemler önerilmektedir. İlk olarak, modifiye ettiğimiz radyal simetri merkezleri (RSM) metodu ile parçacığın şiddet dağılımının bir kısmının gözlenebildiği durumlarda da pozisyonun belirlenebileceği ve optiksel tuzağın kalibre edilebileceği, 100x mikroskop altında çıkış gücü maksimum  $40mW$  olan  $532nm$  dalga boylu lazer ile tuzaklanmış  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının DVM ile alınmış  $172.60sn$ 'lik deneysel video görüntüsü kullanılarak gösterilmiştir. Bu video görüntüsünden kesilerek elde edilen, parçacığın şiddet dağılımının bir kısmının gözlenebildiği farklı kamera konfigürasyonları ile elde edilen parçacık yörüngeleri, pozisyon dağılımları incelenmiş ve kalibrasyon sonucu elde edilen sertlik değerleri arasındaki maksimum farkın  $0.03fN/nm$  olduğu görülmüştür. Ayrıca bu tezde RSM metodu temelli geliştirilen bir algoritma ile bir birine değmeye yakın  $2.06\mu m$  çaplı iki silika parçacığın pozisyonlarının, dolayısıyla aralarındaki mesafenin daha hassas bir şekilde kestirebileceği deneysel görüntü üzerinden türetilen simülasyon görüntüleri kullanılarak saptanmıştır.

Ocak 2017, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: optiksel tuzaklama, kalibrasyon, dijital video mikroskobu, lokalizasyon, görüntü işleme

## ABSTRACT

Doctoral Dissertation

### NOVEL TECHNIQUES FOR THE CALIBRATION OF OPTICAL TWEEZERS WITH NANOMETER SCALE

Harun YÜCEL

Ondokuz Mayıs University  
Graduate School of Sciences  
Department of Physics

Supervisor: Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU

In order to examine the mechanical properties of micro systems, we must have ability to detect and measure the micro, nano and subnano scale forces and torques. In 1993 Ghislain and coworkers developed a new scanning force microscopy system which was later called Photonic Force Microscope (PFM). They used an optically trapped micro sphere, a dielectric or metallic particle, as a probe. The optical trap forms a potential well in which the probe moves randomly and makes a Brownian motion that is followed by a sensing system. The analysis of that motion gives information about the local forces acting on the probe. The probe position can be recorded by different devices detecting the forward or backward scattered laser light. Usually position sensing fotodetectors are used for this purpose. However, fotodetectors are not sufficient in the tracking of multi trapped particles and some other cases . In such cases digital video microscopes (DVM), where the particles are illuminated by white light and the images of the trapped particles are taken by digital video camera, are used. In this thesis, new techniques are suggested in order to detect, accurately, the positions of the particles in optical tweezers by using the images of the micro sized particles under DVM. These techniques are verified by using experimental data and by using the simulations. First, in the experimental system, we used 100x objective and  $532nm$  wave length laser which its output power is  $40mW$  and we observed  $2.06\mu m$  sized silica particles suspended in water for  $172.60sn$ . We applied the modified algorithm to different camera image configurations which are obtained from cutting the same experimental video frame by selecting a different part of it each time and we calibrated the trap stiffness for each camera configurations. Then we compared the trap stiffness values (the maximum difference among them is only  $0.03fN/nm$ ) and the position distributions. As a result, it is shown that the particle positions can be accurately determined and the optical tweezers can be calibrated by using a part of the intensity distribution of the trapped particle with radial symmetry centers method (RSM). In this thesis, it is also shown that the RSM can be used to predict the positions more accurately when the particles are close to contact.

January 2017, 83 pages

Key Words: optical tweezers, calibration, digital video microscopy, localization, image processing

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, uzun bir çalışma ve uğraşın sonucunda ortaya çıkardığım bu tezin oluşmasında en büyük katkı sahibi, emekli olmasına rağmen gönüllü olarak akademik danışmanlığını devam ettiren, yeri geldiğinde çalışma odasında, yeri geldiğinde evinde, yeri geldiğinde restoranlarda, çay ocaklarında özveri ile bu tezin geleceği üzerine tartıştığım, karşılaştığım büyük zorluklar karşısında bana desteğini hiç bir zaman esirgemeyen ve kendisi ile çalışmış olmakla kendimi şanslı saydığım değerli Hocam Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin konusunun belirlenmesinde önemli rolü olan ve bir süre bu tezin ikinci akademik danışmanlığını yürütmüş olan değerli bilim adamı Bilkent Üniversitesi Fizik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Giovanni VOLPE'ye, laboratuvar çalışmalarında bana olan desteğiyle önemli katkıda bulunan Dr. Sathyanarayana PALADUGU'ya ve Bilkent Üniversitesi “*ARL Soft Matter Lab*” üyelerine çalışmalarım süresince olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinin değerli üyeleri olan Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ ve Prof Dr. Necati MENEK'e ayırdıkları zaman, değerli önerileri ve bana verdikleri destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu tez çalışmasının oluşmasında büyük pay sahibi olan ve çalışmanı olduğum şirketin kendi deneysel ekipmanlarının kullanılmasına izin veren STC Elektronik Ltd. Genel Müdürü Taha ÇAĞIL'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışması sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda fikir ve önerileri ile bana destek veren değerli arkadaşlarım Dr. Seyfullah YILMAZ'a, Dr. Erdem ALKIM'a ve Dr. Serdal OKUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak benden her türlü desteği esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

29.12.2016, Samsun

Harun YÜCEL

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET . . . . .	i
ABSTRACT . . . . .	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR . . . . .	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ . . . . .	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ . . . . .	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ . . . . .	ix
1. GİRİŞ . . . . .	1
1.1. Kısmi Şiddet Dağılımı İle Kalibrasyon . . . . .	6
1.2. Temasa Yakın Parçacıkların İzlenmesi . . . . .	7
2. GENEL BİLGİLER . . . . .	9
2.1. Optiksel Tuzaklama . . . . .	10
2.1.1. Optik kuvvetlerin fiziksel kökeni . . . . .	12
2.1.2. Rayleigh rejimi . . . . .	13
2.1.3. Geometrik optik rejimi . . . . .	14
2.1.4. Geometrik optikte optiksel kuvvetler . . . . .	18
2.1.5. Geometrik optikte saçılma ve gradyant kuvvetleri . . . . .	18
2.1.6. Geometrik optikte optiksel tuzak . . . . .	21
2.1.7. Holografik optik cımbızlama . . . . .	23
2.2. Brownian Hareket . . . . .	25
2.2.1. Serbest Difüzyon . . . . .	25
2.2.2. Harmonik potansiyel altında Brownian hareket . . . . .	26
2.3. Optik Tuzaklama Kalibrasyonu . . . . .	28
2.3.1. Pozisyon kalibrasyonu . . . . .	28
2.3.2. Optiksel potansiyel analizi . . . . .	28
2.3.3. Eşbölüşüm metodu . . . . .	29
2.3.4. Yerdeğişirmelerinin kare ortalamalarının analizi (MSD) . . . . .	30
2.3.5. Otokorelasyon analizi (ACF) . . . . .	30
2.3.6. Güç spektrumu analizi (PSD) . . . . .	31
2.4. Parçacık İzleme Yöntemleri . . . . .	32
2.4.1. İmge koordinatları ve evrişim . . . . .	33
2.4.2. Kütle merkezi metodu . . . . .	34
2.4.3. Gaussian dağılım metodu . . . . .	35
2.4.4. Desen uydurma metodu . . . . .	36
2.4.5. Radyal simetri merkezleri metodu . . . . .	37
3. DENEYSEL SİSTEM ve YÖNTEM . . . . .	40
3.1. Deneysel Sistemin Kurulumu . . . . .	40
3.2. Yöntem . . . . .	43
3.2.1. Veri toplama . . . . .	43
3.2.2. Verilerin analizi . . . . .	44
3.3. Düzenegın Kalibrasyonu ve Testleri . . . . .	45
3.4. Görüntü Karakterizasyonu . . . . .	49
4. KISMİ ŞİDDET DAĞILIMI İLE KALİBRASYON . . . . .	53
4.1. Giriş . . . . .	53
4.2. Materyal ve Metot . . . . .	54
4.3. Sonuçlar . . . . .	57
5. TEMASA YAKIN PARÇACIKLARIN İZLENMESİ . . . . .	62
5.1. RSM Temelli Algoritma ve Testleri . . . . .	63
5.2. TTM Temelli Algoritma ve Testleri . . . . .	68

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER . . . . .	73
KAYNAKLAR . . . . .	75
EKLER . . . . .	79
EK 1 RSM Hesaplama Detayı . . . . .	79
EK 2 USAF 1951 Standart Çözünürlük Hedefi . . . . .	80
EK 3 Bilgisayar Program CD'si . . . . .	81
ÖZGEÇMİŞ . . . . .	83



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b>	(a) Basit bir kuvvet ölçüm aleti, (b) Yaylı kantarda skala kalibrasyonu ve $0.1kg$ kütleli cisme etkiyen yer çekimi kuvvetinin ölçümü . . . . .	2
<b>Şekil 1.2.</b>	Temel PFM düzeneği. Düzenek kabaca üç ana kısımdan oluşur. Optiksel tuzaklama, Pozisyon algılama (kuadrant foto detektör) ve Görüntüleme sistemi (DVM) (Volpe, 2008) . . . . .	5
<b>Şekil 2.1.</b>	Yaygın kullanılan optik tuzaklama düzeneğinin bir şeması. Genellikle lazer demetinin çapı mikroskop objektifinin giriş çapı kadar genişletilir. Bunun için bir Keplerian teleskop (L1 ve L2) kullanmak yeterlidir. Bir ikinci teleskop (L3 ve L4) 1:1 konfigürasyonu ile tuzağı odak düzleminde hareket ettirmek için kullanılabilir. Yüksek numerik açıklıklı mikroskop objektif optiksel tuzağı oluşturur. Pozisyon belirleme sistemi olarak pozisyon detektörü kullanılır. Aynı zamanda sistem bir mikroskop aydınlatması sayesinde CCD kamera üzerinden de izlenebilir (Neuman & Block, 2004) . . . . .	11
<b>Şekil 2.2.</b>	Optiksel tuzaklama veya manipülasyon deneylerinde kullanılan tipik cisimler ve bunlara karşılık gelen rejimler. Tuzaklama deneylerinde yaygın olarak görünür bölge veya yakın kızıl ötesi lazerlerinin kullanıldığı varsayılır (Volpe, 2008) . . . . .	12
<b>Şekil 2.3.</b>	Rayleigh rejimindeki saçılma ve gradyant kuvvetleri (Volpe, 2008) .	14
<b>Şekil 2.4.</b>	Bir lazer demetinin prizma yüzeyinden yansımaları ve kırılması (Bell, 2007) . . . . .	15
<b>Şekil 2.5.</b>	Bir elektromanyetik dalganın ışın yorumu. Işık ışınları dalga cephesine dik, Poynting vektörü ile aynı yönlüdür . . . . .	15
<b>Şekil 2.6.</b>	(a) s polarize, (b) p polarize bir ışık ışınının ( $r_i$ ), $n_i$ ve $n_t$ kırılma indisli iki ortam arasındaki yüzeyden yansımaları ( $r_r$ ) ve kırılması ( $r_t$ )	16
<b>Şekil 2.7.</b>	(a) $n_i = 1$ , $n_t = 1.5$ ve (b) $n_i = 1.5$ , $n_t = 1$ için yansımaları ve geçirgenlik katsayılarının ışının gelme açısı $\theta_i$ 'ye göre değişim grafikleri . . . . .	17
<b>Şekil 2.8.</b>	$P_i$ gücünde bir ışık ışının küresel bir parçacık ile oluşturduğu ardışık üç saçılma olayı. Şekilde her ışık ışının yanına gücü yazılmıştır. $P_{r,2}$ güçlü ışından sonra çizim sonlandırılmıştır . . . . .	19
<b>Şekil 2.9.</b>	$n_i = 1.33$ (su), $n_t = 1.42$ (silica) değerleri için bir ışının küresel cam bir parçacık üzerine etkiyen kuvvetlerin tuzaklama verimliliğinin gelme açısına göre değişim grafiği. (a)'da tüm saçılma olayları dikkate alınır, (b)'de sadece ilk iki saçılma olayı dikkate alınır . . . . .	20
<b>Şekil 2.10.</b>	Gaussian şiddet profiline sahip bir lazer demetinin bir objektif ile odaklanması ve gradyant kuvvetlerin ışın optiği ile bir parçacık üzerine oluşturacağı kuvvetler. (a)'da parçacık odak noktasından uzaktadır ve odak noktasına doğru bir kuvvet etkisi altındadır. (b)'de parçacık (a)'daki durumun tam tersi konumdadır ve yine odak noktasına doğru bir kuvvetin etkisi altındadır. (c)'de parçacık odak düzleminde odak noktasının sağ tarafında olan bir konumdadır ve yine optik kuvvetlerin toplamı parçacığı odak noktasına taşıma eğilimindedir . . . . .	21

<b>Şekil 2.11.</b>	Gradyant kuvvetlerin ışın optik tanımı. (a) Şiddeti sağdan sola doğru artan paralel ışık demeti tarafından aydınlatılan bir saydan küre. Farklı şiddet bölgelerinden gelen iki ışık ışınının küre içindeki yolu ve fotonların momentumunun değişimi sonucunda oluşan kuvvetler. Momentum korunumu gereği net kuvvet şiddetin büyük olduğu tarafa doğru küreyi hareket ettirmeye zorlar. (b)'de odaklanmış lazer demeti sayesinde bir durgun tuzaklama gösterilmektedir. Burada paralel demetin şiddet dağılımı ortada maksimumdur ve kenarlara gidildikçe azalır. Bu şiddet dağılımında ele alınan iki ışık ışınının küre içinde izlediği yol ve bu esnada momentum transferi sebebiyle oluşan kuvvetler gösterilir. Işık şiddetleri eşit olduğundan oluşan kuvvetlerinde büyüklükleri aynıdır ve küre bu merkezde sabit tutulmaya çalışılır. Burada gösterilmeyen dikey yöndeki kuvvetlerde saçılma kuvvetleri tarafından dengelenir. Küre odak merkezinden uzaklaşmaya çalıştıkça optik kuvvetler onu geri getirmeye çalışacaktır (Neuman & Block, 2004) . . . . .	22
<b>Şekil 2.12.</b>	Jones vd. (2016) tarafından hesaplanan, bir parçacığın odak civarında oluşan saçılma ( $s$ ) ve gradyant ( $g$ ) kuvvetleri için tuzaklama verimliliği katsayıları ( $Q_s$ , $Q_g$ ve $Q$ ). (a) $z$ yönünde, (b) $x$ yönündeki konum değişimine karşılık gelir . . . . .	23
<b>Şekil 2.13.</b>	(a) Holografik optik cımbızlama düzeneği faz deseni ve çoklu tuzaklar (Dufresne & Grier, 1998), (b) şekillendirilmiş demetin objektif ile odaklanması sonrasında cımbız merkezleri, (c) tuzaklanmış üç parçacığın mikroskop altındaki kamera görüntüsü . . . . .	24
<b>Şekil 2.14.</b>	(a) $2.06\mu m$ çaplı silika parçacığının su içindeki dijital video kamera ile gözlenen serbest difüzyon hareketi, (b) Yer değiştirmelerin karesinin ortalaması (kırmızı eğri) ve teorik beklenen değer (mavi çizgi) . . . . .	26
<b>Şekil 2.15.</b>	(a) Üç boyutta parçacığın hareketinin yörüngesi, (b) üç yönün her biri için MSD ve $Dt$ eğrileri. Simülasyon parametreleri $k_x = k_y = 0.1fN/nm$ , $k_z = 0.02fN/nm$ , $R = 1\mu m$ , $\eta = 0.001Ns/m^2$ , $T = 300K$ , $\Delta t = 25ms$ . . . . .	27
<b>Şekil 2.16.</b>	(a) Şekil 2.15'deki simülasyonun pozisyon dağılımı ve (b) potansiyel enerji grafiği . . . . .	29
<b>Şekil 2.17.</b>	Şekil 2.15'deki simülasyon sonuçları için MSD fit . . . . .	30
<b>Şekil 2.18.</b>	Şekil 2.15'deki simülasyon sonuçları için (a) ACF fit ve (b) PDS fit . . . . .	31
<b>Şekil 2.19.</b>	(a) İleri saçılma ile pozisyon deteksiyonu, (b) Geri saçılma ile pozisyon deteksiyonu, (c) DVM ile pozisyon deteksiyonu . . . . .	32
<b>Şekil 2.20.</b>	(a) İmge koordinat sistemi. Sıfır noktası imgenin dışındadır ve bir noktanın koordinatı $(x, y)$ formunda verilir. $R1(7, 4)$ ve $R2(6, 6.5)$ gibi, (b) $h$ evrişim matrisinin $I$ imgesi ile evrişim ( $*$ ) işlemini ( <i>convolution</i> ) . . . . .	33
<b>Şekil 2.21.</b>	(a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) binary imge, (c) teorik ve kütle merkezi koordinatları (sentroid) . . . . .	35
<b>Şekil 2.22.</b>	(a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) hedef (template) imge, (c) evrişik imge . . . . .	37
<b>Şekil 2.23.</b>	(a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) teorik $(7.5, 7.5)$ merkez ve RSM sonucu ile gradyant vektörleri . . . . .	38
<b>Şekil 3.1.</b>	STC laboratuvarında kurulan Deneysel düzeneğin bir fotoğrafı . . . . .	41
<b>Şekil 3.2.</b>	Çalışma kapsamında kurulan deneysel düzeneğin üstten görünümünün şeması . . . . .	41
<b>Şekil 3.3.</b>	Çalışma kapsamında kurulan deneysel düzeneğin mikroskop sisteminin profil görünümünün şeması . . . . .	42
<b>Şekil 3.4.</b>	Optiksel tuzaklama sisteminin iki önemli elemanı, objektif ve örnek odasının (a) şematik görünümü, (b) deneysel sistemdeki görünümü . . . . .	43

<b>Şekil 3.5.</b>	(a) Toplam $15mW$ gücünde kırmızı lazer ile yakalanmış, $2.06\mu m$ çaplı silika parçacığının $100x$ objektif ile alınmış kamera görüntüsü. (b) $5.53\mu m$ çaplı silika parçacığının $63x$ objektif ile alınmış kamera görüntüsü . . . . .	44
<b>Şekil 3.6.</b>	Soldan sağa ve yukarıdan aşağı giderek azaltılan lazer gücü altında tuzaklanmış $2.06\mu m$ çaplı silika parçacığının, tuzak içindeki Brownian hareketinin, video analizleri sonucu elde edilmiş yörüngeleri . . . . .	44
<b>Şekil 3.7.</b>	USAF 1951 satandart çözünürlük test hedefi. . . . .	45
<b>Şekil 3.8.</b>	(a)-(d) test hedefi ile görüntüleme sisteminden alınmış imgeler. Her imgenin altına (Grup_Element) numaraları yazılmıştır . . . . .	46
<b>Şekil 3.9.</b>	Normalize edilmiş pozisyon dağılımları. (a) $x$ yönünde, (b) $y$ yönünde	47
<b>Şekil 3.10.</b>	(a) Güç spektrumu yoğunluğu, (b) lazer gücüne karşılık cımbız sertliği değişimi . . . . .	48
<b>Şekil 3.11.</b>	(a) $2.06\mu m$ çaplı parçacığın $100x$ objektif altındaki görüntüsü ve şiddet dağılım profilinin çıkarıldığı eksen, (b) şiddet dağılım profili	51
<b>Şekil 3.12.</b>	(a) $5.53\mu m$ çaplı parçacıkların $63x$ objektif altında alınan görüntüsü, (b) interpolasyon yöntemiyle üretilmiş parçacık görüntüsü, (c) deneysel ve üretilmiş parçacıklar için kırmızı eksen üzerindeki şiddet dağılım profilinin grafikleri . . . . .	52
<b>Şekil 4.1.</b>	Kamera konfigürasyonları, her bir konfigürasyon için bir örnek görüntü ve her bir konfigürasyon için belirlenen parçacık yörüngeleri. (a) video görüntüsünün tümü için, (b), (c), (d) ve (e) video görüntüsünden kesilerek elde edilen yeni video görüntülerini gösterir . . . . .	56
<b>Şekil 4.2.</b>	(1) ve (2)'de herbir kamera konfigürasyonu için normalize edilmiş pozisyon dağılımları. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1'de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir . . . . .	59
<b>Şekil 4.3.</b>	(3)'de ise her bir kamera konfigürasyonu için ortalama pozisyon bilgisi gösterilir. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1'de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir . . . . .	60
<b>Şekil 5.1.</b>	Temasa yakın parçacıkların izlenmesi için önerilen RSM algoritmasının ara çıktılar ile birlikte bir şeması . . . . .	64
<b>Şekil 5.2.</b>	(a)'da iki parçacık için yapılan simülasyonunun farklı algoritmalar için elde edilen sonucu. Bağlı mesafenin çapa oranına karşılık mutlak hatanın çapa oranı gösterilir. (b)'de simülasyonun kurgusu verilir . . . . .	66
<b>Şekil 5.3.</b>	(a)'da üç parçacık için yapılan simülasyonunun farklı algoritmalar için elde edilen sonucu. Bağlı mesafenin çapa oranına karşılık mutlak hatanın çapa oranı gösterilir. (b)'de simülasyonun kurgusu verilir . . . . .	67
<b>Şekil 5.4.</b>	Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritma. (1) ve (4) simülasyon ile elde edilen parçacık görüntüleridir $I$ . Sağ altta görülen $R$ referans parçacığıdır. (2) ve (5) uydurma işleminde kullanılan hedef desenlerdir $S_C$ . (3) ve (6) evrişim (*) operatöründen sonra elde edilen imgedir. Algoritma her bir parçacık için farklı hedef desenleri ile tekrarlanır . . . . .	68
<b>Şekil 5.5.</b>	Tek parçacık ile simülasyon senaryosu. ilk dize tam halka hedef desenini, ikinci dize yarım halka hedef deseni ile gerçekleştirilir . .	69
<b>Şekil 5.6.</b>	TMM ile RSM'nin bir parçacık simülasyonu için mutlak hata karşılaştırması. (a)' TMM hesabında tam halkanın kullanıldı, (b)'de ise $3/4$ halka kullanıldı . . . . .	70
<b>Şekil 5.7.</b>	İki parçacık simülasyonu için mutlak hatanın bağlı mesafe göre değişimi. Bağlı mesafe (a)'da parçacığın çapına oranı olarak, (b)'de yüzeyden yüzeye mikron biriminde mesafe olarak ve (c)'de merkezden merkeze piksel biriminde gösterilir . . . . .	71



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b>	Farklı lazer güçleri için PDS metodu ile hesaplanan cımbız sertlik değerleri ve hataları ( $\pm$ ). Tüm değerler $fN/nm$ birimindedir . . .	49
<b>Çizelge 3.2.</b>	$2.06\mu m$ çaplı parçacığın 100x objektif altındaki görüntüsü için fit parametreleri . . . . .	50
<b>Çizelge 4.1.</b>	Optiksel tuzak sertlikleri, ( $k_x$ ) x yönü ve ( $k_y$ ) y yönünü belirtir. (Pot.) potansiyel analizi metodu, (Equ.) eşbölüşüm metodu, MSD, ACF ve PSD metotları Bölüm 2.3'de tanımlandı. Tüm birimler $fN/nm$ 'dir ve Pot. ve Equ. metotları için hata $\pm 0.09$ , diğer metotlar için hata $\pm 0.04$ 'dür. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1'de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir . . .	61

## 1 GİRİŞ

İnsanoğlunun doğadaki nesnelere davranışını, doğadaki olayların gelişimini ve neden sonuç ilişkilerini gözlemle arzusu ve yeteneği, binlerce yıl öncesinden başlayan ve bugün halen devam eden, doğayı anlama çabamıza ve öğrendiklerimizden büyük bir bilgi birikimi oluşturmamıza sebep olmuştur. Fizik bilimi bu bilgi birikiminin en önemli parçasıdır. Gökteki gezegenlerin ve yıldızların hareketlerinden atomaltı parçacıklarının davranışına kadar geniş bir alana yayılan fizik bilimi, enerji ve kuvvet gibi çeşitli kavramlar yoluyla doğanın işleyişini anlamaya çalışır. İnsanoğlu, doğanın işleyişini anladıkça, onu kontrol etmeyi ve yararına kullanmayı da öğrenir.

Fiziğin, cisimlerin bir kuvvet altındaki davranışını inceleyen dalı mekaniktir. Mekaniğin temel kavramlarından biri olan kuvvet kavramı antik çağlarda Aristotle (MÖ 384 - 322) ve Archimedes (MÖ 287 - 212) gibi düşünürler tarafından hareketsiz durma, hareket ve basit makinaların çalışma prensiplerinin açıklanmasında kullanılmıştır. Antik dönemdeki kuvvet kavramı “*Bir nesnenin hareket etmesi için sürekli bir kuvvete ihtiyaç vardır*” gibi bugün yanlış olduğunu bildiğimiz bir tanıma sahiptir. Cisimlerin hareketlerinin ve kuvvetin bugün bildiğimiz tanımı Galileo Galilei (1564 - 1642) ve Sir Isaac Newton (1642 - 1726) tarafından “*Bir nesne üzerine bir kuvvet etki etmediğinde ya durur ya da hareketini sonsuza denk sürdürür. Kuvvet cismin hareketinin yönünü veya hızını değiştirir.*” olarak yapılır. Kuvvetin bu tanımı gezegenlerin hareketini iyi bir şekilde açıklar ve bugün hala uzaya gönderilen roketlerin yörünge hesaplamaları bu ilkelere göre yapılır. Bu yaklaşımda bir cisme çok uzun süre bir kuvvet uyguladığınızda cismin hızını da çok büyük değerlere ulaştırılabilir. Oysa Albert Einstein (1879 - 1955) tarafından önerilen son bir düzeltme ile kuvvet hareket ilişkisi “*Bir cisim ışık hızından daha büyük hızlara çıkartılamaz.*” olarak sınırlandırılır.

Bugün evrendeki etkileşimleri açıklamak için dört temel kuvvetin gerekli olduğunu biliyoruz. Bunlar:

1. Güçlü Kuvvet (*Strong Force*): Nükleonları atom çekirdeğinde bir arada tutan kuvvettir ve çok kısa menzillidir.
2. Zayıf Kuvvet (*Weak Force*): Çok kısa menzillidir,  $\beta$  bozunmasının kaynağıdır, yıldızların güç elde etmesinde, elementlerin oluşmasında önemli rolü vardır. Doğal radyasyonun sorumlusudur.
3. Elektromanyetik Kuvvetler: Yüklü cisimler sahip oldukları elektrik yükü

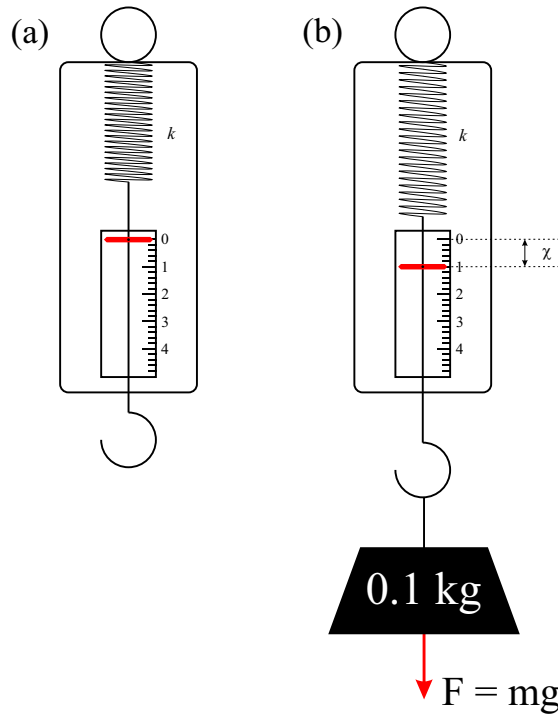
nedeniyle birbirlerinden etkilenirler. Elektromanyetik kuvvetin menzili sonsuzdur.

4. Kütle Çekimi Kuvveti: İki yada daha fazla kütle birbirlerini çekerler. Kütle çekim kuvvetinin menzili sonsuzdur.

şeklindedir. Günlük hayatımızda karşılaştığımız diğer kuvvetler bu dört temel kuvvetin çeşitli formlardaki halleridir. Örneğin Hooke kanunu ile ifade ettiğimiz yaylardaki elastik (geri çağırıcı) kuvvetler, elektromanyetik etkileşme ve Pauli dışarlama ilkesinin bir sonucu olarak cismin denge konumuna geri dönmesidir. Sürtünme kuvveti ise iki yüzey arasındaki elektromanyetik kuvvetlerin ve her iki yüzeydeki atomların birbirine geçmesine engel olan Pauli dışarlama etkisinin bir sonucudur.

Doğadaki etkileşmeler hakkındaki kesin bilgimiz, onların cisimler üzerine uyguladıkları kuvvetlerin nicel (sayısal) olarak belirlenmesine dayanır. Çeşitli etkileşmeler için çeşitli ölçüm yöntemleri vardır. En basit kuvvet ölçüm yöntemlerinden biri kalibre edilmiş skalaya sahip bir yay ile yayı geren kuvvetin belirlenmesidir. Şekil 1.1 (a)'da yaylı bir kuvvet ölçüm sistemi, (b)'de skala kalibrasyonu ve  $0.1kg$  kütleli bir cisme uygulanan yer çekimi kuvveti ölçümü gösterilmektedir.

Bu kolay sistemde esas, kuvveti belirleyici nokta, yayın gerilme miktarına denk



**Şekil 1.1.** (a) Basit bir kuvvet ölçüm aleti, (b) Yaylı kantarda skala kalibrasyonu ve  $0.1kg$  kütleli cisme etkiyen yer çekimi kuvvetinin ölçümü

gelen skala iğnesinin pozisyonundaki değişimdir. Bu değişim  $x$  kadar ise ve yay sabiti  $k$  ise Şekil 1.1 (b)'deki durum için  $kx = mg$  yazılabilir. Burada ölçüm hassasiyeti direkt olarak yay sabitine ve bir prob (gösterici) olarak kullanılan skala iğnesinin pozisyonundaki değişimin hassas bir şekilde belirlenmesine bağlıdır. Pozisyonundaki değişimin yüksek hassasiyetle belirlendiği varsayılırsa ve her yayın belli bir esneme limiti olduğu da hatırlanırsa, farklı büyüklükteki kuvvetlerin ölçümünde farklı yaylar kullanılması gerektiği anlaşılabilir.

Günlük yaşantımızda karşılaştığımız kuvvetleri bu ve benzeri aletlerle ölçmekteyiz. Bu kuvvetlerin oluşturduğu dinamiği iyi bir şekilde bilmekte ve amaçlarımız doğrultusunda kullanmaktayız. Ancak kuvvetler mikrometrik, nanometrik, nanoaltı ve moleküler skalada da vardır. Örneğin RNA polimeri transkripsiyon<sup>1</sup> (yazılma) sırasında maksimum  $14pN$  büyüklüğünde bir kuvvet uygular (Yin vd., 1995). DNA'nın mekanik özelliklerinin bilinmesi onun replikasyon<sup>2</sup> (ikileşme) ve transkripsiyon süreçlerinin yapısal dinamiğinin anlaşılması için gereklidir. Tek DNA molekülünün kuvvet ve uzamalarının ölçümü (Smith vd., 1992, 1996; Strick vd., 1996) molekülün mekanik özelliklerinin belirlenmesine imkan vermiştir. Kuvvetlerin mikro akışkanlarda da bulunduğu *lab\_on\_a\_chip*<sup>3</sup> uygulamalarında görülür (Knight, 2002). Bunların yanında ışığın doğrusal ve açısal momentum transferinde mikroskobik boyutta kuvvetler (Ashkin, 1970) ve döndürücü kuvvetler (Volke-Sepulveda vd., 2002) ürettiği görülür. Bu boyuttaki kuvvetlerin davranışı alıştığımızdan farklıdır ve çok daha karmaşıktır. Özellikle parçacıkların Brownian hareketinin sorumlusu olan ısısal gürültü her zaman vardır.

Görülebileceği gibi mikro dünyadaki kuvvetleri belirlemeye yönelik ölçüm tekniklerinin gelişmesi ve bu teknikler yardımıyla mikro dünyadaki dinamiklerin anlaşılmasına başlanması henüz çok yenidir. Bu nedenle bu tezde mikrometrik, nanometrik ve nanoaltı boyuttaki kuvvetler ile ilgileneceğiz ve bu kuvvetlerin ölçülmesinde kullanılan yöntemler üzerine çalışacağız. Söz konusu kuvvetlerin ölçümü biyofiziksel süreçlerin anlaşılması ve ileri nanoteknoloji uygulamaları için önemlidir.

Mikro sistemlerin mekaniksel özelliklerinin anlaşılması için çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. 1982'de Binnig vd. (Binnig vd., 1982) tarafından taramalı tünelleme mikroskobu (STM - *Scanning Tunneling Microscope*) keşfedilmiş ve dinamik düzeyde kristal yapılarının ve organik moleküllerinin çözülmesini sağlanmıştır. 1986'da atomik kuvvet mikroskobu (AFM - *Atomic Force Microscope*)

<sup>1</sup>DNA'yı oluşturan nükleotit dizisinin RNA polimeraz enzimi tarafından bir RNA dizisi olarak kopyalanması süreci.

<sup>2</sup>Tüm organizmalarda meydana gelen ve DNA kopyalayarak kalıtımın temelini oluşturan biyolojik bir süreç.

<sup>3</sup>Bir yada birkaç laboratuvar fonksiyonunun bir kaç milimetre boyutundaki tek bir çipin içine yerleştirildiği elektro mekanik yada elektro kimyasal sistemler.

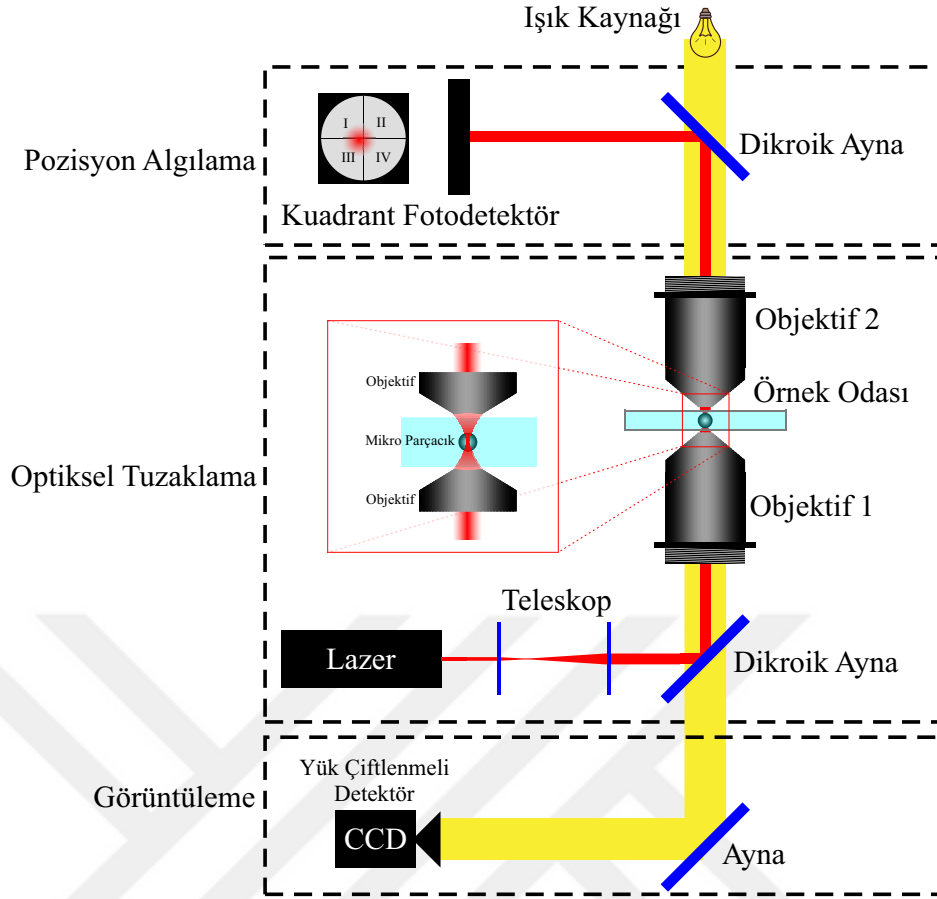
keşfedilmiştir (Binnig vd., 1986). Bu cihazlar biyolojik ve nano boyuttaki yapılar üzerine yapılan çalışmalarda geleneksel optik mikroskopların difraksiyon limit problemini çözmüş ve daha yüksek çözünürlükte, tek atom tek molekül seviyesinde, bilgi elde etmeyi sağlamıştır. Ancak bu teknikler, probu kontrol etmek için mikroskopik hassas cihazlar gerektirmektedir.

Ashkin vd. (1986) bir odaklanmış lazer demeti ile gelen radyasyon basıncını kullanarak küçük parçacıkların tuzaklanabileceğini göstermiştir. Örneğin, bir mikron büyüklüğündeki saydam bir parçacık, kırılma indisi parçacığın kırılma indisinden küçük olan bir ortamda yüksek derecede odaklanmış lazer demetinin içinde olduğunda bir optiksel tuzak oluşmuş olur (Neuman & Block, 2004). Lazer demeti, küresel parçacığın yüzeyinin farklı noktalarında farklı şiddetlerle kırılacağından bir momentum transferi oluşur ve parçacık lazer demetinin şiddetinin büyük olduğu bölgeye doğru bir geri çağırıcı kuvvetin etkisi altında kalır. Böylece parçacık odak noktası civarında tuzaklanmış olur ve bu nokta civarında Brownian hareketini sürdürür. Bu sistem literatürde optiksel tuzaklama “*Optical Trapping*” olarak, bazen de optiksel cımbızlama “*Optical Tweezers*” olarak adlandırılır.

