



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

KONFOKÁLNÍ MODUL PRO KOHERENCÍ ŘÍZENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

CONFOCAL MODULE FOR THE COHERENCE CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Kubátová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka: **Bc. Eva Kubátová**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

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

Konfokální modul pro koherenci řízený holografický mikroskop

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Koherenci řízený holografický mikroskop je v současnosti rozšířen o fluorescenční osvětlení. To však neumožňuje pozorování konfokálním způsobem. Tento způsob se v současnosti jeví jako nutná doplňková technika ke kvantitativnímu fázovému zobrazení. V rámci této diplomové práce bude navržen konfokální fluorescenční modul, který bude využívat k rastrování obrazu DMD čip.

Cíle diplomové práce:

- 1) Navrhnout řešení konfokálního fluorescenčního modulu s DMD čipem.
- 2) Optimalizovat optickou soustavu modulu.
- 3) Vytvořit výrobní dokumentaci modulu.
- 4) Navrhnout justážní metodu modulu.
- 5) Modul otestovat.

Seznam doporučené literatury:

BROWN, T. G.; COGSWELL, C. J.; WILSON, T. Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXII. In: Proc. of SPIE Vol. 2015. p. 933001-1.

WRIGHT, S. J., et al. Confocal fluorescence microscopy with the tandem scanning light microscope. Journal of cell science, 1989, 94.4: 617-624.

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

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2019/20

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM) byl vyvinut na VUT v Brně pro kvantitativní fázové zobrazování živých buněk. V dnešní době dochází k vylepšování jeho zobrazovacích možností pomocí přídatných modulů. V současnosti je vybaven epifluorescenčním modulem, který umožňuje pozorování fluorescenčně značených živých buněk. Tato práce naváže na vývoj tohoto modulu a rozšíří jeho možnosti o konfokální zobrazení. Nevýhodou současných vícekanálových konfokálních mikroskopů je mechanická rotace Nipkowových disků, které způsobují nežádoucí mechanické vibrace. Proto je v práci nahrazen DMD čipem. Pro jeho využití je navržen optický systém celého konfokálního modulu, jehož správná funkce byla nasimulována v optickém CADu. Experimentálně ověřený prototyp slouží k testování zobrazovacích vlastností. Na jeho základě je navržena aplikační idea fluorescenčního konfokálního modulu, který bude možné připojit k CCHM mikroskopu.

Summary

The Coherence Controlled Holographic Microscope (CCHM) was developed at BUT Brno for a quantitative phase imaging of living cells. Nowadays it occurs that its imaging properties are enhanced by the use of additional modules. In the present the microscope is equipped with the epifluorescence module, which allows observation of fluorescently marked living cells. This thesis is going to follow up on the development of this module and is going to extend its options by confocal imaging. The disadvantage of current multi-channel confocal microscopes is a mechanical rotation of the Nipkow discs, which causes undesired mechanical vibrations. That is why in this thesis it is replaced by Digital Micromirror Device. With its use was developed optical system of the whole confocal model, whose correct function was simulated in optical CAD. The experimentally verified prototype serves to test the imaging properties. On this basis is designed an application idea of the fluorescence confocal module, which will be possible to connect to the CCHM microscope.

Klíčová slova

Holografická mikroskopie, fluorescence, DMD čip, vícekanálová fluorescenční konfokální mikroskopie, optický a mechanický návrh.

Keywords

Holographic microscopy, fluorescence, Digital Micromirror Device, multi-channel confocal microscopy, optical and mechanical design.

KUBÁTOVÁ, Eva. Konfokální modul pro koherenci řízený holografický mikroskop. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/121592>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce Zbyněk Dostál.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně, pouze za odborného vedení Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D., a všechny podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 25. června 2020.

Děkuji Ing.Zbyňka Dostála,Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a přátelskou spolupráci.

Obsah

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Základní techniky mikroskopie | 5 |
| 1.1 | Metoda světlého pole | 5 |
| 1.2 | Metoda temného pole | 5 |
| 1.3 | Zernikeho metoda fázového kontrastu | 6 |
| 1.4 | Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC) | 7 |
| 2 | Principy holografické a fluorescence mikroskopie | 11 |
| 2.1 | Digitální holografie | 11 |
| 2.2 | Digitální holografická mikroskopie | 12 |
| 2.3 | Koherenci řízený holografický mikroskop - CCHM | 13 |
| 2.3.1 | CCHM I. generace | 13 |
| 2.3.2 | CCHM II. generace | 14 |
| 2.4 | Suchá hmota | 15 |
| 2.5 | Flourescenční mikroskopie | 16 |
| 2.5.1 | Typy fluorescence mikroskopie | 17 |
| 2.6 | Konfokální fluorescence mikroskopie | 18 |
| 2.7 | Nipkowův kotouč | 19 |
| 2.8 | Digital Micromirror Device neboli DMD | 21 |
| 3 | Motivace a cíle práce | 23 |
| 4 | Optický návrh | 25 |
| 4.1 | Společný postup návrhů | 25 |
| 4.2 | Osvětlení DMD | 25 |
| 4.2.1 | Prvotní návrh osvětlení s použitím homogenizační tyče | 27 |
| 4.2.2 | Druhý návrh osvětlení bez optické tyče | 28 |
| 4.3 | Simulace v optickém CADu | 29 |
| 4.3.1 | Simulace od vzorku ke zdroji | 29 |
| 4.3.2 | Simulace od DMD po detektor | 29 |
| 4.3.3 | Simulace konfokálního zobrazení | 30 |
| 4.4 | Výběr optiky | 34 |
| 5 | Mechanický návrh | 35 |
| 5.1 | Uložení fluorescence kostky v experimentu | 35 |
| 5.2 | Kryt DMD čipu | 35 |
| 5.3 | Uložení součástí | 36 |
| 6 | Testování | 41 |
| 6.1 | Pozorování pomocí objektivu s 10-násobným zvětšením | 41 |
| 6.2 | Pozorování pomocí objektivu s 20-násobným zvětšením | 47 |
| 7 | Idea konfokálního modulu | 51 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 8 Závěr | 57 |
| A Obrazová příloha experimentů | 59 |

Úvod

Světelná mikroskopie je zobrazovací metoda sloužící k zobrazení širokého spektra barevných i nebarevných materiálů (rostlinné a živočišné buňky, horniny, vlákna, polymery, stavební materiály, léčiva atd.) [1].

První mikroskop sestavil v roce 1590 v Nizozemsku Zacharias Jansenn, jehož práci dále rozvíjel Galileo Galilei v roce 1610. Výzkum cytologie započal právě vynálezem mikroskopů. Prvním známým případem pozorování buněk je sledování korku Robertem Hookeem v roce 1665. Mikroskopie byla tehdy v plenkách a tak byl schopen pozorovat pouze buněčné stěny (apoplast) a prázdné prostory (symlasty) [3].

Výrazný pokrok v mikroskopii zapříčinil amatérský sklář a optik Antoni van Leeuwenhoek, který vytvořil mikroskop se zvětšením až 270x, což mu umožnilo pozorovat velké množství mikroorganismů a například také červené krvinky [3].

Základními typy mikroskopií, které se v dnešní době používají, jsou metody světlého pole, temného pole, Zernikeho metoda fázového kontrastu a Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie. Mezi pokročilé mikroskopy patří interferenční mikroskopie (Jamin, Sirks, Pringsheim), digitální holografická mikroskopie a epifluorescenční konfokální mikroskopie [12]. První interferenční mikroskop s oddělenou předmětovou a referenční větví popsal v roce 1893 Sirks. Interferometrie je neustále se rozšiřující obor. Komerčně se vyráběly interferometry se zcela oddělenými větvemi (Krug a Lau, Horn) až v 50. letech 20. století. Fungovaly na principu měření rozdílu optických drah předmětové a referenční větve způsobeného vzorkem. Bohužel v této době ještě byla tato metoda finančně a časově náročná. Pro běžné pozorování živých buněk se tedy používaly jednodušší metody Zernikeho metoda a Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie.

Objev holografie (1947), laseru (1960) a rozvoj výpočetní techniky a digitálních záznamů umožnil rozvinutí a rozšíření interferometrie. V 90. letech 20. století zažívá rozkvet transmisní interferenční mikroskopie. Pomocí kvantitativního fázového kontrastu se lze vyhnout toxickému barvení buněk a jejich poškozování. Zároveň umožňuje kvantitativní pozorování v reálném čase. Pro tuto techniku bylo důležité popsání suché hmoty, která je více popsána v části 2.4.

V dnešní době se používají dva typy interferenčních mikroskopů. Dělí se podle úhlu mezi předmětovým a referenčním paprskem ve výstupní rovině interferometru. Použije-li se úhel nulový či téměř nulový (in-line) hovoříme o interferenčních mikroskopech. Je-li úhel nenulový (mimoosová interference, off-axis) jedná se o holografické mikroskopy.

Již od počátku 19. století se objevují záznamy o další oblíbené mikroskopii. Tzv. fluorescenční mikroskopie je naopak založena na principu barvení buněk fluorescenčním barvivem s definovaným excitačním a emisním spektrem. Základním typem fluorescenční metody je epi-fluorescenční mikroskopie. Její princip je v dnešní době rozvíjen pro metody 3D zobrazování. Pro tento účel se fluorescenční metody kombinují s konfokální mikroskopií. Vzniká tak laserová rastrovací konfokální mikroskopie umožňující skenování celého zorného pole pomocí laserového paprsku s excitační vlnovou délkou. Obdobnou kombinací je epi-fluorescenční pozorování vícekanálovou konfokální mikroskopií, která využívá soustavy rotujících dvojic dírkových clon na Nipkowově kotouči.

1 Základní techniky mikroskopie

Světelné mikroskopy využívají viditelné spektrum vlnových délek 420-760 nm. Lze pomocí nich dosáhnout zvětšení až tisíckrát a maximálního rozlišení je až 0,2 μm . Omezení rozlišení je dáno vlnovou povahou světla, tudíž úprava optické soustavy či použití jiným čoček neumožní jeho překročení.

1.1 Metoda světlého pole

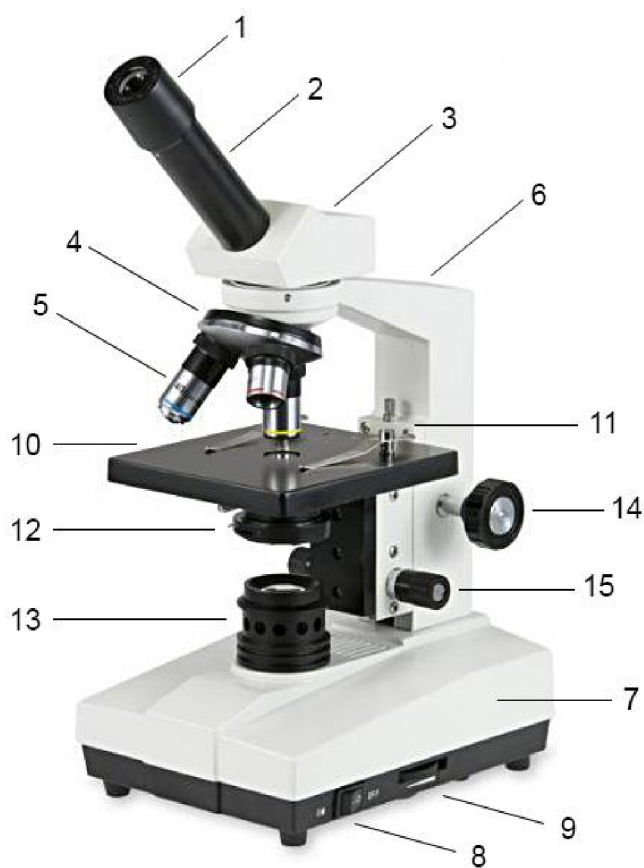
Metoda světlého pole (Bright field - BF) je základní a jedna z nejjednodušších metod zobrazení. Pro zobrazení se nevyužívají filtry ať barevné či polarizační, či žádné přidané clony. Optický mikroskop se skládá z mechanických částí (podstavec, stojan a stolec s křížovým posuvem), osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona) a zobrazovací části (objektiv a okulár - monokulár či binokulár). Kondenzor soustředí světlo zdroje na vzorek. Ten se při vhodné kombinaci zobrazovacích optických prvků promítne na sítnici oka nebo na detektor. Klasické mikroskopy mají sadu objektivů o různých zvětšeních nad vzorkem. Objektiv se skládá ze soustavy čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností. Objektivy vytváří skutečný, převrácený a zvětšený obraz vzorku. Obraz se promítá do polní roviny okuláru. Přes okulár pozorujeme zdánlivě zvětšený obraz. Výsledný obraz je zdánlivý, zvětšený a převrácený. Po odrazu nebo průchodu vzorkem tedy nedochází ke změnám vlastností. Při této metodě se používají barvené a přirozeně pigmentové preparáty s vysokým kontrastem [1].

Existují také tzv. invertované mikroskopy s objektivem umístěným pod vzorkem, které jsou vhodnější pro pozorování biologických vzorků. Invertované mikroskopy jsou vhodné pro pozorování tenkých biologických vzorků například buněčných kultur.

1.2 Metoda temného pole

Tato metoda zvyšuje kontrast na vzorku pomocí vložení clony viz obrázek 2. Tato clona je umístěna do zadní ohniskové roviny kondenzoru a má tvar propustného mezikruží. Numerická apertura světelného svazku vystupujícího z kondenzoru je větší než numerická apertura mikroskopového objektivu použitého k pozorování daného předmětu. Do objektivu se tímto způsobem dostane pouze světlo rozptýlené vzorkem. Při pozorování se vzorek jeví jako svítící na tmavém pozadí a je lépe pozorovatelný než v metodě světlého pole. Tuto metodu jde zajistit již zmíněnou clonou nebo existují speciální kondenzory (paraboloidní nebo kardioví) pro temné pole, které se zasunou na místo běžného kondenzoru [4].

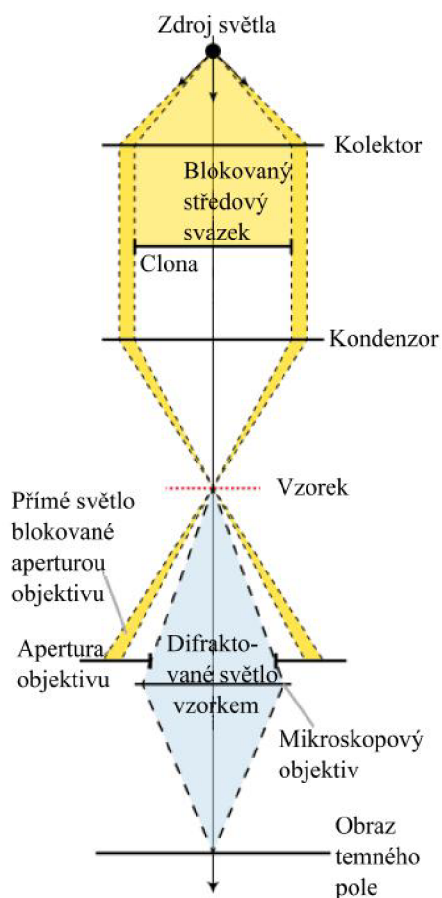
Pomocí metody temného pole lze pozorovat průhledné nebarevné preparáty jako například živé buňky. Ideální je pro zobrazení obrysů, hran, hranic a gradientu indexu lomu. Nevýhodou je malé množství informací o vnitřní struktuře vzorku [1].



Obrázek 1: Světelný mikroskop: 1- okulár, 2- okulárový tubus, 3- hlavice mikroskopu, 4- revolverová hlava, 5- objektiv, 6- rameno mikroskopu, 7- noha mikroskopu, 8- vypínač osvětlení, 9- ovladač regulace osvětlení, 10- pracovní stůl, 11- držák preparátu, 12- kondenzor , 13- kolektor, 14- ovladač makroposuvu – pro hrubé zaostření, 15- ovladač mikroposuvu – pro jemné doostření, převzato z [2].

1.3 Zernikeho metoda fázového kontrastu

Metoda fázového kontrastu byla objevena holandským profesorem Fritsem Zernike a umožňuje vylepšení kontrastu u nezabarevných biologických preparátů. Vzorky neovlivňující amplitudu světla se nazývají fázové. Na obrázku 3 je zjednodušené schéma mikroskopové optické soustavy nachystané pro Zernikeho metodu. Do ohniskové roviny kondenzoru mikroskopu je vložena clona ve tvaru propustného mezikruží (kondenzorová maska), kterou proniká světlo na vzorek. Po průchodu vzorkem světlo pokračuje přes objektiv na fázovou masku. Ta je umístěna do zadní ohniskové roviny objektivu. Fázová maska mění fázi průchozího světla o $1/4$ vlnové délky. Světelné paprsky, které nebyly odchýleny na povrchu vzorku, dopadají na mezikruží (fázová destička) a dochází k fázovému posunu těchto paprsků. Zbývající paprsky odchýlené vzorkem (difrakcí či lomem světla), procházejí ohniskovou rovinou objektivu beze změny fáze. Kontrast vzniká interferencí paprsků fázově posunutých s fázově neposunutými [11].

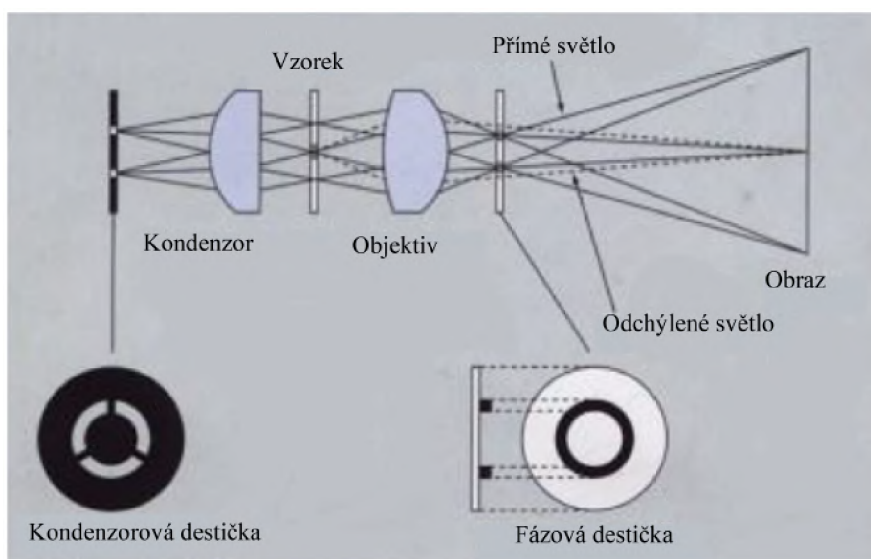


Obrázek 2: Zjednodušené schéma sestavy pro metodu temného pole, převzato a přeloženo z [6].

1.4 Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC)

Další oblíbenou metodou pozorování je diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC). Nejoblíbenější varianta této metody je Normanského diferenciální interferenční kontrast (DIC Nomarski) znázorněna na obrázku 4 [5].

Francouz Georges Normanski upravil Wollastonův hranol, aby mohl detekovat optické gradienty vzorků a konvertovat je do rozdílů intenzit. Světlo ze semikoherentního zdroje se polarizuje polarizátorem. Dále prochází světlo přes Wollastonův hranol, který je tvořený ze dvou tmelených křemenných klínů. Uvnitř Wollastonova hranolu se rozděluje polarizované světlo do dvou mírně rozdílných směrů, na řádný a mimořádný paprsek. Paprsky mají vůči sobě kolmou polarizaci, procházejí kondenzorem a po průchodu vzorkem získají mírně rozdílné fázové zpoždění. Hranoly se musí volit podle zvětšení použitého objektivu [8]. Paprsky prochází vzorkem velice blízko sebe. Vzorek zpožďuje jejich fázi v závislosti na své tloušťce a indexu lomu. Paprsky následně fokusuje objektiv nad objektovou ohniskovou rovinu. Další Wollastonův hranol složí paprsky a ty dále pokračují po stejné trajektorii. Aby došlo k interferenci paprsků je třeba, aby paprsky získaly stejnou polarizaci. Toto zaručí druhý polarizátor (tzv. analyzátor) nad hranolem. Světlo pokračuje dále

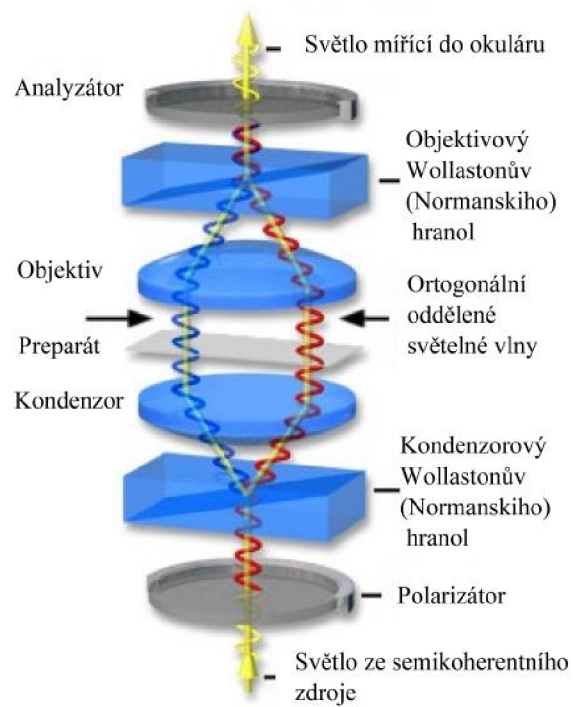


Obrázek 3: Zjednodušené schéma sestavy pro Zernikeho metodu fázového kontrastu, převzato z [7].

do okuláru. Jako výsledný obraz pozorujeme rozdíly v intenzitě a barvách. Stíny či rozdíly barev dokáží vytvořit zdánlivý 3D obraz [8].

Porovnání čtyř základních metod

Na obrázku 5 jsou pro porovnání zachyceny krvinky pomocí výše zmíněných metod světlého, temného pole, fázového kontrastu a DIC. Z hlediska biologického rázu vzorku nelze zajistit, aby se pozorovala stejná situace krvinek. Přesto lze rozpoznat odlišné zachycení červených krvinek. Největší rozdíl je patrný u fázových bílých krvinek, které ve světelném poli nejsou téměř pozorovatelné, viditelné je pouze jádro. V temném poli naopak lze lépe pozorovat povrch bílé krvinky a jádro není kontrastní. Při pozorování fázovou Zernikeho metodou nalezneme jednoduše jak povrch bílé krvinky, tak její jádro. Obdobně DIC zachycuje buňku jako celek. Používá se k vykreslování kontrastu v transparentních vzorcích obdobně jako Zernikeho metoda. Zaznamenaný obraz má pseudo-3D efekt šikmého nasvícení.



Obrázek 4: Schéma diferenční interferenční kontrastní mikroskopie, převzato z [8], přeloženo podle [5].



Obrázek 5: Krvinky pozorované čtyřmi základními metodami zobrazování na mikroskopu řady LP 3000, převzato z [13] a z [10].

2 Principy holografické a fluorescenční mikroskopie

Fotografování je fenomén známý již od 19. století, kdy první černobílou fotografii pořídil roku 1826 Joseph Nicéphore Niépce. Postupně se experimentovalo se zachycováním barev. V dnešní době je fotografování na fotocitlivé desky nahrazeno moderními čipy. Barvené fotografie jsou nyní součástí běžného života. Trojrozměrné scény zachycujeme na dvojdimenzionální obraz s mnoha vlastnostmi jako kontrast, jas a podobně. Nelze na nich ale zachytit hloubku a perspektivu. To umožňuje holografie (z řeckého holos -úplný, grafie - záznam), která umožňuje zachytit nejen amplitudu vlny ale i její fázi. Umožňuje tak plný záznam vlny. Dříve se na zachycení obrazu používaly fotografické desky, dnes s rozvojem informační techniky obzvláště počítačů a kamer a prací s 3D prostorem lze 3D rekonstrukci zachycované scény získat digitální cestou.

2.1 Digitální holografie

Za zakladatele digitální holografie se pokládá Dennis Gabor. Zabýval se vylepšením rozlišení elektronových mikroskopů. Místo aby se snažil vylepšovat elektronové čočky, zabýval se teorií zobrazování. Uvědomil si, že difrakční obrazec obsahuje informace o amplitudě a fázi vlny. Záznam tohoto pole lze následně opticky syntetizovat na objektové pole. Tyto vlastnosti je možno aplikovat také na viditelné spektrum, což bylo tehdy výhodné ve světelné mikroskopii. Toto nové zobrazování umožnilo fázově zaznamenat celé zorné pole. Plného rozvoje této techniky bylo dosaženo až po dvou událostech. Po vývoji dostatečně silného koherentního laserového zdroje, který umožnil dostatečný interferenční kontrast. A po umožnění mimoosového osvětlení referenční vlnou a tím vyhnutí se problému s nultým řádem difrakce a zdvojeným obrazem vznikajícím při Gaborově osvětlení. Tohoto dosáhli pánové Leith a Upaniek.

V roce 1967 Goodman a Lawrence demonstrovali proveditelnost numerické rekonstrukce obrazu z Fourierovu hologramu detekované na kameře Vidicon. Vznik digitální holografie byl první významný krok v rozvoji pozorování vzorků v reálném čase pomocí holografie. Schnars a Jueptner v roce 1994 poprvé použili CCD kameru připojenou k počítači. Obraz který přepočítával byl vytvořený ve Fresnelově sestavě. O té době se, místo

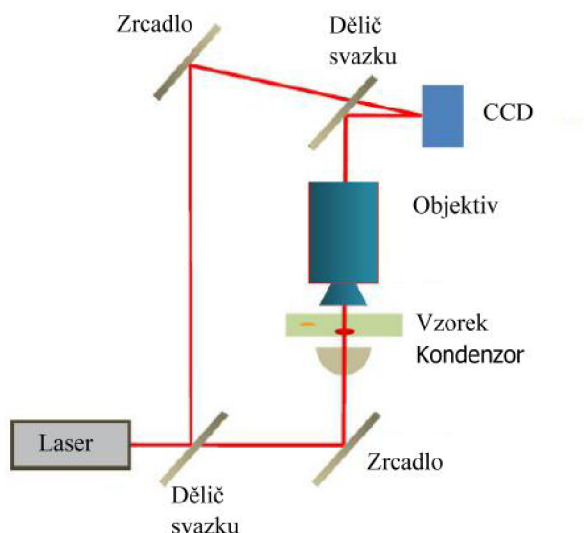
na záznamovou desku, zachytávají holografické interferogramy vzorku na CCD nebo CMOS čipy. Ty posílají informace do počítače k dalšímu zpracování. Obraz lze zrekonstruovat jako matici komplexní čísla reprezentující amplitudu a fázi pole na čipu.

Digitální holografie umožňuje úpravu získaných dat. Obraz lze přiblížit, zašifrovat, lze v něm rozlišovat vzory, používat asociativní paměť a neurální síť. Rychlost záznamu umožnila také pozorování a zpracování obrazu v reálném čase.

Digitální holografie je široká a neustále se rozvíjející se větev mikroskopie. V digitální holografické mikroskopii lze použít jeden hologram k numerickému zaostření obrazu v jakékoli vzdálenosti [14]. Přístup k informaci o fázi pole umožňuje numerické opravy aberací a kvantitativní fázovou mikroskopii s citlivostí v nanometrech při pozorování fázových objektů.

2.2 Digitální holografická mikroskopie

Na obrázku 6 je znázorněné zjednodušené schéma digitálního mikroskopu. Světlo z laserového zdroje je rozděleno na dělič svazku. Referenční paprsek prochází přes zrcadla na druhý dělič svazku a CCD čipu interferuje s předmětovým paprskem. V předmětové větvi dochází k nasvícení vzorku pomocí kondenzoru, po průsvitu vzorku objektiv promítá obraz vzorku přes druhý dělič svazku na CCD čip.



Obrázek 6: Schéma holografického mikroskopu (DHM). Obrázek je převzat a upraven z [17].

