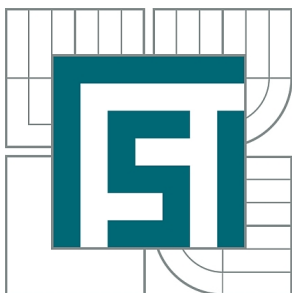


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

POUŽITÍ FLUORESCENČNÍHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU

APPLICATIONS OF FLUORESCENCE HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

EVŽEN ZOBAČ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. PAVEL KOLMAN, Ph.D.

BRNO 2014

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Evžen Zobač

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901R043)**

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 bakalářské práce:

Použití fluorescenčního holografického mikroskopu

v anglickém jazyce:

Applications of Fluorescence Holographic Microscope

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Fluorescenční holografický mikroskop umožňuje kontrastní kvantitativní trojrozměrné zobrazování fázových objektů. Prostudujte dostupnou literaturu o fluorescenční interferometrii (např. 4Pi [6], I5M [3,4] a další [2,5]). Na základě poznatků z literatury navrhnete vhodné vzorky pro testování zobrazovacích vlastností mikroskopu a proveďte potřebná pozorování. Proveďte nezbytné konstrukční úpravy zařízení a software. Interpretujte výsledky pozorování.

Cíle bakalářské práce:

1. Rešerše literatury.
2. Návrh, realizace a měření testovacích vzorků.
3. Interpretace výsledků pozorování.

Seznam odborné literatury:

1. M. Born, E. Wolf, Principles of optics., 7th ed. Cambridge: Cambridge university press, 2002.
2. A. Bilencia, J. Cao, M. Colice, A. Ozcan, B. Bouma, L. Raftery, G. Tearney, "Fluorescence Interferometry Principles and Applications in Biology", Annals of the New York Academy of Sciences, 1130: 68–77, (2008).
3. L. Shao, B. Isaac, S. Uzawa, D. A. Agard, J. W. Sedat, M. G. L. Gustafsson, "I5S: Wide-Field Light Microscopy with 100-nm-Scale Resolution in Three Dimensions", Biophysical Journal, V. 94, 4971–4983, (2008).
4. M. G. L. Gustafsson, "Extended resolution fluorescence microscopy", Biophysical methods, 627-634.
5. G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, H. F. Hess, "Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure", www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0813131106, (2008).
6. J. Bewersdorf, R. Schmidt, S. W. Hell, "Comparison of I5M and 4Pi-microscopy", Journal of Microscopy, V. 222, 105–117, (2006).

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Pavel Kolman, Ph.D.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2013/2014.

V Brně, dne 29.11.2013

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o fluorescenčním holografickém mikroskopu, interferometrickém mikroskopu s mimoosovou interferencí.

Práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V teoretické části je popsáno uspořádání fluorescenčního holografického mikroskopu a základní teorie ohledně fluorescenční interferometrie. Dále jsou zde uvedeny metody používané ke zvýšení rozlišení fluorescenčních mikroskopů.

Praktická část se věnuje ověření zobrazovacích vlastností fluorescenčního holografického mikroskopu a také možnostem, které vylepší zobrazovací vlastnosti a měření jako takové.

Summary

This bachelor thesis discusses the holographic fluorescence microscopy, interferometric microscope with off-axis interference.

It is divided into a theoretical part and an experimental part. The theoretical part describes the setting of the holographic fluorescent microscope and basic theory of fluorescence interferometry. There are also described the methods used to increase the resolution of fluorescence microscopy.

The practical part deals with the verification of the imaging properties of holographic fluorescence microscope and opportunities for enhanced imaging features and measurements.

Klíčová slova

Fluorescenční holografický mikroskop, fluorescenční interferometrie, 4Pi, I⁵M, SIM, STED

Keywords

Fluorescent holographic microscope, fluorescence interferometry, 4Pi, I⁵M, SIM, STED

ZOBAČ, E. *Použití fluorescenčního holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 23 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Pavel Kolman, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Pavla Kolmana, Ph.D. a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Brně 30. 5. 2014

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavlu Kolmanovi, Ph.D., že mi umožnil podílet se na tomto projektu, za jeho rady při práci v laboratoři a odborné konzultace. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Janě Čollákové za poskytnutí fluorescenčních kalibračních destiček. Také chci poděkovat své rodině a mé přítelkyni, za podporu nejen během vypracovávání této práce.

Obsah

Úvod	2
1 Historie fluorescenční mikroskopie a holografie	3
2 Fluorescenční holografický mikroskop	5
2.1 Vlastnosti FHM	5
2.2 Schéma a součásti FHM	6
2.3 Součástky použité při stavbě modulu FHM	7
3 Fluorescenční interferenční mikroskopie	8
3.1 Rozptylová funkce	8
3.2 Difrakční limit detekce	9
3.3 Interferenční fluorescenční metody zvyšující rozlišení	11
3.3.1 Více-fotonové metody	12
3.3.2 4Pi a I5M mikroskopie	12
3.3.3 Přídavné mikroskopové techniky zvyšující rozlišení	13
3.4 Aplikace fluorescenční interferenční mikroskopie	15
3.5 Shrnutí pokroků I5M	15
4 Testovací vzorky pro FHM	16
4.1 Návrh možných úprav	19
Závěr	21
Literatura	24

Úvod

Fluorescenční holografická mikroskopie je kontrastní kvantitativní technika sloužící ke trojrozměrnému zobrazování fázových objektů. Ve světě již byly popsány a sestrojeny interferenční fluorescenční mikroskopy, avšak fluorescenční mikroskop využívající mimoosovou interferenci-holografii doposud popsán a sestrojen nebyl. V první kapitole je uvedena historie fluorescenční mikroskopie a holografie.

Druhá kapitola se zabývá konstrukcí a vlastnostmi fluorescenčního holografického mikroskopu, který vzniká v optické laboratoři ústavu fyzikálního inženýrství. Tento mikroskop sestává ze dvou proti sobě umístěných objektivů. Světlo z těchto objektivů jde do achromatického mřížkového mimoosového interferometru. Tento interferometr je shodný s interferometrem z koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM) [1], jenž byl také vyvinut v této laboratoři.

Další kapitola obsahuje řešerši problematiky fluorescenční interferenční mikroskopie, dodatečných technik ke zvýšení rozlišení interferenční fluorescenční mikroskopie a metod ke zjišťování rozlišení.

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda předpokládané zobrazovací charakteristiky FHM odpovídají skutečnosti. Byly vyrobeny testovací vzorky vhodné pro tento druh mikroskopu. Návrh a postup výroby vhodných vzorků a další praktické metody jsou popsány ve čtvrté kapitole spolu s výsledky experimentálního měření a diskuzí nad těmito výsledky. Dále jsou zde uvedeny možné kroky, které vylepší zobrazovací vlastnosti tohoto mikroskopu a měření jako takové.

Kapitola 1

Historie fluorescenční mikroskopie a holografie

Fluorescenční holografická mikroskopie, jak už název napovídá, vychází z kombinace dvou technik - fluorescence a holografie. Nejprve se podíváme na historii fluorescenční mikroskopie. Fluorescence jako taková, byla popsána již v sedmnáctém století [2], avšak jako mikroskopová technika se začala používat až na konci devatenáctého století. S fluorescencí je spojena celá řada jmen. George Gabriel Stokes v roce 1852 postuloval, že fluorescenční světlo má delší vlnovou délku než světlo, jež fluorescenci vyvolalo, po svém objeviteli je tento jev nazýván Stokesův posuv. Dalším výrazným milníkem fluorescenční mikroskopie byla syntetizace prvního umělého fluorescenčního barviva v roce 1871 německým chemikem Adolfem von Bayerem.

První fluorescenční mikroskop vznikl jako nástupce UV mikroskopu. Tento mikroskop vyvinul Otto Heimstaedt a Heinrich Lehman. Byl používán pro zkoumání autofluorescence (vlastní fluorescence) bakterií, prvoků a rostlinných a živočišných tkání. Právě možnost pozorovat pouze autofluoreskující vzorky omezovala použití fluorescenční mikroskopie v jejích počátcích. Přibližně po dvaceti letech od zkonstruování prvního fluorescenčního mikroskopu Max Haitinger vyvinul metodu sekundární (nevlastní) fluorescence, což zahrnovalo aplikaci vnějšího fluorescenčního barviva na vzorek. Další výrazný krok ve fluorescenční mikroskopii nastal v šedesátých letech minulého století, kdy byl zkonstruován dichromatický dělič paprsků, neboli dichromatické zrcadlo. Toto zrcadlo díky speciální tenké kovové vrstvě dokáže odrážet úzké pásmo vlnových délek, zatímco ostatní vlnové délky propouští. Toto řešení umožňuje osvětlení vzorku excitačním světlem s vlnovou délkou k tomu potřebnou. Fluorescenční mikroskopy jsou dnes běžně vyráběné. Fluorescenční mikroskopie je také hojně využívaná metoda v biologii a lékařství.

