



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**VÝMĚNÍK FILTRŮ PRO KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP**

FILTER WHEEL FOR CONFOCAL MICROSCOPE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. BARBORA DAŇKOVÁ**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. ZBYNĚK DOSTÁL, Ph.D.**

BRNO 2024





# Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství  
Studentka: **Bc. Barbora Daňková**  
Studijní program: Přesná mechanika a optika  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**  
Akademický rok: 2023/24

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

## Výměník filtrů pro konfokální mikroskop

### Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Pro právě vyvíjený konfokální mikroskop, který je založený na DMD čipu, je nutno zkonstruovat robotizovaný výměník pro fluorescenční filtry. Tento výměník musí dovolovat výměnu filtrů alespoň pro čtyři fluorescenční kanály a musí být ovládán z počítače.

### Cíle diplomové práce:

- Provést rešerši výměníků fluorescenčních filtrů pro mikroskopii.
- Provést optickou simulaci konfokálního mikroskopu a stanovit optické požadavky na filtry.
- Sestavit návrh řešení nejvhodnějšího typu robotizovaného výměníku.
- Vytvořit výkresovou dokumentaci.
- Případně výměník sestavit a otestovat.

### Seznam doporučené literatury:

FUKA, J. a HAVELKA, B. Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961.

TÖRÖK, P a KAO, F. Optical imaging and microscopy: techniques and advanced systems. Springer, 2007.

AHN, CH. a PARK, J. H. Confocal Single-Pixel Imaging. Photonics. 2023. Vol. 10, no. 6, p. 687. DOI 10.3390/photonics10060687.

GLÉZL, Š., KAMARÁD, J. a SLIMÁK, I. Přesná mechanika. Alfa, 1992.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2023/24

V Brně, dne

L. S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jiří Hlinka, Ph.D.  
děkan fakulty

## Abstrakt

Stávající holografický Q-Phase mikroskop, který je umístěn na FSI VUT v Brně, je plánováno rozšířit o konfokální fluorescenční modul založený na technologii, která využívá digitální mikrozrcátkové zařízení. Ten bude implementován místo stávajícího epifluorescenčního modulu. Pro stávající řešení modulu je nutné navrhnout výměník fluorescenčních filtrů, který v něm chyběl. Tato práce vysvětluje základní techniky konfokální fluorescenční mikroskopie a detailněji se věnuje principům vícekanálové fluorescenční konfokální mikroskopie. Pro realizaci vlastního návrhu výměníku je vytvořena optická simulace jeho osvětlovací části. Díky ní jsou stanoveny rozměrové požadavky na optické komponenty výměníku. Jsou také zhodnocena komerčně dostupná řešení. Jelikož jejich parametry nevyhovují potřebným požadavkům, je navrženo vlastní řešení. To zahrnuje konstrukční návrh podložený několika koncepty a také jeho robotizaci. Výměník je navržen pro šest fluorescenčních kanálů a je pro něj sestavena výkresová dokumentace. Podle ní je výměník vyroben, sestaven a v poslední části práce úspěšně otestován.

## Abstract

The existing holographic Q-Phase microscope, located at the FME of Brno BUT, is planned to be expanded with a confocal fluorescence module based on digital micromirror device technology. This will be implemented instead of the existing epi-fluorescence module. For the existing solution of the module, it is necessary to design a fluorescent filter turret, which was missing in it. This work explains the basic techniques of confocal fluorescence microscopy and deals in more detail with multi-channel fluorescence confocal microscopy principles. An optical simulation of its illumination part is created to realise the exchanger's design. Thanks to it, the dimensional requirements for the optical components of the turret are determined. Commercially available solutions are also evaluated. A custom solution is proposed since their parameters do not meet the requirements. This includes the mechanical design based on several concepts as well as its robotization. The turret is designed for six fluorescent channels, and drawing documentation has been compiled. According to her, the turret was manufactured, assembled, and successfully tested in the last part of the work.



## **Klíčová slova**

fluorescenční mikroskopie, vícekanálová konfokální mikroskopie, digitální mikrozrcátkové zařízení, fluorescenční filtr, výměník kostek

## **Keywords**

fluorescence microscopy, multi-channel confocal microscopy, digital micromirror device, fluorescence filter, fluorescent filter turret



## Citace

DAŇKOVÁ, Barbora. *Výměník filtrů pro konfokální mikroskop*. Brno, 2024. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.





## **Prohlášení**

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, a že jsem ve své práci neporušila autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

.....  
Barbora Daňková  
24. května 2024



## **Poděkování**

Děkuji Ing. Zbyňku Dostálovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost, i připomínky a rady, které mi během zpracování této diplomové práce poskytl. Děkuji mu také za zapůjčení literatury. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Ústavu fyzikálního inženýrství Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně za velmi vstřícný přístup, který studentům poskytují. Tímto také děkuji své rodině a přátelům za veškerou podporu během studia.



# Obsah

Úvod	1
<b>1 Základní zobrazovací techniky světelné mikroskopie</b>	<b>3</b>
1.1 Mikroskopie světlého pole	3
1.2 Mikroskopie temného pole	4
1.3 Rheinbergovo osvětlení	5
1.4 Zernikův fázový kontrast	5
1.5 Nomarského diferenciální interferenční kontrast	5
<b>2 Fluorescenční mikroskopie</b>	<b>7</b>
2.1 Princip fluorescence	7
<b>3 Fluorescenční konfokální mikroskopie</b>	<b>11</b>
3.1 Princip konfokální mikroskopie	11
3.1.1 Optický systém s dvojitým zaostřováním	11
3.1.2 Systém pro skenování vzorku	14
3.2 Laserová skenovací konfokální mikroskopie	16
3.3 Vícesvazková konfokální mikroskopie	16
3.4 Vícesvazková konfokální mikroskopie s DMD čipem	19
<b>4 Motivace a cíle práce</b>	<b>25</b>
<b>5 Optická simulace v programu Zemax a stanovení optických požadavků na filtry</b>	<b>27</b>
<b>6 Rešerše dostupných výměníků fluorescenčních filtrů</b>	<b>31</b>
6.1 Dodavatelé a jejich nabídky	31
6.2 Zhodnocení výměníků dostupných na trhu	35
<b>7 Koncepce výměníku filtrů</b>	<b>37</b>
7.1 Koncepty výměníků filtrů	37
7.2 Hodnocení konceptů	39
<b>8 Konstrukční řešení výměníku filtrů</b>	<b>41</b>

8.1	Vlastní konstrukce . . . . .	41
8.2	Ovládání výměníku . . . . .	46
8.3	Montážní postup a seřízení . . . . .	49
<b>9</b>	<b>Testování výměníku</b>	<b>53</b>
	<b>Závěr</b>	<b>57</b>
	<b>Literatura</b>	<b>59</b>

# Úvod

Zobrazování buněk v biologii pomocí světelného mikroskopu je nezbytné pro detailní studium a pochopení procesů, které se v buňce odehrávají. Světelná mikroskopie umožňuje identifikovat buněčné změny související s různými onemocněními, a tato onemocnění analyzovat. Pozorování chování živých buněk v reálném čase dnes hraje významnou roli při hledání vhodné léčby pro pacienty s nádorovým onemocněním [1]. Světelná mikroskopie je klíčová při jejich včasné a cílené léčbě. Pozorování chování živých buněk v reálném čase je nezbytné při vývoji nových léčiv a jejich testování. Světelná mikroskopie má také zásadní význam při rozvoji personalizované medicíny. Pomocí analýzy jednotlivých buněk pacienta lze přizpůsobit léčbu tak, aby byla co nejúčinnější s minimálními vedlejšími účinky. To zvyšuje šance na úspěšnou terapii. S touto aplikací se mimo jiné pojí zvolení vhodné techniky pozorování pomocí mikroskopu pro daný typ buněk.

Běžně se v mikroskopii využívá viditelného světla. Pojmem viditelné světlo označujeme malou část spektra elektromagnetického záření v rozmezí přibližně 380 – 760 nm, které je schopno lidské oko zachytit pomocí tyčinek a čípků na sítnici. Vlnové délky se pohybují od infračervené oblasti, která má větší vlnové délky (fotony mají menší energie), a je okem neviditelná, přecházejí přes červenou, oranžovou, žlutou, zelenou, modrou k fialové, až se opět stávají neviditelnými v UV oblasti (fotony mají větší energie). Obecně můžeme říci, že biologické tkáně lépe absorbují světlo s kratšími vlnovými délkami (větší energií). Toto záření je pro biologický materiál nebezpečné a při velkých dávkách nebo dlouhé expozici může tkáň nevratně poškodit [2]. Méně je potom absorbováno záření s většími vlnovými délkami (menší energií). Toto záření penetruje hlouběji do tkání, a je pak možné zobrazovat třeba i in-vivo tkáně živých organismů [3].





# 1 Základní zobrazovací techniky světelné mikroskopie

Pro to, abychom byli schopni zvolit vhodnou techniku pozorování pomocí mikroskopu, je dobré si uvědomit základní problematiku spojenou s průchodem světla buňkami. Buňky jsou transparentní a světlo téměř nepohlcují. Jsou složeny především z vody, dále ze sacharidů, lipidů, proteinů, nukleových kyselin a dalších látek. Tyto základní komponenty mají index lomu odlišný od okolního prostředí a způsobují nepatrnou absorpci světla. Tento nepatrný pokles amplitudy procházející světelné vlny však není dostatečný pro to, abychom ho v podobě poklesu intenzity byli schopni zaznamenat lidským okem. Z důvodu odlišného indexu lomu ale buňky dokážou měnit fázi vlny. Pomocí vhodných mikroskopových technik dokážeme změnu fáze převést na změnu intenzity světla a zvýraznit kontrast v pozorovaném obraze. Tím se objekty zviditelní pro lidské oko.

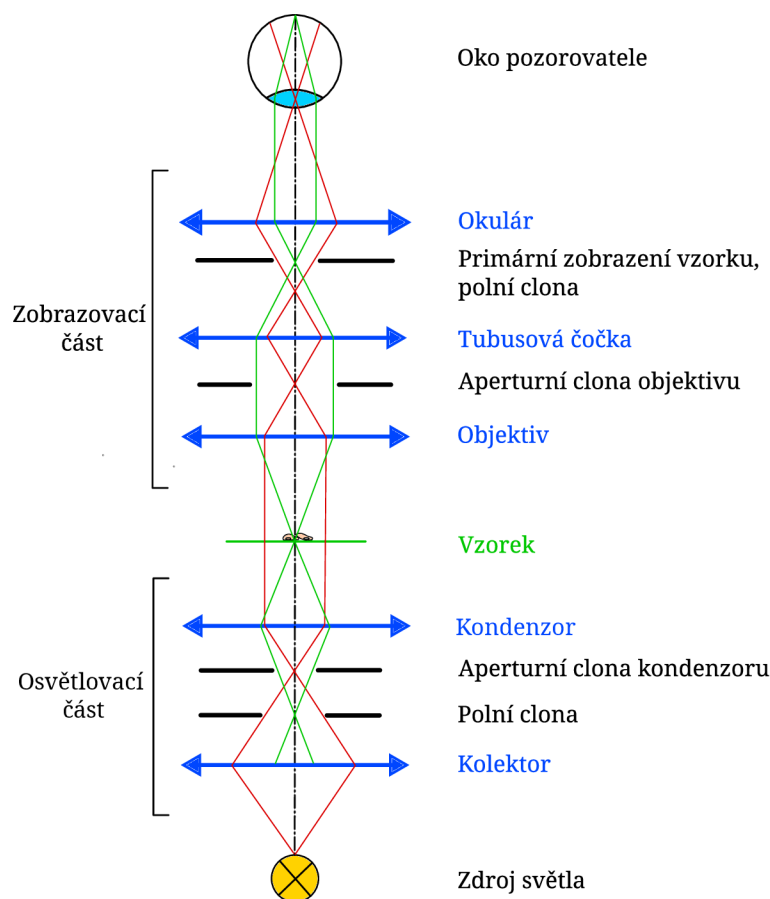
Mezi běžně používané metody pozorování pomocí světelné mikroskopie patří mikroskopie světlého pole, mikroskopie temného pole, Rheinbergovo osvětlení, Zernikeův fázový kontrast a Nomarského diferenciální interferenční kontrast. V následujících odstavcích si jednotlivé metody představíme a shrneme výhody a nevýhody každé z nich.

## 1.1 Mikroskopie světlého pole

Nejstarší a nejběžnější technikou pozorování je mikroskopie ve světlém poli (obrázek 1.1). Je to základní technika, ze které jsou odvozeny další pokročilejší techniky. Běžný mikroskop se skládá ze dvou částí – osvětlovací a zobrazovací. Osvětlovací část se skládá z kolektoru, jehož úkolem je sběr světla ze zdroje, a z kondenzoru. Kondenzor vytváří rovnoběžné svazky paprsků, které zajišťují rovnoměrné osvětlení všech míst vzorku (Köhlerovo osvětlení) [4]. Zobrazovací část je tvořena objektivem, tubusovou čočkou a okulárem. Objektiv slouží k zaostření zkoumaného vzorku. Ten je umístěn v ohniskové rovině objektivu. Obraz vzorku vzniká v ohniskové rovině tubusové čočky, kde je zároveň i polní rovina. Při použití tubusové čočky jsou světelné paprsky jdoucí od jednoho bodu vzorku po průchodu objektivem rovnoběžné, což umožňuje vkládání přídavných prvků pro jiné mikroskopové techniky. Používají se například polopropustná, či dichroická zrcátka, která umožňují odklonění svazku. Ohnisková rovina okuláru je sjednocena s ohniskovou rovinou tubusové čočky. Okulárem pozorujeme kontrastní linie objektů na světlém pozadí.

Obrovskou výhodou techniky světlého pole je její jednoduchost. Tato metoda není ovšem vhodná pro všechny typy buněk. Ve světlém poli lze dobře pozorovat buňky obsahující přirozeně pigment (např. rostlinná buňka obsahující chlorofyl). Pro transparentní buňky je metoda světlého pole nevhodná z důvodu nízkého kontrastu. Proto je nutno buňky obarvit, abychom zvýšili jejich kontrast. Nabarvení ale může být pro buňky toxické a může vést ke změně fyziologických procesů, což je při pozorování živých buněk nežádoucí. Nevýhodou je také nutnost fixace preparátu. V medicíně nachází tato metoda využití v histologii [2].

Pro pozorování živých buněk je často využíváno invertovaného uspořádání transmisního mikroskopu [5]. Vzorek je osvětlován shora, objektiv se nachází pod vzorkem. Invertované



Obrázek 1.1: Schéma mikroskopu s nekonečnou tubusovou délkou. Červeně jsou znázorněny paprsky jdoucí ze zdroje. Zeleně jsou znázorněny paprsky jdoucí z bodu na vzorku.

uspořádání mikroskopu nabízí hned několik výhod. Buňky mají přirozeně tendenci klesat na dno komůrky a přilnout k podložnímu sklíčku. Pokud se objektiv s imerzním médiem nachází pod vzorkem, nad vzorkem vzniká potřebný manipulační prostor, například k výměně média v komůrce pomocí mikropipety.

## 1.2 Mikroskopie temného pole

Při zkoumání buněk technikou temného pole je cílem zvýšení kontrastu transparentních buněk bez nutnosti jejich nabarvení [2]. Zvýšení kontrastu docílíme pomocí vložení clony ve tvaru propustného mezikruží do zadní ohniskové roviny kondenzoru. Na zkoumaný vzorek dopadají paprsky pouze pod velmi šikmými úhly. Na jednotlivých strukturách vzorku dochází k rozptylu paprsků. Osvětlovací paprsky prošlé vzorkem jsou dále blokovány a rozptýlené paprsky jsou pomocí objektivu sbírány a zaostřovány na čip kamery. Můžeme tak pozorovat světlé detaily objektů na tmavém pozadí. Podmínkou funkčnosti mikroskopu je, že numerická apertura kondenzoru a tudíž i osvětlení musí být větší než numerická apertura objektivu.

Nevýhodou této metody je velmi nízká intenzita světla dopadající na detektor, tudíž potřebujeme zdroj s vysokým výkonem, abychom docílili dostatečného osvětlení vzorku. Nezbytností je i dostatečně citlivý detektor. Metoda temného pole není použitelná pro

pozorování buněk ve více vrstvách z důvodu vícenásobného rozptylu paprsků na mnoha vrstvách. Je ale vhodná pro zkoumání tekutých vzorků (např. bakterie ve vodě, krev). Lze ji také použít pro sledování trajektorie pohybu buněk.

### 1.3 Rheinbergovo osvětlení

Speciální technikou podobnou temnému poli je Rheinbergovo osvětlení [6]. Při Rheinbergově osvětlení do zadní ohniskové roviny kondenzoru vkládáme barevnou masku ve tvaru mezikruží. Paprsky procházející vnitřním kroužkem procházejí skrz vzorek a udávají barvu pozadí obrazu. Paprsky mající barvu vnějšího mezikruží procházejí vzorkem pod šikmými úhly a objektivem nejsou zachyceny. Na vzorku se ale rozptylují do apertury objektivu. Barva mezikruží udává barvu pozorovaného vzorku. Využíváme komplementárních (doplňkových) barev (např. červená a zelená). Doplnkovými barvami dosáhneme kontrastního obrazu. Co se týče velikosti a konstrukce barevné masky, je zvolena vhodným způsobem tak, aby objektiv sbíral a zaostřoval pouze paprsky rozptýlené a procházející vnitřním kroužkem.

### 1.4 Zernikův fázový kontrast

Při zkoumání toho, jak zviditelnit transparentní vzorky s odlišným indexem lomu světla, přišel Frits Zernike ve 30. letech 20. století s jedinečnou myšlenkou, za niž mu byla udělena v roce 1953 Nobelova cena. Dokázal fázovou modulaci světla převést na změnu amplitudy, a tím vizualizovat fázi [7].

Optická konstrukce u Zernikého fázového kontrastu vychází z metody světlého pole. Před kondenzor je vložena clonka ve tvaru propustného mezikruží, která propouští pouze okrajový kužel paprsků a centrální část svazku odstíní. Okrajové paprsky poté dopadají na vzorek, z větší části jím procházejí beze změny a část se rozptýlí na strukturách vzorku. Do zadní ohniskové roviny objektivu je vložena fázová destička opět ve tvaru mezikruží, která mění fázi nerozptýlených okrajových paprsků. V obrazové rovině dochází k interferenci paprsků, které prošly nezměněny vzorkem a paprsků, jejichž fáze byla posunuta fázovou destičkou. Použitím různých fázových destiček lze dosáhnout různého fázového zpoždění a pozitivního nebo negativního fázového kontrastu.

Velkou výhodou je pozorování transparentních živých buněk v reálném čase bez nutnosti jejich obarvení. Odpadá časově náročná příprava tkáně. Nevýhodou je náročnější centrace fázové destičky s prstencovou clonkou a vznik halo efektu ve výsledném obraze. Touto metodou je možno pozorovat tkáňové kultury i izolované buňky.

### 1.5 Nomarského diferenciální interferenční kontrast

V 50. letech 20. století objevil Nomarski způsob, jak vizualizovat změnu fáze pomocí polarizace světla [2]. Optická konstrukce vychází z metody světlého pole. Světlo ze zdroje prochází přes polarizační filtr, který ho lineárně polarizuje. Pomocí kondenzorového Wollastonova hranolu je rozděleno na dvě kolmo polarizované složky – paprsek řádný a mimořádný. Paprsky prochází kondenzorem, vzorkem a objektivem v těsné blízkosti vedle sebe. Pokud jeden z paprsků projde místem ve vzorku s odlišným indexem lomu či jeho tloušťkou, vznikne mezi paprsky drobný fázový posun. Poté jsou paprsky opět složeny dohromady v jeden pomocí objektivového Wollastonova hranolu. Výsledný kontrast bodu obrazu vzorku je dán interferencí řádného a mimořádného paprsku. Aby k ní mohlo dojít, musí mít oba paprsky

shodnou polarizaci. Proto je do zobrazovací části vložen analyzátor. Analyzátor je natočen oproti polarizátoru pod úhlem 45 stupňů. Místa, kde řádný i mimořádný paprsek prochází strukturou se stejným fázovým zpožděním, se jeví ve výsledném obraze bíle. Místa, kde paprsky získaly jiné fázové zpoždění, jsou tmavší barvy. Zachycené struktury se mohou zdánlivě jevit jako trojrozměrné a osvětlené z boku, přestože jsou osvětlené kolmo. Tato metoda nachází využití při pozorování živých transparentních buněk. Lze pozorovat tkáňové kultury i izolované buňky.

## 2 Fluorescenční mikroskopie

Jedna z nejpoužívanějších metod zvýšení kontrastu živých buněk je využití fluorescence. Jedná se opět o techniku snadno integrovatelnou do mikroskopie světelného pole.

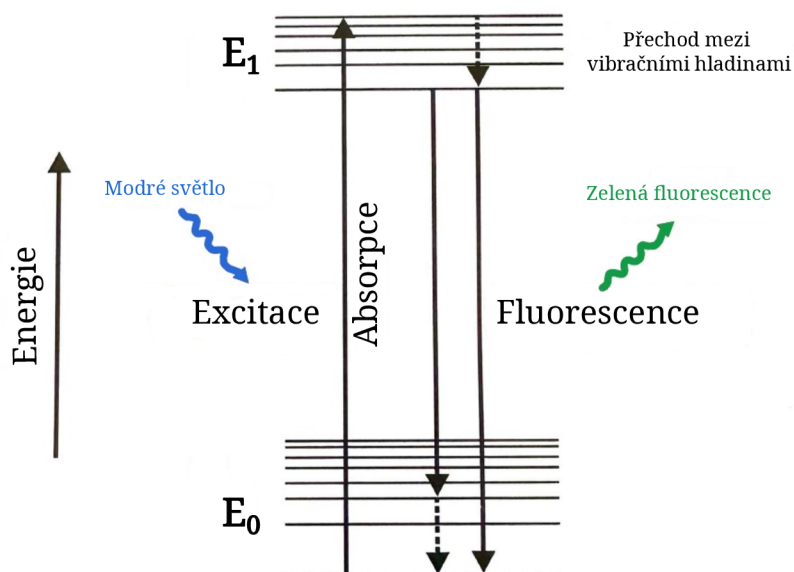
Existují barviva, pomocí kterých si dokážeme barevně zvýraznit nebo odlišit různé struktury v buňkách. Tato barviva (fluorofory) jsou biologicky upravena tak, aby se byla schopna vázat na dané buněčné struktury. Těchto barviv existuje celá škála. Pokud na tato barviva posvítíme světlem o určité vlnové délce, dochází k jevu zvanému fluorescence, a tím ke zviditelnění struktury buňky.

### 2.1 Princip fluorescence

Fluorescenční mikroskopie využívá k vytvoření fluorescence jednofotonovou excitaci. Každá molekula fluoroforu obsahuje atomová jádra skládající se z protonů a neutronů a obaly obsahující elektrony. Elektrony nejsou kolem jader uspořádány náhodně, ale vyskytují se na určitých energetických hladinách. Pokud na molekuly s elektrony, které se nachází v základním stavu  $E_0$ , dopadne foton s dostatečnou energií, molekula tuto energii absorbuje a elektron se dostává na vyšší energetickou hladinu  $E_1$ . Tomuto jevu říkáme excitace. Energetické hladiny elektronů jsou kvantovány. Proto elektron od fotonu při excitaci přijme jen přesně dané kvantum energie. V molekule fluoroforu v rámci jedné energetické hladiny může existovat více vibračních hladin. Ty jsou dány tvarem molekuly a tuhostí jejich vazeb. Elektron má snahu se po excitaci dostávat na nejnižší vibrační úroveň a nejnižší energetickou hladinu. Když poklesne na nižší energetickou úroveň, tak zbylou energii vyžáří ve formě fotonu. Tím dochází k fluorescenci. Princip fluorescence je znázorněn pomocí Jablonského diagramu na obrázku 2.1. Přechod elektronu mezi vibračními hladinami v excitovaném stavu je doprovázen ztrátou energie, která je uvolněna ve formě tepla. To vždy vede k tomu, že emitované světlo bude mít nižší energii (větší vlnovou délku) ve srovnání se světlem použitým pro excitaci. Posun maxim spekter vlnových délek emise ve srovnání s excitací se nazývá Stokesův posun. Proces excitace elektronu a následné emise fotonu je extrémně rychlý (poločas emise obvykle bývá méně než  $10^{-8}$  s). Ne všechny elektrony, které po excitaci klesnou zpět do základního stavu, emitují světelné záření. Někdy může v důsledku této změny energie dojít k uvolnění energie ve formě tepla nebo ke změnám v chemické struktuře látek.

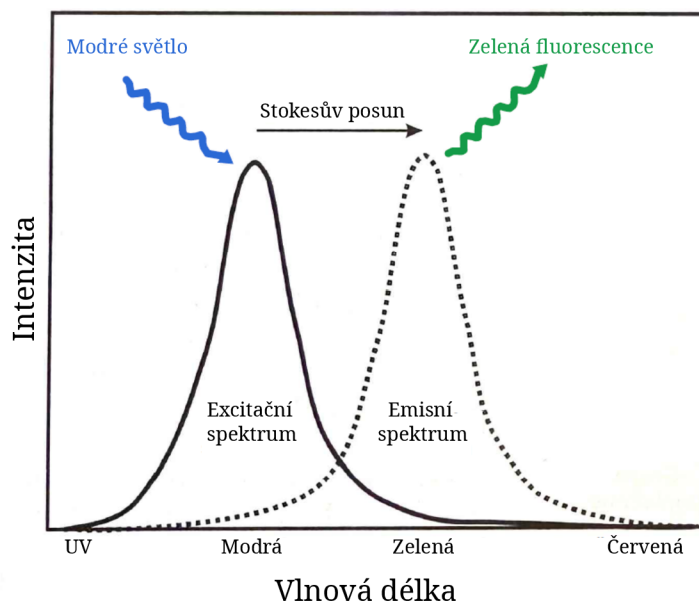
Efektivita, se kterou fluorofor přeměňuje absorbované světlo na emitované fluorescenční záření, se nazývá kvantový výtěžek. Kvantový výtěžek závisí na molekulárních charakteristikách barviva a prostředí, ve kterém se barvivo nachází. Kvantový výtěžek může být ovlivněn i molekulou, na kterou je barvivo navázáno.