Na záznamu vzniká obrazec o intenzitě ve tvaru:

$$i = |o + r|^2 = |o|^2 + |r|^2 + or^* + o^*r, \quad (1)$$

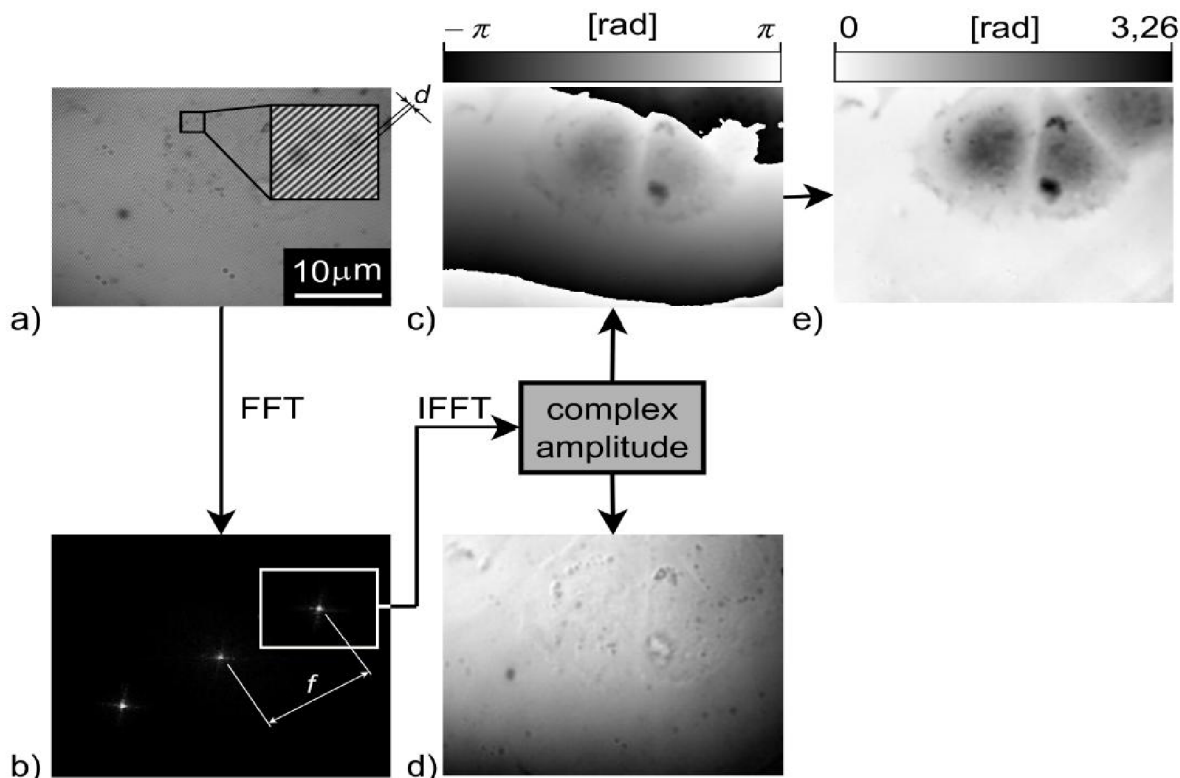
kde o je objektová vlna, r představuje referenční vlnu, o^* představuje komplexně sdruženou předmětovou vlnu a r^* komplexně sdruženou referenční vlnu. Členy $|o|^2$ a $|r|^2$ představují intezity obou vln. Členy or^* a o^*r reprezentují intenzitu interferenčních kroužků o nosné frekvenci f .

Z těchto členů lze pomocí digitální rekonstrukci získat fázi φ objektové vlny o těmito kroky, viz 7:

- pořízení hologramu s roztečí proužků d ,
- rychlá Fourierova transformace hologramu,
- výběr spektra proužků okolo nosné frekvence $f = \frac{1}{d}$,
- apodizace výřezu spektra,
- zpětná Fourierova transformace, pomocí níž získáme komplexní amplitudu ka objektové vlny o ,

intenzitní obraz objektové vlny o je dán kvadrátem komplexní amplitudy a hodnoty fáze jsou dány $\varphi = \arctan \frac{Im(ka)}{Re(ka)}$. Následně je fáze vlny navázána a vyrovnána.

Mezi výhody digitální holografie patří záznam vlny na jeden snímek s možností numerického přeastření. Další výhodou je získání kvantové fázové zobrazování neboli QPI. Nevýhody vznikají použitím laseru. Dochází ke snížení rozlišení, ke vzniku koherenčního šumu a nechtěné interferenci.



Obrázek 7: Podrobné schéma zpracování obrazu holografickým mikroskopem (DHM): a) hologram, b) frekvenční spektrum hologramu, c) rekonstruovaná fáze, d) intenzitní obraz objektové vlny, e) QPI - navázaná a vyrovnaná fáze [27].

2.3 Koherencí řízený holografický mikroskop - CCHM

2.3.1 CCHM I. generace

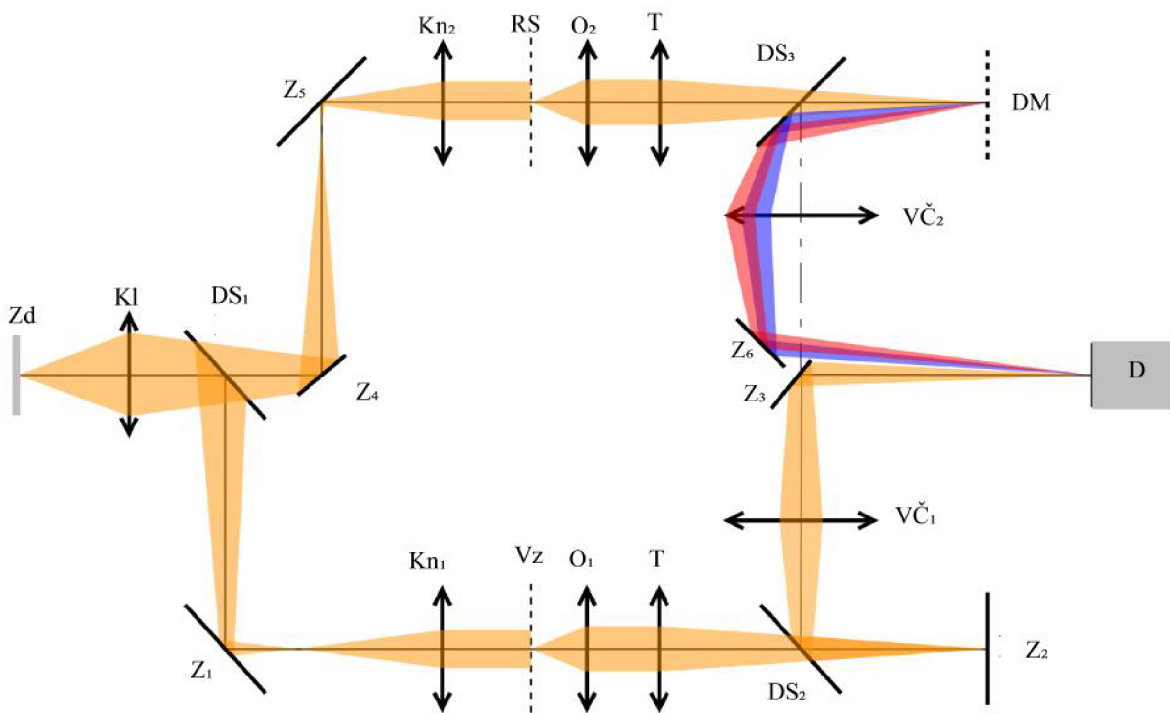
Na VUT v roce 1999 byl zkonstruován v rámci diplomových prací [20, 21] první laboratorní model holografického zobrazení později v rámci doktorského [22] studia byl postaven prototyp. Byl navržen jako mřížkový, tzv. achromatický interferometr pro získání vlastnosti prostorové invariance. Tento mikroskop dostal označení CCHM první generace.

Optický systém se skládá z osvětlovací a zobrazovací soustavy, na výstupu je opatřen digitálním detektorem. Je složený ze dvou totožných mikroskopů, každý z nich je uložen do vzájemně oddělených větví interferometru Machova-Zehnerova typu. Achromatickosti bylo dosaženo jejich úpravou tak, že na výstupní rovině vzniká interferenční struktura.

Prostorová frekvence struktury nezávisí na vlnové délce použitého osvětlení, závisí pouze na difrakční mřížce, kterou používá jako dělič svazků [19].

2.3.2 CCHM II. generace

Tento typ mikroskopu vychází z první generace. Obě větve interferometru se principiálně příliš neliší od klasického světelného mikroskopu korigovaného na nekonečno, viz obrázek 8. Zdroj světla Z_d je zobrazen kolektorem K_l přes dělič svazků DS_1 do dvou zadních ohniskových rovin kondenzorů K_{n_1} , které osvětlí vzorek V_z a referenční sklíčko RS svazky rovnoběžných paprsků. Tomuto principu se také říká tzv. Köhlerovo osvětlení. Vzorek V_z a referenční sklíčko RS jsou objektivy O_1 a tubusovými čočkami T zobrazeny do roviny difrakční mřížky DM a zrcadla Z_4 . V referenční větvi umístěná difrakční mřížka rozloží dopadající světlo na spektrum. Rovina mřížky DM je výstupní čočkou $VČ_1$ zobrazena do roviny, ve které se nachází čip detektoru D . Stejná výstupní čočka $VČ_2$ je i ve větvi předmětové. Jemným posuvem zrcátka Z_4 v předmětové větvi (při seřizování mikroskopu) je dosaženo zcela stejných optických vzdáleností v obou větvích. Do předmětové větve se umístí vzorek a do referenční větve pouze sklíčko o takové tloušťce, aby se přibližně vyrovnal fázový posuv způsobený indexem lomu vzorku.



Obrázek 8: Schéma CCHM druhé generace. Z_d - zdroj záření, K_l - kolektor, DS - dělič svazků, RS - referenční sklíčko, Z - zrcadlo, K_n - kondenzor, O - objektiv, T -tubusová čočka, DM - difrakční mřížka, V_z -vzorek, $VČ$ - výstupní čočka a D - detektor. Obrázek je převzat a upraven [27].

Detektorem snímaný výsledný interferenční obrazec je následně analyzován softwarem. Analýza obrazce vypovídá o vlastnostech pozorovaného vzorku, přičemž je možné, že se v obrazci projeví i nedokonalosti optického zařízení. Referenční svazek se odráží před sloučením se svazkem předmětové větve od difrakční mřížky pod úhlem α , závislém na vlnové délce λ . Tato mřížka umožňuje vznik achromatické interferenční struktury. Jedná se v principu o interferenci 0. a 1. řádu, podle Leithovy teorie [27] zobrazení difrakční mřížky achromatickou čočkou.

Multimodální verze CCHM pro kvantitativní fázové zobrazování (QPI) se nazývá Q-phase mikroskop [23]. Jeho účel je pozorování živých buněk bez použití značení barvivy. Fáze $\varphi(x, y)$ objektové vlny o je přímo úměrná indexu lomu $n(x, y)$ a tloušťky buněk $t(x, y)$.

$$\varphi(x, y) \approx k [n(x, y) - n_0] t(x, y), \quad (2)$$

kde k představuje vlnové číslo, n_0 je index lomu média.

QPI koncept umožňuje přímou detekci buněčných membrán a změny uvnitř buňky. Další schopnost je pozorování vzorků v rozptylujících médiích. Plně vybavený mikroskop obsahuje integrovaný fluorescenční modul, simulované DIC, zobrazení světlym polem. Při pozorování lze také tyto metody kombinovat [23].

2.4 Suchá hmota

Výhodu QPI při biologické expozici je, že kvantitativní fázová data $\varphi(x, y)$ jsou přepočítávána na tzv. suchou hmotu. Při experimentu dochází k monitorování změn suché hmoty uvnitř buněk a to s vysokou citlivostí [23].

Je tedy zřejmé, že světelná vlna prochází vzorkem s proměnným indexem lomu, je její vlnoplocha pozměněna a s ní i fáze vlny [23]. Tyto informace vedou k určení hmotnosti buněk neboli tzv. suché hmoty. Přepočet lze provést podle více vztahů.

V roce 1952 H. G. Davies a M. H. F. Wilkins v rámci buněčné interferometrie určili celkovou suchou hmotu $m(\text{pg})$ jako přímou úměru rozdílu optických drah OPD a vyjádřili ji podle vztahu 3 [15]:

$$m = \frac{\langle OPD \rangle A}{\chi}, \quad (3)$$

kde $\langle OPD \rangle$ průměrný rozdíl optických drah v μm [18], A představuje buněčnou plochu v μm^2 a χ je specifický refrakční přírůstek v $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$. Konstanta χ je rovno $100\alpha_1$ a hodnoty α_1 lze vyjádřit ze vztahu pro index lomu n [15]:

$$n(x, y) = n_0 + \alpha_1 C(x, y), \quad (4)$$

kde C je koncentrace suché hmoty v buňce v (g/ml) , α je specifický refrakční přírůstek v (ml/g) . V roce 2008 Gabriel Popescu určil pomocí zpoždění fáze světelného svazku plošnou hustotu suché hmoty v $(\text{pg}\mu\text{m}^{-2})$ [15] vztahem:

$$\sigma(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi\alpha_2} \varphi(x, y), \quad (5)$$

kde λ vlnovou délkou zdroje v μm , α_2 je specifický refrakční přírůstek v $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$ a φ zastupuje fázový rozdíl v radiánech [15]. Hodnotu suché hmoty m následně určíme z průměrné hodnoty plošné hustoty σ suché hmoty:

$$m = \langle \sigma \rangle A = \frac{\lambda}{2\pi\alpha_2} \langle \varphi \rangle A, \quad (6)$$

kde $\langle \sigma \rangle$ představuje průměrnou plošnou hustotu suché hmoty v $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, a $\langle \varphi \rangle$ průměrný fázový rozdíl v radiánech [15].

Třetí možností je přepočítání G. Dunna a D. Zichy. Ti vyjadřují celkovou suchou hmotu m pomocí průměrného fázového posunu [15]:

$$m = \langle \varphi \rangle A\beta, \quad (7)$$

$\langle \varphi \rangle$ představuje průměrný fázový posuv v radiánech, A buněčnou plochu v m^2 a m udává množství hustoty suché hmoty $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, které způsobí fázové zpoždění rovné jedné vlnové délce použitého světla. V článku [16] předpokládají přímou úměru mezi vlnovou délkou a plošnou hustotou. Pro vlnovou délku 546 nm uvádí hodnotu $\beta = 3 \text{ pg}\mu\text{m}^2$. Tato hodnota je závislá na vlnové délce, proto je nutné hodnotu hustoty přepočítávat pro používanou vlnovou délku [15].

Vlastnosti CCHM

Koherenci řízené holografické mikroskopy jsou významné v následujících vlastnostech. Rozlišovací schopnost mikroskopu ve fázi je cca 0,01 až 0,05 rad. Laterální rozlišení je jako u běžných mikroskopů dáno použitými objektivy, avšak umožňuje odstranění koherenčního šumu v obraze a různých interferencí světla po odrazu na optických členech za použití laserů. Omezené zpětné numerické přeostrůvání ze známé intenzity (amplitudy) a fáze obrazové vlny v některé rovině pozorování. Lze vypočítat tyto veličiny i v jiných rovinách v rámci koherence. Ex post numerická rekonstrukce v 3D oblasti zjednodušuje pozorování pohybujících se objektů. V důsledku nízké koherence osvětlení vzniká efekt optických řezů, který spočívá v potlačení vlivu světla rozptýleného v rozostřených oblastech pozorovaného vzorku. Tato vlastnost je příznačná pro konfokální mikroskopii, kde je jí dosaženo pomocí duálního rastrování vzorku bodovými aperturami. V biologii se tato vlastnost příliš nevyužívá, jelikož se jedna vrstva buněk zpravidla vejde do jediného řezu.

2.5 Flourescenční mikroskopie

V roce 1852 britský vědec George G. Stokes poprvé popsal fluorescenci po pozorování červeného světla vyzářeného fluoritem po osvětlení ultrafialovým zářením.

Fluorescence je luminescenční fyzikální jev, při kterém molekuly látek absorbují světelné záření určité vlnové délky. Při absorpci dochází přenesení části světelné energie na elektrony látky a dochází k jejich excitaci. Elektrony ve velmi krátké době (femtosekundy, 10^{-15} s) opět vyzáří, dochází k emisi světla o delší vlnové délce, neboli s nižší energií, a jinou barvou. Jedná se tak o červený posun a souvisí se ztrátami energie jinými dalšími procesy jako uvolnění tepla, rezonanční přenos na okolní molekuly [24, 25]. Tento posun

ve vlnové délce se nazývá Stokesův posun. Lze jej kvantifikovat přes změnu energie fotonu před absorpcí a po emisi elektronu s molekulou:

$$\begin{aligned}E_0 &= h\nu_0, \\E_1 &= h\nu_1, \\ \Delta E &= h(\nu_1 - \nu_0) = h\Delta\nu,\end{aligned}$$

kde E_0 je energie fotonu před srážkou, E_1 je energie fotonu po emisi, ν_0 je frekvence fotonu před absorpcí, ν_1 je frekvence fotonu po emisi; ΔE je úbytek energie způsobený červeným posunem.

Fluorescenci můžeme rozdělit na dva typy: primární (autofluorescenci) a sekundární (nepřímou) fluorescenci. Látky schopné primárního typu se nazývají fluorochromy a patří mezi ně například minerály, krystaly, pryskyřice, máslo, chlorofyl, vitamíny a anorganické látky. Od 30. let 19. století se začaly používat k sekundární fluorescenci, při ní dojde k chemickému navázání (barvení) nefluorescentních makromolekul bakterií, patogenů a biologických vzorků [24].

2.5.1 Typy fluorescenční mikroskopie

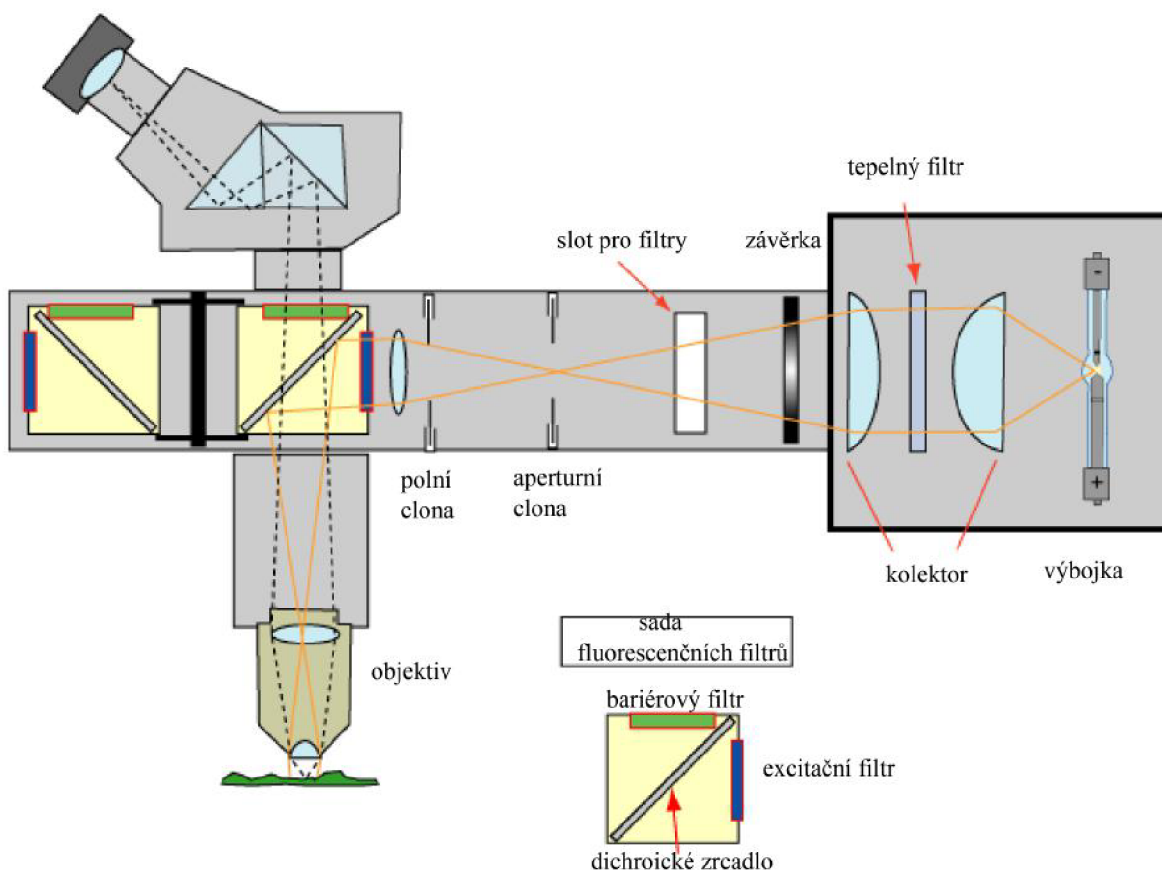
Fluorescenční mikroskopy jsou optické mikroskopy využívající fluorescenci k pozorování organických i anorganických vzorků. Dělí se na epifluorescenční mikroskopy (viz obrázek 9) a transmisní fluorescenční mikroskopy. V biologii se používají pouze epifluorescenční mikroskopy.

Zdroje Oba typy mikroskopů používají jako zdroj světla vysokotlakou rtuťovou výbojku nebo xenonovou výbojku. Rtuťová výbojka má výkon v rozsahu 5 – 200 W a vyzařuje největší množství energie o vlnových délkách v intervalu $\lambda = 356 - 546$ nm. Xenonová výbojka má oproti rtuťové užší rozsah výkonu (75 – 150) Wattů.

Excitační filtry Pro pozorování fluorescence je nutné definovat úzké spektrum excitačního světla. K tomu používáme excitační filtry. Mikroskopy mají za zdrojem zabudované držáky pro barevné filtry umožňující volbu vlnových délek podle použitého fluorochromu.

Dichroické zrcátko Excitační světlo dopadá poté na dichroické zrcátko pod úhlem 45° . Světlo je jím odkloněno do směru k objektivu a ke vzorku. Světlo emitované vzorkem a sebrané objektivem propouští bez odklonu do detektoru.

Objektiv Epifluorescenční mikroskop používá objektiv jako kondenzor směřující světlo na vzorek. Po dopadu na vzorek sbírá emitované světlo. Tento typ iluminace má výhodu spojení dobře korigovaného kondenzoru a objektivu vytvářejícího obraz. Není tak



Obrázek 9: Komplexní schéma epifluorescenčního mikroskopu [25]

nutné dodatečné doostřování. Pro osvit na hodnotě numerické apertury objektivu je nutné seřadit epi-osvětlení dle Köhlerova principu.

Emisní filtry Ze vzorku se neodráží pouze fluorescenční emisní záření. Zbytkové záření snižuje kontrast požadovaných vlnových délek. Pro separaci emisního záření pro zobrazení vzorku opět použijeme filtry s úzkým spektrem propustnosti.

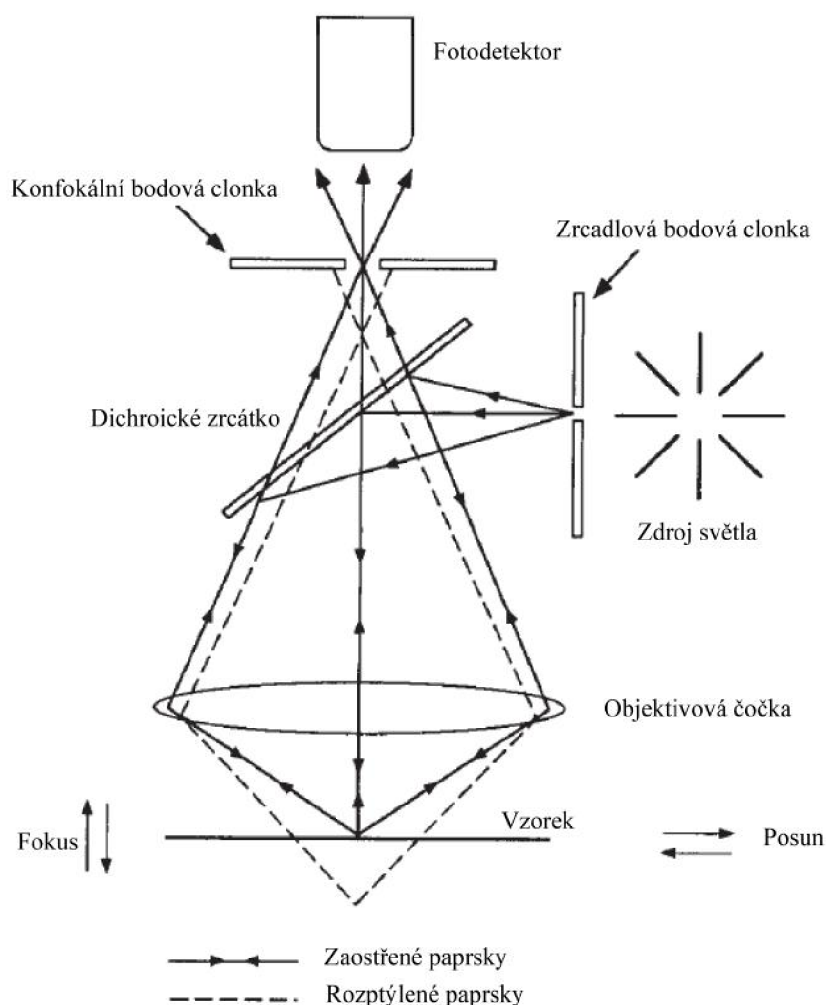
2.6 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Tato metoda se využívá v biologických aplikacích. Vzorky jsou obarveny fluorescenční značkou. Při použití konvenčního světelného mikroskopu by došlo k ovlivnění obrazu emisí z míst vzorku, jež nejsou v hloubce ostrosti. Toto se stává u vzorků s tloušťkou větší než $2\mu\text{m}$. Konfokální mikroskopie vytváří obraz postupně z více záznamů, tzv. optických řezů. Každý záznam souvisí s vlastní osovou pozicí vzorku. Excitační světlo ze zrcadlové bodové clony zdroje prochází přes optiku a je fokusováno na vzorek, kde vyvodí emisní záření.

Jak je ukázáno na obrázku 10, pouze paprsky z jedné osové vzdálenosti se prochází konfokální bodovou clonou na otvor a procházejí dále na fotodetektor. Rozptýlené světlo

konfokální bodová clona okolo otvoru eliminuje a nezaostřená část obrazu se tak nezaznamená.

Z nasbíraných dat lze vytvořit bod po bodu, rovinu po rovině 3D model. Vytvoření prvního konfokálního mikroskopu je přisuzováno Marvinu Minskému.

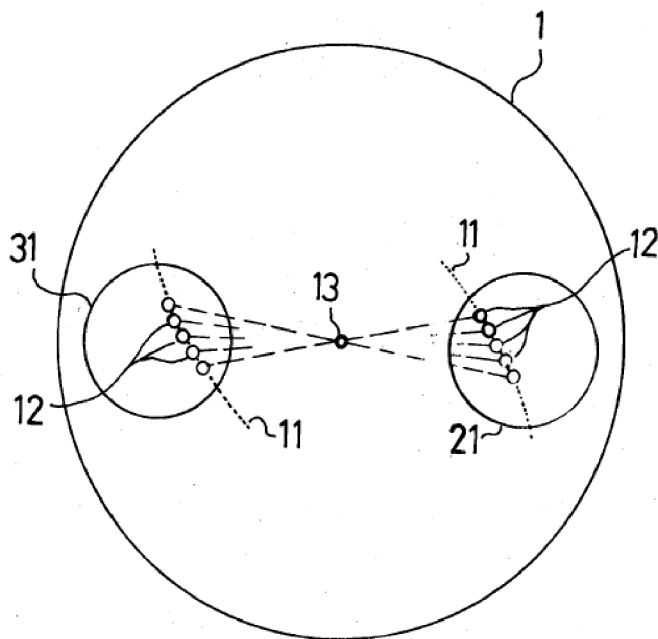


Obrázek 10: Schéma skenovacího konfokálního mikroskopu [28].

2.7 Více kanálová skenovací konfokální mikroskopie

Vícekanálový skenovací konfokální mikroskop rozšířil možnosti aplikací konfokálních mikroskopů. Optický systém, který vytváří obraz předmětu, obsahuje Nipkowův kotouč, vložený kolmo vůči optické ose. Disk je znázorněn na obrázku 11 [29, 30]. Nipkowův kotouč leží v polní rovině objektivu mikroskopu. clony 21 a 31 ohraničují velikost nasvětleného a zobrazeného pole. Okolo bodu 13 N. disk rotuje a s ním i sada dvojic dírkových clon 12, které jsou umístěny protilehle na Archimédových spirálách 11. Světlo vycházející z osvětlující dírkové clony je fokusováno na vzorek a dojde-li k jeho odrazu v předmětové

roviny objektivu, tak je následně fokusováno i do dírkové clony v zobrazovací části mikroskopu. Otáčením N. kotouč je postupně zobrazen každý bod vzorku. Dílčí informace se vlivem rotačního pohybu desky v obrazové rovině spojí a setrvačností oka vytvoří optický obraz [30]. Úkol disku je rozklad a rekonstrukce obrazu, potlačování šumu v obraze či vybírání jednoho z více obrazů [30].

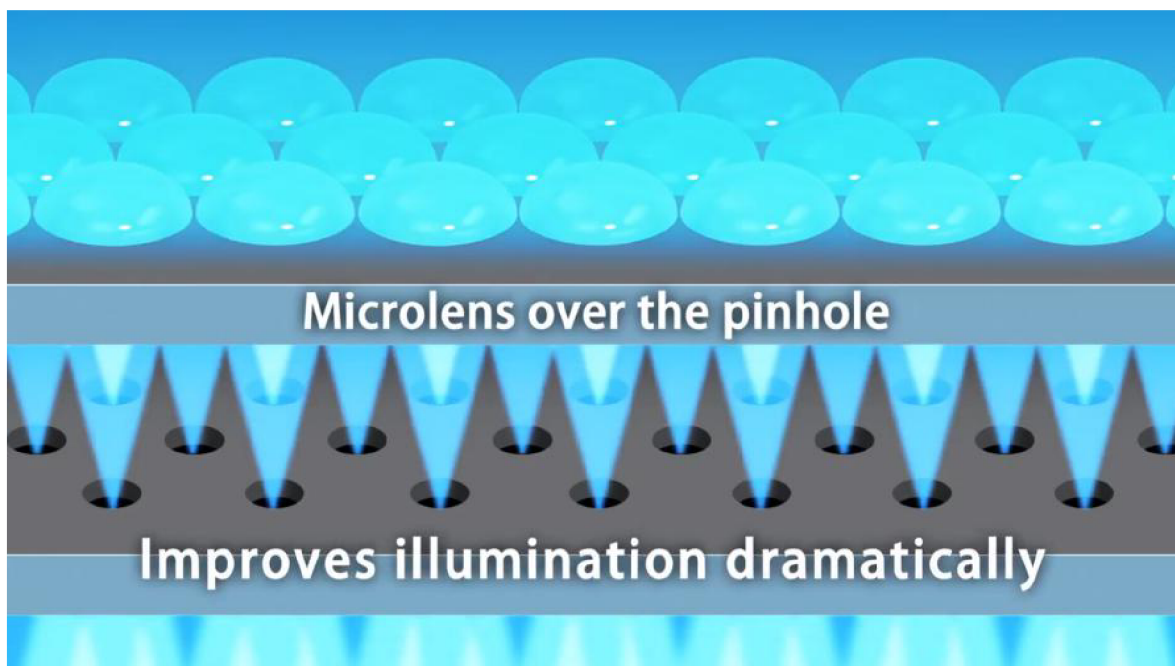


Obrázek 11: Nipkowův disk podle Mojžíra Petráně Mudr., CSc. a jeho týmu. 1- Nipkowův kotouč, 11- Archimédovy spirály, 12- dírkové clony, 13- bod otáčení, 21- clona nasvětleného pole, 31- clona zobrazeného pole [30].