Holografie byla objevena a popsána Denisem Gaborem v roce 1948 při snaze docílit vyššího zvětšení elektronového mikroskopu rekonstrukcí hologramu pomocí větší vlnové délky záření, než byla vlnová délka záření, s nímž byl hologram zaznamenán. Vyššího zvětšení elektronového mikroskopu nebylo však v těchto experimentech dosaženo. Po objevu laseru se pak holografie začala rozvíjet jako metoda optická. Při záznamu hologramu je zaznamenávána kompletní obrazová vlna. Holografického záznamu mikroskopického obrazu bylo dosaženo již v sedmdesátých letech dvacátého století [3]. Kvůli tehdy nedostatečně výkonnému výpočetnímu zařízení, k okamžité rekonstrukci obrazové vlny, nebyla holografie použitelná v praxi. Nyní se holografie používá v běžném životě nejvíce jako ochranný prvek. V elektrotechnice je možný záznam na holografické záznamové disky [4] a například ve strojírenství se používá ke kvantitativnímu měření napětí, které působí na součást [5].

Fluorescenční interferenční mikroskopie vznikla a byla popsána v devadesátých letech 20. století. Motivací k jejímu vzniku bylo zvýšit rozlišení stávajících fluorescenčních mikroskopů. Více o této technice a její historii bude řečeno v třetí kapitole.

Na ústavu fyzikálního inženýrství VUT má holografická mikroskopie několikaletou tradici. V roce 1998 vyšel článek o konfokálním holografickém mikroskopu [6] a v roce 1999 byl zapsán užitný vzor [7]. Od té doby vznikla v optické laboratoři celá řada modifikací holografického mikroskopu, které mají i praktické využití (např.: [8], [9], [10], [11]).

Kapitola 2

Fluorescenční holografický mikroskop

V roce 2009 byl v optické laboratoři ústavu fyzikálního inženýrství sestaven holografický mikroskop s novým uspořádáním difrakční mřížky. Mřížka již není použita jako dělič paprsku, přesunula se do jedné z větví do roviny sdružené s předmětovou rovinou. Díky tomuto je možné použít při konstrukci objektivu určené pro nekonečnou tubusovou délku. Tímto řešením vzniká prostor pro vložení nejrůznějších modulů (proto se tomuto holografickému mikroskopu také říká multimodální). Interferometr tohoto druhu byl společně s fluorescenčním modulem použit ke stavbě fluorescenčního holografického mikroskopu (FHM).

Fluorescenční modul byl navržen, zkonstruován a sestaven Ing. Pavlem Kolmanem, PhD.. Hlavními prvky tohoto modulu jsou dva proti sobě umístěné mikroskopové objektivy. Oba tyto objektivy je možné posouvat ve dvou příčných směrech. Dále je umožněn posuv jednoho objektivu a stolku se vzorkem ve směru optické osy. Stolek je možno posouvat v osovém směru i jemně pomocí piezo posuvu a pomocí šroubů v příčném směru. Blok fluorescenčních filtrů (FF) je umístěn tak, jak je to zobrazeno na obrázku 2.1. Posuvný blok zrcadel (PBZ), umístěný v jedné větvi, umožňuje změnu délky optické této větve.

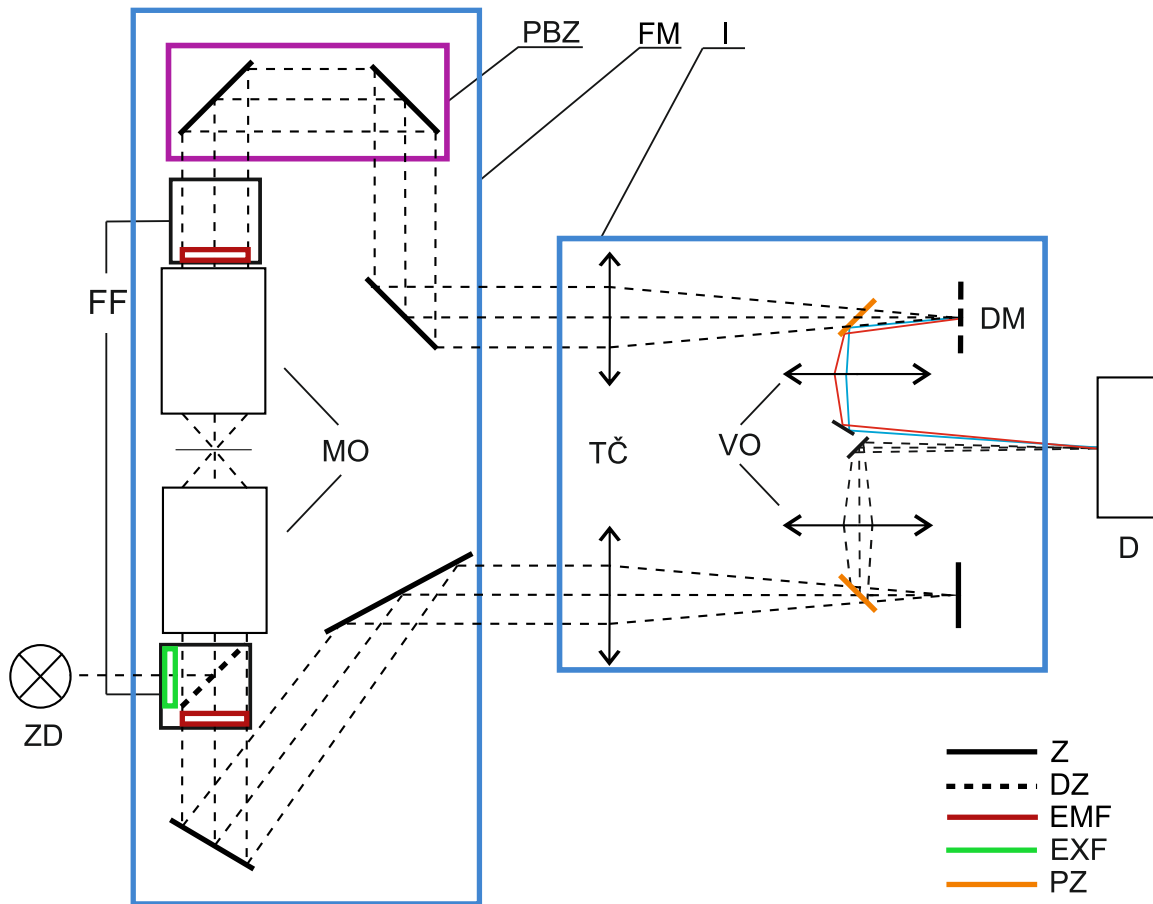
2.1 Vlastnosti FHM

Oproti fluorescenčním mikroskopům popsaným v následujících kapitolách FHM využívá mimoosové interference, díky čemuž je možné zrekonstruovat předmětovou vlnu pouze z jednoho snímku, tím je umožněno pozorování dynamických jevů. FHM dále umožňuje kompletní záznam obrazové vlny v reálném čase. Rekonstrukcí této vlny se získá komplexní amplituda. FHM také umožňuje provádět optické řezy a kvantitativní fázový kontrast. Samozřejmostí je pozorování fluorescenčních vzorků a možnost výměny vhodných excitačních a emisních filtrů v závislosti na použitém fluoroforu.

Dosud popsané a zkonstruované fluorescenční mikroskopy, využívající interferometrické metody k zobrazení předmětu, využívají osových interference a jsou to tedy interferometrické fluorescenční mikroskopy. FHM využívá mimoosové interference, měl by tedy být prvním fluorescenčním holografickým mikroskopem.

2.2 Schéma a součásti FHM

Na obrázku 2.1 je zobrazeno schéma FHM. Zdroj světla (Z), který může být časově a prostorově nekoherentní, je zobrazen pomocí dichroického zrcadla (DZ) a mikroskopového objektivu do předmětové roviny. Zde proběhne excitace fluoroforu ve vzorku a následná emise fluorescenčního světla. Toto světlo je zachycováno objektivem z obou stran. Tubusovými čočkami je předmět zobrazen v jedné větvi na reflexní difrakční mřížce (DM). V druhé větvi se nezobrazuje předmět přímo na odrazné zrcadlo (ZR), ale několik milimetrů před něj (kvůli kvalitě zobrazení). Ve větvi se zrcadlem se obraz předmětu odrazí pomocí polopropustného zrcadla (PZ) do výstupního objektivu (VO), pomocí něhož se zobrazí na detektor (D). Rovina difrakční mřížky je sdružená s rovinou detektoru. V zadní ohniskové rovině VO je umístěn prostorový filtr, který zastiňuje nultý difrakční řád a možné vyšší řády. S druhou větví tak interferuje pouze první difrakční řád.



