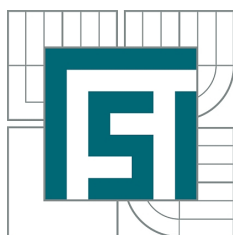


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



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

KOHERENCÍ ŘÍZENÁ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE V OPTICKY ROZPTYLUJÍCÍCH PROSTŘEDÍCH COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPY IN DIFFUSE MEDIA

DISERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. MARTIN LOŠŤÁK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. RADIM CHMELÍK, Ph.D.

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá zobrazováním přes difuzní prostředí v koherenci řízeném holografickém mikroskopu (CCHM) vyvinutém na Ústavu fyzikálního inženýrství v Brně. Je v ní uveden výpočet vzájemné koherence světla v mikroskopu, výpočet signálu v závislosti na vzájemném laterálním posuvu obou větví a vzájemná souvislost obou výsledků. Poslední zmíněný výpočet je navíc podroben ověřovacím experimentům.

Pomocí jednoduchého geometrického modelu je zde vysvětlen princip zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí balistickým i difuzním světlem a je doplněn příslušnými potvrzujícími experimenty. Na tento model dále navazují teoretické výpočty rozptylové funkce bodu (PSF) pro zobrazení přes difuzní prostředí. Výsledek modelu je potvrzen experimentem.

Summary

This thesis deals with imaging through diffuse media in coherence-controlled holographic microscope (CCHM) developed in IPE FME BUT. The mutual coherence function as well as the signal dependence on the lateral mutual shift between both arms of the CCHM are calculated. Both functions are related to each other. The latter dependence is measured experimentally.

A principle of imaging with CCHM through diffuse media with both ballistic and diffuse light is explained by a simple geometrical model. This model is then verified experimentally by imaging a sample through diffuse medium. The point spread function (PSF) of CCHM for imaging through diffuse media is then calculated. Results of PSF calculation are proved experimentally.

Klíčová slova

koherenci řízená holografická mikroskopie, vzájemná koherence, koherentní funkce přenosu, rozptylová funkce bodu, zobrazování přes difuzní prostředí, nízká koherence, difuzní světlo

Keywords

coherence-controlled holographic microscopy, mutual coherence, coherent transfer function, point spread function, imaging through diffuse media, low coherence, diffuse light

LOŠTÁK, M. *Koherenci řízená holografická mikroskopie v opticky rozptylujících prostředích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 50 s. Vedoucí disertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval v celém rozsahu samostatně pod vedením prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D. a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Ing. Martin Lošťák

Na tomto místě děkuji prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. za vedení dizertační práce a všem svým kolegům z laboratoře za odbornou pomoc. Mnohokrát děkuji své rodině a přátelům za neutuchající podporu. Z celého srdce chci také poděkovat všem svým učitelům.

Ing. Martin Lošťák

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Optické metody zobrazení v difuzním prostředí	1
1.1.1	Konfokální mikroskopie	1
1.1.2	Interferenční techniky	1
1.1.3	Techniky využívající přímo difuzní světlo	2
1.1.4	Holografická mikroskopie v difuzních prostředích na VUT	3
1.2	Motivace a cíle dizertační práce	4
2	Koherenci řízený holografický mikroskop	7
2.1	Optické schéma 1. generace CCHM	7
2.2	Optické schéma 2. generace CCHM	8
2.3	Rekonstrukce obrazu z hologramu	9
3	Holografický signál a vzájemná koherence v CCHM	11
3.1	Teoretický výpočet	11
3.1.1	Holografický signál	11
3.1.2	Signál a funkce přenosu pro kvazimonochromatický zdroj	13
3.2	Signál při vzájemně posunutých větvích	14
3.2.1	Vzájemná koherence	15
3.3	Měření vzájemné koherence	17
3.3.1	Měření vzájemné koherence pro 1. generaci CCHM	17
3.3.2	Měření vzájemné koherence pro 2. generaci CCHM	20
3.3.3	Závěr k měření vzájemné koherence	20
4	Difuzní zobrazování v CCHM	21
4.1	Princip zobrazování v CCHM přes difuzní prostředí	21
4.1.1	Princip zobrazování v CCHM balistickým světlem	22
4.1.2	Princip zobrazování v CCHM difuzním světlem	23
4.2	Experiment - ověření schopnosti CCHM zobrazovat přes difuzní prostředí	23
4.2.1	Zobrazování balistickým světlem	24
4.2.2	Zobrazování difuzním světlem - posuv obrazu v referenční větvi	25
4.2.3	Zobrazování difuzním světlem - posuv obrazu v objektové větvi	25
5	PSF pro zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí	29
5.1	Zobrazení difuzním světlem	29
5.1.1	Komplexní amplituda v objektové větvi	29
5.1.2	Srovnání výpočtu CTF pro 2D a 3D situaci	31
5.1.3	Výpočet PSF objektové větve	32
5.1.4	Výpočet PSF mikroskopu CCHM	33

5.1.5	Laterální posuv větví	34
5.1.6	Numerický výpočet PSF objektové větve a PSF mikroskopu	34
5.1.7	Výsledky numerické simulace	35
5.2	Experimentální výsledky	38
5.3	Závěrečné shrnutí simulace a měření PSF	41
Závěr		41
Literatura		45

Kapitola 1

Úvod

1.1 Optické metody zobrazení v difuzním prostředí

Při zobrazování v rozptýlených prostředích, jako jsou například buněčné struktury, je obraz zaostřené struktury degradován světlem rozptýleným mimo předmětovou rovinu. Úkolem některých mikroskopových technik je zamezit tomuto vícekrát rozptýlenému neboli difuznímu světlu, aby se podílelo na formování obrazu. K tomu používáme buď filtraci mechanickou (konfokální mikroskopie) nebo filtraci pomocí odlišných koherenčních vlastností difuzního a přímo prošlého (balistického) světla. Při biologickém zobrazování se však lze setkat i s technikami, které se naopak snaží difuzní světlo pro zobrazení využít, například tzv. continuous-wave imaging, diffuse photon density waves aj. Uvedené techniky [1] však mívají výrazně nižší rozlišovací schopnost než optická mikroskopie, ovšem jsou schopny zobrazovat i přes velmi hustá prostředí a nalézají využití zejména v lékařské vědě [2].

1.1.1 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop (KM) byl poprvé navržen a zkonstruován Marvinem Minským v roce 1961 [3]. Díky dvojitému rastrování, souběžně v osvětlovací a detekční části, se násobí dva efekty. První filtrace je zajištěna malou aperturou, která je zobrazena do předmětové roviny, čímž je osvětleno pouze malé okolí právě pozorovaného bodu. Díky druhé filtraci, aperturou v detekční části, pak je detekováno výhradně světlo balistické, tedy světlo, které projde vzorkem přímo nebo se rozptýlí jen v předmětové rovině. Ve výsledku umožňuje tento princip vytváření optických řezů. Princip KM je velmi přesně popsán v knize [4].

1.1.2 Interferenční techniky

Kromě KM se pro zobrazování přes difuzní prostředí využívají interferenční (nebo též holografické) techniky. S výjimkou metody fázové konjugace [5, 6] jsou všechny interferenční techniky zobrazující přes difuzní prostředí založeny na využití nekoherentního světla nebo alespoň částečně koherentního světla. Označíme je zkratkou LCI (z angl. low-coherence interferometry). Tyto techniky dokáží zobrazovat přes rozptýlné prostředí díky mechanismu tzv. koherenční brány (z angl. „coherence-gating“) [7, 8, 9]. Techniky spadající do LCI tedy filtrují rozptýlené světlo tím, že rozptýlené světlo se setkává se světlem z referenční větve mimo koherenční objem. Schopnost LCI zobrazovat přes rozptýlné prostředí je v několika publikacích srovnána se schopností konfokálního mikroskopu. Například v publikaci

[10] lze nalézt výpočet koherentní funkce přenosu (CTF) jak pro KM, tak i LCI. Výsledek ukazuje, že při monochromatickém osvětlení a uspořádání na odraz je CTF pro LCI stejná jako pro ideální konfokální mikroskop. V další publikaci [11] je srovnána rozptylová funkce bodu (PSF) obou technik. Autoři zde ukazují, že LCI má s KM tři shodné základní vlastnosti, kterými jsou superrozlišení, potlačení difuzního světla i hloubková diskriminace. Porovnáním druhé vlastnosti se blíže zabývá publikace [8], a to zejména experimentálně. V publikaci [12] je provedeno srovnání množství signálu v závislosti na charakteru rozptylného média a vyplývá z ní, že signál v LCI je vlivem difuzoru tlumen méně výrazně než v KM. Historický přehled holografických technik využívajících nekoherentních zdrojů světla pro zobrazení v difuzních médiích je součástí publikace [9].

Schopnost zobrazování v difuzním prostředí pomocí holografie prokázali autoři v modelových difuzních prostředích, jako je roztok mléka ve vodě [13], latexové kuličky ve vodě [12] či difuzní sklo, které je vloženo mezi vzorek a objektiv [7, 14, 15]. Jde ovšem často i o zobrazení biologických difuzních objektů, jako jsou například kolagenová vlákna [16] či jiné biologické objekty [9].

Funkce PSF a její Fourierova transformace CTF jsou velmi významnou charakteristikou zobrazení světelného mikroskopu a určují mimo jiné jeho rozlišení. Popisu a měření těchto funkcí v optické mikroskopii se věnuje celá řada publikací, např. [17, 18]. Působení difuzního prostředí umístěného mezi vzorkem a objektivem však mění charakter zobrazení tím, že světlo rozptýlené na vzorku projde poté na difuzoru mnoha náhodnými rozptyly a vyjádření PSF či CTF pomocí výpočtu je tím velmi znesnadněno. Pokud je nám známo, nikdo zatím nepublikoval výpočet PSF či CTF v LCI při zobrazení přes difuzní prostředí.

V [9] a [11] autoři diskutují vliv difuzního prostředí na světelný impuls jdoucí objektovou větví přes difuzní prostředí a náčrtkem ukazují PSF celého mikroskopu LCI při zobrazení přes difuzní prostředí. V [8] a [13] se autoři věnují určení rozlišení experimentálně pomocí zobrazení testovací amplitudové mřížky. Z obou publikací vyplývá, že degradace obrazu vlivem difuzního prostředí v LCI je způsobena nízkou hodnotou poměru signálu vůči šumu a že rozlišení lze zlepšit na hodnotu bez difuzoru průměrováním více obrazů téhož předmětu.

Speciální skupinu interferenční mikroskopie tvoří OCT (optická koherenční tomografie) [19] a OCM (optická koherenční mikroskopie) [20]. Výjimečné jsou zejména proto, že umožňují pozorování *in vivo*. OCT je nyní již běžná metoda využívaná především v oftalmologii.

1.1.3 Techniky využívající přímo difuzní světlo

Optické techniky zobrazující difuzním světlem jsou často využívány zejména v lékařských vědách [2]. Rozlišení, které pomocí těchto technik zobrazení dostáváme, je daleko horší než u technik využívajících světlo balistické. Avšak tloušťka vzorku, který jsme schopni zobrazit, je naopak daleko větší. Rozlišení i maximální pozorovací tloušťka se pohybují v řádech milimetrů až centimetrů v závislosti na konkrétní technice a vlastnostech vzorku, zatímco rozlišení při zobrazení balistickým světlem odpovídá difrakčnímu limitu zobrazovací soustavy.

U metod zobrazujících difuzním světlem nezískáváme obraz klasicky, pomocí záznamu geometrického obrazu předmětové roviny. Detekce často probíhá pomocí několika bodových detektorů rozmístěných v definovaných pozicích. Z vyhodnocení měření pak usuzujeme na vlastnosti či strukturu vzorku. Pro takové zobrazování je samozřejmě potřeba mít k dispozici velmi dobrý teoretický model, který dává naměřený signál do souvislosti s vlastnostmi vzorku, jímž světlo prošlo, nebo od kterého se odrazilo. Obecně lze rozdělit

tyto techniky na dva typy.

V prvním vysílá zdroj velmi krátké pulzy světla (řádově femtosekundové až pikosekund) na vzorek a po průchodu vzorkem je pak zaznamenána intenzita světla v závislosti na čase. Jako první projde zřejmě světlo balistické, jež projde přímo, bez rozptylu uvnitř vzorku. Další detekované světlo je více či méně rozptýleno a jeho časový průběh lze spočítat z difuzní rovnice. Pomocí fitování naměřené závislosti s předpovězenou pak získáváme koeficienty charakterizující vzorek. Mezi ně patří například koeficienty absorpce či rozptylu [1, 2]. Vzhledem k tomu, že zaznamenáváme časový průběh intenzity, nazývají se tyto metody „time-domain“.

Druhým typem technik jsou ty, u kterých zdroj světla vysílá spojitě světelné vlnění (CW - Continuous Waves) s definovanou modulací amplitudy a daným fázovým posuvem. Po průchodu vzorkem je pak taková vlna popsána pomocí modelu tzv. Photon Density Waves - PDW. To jsou útvary, které připomínají vlny, neboť u nich lze měřit interferenci, fázovou rychlost nebo lom. Přesně vzato však o světelné vlny nejde. V případě PDW měříme jejich fázi a modulaci amplitudy relativně vůči zdroji v několika pozicích. Protože je zde zaznamenána frekvenční závislost, patří tyto techniky do tzv. „frequency-domain“ [1].

1.1.4 Holografická mikroskopie v difuzních prostředích na VUT

Zobrazení přes difuzní prostředí pomocí interferometrických metod je možné pouze tehdy, využíváme-li zdroje světla se sníženou koherencí. Současné interferometrické systémy s oddělenou předměťovou a referenční větví lze rozdělit do dvou skupin, a to dle úhlu, pod kterým svazky z větví na výstupu interferují. První skupinu tvoří systémy, u nichž se svazky potkávají pod nulovým nebo téměř nulovým úhlem a nazývají se „in-line“, naproti tomu druhou skupinu, jež se nazývá „off-axis“, tvoří mikroskopy, jejichž svazky interferují pod nenulovým úhlem. Jelikož mezi pojmy „holografický mikroskop“ a „interferenční mikroskop“ panuje v literatuře nejednotnost, budeme v rámci celé práce nazývat mikroskopy s „in-line“ uskupením interferenčními, zatímco mikroskopy s „off-axis“ konstrukcí budeme nazývat „holografickými“.

Holografické mikroskopy (tj. mikroskopy obsahující interferometr s „off-axis“ konstrukcí) umožňují rekonstrukci předmětové vlny z jediného snímku, čímž se stávají vhodnými pro dynamické děje, jejich nevýhodou je ovšem možnost použití pouze se zdroji s vysokou koherencí, nejčastěji tedy lasery [17, 18].

Interferenční mikroskopy (tj. s „in-line“ konstrukcí) naproti tomu umožňují snadné použití se zdroji s nízkou koherencí. Pro rekonstrukci předmětové vlny je však v tomto případě zapotřebí více snímků s různými fázovými posuvy. Nejméně tři, často však i více. To znemožňuje použití těchto mikroskopů pro velmi dynamické děje. První sériově vyráběné interferenční mikroskopy byly navrženy Krugem a Lauem v roce 1951 [21]. Známým příkladem interferenčního mikroskopu s nekoherentním zdrojem světla je Hornův mikroskop [22], který je složen ze dvou transmisních mikroskopů umístěných vedle sebe.

Až do konce 90. let nebyla oblast interferenční ani holografické mikroskopie předmětem hlubšího zájmu, což bylo zapříčiněno zejména pomalou a velmi komplikovanou rekonstrukcí obrazu. Změna nastala až spojením těchto technik se záznamem na digitální média, která umožnila mnohonásobně jednodušší a rychlejší zpracování interferogramů. Příklady interferenčních mikroskopů využívajících zdrojů s nízkou koherencí jsou uvedeny v publikacích [13, 23, 24, 25, 26].

Uvedené nevýhody interferenční a holografické mikroskopie odstraňuje tzv. mřížkový achromatický interferometr navržený E. Leithem [5, 27], na jehož principu, byly postaveny

i holografické mikroskopy na ÚFI VUT v Brně. První prototyp achromatického holografického mikroskopu vznikl na VUT v roce 1999 a šlo o variantu pro odražené světlo. V první publikaci, která o tomto prototypu pojednává [28], je změřena CTF mikroskopu a srovnána s teoreticky odvozenou. Rovněž je zde ukázána schopnost optických řezů mikroskopu, tj. analogie s konfokálními řezy. V roce 2002 [29] byla postavena 1. varianta transmisního holografického mikroskopu (TDHM), která byla posléze přestavena pro zobrazování s polychromatickým zdrojem [30, 31]. První zobrazování s touto přestavěnou verzí TDHM přes difuzní prostředí je popsáno v publikaci [30], kde byly pozorovány dva vzorky, a to nepropustná Cr mřížka nanesená na povrch skla (amplitudový vzorek) a schodovitá struktura o hloubce 620 nm vyleptaná v povrchu průhledného PMMA (fázový vzorek). Jako difuzor, vložený mezi vzorek a objektiv, byla použita 10 mikronová plastová folie.

V roce 2005 pak byla představena nová generace TDHM [32], jehož geometrie je shodná se schématem mikroskopu na obr. 2.1 využívaným pro experimenty v rámci této práce. Tato varianta byla dokončena v roce 2006 a její využití pro pozorování přes rozptýlné objekty je demonstrováno v publikaci [33]. Difuzorem je 2 μm tlustá folie a vzorkem je CELLocate (fázová maska určená pro detekci polohy buněk v mikroskopu). V uvedené variantě TDHM je již umožněno měnit stupeň časové i prostorové koherence, a proto se mikroskop začal označovat jako CCHM, tj. koherenci řízený holografický mikroskop (angl. coherence-controlled holographic microscope). Stejnou zkratkou budeme souhrnně označovat v této práci tuto i všechny následující generace achromatického holografického mikroskopu vzniklého v naší laboratoři.

V publikaci [33] je ukázáno, že s CCHM ve světle časově a prostorově koherentním je zobrazení přes 2 μm tlustý difuzor nemožné, zatímco v nízko koherentním módu je obraz přes tento difuzor zachován. Je zde také ukázáno, že difuzor v případě nízko koherentního módu nemá vliv na výsledek měření fáze předmětové vlny, kterou lze pomocí CCHM rekonstruovat.

Obdobné výsledky byly prezentovány na konferenci v roce 2007 [34] a později taktéž v [35] a [36].

V publikaci, která se velmi podrobně zabývá konstrukcí nové generace CCHM [15], je ukázáno zobrazení přes oboustranně zmatněné krycí sklo tloušťky 150 μm . Ve stejném roce byla na stejném zařízení s týmž difuzorem poprvé ukázána možnost zobrazení v CCHM taktéž difuzním světlem [37, 38].

Reálné (biologické) difuzní objekty byly pozorovány v rámci dizertační práce [39]. Difuzním médiem byla těžká voda s rozptýlenými polystyrénovými kuličkami o průměru 365 nm a roztok fosfolipidů ve vodě o koncentraci $C=3\%$. Přitom, jak je zde ukázáno, metoda fázového kontrastu přestává být schopna zobrazit již pro koncentraci 10x nižší, tj. $C=0,3\%$. Další zobrazování biologických objektů v difuzním prostředí je součástí práce [40]. Médiem je zde opět roztok fosfolipidů ve vodě. Teoretický popis zobrazení přes difuzní prostředí je součástí tří novějších publikací [41, 42, 43].

1.2 Motivace a cíle dizertační práce

Hlavní důvody, které nás vedly k sepsání této práce, lze rozdělit do třech nejdůležitějších:

1. Schopnost zobrazit přes difuzní prostředí při použití zdrojů s nízkou koherencí je známou vlastností interferenční mikroskopie, jak je popsáno například v publikacích [8, 13]. V uvedených publikacích navíc autoři experimentálně ukazují, že rozlišení se při takovémto zobrazení nezmění. Ačkoli je tento jev popsán na základě experimentu, neexistuje prozatím žádný jeho přesný matematický popis.

2. Při pozorování s CCHM jsme zjistili, že v případě zobrazení přes difuzor je možné rekonstruovat obraz i v konfiguraci s vzájemně posunutými větvemi o vzdálenost vyšší, než odpovídá koherenční šířce v dané rovině. V takovéto konfiguraci již přitom není možné zobrazit s CCHM ani v případě zobrazení bez difuzoru. Toto pozorování nás přivedlo k objevu, že lze zobrazovat s CCHM i s využitím difuzního světla. Tento experiment jsme chtěli zopakovat a mechanismus zobrazení difuzním světlem řádně matematicky popsat.
3. Z výpočtů, které jsme provedli a které odpovídají i výsledkům z publikace [44], jsme zjistili, že měřením závislosti signálu na vzájemném posunutí větví ve výstupní rovině lze zároveň měřit funkci vzájemné koherence CCHM. Tento jev jsme chtěli prověřit a zároveň změřit vzájemnou koherenci CCHM, neboť koherenční vlastnosti CCHM úzce souvisejí s jeho možnostmi zobrazení přes difuzní prostředí.