Nevýhodou fluorescence je omezená životnost fluorescenčního barviva. Po určitém počtu excitací a emisí barvivo ztrácí účinnost, vyhasíná a vyběluje se. V konečném důsledku dochází ke štěpení kovalentních vazeb barviva a to nevratně mizí. Tento jev se nazývá photobleaching. Tomuto lze předcházet snížením intenzity excitačního světla, časově omezeným osvitom barviva, a zvýšením koncentrace barviva [27].

Další problém představuje rotace disku. Dochází při ní k částečné ztrátě konfokality. Řešení obou problémů představuje dvojitý rotující disk Yokogawa firmy Olympus. Přidáním mikročoček dochází k soustředění světla do osvětlovacích dírkových clon Nipkowova diskům viz obrázek 12 [31].

Výsledkem je obraz s výrazně menším šumem, rychlejším vznikem obrazu a tím i se snížením photobleachingu. Nipkowův a Yokogawa disky jsou rotující scannery. Obdobného principu lze dosáhnout i digitálně pomocí DMD čipu.

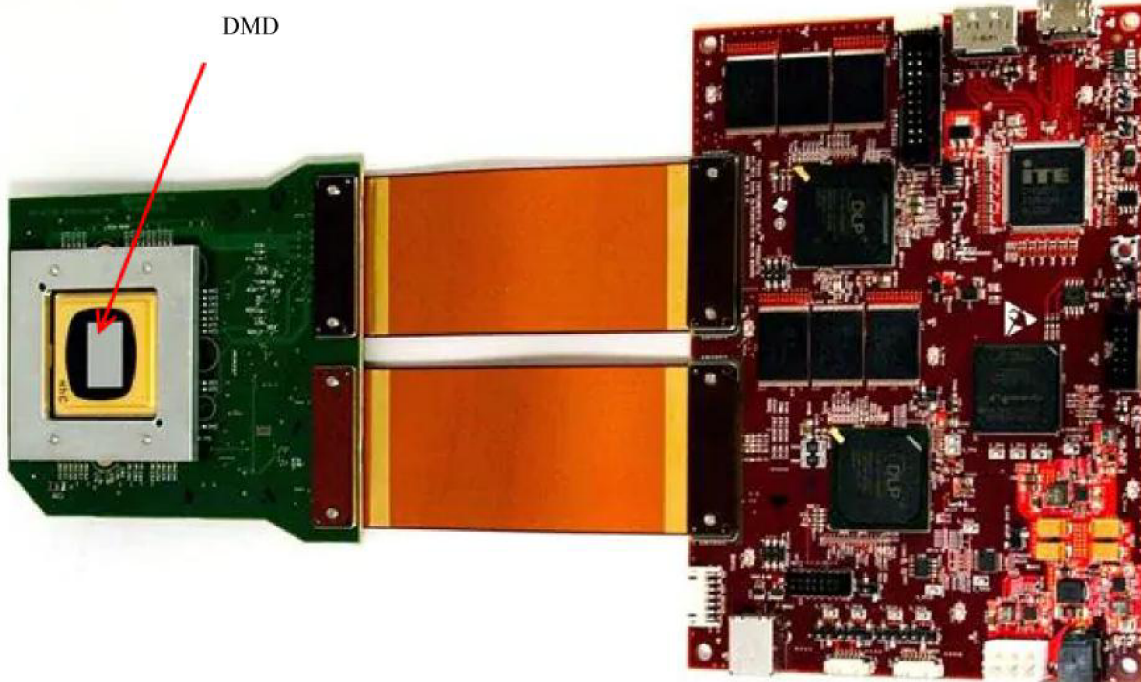


Obrázek 12: Přibližný pohled na duální rotující disk Yokogawa s mikročočkami [31].

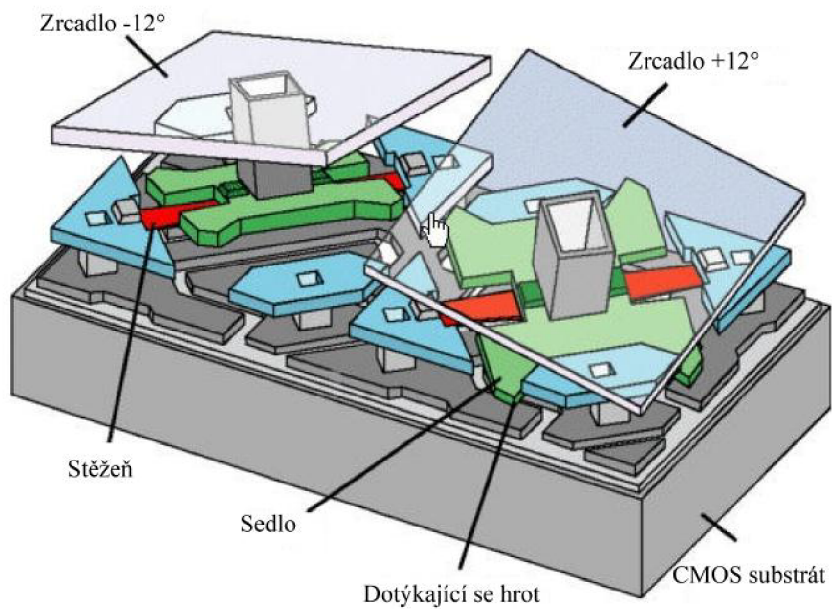
2.8 Digital Micromirror Device neboli DMD

DMD patří mezi mikro elektronicko-mechanické systémy (MEMS) nejčastěji využívané v DLP projektoru [33]. Na obrázku 13 je vyfocený čip DLP LightCrafter 9000 firmy TEXAS INSTRUMENTS. Je složen ze dvou elektronických řídicích desek. Na pravé desce jsou vyvedené vstupy a výstupy k připojení k počítači a na druhé je umístěn samotný čip s chladičskou deskou.

DMD je složeno z více než 4 milionů mikrozrcátek. Ta fungují jako modulátory světla. Modulují nejen amplitudu, ale i směr odraženého světla. Otáčejí se okolo diagonální osy o $\pm 12^\circ$ podle statické či proměnné obrazové předlohy. Polohy otočení se nazývají on-state, off-state a flat-state. On-state poloha směřuje dopadající světlo dále do optické soustavy. Flat-state je mezipoloha, při níž zrcadlo je rovnoběžné povrchem substrátu. Off-state odkloňuje nevyžadované světlo z optické soustavy. Mikrozrcátka digitálně určují obraz osvětlení vzorku. Pixel představuje jedno či více mikrozrcátek podle potřeby.



Obrázek 13: DLP LightCrafter 9000 firmy TEXAS INSTRUMENTS [35].



Obrázek 14: Schéma mikrozrcátek v off-state a on-state převzato a upraveno z [36].

3 Motivace a cíle práce

Nevýhodou rotujících disků obou typů jsou mechanické vibrace. Pokud by byl k CCHM připojen klasický rotující N. disk či Yokogawa, vnášely by do mikroskopu vibrace a kazily tak holografické pozorování. Tomuto se pokusíme zamezit využitím DMD čipu, který bude statickým prvkem. Pohybující se štěrbinu nahradí otáčející se mikrozcátka, které jsou schopny otáčet s frekvencí až 9523 Hz pro binární vzory.

Cílem práce je vytvořit konfokální modul pro koherenci řízený holografický mikroskop. Jelikož se jedná o prvotní návrh nelze předpokládat kompletní sestavení včetně softwarového vybavení. Proto tato práce bude složena z těchto kroků:

- návržení optického systému využívající DMD čip místo Nipkowova disku,
- vytvoření výkresové dokumentace k mechanickým částem potřebných pro sestavení experimentu,
- otestování rozlišení promítání DMD na detektor a vytvoření patternů pro promítání DMD čipem,
- otestování funkčnosti experimentu na profilovaném vzorku,
- návržení uložení do modulu k současnému CCHM mikroskopu.

4 Optický návrh

Cílem je vytvořit optickou soustavu, která je schopna osvětlovat vzorek v optických řezech. Ideou je promítání definovaných bodů a vzorů na vzorek pomocí DMD, ten je schopen vytvářet binární vzory s frekvencí až 9523 Hz. Tím lze simulovat funkci Nipkowova kotouče. Jednotlivá zrcátka DMD čipu odrazí světlo, které je následně fokusováno na vzorek. Dojde-li k jeho odrazu (v případě klasické konfokální techniky), či vybuzení fluoroforu (v případě fluorescenční konfokální techniky) v rovině ostrosti objektivu, je toto záření fokusováno na detektor, ze které budou vyčteny jen přesně dané pixely s polohou odpovídající polohám odražejících zrcátek. Jak je patrné, lze sestavu využít ve dvou modech. Jak pro klasickou tak i fluorescenční konfokální mikroskopii. To umožní i pozorování adheze buněčných membrán metodou RIC (Reflekční interferenční kontrast). RIC je technika využívající polarizované světlo k vytvoření obrazu předmětu na skleněném povrchu. Výhodou tohoto uspořádání může být i to, že bude možné zaznamenávat i celkovou rozptylovou funkci bodů, jednotlivých svítících fluoroforů, a její analýzo získat obdobu metody Airyscan [32].

Optický návrh na obrázku 15 je inspirován epifluorescenčním mikroskopem. Rozdílným prvkem je DMD čip osvětlen pomocí osvětlovací soustavy. Dále kolektor K3 a objektiv O zobrazuje rovinu DMD na vzorek Vz. Fokusovaný obraz se odrazí nazpět a promítá se přes objektiv O a tubusovou čočku T na rovinu detektoru D. Tento svazek je odkloněn pomocí fluorescenční kostky FK.

4.1 Společný postup návrhů

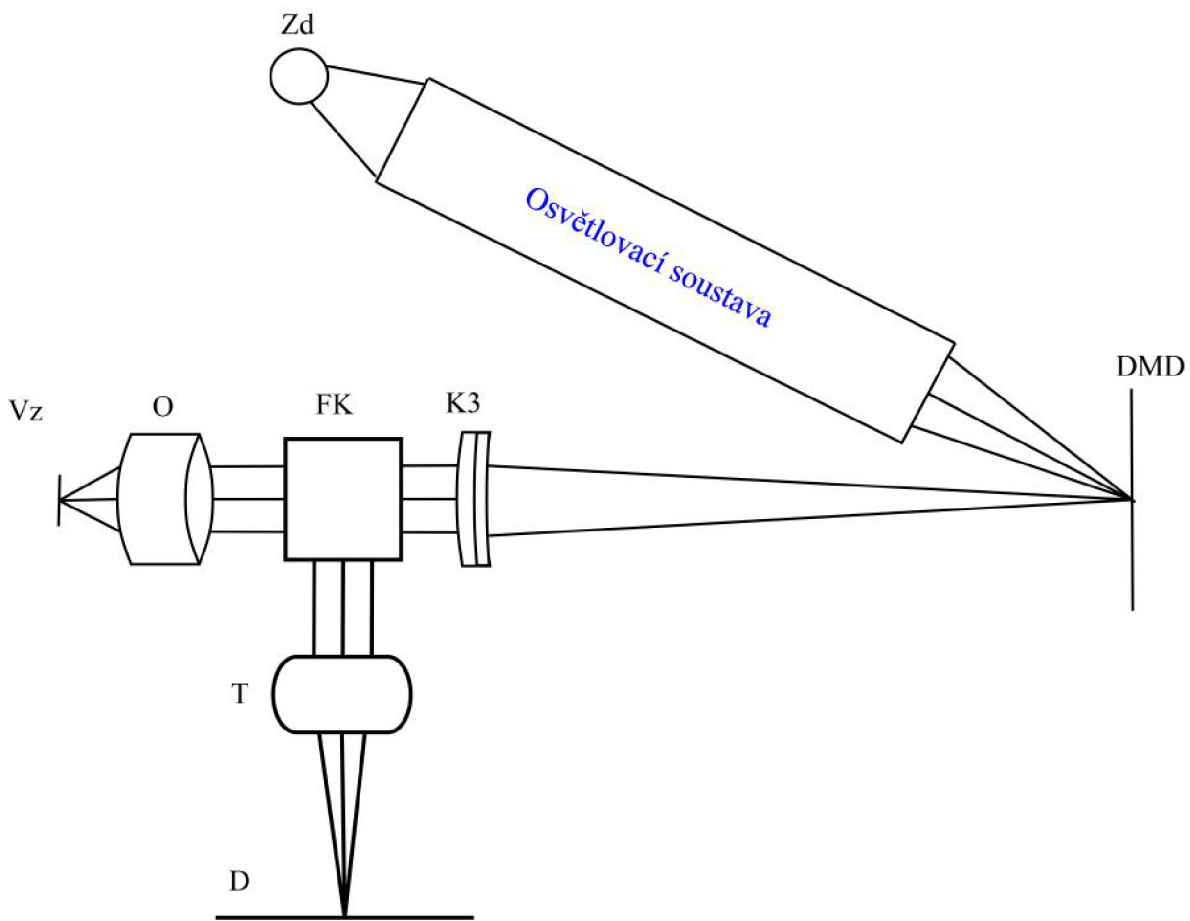
Optický návrh sestavy zahrnuje výpočty pro ustanovení poloh objektivu, kolektoru a dvě možnosti osvětlení DMD čipu (s a bez homogenizační tyče) upravující návrh z diplomové práce Ing. Jany Vavřínové [37]. Sestava pro výběr kolektoru K3 s obecnou osvětlovací soustavou je znázorněna na obrázku 16.

Pro vytvoření návrhů bylo potřeba dodržet následujících parametrů. Budou použity zdroje světla LAMBDA XL firmy SUTTER INSTRUMENT [43] (zdroj požadovaný v konečném modulu) a Fiber-Lite DC950 DC-regulated illuminator firmy Dolan-Jenner [44] (přístupný k experimentu) se světlovodem o průměru $d_z = 3$ mm. DMD má aktivní plochu o rozměrech 19,354 x 12,096 mm, tudíž jeho aperturu využijí o průměru $d_{DMD} = 9$ mm.

Pro biologické aplikace se v CCHM používají objektivy 10x-40x.

4.2 Osvětlení DMD

Návrh soustavy byl směřován od vzorku ke zdroji světla. Minimální zorné pole CCHM mikroskopu je 94 x 94 μm pro objektiv 40x (objektiv s maximálním zvětšením v CCHM). Ohnisko objektivu f_O bylo určeno objektiv se zvětšením $M_1 = 40$ a s ním výrobcem doporučenou tubusovou čočku s ohniskem $f_T = 200$ mm. Pro výpočet ohniska objektivu platí:



Obrázek 15: Celkový návrh optické sestavy: Zd- zdroj světla, K3- kolektor, FK- fluorescenční kostka, O- objektiv, Vz- vzorek, T- tubusová čočka, D- detektor, DMD.

$$f_O = \frac{f_T}{M_1} = \frac{200}{40} = 5 \text{ mm.} \quad (8)$$

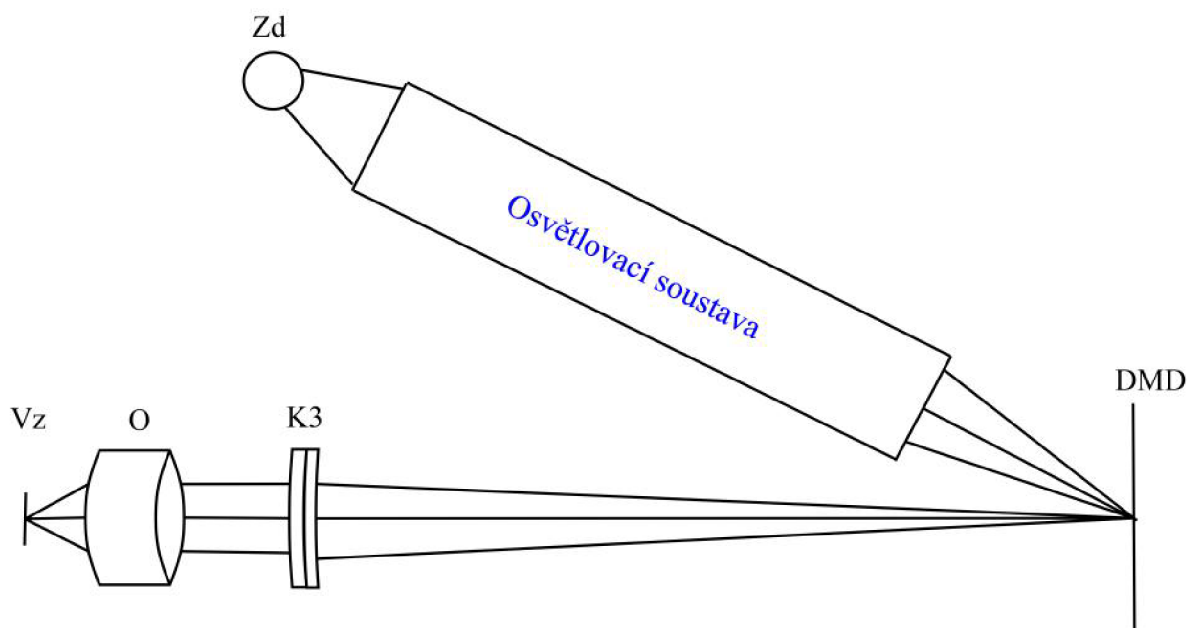
Pro optickou konjugaci rovin vzorku a DMD čipu je nutné mezi objektiv a DMD vložit kolektor K3. Přibližný průměr vzorku je $d_{VZ} = 0,1 \text{ mm}$. Ohnisko určíme pomocí vztahů pro zvětšení M_2 mezi zmíněnými rovinami.

$$M_2 = \frac{d_{VZ}}{d_{DMD}} = \frac{f_O}{f_{K3}}. \quad (9)$$

Z čehož lze odvodit vztah pro f_{K3} :

$$f_{K3} = \frac{f_O d_{DMD}}{d_{VZ}} = 450 \text{ mm.} \quad (10)$$

Následující podčásti se zabývají způsoby osvětlení DMD čipu zdrojem. První návrh využívá optické tyče a dvou kolektorových čoček. Druhý návrh nepředpokládá využití homogenizační tyče. Bc. Vavřínová pro osvětlení DMD čipu využila dvou kolektorových

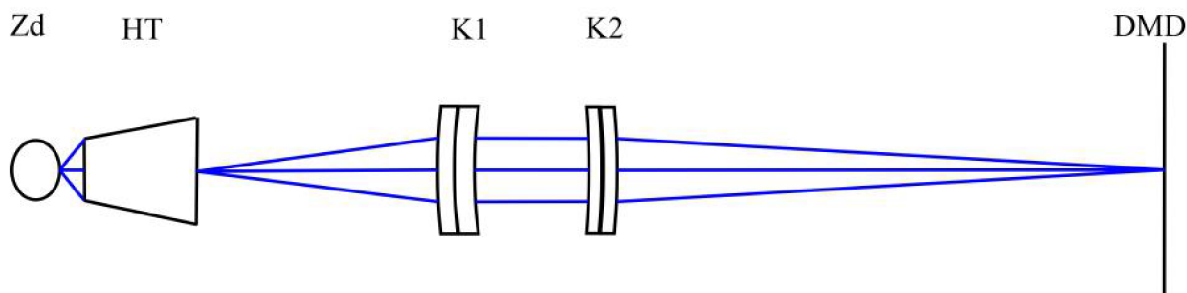


Obrázek 16: Sestava pro určení kolektoru s obecnou osvětlovací soustavou: Zd- zdroj světla, K3- kolektor, O- objektiv, Vz- vzorek, DMD.

achromatických dubletů. V mých návrzích jsem nahradila první kolektor s ohniskovou vzdáleností $f_1 = 85$ mm. Druhý kolektor s ohniskovou vzdáleností $f_{K2} = 400$ mm jsem ponechala [37].

4.2.1 Prvotní návrh osvětlení s použitím homogenizační tyče

Homogenizační tyč má za úkol sběr a homogenizaci světla zdroje. Jeho další výhodou je ve zvětšení plochy zdroje a divergence svazku. Návrh s homogenizační tyčí HT je znázorněn na obrázku 17.



Obrázek 17: Sestava s homogenizační tyčí HT.

Pro výpočty jsem použila technické parametry homogenizační tyče firmy Edmudoptics [38] o vstupní apertuře 2,5 mm a výstupní apertuře $d_{vs} = 5$ mm a délce 50 mm.

Tenčí část tyče doléhá na světlovod přibližně stejného optického průměru. Pro určení potřebné ohniskové vzdálenosti první kolektorové čočky K1 použijeme optické zvětšení

M_3 mezi výstupní aperturou tyče a rovinou DMD čipu. Zdroj světla LAMBDA XL firmy SUTTER INSTRUMENT má průměr $d_z = 3$ mm. Zvětšení tudíž určíme jako:

$$M_3 = \frac{d_{DMD}}{d_{vs}} = \frac{9}{5} = 1,8 \quad (11)$$

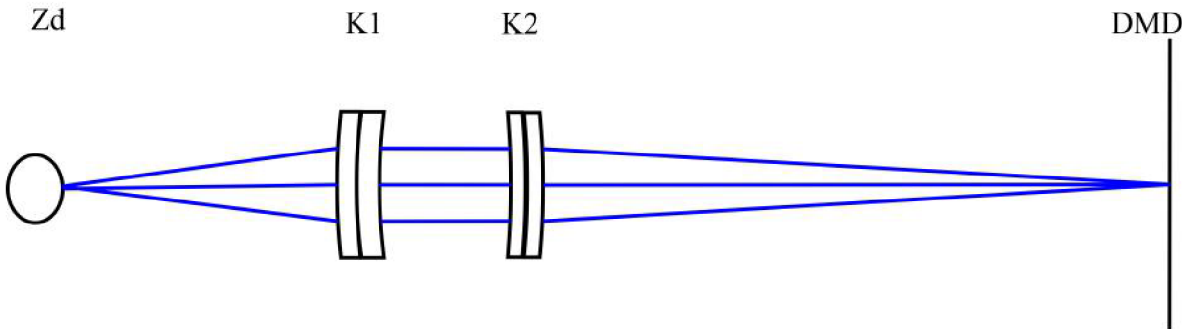
Ze vztahu pro zvětšení určeném ohnisky obou kolektorů lze vyjádřit vztah pro f_{K1} takto:

$$M_3 = \frac{f_{K2}}{f_{K1}} \rightarrow f_{K1} = \frac{f_{K2}}{M_3} = 222,22 \text{ mm} \quad (12)$$

Vzdálenost kolektoru K2 od DMD je pevně dána na hodnotu $f_{K2} = 400$ mm. Můžeme tak ovlivnit jen vzdálenost zdroje k prvnímu kolektoru K1. V tomto případě po přičtení délky tyče 50 mm k ohniskové vzdálenosti f_{K1} dosahuje vzdálenost zdroje k prvnímu kolektoru K1 přibližně 270 mm. Pro využití v již vytvořeném mikroskopu je třeba hledat variantu, která bude prostorově úspornější.

4.2.2 Druhý návrh osvětlení bez optické tyče

Druhá varianta je složena pouze ze dvou kolektorů K1 a K2. Sestava je zobrazena na obrázku 18.



Obrázek 18: Sestava druhého návrhu bez homogenizační tyče.

První kolektor sbírá světlo zdroje o průměru $d_{Zd} = 3$ mm. Pro zvětšení M_3 mezi rovinami zdroje a DMD platí:

$$M_3 = \frac{d_{DMD}}{d_{Zd}} = \frac{9}{3} = 3. \quad (13)$$

Velikost ohniska f_{K1} je dáno:

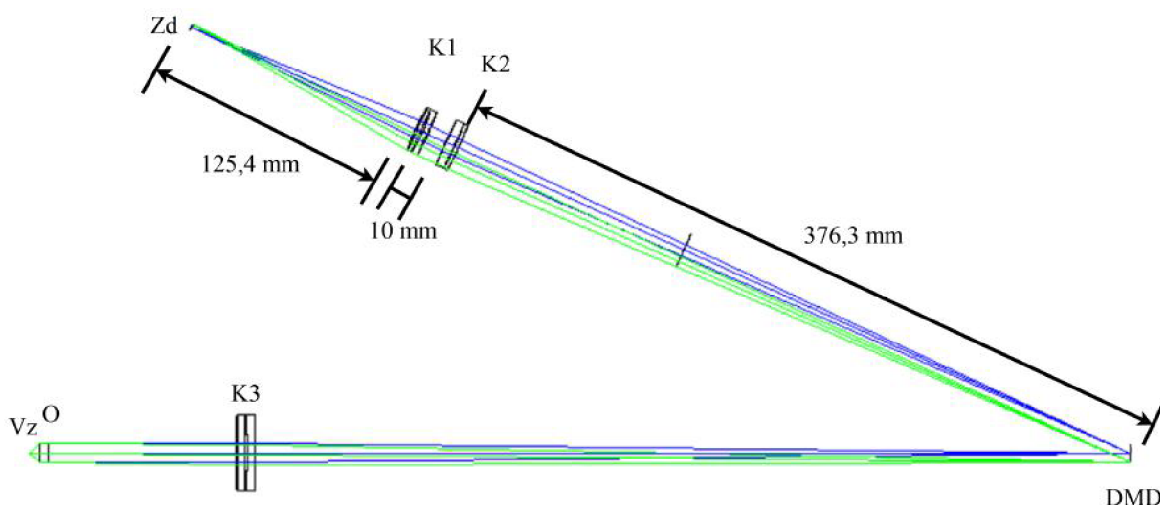
$$M_3 = \frac{f_{K2}}{f_{K1}} \rightarrow f_{K1} = \frac{f_{K2}}{M_3} = 133,3 \text{ mm}. \quad (14)$$

Ohnisková vzdálenost je přibližně 2-krát menší než ve verzi s tyčí. Tato varianta je tudíž prostorově úspornější. Za kolektor K1 jsem vybrala achromatický dublet AC254-125-A s ohniskovou vzdáleností $f_{KOL1} = 125$ mm [40]. Druhý kolektor jsem ponechala podle výběru Bc. Vavřínové a to achromatický dublet od firmy Thorlabs s označením AC254-400-A a ohniskovou vzdáleností $f_{K2} = 400$ mm [41].

4.3 Simulace v optickém CADu

4.3.1 Simulace od vzorku ke zdroji

V programu OpticsStudio by nasimulována větev od vzorku po osvětlení (obrázek 19). Zpětným trasováním od vzorku byl v optickém CADu kontrolován maximální průměr osvětlení na DMD čipu po průchodu kolektorem K3 a průměr na zdroji světla Zd. Po kontrole byl teoretický průměr svazku na DMD čipu 9 mm a na zdroji odpovídá 3,36 mm. Pro kolektor K3 jsem vybrala čočku ve firmě Edmundoptics s číslem #49282 [42]. Tato



Obrázek 19: Sestava od vzorku po zdroj světla: Zd- zdroj, K1- kolektor, DMD, O- objektiv, Vz- vzorek.

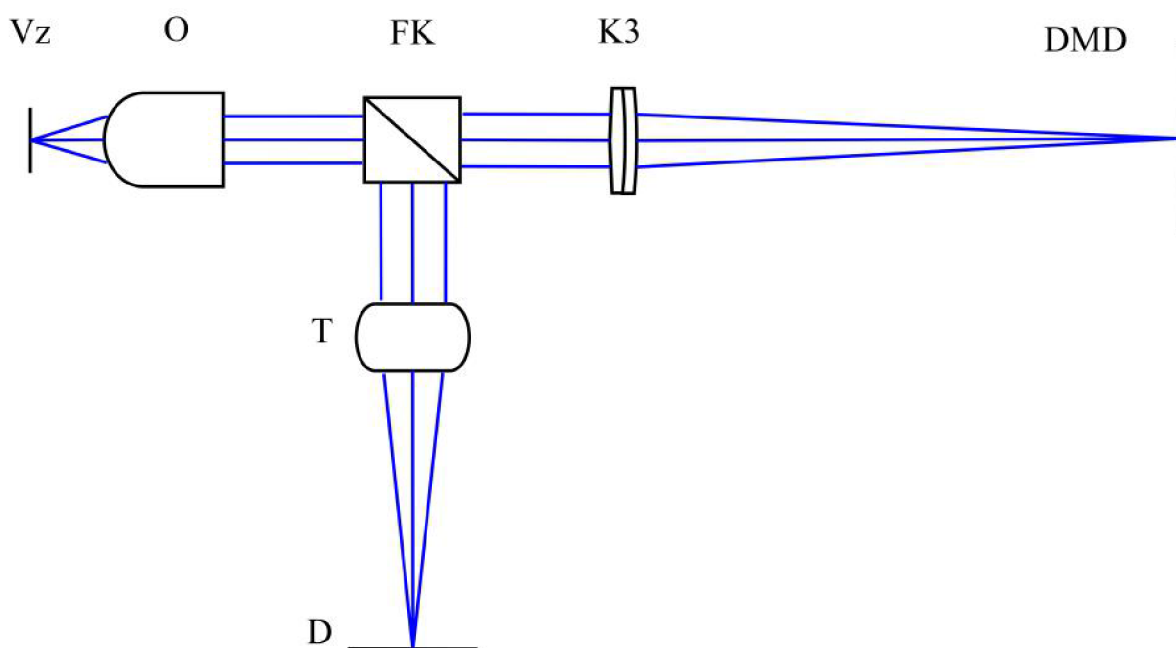
čočka má větší průměr, než byl původně plánovaný a to $d = 40$ mm.

