



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

# NÁVRH ZOBRAZOVACÍ SESTAVY KOHERENCÍ ŘÍZENÉHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU

DESIGN OF THE IMAGING PART OF THE COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vladislav Dvořák

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Matěj  
Špaček

BRNO 2023



# Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství  
Student: **Vladislav Dvořák**  
Studijní program: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Matěj Špaček**  
Akademický rok: 2022/23

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 bakalářské práce:

## Návrh zobrazovací sestavy koherencí řízeného holografického mikroskopu

### Stručná charakteristika problematiky úkolu:

V laboratoři Ústavu fyzikálního inženýrství na VUT v Brně bude pro potřeby testování nových mikroskopických přístupů a metod postavena otevřená laboratorní verze koherencí řízeného holografického mikroskopu. Pro tento mikroskop je třeba navrhnout jeho zobrazovací část.

### Cíle bakalářské práce:

- 1) Navrhnout teoretický model optické cesty.
- 2) Zvolit vhodné optické komponenty.
- 3) Zobrazovací část mikroskopu sestavit.
- 4) Otestovat funkčnost zobrazovací části mikroskopu.

### Seznam doporučené literatury:

SLABÝ, Tomáš, Pavel KOLMAN, Zbyněk DOSTÁL, Martin ANTOŠ, Martin LOŠŤÁK a Radim CHMELÍK. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. Optics Express [online]. 2013, 21(12) [cit. 2020-10-25]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.21.014747

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

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

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2022/23

V Brně, dne

L. S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.  
ředitel ústavu

---

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



## **Abstrakt**

Výzkumná skupina Experimentální biofotoniky na VUT v Brně se dlouhodobě zabývá rozvojem koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM). Pro potřeby dalšího rozvoje v této oblasti je třeba postavit otevřenou laboratorní verzi tohoto mikroskopu, který zde byl doposud zastoupen pouze v komerčním provedení. Tato práce se věnuje návrhu a sestavení jeho zobrazovací části.

První část práce je věnována obecnému přehledu mikroskopických metod s důrazem na interferenční mikroskopii a na princip fungování CCHM mikroskopu. V druhé části jsou mezi sebou nejprve srovnávány mnou navržené koncepty optického uspořádání. Následně jsou vybrány optické komponenty a experimentálně změřeny jejich neznámé parametry. S využitím naměřených hodnot je provedeno trasování vybraného konceptu a představeno konstrukční řešení. Zobrazovací část mikroskopu byla na základě konstrukčního řešení sestavena a experimentálně ověřena.

## **Summary**

The Experimental Biophotonics Research group at Brno University of Technology has been involved in the development of Coherence controlled holographic microscope (CCHM). For the purposes of further development in this field, it is necessary to build an open laboratory set-up of the microscope, which has only been available in a commercial design. The objective of this thesis is to design and assemble its imaging unit.

The first part of the thesis is dedicated to a general overview of microscopic methods, with an emphasis on interference microscopy and principle of CCHM microscope. In the second part, different optical set-up concepts are discussed and compared. Then, the optical components are selected and the unknown parameters of these components are experimentally measured. With the use of measured parameters, the optical tracing and mechanical design are introduced. The imaging unit has been assembled based on the suggested design and experimentally verified.

## **Klíčová slova**

Koherencí řízený holografický mikroskop, Kvantitativní fázový kontrast, interferenční mikroskopie, návrh mikroskopu

## **Keywords**

Coherence controlled holographic microscope, quantitative phase imaging, interference microscopy, microscope design

DVOŘÁK, V. *Návrh zobrazovací sestavy koherencí řízeného holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2023. 43 s. Vedoucí Ing. Matěj Špaček.



Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Ing. Matěje Špačka a s použitím uvedené literatury a pramenů.

Vladislav Dvořák



Děkuji Ing. Matěji Špačkovi za odborné vedení, cenné rady a pomoc při psaní této práce. Poděkování také patří mé rodině za podporu během studia.

Vladislav Dvořák

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| Úvod  | 3         |
| <b>1 Techniky kontrastu ve světelné mikroskopii</b>   | <b>7</b>  |
| 1.1 Pozorování ve světlém poli                        | 7         |
| 1.2 Pozorování v tmavém poli                          | 8         |
| 1.3 Zerinkeho fázový kontrast                         | 9         |
| 1.4 Normanského diferenciální interferenční kontrast  | 11        |
| 1.5 Kvantitativní fázový kontrast                     | 14        |
| <b>2 Motivace a cíle práce</b>                        | <b>19</b> |
| <b>3 Návrh optického uspořádání</b>                   | <b>21</b> |
| 3.1 Koncepční řešení                                  | 21        |
| 3.1.1 Rovnoběžné uspořádání                           | 22        |
| 3.1.2 Kolmé uspořádání                                | 22        |
| 3.1.3 Kolmé uspořádání II                             | 24        |
| 3.2 Výběr optických komponent                         | 24        |
| 3.3 Trasování   | 26        |
| 3.3.1 Měření ohniskové vzdálenosti tubusových čoček   | 26        |
| 3.3.2 Separace difrakčních řádů                       | 26        |
| 3.3.3 Trasování koncepčních návrhů                    | 28        |
| <b>4 Konstrukční řešení holografického mikroskopu</b> | <b>31</b> |
| 4.1 Podsestava upevnění D zrcátka                     | 31        |
| 4.2 Podsestava pro změnu délky referenční větve       | 32        |
| 4.3 Podsestava upevnění difrakční mřížky              | 32        |
| 4.4 Sestava zobrazovací části CCHM mikroskopu         | 34        |
| <b>5 Testování zobrazovací sestavy mikroskopu</b>     | <b>35</b> |
| Závěr   | 39        |

