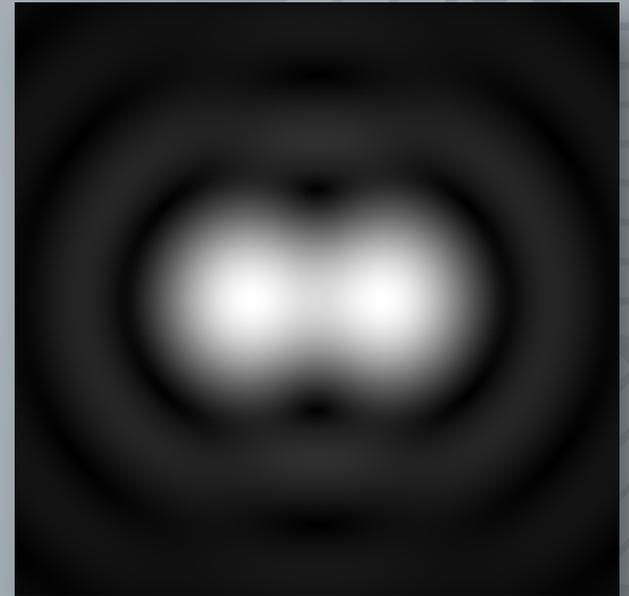
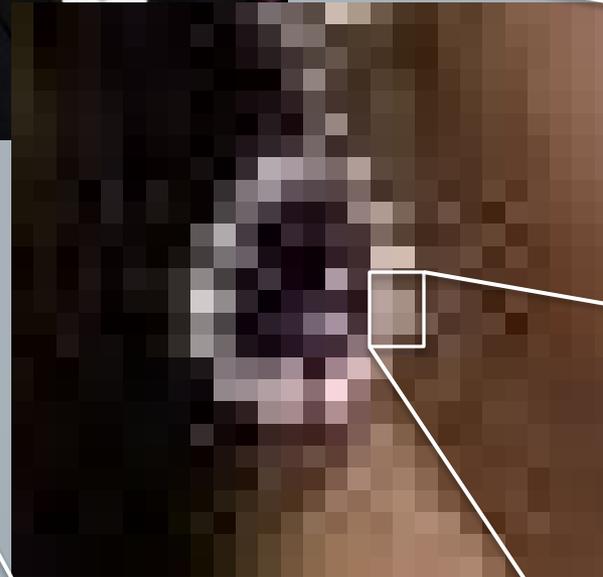


Gibt es eine Grenze des Auflösungsvermögens?

Oliver Passon
Bergische Universität Wuppertal
Physik und ihre Didaktik





Auflösung \neq Vergrößerung
Die Vergrößerung muss auf das
Auflösungsvermögen abgestimmt sein

Über „Auflösung“ sprechen

“Resolution of a microscope is defined as the smallest distance at which two point like objects could be discriminated.”

Saka (2014) p. 4

“The resolution of an optical microscope is defined as the smallest distance between two points on a specimen that can still be distinguished as two separate entities.”

Dear Prof Zalevsky,

I have come across your excellent "Exceeding the Diffraction and the Geometric Limits of Imaging Systems: A Review" from 2011. However, you make a curious remark in the beginning, namely that "resolution is the smallest distance one can resolve". Is this an ironic expression for the fact that resolution is in fact no physical quantity proper (as Toraldo di Francia" stated already in 1955)? Do you think that there is a better definition than this tautology?

best regards,
Oliver Passon

Von Zeev Zalevsky <Zeev.Zalevsky@biu.ac.il>★

Antworten Weiterleiten Archivieren Junk Löschen Mehr ▾

Betreff **Re: resolution**

31.05.2016 19:09

An Oliver Passon★

Hi Oliver,
I didn't really understand your question. I personally define resolution as the minimal distance in space allowing to perform two points discrimination. I know that from philosophical point of view there might be other definitions but from mathematical point of view I find it the simplest.

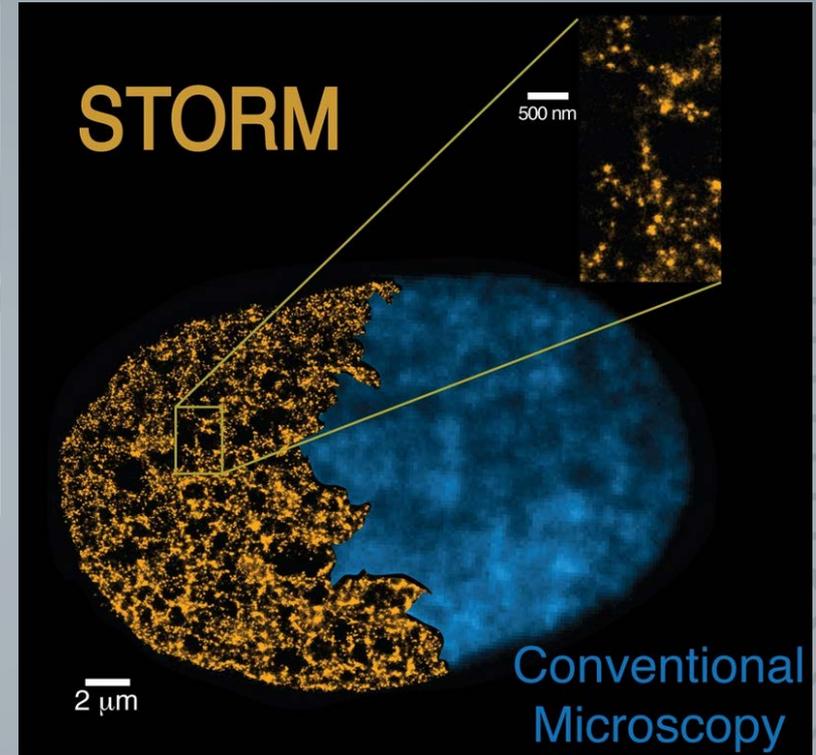
Best
Zeev

„Auflösung“ ist keine „physikalische Größe“, sondern ein „Fähigkeit“...

Warum man über Auflösung sprechen sollte



Nobel prize for Chemistry 2014
Eric **Betzig**, Stefan **Hell** and William **Moerner**



“[...] for having bypassed a **presumed** scientific limitation **stipulating** that an optical microscope can never yield a resolution better than 0.2 micrometers.”

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/press.html

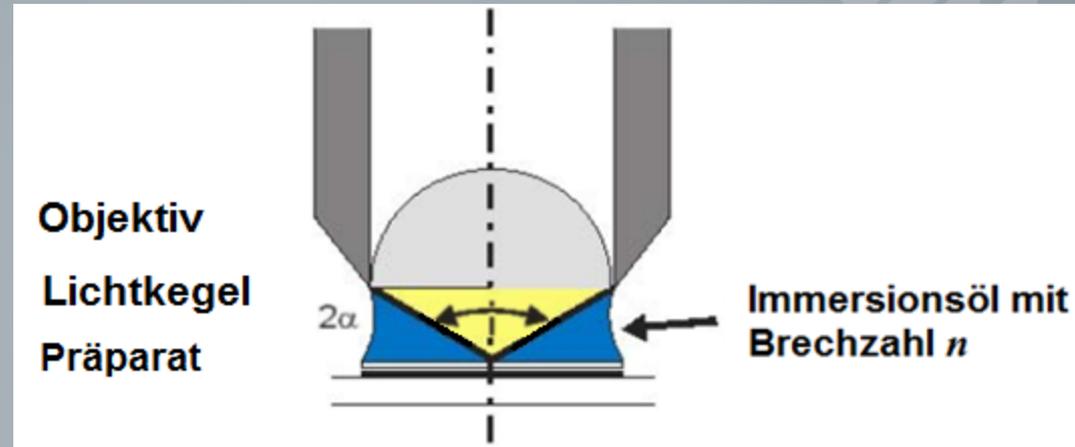
to presume = unterstellen, annehmen, voraussetzen, ...

to stipulate = festsetzen, vorschreiben, fordern, ...

“[...] for having bypassed a presumed scientific limitation stipulating that an optical microscope can never yield a resolution better than 0.2 micrometers.”



Ernst Abbe (1873):



$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2NA}$$

Mit NA = numerische Apertur

Auflösung kann beliebig gesteigert werden, aber...

$$\lambda \approx 400nm \quad NA \approx 1$$

$$\Rightarrow d_{min} \approx 0,2\mu m$$

Nebenbemerkung: Mit dem Auge können ca. 0,2mm aufgelöst werden \Rightarrow eine Auflösung >1000 ist also nicht sinnvoll...

