



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**AUTOMATIZOVANÉ PROCEDURY PRO
KOHERENCÍ ŘÍZENÝ HOLOGRAFICKÝ
MIKROSKOP**

AUTOMATED PROCEDURES FOR COHERENCE CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

ZKRÁCENÁ VERZE DIZERTAČNÍ PRÁCE

SHORT VERSION OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Zbyněk Dostál

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

BRNO 2016

Abstrakt

Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM) a Fluorescenční holografický mikroskop (FHM) byly vyvinuty zejména pro kvantitativní fázové zobrazování a měření dynamiky živých buněk, které obvykle bývá předmětem digitální holografické mikroskopie (DHM). CCHM a FHM v režimu nízké koherence rozšiřují možnosti digitální holografické mikroskopie pro studium živých buněk. Nicméně, výhoda plynoucí z využití nízké koherence je doprovázena zvýšenou citlivostí systému na přesnou justáž. Z tohoto důvodu je zavedení automatické justáže systému nevyhnutelné. V disertační práci je odvozena teorie řízení, je navržen a experimentálně ověřen automatizovaný systém justáže pro oba mikroskopy. Bylo zjištěno, že holografický signál je významnou veličinou pro provádění justážních postupů. Na tomto základě byly odvozeny původní procedury nastavení, které obsahují procesy pro počáteční a pokročilou justáž, jakož i pro dlouhodobé udržení mikroskopu v naladěném stavu. Automatizované procesy byly v obou mikroskopech implementovány pomocí původní sady robotických mechanismů. Všechny v práci popsány postupy byly experimentálně ověřeny na mikroskopech v laboratoři experimentální biofotoniky. Pro FHM byl navíc vyvinut ovládací software, který obsahuje potřebné automatizované procedury.

Summary

Coherence-Controlled Holographic Microscope (CCHM) and a Fluorescence Holographic Microscope (FHM) were developed particularly for quantitative phase imaging and measurement of live cell dynamics, which used to be a subject of digital holographic microscopy (DHM). CCHM and FHM in low-coherence mode extend capabilities of DHM in the study of living cells. However, this advantage following from the use of low coherence is accompanied by increased sensitivity of the system to its correct alignment. Therefore, the introduction of an automatic self-correcting system is inevitable. Accordingly, in the thesis, the theory of a suitable control system is derived and the design of an automated alignment system for both microscopes is proposed and experimentally proved. The holographic signal was identified as a significant variable for guiding the alignment procedures. On this basis the original basic realignment algorithms were proposed, which encompasses the processes for initial and advanced alignment as well as for long-term maintenance of the microscope aligned state. Automated procedures were implemented in both microscopes unique set of robotic mechanisms designed and built within the frame of the thesis work. All of the procedures described in the thesis were experimentally proved at real microscopes in the experimental biophotonics laboratory. In addition, the control software, which contains necessary automated procedures, was developed for FHM.

Klíčová slova

Světlo nízké koherence, interferometrie, holografický mikroskop, automatická justáž, robotické mechanismy, software.

Keywords

Low-coherent light, interferometry, holographic microscope, automated alignment, robotic mechanisms, software.

DOSTÁL, Z. *Automatizované procedury pro Koherencí řízený holografický mikroskop*. Zkrácená verze disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016, 42 s., Vedoucí prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně, pouze za odborného vedení prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D., a všechny podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 27. června 2016.

Děkuji prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady. Také děkuji Ing. Pavlu Kolmanovi, Ph.D., a Ing. Lukáši Kvasnicovi, Ph.D., za rady a pomoc.

Obsah

1 Úvod a cíle disertační práce	3
2 Mikroskopie živé buňky	5
2.1 Optické vlastnosti živé buňky	5
2.2 Moderní metody zobrazování buněk	5
2.3 Klasické neinvazivní metody zobrazování živých buněk	5
2.4 Interferenční metody pro kvantitativní zobrazování buněk	6
3 Justáž optických mikroskopů	7
3.1 Justáž mikroskopů klasických zobrazovacích technik	7
3.2 Justáž mikroskopů moderních zobrazovacích technik	7
4 Justáž interferenčních mikroskopů	8
5 Optické sestavy mikroskopů a zpracování obrazu	9
5.1 Koherenci řízený holografický mikroskop	9
5.2 Fluorescenční holografický mikroskop	10
5.3 Zpracování obrazu	11
6 Teorie zobrazení pro CCHM a FHM	15
6.1 Teorie zobrazení pro CCHM	15
6.2 Teorie zobrazení pro FHM	16
6.3 Experimenty	16
7 Justážní procedury a jejich testování	21
7.1 Popis pohyblivých částí mikroskopů	21
7.2 Procedury úvodního nastavení mikroskopů	21
7.2.1 Prvá fáze úvodního nastavení	21
7.2.2 Druhá fáze úvodního nastavení	22
7.2.3 Testování procedur na CCHM mikroskopu	24
7.2.4 Testování procedur na FHM mikroskopu	24
7.3 Procedura pro dlouhodobé pozorování na CCHM mikroskopu	25
8 Konstrukce robotizovaných prvků	27
8.1 Robotizované prvky se servopohony	29
8.2 Robotizované prvky s lineárními stolky	29
9 Software pro řízení Fluorescenčního holografického mikroskopu	33
9.1 Program uživatelského rozhraní	33
9.2 Regulátor servopohonů a regulátor lineárních stolků	34
9.3 Program kamery Basler a program ke zpracování obrazu	35
10 Závěr	37

1 Úvod a cíle disertační práce

Koherencí řízený holografický mikroskop a Fluorescenční holografický mikroskop, které byly naší výzkumnou skupinou vyvíjeny, kladly v minulosti nepřiměřeně vysoké nároky na uživatele, neboť vyžadovaly před každým měřením manuální nastavení mikroskopu s cílem dosáhnout nejvyššího kontrastu interferenčních proužků. Tato nevýhoda bránila širšímu uplatnění těchto mikroskopů na biologických pracovištích. Jedinou cestou, jak tuto nevýhodu odstranit, byla **automatizace nejdůležitějších procesů**, které probíhají při spuštění a provozu holografických mikroskopů vyvíjených naší výzkumnou skupinou. Této problematice a tomuto cíli je věnována tato disertační práce. Jejímí dílčími cíli bylo:

- sestavit přehled metod používaných pro justáž mikroskopů,
- uvážit použitelnost současných justážních metod pro námi vyvíjené mikroskopy,
- navrhnout a ověřit veličinu vhodnou k charakterizaci naladění mikroskopů,
- navrhnout a otestovat vhodné justážní procedury,
- navrhnout a vyrobit počítačem řízené robotické mechanismy pro vyvíjené mikroskopy,
- vytvořit řídicí program pro právě vznikající Fluorescenční holografický mikroskop,
- do programu integrovat metody automatické justáže.

Vyjmenované úkoly byly postupně řešeny a jejich řešení se stalo podkladem jednotlivých kapitol této práce. Zkrácená verze disertační práce obsahuje jen důležité informace a výsledky.

V rešeršní části práce v kapitole 2 jsou shrnuty nejpoužívanější metody mikroskopie živé buňky včetně interferenčních metod. Pro tyto metody jsou v kapitole 3 uvedeny možnosti justáže mikroskopů. V literatuře publikované metody justáže pro interferenční (tedy i holografické) mikroskopy byly shledány nevyhovujícími pro mikroskopy, které naše výzkumná skupina vyvíjí (viz popis mikroskopů v kapitole 5). Tyto metody buď vyžadovaly přídavný osvit vzorku či doplnění optické sestavy mikroskopu o dodatečnou optiku. Proto byla v kapitole 6 odvozena a na mikroskopech otestována vhodná veličina využitelná pro hodnocení stavu naladění mikroskopů. Na základě jejího měření byly v kapitole 7 navrženy a otestovány vhodné justážní procedury. Z jejich požadavků vyplynulo v kapitole 8 konstrukční řešení robotizovaných mechanismů, které umožňují praktické zavedení justážních procedur. Poslední 9. kapitola je zaměřena na popis funkcí obslužného softwaru pro Fluorescenční holografický mikroskop, který byl speciálně vytvořen pro tento mikroskop. Tento software také obsahuje navržené justážní procedury.

2 Mikroskopie živé buňky

2.1 Optické vlastnosti živé buňky

Zobrazování buněčných preparátů pro biologické aplikace má oproti technickým aplikacím mikroskopie mnohá specifika a s nimi související požadavky na zobrazovací soustavu mikroskopu. Snad nejvýznačnějším z nich je vlastní optická povaha živé buňky, která je z největší části tvořena vodou, tedy látkou o přibližně stejném indexu lomu, jako má její přirozené prostředí. Buňka je z chemického hlediska membránami ohraničený vodný roztok především proteinů, lipidů, cukrů, jejichž hmotnost je označována jako *suchá hmota buňky* [1]. Tyto látky se od svého rozpouštědla liší indexem lomu, jsou amplitudově nekонтastní a zároveň pro biology nejvíce zajímavé. Proto lze buňky řadit z optického hlediska mezi fázové objekty, tedy objekty, které mění zejména fázi procházející světelné vlny, nikoliv její amplitudu. Tudíž je problematické zobrazit živou buňku běžným světelným mikroskopem.

2.2 Moderní metody zobrazování buněk

Problém nízkého amplitudového kontrastu řeší moderní metody mikroskopie značením buněk fluorescenčními barvivy. První popisy fluorescenčních metod se selektivním barvením struktur buňky byly uveřejněny na začátku 19. století [2, 3]. Vlastní barvení lze provést dvěma způsoby. Při klasickém barvení je buňka fixována a je znemožněno studium životních procesů buňky. Při pozorování živé buňky fluorescenčními metodami je chování buňky ovlivňováno fototoxicitou fluorescenčních barviv [4]. Také lze buňku geneticky modifikovat transfekcí plasmidu, který způsobuje produkci barviva, které je specificky vázáno v buňce [5]. Tímto zásahem je však buňka nenávratně pozměněna.

Základní metodou pro fluorescenční pozorování buněk je epi-fluorescenční mikroskopie [6, 7]. Metoda je kvantitativní v tom smyslu, že podle jasů zaznamenaného obrazu lze určit množství svítícího barviva a tím i množství hmoty buňky, na kterou je vázáno [8]. Princip epi-fluorescenčního pozorování je v dnešní době rozvíjen pro metody 3D zobrazování. Základní metodou je jeho kombinace s konfokální mikroskopií [9, 10] za vzniku laserové rastrovací konfokální mikroskopie [11], atd. Společnou nevýhodou všech metod založených na fluorescenci světla je jejich invazivita.

2.3 Klasické neinvazivní metody zobrazování živých buněk

Vizualizovat změny fáze vlny bez umělého značení buňky lze mimo jiné pomocí Zernikova fázového kontrastu [12, 13], Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu [14] a Hoffmanova modulačního kontrastu [15].

Společným rysem všech těchto metod je, že výsledný fázový obraz není kvantitativní a pouze vizualizuje buňku. Tudíž tyto metody neumožňují měření suché hmoty v buňce, jejíž plošná hustota je přibližně úměrná fázovému posuvu světelného svazku v příslušném bodě vzorku [1].

2.4 Interferenční metody pro kvantitativní zobrazování buněk

Výše zmíněné metody neumožňují zobrazovat kvantitativně živou buňku neinvazivně bez zásahu do jejího přirozeného stavu. Je známo, že plošná hustota suché hmoty buňky je přibližně úměrná fázovému posuvu světla v daném bodě vzorku [1]. Tento typ pozorování živých buněk a jejich dynamiky [16] umožňují metody kvantitativního fázového zobrazování (Quantitative Phase Imaging - QPI), z nichž nejvíce je zastoupena metoda digitální holografické mikroskopie (DHM). Holografické metody mikroskopie tedy v jistém smyslu představují neinvazivní protějšek fluorescenčních metod. Metoda DHM byla rozvíjena pro použití v biologických aplikacích s použitím laserového světla [17]. In-line uspořádání využívají prakticky všechny interferenční mikroskopy. Pro získání kompletní fázové informace je nutno využít Phase Shifting Algorithm [18]. Příkladem zařízení upraveného pro kvantitativní fázová pozorování je interferenční Hornův mikroskop [19, 20] nebo adaptace Zernikovy metody fázového kontrastu SLIM [21].

Off-axis holografie [22] umožňuje provést kompletní záznam vlny jedním interferogramem - hologramem. První off-axis holografický mikroskop dovoľoval pouze rekonstrukci vlny [23]. K rekonstrukci fáze vlny je třeba využít počítač, proto až s vývojem výkonného hardwaru vznikl první použitelný mikroskop [24]. Off-axis holografický záznam lze také získat připojením modulu τ interferometru [25] nebo wDPM modulu [26] k běžnému mikroskopu. Nevýhodou všech popsaných off-axis uspořádání je použitý laserový zdroj. Zaznamenaný hologram je ovlivněn koherenčním šumem a záznamy difrakcí vznikajícími na aperturách čoček. Tyto vady hologram poškozuji a zhoršují kvalitu výsledného fázového kontrastu.

Řešením problému je použití světla nízké časové a prostorové koherence. Tyto mikroskopy (Koherencí řízené holografické mikroskopy - CCHM) využívají principu nekoherentní off-axis holografie. Interferenční struktura je současně zobrazením struktury difrakční mřížky a proto ji lze vytvořit i nekoherentním světlem [27, 28, 29]. Nevýhodou těchto mikroskopů je nutnost opticky identických větví interferometru. Tím je dána vysoká náročnost na nastavení mikroskopu, neboť čím méně koherentní světlo je použito, tím obtížnější je kvůli vysoké citlivosti nastavení optické délky obou větví a jejich přesné koincidence v příčném směru.

Koherencí řízený holografický mikroskop [29] je vhodný k multimodálnímu zobrazování, například v kombinaci s epi-fluorescencí. Nicméně nedovoluje v tomto módu hloubkově diskriminované zobrazení fluorescenčního barviva. Toho lze dosáhnout využitím nekoherentní in-line holografie [30, 31]. V současné době je vyvíjen a patentován Fluorescenční holografický mikroskop (FHM) [32], využívající off-axis holografického uspořádání interferometru. Předností tohoto mikroskopu je možnost tvorby optických řezů (obraz amplitudy). Z fáze je teoreticky možné vypočítat rozložení indexu lomu preparátu v jeho 3D struktuře. CCHM a FHM mikroskopy vyžadují pro svou činnost a jednoduchou obsluhu robotické řízení vybraných prvků mikroskopu. Jedná se o komponenty určené k justáži přístroje, manipulaci se vzorkem, výměně fluorescenčních kanálů a řízení výsledného zvětšení mikroskopu. Bližšímu popisu těchto přístrojů, zpracování obrazu, řízení komponent a automatickým procedurám pro tyto přístroje se bude věnovat zbytek této práce.

3 Justáž optických mikroskopů

Optické mikroskopy jsou účinnými nástroji nejen v buněčné biologii, ale téměř ve všech oborech živých i neživých věd. Ať se jedná o ten nejjednodušší systém, nebo vysoce komplikovaný superrozlišovací systém, oba spojuje jedna důležitá věc. Tou je správné vyladění vzájemných poloh optických prvků, neboli justáž. Pokud není přístroj správně seřízen, tak získaná obrazová data nejsou kvalitní. Proto každý výrobce mikroskopů dbá na jejich justovatelnost a postupy justáže bývají uvedeny v manuálech přístrojů.

3.1 Justáž mikroskopů klasických zobrazovacích technik

Tyto metody jsou přehledně shrnuty v [33]. Základem kvalitního zobrazení vzorku je jeho rovnoměrný osvit pomocí „kritického osvětlení“ nebo Köhlerova osvětlení [34]. Těsně za zdrojem světla je v optické cestě polní clona a u Köhlerova osvětlení i kolektorová čočka. V zadní ohniskové rovině kondenzoru je vložena aperturní clona. Je důležité, aby tyto prvky byly stříditelné a osově nastavitelné. U fluorescenčních mikroskopů zpravidla přibývá možnost justovat polohu výboje lampy. Je možno centrovat vlastní výboj, jeho osovou polohu a pozici odrazné paraboly. Také je možno defokusovat obraz výboje v rovině vzorku.