Optiksel tuzaklamanın önemli bir uygulaması olarak, 1993’te Ghislain vd. böyle bir optiksel tuzaklanmış mikro küreyi prob olarak kullanarak (Ghislain & Webb, 1993; Ghislain vd., 1994) bir yeni çeşit taramalı kuvvet mikroskobu geliştirdiler. Daha sonra bu teknik Fotonik Kuvvet Mikroskobu (PFM - *Photonic Force Microscope*) (Florin vd., 1997) olarak adlandırıldı. Tipik bir PFM bir dielektrik veya metalik mikrometre boyutta bir parçacığı prob olarak kullandığı bir optiksel tuzak ve pozisyon algılayıcı sistemden oluşur (Şekil 1.2). Optiksel tuzak bir potansiyel kuyusu olarak ele alınabilir ve parçacık bu kuyu içinde Brownian hareketten ötürü rastgele hareket eder. Isısal hareketin analizi, parçacık üzerine etki eden yerel kuvvetler hakkında bilgi sağlar. Prob’un üç boyuttaki pozisyonu parçacıktan ileri ve geri saçılan lazer demetinin deteksiyonunu yapan cihazlarla belirlenebilir. En yaygın kullanılan cihaz kuadrant fotodiyot, pozisyona duyarlı detektör, veya bir kameradır (Neuman & Block, 2004). PFM ile  $10^{-12} - 10^{-15} N$  aralığındaki kuvvetler ölçülebilir.

Şekil 1.2’de görüldüğü gibi PFM düzeneğinde lazer kaynağından çıkan lazer demeti dikroik (dichroic) aynada yansıdıktan sonra yüksek numerik açıklıklı objektif 1 tarafından örnek odası içine odaklanır ve bu odak noktasında parçacık tuzaklanır. Objektif 2 sayesinde parçacıktan saçılan lazer demeti toplanarak pozisyona duyarlı foto detektöre yönlendirilir. Ayrıca bir ışık kaynağı ile sistem CCD kamera üzerinden de takip edilebilir. Sistemde ayrıca farklı dalga boylu ışıkların gürültü üretmesini engellemek için renk filtreleri kullanılır. Işık kaynağı, objektif ve kameradan oluşan görüntüleme sistemine dijital video mikroskobu (DVM) adı verilir.

PFM’de veya optiksel tuzaklama uygulamalarında, dış kuvvet alanının prob



**Şekil 1.2.** Temel PFM düzeneği. Düzenek kabaca üç ana kısımdan oluşur. Optiksel tuzaklama, Pozisyon algılama (kuadrant foto detektör) ve Görüntüleme sistemi (DVM) (Volpe, 2008)

üzerinde uyguladığı kuvvetin belirlenmesi için, optiksel tuzağın kuvvet kalibrasyonu yapılmalıdır. Deneysel sistemin detektör kalibrasyonu gibi özelliklerinin belirlenmesinden sonra bir yayın geri çağırıcı kuvveti gibi davranan optiksel tuzağın sertliği (*stiffness*) veya yay sabiti, probun Brownian hareketine dayalı çeşitli kalibrasyon metotlarıyla belirlenebilir. Dolayısıyla probun optiksel tuzak içindeki hareketinin (yay sabitinin) hassas bir şekilde belirlenmesi, Şekil 1.1'deki skala iğnesinin pozisyonundaki değişimin hassas bir şekilde belirlenmesi gibi, kuvvetin hassas olarak belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Burada, bu tezin konusunun probun pozisyonunun belirlenmesi üzerine odaklandığını vurgulamalıyız.

Optiksel tuzaklamanın bir diğer uygulaması da birden fazla lazer demeti kullanarak aynı ortam içinde birden fazla optiksel tuzak elde edilmesidir. Çoklu demet elde etmek için çok sayıda lazer kaynağı kullanılabilir gibi difraksiyon optiği de kullanılabilir. Lazer demetinin faz modülasyonunu gerçekleştiren SLM (Spatial Light Modulator) gibi elektro optik cihazlar yardımıyla çoklu demetler üretilebilir ve bu demetlerin pozisyonu bilgisayar yardımıyla kontrol edilebilir. Bu tür

sistemlere holografik optik cımbızlama (HOT - *Holographic Optical Tweezers*) adı verilir (Grier & Roichman, 2006). Birden fazla parçacığın tuzaklanabildiği ve ortam içinde istenilen koordinatlara yerleştirilebildiği bu tür sistemlerde parçacıkların pozisyonu direkt olarak Şekil 1.2'deki gibi CCD (yük çiflenmeli detektör) kameradan alınan görüntü (DVM) üzerinden belirlenir.

Yukarıdan da anlaşılacağı gibi yay sabiti ( $k$ ) bilinen parçacığın pozisyonunu ( $x$ ) doğru belirlemek,  $F = kx$  ifadesi ile verilen kuvvet hakkında elde edilen bilginin doğruluğunda hayati öneme sahiptir. Özellikle çoklu tuzakların izlendiği sistemlerde kameradan alınan mikroskop görüntüsü (DVM) üzerinden pozisyon belirlenmesi yapılır. Bu görüntülerin analizi için literatürde bir çok metot vardır. Öncü çalışmalardan biri Crocker & Grier (1996) tarafından yapılmıştır ve parçacığın görüntü üzerinde oluşturduğu şiddet dağılımını iki boyutlu Gaussian dağılımına uydurarak pozisyon belirlenmesi önerilmiştir.

Bu tezde esas olarak DVM ile alınan kamera görüntüsünde parçacığın pozisyonunun belirlenmesi (kalibrasyonu) için daha hassas, hızlı, kolay ve sınırlamaları esneten yeni analiz teknikleri önerilmektedir. Bu çalışmalar aşağıda kısaca ve Bölüm 4 ve Bölüm 5'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

## 1.1. Kısmi Şiddet Dağılımı İle Kalibrasyon

### Motivasyon

DVM'de bir parçacığın görüntü üzerinde oluşturduğu şiddet dağılımını bir Gaussian dağılım olarak ele alınabilir. Eğer parçacık küresel simetrik bir parçacık ise oluşturacağı şiddet dağılımını da radyal (yarıçapa göre) simetriktir. Deneysel durumda parçacığın oluşturduğu şiddet dağılımını tam olarak gözlenmeyebilir. Örneğin bir yüzeye yakın parçacığın şiddet dağılımını yüzeyin görüntüsünün difraksiyon deseni sebebiyle bozulmuş olabilir ve bu bozuk görüntü nedeniyle bulunan pozisyon bilgisi hatalı olur. Parçacık kameranın görme alanı sınırına yakın, yada kısmen dışında olabilir. Bu durumlarda mevcut algoritmalar kullanılarak parçacığın pozisyonu doğru olarak belirlenemez. Oysa bu tür durumlarda parçacığın pozisyonunun belirlenebilmesi, sistemin kalibre edilebilmesi ve ölçüm alınabilmesi için bir çözüm yöntemi bu tezde sunulmaktadır.

### Literatür

Tez çalışmasına başlandığı sırada kamera görüntüsündeki tek parçacığın pozisyonu yaygın olarak Crocker & Grier (1996) tarafından önerilen Gaussian Fit metoduyla yapılıyordu. Bunun yanında Lee vd. (1991) tarafından önerilen kütle merkezi metodu ve son zamanlarda Parthasarathy (2012) tarafından önerilen radyal simetri merkezleri metodu (RSM) da bulunmaktadır. Ancak, bu metotlar ile kamera görüntüsündeki

parçacığın şiddet dağılımının tamamı gözlenebiliyorsa pozisyon belirlenebilmektedir.

### **Çalışma**

Bir cımbızlama düzeneğinden deneysel olarak parçacık hareketi parçacığın şiddet dağılımının tamamı görülecek şekilde kayıt edildi. Daha sonra bu kayıt edilen veri üzerinde yapay olarak parçacığın şiddet dağılımı kesilerek şiddet dağılımının tamamının gözlenmediği yeni veriler oluşturuldu. Modifiye edilen RSM algoritması ile hem şiddet dağılımının tamamının gözlendiği kayıtlar hem de şiddet dağılımının bir kısmının gözlendiği kayıtlar analiz edilerek pozisyon bilgileri karşılaştırıldı.

### **Sonuçlar**

Tez çalışmasında Parthasarathy (2012) tarafından önerilen RSM metodu yeniden düzenleyerek söz konusu (şiddet dağılımının bir kısmının olduğu) durumlarda da pozisyonun doğru bir şekilde belirlenebileceği deneysel olarak gösterildi. Ayrıca, önerilen metot ile bir cımbız sisteminin kalibrasyonunun gerçekleştirilebileceği de gösterildi (Yücel & Okumuşoğlu, 2016a). Detaylı sonuçlar Bölüm 4'de verilmektedir.

## **1.2. Temasa Yakın Parçacıkların İzlenmesi**

### **Motivasyon**

Çoklu cımbızlarla çalışma durumunda çoğu zaman bir birbirine temas etmeye yakın iki parçacığın arasındaki bağıl mesafesinin ölçülmesi gereklidir. Son zamanlarda sadece iki değil üç ve daha fazla parçacığın birbirlerine göre bağıl mesafeleri mikro dünyadaki kuvvetleri ve bu kuvvetlerin oluşturduğu dinamikleri belirlemek için gereklidir Paladugu vd. (2016). Ancak mikroskop sisteminde parçacığın görüntüsü difraksiyon sebebiyle aslında olduğundan büyük görünür. Bu durum temasa yakın iki parçacığın şiddet dağılımları birbirlerinin difraksiyon deseni altında bozulacağı için pozisyonların belirlenmesinde ciddi problem oluşur (Baumgartl & Bechinger, 2005). Bu durumlarda parçacıkların pozisyonlarının doğru olarak belirlenmesi mikro dünyadaki kuvvetleri ve bu kuvvetlerin oluşturduğu dinamikleri anlamak açısından önemlidir.

### **Literatür**

Tez çalışmasının başında bu problemin çözümü için Baumgartl & Bechinger (2005) tarafından önerilen düzeltme metodu ve Ueberschär vd. (2012) tarafından önerilen şiddet uydurma (fit) metodu vardı. Bu tez çalışması sırasında konuya pratik çözüm getiren iki yeni çalışma yayınlanmıştır. Bunlardan ilki Zhang vd. (2015) tarafından önerilen desen uydurma metodu temelli bir algoritmadır. Bu algoritma doğru pozisyon belirlenmesinde bir referans parçacık kullanmaktadır ki bu durum zaten



sınırlı olan gözleme alanını daha da sınırlı hale getirir. Diğer çalışma ise Raudsepp vd. (2015) tarafından önerilen korelasyon temelli üç boyutlu izlemeye imkan veren algoritmadır. Bu algoritma temelde şiddet dağılımının bir eğriye uydurulmasına dayanır.

### **Çalışma**

Bu tez çalışmasında ilk olarak deneysel düzenden alınan görüntüler aracılığıyla parçacığın şiddet dağılımı karakterize edildi. Bu karakter bilgisi parçacığın görüntüsünü simüle etmek için kullanıldı. Bu yolla, teorik olarak pozisyonunu bildiğimiz, parçacık görüntüleri oluşturuldu. Daha sonra Parthasarathy (2012) tarafından önerilen radyal simetri merkezleri metodu temelli yeni bir algoritma önerildi ve uygulandı. En sonunda simüle edilen görüntüler üzerinden algoritmanın testleri yapıldı. Ayrıca, bu tez çalışması sırasında Zhang vd. (2015) tarafından önerilen ve aynı probleme çözüm getiren algoritmanın da testleri, simülasyonlar aracılığı ile, yapıldı.

### **Sonuçlar**

Parthasarathy (2012) tarafından önerilen RSM metodu temelli yeni bir algoritma önerildi. Simüle edilen imgeler yardımıyla iki ve üç parçacık durumları için bağıl mesafelerin doğru bir şekilde belirlenebileceği gösterildi. Ayrıca Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritmanın simülasyonlar ile testleri iki parçacık durumu için gerçekleştirildi ve bağıl mesafelerin referans parçacık kullanarak doğru bir şekilde gözlemlendiği görüldü (Yücel & Okumuşoğlu, 2016b). Detaylı sonuçlar Bölüm 5’de verilmektedir.

Bu tezde Bölüm 2’de optiksel tuzaklamanın dayandığı temel bilgiler, Brownian hareket, optiksel tuzaklamada kuvvet kalibrasyonu ve pozisyon belirleme algoritmaları hakkında temel bilgiler verilmektedir. Bölüm 3’te tez çalışmasında kurulan ve kullanılan cımbızlama düzeneği ve verilerin analizi yer almaktadır. Bölüm 4’de bir optiksel tuzağın, DVM ile gözlenen parçacığın şiddet dağılımının bir kısmını kullanarak da kalibre edilebileceği gösterilmektedir. Bölüm 5’de ise iki parçacığın bir birine yakın olduğu durumda doğru pozisyon bilgisinin elde edilmesi için bir algoritma önerilerek görüntü simülasyonlarıyla test edilmektedir. Bölüm 6’da da sonuçlar özetlenerek gelecekte yapılacak çalışmalar için öneriler sunulmaktadır.

## 2 GENEL BİLGİLER

17. yüzyıldan beri ışığın cisimler üzerine kuvvet uygulayabileceği tartışılmaktadır. 1619 'da Johannes Kepler *De Cometis* (Kepler, 1619) adlı yapıtında güneş ışınlarının kuyruklu yıldızların kuyruklarını saptırabileceğini ileri sürdü ve böylece ışığın bir basınç uygulayabileceği hakkında ilk tartışmalar başlamış oldu. 19. yüzyılın sonlarında Maxwell's elektromanyetik teorisi (Maxwell, 1881) bir ışık demetinin momentum akısının, onun şiddetiyle orantılı olduğunu gösterdi ve ışığın bir cisim üzerine yayılma doğrultusunda bir radyasyon basıncı oluşturabileceği Poynting tarafından (Poynting, 1884) gösterildi. Bunun üzerine yapılan deneysel çalışmalarda ışığın momentumu ilk kez 1901'de Lebedev (Lebedev, 1901) ve 1936'da Beth (Beth, 1936) tarafından gözlemlendi. Ancak elde edilen bulgular 1960'larda lazerlerin keşfine kadar önemsiz kaldı. Lazerleri keşfi ve gelişimi sonrası Ashkin (Ashkin, 1970; Ashkin vd., 1986) tarafından radyasyon basıncının mikro parçacıkları yakalamak ve yönlendirmek (optiksel tuzaklamak) için kullanılabilmesini teorik ve deneysel olarak gösterildi<sup>1</sup>. Bu keşfin ardından optiksel tuzaklama biyofizik, koloidal fizik ve küçük sistemlerin hidrofiziği gibi geniş bir alanda mikroskobik sistemlerin dinamiğinin incelenmesinde kullanılan çok güçlü bir yöntem haline gelmiştir.

Şekil 2.1'de yaygın olarak kullanılan bir optik tuzaklama düzeneği gösterilmektedir (Neuman & Block, 2004). Bu sistem Şekil 1.2'de gösterilen PFM sistemine benzemektedir. Şekilde lazer kaynağından çıkan lazer demeti demet genişletme ve yönlendirme sisteminden geçtikten sonra yüksek numerik açıklıklı (NA) mikroskop objektifi vasıtasıyla örnek odası içinde bir noktada sıkı bir şekilde odaklanır. Bu sayede odak noktası civarında mikro parçacıkların etkilenebileceği büyüklükte optiksel kuvvet alanı oluşturulur. Bu odak civarında bulunan mikro boyutlu bir cisim bu kuvvet alanının etkisiyle tuzaklanır. Daha sonra yönlendirme optiği vasıtasıyla tuzaklanan cisim örnek odası içinde istenilen bölgeye taşınabilir (optiksel cımbız ve optiksel manipülasyon). Pozisyon detektörü ile pozisyon belirlenir. Aynı zamanda sistem bir CCD (yük çiftlemeli detektör) kamerası üzerinden izlenebilir.

Böyle bir sistemden yararlanılarak mikroskobik boyutlu kuvvetlerin belirlenebilmesi, tuzaklanan küresel parçacığın prob olarak kullanılması ve bu

<sup>1</sup>Optiksel tuzaklamamanın tarihi gelişimi hakkında burada detaylı bir tarihçe verilmediği için bir çok önemli çalışmadan bahsedilmemiştir. Arzu edenler, detaylı bir tarihçeyi (Ashkin, 2001, 2006; Volpe, 2008) referanslarında bulabilirler.

parçacığın ısısal hareketinin analizi ile mümkündür. Probon hareketi pozisyon algılayıcı sistemler ile izlenerek belirlenir. Optiksel tuzaklama kullanılarak kuvvet ölçebilen sistemlerin dayandığı teoriyi daha iyi anlayabilmek için:

- Optik kuvvetler ve bir optik tuzağın oluşumu, Bölüm 2.1’de
- Tuzaklanmış probun Brownian hareketi, Bölüm 2.2’de
- Optik tuzaklama kalibrasyonu Bölüm 2.3’de
- Probon pozisyonunun belirlenmesi, Bölüm 2.4’de

ayrıntılarıyla ele alınmaktadır.

## 2.1. Optiksel Tuzaklama

Bir optiksel tuzak (cımbız) yüksek numerik açıklıklı ( $NA^2$ ) bir mercek tarafından sıkı bir şekilde odaklanan lazer demetiyle oluşur. Odağa yakın bölgede, bir dielektrik parçacık (prob) gelen fotonların momentum transferinden ötürü bir optiksel kuvvete maruz kalır. Optiksel kuvvet parçacık üzerine gelen radyasyon ile parçacığın etkileşmesi sonucu oluşan momentum transferinden kaynaklanır ve elektromanyetik teori ile bu etkileşme ve oluşan kuvvetler tam olarak hesaplanabilir.

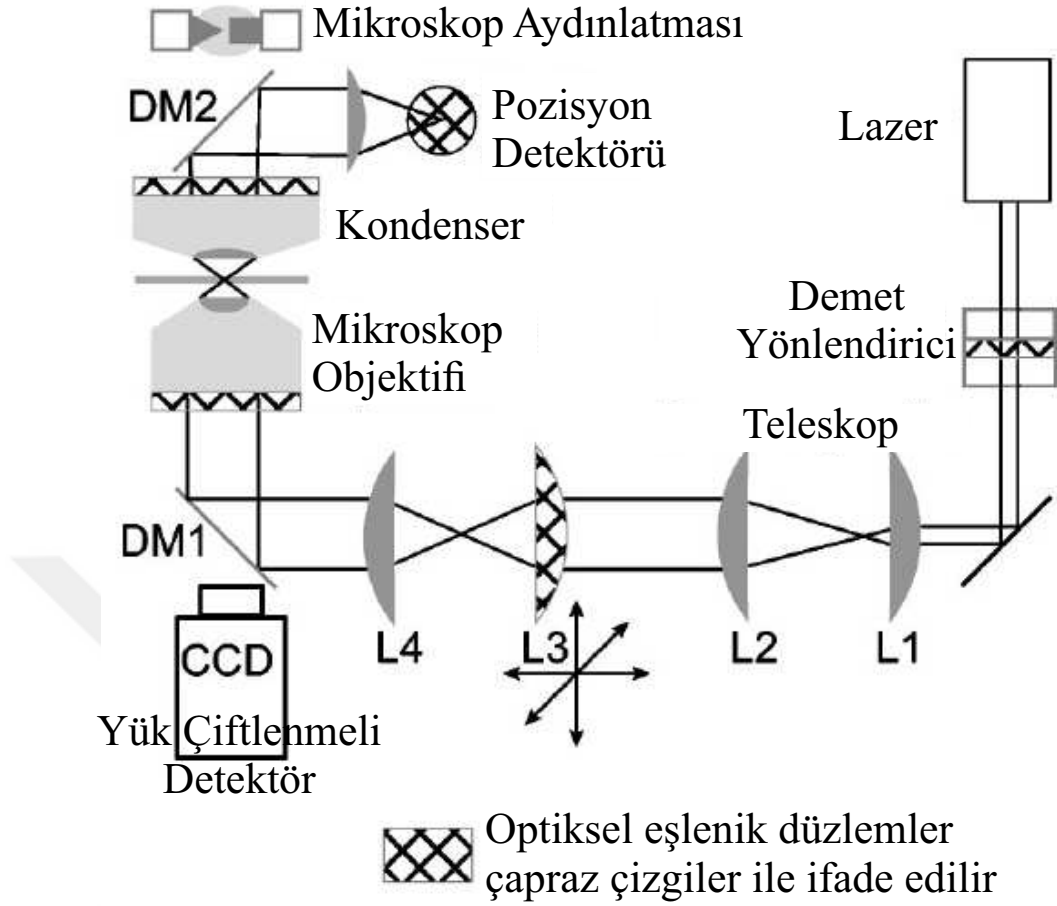
Bugün ışığın momentum taşıdığı kuantum mekaniğindeki de Broglie dalga boyu ( $\lambda$ ) bağıntısından iyi bilinir.  $\lambda$  dalga boylu bir foton  $p = h/\lambda$  ile ifade edilen bir momentum taşır. Burada  $h$  Planck sabitidir. Bir atom bir foton yayınladığında yada yakaladığında onun momentumu Newton’un kanunlarına göre değişir. Benzer bir şekilde bir cisim yüzeyinden bir foton yansıdığı yada kırıldığı da aynı momentum değişimi görülür. Ancak çoğu durumda bu kuvvet çok küçüktür ve mikro boyutlu cisimler hariç daha büyük boyutlu cisimler için ihmal edilebilir. Ağırlığı  $1\mu g$  ve boyutu  $1\mu m$ ’nin 10 katları civarında olan cisimler bu radyasyon basıncından önemli ölçüde etkilenirler.

Sıkı odaklanmış bir Gaussian lazer demeti mikro boyutlu saydam parçacıkları etkiler ve çekici bir potansiyel kuyusu gibi davranır. Odaklanmış lazer demeti, parçacığın içinden geçerken kırılmalar ve yansımalar sonucu momentum aktarımı gerçekleşir ve parçacık ışık şiddetinin güçlü olduğu tarafa doğru bir kuvvet etkisi altında kalır (Şekil 2.3, 2.10 ve 2.11). Bu kuvvete optiksel cımbızlama (“*tweezers*”) kuvveti denir. Kısaca bu kuvvet bir geri çağırıcı kuvvet gibi parçacığın pozisyonuna göre değişir dolayısıyla Hooke konunu ile ifade edilir.

$$F_x = -k_x(x - x_0) \quad (2.1)$$

Burada  $x$  parçacık pozisyonu,  $x_0$  odaklama pozisyonu ve  $k_x$  optiksel kuvvetin yay sabiti, sertliğidir ve Bölüm 2.3’de tartışılan kalibrasyon metotları ile kalibre edilerek

<sup>2</sup>Optik sistemin ışık alma açısı genişliği.

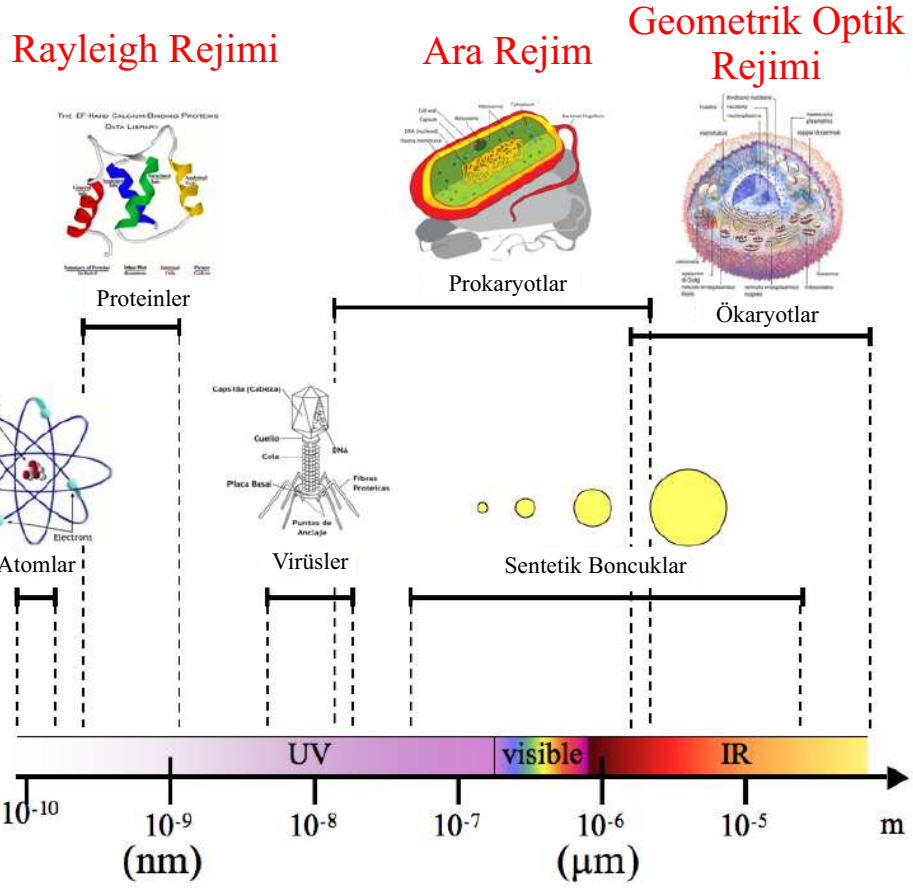


**Şekil 2.1.** Yaygın kullanılan optik tuzaklama düzeneğinin bir şeması. Genellikle lazer demetinin çapı mikroskop objektifinin giriş çapı kadar genişletilir. Bunun için bir Keplerian teleskop (L1 ve L2) kullanmak yeterlidir. Bir ikinci teleskop (L3 ve L4) 1:1 konfigürasyonu ile tuzağı odak düzleminde hareket ettirmek için kullanılabilir. Yüksek numerik açıklıklı mikroskop objektif optiksel tuzağı oluşturur. Pozisyon belirleme sistemi olarak pozisyon detektörü kullanılır. Aynı zamanda sistem bir mikroskop aydınlatması sayesinde CCD kamera üzerinden de izlenebilir (Neuman & Block, 2004)

belirlenir. Optik cımbızlama teorisinde cımbızlama için kullanılan ışığın dalga boyu  $\lambda$  ile cımbızlanan cisminin çapı  $L$  göz önüne alındığında üç farklı rejim tanımlanabilir.

1. Rayleigh rejimi,  $L \ll \lambda$
2. Ara rejim,  $L$  ile  $\lambda$  kıyaslanabilir
3. Geometrik optik rejimi,  $L \gg \lambda$ .

Şekil 2.2’de bu üç rejime giren cisimler ve bu cisimlerin boyutlarına karşılık gelen dalga boyları gösterilmiştir. Her üç rejimde de elektromanyetik denklemler çözülebilir ve cisim üzerine etki eden kuvvet hesaplanabilir. Daha detaylı bilgi için literatürden



**Şekil 2.2.** Optiksel tuzaklama veya manipülasyon deneylerinde kullanılan tipik cisimler ve bunlara karşılık gelen rejimler. Tuzaklama deneylerinde yaygın olarak görünür bölge veya yakın kızıl ötesi lazerlerinin kullanıldığı varsayılır (Volpe, 2008)

(Ashkin, 2006; Dienerowitz, 2008; Jones vd., 2016; Mazolli vd., 2003) kaynakları incelenebilir. Bu tezde tartışmayı basit tutmak ve deneysel sistem  $L \gg \lambda$  durumuna daha yakın olduğu için geometrik optik rejimi detaylı bir şekilde ele alınacaktır.

### 2.1.1. Optik kuvvetlerin fiziksel kökeni

Bir elektromanyetik alan tarafından oluşan kuvvetler, *Lorentz Kanunu* aracılığıyla ifade edilir. İçinde  $q(\mathbf{r}, t)$  yükdağılımı ve  $\mathbf{j}(\mathbf{r}, t)$  akımı bulunan  $S$  yüzeyiyle sınırlandırılmış  $V$  hacimli bir cisim üzerine etkiyen kuvvet, Maxwell denklemlerinin bir sonucu olarak Lorentz kanunuyla

$$\mathbf{F}_L(\mathbf{r}, t) = \int_V [q(\mathbf{r}, t)\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) \times \mathbf{B}(\mathbf{r}, t)] dV \quad (2.2)$$

ile ifade edilir. Burada  $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$  ve  $\mathbf{B}(\mathbf{r}, t)$  sırasıyla cisim üzerine etkiyen elektrik alan ve manyetik alanlardır. Eşitlik 2.2'deki  $\mathbf{F}_L(\mathbf{r}, t)$  Lorentz kuvvetinin hesaplanmasında kullanılan alanlar, gelen ve saçılan alanların bir süper pozisyonudur.

Mekanikteki itme - momentum teoreminden cismin doğrusal (lineer) momentumundaki değişim Lorentz kuvvetine eşittir

$$\frac{d\mathbf{P}_{mek}}{dt} = \mathbf{F}_L(r, t) \quad (2.3)$$

ve elektromanyetik alanın  $V$  hacimli cisim üzerinde oluşturacağı momentum değişimi

$$\frac{d\mathbf{P}_{em}}{dt} = \frac{d}{dt} \int_V \epsilon_0 (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) dV \quad (2.4)$$

şeklindedir. Toplam momentum değişimi, Maxwell denklemleriyle beraber

$$\begin{aligned} \frac{d(\mathbf{P}_{mek} + \mathbf{P}_{em})}{dt} = \int_V \epsilon_0 [ & \mathbf{E}(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \mathbf{E} \times (\nabla \mathbf{E} \times \mathbf{E}) \\ & + c^2(\mathbf{B}(\nabla \cdot \mathbf{B}) - \mathbf{B} \times (\nabla \times \mathbf{B})) ] dV \end{aligned} \quad (2.5)$$

olarak yazılabilir. Burada Maxwell'in stres tensörü  $\mathbf{T} = T_{\alpha\beta}$

$$T_{\alpha\beta} = \epsilon_0 \left[ E_\alpha E_\beta + c^2 B_\alpha B_\beta - \frac{1}{2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + c^2 \mathbf{B} \cdot \mathbf{B}) \delta_{\alpha\beta} \right] \quad (2.6)$$

ile birlikte toplam momentum değişimi

$$\frac{d(\mathbf{P}_{mek} + \mathbf{P}_{em})_\alpha}{dt} = \int_V \sum_\beta \frac{\partial}{\partial x_\beta} T_{\alpha\beta} dV = \oint_S \sum_\beta T_{\alpha\beta} n_\beta dS \quad (2.7)$$

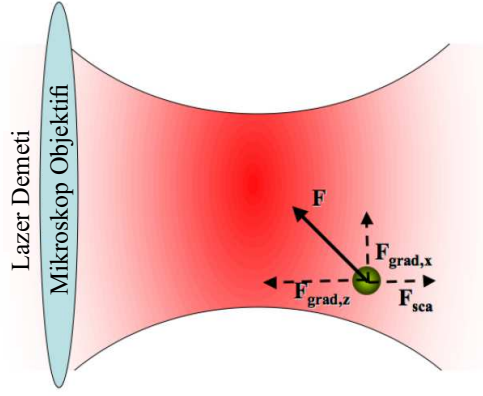
olarak yazılabilir (Volpe, 2008). Burada  $n_\beta$ , cismin hacminin dışına doğru olan  $S$  yüzeyinin normalidir. Bu eşitlik bir momentum korunumu durumudur ve bu denklem bir elektromanyetik alanın bir cisim üzerine uyguladığı kuvveti hesaplamak için kullanılır.

Optiksel cımbızlamanın teorisinde oluşan kuvvetleri hesaplamak için ara rejimde tam olarak dalga optiği ve saçılma teorisi kullanılır. Ara rejim için detaylı bir açıklama Jones vd. (2016)'nin Bölüm 5'inde bulunabilir.

### 2.1.2. Rayleigh rejimi

Tuzaklanan kürenin çapı tuzaklayıcı lazerin dalga boyundan çok küçük olduğu durumda, yani  $L \ll \lambda$ , Rayleigh saçılması durumu geçerlidir ve optiksel kuvvetler parçacığın bir dipol olduğu varsayımıyla hesaplanabilir. Bu yaklaşımda (Şekil 2.3), parçacık üzerine etkiyen net kuvvet ( $\mathbf{F}$ ) saçılma ( $\mathbf{F}_{sca}$ ) ve gradyant ( $\mathbf{F}_{grad(z,x)}$ ) kuvvetleri olmak üzere iki bileşen olarak yazılabilir. Saçılma kuvvetleri ışığın dipol tarafından soğurulması ve yeniden yayınlanması sebebiyle oluşur.  $L$  çaplı bir küre için saçılma kuvveti

$$F_{sca} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c}, \quad \sigma = \frac{128\pi^5 L^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (2.8)$$



**Şekil 2.3.** Rayleigh rejimindeki saçılma ve gradyant kuvvetleri (Volpe, 2008)

ile ifade edilir (Neuman & Block, 2004). Burada  $I_0$  gelen ışığın yoğunluğu,  $\sigma$  kürenin saçılma tesir kesiti,  $n_m$  ortamın kırılma indisi,  $c$  ışık hızı,  $m$  parçacığın kırılma indisinin, ortamın kırılma indisine oranı ( $n_p/n_m$ ) ve  $\lambda$  tuzaklayıcı lazerin dalga boyudur. Saçılma kuvvetinin yönü ışığın yayılma yönündedir.

Gradyant kuvvetleri ışık alanı ile dipolün etkileşmesinden kaynaklanır ve

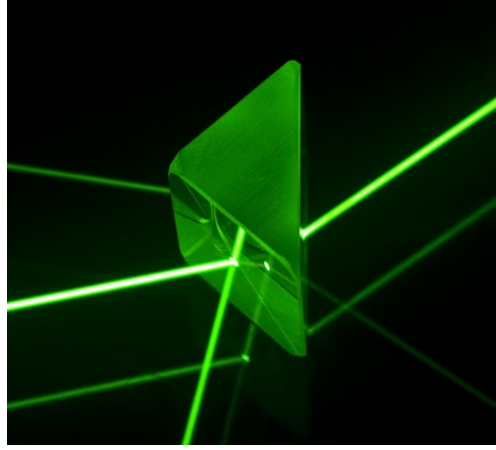
$$F_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0 \quad , \quad \alpha = n_m^2 L^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (2.9)$$

ile ifade edilir (Neuman & Block, 2004). Burada  $\alpha$  kürenin polarizebilitesidir. Gradyant kuvvetleri ışığın şiddetiyle orantılıdır.  $m > 1$  olduğunda, yani ortamın kırılma indisi parçacığın kırılma indisinden küçük olduğunda, gradyant kuvvetinin yönü şiddet merkezine doğru, aksi halde şiddet merkezinden uzağa doğrudur.

Şekil 2.3'de mekanik kuvvetin bileşenleri görülebilir. Sıkı odaklanmış lazer bir parçacığı her yönde tuzaklayabilir. Ancak saçılma kuvvetlerinin yönü ışığın yayılma yönünde olduğu için sıkı olmayan odaklanma durumunda parçacık odağın dışına itilebilir. Rayleigh rejiminin detaylı formülasyonu (Jones vd., 2016) kaynağının Bölüm 3'ünde bulunabilir.

### 2.1.3. Geometrik optik rejimi

Bir lazer demeti Şekil 2.4'deki transparan bir prizmanın yüzeyine geldiğinde, lazer demetinin bir kısmı yansıyor ve diğer kısmı kırılarak prizma içinde yoluna devam edecektir. Yansıma ve kırılma sırasında lazer demetinin yönü değiştiği için mekanik momentumu değişecek ve Newton'un etki tepki kanununa göre cisim üzerine bir kuvvet etki edecektir. Lazer demetinin etkileştiği cismin boyutu dalga boyundan büyük olduğu için ( $L \gg \lambda$ ), lazer demetinin davranışı ışık ışınları yardımıyla oldukça iyi bir şekilde tanımlanabilir. Optik cımbızlama durumunda görünür bölgedeki bir lazer demeti için söz konusu etkileşmeye maruz kalan cisim  $\mu m$  ölçülerde ise ışık ışınları yardımıyla ışığın davranışı açıklanabilir. Örneğin bir sıvı



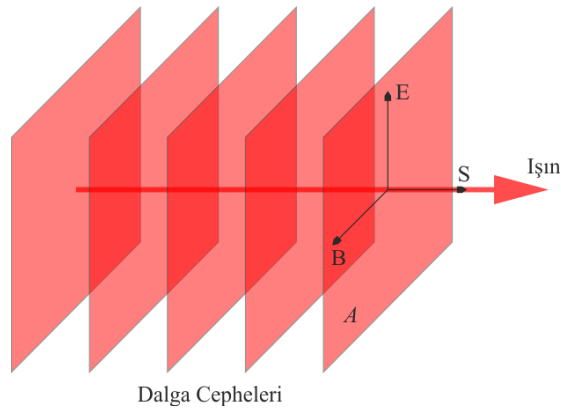
**Şekil 2.4.** Bir lazer demetinin prizma yüzeyinden yansması ve kırılması (Bell, 2007)

içine askıda bulunan ve boyutu bir kaç mikrometre olan koloidal parçacıklar, görünür bölgedeki sıkı odaklanmış bir lazer demeti tarafından tuzaklanabilir.