Inhalt und Thesen dieses Vortrags

- Begründung von Abbes Auflösungsgrenze (und des Rayleigh-Kriteriums)
- Darstellung der neuen Verfahren zur „Supermikroskopie“ (STED und stochastische Lokalisierung)

Thesen:

- i. Die optische Auflösung unterliegt keiner prinzipiellen Grenze (unabhängig von neuen Mikroskopie-Techniken).
- ii. Das optische Auflösungsvermögen ist lediglich durch die Qualität der Daten (Signalstärke und Rauschen) limitiert.
- iii. Die Angaben zur Auflösung der neuen Techniken missachten diese Tatsache.
- iv. Die Methoden zur „stochastischen Lokalisierung“ haben keinen definierten Auflösungsbegriff.

Am Montag, den 23. Juli 1923 (17h) fand das „Examen-Rigorosum“ im Promotionsverfahren Werner Heisenbergs statt.

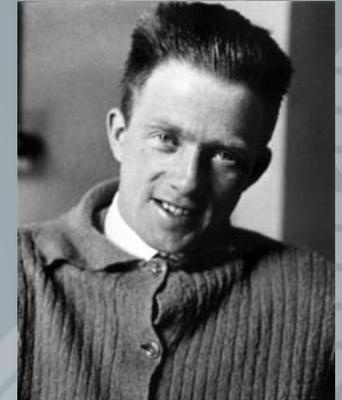
Anwesende Prüfer:

Oskar Perron (Mathematik)

Hugo Seeliger (Astronomie)

Arnold Sommerfeld (Physik)

Wilhelm Wien (Physik)



„Als Gesamtergebnis wurde festgestellt Note III cum laude“

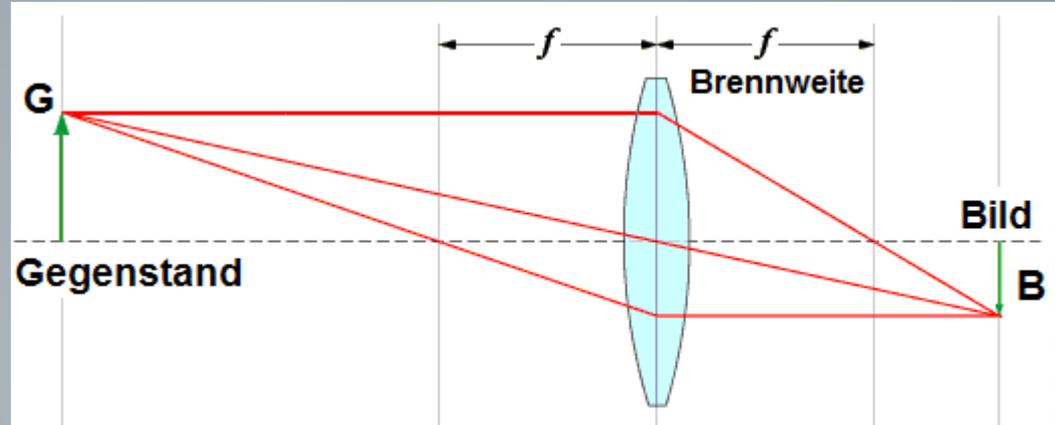
„In der Prüfung fragte Wien über das Auflösungsvermögen des Fabry-Pérot-Interferometers, und das hatte ich nie studiert. Während der Prüfung habe ich natürlich versucht, es herauszubringen, aber in der kurzen Zeit gelang es nicht. So hat er sicher gemerkt, daß ich kein Interesse gehabt hatte. Da wurde er ärgerlich und er fragte nach dem Auflösungsvermögen des Mikroskops. Als ich das nicht wußte, fragte er nach dem Auflösungsvermögen des Fernrohrs und das wußte ich auch nicht.“

Rechenberg (2010, S. 137)