Máme-li vzorek rovnoměrně osvětlen, je dán předpoklad kvalitního zobrazení. V moderních mikroskopech je zobrazovací část mikroskopu složena z objektivu a tubusové čočky. Ty musí společně vykreslit obraz vzorku, který okulár zvětšuje a zobrazuje jej tak, aby lidské oko bylo schopno zobrazit všechny pozorované detaily vzorku. Každá metoda klasické mikroskopie přináší nový požadavek na optickou soustavu. Například u Zernikeho fázového kontrastu se jedná o nutnost vystředit mezikruží kondenzorové masky vůči fázové destičce objektivu. Pro Nomarského fázový kontrast jsou to vzájemné pozice polarizačních hranolů. Pro Hoffmanův modulační kontrast je to poloha masky v ohniskové rovině kondenzoru. A tak dále. U těchto metod lze pouhým okem při pohledu na výsledný obraz posoudit kvalitu obrazových dat.

3.2 Justáž mikroskopů moderních zobrazovacích technik

K posouzení výsledného obrazu většiny těchto technik je již zapotřebí počítačová analýza zachyceného obrazu. Často jsou v mikroskopech kombinovány metody základní a metody moderních zobrazovacích technik, které bývají k mikroskopu připojeny jako přídatný modul. Proto jsou justážní postupy obdobné jako u klasických metod. Justážní postupy těchto modulů jsou různé. Každý modul zpravidla obsahuje svůj vlastní zdroj světla (koherentní či nekoherentní), vlastní osvětlovací optiku na principech již popsaných a speciální optický prvek umístěný buď v rovině konjugované s rovinou vzorku (Nipkowův disk, systém galvozcadel, amplitudové mřížky či jiné masky) nebo v rovině konjugované se zadní ohniskovou rovinou objektivu tak, aby ovlivňovaly fázi osvětlující vlny (fázové masky pro tvorbu speciálních svazků). Justáž těchto prvků je klíčová pro správnou funkci zobrazovacích technik.

4 Justáž interferenčních mikroskopů

Interferenční mikroskopové systémy nejsou v dnešní době příliš komerčně rozšířenými přístroji a téměř každý typ přístroje je unikátní. Nicméně u všech typů přístrojů platí, že jejich správná funkce a kvalitní záznam jsou závislé na kvalitě získané interference, tedy kontrastu interferenční struktury.

Jedna z možností, jak naladit interferometr využívající zdroj bílého světla, je popsána v [35]. Detektor je složen z vlastního fotodetektoru přístroje, který není citlivý na laserové světlo, a ze čtyř do čtverce rozmístěných fototranzistorů, které jsou citlivé jen na světlo laseru. Další metoda je schematicky podobná a je popsána v [36], kde se pomocí přídavného zdroje světla udržuje sjustovaný Michelsonův a Fabry-Perotův interferometr. Princip je založen na poměrování světelného výkonu mezi referenčním detektorem, který je osvětlen laserem přímo, a mezi světelnými výkony tří pomocných svazků, které jsou vedeny celým interferometrem kolem signálního svazku. V [37] popsaná metoda je aplikována na Michelsonově interferometru a vychází z použití diferenciální fázové modulace tak, aby na výstupu interferometru umožnila detekci fázového rozdílu mezi dvěma Gaussovskými svazky. Další systém využívající sekundární laserový zdroj ke stabilizaci interferometru je popsán v [38]. Metody [35, 38, 37, 39] jsou nevhodné pro biologické zobrazování živých buněk, protože přídavný zdroj světla může na buňky působit destruktivně, nebo přinejmenším ovlivňovat jejich chování. Nevýhoda metody [36] spočívá v tom, že přidává dodatečně optické elementy do sestavy interferometru, což není praktické.

Metody popsané v předchozím textu tedy nejsou v tomto případě dobře použitelné. Mají-li se mikroskopy vznikající na našem pracovišti používat širokou základnou uživatelů, je proto nutné vyvinout vlastní automatickou metodu pro justáž. Budeme požadovat, aby tato metoda byla založena na optickém schématu přístroje. Veličina, která popisuje kvalitu zobrazení mikroskopu, nechť je odvozena přímo z holografického signálu, takže její hodnotu lze získávat téměř v reálném čase. Vhodnou veličinou, jak bude v práci dále ukázáno, je měřený holografický signál $\bar{w}_D$.

5 Optické sestavy mikroskopů a zpracování obrazu

5.1 Koherencí řízený holografický mikroskop

Optická sestava koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM) [29, 40], na jehož návrhu a stavbě jsem se aktivně podílel, je zobrazena na obrázku 1(a). Jako zdroj světla je použita halogenová lampa, jejíž světlo je vedeno světlovodem do roviny zdroje Zd. Tato rovina je zobrazena kolektorovou čočkou Kol do zadních ohniskových rovin kondenzorů $K_{1,2}$ tak, aby vzorek VZ a referenční objekt RO byly osvětleny köhlerovsky. Světelný svazek je pomocí děliče D_1 a zrcadel $Z_{1,4,5}$ rozdělen do dvou optických cest objektové a referenční větve. Plynule měnitelná aperturní clona AC je umístěna v blízkosti zdroje světla Zd a dovoluje řídit prostorovou koherenci světla. Koherenci časovou ovlivňuje pásmový interferenční filtr IF. Polní rovina PR obsahující záměrný obrazec SC je kolektorem Kol a kondenzory K zobrazena do roviny vzorku VZ a referenčního objektu RO. Roviny vzorku i referenčního objektu jsou zobrazeny do roviny meziobrazů $MO_{1,2}$ pomocí mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a tubusových čoček $TČ_{1,2}$. Tyto roviny jsou zobrazeny do výstupní roviny interferometru VR pomocí výstupních objektivů $VO_{1,2}$. Hologram je zaznamenáván pomocí CCD kamery K, která je umístěna v těsné blízkosti výstupní roviny interferometru VR. Difrakční mřížka DM a zrcátko Z_2 jsou umístěny v rovinách vzniklých meziobrazů $MO_{1,2}$ za tubusovými čočkami $TČ_{1,2}$. Tím je ve výstupní rovině VR zaručen vznik interferenčního obrazce se shodnou prostorovou frekvencí proužků pro všechny vlnové délky použitého světla a pro všechny body plošného zdroje Zd [29]. Principiálně optický systém tvoří off-axis holografické uspořádání, které je založeno na interferenci nultého a prvního difrakčního řádu. Achromatičnost a prostorová invariance interferenčního obrazce je dána faktem, že se prakticky jedná o Leithův princip zobrazení [41] difrakční mřížky do výstupní roviny interferometru VR pomocí výstupních objektivů VO.

Vývoj mikroskopu pokračoval myšlenkou na zjednodušení optické sestavy náhradou kondenzoru a objektivu v referenční větvi variabilní optickou soustavou. Příslušné optické schéma již bylo námi patentováno [42], z časových důvodů však zatím nebylo realizováno. Příklad provedení interferometrického systému s variabilní optikou pro nekoherentní zdroj záření je schematicky znázorněn na obrázku 1(b) - (e). Předmětová a referenční větev obsahují obdobné optické prvky jako předchozí uspořádání CCHM s tím, že některé prvky jsou vypuštěny a prvky referenční větve mohou mít proměnlivé ohniskové vzdálenosti. Předmětová větev, tak jako v původním návrhu, obsahuje vstupní zobrazovací soustavu (kondenzor K pro Köhlerovo osvětlení vzorku, objektiv O a tubusová čočka TČ) a výstupní zobrazovací soustavu VO. Interferometr pak musí splňovat jednu z těchto možností:

- Optická sestava na obrázku 1(b): Mikroskopový objektiv O_1 referenční zobrazovací soustavy a mikroskopový objektiv O_2 předmětové vstupní zobrazovací soustavy se od sebe liší, a to alespoň jedním z parametrů zahrnujících jmenovitou ohniskovou vzdálenost a jmenovitou numerickou aperturu. Z uvedeného vyplývá požadavek, aby zvětšení výstupních objektivů $VO_{1,2,(3)}$ kompenzovalo rozdílnost zvětšení mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ tak, aby bylo zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou interferometru VR obou větví shodné. Soustava výstupních objektivů VO

může být tvořena jednou soustavou pro každou větev nebo dělenou na dvě části s tím, že jedna část je společná pro obě větve a mezi tyto části výstupních soustav jsou vloženy soustavy zrcadel.

- Optická sestava na obrázku 1(c): Soustava interferometru je analogií předešlého bodu s tím rozdílem, že referenční zobrazovací soustava (K_1 , O_1 , $T\check{C}_1$) je vypuštěna, ale zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní obrazovou rovinou VR interferometru zůstává stejné pro obě větve.
- Optická sestava na obrázku 1(d): Soustava interferometru je analogií prvního bodu s tím rozdílem, že referenční výstupní objektiv VO_1 je vypuštěn, ale zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou VR interferometru zůstává stejné pro obě větve.
- Optická sestava na obrázku 1(e): Soustava interferometru je analogií libovolného předešlého bodu s tím rozdílem, že v obou větvích, tedy v referenční i předmětové, je zařazena difrakční mřížka DM v blízkosti meziobrazů MO předmětové a referenční větve. Difraktované svazky pak prochází výstupními objektivy VO a jsou zrcadly $Z_{6,7}$ směřovány do výstupní roviny interferometru VR.
- Soustava interferometru je analogií libovolného předešlého bodu s tím rozdílem, že alespoň jedna transmisní difrakční mřížka DM je nahrazena difrakční mřížkou reflexní.

Vzhledem k použití plošného polychromatického zdroje světla je u všech těchto případů nutno (kromě dodržení stejného zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou VR) interferometru zaručit i stejnou optickou délku větví. Proto je nutno do každé sestavy z předešlého výčtu vložit soustavu zrcadel, dovolujících opticky natahovat délku větve. Kromě toho musí optické sestavy obsahovat i prvek dovolující příčný pohyb obrazu referenčního vzorku ve výstupní rovině interferometru.

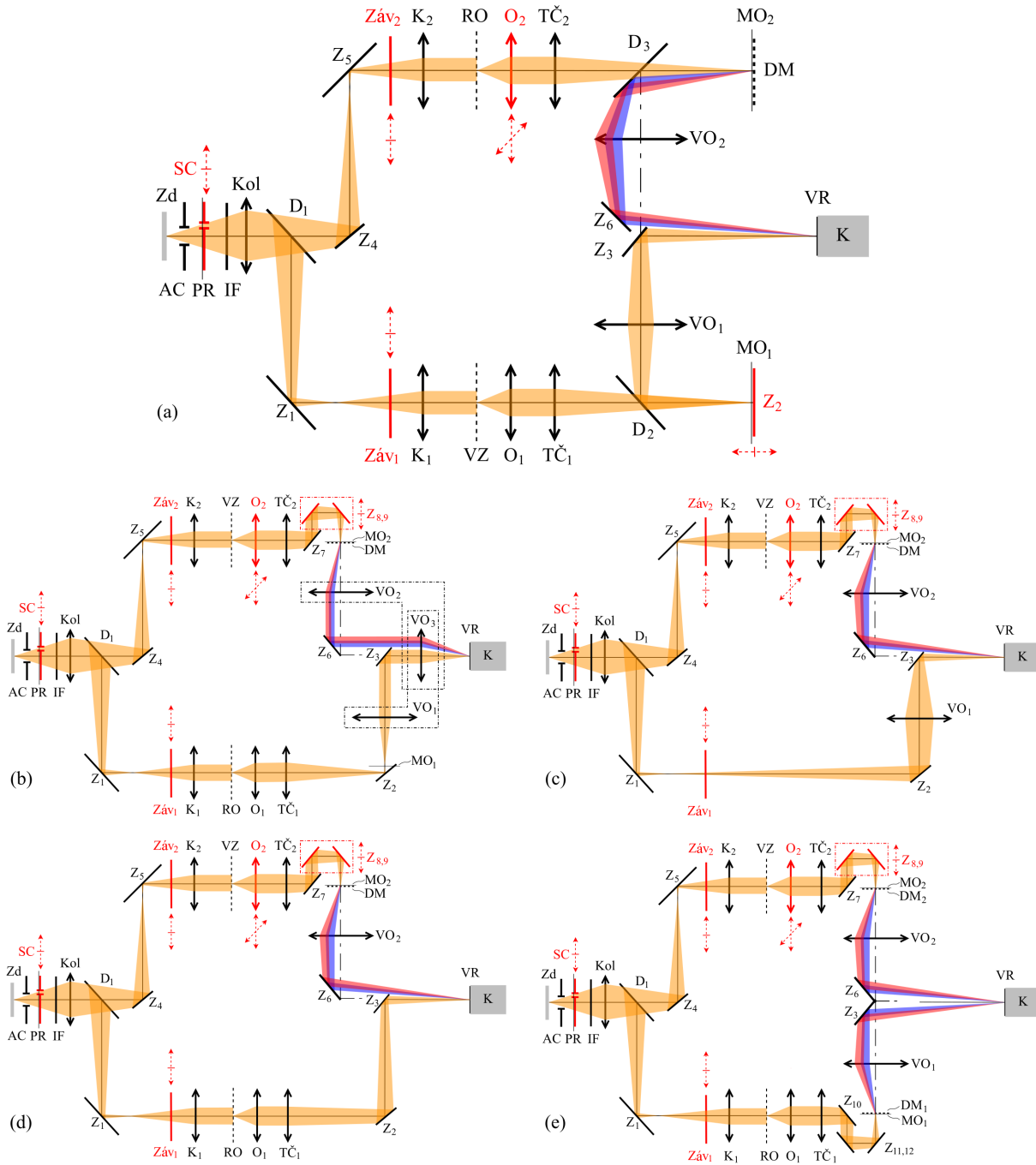
5.2 Fluorescenční holografický mikroskop

Tento mikroskop je dalším z vývojových kroků CCHM. Tento mikroskop slouží k tvorbě optických řezů vzorkem a k výpočtu rozložení indexu lomu ve vzorku. Princip mikroskopu byl patentován [32]. Podílel jsem se na jeho mechanickém návrhu, stavbě a tvorbě řídicího softwaru. Optická sestava FHM je zobrazena na obrázku 2. Zdrojem osvětlení Z_d tohoto mikroskopu je defokusovaný výboj xenonové lampy. Rovina polní clony PC je zobrazována kolektorovými čočkami $Kol_{1,2,3}$, tubusovými čočkami $TL_{1,2}$ a mikroskopovými objektivy $O_{1,2}$ do roviny vzorku VZ. Světelný svazek je pomocí děliče D_1 a zrcadly $Z_{1,2,3,4}$ rozdělen do dvou opticky ekvivalentních cest osvětlovacích větví. Plynule měnitelná aperturní clona AC a aperturní clony objektivů OAC jsou umístěny v optickém svazku pro nastavení prostorové koherence jimi procházejícího světla. Navíc OAC clony slouží ke snížení numerické apertury mikroskopových objektivů $O_{1,2}$. Intenzitu osvětlení lze regulovat vkládáním šedých filtrů F. Volba excitačního spektra vlnových délek a emisního spektra vlnových

