

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA OPTIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Základní principy, experimentální ověření a aplikace digitální 'in-line' holografie



Vedoucí diplomové práce:
Prof. RNDr. Zdeněk Bouchal, Dr.
30. červenec 2012

Vypracoval:
Bc. Libor Mořka
Optika a optoelektronika
II. ročník (navazující studium)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem vytvořil tuto diplomovou práci samostatně pod vedením pana prof. RNDr. Zdeňka Bouchala, Dr. a v seznamu použité literatury jsem uvedl všechny zdroje použité při zpracování práce.

V Olomouci dne 30. července 2012

Poděkování

Na tomto místě chci především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu prof. RNDr. Zdeňku Bouchalovi, Dr., za dostatek trpělivosti, cenné rady, náměty a připomínky.

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 5 |
| 2 | Principy holografického zobrazení | 6 |
| 2.1 | Koherence a interference světla | 6 |
| 2.2 | Difrakce světla | 7 |
| 2.3 | Optické zobrazení a základní zobrazovací funkce | 9 |
| 2.4 | Optická holografie | 10 |
| 2.4.1 | Gaborův hologram | 10 |
| 2.4.2 | Leithův-Upatnieksův hologram. | 11 |
| 2.5 | Digitální holografie | 13 |
| 2.5.1 | Digitální osová holografická mikroskopie | 14 |
| 3 | Rekonstrukce obrazu a výpočet bodové rozptylové funkce | 16 |
| 3.1 | Geometrické přiblížení | 17 |
| 3.2 | Kruhová clona | 18 |
| 3.3 | Obdélníková clona | 18 |
| 3.4 | Clona s Gaussovskou propustností | 19 |
| 3.5 | Dvoubodové rozlišení | 20 |
| 3.6 | Vliv rozměru vstupní clony na rozlišení | 21 |
| 4 | Základní rekonstrukční algoritmy | 24 |
| 4.1 | Jednostupňové a dvoustupňové šíření | 24 |
| 4.2 | Konvoluční metoda | 25 |
| 4.3 | Kirchhoffův-Helmholtzův rekonstrukční algoritmus | 26 |
| 5 | Diskretizace signálu | 28 |
| 5.1 | Vzorkovací teorém | 28 |
| 5.2 | Součin prostorové a frekvenční šířky signálu | 29 |
| 5.3 | Záznam hologramu a vzorkovací podmínka | 29 |
| 5.4 | Analýza zobrazování v digitální holografii | 31 |
| 5.5 | Numerická rekonstrukce a vzorkovací podmínka | 32 |
| 6 | Numerická separace komplexně sdruženého obrazu | 34 |
| 6.1 | Dekonvoluční přístup | 35 |
| 6.2 | Iterační přístup | 35 |
| 6.3 | Frekvenční filtrace částí hologramu | 36 |
| 7 | Experimentální výsledky | 37 |
| 7.1 | Ověření základních principů v DIHM | 37 |
| 7.1.1 | Příčný posun | 38 |
| 7.1.2 | Podélný posun | 38 |
| 7.1.3 | Příčný a podélný profil PSF | 39 |
| 7.2 | Zobrazení testů | 42 |
| 7.2.1 | Přímý záznam | 42 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 7.2.2 | Záznam v sestavě Machova-Zehnderova interferometru | 44 |
| 8 | Příklady aplikací digitální holografické mikroskopie | 46 |
| 9 | Závěr | 50 |

1 Úvod

V roce 1948 publikoval Denis Gabor článek [1], který se stal základním kamenem celé holografie. Prezentovaná technika osově holografie se sférickou referenční vlnou byla původně vyvinuta pro elektronové mikroskopy, kde bylo potřeba odstranit aberace magnetických elektronových čoček.

Ve své době tento koncept neupoutal příliš pozornosti. Změna přišla až v 60. letech 20. století s vynálezem laseru. V roce 1964 Leith a Upatnieks demonstrovali první optickou rekonstrukci [2] a o rok později vyřešili problém komplexně sdruženého obrazu změnou geometrie záznamu [3], tato technika je známá jako mimoosová holografie.

Digitální holografie celý koncept holografie zefektivnila a rozšířila možné aplikace. S teoretickým návrhem přišli Goodman a Lawrence [4] již v roce 1965. Nicméně tato disciplína se plně rozvinula až v 90. letech, kdy byly k dispozici kvalitnější CCD kamery a výkonnější počítače. První záznam hologramu na CCD kameru s následnou digitální rekonstrukcí byl proveden v roce 1994 Schnarsem a Jüptnerem [5]. V současnosti dochází k rychlému rozvoji této disciplíny, zejména na poli holografické mikroskopie, ale i v jiných oborech [6].

V této diplomové práci bude zaměřena pozornost především na digitální osovou holografickou mikroskopii se sférickou referenční vlnou (DIHM - digital in-line holographic microscopy). Tato nová slibná zobrazovací technika spojuje záznam sférickou referenční vlnou, umožňující dosáhnout velkého rozlišení, s digitální holografií [7].

Ve druhé kapitole nejprve shrneme základní principy optické holografie, které tvoří základ pro holografii digitální. Budeme diskutovat pro nás podstatné metody záznamu hologramu a představíme digitální osovou holografickou mikroskopii.

Ve třetí kapitole odvodíme podrobně vztahy popisující závislost polohy obrazu na poloze předmětu. Výpočty budou provedeny obecně pro techniky záznamu hologramu s referenční vlnou, která má konstantní průběh intenzity v rovině záznamu. Práce dále obsahuje výpočet bodové rozptylové funkce (PSF - point spread function) těchto zobrazovacích systémů. Následuje odvození dvoubodového kritéria pro podélné a příčné rozlišení.

Ve čtvrté kapitole jsou prezentovány základní algoritmy pro rekonstrukci obrazu. Mimo algoritmů založených na Fresnelově transformaci bude také stručně představen Kirchhoffův-Helmholtzův rekonstrukční algoritmus, který je svou specifickou aproximací přizpůsobený DIHM a dovoluje tedy rekonstrukce za hranicí Fresnelovy aproximace.

Pátá kapitola přináší diskuzi omezení, které klade vzorkovací podmínka na jednotlivé techniky záznamu hologramu. Pomocí veličiny, která nám ohodnotí výkon zobrazovací soustavy, porovnáme jednotlivé techniky záznamu hologramu.

V šesté kapitole budou prezentovány numerické metody potlačení komplexně sdruženého obrazu.

V sedmé kapitole provedeme experimentální ověření teoretických výsledků kapitoly 3. Na závěr prezentujeme rekonstrukce čárových testů a jiných reálných objektů, které jsme zaznamenali metodou DIHM.

V osmé kapitole ukážeme široké využití digitální holografické mikroskopie především v biologii a při studiu proudění kapalin v malých kanálcích.

2 Principy holografického zobrazení

Základem digitální osově holografické mikroskopie, studované v této práci, jsou principy optické holografie objevené Gaborem koncem 40. let 20. století. Optická holografie je dvoustupňová zobrazovací technika. Nejprve je proveden záznam, za kterým následuje rekonstrukce pozorovaného předmětu. K záznamu rozptýlené předmětové (signální) vlny nedochází na detektoru přímo, ale při detekci se skládá s pomocnou (referenční) vlnou. Nezbytnou podmínkou, aby byly vlny schopny vzájemně interferovat, je korelace mezi signální a referenční vlnou. Vzniklý interferenční obrazec se nazývá hologram předmětu. Vzhledem ke skutečnosti, že obsahuje informaci o amplitudě i fázi předmětové vlny, může být provedena trojrozměrná rekonstrukce předmětu. V dalším textu budou diskutovány některé konfigurace holografického záznamu. V následujících kapitolách o koherenci a interferenci, difrakci a optickém zobrazení bylo čerpáno z literatury [8], [9] a [10].

2.1 Koherence a interference světla

Při studiu holografického zobrazení je nutné brát do úvahy vlnovou podstatu světla, tj. diskutovat koherenci, interferenci a difrakci světelných vln. Světlo je elektromagnetické vlnění, které je popsáno vektorem elektrické intenzity. Veličina vykazuje rychlé oscilace v prostoru a čase. Tyto oscilace lze charakterizovat vlnovou délkou nebo frekvencí. V optice je výhodné, v rámci skalární vlnové teorie, elektrické intenzitě přiřadit komplexní veličinu (skalární komplexní amplitudu), která určuje amplitudu a fázi kmitů elektrické intenzity v daném bodě prostoru a v daném čase.

Jestliže se dvě světelné vlny setkají v prostoru, bude výsledná komplexní amplituda dána součtem dílčích komplexních amplitud, $U = U_1 + U_2$. Výsledný intenzitní záznam na detektoru je však významně ovlivněn charakterem fázových změn obou vln.

Bude-li fázový rozdíl vln po dobu detekce stálý, můžeme vlny považovat za koherentní. Jejich složením vznikne interferenční obrazec. Zapišeme-li komplexní amplitudy obou vln ve tvaru $U_j = u_j \exp(i\varphi_j)$, $j = 1, 2$, kde u_j a φ_j značí amplitudu a fázi vlny, můžeme v případě dvou vln psát výslednou intenzitu $I = |U|^2$ ve tvaru interferenčního zákona,

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\Delta\varphi), \quad (1)$$

kde I_j jsou intenzity dílčích vln a $\Delta\varphi$ je rozdíl jejich fází. Výsledná intenzita tedy není dána pouhým součtem intenzit dílčích vln, ale závisí na interferenčním členu, který je určen rozdílem fází obou vln. Pokud se rozdíl fází obou skládaných vln v průběhu detekce rychle mění, bude po vystředování přes dobu detekce interferenční člen nulový. Výsledná intenzita je potom dána pouhým součtem dílčích intenzit, $I = I_1 + I_2$. V tomto případě mluvíme o světle nekoherentním, které neinterferuje.

Koherentní a nekoherentní světlo jsou mezními případy obecnějšího, částečně koherentního stavu světla. Při práci s takovýmto světlem používáme statistické veličiny zavedené v rámci teorie koherence druhého řádu. Tato teorie předpokládá stacionaritu a ergodicitu světelných polí. Rozlišujeme prostorovou a časovou koherenci. Uvažujme světelné signály vyslané dvěma prostorově oddělenými zdroji (Youngův pokus). Zajímá nás výsledná intenzita v určitém bodě prostoru. Detektorem měříme intenzitu středovanou

přes čas. Pro tuto intenzitu bude platit

$$I = \langle |U_1(t) + U_2(t + \tau)|^2 \rangle, \quad (2)$$

kde τ je časové zpoždění skládaných vln. Korelaci dvou skládaných vln, které pocházejí od dvou prostorově oddělených zdrojů, charakterizuje funkce vzájemné koherence

$$\Gamma_{12}(\tau) = \langle U_1(t) U_2(t + \tau) \rangle. \quad (3)$$

Její normováním získáme komplexní stupeň koherence

$$\gamma_{12}(\tau) = \Gamma_{12}(\tau) / \sqrt{I_1 I_2}. \quad (4)$$

Zapišeme-li komplexní stupeň koherence pomocí modulu a fáze $\gamma_{12} = |\gamma_{12}| \exp(\Delta\varphi)$, můžeme přepsat (2) ve tvaru interferenčního zákona

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} |\gamma_{12}(\tau)| \cos(\Delta\varphi). \quad (5)$$

Schopnost světla interferovat, nebo také kontrast interferenčních proužků, lze kvantitativně vyjádřit pomocí vizibility, která je definovaná vztahem

$$V = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min}). \quad (6)$$

V případě rovnosti dílčích intenzit ($I_1 = I_2$), dosadíme-li za maximální a minimální intenzitu z výrazu (5), zjistíme, že vizibilita je rovna velikosti komplexního stupně koherence

$$V = |\gamma_{12}(\tau)|. \quad (7)$$

Hodnota stupně koherence leží v intervalu $0 \leq |\gamma_{12}(\tau)| \leq 1$ a charakterizuje prostorovou a časovou koherenci. Krajní hodnoty odpovídají nekoherentnímu ($V = 0$) a úplně koherentnímu ($V = 1$) světlu.

Prostorová koherence souvisí s korelací světla v různých bodech prostoru a její stupeň koherence lze určit pomocí Youngova pokusu. Kvantitativní mírou časové koherence je koherenční délka, kterou zjistíme pomocí Machova-Zehnderova interferometru. Časová koherence má přímou souvislost se spektrálními vlastnostmi zdroje záření. Koherenční délka l je určena poměrem $l = \lambda^2 / \Delta\lambda$, kde λ je střední vlnová délka a $\Delta\lambda$ šířka spektra. Zatímco koherenční délka slunečního světla je v jednotkách mikrometrů, u laserů používaných v holografii se jedná o desítky metrů.

2.2 Difrakce světla

Při popisu šíření vln, které vytvářejí holografický záznam předmětu a při jeho následné rekonstrukci, hraje významnou roli difrakce světla. Difrakce je projevem vlnové podstaty světla a lze ji pozorovat při dopadu světelné vlny na překážku, jejíž rozměry jsou srovnatelné s vlnovou délkou. Prostorové omezení vlny se následně projeví tak, že se světlo za překážkou šíří i do prostoru geometrického stínu. Tento jev lze vysvětlit pomocí Huygensova principu. Na jednotlivé body vlnoplochy lze nahlížet jako na zdroj sekundárních sférických vln, které vzájemně interferují. Základní úloha difrakce předpokládá šíření

vlny vyzářené bodovým zdrojem, příčné omezení vlny clonou a následné určení komplexní amplitudy prošlého světla v prostoru za clonou.

Matematickou formulací Huygensova-Fresnelova principu je difrakční integrál. Tento vztah nám umožní ze znalosti komplexní amplitudy v rovině clony vypočítat komplexní amplitudu difraktovaného světla v libovolné rovině za clonou. Difrakční integrál můžeme za jistých slabých předpokladů zapsat ve tvaru [7]

$$U(x', y', z') = \frac{z'}{i\lambda} \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \int U(x, y) \frac{\exp(ikr)}{r^2} dx dy, \quad (8)$$

kde $k = 2\pi/\lambda$, $U(x, y)$ je známá komplexní amplituda v rovině clony a $U(x', y', z')$ komplexní amplituda v rovině, která je paralelní s rovinou clony ve vzdálenosti z' . Symbol r udává vzdálenost jednotlivých bodů clony a bodů roviny, na které komplexní amplitudu počítáme. Tuto vzdálenost lze vyjádřit pomocí Euklidovské metriky

$$r = \sqrt{z'^2 + (x - x')^2 + (y - y')^2}. \quad (9)$$

Difrakční integrál (8) můžeme zapsat pomocí konvoluce

$$U(x', y', z') = \frac{z'}{i\lambda} U(x, y) \otimes g(x, y, z'), \quad (10)$$

kde g je funkce impulzové odezvy volného prostoru daná vztahem

$$g(x, y, z') = \frac{\exp\left(ik\sqrt{x^2 + y^2 + z'^2}\right)}{x^2 + y^2 + z'^2}. \quad (11)$$

Při výpočtu integrálu je nutné nejprve aproximativně vyjádřit optické dráhy mezi jednotlivými body na cloně a bodem pozorování. Kritériem pro zvolení vhodné aproximace je Fresnelovo číslo NF . Pro hodnotu $NF \approx 1$ použijeme Fresnelovu a pro hodnotu $NF \ll 1$ Fraunhoferovu aproximaci.

Ve Fresnelově aproximaci lze funkci impulzové odezvy psát ve tvaru

$$g(x, y, z') = \frac{e^{ikz'}}{z'^2} \exp\left(ik\frac{x^2 + y^2}{2z'}\right) \quad (12)$$

a ve Fraunhoferově aproximaci přejde výraz (8) na Fourierovu transformaci

$$U(f_x, f_y, z') \approx \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \int U(x, y) \exp\{-i2\pi(f_x x + f_y y)\} dx dy, \quad (13)$$

kde $f_x = x/(\lambda z')$ a $f_y = y/(\lambda z')$.

2.3 Optické zobrazení a základní zobrazovací funkce

Optickou nebo digitální rekonstrukci hologramu můžeme chápat jako trojrozměrné zobrazení, které lze analyzovat pomocí obecných postupů a kritérií známých z vlnové teorie optického zobrazení. Ideální zobrazení vyžaduje vzájemně jednoznačné přiřazení bodů předmětu a obrazu a podobnost jejich geometrických tvarů. Těchto požadavků lze dosáhnout jen v přístupu geometrické optiky, vlnová podstata světla přesné bodové přiřazení vylučuje. Přesto je ale možné v reálných situacích požadovaných podmínek v dobrém přiblížení dosáhnout.

V technické praxi se nejčastěji využívá jevů geometrické optiky založené na lomu a odrazu světla. V poslední době sílí význam difraktivního a holografického zobrazení, při kterém je obraz formován pomocí difrakce světla na periodických strukturách. Známé jsou i zobrazovací metody využívající jevů nelineární optiky.

Přestože uvedené zobrazovací metody pracují s různými jevy, je možné stanovit obecně platnou metodiku popisu a hodnocení optického zobrazení. Základním problémem v teorii zobrazení je určení obrazu bodového zdroje. Tento úkol lze formulovat pomocí pupilové funkce, která popisuje vliv zobrazovacího řetězce, který obraz vytváří. S použitím Fraunhoferovy teorie difrakce lze komplexní amplitudu při bodovém zobrazení určit jako Fourierovu transformaci pupilové funkce. Odpovídající normovaná intenzita popisující obraz bodového zdroje představuje základní zobrazovací funkci, která se nazývá bodová rozptylová funkce.

Složitějším úkolem je popis zobrazení rozlehlého předmětu. V tomto přístupu je nutné zvažovat koherenční vlastnosti použitého optického záření. Metodika hodnocení obrazu vychází z fourierovské analýzy, která vyžaduje linearitu systému. V závislosti na korelačních vlastnostech světla splňují podmínku linearitu různé veličiny. Pro koherentní světlo je zobrazení lineárním procesem pro komplexní amplitudu, pro nekoherentní světlo pro intenzitu a v obecném případě částečně koherentního světla je nutné pracovat s funkcí vzájemné koherence.

V rámci harmonické analýzy je zobrazení plošného předmětu hodnoceno pomocí optické funkce přenosu (OTF - optical transfer function). V rámci fourierovské analýzy se dá dokázat, že v případě koherentního světla je OTF určena přímo pomocí pupilové funkce. Pro nekoherentní světlo lze OTF získat jako Fourierovu transformaci PSF nebo také autokorelací pupilové funkce.

2.4 Optická holografie

Jak již bylo řečeno, optická holografie tvoří základ pro holografii digitální. Z tohoto důvodu zde nastíníme její základní principy. Poznatky prezentované v této kapitole vycházejí z knihy [8].

