



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

VLÁKNOVÝ OSVĚTLOVACÍ MODUL PRO MIKROSKOPII

FIBER GUIDED ILLUMINATION MODULE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vlastimil Kropáč

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Student: **Bc. Vlastimil Kropáč**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

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:

Vláknový osvětlovací modul pro mikroskopii

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Pro pozorování rychlých dynamických dějů v živých buňkách je nutné snížit expoziční čas kamery CCHM mikroskopu. Aby byla zachována kvalita obrazových dat, je nutné osvětlit vzorek vyšší intenzitou světla. Nově navrhovaný modul má tento požadavek zajistit.

Cíle diplomové práce:

- 1) Provést rešerši stávajících komerčních osvětlovacích modulů a stanovit nutné parametry pro použití s CCHM.
- 2) Navrhnout optické schéma modulu.
- 3) Vybrat vhodný zdroj světla a optické komponenty.
- 4) Modul sestavit a otestovat.

Seznam doporučené literatury:

HARNA, Zdeněk. Přesná mechanika. Brno: Vysoké učení technické, 1996. ISBN 8021407948.

YODER, Paul R. Mounting optics in optical instruments. 2nd ed. Bellingham, Wash.: SPIE, 2008. ISBN 978-0819471291.

TRYLIŃSKI, Władysław. Fine mechanisms and precision instruments: principles of design. Pergamon, 1971.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2019/20

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

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

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá návrhem osvětlovacího systému pro koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM). V teoretické části je zmíněna historie mikroskopie, princip holografie a jednotlivé druhy interferenční mikroskopie. Pro přiblížení daného tématu, jsou v práci zmíněny jednotlivé zdroje světla a přehled současných osvětlovacích systémů. Diplomová práce dále popisuje postup návrhu vláknového osvětlovacího modulu pro mikroskopii od optického návrhu, přes návrh konstrukce až na poslední krok, kterým je sestavení a otestování modulu.

Summary

This diploma thesis describes the design of the illumination system for a Coherence-Controlled Holographic Microscope (CCHM). The theoretical part mentions the history of microscopy, the principle of holography and individual types of interference microscopy. To get closer to the topic, individual light sources and an overview of current illumination systems are mentioned. The diploma thesis also describes the procedure of designing a fiber-optic illumination module for microscopy from optical design through design of construction to the last step, which is assembly and testing of the module.

Klíčová slova

Holografie, interferometrie, mikroskopie, holografická mikroskopie, zdroje světla, LED, optický návrh, optická simulace, konstrukční návrh.

Keywords

Holography, interferometry, microscopy, holographic microscopy, light sources, LED, optical design, optical simulation, mechanical design.

KROPÁČ, V. *Vláknový osvětlovací modul pro mikroskopii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2020, 56 s., vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci zpracoval samostatně, pod odborným vedením Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D., a použil jen literaturu, která je citovaná a uvedená v seznamu literatury.

.....

V Brně 26. června 2020.

Děkuji mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Zbyňkovi Dostálovi, Ph.D., za cenné rady, připomínky a poznámky, které mi poskytl při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji panu Ing. Martinovi Antošovi, Ph.D., za konzultace, které mi poskytl během zpracování této diplomové práce. Tímto také děkuji své rodině za podporu a trpělivost při studiu.

Obsah

Úvod	3
1 Teoretický úvod	5
1.1 Mikroskopie	5
1.2 Interferenční mikroskopie se světlem nízké koherence	6
1.2.1 Interferenční mikroskopy založené na Mach-Zehnder interferometru	9
1.2.2 Interferenční mikroskopy založené na polarizovaném světle	10
1.2.3 Interferenční mikroskopy založené na odraženém světle	11
1.3 Holografická mikroskopie	11
1.3.1 Princip digitálního holografického zobrazení	12
1.3.2 Koherencí řízené holografické mikroskopy	14
2 Zdroje světla	18
2.1 Světelné zdroje inkadescenční	18
2.1.1 Žárovky	18
2.1.2 Halogenové žárovky	18
2.2 Světelné zdroje výbojkové	19
2.2.1 Vysokotlaké výbojky	19
2.2.2 Nízkotlaké výbojky	20
2.3 Světelné zdroje polovodičové	20
2.3.1 LED (Light-Emitting Diodes) dioda	20
2.3.2 Laserové LED diody	21
3 Současné osvětlovací systémy	22
3.1 Wolfram-halogenová lampa	22
3.2 Rtuťová lampa	22
3.3 Xenonová lampa	23
3.4 Halogenidová výbojková lampa	24
3.5 LED lampy	25
3.6 Současný osvětlovací systém CCHM	28
4 Motivace a cíle práce	30
5 Návrh osvětlovacího systému	31
5.1 Optický návrh	31
5.1.1 Světlovod	31
5.1.2 Výběr LED diody	31
5.2 Optická simulace	34
5.2.1 Dvouočkový osvětlovač	34
5.2.2 Dvouočkový osvětlovač s TIR	35
5.2.3 Vláknový optický taper	37

6	Konstrukční a mechanické řešení	41
6.1	3D návrh v programu Solidworks	41
7	Sestavení a otestování modulu	45
7.1	Vyrobený osvětlovací modul	45
7.2	Testování osvětlovacího modulu	46
7.2.1	Měření výkonu osvětlovacího modulu	46
	Závěr	49
A	Seznam příloh	51
	Seznam použité literatury	53

Úvod

Ze spousty lidí, pro které se stal optický mikroskop neodmyslitelným, každodenním pomocníkem, si málokdo vzpomene, že tento přístroj vznikl před více než 400 lety. Jeho název je odvozen z řeckých slov micron – malý a schope – cíl. Tím je dán i samotný účel využití, tzn. sledování objektů prostým okem nesnadno viditelných nebo zcela neviditelných. Mikroskopové techniky jsou v dnešní době velice rozšířené a jejich druhů je nespočet. Jednu z těchto technik představuje holografická mikroskopie. Holografie pochází z řeckých slov holos – úplný a grafie – záznam. Holografická mikroskopie poskytuje informaci, nejen o intenzitě, ale také o fázi světla, které projde nebo se naopak odrazí zobrazeným předmětem. Holografická mikroskopie má široké spektrum využití od technických oborů až k biologickým aplikacím, které představují velký význam.

Brno je kolébkou mikroskopie a stejně tak tomu je i v případě nekoherentní holografické mikroskopie. Na Vysokém učení technickém v Brně se již řadu let vyvíjí koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM), který je v současné době i komerčně dostupný. Nádorových onemocnění v současné době neustále přibývá a CCHM představuje dokonalý nástroj pro jejich detailnější prozkoumání a lepší porozumění. Jedná se o přístroj a stejně jako se vyvíjí dnešní doba a technologie, tak je i zde prostor pro vylepšení a zdokonalení. Současný osvětlovací systém CCHM nemá dostatečnou intenzitu světla, která by umožňovala pozorování rychlých dynamických dějů v živých buňkách za současného snížení expozičního času kamery.

V dnešním 21. století jsme svědky revoluce i v oblasti osvětlovacích systémů. Klasická žárovka jejímž vynálezcem je Heinrich Göbel a která byla zdokonalena díky Thomasi Alvu Edisonovi je dnes stále více nahrazována LED diodami. LED diody představují pokrok nejen v oblasti osvětlovacích systémů, ale rovněž v oblasti digitálních zařízení. Díky těmto technologiím jsme schopni světlo využívat efektivněji a s nižšími náklady na provoz.

Cílem této diplomové práce je poskytnout dostatečné množství informací ohledně osvětlovacích systémů pro jejich použití v mikroskopii. Dále v návaznosti na současně stále více se objevující LED světelné zdroje, je i zde prostor pro začlenění této nové technologie do systému CCHM. Tento nově navrhovaný osvětlovací modul by měl přispět ke zvýšení intenzity světla v objektové a referenční větvi mikroskopu, a tím vést ke zkvalitnění pozorování živých buněk.

1 Teoretický úvod

1.1 Mikroskopie

V 1. století A. D. Seneca popsal skutečné zvětšení pomocí vodní koule. Napsal, že dopisy lze zvětšit a vyjasnit vidění skrz kouli skla naplněnou vodou. O 1 000 let později arabský učenec Alhazen napsal hlavní práci ohledně optických principů, v níž popsal anatomii oka a jak čočky zaostřují obraz. Raná historie mikroskopu a jeho vynálezců je zahalena mnoha nejasnostmi a spoustou dezinformací. Na konci 16. století došlo k rozsáhlému rozšíření brýlových čoček a lidé si více všimli zvětšovacích vlastností čoček. První složený mikroskop (dvě a více čoček) objevil Hans Jansen nebo jeho syn Zacharias z Middleburgu v Holandsku kolem roku 1595. V roce 1830 Joseph Jackson Lister dokázal, že pokud je několik čoček s malým zvětšením umístěno v určité přesné vzdálenosti od sebe, stále získáme sférickou aberaci z první čočky, ale nezískáme další aberaci z ostatních čoček. Lister publikoval svou práci, ale ta byla ignorována a tak si nechal postavit mikroskop podle svých vlastních představ. Jednu z prvních knih mikroskopie vytvořil Robert Hooke (1635–1703). Byl správcem experimentů v královské společnosti v Londýně. V roce 1663 byl požádán o sérii přednášek o své práci s mikroskopy. Jeho první práce zahrnovala pohled na strukturu kusu korku. Řezal tenké pláty žiletkou a ve svém mikroskopu viděl malé prostory, z nichž je korek vyroben. Tyto prostory pojmenoval jako „buňky“. V roce 1665 publikoval své výsledky práce v knize „Micrographia“. Prozkoumal přírodní a člověkem vytvořené předměty od jehly až k očím mouchy. Informoval také o konstrukci mikroskopů, které použil.

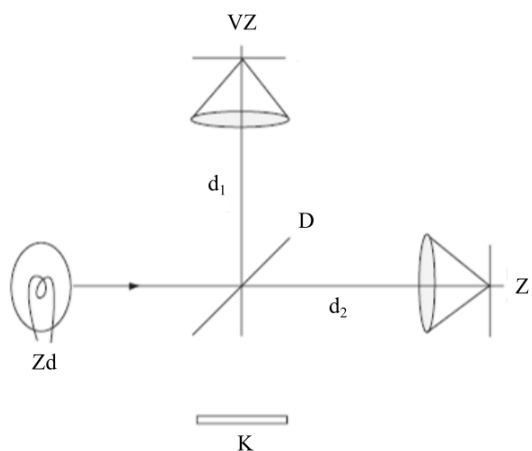
Jedním ze všech velkých přispěvatelů do mikroskopie byl amatér – Holanďan, jehož jméno je v dnešní době velmi známé jako Antony van Leeuwenhoek (1632–1723). Objevil a popsal bakterie, spermie, krevní buňky a mnoho dalšího. Jeho výzkumy byly široce rozšířeny a jeho objevy upoutaly pozornost vědců. Během svého života postavil přes 500 mikroskopů s jedinou čočkou, které Hooke považoval za nepraktické. Předpokládá se, že každý přístroj byl použit pouze pro jeden typ vzorku. Jeho kresby jsou jednoznačné a jsou svědectvím o jeho pozorovatelských dovednostech. Udělal první popis mikroorganismů včetně bakterií. Jeho nejsilnější čočky zvětšovaly asi 300krát a dokázaly rozlišit detaily o velikosti 1,4 mikrometru [1].

V roce 1886 Ernst Karl Abbe (1840–1905) a Carl Zeiss (1816–1888) společně přispěli k výrobě apochromatických objektivů. Tyto objektivy poskytovaly snímky se sníženou sférickou aberací a bez barevných zkreslení (chromatické aberace) při vysokých numerických aperturách. O několik let později, v roce 1893, profesor August Köhler objevil metodu osvětlení, kterou vyvinul pro optimalizaci fotomikrografie, což mikroskopům umožnilo plně využít rozlišovací schopnost Abbeho objektivů. V posledním desetiletí 19. století došlo k inovacím v optické mikroskopii, včetně metalografických mikroskopů, anastigmatických fotočoček, binokulárních mikroskopů s hranoly napřimujícími obraz a prvních stereo mikroskopů. Začátkem 20. století začali výrobci mikroskopů s parfokálními objektivy, které umožňují, aby obraz zůstal v ohnisku, když si člověk, který mikroskopuje, mění objektivy na rotujícím nosiči objektivů. V roce 1824 Zeiss představil

metalografii ve stylu Le Chatelier s optikou korigovanou na nekonečno. Krátce před druhou světovou válkou Zeiss vytvořil několik prototypů mikroskopů s fázovým kontrastem, založených na optickém principu, který vyvinul Frits Zernike [2, 3]. O několik let později byly stejné mikroskopy modifikovány tak, aby produkovaly časosběrný záznam buněčného dělení získaný s optikou fázového kontrastu. Tato technika zvyšující kontrast se stala všeobecně uznávanou teprve v 50. letech 20. století a je stále volbou pro mnoho buněčných biologů. Fyzik George Nomarski představil v roce 1955 vylepšení designu Wollastonova hranolu pro další výkonnou teorii mikroskopie vytvářející kontrast. Tato technika se běžně označuje jako Nomarského interference nebo diferenciální interferenční kontrastní (DIC) mikroskopie [4] a spolu s fázovým kontrastem umožnily vědcům prozkoumat mnoho nových oblastí v biologii využívajících žijící buňky nebo neobarvené tkáně. Robert Hoffman představil další způsob zvyšování kontrastu v živém materiálu využíváním fázových gradientů v blízkosti buněčných membrán. Tato technika se nyní nazývá Hoffmanův modulační kontrast a je k dispozici jako volitelné příslušenství u většiny moderních mikroskopů [5].

1.2 Interferenční mikroskopie se světlem nízké koherence

Interferenční mikroskopie se světlem nízké koherence má oproti konvenčním technikám interferometrie mnoho výhod, zahrnujícím odstranění koherenčního šumu a možnost využít efekt koherenční brány daný nízkou koherencí světla k tvorbě optických řezů vzorkem (v reflexním módu) nebo k zobrazení v turbidním médiu (v transmisním módu) [6]. Základní schéma uspořádání interferenčního mikroskopu je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma interferenčního mikroskopu. Zd: zdroj osvětlení; D: dělič svazků; Z: zrcadlo; VZ: vzorek; K: detektor (CCD čip), d_1 : objektová větev; d_2 : referenční větev. Převzato a upraveno z [6].

Zdrojem osvětlení Zd je bílé nekoherentní světlo. Vzorek VZ je umístěn do objektové větve interferometru d_1 a druhá větev d_2 slouží jako referenční. Vlna ze zdroje osvětlení Zd je pomocí děliče svazků D rozdělena na vlnu, která následně dopadá na

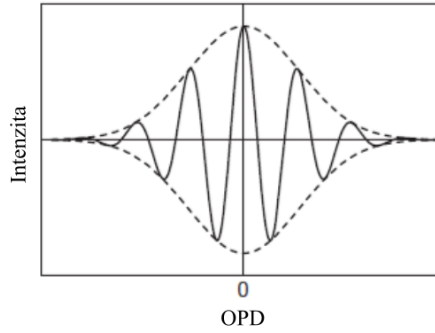
vzorek VZ a vlnu, která dopadá na referenční zrcadlo Z. Obě vlny, ze vzorku VZ a referenčního zrcadla Z prochází stejnou cestou přes dělič svazků D a vlnění je detekováno kamerou K (CCD čip). Superpozice vln $U(t)$ procházejících oběma rameny interferometru je dle [6] vyjádřena:

$$U(t) = U_s(t) + U_r(t + \tau), \quad (1)$$

kde U_s a U_r jsou amplitudy objektové a referenční větve. Hodnota τ je časové zpoždění v důsledku rozdílu délky optických drah (OPD), kterými svazky paprsků procházejí. Jakýkoliv intenzitní detektor (CCD nebo CMOS) ve skutečnosti měří intenzitu světla $I_d(\tau)$, to jest časově středovanou hodnotu amplitudy $\langle |U|^2 \rangle$, danou vztahem

$$I_d(\tau) = \langle |U|^2 \rangle = \langle [U_s^*(t) + U_r^*(t + \tau)][U_s(t) + U_r(t + \tau)] \rangle. \quad (2)$$

Obrázek 2 zobrazuje závislost změny intenzity v daném bodě obrazu na rozdílu optické dráhy (OPD).



Obrázek 2: Výstup z interferometru. OPD: rozdíl optické dráhy. Čárkované čáry představují okrajovou obálku interferenčních proužků. Převzato a upraveno z [6].

U širokopásmového prostorově nekoherentního zdroje lze intenzitu $I_{(\tau)}$ v kterémkoliv bodě (x, y) v rovině obrazu odpovídající bodu na vzorku, psát jako

$$I_{(\tau)} = I_s + I_r + 2(I_s I_r)^{1/2} \gamma \left(\frac{p}{c} \right) \cos \left[\left(\frac{2\pi}{\bar{\lambda}} \right) p + \phi_0 \right], \quad (3)$$

kde I_s a I_r jsou intenzity dvou paprsků na sobě nezávislých, $\gamma(p/c)$ je komplexní stupeň koherence (odpovídající viditelnosti obálky okrajů interferenčních proužků), $\cos[(2\pi/\bar{\lambda})p + \phi_0]$ je kosinusoidální modulace, kde $\bar{\lambda}$ odpovídá vlnové délce zdroje, c rychlosti světla ve vakuu, $p = \text{OPD} = 2(z - h)$ je rozdíl v délce optických drah procházejících oběma paprsky a ϕ_0 je rozdíl fázových posunů v důsledku odrazu na děliči svazků D a zrcadlech Z, viz rovnice (11.15) z [6].

Interferenční obrazce pro každý pixel mohou být zpracovány za účelem získání funkce viditelnosti. Můžeme tedy určit maximální amplitudu intenzity a umístění tohoto píku podél osy skenování. Hodnoty amplitudy píku poskytují zaostřený obraz zkoumaného objektu (analogický s podobnou technikou v konfokální mikroskopii), zatímco hodnoty umístění tohoto píku podél osy skenování poskytují výšku povrchu v odpovídajících bodech. Hlavním cílem interferometrie se světlem nízké koherence je zjistit hloubku vzorku

z místa maximální intenzity proužků pomocí různých kroků, které lze rozdělit do dvou hlavních skupin:

Digitální filtrování

Nejběžněji používanou metodou k získání intenzity proužků z dat vzorku je digitální filtrování ve frekvenční doméně. Tento postup zahrnuje dvě diskrétní Fourierovy transformace (vpřed a inverzní) pro každý pixel ve vzorku. Tento postup tedy vyžaduje velké množství operační paměti počítače a delší dobu zpracování.