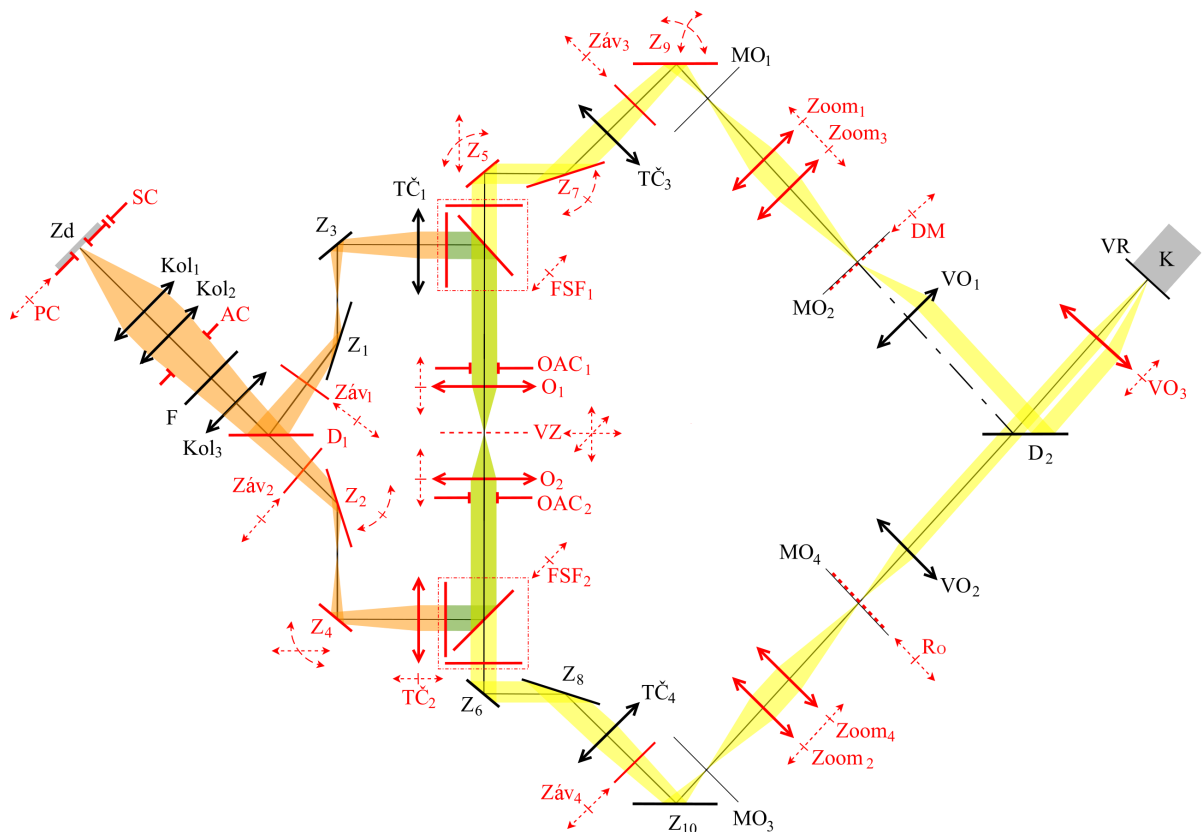
délek je pro fluorescenční aplikaci mikroskopu je zajištěna výměnou fluorescenčních sestav filtrů FSF. Vzorek VZ je z objektové roviny zobrazen do výstupní roviny interferometru VR pomocí mikroskopových objektivů $O_{1,2}$, tubusových čoček $T\check{C}_{1,2}$, zoomovacích soustav $Zoom_{1,2,3,4}$ a výstupních objektivů $VO_{1,2,3}$. Při zobrazení vznikají meziobrazy $MO_{1,3}$ za tubusovými čočkami $T\check{C}_{3,4}$ a meziobrazy $MO_{2,4}$ za zoomovacími soustavami $Zoom_{3,4}$. Transmisní difrakční mřížka DM a referenční okénko Ro jsou umístěny v rovině meziobrazu $MO_{2,4}$ za zoomovacími soustavami $Zoom_{3,4}$. Ve výstupní rovině VR pak vzniká interferenční obrazec se shodnou nosnou prostorovou frekvencí proužků pro všechny vlnové délky emisního světla vzorku a pro všechny emitující body vzorku VZ. V blízkosti výstupní roviny VR je umístěna CMOS kamera K. Principiálně optický systém tvoří off-axis holografické uspořádání, které je jako u CCHM založeno na interferenci nultého a prvního difrakčního řádu [29].

5.3 Zpracování obrazu

Detektorem K pořízený hologram je numericky zpracován. Nejdříve je provedena Fourierova transformace pořízeného hologramu. Tím je získáno spektrum prostorových frekvencí obrazu. Ze spektra je vybráno postranní pásmo prostorových frekvencí kolem nosné prostorové frekvence. Poloměr vybrané oblasti je závislý na rozlišovací schopnosti a zvětšení mikroskopu; jsou vybírány jen takové frekvence, které je optika mikroskopu schopna přenést do své výstupní roviny VR. Nulová prostorová frekvence je posunuta do středu výběru spektra a to je vynásobeno Hanningovou váhovou funkcí [43]. Komplexní amplituda rekonstruované vlny (matice měřeného holografického signálu) $w_D(i, j)$ je vypočtena inverzní Fourierovou transformací získaného výběru spektra. Z ní je dále vypočten fázový obraz $\text{Arg}[w_D(i, j)]$ a amplitudový obraz $|w_D(i, j)|$. Kvantitativní fázový obraz je získán navazovací procedurou a procedurou kompenzující deformaci jeho pozadí [44, 45].



Obrázek 1: (a) Optická sestava CCHM, (b) - (e) varianty optických sestav se zjednodušenou referenční větví: Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížky, D - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CCD kamera (detektor). Motorizované části CCHM (červeně): mechanismus pro vkládání seřizovací clony SC, počítačem řízené závěrky Záv, 2D příčný lineární stolek objektivů O_2 , lineární stolek pro osový pohyb zrcadla Z_2 (případně pro osový pohyb zrcadel $Z_{8,9}$).



Obrázek 2: Optická sestava FHM: Zd - zdroj světla, PC - polní clona, AC - aperturní clona, F - šedé filtry, Kol - kolektory, Z - zrcadla, VZ - vzorek, FSF - fluorescenční sestavy filtrů (excitační filtry, dichroická zrcadla, emisní filtry), OAC - aperturní clony objektivů, O - objektivy, MO - roviny meziobrazů, Zoom - zoomovací objektivy, DM - difrakční mřížky, Ro - referenční okénko, D - děliče svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CMOS kamera (detektor). Motorizované části FHM (červeně): mechanismus pro vkládání seřizovací clony SC, mechanismus pro změnu průměru polní clony PC, mechanismy pro změny průměrů aperturní clony AC a aperturních clon objektivů OAC, počítačem řízené závěrky Záv, mechanismy pro změnu fluorescenčního kanálu (lineární výměník děličů svazků D₁, lineární výměníky fluorescenčních sestav filtrů FSF_{1,2}, lineární výměníky difrakčních mřížek DM a referenčních okének Ro), osové lineární stolky pro oba dublety tubusové čočky TČ₂, vázané pohyby zrcátek Z_{2,4} a Z_{5,7}, osové lineární stolky objektivů O, 3D lineární stolek vzorku VZ, 2D rotační stolek pro zrcátko Z₉, změna ohniskových vzdáleností zoomovacích objektivů Zoom, změna ohniskové vzdálenosti a ostření VO₃.

6 Teorie zobrazení pro CCHM a FHM

Oba mikroskopy se po optické stránce mírně odlišují. CCHM mikroskop využívá Köhlerův princip osvětlení vzorku VZ a referenčního objektu RO (viz obrázek 1). Prvá vlna je modulována průchodem přes vzorek VZ, zatímco druhá vlna prochází referenčním objektem RO a zůstává téměř nezměněna. Druhý mikroskop, FHM, je sice založen na holografickém principu (viz obrázek 2), avšak zdrojem světla je emitující fluorescenční barvivo obsažené v pozorovaném vzorku. To znamená, že obě interferující vlny nesou informace o vzorku, v němž jsou generovány. Nicméně oba mikroskopy spojuje jedna klíčová vlastnost. Interferující vlny jsou prostorově i časově nekoherentní, a jsou tedy schopny tvořit interferenční strukturu jen při perfektním vyladění mikroskopu. Nejprve se budeme zabývat případem CCHM mikroskopu.

6.1 Teorie zobrazení pro CCHM

Aby bylo možné prokázat, že průměrná hodnota holografického signálu je vhodnou veličinou pro seřízení mikroskopu, je nutno popsat její závislost na klíčových parametrech podstatných pro naladění mikroskopu, tedy na rozdílu optických délek ΔL obou zobrazovacích větví, na vzájemném posuvu obrazů ve výstupní rovině VR, který je popsán odpovídajícím vektorem posuvu $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ v předmětové rovině, na velikosti poměrného zvětšení M mezi oběma zobrazovacími větvemi a na odchylce Δz osové pozice objektivu. Jelikož je rovina vzorku VZ osvětlena köhlerovsky, lze určit teoretickou hodnotu holografického signálu pomocí vztahu (2.20) [46]. Dále předpokládáme, že numerické apertury objektivů $O_{1,2}$ nejsou příliš vysoké (s hodnotou pod 0,5), že rozložení intenzity v rovině zdroje je rotačně souměrné (viz [46], části 2.2.4, 6.1 a 6.4.1) a že v mikroskopu není vložen vzorek.. Následně lze získat výsledný vztah pro holografický signál:

$$\begin{aligned}
 w(\mathbf{q}_t; \mathbf{q}_f, M, \Delta L, \Delta z) &= 2\pi \int_0^\infty i_K(K) \exp(-2\pi i K \Delta L) \\
 &\times \int_0^{NA_s/n} i_T(\kappa) J_0\{2\pi K \boldsymbol{\kappa} \cdot [\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)]\} \\
 &\times \exp\left[2\pi i K \left(\sqrt{1-\kappa^2} - 1\right) \Delta z\right] \kappa d\kappa dK, \quad (1)
 \end{aligned}$$

kde $\mathbf{q}_t = (x, y)$ je vektor kartézských souřadnic ve výstupní rovině VR, který je podělen zvětšením mezi předmětovou rovinou v příslušné větvi a výstupní rovinou VR, $\mathbf{K}$ je redukovaný vlnový vektor rovinné vlny v prostoru za kondenzorem, $K = |\mathbf{K}| = 1/\lambda$, λ je vlnová délka světla, $i_K(K)$ je spektrální funkce zdroje, $\mathbf{K}_t$ je příčná část redukovaného vlnového vektoru $\mathbf{K}$, $\boldsymbol{\kappa} = \mathbf{K}_t/K$, $\kappa = |\boldsymbol{\kappa}|$, $i_T(\kappa)$ popisuje radiální rozložení intenzity v rovině zdroje, NA_s je nejmenší numerická apertura optických prvků mikroskopu měřená v předmětovém prostoru, n je index lomu předmětového prostoru mikroskopových objektivů $O_{1,2}$.

Rovnice (1) popisuje holografický signál CCHM pro prostorově i časově nekoherentní zdroj v závislosti na justážních parametrech.

6.2 Teorie zobrazení pro FHM

Ke stanovení výrazu pro teoretický holografický signál w pro FHM mikroskop předpokládejme, že fluorescenční vzorek je nahrazen tenkým děličem svazků. Ten je osvětlován köhlerovsky objektivem O_2 , tedy vlnou u_2 . Světlo je jím částečně odraženo zpět do objektivu O_2 a částečně propuštěno do objektivu O_1 . Navíc objektiv O_2 je přesně zaostřen na odraznou plochu děliče, což lze experimentálně zajistit. Pak jsou splněny stejné podmínky pro platnost vztahu (1) jako u CCHM mikroskopu. Protože osvětlovací část optické soustavy je pro obě větve totožná, je zřejmé, že závěry odvozené za předchozích předpokladů platí i pro fluorescenčně emitovaný signál v předmětové rovině mikroskopu. Ten by sice lépe odpovídal situaci s kritickým, nikoli köhlerovským osvětlením, ale je známo, že oba tyto typy osvětlení jsou koherenčně ekvivalentní (viz [47], kapitola 10.6).

6.3 Experimenty

Výše popsany teoretický holografický signál w dle rovnice (1), respektive hodnota jeho modulu $\bar{w}$, byla pro ověření porovnána s experimentálními daty z CCHM při $M = 1$. Do předmětové roviny nebyl vložen vzorek. Měření bylo provedeno s plošným a spektrálně úzkopásmovým zdrojem světla. Spektrální funkce zdroje $i_K(K)$ byla dána spektrální propustností interferenčního filtru FB650-10 ($\lambda = 650$ nm, FWHM = 10 nm) od firmy Thorlabs [48]. K eliminaci šumu byla matice měřeného holografického signálu $w_D(i, j)$ průměrována přes celé obrazové pole dle vztahu

$$\bar{w}_D = \sum_{i=0}^{N_I-1} \sum_{j=0}^{N_J-1} \frac{|w_D(i, j)|}{N_I N_J}, \quad (2)$$

kde $\bar{w}_D$ je hodnota měřeného holografického signálu a N_I a N_J jsou rozměry matice měřeného holografického signálu (matice amplitudového obrazu) $w_D(i, j)$.

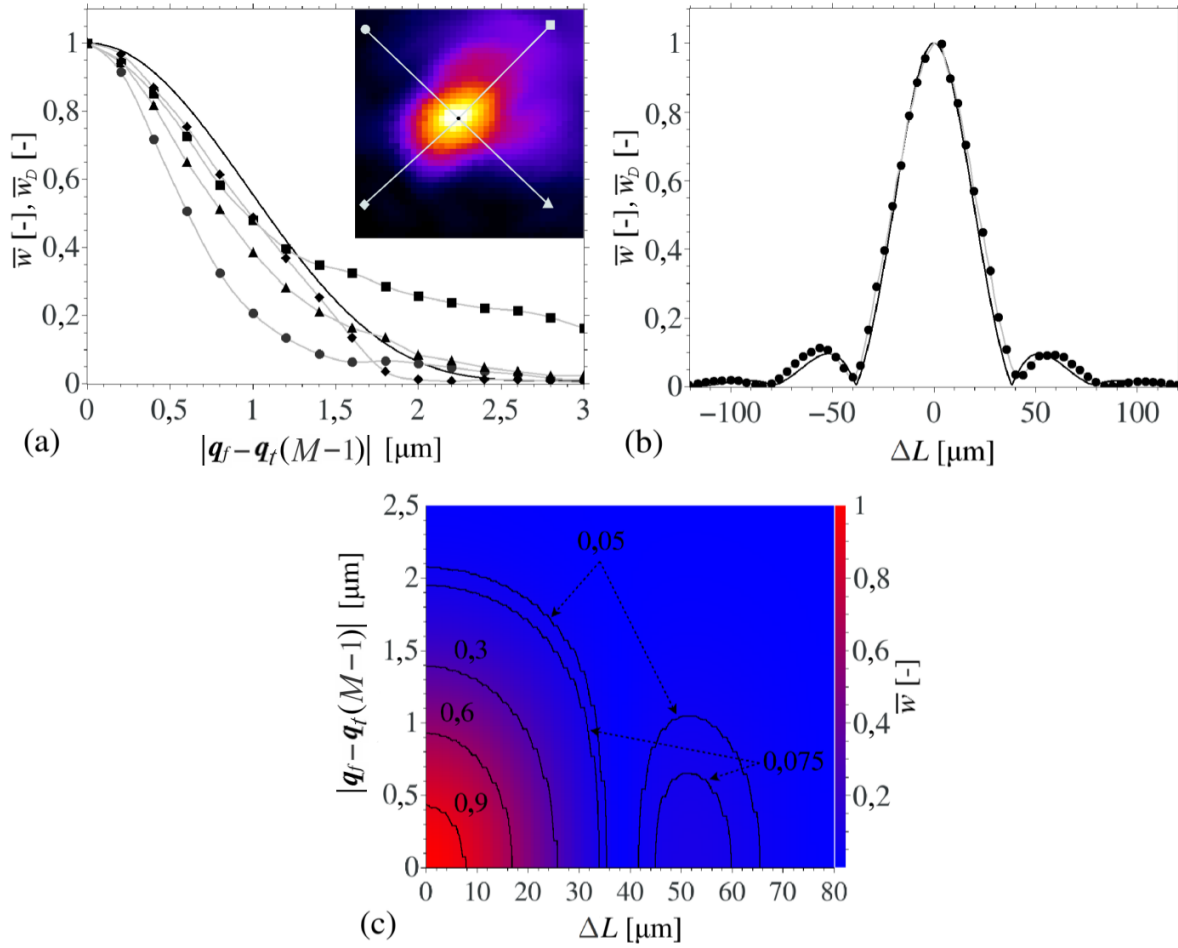
Na obrázku 3(a) je ukázáno porovnání závislostí hodnot teoretického a měřeného holografického signálu $\bar{w}$ a $\bar{w}_D$ na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ pro $M = 1$. Naměřené křivky se od teoretických mírně odlišují. To je způsobeno zejména optickými aberacemi výstupního objektivu VO_2 , který je umístěn za difrakční mřížkou DM v referenční větvi. Naproti tomu naměřené hodnoty holografického signálu na obrázku 3(b) perfektně kopírují teoreticky vypočtenou křivku. Měření na obrázku 3(b) bylo provedeno při $M = 1$ pro týž zdroj světla jako na obrázku (a) a pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$ při změně ΔL .

