



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

GEOMETRICKO-FÁZOVÁ HOLOGRAFIE S INTERFERENCEČNÍM MIKROSKOPEM JAMIN-LEBEDEFF

GEOMETRIC-PHASE HOLOGRAPHY WITH A JAMIN-LEBEDEFF INTERFERENCE MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vladislav Dvořák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Bouchal, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Student: **Bc. Vladislav Dvořák**
Studijní program: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Bouchal, Ph.D.**
Akademický rok: 2024/25

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:

Geometricko–fázová holografie s interferenčním mikroskopem Jamin–Lebedeff

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Geometricko–fázová holografie je modulární zobrazovací technika využívající fázi světla k měření a charakterizaci opticky anizotropních vzorků. Náplní diplomové práce je návrh sestavy rozšiřující použití geometricko–fázové holografie na izotropní vzorky. Rozšíření bude realizované návrhem interferenčního mikroskopu typu Jamin–Lebedeff a připojením geometricko–fázového modulu na jeho výstup. Ověření funkčnosti bude provedeno fázovou rekonstrukcí testovacích izotropních vzorku. Funkčnost bude ověřena s jedním ze dvou dostupných geometricko–fázových modulů pracujících ve viditelné nebo infračervené oblasti.

Cíle diplomové práce:

Rešerše metod interferenční mikroskopie.

Seznámení se s principem geometricko–fázové holografie.

Návrh interferenčního mikroskopu, který po připojení geometricko–fázového modulu umožní fázové zobrazení izotropních vzorků.

Teoretický popis a experimentální ověření principu zobrazení.

Seznam doporučené literatury:

BORN, Max a WOLF, Emil. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. 7th expanded ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1999. ISBN 05-216-4222-1.

SALEH, Bahaa E. A. a TEICH, Malvin Carl. Základy fotoniky. Sv. 1. Radomír VACEK (překladatel), Jan PEŘINA (překladatel), Jiří FIALA (překladatel), Jaroslav PANTOFLÍČEK (překladatel), Miloslav DUŠEK (překladatel). Praha: Matfyzpress, 1994. ISBN 80-85863-01-4.

SALEH, Bahaa E. A., Malvin Carl TEICH, Jiří FIALA, Jaroslav PANTOFLÍČEK and Radomír VACEK. 1994. Základy fotoniky: Fundamentals of photonics. Praha: Matfyzpress, Sv. 2. ISBN 80-85863-02-2.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2024/25

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jiří Hlinka, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá návrhem a realizací mikroskopového systému pracujícího ve viditelné oblasti spektra, který kombinuje výhody osové a mimoosové holografické mikroskopie a umožňuje jednosnímkové kvantitativní fázové zobrazení v opticky robustním uspořádání. Kombinace výhod je dosažena novým využitím principu geometricko-fázové holografické mikroskopie, která byla v minulosti úspěšně využita při měření opticky anizotropních vzorků. Základem navrženého řešení je připojení geometricko-fázového holografického modulu k jednocestnému holografickému mikroskopu Jamin–Lebedeff. Mikroskop Jamin–Lebedeff vytváří signální a referenční vlnu s kolmými lineárními polarizacemi, přičemž lineární polarizace signální vlny je zachována i při průchodu izotropním vzorkem. Na výstupu mikroskopu jsou tyto polarizace transformovány na opačné kruhové polarizace, čímž je umožněno jejich úhlové oddělení a následná interference v geometricko-fázovém holografickém modulu. Tímto způsobem vzniká mimoosový hologram, ze kterého je možné rekonstruovat kvantitativní fázový obraz vzorku. Funkčnost systému byla experimentálně ověřena zobrazením izotropních vzorků a následnou jednosnímkovou rekonstrukcí jejich kvantitativních fázových obrazů. Výsledky experimentů potvrzují funkčnost systému ve viditelné oblasti spektra. Ověřený princip zobrazení bude dále využit při konstrukci identického systému pracujícího v infračervené oblasti, kde umožní měření fázové odezvy aktivních metapovrchů.

Summary

This thesis presents the design and implementation of a microscopic system operating in the visible spectral range, which combines the advantages of in-line and off-axis holographic microscopy and enables single-shot quantitative phase imaging in an optically robust configuration. The combination of these advantages is achieved through a novel application of the principle of geometric-phase holographic microscopy, which has previously been successfully used for imaging optically anisotropic samples. The proposed solution is based on connecting a geometric-phase holographic module to a single-pass Jamin–Lebedeff-type holographic microscope. This microscope generates signal and reference waves with orthogonal linear polarizations, with the linear polarization of the signal wave preserved when passing through isotropic samples. At the microscope's output, these polarizations are converted into opposite circular polarizations, allowing for their angular separation and subsequent interference within the geometric-phase holographic module. This process results in the formation of an off-axis hologram from which the quantitative phase image of the sample can be reconstructed. The system's functionality was experimentally verified by imaging isotropic samples and performing single-shot reconstruction of their quantitative phase images. The experimental results confirm the system's performance in the visible spectral range. The validated imaging principle will be further applied in the development of an identical system operating in the infrared range, enabling phase response measurements of active metasurfaces.

Klíčová slova

digitální holografie, geometrická fáze, mikroskop Jamin-Lebedeff, geometricko-fázová mikroskopie

Keywords

digital holography, geometric phase, Jamin-Lebedeff microscope, geometric-phase microscopy

DVOŘÁK, V. *Geometricko-fázová holografie s interferenčním mikroskopem Jamin-Lebedeff*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2025. 54 s. Vedoucí Ing. Petr Bouchal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Ing. Petra Bouchala, Ph.D. a s použitím uvedené literatury a pramenů. Generativní umělá inteligence byla využita výhradně ke stylistickým úpravám a jazykové korektuře textu.

Bc. Vladislav Dvořák

Děkuji Ing. Petru Bouchalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc při psaní této diplomové práce. Poděkování také patří mé rodině a přátelům za podporu během studia.

Bc. Vladislav Dvořák

Obsah

Úvod	3
1 Rešerše metod fázového zobrazení	7
1.1 Zobrazení ve světlém poli	7
1.2 Zernikeho fázový kontrast	9
1.3 Nomarského diferenciální interferenční kontrast	14
1.4 Spirální fázový kontrast	16
1.5 Kvantitativní fázové zobrazení	18
1.5.1 Mikroskop Jamin-Lebedeff	20
2 Motivace práce	21
3 Mikroskop Jamin-Lebedeff	23
3.1 Teoretický popis zobrazení mikroskopem Jamin-Lebedeff	23
3.2 Prostorová separace svazků krystalem kalcitu	29
3.3 Konstrukční návrh mikroskopu Jamin-Lebedeff	34
3.4 Experimentální ověření funkčnosti mikroskopu Jamin-Lebedeff	36
4 Geometricko-fázový modul	41
4.1 Princip geometricko-fázové modulace světla	41
4.2 Teoretický popis zobrazení geometricko-fázovým modulem	43
4.3 Mikroskop Jamin-Lebedeff s geometricko-fázovým modulem	46
5 Závěr	51
Literatura	54

Úvod

Na mikroskopické úrovni existuje mnoho struktur a procesů, které není možné pozorovat holým okem. Pro jejich zkoumání bylo nutné vyvinout speciální zobrazovací techniky. Nejstarší a nejrozšířenější zobrazovací metody jsou založené na světelné mikroskopii, jejíž historie sahá až do prvního století před naším letopočtem [1]. I přes svou dlouhou historii prochází světelná mikroskopie až do současnosti neustálým vývojem. Moderní světelné mikroskopy využívají pokroků v oblasti digitální techniky a představují nástroje, které kromě zviditelnění zobrazovaných objektů poskytují také jejich komplexní numerickou analýzu nebo kvantitativní měření.

Světlo je elektromagnetické záření charakterizované prostorově a časově proměnným elektrickým a magnetickým polem. Světelná mikroskopie se zabývá převážně elektrickou složkou tohoto záření, která je běžnými materiály silněji ovlivňována. Elektrické pole je charakterizované vektorem elektrické intenzity. Tento vektor je určený amplitudou a fází svých kmitových složek. Jejich poměr amplitud a vzájemné fázové zpoždění definují orientaci a vývoj vektoru elektrické intenzity v prostoru a čase. Sledování prostorového a časového vývoje vektoru elektrické intenzity umožňuje zkoumat polarizaci světla. Lidské oko je schopné vnímat pouze intenzitu světla. Intenzita světla je určena jeho amplitudou, která může být změněna při průchodu nebo odrazu světla od okolních objektů. Moderní světelné detektory využívané v rámci optické mikroskopie pracují podobně jako lidské oko a jsou schopny digitálně zaznamenat intenzitu světla a její změny. Toho využívají základní metody optické mikroskopie, které poskytují obrazový kontrast vzorků pohlcujících světlo. Mnoho vzorků z oblasti biofotoniky [2] a nanofotoniky [3] absorbuje nebo rozptyluje světlo jen velmi slabě. To při použití základních zobrazovacích metod snižuje jejich obrazový kontrast nebo zcela znemožňuje pozorování. Tyto vzorky nezpůsobují výrazné změny amplitudy procházejícího světla, ale ovlivňují jeho fázi. Ke změnám fáze dochází díky lokálním odlišnostem v tloušťce nebo indexu lomu zobrazovaných vzorků. Popsané vzorky se nazývají fázové a k jejich zobrazení byly vyvinuty metody fázového kontrastu. Tyto metody převádí fázové změny vnesené vzorkem na intenzitní změny výsledného zobrazení. Tím se výrazně zvyšuje kontrast původně špatně viditelných objektů a je možné provádět jejich detailní analýzu.

Mezi tradiční metody fázového kontrastu patří Zernikeho fázový kontrast a Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC, z anglického Differential interference contrast). K této problematice ale existují také nové přístupy založené například na spirálním fázovém kontrastu. Zernikeho fázový kontrast spočívá v jednoduché modifikaci klasického mikroskopu. Tato modifikace umožňuje dodatečnou amplitudovou a fázovou modulaci světla rozptýleného a nerozptýleného zobrazovaným vzorkem. Nastavením vhodných parametrů dochází ke konstruktivní nebo destruktivní interferenci těchto složek. Interferenční efekty pak vytváří kontrast pozorovatelný v detekovaných intenzitních obrazech. Při zob-

razení se ale mohou vyskytovat artefakty jako haló efekt či stínový efekt [4]. U techniky DIC je světlo před dopadem na vzorek rozděleno do dvou mírně posunutých svazků s kolmými polarizacemi. Díky příčnému posunutí získávají oba svazky při průchodu vzorkem odlišné fázové změny. Po průchodu vzorkem jsou oba svazky opět prostorově sesazeny a po projekci lineárním polarizátorem vytváří interferenční obraz. Interferenční obraz zviditelňuje fázové gradienty ve směru posunutí svazků procházejících vzorkem. Spirální fázový kontrast využívá interferenčních efektů podobně jako předchozí metody. Světlo při zobrazování prochází vírovou (spirální) fázovou maskou. Vírová maska přiřazuje každému zobrazovanému bodu vírovou fázi s natočením závislým na lokální tloušťce a indexu lomu zobrazovaného vzorku. Interferencí obrazových stop vzniká intenzitní kontrast fázových obrazů. Uvedené metody umožňují efektivní zviditelnění fázových objektů, ale neumožňují změny fáze kvantifikovat a tak detailně analyzovat vlastnosti vzorku.

Významný pokrok v oblasti fázové mikroskopie představuje použití metod digitální holografické mikroskopie. Holografické mikroskopy existují v různých provedeních a nad rámec kontrastního zviditelnění fázových objektů umožňují jejich kvantitativní rekonstrukci. Holografické mikroskopy jsou interferometrické systémy uzpůsobené pro zobrazování. Zobrazovaný vzorek se vkládá do objektivové větve interferometru a při zobrazování je porovnáván s referenčním vzorkem vloženým do referenční větve interferometru. Fázovou změnu vnesenou vzorkem je možné kvantitativně rekonstruovat z interferenčního pole vytvořeného na výstupu interferometru. Holografické mikroskopy lze klasifikovat na základě mnoha kritérií. Nejčastěji jsou rozdělovány podle způsobu složení objektové a referenční větve. Pokud obě vlny před detekcí postupují souběžně, jedná se o osovou holografickou mikroskopii. Výhodou těchto mikroskopů je jejich robustnost a konstrukční a justážní jednoduchost. Tyto výhody se nejvíce uplatňují v jednocestném uspořádání, kdy signální i referenční vlna sdílí společnou optickou cestu. Pro úspěšnou fázovou rekonstrukci je ale třeba využít techniky krokování fáze a zaznamenat alespoň čtyři modifikované hologramy [5]. Druhou skupinu tvoří mimoosové holografické mikroskopy, u nichž se svazky skládají pod nenulovým úhlem. Tyto mikroskopy jsou konstrukčně složitější a náročnější na justáž, avšak k rekonstrukci kvantitativního fázového obrazu postačuje jediný záznam hologramu [6].

Zajímavé propojení tradičních metod mikroskopie fázového kontrastu a holografické mikroskopie nabízí mikroskop Jamin-Lebedeff, který je odvozen od principu DIC mikroskopie. Vnesená separace svazků je ale výraznější. Za vhodných podmínek mohou svazky procházet zobrazovaným objektem a prázdnou částí zorného pole a vytvářet tak signální a referenční vlnu. Krokování fáze je možné dosáhnout pomocí polarizačních prvků v konstrukci Sénarmontova kompenzátoru [7].

Tato diplomová práce se zaměřuje na návrh jednocestného holografického mikroskopu s mimoosovým záznamem interferujících vln. Řešení tak kombinuje robustnost osových metod s jednosnímkovým zobrazením typickým pro mimoosové metody. Návrh je založený

na konstrukčním řešení mikroskopu Jamin-Lebedeff a jeho kombinaci s geometricko-fázovou holografickou mikroskopií vyvinutou na Ústavu fyzikálního inženýrství Vysokého učení technického v Brně. Propojení metod je možné díky polarizačním vlastnostem obou systémů, které umožňují vytvořit a dále ovládat signální a referenční vlnu zakódovanou do kolmých polarizačních stavů (kolmých lineárních nebo opačných kruhových polarizací). Mikroskop Jamin-Lebedeff zajišťuje vytvoření signální a referenční vlny v kolmých lineárních polarizacích. Tyto vlny jsou na jeho výstupu převedeny na opačné kruhové polarizace. Geometricko-fázová mikroskopie je založena na použití geometricko-fázové mřížky. Tato mřížka slouží jako difraktivní dělič pro kruhové polarizované světlo. Připojení jednoduchého zobrazovacího modulu s geometricko-fázovou mřížkou na výstupu mikroskopu Jamin-Lebedeff umožní úhlovou separaci a opětovné spojení signální a referenční vlny a vytvoření mimoosového hologramu [8]. Jednoduchost navrhovaného řešení je výhodná pro konstrukci holografických mikroskopů v méně využívaných spektrálních oblastech, kde je konstrukce složitých interferometrů náročná. Cílem této práce je ověření principu ve viditelné oblasti. Využití principů ověřených ve viditelné oblasti bude základem pro konstrukci identického systému v infračervené oblasti, který umožní charakterizaci aktivních VO₂ metapovrchů vyráběných na Středoevropském technologickém institutu (CEITEC) v Brně.

Tato práce se v úvodní části zabývá rešerší metod určených pro zobrazování fázových objektů se zaměřením na techniky fázového kontrastu a kvantitativního fázového zobrazení. Následně je představen koncepční návrh optického systému složeného z mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového modulu. Nejprve je proveden teoretický rozbor jeho zobrazovacího principu. Postupně je vysvětlen vznik polarizačně kódované signální a referenční vlny a popsán jejich průchod zobrazovacím systémem. Popis polarizace je proveden pomocí Jonesova formalismu. Teoreticky je rovněž prokázána možnost kvantitativního fázového zobrazení v samotném mikroskopu Jamin-Lebedeff při použití geometricko-fázového krokování fáze. Následně je představen konstrukční návrh tohoto mikroskopu s důrazem na jeho praktickou realizaci. Po sestavení zařízení je ověřena jeho funkčnost prostřednictvím experimentů vedoucích ke kvantitativnímu fázovému zobrazení realizovanému v osovém uspořádání pomocí krokování fáze. Následuje teoretická analýza zobrazení a popis polarizačních transformací světla při průchodu geometricko-fázovým holografickým modulem. Tento popis potvrzuje vznik mimoosového hologramu s prostorovou nosnou frekvencí. V závěrečné části je výsledné zobrazení prakticky testováno připojením geometricko-fázového holografického modulu k mikroskopu Jamin-Lebedeff. V této konfiguraci byl úspěšně proveden záznam mimoosových hologramů a jednosnímková rekonstrukce kvantitativních fázových obrazů testovacích vzorků.

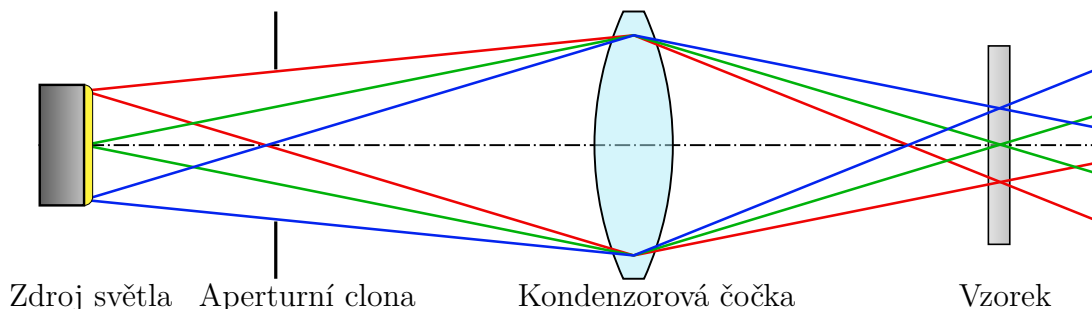
1. Rešerše metod fázového zobrazení

Metody fázového kontrastu vychází z principu klasické mikroskopie ve světlém poli, kterou dále modifikují. Pro pochopení fázových metod je proto potřeba porozumět klasickému principu zobrazení ve světlém poli.

1.1. Zobrazení ve světlém poli

Optický mikroskop se skládá z osvětlovací a zobrazovací části. Osvětlovací část vytváří rovnoměrné osvětlení vzorku, zatímco zobrazovací část slouží k vytvoření zvětšeného obrazu pozorovaného objektu.

V mikroskopii světlého pole existují dva základní principy osvětlení nazývané kritické a Köhlerovo osvětlení. Schéma kritické osvětlovací sestavy je znázorněno na obrázku 1.1. Sestava se skládá ze světelného zdroje, aperturní clony a kondenzorové čočky. Kondenzorová čočka promítá obraz světelného zdroje přímo do roviny vzorku. Aperturní clona reguluje průměr světelného svazku vycházejícího ze zdroje a tím ovlivňuje intenzitu světla dopadajícího na vzorek. Značnou nevýhodou této metody je nutnost použití homogenního zdroje světla a přesné zaostření jeho obrazu do roviny vzorku. Pokud tyto podmínky nejsou splněny, sledovaný objekt není rovnoměrně osvětlen a zdroj tak může zkreslovat zaznamenávaný obraz vzorku [1, 9].

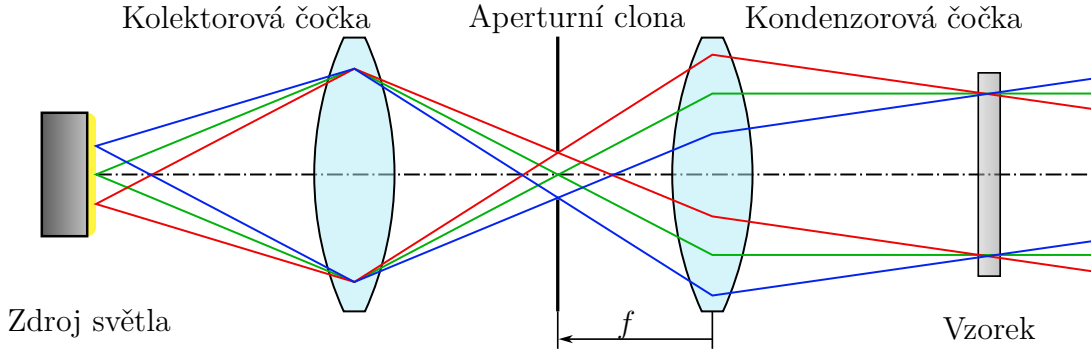


Obrázek 1.1: Schéma kritického osvětlení. Zdroj světla je pomocí kondenzorové čočky promítnut do roviny vzorku. Aperturní clonou lze regulovat průměr světelného svazku vycházejícího ze zdroje.

Nevýhody kritického osvětlení řeší Köhlerovo osvětlení, které je v současnosti dominantně používané. Schéma Köhlerovy osvětlovací soustavy je znázorněno na obrázku 1.2. Köhlerova osvětlovací sestava se skládá ze zdroje světla, kolektorové čočky, aperturní clony a kondenzorové čočky. Kolektorová čočka vytváří obraz zdroje světla v přední ohniskové rovině kondenzorové čočky, kde je umístěna aperturní clona. Tato clona určuje numerickou aperturu kondenzorové čočky a tím ovlivňuje i rozlišení výsledného obrazu. Uzavíráním clony se snižuje rozlišení, ale zároveň se zvětšuje hloubka ostrosti. Pro dosažení co nejvyššího rozlišení je proto vhodné ponechat aperturu co nejvíce otevřenou. Kondenzor ná-

1.1. ZOBRAZENÍ VE SVĚTLÉM POLI

sledně z každého bodu zdroje propuštěného aperturní clonou vytváří rovinnou vlnu, která osvětluje sledovaný vzorek. Díky tomuto principu lze dosáhnout rovnoměrného osvětlení i při použití nehomogenního zdroje světla a zároveň minimalizovat artefakty způsobené například vadami skla nebo prachovými částicemi [1, 9].



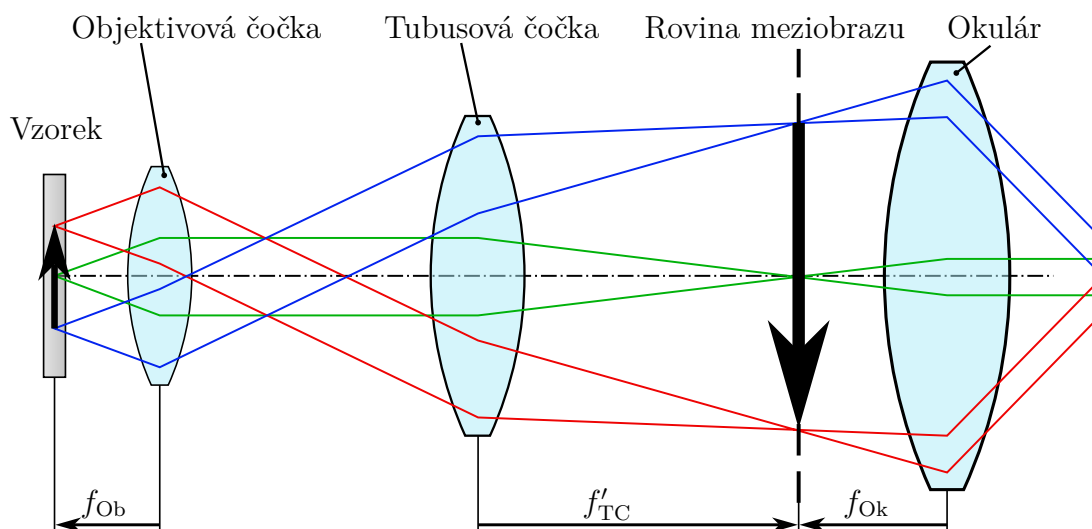
Obrázek 1.2: Schéma Köhlerova osvětlení. Kolektorová čočka zobrazí zdroj světla do přední ohniskové roviny kondenzorové čočky. Ta z každého bodu vytvoří rovinnou vlnu, která osvětluje sledovaný vzorek. Aperturní clonou lze měnit numerickou aperturu kondenzorové čočky.

