

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA OPTIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Mikroskop řízený prostorovým
modulátorem světla



Vypracovala:	Alexandra Pešátová
Studijní program:	B1701 Fyzika
Studijní obor:	1701R054 Digitální a přístrojová optika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Michala Baránka, Ph.D. a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých pramenů.

V Olomouci dne 13. května 2021

.....
Alexandra Pešátová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Michalu Baránkovi, Ph.D. za cenné rady a čas, který mi věnoval nejen na konzultacích, ale také při práci v laboratoři. Taktéž děkuji RNDr. Josefu Kapitánovi, Ph.D. za poskytnutí biologického vzorku. A v neposlední řadě patří můj vděk Mgr. Filipu Mikeskovi za podporu a korekturu jazyka.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Alexandra Pešátová
Název práce	Mikroskop řízený prostorovým modulátorem světla
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra optiky
Vedoucí práce	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Díky speciálním metodám světelné mikroskopie je možné zobrazovat slabě absorbující biologické vzorky se zvýšeným kontrastem. K současnému rozvoji těchto metod výrazně přispívají moderní technologie. Příkladem je prostorový modulátor světla, počítačem řízený displej z kapalných krystalů, s jehož pomocí lze efektivně tvarovat procházející elektromagnetickou vlnu. Cílem práce je návrh a stavba optického mikroskopu se zabudovaným prostorovým modulátorem světla, který umožní realizaci vybraných metod světelné mikroskopie.
Klíčová slova	optické zobrazování, mikroskopie, fourierovská optika, prostorový modulátor světla
Počet stran	31
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Alexandra Pešátová
Title	Optical microscope managed by spatial light modulator
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Optics
Supervisor	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	The special microscopic techniques enable imaging of weak absorbing biological samples with significantly higher contrast. Development of this methods is enhanced by modern technologies, such as spatial light modulator, liquid crystal display operated by computer. The aim of this work is experimental realization of the optical microscope with spatial light modulator, which allows implementation of the selected microscopic techniques.
Keywords	optical imaging, microscopy, fourier optics, spatial light modulator
Number of pages	31
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Úvod	7
1 Teoretická část	8
1.1 Moderní metody světelné mikroskopie	8
1.1.1 Temné pole	8
1.1.2 Zernikův fázový kontrast	9
1.1.3 Spirální fázový kontrast	10
1.2 Kapalně krystalové	11
1.2.1 Paralelní a vertikální nematkové krystalové	12
1.2.2 Stočené nematkové krystalové	13
1.3 Prostorový modulátor světla	13
1.4 Realizace mikroskopických metod pomocí prostorového modulátoru světla	14
2 Experimentální část	17
2.1 Sestava	17
2.1.1 Zvětšení systému	18
2.1.2 Separace difrakčních řádů	18
2.1.3 Určení parametrů masek	20
2.2 Výsledky	21
2.2.1 Fázový kalibrační vzorek	21
2.2.2 Biologický vzorek	27
Závěr	30
Literatura	31

Úvod

Vynález mikroskopu posunul hranice možností pozorování objektů, které už oko nedokáže rozeznat, a otevřel tak nový svět poznávání. Kromě zlepšování rozlišovací schopnosti je jedním z důležitých cílů zvyšování kontrastu. Některé objekty jsou považovány za amplitudové, protože pohlcují část světla, a proto je možné je snadno pozorovat ve standardním světlém poli. Víceméně existují objekty, které ovlivňují pouze fázi a je potřebné je uměle dobarvit, aby byly schopné absorbovat část procházejícího světla. Během tohoto procesu může dojít ke zničení popřípadě usmrcení vzorku. Tato skutečnost vedla k vývoji metod fázového kontrastu, díky kterým je možné pozorovat struktury, jejichž kontrast by byl jinak nízký [1] [2] [3] [4] [5] [6].

V případě potřeby přechodu z jedné metody na jinou, je nutný mechanický zásah do optické soustavy, který může být časově a finančně náročný. Zkoumanou alternativou je využití prostorového modulátoru světla, který se jeví jako flexibilní možnost využití mikroskopických metod na zvýšení kontrastu [1] [2].

V teoretické části budou popsány základní mikroskopické metody jako temné pole, Zernikův fázový kontrast a modernější metoda spirálního fázového kontrastu. Dále bude popsán princip fungování kapalných krystalů v prostorovém modulátoru světla a jeho aplikace v mikroskopii a realizace výše uvedených metod na zvýšení kontrastu obrazu vzorku.

V experimentální části bude představená sestava, se kterou byli realizovány mikroskopické metody, její parametry a použité vybavení. Kapitola se věnuje také výpočtu správných parametrů pro dosažení separace difrakčních řádů a určení velikosti centrální oblasti masky kvůli správnému fungování prostorové filtrace. Ve výsledcích jsou pozorovány fázové vzorky jako kalibrační USAF test, lícní buňky, krysí buňky a červené krvinky.

Kapitola 1

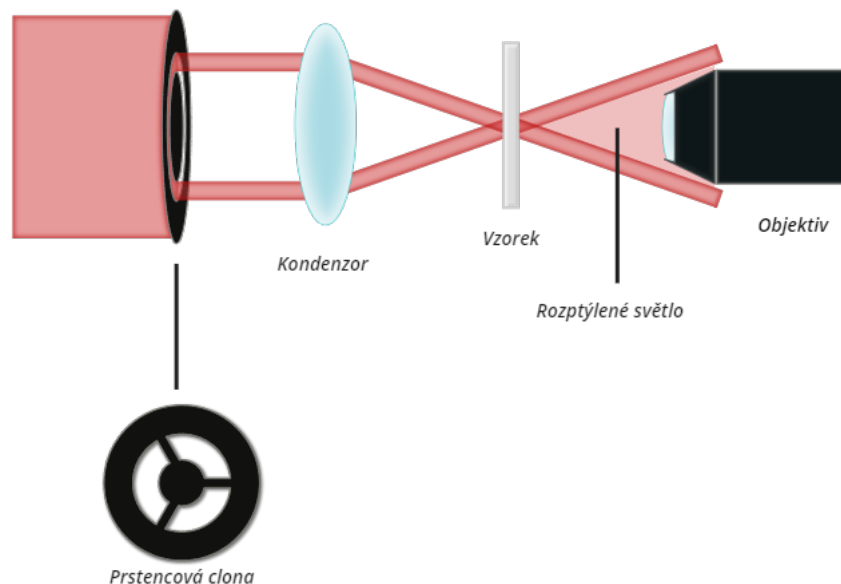
Teoretická část

1.1 Moderní metody světelné mikroskopie

Lidské oko dokáže detekovat pouze změnu intenzity nikoli fáze, což může vést k problémům například u buněk, které mohou mít slabou absorpci světla a mění pouze fázi. Pokud je pozorujeme okem či kamerou, nejsme schopni vnímat strukturu objektu. Proto je potřebné fázi převést na intenzitu, a to je možno mnoha způsoby, přičemž nejčastější je barvení vzorků. Během tohoto procesu může dojít k usmrcení vzorků a znemožnění pozorování živých procesů. Aby k této situaci nemuselo dojít, jsou vyvíjeny neinvazivní optické metody.

1.1.1 Temné pole

Jde o mikroskopickou metodu, kdy je využito svazku šikmých paprsků pomocí clony ve tvaru mezikruží, které pak osvětlují vzorek. Při dopadu světelných svazků na strukturu vzorku nastává rozptyl. Světlo, které projde nezměněné, mine mikroskopový objektiv, kdežto světlo rozptýlené vstupuje do objektivu. Výsledkem jsou světlé detaily



Obrázek 1.1: Schéma mikroskopu s temným polem

na tmavém pozadí, kde je možné pozorovat struktury, které předtím nebyly viditelné běžným intenzitním detektorem. V pojetí fourierovské optiky temné pole odstraní nultý

řád z difrakčního obrazce zformovaného v ohniskové rovině objektivu. Obraz je tvořen pouze vyššími difrakčními řádami. Běžně se temné pole využívá na zobrazení například mořských organismů jako plankton nebo řasy. Nevýhodou metody je požadavek na vysoký výkon osvětlovacího svazku [3] [4].



(a) Světlé pole

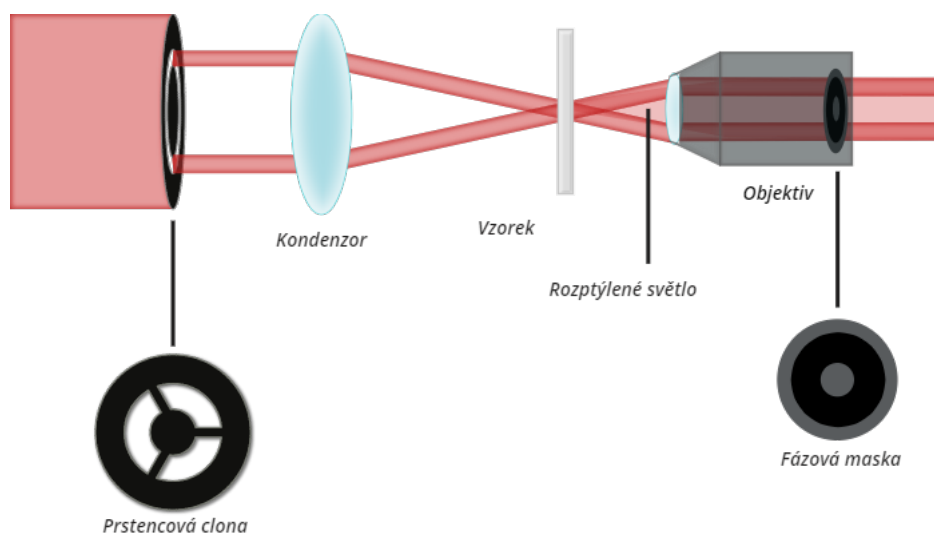


(b) Temné pole

Obrázek 1.2: Snímky perlooček a buchanky ve světlém a tmavém poli [5]

1.1.2 Zernikův fázový kontrast

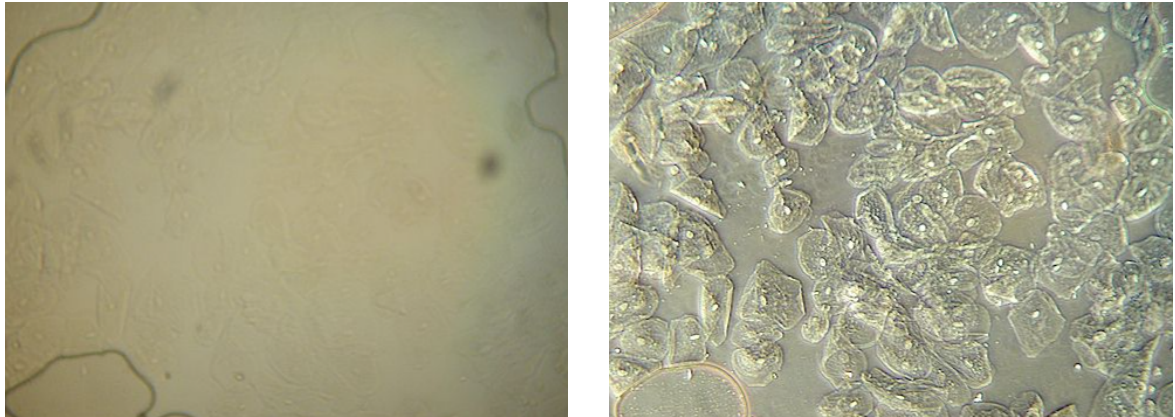
Těsně před 2. světovou válkou vytvořil Zeiss několik prototypů mikroskopů s fázovým kontrastem založených na principech, které popsal Frits Zernike. Tato technika se začala používat až v 50. letech minulého století a je dodnes frekventovaně využívaná mnohými buněčnými biology.



Obrázek 1.3: Schéma mikroskopu s Zernikovým fázovým kontrastem

Princip je založen na využití šikmého svazku podobně jako v případě temného pole, avšak do objektivu nevstupuje jenom světlo rozptýlené od vzorku ale i přímé. Světlo rozptýlené na fázovém vzorku má zpoždění fáze přibližně $\pi/2$ při dopadu na obrazovou rovinu [3] [4]. Aby bylo dosaženo posuvu o π , je fáze přímého světla uměle posunutá

pomocí fázové destičky umístěné v objektivu. V případě posuvu kupředu vzniká destruktivní interference, jejíž výsledkem je ztmavnutí obrazu nazývané pozitivní kontrast. Pro dosažení negativního kontrastu je rovněž potřebné dosáhnout posuvu o π , avšak posouvá se fáze přímého světla vzad, což způsobí, že se obě složky střetnou v obrazové rovině ve fázi a spolu interferují konstruktivně. Výsledkem je světlý obraz [3] [4].