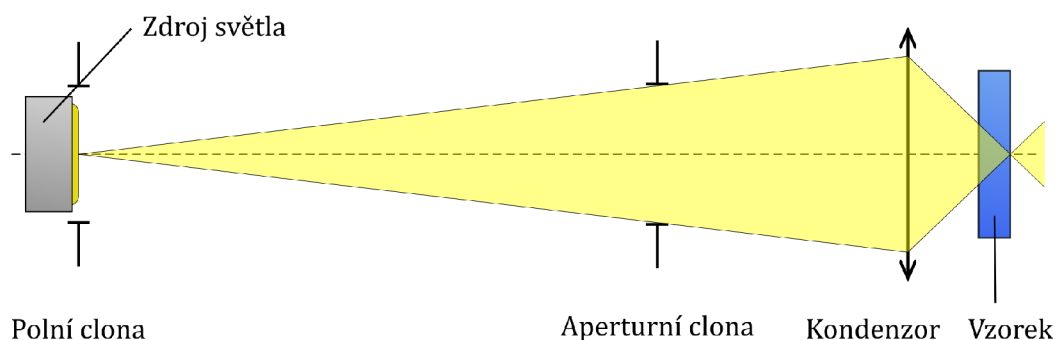


# Úvod

Mnoho významných procesů se odehrává na mikroskopické úrovni, tedy pod limitem rozlišení lidského oka. Pro jejich studium bylo nutné vyvinout technologie, které umožní tyto procesy pozorovat.

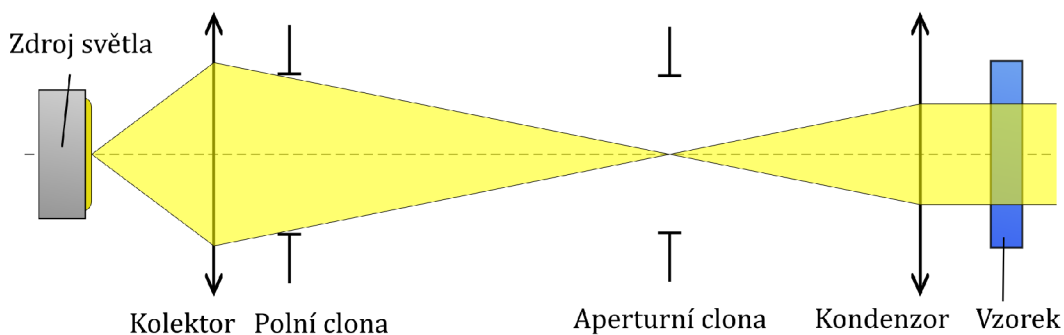
Světelný mikroskop je zařízení určené pro pozorování struktur, které nejsou rozlišitelné pouhým okem. Jako médium pro přenos informací používá viditelné světlo. Mikroskop se skládá ze dvou optických částí. První část se jmenuje osvětlovací a jejím úkolem je rovnoměrně osvětlit vzorek. Rozlišujeme dva základní druhy osvětlení - kritické (také Nelsonovo) a Köhlerovo.

Kritická neboli Nelsonova osvětlovací soustava se skládá ze zdroje světla, kondenzoru, aperturní clony a clony polní. Její schéma je zobrazeno na obrázku 1. Zdroj světla je zde kondenzorem zobrazen přímo do roviny vzorku. Aperturní clonou lze ovlivňovat aperturu osvětlujícího svazku a clonou lze regulovat intenzitu světla. Aby byl vzorek osvětlen rovnoměrně, je vyžadováno použití homogenního zdroje světla. Někdy je také obtížné přesně zaostřit na rovinu vzorku, díky čemuž může vznikat nerovnoměrné či zrnité pozadí [1].