Zobrazovací část světelného mikroskopu se skládá z mikroskopového objektivu a tubusové čočky. V této konfiguraci je možné detekci provést digitálně. Pro potřeby pozorování okem je dále využita okulárová čočka. Schéma zobrazovací soustavy mikroskopu i s okulárem je znázorněno na obrázku 1.3. Moderní světelné mikroskopy využívají čočky korigované na nekonečnou vzdálenost [10]. To znamená, že mikroskopový objektiv při zobrazování ze své předmětové ohniskové roviny převádí vzorek do spektra rovinných vln, které jsou následně zaostřeny do obrazové ohniskové roviny tubusové čočky, kde vzniká zvětšený obraz. V této rovině je možné obraz snímat digitálně pomocí intenzitního detektoru. Zvětšení obrazu M_{Ob} lze určit podle vztahu

$$M_{Ob} = -\frac{f'_{TC}}{f_{Ob}}, \quad (1.1)$$

kde f'_{TC} je zadní ohnisková vzdálenost tubusové čočky a f_{Ob} je přední ohnisková vzdálenost objektivu [10]. Obraz zároveň vzniká v přední ohniskové rovině okulárové čočky, která funguje jako lupa a zobrazuje ho opět do nekonečna. Takto vytvořené rovinné vlny jsou pak lidským okem zaostřeny na sítnici. Zvětšení M_{Ok} vytvořené okulárem lze vyjádřit vztahem

$$M_{Ok} = \frac{L}{f_{Ok}}, \quad (1.2)$$



Obrázek 1.3: Schéma zobrazovací sestavy mikroskopu tvořeného objektivem, tubusovou čočkou a okulárem pro možnost pozorování obrazu okem.

kde f_{Ok} je přední ohnisková vzdálenost okulárové čočky a $L = 250$ mm představuje konvenční zrakovou vzdálenost lidského oka [11]. Výsledné zvětšení mikroskopu se vypočítá jako součin zvětšení objektivu a okuláru [4]

$$M = M_{Ob} \cdot M_{Ok}. \quad (1.3)$$

Takto sestrojený mikroskop se nazývá mikroskop pro světlé pole a umožňuje pozorování amplitudových vzorků, tedy vzorků, které absorbují nebo rozptylují světlo. Mnoho objektů amplitudu procházejícího světla nemění a v intenzitním obraze nevytváří kontrast. To znemožňuje jejich pozorování v tradičních mikroskopech zobrazujících ve světlém poli. Neabsorbující vzorky ovlivňují pouze fázi světla. Změny fáze jsou určeny jejich prostorově proměnnou tloušťkou nebo lokálními změnami v indexu lomu. Takové objekty se označují jako fázové [4]. Pro jejich pozorování s vysokým kontrastem byly vyvinuty metody, které převádějí fázové změny na intenzitní, čímž zlepšují viditelnost těchto objektů. V následujících podkapitolách jsou popsány vybrané techniky umožňující zobrazení fázových objektů.

1.2. Zernikeho fázový kontrast

Metoda Zernikeho fázového kontrastu, pojmenovaná po svém vynálezci Fritzu Zernikem, byla poprvé představena v roce 1932 a její přínos byl oceněn udělením Nobelovy ceny v roce 1953 [12]. Metodu lze využít k vytváření vysoce kontrastních obrazů průhledných vzorků, jako jsou například živé buňky, mikroorganismy, tenké řezy tkání či litografické vzorky. Mikroskop pro Zernikeho fázový kontrast je založený na principu tradičního zobrazení ve světlém poli. Využívá ale dodatečných optických prvků v osvětlovací i zobrazovací

1.2. ZERNIKEHO FÁZOVÝ KONTRAST

části. Schéma sestavy pro Zernikeho fázový kontrast je znázorněno na obrázku 1.5. Světlo z běžného nekoherentního zdroje záření prochází tradiční soustavu Köhlerova osvětlovače až do přední ohniskové roviny kondenzoru. V této rovině je umístěna clona ve tvaru mezikruží fungující jako prostorový filtr. Z každého bodu mezikruží pak vychází kulová vlna, která je kondenzorovou čočkou zkolimována. Tím vznikne homogenní osvětlení zkoumaného vzorku rovinnými vlnami, jejichž směry šíření leží na povrchu kuželu s vrcholovým úhlem určeným průměrem clony a ohniskové vzdálenosti kondenzoru.

Po průchodu fázovým objektem se světlo rozdělí na dvě složky. První složka představuje světlo, které není objektem ovlivněno. Tyto rovinné vlny pokračují v původním směru. Druhá složka představuje světlo, které interagovalo se vzorkem a bylo vychýlené do jiného směru. Rozptýlené světlo má zpravidla menší amplitudu a zároveň dochází ke zpomalení jeho fáze v porovnání s nerozptýleným světlem. Toto zpomalení se u biologických vzorků pohybuje okolo hodnoty $\pi/2$ [4, 13].

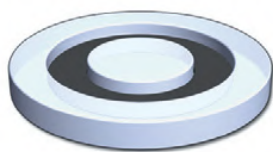
Obě složky světla procházejí přes zobrazovací mikroskopový objektiv až do jeho zadní ohniskové roviny, kde vzniká ostrý obraz mezikruhové clony z přední ohniskové roviny kondenzoru. V zadní ohniskové rovině mikroskopového objektivu je umístěna amplitudově-fázová destička, která má odlišnou propustnost a tloušťku v oblastech, kam dopadá nerozptýlené světlo. Jejím hlavním úkolem je snížit amplitudu nerozptýleného světla tak, aby byla srovnatelná s amplitudou rozptýleného světla, a posunout jeho fázi o $\pm\pi/2$ vzhledem ke světlu rozptýlenému vzorkem. Pokud je amplitudově-fázová destička v oblasti mezikruží tenčí než v jeho okolí, jak je znázorněno na obrázku 1.4(a), dochází k dodatečné změně fáze $-\pi/2$. To způsobí další zpoždění světla rozptýleného vzorkem oproti nerozptýlenému světlu, což vede k jejich celkovému vzájemnému fázovému rozdílu blízkému hodnotě π . V druhém případě je oblast mezikruží na amplitudově-fázové destičce silnější než jeho okolí, jak je znázorněno na obrázku 1.4(b). Dochází tedy ke zpomalení fáze nerozptýleného světla o hodnotu $\pi/2$. Výsledný vzájemný fázový rozdíl mezi rozptýleným a nerozptýleným světlem je poté blízký nulové hodnotě [4].

Po průchodu světla mikroskopovým objektivem a amplitudově-fázovou destičkou pokračuje světlo přes tubusovou čočku až do její obrazové ohniskové roviny, kde obě složky interferují a vytvářejí výsledný obraz. V režimu pozitivního fázového kontrastu vzniká kvůli výslednému fázovému posunutí obou složek o π destruktivní interference, což znamená, že objekty s vyšším indexem lomu než jejich okolí se jeví tmavší než jejich okolí. V režimu negativního fázového kontrastu vzniká kvůli výslednému fázovému posunutí obou složek blízkému nulové hodnotě konstruktivní interference a objekty s vyšším indexem lomu než jejich okolí se budou vůči svému okolí jevit světlejší. Tento efekt je znázorněn na obrázku 1.4(c) a 1.4(e) [4].

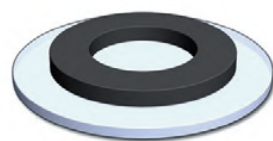
Interpretace obrazů pořízených pomocí fázového kontrastu není zcela jednoznačná. Intenzita v obrazové rovině je závislá především na optické dráze světla, tedy součinu indexu lomu a tloušťky objektu. V pozitivním kontrastním režimu, což je konvenční mód

Pozitivní fázový kontrast

Negativní fázový kontrast



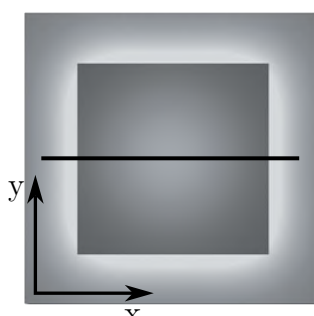
Fázové destičky



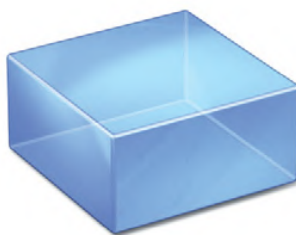
(a)

(b)

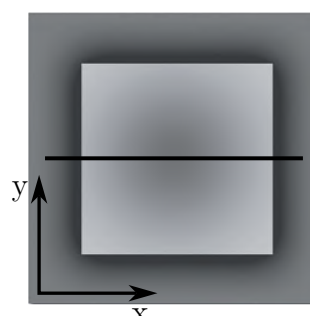
Ilustrativní zobrazení fázového objektu



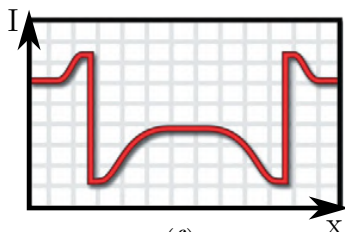
(c)



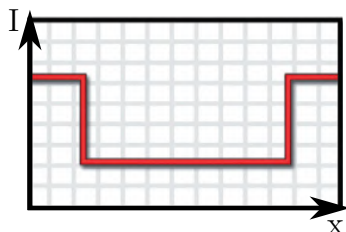
(d)



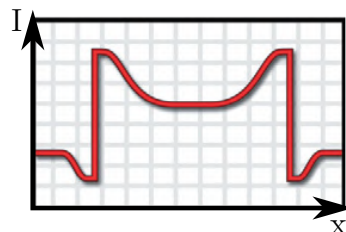
(e)



(f)



(g)



(h)

Obrázek 1.4: Schéma fázových destiček pro pozitivní (a) a negativní fázový kontrast (b) a ilustrativní zobrazení fázového objektu ve tvaru krychle (d) pomocí pozitivního (c) a negativního (e) fázového kontrastu s intenzitními profily vedenými jejich středem (f, g, h). Na těchto grafech lze pozorovat haló a stínový efekt. Převzato a upraveno z [4].

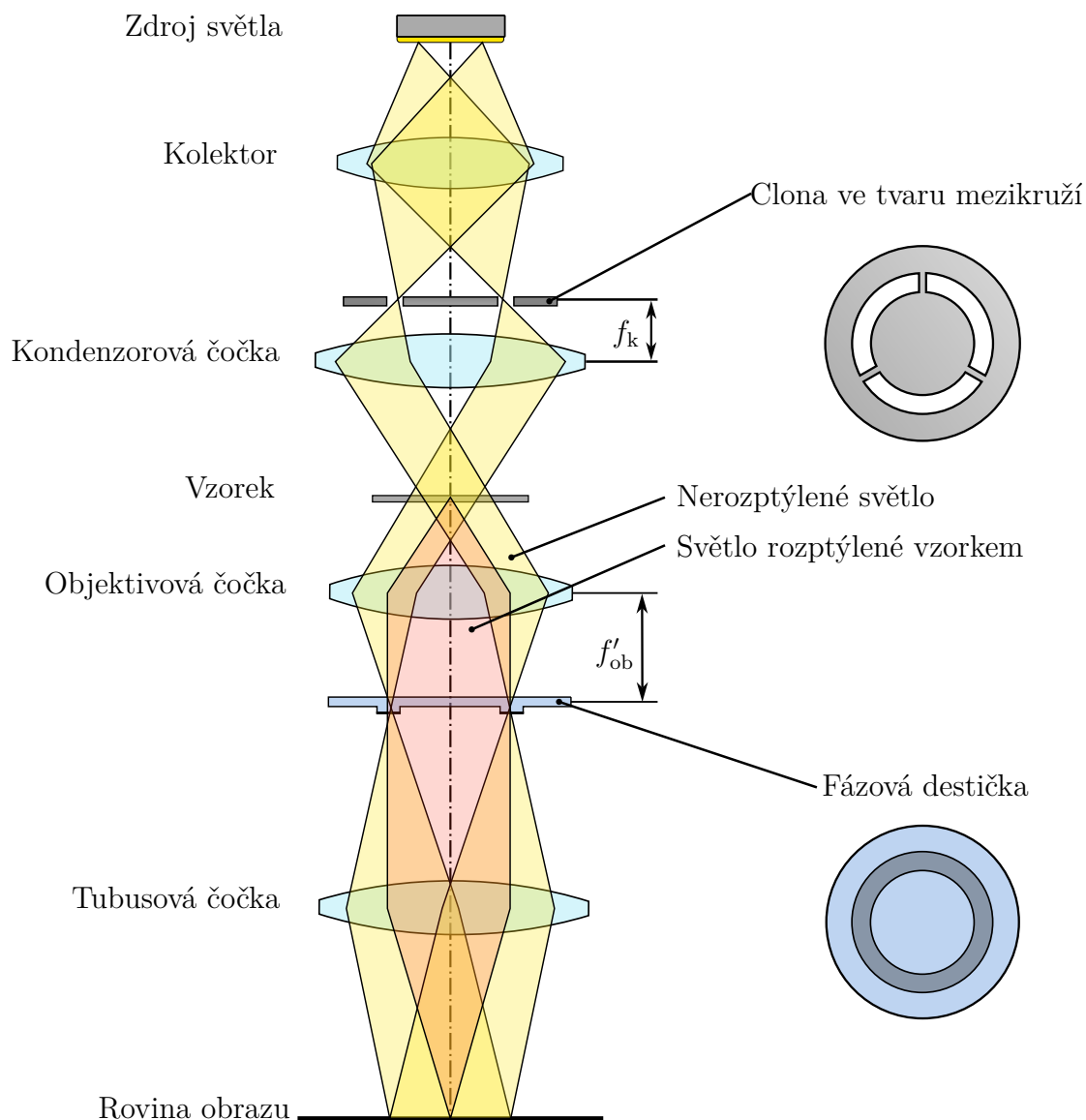
zobrazování pomocí fázového kontrastu, se objekty s vyšším indexem lomu vůči jejich okolí obvykle jeví tmavší, jak lze vidět na obrázku 1.4(c). Pokud je však objekt dostatečně silný, může způsobit fázový posun rozptýleného světla větší než π , což vede ke konstruktivní interferenci a objekt se pak bude jevit světlejší. Metoda je však také náchylná k optickým artefaktům, které mohou zkreslit intenzitu obrazu, aniž by souvisely s rozdílem optických drah. Mezi nejvýraznější artefakty patří haló efekt a stínový efekt [4].

Haló efekt se projevuje světlým prstencem kolem objektů, které se jeví tmavší než jejich okolí, nebo naopak tmavým prstencem kolem světlých objektů. Tento jev vzniká tím, že část rozptýleného světla projde amplitudově-fázovou destičkou skrze oblast mezikruží, určenou pro nerozptýlené světlo. Takto přenesené světlo nezískává potřebné fázové zpoždění oproti nerozptýlené složce a není tedy ovlivněno destruktivní či konstruktivní interferencí, což vede k lokálnímu obrácení kontrastu. Tento jev je ilustrován na obrázcích 1.4(c) a 1.4(e) [4].

1.2. ZERNIKEHO FÁZOVÝ KONTRAST

Stínový efekt, známý z anglické literatury také jako shade-off efekt, se projevuje postupnou změnou intenzity u velkých planárních objektů směrem k jejich středu, přestože jejich optická dráha je všude stejná, jak je znázorněno na obrázcích 1.4(c) a 1.4(e), popřípadě na řezech intenzitou podél vyznačených oblastí 1.4(f) a 1.4(h). Tento artefakt vzniká v důsledku malého vychýlení rozptýleného světla z centrálních částí objektů, které tak částečně zasahuje do mezikruhové oblasti amplitudově-fázové destičky. Takto přenesené světlo opět nezískává potřebné fázové zpoždění proti nerozptýlené složce a nedochází tak k destruktivní či konstruktivní interferenci [4].

1. REŠERŠE METOD FÁZOVÉHO ZOBRAZENÍ



Obrázek 1.5: Schéma sestavy mikroskopu pro Zernikeho fázový kontrast. Světlo vycházející ze zdroje putuje přes kolektor až do přední ohniskové roviny kondenzoru. Zde je umístěna clona ve tvaru mezikruží. Světlo propuštěné touto clonou putuje na vzorek, kde se rozdělí na světlo, které není vzorkem ovlivněno a pokračuje původním směrem, a na světlo, které je světlem rozptýleno do okolí a fázově posunuto oproti neovlivněnému světlu. Obě tyto složky putují přes amplitudově-fázovou destičku v zadní ohniskové rovině objektivové čočky, která změní fázi a amplitudu světla neovlivněného vzorkem. Obě složky následně tubusová čočka přenesse do roviny detektoru, kde spolu interferují a vytvářejí zde výsledný obraz.

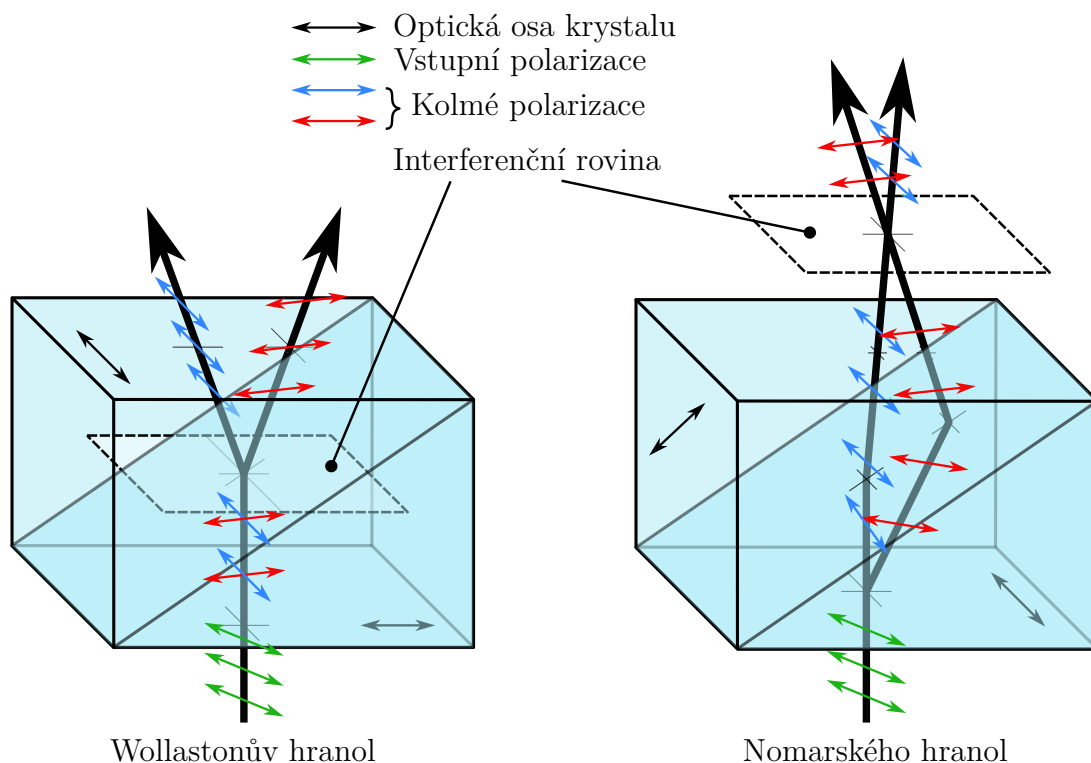
1.3. Nomarského diferenciální interferenční kontrast

Další technikou pro pozorování fázových objektů je diferenciální interferenční kontrast, který se označuje také zkratkou DIC z anglického názvu Differential Interference Contrast nebo také jako Nomarského metoda podle jejího vynálezce, francouzsko-polského optického teoretika jménem Georges Nomarski. Tato technika využívá polarizační prvky a speciální Wollastonovy hranoly. Tyto hranoly umožňují prostorové rozdělení polarizovaného světla do dvou kolmo polarizovaných složek. Tyto složky procházejí odlišnými oblastmi vzorku a po opětovném prostorovém sesazení a projekci do stejného polarizačního stavu interferenčně zesilují lokální gradienty optické dráhy zobrazovaného vzorku [4].

Wollastonův hranol slouží jako polarizační dělič svazků a skládá se ze dvou klínových destiček z dvojlomného materiálu, které jsou k sobě pevně spojeny. Optické osy obou klínů jsou orientovány kolmo na sebe a na směr šíření dopadajícího světla, jak je naznačeno na obrázku 1.6. Hranol je osvětlený lineárně polarizovaným světlem s vektorem elektrické intenzity kmitajícím diagonálně vůči optickým osám klínových destiček. V důsledku dvojlomu se při průchodu světla hranolem původní svazek rozdělí na dva svazky s kolmými lineárními polarizacemi, které se pohybují mírně odlišnými směry. Diagonální nastavení lineárního polarizátoru proti optickým osám hranolu zajišťuje rovnoměrné rozdělení světla do obou svazků. Rovina, kde se tyto dva svazky protínají, se nazývá interferenční rovina. Pro pokročilé aplikace je zapotřebí, aby tato rovina ležela mimo materiál hranolu. Aby bylo možné umístit rovinu mimo samotný hranol, byl vyvinut Nomarského hranol, který je zobrazen na obrázku 1.6. Požadovného chování je zde dosaženo rozdílnou orientací optických os klínových destiček než u Wollastonova hranolu 1.6 [4].

Schéma DIC mikroskopu je znázorněno na obrázku 1.7. Světlo ze zdroje je nejprve lineárně polarizováno pomocí polarizátoru a následně prochází Wollastonovým hranolem, který jej rozdělí na dva svazky s kolmými polarizacemi. Interferenční rovina hranolu je umístěna v přední ohniskové rovině kondenzoru, což umožňuje kolimaci obou svazků a splnění podmínky Köhlerova osvětlení. Jelikož mají svazky kolmé polarizace, vzájemně se neovlivňují a systémem prochází nezávisle. Vzdálenost mezi nimi, označována jako stříh, je natolik malá, že leží pod rozlišovací schopností mikroskopu. Směr, ve kterém došlo k rozdělení paprsků, se nazývá osa stříhu a její orientace je určena optickou osou druhé klínové destičky hranolu [4].