Fázový posun

Přístup, který je výpočetně mnohem méně náročný, spočívá v řízené změně fáze referenční vlny třemi nebo více kroky k . Pro každou změnu je proveden záznam odpovídající hodnoty intenzity I_k . Tyto hodnoty intenzity pak mohou být použity k vyhodnocení kontrastu proužků přímo v dané pozici. K extrakci lze použít různé metody posunu fáze na základě měření pro tři nebo více hodnot fázového kroku. Čtyř-krokové metody [6, 7] se zdají být dobré pro měření kontrastu nebo intenzity I_k . Provedou se 4 měření intenzity:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_0[1 + \gamma \cos(\varphi + 0)] = I_0[1 + \gamma \cos(\varphi)], \\ I_2 &= I_0 \left[1 + \cos \left(\varphi + \frac{\pi}{2} \right) \right] = I_0[1 - \gamma \sin(\varphi)], \\ I_3 &= I_0[1 + \cos(\varphi + \pi)] = I_0[1 - \gamma \cos(\varphi)], \\ I_4 &= I_0 \left[1 + \cos \left(\varphi + \frac{3\pi}{2} \right) \right] = I_0[1 + \gamma \sin(\varphi)], \end{aligned} \quad (4)$$

kde φ je fáze vlny. Jedná se o velmi účinnou metodu, která také opravuje chyby, takže pokud fázový krok není $\frac{\pi}{2}$, stále je viditelnost patrná, ale je zmenšená o faktor, který závisí na stupni fáze. To je dostatečné pro určení polohy píku, ale protože se fázový krok může změnit, pokud je spektrální distribuce změněna při odrazu, může to vést k chybám v zaostřeném obrazu. Fázi předmětové vlny lze určit ze vztahu

$$\tan \varphi = \frac{I_4 - I_2}{(I_1 - I_3)}. \quad (5)$$

V případě tří-krokové metody se fáze referenčního paprsku mění konstantní rychlostí $\delta(t)$ a pokaždé, když je změna fáze rovna násobku $\frac{\pi}{2}$, je ukončeno načtení detektoru [8]. Základní rovnice pro intenzitu danou interferencí vln, kde I_0 je průměrná intenzita a druhý člen představuje modulaci proužků, je dána vztahem

$$I(x, y, t) = I_0 + I_1 \cos[\varphi(x, y) + \delta(t)]. \quad (6)$$

Pokud je intenzita I integrována, zatímco $\delta(t)$ se mění od 0 do $\frac{\pi}{2}$, $\frac{\pi}{2}$ do π a π do $\frac{3\pi}{2}$, je výsledný záznam intenzit na CCD $A(x)$, $B(x)$ a $C(x)$ [7] daný dle:

$$\begin{aligned} A(x, y) &= I'_0 + I'_1[\cos \varphi(x, y) - \sin \varphi(x, y)], \\ B(x, y) &= I'_0 + I'_1[-\cos \varphi(x, y) - \sin \varphi(x, y)], \\ C(x, y) &= I'_0 + I'_1[-\cos \varphi(x, y) + \sin \varphi(x, y)]. \end{aligned} \quad (7)$$

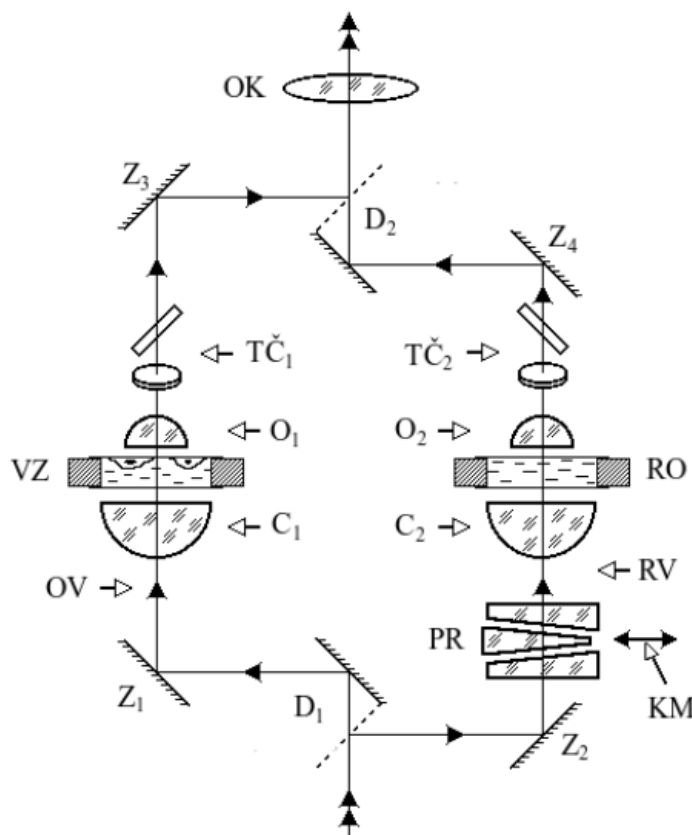
Z těchto záznamů může být fáze $\varphi(x)$ spočítána dle:

$$\tan \varphi(x, y) = \frac{C(x, y) - B(x, y)}{A(x, y) - B(x, y)}, \quad (8)$$

viz [7].

1.2.1 Interferenční mikroskopy založené na Mach-Zehnder interferometru

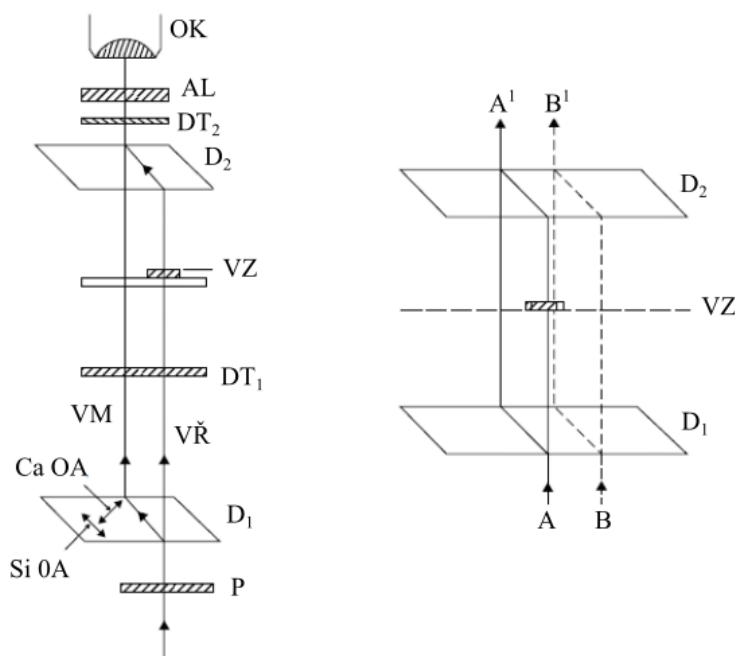
Příkladem tohoto typu interferometru je Hornův interferenční mikroskop viz obrázek 3. V tomto interferometru prochází dopadající světlo děličem svazků D_1 . V děliči svazků se polovina světla odráží pod úhlem 90° vzhledem k přicházejícímu paprsku a polovina světla prochází přímo skrz. Obě vlny se šíří, dokud nedopadnou na dvě plně odrazná zrcadla $Z_{1,2}$. Poté obě odražené vlny putují skrz vzorek VZ v objektové větvi OV a referenční vzorek RO v referenční větvi RV a odráží se na dvou zrcadlech $Z_{3,4}$ do jiného děliče svazků D_2 . Finální dělič svazků D_2 kombinuje obě vlny. Jsou-li zrcadla umístěna správně, jsou vzdálenosti, po které se obě vlny pohybují rovné, obě vlny konstruktivně interferují a vytváří interferenční strukturu na výstupu mikroskopu.



Obrázek 3: Schéma Hornova mikroskopu. D: děliče svazků; Z: zrcadla; VZ: vzorek; RO: referenční vzorek; $C_{1,2}$: kondenzory; $O_{1,2}$: objektivy; $TČ_{1,2}$: tubusové čočky; OK: okulár; PR: optické klíny; KM: krokový motor; OV: objektová větev; RV: referenční větev. Převzato a upraveno z [7].

1.2.2 Interferenční mikroskopy založené na polarizovaném světle

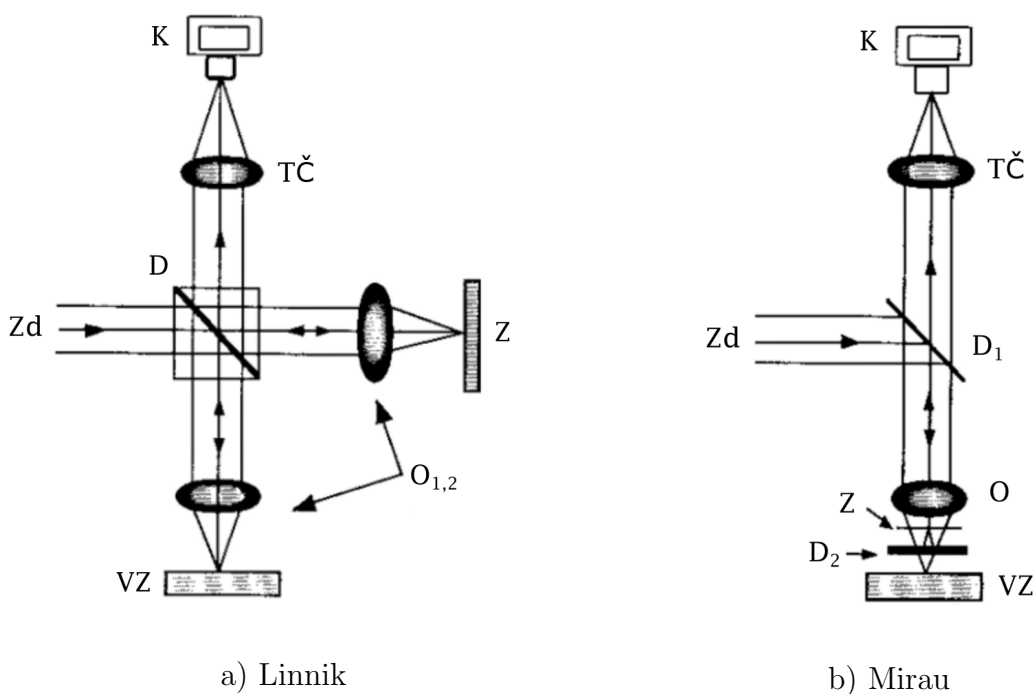
Příkladem tohoto druhu mikroskopů je Jamin–Lebedeff interferenční mikroskop (obrázek 4), kdy je svazek lineárně polarizován polaroidovým filtrem P. Lineárně polarizované světlo pak prochází dvojlomným děličem D_1 , který je orientován s optickou osou 45° vzhledem k úhlu maximálního přenosu polarizátoru. Dělič D_1 rozdělí lineárně polarizované světlo na vlnu řádnou VŘ a ortogonálně polarizovanou vlnu mimořádnou VM, která je příčně oddělená. Stupeň příčného oddělení řádných a mimořádných vln závisí na dvojlomu a tloušťce krystalu. V mikroskopu Jamin–Lebedeff je hodnota oddělení řádné VŘ a mimořádné vlny VM $546\text{ }\mu\text{m}$ pro dvojici kondenzor–objektiv při zvětšení $10\times$; $175\text{ }\mu\text{m}$ pro dvojici kondenzor–objektiv při zvětšení $40\times$; a $54\text{ }\mu\text{m}$ pro dvojici kondenzor–objektiv při zvětšení $100\times$. V případě dvojlomných křemenných hranolů je mimořádná vlna zpomalena vzhledem k řádné vlně. Obě vlny prochází skrz vzorek VZ a $\lambda/2$ destičku DT_1 . Poté jsou obě vlny spojeny pomocí dělice svazku D_2 a prochází skrz $\lambda/4$ destičku DT_2 . $\lambda/4$ destička DT_2 způsobí změnu lineárně polarizované vlny na vlnu s kruhovou polarizací, která následně prochází analyzátozem AL a okulárem OK. Když se podíváme na obraz v interferenčním mikroskopu založeném na interferometru Jamin–Lebedeff, vidíme dva obrazy, které jsou od sebe laterálně posunuty. Jeden obraz je zaostřený a druhý je nezaostřený (astigmatický). Získáme tak obraz A^1 z vlny řádné, která prochází vzorkem a obraz B^1 z vlny mimořádné, která prochází vzorkem [9].



Obrázek 4: Schéma interferenčního mikroskopu Zeiss založeného na interferometru Jamin–Lebedeff. P: polarizátor; $D_{1,2}$: dělice svazků; DT_1 : $\lambda/2$ destička; VZ: vzorek; DT_2 : $\lambda/4$ destička; AL: analyzátor; OK: okulár; Ca OA: kalcit; Si OA: křemen; VŘ: vlna řádná; VM: vlna mimořádná; A^1 : obraz získaný z řádné vlny procházející vzorkem; B^1 : obraz získaný z mimořádné vlny procházející vzorkem. Převzato a upraveno z [9].

1.2.3 Interferenční mikroskopy založené na odraženém světle

Základy používané pro interferenční mikroskopii na procházející světlo lze také použít pro interferenční mikroskopii s odraženým světlem, např. pro mikroskopy Sangnaca, Linnika, Miraua a interferenčního mikroskopu Zeisse (Raentsch). Svazek paprsků ze zdroje Z_d je rozdělen na dvě vlny pomocí děliče svazku D viz obrázek 5 a) pro Linnikův mikroskop a pomocí děliče $D_{1,2}$ viz obrázek 5 b) pro Mirauův mikroskop. Jedna vlna, která se odráží pomocí zmíněných děličů svazků, dopadá na vzorek VZ ; druhá vlna, která je propuštěna děličem svazku, dopadá na zrcadlo Z . Vlny se odráží od vzorku VZ a zrcadla Z , a poté procházejí opět děličem svazku, kde je vlna z objektové větve zkombinována s vlnou z referenční větve a následně dopadají na detektor K (CCD čip). Jiné odrazné interferenční mikroskopy jsou založeny na polarizovaném světle a používají jediný dvojlomný hranol jak k rozdělení, tak i ke spojení svazku paprsků a tím k vytvoření interferenčního obrazu [9].



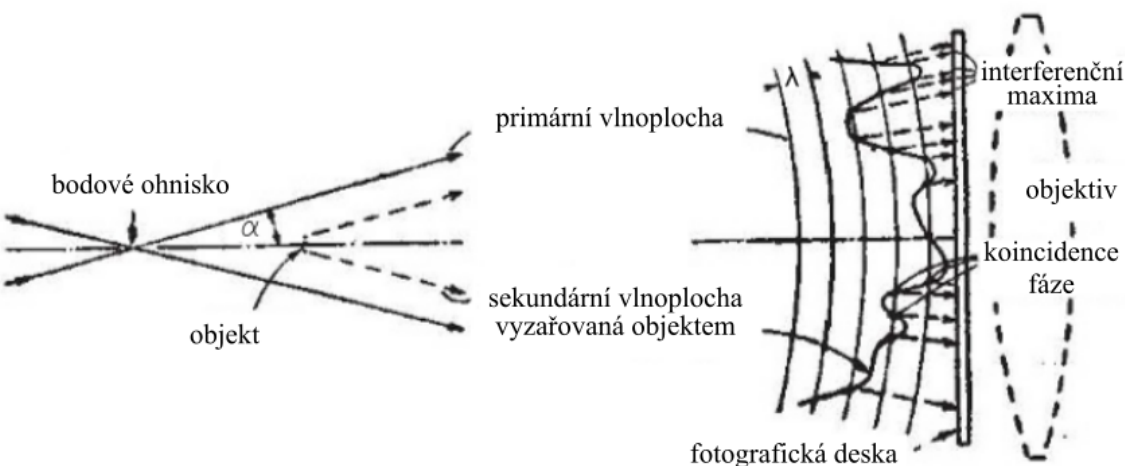
Obrázek 5: Schéma dvou možných uspořádání používaných v interferenčních mikroskopech na odraz: a) Linnik, b) Mirau. Z_d : nekoherentní zdroj osvětlení; D : děliče paprsků; O : objektivy; Z : zrcadlo; VZ : vzorek; $TČ$: tubusová čočka; K : detektor (CCD čip). Převzato a upraveno z [6].

1.3 Holografická mikroskopie

Princip holografie byl objeven Dennisem Gaborem v roce 1948 jako možný způsob zlepšení rozlišení elektronového mikroskopu [10]. Mikrofotografie jsou získávány ve dvou krocích, elektronickou analýzou, následovanou optickou syntézou, jako v rentgenovém mikroskopu Sira Lawrence Bragga. Nový princip zajišťuje kompletní záznam amplitud a fází v jednom

ímku, a je použitelný na velmi obecnou třídu objektů.

Objekt je osvětlen svazkem přivedeným do ohniska, od kterého se odchyluje v po-
 řičním úhlu α (obrázek 6). Dostatečná koherence je zajištěna, pokud je průměr zaostření
 aussovského svazku menší než mez rozlišení, $\lambda/2 \sin \alpha$. Fyzický průměr určený difrakcí
 sférickou aberací osvětlovacího systému může být mnohem větší. Objekt je v malé
 vzdálenosti za bodovým ohniskem (nebo v jeho přední části), za nímž následuje fotogra-
 fická deska ve velkém násobku této vzdálenosti. Toto uspořádání je tedy podobné elektro-
 vému transmisnímu mikroskopu, ale používá se v rozsahu, ve kterém je transmisní mi-
 kroskop zbytečný, protože vytváří obrazy velmi odlišné od originálu. Objekt je s výhodou
 menší než plocha osvětlená v rovině objektu a musí být upevněn na nosiči, který přenáší
 atelnou část primární vlny. Fotografický záznam je vytvářen interferencí primární vlny
 koherentní částí sekundární vlny vyzařované objektem. Lze ukázat, že přinejmenším ve
 větších částech hologramu budou interferenční maxima vznikat téměř tam, kde se fáze
 primární a sekundární vlny shodují [11].



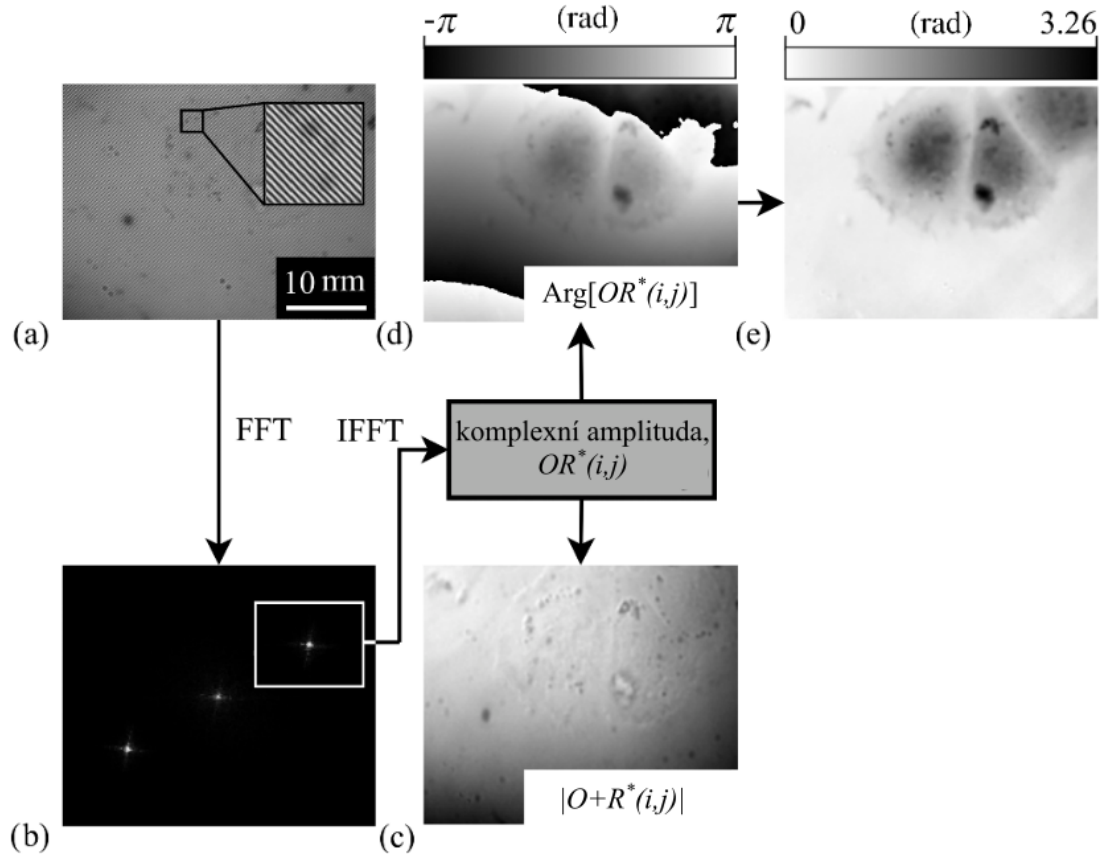
obrázek 6: Interference mezi homocentrickým svazkem paprsků a sekundární vlnou zařovanou malým objektem. Převzato a upraveno z [11]

3.1 Princip digitálního holografického zobrazení

rogram je zaznamenán na detektoru K (viz obrázek 8, 9) a obraz je rekonstruován v reálném čase pomocí počítače. Detektorem je černobílý CCD čip s roztečí pixelů $6,45 \mu\text{m}$. Z hlediska použití CCD čipu pro detekci je velmi žádoucí použít plan-korigovanou optiku jako zobrazovací část, nejen pro objektivy, ale také pro tubusové a výstupní čočky. Detektor je schopen zaznamenat intenzitu I , ve formě hologramu, který nese informaci o fázi vlny φ . Podíváme-li se na obraz komplexní amplitudy objektové vlny $O(x, y)$ a referenční vlny $R(x, y)$, pak je rozdělení intenzity hologramu, který je generován ve výstupní rovině mikroskopu

$$I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = |O|^2 + |R|^2 + OR^* + O^*R, \quad (9)$$

kde hvězdička označuje komplexní konjugovanou vlnu a x, y jsou souřadnice ve výstupní rovině. První člen $|O|^2$ odpovídá intenzitě objektové vlny a druhý člen $|R|^2$ intenzitě referenční vlny. Tyto dva členy vytvářejí v prostorovém frekvenčním spektru hologramu centrální oblast viz obrázek 7 (b). Obrazový člen je OR^* a O^*R je jeho komplexní sdružení, vytvářejí spektra posunutá o nosnou frekvenci f_c . Oba mohou být použity k rekonstrukci amplitudy a fáze objektu.