Bir elektromanyetik dalganın oluşturduğu enerji akısı elektromanyetik dalganın Poynting vektörü  $\vec{S}$  ile, yada birim zamanda birim alandan geçen foton sayısının enerji karşılığı ile verilir. Bu enerjinin nasıl transforme edildiğini tanımlamak için elektromnyetik dalga ışık ışınlarının bir serisi olarak ifade edilir. Bu ışık ışınları elektromnyetik dalganın dalga cephesine diktir ve dalganın ilerleme yönündedir. Örneğin Şekil 2.5’de bir düzlem dalga için ışık ışını gösterilmiştir. Bu ışık ışınının gücü

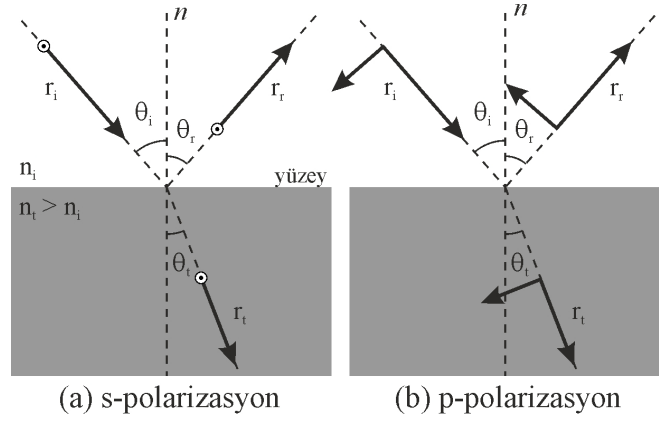
$$P = |\vec{S}|A \quad (2.10)$$

ile verilir. Bir ışık ışını iki ortam arasındaki yüzeye belli bir  $\theta_i$  gelme açısıyla geldiğinde, ortamların optik empedansları, yani kırılma indekslerine göre ışının bir kısmı yansır ve diğer kısmı kırılarak ortam değiştirir. Şekil 2.6’de gösterildiği gibi,



**Şekil 2.5.** Bir elektromanyetik dalganın ışın yorumu. Işık ışınları dalga cephesine dik, Poynting vektörü ile aynı yönlüdür





**Şekil 2.6.** (a) s polarize, (b) p polarize bir ışık ışınının ( $r_i$ ),  $n_i$  ve  $n_t$  kırılma indisli iki ortam arasındaki yüzeyden yansımaları ( $r_r$ ) ve kırılması ( $r_t$ )

ışık ışınlarının yansımaları yansıma kanununa göre,

$$\theta_i = \theta_r \quad (2.11)$$

ve kırılması Snell yasasına göre gerçekleşir.

$$n_t \sin \theta_t = n_i \sin \theta_i \quad (2.12)$$

Şekil 2.6'de dikkate alınan bir durum ise polarizasyondur. Işık ışınının geldiği ve yansıdığı düzlem referans alınarak polarize bir dalganın polarizasyonu bu düzleme dik ve düzlem üzerinde bileşenler cinsinden ifade edilebilir. Düzleme dik bileşen s polarizasyon, düzlem üzerindeki bileşen p polarizasyon olarak isimlendirilir. s polarizasyon yansıma ve kırılma esnasında değişmezken, p polarizasyon durumu yansımada yön değiştirir. Enerji korunumu gereği, gelen ışın gücü yansıyan ve kırılan ışın güçlerinin toplamı olmalıdır.

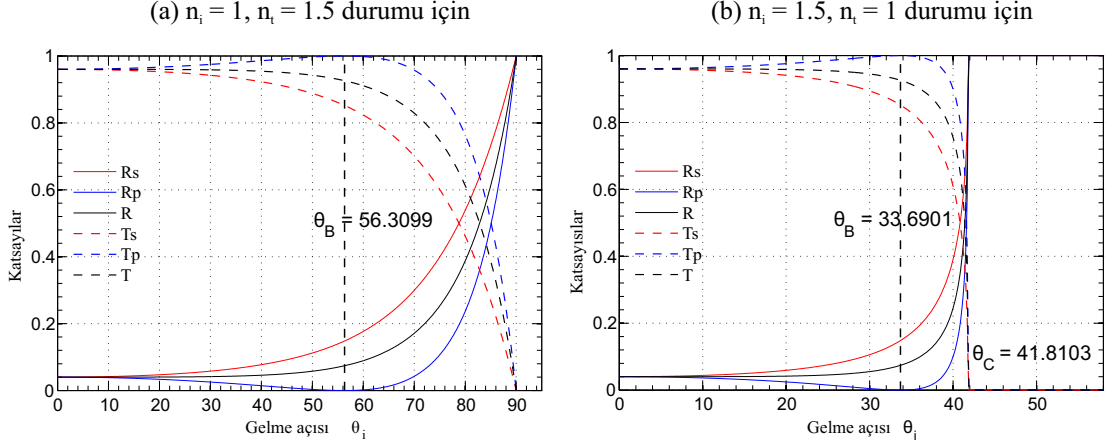
$$P_i = P_r + P_t \quad (2.13)$$

Yani güç ile ışık şiddetinin orantılı olduğu hatırlanırsa gelen ışık şiddeti, yansıyan ve kırılan ışık şiddetlerinin toplamıdır. Dolayısıyla ortamın yansıma ve geçirgenlik sabitleri bilinmelidir. Gelen ışın şiddetinin yansıyan ve kırılan ışınların şiddetlerine nasıl ayrıldığı Maxwell kanunlarından hesaplanabilir. Sonuçta toplam şiddetin iki ışın arasında bölüşümü polarizasyona bağlıdır ve *Fresnel* eşitlikleriyle ifade edilir. s polarize durum için yansıma katsayısı  $R_s$  ve geçirgenlik katsayısı  $T_s$

$$R_s = \left| \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \right|^2, \quad T_s = \frac{4n_i n_t \cos \theta_i \cos \theta_t}{|n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t|^2} \quad (2.14)$$

ile ifade edilir. p polarize ışık için yansıma katsayısı  $R_p$  ve geçirgenlik katsayısı  $T_p$

$$R_p = \left| \frac{n_i \cos \theta_t - n_t \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \right|^2, \quad T_p = \frac{4n_i n_t \cos \theta_i \cos \theta_t}{|n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i|^2} \quad (2.15)$$



**Şekil 2.7.** (a)  $n_i = 1$ ,  $n_t = 1.5$  ve (b)  $n_i = 1.5$ ,  $n_t = 1$  için yansıma ve geçirgenlik katsayılarının ışının gelme açısı  $\theta_i$ 'ye göre değişim grafikleri

ile verilir. Sonuçta  $R_s + T_s = 1$  ve  $R_p + T_p = 1$  olacağı açıktır. Polarize olmayan ışık için bu sabitler ortalama değerdedir ve

$$R = \frac{R_s + R_p}{2}, \quad T = \frac{T_s + T_p}{2} \quad (2.16)$$

olarak ifade edilir. Yansıyan ve geçen ışınların güçleri Fresnel katsayılarıyla gelen ışın gücü ile çarpımından

$$P_r = RP_i, \quad P_t = TP_i \quad (2.17)$$

hesaplanır.

Şekil 2.7'de (a)  $n_i = 1$ ,  $n_t = 1.5$  ve (b)  $n_i = 1.5$ ,  $n_t = 1$  için yansıma ve geçirgenlik katsayılarının ışının gelme açısı  $\theta_i$ 'ye göre değişim grafikleri bulunmaktadır. Grafiklerden gelen ışığın polarizasyonuna göre katsayıların farklı değerler aldığı görülebilir. Özellikle p-polarizasyon durumunda yansıma katsayısının bir  $\theta_B$  değerinde minimum değer aldığı, benzer şekilde geçirgenlik katsayısının da bu  $\theta_B$  değerinde maksimuma ulaştığı görülür. Bu açı *Brewster* açısı olarak isimlendirilir ve

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_t}{n_i}\right) \quad (2.18)$$

ile ifade edilir. Görüldüğü gibi az yoğun ortamdan çok yoğun ortama geçerken her zaman ortamlar arasında geçiş vardır ancak tersi durumda, yani çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçişte bir kritik açıdan sonra sadece yansıma olabilir. Bu kritik açı  $\theta_C$

$$\theta_C = \arcsin\left(\frac{n_t}{n_i}\right) \quad (2.19)$$

ile ifade edilir. Bu olay hem s polarize hem de p polarize ışık için geçerlidir ve *tam yansıma - total internal reflection* olarak bilinir.

#### 2.1.4. Geometrik optikte optiksel kuvvetler

$\lambda$  dalgaboylu bir foton, yani ışığın bir kuantumu, boşlukta  $E = hc/\lambda$  kadarlık bir enerji ve  $\vec{p} = (h/\lambda)\hat{u}$  ile verilen momentum<sup>3</sup> taşır. Burada  $h$  Planck sabiti,  $c$  ışığın boşluktaki hızı ve  $\hat{u}$  fotonun hareket yönünü tanımlayan birim vektördür. Böyle bir foton bir cisimden elastik olarak saçıldığında enerjisi değişmez fakat momentumu yön değiştirebilir.

$P$  gücünde bir ışık ışını bir noktadan birim zamanda geçen  $N = P/E$  adet foton taşır. Bu ışık ışını bir ayna üzerine dik bir şekilde geldiğinde tam olarak geri yansıtacak ve her bir fotonun momentum değişimi  $-2\vec{p}$  kadar olacaktır. Birim zamandaki toplam momentum değişimi  $-2N\vec{p} = -2(P/c)\hat{u}$  olur ve Newton'un etki tepki prensibine göre ayna üzerinde etkileyen geri tepme kuvveti

$$\vec{F} = \frac{2P}{c}\hat{u} \quad (2.20)$$

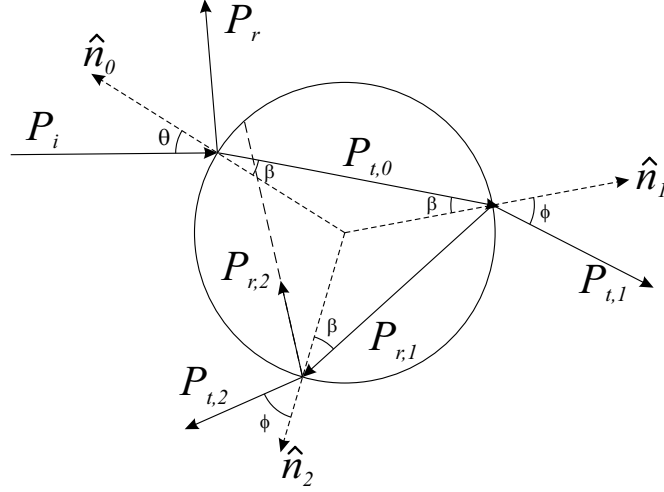
olarak ifade edilir. Bu ifade  $P$  gücünde bir lazer demetinin uygulayabileceği maksimum optiksel kuvveti ifade eder. Örneğin  $1mW$  gücünde bir lazerin maksimum uygulayabileceği kuvvet  $7 \times 10^{-12}N$ , yani 7 piconewton ( $pN$ ) dur. Bu kuvvet büyüklüğü mikroskopik yada nanoskopik dünyadaki kuvvetlerle kıyaslanabilir bir büyüklüktür.

Genelde bir cisim üzerine birden fazla ışık ışını gelir ve ışınların her biri yansıma ve kırılmadan sonra momentum değişimine uğrar. Cisim üzerine etkileyen toplam kuvvet her bir ışının oluşturduğu kuvvetlerin toplamıdır. Bunun yanında ışık ışınları cisim içinde ardışık yansımalar ve saçılmalar yapabilir ve bu sebeple oluşan kuvvetler de göz önüne alınabilir.

#### 2.1.5. Geometrik optikte saçılma ve gradyant kuvvetleri

Tuzaklanmış mikroskopik bir parçacığın üzerine etkileyen kuvvetleri anlayabilmek için minimum karmaşıklığın olduğu tek ışık ışınının küresel mikroskopik bir parçacıkla etkileşmesini göz önüne alalım (Şekil 2.8). Bir dielektrik parçacık üzerine gelen  $P_i$  gücündeki bir lazer ışını mikroskopik parçacığın yüzeyine geldiğinde, ışının bir kısmı yüzeyden  $P_r$  gücüyle yansır ve geri kalan kısmı ise  $P_{t,0}$  gücüyle parçacık içine girer. Parçacığın içinde ilerleyen ışın parçacığın sınırlarına geldiğinde yine yansıma  $(r, 1)$ ,  $(r, 2)$  ve kırılma  $(t, 1)$ ,  $(t, 2)$  olayları olur. Burada ışının yüzey sınırlarından geçerken uğradığı yansıma ve kırılma olayını bir *saçılma olayı* olarak adlandırmak bundan sonraki süreci açıklamada kolaylık sağlayacaktır. Bu şekilde ardışık saçılma olayları sayesinde parçacık içerisindeki ışının şiddeti giderek azalır. Bu ardışık saçılma olayları sonucu oluşan kuvvet (Callegari vd., 2015; Jones vd., 2016; Ashkin,

<sup>3</sup>Işığın bir ortamdaki momentum tanımı çok daha karmaşıktır ve literatürde *Abraham-Minkowski dilemma (ikilem)* adı altında hala tartışılır (Barnett & Loudon, 2010).



**Şekil 2.8.**  $P_i$  gücünde bir ışık ışının küresel bir parçacık ile oluşturduğu ardışık üç saçılma olayı. Şekilde her ışık ışının yanına gücü yazılmıştır.  $P_{r,2}$  güçlü ışından sonra çizim sonlandırılmıştır

1992)

$$\vec{F} = \frac{P_i}{c_i} \hat{u}_i - \frac{P_r}{c_i} \hat{u}_{r,0} - \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{P_{t,n}}{c_i} \hat{u}_{t,n} \quad (2.21)$$

şeklinde ifade edilir. Eşitlik 2.21’de,  $P_i$  ilk gelen ışının gücü,  $P_r$  ve  $P_t$  sırasıyla yansıyan ve kırılan ışınların güçleri ve  $c_i$  de gelen ışının ortam içindeki hızıdır.  $P_r$  ve  $P_t$  değerleri Eşitlik 2.14, 2.15 ve 2.16 ile verilen polarizasyon durumuna uygun Fresnel sabitleri ile Eşitlik 2.17 bağıntısından hesaplanır. Görüldüğü gibi parçacık içinde yansıyan ışınların oluşturduğu kuvvetler sonucu etkilemez. Sadece gelen ilk ışının, ilk yansıyan ışının ve daha sonra parçacık içinden çıkan ışınların oluşturduğu kuvvetlerin toplamı nihai kuvveti oluşturur. Yani toplam momentum değişimi parçacık üzerine etkiyen kuvveti verir. Ayrıca ışık ışınlarının yönlerini gösteren  $\hat{u}_i$ ,  $\hat{u}_r$  ve  $\hat{u}_t$  birim vektörleri yansıma ve kırılma konularından kolayca hesaplanabilir..

Tüm saçılma olayları geliş düzleminde olacağından, net kuvvetin iki ana bileşenden oluştuğu söylenebilir. Bunlardan birincisi *saçılma kuvvetleri* ( $\vec{F}_{sca}$ ) olarak isimlendirilir ve parçacığı gelen ışık yönünde iter. İkincisi ise *gradyant kuvvetleri* ( $\vec{F}_{grad}$ ) olarak isimlendirilir ve gelen ışık yönüne dik yönde parçacığı çeker. Net kuvvet

$$\vec{F} = \vec{F}_{sca} + \vec{F}_{grad} , \quad \vec{F}_{sca} = (\vec{F} \cdot \hat{u}_i) \hat{u}_i , \quad \vec{F}_{grad} = \vec{F} - \vec{F}_{sca} \quad (2.22)$$

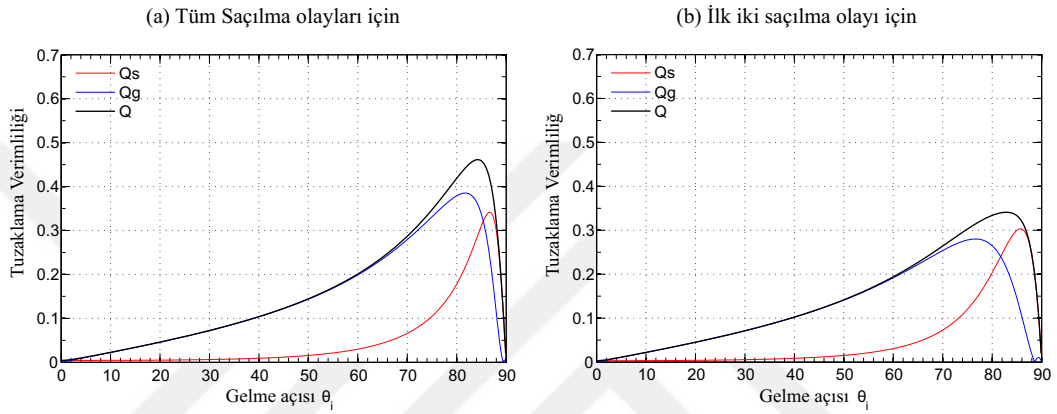
olarak yazılabilir. Gelen ışının ortam içindeki hızı  $c_i$  ile ışının gücü  $P_i$  oranı ( $c_i/P_i$ ), kuvvet büyüklükleriyle çarpıldığında boyutsuz bir parametreler elde edilir. Bu parametreler tuzaklama verimliliği “*trapping efficiencies*” ( $Q$ ) olarak adlandırılır ve saçılma ( $\vec{F}_{sca}$ ) ve gradyant kuvvetler ( $\vec{F}_{grad}$ ) için

$$Q_s = \frac{c_i}{P_i} |\vec{F}_{sca}| , \quad Q_g = \frac{c_i}{P_i} |\vec{F}_{grad}| \quad (2.23)$$

şeklinde ifade edilir.  $Q_s$  ve  $Q_g$  tuzaklama verimliliklerinden de

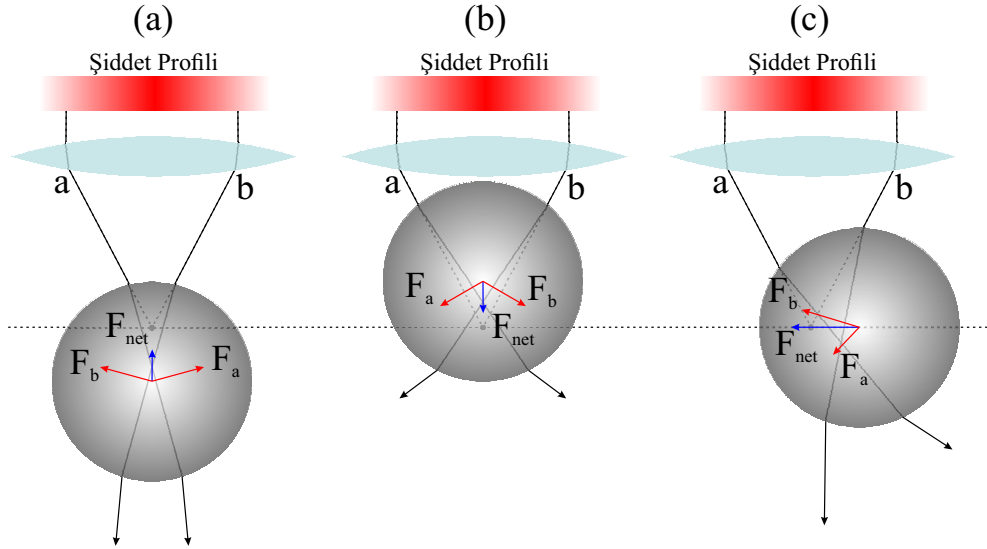
$$Q = \sqrt{Q_s^2 + Q_g^2} \quad (2.24)$$

ifadesi ile toplam tuzaklama verimliliği  $Q$  elde edilir. Şekil 2.9'de tuzaklama verimliliğinin gelme açısına göre değişiminin grafiği gösterilmektedir. Görülebileceği gibi saçılmadan kaynaklı kuvvet bileşeni büyük açılarda önem kazanmakta genellikle gradyant kuvvet bileşeni parçacık üzerine etkiyen net kuvveti oluşturmaktadır. Ayrıca gelen ışının parçacıkla etkileşmesinde büyük katkının ilk iki saçılma olayından geldiği Şekil 2.9 (b)'ye bakıldığında söylenebilir.



**Şekil 2.9.**  $n_i = 1.33$  (su),  $n_t = 1.42$  (silica) değerleri için bir ışının küresel cam bir parçacık üzerine etkiyen kuvvetlerin tuzaklama verimliliğinin gelme açısına göre değişim grafiği. (a)'da tüm saçılma olayları dikkate alınır, (b)'de sadece ilk iki saçılma olayı dikkate alınır

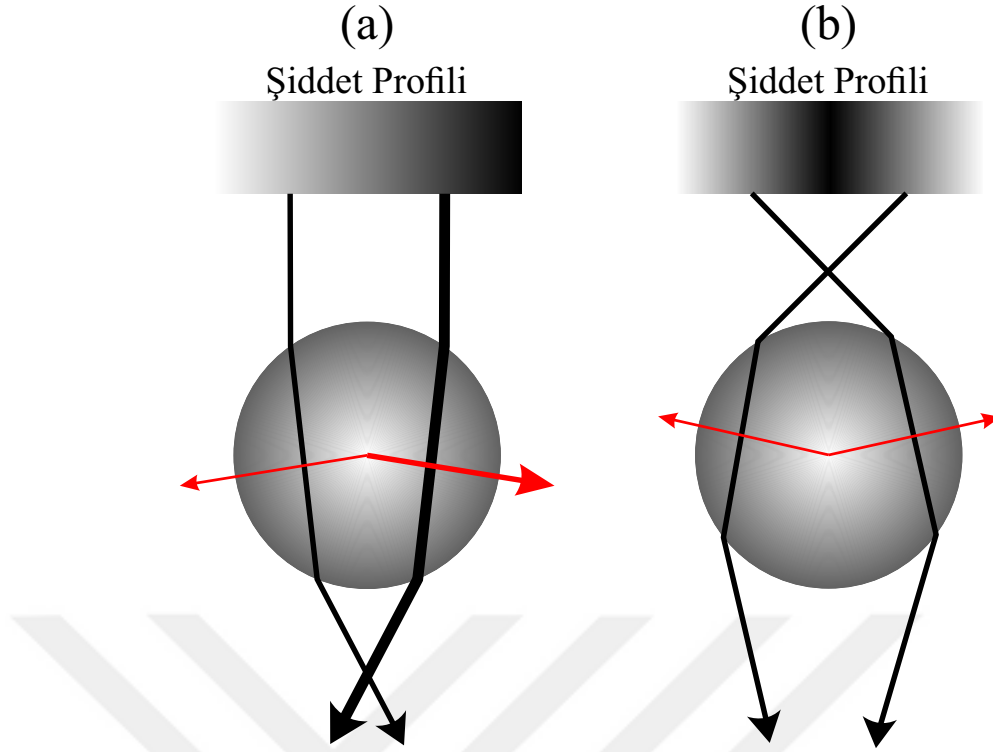
Buraya kadar bir küre üzerine gelen tek bir ışık ışınının küre üzerine oluşturacağı kuvvetler üzerine tartışıldı. Gerçekte tek bir ışın ile stabil bir tuzaklama elde etmek imkansızdır. Tek ışın için saçılma kuvveti parçacığı gelen ışın yönünde iter. Durgun bir tuzak elde etmek için en az iki demet olmalıdır. Böyle bir durum Şekil 2.10'de gösterilmektedir. Şekilde ayrıca  $z$  yönünde (demetin ilerleme yönünde) durgun bir tuzaklama oluşması için odaklanmış bir demetin kullanılması gerektiği de anlaşılır. Bu sebeple odaklayıcı objektifin numerik açıklığı (NA) önemlidir. Küçük açılarda gradyant kuvvetler baskın olduğu için saçılma kuvvetleri göz ardı edilebilir ve sadece iki saçılma olayını dikkate almak yeterlidir. Bu yaklaşımda problem daha basit hale gelir ve küre üzerine gelen ışının momentumu ile kürenin diğer yüzünden ayrılan ışınların momentum farkları bize direkt parçacığın üzerinde oluşan kuvveti verecektir. Böylece her bir ışının oluşturduğu momentum değişimi farklı yönlerde ve büyüklüklerde olacağı ve sonuçta küre üzerine etkiyen net kuvvetin momentum değişimlerinin toplamı olarak ifade edilebilir.



**Şekil 2.10.** Gaussian şiddet profiline sahip bir lazer demetinin bir objektif ile odaklanması ve gradyant kuvvetlerin ışın optiği ile bir parçacık üzerine oluşturacağı kuvvetler. (a)'da parçacık odak noktasından uzaktadır ve odak noktasına doğru bir kuvvet etkisi altındadır. (b)'de parçacık (a)'daki durumun tam tersi konumdadır ve yine odak noktasına doğru bir kuvvetin etkisi altındadır. (c)'de parçacık odak düzleminde odak noktasının sağ tarafında olan bir konumdadır ve yine optik kuvvetlerin toplamı parçacığı odak noktasına taşıma eğilimindedir

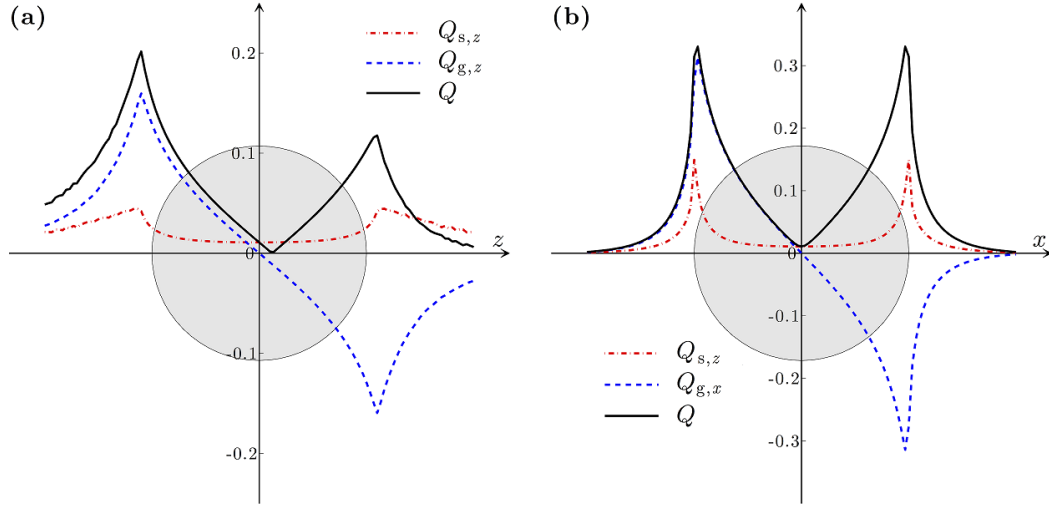
### 2.1.6. Geometrik optikte optiksel tuzak

Bir lazer kaynağının yayınladığı lazer ışınları bir demet olarak ele alınabilir ve bu demetin her bölgesindeki lazer şiddeti aynı değildir. Çoğunlukla bir lazer kaynağı Gaussian şiddet profiline sahip lazer demeti üretir. Yani demetin merkezinde şiddet maksimumdur ve merkezden uzaklaştıkça şiddet azalır. Böyle bir demet bir lens (objektif) ile odaklandığında, odak noktası civarında lazer şiddeti maksimum hale gelir. Lazer ilerlediği yönü  $z$  yönü olarak tanımlarsak,  $z$  yönünde lazer demetinin şiddeti objektif çıkışından itibaren giderek artar ve odak noktasında maksimum olur. Bu esnada lazer demetinin çapı giderek küçülür ve odak noktasında minimum olur. Odak noktasından sonra ise lazer demetinin çapı  $z$  ile artar ve lazer şiddeti giderek azalır. Dolayısıyla odak noktası civarındaki bir parçacık  $z$  yönünde şiddetin maksimum olduğu yönde bir kuvvet etkisi altında kalır. 3 boyutta düşünüldüğünde  $x$  ve  $y$  yönlerinde de durum aynıdır. Özellikler Gaussian şiddet dağılımının radyal simetrisi sebebiyle  $x$  ve  $y$  yönleri özdeş olarak ele alınabilir. objektiften ayrılan demet  $z$  yönünde ilerlediğinde çapı küçülmesine rağmen  $xy$  düzleminde şiddet dağılımı yine Gaussian'dır. Dolayısıyla demetin merkezi  $xy$  düzleminde her zaman maksimum şiddete sahiptir ve parçacık demetin merkezine doğru bir kuvvet etkisi altında kalır. Bahsedilen bu davranış Şekil 2.11'da izah edilmeye çalışılmıştır.



**Şekil 2.11.** Gradyant kuvvetlerin ışın optik tanımı. (a) Şiddeti sağdan sola doğru artan paralel ışık demeti tarafından aydınlatılan bir saydan küre. Farklı şiddet bölgelerinden gelen iki ışık ışınının küre içindeki yolu ve fotonların momentumunun değişimi sonucunda oluşan kuvvetler. Momentum korunumu gereği net kuvvet şiddetin büyük olduğu tarafa doğru küreyi hareket ettirmeye zorlar. (b)'de odaklanmış lazer demeti sayesinde bir durgun tuzaklama gösterilmektedir. Burada paralel demetin şiddet dağılımı ortada maksimumdur ve kenarlara gidildikçe azalır. Bu şiddet dağılımında ele alınan iki ışık ışınının küre içinde izlediği yol ve bu esnada momentum transferi sebebiyle oluşan kuvvetler gösterilir. Işık şiddetleri eşit olduğundan oluşan kuvvetlerinde büyüklükleri aynıdır ve küre bu merkezde sabit tutulmaya çalışılır. Burada gösterilmeyen dikey yöndeki kuvvetlerde saçılma kuvvetleri tarafından dengelenir. Küre odak merkezinden uzaklaşmaya çalıştıkça optik kuvvetler onu geri getirmeye çalışacaktır (Neuman & Block, 2004)

Şekilden anlaşılabilceği gibi parçacık her zaman odak noktasına doğru bir kuvvet hisseder. Şekil 2.12'da ise Jones vd. (2016) tarafından hesaplanan küresel bir parçacığın odak noktasına göre konumunun, parçacığın hissettiği kuvveti nasıl etkilediğine ilişkin tuzaklama verimliliği verilmektedir. (a)'da parçacığın  $z$  yönündeki konumu, (b)'de ise  $x$  yönündeki konumuna göre tuzaklama verimlilikleri verilmektedir. Şekilde  $s$  ve  $g$  indisleri ise yukarıda kullandığımız saçılma ( $sca$ ) ve gradyant ( $grad$ ) indislerine karşılık gelmektedir. Görülebileceği gibi odak noktasında parçacığın üzerine etkiyen toplam kuvvet sıfırdır ve parçacık bu konumdan uzaklaştıkça büyüyen bir kuvvet etkisi altında kalır. Buradan optik kuvvetlerin geri



**Şekil 2.12.** Jones vd. (2016) tarafından hesaplanan, bir parçacığın odak civarında oluşan saçılma ( $s$ ) ve gradyant ( $g$ ) kuvvetleri için tuzaklama verimliliği katsayıları ( $Q_s$ ,  $Q_g$  ve  $Q$ ). (a)  $z$  yönünde, (b)  $x$  yönündeki konum değişimine karşılık gelir

çağırıcı kuvvet gibi davrandıkları dolayısıyla parçacığın harmonik bir potansiyel altında olduğu söylemenin iyi bir yaklaşım olduğu görülür. Bu yaklaşımda parçacık üzerine etkiyen kuvvet, parçacık konumuna  $(x, y, z)$  bağlı olarak Hooke yasasıyla ifade edilebilir.

$$\begin{cases} F_x = -k_x(x - x_0) \\ F_y = -k_y(y - y_0) \\ F_z = -k_z(z - z_0) \end{cases}, \quad (2.25)$$

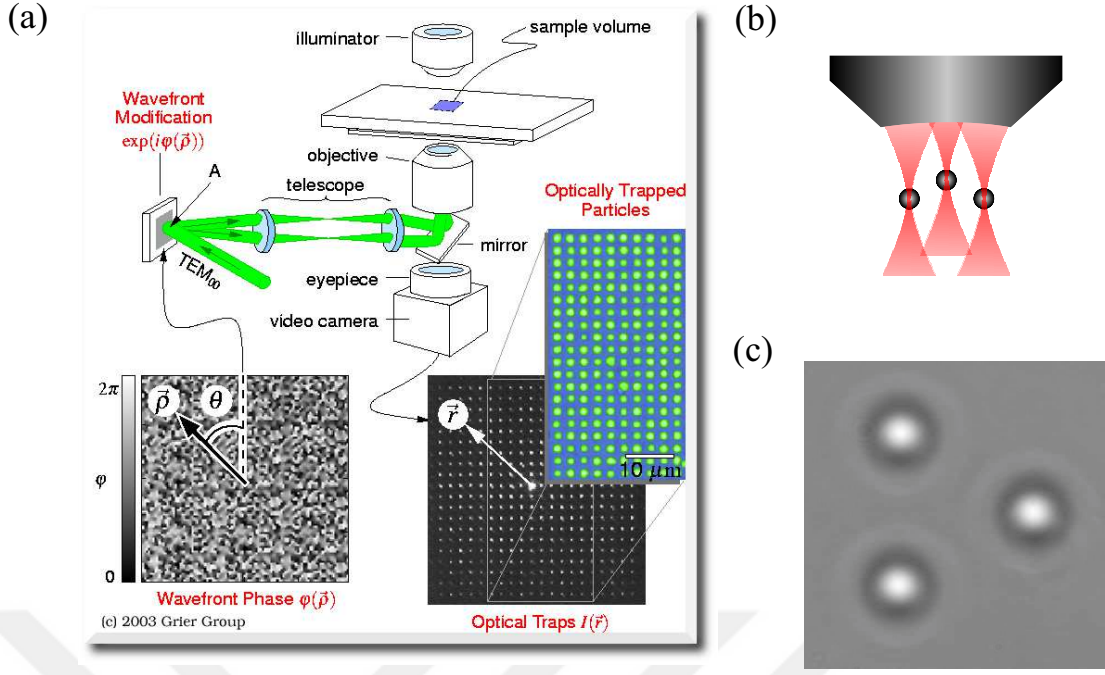
Eşitlik 2.25’de  $x_0$ ,  $y_0$  ve  $z_0$  odak noktası koordinatlarıdır. Buradaki  $k_x$ ,  $k_y$  ve  $k_z$  yay sabitleridir ve cımbızlama sertliği “*stiffness*” olarak da adlandırılır. Eşitlik 2.25’de  $k_x$  ve  $k_y$  demetin radyal simetrisinden dolayı birbirine eşittir ve demetin ilerleme yönüne diktir.  $k_z$  ise demetin ilerleme yönündedir ve daha küçüktür. Eğer demet polarize ise bu kuvvetler önemli ölçüde asimetric olabilir.

### 2.1.7. Holografik optik cımbızlama

Optik cımbızlamada, cımbızlamayı sağlayan lazer demetinin yapısı önemlidir. Dolayısıyla lazer demetinin yapısı değiştirilerek cımbızlama özellikleri değiştirilebilir. Örneğin Gaussian demet yerine Laguerre Gaussian demet kullanılabilir. Bu durumda lazer demetinin şiddet dağılımı bir halka üzerinde yoğunlaşır ve parçacıklar bu halka üzerinde tuzaklanır (Grier, 2003). Diğer ve sık kullanılan bir örnek ise silindirik bir lens ile odaklanmış çizgi cımbızıdır ki parçacıklar bir çizgi üzerinde yakalanırlar (Biancaniello & Crocker, 2006).

Görülebileceği gibi demet şekillendirme farklı özelliklere sahip tuzaklar elde





**Şekil 2.13.** (a) Holografik optik cımbızlama düzeniği faz deseni ve çoklu tuzaklar (Dufresne & Grier, 1998), (b) şekillendirilmiş demetin objektif ile odaklanması sonrasında cımbız merkezleri, (c) tuzaklanmış üç parçacığın mikroskop altındaki kamera görüntüsü

etmede önemli bir yer tutar (Dufresne & Grier, 1998; Grier & Roichman, 2006). Demeti şekillendirmenin başlıca yolu da hologramlar kullanmaktır. Günümüzde hologramlar ile demet şekillendirmek için bir elektro optik aygıt olan uzaysal ışık modülatörü SLM (Spatial Light Modulator) kullanılır. Bu aygıt sahip olduğu sıvı kristal ekran sayesinde ışığın fazını ve şiddetini modüle edebilmektedir ve bilgisayar yardımıyla SLM üzerine hologramlar yerleştirilebilmektedir. Bu sayede SLM üzerine gönderilen bir demet şekillendirilebilir. Bu cihaz holografik cımbızlamada sıklıkla , birden fazla tuzak merkezi elde etmek için kullanılır. Şekil 2.13 (a)'da ki gibi bir düzenekte objektifin çıkışında (b)'deki gibi üç trap merkezi elde edilebilir. Bu şekilde tuzaklanmış parçacıkların mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 2.13 (c)'de görülebilir. Böyle bir sistemde parçacıklar bilgisayar yardımıyla istenilen konumda tutulabilir veya istenilen konuma sürüklenebilir.

Holografik optik cımbızlamanın bir diğer avantajı da biyolojik bir dokunun arkasında cımbızlamaya imkan vermesidir. Aslında buradaki konu saçıcı bir ortamın ardında görüntü oluşturmaya girer. SLM gibi faz modüle edici cihazlar ile saçıcı ortamın ardında görüntü oluşturmak dolayısıyla lazeri odaklamak mümkündür (Vellekoop & Mosk, 2007; Čižmár vd., 2010). Hatta saçıcı bir ortamın odaklanma performansı bir merceğin odaklanma performansından daha iyi olan üstün mercekler *süperlens*'ler ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir (Park vd., 2013)

## 2.2. Brownian Hareket

Herhangi bir kişi bir mikroskop aracılığıyla suya yada bir sıvıya baktığında, rastgele bir şekilde hareket eden küçük parçacıklar gözleyebilir. Bu harekete adı verilen Brown, bu gözlemden söz eden öncülerden biridir (Brown, 1828, 1829). Daha sonra bu hareketin fiziksel temellerinin anlaşılması, aralarında A. Einstein (1905) 'nın da bulunduğu bir çok bilim insanının değerli katkılarıyla gerçekleşmiştir (Nelson vd., 1967). Bu katkılar sadece Brownian hareketini açıklamakla kalmaz aynı zamanda atomların varlığı ile ilgili evren anlayışımızı da etkiler.

Brownian hareketinin temelindeki fizik, optik cımbızlamanın, mikroskopik dünyadaki kuvvetleri (ve döndürücü kuvvetleri) ölçmede kullanılan önemli bir metot olmasını sağlamıştır. Bu sebeple, serbest Brownian parçacığının ve optik potansiyel altındaki Brownian parçacığının hareketi optik cımbızlama teorisinin anlaşılması açısından önemlidir.