Obrázek 2.1: Schéma fluorescenčního holografického mikroskopu. D-Detektor, DM-Difrakční mřížka, DZ-Dichroické zrcadlo, EMF-Emisní filtr, EXF-Excitační filtr, FF-Fluorescenční filtry, FM-Fluorescenční modul, I-Interferometr, MO-Mikroskopový objektiv, PBZ-Posuvný blok zrcadel, TČ-Tubusová čočka, VO-Výstupní objektiv, ZD-Zdroj osvětlení, Z-Zrcadlo

2.3 Součástky použité při stavbě modulu FHM

1. Osvětlovač Nikon Y-FL
2. Piezo posuv stolku se vzorkem, rozsah posuvu $17\text{ }\mu\text{m}$
3. Mikroskopové objektivy konstruované na nekonečnou tubusovou délku se závitem M25
4. Blok fluorescenčních filtrů
5. Tubusové čočky $f=200\text{ mm}$
6. Difrakční mřížka s hustotou vrypů 150mm^{-1}
7. Výstupní objektivy Canon 35 mm f/2 (rok výroby 1990 - 2012)
8. CCD kamera, černobílá, 16bit, velikost čipu 1376×1038 pixelu, velikost pixelu $6,45 \times 6,45\text{ }\mu\text{m}$, rychlost záznamu 12 fps

Kapitola 3

Fluorescenční interferenční mikroskopie

Dříve, než se dostaneme k popisu fluorescenční interferometrie, je vhodné sdělit základy interferenční mikroskopie. Pojem „interferenční mikroskopie“ byl poprvé použit J. A. Sirksem na konci 19. století [12]. Jeden z prvních interferenčních mikroskopů byl navržen J. Dysonem [13]. Tento mikroskop vytvářel interferenční obrazce bez použití polarizačních prvků. Poté bylo představeno několik dalších řešení ať už transmisního nebo reflexního typu. Například Linnikův interferometr používaný při studiu povrchů v reflexním mikroskopu, nebo Machův-Zenderův interferometr, jehož modifikace je právě použita pro sestavení FHM.

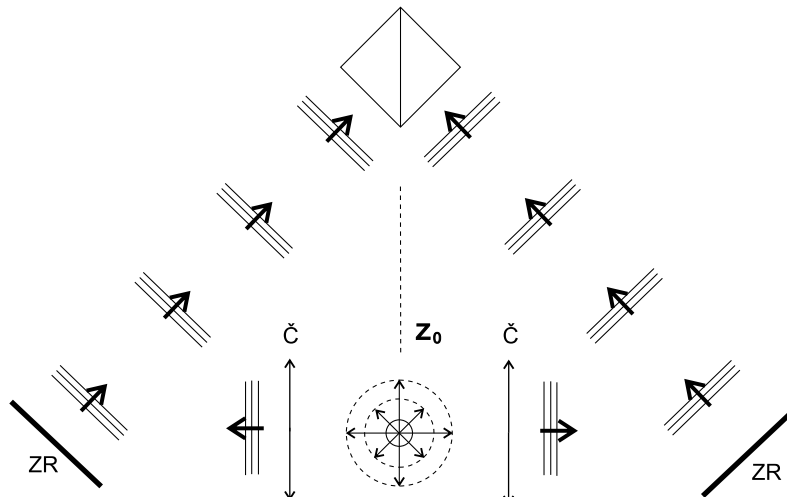
Pro vysvětlení principu fluorescenční interferometrie si představme fluoreskující částici umístěnou tak, jak je to zobrazeno na obrázku 3.1. Emitované fluorescenční záření je zachycováno čočkami z obou stran a pomocí zrcadel je směřováno na kombinační člen. Ve výsledku jsou vlny z obou větví spojeny opět dohromady a dopadají na detekční zařízení. Interferenční obrazec je detekován pouze tehdy, když rozdíl délky optických větví je menší než koherenční délka (D_K) emitovaného záření. Přičemž maximální intenzita interference nastává, pokud je fluorescenční zdroj umístěn v rovině z_0 a optická dráha obou větví je srovnána.

Tento výsledek je důležitý vezmeme-li v potaz například tenké fluorescenční značky se šířkou menší, než je polovina koherenční délky emitovaného fluorescenčního záření. Pokud jsou tyto značky umístěny na různých místech a jsou od sebe vzdáleny více, než na polovinu koherenční délky podél optické osy, mohou být od sebe rozlišeny, protože k interferenčnímu obrazci přispívá pouze světlo z oblasti $z_0 \pm \frac{D_K}{2}$. Toto je jedna z hlavních výhod fluorescenční interferometrie, která umožňuje zjištění hloubkové informace v rozsahu několika mikrometrů o fluorescenčních vzorcích. Zároveň udává minimální rozlišení interferenčních fluorescenčních mikroskopů v osovém směru.

3.1 Rozptylová funkce

Rozptylová funkce libovolného optického přístroje je vlastně obraz bodového předmětu zobrazený tímto přístrojem. Integrál z této rozptylové funkce je normován k jedničce, neboli plocha pod křivkou rozptylové funkce by měla být rovna jedné. Velikost stupně rozptylu rozptylové funkce udává, jak kvalitně dokáže daný systém zobrazovat.

Rozptylová funkce hraje důležitou roli v teorii zobrazování ve fluorescenční mikrosko-



Obrázek 3.1: Zobrazení procesu, při kterém interferují dva fluorescenční paprsky pocházející z jednoho fluoroforu. Č-čočka, ZR-zrcadlo. Překresleno z [14].

pii, protože zobrazovací proces u nekoherentních zobrazovacích systémů je lineární a může být popsán lineárními rovnicemi [15].

$$Obraz(A + B) = Obraz(A) + Obraz(B) \quad (3.1)$$

Což znamená, že dva objekty A a B mohou být zobrazovány zároveň a výsledek je roven součtu nezávislého zobrazení těchto objektů. Jinými slovy, zobrazování předmětu A není ovlivněno zobrazováním předmětu B a naopak. Nabízí se tedy možnost rozdělit předmět na tak malé části, že se bude fakticky jednat o bodové objekty a výsledný obraz takto rozděleného předmětu se bude počítat jako součet zobrazení rozptylových funkcí. Matematická reprezentace tohoto procesu se nazývá konvoluce.

Linearita systému tedy dovoluje spočítat obraz libovolného objektu rozdělením objektu na jednotlivé části. Následným zobrazením každé z těchto částí samostatně a součtem těchto částí lze získat obraz celého objektu.

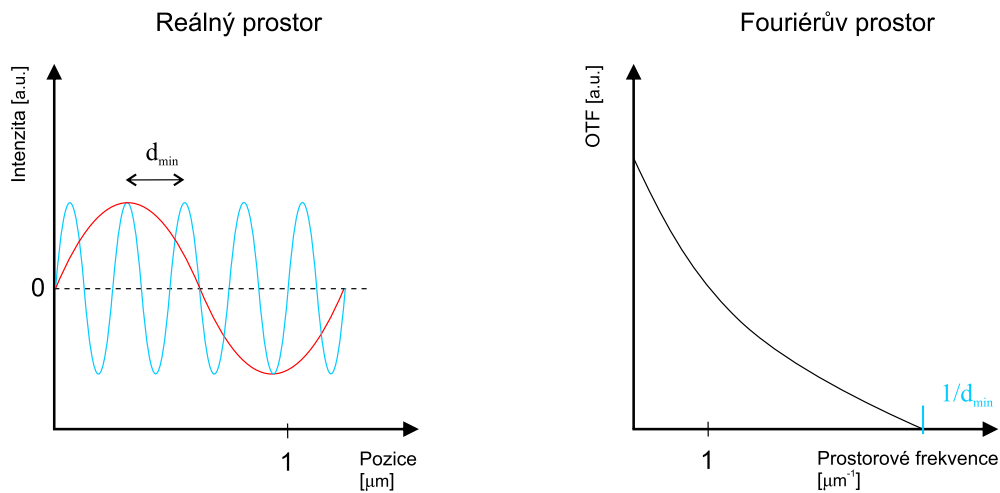
$$g(x, y) = f(x, y) * h(x, y) = \int_{R \times R} f(a, b) \cdot h(x, y) da db \quad (3.2)$$

Rovnice 3.2 je konvoluční integrál pro prostorově invariantní systémy a $h(x, y)$ rozptylová funkce bodu $[x, y]$.