Odraz od DMD čipu v programu Opticstudio DMD reprezentuje difrakční mřížka. Program vyžaduje určení poměru čar na μm neboli N . Pro výpočet použijeme tyto vlastnosti. Pozorujeme prvotní řád $m = 1$. Vlnová délka pro simulaci byla použita $\lambda = 0,587$ μm . Úhel dopadu a odrazu odpovídají hodnotě $\theta_i = 12^\circ$ a $\theta_r = -12^\circ$. Pro výpočet jsem použila vztah odvozený ze zprávy výrobce [39]:

$$\sin(\theta) = \sin(\theta_r) = m \frac{\lambda}{d} - \sin(\theta_i) d = \frac{m\lambda}{\sin(\theta_i) - \sin(\theta_r)} = 1,413 \mu\text{m}N = \frac{1}{d} = 0,707 \frac{\text{linen}}{\mu\text{m}} \quad (15)$$

4.3.2 Simulace od DMD po detektor

Většina návrhu částí soustavy na obrázku 20 je popsán ve společné části návrhu a to od DMD čipu po vzorek. Rozdíl činí vložení děliče svazků mezi kolektor a objektiv. Od vzorku se světlo odráží zpět přes objektiv na dělicí kostku. Ta odklání světlo na tubusovou čočku, za kterou dopadá světlo na detektor a vytváří obraz vzorku.



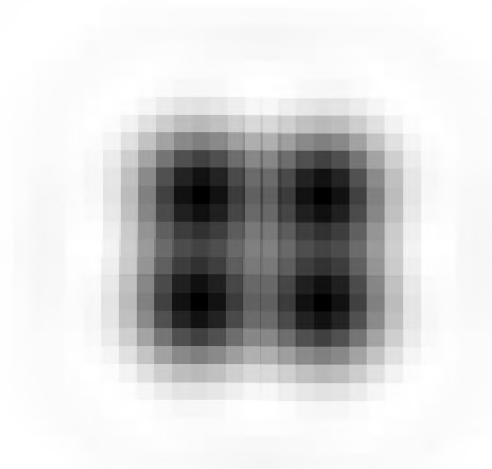
Obrázek 20: Sestava od DMD čipu po detektor.

4.3.3 Simulace konfokálního zobrazení

Aby se oskenoval vzorek a na detektoru se pozorované body neprolínaly, je nutné vybrat minimální rozteč použitých zrcátek na DMD čipu, které budou směřovat světlo na vzorek.

Rozměry DMD čipu Aktivní část DMD čipu má rozměry 19,354 x 12,096 mm (2560x1600 pixelů). Velikost jednoho zrcátka 7,56 μm .

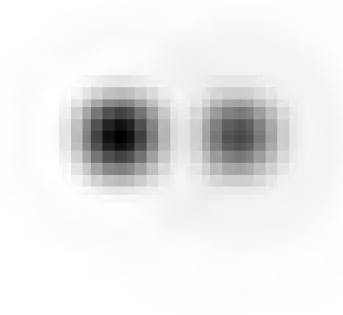
Promítnutí DMD čipu na detektor Simulace v programu Opticstudio (obrázek 24) byla použita pro určení nejmenší vzdálenosti pixelů na DMD. Tubusová čočka a objektiv byly z důvodu nedostatečných informací od výrobce nahrazeny paraxiálními čočkami. K ověření principu konfokálního zobrazení je třeba stanovit minimální rozteče aktivních zrcadel, které simulují dírky Nipkowova kotouče. Pro princip zobrazení, při kterém bude výběr vyčítaných pixelů CCD čipu simulovat filtraci záření z rovin mimo rovinu ostrosti, je nutné, aby se zaznamenané rozptylové funkce bodů (PSF - Point Spread Function) z různých rovin neovlivňovaly. Na obrázku 21 jsou znázorněny simulace 4 PSF pro objektiv 40x. Ty byly rozmístěny podle Rayleighho kritéria.



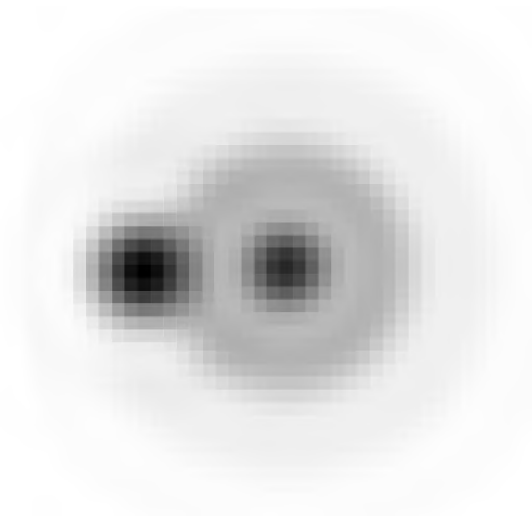
Obrázek 21: Minimální rozteč PSF pro objektiv se zvětšením 40x, rozteč bodů v obrazové rovině je $44 \mu\text{m}$.

Jejich rozteč je v obrazové rovině $44 \mu\text{m}$ a $19,5 \mu\text{m}$ v rovině DMD čipu (tj. rozteč zaokrouhleně odpovídá 3 zrcátkům). Tato rozteč je minimální možná pro toto zvětšení a ideálně vyrovnaný rovinný povrch vzorku. Reálný vzorek tomuto předpokladu neodpovídá. Je tedy nutné stanovit nejmenší rozteč aktivních zrcátek porovnáním ideální podoby PSF a její defokusované podoby, viz obrázky 22 a 23. Na těchto obrázcích je ideální PSF umístěna do druhého minima defokusované FSF. Na obrázku 22 je zobrazena situace pro objektiv 10x s defokusací $7,5 \mu\text{m}$. Tato defokusace byla simulována na základě zjištění pološířky osové intenzitní odezvy z části 6. Intenzita středu defokusované PSF byla snížena dle naměřených hodnot. Rozteč obou PSF je v obrazové rovině $39 \mu\text{m}$ a $17 \mu\text{m}$ v rovině DMD čipu (tj. rozteč zaokrouhleně odpovídá 2 zrcátkům). Na obrázku 23 je zobrazena situace pro objektiv 20x s defokusací $3,7 \mu\text{m}$. Tato defokusace byla opět simulována na základě zjištění pološířky osové intenzitní odezvy z části 6 a intenzita středu defokusované PSF byla snížena dle naměřených hodnot. Rozteč obou PSF je v obrazové rovině $38 \mu\text{m}$ a $16,8 \mu\text{m}$ v rovině DMD čipu (tj. rozteč zaokrouhleně odpovídá 2 zrcátkům). Z této simulace vyplývá, že jak pro ideální případ, tak i případy s defokusací by měla stačit rozteč 2 zrcátek. Navíc bylo prokázáno, že stanovená rozteč je nezávislá na použitém objektivu.

Tudíž vhodně navržená sada masek s vhodnou roztečí bude moci být využita při všech zobrazovacích experimentech.

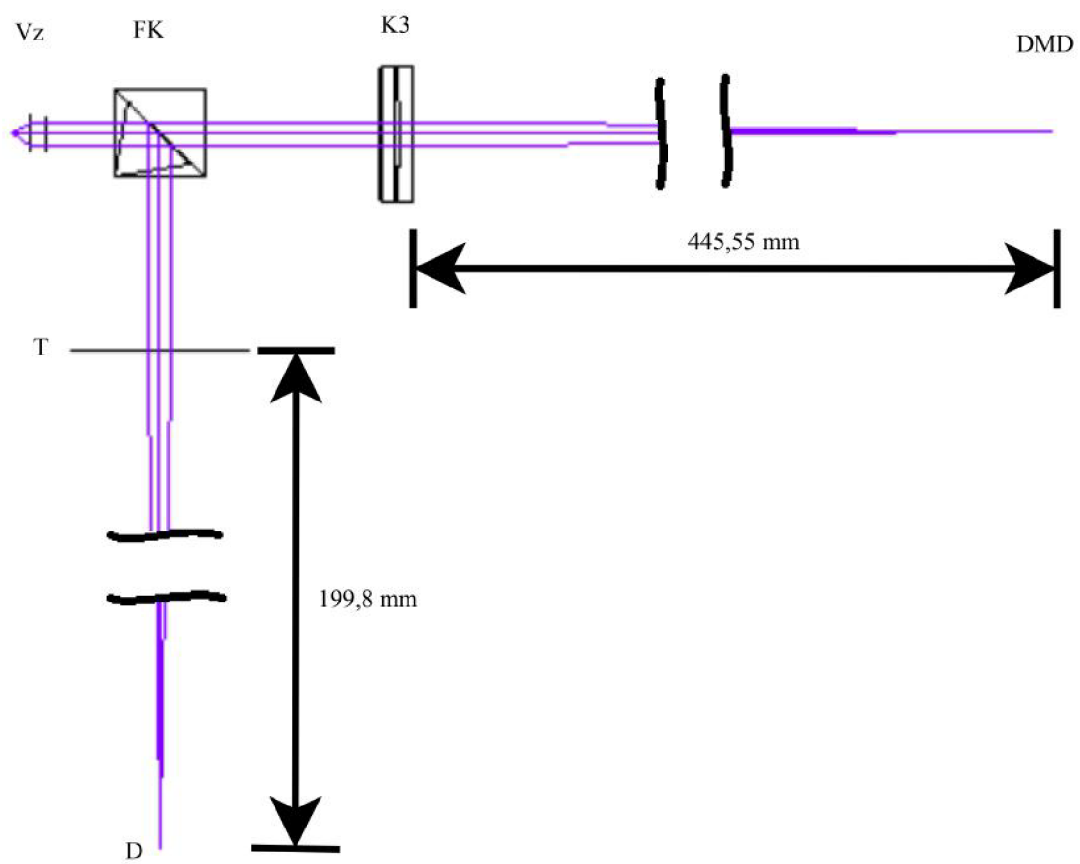


Obrázek 22: Minimální rozteč PSF pro objektiv se zvětšením 10x, rozteč bodů v obrazové rovině je 39 μm .



Obrázek 23: Minimální rozteč PSF pro objektiv se zvětšením 20x, rozteč bodů v obrazové rovině je 38 μm .

Rozvržení bylo použito jako inspirace vzorů k přepínání zrcátek na DMD čipu z off-state na on-state. V programu MatLab byly po testech rozlišení vytvořeny spotové šachovnicové vzory (viz obrázek 31) tak, aby vyplnily zobrazované pole. Aktivní plocha je černá (nese hodnotu 0), neaktivní pixely jsou bílé (s hodnotou 1). Reálná rozteč zrcadel bude stanovena při testování.



Obrázek 24: Layout pro teoretické určení rozlišení. Kondenzorovou čočku představuje reálný achromatický dublet, funkci objektivu a tubusové čočky plní paraxiální čočky. Vz- vzorek, T- tubusová čočka.

4.4 Výběr optiky

K již zmíněným optickým prvkům byly zvoleny následující prvky. Pro testování jsem zvolila dělicí kostku 70:30 BS022 firmy Thorlabs [46]. Za tubusovou čočku jsem zvolila TTL200-A s ohniskem $f_t = 200$ mm firmy Thorlabs [47]. Pro experiment byla použit detektor DFK 51AU02 [49]. Pro výsledný modul se předpokládá použití detektoru Zyla 4.2 sCMOS firmy ADOR [50].

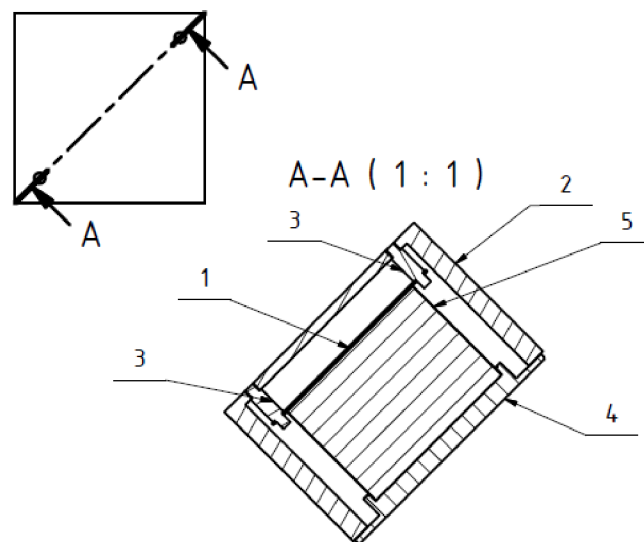
V rámci experimentálního pokusu byly použity objektivy Nikon Plan 10x/0,25 ∞ /–WD 10.5 (dále jako objektiv10) a Nikon Plan Fluor 20x/0,05 OFN25 DIC N2 (dále objektiv20).

5 Mechanický návrh

V rámci mechanického návrhu bylo pro experiment nutné uložit a upevnit optické části. K tomu byly využity součásti firmy Thorlabs. Některé součásti bylo nutné vyrobit či upravit. První součást je držák na zdroj světla vytvořen na 3D tiskárně.

5.1 Uložení fluoresceční kostky v experimentu

Pro uložení dělicí kostky velikosti 25,4 x 25,4 mm bylo nutné upravit součást firmy Thorlabs určenou původně pro uchycení děličů svazku. V příloze se nachází původní výkres sestavy firmy Thorlabs pro díl CM1-BP1. K úpravám patřilo vyfrézování prohlubně do spodního dílu pro uložení kostky. Úpravy spodního dílu jsou na výkresu A4-PMO-2/004. Dělicí kostku bylo třeba shora přitlačit ke spodnímu dílu, aby nedocházelo k posunu dělicí kostky při manipulaci sestavou. K tomu byl navržen vzpruhový plát na výkresu A4-PMO-2/001. Do vrchního dílu (A4-PMO-2/002) bylo třeba vytvořit díry pro vložení kolíků (A4-PMO-2/003). Celá sestava je zobrazena na výkresu A4-PMO-2/000 a na obrázku 25.

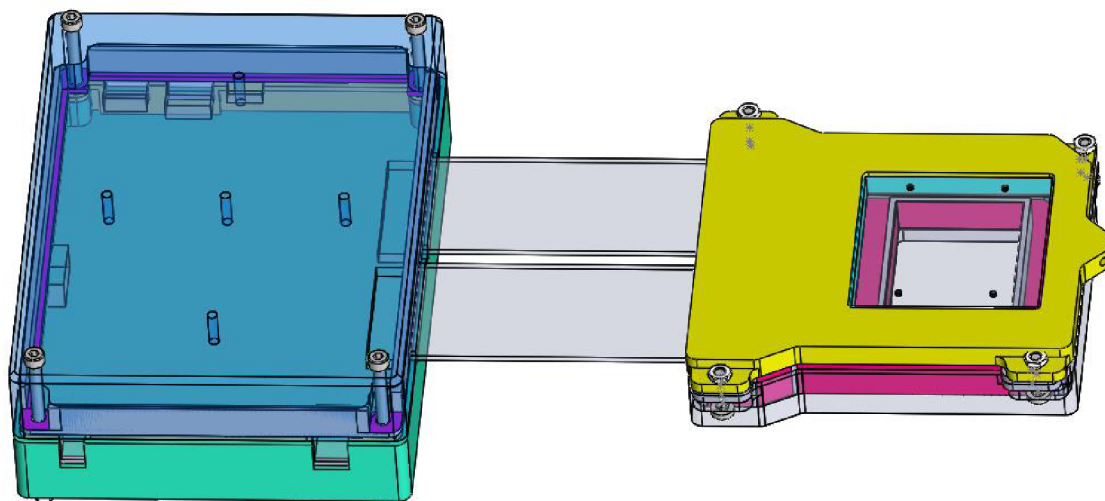


Obrázek 25: Řez uložení fluorescenční kostky: 1- vzpruhový plát, 2- vrchní díl, 3- kolík, 4- držák děliče, 5- fluorescenční kostka

5.2 Kryt DMD čipu

Pro uchycení DMD čipu bylo třeba navrhnout dvouvrstvý kryt. Vnitřní vrstva obalu je vytvořena pomocí 3D tiskárny. Plastový materiál byl zvolen pro elektrostatickou izolaci elektronických desek. Vnější vrstvy A4-PMO-1/001, A4-PMO-1/002, A4-PMO-1/005, A4-PMO-1/006 jsou tvořeny hliníkovou slitinou a jsou prošroubovány skrz vnitřní plastové

vrstvy STL-PMO-1/003, STL-PMO-1/004, STL-PMO-1/007, STL-PMO-1/008. Během návrhu bylo potřeba počítat s otvory pro vstupy zdroje energie a komunikací s PC, taktéž je potřeba počítat s případným přidáním aktivního chlazení za DMD čip. Při výrobě plastových částí mohou vznikat nepřesnosti při 3D tisku. U kovových částí je proto nutné zajistit nalícování dílů kompatibility a možnost uzavření krytu. Z časových důvodů nebyl vyroben kovový kryt DMD na obrázku 26. Tudíž bylo třeba si zapůjčit již zakrytované DMD.

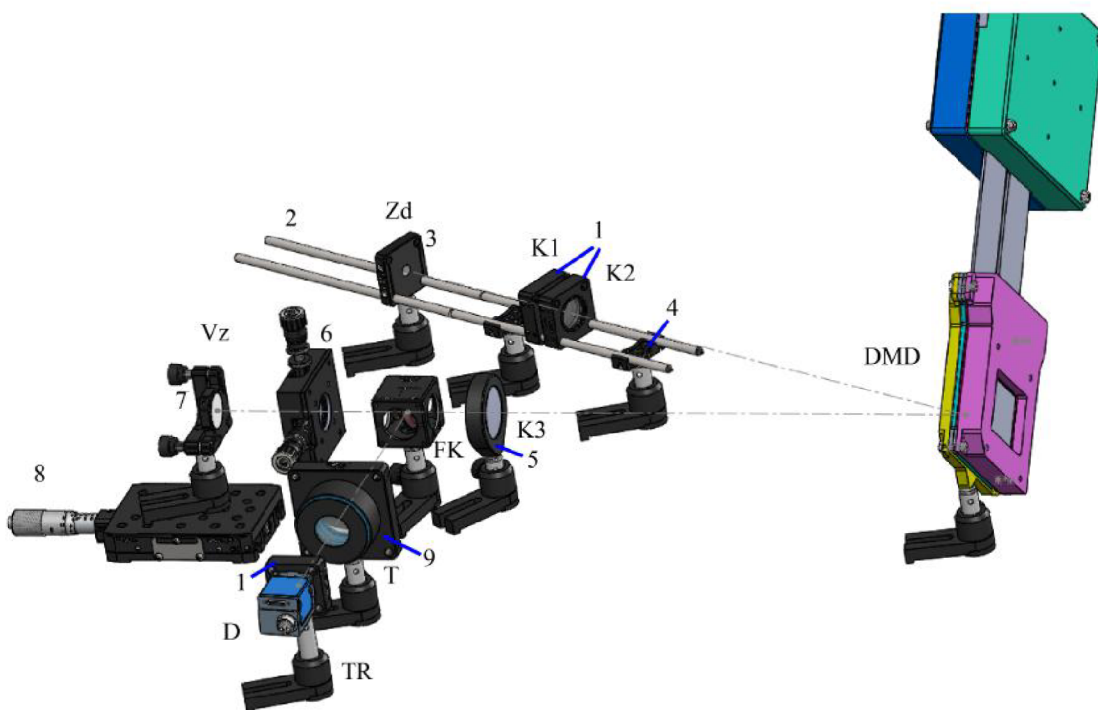


Obrázek 26: Model dvouvrstvého krytu DMD čipu.

5.3 Uložení součástí

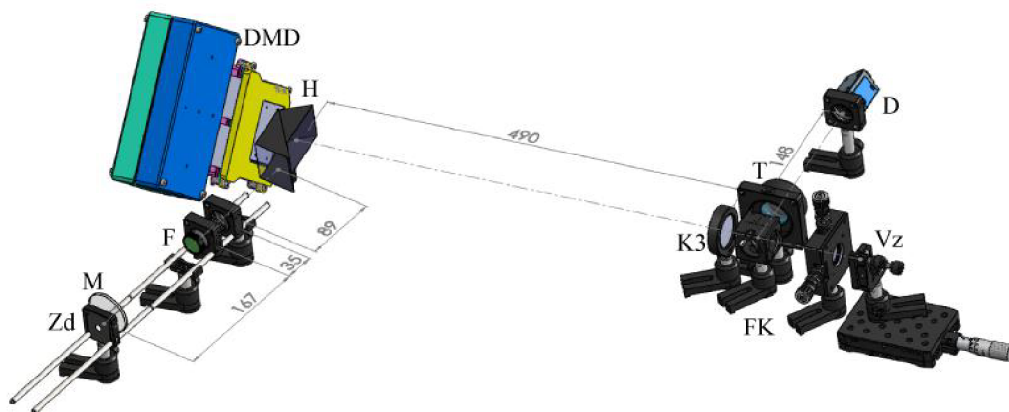
Veškeré kupované mechanické díly byly pořízeny ve firmě Thorlabs [45]. Prvotní návrh experimentu byl postaven podle modelu bez vloženého zdroje a detektoru na obrázku 27 Kolektory K1 a K2 osvětlovací soustavy byly uloženy do dílů CP02T/M (1). Ty byl nasunuty na tyče ER8 (2), také byly spojeny s dalšími tyčemi napojené na nosič CP08/M (3) zdroje Zd. Ty jsou podpírány dvěma držáky CPMA2/M (4). Kolektor K3 byl uložen do nosiče LMR40/M (5). Pro umožnění posunu objektivu v rovině kolmé na jeho optickou osu, byl uložen do posuvného stolku ST1XY-D/M (6). Zrcátko představující vzorek Vz bylo zakoupeno se stolkem KM100-E02 (7) umožňující jemné naklánění zrcátka ve dvou osách. Posun vzorku podél optické osy byl zajištěn stolkem s mikrometrickým posuvem XR25C/M (8). Fluoresceční kostka FK je uložena v upraveném dílu CM1-BP1 podle sestavy A4-PMO-2/000. Tubusová čočka T byla našroubována na nosič LCP01/M (9). Detektor D byl přes závitový kroužek (redukci) našroubován nosič CP02T/M (1).

Veškeré součásti včetně sestavy k DMD jsou uchyceny do podstavců UPH30/M s tyčemi TR vysokými podle potřeby od 30 mm po 50 mm.



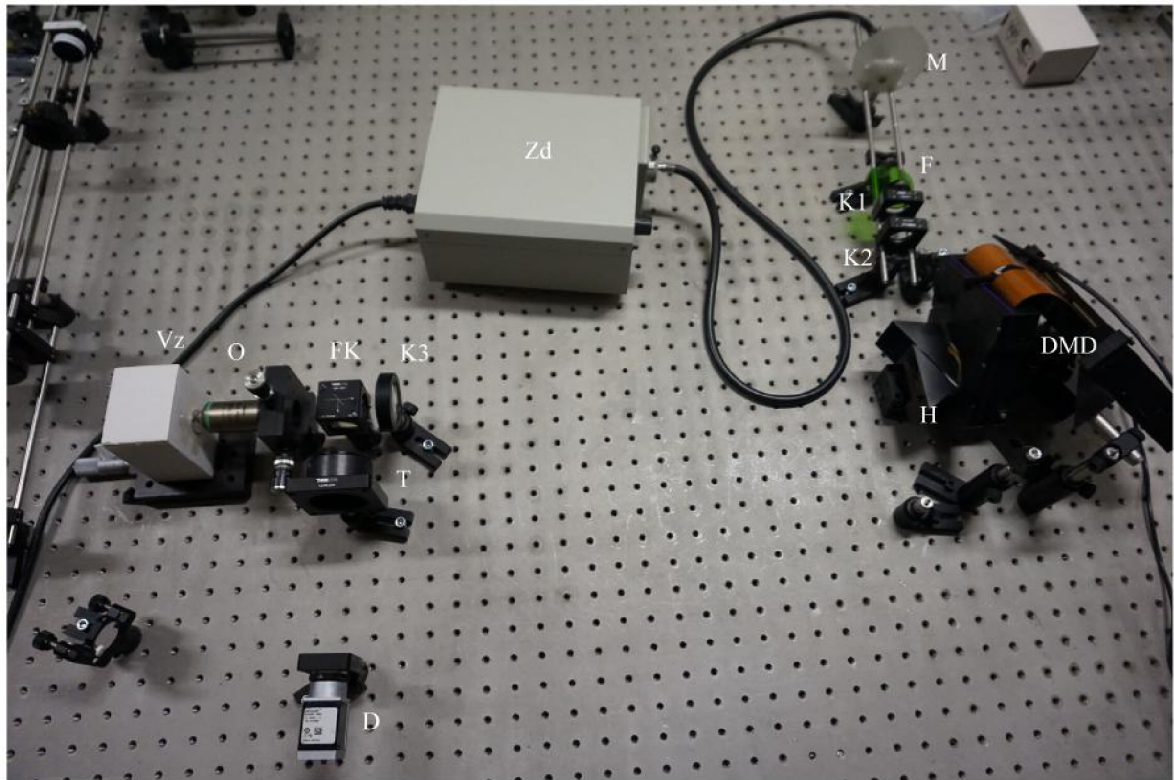
Obrázek 27: Prvotní experimentální sestava: K- kolektor, Zd- zdroj, Vz- vzorek, DMD, FK- fluorescenční kostka, T- tubusová čočka, D- detektor, TR- nosné tyče, 1- CP02T/M, 2- ER8, 3- CP08/M, 4- CPMA2/M, 5- LMR40/M, 6- ST1XY-D/M, 7- KM100-E02, 8- XR25C/M, 9- LCP01/M.

Po prvotním testování byla sestava upravena do následující podoby na obrázku 28 pozměněním vzdáleností optických prvků a přidáním optických prvků. Důvody byly jednodušší nalezení odrazu od DMD čipu a usazení optiky. K tomuto účelu byl před DMD čip umístěn hranol H zajišťující odraz kolmo vůči desce DMD čipu. K dalším úpravám patří přidání matnicové desky M těsně za zdroj světla a barevného filtru F firmy Thorlabs FB580-10 [48] o vlnové délce $\lambda = 580 \text{ nm}$ s pološířkou 10 nm. Hranol byl přidán z důvodu zlepšení možnosti osvitu DMD čipu. Nevýhodou je možné vnesení sférické vady do zobrazení roviny DMD čipu na rovinu vzorku. Tato vada vzhledem k velikosti ohniska kolektoru K3 není významná, proto nebylo třeba její vliv kontrolovat optickou simulací. Matnicová deska rozptyluje světlo zdroje. Její výhodou je lepší zaostření na vzorku. Barevný filtr definicí vlnové délky odstraňuje efekt spektrálního rozkladu bílého zdroje na DMD čipu.



Obrázek 28: Finální experimentální sestava: Zd- zdroj, M- matnice, F- barevný filtr, K- kolektor, H- hranol, FK- fluorescenční kostka, Vz- vzorek, DMD, T- tubusová čočka, D- detektor.

Reálná podoba celé sestavy se zapůjčeným DMD čipem a s použitím mince jakou vzorku je zachycena na obrázku 29.



Obrázek 29: Reálná experimentální sestava: Zd- zdroj, M- matnice, F- barevný filtr, K- kolektor, H- hranol, FK- fluorescenční kostka, Vz- vzorek, DMD, T- tubusová čočka, D- detektor.