Zwei Konzeptualisierungen der Optik



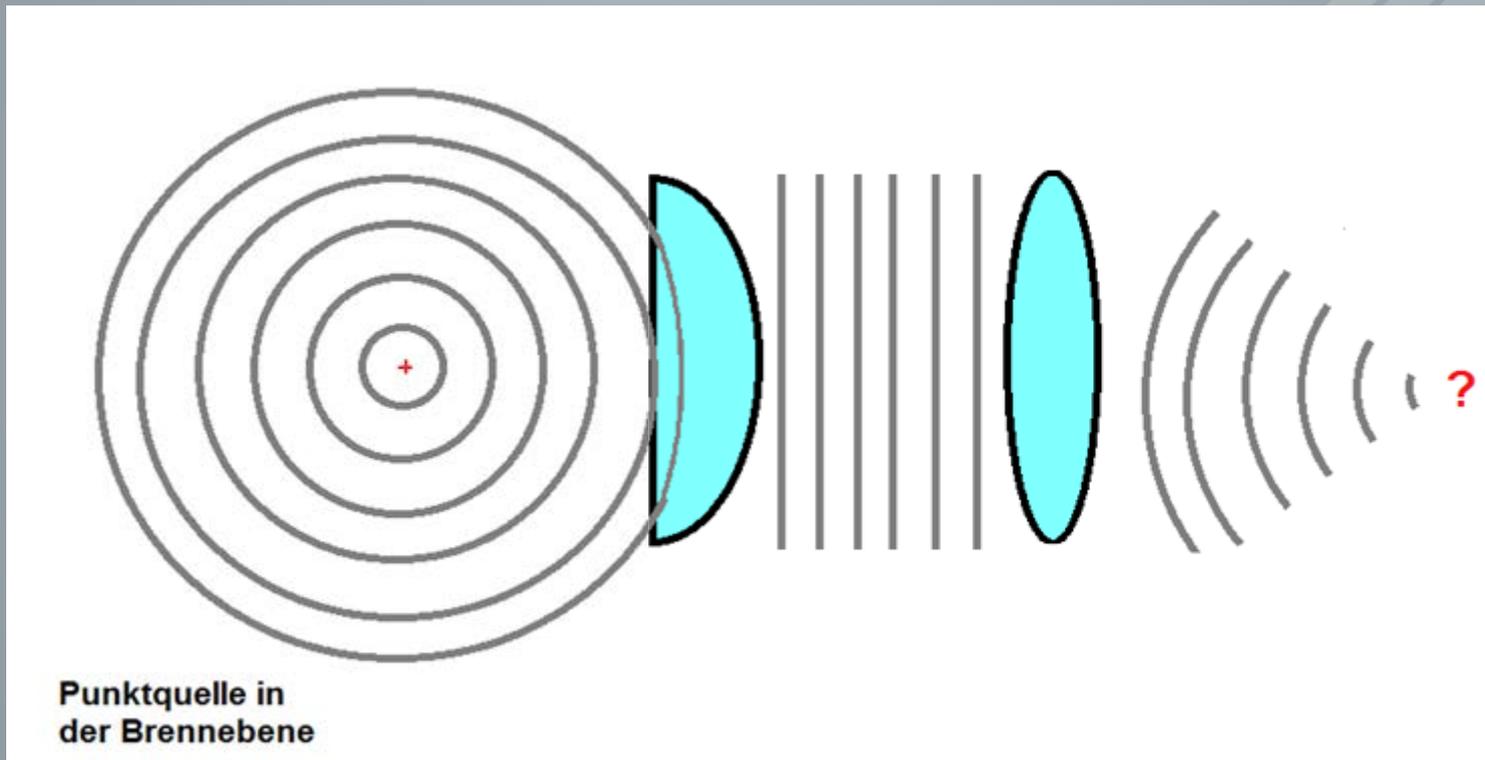
(i) Strahl- bzw.
geometrische Optik

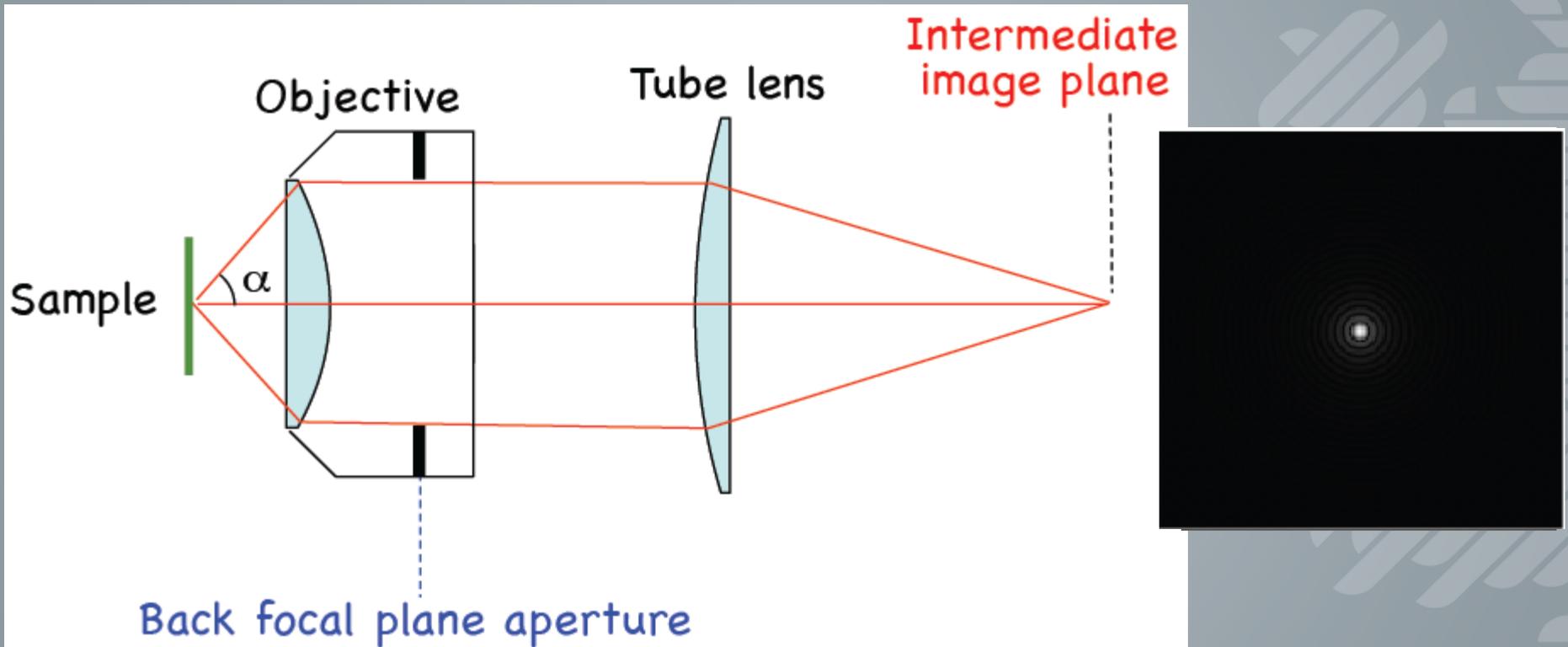


- Abbildung erfolgt „Punkt zu Punkt“
- Dann enthält das **Bild** alle Details des **Gegenstandes** und...
- ...eine **prinzipielle** Auflösungsgrenze existiert nicht!
- Während in der Praxis natürlich Abbildungsfehler die erreichbare Auflösung herabsetzen
- Interferenz und Beugung können in der geometrischen Optik nicht beschrieben werden.

Zwei Konzeptualisierungen der Optik

(ii) Wellenoptik

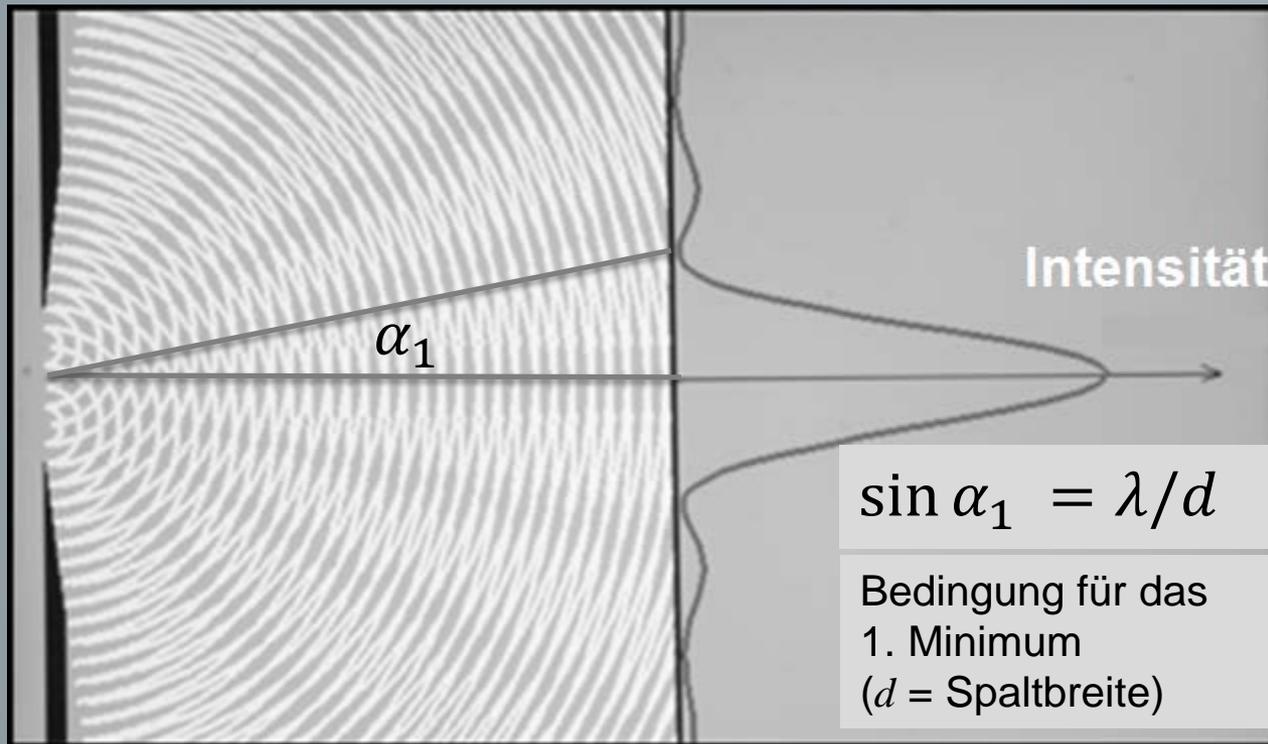




In der Wellenoptik wird ein Gegenstandspunkt nicht auf einen Bildpunkt abgebildet („Airy-Scheibchen“)

Exkurs: Beugung

Beugung = Ausbreitung in den „geometrischen Schattenraum“



Das Bild einer Punktquelle ist das Beugungsmuster der Apertur!

Die Auflösungskriterium nach Rayleigh



John W. Strutt
(ab 1873 3. Baron Rayleigh)
1842-1919

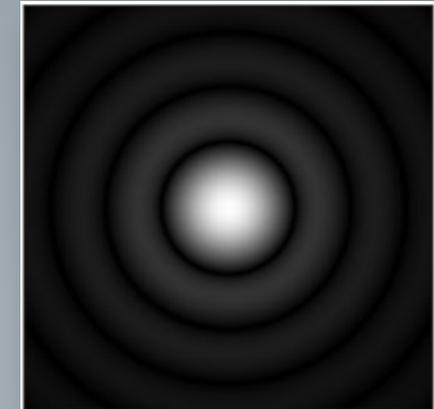
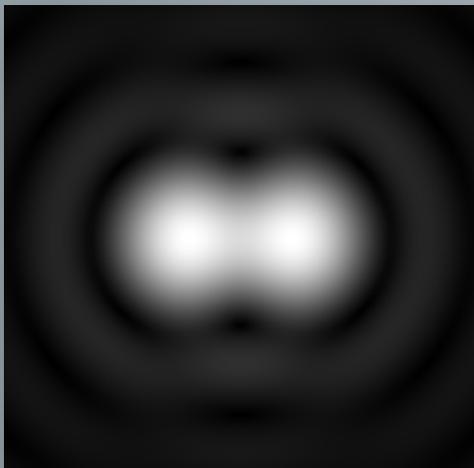


Bild eines Sterns (durch ein Teleskop gesehen):

Winkel zum ersten Minimum:

$\sin \alpha_1 = 1,22 \cdot \lambda / d$ (mit d dem Durchmesser der Kreisblende)



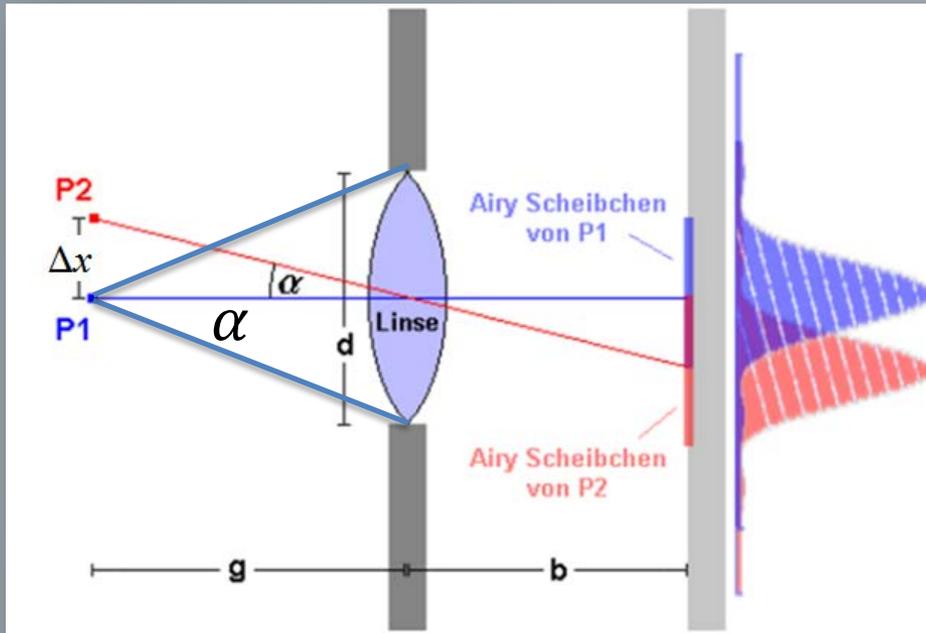
Rayleigh (1874) schlägt vor:

Zwei Punktquellen (gleicher Intensität) werden „aufgelöst“, wenn das Max. des einen Beugungsmuster mit dem 1. Min. des zweiten zusammenfällt.