Fluorescenční molekuly mají charakteristická excitační spektra. Excitační spektra nám říkají, jak snadno lze danou fluorescenční látku excitovat různými vlnovými délkami světla. U jednofotonové excitace jsou stejná jako absorpční spektra. Fluorescenční emisní spektrum udává jaké vlnové délky fluorescenční molekula vyzařuje. Proti excitačnímu spektru má vrcholy posunuté směrem k nižším energiím (vyšším vlnovým délkám). Idealizovaný příklad,



Obrázek 2.1: Jablonského diagram:  $E_0$  – základní energetický stav,  $E_1$  – excitovaný stav. Převzato a upraveno z [8].

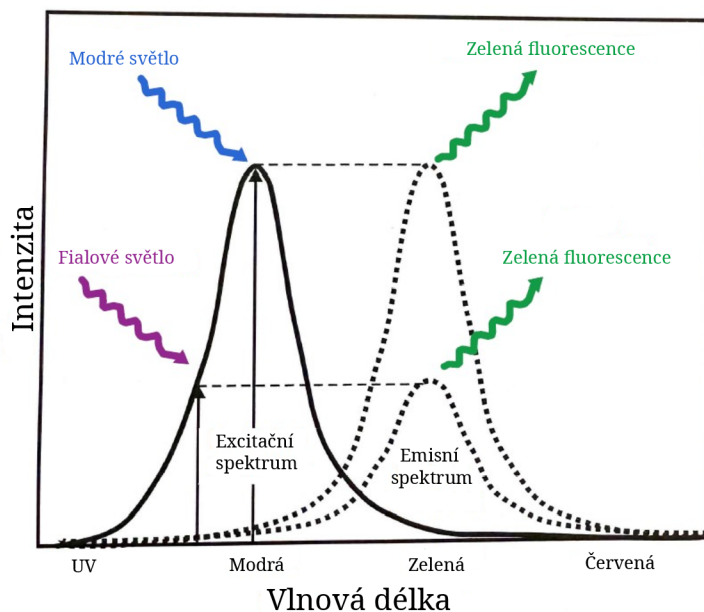
jak tato spektra mohou vypadat, je znázorněn na obrázku 2.2, který zobrazuje fluorescenci běžně používané látky – fluoresceinu.



Obrázek 2.2: Stokesův posun. Převzato a upraveno z [8].



Nejvyšší kvantové výtěžnosti fluorescenčního záření dosáhneme při použití optimální vlnové délky excitačního záření, která se nachází pod vrcholem grafu excitačního spektra. Použitím excitačního záření o vlnové délce mírně odlišné od optimální, je vybuzení fluoroforu možné, avšak intenzita emitovaného fluorescenčního záření bude menší. Pokud k excitaci fluoroforu, který má maximální absorpci v modré oblasti, použijeme např. kratší vlnovou délku (fialové světlo), bude mít emitované fluorescenční záření stejné vlnové délky (stejně zelené spektrum), ale jeho intenzita poklesne (viz obrázek 2.3).

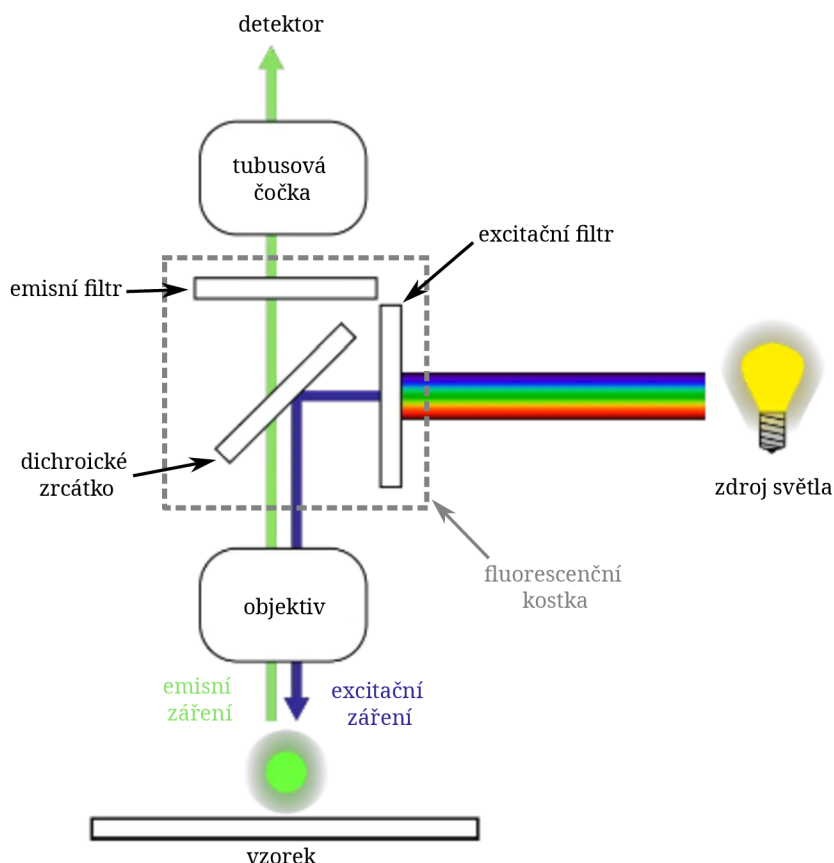


Obrázek 2.3: Redukovaná kvantová výtěžnost při použití vlnové délky v okolí vlnové délky s maximální fluorescenční výtěžností. Převzato a upraveno z [8].

Fluorescenční mikroskopie oproti klasické mikroskopii využívá speciálního epifluorescenčního osvětlení. Při tomto druhu osvětlení je světlo jdoucí ze zdroje zaostřeno pomocí objektivu na vzorek. Ten stejný objektiv zároveň slouží ke sběru fluorescenčního záření ze zkoumaného vzorku. Optické členy objektivu mikroskopu fungují tedy jako objektiv i kondenzor. Použitím epifluorescenčního osvětlení odpadá problém pečlivého nastavení obou systémů čoček. Další výhodou je bezpečnost pozorování. V případě použití laseru nebo vysokoenergetického zdroje o vlnových délkách blízkých UV spektru tato konstrukce nedovoluje excitačnímu záření vstupovat do okuláru k lidskému oku, které by mohlo poškodit. Při použití vysoce citlivých detektorů světla je taktéž excitační záření odkloněno, a je tak dosaženo mnohem lepší citlivosti detekce.

Další odlišností oproti klasické mikroskopii je nutnost použití tzv. fluorescenční kostky v sestavě. Fluorescenční kostka slouží k zalomení osvětlovacího svazku světla a k vyfiltrování potřebných vlnových délek, které jsou nezbytné pro správné vyvolání fluorescence a zaznamenání intenzity fluorescenčního záření na detektor. Fluorescenční kostka obsahuje excitační filtr, dichroické zrcátko a emisní filtr. Excitační filtr upravuje vyzařované spektrum zdroje a vybírá světlo o požadovaných vlnových délkách. Světlo se odráží od dichroického zrcátka, které je umístěno v kostce pod úhlem 45° vzhledem k ose optické soustavy mikroskopu. Dichroické zrcátko je povrstveno tak, aby bylo schopno excitační vlnové délky světla

odrážet a emisní propouštět. Záření dopadá na zkoumaný vzorek, kde dochází k excitaci fluoroforu a následné emisi fluorescenčního záření. Toto záření s pozměněnou vlnovou délkou putuje zpět skrz objektiv k fluorescenční kostce a prochází dichroickým zrcátkem. Následně prochází emisním filtrem k detektoru. Je tak zaručeno, že excitační záření nedopadá na detektor.



Obrázek 2.4: Schéma fluorescenčního mikroskopu využívajícího epifluorescenční osvětlení se zakomponovanou fluorescenční kostkou. Převzato a upraveno z [9].

Jak vyplývá z výše uvedeného, k pozorování různých struktur buněk potřebujeme v mikroskopu používat různá fluorescenční barviva specificky vázaná na jednotlivé části buňky, a tudíž i různá dichroická zrcátka s kompatibilními excitačními a emisními filtry. V mikroskopu obvykle bývá více fluorescenčních kostek se zrcátky a filtry, a tyto kostky je mezi sebou potřeba vyměňovat. K tomu je zapotřebí mechanického systému, který bude zajišťovat výměnu jednotlivých kostek mezi sebou, a pohonného systému, který bude uvádět kostky do pohybu. Více o mechanickém výměnném systému je popsáno v částech 7 a 8, kde se zaměřuji na jednotlivé principy výměníků a na realizaci mého řešení. Další a často využívanou možností je použití fluorescenčních kostek s vícepásmovými filtry pro dané kombinace fluoroforů (např. DAPI + FITC + TRITC). Použitím těchto sad je ale snížena variabilita epifluorescenčního mikroskopu.



# 3 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se používá buď samostatně, anebo se dá s výhodami využít v kombinaci s principem konfokální mikroskopie. Obě metody se poté dají kombinovat s holografickou mikroskopií [10], což je dlouhodobý vývojový plán výzkumné skupiny Prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D. na Ústavu fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně.

## 3.1 Princip konfokální mikroskopie

Za vynález konfokálního mikroskopu vděčíme Marvinu Minskému, kterému byla tato myšlenka v roce 1957 patentována [11]. V následujících letech však nedošlo k žádnému výraznějšímu rozvoji této mikroskopové techniky. Pokrok nastal až koncem 80. let 20. století s rozvojem laserů a počítačů menších rozměrů. Konfokální mikroskopie v té době nabízel usnadnění při studiu molekul a dynamiky toku buněčných iontů (zejména vápníku) [8]. Na počátku 90. let 20. století byly vyráběny přístroje s vysokým rozlišením, dobrou citlivostí, a již byly schopny provádět optické řezy. Tyto přístroje však zoufale pomalu zpracovávaly nasnímaná data. Vytvoření 3D obrazu z několika optických řezů jim pro představu zabralo i více než hodinu. Významné zlepšení přišlo až s příchodem výkonnějších počítačů.

Minsky ve svém patentu popsal dva nové systémy. Prvním je princip optického systému s dvojitým zaostřováním („double focusing optical system“), který zajišťuje bodové osvětlení vzorku pomocí dírkových clon. Druhým je elektro-mechanický systém pro posouvání vzorku ohniskovým bodem objektivu a současné vytvoření synchronizovaného, identického skenovacího obrazce na zobrazovacím zařízení. Tento druhý systém bývá nazýván „stage scanning system“ (systém pro skenování vzorku).

### 3.1.1 Optický systém s dvojitým zaostřováním

Na obrázku 3.1 jsou zobrazena dvě různá optická uspořádání konfokálního mikroskopu. Schéma klasického uspořádání konfokálního mikroskopu je na obrázku 3.1a). Schéma alternativního uspořádání konfokálního mikroskopu je na obrázku 3.1b). Obě uspořádání mají stejnou funkci a s jejich pomocí dojdeme ke stejným výsledkům.

Na obrázku 3.1a) je zobrazen zdroj světla 10, například žárovka nebo jiný vhodný světelný zdroj pro mikroskopii. Žárovka má obvykle reflektor 12, který slouží ke zvýšení intenzity světla. Za zdrojem světla je umístěno stínící zařízení 14, kterým může být deska obsahující malý dírkový otvor 16 v zákrytu se světelným zdrojem. Je žádoucí získat co nejpřesnější aproximaci bodového zdroje světla. Rozlišovací schopnost mikroskopu závisí na tom, jak dobře se nám geometrický bod podaří aproximovat. Systém dvojitě zaostřený je systém, který obsahuje dvě čočky 18 a 20. Kondenzorová čočka 18 zaostřuje světlo z dírkové clony 16 na vzorek 22, aby se osvětlil jeden bod na vzorku. Objektivová čočka 20 zaostřuje osvětlený bod na vzorku na druhou dírkovou clonu 26. Kondenzorová čočka 18 je zobra-

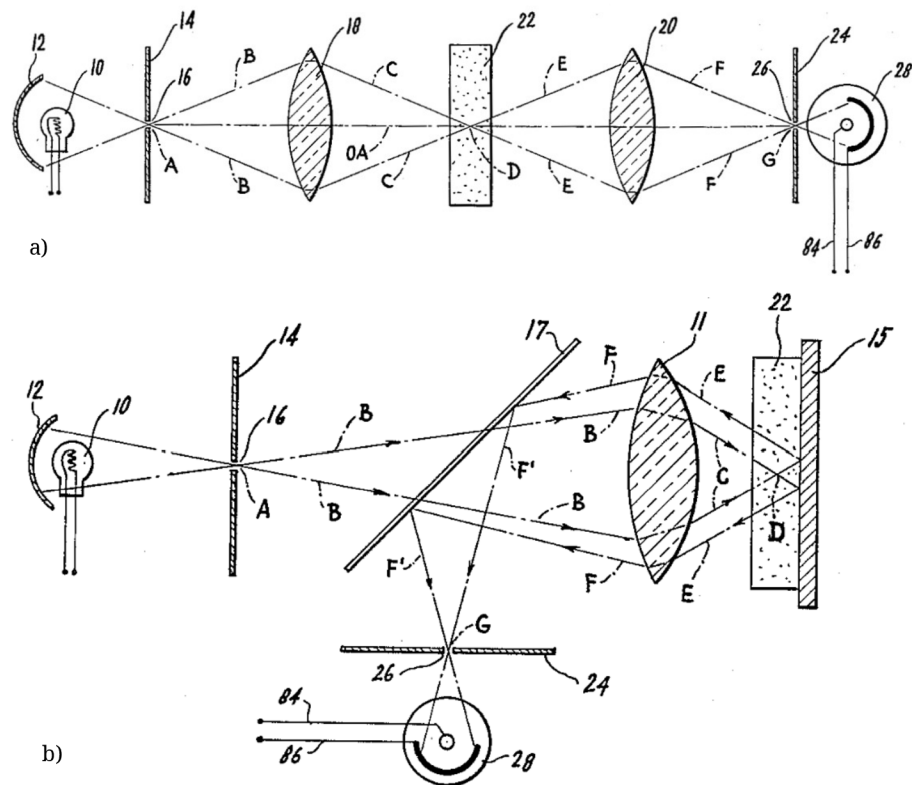
zena v obrázku 3.1a) jako symetrická dvojbypuklá čočka, ale v praxi je nahrazena složitější optickou soustavou vloženou mezi dírkovou clonu 14 a vzorek 22. Objektívová čočka 20 je umístěna na druhé straně vzorku 22 mezi vzorkem a druhou dírkovou clonou 24 a v praxi je nahrazena objektívovou a tubusovou čočkou. Clona 24 obsahuje malý dírkový otvor 26, který je opticky sdružen s dírkou 16 ve cloně 14. Za clonou 24 je v zákrytu s dírkovým otvorem 26 umístěné fotocitlivé zařízení 28, např. fotoelektrický článek. Fotocitlivé zařízení přeměňuje světlo na elektrický proud, a tím je schopné měřit intenzitu světla, které prošlo dírkou 26. Intenzita bodu D na vzorku 22 je reprezentována jako tečka stejné relativní intenzity na obrazovce osciloskopu 68.

Středy dírek 16 a 26 (bodový zdroj světla A) 26 (bod G) a geometrické středy čoček 18 a 20 musí být umístěny na jedné optické ose systému, která je v nákresu na obrázku 3.1a) označená čerchovanou čarou a písmeny OA. Osvícený bod D na vzorku leží také na této ose. Všechny paprsky světla přijaté fotocitlivým zařízením 28 musí projít vzorkem 22 v bodě D. Světlo rozptýlené z jiných bodů vzorku 22, než je osvětlený bod D, putuje také zobrazovací částí optického systému, ale paprsky nejsou zaostřeny do dírkou 26. Dopadnou na desku 24, tudíž je fotocitlivé zařízení nezachytí a neovlivňují intenzitu zobrazeného bodu.

Na obrázku 3.1b) je znázorněno upravené optické uspořádání konfokálního mikroskopu. Na rozdíl od uspořádání na obrázku 3.1a) obsahuje tato varianta jedinou čočku 11 namísto dvou 18 a 20. Vzorek 22 se umísťuje na odrazivou plochu zrcadla 15. Mezi deskou 14 s dírkovým otvorem 16 a čočkou 11 se nachází polopropustné zrcadlo 17. Odrazivá plocha polopropustného zrcadla 17 je otočena směrem k čočce 11, zatímco propustná plocha je otočena k dírkovému otvoru 16.

Světlo odražené reflektorem 12 z žárovky 10 je kolimováno dírkovým otvorem 16 v desce 14, aby bylo dosaženo bodového zdroje světla A. Rozbíhavé paprsky (ohraničené okrajovými paprsky B) prochází skrze polopropustné zrcadlo 17, následně skrze čočku 11, a stávají se paprsky sbíhavými (ohraničenými okrajovými paprsky C). Ohnisko D sbíhavých paprsků C je zaostřeno na vzorek 22. Po odražení od zrcadla 15 pod vzorkem se svazek stává rozbíhavým (ohraničen okrajovými paprsky E) a prochází znovu čočkou 11. Čočka 11 vytváří sbíhavý svazek světla (ohraničen okrajovými paprsky F), který je odražen polopropustným zrcadlem 17. Polopropustné zrcadlo je umístěno pod úhlem  $45^\circ$  vzhledem k optické ose, a odrazí kužel paprsků (ohraničený okrajovými paprsky F) do sbíhavého svazku (ohraničeného okrajovými paprsky F') směrem k detektoru 28. Před detektorem 28 je paprsek zaostřen na vertikální optické ose do bodu G, který se nachází v dírkovém otvoru 26 v desce 24. Deska 24 odstíní rozptýlené paprsky. Detektor 28 měří intenzitu světla, která projde skrze dírkový otvor 26.

Systém s dvojitým zaostřováním poskytuje výhodu v možnosti použití jednodušších čoček a celkově jednoduššího uspořádání v porovnání s klasickými mikroskopy. U klasického mikroskopu by měl být ideálně zaostřen každý bod nacházející se v zorném poli, avšak toho není možno v praxi dosáhnout. Zorné pole pokrývá určitou oblast a v důsledku toho se projevují různé vady optické soustavy (např. čočka vytváří obraz jiné kvality v blízkosti optické osy v porovnání s obrazem na okraji, nerovnoměrnost osvětlení plochy vzorku). Tyto vady je do určité míry možné korigovat za cenu zvýšení složitosti systému (např. výrobně složitější asférické čočky, irisová clona). Je nutné kalibrovat optické vlastnosti mikroskopu pro mnoho bodů zorného pole. Při konfokální mikroskopii snímáme intenzitu záření z jediného bodu, což zjednodušuje kalibraci. Protože zobrazujeme bod na optické ose do jiného bodu na optické ose, stačí nám jednodušší objektiv, který bude mít korigovanou pouze sférickou vadu a barevnou vadu polohy. Objektiv nemusí mít korigovanou komu, astigmatismus, kří-



Obrázek 3.1: Schéma konfokálního mikroskopu – optický systém s dvojitým zaostřováním a) v klasickém uspořádání, b) v alternativním uspořádání: OA – optická osa, A – bodový zdroj světla, B – paprsky reprezentující divergentní vlnu, C – paprsky reprezentující konvergentní vlnu, D – bod obrazu dírkové clony v rovině vzorku, E – paprsky reprezentující divergentní vlnu, F – paprsky reprezentující konvergentní vlnu, F' – paprsky reprezentující konvergentní vlnu odraženou od polopropustného zrcadla, G – bod obrazu dírkové clony, 10 – zdroj světla, 11 – čočka, 12 – reflektor, 14 – deska, 15 – odrazivé zrcadlo, 16 – malý dírkový otvor, 17 – polopropustné zrcadlo, 18 – kondenzorová čočka, 20 – objektivová čočka, 22 – vzorek, 24 – deska, 26 – malý dírkový otvor, 28 – fotocitlivé zařízení, 84 a 86 – vodiče. Převzato a upraveno z [11].

vost pole, zkreslení ani barevnou vadu velikosti. Vzhledem k jednoduššímu designu čoček lze objektivy konstruovat tak, aby čočky měly větší rozměry a delší pracovní vzdálenost.

Běžné mikroskopy často vyžadují umístění clon na konkrétní místa optické soustavy, která mohou být špatně přístupná. Vzhledem k tomu, že celé zorné pole konfokálního optického systému tvoří jeden bod, má systém výhodu v tom, že poskytuje možnost umístění clony do každé roviny kolmé na optickou osu. Pohybem desky s dírkovým otvorem pevně dané velikosti podél optické osy lze vytvořit clonu proměnlivé velikosti. Nahradíme tím použití irisové clony používané v konvenčních systémech, která je v pevně dané pozici a její velikost lze nastavovat.

Pokud je potřeba zavést clony určené pro specifické účely, například pro fázový kontrast nebo mikroskopii v temném poli, je u běžného mikroskopu nutné umístit tyto clony na konkrétně daných místech, které jsou velice omezeny. To vyžaduje vysokou přesnost při výrobě clon. V některých případech nelze clony požadovaných parametrů vyrobit. U konfokálního

mikroskopu je možné přidat do sestavy libovolný počet clon a jednoduše danou clonu posunout dle potřeby pro získání požadovaného výsledku. Například v systému znázorněném na 3.1a) lze temného pole dosáhnout umístěním vhodně tvarované clony kdekoli mezi dírkovým otvorem 16 a čočkou 18 a doplňkové clony na odpovídajícím místě mezi čočkou 20 a dírkovým otvorem 26. Díky širokým možnostem umístění clon je konfokální mikroskop mimořádně flexibilním přístrojem.

### 3.1.2 Systém pro skenování vzorku

Na obrázku 3.2 je zobrazen systém pro skenování vzorku. Tento systém zajišťuje pohyb vzorku 22 vzhledem k optickému systému. Systém umožňuje využití různých skenovacích vzorů. Nejčastěji se využívá běžná forma osciloskopického rastru složená z paralelních horizontálních linií. Schéma zařízení na obrázku 3.2 zobrazuje uspořádání schopné provést tento skenovací vzor. Systém zajišťuje rychlý pohyb vzorku v podélném i příčném směru, což umožňuje průchod vzorku ohniskovým bodem objektivu synchronizovaně s osciloskopickým rastrem.

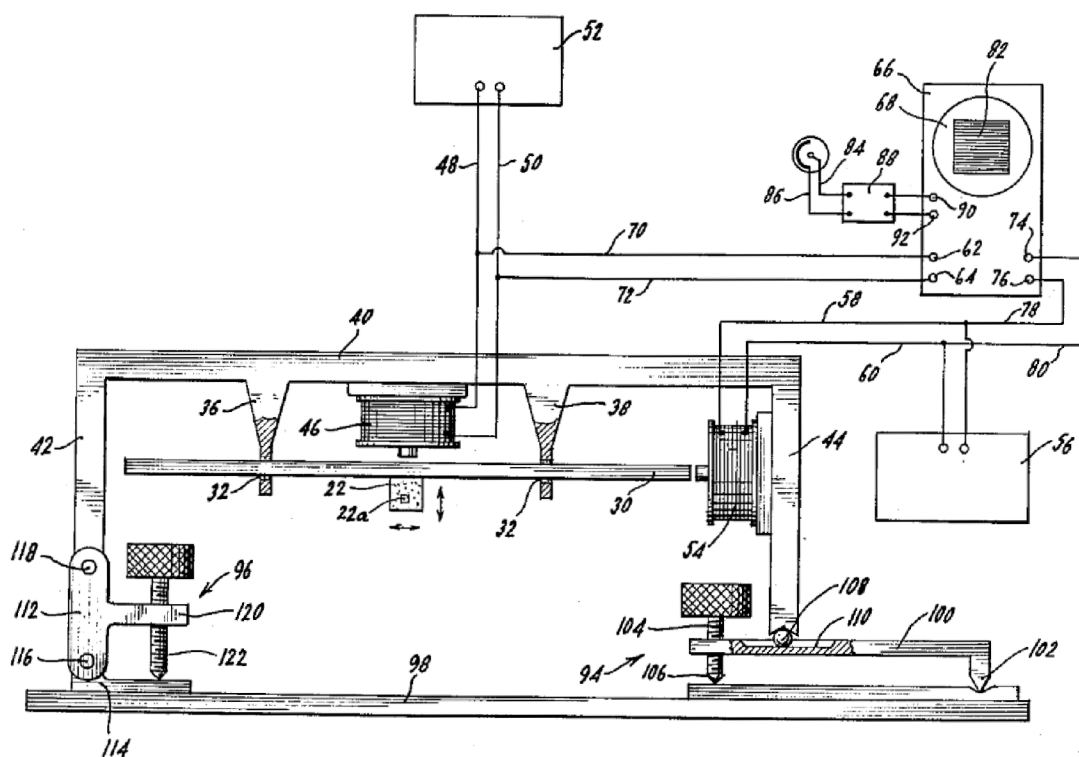
Vzorek 22 je upevněn na ladicí vidlici 30 nebo jiném plechovém díle schopném vibrovat při určité frekvenci buzení. Ladicí vidlice 30 je zavěšena ve svých uzlových bodech na podpůrných ramenech 36 a 38 rámu 40. Rám 40 je tvaru písmene L s koncovými nohama 42 a 44. Elektromagnet 46 je pevně namontován na rám 40, je umístěn vedle a nad středem ladicí vidlice 30 a je připojen vodiči 48 a 50 k oscilátoru 52. Za pomoci oscilátoru 52 je ovládán elektromagnet 46 tak, aby buzením ladicí vidlice 30 při její vlastní frekvenci způsobil vibraci vzorku 22 ve svislém směru. V některých případech může být žádoucí upravit frekvenci buzení ladicí vidlice 30 mimo její vlastní frekvenci.