Při průchodu vzorkem dochází k rozdílným změnám fáze příčně posunutých svazků, protože každý z nich prochází jinou částí vzorku. Po průchodu vzorkem a mikroskopovým objektivem oba svazky dosáhnou druhého Wollastonova hranolu, jehož osa stříhu je orientována stejným směrem jako u prvního hranolu a jehož interferenční rovina je umístěna v zadní ohniskové rovině objektivu. V místě interferenční roviny dojde k opětovnému příčnému sesazení svazků. Oba svazky dále putují přes analyzátor, který je natočen o 90° vůči vstupnímu polarizátoru. Pokud oba svazky prošly stejnou optickou dráhou, vytvoří



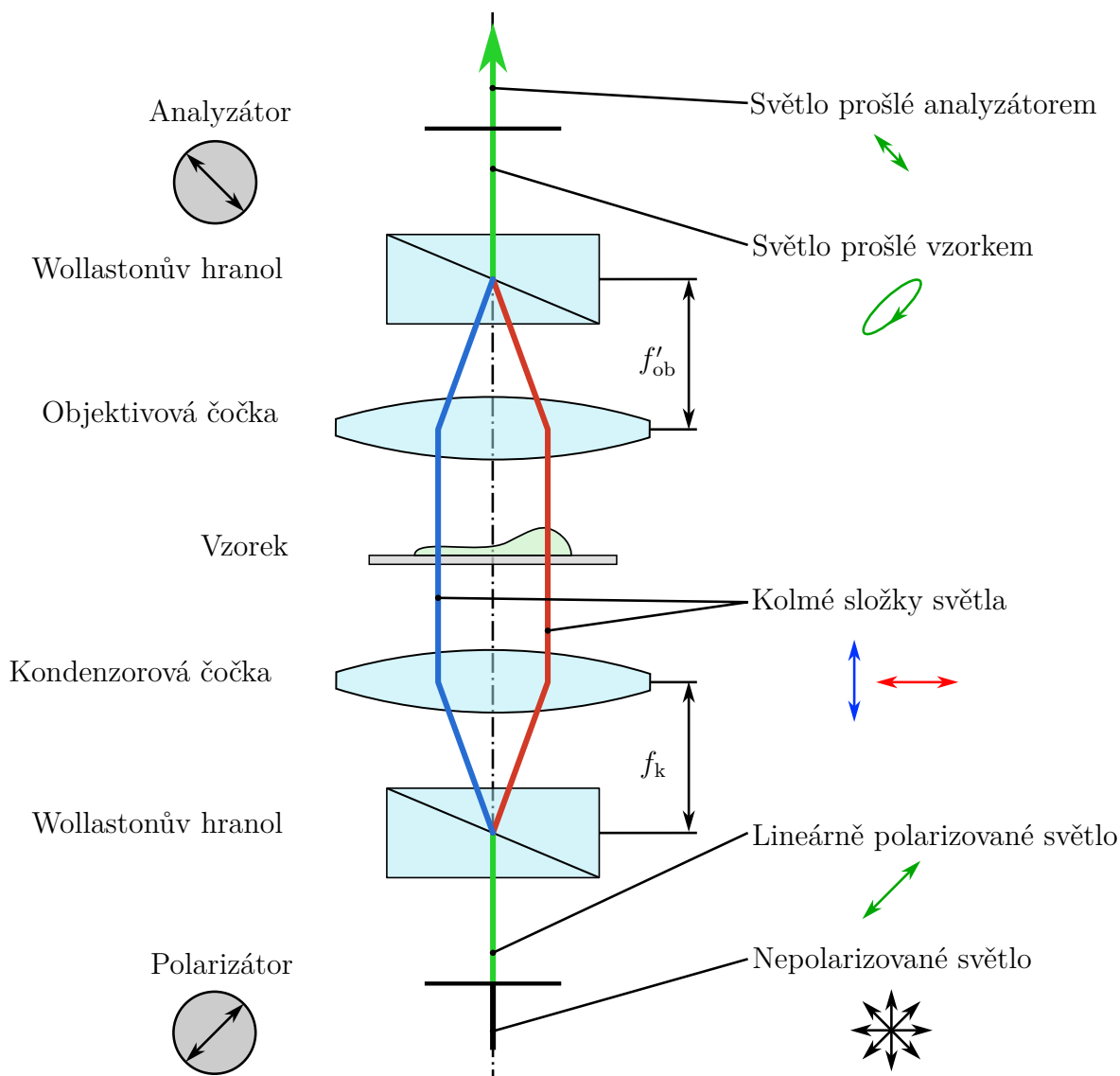
Obrázek 1.6: Schéma rozdělení polarizací pomocí Wollastonova a Nomarského hranolu.

za objektivem lineárně polarizované světlo, které je analyzátozem blokováno. Pokud ale mezi svazky vznikne fázový rozdíl, výsledná polarizace bude eliptická a část světla přes analyzátor projde až na detektor, kde vytvoří kontrastní obraz na černém pozadí [4].

Často se využívá modifikace, při které je posun fáze jednoho ze svazků uměle vytvořen. Toho lze dosáhnout buď natočením jednoho z hranolů nebo umístěním čtvrtvlnné destičky za vstupní polarizátor (de Sénarmontova metoda). Výsledkem je obraz s tmavými a světlými oblastmi na tmavě šedém pozadí, který vytváří dojem trojrozměrného reliéfu osvětleného z boku [4, 14].

Metoda DIC se vyznačuje vysokým rozlišením a není zatížena obrazovými artefakty jako haló efekt u Zernikeho fázového kontrastu. Z popisu metody vyplývá, že obrazový kontrast nevzniká interferencí rozptýleného a nerozptýleného světla, ale porovnáním dvou svazků odlišným způsobem ovlivněných zobrazovaným vzorkem. Obrazový kontrast tedy nevzniká přímo v závislosti na optické dráze ale pouze jejich změnách ve směru rovnoběžném s osou stříhu. Mnoho DIC mikroskopů je navrženo tak, aby umožňovaly otáčení osy stříhu, čímž lze dále optimalizovat viditelnost konkrétních struktur vzorku [4].

1.4. SPIRÁLNÍ FÁZOVÝ KONTRAST



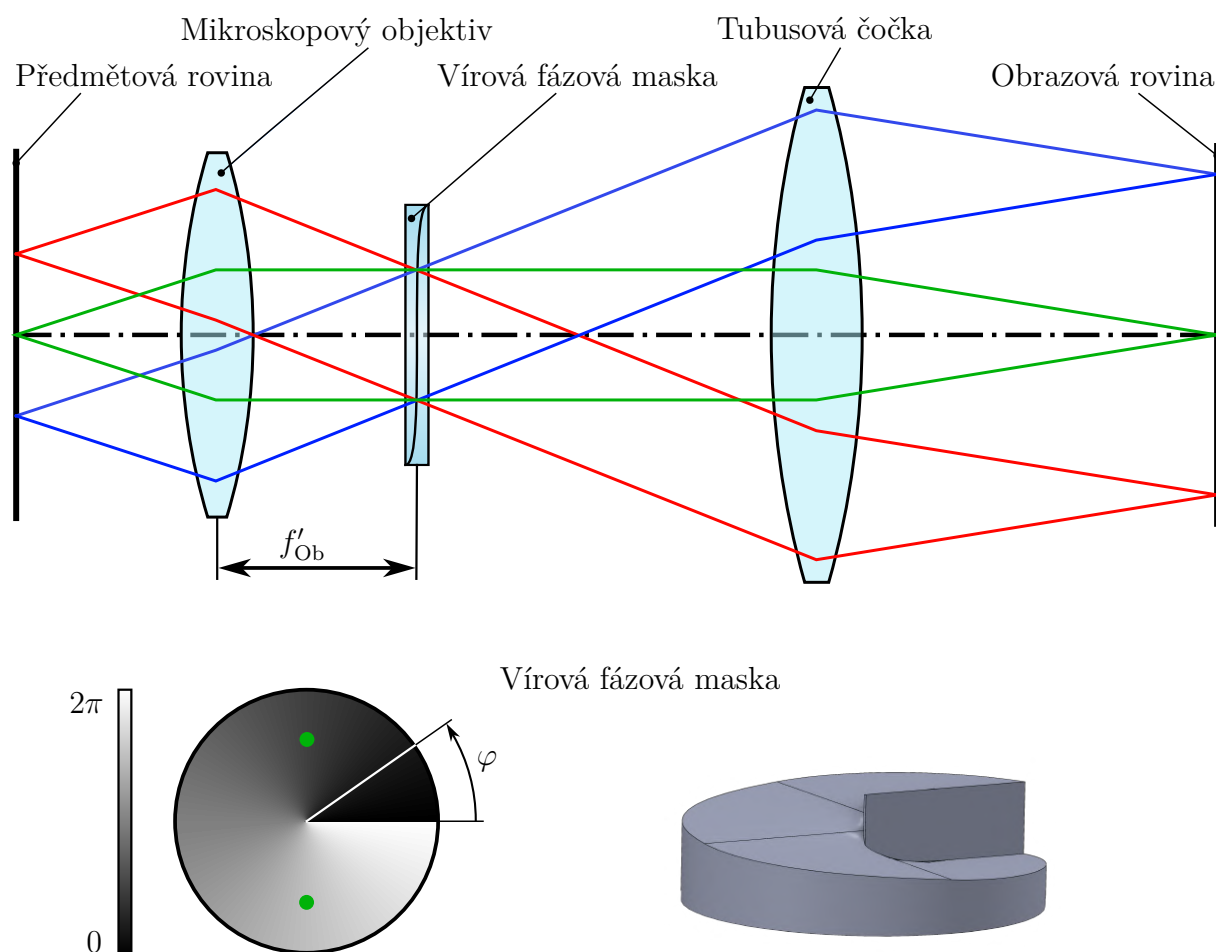
Obrázek 1.7: Schéma sestavy mikroskopu pro diferenciální interferenční kontrast. Lineárně polarizované světlo přicházející od vstupního polarizátoru je pomocí Wollastonova hranolu prostorově rozděleno na dva svazky s kolmými lineárními polarizacemi. Tyto svazky dále procházejí přes kondenzorovou čočku na rovinu vzorku. Při průchodu vzorkem dochází k rozdílným změnám fáze příčně posunutých svazků. Po průchodu vzorkem a objektivovou jsou svazky opět sesazeny pomocí druhého Wollastonova hranolu a dále procházejí přes analyzátor.

1.4. Spirální fázový kontrast

Spirální fázový kontrast představuje relativně novou zobrazovací metodu, která byla vyvinuta v laboratoři profesorky Moniky Ritsch-Marte na Lékařské univerzitě v rakouském Innsbrucku. Princip této metody spočívá ve fázovém filtrování ve Fourierově rovině, které vytváří bodovou rozptylovou funkci s toroidním (prstencovým) tvarem. Vytvoření obrazu lze matematicky popsat jako konvoluci původního objektu s touto bodovou rozptylovou

funkcí, což vede k izotropnímu zvýraznění hran jak fázových, tak i amplitudových struktur.

Optická sestava mikroskopu pro spirální fázový kontrast se od standardního světelného mikroskopu liší zavedením vírové fázové masky, umístěné do zadní ohniskové roviny mikroskopového objektivu, kde se vytváří Fourierův obraz pozorovaného objektu, jak je vidět na obrázku 1.8. Tato maska moduluje fázi procházející vlnoplochy podle vztahu $\exp(i\varphi)$, kde φ označuje úhlovou polární souřadnici v rovině kolmé na šíření dané vlny. Výsledkem této modulace je, že každý bod vzorku je v obrazové rovině reprezentován jako prstencová stopa s vírovou fází závislou na lokální tloušťce a indexu lomu zobrazovaného předmětu. Interferencí těchto obrazových stop pak v obrazové rovině vzniká intenzitní kontrast fázových obrazů [15, 16].



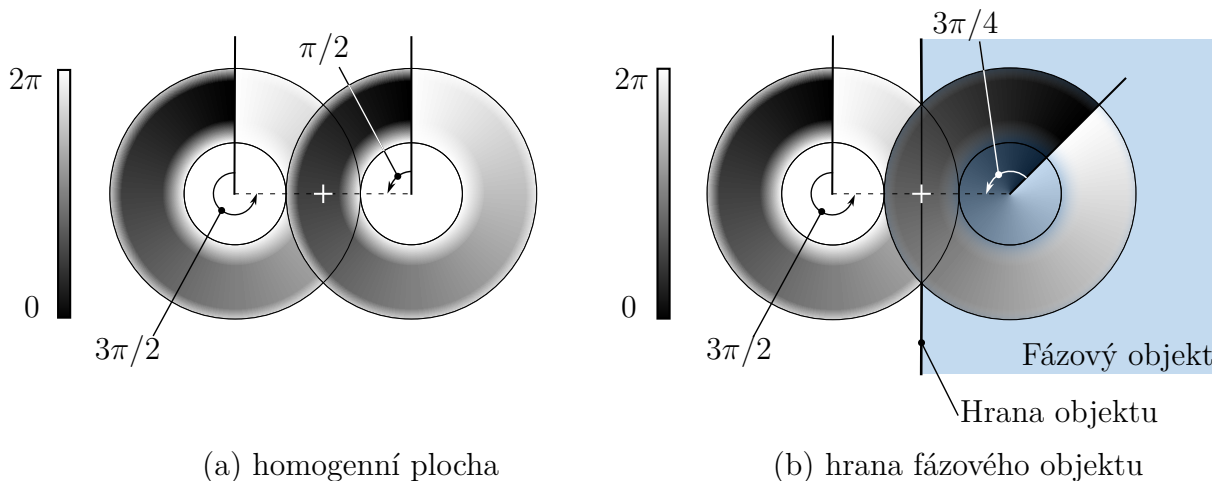
Obrázek 1.8: Schéma optické sestavy mikroskopu pro spirální fázový kontrast (nahore) a vírová fázová maska použitá v tomto systému (dole).

Při zobrazování bodu na homogenní ploše je kladný příspěvek od jednoho bodu vyrušený negativním příspěvkem od sousedního bodu a dojde k destruktivní interferenci (obrázek 1.9(a)). Intenzita v obrazové rovině je pak nulová. Naopak na hranách amplitudových nebo fázových struktur, kde dochází k fázovému posunu mezi sousedními body,

1.5. KVANTITATIVNÍ FÁZOVÉ ZOBRAZENÍ

není destruktivní interference úplná. Výsledkem je zvýšená intenzita vedoucí ke kontrastnímu zobrazení hran nebo fázových změn (obrázek 1.9(b)) [15].

Metoda spirálního fázového kontrastu zvýrazňuje fázový gradient vzorku. Díky rotační symetrii bodové rozptylové funkce dochází k rovnoměrnému zvýraznění hran ve všech směrech, tato metoda je tedy izotropní. To představuje významnou výhodu oproti metodě DIC, která zvýrazňuje detaily především ve směru stříhu.



Obrázek 1.9: Interference dvou prstencových stop s vírovou fází (a) na homogenní ploše a (b) na hraně fázového objektu, který posouvá fázi prošlého světla o $\pi/4$ (b).

1.5. Kvantitativní fázové zobrazení

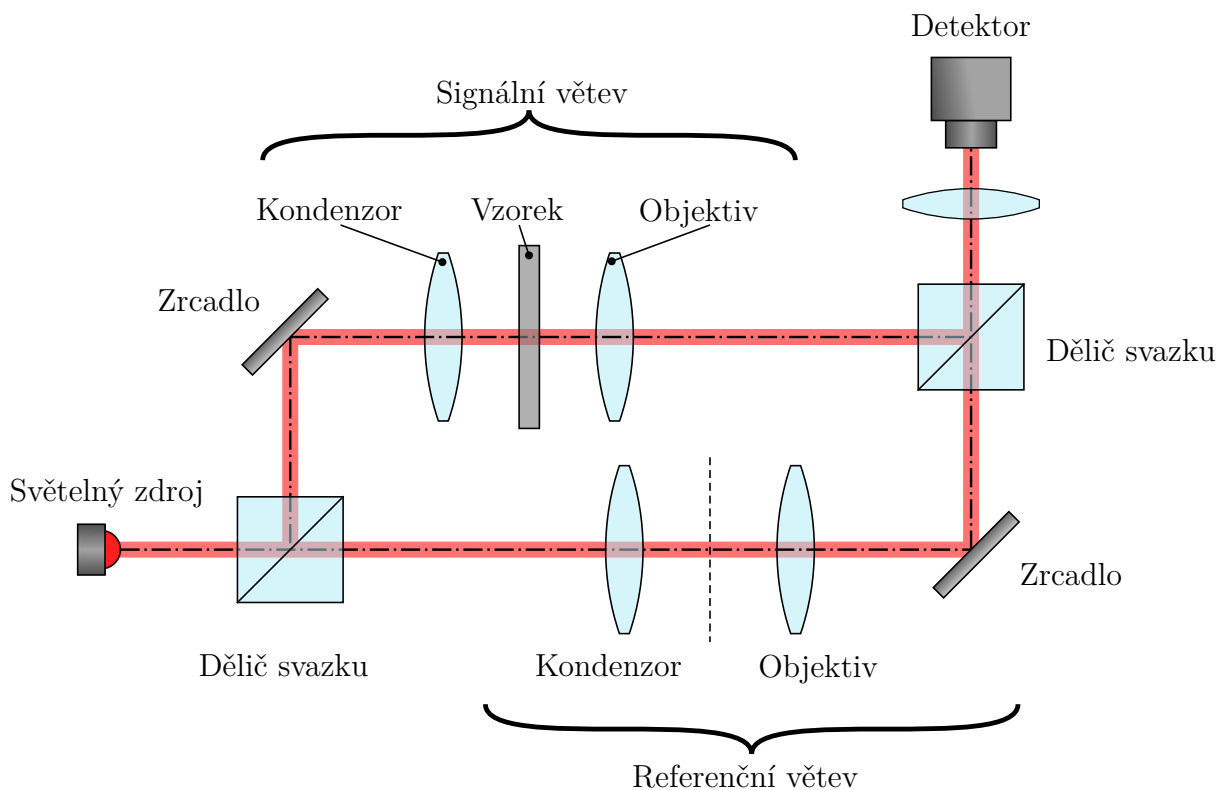
Dříve zmíněné zobrazovací techniky umožňují zvýraznit kontrast fázových objektů, avšak neposkytují informaci o absolutní velikosti fázového posunu způsobeného vzorkem. Kvantitativní fázové zobrazení, často označované také jako digitální holografická mikroskopie, představuje metodu, která umožňuje přesné měření fázové změny světelné vlny po průchodu vzorkem, a to bez nutnosti jeho obarvení. Tato metoda je tedy obzvláště vhodná pro pozorování živých buněk bez vlivu toxických efektů barviv, nebo pro studium nanostruktur, kde je barvení z principu nemožné [2].

Princip kvantitativního fázového zobrazení je založen na interferenci dvou optických vln, přičemž jen jedna z nich prochází zobrazovaným vzorkem. Schéma základního uspořádání holografického mikroskopu je znázorněno na obrázku 1.10. Světlo ze zdroje je děličem svazku rozděleno do dvou větví. V jedné z nich, označované jako signální větev, světelná vlna prochází pozorovaným vzorkem, přičemž dochází k deformaci vlnoplochy vlivem lokálních změn indexu lomu a tloušťky vzorku. V referenční větvi vzorek chybí, nebo je použitý referenční vzorek známého tvaru a tloušťky, a světlo zde slouží jako reference pro měření deformace vlnoplochy signální vlny. Obě větve se následně znovu spojí pomocí druhého děliče svazku a interferují na detektoru, kde vzniká hologram, který předsta-

vuje interferenční obrazec obsahující jak amplitudové, tak fázové informace o vzorku [17]. Výsledná intenzita v rovině detektoru je popsána vztahem

$$I = I_r + I_s(x, y) + 2\sqrt{I_r \cdot I_s(x, y)} \cos(\delta + \phi(x, y)), \quad (1.4)$$

kde I_s a I_r jsou intenzity signální a referenční vlny, $\phi(x, y)$ je fázový posun způsobený vzorkem a δ je konstantní rozdíl optických drah signální a referenční vlny [2].



Obrázek 1.10: Schéma holografického mikroskopu Mach-Zehnderova typu. Světlo je pomocí děliče svazku rozděleno do dvou větví, přičemž v jedné větvi je vložen pozorovaný vzorek, který způsobí deformaci vlnoplochy prošlého světla. Po průchodu větvemi interferometru se svazky z obou větví opět spojují na detektoru, kde se vytvoří interferenční obrazec.

Na základě úhlu mezi signální a referenční vlnou při jejich rekombinaci lze rozlišit dvě základní konfigurace mikroskopu nazývané osová a mimoosová holografie [2]. V osovém uspořádání je úhel mezi svazky nulový. Tento typ mikroskopu je konstrukčně jednoduchý a robustní, přičemž signální a referenční vlna mohou sdílet stejnou optickou cestu — jedná se o tzv. jednocestné uspořádání. Pro rekonstrukci fázového obrazu je nezbytné použít metodu krokování, které obnáší pořízení zpravidla čtyř hologramů I_j , přičemž jsou hologramy pořízeny s hodnotami $\delta_j = (j - 1) \cdot \pi/2$, $j = 1, 2, 3, 4$ [2]. Tato podmínka

1.5. KVANTITATIVNÍ FÁZOVÉ ZOBRAZENÍ

značně znemožňuje efektivní pozorování dynamických procesů. Rekonstrukce fáze vnesené vzorkem je pak vypočítána pomocí vzorce

$$\phi = \arctg \left(\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3} \right). \quad (1.5)$$

V mimoosovém uspořádání svírají signální a referenční svazky při rekombinaci nenulový úhel. To umožňuje rekonstrukci fázového obrazu již z jednoho hologramu, čímž se tato konfigurace stává vhodnější pro sledování dynamických dějů. Intenzita obrazu zaznamenaná na detektoru je popsána rovnicí

$$I = I_r + I_s(x, y) + 2\sqrt{I_r \cdot I_s(x, y)} \cos(\alpha x + \phi(x, y)), \quad (1.6)$$

kde α představuje prostorovou frekvenci vzniklou v důsledku mimoosového uspořádání, danou vztahem $\alpha = 2\pi \sin(\theta)/\lambda$. Zde je λ vlnová délka světla a θ je úhel mezi signální a referenční větví [2]. Rekonstrukce fázového obrazu se v tomto případě provádí pomocí prostorového filtrování ve spektru obrazových frekvencí pořízeného hologramu. I když jsou mimoosové systémy výrazně vhodnější pro zobrazování rychlých a dynamických jevů, jejich realizace je konstrukčně složitější a vyžaduje přesnější optickou justáž.

