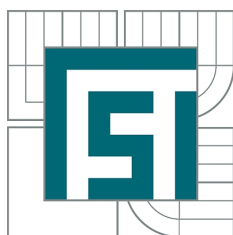


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



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

MOŽNOSTI TROJROZMĚRNÉHO ZOBRAZOVÁNÍ  
V TRANSMISNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU  
POSSIBILITIES OF THREE-DIMENSIONAL IMAGING IN TRANSMITTED-LIGHT  
HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. LUCIA SLÁDKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. PAVEL KOLMAN, Ph.D.

BRNO 2013



## **Abstrakt**

Digitálna holografická mikroskopia (DHM) je neinvazívna metóda vhodná pre získavanie obrazu i u vzoriek s nízkym kontrastom. V súčasnej dobe konštrukcia DHM umožňuje vzorku osvetliť plošným zdrojom svetla, halogénovou lampou. Plošný zdroj sa zobrazuje do prednej ohniskovej roviny kondenzora tak, aby bolo dosiahnuté Köhlerovo osvetlenie vzorky. Každému bodu zdroja odpovedá v predmetovom priestore objektívu rovinná vlna osvetľujúca celé zorné pole, avšak z iného smeru. Poloha bodu plošného zdroja určuje smer osvetlenia. Mikroskop umožňuje teda rekonštruovať nielen intenzitu, ale i fázu predmetovej vlny. Novo navrhnutá a skonštruovaná výmenná dierková clona pri rotácii okolo optickej osi upravuje plošné osvetlenie. Clona je umiestnená excentricky vzhľadom k optickej osi mikroskopu. Dopad zväzku svetla na vzorku je pod definovaným uhlom. Po rekonštrukcii snímok fázy z jednotlivých uhlov osvetlenia by malo byť možné získať trojdimenzionálnu štruktúru vzorky.

## **Summary**

Digital holographic microscopy (DHM) is noninvasive method for obtaining images even from samples with low contrast. Nowadays DHM design makes it possible to illuminate sample by broad light source, halogene lamp. Broad light source is displayed in the front focal plane of condensor in such way, that Köhler illumination is achieved. Each point of the source corresponds to a plane wave in image field of objective, which illuminates the whole field of view, but from different direction. Position of the point determines the direction of illumination. In this reason, the microscope enables so reconstruct not only intensity, but also phase of object wave. New designed and constructed interchangeable pinhole aperture modify broad light illumination by rotation around the optical axis. Aperture is placed eccentrically considering the optical axis of microscope. Incidence of light beam on a sample would be under defined angle. After the reconstruction of taken phase images from individual angles of illumination should be possible to obtain three-dimensional structure of the sample.

## **Klíčová slova**

Koherenciou riadený holografický mikroskop, CCHM, výmenná rotačná dierková clona

## **Keywords**

Coherence-controlled holographic microscope, CCHM, interchangeable rotating pinhole aperture

SLÁDKOVÁ, L. *Možnosti trojrozměrného zobrazování v transmisním holografickém mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 44 s. Vedoucí Ing. Pavel Kolman, Ph.D.



Prehlasujem, že som predloženú prácu *Možnosti trojrozměrného zobrazování v transmisním holografickém mikroskopu* napísala samostatne pod vedením Ing. Pavla Kolmana, Ph.D., a že všetky podklady, ktoré som pre prácu použila, sú uvedené v zozname literatúry.

Bc. Lucia Sládková



Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať svojmu vedúcemu Ing. Pavlovi Kolmanovi, Ph.D., za odborné vedenie práce. Ďalej by som sa chcela poďakovať hlavne svojmu priateľovi a rodine za veľkú podporu a pomoc pri písaní práce. V neposlednom rade chcem poďakovať celému odbornému kolektívu skupiny Experimentálnej biofotoniky, najmä Ing. Zbyňkovi Dostálovi, Ing. Matějovi Týčovi, Ing. Jane Čollákovéj a Ing. Anete Křížovej.

Bc. Lucia Sládková

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>3</b>
1.1	Vývoj interferenčnej mikroskopie . . . . .	3
1.2	Úvod do holografickej mikroskopie . . . . .	5
1.3	Aktuálny stav a motivácia práce . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Koherenciou riadený holografický mikroskop CCHM</b>	<b>7</b>
2.1	Konštrukcia mikroskopu . . . . .	7
2.1.1	Parametre vybraných častí mikroskopu . . . . .	9
2.1.2	Fyzikálne princípy zobrazovania . . . . .	11
2.1.3	Vlastnosti zobrazovania . . . . .	13
2.2	Rekonštrukcia hologramu . . . . .	14
2.3	Spôsob osvetľovania a vznik interferenčných prúžkov . . . . .	16
2.3.1	Plošný zdroj . . . . .	16
2.3.2	Interferenčné prúžky . . . . .	16
2.4	Prehľad vlastností transmisného a reflexného módu . . . . .	17
2.4.1	Reflexný mód . . . . .	17
2.4.2	Transmisný mód . . . . .	17
2.5	Možnosti využitia mikroskopu . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Možnosti trojrozmerného zobrazovania</b>	<b>19</b>
3.1	Úprava tvaru zdroja osvetlenia . . . . .	19
3.2	Princíp zobrazovania . . . . .	20
3.3	Pozorovanie biologických preparátov . . . . .	21
3.4	Obrazová fáza . . . . .	21
3.5	Typy pozorovacích komôrok . . . . .	22
3.5.1	Stacionárne pozorovacie komôrky . . . . .	22
3.5.2	Prietokové pozorovacie komôrky . . . . .	22
3.6	Vplyv veľkosti clony na zobrazované objekty . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Experiment</b>	<b>25</b>
4.1	Zostava s manuálnou rotáciou clony . . . . .	25
4.2	Meranie krycieho sklíčka Cellocate . . . . .	27
4.3	Meranie živých buniek . . . . .	32
<b>5</b>	<b>Rotačná dierková clona</b>	<b>35</b>
5.1	Konštrukčný návrh . . . . .	35
5.2	Rotácia clony . . . . .	36



*OBSAH*

5.3 Riadenie . . . . .	37
<b>6 Záver</b>	<b>40</b>
<b>Zoznam príloh</b>	<b>42</b>
<b>Literatúra</b>	<b>43</b>

# Kapitola 1

## Úvod

### 1.1. Vývoj interferenčnej mikroskopie

Vo svetelných mikroskopoch vzniká zobrazenie vzorky interferenciou nerozptýleného (primárneho) lúča a lúča difraktovaného pri prechode pozorovaným objektom. Zobrazenie zmeny fázy svetla pri prechode mikroskopom ale nie je možné bežnými svetelnými mikroskopmi. To až interferenčná mikroskopia umožnila zobrazovanie s oddelenou predmetovou a referenčnou vetvou.

Od roku 1893, kedy bola Sirksom prvý krát popísaná interferenčná mikroskopia s oddelenými vetvami, boli navrhnuté desiatky rôznych variantov týchto prístrojov. V 50. rokoch 20. storočia sa objavujú prvé komerčne vyrábané interferenčné mikroskopy s úplne oddelenými vetvami, ktorých autormi sú Krug, Laue a Horn [1]. Na nich bolo možné merať rozdiel optických dráh (OPD) predmetovej a referenčnej vetvy. Avšak v tej dobe praktické meranie touto metódou bolo veľmi zdĺhavé a i finančne náročné. Pre bežné pozorovanie biologických preparátov sa preto metóda nevyužívala.

Fluorescencia bola popísaná britským vedcom G. G. Stokesom v roku 1852, keď pri ožiarení fluoritu ultrafialovým svetlom následne došlo k vyžiareniu svetla viditeľného. Jav fluorescencia sa zakladá na princípe absorpcie svetla a následnom vyžiarení svetla väčšej vlnovej dĺžky. Tomuto princípu odpovedá štruktúra energiových hladín atómov a pohlcovanie časti energie pri nežiarivých procesoch. Fluorescenčné farbivá používané pre farbenie buniek sú detekované fluorescenčným mikroskopom. Farbenie je u biologických tkanív vysoko špecifické, a preto sa táto technika stala veľmi rozšírenou a cenenou v biológii a medicíne. Farbivá sa vyrábajú s rôznymi excitačnými a emisnými vlnovými dĺžkami a dajú sa používať cielene na špecifické zložky živej bunky ako i na molekuly [2].

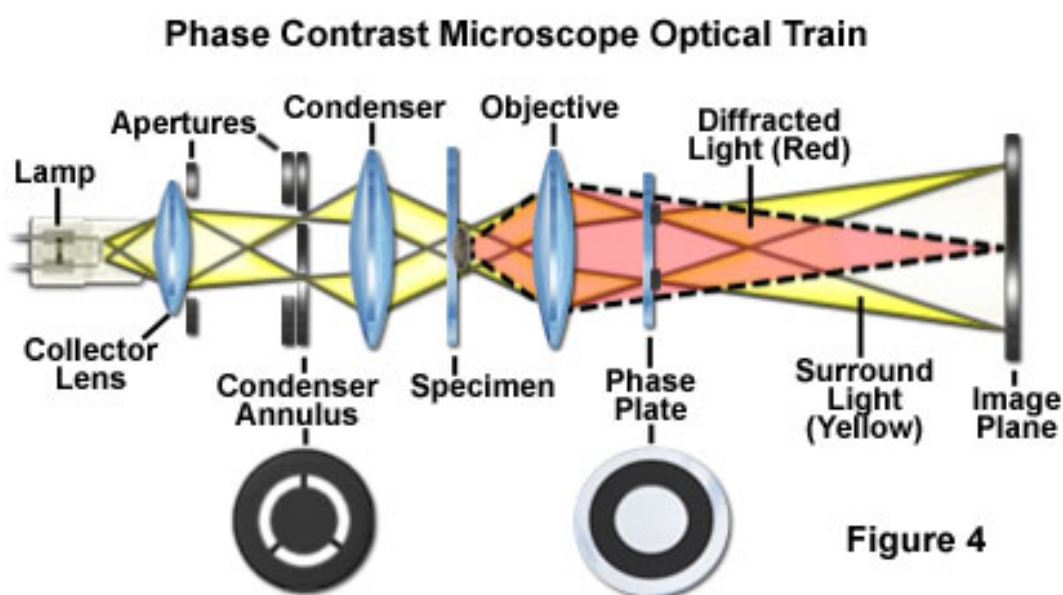
Fluorescenčný mikroskop je podobný bežnému optickému mikroskopu, len svetlo vstupujúce do mikroskopu prechádza dvomi filtermi. Vzorka je ožiarená určitou vlnovou dĺžkou a následne mikroskop spektrálne separuje emitované svetlo bunky s oveľa nižšou intenzitou a privádza ho na detektor. Pri prechode zväzku excitačný filter prepustí len želané vlnové dĺžky, ktoré sa následne odrazia dichroickým zrkadlom a dopadajú na vzorku. Svetlo emitované vzorkou s inou vlnovou dĺžkou prechádza dichroickým zrkadlom a bariérovým filtrom sa vyberajú len dĺžky fluorescencie. Ofarbené objekty sa javia ako jasné žiariace objekty na temnom pozadí [3].

Pri fluorescenčnej mikroskopii sú farbivá rôzne stabilné a metóda je náročná na citlivý detektor, kvôli nízkej intenzite signálu.

## 1.1. VÝVOJ INTERFERENČNEJ MIKROSKOPIE

Iné pozorovacie techniky neumožňovali kvantitatívne vyhodnocovanie fázy, ale jej zmenu dokázali aspoň zviditeľniť. Asi najznámejšou je metóda Zernikov fázový kontrast (1934) využívaná u transmisných mikroskopov. Bunky je možné pozorovať bez fixácie a farbenia v ich prirodzenom stave.

Prvá, svetelná vlna je vzorkou difraktovaná a druhá svetelná vlna prechádza bez difrakcie. Obe svetelné vlny prechádzajú objektívom a fázovou doštičkou umiestnenou v zadnej ohniskovej rovine objektívu, pričom každá vlna prechádza inou časťou fázovej doštičky, ktorá fázovo posunie svetlo rozptýlené vzorkou o  $\pi/2$  voči svetlu nerozptýlenému. Obe vlny sú následne sfokusované do obrazovej roviny. V tomto mieste nastáva deštruktívna interferencia a vytvára sa kontrastný obraz (obr. 1.1). V miestach veľkých gradientov optickej dráhy vzniká halo efekt. Snímka je následne presvetlená, a teda znehodnotená [4].



Obr. 1.1: Dráha lúča pri fázovej kontrastnej mikroskopii, prevzaté z [4].

Inou metódou je Nomarského diferenciálny interferenčný kontrast (DIC), používaný najmä od 60. rokov 20. storočia. Pre potreby mikroskopie bola metóda upravená francúzskym fyzikom G. Nomarskim v 50. rokoch 20. storočia. Rozdiel optických dráh vzniká pri precho de dvoch priečne posunutých zväzkov vzorkou. Používa modifikovaný Wollastonov hranol, ktorý slúži k detekcii optických gradientov a prevádza ich na rozdiely v intenzite. Polarizovaný zväzok prechádza modifikovaným deliacim Wollastonovým hranolom, z ktorého vychádzajú dva vzájomne kolmo polarizované zväzky tesne vedľa seba. Zväzky sa krížia v prednej ohniskovej rovine kondenzora, ale kvôli navzájom kolmej polarizácii neinterferujú. Pri postupe sústavou sa ich vlnoplocha modifikuje v závislosti na hrúbke vzorky alebo jej indexe lomu. Lúče postupujú do objektívu a sú fokusované pred jeho zadnú ohniskovú rovinu. V tomto mieste je druhý modifikovaný Wollastonov hranol, ktorý zväzky skladá dohromady za rovinou hranolu. Zväzky, ktoré prešli hranolom sú ale rozdielne. Za druhým Wollastonovým hranolom je analyzátor. Aby zväzky interferovali, polarizuje oba zväzky rovnako. Po interferencii je vzorka pozorovaná s viditeľnými rozdielmi farby a intenzity. Ani touto metódou sa nedá určiť kvantitatívny fázový posuv svetla spôsobený vzorkou. Metóda zamedzuje vzniku halo efektu pri zachovaní dobrého rozlíšenia [1], [5].

Záujem o interferenčnú mikroskopiu sa obnovil až po objave holografie, lasera a rozvoji výpočtovej techniky a digitálnych záznamových zariadení koncom 20. storočia. Na pozorovanie biologických vzoriek sa od 90. rokov 20. storočia používa prevažne transmisná interferenčná mikroskopia. Vznikajúci kvantitatívny fázový kontrast (OPD) bez farbenia vzoriek a bez toxických zmien živej bunky dáva možnosť pozorovať zmeny v bunke v reálnom čase.

V roku 1952 vedci Davies a Wilkins zistili priamu spojitosť OPD s množstvom suchej bunkovej hmoty, a teda objavili možnosť bunku opticky vážiť alebo zisťovať zmeny hustoty vnútrobunkovej hmoty [6], [1].

## 1.2. Úvod do holografickej mikroskopie

O objav holografickej mikroskopie sa zaslúžil maďarský fyzik Dennis Gábor (rok 1948). Stalo sa tak pri snahe o zvýšenie zväčšenia elektrónového mikroskopu pomocou využitia väčšej vlnovej dĺžky použitého žiarenia pre rekonštrukciu hologramu, než akou bol zaznamenaný. Táto snaha však nebola úspešná, pretože zmena vlnovej dĺžky spôsobovala aberácie zhoršujúce výsledné rozlíšenie natolko, že potlačila efekt väčšieho zväčšenia.

Holografia sa následne rozvíjala ďalej ako optická metóda. Hologram zaznamenáva úplnú informáciu o obrazovej vlne. V počiatočných holografie vo svetelnej mikroskopii sa vedci zaoberali záznamom bez použitia šošoviek a zväčšenia obrazu využitím rozdielnych geometrií záznamového a rekonštrukčného zväzku. To ale viedlo ku chybám pri zobrazení. Prvý svetelný holografický mikroskop bol veľmi podobný tým súčasným. Používal mikroskopový objektív a zaznamenával obraz v obrazovej rovine ako hologram. Umožňoval klasické mikroskopické techniky a zobrazenia (napr. pozorovanie v tmavom poli). Zaznamenávala sa fáza zobrazenia a bolo možné vytvoriť i holografickú rekonštrukciu v trojrozsornej oblasti. Rozlíšenie mikroskopu použitím objektívu pri zaznamenávaní obrazu bolo vyššie, než pri zázname bez objektívu [7].

Holografický záznam obrazu bol uskutočňovaný už v 60. rokoch 20. storočia. V tomto čase neboli dostupné vhodné detekčné zariadenia a dostatočne výkonné počítače na okamžité zaznamenávanie pozorovaní a spracovanie záznamu, a preto sa táto metóda veľmi nerozšírila.

Holografický mikroskop musí byť pre praktické využívanie vybavený okrem optickej sústavy aj digitálnym detekčným systémom a výkonným počítačom pre spracovávanie merania v reálnom čase.