6 Testování

DMD čip byl ovládán pomocí programu DLP LCR6500 & LCR9000 GUI4.0.1 ve video režimu, přičemž DMD byl připojený jako druhá obrazovka. Pomocí DMD čipu bylo promítáno celkem 6 vzorů (animací) s rozlišením 2650x1600 pix. Jsou tyto:

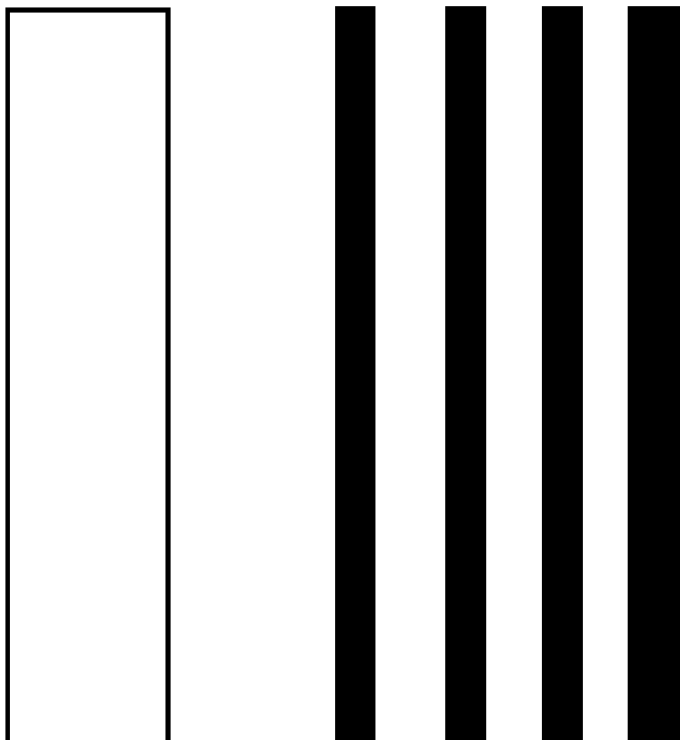
- Základní středový bod velikosti 3x3 zrcátek. Pomocí středového bodu byly vytvořeny křivky intenzitní odezvy na zrcadle.
- Náhodně vytvořené pruhy (viz obrázek 30) pro funkci přibližného nalezení ostrého obrazu.
- Šachovnice, již zmíněná výše na obrázku 31 ve čtyřech variantách, pro přehled jsou vytištěné pouze pro první variantu šachovnice.
- Horizontální pruh 3x3 zrcátek postupně se přesunující shora dolů. A ten samý motiv posunutý o tři pixely doprava, aby se zaplnila ve výsledném obraze celá plocha. Vytvořené video bylo použito k zachycení co nejvíce obrazů a vybrání nejvhodnější pro prezenci hloubky ostrosti.
- Archimédova spirála. Parametry Archimédovy spirály byly navoleny tak, aby vzniklo rameno nekřížících se bodů. Pro urychlení měření bylo rotováno okolo osy tak, aby vznikly čtyři kolmá ramena. Pro měření bylo použito video. Počáteční obraz videa je ukázán na obrázku 33.
- Další vytvořená animace je samostatný bod putující horizontálně přes celou měřenou plochu. Toto video pro daný detektor, představovalo dobu měření přibližně 8 hodin. A mohlo by být zrychleno lepším řízením DMD čipu z PC a zrychlením snímání detektoru. Jinak by nebylo možné rychle měřit biologické vzorky. Ve video modu je DMD schopno frekvence 60 Hz, ale je schopno dosáhnout frekvence až 9523 Hz pro binární vzory. Z důvodů obav přehřátí DMD čipu tato měření nebyla prováděna.

Výsledný obraz zachytával detektor DFK 51AU02 pomocí programu IC Capture 2.4. Vlastnost použité detektoru (12 fps) a PC znemožnily využití maximální rychlosti mikro-zrcátek DMD čipu. V rámci testování byly pro každý objektiv proměřeny dvě možnosti pro měření s použitím zrcadla a mince o hodnotě 2,- Kč.

6.1 Pozorování pomocí objektivu s 10-násobným zvětšením

Zrcátko bylo zaostřeno pomocí vzoru z obrázku 30. Rovina ostrosti objektivu se zvětšením 10x byla určena pomocí odrážejícího středového bodu velikosti 3x3 zrcátek DMD čipu. Tento bod byl na detektoru defokusován o různá Δz a pro jednotlivé PSF byly vykresleny intenzitní profily, viz obrázek 34. Z maxim těchto profilů byla stanovena osová intenzitní odezva, viz obrázek 35 s pološířkou 7,5 μm ze simulace v části 4.3.2. .

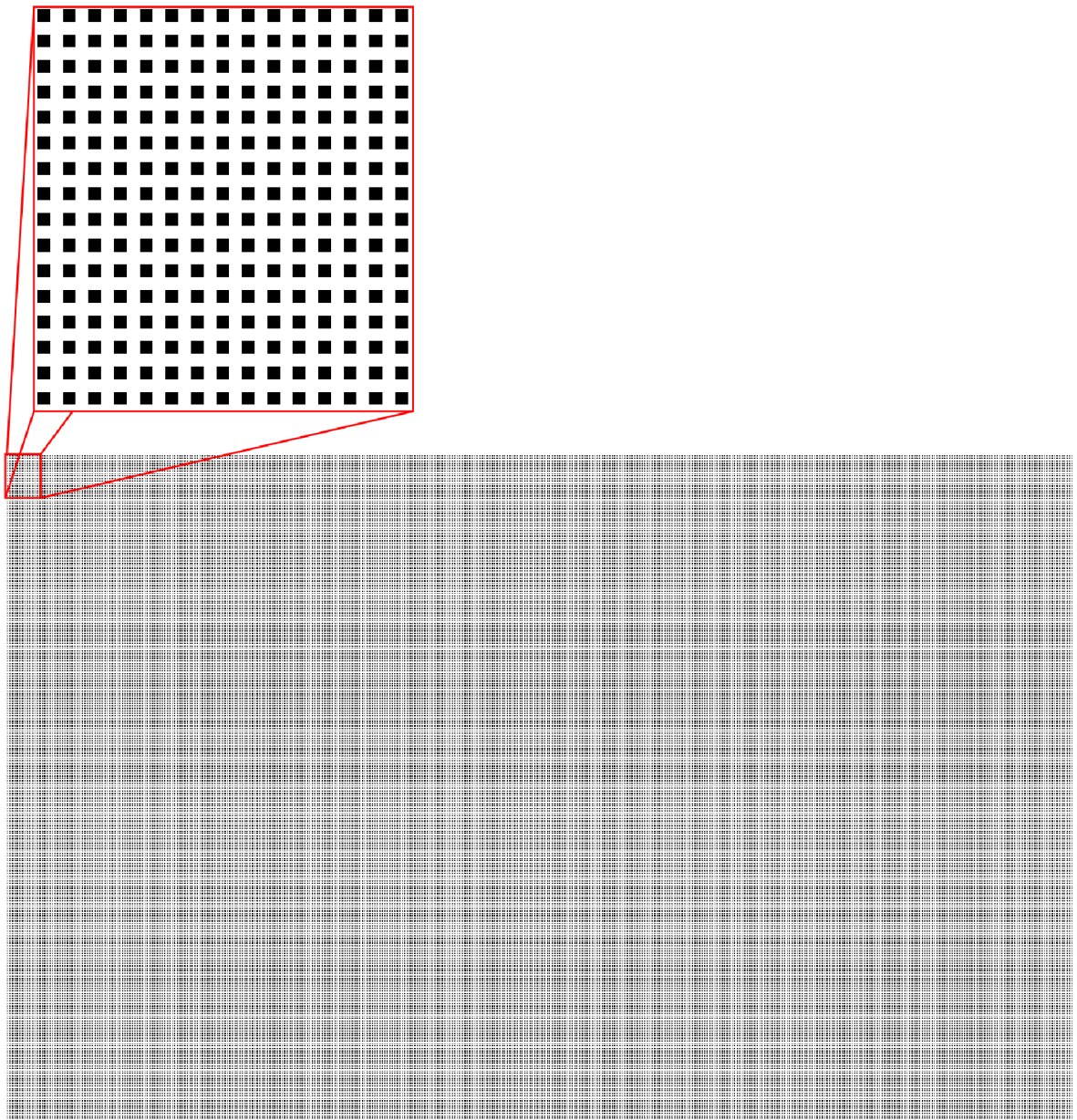
Z maxim v předchozím obrázku byl vytvořen graf defokusace. Krajní body byly určeny jako průměrná hodnota šumu v obrázku. Pološířka osové intenzitní odezvy odpovídá hodnotě 7,5 μm .



Obrázek 30: Nedefinované pruhy pro prvotní nalezení vzorku.

Na obrázku 36 je záznam Archimédovy spirály s detailem na část jednoho ramene. Na obrázku lze pozorovat separaci bodů. Na obrázku mince 37 lze pozorovat, že se zaznamenaly pouze body Archimédovy ve fokusu a a rozptýlené světlo není pozorovatelné. Na obrázku lze pozorovat separaci fokusovaných bodů.

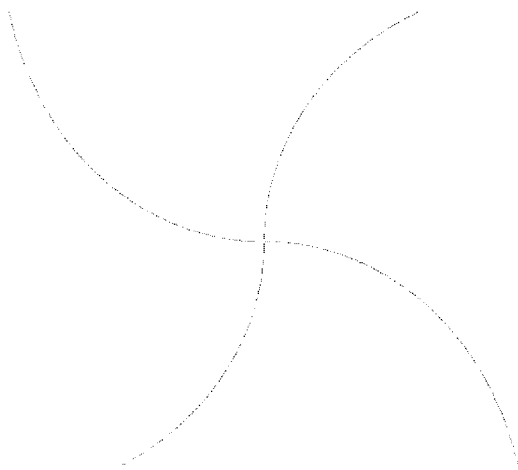
Záznamy s více vzorů a rovin mince naleznete v příloze A.



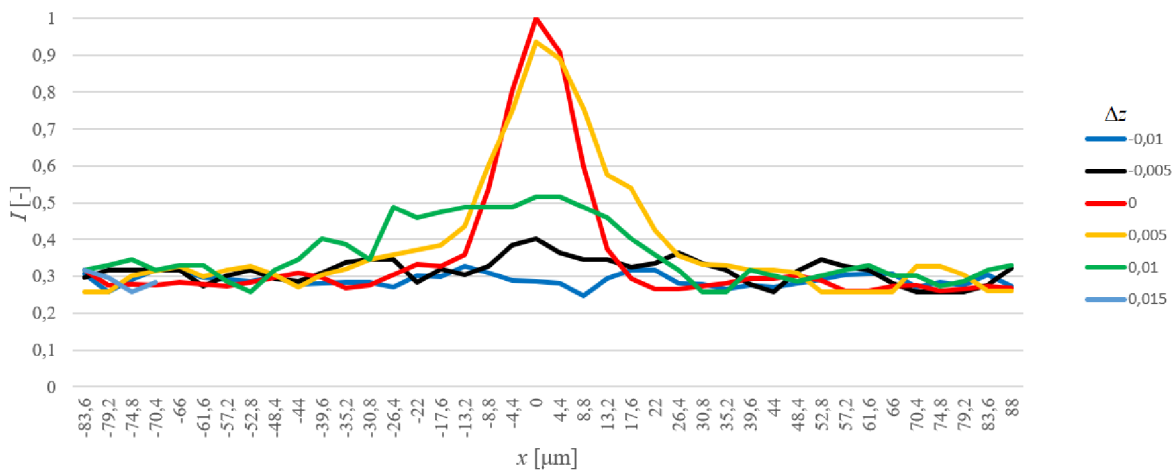
Obrázek 31: První vzor použitý jako maska se šachovnicovým vzorem s detailem na levý horní roh plochy s hodnotami 0 a 1.



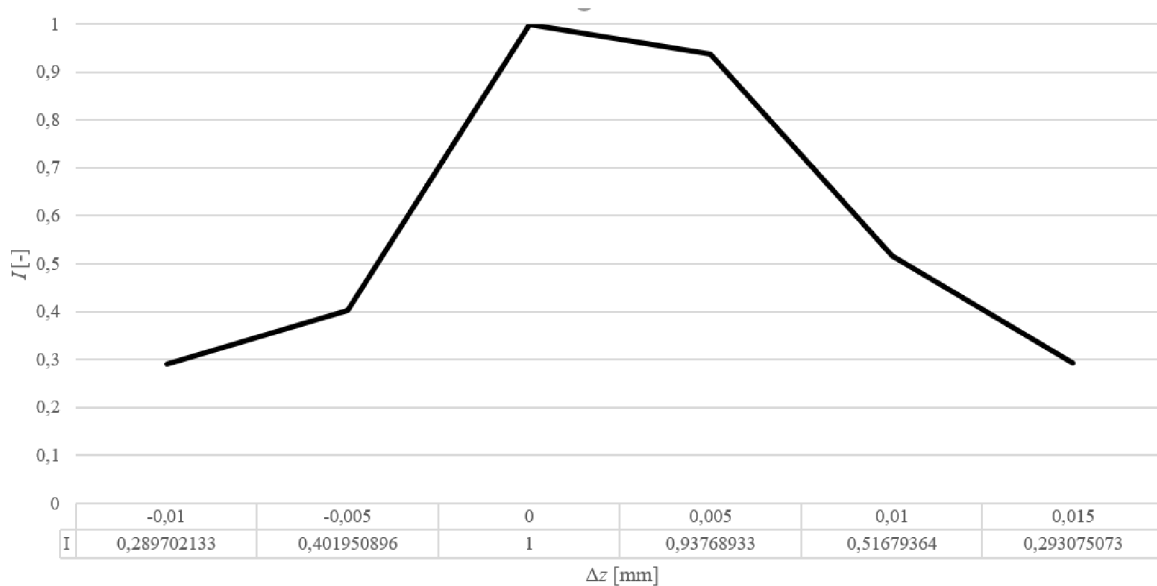
Obrázek 32: Přibližná řada horizontálních zrcátek 3x3 vzdálených o 3 zrcátka zachycené uprostřed obrazu promítaného DMD čipem



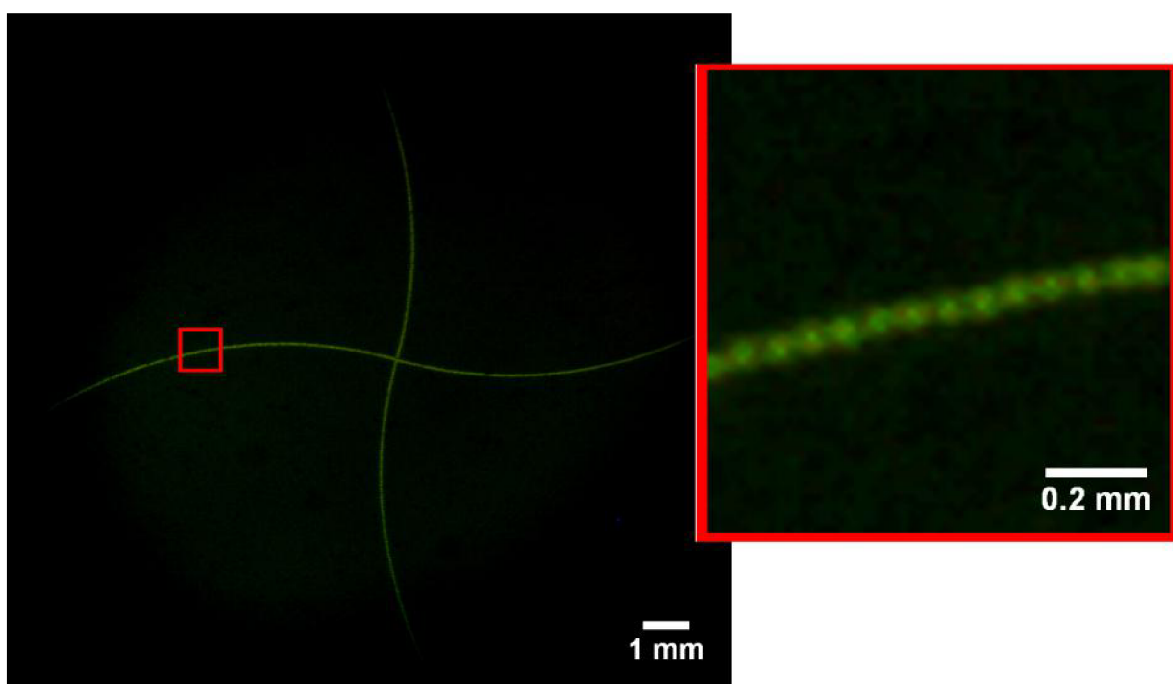
Obrázek 33: První obraz rotované Archimédovy spirály ze série vytvořené pro video, velikost bodů 3x3 zrcátek se vzdáleností 3 zrcátka.



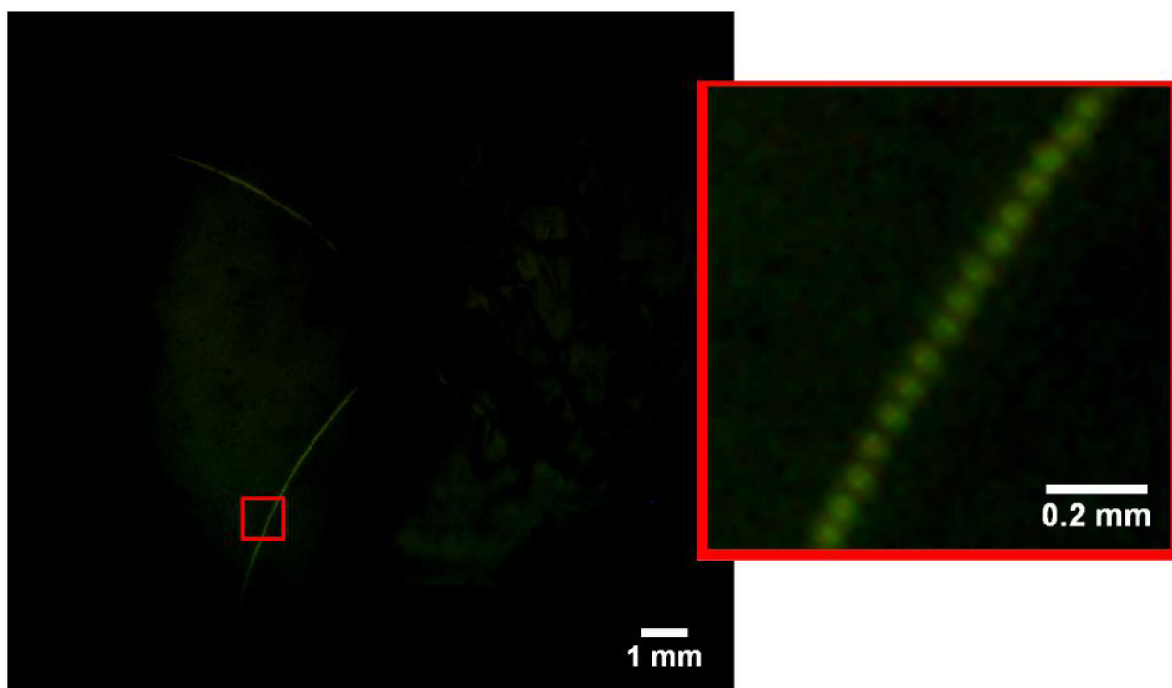
Obrázek 34: Intenzitní profily PSF pro různé defokusované Δz . Měřeno v ose x roviny vzorku, kde I je normovaná intenzita. Měřeno s objektivem 10x.



Obrázek 35: Osová intenzitní odezva pro objektiv 10x, kde I je normovaná intenzita a Δz je defokusace.



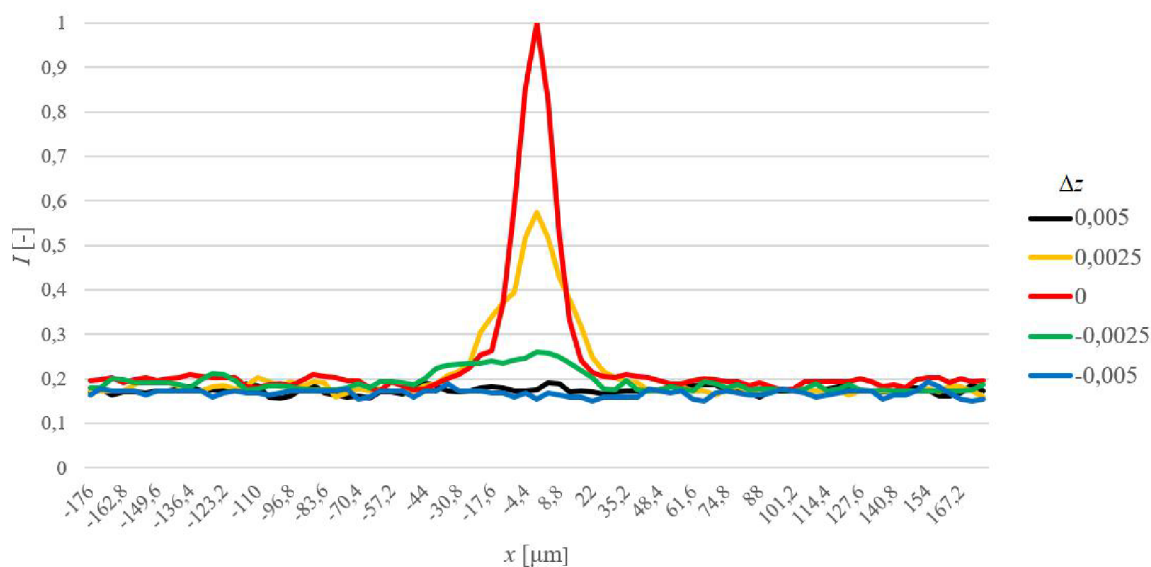
Obrázek 36: Zaznamenaná Archimédova spirála na zrcadle s přiblížením na detail, použitý objektiv byl se zvětšením 10x. Záznam byl normován pro lepší viditelnost.



Obrázek 37: Zaznamenaná Archimédova spirála na první rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost.

6.2 Pozorování pomocí objektivu s 20-násobným zvětšením

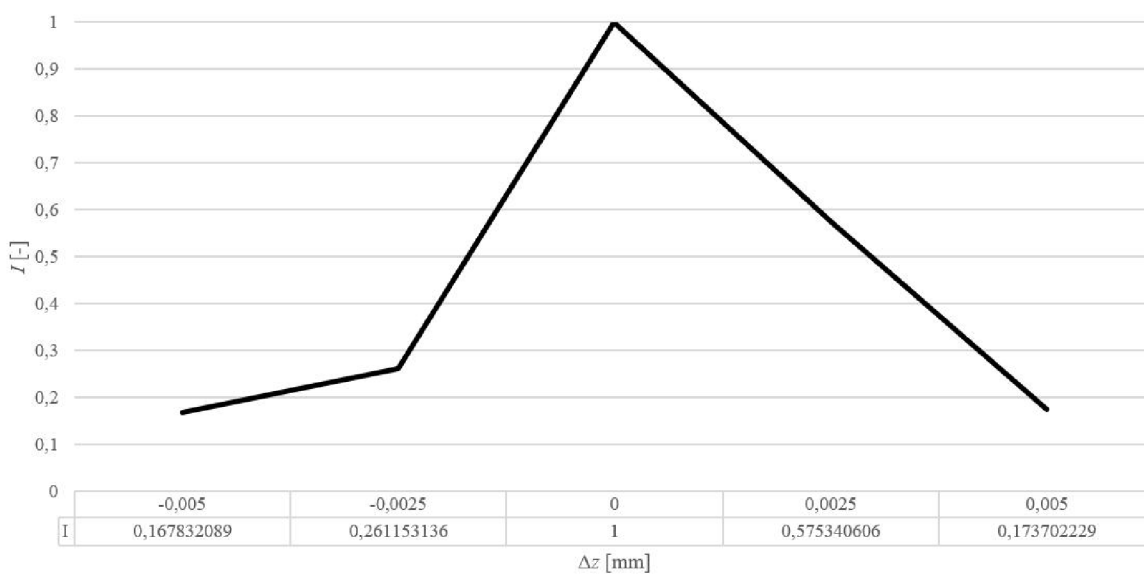
Zrcátko bylo zaostřeno pomocí vzoru z obrázku 30. Rovina ostrosti objektivu se zvětšením 10x byla určena pomocí odražejícího středového bodu velikosti 3x3 zrcátek DMD čipu. Tento bod byl na detektoru defokusován o různá Δz a pro jednotlivé PSF byly vykresleny intenzitní profily, viz obrázek 38. Z maxim těchto profilů byla stanovena osová intenzitní odezva, viz obrázek 39 s pološířkou 3,7 μm ze simulace v části 4.3.2. .



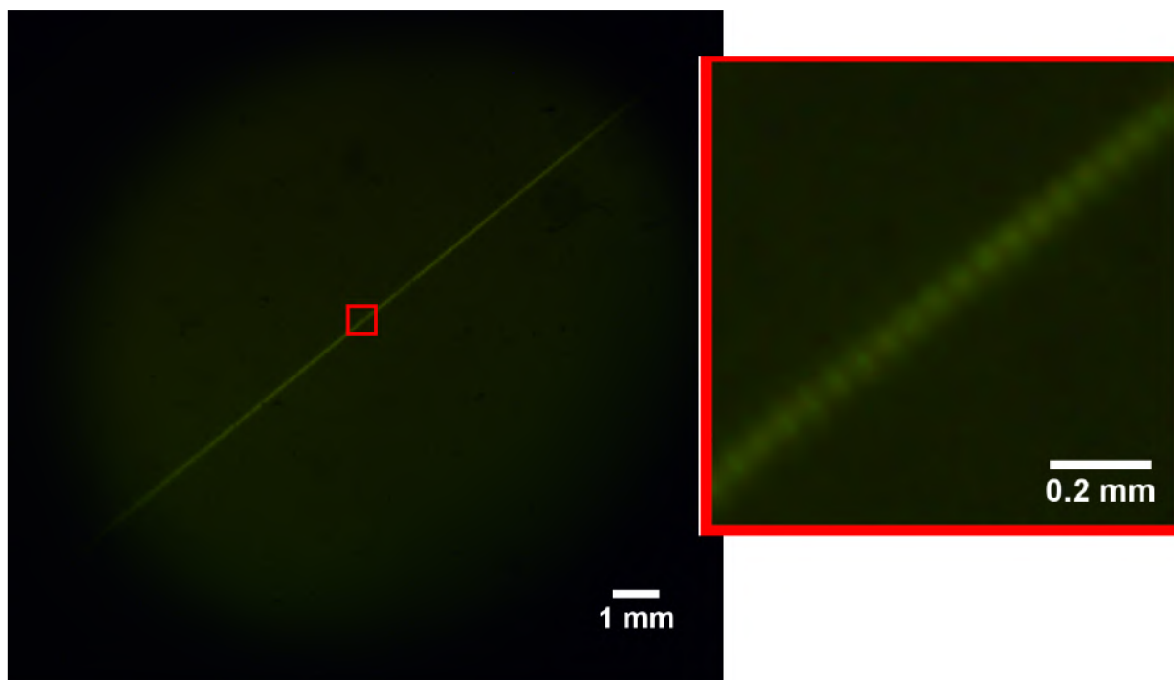
Obrázek 38: Intenzitní profily PSF pro různé defokusované Δz . Měřeno v ose x roviny vzorku, kde I je normovaná intenzita. Měřeno s objektivem 20x.

Z maxim v předchozím obrázku byl vytvořen graf defokusace. Krajní body byly určeny jako průměrná hodnota šumu v obrázku. Na obrázku 40 je záznam Archimédovy spirály s detailem na část jednoho ramene. Na obrázku mince 41 lze pozorovat, že se zaznamenaly pouze body Archimédovy ve fokusu a a rozptýlené světlo není pozorovatelné.

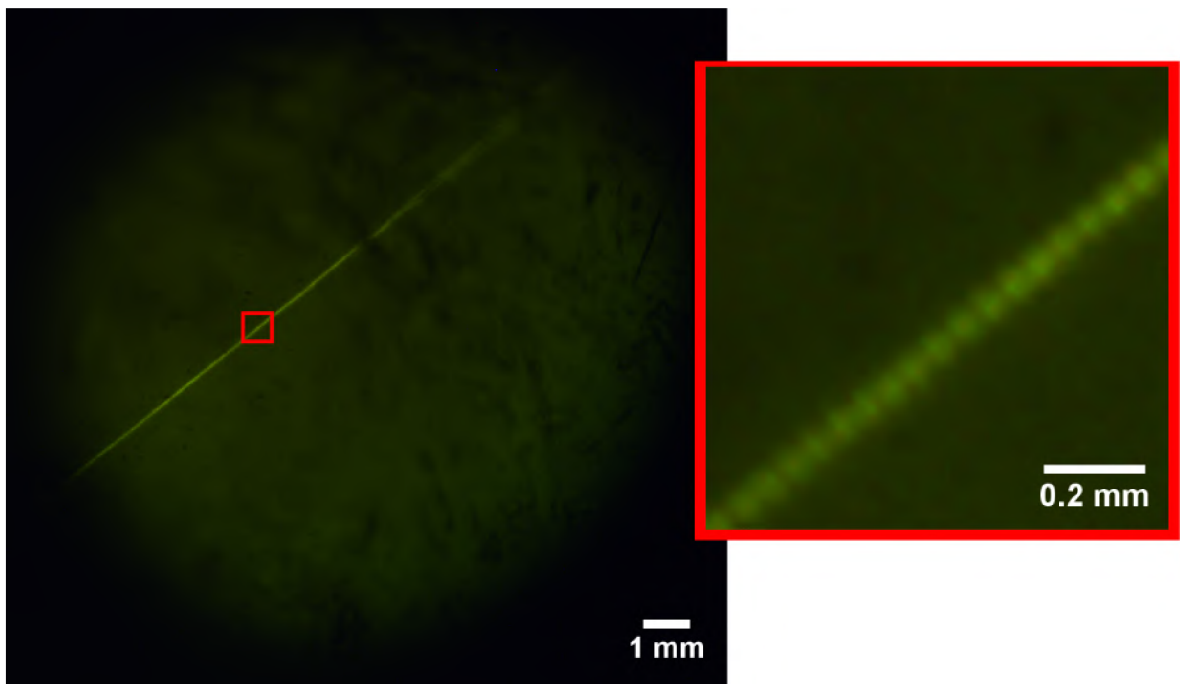
Záznamy s více vzorů a rovin mince naleznete v příloze A. Pološířka osové intenzitní odezvy odpovídá hodnotě 3,75 μm .



Obrázek 39: Osová intenzitní odezva pro objektiv 20x, kde I je normovaná intenzita a Δz je defokuse



Obrázek 40: Zaznamenaná řada na zrcadle s přiblížením na detail.