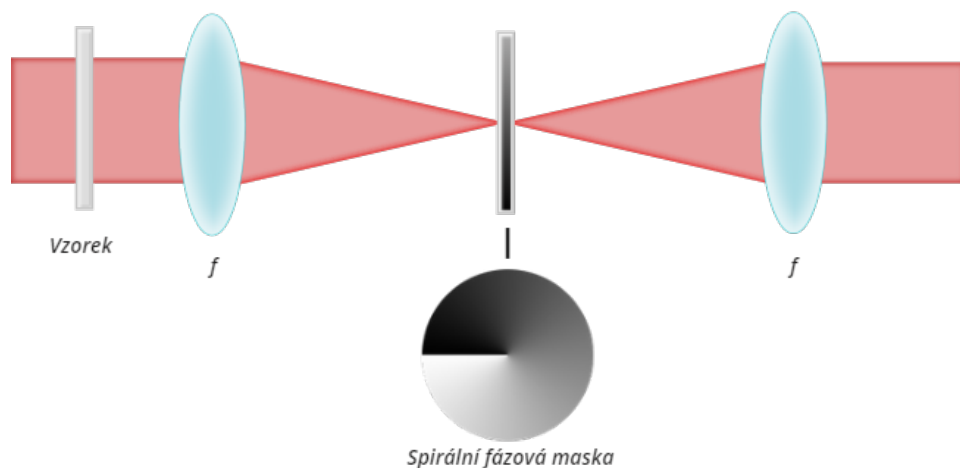
(a) Světlé pole

(b) Zernikův fázový kontrast

Obrázek 1.4: Snímky lícních buněk ve světlém poli a s Zernikovým fázovým kontrastem [7]

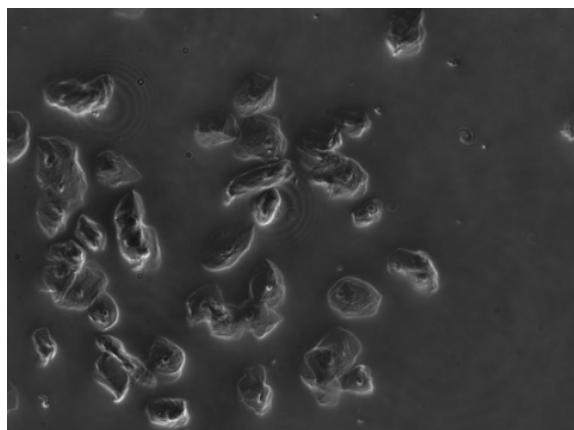
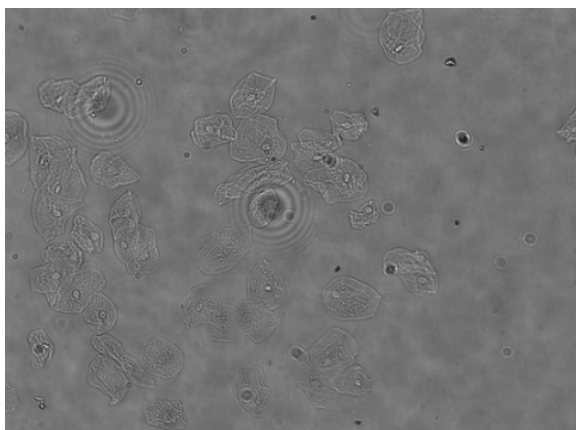
1.1.3 Spirální fázový kontrast

Metoda, vyvinutá v posledních letech, je spirální fázový kontrast, který vede k zesílení pozorovaných hran amplitudového nebo fázového objektu. Zajišťuje to spirální fázová maska umístěná ve 4-f systému, která zavádí fázový posun azimutálně od $-\pi$ do $+\pi$ [2] [8].



Obrázek 1.5: Schéma spirálního fázového kontrastu

Na rozdíl od jiných metod zde dochází k izotropnímu zesílení hran z důvodu rotační symetrie masky. Tuto symetrii je možno porušit pro dosažení stínového efektu, jestliže je singulární bod posunut mimo optickou osu systému [8].



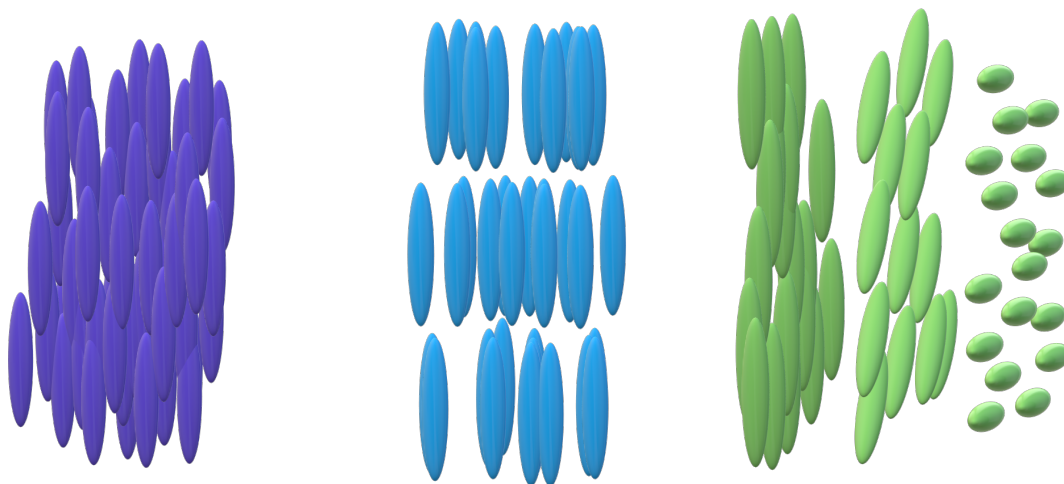
(a) Bez použití spirálního kontrastu

(b) S použitím spirálního kontrastu

Obrázek 1.6: Snímky lícních buněk ve světlém poli a se spirálním fázovým kontrastem [9].

1.2 Kapalné krystaly

Jedná se o stav mezi kapalným a pevným skupenstvím, kde mají molekuly tvar protáhlého oválu s orientací podobnou krystalům, avšak je přítomná i podobnost s kapalinami ve formě chybějícího prostorového uspořádání. Aplikace kapalných krystalů zasahují od různých chemických senzorů a laditelných filtrů až po technologii digitálních displejů, které jsou v současnosti přítomné téměř v každé domácnosti. Existují tři možná uspořádání kapalných krystalů [10] [11] [12].



(a) Nematické kapalné krystaly

(b) Smectické kapalné krystaly

(c) Cholesterické kapalné krystaly

Obrázek 1.7: Druhy uspořádání kapalných krystalů

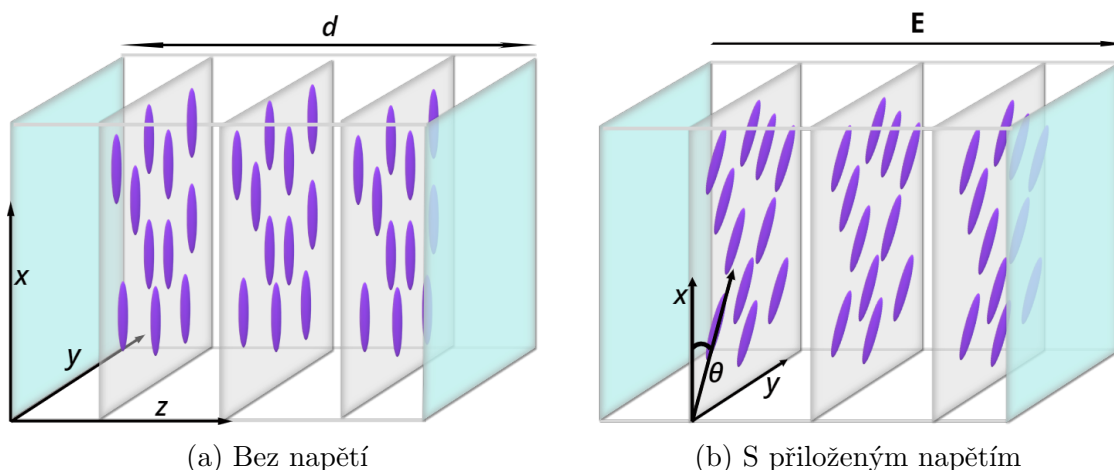
1. *Nematické kapalné krystaly* - orientace podél dlouhé osy jsou rovnoběžné, ale poloha je náhodná
2. *Smectické kapalné krystaly* - orientace molekul je rovnoběžná a jsou uspořádané v rovnoběžných rovinách, ve kterých je poloha náhodná

3. *Cholesterické kapalné krystaly* - molekuly jsou uspořádané v rovinách, kde se orientace zachovává, ale vně se osy molekul šroubovitě stáčí kolem osy kolmé k rovinám

Vlastností kapalných krystalů je schopnost měnit orientaci molekul v závislosti na přiloženém elektrickém poli nebo na mechanickém působení. Další důležitou charakteristikou je uspořádání nematických krystalů v pixelech, které určují o jaký typ modulace jde. Je možné je dělit na tři typy: vertikální nematické, paralelní nematické a stočené nematické krystaly [10] [11].

1.2.1 Paralelní a vertikální nematické krystaly

Pokud je vrstva nematického kapalného krystalu umístěná mezi dvě skleněné destičky, se kterými je pohybováno, vytvoří se požadovaná orientace molekul kapalného krystalu mezi deskami a tím vznikne jednoosý krystal s optickou osou ve směru orientace molekul [11].



Obrázek 1.8: Vertikální kapalné krystaly.

V přítomnosti elektrického pole se molekuly stáčí o úhel θ v závislosti na velikosti přivedeného napětí (Obr. 1.8). Důsledkem tohoto jevu se bude snižovat hodnota mimořádného indexu lomu v poměru k úhlu podle

$$\frac{1}{n_e^2(\theta)} = \frac{\cos(\theta)^2}{n_e^2} + \frac{\sin(\theta)^2}{n_o^2}, \quad (1.1)$$

kde n_e je mimořádný index lomu a n_o je řádný index lomu, jehož hodnota zůstává konstantní [10].

Takovou celou z kapalných krystalů je zavedeno fázové zpoždění

$$\Delta\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} [n_e(\theta) - n_o]d, \quad (1.2)$$

kde d je šířka cely [10] a λ je vlnová délka ve vakuu. Na tomto principu je možné sestavit napěťově řízený modulátor [11].

1.2.2 Stočené nematické krystaly

V případě stočených nematických krystalů hovoříme o nehomogenním anizotropním prostředí, které se lokálně chová jako jednoosý krystal [12]. Pokud se krystal rozdělí na vrstvy, je možné studovat vrstvu po vrstvě jako jednoosé krystaly, jejichž optické osy vytváří šroubovici podél osy kolmé k vrstvám. Předpokládáme šíření světla ve směru osy z . Pro úhel stáčení krystalů platí lineární závislost

$$\psi = \alpha z, \quad (1.3)$$

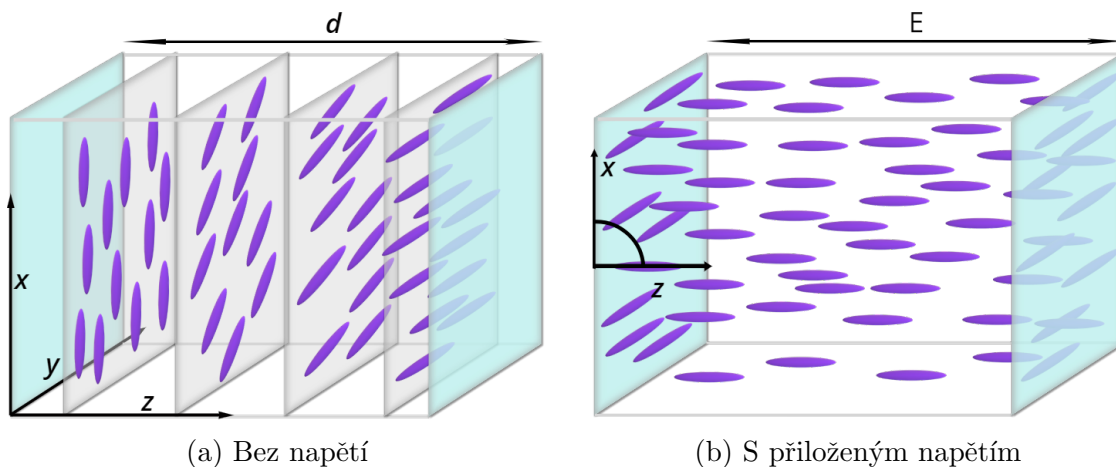
kde α je rovno koeficientu stočení. Na obrázku 1.9a je uveden příklad, kde je celkový úhel stočení ψ roven 90° . Fázová retardace na jednotku délky je rovna

$$\beta = (n_e - n_o)k = (n_e - n_o)\frac{2\pi}{\lambda}. \quad (1.4)$$

Jestliže dopadá světlo, které je lineárně polarizováno ve stejném směru jako první vrstva krystalů, působí taková cela jako polarizační rotátor, který otočí polarizaci o úhel ϕ [11] [12].