Hodnota teoreticky vypočteného signálu $\bar{w}$ je závislá na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ a ΔL . Tato závislost je pro $M = 1$ ukázána na obrázku 3(c). Lokální maximum $\bar{w}_{l,i}$ podél osy ΔL je důsledkem tvaru spektrální funkce zdroje světla $i_K(K)$. Průběh ve směru osy $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ je hladký bez bočních maxim. To je výsledkem Gaussovského tvaru intensity $i_T(\kappa)$. Hodnota teoretického holografického signálu $\bar{w}$ narůstá podél osy ΔL pro konstantní $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ a také narůstá podél osy $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ pro konstantní ΔL . Také lze prokázat,

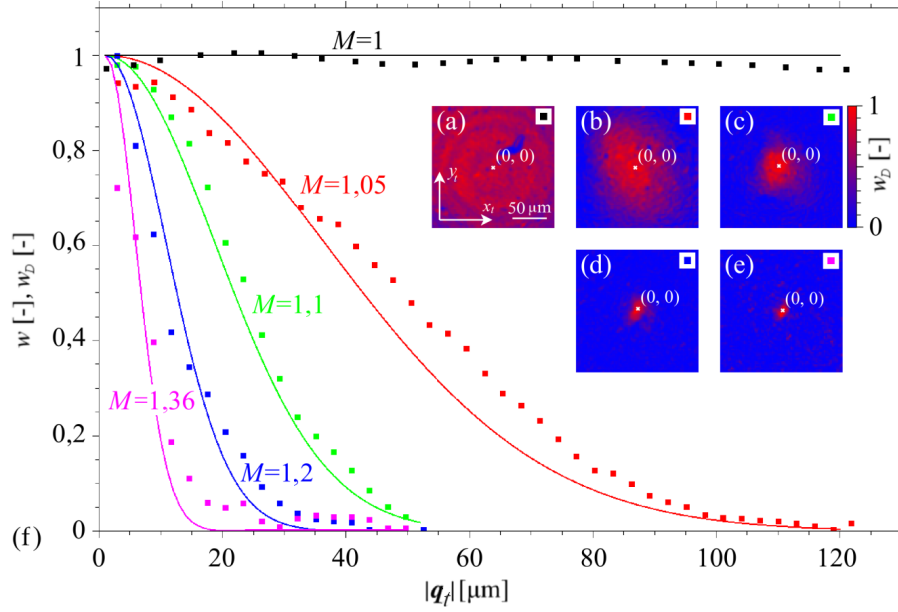
že měřený holografický signál $\bar{w}_D$ má své globální maximum pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ pro $M = 1$ s polychromatickým světelným zdrojem.

Doplňme studii výše o experiment provedený na experimentální sestavě FHM, při němž byl sledován vliv zvětšení M na velikost $\bar{w}_D$. Fluorescenční vzorek byl nahrazen blánovým děličem osvětleným výbojkou opět přes interferenční filtr FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, FWHM = 10 nm). Zvětšuje-li se velikost poměrného zvětšení M , dochází k postupnému omezení oblasti zorného pole na kterém lze lokalizovat interferenční proužky podle obrázku 4. Z tohoto měření jasně vyplývá, že je-li poměrné zvětšení větví $M = 1$, nedochází k omezení oblasti zorného pole, na kterém lze lokalizovat interferenční proužky a následně měřený holografický signál $\bar{w}_D$ nabývá svého maxima.

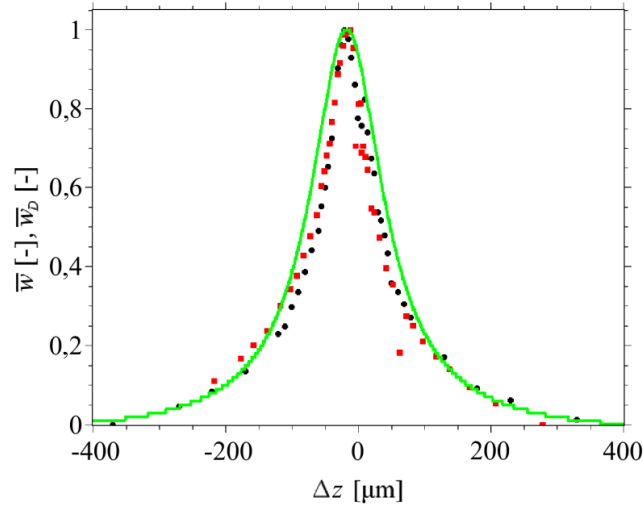
Posledním experimentem bylo ověření závislosti velikosti signálu $\bar{w}_D$ na odchylce polohy objektivu Δz . Opět jako v předešlém případě byl fluorescenční vzorek nahrazen blánovým děličem, který byl osvětlen výbojkou přes interferenční filtr FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, FWHM = 10 nm). Na obrázku 5 je uvedena závislost velikosti měřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ na velikosti posunutí Δz objektivu O. Jak je patrné z teoretické křivky a z křivky naměřené, dochází při rostoucím posunutí k úbytku velikosti signálu. Tohoto jevu je tedy možno využít k nalezení identické roviny ostrosti pro oba objektivy O FHM mikroskopu. Autofokusační metoda pro CCHM je založena na metodě hodnocení ostrosti fázového obrazu a je konstrukcí přístroje umožněna až pro plně robotizovanou komerční verzi mikroskopu Q-PHASE z produkce firmy TESCAN ORSAY HOLDING [49].



Obrázek 3: Porovnání teoretického holografického signálu $\bar{w}$ (plná čára) a naměřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ (čáry se symboly). (a) Závislost signálu na $|q_f - q_t(M - 1)|$ pro identické délky větví interferometru, tj. $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ a pro jednotkové poměrné zvětšení $M = 1$. Čáry se symboly reprezentují profily hodnot signálu měřené z bodu z $q_f - q_t(M - 1) = (0, 0) \mu\text{m}$ do čtyř směrů (viz vložený obrázek). (b) Závislost změny hodnot signálu na velikosti ΔL pro $|q_f - q_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$ a $M = 1$. (c) Vrstevnicový graf závislosti teoretického holografického signálu $\bar{w}$ na $|q_f - q_t(M - 1)|$ a na ΔL pro $M = 1$. Hodnoty $\bar{w}$ a $\bar{w}_D$ jsou normovány.



Obrázek 4: (a) - (e) Výřezy z obrazové matice hodnot měřeného holografického signálu w_D v okolí optické osy $\mathbf{q}_t = (x_t, y_t) = (0, 0) \mu\text{m}$ mikroskopu pro různé hodnoty poměrného zvětšení M , pro $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$. (f) Porovnání závislostí teoretických hodnot holografického signálu w (plná čára) a měřených hodnot holografického signálu w_D (symboly) v závislosti na velikosti vektoru polohy $|\mathbf{q}_t|$ pro různé hodnoty M . Průběhy křivek w_D jsou získány radiálním průměrováním hodnot výřezů. Hodnoty w a w_D jsou normovány.



Obrázek 5: Závislost hodnot měřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ (symboly) a hodnot teoretického holografického signálu $\bar{w}$ (plná čára) v závislosti na posunutí Δz objektivu O_1 při $M = 1$, $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$. Měření bylo opakováno pro dvě nastavení objektivu O_2 kolem uživatelem určené roviny ostrosti (výsledky vyznačeny červenými čtverečky a černými kroužky). Hodnoty $\bar{w}$ a $\bar{w}_D$ jsou normovány.

7 Justážní procedury a jejich testování

Pro oba mikroskopy byly na základě výše popsaných experimentů vytvořeny justážní metody které zaručují jejich plné automatizované seřízení mikroskopů. Tyto procedury jsou prováděné před začátkem vlastního experimentu a vedou k plnému naladění mikroskopu.

U CCHM mikroskopu je možno testovat inicializační procedury jako celek. Tento přístroj již komerčně dostupný, je přesně dáno jeho využití, jeho procedury justáže jsou prakticky ve finálním stavu, v současnosti se nemodifikují a byly z mé práce převzaty výrobcem mikroskopu (firmou TESCAN ORSAY HOLDING). S touto firmou na základě mé práce vznikl patent [40], jenž tyto procedury popisuje. Také tyto procedury byly publikovány [42].

7.1 Popis pohyblivých částí mikroskopů

Pro potřeby justáže byly potřebné optické prvky obou mikroskopů motorizovány (viz obrázek 1 a obrázek 2). První skupina mechanismů je určena k dosažení různých hodnot q_f . Druhou skupinou mechanismů lze získat rozdílné délky větví interferometru ΔL . Třetí skupinou mechanismů jsou zoomovací soustavy FHM mikroskopu Zoom. Pro výchozí provoz přístroje jsou v současnosti zoomovací soustavy $\text{Zoom}_{1,2,3,4}$ nastaveny na zvětšení $M = 1$. Poslední skupinou jsou pomocné mechanismy justáže (záměrné obrazce obou mikroskopů, závěrky Záv, říditelné apertury polních a aperturních clon) a mechanismy k výměně fluorescenčních kanálů FHM mikroskopu.

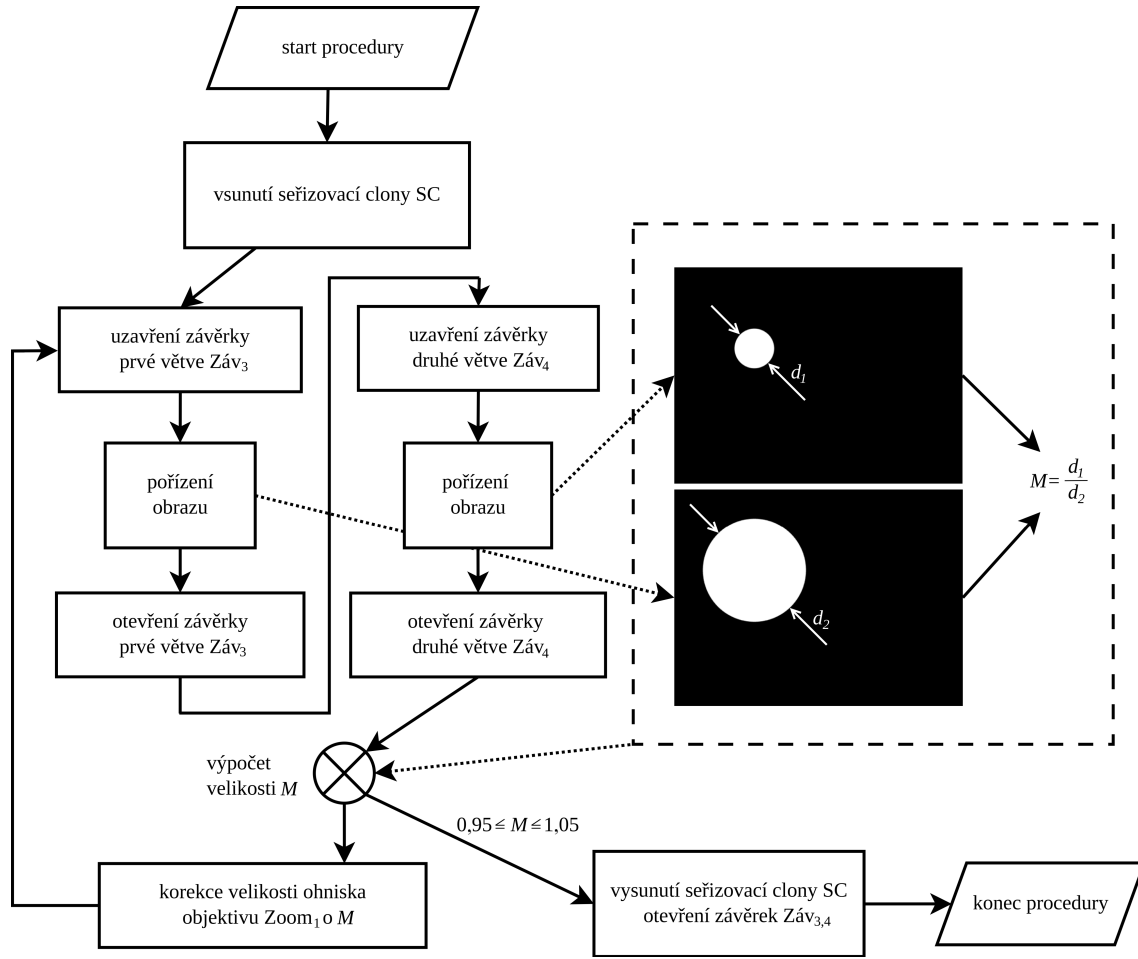
7.2 Procedury úvodního nastavení mikroskopů

Tyto procedury jsou používány pro korekci velkého rozladění typického při startu mikroskopu. Inicializační procedury jsou prováděny ve dvou fázích. Prvou je předběžné naladění mikroskopu ze stavu, kdy interference nemůže vzniknout. Po úspěšném skončení první fáze následuje fáze druhá. Ve výstupní rovině jsou znatelné interferenční proužky a měřený holografický signál $\bar{w}_D$ je dostačující k úspěšnému průběhu procedur druhé fáze, které jsou založeny na principu měření hodnot holografického signálu $\bar{w}_D$. Jeho hodnota je zesílena jeho maximální hodnotu na $\bar{w}_{D,max}$.

7.2.1 Prvá fáze úvodního nastavení

Tyto procedury jsou založeny na principu měření charakteristického rozměru seřizovací slony SC. Prvá procedura zajistí, aby se poměrné zvětšení M obou zobrazovacích větví interferometru co nejvíce přiblížilo 1. Procedura se týká pouze FHM, protože CCHM zatím není vybaveno variabilní optikou. Princip metody je znázorněn na obrázku 6. Výsledná hodnota M musí být v intervalu 0,95 až 1,05, protože v tomto rozmezí již matice měřených hodnot komplexní amplitudy $w_D(i, j)$ obsahuje dostatek vysokých hodnot holografického signálu (dle obrázku 4) pro úspěšný běh dalších justážních procedur.

Následuje druhá procedura, která je založena na odečítání poloh obrazů seřizovací clony SC. Tato procedura je schopna obrazy zarovnat i při velkém rozladění mikroskopu



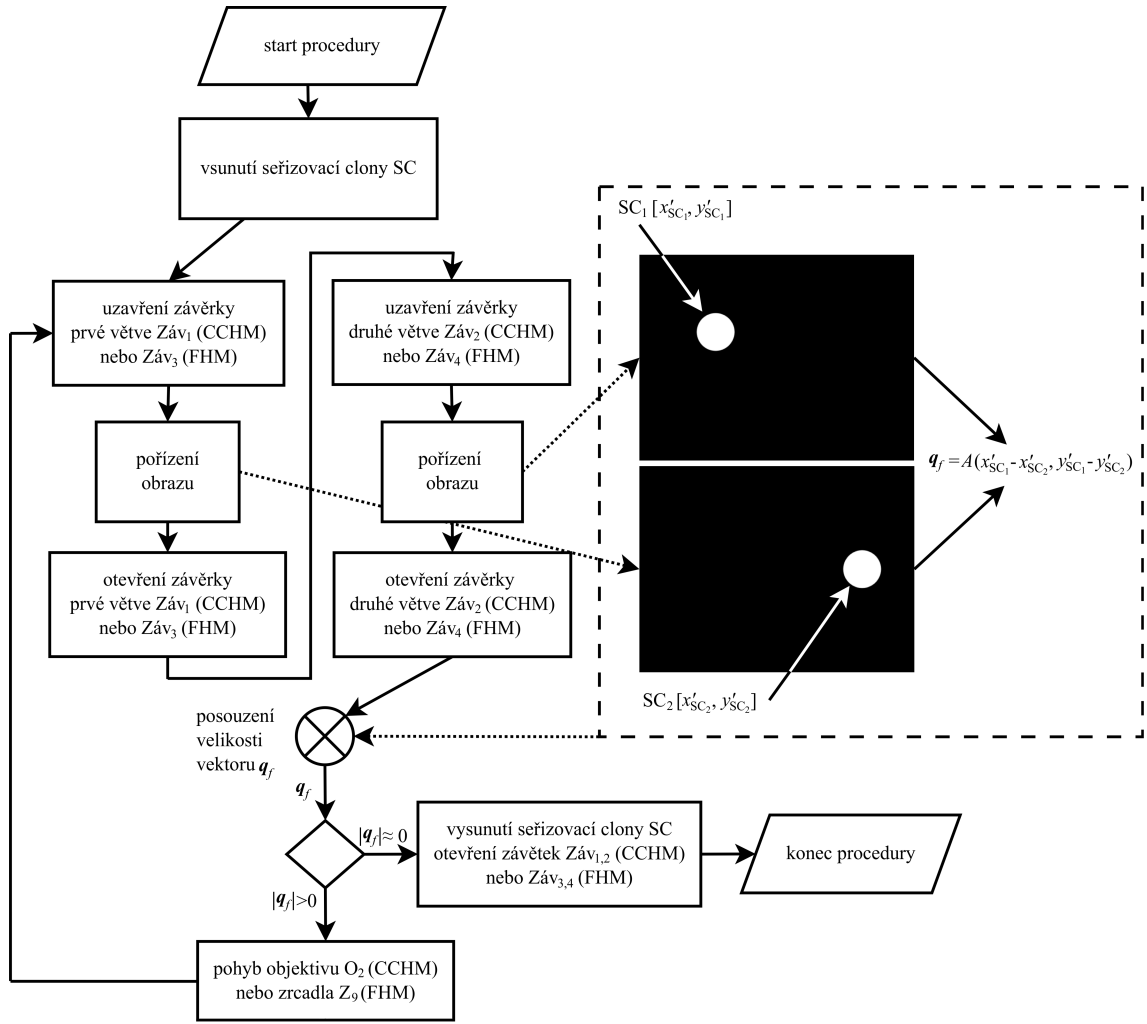
Obrázek 6: Vývojový diagram procedury první fáze úvodního nastavení FHM pro korekci poměrného zvětšení obou zobrazovacích větví interferometru M .

a tím umožnit následné naladění interferenční struktury. Procedura je vhodná pro oba mikroskopy. Její princip je zachycen na obrázku 7. Cílem je pomocí mechanismu posuvu pole (objektiv O_2 CCHM mikroskopu a zrcadlo Z_9 FHM mikroskopu) nastavit mikroskop tak, aby vzájemný posuv polí $|\mathbf{q}_f| \approx 0 \mu\text{m}$ a tím byl dán dobrý předpoklad pro nalezení globálního maxima $\bar{w}_D$ dle obrázku 3.