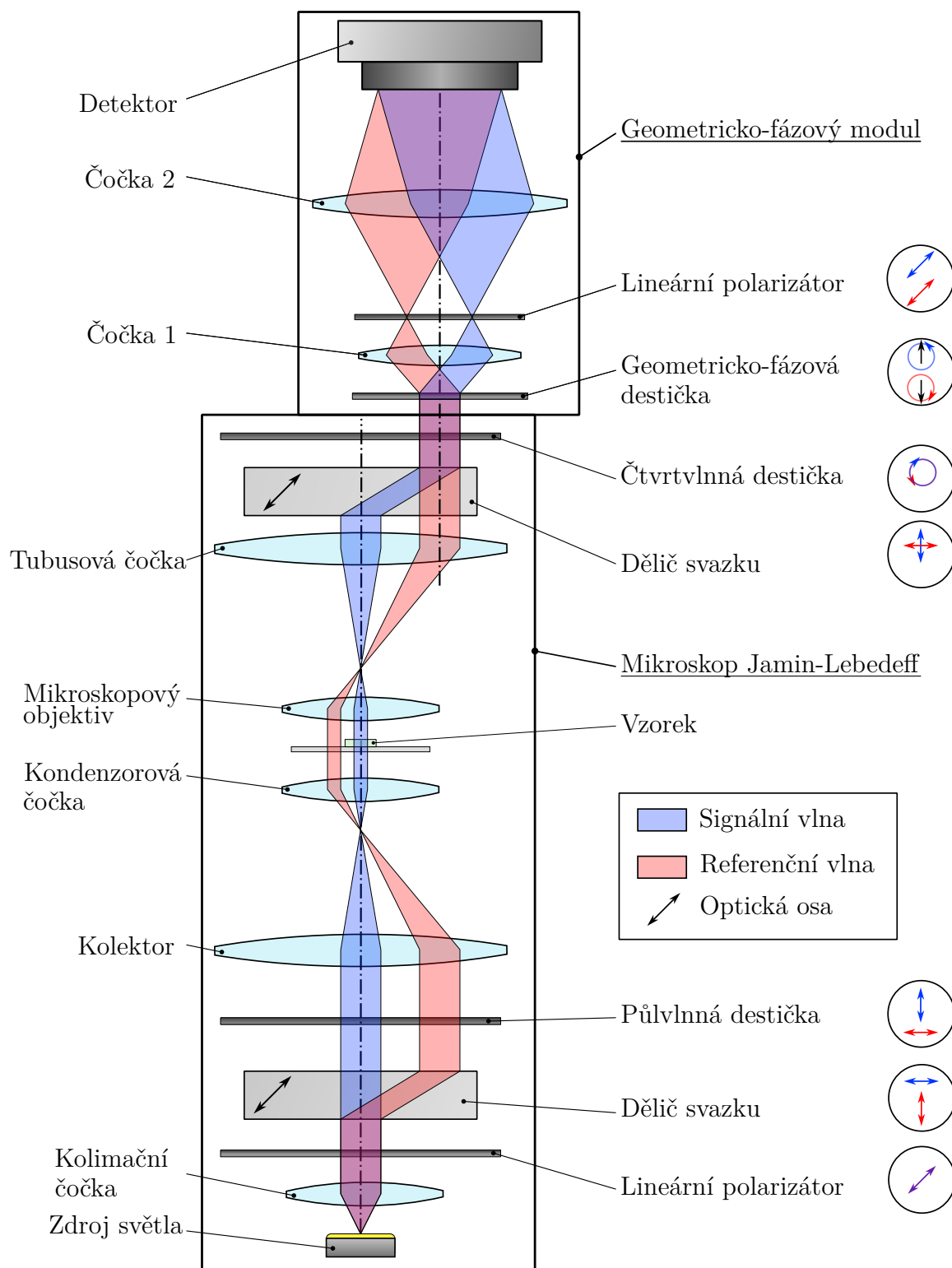
1.5.1. Mikroskop Jamin-Lebedeff

Zajímavým řešením, které kombinuje jednoduchost metod fázového kontrastu s holografickou rekonstrukcí obrazu je mikroskop Jamin-Lebedeff, Mikroskop představuje jednocestný osový holografický mikroskop, jehož princip vychází z metody diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). V osvětlovací části systému je světlo rozděleno na dva lineárně polarizované svazky s navzájem kolmou polarizací. Toto rozdělení je realizováno prostřednictvím anizotropních krystalů, nejčastěji z kalcitu nebo křemene, jejichž optická osa je orientována pod úhlem 45° vůči směru šíření svazků [17]. Na rozdíl od klasického DIC mikroskopu je separace svazků v případě mikroskopu Jamin–Lebedeff natolik výrazná, že jsou v rovině vzorku zcela oddělené. Pozorovaným objektem prochází pouze jeden ze svazků, zatímco druhý prochází volnou částí zorného pole a slouží jako referenční. Za mikroskopovým objektivem dochází ke zpětnému prostorovému sesazení svazků pomocí druhého anizotropního krystalu. Následně světlo prochází čtvrtvlnnou destičkou, která převede kolmé lineární polarizace na opačně orientované kruhové polarizace, a dále lineárním polarizátorem směrem k detektoru. Rotací výstupního polarizátoru se mezi oběma svazky zavádí definované hodnoty vzájemného fázového posunu δ_j potřebné ke kvantitativní rekonstrukci fáze vzorku, vypočítané dle rovnice 1.5 [17].

2. Motivace práce

Tato diplomová práce se zabývá vývojem mikroskopového systému, který kombinuje výhody osové a mimoosové holografické mikroskopie. Schéma navrženého systému je znázorněno na obrázku 2.1. Systém se skládá ze dvou hlavních částí. První část tvoří jednocestný osový holografický mikroskop typu Jamin–Lebedeff, ve kterém se vytvoří signální a referenční vlna s lineárními, navzájem kolmými polarizacemi. Na výstupu této části jsou polarizace obou vln převedeny na opačné kruhové polarizace. Druhá část se je tvořena geometricko-fázovým holografickým modulem. Modul je založený na využití geometricko-fázové mřížky, jež slouží jako difraktivní dělič pro kruhově polarizované světlo. Geometricko-fázová mřížka zajišťuje úhlovou separaci polarizačně kódované signální a referenční vlny, zatímco zbylé optické komponenty zajišťují jejich opětovné spojení a interferenci v rovině detektoru. K výsledné interferenci dochází při nenulovém rekombinačním úhlu mezi signální a referenční vlnou, což umožňuje vznik mimoosového hologramu.

Spojení obou částí je možné díky vhodnému zacházení s polarizacemi signální a referenční vlny. Výsledný navržený systém kombinuje konstrukční jednoduchost a stabilitu osové holografie s výhodou jednosnímkového záznamu typickou pro mimoosové uspořádání. Cílem práce je sestavení funkčního mikroskopu pracujícího ve viditelné spektrální oblasti. Na základě získaných poznatků bude následně sestaven identický systém pracující v blízké infračervené oblasti, který bude využit ke studiu aktivních metapovrchů z materiálu VO_2 , vyvíjených na Středoevropském technologickém institutu (CEITEC) v Brně.



Obrázek 2.1: Konceptní návrh vyvíjeného mikroskopu. Zařízení kombinuje jednocestný osový mikroskop Jamin-Lebedeff s geometricko-fázovým holografickým modulem, který transformuje osové uspořádání na mimoosové. Tato kombinace je realizována díky vhodnému řízení polarizačních vlastností světla v jednotlivých částech systému. Signální a referenční vlna je v obrázku barevně kódovaná spolu s označením polarizačních stavů světla v jednotlivých fázích zobrazovacího procesu.

3. Mikroskop Jamin-Lebedeff

První část navrhovaného zobrazení je založena na průchodu světla mikroskopem Jamin-Lebedeff a vytvoření signální a referenční vlny s kolmými lineárními polarizacemi. V této kapitole bude proveden teoretický popis zobrazení mikroskopem Jamin-Lebedeff, včetně popisu separace polarizovaného světla do signální a referenční vlny pomocí anizotropních krystalů, jejich opětovné spojení a provedení krokování fáze vedoucí k rekonstrukci kvantitativních fázových obrazů v osovém uspořádání. Dále zde bude popsán konstrukční návrh mikroskopu a provedeno experimentální ověření jeho funkčnosti pomocí kvantitativního fázového zobrazení testovacích vzorků.

3.1. Teoretický popis zobrazení mikroskopem Jamin-Lebedeff

Pro zobrazení mikroskopem Jamin-Lebedeff a jeho teoretický popis je stěžejní polarizace světla. Polarizaci rovinné vlny je možné definovat dvousložkovým Jonesovým vektorem. Složky Jonesova vektoru odpovídají složkám elektrické intenzity světla ve směrech os x a y Kartézské soustavy souřadnic. Jejich amplituda a vzájemné fázové zpoždění definují polarizační stav. Světlo je obecně elipticky polarizované. Obecný polarizační stav popisuje Jonesův vektor

$$J = \begin{bmatrix} \cos \psi \\ e^{i\delta} \sin \psi \end{bmatrix}, \quad (3.1)$$

kde ψ je úhel vztažený k ose x a δ představuje vzájemné fázové zpoždění obou složek. Lineární polarizace se získá dosažením vzájemného fázového zpoždění $\delta = m \cdot \pi$, kde m je celé číslo. Prakticky je možné lineární polarizaci vytvořit pomocí lineárního polarizátoru. Druhým polarizačním stavem významným při popisu zobrazení je kruhová polarizace. Kruhovou polarizaci je možné z obecného Jonesova vektoru získat vyrovnaním amplitud obou složek a vytvořením fázového zpoždění $\delta = \pm \pi/2$. Prakticky lze polarizační stavy transformovat a přecházet mezi nimi za použití vlnových destiček.

Při teoretickém popisu zobrazení, které postupuje podle obrázku 3.1, je uvažován bodový zdroj monochromatického záření. Světlo, které vychází ze zdroje, je kolimační čočkou převedeno na rovinnou vlnu a dále prochází lineárním polarizátorem. Pro jednoduchost dalšího popisu uvažujeme polarizátor orientovaný propustným směrem pod úhlem 45° vzhledem k ose x . Tímto způsobem je vytvořena diagonální lineární polarizace, která se vyznačuje stejnou amplitudou kmitových složek a jejich nulovým fázovým zpožděním. Rovinnou vlnu postupující za polarizátorem lze vyjádřit vztahem

$$\vec{u} = A \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.2)$$

3.1. TEORETICKÝ POPIS ZOBRAZENÍ MIKROSKOPEM JAMIN-LEBEDEFF

kde A je amplituda vlny a závorka představuje dvousložkový Jonesův vektor popisující její diagonální polarizaci.

Vlna dále putuje přes dělič svazku tvořený z anizotropního krystalu. Krystal je tvořený jednoosým anizotropním materiálem. Anizotropie je charakterizována optickou osou krystalu, která značí směr, pro který se materiál chová jako izotropní. Pro každý jiný úhel je možné světlo rozdělit do dvou polarizačních složek. Jedna složka je za všech okolností ovlivněna stejným indexem lomu n_a , který se nazývá řádný. Druhá složka je ovlivněna mimořádným indexem lomu $n_b(\alpha)$. Velikost mimořádného lomu závisí na úhlu α mezi směrem šíření dopadající rovinné vlny a optickou osou anizotropního materiálu. Při vhodné orientaci optické osy krystalu vůči směru dopadajícího záření a správné polarizaci dopadající vlny dochází k jejímu rovnoměrnému rozdělení do dvou příčně posunutých vln s lineárními a vzájemně kolmými polarizacemi. Směr šíření obou vystupujících vln je shodný se směrem šíření vstupní vlny. Vystupující vlny představují signální a referenční vlnu $u_{S,1}$ a $u_{R,1}$. V tomto případě je diagonální polarizace vstupní vlny rovnoměrně rozdělena do lineárních polarizací ve směru osy x , resp. ve směru osy y , a je možné je zapsat jako

$$\vec{u}_{S,1} = A_S \cdot e^{i\varphi_o} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (3.3)$$

$$\vec{u}_{R,1} = A_R \cdot e^{i\varphi_e} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.4)$$

kde φ_o a φ_e jsou fázová zpoždění způsobená průchodem vln krystalem. Mezi vlnami tak vznikne fázové zpoždění $\Delta\varphi = \varphi_o - \varphi_e$. Další detaily k funkci krystalu budou uvedeny v podkapitole 3.2.

Z důvodů, které budou zřejmé později, obě vlny prochází přes půlvlnnou destičku, jejíž rychlá osa svírá úhel 45° s osou x . Matice reprezentující půlvlnnou destičku má tvar

$$M_{\lambda/2} = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix}. \quad (3.5)$$

Vlny prošlé půlvlnnou destičkou pak změně polarizace podle vztahů

$$\vec{u}_{S,2} = A_S \cdot e^{i\varphi_o} \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} = A_S \cdot e^{i\varphi_o} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.6)$$

$$\vec{u}_{R,2} = A_R \cdot e^{i\varphi_e} \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} = A_R \cdot e^{i\varphi_e} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}. \quad (3.7)$$

Obě vlny poté procházejí přes kolektor a kondenzor. Tato sestava obě vlny se zmenšením přenese do roviny vzorku, kde je umístěný sledovaný objekt, resp. referenční vzorek odpovídající prázdné části zorného pole. U signální a referenční vlny může nastat částečná

absorpce světla a vnesení fázového posunu zobrazovaným vzorkem. Signální vlna je obecně popsána prostorově proměnnou amplitudou $a_S(x, y)$ a fázovým posunem $\phi_S(x, y)$, zatímco útlum a_R , a fázová změna ϕ_R jsou u referenční vlny konstantní. Signální a referenční vlnu pak lze zapsat jako

$$\vec{u}_{S,3} = a_S(x, y) \cdot e^{i\varphi_o} \cdot e^{i\phi_S(x,y)} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.8)$$

$$\vec{u}_{R,3} = a_R \cdot e^{i\varphi_e} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}. \quad (3.9)$$

Signální a referenční vlna dále prochází mikroskopovým objektivem a tubusovou čočkou, díky kterým dochází k vytvoření zvětšeného obrazu vzorku v rovině detektoru. Při zanedbání vlivu difrakce a uvážení dokonalého bodového zobrazení dochází pouze k transformaci souřadnic ve tvarech $x' = m \cdot x$ a $y' = m \cdot y$, přičemž x' a y' jsou souřadnice v rovině detektoru a m je hodnota příčného měřítka zvětšení. Před detekcí obě vlny procházejí druhým děličem v podobě identického anizotropního krystalu, který byl použitý k jejich rozdělení. Druhý krystal zajišťuje opětovné sesazení signální a referenční vlny. Tohoto chování je dosaženo díky použití půlvlnné destičky (3.6, 3.7), která zaměnila lineární polarizace signální a referenční vlny po průchodu prvním děličem. Díky tomu vlna, která byla při průchodu prvním děličem ovlivněna působením řádného indexu lomu, je při průchodu druhým děličem ovlivněna mimořádným indexem lomu. Stejný efekt, ale v opačném pořadí, nastává také při průchodu druhé vlny oběma děliči. Díky tomuto kompenzačnímu efektu je výsledné fázové zpoždění signální a referenční vlny po průchodu oběma děliči stejné až na fázové změny vnesené zobrazovaným vzorkem. Rovnice signální a referenční vlny pak dostávají tvar

$$\vec{u}_{S,4} = a_S(x', y') \cdot e^{i\varphi_e} \cdot e^{i\varphi_o} \cdot e^{i\phi_S(x',y')} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} = a_S(x', y') \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x',y')} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.10)$$

$$\vec{u}_{R,4} = a_R \cdot e^{i\varphi_o} \cdot e^{i\varphi_e} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} = a_R \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (3.11)$$

kde $\gamma = \varphi_o + \varphi_e$ je fázový posun způsobený oběma děliči svazku.

Díky vyrovnaní optických drah a kompenzací vlivu obou děličů můžou obě vlny po sjednocení jejich polarizačních stavů lineárním polarizátorem interferovat. Vlivem interference dochází k vytvoření intenzitních změn v závislosti na fázových změnách vnesených vzorkem. Tímto způsobem může mikroskop Jamin-Lebedeff poskytovat zobrazení v režimu fázového kontrastu. V pokročilém režimu zobrazení je možné dosáhnout ale i kvantitativní fázové rekonstrukce jako v tradičních holografických mikroskopech. K dosažení kvantitativní fázové rekonstrukce je třeba využít metodu krokování fáze a zaznamenat fázově posunuté hologramy nezbytné pro rekonstrukci fáze popsanou vztahem (1.5). V případě

3.1. TEORETICKÝ POPIS ZOBRAZENÍ MIKROSKOPEM JAMIN-LEBEDEFF

mikroskopu Jamin-Lebedeff je díky kódování signální a referenční vlny do kolmých polarizačních stavů možné ke krokování fáze využít změn geometrické fáze světla. Ke změnám geometrické fáze dochází při polarizační transformaci světla. V jednoduchém případě, který lze využít ke krokování fáze, je možné geometrickou fázi světla měnit při transformaci kruhové polarizace na lineární pomocí standardního lineárního polarizátoru. Aby bylo možné krokování fáze implementovat, je před detekcí do optické cesty vložena čtvrtvlnná destička, jejíž rychlá osa svírá s osou x úhel $\alpha = 45^\circ$. Jonesova matice popisující chování čtvrtvlnné destičky je ve tvaru

$$M_{\lambda/4} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 & -i \\ -i & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.12)$$

Díky čtvrtvlnné destičce se převedou kolmé lineární polarizace na opačné kruhové polarizace podle rovnic

$$\vec{u}_{S,5} = a_S(x', y') \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \cdot \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 & -i \\ -i & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} = \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix}, \quad (3.13)$$

$$\vec{u}_{R,5} = a_R \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \cdot \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 & -i \\ -i & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix}. \quad (3.14)$$

Do sestavy je dále vložen lineární polarizátor, který plní dvojí funkci. Opačné kruhové polarizace jsou ortogonální polarizační stavy, které se sčítají pouze v intenzitě. Lineární polarizátor projektuje obě kruhové polarizace do stejného kmitosměru a umožňuje tak jejich interferenci. Při projekci ale dochází také ke vzniku fázových členů. Tyto fázové členy představují geometrickou fázi světla závislou na natočení polarizátoru a lze je využít ke krokování fáze. Jonesova matice obecně natočeného polarizátoru má tvar

$$M_{LP} = \begin{bmatrix} \cos^2 \theta & \cos \theta \sin \theta \\ \cos \theta \sin \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix}, \quad (3.15)$$

kde θ je úhel, který svírá propustný směr polarizátoru s osou x . Průchodem lineárním polarizátorem změní signální a referenční vlna svoje tvary podle rovnic

$$\begin{aligned} \vec{u}_{S,6} &= \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \begin{bmatrix} \cos^2 \theta & \cos \theta \sin \theta \\ \cos \theta \sin \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} = \\ &= \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \cdot e^{i\theta} \begin{bmatrix} \cos \theta \\ \sin \theta \end{bmatrix}, \end{aligned} \quad (3.16)$$

$$\vec{u}_{R,6} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} \cos^2 \theta & \cos \theta \sin \theta \\ \cos \theta \sin \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \cdot e^{-i\theta} \begin{bmatrix} \cos \theta \\ \sin \theta \end{bmatrix}. \quad (3.17)$$

Jak vyplývá z rovnic (3.16) a (3.17), po polarizačním sjednocení získá signální vlna fázový posun θ , kdežto referenční vlna získá fázový posun $-\theta$. Mezi vlnami tedy vzniká vzájemný fázový rozdíl 2θ , který je určený natočením lineárního polarizátoru.

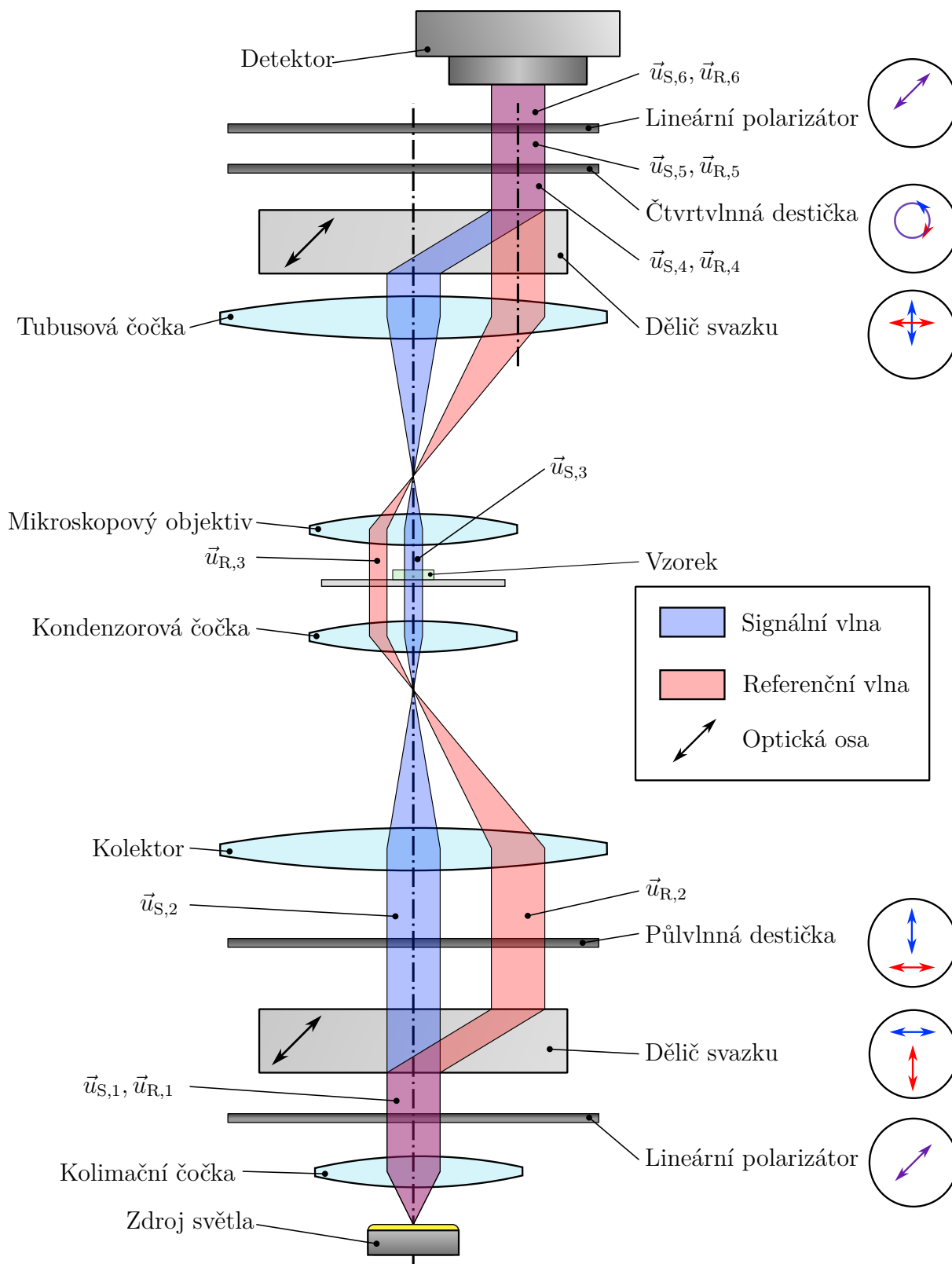
Na detektoru spolu signální a referenční vlna interferují a vzniká zde interferenční obraz. Výsledná intenzita v rovině detektoru lze vyjádřit pomocí vztahu

$$\begin{aligned} I &= |\vec{u}_{S,6} + \vec{u}_{R,6}|^2 = (\vec{u}_{S,6} + \vec{u}_{R,6})^\dagger \cdot (\vec{u}_{S,6} + \vec{u}_{R,6}) = \\ &= \vec{u}_{S,6}^\dagger \cdot \vec{u}_{S,6} + \vec{u}_{R,6}^\dagger \cdot \vec{u}_{R,6} + \vec{u}_{S,6}^\dagger \cdot \vec{u}_{R,6} + \vec{u}_{R,6}^\dagger \cdot \vec{u}_{S,6} = \\ &= \frac{a_S^2(x', y')}{2} + \frac{a_R^2}{2} + \frac{ia_S(x', y')a_R}{2} \left\{ e^{-i[2\theta + (\phi_S(x', y') - \phi_R)]} - e^{i[2\theta + (\phi_S(x', y') - \phi_R)]} \right\} = \\ &= \frac{a_S^2(x', y')}{2} + \frac{a_R^2}{2} + a_S(x', y')a_R \sin [2\theta + (\phi_S(x', y') - \phi_R)], \end{aligned} \quad (3.18)$$

což formálně odpovídá tradiční rovnici (1.4). Z porovnání těchto rovnic vyplývá, že pro rekonstrukci fáze podle rovnice (1.5) je krokování fáze zajištěno záznamem intenzit I_j získaných otáčením lineárního polarizátoru, přičemž potřebné úhly natočení jsou

$$\theta_j = \frac{\pi}{4} \cdot (j - 1), \quad j = 1, 2, 3, 4. \quad (3.19)$$

3.1. TEORETICKÝ POPIS ZOBRAZENÍ MIKROSKOPEM JAMIN-LEBEDEFF



Obrázek 3.1: Schéma navrženého mikroskopu Jamin-Lebedeff. Signální a referenční vlna jsou v obrázku barevně kódované. Barevné kódování je přeneseno i do označení polarizačních stavů vln v jednotlivých krocích zobrazovaného procesu. Označení signální a referenční vlny $\vec{u}_{S,1-6}$ a $\vec{u}_{R,1-6}$ v jednotlivých fázích zobrazovacího procesu a grafické znázornění polarizačních stavů usnadňuje propojení schématu s teoretickým popisem.