### 2.2.1. Serbest Difüzyon

Bir stokastik<sup>4</sup> (rastlantısal) sistemin en basit örneği olarak, bir sıvı ve içinde rastgele hareket yapan Brownian parçacık verilebilir. Bu parçacıklar mikroskopikdir. Böyle bir parçacığın zamana bağlı hareketi Langevin eşitliği ile ifade edilir.

$$m\ddot{x}(t) = -\gamma\dot{x}(t) + \sqrt{2k_B T\gamma}W(t) \quad (2.26)$$

Burada  $x(t)$  parçacığın  $t$  zamanındaki konumu ve  $m$  parçacığın kütlesidir.  $\gamma$  parçacığı çevreleyen sıvının oluşturduğu sürtünme sabitidir ve Einstein'ın difüzyon eşitliği ile

$$\gamma = 6\pi\eta R \quad , \quad D = k_B T / \gamma \quad (2.27)$$

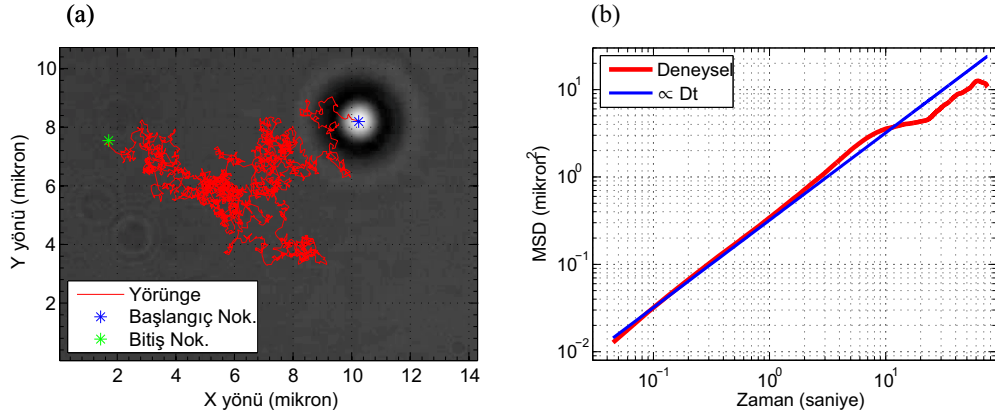
şeklinde ilişkilidir. Eşitlik 2.27'de  $D$  difüzyon sabiti,  $k_B$  Boltzmann sabiti,  $T$  mutlak sıcaklık,  $\eta$  sıvının viskozitesi ve  $R$  parçacığın yarı çapıdır.

Langevin eşitliğinin en önemli terimi  $\sqrt{2k_B T\gamma}W(t)$  ifadesidir. Bu terim parçacığın komşu sıvı molekülleriyle etkileşmesinden kaynaklı rastgele kuvvet dalgalanmalarını ifade eder. Genellikle rastgele dalgalanma bir Gaussian dağılıma sahiptir ve yeteri kadar uzun bir zaman aralığındaki ortalama değeri sıfırdır.

Eşitlik 2.26 parçacığın hem difüzyon davranışını hem de balistik davranışını aynı anda barındırır. Gerçekte yarıçapı  $R = 1\mu m$  ve kütlesi  $10pg$  olan bir parçacığın viskozitesi  $\eta = 0.001Ns/m^2$  olan  $T = 300K$  sıcaklığındaki sıvının içindeki davranışı için,  $\tau = m/\gamma$  momentum gevşeme zamanı  $0.6\mu s$  civarında olduğundan parçacığın balistik davranışı ihmal edilebilir ve Eşitlik 2.26'de  $m = 0$  alınabilir. Bu durumda yeni denklem daha basit bir forma kavuşur.

$$\gamma\dot{x}(t) = -\sqrt{2k_B T\gamma}W(t) \quad , \quad \dot{x}(t) = -\sqrt{2D}W(t) \quad (2.28)$$

<sup>4</sup>Zaman göre aldığı değeri rastlantısal olarak değişen sistemler



**Şekil 2.14.** (a)  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının su içindeki dijital video kamera ile gözlenen serbest difüzyon hareketi, (b) Yer değiştirmelerin karesinin ortalaması (kırmızı eğri) ve teorik beklenen değer (mavi çizgi)

Şekil 2.14 (a)'da  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının su içindeki dijital video kamera ile gözlenen serbest difüzyon hareketinin yörüngesi verilmektedir. Bu gözlem tez çalışmaları sırasında kurulan deneysel düzenekte dijital kamera ile  $22fps$  (Frame Per Second) hızında kayıt yapılmıştır ve sonra video kaydı pozisyon belirleyici kodlar ile analiz edilerek parçacığın yörüngesi çıkarılmıştır. Şekil 2.14 (b)'de ise serbest difüzyon hareketinin bir karakteristiğini ifade eden yer değiştirmelerinin karesinin ortalamasının (MSD - *Mean Square Displacement*) grafiği yer alır.  $\vec{r} = x\hat{i} + y\hat{j}$  iki boyutta parçacığın konum vektörü ise

$$MSD(\Delta t) = \overline{(\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t))^2} \quad (2.29)$$

ile verilir. MSD'nin zamanla grafikteki lineer değişimi göstermesi parçacığın serbest difüzyon hareketi yaptığı anlamına gelir. Grafikte deneysel verilerin teorik olarak  $Dt$  ile orantılı olduğu görülebilir. Eğer parçacık bir akım içerisinde ise veya bir dış etki içinde ise MSD  $Dt$  ile orantılı değildir.

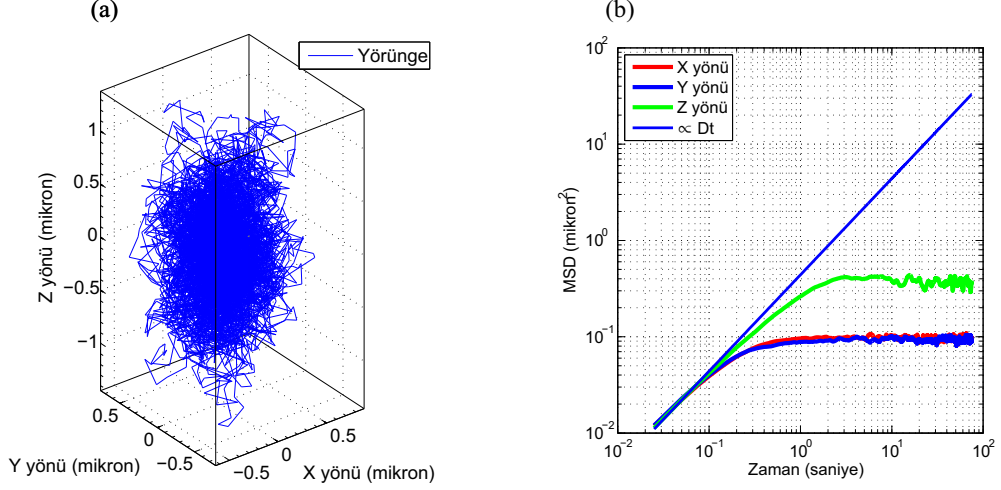
### 2.2.2. Harmonik potansiyel altında Brownian hareket

Eğer bir sıvı içindeki parçacık, sıkı odaklanmış lazer ile oluşturulmuş bir optik tuzak içinde ise, bu durumda Langevin eşitliği Eşitlik 2.26'ye benzer bir şekilde üç boyut için

$$m\ddot{\vec{r}}(t) = -\gamma\dot{\vec{r}}(t) - \vec{K} \cdot \vec{r}(t) + \sqrt{2k_B T \gamma} \vec{W}(t) \quad (2.30)$$

olarak yazılabilir. Burada  $\vec{r}(t) = [x(t), y(t), z(t)]^T$  parçacığın pozisyon vektörü ve  $\vec{K} = [k_x(t), k_y(t), k_z(t)]$  cımbız sertlik vektörüdür.  $\vec{W}(t) = [W_x(t), W_y(t), W_z(t)]^T$  ifadesi birbirinden bağımsız bileşenleri olan beyaz gürültüyü (Gaussian dağılımlı rastgele süreç) ifade eder. Sistemin çok düşük Reynold<sup>5</sup> sayısı rejiminde olduğu

<sup>5</sup>Akışkanlar mekaniğinde Reynolds sayısı(Re), bir akışkanın, atalet kuvvetlerinin viskozite kuvvetlerine olan oranıdır ve sonuç olarak bu değer bu iki tip kuvvetin belli bir akış şartı altında birbirine olan



**Şekil 2.15.** (a) Üç boyutta parçacığın hareketinin yörüngesi, (b) üç yönün her biri için MSD ve  $Dt$  eğrileri. Simülasyon parametreleri  $k_x = k_y = 0.1 fN/nm$ ,  $k_z = 0.02 fN/nm$ ,  $R = 1 \mu m$ ,  $\eta = 0.001 Ns/m^2$ ,  $T = 300 K$ ,  $\Delta t = 25 ms$

varsayılırsa, yani atalet kuvvetlerinin ihmal edilebilecek kadar küçük olduğu durumda  $m = 0$  alınabilir ve ifade

$$\dot{\vec{r}}(t) = -\frac{1}{\gamma} \vec{K} \cdot \vec{r}(t) + \sqrt{2D} \vec{W}(t) \quad (2.31)$$

olarak yazılabilir. Bu denklem numerik olarak Volpe & Volpe (2013) tarafından önerildiği gibi  $\Delta t$  zaman aralıkları için çözülebilir. Çözüm kısaca  $\vec{w}_i$  vektörünün her bir bileşeni ortalaması sıfır, varyansı  $1/\Delta t$  olan Gaussian dağılımına sahip rastgele bir sayı üretilerek

$$\vec{r}_i = \vec{r}_{i-1} - \frac{1}{\gamma} \vec{K} \cdot \vec{r}_{i-1} \Delta t + \sqrt{2D\Delta t} \vec{w}_i \quad (2.32)$$

olarak yazılır. Bu denklem kullanılarak bir potansiyel kuyusu içindeki Brownian parçacığının hareketi simüle edilebilir. Yaptığımız bir örnek simülasyonda,  $k_x = k_y = 0.1 fN/nm$ ,  $k_z = 0.02 fN/nm$  değerleri için ve yarıçapı  $R = 1 \mu m$  olan bir parçacığın viskozitesi  $\eta = 0.001 Ns/m^2$  olan  $T = 300 K$  sıcaklığındaki sıvının içindeki davranışının simülasyonu Şekil 2.15 (a)'deki gibi elde edildi. Görülebileceği gibi parçacığın hareketi optik tuzak merkezinin etrafında bir elipsoid hacme yayılır. Simülasyonda elde edilen pozisyon bilgisinin MSD analizi yapıldığında Şekil 2.15 (b)'deki sonuç elde edildi. Görülebileceği gibi MSD her yerde  $Dt$  ile orantılı değildir. Optik potansiyelin etkisi açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca  $k_z$  değerleri  $k_x$  ve  $k_y$ 'den küçük olduğu için normal difüzyon çizgisine ( $Dt$ ) daha yakın bir eğri vermektedir. Bir sonraki konu olan optiksel tuzaklama kalibrasyonunda Şekil 2.15'de sonucu verilen simülasyonun pozisyon bilgileri kullanılacaktır.

göreceli önemini verir. Bundan ötürü, Reynolds sayısı, düzgün akış ve türbülanslı akış gibi değişik akış rejimlerini nitelemek için kullanılır (Purcell, 1977).

### 2.3. Optik Tuzaklama Kalibrasyonu

Optik cımbızlama düzeneklerinde nicel bir ölçüm alabilmek için sistemin pozisyon kalibrasyonu ve optiksel tuzakın kuvvet kalibrasyonu yapılmalıdır. Bu iki parametre bilindiğinde, tuzak içinde bulunan bir parçacığa etki eden dış kuvvet nicel olarak belirlenebilir. Optiksel tuzaklama kalibrasyonunda amaç, tuzak sertlik (yay sabiti) değerlerini ( $k_x$ ,  $k_y$  ve  $k_z$ ) belirlemektir. Bu amaç için literatürde bir kaç yaygın kullanılan metot vardır. Ayrıca detaylı bilgi Jones vd. (2016); Sarshar vd. (2014) referanslarında bulunabilir.

#### 2.3.1. Pozisyon kalibrasyonu

Tuzaklanan cismin denge konumundan uzaklığının hassas olarak belirlenmesi, uygulanan kuvvetin yay sabitinin belirlenmesi için gereklidir. Bu sayede nano veya nanoaltı boyutta kuvvetlerin ölçümü sağlanabilir. Doğrudan pozisyon kalibrasyonu probun örnek odası içinde bilinen bir yer değiştirmesine karşılık CCD kamera üzerindeki yer değiştirmesinin elde edilmesiyle sağlanır. Bunun için örnek odası yerine cetveli mikrometre yada hassas üretilmiş çözünürlük test hedefleri kullanılabilir. Bu tez çalışmasında USAF 1951 standart çözünürlük hedefi kullanılmıştır (USAF, 1951). Bu hedefin yapısı ve üzerindeki çizgi kalınlıkları Ek 2’de verilmektedir. Pozisyon kalibrasyonunda noktalardan oluşmuş bir desen veya hareketli bir mikroskop tablası da kullanılabilir. Tablanın yer değiştirmesi örnek odası içinde sabit duran parçacıklardan belirlenebilir.

#### 2.3.2. Optiksel potansiyel analizi

Bölüm 2.1.6’da açıklandığı gibi bir optik tuzak geri çağırıcı kuvvet gibi davranır ve harmonik potansiyel ile iyi bir şekilde modellenir. Optik cımbızın potansiyeli her üç yönde ayrı ayrı olmak üzere  $x$  yönü için

$$U(x) = \frac{1}{2}k_x(x - \bar{x})^2 \quad (2.33)$$

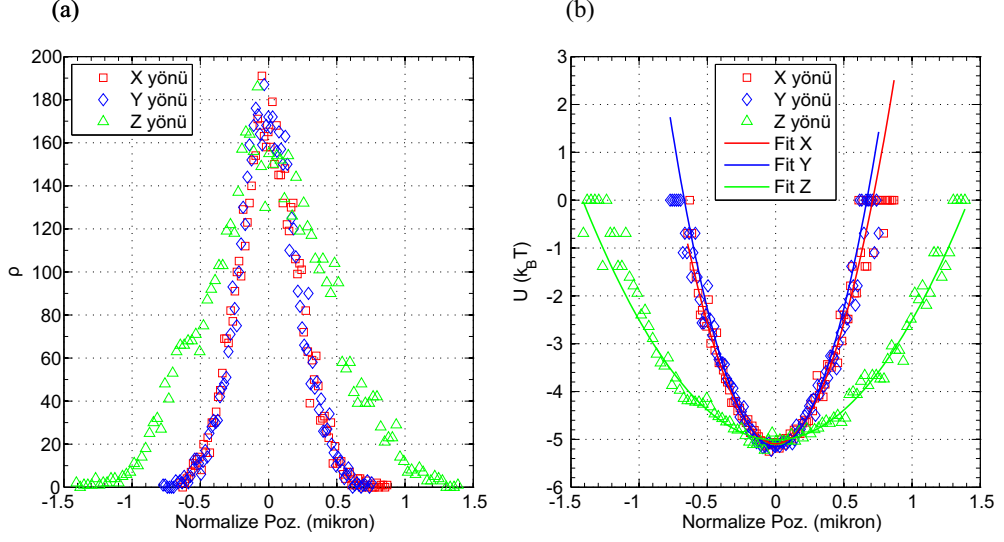
olarak yazılabilir. Diğer taraftan ısı denge durumunda Brownian parçacığın olasılık dağılımı Maxwell-Boltzmann dağılımı ile

$$\rho(x) = \rho_0 \exp \left[ -\frac{U(x)}{k_B T} \right] \quad (2.34)$$

olarak ifade edilir. Burada  $k_B$  Boltzmann sabiti,  $T$  mutlak sıcaklık tır. Bir dış kuvvet etkisi altında olmayan optik tuzaktaki parçacığın pozisyon bilgisinden olasılık yoğunluk fonksiyonu  $\rho(x)$  çıkarılabilir. Eğer  $\rho(x)$ ’i biliyorsak

$$U(x) = -k_B T \log [\rho(x)] + U_0 \quad (2.35)$$

ifadesinden potansiyeli elde edebiliriz ve deneysel olarak  $U(x)$ ’i biliyorsak harmonik potansiyele fit ederek  $k_x$  belirlenebilir. Örneğin Şekil 2.15 (a)’da sonucu verilen



**Şekil 2.16.** (a) Şekil 2.15’deki simülasyonun pozisyon dağılımı ve (b) potansiyel enerji grafiği

simülasyonda türetilen  $x$ ,  $y$  ve  $z$  pozisyon bilgilerini kullanarak, Şekil 2.16 (a)’daki dağılımlar ve (b)’deki potansiyel enerji grafiği elde edilir. Potansiyel enerji grafiğinin Eşitlik 2.33’e fit edilmesiyle  $k_x = 0.0835 fN/nm$ ,  $k_y = 0.956 fN/nm$  ve  $k_z = 0.0208 fN/nm$  değerleri elde edilir ki bu değerler simülasyonun üretici parametreleri yaklaşık olarak karşılar.

### 2.3.3. Eşbölüşüm metodu

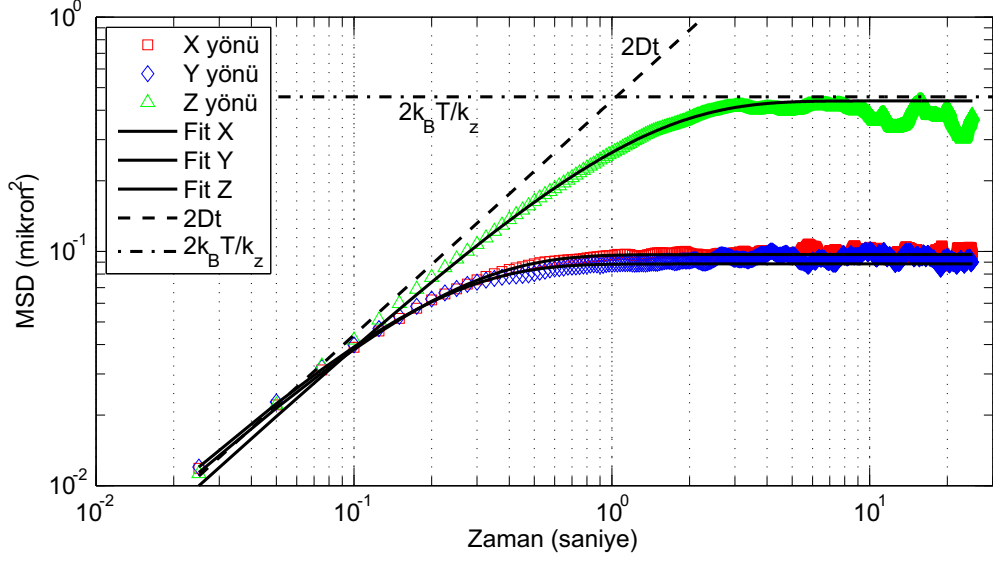
Eşbölüşüm metodu yine parçacığın Gaussian olasılık dağılımına göre bir kestirim yapar. Potansiyel enerjinin ortalaması

$$\langle U(x) \rangle = \frac{1}{2} k_x \langle (x - \bar{x})^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.36)$$

şeklinde yazılabilir. Burada  $k_B$  Boltzmann sabiti,  $T$  mutlak sıcaklık,  $x$ ,  $\bar{x}$  sırasıyla parçacığın yerdeğişimi ve onun ortalama değeridir. Buradan

$$k_x = \frac{k_B T}{\langle (x - \bar{x})^2 \rangle} \quad (2.37)$$

olarak elde edilir.  $\langle (x - \bar{x})^2 \rangle$  ifadesi yer değişimi varyansına karşılık gelir. Yani pozisyon bilgisinin standart sapmasının karesidir. Buradan kolayca tuzak sertlik değerleri hesaplanabilir. Şekil 2.15 (a)’da sonucu verilen simülasyonda türetilen  $x$ ,  $y$  ve  $z$  pozisyon bilgilerini kullanarak, eşbölüşüm metoduyla,  $k_x = 0.085 fN/nm$ ,  $k_y = 0.089 fN/nm$  ve  $k_z = 0.022 fN/nm$  değerleri elde edildi. Bu sonuçlar simülasyon parametrelerine yakındır.



**Şekil 2.17.** Şekil 2.15'deki simülasyon sonuçları için MSD fit

### 2.3.4. Yerdeğiştirmelerinin kare ortalamalarının analizi (MSD)

Daha önce Şekil 2.14 (b) ve 2.15 (b)'de MSD'nin iyi bir analiz metodu olabileceği görüldü. Hatta farklı cımbız sertliklerinin için MSD eğrilerinin farklı olduğu, difüzyon hareketi için MSD'nin  $t$  ile orantılı olduğu görüldü. Balistik hareket için ise MSD,  $t^2$  ile orantılıdır. MSD ile cımbız sertliği arasındaki ilişki

$$\text{MSD}_x(\Delta t) = \overline{[x(t + \Delta t) - x(t)]^2} = 2 \frac{k_B T}{k_x} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{|\Delta t|}{\tau_x}\right) \right] \quad (2.38)$$

ile verilir. Burada  $k_x$  cımbız sertliği,  $\tau_x = \gamma/k_x$  cımbızın karakteristik zamanıdır. Eğer biz parçacığın zaman içindeki pozisyonlarını biliyorsak MSD'yi deneysel olarak çıkarabiliriz ve elde edilen MSD'yi Eşitlik 2.38'un sağ tarafına fit ederek  $k_x$  belirlenebilir.

Şekil 2.15 (a)'da sonucu verilen simülasyonda türetilen  $x$ ,  $y$  ve  $z$  pozisyon bilgilerini kullanarak, MSD fit sonucunda Şekil 2.17'deki grafik ve  $k_x = 0.089 \text{ fN/nm}$ ,  $k_y = 0.102 \text{ fN/nm}$  ve  $k_z = 0.018 \text{ fN/nm}$  elde edildi. Bu değerler simülasyonun cımbızlama sertliği parametreleri ile uyumludur.

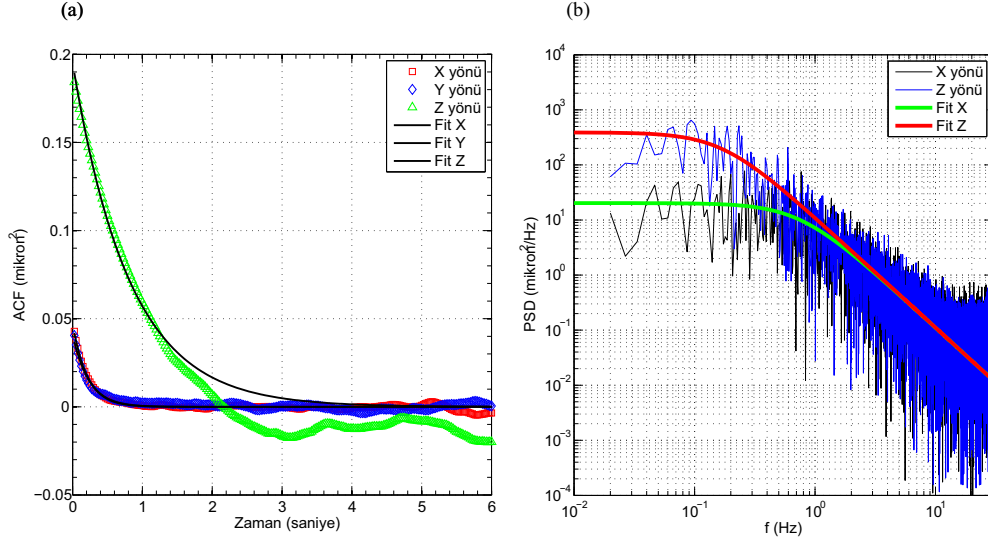
### 2.3.5. Otokorelasyon analizi (ACF)

Optik cımbızlamanın karakteristiğini çıkarmak için sıklıkla kullanılan bir diğer metot ise otokorelasyon fonksiyonu (*Autocorrelation Function* - ACF) metodudur. Otokorelasyon fonksiyonunun cımbız sertliği ile ilişkisi

$$C_x(\Delta t) = \frac{k_B T}{k_x} \exp\left(-\frac{|\Delta t|}{\tau_x}\right) \quad (2.39)$$

ile ifade edilir. Burada  $\tau = \gamma/k_x$  cımbız karakteristik zamanı ve  $k_x$  cımbız sertliğidir. MSD metodunda olduğu gibi, eğer parçacığın zaman içindeki konum değişimini





**Şekil 2.18.** Şekil 2.15’deki simülasyon sonuçları için (a) ACF fit ve (b) PDS fit

bilirsek korelasyon fonksiyonunu deneysel olarak hesaplayabiliriz. Bunun için

$$C_{x,k} = \frac{1}{N - |k|} \sum_{j=1+k}^N x_{j+k} x_j \quad (2.40)$$

ifadesi kullanılır (Jones vd., 2016). Sonuçta  $k_x$  fit edilerek elde edilebilir.

Şekil 2.18 (a)’da Şekil 2.15’deki simülasyon sonuçlarımız için ACF grafikleri verilmektedir. Sonuç olarak  $k_x = 0.1324 fN/nm$ ,  $k_y = 0.1411 fN/nm$  ve  $k_z = 0.0328 fN/nm$  elde edildi. Bu değerler simülasyonun cımbızlama sertliği parametreleri ile uyumludur.

### 2.3.6. Güç spektrumu analizi (PSD)

Şimdi optik olarak tuzaklanmış bir parçacığın yörüngesinin güç spektrumunu inceleyelim. Güç spektrumu analizinin en gerçekçi analiz olduğu söylenebilir ve literatürde diğer metotlara kıyasla daha yaygın kullanılır. Aslında güç spektrumu yöntemi frekans uzayında çalışıyor olmanın avantajlarına sahiptir. Frekans uzayında deney düzeneğinin mekanik titreşimlerinden kaynaklı gürültü kolayca elenebilir. Bu gürültü güç spektrumunda bir pik olarak görülür. Güç spektrumu hakkında bir detaylı çalışma Berg-Sørensen & Flyvbjerg (2004)’nin çalışmasında bulunabilir.

Eşitlik 2.31’deki Langevin denklemi  $f_{c,x} = k_x/(2\pi\gamma)$  köşe frekansı tanımlaması yapılarak tek boyutta

$$\frac{dx(t)}{dt} + 2\pi f_{c,x} x(t) = \sqrt{2D} W_x(t) \quad (2.41)$$

olarak yeniden yazılabilir. Bu denklemin Fourier transformu

$$2\pi(f_{c,x} - if)\check{X}(f) = \sqrt{2D}\check{W}_x(f) \quad (2.42)$$



olarak elde edilir. Buradan PSD,  $|\check{W}_x(f)|^2 = 1$  olacağından

$$P_x(f) = |\check{X}(f)|^2 = \frac{D/(2\pi^2)}{f_{c,x}^2 + f^2} \quad (2.43)$$

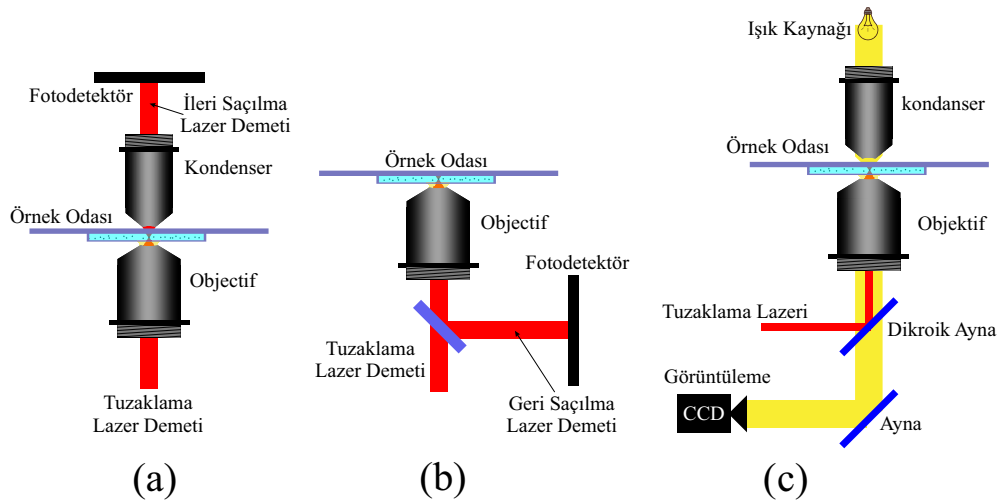
olarak yazılır (Jones vd., 2016). Görülebileceği gibi  $|\check{X}(f)|^2$  terimi parçacığın zaman içindeki konum bilgilerinin Fourier dönüşümüdür. Eğer bizim elimizde deneysel olarak zamana bağlı pozisyon bilgisi varsa numerik olarak bu bilginin Fourier transformu alınabilir ve Eşitlik 2.43'ün sağ tarafına fit edilerek köşe frekansı bulunabilir. Şekil 2.15 (a)'da sonucu verilen simülasyonda türetilen  $x$ ,  $y$  ve  $z$  pozisyon bilgilerini kullanarak köşe frekansı bulunduktan sonra  $k_x = k_y = 0.08 fN/nm$  ve  $k_z = 0.02 fN/nm$  olarak elde edildi. Şekil 2.18 (b)'de Şekil 2.15'deki simülasyon sonuçları için PSD grafikleri verilmektedir.

## 2.4. Parçacık İzleme Yöntemleri

Deneysel düzenekte parçacığın pozisyonunun belirlenmesi PFM'nin en önemli bileşenini oluşturur. Çünkü neredeyse tüm bilgiler tuzak içindeki parçacığın konumunun analiziyle elde edilir. Bu sebeple pozisyon belirlemede daha doğru metotların kullanılması önemlidir.

Tuzak içinde hareket eden parçacığın konumunu belirlemek için iki ana yöntem vardır. Bu yöntemler Şekil 2.19'de gösterilen

- Fotodetektör ile tuzaklama lazerinin parçacıktan ileri (a) veya geri (b) saçılmalarını izlemek, bak. (Volpe, 2008),
- Digital video kamera yardımıyla (c)'deki gibi mikroskoptan DVM (*Digital Video Microscopy*) ile parçacıkları gözlemek, bak. (Crocker & Grier, 1996),



**Şekil 2.19.** (a) İleri saçılma ile pozisyon deteksiyonu, (b) Geri saçılma ile pozisyon deteksiyonu, (c) DVM ile pozisyon deteksiyonu

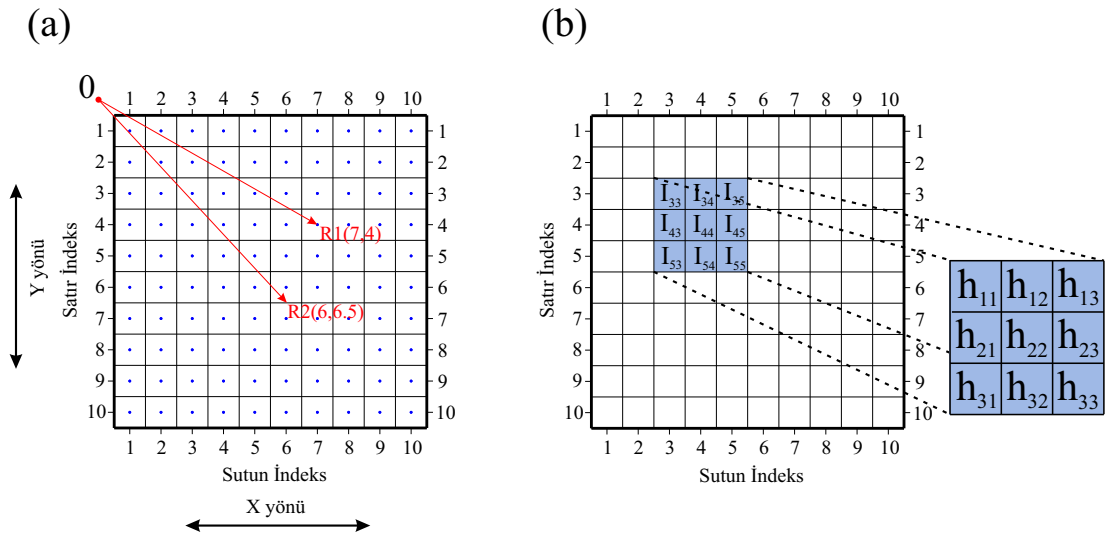
şeklinde.

Geri ve ileri saçılma yöntemlerinde detektör olarak pozisyona duyarlı fotodetektörler (PSD - *Position Sensing Detektor*) yada kuadrant fotodetektörler (QPT *Quadrant Photodetektor*) kullanılır. Bu sistemler analog yapıda olduğu için birim zamanda daha fazla veri almak açısından avantajlıdır. Ancak iki ve çok parçacığın aynı anda gözlemlenmesinde yetersizdirler. DVM tekniği ise detektör olarak dijital bir video kamera (CMOS yada CCD) kullanılır. Bu cihazlar daha yavaş olmasına rağmen çok sayıda parçacığı aynı anda gözlemlemeye olanak sağladıkları için avantajlıdır. Arzu edenler pozisyon belirleme yöntemlerinin daha detaylı tartışıldığı (Cheezum vd., 2001; Keen vd., 2007) referansını inceleyebilirler.

Bu tez çalışmasında DVM kullanıldığı için DVM’de kullanılan analiz teknikleri hakkında detaylı bilgi verilecektir.

#### 2.4.1. İmge koordinatları ve evrişim

Kameradan alınan bir  $I_{N \times M}$  imgesi genellikle  $i = 1, 2, \dots, N$  yukarıdan aşağıya,  $j = 1, 2, \dots, M$  soldan sağa sütundan oluşan bir matris olarak ifade edilir. Bu imge üzerinde bir noktayı belirtmek için imgenin satır ve sütun indekslerini kullanmak çoğu durumda kolaylık sağlar. Şekil 2.20 (a)’da  $10 \times 10$  boyutlu bir imge üzerinde koordinat sistemi tanımlanmaktadır. Görülebileceği gibi sıfır noktası imgenin dışındadır. Bu sistemde bir  $R$  noktası  $(x, y)$  bileşenleri ile ifade edilebilir.  $x$  bileşeni X yönündeki indeksi,  $y$  bileşeni de Y yönündeki indeksi belirtir. Şekilde  $R1(7, 4)$  noktası ile  $R2(6, 6.5)$  noktası örnek olarak gösterilmektedir. Bu koordinat sisteminde bir çok matematiksel işlem alışıla geldiği gibi kullanılabilir. Ancak, Y yönündeki artıştan kaynaklı doğabilecek



**Şekil 2.20.** (a) İmge koordinat sistemi. Sıfır noktası imgenin dışındadır ve bir noktanın koordinatı  $(x, y)$  formunda verilir.  $R1(7, 4)$  ve  $R2(6, 6.5)$  gibi, (b)  $h$  evrişim matrisinin  $I$  imgesi ile evrişim  $(*)$  işlemini (*convolution*)

problemlere dikkat edilmelidir. Bu sebeple imgenin gradyanı için

$$dx_{i,j} = \frac{I_{i,j+1} - I_{i,j-1}}{2}, \quad dy_{i,j} = \frac{I_{i+1,j} - I_{i-1,j}}{2} \quad (2.44)$$

ifadeleri kullanılır. Bir imgenin gradyant vektörlerinin çıkarılmasında yukarıdaki formül kullanılabileceği gibi evrişim (*convolution*) da kullanılabilir. Bir  $I_{N \times M}$  imgesinin  $h$  evrişim matrisi (yada maskesi) ile evrişimi (\*), Şekil 2.20 (b)'de gösterilen karşılıklı matris elemanlarının çarpılarak toplanması anlamına gelir ve  $h$  evrişim matrisi tüm  $I$  elemanlarını dolaşır. Bu işlem

$$h = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix}, \quad \hat{I} = h * I \quad (2.45)$$

olarak ifade edilir. Evrişim operatörü ise (\*) açık olarak  $\hat{I}$ 'nın bir elemanı için

$$\hat{I}(i,j) = \sum_{l=-1}^1 \sum_{k=-1}^1 h(2+l, 2+k) I(i+l, j+k) \quad (2.46)$$

olarak yazılır. Bu işlem imge işlemenin temel işlemlerinden olup filtreleme, sınır belirleme gibi bir çok işlemin önemli bir parçasını oluşturur.

Bu tez çalışması sırasında MatLAB<sup>6</sup> ve Image Analysis Toolbox kullanılmıştır. Bu sebeple tez boyunca MatLAB'ın imge koordinat sistemi ve fonksiyonları kullanıldı.

#### 2.4.2. Kütle merkezi metodu

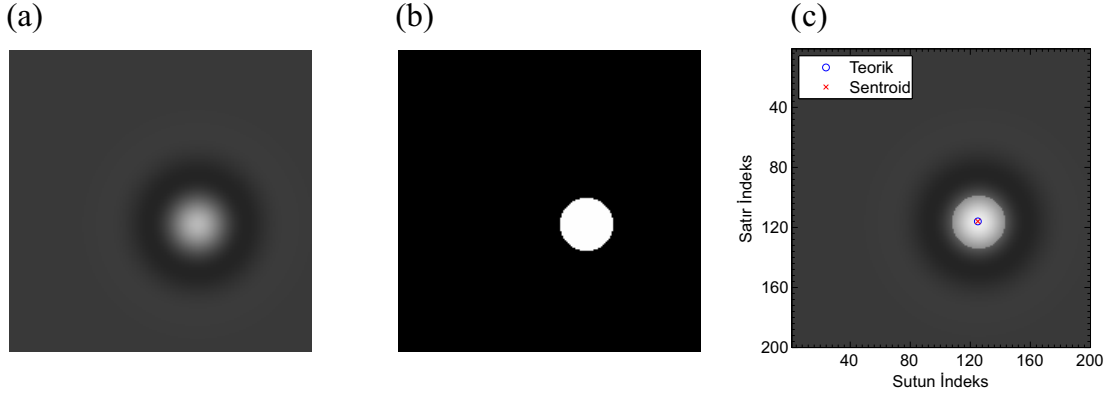
Kütle merkezi metodu (*centroid-centroid*) koloidal çalışmalarda oldukça yaygın kullanılan bir metottur (Lee vd., 1991; Cheezum vd., 2001). Metodun bir yeni versiyonu Fish & Scrimgeour (2015) tarafından son zamanlarda raporlanmıştır. Metod temelinde iki boyutta bir cismin kütle merkezini bulmaya benzer. Koloidal parçacığın imge üzerindeki görüntüsü Şekil 2.21 (a)'daki gibi yaklaşık olarak iki boyutlu Gaussian şiddet dağılımı olduğu varsayılabilir. Bu imge üzerine bir eşik değeri ( $th$ ) uygulayarak Şekil 2.21 (b)'deki binary imge elde edilir.

$$L(i,j) = \begin{cases} 1 & I(i,j) \geq th \\ 0 & I(i,j) < th \end{cases} \quad (2.47)$$

Bu binary imgede beyaz yerler imge matrisinde 1, siyah yerler 0 değerindedir. Dolayısıyla binary imge bize Gaussian dağılımının merkezi civarında çalışabilme imkanı sağlar. Vektörlerin nokta çarpımına benzer olarak aynı boyutlu iki matriside nokta çarptığımızda her bir eleman kendi satır sütunundaki eleman ile çarpılır.

$$I_{bin} = I \cdot L \quad (2.48)$$

<sup>6</sup>MATLAB and Image Processing Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States. Ayrıca bak. (Solomon & Breckon, 2011).