Obrázek 1: Schéma kritického osvětlení

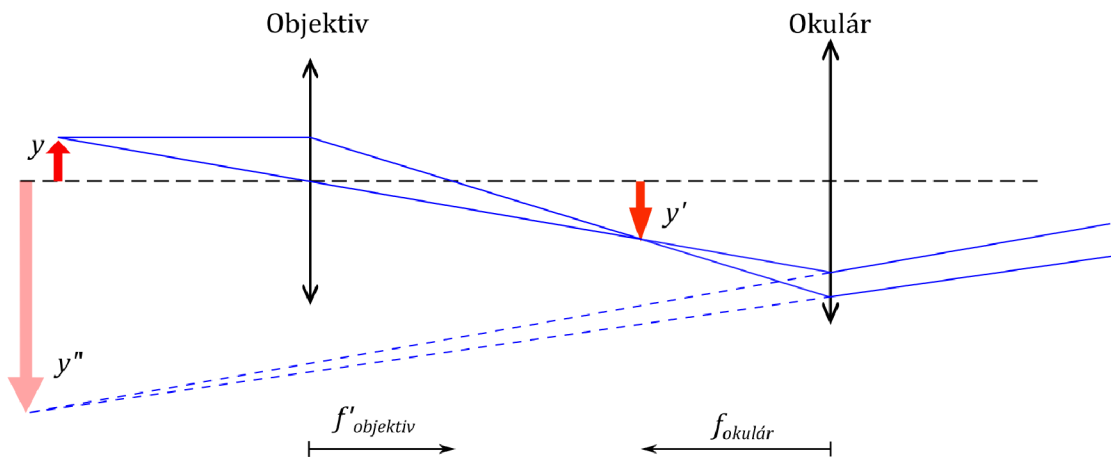
Köhlerovo osvětlení je dnes zdaleka nejpoužívanější. Sestává se ze zdroje světla, kolektoru, kondenzoru, dále z aperturní a polní čočky v uspořádání jako na obrázku 2. Zdroj světla je kolektorem zobrazen do roviny aperturní clony, kde vzniká jeho zvětšený obraz. Aperturní clona určuje numerickou aperturu osvětlujícího svazku, čímž ovlivňuje i rozlišení výsledného obrazu. Pomocí kondenzoru pak vzniká rovinná vlna, která dopadá na vzorek. Vzorek je rovnoměrně nasvícen i v případě použití nehomogenního zdroje světla. [1].



Obrázek 2: Schéma Köhlerova osvětlení

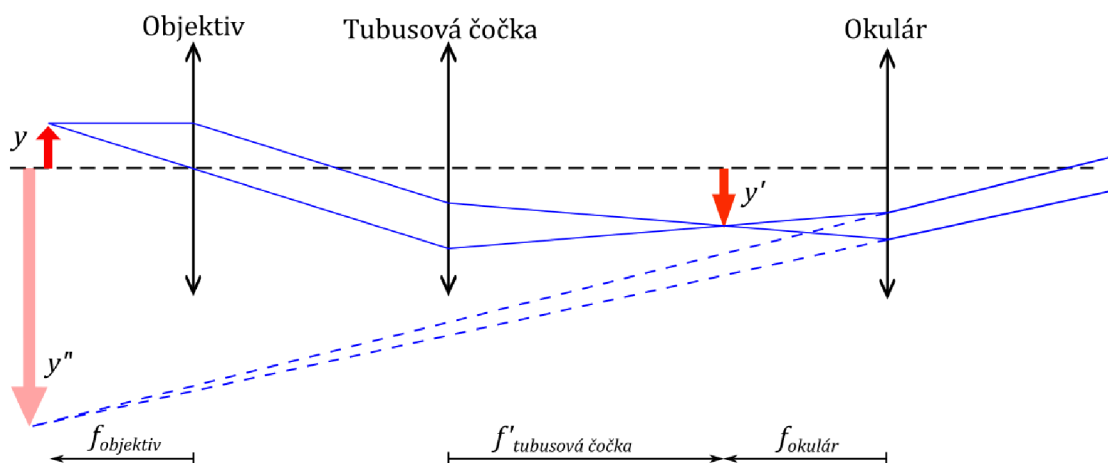


Druhá část světelného mikroskopu se nazývá zobrazovací, skládá se z objektivu a okuláru, případně z objektivu a kamery (obr. 3). Předmět je osvětlen osvětlovačem, objektiv pak tento předmět zobrazí do ohniskové roviny okuláru a vytvoří tak meziobraz, který je reálný, zvětšený a převrácený. Okulár zde funguje jako lupa a daný meziobraz znovu zvětší. Celkový obraz je pak zdánlivý, zvětšený a převrácený [2, 3].



Obrázek 3: Schéma světelného mikroskopu

Moderní světelné mikroskopy mají mírně odlišný design, zobrazený na obrázku 4. Využívá se zde objektivů korigovaných na nekonečnou vzdálenost. Předmět, který je umístěn do předmětové ohniskové roviny objektivu, je zobrazen do nekonečna. Reálný obraz pro okulár se pak vytvoří pomocí tubusové čočky, která jej zfokusuje do své obrazové ohniskové roviny. Toto uspořádání nám umožňuje vložit do oblasti mezi objektivem a tubusovou čočkou, kde jsou světelné paprsky kolimované, další optické komponenty (např. děliče svazku, filtry apod.) [4].