3.2. Prostorová separace svazků krystalem kalcitu

V návrhu mikroskopu Jamin-Lebedeff je uvažováno použití děliče svazku s označením BD27 od společnosti Thorlabs [18], který využívá anizotropní vlastnosti krystalu kalcitu k prostorové a polarizační separaci optických svazků. Pro lepší pochopení principu jeho funkce je v této kapitole představena teorie anizotropních materiálů, která je dále aplikována na konkrétní případ krystalu kalcitu použitého v navrhovaném mikroskopu. Teoretické poznatky o anizotropních materiálech byly čerpány z literatury [11, 19].

Anizotropní chování se vyskytuje u materiálů s krystalickou strukturou, kde jsou molekuly pravidelně uspořádány. To vede k tomu, že jejich optické vlastnosti závisí na směru šíření světla. V takovém prostředí je vztah mezi elektrickou intenzitou $\vec{E}$ a elektrickou indukcí $\vec{D}$ popsán rovnicí

$$\vec{D} = \hat{\epsilon} \vec{E}, \quad (3.20)$$

kde $\hat{\epsilon}$ představuje tenzor elektrické permitivity. Složky tenzoru elektrické permitivity závisí na zvoleném souřadnicovém systému. Vždy lze však zvolit takový souřadnicový systém, v němž je tento tenzor diagonální. Takový systém souřadnic se nazývá základní systém souřadnic a definuje základní osy krystalu x_1 , x_2 a x_3 . Podél těchto os lze zavést indexy lomu n_1 , n_2 a n_3 ve tvaru

$$n_1 = \sqrt{\epsilon_{11}/\epsilon_0}, \quad n_2 = \sqrt{\epsilon_{22}/\epsilon_0}, \quad n_3 = \sqrt{\epsilon_{33}/\epsilon_0}, \quad (3.21)$$

kde ϵ_{11} , ϵ_{22} a ϵ_{33} jsou diagonální složky tenzoru elektrické permitivity $\hat{\epsilon}$ a $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$ je permitivita vakua.

Pokud jsou všechny indexy lomu rozdílné, materiál se označuje jako dvouosý. Pokud jsou díky krystalové symetrii dva z těchto indexů shodné, materiál se označuje jako jednoosý. V tomto případě se zavádí označení $n_o = n_1 = n_2$ pro řádný index lomu (anglicky ordinary) a $n_e = n_3$ pro mimořádný index lomu (anglicky extraordinary). Materiál se nazývá pozitivně jednoosý, pokud $n_e > n_o$, a negativně jednoosý, pokud naopak platí $n_o > n_e$. Osa, v jejímž směru se materiál jeví být pro světlo izotropní, se nazývá optická osa. V takovém směru je světlo ovlivněno jen indexem lomu n_o . V případě kompletní symetrie jsou indexy lomu ve všech směrech stejné a materiál je opticky izotropní.

Optické vlastnosti anizotropního krystalu lze graficky reprezentovat pomocí indexového elipsoidu, definovaného rovnicí

$$\frac{x_1^2}{n_1^2} + \frac{x_2^2}{n_2^2} + \frac{x_3^2}{n_3^2} = 1, \quad (3.22)$$

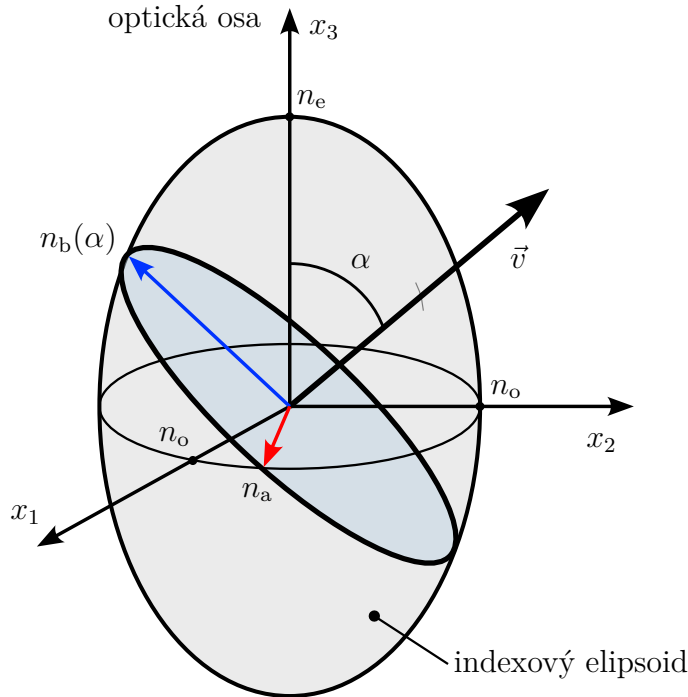
Schéma indexového elipsoidu pozitivně jednoosého materiálu je zobrazeno na obrázku 3.2. Světlo, jehož směr šíření je určený jednotkovým vektorem $\vec{v}$, který svírá úhel α s optickou osou materiálu, se rozdělí na dvě vlny. První složka světla, označovaná jako řádná vlna,

3.2. PROSTOROVÁ SEPARACE SVAZKŮ KRYSTALEM KALCITU

je ovlivněna indexem lomu n_a , který se rovná vždy řádnému indexu lomu n_o nezávisle na úhlu α . Její vektor elektrické indukce $\vec{D}_o$ je kolmý na rovinu určenou optickou osou x_3 a vektorem $\vec{v}$, a zároveň je rovnoběžný s vektorem elektrické intenzity $\vec{E}_o$. Druhá složka světla, nazvaná mimořádná, je ovlivněna indexem lomu n_b , jehož hodnota závisí na úhlu α podle rovnice

$$\frac{1}{n_b^2(\alpha)} = \frac{\cos^2 \alpha}{n_o^2} + \frac{\sin^2 \alpha}{n_e^2}. \quad (3.23)$$

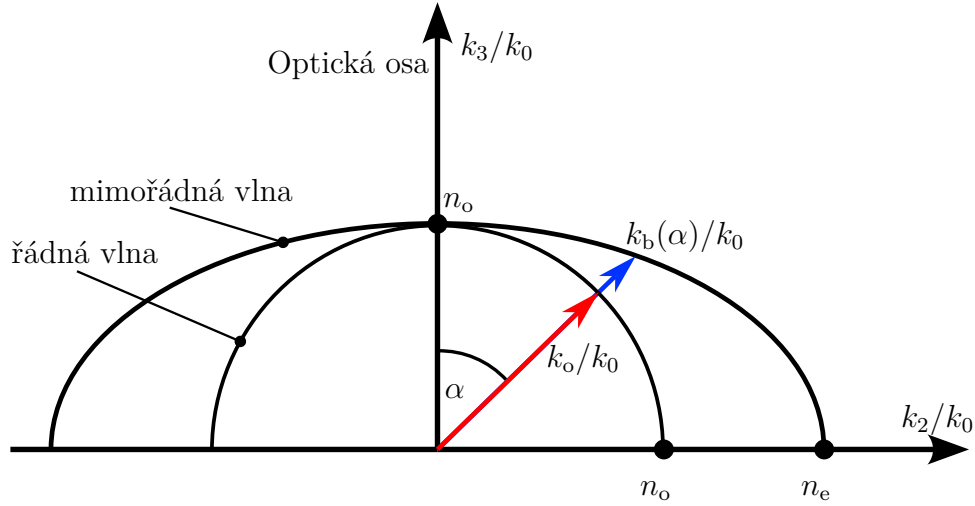
Vektor elektrické indukce mimořádné vlny $\vec{D}_e$ je kolmý na vektor směru šíření $\vec{v}$, kmitá v rovině určené optickou osou a vektorem $\vec{v}$ a obecně není rovnoběžný s vektorem elektrické intenzity $\vec{E}_e$.



Obrázek 3.2: Indexový elipsoid pozitivně jednoosého anizotropního materiálu.

Velikost k vlnového vektoru $\vec{k}$, pro který platí vztah $\vec{k} = k \cdot \vec{v}$, se nazývá vlnové číslo a závisí na indexu lomu materiálu n podle vztahu $k = n \cdot k_0$, kde k_0 je vlnové číslo ve vakuu. Zatímco u řádné vlny je vlnové číslo k_o konstantní ve všech směrech, hodnota vlnového čísla mimořádné vlny je dána vztahem $k_e = n_b(\alpha) \cdot k_0$. Vlnový vektor $\vec{k}_e$ tedy mění svou velikost v závislosti na směru šíření vzhledem k optické ose anizotropního prostředí. Grafická reprezentace závislosti hodnoty vlnového čísla na směru šíření se nazývá k-povrch, který je pro řádnou vlnu kulový s poloměrem o velikosti $n_o k_0$ a který má pro mimořádnou vlnu tvar rotačního elipsoidu. Na obrázku 3.3 je zobrazeny řezy k-povrchů pro řádnou a mimořádnou vlnu rovinou x_2 - x_3 .

Směr toku energie, který určuje směr šíření svazku, je popsán Poyntingovým vektorem $\vec{S}$, který nemusí být rovnoběžný s vlnovým vektorem $\vec{k}$, který určuje jen orientaci vlnoploch. Vlnový vektor $\vec{k}$ je kolmý na vektor elektrické indukce $\vec{D}$ a na vektor mag-

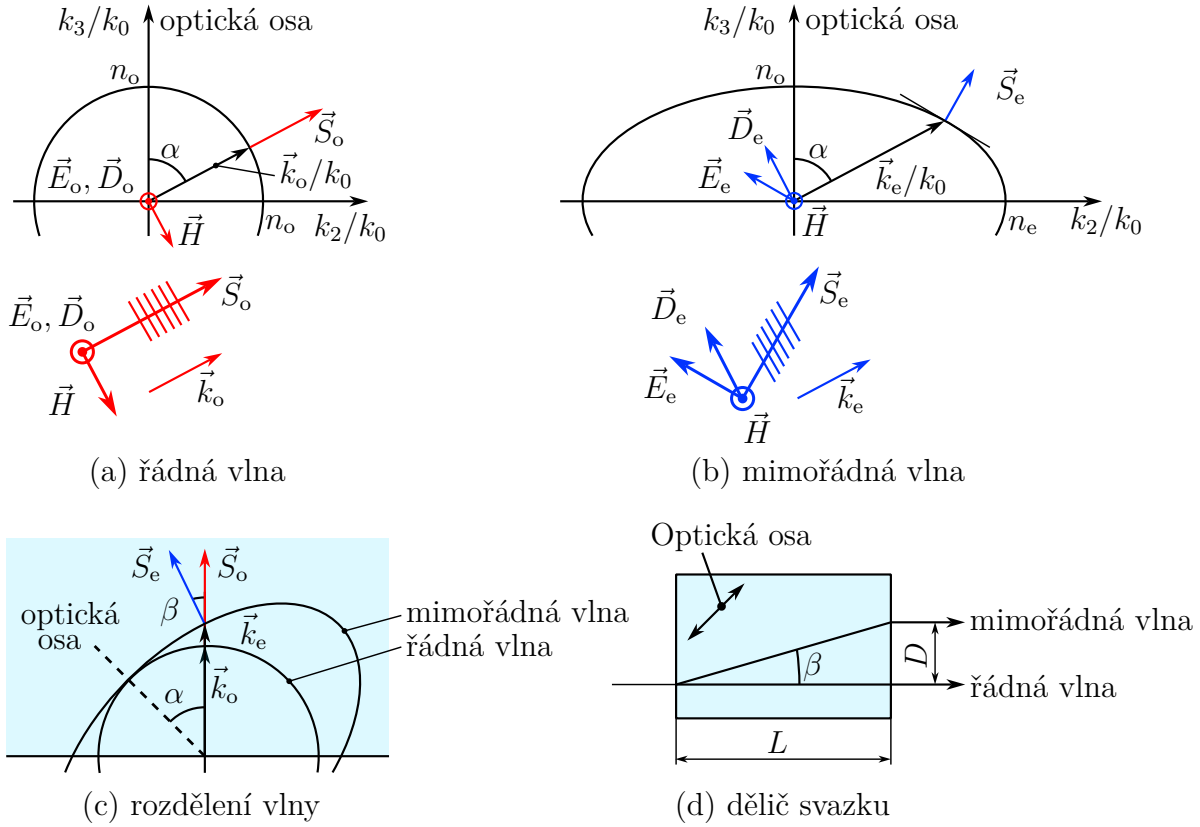


Obrázek 3.3: Řez k-povrchem pro řádnou a mimořádnou vlnu rovinou x_2 - x_3 .

netické intenzity $\vec{H}$. Zato Poyntingův vektor $\vec{S}$ je kolmý na vektor magnetické intenzity $\vec{H}$ a elektrické intenzity $\vec{E}$. U řádné vlny jsou vektory $\vec{E}_o$ a $\vec{D}_o$ rovnoběžné, stejně jako vektory $\vec{k}_o$ a $\vec{S}_o$. Situaci je možné vysvětlit graficky pomocí řezu k-povrchem, jak ukazuje obrázek 3.4(a). Směr Poyntingova vektoru, a tedy i směr šíření vlny je kolmý na tečnu k-povrchu určenou dopadovým úhlem vstupní vlny. Pro řádnou vlnu je řezem k-povrchem kružnice a Poyntingův vektor $\vec{S}_o$ je tedy vždy souběžný s vektorem $\vec{k}_o$ nezávisle na úhlu dopadu vstupní vlny. V případě mimořádné vlny ale vektory $\vec{E}_e$ a $\vec{D}_e$, a tím pádem ani $\vec{k}_e$ a $\vec{S}_e$, rovnoběžné obecně nejsou. Situaci je opět možné vysvětlit graficky pomocí obrázku 3.4(b). Řezem k-povrchem pro mimořádnou vlnu je elipsa. Poyntingův vektor $\vec{S}_e$ kolmý k tečně elipsy určené dopadovým úhlem vstupní vlny již obecně není souběžný s vektorem $\vec{k}_e$. Souběžnost Poyntingova vektoru $\vec{S}_e$ a vektoru $\vec{k}_e$ je splněna pouze pro vlnu dopadající ve směru rovnoběžném nebo kolmém na optickou osu anizotropního prostředí. Tímto způsobem dochází k úhlové separaci řádné a mimořádné vlny pod úhlem β . Tento úhel je závislý na úhlu, který svírá dopadající vlna s optickou osou anizotropního prostředí, jak je znázorněno na obrázku 3.4(c). Princip prostorové separace vstupní vlny do dvou kolmo polarizovaných svazků je využit v konstrukci děliče svazku zobrazeném na obrázku 3.4(d).

Krystal kalcitu, který je použitý v děliči svazku BD27, je negativně jednoosý anizotropní krystal. Indexy lomu n_o a n_e jsou závislé na vlnové délce dopadajícího světla. Tato závislost byla popsána disperzními vztahy v práci [20]. Na základě tohoto popisu byla v prostředí MATLAB vypočítána velikost prostorové separace svazků D v závislosti na vlnové délce λ , která je zobrazena v grafu 3.5(a). Model popsáný v [20] je platný v intervalu 204 nm až 2172 nm, separaci svazků pomocí krystalu kalcitu je tak možné použít nejen v celé oblasti viditelného světla, ale také v blízké infračervené oblasti. Pro He-Ne laser s vlnovou délkou $\lambda = 632,8$ nm, který byl v této práci uvažovaný jako zdroj světla, byl tento model propočítán podrobněji. Graf zobrazující řez k-povrchem pro řádnou a mimořádnou

3.2. PROSTOROVÁ SEPARACE SVAZKŮ KRYSTALEM KALCITU

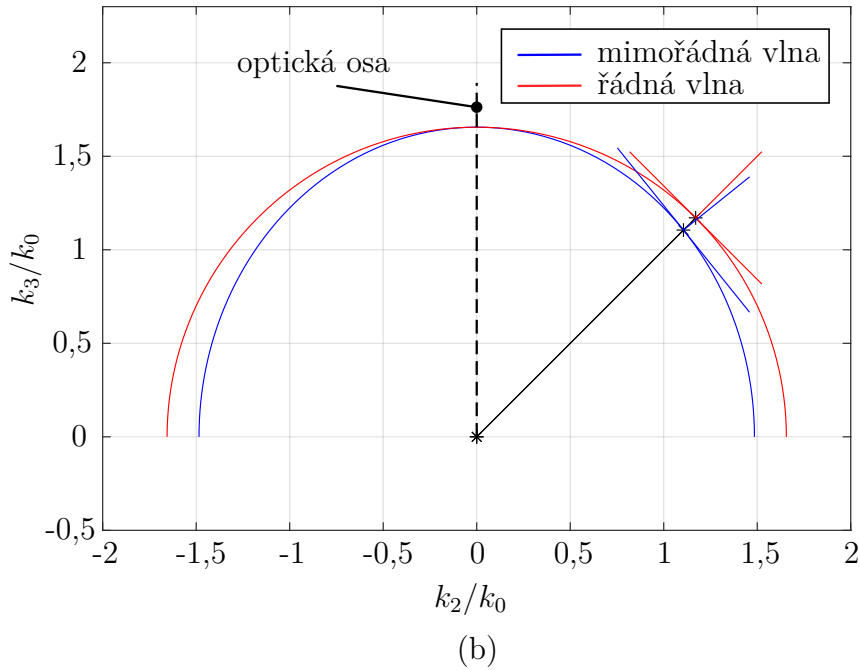
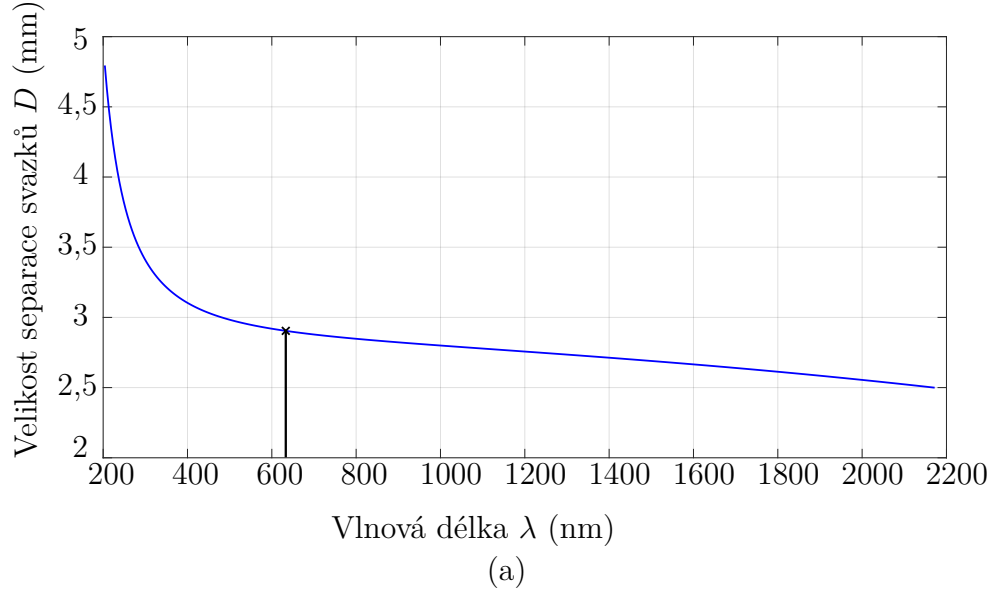


Obrázek 3.4: Schéma vektorů $\vec{E}$, $\vec{D}$, $\vec{H}$, $\vec{k}$ a $\vec{S}$ pro (a) řádnou a (b) mimořádnou vlnu v jednoosém anizotropním materiálu. (c) Princip rozdělení svazků pomocí jednoosého anizotropního krystalu. (d) Schéma děliče svazku tvořeného anizotropním krystalem.

vlnu rovinou $x_2 - x_3$, který byl vykreslen pro vlnovou délku $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, je zobrazen na obrázku 3.5(b). Indexy lomu zde mají hodnoty $n_o = 1,656$ a $n_e = 1,485$. Optická osa krystalu je v děliči natočená tak, že svírá s vektorem šíření vstupní vlny $\vec{v}$ úhel $\alpha = 45^\circ$. Řádná a mimořádná vlna tak pocítují indexy lomu $n_a = n_o = 1,656$ a $n_b(45^\circ) = 1,563$. Díky natočení krystalu pak svírají Poyntingovy vektory $\vec{S}_o$ a $\vec{S}_e$ úhel $\beta = 6,19^\circ$. Délka krystalu je podle výrobce $L = 26,8 \text{ mm}$. Lze tak vypočítat velikost separace svazků, která je rovna $D = 2,90 \text{ mm}$. Díky tomu, že řádná a mimořádná vlna jsou ovlivněny jinými indexy lomu, vzniká při separaci svazků rozdíl optických drah $\Delta = |n_a - n_b(45^\circ)| \cdot L = 2,47 \text{ mm}$. Tento dráhový rozdíl překonává koherenční délku většiny zdrojů a omezoval by zobrazení pouze na použití laserových zdrojů záření. Díky použití půlvlnné destičky za prvním krystalem, jak je ukázáno v rovnicích (3.6) a (3.7), je však dráhové zpoždění signální a referenční vlny kompenzované druhým děličem a zobrazení tak může pracovat se světelnými zdroji částečně koherentního světla.

Velikost separace D určuje maximální možný průměr svazku signální a referenční vlny. Při tomto průměru nedojde k jejich prostorovému překryvu a vlny tak budou při zobrazení vzájemně nezávislé. Svazky vystupující z anizotropního krystalu jsou dále přeneseny do roviny vzorku pomocí kolektoru a kondenzoru se zvětšením m_{osv} . Velikost zorného pole je

pak určena výrazem $d_{max} = D/m_{osv}$. Pro $m_{osv} = 10\times$ tak lze na jeden snímek zaznamenat objekt, který má nejvýše průměr $d_{max,10\times} = 0,29$ mm. Vzhledem k tomu, že navrhovaný mikroskop je určen pro zobrazování struktur do $100\text{ }\mu\text{m}$, nepředstavuje omezení velikosti zobrazovaného pole výrazný praktický problém.