**Şekil 2.21.** (a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) binary imge, (c) teorik ve kütle merkezi koordinatları (sentroid)

Dolayısıyla yeni elde edilen  $I_{bin}$  imgesinde Gaussian merkezi civarı orjinal imgedeki değerleri, geri kalan yerler sıfır değerini alır. Bu işlemin akabinde  $(x_c, y_c)$  merkez koordinatları

$$x_c = \frac{\sum_i^N \sum_j^M j I_{bin}(i, j)}{\sum_i^N \sum_j^M I_{bin}(i, j)}, \quad y_c = \frac{\sum_i^N \sum_j^M i I_{bin}(i, j)}{\sum_i^N \sum_j^M I_{bin}(i, j)} \quad (2.49)$$

denklemleriyle elde edilir. Şekil 2.21 (c)'de bu işlem sonucunda bulunmuş merkez ve teorik bilinen merkez gösterilmektedir. Kütle merkezi metodu kolay olmasına karşın performansı gözlenen parçacığın görüntüsünün gürültü durumuna ve deney sisteminin optik bozukluklarına hassastır. Parthasarathy (2012) yaptığı simülasyon çalışmasında bu durumu raporlanmaktadır.

### 2.4.3. Gaussian dağılım metodu

Daha önce kamerada izlenen kolloidal parçacığın görüntüdeki şiddet dağılımının iki boyutlu bir Gaussian dağılımına benzediğinden söz edilmişti. Bu açıdan parçacığın görüntüsündeki şiddet dağılımına iki boyutlu bir Gaussian yüzeye uydurmak, parçacığın merkezini bulmada daha doğru bir yaklaşımdır (Crocker & Grier, 1996). Gaussian dağılımın detayına geçmeden önce  $I$  imgesinin şiddet normalizasyonu

$$I_{nor}(i, j) = \frac{I(i, j) - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \times A \quad (2.50)$$

ifadesiyle gerçekleştirilir. Burada  $I_{max}$  ve  $I_{min}$ ,  $I$  imgesinin aldığı maksimum ve minimum şiddet değerlerini ifade eder ve  $A = 1$  olduğunda imgenin tüm piksel değerleri 0 ile 1 arasında olur. Bu işlemin ardından uydurma için  $(2w + 1) \times (2w + 1)$  boyutlu örnek Gaussian dağılımı (kernel yada evrişim matrisi) oluşturulur.

$$K(l, k) = \left[ \sum_{-w}^w \exp\left(-\frac{l^2}{4w^2}\right) \right] \times \exp\left(-\frac{l^2 + k^2}{4w^2}\right) \quad (2.51)$$

ve daha sonra bunun  $I$  ile evrişiminden

$$I^c(i, j) = \sum_{l=-w}^w \sum_{k=-w}^w I_{nor}(i+l, j+k)K(l, k) \quad (2.52)$$

elde edilir. Yeni elde edilen evrişik  $I^c$  imgesinin lokal maksimum noktası  $(x_c, y_c)$  pozisyon bilgisi olarak kullanılabilir. Bunun üzerine bir düzeltme terimi

$$m = \sum_{l^2+k^2 < w^2} I^c(y_c+l, x_p+k) \quad (2.53)$$

olmak üzere

$$\Delta x_c = \frac{1}{m} \sum_{l^2+k^2 < w^2} l I^c(y_c+l, x_p+k) \quad (2.54)$$

$$\Delta y_c = \frac{1}{m} \sum_{l^2+k^2 < w^2} k I^c(y_c+l, x_p+k) \quad (2.55)$$

olarak elde edilir ve sonuç  $(x_c + \Delta x_c, y_c + \Delta y_c)$  olarak bulunur. Gaussian dağılım metodunun bir örnek MatLAB kodu Jones vd. (2016) referansında bulunabilir.

Gaussian dağılım metodu oldukça iyi sonuç verdiği Parthasarathy (2012)'nin yaptığı simülasyon çalışmasında görülür. Ancak imgedeki gürültü durumu arttığında hassasiyeti azalmaktadır. Bu sebeple gürültü azaltıcı özel algoritmalarla beraber de kullanılabilir.

#### 2.4.4. Desen uydurma metodu

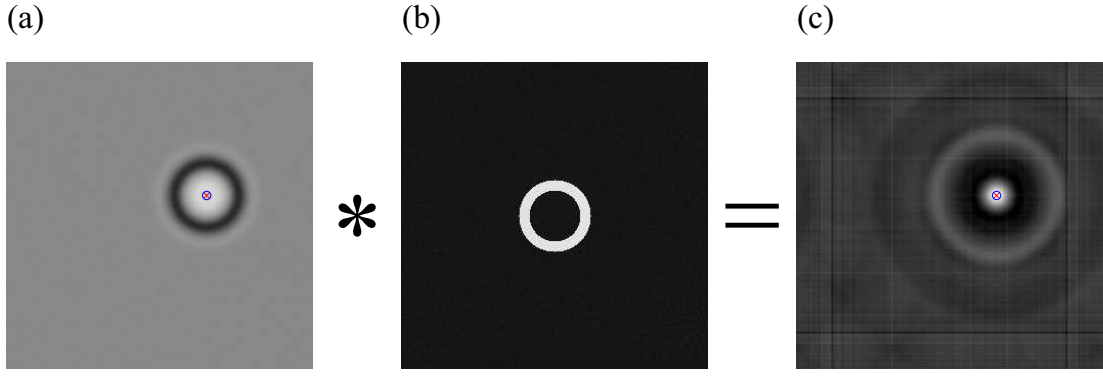
Desen uydurma metodu Gaussian dağılım metoduna oldukça benzerdir. Sadece örnek evrişim matrisinde Gaussian dağılım yerine halkalar kullanılır (Brujic, 2004; Zhang vd., 2015).

Kamera tarafından kaydedilen imgenin oluşumu evrişim açısından,  $S(r)$  optik sistemin nokta ayırıcı fonksiyonu<sup>7</sup> PSF'si (*Point Separate Function*) olmak üzere, eğer optik sistem  $n$  tane parçacık görüyorsa kamera imgesinde parçacıkların görüntüsü, \* evrişim işlemini göstermek üzere

$$I(r) = \sum_{i=1}^n \delta(r - r_i) * S(r) \quad (2.56)$$

olarak yazılabilir. Buradan da anlaşılacağı gibi parçacığın konumu civarında sistemin PSF'sinin oluşturduğu şiddet dağılımları oluşacaktır. Yani kamera görüntüsü oluşur. Kolay bir şekilde bu ifadenin tersini yazmak, yani kamera görüntüsünden parçacıkların koordinatlarını çıkarmak mümkündür.

$$\sum_i \delta(r - r_i) = F^{-1} \left[ \begin{array}{c} \tilde{I}(k) \\ \tilde{S}(k) \end{array} \right] \quad (2.57)$$



**Şekil 2.22.** (a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) hedef (template) imge, (c) evrişik imge

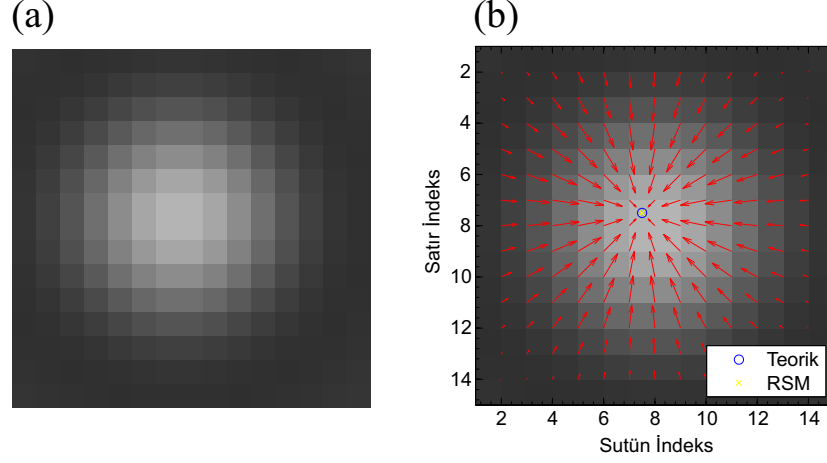
Burada  $F^{-1}$  ters Fourier transformunu,  $\tilde{I}(k)$  ve  $\tilde{S}(k)$  imgenin ve template imgenin Fourier transformunu ifade eder. Biz tam olarak optik sistemin PSF fonksiyonunu bilmese bile, Şekil 2.22 (b)'deki gibi belirleyici bir şiddet dağılımını hedef imge olarak seçebiliriz. Şekil 2.22'deki (a) ve (b) imgeleriyle Eşitlik 2.57'in sağ tarafındaki işlem (\*) uygulandığında Şekil 2.22 (c)'deki evrişik imge elde edilir. Bu evrişik imge üzerindeki lokal maksimum bize parçacığın konumunu verir. Görülebileceği gibi metot farklı hedef desenleri uygulamaya elverişlidir, hatta desenin bir kısmı ile de ofset hatalı da olsa pozisyon bulmaya imkan verir (Zhang vd., 2015). Karmaşık, gürültülü imgelerde dairesel yapıları belirlemek bu metotla kolaydır.

#### 2.4.5. Radyal simetri merkezleri metodu

Son zamanlarda Parthasarathy (2012) tarafından geliştirilen radyal simetri merkezleri metodu (RSM *Radial Symmetry Centers*) diğer metotlara kıyasla daha kolay, hızlı ve doğru sonuç üreten bir metottur. Metodun temelinde imgenin küçük bölgeleri için şiddet dağılımının artış yönlerini belirlemek, ve bu yönlerin kesişim noktasını bulmak yatar. Bir imgenin şiddet dağılımının gradyanını bulmak demek şiddetin artış yönünü her bir piksel için bulmak demektir. İmgenin gradyanının hesaplanması RSM'nin en önemli adımıdır. Literatürde bir imgenin her bir pikseli için gradyanını hesaplayan çeşitli algoritmalar vardır. Parthasarathy (2012) RMS'yi önerdiği çalışmasında Robert's cross<sup>8</sup> operatörünü kullanır. Ancak bu operatörden sonra gradyant vektörlerinin ortalamasını alarak bir düzeltme yapılır. Ma vd. (2012) süper çözünürlüklü mikroskopi için geliştirdiği benzer bir lokalizasyon metodunda  $I$

<sup>7</sup>Bir optik sistemin nokta kaynak için gösterdiği davranış

<sup>8</sup>Sınır belirleme (*edge detection*) operatörlerinden birisi. Bak. (Solomon & Breckon, 2011)



**Şekil 2.23.** (a) Kamera imgesi simülasyonu, (b) teorik (7.5, 7.5) merkez ve RSM sonucu ile gradyant vektörleri

imgesiyle evriştirmek için

$$dx = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I, \quad dy = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I \quad (2.58)$$

operatörlerini kullanır. Bu operatörler daha geniş bir alan için ortalama vektörler türettiği için, granyant vektörlerinin hesabından sonra ortalama olarak düzeltme yapmaya gerek yoktur. Şekil 2.23 (b)'de kırmızı oklar ile gösterilen vektörler bu operatör sayesinde elde edilmiştir.

Vektörlerin kesişim noktası aradığımız merkezi bulmamızı sağlar. Ancak bu çok kolay değildir. Her hangi biri vektörlerin ikili kombinasyonlarının kesişim noktalarının ortalamasını hesaplayabilir. Ancak bu, hesaplama zamanı açısından oldukça kötü bir yaklaşımdır. Bunun yerine Parthasarathy (2012) ve Ma vd. (2012) çalışmalarında her bir vektörün doğrultusuna en yakın noktayı bulmayı hedeflerler. İmge üzerinde öyle bir  $(x_c, y_c)$  noktası vardır ki bu noktanın vektörlerin doğrultusuna olan dik uzaklıkları toplamı minimumdur. İdeal durumda uzaklıklar toplamı sıfırdır, çünkü tüm vektörler bir noktada kesişir. Ancak çoğunlukla imge üzerinde gürültü, deneysel sistemin optik bozuklukları gibi sebepler nedeniyle tüm vektörler bir noktada kesişmezler. İmge üzerindeki bir noktanın, eğimi  $m$  olan doğrultuya dik uzaklığı  $d$

$$m(i, j) = dy(i, j)/dx(i, j) \quad (2.59)$$

olmak üzere

$$d(i, j)^2 = \frac{[(i - y_c) + m(i, j)(x_c - j)]^2}{m(i, j)^2 + 1} \quad (2.60)$$

şeklindedir. Bir ağırlık fonksiyonu sayesinde imge üzerinde gürültünün olduğu bölgelerdeki vektörlerin hesap dışı bırakılması  $L$  binary imge kullanarak sağlanabilir ve her bir vektörün büyüklüğü ağırlık olarak alınabilir.

$$w(i, j) = L(i, j) \sqrt{dx(i, j)^2 + dy(i, j)^2} \quad (2.61)$$

Sonuçta toplam mesafe

$$D = \sum_{i,j} w(i, j) d(i, j)^2 \quad (2.62)$$

olarak yazılabilir ve  $D$ , bir  $(x_c, y_c)$  noktasında minimum değer alır. O halde

$$\begin{cases} \partial D / \partial x_c = 0 \\ \partial D / \partial y_c = 0 \end{cases} \quad (2.63)$$

minimizasyonu yardımıyla elde edilen lineer denklem sistemi analitik olarak çözülerek  $(x_c, y_c)$  merkez noktası belirlenir. Hesaplamanın detayı Ek 1’de, kodları da Ek 3’de verilmiştir.

RSM metodunun parçacığın şiddet merkezini analitik olarak çözülebilmesi bilgisayar hesaplama süresi açısından onu diğer metotlara kıyasla daha hızlı çalışmasını sağlar. Parthasarathy (2012)’nin yaptığı karşılaştırmada bu açıkça görülür ve düşük gürültü durumlarında Gaussian metot kadar iyi sonuç verir. Yüksek gürültü durumlarında ise Gaussian dağılımdan daha doğru sonuç verir. Bu sebeple düşük çözünürlükte, yani parçacığın şiddet dağılımının yaklaşık  $10 \times 10$  piksellik bir alana düşmesi durumunda bile iyi sonuçlar üretir ve süper çözünürlüklü mikroskopik uygulamalar için kullanışlıdır (Ma vd., 2012).



### 3 DENEYSEL SİSTEM ve YÖNTEM

Işık, bir madde üzerine, saçılma dolayısıyla oluşan momentum transferi sayesinde bir kuvvet uygulayabilir (Poynting, 1884). Lazerlerin keşfinden sonra Arthur Ashkin radyasyon basıncını kullanabilmek için *tek demet gradient kuvvet tuzağı* (*single beam gradient force trap*) adında bir teknik önerdi (Ashkin, 1970). Bugün bu teknik geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Bu tez çalışmasında bir optik cımbızlama düzeneği kurarak su içinde yakalanmış farklı boyutlu silika parçacıklarının tuzak içindeki Brownian hareketlerini bir dijital video kamera yardımıyla gözledik ve görüntü verileri aldık. Daha sonra buradan elde ettiğimiz veriler ile pozisyon bulma algoritmalarının performanslarını test ettik. Bu bölümde deneysel düzeneğin kurulumu, özellikleri ve parçacık imgelerinin modellenmesi anlatılmaktadır. İmge modelleri Bölüm 5'te temasa yakın parçacıkların izlenmesi için yapılan simülasyonlarda kullanılmıştır. Ayrıca alınan veriler ile Bölüm 4'te optik cımbızlama düzeneklerinin parçacığın tamamının gözlenmesine gerek olmaksızın kalibre edilebileceği gösterilmiştir.

Tezin deneysel çalışmalarının ilk kısmı Bilkent Üniversitesinin Fizik Bölümünde, ileri araştırmalar Laboratuvarında (ARL) yapılan STC projesinde gerçekleştirilmiştir. Geri kalan kısmı ise *STC<sup>1</sup> Elektronik Ltd.* şirketinin Ankara'daki laboratuvarlarında şirketin kendi optik ekipmanlarıyla kurulmuştur.

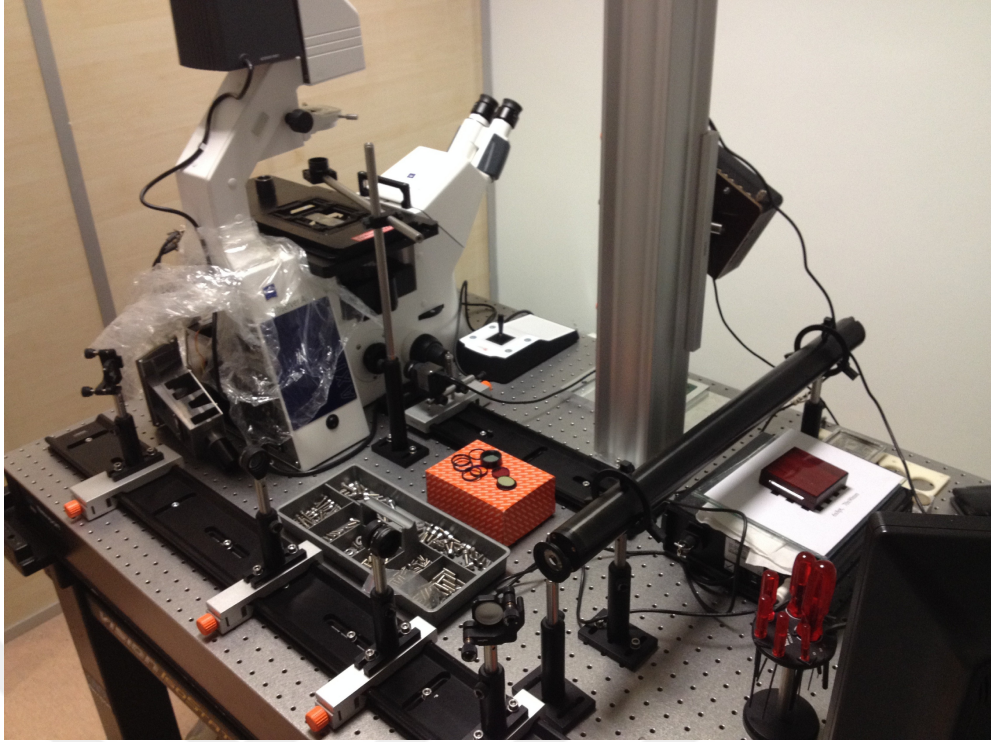
#### 3.1. Deneysel Sistemin Kurulumu

STC Laboratuvarında kurduğumuz deneysel düzeneğin bir fotoğrafı Şekil 3.1'de ve şeması Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de verilmiştir. Deneysel sistemde başlıca şu elemanlar kullanılmıştır:

- $15mW$  gücünde  $638nm$  dalga boylu Thorlabs marka HeNe lazer kaynağı ve maksimum  $40mW$  gücünde  $532nm$  dalga boylu Voltran marka diyot lazer.
- Zeiss marka Observer A1 model halojen lamba aydınlatmalı ters mikroskop ve motorize tabla.
- $1024 \times 1280$  çözünürlüklü Thorlabs marka DCU224C CCD dijital video kamera.
- Zeiss ve Nikon marka  $100x, 1.3$  yağ daldırmalı ve  $63x, 0.6$  standart mikroskop objektifleri.

---

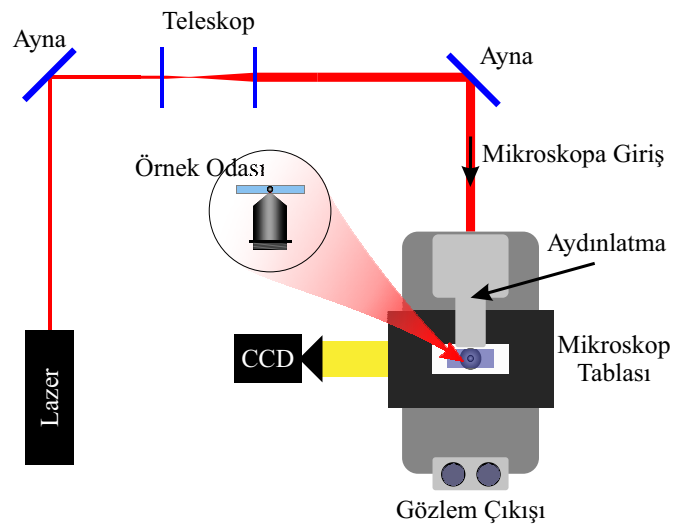
<sup>1</sup>OSTİM, ODTU Teknokent, Ankara



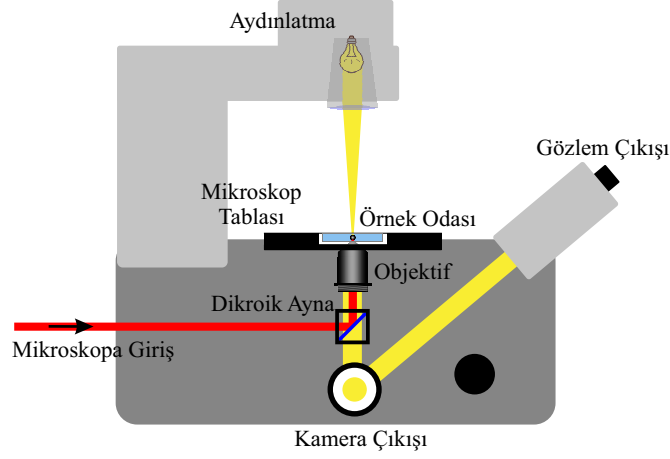
Şekil 3.1. STC laboratuvarında kurulan Deneysel düzeneğin bir fotoğrafı

- $2.06\mu\text{m}$  ve  $5.53\mu\text{m}$  çaplı, Microparticles GmbH marka, silika parçacıklar.
- Optomekanik ekipmanlar, mercekler, filtreler, aynalar, dikroik (dichroic) ayna mikroskop lamları ve bilgisayar.

Şekil 3.2'de düzenek üç boyuta yayıldığı için üstten görünüm ve Şekil 3.3'de



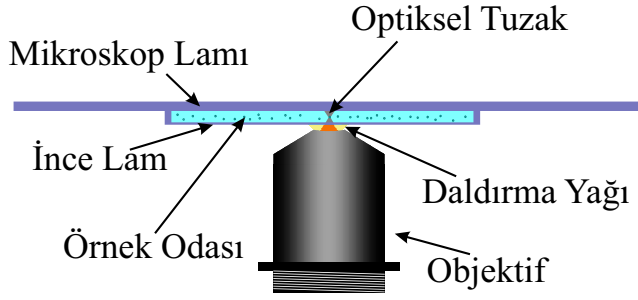
Şekil 3.2. Çalışma kapsamında kurulan deneysel düzeneğin üstten görünümünün şeması



**Şekil 3.3.** Çalışma kapsamında kurulan deneysel düzeneğin mikroskop sisteminin profil görünümünün şeması

mikroskopun profilden görünümü ayrı olarak gösterilmektedir. Lazer kaynağından çıkan  $638nm$  dalga boylu (kırmızı) lazer demeti bir ayna ile teleskop sistemine yönlendirilir. Teleskop sistemi iki merceklili bir sistemdir ve lazer demetinin çapını genişletmek için kullanılır. Lazer demetinin çapı mikroskop objektifinin giriş çapından büyük olmamalıdır. Buda yaklaşık yarım santimetrelik bir çapa denk gelir. Teleskop sisteminin bir diğer amacında demeti doğrultmak ve dağılganlığını gidermektir. Yani demetin doğrultulması ve 3-4 metre uzakta bile demetin çapının sabit kalması sağlanır. Genişletilen ve doğrultulan demet ikinci bir ayna yardımıyla mikroskoba yönlendirilir. Asıl cımbızlama ve görüntüleme sistemi mikroskopun içinde yer alır. Mikroskop içine arkadan giren lazer demeti dikroik<sup>2</sup> ayna yardımı ile objektife yönlendirilir ve lazer demetinin örnek içinde sıkı bir şekilde odaklanması sağlanır. Mikroskop içindeki buraya kadar olan kısım cımbızlama sistemini oluşturur. Deneysel düzeneğinde parçacığın pozisyonunu dijital video kamera ile gözdlediğimiz için görüntüleme sisteminde mikroskopun kendi görüntüleme sistemi kullanılır. Bu sistem örnek üzerinden beyaz ışık aydınlatması ile başlar ve örnek odasından geçen aydınlatma ışığı objektiften geçerek dikroik aynaya gelir. Beyaz ışık birden fazla dalga boylu ışıklardan oluştuğu için önemli bir miktar ışık dikroik aynadan yansımada geçer ve kamera sensörüne ulaşır. Kamera sensörü önünde kırmızı ışığı yansıtan ikinci bir filtre kullanmak kamera görüntüsündeki geri plan şiddet dağılımının daha düzgün olmasını sağlar. Çünkü az miktarda da olsa lazer demeti kamera sensörüne ulaşır. Özellikle örnek odasının camlarından yansıyan lazer demeti kamerada görülebilir. Çalışma kapsamında kurduğumuz düzenek yaygın kullanılan bir düzenektir. Bazı durumlarda hazır ticari bir mikroskop kullanmak yerine bir el

<sup>2</sup>Dikroik (dichroic) ayna: özel malzemeden yapılmış belli dalga boylarını yansıtan ve belli dalga boylarını geçiren aynadır. Düzenekte kırmızı ışığı yansıtan ayna kullanılmıştır.



(a) Örnek Odası (şema)



(b) Örnek Odası (fotoğraf)

**Şekil 3.4.** Optiksel tuzaklama sisteminin iki önemli elemanı, objektif ve örnek odasının (a) şematik görünümü, (b) deneysel sistemdeki görünümü

yapımı mikroskop da inşa edilebilir. Detaylı bilgi için (Pesce vd., 2015) referansı incelenebilir.

Şekil 3.4’de deneysel düzeneğin en önemli iki elemanı olan objektif ve örnek odasının (a) şematik ve (b) deneysel düzenepteki görünümü verilmektedir. Özellikle yüksek numerik açıklıklı ( $NA = 1.3$ ) 100x objektif örnek odası içerisinde güçlü bir optiksel tuzağın oluşmasını sağlar ve kameradaki parçacık görüntüsünün büyük olmasını sağlar. Örnek odası ise yaklaşık  $10\mu l$ ’lik hacme sahiptir ve örnek odasının objektife bakan tarafındaki mikroskop lamı (cam), çalışma uzaklığı ( $170\mu m$ ) sebebiyle 100x objektif ile görüntü alabilmek için incedir.

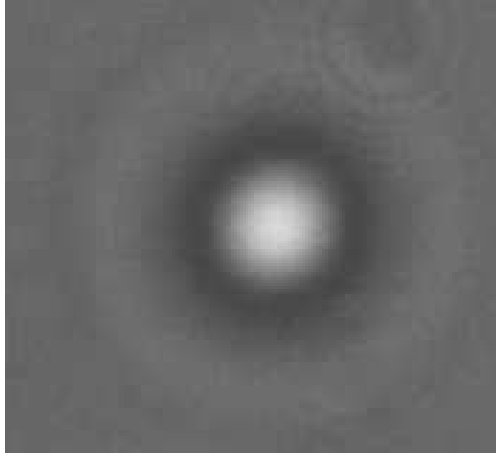
## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Veri toplama

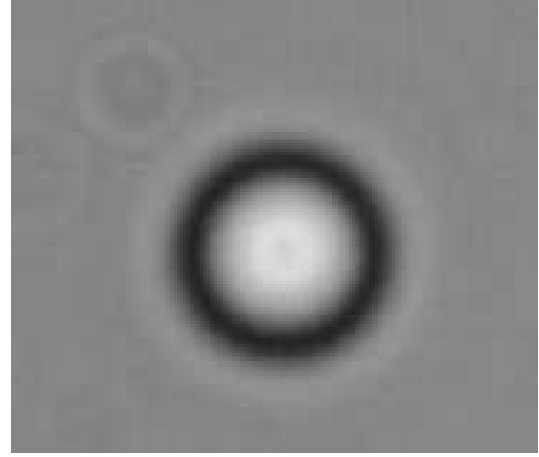
Deneysel düzeneğin kurulumunun ardından numune hazırlanarak tuzaklanmış parçacık görüntüleri elde edildi. İlk olarak saflaştırılmış su içinde  $2.06\mu m$  çaplı silica parçacıkları katıldı ve toplamda  $15mW$  gücünde kırmızı lazer ile 100x objektif altında tuzaklanma sağlandı. Daha sonra parçacığın optiksel tuzak içindeki Brownian hareketi  $145sn$  boyunca gözlemlendi ve bu süre içinde 6000 kare imge (kamera görüntüsü) kaydedildi (saniyede 41.38 adet görüntü “frame”). Şekil 3.5’de kayıt edilen imgelerden iki tanesi gösterilmektedir.

Sonraki adımda lazer gücü, yoğunluk filtreleri<sup>3</sup> (Neutral Density Filter) kullanılarak %100 ‘den %10’a aşama aşama azaltıldı ve aynı ölçüm her bir adım için tekrarlandı. Sonuçta elimizdeki filtreler ile elde edilen farklı lazer güçleri kullanılarak alınmış video görüntüleri elde edildi.

<sup>3</sup> $I = I_0 10^{-OD}$ , OD optiksel yoğunluk (optical density) değerine sahip malzemenin ışığı geçirme katsayısı.  $OD = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right)$



(a) 2.06 mikron çaplı silika

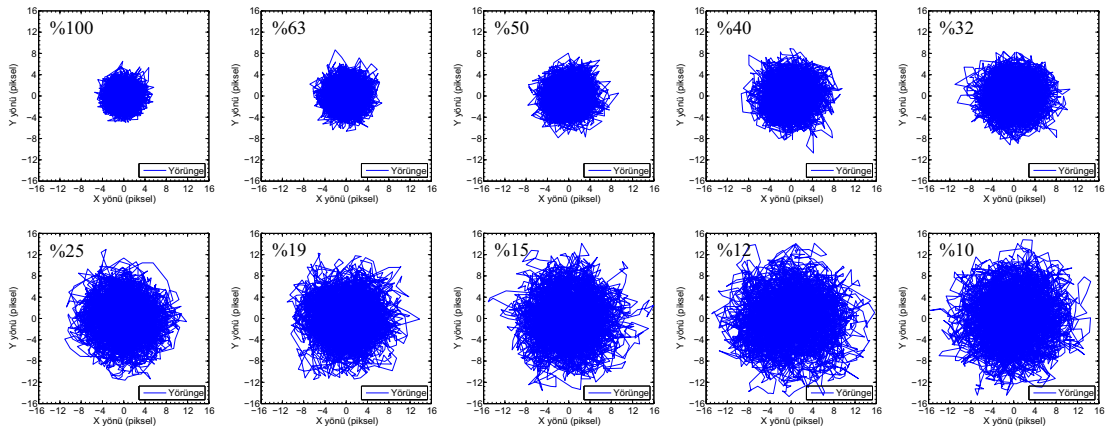


(b) 5.53 mikron çaplı silika

**Şekil 3.5.** (a) Toplam  $15mW$  gücünde kırmızı lazer ile yakalanmış,  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının  $100x$  objektif ile alınmış kamera görüntüsü. (b)  $5.53\mu m$  çaplı silika parçacığının  $63x$  objektif ile alınmış kamera görüntüsü

### 3.2.2. Verilerin analizi

Her bir video kaydını RSM metodu ile analiz ederek parçacığın bu lazer gücüne maruz kaldığı zaman içerisindeki yörüngesi çıkarılmıştır. Bu yörüngeler Şekil 3.6'de gösterilmektedir. Her bir grafiğin sol üst köşesinde tam güçteki lazer demetinin ne kadarının filtreden geçtiğini ifade eden yüzdelik değerleri yazılmıştır. Şekildeki grafiklerden sol üstteki grafik tam lazer gücünde (en yüksek şiddet) alınmış veriye karşılık gelir. Bu durum parçacığın en derin potansiyel kuyusunda, dolayısıyla geri çağırıcı kuvvetin (Eşitlik 2.20) en fazla olduğu durumdur. Şekildeki grafiklerden de görüldüğü üzere soldan sağa ve yukarıdan aşağı gittikçe lazer gücü azalmakta ve



**Şekil 3.6.** Soldan sağa ve yukarıdan aşağı giderek azaltılan lazer gücü altında tuzaklanmış  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının, tuzak içindeki Brownian hareketinin, video analizleri sonucu elde edilmiş yörüngeleri

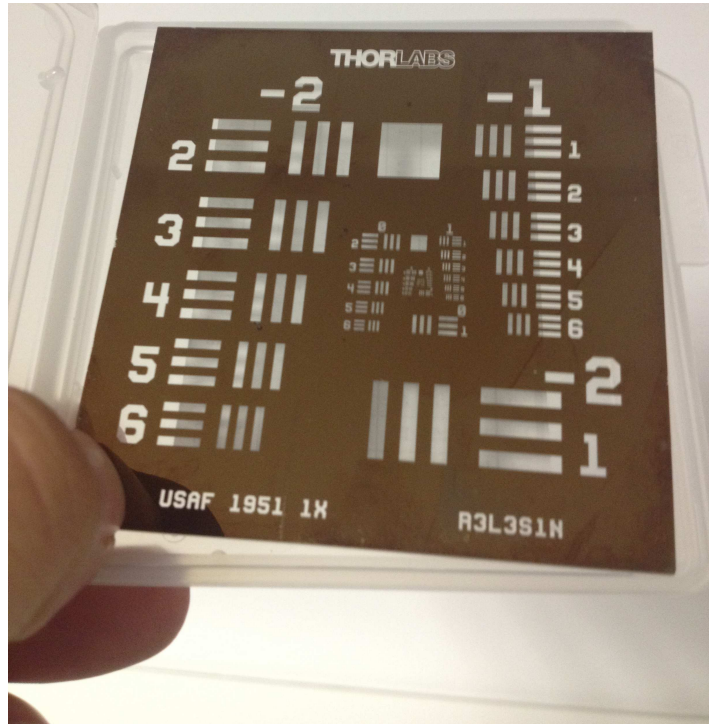


yörünge genişliği artmaktadır. Görülebileceği gibi lazer gücü azaldıkça yada diğer bir ifade ile lazerin şiddeti azaldıkça parçacığın bulunduğu tuzağın geri çağırıcı kuvvet değeri de azalmaktadır. Parçacığın hareketinin dağılımından bu sonuç çıkar.

Mevcut deney düzeneğinde yaptığımız diğer bir gözlem ise tuzaklama olmaksızın  $5.53\mu m$  çaplı parçacıkların imgelerini 63x objektif altında görüntülemek olmuştur. Parçacığın çapı büyük olduğu için su içindeki Brownian hareketi önemli ölçüde azdır. Bu sebeple bir tuzaklama gözlenemez. Alınan imgelerden biri Şekil 3.5 (b)'de gösterilmektedir. Buradan aldığımız imgeler, Bölüm 3.4'da modellenerek daha sonraki simülasyon çalışmalarında teorik olarak imge üretmek amacıyla kullanılmıştır.

### 3.3. Düzeneğin Kalibrasyonu ve Testleri

DeneySEL düzeneğin kalibrasyonu, optik cımbızlama kalibrasyonu anlamına gelir ve bunun için ilk önce parçacıkların hareketlerinin gözlemlendiği görüntüleme sisteminin kalibrasyonu yapılmalıdır. Yani kamera görüntüsü (imge) içinde parçacık bir piksel yer değiştirdiğinde, bu yer değiştirmenin parçacığın bulunduğu düzlemde ne kadarlık bir fiziksel uzaklığa karşılık geldiği belirlenmelidir. Optik büyütme güçleri genelde bilindiği halde bu şekilde yapılacak hesaplama kaba bir kestirime karşılık gelir. Bunun yerine ölçüsü bilinen bir kalibrasyon hedefi kullanarak görüntüleme sisteminin kalibrasyonu daha doğru ve hassas bir şekilde yapılabilir.



Şekil 3.7. USAF 1951 satandard çözünürlük test hedefi.