V momentě, jakmile začne působit elektrické pole na celu ve směru osy z se molekuly začnou stáčet do směru shodného s polem a ztrácí se schopnost krystalu měnit rovinu polarizace (Obr. 1.9b).

Přístroje využívající stočené nematické krystaly jsou používány zejména pro videoprojekci a nejsou vhodné pro modulaci amplitudy či fáze, protože výsledkem je vždy určitá kombinace obou modulací, zatímco paralelní nematické krystaly produkují mnohem vyšší kvalitu modulace amplitudy nebo fáze [2].

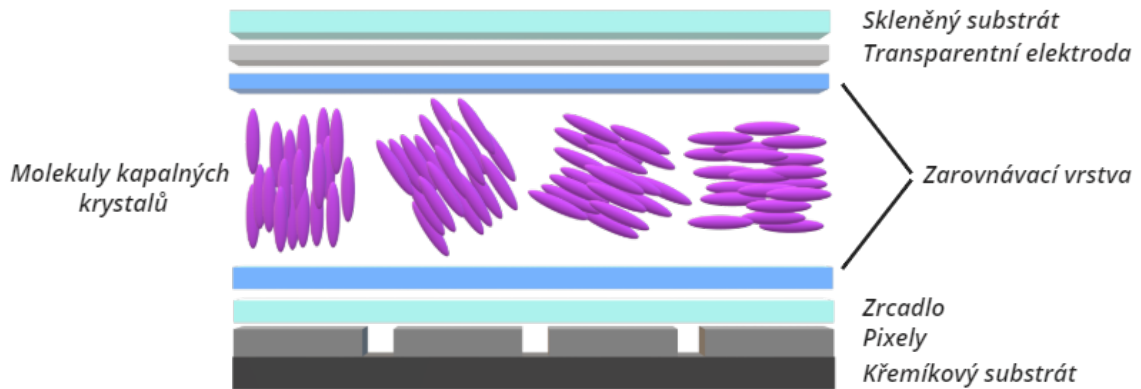


Obrázek 1.9: Stočené nematické krystaly

1.3 Prostorový modulátor světla

Prostorové modulátory světla (PMS) využívají technologii kapalných krystalů na modulaci amplitudy, fáze a polarizace. Fungují obdobně jako LCD displeje, avšak místo toho, aby promítaly obraz, modulují světelný svazek. Kapalně krystaly jsou uspořádány v mřížce pixelů, kde každý může být ovládán samostatně a nezávisle pomocí přiloženého napětí (elektronicky adresované PMS), anebo optického signálu (opticky adresované PMS) [10] [12].

Elektronicky adresované PMS jsou běžně komerčně dostupná zařízení, kde je index lomu ovládán elektrickým polem. Podle směrování svazku po modulaci existují dva typy PMS – transmisní, kde se využívají transparentní displeje z kapalných krystalů (LCD – Liquid Crystal Display), anebo reflexní složené z kapalných krystalů na křemíkovém čipu (LCoS – Liquid Crystal on Silicone).



Obrázek 1.10: Schéma LCoS SLM

Efektivita PMS není 100%, i když je světlo vhodně polarizované, z důvodu konstrukce zařízení. Uložení pixelů v mřížce vytváří periodickou strukturu, na které vzniká difrakce. Rovněž mezi nimi vznikají mezery, které redukují účinnou plochu a zároveň způsobují difrakci, se kterou je nutné počítat.

K ovládní elektronicky adresovaného PMS není zapotřebí žádného externího softwaru, neboť se chová jako další obrazovka. Promítaný černobílý obraz moduluje fázi od 0 do 2π v závislosti na tom, jaká barva v rozmezí 0 až 255 v 8-bitovém kódování se nachází na konkrétní poloze displeje [10]. Pokud je potřebné dosáhnout fázového posunu většího než 2π , používá se navzorkování fáze a PMS se pak chová jako elektronicky řízený difraktivní optický element, který je schopen nahradit mnoho praktických optických elementů. Je možno vytvořit elektricky ovládané čočky, masky, závěrky a různé jiné aplikace. Konkrétním možností je věnovaná následující sekce [12].

1.4 Realizace mikroskopických metod pomocí prostorového modulátoru světla

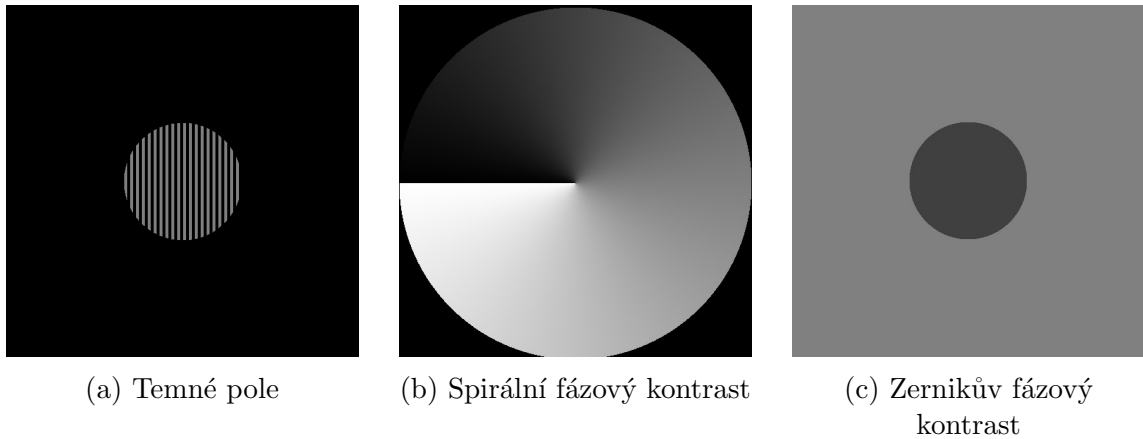
K realizaci metod uvedených v kapitole 1.1 je možné využít PMS. Předchází se tak nutnosti měnit vybavení při změně těchto metod, která může být časově i finančně náročná. Masky se mohou měnit libovolně podle parametrů, které uživatel vyžaduje, v zlomcích sekund. Nabízí se taktéž možnost kombinovat různé metody simultánně. Existuje možnost do masek zavádět mřížku, kdy se střídá hodnota 0 a π , a pracovat tak v 1. difrakčním řádu [1] [2].

Pro dosažení zvýraznění hran temného pole je třeba umístit clonu do Fourierovy roviny ve 4-f systému. Na rozdíl od běžného temného pole realizovaného odcloněním šikmých paprsků je provedena filtrace prostorového spektra za pomoci PMS. Vysoké frekvence jsou ponechány bez modulace a nízké frekvence jsou odfiltrovány do 1. difrakčního řádu pomocí mřížkové funkce. Výsledkem je tmavé pozadí a světle zvýrazněné detaily v 0. difrakčním řádu [1] [2].

Podobný postup je realizován se spirálním fázovým kontrastem, kdy se do Fourierovy roviny umístí fázová maska s propustností $\exp(i\phi)$, kde ϕ je polární souřadnice s hodnotami od 0 do 2π v rovině transverzální ke směru šíření světla. Vznikne izotropní zvýraznění hran obrazu předmětu [1] [2] [13].

Posunem fáze centrální oblasti o $\pi/2$ nebo $3/2\pi$ je dosaženo Zernikova fázového kontrastu. Tato metoda poskytuje několik stupňů volnosti. Prvním je možnost úpravy velikosti centrální oblasti a tedy zvolení vhodného poloměru na redukování halo efektu. Druhou alternativou je volba optimální hodnoty posunu fáze a adaptování se na různé fázové hloubky. Výsledný obraz má tmavou strukturu (pozitivní Zernikův kontrast), anebo světlou strukturu (negativní Zernikův kontrast) [1] [2].

Následující masky jsou ilustrační, jelikož každá optická soustava disponuje jinými parametry.



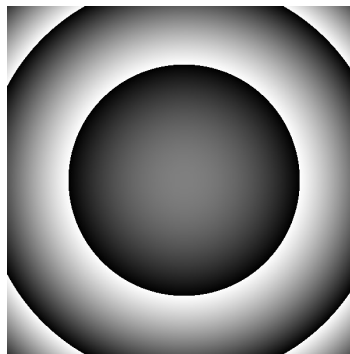
Obrázek 1.11: Masky promítané na PMS při realizaci mikroskopických metod

Digitální doostřování

Stejným způsobem je možno implementovat funkci propustnosti čočky, která má tvar

$$t(x,y) = \exp \left[i \frac{k}{2f} (x^2 + y^2) \right], \quad (1.5)$$

kde f je ohnisková vzdálenost čočky [10]. Možnost numerického zvolení ohniskové vzdálenosti poskytuje vysokou přesnost při ostření obrazu. Umožňuje to vykompenzovat

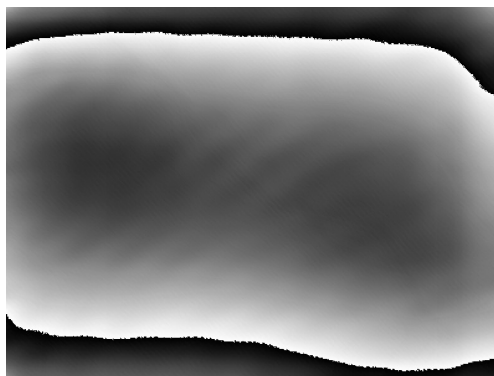


Obrázek 1.12: Čočka s ohniskovou vzdáleností $f = 25000$ mm

mechanický zásah do soustavy a obejít omezení přesnosti šroubů při posunu vzorku a objektivu. To je výhodné zejména při mikroskopových objektivěch s vyšší hodnotou zvětšení a malou hloubkou ostrosti.

Korekce výrobních nedokonalostí

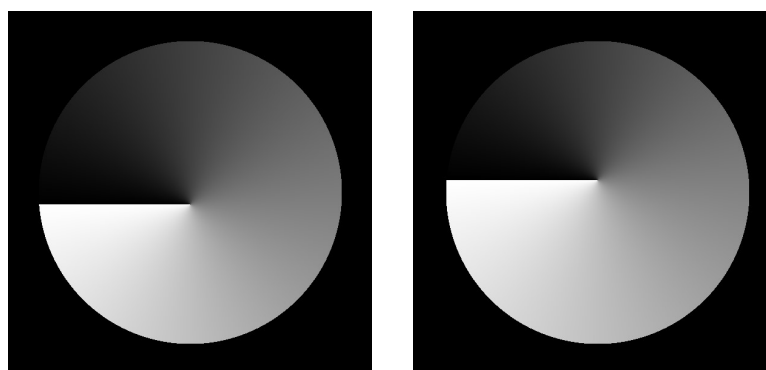
Ke korekci aberací, které vznikají na PMS z důvodu nedokonalostí výroby, se aplikuje korekční maska. Tahle maska bývá součástí dokumentů dodaných výrobcem a je potřebné ji zakomponovat do masek. V případě, že je použit software dodaný výrobcem, bývá zpravidla tato maska automaticky započítaná k promítaným maskám.