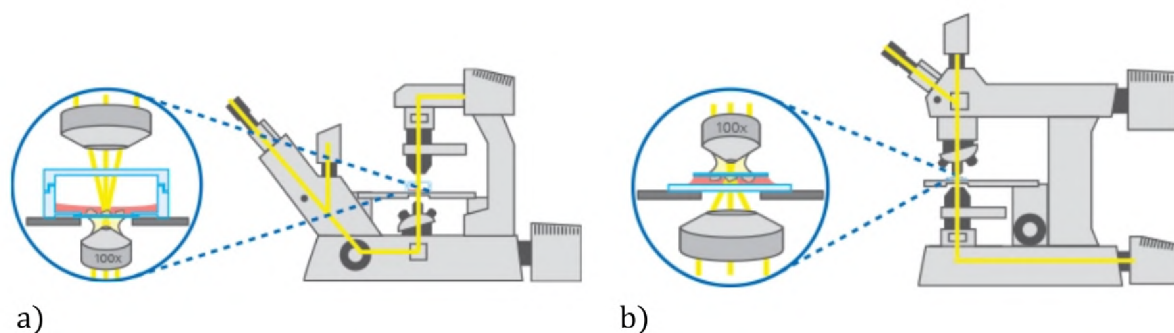
Obrázek 4: Schéma moderní sestavy světelného mikroskopu

Podle umístění osvětlovače lze obecně mikroskopy rozlišovat na reflexní a transmisní [5]. U reflexních mikroskopů se kondenzor nachází na stejné straně vzorku jako objektiv, světlo se tak od vzorku odráží zpět do objektivu (episkopické osvětlení). Reflexní mikroskopie se používá zejména ve vědních oborech, které zkoumají neprůhledné vzorky, například

v metalurgii, ale také u epifluorescenční mikroskopie. V transmisních mikroskopech je osvětlovací soustava umístěna na druhé straně předmětu než objektiv a světlo vzorkem prochází. Transmisní mikroskopy se používají pro pozorování průhledných struktur, jako jsou buňky či tkáně [6].

Podle umístění objektivu vůči vzorku lze dále rozlišovat transmisní mikroskopy vzpřímené a invertované (obrázek 5). U vzpřímených mikroskopů je zdroj světla umístěn pod sledovaným vzorkem, světlo tedy prochází vzorkem směrem nahoru. Objektivy jsou pak umístěny nad vzorkem. Naopak u invertovaných mikroskopů se zdroj světla nachází nad vzorkem, prosvěcujíc vzorek seshora.

Invertované transmisní mikroskopy se používají zejména pro pozorování buněk, které se přirozeně drží na dně pozorovacích komůrek. U invertovaných mikroskopů můžeme použít objektivy s menší pracovní vzdáleností, což vede k lepšímu rozlišení. Vzorek také nemusí být přikrytý krycím sklíčkem, je tedy umožněn přístup shora. Při invertovaném uspořádání se také zamezí kontaminaci vzorku objektivovou čočkou. Zdálo by se, že invertované mikroskopy mají daleko více výhod oproti mikroskopům vzpřímeným. Jsou ovšem konstrukčně náročnější, což odpovídá vyšší ceně, a kladou se zde také vyšší výrobní nároky na dno pozorovací komůrky, přes které je vzorek pozorován [7].



Obrázek 5: Schéma a) invertovaného a b) vzpřímeného mikroskopu. Převzato a upraveno z [7].

V laboratořích Experimentální biofotoniky na VUT v Brně je dlouhodobě vyvíjen Koherenčně řízený holografický mikroskop (CCHM). Jedná se o invertovaný mikroskop v transmisním uspořádání. V současné době je zde zastoupen pouze ve dvou komerčních verzích, známých pod obchodním označením Telight Q-phase [8], které mají uzavřený design, je proto obtížné zasahovat do jejich optického uspořádání. Pro další rozvoj tohoto mikroskopu je proto třeba navrhnout jeho otevřenou laboratorní verzi.

CCHM je interferenční mikroskop, u kterého se při zobrazování uplatňuje kvantitativní fázový kontrast. Díky tomu jsou na jeho konstrukci kladeny speciální nároky. Proto je třeba se nejprve seznámit s jednotlivými druhy metod vytvářejících kontrast, s principem interferenční mikroskopie a s konstrukčním uspořádáním CCHM.