Obrázek 7: Zpracování obrazu: (a) hologram; (b) prostorové frekvenční spektrum; (c) intenzitní obraz; (d) fázový obraz; (e) QPI (kvantitativní fázový obraz). Převzato a upraveno z [12].

Proces rekonstrukce je založen na odstranění nosné frekvence ve Fourierově rovině [13]. Hologram je transformován pomocí algoritmu 2D rychlé Fourierovy transformace (FFT). Tím je získáno spektrum prostorových frekvencí obrazu. Ze spektra je vybráno postranní pásmo prostorových frekvencí okolo nosné frekvence f_c a jeho velikost odpovídá maximálnímu obrazovému členu prostorové frekvence f_{MAX} . Tato prostorová frekvence je v CCHM daná pomocí

$$f_{MAX} = \frac{NA + NA_S}{m\lambda} \leq \frac{2NA}{m\lambda}, \quad (10)$$

kde NA je numerická apertura objektivů, NA_S je numerická apertura osvětlení (kondenzoru), m je celkové zvětšení mezi výstupní rovinou a rovinou vzorku a λ je vlnová délka zdroje světla. Spektrum je následně apodizováno. Použitím 2D inverzní rychlé Fourierovy transformace (IFFT) získáme hodnoty komplexní amplitudy objektové vlny $OR^*(i, j)$. Z ní

je následně možné vypočítat její fázi a intenzitu. Intenzitní obraz (obrázek 7 (c)) odpovídá obrazu, který je možné vidět v konvenčním optickém mikroskopu a můžeme jej vypočítat jako $|O + R^*(i, j)|$. Fázový obraz (obrázek 7 (d)) odpovídá rozdílu optické dráhy (OPD) předmětové vlny vzhledem k referenční. Hodnoty fáze jsou dány jako argument $[OR^*(i, j)]$. Kvantitativní fázový obraz (QPI) je získán navazovací procedurou a procedurou kompenzující deformaci jeho pozadí [14].

1.3.2 Koherencí řízené holografické mikroskopy

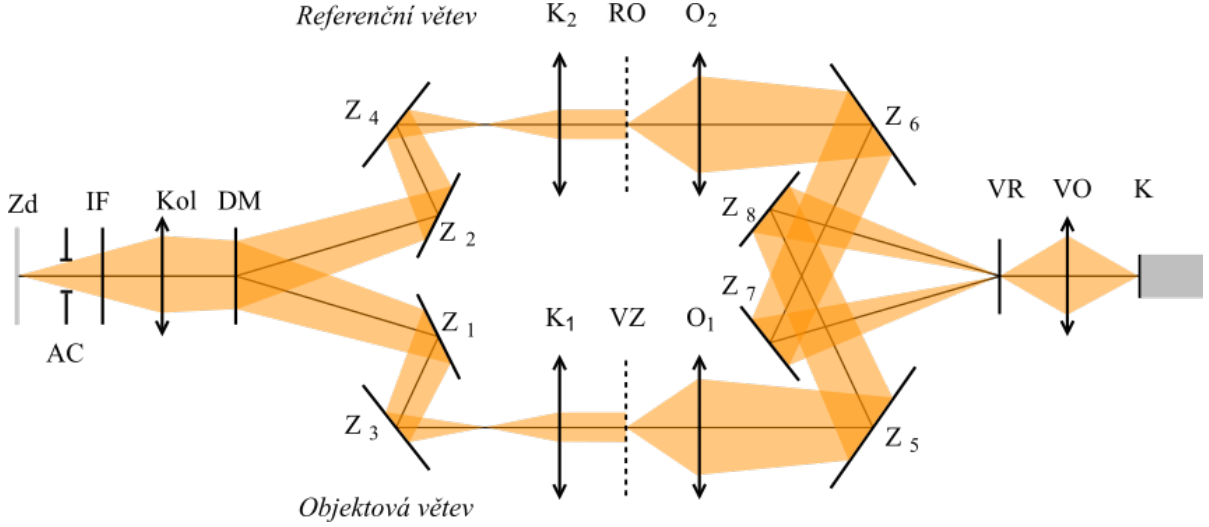
Koherencí řízené holografické mikroskopy (CCHM z anglického názvu Coherence-Controlled Holographic Microscope) vyvíjené na FSI VUT jsou dvousvazkové dvoucestné interferenční mikroskopy založené na mimo-osové geometrii. Díky svému unikátnímu uspořádání však na rozdíl od DHM (Digital Holographic Microscopes) umožňují využít prostorově i časově nekoherentních zdrojů osvětlení [10].

První generace

První CCHM mikroskop, který byl v zásadě mimoosý DHM (Digital Holographic Microscopes) s achromatickým interferometrem pro odražené světlo, byl postaven a experimentálně ověřen profesorem Chmelíkem a docentem Harnou [13]. Od něj byl odvozen mikroskop v transmisním uspořádání [15]. Z transmisního uspořádání CCHM získáváme pro každý obrazový bod kvantitativní informaci o fázovém zpoždění, které je přímo úměrné plošné hustotě suché hmoty buňky [16]. Změny rozložení suché hmoty jsou v relaci s ději, kterými buňka prochází během buněčného cyklu, jako je růst, pohyb a dělení [17]. Optický systém CCHM mikroskopu se v základním členění výrazně neliší od běžného optického mikroskopu. Sestává se z osvětlovací a zobrazovací soustavy a na výstupu je opatřen detektorem K. Zásadní rozdíl spočívá v tom, že je složen ze dvou identických mikroskopů, z nichž každý je umístěn ve vzájemně oddělených větvích interferometru Machova-Zehnderova typu, který je modifikovaný pro achromatickou mimoosovou holografii [18], tzn., že v jeho výstupní rovině VR (viz obrázek 8) vzniká interferenční struktura jejíž nosná prostorová frekvence nezávisí na vlnové délce použitého osvětlení [15]. Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM), který byl navržen a postaven, využívá difrakční mřížkový achromatický interferometr a umožňuje použití širokého rozsahu plošných časově částečně koherentních zdrojů po téměř nekoherentní [14]. Optická sestava tohoto mikroskopu je vidět na obrázku 8.

Difrakční mřížka DM v achromatickém interferometru CCHM je zobrazována na výstupní rovině VR, jak navrhuje Leith [18], ale každý z +1 a -1 difrakčního řádu se šíří přes oddělenou optickou cestu – objektovou a referenční větev interferometru. Obě větve jsou identické se zrcadlovou symetrií podél osy interferometru, v každé větvi jsou dva identické kondenzory $K_{1,2}$ a mikroskopové objektivy $O_{1,2}$ konečné tubusové délky. Rovina difrakční mřížky DM a výstupní rovina interferometru VR jsou (v obou větvích) opticky konjugované s objektovou rovinou. Mřížka je tedy zobrazena v rovině referenčního objektu RO a vzorku VZ, přičemž struktura mřížky je jemnější než rozlišovací schopnost kondenzorů $K_{1,2}$ a proto není zobrazena mikroskopem. Úplný obraz mřížky DM je

vytvořen na výstupní rovině VR, kde se oba řády kombinují a v obraze je přítomna interferenční struktura [14].



Obrázek 8: Optické schéma mikroskopu. Zd: zdroj světla; AC: aperturní clona; IF: interferenční filtr; Kol: kolektor; DM: difrakční mřížka; Z: zrcadla; K: kondenzory; RO: referenční objekt; VZ: vzorek; O: objektivy; VR: výstupní rovina; VO: výstupní objektiv; K: detektor (CCD čip). Převzato a upraveno z [14].

Sledujeme-li axiální paprsek vycházející ze zdroje Zd, který prochází kolektorem Kol a difrakční mřížkou DM, dojde k jeho rozdělení na dva paprsky, z nichž každý bude odkloněný o úhel ϑ od osy interferometru:

$$\vartheta = \arcsin(f_G \lambda), \quad (11)$$

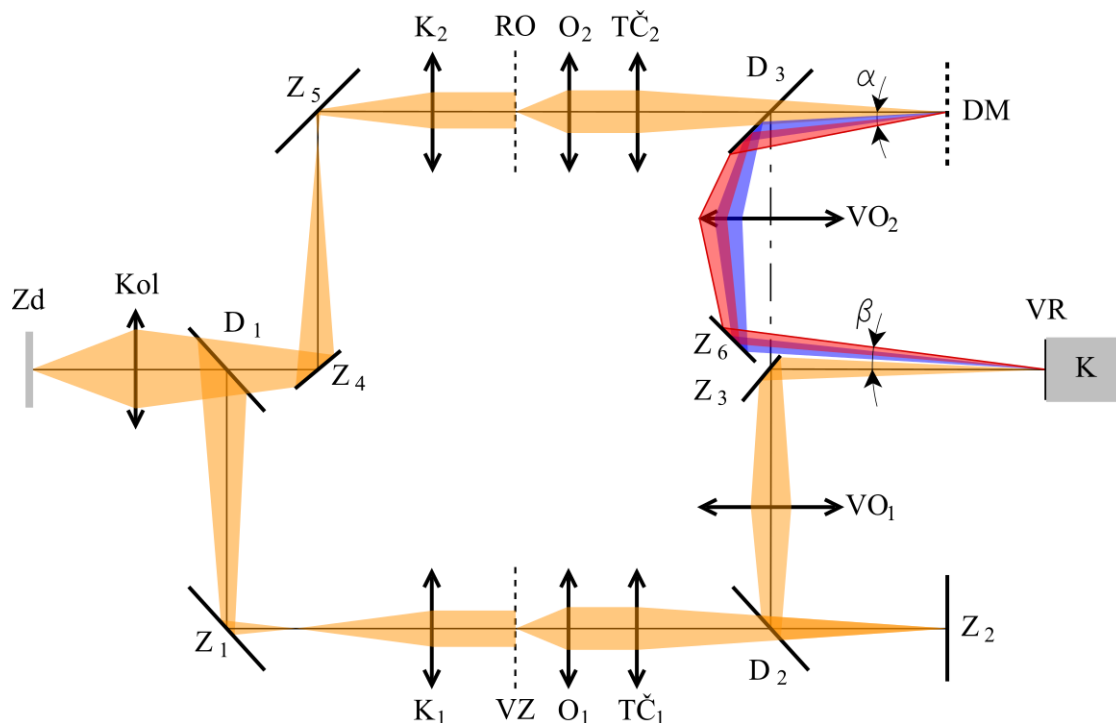
kde f_G je prostorová frekvence difrakční mřížky DM a λ je vlnová délka světla. Větvě interferometru jsou odkloněny o úhel ϑ_0 odpovídající střední vlnové délce $\lambda_0 = 650 \text{ nm}$. Plošný polychromatický zdroj Zd (halogenová žárovka a infračervený filtr, případně kombinovaný s interferenčním filtrem IF) je zobrazen kolektorem přibližně k předním ohniskovým rovinám obou kondenzorových čoček $K_{1,2}$ (primární obraz). To vyvolává Köhlerovo osvětlení objektu. Obraz zdroje je spektrálně posunut s ohledem na difrakční mřížku DM tak, že středový bod zdroje leží na optické ose kondenzorové čočky $K_{1,2}$ pro $\lambda = \lambda_0$, zatímco pro $\lambda \neq \lambda_0$ jsou obrazy stranově posunuté. Podle rovnice (11) čím větší je λ , tím větší je ϑ , takže primární obrazy světelného zdroje jsou posunuty pro λ dále od osy interferometru a od sebe navzájem [14].

Koncepce transmisního CCHM mikroskopu poskytla pozoruhodný pokrok v jeho návrhu a vytvořila základ především pro řadu biologických pozorování. Tento koncept využívá difrakční mřížku DM používanou jako dělič paprsků pro rozdělení dopadajícího světla na paprsek objektu a referenční paprsek. Tato konstrukce má však některé omezující faktory. Nejvýznamnější omezení je představeno spektrální propustností mikroskopu pro vlnové délky odlišné od centrální vlnové délky. To je důsledek disperze difrakční mřížky DM, která vytváří laterálně posunuté obrazy zdroje na vstupních pupilách kondenzorů

$K_{1,2}$. Při použití vlnových délek, které jsou delší nebo kratší než střední vlnová délka, jsou stranově posunuté obrazy zdroje oříznuty clonou vstupní pupily, což má za následek snížení množství interferujícího světla, zatímco současně vyvolává zvýšení prostorové koherence zdroje. Tím je ovlivněna kvalita signálu na těchto vlnových délkách. To také způsobuje mírně anizotropní přenosy prostorových frekvencí. Další důležitou nevýhodou tohoto konceptu je potřeba čtyř identických mikroskopických objektivů (dva jako kondenzory a dva jako objektivy). Ačkoli se používají komponenty s velkou pracovní vzdáleností, nedostatek pracovního prostoru mezi kondenzory a objektivy je významný, zejména při práci s komponentami s vysokou numerickou aperturou NA [19].

Druhá generace

Nové optické uspořádání CCHM, které bylo navrženo a které překonává většinu zmíněných nevýhod předchozího CCHM, si zachovává všechny výhody nekoherentní mimoosové holografie a umožňuje multimodální zobrazování. Optické schéma mikroskopu je znázorněno na obrázku 9.



Obrázek 9: Optické schéma mikroskopu. Zd: zdroj světla; Kol: kolektor; D: děliče svazků; Z: zrcadla; $K_{1,2}$: kondenzory; VZ: vzorek; RO: referenční objekt; $O_{1,2}$: objektivy; $TČ_{1,2}$: tubusové čočky; DM: difrakční mřížka; $VO_{1,2}$: výstupní objektivy; VR: výstupní rovina; K: detektor (CCD čip). Převzato a upraveno z [19].

Nová sestava CCHM je založena na interferometru Mach-Zehnderova typu přizpůsobeného pro achromatickou mimoosovou holografickou mikroskopii. Světlo procházející achromatickým interferometrem se šíří oddělenými optickými dráhami – předmětovou a referenční větví interferometru. Obě větve jsou tvořeny identickými mikroskopickými sesta-

vami skládajícími se z kondenzorů K_1 , K_2 , objektivů korigovaných na nekonečno O_1 , O_2 a tubusových čoček $T\check{C}_1$, $T\check{C}_2$. Podstatnou změnou v koncepci CCHM je odrazová difrakční mřížka DM, která je umístěna v referenční větvi interferometru a zrcátko Z_2 , které jsou zobrazovány do výstupní roviny VR, jak navrhuje Leith a Upatnieks [18]. Rovina difrakční mřížky a objektové roviny vzorku VZ a referenčního objektu RO, jsou opticky konjugované s výstupní rovinou zrcadla Z_2 . Protože pro zobrazování se používá pouze +1 řád difrakční mřížky (jiné difrakční řády jsou eliminovány prostorovým filtrováním v ohniskové rovině výstupní čočky VO_2), není obraz mřížky tvořen přímo ve výstupní rovině. Když se však ve výstupní rovině zkombinuje objektový a referenční svazek, objeví se interferenční proužky, které odpovídají obrazu difrakční mřížky DM, jak by byl vytvořen přímo pomocí 0 a +1 řádu difrakční mřížky DM. Prostorovou frekvenci interferenčních proužků – tj. nosnou frekvenci f_C ve výstupní rovině VR můžeme vyjádřit jako

$$f_C = \frac{f_G}{m_{VO}}. \quad (12)$$

kde f_G je prostorová frekvence difrakční mřížky DM a m_{VO} je zvětšení výstupních objektivů VO. Plošný polychromatický nekoherentní světelný zdroj Zd (např. halogenová lampa) je zobrazen kolektorem Kol do přední ohniskové roviny kondenzorů $K_{1,2}$, čímž je zajištěno Köhlerovo osvětlení. Sekundární obraz zdroje se vytvoří v zadních ohniskových rovinách objektivů O a terciární obraz zdroje se vytvoří v blízkosti zadních ohniskových rovin výstupních objektivů VO. V referenční větvi je terciární obraz zdroje v zadní ohniskové rovině výstupního objektivu VO_2 spektrálně rozptýlen s ohledem na disperzi difrakční mřížky tak, že čím delší je vlnová délka světla, tím dále je obraz, zdroj je umístěn od osy referenční větve. Na rozdíl od 1. generace CCHM není ořezán. Pokud budeme sledovat axiální paprsek, který vychází ze zdroje Zd, prochází referenčním ramenem a dopadá na mřížku. Při uvažování +1 difrakčního řádu mřížky je dopadající paprsek rozptylován mřížkou v úhlu α podle mřížkové rovnice $\sin \alpha = f_G \lambda$, kde λ je vlnová délka světla. Difraktovaný paprsek pak prochází výstupním objektivem VO_2 a vstupuje do výstupní roviny v úhlu β . Vztah mezi α a β je dán pomocí $\sin \beta = \sin \alpha / m_{VO}$. V předmětové větvi interferometru se světlo odráží zrcadlem Z_2 a normálně prochází výstupním objektivem VO_1 , protože v dráze není žádný difrakční prvek. Světlo není v této větvi spektrálně rozptýleno. Paprsky různých vlnových délek vyzařované z odpovídajících bodů terciárních obrazů zdroje v obou interferenčních větvích se tedy kombinují ve výstupní rovině VR pod různými úhly β . To je způsobeno disperzní schopností difrakční mřížky DM a vede k interferenčním proužkům rovnoběžným s rýhami difrakční mřížky a prostorové nosné frekvence f_C , která je konstantní pro všechny vlnové délky – tj. interferometr je achromatický. Pokud je pozorován vzorek VZ, obrazová rovina mimo-osového hologramu s prostorovou nosnou frekvencí f_C se vytvoří na výstupní rovině VR [19].

2 Zdroje světla

Elektrické zdroje světla dělíme do tří základních skupin:

- inkadescentní (žárovky),
- výbojkové,
- polovodičové.

Jednotlivé elektrické zdroje světla je možné charakterizovat fotometrickými veličinami. Základní fotometrickou veličinou v mezinárodní soustavě SI je svítivost s jednotkou candela (cd), jejíž velikost lze fyzikálně stanovit. Ze svítivosti jsou odvozeny ostatní jednotky. Světelný tok (Φ) se používá pro vyjádření světelného výkonu zdroje, osvětlovací soustavy atd. Jednotkou světelného toku je lumen (lm), který je definován jako světelný tok bodového světelného zdroje o svítivosti 1 cd do jednotkového prostorového úhlu 1 steradiánu. Světelný tok dopadající na určitou plochu způsobuje její osvětlení, které je tím větší, čím větší je dopadající světelný tok a čím menší je uvažovaná plocha. Intenzita osvětlení je tedy podílem světelného toku a velikosti plochy. Jednotkou intenzity osvětlení je lux (lx), což je osvětlení, které vyvolá světelný tok 1 lm na ploše 1 m². Účinnost elektrického zdroje světla se vyjadřuje jednotkami měrného výkonu, podílem mezi příkonem zdroje (W) a celkovým světelným tokem zdroje (lm); jednotkou je lm/W [20].

2.1 Světelné zdroje inkadescentní

2.1.1 Žárovky

Technologie žárovek využívá elektrický proud k ohřevu stočeného wolframového vlákna, které tak emituje záření. Skleněný obal žárovky kolem vlákna uzavírá směs dusíku a malé množství jiných inertních plynů, jako je argon. Některé žárovky, jako jsou například zábleskové lampy, rovněž obsahují xenon. Žárovky prošly dlouhou cestou od první uhlíkové žárovky Thomase A. Edisona, která, když byla představena v roce 1879 a měla životnost asi 40 hodin. Životnost žárovky je silně ovlivněna vstupním napětím. Například snížení vstupního napětí z normálních 110 V na 104,5 V může zdvojnásobit její životnost, zatímco zvýšení napětí na pouhých 115,5 V může snížit její životnost na polovinu. Kolísání napětí také ovlivňuje její světelný tok, výkon a účinnost [21].

2.1.2 Halogenové žárovky

Na rozdíl od klasických žárovek používají halogenové žárovky náplň z halogenového plynu (obvykle jód nebo brom), aby vytvořily tzv. halogenový cyklus uvnitř lampy. V halogenovém cyklu se halogenový plyn kombinuje s wolframem, který se vypařuje z vlákna žárovky. Částice wolframu se neusazují na horká místa vlákna, nýbrž na chladnější část na jeho konci. Uvolněné halogeny jsou znovu připravené vstoupit do halogenového cyklu. Tzn., že atomy wolframu se nemohou usazovat na stěně baňky a baňka tedy nezčerná, takže i sebemenší halogenová žárovka vždy zůstane čirá. Tím se zabrání nevyhnutelnému

snížení světelného toku během životnosti, k němuž dochází u klasických žárovek. Nevýhodou je jejich vysoká cena a povrchová teplota okolo 600 °C. Předností je delší životnost, větší světelný výkon, vysoká světelná účinnost a malé rozměry. Používají se jako bodové zdroje světla v projektorech, v reflektorech automobilů, v reflektorech venkovního osvětlení apod [21].