Winkelauflösung:

$$\alpha_{\min} \approx \frac{1,22 \cdot \lambda}{d}$$

Die räumliche Auflösungsgrenze beim Mikroskop nach Rayleigh



$$\alpha_{\min} = \frac{\Delta x}{g}$$

Beim Mikroskop: $g \approx f$

$$\begin{aligned} \Delta x_{\min} &= 1,22 \cdot \frac{\lambda \cdot f}{d} \\ &\approx \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \sin \alpha} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{\sin \alpha} \end{aligned}$$

- Lord Rayleigh betrachtet die „Zwei-Punkt Auflösung“
- Ernst Abbe ist von periodischen Strukturen ausgegangen

Herleitung des Auflösungs Grenze nach Abbe

Fragestellung von Abbe (1873):

Bis zu welcher Gitterkonstante d_{min} gelingt die Abbildung?

(Mindestens) die erste

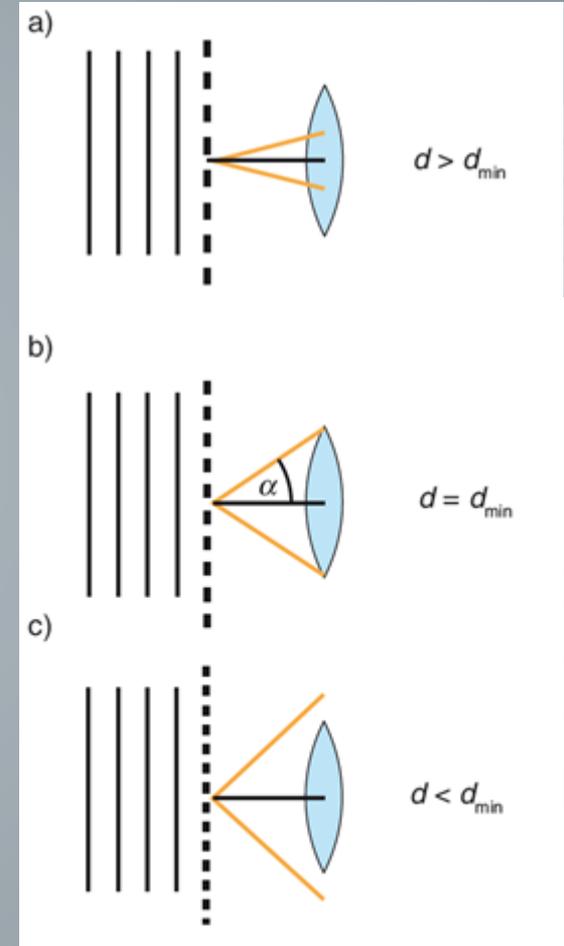
Beugungsordnung muss in das Objektiv

fallen: $\sin \alpha \geq \frac{\lambda}{d}$. Daraus folgt:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{\sin \alpha}$$

Bei schräger Beleuchtung:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \sin \alpha}$$



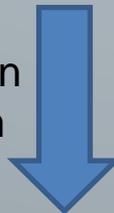
Ein kleiner Exkurs zur Bildentstehung

- Typische Präparate sind weder Punktquellen noch periodisch...
- Ein beliebiges Objekt $O(x)$ kann als Summe von Punktquellen aufgefasst werden.
- Falls das Beugungsmuster der Punktquelle (die „point-spread function, PSF) nicht vom Ort in der Bildebene abhängt, kann das Bild $I(x)$ als Summe der Punkt-Bilder dargestellt werden.

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} O(x') \cdot I_{\text{PSF}}(x - x') dx'$$
$$I(x) = O(x') \otimes I_{\text{PSF}}(x)$$

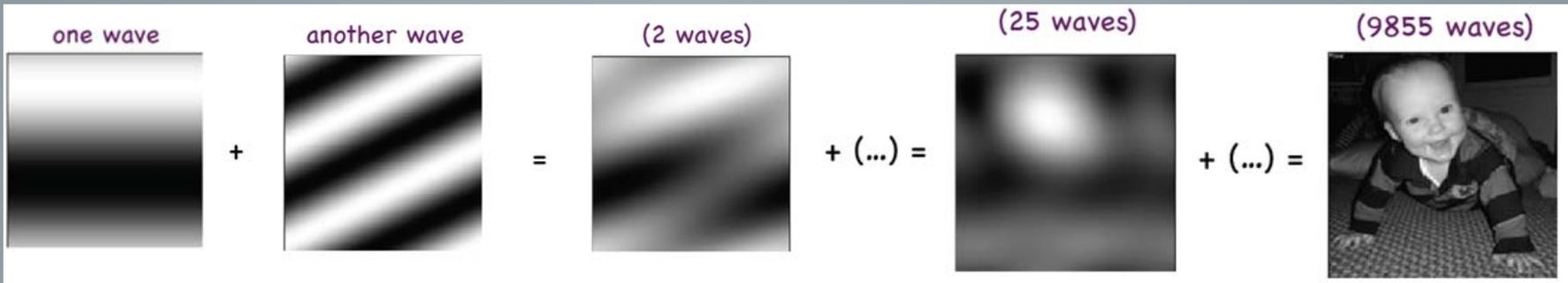
Faltungsdarstellung
der Bildentstehung

Fourier Transformation
und Faltungstheorem

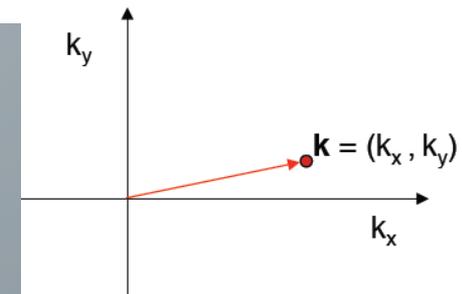
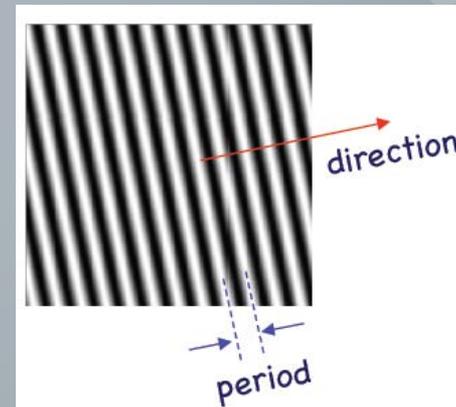