(a) 6\_1



(b) 6\_4



(c) 7\_1

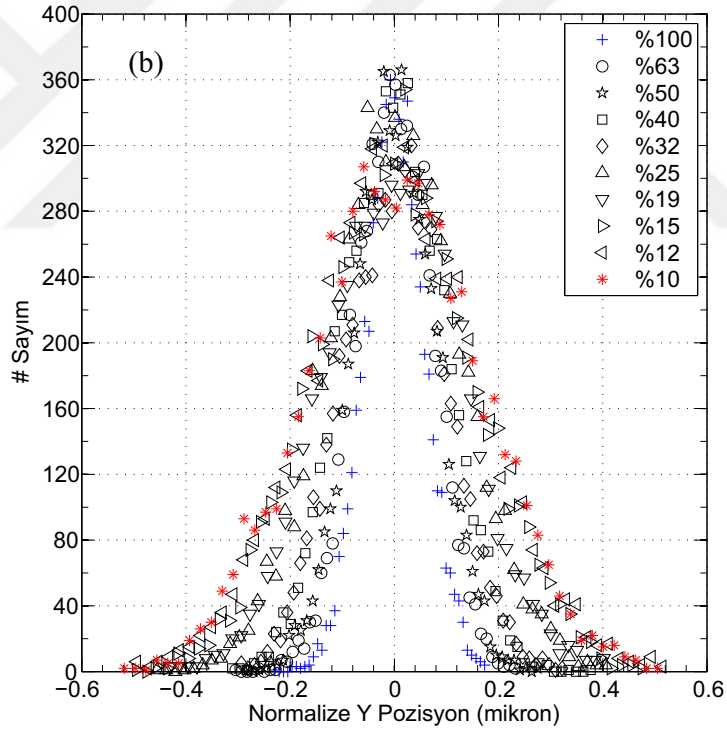
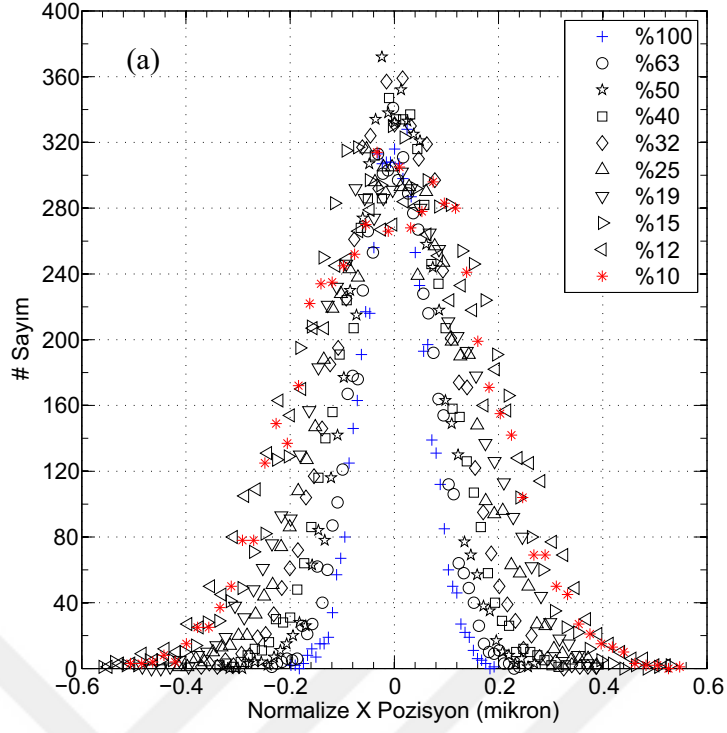


(d) 7\_5

**Şekil 3.8.** (a)-(d) test hedefi ile görüntüleme sisteminden alınmış imgeler. Her imgenin altına (Grup\_Element) numaraları yazılmıştır

Bunun için Şekil 3.7’de gösterilen USAF 1951 standart çözünürlük test hedefi kullanıldı (USAF, 1951). Bu hedef üzerindeki çizgilerin kalınlıkları bilinmektedir. Şekil 3.8 (a)’deki çizgiler  $7.81\mu m$ , (b)’deki çizgiler  $5.52\mu m$ , (c)’deki çizgiler  $3.91\mu m$ , (d)’deki çizgiler  $2.46\mu m$  genişliklerine karşılık gelir. Bu sayede deney düzeneğinin görüntüleme sistemi kalibre edildi. Bir piksellik yer değiştirmenin  $0.035 \pm 0.005\mu m$ , yani  $35 \pm 5nm$ ’lik mesafeye karşılık geldiği bulundu. Deneysel düzenekte yapılan küçük değişiklikte bile sistem yeniden kalibre edilmelidir. Bu nedenle tez çalışmasının değişik düzenek durumlarında bu durumlara özgü farklı görüntü kalibrasyon değerleri belirlendi ve kullanıldı.

Parçacıkların hareketlerinin izlendiği görüntüleme sisteminin kalibrasyonu sonrası, parçacıkların tuzak içindeki yörüngeleri metre cinsinden elde edildi. Şekil 3.9’de farklı lazer güçlerinde gözlenen parçacık hareketinin normalize edilmiş pozisyon dağılımları ( $\mu m$  cinsinden) verilmiştir. Cımbız kalibrasyonu için Bölüm 2.3’de açıklanan PSD metodu ile cımbız sertliği değerleri hesaplanarak Şekil 3.10 (a)’daki spektrumlar elde edildi. Bu spektrumlar kullanılarak cımbız sertliği değerleri Çizelge 3.1’deki gibi elde edildi. PSD kalibrasyon hesabı görüntüleme sisteminin kalibrasyon ( $35nm$ ) değerinin kendi hatası ( $5nm$ ) içinde değiştirilerek tekrarlandı ve standart sapma değerleri Çizelge 3.1’de hata ( $\pm$ ) olarak gösterildi. Farklı lazer

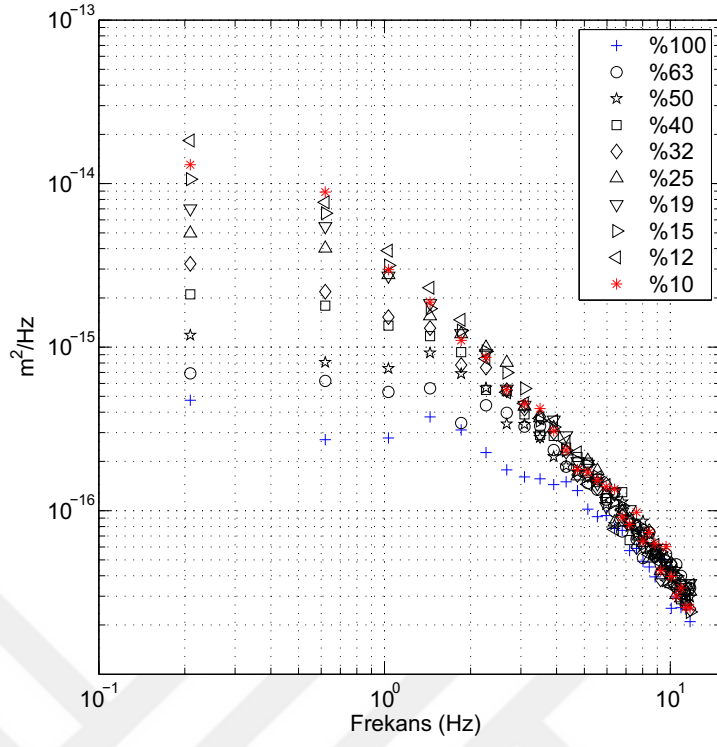


**Şekil 3.9.** Normalize edilmiş pozisyon dağılımları. (a)  $x$  yönünde, (b)  $y$  yönünde

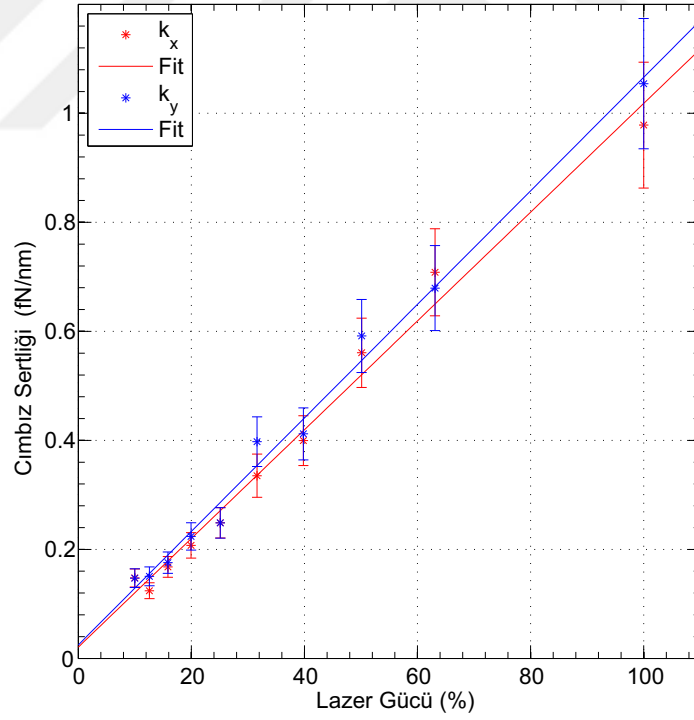
güçlerine karşılık cımbız sertliklerini bildiğimize göre Şekil 3.10 (b)'deki gibi cımbız sertliğinin lazer gücüne karşı grafiği çizilerek, bu değişimin lineer olduğu görüldü. Bu beklenen bir sonuçtur ve deney düzeneğimizin doğru çalıştığı anlamına gelir.



(a) PSD spektrumları



(b) Cımbız Sertlikleri



Şekil 3.10. (a) Güç spektrumu yoğunluğu, (b) lazer gücüne karşılık cımbız sertliği değişimi

**Çizelge 3.1.** Farklı lazer güçleri için PDS metodu ile hesaplanan cımbız sertlik değerleri ve hataları ( $\pm$ ). Tüm değerler  $fN/nm$  birimindedir

	%100	%63	%50	%40	%32	%25	%19	%15	%12	%10
$k_x$	0.978	0.708	0.561	0.400	0.335	0.249	0.207	0.168	0.124	0.148
$\pm$	0.115	0.080	0.064	0.046	0.040	0.028	0.023	0.019	0.015	0.017
$k_y$	1.054	0.679	0.592	0.412	0.398	0.249	0.224	0.176	0.151	0.147
$\pm$	0.119	0.078	0.067	0.048	0.045	0.028	0.025	0.020	0.017	0.017

### 3.4. Görüntü Karakterizasyonu

Optik cımbızlama düzeneğinin görüntüleme sisteminde kamerada gözlenen parçacıkların şiddet dağılımları görüntüleme sisteminin optiğine, dalga boyuna, parçacık türüne hatta örnek odasında kullanılan malzemenin türüne kadar bir çok değişkene bağlıdır. Dolayısıyla böyle bir görüntüleme sisteminin numerik bir simülasyonla elde edilmesi oldukça zordur. Görüntüleme sistemi iyi bir şekilde modellendikten sonra Mie saçılma teorisi yardımıyla oluşan görüntüdeki şiddet dağılımları hesaplanabilir (Ovryn & Izen, 2000). Ancak sistemin modellenmesi tam olarak deneysel sistemi karşılayamayacağı için bu metotla imge simülasyonları üretmek literatürde tercih edilmeyen bir metottur (Baumgartl & Bechinger, 2005; Ueberschär vd., 2012). Bunun yerine deneysel olarak alınmış bir imge üzerinde parçacığın şiddet dağılımını bir eğriye uydurarak karakterize etmek, ve daha sonra bu karakterizasyon fonksiyonunu kullanarak imge üretmek literatürde bilhassa pozisyon belirleme algoritmalarının testleri için sıkça kullanılan bir yaklaşımdır. Örneğin Parthasarathy (2012) radyal simetri merkezleri metodunun verimliliğini ve hızını bu tür simülasyonlarla ortaya koymuştur.

Bu tezin konusu da pozisyon belirlemeyi kapsadığı için, biz de deneysel düzenden aldığımız verileri kullanarak  $2.06\mu m$  ve  $5.53\mu m$  çaplı parçacıkların görüntüsünü karakterize ettik, yani parçacık görüntülerinin seçilen bir profil eksenindeki şiddet dağılım bilgilerini çıkardık ve simülasyon çalışmalarında kullandık. Şekil 3.11 (a)'da  $2.06\mu m$  çaplı parçacığın 100x objektif altındaki görüntüsü verilmektedir ve (b)'de Eşitlik 3.1'deki eğri uydurma (fit) fonksiyonu ile elde edilen şiddet dağılım profilinin grafiği görülmektedir.

$$f(x) = (A - I) \exp(-x^2/k^2) J_0(x/L) + I \quad (3.1)$$

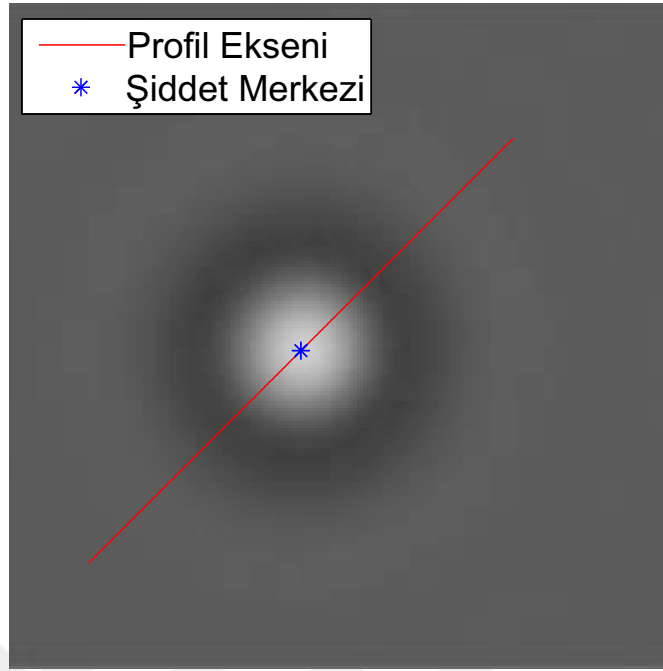
Çizelge 3.2'de de bu fit fonksiyonunun parametreleri verilmektedir. Bu parametreler ile bir parçacığın görüntüsü kolayca numerik olarak üretilebilir. Benzer bir işlem  $5.53\mu m$  çaplı parçacıkların 63x objektif altında alınan görüntüleri içinde

**Çizelge 3.2.**  $2.06\mu m$  çalı parçacığın 100x objektif altındaki görüntüsü için fit parametreleri

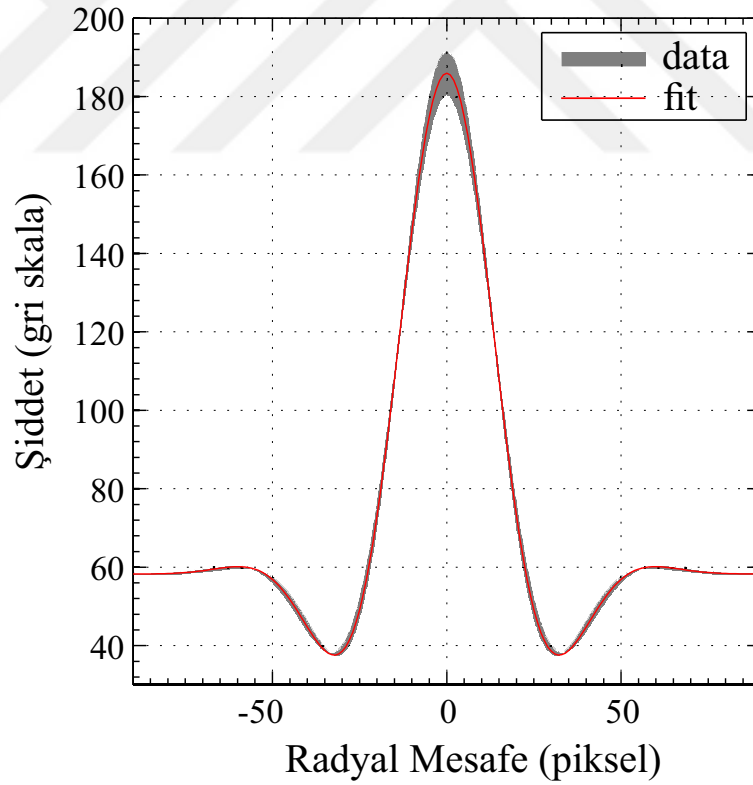
A	I	L	k
185.943446	58.32679523	9.45235457	35.78028741
$\pm 1.472765158$	$\pm 0.085347197$	$\pm 0.058364192$	$\pm 0.400363122$

tekrarlanır. Bu parçacığın oluşturduğu şiddet dağılımı daha karmaşık olduğu için bir fit fonksiyonu kullanmak yerine interpolasyon tekniği kullanılarak modellendi. Şekil 3.12 (a)'da görülen deneysel imgenin, kırmızı eksen üzerindeki şiddet dağılım bilgisi kayıt edilerek daha sonra imge üretiminde interpolasyon için kullanılır. 3.12 (b)'de interpolasyonla üretilmiş imge ve (c)'de deneysel ve simülasyon imgelerinin profillerinin grafikleri verilir. Bu şekilde üretilen imgenin oldukça başarılı olduğu söylenebilir. Burada elde edilen karakterizasyon bilgileri bu tezin Bölüm 5'da iki ve daha çok parçacığın birbirine değmeye yakın durumda pozisyon bulma algoritmalarının performansı belirlemek için kullanılır. Birden çok parçacığın simülasyon imgeleri için her bir parçacığın şiddet dağılımının lineer kombinasyonu yaklaşımını kullanmak geçerli bir yaklaşımdır (Baumgartl & Bechinger, 2005).

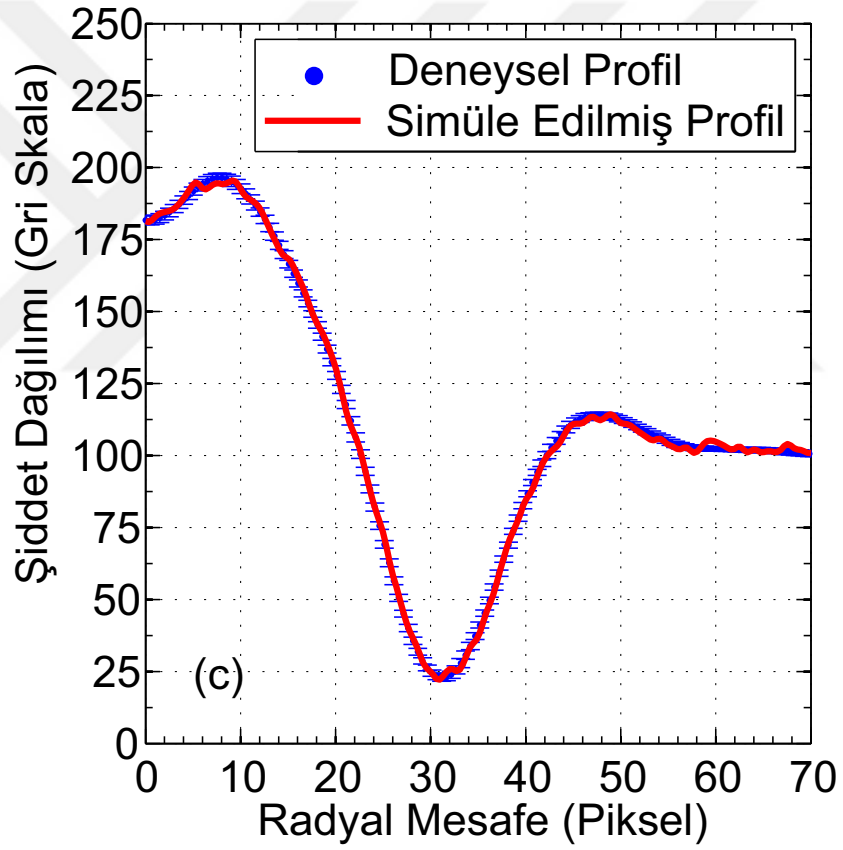
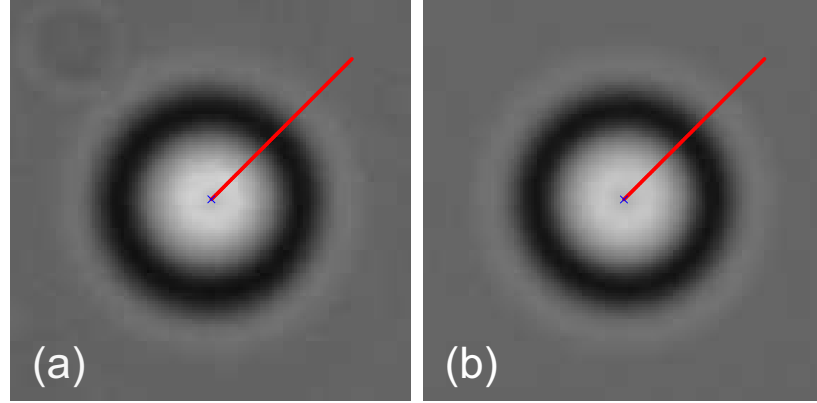
(a) Parçacık Görüntüsü



(b) Şiddet Profili



**Şekil 3.11.** (a)  $2.06\mu m$  çaplı parçacığın 100x objektif altındaki görüntüsü ve şiddet dağılım profilinin çıkarıldığı eksen, (b) şiddet dağılım profili



**Şekil 3.12.** (a)  $5.53\mu m$  çaplı parçacıkların 63x objektif altında alınan görüntüsü, (b) interpolasyon yöntemiyle üretilmiş parçacık görüntüsü, (c) deneysel ve üretilmiş parçacıklar için kırmızı eksen üzerindeki şiddet dağılım profilinin grafikleri

## 4 KISMİ ŞİDDET DAĞILIMI İLE KALİBRASYON

### 4.1. Giriş

Dijital video mikroskobu ile kameradan alınan görüntü üzerinden mikro boyutlu parçacıkların pozisyonunun belirlenmesi daha önce bu tezde Bölüm 2.4'de ele alınmıştı. Böyle bir sistemde optik bozuklukların ihmal edildiği durumda küresel simetrik bir mikro parçacığın oluşturduğu şiddet dağılımı 2 boyutlu Gaussian dağılımı gibi radyal simetrik olur. Bu durumda simetri merkezi parçacığın konum bilgisi olarak kullanılabilir çünkü parçacık hareket ettiğinde bu merkez değişmez.

DVM ile alınan görüntüler üzerinden parçacığın şiddet dağılımının merkezini bulmak için literatürde bir çok algoritma bulunmaktadır(Cheezum vd., 2001). Son zamanlarda gelişen süper çözünürlüklü mikroskoplar ile birlikte pozisyon belirleme önem kazanmış ve daha hızlı çalışabilen ve daha doğru sonuç üretebilen algoritma arayışları hızlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen algoritmalarından önde geleni Parthasarathy (2012) ve Ma vd. (2012) tarafından önerilen ve bu tezde Bölüm 2.4.5'de ele alınan radyal simetri merkezleri (RSM) metodudur. Bu metot mikro parçacığın görüntüsündeki şiddet dağılımının radyal simetrik olma özelliğini kullanır. Eğer şiddet dağılımının gradyant vektör alanı ele alınırsa tüm vektörlerin merkezde kesişeceği görülebilir. Parthasarathy (2012) ve Ma vd. (2012) tarafından önerilen algoritma bu vektörlerin kesişim noktasını kolay, hızlı ve herhangi bir iteratif süreç kullanmadan analitik olarak bulabilmektedir. Parthasarathy (2012)'nin simülasyon çalışmasında RSM'nin hızlı ve Gaussian uydurma metodu (Crocker & Grier, 1996) kadar doğru sonuç üretebildiği gösterilmektedir. Bu metot süper çözünürlüklü mikroskopide ihtiyaç duyulan düşük çözünürlükte pozisyon bulma ihtiyacı için iyidir. Daha sonra bu metot Ma vd. (2015) tarafından simetrik olmayan şiddet dağılımları için geliştirilmiş ve Liu vd. (2013) tarafından 3 boyutta pozisyon belirlemek için geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında RSM'nin tuzaklanmış bir mikro boyutlu parçacığın DVM'de izlenmesi için faydalı olabileceğini düşündük ve DVM'de izlenen parçacığın şiddet dağılımı genellikle yaklaşık  $200 \times 200$  piksellik bir alanda olduğu için, şiddet dağılımının tamamının kullanılmadığı durumda da parçacığın pozisyonunun belirlenebileceğini öngördük. Bunu test etmek için tek tuzaklama lazerli, Bölüm 3'da anlatılan optiksel tuzaklama düzeneğini kurduk ve  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacığının tuzak içindeki Brownian hareketini DVM yardımıyla izledik. Bu video kaydındaki

tüm görüntüleri belli ölçülerde keserek parçacığın şiddet dağılımının tamamının gözlenmediği dört yeni video kaydı oluşturduk. Elde edilen tüm kamera konfigürasyonları için video kayıtlarını, modifiye ettiğimiz RSM algoritması ile analiz ederek pozisyon bilgilerini karşılaştırdık. Ayrıca Bölüm 2.3’de bahsedilen kalibrasyon metotları ile sistemi kalibre ederek elde edilen tuzaklama sabitlerini karşılaştırdık.

Sonuç olarak, bu çalışmada farklı kamera konfigürasyonları için elde edilen pozisyon bilgilerinin bir birleri arasında çok büyük farklılıklar taşımadığı, dolayısıyla RSM ile parçacığın şiddet dağılımının tamamının gözlenemediği durumlarda da pozisyon bilgisinin çıkartılabileceğini ve sistemin kalibre edilerek ölçüm yapılabileceğini gösterdik. Bu sonuçlar (Yücel & Okumuşoğlu, 2016a)’da yayınlanmıştır.

## 4.2. Materyal ve Metot

Bölüm 2.4.1’da tanımlanan imge koordinatları bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır. İmge koordinatları temelde bir matrisin satır ve sütun indekslerine karşılık gelir ve imge içerisindeki bir noktanın konumunun bu indeksler cinsinden ifade edilmesi literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle MatLAB çalışma ortamı direkt olarak bu koordinatları kullanır. Bu koordinatlarda sıfır noktasının imgenin dışında sol üst köşede bulunmaktadır (Şekil 2.20) ve kameradan alınan bir  $I_{N \times M}$  imgesi  $i = 1, 2, \dots, N$  yukarıdan aşağı satır,  $j = 1, 2, \dots, M$  soldan sağa sütundan oluşan bir matris olarak ifade edilir.

Bu çalışmada kullandığımız RSM algoritması Bölüm 2.4.5’de Parthasarathy (2012) ve Ma vd. (2012) tarafından önerilen algoritmaların bir birleşimi olarak modifiye edilmiş bir şekilde verilmektedir. Algoritma kısaca şu şekildedir:

1.  $I$  imgesinin ortalama şiddet değerinden biraz daha yüksek bir değer olarak belirlenen bir eşik değeri ( $th$ ) yardımıyla

$$L(i, j) = \begin{cases} 1 & I(i, j) \geq th \\ 0 & I(i, j) < th \end{cases} \quad (4.1)$$

$L$  “binary” ikili sayı (1 ve 0) değerli imge belirlenir. Bu imgede 1 değerini alan bölge bu çalışmada “aktif alan” olarak isimlendirilir.

2.  $I$  imgesinin gradient vektörlerini hesaplamak için Ma vd. (2012) tarafından da kullanılan evrişim matrisleri aynen kullanılır

$$dx = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I, \quad dy = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I \quad (4.2)$$

3. Gradyant vektörlerinin kesişim noktasını belirlemeden önce eğimleri ( $m(i, j)$ ) ve ağırlık değerleri ( $w(i, j)$ )

$$m(i, j) = dy(i, j)/dx(i, j) \quad , \quad w(i, j) = L(i, j)\sqrt{dx(i, j)^2 + dy(i, j)^2} \quad (4.3)$$

bağıntıları kullanılarak hesaplanır.

4. Ek 1’de verilen

$$A = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)^2}{m(i, j)^2 + 1}, \quad B = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1} \quad (4.4)$$

$$C = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1}, \quad D = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)}{m(i, j)^2 + 1}$$

ve

$$E = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}, \quad F = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}$$

lineer denklem sisteminin elemanları hesaplanır.

5. Bu  $A, B, C, D, E$  ve  $F$  değerleri kullanılarak

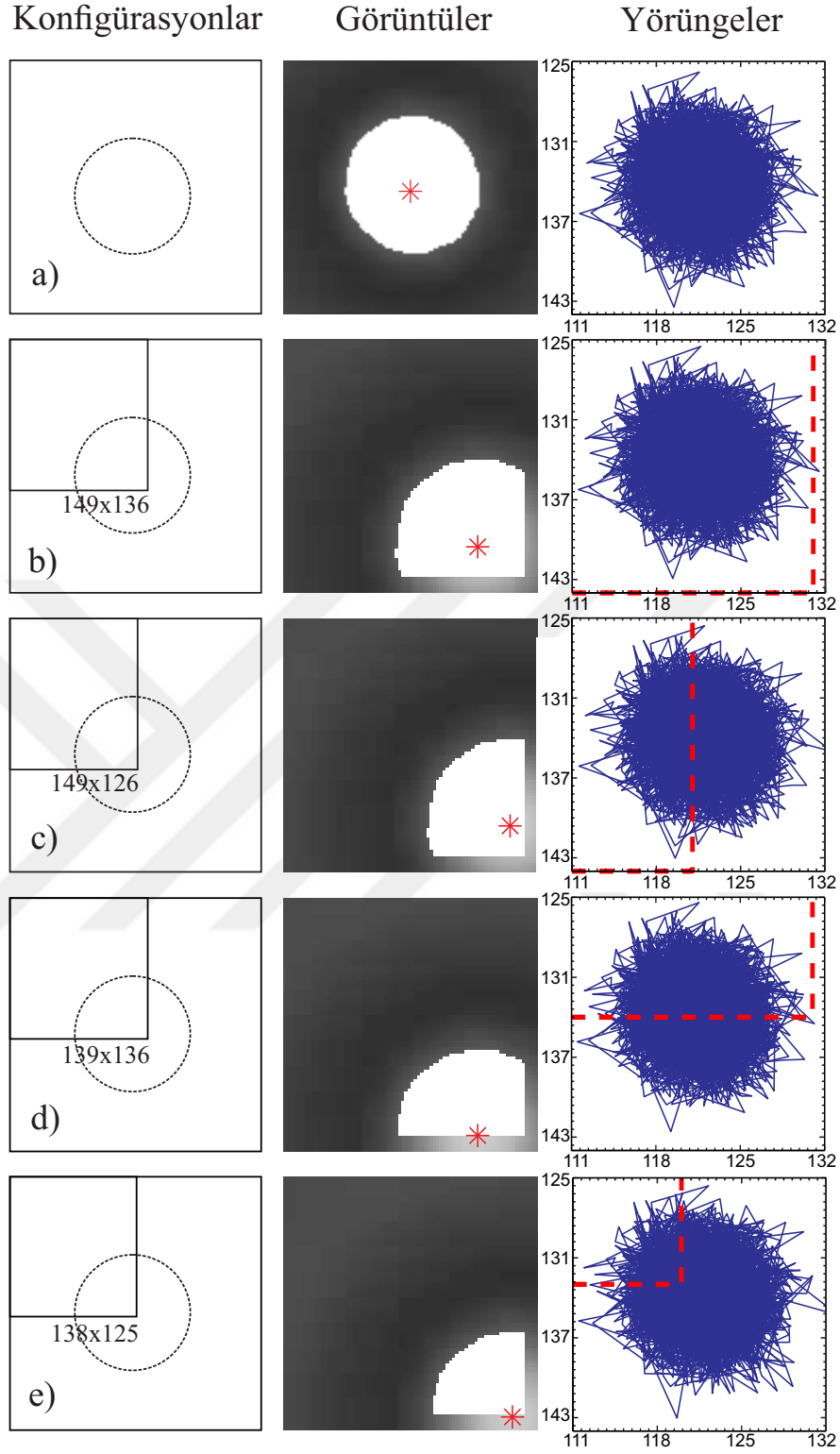
$$\begin{bmatrix} x_c \\ y_c \end{bmatrix} = \frac{1}{AD - BC} \begin{bmatrix} D & -B \\ -C & A \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E \\ F \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

ifadesi yardımıyla ( $x_c, y_c$ ) pozisyon koordinatları elde edilir.

DeneySEL düzenekte  $532nm$  dalga boylu maksimum  $40mW$  güçte yeşil lazer kaynağı ve Nikon 100x (NA 1.30) objektif kullanıldı. Su içerisinde bulunan  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacıklarının tuzak içindeki hareketi, beyaz ışık aydınlatması ile dijital video kameradan saniyede 34.76 görüntü (“frame”) hızında  $172.60sn$  boyunca  $250 \times 248$  piksel karelik bir alan için 6001 adet resim görüntüsü kaydedildi. Sistemin  $xy$  kalibrasyonu veya pozisyon kalibrasyonu sonucunda bir pikselin  $0.032 \pm 0.005\mu m$  ‘ye karşılık geldiği belirlendi.

Alınan video kaydında parçacığın şiddet dağılımının tamamı kaydedildi. MatLAB ortamında bu video kaydındaki görüntüler tek tek ele alınarak parçacığın şiddet dağılımının bir kısmı dışarıda kalacak şekilde kesilip yeniden bir video kaydı olarak oluşturuldu. Bu işlem Şekil 4.1’in konfigürasyonlar sütununda belirtilen boyutlar için tekrarlandı. Burada tüm konfigürasyonlarda deneysel verinin aynı ancak kamera görüntüsünün boyutlarının farklı olduğuna dikkat edilmelidir. Şekil 4.1’de konfigürasyon (a) deneysel veriye karşılık gelirken, (b), (c), (d) ve (e) konfigürasyonları bu deneysel veriden kesilerek elde edilmiş yeni video kayıtlarına karşılık gelir. Konfigürasyonların boyutları parçacığın ortalama pozisyonu olan





**Şekil 4.1.** Kamera konfigürasyonları, her bir konfigürasyon için bir örnek görüntü ve her bir konfigürasyon için belirlenen parçacık yörüngeleri. (a) video görüntüsünün tümü için, (b), (c), (d) ve (e) video görüntüsünden kesilerek elde edilen yeni video görüntülerini gösterir

(121.47, 134.20) değerleri ve evrişim hesabından kaynaklanan imgenin sınırlarına yakın 5 piksellik kullanışsız b6lge dikkate alınarak belirlendi. Bu kullanışsız b6lge içerisinde evrişim ile hesaplanan gradyant vekt6rleri hatalıdır ve bu sebeple g6z arđ edildi. Konfig6rasyon (b)'de parçacığın ortalama merkezi imge sınırlarının içinde, konfig6rasyon (c)'de ortalama pozisyon  $y$  eksenini 6zerinde imge sınırına yakın, konfig6rasyon (d)'de ortalama pozisyon  $x$  eksenini 6zerinde imge sınırına yakın ve konfig6rasyon (e)'de ortalama pozisyon hem  $x$  hem de  $y$  eksenini 6zerinde imge sınırına yakındır. Bu sınırlar Şekil 4.1'in y6r6ngeler s6tununda kırmızı kesikli çizgi ile g6sterilmektedir. Buradan parçacığın merkezinin bazen imge dışına çıktığı g6r6lebilir.

Şekil 4.1'in g6r6nt6ler s6tununda deneysel video kaydının 1000. resmi g6sterilmektedir. Ayrıca bu resimler 6zerinde her bir konfig6rasyon için  $L$  aktif alanları beyaz b6lge olarak g6sterilmiştir. Sonuçta kırmızı \* (asteriks) işaretiyle g6sterilen merkez noktası bu aktif alan içerisindeki gradyant vekt6rleri g6z 6n6ne alınarak hesaplanmıştır. Parçacığın y6r6ngesi video kaydındaki 6001 resmin her biri için belirlenen pozisyon noktalarının birleştirilmesiyle oluşturulur. Konfig6rasyon (b)'de parçacığın merkezi zamanının çoğunu bu aktif alan içerisinde geçirir. Bu durumu Şekil 4.1'in y6r6ngeler s6tununda konfig6rasyon (b)'ye karşılık gelen y6r6nge grafiğinden anlamak m6mk6nd6r. Y6r6ngeler s6tununda kesikli kırmızı çizgi ile g6sterilen koordinatlar direkt olarak aktif alanların imge sınırına yakın yerlerindeki sınırlarını ifade etmektedir. Bu sınırlar t6m imgeler için sabit kalacağından parçacığın merkezinin bazen aktif alanın dışına çıkabileceği anlaşılabilir. Bu durum Konfig6rasyon (e)'nin y6r6nge grafiğinde g6sterilen kırmızı kesikli çizgi ile daha açık bir Şekilde anlaşılabilir. Dolayısıyla video kaydındaki 6001 resimden konfig6rasyon (b)'de 1 tanesi için, konfig6rasyon (c)'de 3365 tanesi için, konfig6rasyon (d)'de 3197 tanesi için ve konfig6rasyon (e)'de 5389 tanesi için parçacığın merkezi aktif alanın dışındadır.