2.2 Světelné zdroje výbojkové

Výbojky jsou trubice s elektrodami naplněné plynem, který emituje světlo, je-li ionizován procházejícím proudem. Pomocné zařízení známé jako předřadník dodává napětí do jedné elektrody lampy, která je potažena směsí oxidů kovů alkalických zemin, aby se zvýšila emise elektronů, které pak prochází plynem, přičemž dochází k jeho ionizaci. Výbojkové světelné zdroje dělíme do dvou základních kategorií:

- vysokotlaké,
- nízkotlaké.

2.2.1 Vysokotlaké výbojky

Vysokotlaké rtuťové výbojky

V tomto typu výbojky je světlo produkováno elektrickým výbojem v rtuťových parách. Rtuť je doplněna argonovým plynem a je uzavřena v trubici z křemenného skla, která je obklopena vnější baňkou z borosilikátového skla. Ve vysokotlakých rtuťových výbojkách může být také použit xenon, který napomáhá ve startovací době a nemění významně viditelné spektrum lampy [21].

Halogenidové výbojky

Tato výbojka je rtuťovou výbojkou s příměsí sloučenin kovu, halogenidu. Ten se přidává do trubice ke zlepšení barvy i světelné účinnosti [21].

Vysokotlaké sodíkové výbojky

Světlo vzniká ve vysokotlaké sodíkové výbojce elektrickým výbojem v prostředí kombinace par rtuti a sodíku, přičemž spektru emise dominuje sodíkové záření. Vnější žárovka z tvrdého skla může být čirá nebo její vnitřní povrch může být potažen difúzním práškem, aby se snížil jas obloukové trubice [21].

Xenonové výbojky

Xenonové výbojky neobsahují rtuťové páry. Obsahují pouze xenonový plyn, udržovaný pod tlakem několika atmosfér. Xenonové výbojky jsou dostupné ve výkonech od 5 do 32 000 W [21].

2.2.2 Nízkotlaké výbojky

Zářivky

Zářivky jsou nízkotlaké výbojky se žhavenými elektrodami. Část elektrické energie je výbojem mezi elektrodami převáděna na viditelné světlo (2 %), další viditelné světlo se získá přeměnou ultrafialového záření v luminoforu (20 %). Nevýhodou zářivek je pulzace světla jako následek periodického zhášení výboje při provozu ze střídavé sítě. Tato pulzace může způsobit tzv. stroboskopický jev. U zářivek je velký rozdíl v hodnotě indexu podání barev [22].

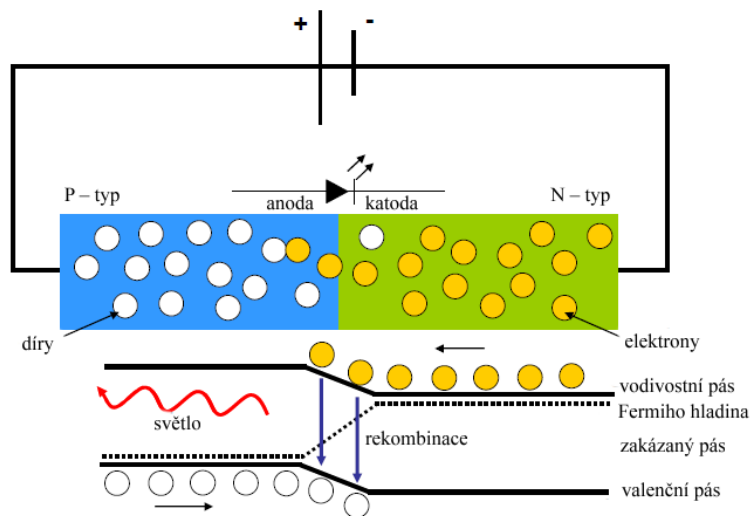
Sodíkové výbojky

Tyto výbojky lze srovnat se zářivkami a vyznačují se velmi vysokým měrným výkonem. Sodíkové páry mají při svícení tlak přibližně 0,5 Pa. Protože vyzařují monochromatické světlo, mají až nulový index podání barev. Používají se především pro venkovní osvětlení komunikací, dálnic, apod. [22].

2.3 Světelné zdroje polovodičové

2.3.1 LED (Light-Emitting Diodes) dioda

Průlom v technologii způsobil objev nového druhu svítidel na bázi polovodičových čipů, tzv. světelných diod neboli LED. Vynález modré LED diody je datován do poloviny 80. let 20. století. Bílé světlo vzniká buď kombinací červené, zelené a modré LED nebo prostřednictvím částečné foto-konverze modrého světla na žluté světlo pomocí luminescence. LED diody jsou charakteristické P-N přechodem mezi dvěma polovodiči (obrázek 10). Vyzařují světlo pouze v propustném směru. Pokud je přechod LED diody v propustném směru, proud protéká ze strany polovodiče typu P (anody) na stranu polovodiče typu N (katody) a je emitováno světlo [23].



Obrázek 10: Princip LED diody. Převzato a upraveno z [24].

2.3.2 Laserové LED diody

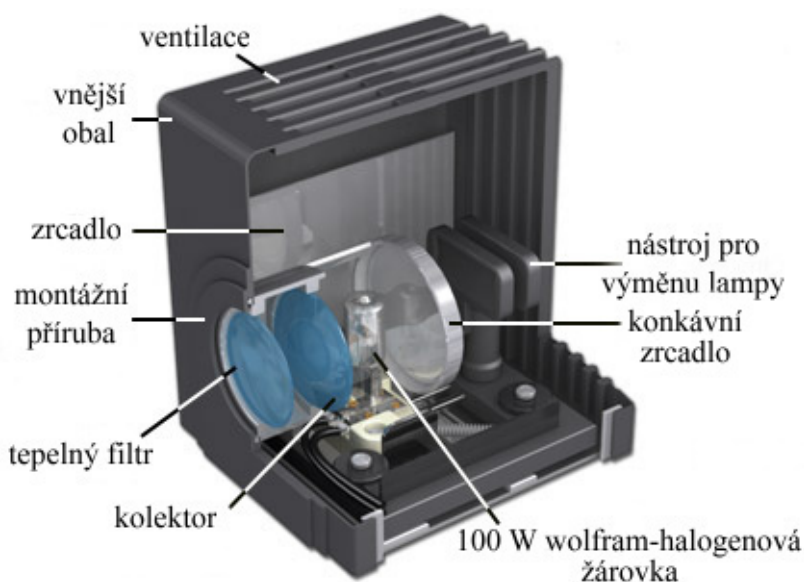
Laser (kvantový generátor světla) je zdroj a zesilovač monochromatického a velmi intenzivního, prostorově a časově koherentního světelného záření. To lze čočkami a zrcadly soustředit do velmi malé plochy, a tím získat účinný zdroj tepla, který lze použít pro tavení, svařování nebo řezání. Laserů se také využívá v lékařství, měřicí technice a ve světelné technice ke světelným efektům [22].

3 Současné osvětlovací systémy

Světelné zdroje zmíněné v předchozí části se používají v současných osvětlovacích systémech mikroskopů a samotná volba odpovídá dané aplikaci. Moderní mikroskopy mají obvykle integrovaný světelný zdroj, který lze ovládat do relativně vysoké míry.

3.1 Wolfram-halogenová lampa

Nejběžnějším zdrojem pro dnešní mikroskopy je žárovka s wolframovým vláknem umístěná v reflexním pouzdru, které promítá světlo skrz kolektorovou čočku a do kondenzoru. Napájecí napětí je řízeno pomocí variabilního reostatu, který je běžně integrován do mikroskopového stojanu. Typická osvětlovací lampa a její řez vnějším obalem je znázorněn na obrázku 11.



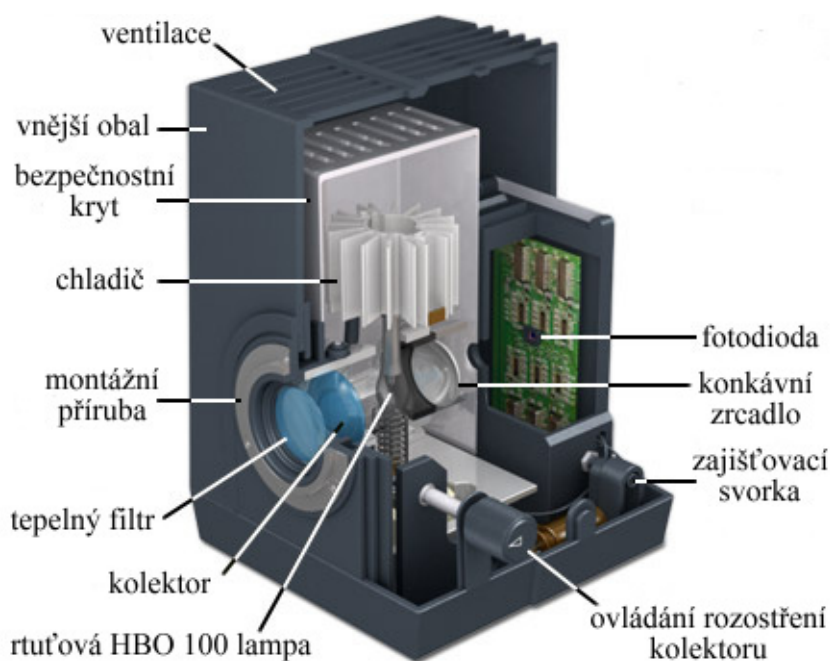
Obrázek 11: Wolfram-halogenový osvětlovač. Převzato a upraveno z [25].

Žárovka pracuje při stejnosměrném napětí, nejčastěji 12 V a produkuje až 100 W světelného výkonu. Napětí lampy je řízeno stejnosměrným napájecím zdrojem, který je často zabudován do těla mikroskopu, s regulací napětí pomocí potenciometru. Tyto žárovky generují během provozu velké množství tepla a vnější obal je opatřen několika vrstvami chladičů, které pomáhají odvádět přebytečné teplo. Její polohu lze nastavit pro posílení maximálního osvitu. Světlo ze světelného zdroje je směřováno do vstupní pupily mikroskopu pomocí kolektoru (obrázek 11) a poté často skrze difuzor na clonu kondenzoru [26].

3.2 Rtuťová lampa

V typické konfiguraci optického mikroskopu je rtuťová lampa umístěna uvnitř specializovaného osvětlovače sestávajícího z vnějšího obalu obsahujícího lampu, konkávního zrcadla,

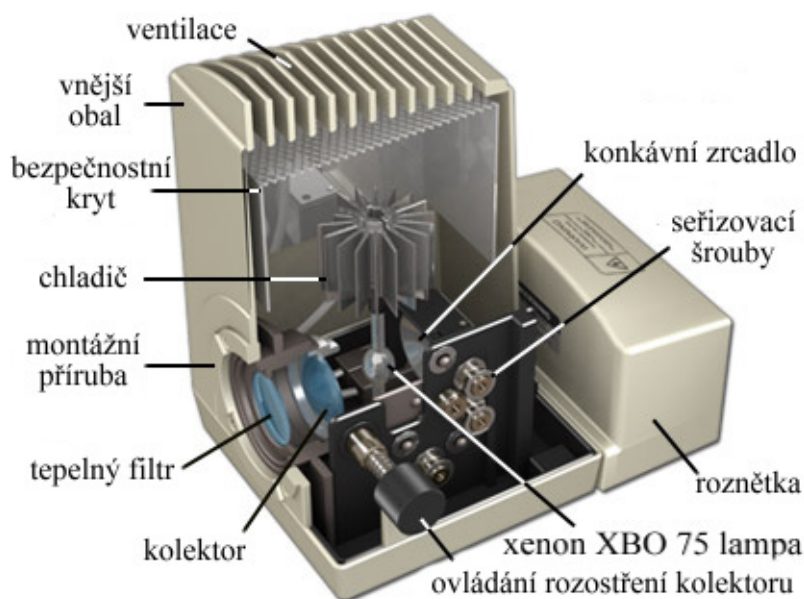
nastavitelného systému kolektoru pro rozostření výstupu lampy, fotodiody a zajišťovací svorky (obrázek 12). V závislosti na konstrukci mohou rtuťové výbojky obsahovat také filtry pro blokování ultrafialového spektra a studené sklo pro blokování infračerveného spektra do optické soustavy mikroskopu. Mnoho osvětlovačů také obsahuje externí chladiče, které odvádějí teplo a větrací otvory, které umožňují odvádění horkého vzduchu. Kromě toho musí lampa obsahovat justážní šroub pro nastavení polohy kolektoru a justážní šroub pro vyrovnání lampy a zrcátka. Hlavním problémem je, že ze samotné lampy mohou produkovat škodlivé ultrafialové vlnové délky a měla by zahrnovat spínač, který automaticky vypne lampu v případě, že by během používání došlo k poškození nebo otevření krytu [25].



Obrázek 12: Rtuťový osvětlovač. Převzato a upraveno z [25].

3.3 Xenonová lampa

Vhodná konstrukce osvětlovače s xenonovou výbojkou (obrázek 13) je rozhodující pro dlouhou životnost a výkon lampy, protože tyto lampy jsou provozovány při extrémně vysokých vnitřních tlacích (obvykle více než 5 MPa), takže při výběru materiálů by měla být brána v úvahu i případná možnost exploze. Protože výbojky zvětšují svůj objem z důvodu nadměrné produkce tepla vytvářeného během provozu, měl by být pouze jeden konec lampy pevně připevněn k vnějšímu obalu; druhý konec je vhodné zajistit pružným kovovým pásem nebo zakryt chladicím tělesem a uchycen na příslušné vnitřní elektrické svorce pomocí kabelu. Xenonové lampy musí být vybaveny dostatečným chlazením, aby mohly být provozovány při teplotě povrchu nižší než 750 °C a nižší teplotě než 250 °C, měřené základní objímce. Nadměrné teploty rychle vedou k oxidaci elektrod, způsobují jejich zrychlené opotřebení a zvyšují možnost předčasného zničení lampy.

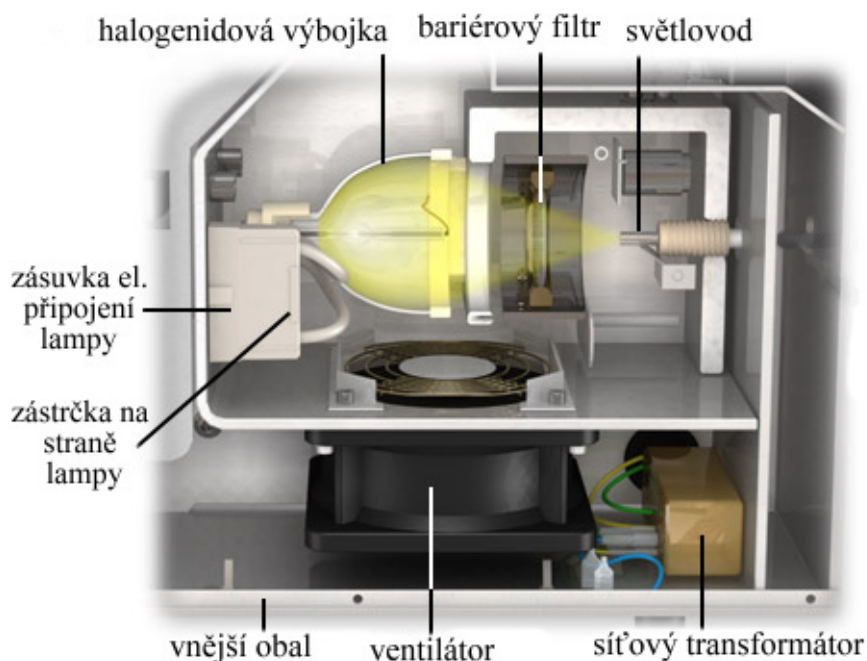


Obrázek 13: Xenonová lampa. Převzato a upraveno z [25].

Většina vysoce výkonných xenonových lamp je vybavena vnitřním odrazným zrcadlem, které je spojeno se systémem výstupního kolektoru, který vytváří kolimovaný světelný paprsek vysoké intenzity. Konstrukce reflektorů jsou od jednoduchých konkávních zrcadel po složité eliptické, sférické, asférické a parabolické geometrie, které účinněji uspořádají a usměrňují vyzařování lampy do kolektorové čočky a následně skrz mikroskop [25].

3.4 Halogenidová výbojková lampa

Tyto světelné zdroje využívají vysoce výkonnou obloukovou výbojku umístěnou v ohnisku eliptického zrcadla, které soustřeďuje světelný výkon do kapalinového světlovodu, který přivádí světlo do optické soustavy mikroskopu. Požadavky na napájení pro halogenidové výbojky se poněkud liší od požadavků na rtuťové a xenonové výbojky. Halogenidové výbojky lze použít se zdroji střídavého i stejnosměrného proudu (v závislosti na konstrukčních parametrech výbojky), ale oba typy musí mít podobné vlastnosti, musí obsahovat zapalovací a zátěžové obvody a stabilizaci zdroje. Napájecí zdroje vyžadují chlazení, které je obvykle zajištěno pomocí ventilátorů a chladičů. Protože všechny typy obloukových lamp vyžadují vysoké napětí k zahájení hoření výboje, jsou vybaveny hlavním napájecím obvodem a zapalovacím obvodem. Schéma lampy využívající halogenidovou výbojku je na obrázku 14. Prakticky všechny moderní světelné zdroje jsou konstruovány jako externí a využívají světlovody (buď z optických vláken, nebo kapaliny) k vedení světla do citlivých součástí mikroskopu z bezpečné vzdálenosti, tím snižují přenos tepla od tepelného zdroje a zajišťují vyšší úroveň světelné stability pro dlouhodobé experimenty.

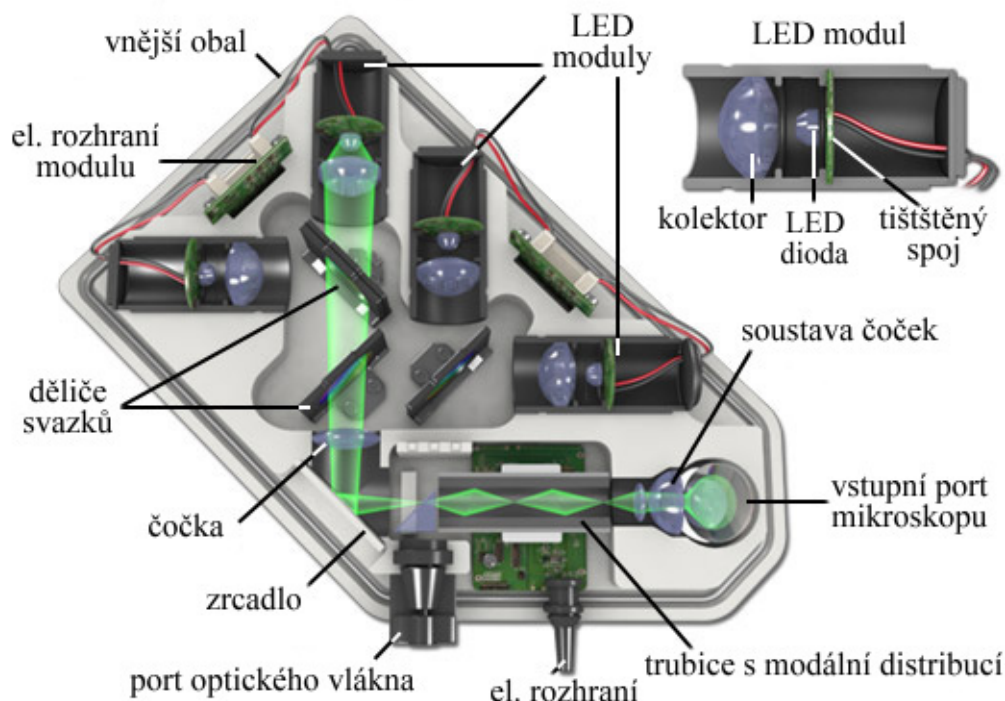


Obrázek 14: Halogenidová výbojková lampa. Převzato a upraveno z [25].

Halogenidová výbojka a zrcadlo jsou namontovány pomocí svorek, aby ohnisko bylo přesně zobrazeno na vstupní apertuře světlovodu. V některých osvětlovačích je mezi lampou a vstupem do světlovodu umístěn bariérový filtr. Aby se předešlo možnému tepelnému poškození mikroskopu, infračervené záření a další potenciálně škodlivé emisní vlnové délky (např. UV) generované lampou by měly být odstraněny před tím, než vstoupí do světlovodu, a to nejlépe pomocí vhodných filtrů [25].

