



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

POZOROVÁNÍ AMPLITUDOVÝCH A FÁZOVÝCH PŘEDMĚTŮ PŘES ROZPTYLUJÍCÍ PROSTŘEDÍ POMOCÍ HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU S KONTROLOVATELNOU KOHERENCÍ

AMPLITUDE AND PHASE OBJECTS OBSERVATION THROUGH SCATTERING MEDIA
BY MEANS OF COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ADAM EFFENBERGER

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. VĚRA KOLLÁROVÁ, Ph.D.

BRNO 2015

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Adam Effenberger

který/která studuje v **magisterském navazujícím studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Pozorování amplitudových a fázových předmětů přes rozptylující prostředí pomocí holografického mikroskopu s kontrolovatelnou koherencí

v anglickém jazyce:

Amplitude and phase objects observation through scattering media by means of coherence-controlled holographic microscope

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Holografický mikroskop s kontrolovatelnou koherencí (CCHM) umožňuje zobrazovat fázové a amplitudové předměty i přes některá rozptylující prostředí. Tato vlastnost vyplývá z tzv. efektu koherenční brány při využití prostorové nekoherentního světla. Navržená práce by měla experimentálně potvrdit předpoklady vyplývající z teoretického popisu.

Cíle diplomové práce:

1. Rešerše dosavadních teoretických poznatků pro zobrazení dvourozměrných vzorků přes CCHM.
2. Zobrazení definovaného fázového předmětu přes různé rozptylující prostředí, vyhodnocení kvality získaného kvantitativního zobrazení.
3. Ověření kvality zobrazení v závislosti na poloze difuzoru či rozptylujícího média.

Seznam odborné literatury:

- Born M., Wolf E.: Principles of Optics, Cambridge University Press (1999).
- Goodman J.: Introduction to Fourier Optics, Roberts & Company Publishers (2005).
- Lošták M. et al.: Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media, OPTICS EXPRESS, Vol. 22, No. 4 (2014), pp. 4180-4195.
- Chmelík R. et al.: The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy, PROGRESS IN OPTICS, Vol. 59 (2014), pp. 267-335.
- Slabý T. et al.: Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope, OPTICS EXPRESS, Vol. 21, No. 12 (2013), pp. 14747-14762.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Věra Kollárová, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2014/2015.

V Brně, dne 24.11.2014

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá pozorováním fázových a amplitudových předmětů skrze difuzní prostředí pomocí holografického mikroskopu s kontrolovatelnou koherencí (CCHM).

V práci je stručně shrnuta historie vývoje holografického mikroskopu s kontrolovatelnou koherencí, je zde popsána jeho konstrukce a výhody oproti běžnému světelnému mikroskopu a vysvětlen princip zpracování hologramu. V experimentální části je ověřena možnost kvantitativního fázového zobrazení skrze rozptylující vrstvu tvořenou zmatněným krycím sklíčkem, a to jak pomocí balistického, tak difuzního světla. Je také demonstrováno, jak významně se může lišit obraz amplitudového předmětu zobrazeného přes difuzní prostředí pomocí CCHM od obrazu získaného klasickým světelným mikroskopem.

Abstract

This diploma thesis deals with phase and amplitude objects observation through scattering media by means of a coherence-controlled holographic microscope (CCHM).

A brief history of development and construction of the microscope, its advantages compared to the classical light microscopy and hologram processing are described. Quantitative phase imaging through scattering media by means of ballistic as well as diffuse light is verified in the experimental part. A comparison of an image obtained through a scattering layer by means of CCHM and a classical microscopy in the light field is demonstrated.

Klíčová slova

koherencí řízená holografická mikroskopie, difuzní světlo, koherenční brána

Key words

coherence-controlled holographic microscope, diffuse light, coherence gate

Bibliografická citace této práce

EFFENBERGER, A. *Pozorování amplitudových a fázových předmětů přes rozptylující prostředí pomocí holografického mikroskopu s kontrolovatelnou koherencí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 55 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Věra Kollárová, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval v celém rozsahu samostatně pod odborným vedením Mgr. Věry Kollárové, Ph.D. a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, uvádím v seznamu literatury.

V Brně 29.5. 2015

.....
Adam Effenberger

Poděkování

Děkuji Mgr. Věře Kollárové, Ph.D za odborné vedení, cenné připomínky, veškerou pomoc, čas a nekonečnou trpělivost. Dále bych rád za poskytnuté konzultace poděkoval všem z laboratoří Optické mikroskopie a Experimentální biofotoniky, jmenovitě pak zejména Ing. Anetě Křížové a Ing. Lukáši Kvasnicovi. Nakonec bych rád poděkoval své rodině za trvalou podporu v průběhu celého studia.

Obsah

1. Úvod	3
2. Holografie a interferenční mikroskop	5
2.2 Holografie.....	5
2.1 Interferenční mikroskop.....	5
2.3 Holografický mikroskop.....	6
3. CCHM – koherenci řízený holografický mikroskop	7
3.1. Koherenci řízený holografický mikroskop 1. generace.....	7
3.2. Koherenci řízený holografický mikroskop 2. generace.....	9
3.3 Zpracování obrazu.....	11
3.4. Navazování a vyrovnávání fáze.....	13
4. Přednosti CCHM	17
4.1 Kvantitativní fázové zobrazení.....	17
4.1.1. Výpočet hloubky vyleptaných oblastí.....	17
4.2. Zobrazení skrze rozptylující vrstvu.....	19
4.2.1. Matematický popis zobrazení přes rozptylující vrstvu.....	19
5. Experimenty	21
5.1. Fázový vzorek.....	22
5.1.1. Pozorování fázového vzorku bez difuzoru.....	24
5.1.2. Rekonstrukce trojrozměrných modelů.....	25
5.1.3. Pozorování skrze slabý difuzor.....	27
5.1.4. Pozorování skrze středně silný difuzor.....	29
5.1.5. Pozorování skrze silný difuzor.....	30
5.1.6. Silný difuzor – vychylování objektivu.....	31
5.2. Amplitudový vzorek.....	33
5.2.1. Pozorování amplitudového vzorku bez difuzoru.....	34
5.2.2. Pozorování amplitudového vzorku skrze slabý a středně silný difuzor.....	35
5.2.3. Pozorování amplitudového vzorku skrze silný difuzor.....	36
6. Závěr	39
Literatura	41
Seznam použitých zkratk a symbolů	43
Dodatek A – difuzory	44
Dodatek B – přehled naměřených hloubek vybraných oblastí	45

1. Úvod

Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM – z anglického *Coherence-controlled holographic microscope*) vyvíjený od konce dvacátého století v laboratořích Ústavu fyzikálního inženýrství (ÚFI) na Fakultě strojního inženýrství (FSI) Vysokého učení technického v Brně (VUT) je potenciálně mimořádně užitečným přístrojem. Mikroskop je schopný kontrastně zobrazovat nejen amplitudové, ale také fázové vzorky – a to v transmisním i reflexním módu. Fázové předměty mohou být nejen kvalitativně zobrazeny, fázové změny lze také kvantitativně určit.

Mikroskop může být užitečný především pro laboratoře zabývající se studiem živých buněk, pro jejichž pozorování je přednostně vyvíjen. Umožňuje totiž jejich kontrastní pozorování v přirozeném prostředí bez využití jakýchkoli barviv [1].

Mikroskop umožňuje velmi přesně určit polohu buněk, detekovat jejich tenké okraje, zjistit rozložení hmoty uvnitř buněk nebo také rozlišit mezi různými druhy buněčné smrti. Pro pozorování běžně používá světlo s hustotou energie o sedm řádů nižší, než se standardně využívá při fluorescenční mikroskopii [2]. Díky tomu na buňky nepůsobí fototoxicky a umožňuje tak i jejich dlouhodobá pozorování a to i v řádu několika dnů.

Možné využití mikroskopu je ale mnohem širší. Vedle rakovinočtových buněk K2 [3,4] (buňky kryšího Rousova sarkomu LW13K2) na něm byly například zkoumány také povrchové nanostruktury.

Hlavními přednostmi CCHM jsou schopnost pozorovat v rozptylujícím prostředí, možnost pozorovat v prostorově i časově nekoherentním osvětlení, subnanometrové rozlišení v ose z , laterální rozlišení srovnatelné se špičkovými světelnými mikroskopy, možnost vysoké rychlosti snímání vzorku i zpracovávání naměřených dat a velký prostor pro vzorek. Důsledkem toho je mj. možnost pořizovat snímky rychlých dějů bez nežádoucích artefaktů (koherenční šum, halo efekt,...).

Díky vestavěnému fluorescenčnímu modulu, možnosti simulovat metodu DIC (Nomarského diferenciální interferenční kontrast – detekuje fázové změny a převádí je na rozdíly v intenzitě) nebo např. pozorování ve světlém poli, jde o neobyčejně mnohostranný přístroj s velmi širokými možnostmi využití.

Cílem této práce je popsat funkci a přednosti CCHM, provést sérii pozorování definovaného fázového vzorku skrze sadu různě silných difuzorů a sérii pozorování amplitudového vzorku skrze tutéž sadu difuzorů. Pozorování skrze silný difuzor mají za cíl experimentálně potvrdit předpoklady vyplývající z teoretického popisu [5].

V první části práce jsou krátce popsány holografie a interferenční mikroskop, jejichž propojení dává vzniknout holografickému mikroskopu.

Druhá část přináší stručný přehled vývoje holografického mikroskopu na ÚFI a porovnává CCHM 1. generace s CCHM 2. generace. Dále popisuje zpracování obrazu pořízeného tímto přístrojem.

Třetí část práce se zabývá hlavními přednostmi CCHM – možnosti kvantitativního fázového zobrazení a schopností zobrazit vzorek umístěný v rozptylujícím prostředí. Kvantitativní fázové zobrazení se následně využívá při popisu výpočtu hloubky oblastí vyleptaných ve fázovém vzorku. Druhá polovina třetí části přináší stručné shrnutí výsledku teoretického popisu z [5], který je následně v experimentální části ověřován – možnosti zobrazovat difuzním (rozptýleným) světlem.

Experimentální část je rozdělena do dvou sekcí. První sekce je věnována experimentům s fázovým vzorkem, kterým bylo sklíčko s vyleptanými oblastmi různých velikostí a hloubek čtvercového tvaru. Druhá sekce se následně zabývá obdobnými experimenty prováděnými s amplitudovým vzorkem – rozlišovacím testem USAF 1951.

V závěru jsou dosažené experimentální výsledky shrnuty a porovnány s ověřovanou teorií.

2. Holografie a interferenční mikroskop

Za jeden z nejdůležitějších jevů, umožňujících sestavení holografického mikroskopu, lze považovat interferenci. Interference světla ze dvou větví holografického mikroskopu je totiž základní podmínkou pro získání informace tímto přístrojem. Právě z interferenčních proužků interferogramu můžeme s využitím Fourierovy transformace získat informaci nejen o amplitudě světla prošlého vzorkem, ale také informaci o jeho fázi. V některých případech tak lze z jediného snímku vytvořit trojrozměrný model celého vzorku [6,7].

2.2 Holografie

Princip holografie objevil v roce 1948 maďarsko-britský fyzik Dennis Gabor [8]. Za tento objev obdržel v roce 1971 Nobelovu cenu za fyziku [7,9].

Holografie je metoda rekonstrukce vlnoplochy. Hlavním přínosem této metody je možnost zaznamenat kompletní informaci o světelné vlně (intenzitu i fázi) a následně identickou vlnu rekonstruovat. To často v důsledku znamená schopnost zrekonstruovat trojrozměrný model zkoumaného vzorku z jediného zaznamenaného snímku.

Důležitým vývojovým krokem na poli holografie, vedoucím k praktickému využití principu holografie ve světelné mikroskopii, byl objev možnosti holografického záznamu s prostorovou nosnou frekvencí tvořenou v mimoosovém uspořádání. První publikaci o této technice zveřejnili roku 1962 pánové E. N. Leith a J. Upatnieks [10]. O dva roky později publikovali také článek, popisující, jak tímto způsobem opticky oddělit nežádoucí konjugovaný obraz a obraz nultého řádu [11]. Tato tzv. mimoosová holografie je holografie je základním principem sestavy CCHM.

2.1 Interferenční mikroskop

Interferenční mikroskop s oddělenou předmětovou a referenční větví využívá dvou identických světelných svazků, které vznikají rozdělením jednoho původního. Jeden ze svazků interaguje se zkoumaným vzorkem, druhý se vzorkem referenčním. Po průchodu celou soustavou mikroskopu se tyto svazky setkají a interferují spolu.

Interferometry lze rozdělit do tří skupin – podle způsobu, jakým jsou svazky ve výstupní rovině těchto přístrojů kombinovány (osové, mimoosové a stříhové interferometry). Střetávají-li se interferující svazky pod nulovým (nebo téměř nulovým) úhlem, označujeme tento interferometr jako osový (in-line). Je-li úhel interferujících svazků nenulový, hovoříme o mimoosovém uspořádání (off-axis). Ve stříhovém interferometru se optické osy v rovině detektoru neprotínají, jsou vůči sobě v příčném směru posunuty [7].

Mikroskopy v osovém uspořádání vytvářejí interferogram s velmi nízkou prostorovou frekvencí interferenčních proužků. Jejich předností je skutečnost, že zdroj osvětlení může být zcela nekoherentní, což vede k potlačení koherenčního šumu. Naopak jejich nevýhodou je skutečnost, že pro získání úplné informace je nutno pořídit více snímků (typicky 3-4). Proto nejsou vhodné pro pozorování rychlých dějů [7].

Mimoosové uspořádání mikroskopu má naopak za následek interferogram s velmi vysokou prostorovou frekvencí interferenčních proužků. Tento případ klade větší nároky na přesnost sesazení jednotlivých částí mikroskopu. Výhodou tohoto uspořádání je skutečnost, že pro získání veškeré informace stačí jediný snímek. Tato možnost je tedy preferována především při pozorování rychlých jevů. Mimoosový interferenční mikroskop se často označuje jako digitální holografický mikroskop (DHM) [7].

2.3 Holografický mikroskop

Holografický mikroskop lze přirovnat k rovnoramenným vahám. Podobně jako tyto váhy má i holografický mikroskop dvě „ramena“, v české terminologii označované jako 2 větve [1, 6, 7, 12, 13]. Podobně jako rovnoramenné váhy detekují rozdíl vah na jednotlivých ramenech, holografický mikroskop detekuje rozdíly v optických drahách svých větví – referenční a objektové.

Holografický mikroskop tedy vznikne připojením referenční větve ke klasickému světelnému mikroskopu.

Pravděpodobně první holografický mikroskop, byl zkonstruován okolo roku 1966 [12,14]. Tzv. hybridní holografický mikroskop vznikl vložením mikroskopové soustavy do předmětové větve Machova-Zehnderova interferometru [15]. Hologram byl zaznamenáván na fotografickou desku. Komplikovaný způsob záznamu hologramu byl pravděpodobně jednou z hlavních příčin, proč se tato technika ve své době neujala [12].

V počátcích holografické mikroskopie byla hlavním limitujícím faktorem absence použitelné výpočetní techniky. Plně využít těchto myšlenek – náročných na výpočty během zpracování obrazu – se proto začalo dařit až koncem 20. století [5,12].

Významný rozvoj počítačů na přelomu 20. a 21. století způsobil v holografické mikroskopii renezanci. Hologram již není zaznamenáván na fotografickou desku, ale elektronicky na čip CCD kamery. Převod dat do počítače umožňuje v reálném čase měření zpracovávat a pomocí matematických procedur dále zpracovávat. To dělá z holografické mikroskopie velice perspektivní pozorovací techniku [12]

Klasický holografický mikroskop využívá koherentní osvětlení. Důsledkem použití takového zdroje jsou koherenční šum a nežádoucí interference, snižující kvalitu výsledného zobrazení. Použití nekoherentního osvětlení, které tyto nedostatky nezpůsobuje, obvykle vedle velkých nároků na seřízení brání chromatické vady mikroskopu, vedoucí k redukci kontrastu interferenčních proužků (především v okrajových částech zorného pole). Vzniká tak nutnost kompromisu – osvětlení s dostatečně nízkou koherencí potlačující vliv koherenčních artefaktů, která ale zachová dostatečně vysoký kontrast interferenčních proužků v celém zorném poli [12].

Koherencí řízený holografický mikroskop, využívající achromatického interferometru, který je založen na využití difrakční mřížky, výše popsany kompromis odstraňuje.

3. CCHM – koherenci řízený holografický mikroskop

Návrh prvního achromatického holografického mikroskopu z roku 1998 zkonstruovaného o rok později na Ústavu fyzikálního inženýrství (ÚFI) vycházel z principu, který roku 1967 navrhli Emmett Leith a Juris Upatnieks [16]. Tento mikroskop využívá jako dělič svazku difrakční mřížku. Rovina této mřížky je konjugovaná s předmětovou rovinou. Vzhled interferenčního obrazce nezávisí na vlnové délce použitého světla, ani na směru jeho šíření. Díky tomu je interferometr mikroskopu achromatický a prostorově invariantní. Zdroj světla tedy může být libovolně prostorově i časově nekoherentní [12].

Míra koherence použitého osvětlení má významný vliv na výsledný obraz. Vedle již zmíněných nežádoucích interferenčních artefaktů, vznikajících při vysoce koherentním osvětlení, je také důležitý efekt optických řezů. Ty lze při osvětlení s nízkou koherencí tvořit díky výrazně se projevující hloubkové diskriminaci. Právě možnost pořizovat takovéto optické nedestruktivní řezy (známé z konfokální mikroskopie) nerastrovací metodou byla původní motivací konstrukce reflexní verze tohoto přístroje [12].

Pojem *koherenci řízený holografický mikroskop* (CCHM) se poprvé objevil roku 2010 v názvu dizertační práce [6] a článku [17] Pavla Kolmana. Jednalo se o významně vylepšenou verzi prototypu transmisního uspořádání z roku 1999 [18]. Tento mikroskop je nyní označován jako koherenci řízený holografický mikroskop 1. generace.

3.1. Koherenci řízený holografický mikroskop 1. generace

Koherenci řízený holografický mikroskop 1. generace je založený na achromatickém interferometru s difrakční mřížkou jako děličem svazku. Mikroskop je schopný zaznamenat kontrastní hologram i při použití časově i prostorově nekoherentního osvětlení. Schopnost použít pro měření světlo s libovolnou koherencí přináší možnost použít míru koherence jako nastavitelný parametr mikroskopu. Míra koherence osvětlení totiž ovlivňuje celý zobrazovací proces [12].