Nakonec je nutno zkontrolovat, zda-li je hodnota měřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ větší než uživatelem stanovená minimální hodnota $\bar{w}'_D$ (přibližně 80 % z $\bar{w}_{D,max}$). Pokud tomu tak není, je nutno spustit proceduru, která po stanovených krocích mění ΔL . Tato procedura je shodná s procedurou druhé fáze úvodního nastavení. Pro tento účel stačí použít krok $10 \mu\text{m}$, díky kterému lze nalézt dle obrázku 3(c) až 90 % $\bar{w}_{D,max}$.

7.2.2 Druhá fáze úvodního nastavení

Tato procedura zajistí, aby poměrné zvětšení obou zobrazovacích větví interferometru bylo co nejbližší $M = 1$. Metoda je založena na principu hledání maxima. Jak je patrné z obrázku 4, pokud se $M \rightarrow 1$, přibývá v matici $w_D(i, j)$ vysokých hodnot holografického signálu a tím roste měřený holografický signál $\bar{w}_D$. Proto je M po krocích měněno (změnou



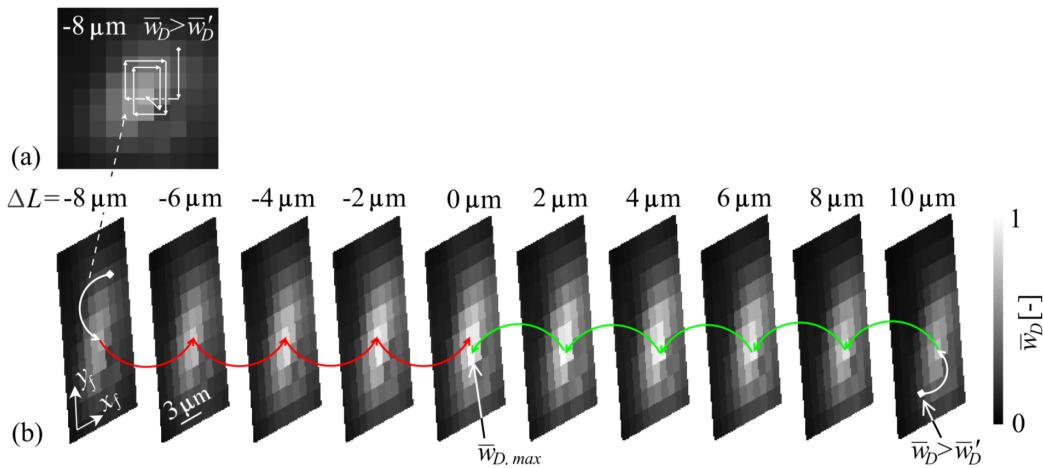
Obrázek 7: Vývojový diagram procedury první fáze úvodního nastavení CCHM a FHM pro korekci posuvu pole q_f . Veličina A je zesílení procedury, pro CCHM mikroskop je $A = \frac{1}{m}$.

ohniskové délky zoomu $Zoom_1$) v definovaném rozmezí okolo své výchozí hodnoty.

Další procedura slouží pro hledání nejvyšší hodnoty signálu $\bar{w}_D$ změnou prvku, který posouvá obrazové pole (objektiv O_2 u CCHM mikroskopu a zrcátko Z_9 u FHM mikroskopu) s cílovým stavem $|q_f| = 0 \mu m$. Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je dvou-rozměrné rastrování obrazovým posouvačem po drobných krocích kolem výchozí polohy (viz snímky na obrázku 8(b)). Druhou možností je uplatnit postup navržený Ing. Lukášem Kvasnicou, Ph.D., který využívá heuristický algoritmus (viz obrázek 8(a)) s ukončovací podmínkou.

Další procedura vede k nastavení nulového rozdílu délky větví, což odpovídá hodnotě $\Delta L = 0 \mu m$. Proto je pohybováno s prvky optické soustavy, které mění délku zobrazovací větve (zrcátko Z_2 u CCHM mikroskopu nebo osové výsuvy objektivů O a vzorku VZ u FHM mikroskopu).

Poslední procedurou je nalezení správných osových poloh obou objektivů FHM mikroskopu, které odpovídají $\Delta z = 0 \mu m$. Nastavitelný interval pohybu je po krocích procházen a je hledána maximální hodnota signálu $\bar{w}_D$ dle obrázku 5.



Obrázek 8: Podstata druhé fáze úvodního nastavení. Hodnoty úrovně šedi pixelů (malé čtverce) každého podobrazu reprezentují hodnotu měřeného holografického signálu průměrovanou přes celé zorné pole $\bar{w}_D$ pro rozdílné hodnoty $\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)$, a pro podobraz konstantní ΔL a $M = 1$. Průměrné hodnoty $\bar{w}_D$ jsou normovány vůči svému maximu v rámci celého měření. (a) Prvým v pořadí je heuristický algoritmus hledající lokální maximum hodnoty $\bar{w}_D$ změnou $\mathbf{q}_f$ při udržování konstantních hodnot ΔL a M . To je dáno příčnými pohyby mikroskopového objektivu O_2 mikroskopu CCHM a nebo zrcadlem Z_9 mikroskopu FHM. (b) Druhým v pořadí je hledání globálního maxima hodnoty $\bar{w}_{D,max}$ změnou ΔL pomocí osového pohybu zrcadla Z_2 mikroskopu CCHM nebo pomocí osových výsuvů objektivů O a vzorku SC mikroskopu FHM ve směru vzrůstajících hodnot $\bar{w}_D$. Hodnoty měřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ jsou normovány.

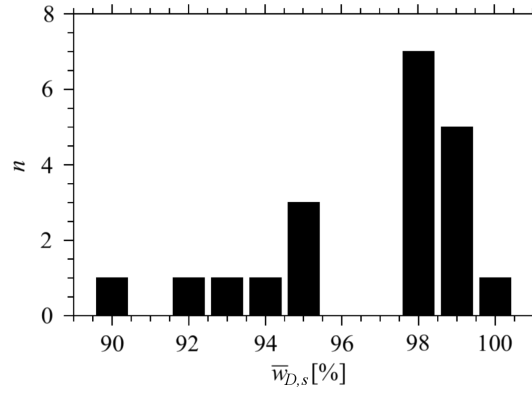
Postupné provedení všech čtyřech procedur zaručí, že všechny podmínky pro nalezení maximální hodnoty signálu $\bar{w}_{D,max}$ $M = 1$, $\Delta L = 0 \mu m$, $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu m$ a $\Delta z = 0 \mu m$ jsou splněny. Pořadí těchto procedur je možno zaměňovat dle potřeby, případně i opakovat s použitím odlišných parametrů.

7.2.3 Testování procedur na CCHM mikroskopu

Testování metod pro CCHM bylo provedeno pro všechny použitelné metody společně, přičemž jednotlivé procedury na sebe plynule navazovaly. K testování byl použit originální SW firmy TESCAN ORSAY HOLDING pro CCHM, do kterého byly implementovány popsane metody. CCHM mikroskop byl opakovaně náhodně rozladován posuvem objektivu O_2 a pohybem zrcátka Z_2 o vzdálenost $100 \mu m$. Na obrázku 9 jsou ukázány výsledky automatizovaného seřizování v procentuálním porovnání k hodnotě získané při manuálním precizním naladění $\bar{w}_{D,max,m}$. Je patrné, že testované procedury metody ladění skončily bezchybně s vysokou úspěšností.

7.2.4 Testování procedur na FHM mikroskopu

Testování procedur pro ladění FHM mikroskopu bylo prováděno po částech. Každá procedura byla opakována dvacetkrát s tím, že byla dodržována návaznost. Výsledek předcházející procedury byl vždy použit jako počáteční podmínka navazující procedury. Mikroskop

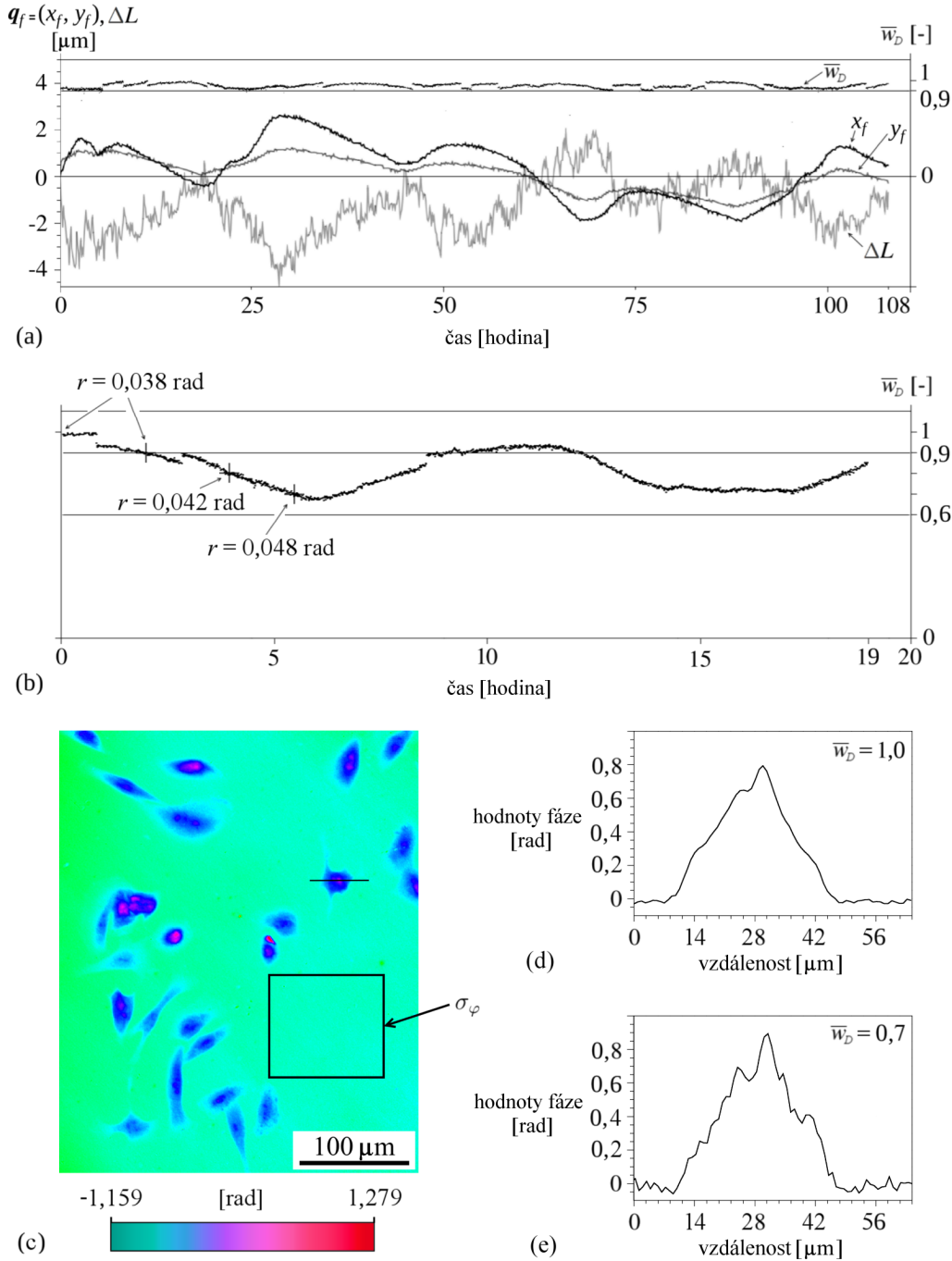


Obrázek 9: Histogram demonstrující celkovou úspěšnost při testování procedur na CCHM mikroskopu. Relativní hodnota signálu $\bar{w}_{D,s} = (\bar{w}_{D,max}/\bar{w}_{D,max,m}) \cdot 100 \%$.

byl před testováním rozladen. Poměrné zvětšení M bylo nahodile měněno v intervalu 15 % až 60 % rozsahu změny ohniska zoomovacího objektivu Zoom_1 , posuv polí $|\mathbf{q}_f|$ byl náhodně měněn o cca max. $1/3$ zorného pole, výchozí změna délky větve ΔL a velikost rozostření Δz byly voleny nahodile. Popsané procedury byly provedeny s vysokou úspěšností, protože výsledné poměrné zvětšení bylo stanoveno s velikostí 95% intervalu spolehlivosti $\pm 0,01$ a výsledná změna délky větve byla stanovena s velikostí 95% intervalu spolehlivosti $\pm 0,76 \mu\text{m}$. Procedura hledající nízkou hodnotu $|\mathbf{q}_f|$ ve všech případech správně identifikovala oblast maxima holografického signálu. Také autofokusační procedura našla správnou rovinu ostrosti s velikostí intervalu 95% spolehlivosti $\pm 1,8 \mu\text{m}$. Velikosti všech intervalů spolehlivosti zaručují získání vysoké hodnoty holografického signálu $\bar{w}_D$, protože středy těchto intervalů odpovídají maximálním hodnotám a byly potvrzeny manuálně.