3.5 LED lampy

LED diody jsou podstatně kompaktnější než obloukové lampy a lze je připojit přímo k chladiči, který je snadno ochlazen malým, počítačem řízeným ventilátorem. Tato technologie umožňuje upevnit zdroje LED přímo do mikroskopového systému, blíže ke vzorku, a tak se potenciálně vyhnout významné ztrátě intenzity světla (často přesahující 95 %), ke které dochází již u zmíněných zdrojů světla. Navzdory této vysoké úrovni flexibility je třeba poznamenat, že zdroje založené na LED diodách absolutně vyžadují účinný chladič, protože s vysokou teplotou se snižuje jejich životnost a vede tak ke ztrátě účinnosti zdroje. Mezi výhody integrovaného zdroje LED lamp patří možnost nastavit intenzitu osvětlení pro každou diodu tak, aby odpovídala požadovanému času integrace kamery. Kromě toho je regulace intenzity a spínání LED diod čistě elektronická. Protože LED diody nejsou pod vysokým tlakem, jejich případné selhání je neškodné (bez exploze) ve srovnání s obloukovými lampami. V posledních několika letech bylo zavedeno několik komerčních LED lamp pro fluorescenci a širokospektrální mikroskopii (bílé světlo). Příklad této komerční LED lampy je znázorněn na obrázku 15.



Obrázek 15: LED lampa. Převzato a upraveno z [25].

Lampa z obrázku 15 je navržena pro přímé spojení se vstupním portem fluorescenčního mikroskopu a obsahuje až čtyři nezávisle ovládatelné modulární LED diody pro sekvenční nebo simultánní buzení více fluoroforů [25].

Vysoce-výkonná LED pro mikroskopii – Solis

LED diody Solis (obrázek 16) jsou vysoce výkonné LED diody určené pro mikroskopové aplikace.



Obrázek 16: LED lampa Solis. Převzato z [27].

Modul je lehký a konstrukce bez ventilátoru umožňuje jeho provoz bez vibrací. Upevnění přímo na port mikroskopu je možné pomocí některého z adaptérů pro mikroskopy

od firmy Thorlabs. Každá LED obsahuje kolimační optiku v tubusu s velkou aperturou $\varnothing$ 48,3 mm. Integrovaný čip EEPROM ukládá důležité provozní informace LED, jako je vlnová délka a maximální proud, a řídí funkce automatického vypnutí LED diody, při teplotách nad 95 °C [27].

LED osvětlovač MLH2

Tento zdroj světla (obrázek 17) poskytuje kvalitnější osvětlení mikroskopu díky 30W LED diodě. Tato LED dioda je jasnější než 100W halogenový zdroj světla. Má nastavitelný kolimátor pro homogenní osvětlení a je kompatibilní s fluorescenčním mikroskopem. Pomocí ovládacího prvku je možné nastavit jas od 0 do 100 %. Součástí je pasivní chladič systém pro provoz bez hluku a vibrací. Díky adaptérům je možné tento zdroj světla připojit ke většině mikroskopů od různých výrobců (Zeiss, Nikon, Olympus, Leica atd.) [28].



Obrázek 17: LED osvětlovač MLH2. Převzato z [28].

Albalux FM – vláknový osvětlovací modul

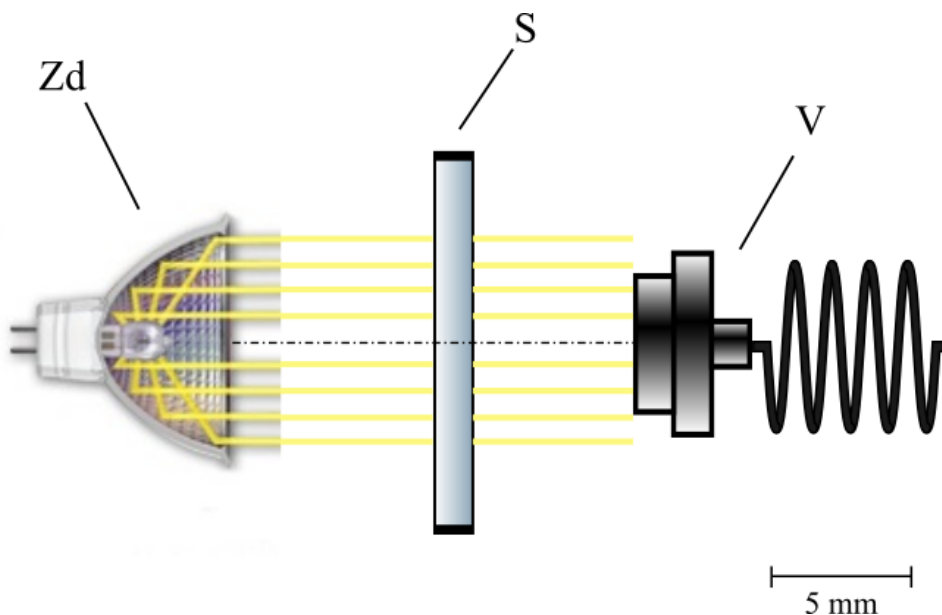
Světelný zdroj Albalux FM (obrázek 18) nabízí vysokou svítivost na výstupu, kterou poskytuje na dlouhé projekční vzdálenosti s malým úhlem divergence paprsku. Malý 450 nm diodový laser excituje fosfor, který následně produkuje širokospektrální nekoherentní bílé světlo. Tato oceněná technologie je světově prvním laserově-generovaným zdrojem bílého světla svého druhu. Poskytuje na výstupu osvětlení 150 lm při teplotě chromatičnosti (CCT – Correlated Color Temperature) 6000 K a indexu podání barev (CRI – Color Rendering Index) 70. Možnosti použití jsou v medicínské a průmyslové endoskopii, spektroskopických diagnostikách, biomedicínských přístrojích a jiném speciálním osvětlení [29].



Obrázek 18: Vlákenný osvětlovací modul Albalux FM. Převzato z [29].

3.6 Současný osvětlovací systém CCHM

Osvětlovací systém CCHM (obrázek 19) regulovatelný pomocí zdroje Fiber-Lite DC-950 je tvořen širokopásmovým, tj. prostorově a časově nekoherentním světelným zdrojem – halogenovou žárovkou (EKE 21V 150W) Zd, studeným sklem S a světlovodem V.



Obrázek 19: Schéma současného uspořádání osvětlovacího systému CCHM. Zd: halogenová žárovka; S: studené sklo; V: světlovod. Převzato a upraveno z [25].

Halogenová žárovka Zd produkuje velké množství infračerveného záření, proto je do systému vloženo studené sklo S, které toto záření pohlcuje a tím zabraňuje poškození světlovodu V. Zakončením celého osvětlovacího systému tvoří světlovod V LLG05-4 od

firmy Thorlabs [27]. Kolimovaný zdroj světla, který vychází z halogenové žárovky, je pohlcován světlovodem V o vstupním průměru 5 mm a následně distribuován do objektové a referenční větve mikroskopu. Pomocí tohoto systému dochází k rovnoměrnému osvětlení objektové a referenční větve.

Světelný zdroj (halogenová žárovka o výkonu 150 W) má však velké výkonové ztráty. Tyto ztráty byly kvantifikovány a změřeny. Měření výkonu osvětlovacího modulu bylo provedeno za pomoci digitálního Power meteru Thorlabs PM100D s připojeným adaptérem S310C. Světlo, které prochází světlovodem V a následně z něj vystupuje, má výkon 0,580 W. Byl také změřen výkon v rovině vzorku v obou větvích CCHM mikroskopu. V případě objektové větve je dosaženo výkonu $37,5 \mu\text{W}$ a v případě referenční větve $50,0 \mu\text{W}$. Jedná se o celkem velké ztráty, vzhledem k vysokému výkonu halogenové žárovky. Tato žárovka má bezesporu velký výkon, ale jak bylo zmíněno již dříve, má krátkou životnost, nízkou efektivitu a proto bude nahrazena.

4 Motivace a cíle práce

Jak bylo zmíněno dříve, tak v současnosti využívá CCHM mikroskop osvětlovací systém tvořený klasickou halogenovou žárovkou. Zmíněné osvětlovací systémy, které je možné napojit přímo na tělo mikroskopu jsou pro CCHM mikroskop nevhodné a to z důvodu zajištění nutnosti dobře homogenizovaného zdroje světla. Tento požadavek dokáže zajistit pouze vláknový osvětlovací modul, kterých je na trhu nedostatek. S postupujícím trendem vývoje LED osvětlení je možné využít tento zdroj světla také pro mikroskopii a to z důvodu nízkých provozních nákladů a dlouhé životnosti LED zdroje. Pro pozorování rychlých dynamických dějů v živých buňkách je nutné snížit expoziční čas kamery CCHM. Aby byla zachována kvalita obrazových dat, je nutné osvětlit vzorek vyšší intenzitou světla. Pro navržení nového osvětlovacího modulu bylo nutné:

- vybrat vhodný zdroj světla a optické komponenty,
- navrhnout optické schéma modulu,
- navrhnout konstrukční a mechanické řešení,
- modul sestavit a otestovat.

5 Návrh osvětlovacího systému

Požadavkem pro návrh nového osvětlovacího modulu je zajištění dobře homogenizovaného zdroje světla pro CCHM mikroskop. Nově navrhovaný osvětlovací systém bude tvořen výkonnějším zdrojem světla než je zmíněná halogenová žárovka a optickými prvky, které zabezpečí efektivní přenos energie do stávajícího světlovodu mikroskopu o průměru vstupní apertury 5 mm.

5.1 Optický návrh

5.1.1 Světlovod

Součástí stávajícího mikroskopu je světlovod LLG05-4H (obrázek 20) od firmy Thorlabs. Tento kapalinový světlovod V nabízí vysokou propustnost od 340 do 800 nm pro osvětlení bílým světlem. Poskytuje vynikající přenos od blízkého UV spektra k vzdálené infračervené oblasti. Je doporučen pro použití s wolfram-halogenovými, xenonovými nebo halogenidovými zdroji světla. Rozsah teplot pro použití kapalinového světlovodu je od -5 do 35°C . Celková délka tekutého světlovodu je 1,2 m a průměr jádra je 5 mm [27].



Obrázek 20: Světlovod LLG05-4H. Převzato z [27].

5.1.2 Výběr LED diody

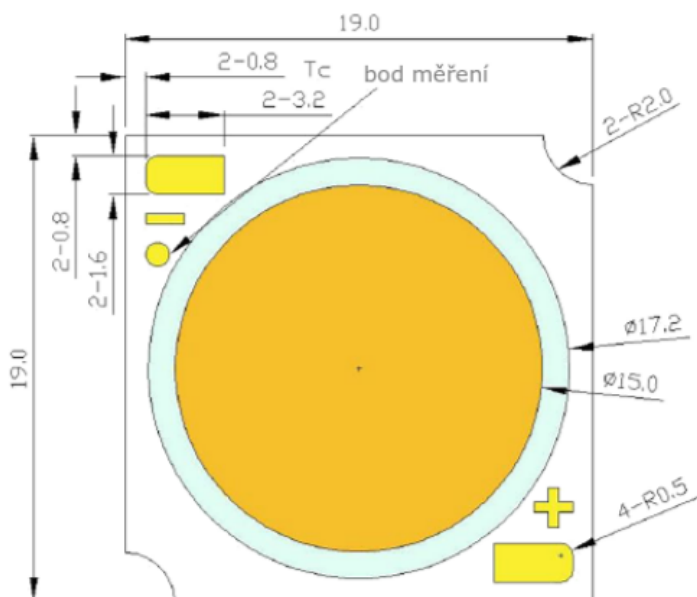
Při návrhu osvětlovacího systému byly zvažovány dvě výkonové LED diody:

1. ProLight Opto PACK-57FNL-BC8N,
2. Cree XLamp CMA3090 LED.

Výkon samotných LED diod je ovlivněn jejich opticky účinnou plochou, tzn. že čím větší výkon LED diody požadujeme, tím i úměrně roste průměr svítivé plochy. Současně s rostoucím výkonem LED diod dochází při jejich provozu k zahřívání, proto je nutné zajistit jejich dostatečné chlazení.

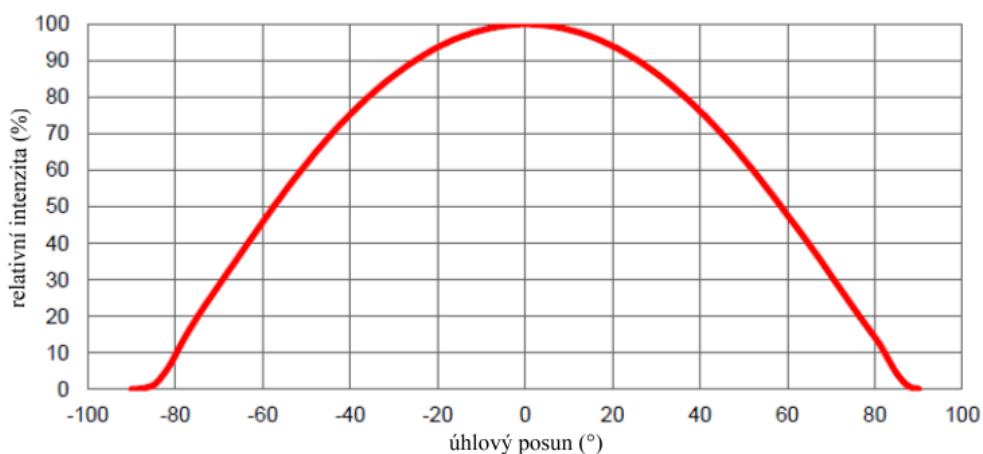
1. ProLight Opto PACK-57FNL-BC8N

Rozměry této LED diody (obrázek 21) jsou $19 \times 19 \times 1.4$ mm, přičemž opticky účinná plocha má průměr 15 mm. Tato výkonová LED dioda ve verzi COB (Chip On



Obrázek 21: ProLight Opto PACK-57FNL-BC8N – rozměry. Převzato a upraveno z [30].

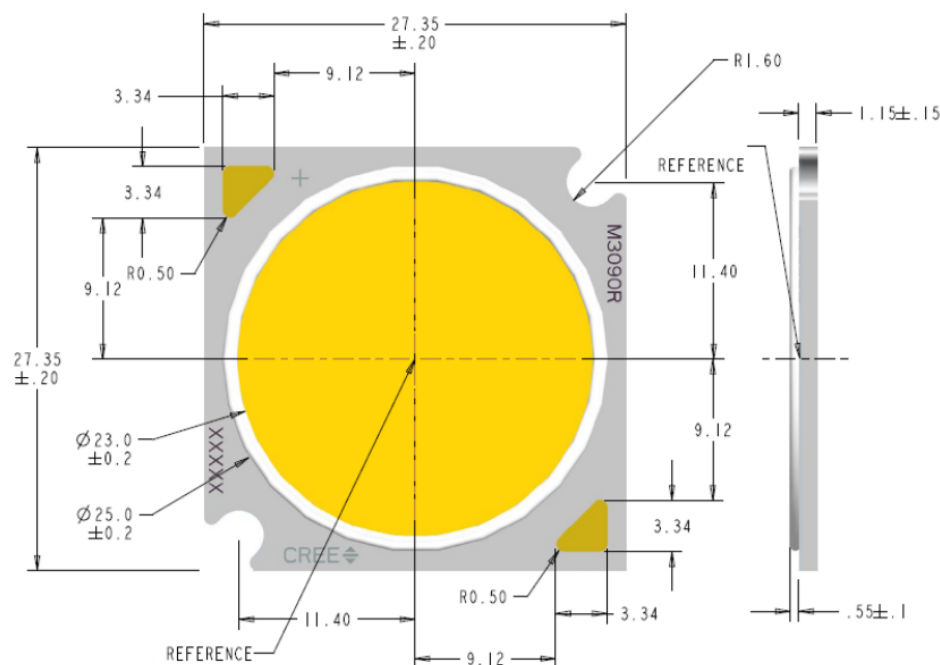
Board) a vyzařuje neutrální bílé spektrum (3890–4080K) při maximálním výkonu 57 W a vyzařovacím úhlu 120° (obrázek 22). Světelný tok samotného zdroje je 3 460 – 7 150 lm. Její nespornou výhodou je zmíněná vysoká hustota světelného toku a dobrá stálost barev s indexem podání barev (CRI – color rendering index) 80. Světelná účinnost zdroje je 125,6 lm/W. Nespornou výhodou je i její dlouhá životnost. Jako většina LED diod je i tato energeticky účinnější než žárovky a většina halogenových žárovek. Hlavním použitím této LED diody je ve skupinových nebo bodových osvětlovacích systémech [30].



Obrázek 22: Vyzařovací diagram. Převzato a upraveno z [30].

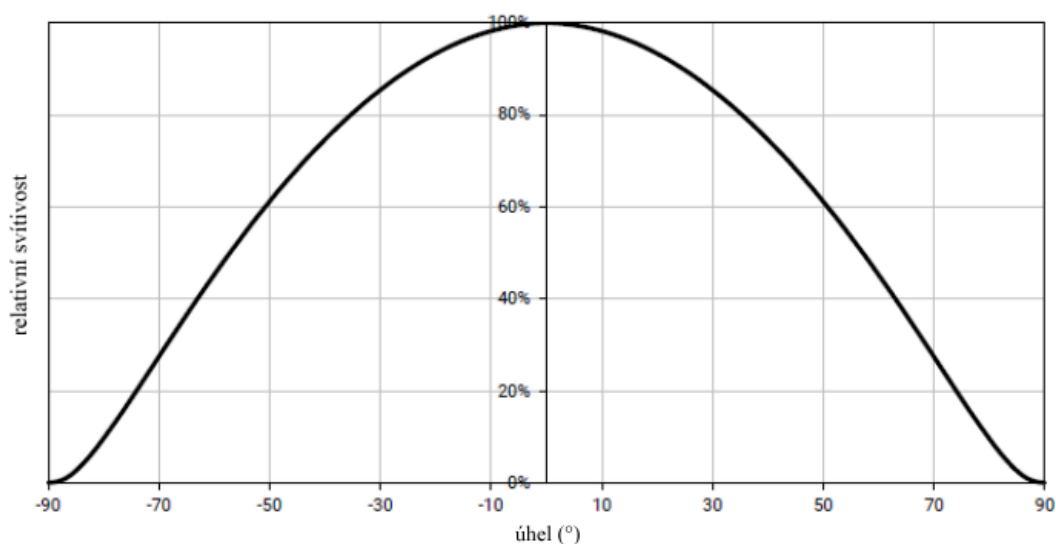
2. Cree XLamp CMA3090 LED

XLamp High-Current LED je optimalizována pro nejlepší světelný výkon ve své třídě, účinnost a spolehlivost při vysokých proudech. Proud v propustném směru je 1,8 A při napětí 45 V. Rozměry této LED diody (obrázek 23) jsou $27,4 \times 27,4 \times 1,2$ mm, přičemž opticky účinná plocha má průměr 23 mm. Tato LED výkonová dioda ve verzi COB opět



Obrázek 23: Cree XLamp CMA3090 - rozměry. Převzato a upraveno z [31].

vyzařuje neutrální bílé spektrum (4000 K) při maximálním výkonu 174 W a vyzařovacím úhlu 115° (obrázek 24). Poskytuje světelný tok 10 652 lm [31].