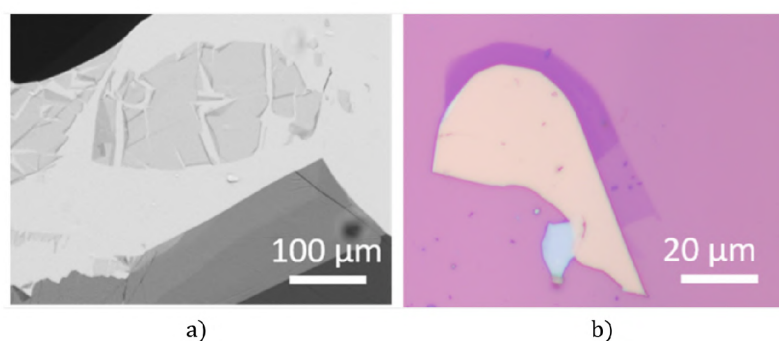
# 1. Techniky kontrastu ve světelné mikroskopii

Světlo je charakterizováno svou amplitudou (a tedy intenzitou), polarizací, frekvencí a fází. Lidské oko je ovšem schopno pozorovat jen změny v intenzitě a rozeznávat jednotlivé frekvence světla [9]. Díky různým metodám lze například kontrast pozorovaného vzorku zvýšit, zviditelnit některé části, nebo dokonce zviditelnit struktury, které se pro lidské oko jeví nekontrastně. Tato část bude věnována nejvýznamnějším z těchto metod. Různé metody kontrastu mohou zvýrazňovat různé charakteristiky. Každá z nich má své výhody a nevýhody, proto je dobré je kombinovat.

## 1.1. Pozorování ve světlém poli

Mikroskopie ve světlém poli (Brightfield microscopy) je nejstarší a nejčastější metoda pozorování. Používá se zejména v transmisní mikroskopii, lze ji ale použít i v mikroskopii reflexní. Kontrast je zde dosažen rozdílnou absorpcí či odrazivostí po ploše vzorku. Při průchodu světla vzorkem může nastat absorpce či změna směru šíření. Světlo je pohlceno či rozptýleno takovým způsobem, že významně odkloněné paprsky neprocházejí pupilou objektivu. Části, kde k těmto jevům výrazně dochází, se na obraze projeví menší intenzitou, a tedy tmavěji.

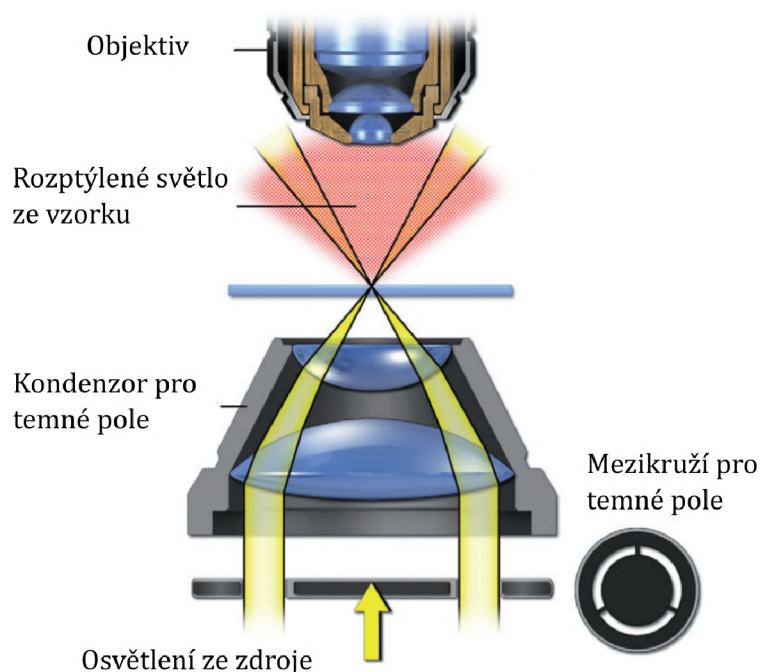
Touto metodou je vhodné pozorovat takzvané amplitudové objekty, tedy objekty, které výrazně mění amplitudu dopadajícího světla a vytváří tak výrazný kontrast mezi sledovaným vzorkem a pozadím. Průhledné objekty, jako například buňky, amplitudu výrazně nemění, proto se pro zvýšení kontrastu obarvují. Barviva ale mohou mít na pozorované objekty toxické účinky. Tato metoda tedy není pro pozorování živých buněk vhodná, naopak se často využívá při zkoumání neprůhledných struktur [10, 11].



Obrázek 1.1: Zobrazení pomocí metody světlého pole. Obrázek a) pořízen transmisním mikroskopem. Zobrazeny plátky grafitu (tmavě šedá) a grafénu (světle šedá). Obrázek b) pořízen reflexním mikroskopem. Zobrazeny plátky grafénu a grafitu na povrchu oxidu křemičitého. Převzato a upraveno z [11].