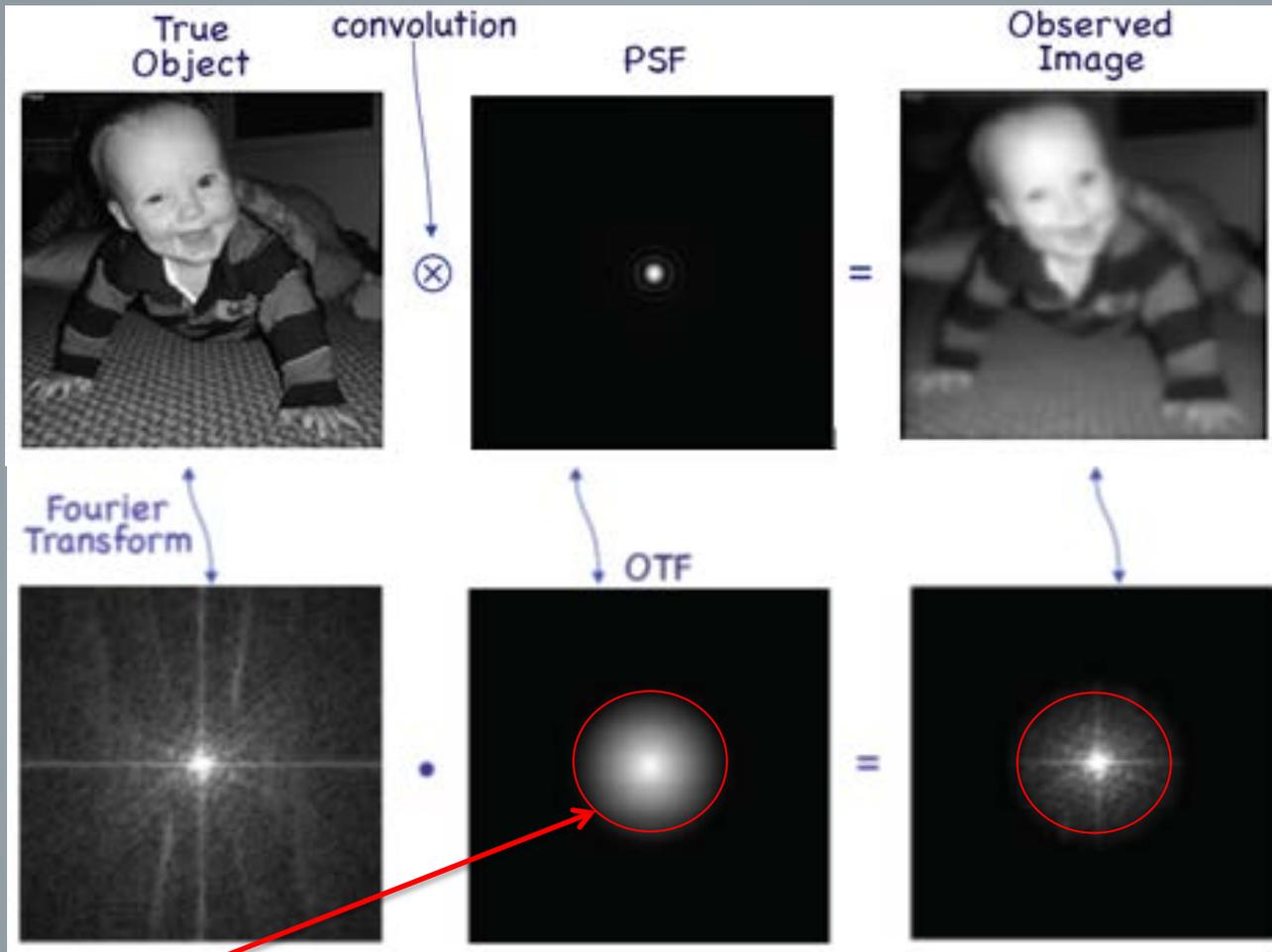
$$\mathcal{F}[I(x)] = \mathcal{F}[O(x')] \cdot \underbrace{\mathcal{F}[I_{\text{PSF}}(x)]}_{\text{OTF}}$$

Fourier Synthese und Analyse, oder: Bilder als Summe von Wellen



Kenngrößen einer Welle:	Und ihr Pendant im „Fourier-Raum“
Frequenz	Abstand vom Ursprung
Richtung	Richtung des Abstandes
Amplitude	Größe des Wertes

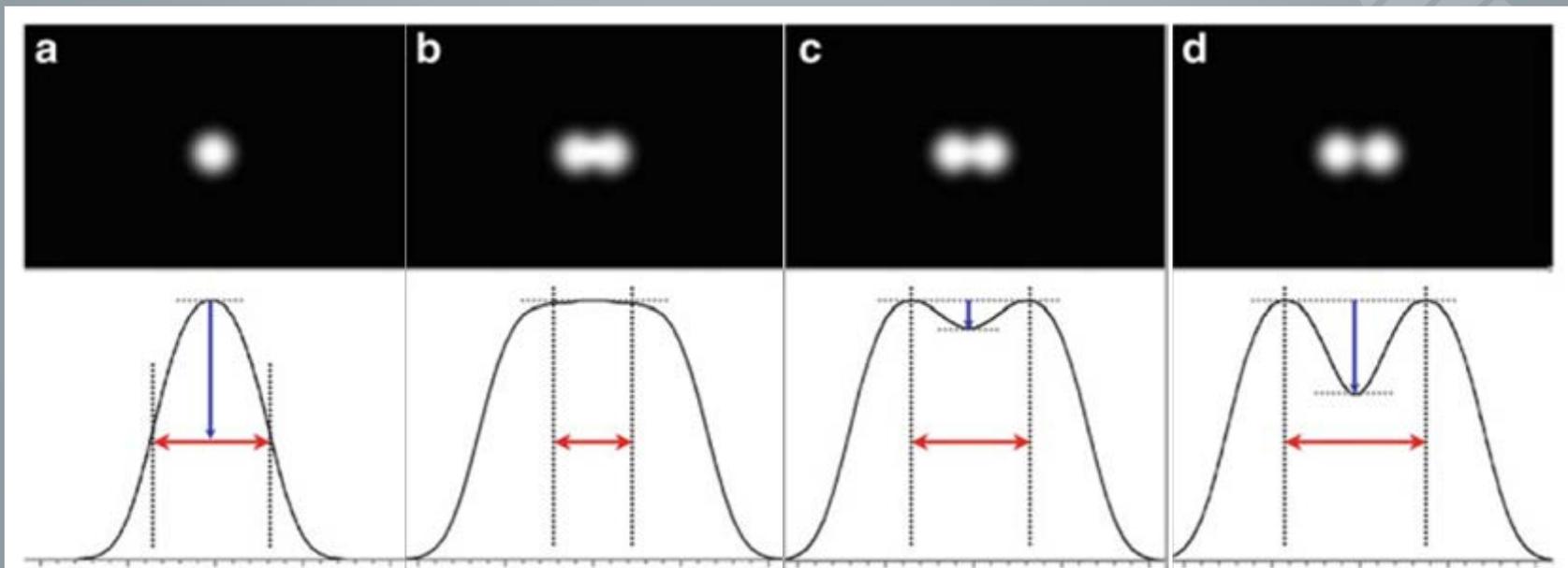




„cut-off“ der optischen Transferfunktion (OTF). Höhere Frequenzen (= feinere Details) sind im Bild nicht enthalten. Das Abbe Kriterium entspricht genau dieser Grenze (Gitter-Signal ist eine Punktquelle im Fourierraum...)

Warum das Rayleigh Kriterium keine prinzipielle Auflösungsgrenze begründet

- Rayleighs Kriterium argumentiert mit der Breite des Bildes einer Punktquelle. Dies ist mehrdeutig.



a) FWHM

b) Sparrow Kriterium

c) 5% dip

d) Rayleigh (20% dip)

Warum das Rayleigh Kriterium keine prinzipielle Auflösungsgrenze begründet

„Außerdem ist es offensichtlich, dass vom mathematischen Standpunkt das Bild von zwei Punkten – unabhängig von ihrer Nähe – vom Bild eines einzelnen Punktes abweicht. Es ist nicht absurd anzunehmen, dass der technische Fortschritt uns immer feinere Rezeptoren liefert, die in der Lage sein werden, den Unterschied zwischen dem Bild eines Punktes und dem Bild von zwei Punkten im beliebigen Abstand voneinander, zu liefern. Dies bedeutet aber, dass wir zum jetzigen Zeitpunkt nur eine praktische (wenn überhaupt) und keine prinzipielle Grenze für die zwei-Punkt Auflösung kennen.“

Toraldo di Francia, G. (1955)

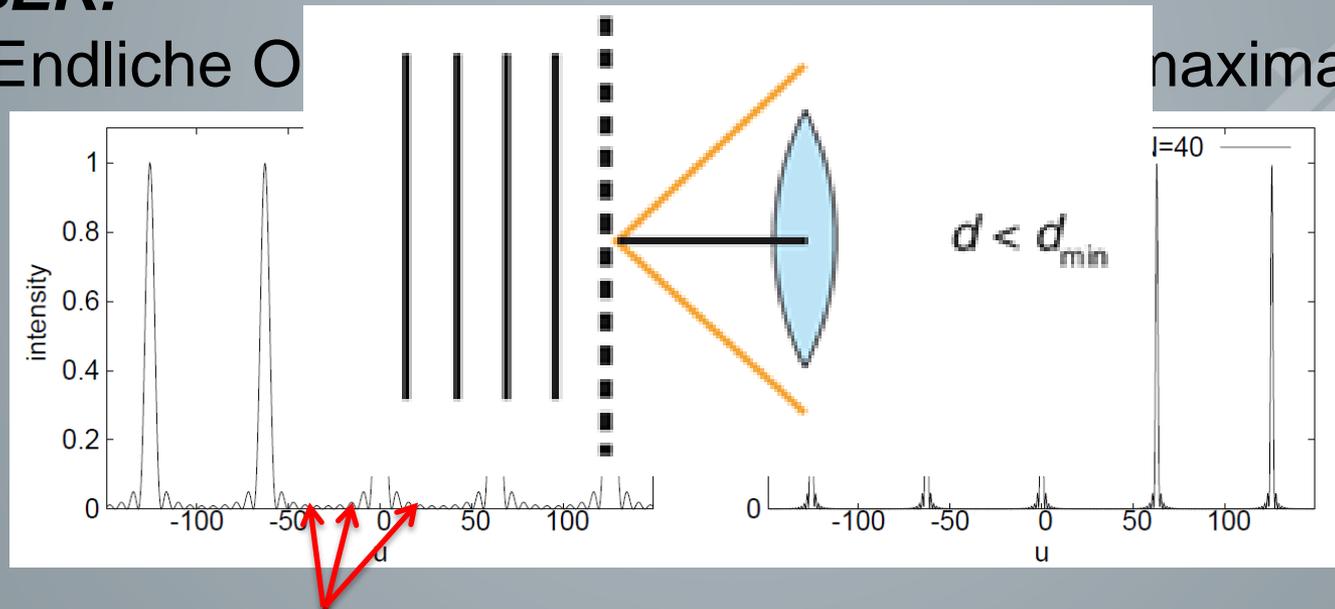
- Das Rayleigh Kriterium formuliert eine Grenze für die bequeme Unterscheidung von Punktquellen mit dem Auge.
- Toraldo spricht vom „mathematischen Standpunkt“. In der Praxis limitiert Rauschen etc. die Auflösung.
- Rayleigh wusste das...