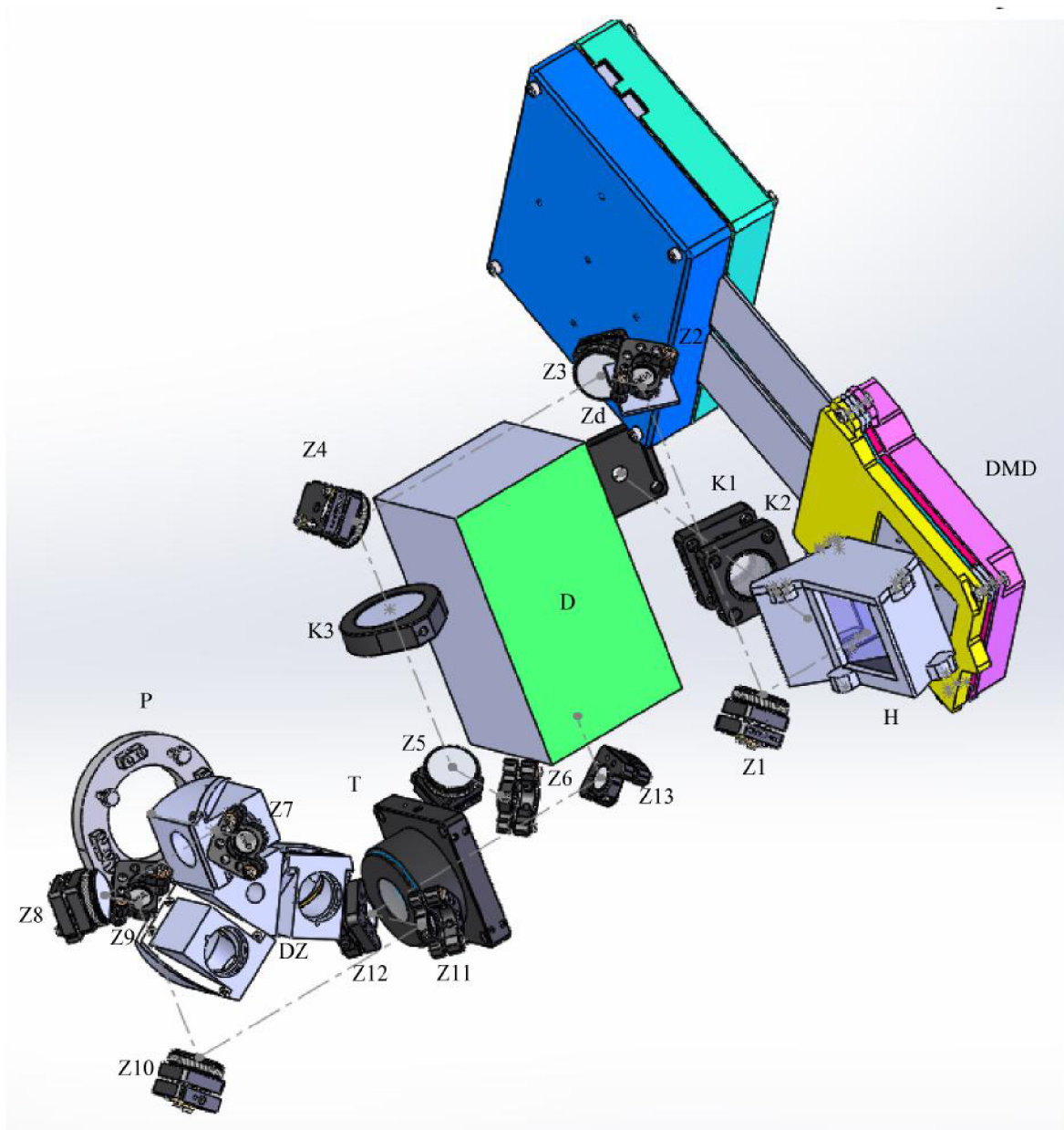


Obrázek 41: Zaznamenaná řada na první rovině na minci s přiblížením na detail.

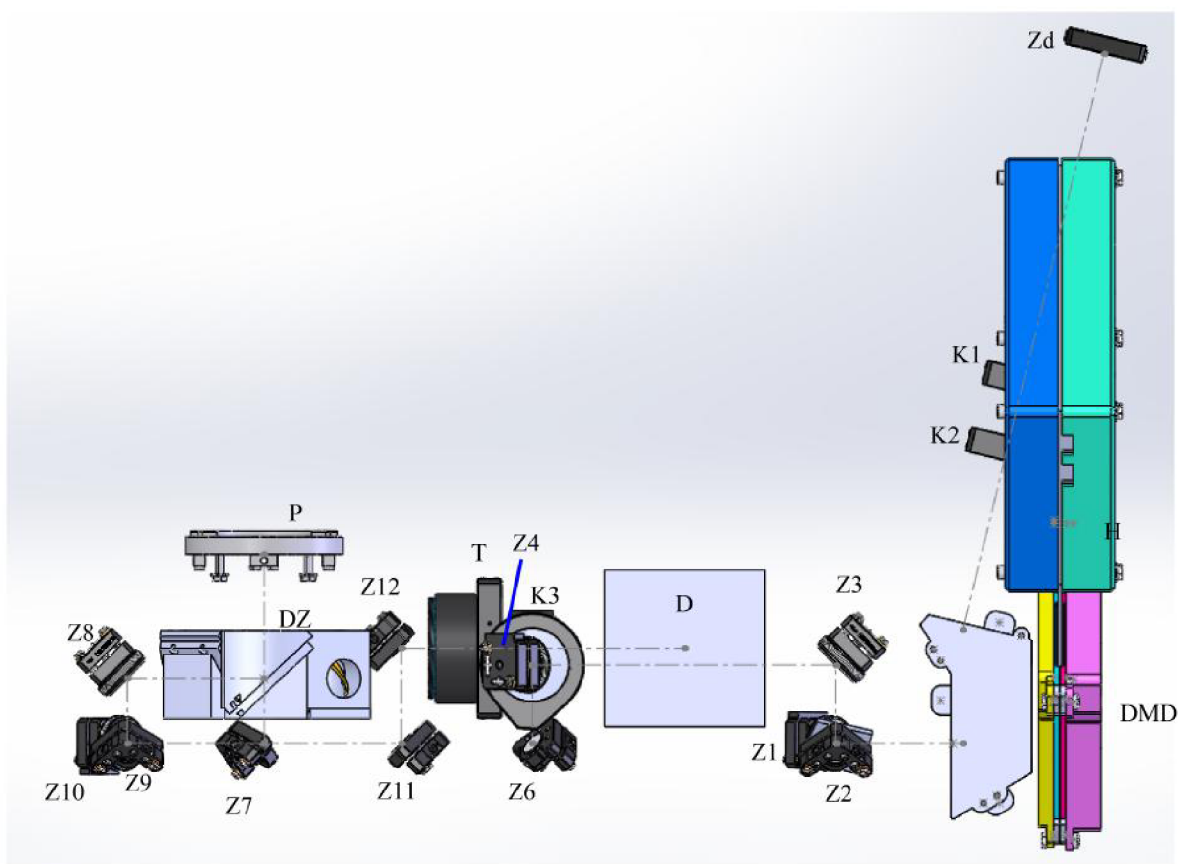
7 Idea konfokálního modulu

Podle provedeného experimentu byla navržen idea modelu konfokálního modulu, který je plánovaný k přidání k CCHM. Návrh komplikoval omezený prostor vyhrazený pro tento modul v proskleném vyhřívaném inkubátoru CCHM. Umístění optických komponent jsou ukázány na obrázcích 42 a 43. Osvětlovací soustava od zdroje Zd po hranol H jsou situovány kvůli pasivnímu chlazení DMD mimo tuto skříň. Pro získání dostatečné optické dráhy mezi hranolem H a kolektorem K3 a pro umožnění usazení do nosiče firmy Thorlabs bylo nutné vést optickou osu modulu pomocí zrcátek Z1-Z4, nahoru a do jeho středu. Vymezený prostor se přibližně uprostřed délky výrazně snižuje. Proto byl paprsek odkloněn zrcátkem Z4 zpět kolmo k základně mikroskopu. Pomocí zrcátek Z5-Z7 je paprsek veden na navržený otočný měnič dichroických zrcátek DZ. Z něj vstupuje paprsek přes napojovací přírubu P do CCHM. Po interakci na vzorku se svazek excitovaného světla vrací do dichroického zrcátka. Tam se odklání na zrcátka Z8-12. Následně tubusová čočka TČ vytváří obraz na detektoru D.

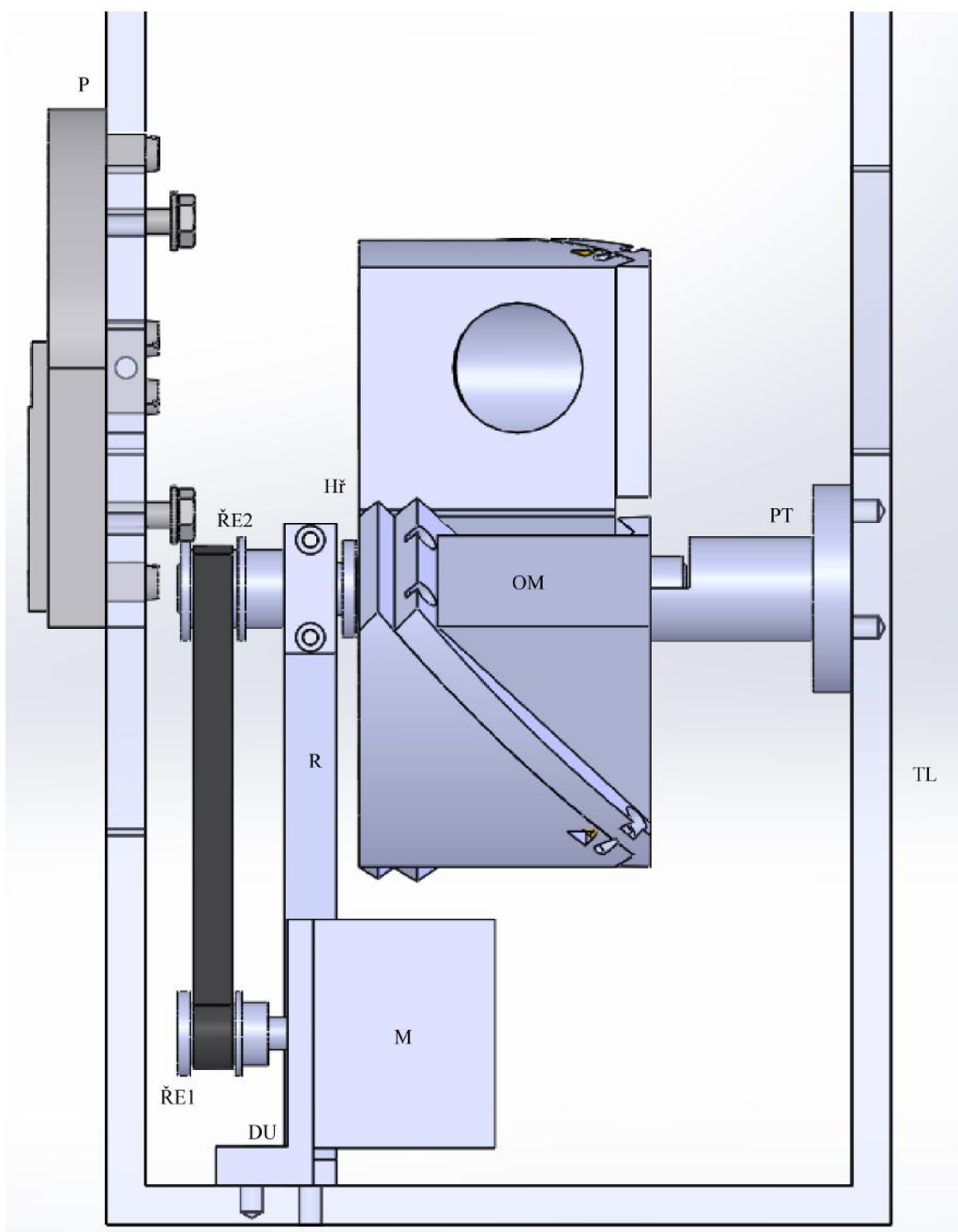
Pro modul bylo nutné navrhnout měnič dichroických zrcátek a jeho pohon viz obrázek 44 45. Otočný měnič OM byl navržen pro výměnu tří dichroických zrcátek. Přes hřídel Hř je z jedné strany uchycen k tělu TL pomocí podpůrné tyče PT. Z druhé strany je postaven na ramenech stojanu R přišroubovaných k sobě. Rotace měniče je poháněna přes řemen Ř typu GT2 krokovým motorem M SY35ST28-0504A firmy Pololu [51] s úhlovým krokem $1,8^\circ$. Řemenice ŘE1 u krokového motoru je o 16ti zubech a řemenice ŘE2 u měniče je o 20ti zubech. Krokový motor je uchycen k tělu modulu přes drážkový úchyt DU. Celkový modul je zobrazen na obrázku 46.



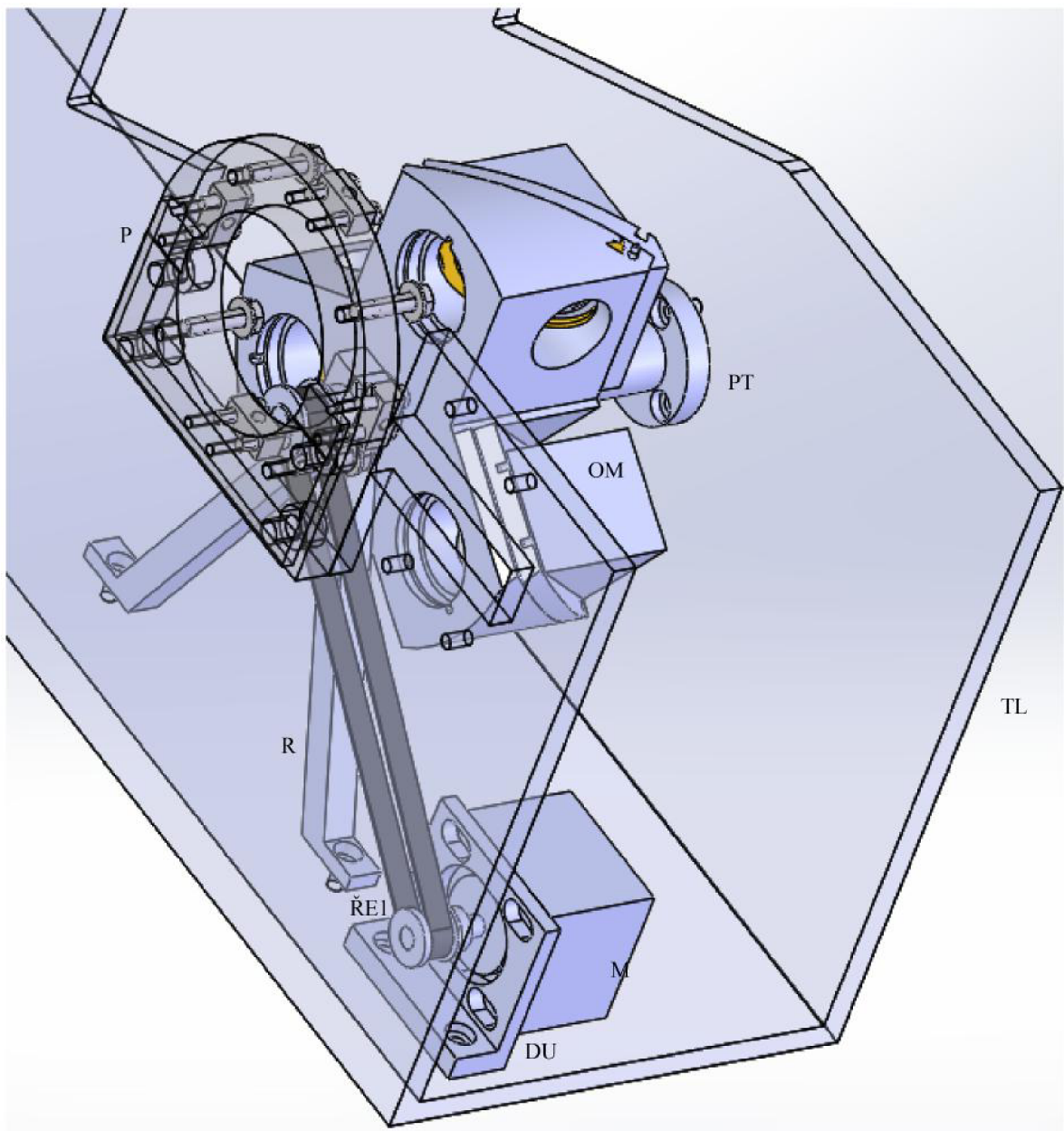
Obrázek 42: Obecný pohled na optické části, které jsou uloženy v navržených součástkách a součástkách firmy Thorlabs [45]: Zd- zdroj, K- kolektor, DMD, Z- zrcátko, DZ- otočný měnič dichroických zrcátek, P- příruba, T- tubusová čočka, D- detektor.



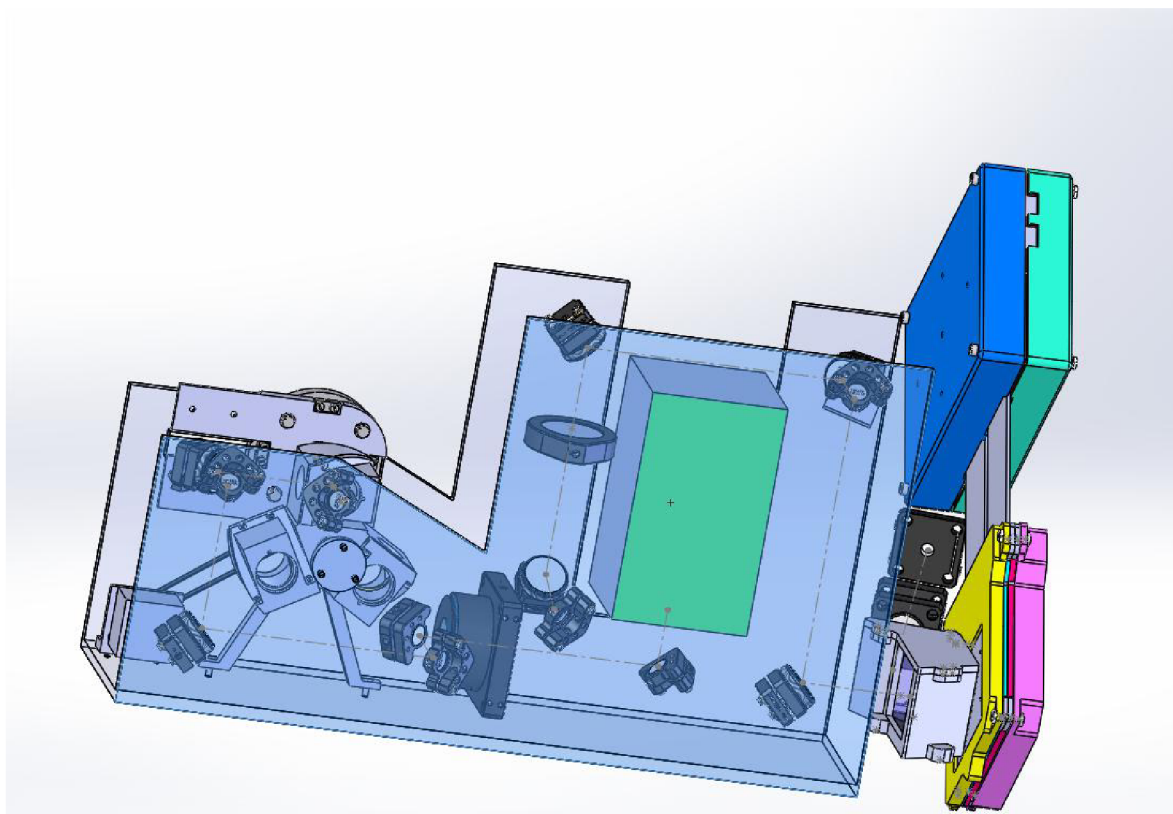
Obrázek 43: Pohled shora na optické části, které jsou uloženy v navržených součástkách a součástkách firmy Thorlabs [45]: Zd- zdroj, K- kolektor, DMD, Z- zrcátko, DZ- otočný měnič dichroických zrcátek, P- příruba, TČ- tubusová čočka, D- detektor.



Obrázek 44: Pohled z boku na otočný měnič dichroických zrcátek DZ: OM- otočný měnič, PT- podpůrná tyč, R- ramena stojanu, Hř- hřídel, M- krokový motor, DU- drážkový úchyt, TL- tělo modulu.



Obrázek 45: Obecný pohled na otočný měnič dichroických zrcátek DZ: OM- otočný měnič, PT- podpůrná tyč, R- ramena stojanu, Hř- hřídel, M- krokový motor, DU- drážkový úchyt, TL- tělo modulu.

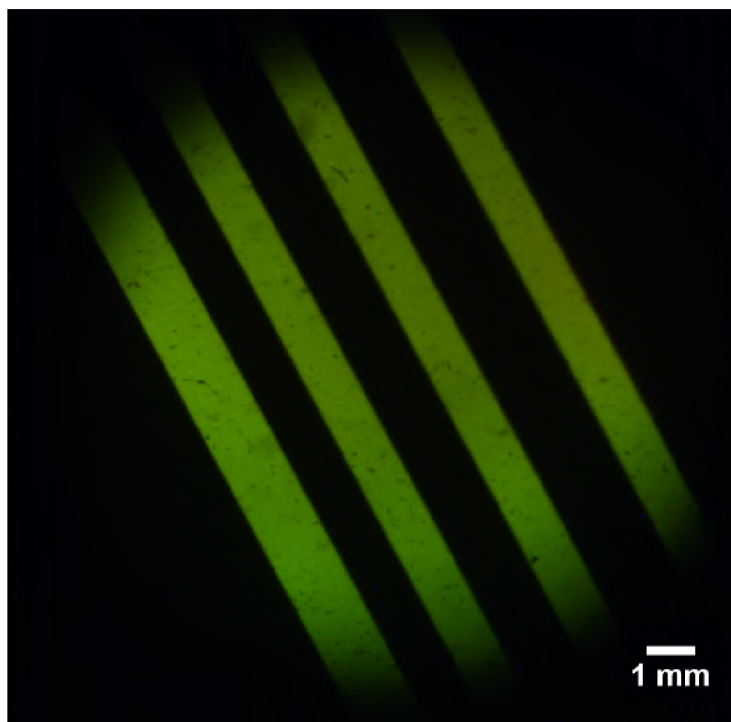


Obrázek 46: Obecný pohled na celkový konfokální modul.

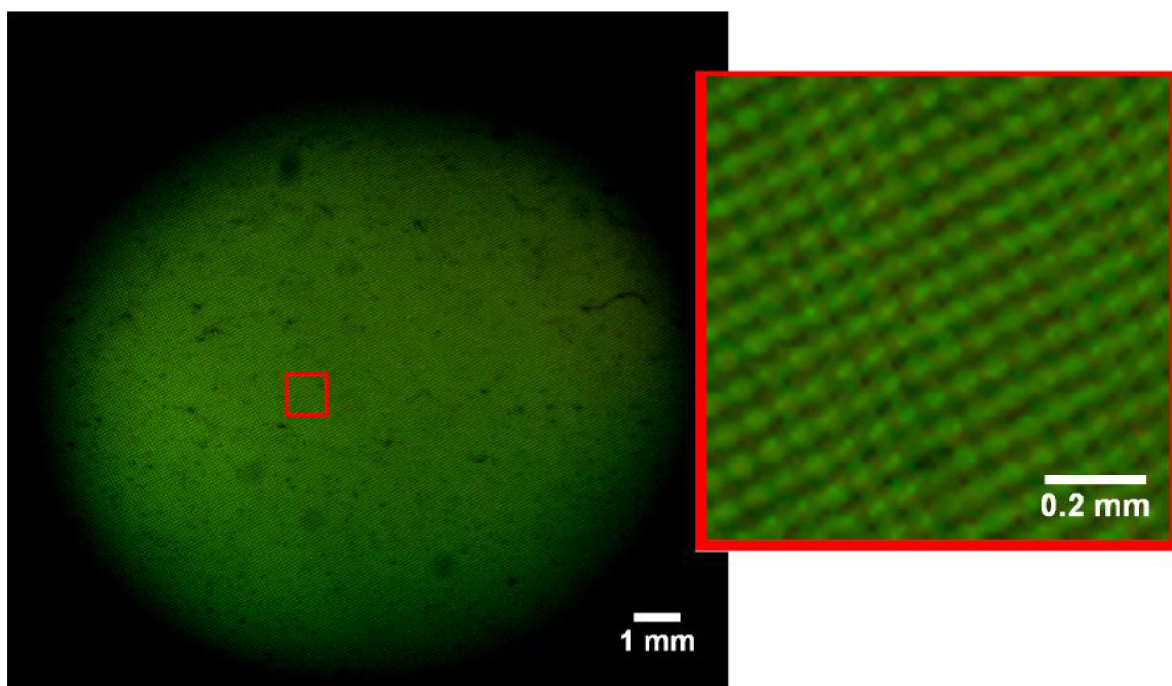
8 Závěr

Tato práce velkou měrou přispěla k vývoji konfokálního modulu pro Koherencí Řízený Holografický Mikroskop. V rámci této práce došlo ke spojení dvou technik pozorování živých buněk: digitální holografické mikroskopie a konfokální fluorescenční mikroskopie. Optická sestava byla navržena v optickém CADu. Ta byla inspirována částečně epi-fluorescenčním mikroskopem a částečně vícekanálovým konfokálním mikroskopem s Nipkowovým diskem. Nipkowův disk je zdroj mechanických vibrací, které se mohou přenášet do mikroskopu. Tudíž není vhodný pro aplikaci s holografickým mikroskopem. Tento problém byl vyřešen DMD čipem, který je založen na MEMS technologii. Ze simulace z optického CADu byla stanovena minimální rozteč aktivních zrcadel, pro objektivy se zvětšením 10x až 40x. Pro výběr vyčítaných pixelů CCD čipu, simulující filtraci záření z rovin mimo rovinu ostrosti, byla stanovena nutnost minimální rozteče aktivních zrcátek. V rámci experimentu bylo provedeno pozorování rovinného zrcátka a profilovaného vzorku, který sloužil k ověření schopnosti vytvářet optické řezy vzorkem. K tomuto experimentu byl použit objektiv se zvětšením 10x a se zvětšením 20x. Obrazy demonstrují vliv profilu vzorku na zobrazení vzoru aktivních zrcátek DMD čipu. Na základě experimentu byla navržena idea konfokálního modulu, připojitelného ke Koherencí Řízenému Holografickému mikroskopu.

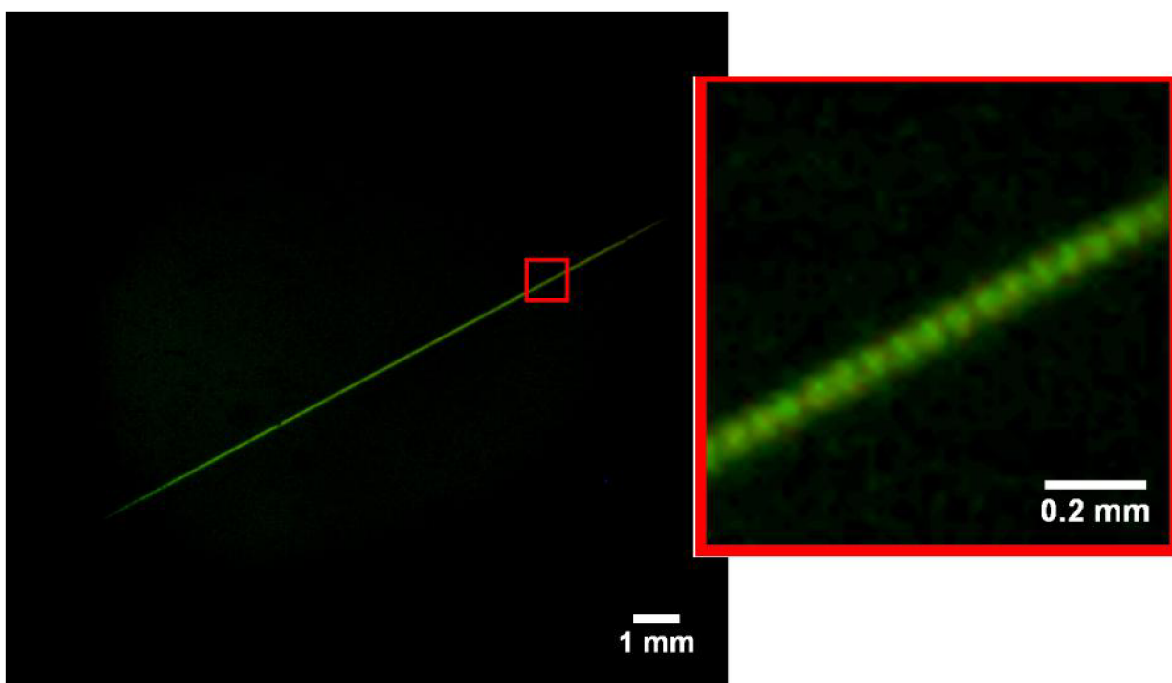
A Obrazová příloha experimentů



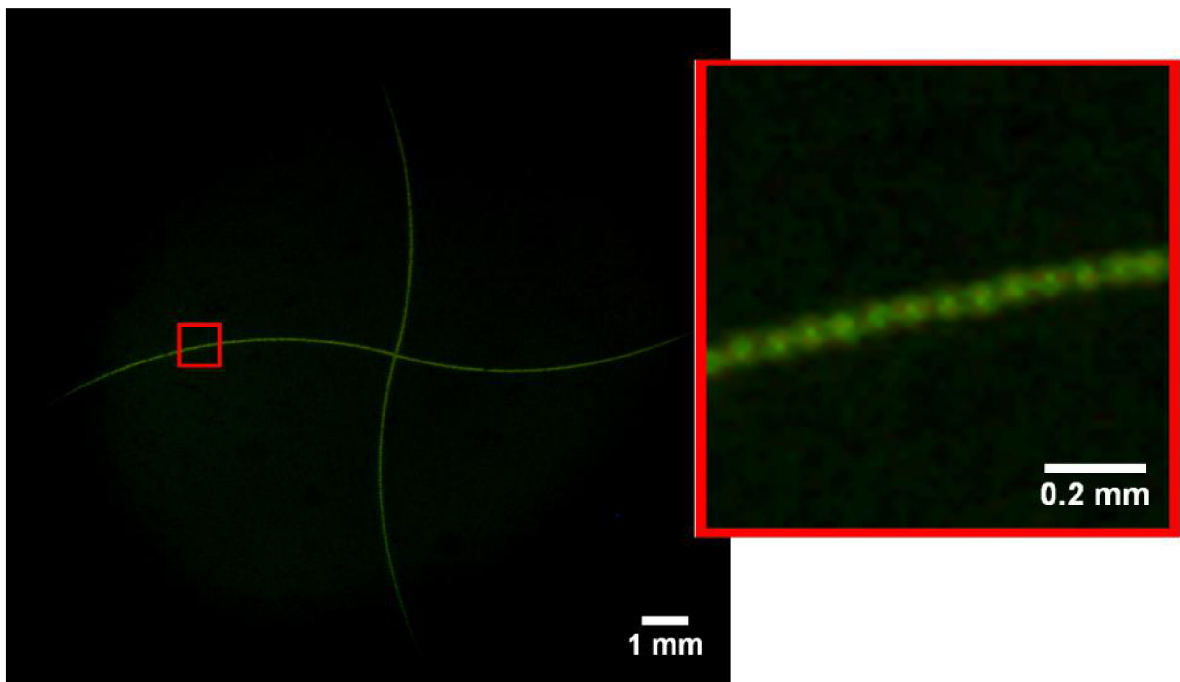
Obrázek 47: Zaznamenané pruhy na zrcadle za použití objektivu s 10-násobným zvětšením. Obrázek nebyl pozměněn.