Druhý elektromagnet 54 je připevněn k rámu 40, například k noze rámu 44, tak jako na obrázku 3.2. Je umístěn poblíž jednoho konce vidlice 30. Napájecí obvod 56 tohoto elektromagnetu 54 je generátorem pilovitěho signálu, a je připojen pomocí vodičů 58 a 60. Slouží k podélnému pohybu celé vidlice 30. Tento podélný pohyb se kombinuje s příčným pohybem vidlice 30, a vytváří se tak skenovací vzor nad vybranou oblastí vzorku 22. Skenovaná oblast je pro názornost zvětšena pod číslem 22a na obrázku 3.2. O tlumení podélného pohybu vidlice se stará viskózní tlumicí hmota 32, která je na konci podpůrných ramen 36 a 38.

K elektromagnetu 46 a ke generátoru 52 jsou paralelně připojeny příčné vstupy 62 a 64 osciloskopu 66 pomocí vodičů 70 a 72. Podobně je na svorky 74 a 76 osciloskopu 66 připojen i elektromagnet 54 vodiči 78 a 80. Na stínítku osciloskopu 68 je tak vytvořen rastr 82, jehož podélné a příčné složky pohybu jsou synchronizovány s podélným a příčným pohybem vzorku 22. Podélné a příčné skenovací amplitudy rastru na obrazovce osciloskopu mohou být mnohem větší než odpovídající skenovací amplitudy osvětleného bodového pole, jak lze vidět při porovnání rozměrů rastru 82 s oblastí vzorku 22a. To vede k velkému zvětšení oblasti vzorku. Signál z fotodetektoru 28 je veden skrz vodiče 84 a 86, je zesílen zesilovačem 88 a je připojen ke svorkám 90 a 92 mřížkového obvodu obrazovky osciloskopu. Intenzita světla v libovolné části skenované oblasti vzorku odpovídá intenzitě bodu v rastru na obrazovce osciloskopu 82. Na obrazovce je tak reprodukován zvětšený obraz oblasti vzorku 22a.

V popsaném systému skenování vzorku není nutné, aby rovina zkoumaného vzorku byla kolmá k optické ose přístroje. Pohyb skenování lze nastavit tak, aby zahrnoval složku rovnoběžnou s optickou osou. Omezení jsme pouze pracovní vzdáleností objektivů. Tím lze nasnímat šikmý řez. Toto je funkce, kterou u konvenčních mikroskopů nelze nalézt.





Obrázek 3.2: Schéma konfokálního mikroskopu – systém pro skenování vzorku: 22 – vzorek, 22a – skenovaná oblast vzorku, 30 – ladicí vidlice, 32 – viskózní tlumicí hmota, 36 a 38 – podpurná ramena rámu, 40 – rám, 42 a 44 – koncové nohy rámu, 46 – první elektromagnet, 48 a 50 – vodiče, 52 – první oscilátor, 54 – druhý elektromagnet, 56 – druhý oscilátor, 58 a 60 – vodiče, 62 a 64 – svorky osciloskopu, 66 – osciloskop, 68 – obrazovka osciloskopu, 70 a 72 – vodiče, 74 a 76 – svorky osciloskopu, 78 a 80 – vodiče, 82 – rastr na obrazovce osciloskopu, 84 a 86 – vodiče, 88 – zesilovač, 90 a 92 – svorky osciloskopu, 94 – prvek pro příčný pohyb vzorku, 96 – prvek pro podélný pohyb vzorku, 98 – plochá základna, 100 – prvek, 102 – hrot závěsu, 104 – stavěcí šroub, 106 – hrot stavěcího šroubu, 108 – kulička, 110 – drážka, 112 – spojovací díl, 114 – prodloužení ploché základny, 116 a 118 – otočné čepy, 120 – středová kolmá ramenní část spojovacího dílu, 122 – konec šroubu s hrotem. Převzato a upraveno z [11].

Skenovací aparát umožňuje posun skenované oblasti vzorku. Toho docílíme pohybem celého rámu 40 v různých osách, čehož lze dosáhnout libovolnými vhodnými prostředky. Na obrázku 3.2 je znázorněn prvek pro příčný 94 a podélný 96 pohyb. Oba prvky jsou namontovány na plochem základu 98. Příčný nastavovací prvek 94 má jeden konec ve tvaru hrotu závěsu 102 opírajícího se o základnu 98 a na druhém konci je stavěcí šroub 104. Šroub 104 má konec s hrotem 106, který se dotýká základny 98. Spodní konec nohy rámu 44 je přes kuličku 108 posuvně uložen v drážce 110 na horní ploše prvku 100. Otáčením šroubu 104 lze zvedat nebo snižovat rám 40, a tím posouvat vzorek ve příčném směru.

Prvek pro podélné nastavení 96 zahrnuje spoj 112, který je na svém dolním konci ukotven pomocí otočného čepu 116 k pevnému prodloužení základny 114. Horní konec spoje 112 je spojen s dolní částí nohy rámu 42 pomocí otočného čepu 118. Spoj 112 má středovou kolmou ramenní část 120, ve které je umístěn stavěcí šroub 122. Hrot šroubu 122 spočívá

na základně 98. Otočením šroubu 122 dojde k úhlovému otočení spoje 112. Tento otočný pohyb způsobuje posuv rámu 40 v podélném směru, který je umožněn valivým pohybem kuličky 108 v drážce 110.

Vynálezem se podařilo vytvořit systém mikroskopu, ve kterém mohou být použity jednoduché objektivy, a zlepšit rozlišovací schopnosti na úroveň, které při použití běžného zařízení s konvenčními mikroskopovými technikami nelze dosáhnout. Optický systém konfokálního mikroskopu je schopen potlačit veškeré rozptýlené světlo, a zachytit pouze světlo, které vychází z osvětleného bodu vzorku. Vysokou selektivitou se snižuje rozmazání obrazu, zvyšuje rozlišení [12] a zvyšuje poměr signálu k šumu získaných dat. Konfokální mikroskopie umožňuje neobvykle jasné zkoumání tlustých vzorků a vzorků rozptylujících světlo. Také umožňuje provádět optické řezy vzorku, které lze následně počítačovým zpracováním rekonstruovat do trojrozměrného modelu. Konfokální mikroskopový systém s vhodnou optikou je možné použít i pro vlnové délky záření mimo viditelné spektrum a lze jej snadno modifikovat pro fluorescenční mikroskopii, kde je velice oblíbený.

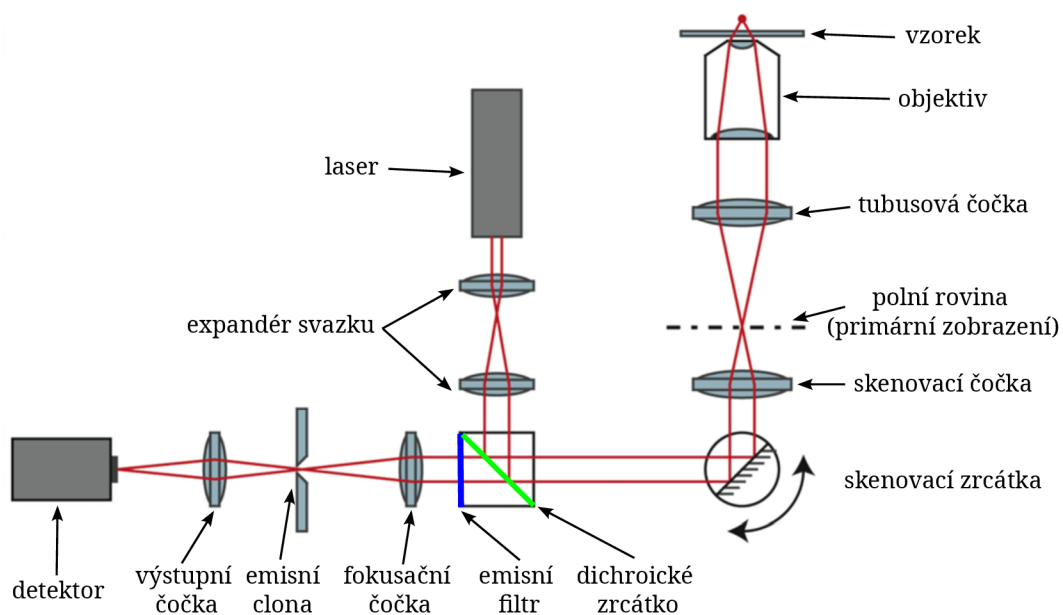
### 3.2 Laserová skenovací konfokální mikroskopie

Laserová konfokální mikroskopie využívá pro excitaci fluoroforu ve vzorku jako zdroj světla laser. Často se používá více laserů, z nichž každý je schopen excitovat jiné fluorofory. Přepínání laserových svazků je zajištěno pomocí dichroických odražečů a filtrů. Schéma laserové konfokální mikroskopie je znázorněno na obrázku 3.3. Protože laser vytváří vysoce kolimovaný svazek světla, můžeme v mikroskopu zjednodušit osvětlovací optiku. Často jsou používány expandéry svazku, které slouží ke zvětšení průřezu kolimovaného svazku jdoucího z laseru. V sestavě není nutné používat excitační clonu. Stačí použít pouze emisní clonu, která je umístěna v zobrazovací části. Odpadá tak problém se zakomponováním další mechanické součástky do systému. Dále mikroskop obsahuje skenovací část. Na rozdíl od uspořádání popsaného v části 3.1.2, kde zdroj byl ve stabilní poloze a docházelo ke skenování v podélném a příčném směru pomocí posuvu stolečku se vzorkem, se u laserové skenovací konfokální mikroskopie využívá skenování laserovým paprskem. Pro nasnímání jednoho optického řezu se nemusí se vzorkem pohybovat. Skenování probíhá obvykle pomocí dvou galvanometrických zrcátek, z nichž jedno pohybuje se stopou svazku v podélném směru a druhé v příčném směru roviny snímaného vzorku. Koordinovaným pohybem obou zrcátek lze docílit proskenování celé roviny vzorku [8].

### 3.3 Vícesvazková konfokální mikroskopie

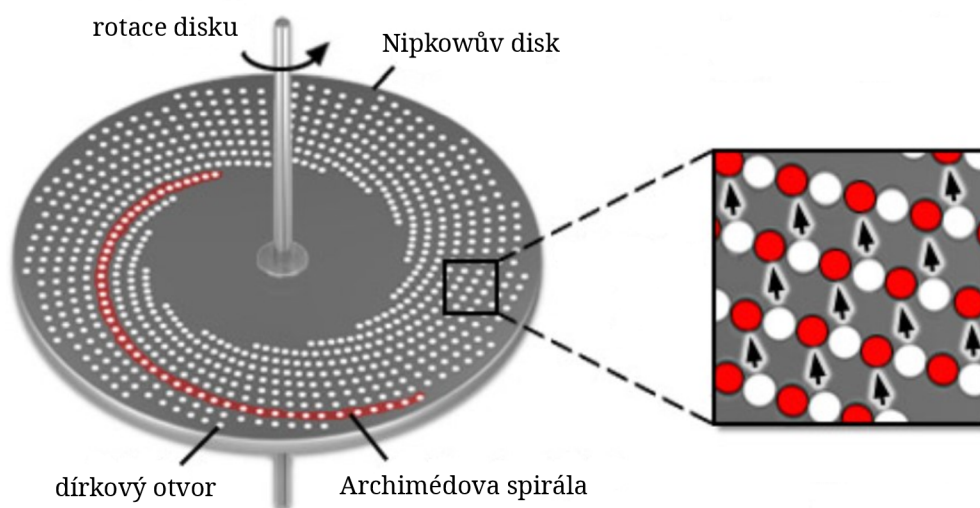
V předchozí části byl popsán princip jednosvazkové konfokální mikroskopie. Základní princip spočívá buď v použití polychromatického zdroje světla, který vyžaduje použití excitační clony v sestavě, která vytváří bodový zdroj záření, nebo v použití laseru. Zkoumaný bod vzorku je osvětlen a pozorován přímo, nebo fluorescenčně. Paprsky vycházející z rovin blízko roviny ostrosti vzorku jsou pomocí emisní clony odstíněny a intenzita z bodu na vzorku je snímána detektorem. Tím je zajištěna hloubková diskriminace a zvýšeno rozlišení. Z optických řezů je poté možno pomocí počítačové rekonstrukce vytvořit 3D model pozorovaného objektu.

Protože u jednosvazkové konfokální mikroskopie lidské oko nezachytí obraz celého zorného pole najednou, přišli pánové Mojmir Petráň a Milan Hadravský v roce 1965 s vylepšením [14]. Zmenšili a upravili již existující Nipkowův disk pro potřeby mikroskopie.



Obrázek 3.3: Schéma laserového konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Převzato a upraveno z [13].

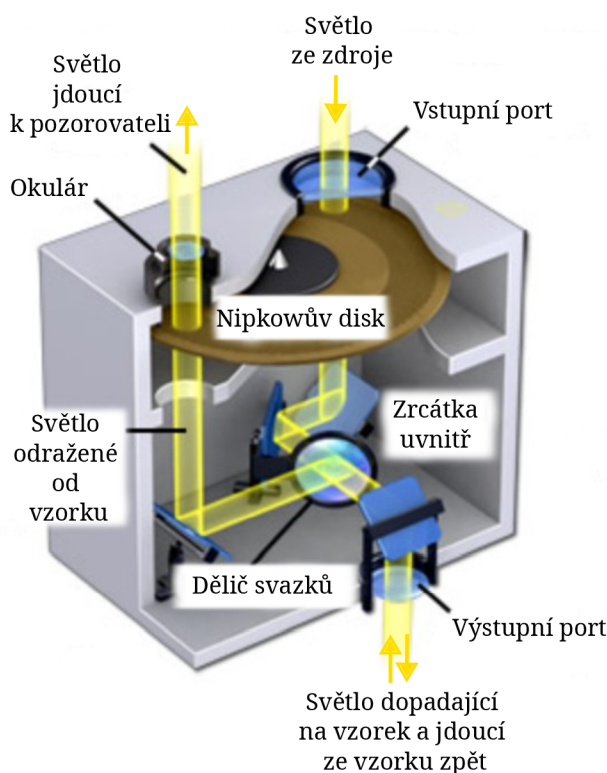
Přidáním desetitisíců až statisíců malých kruhových otvorů umožnili osvětlení preparátu v mnoha místech zároveň. To zrychlilo skenování a umožnilo pozorovat obraz skrze okuláry. Rychlost skenování a nízká fototoxicita přináší výhody při pozorování živých buněk a umožnila také sledovat procesy v buňkách, které se velmi rychle odehrávají (např. toky iontů). Nevýhodou je naopak nižší osové rozlišení v porovnání s jednosvazkovou konfokální mikroskopií. To je způsobeno nechtěným průchodem rozptýleného světla vedlejšími dírkami v Nipkowově disku.



Obrázek 3.4: Nipkowův disk. Převzato a upraveno z [15].

Na obrázku 3.4 je zobrazen Nipkowův disk. Nipkowův disk obsahuje malé dírkové otvory na křivkách – Archimédových spirálách. Archimédovy spirály jsou uspořádány ve dvojicích, které jsou souměrné podle středu otáčení Nipkowova disku. Každý z otvorů na jedné křivce je vůči otvoru ležícímu na sousední křivce na stejném poloměru posunutý o stejný úhel.

Při použití konfokálního modulu s Nipkowovým diskem jsou optické komponenty umístěny takovým způsobem, aby se Nipkowův disk nacházel v polní rovině osvětlovací části, a zároveň v polní rovině zobrazovací části mikroskopu (viz obrázek 3.5). Polní rovina osvětlovací části mikroskopu je souměrná podle středu s polní rovinou zobrazovací části. Světlo jdoucí ze zdroje vstupuje do modulu, a dírkovými otvory v rotujícím Nipkowově disku jsou vytvořeny jednotlivé dílčí světelné paprsky, které putují přes zrcátka a procházejí děličem svazků k výstupnímu portu, a dále ke vzorku. Po odrazu světla od vzorku, což na obrázku 3.5 není znázorněno, se světlo vrací skrz výstupní port, odráží se od zrcátka a putuje k děliči svazků. Od dělice svazků se dílčí světelné paprsky odráží směrem k oku pozorovatele. V polní rovině zobrazovací části opět prochází dírkovými otvory v Nipkowově disku. Zde dochází k ořezání rozptýleného světla z rovin blízkých rovině zaostření ve vzorku. Dílčí informace procházející jednotlivými dírkovými otvory se vlivem rotačního pohybu Nipkowova disku kolem středu spojí v obrazové rovině. Setrvačností oka je vytvořen dokonalý obraz, který lze pozorovat skrz okulár.

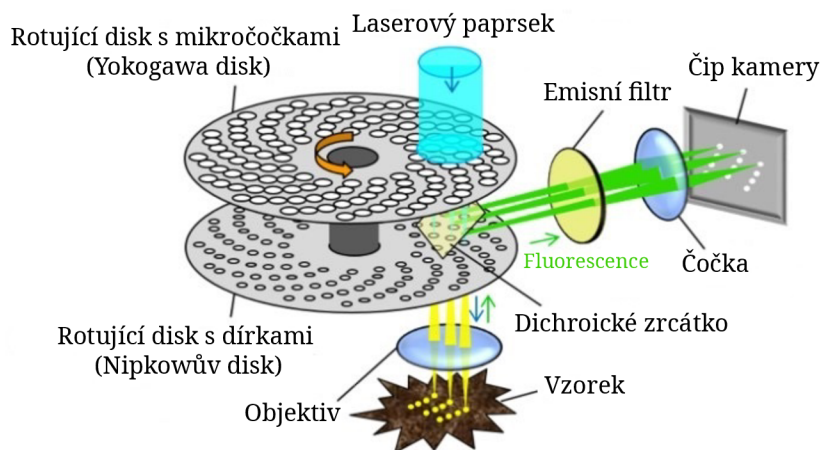


Obrázek 3.5: Konfokální modul k mikroskopu s Nipkowovým diskem. Převzato a upraveno z [15].

Dírkové otvory v Nipkowově disku umožňují odstranění rozptýleného světla, ale oproti tomu je velkou nevýhodou snížení intenzity světla dopadajícího na vzorek. Drtivá většina záření zdroje je totiž stíněna Nipkowovým diskem a jen malá část projde skrz dírky.



Tento problém řeší použití kombinace Nipkowova dírkového kotouče společně s Yokogawa diskem (obrázek 3.6). Tyto dva disky se otáčejí v tandemu. Yokogawa disk se umísťuje blíže zdroji a obsahuje pole mikročoček. Každá mikročočka sbírá a zaostřuje světlo na odpovídající díрку Nipkowova disku. Výhodou použití těchto dvou disků dohromady je to, že větší intenzita světla dopadajícího na vzorek vyvolává intenzivnější fluorescenci vzorku, která je lépe zachytitelná detektorem.



Obrázek 3.6: Schéma konfokálního fluorescenčního mikroskopu s Yokogawa diskem. Převzato a upraveno z [16].

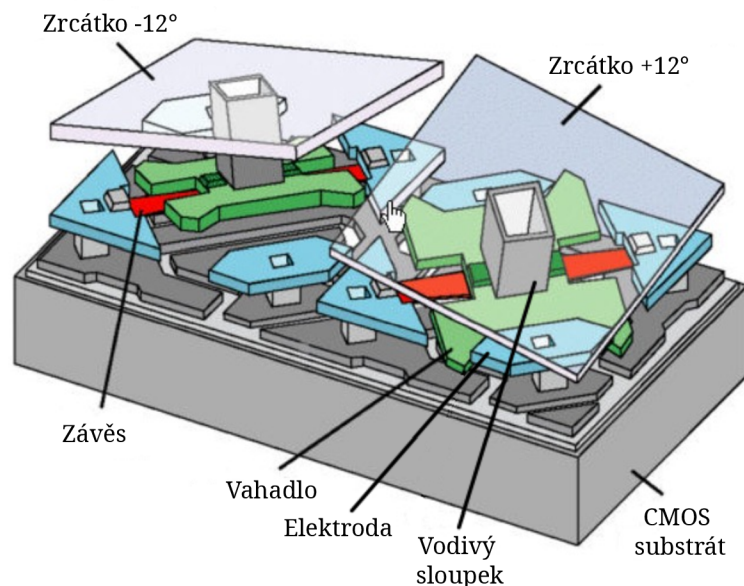
Nevýhodou použití rotujících disků je vnášení mechanických vibrací do systému mikroskopu. To může mít za následek zhoršení rozlišení pozorovaného obrazu. Proto je výhodnější použít moderní opticko-digitální prvky, jako je například digital micromirror device (DMD) čip, které navíc umožňují rychlejší skenování.

### 3.4 Vícesvazková konfokální mikroskopie s DMD čipem

DMD čip (digital micromirror device) je optické mikro-elektro-mechanické zařízení (MEMS), které je tvořeno statisíci až miliony vysoce odrazivých hliníkových mikrozrcátek [17]. Každé zrcátko je zespodu pomocí vodivého sloupku připojeno k torznímu závěsu a vahadlům. Naklápění zrcátka je zajištěno přiváděním napětí na elektrody a pohyb je limitován mechanickými zarážkami. Základem DMD čipu je CMOS substrát, který obsahuje CMOS SRAM paměťové buňky, které řídí naklápění zrcátka. Každé zrcátko, případně malá skupina zrcátek, představuje dírkový otvor Nipkowova disku a tedy jeden pixel ve výsledném obraze. Každé zrcátko je možno digitálně ovládat. Lze je naklápět o  $\pm 12^\circ$  do dvou poloh podél osy, která je dána úhlopříčkou zrcátka (obrázek 3.7). Naklopení o  $+12^\circ$  představuje pozici ON. Světlo je vychylováno požadovaným směrem. Naklopení o  $-12^\circ$  představuje pozici OFF. Světlo je odkloněno pryč. Díky schopnosti mikrozrcátek velmi rychle měnit pozice ON a OFF je možné také vytvářet obraz v úrovních odstínů šedi, a tím můžeme prostorově modulovat amplitudu a směr odraženého světla.

DMD čip lze s výhodami použít v konfokální mikroskopii. Je možné ho umístit místo Nipkowova disku. Pro sejmутí intenzit jednotlivých pixelů v jedné rovině není nutné pohybo-

vat vzorkem. Funkce skenování je nahrazena přepínáním zrcátek na DMD čipu. Pohybovat vzorkem je nutno až při přeostření do jiné roviny (pro vytvoření 3D modelu vzorku). DMD čip nahrazuje funkci excitační a emisní clony, protože oběma směry propustí jen světlo dopadající na zrcátka v pozici ON. DMD čipu pro konfokální mikroskopii bylo využito už dříve, např. v [18].



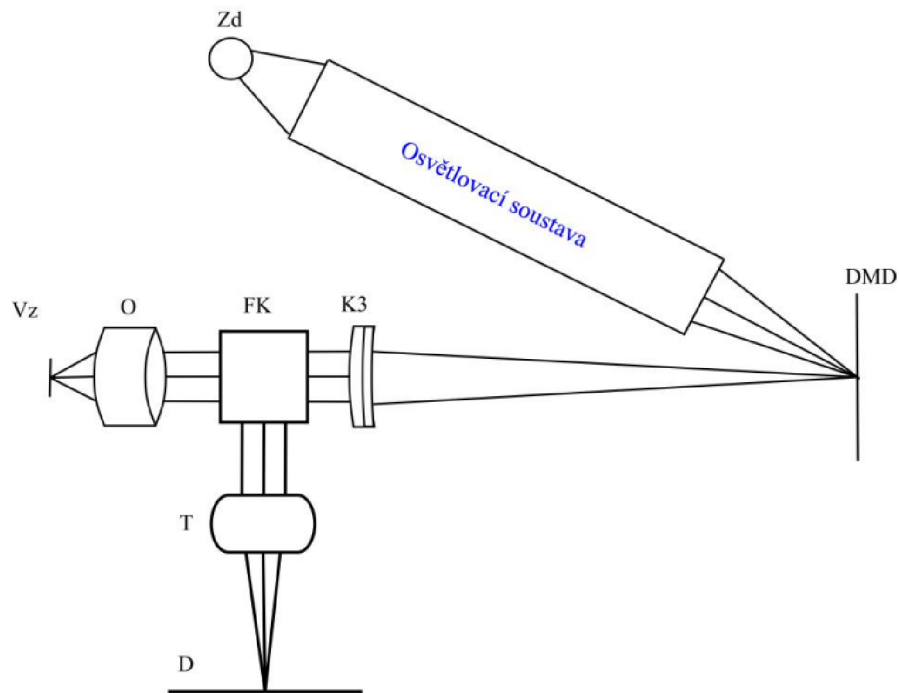
Obrázek 3.7: Struktura dvou vedlejších pixelů DMD čipu. Vlevo zrcátko naklopené do pozice OFF, vpravo do pozice ON. Převzato a upraveno z [19].

Navazuji na diplomovou práci Ing. Evy Kubátové [20]. Té se podařilo spojit dvě techniky pozorování živých buněk, a to digitální holografickou mikroskopii a konfokální fluorescenční mikroskopii. Celý optický systém konfokálního modulu pro koherenci řízený holografický mikroskop navrhla v optickém CADu. Původní návrh (obrázek 3.8) je zajímavý hlavně díky zakomponování DMD čipu. Konečná sestava byla vylepšena umístěním hranolu s úplným vnitřním odrazem (TIR hranol) před DMD čip.