3.2 Difrakční limit detekce

Rozlišení je často definováno jako nejmenší vzdálenost mezi obrazy dvou kvazi bodových objektů, při které jsou ještě od sebe rozpoznatelné a nejsou sloučeny do nerozlišitelného shluku. Rozlišovací kritéria, jako Rayleighův limit, Sparroův limit, Strehlovo kritérium

a další přímo souvisí s vlastnostmi rozptylové funkce. Tato kritéria jsou velmi užitečná pro různá pozorování, avšak mají několik nedostatků, jak píše Schermelleh a kolektiv ve své práci [15]. Mezi tyto nedostatky patří zejména to, že tyto detekční limity nemusí nutně korespondovat s úrovní detailů, které jsou skutečně dosažitelné. Kupříkladu Rayleighův limit je definován jako vzdálenost středu hlavního píku a prvního vedlejšího minima rozptylové funkce. Tato vzdálenost však může být s použitím vhodných prvků, jako například Toraldových filtrů ¹, téměř libovolně malá, na úkor velmi výrazného zvětšení postranních laloků (vedlejších maxim rozptylové funkce) vůči centrálnímu maximu. Dále, při odvozování těchto kritérií nebylo uvažováno o světle jako o vlně, jež může difraktovat a jež v sobě nese informace o konečném limitu úrovně rozlišitelných detailů [15].



Obrázek 3.2: Převod z reálného do prostoru Fourierových frekvencí, překresleno z [15].

Výše uvedeným výtkám vůči difrakčním limitům se definice rozlišení podle Abbeho 3.3 (převzato z [18]) vyhýbá. Jak už bylo výše uvedeno, proces zobrazování může být popsán konvoluční operací. S pomocí Fourierovy transformace (FT) může být každý objekt popsán jako suma sinusoid s různými prostorovými frekvencemi (čím vyšší frekvence, tím jemnější detail). Konvoluční proces 3.2 (převzato z [19]) může být značně zjednodušen, pokud se na tuto problematiku podíváme skrze ekvivalentní operace ve Fourierově prostoru. Fourierovsky transformovaný objekt musí být jen vynásoben fourierovsky transformovanou rozptylovou funkcí (OTF – optical transfer function) k získání fourierovsky transformovaného ideálního obrazu.

OTF vlastně udává, jak moc se každá z prostorových frekvencí fourierovsky transformovaného objektu promítne do zobrazovaného obrazu. Pro definici rozlišení je důležité, že optická přenosová funkce má pevnou frekvenční hranu – Abbeho limit (viz obrázek 3.2). Abbeho limit je vlastně nejmenší pravidelnost vyskytující se ve struktuře, která je ještě rozpoznatelná ve výsledném obraze. Ukazuje, jaké nejmenší úrovně detailu lze dosáhnout s danou rozptylovou funkcí. Proto žádný pravidelný detail, menší než nejmenší vlnová délka obsažená v rozptylové funkci, nemůže být přenesen do výsledného obrazu.

¹ „pupil-plane filterig“ filtrace v rovině pupily použitím několika soustředných fázových filtrů v rovině výstupní pupily. Viz.: [16], [17].

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (3.3)$$

Abbeho limit je celkem jednoduchá závislost na vlnové délce λ a maximálním úhlu α , pod kterým paprsky ze vzorku míří do mikroskopového objektivu.

3.3 Interferenční fluorescenční metody zvyšující rozlišení

Jak bylo uvedeno výše, rozlišení klasických mikroskopů je dáno limity fyzikálních zákonů. Tyto limity mohou být za určitých předpokladů překročeny. Existují tři zvláště důležité předpoklady pro klasickou fluorescenční mikroskopii. Pozorování se provádí v tradičním uspořádání, ve kterém je světlo zachycováno jedním objektivem, excitační světlo je rovnoměrně rozprostřeno po celé ploše vzorku, fluorescence probíhá klasicky, tedy lineární absorpcí jednoho fotonu. Převrácením těchto předpokladů dostaneme tři základní koncepty pro zvýšení rozlišení (nejen) fluorescenčních mikroskopů [20].

1. Zachytit světlo z co největšího prostorového úhlu
2. Použití excitačního osvětlení, jenž je závislé na poloze
3. Použití nelineárních ² fluorescenčních procesů zahrnujících dva a více fotony

Prvním konceptem je použít ne jeden, ale dva objektivy pro zachycení emisního světla ze vzorku. Tento koncept je schopen zvýšit rozlišení mikroskopu stejným principem, jakým se zvýší rozlišení použitím mikroskopového objektivu s vyšší numerickou aperturou.

Druhý koncept využívá metod strukturovaného osvětlení. Funguje díky tomu, že prostorová struktura excitačního osvětlení moduluje emitované světlo a převádí jej na informaci o vzorku s vyšším rozlišením, než by za použití normálního osvětlení bylo toto světlo schopno přenést.

Třetí koncept používá k excitaci fluoroforu místo jednoho více fotonů. K pochopení tohoto konceptu si představme obraz ideálního bodového zdroje zobrazeného konvenčním mikroskopem. Protože rozlišení takového systému je konečně velké, profil zobrazeného zdroje (rozptylová funkce) není nekonečně úzký. Pravděpodobně to bude hladký pík o určité šířce. Odpovídající rozptylová funkce zobrazovacího procesu, který zahrnuje dva a více fotony, by měl být roven druhé nebo vyšší mocnině rozptylové funkce při užití jednoho fotonu. Profil více-fotonové rozptylové funkce tedy bude užší, což ve výsledku dává vyšší rozlišení [20].

V následujících odstavcích budou tyto koncepty představeny chronologicky podle data vzniku.

²Více-fotonové metody patří do odvětví nelineární optiky. Od lineární absorpce se liší tím, že velikost absorpce závisí (u dvou-fotonové absorpce) na druhé mocnině intenzity světla [21]. Při lineární absorpci je síla absorpce nezávislá na intenzitě světla.

3.3.1 Více-fotonové metody

Více-fotonová fluorescenční mikroskopie byla první fluorescenční mikroskopovou technikou, která úspěšně umožňovala provádět optické řezy v axiálním směru [22]. Tato metoda (v tomto případě dvou-fotonová) spočívá v osvětlení vzorku pomocí zaostřeného laserového paprsku s přibližně dvojnásobnou vlnovou délkou (poloviční energií fotonu), než je obvyklá vlnová délka excitace. Při ozáření fluoroforu tímto paprskem nedojde ke vzniku excitovaného stavu a látka nefluoreskuje. Pokud ale zvýšíme intenzitu tohoto záření, může dojít v ohnisku k současné absorpci dvou fotonů, čímž se dodá dostatečná energie k excitaci fluoroforu. Tato metoda však sama o sobě nevede ke zvýšení rozlišení. Nicméně dvou-fotonová mikroskopie výrazně redukuje světlo nepocházející ze zaostřené roviny, čímž umožňuje provádět velmi dobré optické řezy. Díky nižšímu rozptylu použitého světla v biologických tkáních je tato metoda vhodným nástrojem k pozorování hloubkových vzorků nebo tkání či v *in vivo*³ mikroskopii. Více-fotonovou metodu je možné použít i v kombinaci s následně uvedenými metodami.

3.3.2 4Pi a I⁵M mikroskopie

Tyto dva koncepty efektivně zvyšující axiální rozlišení byly představeny nezávisle na sobě. Prvním z nich je 4Pi mikroskopie [23] druhá nese název I⁵M [24]. Oba tyto koncepty využívají principu interferenční mikroskopie v kombinaci s dvojicí proti sobě umístěných mikroskopových objektivů, které zužují rozptylovou funkci v axiálním směru díky dvojnásobně větší numerické apertuře ve srovnání s mikroskopy s jedním mikroskopovým objektivem.