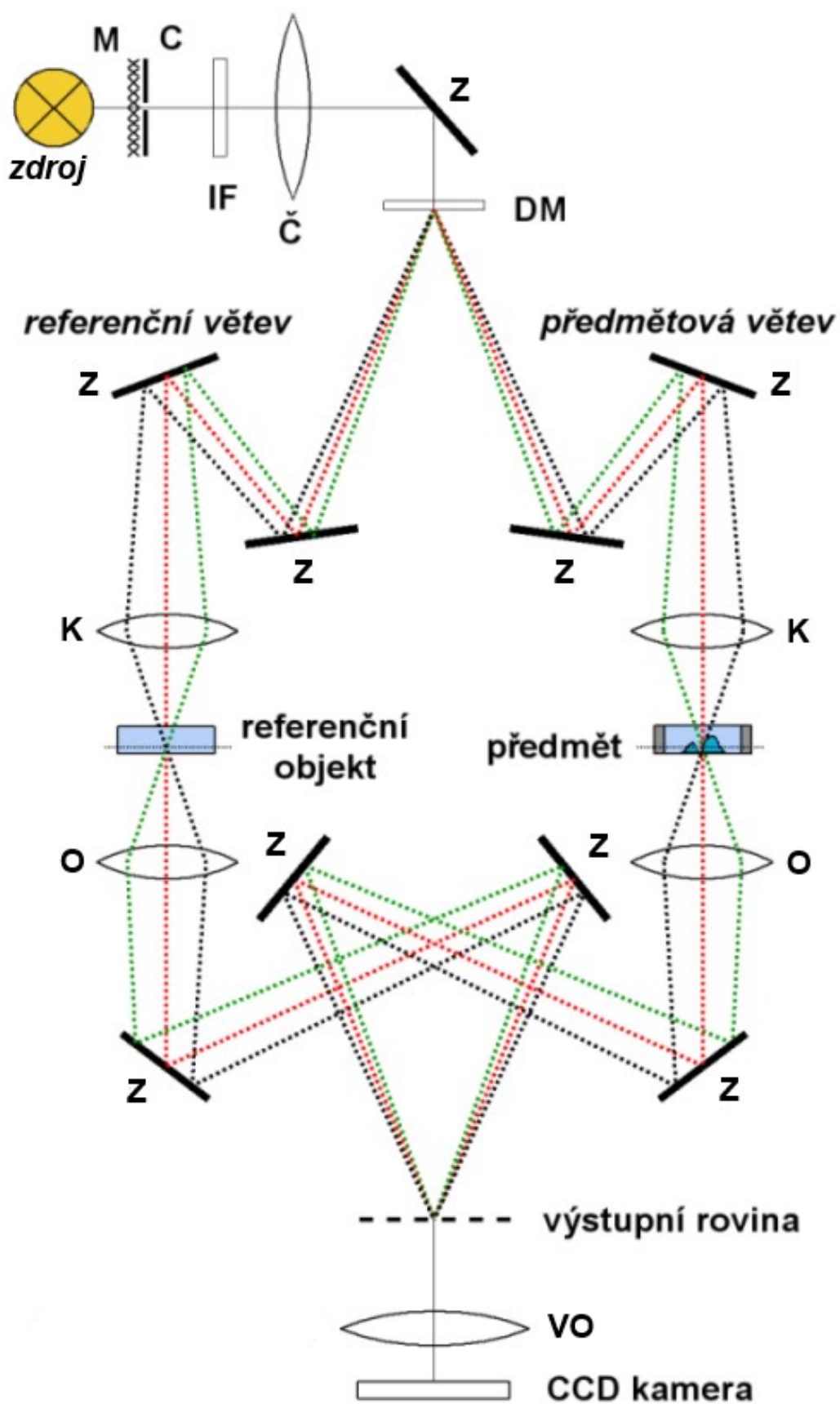
Vysoká koherence osvětlení je vhodná pro rekonstrukci trojrozměrného obrazu z jediného snímku. Nižší koherence naopak přináší výhodu kvalitnějšího zobrazení bez koherenčního šumu a artefaktů a také lepší laterální rozlišení.

Při velmi nízké časové či prostorové koherenci osvětlení se začne projevovat tzv. efekt koherenční brány. V reflexním módu dojde k interferenci světla pouze z tenké části povrchu vzorku, což má za následek tvorbu optických řezů v řádu jednotek μm .

U transmisního uspořádání CCHM je tento efekt užitečný především pro pozorování vzorků umístěných v silně rozptylujícím prostředí. Koherenční brána se projeví zejména při nízké prostorové koherenci. Světlo z určitého bodu předmětu interferuje pouze se světlem z odpovídající malé oblasti referenčního vzorku. Obraz je pak (při souměrném nastavení mikroskopu) tvořen pouze balistickým (nerozptýleným) světlem. Vhodným posuvem obrazu např. z referenční větve, lze však k zobrazení využít i rozptýlené (difuzní) světlo [6,12,17].

Schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu 1. generace ukazuje obrázek 1. Světlo z prostorově i časově nekoherentního zdroje prochází skrz matnici (M), clonu (C) a interferenční filtr (IF), jejichž seřízení má vliv na míru časové a prostorové koherence světla v mikroskopu. Svazek následně dopadá na difrakční mřížku (DM), kde se dělí na dva svazky – předmětový a referenční. Předmětový svazek se několikrát odráží, prochází kondenzorem (K), který zajišťuje rovnoměrné osvětlení předmětu. Světlo prochází předmětem, který v závislosti na své tloušťce a indexu lomu posouvá jeho fázi. Přes objektiv (O) a soustavu zrcadel pokračuje k výstupní rovině, kde se střetává se svazkem referenčním. Jeho cesta byla principiálně téměř stejná. Jediným rozdílem bylo, že neprocházel skrz zkoumaný vzorek. Ve výstupní rovině mikroskopu oba svazky interferují a vytváří tak hologram s interferenčními proužky. Světlo dále prochází výstupním objektivem (VO), který hologram zvětšuje do roviny čipu CCD kamery, jež vše zaznamenává [19]. Z deformací interferenčních proužků lze vypočítat fázový rozdíl mezi

předmětovým a referenčním svazkem – kvantitativní fázový rozdíl.



Obrázek 1: Schéma transmisního koherenci řízeného holografického mikroskopu 1. generace: *M* – matnice, *C* – clona, *IF* – interferenční filtr, *Z* – zrcadla, *Č* – čočka, *DM* – difrakční mřížka, *K* – kondenzory, *O* – objektivy, *VO* – výstupní objektiv. Převzato z [1].

3.2. Koherencí řízený holografický mikroskop 2. generace

V koherencí řízeném holografickém mikroskopu 2. generace (obrázky 2 a 3) neslouží difrakční mřížka (DM) jako dělič svazku (jako tomu bylo u generace první), ale je umístěna v referenční větvi před výstupním objektivem (VO). Druhým významným rozdílem je použití běžných mikroskopových objektivů korigovaných na nekonečnou tubusovou délku. To umožňuje přidání dalších technik. Významně se také zvětšil prostor pro zkoumané vzorky. Modifikace odstranily i omezení spektrální propustnosti [7]. Zdrojem světla proto může být obyčejná halogenová žárovka. Časovou koherenci pak lze nastavit volbou interferenčního filtru, umístěného za zdrojem.

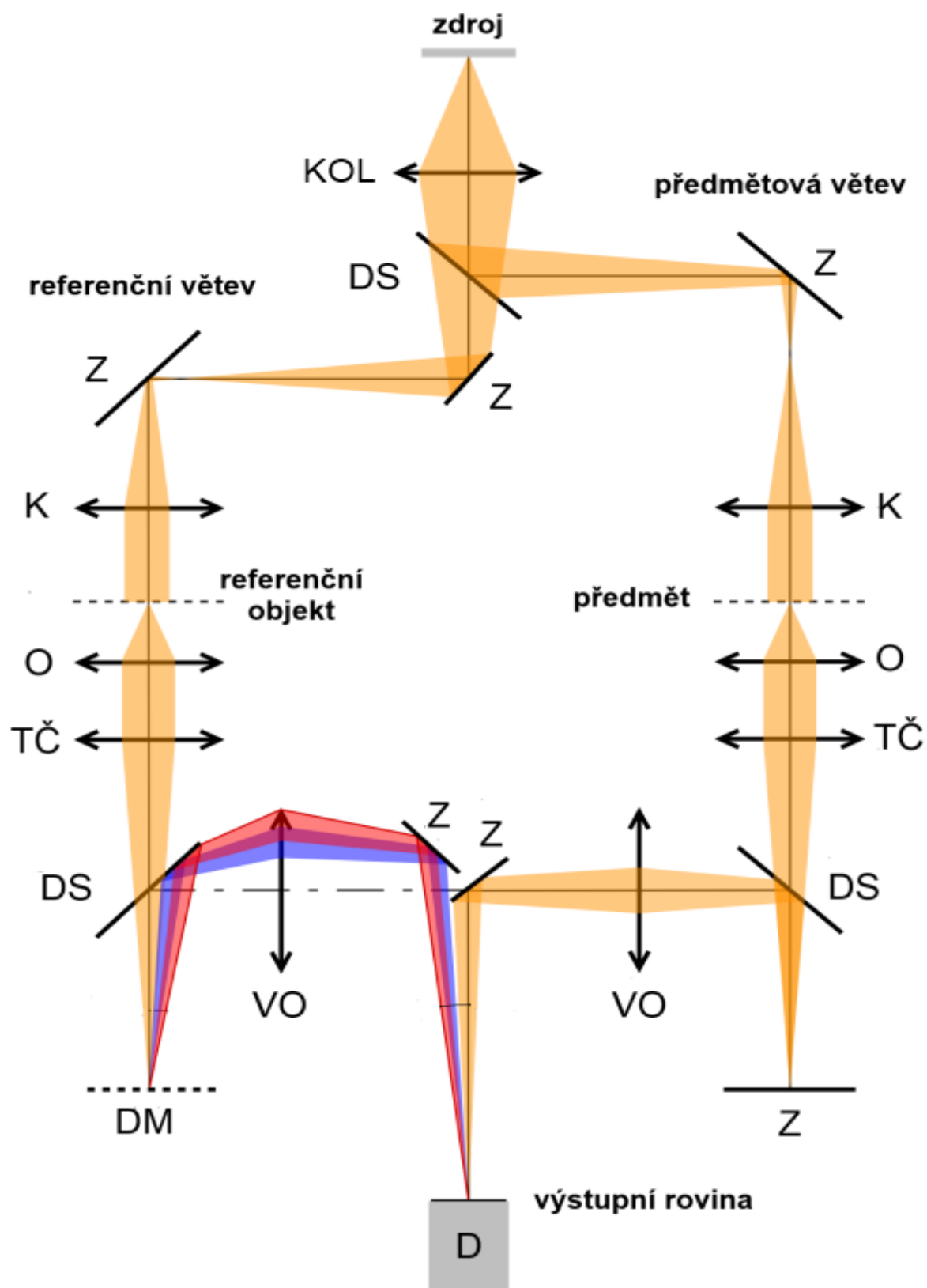
Mikroskop je vyráběn firmou Tescan. K jeho ovládání byl vyvinut software, který umožňuje značné zjednodušení a částečné zautomatizování seřizovacího postupu tohoto přístroje a okamžité zpracování pořízených hologramů.

Mikroskop je schopen kvantitativního fázového zobrazování. Umožňuje pozorování vzorků umístěných v disperzním neprůhledném prostředí. Vedle možnosti simulovat běžný světelný mikroskop (zatloučením referenční větve) je schopen napodobit také pozorování metodou DIC (numerický přepočít probíhající v reálné čase). Vedle klasického pozorování nabízí také fluorescenční mód. Jeho hlavní doménou jsou dlouhodobá pozorování živých buněk. Z tohoto důvodu je umístěn ve speciálním vyhřívaném průhledném boxu (obrázek 2). Je schopen dlouhodobých, vysoce kontrastních pozorování buněk, během nichž umožňuje sledovat jejich životní cyklus [1], přesuny hmoty v jejich nitru, změny tvaru, velikosti i pohyblivosti, či rozlišit mezi různými formami buněčné smrti [2].

Veškerá měření a experimenty publikované v této práci byly prováděny právě na tomto přístroji – holografickém mikroskopu s kontrolovatelnou koherencí 2. generace.



Obrázek 2: Koherencí řízený holografický mikroskop 2. generace je umístěn ve vyhřívaném průhledném boxu.



Obrázek 3: Schéma transmisního koherenci řízeného holografického mikroskopu 2. generace: KOL – kolektor, DS – děliče svazku, Z – zrcadla, K – kondenzory, O – mikroskopové objektivy, TČ – tubusové čočky, DM - difrakční mřížka, VO – výstupní objektivy, D – detektor. Převzato z [7].

3.3 Zpracování obrazu

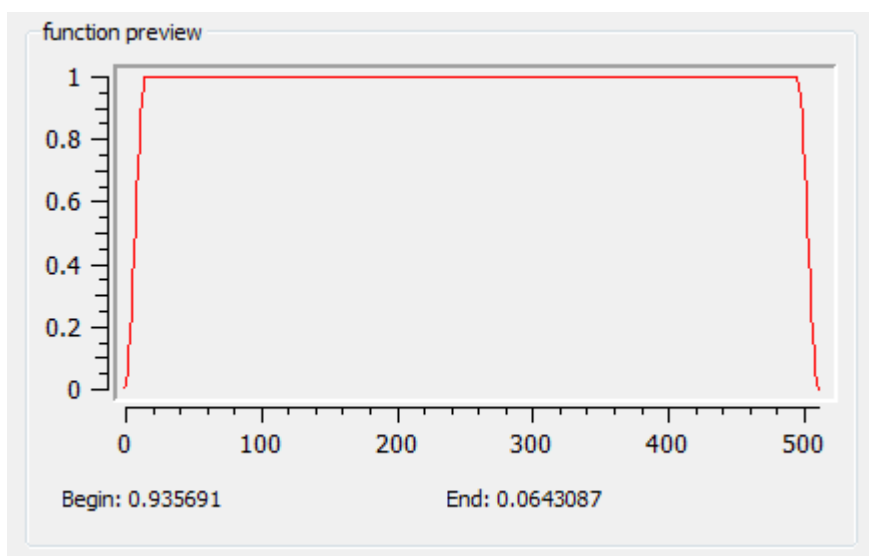
Pozorujeme-li vzorek obyčejným světelným mikroskopem, při jeho zobrazení se běžně obejdeme bez jakýchkoli složitých výpočtů. U holografického mikroskopu tomu tak není. Nasnímaný interferogram je třeba zpracovat počítačem. Stručný nástin tohoto procesu je popsán níže, schéma na obrázku 5 následně celou proceduru zpracování obrazu názorně shrnuje.

Nezpracovaný snímek pořízený holografickým mikroskopem (obrázek 5a) se podobá snímku z optického mikroskopu – navíc pokrytému interferenčními proužky. V nich je zakódována informace, jakým způsobem vzorek světelnou vlnu, která s ním interagovala, ovlivnil – kolik světla rozptýlil a jak posunul její fázi.

Dvourozměrnou rychlou Fourierovou transformací (FFT – Fast Fourier Transform) hologramu získáme spektrum prostorových frekvencí obrazu (obrázek 5b). Toto spektrum je středově souměrné. Pro zvýšení rychlosti zpracování dat počítačem se proto počítá jen jeho jedna polovina. Centrální část spektra prostorových frekvencí reprezentuje informaci shodnou s pozorováním ve světlem poli – bez interference. Tato část spektra odpovídá součtu autokorelačních funkcí obrazu z předmětové a referenční větve [13]. Nenese tedy požadovanou informaci a při dalších výpočtech se jí nevyužívá.

Důležitá informace je „skryta“ v okolí prvního (respektive mínus prvního) řádu spektra prostorových frekvencí (obrázek 5c). Právě tato část totiž reprezentuje prostorové frekvence modulované na nosné frekvenci zmíněných proužků [13].

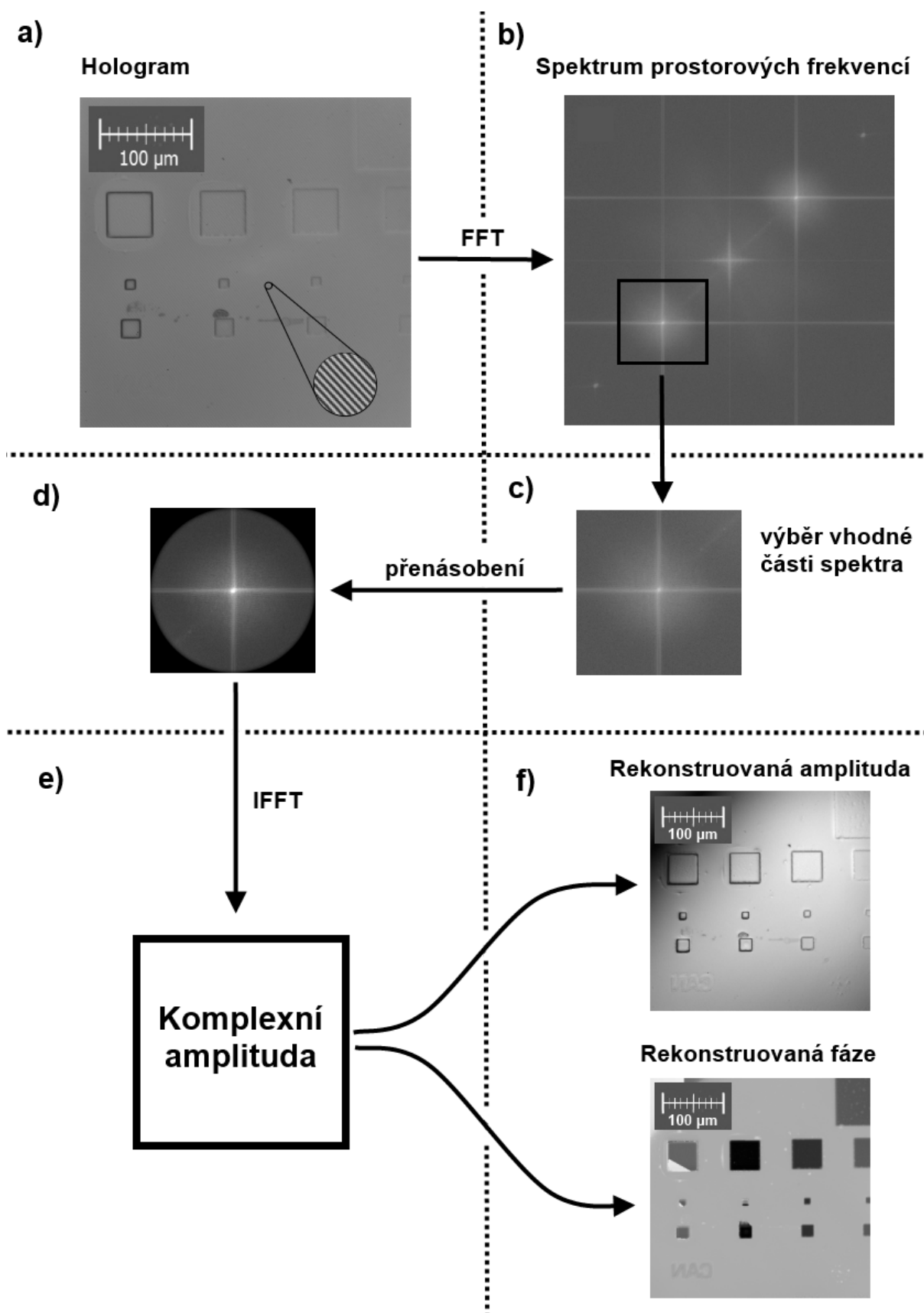
Na vybranou část spektra prostorových frekvencí (obrázek 5c) je třeba aplikovat inverzní FFT (IFFT). Kdybychom IFFT spočítali přímo z tohoto čtvercového výběru, došlo by k nežádoucímu zkreslení a vzniku artefaktů v rekonstruovaném obraze. Proto je třeba vybranou část „zakulatit“ – oříznout v souladu s tím, jaké prostorové frekvence je objektiv schopen přenést (hodnoty v rohových oblastech položit nule). Tím se zbavíme neúčinné části, která pouze zhoršuje poměr signál/šum (SNR – Signal-to-noise ratio).



Obrázek 4: Váhová funkce (Weight function) používaná pro apodizaci spektra před rekonstrukcí komplexní amplitudy.

Dalším důležitým krokem před aplikací IFFT je apodizace selektované části váhovou funkcí (obrázek 4). Získáme tak vstup vhodný pro IFFT (obrázek 5d), jejímž výstupem bude požadovaná komplexní amplituda (obrázek 5e).

Vypočtením modulu komplexní amplitudy následně zjistíme informaci o amplitudě prošlého světla, argument komplexní amplitudy nese informaci o obrazové fázi [13] (obrázek 5f).



Obrázek 5: Schéma zpracování obrazu pořízeného holografickým mikroskopem.

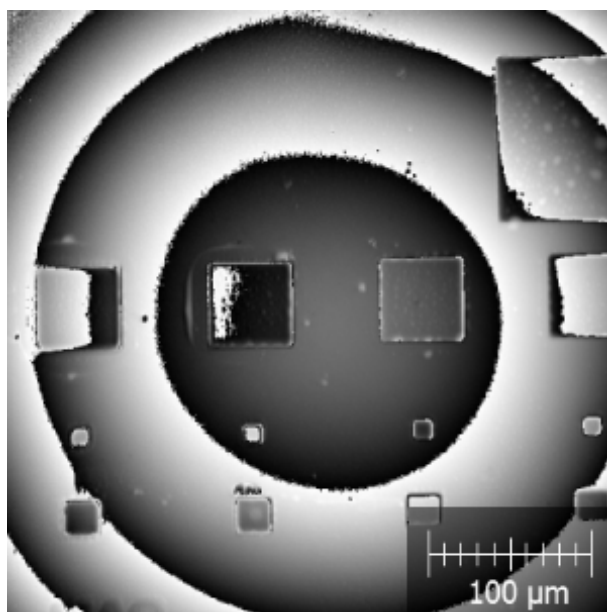
3.4. Navazování a vyrovnávání fáze

To, jak tlustý vzorek je holografický mikroskop v transmisním módu schopný kvalitně zobrazit, limitují dva faktory. Prvním z nich je transparentnost vzorku. Pozorovaný objekt musí být prozářitelný. Druhým limitujícím prvkem jsou fázové skoky. Fázový rozdíl mezi dvěma blízkými body nesmí být větší než 2π .