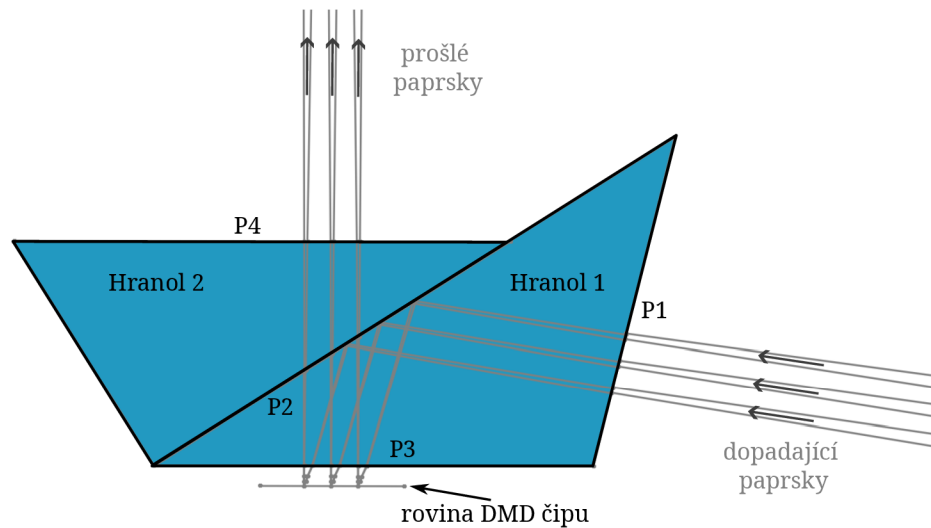
TIR (total internal reflection) hranol můžeme vidět na obrázku 3.9. Skládá se ze dvou hranolů, mezi kterými je tenká vzduchová mezera. Dopadající paprsky se lámou na ploše P1 a vcházejí do hranolu 1. Poté putují směrem k ploše P2 a díky velice tenké vzduchové vrstvě mezi hranolem 1 a hranolem 2 se od plochy P2 odrážejí. Skrz plochu P3 hranol opouštějí a dopadají na DMD čip pod úhlem  $24^\circ$ . Paprsky odražené od mikrozrcátek v pozici ON putují kolmo směrem k ploše P3 a vstupují zpět do hranolu 1. Dopadají na plochu P2, skrz kterou prochází do hranolu 2. Z hranolu 2 poté vystupují a putují směrem ke zkoumanému vzorku.

Hlavní výhodou konečného návrhu Ing. Evy Kubátové je lepší prostorové uspořádání komponent modulu. Díky přidání TIR hranolu před DMD čip je možno umístit osvětlovací část do pozice kolmé k zobrazovací části. Výhodou je jednodušší nalezení odražených paprsků, které vychází z TIR hranolu ve směru kolmém k DMD čipu.

Optická sestava Ing. Evy Kubátové měla však i své nevýhody. Světlo přicházející od vzorku již neprochází zpět přes DMD čip, ale je odkloněno dichroickým zrcátkem na detektor umístěný v ramenu zobrazovací části. DMD čip v tomto návrhu zastává funkci excitační



Obrázek 3.8: Celkový optický návrh konfokálního modulu Ing. Evy Kubátové, převzato z [20]: Zd – zdroj světla, DMD – DMD čip, K3 – kolektor, FK – fluorescenční kostka, O – objektiv, Vz – vzorek, T – tubusová čočka, D – detektor.

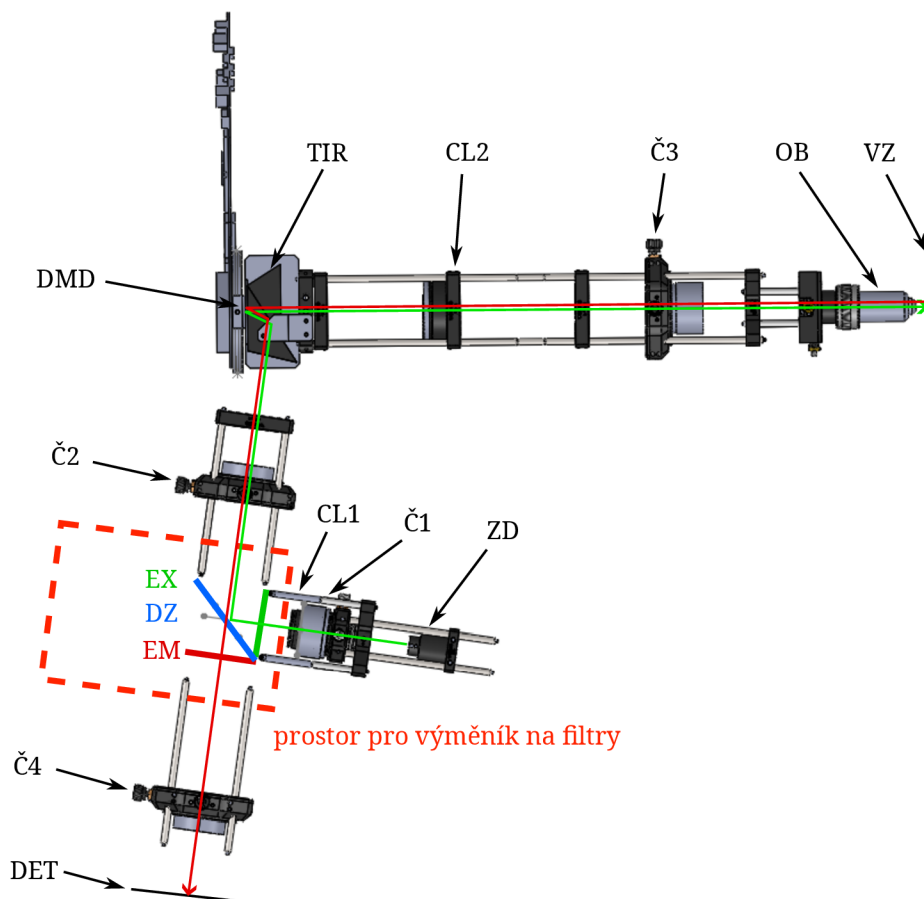


Obrázek 3.9: Průchod paprsků TIR hranolem. P1 – P4 – jednotlivé lámavé plochy hranolů.

clony, ale nikoli clony emisní. To vede k nutnosti výpočetně náročného softwarového zpracování velkého množství snímků, ze kterých je nutno vybírat správný obrazový pixel, který by odpovídal středu emisní clony.

Ing. Martin Antoš, Ph.D. pak některé z nevýhod odstranil úpravou návrhu Ing. Evy Kubátové do nynější podoby (obrázek 3.10). Z dostupných dokumentů [21] je patrné, že

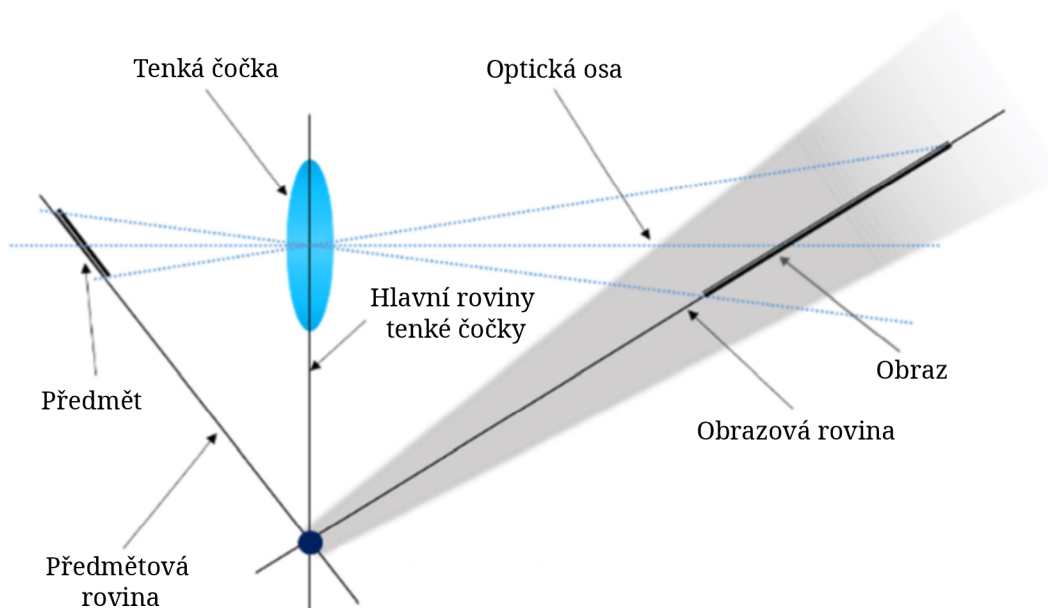
upravil umístění detektoru, výměníku pro fluorescenční kostky a zdroje světla. Detektor i výměník fluorescenčních kostek umístil do osvětlovací části mikroskopu a jako zdroje využil epifluorescenční osvětlení typické pro klasickou fluorescenční mikroskopii. Díky průchodu paprsků přes DMD čip při osvětlení vzorku i vyzáření fluorescenčního záření plní DMD čip funkci excitační i emisní clony zároveň. Podstatně se tím zjednodušuje následná softwarová analýza obrazu snímaného detektorem. Pojďme si nyní představit upravenou sestavu konfokálního modulu Ing. Martina Antoše, Ph.D.



Obrázek 3.10: Model konfokálního modulu sestaveného z dílů v programu SolidWorks dle návrhu Ing. Martina Antoše, Ph.D. ZD – zdroj světla, Č1 – čočka, CL1 – clona, EX – excitační filtr, DZ – dichroické zrcátko, Č2 – čočka, DMD – DMD čip, TIR – hranol s úplným vnitřním odrazem, CL2 – clona, Č3 – tubusová čočka, OB – objektiv, VZ – vzorek, EM – emisní filtr, Č4 – čočka, DET – detektor. Excitační záření jdoucí ze zdroje ke vzorku je znázorněno zelenou barvou, emisní záření jdoucí ze vzorku k detektoru je znázorněno červenou barvou.

Jednotlivé komponenty modulu jsou popsány na obrázku 3.10. Čočky použité v sestavě a jejich parametry jsou shrnuty v tabulce 3.1. Zdrojem záření ZD je halogenová lampa od firmy Osram navázaná do optického vlnovodu s průměrem jádra 6,5 mm. Paprsky putují z tohoto polychromatického zdroje, procházejí čočkou Č1 a dále clonou CL1. Pomocí clony CL1 můžeme redukovat intenzitu světla dopadající na DMD čip. Konfokální modul byl v rámci pilotního experimentu testován s jednoduchou kostkou pro fluorescenční mikroskopii. Jak jsem již zmiňovala výše, tuto kostku budeme pro potřeby zkoumání biologických

vzorků nahrazovat výměníkem na fluorescenční filtry. Při vložení fluorescenční kostky paprsky prochází skrz excitační filtr EX, který vyfiltruje z polychromatického zdroje jen úzké spektrum vlnových délek. Světlo se odráží od dichroického zrcátka DZ, které je umístěno v kostce pod úhlem  $45^\circ$  vzhledem k osám optické soustavy. Dále putují TIR hranolem, odrazí se směrem k DMD čipu a po odrazu od DMD čipu, znovu projdou TIR hranolem, tentokrát ve směru kolmém k rovině DMD čipu. V konfokálním modulu je používán DMD čip DLP9000 od společnosti Texas Instruments [22]. Tento DMD čip je vhodný pro vlnové délky světla  $400 - 700$  nm. Paprsky dále prochází tubusovou čočkou Č3 a objektivem OB Plan Fluor (typ MRH00201) od firmy Nikon se zvětšením 20x a numerickou aperturou 0,50 a jsou zaostřovány na zkoumaný vzorek VZ, kde dochází k excitaci molekul fluoroforu. Protože paprsky dopadají na DMD čip kolmo a jsou odraženy pod úhlem  $24^\circ$ , je nutno, aby rovina, do které bude umístěna kamera, byla skloněna pod úhlem  $13,75^\circ$  vzhledem k optické ose konfokálního modulu. Tato hodnota vychází z principu Scheimpflugova zobrazení [23]. Scheimpflugovo zobrazení se používá v případech, kdy předměťová rovina není kolmá na osu soustavy (viz obrázek 3.11). Při protažení předměťové roviny a hlavní roviny zobrazovací čočky vzniká bod. Pokud tento bod spojíme s bodem na optické ose, do kterého se má daný předmět zobrazit, vzniká rovina šikmá k optické ose, do které je zobrazena rovina předmětu, a do které umísťujeme detektor. Použitím Scheimpflugova principu zobrazení lze dosáhnout nejlepšího možného zobrazení a omezit především zkreslení obrazu. Výsledný úhel mezi rovinou DMD čipu a kamery je  $103,75^\circ$ . Světlo emitované ze vzorku putuje zpět optickou soustavou a bude procházet dichroickým zrcátkem DZ, emisním filtrem EM a čočkou Č4, kterou je zaostřeno na CMOS čip kamery C1+12000 od společnosti Moravian Instruments [24] v rovině DET. Obraz je analyzován pomocí počítače.



Obrázek 3.11: Princip Scheimpflugova zobrazení. Převzato a upraveno z [25].

Testování v rámci pilotního experimentu pro ověření správné justáže modulu provedl Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D. v lednu roku 2023 [21]. Pro potřeby testu byla do sestavy zařazena druhá clona CL2. Jako vzorek byla použita fluorescenční testovací destička od společnosti CHROMA [26]. Ta byla nasvícena obrazem pruhů nahraným do DMD čipu.



Tabulka 3.1: Použité čočky v návrhu konfokálního modulu od Ing. Martina Antoše, Ph.D.

Komponenta	Výrobce	Označení výrobce	Ohnisko (mm)	Průměr (mm)
Č1	Thorlabs	AC300-080-A	80	30
Č2	Edmund Optics	32-923	160	40
Č3	Edmund Optics	32-927	400	40
Č4	Edmund Optics	32-923	160	40

Zachycený obraz testovacích pruhů byl kontrastní, ale při zaclonění cesty k mikroskopovému objektivu pomocí clony CL2 se objevil „duch“, který byl pravděpodobně způsoben odrazem světla od TIR hranolu ve spojení s mírným překryvem spekter dichroického zrcátka, excitačního a emisního filtru.

Model konfokálního modulu jsem dle návrhu Ing. Martina Antoše, Ph.D. seskládala dohromady z jednotlivých dílů v programu SolidWorks, protože byl skládán experimentálně, a tato část dokumentace chyběla. K některým dílům byly dostupné pouze výkresy a bylo třeba podle nich vytvořit modely. Většina dílů sestavy konfokálního modulu však byla navržena a sestavena z komponent dostupných od firmy Thorlabs [27]. Tato firma umožňuje jednotlivé komponenty pospojovat pomocí čtveřice ocelových tyček o průměru 6 mm do klecového systému. Délky jednotlivých tyček jsou voleny podle rozestupů mezi jednotlivými komponentami. V sestavě je použitý klecový systém pro jednopalcovou i dvoupalcovou optiku. Mezi různými rozměry lze přecházet pomocí přechodových dílů. Optický vlnodod je umístěn ve válcovém adaptéru a zajištěn pomocí stavěcích šroubů. Válcový adaptér je s klecovým systémem spojen pomocí tubusu. Všechny čočky jsou uloženy v objímkách příslušné velikosti od firmy Edmund Optics [28], ve kterých jsou zajištěny pomocí aretačních kroužků. Objímky jsou našroubovány do translačních křížových posuvů, které umožňují přesné nastavení optického středu čočky do optické osy mikroskopu pomocí dvou šroubů. Objektiv je také z důvodu centrace upevněn na jemném křížovém posuvu. Clona CL1 je přichycena k objímce s čočkou Č1. Tím je zajišťována správná centrace této clony. TIR hranol je umístěn na hliníkovém podstavci, který vymezuje jeho přesnou polohu, a je zajištěn plastovou úchytkou shora. DMD čip je umístěn v hliníkových držácích, které navrhl a nechal zhotovit Ing. Martin Antoš, Ph.D. Vzorek je umístěn na stolečku. Jednotlivé komponenty konfokálního modulu jsou umístěny na výškově nastavitelných sloupcích, které jsou pomocí držáků ve tvaru vidlice přichyceny k optickému stolu.

## 4 Motivace a cíle práce

Do právě vyvíjeného konfokálního modulu pro holografický Q-Phase mikroskop, který je založený na DMD čipu, je nutno doplnit robotizovaný výměník pro fluorescenční filtry. Tento výměník musí dovolovat výměnu filtrů alespoň pro čtyři fluorescenční kanály. Musí být také ovládán z počítače z důvodu automatizovaného pozorování buněk při dlouhodobých experimentech. Přepínání jednotlivých kanálů mezi sebou musí být dostatečně rychlé z důvodu pozorování živých buněk. Výměník musí být snadno integrovatelný do klecového systému firmy Thorlabs. Provedení výměníku je také omezeno prostorovým uspořádáním modulu, které je patrné z obrázku 3.10.

Na základě provedení optické simulace v programu Zemax musí být výměník navržen na vhodnou velikost apertury optiky. Dichroické zrcátko musí být uloženo v kostce pod úhlem  $45^\circ$  vzhledem k optické ose konfokálního modulu. Pro pohodlné nastavení osvitů DMD čipu musí mít uživatel možnost každé dichroické zrcátko v každé fluorescenční kostce úhlově najustovat.

Výměník fluorescenčních kostek zahrnula jako ideu ve své diplomové práci již Ing. Eva Kubátová, reálně však vyroben nebyl. Při testování použila pouze jedinou fluorescenční kostku. Otočný výměník byl v jejím modelu umístěn na jiném místě a umožňoval použití pouze tří fluorescenčních kostek, což je pro potřeby pozorování skrz více fluorescenčních kanálů nedostačující. Stávající konfokální modul navrhnul, napočítal a zkonstruoval Ing. Martin Antoš, Ph.D., avšak výměník na fluorescenční kostky navržen nebyl.

Pro sestavení robotizovaného výměníku fluorescenčních filtrů pro konfokální modul je zapotřebí:

- provést optickou simulaci konfokálního modulu a stanovit optické požadavky na filtry,
- provést rešerši komerčně dostupných výměníků fluorescenčních filtrů pro mikroskopii,
- sestavit návrh řešení nejvhodnějšího typu robotizovaného výměníku,
- vytvořit výkresovou dokumentaci,
- případně výměník sestavit a otestovat.





# 5 Optická simulace v programu Zemax a stanovení optických požadavků na filtry

Pro návrh optické sestavy konfokálního modulu bylo využito programu Zemax. Ing. Martin Antoš Ph.D. navrhl mnoho variant optických simulací zobrazovací části sestavy konfokálního modulu. Nejdříve bylo nutno zkontrolovat, zda jeho poslední varianta (viz obrázek 5.1) zobrazovací části odpovídá reálné konstrukci modulu. Tato varianta byla zvolena, protože má dle dostupné dokumentace nejmenší velikost Airyho stopy a nejmenší RMS radius spot diagramu. Jednotlivé komponenty, jejich parametry a umístění v modulu shrnuje tabulka 5.1.

Po ověření a kontrole jednotlivých optických komponent jsem v programu Zemax vytvořila osvětlovací část (viz obrázek 5.2) konfokálního modulu, jejíž optický návrh chyběl. Vzdálenosti mezi jednotlivými prvky byly získány z modelu navrženého Ing. Martinem Antošem, Ph.D., a jsou shrnuty v tabulce 5.2. Ze zobrazovací části jsem převzala velikost nasvíceného pole na DMD čipu, ta činí 10,80 mm v průměru. DMD čip DLP9000 [22] má vzdálenost mezi středy zrcátek 7,56  $\mu\text{m}$  a rozlišení 2560 x 1600 mikrozrcátek (necelých 4 100 000 mikrozrcátek). Velikost aktivní plochy je 19,3536 x 12,096 mm. Osvětlená plocha zahrnuje přibližně 1 600 000 mikrozrcátek, což odpovídá necelým 40 % plochy DMD čipu. Pro osvětlení vzorku používáme plošný zdroj – žárovku navedenou do optického vlnovodu o průměru 6,5 mm. Tyto parametry jsem použila pro simulaci osového a mimoosového svazku.

Ze simulace osvětlovací části je patrné, že na DMD čip nedopadají rovnoběžné paprsky a před dopadnutím paprsků na DMD čip nevzniká primární obraz zdroje. Pro osvětlení DMD čipu tedy nebylo použito Köhlerova osvětlení, ale kritického osvětlení s defokusací.

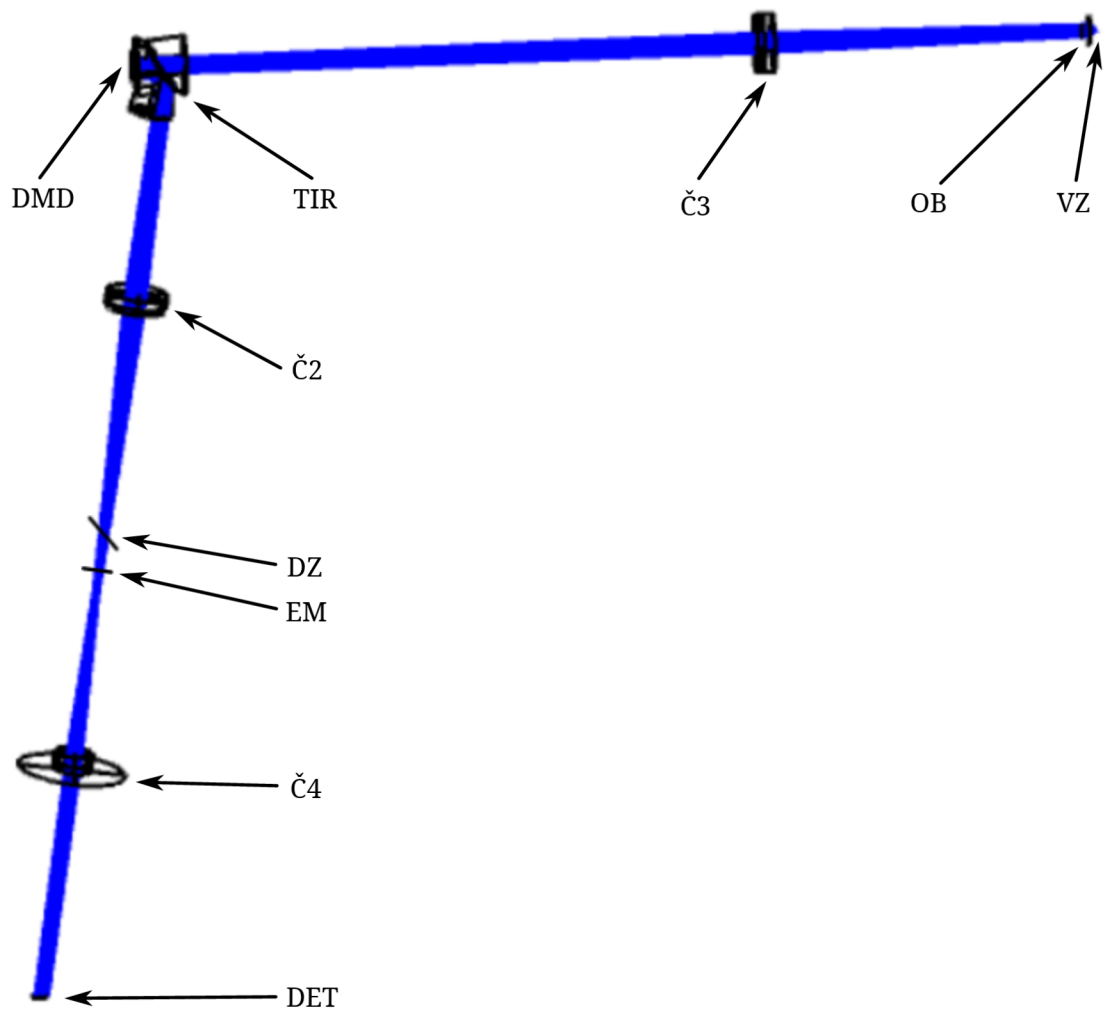
Z provedené simulace jsem zjistila, že by bylo nejvhodnější zvolit excitační filtr o průměru 26,1 mm. Proto jsem se rozhodla zvolit filtry o průměru 25 mm uložené v objímkách o tloušťce 3,5 mm. Tyto filtry mají aperturu o průměru 22 mm. Tento parametr jsem doplnila do simulace. K excitačnímu filtru je třeba zvolit vhodnou velikost dichroického zrcátka. Dle apertury použitých čoček a emisního filtru bylo ze simulace zjištěno, že svazek dopadající na rovinu dichroického zrcátka vytváří eliptickou stopu s velikostí hlavní osy 58,19 mm. Bylo by tedy vhodné zvolit kruhové, případně eliptické zrcátko odpovídající velikosti. Kdybychom však zvolili takto velké zrcátko, bylo by nutné toto zrcátko umístit i do příslušně velké mechaniky. Výsledný výměník by tak byl mohutný a těžký, s čímž jsou spojeny i problémy s ovládáním. Proto jsem nakonec zvolila a do simulace doplnila rozměry dichroického zrcátka standardního rozměru 26 x 38 mm a tloušťky 1 mm, které jsou pro požadované vlnové délky běžně dostupné v katalogích výrobců (např. dodavatel Chroma [26]). Po optické stránce dochází k částečnému ořezávání svazku. Přesto je celá aktivní plocha DMD čipu plně nasvícena. Ze simulace Ing. Martina Antoše, Ph.D. je patrné, že minimální potřebná apertura dichroického zrcátka je 16,54 mm a emisního filtru je 7,72 mm. Vybrané optické komponenty tak umožní na DMD čipu osvětlit plochu o průměru 10,8 mm.

Tabulka 5.1: Použité komponenty a jejich parametry v zobrazovací části optické simulace konfokálního modulu navržené Ing. Martinem Antošem, Ph.D. [21].