## 1.3. Aktuálny stav a motivácia práce

Interferenčné mikroskopy vyvinuté na Ústave fyzikálneho inžinierstva FSI VUT v Brne umožňujú zobrazenie svetlom nízkej časovej a priestorovej koherencie. Tento spôsob zobrazenia je možný vďaka princípu mimoosovej holografie. Uhol medzi predmetovým a referenčným zväzkom určuje, že interferogram je hologramom. Z jednej snímky je teda možné zrekonštruovať predmetovú vlnu (amplitúdu i fázu). Achromatický mriežkový interferometer nahradil často používaný typ interferometra a je navyše priestorovo invariantný. Ako zdroj svetla sú použiteľné halogénové lampy, pretože počet kontrastných interferenčných

### 1.3. AKTUÁLNY STAV A MOTIVÁCIA PRÁCE

prúžkov v holograme nie je obmedzený priestorovou ani časovou koherenciou, využiť je teda možné plošný priestorovo a časovo nekoherentný zdroj.

Podľa typu pozorovanej vzorky sa vlastnosti zobrazenia upravujú voľbou koherencie osvetlenia, a preto sa zaviedol názov "koherenciou riadený holografický mikroskop", anglicky Coherence-controlled holographic microscope (CCHM) [8].

Motiváciou práce je preskúmanie vplyvu tvaru plošného zdroja osvetlenia na parametre zobrazenia živých biologických vzoriek v koherenciou riadenom holografickom mikroskope. Práca sa zameriava na návrh a konštrukciu kruhovej clony menšieho priemeru, ktorá rotuje okolo optickej osi mikroskopu po kružnici s väčším priemerom tak, že vytvára svietiace medzikružie. Princíp zobrazovania sa overí pri rekonštrukcii nasnímaných statických fázových objektov ako i biologických objektov.

Cieľom práce je konštrukčný návrh úprav mikroskopu zahŕňajúci aj tvorbu výkresovej dokumentácie a jej následné zadanie do výroby, kompletácia zariadenia a overenie funkčnosti návrhu pri pozorovaní preparátov.

## Kapitola 2

# Koherenciou riadený holografický mikroskop CCHM

Koherenciou riadený holografický mikroskop prvej generácie (CCHM), ktorý bol vyvinutý na Ústave fyzikálneho inžinierstva na FSI VUT v Brne je typ transmisného holografického mikroskopu. Toto zariadenie sa ovládaním a výzorom podobá klasickému mikroskopu a má perspektívne vyhliadky, čo sa týka multifunkčnosti využitia v pozorovaní preparátov v biológii a medicíne s využitím i pre potreby priemyselnej výroby.

Od výroby mikroskopu v roku 2006 prebehlo nespočet testovacích meraní, meraní živých buniek, boli použité rôzne typy komôrok pre ich kultiváciu a pozorovanie kvôli zachovaniu čo najprirodzenejšieho prostredia. Takto sa stalo pozorovanie živých buniek hlavnou aplikáciou tohto mikroskopu.

V súčasnej dobe je prepojenie holografickej mikroskopie s inými technikami žiadané z dôvodu trendu kombinovania viacerých metód pri skúmaní vzoriek a preparátov. Takýto typ kombinovaného mikroskopu sa označuje multimodálny holografický mikroskop, skrátene MHM [8].

### 2.1. Konštrukcia mikroskopu

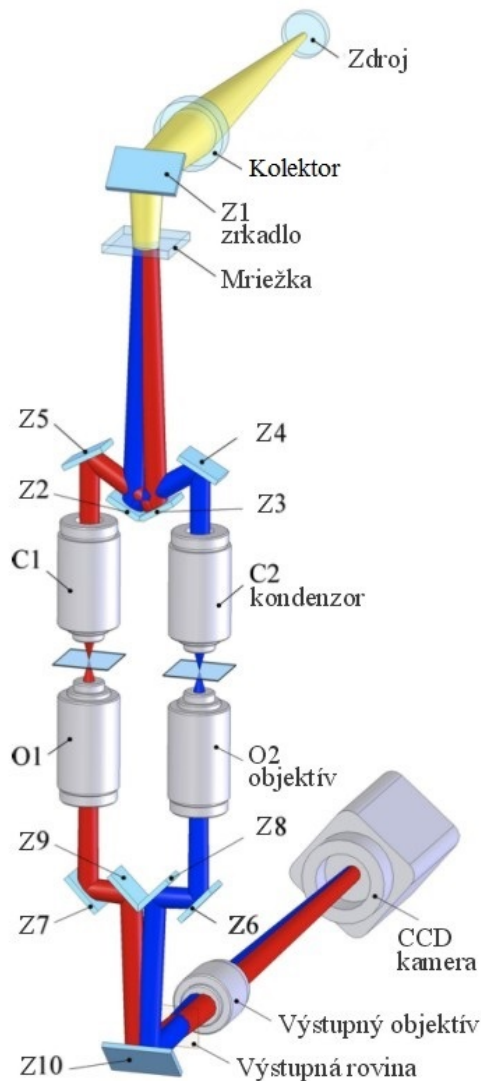
Schéma CCHM 1. generácie sa veľmi nelíši od schémy bežného mikroskopu, teda základnými časťami sú:

- osvetľovacia sústava
- zobrazovacia sústava
- detektor na výstupe

Primárnym rozdielom je ale to, že mikroskop pozostáva z dvoch totožných mikroskopov, kde každý z nich je umiestnený v jednej vetve interferometra Mach-Zehnderovho typu. Tento interferometer je navyše pozmenený pre achromatickú off-axis holografiiu. Vo výstupnej rovine vzniká interferenčná štruktúra s nosnou priestorovou frekvenciou nezávislou na vlnovej dĺžke osvetlenia. Vzhľadom k využívaniu nekoherentného osvetlenia sú vetvy rovnaké, symetrické pozdĺž osi interferometra. Predmetová, ako i referenčná, vetva obsahuje 2 rovnaké pozorovacie mikroskopové objektívy (O) a 2 kondenzory (C), ktoré

## 2.1. KONŠTRUKCIA MIKROSKOPU

majú predĺženú pracovnú vzdialenosť. Kondenzor (C) osvetľuje pozorovaný predmet a objektív (O) predmet zobrazuje do výstupnej roviny (OP), kde dochádza ku interferencii. Osvetľovanie je spoločné pre obe vetvy, zabezpečované pomocou plošného zdroja svetla (S) (môže byť súčasne priestorovo i časovo nekoherentný). Zdroj je kolektorom (L) zobrazovaný cez delič zväzku (G) do predmetových ohniskových rovín oboch kondenzorov, a takto vznikne rovnomerné Köhlerovo osvetlenie. Do osvetľovacej sústavy patria i výmenné apertúrne clony nachádzajúce sa v rovine plošného zdroja svetla (S) a aj výmenné farebné a neutrálne filtre (F). Osvetľovacia sústava má os zjednotenú s osou interferometra a je kolmá na rovinu deliča zväzku (G) [8].



Obr. 2.1: Chod lúčov v CCHM 1. generácie, prevzaté a upravené z [8].

Deličom je transmisná difrakčná mriežka, ktorá delí zväzok do 1. a -1. difrakčného rádu. Rovina difrakčnej mriežky, predmetová rovina objektívu a výstupná rovina interferometra sú opticky združené. V predmetových rovinách objektívov vzniká zobrazenie povrchu difrakčnej mriežky, ale bez štruktúry prúžkov (vrypov). Tento stav nastáva, pretože mriežková štruktúra je pod medzou rozlíšenia kondenzora. Interferenčná štruktúra vzniká vo výstupnej rovine privedením oboch difrakčných rádo. Výstupný objektív (OL) zväčšuje interferenčnú štruktúru, hologram, vo výstupnej rovine (OP) na detektor (D).

Os výstupného objektívu a detektora je zjednotená s osou interferometra a kolmá k výstupnej rovine [8].

V roku 2009 bol vyvinutý nový typ mikroskopu, CCHM 2. generácie. Používa sa odrazná difrakčná mriežka, na rozdiel od transmisnej difrakčnej mriežky používanej u CCHM 1. generácie, ktorá je umiestnená v ohniskovej rovine tubusovej šošovky. Vďaka tomu je možné používať objektív s nekonečnou tubusovou dĺžkou. Mikroskop je primárne navrhnutý pre transmisný mód, pozorovanie v prechádzajúcom svetle, za využitia bežných mikroskopových kondenzorov. Použité sú kondenzory s väčšou pracovnou vzdialenosťou ako objektívy, a teda usporiadanie je invertované oproti zaužívanému, aby bol poskytnutý dostatok priestoru pre pozorovacie komôrky i pri väčších zväčšeniach objektívov. Medzi objektívmi a tubusovými šošovkami takto vzniká priestor nekonečného zväzku rovinných vln a vzniká tak i možnosť vloženia modulov. Rastie tak počet použiteľných zobrazovacích techník ako napr. fluorescencia, optická pinzeta, ramanovská spektroskopia a iné.

### 2.1.1. Parametre vybraných častí mikroskopu

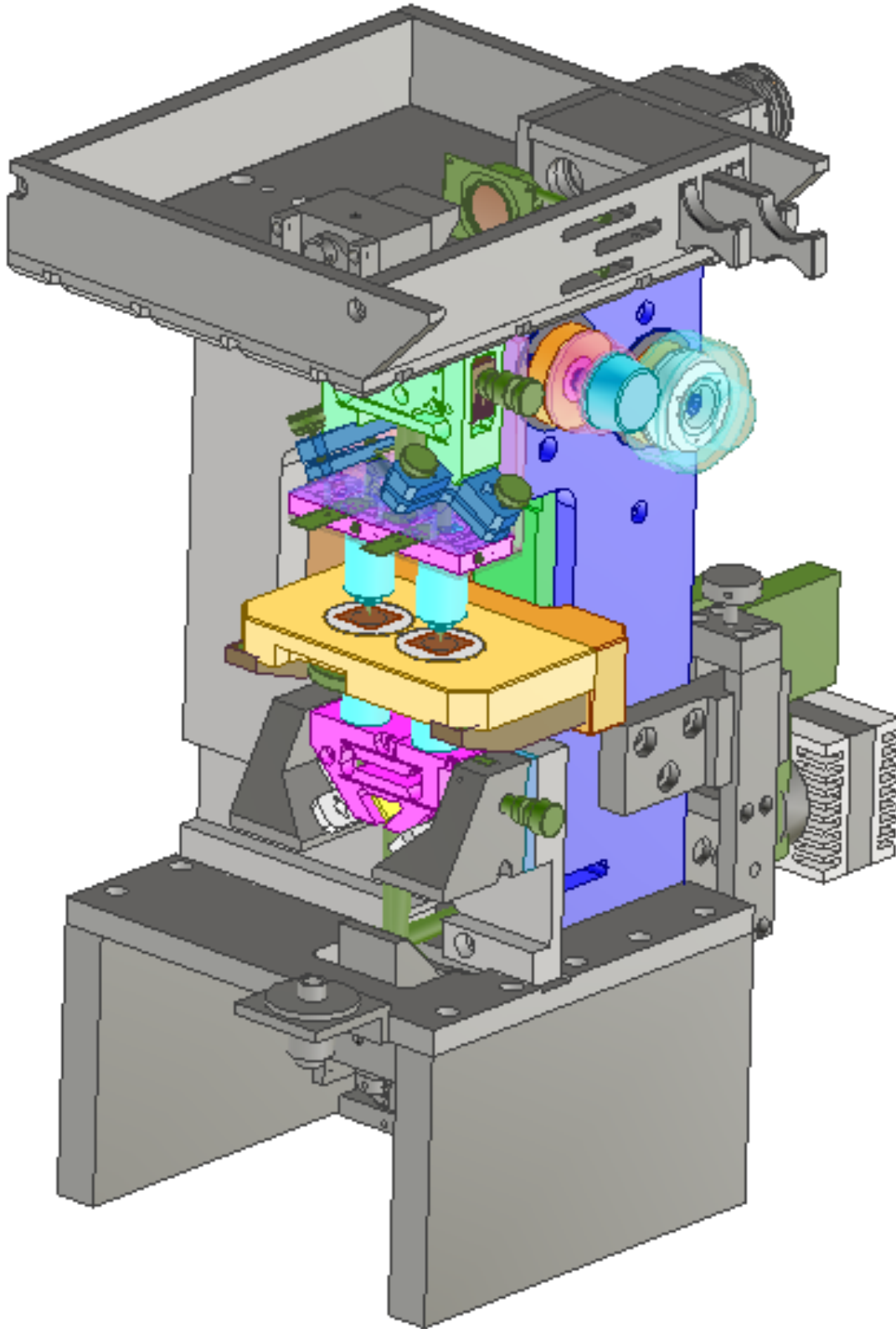
Skonstruovaný CCHM 2. generácie je tvorený nasledujúcimi konštrukčnými prvkami, z ktorých väčšina je zo zliatin hliníka a ostatné, väčšinou pohyblivé časti a časti s trecou plochou, sú mosadzné.

Bližší popis parametrov vybraných častí mikroskopu:

- **interferometer** - achromatický, priestorovo invariantný so symetrickou konštrukciou
- **osvetľovacia sústava** - svetlo z externého halogénového zdroja je privádzané svetlovodným káblom do osvetľovacieho systému pre holografický mikroskop, kde sa nachádza karusel s 8 clonami o rôznych priemeroch (0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 3; 4; 5 mm). Súčasťou systému je bariérový filter pre odtienenie IR žiarenia, tzv. studený filter.
- **kolektor** - dvojica šošoviek s ohniskovou vzdialenosťou 77,03 mm, hrúbky 8,6 mm a s priemerom 25 mm. Zväčšenie je 1,6 krát, šošovka je centrovateľná kvôli justácii.
- **difrakčná mriežka** - slúži ako delič zväzku a jej priestorová frekvencia je  $71 \text{ mm}^{-1}$ .
- **zrkadlá** - naklápatelné v dvoch osiach, čo umožňuje pri justácii zjednotenie zobrazenia difrakčnej mriežky vo výstupnej rovine oboma vetvami. Z4 je posuvné i v smere osi interferometra, kvôli správne vycentrovaniu na os zväzku.
- **kondenzory** - posuvné zároveň s celou osvetľovaciou časťou v osovom smere, pre umožnenie výmeny objektívov a zaostrenie roviny deliča zväzku pri justácii. V smere kolmom na os zväzku sa posúvajú nezávisle, čo je dôležité pre výmenu objektívov s väčším zväčšením, kedy sa prejavuje nesúososť kondenzora s objektívom.
- **objektívy** - pre správnu funkciu mikroskopu musia byť rovnakého zväčšenia ako kondenzory. Objektív O2 sa osovo posúva kvôli zaostreniu roviny mriežky nezávisle v oboch vetvách.
- **mikroskopový stolček** - vyhrievaný (teplotne stabilizovaný), posuvný v osi interferometra. Vzorka i referencia sú umiestnené na tom istom stolčeku, čo zaručuje



## 2.1. KONŠTRUKCIA MIKROSKOPU



Obr. 2.2: CCHM 2. generácie [8].

súčasný posuv. Referencia sa dá nezávisle posúvať i v osi zväzku kvôli zaostreniu predmetov v oboch vetvách zároveň.

## 2. KOHERENCIOU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP CCHM

- **detektor** - digitálna kamera s veľkosťou čipu  $1376 \text{ pixelov} \times 1038 \text{ pixelov}$ , veľkosť pixelu  $6,45 \text{ } \mu\text{m} \times 6,45 \text{ } \mu\text{m}$ . Rýchlosť snímania je 12 snímok za sekundu, 12 bitov, chladená Peltierovým článkom s digitálnym prenosom.
- **zorné pole** - veľkosť  $2,2 \text{ mm} \times 1,7 \text{ mm}$  (uhlopriečka  $2,8 \text{ mm}$ ). Voči konvenčným mikroskopom 3-krát menšie, kvôli potrebe dostatočného navzorkovania vysokej priestorovej frekvencie hologramu vo výstupnej rovine.
- **statív** - z duralových dosiek, šírky  $18 \text{ mm}$  s možnosťou otočenia o  $180^\circ$  do invertovanej polohy.
- **vibrácie** - pomocou betónovej dosky so silentblokmi pasívne tlmenie.
- **stabilizácia teploty** - topné telesá a regulátory teploty sú v betónovej doske. Mikroskop i s ohrevnými doskami je v termoizolačnom boxe, ktorý je pre pozorovanie buniek vyhrievaný na  $35^\circ \text{ C}$ , samotný preparát je vyhrievaný pomocou stolčeka na  $37^\circ \text{ C}$ .

Mikroskop (obr. 2.3) je nainštalovaný v Laboratóriu experimentálnej fotoniky a biofotoniky na Ústave fyzikálneho inžinierstva FSI VUT v Brne.