První faktor je snadno pochopitelný. Objevuje se u všech typů transmisních pozorování. Od běžných světelných mikroskopů až po transmisní elektronové mikroskopy. Abychom mohli o vzorku něco zjistit, musí z něj nějaká informace přijít. Neprojde-li vzorkem do detektoru žádné světlo (elektrony), není co analyzovat, nic nevidíme.

Druhé omezení je specifické jen pro interferenční mikroskopy. Právě při jejich využití nás totiž vedle intenzity prošlého záření zajímá také jeho fáze. Fáze světla je periodická veličina s periodou 2π . Vyskytuje-li se tedy na vzorku dvojice oblastí, jejichž průchod částí světelného svazku, putujícího ze zdroje do detektoru, způsobí mezi těmito částmi svazku fázový posuv větší než 2π , vznikne v pořízeném fázovém snímku fázový skok.

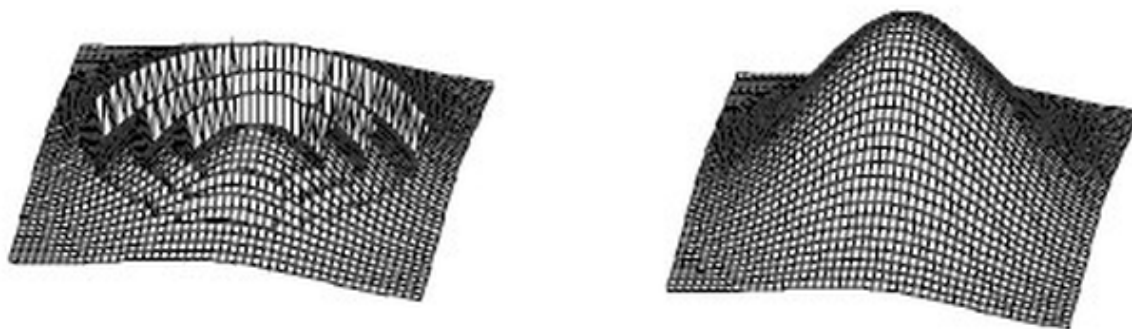
Fázové rozdíly způsobené průchodem světla jsou dvojího druhu. První způsobuje pravděpodobně optika samotného mikroskopu. To se ve fázovém obraze projevuje vznikem soustředných kružnic (obrázek 6).



Obrázek 6: Rekonstruovaná fáze z hologramu obsahuje fázové skoky.

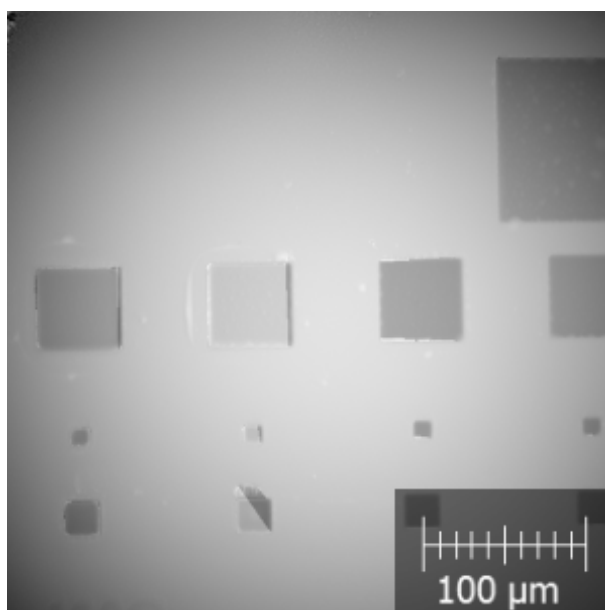
Druhá složka je způsobená strukturou samotného vzorku. Právě tato část fázových rozdílů nás zajímá, nese totiž požadovanou informaci o vzorku.

S využitím softwaru lze většinu výše popsaných fázových skoků relativně snadno odstranit. Proces odstranění fázových skoků je označován jako navazování fáze. Dobrou představu, jak takového navázání fáze funguje, může vytvořit obrázek 7. Jeho levá část ukazuje naměřenou fázi před navázáním, pravá část ukazuje stejnou oblast po navázání.



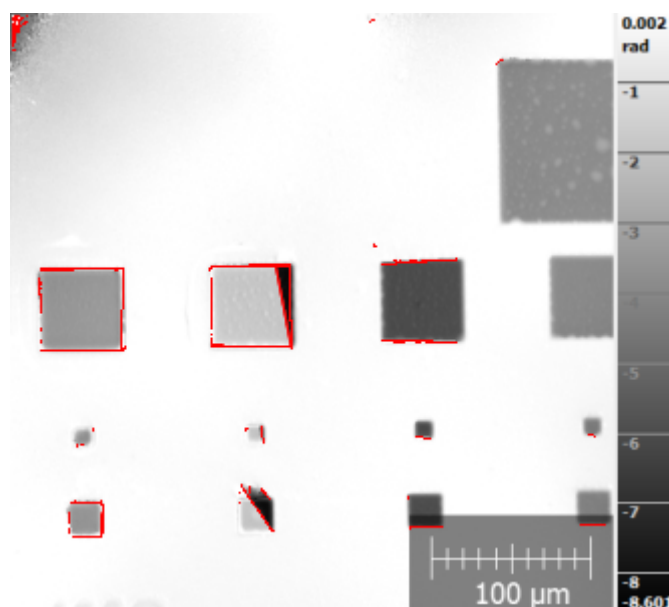
Obrázek 7: Fáze rekonstruovaná z hologramu (vlevo) a odpovídající navázaná fáze (vpravo).
Převzato z [20].

Vyskytuje-li se někde ve zpracovávaném obraze fázový skok mezi dvěma blízkými body, který je roven přesně 2π , lze předpokládat, že tyto oblasti ve skutečnosti vzájemně fázově posunuty (téměř) nejsou. Algoritmus takovéto oblasti vyhledá a „spojí“ dohromady. Výsledek popsaneého procesu aplikovaného na snímek z obrázku 6 ukazuje snímek navázané fáze na obrázku 8.



Obrázek 8: Navázaná fáze.

Navázaný fázový snímek vypadá sice podstatně lépe než snímek s nenávanou fází, stále je ale třeba jej upravit. Je nutné vyrovnat jeho pozadí. To především znamená odečíst od něj kulový vrchlík, způsobený optikou mikroskopu. Další narovnání může být třeba, není-li rovina vzorku dokonale kolmá ke směru šíření světla nebo například je-li vzorek umístěn na neplanparalelním, klínovitém sklíčku.



Obrázek 9: Navázaná vyrovnaná fáze. Červeně jsou zvýrazněny fázové skoky, které algoritmus nedokázal jednoznačně interpretovat.

Navázaný vyrovnaný fázový snímek výše zobrazeného vzorku ukazuje obrázek 9. Právě navázaná vyrovnaná fáze je to, co nás při studiu fázových vlastností vzorku zajímá.

Základní podmínkou úspěšnosti navazovacího algoritmu je plynulost fázových změn. Nachází-li se někde na vzorku ostrý fázový skok, program jej dokáže správně interpretovat jen v případě, že je menší než 2π . Nenavázané skoky jsou v obrázku 9 zvýrazněny červenou barvou.

Správnou interpretaci fázového skoku může zachránit skutečnost, dá-li se fázový schodek „obejít“ po „méně strmém svahu“. V případě druhé čtvercové plochy zprava nedošlo k navázání fáze pouze na horním a dolním okraji pozorované oblasti. Díky o něco méně strmým bočním hranám se ale oblast podařilo navázat správně.

Oblasti na levé polovině snímku ukazují opačný případ. Fázové skoky jsou příliš strmé ve všech částech vyleptané oblasti. Hloubku těchto oblastí tedy nelze jednoznačně určit.

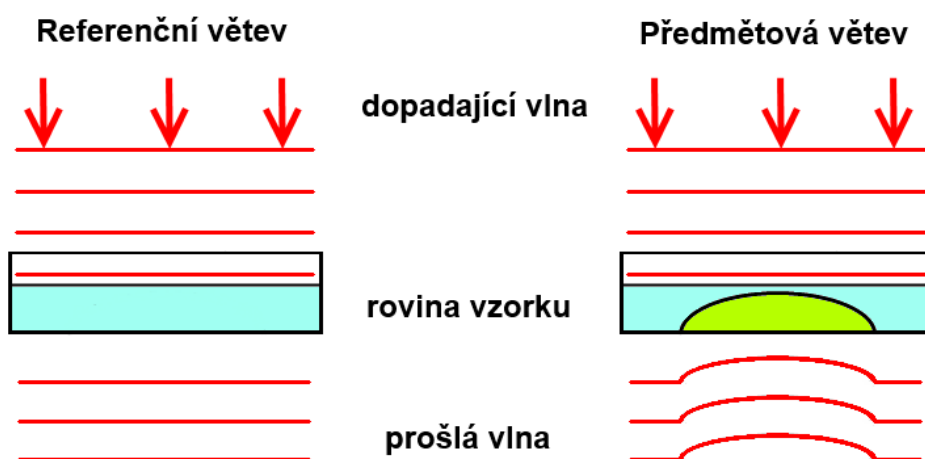
Nejhlubší díry jsou v levé části snímku. Při správném navázání by se tak čtverce vlevo měly jevit nejtmavší, ty v pravé části naopak nejsvětlejší. Tento barevný gradient lze ovšem pozorovat pouze v pravé části snímku, kde došlo ke správnému navázání.

Za zmínku stojí také šikmá diagonální porucha v navázané fázi u malého čtverce ve spodní řadě. Ta má za následek, rozdělení této čtvercové oblasti na dvě trojúhelníkové – jedné se správně navázanou fází a druhé s nenavázaným fázovým skokem. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že spodní a levá hrana oblasti jsou natolik strmé, že je mikroskop vůbec nedetekoval. Pravá a horní hrana jsou naopak dostatečně pozvolné nejen pro detekci ale i pro správné navázání.

4. Přednosti CCHM

4.1 Kvantitativní fázové zobrazení

Jak bylo zmíněno výše, jednou z hlavních předností holografického mikroskopu je schopnost kvantitativního fázového zobrazení (QPI, z anglického *quantitative phase imaging*). Zviditelnění fázových rozdílů umožňují sice i běžně využívané metody fázového kontrastu nebo metoda DIC aplikovatelné i u klasických světelných mikroskopů. V případě těchto metod jde ale pouze o kvalitativní fázové zobrazení [1,7,12]. Na rozdíl od kvalitativního fázového zobrazení dokáže kvantitativní fázové zobrazení, zprostředkované interferenčními mikroskopy, fázové rozdíly nejen zobrazit, ale také měřit.



Obrázek 10: Vliv vzorku na tvar vlnoplochy.

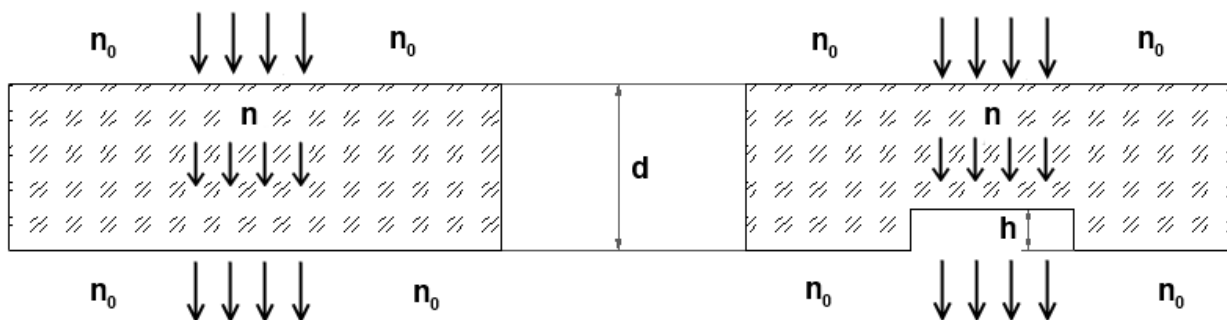
Rychlost šíření elektromagnetického vlnění je nepřímo úměrná indexu lomu prostředí, kterým se toto vlnění šíří. Čas, potřebný k překonání definované vzdálenosti, tedy nezávisí pouze na vzdálenosti samotné, závisí také na indexu lomu prostředí, kterým se světelná vlna šíří.

Šíří-li se proto vlna skrze vzorek, je v závislosti na indexu lomu v jeho jednotlivých částech deformováno její čelo (obrázek 10). Fázový posuv světelné vlny v takovém případě závisí na součinu lokální tloušťky vzorku $t(x,y)$ a indexu lomu $n(x,y)$ v daném místě [12]. Holografický mikroskop umožňuje tyto deformace způsobené vzorkem kvantitativně detekovat – změřit rozložení fáze v rovině vzorku.

Kvantitativní fázový obraz může podat velice přesnou informaci o morfologii či topografii vzorku. V případě pozorování buněk ukáže kvantitativní fázový obraz rozložení suché hmoty uvnitř zkoumané buňky – tzn. hmotnosti buňky za sucha [2,12]. Tato vlastnost dělá z holografického mikroskopu velice citlivý a potenciálně vhodný přístroj právě pro pozorování živých buněk.

4.1.1. Výpočet hloubky vyleptaných oblastí

Výpočet hloubky vyleptaných oblastí vychází z naměřených hodnot fáze φ prošlého světla. Hodnota rozdílů fází $\Delta\varphi$ světla prošlého referenčním a předmětovým ramenem je přímo úměrná rozdílu mezi optickými drahami v referenční a v objektové větvi (OPD – z anglického *optical path difference*). Vedle samotného vzorku a referenčního vzorku je její hodnota závislá na vlnové délce použitého záření λ_c a na indexu lomu prostředí n_0 , obklopujícího vzorek.



Obrázek 11: Výpočet hloubky pozorované oblasti z naměřené fáze.

Obrázek 11 ukazuje vzorek (vpravo) a referenční vzorek (vlevo). Vzorkem je sklíčko s indexem lomu n , tloušťkou d a vyleptanou dírou hloubky h . Referenční vzorek je také sklíčko. Má stejnou tloušťku d a index lomu n jako vzorek, na rozdíl od vzorku je ale rovné – neobsahuje žádné vyleptané prohlubně. Obě sklíčka uvažujeme v prostředí s indexem lomu n_0 .

Pro OPD, rozdíl optických drah mezi referenční a předmětovou větví, u výše popsaného případu platí:

$$OPD = d \cdot n - [(d - h) \cdot n + h \cdot n_0] \quad . \quad (1)$$

Úpravou vztahu (1) dostaneme závislost:

$$OPD = h \cdot (n - n_0) \quad . \quad (2)$$

Pro hloubku pozorované oblasti h tak dostáváme:

$$h = \frac{OPD}{n - n_0} \quad . \quad (3)$$

Pro OPD platí lineární závislost na naměřeném fázovém rozdílu $\Delta\varphi$:

$$OPD = \lambda_c \cdot \frac{\Delta\varphi}{2 \cdot \pi} \quad , \quad (4)$$

kde $\Delta\varphi$ je dosazováno v radiánech. Na této veličině je nepříjemné, že se při měření projevuje periodicky – s periodou 2π . Naměřené hodnoty se proto pohybují v intervalu $(-\pi; \pi)$. Při měření tedy nelze jednoznačně rozlišit hodnotu „ $\Delta\varphi$ “ od „ $\Delta\varphi + 2Z\pi$ “, kde Z je libovolné celé číslo.

Dosazením vztahu (4) do vztahu (3) dostaneme:

$$h = \Delta\varphi \cdot \frac{\lambda_c}{2 \pi \cdot (n - n_0)} \quad . \quad (5)$$

Výše uvedený výpočet vycházel z názorného, ale zjednodušeného předpokladu. Předpokládal, že vzorek i referenční vzorek mají (mimo vyleptané oblasti) identickou tloušťku i index lomu – naprosto shodnou optickou tloušťku. To v praxi nemusí být pravda.

Při seřizování mikroskopu se délka optické dráhy referenčního ramene dá velmi přesně nastavit pomocí zrcátek ovládaných piezo posuvem. Shoda v délkách optických drah se tedy zajišťuje s jejich využitím. V referenční větvi tak může teoreticky být předmět

způsobující téměř libovolnou (v celém zorném poli stejnou) změnu optické dráhy. Při správně seřízeném mikroskopu tak výše uvedený výsledek (5) odpovídá skutečnosti přesně.

Kdyby tomu tak nebylo, nebylo by možné níže uvedená měření relevantně provádět. Vzhledem k poměru tloušťky samotného krycího sklíčka ($\sim 1000 \mu\text{m}$) ku hloubce vyleptaných děr ($\sim 0,002\text{--}6 \mu\text{m}$), by byl celý experiment neúnosně závislý především na shodě indexu lomu obou sklíček. Nejistota 0,001 v rozdílu hodnot těchto indexů by znamenala nejistotu v určené hloubce přibližně $1 \mu\text{m}$.

I tak je ale co nejlepší shoda referenčního vzorku s měřeným vzorkem výhodná. Hlavním důvodem je skutečnost, že svazek v rovině vzorku není obecně paralelní. Shoda větví také usnadňuje seřízení mikroskopu. Je tedy vhodné, aby optická délka obou větví byla shodná alespoň přibližně. Proto bylo při prováděných experimentech do referenční větve vkládáno jako referenční vzorek podložní sklíčko, které tuto přibližnou shodu zajišťovalo.

4.2. Zobrazení skrze rozptylující vrstvu

Pozorování a zobrazování objektů skrze rozptylující média je důležitou součástí studia živých buněk a tkání. Velká část mikroskopů ovšem takováto pozorování v dostatečné kvalitě neumožňuje, neboť se většina světla při průchodu přes difuzní prostředí rozptýlí a získaný obraz znehodnocuje. Jednou z hlavních předností CCHM je možnost separace rozptýleného světla, což umožňuje zobrazení vzorků i skrze difuzní prostředí. To umí i jiné techniky (například konfokální mikroskopie). CCHM ale navíc dovoluje využít k zobrazení také difuzní, rozptýlené, světlo [12]. Tento jev souvisí s použitím prostorově nekoherentního světla, umožňujícího vznik efektu tzv. koherenční brány. Světlo z určitého místa vzorku může interferovat pouze se světlem z odpovídajícího místa referenční větve – v oblasti, která je určena mírou prostorové koherence.

Možností zobrazovat vzorky přes sklíčko se zmatněným povrchem umístěným mezi vzorkem a objektivem CCHM byla demonstrována např. v [21]. Ve článku je ukázáno, že je možné zobrazovat balistickým, i difuzním světlem. Autor publikoval také článek [22], v němž analyticky spočítal jednorozměrné zobrazení bodu přes difuzní vrstvu a ukázal, na jakém principu zobrazení funguje. V experimentální části poté demonstroval, že i v tomto případě může rozlišení dosahovat až teoretické rozlišovací schopnosti použitého mikroskopu. V článku [5] je shrnuta teorie 3D zobrazení pomocí CCHM. Je zde prezentován také popis zobrazení plošného vzorku přes tenkou difuzní vrstvu a ukázáno, že zobrazení bodu se pro každý bod předmětové roviny mírně liší, že není invariantní. Numerické simulace a základní experimentální ověření možnosti zobrazení dvourozměrného předmětu přes tenkou vrstvu umístěnou mezi vzorek a objektiv je popsáno v [23]. Tato diplomová práce má experimentálně ověřit teoretický popis a simulace uvedené v [5, 23].