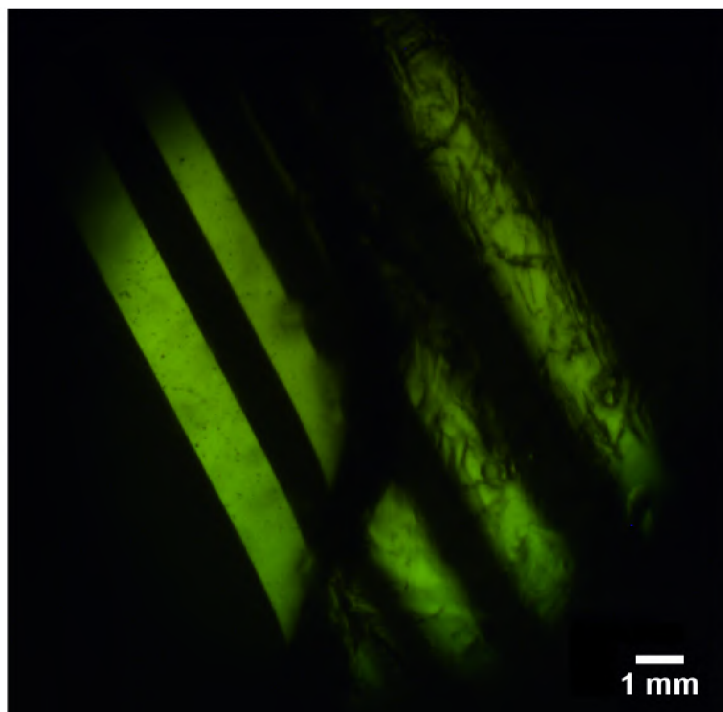
Obrázek 48: Zaznamenaná šachovnice na zrcadle s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10x.



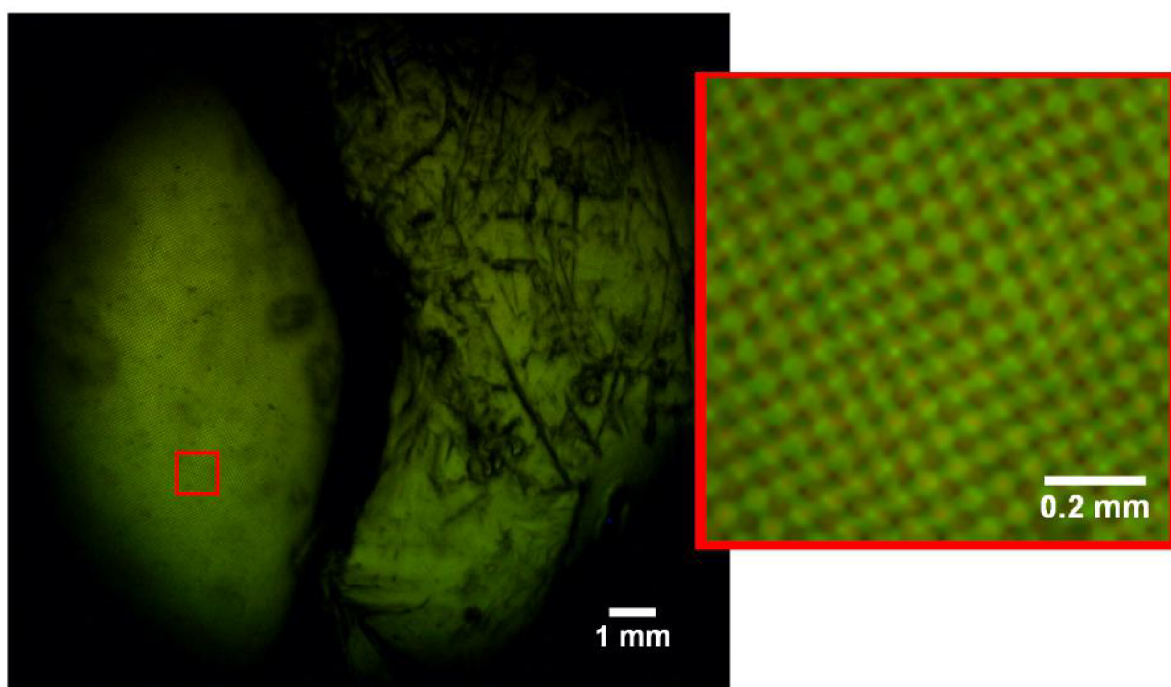
Obrázek 49: Zaznamenaná řada na zrcadle s přiblížením na detail, použitý objektiv byl se zvětšením 10x. Záznam byl normován pro lepší viditelnost.



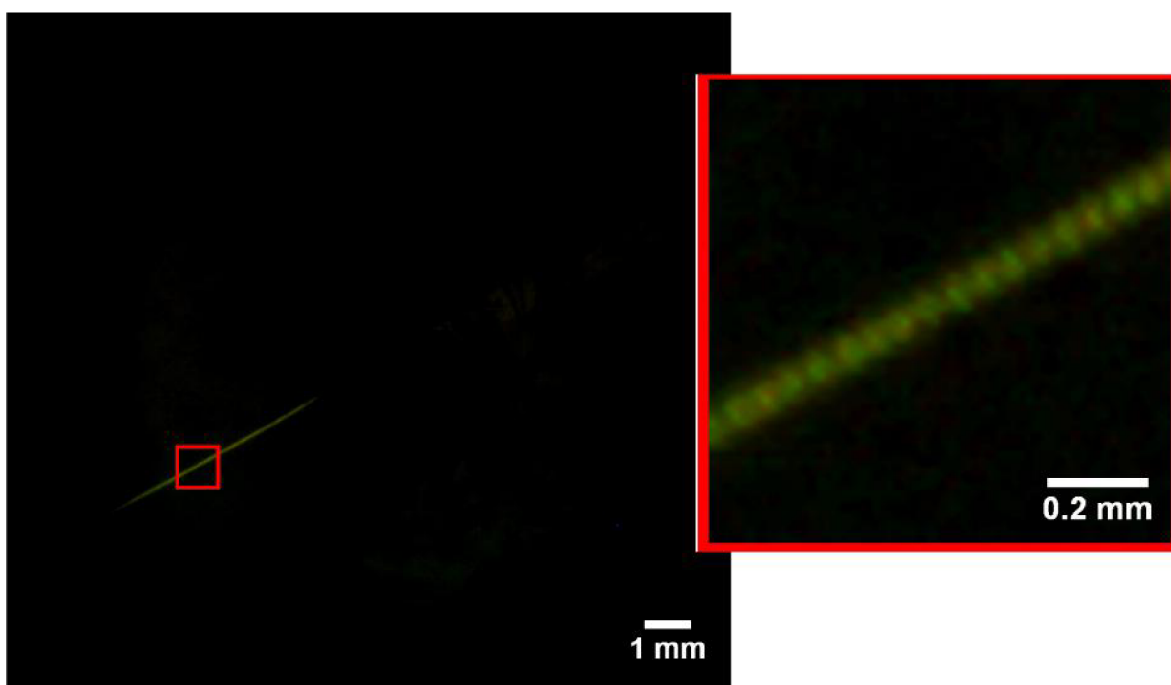
Obrázek 50: Zaznamenaná Archimédova spirála na zrcadle s přiblížením na detail, použitý objektiv byl se zvětšením 10x. Záznam byl normován pro lepší viditelnost.



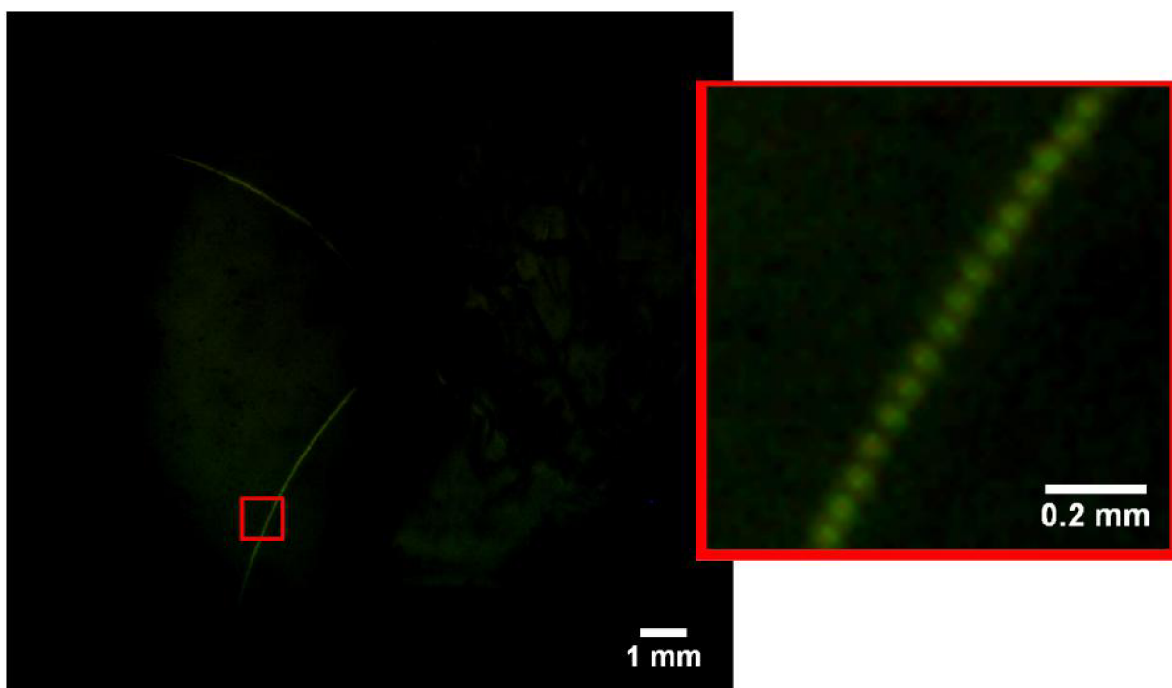
Obrázek 51: Zaznamenané pruhy na první rovině na minci za použití objektivu s 10-násobným zvětšením



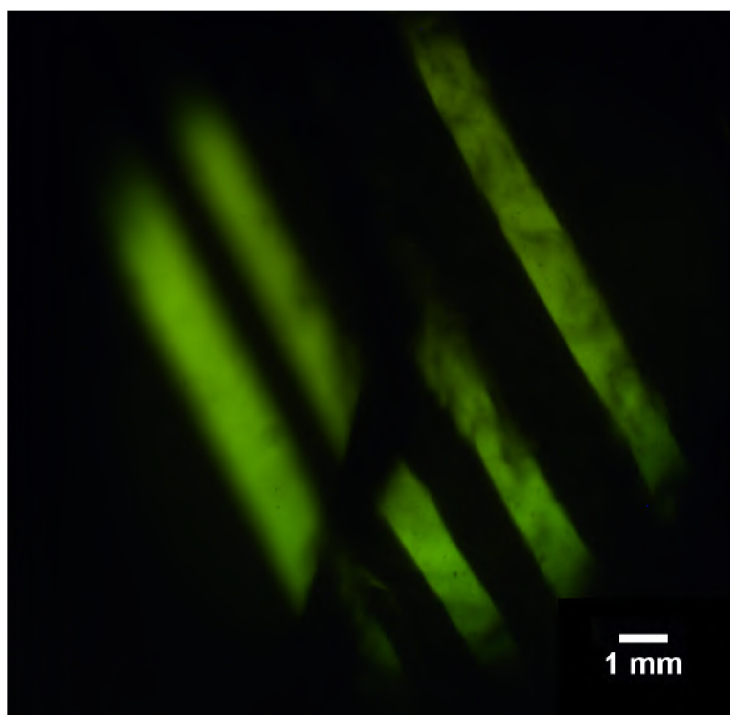
Obrázek 52: Zaznamenaná šachovnice na první rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10x.



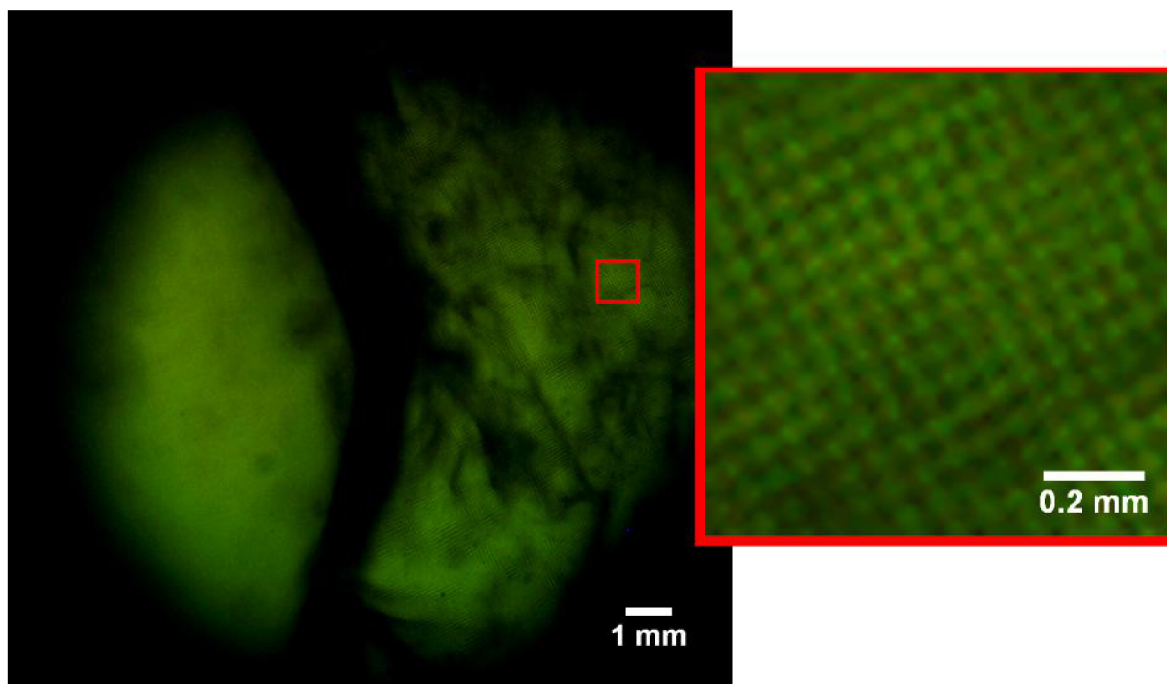
Obrázek 53: Zaznamenaná řada na první rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10x.



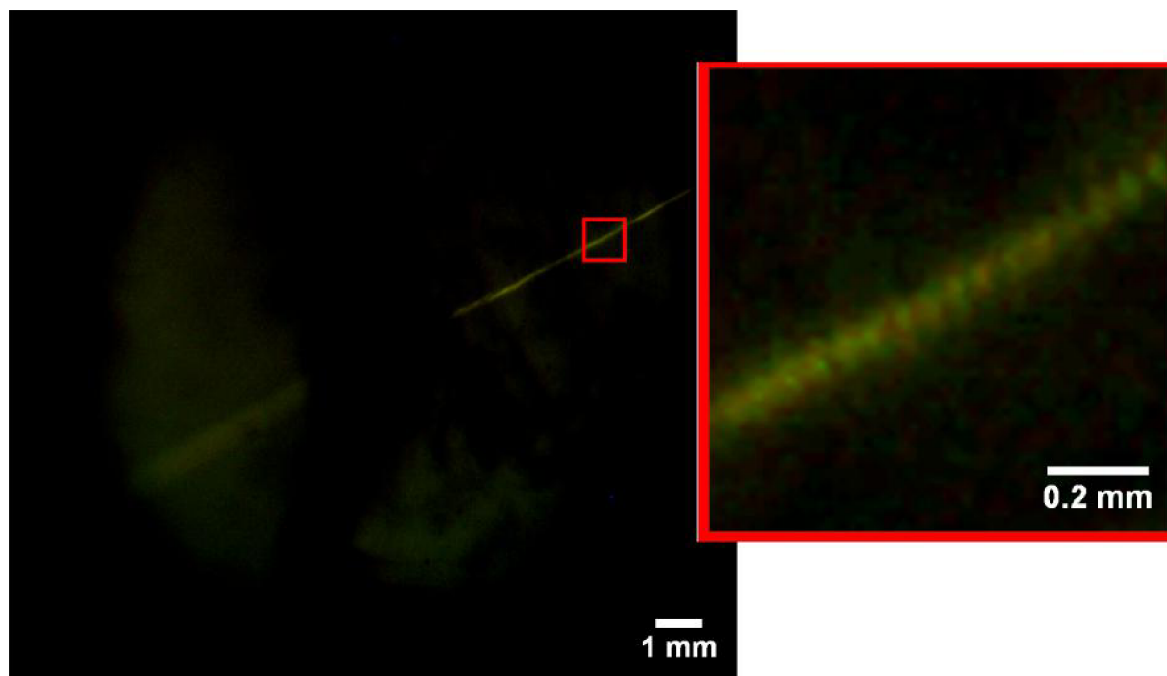
Obrázek 54: Zaznamenaná Archimédova spirála na první rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10.



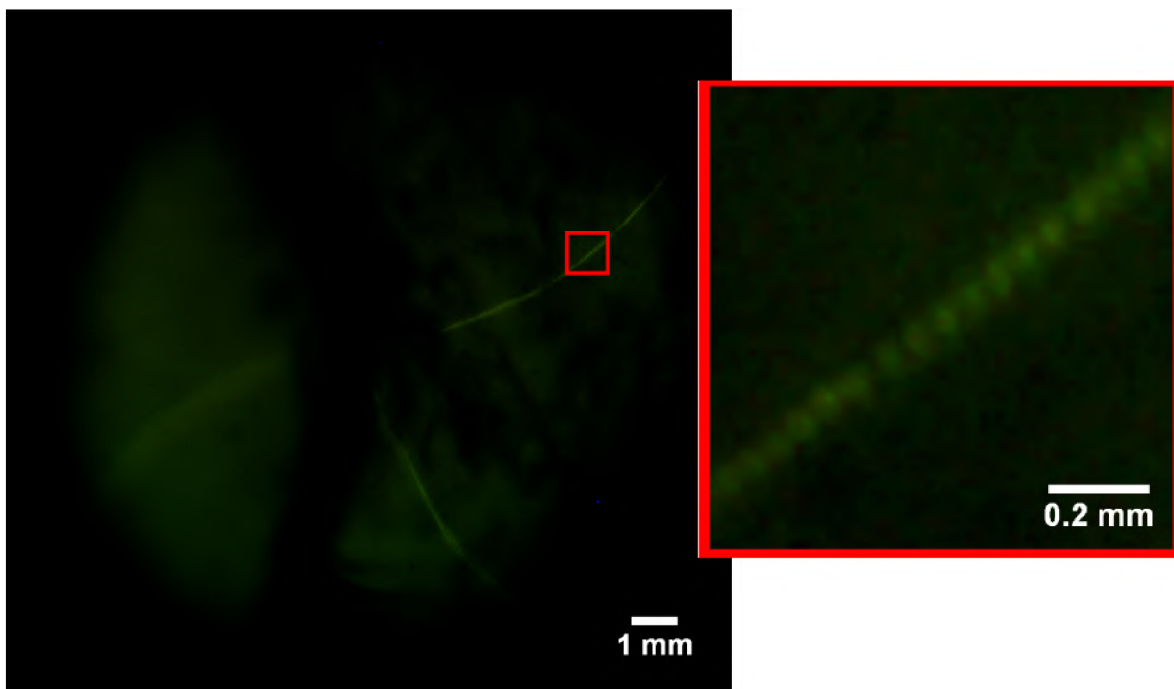
Obrázek 55: Zaznamenané pruhy na druhé rovině na minci za použití objektivu s 10-násobným zvětšením. Obrázek nebyl pozměněn.



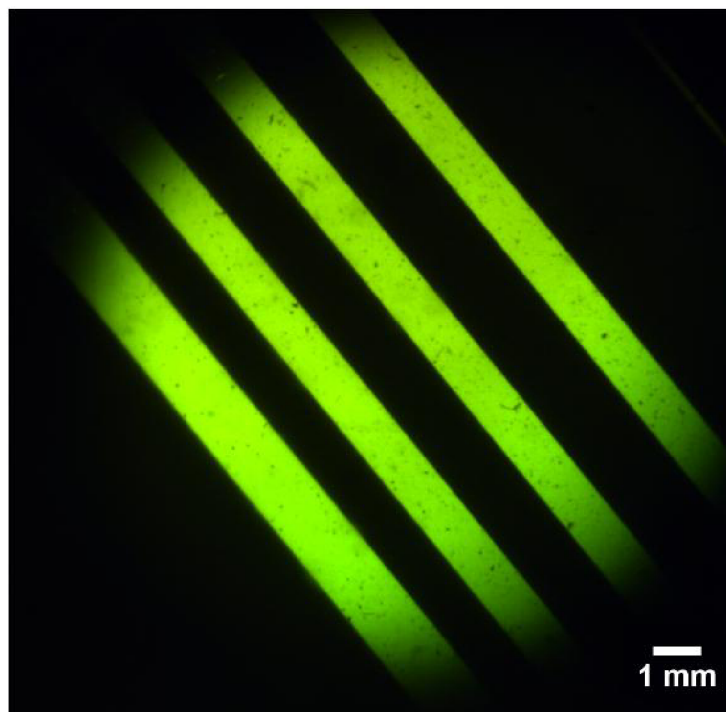
Obrázek 56: Zaznamenaná šachovnice na druhé rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10x.



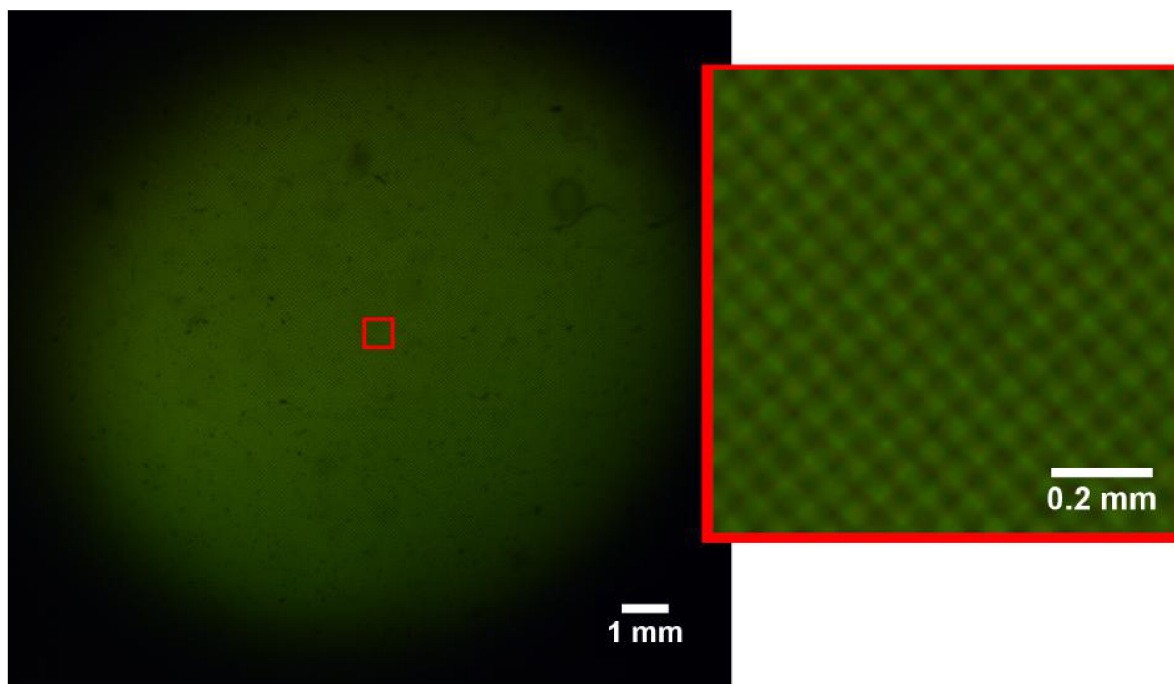
Obrázek 57: Zaznamenaná řada na druhé rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10x.



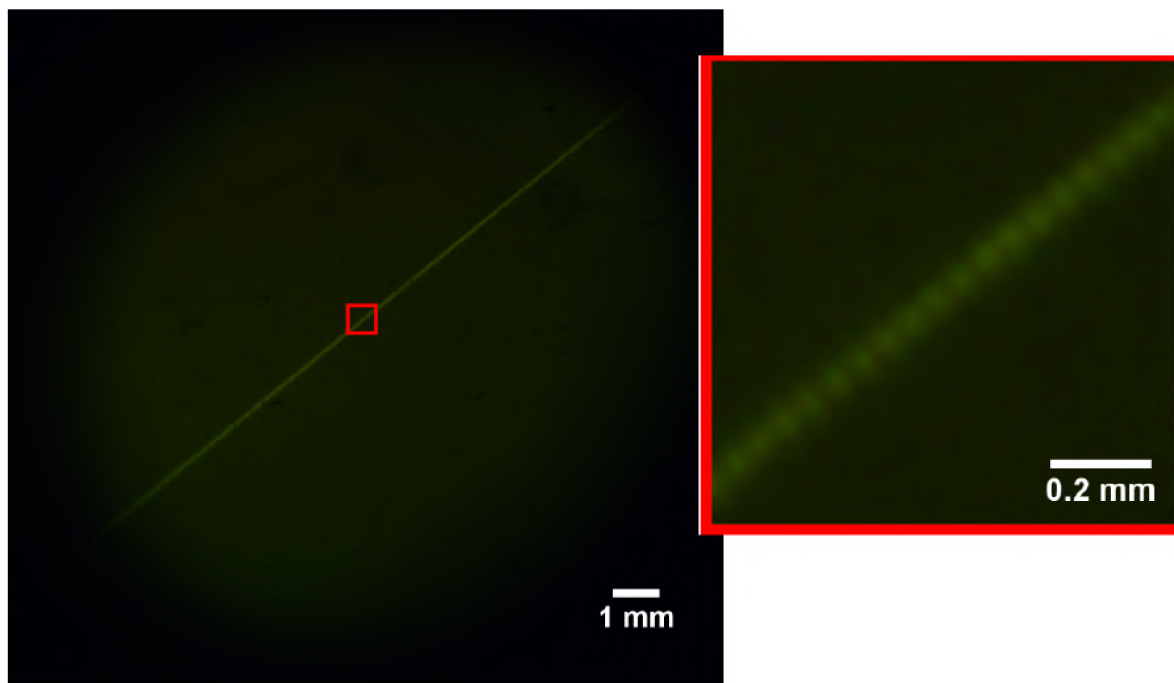
Obrázek 58: Zaznamenaná Archimédova spirála na druhé rovině na minci s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 10.