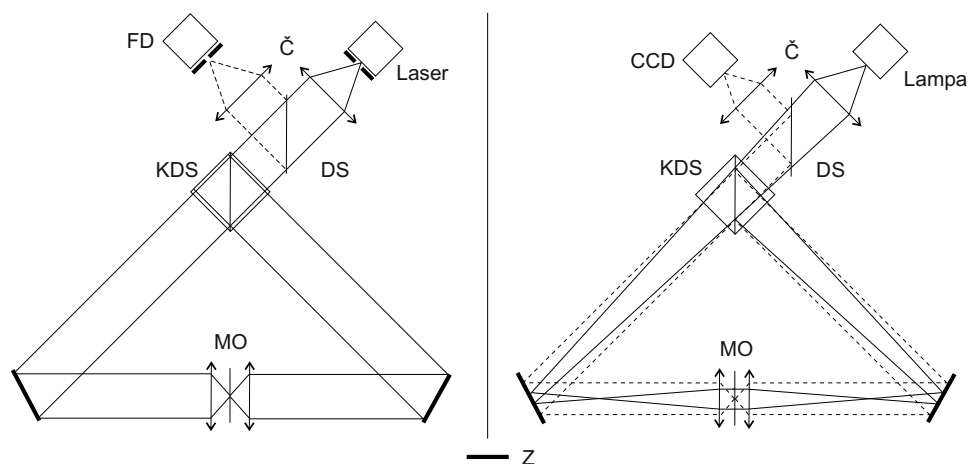
4Pi mikroskopie je rastrovací mikroskopová metoda, k osvětlení vzorku se používá laserový paprsek, který prochází přes dírkovou clonu a zastává tak funkci bodového zdroje. Po obou stranách vzorku jsou umístěny mikroskopové objektivy, které oba zachycují fluorescenční emisní světlo (při použití dvou mikroskopových objektivů je světlo zachycováno pod prostorovým úhlem 4π , díky čemuž metoda 4Pi nese svůj název). Emisní světlo prochází skrze optické větve (viz obr. 3.3) a světlo z obou větví následně prochází dírkovou clonou a interferuje v rovině detektoru. Dírkové clony jsou použity k odstranění světla pocházejícího z nezaostřené roviny vzorku.

Během vývoje této metody vznikly tři různé variace. Typ 4Pi-A používal oboustranné osvětlení vzorku, k pozorování emisního světla se používalo však již jen jednoho objektivu. U typu 4Pi-B se naopak vzorek osvětloval pouze z jedné strany a emisní světlo bylo zachycováno z obou stran. Typ 4Pi-C kombinoval obě tyto metody a excitační i emisní světlo procházelo oběma objektivy. Experimentálně změřené axiální rozlišení metody 4Pi-A je 100 nm [23].

I⁵M (Incoherent illumination interference and image interference microscope) je wide-field metoda (metoda širokého zorného pole) dosahující v klasickém uspořádání podobného axiálního rozlišení jako metoda 4Pi. Jako osvětlovací prvek je však použito světlo s nízkou koherencí, což zjednodušuje konstrukci (není třeba rastrovací mechanismus na zobrazení celého zorného pole) a umožňuje pozorování dynamických biologických vzorků, na druhou stranu však kvůli nízké koherenci excitačního a emisního není nastavení tohoto mikroskopu snadné. Metoda I⁵M je podobně jako 4Pi-C kombinací dvou metod a to konkrétně I³M, mikroskopii interferenčního nekoherentního osvětlení a I²M, mikroskopii interferenčního zobrazování.

³Označení pozorování živých organismů v jejich přirozených podmínkách.

Obě tyto metody mohou být kombinovány s dalšími mikroskopovými technikami, které zvyšují laterální rozlišení.



Obrázek 3.3: Porovnání schémat 4Pi (vlevo) a I5M (vpravo). Č-Čočka, DS-Dělič svazku, FD-Fotodioda, KDS-Kostkový dělič svazku, MO-Mikroskopový objektiv, Z-Zrcadlo. Překresleno z [25]

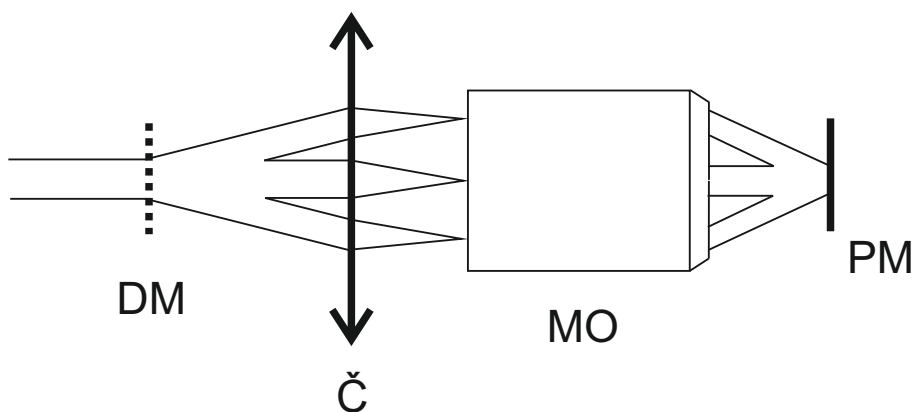
3.3.3 Přídavné mikroskopové techniky zvyšující rozlišení

Mikroskopie strukturovaného osvětlení (SIM) Tato metoda, kombinující zobrazení širokého pole a osvětlení se známou strukturou excitačního světla, byla popsána v práci Matse Gustafssona [26]. Světlo z osvětlovače dopadá na difrakční mřížku a poté je rozděleno na 3 vzájemně koherentní paprsky (viz obrázek 3.4). V rovině vzorku tyto paprsky interferují se strukturou vzorku za vzniku moaré obrazce. Objektivem jsou pak snímány informace o moaré obrazci. Po nasnímání série obrázků, při které se projíždí přes vzorek příčně a částečně se vzorek natáčí, se obraz počítačově zpracuje. Počítačovým zpracováním moaré obrazce lze spočítat, jak vypadala struktura, která tento obrazec způsobila. V kombinaci s konceptem I⁵M vzniká I⁵S. U I⁵S je za difrakční mřížkou umístěn ještě dělič svazku a vznikne tak 6 paprsků, 3 z každé strany vzorku. Teoretické rozlišení této metody ve všech třech dimenzích je menší než 100 nm [26].

Ještě lepšího rozlišení pak lze dosáhnout použitím nelineárního SIM, kdy je k excitaci použit laserový paprsek s vysokou intenzitou procházející přes difrakční mřížku [27].

Vyčerpání stimulovanou emisí (STED) Využití stimulované emise k překonání difrakčního limitu použili poprvé ve své práci Hell a Wichmann [28]. Tato mikroskopová metoda využívá k excitaci fluoroforu dva paprsky. První excituje celou oblast vzorku. Druhý paprsek, jehož tvar je upravený speciální maskou⁴ do prstencového tvaru, má vyšší vlnovou délku a ozáří pouze okraje excitované oblasti (viz obrázek 3.5). Fotony emitované z dvakrát excitované oblasti jsou odfiltrovány a nepodílejí se na vzniku obrazu. Tímto procesem

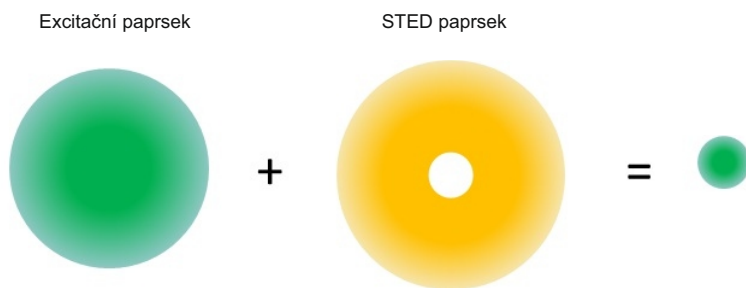
⁴Například pomocí spirálovité fázové masky je možno vytvořit tzv „optický vír“ [29].



Obrázek 3.4: Schéma metody SIM. Č - čočka, DM - difrakční mřížka, MO - mikroskopový objektiv, PM - předmětová rovina.

se zúží zobrazovaná oblast pozorovaného vzorku, což zvyšuje příčné rozlišení. Toto rozlišení lze vypočítat pomocí vztahu 3.4 (převzato z [30]), kde I_{STED} je intenzita STED paprsku a I_s je saturační intenzita (experimentálně určený parametr pro daný fluofoer a podmínky). Experimentálně dosažené příčné rozlišení touto metodou dosahuje až 6 nm [31].

$$d_{STED} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\alpha) \cdot \sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_s}}} \quad (3.4)$$



Obrázek 3.5: Profil excitačního paprsku, STED paprsku a výsledný excitovaný profil.

Fluorescenční mikroskopie stojaté vlny (SWFM) Tato metoda je podobná předchozí metodě SIM. Excitační světlo se skládá ze dvou proti sobě vysílaných nefokusovaných laserových paprsků. Tyto dva paprsky interferují a v rovině vzorku vzniká stojatá vlna. Prostorově proměnná excitační intenzita promítá informaci o vysokém axiálním rozlišení do pozorovaného emitovaného záření skrze podobný vzor jako moaré efekt. Jelikož se

excitační intenzita v osovém směru rychle mění informace o rozlišení může být zjištěna pořízením tří obrázků v různých fázích stojaté vlny [20].