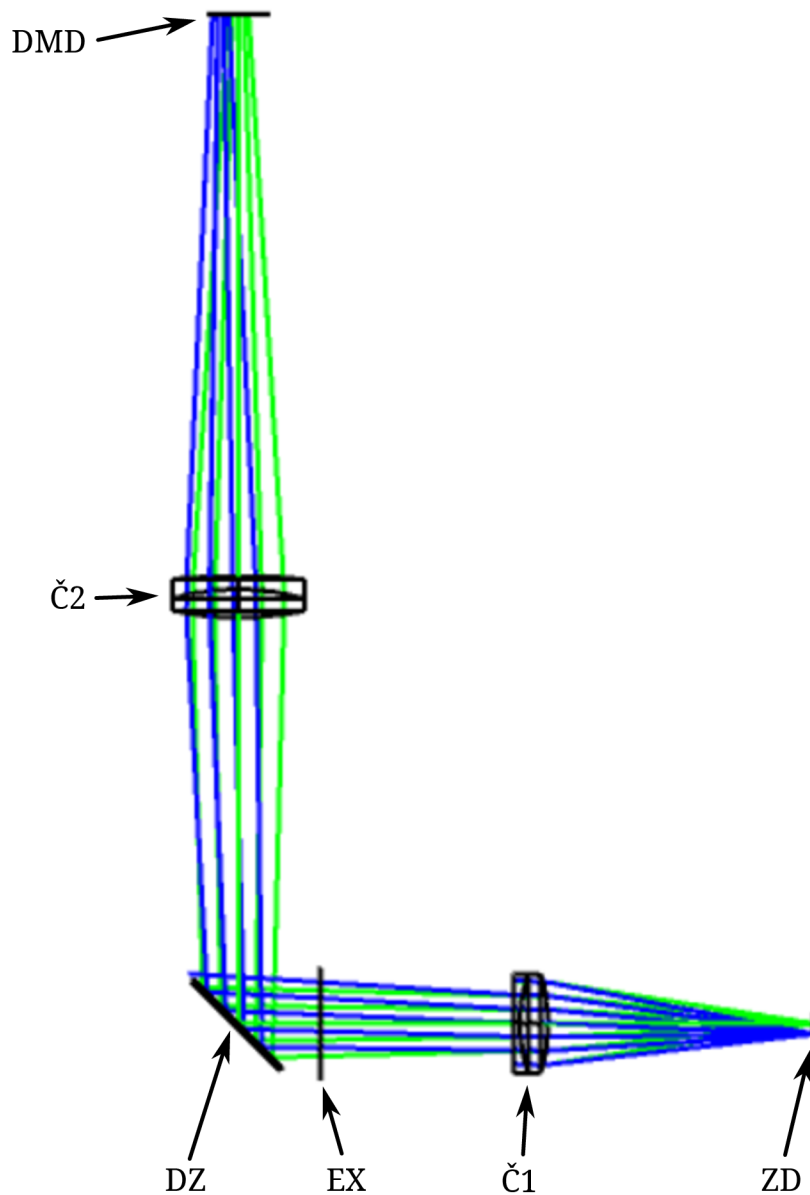
Komponenta	Vzdálenost k následující komponentě (mm)	Apertura (mm)
VZOREK	5,00	0,13
OBJEKTIV Nikon Plan Fluor 20x, NA 0,5 (MRH00201)	205,00	20,00
TUBUSOVÁ ČOČKA Č3 32-927, Edmund Optics	383,65	39,00
TIR HRANOL	32,60	40,00
KRYCÍ SKLO DMD ČIPU	1,30	20,00
ROVINA DMD ČIPU DLP9000, Texas Instruments	170,75	<b>10,80</b>
ČOČKA Č2 32-923, Edmund Optics	136,00	40,00
DICHROICKÉ ZRCÁTKO	176,50	40,00
ČOČKA Č4 32-923, Edmund Optics	166,70	25,00
KAMERA CMOS C1+12000, Moravian Instruments	-	5,77

Tabulka 5.2: Použité komponenty a jejich parametry v osvětlovací části optické simulace konfokálního modulu. Převzato z [21].

Komponenta	Vzdálenost k následující komponentě (mm)	Apertura (mm)
ZDROJ SVĚTLA	80,79	<b>6,50</b>
ČOČKA Č1 AC300-080-A, Thorlabs	69,14	30,00
EXCITAČNÍ FILTR	25,09	22,00
DICHROICKÉ ZRCÁTKO	123,50	38,00 x 26,00
ČOČKA Č2 32-923, Edmund Optics	183,25	39,00
ROVINA DMD ČIPU DLP9000, Texas Instruments	-	19,37



Obrázek 5.1: Optická simulace zobrazovací části konfokálního modulu navržená Ing. Martinem Antošem, Ph.D. v programu Zemax: VZ – bod vzorku, OB – objektiv, Č3 – tubusová čočka, TIR – hranol s úplným vnitřním odrazem, DMD – rovina DMD čipu, Č2 – čočka, DZ – rovina dichroického zrcátka, EM – rovina emisního filtru, Č4 – čočka, DET – rovina detektoru. Převzato a upraveno z [21].



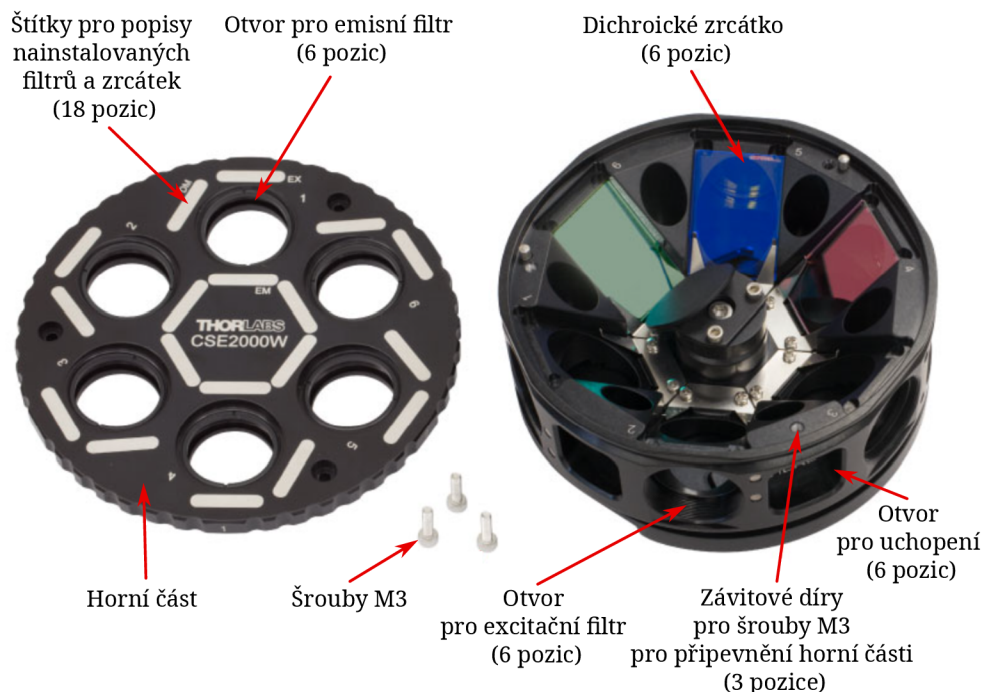
Obrázek 5.2: Optická simulace osvětlovací části konfokálního modulu vytvořená v programu Zemax: ZD – rovina zdroje, Č1 – čočka, EX – excitační filtr, DZ – dichroické zrcátko, Č2 – čočka, DMD – rovina DMD čipu. Zeleně jsou znázorněny paprsky jdoucí z osového bodu, modře paprsky jdoucí z mimoosového bodu zdroje.

## 6 Rešerše dostupných výměníků fluorescenčních filtrů

Při rozhodování, zda bude třeba navrhnout vlastní design výměníku od začátku, nebo zda lze použít či adaptovat některý z dostupných konvenčně vyráběných výměníků, bylo nutné nejprve provést rešerši dostupných výměníků na trhu.

### 6.1 Dodavatelé a jejich nabídky

Firma Thorlabs [27] nabízí hotový **otočný výměník kostek** CSE2000W (obrázek 6.1) pro automatickou výměnu filtrů a dichroických zrcátek. Otočný výměník kostek je určen pro použití s osvětlovacími moduly CSE2000, CSE2100, CSE2200. Cena sestavy osvětlovacího modulu s otočným výměníkem kostek se v závislosti na použité optice pohybuje mezi 3230 až 5750 €. Jedná se o hotové řešení, které umožňuje automatické ovládání. Nahrazovalo by celou osvětlovací část stávající sestavy. Lze zakoupit i otočný výměník kostek jako samostatnou komponentu ze cenu 2168 €. V cenách nejsou zahrnuta dichroická zrcátka a filtry. K samostatnému otočnému výměníku kostek by bylo nutné navrhnout uložení a automatický pohon. Otočný výměník kostek však neumožňuje justáž dichroických zrcátek.



Obrázek 6.1: Otočný výměník kostek CSE2000W od firmy Thorlabs. Převzato a upraveno z [27].

Dále je možno z jednotlivých komponent od firmy Thorlabs výměník sestavit. Thorlabs nabízí několik variant fluorescenčních kostek. Jsou určeny pro dichroické zrcátko o rozměrech až 25,2 mm x 36,0 mm x 1,0 mm. Slouží pro uchycení excitačního filtru o průměru 25 mm a tloušťce do 5 mm, a emisního filtru o průměru 25 mm a tloušťce do 3,5 mm. Filtry jsou uchyceny pomocí aretačních kroužků, které dostaneme společně s fluorescenční kostkou.

Thorlabs nabízí **originální fluorescenční kostky vyráběné firmami Olympus a Nikon** pro vybrané modely jejich mikroskopů. Fluorescenční kostky v sobě nemají namontovaná dichroická zrcátka ani filtry. Ty je třeba dokoupit zvlášť a namontovat do kostek. Instalace je však jednoduchá, Thorlabs má na stránkách dostupné i videonávody. Dichroické zrcátko uvnitř je uchyceno pomocí plíšku. Tyto kostky mají plastovou konstrukci. Cena se pohybuje kolem 520 € v závislosti na typu kostky. Cena nezahrnuje dichroické zrcátko ani filtry. Tyto kostky jsou zaměnitelné s alternativou vyráběnou firmou Thorlabs.

Thorlabs také vyrábí **vlastní náhrady fluorescenčních kostek pro mikroskopy Olympus a Nikon** z hliníku. Uvnitř kostek je pružinový mechanismus pro snížení mechanického napětí dichroického zrcátka. Lze tak dosáhnout lepší kvality zobrazení. Mají jednoduchou montáž a dobrou schopnost držet filtry na místě. Thorlabs nabízí možnost si zakoupit kostku prázdnou, nebo s již předinstalovanou sadou filtrů (např. fluorescenční kostka TLV-U-MF2-TRITC na obrázku 6.2). Na boku jsou tři štítky, na které si uživatel může umístit popisy instalovaných filtrů a dichroického zrcátka. Cena se pohybuje v rozmezí 439 - 486 € za kostku bez filtrů opět v závislosti na typu kostky. Cena za kostku s předinstalovanými filtry se pohybuje v rozmezí 1000 - 1300 € dle použité sady filtrů.



Obrázek 6.2: Fluorescenční kostka TLV-U-MF2-TRITC s předinstalovanými filtry a dichroickým zrcátkem pro fluorofor TRITC od firmy Thorlabs. Převzato a upraveno z [27].

Originální plastové kostky od firem Olympus a Nikon jsou lehčí, avšak jsou dražší. Vzhledem k rozdílné hmotnosti různých provedení kostky je v případě osazení různých provedení do otočného výměníku nezbytné otočný výměník vyvážit. Dichroická zrcátka jsou uchycena ve fluorescenčních kostkách napevno. Žádná z nabízených variant tak nesplňuje požadavek na justáž dichroického zrcátka.

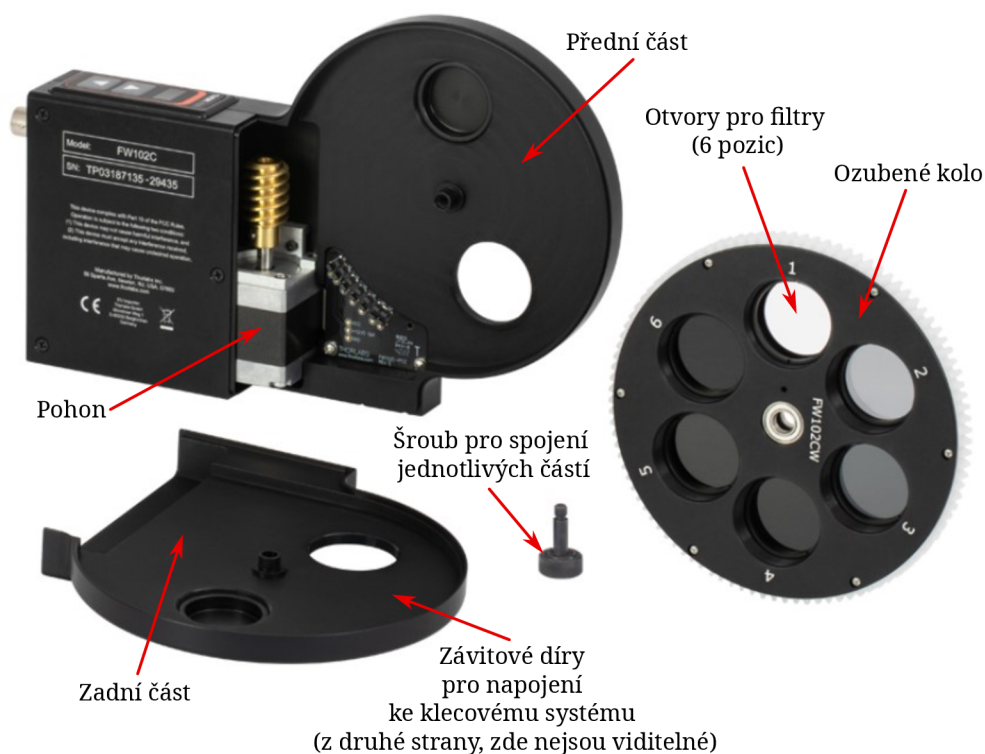
Firma Thorlabs nabízí také **více provedení výměníků pro samostatné filtry a dichroická zrcátka**. Lze zakoupit **lineární piezo výměník ELL9** na čtyři jednopalcové filtry. Pro montáž filtrů je nutné vložit filtr do tubusu s vnějším závitem a uchytit ho



pomocí aretačního kroužku. Celý tubus je pak možno namontovat do lineárního posuvníku. Udávaný čas výměny mezi dvěma filtry se pohybuje do 500 ms. Záleží na množství osazených filtrů. Cena lineárního piezo výměníku je 365 € bez tubusů a aretačních kroužků pro montáž filtrů. Hlavní nevýhoda je v prostorových nárocích, protože potřebujeme měnit dva filtry umístěné kolmo k sobě. Komponenta není připravena na montáž do klecového systému.

**Otočný výměník filtrů** je nabízený ve dvou provedeních. Standardní provedení otočného výměníku FW102C (obrázek 6.3) nabízí výměnu šesti jednopalcových filtrů. Umožňuje přímou montáž filtrů do tloušťky 6,35 mm. Filtry jsou v otvorech přichyceny pomocí aretačních kroužků, které dostaneme společně s výměníkem. Součástí výměníku jsou i dvě závitové záslepky, pro případné uzavření otvoru výměníku. Cena je 1210 € bez filtrů. Druhé provedení FW103H umožňuje rychlejší výměnu filtrů (kolem 55 ms). Cena je 1944 €. Obě varianty jsou vhodné pro montáž do klecového systému.

V sestavě by musely být tyto výměníky filtrů dva – jeden pro ovládání výměny excitačních filtrů, a druhý pro ovládání výměny emisních filtrů.



Obrázek 6.3: Otočný výměník filtrů FW102C od firmy Thorlabs. Převzato a upraveno z [27].

Potřebujeme také **výměník pro dichroická zrcátka**. Firma Thorlabs nabízí manuální výměník CDFW5 na čtyři zrcátka za cenu 661 € vhodný pro montáž do klecové konstrukce. Motorizovaný výměník bohužel není dostupný.

Z komponent by šlo sestavit výměník pro emisní a excitační filtry. K výměníku pro zrcátka by bylo nutné navrhnout motorizovaný pohon. Výsledné řešení by ale bylo velmi náročné na prostor, ovládání a také velmi drahé. Navíc je toto řešení velmi nepraktické a uživatelsky nepřívětivé.

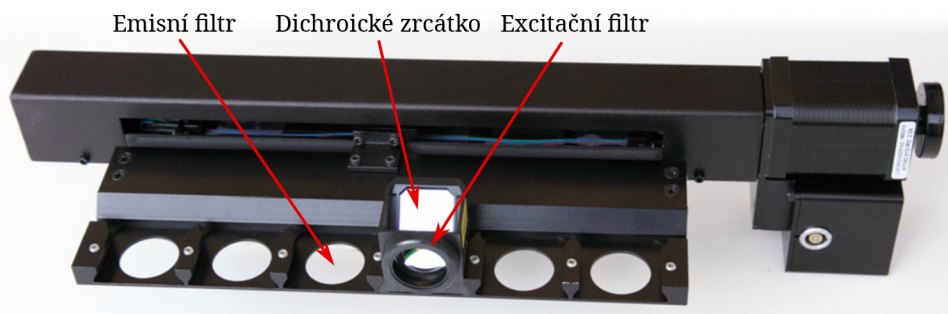
Dodavatel **Edmund Optics** [28] nabízí mnoho variant fluorescenčních kostek, podobně jako firma Thorlabs. Kostky již obsahují dichroická zrcátka a fluorescenční filtry. Tento

dodavatel má větší možnost výběru kombinací filtrů pro různé fluorofory. Cena kostek je \$1160, různé sety filtrů ani typy kostek cenu neovlivňují. Ke kostkám by bylo nutné, stejně jako v případě kostek od firmy Thorlabs, zkonstruovat výměník s pohonem, protože ho Edmund Optics nenabízí. Z motorizovaných výměníků je v nabídce pouze výměník filtrů. Je to kompletní jednotka s motorem a enkodérem. Cena je \$2834. Umožňuje použití až 10 filtrů, což je pro naše potřeby už zbytečně mnoho. Výměník není připraven pro zabudování do klecového systému Thorlabs. Opět by byla potřeba dva výměníky na excitační a emisní filtry.

**Applied Scientific Instrumentation (ASI)** [29] nabízí kostky s vyfrézovanou rybinovou drážkou. Tyto kostky je možno připevnit ke stolečku pomocí rybinového posuvu. Stolečky by se tedy musely seskládat na otočný mechanismus, nebo využít pouze kostky, ke kterým by bylo nutné navrhnout otočný mechanismus s rybinovými drážkami, podobně jako u firem Thorlabs, nebo Edmund Optics.

Dodavatel ASI nabízí také automatizovaný lineární výměník kostek C60-CUBE-SLDR pro 4 pozice fluorescenčních kostek. Čas mezi výměnou dvou sousedních fluorescenčních kanálů je do 250 ms. Další informace o tomto produktu bohužel nejsou veřejně dostupné. Cenu dodavatel neuvádí.

Dodavatel **Tofra Inc.** [30] nabízí lineární posuvný výměník s označením 108-01 (obrázek 6.4) pro výměnu 6 fluorescenčních kostek. Kostky lze vkládat a vyjímat ručně. Výměník je motorizovaný, je obsluhován krokovým motorem s krokem  $1,8^\circ$ . Je možno nastavit mikrokrokování. Čas přepnutí mezi dvěma sousedními fluorescenčními kanály je do 200 ms (190 ms s napájením 12 V, 160 ms s napájením 24 V, 130 ms s napájením 36 V). Tento výměník je primárně určen pro mikroskop Nikon TE2000. Posuvný mechanismus se montuje do stávajících montážních otvorů v tomto mikroskopu. Cena je \$1900. Dodání je 6 týdnů po obdržení objednávky a zaplacení.



Obrázek 6.4: Lineární výměník kostek 108-1 od dodavatele Tofra Inc. Převzato a upraveno z [30].

Jiný lineární výměník (obrázek 6.5) pro 5 pozic filtrů a dichroických zrcátek zkonstruoval i **Jozef Sofka** [31]. Jeho výměník neobsahuje sadu excitačních filtrů a je určen pro aplikace s použitím laseru jako zdroje záření. Pro naše účely by tedy bylo nutno do výměníku integrovat lištu se sadou excitačních filtrů. Na lineárním výměníku Jozefa Sofky je zajímavé, že dichroická zrcátka jsou ovládána nezávisle na sadě emisních filtrů. Do výměníku lze umístit dichroická zrcátka o velikosti 25 x 36 mm, nebo 25 x 38 mm tlusté 1, nebo 2 mm a filtry o průměru 25 mm tloušťky 3,5 nebo 5 mm. Dle dostupných informací má nízké vibrace. Posuv dosahuje rychlejšího přepínání mezi sousedními kostkami, a to 30 ms. Tento výměník však není na prodej.





Obrázek 6.5: Lineární výměník od Jozefa Sofky. Převzato a upraveno z [31].

Vysokorychlostní lineární výměník na fluorescenční kostky od firmy **Finger Lakes Instrumentation** [32] není veřejně nabízen k prodeji, dokument je z roku 2018. Výrobce však uvádí kontaktní adresu. Slouží k výměně 3 nebo 5 fluorescenčních kostek. K ovládní je používán vysoce výkonný servomotor s enkodérem. Čas přepínání mezi jednotlivými kostkami je pod 30 ms. Obsahuje regulátor, který dokáže přizpůsobit rychlost pohybu změně zatížení a snížit nežádoucí vibrace. Cílem je dosažení špičkového výkonu. Dle dostupné dokumentace mohou být do kostek vkládána dichroická zrcátka o rozměrech  $25,6 \pm 0,6$  mm x  $37,5 \pm 1,5$  mm a tloušťce 1,2 nebo 3 mm. Je možno vložit filtry o průměru  $25 \pm 0,4$  mm a tloušťce 3,5 nebo 5 mm. Uložení zrcátka je pevné, justáž není možná.

Dodavatel **Nikon Instruments** [33] nabízí více typů motorizovaných výměníků fluorescenčních kostek určených pro epifluorescenční mikroskopii. Z dostupné výkresové dokumentace jsou patrné pouze celkové rozměry zařízení. Bohužel bližší informace nejsou veřejně dostupné.

Dodavatel **Prior** [34] nabízí pouze kontroler ProScan III Controller k výměníku od Nikon Instruments. S tímto kontrolerem lze dosáhnout času přepnutí mezi dvěma vedlejšími pozicemi do 300 ms. Otočné výměníky kostek v nabídce nemají.

Dodavatel **AccuScope** [35] nabízí výměník s označením 600-3232 pro 6 fluorescenčních kostek. Cena je na vyžádání. Součástí nejsou kostky. Pohyb je prováděn pomocí ozubeného kola a řemene, nikoli pomocí hřídele. Více informací, například zda-li je součástí dodávky i pohon, bohužel dodavatel neuvádí.

Dodavatel použitých dílů z mikroskopů **SpachOptics** [36] nabízí použité díly z mikroskopů značek Olympus, Nikon, Leica a Zeiss. Nabízí otočný výměník Olympus U-URBC pro 4 fluorescenční kostky. Cena je nízká \$695, kvalita a požadované parametry nemusí být zaručeny. Více informací bohužel dodavatel neuvádí.

## 6.2 Zhodnocení výměníků dostupných na trhu

Často dodavatelé nabízejí pouze fluorescenční kostky s rybinovým uchycením. Tyto kostky mají vhodné velikosti dichroických zrcátek i filtrů, avšak pro použití těchto kostek by bylo nutné navrhnout výměník na tyto kostky a jeho motorizaci. Někteří dodavatelé nabízejí otočné mechanismy, nebo lineární výměníky. Obecně problém s lineárními výměníky je ten, že jsou v jednom směru rozměrnější, než v ostatních směrech. Je tedy těžší je zakompono-

vat do stávajícího systému mikroskopu. Otočné mechanismy mají často možnost používat jen 4 fluorescenční kanály, což je pro naše potřeby málo. Když už jsem našla otočný mechanismus, který umožňoval výměnu pro 6 fluorescenčních kanálů, často chybí potřebná dokumentace, rozměry, či informace o pohonu. U dodavatelů nabízejících výměnné mechanismy by bylo třeba také navrhnout nezbytné úpravy pro připojení výměníku ke klecovému systému firmy Thorlabs, na který nejsou připravené.

Žádný z dodavatelů však nenabízí fluorescenční kostky, či výměníky, u kterých by bylo možno provádět justáž zrcátka. To byl hlavní důvod vedoucí k tomu, že jsem nakonec usoudila, že nejlepším řešením bude vytvořit vlastní návrh výměníku pro filtry a dichroická zrcátka.

# 7 Koncepce výměníku filtrů

V rámci návrhu výměníku filtrů jsem vytvořila několik koncepcí, jak by výměník mohl být realizován. Jedná se o tyto čtyři varianty:

- kazetový výměnný mechanismus,
- otočný výměník excitačních filtrů a lineární posuvný výměník emisních filtrů,
- dva otočné výměníky filtrů,
- otočný výměník kostek.

První tři varianty počítají s tím, že bude použito jedno vícepásmové dichroické zrcátko, které je vhodné pro použití s více fluorofory. Zrcátko by se nemuselo v kostce složitě měnit a pokaždé znovu justovat. Pro snímání jednoho fluorescenčního obrazu jednoho barviva je nutno použít odpovídající excitační a emisní filtr. Fluorescenční kostka bude upevňována do již existujícího hliníkového držáku, který navrhl Ing. Martin Antoš, Ph.D.