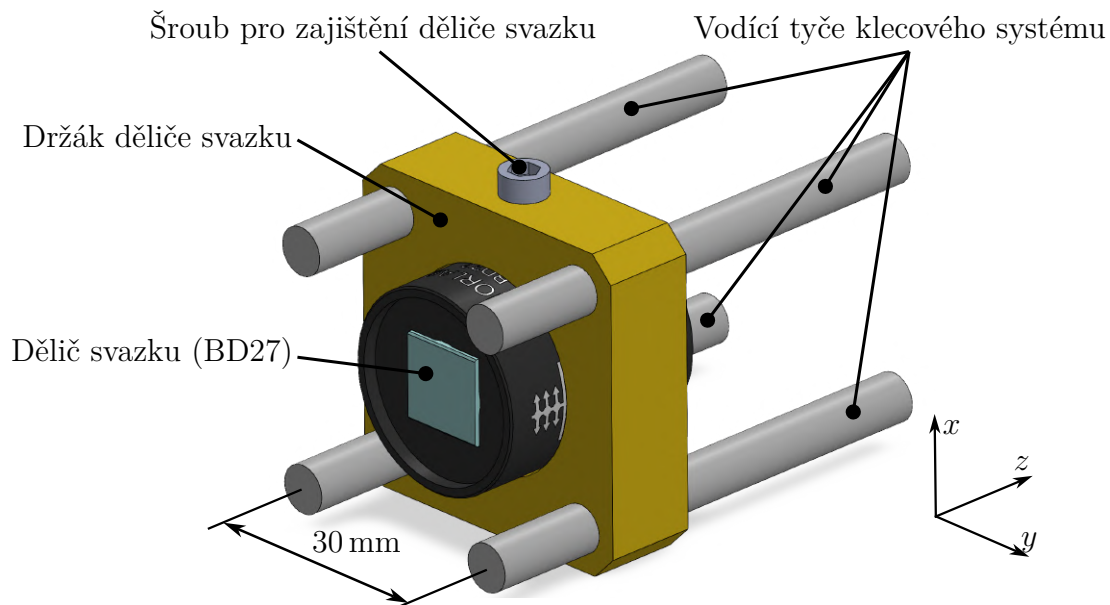


Obrázek 3.5: (a) Závislost velikosti separace svazků D na vlnové délce při úhlu $\alpha = 45^\circ$ mezi optickou osou a vektorem $\vec{k}$ s vyznačenou vlnovou délkou $\lambda = 632,8$ nm. (b) Řez k -povrchem pro řádnou a mimořádnou vlnu rovinou $x_2 - x_3$ pro vlnovou délku $\lambda = 632,8$ nm.

3.3. Konstrukční návrh mikroskopu Jamin-Lebedeff

Na základě teoretického návrhu bylo provedeno základní optické trasování za použití para-xiálních čoček v prostředí Ansys Zemax OpticStudio. Zde byla ověřena funkčnost návrhu a byla vytvořena 3D skica, která byla základem pro konstrukční návrh mikroskopu.

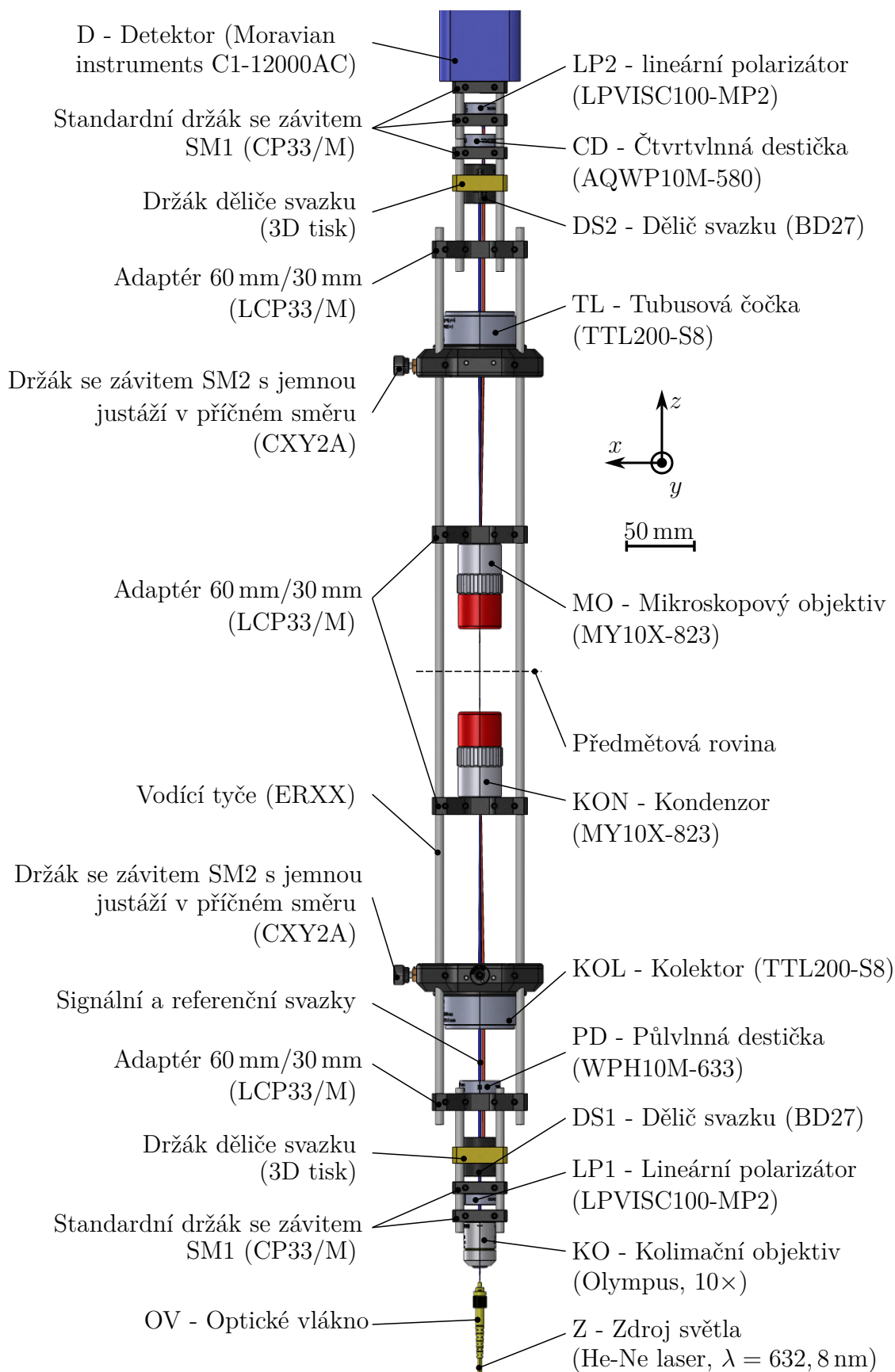
Konstrukční řešení bylo navrženo v prostředí SOLIDWORKS. Při návrhu byl využit koncept klecového systému od firmy Thorlabs, což je modulární systém umožňující snadnou konstrukci optických systémů. Optické komponenty jsou připevněny do polohovatelných uložení, kterými lze přesně nastavit polohu daného prvku. Uložení s optickými komponenty jsou pak spojeny s dalšími prvky pomocí vodících tyčí. Lze tak vytvořit velký systém, který je lehce naladitelný a modifikovatelný. Většina dílů byla zakoupena od firmy Thorlabs. Jako zdroj světla, optické vlákno, kolimátor a detektor byly použity komponenty od jiných výrobců. Pro dělič svazku nebylo možné najít vhodné uložení do klecového systému, bylo tedy nutné navrhnout vlastní řešení. Navržený díl byl poté vyroben pomocí 3D tisku. Navržený držák je zobrazený na obrázku 3.6.



Obrázek 3.6: Návrh držáku děliče svazku BD27 od firmy Thorlabs. Držák je navržen tak, aby umožnil rotaci děliče kolem osy z a translační pohyb kolem stejné osy. Dělič svazku s držákem jsou připevněny do systému pomocí vodících tyčí.

Na obrázku 3.7 je zobrazen model konstrukčního návrhu mikroskopu Jamin-Lebedeff s názvy dílů a jejich katalogovým označením. Pro uložení většiny optických komponent stačilo použít standardní držáky, které umožňují nastavení polohy jen ve směru osy z . Pro nedostatečnou přesnost uložení kolektoru a tubusové čočky musely být tyto komponenty uloženy do držáků, které umožňují kromě nastavení polohy podél osy z také přesné nastavení ve směrech x a y . Uložení vzorku, který je vložen do předmětové roviny, je provedeno pomocí stolku, který je uložen mimo klecový systém a který umožňuje translační pohyb vzorku ve všech třech směrech.

3. MIKROSKOP JAMIN-LEBEDEFF



Obrázek 3.7: Model konstrukčního řešení mikroskopu Jamin-Lebedeff vytvořený v prostředí SOLIDWORKS s popisem jednotlivých dílů.

3.4. Experimentální ověření funkčnosti mikroskopu Jamin-Lebedeff

Sestava mikroskopu Jamin-Lebedeff byla podle modelu sestavena a seřizena. Sestavený systém je zobrazen na obrázku 3.8. Jako zdroj světla je použit He-Ne laser, který se vyznačuje vysokou časovou i prostorovou koherencí, což usnadňuje seřízení celého optického systému. Výstupní svazek laseru je navázán do optického vlákna OV, jehož druhý konec je upevněn do klecového systému v místě přední ohniskové roviny kolimační čočky KO s ohniskovou vzdáleností $f_{KO} = 18$ mm. Výsledkem je bodový zdroj světla, které je kolimační čočkou transformováno na rovinnou vlnu. Kolimované světlo následně prochází lineárním polarizátorem LP1, jehož propustný směr je orientován pod úhlem 45° vůči ose x . Vytvoří se tak diagonálně polarizované světlo, které vstupuje do děliče svazku DS1, tvořeného anizotropním krystalem kalcitu. Zde dochází ke vzniku dvou prostorově oddělených svazků, přičemž signální vlna je polarizovaná ve směru osy x a referenční vlna je polarizovaná ve směru osy y . Díky vhodné orientaci lineárního polarizátoru LP1 mají obě vlny shodné amplitudy. Obě polarizace dále prochází půlvlnnou destičkou PD, která převádí směr polarizace signální vlny ze směru osy x do směru osy y , respektive směr polarizace referenční vlny ze směru osy y do směru osy x . Upravené vlny jsou dále zaostřeny do zadní ohniskové roviny kolektoru KOL s ohniskovou vzdáleností $f_{KOL} = 200$ mm. Tato rovina je shodná s přední ohniskovou rovinou kondenzoru KON s ohniskovou vzdáleností $f_{KON} = 20$ mm, který následně obě vlny transformuje na rovinné. Takto vytvořené rovinné vlny rovnoměrně osvětlí části předmětové roviny odpovídající sledovanému vzorku, resp. referenčnímu vzorku zastoupenému prázdnou částí zorného pole.

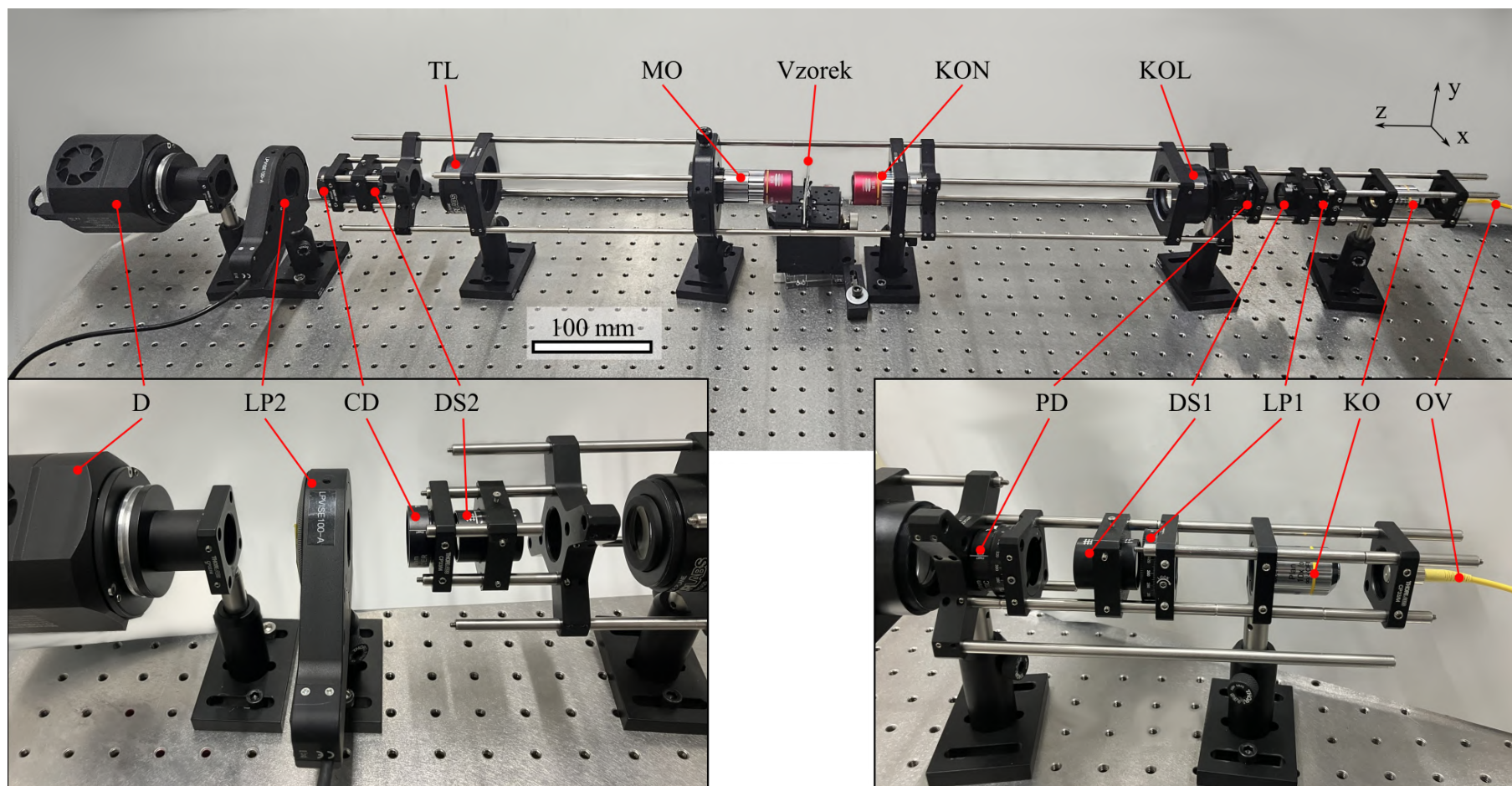
V předmětové rovině dochází k fázovým změnám signální a referenční vlny v důsledku jejich průchodu příslušnými vzorky. Předmětová rovina je shodná s přední ohniskovou rovinou mikroskopového objektivu MO, který je identický s kondenzorem KON a má tedy shodnou ohniskovou vzdálenost. Mikroskopový objektiv MO zobrazí oba vzorky do nekonečna. Výsledný obraz pak vzniká v zadní ohniskové rovině tubusové čočky TL, která je shodná s kolektorem KOL. Do této roviny je umístěný také detektor D. Před dopadem na detektor procházejí signální a referenční vlna druhým děličem svazku DS2, který obě vlny prostorově sjednotí. Následně procházejí čtvrtvlnnou destičkou CD, která převede jejich kolmé lineární polarizace na opačné kruhové polarizace. Světlo dále pokračuje přes lineární polarizátor LP2, který je oproti původnímu konstrukčnímu modelu uložen v motorizovaném otočném držáku s označením PRM1/MZ8 od firmy Thorlabs. Na detektoru D signální a referenční vlna interferují a vzniká tím hologram sledovaného vzorku. Jako detektor byla použita kamera C1-12000AC od firmy Moravian instruments, vybavená čipem o rozměrech $14,186 \times 10,378$ mm.

Jako testovací vzorky byly použity lidské epitetální buňky, které jsou obsaženy v lidských slinách. Nejprve byly pořízeny čtyři hologramy I_j , u kterých došlo ke krokování fáze

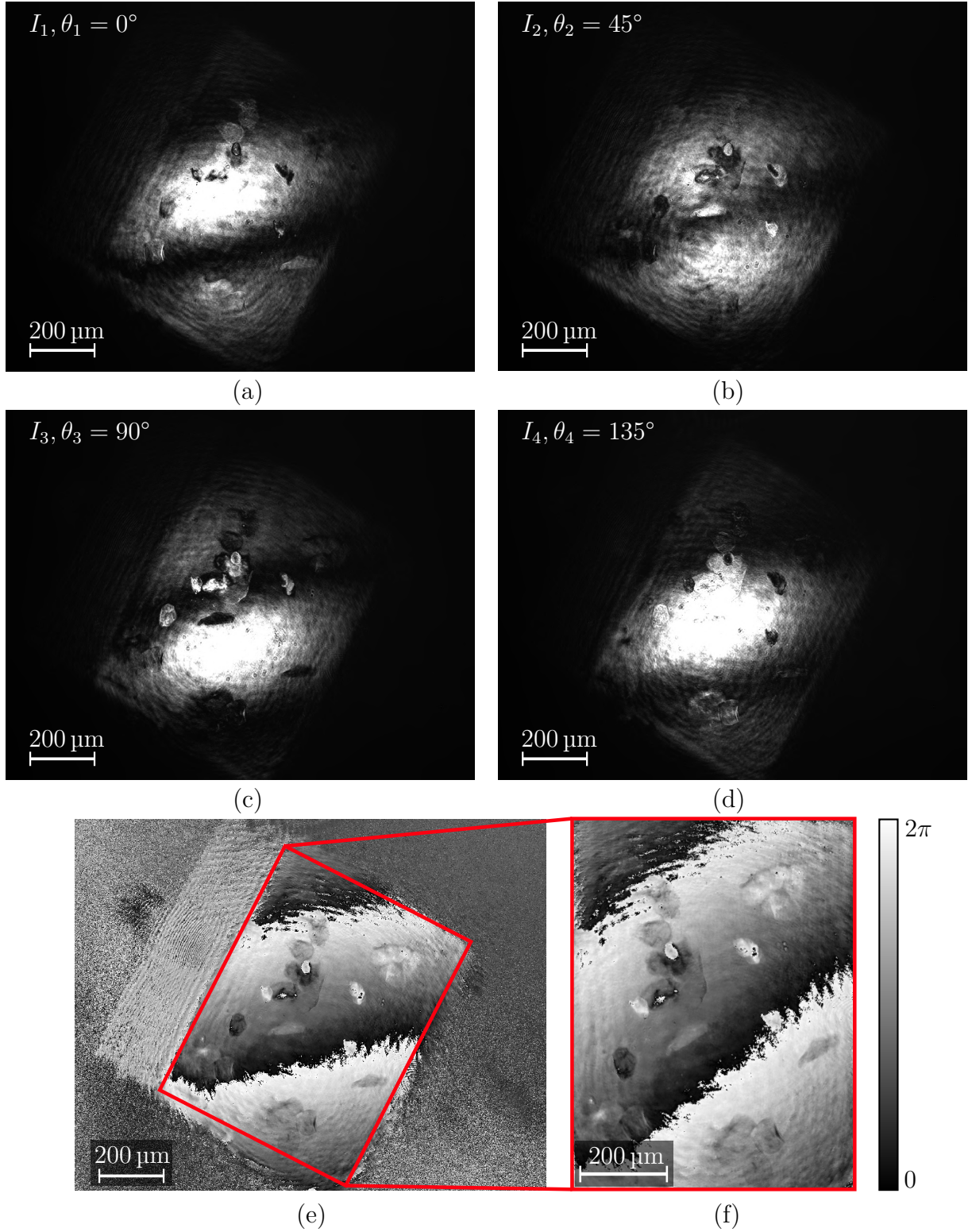
pomocí postupného natáčení lineárního polarizátoru podle vztahu (3.19). Zaznamenané obrazy jsou zobrazeny na obrázcích 3.9(a)-(d). Na těchto snímcích je vidět, že zobrazované pole pokrývá jen část čipu detektoru. Pomocí vztahu (1.5) byla z těchto hologramů provedena rekonstrukce fáze, která je zobrazena na obrázku 3.9(e). Na obrázku 3.9(f) je zobrazena zvětšená a ořízlá část zobrazovaného pole. Rekonstruovaná fáze se mění v plném rozsahu 0 až 2π rad a v obraze jsou jasně patrné fázové změny vnesené zobrazovaným vzorkem.

Obraz byl kvůli použití vysoce koherentního zdroje zatížen parazitními interferencemi, které snižovaly rozlišení a celkovou kvalitu fázového obrazu. Za účelem zlepšení kvality obrazu byla mezi zdroj světla a kolimační čočku vložena rotující matnice. Rotující matnice se chová jako plošný, prostorově nekoherentní zdroj osvětlení, který eliminuje parazitní interference. Současně však zachovává vysokou časovou koherenci laserového záření výhodnou pro snadné seřízení sestavy. Kvůli tomu, že matnice částečně pohlcovala světlo, bylo nutné také použít výkonnější laser, za kterým nebylo světlo vyvedeno do optického vlákna. S využitím zdroje světla se sníženou prostorovou koherencí byly opět pořízeny čtyři hologramy I_j , které lze vidět na obrázcích 3.10(a)-(d). Z těchto hologramů byla opět provedena rekonstrukce fáze podle vztahu (1.5). Výsledná rekonstrukce fáze je zobrazena na obrázku 3.10(e) a její zvětšený detail se zobrazovanou fází na obrázku 3.10(f).

Na obrázcích 3.9(e) a 3.10(e) je zjevně viditelná změna fáze způsobená fázovými objekty. Z porovnání obrázků je také jasně patrné zvýšení kvality fázové rekonstrukce související se snížením prostorové koherence osvětlení. Na základě prezentovaných výsledků lze prohlásit, že sestavený mikroskop Jamin-Lebedeff je funkční a připravený pro připojení geometricko-fázového modulu, který zajistí jednosnímkovou fázovou rekonstrukci.