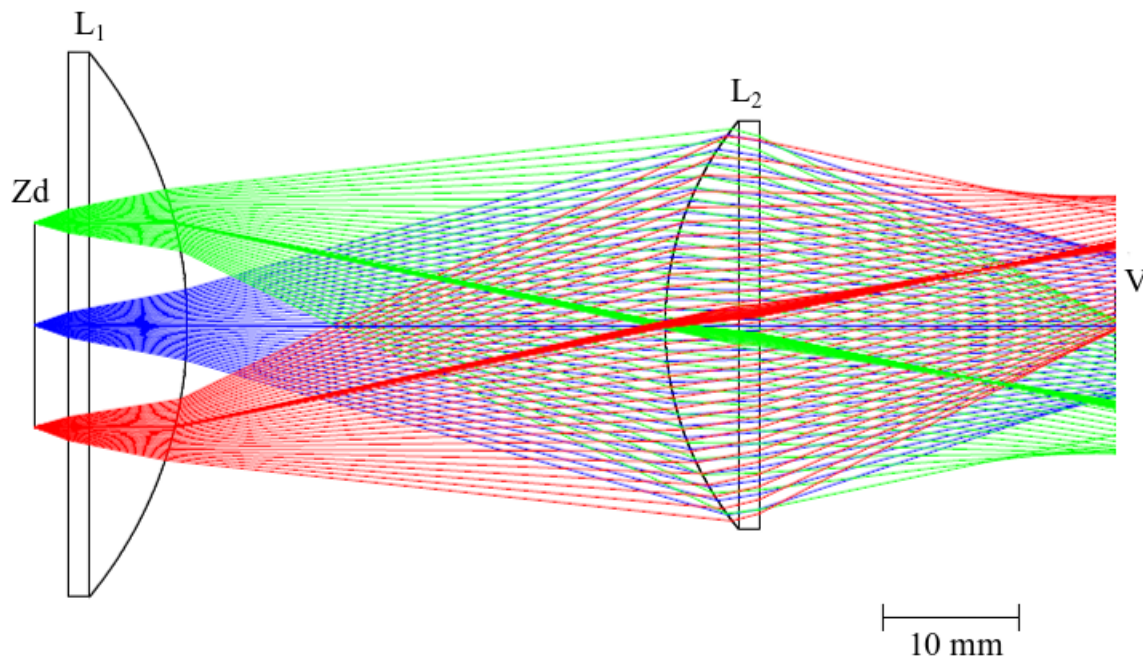
Obrázek 24: Vyzařovací graf. Převzato a upraveno z [31].

5.2 Optická simulace

Celkově jsem vytvořil 3 simulační návrhy optického systému osvětlovacího modulu v programu Zemax. Zdrojem osvětlení jsou popsané LED diody v různých kombinacích s optickými komponenty. Všechny jednotlivé varianty mají jedno společné a tím je vstupní průměr jádra světlovodu V (5 mm).

5.2.1 Dvoučočkový osvětlovač

První optický návrh (obrázek 25) se skládá ze zdroje osvětlení Zd, kterým je v tomto případě LED dioda ProLight Opto PACK-57FNL-BC8N s opticky účinnou plochou 15 mm a vyzařovacím úhlem 40° vzhledem k hodnotám, které vyplývají z vyzařovacího grafu pro samotnou LED diodu je její účinnost cca. 75 %. Světlo, které je vyzařováno ze zdroje Zd, dopadá na plan-konvexní čočku L_1 (Edmund Optics [32]) s ohniskovou vzdáleností 40 mm a průměrem 40 mm. Tato čočka láme světlo na plan-konvexní čočku L_2 (Edmund Optics [32]), která je orientována konvexní stranou k první čočce a její ohnisková vzdálenost je 30 mm s průměrem 30 mm. Po lomu dopadají paprsky do roviny V ohraničené průměrem světlovodu. Kombinace plan-konvexní čočky L_1 fungující jako kolektor a plan-konvexní čočky L_2 byla zvolena kvůli fokusaci paprsků vycházejících z plošného zdroje Zd blíže k optické ose. Tato sestava má jednoduché uspořádání, které však pouze zčásti fokusuje maximální množství světelných paprsků do světlovodu V. Výkon v oblasti světlovodu V se vstupní aperturou 5 mm dosahuje dle simulace hodnoty 0,0705 W. Jak je vidět z optické simulace na obrázku 25, paprsky mají na výstupu spíše divergentní charakter. Optické parametry navrženého dvoučočkového osvětlovače jsou uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 25: Navržené uspořádání optické sestavy. Zd: zdroj osvětlení; $L_{1,2}$: plan-konvexní čočky; V: světlovod.

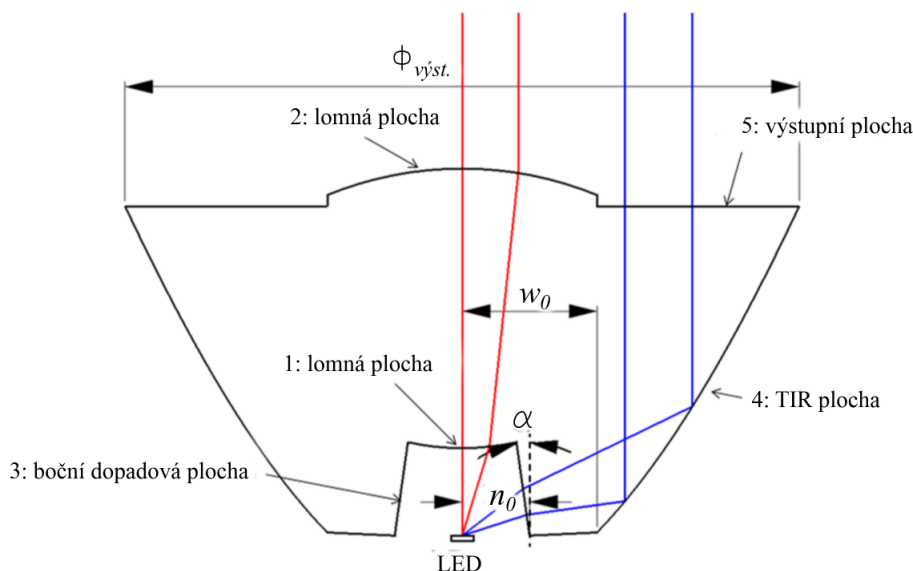
Tabulka 1: Optické parametry dvoučočkového systému.

Povrch	Komponenta	Rádus (mm)	Tloušťka (mm)	Materiál	Optický průměr (mm)
1	Zd	–	2,50	–	15
2	L ₁	–	8,70	N-SF11	40
3	L ₁	-31,39	35,13	–	40
4	L ₂	23,54	6,90	N-SF11	30
5	L ₂	–	26,13	–	30
6	V	–	–	–	5

5.2.2 Dvoučočkový osvětlovač s TIR

Druhý optický návrh (obrázek 27) je tvořen zdrojem světla Zd, kterým je rovněž LED dioda ProLight Opto PACK-57FNL-BC8N s opticky účinnou plochou 15 mm a vyzařovacím úhlem 60° vzhledem k dané specifikaci z vyzařovacího grafu příslušné LED diody dosahuje účinnosti 50 %. Na tuto LED diodu navazuje TIR reflektor R.

TIR (Total Internal Reflection) reflektor využívá principu totálního odrazu ke sběru a zpracování světla. Všechny TIR reflektory jsou navrženy se vzájemnou kombinací jednotlivých ploch, jak je znázorněno na obrázku 26. První kombinací jsou dvě lomné



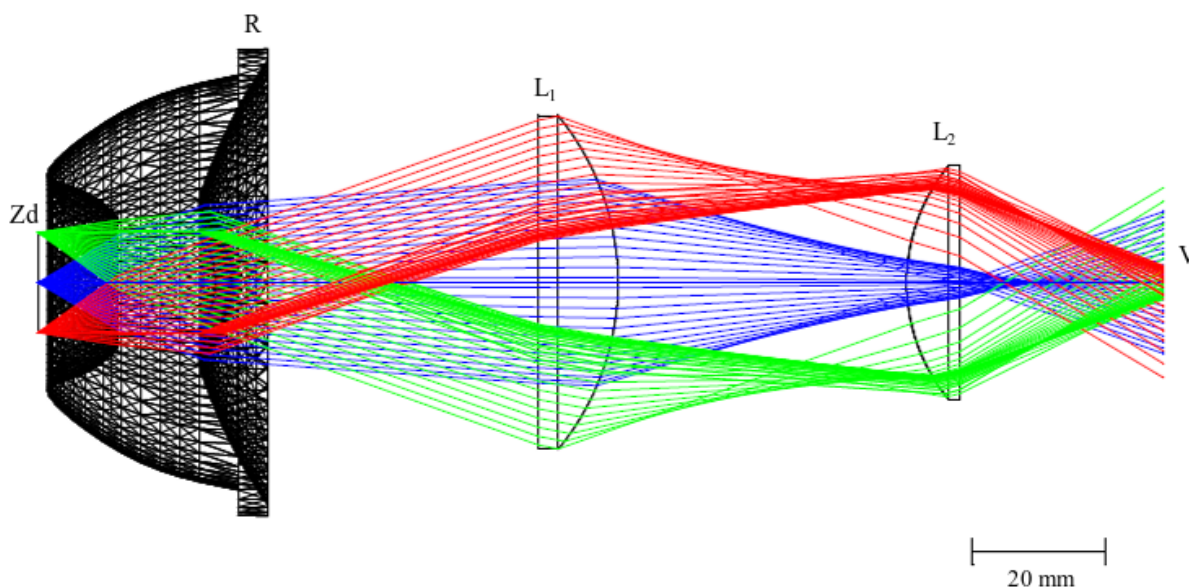
Obrázek 26: Náčrt TIR reflektoru. Čočka se skládá ze dvou skupin ploch. Počáteční body boční dopadové plochy a povrchu TIR jsou n_0 a w_0 . Úhel náklonu boční dopadové plochy je α a průměr výstupní pupily je $\Phi_{výst.}$. Rovněž jsou vyneseny paprsky emitované z různých skupin povrchů. Převzato a upraveno z [33].

plochy (tj. plocha 1 a plocha 2), které tvoří sférickou čočku a mají za cíl kolimovat paprsky emitované pod malými úhly vzhledem k optické ose LED. Druhá kombinace zahrnuje tři plochy: boční dopadovou plochu, která je odkloněná o úhel α ve vzdálenosti n_0 k optické

ose (tj. plocha 3), TIR plochu, jejíž počátek je ve vzdálenosti w_0 od optické osy (tj. plocha 4) a výstupní plochu (tj. plocha 5). Paprsky, které vychází z LED pod velkými úhly jsou díky vhodné kombinaci ploch kolimovány do výstupní pupily $\Phi_{výst.}$. Tvar každého povrchu má velkou volnost designu [33].

Tento TIR reflektor může efektivně směřovat světlo a volbou poloměru zakřivení 1 a 2 plochy můžeme regulovat úhel paprsků. Čočka má vynikající schopnost kolimovat paprsky v malém úhlu. Zatímco reflektor má výhodu v tom, že mění paprsky pod velkým úhlem. Čočka i reflektor jsou tedy spojeny dohromady. Kombinace reflektoru a skupiny čoček do TIR reflektoru, může účinně vylepšit světelnou účinnost LED osvětlovacích zařízení, a snížit tak ztráty osvětlovače [34].

Paprsky, které vychází z TIR reflektoru R následně dopadají na plan-konvexní čočku L_1 (Edmund Optics [32]) s ohniskovou vzdáleností 50 mm a průměrem 50 mm. Průchodem světla přes tuto čočku dochází k lomu paprsků a ty následně dopadají na druhou plan-konvexní čočku. Druhá plan-konvexní čočka L_2 je orientována konvexní stranou ke zdroji osvětlení. Její ohnisková vzdálenost je 35 mm s průměrem rovněž 35 mm. Světlo, které prošlo touto optickou soustavou, dopadá na vstupní průměr 5 mm jádra světlovodu V. Zvolená kombinace plan-konvexní čočky L_1 jako kolektor a plan-konvexní čočky L_2 vede k vytvoření systému, který kolimuje okrajové paprsky vycházející ze zdroje Zd. V porovnání s prvním návrhem je možné ze simulace vidět, že došlo k vylepšení. Paprsky, které prochází touto optickou soustavou přes jednotlivé optické komponenty, mají již spíše sbíhavý (konvergentní) charakter. Stále však dochází k určitým ztrátám a jádro vlákna není osvětleno zcela dostatečně. Výkon, který je na vstupu do světlovodu V dosahuje dle simulace hodnoty 0,057 W. Optické parametry navrženého dvoučočkového osvětlovače s použitím TIR reflektoru jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek 27: Navržené uspořádání optické sestavy. Zd: zdroj osvětlení; R: TIR reflektor; $L_{1,2}$: plan-konvexní čočky; V: světlovod.

Tabulka 2: Optické parametry dvoučočkového systému s použitím TIR reflektoru.

Povrch	Komponenta	Rádus (mm)	Tloušťka (mm)	Materiál	Optický průměr (mm)
1	Zd	–	11,00	–	15,0
2	–	–	1,00	–	40,0
3	R	–	–	N-BK7	243,3
4	–	–	33,00	–	60,0
5	L ₁	–	12,00	N-SF11	50,0
6	L ₁	-39,24	43,28	–	50,0
7	L ₂	27,47	8,00	N-SF11	35,0
8	L ₂	–	30,52	–	35,0
9	V	–	–	–	5,0

5.2.3 Vláknový optický taper

Poslední návrh tvoří zdroj osvětlení Zd, kterým je LED dioda Cree XLamp CMA3090 s opticky účinnou plochou o průměru 23 mm, výkonem 174 W a vyzařovacím úhlem kolem 60° vzhledem k hodnotám, které plynou z vyzařovacího grafu LED diody (obrázek 24). Tento návrh se od předchozích odlišuje použitím optické součástky, kterým je vláknový optický taper T (vláknový optický kužel).

Vláknové optické tapery jsou jedinečné komponenty z optických vláken, které se používají buď pro zvětšení nebo zmenšení obrazu. Při procesu výroby taperu se připravuje válcovitý špalek, centrální zóna špalku se zahřívá a taper se napíná. Výsledný kus ve tvaru přesýpacích hodin je rozřezán na dva kusy a obroben na taper (obrázek 28) [35].

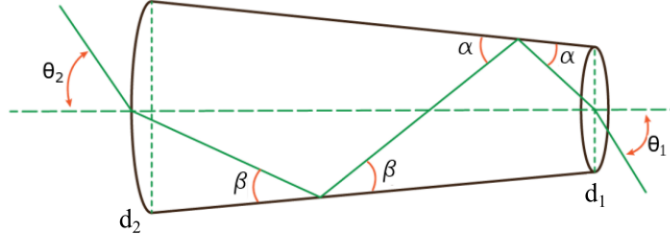


Obrázek 28: Vláknový optický taper. Převzato z [32].

Vláknové optické tapery se řídí vztahem zohledňujícím jeho průměry a úhly paprsků, které na něj dopadají a vycházejí:

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{d_2}{d_1}, \quad (13)$$

kde d_1 je průměr menšího konce taperu, d_2 je průměr většího konce taperu, θ_2 je vstupní úhel a θ_1 úhel pod kterým paprsek vystupuje z taperu (obrázek 29).



Obrázek 29: Propustnost vláknového optického taperu. Převzato a upraveno z [36].

Světelný paprsek vstupující do optického taperu větším průměrem d_2 pod úhlem θ_2 z něj vystupuje menším koncem o průměru d_1 pod úhlem θ_1 . Podle relace tedy platí, že v případě průměru $d_1 < d_2$ je úhel $\theta_1 > \theta_2$ a naopak [36].

Poměr zvětšení obrazu je jednoduchým poměrem průměru velkého a malého konce optického taperu. Protože světlo může procházet taperem v obou směrech, slouží stejně dobře pro zmenšení i zvětšení. Typické poměry zvětšení pro SCHOTT tapery jsou v rozsahu až 5 : 1. Numerická apertura je měřítkem schopnosti sbírat světlo vlákna. Na rozdíl od případu paralelních vláken se však efektivní NA_{eff} taperových vláken mění po délce zúžení a zmenšuje se s rostoucím průměrem. Tím pádem:

$$NA_{eff} = NA_{max} \times d_1/d_2. \quad (14)$$

Snížená efektivní NA_{eff} velkého konce zúžení je důležitým faktorem propustnosti taperu. Pro získání maximální propustnosti, vstupní NA na širším konci by neměla překročit efektivní NA_{eff} taperu. Jakékoli světlo při překročení této hodnoty uniká skrz stěny vlákna. Když paprsek prochází zúžením, přibližuje se ke kritickému meznímu úhlu a je absorbován pomocí materiálu EMA (ethylen methyl akrylát). Výsledkem je, že při hodnotě nad mezním úhlem se propustnost T v případě taperů vztahuje k efektivní numerické apertuře (NA_{eff}):

$$T = T_{coll} \times (NA_{eff})^2, \quad (15)$$

kde T_{coll} je fokusovaná propustnost [35].

Velikost dostupných taperů se pohybuje od několika milimetrů až po současné maximum průměru 75 mm. Běžné velikosti jsou navrženy pro propojení se standardními zesilovači obrazu a čipy CCD. V závislosti na aplikaci, může být toto napojení buď na velký nebo malý konec zúžení. Délka taperu se může ve výrobním procesu do určité míry měnit, ale obecně se rovná přibližně průměru velkého konce. Vláknové optické tapery nabízejí některá jedinečná a kompaktní řešení pro aplikace, jako je napojení na CCD čip, lékařské zobrazování a vědecké zobrazování [35].

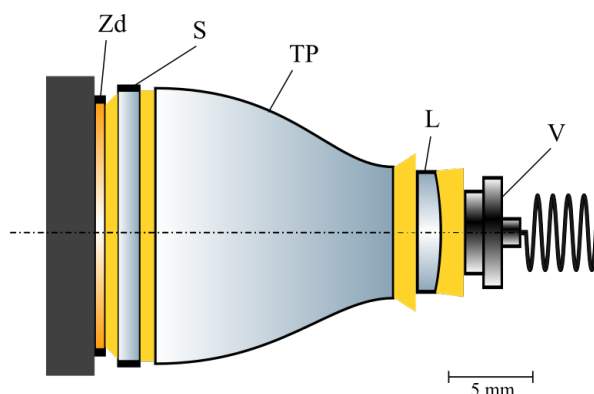
Optický taper v mém případě je od společnosti Edmund Optics [32]. Je vyrobený z Schott 24 skla s příměsí EMA. Obě zakončení jsou kulatá, větší průměr má 25 mm, který se zužuje na průměr o velikosti 8 mm. Provozní teplota se pohybuje od -10°C do 300°C . Nicméně, abychom snížili riziko poškození, vlivem tepla produkovaného LED diodou bylo před samotný taper TP umístěno studené sklo S. Toto studené sklo od společnosti Edmund

Optics [32] s průměrem 25 mm a tloušťkou 3,3 mm je navrženo s úhlem dopadu 0° . Funkcí studeného skla je odfiltrování infračerveného záření a propuštění pouze záření viditelného.

Třetí návrh nebylo možné plně opticky simulovat v programu Zemax a byla vytvořena schémata jednotlivých uspořádání optických prvků. Tento poslední návrh zahrnuje dvě konfigurace co se týče pokračování paprsků na výstupu z taperu TP:

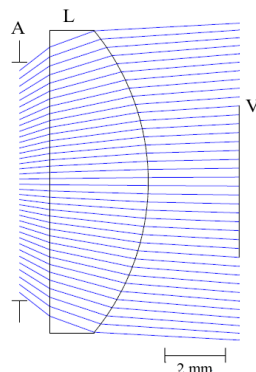
a) Vláknový optický taper s plan-konvexní čočkou,

První variantou (obrázek 30) třetího návrhu je použití plan-konvexní čočky L od společnosti Edmund Optics [32] o průměru 10 mm s ohniskovou vzdáleností 10 mm.



Obrázek 30: Schéma s plan-konvexní čočkou. Zd: zdroj osvětlení; S: studené sklo; TP: taper; L: plan-konvexní čočka; V: světlovod.

Pro zjištění úhlu divergence na výstupu z taperu TP byla experimentálně na optické lavici poskládána sestava, skládající se ze světelného zdroje Zd, studeného skla S, taperu TP a plan-konvexní čočky L. Tato plan-konvexní čočka L na výstupu alespoň zčásti sdružuje paprsky do světlovodu V. Jak je možné vidět ze simulace (obrázek 31), která byla provedena v programu Zemax, mají paprsky na výstupu z této čočky divergentní charakter a očekává se, že zvýšení světelného výkonu nebude příliš patrné. Optické parametry použité čočky jsou uvedeny v tabulce 3.



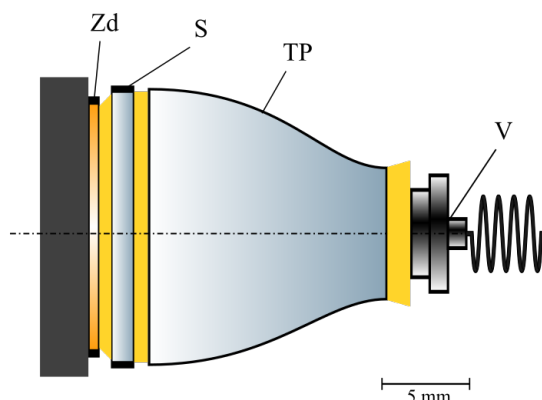
Obrázek 31: Průchod paprsků plan-konvexní čočkou. A: apertura výstupu z taperu; L: plan-konvexní čočka; V: světlovod.

Tabulka 3: Optické parametry plan-konvexní čočky v kombinaci s optickým taperem.