Z vyjmenovaných důvodů byly pro práci vytyčeny tři hlavní cíle:

Cíle dizertační práce

1. Charakterizovat zobrazení v difuzním prostředí vytvářené difuzním a balistickým světlem.
2. Na základě experimentu navrhnout vhodný model pro objasnění mechanismu zobrazení v difuzním prostředí.
3. Popsat koherenční vlastnosti světla v mikroskopu v závislosti na velikosti zdroje a výsledek ověřit experimentem.

Kapitola 2

Koherencí řízený holografický mikroskop

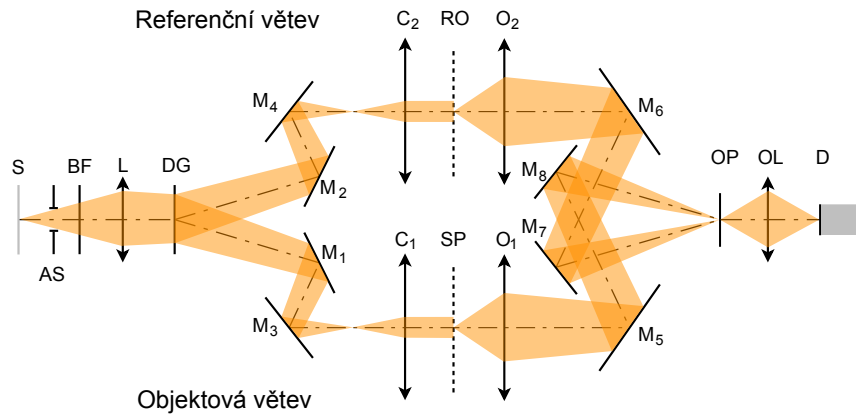
V následující kapitole je popsán princip a optické schéma 1. a 2. generace CCHM. Tyto dva typy mikroskopů jsou pro výsledek důležité, neboť jich se týkají veškeré výpočty v této práci. Taktéž všechny experimenty publikované v této práci byly pořízeny s uvedenými verzemi CCHM.

2.1 Optické schéma 1. generace CCHM

CCHM je založen na principu achromatického prostorově invariantního interferometru [27]. Schéma 1. generace CCHM je na obr. 2.1. Světlo vychází z polychromatického prostorově nekoherentního zdroje S. Časovou koherenci zdroje ovlivňujeme vložením filtru F, kterým propouštíme pouze část spektra. Prostorovou koherenci ovlivňujeme změnou velikosti clony AS přímo za zdrojem. Ze zdroje dopadá světlo na kolektor L, kterým je svazek soustředěn na difrakční mřížku DG. Jde o fázovou mřížku, která dělí svazek do dvou větví, objektové a referenční. Pro vytvoření objektového, respektive referenčního svazku je využito +1., respektive -1. difrakčního maxima. V obou větvích je svazek odkloněn oproti původnímu směru o úhel α_0 , který závisí na vlnové délce světla λ rovnicí $\sin(\alpha_0) = f_G \lambda$, kde f_G je prostorová frekvence vrypů fázové difrakční mřížky DG. Zdroj světla je zobrazen kolektorem L do předmětových ohniskových rovin kondenzorových objektivů C_1 , C_2 , čímž je zajištěno Köhlerovo osvětlení předmětové roviny Sp resp. R, kam kondenzory zobrazují difrakční mřížku DG. Předmětová rovina je pak zobrazena objektivy O_1 , O_2 do výstupní roviny OP a odtud dále pomocí výstupního objektivu OL na detektor D (CCD kamera). Svazky dopadající do výstupní roviny zde vzájemně interferují, přičemž svírají s kolmicí k výstupní rovině stejný úhel α_0 jako po průchodu mřížkou. CCHM, jak již bylo řečeno, je achromatický i prostorově invariantní. To znamená, že systém interferenčních proužků vznikající ve výstupní rovině je společný pro všechny body zdroje a všechny vlnové délky. Prostorová frekvence interferenční struktury proužků vzniklé ve výstupní rovině je $f_{OP} = 2f_G$, případně $m_{OL}2f_G$ v rovině čipu. Mřížka sama se nezobrazuje v žádné z větví zvlášť, neboť dbáme na to, abychom propouštěli v každé větvi pro každou barvu viditelného spektra pouze jeden řád. Zobrazení struktury mřížky se vytvoří pouze pozorujeme-li oběma větvemi.

Mikroskop je navržen tak, že část mezi mřížkou a objektovou rovinou je shodná s částí mezi objektovou rovinou a výstupní rovinou. To znamená, že jako kondenzory jsou zde použity stejné objektivy určené pro pozorování, navíc stejná situace je jak v referenční

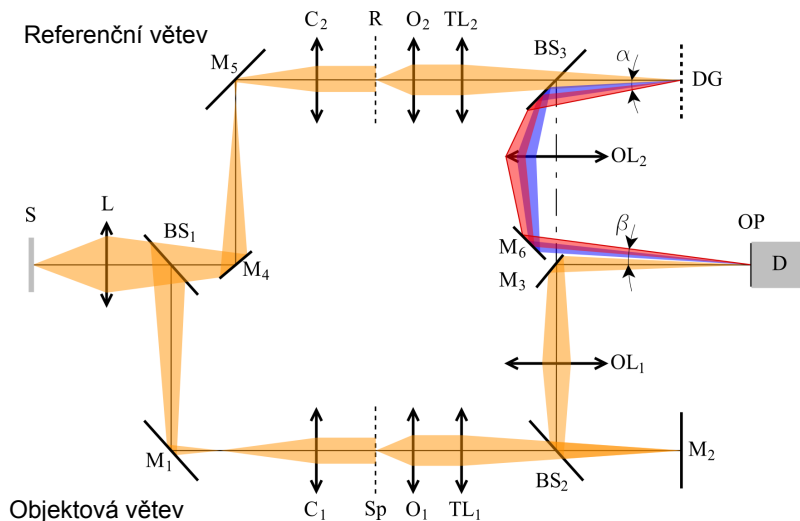
tak v objektové větvi. Chceme-li tedy pozorovat jedním vybraným objektivem, je potřeba v tomto provedení mikroskopu mít ještě tři stejné další.



Obrázek 2.1: Schéma optické soustavy CCHM 1. generace. S.. zdroj světla, AS.. aperturní clona, BF.. neutrální, interferenční filtry případně pásmové filtry, L.. kolektor, M..zrcadla, DG.. difrakční mřížka, C_1, C_2 .. kondenzorové objektivy, RO.. referenční objekt, SP.. pozorovaný vzorek, O_1, O_2 .. zobrazovací objektivy, OP.. výstupní rovina, OL.. výstupní objektiv, CCD.. CCD čip digitální kamery.

2.2 Optické schéma 2. generace CCHM

Schéma 2. generace CCHM je na obr. 2.2. Hlavním rozdílem oproti 1. generaci je výhoda použití klasických kondenzorů namísto objektivů, takže není nutné mít čtyři stejné objektivy, nýbrž stačí pouze dva.



Obrázek 2.2: Schéma optické soustavy CCHM 2. generace. S.. zdroj světla, L.. kolektor, BS.. děliče svazku, M.. zrcadla, DG.. difrakční mřížka, C_1, C_2 .. kondenzorové objektivy, R.. referenční objekt, Sp.. pozorovaný vzorek, O_1, O_2 .. zobrazovací objektivy, OP.. výstupní rovina, OL_1, OL_2 .. výstupní objektivy, D.. CCD čip digitální kamery. TL_1, TL_2 .. tubusové čočky. Převzato z [45].

Zobrazovací objektivy o jsou korigovány na nekonečnou vzdálenost, tudíž jsou doplněny i tubusovými čočkami TL. Dalším rozdílem oproti 1. generaci je fakt, že difrakční mřížka DG je uložena pouze v jedné větvi a je využíván pouze její 1. řád. Na výstupu se tedy nepotkávají +1. a -1. řád, ale 1. řád a nultý řád realizovaný vlnou jdoucí referenční větví. To způsobuje, že nosná frekvence, která se objeví ve výstupní rovině, je dvakrát nižší než v případě 1. generace $f_{OP} = m_{OL}f_G$, kde m_{OL} je zvětšení výstupních objektivů. Navíc difrakční mřížka je zde volena na odraz nikoli na průchod. Děličem světla BS_1 je dělicí kostka, zatímco ostatní děliče BS_2 a BS_3 jsou realizovány tenkými polopropustnými blankami.

2.3 Rekonstrukce obrazu z hologramu

Interferogram ve výstupní rovině CCHM je obrazovým hologramem (z angl. „image-plane hologram“, viz [46]), který dále zobrazujeme výstupním objektivem na čip CCD kamery. Tento výsledný hologram je dále počítačově zpracován fourierovskými metodami. Holografický záznam na CCD je převeden 2D rychlou Fourierovou transformací do spektra prostorových frekvencí. v tomto spektru je proveden výřez se středem v nosné frekvenci f_{OP} . Velikost okna výřezu odpovídá maximální frekvenci přenesené objektivem. Počátek souřadnic ve 2D prostoru frekvencí je přesunut do středu okna výřezu. Kvůli apodizaci se pak tento výřez násobí váhovou funkcí (Hanningova funkce).

Komplexní holografický signál se získá z takto separovaného a vynásobeného spektra inverzní Fourierovou transformací, konkrétně 2D rychlou inverzní Fourierovou transformací. Čtverec jeho modulu reprezentuje intenzitu rekonstruovaného obrazu, zatímco fáze komplexního signálu je úměrná rozdílu délek optických drah mezi objektovou a referenční větví způsobenému průchodem světla přes vzorek.

Kapitola 3

Holografický signál a vzájemná koherence v CCHM

V této kapitole se budeme zabývat popisem některých zobrazovacích vlastností CCHM. Zaměříme se zejména na vyjádření signálu, CTF (koherentní funkce přenosu) a vzájemné koherence, v této práci vyjádřené pomocí vzájemné intenzity J_{12} . Tyto funkce pro CCHM budou v rámci celé kapitoly postupně odvozeny. K tomu využijeme model vytvořený v publikacích [10, 42, 47].

3.1 Teoretický výpočet

3.1.1 Holografický signál

Pro odvození vztahu popisujícího holografický signál v CCHM vyjádříme nejprve komplexní amplitudy světla u_o a u_r v předmětové a referenční větvi ve tvaru

$$\begin{aligned} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) &= \sqrt{i(\mathbf{K})} P_C(\mathbf{K}) \times \\ &\times \iint_{-\infty}^{\infty} P(\mathbf{K}') C(\mathbf{K}, \mathbf{K}') T(\mathbf{K}' - \mathbf{K}) \exp[2\pi i \mathbf{K}' \cdot \mathbf{q}_t] d^2 \mathbf{K}_t' \end{aligned} \quad (3.1)$$

$$u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = \sqrt{i(\mathbf{K})} P_C(\mathbf{K}) P(\mathbf{K}) \exp[2\pi i \mathbf{K} \cdot \mathbf{q}_t]. \quad (3.2)$$

Vektor $\mathbf{q}_t$ značí příčnou složku polohového vektoru $\mathbf{q} = (\mathbf{q}_t, z)$ a popisuje polohu bodu ve výstupní rovině CCHM, v němž amplitudu určujeme. Pro jednoduchost uvažujeme zvětšení M mezi předmětovou a výstupní rovinou $M = 1$. Místo ve výstupní rovině popsanému polohovým vektorem $\mathbf{q}_t$ tak bude odpovídat opět $\mathbf{q}_t$ v rovině předmětové. Vektor $\mathbf{K}$ je přímo úměrný vlnovému vektoru popisujícímu vlnu v předmětovém prostoru mikroskopu a jeho velikost je rovna $|\mathbf{K}| = 1/\lambda = n/\lambda_v$, kde λ je vlnová délka osvětlení v médiu o indexu lomu n a λ_v je vlnová délka ve vakuu. $u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$, respektive $u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$ tedy lze chápat jako vyjádření amplitudy vytvořené myšleným bodovým zdrojem vyzařujícím s amplitudou $\sqrt{i(\mathbf{K})}$, který vytvoří v předmětové rovině rovinnou vlnu s vlnovým vektorem $2\pi\mathbf{K}$. Rovinná vlna s vlnovým vektorem $\mathbf{K}$ po interakci se vzorkem přejde v obecnou vlnu, kterou lze rozložit opět ve spektrum rovinných vln (podrobněji v [10, 42, 47]). Vlnové vektory těchto rovinných komponent lze vyjádřit jako $\mathbf{K}' = \mathbf{K} + \mathbf{Q}$, kde $\mathbf{Q} = (X, Y, Z)$

je vektor prostorových frekvencí vzorku. Jeho velikost označíme $|\mathbf{Q}| = Q$. Předpokládáme elastický rozptyl, tedy platí $K' = K$. Příčné složky vektorů $\mathbf{K}$, respektive $\mathbf{K}'$ značíme $\mathbf{K}_t$, respektive $\mathbf{K}'_t$ a platí $\mathbf{K} = (\mathbf{K}_t, K_z)$, respektive $\mathbf{K}' = (\mathbf{K}'_t, K'_z)$, tj. $\mathbf{K}_t = (K_x, K_y)$ a $\mathbf{K}'_t = (K'_x, K'_y)$. Výrazy $P(\mathbf{K})$, respektive $P_C(\mathbf{K})$ vyjadřují pupilovou funkci objektivu, respektive kondenzoru a jsou definovány v případě CCHM s aplanatickými objektivy (viz [47]) takto

$$P_C(\mathbf{K}) = K_z^{-1/2} K^{1/2} A_C(\mathbf{K}) \quad (3.3)$$

$$A_C(\mathbf{K}) = \begin{cases} 1 & K_t \leq \text{NA}_{\text{ill}}/\lambda_v \\ 0 & \text{v ostatních případech,} \end{cases} \quad (3.4)$$

$$P(\mathbf{K}) = K_z^{-1/2} K^{1/2} A(\mathbf{K}) \quad (3.5)$$

$$A(\mathbf{K}) = \begin{cases} 1 & K_t \leq \text{NA}_{\text{ob}}/\lambda_v \\ 0 & \text{v ostatních případech,} \end{cases} \quad (3.6)$$

kde $K_z = (K^2 - K_t^2)^{1/2}$. NA_{ill} značí numerickou aperturu osvětlovacího svazku v předmětovém prostoru před interakcí se vzorkem a NA_{ob} je numerická apertura mikroskopového objektivu. Výraz $T(\mathbf{K}' - \mathbf{K})$ je Fourierovou transformací rozptylového potenciálu $t(\mathbf{q})$ (viz [48]) a $C(\mathbf{K}, \mathbf{K}')$ představuje, dle [47], tzv. geometrický faktor, jenž nabývá konstantní hodnoty nebo jej lze pro případy s malým sklonem paprsků konstantou aproximovat, což provedeme i v této práci.

Nyní bude naším cílem vyjádřit intenzitu $i(P)$ ve výstupní rovině v bodě P. Vyjádříme ji pomocí Hopkinsova vztahu (viz [48], část 10.7) jako

$$i(P) = \iiint_{\zeta}^{\infty} |u(S, P, \nu)|^2 d\nu d\sigma, \quad (3.7)$$

kde $u(S, P, \nu)$ je amplituda v bodě P od myšleného bodového monochromatického zdroje o frekvenci ν a fázi 0 umístěného v bodě S zdroje ζ . Protože v této práci chceme vyjádřit jednotlivé prostorové i frekvenční (spektrální) složky pomocí vektoru $\mathbf{K}$, využijeme Jakobián z článku [10] (plné odvození lze nalézt například v práci [47] na str. 51). K použití tohoto Jakobiánu je nutné, aby byla pro kondenzor splněna sinová podmínka, z níž vyplývá rovnost

$$d\nu d\sigma = K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}. \quad (3.8)$$

Intenzitu ve výstupní rovině pak zapíšeme jinak, pomocí výrazů použitých ve vztahu 3.1. Namísto $u(S, P, \nu)$ použijeme zápis amplitudy ve tvaru $u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$. Intenzitu ve výstupní rovině pak můžeme psát jako:

$$i(\mathbf{q}_t) = \iiint_{-\infty}^{\infty} u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}, \quad (3.9)$$

kde

$$u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp(i\Phi) + u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp(-i\Phi). \quad (3.10)$$

Hodnota Φ vyjadřuje fázový posuv způsobený vlivem mimoosového uspořádání. Φ je lineární funkcí prostorové souřadnice kolmé ke směru interferenčních proužků. Předpokládáme, že systém mikroskopu je achromatický a prostorově invariantní, takže není závislý na proměnné $\mathbf{K}$. Intenzitu $i(\mathbf{q}_t)$ lze tedy rozepsat dosazením (3.10) do (3.9) jako

$$\begin{aligned} i(\mathbf{q}_t) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} |u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})|^2 K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K} + \iiint_{-\infty}^{\infty} |u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})|^2 K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K} + \\ &+ \exp(i2\Phi) \iiint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K} + \\ &+ \exp(-i2\Phi) \iiint_{-\infty}^{\infty} u_o^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}. \end{aligned} \quad (3.11)$$

Za signál se v holografii využívá třetí člen rozvoje (3.11) bez fázoru $\exp(i2\Phi)$, který je odstraněn během rekonstrukce. Holografický signál označíme symbolem w a vyjádříme jej jako

$$w(\mathbf{q}_t) = \iiint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}. \quad (3.12)$$

Holografický signál w lze vyjádřit (viz [42]) taktéž ve formě

$$w(\mathbf{q}_t) = \iiint_{-\infty}^{\infty} H(\mathbf{Q}) T(\mathbf{Q}) \exp(i2\pi \mathbf{Q} \cdot \mathbf{q}_t) d^3 \mathbf{Q}, \quad (3.13)$$

kde $H(\mathbf{Q})$ značí koherentní funkci přenosu (CTF), jejíž nosič (oblast prostorových frekvencí, kde je CTF nenulová) určuje, jaké prostorové frekvence objektu mohou být systémem přeneseny. Hodnota CTF vyjadřuje, s jakou vahou se daná frekvence zobrazí. CTF pro CCHM nabývá tvaru (viz [42]):

$$\begin{aligned} H(\mathbf{Q}) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} i(\mathbf{K}) |P_C(\mathbf{K})|^2 P^*(\mathbf{K}) C(\mathbf{K}, \mathbf{Q}) P(\mathbf{K} + \mathbf{Q}) \times \\ &\times \delta[K_z + Z - \sqrt{K^2 - (K_x + X)^2 - (K_y + Y)^2}] K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}. \end{aligned} \quad (3.14)$$

Tento obecný zápis lze zjednodušit v případě s aplanatickými objektivy (viz [47]) na

$$H(\mathbf{Q}) = Q^{-1} \int_K \int_F i(\mathbf{K}) K_z^{-1/2} |K_z + Z|^{-1/2} d\varphi dK, \quad (3.15)$$

kde K a F představují integrační obory definované v [10], [47]. Numerickým i analytickým výpočtům CTF pro CCHM se podrobně věnuje publikace [42] a diplomová práce [49].

3.1.2 Signál a funkce přenosu pro kvazimonochromatický zdroj

V této práci se budeme dále zabývat výhradně případy s kvazimonochromatickým osvětlením (viz [48]) s vlnovým číslem osvětlení K a budeme navíc předpokládat rovnoměrné

rozložení intenzity světla na zdroji. Těmito dvěma předpoklady se tak funkce spektrální intenzita zdroje $i(\mathbf{K})$ stává konstantou, a ztrácí tedy na významu. V dalších výpočtech ji budeme vynechávat. Předpokladem pro kvazimonochromatické osvětlení se navíc zbavíme integrace podle proměnné ν , a budeme tedy integrovat pouze přes plochu zdroje. Jakobián ze vztahu (3.8) přejde ve tvar

$$d\sigma = K^{-2}d^2\mathbf{K}_t. \quad (3.16)$$

Signál tedy dle (3.12) vyjádříme jako

$$w(\mathbf{q}_t) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2\mathbf{K}_t. \quad (3.17)$$

CTF vyjádřená původně vztahem (3.15) nabývá tvaru

$$H_M(\mathbf{Q}) = Q^{-1} \int_F K_z^{-1/2} |K_z + Z|^{-1/2} d\varphi. \quad (3.18)$$

3.2 Signál při vzájemně posunutých větvích

Způsobíme-li v předmětové větvi CCHM vzájemný posuv objektové vlny oproti referenční ve výstupní rovině o $\Delta\mathbf{q}_t$, změni se amplituda $u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$ ze vztahu (3.10). Vyjádření amplitudy při vzájemně posunutých větvích budeme odlišovat od amplitudy bez posuvu a označíme ji jako $u_\Delta(\Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t, \mathbf{K})$. Tato amplituda je rovna

$$u_\Delta(\Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_o(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp[i(\Phi + \Delta\Phi)] + u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp(-i\Phi), \quad (3.19)$$

kde $\Delta\Phi$ je fázový člen nezávislý na $\mathbf{K}$. Intenzitu při posunutých větvích $i_\Delta(\mathbf{q}_t, \Delta\mathbf{q}_t)$, která je rovna

$$i_\Delta(\mathbf{q}_t, \Delta\mathbf{q}_t) = \iint_{-\infty}^{\infty} |u_\Delta(\Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t, \mathbf{K})|^2 K^{-2} d^2\mathbf{K}_t, \quad (3.20)$$

vyjádříme dále dosazením vztahu (3.19) do (3.20) jako

$$\begin{aligned} i_\Delta(\mathbf{q}_t, \Delta\mathbf{q}_t) &= \iint_{-\infty}^{\infty} \{|u_o(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K})|^2 + |u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})|^2\} K^{-2} d^2\mathbf{K}_t \\ &+ \exp[i(2\Phi + \Delta\Phi)] \iint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2\mathbf{K}_t + \\ &+ \exp[-i(2\Phi + \Delta\Phi)] \iint_{-\infty}^{\infty} u_o^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2\mathbf{K}_t. \end{aligned} \quad (3.21)$$

Pokud do objektové větve nevložíme difuzor ani vzorek, tzn. (viz [47]), že ve vztahu (3.1) položíme $C(\mathbf{K}, \mathbf{K}')T(\mathbf{K}' - \mathbf{K}) = C(\mathbf{K}, \mathbf{m})T(\mathbf{m}) = \delta(m)\delta(n)$, potom předmětová vlna nabude tvaru popsaného výrazem:

$$u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = P_C(\mathbf{K}) \iint_{-\infty}^{\infty} P(\mathbf{K}') \delta(m) \delta(n) \exp[2\pi i \mathbf{K}' \cdot \mathbf{q}_t] d^2\mathbf{K}_t', \quad (3.22)$$

kde δ představuje Diracovu delta funkci. Po úpravě přechází výraz pro předmětovou vlnu ve tvar

$$u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = P_C(\mathbf{K})P(\mathbf{K}) \exp[2\pi i \mathbf{K} \cdot \mathbf{q}_t], \quad (3.23)$$

který odpovídá vztahu (3.2) pro referenční vlnu, což je logické. Takže můžeme psát $u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$. Obdobně jako v rovnici (3.11) je 3. člen rozvoje (3.21) bez fázového členu roven signálu. Fázový signál je odstraněn při rekonstrukci. Signál při posunutých větvích závisí pak pouze na vzájemném posunutí $\Delta \mathbf{q}_t$ a je nezávislý na absolutní poloze $\mathbf{q}_t$. Signál je vyjádřen ve tvaru

$$\begin{aligned} w_\Delta(\Delta \mathbf{q}_t) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int |P_C(\mathbf{K})|^2 |P(\mathbf{K})|^2 \exp(i2\pi \mathbf{K}_t \cdot \Delta \mathbf{q}_t) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t = \\ &= \int_{K_t \leq \text{NA}_{\text{ill}}/\lambda_v} K_z^{-2} \exp(i2\pi \mathbf{K}_t \cdot \Delta \mathbf{q}_t) d^2 \mathbf{K}_t, \end{aligned} \quad (3.24)$$

Pro nízké osvětlovací apertury NA_{ill} lze aproximovat K_z konstantou, neboť platí $|K_z| \approx |K_z + Z| \approx K$ (viz [42], kap. 6). Integrál je pak roven

$$\begin{aligned} w_\Delta(\Delta \mathbf{q}_t) &= \frac{2J_1[\nu(\Delta \mathbf{q}_t)]}{\nu(\Delta \mathbf{q}_t)} \\ \nu(\Delta \mathbf{q}_t) &= \frac{2\pi \text{NA}_{\text{ill}}}{\lambda_v} |\Delta \mathbf{q}_t| \end{aligned} \quad (3.25)$$

Symbol J_1 zde označuje Besselovu funkci 1. stupně a 1. řádu. Závislost holografického signálu na vzájemném posunutí $\Delta \mathbf{q}_t$ je tedy vyjádřena Airyho funkcí ([50], s. 52) proměnné ν , která je přímo úměrná posunutí $\Delta \mathbf{q}_t$ a numerické apertuře NA_{ill} a nepřímo úměrná vlnové délce osvětlení. Experimentální ověření výsledku (3.25) je v kapitole 3.3.

3.2.1 Vzájemná koherence

Zobrazení difuzním světlem v CCHM je závislé na koherenčních vlastnostech světla v tomto mikroskopu. Z toho důvodu zde uvedeme popis vzájemné koherence ve výstupní rovině CCHM. Omezíme se nyní na případ uvažovaný v minulé kapitole, kdy zdroj σ je kvazimonochromatický, takže vyzařuje pouze na jedné vlnové délce λ_0 a platí $|\mathbf{K}| = 1/\lambda_0$. V případě kvazimonochromatického osvětlení lze nejlépe popsat míru vzájemné koherence pomocí vzájemné intenzity $J(\mathbf{P}_1, \mathbf{P}_2)$, respektive pomocí stupně koherence $j(\mathbf{P}_1, \mathbf{P}_2)$ (viz [48, str. 578]).

$$\begin{aligned} J_{12} = J(\mathbf{P}_1, \mathbf{P}_2) &= \iint_{\zeta} u(\mathbf{P}_1, \mathbf{S}) u^*(\mathbf{P}_2, \mathbf{S}) d\sigma, \\ j_{12} = j(\mathbf{P}_1, \mathbf{P}_2) &= \frac{1}{\sqrt{I(\mathbf{P}_1)} \sqrt{I(\mathbf{P}_2)}} \iint_{\zeta} u(\mathbf{P}_1, \mathbf{S}) u^*(\mathbf{P}_2, \mathbf{S}) d\sigma. \end{aligned} \quad (3.26)$$

Význam funkcí $u(\mathbf{P}_1, \mathbf{S})$ a $u(\mathbf{P}_2, \mathbf{S})$ je stejný jako v případě (3.7). Všimněme si, že je-li $\mathbf{P}_1 = \mathbf{P}_2 \equiv \mathbf{P}$, pak funkce vzájemné intenzity je totožná s vyjádřením pro intenzitu v bodě $\mathbf{P}$ a stupeň koherence je roven jedné. Vztah pro vzájemnou intenzitu (3.26) opět označíme formalismem zavedeným na začátku této kapitoly, tedy $\mathbf{P}_1$, respektive $\mathbf{P}_2$ vyjádříme

pomocí jejich polohového vektoru ve výstupní rovině $\mathbf{q}_t$, respektive $\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t$. Vzájemnou intenzitu tedy můžeme vyjádřit takto:

$$J_{12} \equiv J(\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t) \quad (3.27)$$

a amplitudy $u(P_1, S)$, $u(P_2, S)$ zapíšeme ve tvaru:

$$u(P_1, S) = u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp(i\Phi) + u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp(-i\Phi) \quad (3.28)$$

$$\begin{aligned} u(P_2, S) &= u(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_o(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp[i(\Phi + \Delta\Phi)] + \\ &+ u_r(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) \exp[-i(\Phi + \Delta\Phi)], \end{aligned} \quad (3.29)$$

kde $\Delta\Phi$ je fázový člen nezávislý na $\mathbf{K}$. Vzájemnou intenzitu počítáme tedy dle zápisu

$$J(\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t) = \iint_{-\infty}^{\infty} u(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t. \quad (3.30)$$

Dosazením (3.28) do (3.30) pak získáváme rovnici pro vzájemnou intenzitu ve tvaru

$$\begin{aligned} J(\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t) &= \exp(-i\Delta\Phi) \iint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_o^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t + \\ &+ \exp(i\Delta\Phi) \iint_{-\infty}^{\infty} u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t + \\ &+ \exp[i(2\Phi + \Delta\Phi)] \iint_{-\infty}^{\infty} u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t + \\ &+ \exp[-i(2\Phi + \Delta\Phi)] \iint_{-\infty}^{\infty} u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_o^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t. \end{aligned} \quad (3.31)$$

První dva členy rozvoje (3.31) udávají vzájemnou intenzitu (tedy i koherenci) v jednotlivých větvích zvlášť, druhé dva členy jsou smíšené a udávají vzájemnou koherenci světla v objektové a referenční větvi.

Nyní odvodíme, jak by vypadala funkce vzájemné intenzity pro CCHM v případě, že v mikroskopu žádný vzorek není. Stejně jako v případě (3.2) je vyjádření pro objektovou vlnu shodné s vyjádřením pro referenční vlnu, takže $u_o(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$. Integrál (3.31) je až na konstantu roven

$$J(\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_r(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_r^*(\mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t. \quad (3.32)$$

Funkci vzájemné intenzity můžeme tedy zapsat jako

$$\begin{aligned} J(\mathbf{q}_t, \mathbf{q}_t + \Delta\mathbf{q}_t) &= \iint_{-\infty}^{\infty} |P_C(\mathbf{K})|^2 |P(\mathbf{K})|^2 \exp(i2\pi \mathbf{K}_t \cdot \Delta\mathbf{q}_t) K^{-2} d^2 \mathbf{K}_t \sim \\ &\sim \iint_{K_t \leq NA_{\text{ill}}/\lambda_v} K_z^{-2} \exp(i2\pi \mathbf{K}_t \cdot \Delta\mathbf{q}_t) d^2 \mathbf{K}_t. \end{aligned} \quad (3.33)$$

Výsledek pro vzájemnou intenzitu v CCHM s prázdným předmětovým polem je tedy stejný jako výsledek (3.24) pro signál v závislosti na vzájemném posunutí, což odpovídá i výsledku z publikací [42, 44]. Stejně jako v případě (3.25) jde i nyní pro nízké apertury NA_{ill} o Airyho funkci, která je navíc v případě $NA_{\text{ill}} = NA_{\text{ob}}$ shodná s funkcí popisující amplitudovou PSF mikroskopového objektivu. Z tohoto vztahu plyne výraz pro teoretickou hodnotu koherenční šířky W_c , která je rovna 1. kořenu Airyho funkce ze vztahu (3.25), tj. $W_c = 0,61\lambda/NA_{\text{ill}}$. Proto v případě plně vysvícené apertury objektivu je koherenční šířka W_c rovna bodovému rozlišení mikroskopového objektivu.

3.3 Měření vzájemné koherence

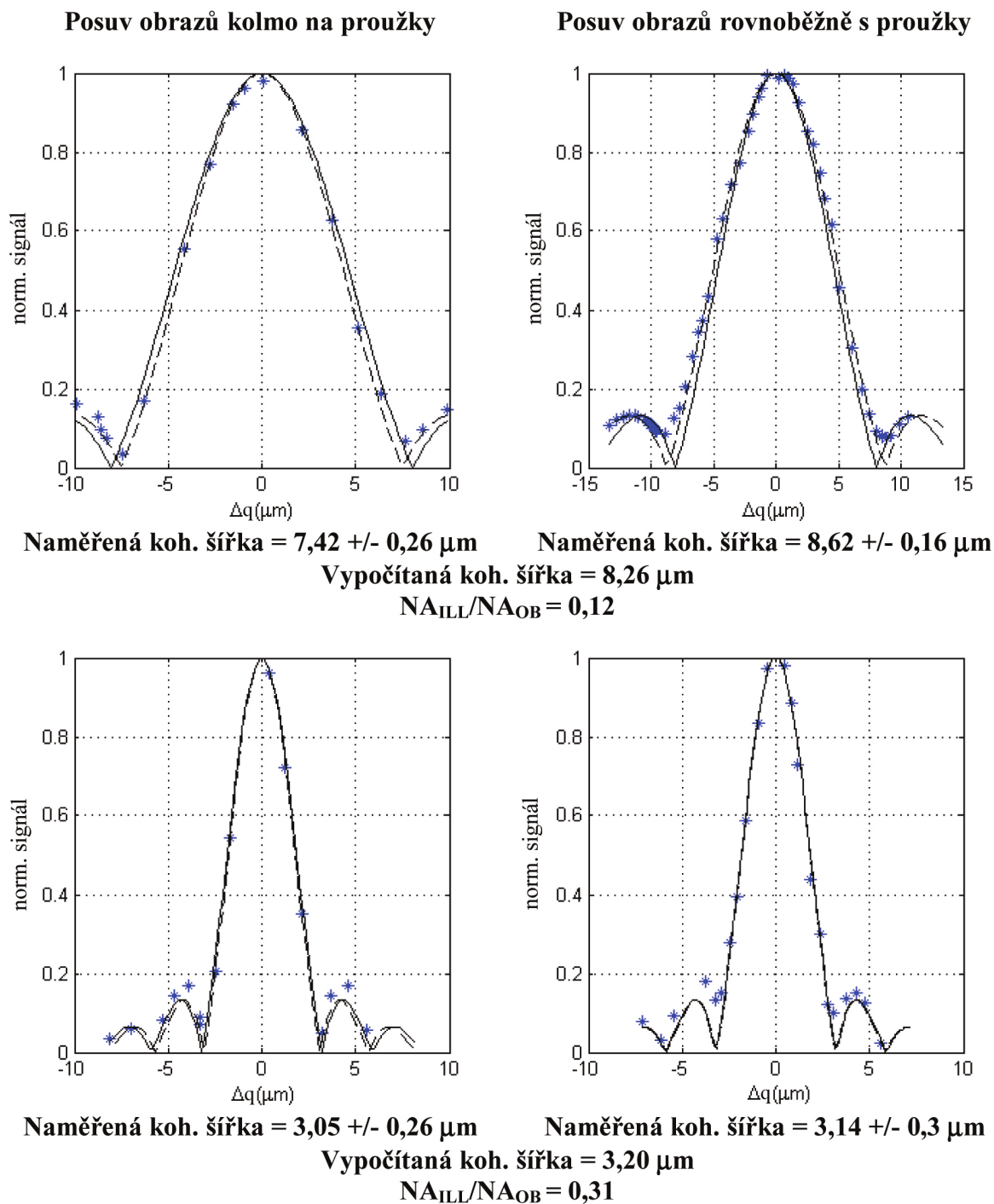
V následujícím experimentu ověříme platnost vztahu (3.25) pro průběh signálu v CCHM v závislosti na vzájemném posunutí obrazů $\Delta\mathbf{q}_t$ při zobrazování s prázdným předmětovým polem a bez difuzoru. Jelikož je tento vztah totožný se vztahem pro vzájemnou intenzitu, lze toto měření považovat za měření vzájemné koherence mikroskopu CCHM. Srovnáme takto teoretické a naměřené hodnoty koherenčních šířek pro obě generace CCHM.

3.3.1 Měření vzájemné koherence pro 1. generaci CCHM

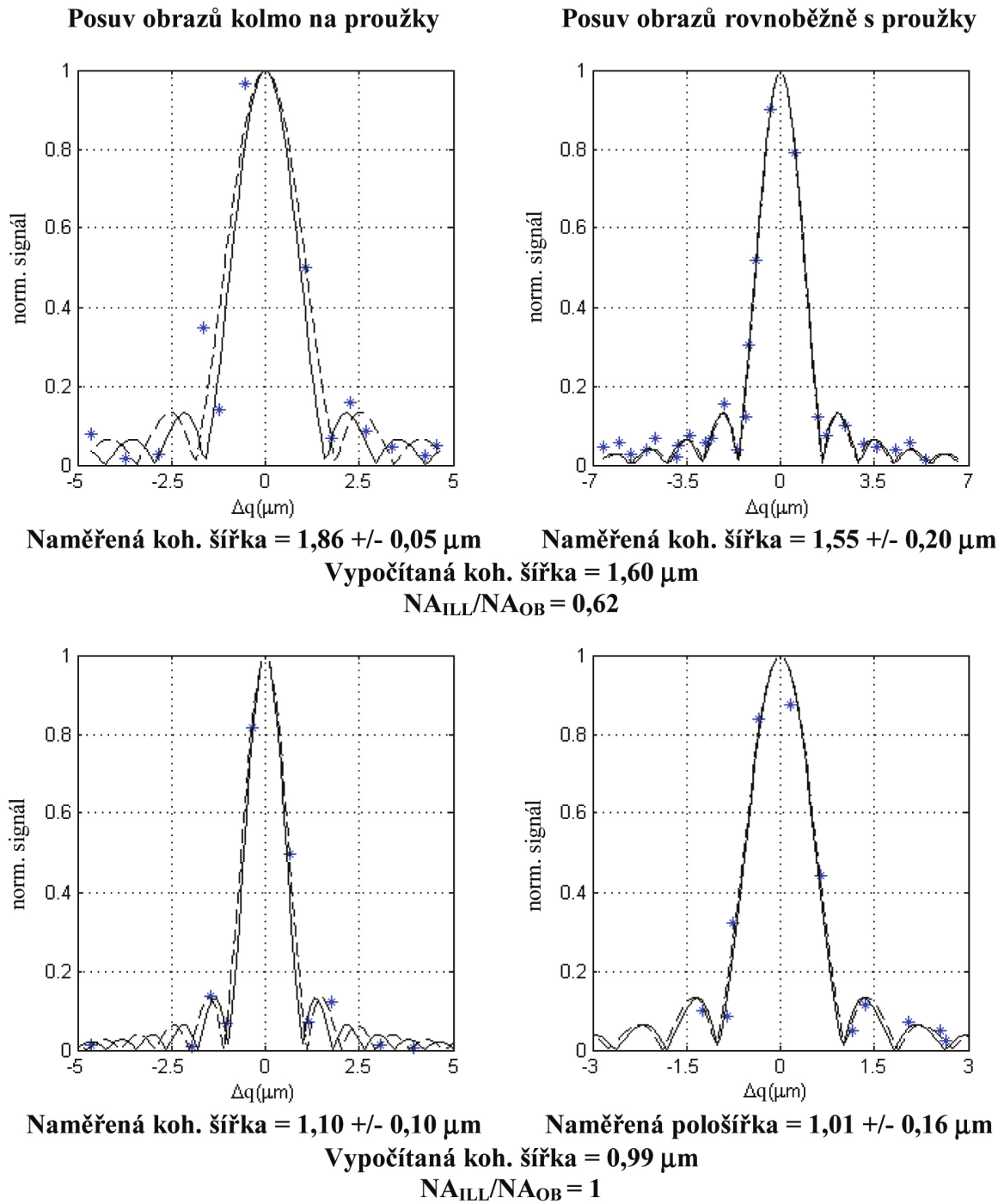
Experiment byl proveden na experimentální sestavě popsané v kapitole 2 na obr. 2.1 s kondenzorovými a zobrazovacími objektivy Lambda $20\times/NA = 0,4$. Vlnová délka osvětlení je $\lambda = 650\text{ nm}$. V grafech na obr. 3.1 a 3.2 jsou vyneseny hodnoty měřeného a teoreticky vypočítaného signálu (ze vztahu (3.25)) v závislosti na posuvu $\Delta\mathbf{q}_t$. V grafu je uvedena průměrná hodnota signálu z oblasti 3×3 pixely ležící ve středu zorného pole. Signál je navíc normován vůči maximální hodnotě, které nabývá ve střední poloze, tedy pro $\Delta\mathbf{q}_t = 0$. Experiment byl proveden pro několik velikostí zdroje, vyjádřených pomocí poměru $NA_{\text{ill}}/NA_{\text{ob}}$, kde NA_{ill} je numerická apertura osvětlovacího svazku v předmětovém prostoru a NA_{ob} je numerická apertura objektivu. Protože experiment byl prováděn s prázdným předmětovým polem, jsou indexy lomu ve vztazích pro numerické apertury rovny $n = 1$. $NA_{\text{ill}}/NA_{\text{ob}}$ udává poměr průměru obrazu zdroje v místě výstupní pupily objektivu ke skutečnému průměru této pupily. Posuvy $\Delta\mathbf{q}_t$ jsou provedeny kolmo i rovnoběžně se směrem proužků, a to náklonem zrcadla M_5 v objektové větvi (viz obr. 2.1). Posuvy jsme provedli kolmo i rovnoběžně se směrem proužků z důvodu asymetrie sestavy.

Výsledky experimentu, uvedené v obrázcích 3.1 a 3.2, ukazují velmi přesnou shodu s předpovězenou teoretickou závislostí ze vztahu (3.25). Relativní odchylka naměřených koherenčních šířek W_c od vypočítaných se neliší o více než 15%, většinou se však pohybuje pod 5%. Průběhy všech naměřených závislostí velmi dobře odpovídají závislostem vypočítaným.

Důležité je, že naměřené grafy nevyjadřují pouze závislosti průběhu signálu na vzájemném posunutí obrazů, nýbrž i vzájemnou koherenci ve výstupní rovině CCHM (viz poznámka pod vztahem (3.33)).



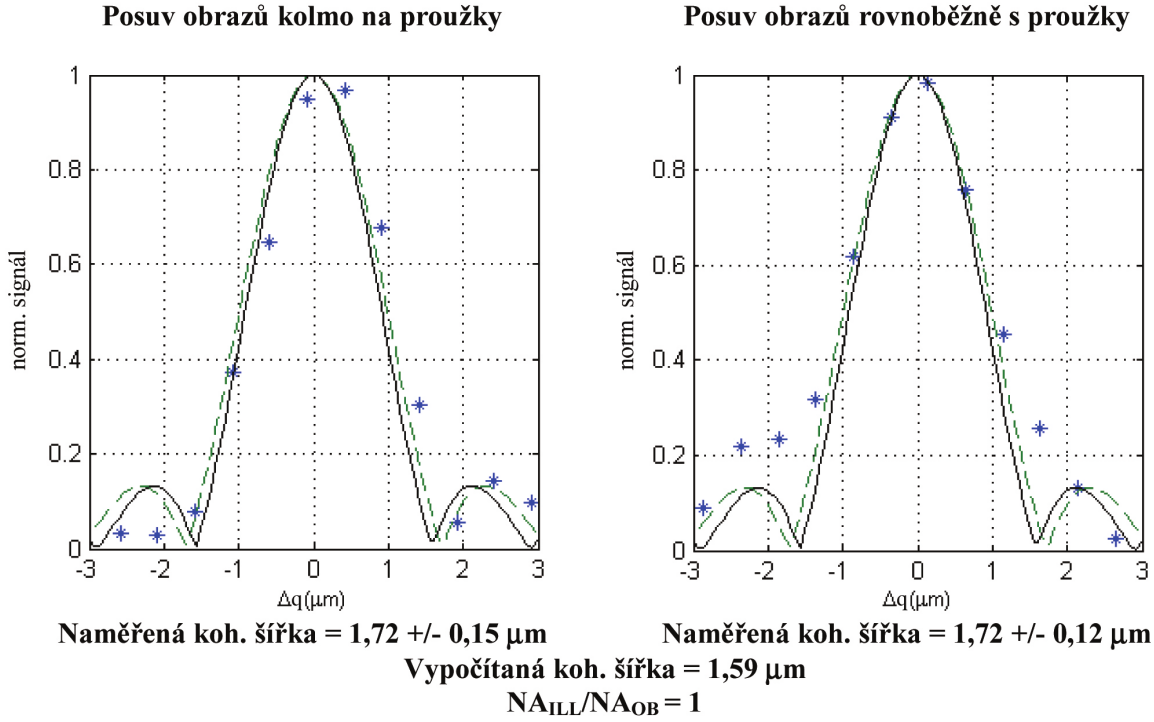
Obrázek 3.1: Průběh normovaného holografického signálu v 1. generaci CCHM v závislosti na vzájemném posuvu Δq_t , tj. zároveň průběh funkce vzájemné intenzity. Pro experiment byly použity objektivy s numerickou aperturou $NA_{ob} = 0,4$, v horním řádku $NA_{ill} = 0,05$, tj. $NA_{ill}/NA_{ob} = 0,12$ a v dolním řádku $NA_{ill} = 0,12$, tj. $NA_{ill}/NA_{ob} = 0,31$. *... naměřená data, - - -... fitovaná křivka, —... teoretický výpočet ze vztahu (3.25).



Obrázek 3.2: Průběh normovaného holografického signálu v 1. generaci CCHM v závislosti na vzájemném posuvu Δq_t , tj. zároveň průběh funkce vzájemné intenzity. Pro experiment byly použity objektivy s numerickou aperturou $NA_{\text{ob}} = 0,4$. v horním řádku $NA_{\text{ill}} = 0,25$, tj. $NA_{\text{ill}}/NA_{\text{ob}} = 0,62$ a v dolním řádku $NA_{\text{ill}} = 0,4$, tj. $NA_{\text{ill}}/NA_{\text{ob}} = 1,00$. *... naměřená data, - - -... fitovaná křivka, —... teoretický výpočet ze vztahu (3.25).

3.3.2 Měření vzájemné koherence pro 2. generaci CCHM

V případě měření vzájemné koherence 2. generace CCHM již uvádíme pouze měření pro plně vysvícenou aperturu objektivů, tj. kdy $NA_{ill} = NA_{ob}$. Experiment byl proveden s kondenzory Nikon s numerickou aperturou 0,52 a objektivy Nikon $10\times/0,25$. Vlnová délka osvětlení $\lambda = 650$ nm. Vzájemný posuv byl narozdíl od experimentu s 1. generací CCHM proveden laterálním posuvem objektivu v referenční větvi. Teoretické hodnoty koherenčních šířek se liší o méně než 10% oproti naměřeným, což je vidět z grafu na obr. 3.3.



Obrázek 3.3: Průběh normovaného holografického signálu v 2. generaci CCHM v závislosti na vzájemném posuvu Δq_t , tj. zároveň průběh funkce vzájemné intenzity. Pro experiment byly použity objektivy s numerickou aperturou $NA_{ob} = 0,25$. Numerická apertura osvětlovacího svazku $NA_{ill} = 0,25$, tj. $NA_{ill}/NA_{ob} = 1$. *... naměřená data, - - - - - fitovaná křivka, —... teoretický výpočet ze vztahu (3.25).

3.3.3 Závěr k měření vzájemné koherence

Z naměřených výsledků funkce vzájemné intenzity, kterou jsme získali měřením závislosti holografického signálu v CCHM na vzájemném posunutí Δq_t , jsme získali hodnotu koherenční šířky W_c . Potvrdili jsme, že koherenční šířka W_c v CCHM při plném vysvícení pupily objektivu, tj. $NA_{ill} = NA_{ob}$, je přibližně rovna bodovému rozlišení mikroskopu $0,61\lambda/NA_{ob}$. Navíc u první generace mikroskopu jsme zjistili, že naměřené a předpovězené hodnoty koherenční šířky si odpovídají, a to pro všechny rozsahy prostorové koherence. Od nejvíce až po nejméně prostorově koherentní nastavení mikroskopu, což bylo v experimentu provedeno změnou průměru aperturní clony od $NA_{ill} = 0,12NA_{ob}$ až po plně vysvícenou pupilu objektivu $NA_{ill} = NA_{ob}$.

Kapitola 4

Difuzní zobrazování v CCHM

V této kapitole se věnujeme názornému popisu zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí pomocí geometrického modelu a demonstrujeme výsledky experimentů zobrazení přes difuzní prostředí v CCHM.

4.1 Princip zobrazování v CCHM přes difuzní prostředí

K vysvětlení principu zobrazení přes difuzní prostředí využijeme model CCHM zakreslený na obr. 4.1(a). Model spočívá v nahrazení skutečného zdroje S (obr. 2.1 a 2.2), který zajišťuje v CCHM Köhlerovo osvětlení, virtuálními zdroji IS_1 , IS_2 světla umístěnými v předmětové rovině kondenzorů C_1 , C_2 .

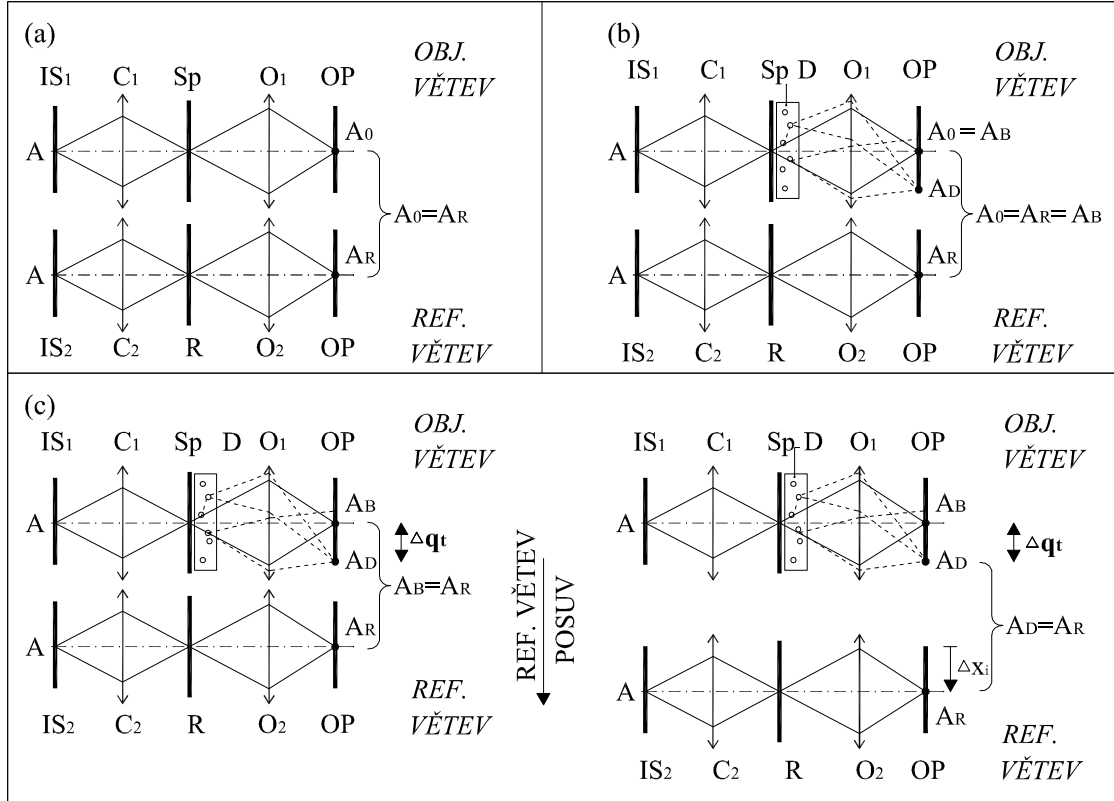
Oprávněnost tohoto modelu je odvozena z Van-Cittert Zernikeova teorému [48], který říká, že posuzujeme-li zobrazení z hlediska zdroje, tedy když předmětem je zdroj, pak je-li výstupní pupila zobrazení zdroje osvětlena efektivně nekoherentně, lze tuto pupilu považovat za nový zdroj světla, který má stejné rozložení intenzity světla, velikost i tvar jako osvětlená část této pupily.

To, zda je pupila osvětlena efektivně nekoherentně (v našem případě budeme brát za pupilu rovinu konjugovanou s předmětovou rovinou Sp , resp. R), lze posoudit více způsoby. V [48] je uvedeno, že osvětlení pupily lze považovat za efektivně nekoherentní, pokud velikost obrazu zdroje je mnohonásobně větší, než je difrakční stopa vytvořená v místě této pupily. Rozbor na tomto základě je pro 1. generaci CCHM proveden v bakalářské práci [51]. Dobrým kritériem pro posouzení efektivní nekoherence je však také porovnání koherenční šířky osvětlení W_c v předmětové rovině Sp , resp. R s rozlišovací schopností zobrazovacího objektivu. Pokud totiž obě hodnoty budou srovnatelné, pak lze říci, že z hlediska zobrazení tímto objektivem je v podstatě každý zobrazovaný bod vzájemně nekoherentní s libovolným jiným bodem předmětové roviny. Čím větší ovšem bude koherenční šířka W_c v porovnání s rozlišením mikroskopového objektivu, tím více koherentní bude osvětlení.

Jak je odvozeno v závěru části 3.2.1, koherenční šířka je úzce spjata s rozlišením objektivu. Pokud velikost osvětlovacího zdroje bude natolik velká, že jeho geometrický obraz vyplní celou pupilu objektivu, pak koherenční šířka v předmětové rovině je v podstatě rovna bodovému rozlišení mikroskopového objektivu. Pokud zvolíme natolik velký (prostorově nekoherentní) zdroj, lze říci, že osvětlení předmětu je efektivně nekoherentní.

Ve zjednodušeném modelu CCHM na obr. 4.1 je mikroskop zakreslen s oběma větvemi odděleně, jakoby každá měla svůj zdroj světla IS_1 , resp. IS_2 a vlastní výstupní rovinu OP . Důvodem, proč je zakreslen mikroskop CCHM ve formě modelu na obr. 4.1(a), je fakt,

že z něj lze snadněji pochopit mechanismus koherenční brány v CCHM při zobrazení přes difuzní prostředí balistickým i difuzním světlem. Princip filtrace balistického světla v CCHM (obr. 4.1(b)) koherenční bránou totiž velmi připomíná případ filtrace pomocí „pinhole“ v konfokální mikroskopii s duálním rastrováním. Tato analogie byla potvrzena i výpočtem v publikacích [47], respektive [8], kde jsou srovnány koherentní funkce přenosu (CTF), respektive PSF obou mikroskopů (konfokálního i interferenčního). Analogií s principem filtrace v KM lze však vysvětlit i princip zobrazení v CCHM difuzním světlem (obr. 4.1(c)).



Obrázek 4.1: Zjednodušené schéma CCHM pro vysvětlení principu zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí balistickým a difuzním světlem. IS_1 , IS_2 ...virtuální zdroje umístěné v předměťových rovinách kondenzorů C_1 , C_2 . Sp , R ...předmětové roviny mikroskopových objektivů O_1 , O_2 . D ...difuzor. A_O , A_R ...obrazy bodu a ve výstupní rovině OP . A_B ...balistický obraz bodu A . A_D ...difuzní obraz bodu A . Čárkovaná čára...rozptýlené (difuzní) světlo, plná čára...nerozptýlené (balistické) světlo. a) Zobrazení bez difuzoru. b) Zobrazení s difuzorem balistickým světlem $\Delta q_t = 0$. c) Zobrazení s difuzorem difuzním světlem, referenční větev posunuta ve výstupní rovině o Δq_t .

4.1.1 Princip zobrazování v CCHM balistickým světlem

Na základě úvah z předchozí části 4.1 předpokládáme, že zdroje IS_1 a IS_2 jsou zcela prostorově nekoherentní, to znamená, že pro libovolný bod A zdroje IS_1 , resp. IS_2 platí, že světlo vycházející z tohoto bodu A je vzájemně zcela nekoherentní se světlem vycházejícím z kteréhokoli jiného bodu než A zdroje IS_1 , resp. IS_2 . To samé platí i o zdrojích IS_1 a IS_2 vzájemně, neboť pocházejí ze stejného společného zdroje. Znamená to tedy, že každý libovolný bod A zdroje IS_1 je vzájemně koherentní pouze s odpovídajícím si bodem A zdroje IS_2 a vzájemně nekoherentní s jakýmkoli jiným bodem.

Uvažujeme-li, že v předmětové větvi není umístěn difuzor (obr. 4.1(a)) a vzorek rozptyluje světlo pouze jednou, a to jen v předmětové rovině Sp , pak veškeré světlo vycházející v předmětové větvi z bodu A a propuštěné vzorkem dopadá do svého geometrického obrazu A_O ve výstupní rovině OP . V referenční větvi všechno světlo vycházející z odpovídajícího bodu A zdroje IS_2 dopadá do svého geometrického obrazu A_R ve výstupní rovině. Je-li mikroskop v běžném nastavení, pak A_O a A_R jsou v koincidenci. Tedy v bodě $A_O = A_R$ výstupní roviny všechno světlo vycházející z bodu A zdroje IS_1 v předmětové větvi, které není absorbováno vzorkem, interferuje se světlem z referenční větve vycházejícím z odpovídajícího bodu A zdroje IS_2 . To platí pro každý další bod zdroje, tudíž všechno světlo prošlé vzorkem vytváří na výstupu holografický signál.

Vložíme-li ovšem do objektové větve difuzor (obr. 4.1(b)), pak pouze část světla vycházejícího z bodu A v IS_1 se dostane do bodu A_O . Toto světlo nazveme balistickým, a proto označíme jeho místo dopadu ve výstupní rovině symbolem A_B . V běžném nastavení mikroskopu je A_B v koincidenci s A_R a na výstupu bude tedy interferovat pouze balistické světlo. Zbytek je světlo rozptýlené neboli difuzní, které se nepodílí na vytvoření signálu. Namísto mechanické filtrace pomocí „pinhole“ používanou v KM, je v CCHM bod A_R , který má v případě modelu nulovou šířku, ovšem reálně je jeho rozměr roven koherenční šířce W_c . Tento mechanismus filtrace balistického světla se nazývá koherenční bránou.

4.1.2 Princip zobrazování v CCHM difuzním světlem

Na rozdíl od konfokálního mikroskopu, kde je světlo odchýlené od původního směru blokováno, aby neprošlo na detektor, je v CCHM difuzní světlo zachyceno na CCD čip. Díky tzv. koherenční bráně však přispívá pouze k vytvoření pozadí a neinterferuje, tj. nevytváří holografický signál. Uvažujeme libovolný bod výstupní roviny (jiný než A_B), který je osvětlen difuzním světlem vycházejícím z bodu A , a nazveme jej A_D (viz obr. 4.1), tedy difuzní obraz bodu A . Vektor posunu z bodu A_B do bodu A_D označme $\Delta \mathbf{q}_t$. Pokud vychýlením referenční větve posuneme obraz v referenční větvi o vzdálenost $\Delta \mathbf{q}_t$, kdy A_R ztotožníme s A_D , pak pouze ta část objektového svazku vycházejícího z bodu A zdroje IS_1 , která dopadá do A_D , může interferovat se světlem z referenční větve. Změnou směru a velikosti $\Delta \mathbf{q}_t$ můžeme rozhodnout, který difuzní obraz A_D pro zobrazení vybereme. Protože tento mechanismus je platný pro všechny body A zdrojů IS_1 , IS_2 , bude při každém posuvu $\Delta \mathbf{q}_t$ vytvořen difuzní obraz celého objektu.

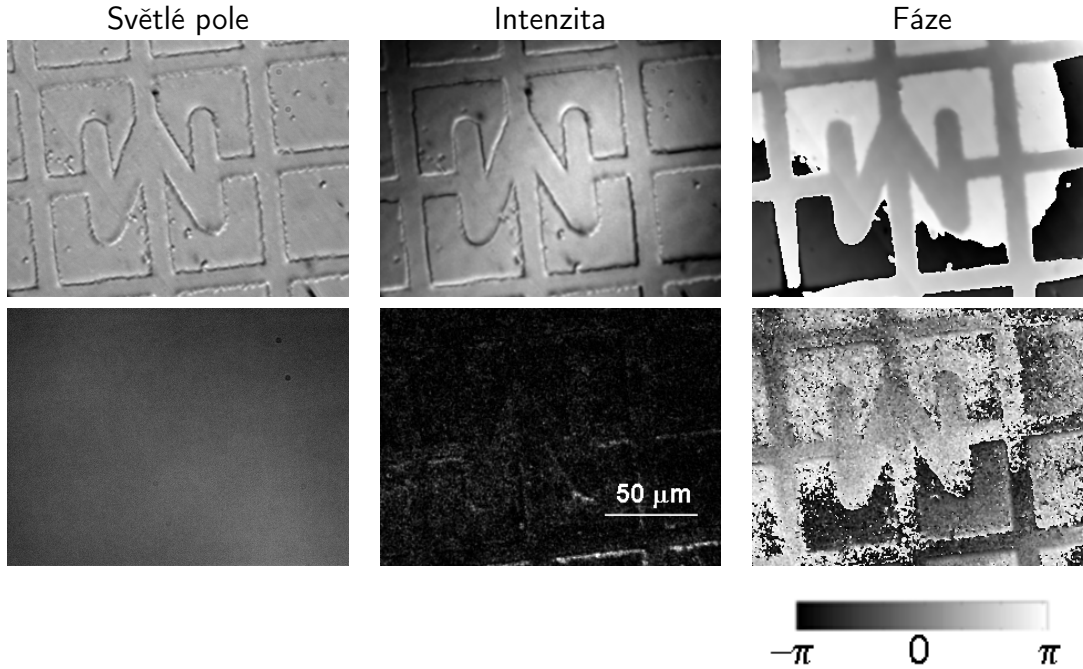
4.2 Experiment - ověření schopnosti CCHM zobrazovat přes difuzní prostředí

V následující části uvedeme experimentální ověření schopnosti mikroskopu zobrazovat v CCHM v difuzním prostředí jak světlem balistickým, tak difuzním. Měření probíhalo na mikroskopu CCHM 1. generace. V experimentech byly použity nejprve objektivy i kondenzory Lambda 10 $\times$ /NA=0,25 v experimentu z části 4.2.1 a 4.2.2. V dalším experimentu v části 4.2.3 jsme použili objektivy i kondenzory Lambda 20 $\times$ /NA=0,4. Jako vzorek je použito krycí sklíčko CELLocate o tloušťce 170 μm s vyleptaným reliéfem hloubky cca 360 nm. Sklíčko CELLocate je určeno pro detekci polohy buněk v zorném poli mikroskopu. Jako difuzor jsme aplikovali oboustranně zmatněné krycí sklíčko o tloušťce (150 ± 20) μm . Difuzor byl vložen 3 mm za vzorek směrem k objektivu. Zdrojem světla byla halogenová lampa s použitím interferenčního filtru propuštějícího na vlnové délce 650 nm s pološířkou 10 nm, velikost zdroje je clonou upravena tak, aby obraz zdroje zcela vyplnil vstupní pupilu

kondenzoru. Záznam byl proveden pomocí digitální kamery Softhard Technology Astropix 1.4 (černobílá, velikost čipu $1376 \text{ pixelů} \times 1038 \text{ pixelů}$, velikost pixelu $6,45 \mu\text{m} \times 6,45 \mu\text{m}$, 12 snímků za sekundu, 12 bitů, chlazená Peltierovým článkem). Vzájemný posuv větví byl proveden natáčením zrcátka M_6 , respektive M_5 v referenční, respektive předmětové větvi (označeno na obr. 2.1). Snímky ve světlém poli vznikly snímáním vzorku pouze objektovou větví, tedy jako v klasickém mikroskopu.

4.2.1 Zobrazování balistickým světlem

V této části budeme demonstrovat schopnost CCHM v režimu nízké prostorové koherence zobrazovat přes difuzor světlem balistickým. Nejprve byl experiment proveden bez a posléze s difuzorem (viz obr. 4.2). Konfigurace referenční a objektové větve je stejná jako na obr. 4.1, kde $A_B = A_R$. Znamená to tedy, že posun $\Delta \mathbf{q}_t = \mathbf{0}$. Protože sklíčko CELLO-



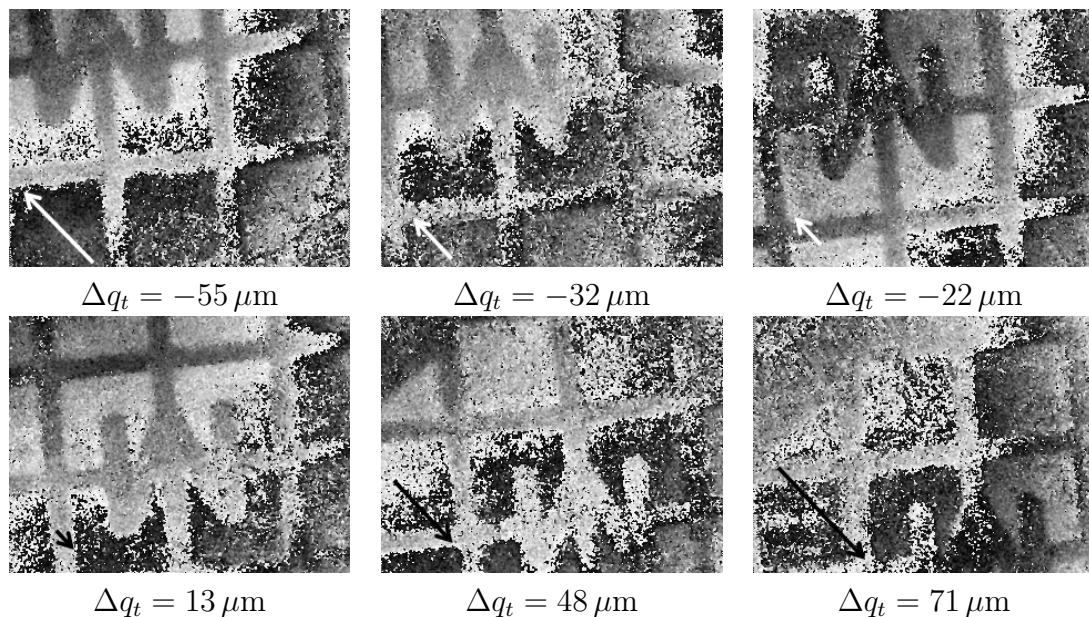
Obrázek 4.2: Zobrazování balistickým světlem. Horní řádek reprezentuje zobrazení bez difuzoru, dolní řádek zobrazení s difuzorem. V prvním sloupci jsou obrázky pořízené pouze objektovou větví, referenční větev byla blokována, což tedy odpovídá zobrazení v klasickém mikroskopu ve světlém poli. Druhý a třetí sloupec ukazují zobrazení v holografickém módu mikroskopu. V druhém sloupci je zobrazena absolutní hodnota signálu w a v posledním sloupci jeho fáze.

cate je fázový objekt, obraz rekonstruované fáze je mnohem kontrastnější než intenzitní. V případě bez difuzoru dostáváme ostrý obraz jak v intenzitě, tak ve fázi.

Pro názornou demonstraci toho, jak by daný difuzor znehodnotil obraz v klasickém mikroskopu, jsou v prvním sloupci obr. 4.2 uvedeny snímky ve světlém poli. Zatímco zobrazení bez difuzoru poskytuje klasický mikroskopický snímek vzorku, v případě s difuzorem je struktura vzorku při zobrazení ve světlém poli již zcela neviditelná, přesto však z rekonstruovaného hologramu dostáváme obraz intenzity a fáze jako v případě s difuzorem, tak bez něj. Snímky z obr. 4.2 tedy potvrzují schopnost zobrazovat vzorek přes difuzní prostředí balistickým světlem v CCHM díky efektu koherenční brány.

4.2.2 Zobrazování difuzním světlem - posuv obrazu v referenční větvi

Abychom prokázali schopnost CCHM v režimu nízké prostorové koherence zobrazovat i světlem difuzním, provedli jsme pozorování tak, jak to odpovídá náčrtku na obr. 4.1(b). Uskutečnili jsme nejprve sadu experimentů, kde vzorkem je sklíčko CELLocate překryté difuzorem. Postupně jsme přitom zvyšovali velikost vektoru $\Delta \mathbf{q}_t$ ve směru podél interferenčních proužků. Ačkoli jsme natáčeli zrcátkem ve větvi referenční, ve výsledku se posuv



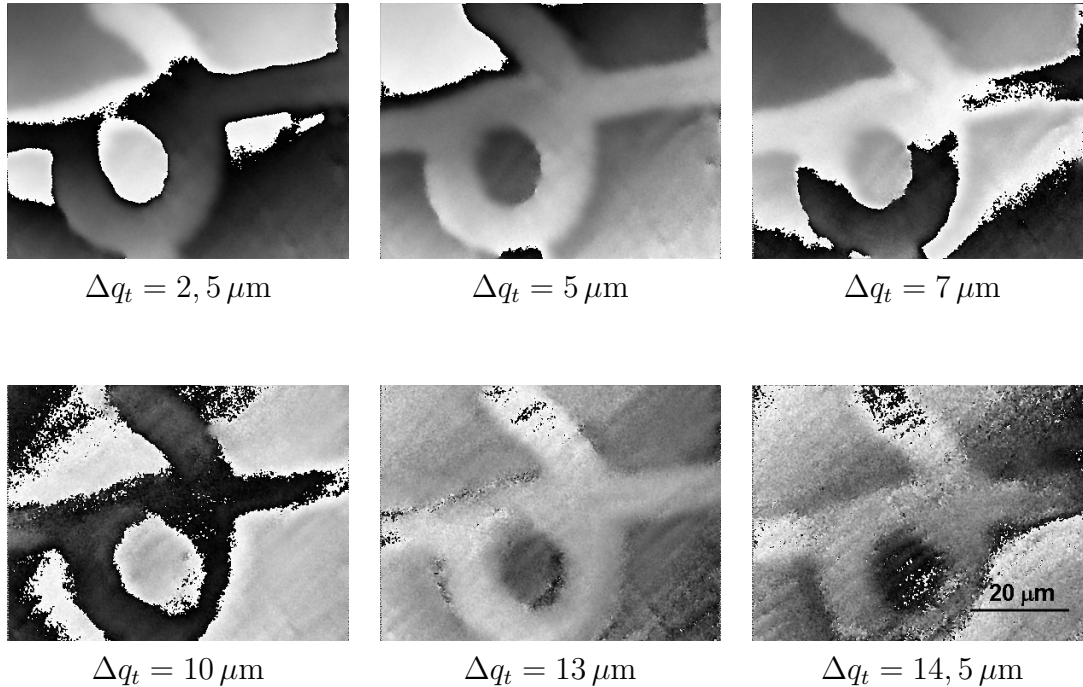
Obrázek 4.3: Snímky rekonstruované fáze vzniklé difuzním světlem při natáčení zrcátka v referenční větvi 1. generace CCHM. Jsou zde uvedeny snímky pro jednotlivé posuny $\Delta \mathbf{q}_t$ ve směru podél proužků.

projeví příčným posuvem obrazu v zorném poli taktéž o $\Delta \mathbf{q}_t$, měřeno souřadnicemi v předmětové rovině. Na obrázku 4.3 jsou uvedeny snímky rekonstruované nenavázané fáze pro různé posuny $\Delta \mathbf{q}_t$ podél směru interferenčních proužků. Je patrné, že fázové snímky lze zrekonstruovat i při vzájemném posunutí obrazů o $71 \mu\text{m}$, což několikanásobně převyšuje hodnotu koherenční šířky pro daný objektiv $W_c = 1,6 \mu\text{m}$. V případě bez difuzoru totiž interference mizí při vzdálenosti $\Delta q_t > W_c$ velmi rychle. Slabý signál je možné naměřit i pro hodnoty vyšší než je koherenční šířka, ovšem ne pro vzdálenost asi čtyřicetkrát vyšší. V uvedeném případě se již podílí na vytváření signálu výhradně světlo difuzní. Tímto experimentem je tedy potvrzena schopnost mikroskopu zobrazovat difuzním světlem.

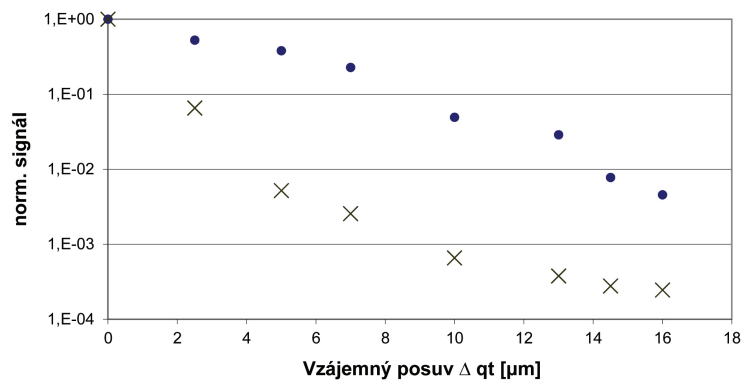
4.2.3 Zobrazování difuzním světlem - posuv obrazu v objektové větvi

V této části uvádíme pozorování v 1. generaci CCHM s difuzorem při natáčení zrcátkem v objektové větvi. Jak si lze všimnout na obrázku 4.4, během natáčení zrcátkem v objektové větvi se poloha obrazu v zorném poli až do $\Delta q_t = 7 \mu\text{m}$ nijak nemění, což lze vyvodit z geometrického modelu v části 4.1.2. Při posuvu Δq_t nad $7 \mu\text{m}$ dojde k viditelnému skoku, který nejspíše vzniká díky vedlejším maximům funkce vzájemné intenzity. Zvyšující se posuv Δq_t se nejvíce projevuje snižujícím se poměrem signálu vůči šumu projevujícím se degradací kvality snímků fáze.

Koherenční šířka je pro objektiv $20\times$ rovna $W_c = 1,1 \mu\text{m}$, vypočteno ze vztahu (3.25), měřeno vzhledem k souřadnicím předmětové roviny. Zřetelný fázový obraz vzorku lze však rekonstruovat i pro $\Delta q_t = 14,5 \mu\text{m}$, čímž dokazujeme, že i v případě naklápění zrcátkem v objektové větvi jsme schopni v CCHM zobrazovat difuzním světlem.



Obrázek 4.4: Zobrazení difuzním světlem ve fázi pro různé posuvy způsobené naklápěním zrcadla v objektové větvi



Obrázek 4.5: Grafy poklesu normovaného holografického signálu v závislosti na vzájemném posuvu Δq_t pro případ bez difuzoru(×) a s difuzorem (●) při zobrazování vzorku CELLocate.

V dalším textu je uvedeno kvantitativní srovnání poklesu měřené střední hodnoty signálu z celého zorného pole, již budeme nazývat dále normovaný signál, v závislosti na vzájemném posuvu Δq_t . V grafu na obr. 4.5 jsou uvedena srovnání poklesu normovaného signálu pro dva různé případy. V případě označeném „●“ je uveden pokles pro pozorování uvedené v obr. 4.4, tedy s difuzorem. V druhém případě, označeném „×“, je provedeno pozorování na stejném vzorku, ovšem bez difuzoru. Odtud je patrné, že pokles normovaného signálu je pro případ bez difuzoru daleko rychlejší. Konkrétně, zatímco v případě bez difuzoru poklesne normovaný signál při $\Delta q_t = 5 \mu\text{m}$ o více než 90 procent, v případě

s difuzorem při stejné hodnotě Δq_t poklesne signál pouze o třicet procent. Pokles o 90 procent nastává v případě s difuzorem až při posuvu $\Delta q_t \doteq 15 \mu\text{m}$, což je posuv cca třikrát vyšší než v případě bez difuzoru.

V publikaci [38] je možné nalézt srovnání rekonstruovaných fázových snímků vzorku CELLocate v CCHM pro posuvy větví vytvořené bez difuzoru a s difuzorem.

Kapitola 5

PSF pro zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí

5.1 Zobrazení difuzním světlem

Při zobrazování přes difuzor jsme při vzájemném posouvání obrazů zjistili, že signál klesá v závislosti na vzájemném posuvu daleko pomaleji než v případě pozorování bez difuzoru. Kvantitativní srovnání je v kapitole 4, na obr. 4.5. Z něj vyplývá, že vzájemné posunutí obrazů potřebné pro pokles signálu z maxima na 10 procent z maximální hodnoty, je s difuzorem zhruba třikrát vyšší než bez difuzoru. Tento poznatek nás přivedl k modelu zobrazení difuzním světlem, jehož princip je názorně vysvětlen taktéž v kapitole 4 včetně potvrzujících experimentů. Uvažujeme přitom, že o difuzní světlo se jedná tehdy, jsou-li vzájemná posunutí obrazů ve výstupní rovině větší, než je koherenční šířka W_C tamtéž. To znamená, že posuneme obrazy v mikroskopu bez difuzoru vzájemně natolik, že světlo dopadající do výstupní roviny přes objektovou větev již není vzájemně koherentní se světlem dopadajícím do téhož bodu z větve referenční. Srovnání poklesu signálu v závislosti na vzájemném posunutí větví je součástí kapitoly 3.3.

5.1.1 Komplexní amplituda v objektové větvi

K odvození PSF v difuzním světle a přes difuzní prostředí provedeme nejprve zjednodušenou 2D analýzu. Jednak je tento přístup názorný, navíc jej lze snadněji interpretovat výsledky, které získáme následným numerickým modelem (část 5.1.6). V případě 3D modelu mikroskopu je numerický výpočet pro běžně dostupnou výpočetní techniku příliš náročný.

Aproximujeme tedy nyní mikroskop 2D modelem. Souřadnice y tímto zmizí, a zdroj, objekt, difuzor i výstupní rovina se stanou úsečkami. Označení „rovina“ ovšem ponecháme, abychom nemuseli zavádět nové názvosloví. Vektor $\mathbf{K}$ bude mít tedy pouze dvě složky $\mathbf{K} = (K_x, K_y)$ a signál nabyde tvaru

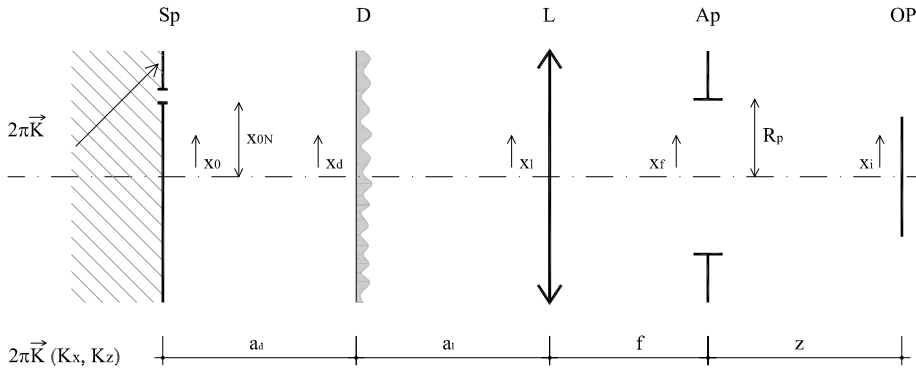
$$w(x_i) = \int_{-NA_{\text{ill}}/\lambda}^{NA_{\text{ill}}/\lambda} u_o(x_i, K_x) u_r^*(x_i, K_x) dK_x. \quad (5.1)$$

Z tvaru pro výpočet signálu (3.12) vyplývá, že pro výpočet PSF celého mikroskopu je nejprve nutné vyjádřit tvar objektové vlny v případě, kdy v objektové větvi bude

předmětem bodový otvor. Proto nejprve provedeme samostatně analýzu objektové větve, a to paraxiálně. Jsme si přitom vědomi toho, že i neparaxiální model je možný, ovšem to by již přesáhlo účel této práce. Paraxiální model navíc poskytuje jednoduchý, ovšem stále postačující a srozumitelný náhled do této problematiky. Výpočet jsme provedli za pomoci zjednodušeného schématu objektové větve zakresleného na obr. 5.1. Objektiv je aproximován tenkou čočkou L s funkcí propustnosti $t_l(x_l)$, která byla odvozena například v [52].

Numerická apertura objektivu je dána poloměrem R_p aperturní clony Ap. Tuto aperturní clonu jsme umístili do obrazové ohniskové roviny objektivu, neboť předpokládáme telecentrický chod paprsků objektivem.

Sférická vlna je emitována bodovým zdrojem a s pomocí kondenzorové a kolektorové čočky je transformována - kolimována - do rovinné vlny mající v objektovém prostoru vlnový vektor $2\pi\mathbf{K}$. Tato rovinná vlna prochází přes vzorek (rovinný) s funkcí propustnosti $t_0(x_0)$ ležící v předmětové rovině Sp. Bezprostředně za vzorkem je komplexní amplituda této vlny popsána funkcí $u_0(x_0)$, viz vztah (5.2). Tato vlna je poté rozptýlena na rovinném difuzoru s funkcí propustnosti $t_d(x_d)$. Funkce $t_d(x_d)$ je náhodná čistě fázová funkce, která je definovaná v části 5.1.6. Vliv objektivu L a jeho apertury R_p je vyjádřen funkcí propustnosti $t_l(x_l)$, resp. $t_f(x_f)$.



Obrázek 5.1: Zjednodušené schéma objektové větve pro výpočet amplitudy ve výstupní rovině při zobrazování rovinného objektu umístěného v předmětové rovině mikroskopu Sp. v tomto obrázku je předmětem bodová clonka umístěná na souřadnici $x_0 = x_{0N}$. D...difuzor, L...tenká čočka aproximující objektiv, Ap...aperturní clona v zadní ohniskové rovině tenké čočky, OP...výstupní rovina.

$$u_0(x_0) = \exp(i2\pi K_x x_0) t_0(x_0) \quad (5.2)$$

$$t_l(x_l) = \exp(i2\pi K n \Delta_0) \exp\left(\frac{-i\pi K x_l^2}{f}\right) \quad (5.3)$$

$$t_f(x_f) = \text{rect}\left(\frac{x_f}{2R_p}\right) \quad (5.4)$$

$$P_d(x) = -iK \frac{\exp(i2\pi K d)}{d} \exp\left(\frac{i\pi K x^2}{d}\right) \quad (5.5)$$

Proměnná n je index lomu čočky L a Δ_0 je její tloušťka měřená podél optické osy. Komplexní amplituda $u_o(x_i, K_x)$ objektové vlny ve výstupní rovině je vyjádřena jako

$$u_o(x_i, K_x) = \left(\{ [(\{ [u_0(x_0) * P_{ad}(x_d)] t_d(x_d) \} * P_{al}(x_l)) t_l(x_l)] * P_f(x_f) \} \text{rect} \left(\frac{x_f}{2R_p} \right) \right) * P_z(x_i), \quad (5.6)$$

kde „*“ vyjadřuje operátor konvoluce a funkce rect je definována jako:

$$\text{rect}(x) = \begin{cases} 0 & |x| > 1/2, \\ 1/2 & |x| = 1/2, \\ 1 & |x| < 1/2. \end{cases} \quad (5.7)$$

5.1.2 Srovnání výpočtu CTF pro 2D a 3D situaci

Pro výpočty v nynější práci jsme pro zjednodušení ubrali jeden příčný rozměr, a to y . Podobný přístup je zvolen například v publikaci [11]. v následujícím textu ukážeme, že rozdíl mezi přenosovou funkcí $H_1(X)$ popisující zobrazení 1D objektu v naší aproximaci mikroskopu a přenosovou funkcí $H_2(X, 0)$ popisující zobrazení 1D objektu ve skutečném mikroskopu je velmi malý. Výpočet je odvozený z teoretického modelu publikace [10].

Abychom to mohli dokázat, vyjádříme nejprve, jak bude CTF vypadat v případě zobrazování 2D objektů v CCHM. Nadále se budeme přitom držet předpokladu vyjádřeného v části 3.1.2, tedy, že osvětlení je kvazimonochromatické. Je-li vzorek dvourozměrný, pak se jeho funkce propustnosti redukuje na tvar $t = t_2(x, y)\delta(z) \Rightarrow T(X, Y, Z) = T_2(X, Y)$ a vztah pro 3D CTF (3.18) $H_M(\mathbf{Q})$ se tak zjednoduší na vztah pro 2D CTF $H_{2M}(X, Y; z_i)$ ve tvaru

$$H_{2M}(X, Y; z_i) = \int_{-\infty}^{\infty} H_M(\mathbf{Q}) \exp(i2\pi Z z_i) dZ, \quad (5.8)$$

kde z_i je parametr, který značí z -ovou souřadnici vzorku, pro kterou dvojrozměrnou funkci přenosu určujeme. Pro rovinné vzorky při monochromatickém osvětlení pak lze vztah (5.10) pro signál vyjádřit zjednodušeně jako

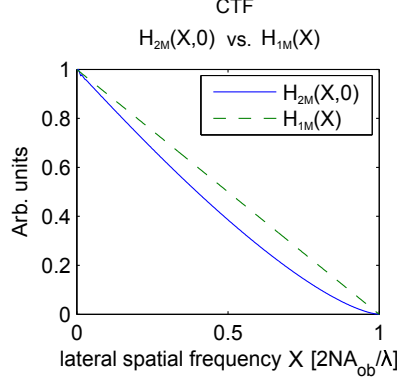
$$w(\mathbf{q}_t; z_i) = \iint_{-\infty}^{\infty} H_{2M}(X, Y; z_i) T(X, Y) \exp(i2\pi \mathbf{Q}_t \cdot \mathbf{q}_t) dX dY. \quad (5.9)$$

Pro čarové objekty orientované ve směru osy y dojde k dalšímu zjednodušení výpočtu signálu, neboť funkce propustnosti $t = t_1(x_0) \Rightarrow T(X, Y) = T_1(X)\delta(Y)$

$$w(x_0, y_0) = \int_{-\infty}^{\infty} T_1(X) \exp(i2\pi X x_0) H_{2M}(X, 0) dX. \quad (5.10)$$

Přenosová funkce CTF pro 1-D objekty v CCHM je tedy $H_{2M}(X, 0)$.

V případě dvojrozměrné aproximace uvedené v modelu tohoto článku je CTF odlišná, a to $H_{1M}(X) = FT(h_{\text{CCHM}}(x_0))$. Na rozdíl od vztahu pro $H_{2M}(X, 0)$, který nelze vyjádřit analyticky, lze $H_{1M}(X)$ vypočítat snadno, neboť $h_{\text{CCHM}}(x_0) = \left(\frac{\sin [NA_{\text{ill}}(x_0 - x_{0N})2\pi/\lambda]}{NA_{\text{ill}}(x_0 - x_{0N})2\pi/\lambda} \right)^2$. To znamená, že $H_{1M}(X) = \text{rect} \left(\frac{X}{2NA_{\text{ill}}/\lambda} \right) * \text{rect} \left(\frac{X}{2NA_{\text{ill}}/\lambda} \right)$. Výsledkem konvoluce dvou



Obrázek 5.2: Srovnání přenosové funkce $H_{1M}(X)$ pro zobrazení 1D objektu v dvojrozměrné aproximaci mikroskopu, kde je vypuštěn laterální rozměr y s přenosovou funkcí $H_{2M}(X, 0)$ pro zobrazení 1D objektu ve skutečném mikroskopu .

identických rect funkcí je tzv. trojúhelníková funkce (triangle function). Srovnání $H_{1M}(X)$ s $H_{2M}(X, 0)$ je v grafu na obrázku 5.2.

Z grafu vidíme, že rozdíl mezi přenosovými funkcemi $H_{1M}(X)$ a $H_{2M}(X, 0)$ bez difuzoru není velký. Na základě tohoto výsledku předpokládáme, že vypuštěním příčného rozměru y se nedopouštíme významné chyby při určování rozlišení CCHM. Stejnou aproximaci mikroskopu tedy využijeme v následující části práce, kdy se budeme zabývat odvozením PSF pro případ s difuzorem.

5.1.3 Výpočet PSF objektové větve

Doposud jsme mluvili o charakteristice CCHM pomocí přenosové funkce CTF. v případě zobrazení přes difuzní prostředí se ale ukáže, že je jednodušší odvodit vztah pro PSF nikoli CTF. PSF je funkce sdružená s funkcí CTF přes Fourierovu transformaci, takže, známe-li CTF, známe i PSF a naopak.

V této části popíšeme výpočet PSF v objektové větvi. Vložíme-li nepropustné stínítko s bodovým otvorem do předmětové roviny S_p tak, aby se otvor nacházel na souřadnici $x_0 = x_{0N}$, pak funkce propustnosti takového stínítka je popsána funkcí $t_0(x_0) = \delta(x_0 - x_{0N})$ a komplexní amplituda $u_0(x_0)$ (5.2) je vyjádřena jako

$$u_0(x_0) = \exp[i2\pi K_x x_0] \delta(x_0 - x_{0N}). \quad (5.11)$$

Dosazením rovnice (5.11) do rovnice (5.6) získáváme komplexní amplitudu zobrazení bodu v objektové větvi a tuto amplitudu budeme označovat $\eta_{obj}(x_i, K_x)$ a vypočítáme ji takto:

$$\begin{aligned} \eta_{obj}(x_i, K_x) &= C \exp(i2\pi K_x x_{0N}) \exp\left(\frac{i\pi K x_{0N}^2}{a_d}\right) \exp\left(\frac{i\pi K x_i^2}{z}\right) \times \\ &\times \int_{-\infty}^{\infty} t_d(x_d) I(x_d) \exp\left[\frac{i\pi K}{a_d}(-2x_{0N}x_d + x_d^2)\right] dx_d, \end{aligned} \quad (5.12)$$

kde

$$I(x_d) = F \left[Ee \left(R_p - \frac{B}{2A} \right) - Ee \left(-R_p - \frac{B}{2A} \right) \right], \quad (5.13)$$

$A = \frac{f-a_l}{2f^2} + \frac{1}{2z}$, $B = \frac{x_d}{f} + \frac{x_i}{z}$, $C = iK^4 \frac{\exp[i2\pi K(a_d+a_l+f+n\Delta_0+z)]}{a_d a_l f z}$, $F = \exp\left(-i\pi K \frac{B^2}{2A}\right) \sqrt{\frac{1}{4KA}}$. Funkce $Ee(x)$ je vyjádřena pomocí sumy Fresnelových integrálů [53]

$$Ee(x) = C(x) + iS(x) = \int_0^x \exp\left(i\frac{\pi}{2}t^2\right) dt. \quad (5.14)$$

Přesný význam funkce $\eta_{\text{obj}}(x_i, K_x)$ je komplexní amplituda vlny v objektové větvi ve výstupní rovině v místě o souřadnici x_i , zobrazujeme-li bodový otvor umístěný v objektové rovině o souřadnici x_{0N} . Tento bodový otvor je osvětlen rovinnou vlnou s vlnovým vektorem $2\pi\mathbf{K} = 2\pi(K_x, K_z)$. Abychom mohli nazvat funkci η_{obj} PSF, je zapotřebí, aby zobrazení popsané funkcí η_{obj} splňovalo podmínku prostorové invariance a linearity.

Rovnice (5.12) ukazuje, že zobrazovací proces popsaný η_{obj} je sice lineární, není ovšem prostorově invariantní, neboť nezávisí na rozdílu $x_{0N} - x_i$. Členy x_i, x_{0N} se objevují ve výrazu (5.12) nezávisle. Přesto však, jak bude ukázáno v simulacích dále, lze považovat η_{obj} v jistém intervalu x_{0N} za prostorově invariantní. v zmiňovaném intervalu se totiž funkce η_{obj} pouze posouvá podél osy x_0 přesně o hodnotu x_{0N} , zatímco tvar funkce zůstává neměnný. Pro účely experimentů a numerických simulací lze tedy považovat funkci opravdu za prostorově invariantní η_{obj} , a lze ji tedy nazvat PSF objektové větve.

5.1.4 Výpočet PSF mikroskopu CCHM

PSF h_{CCHM} celého mikroskopu lze vypočítat, dosadíme-li v rovnici (5.1) namísto $u_o(x_i, K_x)$ výraz $\eta_{\text{obj}}(x_i, K_x)$ (5.12). Pak lze PSF h_{CCHM} celého mikroskopu vyjádřit jako

$$h_{\text{CCHM}}(x_i) = \int_{-NA_{\text{ill}}/\lambda}^{NA_{\text{ill}}/\lambda} \eta_{\text{obj}}(x_i, K_x) u_r^*(x_i, K_x) dK_x, \quad (5.15)$$

kde $u_r(x_i, K_x)$ je komplexní amplituda referenční vlny. Na rozdíl od amplitudy vlny v objektové větvi je referenční vlna nezávislá na objektu. Provedeme-li analogii s rovnicí (5.12) pro referenční větev, tj. bez vzorku a bez difuzoru ($t_d = 1$ a $t_0 = 1$), pak získáme jednoduchý výraz

$$u_r(x_i, K_x) = C_{\text{ref}} \exp\left(-i2\pi K_x \frac{x_i}{M}\right), \quad (5.16)$$

kde M je absolutní hodnota zvětšení mezi výstupní a předmětovou rovinou. C_{ref} je komplexní konstanta. z důvodu jednoduchosti budeme od tohoto okamžiku namísto souřadnice x_i používat konjugovanou souřadnici $x_0 = -x_i/M$. Výhodou používání x_0 místo x_i je fakt, že výsledky jsou v tomto případě vztaženy přímo k objektu nezávisle na zvětšení objektivu, čímž se výsledky stávají snáze interpretovatelnými.

Za účelem zjednodušení vztahu (5.15) pro h_{CCHM} provedeme faktorizaci výrazu (5.12) pro PSF v objektové větvi $\eta_{\text{obj}}(x_0, K_x)$ následujícím způsobem:

$$\eta_{\text{obj}}(x_0, K_x) = h_{\text{obj}}(x_0) \exp(i2\pi K_x x_{0N}). \quad (5.17)$$

První část $h_{\text{obj}}(x_0)$ obsahuje všechny části $\eta_{\text{obj}}(x_0, K_x)$ nezávislé na K_x . PSF mikroskopu lze tedy zapsat jako

$$h_{\text{CCHM}}(x_0) = h_{\text{obj}}(x_0) C_{\text{ref}} \underbrace{\int_{-\text{NA}_{\text{ill}}/\lambda}^{\text{NA}_{\text{ill}}/\lambda} \exp [i2\pi K_x(x_{0\text{N}} - x_0)] dK_x}_{h_{\text{ref}}(x_0)}. \quad (5.18)$$

Integrál v poslední rovnici může být označen jako h_{ref} neboť je roven

$$h_{\text{ref}}(x_0) = \frac{\sin [\text{NA}_{\text{ill}}(x_0 - x_{0\text{N}})2\pi/\lambda]}{\text{NA}_{\text{ill}}(x_0 - x_{0\text{N}})2\pi/\lambda}, \quad (5.19)$$

což je rovno výrazu pro amplitudu obrazu bodového otvoru zobrazeného objektivem s numerickou aperturou NA_{ill} při osvětlení bodovým zdrojem. Zde je důležité zmínit, že h_{ref} není PSF v pravém slova smyslu. S podobným označením se však můžeme setkat i v dřívějších publikacích, např. [9, 11] a i my považujeme takové označení za velmi ilustrativní, zejména pro účely teoretického rozboru obsaženého v této práci. Zanedbáme-li totiž konstantu C_{ref} , pak můžeme psát PSF celého mikroskopu jako

$$h_{\text{CCHM}}(x_0) = h_{\text{obj}}(x_0) h_{\text{ref}}^*(x_0). \quad (5.20)$$

Použití komplexní konjugace pro $h_{\text{ref}}^*(x_0)$ je zbytečné, neboť $h_{\text{ref}}(x_0)$ je reálná funkce tudíž $h_{\text{ref}}(x_0) = h_{\text{ref}}^*(x_0)$. v následujícím textu ji budeme tedy označovat pouze $h_{\text{ref}}(x_0)$.

Pokud navíc v objektové větvi není difuzor a zároveň osvětlovací svazek má stejnou nebo větší numerickou aperturu než objektiv, tedy pokud $\text{NA}_{\text{ill}} \geq \text{NA}_{\text{ob}}$, pak

$$h_{\text{CCHM}}(x_0) = |h_{\text{obj}}(x_0)|^2 = |h_{\text{ref}}(x_0)|^2. \quad (5.21)$$

Pro jednoduchost budeme označovat funkci $h_{\text{obj}}(x_0)$ „PSF objektové větve“ a $h_{\text{CCHM}}(x_0)$ „PSF mikroskopu“.

5.1.5 Laterální posuv větvi

Při zobrazování s CCHM v difuzním světle budeme využívat různé laterální vzájemné posuvy mezi objektovou a referenční větví tak, jak je to popsáno výše, v části 4.1.2. Vzájemný posuv je proveden pomocí posouvání mikroobjektivu v referenční větvi ve směru kolmo k optické ose. Pokud posuvem objektivu způsobíme vzájemný posuv obrazů Δx_i ve výstupní rovině, který budeme vyjadřovat konjugovanou souřadnicí Δx_0 , pak PSF mikroskopu bude vyjádřeno

$$h_{\text{CCHM}}(x_0, \Delta x_0) = h_{\text{obj}}(x_0) h_{\text{ref}}(x_0 - \Delta x_0). \quad (5.22)$$

5.1.6 Numerický výpočet PSF objektové větve a PSF mikroskopu

Difuzor používaný v experimentech pro tuto práci bylo zmatněné sklo, jehož funkci propustnosti lze (dle [54, 55]) zapsat funkcí propustnosti $t_d(x_d) = \exp [ik\Phi(x_d)]$. $\Phi(x_d)$ je

rozdíl optických drah způsobený průchodem světla v místě o souřadnici x_d a k je zde velikost vlnového vektoru. Předpokládáme přitom, že sklon svazku dopadajícího do x_d nebude mít vliv na fázové zpoždění způsobené průchodem přes difuzor. Náhodnou spojitou funkci $\Phi(x_d)$ jsme nahradili ve výpočtech diskretní funkcí, jejíž hodnoty v jednotlivých bodech mají gaussovské rozdělení se střední hodnotou $\mu = 0$ a variancí σ . Variance σ zároveň definuje i maximální rozpětí těchto diskretních hodnot. Souřadnice x_d je pro účel numerické simulace taktéž diskretizována a rozdělena do malých úseků délky $0,1 \mu\text{m}$, což odpovídá zhruba $1/6$ vlnové délky $\lambda = 650 \text{ nm}$, pro niž jsme simulace počítali. Tyto úseky jsou tedy dostatečně malé v porovnání s rozlišením mikroskopu. Změna variance σ souvisí se změnou schopnosti difuzoru rozptylovat dopadající světlo. Čím vyšší je σ , tím více difuzor rozptyluje dopadající světlo. Hodnoty variance σ se v simulacích pohybovaly v intervalu $0,00 - 0,84\lambda$. Ve všech numerických výpočtech a stejně tak v experimentech byl pro osvětlení vybrán vždy mód s minimální prostorovou koherencí, tj. kdy NA_{ill} je rovno numerické apertuře objektivu $\text{NA}_{\text{ob}} = 0,25$. Za účelem výpočtu PSF mikroskopu a PSF objektové větve byly výše uvedené parametry vloženy do modelu odvozeného v části 5.1.3.

5.1.7 Výsledky numerické simulace

Parametry modelu byly nastaveny tak, aby odpovídaly experimentu popsanému v části 5.2. Výsledky modelu pro osový bod $x_{0N} = 0$ jsou v obr. 5.3, kde v levém sloupci je vykreslena absolutní hodnota PSF objektové větve $|h_{\text{obj}}(x_0)|$ spolu s $|h_{\text{ref}}(x_0)|$ či $|h_{\text{ref}}(x_0 - \Delta x_0)|$. V pravém sloupci je absolutní hodnota PSF mikroskopu $|h_{\text{CCHM}}(x_0)| = |h_{\text{obj}}(x_0)h_{\text{ref}}(x_0 - \Delta x_0)|$.

Obrázky 5.3(a), 5.3(b)-5.3(d), a 5.3(e) reprezentují tři různé realizace difuzoru. Každá realizace přísluší k různé funkci $\Phi(x_d)$, a tedy i k různé funkci $h_{\text{obj}}(x_0)$. Různé realizace se vzájemně liší, i pokud σ a μ zůstávají konstantní, neboť σ a μ jsou pouze statistickými parametry funkce $\Phi(x_d)$.

Obrázek 5.3(a) ukazuje situaci bez difuzoru, tj. $\sigma = 0$. Numerická simulace funkce h_{obj} a h_{CCHM} v obr. 5.3(a) odpovídá jejich analytickému vyjádření. Ve všech třech obrázcích 5.3(b)-5.3(d) je zachycena pouze jediná realizace $\sigma = 0,42\lambda$. Jediný rozdíl mezi obr. 5.3(b)-5.3(d) je pouze ve vzájemném posunutí Δx_0 . Obrázek 5.3(e) zachycuje realizaci silnějšího difuzoru charakterizovaného variancí dvakrát vyšší, tedy $\sigma = 0,84\lambda$.

Obrázek 5.3(b) ukazuje PSF v balistickém světle, tzn. pro $\Delta x_0 = 0$. PSF v balistickém světle mají téměř shodný průběh s PSF bez difuzoru z obr. 5.3(a), pouze hodnota signálu se zde velmi snížila. V tomto případě je to zhruba desetinásobný pokles oproti případu bez difuzoru.

Obrázek 5.3(c) ukazuje PSF pro difuzní světlo při vzájemném posunutí $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$. V této konkrétní reprezentaci difuzoru při daném posunutí je centrální maximum funkce h_{ref} v pozici lokálního maxima funkce h_{obj} , tudíž součin těchto funkcí $h_{\text{obj}}h_{\text{ref}}$ dává v tomto místě ostré maximum. PSF mikroskopu v obr. 5.3(b) je tedy v tomto případě velmi podobné PSF v mikroskopu v balistickém světle potažmo PSF mikroskopu zcela bez difuzoru z obr. 5.3(a).

Na druhou stranu stačí malá změna vzájemného posunutí Δx_0 k tomu, aby se průběh PSF mikroskopu výrazně změnil. To je vidět na obr. 5.3(d), kde vzájemné posunutí se liší oproti 5.3(c) pouze o $1,0 \mu\text{m}$, tj. $\Delta x_0 = 15,0 \mu\text{m}$. Zde tedy naopak centrální maximum funkce h_{ref} leží v lokálním minimu funkce h_{obj} . Součin $h_{\text{obj}}h_{\text{ref}}$ dává za výsledek velmi odlišný průběh PSF mikroskopu. Centrální maximum výsledné PSF mikroskopu se rozdvojilo, což má za následek výrazně horší rozlišení, a tedy i horší kvalitu zobrazení. To je možné vidět z tvaru PSF mikroskopu v pravém sloupci obr. 5.3(d).

V obr. 5.3(e) je reprezentace difuzoru s variancí σ funkce Φ , $\sigma = 0.84 \lambda$. Zde je balistický pík zhruba třikrát slabší než v případě difuzoru s $\sigma = 0,42 \lambda$ (obr. 5.3(b)).

Z výsledků v obr. 5.3 můžeme usuzovat, že difuzor s $\sigma = 0,42 \lambda$ poskytuje nejlepší zobrazovací vlastnosti v balistickém světle, zatímco při zobrazení se silnějším difuzorem s $\sigma = 0,84 \lambda$ vykazuje signál v difuzním světle o porovnatelné kvalitě se zobrazením v balistickém světle. Pro každý difuzor ovšem platí, že tvar výsledné funkce PSF mikroskopu je možné výrazně měnit i malou změnou vzájemného posunutí Δx_0 . Hodnoty nejvhodnějších posunutí vedoucích k nejlepšímu PSF však lze těžko obecně předpovídat, neboť jsou velmi individuální pro každou reprezentaci difuzoru. Z tohoto důvodu v práci tedy neuvádíme žádnou rovnici, z níž by bylo možné ideální posuv odvodit. Ze stejného důvodu tedy ani neuvádíme charakteristiku závislosti rozlišení na vzájemném posunutí.

Vypočítané funkce PSF, jejichž závislost je vynesena v obr. 5.3, byly použity pro model zobrazování nebodového objektu (obr. 5.5). Nejprve je však nutné ukázat, že funkce h_{obj} lze opravdu považovat za prostorově invariantní. Za tímto účelem jsme provedli výpočty zobrazení mimoosových bodů $x_{0N} = -10 \mu\text{m}$ a $x_{0N} = -20 \mu\text{m}$ (obr. 5.4) pro tutéž reprezentaci difuzoru, která byla použita pro obr. 5.3(b). Vypočítané funkce h_{obj} pro tyto mimoosové body jsme srovnali s h_{obj} pro osový bod $x_{0N} = 0 \mu\text{m}$, samozřejmě při stejné realizaci difuzoru. Všechny grafy v obr. 5.4 počítají s jedinou realizací difuzru, a to konkrétně s realizací z obr. 5.3(b)-5.3(d). Obrázky 5.4(a) a 5.4(b) ukazují výsledky simulace pro vzájemný posuv $16 \mu\text{m}$, zatímco obr. 5.4(c) a 5.4(d) posuv $\Delta x_0 = 15 \mu\text{m}$.

První sloupec obr. 5.4 odpovídá osovému bodu $x_{0N} = 0 \mu\text{m}$, druhý sloupec obr. 5.4 odpovídá mimoosovému bodu $x_{0N} = -10 \mu\text{m}$ a třetí sloupec $x_{0N} = -20 \mu\text{m}$. Funkce h_{obj} (černá barva) spolu s h_{ref} jsou v obr. 5.4(a) a 5.4(c) a signál reprezentovaný součinem funkcí $h_{\text{ref}} h_{\text{ref}}$ jsou na obr. 5.4(b) a 5.4(d), přičemž všechny grafy jsou vykresleny tak, aby hlavní maximum bylo vykresleno ve středu horizontální osy.

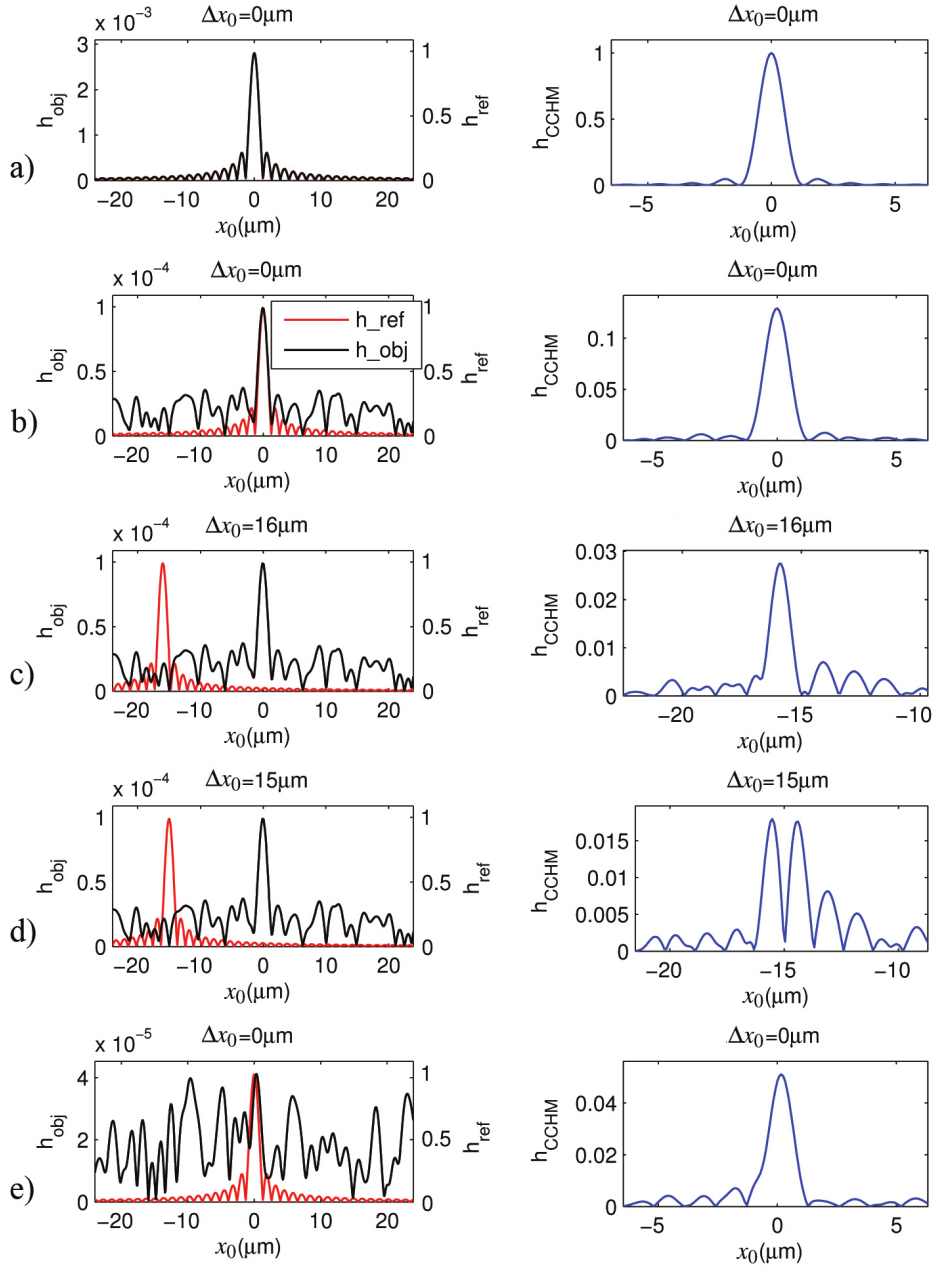
Změnou hodnoty x_{0N} se funkce h_{ref} , h_{obj} a h_{CCHM} pouze posouvají v ose x_0 podle příslušného posunu x_{0N} , tvar jejich průběhu ovšem zůstává neměnný. Z toho lze usuzovat, že funkce h_{obj} a h_{CCHM} lze považovat za prostorově invariantní minimálně na intervalu $x_{0N} = \langle -20, 20 \rangle \mu\text{m}$, takže pro účely experimentu v této práci lze h_{obj} a h_{CCHM} považovat za prostorově invariantní.

Protože lze h_{CCHM} považovat za invariantní, využili jsme ji k výpočtu zobrazení 2D objektu, a to konkrétně tří identických rovnoběžných nekonečně dlouhých ekvidistantních štěrbin. Výsledek výpočtu tohoto 2D objektu je na obr. 5.5. Funkce propustnosti objektu $t(x_0)$ nabývá pouze hodnot 1 a 0. Propustnost $t = 1$ uvnitř štěrbin a $t = 0$ mimo štěrbinu. Obrázky 5.5 ukazují vypočítaný holografický signál $w(x_0)$ získaný konvolucí funkce propustnosti $t(x_0)$ se simulovanou PSF mikroskopu h_{CCHM} :

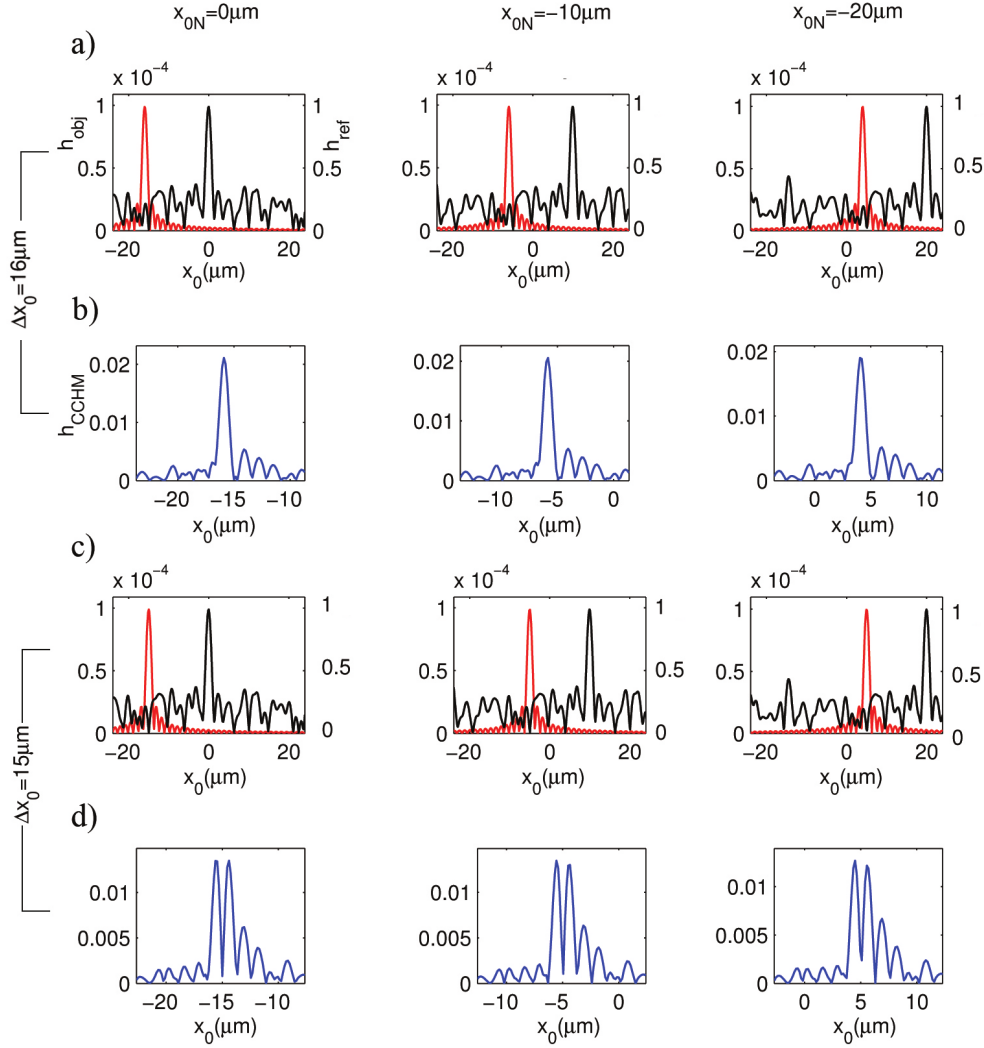
$$w(x_0) = \int_{-\infty}^{\infty} t(x'_0) h_{\text{CCHM}}(x_0 - x'_0) dx'_0. \quad (5.23)$$

Horní řádek obr. 5.5 ukazuje vypočtený signál w vykreslený ve stupních šedi, zatímco spodní řádek obsahuje řezy horními obrazy. Pro celý obr. 5.5 se jedná o jedinou realizaci difuzoru shodnou s realizací na obr. 5.3(b)-5.3(d). V prvních dvou sloupcích obr. 5.5 jsou simulované štěrbinové rozmístěny s prostorovou frekvencí $f_{\text{incoh}} = 2NA_{\text{ob}}/\lambda$ (limit rozlišení pro klasický mikroskop i CCHM s plně prostorově nekoherentním osvětlením, tj. při plně vysvícené pupile objektivu $NA_{\text{ob}} = NA_{\text{ill}}$ [45]) a $f_{\text{coh}} = NA_{\text{ob}}/\lambda$ (limit rozlišení pro klasický mikroskop i CCHM s koherentním osvětlením, tj. při osvětlení bodovým zdrojem umístěným na optické ose, kdy $NA_{\text{ill}}/NA_{\text{ob}} \rightarrow 0$ [45]). Vzájemné posunutí obou větví je $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$, což odpovídá PSF z obr. 5.3(c). Třetí sloupec zachycuje simulaci štěrbin

rozmístěných s frekvencí f_{coh} , ovšem vzájemný posuv větví $\Delta x_0 = 15,0 \mu\text{m}$, což odpovídá PSF v obr. 5.3(d). Z obr. 5.5 můžeme tedy usuzovat, že při vzájemném posunutí $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$ lze při této realizaci difuzoru pozorovat šterbiny s frekvencí f_{incoh} , zatímco při vzájemném posunutí $\Delta x_0 = 15,0 \mu\text{m}$ není rozlišena ani frekvence dvakrát nižší, tedy f_{coh} .



Obrázek 5.3: V levém sloupci jsou absolutní hodnoty funkce h_{obj} spolu s h_{ref} vzájemně posunuté dle relevantního Δx_0 , v pravém sloupci je absolutní hodnota jejich součinu $|h_{\text{CCHM}}| = |h_{\text{obj}}h_{\text{ref}}|$ normována k maximální hodnotě $|h_{\text{CCHM}}|$ bez difuzoru. Řádek a) ukazuje simulaci bez difuzoru, řádky b)-d) a e) reprezentují dvě různé realizace difuzoru. Řádky b)-d) reprezentují různá vzájemná posunutí Δx_0 pro tutéž realizaci difuzoru, konkrétně danou rozptylem $\sigma = 0,42 \lambda$. V poledním řádku e) je výsledek difuzoru s realizací s vyšším rozptylem $\sigma = 0,84 \lambda$, což znamená silněji rozptylující difuzor.

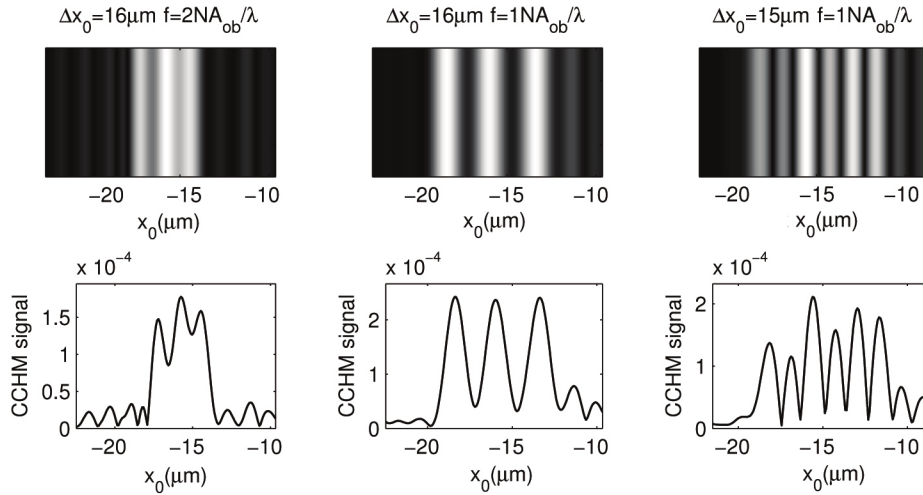


Obrázek 5.4: Výsledky výpočtu PSF pro mimoosové body. První dva řádky a), b) reprezentují obraz se vzájemným posunutím $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$ a následující dva řádky c), d) $\Delta x_0 = 15,0 \mu\text{m}$. Řádky a), c) ukazují absolutní hodnoty funkcí h_{ref} (červená čára) a h_{obj} (černá čára), které jsou vůči sobě vzájemně posunuty o Δx_0 a řádky b) a d) ukazují absolutní hodnoty PSF celého mikroskopu $|h_{\text{CCHM}}| = |h_{\text{obj}} h_{\text{ref}}|$. Každý sloupec ukazuje obraz pro různé body x_{0N} , postupně: osový bod $x_{0N} = 0 \mu\text{m}$ a mimoosové body $x_{0N} = -10 \mu\text{m}$ a $x_{0N} = -20 \mu\text{m}$.

5.2 Experimentální výsledky

Experiment byl proveden na mikroskopu CCHM 2. generace, jehož optické schéma je na obr. 2.2. Použili jsme objektivy Nikon $10\times/0,25$ s nekonečnou tubusovou vzdáleností. Aperturní úhel osvětlovacího svazku byl nastaven natolik velký, aby geometrický obraz zdroje zcela vyplnil aperturu objektivu, tj. $\text{NA}_{\text{ill}} = \text{NA}_{\text{ob}}$. Osvětlovací svazek je přitom kvazimonochromatický, což jsme zajistili použitím interferenčního filtru propouštějícího na střední vlnové délce $\lambda_0 = 650 \text{ nm}$ a majícího pološířku $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$. Koherenční délka použitého světla tedy byla $42 \mu\text{m}$. Díky použití kvazimonochromatického světla je možné celý mechanismus zobrazování lépe matematicky uchopit z mnoha důvodů. Jedním z nich je, že nedochází při tomto typu osvětlení k významné disperzi světla, která popis značně komplikuje.

Vzorkem zobrazovaným v rámci tohoto experimentu je rozlišovací USAF test, který byl vytvořen leptáním do tenké Cr vrstvy nanesené na povrchu podložního skla. Mezi vzorek



Obrázek 5.5: Numerická simulace zobrazení tří nekonečných identických rovnoběžných ekvidistantně rozložených štěrbin. V horním řádku je vypočítaný signál ve stupních šedi. Ve spodním řádku je příčný řez horním řádkem. V levém sloupci je prostorová frekvence štěrbin $f = 2NA_{\text{ob}}/\lambda$ a vzájemný posuv $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$, v prostředním sloupci $f = NA_{\text{ob}}/\lambda$, $\Delta x_0 = 16,0 \mu\text{m}$ a v pravém sloupci $f = NA_{\text{ob}}/\lambda$, $\Delta x_0 = 15,0 \mu\text{m}$.

Sp a pozorovací objektiv o (obr. 2.2) jsme vložili difuzor D, kterým bylo zmatněné krycí sklo tloušťky $0,17 \text{ mm}$ ležící ve vzdálenosti $a_d = 4,0 \text{ mm}$ od vzorku směrem k objektivu.

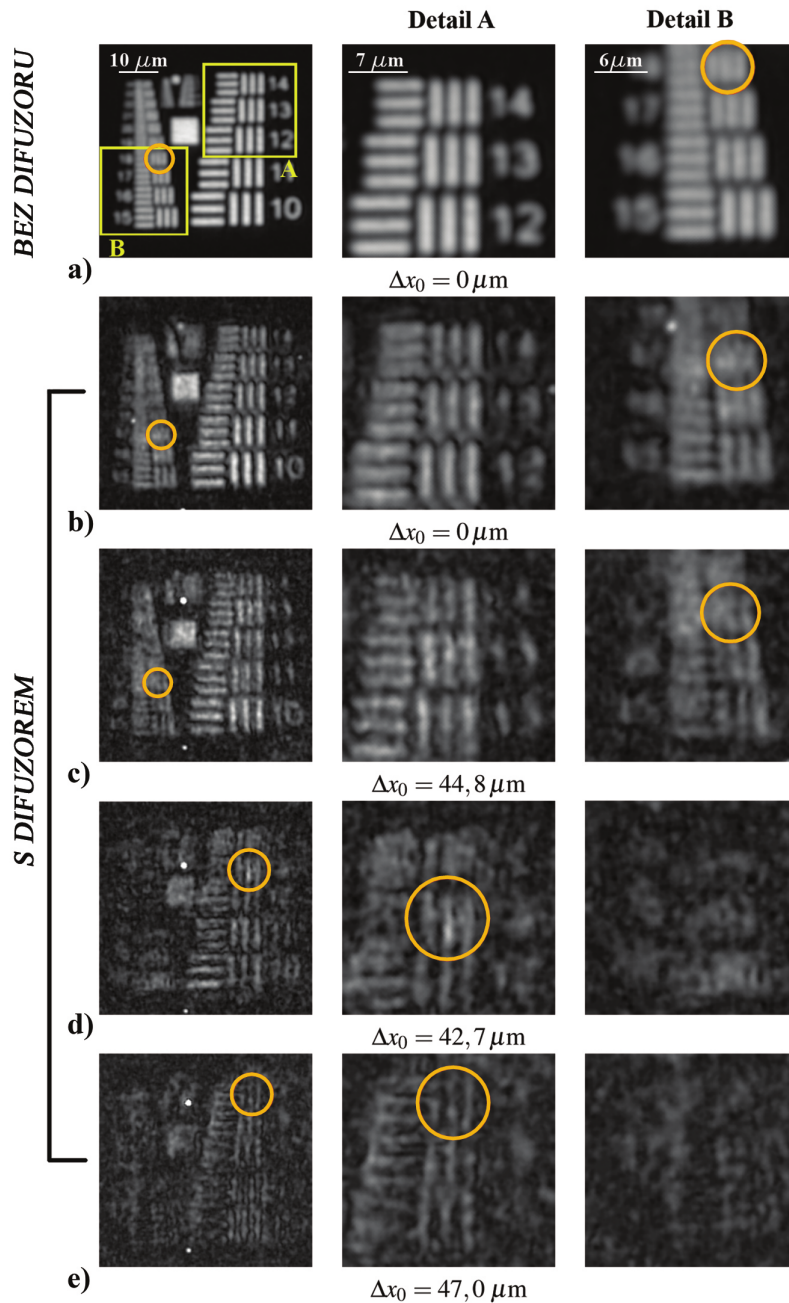
Nyní srovnáme výsledky simulace obrazu čarového objektu z obr. 5.5 s výsledky experimentu. Obrázek 5.6 ukazuje naměřený holografický signál w při zobrazení USAF testu ve stupních šedi. Původní hologramy zde neuvádíme zejména z důvodu jejich nízkého kontrastu. V prvním sloupci obr. 5.6 je obraz celého testu zatímco v dalších sloupcích jsou zobrazeny pouze jeho detaily. Ty jsou v obrázku viditelně vyznačeny čtvercovými oblastmi A resp. B.

Oranžové kroužky pak označují v každém zobrazení skupinu čar, jejichž frekvence je již na mez rozlišení pro danou konfiguraci. Obrázek 5.6(a) ukazuje zobrazení USAF testu bez difuzoru, naproti tomu obr. 5.6(b)-5.6(e) zachycují obraz pořízený přes difuzor. Obrázky v jednotlivých řádcích 5.6(b)-5.6(e) se liší pouze vzájemným posunutím Δx_0 , které bylo provedeno laterálním posuvem mikroskopového objektivu O_2 . Zatímco v obr. 5.6(b) je obraz vytvořen balistickým světlem, zbylé řádky ukazují zobrazení difuzním světlem. Konkrétní hodnoty posuvů pro jednotlivé řádky jsou tyto: $\Delta x_0 = 44,8 \mu\text{m}$ - obr. 5.6(c), $\Delta x_0 = 42,7 \mu\text{m}$ - obr. 5.6(d) a $\Delta x_0 = 47,0 \mu\text{m}$ - obr. 5.6(e).

Variance σ ve fázi funkce propustnosti difuzoru $t_d(x_d)$ je podobná varianci difuzoru ze simulace z obr. 5.3(b)-(d). V každém z těchto obrázků je mez rozlišení různá a je vyznačena v každém řádku oranžovou značkou. V obr. 5.6(a) je rozlišení rovno $f_{\text{lim}} = 0,81f_{\text{incoh}}$, kde $f_{\text{incoh}} = \frac{2NA_{\text{ob}}}{\lambda}$, dále pak $f_{\text{lim}} = 0,73f_{\text{incoh}}$ pro $\Delta x_0 = 44,8 \mu\text{m}$, $f_{\text{lim}} = 0,48f_{\text{incoh}}$ pro $\Delta x_0 = 42,7 \mu\text{m}$ a $f_{\text{lim}} = 0,53f_{\text{incoh}}$ pro $\Delta x_0 = 47,0 \mu\text{m}$.

Teoreticky je pro obr. 5.6 očekávána hodnota $f_{\text{lim}} = f_{\text{incoh}}$. Experimentálně toho však nebylo dosaženo, což má více důvodů. Jedním z nich je fakt, že pro frekvence blízké f_{incoh} je hodnota CTF velmi nízká, což znamená velmi nízký kontrast pro frekvence blízké se mezní. Dalším činitelem zhoršujícím rozlišení jsou také optické vady objektivů, zejména otovorová vada. Zde je důležité poznamenat, že k podobným výsledkům bychom dospěli i při pozorování klasickým mikroskopem. Dosažení teoretické meze v experimentu není úplně možné. Zobrazení přes difuzor je navíc zhoršeno nízkou hodnotou podílu signálu vůči šumu (SNR - signal-to-noise ratio).

Na kvalitu zobrazení má vliv, zejména při zobrazování přes difuzor, dlouhá expozice neboli průměrování více snímků. Průměrování více snímků z různých posuvů bylo provedeno taktéž, ovšem prozatím bez významných výsledků. v současnosti se však pracuje na metodě, která by umožnila skládat obrazy vzniklé v různých pozicích vzájemného posunutí Δx_0 za účelem vzniku obrazu s vyšší kvalitou a rozlišením.



Obrázek 5.6: Výsledky experimentu - zobrazení rozlišovacího testu USAF. Obrázky byly pořízeny s objektivu 10×/0,25, interferenčním filtrem $\lambda = 650 \text{ nm}$, 10 nm FWHM. a) zobrazení bez difuzoru, b) zobrazení s difuzorem - balistické světlo, c)-e) zobrazení s difuzorem - difuzní světlo. Vzájemná posunutí jsou postupně c) $\Delta x_0 = 44,8 \mu\text{m}$ d) $\Delta x_0 = 42,7 \mu\text{m}$, e) $\Delta x_0 = 47,0 \mu\text{m}$. V druhém a třetím sloupci jsou zvětšené detaily oblastí A resp. B. Oranžové kroužky označují limit rozlišení obrazů v příslušném řádku.

5.3 Závěrečné shrnutí simulace a měření PSF

Byl vytvořen jednoduchý model pro zobrazování v CCHM přes tenké difuzní vzorky, a to na základě 2D modelu CCHM ve Fresnelově paraxiální aproximaci. Ačkoli CCHM je achromatický, omezili jsme se v modelu a stejně tak i v experimentech pouze na monochromatické světlo. Tím se experimentální výsledky stávají snáze interpretovatelnými a lze je jednodušeji srovnat s výsledky výpočtů.

Obecné řešení pro tvar rovnice PSF bylo odvozeno analytickým výpočtem, ovšem pro získání konkrétního kvantitativního řešení již bylo nutné využít numerické simulace. Funkce propustnosti difuzoru je totiž definována jako soubor náhodných fázorů. Pro ověření správnosti numerického modelu jsme srovnávali výsledky modelu s výsledkem analytického výpočtu pro limitní případ, že funkce propustnosti difuzoru je rovna jedné.

Výsledkem simulace PSF pro zobrazení přes slabě rozptylující difuzor v balistickém světle byl velmi výrazný pík. Jak dále ukázaly výsledky, výrazný pík, ačkoli ne tak silný, jsme obdrželi i v případě difuzního světla, což prokázalo možnost zobrazovat v CCHM i v difuzním světle. PSF v případě difuzního světla ovšem silně závisí na parametru Δx_0 vyjadřujícímu vzájemné laterální posunutí větví ve výstupní rovině CCHM.

Vliv silnějšího difuzoru na PSF mikroskopu byl taktéž studován. Ve srovnání se slabším difuzorem zde již není tak velký rozdíl mezi píkem v balistickém a difuzním světle. Až na změnu hladiny signálu vůči šumu zůstávají ovšem ostatní vlastnosti zobrazení v difuzním světle stejné jako v případě slabšího difuzoru.

V experimentální části jsme prokázali, že vypočítané výsledky pro slabší difuzor jsou platné, a to na zobrazení rozlišovacího USAF terče přes zmatněné krycí sklo. Taktéž jsme experimentálně prokázali silný vliv vzájemného posunutí Δx_0 na PSF. Zvolením vhodné hodnoty Δx_0 jsme byli schopni zobrazit předměty s prostorovou frekvencí blízkou teoretickému limitu rozlišení pro CCHM $2NA/\lambda$. Nicméně této teoretické hranice jsme plně nedosáhli, a to zejména díky nízké hodnotě SNR. Při změně parametru Δx_0 ze správné hodnoty se PSF rapidně změnila, což mělo za následek výsledný obraz s horší kvalitou i rozlišením.

Závěr

Shrnutí dosažených cílů

Cíle dizertační práce byly splněny. Zde předkládáme jejich závěrečné shrnutí.

- Koherenci světla v CCHM v závislosti na velikosti zdroje jsme popsali pomocí funkce vzájemné intenzity, jejíž tvar jsme v práci odvodili. Zjistili jsme, že tuto funkci lze v případě CCHM ztotožnit s funkcí pro holografický signál v závislosti na vzájemném laterálním posunutí referenční a objektové větve. Funkci jsme následně naměřili pro 1. i 2. generaci CCHM pro více velikostí zdroje. Experimentální výsledky velmi přesně odpovídají teoretickým výpočtům.
- Při pozorování s CCHM jsme zjistili, že v případě, kdy objekty jsou překryty difuzním sklem, jsme schopni rekonstruovat obraz i při vzájemných posunutích daleko větších, než při kterých to bylo možné bez difuzoru. Na základě tohoto experimentu jsme navrhli základní geometrický model vysvětlující tento jev. Ukazujeme zde mechanismus vzniku obrazu přes difuzní prostředí balistickým i difuzním světlem. Zobrazení přes difuzní prostředí balistickým světlem vzniká v CCHM v případě, kdy vzájemné laterální posunutí větví je nulové nebo velmi malé. Naproti tomu pro zobrazení v CCHM přes difuzní prostředí difuzním světlem je zapotřebí vytvořit vzájemné posunutí větší, než je koherenční šířka mikroskopu v místě, kde vzájemný posuv měříme.
- Na základě úvah provedených v publikacích [11] a [56] jsme vytvořili teoretický model pro rozptylovou funkci PSF charakterizující zobrazení v difuzním prostředí vzniklé balistickým, respektive difuzním světlem v CCHM. Tento model byl podroben ověřovacím experimentům, pomocí nichž jsme zjistili skutečné hodnoty rozlišení pro zobrazení v difuzním prostředí v CCHM.
- Výpočet teoretického modelu PSF je v práci předveden na 2D modelu CCHM. Jeho obecné řešení je zde uvedeno analyticky. Pro získání konkrétního řešení jsme ovšem využili numerickou simulaci pro realizaci funkce propustnosti simulovaného difuzoru. Tato funkce je v práci modelována jako suma fázorů s náhodným rozdělením fáze. z výsledků modelu jsme zjistili, že při zobrazení v CCHM balistickým světlem je rozlišení shodné jako při zobrazení zcela bez difuzoru. Limitujícím je zejména množství balistického světla, které difuzorem projde. Rozptyluje-li difuzor natolik, že holografický signál tvořený interferencí balistických fotonů je již překryt šumem, zobrazení je nemožné. Tento závěr byl potvrzen i následným experimentem a je navíc v souladu s pozorováním provedeným v publikacích [8] a [13]. Stejný teoretický model jako pro zobrazení balistickým světlem jsme využili i pro model PSF při zobrazení difuzním světlem. z tohoto modelu jsme numerickou simulací zjistili, že rozlišení při

zobrazení difuzním světlem je silně závislé na hodnotě vzájemného posunutí referenční a předmětové větve. Při vhodném posunutí je možné získat stejné rozlišení jako v balistickém světle, při nevhodném posunutí je naopak zobrazení takřka nemožné. Všechny vyjmenované závěry z modelu byly navíc potvrzeny experimenty provedenými s CCHM, kde vzorkem byl rozlišovací USAF terč a difuzorem bylo zmatněné krycí sklo.

Literatura

- [1] Rudolph, W., Kempe, M. Trends in optical biomedical imaging, *Journal of Modern Optics*, 1997, 44.9, s. 1617-1642.
- [2] Tuchin, V. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*, Bellingham, Washington USA: SPIE Press, 2007.
- [3] Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning*, 1988, 10.4, s. 128-138.
- [4] Wilson, T. *Confocal microscopy*, London: Academic Press, 1990.
- [5] Leith, E. , Upatnieks, J. Reconstructed wavefronts and communication theory, *JOSA*, 1962, 52.10, s. 1123-1128.
- [6] Kogelnik, H. Holographic image projection through inhomogeneous media, *Bell Syst. Tech. J*, 1965, 44.10, s. 2451-2455.
- [7] Indebetouw, G., Klysubun, P. Imaging through scattering media with depth resolution by use of low-coherence gating in spatiotemporal digital holography, *Optics Letters*, 2000, 25.4, s. 212-214.
- [8] Kempe, M., Rudolph, W., Welsch, E. Comparative study of confocal and heterodyne microscopy for imaging through scattering media, *JOSA A*, 1996, 13.1, s. 46-52.
- [9] Leith, E., Chen, C., Chen, H., Chen, Y., Dilworth, D., Lopez, J., Rudd, J., Sun, P., Valdmanis, J. and Vossler, G. Imaging through scattering media with holography, *JOSA A*, 1992, 9.7, s. 1148-1153.
- [10] Chmelík, R. Three-dimensional scalar imaging in high-aperture low-coherence interference and holographic microscopes, *Journal of Modern Optics*, 2006, 53.18, s. 2673-2689.
- [11] Leith, E. Broad-source image plane holography as a confocal imaging process, *Applied Optics*, 1994, 33.4, s. 597-602.
- [12] Kempe, M., Genack, A., Rudolph, W., Dorn, P. Ballistic and diffuse light detection in confocal and heterodyne imaging systems, *JOSA A*, 1997, 14.1, s. 216-223.
- [13] Tamano, S., Hayasaki, Y., Nishida, N. Phase-shifting digital holography with a low-coherence light source for reconstruction of a digital relief object hidden behind a light-scattering medium, *Applied Optics*, 2006, 45.5, s. 953-959.
- [14] Leith, E., Kuei, C. Interferometric method for imaging through inhomogeneities, *Optics Letters*, 1987, 12.3, s. 149-151.

- [15] Kolman, P., Chmelík, R. Coherence-controlled holographic microscope, *Optics Express*, 2010, 18.21, s. 21990-22003.
- [16] Dubois, F., Yourassowsky, C., Monnom, O., Legros, J., Debeir, O., Van Ham, P., Kiss, R., Decaestecker, C. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration, 2006, 11.5, s. 054032-054032-5.
- [17] Charrierre, F., Marian, A., Colomb, T., Marquet, P., Depeursinge, C. Amplitude point-spread function measurement of high-NA microscope objectives by digital holographic microscopy, *Optics Letters*, 2007, 32.16, s. 2456-2458.
- [18] Cotte, Y., Toy, M., Pavillon, N., Depeursinge, C. Microscopy image resolution improvement by deconvolution of complex fields, *Optics Express*, 2010, 18.19, s. 19462-19478.
- [19] Huang, D., Swanson, E., Lin, C., Schuman, J., Stinson, W., Chang, W., Hee, M., Flotte, T., Gregory, K., Puliafito, C. et al., Optical coherence tomography, *Science*, 1991, 254.5035, s. 1178-1181.
- [20] Izatt, J., Hee, M., Owen, G., Swanson, E., Fujimoto, J. Optical coherence microscopy in scattering media, *Optics Letters*, 1994, 19.8, s. 590-592.
- [21] Krug, W., Rieneitz, J., Shulz, G. *Contributions to Interference Microscopy*. Translated by J. Home Dickson. London: Hilger and Watts Ltd., 1964.
- [22] Zicha, D., Genot, E., Dunn, G. A., Kramer, I. M. TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells, *Journal of Cell Science*, 1999, 112.4, s. 447-454.
- [23] Dubois, F., Callens, N., Yourassowsky, C., Hoyos, M., Kurowski, P., Monnom, O. Digital holographic microscopy with reduced spatial coherence for three-dimensional particle flow analysis, *Applied Optics*, 2006, 45.5, s. 864-871.
- [24] Dubois, F., Novella Requena, M. L., Minetti, C., Monnom, O., Istasse, E. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source, *Applied Optics*, 2004, 43.5, s. 1131-1139.
- [25] Dubois, F., Yourassowsky, C., Callens, N., Minetti, C., Queeckers, P., Podgorski, T., Brandenburger, A. Digital holographic microscopy working with a partially spatial coherent source, In *Coherent Light Microscopy*, 2011, s. 31-59.
- [26] Dubois, F., Joannes, L., Legros, J. C. Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence, *Applied Optics*, 1999, 38.34, s. 7085-7094.
- [27] Leith, E. N., Upatnieks, J. Holography with achromatic-fringe systems, *JOSA*, 1967, 57.8, s. 975-979.
- [28] Chmelík, R., Harna, Z. Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*, 1999, 38.10, s. 1635-1639.
- [29] Prokopová, M. Transmisní holografický konfokální mikroskop, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D., 2002.

- [30] Chmelík, R., Kolman, P., Lovicar, L., Suchomel, F. Transmission Holographic Microscope Image Characteristics, In: 14th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, International Society for Optics and Photonics, 2005, s. 59450V-59450V-6.
- [31] Chmelík, R., Kolman, P. Transmisní holografický mikroskop pro polychromatické světlo: návrh optické soustavy a vlastnosti zobrazení. *Jemná mechanika a optika*, 2004, 49.9, s. 248-250.
- [32] Kolman, P., Chmelík, R., Lovicar, L., Suchomel, F. Low-coherence interference microscope in transmission mode, Program and Abstract Book of Focus on Microscopy 2005, 2005, s. 60.
- [33] Kolman, P., Janečková, H., Chmelík, R., Veselý, P., Lovicar, L., Foret, Z. In vitro dynamic observations in a low-coherence holographic microscope, In: 15th Czech-Polish-Slovak Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics. International Society for Optics and Photonics, 2007, s. 66090M-66090M-7.
- [34] Janečková, H., Kolman, P., Veselý, P., Chmelík, R. Digital holographic microscope with low-spatial and temporal coherence of illumination, In: Photonics Europe, International Society for Optics and Photonics, 2008, s. 70002E-70002E-8.
- [35] Janečková, H., Kolman, P., Veselý, P., Chmelík, R. Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination, In: Photonics Europe, International Society for Optics and Photonics, 2008, s. 70002E-70002E-8.
- [36] Chmelík, R., Uhlířová, H., Kolman, P., Veselý, P. Wide Range Coherence Digital Holographic Microscope, In: Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, Optical Society of America, 2010, s. DTuA6.
- [37] Kolman, P. Koherencí řízená holografická mikroskopie, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D. 2010.
- [38] Lošťák, M., Kolman, P., Dostál, Z. , Chmelík, R. Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope, In: 17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, International Society for Optics and Photonics, 2010, s. 77461N-77461N-9.
- [39] Janečková, H. Mikroskopie časově proměnných biologických objektů, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D., 2009.
- [40] Křížová A., Čolláková J., Chmelík, R., Koherencí řízený holografický mikroskop a jeho aplikace na ÚFI VUT v Brně, *Jemná mechanika a optika*, 2013, 58.6, s. 171-173.
- [41] Henzlová M., Lošťák M., Chmelík R. Theoretical study of coherence-controlled holographic microscopy in the presence of scattering media, In: 18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics. International Society for Optics and Photonics, 2012, p. 869713-869713-8.
- [42] 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, 59.1, s. 267-336.

- [43] Lošťák, M., Chmelík, R., Slabá, M., Slabý, T. Coherence- controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express*, 2014, 22.4, s. 4180-4195.
- [44] Weingärtner, I. Measurement of Mutual Coherence Functions by Image Holography, *JOSA*, 1970, 60.4, s. 572-573.
- [45] 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, 21.12, s. 14747-14762.
- [46] Brandt, G., Image plane holography, *Applied Optics*, 1969, 8.7, s. 1421-1429.
- [47] Chmelík, R. Trojrozměrné zobrazení v mikroskopii, ÚFI FSI VUT v Brně, 2003.
- [48] Born, M., Wolf, E. *Principles of Optics*, seventh expanded edition, Cambridge: Cambridge university press, 2002.
- [49] Henzlová, M. Teoretický popis zobrazení digitálním holografickým mikroskopem, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D., 2010.
- [50] Komrská, J. *Vlnová optika: část Difrakce světla*, Brno: CERM, 2004.
- [51] Henzlová, M. Numerické přeostrévání v digitálním holografickém mikroskopu s částečně koherentním osvětlením. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D., 2008.
- [52] Goodman, J. *Introduction to Fourier Optics*, 2nd edition, New York, London: McGraw-Hill, 1996.
- [53] Press, W. H. *Numerical recipes 3rd edition: The art of scientific computing*, Cambridge: Cambridge university press, 2007.
- [54] Kurtz, C. N. Transmittance characteristics of surface diffusers and the design of nearly band-limited binary diffusers, *JOSA*, 1972, 62.8, s. 982-989.
- [55] Crane, R. B. Use of a laser-produced speckle pattern to determine surface roughness. *JOSA*, 1970, 60.12, s. 1658-1663.
- [56] Leith, E., Chen, C., Chen, H., Chen, Y., Dilworth, D., Lopez, J., Vossler, G.. Imaging through scattering media with holography, *JOSA A*, 1992, 9.7, s. 1148-1153.

Seznam nejdůležitějších zkratek a symbolů

- PSF - rozptylová funkce bodu (z angl. Point Spread Function)
- CTF - koherentní funkce přenosu (z angl. Coherent Transfer Function)
- LCI - nízkokoherentní interferometrie (z angl. Low-coherence interferometry)
- CCHM - koherencí řízený holografický mikroskop (z angl. Coherence-controlled holographic microscope)
- TDHM - transmisní digitální holografický mikroskop
- KM - konfokální mikroskop
- SNR - poměr signálu k šumu (z angl. Signal-to noise ratio)

- $\mathbf{q} = (\mathbf{q}_t, z)$ - polohový vektor
- $\mathbf{q}_t = (x, y)$ - příčná složka polohového vektoru
- $\mathbf{K} = (\mathbf{K}_t, K_z)$ - redukovaný vlnový vektor
- $\mathbf{K}_t = (K_x, K_y)$ - příčná složka redukovaného vlnového vektoru
- $P(\mathbf{K}), P_C(\mathbf{K})$ - pupilová funkce objektivu, resp. kondenzoru
- NA_{ill} - numerická apertura osvětlovacího svazku v předmětovém prostoru před interakcí se vzorkem
- NA_{ob} - numerická apertura mikroskopového objektivu
- n - index lomu
- λ_v - vlnová délka ve vakuu
- u_o - komplexní amplituda předmětové vlny
- u_r - komplexní amplituda referenční vlny
- u - komplexní amplituda vlny vzniklé interakcí předmětové a referenční vlny
- i - intenzita vlny vzniklé interakcí předmětové a referenční vlny
- i_Δ - intenzita vlny vzniklé interakcí předmětové a referenční vlny při vzájemném posunutí větví
- $\mathbf{Q} = (X, Y, Z)$ - vektor prostorových frekvencí vzorku
- w - holografický signál
- w_Δ - holografický signál při vzájemném posunutí větví
- J_1 - Besselova funkce 1. stupně a 1. řádu
- J_{12} - vzájemná intenzita

- j_{12} - stupeň koherence
- W_C - koherenční šířka
- H - 3D CTF
- H_M - 3D CTF pro kvazimonochromatické světlo
- H_{2M} - 2D CTF pro kvazimonochromatické světlo
- H_{1M} - 1D CTF pro 2D model CCHM pro kvazimonochromatické světlo
- h_{CCHM} - PSF celého mikroskopu
- h_{obj} - PSF objektové větve
- h_{ref} - PSF referenční větve
- t_d - funkce propustnosti difuzoru
- σ - rozptyl fáze funkce propustnosti difuzoru

Seznam vlastních publikací

- [1] Lošťák, M., Chmelík, R., Slabá, M., Slabý, T. Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express*, 2014, 22.4, s. 4180-4195.
- [2] 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, 59.1, s. 267-336.
- [3] 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, 21.12, s. 14747- 14762.
- [4] Henzlová M., Lošťák M., Chmelík R. Theoretical study of coherence-controlled holographic microscopy in the presence of scattering media, In: 18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics. International Society for Optics and Photonics, 2012, p. 869713-869713-8.
- [5] Lošťák, M., Kolman, P., Dostál, Z., Chmelík, R. Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope, In: 17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, International Society for Optics and Photonics, 2010, s. 77461N-77461N-9.