4.2.1. Matematický popis zobrazení přes rozptylující vrstvu

Následující popis zobrazení přes rozptylující vrstvu vychází z článků [5,23]. Uvažuje dvourozměrný vzorek popsáný komplexní funkcí propustnosti $u(\vec{r}_{st})$. Výpočty jsou založeny na parabolické aproximaci a předpokládají prostorově nekoherentní kvazimonochromatické světlo se střední vlnovou délkou λ_c . Protože takovéto zobrazení není prostorově invariantní, nemůžeme zavést funkci impulzní odezvy. Zobrazení ve výstupní rovině je tedy nutné počítat bod po bodu, pomocí integrace. Proto pro obraz popsáný funkcí $u_i(\vec{r}_t)$ platí:

$$u_i(\vec{r}_t) = \iint_{-\infty}^{+\infty} u(\vec{r}_{st}) w_D(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}, z_D, \vec{r}_f) d^2 \vec{r}_{st}, \quad (6)$$

jak bylo ukázáno v článku [W]. Funkce $w_D(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}, z_D, \vec{r}_f)$ reprezentuje zobrazení bodu

předmětové roviny, $\vec{r}_t = (x_t, y_t)$ jsou souřadnice obrazové roviny, $\vec{r}_{st} = (x_{st}, y_{st})$ jsou souřadnice vybraného bodu, z_D je vzdálenost difuzoru od vzorku a $\vec{r}_f = (x_f, y_f)$ je vektor posunutí obrazů vytvořených ve výstupní rovině předmětové a referenční větve. Souřadnice jsou přepočteny do roviny předmětu, redukované zvětšením mikroskopu. Vztah (6) lze chápat jako zobrazení se zvětšením jedna.

Vzhledem k [L] lze obraz $w_D(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}, z_D, \vec{r}_f)$ vyjádřit součinem dvou funkcí:

$$w_D(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}, z_D, \vec{r}_f) = s_t^*(\vec{r}_t - \vec{r}_{st}) p_{iD}(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}, z_D, \vec{r}_f). \quad (7)$$

Funkce $s_t(\vec{r}_t)$ závisí na optických vlastnostech referenční větve a odráží koherenční vlastnosti zdroje. Funkce $p_{iD}(\vec{r}_t)$ závisí na optických vlastnostech předmětové větve [5]. Hvězdička značí komplexní sdružení.

V parabolické aproximaci lze výraz $s_t(\vec{r}_t)$ popsat Besselovou funkcí prvního řádu

$$s_t(\vec{r}_t) = \frac{2J_1(\mu)}{\mu}, \quad (8)$$

kde $\mu = 2\pi \frac{NA_S}{\lambda_C} |\vec{r}_t|$. NA_S reprezentuje nejmenší z numerických apertur zdroje, kondenzoru a objektivu, a zároveň v sobě nese informaci o stupni prostorové koherence. S rostoucí hodnotou NA_S klesá stupeň prostorové koherence. Funkce $p_{iD}(\vec{r}_t)$ je vztažena k zobrazení vzorku předmětovou větví. Je v ní také zahrnut vliv difuzoru na zobrazení:

$$p_{iD}(\vec{r}_t, \vec{r}_{st}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} p_0(\vec{r}_t - \vec{r}_{st} + \vec{Q}_{Dt} z_D \lambda_C - \vec{r}_f) T_{Dr}(\vec{Q}_{Dt}) \exp \left[-i\pi \lambda_C z_D |\vec{Q}_{Dt}|^2 + i2\pi \vec{Q}_{Dt} \cdot \vec{r}_{st} \right] d^2 \vec{Q}_{Dt}. \quad (9)$$

V parabolické aproximaci lze funkci $p_o(\vec{r})$ vyjádřit vztahem $p_o(\vec{r}) = \frac{2J_1(v)}{v}$, kde

$v = 2\pi \frac{NA}{\lambda_C} |\vec{r}|$ a NA je numerická apertura objektivu. Funkce T_{Dt} popisuje úhlové spektrum komplexní funkce propustnosti $t(\vec{r}_{Dt})$ dvourozměrné difuzní vrstvy. Funkce je definována Fourierovou transformací

$$T_{Dt}(\vec{Q}_{Dt}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} t(\vec{r}_{Dt}) \exp(i2\pi \vec{Q}_{Dt} \cdot \vec{r}_{Dt}) d^2 \vec{r}_{Dt}. \quad (10)$$

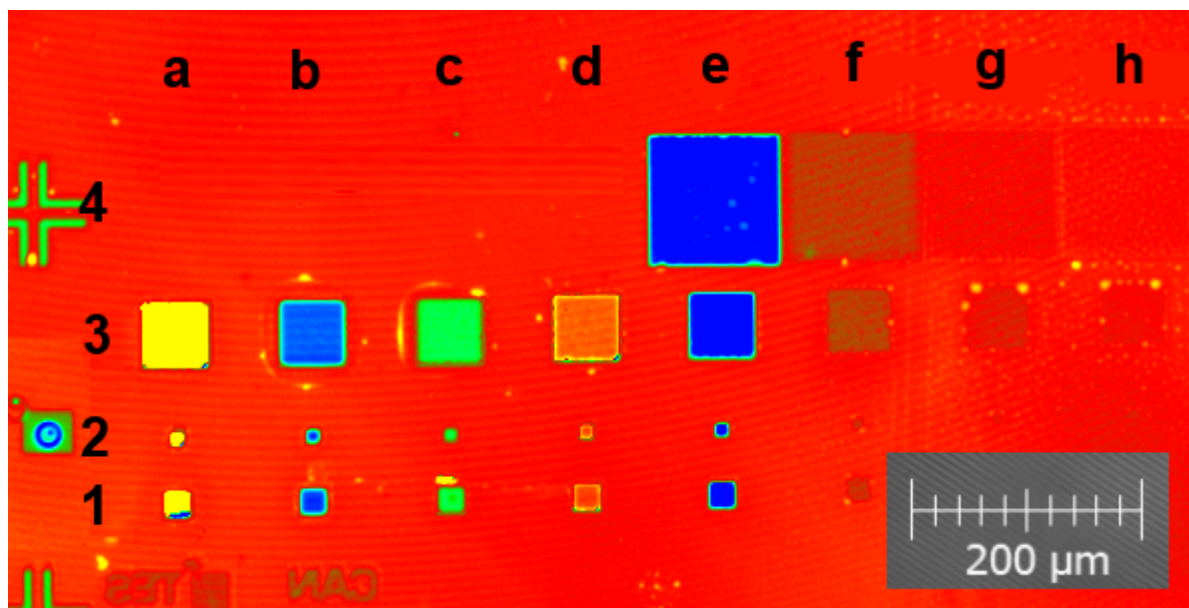
Vektor $\vec{Q}_{Dr}$ je vektorem rozptylu difuzní vrstvy a vektor $\vec{r}_{Dr}$ popisuje souřadnice roviny difuzoru. V závislosti na jeho vlastnostech se obraz bodu w_D může lišit pro každý bod předmětové roviny $\vec{r}_{st}$.

Funkce $s_t(\vec{r}_t)$ (8) ve w_D v (7) odráží stupeň koherence. V případě prostorově nekoherentního světla ji popisuje ostré maximum definované vztahem (8), šířka maxima souvisí s numerickou aperturou NA_S . Funkce $s_t(\vec{r}_t)$ se tedy chová jako „filtr“ funkce $p_{iD}(\vec{r}_t)$ (9). Světlo z vybraného bodu (malé oblasti) předmětové roviny tedy interferuje pouze se světlem z odpovídajícího bodu (oblasti) předmětové roviny v referenční větvi. To znamená, že obraz předmětu umístěného v rozptylujícím prostředí lze vytvořit nejen balistickým (nerozptýleným) světlem (pro $\vec{r}_f = 0$), ale při vhodném posunu obrazu větvi vůči sobě také světlem rozptýleným (pro $\vec{r}_f \neq 0$). Pro případ prostorově koherentního světla, kdy $NA_S \rightarrow 0$, nabývá funkce $s_t(\vec{r}_t)$ hodnot blízkých jedné, efekt koherenční brány se tedy neprojevuje. K interferenci v takovém případě dochází mezi všemi body referenční a předmětové roviny. Důsledkem je nežádoucí koherenční zrnitost. Obraz bodu je pak určen funkcí (9).

5. Experimenty

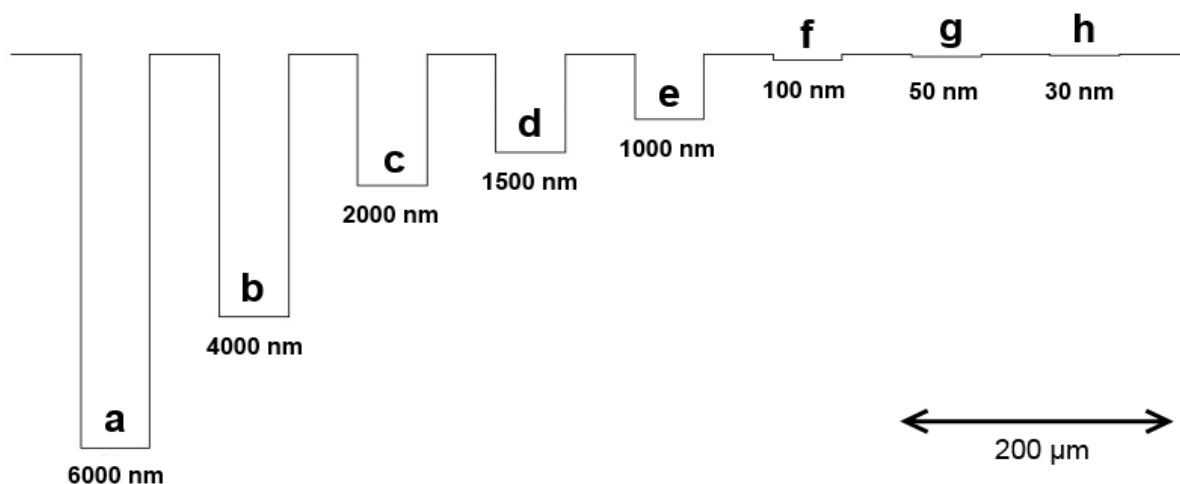
V rámci této práce byly prováděny dva druhy experimentů. V první sérii experimentů byla vzorkem skleněná destička s polem vyleptaných čtvercových oblastí různé hloubky a velikosti (obrázek 12), jednalo se tedy o fázový vzorek. Vzorek při druhé sérii experimentů byl naopak čistě amplitudový – byl jím standardní rozlišovací test USAF 1951 (obrázek 14).

Oba vzorky byly pozorovány v prostorově nekoherentním osvětlení. Časové koherence byla částečná. Zdrojem byla pro všechna pozorování halogenová žárovka OSRAM s výkonem 100 W. Světlo ze zdroje procházelo barevným filtrem s nejvyšší propustností vlnové délky $\lambda_c = 650$ nm, při pološířce $\Delta\lambda = 10$ nm.



Obrázek 12: Skleněná destička s vyleptanými čtvercovými prohlubněmi (v umělých barvách). Pro snazší orientaci je rozdělen do sloupců a-h a řad 1-4.

Fázový vzorek s vyleptanými čtvercovými oblastmi byl nejprve proměřen na holografickém mikroskopu s využitím kvantitativního fázového zobrazení – byly změřeny hloubky jednotlivých oblastí. Následně byl pozorován skrze sadu tří různě silných difuzorů, přičemž bylo profilometrické měření zopakováno.

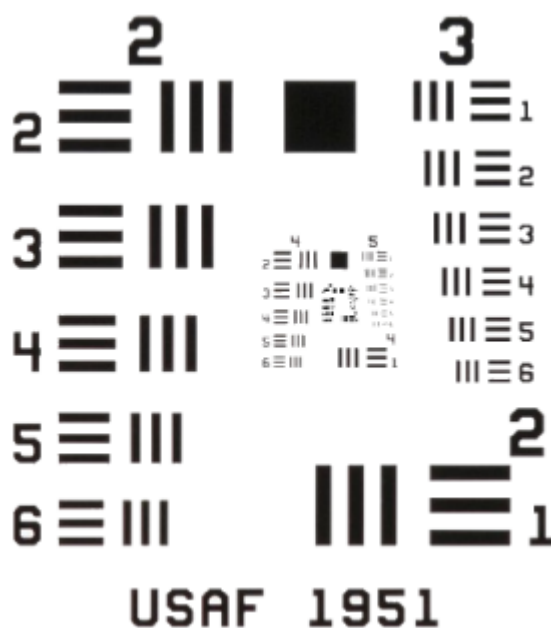


Obrázek 13: Teoretický profil zkoumaného fázového vzorku (řada „3“).

Tato měření měla dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo ukázat, že holografický mikroskop je schopen zviditelnit fázové objekty, které jsou v klasické mikroskopii pozorovatelné jen

velmi obtížně – a to dokonce i skrze difuzní elementy. Druhým cílem pak bylo experimentálně ověřit výpočty předpovězený jev, ke kterému by mělo docházet při zobrazování předmětu skrze silně rozptylující prostředí. Možnosti zobrazovat vzorek nebalistickým (difuzním) světlem – světlem, které bylo difuzorem rozptýleno a v některých případech tímto způsobem dosáhnout lepšího výsledku, než při běžném pozorování balistickým nerozptýleným světlem.

Pozorování amplitudového vzorku (obrázek 14) mělo tři hlavní cíle. Prvním z nich bylo změřit laterální rozlišovací schopnost mikroskopu. Druhým cílem bylo ukázat, jaký vliv na toto rozlišení mají difuzory použité v experimentech s fázovým vzorkem. Třetím záměrem pak bylo prokázat schopnost holografického mikroskopu zobrazit i čistě amplitudový vzorek skrze silně rozptylující prostředí – takové, skrze jaké běžný světelný mikroskop není schopný pozorované objekty kontrastně zobrazit.



Obrázek 14: Rozlišovací test USAF 1951.

5.1. Fázový vzorek

Zkoumaným fázovým vzorkem bylo podložní sklíčko s polem vyleptaných čtvercových oblastí různých hloubek a velikostí. Toto pole zabíralo na vzorku plochu přibližně $300\ \mu\text{m} \times 1600\ \mu\text{m}$. Vyleptané plochy tvořily čtverce o velikostech stran $100\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$ a $10\ \mu\text{m}$. Jejich teoretické hloubky byly $2\ \text{nm}$, $4\ \text{nm}$, $6\ \text{nm}$, $8\ \text{nm}$, $10\ \text{nm}$, $15\ \text{nm}$, $20\ \text{nm}$, $30\ \text{nm}$, $50\ \text{nm}$, $100\ \text{nm}$, $1000\ \text{nm}$, $1500\ \text{nm}$, $2000\ \text{nm}$, $4000\ \text{nm}$ a $6000\ \text{nm}$.

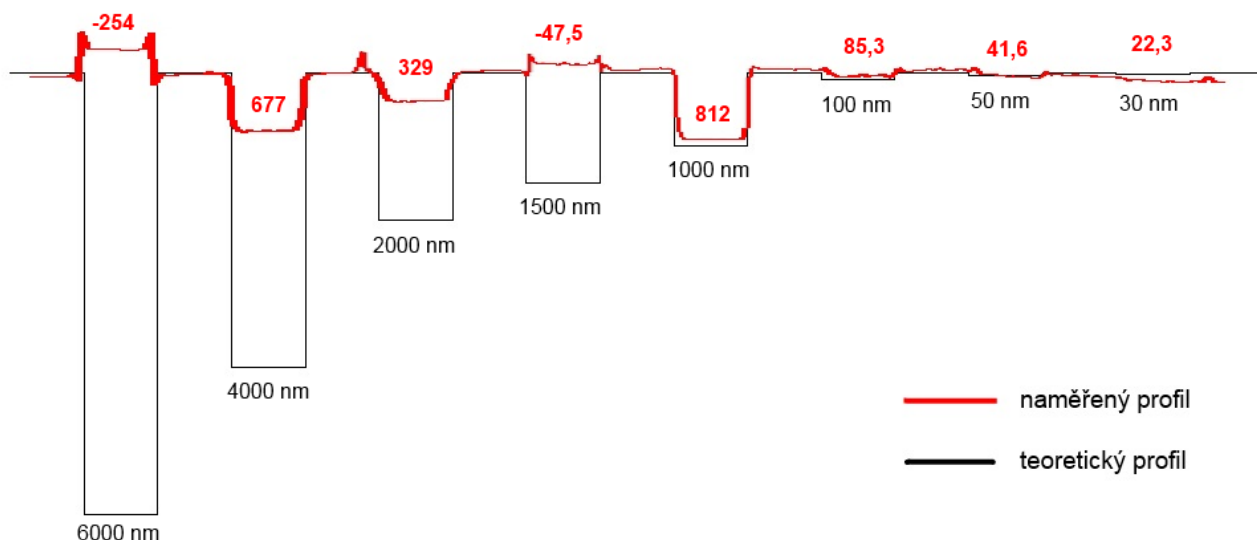
Vzhledem k relativně velké drsnosti sklíčka, pohybující se v řádu několika desítek nanometrů, nemělo nicméně pozorování oblastí mělčích než $30\text{--}50\ \text{nm}$ žádný praktický význam.

Vzorek byl připraven firmou TESCAN jako zkušební fázový rozlišovací test. Šlo o první výrobek svého druhu. Cílem firmy tedy nebylo vytvořit precizní výrobek, ale pouze ověřit možnosti výroby takového fázového rozlišovacího testu.

Indexy lomu pozorovaného i referenčního sklíčka byla dle měření refraktometrem *AR4 Abbe Refractometer* firmy *A. Krüss Optronik GmbH* rovny $n = 1,512$. Okolním médiem vzorku byl vzduch ($n_0 = 1,000$). Dosazením uvedených hodnot do vztahu (5) dostaneme pro závislost naměřeného fázového rozdílu $\Delta\varphi$ a zjišťované hloubky měřené oblasti vztah:

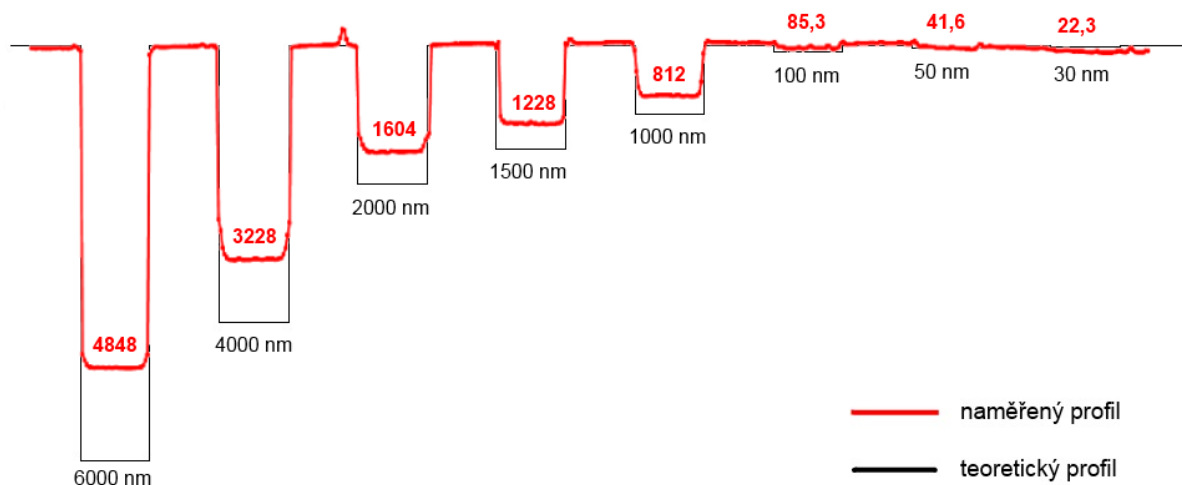
$$h[\text{nm}] = (\Delta\varphi[\text{rad}] + Z \cdot 2\pi) \cdot 202,8 \quad , \quad (11)$$

kde Z je neznámé celé číslo.



Obrázek 15: Porovnání naměřeného profilu s profilem teoretickým ukazuje, že holografický mikroskop nedokáže navázat prudké fázové skoky větší než 2π . Naměřené hodnoty jsou uvedeny v nm.