Obrázek 1.13: Příklad korekční masky

Změna polohy masky

Obdobně, jako bylo zmíněno v sekci digitálního doostřování, zde je motivace zlepšit justáž systému bez mechanického zásahu, neboť citlivost šroubů nemusí být dostačující. V softwaru dodaném výrobcem nebo také v MATLABu se nabízí možnost decentrovat masky do určitého směru, což je často klíčové především při filtrování spirálními fázovými kontrasty. Zde je důležité trefit střed masky, aby bylo dosaženo izotropní filtrace.



(a) Decentrace spirální fázové masky o 20 pixelů vertikálně

(b) Decentrace spirální fázové masky o -20 pixelů vertikálně

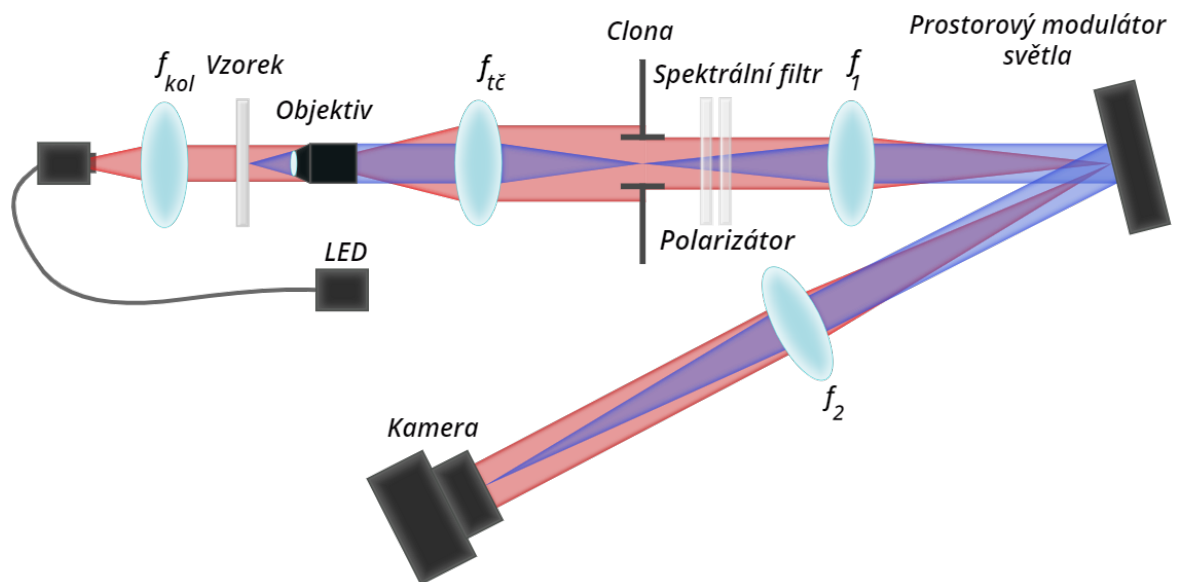
Obrázek 1.14: Princip příčného posunutí masky

Kapitola 2

Experimentální část

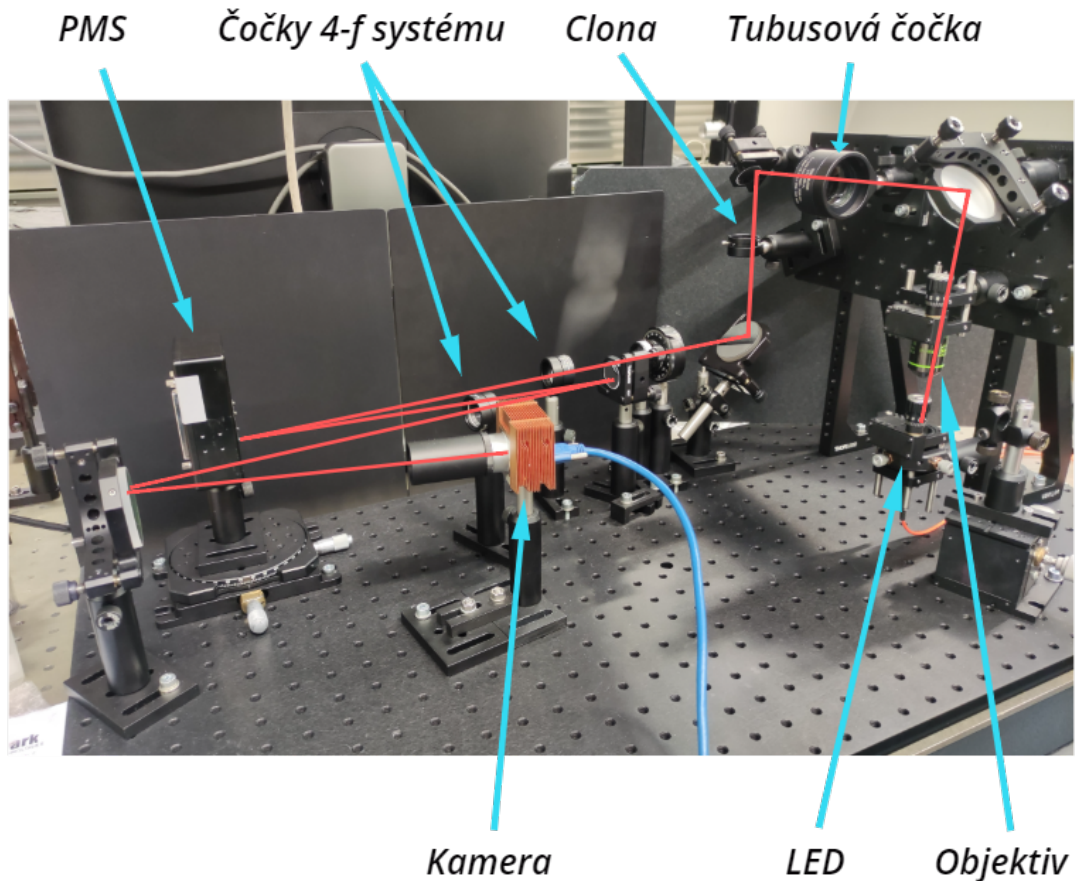
2.1 Sestava

Experimentální sestava se skládá z mikroskopové části a 4-f systému s PMS ve fourierově rovině. Jako zdroj slouží LED o centrální vlnové délce 625 nm s výkonem 17,5 mW, která je navázána do optického vlákna. Světlo vyzářené z vlákna je kolimováno asférickou čočkou s ohniskovou vzdáleností $f_{kol} = 11$ mm. V obrazové ohniskové rovině kolimační čočky se nachází vzorek, který je zobrazen mikroskopovým objektivem. V experimentu byly použity dva různé objektivy. Olympus UPlan FL N se zvětšením 20x s numerickou aperturou 0.5 a Olympus UPlan FL N se zvětšením 10x s numerickou aperturou 0.3. V obou případech byla použita tubusová čočka s ohniskovou vzdáleností $f_{t\check{c}} = 180$ mm, v jejíž ohniskové rovině se nachází clona zorného pole. V soustavě se nachází také spektrální filtr o šířce 1 nm, aby nedocházelo k disperzi a lineární polarizátor, aby bylo dosaženo maximální účinnosti PMS.



Obrázek 2.1: Schéma experimentu

Ve 4-f systému se nachází dvě čočky s ohniskovými vzdálenostmi $f_1 = 300$ mm a $f_2 = 500$ mm v jejichž společné ohniskové rovině je umístěn PMS značky Hamamatsu (X10468) s rozlišením 800 x 600 a velikosti pixelů 20 μm , který provádí filtraci prostorového spektra. Obraz snímá kamera značky Basler (acA1920-155um) s rozlišením 1920 x 1200 a s velikostí pixelů 5,86 μm .



Obrázek 2.2: Fotografie experimentu

2.1.1 Zvětšení systému

Zvětšení systému je rovno

$$M = \frac{f_{\text{tč}} \cdot f_2}{f_{MO} \cdot f_1}, \quad (2.1)$$

kde f_{MO} je ohnisková vzdálenost objektivu. Pro objektiv se zvětšením 10x je ohnisková vzdálenost $f_{MO1}=18$ mm a pro objektiv se zvětšením 20x $f_{MO2}=9$ mm. Po dosazení hodnot do vztahu 2.1 lze psát

$$M_1 = \frac{180 \cdot 500}{18 \cdot 300} \approx 16,6 \quad (2.2)$$

a

$$M_2 = \frac{180 \cdot 500}{9 \cdot 300} \approx 33,3. \quad (2.3)$$

2.1.2 Separace difrakčních řádů

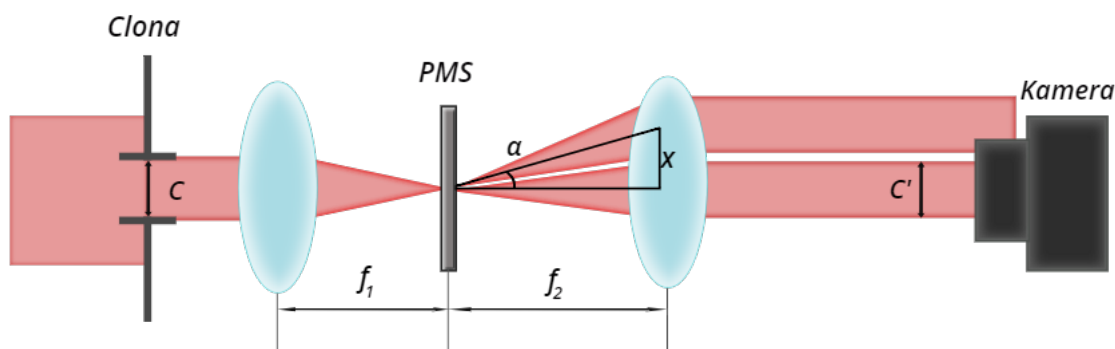
Z důvodu periodické struktury dochází na povrchu PMS k difrakci. Je třeba oddělit vzniklé difrakční řády v obrazovém prostoru tak, aby se nepřekrývaly a neznehodnocovaly výsledný obraz. Pomocí mřížkové rovnice získáme úhel, pod kterým je odkloněn m -tý řád

$$\sin(\alpha_m) = \sin(\alpha_i) + m \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (2.4)$$

kde m je řád difrakčního maxima, který je v našem případě roven jedné. λ je vlnová délka a Λ je mřížková konstanta. Pokud by PMS nepromítalo žádnou masku, byla by Λ rovno vzdálenosti jednoho pixelu. V případě, že se pracuje s 1. difrakčním řádem, je na PMS promítána binární mřížka, která mění Λ na dvojnásobek. V případě PMS použitého v sestavě se jedná o 40 μm . Z důvodu, že se jedná o malé uhly je možné funkci sinus aproximovat jako $\sin\alpha \approx \alpha$. Pak lze psát

$$\alpha = \frac{\lambda}{\Lambda} = \frac{625 \text{ nm}}{4 \cdot 10^4 \text{ nm}} = \frac{1}{64}. \quad (2.5)$$

Z obrázku 2.3 vyplývají vztahy



Obrázek 2.3: Princip separace difrakčních řádů

$$\alpha = \frac{x}{f_2} \implies x = \alpha \cdot f_2, \quad (2.6)$$

$$C' = \frac{C}{f_1} \cdot f_2, \quad (2.7)$$

Aby jsme dosáhli separace musí platit podmínka $x > C'$. Po dosazení x a C' vznikne výraz

$$\alpha \cdot f_2 > \frac{C}{f_1} \cdot f_2, \quad (2.8)$$

po úpravě

$$\alpha > \frac{C}{f_1}. \quad (2.9)$$

Pro zvolenou hodnotu $f_1 = 300 \text{ mm}$ pak ze vztahu 2.9 vyplývá, že C musí být menší než 3,975 mm. Volba f_2 vychází z požadavku aby C' odpovídalo menšímu rozměru kamery

$$C' = 1200 \text{ pixelů} \cdot 5,86 \mu\text{m} = 7032 \mu\text{m} = 7,032 \text{ mm}. \quad (2.10)$$

S využitím vztahu 2.7 vychází, že f_2 je rovno

$$f_2 = \frac{C'}{C} \cdot f_1 = \frac{7,032 \text{ mm}}{3,975 \text{ mm}} \cdot 300 \text{ mm} \approx 530 \text{ mm}. \quad (2.11)$$