Tři výše uvedené metody patří mezi nejrozšířenější, existují však i další, které však nejsou přímo spojeny s interferometrickou fluorescenční mikroskopií. Patří mezi ně metody STROM (stochastická optická rekonstrukční mikroskopie) a FPALM (fluorescenční mikroskopie lokálně aktivovaných fluoroforů) využívající přesné lokalizace jednotlivých fluoroforů.

3.4 Aplikace fluorescenční interferenční mikroskopie

Fluorescenční interferometrická mikroskopie by měla mít využití v lékařství a biologických aplikacích. Optické řezy v mikroskopii širokého zorného pole s vysokým rozlišením a velkou hloubkou průniku do vzorku, neboli spectral domain fluorescence coherence tomography (SD-FCT), měření s nanometrovou přesností podél optické osy a zobrazování živých buněk při použití selektivního barvení [32] jsou jedněmi z nich. Prvním komerčně vyráběným fluorescenčním interferenčním mikroskopem byl v roce 2004 Leica 4Pi společnosti Leica Microsystems [33].

3.5 Shrnutí pokroků I⁵M

Jelikož vyvíjený FHM je typově IⁿM shrňme si postupné pokroky v rámci této metody.

V již zmiňovaném patentu Matse Gustafssona [24] bylo popsáno uspořádání techniky, obecně, IⁿM, způsob osvětlení a teoreticky dosažitelné rozlišení. V článku [34] byly porovnávány OTF technik 4Pi, SWM a právě I⁵M. Bylo zjištěno, že jednoznačného zlepšení osového rozlišení dosahuje pouze 4Pi mikroskop (při použití dvou-fotonové excitace). I⁵M dosahuje zlepšení pouze částečného. V roce 2005 byla představena možnost dosáhnout teoreticky nekonečného rozlišení v kombinaci s metodou S-SIM [27]. V praxi je však rozlišení omezeno kvůli vybělování fluroforů a omezením poměru signálu k šumu. Metoda S-SIM byla dále vyvíjena a v roce 2008 byla popsána metoda 3D SIM [35], která umožňovala dosáhnout rozlišení menšího než 100 nm ve všech směrech. Kombinací S-SIM a fluoreskujícího proteinu s přepínatelnými stavy (FPALM) bylo dosaženo rozlišení přibližně 50 nm ve všech směrech [36].

V jenom z posledních článků ohledně I⁵M je předvedena technika 3D zobrazování s vysokým rozlišením [37]. Tato technika funguje na principu snímání devíti 2D obrazů (pocházejících z různých rovin vzorku) pomocí sady čoček. Kombinací těchto obrazů vzniká výsledný 3D obraz vzorku. Jedná se tak o velmi rychlou 3D metodu, limitovanou teoreticky pouze snímací frekvencí použité kamery.

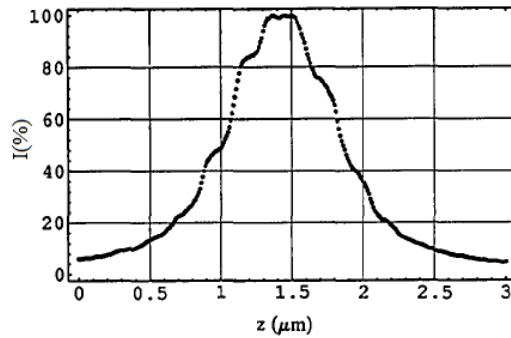
Kapitola 4

Testovací vzorky pro FHM

Pro testování fluorescenčních mikroskopů existuje celá řada komerčních vzorků, většina je jich však vytvořena pro klasické fluorescenční mikroskopy uzpůsobené k jednostrannému osvětlení a pozorování. Pro interferometrický fluorescenční mikroskop je vhodné mít fluorofor umístěný uprostřed vzorku mezi krycími sklíčky stejné tloušťky. Takové vzorky lze také zakoupit, jedná se však o zakázkovou výrobu a cena jednoho takového vzorku velmi vysoká. Také z tohoto důvodu byly testovací vzorky pro FHM vyrobeny.

V článku o vlastnostech 4Pi konfokálního mikroskopu [23] byl pro ověření skutečného axiálního rozlišení použit vzorek tvořený vrstvou Nilské modři, která byla ponořena v etanolu a vložena mezi krycí sklíčka. Měření probíhalo s vrstvami o tloušťkách 500 nm až 5 μm . Vzorek byl umístěn do společného ohniska dvou mikroskopových objektivů. Použity byly objektivy 63x a 100x s numerickou aperturou 1,4. Měřila se závislost odezvy tohoto mikroskopu na posuvu podél optické osy. Obrázek 4.1 zobrazuje naměřenou závislost pro 590 nm tlustou vrstvu.

V daném článku byla popsána celková rozptylová funkce daného mikroskopu jako součin rozptylové funkce osvětlení a rozptylové funkce detekce. Jako odezva na nekonečně tenkou fluorescenční vrstvu je definován integrál



Obrázek 4.1: Experimentálně naměřená odezva 4Pi konfokálního mikroskopu. Intenzita byla normována ke 100. Převzato z [23]

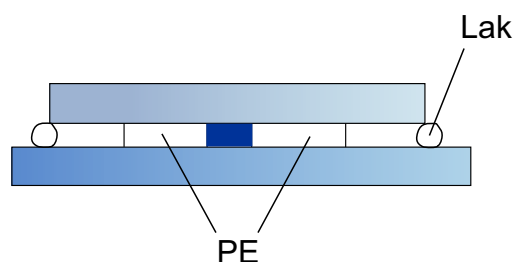
$$I_{vrstva}(z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} h_{os}(x, y, z) \cdot h_{det}(x, y, z) dx dy \quad (4.1)$$

Odezvu na nekonečně strmý fluorescenční schod lze pak vypočítat integrálem zetové odezvy na vrstvu určité tloušťky podél optické osy

$$I_{schod}(z) = \int_{-\infty}^z I_{vrstva}(z') dz' \quad (4.2)$$

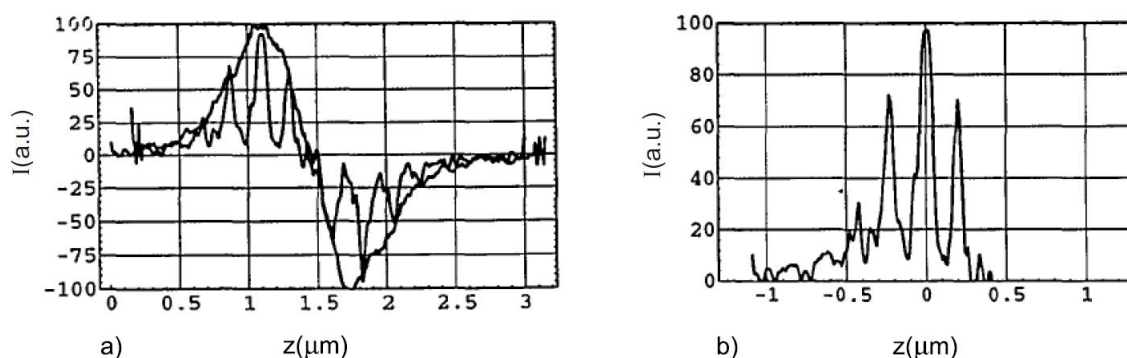
Intenzitu odezvy fluorescenční vrstvy můžeme reálně naměřit a k získání reálného rozlišení je jen dále třeba derivovat tuto závislost. Při teoretickém pokusu v článku byla první derivace porovnána s první derivací závislosti odezvy mikroskopu na posuv u klasického konfokálního mikroskopu. Z obrázku 4.3 a) je patrné, že křivka 4Pi mikroskopu leží pod křivkou klasického konfokálního mikroskopu. Pološířka hlavního píku byla změřena přibližně na 110 nm. Pro porovnání, pološířka hlavního píku klasického konfokálního mikroskopu je 550 nm (viz. obrázek 4.3 a)).

Pro zopakování tohoto pokusu byla vytvořena tenká fluorescenční vrstva. Vzorek je tvořen maskou z polyetylenové (PE) folie tloušťky $5\text{ }\mu\text{m}$ s otvorem o průměru 1 mm. Do tohoto otvoru bylo aplikováno fluorescenční barvivo CMTM 594 WDA od firmy Biotium, excitační vlnová délka pro toto barvivo je 593 nm, emisní vlnová délka 614 nm. PE maska spolu s fluorescenčním barvivem byla umístěna mezi dvě skleněná krycí sklíčka o tloušťkách $170\text{ }\mu\text{m}$. Sklíčka byla k sobě přilepena lakem. Jelikož byly pro proměření tohoto vzorku použity objektivy s nižší numerickou aperturou, tloušťka fluorescenční vrstvy mohla být větší než ve výše uvedeném experimentu. Tloušťka PE folie je přibližně $5\text{ }\mu\text{m}$.