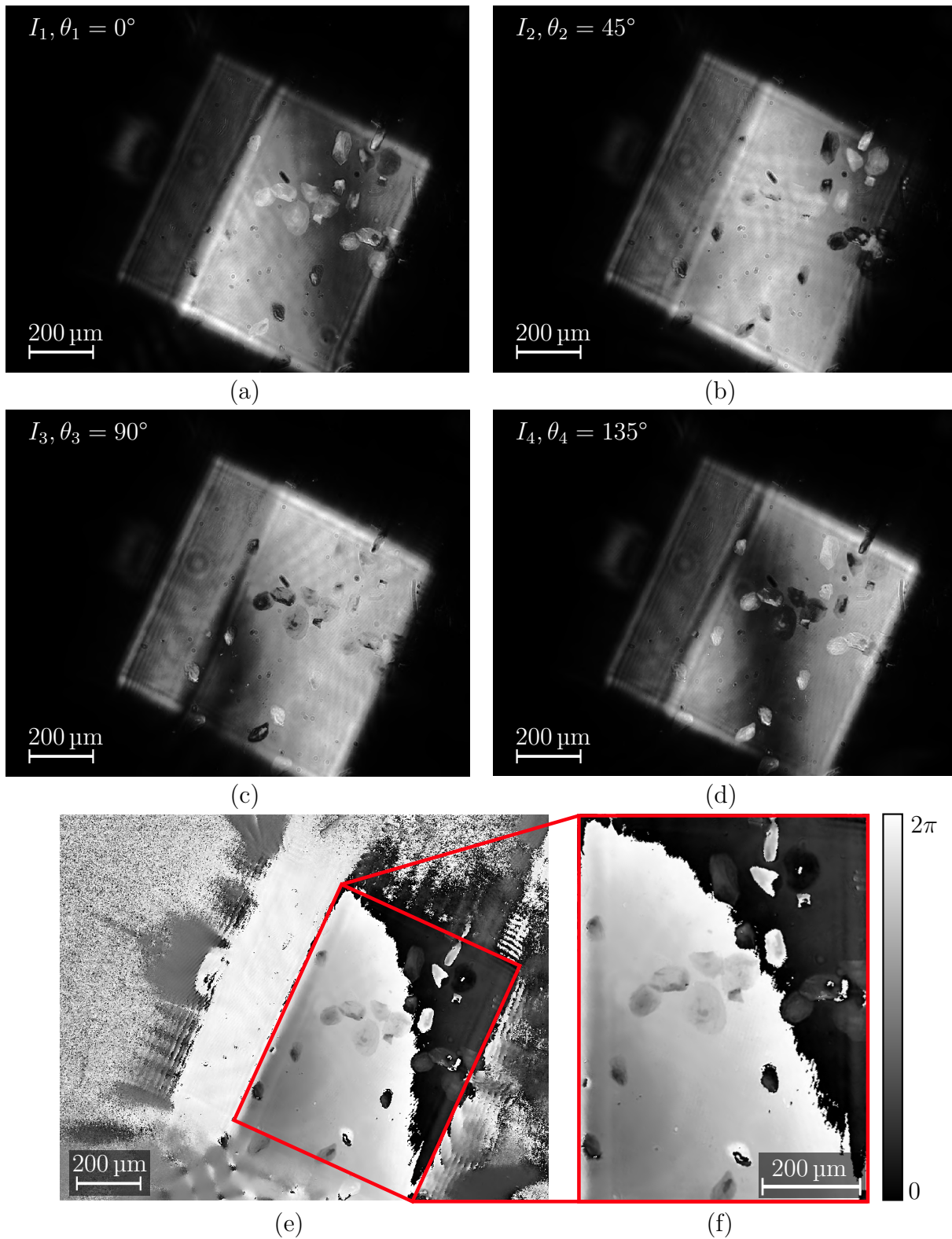


Obrázek 3.8: Fotografie sestavy mikroskopu Jamin-Lebedeff s popisem a detaily jejich podsoučástí. OV - optické vlákno, KO - kolimační čočka, LP1, LP2 - lineární polarizátor, DS1, DS2 - dělič svazků, PD - půlvlnná destička, KOL - kolektor, KON - kondenzor, MO - mikroskopový objektiv, TL - tubusová čočka, CD - čtvrtvlnná destička, D - detektor.



Obrázek 3.9: Hologramy lidských epitelálních buněk zaznamenané při krokování fáze pomocí rotace lineárního polarizátoru o úhel (a) $\theta_1 = 0^\circ$, (b) $\theta_2 = 45^\circ$, (c) $\theta_3 = 90^\circ$ a (d) $\theta_4 = 135^\circ$ vůči ose x podle rovnice 3.19. Hologramy byly pořízené za použití světelného zdroje s vysokou časovou i prostorovou koherencí. (e) Rekonstrukce fáze vypočítaná z pořízených obrazů (a) až (d) podle rovnice 1.5 a (f) ořízlý detail.

3.4. EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ FUNKČNOSTI MIKROSKOPU JAMIN-LEBEDEFF



Obrázek 3.10: Hologramy lidských epitelálních buněk zaznamenané při krokování fáze pomocí rotace lineárního polarizátoru o úhel (a) $\theta_1 = 0^\circ$, (b) $\theta_2 = 45^\circ$, (c) $\theta_3 = 90^\circ$ a (d) $\theta_4 = 135^\circ$ vůči ose x podle rovnice 3.19. Hologramy byly pořízeny za použití světelného zdroje s vysokou časovou koherencí, kdy prostorová koherence byla snížena pomocí rotující matrice. (e) Rekonstrukce fáze vypočítaná z pořízených obrazů (a) až (d) podle rovnice 1.5 a (f) ořízlý detail.

4. Geometricko-fázový modul

Po úspěšném ověření funkčnosti mikroskopu Jamin-Lebedeff bylo možné testovat jeho použití v kombinaci s geometricko-fázovým holografickým modulem. Geometricko-fázový holografický modul je jednoduchý zobrazovací modul obsahující geometricko-fázovou mřížku, která slouží jako difraktivní dělič pro kruhově polarizované světlo. Použití modulu v kombinaci s mikroskopem Jamin-Lebedeff umožňuje záznam mimoosového hologramu, což zaručuje jednosnímkovou rekonstrukci fáze. Návrhem geometricko-fázové mřížky a sestavením geometricko-fázového modulu pracujícího v infračervené oblasti se zabývá diplomová práce Ing. Michala Schlora [21]. V navrhovaném systému bude použit modul pracující ve viditelné oblasti spektra, který je již sestaven v laboratoři Experimentální biofotoniky na ústavu fyzikálního inženýrství fakulty strojního inženýrství VUT v Brně. V této kapitole bude nejprve proveden teoretický popis geometricko-fázové mřížky a geometricko-fázového holografického modulu navazujícího na mikroskop Jamin-Lebedeff. Funkčnost kombinace mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového modulu bude následně experimentálně ověřena.

4.1. Princip geometricko-fázové modulace světla

Geometricko-fázový holografický modul je založený na použití geometricko-fázové mřížky, která funguje jako polarizačně citlivá difrakční mřížka. Geometricko-fázová mřížka je v laboratoři Experimentální biofotoniky dostupná ve formě optického prvku z polymerních kapalných krystalů a geometricko-fázového metapovrchu. V této práci je využita mřížka z polymerních kapalných krystalů, která je optimalizovaná pro použití ve viditelné oblasti. Mřížka ve formě metapovrchu je pak využitelná v plánovaných experimentech v infračervené oblasti.

Polymerní kapalně krystaly tvořící stavební bloky geometricko-fázové mřížky lze obecně považovat za anizotropní prostředí s jednoosým dvojlomem. Jonesova matice charakterizující takové prostředí má tvar

$$M_M = \begin{bmatrix} \cos^2 \Theta + e^{i\eta} \sin^2 \Theta & (1 - e^{i\eta}) \cos \Theta \sin \Theta \\ (1 - e^{i\eta}) \cos \Theta \sin \Theta & \sin^2 \Theta + e^{i\eta} \cos^2 \Theta \end{bmatrix}, \quad (4.1)$$

kde η je obecná retardace a Θ je natočení osy anizotropie. Pro dosažení maximální účinnosti geometricko-fázové modulace je vyžadovaná retardace odpovídající půlvlnné destičce, pro kterou platí $\eta = \pi$. Matice z rovnice (4.1) pak přejde do tvaru

$$M_{M,\lambda/2} = \begin{bmatrix} \cos^2 \Theta - \sin^2 \Theta & 2 \cos \Theta \sin \Theta \\ 2 \cos \Theta \sin \Theta & \sin^2 \Theta - \cos^2 \Theta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos 2\Theta & \sin 2\Theta \\ \sin 2\Theta & -\cos 2\Theta \end{bmatrix}. \quad (4.2)$$

4.1. PRINCIP GEOMETRICKO-FÁZOVÉ MODULACE SVĚTLA

Kruhově polarizované světlo je půlvlnnou destičkou transformované na opačnou kruhovou polarizaci. Při této polarizační transformaci také dochází ke změně geometrické fáze světla, závislé na úhlové orientaci půlvlnné destičky Θ . To lze demonstrovat na světle s levotočivou a pravotočivou kruhovou polarizací

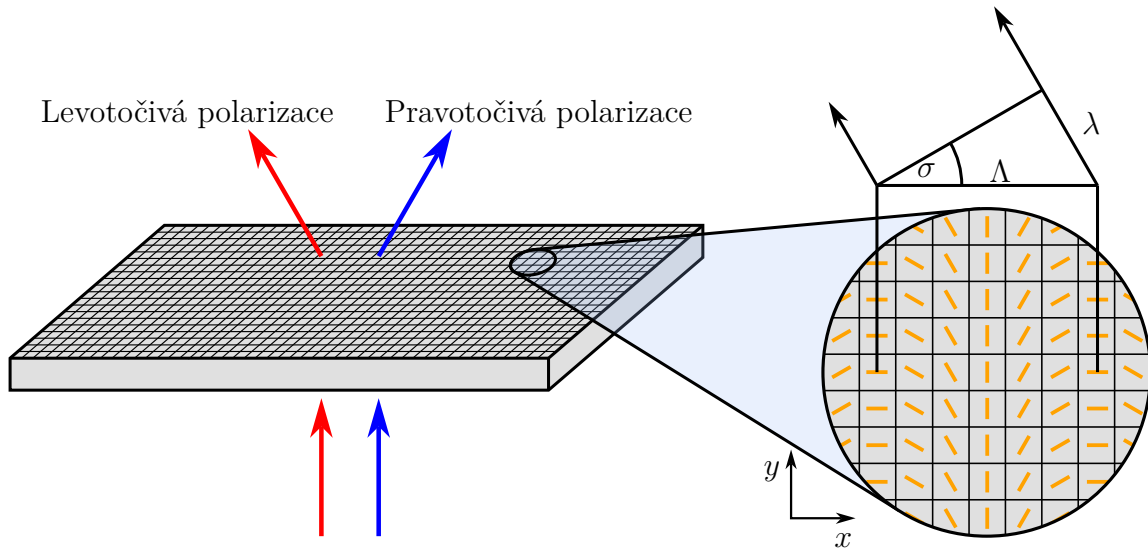
$$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} \cos 2\Theta & \sin 2\Theta \\ \sin 2\Theta & -\cos 2\Theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} \cos 2\Theta + i \sin 2\Theta \\ \sin 2\Theta - i \cos 2\Theta \end{bmatrix} = \frac{e^{i2\Theta}}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix}, \quad (4.3)$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} \cos 2\Theta & \sin 2\Theta \\ \sin 2\Theta & -\cos 2\Theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} \cos 2\Theta - i \sin 2\Theta \\ \sin 2\Theta + i \cos 2\Theta \end{bmatrix} = \frac{e^{-i2\Theta}}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix}. \quad (4.4)$$

Z rovnic (4.3) a (4.4) je vidět, že změna fáze je pro opačné vstupní kruhové polarizace komplexně sdružená. Pro prvek se stejnou orientací osy anizotropie v celém jeho objemu je změna fáze konstantní. Pokud je ale technologicky možné vyrobit optický prvek tvořený z půlvlnných destiček s prostorově proměnnou osou anizotropie $\Theta(x, y)$, je možné ho využít k tvarování světla, protože prostorově proměnné budou i změny geometrické fáze. Vhodným uspořádáním půlvlnných destiček je pak možné světlo tvarovat libovolným způsobem. Prostorové uspořádání půlvlnných destiček, které způsobí úhlový odklon světla o úhel σ , je zobrazeno na obrázku 4.1. Požadované úhlové odklonění lze vyjádřit vztahem

$$\sigma = \arcsin \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (4.5)$$

kde λ je vlnová délka procházejícího světla a Λ je perioda mřížky, která odpovídá vzdálenosti, na které se změní orientace osy anizotropie půlvlnných destiček o 180° . Aby



Obrázek 4.1: Schéma geometricko-fázové mřížky a fungující jako polarizačně citlivá difrakční mřížka. Díky dané prostorově proměnné orientaci osy anizotropie lokálních půlvlnných destiček vzniká pro vlny s opačnou kruhovou polarizací opačný úhlový odklon od optické osy zobrazovacího systému. Oranžové čáry v detailu představují směr osy anizotropie jednotlivých půlvlnných destiček.

došlo k separaci vln pod úhlem σ ve směru osy x , je nutné, aby funkce popisující natočení osy anizotropie na mřížce měla tvar

$$\Theta(x, y) = kx \sin(\sigma), \quad (4.6)$$

kde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ je vlnové číslo. Jonesovu matici popisující geometricko-fázovou mřížku pak lze napsat ve tvaru

$$M_{M,\lambda/2} = \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{4\pi x}{\Lambda}\right) & \sin\left(\frac{4\pi x}{\Lambda}\right) \\ \sin\left(\frac{4\pi x}{\Lambda}\right) & -\cos\left(\frac{4\pi x}{\Lambda}\right) \end{bmatrix}. \quad (4.7)$$

4.2. Teoretický popis zobrazení geometricko-fázovým modulem

V navrhovaném systému geometricko-fázový modul navazuje na mikroskop Jamin-Lebedeff. Z mikroskopu je odstraněn lineární polarizátor a detektor. Modul je umístěn v pozici, kdy je geometricko-fázová mřížka umístěna do zadní ohniskové roviny tubusové čočky. Světlo dopadající na geometricko-fázovou mřížku jsou pak vlny $\vec{w}_{S,1} = \vec{u}_{S,5}$ a $\vec{w}_{R,1} = \vec{u}_{R,5}$, které mají tvar odvozený v kapitole 3.1

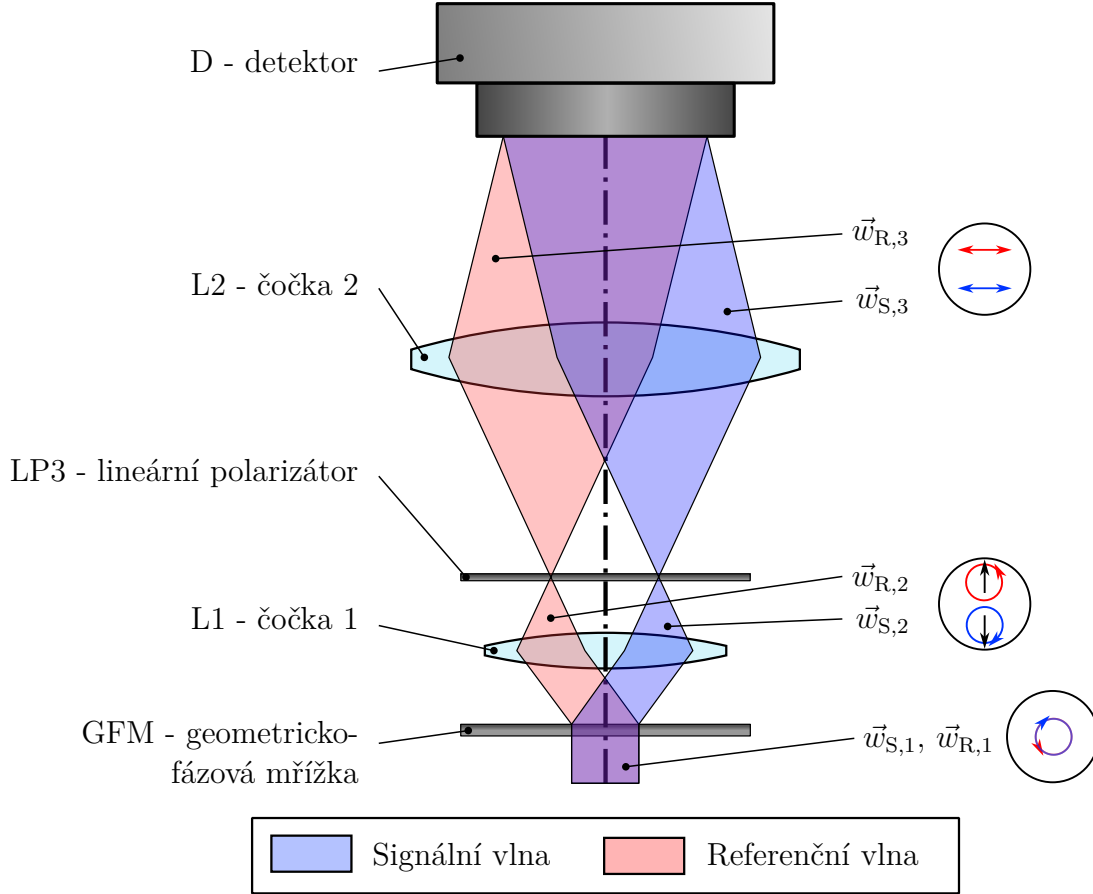
$$\vec{w}_{S,1} = \vec{u}_{S,5} = \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix}, \quad (4.8)$$

$$\vec{w}_{R,1} = \vec{u}_{R,5} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix}. \quad (4.9)$$

Schéma geometricko-fázového modulu je zobrazeno na obrázku 4.2. Signální a referenční vlna nejprve prochází geometricko-fázovou mřížkou, která je umístěna v přední ohniskové rovině čočky L1. Jonesova matice geometricko-fázové mřížky je popsána rovnicí (4.7) v kapitole 4.1. Signální a referenční vlna průchodem přes geometricko-fázovou mřížku změni své kruhové polarizace na opačné. S touto polarizační transformací je spojena změna fáze související s prostorovým uspořádáním osy anizotropie lokálních půlvlnných destiček tvořících mřížku (4.6). Signální a referenční vlna může být po průchodu geometricko-fázovou mřížkou zapsaná pomocí rovnic

$$\begin{aligned} \vec{w}_{S,2} = \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) & \sin\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) \\ \sin\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) & -\cos\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} = \\ \frac{-i \cdot a_S(x', y')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x', y')} \cdot e^{i\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right)} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix}, \end{aligned} \quad (4.10)$$

4.2. TEORETICKÝ POPIS ZOBRAZENÍ GEOMETRICKO-FÁZOVÝM MODULEM



Obrázek 4.2: Schéma geometricko-fázového modulu. Signální a referenční vlna jsou barevně kódované. Barevné kódování je přeneseno i do označení polarizačních stavů vln $w_{S,1-3}$ a $w_{R,1-3}$ v jednotlivých krocích zobrazovaného procesu. Označení vln $w_{S,1-3}$ a $w_{R,1-3}$ odpovídá značení v teoretickém popisu.

$$\vec{w}_{R,2} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) & \sin\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) \\ \sin\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) & -\cos\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \cdot e^{-i\left(\frac{4\pi x'}{\Lambda}\right)} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix}. \quad (4.11)$$

Fázový člen $e^{\pm 4i\pi x'/\Lambda}$ vytvořený u obou vln zajišťuje jejich vzájemnou úhlovou separaci. Po průchodu geometricko-fázovou mřížkou procházejí obě vlny první čočkou L1, lineárním polarizátorem a druhou čočkou L2. Čočky L1 a L2 tvoří 4f systém a se zvětšením odpovídajícím poměru jejich ohniskových vzdáleností přenesou výstupní rovinu mikroskopu Jamin-Lebedeff sjednocenou s rovinou geometricko-fázové mřížky až na detektor, kde vytvoří výsledný zvětšený obraz. Při zanedbání vlivu difrakce a uvažování dokonalého bodového zobrazení lze zvětšení popsat transformací souřadnic podle vztahů $x'' = m_M \cdot x'$ a $y'' = m_M \cdot y'$, kde m_M je příčné zvětšení způsobené čočkami L1 a L2. Lineární polarizátor, který je vložený mezi čočky L1 a L2, projektuje obě kruhové polarizace do stejného

kmitosměru a umožňuje tak jejich interferenci. Jonesova matice lineárního polarizátoru, jehož propustný směr je rovnoběžný s osou x , má tvar

$$M_{LP,M} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}. \quad (4.12)$$

Vlny dopadající na detektor po průchodu čočkami a lineárním polarizátorem nabývají tvarů

$$\vec{w}_{S,3} = \frac{-i \cdot a_S(x'', y'')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x'', y'')} \cdot e^{-i\left(\frac{4\pi x''}{\Lambda'}\right)} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix} =$$

$$\frac{-i \cdot a_S(x'', y'')}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_S(x'', y'')} \cdot e^{-i\left(\frac{4\pi x''}{\Lambda'}\right)} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4.13)$$

$$\vec{w}_{R,3} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \cdot e^{i\left(\frac{4\pi x''}{\Lambda'}\right)} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} = \frac{a_R}{\sqrt{2}} \cdot e^{i\gamma} \cdot e^{i\phi_R} \cdot e^{i\left(\frac{4\pi x''}{\Lambda'}\right)} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4.14)$$

kde $\Lambda' = m_M \cdot \Lambda$ je zvětšená perioda mřížky. V rovině detektoru pak dochází k interferenci signální a referenční vlny a vzniká zde interferenční obraz. Výsledná intenzita v rovině detektoru je popsána vztahem

$$I = |\vec{w}_{S,3} + \vec{w}_{R,3}|^2 = (\vec{w}_{S,3} + \vec{w}_{R,3})^\dagger \cdot (\vec{w}_{S,3} + \vec{w}_{R,3}) =$$

$$= \vec{w}_{S,3}^\dagger \cdot \vec{w}_{S,3} + \vec{w}_{R,3}^\dagger \cdot \vec{w}_{R,3} + \vec{w}_{S,3}^\dagger \cdot \vec{w}_{R,3} + \vec{w}_{R,3}^\dagger \cdot \vec{w}_{S,3} =$$

$$= \frac{a_S^2(x'', y'')}{2} + \frac{a_R^2}{2} + \frac{ia_S(x'', y'')a_R}{2} \left\{ e^{-i\left[\frac{8\pi x''}{\Lambda'} + (\phi_S(x'', y'') - \phi_R)\right]} - e^{i\left[\frac{8\pi x''}{\Lambda'} + (\phi_S(x'', y'') - \phi_R)\right]} \right\} =$$

$$= \frac{a_S^2(x'', y'')}{2} + \frac{a_R^2}{2} + a_S(x'', y'')a_R \sin \left[\frac{8\pi x''}{\Lambda'} + (\phi_S(x'', y'') - \phi_R) \right], \quad (4.15)$$

což odpovídá rovnici (1.6), přičemž prostorová frekvence je rovna $\alpha = \frac{8\pi}{\Lambda'}$. Informace o fázové změně způsobené vzorkem je zakódovaná v hologramu s prostorovou nosnou frekvencí a projevuje se jako deformace interferenčních proužků tvořících nosnou prostorovou frekvenci. Pro rekonstrukci fázového obrazu je nutné provést jeho zpracování pomocí Fourierovských metod. Při této proceduře je provedena Fourierova transformace hologramu. Ve spektru prostorových frekvencí, dojde díky prostorové nosné frekvenci k prostorové separaci intenzitních a dvou interferenčních členů z rovnice (4.15). Za tuto separaci jsou zodpovědné fázové členy $e^{\pm 8i\pi x''/\Lambda'}$. Výřezem pouze jednoho interferenčního členu, jeho umístěním do středu spektra prostorových frekvencí a provedením zpětné Fourierovy transformace je získána rekonstrukce hologramu. Rekonstruovaný hologram odpovídá komplexní amplitudě

$$H = a_S(x'', y'')a_R \cdot e^{i[(\phi_S(x'', y'') - \phi_R)]}, \quad (4.16)$$

4.3. MIKROSKOP JAMIN-LEBDEFF S GEOMETRICKO-FAZOVÝM MODULEM

kde došlo k odstranění fázové funkce $e^{8i\pi x''/\Lambda'}$ posunem do středu spektra prostorových frekvencí. Z funkce H je možné rekonstruovat amplitudu hologramu jako $A_H = |H|$ nebo fázi $\Delta\phi = \arg(H)$, kde $\Delta\phi = \phi_S(x'', y'') - \phi_R$.