Čtvrtá varianta počítá s tím, že bude použito více jednopásmových dichroických zrcátek. Ke každému zrcátku je přiřazen odpovídající excitační a emisní filtr. Tato sada bude umístěna ve fluorescenční kostce. Otočením výměníku je možno zvolit jinou fluorescenční kostku, což umožňuje snímat různé fluorofory. Výhodou je provedení justáže všech kostek jednou po prvním sestavení. Další justování už pak není nutné.

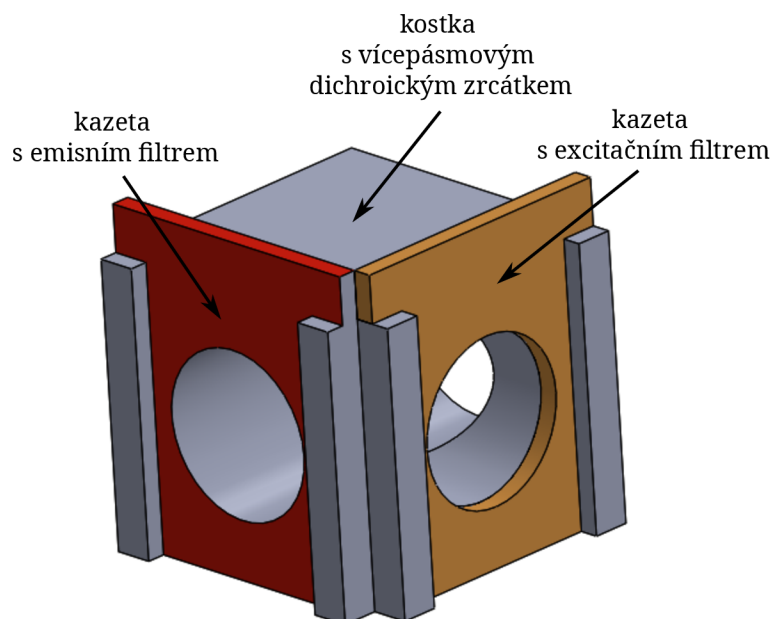
## 7.1 Koncepty výměníků filtrů

První koncept umožňuje výměnu pomocí **kazet s filtry** (obrázek 7.1). V každé kazetě je umístěn jeden filtr. Jednotlivé kazety jsou zasunovány do drážek vyfrézovaných v kostce a drží v ní pomocí mechanické zarážky. Tato metoda je velmi jednoduchá a byla by vhodná pro manuální obsluhování. Není však vhodná pro automatizované ovládání. Výsledné řešení by obsahovalo více jednotlivých kazet, které se mohou na pracovišti lehce ztratit. Z těchto důvodů jsem v dalších návrzích umístila více filtrů do jednoho mechanismu.

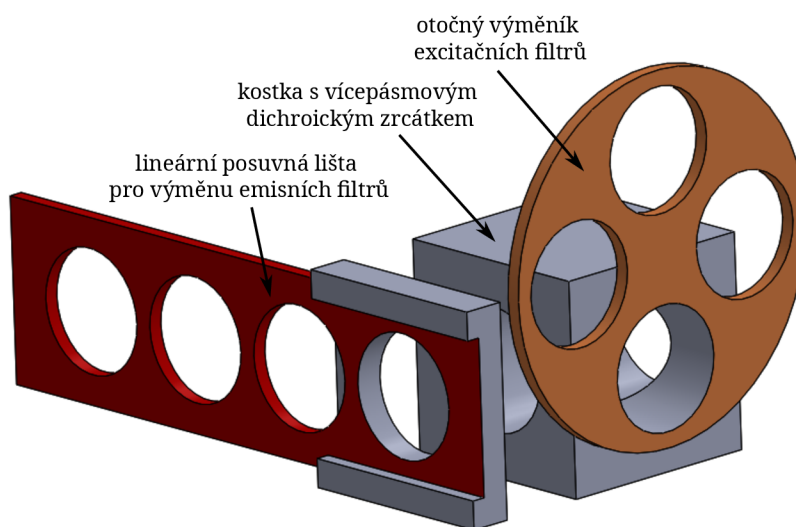
Druhá varianta zahrnuje dva výměnné systémy (obrázek 7.2). Prvním je **otočný výměník excitačních filtrů** a druhým je **lineární posuvný výměník emisních filtrů**. Výhodou je možnost vsazení více emisních filtrů do posuvné lišty. Nevýhodou je výroba více různých dílů. Automatizace ovládání by opět byla složitější kvůli nutnosti použít dva pohony.

Třetí varianta využívá **dvou otočných výměníků filtrů** (obrázek 7.3). První slouží k výměně excitačních filtrů a druhý k výměně emisních filtrů. Tato varianta má výhodu v tom, že díly jsou stejné, což je snazší pro výrobu. Při použití dvou otočných výměníků filtrů umístěných kolmo k sobě je z prostorových důvodů omezen počet filtrů na jednom disku. Při automatizovaném ovládání otočných výměníků filtrů počítačem je nutno brát v úvahu umístění pohonu a napojení výměníků k pohonu. Pohony by opět musely být dva a tím se řízení zbytečně komplikuje.

Čtvrtý koncept **otočného výměníku kostek** (obrázek 7.4) umožňuje výměnu čtyř fluorescenčních kostek. Tyto čtyři kostky jsou spojeny s otočným mechanismem pomocí rybinových drážek. Otočný mechanismus je spojený pomocí šroubů s ozubeným kolem,

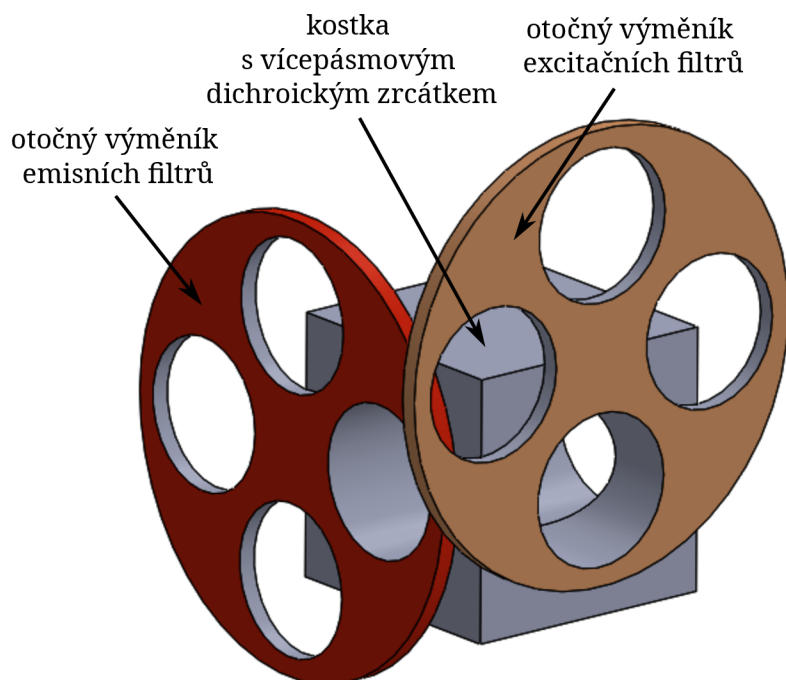


Obrázek 7.1: Model kazetového výměnného mechanismu pro výměnu excitačních a emisních filtrů vytvořený v programu SolidWorks.



Obrázek 7.2: Model otočného výměníku excitačních filtrů a lineárního posuvného výměníku emisních filtrů vytvořený v programu SolidWorks.

které je poháněno ozubeným řemenem pomocí hřídele napojené na krokový motor. Velkou výhodou je možnost automatického ovládní pomocí jediné pohonné jednotky.

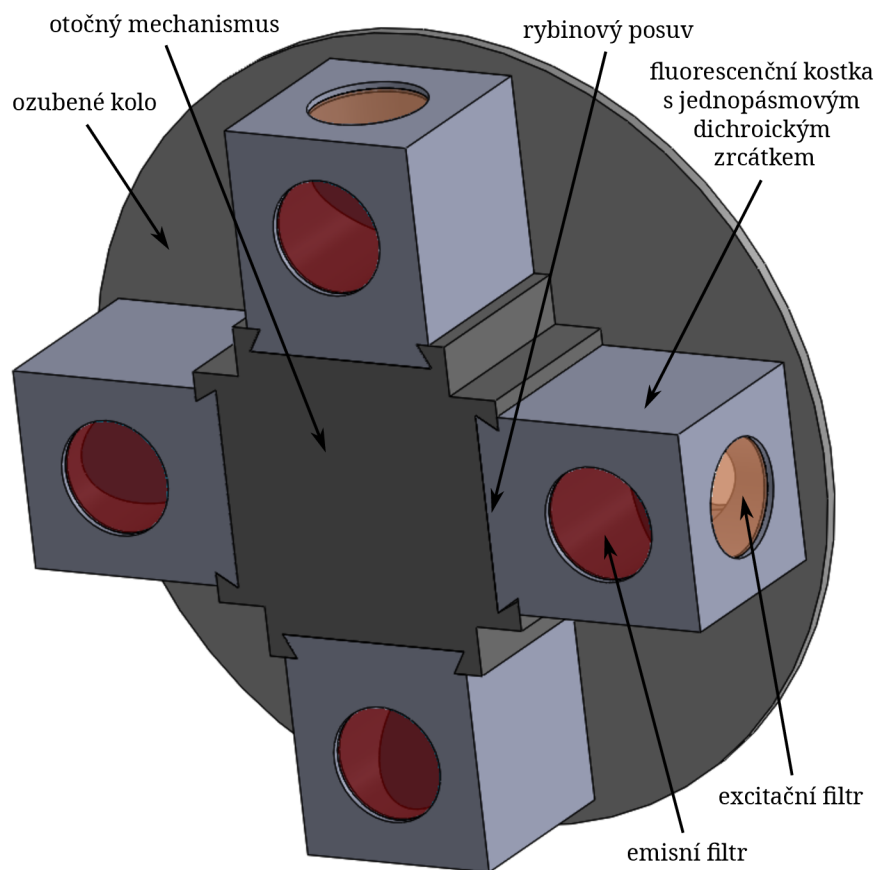


Obrázek 7.3: Model dvou otočných výměníků pro výměnu excitačních a emisních filtrů vytvořený v programu SolidWorks.

## 7.2 Hodnocení konceptů

Všechny čtyři koncepty by umožňovaly justáž dichroického zrcátka. Protože použitím vícepásmových dichroických zrcátek v prvních třech konceptech je snížena variabilita použití fluoroforů, upustila jsem nakonec od těchto variant a vytvořila jsem čtvrtý koncept výměníku, který zahrnuje výměnu celých kostek obsahujících jednopásmová dichroická zrcátka a kompatibilní excitační a emisní filtry. Cílem je také co nejvíce zjednodušit ovládání pro uživatele. Z toho důvodu, že by byly kladeny vysoké nároky na přesnost vyrobení ozubeného kola, rozhodla jsem se ozubené kolo ze sestavy úplně vypustit. Pohyb otočného výměníku kostek bude zajištěn pomocí hřídele přímo napojené na krokový motor. Hřídel bude spojena s otočným mechanismem, na kterém budou upevněny fluorescenční kostky. Možnou nevýhodou bude velká hmota, se kterou bude motor pohybovat. Bude třeba vhodně vybrat pohon a jeho silové charakteristiky.

Protože je nalezení vzorku skrze filtry obtížné z důvodu velmi slabé intenzity emitovaného fluorescenčního záření, rozhodla jsem se rozšířit původní otočný výměník se čtyřmi fluorescenčními kostkami o další dvě kostky. Jedna kostka bude obsahovat pouze polopropustné zrcátko a bude bez filtrů. Bude sloužit k nastavení vzorku do pozorovatelné oblasti. V dalších pěti kostkách, které již budou určeny pro samotné pozorování, budou umístěna dichroická zrcátka s kompatibilními excitačními a emisními filtry.



Obrázek 7.4: Model otočného výměníku fluorescenčních kostek vytvořený v programu SolidWorks.



# 8 Konstrukční řešení výměníku filtrů

## 8.1 Vlastní konstrukce

Konstrukční řešení jsem vytvořila v programu SolidWorks. Konstrukce výměníku filtrů pro konfokální modul je řešena pomocí otočného výměníku kostek (viz obrázky 8.1, 8.2). Pro připojení otočného výměníku kostek ke stávajícímu konfokálnímu modulu je použito tří hliníkových desek (U1, U2, U3) o tloušťce 9 mm, které jsou sešroubované k sobě pomocí čtyř šroubů M4 do tvaru písmene U. Tyto desky v sobě mají vyvrtané díry, díky kterým mohou být spojeny s tyčkami klecového systému od firmy Thorlabs. Otočný výměník kostek OV je umístěn do prostoru mezi těmito sešroubovanými deskami. Z otočného výměníku OV bylo pro odlehčení odebráno maximum materiálu. Tím jsem docílila snížení momentu setrvačnosti. Lehčí výměník tak lze snáze ovládat motorem. Po obvodu otočného výměníku OV je vyfrézováno šest rybinových drážek. Do rybinových drážek se nasouvají jednotlivé kostky. Kostky jsou v rybinové drážce zafixovány proti nechtěnému pohybu pomocí plunžrů PŽ1 o průměru 8 mm (dodavatel HALDER [37], typ 22080.0208) zapadajících do drážek ve spodu kostek. Každá z kostek je složena ze dvou částí K1 a K2. Obě části kostky jsou k sobě spojeny pomocí čtyř šroubů M3. Do obou částí kostek je vyfrézovaná kapsa, ve které je uložen držák dichroického zrcátka DRZ i s dichroickým zrcátkem DZ, které je přichyceno tenkým plíškem PL pomocí šroubů M2,5 s kuželovou hlavou. Tvar plíšku je navržen tak, aby nebylo bráněno v cestě procházejícímu paprsku světla. Kapsa umožňuje pohyb držáku se zrcátkem při justáži. Držák dichroického zrcátka se z jedné strany opírá o tři plunžry PŽ2 o průměru 5 mm (dodavatel HALDER [37], typ 22080.2005). Proti plunžrům působí z druhé strany tři justážní šrouby JŠ (Thorlabs, F3ES15) zašroubované v závitových vložkách VL (Thorlabs, F3ESN1P), které tvoří tříbodový kinematický mechanismus odebírající všech šest stupňů volnosti. Pomocí justážních šroubů je možno zvláště dojustovat naklopení každého z dichroických zrcátek v každé kostce.

Kostka byla navržena na velikost dichroického zrcátka 26 x 38 mm a tloušťku 1 mm, a na filtry o průměru 25 mm. Filtry jsou dodávány v objímkách o tloušťce 3,5 mm a jsou vsazeny do vyhloubených děr v kostce. Excitační filtr EX se nachází v části kostky K2. Emisní filtr EM se nachází v části kostky K1. Filtry jsou uchyceny pomocí víček V dvěma šrouby M4.

Na obrázku 8.3 je zobrazen pohled ze strany pohonu otočného výměníku kostek. Otočný výměník s kostkami OV je pevně napojen na hřídel H. Hřídel H je uložena v přírubě PŘ. Příruba PŘ vymezuje polohu výměníku a umožňuje plynulé otáčení hřídele. Příruba PŘ je pevně spojena s hliníkovou deskou U2 pomocí šroubů M4. Proti nechtěnému vypadení výměníku z příruby je na hřídeli umístěn pojistný kroužek PK. Otočný výměník je poháněn krokovým motorem M řízeným počítačem. Hřídel H je spojena s osou krokového motoru M pomocí stavěcího šroubu M4. Pro přesné snímání polohy krokového motoru M je na ose motoru umístěn enkodér E. Pro uchycení enkodéru byla navržena deska D vyrobená z plastu, která je umístěna u motoru. Deska D je přichycena k motoru M pomocí šroubů



M4 a matek s podložkami. Celý motor M je připevněn k desce U2 pomocí dlouhých šroubů M4 a sloupků S, které zvětšují styčné plochy. Délka sloupků S byla navržena tak, aby mezi enkodérem E a hřídelí H byla ponechána mezera o velikosti 1 mm. Tato mezera zajišťuje volný pohyb otočného výměníku kostek.

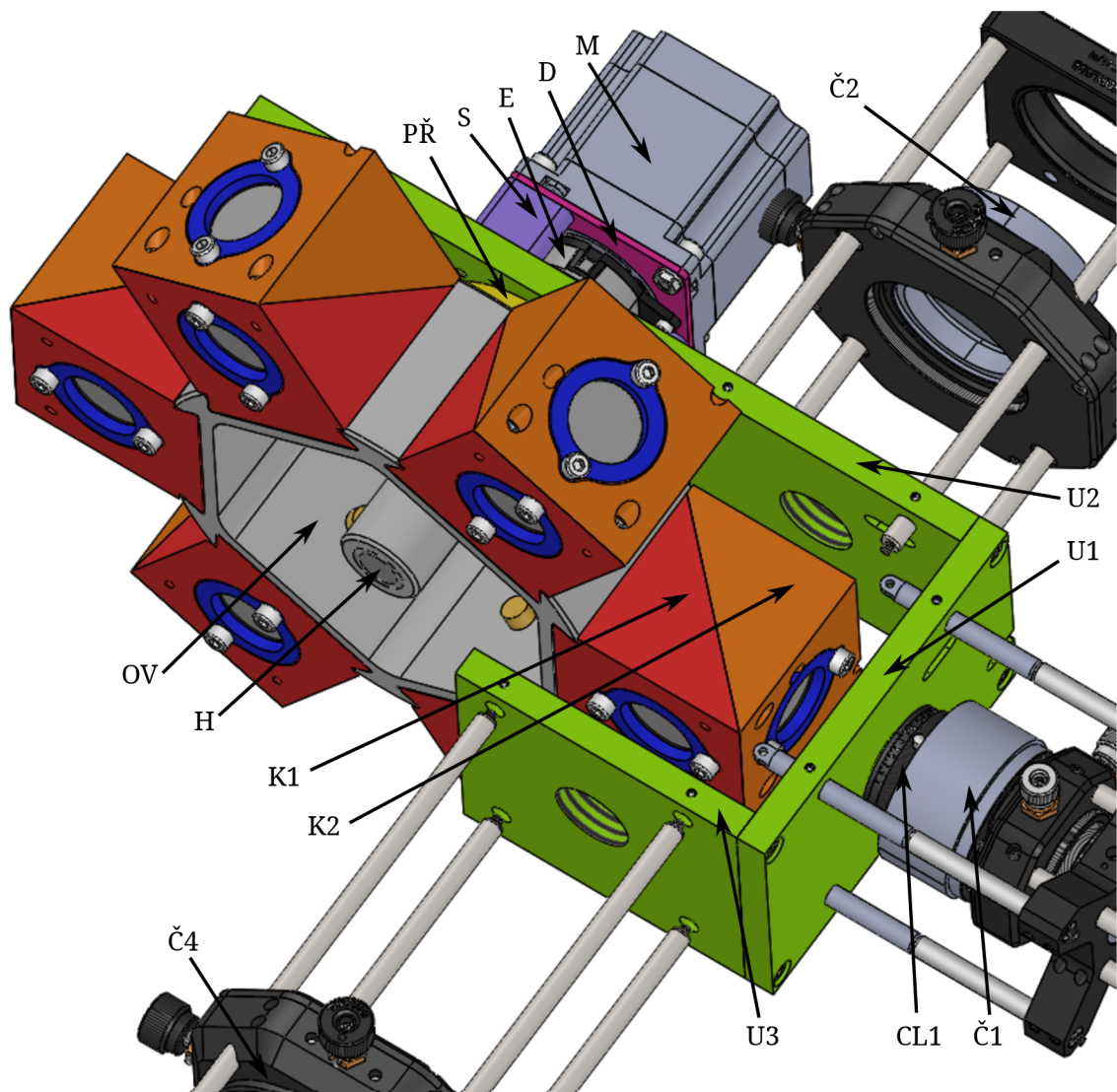
Pro výrobu jednotlivých dílů sestavy bylo použito několik materiálů. Pro výrobu otočného výměníku OV, obou dílů kostky K1 a K2, držáků zrcátka DRZ a plíšků PL je použit materiál EN AW 6060, nebo podobný. Tento materiál jsem zvolila z důvodu vysoké pevnosti, je tedy vhodný pro použití v namáhaných aplikacích. Dalšími výhodami tohoto materiálu jsou korozivzdornost, nízká hmotnost a dostačující obrobiteľnost. Jako povrchová úprava bylo zvoleno eloxování, pro které se tento materiál hodí. Černá povrchová úprava omezuje nežádoucí vnitřní odlesky v kostkách. Díly byly vyrobeny firmou PJ Kovo [38] (Petr Janovský) z Jihlavy. Tato firma se specializuje na obrábění přesných strojních dílů.

Výrobně jednodušší součásti, jako desky U1, U2, U3, hřídel H a příruba PŘ, byly zhotoveny v dílnách FSI VUT v Brně. Většina dílů je zhotovena ze slitiny hliníku EN AW 6060 (příp. EN AW 6082). Pro výrobu hřídele byla zvolena konstrukční ocel S355N. Tyto díly byly zatím ponechány bez povrchové úpravy.

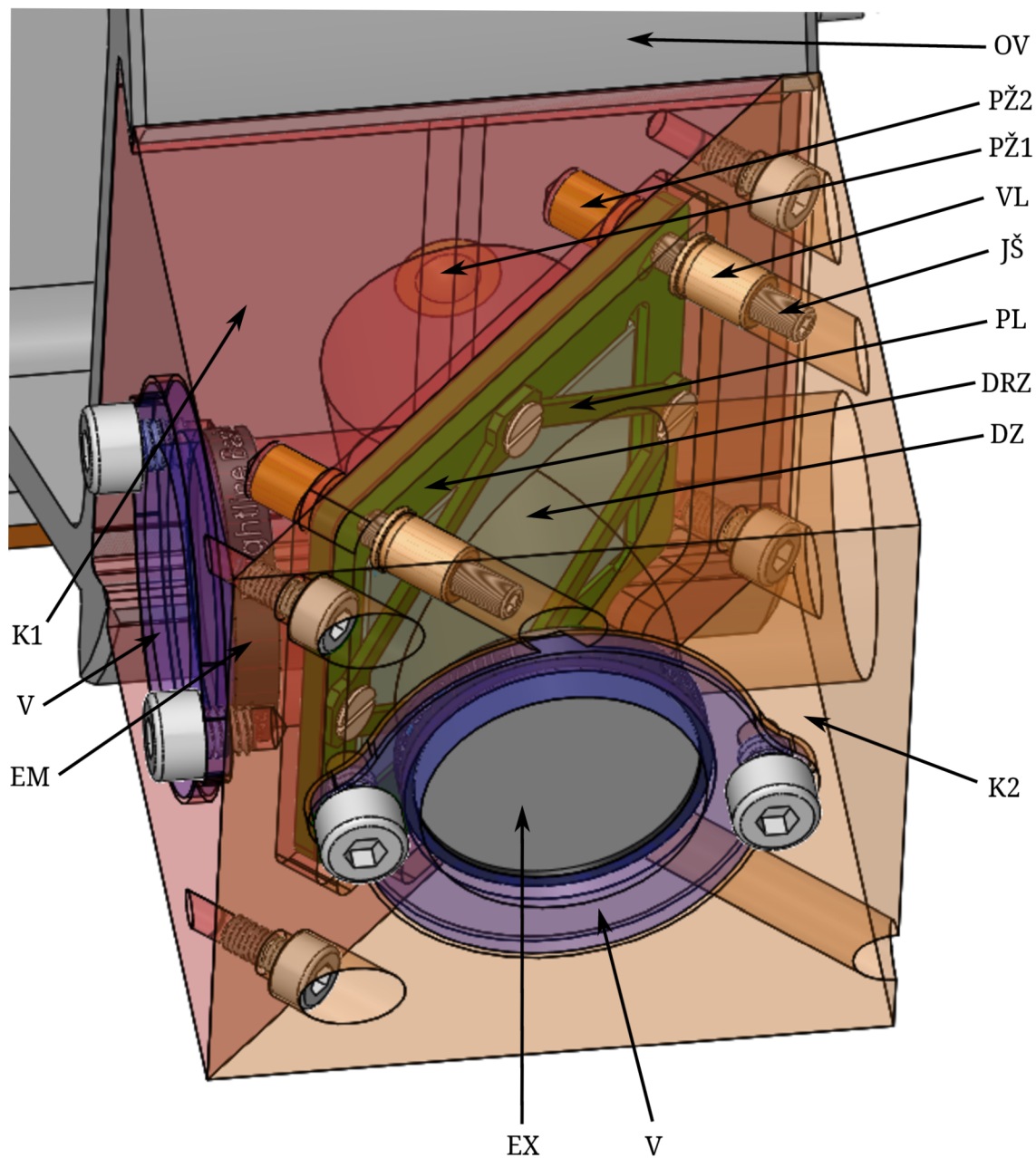
Deska D, sloupky S a víčka V byly z důvodu jednoduchosti a rychlosti výroby, nízké hmotnosti a nízké ceny zhotoveny z plastu na 3D tiskárně v laboratoři na VUT. Deska D a sloupky S byly zhotoveny z polyethylen glykolu od společnosti Devil Design [39]. Víčka V byla zhotovena z resinu Pro476 HDT60 od společnosti Loctite [40]. Pro vylepšení vzhledu byl povrch víček lehce zabroušen a byl proveden nástřik černým lakem ve spreji.

Pro zhotovení jednotlivých dílů jsem vytvořila výkresovou dokumentaci, která je součástí této diplomové práce. Výkresy byly následně předány do výroby ke zhotovení. Pro vytištění dílů na 3D tiskárně výkresy nebyly potřeba, postačily pouze modely dílů, které jsou také součástí přílohy této diplomové práce. Z důvodu lepší přehlednosti jsem do výkresu sestavy zakomponovala podsestavu fluorescenční kostky.