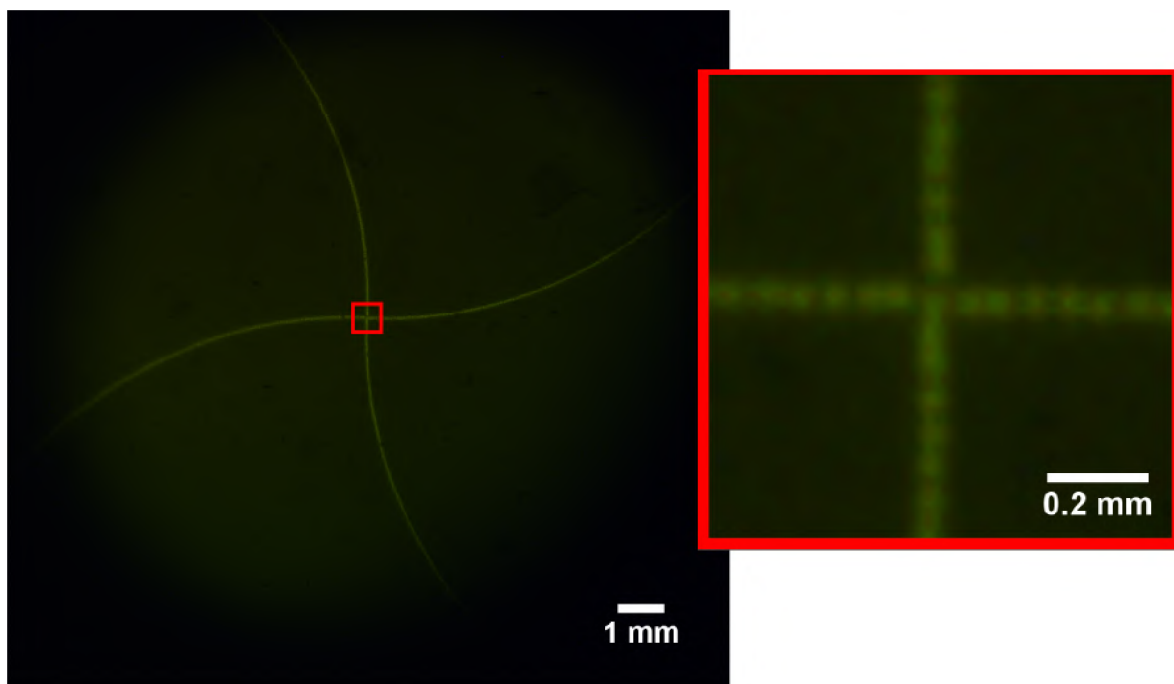
Obrázek 59: Zaznamenané pruhy na zrcadle za použití objektivu s 20-násobným zvětšením. Obrázek nebyl pozměněn.



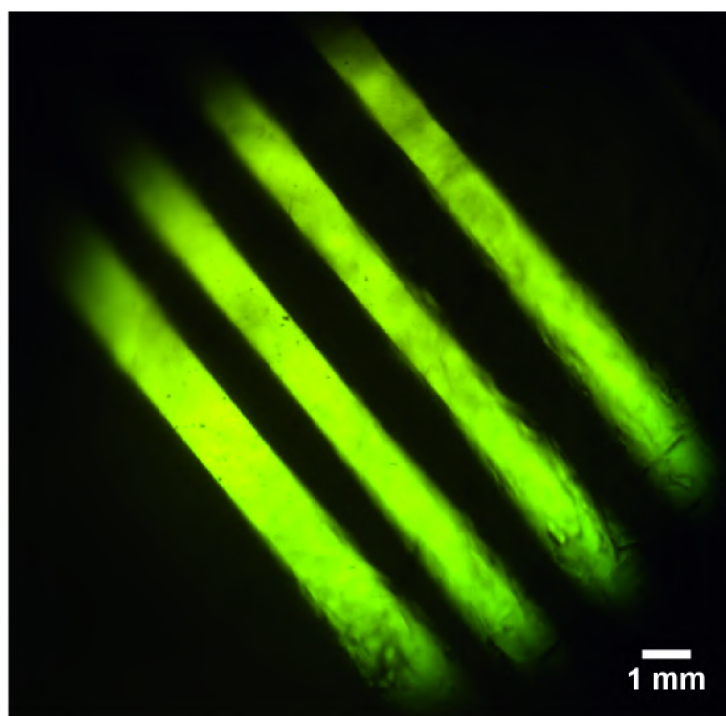
Obrázek 60: Zaznamenaná šachovnice na zrcadle s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



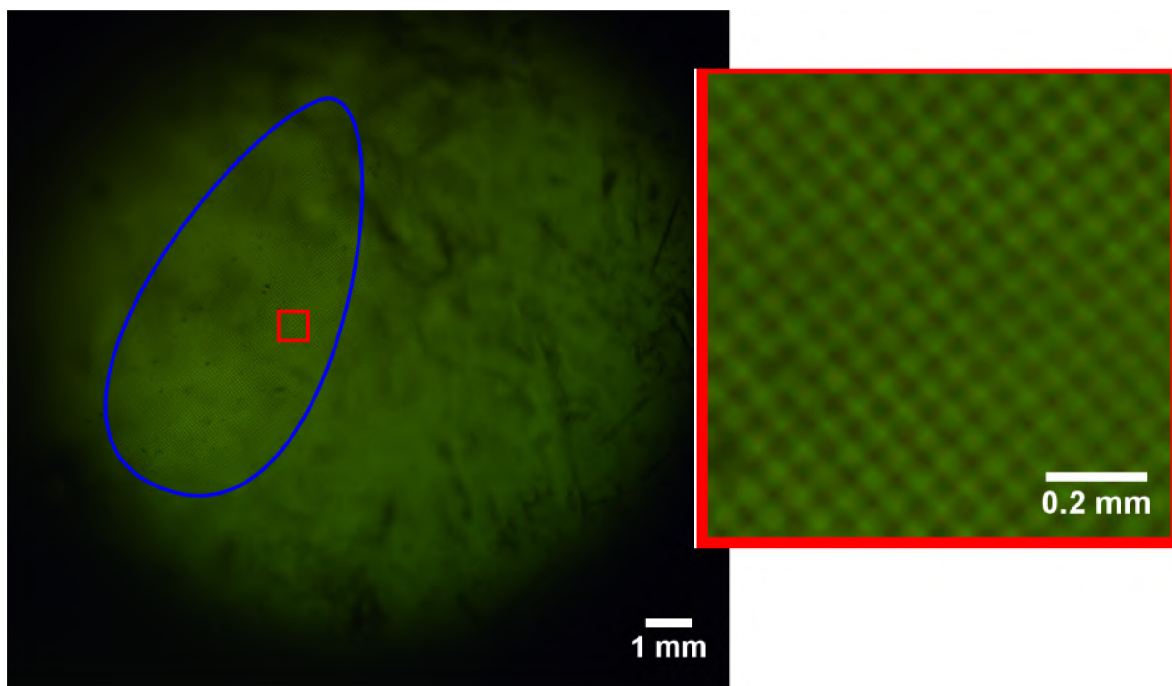
Obrázek 61: Zaznamenaná řada na zrcadle s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



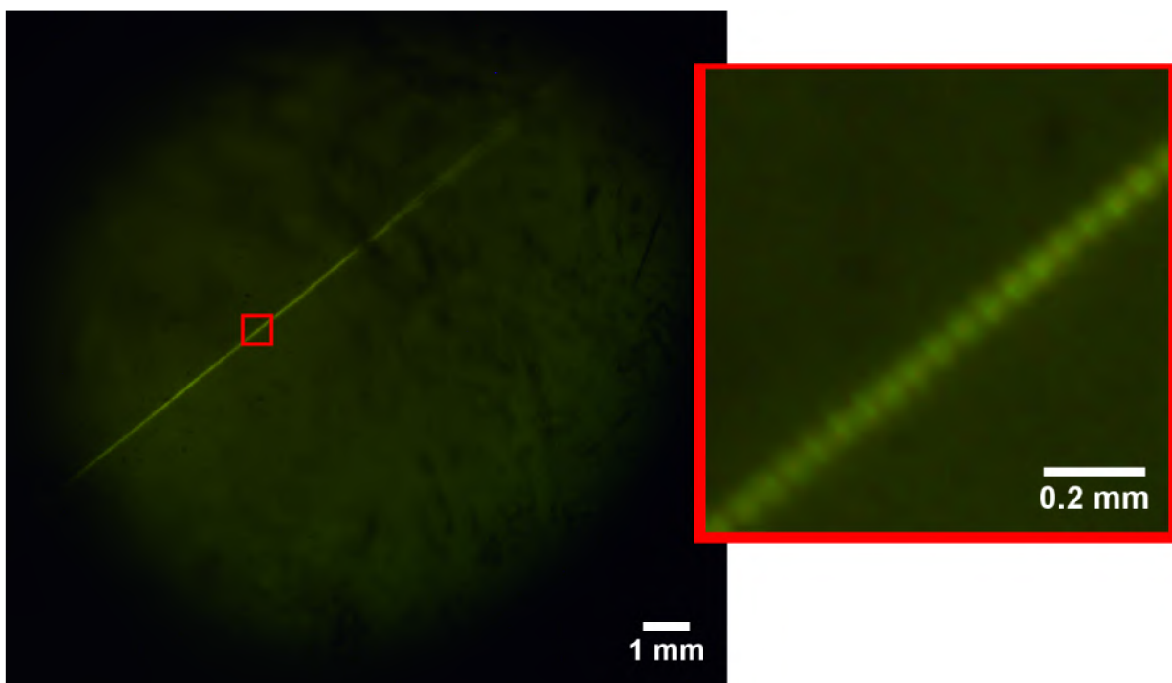
Obrázek 62: Zaznamenaná spirála na zrcadle s přiblížením na detail, záznam byl normován pro lepší viditelnost. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



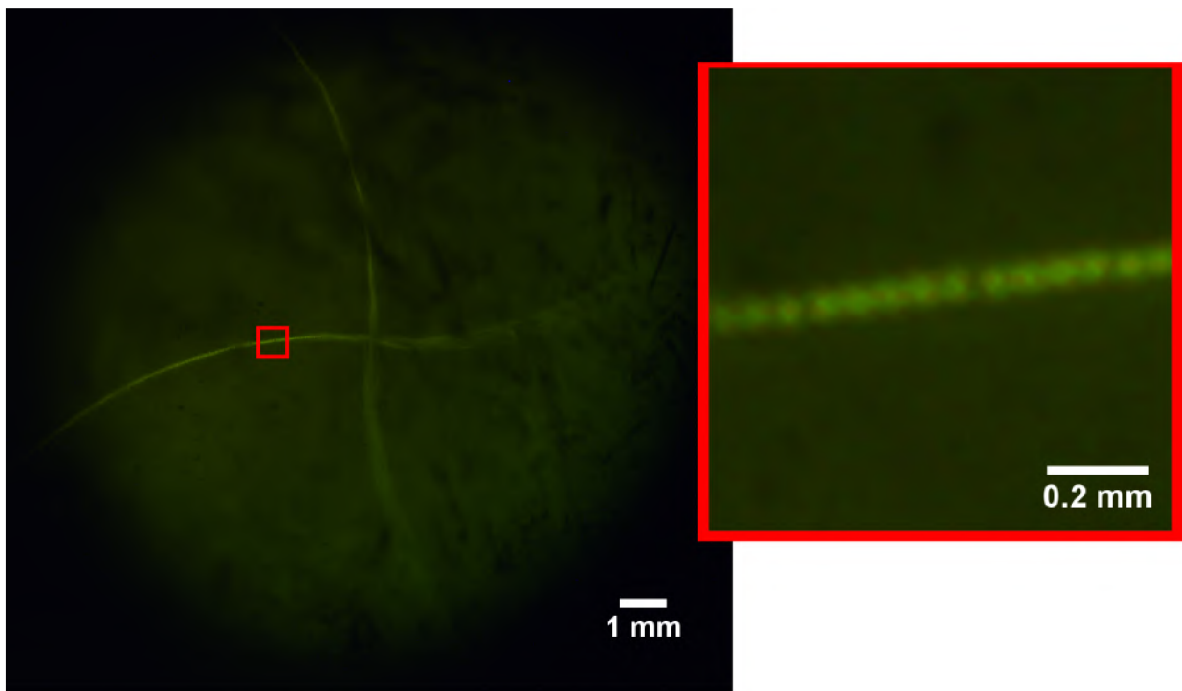
Obrázek 63: Zaznamenané pruhy na první rovině na minci za použití objektivu s 10-násobným zvětšením. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



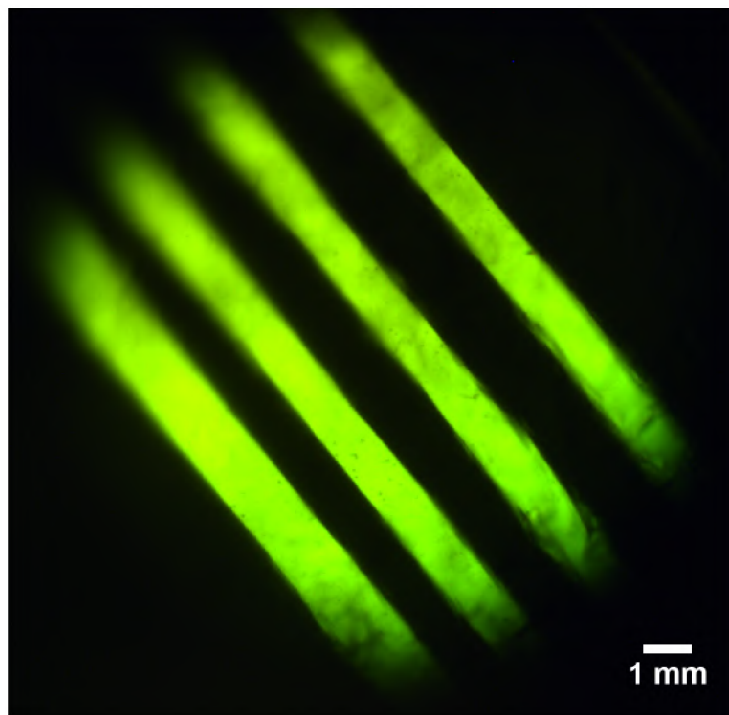
Obrázek 64: Zaznamenaná šachovnice na první rovině na minci s přiblížením na detail. Zaostrěná oblast byla přibližně vyznačena modrým ohraničením. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



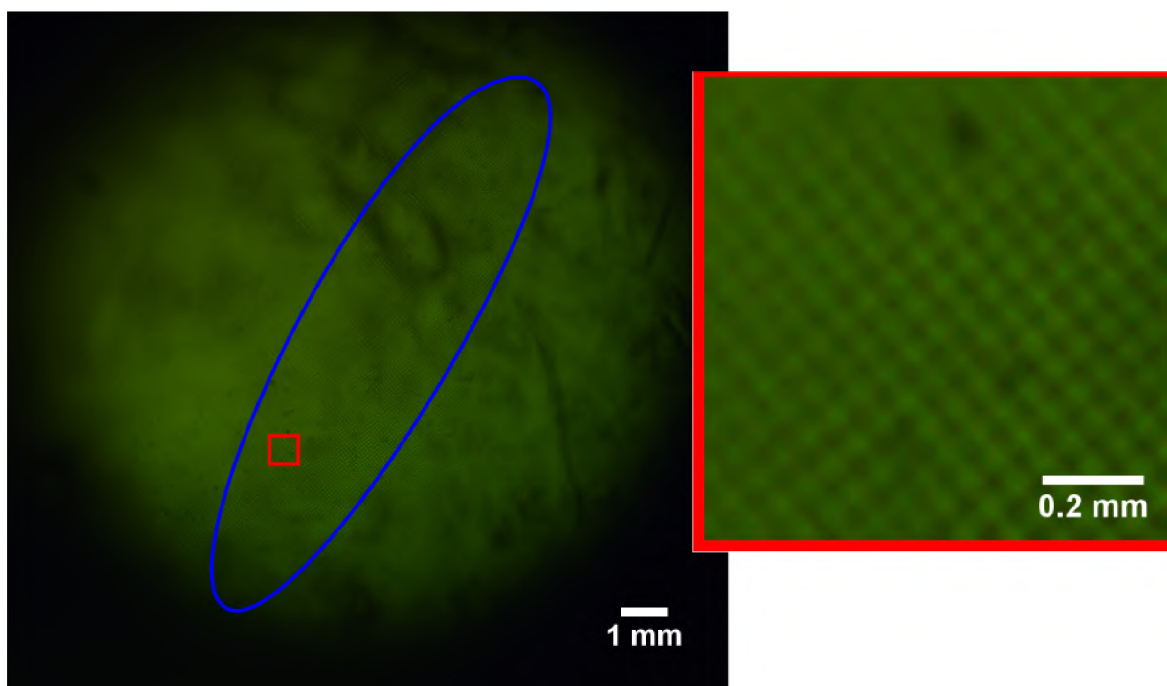
Obrázek 65: Zaznamenaná řada na první rovině na minci s přiblížením na detail. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



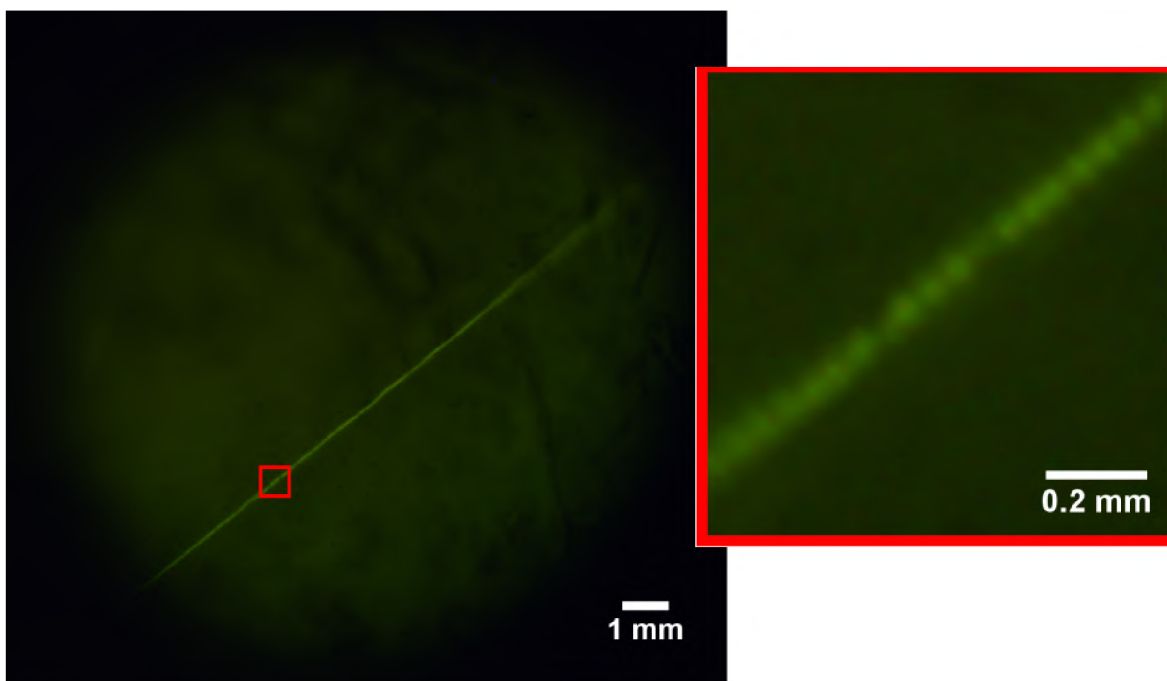
Obrázek 66: Zaznamenaná Archimédova spirála na první rovině na minci s přiblížením na detail. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



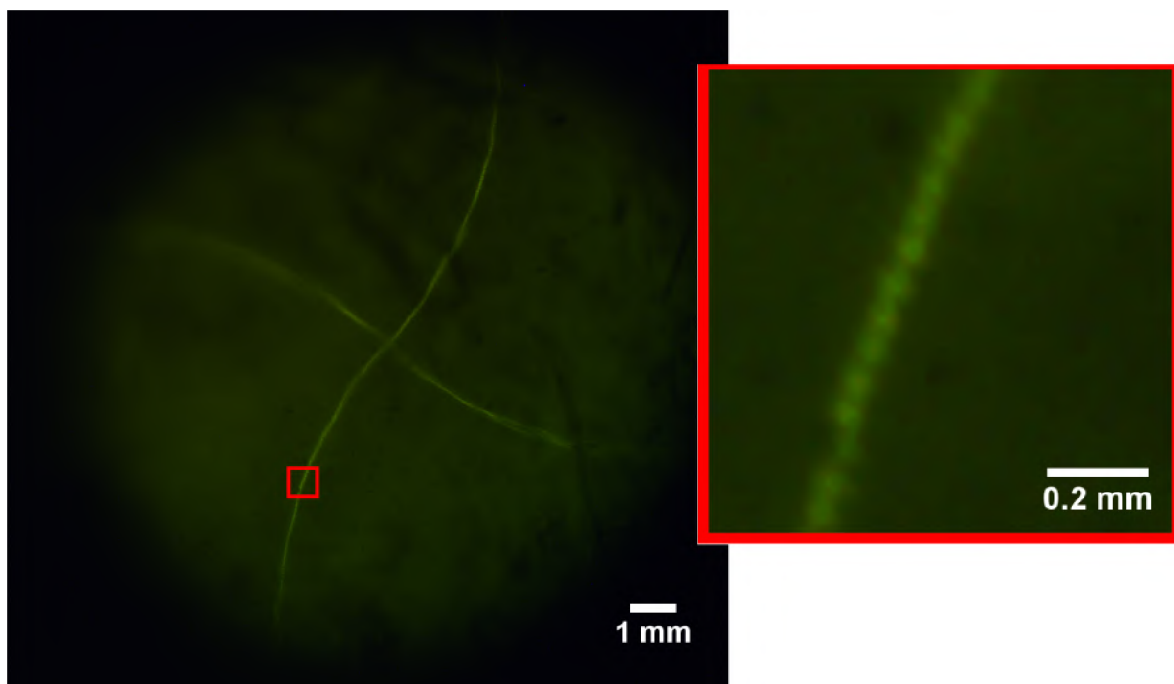
Obrázek 67: Zaznamenaná šachovnice na druhé rovině na minci s přiblížením na detail. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



Obrázek 68: Zaznamenaná šachovnice na druhé rovině na minci s přiblížením na detail. Zaostrěná oblast byla přibližně vyznačena modrým ohraničením. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



Obrázek 69: Zaznamenaná řada na druhé rovině na minci s přiblížením na detail. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.



Obrázek 70: Zaznamenaná Archimédova spirála na druhé rovině na minci s přiblížením na detail. Použitý objektiv se zvětšením 20x. Obrázky nebyly pozměněny.

Literatura

- [1] ALEXANDRA KARASOVÁ; ANDRA NISTOR. OPTICKÁ MIKROSKOPIE, [Online; 25.3.2020], https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/8_cFAA.pdf?redirected
- [2] MITRACOMICRO [Online; 25.3.2020], <https://www.intracomicro.cz/teorie/popis-mikroskopu/>
- [3] CYTOLOGIE - LOUNY [Online; 16.3.2020], <http://cytolouny.cz>
- [4] MIKROSKOP - MIKROSKOPY.CZ [Online; 9.3.2020], <https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/temne-pole/>
- [5] MIKROSKOP - MIKROSKOPY.CZ [Online; 17.3.2020], <https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/interferencni-kontrast/>
- [6] WIKISKRIPTA [Online; 12.3.2020], https://www.wikiskripta.eu/w/Mikroskopie_pro_procházející_světlo
- [7] INVID [Online; 12.3.2020], https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fwww.invid.cz%2Fplugin-%2Fdocument%2Fshow%2F66&psig=AOvVaw2NBs_VeEK0KQ0seLJErDkJ-&ust=1593636801471000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTClism-61quoCFQAAAAAdAAAAABAD
- [8] OLYMPUS [Online; 25.3.2020], <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope--resource/primer/techniques/dic/dicoverview/>
- [9] IBIDI [Online; 25.3.2020], <https://ibidi.com/content/214-dic>
- [10] MICROSCOPYU [Online; 25.3.2020], <https://www.microscopyu.com/galleries/DIC-phase-contrast>
- [11] POKORNÝ, P. Světelná mikroskopie a její aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010, 54 stran. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Lošťák.
- [12] BORN, Max; WOLF, Emil. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. Elsevier, 2013.
- [13] LABORATORNÍ MIKROSKOP [Online; 12.3.2020], <https://laboratorni-mikroskop-cz.webnode.cz/darkfield-mikroskop-pozorovani-v-temnem-poli/>
- [14] Týč, Matěj & Kvasnica, Lukáš & Slabá, Michala & Chmelik, Radim. (2013). Numerical refocusing in digital holographic microscopy with extended-sources illumination. Optics express. 21. 28258-71. 10.1364/OE.21.028258.

- [15] KOVÁŘOVÁ, K. Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 28 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.
- [16] DUNN, G., ZICHA, D. Dynamics of broplast spreading. *Journal of Cell Science*, vol. 108, pp. 1239-1249, 1995.
- [17] Marquet, P. et al.: Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters* 30 (2005) 468-470.
- [18] DAVIES, H. G.; DEELEY, E. M. An integrator for measuring the “dry mass” of cells and isolated components. *Experimental cell research*, 1956, 11.1: 169-185.
- [19] KOLMAN, P. Koherencí řízený holografický mikroskop. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [20] CHYTKOVÁ, I. Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – konstrukce a experiment. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 1999. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [21] PROKOPOVÁ, M. Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – teorie a konstrukce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 1999. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [22] PROKOPOVÁ, M. Transmisní holografický konfokální mikroskop. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2002. Pojednání ke státní doktorské zkoušce. Školitel doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [23] TELIGHT [Online; 6.2.2020], <http://www.telightco.com/q-phase/other-pdf/telight-q-phase-brozura-2019-v04.pdf>
- [24] MICROSCOPYU [Online; 6.2.2020], <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [25] KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN [Online; 10.2.2020], <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
- [26] TELEDYNE PHOTOMETRICS [Online; 6.2.2020], <https://www.photometrics.com/learn/spinning-disk-confocal-microscopy/what-is-spinning-disk-confocal-microscopy>
- [27] DOSTÁL, Z. Automatizované procedury pro Koherencí řízený holografický mikroskop. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016, 82 s., Vedoucí prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

- [28] Paddock, S.W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol Biotechnol* 16, 127–149 (2000). <https://doi.org/10.1385/MB:16:2:127>
- [29] MALY, Miroslav; VESELY, Pavel. Scanning confocal microscope. U.S. Patent No 5,760,950, 1998.
- [30] PETRÁŇ, Mojmir MuDr., CSc.; HADRAVSKÝ Milan MuDr., CSc. Plzeň; BENEŠ Jiří MuDr., Ústí nad Labem. Nipkowův kotouč pro mnohonásobné proložené řádkování. Popis vynálezu k autorskému osvědčení č. 253 355, vydáno 01 01 89
- [31] YOKOGAWA [Online; 20.6.2020],
<https://www.yokogawa.com/library/videos/product-overviews/spinning-disk-confocal-csu-the-de-facto-standard-for-live-cell-imaging/>
- [32] ZEISS [Online; 9.9.2019], https://bitesizebio.com/product_article/zeiss-airyscan-a-brave-new-microscopy-world-with-sharper-confocal-resolution/
- [33] AUTOMATIZACE.HW.CZ [Online; 3.2.2020],
<https://automatizace.hw.cz/clanek/2006081301>
- [34] TEXAS INSTRUMENTS; DLP9000 Family of 0.9 WQXGA Type A DMDs, https://www.ti.com/lit/ds/symlink/dlp9000.pdf?ts=1592584646686- &ref_url=https%253A%252F%252Fwww.ti.com%252Fproduct%252FDLP9000
- [35] MOUSER ELECTRONICS [Online; 3.2.2020],
<https://cz.mouser.com/ProductDetail/Texas-Instruments-/DLPLCR9000EVM?qs=VAB4DzKv5wWUqomADb6eVg%3D%3D>
- [36] UNIVERSITY OF OREGON [Online; 3.2.2020],
<http://homework.uoregon.edu/pub/class/155/Canvas/dt2.html>
- [37] VAVŘINOVÁ, J. Koherencí řízený holografický mikroskop s digitální optikou. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.
- [38] EDMUNDOPTICS [Online; 20.9.2019],
<https://www.edmundoptics.com/p/25mm-2x-50mm-length-standard-na-tapered-light-pipe/17717/>
- [39] [Online; 1.10.2019],
https://www.ti.com/lit/wp/dlpa037/dlpa037.pdf?ts=1593296753024- &ref_url=https%253A%252F%252Fwww.google.com%252F
- [40] THORLABS [Online; 21.6.2020],
<https://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=AC254-125-A>
- [41] THORLABS [Online; 21.6.2020],
<https://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=AC254-400-A>

- [42] EDMUNDOPTICS [Online; 21.6.2020],
<https://www.edmundoptics.com/p/40mm-dia-x-450mm-fl-vis-0deg-coated-achromatic-lens-/9624/>
- [43] SUTTER INSTRUMENTS [Online; 3.2.2020],
<https://www.sutter.com/IMAGING/lambdaxl.html>
- [44] DOLAN-JENNER [Online; 3.2.2020],
<https://dolan-jenner.com/products/fiber-lite-dc950-illuminator>
- [45] THORLABS [Online; 3.2.2020], <https://www.thorlabs.de>
- [46] THORLABS [Online; 3.2.2020], <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?-partnumber=BS022>
- [47] THORLABS [Online; 3.2.2020], <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?-partnumber=TTL200-A>
- [48] THORLABS [Online; 20.6.2020], <https://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?-partnumber=FB580-10>
- [49] DFC [Online; 3.2.2020],
<https://www.dspfga.cz/cz/produkty/kamery/prumyslove-kamery/usb-20-barevne/dfk-51au02>
- [50] ANDOR OXFORD INSTRUMENTS [Online; 3.2.2020],
<https://andor.oxinst.com/products/scmos-camera-series/zyla-4-2-scmos#product-information-tabs>
- [51] POLOLU [Online; 15.6.2020], <https://www.pololu.com/product/1208>