### 2.1.2. Fyzikálne princípy zobrazovania

Pri predpoklade, že optická sústava obsahujúca kondenzor a objektív je achromatická, mriežka bude zobrazovať priestorové frekvencie interferenčných prúžkov do výstupnej roviny nezávisle na vlnovej dĺžke.

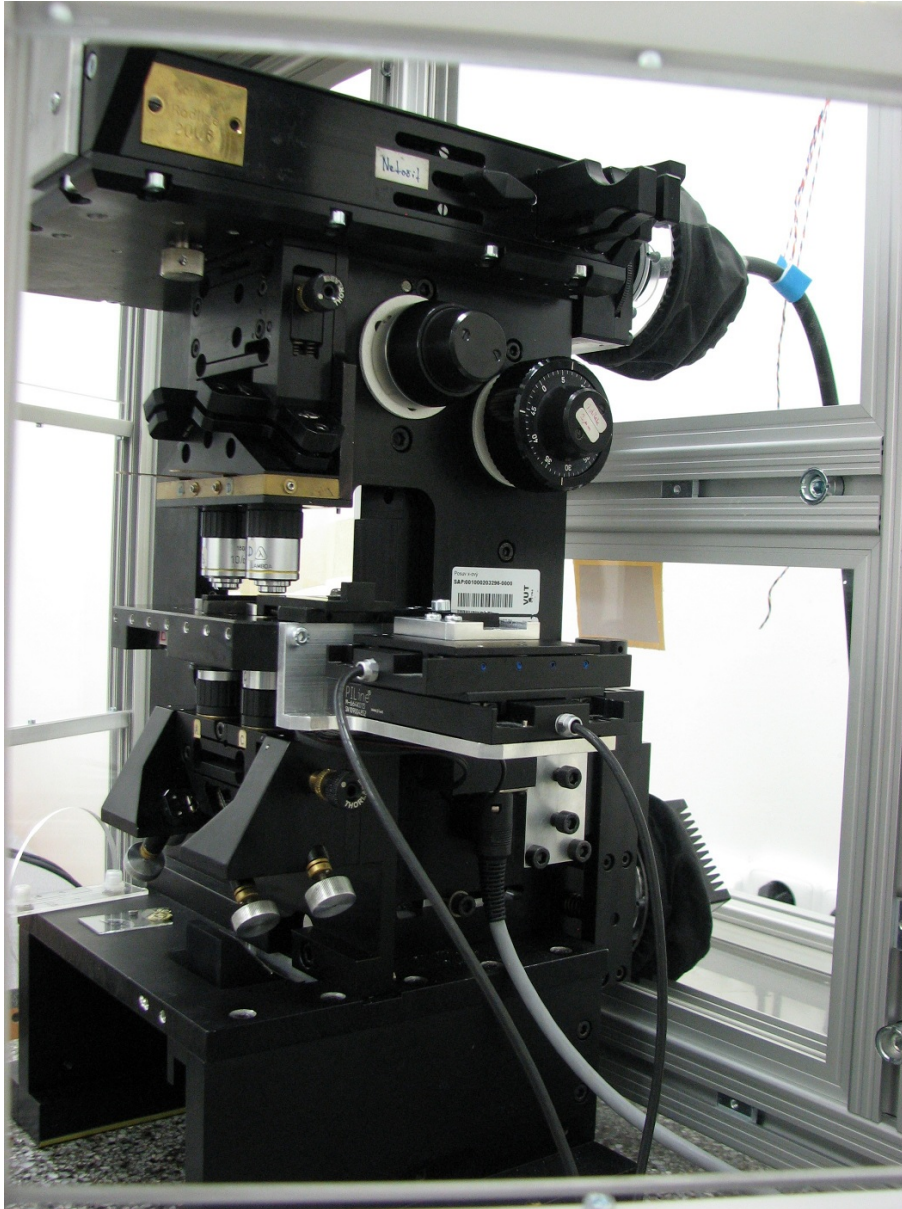
Lúč na optickej osi kolektora (L) tvoriaci os zväzku vychádzajúceho z osového bodu zdroja (S) je mriežkou odklonený pod uhlom  $\theta$  a pre jeho veľkosť platí:

$$\sin \theta = n\lambda f_G, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2 \dots \quad (2.1)$$

kde  $\lambda$  - vlnová dĺžka,  $n$  - difrakčný rád. Ďalej budeme používať tvar rovnice pre  $n = 1$ .

Naklonenie vetví interferometra od osi o uhol  $\varphi_0$  odpovedá strednej vlnovej dĺžke  $\lambda_0 = 550 \text{ nm}$ , pre ktorú bol interferometer navrhutý. Disperzia mriežky farebne rozkladá zobrazenie zdroja (S) v predmetových ohniskových rovinách kondenzorov (C). Pre  $\lambda = \lambda_0$  stred zdroja leží na optickej osi kondenzora, pre  $\lambda \neq \lambda_0$  je stred priečne posunutý voči tejto osi. Z rovnice vyplýva, že s dlhšou vlnovou dĺžkou  $\lambda$  rastie i difrakčný uhol  $\theta$  a z tohto dôvodu je zobrazenie zdroja v predmetových ohniskových rovinách kondenzorov posunuté pre väčšie vlnové dĺžky  $\lambda$  ďalej od osi i od seba navzájom. V obrazových ohniskových rovinách objektívov (O) sekundárne obrazy zdroja vznikajú stranovo posunuté o rovnakú vzdialenosť v opačných smeroch voči optickej osi ako v prípade kondenzorov. Menšia vzdialenosť sekundárnych obrazov zdroja od osi i od seba navzájom je u väčších vlnových dĺžok  $\lambda$ . Z toho je zrejmé, že stranovo prevrátené je i poradie farieb v spektrálnom rozklade. Ak by sa zväzky divergujúce zo sekundárnych obrazov zdroja v oboch vetvách šírili priamo do výstupnej roviny (OP), prúžky vznikajúce v tomto mieste by nemali rovnakú priestorovú frekvenciu pre rôzne vlnové dĺžky  $\lambda$ . Pre zväzky väčších vlnových dĺžok interferujúce pod menším uhlom by vznikali prúžky s nižšou frekvenciou a obrátene. Ak chceme, aby vznikol achromatický holografický záznam, musia zobrazujúce zväzky rôznych vlnových

## 2.1. KONŠTRUKCIA MIKROSKOPU



Obr. 2.3: CCHM 2. generácie.

dĺžok tvoriť interferenčné prúžky jedinej priestorovej frekvencie. Každá vlnová dĺžka musí mať uhlovú veľkosť sekundárnych zobrazení zdroja voči výstupnej rovine rovnú uhlovej veľkosti primárnych zobrazení zdroja voči difrakčnej mriežke.

Vetvy interferometra sú prekrížené pomocou zrkadiel ( $Z$ ), ktoré sú umiestnené za objektívmi. Prekríženie môže byť v zobrazovacej časti aj v osvetľovacej časti, nie však súčasne. Priestorová frekvencia interferogramu vo výstupnej rovine ( $OP$ )  $f_{OP}$  je dvojnásobná ako priestorová frekvencia  $f_G$  difrakčnej mriežky, pretože pre interferogram vzniká z 1. a -1. difrakčného rádu mriežky ( $G$ ). Platí [8]:

$$f_{OP} = 2 \sin(\theta) / \lambda = 2f_G, \quad (2.2)$$

### 2.1.3. Vlastnosti zobrazovania

Mikroskop vie zobraziť objekty i v silne rozptyľujúcom prostredí a umožňuje teda potlačiť svetlo násobne rozptýlené v oblastiach, ktoré neležia v predmetovej rovine.

Koherentné zdroje spôsobujú nežiaduci koherentný šum (speckle) a interferencie v optických sústavách. Oba tieto javy výrazne zhoršujú kvalitu zobrazenia. Obmedziť ho je možné použitím svetla s redukovanou priestorovou koherenciou, a tak zvýšiť kvalitu zobrazenia. Matematicky ide o filtráciu vyšších priestorových frekvencií z rozostrených rovín, znižujúcu negatívny vplyv na zobrazenie zaostrenej roviny. Obmedzením časovej koherencie sa redukuje prítomnosť koherenčného šumu. Ten pochádza z rozostrených rozptyľových centier. V achromatických systémoch kombináciou nízkej priestorovej aj časovej koherencie sa potlačí i rozptyľovanie zväzku na rozhraniach optických členov.

S redukciou šumu súčasne vzniká efekt optických rezov. Táto vlastnosť je typická u konfokálnych mikroskopov, kde sa dosahuje pomocou duálneho rastrovania vzorky bodovými apertúrami. Nízka priestorová koherencia potlačuje vplyv rozptyľujúcich prostredí tak, že obmedzuje interferenciu nebalistických fotónov. Pri obmedzení časovej koherencie dôjde ku stenčeniu optického rezu, ktorý je v prípade nekoherentnej holografie tenší ako u klasického konfokálneho zobrazenia. Potlačenie vplyvu svetla násobne rozptýleného mimo predmetovú rovinu umožňuje vznik optických rezov. Zobrazenie vzniká len za pomoci balistických fotónov v prípade intenzitného i fázového zobrazenia pri prekrytí vzorky silne rozptyľujúcou vrstvou. Pri klasickom zobrazení vo svetlom poli nie je možné takúto štruktúru pozorovať.

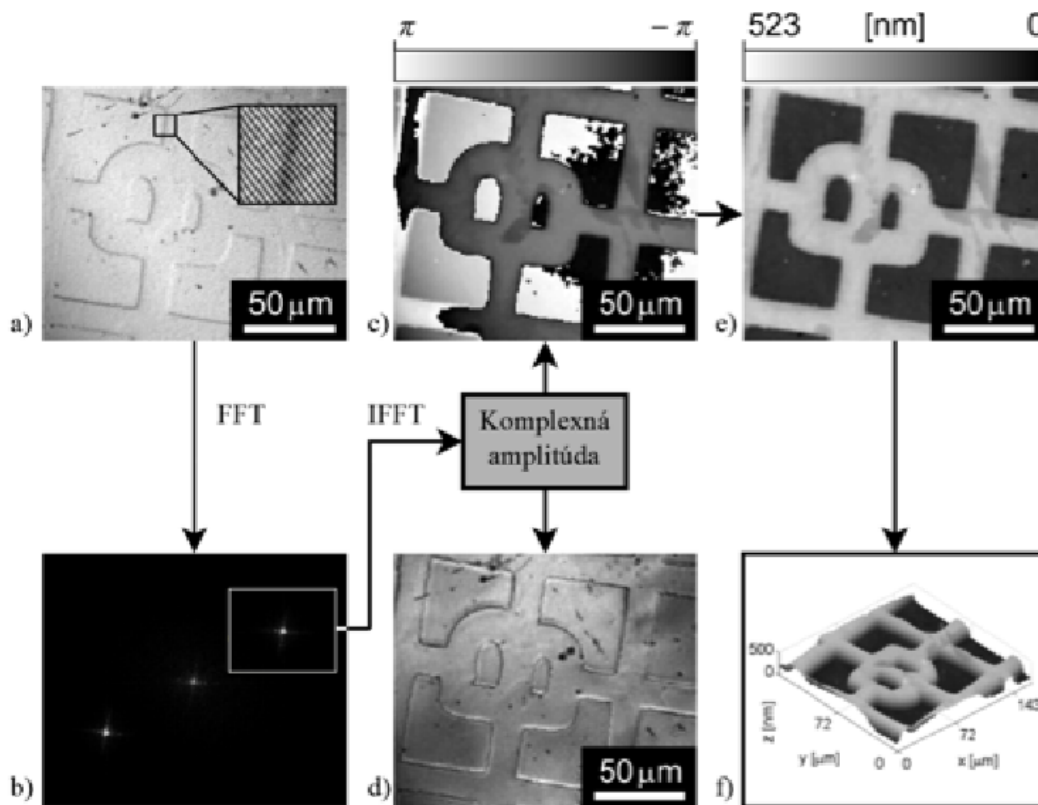
Pri osvetlení osovým bodom vzniká primárny obraz v predmetovom ohnisku kondenzora. Vzorka v predmetovej rovine objektívu je osvetľovaná zväzkom lúčov rovnobežných s optickou osou a lúče rozptýlené vzorkou sú zachytené objektívom tak, že vzorka je zobrazovaná do obrazovej roviny objektívu, ktorá je zjednotená s výstupnou rovinou interferometra. Pri sledovaní bodov na okraji zorného poľa každý smer rozptylu odpovedá jednému bodu v tejto ohniskovej rovine. V obrazovom ohnisku objektívu sa vytvára sekundárny obraz odpovedajúci nerozptýlenému zväzku a v jeho okolí vznikajú body odpovedajúce rozptýlenému lúču, ktoré sú vzájomne koherentné. Guľové vlny vychádzajúce z osového bodu a okrajového bodu sú vzájomne koherentné, interferujú a vytvárajú predmetovú vlnu šíriacu sa do obrazovej roviny objektívu.

V opticky zhodnej referenčnej vetve bez vzorky k rozptylu nedochádza a do obrazovej ohniskovej roviny referenčného objektívu sa zobrazí len osový bod, z ktorého vychádza guľová vlna interferujúca vo výstupnej rovine interferometra s predmetovou vlnou, pretože obe vlny pochádzajú z jediného bodu plošného zdroja a sú koherentné. Vo výsledku dostávame predmetovú vlnu modulovanú interferenčnými prúžkami s priestorovou frekvenciou  $f_{OP}$ .

S rovnakou priestorovou frekvenciou vzniká vo výstupnej rovine interferenčná štruktúra pre ľubovoľný bod. Z plošného zdroja prúžky od všetkých bodov zdroja majú rovnaký fázový posuv a zobrazia sa presne na seba. Ak je však plošný zdroj priestorovo nekoherentný, sčítajú sa príspevky v intenzite.

## 2.2. Rekonštrukcia hologramu

K rekonštrukcii obrazovej amplitúdy a fázy sa používa metóda, ktorá funguje na princípe odstránenia nosnej priestorovej frekvencie  $f_{OP}$  vo fourierovskom priestore a to takým spôsobom, že zaznamenaný hologram sa prevedie na spektrum priestorových frekvencií pomocou algoritmu dvojrozmernej rýchlej Fourierovej transformácie (FFT). V postrannom pásme je obrazové spektrum separované maskou v tvare kruhového okna s polomerom určeným maximálnou obrazovou frekvenciou. Následne je toto separované spektrum presunuté tak, aby pôvodná nosná priestorová frekvencia  $f_{OP}$  bola po presunutí v nulovej priestorovej frekvencii. Toto separované spektrum je potom násobené Hanningovou váhovou funkciou v tvare  $0,5(1 - \cos \pi \rho)$ , kde  $\rho$  je normovaný polomer váhovej funkcie. Pre túto funkciu platí, že  $\rho = 1$  na okraji kruhového okna. Potom je spektrum pomocou dvojrozmernej inverznej FFT (IFFT) transformované na komplexnú obrazovú amplitúdu, z ktorej sa vypočíta reálna amplitúda (modul). Jej druhá mocnina odpovedá obrazovej intenzite. Rovnako z nej je možné vypočítať obrazovú fázu (argument).



Obr. 2.4: Grafické znázornenie rekonštrukcie obrazovej vlny, a) Hologram i s detailom interferenčnej štruktúry. b) Spektrum priestorových frekvencií, kde uprostred je autokorelačné spektrum, na okrajoch sú spektrá okolo nosnej frekvencie  $f_{OP}$ . c) Fázový obraz. d) Intenzitný obraz. e) Fázový obraz s naviazanou fázou. f) 3D rekonštrukcia obrazu. Prevzaté z [9].

Na rekonštrukciu amplitúdy a fázy touto metódou (odstránenie nosnej priestorovej frekvencie) musí existovať len jediná nosná priestorová frekvencia. Každý bod plošného zdroja vytvára sústavu interferenčných prúvkov rovnakej frekvencie  $f_{OP}$  s rovnakým fá-

## 2. KOHERENCIOU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP CCHM

zovým posuvom. Sústavy prúžkov od jednotlivých bodov sa intenzitne skladajú s dostatočnou presnosťou cez seba, a teda navrhnutý interferometer môžeme považovať za priestorovo invariantný.

Hologram má intenzitu v bode  $x = (x_1, x_2)$  výstupnej roviny (OP) interferometra z dôvodu priestorovo nekoherentného plošného zdroja svetla rovnú súčtu intenzít príspevkov od jednotlivých bodov (s) zdroja (S). Tomu odpovedá vzťah:

$$i(x) = \sum i_s(x) = \sum |o_s(x) + r_s(x)|^2, \quad (2.3)$$

kde  $o_s$  a  $r_s$  sú komplexné amplitúdy predmetovej a referenčnej vlny vo výstupnej rovine (OP).