V experimentu byla použita čočka s ohniskovou vzdáleností $f_2 = 500 \text{ mm}$, tudíž stopa na kaměře bude mít velikost $C' \approx 6,625 \text{ mm}$. Z uvedených hodnot lze určit velikost zorného pole v předmětovém prostoru pro objektiv se zvětšením 10x

$$d_1 = \frac{C'}{M_1} = \frac{6,625 \text{ mm}}{\frac{50}{3}} \approx 0,4 \text{ mm} \quad (2.12)$$

a pro objektiv se zvětšením 20x

$$d_2 = \frac{C'}{M_2} = \frac{6,625 \text{ mm}}{\frac{100}{3}} \approx 0,2 \text{ mm.} \quad (2.13)$$

2.1.3 Určení parametrů masek

Významnou výhodou využití PMS v mikroskopii kromě flexibility je taktéž možnost volby parametrů, které vyhovují uživateli, anebo jsou potřebné pro danou optickou soustavu. Určení správných poloměrů centrálních oblastí je klíčové pro správnou prostorovou filtraci spektra. Dá se vycházet z výpočtu pro zvětšení obrazu zdroje světla, což bylo v našem případě čelo vlákna.

$$M_{\text{zdroje}} = \frac{f_{\text{MO}} \cdot f_1}{f_{\text{kol}} \cdot f_{\text{tč}}}, \quad (2.14)$$

ze vztahu 2.14 lze dopočítat D'_{LED} jako velikost obrazu čela vlákna na PMS,

$$M_{\text{zdroje}} = \frac{D'_{\text{LED}}}{D_{\text{LED}}} \implies D'_{\text{LED}} = \frac{f_{\text{MO}} \cdot f_1}{f_k \cdot f_{\text{tč}}} \cdot D_{\text{LED}}, \quad (2.15)$$

kde D_{LED} je velikost čela vlákna. Na určení velikosti průměru centrální oblasti podělíme velikost stopy na PMS s velikostí pixelu PMS

$$n_{\text{pixelů}} = \frac{D'_{\text{LED}}}{D_{\text{PMS}}} = \frac{f_{\text{MO}} \cdot f_1 \cdot D_{\text{LED}}}{f_{\text{kol}} \cdot f_{\text{tč}} \cdot D_{\text{PMS}}}. \quad (2.16)$$

Po dosazení hodnot pro ohniskové vzdálenosti při použití objektivu Olympus UPlan FL N se zvětšením 10x, který má ohniskovou vzdálenost $f_{\text{MO}1}=18$ mm, velikosti čela vlákna $D_{\text{LED}}=0,4$ mm a velikosti pixelu PMS $D_{\text{PMS}} = 0,02$ mm dostaneme hodnotu

$$n_{\text{pixelů}} = \frac{18 \cdot 300 \cdot 0,4}{11 \cdot 180 \cdot 0,02} \approx 55 \text{ pixelů.} \quad (2.17)$$

Pro objektiv UPlan FL N se zvětšením 20x s ohniskovou vzdáleností $f_{\text{MO}2}=9$ mm je velikost stopy rovna

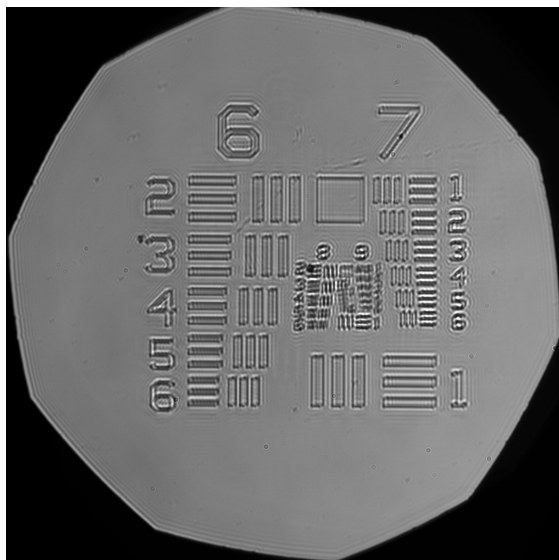
$$n_{\text{pixelů}} = \frac{9 \cdot 300 \cdot 0,4}{11 \cdot 180 \cdot 0,02} \approx 27 \text{ pixelů.} \quad (2.18)$$

Hodnoty 2.17 a 2.18 slouží jako orientační hodnota pro výběr velikosti centrální oblasti. V experimentu byli použity centrální oblasti s velikostí 50 a 25 pixelů.

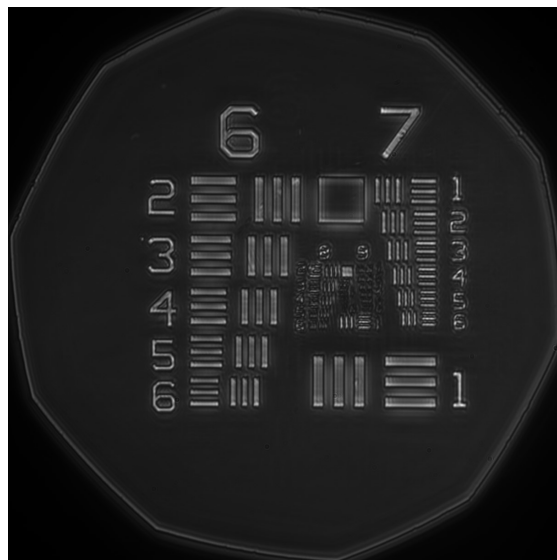
2.2 Výsledky

2.2.1 Fázový kalibrační vzorek

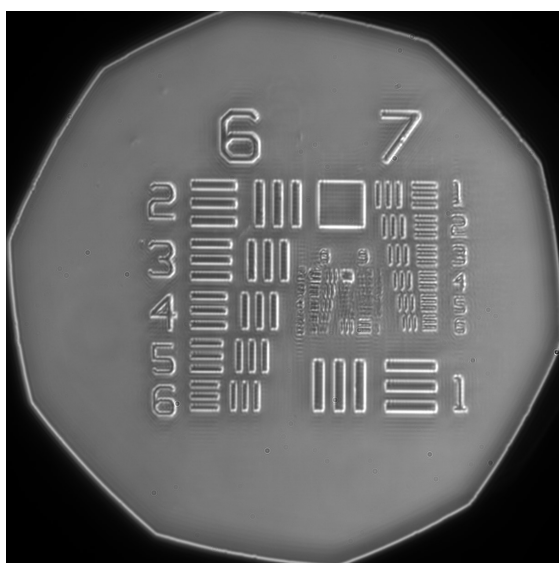
Jako referenční test byl použit fázový test od společnosti Benchmark, který má 3 různé struktury pro 7 variací výšek hran od 50 nm po 350 nm [14]. V následujících snímcích bude zobrazena struktura 6. a 7. skupiny rozlišovacího USAF testu.



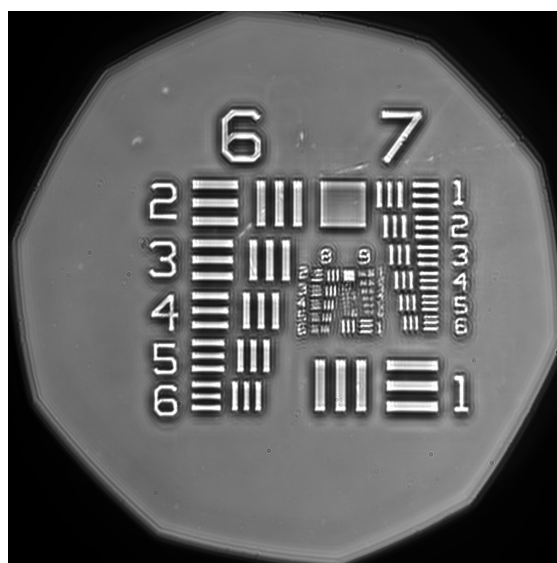
(a) Světlé pole



(b) Temné pole



(c) Spirální fázový kontrast



(d) Negativní Zernikov kontrast

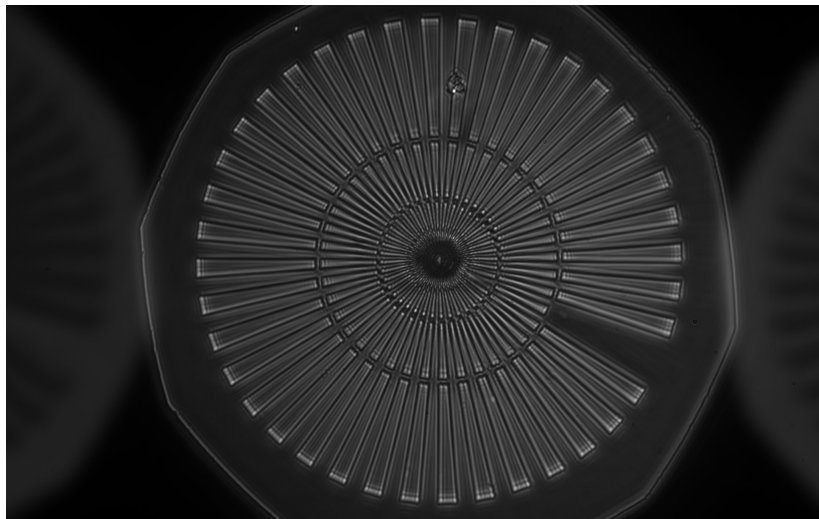
Obrázek 2.4:

Snímky fázového kalibračního USAF testu s výškou hrany 350 nm s objektivem 10x

Při porovnávání snímků bez masky (Obr. 2.4a) se snímky, kde je provedena filtrace spektra pomocí PMS (Obr. 2.4b, 2.4c, 2.4d), je patrné, že dojde ke zvýšení kontrastu. U temného pole (Obr. 2.4b) je zřejmý pokles intenzity v pozadí, kdežto hrany jsou ohraničené vyšší intenzitou. V případě spirálního fázového kontrastu (Obr. 2.4c) se energie přesune do míst obrazu hran předmětu a dojde k izotropnímu zvýraznění. Na snímku s filtrací pomocí Zernikova kontrastu (Obr. 2.4d) se zvýší intenzita v místech,

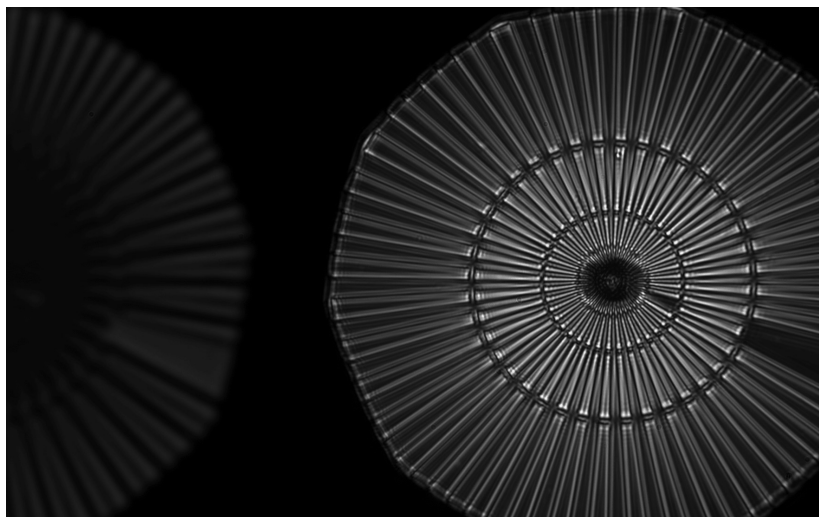
kde předmět posouval fázi oproti pozadí. Nicméně v okolí předmětu vzniká efekt stínování, který se projevuje zobrazením okolí předmětu s nižší intenzitou.

Na snímku 2.5 je příklad temného pole, kdy není dodržena separace podle sekce 2.1.2 a nastane překrytí 0. s 1. difrakčními řády. Pokud by překrytí bylo větší, dojde k degradaci obrazu.