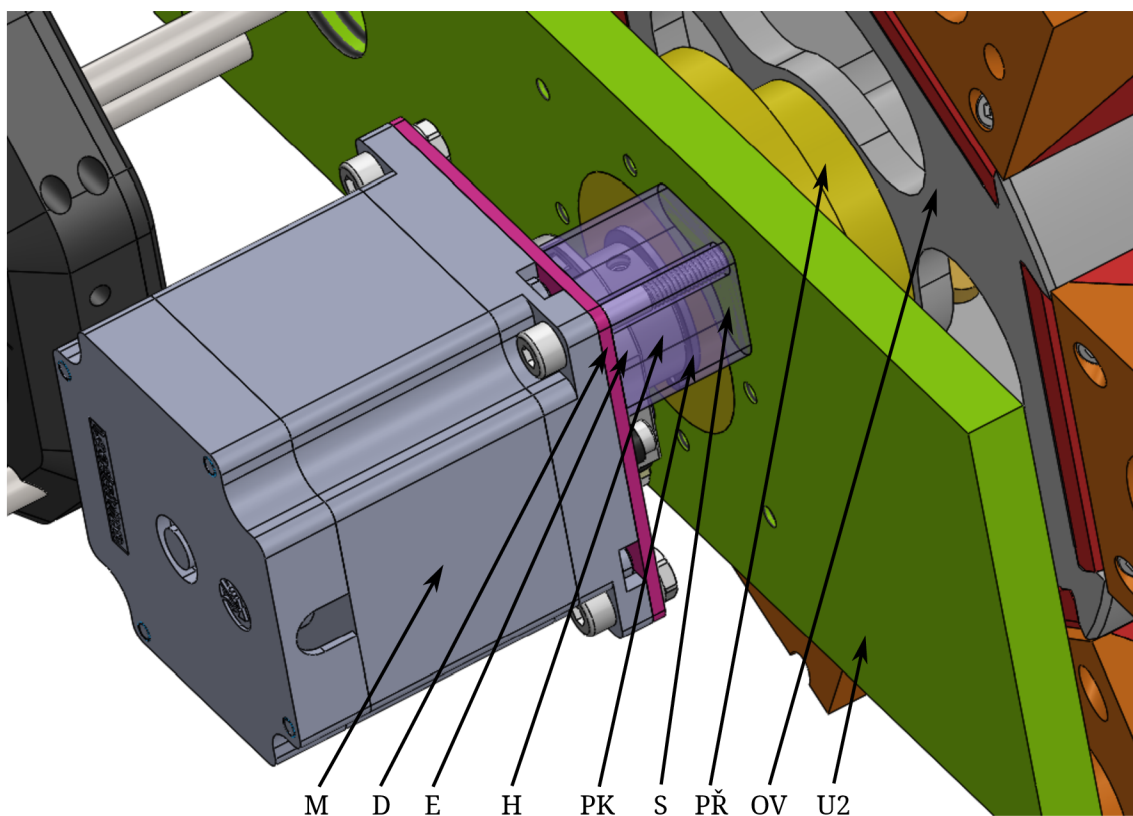
Po cenové kalkulaci jednotlivých výrobních položek jsem zjistila, že jedna kostka bez vsazené optiky vyšla přibližně na 357 €. Při srovnání částky za zhotovený výměník například s otočným výměníkem kostek CSE2000W of firmy Thorlabs, který umožňuje také výměnu šesti fluorescenčních kostek, dojdeme k závěru, že výměníky jsou cenově obdobné. Výhodou výměníku vytvořeného na míru je však umožnění justáže dichroických zrcátek, a v sumě je navíc zahrnuta i cena za pohonnou jednotku.



Obrázek 8.1: Model otočného výměníku kostek vytvořený v programu SolidWorks: Č1, Č2 a Č4 – čočky, CL1 – clona, U1, U2 a U3 – hliníkové desky, K1 a K2 – části fluorescenční kostky, OV – otočný výměník, H – hřídel, PŘ – příruba, S – sloupek, E – enkodér, D – deska, M – motor.



Obrázek 8.2: Model fluorescenční kostky v detailu vytvořený v programu SolidWorks: K1 a K2 – části fluorescenční kostky, OV – otočný výměník, PŽ1 a PŽ2 – plunžry, VL – závitová vložka, JŠ – justážní šroub, DZ – dichroické zrcátko, DRZ – držák dichroického zrcátka, PL – plíšek, EX – excitační filtr, EM – emisní filtr, V – víčko k uchycení filtrů.



Obrázek 8.3: Detail pohonu otočného výměníku kostek vytvořený v programu SolidWorks: M – motor, D – deska k uchycení enkodéru, E – enkodér, H – hřídel, PK – pojistný kroužek, S – sloupek, PŘ – příruba, OV – otočný výměník, U2 – hliníková deska.



## 8.2 Ovládání výměníku

Otočný výměník kostek je ovládán pomocí dvoufázového krokového motoru. Byl vybrán typ 57CM13 od výrobce Leadshine Technology Co., Ltd. [41]. Tento motor má rozměry 57 x 57 x 55 mm, hmotnost 0,7 kg, přírubu NEMA23 a osu o průměru 6,35 mm a délce 20 mm. Úhel otočení jednoho kroku je 1,8°, zádržný moment je 1,3 Nm. Jde o relativně silný motor.

Pro ověření, zda motor bude schopen výslednou sestavu ovládat, bylo v březnu 2024 provedeno testování motoru. Pro toto testování bylo nutné stanovit hodnotu momentu setrvačnosti otočného výměníku s kostkami. Moment setrvačnosti byl určen v analýze programu SolidWorks. V modelu bylo nejprve nutné navolit odpovídající materiály jednotlivým dílům sestavy. Z analýzy vyšel moment setrvačnosti výměníku kostek o velikosti 0,019 kg.m<sup>2</sup>. Pro testování byl výměník s kostkami simulován válcovým hliníkovým dílem o odpovídajícím momentu setrvačnosti. Moment setrvačnosti homogenního válcového tělesa se stanoví dle vztahu:

$$J = \frac{1}{2}mr^2, \quad (8.1)$$

kde  $J$  je moment setrvačnosti,  $m$  je hmotnost válcového tělesa a  $r$  je jeho poloměr. Pro simulaci byl použit materiál hliník o hustotě  $\rho = 2700 \text{ kg/m}^3$  a poloměru  $r = 60 \text{ mm}$ . Výpočtem bylo zjištěno, že válec musí mít hmotnost  $m = 10,56 \text{ kg}$ . Známe-li hmotnost válce  $m$ , je možné snadno stanovit jeho délku  $v$  dle vztahu:

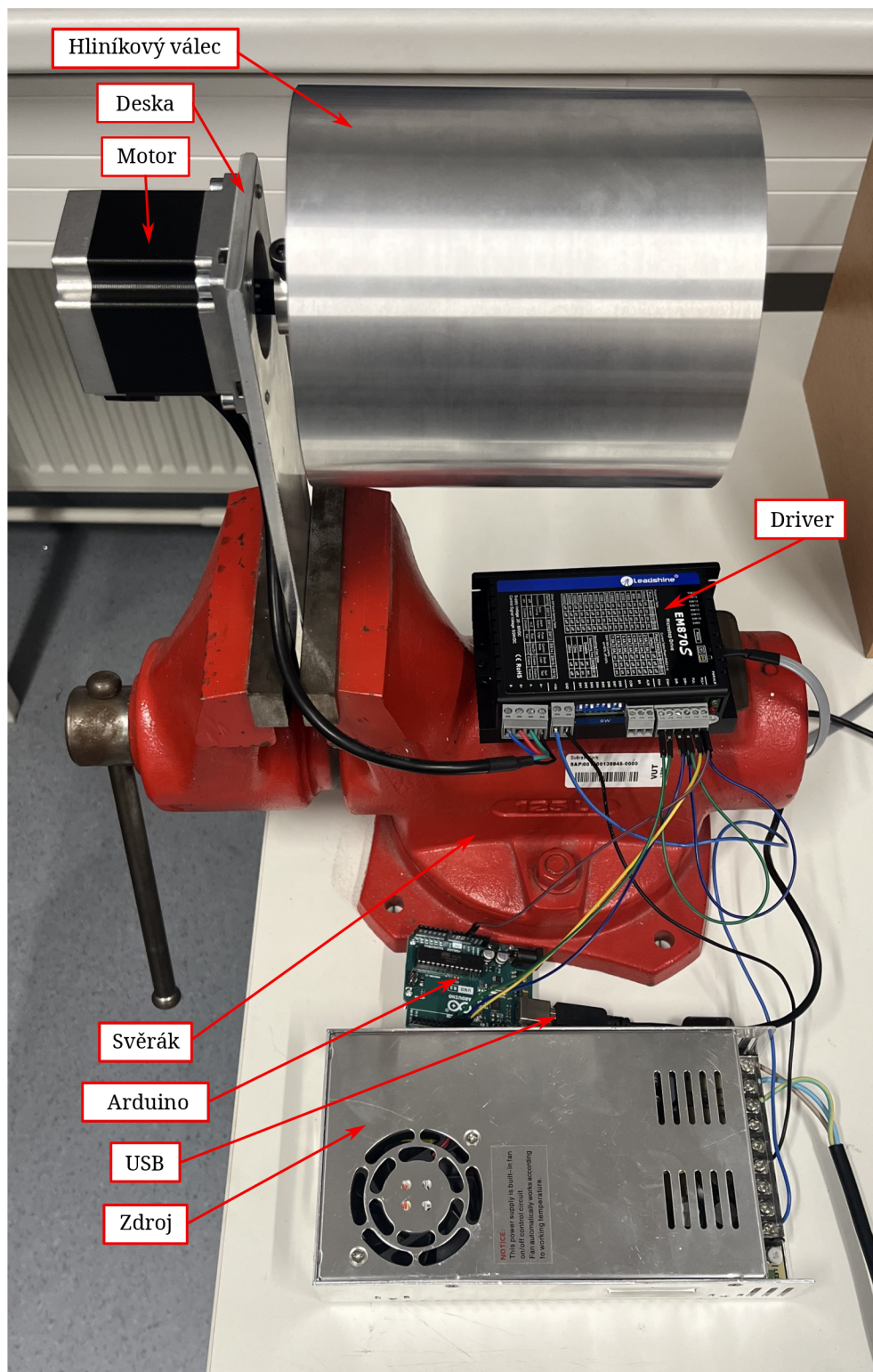
$$v = \frac{m}{\rho\pi r^2}. \quad (8.2)$$

Po dosazení veličin vychází délka válce  $v = 346 \text{ mm}$ .

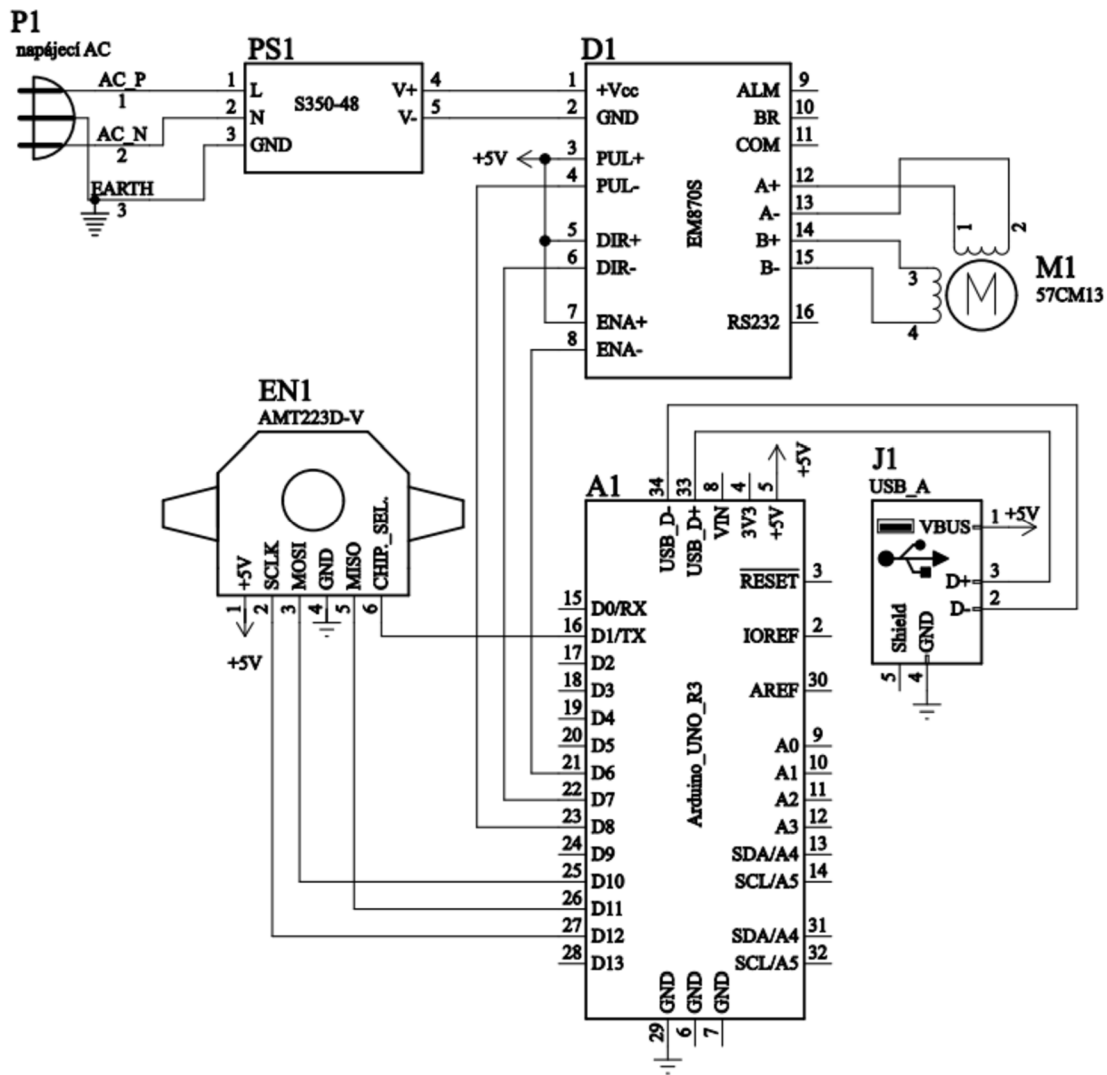
Hliníkový válec o požadovaných parametrech a deska pro připevnění motoru byly zhotoveny v dílně na FSI VUT v Brně. Testovací sestava byla smontována a upnuta do svěráku v laboratoři, a lze ji vidět na obrázku 8.4. Schéma zapojení ovládání motoru shrnuje obrázek 8.5. Zapojení a ovládání bylo navrženo společně s Ing. Zbyňkem Dostálem, Ph.D. Z motoru M1 jsou vyvedeny čtyři vodiče, pomocí kterých je spojen s driverem D1 typu EM870S od výrobce Leadshine Technology Co., Ltd. Driver slouží pro ovládání krokového motoru a lze na něm pomocí přepínačů nastavit mikrokrokování. Podpora mikrokrokování je vyžadována z toho důvodu, že kostky jsou na výměníku rozmístěny přesně po 60 stupních, což není násobkem kroku motoru 1,8°. Driver je napájen ze síťového zdroje PS1 typu S-350-48 od výrobce WEHO [42] (výstupní napětí 48 V, výstupní proud 7,3 A) a je řízen pomocí modulu A1 Arduino UNO R3 [43]. Arduino je napájeno ze zdroje USB (5 V). V době testování ještě sestava neobsahovala enkodér EN1. Enkodér typu AMT223D-V od výrobce CUI Devices [44] byl objednávan dodatečně a je ve finálním zapojení připojen k Arduino přes sběrnici SPI. Slouží ke zjištění polohy natočené hřídele. Enkodér je 14-bitový, tudíž dokáže teoreticky rozlišit 16384 pozic natočení na jednu otáčku. Jeden krok enkodéru tedy dokáže rozlišit natočení hřídele 1' 19".

Při testování bylo nastaveno mikrokrokování motoru přímo pomocí přepínačů na driveru. Motor je konstruován na proud 4 A. Nastavila jsem mikrokrokování 6400 kroků na otáčku a efektivní proud 3,8 A (špičkový proud 5,4 A). Hodnota 6400 mikrokroků byla zjištěna experimentálně při testování. Při tomto nastavení byl pohyb hliníkového válce dostatečně plynulý a nedocházelo ke ztrátám mikrokroků. Jeden krok je 3' 23". Na poloměru výměníku (87,16 mm) se jedná přibližně o krok 0,033 mm. Tuto chybu při nastavení polohy kostky je možné kompenzovat justáží dichroického zrcátka. Enkodér můžeme považovat za vhodně zvolený, protože jeho rozlišení je jemnější, než mikrokrok nastavený na motoru.

Testování proběhlo úspěšně, při nastavených parametrech měl motor dostatečný zádržný moment a pohyb byl dostatečně plynulý bez vibrací. Nedochovalo k přehřívání motoru.



Obrázek 8.4: Sestava při testování motoru s hliníkovým válcem.



Obrázek 8.5: Schéma zapojení ovládání otočného výměníku kostek vytvořené společně s Ing. Zbyňkem Dostálem, Ph.D.



## 8.3 Montážní postup a seřízení

Při manipulaci s optickými komponentami je třeba postupovat opatrně, protože jsou křehké a snadno by se mohly znehodotit. Optické komponenty uchopujeme vždy za okraj, aby zbytečně nedocházelo k jejich znečištění.

Pro testování jsem osadila celkem čtyři fluorescenční kostky. Ve třech jsem použila sety dichroických zrcátek s kompatibilními filtry pro fluorofory DAPI (označení 39000), FITC (označení 39002) a TRITC (označení 39004). Filtry a zrcátka byly zakoupeny od dodavatele optických komponent CHROMA [26]. Do čtvrté kostky jsem umístila pouze dělič svazků CHROMA 21014. Tato kostka s děličem svazků bude sloužit pro snadnější nalezení snímané oblasti. Zbylé dvě kostky zůstávají bez zrcátek a filtrů. Pro vyvážení výměníku je nezbytné mít i tyto prázdné kostky nasazené.

Při samotné montáži nejprve vložíme dichroické zrcátko DZ do držáku zrcátka DRZ. Při tom je třeba správně určit stranu dichroického zrcátka, která na sobě má nanesenou odrazivou vrstvu. Dichroické zrcátko musí být orientováno odrazivou vrstvou směrem ke zdroji světla ZD. Opačná strana má na sobě nanesenou antireflexní úpravu, aby bylo docíleno větší intenzity záření po průchodu skrz dichroické zrcátko. Odrazivou stranu obvykle výrobce označuje pomocí šipky na hraně zrcátka směřující směrem k odrazivé vrstvě. Lze ji však také poznat při pohledu skrz plochu dichroického zrcátka na jeho vnitřní hranu. Při natočení dichroického zrcátka plochou s antireflexní vrstvou k sobě, můžeme vidět, že na vnitřní hraně vzniká odlesk od zadní plochy opatřené odrazivou vrstvou. Pokud dichroické zrcátko natočíme odrazivou plochou k sobě, není odlesk vnitřní hrany vidět. Po vložení dichroického zrcátka do držáku zrcátko přichytíme pomocí plíšku PL a čtyř šroubů s kuželovou zápustnou hlavou. Při utahování těchto šroubů je velmi důležité postupovat opatrně, neboť při příliš silném dotažení hrozí nebezpečí prasknutí zrcátka. Do přichystaných děr v části kostky K1 vsadíme tři plunžry PŽ2 a do části kostky K2 vsadíme vložky VL. Pokud se plunžry nebo vložky protáčí, zajistíme je pomocí speciálního lepidla pro válcové plochy. Do vložek VL našroubujeme justážní šrouby JŠ. Poté vložíme držák s dichroickým zrcátkem do kapsy v části kostky K1 tak, aby byl ve středu kapsy a doléhal na plunžry PŽ2. Přiklopíme ho částí kostky K2 a spojíme obě části kostky pomocí čtyř šroubů M3. Justážní šrouby zašroubujeme tak, aby první dolehl do důlku, druhý do drážky a třetí dosedl na plochu držáku zrcátka. Správné zašroubování ověříme naklopením kostky a následným vrácením kostky zpět do nominální polohy. Při naklopení sestavené kostky se nesmí ozývat hrkavý zvuk, držák zrcátka musí bez vůle doléhat na plunžry a justážní šrouby.

Do děr v kostce uložíme filtry. Při vsazování filtrů musíme dbát na jejich správné uložení. Každý filtr je označen pomocí šipky na objímce. Dle pokynů výrobce mají být oba filtry orientovány tak, aby šipka směřovala směrem ke zkoumanému vzorku. Poté filtry upevníme pomocí víček V a dvou šroubů M4. Správnost uložení filtrů lze opět otestovat naklopením kostky a jejím vrácením do nominální pozice. Filtry by neměly vydávat hrkavý zvuk.

Dále do děr v otočném výměníku OV natlačíme plunžry PŽ1. Na každou rybinovou drážku na kostce nanese malé množství vazelíny. Díky tomu jdou kostky snadněji nasunout do otočného výměníku. Pokud by kostky šly nasunout těžko, může to být způsobeno nepřesným sestavením částí kostky K1 a K2. Je třeba povolit čtyři šrouby M3 spojující části kostky K1 a K2. Tím umožníme vzájemný pohyb částí kostky K1 a K2 vůči sobě. Při zasunutí do rybinové drážky se tak srovnají. Následně šrouby opět utáhneme.

Sestavený otočný výměník s kostkami sešroubujeme pomocí závitů M14 s hřídelí H. Pro sešroubování bylo nutné upnout hřídel do svěráku, protože v závitě je minimální vůle. Proto nebylo nutné hřídel lepit k otočnému výměníku. Pokud by byl šroubovaný spoj vol-

nější, bylo by nutné ho zajistit lepidlem na závity. Na styčnou plochu hřídele a otočného výměníku nanese malé množství vazelíny, aby šla hřídel v případě potřeby demontáže snadno vytáhnout z otočného výměníku.

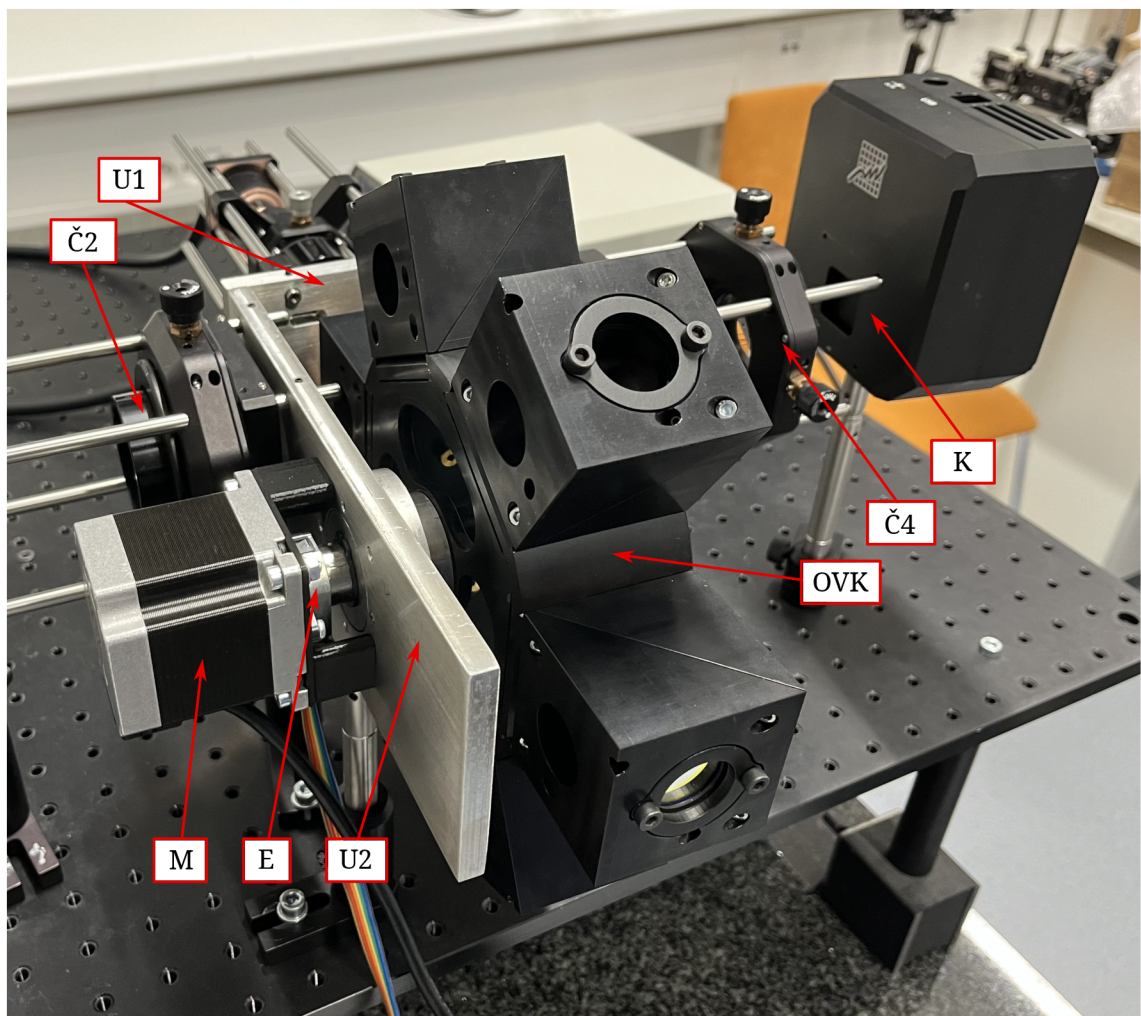
Dále spojíme dohromady dvě hliníkové desky U1 a U2 pomocí šroubů M4. Z důvodu nižší přesnosti výroby dílů smontování provedeme na litinové desce pomocí úhelníku, abychom zajistili, že jsou desky ve stejné výšce, a že jsou na sebe kolmé. Poté do otvoru v desce U2 vsadíme přírubu PŘ a přišroubujeme ji čtyřmi šrouby M4. Do příruby PŘ zasuneme sestavený otočný výměník kostek s hřídelí a provedeme její zajištění pomocí pojistného kroužku. Styčné plochy je opět nutné namazat vazelínou. Vysuneme kostky a na litinové desce připevníme desku U3 pomocí šroubů M4.