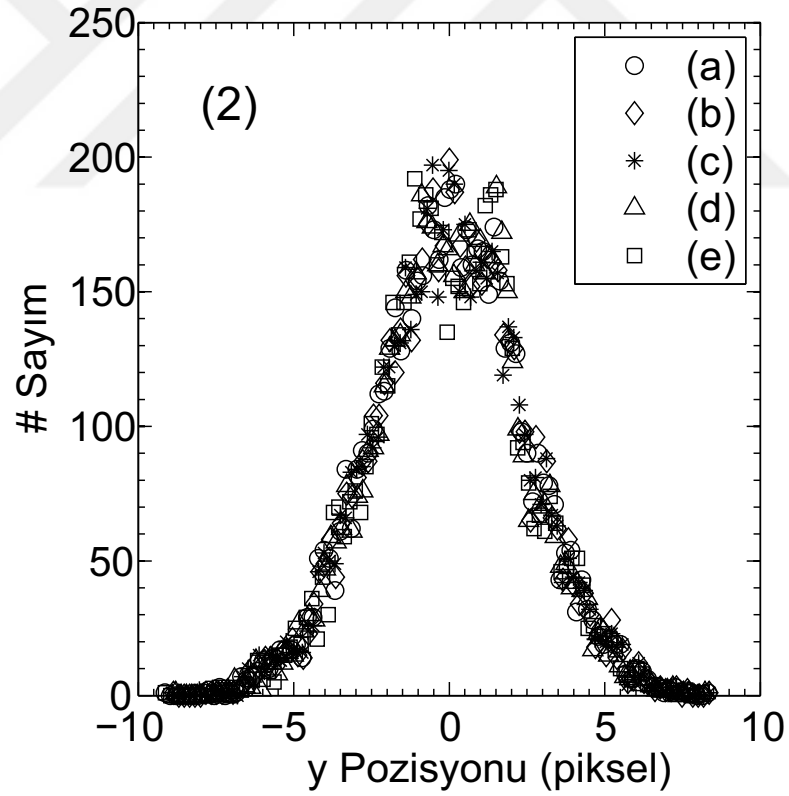
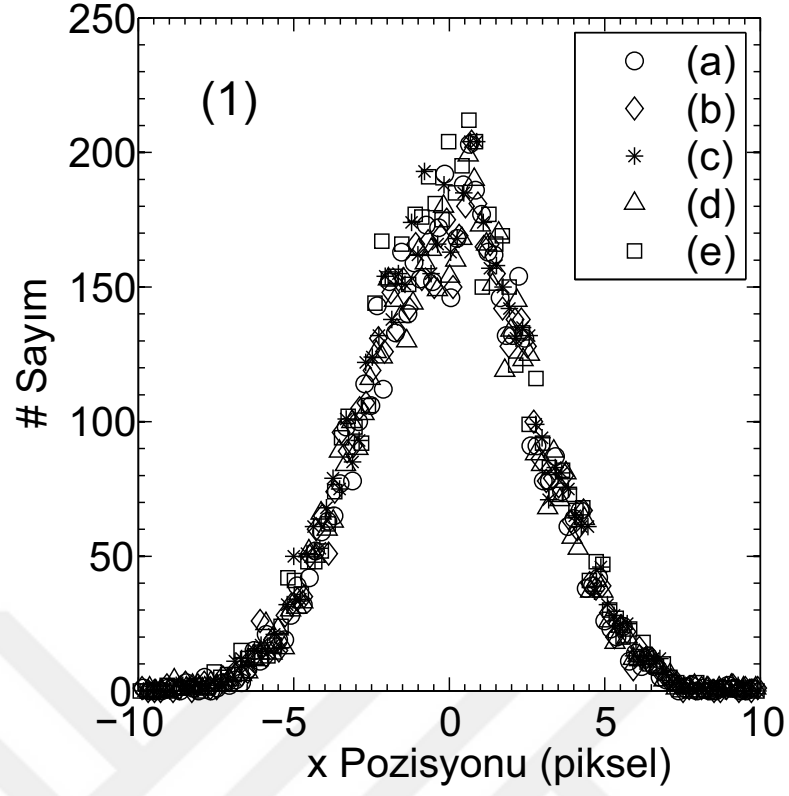
### 4.3. Sonuçlar

Her bir kamera konfig6rasyonu aynı deneysel video kaydıdan kesilerek 6retildikten sonra modifiye edilmiş RSM algoritmasıyla analiz edildi ve elde edilen pozisyon bilgilerinden parçacığın y6r6ngesi belirlendi. Bu y6r6nge bilgisi Şekil 4.1'in y6r6ngeler s6tununda g6sterilmektedir. Y6r6ngelere bakıldığında parçacığın Şiddet dağılımının tamamının kullanıldığı konfig6rasyon (a)'ya kıyasla, parçacığın Şiddet dağılımının bir kısmının kullanıldığı konfig6rasyon (b), (c), (d) ve (e)'nin y6r6ngelerinin farklı olduğunu s6ylemek zordur. Sadece konfig6rasyon (e)'de aktif alana uzak b6lgelerde y6r6nge bilgisinin 6nemli 6l6de değiştiği s6ylenebilir. Daha detaylı bir analiz için konfig6rasyon (a)'da elde edilen pozisyon bilgilerinin mutlak

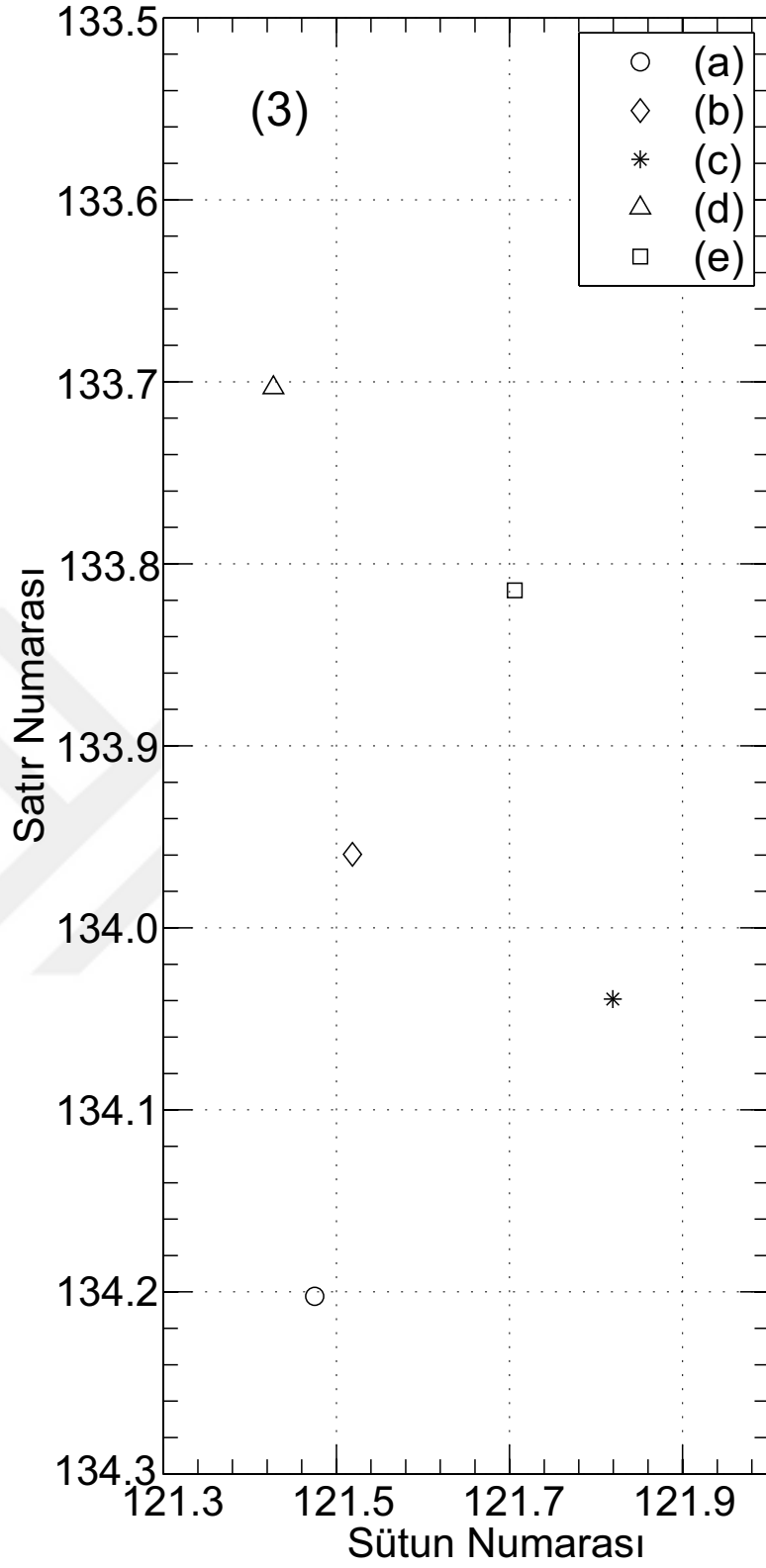
doğru olduğunu varsayabiliriz. Böylece diğer konfigürasyonlarda elde edilen pozisyon bilgileri konfigürasyon (a) ile kıyaslanabilir. (b), (c), (d) ve (e) konfigürasyonlarında elde edilen pozisyon noktasının, konfigürasyon (a)'da elde edilen pozisyon noktasına olan uzaklıkların standart sapması bize konfigürasyonlar arasında nicel bir karşılaştırma yapabilmemizi sağlar. Bu standart sapmalar (b), (c), (d) ve (e) konfigürasyonları için sırasıyla 0.006, 0.133, 0.166 ve 0.226 piksel olarak elde edildi. Her bir konfigürasyonda merkez noktasının aktif alanın dışında bulunduğu imge sayılarını hatırlarsak konfigürasyon (e)'nin standart sapmasının büyük olması anlam kazanır. Sonuç olarak parçacığın merkezi aktif alandan uzaklaştıkça algoritmanın ürettiği hata miktarı artmaktadır. Bu sebeple parçacığın şiddet dağılımının tamamının kullanılmadığı durumlarda parçacığın merkezinin aktif alanın içerisinde bulunması yada alanın çok az dışında bulunması gerektiği söylenebilir.

Teorik olarak, ideal durumda 2 boyutlu bir Gaussian dağılımının herhangi bir bölgesindeki iki gradyant vektörü bize direkt parçacığın merkezini gösterebilir. Ancak deneysel durumda optiksel bozuklukların simetri üzerine oluşturduğu ve kameranın elektronik yapısından kaynaklı gürültüler sebebiyle bu her zaman geçerli değildir. Özellikle elektronik cihazın oluşturduğu gürültü gradyant vektörlerinin yönelimlerinde dalgalanmalara sebep olur ve merkezden uzaklaştıkça bu dalgalanmalar vektörlerin kesişim noktası civarında daha büyük kaymalara sebep olur. Bu sebeple eğer merkezden uzak bölgelerdeki şiddet dağılımları kullanılmak isteniyorsa kabul edilebilir doğrulukta merkez belirlemek için yüksek çözünürlüklü görüntüler kullanılmalıdır.

Şekil 4.2'de her bir konfigürasyon için elde edilen pozisyon bilgilerinden  $x$  ve  $y$  yönlerindeki normalize edilmiş pozisyon dağılımları gösterilmiştir. Pozisyon dağılımlarından konfigürasyonlar arasında önemli farklılıklar olmadığı söylenebilir ve elde edilen bilgiler optiksel tuzağın kalibrasyonu için kullanılabilir. Bu dağılım bilgisinden Bölüm 2.3'den de hatırlanacağı gibi optiksel tuzak sertlik değerleri ( $k_x$  ve  $k_y$ ) Çizelge 4.1'de sunulduğu şekilde elde edildi. Çizelge 4.1'de bakıldığında ilk etapta  $k_x$  ve  $k_y$  değerleri arasındaki farklılık göze çarpar. Bu farklılık optiksel tuzaklamada kullanılan lazer demetinin objektiften sonra simetrik olmayan bir şiddet dağılımı oluşturmasından kaynaklanır. Yani bu farklılık optiksel bozukluklardan kaynaklanır. Diğer önemli bir husus ise kalibrasyon metotları arasındaki farklılıklardır ki bunun sebebi lazer gücü, pozisyon kalibrasyonu, sıcaklık ve veri alma frekansı gibi çok çeşitli parametrelerden kaynaklanıyor olabilir. Bu parametrelerin optik tuzak sertliği değerine etkisi Sarshar vd. (2014) tarafından detaylı bir şekilde incelenmiştir. Çizelge 4.1'den görüleceği üzere farklı kamera konfigürasyonlarının (a, b, c, d, e) sertlik değerleri çok değişmemektedir. Bu değişim maksimum  $0.03 fN/nm$ 'dir ki bu kalibrasyon değerlerinin hatalarından küçüktür. Buradan kamera konfigürasyonları arasında deneysel olarak sertlik değerlerinin elde edilmesinde önemli farklılıklar



**Şekil 4.2.** (1) ve (2)'de her bir kamera konfigürasyonu için normalize edilmiş pozisyon dağılımları. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1'de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir



**Şekil 4.3.** (3)'de ise her bir kamera konfigürasyonu için ortalama pozisyon bilgisi gösterilir. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1'de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir

**Çizelge 4.1.** Optiksel tuzak sertlikleri, ( $k_x$ ) x yönü ve ( $k_y$ ) y yönünü belirtir. (Pot.) potansiyel analizi metodu, (Equ.) eşbölüşüm metodu, MSD, ACF ve PSD metotları Bölüm 2.3’de tanımlandı. Tüm birimler  $fN/nm$ ’dir ve Pot. ve Equ. metotları için hata  $\pm 0.09$ , diğer metotlar için hata  $\pm 0.04$ ’dür. (a), (b), (c), (d), (e) Şekil 4.1’de gösterilen kamera konfigürasyonlarına karşılık gelir

		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Pot.	$k_x$	0.551	0.522	0.526	0.521	0.542
	$k_y$	0.725	0.703	0.706	0.735	0.731
Equ.	$k_x$	0.585	0.553	0.540	0.559	0.538
	$k_y$	0.694	0.701	0.687	0.727	0.711
MSD	$k_x$	0.489	0.472	0.466	0.481	0.468
	$k_y$	0.620	0.622	0.615	0.632	0.625
ACF	$k_x$	0.515	0.495	0.486	0.499	0.486
	$k_y$	0.610	0.613	0.606	0.627	0.623
PSD	$k_x$	0.490	0.472	0.466	0.476	0.464
	$k_y$	0.598	0.601	0.594	0.613	0.605

olmadığı, dolayısıyla kısmi şiddet dağılımı kullanılarak belirlenen pozisyon bilgilerinden deneysel olarak doğru bir şekilde bilgi çıkarılabileceği söylenebilir.

Şekil 4.3’de diğer önemli bir parametre olan ortalama pozisyon bilgileri karşılaştırılmaktadır. Her bir konfigürasyon için elde edilen pozisyon bilgilerinin ortalamaları arasında maksimum 0.5 piksellik farklılıklar vardır ki bu değer deneysel sistemde  $0.016\mu m$ ’ye karşılık gelir. Bu değer çoğu durumda ihmal denebilir bir değerdir.

## 5 TEMASA YAKIN PARÇACIKLARIN İZLENMESİ

Crocker & Grier (1996) tarafından yapılan öncü çalışmalarda optiksel tuzaklama ile DVM kombine edilmiş ve iki koloidal<sup>1</sup> parçacık arasındaki elektrostatik ve hidrodinamik etkileşmeler hakkında bilgi edinebileceğimiz bir metot oluşturulmuştur (Crocker & Grier, 1994; Polin vd., 2007). Bu metot sadece iki parçacık arasındaki etkileşmeler için değil üç ve daha fazla parçacık arasındaki etkileşmeleri gözlemlemek içinde kullanılmaktadır (Merrill vd., 2009; Paladugu vd., 2016). Bu sebeple bir birine değmeye yakın iki koloidal parçacık arasındaki bağıl mesafenin DVM ile ölçümü önemlidir.

DVM’de, kamerada gözlenen bir mikroskopik parçacığın görüntüsü girişim sebebiyle gerçekte olduğundan daha büyük görünür. Bu durum, kameradan alınan görüntülerde parçacıkların pozisyonlarını bulma ve izlemede pek sorun oluşturmaya da iki mikro parçacığın yan yana geldiği ve bir birine değecek kadar yakınlaştığı durumda bilinen parçacık pozisyonu bulma algoritmaları (geleneksel algoritmalar) yetersiz kalır (Baumgartl & Bechinger, 2005; Baumgartl vd., 2006; Gyger vd., 2008). Bir birine yakın durumdaki parçacıkların şiddet dağılımlarının merkezleri komşu parçacığın şiddet dağılımı sebebiyle kayar. Dolayısıyla artık şiddet dağılım merkezi parçacığın tek başınayken ki şiddet dağılım merkezini göstermez. Bu sistematik hata gözlemlenen etkileşme potansiyelinde hatalı sonuçlara sebep olur.

Bu problemin üstesinden gelen ilk girişim Baumgartl & Bechinger (2005) tarafından önerilen düzeltme metodudur. Düzeltme metodunda önce sistemde tek parçacığın şiddet dağılımı radyal simetrik bir fonksiyona fit edilerek karakterize edilir. Bu karakterizasyon işlemi bu tezde Bölüm 3.4’de kendi aldığımız deneysel parçacık görüntülerinin karakterizasyonu için de yapılmıştır. Bu karakter bilgisi kullanılarak bilgisayar ortamında parçacığın şiddet dağılımları simüle edilebilir. İki parçacığın simülasyonu için iki radyal simetrik fonksiyonun lineer kombinasyonu oldukça iyi bir yaklaşımdır. Bu sayede bir parçacığın şiddet dağılımının üzerine komşu parçacığın şiddet dağılımının etkisi simüle edilebilir. Bu şekilde bilgisayar ortamında üretilecek görüntülerde parçacıkların asıl pozisyonları bilineceği için algoritmaların verdiği hata miktarı belirlenebilir ve parçacıklar arasındaki gözlenen mesafeye bağlı bir düzeltme fonksiyonu elde edilebilir. Bu düzeltme fonksiyonuyla deneysel veriler düzeltilerek ölçüm çıkarılır. Düzeltme metodu bir simülasyona dayandığı için zaman alıcı ve üç parçacık durumuna uygulanması zor bir metottur.

<sup>1</sup>Koloidal bilimi için ayrıntılı bilgi (Cosgrove, 2010)’da bulunabilir.

Son zamanlarda bu problemi direkt olarak çözen, yani direkt olarak deneysel görüntü üzerinden, temasa yakın parçacıkların pozisyonunun belirlenmesi önem kazanmıştır. Konu bu tezde ele alındığı gibi eş zamanlı olarak Zhang vd. (2015) ve Raudsepp vd. (2015) tarafından da ele alınmıştır. Bu tez çalışmasının devam ettiği sırada yayınlanan bu iki çalışma probleme direkt deneysel verinin analizi üzerinden çözüm getirmektedir.

Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritma Bölüm 2.4.4'de bahsedilen desen uydurma metodunu (*Template Matching Method - TMM*) temel alınır. Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algortmada bir tam halka yerine, komşu parçacığın şiddet dağılımından henüz etkilenmemiş uzak bölgeleri için yarım halka deseni uydurulur. Yarım halka deseni kullanımından kaynaklı kayma hataları ("*shifting errors*") bir referans parçacık üzerinden düzeltilir. Önerilen algoritmanın testleri deneysel olarak gerçekleştirilmiş ve oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Ancak algoritma simülasyonlarla da test edilmelidir. Biz algoritmanın simülasyonlarla testini bu tezde Bölüm 5.2'de ele almaktayız.

Raudsepp vd. (2015) tarafından önerilen algortmada ise interpolasyon temelli normalize "cross-corelation" metodu önerilir. Bu teknik aslında tek parçacığın pozisyonunu bulmak için önerilmiştir. Ancak metot görüntü üzerindeki parçacığın şiddet dağılımının radyal simetrik olma varsayımını kullanmadığı için iki parçacığın bir birine yakın olduğu durumda da çalışabilir. Raudsepp vd. (2015) tarafından önerilen metot üç boyutta izleme yaptığı için karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu sebeple bu tezde detaylı olarak ele alınmamıştır.

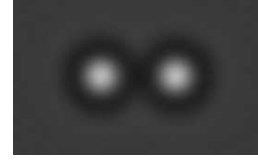
Biz Bölüm 5.1'de temasa yakın parçacıkların pozisyonlarının belirlenmesi için radyal simetri merkezleri metodunu (RSM) temel aldık. Bölüm 4'te de gösterildiği gibi RSM ile parçacığın simetrik şiddet dağılımının tamamının kullanılmadığı durumda da parçacığın pozisyonu belirlenebilir. RSM'nin bu özelliği onu temasa yakın parçacıkların pozisyonunun belirlenmesinde kullanışlı yapabilir. Temel olarak RSM ile parçacığın şiddet dağılımının komşu parçacığın şiddet dağılımından etkilenmediği uzak bölgeleri kullanılarak pozisyon belirlenebilir. Bu bölümde bu yaklaşımı gerçekleştirmek için bir algoritma önerildi ve algoritma simülasyonlar ile üretilen görüntüler üzerinden test edildi. Bu testler sadece iki parçacık arasındaki mesafenin ölçümü için değil, aynı zamanda üç parçacık durumunda parçacıklar arasındaki mesafenin ölçümü içinde uygulandı.

### **5.1. RSM Temelli Algoritma ve Testleri**

Bu çalışmada Bölüm 2.4.1'da tanımlanan imge koordinatları kullanılmaktadır. Bölüm 3.4'de karakterize edilen şiddet dağılımları kullanılarak bilgisayar ortamında üretilen görüntüler yine bu koordinatlar ile ifade edilir. Görüntülerin üretildiği MatLAB



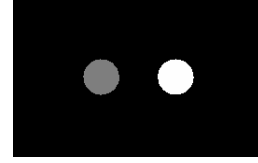
① Simülasyonla üretilmiş görüntü



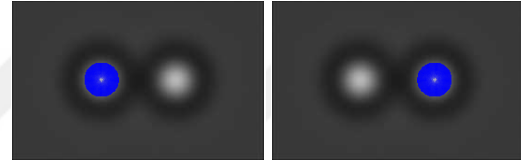
② Eşik değerinin uygulanması ve Binary imgenin eldesi



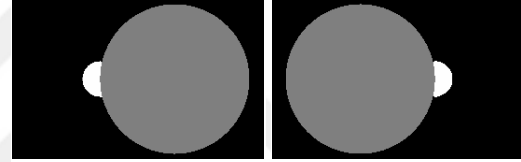
③ Etiketleme ve aktif alanların belirlenmesi



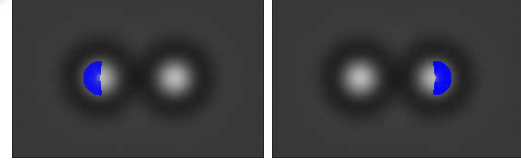
④ Her bir parçacık için gradient vektörlerin belirlenmesi ve ilk kestirilen merkezlerin bulunması



⑤ Etkin alanların eldesi ve ikinci aktif alanların elde edilmesi



⑥ Her bir parçacık için gradient vektörlerin yeniden belirlenmesi ve doğru merkezlerin bulunması



**Şekil 5.1.** Temasa yakın parçacıkların izlenmesi için önerilen RSM algoritmasının ara çıktılar ile birlikte bir şeması

kodları Ek 3’de verilmektedir. İki ve daha fazla parçacığın simülasyonunda her bir parçacığın şiddet dağılımının lineer kombinasyonu kullanılmıştır. Literatürde tam bir mikroskop simülasyonu için gerekli kaynaklar bulunmasına rağmen (Ovryn & Izen, 2000), bu yaklaşım literatürde kullanılan bir görüntü üretme yöntemidir (Baumgartl & Bechinger, 2005; Ueberschär vd., 2012).

Üretilen görüntülerin analiz edildiği algoritma Şekil 5.1’de şematik olarak sunulmaktadır. Bu algoritma şu şekildedir.

1. Simülasyonla görüntüyü üret.
2. Bir  $th$  eşik değeri ile binary görüntüyü elde et.
3. Binary görüntüden her bir parçacığın bölgesini etiketle ve her bir parçacık için aktif alanları elde et.

4. Her bir parçacık için ayrı ayrı  $L_k$  aktif alanları belirle. Bu alanları kullanarak Bölüm 4'de verilen algoritmayı uygula ve her bir parçacık için ilk kestirilen merkezleri bul.
5. Her bir parçacığın şiddet dağılımının etki çapı  $R_{out}$  (bizim verilerimiz için 80 gri skala değeri kullanıldı) için etkin alanları

$$L_k^{eff}(i, j) = \begin{cases} 1 & \sqrt{(j - x_k)^2 + (i - y_k)^2} \leq R_{out} \\ 0 & \sqrt{(j - x_k)^2 + (i - y_k)^2} > R_{out} \end{cases}$$

hesapla. Burada  $k$  parçacık numarasını,  $(x_k, y_k)$   $k$ . parçacığın ilk kestirim merkez koordinatlarını  $i$  ve  $j$  sırasıyla satır ve sütun indexlerini gösterir. Ve sonra her bir parçacık için aktif alanın komşu parçacıkların etkin alanları ile kesişmeyen bölgesini belirle ve ikinci aktif alan olarak kaydet.

$$L_k^{sec}(i, j) = \begin{cases} 1 & L_k(i, j) + \sum_{h \neq k} 2L_h^{eff}(i, j) = 1 \\ 0 & L_k(i, j) + \sum_{h \neq k} 2L_h^{eff}(i, j) \neq 1 \end{cases}$$

6. Her bir parçacık için ayrı ayrı  $L_k^{sec}$  ikinci aktif alanları kullanarak Bölüm 4'de verilen algoritmayı uygula ve her bir parçacık için doğru merkezleri bul.

Bu algoritma otomatik olarak görüntü üzerindeki parçacık sayısını belirleyebilir ve her biri için ikinci aktif alanları belirleyerek doğru merkezleri bulabilir. Bu sebeple bu yaklaşım hem iki, hem de üç ve daha fazla parçacığa uygulanabilir.

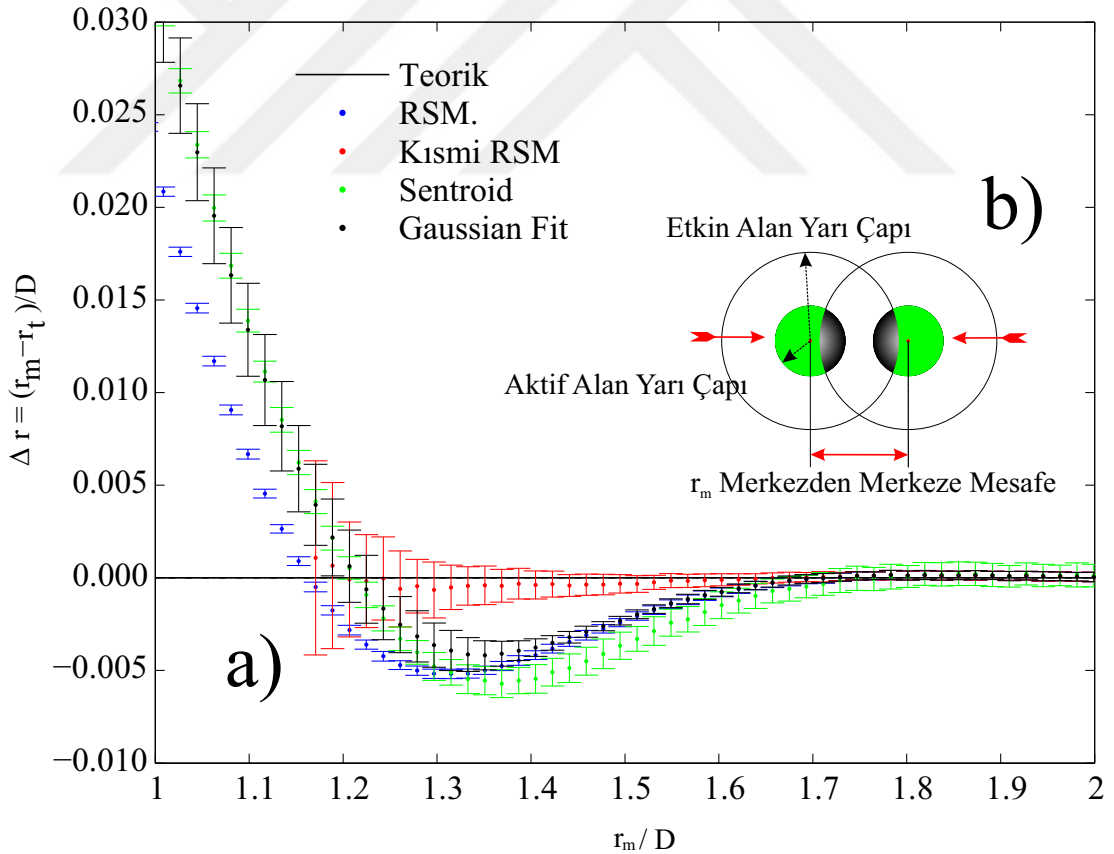
Algoritmanın bir zayıf noktası etkin alanları ilk kestirilen merkezleri referans olarak hesaplamasıdır. Burada eğer ilk merkezlerin hatalarının bir kaç piksel olduğu varsayılırsa ikinci aktif alanlar hemen hemen parçacığın aktif alanının komşu parçacıkların şiddet dağılımlarından etkilenmemiş bölgesini gösterir. Bu durum eğer ilk merkez çok hatalı ise algoritmanın doğru merkez üretmeyeceğini gösterir. Ancak çoğu deneysel görüntü için bu varsayım geçerlidir.

Simülasyon testleri iki parçacık durumu ve üç parçacık durumu için ayrı ayrı organize edildi. İki parçacık durumu için  $2.06\mu m$  parçacığın 100x mikroskop objektifi ile alınmış görüntüsü (Şekil 3.11) için Çizelge 3.2'deki parametreler kullanılarak görüntü üretildi. Görüntü üretiminde görüntünün karakterize edildiği deneysel sistem simüle edildiği için pozisyon kalibrasyonu değeri değişmez. Yani yine 1 piksel  $0.035\mu m$ 'ye karşılık gelir. Simülasyonda parçacıklar aralarındaki mesafe 120 pikselden 50 piksele kadar 71 adımda değiştirilerek yerleştirildi. Her bir mesafe için, parçacıkların arasındaki mesafe sabit tutularak iki parçacıklı sistem kütle merkezi etrafında  $-\pi/3$ 'den  $\pi/3$ 'e kadar 200 adım döndürüldü. Bu döndürme işlemi hem görüntü üretimi sırasında oluşan hataları hem de algoritmanın piksel konumuna bağlı hatalarını ortaya çıkarmak için yapıldı. Görüntülerin üretildiği senaryo Şekil 5.2 (b)'de gösterilmektedir. Bu görüntü üretimi esnasında her bir görüntü için teorik

konumlar kayıt edildi ve görüntünün önerilen algoritma ve literatürdeki bazı diğer algoritmalar ile analizi sonucunda elde edilen konum ile karşılaştırıldı.

Benzer bir işlem üç parçacık durumu içinde yapıldı. Önce hareketli iki parçacık için rastgele bir kütle merkezi noktası seçildi ve bu noktanın 50 piksel kadar yukarısına üçüncü parçacık yerleştirildi. Bu üçüncü parçacık sabit tutularak diğer iki parçacık arasındaki mesafe 150 pikselden 50 piksele kadar 101 adımda değiştirildi. Bu görüntü üretimi farklı rastgele kütle merkezi noktaları için 200 kez tekrarlandı. Görüntülerin üretildiği senaryo Şekil 5.3 (b)'de gösterilmektedir.

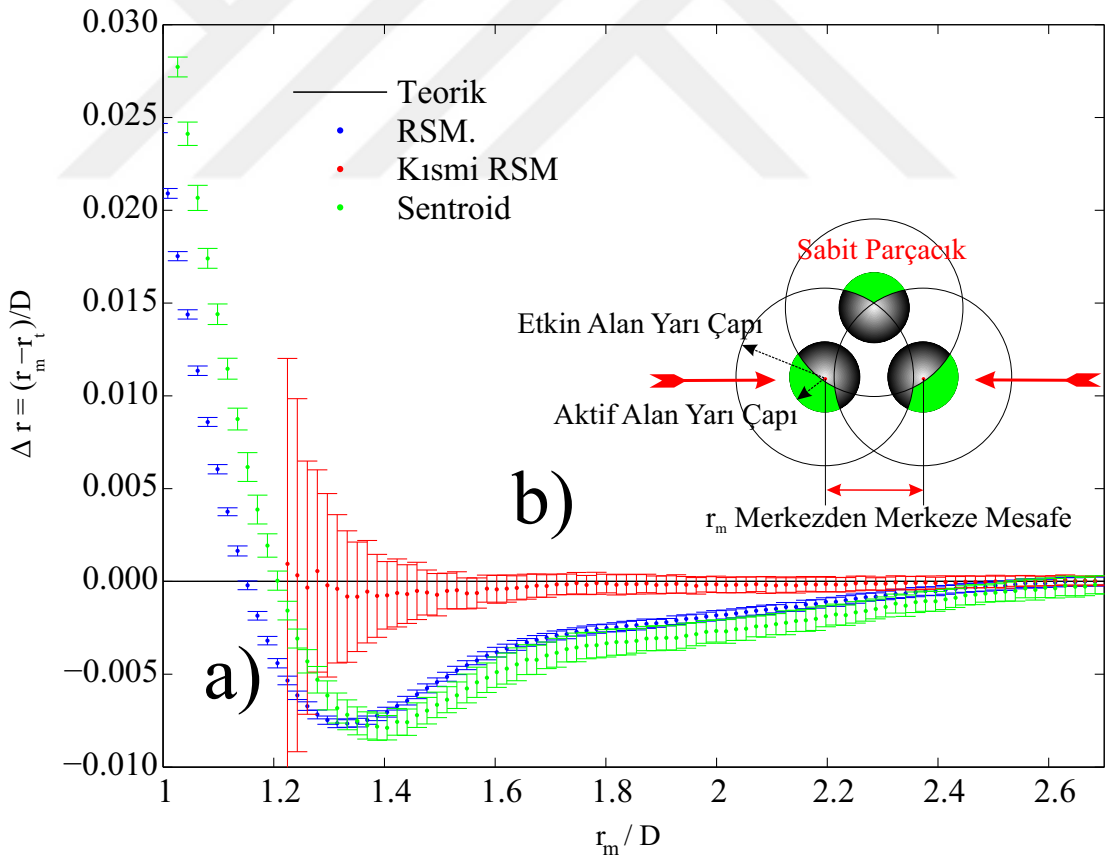
İki parçacık simülasyonu için elde edilen sonuçlar Şekil 5.2 (a)'da gösterilmektedir. Burada  $r_m$  görüntü üzerinden ölçülen iki parçacık arasındaki bağıl mesafe,  $D$  parçacığın çapı ve  $r_t$  ise görüntü üretimi sırasında kullanılan teorik bağıl mesafedir. Şekildeki grafik boyutsuz  $r_m/D$  değerine karşılık boyutsuz mutlak hatayı ( $\Delta r = (r_m - r_t)/D$ ) gösterir. Görülebileceği gibi RSM, Sentroid ve Gaussian fit metotları 1.7'den daha yakın mesafelerde bir sistematik hata üretir. Kısmi RSM olarak adlandırılan bu çalışmada önerilen algoritma ise 1.7 ile 1.2 arasında oldukça iyi bir performans gösterir. Kısmi RSM metodunda parçacıklar bir birine yaklaştıkça hatanın



**Şekil 5.2.** (a)'da iki parçacık için yapılan simülasyonunun farklı algoritmalar için elde edilen sonucu. Bağıl mesafenin çapa oranına karşılık mutlak hatanın çapa oranı gösterilir. (b)'de simülasyonun kurgusu verilir

artması, konumun hesaplanmasında kullanılan aktif alanın küçülmesi sebebiyledir. Bizim sistemimizde parçacıkların yüzeylerinin en yakın noktaları arasındaki mesafe  $1.2 * 2.06 - 2.06 = 0.412\mu m$  'dir. Bu mesafeden daha yakın durumda bulunan parçacıkların pozisyonu bu metotla ölçülemez. Aktif alan küçüldükçe hesaba alınan piksel sayısı azalmakta ve dolayısıyla RSM algoritmasının hatası büyümektedir. Belli bir mesafeden daha yakın durumda ise artık parçacığın üzerinde komşu parçacığın şiddet dağılımından etkilenmemiş bölge kalmamaktadır. Parçacıkların çok fazla yakın olduğu durumda kısmi RSM algoritması sonuç üretememektedir.

Şekil 5.3 (a)'da üç parçacık durumu için yapılan simülasyonun sonucu verilmektedir. Üç parçacıklı bir sistemde gözlemlenen iki parçacık arasındaki bağıl mesafenin hataları, iki parçacıklı sistemdekine kıyasla parçacıklar bir birine daha uzaktayken başlar. Simülasyon sonucunda geleneksel algoritmaların hataların başlama değerinin 2.6 olduğu görülebilir. Böyle bir durumda kısmi RSM metodunun oldukça etkili olduğu ve hataların 1.4 değerine kadar sıfır civarında dalgalandığı görülür. Bu değerden daha yakın durumlarda aktif alanlar (yeşil boyalı bölgeler) iyice küçüldüğü için kısmi RSM metodunun kararlılığı azalır ve büyük dalgalanmalar



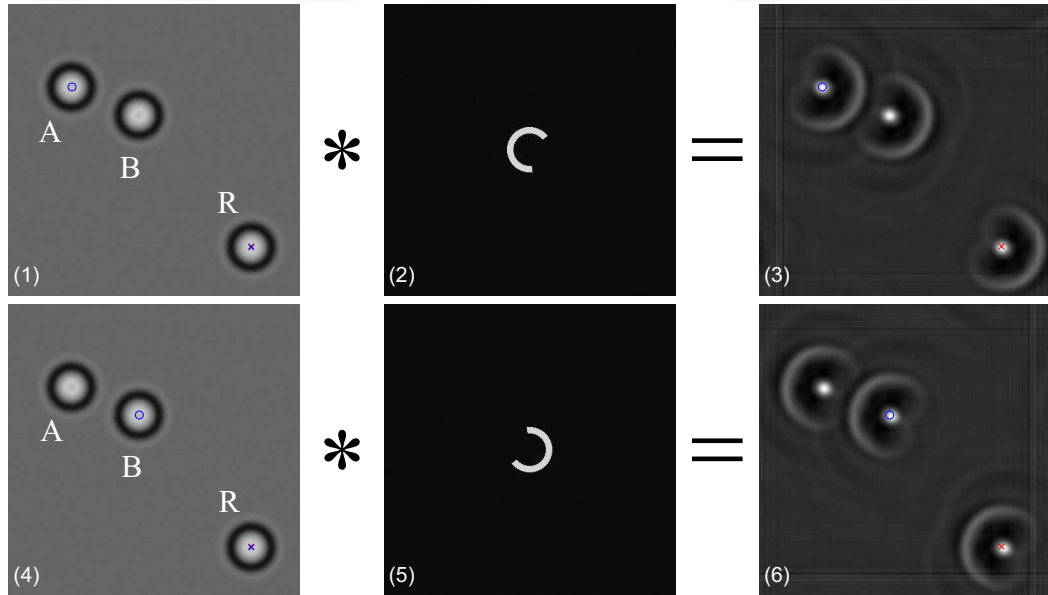
**Şekil 5.3.** (a)'da üç parçacık için yapılan simülasyonunun farklı algoritmalar için elde edilen sonucu. Bağıl mesafenin çapa oranına karşılık mutlak hatanın çapa oranı gösterilir. (b)'de simülasyonun kurgusu verilir

görülür. Yaklaşık 1.2 değerinden sonra da parçacık üzerinde komşu parçacıkların şiddet dağılımından etkilenmemiş bölge kalmaz ve kısmi RSM algoritması sonuç üretemez.