Warum auch Abbe keine prinzipielle Auflösungsgrenze begründet

- Abbe argumentiert mit dem cut-off der „optischen Transferfunktion“
- Optische Systeme funktionieren wie ein „Tiefpassfilter“ und die fehlenden (höheren) Frequenzen entsprechen den feineren Details

ABER:

- Endliche O



Diese Nebenmaxima enthalten Objektinformation unterhalb der vorgeblichen Auflösungsgrenze!

Sophistiziertere Begründung

Theorem 1. The two-dimensional Fourier transform of a spatially bounded function is an *analytic* function in the (f_X, f_Y) plane.

Theorem 2. If an analytic function in the (f_X, f_Y) plane is known exactly in an arbitrarily small (but finite) region of that plane, then the entire function can be found (uniquely) by means of *analytic continuation*.

J. **Goodman** (1996), "Introduction to Fourier Optics" Second Edition. McGraw-Hill, New York, p. 161. siehe auch: **Pask**, C. (1976) Simple optical theory of super-resolution. J. Opt. Soc. Am. 66(1): 68-70.

Mit der analytisch fortgesetzten OTF könnte folgendes Inversenproblem eindeutig gelöst werden („Deconvolution“):

$$O(x') = \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\mathcal{F}[I(x)]}{OTF} \right]$$

Wolter, H. (1958) Zum Grundtheorem der Informationstheorie, insbesondere in der Optik. *Physica* 24(1-5): 457-475.

Wolter, H. (1961) On basic analogies and principal differences between optical and electronic information. In: E. Wolf (Ed.) *Progress in Optics* 1 pp. 157-210. North-Holland, Amsterdam.

Harris, J. L. (1964) Diffraction and Resolving Power. *J. Opt. Soc. Am.* 54(7): 931-933.

Toraldo di Francia, G. (1969) Degrees of Freedom of an Image. *J. Opt. Soc. Am.* 59(7): 799-803.

“[...] it would be desirable that people should stop rediscovering it time and again.“

$$O(x') = \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\mathcal{F}[I(x)] + N}{OTF} \right]$$

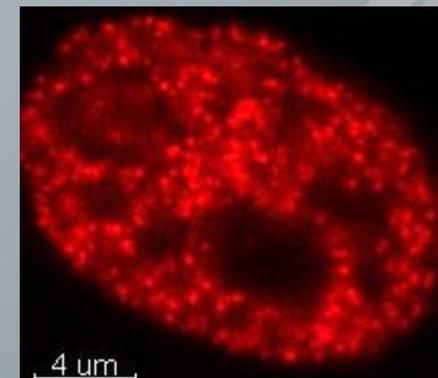
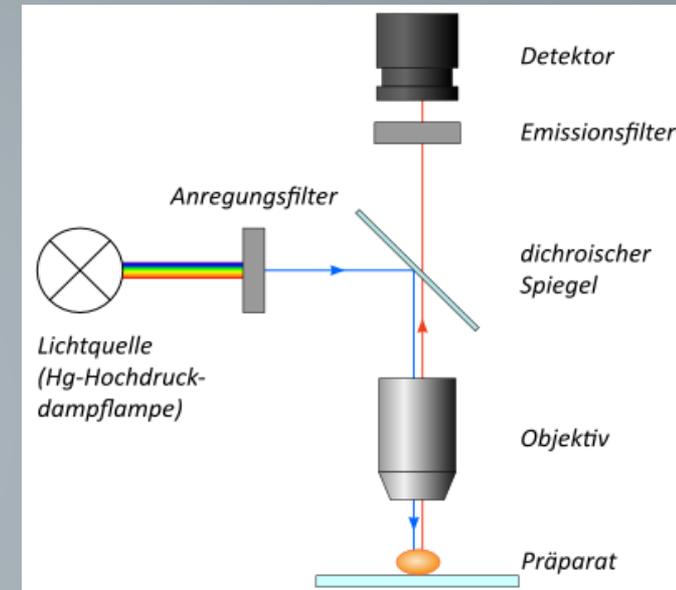
Praktische Steigerung
der Auflösung: ≈ 2

Es gibt keine *prinzipielle* Grenze des Auflösungsvermögens

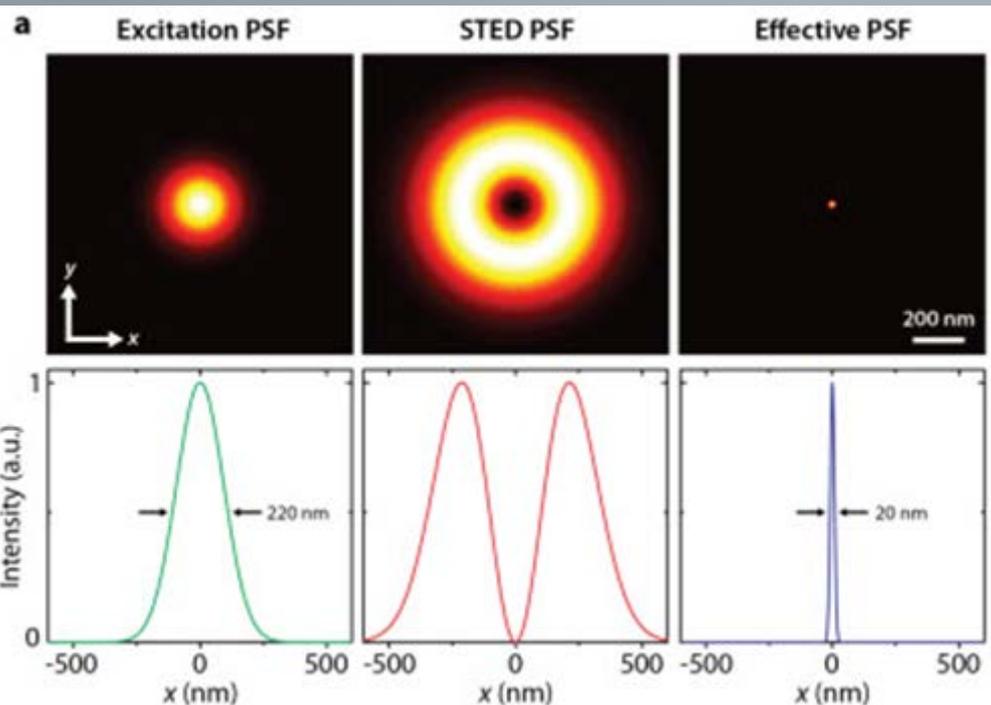
- Rayleighs Zwei-Punkt Auflösungskriterium führt auf ein Problem der Parameterschätzung. Bei Vernachlässigung von „*noise*“ kann dies unabhängig vom Abstand der Quellen eindeutig gelöst werden
- Abbes Beugungsgrenze setzt eine unendlich ausgedehnte Probe voraus. Für endliche Strukturen kann prinzipiell der Gegenstand eindeutig rekonstruiert werden
- Sinnvolle Auflösungsgrenzen sollten also praktische Beschränkungen (noise, Signalstärke, ...) berücksichtigen
- Die Auflösung sollte nicht als Eigenschaft des optischen Systems alleine betrachtet werden!
- Was es heißt, die „Auflösungsgrenze zu brechen“, muss neu gedacht werden!

Methoden zur „Superauflösung“: Vorbemerkung zur Fluoreszenzmikroskopie

- Die **Fluoreszenzmikroskopie** ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie.
- Fluorophore werden durch eine Lichtquelle angeregt – und strahlen anschließend Licht ab, das zur Bildgebung verwendet wird.
- Viele der neuen Verfahren zur „Supermikroskopie“ basieren auf der Manipulation der Fluoreszenz-Stoffe (→ Chemie Nobelpreis).