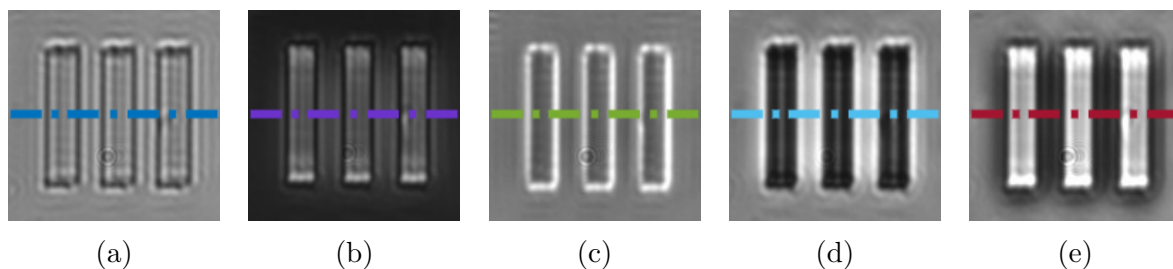
Obrázek 2.5: Temné pole Siemensovy hvězdy s překryvem

Snímek 2.6 znázorňuje princip temného pole, kdy jsou v 0. řádu ponechány vysoké frekvence reprezentující detaily a nízké frekvence jsou odseparované do 1. difrakčního řádu.

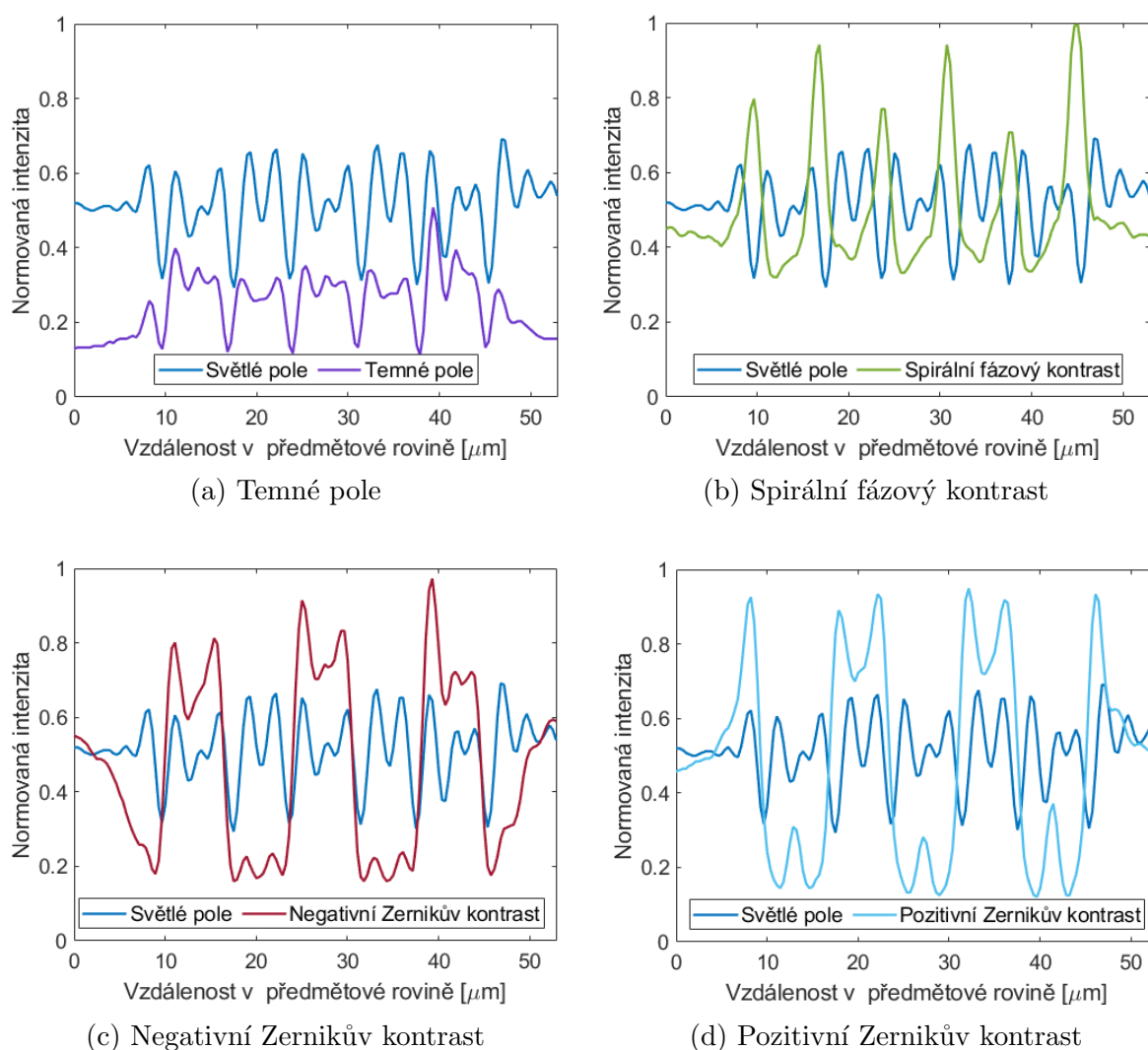


Obrázek 2.6: Aplikování temného pole pro 0. difrakční řád

Vyhodnocení



Obrázek 2.7: Řezy 6. skupiny a 1. elementu USAF testu. Na snímku (a) je referenční světlé pole, na snímku (b) temné pole, na snímku (c) spirální fázový kontrast a v neposlední řadě pozitivní Zernikův kontrast (d) a negativní Zernikův kontrast (e)



Obrázek 2.8: Intenzitní řezy USAF testem s výškou hrany 350 nm

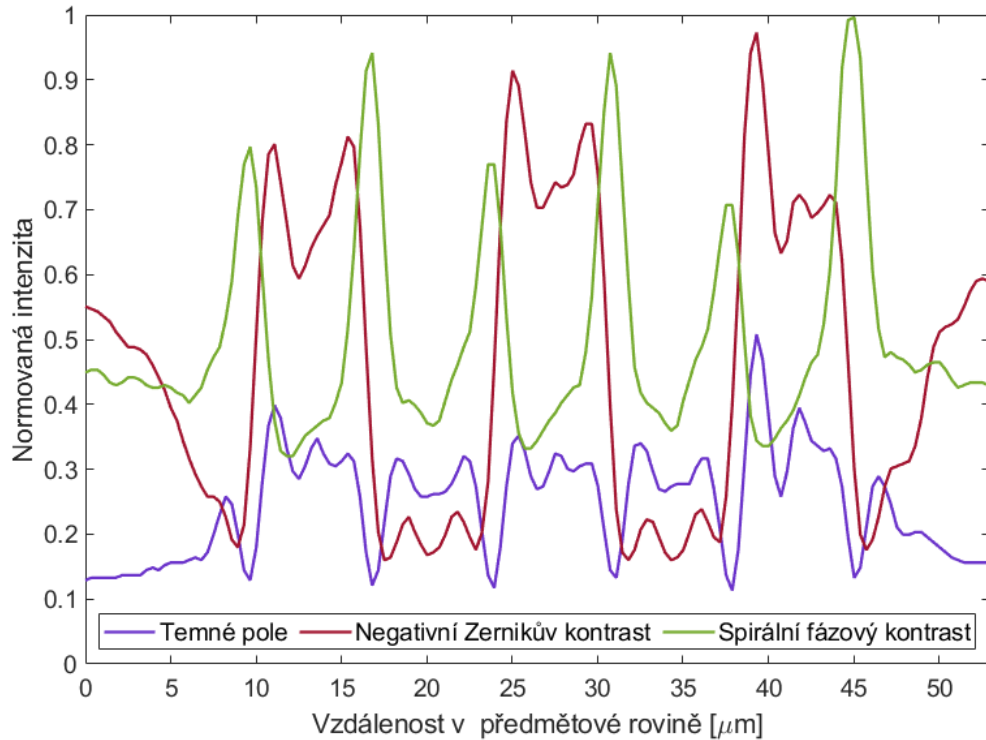
Pro analýzu snímků jsou vytvořeny intenzitní grafy, které porovnávají jednotlivé metody s referencí, kdy není použita žádná maska. Osa x zaznamenává souřadnici v předměťové rovině a osa y normovanou intenzitu.

Temné pole (Obr. 2.8a) posouvá celou úroveň intenzity níže a zvýrazňuje okolí obrazu hran předmětu. Všechny snímky byly zaznamenány se stejnou expozicí pro

porovnávání, a proto je u temného pole kontrast nižší. Aby snímky s temným polem podávaly lepší informaci o struktuře objektu, je vhodné zvýšit expozici.

Při srovnání spirálního fázového kontrastu a reference (Obr. 2.8b) je možné pozorovat zvýšení intenzity v místech obrazu hran pozorovaného předmětu. Z grafu je patrný nárůst kontrastu, kdy některé hodnoty hraničily s maximální hodnotou intenzity.

Na rozdíl od předešlých vzorků, kde docházelo ke zvýraznění hran, Zernikův fázový kontrast (Obr. 2.8c, 2.8d) působí na celou plochu vzorku a zvýrazní hloubkovou strukturu předmětu.

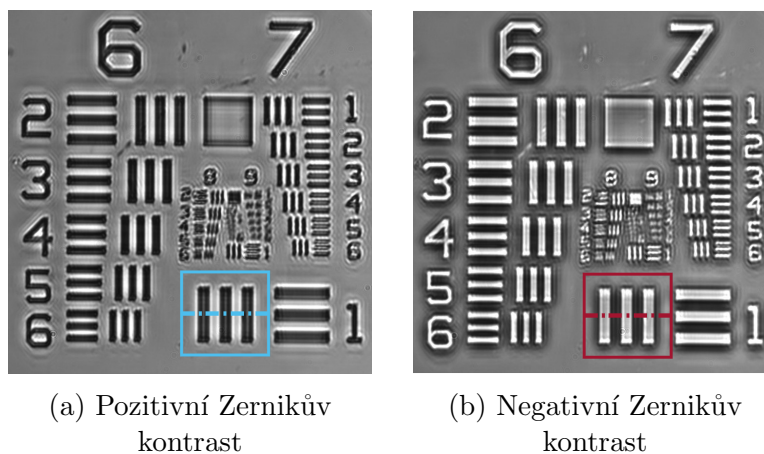


Obrázek 2.9: Porovnání spirálního fázového kontrastu, temného pole a negativního Zernikova kontrastu

Při srovnání těchto metod (Obr. 2.9) jsou zmíněné rozdíly poměrně zjevné. Temné pole má výrazně nižší intenzitu a spolu se spirálním kontrastem zvýrazňují hrany, zatímco Zernikův fázový kontrast zvyšuje intenzitu všude tam, kde je přítomna změna fáze.

Porovnání negativního a pozitivního Zernikova kontrastu

Jak bylo uvedeno v sekci 1.1.2, rozdíl mezi pozitivním a negativním Zernikovým kontrastem je způsob, jakým je přímé světlo modulováno.