Hustota vrypov (minimálna hodnota priestorovej frekvencie) mriežky musí spĺňať 2 podmienky:

1. Plynie z holografickej podmienky - dosadením za  $f_{OP}$  dostaneme:

$$f_G \geq 2NA/m\lambda_0, \quad (2.4)$$

Pri predpoklade, že u mikroskopových objektívov (kondenzorov) je vstupná pupila rovnaká ako mechanický otvor v rovine dosadenia kondenzora, je tento otvor apertúrnou clonou o priemere  $d$  ležiacou vo vzdialenosti  $l$  od difrakčnej mriežky. Vzdialenosť  $l$  je meraná pozdĺž optickej osi kondenzora. Pre priemer  $d$  vstupnej pupily kondenzora (C), resp. výstupnej pupily (O) platí:

$$d \approx 2lNA/m, \quad (2.5)$$

kde  $NA/m = \sin \alpha'$  je numerická apertúra v predmetovom priestore kondenzora. Pre malé uhly  $\alpha' \approx 1,5^\circ$  platí:

$$\sin \alpha' \approx \tan \alpha', \quad (2.6)$$

Vzťah stanovuje priestorovú frekvenciu tak vysokú, že primárne zobrazenie zdroja v nultom ráde difrakcie je oddelené od zobrazenia v 1. ráde pre vlnovú dĺžku  $\lambda = \lambda_0$ . Svetlo z nultého rádu teda nevniká do vstupnej pupily kondenzora. Vzdialenosť ich stredov je rovná  $d$ .

Pri dopade rovinnej vlny v smere normály na mriežku s priestorovou frekvenciou  $f$  vzniká v 1. difrakčnom ráde vlna s rovnakou priestorovou frekvenciou a platí:

$$\lambda f = \sin \alpha_3, \quad (2.7)$$

kde  $\alpha_3$  odpovedá uhlu medzi vlnovým vektorom difraktovanej vlny a normálou k mriežke.

2. Pre difraktovanú vlnu pod apertúrnym uhlom odpovedajúcim posuvu stredu zdroja o  $d/2$  platí:

$$f = \sin \alpha' = NA/m\lambda, \quad (2.8)$$

## 2.3. SPÔSOB OSVETĽOVANIA A VZNIK INTERFERENČNÝCH PRÚŽKOV

z čoho plynie pre posuv o vzdialenosť väčšiu alebo rovnú  $d$  pre priestorovú frekvenciu mriežky druhá podmienka:

$$f_G \geq 2NA/m\lambda_0, \quad (2.9)$$

totožná s prvou podmienkou.

Čo sa týka horného limitu priestorovej frekvencie difrakčnej mriežky, vychádza z rovnice a z podmienky  $|\sin \theta| \leq 1$ .

$$f_G \leq 1/|n\lambda|. \quad (2.10)$$

Zo vzťahu vyplýva, že s rastúcou hodnotou  $f_G$  bude štruktúra prúžkov hologramu jemnejšia. Na ich rozlíšenie kamerou je potrebné ich zobrazíť na čip CCD kamery s väčším zväčšením, čo má za následok zmenšenie zorného poľa. Tak isto sa bude zužovať interval spektrálnej priepustnosti mikroskopu, a teda je najlepšie, aby priestorová frekvencia difrakčnej mriežky bola čo najmenšia.

Mikroskop bol navrhnutý pre 4 totožné planachromatické objektívy s tubusovou dĺžkou 160 mm, pre ktoré je  $l \approx 150$  mm, stredná vlnová dĺžka odpovedá  $\lambda_0 = 650$  nm vzhľadom ku preferovanej biologickej aplikácii mikroskopu, pretože kratšie vlnové dĺžky u biologických objektov pri použití výkonnejších zdrojov svetla vyvolávajú autofluorescenciu molekúl.

S ohľadom na maximálnu veľkosť zorného poľa bola zvolená priestorová frekvencia mriežky (G)  $f_G = 71 \text{ mm}^{-1}$ . Vetvy interferometra zvierajú uhol  $\theta_0 \approx 2,7^\circ$ .

## 2.3. Spôsob osvetľovania a vznik interferenčných prúžkov

### 2.3.1. Plošný zdroj

Použitím plošného zdroja svetla dochádza k negatívne poklesu kontrastu interferenčného obrazca smerom k okrajom zorného poľa. Vo výstupnej rovine je zorné pole primárne obmedzené účinnou plochou difrakčnej mriežky (nami používaná je štvorcová s dĺžkou hrany 3 mm). Obyčajne je detektor natočený okolo optickej osi a prúžky hologramu sú kolmé k jednej z uhlopriečok detektora, lebo sa najlepšie takto navzorkujú najvyššie priestorové frekvencie. Na zistenie poklesu kontrastu interferenčnej štruktúry na okrajoch poľa uvažujeme monochromatický zdroj, priestorovo nekoherentný, kde  $\lambda = \lambda_0$ , vyplňujúci celý priestor vstupnej pupily kondenzora. Osový bod sa zobrazí do stredov kondenzorov a do stredu pupíl oboch objektívov. Takto vznikajú dva páry vzájomne koherentných sekundárnych kvazibodových zdrojov a v oblasti, kde sa zväzky pretínajú, vzniká priestorová štruktúra interferenčných maxim (dvojdielne rotačné hyperboloidy). [8]

### 2.3.2. Interferenčné prúžky

Interferenčná štruktúra vo výstupnej rovine (OP) sa rovná rovinnému rezu touto štruktúrou, maxima tvorí sústava hyperbol. V zornom poli vidíme asi 400 prúžkov ( $f_{OP} =$

## 2. KOHERENCIOU RIADENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP CCHM

142 mm<sup>-1</sup> so šírkou zorného poľa cca 3 mm), z ktorých stredový je lineárny, okrajové sú zakrivené, kedy toto zakrivenie nepresahuje 1 % šírky prúžku. Rozdiel šírky okrajového a stredového prúžku je cca 0,01 %, takže ju môžeme aproximovať lineárnymi ekvidistantnými prúžkami o priestorovej frekvencii  $f_{OP}$ .

Svoje vlastné interferenčné štruktúry vytvárajú i ostatné body zdroja, ale s ostatnými štruktúrami neinterferujú, sčítajú sa v intenzite z dôvodu nekoherencie plošného zdroja (S). Interferenčná štruktúra vytvorená bodmi vzdialenejšími od osi je natočená voči interferenčnej štruktúre vytvorenej paraxiálnymi bodmi o uhol  $\alpha'$ , ktorý je apertúrnym uhlom objektívu v obrazovom priestore. Kvôli tomuto natočeniu dochádza ku odchýlke v priestorovej frekvencii  $f_{OP}$  interferenčných prúžkov vznikajúcich prienikom otočenej interferenčnej štruktúry s výstupnou rovinou. Priestorová frekvencia týchto prúžkov je nižšia, prúžky sú teda širšie, ako pôvodné. Rozdiel v polohe odpovedajúcich si prúžkov  $\delta$  môžeme určiť zo vzťahu:

$$\delta = x(1/\cos \alpha' - 1), \quad (2.11)$$

s maximom na okraji zorného poľa (cca  $x \approx 1,5$  mm). Najvyšší apertúrny uhol pri používaných objektívov je  $\alpha' \approx 1,5^\circ$  a najvyššia hodnota rozdielu  $\delta$  je preto  $\delta_{max} \approx 500$  nm (asi 7 % šírky prúžku).

Výsledná interferenčná štruktúra je rovná súčtu intenzít všetkých obrazcov vytvorených bodmi ležiacimi vo vnútri účinnej plochy zdroja. Čo sa týka kontrastu, ten je najvyšší v okolí stredového bodu, kde sa obrazce najpresnejšie prekrývajú a smerom k okraju zorného poľa klesá. Kontrast v celom poli nepoklesne pod 0,75 a teda môžeme interferometer považovať za priestorovo invariantný. Plošný zdroj s priestorovo nekoherentným zdrojom svetla bol ešte opatrený interferenčným filtrom so strednou vlnovou dĺžkou 650 nm a pološírkou 10 nm.

## 2.4. Prehľad vlastností transmisného a reflexného módu

Pre konštrukciu interferenčných mikroskopov je vhodné využívať achromatické interferometry. Mimoosová holografická mikroskopia má oproti ostatným technikám výhodu rekonštrukcie predmetovej vlny v celom poli z jediného záznamu.

### 2.4.1. Reflexný mód

V prípade reflexného módu nízka časová koherencia sama o sebe umožňuje vznik optických rezov následkom obmedzenej koherenčnej dĺžky, a tak zosilňuje konfokálny efekt, spôsobený duálnym rastrovaním pri konfokálnom systéme a nízkou priestorovou koherenciou v holografickom systéme.

### 2.4.2. Transmisný mód

Rozlišujú sa 2 prípady:

1. Bežné transmisné systémy - nekoherentné holografické systémy s bežným nemriežkovým interferometrom (napr. in-line).



## 2.5. MOŽNOSTI VYUŽITIA MIKROSKOPU

Platí, že priestorová nekoherencia je hlavnou príčinou vzniku optických rezov, zatiaľ čo príspevok nízkej časovej koherencie je druhoradý.

### 2. Nekoherentná obrazová holografia s mriežkovým achromatickým interferometrom (off-axis).

Difrakčná mriežka prevádza efekt časovej nekoherencie na priestorovú. Pri použití širokopásmového bodového zdroja je vplyvom disperzie svetla na rozhraní mriežky stranovo predĺžený v smere kolmom na vrypy mriežky a javí sa teda ako plošný priestorovo nekoherentný zdroj. Vyvoláva sa teda rovnaký efekt optických rezov ako u plošného priestorovo nekoherentného monochromatického zdroja.

Pri širokopásmovom plošného priestorovom nekoherentnom zdroji efekty rezov odpovedajúcich nízkej časovej a priestorovej koherencie sa nielen sčítajú, ale i zosilňujú a rezy sú jemnejšie. Toto platí i pre reflexné systémy.

## 2.5. Možnosti využitia mikroskopu

Transmisné holografické mikroskopy sú využívané väčšinou pre biologické pozorovania, najmä živé bunky, pretože umožňujú kvantitatívne fázové zobrazenie, ktoré je možné prepočítať na plošnú hustotu suchej bunkovej hmoty. Je to neinvazívna a netoxická metóda vhodná na pozorovanie dynamických dejov v reálnom čase. Reflexné holografické mikroskopy sa používajú hlavne v profilometrii povrchov ale i u biologických aplikácií.

Z predchádzajúceho textu plynie význam a zásadná výhoda optickej zostavy s mriežkovým achromatickým interferometrom pre konštrukciu holografických mikroskopov v mimoosovom usporiadaní. Priestorové a spektrálne rozšírenie zdroja je v zostave obmedzované len veľkosťou apertúr optických členov a disperziou mriežky. Koherenciu osvetlenia vieme prispôbiť charakteru vzorky a vlastnostiam zobrazenia, ktoré požadujeme. Vyšší stupeň koherencie osvetlenia umožňuje numerické preostrovanie v osovo rozsiahlejšej oblasti, nižší stupeň koherencie zjemňuje optický rez, a pri nízkej časovej a priestorovej koherencii, kedy sa efekty zosilňujú, je možné dosiahnuť extrémne jemné optické rezy. Pričná rozlišovacia schopnosť odpovedá nekoherentnému zobrazovaciemu procesu a je teda dvojnásobná oproti zobrazeniu v koherentnom osvetlení bodového zdroja, ako sa používa v súčasných digitálnych holografických mikroskopoch s mimoosovým nemriežkovým interferometrom.

## Kapitola 3

# Možnosti trojrozmerného zobrazovania

Medzi súčasné známe techniky umožňujúce trojrozmernú optickú mikroskopiu patrí konfokálna mikroskopia a optická koherenčná tomografia. Tieto metódy generujú trojrozmerné snímky optickým delením vzorky na rezy. Tento spôsob má však určité obmedzenia, týkajúce sa najmä hrúbky vzorky, ktorú je schopné ešte takto zobraziť.

Schopnosť analyzovať štruktúru biologických objektov v troch rozmeroch sa ukázala ako neoceniteľná. Možnosť sledovať biologické funkcie v 3D podáva bližšie informácie o interakcii rôznych častí v bunke. V poslednej dobe došlo ku vývoju a zlepšeniu množstva techník zobrazujúcich 3D informáciu biologických vzoriek. Tak isto boli zautomatizované metódy digitálnej rekonštrukcie tenkých rezov vzorkou. Napriek tomu rekonštrukcia vzorky s veľkosťou niekoľko mm stále vyžaduje stovky individuálnych rezov touto vzorkou.

Konfokálna mikroskopia dokáže zobrazovať do hĺbky približne 1 mm to však ale stále nie je dostačujúca hodnota pre zobrazovanie viacerých vrstiev vzoriek. Táto metóda bohužiaľ dokáže zobrazovať len fluorescenčný signál.

Inou metódou je optická koherenčná tomografia (OCT), ktorá dokáže zobraziť i väčšie hĺbky (2-3 mm). Tomografická rekonštrukcia objektu je možná použitím informácie o sekcii vzorky alebo projekcii, poprípade oboch.

Aktuálne metódy 3D optickej mikroskopie sa nechávajú inšpirovať princípom osvetľovania, ktoré využíva optická koherenčná tomografia [10].

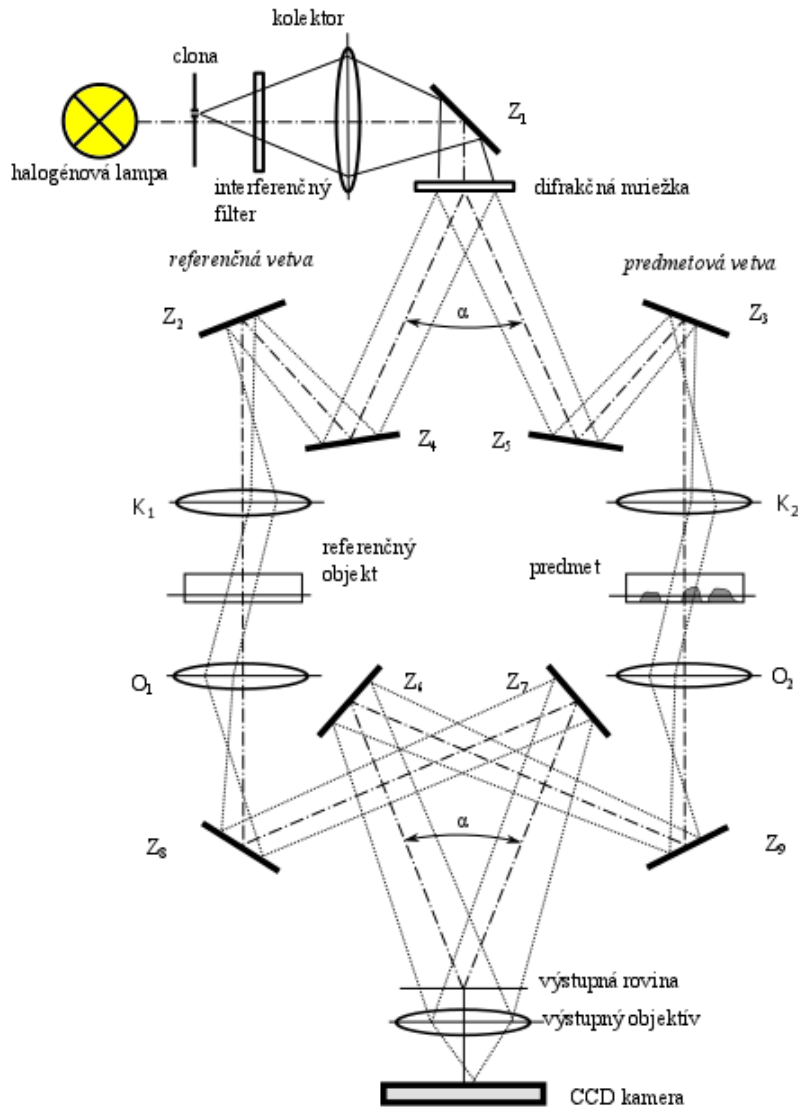
### 3.1. Úprava tvaru zdroja osvetlenia

Princíp tomografického zobrazovania vzorky by teda mohol poskytnúť zlepšenie zobrazovania biologických vzoriek. Aby bolo možné napodobniť spôsob zobrazovania v tomografii, bolo nutné upraviť tvar zdroja používaného v koherenciu riadenom holografickom mikroskope.

Úprava tvaru zdroja bola uskutočnená pomocou dierkovej výmennej rotačnej clony. Otvor v clone je umiestnený excentricky voči optickej osi mikroskopu a tým dochádza ku osvetľovaniu vzorky pod premenlivým uhlom. Bližší popis funkcie a tvaru clony je v kapitole 5 a v sekcii 4.1.

### 3.2. Princíp zobrazovania

Svetlo zo zdroja, ktorým je halogénová lamp, je privádzané pomocou zväzku optických vlákien do mikroskopu. Za zväzkom optických vlákien sa nachádza rotačná clona s otvorom o priemere 1 mm.



Obr. 3.1: Ilustratívna schéma zobrazovania v CCHM 1. generácie pomocou excentricky umiestnenej clony.