Obrázek 4.2: Vzorek vyrobený pro testování axiálního rozlišení

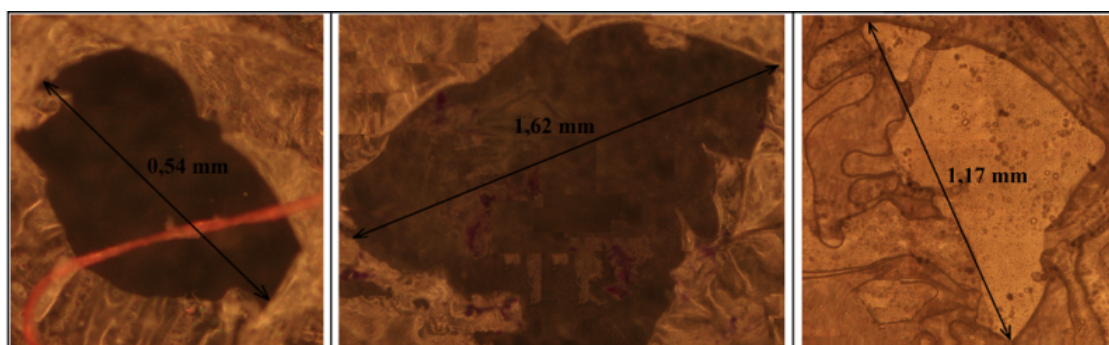
Měření mělo probíhat následovně. Po zaostření na jednu z ploch fluorescenční vrstvy by se postupně piezo posuvem od této plochy odjíždělo, délka kroku by byla zvolena vhodně v rozsahu několika μm . Pro každý krok by byl zaznamenán hologram, předmětem zájmu by byla intenzita interferenčních proužků v závislosti na vzdálenosti. Bohužel dané barvivo ne úplně korespondovalo s námi používanými fluorescenčními filtry, dále vzorek v FHM byl uchycen ve svislé poloze, proto fluorescenční barvivo mohlo stéci k dolní hraně otvoru. Z těchto dvou důvodů nebyl tento pokus úspěšný.



Obrázek 4.3: a) derivace závislosti odezvy mikroskopu na fluorescenční vrstvu, b) výřez z této derivace. Převzato z [23]

Fluorescenční vrstva byla nakonec vytvořena plastovou testovací fluorescenční destičkou Chroma [38] tloušťky jednoho milimetru. Pro dané fluorescenční filtry byla zvolena

destička žluté barvy odpovídající fluoroforu Acridine orange s excitační vlnovou délkou 490 nm a emisní 530 nm. Pro kompenzaci tloušťky byla k této destičce připevněna skleněná destička stejné tloušťky. Jelikož se jednalo o poměrně tlustý vzorek, sladit oba objektivy tak, aby mířily nakolmo k vzorku, bylo náročné. Po té se již mohla opět měřit odezva mikroskopu na posuv podél optické osy. Nebyly však naladěny interferenční proužky ani pro tento fluorescenční vzorek. Přesto, že jeho excitační i emisní vlnová délka odpovídala použitým fluorescenčním filtrům a intenzita emitovaného fluorescenčního světla byla na dostačující úrovni. Na obrázku 4.5 je zobrazen výřez záznamu hologramu tohoto vzorku při použití bílého světla. Jsou na něm jasně patrné interferenční proužky.

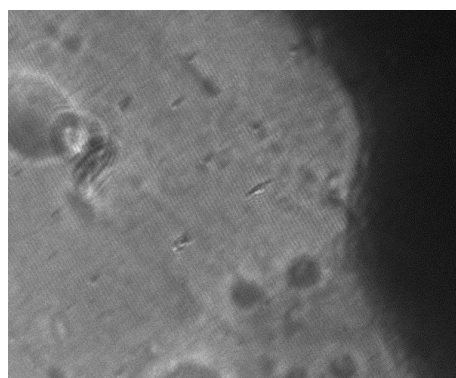


Obrázek 4.4: Detail otvorů v PE folii. Zobrazeno mikroskopem Nikon Eclipse F60, objektivem 10x 0,30.

Další podobný pokus byl navržen a proveden v článku o fluorescenční fázové mikroskopii a nanoskopii [39]. Vychází z toho, že u FPM je axiální rozptylová funkce adekvátní rozlišitelnosti jednotlivých fluoroforů v téže směru. Pološířka axiální rozptylové funkce tedy může být získána odhadem amplitudy interferenčního signálu vznikajícího interferencí dvou fluorescenčních paprsků vzešlých z jednoho fluoroforu, viz. obrázek 3.1. Místo tlusté vrstvy byla použita tenká fluorescenční vrstva tvořená fluorescenčními kuličkami o průměru 100 nm. Opět byla měřena závislost odezvy mikroskopu na posuv podél axiálního směru.

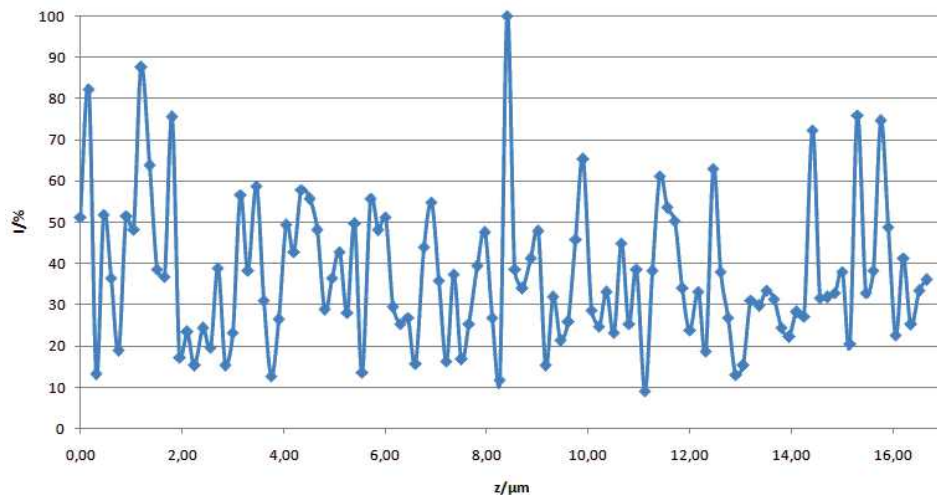
Vzorek pro zopakování tohoto pokusu byl vytvořen nanesením velmi malé kapky roztoku obsahujícího fluorescenční (polystyrenové) kuličky na krycí sklíčko stejné tloušťky jako v prvním pokusu. Excitační vlnová délka pro toto barvivo odpovídá bloku fluorescenčních filtrů s excitačním filtrem 460-490 nm a emisním filtrem 510-570 nm. Tato kapka se druhým sklíčkem rozprostřela po celé ploše a krouživým třením těchto sklíček mezi sebou bylo dosaženo tenké fluorescenční vrstvy.

Měření také probíhalo obdobně jako v prvním případě. Nejprve se zaostřilo na libovolný shluk fluoreskujících kuliček a po malých krocích piezo posuvů byla zaznamenávána odezva mikroskopu. Krok posuvu byl v tomto případě 150 nm. Na obrázku 4.6 je zobrazena naměřená závislost odezvy mikroskopu na intenzitu fluorescenčního záření při přejíždění



Obrázek 4.5: Výřez hologramu fluorescenční testovací destičky při použití bílého světla.

podél optické osy přes tento vzorek. Průběh intenzity podél optické osy však vůbec neodpovídá očekávanému výsledku (obr. 4.1). Osové rozlišení tak nebylo ověřeno ani v tomto případě. Důvodem může být špatné nastavení některé z komponent mikroskopu.



Obrázek 4.6: Závislost intenzity fluorescenčního záření na posuv přes vzorek tvořený tenkou vrstvou z fluorescenčních kuliček.

K pozorování byl použit program Advanced digital holography microscope control od Lukáše Kvasnici a Tomáše Zikmunda [40]. Tento program je určen k online rekonstrukci a zpracování obrazového hologramu, dokáže zobrazit obrazový hologram, vypočte amplitudu, intenzitu a fázi. Obsahuje též možnost ukládání výstupů do obrázkových, či matlabových souborů.

V následující části jsou uvedeny možnosti, které by měly vést ke zlepšení měření.