## 1.2. Pozorování v tmavém poli

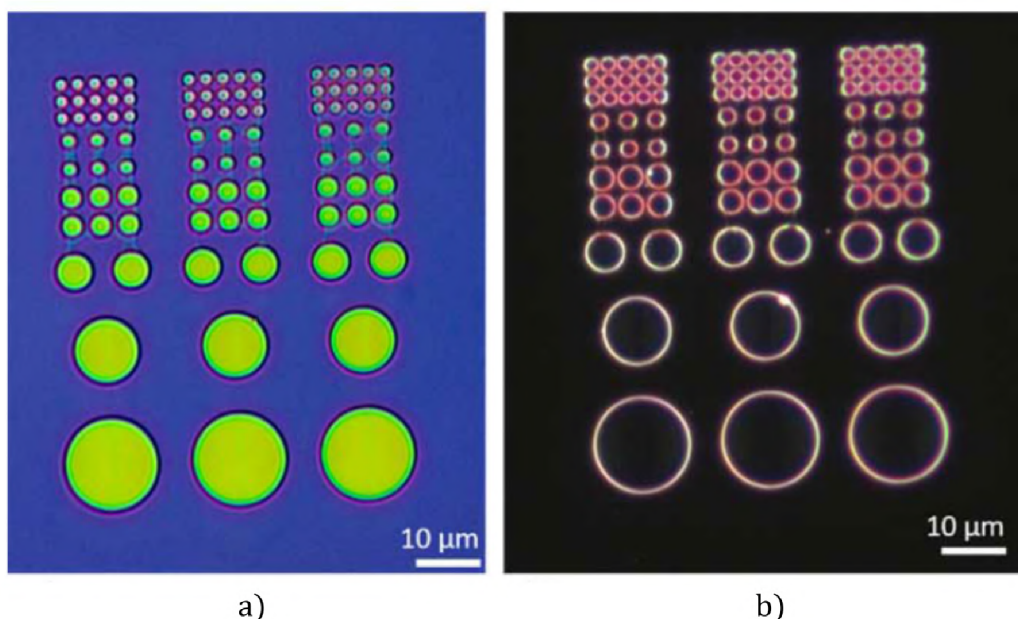
Při pozorování v tmavém poli (Darkfield microscopy) je objekt zobrazen pomocí světla, které se na vzorku rozptyluje. Konstrukční řešení mikroskopu pro tuto metodu pozorování (obr. 1.2) se od mikroskopu pro světlé pole liší vložení tzv. kondenzorové masky ve tvaru mezikruží do ohniskové roviny kondenzoru v Köhlerově osvětlovací soustavě. Světlo, které při průchodu výrazně nezmění svůj směr, je soustavou blokováno. Při pozorování pak lze vidět bílé útvary na černém poli [12, 10].



Obrázek 1.2: Schéma části mikroskopu pro metodu pozorování v tmavém poli. Převzato a upraveno z [10]

Touto metodou lze dosáhnout většího kontrastu. Její nevýhodou ale je, že k zobrazování je využita malá část intenzity světla ze zdroje, je proto nutné používat výkonnější zdroje světla. Nejčastěji se tato metoda používá k detekci hran a obrysů, například při pozorování povrchů objektů či biologických struktur [12].





Obrázek 1.3: Polymerní mikrostruktura zobrazena ve světlém (a) a v tmavém (b) poli. Převzato a upraveno z [11].

### 1.3. Zerinkeho fázový kontrast

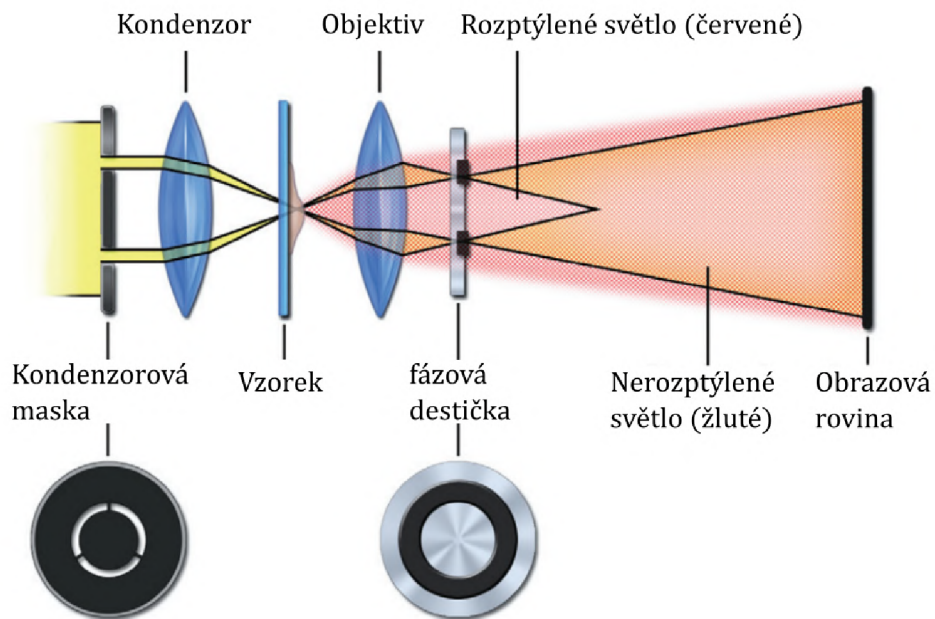
Mnoho vzorků, které nepohlcují světlo, se jeví jako průhledné. Při průchodu světla takovým vzorkem se nemění jeho intenzita, vlivem rozdílného indexu lomu vzorku oproti okolnímu prostředí se však posouvá jeho fáze. Takový vzorek se nazývá fázový objekt. Změnu fáze ovšem lidské oko nedokáže zaznamenat. Metoda fázového kontrastu dokáže převést fázové změny na změny amplitudové, a tudíž dokáže fázový posun zviditelnit.