Bu sonuçlar kısmi RSM algoritması ile iki parçacık arasındaki etkileşme potansiyelinin daha doğru bir şekilde direkt görüntü analizi üzerinden çıkarılabileceğini gösterir. Özellikle parçacık boyutunun ve parçacık boyutuna kıyasla etkin alan çapının algoritmanın limitleri açısından önemli olduğu görülür. Bu simülasyonların  $2.06\mu m$  çaplı silika parçacıkları için yapıldığı göz önüne alınırsa biraz daha büyük parçacıkların simülasyonunda daha iyi sonuçların alınabileceği söylenebilir.

## 5.2. TTM Temelli Algoritma ve Testleri

Bu bölümde Zhang vd. (2015) tarafından önerilen ve bu tez çalışması sırasında yayınlanan ve aynı probleme pratik çözüm getiren TMM (desen uydurma) temelli algoritmanın,  $5.53\mu m$  çaplı silika parçacıklarının görüntüsü simüle edilerek testlerini gerçekleştirildi.  $5.53\mu m$  çaplı parçacığın 63x mikroskop objektifi ile alınmış görüntüsü (Şekil 3.12) için interpolasyonla bilgisayar ortamında pozisyonu bilinen görüntüler üretildi ve Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritma iki senaryoda test edildi. Birinci senaryoda tek parçacık için tam halka deseni ile yarım halka



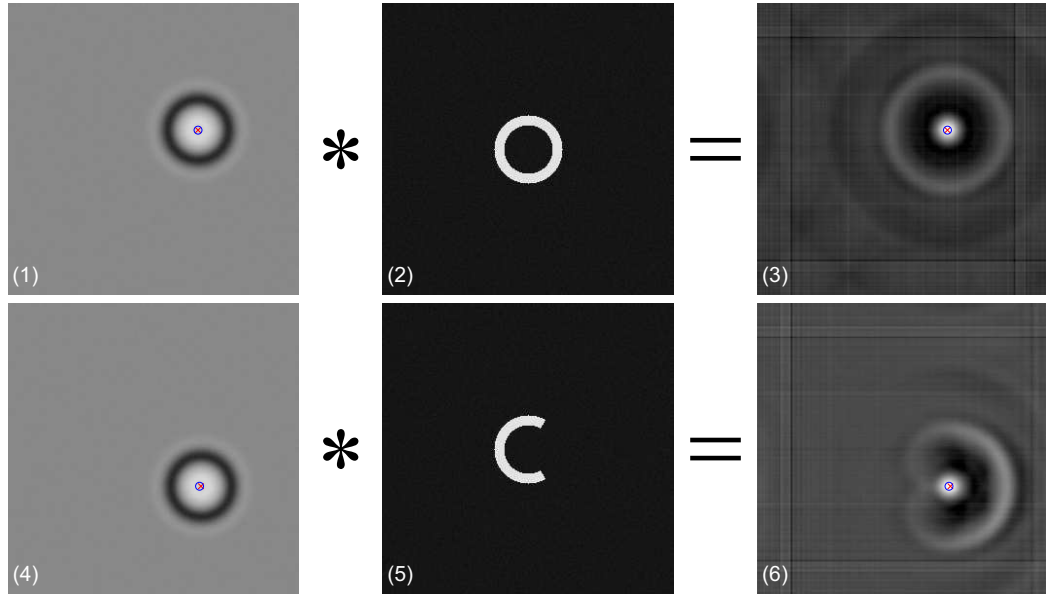
**Şekil 5.4.** Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritma. (1) ve (4) simülasyon ile elde edilen parçacık görüntüleridir  $I$ . Sağ altta görülen R referans parçacığıdır. (2) ve (5) uydurma işleminde kullanılan hedef desenlerdir  $S_C$ . (3) ve (6) evrişim (\*) operatöründen sonra elde edilen imgedir. Algoritma her bir parçacık için farklı hedef desenleri ile tekrarlanır

desenin pozisyon bulmadaki hataları incelendi. İkinci senaryoda ise iki parçacık arasındaki bağıl mesafe ölçümünün testleri gerçekleştirildi.

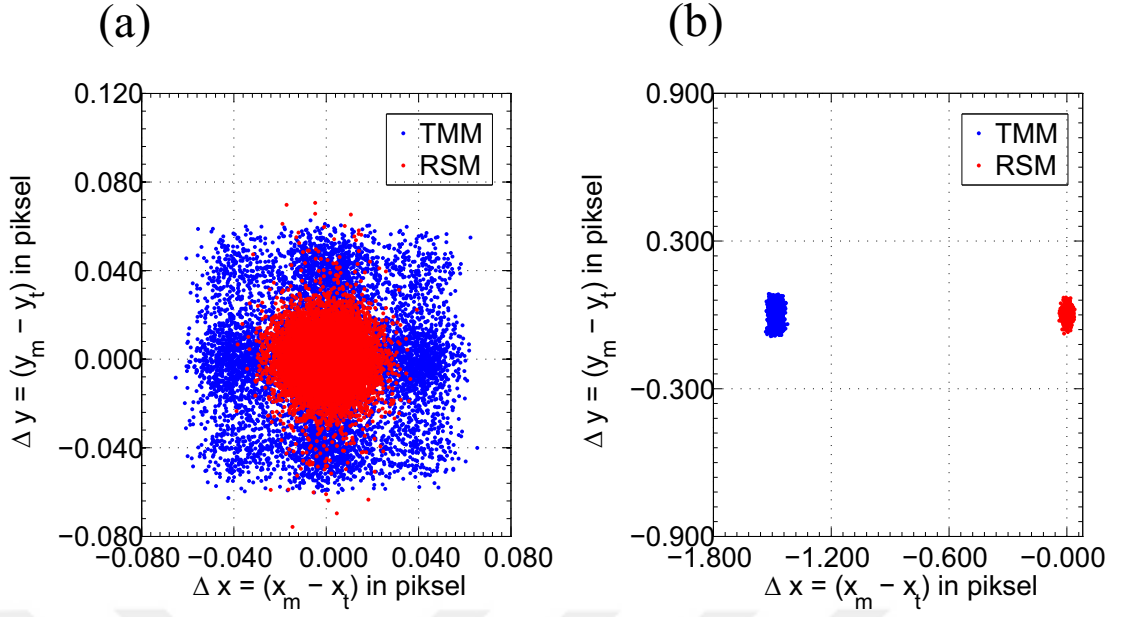
TMM algoritması tek bir parçacık için bu tezin Bölüm 2.4.4’inde verilmektedir. Zhang vd. (2015) tarafından önerilen ve iki parçacık arasındaki bağıl mesafe ölçümü için geliştirilen algoritma kısaca

$$\mathcal{F}^{-1} \left[ \frac{\tilde{I}}{\tilde{S}_C} \right] = \sum_i \delta(r - r_i) + \sum_i \mathcal{F}^{-1} \left[ \frac{\tilde{S}_L}{\tilde{S}_C} \right] \delta(r - r_i) \quad (5.1)$$

denkleminin ifade edilebilir. Bu denklemin nasıl kullanıldığı Şekil 5.4 üzerinden daha kolay anlaşılabilir. Öncelikle algoritmanın bir (R) referans parçacığı kullandığı anlaşılmalıdır. Şekilden algoritmanın kabaca iki döngüye sahip olduğu görülebilir. (A) ve (B) parçacığının pozisyonunu belirlemek için algoritma farklı hedef desenleriyle tekrarlanır. Hedef desenler bir yarım halka şeklindedir ve göz önüne alınan parçacığın komşu parçacığın şiddet dağılımından etkilenmediği uzak bölgesi için belirlenir. Şekildeki (\*) operatörü Eşitlik 5.1’in sol tarafındaki işleme karşılık gelir.  $\tilde{I}$ ,  $I$  imgesinin Fourier transformuna,  $\tilde{S}_C$  ise  $S_C$  hedef desen imgesinin Fourier transformuna karşılık gelir. (\*) operatör işleminin sonucu, yani Eşitlik 5.1’in sağ tarafı Şekil’de (3) ve (6) numaralı sonuç imgelerine karşılık gelir. Sonuç imgelerde beyaz parlak bölgeler parçacıkların merkezlerini gösterir ve bu merkezlerin etrafındaki gölgeler Eşitlik 5.1’in sağ tarafının ikinci terimi nedeniyle oluşur. Bir eşik değeriyle bu gölgeler elenebilir ve parlak merkez noktaları piksel altı çözünürlükte bulunabilir. Burada Şekil 5.4’in ilk dizesi (A) parçacığının pozisyonu içindir. Bu ilk dizinin sonuç imgesindeki (B) parçacığının pozisyonu hatalı olacağı için kullanılmaz. İkinci dizide



**Şekil 5.5.** Tek parçacık ile simülasyon senaryosu. ilk dize tam halka hedef desenini, ikinci dize yarım halka hedef deseni ile gerçekleştirilir

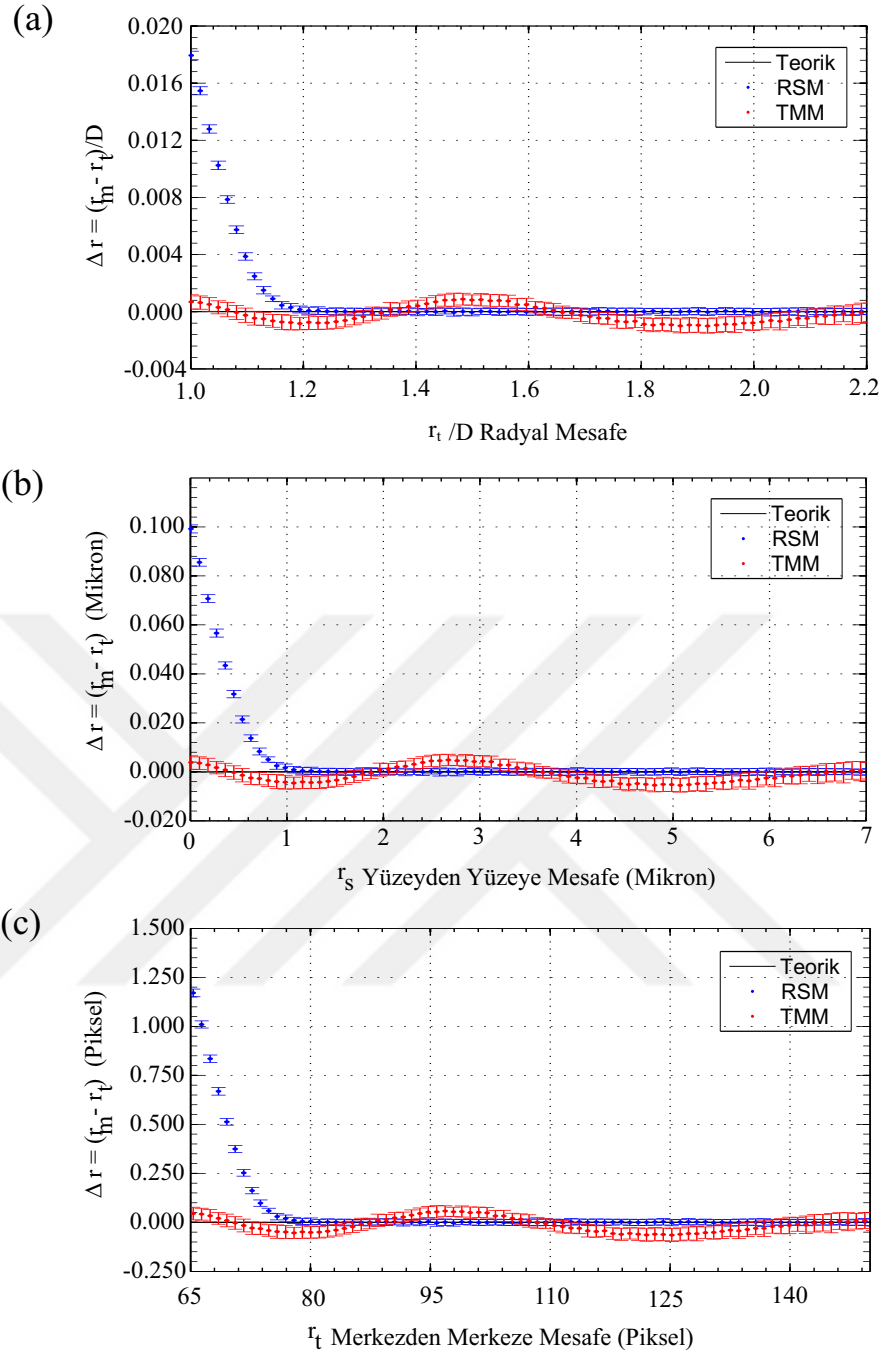


**Şekil 5.6.** TMM ile RSM'nin bir parçacık simülasyonu için mutlak hata karşılaştırması. (a)' TMM hesabında tam halkanın kullanıldı, (b)'de ise 3/4 halka kullanıldı

ise (B) parçacığının pozisyonu belirlenir.

Tek parçacık için gerçekleştirilen simülasyonda Şekil 5.5'de sunulduğu gibi aynı parçacık için hem tam halka hem de yarım halka deseni için pozisyon bulma testleri yapıldı. Parçacık üretimi esnasında teorik merkez rastgele bir pozisyona yerleştirilmiş ve bu işlem on bin kez tekrarlanmıştır. Her bir üretilen imgedeki parçacığın pozisyonu tam ve yarım halka desenleri için bulunmasının yanı sıra RSM algoritması kullanılarak da bulunmuştur. Tek parçacık senaryosu için sonuçlar Şekil 5.6'de verilmektedir. (a)'da tam halka kullanımı durumunda TMM ve RSM algoritmalarının  $x$  ve  $y$  yönündeki hataları verilmektedir. (b)'de ise yarım halka kullanımı durumunda oluşan hatalar gösterilmektedir. Görülebileceği gibi tam halka kullanımında TMM algoritmasının hataları RSM'ye kıyasla büyüktür ve bir simetrik dağılım göstermez. Bunun sebebi algoritmanın *fft* (*fast Fourier transform*) algoritmaları kullanıyor olması olabilir. Buradan TMM algoritmasının pikselizasyona duyarlı olduğu sonucu çıkarılabilir. Yarım halka kullanımında ise halkanın yönelimine bağlı olarak yaklaşık 1.5 piksellik bir sistematik hatanın oluştuğu görülür. Simülasyonda 1 pikselin  $0.0847\mu m$ 'ye karşılık geldiği göz önüne alınırsa, bu sonuç bize TMM temelli bir algortmada kısmi kullanımın büyük sistematik hatalar vereceğini gösterir. Dolayısıyla iki parçacık arasındaki bağıl mesafenin belirlenmesinde TMM temelli bir algoritma riskli olabilir.

Ancak Zhang vd. (2015) bir referans parçacık kullanılarak bu problemin üstesinden gelinebileceğini deneysel olarak göstermişlerdir. Burada ele aldığımız iki



**Şekil 5.7.** İki parçacık simülasyonu için mutlak hatanın bağlı mesafe göre değişimi. Bağlı mesafe (a)'da parçacığın çapına oranı olarak, (b)'de yüzeyden yüzeye mikron biriminde mesafe olarak ve (c)'de merkezden merkeze piksel biriminde gösterilir

parçacık senaryosunda Şekil 5.4'de görülen (R) referans parçacığı kullanılır. Üretilen görüntülerde farklı bağlı mesafeler için iki parçacıklı sistem  $-\pi/3$ 'den  $\pi/3$ 'e kadar 200 adımda döndürülmüştür. Ve sonuçta her bir bağlı mesafe için ortalamalar alınarak standart saplamalar hata olarak Şekil 5.6'de gösterilmiştir.

İki parçacık senaryosu için yapılan simülasyonda elde edilen sonuçlar 5.6'de



verilmektedir. Sonuçlardan RSM algoritmasının parçacıklar birbirine yaklaştığında sistematik bir hata ürettiği ancak Zhang vd. (2015) tarafından önerilen TMM temelli algoritmanın parçacıklar birbirine değene kadar doğru sonuç üretebildiği görülmektedir. TMM algoritmasının sıfır civarındaki dalgalanması deneysel bir gözlemde ihmal edilebilir. TMM'nin maksimum hatası 0.065 piksel olup bunun  $5.5nm$  ye karşılık geldiği ve dolayısıyla ihmal edilebileceği görülür.

Bu simülasyon çalışmasından Zhang vd. (2015) tarafından önerilen algoritmanın oldukça iyi sonuç verdiği söylenebilir. Özellikle referans parçacık üzerinden düzeltme çok iyi bir şekilde çalışmaktadır. Ancak Bölüm 4'den de anlaşılacağı gibi RSM temelli algoritma referans parçacık olmaksızın iki parçacık arasındaki bağıl mesafeyi gözlemeye iyi bir adaydır (Yücel & Okumuşoğlu, 2016b).



## 6 SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tezde mikroskopik seviyede kuvvet ölçmeye imkan veren PFM'de ve genel optiksel tuzaklama düzeneklerinde kullanılan DVM sistemiyle alınan görüntüler üzerinden, tuzaklanan küresel parçacıkların pozisyonlarını belirleyen algoritmalar üzerine çalışılmıştır.

İlk olarak Parthasarathy (2012) ve Ma vd. (2012) tarafından önerilen RSM algoritması modifiye edilerek, DVM'de küresel bir parçacığın görüntü üzerinde oluşturduğu şiddet dağılımının bir kısmının kullanılarak da pozisyonun belirlenebileceği ve bu şekilde deneysel olarak parçacığın şiddet dağılımının tamamının gözlenemediği durumlarda da pozisyon belirlenerek deneysel düzeneğin kuvvet kalibrasyonunun yapılabileceği dolayısıyla ölçüm almada kullanılabileceği gösterilmiştir.

Daha sonra RSM algoritmasının bu özelliğinin, literatürde iyi bilinen bir problem olan iki kolloidal parçacığın temas edecek kadar yakın oldukları durumda pozisyon belirlenmesindeki sistematik hataların giderilebileceği önerilmiş ve bunun için bir algoritma önerilerek simülasyonlarla testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda RSM'nin problemi parçacıkların bir birine daha yakın olduğu bir konuma kadar çözebildiği söylenebilir. Bu tezde önerilen algoritma sadece iki parçacık arasındaki etkileşimler için değil üç ve daha fazla parçacık arasındaki bağıl mesafelerin ölçümü içinde kullanışlı olduğu gösterildi. Mevcut metotlar ile üç ve daha fazla parçacık arasındaki bağıl mesafelerin ölçümü zordur.

Ayrıca, bu tez çalışmasının devam ettiği sırada Zhang vd. (2015) tarafından yayınlanan ve aynı probleme TMM algoritması temelli çözüm getiren algoritmanın da simülasyonlarla testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda TMM temelli algoritmanın kullanılmasının riskli ancak bir referans parçacık yardımıyla oldukça iyi sonuçlar alınabileceği görülmüştür.

Bu tez çalışmasında deneysel bir optik tuzaklama düzeneği kurulmuş ve buradan alınan veriler ile deneysel düzeneğin kuvvet kalibrasyonunun parçacığın şiddet dağılımının tamamı kullanılmadan da gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca pozisyon belirleme algoritmalarının testleri sırasında kullanılan simülasyon üretici fonksiyonlarının elde edilmesinde deneysel düzeneğten toplanan parçacık görüntüleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak bu tezde literatüre iki yeni katkı sağlanmıştır. Birincisi küresel bir parçacığın görüntü üzerinde oluşturduğu şiddet dağılımının bir kısmının kullanılarak

da pozisyonun belirlenebileceği ve bu şekilde deneysel olarak parçacığın şiddet dağılımının tamamının gözlenemediği durumlarda da pozisyon belirlenerek deneysel düzeneğin kuvvet kalibrasyonunun gerçekleştirilmesidir. İkincisi ise RSM algoritması ile temasa yakın parçacıkların pozisyonlarının belirlenmesinde oluşan sistematik hataların giderilebilmesi simülasyonlarla gösterilmesidir. Bu yeni katkılar hem yeni deneysel ölçüm tekniklerinin geliştirilmesine hem de temasa yakın parçacıkların bir birleriyle olan etkileşmelerinin daha doğru bir şekilde gözlemlenmesine yardımcı olacaktır.

Gelecek çalışmalarda bu tezde önerilen yöntemler kullanılarak bir parçacık ile bir yüzey arasındaki kuvvet etkileşmeleri daha kolay bir şekilde gözlemlenebilir. Ayrıca üç ve daha fazla parçacık arasındaki etkileşmeler gözlemlenerek mikroskopik sistemlerde ortaya çıkan etkileşmelerin parçacık sayısı yoğunluğuna olan bağlılıkları (many-body interaction) incelenebilir.

## KAYNAKLAR

- Ashkin, A., 1970. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*, 24(4), 156–159.
- Ashkin, A., 1992. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal*, 61(2), 569–582.
- Ashkin, A., 2001. History of optical trapping and manipulation of small neutral particles, atoms, and molecules. In *Single Molecule Spectroscopy*, (pp. 1–31). Springer.
- Ashkin, A., 2006. *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. Hackensack, NJ: World Scientific.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, S., 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5), 288–290.
- Barnett, S. M., & Loudon, R., 2010. The enigma of optical momentum in a medium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1914), 927–939.
- Baumgartl, J., Arauz-Lara, J. L., & Bechinger, C., 2006. Like-charge attraction in confinement: myth or truth? *Soft Matter*, 2(8), 631–635.
- Baumgartl, J., & Bechinger, C., 2005. On the limits of digital video microscopy. *Europhysics Letters (EPL)*, 71(3), 487–493.
- Bell, M., 2007. Digital Photo: Laser Prism (Erişim Tar: 18.07.2016).  
<https://www.flickr.com/photos/mattbell/1591769889/>
- Berg-Sørensen, K., & Flyvbjerg, H., 2004. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3), 594.
- Beth, R. A., 1936. Mechanical detection and measurement of the angular momentum of light. *Physical Review*, 50(2), 115.
- Biancaniello, P. L., & Crocker, J. C., 2006. Line optical tweezers instrument for measuring nanoscale interactions and kinetics. *Review of Scientific Instruments*, 77(11), 113702.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C., 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930–933.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., & Weibel, E., 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*, 49(1), 57–61.
- Brown, R., 1828. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series 2*, 4(21), 161–173.
- Brown, R., 1829. Additional remarks on active molecules. *Philosophical Magazine Series 2*, 6(33), 161–166.

- Brujic, J., 2004. *Experimental study of stress transmission through particulate matter*. Doktora Tezi, University of Cambridge.
- Callegari, A., Mijalkov, M., Gököz, A. B., & Volpe, G., 2015. Computational toolbox for optical tweezers in geometrical optics. *Journal of the Optical Society of America B*, 32(5), B11.
- Cheezum, M. K., Walker, W. F., & Guilford, W. H., 2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical journal*, 81(4), 2378–2388.
- Cosgrove, T. (Ed.) , 2010. *Colloid science: principles, methods and applications*. Chichester, West Sussex: Wiley, 2nd ed ed.
- Crocker, J. C., & Grier, D. G., 1994. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid. *Physical review letters*, 73(2), 352.
- Crocker, J. C., & Grier, D. G., 1996. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1), 298–310.
- Dienerowitz, M., 2008. Optical manipulation of nanoparticles: a review. *Journal of Nanophotonics*, 2(1), 021875.
- Dufresne, E. R., & Grier, D. G., 1998. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of Scientific Instruments*, 69(5), 1974–1977.
- Einstein, A., 1905. On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der Physik*, 17, 549–560.
- Fish, J., & Scrimgeour, J., 2015. Fast weighted centroid algorithm for single particle localization near the information limit. *Applied Optics*, 54(20), 6360.
- Florin, E.-L., Pralle, A., Heinrich Hörber, J. K., & Stelzer, E. H. K., 1997. Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications. *Journal of Structural Biology*, 119(2), 202–211.
- Ghislain, L. P., Switz, N. A., & Webb, W. W., 1994. Measurement of small forces using an optical trap. *Review of Scientific Instruments*, 65(9), 2762–2768.
- Ghislain, L. P., & Webb, W. W., 1993. Scanning-force microscope based on an optical trap. *Optics Letters*, 18(19), 1678.
- Grier, D. G., 2003. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(6950), 810–816.
- Grier, D. G., & Roichman, Y., 2006. Holographic optical trapping. *Applied Optics*, 45(5), 880.
- Gyger, M., Ruckerl, F., Käs, J., & Ruiz-García, J., 2008. Errors in two particle tracking at close distances. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326(2), 382–386.
- Jones, P. H., Maragò, O. M., & Volpe, G., 2016. *Optical Tweezers: Principles and Applications*. Cambridge University Press, 1 edition ed.
- Keen, S., Leach, J., Gibson, G., & Padgett, M. J., 2007. Comparison of a high-speed camera and a quadrant detector for measuring displacements in optical tweezers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), S264.
- Kepler, J., 1619. De cometis. *Libelli tres. Mylius: Augustae Vindelicorum*.
- Knight, J., 2002. Microfluidics: Honey, I shrunk the lab. *Nature*, 418(6897), 474–475.

- Lebedev, P., 1901. The experimental study of the pressure of the light. *Ann. Phys*, 6, 433.
- Lee, G. M., Ishihara, A., & Jacobson, K. A., 1991. Direct observation of Brownian motion of lipids in a membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(14), 6274–6278.
- Liu, S.-L., Li, J., Zhang, Z.-L., Wang, Z.-G., Tian, Z.-Q., Wang, G.-P., & Pang, D.-W., 2013. Fast and High-Accuracy Localization for Three-Dimensional Single-Particle Tracking. *Scientific Reports*, 3.
- Ma, H., Long, F., Zeng, S., & Huang, Z.-L., 2012. Fast and precise algorithm based on maximum radial symmetry for single molecule localization. *Optics letters*, 37(13), 2481–2483.
- Ma, H., Xu, J., Jin, J., Gao, Y., Lan, L., & Liu, Y., 2015. Fast and Precise 3d Fluorophore Localization based on Gradient Fitting. *Scientific Reports*, 5, 14335.
- Maxwell, J. C., 1881. *A treatise on electricity and magnetism*, vol. 1. Clarendon press.
- Mazolli, A., Maia Neto, P. A., & Nussenzveig, H. M., 2003. Theory of trapping forces in optical tweezers. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 459(2040), 3021–3041.
- Merrill, J. W., Sainis, S. K., & Dufresne, E. R., 2009. Many-body electrostatic forces between colloidal particles at vanishing ionic strength. *Physical review letters*, 103(13), 138301.
- Nelson, E., Nelson, E., Nelson, E., & Nelson, E., 1967. *Dynamical theories of Brownian motion*, vol. 2. Princeton university press Princeton.
- Neuman, K. C., & Block, S. M., 2004. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 75(9), 2787.
- Ovryn, B., & Izen, S. H., 2000. Imaging of transparent spheres through a planar interface using a high-numerical-aperture optical microscope. *JOSA A*, 17(7), 1202–1213.
- Paladugu, S., Callegari, A., Tuna, Y., Barth, L., Dietrich, S., Gambassi, A., & Volpe, G., 2016. Nonadditivity of critical Casimir forces. *Nature Communications*, 7, 11403.
- Park, J.-H., Park, C., Yu, H., Park, J., Han, S., Shin, J., Ko, S. H., Nam, K. T., Cho, Y.-H., & Park, Y., 2013. Subwavelength light focusing using random nanoparticles. *Nature Photonics*, 7(6), 454–458.
- Parthasarathy, R., 2012. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. *Nature Methods*, 9(7), 724–726.
- Pesce, G., Volpe, G., Maragó, O. M., Jones, P. H., Gigan, S., Sasso, A., & Volpe, G., 2015. Step-by-step guide to the realization of advanced optical tweezers. *J. Opt. Soc. Am. B*, 32(5), B84–B98.
- Polin, M., Grier, D. G., & Han, Y., 2007. Colloidal electrostatic interactions near a conducting surface. *Physical Review E*, 76(4), 041406.
- Poynting, J. H., 1884. On the Transfer of Energy in the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 175, 343–361.
- Purcell, E. M., 1977. Life at low Reynolds number. *Am. J. Phys*, 45(1), 3–11.

- Raudsepp, A., Griffiths, M., Sutherland-Smith, A. J., & Williams, M. A. K., 2015. Developing a video tracking method to study interactions between close pairs of optically trapped particles in three dimensions. *Applied Optics*, 54(32), 9518.
- Sarshar, M., Wong, W. T., & Anvari, B., 2014. Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers. *Journal of Biomedical Optics*, 19(11).
- Smith, S. B., Cui, Y., & Bustamante, C., 1996. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*, 271(5250), 795–799.
- Smith, S. B., Finzi, L., & Bustamante, C., 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085), 1122–1126.
- Solomon, C., & Breckon, T., 2011. *Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab*. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley, 1 edition ed.
- Strick, T. R., Allemand, J.-F., Bensimon, D., Bensimon, A., & Croquette, V., 1996. The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule. *Science*, 271(5257), 1835–1837.
- Čižmár, T., Mazilu, M., & Dholakia, K., 2010. In situ wavefront correction and its application to micromanipulation. *Nature Photonics*, 4(6), 388–394.
- Ueberschär, O., Wagner, C., Stangner, T., Gutsche, C., & Kremer, F., 2012. A novel video-based microsphere localization algorithm for low contrast silica particles under white light illumination. *Optics and Lasers in Engineering*, 50(3), 423–439.
- USAF, 1951. MIL-STD-150A standard resolution test chart (Erişim Tar: 24.12.2016). [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=1951\\_USAF\\_resolution\\_test\\_chart&oldid=741572418](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=1951_USAF_resolution_test_chart&oldid=741572418)
- Vellekoop, I. M., & Mosk, A. P., 2007. Focusing coherent light through opaque strongly scattering media. *Optics Letters*, 32(16), 2309.
- Volke-Sepulveda, K., Garcés-Chávez, V., Chávez-Cerda, S., Arlt, J., & Dholakia, K., 2002. Orbital angular momentum of a high-order Bessel light beam. *Journal of Optics B: Quantum and Semiclassical Optics*, 4(2), S82.
- Volpe, G., 2008. *Novel applications of Photonic Force Microscopy*. Doktora Tezi, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Volpe, G., & Volpe, G., 2013. Simulation of a Brownian particle in an optical trap. *American Journal of Physics*, 81(3), 224.
- Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M., & Gelles, J., 1995. Transcription Against an Applied Force. *Science*, 270(5242), 1653–1657.
- Yücel, H., & Okumuşoğlu, N. T., 2016a. Optical tweezer calibration by using a part of the intensity distribution of a trapped particle. *Applied Optics*, 55(28), 7861.
- Yücel, H., & Okumuşoğlu, N. T., 2016b. A simulation study about tracking of micro sized particles close to contact. In *AIP Conference Proceedings: Turkish Physical Society 32th International Physics Conference*.
- Zhang, C., Brügger, G., & Scheffold, F., 2015. Tracking of colloids close to contact. *Optics express*, 23(17), 22579–22586.

## **EKLER**

- EK 1 : RSM Hesaplama Detayı
- EK 2 : USAF 1951 Standart Çözünürlük Hedefi
- EK 3 : Bilgisayar Program CD'si





## EK 1: RSM Hesaplama Detayı

Tüm formülasyon Parthasarathy (2012)'nin çalışmasında ve ek sayfalarında bulunabilir. Doğru denklemi,

$$y_0 - y + m(x - x_0) = 0$$

Burada  $x$  değişkeni için imgenin  $j$  sütun indeksini,  $y$  değişkeni için imgenin  $i$  satır indeksini kullanılır.  $(x_c, y_c)$  imgenin şiddet dağılımının merkezi ise;

$$i - y_c + m(i, j)(x_c - j) = 0$$

$d(i, j)$ ,  $m(i, j)$  ile  $(x_c, y_c)$  noktası arasındaki dik uzaklık

$$d(i, j)^2 = \frac{[(i - y_c) + m(i, j)(x_c - j)]^2}{m(i, j)^2 + 1}$$

$$D = \sum_{i,j}^{N,M} w(i, j)d(i, j)^2$$

$x_c$  için

$$\frac{dD}{dx_c} = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{m(i, j)w(i, j)[(i - y_c) + m(i, j)(x_c - j)]}{m(i, j)^2 + 1} = 0$$

$$x_c \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)^2}{m(i, j)^2 + 1} - y_c \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1} = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}$$

$y_c$  için

$$\frac{dD}{dy_c} = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)[(i - y_c) + m(i, j)(x_c - j)]}{m(i, j)^2 + 1} = 0$$

$$-x_c \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1} + y_c \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)}{m(i, j)^2 + 1} = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}$$

iki eşitlikten

$$A = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)^2}{m(i, j)^2 + 1}, \quad B = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1}$$

$$C = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)}{m(i, j)^2 + 1}, \quad D = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)}{m(i, j)^2 + 1}$$

ve

$$E = \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)m(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}, \quad F = - \sum_{i,j}^{N,M} \frac{w(i, j)(m(i, j)j - i)}{m(i, j)^2 + 1}$$

sonra matris

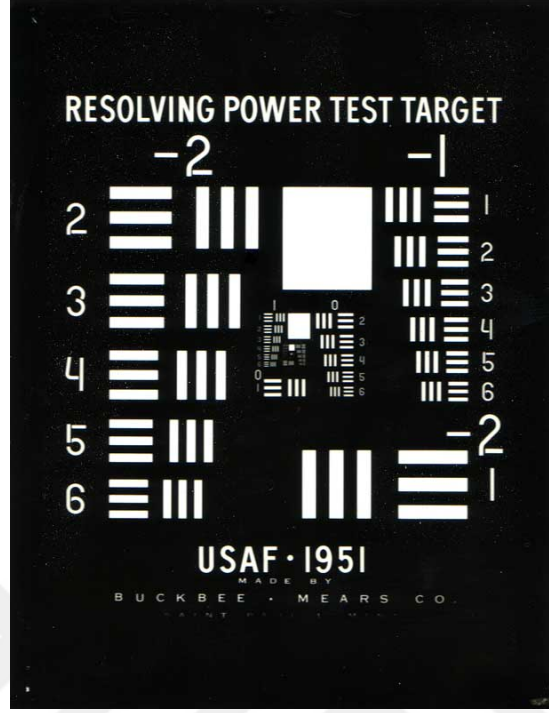
$$\begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_c \\ y_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E \\ F \end{bmatrix}$$

ve matris çözümü

$$\begin{bmatrix} x_c \\ y_c \end{bmatrix} = \frac{1}{AD - BC} \begin{bmatrix} D & -B \\ -C & A \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E \\ F \end{bmatrix}$$

## EK 2: USAF 1951 Standart Çözünürlük Hedefi

USAF 1951 Standart Çözünürlük Hedefinin bir örneği



Hedef üzerindeki çizgilerin kalınlıkları

Width of 1 line in micrometers in USAF Resolving Power Test Target 1951												
Group Number												
Element	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2000.00	1000.00	500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98
2	1781.80	890.90	445.45	222.72	111.36	55.68	27.84	13.92	6.96	3.48	1.74	0.87
3	1587.40	793.70	396.85	198.43	99.21	49.61	24.80	12.40	6.20	3.10	1.55	0.78
4	1414.21	707.11	353.55	176.78	88.39	44.19	22.10	11.05	5.52	2.76	1.38	0.69
5	1259.92	629.96	314.98	157.49	78.75	39.37	19.69	9.84	4.92	2.46	1.23	0.62
6	1122.46	561.23	280.62	140.31	70.15	35.08	17.54	8.77	4.38	2.19	1.10	0.55

Değerler wikipedia'dan alınmıştır (USAF, 1951).

### **EK 3: Bilgisayar Program CD'si**

CD'nin içeriği Şu Şekildedir. Ayrıca bu ağıklamalar "BENIOKU.txt" dosyasında da bulunmaktadır.

#### MatLAB kodları ve ağıklamaları

centroid.m	centroid algoritma fonksiyonu
imGenerate.m	görüntü üretici fonksiyon
imGenerate_int.m	görüntü üretici fonksiyon
grad.m	gradyant alan fonksiyon
connectivity.m	etiketleme algoritması
framedetec_ef.m	etkin alan belirleyen fonksiyon
radial.m	RSM algoritması
Sim_206.m	2.06 mikron çaplı parçacıklar için bir simülasyon
Sim_553.m	5.53 için animasyon
ExpFit553.xls	5.53 mikron çaplı parçacıklar için görüntü karakterizasyonu

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Harun YÜCEL  
Doğum Yeri : Karabük  
Doğum Tarihi : 20.03.1981  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Namık Kemal Lisesi, 1998  
Lisans : OMÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, 2007  
Yüksek Lisans : OMÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, 2009-2012

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

STC Elektronik : ArGe Mühendisi, 2013-2016  
Bilkent Soft Matter Lab. : Ziyaretçi Bilimci, 2013-2015

### Yayımlar

- Yücel, H., Okumuşoğlu N. T., *Optical tweezer calibration by using a part of the intensity distribution of a trapped particle*, Appl. Opt., 55, 28, 7861–7865, 2016. doi: 10.1364/AO.55.007861
- Yücel, H., Okumuşoğlu N. T., *A Simulation Study About Tracking of Micro Sized Particles Close to Contact* In: *AIP Conference Proceedings: Turkish Physical Society 32th International Physics Conference*, 6–9 September, 2016, Bodrum, Turkey.
- Yücel, H., Taşan M., *Coupled-channel analysis for 20.4 MeV energy of p-64Zn inelastic scattering*. *Pramana - Journal of Physics*. 78(2):215–224. 2012. doi: 10.1007/s12043-011-0231-z
- Yücel, H., Okumuşoğlu N. T. *6-20 MeV electrons in water depth dose curves calculated with the Penelope Monte Carlo code fitting the experimental data* In: *Turkish Physical Society 29th International Physics Conference*, 5–8 September, 2012, Bodrum, Turkey.
- Yücel, H., Taşan M. *Analysis of proton scattering from zinc isotopes at energy region of 20-50 MeV* In: *Turkish Physical Society 28th International Physics Conference*, 6–9 September, 2011, Bodrum, Turkey.
- Yücel, H., Taşan M. *Coupled-channel analysis for 20.4 MeV energy of p-64Zn inelastic scattering* In: *5. Workshop on Nuclear Structure Features*, 12–14 Ekim, 2011, Muş, Turkey.