Stimulated emission depletion (STED) ist ein Rasterverfahren



Bildentstehung:

$$I(x) = O(x) \otimes I_{\text{PSF}}^{\text{eff}}(x)$$

STED Auflösung:

$$d_{\text{STED}} = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + a\zeta}}$$

$$\zeta = I_{\text{max}}/I_{\text{sat}}$$

Ein Punkt der Probe wird **angeregt**

Der STED Strahl erzwingt die **Abregung**

Das resultierende Signal ist kleiner als das Airy-Scheibchen

$$d_{\text{STED}} = \frac{\lambda}{2\text{NA}\sqrt{1 + a\zeta}}$$

“From Eq. 21 follows that with increasing STED intensity the size of the image of a point object (the “effective PSF”) decreases: No lower limit exists for the size of d_{STED} .” Lauterbach and Eggeling (2014, 54)

Die STED Auflösungsformel bezieht sich auf rauschfreie Bilder, für die eine Auflösungsgrenze gar nicht existiert!

“Nevertheless, STED could ultimately turn out to be limited to resolutions of 15 nanometers in routine applications. The reason is that due to the fast spontaneous rates competing with the saturation, very high laser intensities would be necessary to push beyond this limit, ruling out samples and markers that are damaged by such intense radiation.”

Schönle et al. (2008, 639)

Jede Auflösungsformel sollte die Auflösung nicht als intrinsische Eigenschaft des optischen Systems betrachten, sondern praktische Limitierungen berücksichtigen



Ernst-Abbe-Denkmal am Fürstengraben, Jena

$$d = \frac{\lambda}{2m \sin \alpha \sqrt{1 + J/J_s}} \longrightarrow 0$$

Quelle: Hell, Nobelvortrag 2014

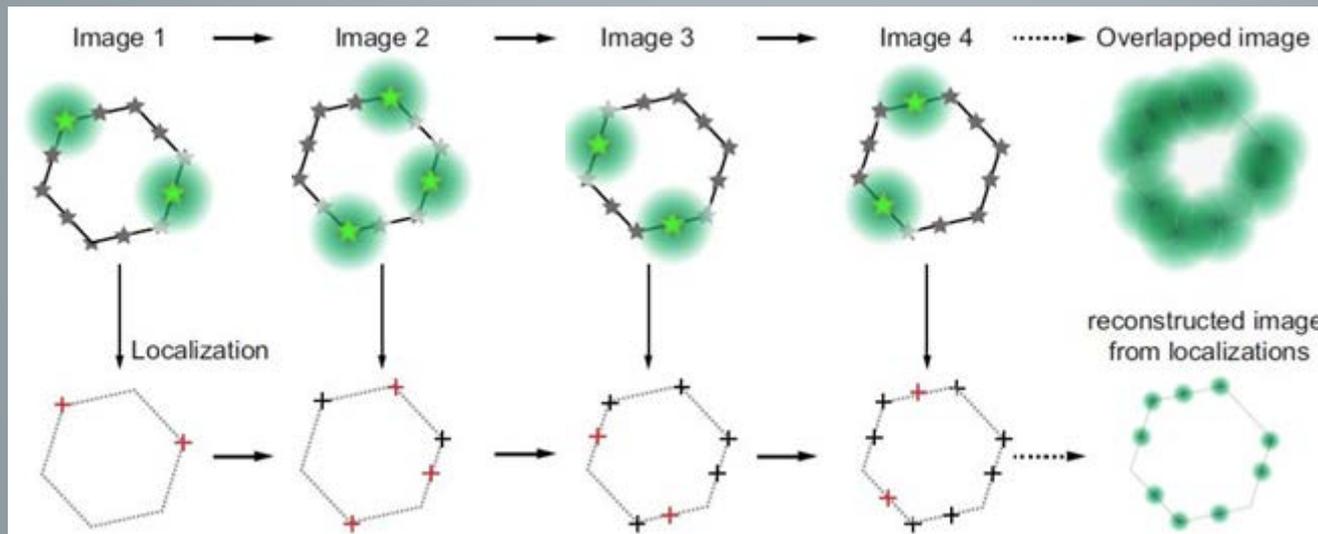
- Theoretisch motivierte Parametrisierung
- Gültig im untersuchten Bereich von Beleuchtungsmustern und Intensitäten
- Gilt nur für eine spezielle Mikroskopie-Methode
- behandelt rauschfreie Bilder

Methoden zur „Superauflösung“:

PALM (photo-activated localization microscopy)

STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)

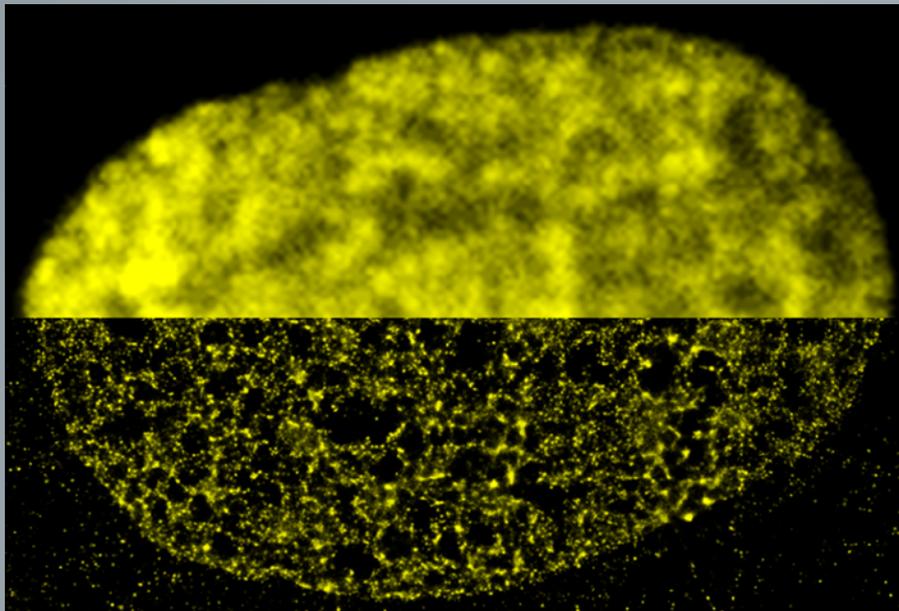
- Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie
- Stochastische Anregung einer **Teilpopulation**, Detektion eines (Teil-)Bildes und Ortsbestimmung der Emitter mit beugungs**un**begrenzter Genauigkeit
- Erzwungene Abregung und erneute Anregung einer **anderen** Teilpopulation



Trick: räumlich dichte Strukturen werden „zeitlich“ getrennt...

Betzig, E et al. (2006) „Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution“, Science 313(5793): 1642-1645.

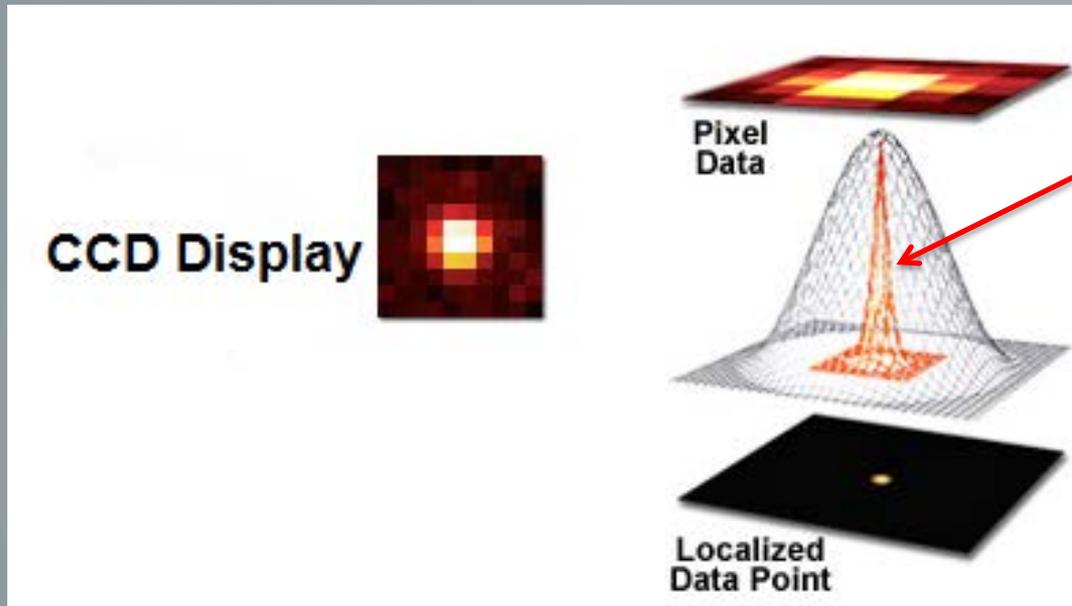
Rust, M. et al. (2006) “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, Nat. Methods 3: 793-796.