Holografie je dvoustupňový proces. Prvním krokem je vytvoření holografického záznamu, což je interferenční obrazec vzniklý interferencí mezi předmětovou O a referenční R vlnou. Podmínky vzniku interferenčního obrazce jsme již diskutovali v předchozí kapitole, nyní budeme pro jednoduchost uvažovat úplnou koherenci světelných vln. Za této podmínky lze rozložení intenzity v rovině záznamu hologramu rozepsat ve tvaru

$$I_H = |O|^2 + |R|^2 + OR^* + RO^*, \quad (14)$$

kde $|O|^2$ a $|R|^2$ jsou intenzity předmětové a referenční vlny. O těchto intenzitách mluvíme jako o členech nultého difrakčního řádu a o dvou zbylých výrazech v rovnici (14) jako o interferenčních členech. Intenzitou (14) je exponována fotografická deska a dále chemickými postupy vyroben tenký optický transparent. Nezbytnou podmínkou je předpoklad linearit mezi intenzitou interferenčního obrazce a propustností transparentu. Pro potřeby další diskuze budeme předpokládat, že propustnost je úměrná intenzitě.

Posvítíme-li na transparent rekonstrukční vlnou S , bude komplexní amplituda U_H rekonstruované vlny v rovině hologramu rovna výrazu

$$U_H = SI_H = S|U|^2 + S|R|^2 + SOR^* + SRO^*. \quad (15)$$

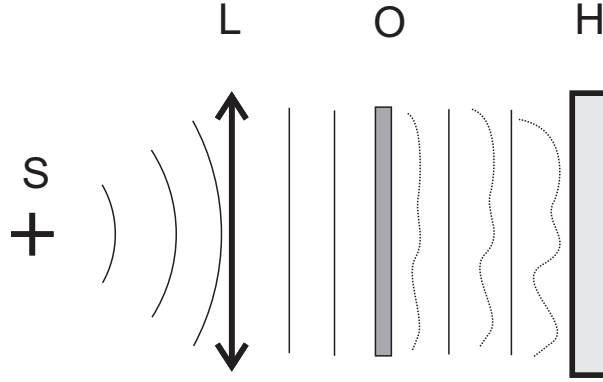
Třetí člen ve vztahu (15) obsahuje původní předmětovou vlnu a čtvrtý člen komplexně sdruženou repliku této vlny. Pokud je rekonstrukční vlna identická s vlnou referenční (resp. komplexně sdružená vlně referenční) a intenzita této vlny je v rovině záznamu konstantní, bude třetí (resp. čtvrtý) člen generovat virtuální (resp. reálný) obraz předmětu.

Zásadní problém a omezení holografie spočívá ve skutečnosti, že rekonstruovaný obraz předmětu, vytvořený jedním z interferenčních členů, bude překryt příspěvkem, které jsou generovány difrakčními členy nultého řádu a druhým interferenčním členem. Toto překrytí způsobuje degradaci obrazu.

V další kapitole krátce prodiskutujeme základní geometrická uspořádání záznamu hologramu, zvláště pak se zaměříme na použitelnost těchto metod.

2.4.1 Gaborův hologram

První geometrické uspořádání holografického záznamu bylo navrženo Gaborem. Jelikož v tomto uspořádání dopadá referenční vlna kolmo na hologram, mluvíme často o Gaborově holografii jako o osově holografii. Záznam i rekonstrukce hologramu je uskutečněna rovinnou vlnou, jejíž intenzita má v rovině záznamu hologramu konstantní průběh. Obrázek 1 znázorňuje geometrické uspořádání záznamu. Čočka L kolimuje sférickou vlnu pocházející z bodového zdroje za vzniku rovinné referenční vlny. Ta dopadá na předmět s velkou propustností t . Při průchodu vlny předmětem dojde u části světla k rozptylu a vzniku předmětové vlny. Obě vlny se šíří současně v prostoru za předmětem, dopadají na fotografickou desku, kde spolu interferují za vzniku interferenčního obrazce. Pokud



Obrázek 1: Sestava pro záznam Gaborova hologramu.

na vyrobený transparent posvítíme rovinnou rekonstrukční vlnou, můžeme komplexní amplitudu v rovině záznamu hologramu psát ve tvaru

$$U_H(x, y) = R|R|^2 + R|O(x, y)|^2 + |R|^2 O(x, y) + R^2 O^*(x, y). \quad (16)$$

Jestliže uvažujeme průsvitný předmět se speciální transparencí

$$t = t_0 + \Delta t, \Delta t \ll t_0, \quad (17)$$

kde t_0 je střední transparencí, dojdeme k závěru, že

$$|O| \ll |R| \quad (18)$$

a je tedy možné druhý člen v rovnici (16) zanedbat oproti ostatním. Pokud bychom naopak zvolili předmět s velkou absorbcí, tento člen by převládl nad interferenčními, což by znemožnilo kvalitní rekonstrukci. V této geometrii záznamu je tedy možné zobrazovat pouze předměty s velkou propustností.

Podstatný problém pochází z přítomnosti komplexně sdruženého obrazu. Z tohoto důvodu bylo navrženo uspořádání prezentované v dalším textu, které tento problém řeší změnou geometrie záznamu.

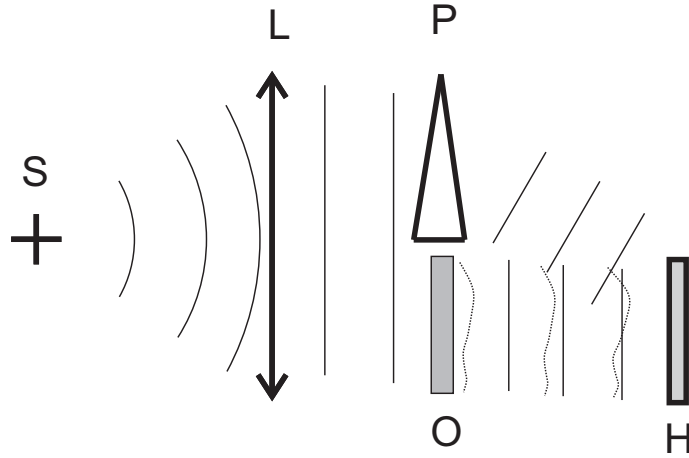
2.4.2 Leithův-Upatnieksův hologram.

Na obrázku 2 je znázorněna geometrie záznamu. Světlo z bodového zdroje S je kolimováno čočkou L. Na rozdíl od Gaborova hologramu dopadá na předmět pouze část referenční vlny. Zbývající část vlny je odkloněna hranolem P tak, aby na detektor dopadala pod úhlem 2θ . Z tohoto důvodu mluvíme o této geometrii záznamu také jako o mimoosové. Rozložení intenzity na detektoru je pak dáno interferencí předmětové vlny a nakloněné rovinné referenční vlny, kterou lze zapsat ve tvaru

$$R(x, y) = r e^{i\alpha y}. \quad (19)$$

Prostorová frekvence α souvisí s náklonem vlny vztahem

$$\alpha = \sin 2\theta / \lambda. \quad (20)$$



Obrázek 2: Sestava pro záznam Leithova-Upatnieksova hologramu.

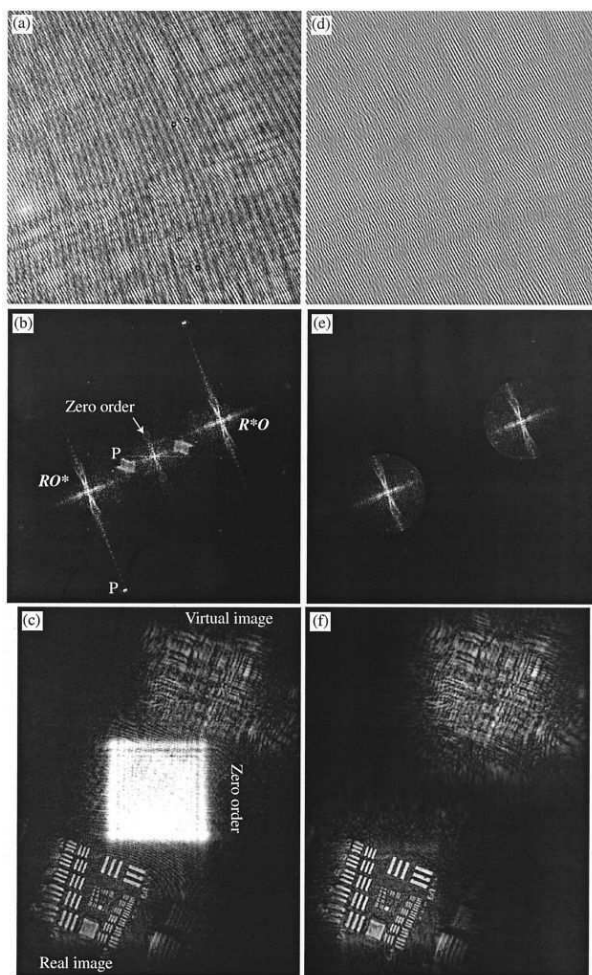
Po dosazení referenční vlny do výrazu (14) získáme intenzitu v rovině záznamu hologramu

$$I_H(x, y) = |r|^2 + |O(x, y)|^2 + r^* e^{-i2\pi\alpha y} O(x, y) + r e^{i2\pi\alpha y} O(x, y)^*. \quad (21)$$

Zásadní výhoda této geometrie spočívá v prostorové separaci ostrého obrazu od příspěvků, které přísluší nežádoucím členům ve vztahu (21).

Hlavní myšlenka je založena na principu šíření jednotlivých komponent vztahu (21) při rekonstrukci rovinnou vlnou. První člen pouze vynásobí amplitudu rovinné rekonstrukční vlny konstantním faktorem. Druhý člen generuje vlnu, kterou si lze představit jako superpozici rovinných vln šířících se pod různými úhly vzhledem k ose. Třetí člen vytváří za hologramem v obrazové rovině rozostřený komplexně sdružený obraz předmětu, který je vlivem nosné frekvence α odkloněn od optické osy o úhel 2θ . Čtvrtý člen potom generuje za hologramem reálný ostrý obraz předmětu. Tento obraz je nyní odkloněn od optické osy o úhel -2θ . K separaci obrazu dojde, pokud nosná frekvence α referenční vlny je dostatečně velká v porovnání s maximální frekvencí předmětové vlny.

Na obrázku 3 je znázorněno numerické odstranění vlivu nežádoucích členů filtrací spektra mimoosově zaznamenaného hologramu.



Obrázek 3: Odstranění vlivu nežádoucích členů z hologramu. (a) Mimoosově zaznamenaný hologram, (b) spektrum hologramu, (c) rekonstrukce obrazu, (d) filtrovaný hologram, (e) spektrum filtrovaného hologramu, (f) výsledná rekonstrukce [12].

2.5 Digitální holografie

Digitální holografie je moderní zobrazovací technika založená na stejném principu jako holografie optická. Záznam hologramu může být proveden jak v osové, tak v mimoosové geometrii. Zásadní rozdíl spočívá v nahrazení fotografického záznamu CCD kamerou. Interferenční obrazec je zaznamenán v digitální podobě, data jsou uložena do počítače a dále zpracována pomocí numerických rekonstrukčních algoritmů. Numerická rekonstrukce obrazu přináší řadu výhod. Odpadá zdlouhavý proces výroby transparentu, což celou metodu v tomto přístupu zrychluje a zjednodušuje [11].

Na druhou stranu digitální holografie přebírá problémy spojené s přítomností nežádoucích členů v rovnici (14), které způsobují degradaci obrazu. Nabízí však nové možnosti, jak tyto problémy řešit.

Separace ostrého obrazu od příspěvků ostatních parazitních členů byla úspěšně vyřešena již v rámci optické holografie změnou geometrie záznamu. V digitální holografii je proces prostorové separace ostrého obrazu proveden velice elegantně numericky filtraceí

spektra [12].

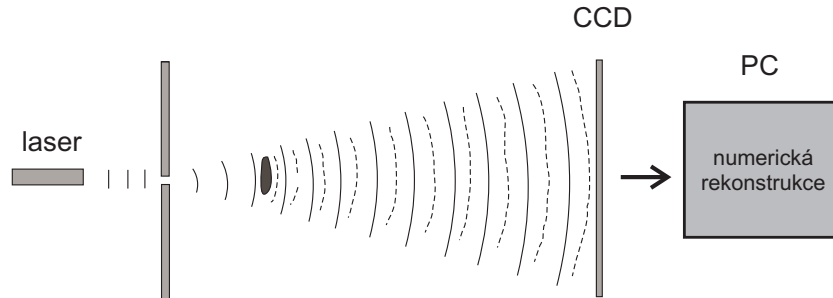
Osová geometrie záznamu teoreticky dosahuje pro danou CCD kameru vyššího rozlišení než mimoosová geometrie [13]. Proto je v určitých případech výhodné setrvat u osově geometrie. Pomocí numerických algoritmů můžeme za jistých předpokladů vliv komplexně sdruženého obrazu potlačit. Tato problematika je řešena v článku [14] a my ji stručně zmíníme v dalším textu.

Názorným příkladem výhod digitální holografie je numerické odečtení prvního členu v rovnici (14), který reprezentuje intenzitu referenční vlny. Mimo holografický záznam provedeme ještě jeden záznam samotné referenční vlny. Odečtením obou intenzit získáme hologram bez přítomnosti tohoto členu

$$\tilde{I} = I - |R|^2. \quad (22)$$

Důležitost tohoto procesu zvláště oceníme v digitální osově holografické mikroskopii, kde se používá sférická referenční vlna. Tímto postupem jsou navíc odstraněny případné nečistoty na CCD kamere [7].

2.5.1 Digitální osová holografická mikroskopie



Obrázek 4: Typické uspořádání pro záznam hologramu v geometrii DIHM.

DIHM je nová mikroskopická technika, která přebírá výhody optické holografie (uložení informace o třírozměrné struktuře předmětu na dvourozměrný hologram) i digitální holografie (jednoduchá praktická numerická rekonstrukce). Metoda na rozdíl od těch klasických umožňuje v reálném čase sledovat pohyb i více mikroskopických předmětů v trojrozměrném objemu. Navíc odpadá nutnost barvení vzorků, které by živý organismus usmrtilo. Z těchto důvodů má DIHM široké uplatnění především v biologii [7, 11, 15, 16].

Základní principy této metody popsal Denis Gabor již v článku [1], který se stal základním kamenem celé holografie. Z praktických důvodů se tato technika začala plně rozvíjet až ve spojení s digitální holografií.

Sestava pro DIHM je velice jednoduchá. Neobsahuje žádné zobrazovací prvky a využívá pouze laseru, velmi malé vstupní clony a CCD kamery. Gaussovský svazek laseru je ostře fokusován na clonu. Jestliže je clona dostatečně malá, můžeme ji považovat za dobrý zdroj sférické referenční vlny. Blízko za clonou je umístěn propustný nebo polopropustný předmět. Při průchodu referenční vlny předmětem dochází k rozptylu světla. Rozptyl referenční vlny si můžeme představovat tak, že každý bod předmětu se stává sekundárním zdrojem, který je koherentní s původní vlnou. V prostoru za předmětem se současně

s referenční vlnou šíří také předmětová vlna vzniklá rozptylem referenční vlny. Tyto vlny dopadají na CCD kameru, kde je následně zaznamenán interferenční obrazec [7].

Rozlišovací schopnost této metody je diskutována v [7]. V [17] je prezentován způsob, jak toto rozlišení vylepšit vyplněním prostoru mezi CCD kamerou a zdrojem referenční vlny kapalinou s vyšším indexem lomu.

Za zmínku také stojí uspořádání, které nahrazuje koherentní laser zdrojem částečně nekoherentního světla. Práce [18] a [19] diskutují ztrátu rozlišení takového systému.

3 Rekonstrukce obrazu a výpočet bodové rozptylové funkce

Rekonstruovat předmět v holografii znamená získat z dvourozměrného hologramu třírozměrný obraz předmětu. Digitální rekonstrukce probíhá numericky v počítači na základě analogie s rekonstrukcí optickou, která byla diskutovaná výše v textu. Hologram (data ze CCD kamery) je nejprve numericky vynásoben rekonstrukční vlnou a takto vzniklá komplexní amplituda je dále šířena do prostoru za hologramem, což v praxi znamená řešení difrakčního integrálu. Souvislost mezi předmětovou a obrazovou vzdáleností, která nám určuje polohu obrazu při rekonstrukci, budeme diskutovat později.

V této kapitole podrobně odvodíme příčný a podélný profil PSF, která nám poslouží k odvození dvoubodového rozlišovacího kritéria. Jelikož pouze jeden z členů v rovnici (14) generuje v dané rekonstrukci obraz předmětu, pro názornost ostatní rušivé členy zanedbáme. Rekonstrukci provedeme jen s interferenčním členem, který obsahuje komplexně sdruženou předmětovou vlnu. Abychom do modelu zahrnuli konečné rozměry detektoru, vynásobíme hologram funkcí $h(x, y)$. Tato funkce působí v rovině holografického záznamu jako clona. Nejjednodušším způsobem, jak rekonstrukci provést, je nejprve vynásobit hologram komplexně sdruženou referenční vlnou (touto speciální volbou rekonstrukční vlny se vyhneme škálování obrazových souřadnic). Komplexní amplitudu lze v této rovině za výše uvedených podmínek psát ve tvaru

$$U_H(x, y) = h(x, y) |R(x, y)|^2 O^*(x, y). \quad (23)$$

Abychom odvodili tvar PSF, uvažujme předmětovou vlnu ve tvaru sférické vlny. Označme (u, v) příčné souřadnice bodového zdroje této vlny a z vzdálenost od roviny, kde je hologram zaznamenán. Jestliže vzdálenost z je ve srovnání s příčnými rozměry detektoru velká, lze ve Fresnelově aproximaci nahradit sférickou vlnu paraboloidní a difrakční integrál psát pomocí konvoluce komplexní amplitudy s funkcí impulzové odezvy volného prostoru (její Fresnelovou aproximací),

$$U(x', y', z') = U_H(x, y) \otimes g(x, y, z'). \quad (24)$$

Dosadíme-li komplexní amplitudu (23) do výrazu (24), můžeme rovnici rozepsat v integrálním tvaru

$$U(x', y', z') = A \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \int h(x, y) e^{-ik(ax^2+bxx)} e^{-ik(ay^2+b_yy)} dx dy, \quad (25)$$

kde koeficienty A , b_x a b_y jsou rovny

$$a = \frac{1}{2z} - \frac{1}{2z'}, \quad (26)$$

$$b_x = -\frac{u}{z} + \frac{x'}{z'}, \quad (27)$$

$$b_y = -\frac{v}{z} + \frac{y'}{z'}, \quad (28)$$

$$A = i \frac{\exp(ikz') |O|}{\lambda z'} |R|^2 \exp \left\{ -ik \left(z + \frac{u^2 + v^2}{2z} \right) \right\}. \quad (29)$$

Zde jsme předpokládali, že intenzita referenční vlny nezávisí na integračních proměnných. Odvozené výsledky budou obecně platné pro osovou holografii a pro holografii se sférickou referenční vlnou DIHM (ve Fresnelově aproximaci). V mimoosové holografii je rekonstrukce uskutečněna nenakloněnou rovinnou vlnou. Referenční vlna bude v rekonstrukci figurovat, avšak tvar a parametry PSF zůstanou nezměněné (lineární faktor v argumentu exponenciály posouvá pouze obrazové souřadnice).