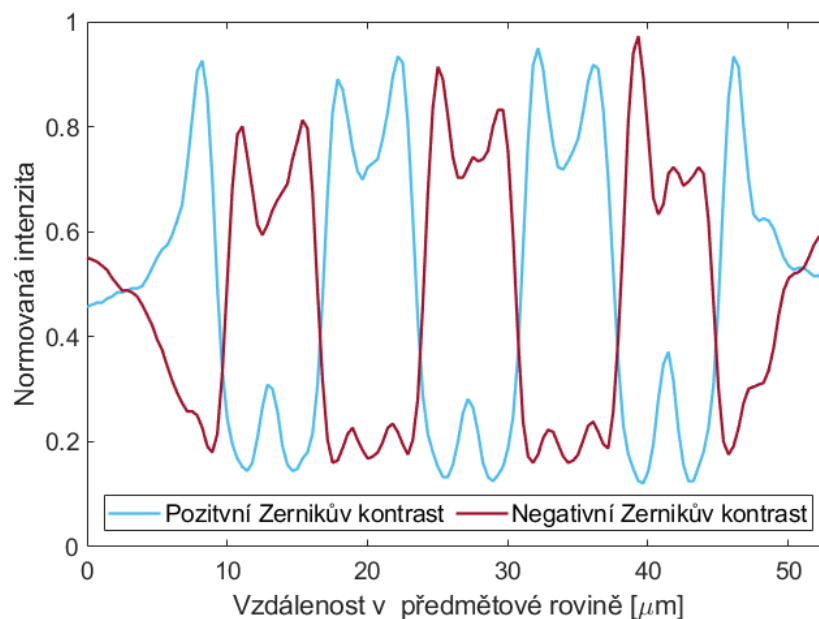


(a) Pozitivní Zernikův kontrast

(b) Negativní Zernikův kontrast

Obrázek 2.10: Znázornění polohy intenzitního řezu

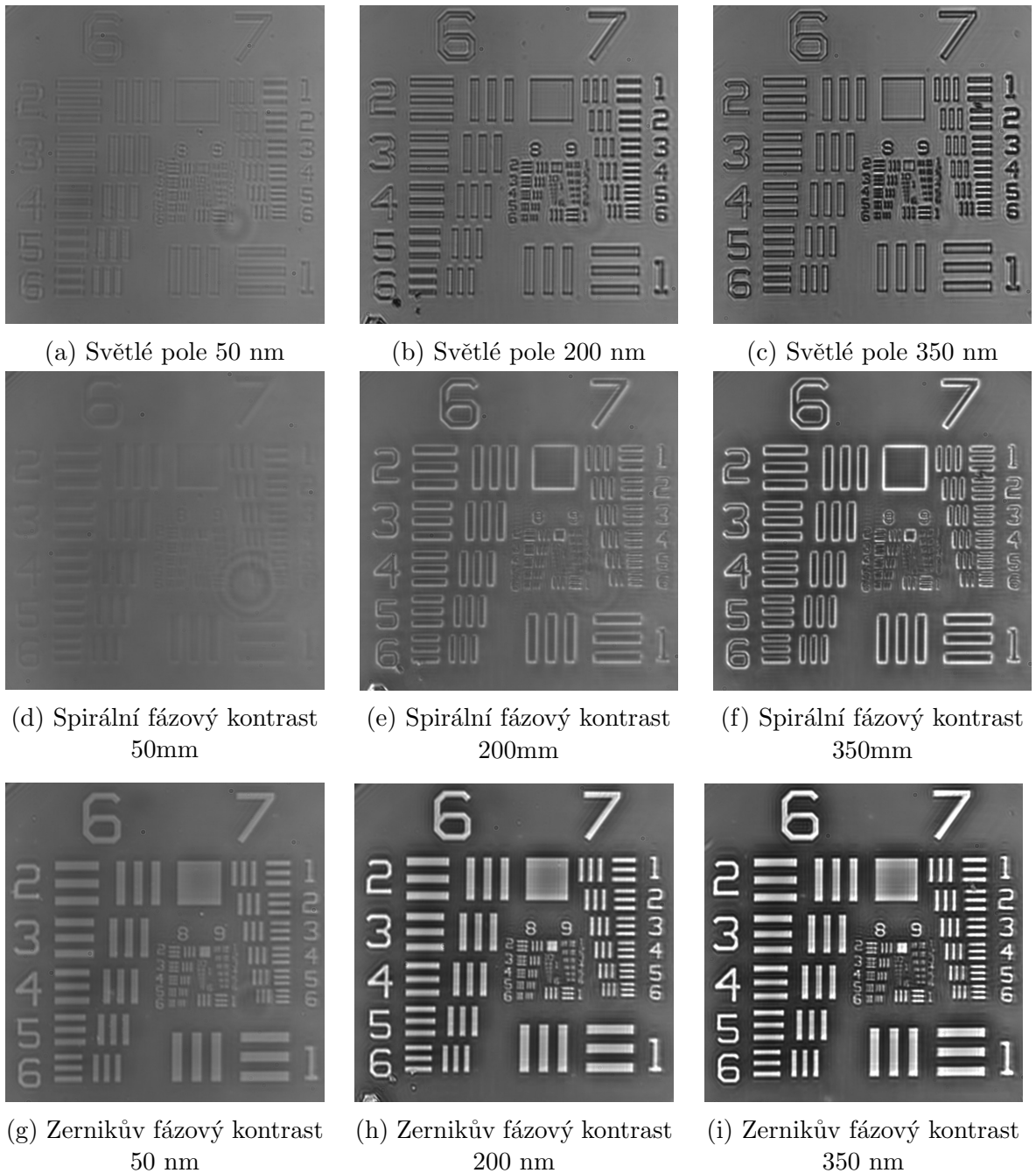
Jestliže je fáze přímého světla posunuta kupředu o π , v rovině obrazu dochází k destruktivní interferenci a předmět ztmavne (Obr. 2.10a). Pokud je fáze přímého světla posunutá vzad, nastane konstruktivní interference v rovině obrazu (Obr. 2.10b), kde je předmět zesvětlen.



Obrázek 2.11: Porovnání pozitivního a negativního Zernikova kontrastu

Podle křivek 2.11 je možno vyčíst, kde se nachází pozorovaný předmět a jaký je jeho reliéf. Pro křivku negativního Zernikova kontrastu jde o místa, kde intenzita prudce stoupá, a pro pozitivní Zernikův kontrast jsou to místa, kde prudce klesá.

Porovnání různých výšek hran USAF testu

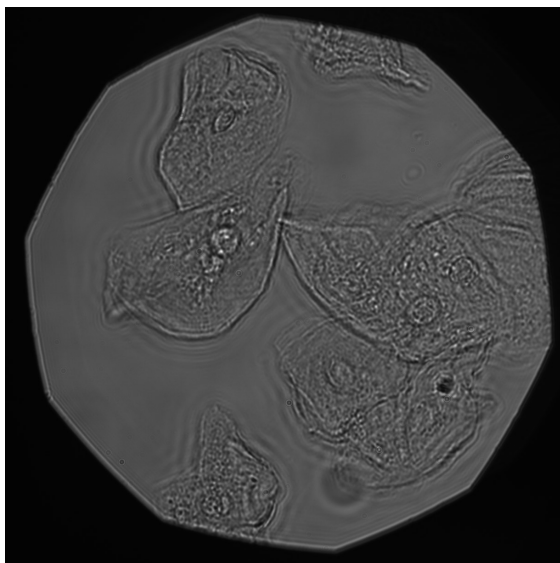


Obrázek 2.12: Porovnání spirálního kontrastu a Zernikova kontrastu při různých výškách hran

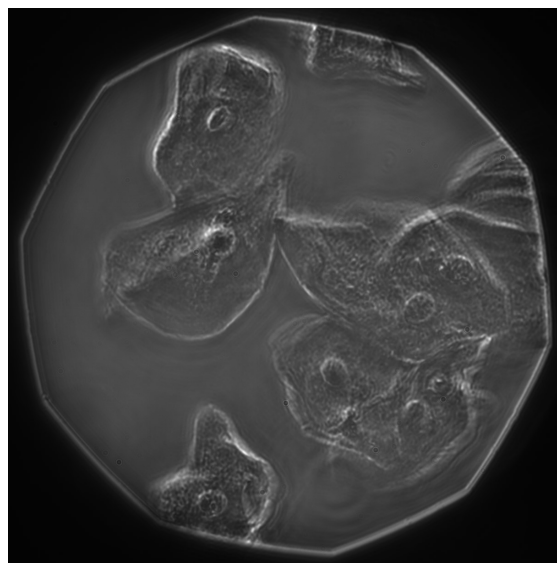
Účelem pozorování různých výšek hran bylo porovnání efektivity jednotlivých metod vůči referenčním snímkům. U výšky hrany 350 nm bylo možno pozorovat objekt i ve světlém poli (Obr. 2.12c). Při spirálním fázovém kontrastu a Zernikovém fázovém kontrastu (Obr. 2.12f,2.12i) dochází ke znatelnému zvýšení kontrastu. Se snižující se výškou hran efektivita obou metod klesá. Lze tvrdit, že u Zernikova fázového kontrastu je předmět dobře viditelný i při výšce 50 nm (Obr. 2.12g), kdežto u spirálního kontrastu (Obr. 2.12d) se struktura stává slabě viditelnou a porovnatelnou s referenčním snímkem světlého pole (Obr. 2.12a).

2.2.2 Biologický vzorek

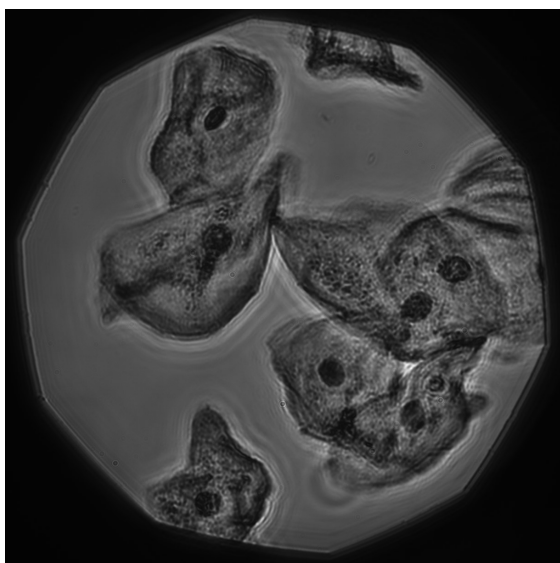
Pro ukázkou typického fázového předmětu byly zobrazeny lícní buňky (Obr. 2.13), krysí tkáň (Obr. 2.14) a červené krvinky (Obr. 2.15).



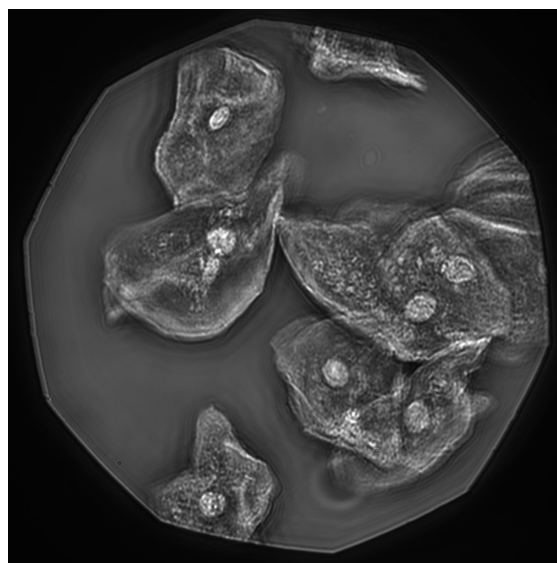
(a) Světlé pole



(b) Spirální fázový kontrast



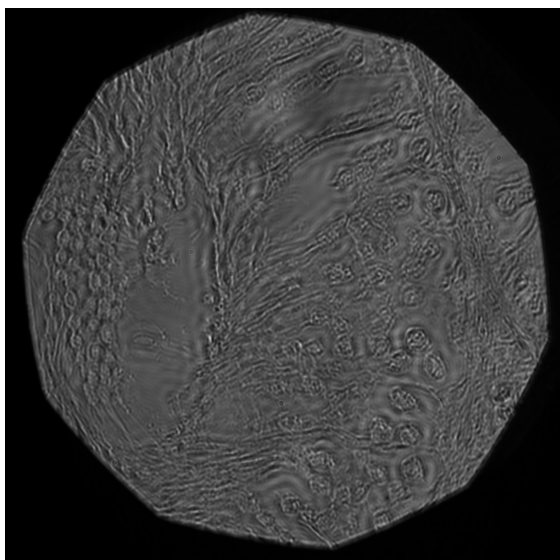
(c) Pozitivní Zernikův kontrast



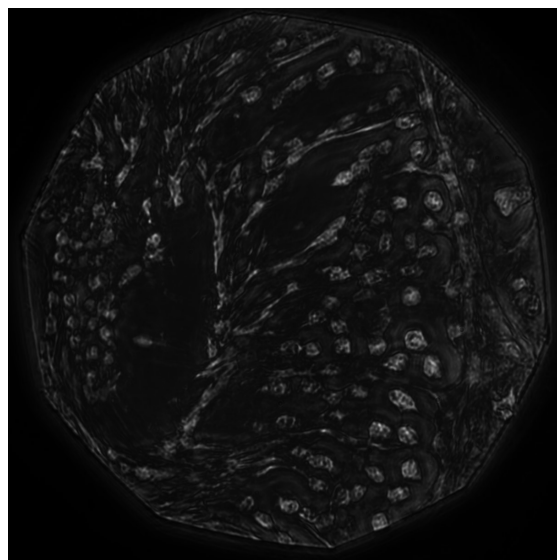
(d) Negativní Zernikův kontrast

Obrázek 2.13: Snímky lícních buněk vytvořené s objektivem se zvětšením 20x

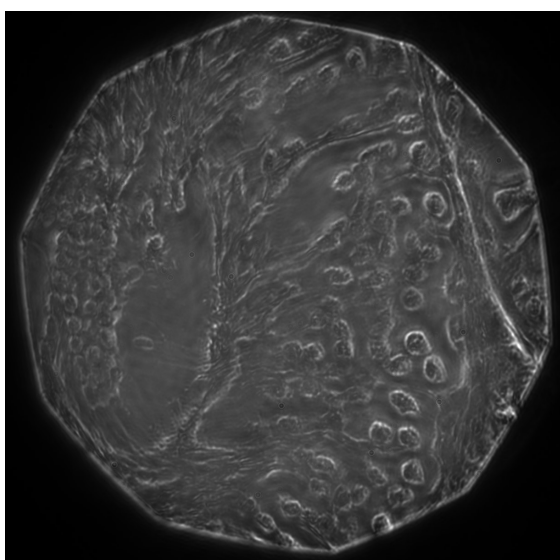
V případě světlého pole je možné vidět přítomnost lícních buněk v předmětové rovině, avšak struktura je téměř nerozeznatelná. Aplikací spirálního fázového kontrastu se zvýrazní hrany jader a je možno rozeznat, kde přesně se jádra nachází. Avšak po promítnutí masky Zernikova kontrastu je zvýrazněn celý předmět, kde je zřetelně vidět struktura předmětu a také poloha jader.