Povrch	Komponenta	Rádus (mm)	Tloušťka (mm)	Materiál	Optický průměr (mm)
1	–	–	4,70	–	–
2	A	–	1,00	–	7,88
3	L	–	3,25	N-SF11	10,00
4	L	-7,85	3,00	–	10,00
5	V	–	–	–	5,00

b) vláknový optický taper bez plan-konvexní čočky.

Druhou možnou variantou je napojení světlovodu V přímo na taper TP bez použití jakékoliv další optiky viz obrázek 32. Tato varianta má určité limity a jisté ztráty, přenesený světelný výkon bude změřen při testování osvětlovacího modulu.



Obrázek 32: Schéma bez plan-konvexní čočky. Zd: zdroj osvětlení; S: studené sklo; TP: taper, V: světlovod.

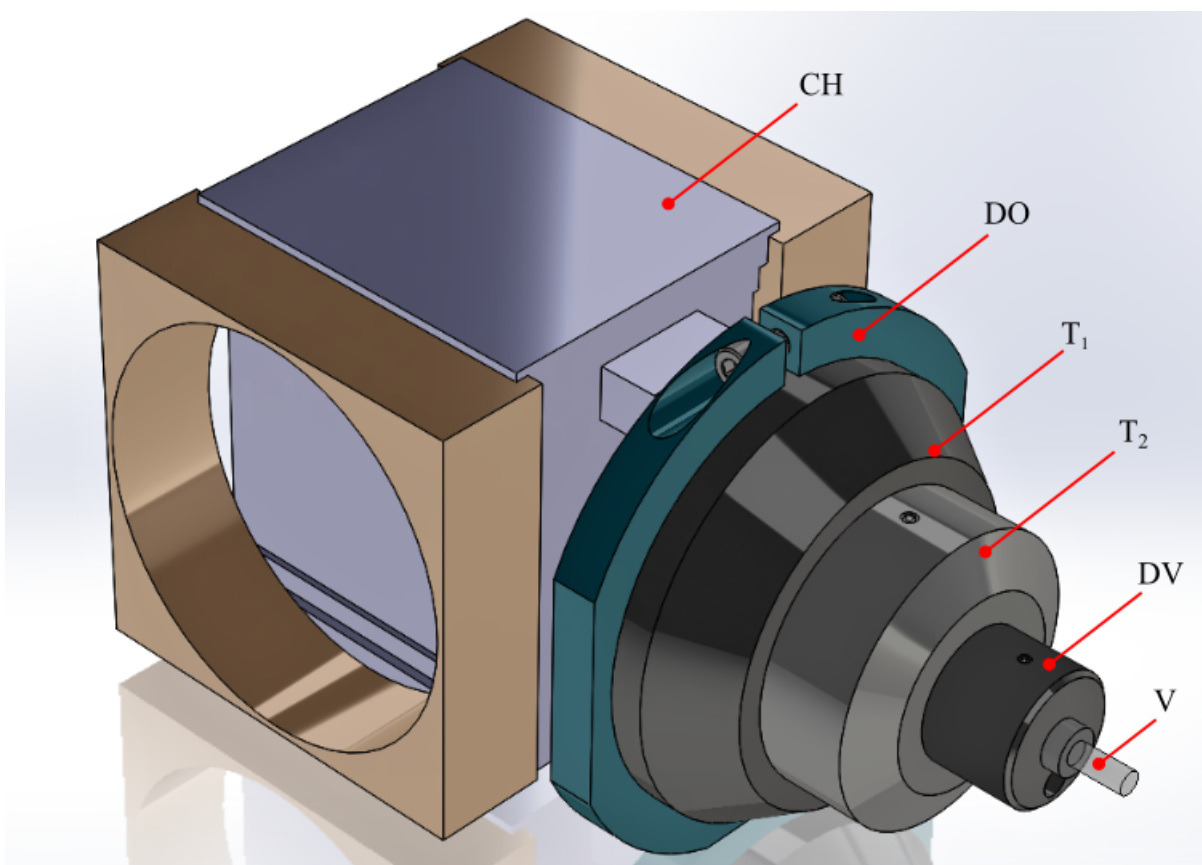
Z předchozích tří návrhů byl pro jeho jedinečnost a inovaci vybrán poslední zmíněný, třetí návrh. Tento návrh se zmíněnými variantami se stal základem pro vytvoření konstrukce a mechanického řešení osvětlovacího modulu. Obě zmíněné varianty budou následně testovány a změřen světelný výkon na výstupu ze světlovodu.

6 Konstrukční a mechanické řešení

Konstrukční návrh navazuje na předchozí optické simulace. Optickou soustavu jsem doplnil o konstrukční a mechanické prvky, které umožňují přesné uložení jednotlivých optickým prvků. Celý osvětlovací modul byl navržen v CAD (Computer Aided Design) programu Solidworks. Tento software umožňuje vytváření 3D modelů. Dle vytvořeného modelu byla vypracována výrobní a výkresová dokumentace. Jako materiál byl u jednotlivých prvků zvolena hliníková slitina (EN-AW 6060), která má dobrou obrobiteľnosť.

6.1 3D návrh v programu Solidworks

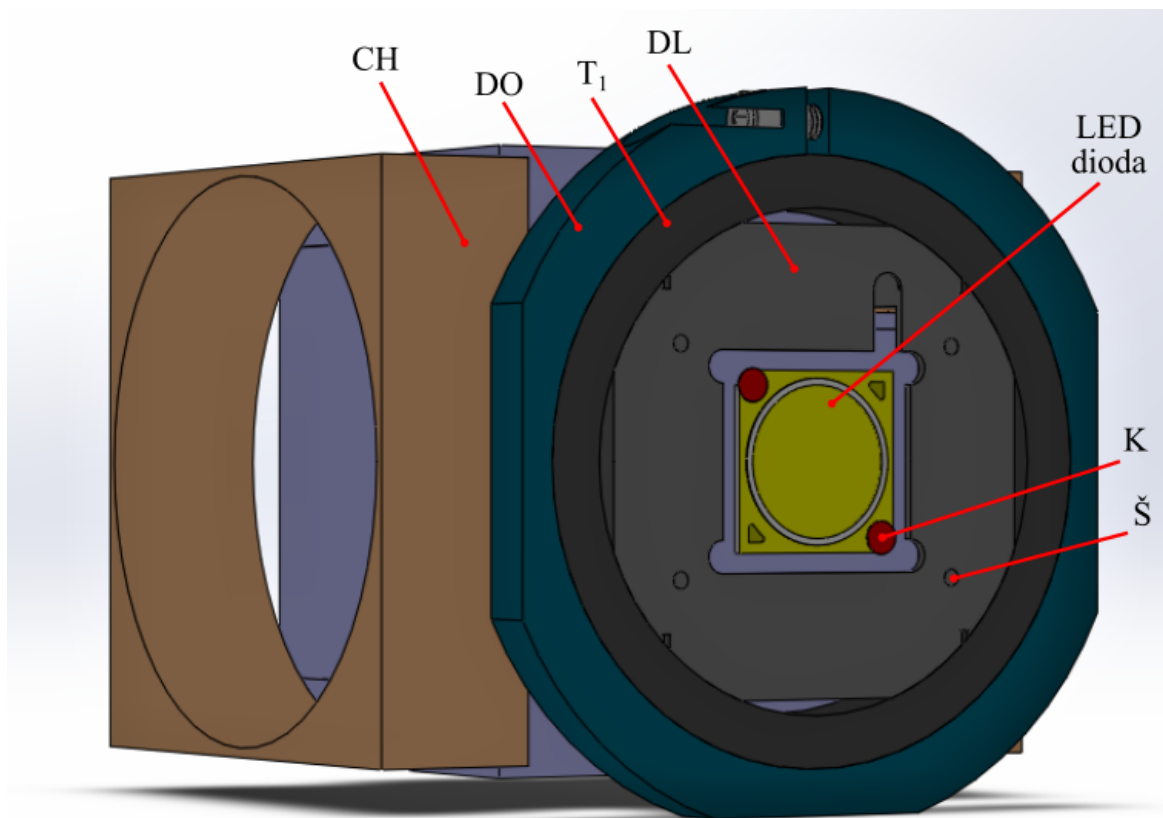
Konstrukci osvětlovacího modulu (obrázek 33) můžeme rozdělit do pěti hlavních celků. Počáteční částí je soustava chlazení s držákem LED diody CH, střední část tvoří dva tubusy T_1 a T_2 . Zakončením celé sestavy je držák světlovodu DV se samotným světlovodem V. Celá konstrukce je fixována do držáku osvětlovacího modulu DO.



Obrázek 33: Sestava osvětlovacího modulu. CH: soustava chlazení s držákem LED diody; DO: držák osvětlovacího modulu; $T_{1,2}$: tubusy; DV: držák světlovodu; V: světlovod.

Začátek samotné sestavy (obrázek 35) tvoří chladicí jednotka CH, která je složena ze dvou ventilátorů (Noctua NF-B9 [37]), chladiče z PC (Noctua NH-U9B [37]) a držáku LED diody DL. Tato chladicí jednotka byla již zakoupena a její účel spočívá v chlazení výkonové LED diody v průběhu jejího provozu. LED dioda je vycentrována a upevněna k držáku

pomocí dvou kolíků K. Samotný držák LED diody DL je napevno přichycen k chladicí jednotce CH pomocí čtyř šroubů Š (obrázek 34).



Obrázek 34: Osvětlovací modul – detailní řez. CH: chladicí jednotka; DO: držák osvětlovacího modulu; T_1 : tubus; DL: držák LED diody; LED dioda; K: kolíky; Š: šrouby.

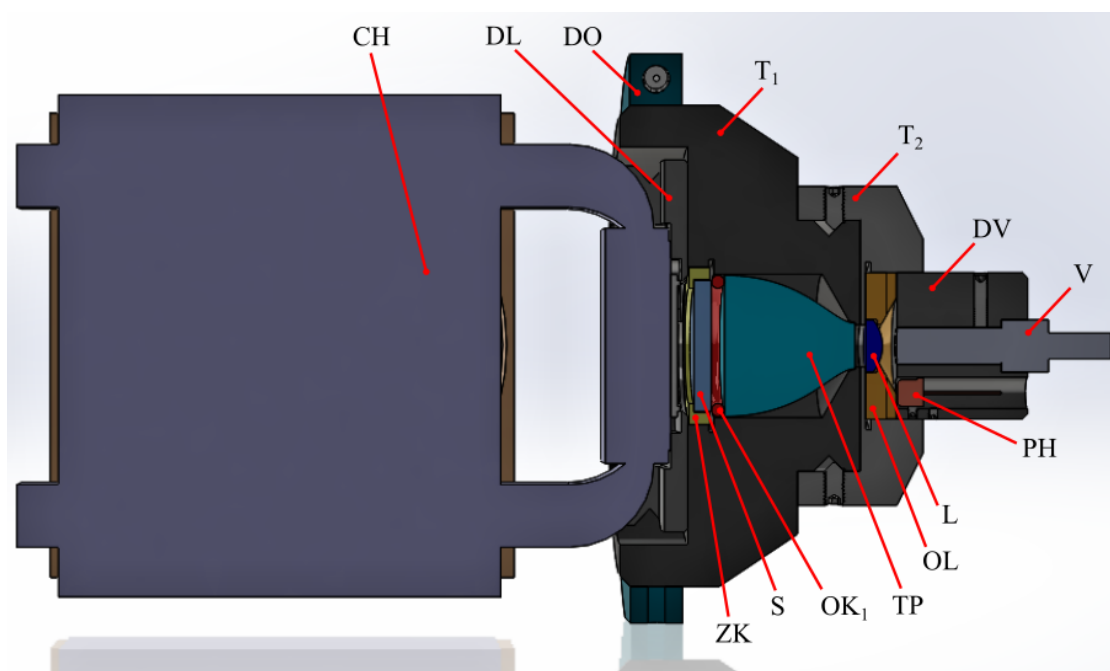
Držák DL, který byl již rovněž vytvořen, měl čtvercový tvar a slouží pro uchycení LED diody. Tento držák bylo potřeba obrobít na požadovaný kruhový průřez s V-drážkou. V-drážka slouží k napojení a zafixování držáku a celé soustavy chlazení k tubusu T_1 pomocí čtyř stavěcích šroubů s hrotem M4. Následuje středová část modulu, kterou tvoří dva tubusy: T_1 a T_2 . Tubus T_1 navazuje na držák LED diody DL a na svém druhém konci je napojen na tubus T_2 . Samotné zakončení je opět řešeno použitím V-drážky pro pevné připojení a zajištění centrace tubusu T_2 pomocí dvou stavěcích šroubů s hrotem M4. Vnitřní část tubusu T_1 je obrobena soustružením na větší průměr, který navazuje na menší průměr se závitem M30×1,5. Dále je vnitřní průměr tohoto tubusu T_1 obroben na ještě menší průměr s kónickým zakončením pro uložení taperu TP. Optické komponenty (taper TP, studené sklo S) jsou v tubusu T_1 uloženy volně [38]. Nejhlouběji je zde uložen taper TP. Taper TP je na jednom konci uložen v osazení tubusu T_1 a na druhém konci je zajištěn o-kroužkem OK_1 . O-kroužek OK_1 slouží jako dilatační člen mezi taperem TP a studeným sklem S. Obě tyto optické komponenty jsou zajištěny závitovým kroužkem ZK se závitem. Spojení závitovým kroužkem je častým spojením optické součásti s objímkou [39]. Závitový kroužek zajišťuje soustřednost a minimalizuje

pohyb daných optických součástí. Na tubus T_1 nasedá tubus T_2 , který je zajištěn pomocí dvou stavěcích šroubů M4 s hrotem. Tubus T_2 je opatřen vnitřním závitem pro našroubování dalších součástí.

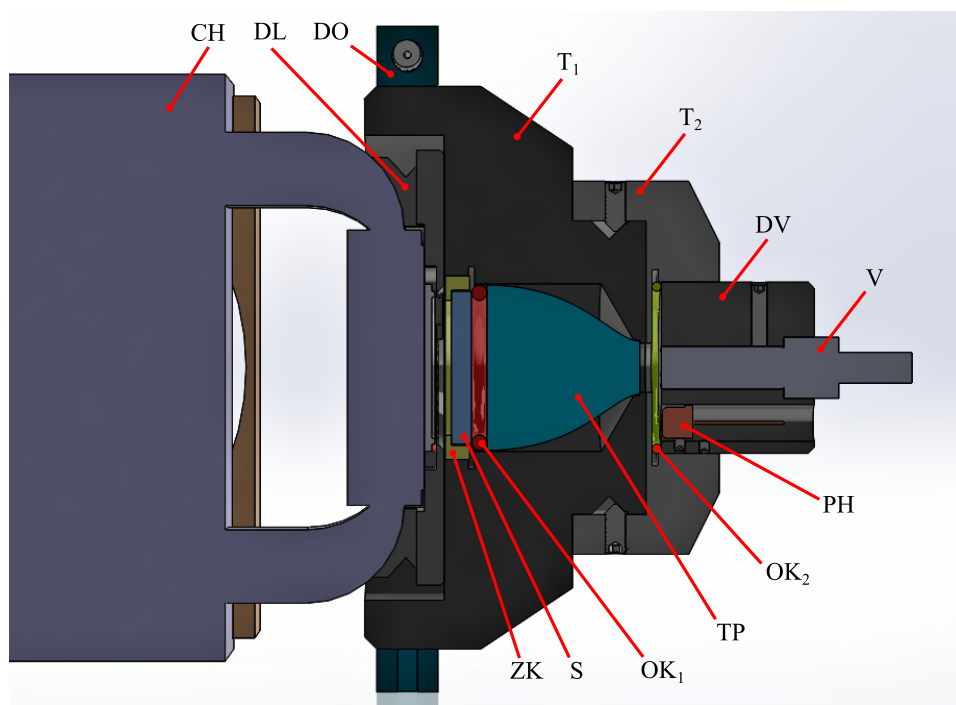
V případě všech zvažovaných variant je do držáku světlovodu DV vyvrtán otvor pro fotodiodu PH, která je zajištěna pomocí stavěcího šroubu M2. Tato fotodioda slouží jako čidlo osvětlení na výstupu z osvětlovacího modulu pro řídicí jednotku ovládání LED diody.

Existují dvě možnosti napojení světlovodu na tubus T_2 . První návrh (obrázek 35 a)) spočívá v použití plan-konvexní čočky L, která je zajištěna objímkou čočky OL se závitem. Objímka čočky OL je vysoustružena ve své vnitřní části do kónického tvaru z důvodu lepšího odvodu světla, které je nutné pro detekci na fotodiodě PH. Tato fotodioda PH je fixována pomocí stavěcího plochého šroubu M2 v držáku světlovodu DV a slouží pro detekci světelných paprsků před vstupem do světlovodu. Držák světlovodu DV je našroubován co nejvíce k objímce plan-konvexní čočky OL. Světlovod V je volně nasunut do držáku DV a zajištěn proti pohybu plochým stavěcím šroubem M3. V případě druhé varianty (obrázek 35 b)), tzn. varianty bez použití plan-konvexní čočky L, je držák vlákna DV přímo našroubován do tubusu T_2 . Stejně jako v předchozím případě je světlovod fixován proti pohybu plochým stavěcím šroubem M3. V případně nutnosti osvětlení fotodiody PH větším množstvím světla je potřeba napřed do tubusu T_2 vložit o-kroužek OK_2 pro větší dilataci držáku vlákna DV od taperu TP.

Jak bylo zmíněno dříve, pro všechny výrobní součásti byla zvolena slitina hliníku EN-AW 6060. Tento materiál má dobrou obrobitelnost, současně však vykazuje určitý stupeň odrazivosti. Pro potlačení odrazu světla, především uvnitř systému osvětlovacího modulu, je vhodné jednotlivé povrchy daných součástí eloxovat. Eloxování hliníku je černé – matné.



a) první návrh



b) druhý návrh

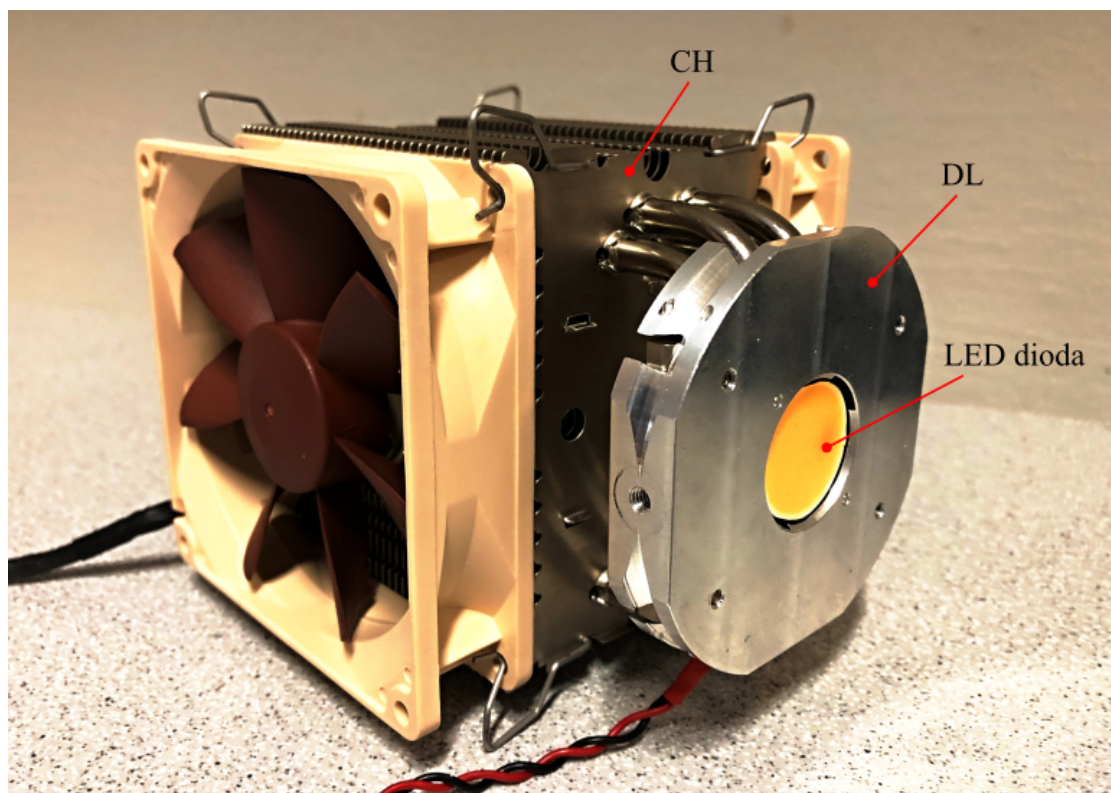
Obrázek 35: 3D model osvětlovacího modulu – středový řez: a) návrh s použitím plan-konvexní čočky, b) návrh bez použití plan-konvexní čočky. CH: chladicí jednotka; DL: držák LED diody; DO: držák osvětlovacího modulu; $T_{1,2}$: trubusy; DV: držák vlákna; V: světlovod; PH: fotodioda; L: plan-konvexní čočka; OL: objímka čočky; $OK_{1,2}$: o-kroužky; TP: taper; S: studené sklo; ZK: závitový kroužek.

7 Sestavení a otestování modulu

7.1 Vyrobený osvětlovací modul

Jednotlivé díly, které byly vyrobeny jsem sestavil (před eloxováním) pomocí daných spojovacích materiálů.

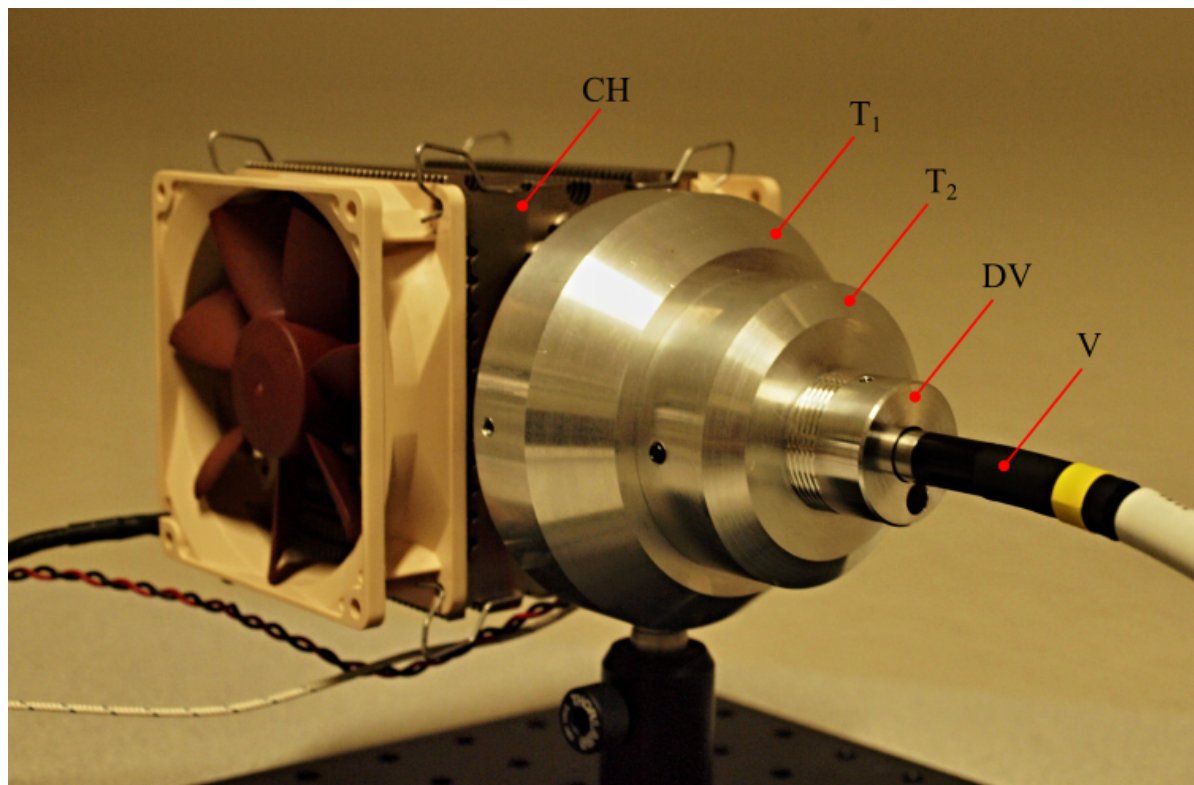
Jako první bylo nutné umístit LED diodu do držáku LED diody DL (obrázek 36). Správné umístění a vycentrování LED diody je dosaženo pomocí dvou kolíků. Pro kontrolu aktuální teploty v okolí LED diody je zde umístěn senzor napojený na multimetr. Samotný držák LED diody DL je připojen k chladicí jednotce CH pomocí čtyř šroubů, pro zajištění lepší styčné plochy bylo nanášeno na zadní část LED diody malé množství teplovodné pasty. Chladicí jednotka CH je tvořena dvěma ventilátory, které jsou upevněny po stranách pomocí svorek. Pro funkčnost samotného chlazení je potřeba zvolit správnou orientaci ventilátorů, z nichž jeden vzduch nasává a druhý naopak odsává.



Obrázek 36: Připojení držáku LED diody k chladicí jednotce. CH: chladicí jednotka; DL: držák LED diody; LED dioda.

Celá chladicí jednotka s držákem LED diody je připojena na tubus T_1 pomocí čtyř stavěcích šroubů s hrotem. Před připojením tubusu T_1 bylo nutné dovnitř tubusu umístit jednotlivé optické prvky: Taper TP, o-kroužek OK_1 , studené sklo S a zajistit je proti pohybu pomocí závitového kroužku ZK. Na tubus T_1 navazuje tubus T_2 , který je zajištěn pomocí dvou stavěcích šroubů s hrotem. Do vnitřní části tubusu T_2 v závislosti na konfiguraci je zašroubována objímka čočky OL s plan-konvexní čočkou L a následně držák

vlákna DV. V případě konfigurace bez použití plan-konvexní čočky L (obrázek 35 b)) je dovnitř tubusu umístěn o-kroužek OK₂, na který je přímo našroubován držák vlákna DV. Světlovod V je zafixován proti pohybu pomocí stavěcího šroubu s plochou hlavou. Sestavený osvětlovací modul je možné vidět na obrázku 37.



Obrázek 37: Sestavený vyrobený osvětlovací modul. CH: chladicí jednotka; T_{1,2}: tubusy; DV: držák vlákna; V: světlovod.

Pro osvětlovací modul byl navržený držák DO. Modul poté bude možné připojit pomocí závitu M4 k základně. Pro testování byl modul připevněn pomocí jedné závitové díry umístěné na tubusu T₁ k základní desce.

7.2 Testování osvětlovacího modulu

Testování osvětlovacího modulu proběhlo před úpravou povrchu pomocí eloxování. Ovládání napájení LED diody pomocí řídicí jednotky je ve fázi technického vývoje a prozatím je řešeno pomocí stabilizovaného zdroje napětí/proudu (Statron 3254.3), díky kterému je možné manuálně zvyšovat nebo snižovat napětí/proud LED diody a tím měnit její svítivost. Měření výkonu osvětlovacího modulu bylo za pomoci digitálního Power meteru Thorlabs PM100D s připojeným adaptérem S310C.

7.2.1 Měření výkonu osvětlovacího modulu

Pro kalibraci systému byly změřeny výkonové ztráty, které jsou způsobeny použitým vláknovým optickým taperem TP. Kalibrace byla provedena měřením hodnot napětí

a proudu při provozu LED diody. Zároveň byl měřen světelný výkon pomocí digitálního Power meteru Thorlabs na výstupu ze světlovodu V. Provozní napětí zvolené LED diody se pohybuje v rozmezí 48–50 V. Pro účely měření bylo zvoleno napětí okolo 48 V a na digitálním power meteru Thorlabs rozsah 650 nm. Měření bylo provedeno v případě systému s použitím plan-konvexní čočky L před samotným světlovodem V - první návrh (obrázek 35 a)) a při konfiguraci bez použití plan-konvexní čočky – druhý návrh (obrázek 35 b)), tzn. umístěním světlovodu V co nejbližší k taperu TP. Porovnání těchto provedených měření je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty při testování.

Osvětlovací systém	Napětí (V)	Proud (A)	Příkon (W)	Výkon na výstupu ze světlovodu (W)	Účinnost (%)
LED modul (1. návrh)	48,2	2,94	141,7	0,570	0,4
LED modul (2. návrh)	48,2	2,94	141,7	0,632	0,5
Současný systém CCHM	–	–	150,0	0,580	0,4

V případě srovnání dvou uvažovaných návrhů nově navrženého LED osvětlovacího modulu je z tabulky 4 možné vidět vyšší hodnotu výkonu na výstupu ze světlovodu V v případě 2. návrhu o 0,062 W. Z těchto hodnot rovněž vyplývá, že propustnost světla (účinnost), které prochází taperem TP a vystupuje ze světlovodu V, dosahuje v případě 2. uvažovaného návrhu, tzn. varianty bez umístění plan-konvexní čočky L před světlovod V hodnoty účinnosti 0,5 %. Z této hodnoty procentuální účinnosti vyplývá, že při použití naší výkonové LED diody s maximálním příkonem 174 W získáme na výstupu z vlákna světlovodu V výkon o hodnotě 0,87 W.

Pro světelný tok Φ platí:

$$\Phi = P_E \cdot P, \quad (16)$$

kde P_E je výkon diody (W) a P je měrný světelný výkon (lm/W). V případě použité LED diody má měrný světelný výkon hodnotu 151,6 lm/W [31]. Vynásobením této hodnoty výkonem 0,87 W získáme hodnotu osvětlení 132 lm. Při porovnání hodnoty osvětlení s komerčně dostupným vláknovým osvětlovacím modulem Albalux FM [29], u kterého výrobce uvádí osvětlení na výstupu z vlákna 150 lm, získáme u nově navrženého vláknového osvětlovacího modulu nižší hodnotu osvětlení pouze o 18 lm. Porovnáním hodnot současného osvětlovacího systému CCHM a nově navrženého LED osvětlovacího modulu, došlo k navýšení výkonu u nového osvětlovače (2. návrh) o 9 % na hodnotu 0,632 W.

Halogenová žárovka tak poskytuje srovnatelný světelný výkon, ale zaostává v ostatních parametrech. LED dioda má vyšší účinnost než u klasické vláknové žárovky, její časté zapínání a vypínání výrazně neovlivňuje jejich životnost a rozsvícení na plný výkon je v řádu milisekund. Elektrickou energii přeměňují LED diody z většiny na světlo, nikoliv na teplo a při stmívání nemění při nižším napětí barvu světla jako vláknové žárovky. Další výhodou je jejich velká mechanická odolnost proti nárazům a otřesům.

Deklarovaná životnost LED zdrojů se běžně pohybuje kolem 25 000 hodin, přičemž pro samotné čipy uvádějí výrobci životnost 100 000 hodin i více. V případě použité halogenové

žárovky současného osvětlovacího systému CCHM je její životnost pouhých 200 hodin. Energetická účinnost halogenové žárovky je několikanásobně nižší než v případě LED diody a to se sebou přináší i vyšší náklady na její provoz.

Závěr

Mikroskopy jsou základními přístroji téměř ve všech oborech a především v buněčné biologii. Jednu ze základních částí mikroskopu tvoří jeho osvětlovací modul, který má zajistit dostatečné osvětlení pozorovaného vzorku. Cílem této diplomové práce bylo provést rešerši stávajících komerčních osvětlovacích modulů a stanovit nutné parametry pro použití s CCHM. Žádný z komerčně dostupných osvětlovacích modulů není vhodný a to z důvodu potřeby zajištění dobře homogenizovaného zdroje světla do systému mikroskopu. Současný osvětlovací systém CCHM je tvořen klasickou halogenovou žárovkou. Tento druh osvětlení je v dnešní době spíše zastaralý a méně účinný. Existují modernější zdroje osvětlení – LED diody, které jsou stále více dostupnější, a tím se tato technologie stala základem pro nově navržený vláknový osvětlovací modul. Vytvořil jsem celkem tři simulační návrhy optického systému osvětlovacího modulu v programu Zemax, z nichž byl pro svou jedinečnost použit poslední, který využívá vláknový optický taper. Tento poslední návrh se stal podkladem pro vytvoření 3D konstrukce v programu Solidworks. Pro navržené komponenty byla vytvořena výkresová dokumentace, podle níž byly jednotlivé součástky vyrobeny. Modul bylo následně možné sestavit a otestovat. Pro zajištění bezpečného provozu LED diody bude sloužit řídicí jednotka, která je stále ve fázi technického vývoje. Testování navrženého osvětlovacího modulu tak bylo provizorní, za použití manuálně ovládaného stabilizovaného zdroje napětí/proudu. Při těchto testech bylo zjištěno, že použitý vláknový optický taper vykazuje určité ztráty. Nově navržený vláknový osvětlovací modul dosahuje lepšího výkonu osvětlení než stávající osvětlovač a bude poskytovat dostatečné osvětlení pro použití v mikroskopii. Podařilo se tak vyvinout nový vláknový osvětlovací modul, který je srovnatelný s komerčně dostupnými osvětlovači, které se objevují na trhu. Díky použité LED technologii je životnost těchto zdrojů v porovnání s klasickými halogenovými žárovkami několikanásobně vyšší a s tím souvisejí i nižší náklady na jejich provoz.

LED osvětlení, které se stále více objevuje kolem nás, představuje budoucnost osvětlovacích systému nejen v mikroskopii, ale i v jiných oblastech.

A Seznam příloh

Výkresová dokumentace:

- Osvětlovací modul S001 (sestava)
- Tubus 1 P001
- Tubus 2 P002
- Závitový kroužek P003
- Objímka čočky P004
- Držák vlákna P005
- Držák (úprava) P006
- Držák osvětlovacího modulu P007

CD:

- Elektronická verze diplomové práce
- Výkresová dokumentace

Seznam použité literatury

Reference

- [1] CROFT, W. J. *Under the Microscope: A Brief History of Microscopy*. Singapore: World Scientific, 2006. ISBN 9810237812.
- [2] ZERNIKE, F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* [online]. 1942, 9(7), 686-698 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/S0031-8914(42)80035-X. ISSN 00318914. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003189144280035X>.
- [3] ZERNIKE, F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica* [online]. 1942, 9(10), 974-986 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/S0031-8914(42)80079-8. ISSN 00318914. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031891442800798>.
- [4] NOMARSKI, G. Interferential polarizing device for study of phase objects. US Patent 2,924,142. Únor 1960. Dostupné z: <https://www.google.cz/patents/US2924142>.
- [5] DAVIDSON, M. W., ABRAMOWITZ, M. *Optical microscopy* American Cancer Society 2002 ISBN 9780471443391 Doi:10.1002/0471443395.
- [6] *Optical imaging and microscopy: techniques and advanced systems*. 2nd rev. ed. Editor Peter TÖRÖK, editor Fu-Jen KAO. Berlin: Springer, 2003. ISBN 354069563x.
- [7] DOSTÁL, Z. *Interference Microscopy* [online]. [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: http://physics.fme.vutbr.cz/files/opory/pdf/MikroskopieSpektroskopie/Interferenci_mikroskopie.pdf.
- [8] BHUSHAN, B.; WYANT, J. C.; KOLIPOULOS, CH. L. Measurement of surface topography of magnetic tapes by Mirau interferometry. *Applied Optics* [online]. 1985, 24(10) [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1364/AO.24.001489. ISSN 0003-6935. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-24-10-1489>.
- [9] WAYNE, R. *Light and video microscopy*. Amsterdam: Elsevier, 2009. ISBN 978-0-12-374234-6.
- [10] SLABÝ, T. *Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace* phdthesis Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství 2014 vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [11] GABOR, D. A New Microscopic Principle. *Nature* [online]. 1948, 161(4098), 777-778 [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.1038/161777a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/Art56>.

- [12] DOSTÁL, Z., SLABÝ, T., KVASNICA, L., a kol. Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope *Journal of Biomedical Optics* ročník 20 10 2015, str. 111215 Doi:10.1117/1.JBO.20.11.111215.
- [13] CHMELÍK, R., HARNA, Z. Parallel mode confocal microscopy in *Optical Biopsies and Microscopic Techniques III*, editace I. J. Bigio; H. Schneckenburger; J. Slavik; K. Svanberg; P. M. Viallet SPIE jan 1999 Doi:10.1117/12.336823.
- [14] KOLMAN, P.; CHMELÍK, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2010, 18(21) [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1364/OE.18.021990. ISSN 1094-4087. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-21-21990>.
- [15] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop* phdthesis Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství 2010 vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [16] DAVIES, H. G., WILKINS, M. H. F., CHAYEN, J., a kol. The Use of the Interference Microscope to Determine Dry Mass in Living Cells and as a Quantitative Cytochemical Method *Journal of Cell Science* ročník s3-95, č. 31 1954, s. 271–304 ISSN 0021-9533.
- [17] ČOLLÁKOVÁ, J. Průtokové komůrky pro mikroskopii živých buněk. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství, 2011. 49s. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Antoš, Ph.D.
- [18] LEITH, E. N; UPATNIEKS, J. Holography with Achromatic-Fringe Systems. *Journal of the Optical Society of America* [online]. 1967, 57(8) [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1364/JOSA.57.000975. ISSN 0030-3941. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=josa-57-8-975>.
- [19] SLABÝ, T.; KOLMAN, P.; DOSTÁL, Z.; ANTOŠ, M.; LOŠŤÁK, M.; CHMELÍK, R. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2013, 21(12) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1364/OE.21.014747. ISSN 1094-4087. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-12-14747>.
- [20] KRTOLOVÁ, A. *Světlo a osvětlování* Avicenum 1981.
- [21] TAYLOR, A. E. F. *Illumination Fundamentals* Rensselaer Polytechnic Institute 2000.
- [22] KOUDELKA, C. Světlo a osvětlování [online]. září 2005, s. 20 [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: <http://fei1.vsb.cz/kat420/vyuka/Bakalarske/prednasky/ Svetlo-%20a%20osvetlovani.pdf>.
- [23] MOTTIER, P. *LED for Lighting Applications* ISTE Ltd. 2009 ISBN 1848211457.

- [24] YUAN, C. A., HAN, C. N., LIU, H. M., a kol. Solid-State Lighting Technology in a Nutshell in *Solid State Lighting Reliability* Springer New York jul 2012 s. 13–41 Doi:10.1007/978-1-4614-3067-4_2.
- [25] Microscope Light Sources. ZEISS, Int. [online]. 2020 [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/lightsources/index.html>.
- [26] ABRAMOWITZ, M.; DAVIDSON, M. W. Light Sources [online]. [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/sources/>.
- [27] THORLABS, Inc. [online]. 2016 [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.com/>.
- [28] LED Lamp House MLH2. STARLIGHT [online]. 2020 [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: https://shop.starlight-oe.com/media/products/ds_mlh2_en.pdf.
- [29] ALBALUX Fiber-Coupled Module [online]. [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.lasercomponents.com/de-en/product/albalux-fiber-coupled-module/>.
- [30] PROLIGHT, OPTO. [online]. 2017 [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <https://www.tme.eu/Document/5190cb36699ac74e147935d2d4360096/PACK-57FWL-BC8N.pdf>.
- [31] CREE, Inc. [online]. 2017 [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: http://www.farnell.com/datasheets/2548304.pdf?_ga=2.264888911.1985240448.-1583086454-120128509.1575216413.
- [32] EDMUND OPTICS, Ltd. [online]. [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <https://www.edmundoptics.com/>.
- [33] LUO, T.; WANG, G. Design and optimization for total internal reflection collimators based on slope-error tolerance analysis. *Optical Engineering* [online]. 2016, 55(2) [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1117/1.OE.55.2.025103. ISSN 0091-3286. Dostupné z: <http://opticalengineering.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.OE.55.2.025103>.
- [34] XU, Y.; CHEN, G.; CHANG, Y. et al. The Secondary Optical Design and Fabrication for the Uniform Illuminating LED Spotlight Using TIR Lens. *MATEC Web of Conferences* [online]. 2016, 61 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1051/mateconf/20166106002. ISSN 2261-236X. Dostupné z: <http://www.mateconferences.org/10.1051/mateconf/20166106002>.
- [35] An Introduction to Fiber Optic Imaging [online]. SCHOTT North America, 2007 [cit. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://www.us.schott.com/d/lightingimaging/2e22eb88-bab2-4256-92de-46df689b255d/schott-introduction-on-fiber-optics-imaging-english-16082018.pdf>.

- [36] Fiber Optics: Theory and Applications [online]. [cit. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://www.photonis.com/system/files/2019-03/Fiber-Optics-Theory-and-Applications.pdf>.
- [37] NH-U9B [online]. Noctua [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://noctua.at/en/nh-u9b>.
- [38] YODER, P. R. *Mounting Optics in Optical Instruments, 2nd Edition (SPIE Press Monograph Vol. PM181)* SPIE Publications 2008 ISBN 978-0819471291.
- [39] HARNA, Z. *Přesná mechanika* Brno: Vysoké učení technické 1996 ISBN 8021407948.