3.1 Geometrické přiblížení

Položíme-li ve vztahu (25) koeficient a roven nule, kvadratický člen v exponenciále se tímto eliminuje a vztah přejde na škálovanou Fourierovu transformaci clonové funkce $h(x, y)$. Tuto podmínku splníme speciální volbou polohy zastavovací roviny $z' = z$.

Význam této volby vynikne v limitním případě, kdy komplexní amplituda není v holografické rovině prostorově omezena a za aperturní funkci ve vztahu (25) tedy můžeme dosadit konstantní funkci $h = 1$, představující homogenní propustnost v celé rovině. Za tohoto předpokladu získáme řešení integrálu (25) ve tvaru Diracovy δ funkce

$$U(x', y', z') = A\delta(b_x, b_y). \quad (30)$$

Z podmínek $b_x = 0$, $b_y = 0$ a z předpokladu $a = 0$ obdržíme polohu maxima této funkce,

$$x_o = u, \quad (31)$$

$$y_o = v, \quad (32)$$

$$z_o = z. \quad (33)$$

Za povšimnutí stojí skutečnost, že předmětový bod o příčné poloze (u, v) , který se nachází v předmětové vzdálenosti z , se zobrazí na bod o příčných souřadnicích (x_o, y_o) a obrazové vzdálenosti z_o . V limitním případě je tedy splněna jednoznačnost přiřazení mezi předmětovou rovinou a speciálně zvolenou zastavovací rovinou, jejíž poloha plyne z podmínky $a = 0$. Tato rovina je rovinou ostrého obrazu a z tohoto důvodu ji budeme dále nazývat obrazovou rovinou.

Navrátíme-li se zpět k obecné aperturní funkci, můžeme vztah mezi předmětovou a obrazovou rovinou dále zjednodušit. S ohledem na skutečnost, že koeficienty u, v pouze posouvají střed Fourierovy transformace, získáme transformaci přímo ve tvaru Fourierovy transformace

$$U(f_x, f_y) = A \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} h(x, y) e^{-i2\pi(f_x x + f_y y)} dx dy, \quad (34)$$

kde frekvenční proměnné závisí na obrazových proměnných vztahy $f_x = (x' - u) / (\lambda z)$ a $f_y = (y' - v) / (\lambda z)$.

Doposud jsme diskutovali pouze rekonstrukci, při které byla rekonstrukční a referenční vlna zvolena identicky. Jestliže je záznam proveden pomocí paraboloidní referenční vlny a rekonstrukce pomocí vlny rovinné, vztahy (31), (32) a (33) již platit nebudou. V tomto případě dojde ke škálování obrazových souřadnic faktorem

$$\beta = d / (d - z), \quad (35)$$

kde z je předmětová vzdálenost a d vzdálenost zdroje paraboloidní vlny a roviny v níž je pořízen holografický záznam. Pro polohu Diracovy δ -funkce v tomto případě obdržíme

$$x_o = \beta u, \quad (36)$$

$$y_o = \beta v, \quad (37)$$

$$z_o = \beta z. \quad (38)$$

3.2 Kruhová clona

Příčný a podélný profil PSF v jednoduchém analytickém tvaru získáme, jestliže vlnu v rovině holografického záznamu příčně omezíme kruhovou aperturní funkcí odpovídající homogenně propustné kruhové cloně

$$h(x, y) = \text{circ} \left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{L} \right). \quad (39)$$

Tuto funkci dosadíme do výrazu (34) a vzhledem k symetrii přejdeme do polárních souřadnic s radiální souřadnicí r' . Tvar PSF se nezmění, jestliže uvažujeme zobrazení osového bodu. Příčný průběh normované intenzity v obrazové rovině pak dostaneme v jednodušším tvaru

$$I_N(r', z_o) = \text{jinc}^2 \left(\frac{NA}{\lambda} r' \right), \quad (40)$$

kde NA je numerická apertura daná vztahem $NA = L/z$.

Pro průběh normované intenzity při malém rozostření obrazu ($\Delta_{z_o} \ll z_o$) podél optické osy obdržíme

$$I_N(0, z') = \text{sinc}^2 \left(\frac{NA^2}{2\lambda} \Delta_{z_o} \right). \quad (41)$$

Funkce sinc a jinc jsou definovány vztahy $\text{sinc} = \sin \pi x / (\pi x)$ a $\text{jinc} = 2J_1(2\pi x) / (2\pi x)$.

3.3 Obdélníková clona

S ohledem na obvyklý tvar účinné plochy CCD je vhodné výpočet provést také pro obdélníkovou clonu

$$h(x, y) = \text{rect} \left(\frac{x}{2L} \right) \text{rect} \left(\frac{y}{2L} \right). \quad (42)$$

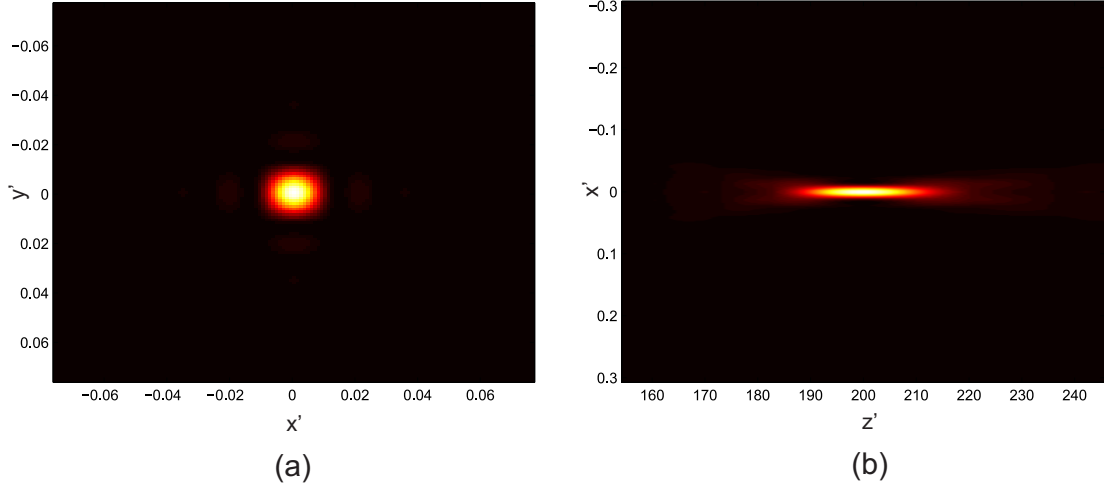
Dále postupujeme stejně jako v předchozím případě. Pro příčný intenzitní průběh zaostřeného obrazu získáme

$$I_N(x', y', z_o) = \text{sinc}^2 \left(2 \frac{NA}{\lambda} x' \right) \text{sinc}^2 \left(2 \frac{NA}{\lambda} y' \right) \quad (43)$$

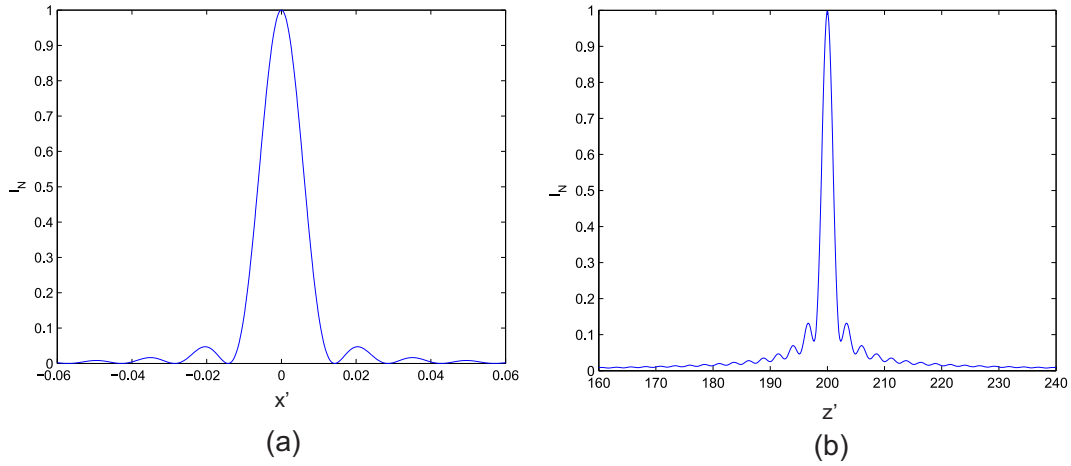
a intenzitní průběh při malém rozostření obrazu ($\Delta_{z_o} \ll z_o$) podél optické osy bude dán vztahem

$$I_N(0, 0, z') = \frac{C(T)^2 + S(T)^2}{T^2}. \quad (44)$$

Symbols $C(T)$ a $S(T)$ značí Fresnelovy integrály s argumentem $T = \sqrt{\frac{2NA^2}{\lambda} |\Delta_{z_o}|}$.



Obrázek 5: Rozložení normované intenzity při zobrazení bodu (obdélníková clona): (a) příčný řez rovinou (x', y') , (b) podélný řez rovinou (x', z') .



Obrázek 6: Rozložení normované intenzity při zobrazení bodu (obdélníková clona): (a) závislost na příčné obrazové souřadnici x' , (b) závislost na podélné obrazové souřadnici z' .

Na obrázku 5 je znázorněn dvourozměrný příčný (a) a podélný (b) profil PSF, vytvořený pomocí numerického modelu DIHM ($NA=0,02$, $\lambda=633$ nm). Na obrázku 6 jsou pak pro srovnání teoreticky odvozené jednorozměrné grafy funkcí (43) (a) a (44) (b) pro stejné hodnoty numerické apertury a vlnové délky, které byly použity v numerickém modelu. Obrazové souřadnice jsou uvedeny v milimetrech.

3.4 Clona s Gaussovskou propustností

Předpokládejme nyní aperturní funkci ve tvaru neomezené Gaussovské funkce

$$h(x, y) = \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{L^2}\right). \quad (45)$$

Směrodatnou odchylku volíme $\sigma = L/2$. Po dosazení do (34), s využitím stejných předpokladů jako v předchozí části, se výrazy intenzitních průběhů zjednoduší. Pro příčný intenzitní průběh v obrazové rovině dostaneme Gaussovskou funkci

$$I_N(r', z_0) = e^{-(\pi \frac{NA}{\lambda} r')^2} \quad (46)$$

a pro intenzitní průběh při rozostření podél osy získáme Lorentzovu funkci

$$I_N(0, z') = \left[1 + \left(\frac{\pi NA^2}{2\lambda} |\Delta_{z_0}| \right)^2 \right]^{-1}. \quad (47)$$

3.5 Dvoubodové rozlišení

Důležitou vlastností zobrazovacího systému je rozlišení dvojice předmětových bodů. Jelikož při zobrazení v koherentním světle není intenzita obrazu dvou předmětových bodů dána pouhým součtem jejich dílčích intenzit, je diskuze dvoubodového rozlišení takového zobrazovacího systému obecně netriviální záležitostí. Užitečným odhadem však mohou být kritéria používaná pro nekoherentní osvětlení. S touto problematikou úzce souvisí bodová rozptylová funkce, resp. pološířky jejího příčného a podélného řezu. Tyto parametry jsou vždy definovány jako pološířky difrakční stopy, jejíž okraj je určen poklesem PSF na jistou hodnotu. Pološířku příčného a podélného profilu PSF určíme poklesem této funkce na nulu (pro sinc a jinc funkce) nebo na hodnotu $\frac{1}{e^2}$ (pro exponenciální další funkce).

Srovnáme-li výsledky předchozích částí, kde jsme určili profily PSF pro různé clonové funkce, jednotlivé funkce mají různý tvar, ale vždy se v nich objevuje stejný argument. V případě příčného profilu to je výraz NA/λ a pro podélný profil NA^2/λ .

Budeme-li uvažovat obdélníkovou clonu, snadno odvodíme příslušnou pološířku příčného profilu

$$\rho = \frac{\lambda}{2NA} \quad (48)$$

a podélného profilu

$$\delta \approx 1.7 \frac{\lambda}{2NA^2}. \quad (49)$$

Těmto výsledkům odpovídá dvoubodové kritérium příčného

$$|r_2 - r_1| \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad (50)$$

a podélného rozlišení

$$|z_2 - z_1| \geq 1.7 \frac{\lambda}{2NA^2}, \quad (51)$$

kde $|r_2 - r_1|$ a $|z_2 - z_1|$ je příčná a podélná vzdálenost dvou předmětových bodů. Odvozená kritéria jsou plně ve shodě s výsledky [7], uvážíme-li aproximaci NA.

Příčné rozlišení úzce souvisí s maximální přenesenou frekvencí v zobrazovacím systému. Dosadíme-li do rovnice (34) clonovou funkci (42), získáme pro maximální obrazovou frekvenci vztah

$$f_{xmax} = \frac{NA}{\lambda}. \quad (52)$$

Problematika rozlišení v DIHM je podrobněji diskutována např. v [18] nebo [19]. Tyto články řeší zobrazování v částečně koherentním světle.

3.6 Vliv rozměru vstupní clony na rozlišení

V předchozí části byla diskutována kritéria rozlišení dvou předmětových bodů. Ukázali jsme, že tato kritéria budou identická pro záznam s rovinnou i paraboloidní referenční vlnou.

V DIHM osvětlujeme kruhovou vstupní clonu Gaussovským svazkem. Pokud je clona dostatečně malá, lze ji považovat za dobrý zdroj sférické vlny (v naší aproximaci paraboloidní vlny). V dalším textu budeme analyzovat vliv větších rozměrů vstupní clony na rozlišení. Vliv rozměru vstupní clony zahrneme do modelu, jestliže za referenční vlnu zvolíme Gaussovský svazek tak, aby jeho pas ležel v místě vstupní clony a jeho průměr odpovídal příčným rozměrům clony. Komplexní amplituda referenční vlny bude mít potom v rovině záznamu hologramu rozložení [9]

$$R(x, y) = \frac{A_0 W_0}{W(d)} \exp \left\{ -\frac{x^2 + y^2}{W^2(d)} - ikd - ik \frac{x^2 + y^2}{2R(d)} + i\zeta(d) \right\}, \quad (53)$$

kde R , W , W_0 popisují poloměr křivosti vlnoplochy, pološířku svazku a pološířku pasu. Parametr ζ představuje fázové zpoždění vzhledem k rovinné vlně. Pro tyto veličiny platí vztahy [9]:

$$W_0 = \sqrt{\frac{\lambda d_0}{\pi}}, \quad (54)$$

$$W(d) = W_0 \left[1 + \left(\frac{d}{d_0} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (55)$$

$$R(d) = d \left[1 + \left(\frac{d_0}{d} \right)^2 \right], \quad (56)$$

$$\zeta(d) = \operatorname{arctg} \left(\frac{d}{d_0} \right), \quad (57)$$

kde d_0 je Rayleighova vzdálenost.

Nyní již nelze před rekonstrukcí odstranit vliv referenční vlny tak, jak jsme to provedli v předchozím případě. Argument exponenciály Gaussovského svazku lze však rozdělit na reálnou a imaginární část. Zatímco imaginární část pouze škáluje obrazové souřadnice, reálná část tlumí komplexní amplitudu v okrajové části roviny holografického záznamu, kde je uložena informace o vyšších frekvencích. Tato část argumentu tak bude mít přímý vliv na rozlišení. Další úvahu si značně zjednodušíme, jestliže odstraníme škálování tím, že hologram vynásobíme komplexně sdruženou částí referenční vlny nesoucí exponenciálu s imaginární jednotkou. Abychom byli schopni provést výpočet příčného a podélného profilu PSF analyticky, uvažujme Gaussovskou clonu roviny holografického záznamu (45). Komplexní amplitudu v rovině holografického záznamu lze za výše uvedených podmínek psát ve tvaru

$$U_H(x, y) = \frac{A_0 W_0}{W(d)} \exp \left\{ -\frac{x^2 + y^2}{W^2(d)} \right\} \exp \left\{ -2 \frac{x^2 + y^2}{L^2} \right\} O^*(x, y). \quad (58)$$

Dosazením (58) do (24) získáme analogii vztahu (25)

$$U(x', y', z') = A \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\{-(a_R + ika_I)x^2 - ikb_x x\} dx \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\{-(a_R + ika_I)y^2 - ikb_y y\} dy, \quad (59)$$

kde $(a_R + ia_I)$, b_x , b_y a A je rovno

$$a_R + ia_I = \left(\frac{1}{W^2} + \frac{2}{L^2} \right) + i \left(\frac{1}{2z} - \frac{1}{2z'} \right), \quad (60)$$

$$b_x = -\frac{u}{z} + \frac{x'}{z'}, \quad (61)$$

$$b_y = -\frac{v}{z} + \frac{y'}{z'}, \quad (62)$$

$$A = i \frac{\exp(ikz')}{\lambda z'} \frac{|O|}{z} \frac{A_0 W_0}{W(d)} \exp \left\{ -ik \left(z + \frac{u^2 + v^2}{2z} \right) \right\}. \quad (63)$$

Pokud je vzdálenost roviny holografického záznamu od pasu Gaussovského svazku mnohem větší než Rayleighova vzdálenost svazku, můžeme přibližně psát $W(d) = \lambda d / (\pi W_0)$. Položíme-li $a_I = 0$, eliminujeme tím imaginární kvadratický člen v exponenciále a obdržíme příčný intenzitní průběh ostrého obrazu

$$I_N(r', zo) = \exp \left[- \left(\frac{\pi NA}{\lambda} r' \right)^2 \right], \quad (64)$$

kde NA je zobecněná numerická apertura

$$1/NA = \frac{z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{\pi W_0}{\lambda d} \right)^2 + \frac{2}{L^2}}. \quad (65)$$

Intenzitní průběh pro malé rozostření podél osy dostáváme ve tvaru

$$I_N(0, 0, z') = \left[1 + \left(\frac{\pi NA^2}{2\lambda} |\Delta_{zo}| \right)^2 \right]^{-1}. \quad (66)$$

Příčný intenzitní průběh ostrého obrazu a intenzitní průběh pro malé rozostření podél osy mají stejný tvar v porovnání s příslušnými vztahy pro paraboloidní referenční vlnu. Numerickou aperturu jsme zobecnili tak, aby zahrnovala rozměr vstupní apertury. Dosadíme-li tuto numerickou aperturu do (50), dostáváme zobecněné kritérium příčného rozlišení dvou předmětových bodů.

$$|r_2 - r_1| \geq \frac{z}{d} W_0 \sqrt{1 + 2 \left(\frac{\lambda d}{\pi L W_0} \right)^2}. \quad (67)$$

Budeme-li vstupní aperturu zmenšovat $W_0 \rightarrow 0$, numerická apertura limitně přechází na tvar $NA = L/z$ a dostáváme kritérium příčného rozlišení (50) z předchozí kapitoly.