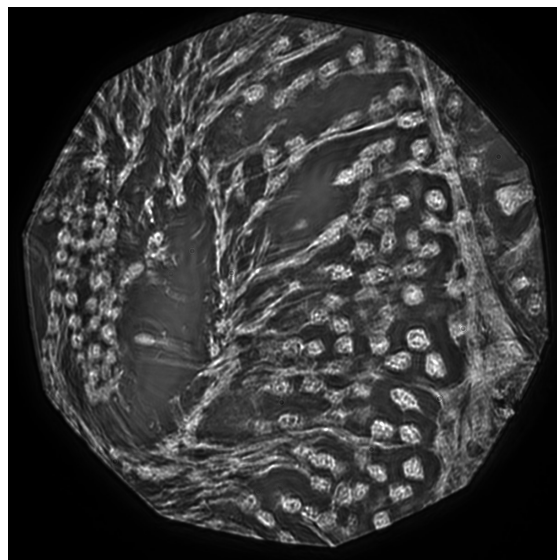
(a) Světlé pole



(b) Temné pole



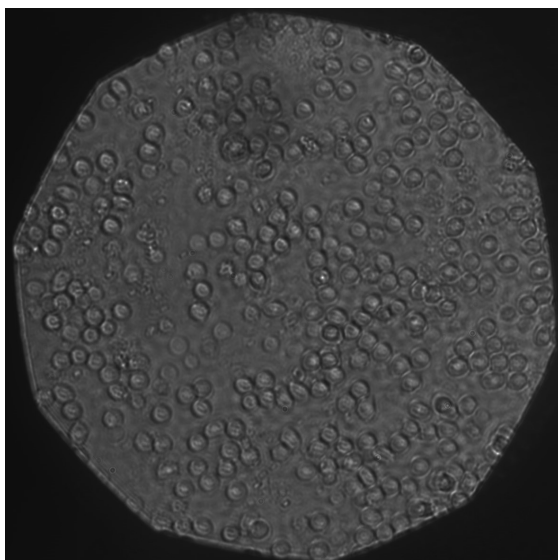
(c) Spirální fázový kontrast



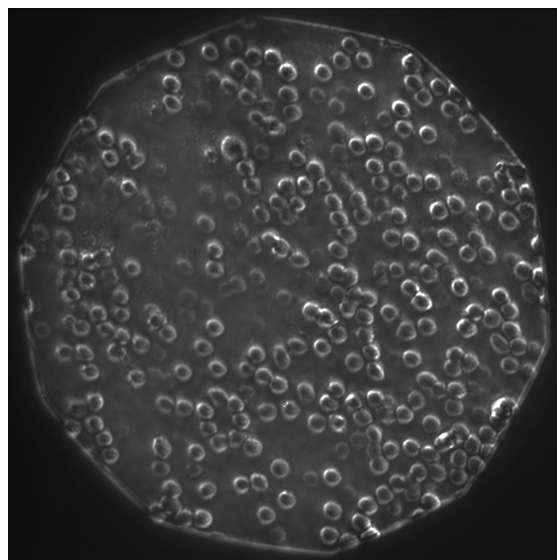
(d) Negativní Zernikův kontrast

Obrázek 2.14: Snímky krysí tkáně vytvořené s objektivem se zvětšením 20x

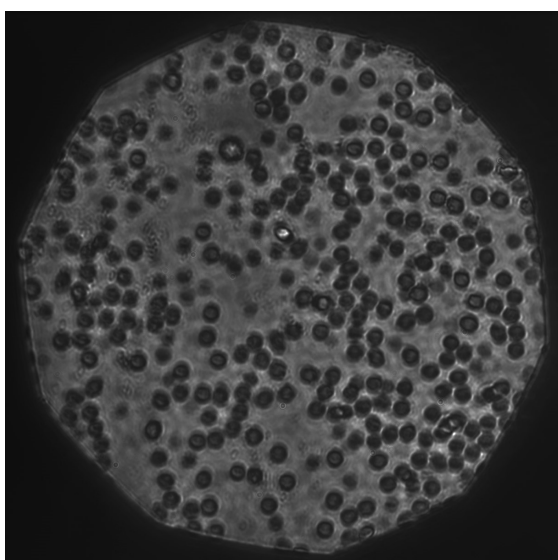
Pro porovnání různých metod bylo použito také temné pole, které na rozdíl od světlého pole zvýrazní hrany, stejně jako spirální fázový kontrast. Ale přece také v tomto případě se jeví Zernikův kontrast jako účinnější než zbylé metody. Na snímku 2.14d jsou zviditelněny též struktury, které by jinak na první pohled nebyly postřehnutelné.



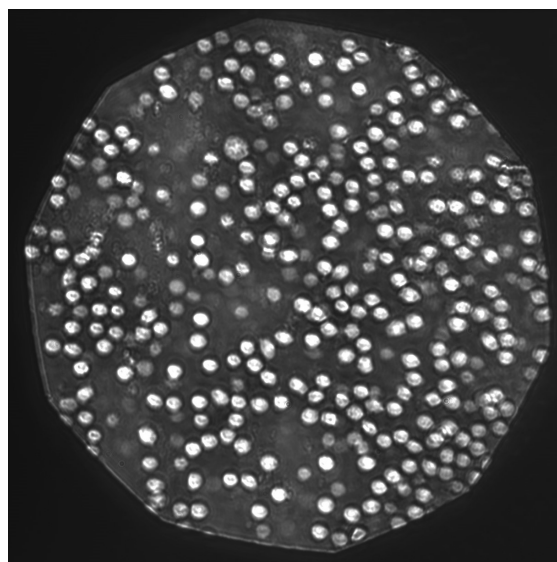
(a) Světlé pole



(b) Spirální fázový kontrast



(c) Pozitivní Zernikův kontrast



(d) Negativní Zernikův kontrast

Obrázek 2.15: Snímky červených krvinek vytvořené s objektivem se zvětšením 20x

Na závěr byly zkoumány červené krvinky. Spirální fázový kontrast opět zvýraznil hrany, ovšem pokud je cílem pozorování specifický bikonkávní tvar červených krvinek, je vhodnější metoda Zernikova kontrastu, která zvýrazní reliéf buňky.

Závěr

Cílem práce bylo obeznámení se s principem moderních mikroskopických metod na zvýšení kontrastu, které jsou běžně užívané v praxi a zkonstruování funkčního mikroskopu využívajícího prostorový modulátor světla na realizaci těchto metod.

V teoretické části jsou popsány moderní mikroskopické metody využívané ke zvýšení kontrastu obrazu fázových předmětů a jejich schematické znázornění. Nejprve je popsána metoda temného pole, v rámci níž je vzorek osvětlen šikmým svazkem a objektiv zachytává pouze světlo rozptýlené na vzorku. Jako druhá je vysvětlena metoda Zernikova fázového kontrastu využívající fázovou destičku umístěnou v mikroskopovém objektivu. Poslední metodou je spirální fázový kontrast vyvinutý na začátku 21. století, který zavádí fázový posun azimutálně pomocí 4-f systému. Dále jsou popsány kapalně krystalové a prostorové modulátory světla. Závěrem je zmíněn popis masek, které realizují popsané mikroskopické metody pomocí prostorového modulátoru světla.

Experimentální část popisuje sestavu mikroskopu se 4-f systémem, v němž je umístěn prostorový modulátor světla, který provádí filtraci prostorového spektra. Pro pozorování byly zvoleny fázové předměty jako kalibrační USAF test anebo Siemsenova hvězda a jako biologické vzorky byly použity lícni buňky, krev a krysí tkáň. V kapitole je také uveden způsob výpočtu separace difrakčních řádů a výpočty sloužící pro správný výběr parametrů masek.

Využití prostorového modulátoru světla v mikroskopii je vysoce flexibilní, neboť je možno využít různých mikroskopických metod a to bez nutnosti mechanického zásahu do soustavy rychlostí desítek Hz. Umožňuje to pohled na vzorek s různými kontrastními metodami a odhalit struktury, které by pouze jedna nemusela zvýraznit.

Nevýhodou sestavy využívající prostorový modulátor světla je vyšší náročnost a objem sestavy z důvodu přítomnosti 4-f systému, který musí mít parametry vhodně zvolené, aby byla dodržena separace difrakčních řádů. V neposlední řadě může být negativem prostorového modulátoru světla i to, že nedisponuje 100% účinností, a dochází tak ke ztrátám energie, což je nutné kompenzovat výkonnějším světelným zdrojem.

Možností rozšíření této práce je několik. Z výsledků je patrné, že metoda temného pole si vyžaduje lepší osvětlení vzorku, aby nemusela být expozice příliš vysoká. Jako další doplnění se nabízí kvantitativní rekonstrukce použitím spirálního fázového kontrastu. A protože jde především o rychlost a flexibilitu soustavy, je možné pomocí programu MATLAB vytvořit uživatelské rozhraní, které by umožňovalo vytváření masek v uživatelsky přívětivém rozhraní a s větší rychlostí.

Literatura

- [1] WARBER, M.; ZWICK, S.; HASLER, M.; HAIST T.; OSTEN, W. *SLM-based phase-contrast filtering for single and multiple image acquisition*, 2009 Proc. SPIE 7442 74420E
- [2] MAURER, C.; JESACHER, A.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. *What spatial light modulators can do for optical microscopy*, 2011 Laser & Photon. Rev., 5: 81-101.
- [3] DAVIDSON, M.; ABRAMOWITZ M. *Optical Microscopy*, Encyclopedia of Imaging Science and Technology, 2002
- [4] JORGENSEN, J.; PFALLER, M. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition, Washington, DC, ASM Press, 2015
- [5] PLÁŠEK, J. *Proměny světelné mikroskopie ve 20. století*, Vesmír 83, 146 - 153, 2004.
- [6] MERTZ, J. *Introduction to optical microscopy*, Greenwood Village, Colo.: Roberts and Company Publishers, c2010, xvii, 413 s. ISBN 978-0-9815194-8-7.
- [7] *MicroBus* [online]. 2020 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://microscope-microscope.org/microscope-info/phase-contrast-microscope/>
- [8] JESACHER, A.; FÜRHAPTER S.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. *Shadow Effects in Spiral Phase Contrast*, Physical review letters, 2005, Vol. 94, No. 23, 233902 1-4.
- [9] ÚLEHLA, P. *Zobrazování metodou spirálního fázového kontrastu*, Olomouc, 2020, Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci
- [10] ROSALES-GUZMÁN, C.; FORBES, A. *How to Shape Light with Spatial Light Modulators*, Washington: SPIE Press. ISBN 9781510613010.
- [11] SALEH, B. E. A.; TEICH, M. C. *Zaklady fotoniky*, svazek 2. a 4., 1. vyd. Praha: MAT-FYZPRESS, 1994, 226 s. ISBN 80-85863-01-4.
- [12] RESTAINO, S.; TEARE, S. *Introduction to Liquid Crystals for Optical Design and Engineering*, Washington: SPIE Press ISBN 978-1-62841-807-1
- [13] FÜRHAPTER, S.; JESACHER, A; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. *Spiral phase contrast imaging in microscopy*, Optics Express, 2005, Vol. 13, No. 3, 689-694
- [14] *Quantitative Phase Target 9911-2-1-4, Benchmark Technologies*. Dostupné z: <https://www.benchmarktech.com/>