7.3 Procedura pro dlouhodobé pozorování na CCHM mikroskopu

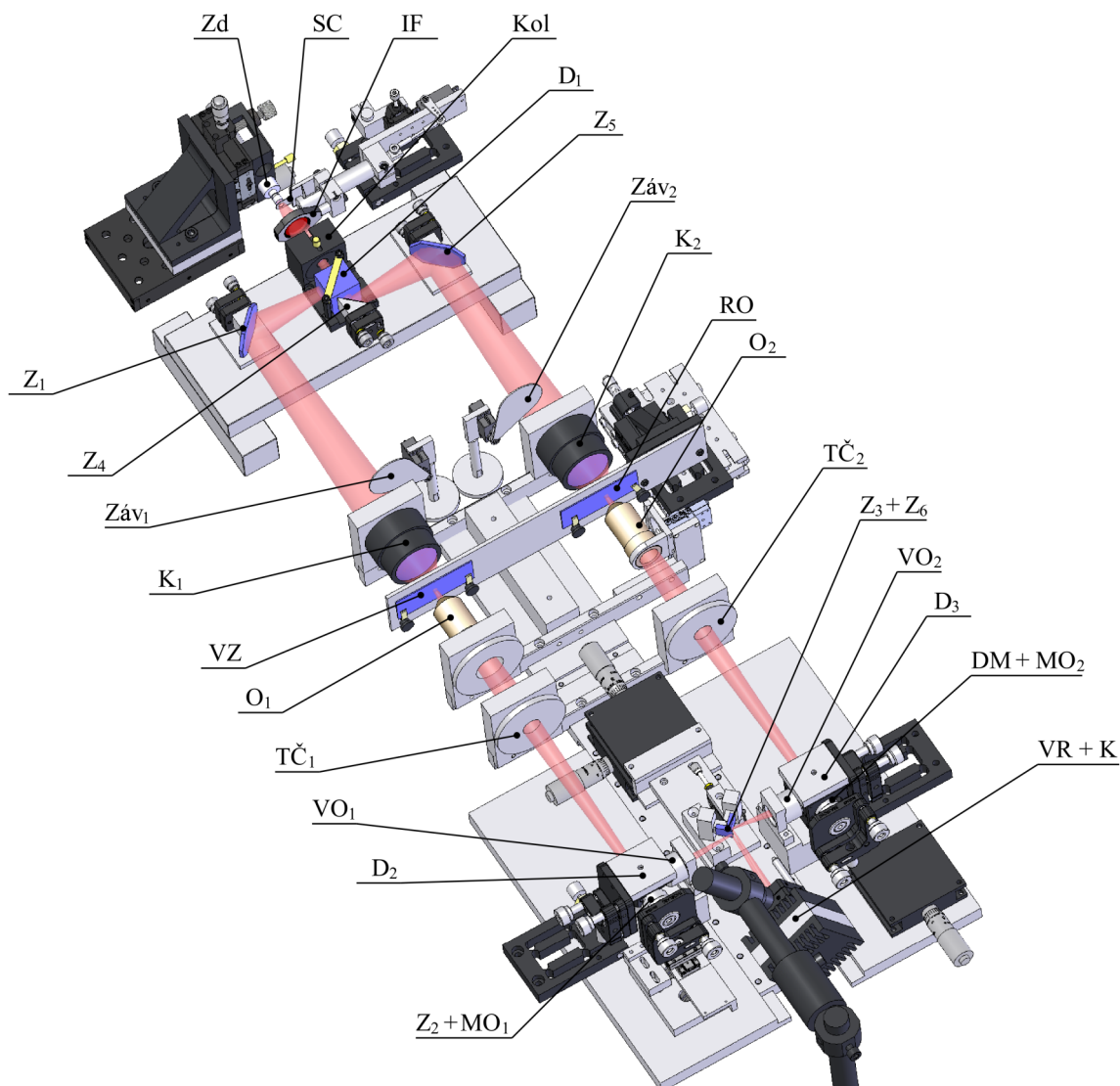
Při běhu dlouhotrvajících experimentů na CCHM mikroskopu je nutno stabilizovat hodnotu signálu $\bar{w}_D$ kolísající vlivem teplotních změn nebo vibrací. Navržená procedura příčně vychyluje mikroskopový objektiv O_2 a osově zrcátko Z_2 kolem jejich výchozích pozic a tím hledá maximum signálu $\bar{w}_D$. Na obrázku 10(a) je graf časové závislosti hodnot signálu $\bar{w}_D$ při běhu procedury. Na obrázku 10(b) je vynesena časová závislost hodnot signálu $\bar{w}_D$ bez spuštění procedury. Definujeme-li hodnotu rozlišení kvantitativní fáze pro QPI jako $r = 2\sigma_\varphi$, kde σ_φ je směrodatná odchylka šumu pozadí měřeného ve výřezu dle obrázku 10(c), pak pokles hodnot signálu na 90 % nemá měřitelný efekt na rozlišení (viz obrázek 10(b)). S klesajícími hodnotami signálu $\bar{w}_D$ šum pozadí QPI σ_φ roste a tím se zhoršuje rozlišení QPI r (viz obrázek 10(d) a (e)).



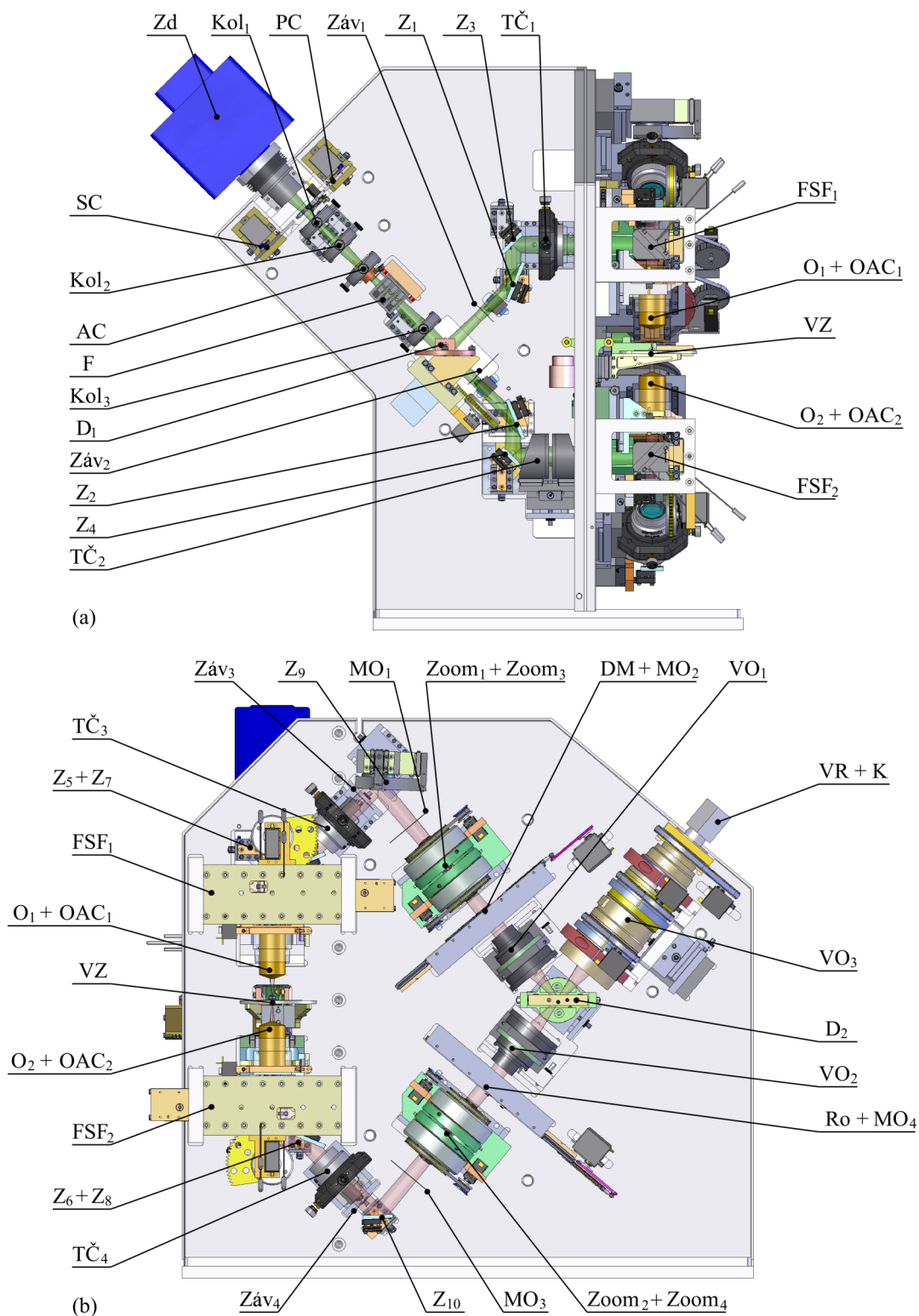
Obrázek 10: (a) Příklad dlouhodobé stabilizace vysokých hodnot měřeného holografického signálu $\bar{w}_D$ (hodnoty jsou normovány) a současný průběh změn hodnot $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ a ΔL , které odpovídají posuvům objektivu O_2 a zrcadla Z_2 , a které vedly ke stabilizaci hodnot signálu. (b) Časová závislost hodnot signálu $\bar{w}_D$ bez dlouhodobé udržovací procedury. Měřené fázové rozlišení r odpovídající daným hodnotám signálu je vyznačeno ve vybraných bodech grafu. (c) Kvantitativní fázový obraz kryších rakovinných buněk pořízený při 90 % maximální hodnoty měřeného holografického signálu ($r = 0,038 \text{ rad}$, viz graf (b)). Měření hodnoty σ_φ je provedeno ve vyznačeném okně (22000 pixelů). (d) a (e) Řezy kryší rakovinnou buňkou pořízené při 100 % a 70 % maximální hodnoty měřeného holografického signálu. Řezy byly vedeny úsečkou vyznačenou v obrázku (c).

8 Konstrukce robotizovaných prvků

V této kapitole je popsáno mechanické řešení důležitých robotizovaných prvků obou mikroskopů. Na obrázcích 11 a 12 jsou zobrazeny 3D modely obou mikroskopů a v nich jsou vyznačeny robotizované podsestavy. Mechanická sestava CCHM byla společně navržena mnou, Ing. Tomášem Slabým, Ph.D., a Ing. Martinem Antošem, Ph.D. Konstrukce FHM vznikla v mé spolupráci s Ing. Pavlem Kolmanem, Ph.D. V obou případech jsem navrhoval robotické mechanismy včetně jejich řízení.



Obrázek 11: Optická sestava CCHM: Zd - zdroj světla, IF - interferenční filtr, SC - seřizovací clona, Záv - počítačem řízené závěrky, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížky, D - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CCD kamera (detektor).



Obrázek 12: Optická sestava FHM. (a) Osvětlovací část, (b) zobrazovací část. Zd - zdroj světla, PC - polní clona, SC - seřizovací clona, AC - aperturní clona, F - šedé filtry, Kol - kolektory, Záv - počítačem řízené závěrky, Z - zrcadla, VZ - vzorek, FSF - fluorescenční sestavy filtrů (excitační filtry, dichroická zrcadla, emisní filtry), OAC - aperturní clony objektivů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, MO - roviny meziobrazů, Zoom - zoomovací objektivy, DM - difrakční mřížky, Ro - referenční okénko, D - děliče svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CMOS kamera (detektor).

8.1 Robotizované prvky se servopohony

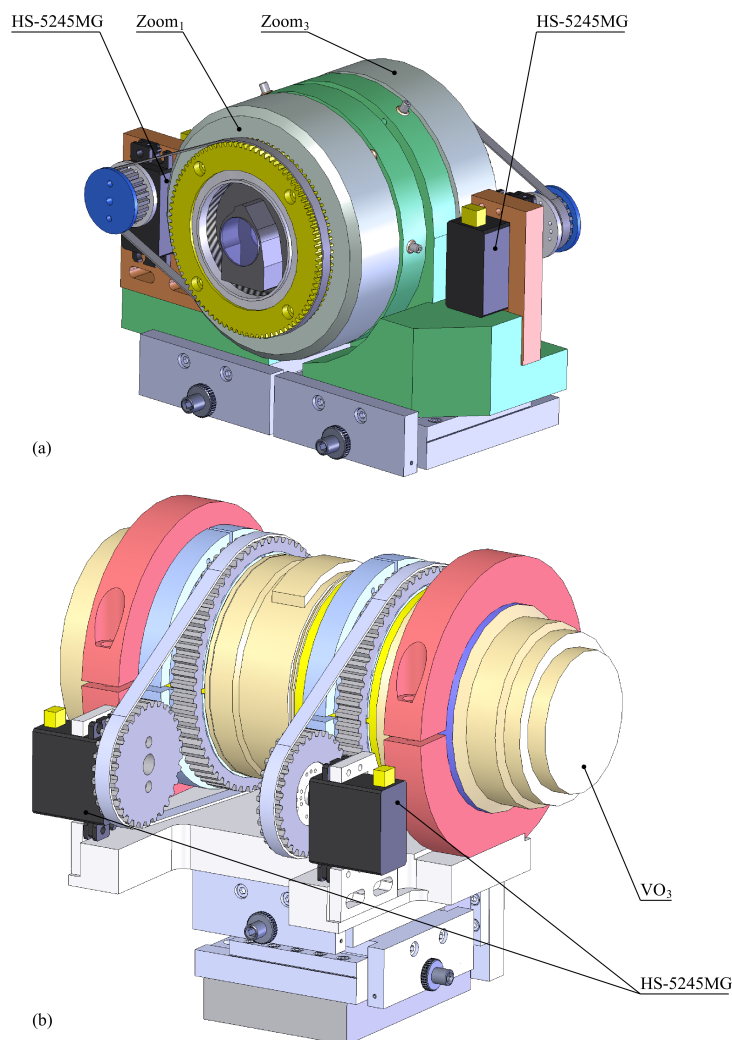
Všechny robotizované prvky jsou řízeny ze softwaru obslužného PC pomocí specializovaných řídicích karet. Byly voleny karty postačující požadavkům každého z mikroskopů.

Pro mikroskopy byly zkonstruovány mechanismy k zakládání seřizovacích clon SC a polní clony PC, mechanismy dovolující měnit průměr polní clony PC a aperturních clon AC a OAC FHM mikroskopu, mechanismy závěrek Záv, mechanismy k přepínání fluorescenčních kanálů a mechanismy pro nastavování zvětšení FHM mikroskopu. Zoom soustavy Zoom_{1,3} a Zoom_{2,4} (viz obrázek 13(a)) jsou navrženy pro změnu zvětšení v rozmezí $M \in \langle 1, 2 \rangle$. Tvoří je vždy pár objektivů Sony 16 – 50 mm $f/3,5 - 5,6$. Objektivy byly usazeny do centrovatelných nosičů. Jako akční prvek byl zvolen programovatelný digitální servopohon HS-5245MG firmy Hitec RCD USA. Servopohony byly shodně kalibrovány tak, aby pro zvolený převodový poměr měnily velikost ohniska objektivu dle zvoleného rozmezí. Tím je zaručen stejný chod všech čtyř objektivů. Stejně servopohony byly použity pro řízení výstupního objektivu VO₃. Ten je tvořen fotografickým objektivem Canon EF 70-200 mm $f/2,8$ L USM. Tomu odpovídá díky převodovému poměru hnací soustavy plný rozsah pohybu servopohonu. Stejným převodovým poměrem je řešeno i doostření objektivu. Díky této robotizaci lze měnit zvětšení soustavy výstupních objektivů VO₁ a VO₃ (a také VO₂ a VO₃) v rozmezí $M \in \langle 1, 1,46 \rangle$.

8.2 Robotizované prvky s lineárními stolky

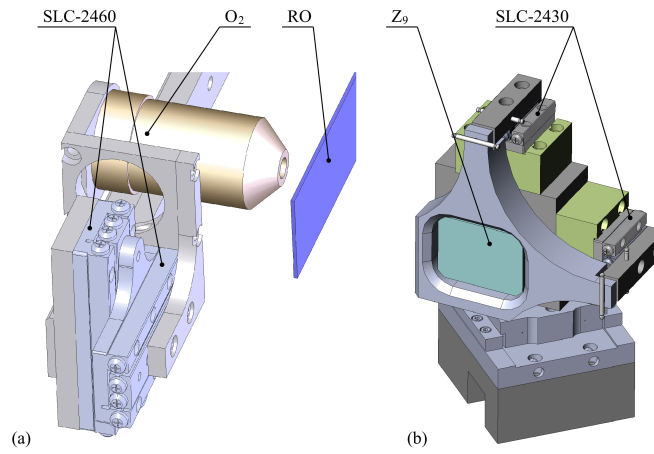
Všechny tyto mechanismy jsou založeny na lineárních stolcích firmy SmarAct [50] a jsou řízeny specializovanými driversy téhož výrobce. Prvou aplikací těchto lineárních stolků jsou akční prvky měnící velikost $\mathbf{q}_f$. Změny této veličiny je možno dosáhnout dvěma způsoby. Lze buď příčně pohybovat vybraným optickým prvkem (objektiv O₂ u CCHM) nebo naklápět zrcadlo v zobrazovací části interferometru (zrcadlo Z₉ u FHM). Mechanismy jsou zobrazeny na obrázku 14. Při návrhu je třeba zkontrolovat dosažitelné přesnosti nastavení obou typů mechanismů. Budeme-li uvažovat extrémní případ a vyjdeme-li z použití modrého světla o vlnové délce $\lambda = 400$ nm a imerzního olejového objektivu s $NA = 1,3$, je mez rozlišení R dle Rayleighova kritéria [47] rovna 187 nm. Minimální krok $\mathbf{q}_f$ mechanismu nesoucího mikroskopový objektiv O₂ CCHM je dán přímo minimální velikostí kroku lineárních stolků (50 nm), který je výrazně menší než nejmenší možná rozlišovací mez objektivu R . Minimální krok $|\mathbf{q}_f|$ mechanismu nesoucího zrcátko Z₉ FHM je při použití mikroskopového objektivu s nejmenším zvětšením 4x (s největším zvětšením 100x) je $|\mathbf{q}_f| = 16,75$ nm ($|\mathbf{q}_f| = 0,67$ nm). Oba mechanismy jsou schopny zajistit přesné seřízení mikroskopů.