4.3. Mikroskop Jamin-Lebedeff s geometricko-fázovým modulem

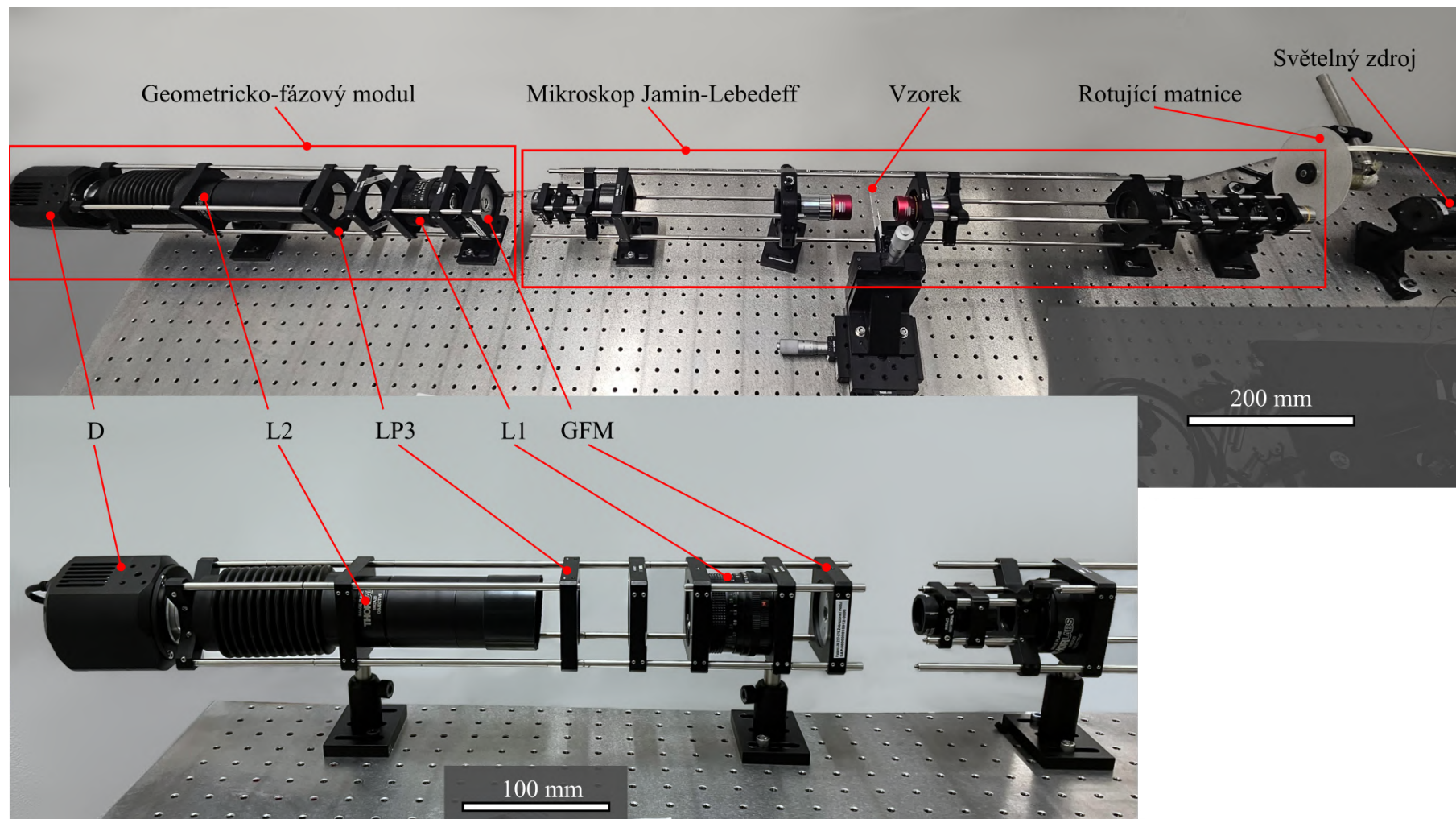
Pro potřebu finálních experimentů byl geometricko-fázový holografický modul připojen k mikroskopu Jamin-Lebedeff. Výsledný systém je zobrazen na obrázku 4.3. Pro ověření funkčnosti systému byl opět použit zdroj světla tvořený He-Ne laserem a rotující matnicí. Tento zdroj se chová jako prostorově nekoherentní zdroj osvětlení, ale současně si zachovává vysokou časovou koherenci laserového záření. Světlo ze zdroje postupuje přes mikroskop Jamin-Lebedeff, jehož podrobné konstrukční řešení je popsáno v kapitole 3.4. Před napojením geometricko-fázového modulu byly ze sestavy mikroskopu odstraněny lineární polarizátor LP2 a detektor D. Výstupem mikroskopu jsou tak dva svazky odpovídající signální a referenční vlně, které mají opačné kruhové polarizace. V zadní ohniskové rovině tubusové čočky TL vzniká obraz sledovaného vzorku, resp. referenčního vzorku. Vzhledem k ortogonální polarizaci však v této rovině nedochází k interferenci svazků. Světlo následně vstupuje do geometricko-fázového modulu.

Konstrukční řešení geometricko-fázového modulu využívá, stejně jako řešení mikroskopu Jamin-Lebedeff, klecový systém od firmy Thorlabs. Geometricko-fázová mřížka, umístěná do zadní ohniskové roviny tubusové čočky TL, úhlově separuje opačné kruhové polarizace. Obě vlny dále procházejí čočkou L1 s ohniskovou vzdáleností $f_{L1} = 50$ mm, která vytvoří obraz vzorků v nekonečnu. Za čočkou L1 je v modulu umístěný lineární polarizátor, který převede obě kruhové polarizace do stejného kmitosměru. Takto lineárně sjednocené vlny dále procházejí přes čočku L2 s ohniskovou vzdáleností $f_{L2} = 200$ mm, která vytvoří výsledný obraz v její zadní ohniskové rovině. V této rovině je umístěn detektor D. Jako detektor byla opět použita kamera C1-12000AC od firmy Moravian instruments. Díky shodné lineární polarizaci obou vln dochází k jejich interferenci, čímž vzniká mimoosový hologram s prostorovou nosnou frekvencí.

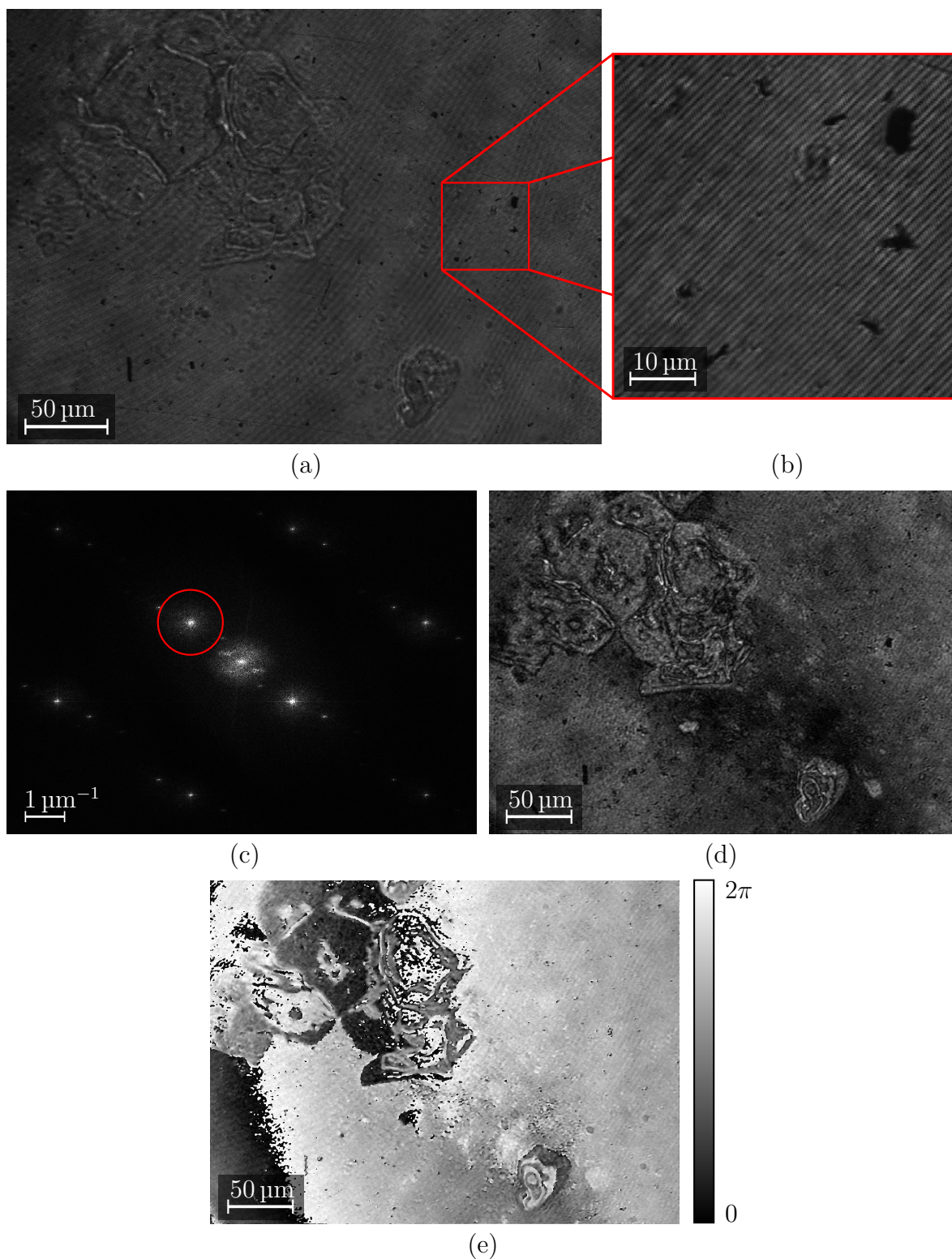
K experimentálnímu ověření funkčnosti systému byly použity lidské epitelární buňky, obsažené v lidských slinách. Výsledný hologram je zachycen na obrázku 4.4(a). Po zvětšení lze na tomto snímku pozorovat rychle se měnící interferenční proužky, které odpovídají prostorové nosné frekvenci, typické pro mimoosovou holografii. Tato modulace je vidět v detailu hologramu na obrázku 4.4(b). Pro zpracování obrazu byl v prostředí MATLAB vytvořen jednoduchý program. Nejprve byl hologram pomocí 2D rychlé Fourierovy transformace převeden do spektra prostorových frekvencí. Získané spektrum prostorových frekvencí je zobrazeno na obrázku 4.4(c). Ve středu spektra leží intenzitní členy z rovnice

(4.15), které jsou neovlivněny prostorovou nosnou frekvencí. Interferenční členy jsou posunuty diagonálně mimo oblast intenzitních členů. Tento posun je určený komplexně sdruženými členy $e^{\pm 8i\pi x''/\Lambda'}$ v rovnici (4.15). V experimentálních datech je posun diagonální namísto posunu ve směru osy x'' , protože byla zvolena jiná orientace difrakční mřížky než v teoretickém modelu. Ze spektra prostorových frekvencí byla následně separovaná vyznačená oblast odpovídající jednomu z interferenčních členů. Nosná frekvence odpovídá středu této oblasti a v jejím okolí je obsažena informace o amplitudových a fázových změnách vnesených zobrazovaným vzorkem. Po vyříznutí byla tato oblast posunuta do středu spektra prostorových frekvencí. Zpětnou 2D rychlou Fourierovou transformací byla získána komplexní amplituda rekonstruovaného hologramu a z ní následně amplitudový a kvantitativní fázový obraz, které jsou zobrazené na obrázcích 4.4(d) a 4.4(e).

Na obrázku 4.4(e) je patrná změna fáze způsobená přítomností fázových objektů. Na základě prezentovaných výsledků lze prohlásit, že navržený systém složený z mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového modulu, je funkční, čímž je splněn cíl této diplomové práce.



Obrázek 4.3: Fotografie sestaveného systému, který se skládá z mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového modulu, společně s detailním pohledem na podsestavu geometricko-fázového modulu. GFM - geometricko-fázová mřížka, L1 - čočka 1, LP3 - lineární polarizátor, L2 - čočka 2, D - detektor.



Obrázek 4.4: (a) Hologram lidských epitelálních buněk zaznamenaný pomocí kombinace mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového holografického modulu. Hologram byl pořízen za použití světelného zdroje s vysokou časovou koherencí, kdy prostorová koherence byla snížena pomocí rotující matnice. (b) Detail hologramu, ve kterém je vidět nosná prostorová frekvence. (c) Spektrum prostorových frekvencí pořízeného hologramu, ve kterém je vyznačena oblast použitá pro rekonstrukci amplitudy a fáze. (d) Rekonstrukce amplitudového obrazu. (e) Rekonstrukce kvantitativního fázového obrazu.

5. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala návrhem zobrazovacího systému, který kombinuje geometricko-fázovou holografii s interferenčním mikroskopem Jamin-Lebedeff. Cílem této práce bylo vytvoření zobrazovacího systému, který využívá výhod jak osových, tak i mimoosových holografických mikroskopie. Osové systémy vynikají svou robustností a konstrukční jednoduchostí. K rekonstrukci fázového obrazu ale vyžadují záznam čtyř modifikovaných hologramů. Naproti tomu mimoosové systémy umožňují rekonstrukci fázového obrazu z jediného hologramu avšak za cenu větší konstrukční a justážní náročnosti. Navržený zobrazovací systém kombinuje výhody obou přístupů díky využití polarizace světla a kódování signální a referenční vlny do kolmých lineárních nebo opačných kruhových polarizací. Mikroskop Jamin-Lebedeff je jednocestný osový holografický mikroskop, který k vytvoření signální a referenční vlny s kolmými lineárními polarizacemi využívá anizotropních krystalů kalcitu. Na jeho výstupu jsou pak tyto kolmé lineární polarizace převedeny na opačné kruhové polarizace, které vstupují do geometricko-fázového holografického modulu. Modul je založený na použití geometricko-fázové mřížky, která slouží jako difraktivní dělič pro kruhově polarizované světlo. Modul umožňuje úhlovou separaci a následné spojení signální a referenční vlny a vytvoření hologramu s prostorovou nosnou frekvencí typickou pro mimoosovou holografii.

První praktická část této práce se zabývala mikroskopem Jamin-Lebedeff. Nejprve byl proveden teoretický popis zobrazení mikroskopem Jamin-Lebedeff, včetně popisu separace polarizovaného světla a vytvoření signální a referenční vlny pomocí anizotropních krystalů. Na základě teoretického popisu byl předložen konstrukční návrh mikroskopu vypracovaný v prostředí SOLIDWORKS. Tento návrh je založen na klecovém systému od firmy Thorlabs, což je systém umožňující snadnou konstrukci optických systémů.

Na základě konstrukčního návrhu byla sestava mikroskopu Jamin-Lebedeff sestavena a byla otestována její funkčnost. Funkčnost mikroskopu byla demonstrována zobrazením lidských epitelálních buněk. Nejprve byl při testování jako zdroj použit He-Ne laser, který se vyznačuje vysokou časovou a prostorovou koherencí. Byly pořízeny čtyři modifikované záznamy hologramů, ze kterých byl následně zrekonstruovaný fázový obraz. Na fázovém obrazu byla jasně viditelná změna fáze způsobená sledovaným vzorkem. Obraz byl ale zatížen parazitními interferencemi, které snižovaly celkovou kvalitu fázového obrazu. Za účelem zlepšení kvality obrazu byla mezi zdroj a mikroskop Jamin-Lebedeff vložena rotující matnice, která se chová jako plošný zdroj světla, čímž byla snížena prostorová koherence světla. S takto upraveným zdrojem byly pořízeny další čtyři modifikované obrazy, ze kterých byl opět zrekonstruován fázový obraz. Při porovnání výsledků bylo zjevné zvýšení kvality fázového obrazu způsobené snížením prostorové koherence světelného zdroje.

V druhé praktické části se práce zaměřuje na geometricko-fázový holografický modul, který již byl dříve sestaven v laboratoři Experimentální biofotoniky na Ústavu fyzikálního

inženýrství fakulty strojního inženýrství VUT v Brně. Nejprve byl proveden teoretický popis principu geometricko-fázového modulu včetně podrobného popisu geometricko-fázové mřížky, která je vyrobena z polymerních kapalných krystalů.

Modul byl připojen k mikroskopu Jamin-Lebedeff a byla experimentálně ověřena funkčnost výsledného systému. Pro ověření funkčnosti výsledného systému byly jako vzorek opět zobrazovány lidské epitelální buňky. Jako zdroj světla byla opět použita kombinace He-Ne laseru s rotující matnicí. Na zachyceném hologramu lze jasně pozorovat prostorovou nosnou frekvenci v podobě interferenčních proužků s vysokou prostorovou frekvencí. Pořízený hologram byl dále zpracován v prostředí MATLAB. V získaném kvantitativním fázovém obrazu lze jasně vidět změnu fáze způsobenou fázovými objekty. Na základě prezentovaných výsledků je tedy možné prohlásit vytvořený zobrazovací systém za funkční, čímž byl splněn cíl této diplomové práce.

Výsledkem této práce je funkční zobrazovací systém, díky kterému byl ověřen princip fungování kombinace mikroskopu Jamin-Lebedeff a geometricko-fázového holografického modulu ve viditelné oblasti spektra. Tento systém bude sloužit jako základ pro vytvoření identického systému, který bude pracovat v infračervené oblasti vlnových délek a který umožní charakterizaci VO₂ metapovrchů vyráběných na Středoevropském technologickém institutu (CEITEC) v Brně.

Literatura

1. ROCHOW, Theodore George; TUCKER, Paul Arthur. *Introduction to microscopy by means of light electrons, X rays or acoustics*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994. ISBN 03-064-4684-7.
2. PARK, YongKeun; DEPEURSINGE, Christian; POPESCU, Gabriel. Quantitative phase imaging in biomedicine. *Nature Photonics*. 2018, roč. 12, č. 10, s. 578–589. ISSN 1749-4885. Dostupné z DOI: 10.1038/s41566-018-0253-x.
3. ZHAO, Xiaoguang; SUN, Zhenci; ZHANG, Lingyun; WANG, Zilun; XIE, Rongbo; ZHAO, Jiahao; YOU, Rui; YOU, Zheng. Review on Metasurfaces: An Alternative Approach to Advanced Devices and Instruments. *Advanced Devices & Instrumentation*. 2022, roč. 2022, s. 19. ISSN 2767-9713. Dostupné z DOI: 10.34133/2022/9765089.
4. MURPHY, Douglas B.; DAVIDSON, Michael W. *Kód: 01389567 Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Second Edition. Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 9780471692140.
5. TAJAHUERCE, Enrique; JAVIDI, Bahram. Encrypting three-dimensional information with digital holography. *Applied Optics*. 2000, roč. 39, č. 35. ISSN 0003-6935. Dostupné z DOI: 10.1364/AO.39.006595.
6. LEITH, E. N.; UPATNIEKS, J. Holography with Achromatic-Fringe Systems*. *Journal of the Optical Society of America*. 1967, roč. 57, č. 8. ISSN 0030-3941. Dostupné z DOI: 10.1364/JOSA.57.000975.
7. STAVENGA, Doekele G; LEERTOUWER, Hein L; WILTS, Bodo D. Quantifying the refractive index dispersion of a pigmented biological tissue using Jamin–Lebedeff interference microscopy. *Light: Science & Applications*. 2013, roč. 2, č. 9, e100–e100. ISSN 2047-7538. Dostupné z DOI: 10.1038/lssa.2013.56.
8. BOUCHAL, Petr; ŠTRBKOVÁ, Lenka; DOSTÁL, Zbyněk; CHMELÍK, Radim; BOUCHAL, Zdeněk. Geometric-Phase Microscopy for Quantitative Phase Imaging of Isotropic, Birefringent and Space-Variant Polarization Samples. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z DOI: 10.1038/s41598-019-40441-9.
9. ABRAMOWITZ, Mortimer; DAVIDSON, Michael W. *Microscope Illumination*. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/illumination/>.
10. GOULETTE, Travis; HOWARD, Charles D.; DAVIDSON, Michael W. *Infinity Optical Systems*. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems>.

LITERATURA

11. BORN, Max; WOLF, Emil. *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. ISBN 0-521-63921-2.
12. ZERNIKE, F. How I Discovered Phase Contrast. *Science*. 1955, roč. 121, č. 3141, s. 345–349. ISSN 0036-8075. Dostupné z DOI: 10.1126/science.121.3141.345.
13. HECHT, Eugene. *Optics*. 4th ed. San Francisco: Addison Wesley, 2002. ISBN 0-321-18878-0.
14. MURPHY, Douglas B.; SCHWARTZ, Stanley; SALMON, Edward D.; SPRING, Kenneth R.; DAVIDSON, Michael W. *De Sénarmont Bias Retardation in DIC Microscopy*. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.microscopyu.com/techniques/dic/de-s%C3%A9narmont-bias-retardation-in-dic-microscopy>.
15. FÜRHAPTER, Severin; JESACHER, Alexander; BERNET, Stefan; RITSCH-MARTE, Monika. Spiral phase contrast imaging in microscopy. *Optics Express*. 2005, roč. 13, č. 3, s. 689–694. ISSN 1094-4087. Dostupné z DOI: 10.1364/OPEX.13.000689.
16. BERNET, Stefan; JESACHER, Alexander; FÜRHAPTER, Severin; MAURER, Christian; RITSCH-MARTE, Monika. Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy. *Optics Express*. 2006, roč. 14, č. 9, s. 3792–3805. ISSN 1094-4087. Dostupné z DOI: 10.1364/OE.14.003792.
17. WAYNE, Randy. *Light and video microscopy*. Second edition. San Diego, CA: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-411484-5.
18. THORLABS, Inc. *BD27 - Calcite Beam Displacer, 2.7 mm Beam Separation, Ø1" Housing*. 1999. Dostupné také z: <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=BD27>.
19. SALEH, Bahaa E. A.; TEICH, Malvin Carl. *Fundamentals of photonics*. Third edition. Hoboken: Wiley, 2019. ISBN 9781119506898.
20. GHOSH, Gorachand. Dispersion-equation coefficients for the refractive index and birefringence of calcite and quartz crystals. *Optics Communications*. 1999, roč. 163, č. 1, s. 95–102. ISSN 0030-4018. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/S0030-4018\(99\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(99)00091-7).
21. SCHLOR, Michal. *Holografie v krátkovlnné infračervené oblasti* [online]. Brno, 2023 [cit. 2025-05-11]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149920>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství.