

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Bakalářská práce

2010

Jan Marek

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Katedra experimentální fyziky

Digitální holografická mikroskopie
(Digital Holographic Microscopy)

Vypracoval: Jan Marek

Studijní program: B1701 – Fyzika

Studijní obor: Aplikovaná fyzika

Forma studia: Prezenční

Termín odevzdání práce:

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Děkuji docentu Romanu Kubínkovi za vedení, směřování a podporu v sestavování této bakalářské práce a také doktoru Františku Petrášovi za poskytnutí odborné literatury, přístupu do laboratoře a vedení experimentu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci zpracoval samostatně na základě citované literatury.

V Olomouci 1. prosince 2010

.....

Anotace bakalářské diplomové práce

Jméno a příjmení: Jan Marek

Katedra: Experimentální fyziky Př. F. UP Olomouc

Název práce:

Digitální holografická mikroskopie

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Počet stran: 54

Klíčová slova: mikroskopie, holografie, digitální holografie, digitální holografická mikroskopie, mikroskopické metody

Rok obhajoby: 2011

Resumé

Bakalářská diplomová práce s názvem „Digitální holografická mikroskopie“ pojednává o mikroskopické metodě, která využívá digitální holografie. Nepřináší do dané problematiky žádnou inovaci, či nějaký převratný objev, jen se snaží setřídít základní poznatky o principech DHM a porovnat tuto metodu s jinými mikroskopickými metodami. Zachycuje základní principy světelné mikroskopie, holografie, digitálního záznamu, což jsou základní principy DHM. Dále pojednává o mikroskopických metodách jako třeba COM, AFM, SEM, TEM a SNOM a tyto metody srovnává s DHM podle kritérií rozlišení, vlivu na vzorek, možnosti reálného záznamu a možnosti 3D zobrazení.

Annotation

Name and surname: Jan Marek

Institute: Experimental physics Pr.F. UP Olomouc

Name of the work:

Digital holographic microscopy

Work leadership: Doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Page number: 54

Key words: microscopy, holography, digital holography, digital holographic microscopy, microscopic methods

Year of publication: 2011

Summary

This work named „Digital holographic microscopy" handles about microscopic methods, which use digital holography. It brings in to the laid problems no innovation, or some revolutionary discovery, only with try true up fundamental piece of knowledge about principle DHM and compare this method with another microscopic method. It records fundamental principles light microscopy, holography, digital record, which are fundamental principles of DHM. Further handle this work about microscopic methods like even COM, AFM, SEM, TEM and SNOM and these methods compare with DHM according to criterion resolution, influence on specimen, possibilities real record and possibilities 3D picture.

Obsah

Anotace bakalářské diplomové práce	4
Resumé	4
Annotation	5
Summary	5
ÚVOD	8
I. MIKROSKOPIE	10
1. Princip světelného mikroskopu.....	10
2. Výpočet zvětšení světelného mikroskopu.....	10
3. Difrakce světla	11
4. Rozlišovací mez a numerická apertura	11
5. Vady spojné optické soustavy.....	13
I. HOLOGRAFIE.....	14
1. Princip holografie	15
2. Dva typy hologramů:	18
II. CCD A PRINCIP DIGITÁLNÍHO ZÁZNAMU	19
III. ZPRACOVÁNÍ OBRAZU A JEHO VYHODNOCOVÁNÍ (FOURIEROVA TRANSFORMACE).....	22
IV. DIGITÁLNÍ HOLOGRAFIE	26
V. EXPERIMENT NA DOKÁZÁNÍ ZÁKLADNÍCH PRINCIPŮ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFIE.....	28
1. Použitá technika.....	28
2. Průběh experimentu	30
VI. DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE (DHM).....	35
1. Opto-digitální holografická mikroskopie.....	35
2. Princip a uspořádání DHM	36
3. Výhody a využití DHM	39
3.1. Rozlišení.....	39

3.2.	3D informace.....	39
3.3.	Markerfree, non-invasively.....	39
3.4.	Zachování života vzorku.....	40
3.5.	Numerická kompenzace aberací.....	40
4.	Závěr k DHM.....	40
VII.	JINÉ MIKROSKOPICKÉ METODY.....	42
1.	Červené krvinky.....	42
2.	Elektronová mikroskopie.....	42
2.1.	Srovnání SEM a DHM.....	43
2.2.	Srovnání TEM s DHM.....	44
3.	Další metody.....	44
3.1.	Srovnání DHM s AFM.....	45
3.1.	Jiná metoda se skenující sondou SNOM.....	46
4.	COM - konfokální optická mikroskopie.....	46
VIII.	ZÁVĚR.....	51
IX.	POUŽITÁ LITERATURA.....	52

ÚVOD

Od dob pravěkých lidé zobrazují, co vidí, co je obklopuje. Nacházíme obrazy pravěkých lovců na stěnách jeskyní. V té době to dělali zřejmě z náboženských důvodů. Ve starověku malovali Egypťané na zdi příběhy a historii. Zobrazování až do renesance bylo dosti symbolické a proto v mnoha ohledech dosti nepřesné, nebo, aby se někdo nepohoršil, prostě jiné, než jak vnímáme realitu pouze očima. Jak se vyvíjelo lidské myšlení, začala být touha po tom zobrazovat co nejpřesněji a nejvěrněji s ohledem na skutečnost.

Tato touha po věrnosti a přesnosti se neprojevila jen v zobrazování, ale i ve zkoumání skutečnosti. V tomto ohledu bylo provedeno mnoho objevů, z nichž bych se zaměřil (s ohledem na téma bakalářské práce) na vynález mikroskopu, na němž se podílelo mnoho učenců 17. století, jako např. Z. Jansen, A. Van Leeuwenhoek a R. Hooke. Tento objev jistě vypomohl ve zkoumání malých objektů a ve zkoumání mikrosvěta. Druhým vynálezem, který bych rád zmínil, je vynález holografie [1,2]. Jedná se o zobrazovací techniku, která umožní na rozdíl od běžné fotografie, či filmu, trojrozměrný obraz. Teoreticky ji popsal Denis Gabor v roce 1949 [3], za což dostal v roce 1971 Nobelovu cenu. Rozvoj holografie přišel ale až s objevem laseru (1958).

Propojením těchto dvou objevů a jejich digitálním záznamem se nám otvírají nové možnosti. Vzniká digitální holografická mikroskopie[4], která s sebou přináší mnoho výhod v pozorování malých objektů.

Tato metoda je velmi dobře použitelná pro pozorování a zkoumání živých biologických preparátů [5]. Proto je s výhodou využitelná i v medicíně. Jak v reflexním režimu, tak i pro režim pro průchod paprsku je totiž možné zachovat život zkoumaných buněk a dokonce pozorovat i jejich vývoj, či jiné procesy jako například sedimentace červených krvinek [6], či vývoj a změny buněk zasažené nádorem, případně vývoj nádoru během a po léčbě, [7] a to v reálném čase díky FFT (rychlé fourierově transformaci). [8]

Pro svou dobrou rozlišovací schopnost ve vertikálním směru je digitální holografie zároveň dobře využitelná v průmyslu. S pomocí této metody je možné nacházet poruchy povrchu, měřit deformace, či např. vibrace v určitém směru. [9]

V této práci se budu zabývat funkcí jednotlivých částí digitálního holografického mikroskopu, dále jen DHM. To znamená samotným světelným mikroskopem, principem holografie a digitálním záznamem. Dále několika možnými uspořádáními DHM, která jsou

pokaždé s výhodou použitelné na pozorování různých druhů vzorku. Pokusím se zároveň porovnat tuto mikroskopickou metodu s metodami, které mají alespoň nějaké společné vlastnosti. Především co se týče typu vzorků, rozlišení či možnosti 3D zobrazení. Nekladu si za cíl, že má práce bude v nějakém ohledu objevná, nebo průlomová, ale pokusím se o uspořádání a popsání metody a použití DHM. Doufám, že mi umožní vhled do problematiky mikroskopie a že umožní lepší pochopení základních principů, které jsou v DHM využívány.

I. MIKROSKOPIE

1. Princip světelného mikroskopu

Mikroskop je optické zařízení sloužící ke zvětšení zorného úhlu při pozorování velmi malých předmětů. V nejjednodušším případě jde o centrovanou soustavu dvou spojných čoček. Přední čočka přivrácená k předmětu se nazývá objektiv a má malou ohniskovou vzdálenost f_1 , řádu několika mm. Okulár, spojná čočka blíže k oku, má ohniskovou vzdálenost f_2 větší, řádu cm. Obě čočky bývají ve skutečnosti složitější optické soustavy. Pozorovaný předmět y se umístí do malé vzdálenosti před objektiv, aby ohnisková vzdálenost objektivu f_1 byla větší než vzdálenost předmětu. Objektiv tedy vytvoří skutečný převrácený a zvětšený obraz y_1 . Okulár je nastaven tak aby tento obraz vznikl v jeho předmětové ohniskové rovině φ_2 . To znamená, že okulár bude předmět zobrazovat do nekonečna, a my ho tedy můžeme pozorovat neakomodovaným okem.

2. Výpočet zvětšení světelného mikroskopu

Tentýž předmět se nám může jevit jako větší nebo menší podle toho v jaké vzdálenosti je, nebo obecněji pod jakým zorným úhlem jej vidíme. Lidské oko ještě rozliší dva body, je-li zorný úhel, pod nímž je oko vidí, alespoň jedna úhlová minuta. Je-li předmět tak malý, že by pouhé oko ho již pro malý zorný úhel nevidělo, je třeba použít nějaký optický přístroj. Nejjednodušší je lupa, ale zde se budeme bavit o světelném mikroskopu.

To co je u mikroskopu důležité, je jeho zvětšení. U velmi malých předmětů je zorný úhel tak malý, že naše oko již není schopno je vnímat. Proto si pomůžeme zvětšením zorného úhlu. Zvětšení mikroskopu pak určíme poměrem

$$Z = \frac{\sigma'}{\sigma} \approx \frac{tg\sigma'}{tg\sigma} = \frac{y_1'}{f_2} \cdot \frac{l}{y}$$

Kde σ' je zorný úhel, pod nímž je vidět předmět v mikroskopu a σ je zorný úhel, pod nímž by byl předmět vidět v konvenční zrakové vzdálenosti l . Dále pak y_1' je reálný převrácený a zvětšený obraz předmětu y , f_1 resp. f_2 jsou ohniskové vzdálenosti objektivu, resp. okuláru. Po pár dalších úpravách této rovnice dostaneme vztah

$$Z = \frac{\Delta}{f_1 f_2} l = Z_1 Z_2$$

Kde Δ je optický interval (což je vzdálenost f_1' a f_2 . S čárkou značím obrazovou ohniskovou vzdálenost.) a Z_1 zvětšení objektivu a Z_2 je zvětšení okuláru. Celkové zvětšení mikroskopu je tedy násobek zvětšení okuláru a objektivu. Chceme-li tedy změnit zvětšení mikroskopu, můžeme to udělat hned třemi způsoby. Výměnou okulárů, výměnou objektivů, což je nejčastější, nebo změnou optického intervalu, což se však zpravidla neprovádí. [10]

3. Difrakce světla

Vedle vad spojných soustav bude výsledek pozorování omezovat rovněž difrakce světla. To je důvod, proč nemůžeme dosáhnout neomezeného rozlišení. Difrakce neboli ohyb světla, je důsledkem relace neurčitosti mezi pravděpodobností detekce fotonu v dané pozici a jeho hybnosti. Omezíme-li rovinou vlnu štěrbinou o šířce a , pak se světlo za štěrbinou začne ohýbat do úhlu. Tento vztah platí pro malé úhly

$$\alpha = \frac{\lambda}{a}.$$

Difrakci můžeme popsat pomocí Huygensova – Fresnelova principu, který říká, že každý bod vlnoplochy světelného pole můžeme považovat za bodový zdroj sekundárních světelných vln o stejné frekvenci, jakou má primární. Výslednou vlnu v libovolném bodě prostoru pak dostaneme superpozicí příspěvků všech sekundárních vln. V čem že je difrakce při pozorování mikroskopem tak nepříjemná? V důsledku difrakce je bod zobrazen do rozptýlené plošky, která odpovídá

$$s = 0,61 \frac{\lambda}{u'},$$

kde u' je aperturní úhel. Z toho plyne, že body, které budou až moc blízko u sebe, nebude možno nikdy rozlišit. Abychom dva blízké body mohli rozlišit, musí být splněno Rayleighovo kritérium: dva body jsou rozlišené, pokud centrální maximum kroužku 1 právě splývá s prvním minimem kroužku 2.

4. Rozlišovací mez a numerická apertura

I při zobrazování nejmenších předmětů jde vždy o ohybový jev, který vzniká difrakcí na drobné překážce. I sama zobrazovací soustava dává světlu prostor pro ohybové jevy, a to na kruhové clonce, vstupní pupile. Difrakce se projeví i v samotném oku. Rozlišovací

schopnost je tedy omezena ohybem světla a je tím větší, čím kratší je vlnová délka světla, které používáme pro zobrazování. Pro vysvětlení použijme Abbeovu teorii rozlišovací schopnosti mikroskopu. Tu posuzujeme podle nejmenší vzdálenosti dvou bodů preparátu, kterou ještě rozlišíme. Předpokládejme, že pozorujeme mikroskopem lineární mřížku osvětlenou rovnoběžným svazkem paprsků kolmých k mřížce. Je-li α odklon krajních paprsků, které ještě vstoupí do objektivu od optické osy, můžeme mřížku vidět pouze, je-li splněna podmínka

$$\sin \alpha = \frac{\lambda}{d},$$

kde λ je vlnová délka světla a d je vzdálenost dvou otvorů mřížky. Odtud dále plyne

$$d = \frac{\lambda}{\sin \alpha} = \frac{\lambda_0}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda_0}{A},$$

kde $A = n \sin \alpha$ a nazývá se numerická apertura. A d se nazývá rozlišovací mez. Tento vztah bude platit pouze pro kolmé osvětlení preparátu. Bude-li preparát osvětlen šikmým svazkem paprsků, nebo jinak obecnějším, bude rozlišovací mez poloviční. Nejmenší pozorovatelná délka je tedy u světelného mikroskopu rovna maximálně poloviční vlnové délce světla dělená numerickou aperturou, jejíž hodnoty však nejsou podstatně větší než jedna. [10]

Porovnejme nyní různá rozlišovací kritéria. Zatím bylo zmíněno Abbeovo a Rayleighovo kritérium. Dále můžeme ještě zmínit Sparrowovo kritérium. Nejvíce obecné je Rayleighovo kritérium, kde po úpravě dostaneme pro rozlišovací mez vztah

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = 0,61 \frac{\lambda}{A}.$$

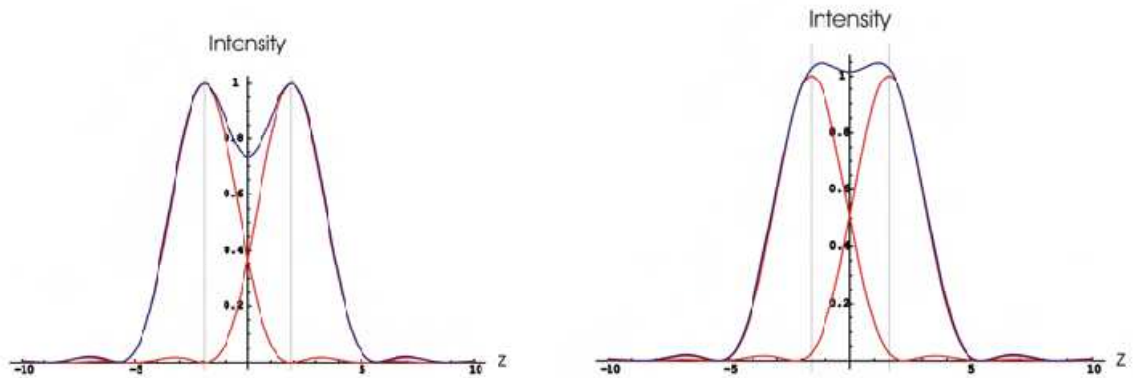
Tento vztah platí obecně pro libovolný tvar apertury a pro libovolný druh světla.

Pro pozorování štěrbin či nestejně velkých bodů lze využít Sparrowova kritéria, které říká, že rozlišitelné jsou i štěrby, které jsou blíže, než jak povoluje Rayleighovo kritérium. Je to způsobeno tím, že centrální minimum nemizí okamžitě, jak se začnou štěrby přibližovat, ale mizí postupně. Dostaneme se až k tomu, že rozlišovací vzdálenost je

$$d = 0,5 \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2A}.$$

Abbeovo rozlišovací kritérium má podmínky nejpřísnější, a je popsáno v předchozím odstavci, proto se již k němu nebudeme vracet.

Ukážeme ještě na grafech rozdíl mezi Rayleighovým kritériem a Sparrowovým kritériem.



Obr 1. Ukázka Rayleighova rozlišovacího kritéria (nalevo) a vedle při posunutí štěrbin k sobě mizení centrálního minima, které podle Sparrowova kritéria (napravo) umožňuje rozlišení i dále než povoluje Rayleighovo kritérium. Grafy převzaty z [11].

5. Vady spojné optické soustavy

V ideálním světě by se nám zobrazoval spojnou optickou soustavou bod zase jako bod. I v reálném světě by to tak mohlo fungovat, ale musely by se splnit podmínky, že se zobrazení děje nulovými paprsky a světlo musí být přísně monochromatické, aby se lámalo při jediném indexu lomu. Jelikož však jsou tyto podmínky příliš přísné, až nereálné jsou zobrazení zatížena různými vadami, aberacemi. Tyto vady nám budou způsobovat chyby a nepřesnosti při zobrazování pomocí optických soustav, jako je např. mikroskop. V našem případě se třeba barevná vada neprojeví, protože budeme pracovat s monochromatickým laserem, ale vadám otvorové, astigmatizmu, komě a zkreslení se úplně nevyhneme, ač se dají do značné míry kompenzovat.

I. HOLOGRAFIE

Optická zobrazení, jako např. fotografie, film, dalekohled, využívají toho, že světelné paprsky jsou vzájemně nezávislé, šíří se přímočaře, lámou se a odráží. Pak pro případ nekoherentního světla můžeme zaznamenávat pomocí optických soustav součty hustot zářivých toků dopadajících z jednotlivých bodů předmětu na detektor (fotografický film...) a to úměrný druhé mocnině amplitud, takže fotografický záznam poskytuje pouze jeden průmět předmětu

$$\varphi = k E_1^2 + k E_2^2 + 2k E_1 E_2 \cos(\gamma_2 - \gamma_1).$$

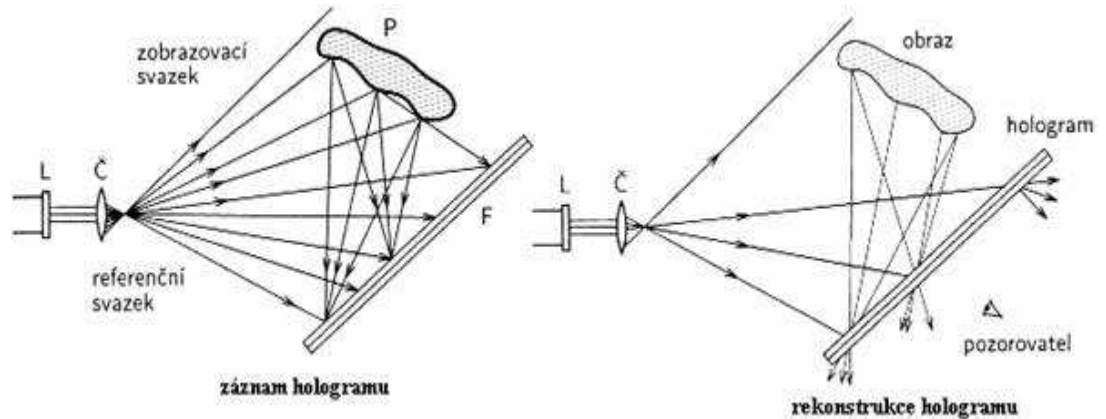
Kde E_1 a E_2 jsou amplitudy světelných vln a k je konstanta. Rovnice udává výpočet pro hustotu zářivého toku dvou světelných vln, přičemž pokud se budeme bavit o nekoherentních světelných paprscích, třetí člen v rovnici vypadne, a proto bylo možno konstatovat, že součty zářivých toků jsou úměrné součtu druhých mocnin amplitud.

Pokud bychom ale chtěli započítat i třetí člen, což lze započítáním fázových posunů, které přísluší vzdálenostním posunutí dílčích vln, musíme použít prostorově i časově koherentní monochromatické světlo umožňující interferenci a tím získáme informaci nejen o rozložení amplitud vln, šířících se z jednotlivých bodů předmětu, ale i rozložení fází vln charakterizující vzdálenostní relace mezi body předmětu ve směru šíření světla. Chceme-li rozdělení fází jednotlivých vln vysílaných body předmětu je zapotřebí referenční svazek, který nám umožní posuzovat rozdělení fází jednotlivých vln předmětového svazku vzhledem k rozložení fází jednotlivých vln referenčního svazku. Například v předešlé rovnici vezměme γ_2 jako fázi referenčního paprsku a γ_1 fázi předmětového paprsku, pak je γ_2 pro všechny předmětové paprsky stejné a z fázového rozdílu $\gamma_2 - \gamma_1$ potom vychází fáze předmětového svazku. Na této úvaze funguje holografie. [10]

Holografie byla objevena a teoreticky popsána roku 1949 britským fyzikem Denisem Gaborem (1900 - 1979, Nobelova cena v roce 1971). Slovo holografie pochází z řečtiny a vznikne složením dvou slov *holos* (úplný) a *grafie* (záznam) znamená tedy úplný obraz. Je to metoda, která umožňuje záznam obrazu ve třech rozměrech. K rozvinutí této metody bylo ale ještě třeba pár let počkat, než byl vynalezen laser (1960), který je dostatečně bodovým zdrojem světla, které je dostatečně koherentní, aby bylo možno holografii uskutečnit. Záznam předmětu v citlivé vrstvě fotografického filmu se jmenuje hologram a nese informaci, nejen o intenzitě (tak jako klasická fotografie, která je přímočarým záznamem světla odraženého a rozptýleného daným objektem), ale také o fázi světla

odraženého od zaznamenávaného předmětu. Hologram tedy zachycuje navíc i způsob, jakým se světlo na povrchu objektu rozptyluje. Na základě toho lze určit prostorové rozložení jednotlivých bodů pozorovaného objektu.

1. Princip holografie



Obr 2. Princip holografie. Obrázek převzat z [12].

Doposud jsme se zabývali úvahou, jak se holografie liší od běžného optického zobrazení. Na obr 1. je ukázáno, jak lze hologram sestavit, a jak jej rekonstruovat. Světelné vlny vyzařované laserem L se opticky (např. čočkovým objektivem Č) rozdělí na dva svazky. Jeden se nechá dopadat na zobrazovaný objekt P tak, aby odražené vlny dopadaly na fotografickou desku F, a současně na ni dopadá také druhý, tzv. referenční (srovnávací) svazek laserových světelných vln. Referenční svazek vln může být odražen i od zrcadla. Zrcadlo ovšem není bezpodmínečně nutné, ale může se použít jako „přesměrovač“ chodu světelných vln. Toto uspořádání ukážeme později. Citlivost materiálů pro zachycení hologramu musí být vysoká: více jak 2000 čar na milimetr délky. Taková jemná struktura ale vyžaduje naprostý klid při záznamu, pohyb zaznamenávaného obrazce vzhledem k citlivé vrstvě nesmí překročit zlomky tisícín milimetru.

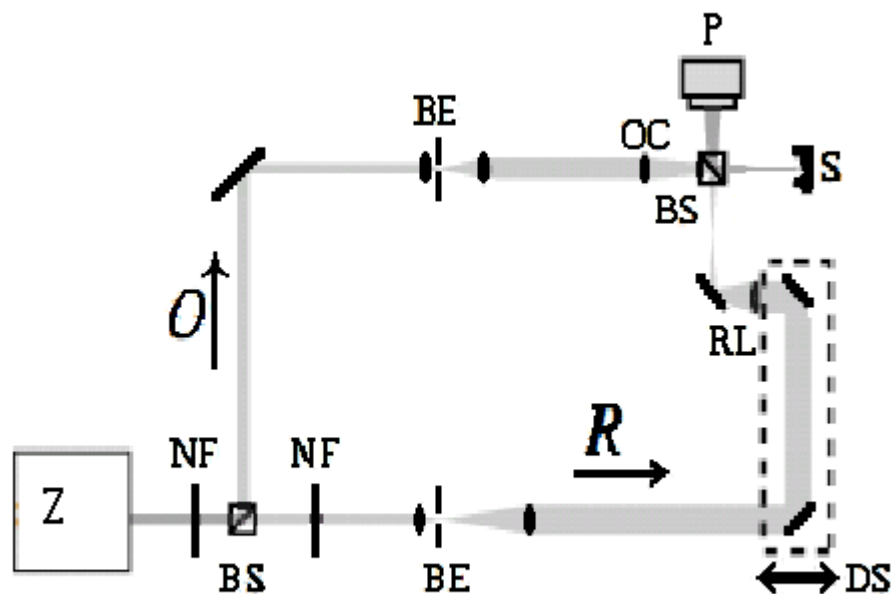
Jeden svazek byl rozptýlen předmětem a druhý dopadá přímo, proto nejsou vlny obou svazků již ve fázi. Rozdílná fáze světelných paprsků se projeví při interferenci. Na fotografické desce vzniká po vyvolání interferenční obrazec, který je tvořen nepravidelně rozloženými interferenčními maximy a minimy. To co lze na hologramu spatřit, nemusí jevit žádnou spojitost se zaznamenaným vzorkem. Obraz vzorku lze získat teprve jeho rekonstrukcí a to tak, že hologram osvětlíme laserovým světlem pod stejným úhlem, pod nímž dopadal na fotografickou desku referenční svazek světla při zhotovování hologramu. Tím se vytvoří

obraz původního objektu ve směru, v němž se tento předmět nacházel. Pokud by se měnil poměr vlnových délek světla, pomocí nichž hologram pořizujeme, vzhledem k vlnovým délkám, jimiž ho rekonstruuje, dosáhneme zvětšení nebo zmenšení obrazu ve srovnání se zaznamenávaným předmětem. [13] Informace o každém bodu zaznamenávaného předmětu je přitom díky interferenci světla „rozptýlena“ v celé ploše hologramu. Proto je možné i z pouhého úlomku holografické desky rekonstruovat celý obraz. Kvalita takto rekonstruovaného obrazu bude tím horší, čím menší úlomek hologramu pro rekonstrukci použijeme. Fakt, že informace o každém bodu zaznamenávaného předmětu je zachycena v celé ploše hologramu, vyplývá z toho, že světlo se šíří z daného bodu (zaznamenávaného předmětu) všemi směry. Někteří se dokonce domnívají, že vesmír je vlastně holografickou projekcí a my vnímáme jen oddělené části tohoto hologramu. To by znamenalo, že každá částice nese informaci o celém vesmíru. [14]

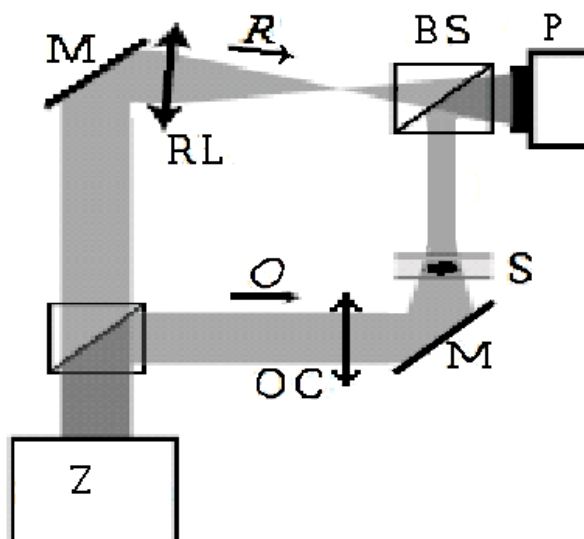
Uvedme ještě pár zajímavostí. Pořídíme-li hologram čočky (spojky nebo rozptylky), převezme hologram její vlastnosti. To znamená, že se obraz bude při průchodu hologramem zmenšovat nebo zvětšovat. Takto lze pomocí hologramů sestavit mikroskop i dalekohled, který bude mít stejné vlastnosti jako dalekohled či mikroskop se skleněnými čočkami.

Pro získání hologramu můžeme použít dvou možných uspořádání. Podle toho, které uspořádání využijeme, nazýváme „off-axis“ holografii a „in-line“ holografii. Off-axis holografie je možno použít jak pro vzorky reflexní, tak pro transmisní. V tomto uspořádání je nutné použít paprskový dělič, aby se od sebe oddělily objektový a referenční paprsek, které se následně sbíhají na detektor, pod nenulovým úhlem, aby vytvořily hologram.

Při in-line holografii se paprsek nedělí, ale vzorek je prosvícen jedním svazkem paprsků, u kterého díky prostupu látkou dochází k fázovému posunu a kolem okraje vzorku prochází zbytek svazku, který se díky této překážce ohýbá a dopadá na detektor jako referenční svazek, bez fázového posunu. Můžeme tedy i tady mluvit o dvou paprscích, co je však důležité je to, že na detektor dopadají pod stejným úhlem. Mezi sebou tedy paprsky svírají úhel nulový.



Obr 3. Možné uspořádání záznamu off-axis holografie na odraz. Jednotlivé symboly: Z - laser, BS - dělič paprsků, P - záznamový materiál, S - vzorek, BE-paprskový expander, NF-filtr, RL resp. OC-čočka v referenční resp. v objektové větvi, DS- zpoždovací systém, R - referenční paprsek, O- objektový paprsek.



Obr. 4. Možné uspořádání pro záznam hologramu pro transmisní vzorky. Označení zachováno, jako u obr. 2.

2. Dva typy hologramů:

1. transmisní - referenční i obrazový svazek paprsků dopadají na stejnou stranu fotografického filmu. Takový hologram lze pozorovat prosvícením filmu laserovým světlem stejné vlnové délky, které bylo použito při záznamu. Laserové světlo se láme na interferenčním obrazci, napodobuje tak rozptylové vlastnosti fotografovaného objektu a promítá jeho trojrozměrný obraz. Tento systém se používá v různých muzeích, výstavních sálech, ..., v nichž jsou návštěvníkům tímto způsobem ukazovány trojrozměrné snímky vzácných předmětů, které z nejrůznějších důvodů nemohou být přímo vystaveny.

2. reflexní (odrazové) - referenční i obrazový paprsek dopadají na opačné strany filmu. Tyto hologramy lze pozorovat v přirozeném světle. Odfiltrují všechno světlo kromě toho, které je vhodné pro pozorování hologramu.

Na tomto principu jsou založeny některé odznaky, ochrana kreditních karet a dokladů, cenných kuponů (např. MHD)... [13]

II. CCD A PRINCIP DIGITÁLNÍHO ZÁZNAMU

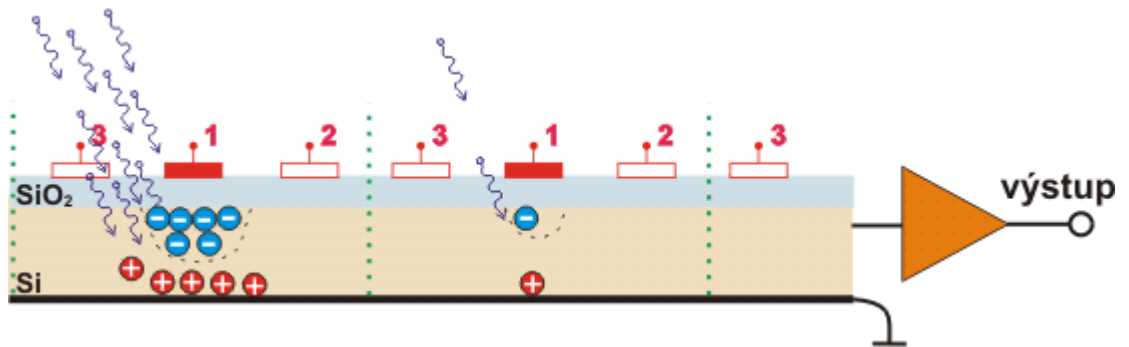
V digitální holografické mikroskopii je důležité zaznamenat obraz v digitální formě, pro další numerické zpracování a tedy se nyní podívejme na to, jak obraz, který získáme pomocí mikroskopu a holografií můžeme zaznamenat. Numerické metody budou popsány později. Nyní popíšme, jak dostat informaci do počítače, jak ji digitalizovat, aby se s ní mohlo pracovat.

Základem bude CCD kamera, která převede obrazovou informaci a elektrický signál. Zkratka CCD pochází z anglického Charge-Coupled Device, což v překladu znamená zařízení s vázanými náboji. CCD prvek je znám od roku 1969, kdy první snímač tohoto druhu sestavili v Bellových laboratořích pánové Williard Boyle a George E. Smith. Tento prvek funguje na principu fotoefektu, za jehož vysvětlení dostal Albert Einstein v roce 1921 Nobelovu cenu za fyziku.

Dopadne-li na povrch látky foton o správné hodnotě energie, vyrazí tento foton z atomu látky elektron z jedné hladiny do hladiny vyšší, tedy do excitovaného stavu, případně úplně mimo dosah atomu. Při tomto jevu předá foton elektronu energii o hodnotě $E = h\nu$, kde ν je frekvence fotonu a h je Planckova konstanta. Této energii se říká ionizační energie. Při delších vlnových délkách (nizkých frekvencích a tedy i energiích) se jev neprojeví, protože energie fotonu nestačí na uvolnění elektronu z obalu atomu. Dostane-li se elektron mimo dosah atomu, pak se jev nazývá vnější fotoefekt. V polovodičích, tedy i v CCD detektorech se využívá vnitřního fotoefektu, kdy následkem absorpce fotonů dochází k elektronovým přechodům na hladinu vyšší energie a k vytvoření pohyblivých nosičů náboje. Dostane-li se tedy elektron alespoň do excitovaného stavu, je v polovodiči schopen podílet se na elektrické vodivosti. Toho se využívá např. u fotodiod, kde se fotoefektem získaný náboj ve fotodiodě odvádí pomocí elektrod, a tedy jsou zdrojem elektrické energie.

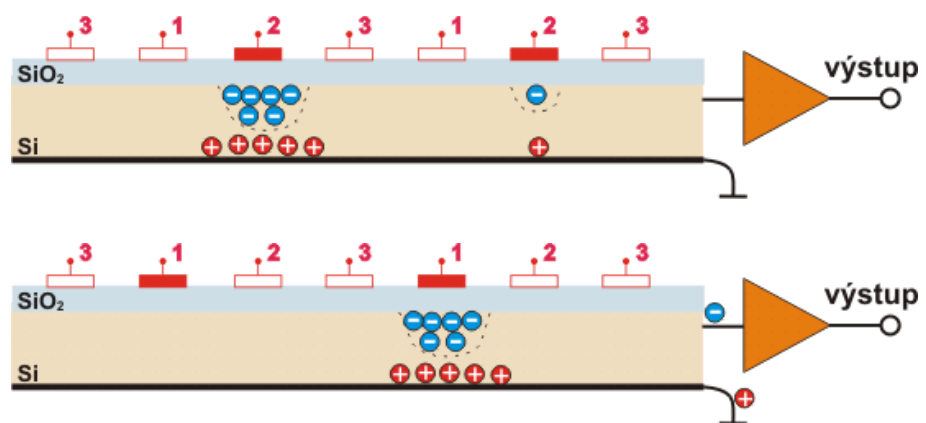
Záznam obrazu lze rozdělit na dvě etapy a to expozici a snímání (čtení) obrazu. Při expozici je CCD detektor vystaven působení světla a na jeho jednotlivé pixely dopadají fotony. Dopadající fotony excitují v polovodiči elektrony, které jsou pak přitahovány ke kladně nabitým elektrodám. Tyto elektrody jsou však izolovány od polovodiče a tedy náboj zůstane v blízkosti elektrody, ale neopustí polovodič. Po elektronech zůstanou v polovodiči tzv. díry, které vůči svému okolí vykazují kladný náboj a jsou přitahovány na spodní zápornou elektrodu CCD detektoru. Na obrázku je znázorněno, že na levý pixel dopadlo více fotonů než na pixel vpravo, proto u jeho elektrody je shromážděno více

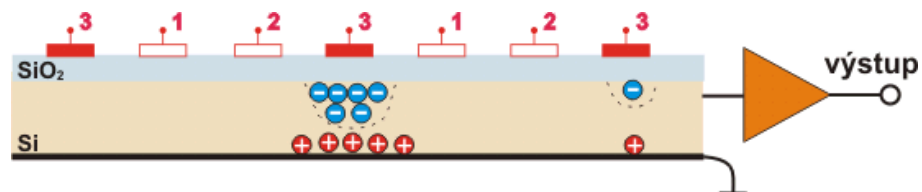
elektronů než u pixelu vpravo. Na obrázku jsou pixely znázorněny a vzájemně odděleny zelenou tečkovanou čarou.



Obr 5. Schéma expozice CCD detektoru. Obrázek převzat z [15].

Po ukončení expozice začne se snímáním obrazu. Na množiny elektrod 1, 2 a 3 přivádíme trojfázový hodinový signál (existují i CCD detektory se čtyřfázovým nebo naopak dvoufázovým čtením). Na elektrodách 2 se začne pozvolna zvyšovat napětí, zatímco na elektrodách 1 se souběžně snižuje. Díky tomu jsou shluky elektronů přitahovány pod elektrody 2. Postupně se celý děj opakuje mezi elektrodami 2 a 3, dále mezi 3 a 1 a tak stále dokola. Shluky elektronů z jednotlivých pixelů se tak posouvají přes sousední pixely směrem k výstupnímu zesilovači. Tento zesilovač pak zesílí malý proud odpovídající počtu elektronů v jednotlivých pixelech na napět'ové úrovni vhodné pro další zpracování obrazu. [15]





Obr 6. Schéma snímání obrazu z CCD detektoru. Převzato z [15].

Takto by fungoval CCD senzor v jedné dimenzi, ale pro zobrazování obrazu je důležité zaznamenávat ve dvou dimenzích. Proto popíšeme ještě princip plošného CCD senzoru. Záznam je stejný jako u 1D senzoru, ale snímání obrazu je trochu komplikovanější. Základní konstrukce dvojrozměrného CCD je pouhým spojením mnoha lineárních CCD na jediném čipu. Namísto toho, aby náboje na koncích řad vstupovaly do obrazových zesilovačů, vstupují ovšem do dalšího lineárního CCD, které je k řadám kolmé a tímto CCD teprve postupují k jedinému zesilovači na jeho konci. Obraz se snímá tak, že se nejprve trojfázovým posuvem y vysune první pixel ze všech svislých CCD do spodního vodorovného. Z toho se pak opakovaným trojfázovým posuvem x celý řádek naposouvá k obrazovému zesilovači. Poté se dalším trojfázovým posuvem y posune druhý pixel ze všech sloupců do vodorovného CCD. Celý tento cyklus se opakuje, dokud nejsou ze sloupců vyprázdněny všechny pixely. Tedy by se dalo říci, že se CCD senzor chová podobně jako paměťový registr.

III. ZPRACOVÁNÍ OBRAZU A JEHO VYHODNOCOVÁNÍ (FOURIEROVA TRANSFORMACE)

V předchozí kapitole jsme popsali, jak lze digitálně zaznamenat obraz tak, aby se mohl dále zpracovávat v počítači. CCD senzor zaznamenává obraz po pixelech, a tedy není možné zachytit obraz spojitě, ale pouze digitálně. Následně v počítači tento obraz můžeme dále zpracovávat a vyhodnocovat, či pomocí monitoru zobrazovat.

Ke zpracování a vyhodnocování se využívá různých transformací např. Fresnelova-Kirchhoffova, Fourierova či jiné. Uvedme základní vztahy Fourierovy transformace, protože pro digitální holografii je velmi cenná. Při zachování podmínky, aby na detektor dopadaly rovinné vlny, resp. vlny o stejné křivosti, mluvíme o Fourierově holografii, resp. kvazi-Fourierově holografii a rekonstrukce může probíhat právě pomocí Fourierovi transformace.

Fourierova transformace se využívá pro zpracování a spektrální analýzu spojitěho periodického i neperiodického signálu. Jedná se o zobrazení, které každému signálu přiřazuje jinou funkci, z jejíchž vlastností lze vyčíst informace o původním signálu. Výsledkem Fourierovy transformace je spektrum jako funkce spojitě frekvence. [16]

Fourierova transformace je definovaná integrálem

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \exp(-j\omega t) dt .$$

Kde $s(t)$ je daný signál reálné proměnné t , j je komplexní jednotka. Zkráceně lze také psát $S(\omega) = F[s(t)]$, kde F značí Fourierovu transformaci. Fourierův obraz $S(\omega)$ se také někdy nazývá Fourierovým spektrem signálu $s(t)$. Fourierova transformace je invertibilní, a tedy mám-li Fourierův obraz $S(\omega)$ mohu zpětně dopočítat původní signál $s(t)$ a to takzvanou zpětnou Fourierovou transformací

$$s(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) \exp(j\omega t) d\omega .$$

Pomocí této transformace lze zpracovávat signály spojitě periodické i neperiodické. Jestliže zpracováváme signál počítačem, pak máme signál digitální, nebo ho musíme digitalizovat a s tím je spojeno několik obtíží. Zaprvé musíme užít diskrétní Fourierovu transformaci, která se od spojitě liší.

Diskrétní Fourierova transformace se využívá k výpočtu obrazu (spekter) časových posloupností. Lze ji odvodit ze spojité Fourierovy transformace a to diskretizací v časové i frekvenční oblasti. Formálně můžeme říci, že diskrétní Fourierova transformace vytvoří z konečné posloupnosti $\{s(n) \mid n = 0, 1, \dots, N-1\}$ obrazovou posloupnost shodné délky $\{S(k) \mid k = 0, 1, \dots, N-1\}$. Je-li výchozí posloupnost tvořena navzájem stejně vzdálenými vzorky signálu $s(nT)$, tvoří obrazová posloupnost rovněž navzájem stejně vzdálené spektrální čáry $S(k\Omega)$.

Fourierova transformace diskrétního signálu se píše ve tvaru

$$S(\omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} s(nT)e^{-j\omega nT},$$

kde $s(nT)$ je diskrétní signál, $T = 1/f$ je perioda vzorkování. Tento vztah dostaneme, nahradíme-li ve spojité Fourierově transformaci integrál sumou. Vezmeme-li v potaz předešlou úvahu o posloupnosti konečné délky, lze tuto transformaci upravit do tvaru

$$S(k\Omega) = \sum_{n=0}^{N-1} s(nT)e^{-jk\Omega nT} = \sum_{n=0}^{N-1} s(nT)e^{-jkn\frac{2\pi}{N}}, \quad k = 0, 1, \dots, N-1.$$

I diskrétní Fourierova transformace má svojí zpětnou transformaci, která se dá opět odvodit od spojité a to opět diskretizací v časové a spektrální oblasti a tedy náhradou integrálu za sumu. Zpětná Fourierova transformace bude vypadat takto

$$S(nT) = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} S(k\Omega) e^{jk\Omega nT} = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} S(k\Omega) e^{jkn\frac{2\pi}{N}}, \quad n = 0, 1, \dots, N-1.$$

Tato metoda je sice účinná, ale vzhledem k tomu že pro výpočet N hodnot $S(k\Omega)$ diskrétní Fourierovy transformace je třeba N komplexních násobení a $N(N-1)$ komplexních sčítání a vzhledem k tomu, že, aby výsledky byly co možná nejpřesnější, potřebujeme N co možná největší, je Fourierova transformace poměrně dost zdoluhavá metoda. Proto byl vymyšlen algoritmus, zvaný Fast Fourier Transform neboli rychlá Fourierova transformace. Tato metoda umožní snížení počtu operací a tedy zrychlení výpočtu Fourierovy transformace. S tímto algoritmem přišli v roce 1965 J. W. Cooley a J. W. Tukey a jejich algoritmus přinesl revoluci do digitálního zpracování signálu. Od té doby bylo vymyšleno již více algoritmů pro aproximaci výpočtu Fourierovy transformace (např. Winogradovův, Raderův a jiné.) každý má své výhody a nevýhody, ale všechny mají za cíl zkrátit dobu výpočtu transformace. [17]

Uvedme příklad, jak je možno Fourierovu transformaci využít v praxi pro zpracování obrazu, tak jak je uveden ve článku [18] pro in-line holografii. Bereme uspořádání kde bodovým zdrojem, a tedy sférickou vlnou je prosvícen prvek ze vzdálenosti několika *mm*. Hologram je snímán na CCD kameru ve vzdálenosti několika *cm* od objektu. Hologram, který zachytí CCD senzor, označíme jako $I(k, \vec{K})$, kde k je vlnové číslo a \vec{K} je polohový vektor bodu (X, Y, Z) na hologramu, kde jako počátek je brán bodový zdroj. K rekonstrukci tohoto hologramu lze použít Helmholtzova – Kirchhoffova integrálního teoremu, který je dán vztahem

$$U(\vec{r}) = \frac{1}{2\pi Z^2} \iint_S I(\vec{K}) \exp\left(ik \frac{\vec{r} \cdot \vec{K}}{|\vec{K}|}\right) d\sigma.$$

Kde $\vec{r} = (x, y, z)$ polohový vektor rekonstruovaného objektu a $d\sigma$ je elementární povrch oblasti. Pokud zachytíme hologram na rovinný senzor ve vzdálenosti d od bodového zdroje, můžeme vztah přepsat

$$U(x, y, z) = \frac{1}{2\pi d^2} \iint I(X, Y) \exp\left(ik \frac{zd}{\sqrt{X^2 + Y^2 + d^2}}\right) \times \exp\left[ik \left(\frac{xX + yY}{\sqrt{X^2 + Y^2 + d^2}}\right)\right] dXdY.$$

Dále můžeme zavést substituci

$$\tilde{X} = \frac{X}{\sqrt{X^2 + Y^2 + d^2}}; \tilde{Y} = \frac{Y}{\sqrt{X^2 + Y^2 + d^2}}.$$

A tedy v podstatě se zaměříme na jiný bod, již ne X, Y, ale \tilde{X} , \tilde{Y} . Předcházející rovnice bude vypadat takto

$$U_{(x,y,z)} = \frac{1}{2\pi d^2} \iint I(\tilde{X}, \tilde{Y}) \exp\left(ikz\sqrt{1 - \tilde{X}^2 - \tilde{Y}^2}\right) \exp\left[ik(x\tilde{X} + y\tilde{Y})\right] d\tilde{X}d\tilde{Y}.$$

Ted' už zbývá pouze symbolické přepsání

$$U_{(x,y,z)} = FT\{I(\tilde{X}, \tilde{Y})\varphi(\tilde{X}, \tilde{Y}, z)\}.$$

Kde $\varphi(\tilde{X}, \tilde{Y}, z) = \exp(ikz\sqrt{1 - \tilde{X}^2 - \tilde{Y}^2})$ a FT značí fourierovu transformaci. Kontrastní hologram je pozorován v intepolovaném bodě (\tilde{X}, \tilde{Y}) . Takto interpolovaný

hologram je násoben fázovým faktorem $\varphi(\tilde{X}, \tilde{Y}, z)$ a pro Fourierovu transformaci se užívá FFT algoritmus. [18]

Takto jsem popsal pouze jednu z možností, jak lze získaná data zpracovávat. Lze využít např. konvoluce [18], či fresnelova algoritmu, který je z uvedených možností rekonstrukce nejobecnější.

IV. DIGITÁLNÍ HOLOGRAFIE

Digitální holografie je principiálně úplně stejná, jako běžná holografie, jen s rozdílem, že záznam neprobíhá na fotografický film či jiné fotosenzitivní materiály, ale hologram je zaznamenáván a CCD kameru a zpracováván počítačovým softwarem. Tím se nám podaří zkrátit čas rekonstrukce, protože probíhá v počítači a není tedy nutno ji provádět jako druhý krok, jako u běžné holografie. Avšak se zápisem na CCD kameru je spojeno několik malých problémů, které se pokusím nyní naznačit.

Pro záznam hologramu se využívá fotosenzitivních materiálů, převážně krystalů halogenidu stříbra a to pro jejich vysoké rozlišení, které je kolem 2000řádků/mm. Pro srovnání, běžný fotografický film má 500řádků/mm. Toto rozlišení, které je tento materiál schopen zaznamenat je velmi výhodné pro záznam hologramu, protože jsme na něm schopni rozeznat velmi přesně jednotlivé interferenční proužky. Toto rozhodně mluví v prospěch běžné holografie, ale má i své velké nevýhody. Zaprvé je třeba udělat dva kroky k získání obrazu, záznam hologramu a následně rekonstrukci. Zadruhé je třeba záznamový materiál chemicky upravovat, což je časově náročné a může to vést i k drobným chybám záznamu a zatřetí, výsledný obraz se nedá hned numericky zpracovat. Tedy tato metoda je velice zdlouhavá.

Na rozdíl od toho, digitální holografie pracuje v reálném čase, tedy bez chemických úprav a bez potřeby druhého kroku pro rekonstrukci. Uvedme však zásadní problém této metody. Rozlišení CCD kamery se pohybuje kolem 100řádků/mm, takto malé rozlišení bude jen těžko schopné interferenčními proužky rozlišit. Představíme-li si CCD kameru jako difrakční mřížku s tím rozdílem, že otvory neohýbají světlo, ale zaznamenávají paprsky, které na ně dopadnou, mohli bychom zapsat pro úhel dopadajících paprsků referenčních a objektových toto, asi jako pro difrakční mřížku

$$\sin \alpha = \frac{\lambda}{b},$$

kde α je hledaný úhel, λ je vlnová délka použitého světelného paprsku, a b je mřížková konstanta (v našem případě šířka jednoho pixelu). To v praxi znamená, že když použijeme laser o vlnové délce 632,8nm a vezmeme-li v potaz, že velikost pixelu CCD kamery je $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ a zohledníme-li, že pro registraci interferenčního proužku je zapotřebí minimálně dvou pixelů, vyjde nám jako nutná podmínka pro úhel mezi referenčním a objektovým svazkem: $\alpha = \arcsin\left(\frac{632,8\text{nm}}{2 \times 8 \mu\text{m}}\right) \approx 2^\circ$. [19]

Z toho vyplývá, že buď můžeme zobrazovat digitální holografii jen velmi malé předměty, nebo velmi vzdálené předměty. A to vždy tak, aby byla zajištěna podmínka, že objektový a referenční svazek při dopadu na CCD kameru svírají maximálně úhel $\alpha \approx 2^\circ$.

V případě, že tato podmínka totiž nebude dodržena, pak zákonitě dojde k převzorkování (Oversampling), a to povede k nežádoucímu jevu, který se nazývá aliasing. To v češtině znamená falšování, či optický klam. Aliasing se projeví tím, že na obrazci se objeví nepravidelné pruhy s výrazně menší hodnotou frekvence, než by měly mít ve skutečnosti. Aby nedošlo k aliasingu, musí být vzorkovací frekvence rovna minimálně dvojnásobku nejvyšší frekvence obsažené ve vzorkovaném signálu - tzv. Shannonův-Nyquistův teorém jež se dá formálně napsat

$$v = \frac{1}{2\Delta x}.$$

Pokud tuto podmínku nespĺňuje, dochází k překrytí frekvenčních spekter vzorkovaného signálu a tedy ke ztrátě informace.

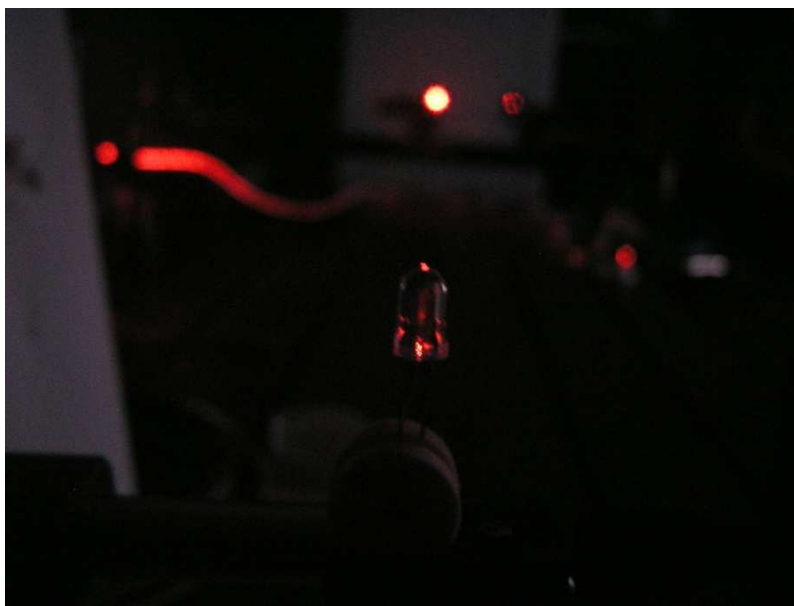
Z předešlého vzorce vyplývá, že CCD kamera, která má velikost pixelu $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ bude mít prostorovou frekvenci kterou je ještě schopen zachytit 62,5 proužků/mm, což je pro holografii velmi málo a je třeba tedy velmi přesně zachovat podmínku o úhlu, která nám zabrání, aby došlo ke ztrátě informace kvůli aliasingu.

V. EXPERIMENT NA DOKÁZÁNÍ ZÁKLADNÍCH PRINCIPŮ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFIE

Tento experiment má za cíl ukázat základní principy záznamu hologramu a jeho následné zpracování a rekonstrukci pomocí Fourierovi transformace.

Jako experimentální uspořádání první části experimentu jsme zvolili kvazi-fourierovskou, bezčočkovou off-axis holografii pro transmisní materiály, aby bylo možno při zpracování využít Fourierovy transformace pro rekonstrukci hologramu. Jako objekt byla zvolena LED dioda a to vzhledem ke své velikosti a dobré světelné propustnosti. Tato dioda je zobrazena na (Obr 7).

Druhá část experimentu je ukázka in-line holografie u předmětu na průchod. Jako předmět byl zvolen záměrný kříž. Jako světelný zdroj byl zvolen modrý laser pracující na vlnové délce $\lambda = 473nm$.



Obr.7: Fotografie LED diody použité v experimentu.

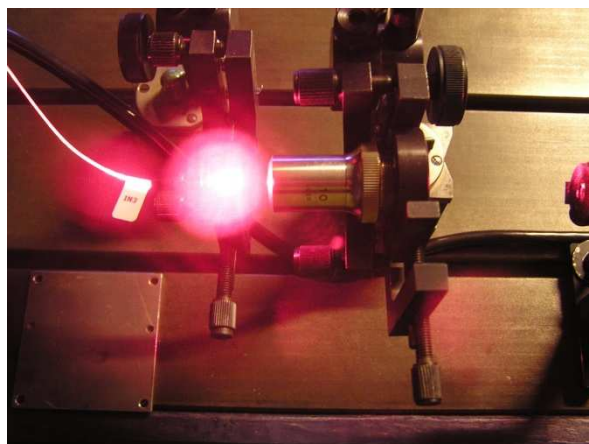
1. Použitá technika

Pro záznam hologramu jsme používali kameru Hanvision HVDUO-10M s detektorem Foveon X3 Pro (F7X3-B91), která je schopna zaznamenávat všechny tři základní barvy v plném rozlišení (Obr.8). V našem experimentu jsme použili jednotlivě pouze světla červené $\lambda = 660nm$ a modré $\lambda = 473nm$, přestože tato kamera by měla i širší využití.

Jako zdroj světla byl použit červený laser, který pracuje na vlnové délce $\lambda=660\text{nm}$. Pomocí mikroskopového objektivu (x10) byl paprsek navázán do optického coupleru (Obr.8) se čtyřmi vstupy a čtyřmi výstupy, který dělí vstupní intenzitu v rovném poměru na výstupech. Pro náš experiment se využily dva výstupy, jeden pro svazek objektový, druhý pro svazek referenční.



Obr 8.: Kamera Hanvision HVDUO-10M.



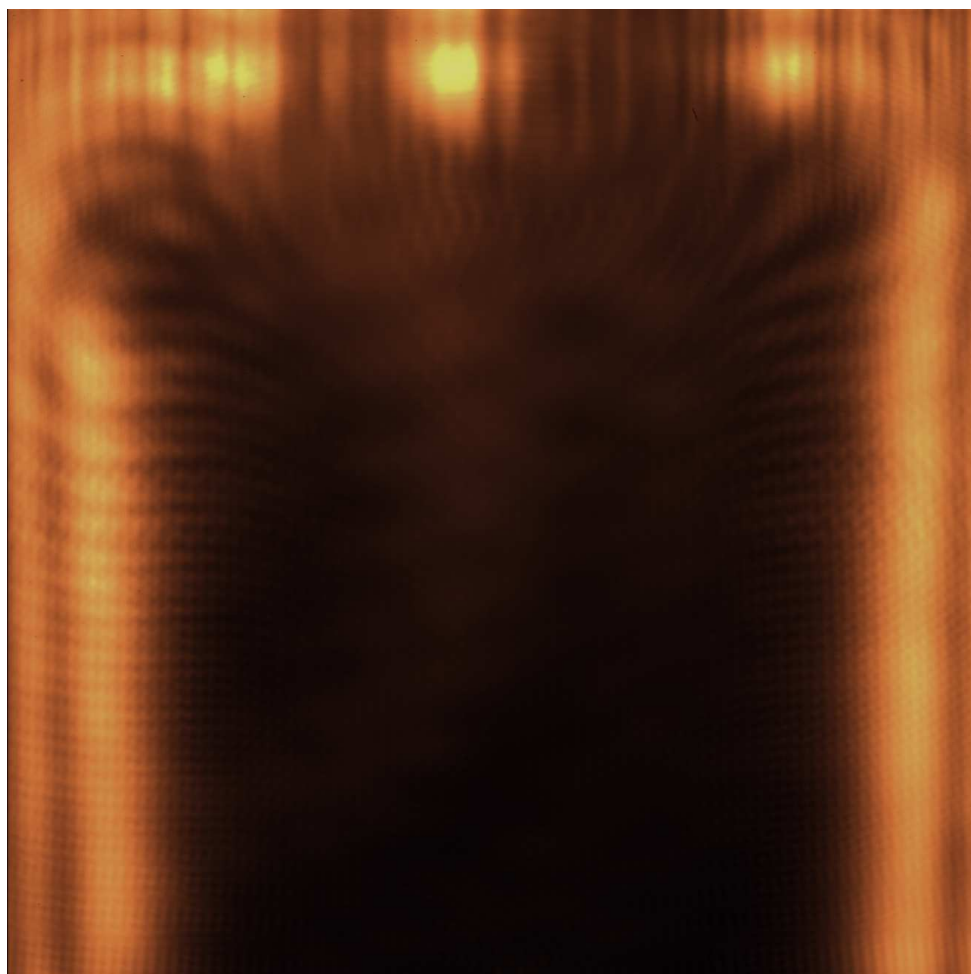
Obr 9.: Coupler 4x4, a navázání laseru na optické vlákno.

V experimentu jsme použili off-axis uspořádání pro průchod. Úhel mezi objektovým a referenčním svazkem byl nastaven podle Nyquistova kritéria a to $2^\circ 4'$. Protože výstup z optického vlákna je ještě směřován přes čočky, vychází z něho gausovský svazek. Toho

jsme dále využili pro získání kvazi-fourierovské holografie. Objekt byl umístěn do místa, kde referenční svazek má pas a tím jsme docílili, že od objektu i od pasu se dále paprsek šířil se stejnou křivostí a po záznamu na kameře jsme mohli pro zpracování využít Fourierovy transformace.

2. Průběh experimentu

Po nastavení všech důležitých parametrů jsme zaznamenali hologram a uložili jsme jej do počítače, pro další zpracování. (Obr10.)



Obr10.: Hologram LED diody zaznamenaný červeným světlem.

Takto získaný hologram jsme zrekonstruovali pomocí programu v MATLABU, což je programovací jazyk pro vědecko-technické a inženýrské výpočty. Pracuje obecně s obdélníkovými komplexními maticemi, což umožňuje pracovat i s vektory a čísly a je

navržen pro snadné (ve smyslu snadného ovládní) výpočty, zobrazování (např. grafů) a jednoduché programování.

Jednotlivé kroky byly následující:

$I = \text{imread}('hologram1.tiff')$ načte intenzitní obraz ve formátu TIFF a uloží ho pod I , pro provedení Fourierovy transformace ovšem Matlab potřebuje vstupní data v jiném formátu (např. double-precision).

$I2 = \text{im2double}(I)$ převede obraz na double-precision hodnoty.

$R = (:,:,1)$ vybere z obrazu informaci jen o červené barvě.

$G = (:,:,2)$ vybere z obrazu informaci jen o zelené barvě.

$B = (:,:,3)$ vybere z obrazu informaci jen o modré barvě.

Následující kroky by byly stejné pro každou barvu, takže například pro červenou:

$F = \text{fft2}(R)$ provede dvojdimenzionální Fourierovu transformaci pro červenou

barvu. Kdybychom teď chtěli zobrazit Fourierovo spektrum, zjistili bychom, že nízké frekvence jsou umístěny v rozích. Aby byl obraz dobře čitelný, je nutné umístit nulové frekvence do středu.

$FS = \text{fftshift}(F)$ převede necentrovane spektrum na centrovane (posune nul.

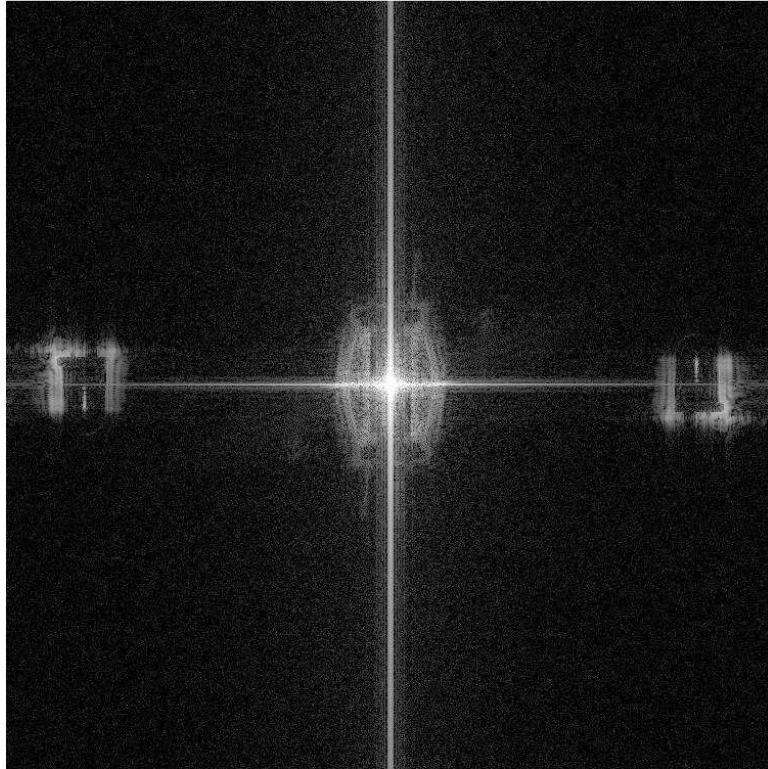
frekvence do středu spektra).

$X = \log(\text{abs}(FS))$ vytvoří Fourierovo spektrum.

$\text{imtool}(X)$ zobrazí Fourierovo spektrum a umožní dále nastavovat kontrast a sytost obrazu.

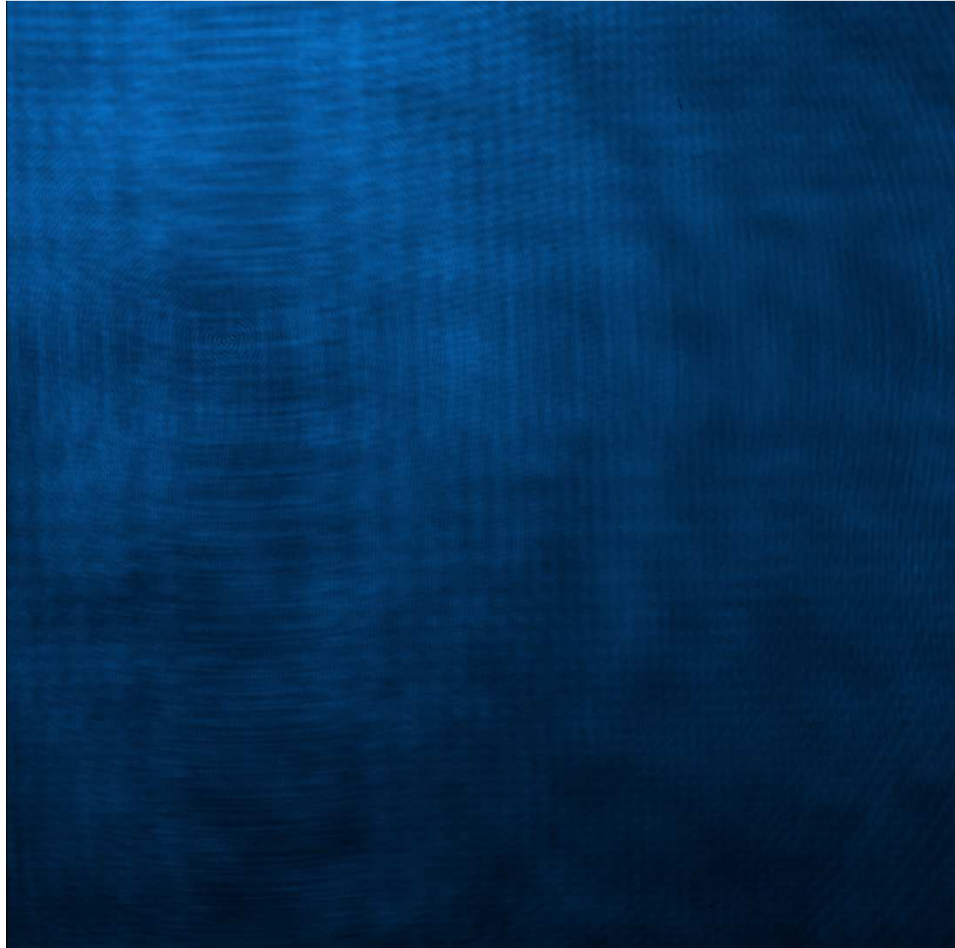
Tento program jsem nevytvářel osobně, ale se svolením jsem ho převzal z bakalářské práce Jana Čuberky o digitální holografii. Pro rekonstrukci hologramu, který jsme získali je tento program dostatečný, a vede k uspokojivým výsledkům.

Po rekonstrukci jsme získali tento obraz, kde je patrný jak reálný tak imaginární obraz a ve středu je možné vidět nultý řád fourierovského spektra, ve kterém se projevuje in-line holografie. V tomto případě je možné považovat in-line holografii za parazitní jev, nicméně pro zobrazování je možné využít i ji, jak ukážeme v další části experimentu.

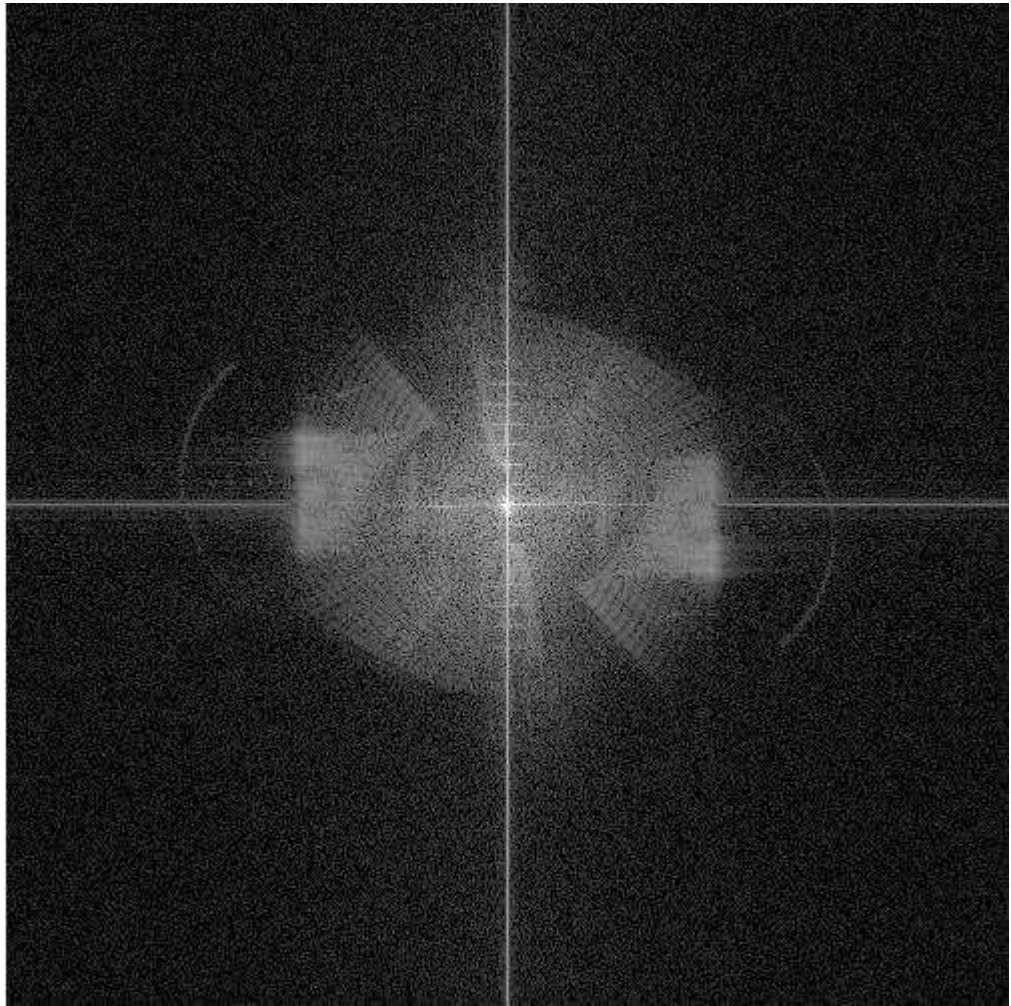


Obr 11.: Rekonstruovaný obraz hologramu diody. Úplně nalevo virtuální obraz, úplně napravo reálný obraz a ve středu je nultý řád fourierovského spektra.

Přesuňme se nyní k druhé části experimentu. S modrým světlem o vlnové délce $\lambda = 473nm$ a v in-line uspořádání jsme zaznamenali hologram záměrného kříže a rekonstrukce proběhla stejně jako v předchozím případě. Z obrazu je jasně patrné, že obrazy se překrývají s nultým řádem fourierovského spektra.



Obr12.: Hologram záměrného kříže v in-line uspořádání.



Obr 13.: Rekonstruovaný obraz hologramu záměrného kříže. V nultém řádu spektra je patrná stupnice vyznačená na záměrném kříži.

Pro rekonstrukci byl použit stejný program jako v předchozím případě.

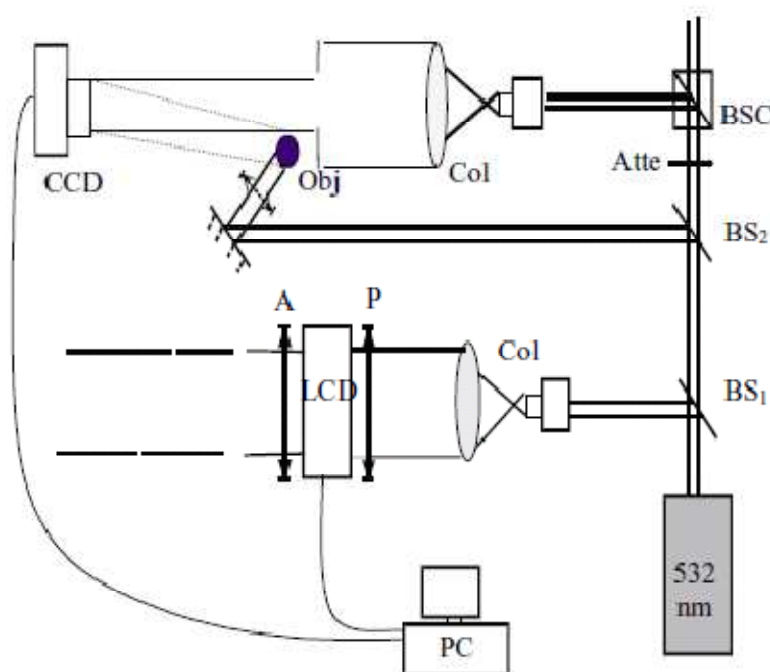
VI. DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE (DHM)

Pokud bychom propojili poznatky již dříve popsané, dostali bychom mikroskopickou metodu zvanou digitální holografická mikroskopie. Tato metoda využívá výhod spojených s rozlišením fázových posunů v holografii a výhod spojených s mikroskopií. To vše v kombinaci s počítačem umožní získat třírozměrný obraz s velmi malým zpožděním (čas potřebný pro přenos a výpočet probíhající v počítači) a tedy více méně v reálném čase a to vše s vertikálním rozlišením kolem 5 nm a co se šířky týče, bude rozlišení jako u běžného světelného mikroskopu rovno asi polovině vlnové délky použitého světla.

Tuto metodu je možno velmi dobře použít pro vzorky transparentní tak i reflexní, pro každé pak musí být použito pouze jiné uspořádání. Pro povahu fyzikálních jevů v této metodě využívaných je vhodná i pro pozorování živých buněk.

1. Opto-digitální holografická mikroskopie

V článku Real time opto-digital holographic microscopy (RTODHM) je popsán způsob možného uspořádání, který zaznamenává hologram digitálně, ale jeho rekonstrukce již digitálně zpracovávána není, rekonstrukce probíhá jako u běžné holografie prosvícením hologramu svazkem o stejných vlastnostech, jako byl referenční.



Obr 14.: Schéma uspořádání při opto-digitální holografii. Převzato z [19].

Uspořádání na obrázku ukazuje možnost opto-digitální holografie. V tomto uspořádání jak se uvádí na obrázku, se využívá světla zeleného laseru, které dopadá na první paprskový dělič (BS1), který rozdělí paprsek v poměru 70%/30%, tak aby se většina odrazila jako paprsek rekonstrukční. Tento paprsek pokračuje dále na kolimátor, kde je rozšířen a kolimován. Polarizátor a analyzátor umožní vizualizace obrazu na displeji. Druhý paprskový dělič (BS2) rozdělí paprsek na objektový a referenční. Objektový paprsek je dále rozšířen pomocí čoček. Referenční paprsek je kolimován a intenzita referenčního paprsku je dále podle potřeby tlumena clonou (atte), aby nedošlo k saturaci kamery. Hologram je snímán CCD kamerou a pomocí počítače zobrazován na LCD obrazovce. Hologram na LCD funguje podobně jako analogový hologram a rekonstrukční paprsek prošlý obrazovkou ohýbá tak, že vzniká obraz ve vzdálenosti dané vztahem

$$d' = d \frac{\Delta x_{LCD}}{\Delta x_{CCD}},$$

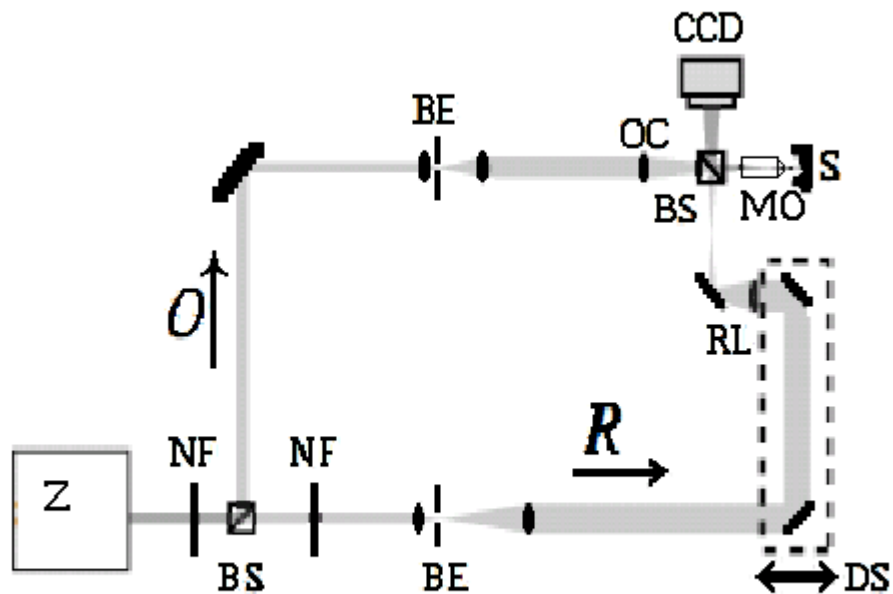
kde d' je vzdálenost kde se rekonstruovaný obraz objeví, d je vzdálenost, ze kterého je objekt snímán kamerou a Δx_{LCD} a Δx_{CCD} značí šířku pixelu obrazovky a kamery v (x) souřadnici. Jelikož vzdálenost, ve které se bude obraz rekonstruovat, je poměrně značná a díky tomu bude docházet ke ztrátám informace, je nutné zapojit jiná optická zařízení pro zkrácení této vzdálenosti. Pomocí drobné změny v uspořádání se dají některé nedostatky odstranit. Přidáním dvou čoček získáme opto-digitální holografickou mikroskopii. První čočka s malou ohniskovou vzdáleností bude separovat difrakční řády světla jdoucího z displeje a clona oddělí právě jeden. Druhá čočka zvětší obraz, aby byl dobře pozorovatelný. Kombinace těchto čoček se volí podle kvality obrazu či potřeby zvětšení. Použitím softwaru pro automatizaci načítání, zpracování a zobrazení vzniká RTODHM, která umožní interferometrická měření a studium evoluce v dynamických objektech. [19]

2. Princip a uspořádání DHM

Co se principů týče, jde v podstatě o digitální holografii obohacenou o mikroskopové objektivy, které umožní zvětšení zorného úhlu a zlepší rozlišení ve vertikálním směru.

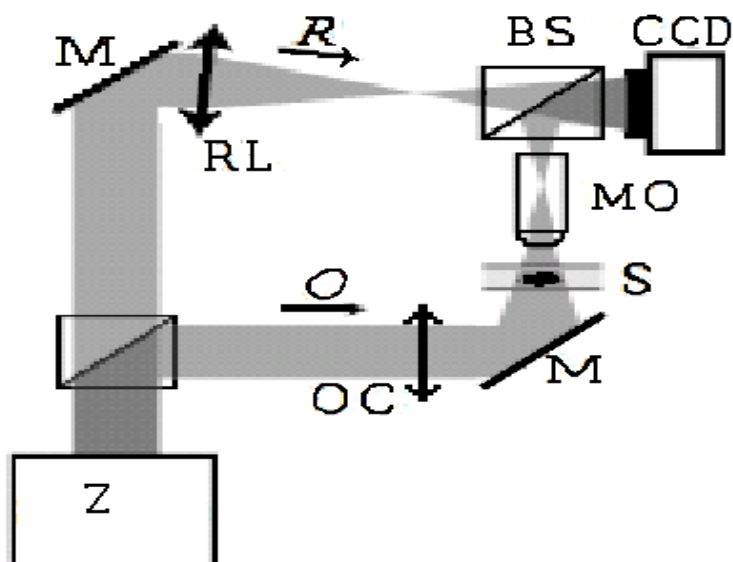
Uspořádání jsou možná dvě pro off-axis holografickou mikroskopii, podle toho pro jaké vzorky ji chceme aplikovat. První možností je uspořádání pro vzorky, jež světlo odrazí a tedy reflexní vzorky a druhé pro vzorky, jimiž světlo projde, tedy transmisní. Jako první popíši uspořádání pro reflexní vzorky.

Paprsek laseru, je rozdělen do dvou směrů, zpravidla světelným děličem 50%/50%. Na svazek předmětový a referenční. Objektový paprsek je nejprve směřován k objektu. Tam prochází přes mikroskopový objektiv a dopadá na vzorek, od kterého se odrazí a dopadá na CCD kameru. Paprsek referenční je nastaven tak, aby s odraženým předmětovým svazkem dopadal na CCD kameru tak, aby bylo možno využít holografie. Je-li to nutné, používá se pro referenční svazek delší dráha, aby se paprsky nedostaly z koherentní oblasti. Z CCD kamery je potom informace o intenzitě a změně fáze přenášena do počítače, kde se dále zpracovává a vyhodnocuje. Rekonstruovaný objekt lze zobrazit na monitoru.



Obr 15.: Možné uspořádání záznamu off-axis DHM na odraz. Jednotlivé symboly: Z - laser, BS - dělič paprsků, CCD - kamera, S - vzorek, BE-paprskový expander, NF-filtr, RL resp. OC-čočka v referenční resp. v objektové větvi, DS- zpoždovací systém, R- referenční paprsek, O- objektový paprsek, MO- mikroskopový objektiv. Převzato z [20].

Druhé uspořádání je pro pozorování transmisních vzorků. Paprsek vycházející z laseru je potřeba opět jako v předchozím uspořádání rozdělit paprskovým děličem. Předmětový paprsek nejprve dopadá na vzorek, kterým projde a přes mikroskopový objektiv dopadá na CCD kameru, kam je zároveň přiveden i referenční svazek a dochází k interferenci. Odtud pak odchází informace do počítače. Ve vyhodnocování se bude postupovat podobně jako u předchozího uspořádání. Počítač data numericky zpracuje, vyhodnotí a může numericky zrekonstruovat získaný hologram a zobrazit na monitoru třeba i pseudo 3D.



Obr 16.: Možné uspořádání pro záznam DHM pro transmisní vzorky. Označení zachováno, jako u předchozího obrázku. Převzato z [20].

Výsledný obraz nese informaci o všech třech rozměrech povrchu vzorku. Znamená to ale, že nejsme schopni vytvořit libovolný řez vzorkem. To co je pod povrchem, o tom nemáme jedinou informaci.

Často se udává, že digitální holografická mikroskopie zaznamenává v reálném čase. Co si pod tím představit? Jde o to, že doba pro zpracování přijatých dat je menší nebo stejně dlouhá jako doba potřebná k záznamu dat. To znamená, že může docházet

i ke zpoždění oproti zkoumanému ději, ale děj nám popíše tak, jak probíhal. Tohoto lze dosáhnout díky FFT (fast fourier transformation).

3. Výhody a využití DHM

V čem tedy spočívá výhoda této mikroskopické metody? Výhod a praktických využití můžeme vidět hned několik.

3.1. Rozlišení

Protože se jedná o optický mikroskop, je jeho rozlišení ve vertikálním směru omezeno rozlišovací mezí a numerickou aperturou, a tedy se můžeme dostat k rozlišení rovnající se maximálně polovině vlnové délky použitého světla. Díky citlivosti fázových změn se v horizontálním směru můžeme dostat na rozlišení i několika *nm*. Je tedy možné zaznamenávat drobné nerovnosti různých materiálů, či změny probíhající na povrchu buněk

3.2. 3D informace

Díky využití holografie, a tedy díky zaznamenání fázového posuvu, dostáváme ze vzorku informaci nejen o délce a šířce vzorku, ale můžeme pracovat i se třetím rozměrem. Máme tedy informaci o povrchu vzorku. Toho lze využít pro vytvoření pseudo 3D obrazu, či pro měření ve všech třech rozměrech. Jelikož se při záznamu využívá fázových posunů, není nutné zdlouhavě vzorek skenovat. Tato vlastnost je využitelná jak u biologických vzorků, tak u zkoumání materiálů, deformací, či vibrací. [21,9]

3.3. Markerfree, non-invasively

Protože DHM pracuje s fázovým posuvem a ne pouze s amplitudou je možné pozorovat i buňky, které by se musely při pozorování běžným mikroskopem barevně označit, protože při průchodu světla neovlivní výrazným způsobem amplitudu světelného paprsku. Avšak díky fázovému posuvu, který způsobí vzorek, není v DHM nutné na buňky působit jakýmkoli invazivním způsobem. [22]

3.4. Zachování života vzorku

Právě z důvodu, že se jedná o metodu neinvazivní vzhledem ke vzorku, je možné zachovávat život buněk v roztocích a sledovat jejich vývoj, pohyb, či jiné změny. Obarvení vzorku může totiž závažným způsobem ovlivnit zdraví, případně i usmrtit buňky vzorku. [23]

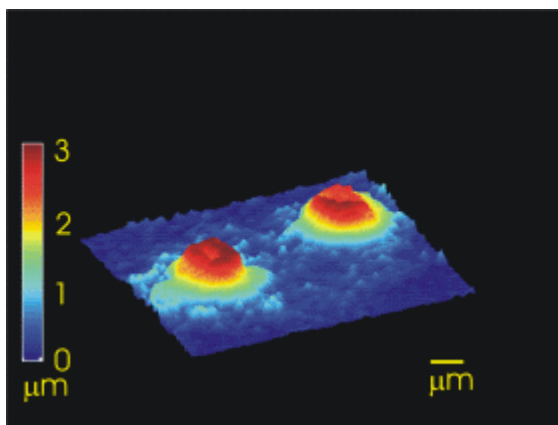
3.5. Numerická kompenzace aberací

S digitálně zachyceným hologramem můžeme dále pracovat numericky v počítačích a upravovat aberace a deformace obrazu vzniklé na optických systémech mikroskopu. Dělá se tak pomocí numerických čoček, které jsou definované převážně v polynomickém tvaru a mohou být v programu na zpracování započteny automaticky při zkoumání posuvu fáze či amplitudy. Umožní to zlepšení výsledného obrazu, který už nebude ovlivněn vadami optického zobrazení.

Lze taky kompenzovat vliv vibrací, což vzhledem k tomu, že se jedná o interferometrické měření, je velmi významné. Vibrace totiž významně ovlivní optickou dráhu světla. Toto můžeme řešit tím, že si nejdříve proměříme samotné vibrace bez vzorku a výsledek započítáme do zpracování záznamu vzorku. Také je možné dívat se na to z hlediska toho, jako když děláme záznam živého organismu, který se pohybuje. Tím, že snímáme více snímků za sebou, máme informaci o pohybech, přesunech a třeba i vývoji živého organismu. [24,20]

4. Závěr k DHM

Na závěr této kapitoly ukažme, jak může vypadat snímek získaný pomocí DHM. Na obrázku jsou dvě červené krvinky. Barvy na obrázku neznázorňují skutečnou barvu, jakou je možné pozorovat klasickou světelnou mikroskopií, ale jsou vyjádřením vertikálního rozměru (podobě jako na mapách vrstevnice). Na obrázku je zároveň vidět pseudo 3D zobrazení, je tedy jasné, že se jedná o obraz již zpracovaný příslušným počítačovým programem a vyhodnocen. Na obrázku rovněž můžeme ukázat jednotlivé vlastnosti, o kterých byla v předchozích odstavcích řeč. Rozdíl rozlišení v horizontálním a vertikálním směru, možnost 3D zobrazení a zároveň fakt, že sledujeme povrch vzorku, to je to, co můžeme vidět. Ostatní vlastnosti se z tohoto obrázku vyčíst nedají a mohli bychom o nich jen znovu mluvit a je pouze zopakovat.



Obr 17.: Dvě červené krvinky zobrazené pomocí digitální holografickou mikroskopií. Barevně rozlišen vertikální rozměr. Převzato z [25].

VII. JINÉ MIKROSKOPICKÉ METODY

V této kapitole bych se rád zaměřil na různé mikroskopické metody, které se, alespoň v některých aspektech, budou podobat digitální holografické mikroskopii a pokusím se tyto metody právě s digitální holografickou mikroskopií porovnat. Porovnání provedu na příkladu záznamu červené krvinky různými metodami. Porovnávat budu obrazy z internetových zdrojů a zaměřím se na tyto metody: konfokální optická mikroskopie (COM), mikroskopie rastrovací sondou (AFM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM), skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a optická mikroskopie v blízkém poli (SNOM). Všechny tyto metody, až na TEM, umí vytvořit 3D obraz a všechny mají výborné rozlišení, takže v čem se tedy liší, a v čem je každá lepší?

1. Červené krvinky

Jenom velmi ve zkratce něco o lidských červených krvinkách. Mikroskopické metody budou porovnány podle toho, jak zachycují červené krvinky. Tedy jen pro představu o tom co zobrazujeme. Červené krvinky jsou bezjaderné buňky bikonkávního, diskového tvaru. Obsahují červené krevní barvivo hemoglobin, které váže kyslík. Lidské červené krvinky jsou menší než většina ostatních lidských buněk. Běžně mají průměr 6–8 μm . Typická červená krvinka obsahuje zhruba 270 milionů molekul hemoglobinu, z nichž každá obsahuje čtyři hemy.

2. Elektronová mikroskopie

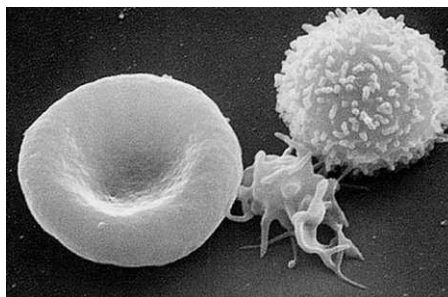
Rozlišovací mez, jak už jsme uvedli je přímo úměrná vlnové délce. To znamená, že čím menší bude vlnová délka tím menší předměty a vzdálenosti jsme schopni rozlišit. V praxi to znamená, že rozlišíme maximálně vzdálenost rovnu polovině vlnové délky. Při světelné mikroskopii, kde maximální vlnová délka je 390nm, to znamená, že jsme schopni rozlišit 195nm. U elektronového mikroskopu se využívá vlnových vlastností pohybujícího se elektronu, jehož vlnová délka se vypočte podle vzorce

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU}} = \frac{1,226}{\sqrt{U}} [nm].$$

Kde h je planckova konstanta, m_0 je klidová hmotnost elektronu, e je elementární náboj a U je urychlovací napětí. Využijeme-li elektronů, dostáváme teoreticky rozlišení

o 5 řádů lepší než u světelného mikroskopu. Díky vadám zobrazení si však v praxi pomůžeme jen o 2-3 řády.

Porovnejme nyní výsledky obrázků červených krvinek. První obrázek zachycuje červenou krvinku metodou SEM.



Obr 18.: Červená krvinka zobrazená pomocí SEM. Vedle červené krvinky je tam dále krevní destička a bílá krvinka. Převzato z [26].

V prvním případě můžeme vidět i drobné nerovnosti na povrchu, což znamená, že máme výborné rozlišení v řádu *nm*. Pozorovanou plasticitu obrazu můžeme přičítat skenování v rovinách různých hloubek vzorku, a tedy máme informaci o všech třech rozměrech.

2.1. Srovnání SEM a DHM

Díky kratší vlnové délce má SEM daleko lepší horizontální rozlišení, a to asi o tři řády. Obě tyto metody mohou nést informaci o třetím rozměru, SEM skenuje a DHM využívá fázového posunu. Výhodou pro DHM zůstává zachování života a možnost záznamů vzorku v reálném čase, což SEM poskytnout nemůže. Pro to, aby bylo možno SEM použít, je nutné zajistit vodivost povrchu, což se právě vylučuje se zachováním života vzorků a tedy i sledování jejich vývoje a pohybů, jako je to možné u DHM.

Druhý obrázek zachycuje červenou krvinku metodou TEM.



Obr 19.: Červená krvinka zobrazená pomocí TEM. Převzato z [27]

Obrázek je následně barevně upraven, neboť elektronová mikroskopie nemůže nést žádnou informaci o barvě. Červené krvinky jsou zde v kapiláře, na které je lépe vidět možnosti rozlišení. Obraz je plochý, neboť vzorek neskenujeme, ani nevyužíváme žádného fázového posunu a tedy nemáme informaci o třetím rozměru, co se tohoto týče, je to podobné jako u běžné světelné mikroskopie. Na rozdíl od ní máme však daleko lepší rozlišení díky malé vlnové délce.

2.2.Srovnání TEM s DHM

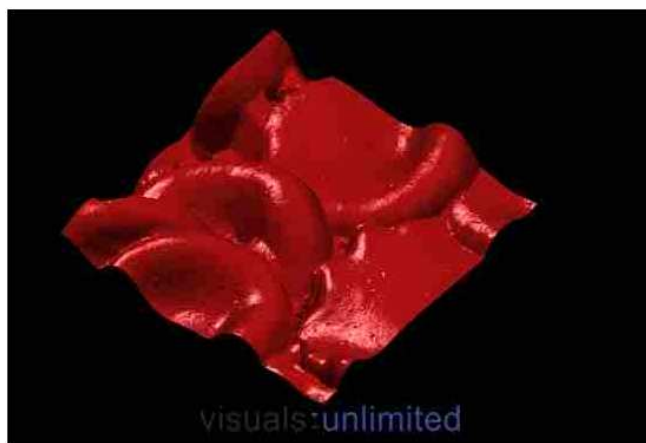
Obraz získaný pomocí TEM bude vždy plochý, jednobarevný a s dobrým horizontálním rozlišením. Jelikož je pro záznam nutné vakuum, není možné zachovat život vzorku. Takto to vypadá, že pomineme-li širokou škálu vzorků, které můžeme pozorovat, máme všechny vlastnosti jiné než u DHM.

3. Další metody

Třetí obrázek zachycuje červenou krvinky metodou AFM

AFM je metoda, při které se sonda neustále jemně dotýká, či je jen nepatrně vzdálena od povrchu vzorku. Využívá se Van der Waalsových sil působících mezi atomy a to při dotyku, tedy vzdálenosti hrotu a vzorku méně než 10^{-10} m působí síly odpuzivé a v případě větší vzdálenosti, je síla přitažlivá. Následně se pomocí laseru určuje, jak moc vzorek sondu vychýlí, a kterým směrem. Jelikož tato metoda skenuje vzorek a má velmi

dobré jak vertikální tak horizontální rozlišení, je třeba zajistit velmi malý posun vzorku vůči skenující sondě, dále je třeba velmi precizně připravit vzorek a odstranit všechny nečistoty, které by mohly ovlivnit výsledek pozorování. U měkkých vzorků, jako třeba biologické vzorky, je třeba také dávat pozor, aby hrot vzorek nepoškodil, neboť je s ním stále ve velmi blízkém kontaktu.



Obr 20.: Červené krvinky zobrazené pomocí AFM. Převzato z [28].

Tato metoda umožňuje velmi dobré rozlišení ve všech směrech, ale informace je pouze o povrchu a to pouze nehybných vzorků. Z obrázku je patrný tvar i přesný rozměr červených krvinek. Barva je však dodaná uměle. AFM není samo o sobě schopno pracovat s barvou.

3.1.Srovnání DHM s AFM

AFM má obecně lepší rozlišovací schopnosti a proto je schopna popsat povrch vzorku daleko přesněji než DHM. Pochopitelně záleží na kvalitě hrotu sondy. Avšak má i své nedostatky. Pouze ve speciálních případech je možné sledovat biologické vzorky, které nejsou dostatečně pevné a případně jim zachovat životní prostředí, což DHM zvládne a je pro tyto účely výhodnější a hojně využívána. Co se vzorků týče je pro AFM příprava náročnější, kdežto DHM není na přípravu a výběr vzorku až tak náročná.

DHM vytváří pomocí počítače 3D obraz a to v reálném čase, kdežto AFM ač vytváří taktéž 3D obraz, není schopna kvůli skenování pracovat v reálném čase, rychlost skenování se pohybuje okolo $10^2 \mu\text{m/s}$. a až poté, co se naskenuje celý povrch lze začít vytvářet 3D obraz.

3.1. Jiná metoda se skenující sondou SNOM

SNOM – scanning near-field optical microscope je optická metoda využívající předností jak mikroskopie se skenující sondou, tak předností optické mikroskopie. Vzorek je osvětlován ze vzdálenosti několika *nm*, což je jen zlomek vlnové délky světla. V blízkém poli se tedy ještě nestihnou projevit difrakční jevy světelných paprsků, a tedy lze dosáhnout výborného rozlišení. V horizontálním směru se můžeme dostat k rozlišení i 50nm, což odpovídá velikosti apertury clony. Ve vertikálním směru, použijeme-li rozlišení pomocí fázových posunů, tak se dostaneme na rozlišení i 1nm.

Porovnejme SNOM a DHM. V mnoha ohledech si jsou tyto metody velmi podobné, obě jsou optické, u obou se dostane výborné rozlišení. Obě tyto metody jsou výhodné pro pozorování přibližně stejných vzorků, tedy výrazné využití je v medicíně, biologii, či ve výzkumu materiálů. Zásadní rozdíl je tedy ve skenování, jehož je u SNOM zapotřebí. Nezískáme tedy touto metodou nikdy záznam v reálném čase, i když v horizontálním rozlišení bude SNOM, díky absenci difrakčních jevů, daleko lepší.

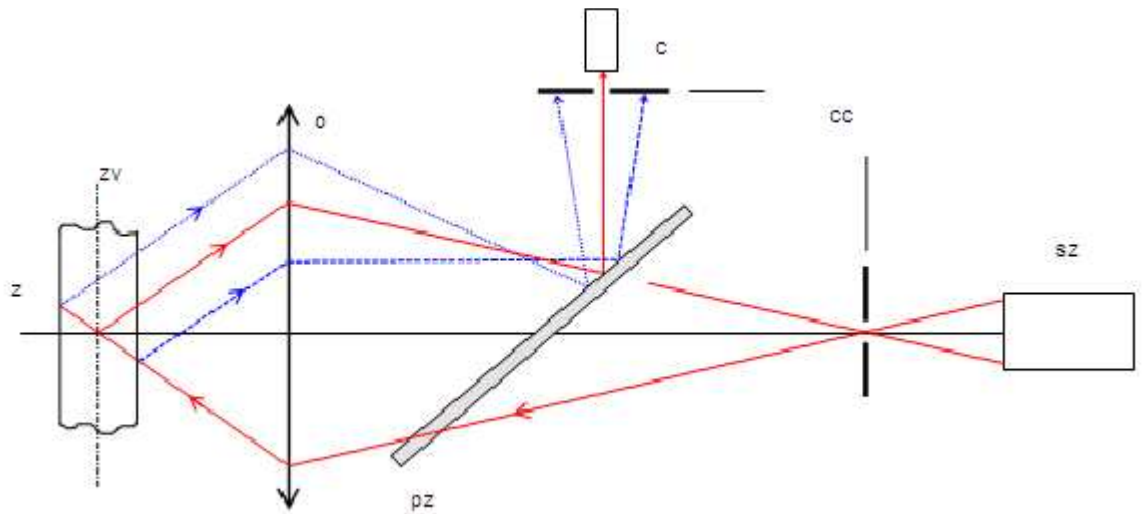
4. COM - konfokální optická mikroskopie

Protože tato metoda je velmi významná a v mnoha ohledech se podobá DHM popíši ji trochu více podrobně.

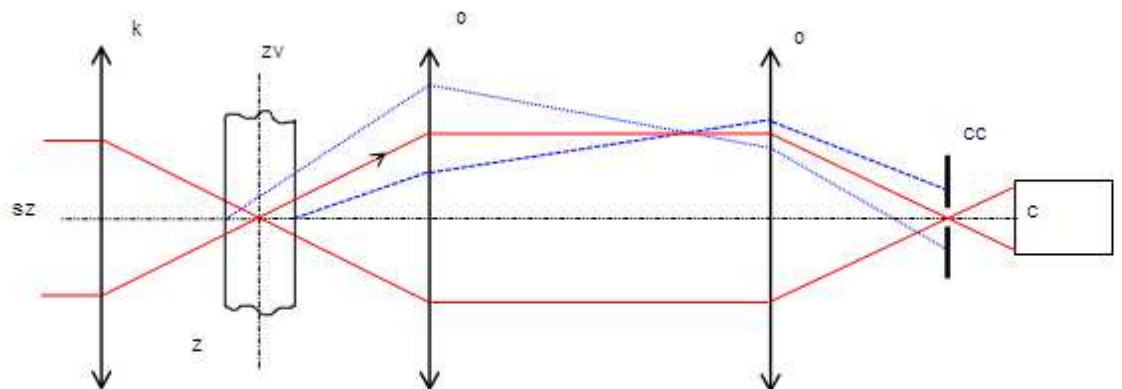
Idea konfokálního mikroskopu pochází od M. Minskiho, který ji patentoval již v roce 1957. První funkční přístroj však byl realizován až o deset let později a éra konfokální mikroskopie začíná v podstatě až koncem sedmdesátých let, kdy byl realizován spolehlivý konfokální mikroskop s rozmítaným laserovým paprskem a kdy se staly běžně dostupnými výkonné personální počítače. Při běžné optické mikroskopii je rozlišovací schopnost omezena na asi 0,2 μm . Děje se tak díky interferenčním jevům a díky parazitnímu osvětlení (z nezaostřených rovin přichází mnohem více světla než z roviny zaostřené). Jinými slovy, zaostřený obraz se překrývá s rozmazanými obrazy struktur nacházejících se mimo zaostřenou rovinu. Pro potlačení tohoto nepříznivého jevu se využívá konfokální optika.

Při této metodě se světlo z bodového zdroje zaostří na vybraný bod preparátu a paprsky jdoucí z tohoto bodu se dále zpracovávají. Paprsky jdoucí z bodů nezaostřených, jak z jiných rovin, tak i ze stran se odfiltrují a tedy na utváření výsledného obrazu

se nepodílejí. To má za následek obrovský úbytek intenzity světla tvořícího obraz, ale získáme tím výrazně lepší rozlišovací schopnost mikroskopu.

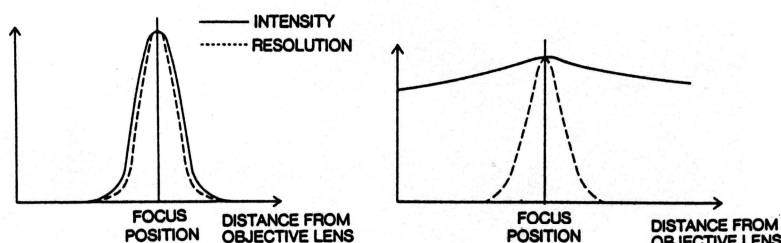


Obr 21.: Schéma konfokálního zobrazovacího systému pro odražené světlo. Na obrázku je SZ – světelný zdroj, CC – konfokální clona, PZ - polopropustné zrcadlo, O – objektiv, Z – vzorek, ZV – zaostřená rovina a C – kamera



Obr 22.: Schéma konfokálního zobrazovacího systému pro procházející světlo. Označení stejné jako u předešlého obrázku, jen navíc K – kondenzor.

Na následujícím grafu budu demonstrovat výhodu konfokálního mikroskopu ve srovnání s běžným mikroskopem. Jde o intenzitu zaostřeného bodu, která je u světelné mikroskopie zatížena šumem z nezaostřených bodů.



Obr 23.: Závislost rozlišení a intenzity světla na vzdálenosti od roviny zaostření pro konfokální (vlevo) a konvenční optiku (vpravo).

Konfokální obrazy jsou tedy vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem. Uvedu příklad výhody konfokálního mikroskopu, který je rovněž uveden v [29]. „S imerzním objektivem o numerické apertuře $NA = 1,3$ a při použití modrozelené čáry argonového laseru (488 nm) činí jejich tloušťka asi $0,4 \mu\text{m}$. Mezní hodnota axiální rozlišovací schopnosti za výše uvedených podmínek činí asi $0,35 \mu\text{m}$.“

Za účelem vytvoření obrazu větší plochy je nutné použít řádkovací (rastrovací) metodu, přičemž podle způsobu vytvoření rastru se rozlišují dva základní typy konfokálního rastrovacího optického mikroskopu (CSOM). První z nich (historicky starší) vytváří pouhým okem pozorovatelný obraz v reálném čase, zatímco ve druhém případě se obraz vytváří elektronicky na obrazovce počítače. V současné době je na trhu asi deset verzí konfokálního mikroskopu.

Přednosti, které má konfokální mikroskopie oproti konvenční lze shrnout následovně:

- a) vysoké axiální rozlišení při vysoké ostrosti obrazu,
- b) možnost optických řezů a pozorování průhledných vzorků i pod povrchem.

Ve spojení s počítačem se pak nabízejí další možnosti zpracování a záznamu obrazu:

- a) rekonstrukce trojrozměrných obrazů,
- b) bezkontaktní povrchová profilometrie (i málo odrazivých materiálů) s vertikálním

rozlišením 0,01 μm ,

c) obrazová analýza,

d) videozáznam a záznam obrazu na optické disky.

Srovnáme – li tedy COM s DHM vidíme, že obě metody jsou optické, a tedy mají obě výrazně omezenou rozlišovací schopnost v horizontálním směru a to difrakcí světla. Obě tyto metody umí podat informaci o všech třech rozměrech, ale DHM ji díky tomu, jak funguje holografie, podá s lepším vertikálním rozlišením a ještě v reálném čase, čehož u COM docílit nemůžeme. Na druhou stranu DHM nám zachytí pouze povrch vzorku, takže nejsme schopni udělat jakýkoli řez vzorkem, kdežto COM, díky tomu že skenuje vždy určitou rovinu, je schopna nejen zachytit tvar, ale i vytvořit libovolné optické řezy vzorkem.

Proveďme ještě malou diskuzi a pokusme se zhodnotit porovnání jednotlivých mikroskopických metod uvedených v předešlých kapitolách. Nejlépe to asi půjde pomocí tabulky. Tato tabulka ukazuje názorně, ale pouze velmi zkratkovitě výhody a nevýhody jednotlivých mikroskopických metod.

mikroskopická metoda	základní princip získání informace	rozlišení vertikální	rozlišení horizontální	3D	zachování života	vliv na vzorek	optický řez	real time záznam
OM	kontrast intenzity světla	-	okolo 0,5μm	ne	ano	průhledné vzorky se musí barvit	není možný	možný
DHM	holografie-fázový posun	okolo 5nm	okolo 0,5μm	ano	ano	není nutné žádné ovlivňování	není možný	možný
COM	zaostření světelného paprsku na určitý bod vzorku a zbytek odfiltrován	až 10nm	až 0,35μm	ano	ano	není nutné žádné ovlivňování	možný	není možný
SEM	skenující odražený paprsek elektronů od povrchu vzorku	okolo 5nm	okolo 0,5nm	ano	Ne	nutné pokovování vzorku	není možný	není možný
TEM	intenzita prošlých elektronů	-	okolo 0,5nm	ne	Ne	fixace, odvodnění, tenký řez	není možný	není možný
AFM	vychýlení sondy působením Van der Waalsovými silami mezi atomy	10 ⁻¹⁰ m	okolo 1nm	ano	Ne	není nutné žádné ovlivňování	není možný	není možný
SNOM	rastrování vzorku v blízkém poli - bez difrakce	okolo 5nm	asi 50nm	ano	ano	není nutné žádné ovlivňování	není možný	není možný

VIII. ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na uvedení základních principů a uspořádání DHM. Byl popsán princip světelného mikroskopu, jakožto základní mikroskopický prvek, jeho omezení v rozlišení a byly naznačeny nevýhody spojené s aberacemi. Další část věnovaná holografii a následně digitální holografii je shrnutím daného optického jevu a zároveň byly popsány základní principy a možná uspořádání. Mojí snahou bylo pouze uspořádat a srozumitelně popsat poznatky o holografii a digitální holografii. Zrovna tak je třeba nahlížet na kapitoly následující o CCD čipu a digitálním zpracováním signálu pomocí Fourierovy transformace. Tyto poznatky byly demonstrovány v experimentu, který ukazuje prakticky některé možnosti využití digitální holografie a ukazuje konkrétní možnost rekonstrukce hologramu.

Samotný popis DHM se potom odvolává na předešlé kapitoly, kde jsou uvedeny některé principy, které následně nebylo nutno opakovat, což poskytlo možnost věnovat se tomu, jak se DHM od digitální holografie liší a jaké jsou její výhody.

Následné srovnání s dalšími mikroskopickými metodami už bylo nasnadě. Snažil jsem se každou mikroskopickou metodu popsat co nejzákladněji, přičemž si uvědomuji, že moje popisy nejsou úplné, či výrazně detailní, ale pro následné srovnání se domnívám, že jsou dostatečné. Doufám, že tato práce přispěla k lepšímu pochopení a k názornému porovnání mikroskopických metod, které jsou zde uvedeny.

IX. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Miroslav Miler: *Holografie*, SNTL, Praha, 1974
- [2] Thomas Kreis: *Handbook of Holographic Interferometry: Optical And Digital Methods*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005
- [3] Denis Gabor: *Microscopy by recorded wavefronts*, Proceedings of the royal Society, London, 1949
- [4] Björn Kemper, Patrik Langehanenberg, Gert von Bally: *Digital Holographic Microscopy: A new method for surface analysis and marker-free dynamic life cell imaging*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim 2007
- [5] Daniel Carl, Alexander Höink, Gert von Bally, Cornelia Denz: *Digital Holographic Microscope for the Analysis of Living Cells*, Münster proceeding 2004
- [6] Ingolf Bernhardt , Lyubomira Ivanova, Patrik Langehanenberg , Bjoern Kemper, Gert von Bally: *Application of digital holographic microscopy to investigate the sedimentation of intact red blood cells and their interaction with artificial surfaces*. *Bioelectrochemistry* 73 (2008) 92–96
- [7] Jürgen Schnekenburger, Ilona Bredebusch, Wolfram Domschke, Björn Kemper, Patrik Langehanenberg, Gert von Bally: *Digital holographic imaging of dynamic cytoskeleton changes*, *Medical Laser Application* 22 (2007) 165–172
- [8] Anith Nelleri, Joby Joseph, Kehar Singh: *Phase reconstruction in lensless digital in-line holographic microscopy*. *Optics and Lasers in Engineering* 48 (2010) 27–31
- [9] Pavel Psota, Vít Lédl, Jan Václavík: *Matlab gui pro měření deformací digitální holografickou interferencí*, Technická univerzita v Liberci, Ústav řízení systémů a spolehlivosti 2008
- [10] Zdeněk Horák, František Krupka: *Fyzika, příručka pro fakulty strojního inženýrství*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1966
- [11] Ruth Barth: *Digital In-Line X-Ray Holographic Microscopy with Synchrotron Radiation*, disertační práce obhájená 2008 Institute of Physical Chemistry
- [12] Svoboda E. a kol: *Přehled středoškolské fyziky*, Prometheus, Praha 2003
- [13] Jaroslav Reichl, Martin Všetička: *Encyklopedie fyziky*, 2006 – 2008
- [14] David Bohm: *Wholeness and the Implikate order*, British Library Cataloguing in Publication data, Lonon, 1980
- [15] Wikipedia.org: CCD, <http://cs.wikipedia.org/wiki/CCD>, 2009

- [16] Vladimír Šebesta, Zdeněk Smékal: *Signály a soustavy*, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií VUT Brno, skriptum 2002
- [17] Čížek, V.: *Diskrétní Fourierova transformace a její použití*, SNTL, Praha 1981
- [18] Anith Nelleri, Joby Joseph, Kehar Singh: *Phase reconstruction in lensless digital in-line holographic microscopy*. *Optics and Lasers in Engineering* 48 (2010) 27–31
- [19] Larbi Bouamama, Mohamed Bouafia, Guenther Wernicke, Sven Krueger, Hartmut Gruber: *Real time opto-digital holographic microscopy (RTODHM)*, *Catalysis Today*, Volume 89, Issue 3, 30 March 2004, Pages 337-341
- [20] Tristan Colomb, Florian Charrière, Jonas Käuhn, Pierre Marquet and Christian Depeursinge: *Advantages of digital holographic microscopy for real-time full field absolute phase imaging*, Photo West, Sam Jose, CA January 19-24, 2008
- [21] Björn Kemper, Patrik Langehanenberg, Gert von Bally: *Digital Holographic Microscopy: A new method for surface analysis and marker-free dynamic life cell imaging*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim 2007
- [22] P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, C. Depeursinge: *Digital holographic microscopy: a non invasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with sub wavelength accuracy*, *Opt. Lett.* 30, 468 – 470 (2005)
- [23] B. Kemper, D. Carl, S. Knoche, R. Thien, G. von Bally: *Holographic interferometric microscopy systems for the application on biological samples*, *Proc. SPIE* 5457, 581-589 (2004)
- [24] Tristan Colomb, Frédéric Montfort, Jonas Kühn, Nicolas Aspert, Etienne Cuche, Anca Marian, Florian Charrière, Sébastien Bourquin, Pierre Marquet, Christian Depeursinge: *Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy*, *J. Opt. Soc. Am. A* December 2006
- [25] Google.com:
http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.bioeng.nus.edu.sg/optbioimaging/colin/img/dhm3.gif&imgrefurl=http://www.bioeng.nus.edu.sg/optbioimaging/colin/research.asp&usq=__QVQieju2bHB5HKaGzwfFLgTqkV4=&h=210&w=280&sz=10&hl=cs&start=1&um=1&itbs=1&tbnid=LNDaWtvNhVKpFM:&tbnh=86&tbnw=114&prev=/images%3Fq%3Derythrocyte%2Bin%2BDHM%26um%3D1%26hl

[%3Dcs%26sa%3DN%26rls%3Dcom.microsoft.cs:IE-](#)

[SearchBox%26rlz%3D1I7ADFA_cs%26tbs%3Disch:1](#), 2010-05-10

- [26] http://www.lienmultimedia.com/article.php?id_article=22167 2010-05-10
- [27] http://www.photoshelter.com/image/I00005HJaWCq_QgI 2010-05-10
- [28] <http://www.photoshelter.com/image/I0000xXM470JgbXw> 2010-05-10
- [29] Slavomír Přikryl: *Moderní mikroskopické metody*, Univerzita Pardubice 2003