4.1 Návrh možných úprav

V první řadě je třeba navrhnout a vyrobit držák pro kostku s filtry. V současném stavu jsou filtry pouze položeny před objektivy a je jednoduché je posunout mimo vhodnou polohu, například při manipulaci s osvětlovačem. Pokud je kostka s filtry, přes kterou prochází excitační světlo ve špatné poloze, vzorek není ideálně osvětlen a kvalita zobrazení mikroskopem klesá. Opětovné nastavení do správné polohy pak znesnadňuje fakt, že emitované fluorescenční světlo má nízkou intenzitu, proto je třeba nastavit delší čas expozice kamery (řádově desítky až stovky milisekund). Delší čas expozice pak způsobuje pomalejší odezvu na změnu polohy kostky. Při ostření na různé tlusté vzorky s různým indexem lomu a srovnávání obou větví se využívá možnosti podélného a příčného posuvu obou objektivů. Není však vyznačena počáteční poloha. Po měření jednoho vzorku tak mohou být objektivy vůči sobě výrazně posunuty a při pozorování dalšího vzorku není snadné znovu srovnat polohu objektivů pro tento vzorek. Řešením by mohlo být vyznačení počáteční polohy všech čtyř posuvů, nebo jednodušeji, umístění terčíku se středem do roviny stolku. Na tento terčík se budou objektivy zaměřovat. Dále by bylo vhodné vybavit tyto posuvy pevně připojenými manipulátory.

Další možnou úpravou je umožnění osvětlení z obou stran s možností pouze jednostranného osvětlení a výběrem strany, ze které se bude osvětlovat. Nejenže by se zlepšilo

možné osově rozlišení, ale zároveň by se zjednodušilo ostření na vzorky, které je třeba ostřit v poli bílého světla.

Závěr

Cílem této práce bylo provést rešeršní studii interferometrické fluorescenční mikroskopie a z těchto článků vybrat vhodné metody k otestování zobrazovacích vlastností sestavovaného FHM.

Byla provedena rešeršní studie zadaného tématu, interferenční fluorescenční interferometrie. Byly vytipovány komerčně dostupné testovací vzorky pro interferometrické fluorescenční mikroskopy. Z článků ohledně fluorescenční interferenční mikroskopie jsem vyhledal vhodné testovací metody a z těchto metod vybral a vyrobil vhodné testovací vzorky. Zobrazovací vlastnosti však nebyly ověřeny.

Při používání FHM jsem přišel na několik možností jak vylepšit stávající konstrukční stav a tím zlepšit jak zobrazovací vlastnosti mikroskopu tak měření samotné.

Literatura

- [1] SLABÝ T., et al.: Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, vol. 21(12):14747–14762, 2013.
- [2] VALEUR B. and BERBERAN-SANTOS M. N.: A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. *J. Chem. Educ.*, 88(6):731–738, 2011.
- [3] GOODMAN J. V. and LAWRENCE R. W.: Digital image formation from electronically detected holograms. *Appl. Phys. Lett.*, 11:77–79, 1967.
- [4] KNIGHT W.: Holographic-memory discs may put dvds to shame. 2005. [cit. 2014-4-30] Dostupné z: http://www.newscientist.com/article/dn8370#.U2zPgIF_u9o
- [5] *Institute for Thermal Turbomachinery and Machine Dynamics*. Holographic interferometry for flow and vibration analysis, 2005. [cit. 2014-5-5] Dostupné z: <http://ttm.tugraz.at/?seite=facilities/Techniques/holo>
- [6] CHMELÍK R. and HARNA Z.: Holographic confocal microscopy as a new surface-profiling tool. *Kovové materiály*, vol. 43(7):1463, 1998.
- [7] CHMELÍK R. and HARNA Z.: *Holografický konfokální mikroskop pro bílé světlo.*, 8547, Užité vzor. Praha (1999).
- [8] JEBÁČKOVÁ A.: *Metodika pozorování dictyostelia discoidea v transmisním digitálním holografickém mikroskopu*. [Bakalářská práce.] Brno: VUT, FSI, 2010.
- [9] KOVÁŘOVÁ K.: *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*. [Bakalářská práce.] Brno: VUT, FSI, 2013.
- [10] ČOLLÁKOVÁ J.: *Průtokové komůrky pro mikroskopii živých buněk*. [Diplomová práce.] Brno: VUT, FSI, 2011.
- [11] BARTONÍČEK J.: *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky, 2011*. [Bakalářská práce.] Brno: VUT, FSI, 2011.
- [12] KRUG W., RIENITZ J., and SCHULZ G.: *Contributions to Interference Microscopy*. Hilger, Watts LTD., London, 1964.
- [13] DYSON J.: An interferometer microscope. *Proceedings of the Royal Society*, pages 170–187, 1950.

- [14] BILENCA A., et al.: Fluorescence interferometry principles and applications in biology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 1130:68–77, 2008.
- [15] SCHERMELLEH L., HEINTZMANN R., and LEONHARD H.: A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology*, vol. 190(issue 2):165–175, 2010.
- [16] HAZRA L. N. and REZA N.: Super-resolution by pupil plane phase filtering. *Pramana - J. Phys.*, vol. 75(5):855–867, 2010.
- [17] DAVIES B. J.: Capabilities and limitations of pupil-plane filters for superresolution and image enhancement. *Optics Express*, vol. 12(17):4150–4156, 2004.
- [18] BORN M. and WOLF E.: *Principles of optics*. Pergamon Press, New York, 6th ed. edition, 1980.
- [19] *Wikipedia*. Konvoluce, 2013. [cit. 2014-5-28] Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Konvoluce>
- [20] GUSTAFSSON M. G. L.: Extended resolution fluorescence microscopy. In *Current opinion in structural biology*, pages 627–634. Elsevier, Oxford, 1999.
- [21] TKACHENKO N. V.: Two photon absorption. In *Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentations*, pages 293–294. Elsevier, Oxford, 2006.
- [22] DENK W., et al.: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, vol. 248(issue 4951):162–179, 1990.
- [23] HELL S. W.: Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope. *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 9(issue 12):4971–4983, 1992.
- [24] GUSTAFSSON M. G. L., et al.: *Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution*. USA, U.S. PATENT, 5,671,085. 1997–09–23.
- [25] HELL S. W., SCHMIDT R., and . BERWERSDORF J.: Comparison of i5m and 4pi-microscopy. *Journal of Microscopy*, vol. 222(issue 2):105–117, 2006.
- [26] GUSTAFSSON M. G. L., et al.: Surpassing the lateral resolution limit by a factor by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, vol. 198(issue 2):82–87, 2000.
- [27] GUSTAFSSON M. G. L.: Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theretically unlimited resolution. *PNAS*, vol. 102(issue 37):13081–13086, 2005.
- [28] HELL S. W. and WICHMANN J.: Breaking the diffraction limit of resolution by stimulated emission: simulated-emission depletion microscopy. *Opt. Lett.*, vol. 19:780–783, 1994.
- [29] COURTIAL J. and O’HOLLERAN K.: Experiments with twisted light. *The European Physical Journal Special Topics*, vol. 145(1):35–47, 2007.
- [30] HEILEMANN M.: Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *Journal of Biotechnology*, vol. 149:243–251, 2010.

- [31] RITTWEGER E., et al.: Sted microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*, vol. 3:144–147, 2009.
- [32] HELL S. W., JAKOBS S., and EGNER A.: Fast 100-nm resolution 3d-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:3370–3375, 2002.
- [33] *Leica Microsystems* Enter the Fluorescence Nano-World: First Commercial 4Pi Microscope, 2012. [cit. 2014-5-25] Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/news-media/news/news-details/article/enter-the-fluorescence-nano-world-first-commercial-4pi-microscope/>
- [34] HELL S. W., JAKOBS S., and EGNER A.: Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. I. Comparative study of concepts. *J. Opt. Soc. Am.*, 18:36–48, 2001.
- [35] SCHERMELLEH L., et al.: Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, vol. 320(issue 5881):1332–1336, 2008.
- [36] REGO E.H., et al.: Nonlinear structured-illumination microscopy with a photo switchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109(issue 3):135–143, 2012.
- [37] ABRAHAMSSON S., et al.: Fast multicolour 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy. *Nature Methods*, vol. 10:60–63, 2013.
- [38] *Chroma Technology Corp.* Autofluorescent plastic slides, 2004. [cit. 2014-5-25] Dostupné z: <http://www.chroma.com/product/filter-accessories/diagnostic-slides/92001-slides>
- [39] BILENCA A.: Fluorescent phase microscopy (fpm) and nanoscopy. In *Biomedical optical phase microscopy and nanoscopy*, pages 387–405. Academic Press, Oxford, 1st ed. edition, 2013.
- [40] KVASNICA L., and ZIKMUND T.: *Pokročilé ovládání holografického mikroskopu A2/212* URL:<https://physics.fme.vutbr.cz/ufi.php?Action=&Id=1853> (software)