Tento model je tedy konzistentní s modelem pro idealizovanou paraboloidní referenční vlnu.

Naopak pro velké rozměry vstupní apertury $(\pi W_o/\lambda d)^2 \gg 1/L^2$ lze odmocninu ve vztahu (67) rozvést v řadu. Zanedbáme-li všechny členy rozvoje až na první, dostaneme příčné rozlišovací kritérium

$$|r_2 - r_1| \geq \frac{z}{d} W_o. \quad (68)$$

Jestliže je vzdálenost zdroje referenční vlny a předmětového bodu v porovnání se vzdáleností d malá, potom $z/d \approx 1$ a rozlišovací mez bude rovna pouze poloměru vstupní clony.

4 Základní rekonstrukční algoritmy

V následující kapitole stručně zmíníme základní numerické přístupy k řešení difrakčního integrálu (8). Podstatou těchto algoritmů je vhodné využití Fourierovy transformace, kterou lze numericky velmi efektivně provést pomocí tzv. rychlé Fourierovy transformace (FFT- Fast Fourier Transform). Tyto algoritmy mají zásadní význam pro numerickou rekonstrukci obrazu v digitální holografii, kde je na základě znalosti komplexní amplitudy v rovině holografického záznamu nutné numericky vypočítat komplexní amplitudu před nebo za touto rovinou. Vzhledem k širšímu využití těchto algoritmů budeme rovinu, v níž byl pořízen holografický záznam, nazývat zdrojovou rovinou. Pro přehlednost zachováme dosavadní značení souřadnic, ale tam, kde to bude výhodné, použijeme vektory

$$\mathbf{r} = x\mathbf{i} + y\mathbf{j}, \quad (69)$$

$$\mathbf{r}' = x'\mathbf{i} + y'\mathbf{j}, \quad (70)$$

kde \mathbf{r} je polohový vektor zdrojové a \mathbf{r}' zastavovací roviny ($|\mathbf{r}| = r$, $|\mathbf{r}'| = r'$). Vzorkování těchto rovin označme Δ a Δ' a symbolem N počet vzorků. Vztah mezi vzorkováním zdrojové a zastavovací roviny je zásadním kritériem při volbě vhodného algoritmu. Jak ukážeme v další kapitole, v důsledku nekorektního vzorkování dochází k degradaci obrazu.

Difrakční integrál lze řešit v různých aproximacích. Nejprve se zaměříme na algoritmy využívající Fresnelovy aproximace. Ukážeme, že existují dva různé tvary Fresnelovy aproximace difrakčního integrálu. První tvar je založen na rozkladu exponenciály uvnitř integrálu a druhý využívá konvoluční teorém. Tato problematika je podrobněji řešena v [20]. V první části kapitoly budeme z této literatury vycházet (jednostupňové a dvoustupňové šíření, konvoluční metoda). V závěru kapitoly popíšeme Kirchhoffův-Helmholtzův rekonstrukční algoritmus [21] vyvinutý speciálně pro rekonstrukci obrazu v DIHM a využívající specifickou aproximaci.

4.1 Jednostupňové a dvoustupňové šíření

Podstata tohoto přístupu spočívá v rozkladu kvadratického členu uvnitř Fresnelovy aproximace difrakčního integrálu

$$U(x', y', z') = \frac{\exp(ikz')}{i\lambda z'} \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \int U(x, y) \exp\left\{i\frac{\pi}{\lambda z'} \left[(x-x')^2 + (y-y')^2\right]\right\} dx dy. \quad (71)$$

Exponenciálu rozdělíme na tři části, přičemž ta s lineárním členem je identifikována jako jádro Fourierovy transformace. V první fázi tedy algoritmus provede Fourierovu transformaci

$$V(f_x, f_y, z') = F\left\{U(x, y) \exp\left[i\pi(x^2 + y^2)/(\lambda z')\right]\right\}, \quad (72)$$

kde $f_x = x'/\lambda z'$, $f_y = y'/\lambda z'$ jsou příslušné frekvence a F značí Fourierovu transformaci. Přechodem k souřadnicím zastavovací roviny a vynásobením (72) fázovým faktorem je získána požadovaná komplexní amplituda zastavovací roviny

$$U(x', y', z') = \frac{1}{i\lambda z'} \exp(ikz') \exp\left[i\pi(x'^2 + y'^2)/(\lambda z')\right] V(x', y', z'). \quad (73)$$

Základní vlastností tohoto algoritmu je vazba mezi vzorkováním zdrojové a pozorovací roviny

$$\Delta' = \frac{\lambda z'}{N\Delta}, \quad (74)$$

která nám neposkytuje příliš velký prostor pro volbu vzorkování zastavovací roviny. Důsledkem toho se může stát, že dané vzorkování nebude korektní.

Pro tyto případy byl vytvořen sofistikovanější algoritmus. Ze zdrojové roviny je komplexní amplituda nejprve šířena prostřednictvím výše popsaného algoritmu do roviny, jejíž polohu si vhodně zvolíme, a teprve poté šířena do zastavovací roviny. Jestliže vzdálenost pomocné roviny od zdrojové a zastavovací roviny označíme z'_1 a z'_2 , musí být splněna rovnost

$$z' = z'_1 + z'_2. \quad (75)$$

Pro z'_1 záporné je zahrnut i případ, kdy pomocná rovina leží před zdrojovou rovinou. Vzhledem k tomu, že vzorkování zdrojové a zastavovací roviny bylo v předchozím algoritmu určeno vztahem (74), pro dvoustupňové šíření dostáváme vztahy

$$\Delta_m = \frac{\lambda |z'_1|}{N\Delta}, \quad (76)$$

$$\Delta' = \frac{\lambda |z'_2|}{N\Delta_m}, \quad (77)$$

kde Δ_m je vzorkování pomocné roviny. Dosadíme-li nyní Δ_m do rovnice pro Δ' , obdržíme požadovaný vztah mezi vzorkováním zastavovací a zdrojové roviny

$$\Delta' = \left| \frac{z'_2}{z'_1} \right| \Delta. \quad (78)$$

Člen $|z'_2/z'_1|$ zde hraje roli škálovacího parametru. Vhodnou volbou vzdáleností z'_1 a z'_2 lze tedy měnit vzorkování zastavovací roviny.

4.2 Konvoluční metoda

Následující algoritmus opět vychází z Fresnelovy aproximace difrakčního integrálu (71), ale na rozdíl od předchozího přístupu je využit teorém o konvoluci, který tvrdí, že konvoluci lze zapsat jako inverzní Fourierovu transformaci součinu dvou funkcí. První je určena Fourierovou transformací konvolučního jádra a druhá je daná Fourierovou transformací funkce, která do konvoluce vstupuje. Vztah mezi komplexní amplitudou zastavovací a zdrojové roviny lze potom zapsat ve tvaru

$$U(x', y', z') = U(x, y) \otimes g(x, y, z) = F^{-1} \{ F(U) F(g) \}, \quad (79)$$

kde g je Fresnelova aproximace přenosové funkce volného prostoru (12). Tento vztah nám nicméně neposkytuje možnost ovlivňovat vzorkování v pozorovací rovině, jelikož vzorkování zastavovací roviny je pevně svázané se vzorkováním zdrojové roviny vztahem

$$\Delta' = \Delta. \quad (80)$$

Jak bylo popsáno výše, nemít pod kontrolou vzorkování může mít nepříjemné důsledky. Naší snahou bude zavést do algoritmu škálovací parametr m tak, aby $\Delta' = m\Delta$. Za tímto účelem přepíšeme integrál (71) do tvaru

$$U(\mathbf{r}', z') = \frac{e^{ikz'}}{i\lambda z'} \int_{-\infty}^{+\infty} U(x, y) \exp\left\{i\frac{\pi}{\lambda z'} |\mathbf{r}' - \mathbf{r}|^2\right\} d\mathbf{r}, \quad (81)$$

Kvadratický člen v exponenciále rozepíšeme

$$|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|^2 = m \left| \frac{\mathbf{r}'}{m} - \mathbf{r} \right|^2 - \left(\frac{1-m}{m} \right) r'^2 + (1-m)r^2 \quad (82)$$

a dosadíme zpět do integrálu, který dále upravíme do tvaru

$$U(\mathbf{r}', z') = \frac{\exp\left\{-i\frac{k}{2z'}\left(\frac{1-m}{m}\right)r'^2\right\}}{i\lambda z} \int_{-\infty}^{+\infty} U(\mathbf{r}_1) \exp\left\{i\frac{k}{2z'}(1-m)r^2\right\} \exp\left\{i\frac{km}{2z'} \left| \frac{\mathbf{r}'}{m} - \mathbf{r} \right|^2\right\} d\mathbf{r}. \quad (83)$$

Zavedeme-li substituci

$$\boldsymbol{\rho}' = \mathbf{r}'/m, \quad (84)$$

$$\zeta' = z'/m, \quad (85)$$

získáme opět tvar konvoluce

$$U(m\boldsymbol{\rho}') = \frac{e^{-i\frac{k}{2\zeta'}(1-m)r'^2}}{i\lambda\zeta'} \int_{-\infty}^{+\infty} U'(\mathbf{r}) \exp\left\{i\frac{k}{2\zeta'} |\boldsymbol{\rho}' - \mathbf{r}|^2\right\} d\mathbf{r}, \quad (86)$$

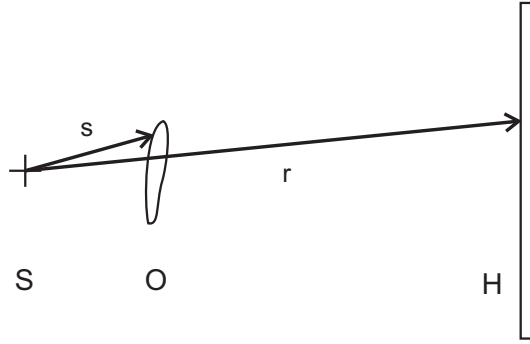
kde

$$U'(\mathbf{r}) = \frac{1}{m} U(\mathbf{r}) \exp\left\{i\frac{k}{2z'} m(1-m)r^2\right\}. \quad (87)$$

4.3 Kirchhoffův-Helmholtzův rekonstrukční algoritmus

V následujícím textu se seznámíme s algoritmem publikovaným v [21]. Tento algoritmus je přizpůsobený geometrii záznamu osového hologramu se sférickou referenční vlnou. Situace je znázorněna na obrázku 7, kde S značí zdroj sférické vlny, O zkoumaný předmět a H hologram. Pokud počátek souřadnic umístíme do zdroje sférické referenční vlny, polohy bodů předmětu a roviny, v níž je pořízen záznam hologramu, budou popsány vektory $\mathbf{s} = (u, v, w)$ a $\mathbf{r} = (x, y, d)$. Jestliže hologram vynásobíme komplexně sdruženou sférickou referenční vlnou, bude obraz předmětu při rekonstrukci generován před hologramem ve stejné vzdálenosti jako původní předmět $\mathbf{s}' = \mathbf{s}$, kde $\mathbf{s}' = (u', v', w')$ je vektor popisující polohu obrazu. Z obrázku 7 vyplývá, že pro malé předměty bude vzdálenost od zdroje k předmětu a tedy i k obrazu podstatně menší než vzdálenost k detektoru

$$|\mathbf{r}| \gg |\mathbf{s}| = |\mathbf{s}'|. \quad (88)$$



Obrázek 7: Vektory popisující polohu předmětu a hologramu v geometrii záznamu DIHM.

Nerovnost (88) je výchozím bodem specifické aproximace difrakčního integrálu (8). Přepíšeme-li rozdíl vektorů \mathbf{r} a \mathbf{s}' ve tvaru

$$|\mathbf{r} - \mathbf{s}'| = \sqrt{|\mathbf{r}|^2 + |\mathbf{s}'|^2 - 2\mathbf{r}\mathbf{s}'} \quad (89)$$

a dále provedeme rozvoj této odmocniny, za předpokladu (88) můžeme zanedbat členy vyššího řádu než prvního. Následně tak dostaneme aproximaci

$$|\mathbf{r} - \mathbf{s}'| \approx |\mathbf{r}| \sqrt{1 - 2\frac{\mathbf{r}\mathbf{s}'}{|\mathbf{r}|^2}} \approx |\mathbf{r}| \left[1 - \frac{\mathbf{r}\mathbf{s}'}{|\mathbf{r}|^2} \right]. \quad (90)$$

Dosazením této aproximace do difrakčního integrálu (8) a provedením transformace souřadnic

$$\xi = xd/|\mathbf{r}|, \quad (91)$$

$$\eta = yd/|\mathbf{r}|, \quad (92)$$

$$|\mathbf{r}| = \sqrt{x^2 + y^2 + d^2}, \quad (93)$$

získáme transformaci ve tvaru [21]

$$U(\mathbf{s}') = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} I'_H(\xi, \eta) \exp [ik(u'\xi + v'\eta)/d] d\xi d\eta, \quad (94)$$

kde

$$I'_H(\xi, \eta) = I_H(x(\xi, \eta), y(\xi, \eta)) (d/\psi)^4 \exp(ikw\psi/d) \quad (95)$$

a $\psi = \sqrt{d^2 - \xi^2 - \eta^2}$. Tutu transformaci lze numericky provést pomocí FFT algoritmu. Vzhledem k tomu, že k odvození výrazu (95) nebyla použita Fresnelova aproximace, pouze jsme předpokládali (88), lze tento algoritmus využít při rekonstrukci obrazu předmětu, který se nachází velmi blízko před hologramem (za hranicí Fresnelovy aproximace).

5 Diskretizace signálu

5.1 Vzorkovací teorém

V digitální holografii je hologram zaznamenán CCD kamerou, data jsou uložena do paměti počítače a dále zpracována pomocí rekonstrukčních algoritmů. Výsledkem je digitálně rekonstruovaný obraz předmětu. Vzhledem ke skutečnosti, že numerické algoritmy mohou ze své podstaty pracovat jen s konečným počtem dat, musíme brát v úvahu omezenou kapacitu paměti počítače. Již při samotném záznamu hologramu na CCD kameru dochází k vzorkování interferenčního obrazce, tj. původně spojitá dvourozměrná funkce je nahrazena obdélníkovou maticí konečného počtu prvků. Zde se nabízí otázka, jak blízko sebe data vzorkovat. Příliš husté vzorkování zbytečně zabírá paměť počítače a v konečném důsledku prodlužuje výpočetní čas. Naopak, jestliže zvolíme vzorkování řídké, ztrácíme část informace o původní funkci. V diskuzi vycházíme z [8].

V následující úvaze bez újmy na obecnosti předpokládejme spojitou jednorozměrnou funkci $g(x)$. Naší snahou bude nahradit omezenou funkci vektorem s co možná nejmenším počtem prvků za podmínky, že z vektoru lze vypočítat původní spojitou funkci pomocí interpolace.

Matematicky proces vzorkování popíšeme pomocí Diracova hřebene (funkce comb)

$$g_v(x) = \text{comb}\left(\frac{x}{\Delta}\right) g(x), \quad (96)$$

kde Δ je vzdálenost sousedních hodnot navzorkované funkce. Fourierova transformace výrazu (96) bude dána výrazem

$$G_s(f_x) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} G(f_x - \frac{n}{\Delta}), \quad (97)$$

kde $G(f_x)$ je Fourierova transformace g . Ze vztahu (97) je zřejmé, že spektrum vzorkované funkce je dáno součtem vzájemně posunutých spekter původní funkce. Tato spektra se obecně navzájem překrývají a dochází k degradaci obrazu. Předpokládejme existenci maximální frekvence tak, že platí $G(f_x) = 0$ pro $|f_x| > f_{max}$. Pokud je dále splněna nerovnost

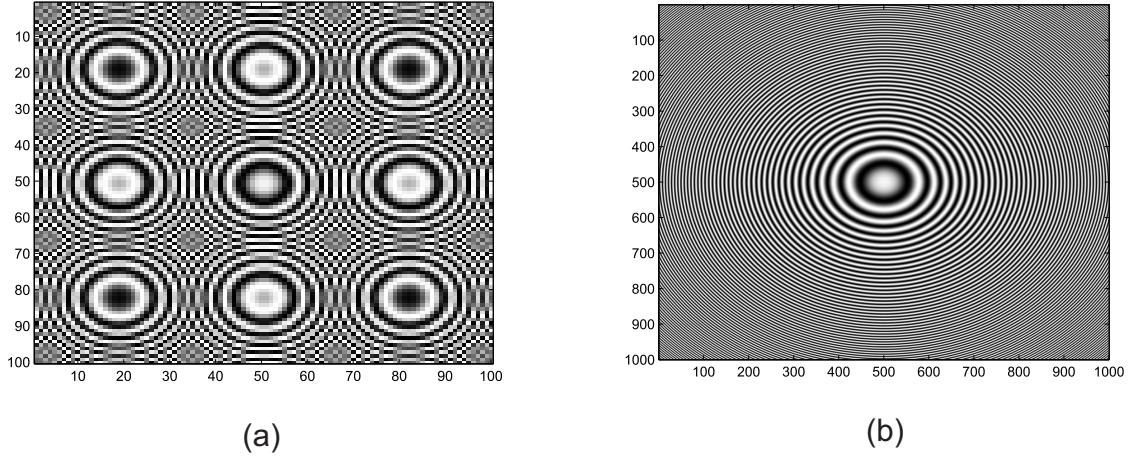
$$f_{max} \leq \frac{1}{2\Delta}, \quad (98)$$

budou jednotlivé posunuté kopie původního spektra navzájem separované a původní spektrum G můžeme obnovit filtrací. Vztah (98) nazveme vzorkovací podmínkou. Optimální vzorkování Δ získáme, jestliže nerovnost v podmínce (98) zaměníme za rovnost.

Whittaker-Shannonův teorém říká, že za podmínky (98) lze původní funkci získat ze vztahu

$$g(x) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} g\left(\frac{n}{2f_{max}}\right) \text{sinc}\left[2f_{max}\left(x - \frac{n}{2f_{max}}\right)\right]. \quad (99)$$

Pokud bude vzorkovací podmínka porušena, dochází k efektu, který nazýváme aliasing. Na obrázku 8 je demonstrován vznik tohoto jevu.



Obrázek 8: Záznam osového hologramu bodového předmětu při použití parametrů $z=400$ mm, $\lambda=633$ nm, $N\Delta=8,9$ mm: (a) nedostatečné vzorkování se vznikem aliasingu, $N=100$, (b) korektní vzorkování, $N=1000$.