Vedle nemožnosti kvantitativně měřit příliš mělké oblasti, byla druhým omezením přítomnost velkých nenavázatelných fázových skoků. Ze vztahu (11) lze spočítat, že u zkoumaného vzorku může k nenavázatelnému fázovému skoku dojít už u $1,3 \mu\text{m}$ vysokého schodu. Tento jev ukazuje obrázek 15. Jsou na něm porovnány teoretický profil řady 3 s profilem naměřeným. K fázovému skoku, který mikroskop nedokázal navázat, došlo u všech oblastí hlubších než 1000 nm. V případě děr hlubokých 1500 nm a 2000 nm došlo k jednomu fázovému skoku o 2π , což v případě zkoumaného vzorku odpovídá schodku vysokému 1274 nm. Hodnoty z oblastí hlubokých 4000 nm jsou vůči skutečnosti posunuté o dvojnásobnou hodnotu -4π (2548 nm). Nejhlubší oblasti vzorku jsou postihnuty dokonce čtyřnásobným fázovým skokem -8π (5097 nm).



Obrázek 16: Porovnání naměřeného profilu po korekci chybného navázání s teoretickým profilem. Naměřené hloubky děr (uvedeny v nm) dosahují přibližně 80% teoretické hodnoty.

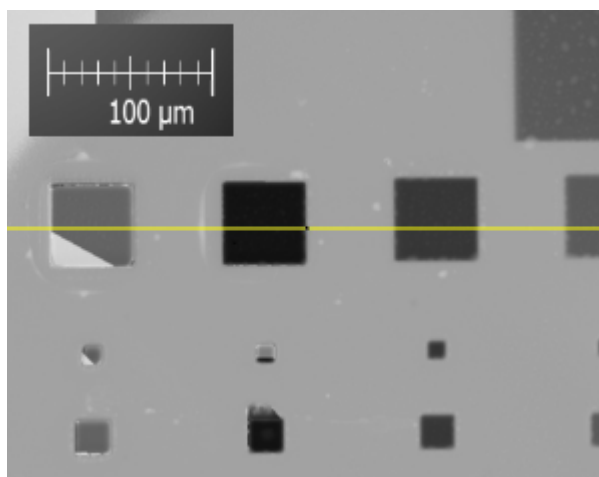
Dalším podstatným faktem je skutečnost, že teoretická hloubka neodpovídá přesně té skutečné. Měření provedená na holografickém mikroskopu ukazují, že skutečné hloubky dosahují přibližně 80% teoretické hodnoty. Tento efekt je patrný z obrázku 16, kde je porovnán naměřený profil (po dopočtu fázových skoků) s teoretickými hodnotami.

Tato skutečnost nesouhlasu měření s teoretickými hodnotami uvedenými na vzorku je v souladu s předpovědí samotného výrobce zkoumaného fázového vzorku.

5.1.1. Pozorování fázového vzorku bez difuzoru

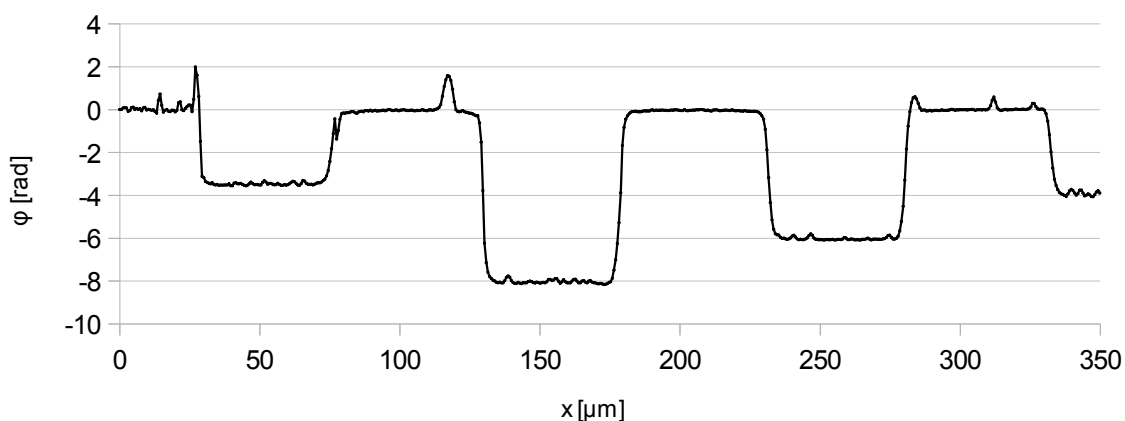
Fázový vzorek byl pozorován objektivem se zvětšením $Z = 10\times$ a numerickou aperturou $NA = 0,3$. Nejprve byl nasnímán skrze nerozptylující podložní sklíčko, poté skrze sadu tří různě silných difuzorů (Dodatek A). Tyto difuzory byly vyrobeny tryskáním pískem z klasických podložních sklíček tlustých 1 mm.

Na snímcích všech čtyř pozorování jsou zachyceny oblasti (nebo alespoň jejich části) hluboké přibližně $1\text{ }\mu\text{m}$, $1,5\text{ }\mu\text{m}$ a $2\text{ }\mu\text{m}$. Tyto oblasti byly vybrány, protože jsou vůči drsnosti povrchu dostatečně hluboké, zároveň ale nejsou hluboké příliš – za ideálních podmínek se je (při použití vhodných algoritmů) může podařit správně fázově navázat.



Obrázek 17: Vybraná část fázového vzorku s vyznačením roviny řezu.

Obrázek 17 ukazuje vzorek pozorovaný skrze nerozptylující krycí sklíčko. Vedle zmíněných oblastí zachycuje také oblasti hloubky $4\text{ }\mu\text{m}$ (sada čtverců v levé části snímku). Již na první pohled je patrné, že tyto oblasti se správně fázově navázat nepodařilo – na snímku se nejví jako nejtmaší. Žlutou čarou je ve snímku vyznačen řez vzorkem. Ten ukazuje graf na obrázku 18.

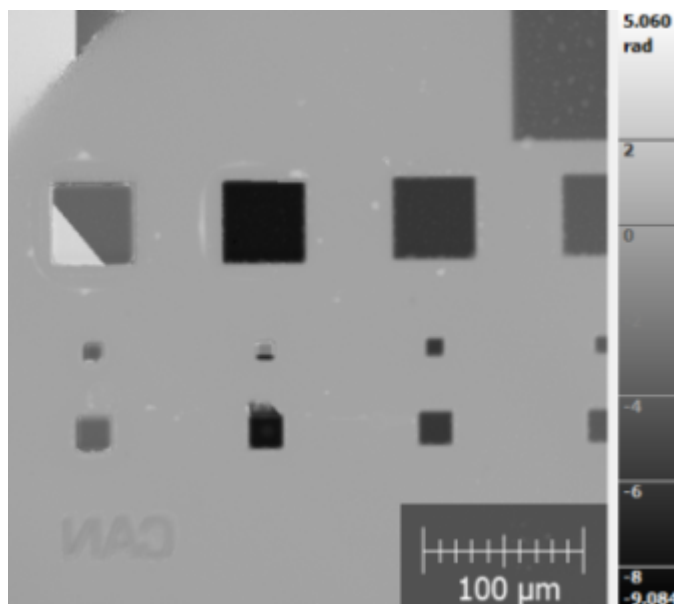


Obrázek 18: Profil řezu fázovým vzorkem (překrytým nerozptylujícím podložním sklíčkem).

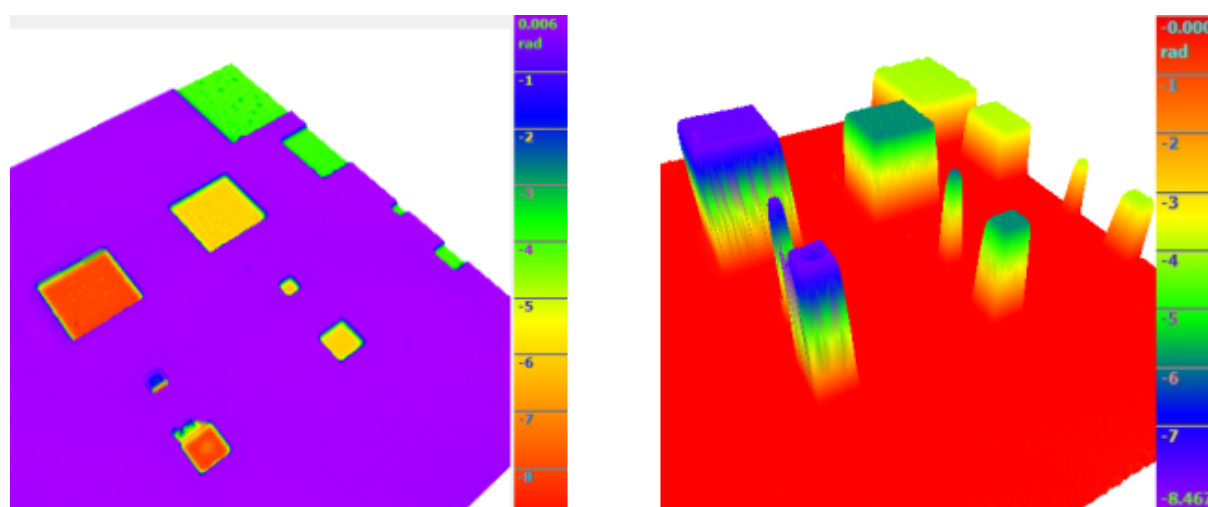
Hloubka vybraných oblastí – pozorování bez difuzoru			
Teoretická hloubka	$2\text{ }\mu\text{m}$	$1,5\text{ }\mu\text{m}$	$1\text{ }\mu\text{m}$
Vypočtená hloubka [rad]	$-8,03\pm 0,05$	$-6,10\pm 0,04$	$-3,94\pm 0,07$
Vypočtená hloubka [μm]	$1,627\pm 0,010$	$1,237\pm 0,008$	$0,799\pm 0,014$

5.1.2. Rekonstrukce trojrozměrných modelů

Jednou z hlavních výhod kvantitativního měření fáze u homogenních vzorků s konstantním indexem lomu v celém svém objemu je schopnost zrekonstruovat jejich trojrozměrnou strukturu z jediného pořízeného snímku. Takovým případem byl i náš fázový vzorek.



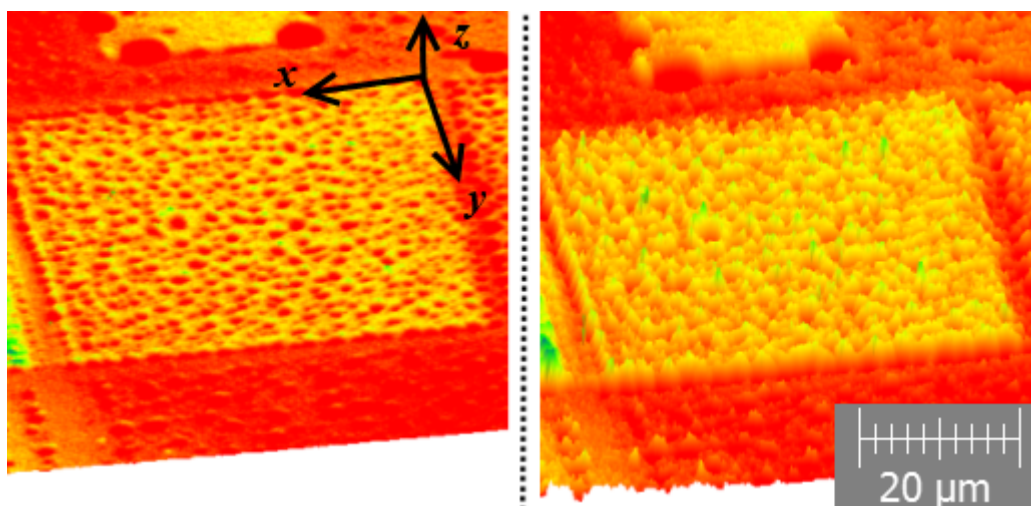
Obrázek 19: Fázový snímek před 3D rekonstrukcí.



Obrázek 20: Trojrozměrná rekonstrukce části fázového vzorku.

Trojrozměrnou rekonstrukci snímku z obrázku 19 ukazuje obrázek 20. V levé části je vyobrazena prostá trojrozměrná rekonstrukce, převedená do barevné palety. Trojrozměrná struktura na něm příliš patrná není. Tato skutečnost má dvě příčiny. První příčinou je, že vyleptané díry jsou v porovnání s jejich laterálními rozměry poměrně malé. Druhým faktorem je, že se prohlubně mohou v okolním terénu snadno ztrácet, vyvýšeniny by byly pozorovatelné lépe.

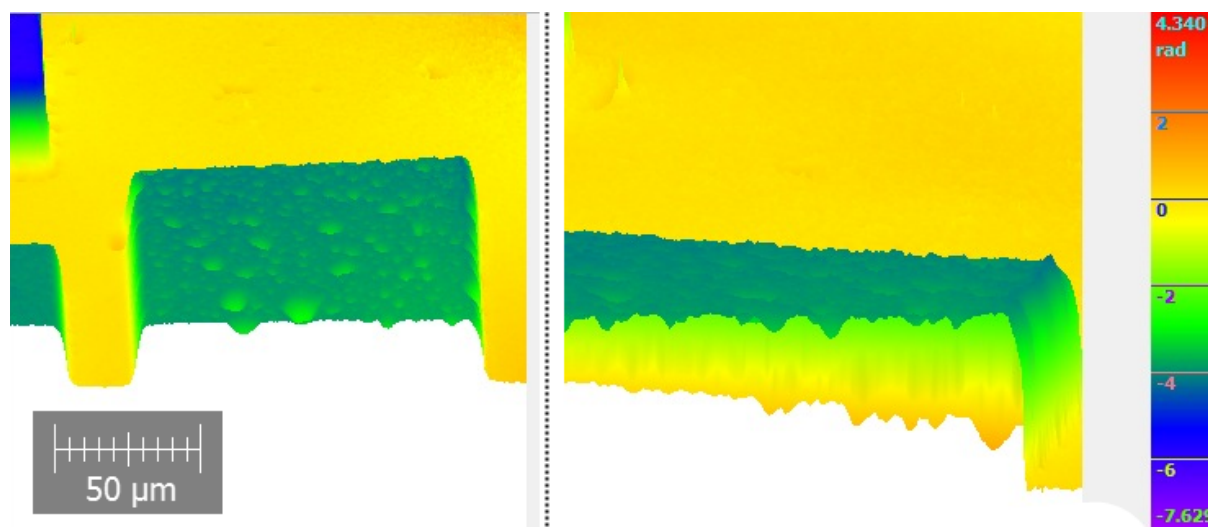
Oba zmíněné nedostatky odstraňují úpravy zachycené v pravé části obrázku 20. Nejprve byl snímek invertován – z prohlubní se staly vyvýšeniny. Poté byla osa z 10x natažena. Výsledkem je snímek, ze kterého je trojrozměrná struktura vzorku zřejmá.



Obrázek 21: Zviditelnění struktury pomocí natáhnutí osy z . Oba snímky zobrazují tutéž čtvercovou oblast o délce hrany $50\ \mu\text{m}$ a vysokou $50\ \text{nm}$.

Vhodně provedená trojrozměrná rekonstrukce může také pomoci zviditelnit některé jinak špatně pozorovatelné struktury. Příklad takového případu ukazuje levá část obrázku 21. Na snímku je zachycena struktura s teoretickou hloubkou $50\ \text{nm}$. Snímek prošel inverzí, zkoumaná struktura by se tedy měla jevit jako vyvýšenina. Tato skutečnost ze snímku ale příliš patrná není.

Na pravém obrázku je tato struktura natažena v ose z v poměru $10:1$. Po uvedené úpravě je i přes značnou drsnost povrchu (naměřená hloubka je $42\ \text{nm} \pm 10\ \text{nm}$) vyvýšený charakter jasně patrný.



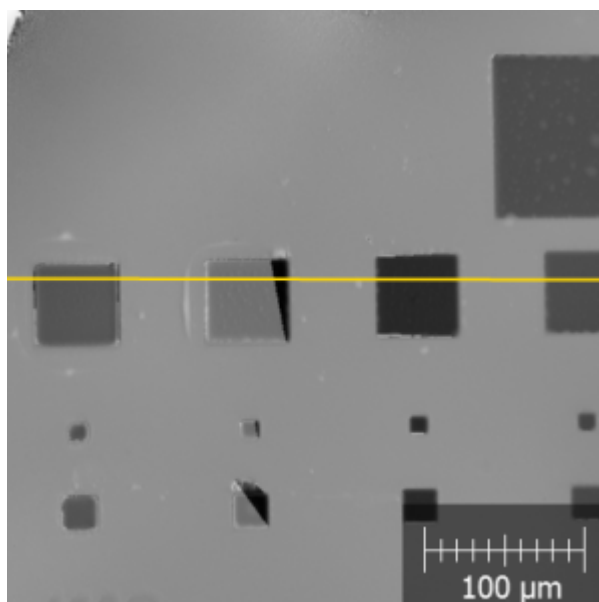
Obrázek 22: Zviditelnění drsnosti povrchu pomocí 3D rekonstrukce. Oba snímky zobrazují tutéž čtvercovou oblast o délce hrany $100\ \mu\text{m}$ a vysokou $1\ \mu\text{m}$. Levý snímek je pohledem shora, pravý ukazuje detail profilu.

Další výhodou trojrozměrné rekonstrukce je názorné zviditelnění zmíněné drsnosti povrchu. Obrázek 22 zachycuje čtvercovou oblast o délce hrany přibližně $100\ \mu\text{m}$. Její hloubka je necelý $1\ \mu\text{m}$, pro lepší názornost je tedy osa z vhodně natažena.

Ze snímku lze vyčíst, že největší nerovnosti dosahují přibližně jedné desetiny „výšky“ této oblasti – tedy přibližně $100\ \text{nm}$. To je hodnota srovnatelná s průměrnou hloubkou sousední oblasti, jejíž teoretická hloubka je právě $100\ \text{nm}$.

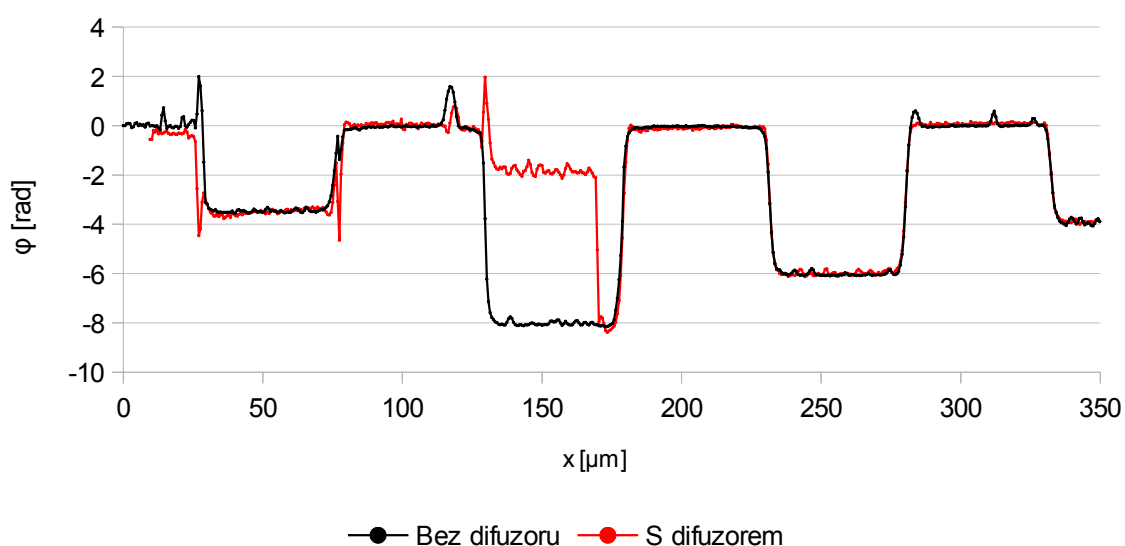
5.1.3. Pozorování skrze slabý difuzor

Pozorování skrze slabý difuzor s sebou přineslo potíže se správným navázáním fáze u oblastí hlubokých $2\ \mu\text{m}$ (dále označovaných jako oblastí „c“). Při použití standardního navazovacího algoritmu (*Goldstein* využívající pouze rekonstruované fáze) došlo ke správné interpretaci naměřených hodnot pouze v malých částech těchto oblastí.