Sestavený výměník upevníme ke klecovému systému firmy Thorlabs pomocí tyček. Pro podepření a zamezení nechtěného průhybu mikroskopu ke spodní části desek U1, U2 a U3 přišroubujeme výškově nastavitelné sloupky s držáky ve tvaru vidlice, pomocí kterých je celá sestava připevněna k optickému stolu. Dále výškově srovnáme celou sestavu mikroskopu do roviny pomocí vodní váhy. Tyčky klecového systému zajistíme pomocí stavěcích šroubů našroubovaných do závitových děr v deskách U1, U2 a U3.

K přírubě motoru M našroubujeme desku D pomocí dvou šroubů M4 s matkami a podložkami v protilehlých rozích. Poté namontujeme enkodér E dle pokynů výrobce. Důležité je především správné vystředění enkodéru. Osu motoru nasadíme do otvoru v hřídeli H. Motor přichytíme pomocí sloupek S a dlouhých šroubů M4 k desce U2. Sloupky S vymezují mezeru mezi enkodérem E a hřídelí H, která umožňuje volné otáčení celého výměníku kostek. Nakonec dotáhneme stavěcí šroub v hřídeli, čímž napojíme hřídel H na osu motoru M.

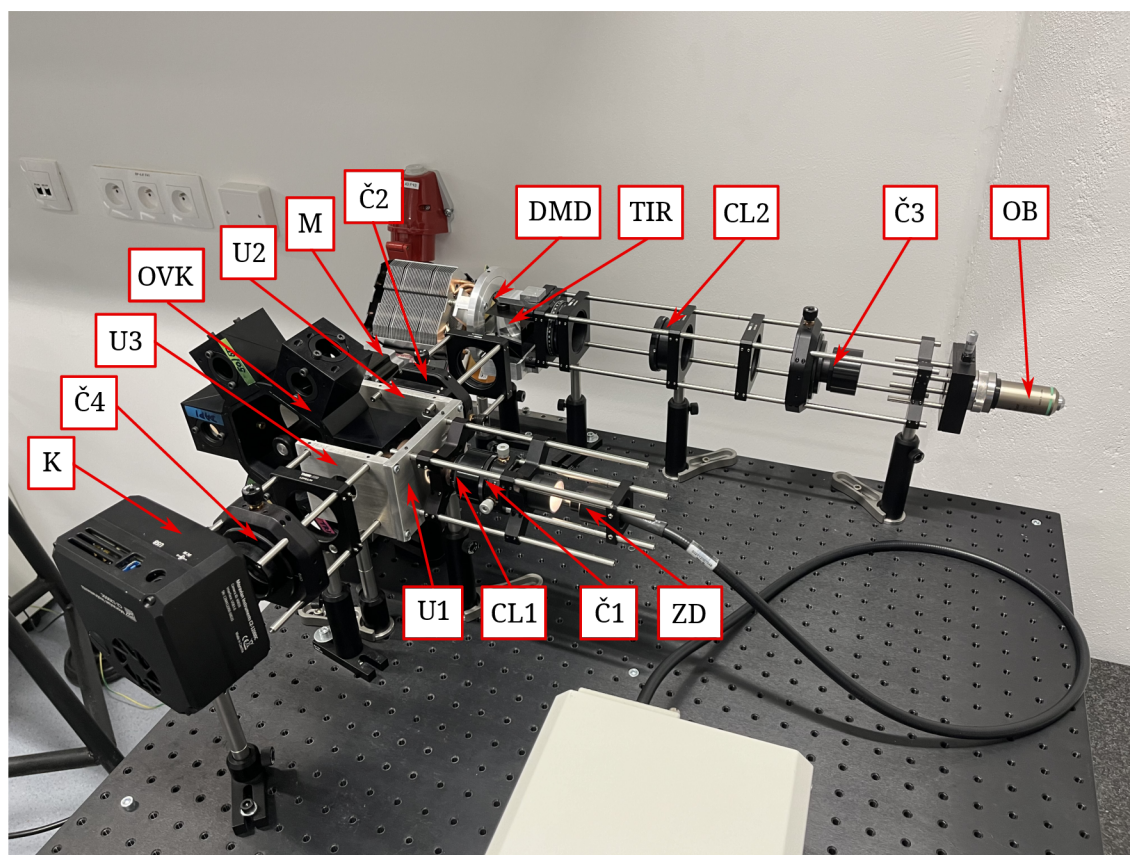
Pro sešroubování jednotlivých dílů byly ve většině případů použity šrouby s válcovou hlavou s vnitřním šestihranem v různých délkách. Pro přišroubování plíšku PL k držáku zrcátka DRZ byly použity šrouby s kuželovou zápusťnou hlavou, aby hlavy šroubů neomezovaly náklon dichroického zrcátka při justáži v kapse kostky. Délky jednotlivých šroubů je možno nalézt ve výkrese sestavy. Kvůli povrchové úpravě eloxováním byly pro snazší zašroubování závity šroubů namazány malým množstvím vazelíny.

Sestavený otočný výměník kostek je na obrázku 8.6. Celý konfokální modul s nainstalovaným otočným výměníkem kostek je možno vidět na obrázku 8.7.



Obrázek 8.6: Sestavený otočný výměník kostek: U1 a U2 – hliníkové desky, Č2 a Č4 – čočky v objímkách, M – motor, E – enkodér, OVK – otočný výměník kostek, K – kamera.





Obrázek 8.7: Konfokální modul s nainstalovaným otočným výměníkem kostek: OVK – otočný výměník kostek; U1, U2, U3 – hliníkové desky; M – motor; Č1, Č2, Č4 – čočky; Č3 – tubusová čočka; CL1, CL2 – clony; ZD – zdroj světla; OB – objektiv; TIR – hranol s úplným vnitřním odrazem; DMD – DMD čip; K – kamera.

## 9 Testování výměníku

Po sestavení a seřízení bylo v květnu 2024 provedeno testování otočného výměníku kostek. Naprogramování modulu Arduino pro ovládání motoru bylo provedeno Ing. Zbyňkem Dostálem, Ph.D. Při vytváření testovacího softwaru byly použity dva zdroje. První se zabýval řízením krokového motoru s využitím knihovny „AccelStepper“ [45]. Druhý byl poskytnut přímo výrobcem enkodéru [46]. Jádro kódu pro ovládání výměníku je možno vidět níže. Kód, jak je momentálně uveden, slouží pouze k prvotnímu testování a bude dále rozvíjen při implementaci fluorescenčního modulu s výměníkem do celkového systému Q-Phase mikroskopu.

V rámci sestavování programu bylo nutno nejprve definovat instanci třídy knihovny „AccelStepper“ se jménem „stepper1“. V rámci toho jsou definovány i výstupy PUL a DIR na vývojové desce arduino. Přes tyto výstupy probíhá ovládání driveru. Dále jsou definovány příkazy pro sběrnici SPI [47], pomocí které komunikuje vývojová deska arduino s enkodérem. Také jsou nadefinována čísla vstupů/výstupů arduino, na kterých komunikace po sběrnici SPI probíhá. Pro aktuální pozici natočení výměníku, pozice jednotlivých kostek a počet mikrokroků, na které je nastaven driver krokového motoru, jsou vytvořeny proměnné. Viz kód:

```
1 #include <AccelStepper.h>
2 #include <SPI.h>
3
4 // Define the stepper motor and the pins that is connected to
5 AccelStepper stepper1(1, 9, 8); // (Typeof driver: with 2 pins, PUL, DIR)
6
7 // Serial rates for UART
8 #define BAUDRATE      115200
9
10 // SPI commands
11 #define AMT22_NOP      0x00
12 #define AMT22_RESET    0x60
13 #define AMT22_ZERO     0x70
14
15 // Define special ascii characters
16 #define NEWLINE        0x0A
17 #define TAB             0x09
18
19 // We will use these define macros so we can write code once compatible with 12 or 14 bit encoders
20 #define RES12           12
21 #define RES14           14
22
23 // SPI pins
24 #define ENC_0           2
25 #define SPI_MOSI        11
26 #define SPI_MISO        12
27 #define SPI_SCLK        13
28
29 // define variables
30 uint16_t position;
31 uint16_t cubePosition;
```

```
32 uint16_t steps = 6400; // microsteps per revolution
```

V programu je pomocí funkce „setup“ nastavena rychlost a zrychlení krokového motoru. Je také třeba definovat, které piny SPI sběrnice jsou vstupy, a které výstupy. Je nadefinována komunikace arduina s počítačem pomocí sériové linky USB a je zahájena komunikace s enkodérem po SPI sběrnici. Nakonec je vyčtena poloha natočení výměníku a na ni je nastavena aktuální poloha krokového motoru. Viz kód:

```
1 void setup() {
2   // Set maximum speed value for the stepper
3   stepper1.setMaxSpeed(10000);
4
5   // Set acceleration value for the stepper
6   stepper1.setAcceleration(10000);
7
8   //Set the modes for the SPI IO
9   pinMode(SPI_SCLK, OUTPUT);
10  pinMode(SPI_MOSI, OUTPUT);
11  pinMode(SPI_MISO, INPUT);
12  pinMode(ENC_0, OUTPUT);
13
14  //Initialize the UART serial connection for debugging
15  Serial.begin(BAUDRATE);
16
17  //Get the CS line high which is the default inactive state
18  digitalWrite(ENC_0, HIGH);
19
20  //set the clockrate. Uno clock rate is 16Mhz, divider of 32 gives 500 kHz.
21  SPI.setClockDivider(SPI_CLOCK_DIV32); // 500 kHz
22
23  //start SPI bus
24  SPI.begin();
25
26  // Set the real position from encoder for stepper1
27  stepper1.setCurrentPosition(readEncoder());
28 }
```

Vlastní program čte sériovou linku z počítače a čeká na zadání pozice natočení výměníku kostek. Pokud dojde k načtení jedné ze šesti pozic, je výměníkem otáčeno na požadovanou hodnotu pozice kostky „cubePosition“. K tomu je využito příkazu „moveTo“ knihovny „AccelStepper“. To zaručí natočení na absolutní pozici, která je zadána. Následně je pozice natočení výměníku kostek vyčítána z enkodéru a pro kontrolu zasílána zpět do počítače. Viz kód:

```
1 void loop() {
2   if(Serial.available() > 0) {
3     int incomingData= Serial.read(); // can be -1 if read error
4     switch(incomingData) {
5       case '1':
6         cubePosition = 1;
7         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quater-step resolution that's one
           rotation)
8         stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
           blocks until is in position
9         delay(500);
10        position = readEncoder();
11        Serial.print("Encoder 0: ");
12        Serial.print(position, DEC);
13        Serial.write(NEWLINE);
```

```

14     break;
15
16     case '2':
17         cubePosition = 1066;
18         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quarter-step resolution that's one
19         rotation)
20         stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
21         blocks until is in position
22         delay(500);
23         position = readEncoder();
24         Serial.print("Encoder 0: ");
25         Serial.print(position, DEC);
26         Serial.write(NEWLINE);
27         break;
28
29     case '3':
30         cubePosition = 2133;
31         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quarter-step resolution that's one
32         rotation)
33         stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
34         blocks until is in position
35         delay(500);
36         position = readEncoder();
37         Serial.print("Encoder 0: ");
38         Serial.print(position, DEC);
39         Serial.write(NEWLINE);
40         break;
41
42     case '4':
43         cubePosition = 3199;
44         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quarter-step resolution that's one
45         rotation)
46         stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
47         blocks until is in position
48         delay(500);
49         position = readEncoder();
50         Serial.print("Encoder 0: ");
51         Serial.print(position, DEC);
52         Serial.write(NEWLINE);
53         break;
54
55     case '5':
56         cubePosition = 4265;
57         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quarter-step resolution that's one
58         rotation)
59         stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
60         blocks until is in position
61         delay(500);
62         position = readEncoder();
63         Serial.print("Encoder 0: ");
64         Serial.print(position, DEC);
65         Serial.write(NEWLINE);
66         break;
67
68     case '6':
69         cubePosition = 5331;
70         stepper1.moveTo(cubePosition); // Set desired move: 800 steps (in quarter-step resolution that's one
71         rotation)

```



```

63 stepper1.runToPosition(); // Moves the motor to target position w/ acceleration/ deceleration and it
    blocks until is in position
64 delay(500);
65 position = readEncoder();
66 Serial.print("Encoder 0: ");
67 Serial.print(position, DEC);
68 Serial.write(NEWLINE);
69 break;
70
71 default:
72 // handle unwanted input here
73 break;
74 }
75 }
76 }

```

K vlastnímu chodu programu jsou také definovány funkce, které zprostředkovávají komunikaci po SPI sběrnici a byla vytvořena i funkce „readEncoder“, která vyčítá polohu enkodéru a přepočítává ji na rozpětí kroků, které odpovídají nastavení mikrokrokování motoru. Tyto funkce byly převzaty prakticky beze změny z dostupných ukázek kódů.

Sestavený výměník jsem zakomponovala do konfokálního modulu a otestovala jsem jeho optické a mechanické vlastnosti. Po najustování dichroických zrcadel se podařilo dosáhnout osvětlení celé aktivní plochy DMD čipu pro všechny osazené fluorescenční kostky. Po mechanické stránce funguje výměník plynule a tiše, přepínání fluorescenčních kostek probíhá bez vibrací. Požadavkem bylo také dosažení rychlého přepínání sousedních kostek z důvodu provádění experimentů s živými buňkami. Při testování jsem dosáhla rychlosti přepnutí mezi sousedními kostkami 0,6 sekundy, což je pro běžné experimenty dostatečné. Pro zvýšení rychlosti přepínání kostek by bylo vhodné upravit kód ovládání motoru, aby vybíral vždy nejkratší cestu k dané fluorescenční kostce a také vyladit rychlost a zrychlení otáčení motoru na maximální, při které ještě nebude docházet ke ztrátě mikrokroků a přehřívání motoru. Videozáznam z testování je možno shlédnout na adrese: [https://raw.githubusercontent.com/ZbynekDostal/rizeni\\_motoru\\_vymenik/main/test\\_video.mp4](https://raw.githubusercontent.com/ZbynekDostal/rizeni_motoru_vymenik/main/test_video.mp4) nebo po naskenování QR kódu.



# Závěr

Pro právě vyvíjený konfokální modul Q-Phase mikroskopu, který je založen na DMD čipu, jsem navrhla robotizovaný výměník fluorescenčních filtrů a dichroických zrcátek, protože komerčně dostupné výměníky nevyhovovaly zadaným požadavkům. Výměník jsem navrhla pro jednopalcové optické komponenty. Tuto velikost jsem stanovila z provedené simulace osvětlovací části sestavy konfokálního modulu v programu Zemax. Jedním z hlavních požadavků bylo umožnit uživateli snadné najustování každého dichroického zrcátka, aby svazek světla odražený od tohoto zrcátka osvětloval celou aktivní plochu DMD čipu. Umožnění justáže je dosaženo díky umístění tří uživateli snadno dostupných justážních šroubů, které jsou zakomponovány v tříbodové kinematické sestavě. Pro vytvoření robotizovaného výměníku jsem nejprve vypracovala čtyři koncepty možných řešení výměníku. Protože bylo provedení výměníku omezeno prostorovým uspořádáním mikroskopu, vybrala jsem z těchto konceptů otočný výměník fluorescenčních kostek. Původní koncept pro čtyři fluorescenční kostky jsem rozšířila na výměník umožňující výměnu šesti fluorescenčních kostek. Součástí návrhu výměníku byla automatizace z důvodu provádění dlouhodobých pozorování. Na základě experimentu s válcovým tělesem, které simulovalo otočný výměník o podobném momentu setrvačnosti, bylo ověřeno, že vybraný motor s driverem jsou pro ovládání navrženého otočného výměníku kostek vhodné. Otočný výměník lze integrovat do klecového systému konfokálního modulu pomocí tří hliníkových desek spojených do tvaru písmene U, které tvoří oporu celému otočnému výměníku kostek i motoru.

Dle návrhu jsem vytvořila výkresovou dokumentaci, která je součástí přílohy této diplomové práce. Podle ní byly zhotoveny jednotlivé díly. Pro výrobu plastových komponent metodou 3D tisku postačily pouze modely příslušných dílů.

Z vyrobených dílů jsem výměník sestavila. Tři kostky jsou osazeny sety dichroických zrcátek a filtrů pro pozorování skrz fluorescenční kanály DAPI, FITC a TRITC. Jedna kostka je osazena pouze děličem svazků bez filtrů. Ta bude sloužit ke snadnějšímu nalezení snímané oblasti vzorku. Zbylé dvě kostky zůstávají zatím neosazené. Jsou připravené pro budoucí volbu dalších dvou fluorescenčních kanálů.

Pro ovládání výměníku byl vytvořen prototyp kódu. Sestavený výměník byl po integraci do konfokálního modulu úspěšně otestován. Bylo dosaženo plynulé a dostatečně rychlé rotace výměníku bez vibrací. To umožní fluorescenční modul s mnou navrženým výměníkem implementovat do holografického Q-Phase mikroskopu, který se nachází v laboratoři FSI VUT v Brně. Celý modul pak bude testován při reálných biologických experimentech.



# Literatura

- [1] ZICHA, D. Addressing Cancer Invasion and Cell Motility with Quantitative Light Microscopy. *Scientific Reports* [online]. leden 2022, sv. 12, č. 1, s. 1621, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1038/s41598-022-05307-7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-05307-7>.
- [2] CHANDLER, D. E. a ROBERSON, R. W. *Bioimaging: Current Concepts in Light and Electron Microscopy*. Sudbury (Mass.): Jones and Bartlett publ, 2009. ISBN 978-0-7637-3874-7.
- [3] WANG, M., WU, C., SINEFELD, D., LI, B., XIA, F. et al. Comparing the Effective Attenuation Lengths for Long Wavelength in Vivo Imaging of the Mouse Brain. *Biomedical Optics Express* [online]. srpen 2018, sv. 9, č. 8, s. 3534–3543, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1364/BOE.9.003534. ISSN 2156-7085. Dostupné z: <https://opg.optica.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-9-8-3534&id=395109>.
- [4] KÖHLER, A. Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik* [online]. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik. 1893, sv. 1893, č. 10, s. 433–440, [cit. 2024-05-22]. ISSN 0373-031X.
- [5] IBIDI GMBH. *Inverted and Upright Microscopy at a Glance* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://ibidi.com/content/212-inverted-and-upright-microscopy>.
- [6] ABRAMOWITZ, M. a DAVIDSON, M. W. *Specialized Microscopy Techniques - Rheinberg Illumination* [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/rheinberg/>.
- [7] MICROSCOPYU. *Introduction to Phase Contrast Microscopy* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>.
- [8] HIBBS, A. R. *Confocal Microscopy for Biologists*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. ISBN 978-0-306-48468-1 978-0-306-48565-7.
- [9] RIJAL, N. *Fluorescence Microscope: Principle, Types, Applications* [online]. 2023 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/fluorescence-microscope-principle-types-applications/>.
- [10] LIU, C., KNITTER, S., CONG, Z., SENCAN, I., CAO, H. et al. High-Speed Line-Field Confocal Holographic Microscope for Quantitative Phase Imaging. *Optics Express* [online]. Optica Publishing Group. květen 2016, sv. 24, č. 9, s. 9251–9265, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1364/OE.24.009251. ISSN 1094-4087.

- [11] MARVIN, M. *Microscopy Apparatus* [online]. USA. US3013467A. [cit. 2024-05-22]. Přihlášeno 7.11.1957. Uděleno 19.12.1961.
- [12] WEBB, R. H. Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics* [online]. 1996-03-01, sv. 59, č. 3, s. 427–471, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1088/0034-4885/59/3/003. ISSN 0034-4885. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/59/3/003>.
- [13] GHOUSHCHI, V. P. *Opto-Mechanical Design And Development of an Optodigital Confocal Microscope*. M.Sc. thesis, Advisor Alper Kiraz, Koç University, Optoelectronics & Photonics Engineering: Koç University, 2015.
- [14] PETRÁŇ, M., HADRAVSKÝ, M., EGGER, M. D. a GALAMBOS, R. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope. *JOSA* [online]. Optica Publishing Group. květen 1968, sv. 58, č. 5, s. 661–664, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1364/JOSA.58.000661. Dostupné z: <https://opg.optica.org/josa/abstract.cfm?uri=josa-58-5-661>.
- [15] TOOMRE, D. K., LANGHORST, M. F. a DAVIDSON, M. W. *Introduction to Spinning Disk Microscopy* [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>.
- [16] YOKOGAWA CORPORATION OF AMERICA. *What Is Confocal Microscopy? A Clear Explanation of Its Principle, History, and the Difference from Laser Microscopy* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.yokogawa.com/br/library/documents-downloads/technical-information/lsc-what-is-confocal-microscopy/>.
- [17] LEE, B. *Introduction to  $\pm 12$  Degree Orthogonal Digital Micromirror Devices DMDs* [online]. 2018 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.ti.com/lit/an/dlpa008b/dlpa008b.pdf>.
- [18] DAN, D., LEI, M., YAO, B., WANG, W., WINTERHALDER, M. et al. DMD-based LED-illumination Super-resolution and Optical Sectioning Microscopy. *Scientific Reports* [online]. Nature Publishing Group. leden 2013, sv. 3, č. 1, s. 1116, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1038/srep01116. ISSN 2045-2322.
- [19] HORNBECK, L. J. Digital Light Processing for high-brightness high-resolution applications. In: SPIE, Květen 1997, sv. 3013, s. 27 – 40 [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.1117/12.273880. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/12.273880>.
- [20] KUBÁTOVÁ, E. *Konfokální modul pro koherenci řízený holografický mikroskop*. Diplomová práce, vedoucí Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství: Vysoké učení technické v Brně, 2020.
- [21] ANTOŠ, M. a DOSTÁL, Z. *Opto-mechanical assembly using DMD for sample scanning in confocal imaging mode*. Projekt TN01000008/05-V015, Centrum elektronové a fotonové optiky, Vysoké učení technické v Brně, Central European Institute of Technology, 2023.
- [22] TEXAS INSTRUMENTS Inc. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.ti.com/product/DLP9000>.

- [23] SCHEIMPFLUG, T. *Improved Method and Apparatus for the Systematic Alteration or Distortion of Plane Pictures and Images by Means of Lenses and Mirrors for Photography and for Other Purposes*. [online]. UK. GB190401196A. [cit. 2024-05-22]. Přihlášeno 1904-01-16. Uděleno 1904-05-12.
- [24] MORAVSKÉ PŘÍSTROJE a.s. [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.gxccd.com/>.
- [25] XING, L., DAI, W. a ZHANG, Y. Scheimpflug Camera-Based Technique for Multi-Point Displacement Monitoring of Bridges. *Sensors* [online]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. leden 2022, sv. 22, č. 11, s. 4093, [cit. 2024-05-22]. DOI: 10.3390/s22114093. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1424-8220/22/11/4093>.
- [26] CHROMA TECHNOLOGY Corp. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.chroma.com>.
- [27] THORLABS, Inc. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.com>.
- [28] EDMUND OPTICS Inc. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.edmundoptics.com/>.
- [29] APPLIED SCIENTIFIC INSTRUMENTATION. *Modular Infinity Microscope Cubes & Cube Components* [online]. 2023 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.asiimaging.com/products/modular-infinity-microscope-mim/modular-infinity-microscope-mim/cubes/>.
- [30] TOFRA, Inc. *Filter Cube Slider with Integrated Controller* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <http://tofrainc.net/filter-cube-slider-integrated.htm>.
- [31] SOFKA, J. *Filter Cube Switcher* [online]. 2023 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <http://sofka.org/portfolio/cube-switcher/>.
- [32] FINGER LAKES INSTRUMENTATION LLC. *High Speed Filter Cube Switcher* [online]. 2018 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.flicamera.com/pdf/InciteManual.pdf>.
- [33] NIKON INSTRUMENTS Inc. *Intermediate Modules* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/accessories/intermediate-modules>.
- [34] PRIOR SCIENTIFIC [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.prior.com/>.
- [35] ACCU-SCOPE [online]. 2022 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://accu-scope.com/>.
- [36] SPACH OPTICS Inc. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.spachoptics.com/>.
- [37] ERWIN HALDER KG [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.halder.com/>.
- [38] PJKovo [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.pjkovo.cz/>.
- [39] DEVIL DESIGN RYSZKA MATEJA Sp. J. [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://devildesign.com/>.

- [40] HENKEL Corp. [online]. 2021 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.loctiteam.com/company/>.
- [41] LEADSHINE CORPORATION Co., Ltd. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.leadshine.com/>.
- [42] ZHEJIANG WEIHAO ELECTRONIC Co., Ltd. [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.wehopower.com/>.
- [43] ARDUINO LLC [online]. 2022 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.arduino.cc/>.
- [44] CUI DEVICES [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.cuidevices.com/>.
- [45] DEJAN. *Stepper Motors and Arduino - The Ultimate Guide* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://howtomechatronics.com/tutorials/arduino/stepper-motors-and-arduino-the-ultimate-guide/>.
- [46] KELLY, J. *AMT22 Arduino SPI Sample Code Tutorial* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.cuidevices.com/product/resource/sample-code/amt22>.
- [47] DHAKER, P. *Introduction to SPI Interface* [online]. 2024 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: <https://www.analog.com/en/resources/analog-dialogue/articles/introduction-to-spi-interface.html>.