5.2 Součin prostorové a frekvenční šířky signálu

Pokud je funkce $g(x, y)$ frekvenčně omezená a navíc lze zanedbat její hodnoty vně obdélníku

$$-x_{max} \leq x < x_{max}, -y_{max} \leq y < y_{max}, \quad (100)$$

existuje minimální množství vzorků potřebné k diskrétní reprezentaci funkce

$$SW = 16x_{max}y_{max}f_{xmax}f_{ymax}. \quad (101)$$

Tato veličina představuje součin prostorové a frekvenční šířky signálu [8] (SW Space-Bandwith product), poskytuje nám informaci o složitosti funkce a navíc je mírou kvality optického systému, který je schopný tuto funkci zpracovat.

5.3 Záznam hologramu a vzorkovací podmínka

Na začátku kapitoly jsme odvodili vzorkovací podmínku (98) a ukázali, že při porušení této nerovnosti dojde ke vzniku nežádoucích artefaktů v datech jako přímý důsledek chybného vzorkování. V následujícím textu se zaměříme na proces záznamu v digitální holografii. Ukážeme, že nerovnost (98) klade dodatečné omezení na geometrii záznamu a přímo závisí na technice, jakou byl záznam pořízen (osová holografie, mimoosová holografie, záznam osového hologramu s paraboloidní referenční vlnou).

Analýza bude provedena pro hologram, který vznikne interferencí rovinné (paraboloidní) referenční a paraboloidní předmětové vlny. Jedná se tedy o hologram bodového zdroje ve Fresnelově aproximaci. Za tohoto předpokladu lze rozdíl fází předmětové a referenční vlny psát v separovaném tvaru

$$\phi(x, y) = \phi_o + \phi(x) + \phi(y). \quad (102)$$

Bude tedy korektní se dále pro jednoduchost omezit na jednorozměrný případ. Prvním krokem je výpočet maximální frekvence, která dopadá na detektor. Tu přibližně odhadneme prostřednictvím vztahu pro lokální frekvenci

$$f_{xloc} = \frac{1}{2\pi} \frac{\partial}{\partial x} \phi(x), \quad (103)$$

do něhož dosadíme za fázi hologramu, který jsme zaznamenali danou technikou. V následujícím textu přistoupíme ke konkrétním příkladům.

Pro fázi osového hologramu předmětového bodu o příčných souřadnicích (u, v) , který je ve vzdálenosti z před hologramem a je zaznamenán pomocí rovinné referenční vlny, lze snadno ve Fresnelově aproximaci odvodit vztah

$$\phi(x) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{x^2 - 2xu}{2z} \right). \quad (104)$$

Provedeme-li dále parciální derivaci tohoto výrazu podle proměnné x , získáme vztah pro lokální frekvenci hologramu

$$f_{xloc} = \frac{x - u}{\lambda z}. \quad (105)$$

Najdeme-li maximální frekvenci (105), dosazením do vzorkovacího kritéria dostaneme přímo podmínku, která nám omezí geometrii osové holografie

$$\frac{L + L_O}{\lambda z} \leq \frac{1}{2\Delta}, \quad (106)$$

kde $2L$ a $2L_O$ jsou příčné rozměry detektoru a předmětu, Δ je velikost vzorkování hologramu.

Fázi mimoosového hologramu lze vyjádřit ve tvaru

$$\phi(x) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{x^2 - 2xu}{2z} \right) + 2\pi\alpha x. \quad (107)$$

Poslední člen je dán příspěvkem od šikmo dopadající referenční vlny. Aby byl obraz předmětu prostorově separován od obrazů, které jsou generovány rušivými členy, musí pro nosnou frekvenci platit [8]

$$\alpha \geq 3 \frac{L_O}{\lambda z}. \quad (108)$$

Další postup je analogický předchozímu případu. Provedením příslušných výpočtů získáme maximální frekvenci mimoosového hologramu, kterou dosadíme do vzorkovací podmínky. Získanou podmínku, která omezuje geometrii záznamu mimoosového hologramu, lze psát ve tvaru

$$\frac{L + L_O}{\lambda z} + 3 \frac{L_O}{\lambda z} \leq \frac{1}{2\Delta}, \quad (109)$$

kde jsme za α dosadili spodní hranici nerovnosti (108). Provedeme-li porovnání tohoto výsledku s předcházejícím pro Gaborovu holografii, je na první pohled zřejmé, že v případě mimoosového hologramu je nutné při daných parametrech soustavy volit jemnější vzorkování CCD kamery. Oba výsledky jsou zjevně totožné pro $\alpha = 0$.

Fáze hologramu s paraboloidní referenční vlnou, jejíž zdroj se nachází ve vzdálenosti d od hologramu, je daná vztahem

$$\phi(x) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{x^2 - 2xu}{2z} - \frac{x^2}{2d} \right). \quad (110)$$

Stejně jako v předcházejících případech získáme obdobně omezení kladené na geometrii sestavy záznamu hologramu. Toto omezení můžeme psát ve tvaru

$$\frac{L(d-z)}{\lambda zd} + \frac{L_O}{\lambda z} \leq \frac{1}{2\Delta}. \quad (111)$$

5.4 Analýza zobrazování v digitální holografii

V předchozím textu jsme odvodili nerovnice nutné k dodržení vzorkovací podmínky při záznamu hologramu. Z těchto nerovnic vyplynuly omezení její geometrie. V článku [13] bylo provedeno srovnání osové a mimoosové holografie pomocí funkce SW a analyzován tak výkon těchto optických systémů. Naším cílem bude porovnat záznam osového hologramu s paraboloidní referenční vlnou s osovou i mimoosovou technikou záznamu.

Abychom byli schopni optické systémy porovnat, nerovnice (106), (109) a (111) nejprve přeměníme na rovnice tak, že budeme uvažovat pro dané zorné pole $2L_O$ nejmenší možnou vzdálenost předmětu od detektoru z_{min} . Vyjádřením λz_{min} z rovnic obdržíme pro osovou holografii

$$\lambda z_{min}^{in-line} = 2\Delta(L + L_O), \quad (112)$$

mimoosovou holografii

$$\lambda z_{min}^{off-axis} = 2\Delta(L + 4L_O), \quad (113)$$

a pro záznam s paraboloidní referenční vlnou

$$\lambda z_{min}^{DIHM} = 2\Delta(L/\beta + L_O). \quad (114)$$

Vztah (52) nám spojuje maximální přenesenou frekvenci obrazu s numerickou aperturou optického systému. Dosadíme-li maximální frekvenci do vztahu pro SW (jednorozměrný případ)

$$SW = 4L_O f_{max} = \frac{4L_O L}{\lambda z} \quad (115)$$

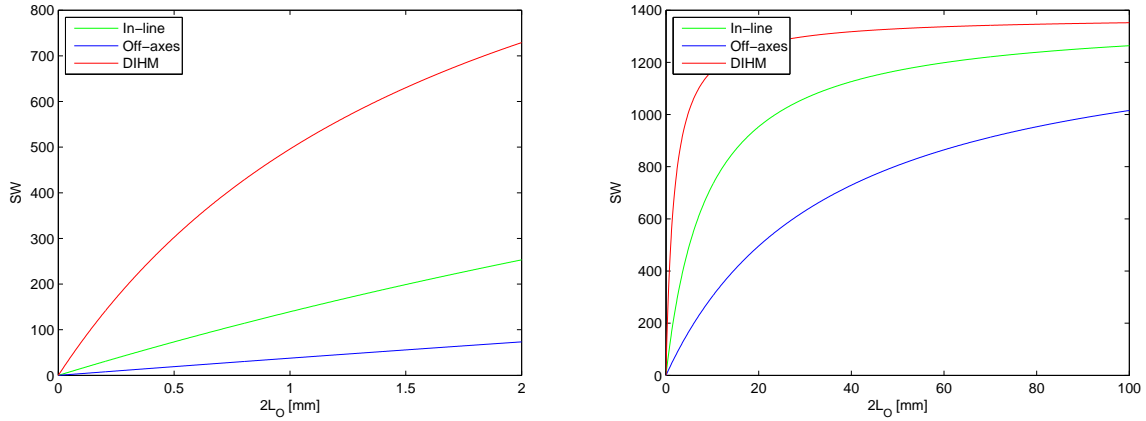
a dále za λz ze vztahů (112), (113) a (114), obdržíme výsledný SW pro konkrétní techniky záznamu hologramu

$$SW_{in-line} = \frac{L_O N}{L + L_O}, \quad (116)$$

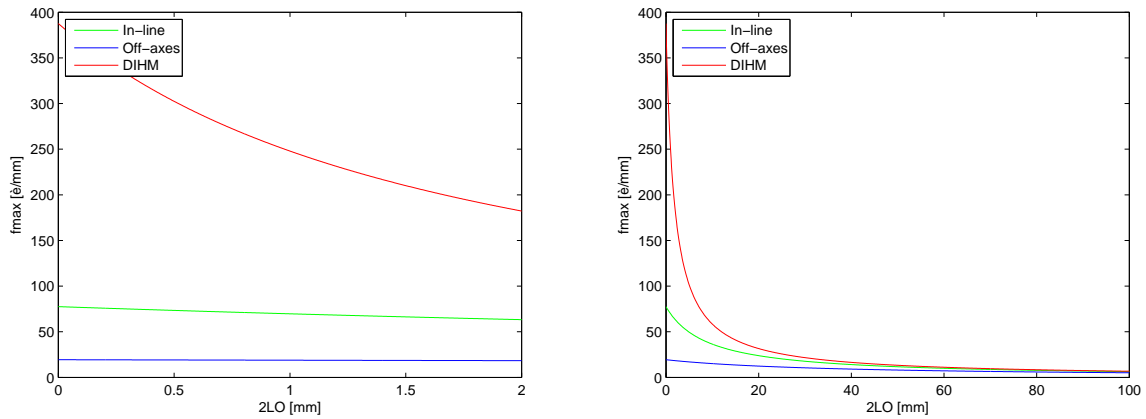
$$SW_{off-axis} = \frac{L_O N}{L + 4L_O}, \quad (117)$$

$$SW_{DIHM} = \frac{L_O N}{L(1/\beta + L_O/L)}, \quad (118)$$

kde $\beta = d/(d-z)$ a $N = 2L/\Delta$. Výsledky pro osovou a mimoosovou holografii jsou plně ve shodě s [13]. V grafu na obrázku 9 dosahuje nejlepších výsledků osová holografie s paraboloidní referenční vlnou. Pokud bychom se ale dívali na paraboloidní vlnu jako na Fresnelovu aproximaci vlny sférické, bylo by nutné také diskutovat meze Fresnelovy aproximace.



Obrázek 9: Závislost prostorové a frekvenční šířky signálu (SW) na zorném poli ($2L_0$) pro hodnoty $N=1376$, $2L=8,9$ mm, $\beta=5$.



Obrázek 10: Závislost maximální přenesené frekvence (f_{max}) na zorném poli ($2L_0$) pro hodnoty $N=1376$, $2L=8,9$ mm, $\beta=5$.

5.5 Numerická rekonstrukce a vzorkovací podmínka

Vzhledem ke skutečnosti, že numerická rekonstrukce probíhá ze své podstaty diskrétně, je nutné dbát na splnění vzorkovací podmínky pro maximální frekvenci během celého procesu numerické rekonstrukce. Na tomto místě se zaměříme speciálně na numerickou rekonstrukci spočívající v přímém řešení Fresnelovy transformace a využijeme škálovanou variantu rekonstrukce (rekonstrukce rovinnou vlnou). Celý proces numerického zpracování dat, od záznamu hologramu na CCD kameru až po konečný rekonstruovaný intenzitní obraz předmětu, lze rozložit na tři po sobě jdoucí kroky. Hologram je nejprve vynásoben kvadratickou exponenciální funkcí, která popisuje šíření do cílové rekonstrukční roviny. Následuje škálovaná Fourierova transformace a na závěr je z komplexní amplitudy vypočítána intenzita.

Vzorkovací podmínku pro hologram jsme již se všemi důsledky na geometrii sestavy podrobně diskutovali v předchozím textu.

Pokud vynásobíme hologram kvadratickou exponenciální funkcí, dostaneme fázi

$$\phi(x) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{x^2 + 2xu}{2z} - \frac{x^2}{2d} - \frac{x^2}{2z'} \right), \quad (119)$$

kde poslední člen je příspěvek od kvadratické exponenciální funkce. Proměnná z' vyjadřuje rekonstrukční vzdálenost. Vzorkovací podmínku odvodíme známým postupem pomocí lokálních frekvencí. Obdržíme

$$\left(\frac{1}{z_0} - \frac{1}{z'} \right) \frac{L}{\lambda} + \frac{L_0}{\lambda z} \leq \frac{1}{2\Delta}, \quad (120)$$

kde jsme označili $z_0 = zd/(d-z)$ obrazovou vzdálenost. Ze vztahu je zřejmé, že v okolí roviny $z' = z_0$ bude korektně vzorkovaný záznam na CCD implikovat splnění vzorkovací podmínky pro diskutovanou komplexní amplitudu.

Po provedení Fourierovy transformace získáme komplexní amplitudu v obrazové rovině. Abychom odhadli korektní vzorkování, je nutné opět znát maximální frekvenci. Vzhledem ke skutečnosti, že spektrum této komplexní amplitudy je tvořeno škálovanou clonovou funkcí roviny záznamu hologramu, maximální frekvence bude rovna

$$f_{max} = \frac{L}{\lambda z'} \quad (121)$$

a výsledná vzorkovací podmínka

$$\frac{L}{\lambda z'} \leq \frac{1}{2\Delta'}. \quad (122)$$

Vzorkování v rekonstrukční rovině značíme symbolem Δ' . Provedeme-li Fourierovu transformaci pomocí algoritmu rychlé Fourierovy transformace, budeme mít vzorkování svázáno vztahem

$$\Delta' = \frac{\lambda z'}{N\Delta}. \quad (123)$$

Vezmeme-li v úvahu, že $2L = N\Delta$ a porovnáme oba vztahy, dojdeme k závěru, že algoritmus volí vzorkování na spodní hranici rovnosti.

6 Numerická separace komplexně sdruženého obrazu

Jak jsme již zmínili, hologram obsahuje dva vzájemně komplexně sdružené interferenční členy, z nichž každý generuje obraz předmětu. Jestliže výjdeme z roviny, v níž byl záznam pořízen, jeden ostrý obraz vzniká před a druhý ve stejné vzdálenosti za touto rovinou. Obraz předmětu, který je generován jedním z interferenčních členů, bude překryt rozostřeným obrazem druhého interferenčního členu. Tato skutečnost je zdrojem degradace obrazu v holografii. Existuje několik způsobů, jak tento problém řešit. V následující diskuzi a potom zejména při popisu dekonvolučního a iteračního algoritmu výjdeme z článku [14].

Jedním ze způsobů, jak problém komplexně sdruženého obrazu řešit, je metoda fázového posunu [22]. Tento přístup je však vhodný pouze pro stacionární objekty.

Efektivních výsledků lze docílit metodou, o které jsme se již zmínili. Jedná se o záznam mimoosového hologramu. Změnou geometrie záznamu dojde v obrazové rovině k prostorové separaci příspěvků pocházejících od jednotlivých komplexně sdružených interferenčních členů a členů nultého difrakčního řádu. Vzhledem ke skutečnosti, že mimoosová geometrie omezuje rozlišení, je v mikroskopii výhodné zůstat u osové geometrie záznamu a vliv komplexně sdruženého obrazu potlačit numericky.

Dále se budeme zabývat některými numerickými metodami, které umožňují potlačit vliv komplexně sdruženého obrazu v Gaborově osové holografii. Zde můžeme plně využít potenciálu digitální optiky. Prostřednictvím počítačových algoritmů lze manipulovat s hologramem nebo přímo s rekonstruovaným předmětem. V následujícím textu budou rozebrány základní principy těchto algoritmů.

Nejprve podrobně popíšeme proces záznamu a rekonstrukce. Uvažujme malé částice, na které dopadá rovinná referenční vlna. Část prošlé referenční vlny se na částicích rozptýlí. Pokud jsou však částice dostatečně malé, lze předpokládat, že se referenční vlna průchodem příliš nezmění. Každá částice je charakterizovaná svou polohou (u_i, v_i, z_i) , kde z_i je její vzdálenost od hologramu a (u_i, v_i) jsou příčné souřadnice. Příčné rozměry odráží funkce ϑ . Bez újmy na obecnosti předpokládejme, že referenční rovinná vlna má jednotkovou amplitudu. Zvolíme-li ve vzdálenosti $d < z_i$ od hologramu rovinu, potom pro komplexní amplitudu v této rovině platí

$$U_d = 1 + a_d, \quad (124)$$

kde a_d je dáno vztahem

$$a_d = \sum \vartheta_i \otimes \delta_{u_i, v_i} \otimes g_{z_i-d} \quad (125)$$

a g_{z_i-d} je funkce impulzové odezvy volného prostoru, jejíž index značí vzdálenost šíření. Potom můžeme intenzitu na hologramu psát ve tvaru

$$I_H = |U_d \otimes g_d|^2 = I_0 + I_T, \quad (126)$$

kde jsme označili členy nultého řádu I_0 a komplexně sdružené interferenční členy I_T . Pro I_T pak vychází

$$I_T = a_d \otimes g_d + a_d^* \otimes g_{-d}. \quad (127)$$

Rekonstrukci komplexní amplitudy a_d získáme obrácením procesu záznamu, tj. dekonvolucí

$$a'_d = I_T \otimes g_{-d} = a_d + a_d^* \otimes g_{-2d}. \quad (128)$$

Z rekonstrukce je zřejmé, že se zde kromě členu a_d objevuje také nežádoucí člen.

Dále budeme prezentovat dva přístupy vedoucí za jistých předpokladů k potlačení komplexně sdruženého obrazu. V obou případech vycházíme z [14].

6.1 Dekonvoluční přístup

Uvažujme nyní speciální případ, kdy všechny částice jsou ve stejné vzdálenosti $z_i = d$ před hologramem

$$a_d = \sum \vartheta_i \otimes \delta_{u_i, v_i}. \quad (129)$$

Jestliže je funkce ϑ reálná, potom bude reálná také funkce a_d a lze ji ve vztahu (128) vyseparovat

$$a'_d = a_d \otimes (\delta + g_{-2d}). \quad (130)$$

Rovnice (130) představuje konvoluci funkce a_d se známou funkcí. Jestliže na spektrum funkce a'_d aplikujeme inverzní filtr

$$\frac{1}{F\{\delta + g_{-2d}\}} = \frac{1}{1 + \exp[-i2\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)]}, \quad (131)$$

po provedení Fourierovy transformace získáme přímo požadovanou funkci a_d .