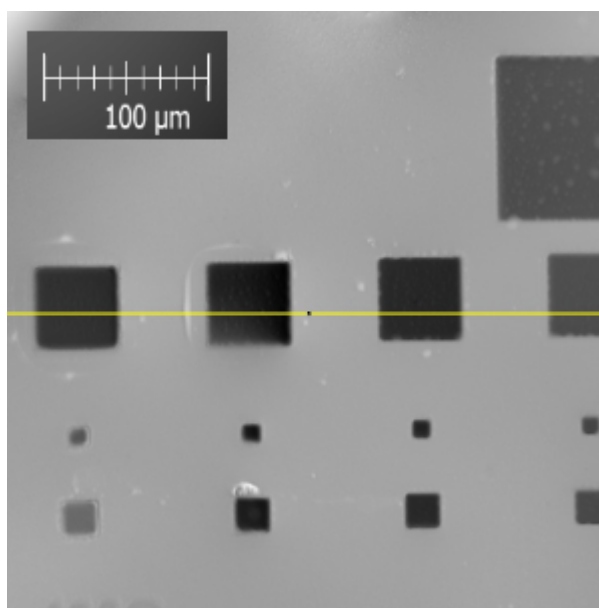
Obrázek 23: Vzorek pozorovaný skrze slabý difuzor.

Barevné skoky na obrázku 23 v oblastech c napovídají, že ke správnému navázání fáze došlo pouze v jejich pravých částech. Tuto domněnku potvrzuje profil řezu vzorkem vynesení v grafu na obrázku 24. Místo řezu je v obrázku 23 vyznačeno žlutou čarou. Profil řezu ukazuje, že uvnitř oblasti c3 (viz obrázek 12) došlo k fázovému skoku o 2π radiánů.



Obrázek 24: Profil řezu vzorkem překrytého slabým difuzorem – uvnitř oblasti c3 došlo k fázovému skoku.

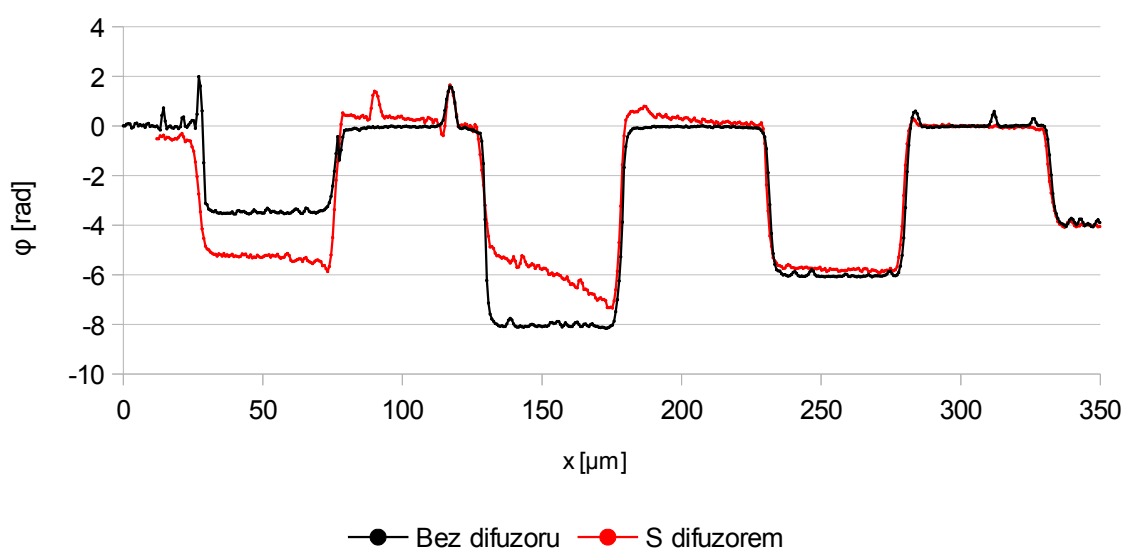
Hloubka vybraných oblastí – slabý difuzor			
Teoretická hloubka	$2\ \mu\text{m}$	$1,5\ \mu\text{m}$	$1\ \mu\text{m}$
Vypočtená hloubka [rad]	$-7,97 \pm 0,08$	$-6,06 \pm 0,07$	$-4,00 \pm 0,06$
Vypočtená hloubka [μm]	$1,627 \pm 0,016$	$1,229 \pm 0,014$	$0,811 \pm 0,012$



Obrázek 25: Vzorek pozorovaný skrze slabý difuzor – fáze navázaná pomocí nestandardního algoritmu.

Problém se špatným navazováním oblastí typu *c* jsme se pokusili vyřešit volbou jiného, nestandardního, navazovacího algoritmu (*Goldstein* využívající navázanou fázi i amplitudu). Ten sice vizuálně fázový skok odstranit dokázal (obrázek 25), jak ale později ukázalo měření profilu povrchu (obrázek 26), šlo pouze o nápravu kvalitativního charakteru.

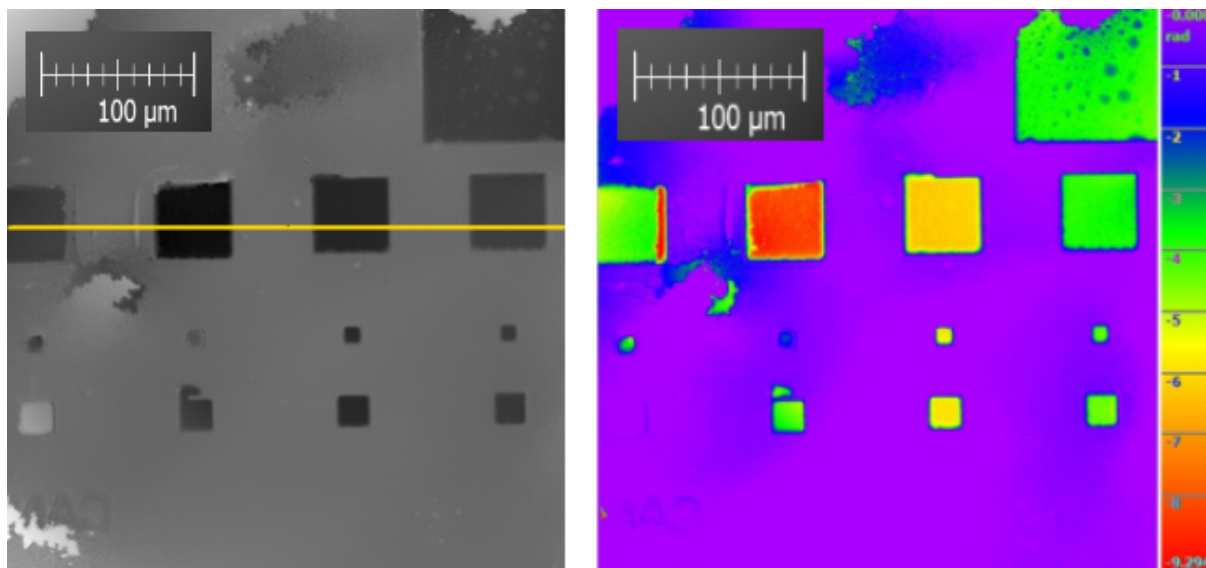
Zmíněný nestandardní navazovací algoritmus využíval při výpočtech také hodnot z rekonstruované amplitudy. To mu pomohlo správně interpretovat fázový skok na pravé hraně oblastí *c*. S ostatními oblastmi vzorku si ale poradil hůře, než standardní algoritmus využívající k navázání pouze informace z rekonstruované fáze. Na zpracování ostatních měření byl proto používán výhradně standardní navazovací algoritmus.



Obrázek 26: Profil řezu vzorkem překrytého slabým difuzorem po navázání nestandardním algoritmem.

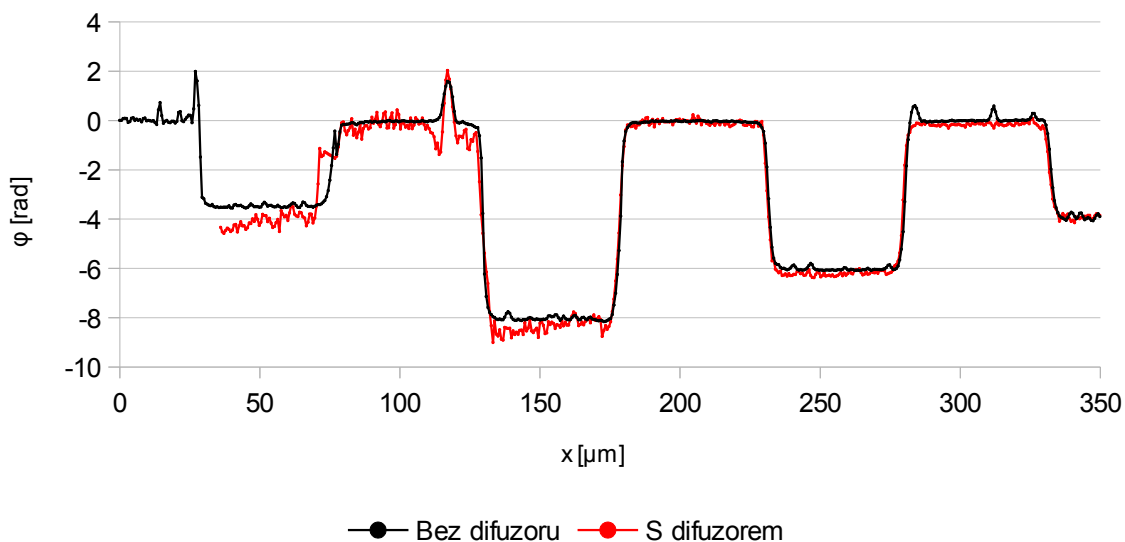
5.1.4. Pozorování skrze středně silný difuzor

Při pozorování skrze středně silný difuzor se začíná viditelně projevovat vliv difuzoru už i při zběžném pohledu na navázanou fázi. Na vzorku se objevují malé nenavázané reziduální oblasti.



Obrázek 27: Vzorek zobrazený skrze středně silný difuzor – lze pozorovat vznik viditelných nepravidelných reziduálních oblastí, ve kterých nebylo možné fázi jednoznačně interpretovat.

Snímek navázané a vyrovnané fáze vzorku pozorovaného skrze středně silný difuzor ukazuje obrázek 27. Obarvený snímek zvýrazňuje oblasti, které difuzor znehodnotil. Jedna z těchto oblastí se vyskytuje také nad čtvercem v pravém horním rohu, v místě řezu, znázorněném na levém snímku žlutou úsečkou, je ale obraz difuzorem porušený jen nepatrně. To ukazuje také graf profilu řezu vzorkem na obrázku 28.

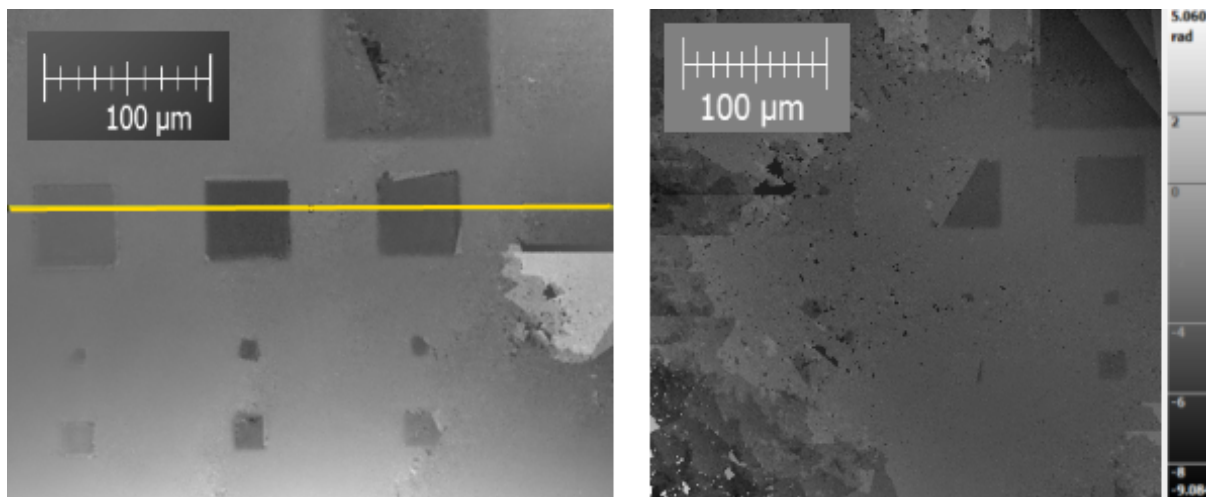


Obrázek 28: Profil řezu vzorkem překrytého středně silným difuzorem – v místě řezu difuzor naměřená data výrazně neovlivnil.

Hloubka vybraných oblastí – středně silný difuzor			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-8,11±0,17	-6,04±0,08	-3,84±0,013
Vypočtená hloubka [μm]	1,645±0,034	1,225±0,016	0,783±0,026

5.1.5. Pozorování skrze silný difuzor

Pozorování skrze silný difuzor přináší významné rozmnožení reziduálních oblastí zmíněných u středně silného difuzoru. Nerekonstruovatelné oblasti běžně překrývají většinu pořízeného záznamu. Posuvem objektivu v referenční větvi v rovině kolmé ke směru šíření světla pak můžeme ovlivnit, která místa se rekonstruují dobře.



Obrázek 29: Vzorek zobrazený skrze silný difuzor – levý snímek ukazuje vysoce nadprůměrně kvalitní rekonstrukci, na pravém snímku je naopak zachycen její běžný výsledek měření.

Levý snímek na obrázku 29 zachycuje vzorek ve značně nadprůměrně dobře seřazeném mikroskopu. Obsahuje pouze jednu velkou reziduální oblast uprostřed pravého okraje snímku. Pravý snímek ukazuje pro porovnání běžný případ navázané fáze pozorované skrze týž silný difuzor.

Důvodem velmi dobrého zobrazení v případě levého snímku může být nestandardní postup při hledání optimálního nastavení mikroskopu, popsany níže.

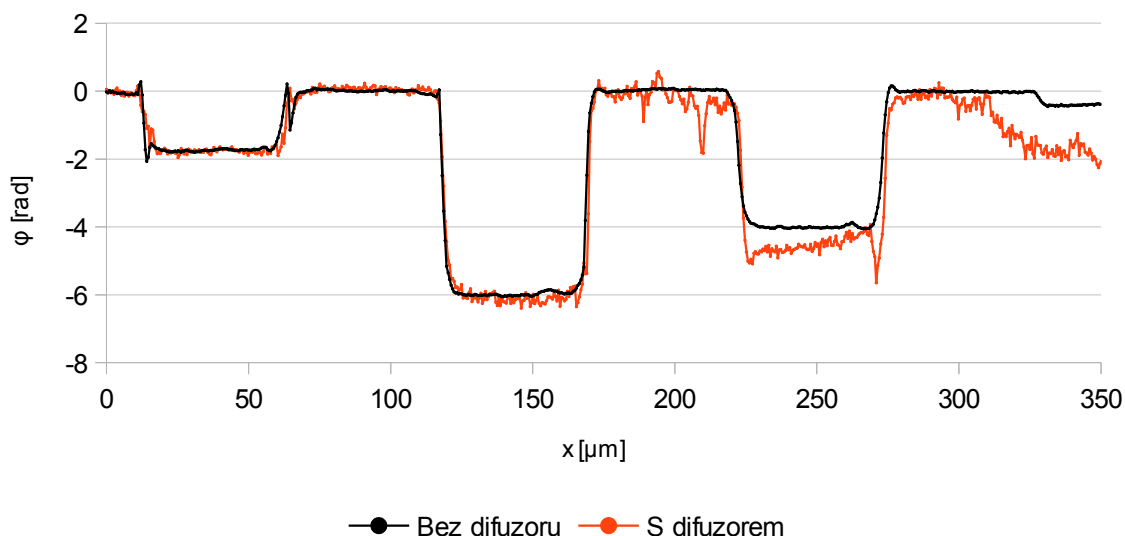
Při běžném postupu se nejprve nalezne oblast vzorku, kterou chceme pozorovat a následně se na ní mikroskop seřídí. To však při pozorování přes silně rozptylující prostředí není dost dobře možné – na neseřazeném mikroskopu je téměř nereálné při takovýchto podmínkách najít polohu vzorku v prostoru, protože není vidět. Proto se při pozorování skrze silný difuzor musí zvolit jiný postup.

Během prvních pozorování skrze silný difuzor jsme pro seřízení využívali podložního sklíčka. Protože používané difuzory jsou vyrobeny právě z podložních sklíček, mají s nimi shodnou optickou délku. Při první části seřizování se tedy místo difuzoru použije podložní sklíčko. Vzorek tak lze relativně snadno najít, zaostřit jej a následně i seřadit interferenci. Poté se toto podložní sklíčko zamění za difuzor.

Difuzor se nalézá pod vzorkem. Při záměně podložního sklíčka za difuzor je tedy nutné na chvíli odstranit také samotný vzorek. Po této záměně je proto téměř vždy nutné opět studovanou část vzorku nalézt. Protože je ale už mikroskop zaostřený do požadované roviny, lze toho i přes difuzor většinou docílit relativně snadno. Tímto postupem byl získán také pravý snímek.

Pro pořízení levého snímku byl ale použit postup odlišný. Bylo při něm využito skutečnosti, že dvě rozptylující plochy použitého difuzoru jsou odděleny tenkým nezmatněným pruhem (Dodatek A). Vzorek byl na difuzor umístěn tak, aby se nalézal právě v jeho nezmatněné části. Pro tuto polohu byl mikroskop seřazen. Následně stačilo posunout sklíčko se vzorkem o 2-3 mm nad zmatněnou část difuzoru. Toho bylo docíleno v několika malých postupných krocích – tak abychom měli část zkoumané oblasti vzorku stále v zorném poli mikroskopu. Výsledkem byl podstatně kvalitnější rekonstruovaný snímek, než jakého jsme byli schopni docílit při prvním postupu.

Řez profilu, vyznačený na levém snímku obrázku 29, je vynesena v grafu na obrázku 30, kde je také porovnám s profilem naměřeným bez použití difuzoru.

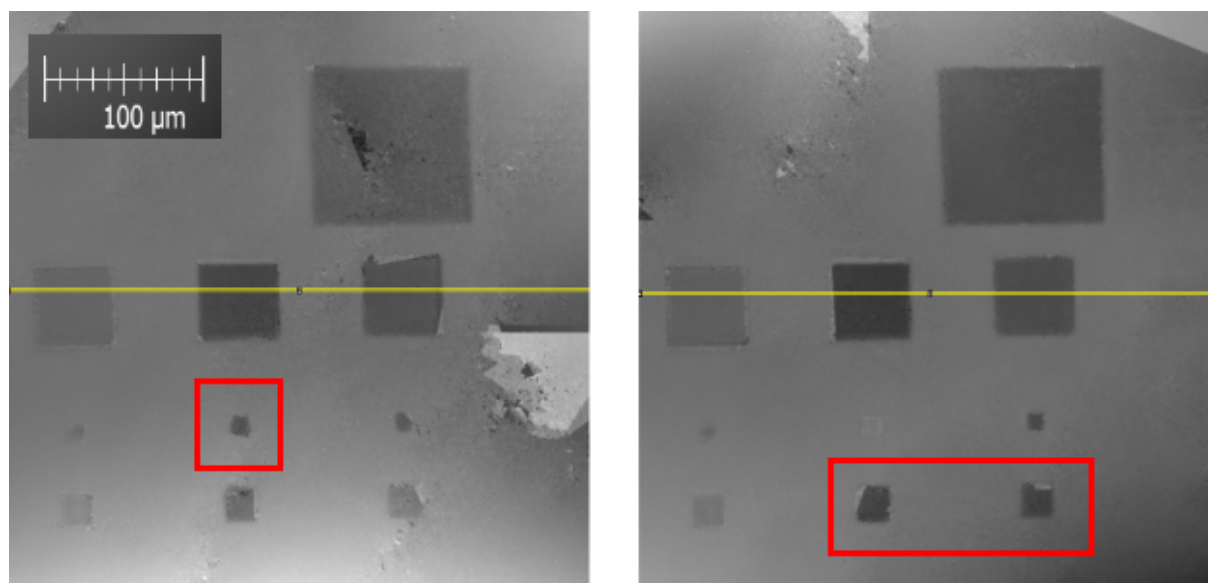


Obrázek 30: Profil řezu vzorkem překrytého silným difuzorem – levá část profilu je difuzorem pouze mírně ovlivněna, v pravé části lze pozorovat výraznější deformace.