Další aplikací těchto lineárních stolků jsou akční prvky měnící ΔL . U CCHM mikroskopu je tohoto efektu dosaženo mechanismem určeným k pohybu zrcátka Z₂, který je znázorněn na obrázku 15(c). U FHM mikroskopu jsou tři možnosti, jak měnit optickou délku zobrazovacích větví. Prvou je mechanismus výsuvu a rotace zrcátka Z₅ a s ním vázaná rotace zrcátka Z₇ viz obrázek 15(a). Princip kinematiky mechanismu je znázorněn na obrázku 15(b). Mechanismus je vykreslen v poloze středové a v poloze vychýlené

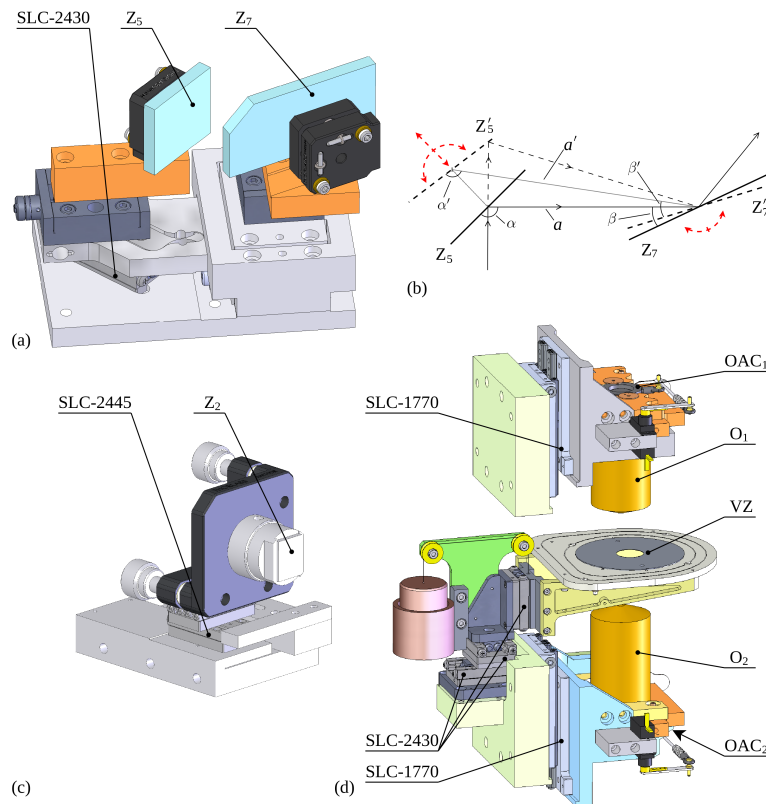


Obrázek 13: (a) Dva mechanismy ke změně zvětšení Zoom_{1,2} FHM, (b) mechanismus ostření a změny zvětšení VO₃ FHM: Zoom - zoomovací objektivy, VO₃ - výstupní objektiv, HS-5245MG - servopohon.

(čárkované). Druhou možností změny délky větve je totožný mechanismus v osvětlovací části mikroskopu, který pohybuje zrcadly Z₂ a Z₄. Poslední možností je společný osový pohyb mikroskopových objektivů O_{1,2} a osový pohyb mikroskopového stolku se vzorkem VZ (viz obrázek 15(d)). Všechny tyto stolky umožňují změnu délky větve s nejmenším krokem $\Delta L = 100 \text{ nm}$. Přesnosti i rozsahy pohybů mechanismů plně dostačují k seřízení obou mikroskopů, protože jsou menší než je koherenční délka bílého světla, která je například pro halogenovou lampu dána asi $1 \mu\text{m}$ [51].



Obrázek 14: (a) Mechanismus měnící posunutí q_f příčným pohybem objektivu O_2 CCHM, (b) mechanismus měnící velikost q_f náklonem zrcadla Z_9 u FHM: O_2 - mikroskopový objektiv, RO - referenční objekt, Z_9 - zrcadlo, SLC-2460, SLC-2430 - lineární stolky.



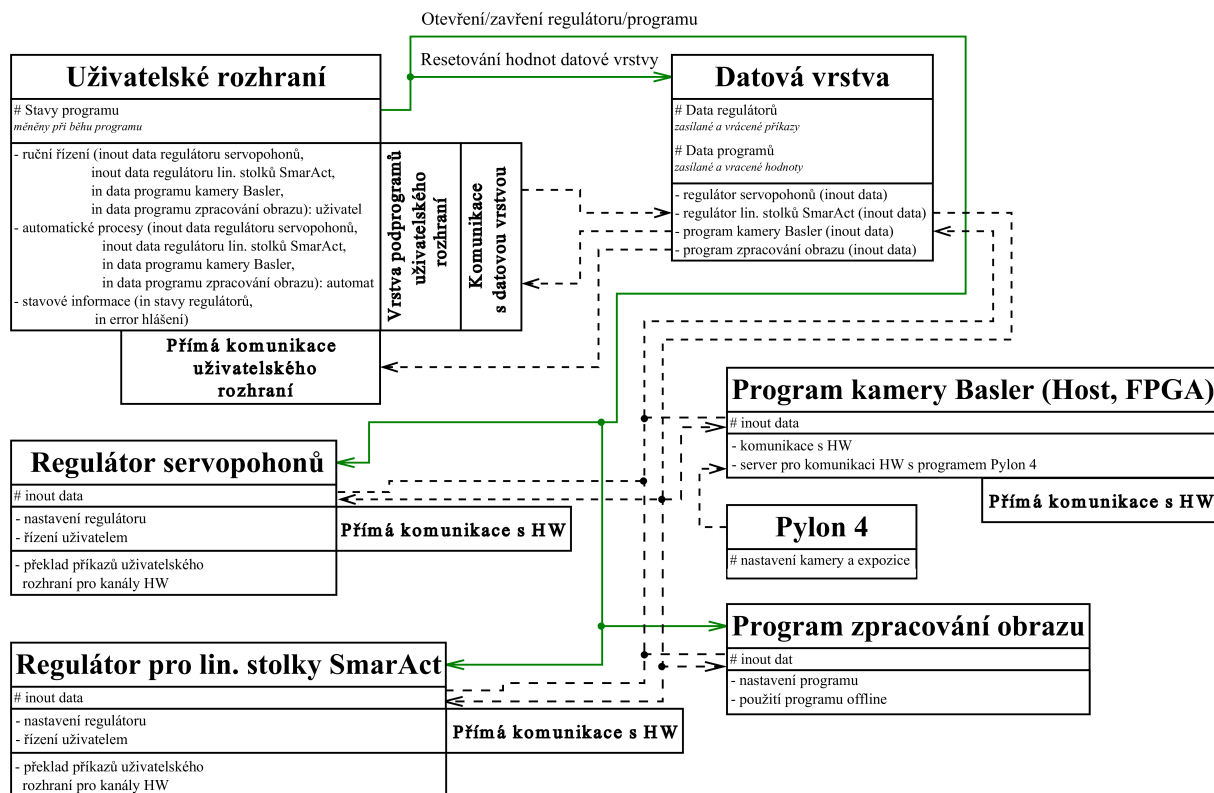
Obrázek 15: (a) Mechanismus FHM měnící délku větve ΔL výsuvem s rotací zrcátka Z_5 a vázanou rotací zrcátka Z_7 , (b) kinematické schéma mechanismu (a) (čárkovaná čára značí vychýlenou polohu), (c) mechanismus určený k pohybu zrcátka Z_2 u CCHM, (d) - mechanismy FHM pro společný osový pohyb mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a osový pohyb mikroskopového stolku se vzorkem VZ: O - mikroskopové objektivy, Z - zrcadla, OAC - aperturní clony objektivů, VZ - vzorek, SLC-2445, SLC-2430, SLC-1770 - lineární stolky.

9 Software pro řízení Fluorescenčního holografického mikroskopu

Z požadavků na řízení a funkci FHM mikroskopu, konstrukce optické soustavy, druhu použitých akčních prvků, jejich kontrolérů a komunikace přímo vyplývají požadavky na software mikroskopu. Konkrétně je nutné programově ovládat servopohony, lineární stolky SmarAct, získávat obrazová data (hologramy) z kamery a ty následně zpracovat, analyzovat a ukládat. Klíčovým úkolem bylo řešení architektury softwaru, která musí být co nejvíce modulární. Jednotlivé jeho části musí být funkčně nezávislé. Paralelita procesů všech částí je důležitá pro jejich nezávislost. Programovací prostředí LabView bylo zvoleno z důvodu možnosti rychlé tvorby programu. Zjednodušené schéma softwaru je uvedeno na obrázku 16. Software se skládá z programů základní vrstvy, které komunikují s hardwarem (regulátor servopohonů, regulátor lineárních stolků SmarAct a program pro obsluhu kamery Basler), a programu, který zpracovává hologramy. Pro uživatele pracujícího s mikroskopem je určen frontální program (program uživatelského rozhraní) a program Pylon 4 dodávaný společně s kamerou. Z požadavků nezávislosti a modularity programů vyplývá požadavek na komunikaci mezi programy. Navíc lze každou část softwaru lze nastavit tak, aby běžela na svém vlastním vlákně procesoru. Proto byla vytvořena datová vrstva, která dovoluje vyměňovat si data mezi programy základní a frontální vrstvy. Data jsou do ní zapisována a z ní vyčítána ve formě textových řetězců, logických proměnných, číselných hodnot a polí. To dovoluje svobodnou výměnu dat mezi jednotlivými částmi softwaru. Tato nezávislost také dovoluje provést jednoduše všechna nastavení programů, testování a ladění.

9.1 Program uživatelského rozhraní

Program uživatelského rozhraní slouží k ovládání celého mikroskopu uživatelem a také se stará o řízení běhu celého softwaru. Architektura programu je založena na principu konečného stavového automatu, který disponuje třemi stavy. Prvým z nich je inicializace. Oba regulátory se spustí a dochází k jejich vlastní inicializaci. Jsou-li připraveny, odesílají informaci o svém statusu přes datovou vrstvu uživatelskému rozhraní. Posledním krokem inicializace je přenastavení pozic lineárních stolků do výchozích hodnot. Druhý stav tvoří v programu uživatelského prostředí smyčku, při jejímž běhu se postupně kontrolují hodnoty požadovaných veličin a porovnávají se s těmi, které jsou v registru smyčky uloženy jako stávající. Je-li zjištěna změna, odesílá se příkaz příslušnému regulátoru a po jeho splnění dojde k přepsání registru smyčky. K vlastnímu zasílání příkazů regulátorům se využívají podprogramy, které pozastaví smyčku programu uživatelského prostředí, zašlou příkaz do datové mezivrstvy a čekají do té doby, dokud regulátor nezašle do datové mezivrstvy žádanou odpověď. Tím je zaručeno, že každý příkaz uživatele či automatické procedury je vykonán a nemůže být přeskočen. Pro ukončení běhu softwaru využívá poslední stav programu. Při něm se všem programům a regulátorům zašle příkaz, aby se ukončily, a tím se deaktivuje komunikace s hardwarem.



Obrázek 16: Zjednodušené blokové schéma řídicího softwaru FHM mikroskopu.

9.2 Regulátor servopohonů a regulátor lineárních stolků

Regulátor servopohonů po svém spuštění sám inicializuje řídicí kartu a očekává příkaz z datové mezivrstvy. Pro každý řiditelný kanál obsahuje regulátor servopohonů možnosti nastavení. Jedná se o koncové polohy mechanismů - tedy servopohonů, nastavení rychlosti pohybu, polohy servopohonů pro jednotlivé stavy, možnost nastavení offsetu pohybu nebo možnost kanál úplně vypnout.

Druhý z regulátorů obsluhuje lineární stolky SmarAct. Tento regulátor po svém spuštění sám inicializuje jejich řídicí elektroniku, postupně u všech lineárních stolků nalezne reference, a tím zjistí jejich fyzické pozice. Poté očekává příkaz z datové mezivrstvy. Pro každý řiditelný kanál obsahuje regulátor možnosti nastavení. Jedná se o koncové polohy stolků, nastavení rychlosti a akceleraci pohybu, polohy stolků, možnost nastavení offsetu nebo reverzovat smysl pohybu stolku.

Z datové mezivrstvy regulátory vyčítají příkazy ve formě textového řetězce. Kód obsahuje informaci o řízené funkci a požadovanou číselnou hodnotu polohy. Regulátor řetězec dekóduje a převede číselnou informaci na pokyny řízeného prvku.

Kromě toho je pro ladění jednotlivých pohybů naprogramována možnost řídit regulátory ručně. Tímto lze získat všechny hodnoty nastavení pro jednotlivé řízené prvky.

9.3 Program kamery Basler a program ke zpracování obrazu

Tento program vyčítá obrazová data z kamery Basler. Skládá se ze dvou částí. Prvou je program, který generuje firmware pro programovatelné hradlové pole (FPGA - Field Programmable Gate Array) graberu kamery. Druhou je spustitelný kód, který s firmwarem komunikuje a který z něj pomocí nástrojů programování hradlového pole pro LabView vyčítá pořízené snímky. Po spuštění programu dojde k inicializaci kamery a spustí se i server grabberu, který využívá program Pylon 4 pro nastavení kamery.

Program ke zpracování obrazu vyčítá z datové mezivrstvy informace ve formě 2D pole obrazových hodnot. Podle metodiky popsané v části 5.3 je získáván amplitudový a fázový obraz. Program lze také spustit s hologramy pořízenými dříve. Program umožňuje nastavit všechny parametry rekonstrukce.

10 Závěr

Tato práce velkou měrou přispěla k uživatelské přívětivosti holografických mikroskopů vyvíjených naší výzkumnou skupinou a umožnila jejich využití na biologických pracovištích tím, že zavedla automatickou justáž a řízení komplikované optické soustavy těchto mikroskopů. Byly aplikovány justážní metody, založené na kombinaci jednoduchých a účelných justážních procedur vycházejících z praktických zkušeností s holografickými mikroskopy. Pro tyto metody byla nalezena spolehlivá veličina vhodně kvantifikující stav mikroskopu v podobě průměrné hodnoty měřeného holografického signálu $\overline{w}_D$, který je online zjišťován při numerickém zpracování hologramů během pozorování. Jednotlivé procedury byly úspěšně otestovány a poté byly převzaty do komerčních verzí Q-PHASE koherencí řízeného holografického mikroskopu. Pro chod těchto procedur byly navrženy robotické mechanismy řízené z obslužného PC. Kromě toho byl vytvořen také řídicí software pro Fluorescenční holografický mikroskop, v němž byly tyto procedury integrovány. Výsledky této disertační práce jsou shrnuty v článku [42] a chráněny patentem [40].

V rámci dalšího vývoje justážních procedur bude probíhat jejich úprava pro budoucí biologické aplikace FHM. S tím bude souviset i budoucí vývoj obslužného softwaru. Také budou testovány sestavy CCHM mikroskopu se zjednodušenou zobrazovací větví. To umožní vytvořit jednoúčelový robotizovaný mikroskop.