Clona sa nachádza v predmetovej rovine kolektora, ktorá zobrazuje otvor v clone do prednej ohniskovej roviny kondenzorov. Osvetlenie vzorky je teda rovnomerné, pod rovnakým uhlom od osi rotácie. Uhol dopadu voči osi kolmej ku osi rotácie sa mení o rovnaký uhol po celej kružnici, po ktorej otvor obieha. Od roviny vzorky, ktorá je úplne osvetlená zväzkom rovnobežných lúčov, sa zväzok lúčov šíri ďalej do objektívu a následne je zobrazovaný na CCD čip kamery. V referenčnej vetve dochádza k rovnakému princípu zobrazovania, avšak namiesto vzorky prechádza lúč cez referenčnú komôrku, v ktorej sa nachádza len médium, bez buniek.

### 3. MOŽNOSTI TROJROZMERNÉHO ZOBRAZOVANIA

Pri prechode lúča vzorkou dochádza v predmetovej vetve k posunu fázy oproti vetve referenčnej a po opätovnom spojení vetví za objektívmi je na CCD čip kamery zaznamenaný hologram (ako už bolo bližšie popísané v kapitole 2). Pre jednotlivé smery osvetlenia (pozície excentricky umiestnenej dierkovej clony) sa zaznamenáva samostatná holografická snímka.

Nositeľom informácie o 3D štruktúre je fázová snímka. Obrázok fázy z každého priemetu, ktorý je zaznamenaný, je úmerný integrálu indexu lomu pozdĺž lúča idúceho skrz vzorku.

### 3.3. Pozorovanie biologických preparátov

Objekty pozorované mikroskopom delíme na tie, ktoré sú dobre pozorovateľné a rozlíšiteľné a na tie, ktoré vieme pozorovať veľmi problematicky a častokrát ich nevieme v zornom poli mikroskopu rozlíšiť.

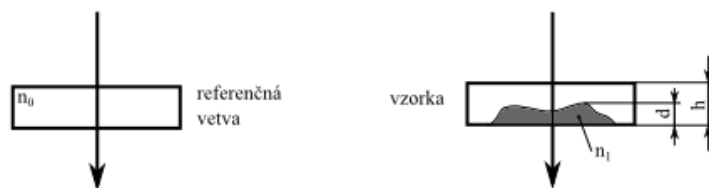
Z optického hľadiska biologické objekty na základe toho rozdeľujeme na:

- amplitúdové
- fázové

Amplitúdové objekty menia amplitúdu prechádzajúceho svetla, zatiaľ čo fázové objekty menia fázu. Detektory signálu sú citlivé na zmenu intenzity a to vytvára prirodzený kontrast pozorovaného objektu. U fázových objektov tomu tak ale nie je, preto je problém ich rozlíšiť od okolia (pozadia) [7].

### 3.4. Obrazová fáza

Pri zobrazovaní objektu dochádza pri prechode lúča cez vzorku v predmetovej vetve mikroskopu ku posunu fázy voči lúču, ktorý prechádza referenčnou vetvou cez referenčnú vzorku bez zobrazovaného objektu (blank vzorka).



Obr. 3.2: Znázornenie optických dráh lúčov v referenčnej a predmetovej vetve mikroskopu, prevzaté a upravené z [11]

Príkladom fázového objektu sú bunky. Informáciu o hodnotách fázy je pri známom indexe lomu možné prepočítať na výšku bunky. Oneskorenie fázy svetelného zväzku prechádzajúceho živou bunkou je úmerné hmotě obsahu bunky bez vody (suchej hmotě). Bunky majú približne rovnaký index lomu, preto ho aproximujeme na priemernú hustotu suchej hmoty. Hodnoty indexu lomu typické pre aproximáciu bunky sú 1,38 - 1,41 [12],

### 3.5. TYPY POZOROVACÍCH KOMÔROK

[13]. V publikácii [14] sa uvádza, že spozdenie rovné jednej vlnovej dĺžke zeleného svetla ( $\lambda = 546 \text{ nm}$ ) odpovedá plošnej hustote suchej hmoty  $3 \text{ pg}\mu\text{m}^{-2}$  ( $= 3 \text{ gm}^{-2}$ ).

## 3.5. Typy pozorovacích komôrok

Príprava pred pozorovaním živých biologických objektov zahŕňa aj výber vhodných komôrok, ktoré by umožňovali kultiváciu buniek ako aj ich pozorovanie.

Používajú sa rôzne typy komôrok. Každý typ je vhodný pre iné podmienky pozorovania preparátov a poskytuje i iné podmienky viac či menej vhodné pre dlhodobejšiu kultiváciu buniek. Pre kultiváciu buniek a pri ich následnom pozorovaní sú používané:

- stacionárne komôrky
- prietokové komôrky

### 3.5.1. Stacionárne pozorovacie komôrky

Tento typ komôrok slúži na umiestnenie preparátu. Komôrky imitujú životné podmienky buniek v Petriho miske a zároveň vyhovujú i podmienkam zobrazenia objektívmi. Pevná časť komôrky je tvorená krycím sklíčkom o priemere 22 mm, ktoré je pripevnené silikónom k nerezovému medzikružiu s vonkajším priemerom 22 mm a vnútorným 15 mm, ktorý ohraničuje priestor pre život buniek. Silikón je netoxický a odolný voči alkoholu a vyživovaciemu médiu buniek. Po sterilizácii sa bunky kultivujú v takto pripravenej komôrke a pre ich pozorovanie sa komôrka zakryje i z vrchnej časti krycím sklíčkom, aby sa nemenila v priebehu experimentu optická dĺžka predmetovej vetvy.

### 3.5.2. Prietokové pozorovacie komôrky

Tento typ komôrok má oproti stacionárnym niekoľko výhod:

1. možnosť aplikácie rôznych účinných látok, a teda sledovanie okamžitej reakcie buniek na túto látku,
2. zachovanie polohy pozorovaných preparátov pred a po aplikácii účinných látok, a tak zaručenie presnosti určenia účinkov látky.

Týmto požiadavkám odpovedajú komerčne dostupné prietokové komôrky od firmy IBIDI (obr. 3.3), umožňujúce pozorovanie buniek pri výmene média alebo aplikácii účinných látok. Tieto komôrky majú i vývody pre silikónové hadičky a sú teda napojiteľné na pumpu, vďaka ktorej vieme regulovať rýchlosť výmeny média. Bunky, pokiaľ nie sú v procese delenia alebo nie sú odumreté, sú prichytené na spodnú časť komôrky.

## 3.6. Vplyv veľkosti clony na zobrazované objekty

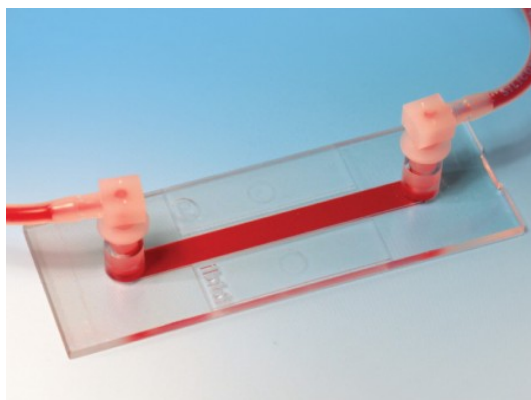
CCHM 1. generácie umožňuje pri pozorovaní vzoriek zmeniť veľkosť clony, ktorá je umiestnená v predmetovej rovine kolektora. Uskutočnené bolo pozorovanie na fibrosarkómových

### 3. MOŽNOSTI TROJROZMERNÉHO ZOBRAZOVANIA

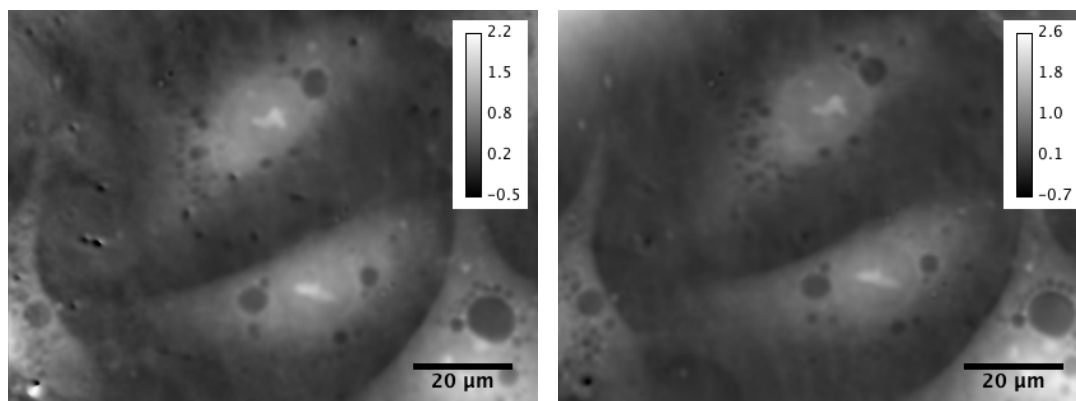
metastazujúcich bunkách A337/311RP ([15]), ktoré boli kultivované v stacionárnych pozorovacích komôrkach. Použité boli objektívy firmy Lambda 20x/0,4 a rovnaký expozičný čas 170 ms. Nasnímané a spracované boli hologramy pri rôznych priemeroch clony, ktorá sa nachádza v mieste optickej osi mikroskopu. Clony mali priemery 0,6; 1 a 2 mm. Hologramy spracované na snímky s naviazanou a vyrovnanou fázou je vidieť na obr. 3.4.

Na základe experimentu bol zvolený najmenší možný priemer clony, pri ktorom ešte nedochádza ku difrakcii na okraji vzoriek. Merania pri veľkosti priemeru clony 0,6 mm po spracovaní vykazujú veľmi podobné parametre ako merania s väčšími priermi.

### 3.6. VPLYV VEĽKOSTI CLONY NA ZOBRAZOVANÉ OBJEKTY

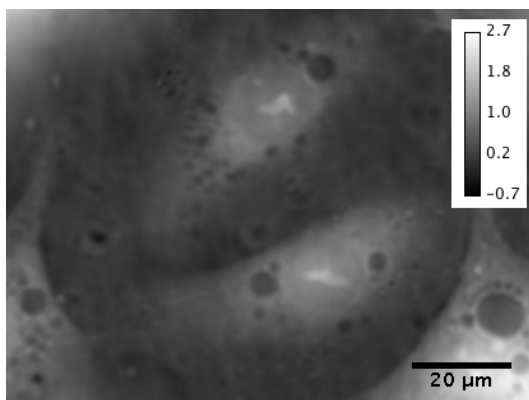


Obr. 3.3: Prietoková komôrka firmy IBIDI [16].



(a) priemer clony 0,6 mm

(b) priemer clony 1 mm



(c) priemer clony 2 mm

Obr. 3.4: Snímky naviazanej a vyrovnanej fázy pozorovaných fibrosarkómových metastázujúcich buniek na CCHM 1. generácie pri rôznom priemere clony. Škála zobrazuje hodnotu fázy v radiánoch.

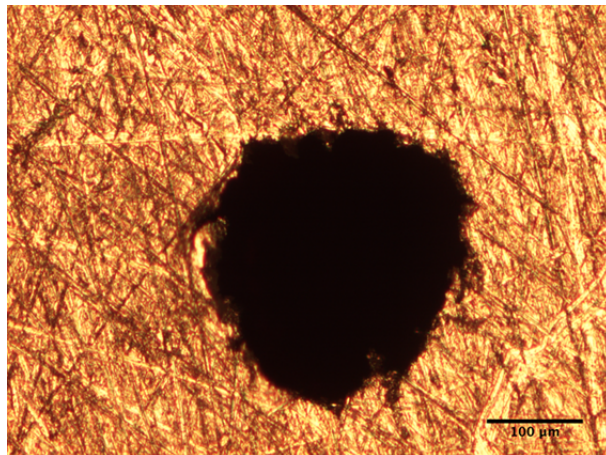
# Kapitola 4

## Experiment

Na overenie funkčnosti navrhnutého systému a princípu zobrazovania bola použitá verzia zostavy s manuálnym posuvom clony. Tá bola použitá na CCHM 2. generácie, ktorý je vo fáze testovania. CCHM 2. generácie je otvorený laboratórny set-up, a z tohto dôvodu je prístupnejší pre úpravy a overovanie funkčnosti princípu zobrazovania zjednodušenej verzie rotačnej dierkovej clony.

### 4.1. Zostava s manuálnou rotáciou clony

Výmenná rotujúca dierková clona s manuálnou rotáciou clony (obr. 4.2) pozostáva z ramena, ktoré slúži na úchyt rotačnej clony. Clona má tvar bubienku, ktorého dno je tvorené kruhovým plieškom o hrúbke 1 mm a je vymeniteľné. Na kruhovom pliešku sa nachádzajú otvory (s priemerom 0,2 mm a 1 mm) slúžiace ako zdroj osvetlenia.



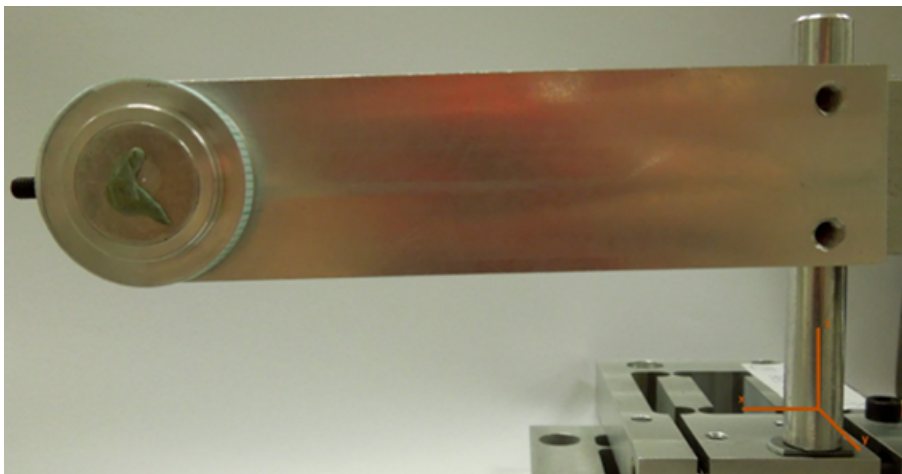
Obr. 4.1: Veľkosť otvoru v zjednodušenej dierkovej clone je približne  $200 \mu\text{m}$ . Obrázok bol vytvorený na reflexnom mikroskope Nikon Eclipse L150, použitý bol objektív firmy Nikon 10x/0,30.

Poloha otvorov je excentrická voči stredu osi rotácie o 1 mm. Pre znázornenie je na obrázku 4.1 možné vidieť clonu s otvorom s priemerom približne 0,2 mm. Veľkosť otvoru bola zvolená čo najmenšia, aby sme získali bodový zdroj a pri tom nedochádzalo ešte k difrakcii na okrajoch snímaných objektov.



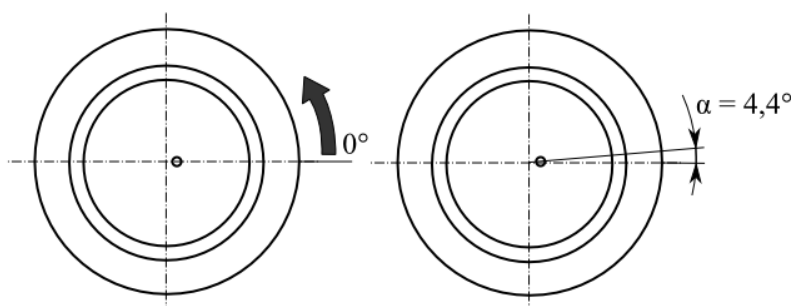
#### 4.1. ZOSTAVA S MANUÁLNOU ROTÁCIOU CLONY

Clona je otáčaná manuálne. Odčítanie jej polohy umožňuje milimetrová papierová stupnica uchytená po obvode. Otočenie clony o jeden dielik milimetrovej stupnice odpovedá zmene uhla dopadu zväzku približne o  $4,4^\circ$  (obr. 4.3). Pre overenie správnosti princípu zobrazovania je táto hodnota dostačujúca. Na pokrytie celého kruhu (teda  $360^\circ$ ) bolo potrebné nasnímať 81 hologramov. Pri požiadavkách na lepšiu kvalitu snímok by bolo už potrebné krok zmenšiť alebo použiť pri spracovaní väčšie množstvo snímok z rôznych smerov osvetlenia. Poloha otvoru, ktorý slúžil ako zdroj osvetlenia, ostala v blízkosti predmetovej roviny kolektora. Celé rameno, v ktorom je clona pripevnená, je posuvné v smere os x, y i z (obr. 4.2).



Obr. 4.2: Zjednodušená výmenná rotačná dierková clona i s ramenom na úchyt a justáciu.

Z dôvodu malej uhlovej apertúry kolektora nebolo možné osvetliť celé zorné pole. Pravdepodobne z dôvodu nepresného vycentrovania polohy clony, dochádzalo k tomu, že vzorka nebola rovnomerne osvetľovaná vo všetkých polohách.



Obr. 4.3: Schéma naznačujúca spôsob rotácie clony.

CCHM 2. generácie leží na optickom stole odizolovanom voči vibráciám. Keďže je rovina vzorky kolmá na stôl, uchyťava sa vzorka na dosku predstavujúcu posuvný stolček vo vertikálnej polohe. Tým, že je vzorka a referencia uložená na rovnakej doske sa pri pohybe pohybujú a zaostrujú zároveň. Na CCD kameru s veľkosťou pixelu  $7,4 \mu\text{m} \times 7,4 \mu\text{m}$  je zaznamenávaný hologram. Pri prechode zväzku svetla cez vzorku dochádza ku fázovému posunu voči referenčnému zväzku v referenčnej vetve mikroskopu. Tento posun nastáva, lebo vzorka, ktorou je v tomto prípade špeciálne sklíčko Cellocate, má v rôznych mies-

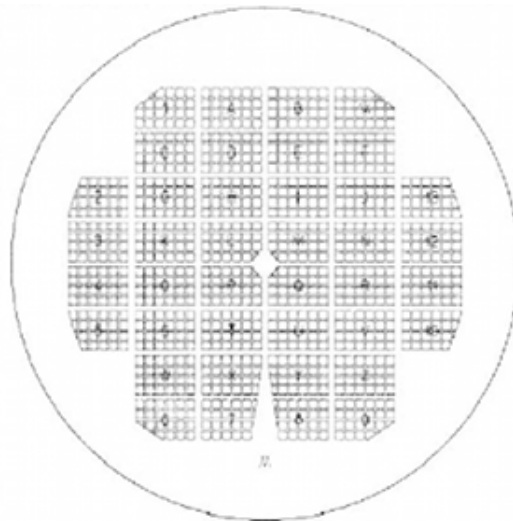
tach rôznu hrúbku a teda lúč urazí rôznu optickú dráhu v sklíčku. Dochádza ku rozdielu optických dráh, ktorý my zaznamenáme práve ako zmenu fázy uchovanú v holograme.

Na osvetľovanie bola použitá halogénová lampa, ktorá je zvyčajne používaná ako zdroj osvetlenia mikroskopu. Medzi zdrojom osvetlenia a kolektorom sa nachádza filter pre vlnovú dĺžku  $\lambda = 650$  nm so spektrálnou šírkou 10 nm. Pri snímaní boli použité plan objektívy firmy Nikon 10x/0,25 a kondenzory. Veľkosť zorného poľa je pri tomto zväčšení približne  $0,47 \times 0,4$  mm. Zvolený expozičný čas bol 800 ms ako v prípade špeciálneho sklíčka Cellocate, tak i pri snímaní živých buniek.

Pomocou vyššie popísanej zostavy s manuálnym posuvom clony boli uskutočnené nasledujúce experimenty.

## 4.2. Meranie krycieho sklíčka Cellocate

Zostava bola po namontovaní najprv overovaná pri zobrazovaní špeciálneho sklíčka Cellocate od firmy Eppendorf, ktoré sa používa pri identifikácii buniek. Špeciálne sklíčko je krycie sklíčko o hrúbke 0,17 mm, na ktorom je vyrytá rýhovaná štruktúra v tvare mriežky. Do tejto mriežky sú zakomponované vyryté písmená abecedy a číslice, v rozložení, ako je možné vidieť na obrázku 4.4.



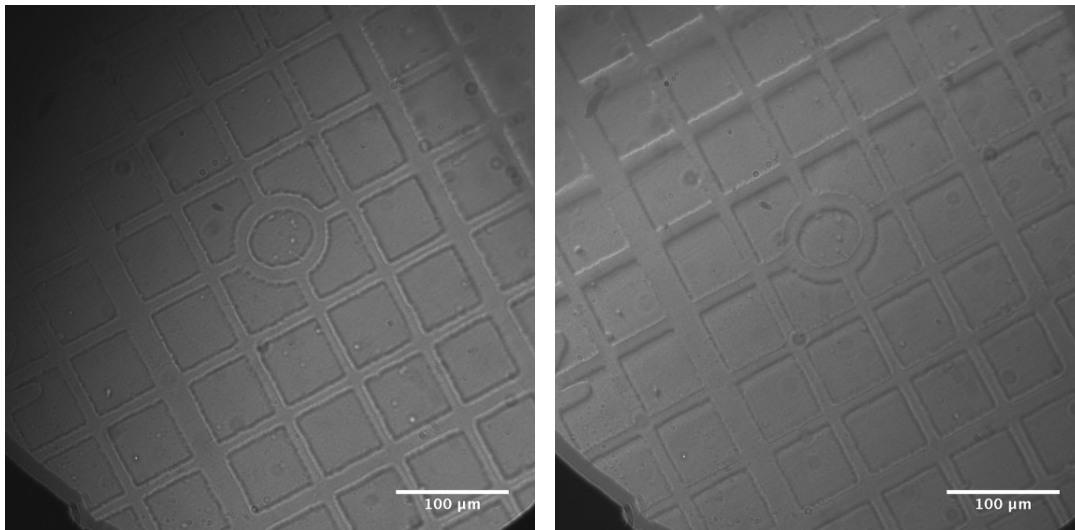
Obr. 4.4: Špeciálne sklíčko Cellocate od firmy Eppendorf, prevzaté a upravené z [17].

Sklíčko bolo umiestnené do roviny vzorky v predmetovej vetve CCHM 2. generácie. Ako referencia bolo použité krycie sklíčko bez štruktúr rovnakej hrúbky ako Cellocate.

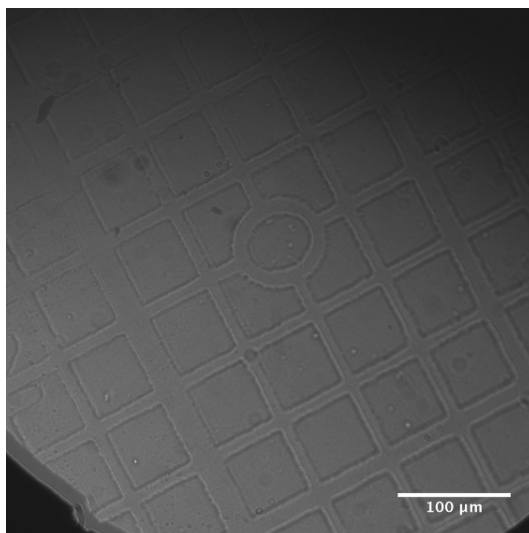
Na snímkach hologramov (obr. 4.5) je možné vidieť podľa tieňa tvoreného štruktúrou mriežky zmenu smeru osvetlenia sklíčka Cellocate v závislosti na pozícii dierkovej clony. Pre názornejšiu ukážku sú vyobrazené (obr. 4.6) snímky amplitúdy a naviazanej vyrovanej fázy pre rovnaké polohy clony ako na obr. 4.5.

Na obr. 4.7 a 4.8 je ukázaná možnosť numericky preostrovať. Numerickým spracovaním je možné zo snímok získať 3D informáciu v porovnaní so samostatnými snímkami (4.5) z jednotlivých smerov osvetlenia.

## 4.2. MERANIE KRYCIEHO SKLÍČKA CELLOCATE



(a) pootočenie clony o uhol  $22,2^\circ$  voči nulovej polohe (b) pootočenie clony o uhol  $164,4^\circ$  voči nulovej polohe



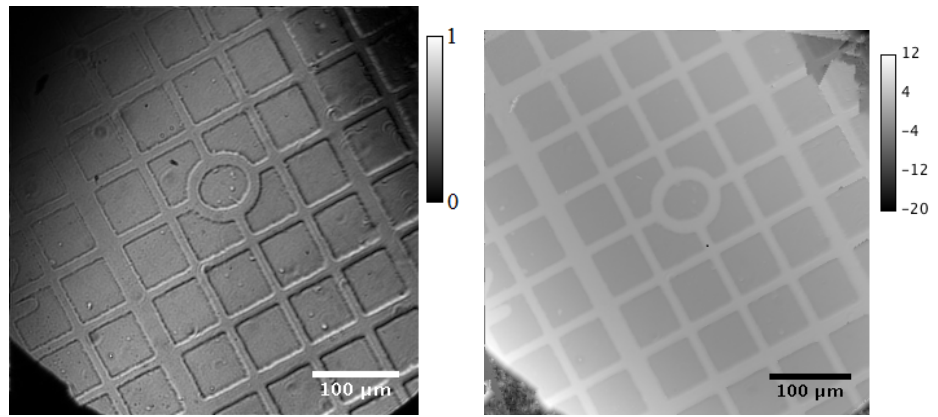
(c) pootočenie clony o uhol  $266,7^\circ$  voči nulovej polohe

Obr. 4.5: Snímky hologramov špeciálneho sklíčka cellocate z rôznych smerov osvetlenia.

Na spracovanie obrazu bol použitý software Ing. Matěja Týča vytvorený v programovacom prostredí Python.

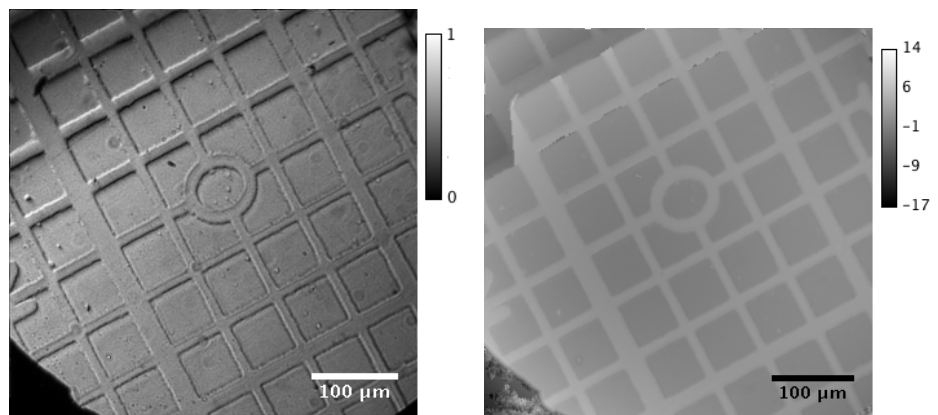
Pre prípad osvetľovania pomocou rotačnej dierkovej clony umiestnenej excentricky voči optickej osi mikroskopu nám ku spracovaniu, ktoré je používané v prípade osvetľovania osovým bodom alebo plošným zdrojom (bližšie popísane v sekcii 2.2), pribudnú ešte ďalšie kroky aby bolo možné zrekonštruovať nasnímané hologramy. Snímky boli preložené cez seba na základe polohy nosnej frekvencie, ktorá bola určená pre každý hologram zvlášť. 3D rekonštrukcia vzorky bola uskutočnená s využitím faktu, že holografický mikroskop zobrazuje ako lineárny, priestorovo invariantný systém.

V prípade použitia monochromatického bodového zdroja má prenosová funkcia tvar guľovej šupky a prenáša sa tak malý rozsah podĺžnych frekvencií. Rôznym polohám bodo-



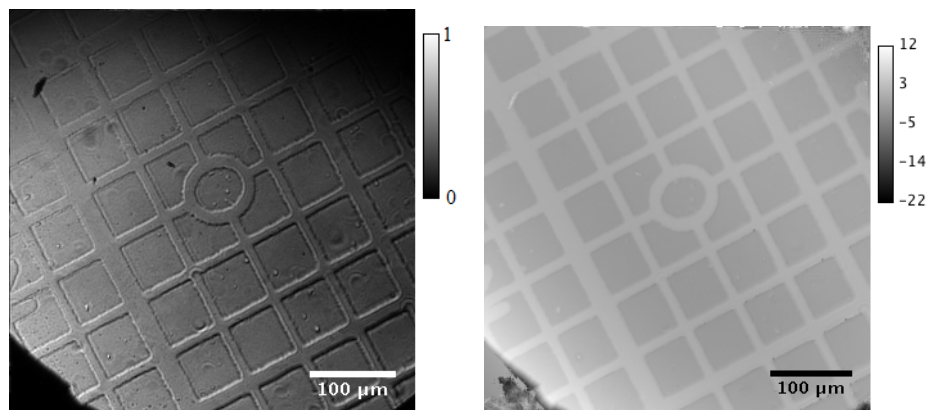
(a) snímka amplitúdy v polohe clony  $22,2^\circ$  voči jej nulovej polohe

(b) snímka naviazanej vyrovnanej fázy v polohe clony  $22,2^\circ$  voči jej nulovej polohe



(c) snímka amplitúdy v polohe clony  $164,4^\circ$  voči jej nulovej polohe

(d) snímka naviazanej vyrovnanej fázy v polohe clony  $164,4^\circ$  voči jej nulovej polohe

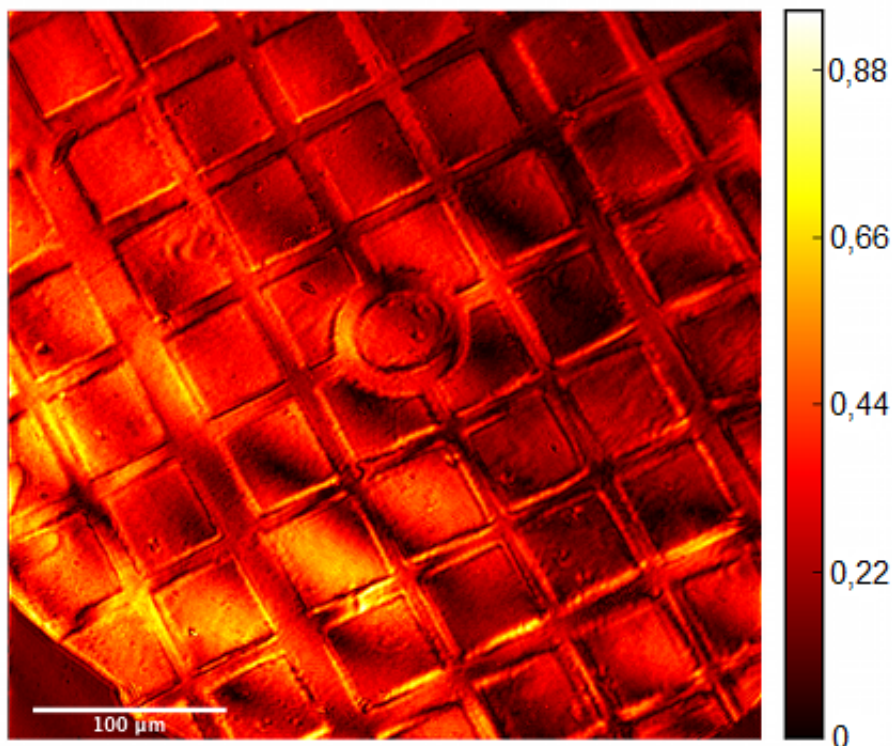


(e) snímka amplitúdy v polohe clony  $266,7^\circ$  voči jej nulovej polohe

(f) snímka naviazanej vyrovnanej fázy v polohe clony  $266,7^\circ$  voči jej nulovej polohe

Obr. 4.6: Snímky amplitúdy (a),(c) a (e) (škála znázorňuje normované hodnoty intenzity voči maximálnej hodnote) a snímky naviazanej vyrovnanej fázy (b), (d) a (f) (škála znázorňuje hodnoty fázy v radiánoch) špeciálneho sklíčka Cellocate z rôznych smerov osvetlenia.

## 4.2. MERANIE KRYCIEHO SKLÍČKA CELLOCATE



Obr. 4.7: Snímka sklíčka Cellocate po spracovaní, farebná škála znázorňuje hodnoty amplitúdy.

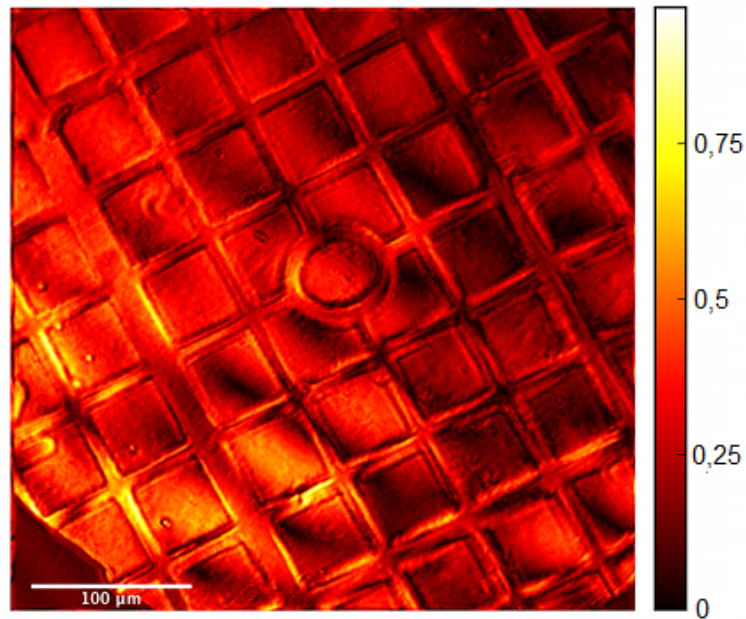
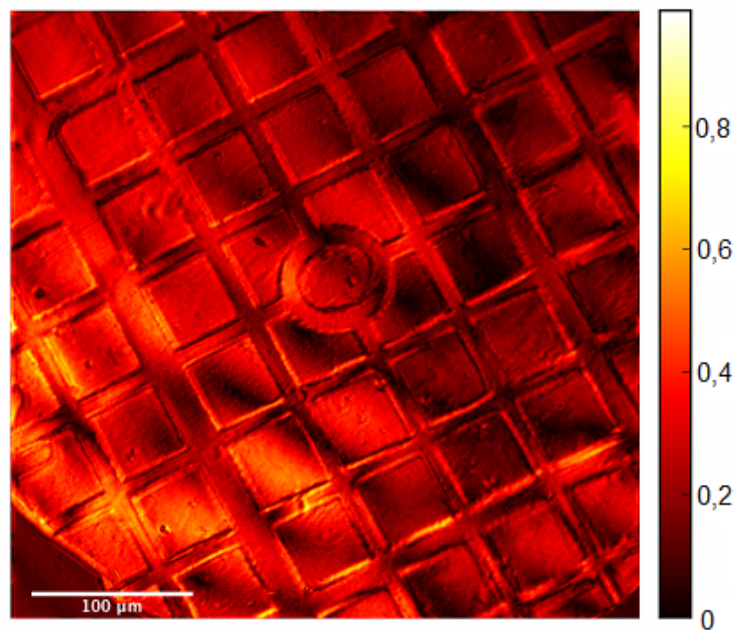
vého zdroja potom odpovedá posunutie prenosovej funkcie (obr. 4.10) a jej tvar sa pritom nemení [18].

Posunutie bolo určované podľa polohy najviac prenesenej priestorovej frekvencie vo frekvenčnom spektre hologramu. Frekvenčné spektrum priestorových frekvencií tak bolo premietané do neznámeho trojrozmerného frekvenčného spektra vzorky (obr.

Prvá snímka (obr. 4.7) zobrazuje spracovanú snímku z miesta zaostrenia roviny vzorky. Metóda spracovania umožňuje numerické preostrovanie (obr. 4.8), ktoré znázorňuje snímky toho istého miesta sklíčka ako v prípade obr. 4.7, nachádzajúce sa v mieste  $28 \mu\text{m}$  pred a  $14 \mu\text{m}$  za rovinou zaostrenia. V ľavom dolnom rohu sú vidieť jemné rozdiely v zaostrení, na snímkach 4.8 a) a b) je toto miesto viac rozostrené. Preostrovanie je výrazné a umožňuje precízne doostrovanie po malých krokoch (1 krok =  $7 \mu\text{m}$ ). Snímky sú zobrazené v nepravých farbách. Farebná škála znázorňuje absolútnu hodnotu rekonštruovaného signálu.

Pre porovnanie je na obr. 4.9 vyobrazená absolútna hodnota rekonštruovaného signálu spracovaná len čistým spriemerovaním snímok. Snímku nie je možné numericky preostrovať alebo len vo veľmi malom rozsahu.

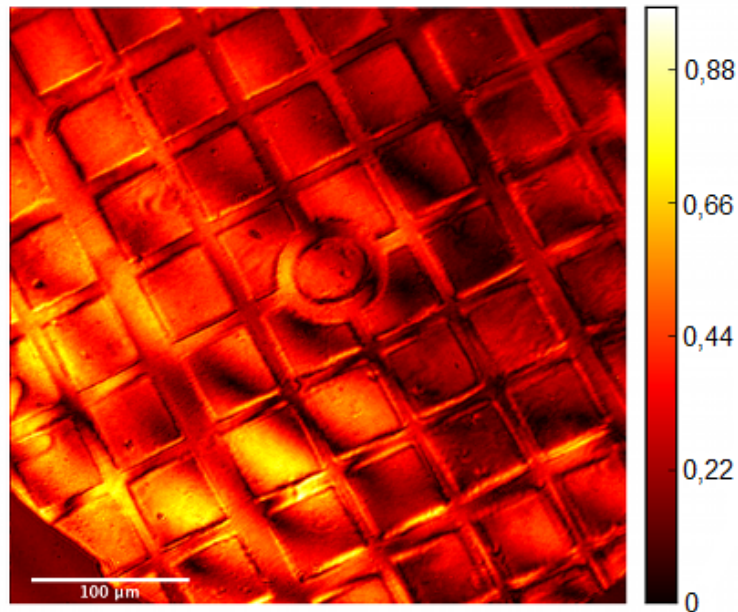
Z experimentu vyplýva, že je možné numericky doostrovať a numerickým spracovaním získať 3D informáciu i pri neznámom indexe lomu vzorky. Na to by bolo potrebné nasnímať bunky pri vyšších numerických apertúrach objektívov, ktoré ale nebolo možné použiť na CCHM 2. generácie. Z meraní vyplynulo tiež, že manuálny posuv clony je príliš pomalý pre snímanie živých biologických objektov. Meranie trvalo približne 20 minút a keďže bunky sú živé objekty mohlo prísť ku veľkej zmene polohy znemožňujúcej trojrozmerné spracovanie zaznamenaných snímok. Z tohto dôvodu bola navrhnutá a skonštruovaná

(a) preostrenie 28  $\mu\text{m}$  pred zaostrenú rovinu(b) preostrenie 14  $\mu\text{m}$  za zaostrenú rovinu

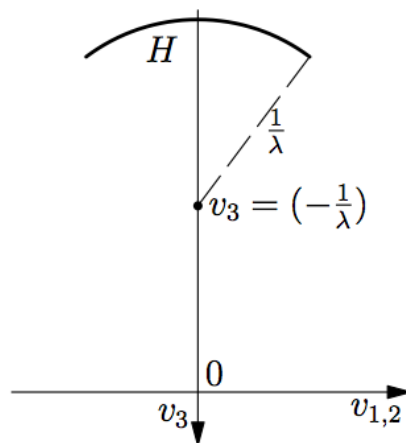
Obr. 4.8: Snímky rovnakého sklíčka Cellocate ako v obr. 4.7 numericky preostrené a) o 28  $\mu\text{m}$  pred zaostrenú rovinu a b) 14  $\mu\text{m}$  za zaostrenú rovinu, farebná škála znázorňuje hodnoty amplitúdy.

nová zostava s automatizovanou rotáciou clony pomocou krokového motoru pre funkčný CCHM 1. generácie.

### 4.3. MERANIE ŽIVÝCH BUNIEK



Obr. 4.9: Snímka sklíčka Cellocate po spriemerovaní, farebná škála znázorňuje hodnoty amplitúdy.

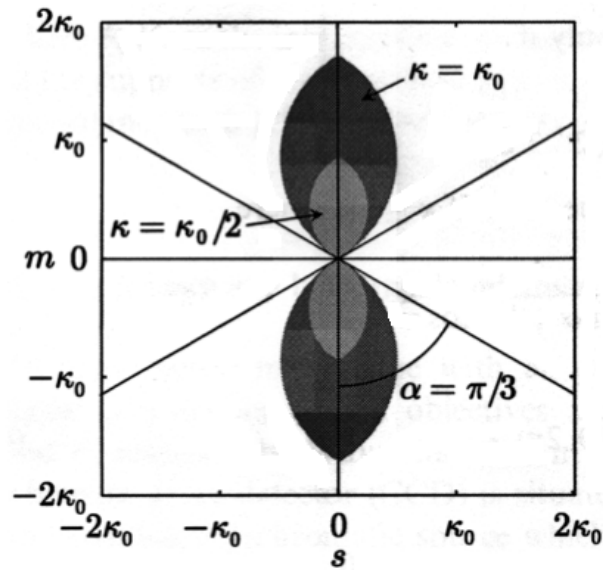


Obr. 4.10: Prenosová funkcia pre koherentné osvetlenie, prevzaté z [18].

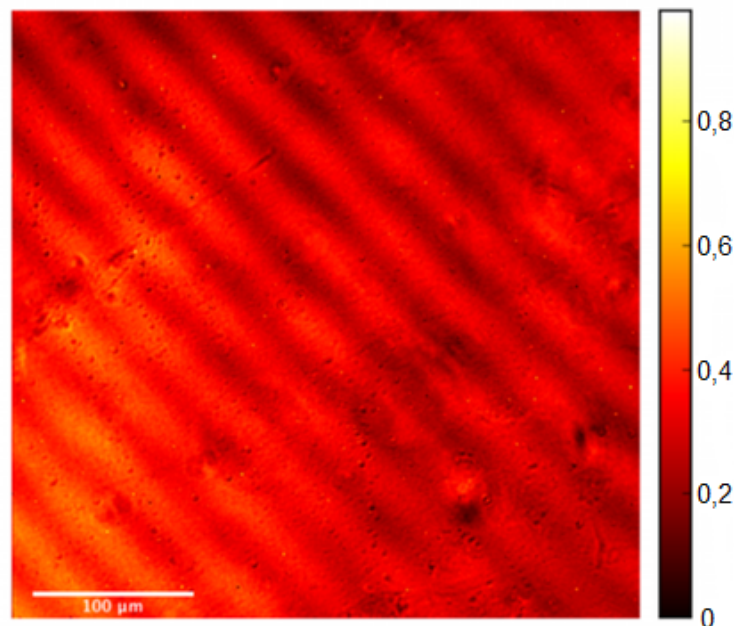
### 4.3. Meranie živých buniek

Po overení funkčnosti zostavy nasledovalo meranie na živých biologických objektoch. Pozorovanie živých buniek je problematické z viacerých dôvodov. Sú náročné na kultiváciu, pozorovanie vyžaduje teplotnú stabilizáciu atď. Merania prebiehali na fibrosarkómových silne metastázujúcich bunkách typu A337/311RP.

Rovnako ako pri pozorovaní statického fázového objektu, špeciálneho sklíčka Cellocate, boli bunky v prietokových komôrkach IBIDI, ktoré umožňovali svojim tvarom pohodlné uchytenie na kolmom stolčeku pomocou klapiek. Na vývody z prietokovej komôrky boli umiestnené silikónové hadičky, ktoré boli zaslepené pomocou štipcov, aby z nich neunikalo kultivačné médium. Takto pripravené bunky boli pozorované opäť rovnakým princípom



Obr. 4.11: Rez 3D priestorovou funkciou vzorky pre rôzne vlnočty ( $\kappa = \kappa_0$ ,  $\kappa = \kappa/2$ ) po rekonštrukcii v transmisnom prípade pri použití monochromatického osvetlenia, prevzaté z [19].



Obr. 4.12: Snímky hologramov metastazujúcich fibrosarkomových buniek A337/311RP, farebná škála znázorňuje hodnoty amplitúdy.

osvetľovania ako u statickej vzorky. Použité objektívy ostali rovnaké ako u pozorovania sklička, rozdielom bola veľkosť priemeru použitej clony, ktorá bola v tomto prípade približne 0,2 mm.

Bohužiaľ u pozorovania buniek nebolo možné zrekonštruovať snímky ako v prípade špeciálneho sklička. Pravdepodobne to je spôsobené nízkou hodnotou numerickej apertúry objektívov a malej uhlovej apertúry kolektora, ktorá pri predchádzajúcom experimente



### 4.3. MERANIE ŽIVÝCH BUNIEK

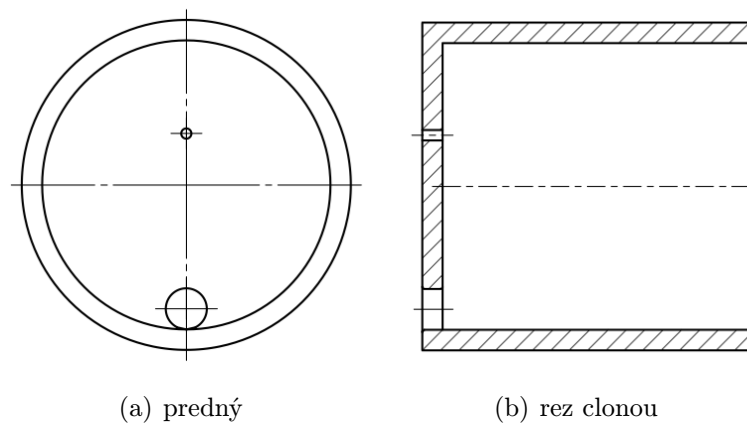
nemusela mať na zobrazovanie až taký vplyv ako v prípade pozorovania živých buniek. Bunky boli umiestnené v rovine kolmej na rovinu ich prirodzeného rastu, tak mohlo v priebehu experimentu, ktorý trval približne 20 minút, dôjsť k ich podstatnému pohybu buniek, znemožňujúcemu spracovanie nasnímaných hologramov. Pri rotácii clony bola na ramene vôľa v pohybe, ktorá mohla spôsobiť, že poloha clony nebola pri manuálnom otáčaní presne vycentrovaná.

## Kapitola 5

# Rotačná dierková clona

Na základe experimentu bola navrhnutá a skonštruovaná počítačovo ovládateľná rotačná dierková clona. Pomocou tejto clony sa upravil štandardne používaný plošný zdroj na CCHM 1. generácie na kruhový excentricky umiestnený. Clona je umiestnená v prednej predmetovej rovine kolektora, vo vzdialenosti 24 mm a rotuje voči optickej osi mikroskopu. Rotáciou bodového zdroja, ktorý vytvára otvor v clone, vzniká tvar medzikružia, ktorým je vzorka osvetľovaná.

### 5.1. Konštrukčný návrh



Obr. 5.1: Pohľady na výmennú rotačnú dierkovú clonu: a) pohľad spredu, b) rez clonou.

Rotačná dierková clona je vymeniteľná a je tvorená bubienkom s vonkajším priemerom 16 mm (obr. 5.1), ktorý má na dne dva otvory. Prvý, slúžiaci ako zdroj svetla o priemeru 1 mm, je umiestnený voči osi zväzku s excentricitou 2,5 mm. Druhý má priemer 2 mm a slúži na zaistenie clony voči rotácii okolo svojej osi. Steny bubienku majú hrúbku 1 mm. Bubienok je vložený do hriadeľa a poistený pomocou kolíka, ktorý spája bubienok a hriadeľ.

Hriadeľ má celkovú dĺžku 27 mm. Zvolený priemer neobmedzuje voľné šírenie sveta osvetľovačom. Z vonkajšej strany má priemer 20 mm v časti, na ktorú sú upevnené ložiská. Z druhej strany hriadeľa, kde je uchytená remenica má hriadeľ priemer 23 mm. Hriadeľ

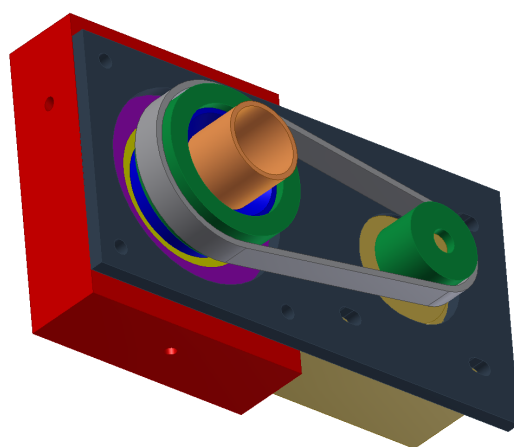
## 5.2. ROTÁCIA CLONY

je rotačne uložený vo dvojici valivých ložísk a jeho správna poloha je zaistená tvarovým stykom. Proti axiálnym posuvom je zaistený zlepením s vnútornými krúžkami ložísk.

Vonkajšie krúžky ložísk sú uložené v kryte, ktorý zároveň slúži ako kameň XY posuvu s rozsahom pohybu  $\pm 1$  mm. Presnú pozíciu je možné nastaviť pomocou troch skrutiek M3 rozmiestnených po  $120^\circ$  okolo osi rotácie hriadeľa. XY posuv slúži na jemnú úpravu pozície výmennej rotačnej dierkovej clony, aby os jej rotácie bola totožná s optickou osou mikroskopu.

Krycou doskou je kameň označený sivou farbou) dotlačený cez vonkajší krúžok ložiska k prírubu, ktorá je napojená na pôvodné miesto osvetľovača CCHM 1. generácie. Na krycej doske je uložený i krokový motor s pastorkom a na hriadeli je lepením zaistená remenica. Prenos otáčavého pohybu je realizovaný pomocou ozubeného remeňa s roztečou zubov 2,5 mm. Pastorok má 20 zubov a remenica 40. Výsledný prevodový pomer dovoľuje krok na hriadeli  $0,85^\circ$ .

Výslednú zostavu je možné vidieť na obr. 5.2 a obr. 5.3.



Obr. 5.2: Pohľad na zostavu.

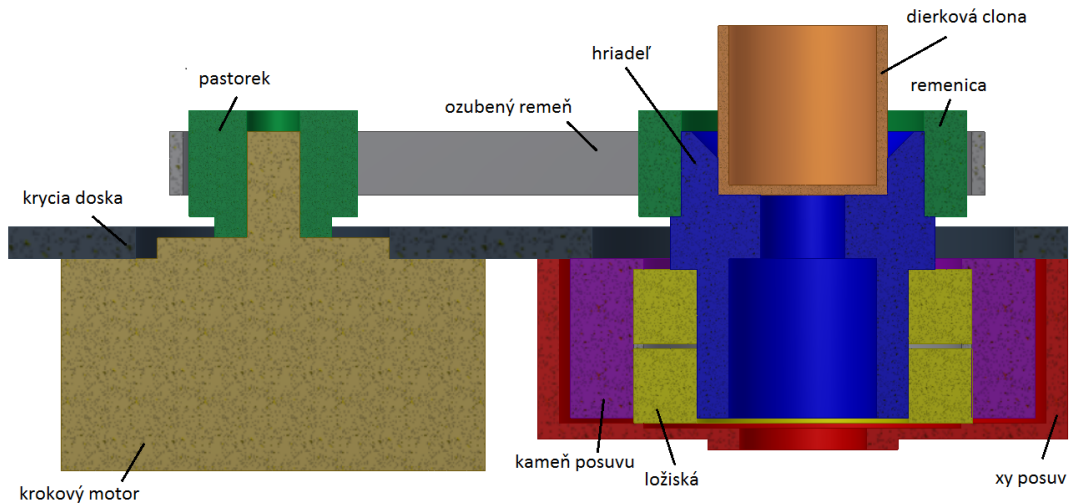
Na reze navrhnutou zostavou (obr. 5.3) je vidieť prehľadovo jednotlivé časti tvoriace zostavu: hriadeľ, clona, ložiská, kryt ložisiek, xy-posuv, krycia doska, remenica, pastorok a ozubený remeň. Pre lepšie rozlíšenie jednotlivých častí je model vo farbách.

Výrobné výkresy sú doložené ku diplomovej práci. Výsledná skonštruovaná zostava je vidieť na obrázku 5.6. Celá zostava je vyrobená zo zliatiny hliníku s označením EN AW-2030.

## 5.2. Rotácia clony

Na rotáciu clony bol použitý bipolárny krokový motor so sériovo zapojeným vinutím SX16-0301D od spoločnosti MICROCON, s.r.o. Tento motor bol zvolený z dôvodu minimálneho momentu zotrvačnosti rotoru ( $11 \text{ gcm}^2$ ) tak, aby rázy pri jednotlivých krokoch boli minimálne a tým bola čo najmenej ovplyvňovaná stabilita naladenia mikroskopu.

Prenos otáčavého pohybu zaisťuje prevod s ozubeným remeňom s použitím dielu firmy Haberkorn Ulmer s.r.o.. Použité remenice mali zvolené počty zubov 40 a 20 s menovitými priermi  $d_{w1} = 31,83$  mm a  $d_{w2} = 15,92$  mm (menšia remenica slúži ako pastorok



Obr. 5.3: Rez zostavou.

motoru). Dĺžka remeňa bola určená na základe výpočtu medziosovej vzdialenosti  $a'$ , ktorá sa volí podľa doporučenia touto reláciou:

$$0,5(d_{w1} + d_{w2}) + 15\text{mm} < a' < 2(d_{w1} + d_{w2}), \quad (5.1)$$

kde  $a'$  je volená medziosová vzdialenosť,  $d_w$  je menovitý priemer remeníc. Následne sa určí teoretická dĺžka remeňa  $L_w$  pomocou vzťahu:

$$L_w = 2a' + 1,75(d_{w1} + d_{w2}) + (d_{w2} - d_{w1})^2 / (4a'). \quad (5.2)$$

Z tabuľky bola následne určená skutočná dĺžka remeňa  $L_w$ . Skutočná vzdialenosť os  $a$  je určená pomocou rovnice:

$$a = K + \sqrt{K^2 - (d_{w2} - d_{w1})^2 / 8}. \quad (5.3)$$

kde  $K$  je touto substitúciou:

$$K = L_w / 4 - 0,393(d_{w1} + d_{w2}), \quad (5.4)$$

je  $L_w$  skutočná dĺžka remeňa, a je skutočná medziosová vzdialenosť a  $d_w$  je menovitý priemer remenice.

Z dôvodu medziosovej vzdialenosti sú na krycej doske je namiesto otvoru drážky dovoľujúce voľnosť v nastavení medziosovej vzdialenosti približne  $\pm 1$  mm [20].

### 5.3. Riadenie

Motor je riadený pomocou karty TMCM-1021 od spoločnosti TRINAMIC Motion Control GmbH Co. KG (obr. 5.4).

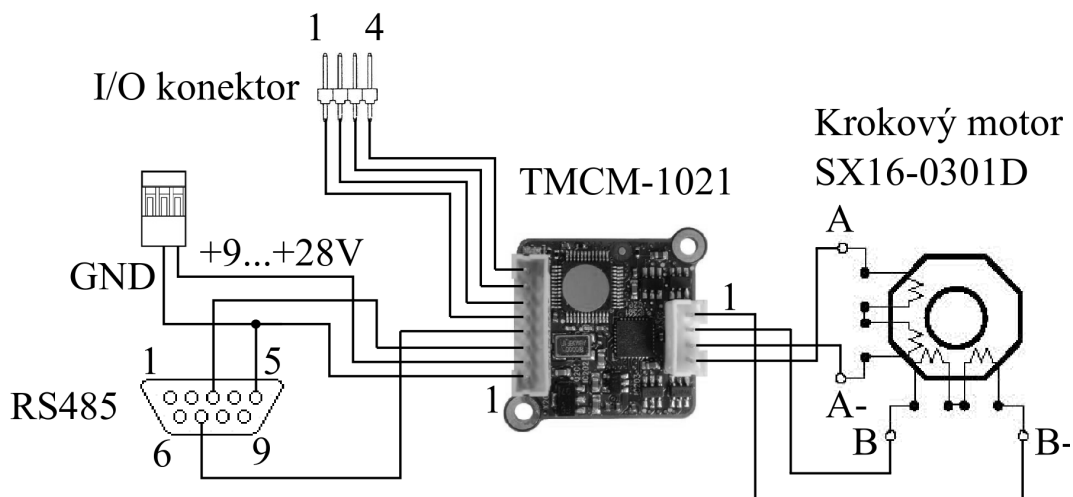
Karta je vybavená pre komunikáciu rozhraním RS485, ktoré je pomocou USB prevodníku pripojené k počítaču. Kartu je možné ovládať pomocou originálneho programovacieho prostredia TMCL-IDE alebo pomocou pripravených funkcií v prostredí LabView,

### 5.3. RIADENIE

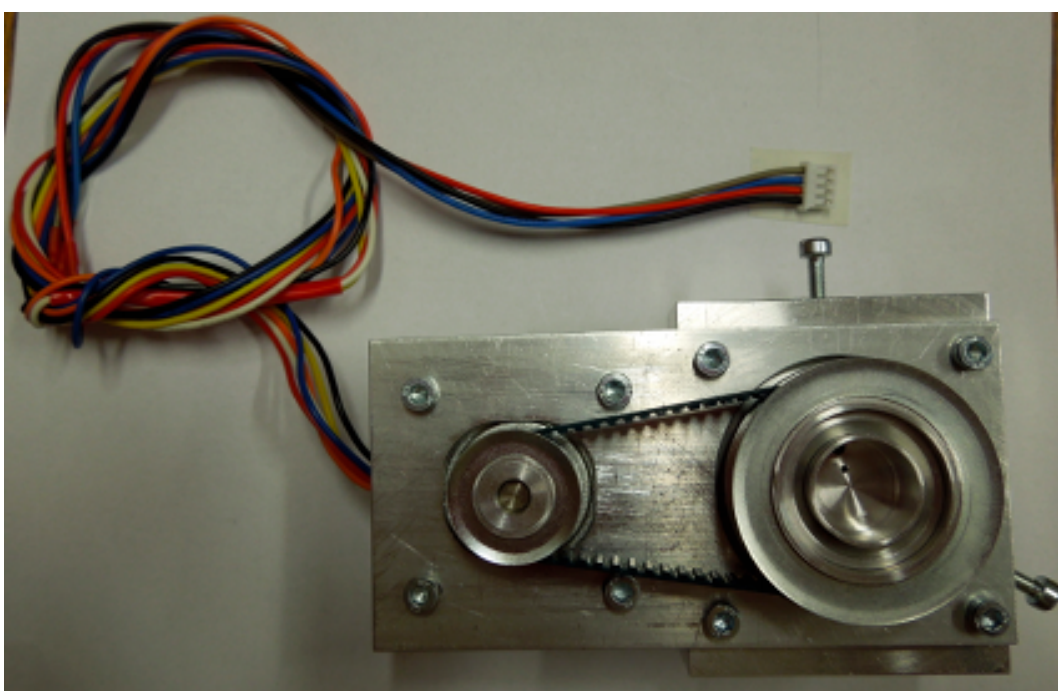


Obr. 5.4: Riadiaca karta TCMC-1021.

z ktorého je tiež možné ovládať i ukladanie hologramov nasnímaných mikroskopom. Celé meranie je tak plne automatizovateľné. Karta umožňuje i pripojenie koncových spínačov či optickej závery (I/O konektor), napr. pre kalibráciu polohy osvetľovacej clony. Celý systém je napájaný pomocou spínaného zdroja v rozsahu napätí 9 - 28 V.



Obr. 5.5: Schéma zapojenia bipolárneho krokového motoru s riadiacou kartou.



Obr. 5.6: Výsledná skonštruovaná zostava rotačnej dierkovej výmennej clony.

# Kapitola 6

## Záver

Cieľom práce bolo navrhnúť a skonštruovať výmennú rotujúcu dierkovú clonu, ktorej funkčnosť mala byť následne overená experimentálne. Najprv bola skonštruovaná zjednodušená rotačná dierková clona, ktorá bola overovaná na CCHM 2. generácie (4.1). Clona v tvare pliešku je umiestnená na dne bubienku. Osa bubienku je totožná s optickou osou. Pre pozorovanie dynamických objektov bol manuálny posun časovo náročný a preto vznikol upravený návrh clony, ktorej rotáciu zabezpečuje krokový motor. Návrh a popis jednotlivých častí clony ako aj odôvodnenie ich použitia je popísané v kapitole 5. Úplná výkresová dokumentácia je obsahom prílohy.

Výmenná dierková rotačná clona je plne funkčná. Jej zobrazovacia schopnosť bola overovaná na dvoch experimentoch pomocou clony najprv s manuálnym otáčaním, ktorá je upresnená v sekcii 4.1. Prvým experimentom je meranie špeciálneho krycieho sklíčka Cellocate firmy Eppendorf GmbH, na ktorého povrchu je vyrytá mriežková štruktúra. Výsledky a priebeh experimentu sú popísané v kapitole 4 v sekcii 4.2. Po spracovaní nasnímaných hologramov z rôznych smerov osvetlenia (obr. 4.5) je výslednú snímku možno numericky preostrovať, a teda jej ďalším numerickým spracovaním získať trojrozmernú informáciu i pri neznámom indexe lomu vzorky. Použitie spracovanie umožňuje numerické preostrovanie v relatívne veľkom rozsahu avšak s vysokou presnosťou kroku. Obrázky spracovaných snímok preostrených do rôznych rovín od zaostrenej roviny sú vidieť na obr. 4.8. Snímku spracovanú pomocou metódy priemerovania všetkých nasnímaných hologramov z rôznych smerov osvetlenia môžeme vidieť na obr. 4.9. Z experimentu bola preukázaná funkčnosť zobrazovacieho princípu. Výrazná je schopnosť numerického doostrovania, ktorú umožňuje použitá metóda spracovania. Ďalším numerickým spracovaním je možné zo snímok získať 3D informáciu o rozložení indexu lomu pozorovanej vzorky.

Druhý z experimentov sa zaoberal zobrazením živých buniek. Výslednú snímku, ktorá vznikla po spracovaní dát zo snímok z jednotlivých smerov osvetlenia, je vidieť na obrázku 4.12. Bohužiaľ v tomto experimente sa po spracovaní nepodarilo zobrazíť nasnímané bunky. V prípade buniek, ktoré boli pri meraní umiestnené kolmo na ich smer prirodzeného rastu kvôli dlhšej dobe merania dôjde ku veľkej zmene polohy bunky. Uhlová apertúra použitého kolektora je malá, čo pri zobrazovaní špeciálneho sklíčka nemuselo hrať významnú rolu avšak mohlo sa prejaviť u zobrazovania živých buniek. Z technických príčin nebolo možné použiť objektívy vyšších numerických apertúr na CCHM 2. generácie. Merania na živých bunkách by bolo potrebné zopakovať na objektívoch vyšších numerických apertúr, ktoré je možné použiť len na CCHM 1. generácie. Rýchlosť snímania je teda potrebné urýchliť pre pozorovanie dynamických objektov.

Navrhnutá zostava vo výsledku plní svoju požadovanú funkciu a princíp zobrazovania pomocou nej bol overený experimentálne. Pre prípad zobrazovania živých buniek sú ale potrebné ďalšie experimenty za použitia vyšších numerických apertúr objektívov a s pomocou automatizovaného pohonu rotácie clony, ktorý bol navrhnutý a skonštruovaný.



# Zoznam príloh

Príloha 1:

výrobná výkresová dokumentácia výmennej rotačnej dierkovej clony s automatizovanou rotáciou clony

Príloha 2:

CD: elektronická verzia diplomovej práce, výkresová dokumentácia výmennej rotačnej dierkovej clony s automatizovanou rotáciou

# Literatúra

- [1] DUNN, G. A.: Transmitted-light Interference Microscopy: a Technique Born Before its Time. *Proceedings of the Royal Microscopical Society*, vol. 33, 1998, p. 189-196.
- [2] Introduction to Fluorescence Microscopy, dostupné na <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html> (5.5.2013)
- [3] ALBERTS, B. et al.: *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, 2005, 740 p. ISBN 80-902906-2-0.
- [4] Phase contrast microscopy, dostupné na <http://www.microscopyu.com/articles/phase-contrast/index.html> (15.5.2013)
- [5] Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy, dostupné na <http://www.microscopyu.com/articles/dic/index.html> (10.5.2013)
- [6] DAVIES, H. G., WILKINS, M. H.: Interference microscopy and mass determination. *Nature*, vol. 169, 1952, p. 541.
- [7] UHLÍŘOVÁ, H.: *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. [Dizertačná práce.] Brno: VUT, FSI, 2010. 72 s.
- [8] KOLMAN, P.: *Koherencí řízený holografický mikroskop*. [Dizertačná práce.] Brno: VUT, FSI, 2010. 72 s.
- [9] SLABÝ, T. et al.: Coherence-controlled holographic microscope. *Proceeding of SPIE*. 2010, 7746, s. 7746R-1-7746R-8. Článek v zborníku akcie: *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, Lipt. Ján, 06.09.2010-10.09.2010*.
- [10] SHARPE, J. et al.: Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science*, vol. 296, 2002, p. 541-545.
- [11] JEBÁČKOVÁ, A.: *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. [Diplomová práce.] Brno: VUT, FSI, 2012. 59 s.
- [12] POPESCU, G. et al.: Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 295, 2008, p. C538-C544.
- [13] BABER, R.: Interference microscopy and mass determination. *Nature*, vol. 169, 1952, p. 366-367.

## LITERATÚRA

- [14] DUNN, G. A., ZICHA, D: Dynamics of fibroblast spreading. *Journal of Cell Sciences*, vol. 108, 1995, p. 1239-1249.
- [15] CAVANNA, T. et al.: *Evidence for protein 4.1B acting as a metastasis suppressor*. *Journal of Cell Science* 120, 2007.
- [16] Prietoková komôrka firmy IBIDI, prevzaté z <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Flow-Accessories/m-Slide-I-Luer-Flow-Kit> (20.5.2013)
- [17] Špeciálne sklíčko Eppendorf Cellocate, prevzaté z <http://www.biolab.cn/uploads/1/Image/200906060323241143.jpg> (25.4.2013)
- [18] TÝČ, M., CHMELÍK R.: Numerical Refocusing of Planar Samples Unlimited. *Proceeding of SPIE*. 2010, 7746, s. 7746R-1-7746R-8. Článok v zborníku akcie: *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, Lipt. Ján, 06.09.2010-10.09.2010*.
- [19] CHMELÍK, R.: Three-dimensional scalar imaging in high-aperture low-coherence interference and holographic microscopes. *Journal of Modern Optics*, vol. 53, 2006, p. 2673-2689
- [20] LEINVEBER, J., ŘASA, J., VÁVRA, P.: *Strojnické tabulky*. Scientia, spol. s. r. o., Praha, 2006, 985 p. ISBN 80-7183-164-6.