6.2 Iterační přístup

Předpokládejme opět malé částice umístěné ve stejné vzdálenosti d od hologramu. Rekonstruovaný obraz částic bude obsahovat příspěvky od obou komplexně sdružených interferenčních členů hologramu. Zatímco jeden z těchto členů vytváří ostrý lokalizovaný obraz částic, druhý člen v této obrazové rovině generuje rozostřený obraz a z tohoto důvodu je rozprostřený po celé této rovině. Tato úvaha tvoří základ ke konstrukci některých iteračních algoritmů.

Následující metoda potlačení komplexně sdruženého obrazu je založena na konstrukci binární masky. Máme-li alespoň hrubou představu o poloze ostrých obrazů jednotlivých částic, můžeme vytvořit filtr nabývající hodnoty $M = 1$, jestliže v bodě je přítomný obraz a $M = 0$ v případě opačném.

Na počátku iteračního procesu aplikujeme masku v obrazové rovině

$$a_0 = M a'_d \quad (132)$$

a tuto komplexní amplitudu šíříme do obrazové roviny komplexně sdruženého interferenčního členu. Jelikož jsme již většinu informace o obrazu, který je generován komplexně sdruženým členem odstranili maskou, bude v této rovině přítomen pouze rozostřený obraz téměř bez přítomnosti ostrého obrazu. Odečteme-li od sebe komplexní amplitudy obou rovin, docílíme lepší kvality obrazu. Iteraci lze následně opakovat

$$a_n = M(a'_d - a_{n-1} \otimes g_{2d}). \quad (133)$$

V každé iteraci lze také navíc měnit filtr M .

Tento přístup je možné zobecnit na malé předměty umístěné v objemu [14]. Na rozdíl od předchozího je komplexně sdružený obraz odstraňován z hologramu filtrací $(1 - M(z_i))$ ve své obrazové rovině z_i . Vzhledem k tomu, že se jedná o předměty umístěné v prostoru, filtrace bude probíhat pro každou obrazovou rovinu odděleně. Výsledné komplexní amplitudy $a_n^T(z_i)$ následně šíříme zpět do holografické roviny a sečteme. Algoritmus vypadá následovně

$$a_0^H = I_T, \quad (134)$$

$$a_n^T(z_i) = (1 - M(z_i))(a_n^H \otimes g_{z_i}), \quad (135)$$

$$a_{n+1}^H = \sum a_n^T(z_i) \otimes g_{-z_i}. \quad (136)$$

6.3 Frekvenční filtrace částí hologramu

Za zmínku stojí nedávno publikovaná metoda [23], která je založená na frekvenční filtraci komplexně sdruženého obrazu ve spektru rozděleného hologramu. Popsaný postup je následující. Hologram je rozdělen na čtyři sektory a v každém uvažujeme novou soustavu pravoúhlých souřadnic s počátkem ve středu sektoru. Dále vypočítáme spektrum každé části. Tímto postupem dojde k separaci frekvencí obou komplexně sdružených členů a můžeme tedy provést filtraci.

7 Experimentální výsledky

7.1 Ověření základních principů v DIHM

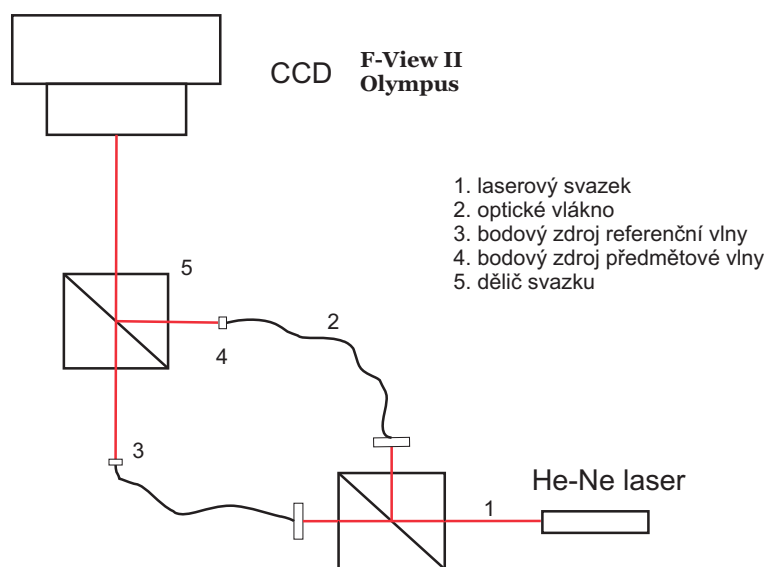
Cílem experimentu je ověření základních vztahů v digitální osově holografické mikroskopii. Nejprve ověříme vztahy, které dávají do souvislosti polohu předmětového a obrazového bodu. Při rekonstrukci rovinnou vlnou, budou pro souřadnice obrazového bodu platit vztahy

$$x_0 = \beta u, \quad (137)$$

$$z_0 = \beta (d - w), \quad (138)$$

$$\beta = d/w. \quad (139)$$

Symbolem d je značena vzdálenost bodového zdroje referenční vlny a roviny, v níž je hologram zaznamenán. Namísto předmětové vzdálenosti z budeme polohu předmětového bodu měřit od zdroje referenční vlny. Tuto vzdálenost jsme označili symbolem w . Mezi těmito veličinami platí jednoduchý vztah $w = d - z$. Experiment je nutné navrhnout tak, aby bylo možné efektivně měnit polohu předmětového bodu.



Obrázek 11: Experimentální sestava určená pro ověření základních principů DIHM.

Na obrázku 11 je znázorněna sestava, kterou jsme použili pro ověření uvedených vztahů. Referenční i předmětová vlna je vytvořena pomocí optického vlákna, jehož konec lze považovat za bodový zdroj sférické referenční vlny. Konec vlákna modelující předmětovou vlnu jsme umístili na posuvu tak, aby bylo možné měnit předmětovou vzdálenost i příčnou polohu bodu. Do obou vláken byl navázán svazek z laseru ($\lambda=633$ nm, výkon = 15 mW). Hologram jsme zaznamenali na CCD kameru F-View 2 Olympus (1376×1032 , velikost pixelu $6,45 \mu\text{m}$). Vzdálenosti zdroje sférické referenční vlny od předmětového bodu w a od hologramu d byly zvoleny tak, aby zůstala v platnosti paraxiální aproximace (malá numerická apertura) a zároveň splněna vzorkovací podmínka. Po umístění

optických elementů jsme pro d a w naměřili $d=214 \pm 10$ mm, $w=20 \pm 5$ mm. Tyto hodnoty i jejich směrodatné odchylky je nutné brát s velkou rezervou, jelikož je nám samotné optické elementy (objímky atd.) neumožnily přesně měřit. Proto s těmito veličinami dále nebudeme přímo počítat.

7.1.1 Příčný posun

Za dané konstantní předmětové vzdálenosti bylo postupně provedeno pět holografických záznamů pro různé příčné polohy s vzájemnými rozestupy po 0.1 mm. Protože z měření jsou známy pouze rozdíly těchto hodnot, budeme ověřovat vztah

$$d'_i = \beta d_i, \quad (140)$$

kde $d_i = |u_i - u_{i+1}|$ je rozdíl polohy předmětového bodu a $d'_i = |x'o'_i - x'o'_{i+1}|$ rozdíl polohy obrazu tohoto bodu.

| příčný posun | | | | |
|--------------|------------------|----------------|-------------------|-----------------|
| i | d_i | $ \Delta d_i $ | d'_i | $ \Delta d'_i $ |
| 1. | 0.100 | 0.005 | 1.214 | 0.5 |
| 2. | 0.100 | 0.005 | 1.215 | 1 |
| 3. | 0.100 | 0.005 | 1.281 | 1.5 |
| 4. | 0.100 | 0.005 | 1.214 | 2 |
| | $\overline{d_i}$ | σ | $\overline{d'_i}$ | σ |
| | 0.100 | 0.005 | 1.23 | 0.02 |

Tab.1: Příčný posun (údaje v tabulce jsou uvedeny v mm).

Z tabulky 1 plyne pro všechna i existence konstantního parametru $\beta = \overline{d'}/\overline{d}$. Po dosazení hodnot z tabulky 1 a užitím zákona šíření chyb dostáváme $\beta = 12.3 \pm 0.7$. Jak již bylo řečeno, tento parametr interpretujeme jako příčné škálování obrazových souřadnic.

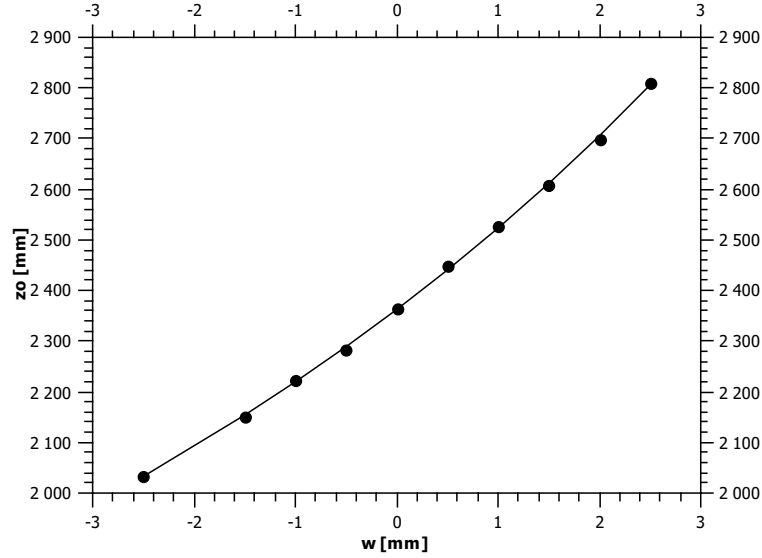
7.1.2 Podélný posun

Za dané příčné polohy předmětového bodu bylo postupně provedeno deset holografických záznamů pro různé podélné polohy s vzájemnými rozestupy 0.5 mm. Výsledky experimentu byly zapsány do tabulky 2. Symbol ω značí vzdálenost od základní podélné polohy w_z , kterou jsme zvolili tak, aby odpovídala podélné poloze w z předchozí části, kde jsme určovali parametr β . Mezi těmito veličinami platí jednoduchý vztah $w = w_z - \omega$.

| podélný posun | | | | | |
|---------------|----------|-------|-----|----------|-------|
| n | ω | z_0 | n | ω | z_0 |
| 1. | -2.5 | 2033 | 6 | 0.5 | 2449 |
| 2. | -1.5 | 2152 | 7 | 1 | 2527 |
| 3. | 1 | 2222 | 8 | 1.5 | 2607 |
| 4. | 0.5 | 2283 | 9 | 2 | 2697 |
| 5. | 0 | 2363 | 10 | 2.5 | 2811 |

Tab.2: Podélný posun (údaje v tabulce jsou uvedeny v mm).

Data z této tabulky dále fitujeme vztahem (138) pro dva neznámé parametry d a w_z . Výsledek fitování je znázorněn na obrázku 12. Pro parametry fitu vychází $d=209,0 \pm 0,8$ m a $w_z = 17,0 \pm 0.1$ mm. Tyto hodnoty jsou velmi blízko těm předpokládaným. Dosadíme-li do vztahu (139) lze opět vypočítat parametr $\beta = 12,29 \pm 0.09$. Což je ve velmi dobré shodě s předchozí částí, kde jsme tento parametr určili z příčného posunu.



Obrázek 12: Proložení experimentálních dat z tabulky 2 vztahem pro podélnou polohu předmětu a obrazu.

7.1.3 Příčný a podélný profil PSF

V následujícím textu prezentujeme experiment, kde jsme změřili pološířky podélného a příčného profilu PSF (ρ' , δ'). Tyto hodnoty následně porovnáme s teoretickou předpovědí. Vzhledem ke skutečnosti, že v tomto experimentu závisí obrazové souřadnice na předmětových vztahem (137), můžeme přímo vypočítat rozlišovací mez $(\rho, \delta) = (\rho'/\beta, \delta'/\beta)$. Pološířky příčného a podélného řezu jsme definovali (pro sinc funkci) poklesu PSF na nulu. PSF byla rekonstruována ze stejného holografického záznamu, pro který jsme v předchozí části přesně určili parametry sestavy d a w_z .

Po provedení řezu rovnoběžně s osou x' bude normovaná intenzita v obrazové rovině pro obdélníkovou clonovou funkci daná vztahem

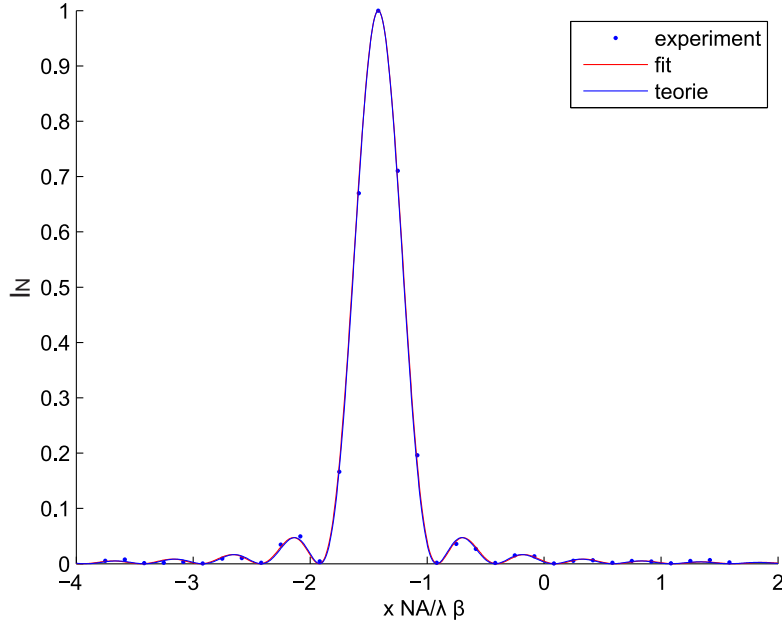
$$I_N(x', 0, z_o) = \text{sinc}^2(2ax'). \quad (141)$$

Experimentálně změřená data fitujeme touto teoreticky odvozenou funkcí. Naším cílem je odhadnout parametr a . Z teoretické předpovědi víme, že $a = NA/(\lambda\beta)$.

Při numerické rekonstrukci je výhodné provést substituci $t' = x'\beta\lambda/NA$. Po takovémto škálování obrazové proměnné, bude numerická rekonstrukce pracovat pouze s obrazovou vzdáleností a vlastní odhad parametru tak očistíme od zbytečných nepřesností. Koeficient a po provedení substituce označme symbolem a_s .

| Příčný profil PSF | | | | |
|-------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | a_c | a | $\rho' [\mu m]$ | $\rho [\mu m]$ |
| analytický výpočet | 1 | 2.23 ± 0.02 | 224 ± 2 | 18.26 ± 0.08 |
| experimentální výsledek | 0.987 ± 0.001 | 220 ± 0.02 | 227 ± 2 | 18.50 ± 0.08 |

Tab.3: Srovnání experimentálně změřeného příčného profilu PSF s teoreticky odvozenou funkcí.



Obrázek 13: Srovnání experimentálně změřeného příčného profilu PSF s teoreticky odvozenou funkcí.

Jak je zřejmé z tabulky 3 a z grafu na obrázku 13, teoretické předpovědi jsou ve velmi dobré shodě s experimentem. Nepřesnosti však nelze vysvětlit danými směrodatnými odchylkami. Problém bude v procesu fitování dat, kdy velké množství dat nenese informaci o tvaru křivky, ale ani destruktivně neovlivňují výsledek - jsou téměř nulové, svým počtem však zmenšují směrodatnou odchylku.

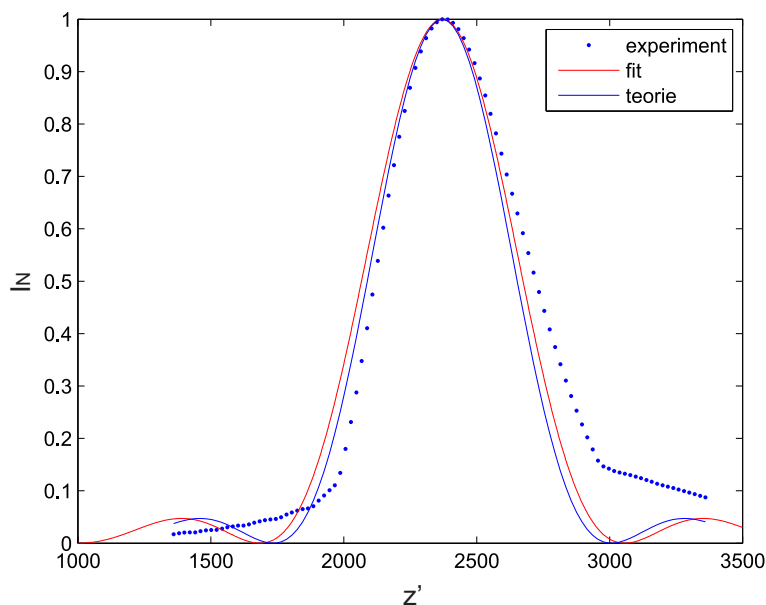
Při ověření pološířky podélného řezu PSF postupujeme podobně jako v předchozím případě. Teoretický průběh podélného profilu PSF se zjednoduší, jestliže přejdeme od obdélníkové clonové funkce roviny záznamu hologramu ke kruhové clonové funkci. Interferenční záznam jednoduše vynásobíme kruhovou clonou. Experimentální data nyní fitujeme funkcí

$$I_N(0, z') = \text{sinc}^2\left(\frac{b}{2}\Delta_{zo}\right). \quad (142)$$

kde odhadujeme parametr $b = NA^2/\lambda\beta^2$. Tento parametr následně porovnáme s teoretickou předpovědí.

| Podélný profil PSF | | | |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | $b [10^{-3}]$ | $\delta' [mm]$ | $\delta [mm]$ |
| analytický výpočet | 3.14 ± 0.02 | 640 ± 10 | 4.21 ± 0.04 |
| experimentální výsledek | 2.93 ± 0.05 | 680 ± 10 | 4.51 ± 0.07 |

Tab.4: Srovnání experimentálně změřeného podélného profilu PSF s teoreticky odvozenou funkcí.

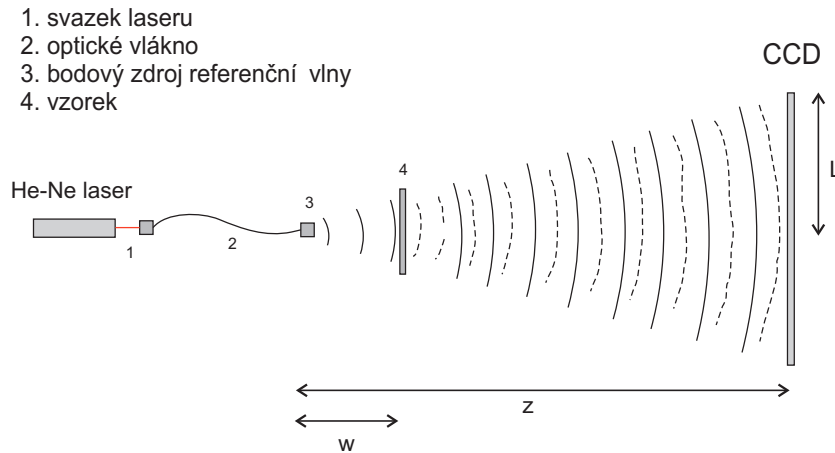


Obrázek 14: Srovnání experimentálně změřeného podélného profilu PSF s teoreticky odvozenou funkcí.

Z tabulky 4 a z grafu na obrázku 14 plyne dobrá shoda mezi teoretickou předpovědí a experimentem. Je třeba zdůraznit, že teoretická křivka platí jen v blízkosti obrazové vzdálenosti z_O . Odtud pravděpodobně pocházejí příslušné odchylky.

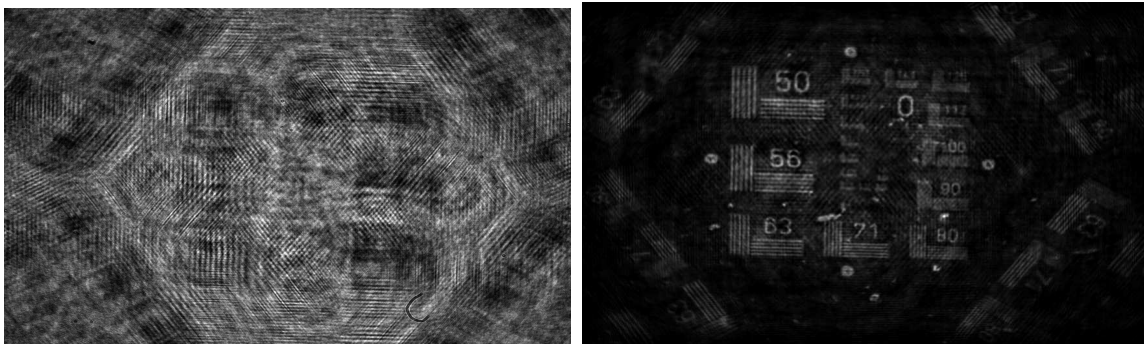
7.2 Zobrazení testů

7.2.1 Přímý záznam



Obrázek 15: Experimentální sestava určená pro záznam hologramu v geometrii DIHM.

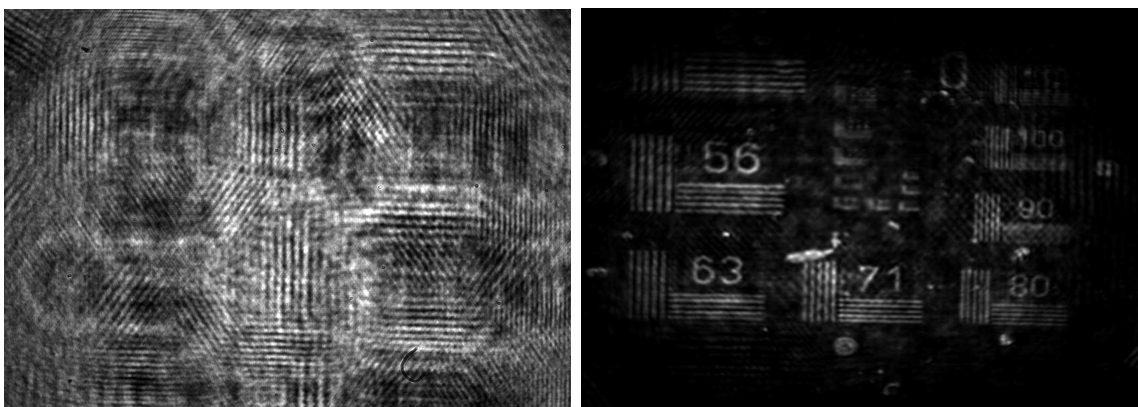
Cílem prezentovaného experimentu bylo ověřit rozlišení DIHM na čárovém testu. Záznam hologramu byl pořízen standardní technikou DIHM, která je znázorněna na obrázku 15. Za zdroj sférické referenční vlny jsme jako v předchozím případě zvolili konec optického vlákna, do něhož byl předem navázán svazek z helium-neonového laseru ($\lambda=633$ nm). V blízkosti bodového zdroje referenční vlny byl umístěn čárový test a ve vzdálenosti d od tohoto bodového zdroje CCD kamera F View II Olympus.



Obrázek 16: Hologram a výsledná rekonstrukce čárového testu ($d=130$ mm, $z=100$ mm).

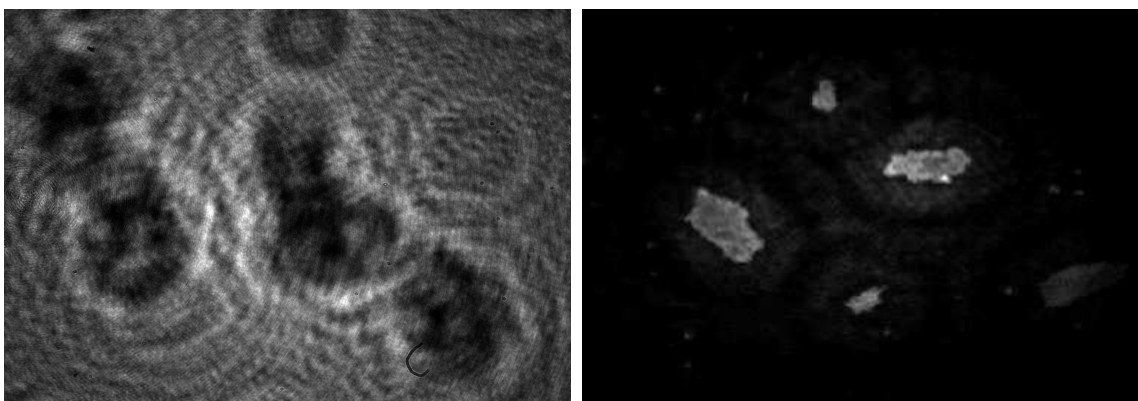
V této konfiguraci jsme zaznamenali nejprve hologram v přítomnosti testu a následně intenzitu samotné referenční vlny. Oba hologramy byly uloženy do paměti počítače a numericky provedeno jejich vzájemné odečtení, kterým se z hologramu odstranila intenzita referenční vlny, ale také případné nečistoty přítomné na CCD kameře. Takto upravený hologram byl pomocí numerického algoritmu rekonstruován.

Na obrázcích 16 a 17 vidíme zaznamenaný hologram (vlevo) a následnou rekonstrukci čárového testu (vpravo). První rekonstrukci odpovídá teoreticky odvozené rozlišení 80 (65) čar/mm a druhé rekonstrukci 87 (71) čar/mm. V závorkách je uvedeno rozlišení v druhém směru.



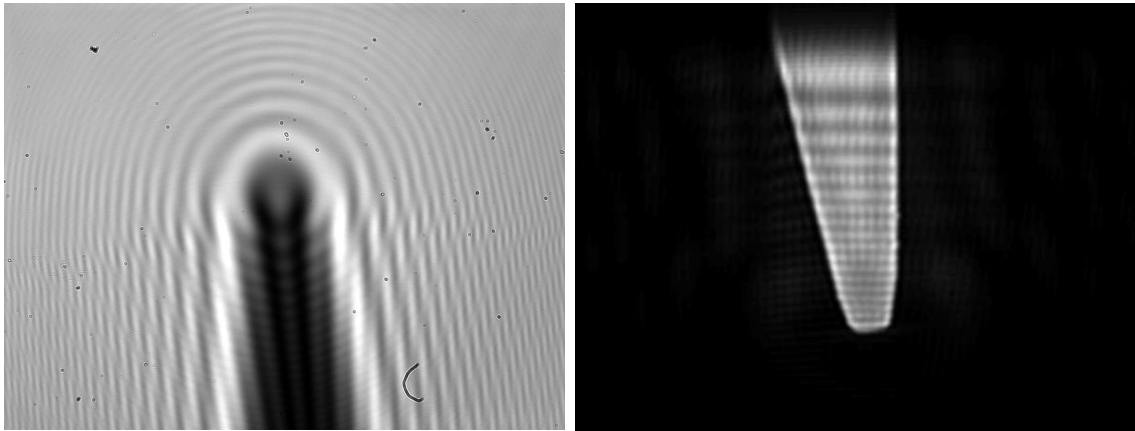
Obrázek 17: Hologram a následná rekonstrukce čárového testu ($d=106$ mm, $z=92$ mm).

Zdrojem degradace obrazu je pravděpodobně na jednu stranu přítomnost komplexně sdruženého obrazu a na druhou přítomnost nežádoucí intenzity předmětové vlny. Oba zdroje degradace budou menší pro řidší vzorky [14]. Závěrem je nutné říct, že tento typ objektů není příliš vhodný pro zobrazování technikou DIHM.



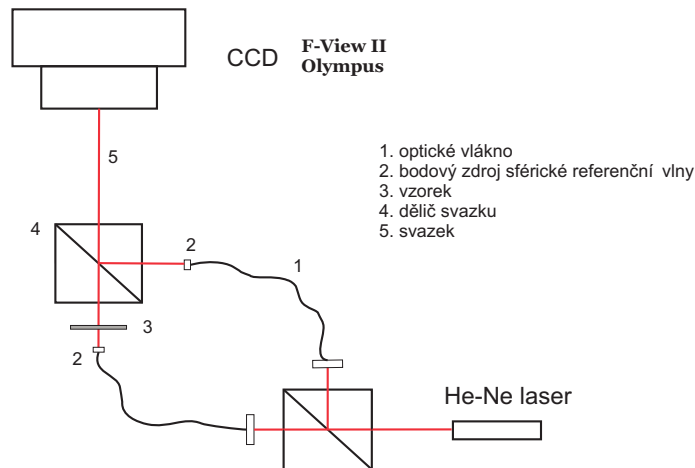
Obrázek 18: Hologram a následná rekonstrukce latexových kuliček ($4 \mu\text{m}$).

Na obrázku 18 je prezentován hologram a následná rekonstrukce latexových kuliček o průměru $4 \mu\text{m}$. I když kuličky vytvořily ve vzorku shluky, podařilo se zaznamenat i pár kuliček samostatně. Záznam byl pořízen se stejnými parametry jako v předchozím případě. Dále jsme provedli záznam a rekonstrukci hrotu jehly. Záznam i rekonstrukce jsou prezentovány na obrázku 19.



Obrázek 19: Hologram a následná rekonstrukce jehly ($d=309$ mm, $z=202$ mm).

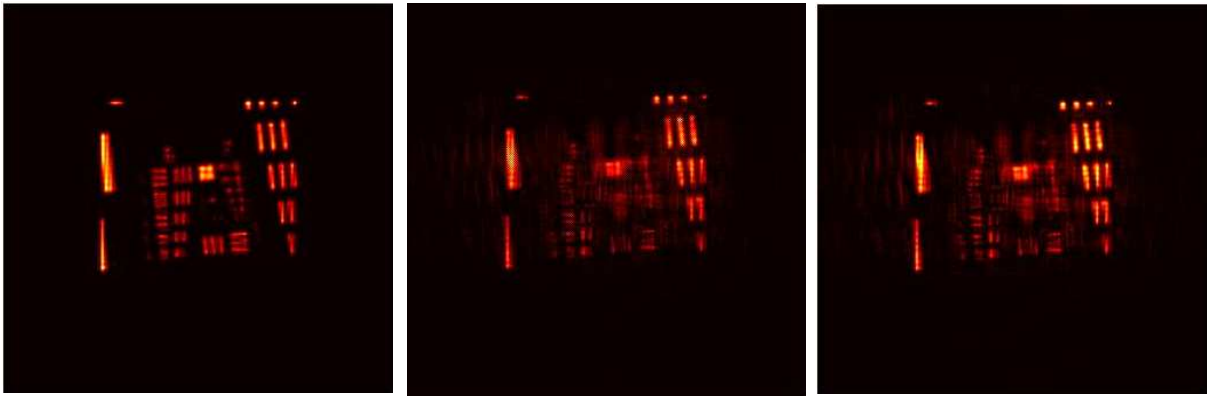
7.2.2 Záznam v sestavě Machova-Zehnderova interferometru



Obrázek 20: Experimentální sestava pro záznam hologramu v geometrii DIHM (Machův-Zehnderův interferometr).

Uspořádání znázorněné na obrázku 15 lze upravit pomocí dvou děličů svazku do podoby Machova-Zehnderova interferometru na obrázku 20. Svazek z laseru je pomocí děliče svazku vyveden do dvou optických vláken, jejichž konce považujeme za bodové zdroje referenční vlny. Svazek z jednoho konce prochází vzorkem, zatímco druhý dopadá přímo na dělič, kde se oba svazky setkávají. V této geometrii záznamu uvažujeme vzorky, které odstíní podstatnou část referenční vlny. Za tohoto předpokladu budeme mít v jednom rameni interferometru předmětovou a v druhém referenční vlnu. Polohy obou konců vláken je nutné velmi přesně nastavit tak, aby jejich vzdálenost od CCD kamery byla stejná a fázový rozdíl referenčních vln na detektoru nulový (vymizí interferenční proužky).

Měření probíhá následujícím způsobem: Nejprve je proveden záznam interference z obou větví interferometru. Následují dva intenzitní záznamy, vždy při jedné větvi zakryté. Tímto způsobem zaznameneáme intenzitu předmětové i referenční vlny. Odečtením všech tří hologramů získáme hologram bez přítomnosti těchto nežádoucích členů.



(a)

(b)

(c)

Obrázek 21: Rekonstrukce čárového testu pro parametry $d=80$ mm a $w=10$ mm: (a) rekonstrukce ideálního obrazu, (b) rekonstrukce po odečtení referenční vlny, (c) rekonstrukce po odečtení referenční a předmětové vlny.

Rekonstrukce provedené v této geometrii měly i po odečtení obou intenzit velmi nízkou kvalitu. Degradace obrazu byla způsobena také v důsledku nedokonalého vzájemného seřízení bodových zdrojů sférických referenčních vln. Z tohoto důvodu byl proveden záznam hologramu numericky. Na obrázku 21 a 22 jsou prezentovány rekonstrukce čárového testu a amplitudové masky. Obraz USAF testu jsme zaznamenali přímo na CCD kameru a tento záznam použili při simulaci hologramu numericky v počítači. Z rekonstrukce je patrná degradace obrazu i po odečtení intenzity referenční a předmětové vlny, a tedy silný vliv komplexně sdruženého obrazu. Tyto rekonstrukce demonstrují možnosti metody za daných geometrických parametrů záznamu.



(a)

(b)

(c)

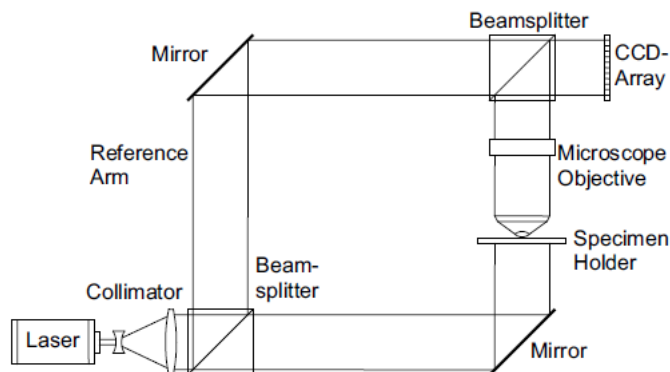
Obrázek 22: Rekonstrukce amplitudové masky pro parametry $d=80$ mm a $w=10$ mm: (a) rekonstrukce ideálního obrazu, (b) rekonstrukce bez jakékoli úpravy, (c) rekonstrukce po odečtení referenční a předmětové vlny.

8 Příklady aplikací digitální holografické mikroskopie

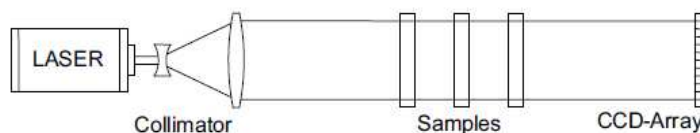
Základní omezení digitální holografie vychází ze vzorkovacího kritéria. Pokud jsou však zkoumané vzorky malé, je možné objekty zobrazovat s dostatečným rozlišením. Z tohoto důvodu nachází digitální holografie své uplatnění především na poli mikroskopie při zobrazování biologických objektů [6].

Holografický mikroskop může pracovat v osově i v mimoosové konfiguraci. Mikroskopy, které jsou znázorněny na obrázcích 23 a 24, využívají rovinné referenční vlny. Na obrázku 23 je znázorněna mimoosová konfigurace, kde náklonem zrcadla lze měnit sklon referenční vlny, a na obrázku 24 je potom typické osově schéma záznamu hologramu. Jak jsme již zmínili, provádíme-li záznam v osově konfiguraci, je nutné pracovat pouze s propustnými nebo polopropustnými vzorky, jinak dochází k degradaci obrazu [6].

Tyto mikroskopy nacházejí své uplatnění například při manipulacích s mikročásticemi pomocí optické pinzety nebo také při analýze příčné polohy, příčných rozměrů a rychlostí souboru částic. Jelikož obrazy jsou rozostřeny v podélném směru, nelze přímo určit související podélné veličiny [6].



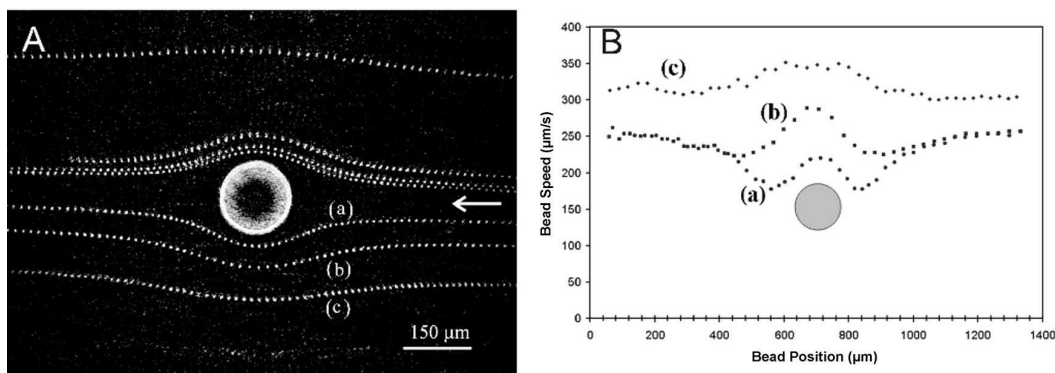
Obrázek 23: Sestava pro mimoosovou holografickou mikroskopii [6].



Obrázek 24: Sestava pro osovou holografickou mikroskopii [6].

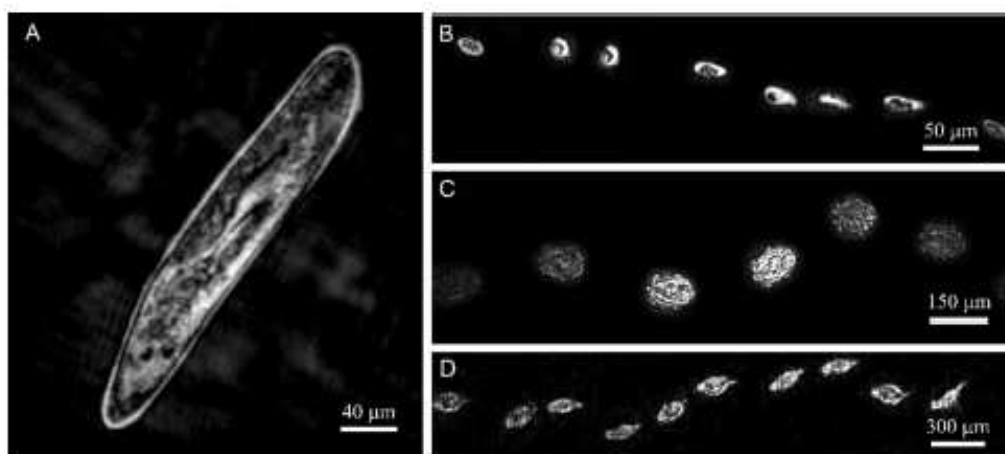
DIHM pracuje se sférickou rekonstrukční vlnou a dokáže dosáhnout dobrého rozlišení i v podélném směru [7]. Tato technika proto nachází své uplatnění při studiu proudění tekutin skrze mikrokanálky nebo při obtékání různých mikroskopických překážek. Pochopení těchto principů je užitečné nejen pro vědu, ale také například pro vývoj biomedicínských nástrojů. Proudnice jsou zviditelněny pomocí latexových kuliček, jejichž pohyb je zaznamenán sekvencí holografických záznamů. Každý z těchto záznamů je schopný zmapovat

velkou část sledovaného prostoru bez jakéhokoli přestřování, které by bylo nezbytné v tradiční mikroskopii [7].



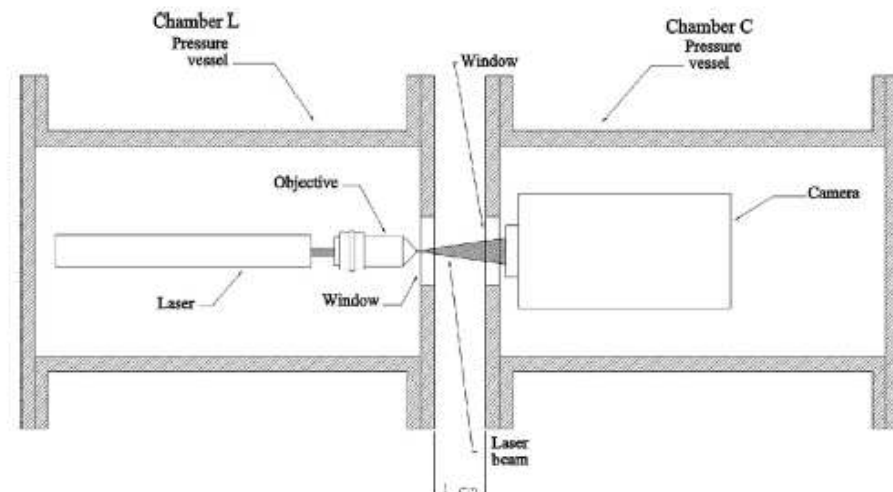
Obrázek 25: Pohyb latexových kuliček ($5 \mu\text{m}$) kolem sférické překážky ($140 \mu\text{m}$) ($\lambda=532 \text{ nm}$, $\text{NA}=0,2$) [7].

Na obrázku (25A) je zachycen pohyb latexových kuliček kolem sférické překážky. Rekonstrukce byla provedena z hologramu, který vznikl součtem dvou stovek hologramů zaznamenaných v intervalech 67 ms. Ze sousedních poloh kuliček byla vypočítána rychlost proudění znázorněná na obrázku (25B) [7].



Obrázek 26: Organismy pozorované podvodní sestavou DIHM. A, *Paramecium*. B-D, Trajektorie různých druhů organismů zaznamenané rychlostí 15 záznamů za sekundu. B, *Ciliate*; C, *Didinium*; D, *Rotifer*, [7].

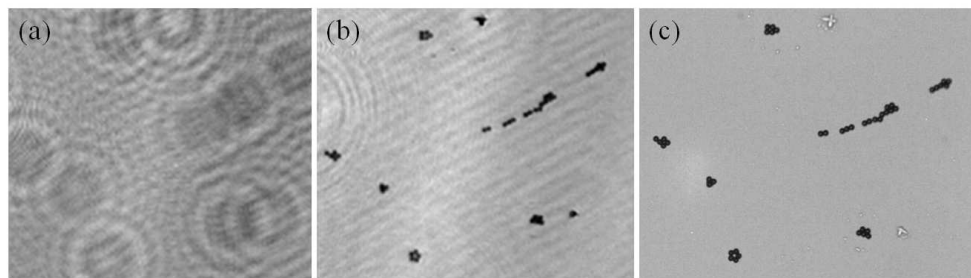
V biologii se DIHM uplatňuje při studiu pohybu mikroorganismů. Jelikož ve srovnání s konvenční mikroskopií není potřeba vzorky jakkoli upravovat, tato nová technika umožňuje studovat mikroorganismy v jejich přirozeném prostředí. Obvykle se v určitých časových intervalech zaznamená sekvence hologramů, které jsou od sebe navzájem odečteny a výsledný hologram rekonstruován. Tímto postupem dojde k odečtení stacionárních struktur spolu s různými nežádoucími artefakty. Ve výsledné rekonstrukci vidíme jen pohybující se objekty [7].



Obrázek 27: Podvodní sestava pro DIHM [7].

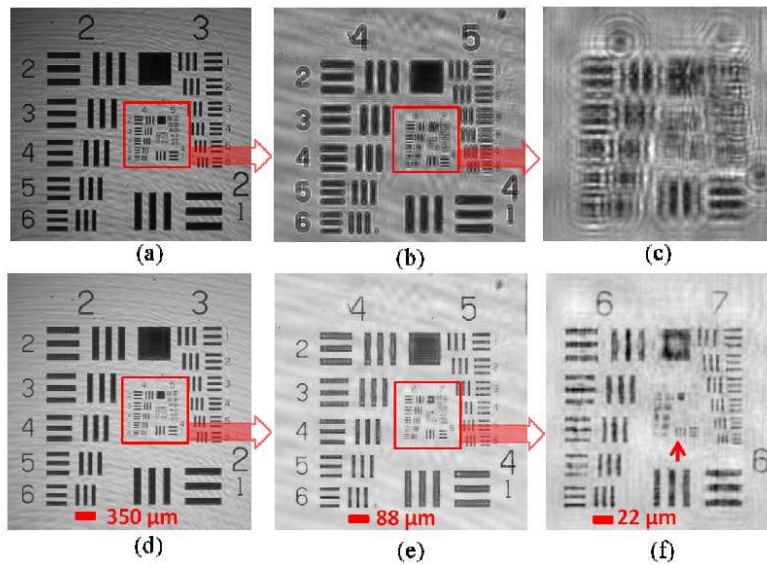
Rozmach metody je také patrný v článku [11], kde je prezentován algoritmus umožňující automatické sledování mikroskopického organismu v prostoru. Algoritmus obsahuje funkci vyhledávání a přestření na daný objekt.

Pro potřeby studia života v oceánech byl vyvinut podvodní mikroskop založený na DIHM. Sestava je znázorněna na obrázku 27. Celý systém se skládá ze dvou tlakových komor. V jedné je umístěn laser a v druhé komoře CCD kamera. Mezi těmito komorami volně proudí voda. Prototyp byl testován patnáct metrů pod hladinou. Rekonstrukce organismů pořízené tímto přístrojem jsou znázorněny na obrázku 26 [7].

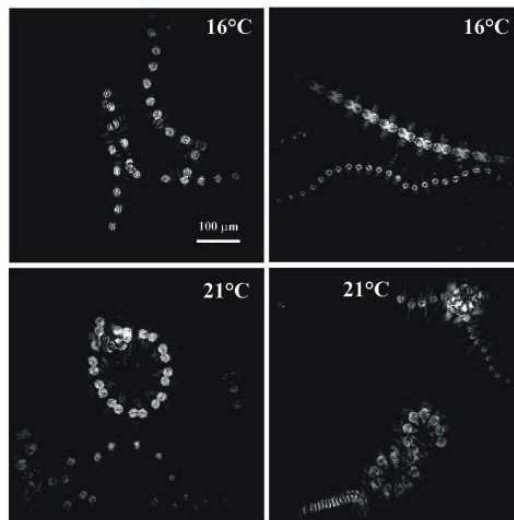


Obrázek 28: (a) Hologram latexových kuliček ($4 \mu\text{m}$) zaznamenaný v transmisičním režimu DIHM, (b) odpovídající rekonstrukce, (c) stejný záznam pořízený konvenčním mikroskopem (40x objektiv, $\text{NA}=0,6$) [24].

V [24] je demonstrován mikroskop pracující na principu DIHM, umožňující přepínání mezi mimoosovým reflexním a osovým transmisičním režimem. V obou režimech je použita sférická referenční vlna. Na obrázku 28 je znázorněna rekonstrukce latexových kuliček zaznamenaná tímto mikroskopem v transmisičním režimu. Rozlišovací možnosti jsou demonstrovány na obrázku 29.



Obrázek 29: Demonstrace rozlišení v osovém transmisním mikroskopu. (a-c) hologram US-AFT, (d-e) příslušné rekonstrukce [24].



Obrázek 30: Studie pohybu řasy v závislosti na teplotě ($d=15$ mm, $w=1$ mm) [16].

Názorným příkladem užitečnosti metody při studiu chování mikroskopických organismů je studie vlivu teploty na pohyb řasy (Alexandrium). Přírozenou teplotou pro tyto řasy je 16°C . Při vyšší teplotě vlivem ztráty bičíku nejsou tyto jednobuněčné organismy schopné přímočarého pohybu a pohybují se po kruhových trajektoriích. Obrázek 30 obsahuje záznamy pohybů této řasy pro dvě různé teploty. Záznam byl pořízen z hologramu, který vznikl součtem sta hologramů zaznamenaných v časovém rozmezí 0,33 s [16].

Další příklady rekonstrukcí mikroskopických organismů najdeme například v [15].

9 Závěr

V této diplomové práci byly shrnuty základní fyzikální a matematické principy digitální holografie se speciálním zaměřením na digitální osovou holografickou mikroskopii (DIHM).

První část práce dává do souvislosti polohu předmětového a obrazového bodu v závislosti na geometrii záznamu hologramu. Pozornost je především věnována podrobnému odvození příčného a podélného profilu bodové rozptylové funkce. Příslušné výpočty byly provedeny ve Fresnelově aproximaci. Ukázali jsme, že výsledky jsou společné pro osovou holografii, mimoosovou holografii a pro osovou holografii s paraboloidní referenční vlnou (Fresnelova aproximace DIHM). Na základě získaných poznatků bylo odvozeno podélné a příčné kritérium rozlišení. Výsledky jsou ve shodě s rozlišovacími kritérii [7] pro DIHM se sférickou referenční vlnou. Ve Fresnelově aproximaci je dvoubodové příčné rozlišení nepřímo úměrné předmětové vzdálenosti a přímo úměrné rozměrům detektoru.

Digitální holografie je dvoustupňový proces. Skládá se ze záznamu hologramu a následné digitální rekonstrukce. Pro účely rekonstrukce byl v programu MATLAB naprogramován rekonstrukční algoritmus využívající Fresnelovu aproximaci difrakčního integrálu. Algoritmus je založený na principu jednostupňového šíření, který jsme popsali ve čtvrté kapitole.

Podstatným omezením digitální holografie je vzorkovací kritérium, které přímo omezuje rozlišení dané zobrazovací soustavy. V páté kapitole jsme podrobně diskutovali podmínky omezující geometrii záznamu pro osovou holografii, mimoosovou holografii a osovou holografii s paraboloidní referenční vlnou. Výpočty byly opět provedeny ve Fresnelově aproximaci. Odvodili jsme, že nejlepšího rozlišení je schopna dosáhnout v dané aproximaci osová holografie s paraboloidní referenční vlnou. Zobrazovací výkon v závislosti na zorném poli byl pro jednotlivé techniky záznamu ohodnocen veličinou SW . Rozdíly mezi těmito závislostmi byly nejpodstatnější pro malá zorná pole, přičemž nejvyšších hodnot SW dosáhla osová holografie s paraboloidní referenční vlnou. V článku [13] byly tyto závislosti odvozeny pro osovou a mimoosovou holografii. Naše výsledky jsou plně ve shodě.

Druhá část diplomové práce obsahuje experimentální výsledky. Cílem těchto experimentů bylo ověřit základní fyzikální principy DIHM. Nejprve byly pro rekonstrukci rovinnou vlnou ověřeny vztahy mezi polohou obrazového a předmětového bodu. Následovalo ověření závislosti pološířky příčného a podélného profilu PSF na parametrech soustavy. Výsledky ukazují na dobrou shodu mezi teorií a experimentem.

Na závěr byly zobrazovány reálné objekty, např. čárové testy. Rekonstrukce těchto objektů vykazují znatelnou degradaci obrazu vlivem přítomnosti komplexně sdruženého obrazu. Záznam jsme také provedli pomocí dvou větví Machova-Zehnderova interferometru. Díky tomuto uspořádání je možné od hologramu odečíst intenzitu referenční a předmětové vlny. Výsledná rekonstrukce byla velmi nekvalitní, proto byl záznam hologramu USAF testu modelován numericky. V rekonstrukci tohoto hologramu byly přítomny nežádoucí artefakty i po odečtení referenční a předmětové intenzity. Podle [7] by se vliv komplexně sdruženého obrazu měl podstatně redukovat s většími rozměry detektoru a menší předmětovou vzdáleností.

Experimentální část práce tedy na jednu stranu ověřila základní principy DIHM a na druhou upozornila na omezení při zobrazování skutečných vzorků za daných geometrických parametrů geometrie záznamu. Tyto parametry jsme zvolili tak, aby byla splněna Fresne-

lova aproximace (místo sférické referenční vlny jsme pracovali s paraboloidní referenční vlnou).

Tato diplomová práce rozšiřuje diplomové práce věnující se digitální holografii na katedře optiky [25].

Literatura

- [1] D. Gabor: *A new microscopic principle*, Nature 161, pp. 777-778 (1948).
- [2] E. N. Leith, J. Upatnieks: *Wavefront reconstruction with difused illumination and three-dimensional objects*, J. Opt. Soc. Am. 54, pp. 1295-1301 (1964).
- [3] E. N. Leith, J. Upatnieks: *Microscopy by wavefront reconstruction*, J. Opt. Soc. Am. 55, pp. 569-570 (1965).
- [4] Goodman, Lawrence: *Digital image formation from electronically detected holograms*, Appl. Phys. Lett. 11, pp. 77-79 (1967).
- [5] Schnars, Jüptner: *Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction*, Appl. Opt. 33, pp. 179-181 (1994).
- [6] T. Kreis: *Applications of Digital Holography: From Microscopy to 3D-Television*, J. Europ. Opt. Soc. Rap. Public. 7 (2012).
- [7] Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jürgen Kreuzer: *Digital in-line holographic microscopy*, Applied Optics 45, pp. 836-850 (2006).
- [8] Joseph W. Goodman: *Introduction to Fourier Optics*, International Editon (1996).
- [9] B. E. A. Saleh, M. C. Teich: *Základy fotoniky 1*, MATFYZPRESS, Praha (1994).
- [10] B. E. A. Saleh, M. C. Teich: *Základy fotoniky 2*, MATFYZPRESS, Praha (1994).
- [11] Ahmed Ayoub and Szabolcs Tökés: *Digital In-Line Holographic Microscope Algorithms for Micro-Organisms Detection and Three Dimension Tracking*, <http://colleges.ksu.edu.sa/Papers/Papers/b25.pdf>.
- [12] Etienne Cuhe, Pierre Marquet, Christian Depeursinge: *Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography*, Applied Optics 39, pp. 4070-4075 (2000).
- [13] Lei Xu, Xiaoyuan Peng, Zhixiong Guo, Jianmin Miao, Anand Asundi: *Imaging analysis of digital holography*, Optics Express 13, pp. 2444-2452 (2005).
- [14] L.Denis, C. Fournier, T. Fournier, T. Ducottet: *Numerical suppression of twin-image in in-line holography of volume of micro-objects*, Measurement Science and Technology 19 (2008).
- [15] Wenbo Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer: *Digital in-line holography for biological applications*, PNAS 98, pp. 11301-11305 (2001).
- [16] H. J. Kreuzer, Manfred H. Jericho: *Holographic microscopy gives new tool for biology and microfluids*, The International Society for Optical Engineering, <https://spie.org/documents/Newsroom/Imported/499/2006120499.pdf> (2006).

- [17] J. Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer: *Immersion digital in-line holographic microscopy*, Optics Letters 31, pp. 1211-1213 (2006).
- [18] Unnikrishnan Gopinathan, Giancarlo Pedrini, and Wolfgang Osten: *Coherence effects in digital in-line holographic microscopy*, J. Opt. Soc. Am. A 25, pp. 2459-2466 (2008).
- [19] D. Alvarez-Palacio, J. Garcia-Sucerquia: *Digital in-line holographic microscopy with partially coherent light: micrometer resolution*, Rev. Mex. Fís. 56, pp. 445-448 (2010).
- [20] Jason D. Schmidt: *Numerical Simulation of Optical Wave Propagation*, SPIE (2010).
- [21] P. Ferraro et al. (Manfred H. Jericho, H. Jürgen Kreuzer) : *Coherent Light Microscopy (Point Source Digital In-Line Holographic Microscopy)*, Springer (2011).
- [22] Ichirou Yamaguchi, Tong Zhang: *Phase-shifting digital holography*, Optics Letters 22, pp. 1268-1270 (1997).
- [23] Lihong Ma, Hui Wang, Yong Li and Hongzhen Jin: *Partition calculation for zero-order and conjugate image removal in digital in-line holography*, Optics Express 20, pp. 1805-1815 (2012).
- [24] Myungjun Lee, Oguzhan Yaglidere and Aydogan Ozcan: *Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography*, Biomedical Optics Express 2, pp. 2721-2730 (2011).
- [25] Adam Himmer: *Digitální holografie a její aplikace*, diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci (2011).