Hloubka vybraných oblastí – silný difuzor			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	$-8,02 \pm 0,29$	$-6,08 \pm 0,65$	$4,46 \pm 0,58$
Vypočtená hloubka [μm]	$1,647 \pm 0,058$	$1,234 \pm 0,131$	$0,904 \pm 0,113$

5.1.6. Silný difuzor – vychýlování objektivu

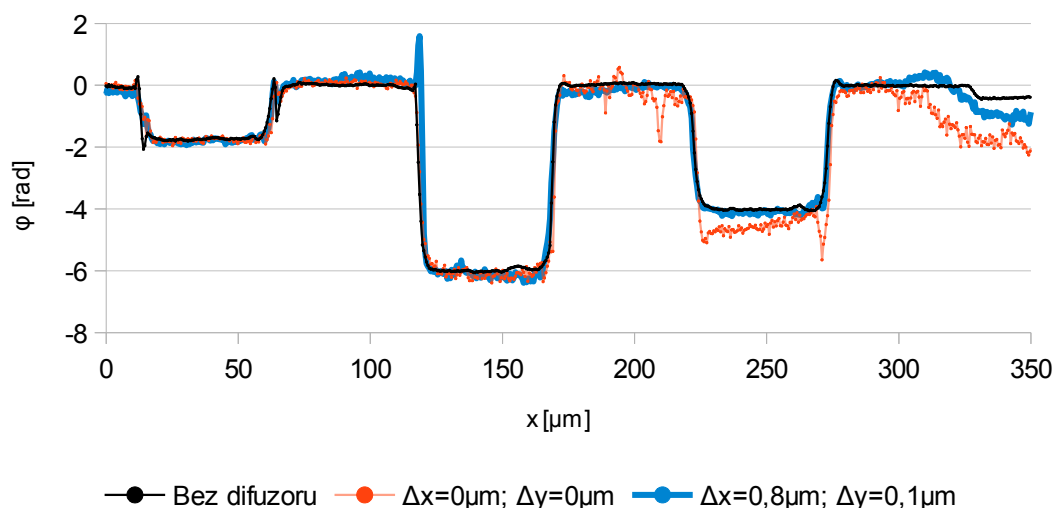
Silné difuzory nebo silně difuzní prostředí způsobují, že fázi nelze v některých oblastech správně rekonstruovat. Nastane-li tento případ, můžeme vychýlováním referenčního objektivu v rovině kolmé ke směru šíření kvalitu obrazu měnit, jak bylo ukázáno v kapitole 4.



Obrázek 31: Vzorek zobrazený skrze silný difuzor. Levý snímek ukazuje situaci nevychýleného referenčního objektivu ($\Delta x = 0 \mu\text{m}$; $\Delta y = 0 \mu\text{m}$), pravý ukazuje zlepšení obrazu po vhodném vychýlení ($\Delta x = 0,8 \mu\text{m}$; $\Delta y = 0,1 \mu\text{m}$).

Tento případ zachycuje také obrázek 31. Na levém snímku je vzorek pozorován nevychýleným referenčním objektivem, při pořízení pravého snímku byl tento objektiv vychýlen v ose x o $0,8\ \mu\text{m}$ a v ose y o $0,1\ \mu\text{m}$. Mezi nejvýraznější pozitivní projevy této změny patří zmizení velké reziduální oblasti pod čtvercem $f3$ (vpravo uprostřed; viz obrázek 12) a vyšší kontrast oblastí ve spodní části snímku. Zhoršení se naopak nejvýrazněji projevilo „zmizením“ jednoho z malých čtverců (na levém obrázku v červeném obdélníku).

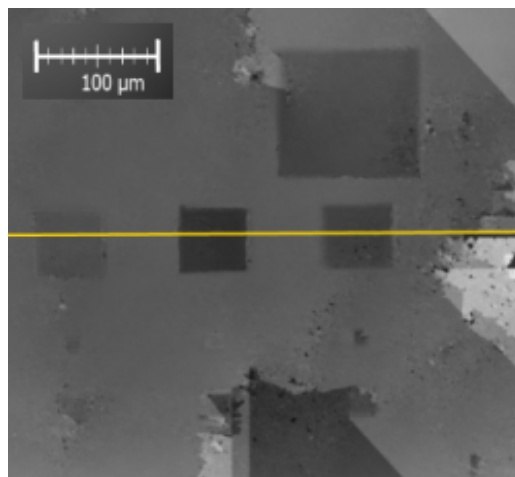
K menším změnám došlo téměř v celé pozorované oblasti. Graf na obrázku 32 ukazuje určité zlepšení téměř v celé rovině řezu.



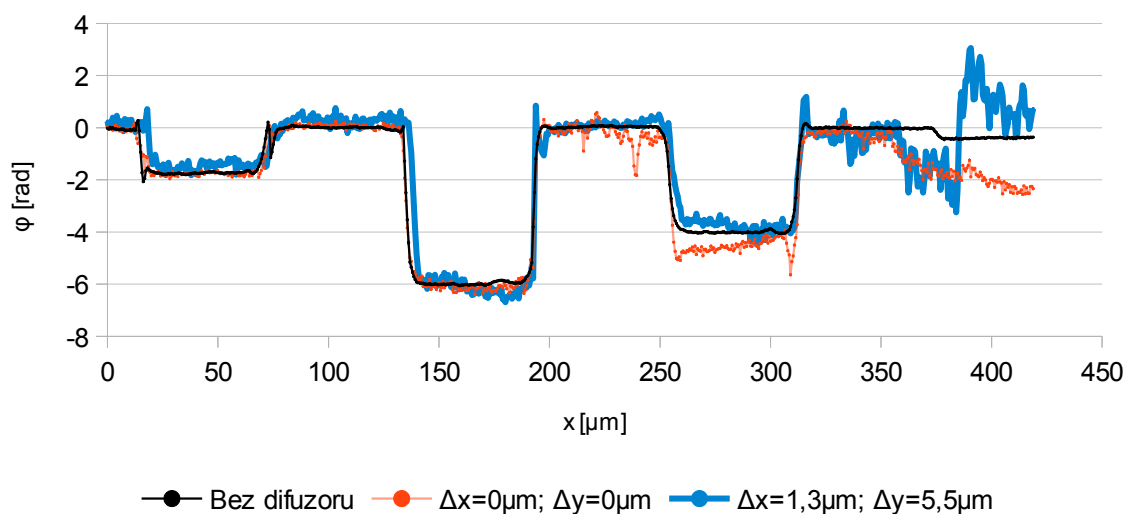
Obrázek 32: Profily řezu vzorkem překrytého silným difuzorem – vliv malého vychýlení objektivu v referenční větvi na kvalitu obrazu.

Hloubka oblastí – silný difuzor ($\Delta x = 0,8\ \mu\text{m}; \Delta y = 0,1\ \mu\text{m}$)			
Teoretická hloubka	$2\ \mu\text{m}$	$1,5\ \mu\text{m}$	$1\ \mu\text{m}$
Vypočtená hloubka [rad]	$-8,08 \pm 0,29$	$-6,12 \pm 0,53$	$4,04 \pm 0,30$
Vypočtená hloubka [μm]	$1,638 \pm 0,058$	$1,242 \pm 0,108$	$0,819 \pm 0,061$

Změny v zobrazení jsou na vychylování referenčního objektivu velice citlivé. I méně než $1\ \mu\text{m}$ dokáže pěkný obraz poměrně dokonale zničit. Přesto lze i pro velká vychýlení nalézt takové polohy objektivu, ve kterých se některé části vzorku rekonstruují velmi dobře, často i lépe než v pozici s nulovou výchylkou. Takový případ ukazuje profil řezu na obrázku 34. I přes vychýlení větší než $5\ \mu\text{m}$, došlo v oblasti řezu k poměrně kvalitní rekonstrukci naměřené fáze.



Obrázek 33: Vzorek zobrazený skrze silný difuzor při vychýlení referenčního objektivu ($\Delta x = 1,3\ \mu\text{m}; \Delta y = 5,5\ \mu\text{m}$).

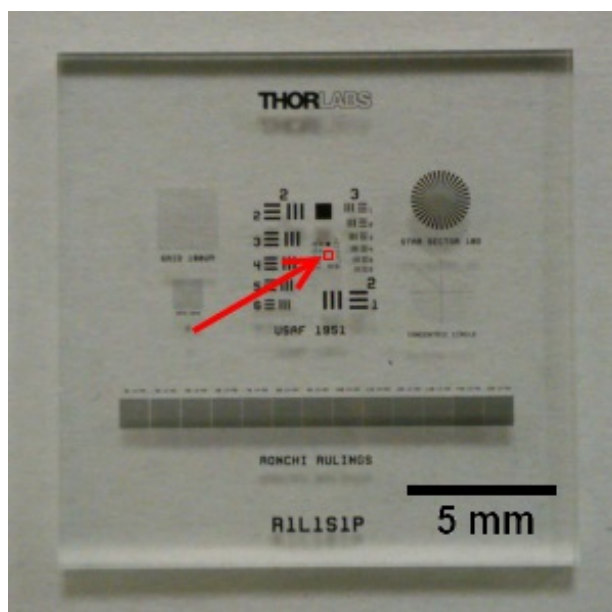


Obrázek 34: Profily řezu vzorkem překrytého silným difuzorem – vliv velkého vychýlení objektivu v referenční větvi na kvalitu obrazu.

Hloubka oblastí – silný difuzor ($\Delta x = 1,3 \mu\text{m}$; $\Delta y = 5,5 \mu\text{m}$)			
Teoretická hloubka	$2 \mu\text{m}$	$1,5 \mu\text{m}$	$1 \mu\text{m}$
Vypočtená hloubka [rad]	$-7,95 \pm 0,63$	$-6,03 \pm 0,70$	$3,93 \pm 0,96$
Vypočtená hloubka [μm]	$1,611 \pm 0,127$	$1,223 \pm 0,142$	$0,797 \pm 0,195$

5.2. Amplitudový vzorek

Stejně jako fázový vzorek byl i amplitudový předmět pozorován objektivem se zvětšením $Z = 10\times$ o numerické apertuře $NA = 0,3$. Studovaným amplitudovým vzorkem byl standardní rozlišovací test USAF 1951 umístěný na komplexním rozlišovací testu od firmy Thorlabs (obrázek 35). Červený čtvereček ukazuje zkoumanou oblast.



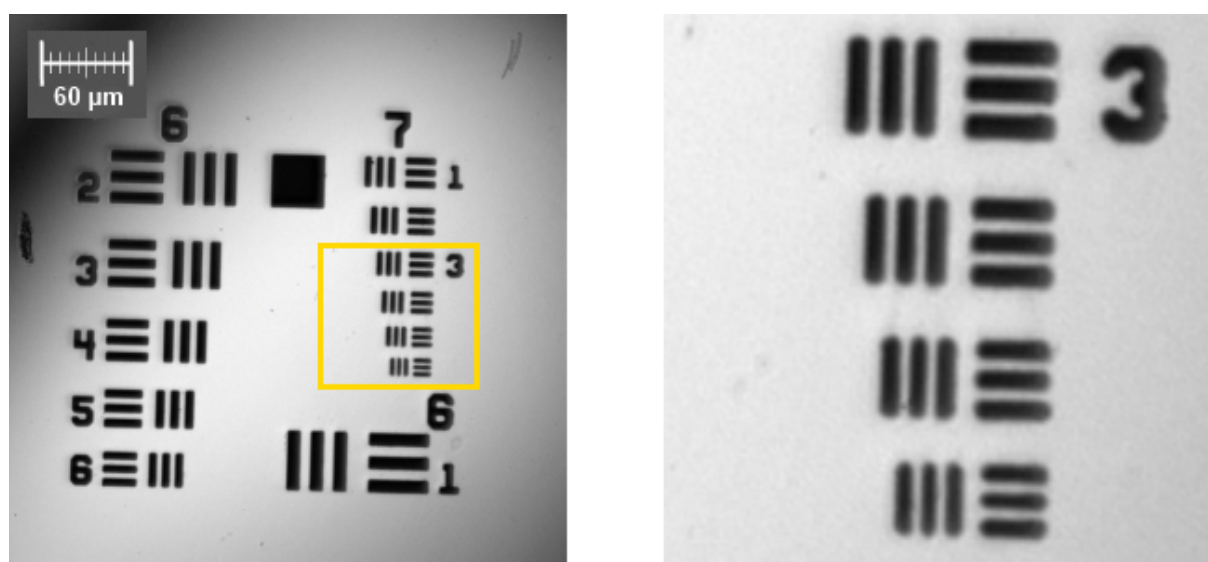
Obrázek 35: Rozlišovací test od firmy Thorlabs použitý jako rozlišovací vzorek.

Obdobný experiment popisuje také článek [22]. Autoři pozorovali speciální rozlišovací test obsahující jemnější struktury než standardní USAF test. Při zdroji světla stejném jako během našich pozorování využili objektivu $10\times/0,25$. Vzorek nasníмали nejprve bez difuzoru, poté skrze něj. Při zobrazení skrze difuzor posunovali referenčním objektivem, čímž dosáhli zobrazení difuzním světlem

Naše měření se liší v objektivu s vyšší numerickou aperturou ($10\times/0,3$) a v použití sady různě silných difuzorů. Jejich nevýhodou, jak ukázal experiment, je pak rozlišovací test s nedostatečně jemnou strukturou.

5.2.1. Pozorování amplitudového vzorku bez difuzoru

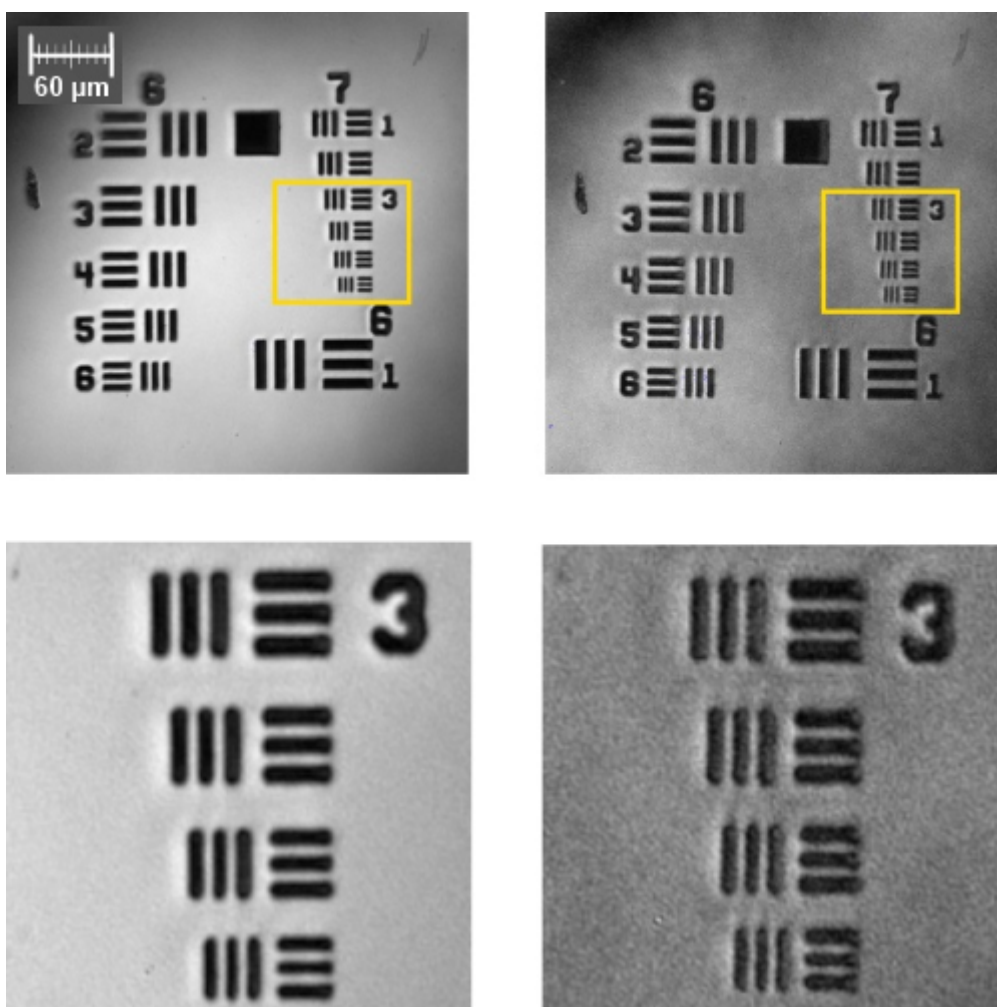
Pozorování mělo tři cíle. Prvním z nich bylo změřit laterální rozlišovací schopnost mikroskopu. Druhým cílem bylo ukázat, jaký vliv na toto rozlišení mají difuzory použité v experimentech s fázovým vzorkem. Třetím záměrem pak bylo prokázat schopnost holografického mikroskopu zobrazit i čistě amplitudový vzorek skrze rozptylující prostředí. Při všech pozorování byla zpracovávána rekonstruovaná amplituda, nikoli fáze jako u předchozí série měření.



Obrázek 36: Amplitudový vzorek pozorovaný bez použití difuzoru – rozlišovací schopnost mikroskopu je lepší než 228,1 čar na milimetr.

První cíl se podařilo naplnit jen z části. Holografický mikroskop byl s použitými objektivy schopný rozlišit i nejmenší detaily vzorku (obrázek 36). Z tabulek [24] tak lze pouze vyčíst, že rozlišovací schopnost mikroskopu je při využití objektivů $10\times/0,3$ lepší než 228,1 čar na milimetr. Mikroskop je tedy schopný rozlišit detaily menší než $2,19\mu\text{m}$.

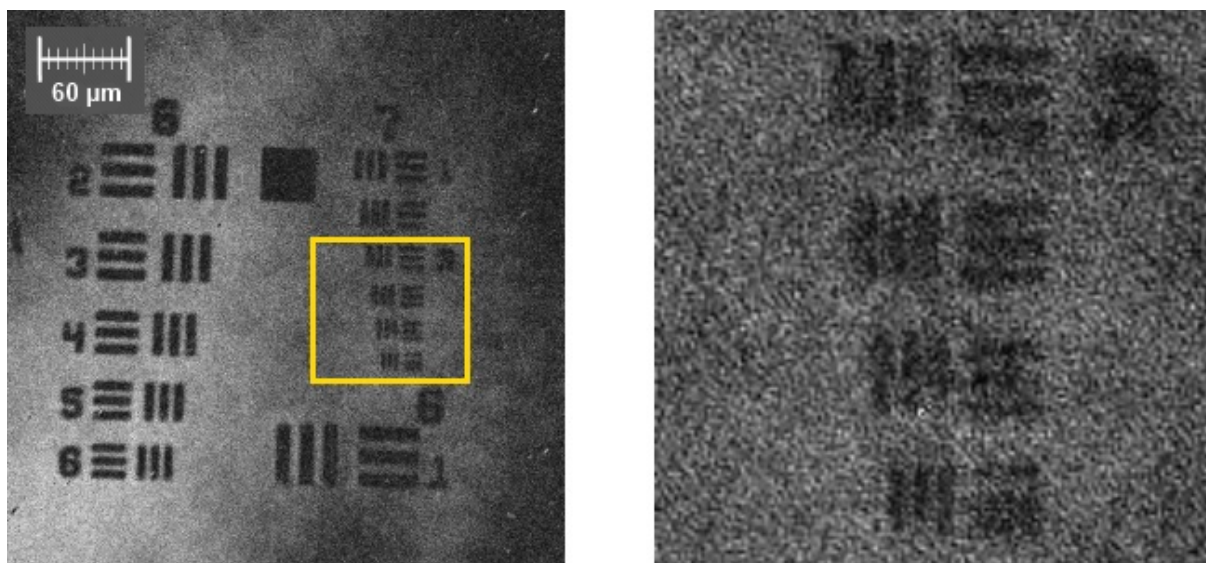
5.2.2. Pozorování amplitudového vzorku skrze slabý a středně silný difuzor



Obrázek 37: Rozlišovací test skrze slabý (levý sloupec) a středně silný (pravý sloupec) difuzor – v obou případech lze rozlišit i nejmenší detaily.