Mikroskop pro pozorování pomocí fázového kontrastu obsahuje oproti mikroskopu pro pozorování ve světlém poli dvě komponenty, které můžete vidět na obrázku 1.4. První z nich je maska ve tvaru mezikruží, která je umístěna do ohniskové roviny kondenzoru, stejně jako při pozorování v tmavém poli. Pomocí ní se v zadní ohniskové rovině objektivu vytvoří ostrý obraz ve tvaru prstence. Další komponentou je fázová destička, která je umístěna právě do zadní ohniskové roviny objektivu.

Světlo putuje od zdroje přes osvětlovací soustavu obsahující masku až ke vzorku. Při průchodu vzorkem se světlo rozdělí na dvě vlny. První vlna není vzorkem nijak ovlivněna a pokračuje v původním směru. Druhá vlna se naopak vlivem vzorku rozptýlí do všech směrů a dochází u ní také k posunu její fáze oproti nezměněné vlně. U biologických vzorků se tento rozdíl fáze pohybuje kolem  $\lambda/4$ , kde  $\lambda$  je vlnová délka použitého světla [10]. Úkolem fázové destičky je pak posunout fázi nezměněného světla. Podle směru posuvu fáze pak můžeme rozlišovat pozitivní a negativní fázový kontrast.

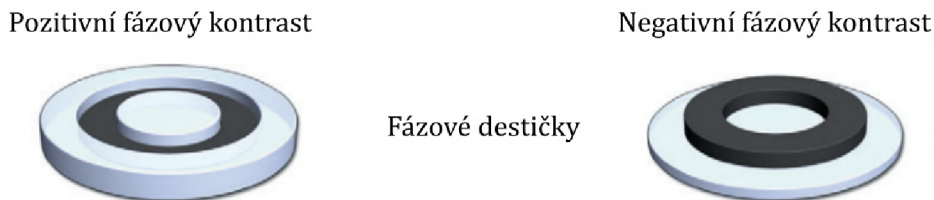
Pozitivní fázový kontrast nastává v situaci, kdy fázová destička posouvá fázi nezměněného světla  $+\lambda/4$ . To lze docílit tím, že mezikruží, kudy tato vlna prochází, bude mít oproti zbytku destičky menší tloušťku. Výsledný fázový rozdíl obou vln se pak pohybuje kolem  $\lambda/2$ . Na obrazové rovině tak nastává destruktivní interference, díky níž se objekty

### 1.3. ZERINKEHO FÁZOVÝ KONTRAST



Obrázek 1.4: Schéma mikroskopu pro fázový kontrast. Převzato a upraveno z [10].

s větším indexem lomu, než je index lomu okolí, zobrazí tmavěji. Při negativním fázovém kontrastu má mezikruží pro nezměněnou vlnu větší tloušťku. Fázová destička tak způsobuje posun fáze o velikosti  $-\lambda/4$  a na obrazové rovině tak nastává konstruktivní interference. Objekty s vyšším indexem lomu se pak zobrazí oproti svému okolí světleji [10].



Obrázek 1.5: Fázové destičky pro metodu pozitivního a negativního fázového kontrastu. Převzato a upraveno z [10].

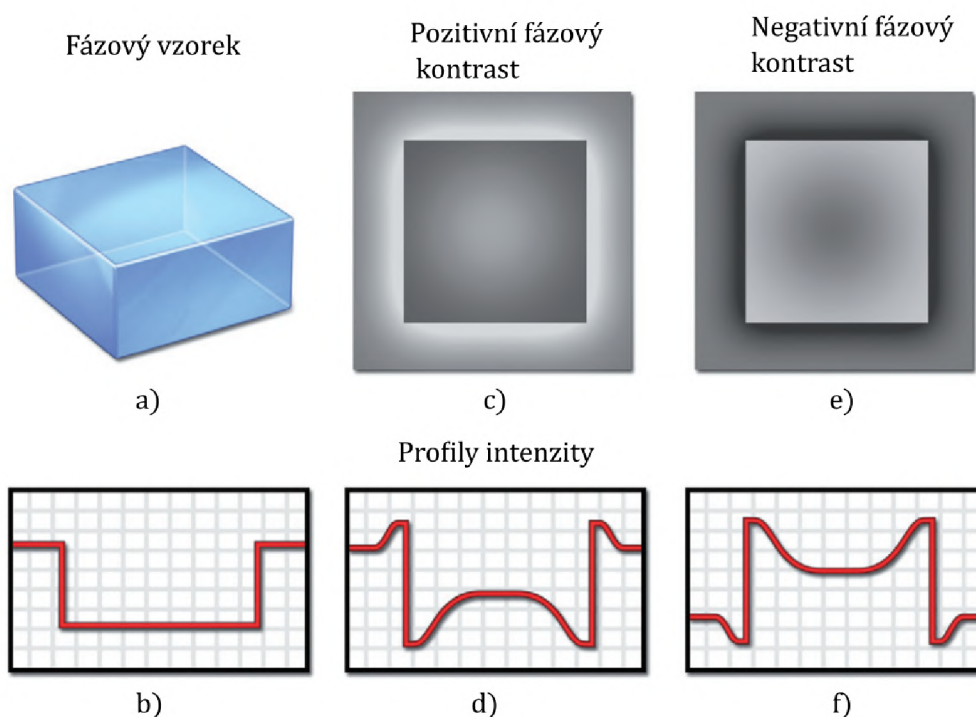
Fázový kontrast obecně zobrazuje změny v optické dráze světla prošlého vzorkem, přičemž optická dráha je závislá na tloušťce a na indexu lomu vzorku. Obraz tak lze interpretovat jako mapu optické hustoty vzorku. Mohou se zde ale také vyskytnout nežádoucí efekty, které nesouvisí se změnami v optické dráze. Tyto jevy se nazývají artefakty a řadí se sem halo efekt a shade-off efekt.