„Auflösung“ $\approx 20\text{nm}$

Comparison of wide-field (upper) and STORM (lower) images of the core histone protein H2B in an intact human fibroblast nucleus (ICFO, Barcelona, Spain)

Die Auflösung in der stochastischen-Lokalisierung Mikroskopie (SLM)



Diese Funktion ist der natürliche Kandidat für die „effektive PSF“ in der SLM

ABER:

Für jeden Bildpunkt erhält man eine andere „PSF“; die Faltungsdarstellung der Bildentstehung setzt jedoch voraus, dass für alle Punkte in der Bildebene eine PSF existiert!

UND:

Die Definition der Auflösung als „cut-off“ der optischen Transferfunktion setzt voraus, dass es eine optische Transferfunktion gibt...

Ein Vorschlag für eine neue Rekonstruktion des Abbe-Limits

AC (Abbe cut-off)

Der *cut-off* der OTF liegt bei: $k_0 = \frac{2NA}{\lambda}$, d.h. die räumliche

Letter

Journal of the Optical Society of America A

1

A note on the classification of super-resolution in far-field microscopy and information theory

OLIVER PASSON^{1,*} AND JOHANNES GREBE-ELLIS¹

¹University of Wuppertal, School of Mathematics and Natural Science, Gaußstr. 20, 42119 Wuppertal

*Corresponding author: passon@uni-wuppertal.de

Compiled June 1, 2016

- i. Der cut-off der OTF kann verschoben werden (STED, CLSM, SIM, SSIM,). AC wird negiert, während (FALT) und (ACB) gültig bleibt
- ii. Die analytische Fortsetzbarkeit der OTF negiert (ACB). Der tatsächliche *cut-off* spielt hier keine Rolle
- iii. Stochastische Lokalisierungsmikroskopie verletzt die Bedingung (FALT)

Zusammenfassung und Fazit

- Seit den 50er Jahren ist bekannt, dass die Beugungsgrenze von Abbe keine **prinzipielle** Auflösungsgrenze darstellt und das Rayleigh-Kriterium nur heuristischen Wert hat.
- In der Praxis limitieren Signalstärke, Rauschen und andere praktische Faktoren die Auflösung – die Abbe Grenze war eine **praktische** Auflösungsgrenze
- **Diese** wurde von neuen Mikroskopiertechniken (STED, structured illumination, ...) seit den 90er Jahren „gebrochen“
- Sinnvolle Auflösungsgrenzen sollten deshalb praktische Beschränkungen (noise, Signalstärke, ...) enthalten
- Bei Verfahren der „stochastischen Lokalisierung“ ist der Auflösungsbegriff selber nicht abschließend geklärt! (Stichwort: Labeling density, Nyquist Kriterium...)
- Die neue Rekonstruktion der Abbe-Grenze trägt hier zu einer systematischeren Klassifikation bei...

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

Lauterbach, M. and Ch. Eggeling (2014) Foundations of STED microscopy. In: E. F. Fornasiero and S. O. Rizzoli (Eds.) *Super-Resolution Microscopy Techniques in the Neurosciences*. Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht and London, 41.

Rechenberg, H. (2010) *Heisenberg – die Sprache der Atome*, Springer: Heidelberg.

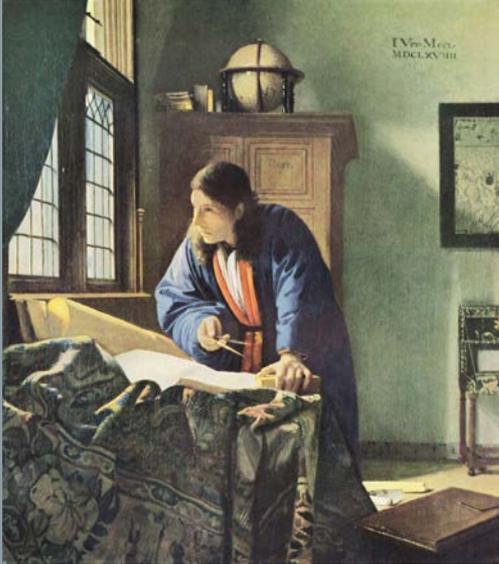
Schönle, A., J. Keller, B. Harke und S. W. Hell (2008) Diffraction unlimited Far Field Fluorescence Microscopy. In: B. R. Masters and P. T. C. So (Eds.) *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. OUP: Oxford.

Saka, S. (2014) Light Microscopy and Resolution. In: E. F. Fornasiero and S. O. Rizzoli (Eds.) *Super-Resolution Microscopy Techniques in the Neurosciences*. Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht and London.

Toraldo di Francia, G. (1955) Resolving Power and Information. *J. Opt. Soc. Am.* 45(7): 497-499.

Zalevsky, Z. (2011) Exceeding the Diffraction and the Geometric Limits of Imaging Systems: A Review. In: S. Dolev and M. Oltean (Eds.) *Optical Supercomputing, Lecture Notes in Computer Science*, 6748 Springer, Berlin.

Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723)



Der Geograph von Jan Vermeer (1668/69) stellt vermutlich van Leeuwenhoek dar.



Linse

Leeuwenhoek Mikroskop
(≈ 270 fache Vergrößerung)



Spirillum Bakterien
durch ein Leeuwenhoek
Mikroskop betrachtet

In der **geometrischen Optik** können Brechung und Reflexion beschrieben werden – aber nicht Beugung und Interferenz...

Warum das Rayleigh Kriterium keine prinzipielle Auflösungsgrenze begründet

“Moreover it is only too obvious that from the mathematical standpoint, the image of two points, however close to one another, is different from that of one point. It is not at all absurd to assume that technical progress may provide us with more and more refined kinds of receptors, detecting the difference between the image of a single point and the image of two points located closer and closer to one another. This means that at present there is only a practical limit (if any) and not a theoretical limit for two-point resolving power.”

Toraldo di Francia, G. (1955) Resolving Power and Information. J. Opt. Soc. Am. 45(7): 497-499.

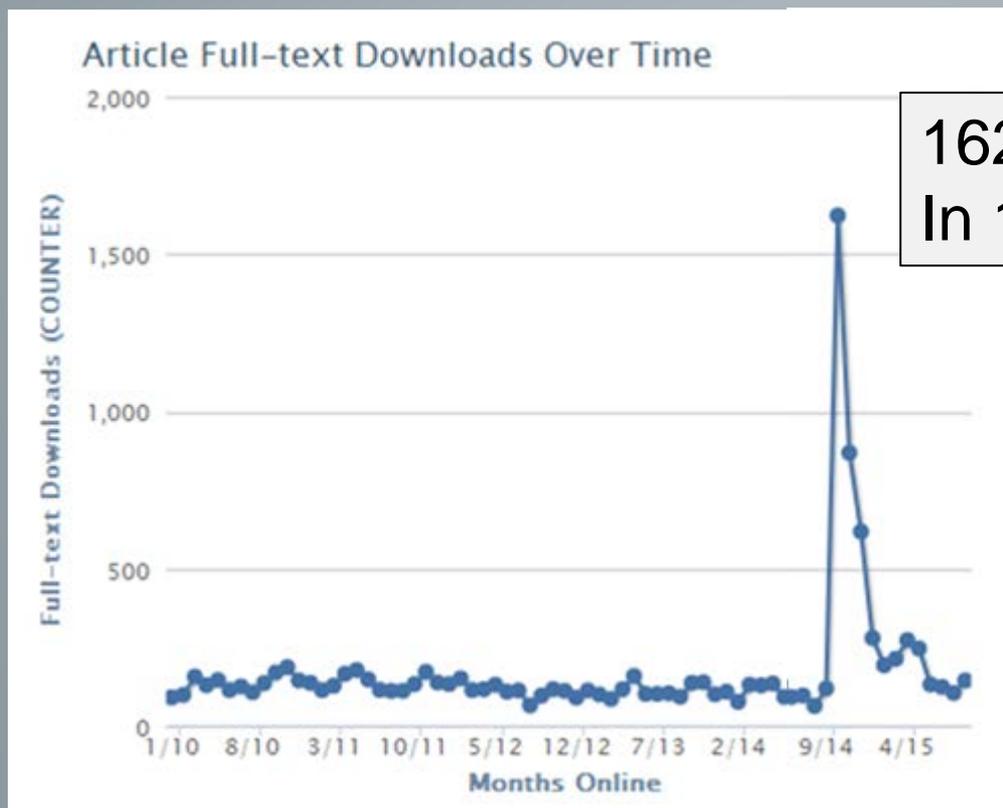
- Das Rayleigh Kriterium formuliert eine Grenze für die bequeme Unterscheidung von Punktquellen mit dem Auge.
- Toraldo spricht vom „mathematischen Standpunkt“. In der Praxis limitiert Rauschen etc. die Auflösung.
- Rayleigh wusste das...

Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy

Stefan W. Hell and Jan Wichmann

Department of Medical Physics, University of Turku, Tykistökatu 6, 20521 Turku, Finland

Received March 7, 1994



1622 downloads
In 10/2014