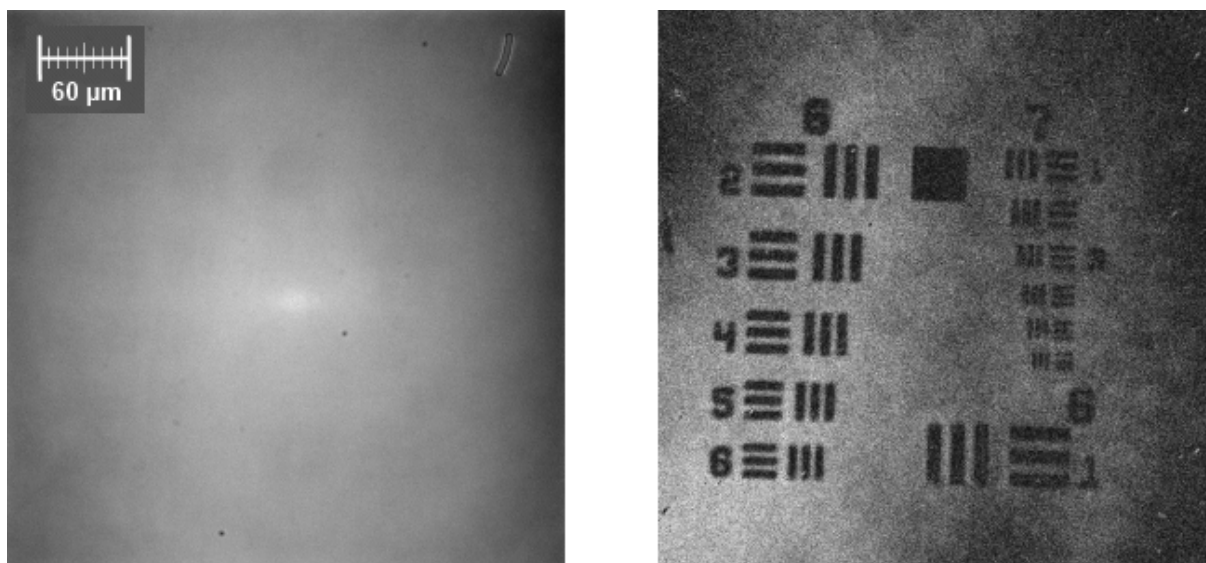
Obdobný výsledek přineslo pozorování rozlišovacího testu skrze slabý a středně silný difuzor (obrázek 37). V obou případech lze stále rozlišit i nejtenčí čáry. Slabý difuzor (vlevo) nezpůsobil v rozlišení žádnou viditelnou změnu. Středně silný difuzor (vpravo) rozlišení sice viditelně zhoršuje, kvůli absenci jemnějších detailů rozlišovacího testu však toto zhoršení nelze dobře kvantifikovat.

5.2.3. Pozorování amplitudového vzorku skrze silný difuzor



Obrázek 38: Silný difuzor – nejjemnější detaily rozlišovacího testu jsou na hraně rozlišení.

Silný difuzor už způsobil splnutí dvou nejmenších vodorovných čar. To lze dobře pozorovat v pravém dolním rohu výřezu na obrázku 38. Svislé čáry jsou stále rozlišitelné. Dá se proto usoudit, že právě tato sada čar je na hraně rozlišení. Rozlišovací schopnost mikroskopu na objektivěch 0,3/10× byla tedy při využití nejsilnějšího difuzoru přibližně 228 čar na milimetr.



Obrázek 39: Pozorování skrze silný difuzor – porovnání světlého pole (vlevo) a holografické rekonstruované amplitudy (vpravo).

Jednu z hlavních výhod holografického mikroskopu s nekoherentním osvětlením ve srovnání s běžným světelným mikroskopem ukazuje obrázek 39. Je to schopnost zobrazit vzorek umístěný v, před nebo za rozptylujícím prostředím. Levý snímek ukazuje snímek při zablokovaném referenčním rameni – tedy v obyčejném mikroskopu ve světlem poli. Pravý snímek pak ukazuje to, co vidíme po odblokování referenčního ramene – rekonstruovanou amplitudu z holografického mikroskopu.

Zatím, co ve světlem poli lze vidět (nebo spíše tušit) jen velmi matné obrysy, snímek rekonstruované amplitudy dovoluje vidět i relativně malé detaily. Důvod tohoto rozdílu je následující. Při pozorování skrze silný difuzor se většina světla mezi zdrojem a detektorem

(v našem případě asi 98%) nešíří balisticky – jinými slovy se většina světla rozptýlí.

Světlé pole mezi balistickým a nebalistickým (difuzním) zářením nijak nerozlišuje. Na detektor tak dopadnou nejen 2% balistického, nerozptýleného, světla, které nese neporušenou nebo jen málo poškozenou informaci o vzorku, ale také zbylých 98% světla rozptýleného. Informace o vzorku se tak téměř úplně ztratí v mnohem intenzivnějším rozptýleném světle.

U holografického mikroskopu sice na kameru dopadne také všechno záření, rozdíl ale nastává při zpracování. Balistické světlo totiž na rozdíl od toho difuzního neinterferuje se světlem z referenční větve. Protože toto světlo neinterferuje, nevytváří ani žádné interferenční proužky, které jsou dále zpracovávány. Nepodílí se tedy na tvorbě rekonstruovaného obrazu a výsledný obraz neovlivňuje. Díky tomu jsme s CCHM schopni pozorovat také vzorky v silně rozptylujícím prostředí.

6. Závěr

Tato diplomová práce se zabývá schopností koherenci řízeného holografického mikroskopu (CCHM) zobrazovat amplitudové i fázové předměty skrze difuzní vrstvu s využitím prostorově nekoherentního světla. Staví na schopnosti mikroskopu pořizovat kvantitativní fázové snímky s vysokým rozlišením.

V úvodní části jsou zmíněny holografie a interferenční mikroskop. Dále je popsán holografický mikroskop, jenž je mimoosovým interferenčním mikroskopem využívajícím myšlenek holografie.

Druhá část přináší přehled vývoje holografického mikroskopu na ÚFI a porovnává CCHM 1. generace s CCHM 2. generace. Velká pozornost je věnována zpracování obrazu pořízeného tímto přístrojem. Proces zpracování obrazu je také názorně shrnut ve vypracovaném schématu. Zvláštní podkapitola je pak věnována navázání a vyrovnání rekonstruované fáze. Je zde také diskutována možná příčina některých chyb při fázovém navazování.

Třetí část práce se zabývá hlavními přednostmi CCHM – možnosti kvantitativního fázového zobrazení a schopností zobrazit vzorek umístěný v rozptylujícím prostředí. Kvantitativní fázové zobrazení následně využívá při popisu výpočtu hloubky oblastí vyleptaných ve fázovém vzorku. Druhá polovina třetí části přináší stručné shrnutí výsledků teoretického popisu, které jsou následně v experimentální části ověřovány – možnosti zobrazovat fázové i amplitudové předměty přes rozptylující vrstvu s využitím balistického i difuzního světla.

V experimentální části byly proměřeny fázový vzorek a vzorek amplitudový. Fázovým vzorkem bylo sklíčko s polem vyleptaných čtvercových oblastí různých hloubek (2–6000 nm) a velikostí (10–100 μm), připravené firmou TESCOAN. Měření ukázalo, že drsnost sklíčka limituje pozorování na oblasti hlubší než 30–50 nm. Bylo spočítáno, že i při ideálních podmínkách může u oblastí hlubších než 1274 nm docházet k chybně interpretovaným fázovým skokům. Reálně může k tomuto jevu dojít i u o něco málo méně hlubokých oblastí. To naznačil i experiment, kdy se tento jev podařilo pozorovat u oblasti hluboké $1237 \text{ nm} \pm 80 \text{ nm}$.

Fázový vzorek byl pozorován skrze slabý, středně silný a silný difuzor, přičemž byl zjišťován vliv těchto difuzorů na měření topografie vzorku. Experiment ukázal, že slabě rozptylující vrstvy se na měření sice projevit mohou, výrazný vliv na nejistotu měření ale nemají. Středně silný difuzor pak způsobuje vážnější efekty jen na malých oblastech vzorku. Silný difuzor naopak většinou znamená kvalitní rekonstrukci fáze jen v několika malých oblastech. Polohu těchto oblastí lze ale měnit vychylováním objektivu v referenční větvi. Pro některé vychýlení lze dosáhnout lepšího zobrazení než v případě bez vychýlení. Při těchto vychýleních se k zobrazení využívá vhodně rozptýlené difuzní světlo. CCHM je proto vhodný typ mikroskopu pro pozorování vzorku v rozptylujícím prostředí.

Měření amplitudového vzorku ukázalo, že rozlišovací schopnost mikroskopu je na objektivěch $10\times/0,3$ lepší než 228,1 čar na milimetr. Mikroskop je tedy schopný rozlišit detaily menší než $2,19 \mu\text{m}$. Při pozorování vzorku skrze difuzory bylo zjištěno, že poměrně vysokého rozlišení lze dosáhnout i při zobrazení skrze difuzní vrstvu. Závěrečné měření amplitudového vzorku pak ukázalo výhodu holografického mikroskopu oproti běžnému světelnému mikroskopu právě při pozorování předmětů v rozptylujícím prostředí.

Literatura

- [1] JEBÁČKOVÁ, A. *Koherenci řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D..
- [2] Q-PHASE multimodal holographic microscope. *Tescan*. [online]. 2012 [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: <http://www.tescan.com/cz/produkty/q-phase/q-phase-0>.
- [3] ČOLLÁKOVÁ, J. *Využití koherenci řízené holografické mikroskopie ke sledování dynamiky živých buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 27 s. Vedoucí práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D..
- [4] KOVÁŘOVÁ, K. *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherenci řízeného holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 28 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Aneta Křížová.
- [5] CHMELÍK, R., *et al.*: The role of coherence in image formation in holographic microscopy. *Prog. Opt.*, 2014, vol. 59, pp. 267–335.
- [6] KOLMAN, P. *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D..
- [7] SLABÝ, T. *Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2014. 91 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D..
- [8] GABOR, D.: A new microscopic principle. *Nature*, 1948, vol. 161, no. 4098, pp. 777–778.
- [9] Dennis Gabor. *Wikipedia: the free encyclopedia*. [online]. 2001- [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Dennis_Gabor
- [10] LEITH, E. N. and UPATNIEKS, J.: Reconstructed wavefronts and communication theory. *Journal of the Optical Society of America*, 1962, 52, 1123-1130.
- [11] LEITH, E. N. and UPATNIEKS, J.: Wavefront reconstruction with diffused illumination and three-dimensionnal objects. *Journal of the Optical Society of America*, 1964, 54, 1295-1301.
- [12] CHMELÍK, R.: *Koherenci řízená holografická mikroskopie: Coherence-controlled holographic microscopy : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika*. Brno: VUTIU, 2011, 23 s. ISBN 978-80-214-4336-5.
- [13] KVASNICA, L. *Řízení optického stolku interferenčního mikroskopu na základě obrazové fáze*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2008. 59 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D..
- [14] LEITH, E. N., UPATNIEKS, J.: Holographic Microscopy, *Nature*, 1966, 211 282.
- [15] Machův – Zehnderův interferometr. *otp.fme.vutbr*. [online]. [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: <http://otp.fme.vutbr.cz/~pavelek/optika/1304.htm>

- [16] LEITH, E. N. and UPATNIEKS, J.: Holography with Achromatic-Fringe Systems. *J. Opt. Soc. Am.*, 1967, 57 975.
- [17] KOLMAN, P. and CHMELÍK R.: Coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Expr.* 18 (2010) 21990.
- [18] CHYTKOVÁ I.: *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – konstrukce a experiment*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 1999. 33 s. Vedoucí diplomová práce Doc. Ing. Zdeněk Harna, CSc..
- [19] EFFENBERGER, A. *Simulace zobrazení holografickým mikroskopem se zahrnutím optických vad obrazu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Matěj Týč.
- [20] MACHÁLEK, M. *Zobrazení biologických vzorku v holografickém konfokálním mikroskopu*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2001. 48 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [21] LOŠŤÁK M., *et al.*: Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope, *Proc. of SPIE*, 2010, Vol 7746, 77461N-1.
- [22] LOŠŤÁK M., *et al.*: Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media, *Opt. Express*, 2014, 22(4), 4180-4195.
- [23] KOLLÁROVÁ V., *et al.*: Quantitative phase imaging through scattering media by means of coherence holographic microscope. (To be published.)
- [24] Dennis Gabor. *Wikipedia*. [online]. [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/1951_USAF_resolution_test_chart

Seznam použitých zkratk a symbolů

CCHM – koherencí řízený holografický mikroskop

ÚFI – Ústav fyzikálního inženýrství

FSI – Fakulta strojního inženýrství

VUT – Vysoké učení technické

buňky K2 – buňky krysího Rousova sarkomu LW13K2

DIC – Nomarského diferenciální interferenční kontrast – detekuje fázové změny a převádí je na rozdíly v intenzitě

DHM – digitální holografická mikroskopie

FFT – rychlá Fourierova transformace (z anglického *Fast Fourier Transform*)

IFFT – inverzní FFT

SNR – Poměr signálu a šumu (z anglického *Signal-to-noise ratio*)

QPI – kvantitativní fázové zobrazení (z anglického *quantitative phase imaging*)

φ – fáze světelné vlny

$\Delta\varphi$ – fázový rozdíl mezi referenčním a předmětovým svazkem, způsobený pozorovaným vzorkem

OPD – rozdíl mezi optickými drahami v referenční a objektové větvi (*optical path difference*)

λ_c – střední vlnová délka

$\Delta\lambda$ – pološířka spektra elektromagnetického záření

n_0 – index lomu vzduchu

NA – numerická apertura

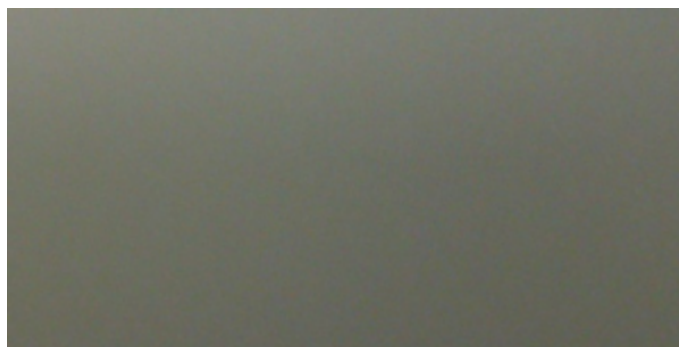
10×/0,3 – mikroskopový objektiv s numerickou aperturou NA = 0,3 a zvětšením Z = 10×

10×/0,25 – mikroskopový objektiv s numerickou aperturou NA = 0,25 a zvětšením Z = 10×

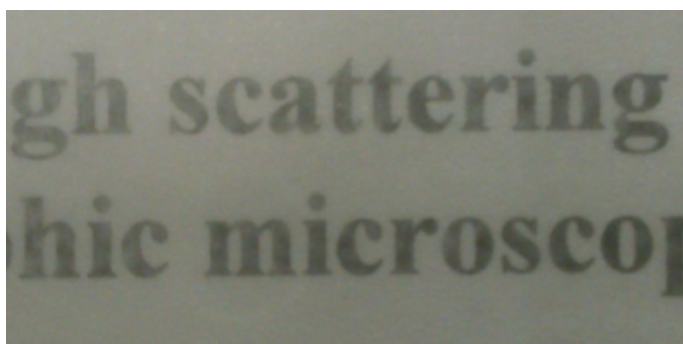
$u(\vec{r}_{st})$ – komplexní funkce propustnosti

z_D – vzdálenost předmětové roviny od roviny difuzoru

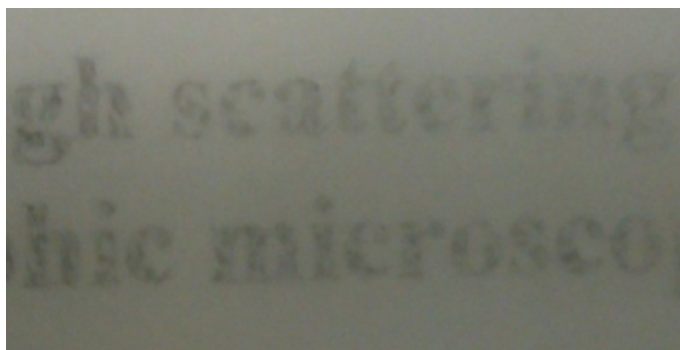
Dodatek A – difuzory



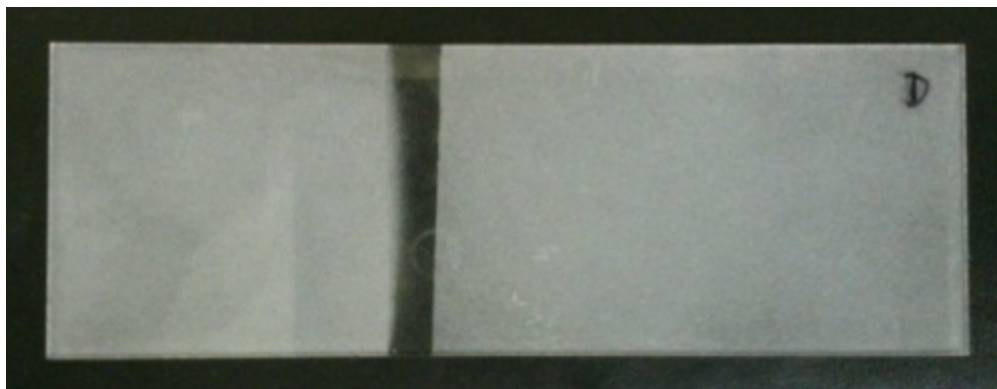
Obrázek 40: Text pozorovaný skrze silný difuzor.



Obrázek 41: Text pozorovaný skrze slabý difuzor.



Obrázek 42: Text pozorovaný skrze silnější difuzor.



Obrázek 43: Silný difuzor.

Dodatek B – přehled naměřených hloubek vybraných oblastí

Hloubka vybraných oblastí – pozorování bez difuzoru			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-8,03 $\pm$ 0,05	-6,10 $\pm$ 0,04	-3,94 $\pm$ 0,07
Vypočtená hloubka [μm]	1,627 $\pm$ 0,010	1,237 $\pm$ 0,008	0,799 $\pm$ 0,014

Hloubka vybraných oblastí – slabý difuzor			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-7,97 $\pm$ 0,08	-6,06 $\pm$ 0,07	-4,00 $\pm$ 0,06
Vypočtená hloubka [μm]	1,627 $\pm$ 0,016	1,229 $\pm$ 0,014	0,811 $\pm$ 0,012

Hloubka vybraných oblastí – středně silný difuzor			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-8,11 $\pm$ 0,17	-6,04 $\pm$ 0,08	-3,84 $\pm$ 0,013
Vypočtená hloubka [μm]	1,645 $\pm$ 0,034	1,225 $\pm$ 0,016	0,783 $\pm$ 0,026

Hloubka vybraných oblastí – silný difuzor			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-8,02 $\pm$ 0,29	-6,08 $\pm$ 0,65	4,46 $\pm$ 0,58
Vypočtená hloubka [μm]	1,627 $\pm$ 0,058	1,234 $\pm$ 0,131	0,904 $\pm$ 0,113

Hloubka oblastí – silný difuzor ($\Delta x = 0,8 \mu\text{m}$; $\Delta y = 0,1 \mu\text{m}$)			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-8,08 $\pm$ 0,29	-6,12 $\pm$ 0,53	4,04 $\pm$ 0,30
Vypočtená hloubka [μm]	1,638 $\pm$ 0,058	1,242 $\pm$ 0,108	0,819 $\pm$ 0,061

Hloubka oblastí – silný difuzor ($\Delta x = 1,3 \mu\text{m}$; $\Delta y = 5,5 \mu\text{m}$)			
Teoretická hloubka	2 μm	1,5 μm	1 μm
Vypočtená hloubka [rad]	-7,95 $\pm$ 0,63	-6,03 $\pm$ 0,70	3,93 $\pm$ 0,96
Vypočtená hloubka [μm]	1,611 $\pm$ 0,127	1,223 $\pm$ 0,142	0,797 $\pm$ 0,195