Literatura

- [1] Davides, 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. Quarterly Journal of Microscopical Science*, ročník s3-95, č. 31 1954: s. 271–304.
- [2] Heimstädt, O. *Das fluoreszenzmikroskop. Z Wiss Mikrosk*, ročník 28 1911: s. 330–337.
- [3] Hirt, A.; Ellinger, P. *Method and device for microscopically viewing living objects*. Prosinec 1932, US Patent 1,891,348.
- [4] Rumbaut, R. E.; Sial, A. J. *Differential Phototoxicity of Fluorescent Dye-Labeled Albumin Conjugates. Microcirculation*, ročník 6, č. 3 1999: s. 205–213 ISSN 1549-8719 doi:10.1111/j.1549-8719.1999.tb00103.x.
- [5] Zhang, G.; Gurtu, V.; Kain, S. R. *An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications*, ročník 227, č. 3 1996: s. 707 – 711 ISSN 0006-291X doi:10.1006/bbrc.1996.1573.
- [6] Ploem, J. *The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. Z Wiss Mikrosk*, ročník 68, č. 3 1967: s. 129–142.
- [7] Ploem, J. S. *Fluorescence microscopy. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. WT Mason, editor. Academic Press, London*, 1999: s. 3–13.
- [8] Ritzen, M. *Quantitative fluorescence microspectrophotometry of catecholamine-formaldehyde products: Model experiments. Experimental Cell Research*, ročník 44, č. 2-3 1966: s. 505–520 ISSN 0014-4827 doi:10.1016/0014-4827(66)90456-3.
- [9] Minsky, M. *Microscopy apparatus*. Prosinec 1961, US Patent 3,013,467 URL <http://www.google.com/patents/US3013467>.
- [10] Minsky, M. *Memoir on inventing the confocal scanning microscope. Scanning*, ročník 10, č. 4 1988: s. 128–138 doi:10.1002/sca.4950100403.
- [11] M. Shotton, D. *Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. Journal of Cell Science*, ročník 94, č. 2 1989: s. 175–206 URL <http://jcs.biologists.org/content/94/2/175.abstract>.
- [12] Zernike, F. *Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. Physica*, ročník 9, č. 7 1942: s. 686–698 ISSN 00318914 doi:10.1016/S0031-8914(42)80035-X.

- [13] Zernike, F. *Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects, part II. Physica*, ročník 9, č. 10 1942: s. 974–986 ISSN 00318914 doi:10.1016/S0031-8914(42)80079-8.
- [14] Nomarski, G. *Interferential polarizing device for study of phase objects*. Únor 1960, US Patent 2,924,142 URL <https://www.google.cz/patents/US2924142>.
- [15] Hoffman, R.; Gross, L. *The modulation contrast microscope. Nature*, ročník 254, č. 5501 1975-4-17: s. 586–588 ISSN 00280836 doi:10.1038/254586a0.
- [16] Mir, M.; Bhaduri, B.; Wang, R.; a kol. *Progress in Optics*. kapitola Quantitative Phase Imaging, Elsevier 2012 s. 133–217.
- [17] Gorocs, Z.; Ozcan, A. *On-Chip Biomedical Imaging. Biomedical Engineering, IEEE Reviews in*, ročník 6 2013: s. 29–46 ISSN 1937-3333 doi:10.1109/RBME.2012.2215847.
- [18] Török, P. *Optical imaging and microscopy: techniques and advanced systems*. ročník 87 kapitola Low-Coherence Interference Microscopy Springer Science & Business Media 2003 s. 256–257.
- [19] Cherry, R. J. *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*. Topics in Molecular and Structural Biology CRC-Press, 1991 ISBN 9780849371172 URL <https://books.google.cz/books?id=r-c0mnw-hC8C>.
- [20] Leitz GmbH & Co KG *Transmitted-Light Interference Microscope*.
- [21] Wang, Z.; Millet, L.; Mir, M.; a kol. *Spatial light interference microscopy (SLIM). Opt. Express*, ročník 19, č. 2 Leden 2011: s. 1016–1026 doi:10.1364/OE.19.001016.
- [22] Leiht, E. N.; Upatnieks, J. *Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. J. Opt. Soc. Am.*, ročník 52, č. 10 Říjen 1962: s. 1123–1128 doi:10.1364/JOSA.52.001123.
- [23] Vanligten, R. F.; Osterberg, H. *Holographic microscopy. Nature Publishing Group*, 1966 doi:10.1038/211282a0.
- [24] Marquet, P.; Rappaz, B.; Magistretti, P. J.; a kol. *Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. Opt. Lett.*, ročník 30, č. 5 Březen 2005: s. 468–470 doi:10.1364/OL.30.000468.
- [25] Shaked, N. T.; Satterwhite, L. L.; Rinehart, M. T.; a kol. *Holography, Research and Technologies*. kapitola Quantitative Analysis of Biological Cells Using Digital Holographic Microscopy, InTech 2011 s. 219–236 doi:10.5772/15122.
- [26] Bhaduri, B.; Pham, H.; Mir, M.; a kol. *Diffraction phase microscopy with white light. Opt. Lett.*, ročník 37, č. 6 Březen 2012: s. 1094–1096 doi:10.1364/OL.37.001094.

- [27] Janečková, H.; Kolman, P.; Veselý, P.; a kol. *Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination*. in *Photonics Europe* International Society for Optics and Photonics 2008 s. 70002E–70002E.
- [28] Kolman, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscope*. *Opt. Express*, ročník 18, č. 21 Říjen 2010: s. 21990–22003 doi:10.1364/OE.18.021990.
- [29] Slaby, T.; Kolman, P.; Dostal, Z.; a kol. *Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope*. *Opt. Express*, ročník 21, č. 12 Červen 2013: s. 14747–14762 doi:10.1364/OE.21.014747 [doi:10.1364/OE.21.014747].
- [30] Gustafsson, M. G. L.; Sedat, J. W.; Agard, D. A. *Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution*. Září 1997, US Patent 5,671,085 URL <http://www.google.com/patents/US5671085>.
- [31] Hess, H. *Systems and methods for 3-dimensional interferometric microscopy*. Červenec 2008, US Patent App. 11/961,601.
- [32] Kolman, P.; Chmelík, R. *Interferometrický systém a způsob měření prostorového rozložení indexu lomu*. Červen 2016, CZ patent 306015.
- [33] Salmon, E. D.; Canman, J. C. *Proper Alignment and Adjustment of the Light Microscope*. John Wiley & Sons, Inc. 2001 ISBN 9780471142904 doi:10.1002/0471142905.hga03ns38.
- [34] Köhler, A. *Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke*. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, ročník 10 1893: s. 433–440 URL <http://www.archive.org/stream/zeitschriftfrw10stut#page/432/mode/2up/search/kohler>.
- [35] Kalamatianos, D.; Wellstead, P. E.; Edmunds, J. M.; a kol. *Active alignment for two-beam interferometers*. *Review of Scientific Instruments*, ročník 77, č. 1 2006: 013103 doi:10.1063/1.2150823.
- [36] Schwiesow, R. *Stabilization mechanism for optical interferometer*. Duben 1984, US Patent 4,444,501 URL <http://www.google.tl/patents/US4444501>.
- [37] Morrison, E.; Meers, B. J.; Robertson, D. I.; a kol. *Automatic alignment of optical interferometers*. *Appl. Opt.*, ročník 33, č. 22 Srpen 1994: s. 5041–5049 doi:10.1364/AO.33.005041.
- [38] Iwai, H.; Fang-Yen, C.; Popescu, G.; a kol. *Quantitative phase imaging using actively stabilized phase-shifting low-coherence interferometry*. *Opt. Lett.*, ročník 29, č. 20 Říjen 2004: s. 2399–2401 doi:10.1364/OL.29.002399.

- [39] Krishnamachari, V. V.; Andresen, E. R.; Keiding, S. R.; a kol. *An active interferometer-stabilization scheme with linear phase control*. *Opt. Express*, ročník 14, č. 12 Červen 2006: s. 5210–5215 doi:10.1364/OE.14.005210.
- [40] Chmelik, R.; Dostal, Z.; Kolman, P.; a kol. *Interferometric system with variable optics for non-coherent radiation source and method of tuning such interferometric system*. 2014, PV 2014-538.
- [41] Leith, E. N.; Upatnikes, J. *Holography with Achromatic-Fringe Systems*. *J. Opt. Soc. Am.*, ročník 57, č. 8 Srpen 1967: s. 975–979 doi:10.1364/JOSA.57.000975.
- [42] Dostal, Z.; Slaby, T.; Kvasnica, L.; a kol. *Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope*. *Journal of Biomedical Optics*, ročník 20, č. 11 2015: str. 111215 doi:10.1117/1.JBO.20.11.111215.
- [43] Harris, F. *On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform*. *Proceedings of the IEEE*, ročník 66, č. 1 Leden 1978: s. 51–83 ISSN 0018-9219 doi:10.1109/PROC.1978.10837.
- [44] Goldstein, R. M.; Zebken, H. A.; Werner, C. L. *Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping*. *Radio Sci.*, ročník 23, č. 4 1988: str. 713720 doi: 10.1029/RS023i004p00713.
- [45] Ghiglia, D. C.; Pritt, M. D. *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms and Software*. New York: Wiley-Interscience, 1998.
- [46] Chmelik, R.; Slaba, M.; Kollarova, V.; a kol. *Progress in Optics*. kapitola The role of coherence in image formation in holographic microscopy, Elsevier 2014 s. 133–217.
- [47] Born, M.; Wolf, E. *Principles of Optics*. seventh expanded edition Edition. Cambridge university press, 2002, SBN-13: 978-0521642224.
- [48] Thorlabs, Inc., www.thorlabs.de, [Online; 12. Května 2016].
- [49] TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., <http://www.tescan.com/en/products/q-phase/q-phase>, [Online; 12. Května 2016].
- [50] SmarAct GmbH, www.smaract.de, [Online; 12. Května 2016].
- [51] Fercher, A.; Hitzenberger, C.; Sticker, M.; a kol. *A thermal light source technique for optical coherence tomography*. *Optics Communications*, ročník 185, č. 1–3 2000: s. 57 – 64 ISSN 0030-4018 doi:10.1016/S0030-4018(00)00986-X.

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

Jméno: Ing. Zbyněk Dostál
Trvalé bydliště: Pionýrů 1338, 564 01 Žamberk, Česká Republika
Datum narození: 16.5. 1985
E-mail: zbynek.dostal@ceitec.vutbr.cz
Národnost: Česká

Studium

2004 – 2007 Bakalářské studium, stud. program Strojírenství, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.
2007 – 2009 Magisterské studium, stud. program Přesná mechanika a optika, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.
od roku 2009 Doktorské studium, stud. program Fyzikální a materiálové inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.

Odborné stáže

únor – duben 2014 Stáž na Universitě v St Andrews, School of Physics & Astronomy, u prof. Kishana Dholakii.

Přehled zaměstnání

od srpna 2011 Zaměstnán ve výzkumné skupině Experimentální biofotonika, STI – Středoevropský technologický institut VUT
od ledna 2012 Zaměstnán na Ústavu fyzikálního inženýrství, Fakulta strojního inženýrství, VUT

Členství ve spolcích

od roku 2010 Člen OSA Student chapter of Central European Institute of Technology-Brno University of Technology
od roku 2014 Člen České společnosti pro vědeckou kinematografii, Sekce aplikované optiky a mikroskopie

Pedagogické aktivity

- Výuka laboratoří z mechaniky, elektřiny a magnetismu, optiky, termodynamiky, kmitání a vlnění
- Přednášky a cvičení z biofotoniky
- Přednášky a cvičení z optického designu

- Přednášky z digitální holografické mikroskopie
- Vedení bakalářských a diplomových prací

Seznam vlastních publikací k tématu disertační práce

Odborné publikace

- Slabý, T.; Antoš, M.; Dostál, Z.; Kolman, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscope*. In *Proceedings of SPIE, Volume 7746. Proceedings of SPIE*. SPIE, 2010. s. 77461R-1 (77461R-8 s.) ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.
- 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*, 2013, roč. 21, č. 12, s. 14747-14762. ISSN: 1094-4087.
- Dostál, Z.; Slabý, T.; Kvasnica, L.; Lošťák, M.; Křížová, A.; Chmelík, R. *Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111215-1 (111215-8 s.) ISSN: 1083-3668.

Patenty

- Chmelík, R.; Slabý, T.; Kolman, P.; Dostál, Z.; Antoš, M.; Vysoké učení technické v Brně: *Interferometrický systém s prostorovou nosnou frekvencí zobrazující v polychromatickém záření*.
 - český užitečný vzor č. 21593, udělen v roce 2011
 - český patent č. 302491, udělen v roce 2011
 - evropský patent EP 2378244 B1, udělen v roce 2012
 - patent USA US 8526003 B2, udělen v roce 2013
 - ruský patent EA 018804 B1, udělen v roce 2013
 - japonský patent JP 5510676 B2, udělen v roce 2014
 - čínský patent CN102279555B, udělen v roce 2016
- Chmelík, R.; Dostál, Z.; Kolman, P.; Slabý, T.; Lošťák, M.; Vysoké učení technické v Brně, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.: *Interferometrický systém s variabilní optikou pro nekoherentní zdroj záření a způsob naladění interferometrického systému*. český patent č. 305665, udělen v roce 2015

Seznam vlastních publikací

- Lošťák, M.; Kolman, P.; Dostál, Z.; Chmelík, R. *Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope*. In *Proceedings of SPIE, Volume 7746. Proceedings of SPIE*. SPIE, 2010. s. 77461N-1 (77461N-9 s.) ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.

- Navrátil, P.; Marcián, P.; Cívín, A.; Dostál, Z. *Influence of stress waves to cracked railroad wheel*. In *Proceedings 49th International Scientific Conference, Experimental Stress Analysis 2011*. 1. Znojmo: Brno University of Technology, 2011. s. 259-266. ISBN: 978-80-214-4275-7.
- Chmelík, R.; Slabá, M.; Kollárová, V.; Slabý, T.; Lošťák, M.; Čolláková, J.; Dostál, Z. *The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy*. *Progress in Optics*, 2014, roč. 59, č. 1, s. 267-336. ISSN: 0079-6638.
- Čolláková, J.; Křížová, A.; Dostál, Z.; Antoš, M.; Vašíček, D.; Chmelík, R. *Multi-modální holografický mikroskop - společný projekt VUT a TESCAN. Jemná mechanika a optika*, 2014, roč. 59, č. 6-7/ 2014, s. 160-162. ISSN: 0447-6441.
- Kollárová, V.; Lošťák, M.; Slabá, M.; Slabý, T.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Křížová, A.; Štrbková, L.; Chmelík, R. *Imaging of 2D objects through diffuse media by coherence controlled holographic microscope*. In *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*. Seattle, Washington United States: Optical Society of America, 2014. ISBN: 978-1-55752-308-2.
- Kollárová, V.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Quantitative phase imaging through scattering media by means of coherence-controlled holographic microscope*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 1112016-1 (111206-8 s.) ISSN: 1083-3668.
- Čolláková, J.; Křížová, A.; Kollárová, V.; Dostál, Z.; Slabá, M.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111213-1 (111213-7 s.) ISSN: 1083-3668.
- Křížová, A.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Kvasnica, L.; Uhlířová, H.; Zikmund, T.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111214 1 (111214-8 s.) ISSN: 1083-3668.
- Plöschner, M.; Kollárová, V.; Dostál, Z.; Nylk, J.; Barton-Owen, T.; Ferrier, D.; Chmelík, R.; Dholakia, K.; Čížmár, T. *Multimode fibre: Light-sheet microscopy at the tip of a needle*. *Scientific Reports*, 2015, roč. 5, č. 1, s. 1-7. ISSN: 2045-2322.
- Kollárová, V.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Slabý, T.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Quantitative phase imaging through scattering media*. In *Quantitative Phase Imaging*. San Francisco, CA: Spie-int Soc Optical Engineering, 1000 20th st, PO BOX 10, Bellingham, WA 98227-0010 USA, 2015. s. 93360T-1 (93360T-8 s.) ISBN: 978-1-62841-426-4.

- Antoš, M.; Bouchal, P.; Dostál, Z.; Štrbková, L.; Kvasnica, L.; Kolman, P.; Chmelík, R. *Mikroskopie v Laboratoři experimentální biofotoniky. Jemná mechanika a optika*, 2016, roč. 61, č. 6, s. 135-139. ISSN: 0447-6441.