Halo efekt vzniká tím, že část rozptýleného světla prochází mezikružím určeným pro nerozptýlenou vlnu. Šířka mezikruží je totiž větší než skutečná velikost prstence, které nezměněná vlna vytvoří. Na obrazovou rovinu tak dopadne i rozptýlené světlo, které má oproti nerozptýlenému světlu fázový posun  $\pi/2$  a není tedy ovlivněno destruktivní interferencí. Toto vede k lokálnímu obrácení kontrastu. Na obraze se pak kolem velkých

## 1. TECHNIKY KONTRASTU VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII

objektů tvoří světlé okraje pro pozitivní fázový kontrast nebo tmavé okraje pro negativní fázový kontrast [13].

Dalším artefaktem, který můžeme pozorovat, je tzv. shade-off efekt neboli stínový efekt, který nastává u velkých a planárních objektů. Rozptýlená vlna, která prochází středem takového vzorku, se výrazně neodchýlí od původního směru, a vstupuje tak do mezikruží fázové destičky. Rozdíl fáze mezi tímto světlem a nerozptýleným světlem je  $\pi/2$ , nedochází tak k interferenci. Díky tomuto efektu pak lze pozorovat postupnou změnu profilu intenzity směrem od kraje ke středu objektu [10]. Na Obrázku 1.6 lze vidět způsob, jak tato metoda zobrazuje fázový objekt ve tvaru krychle.



Obrázek 1.6: Halo a Shade-off efekt na fázovém objektu. a) fázový vzorek b) průběh intenzity bez artefaktů c) zobrazení objektu pomocí pozitivního fázového kontrastu d) průběh intenzity pro pozitivní fázový kontrast e) zobrazení objektu pomocí negativního fázového kontrastu f) průběh intenzity pro negativní fázový kontrast. Převzato a upraveno z [10].

I přes obtížnější interpretaci obrazu je metoda fázového kontrastu výbornou metodou pro zobrazování fázových objektů. Navíc díky ní lze pozorovat i živé buňky, které se nemusí nijak upravovat.

### 1.4. Normanského diferenciální interferenční kontrast

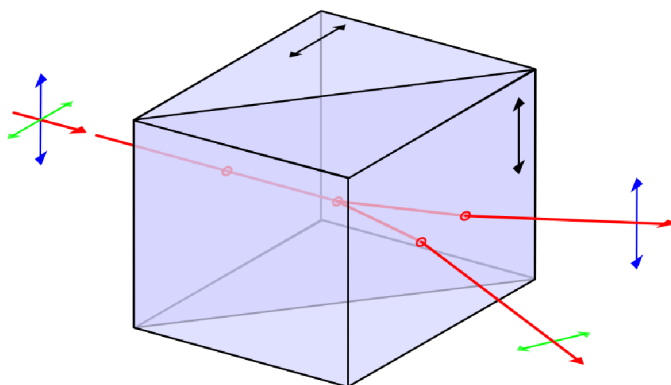
Další metoda, která se používá k zobrazování fázových objektů, se nazývá Diferenciální interferenční kontrast. Tuto metodu lze najít pod zkratkou DIC , která vznikla z jejího



## 1.4. NORMANSKÉHO DIFERENCIÁLNÍ INTERFERENČNÍ KONTRAST

anglického názvu - Differential interference contrast. Také se lze setkat s označením Normanského metoda, podle jejího vynálezce jménem Georges Normanski [14].

Pro pozorování touto metodou je nutné do systému vložit dva Wollastonovy hranoly a dva polarizátory. Wollastonův hranol je druh děliče svazků, vytvořený z dvou klínových desek z dvojlomného křemene. Optické osy obou desek jsou kolmé jak na sebe, tak i na směr šíření světla. Jestliže na tento hranol dopadá lineárně polarizované světlo, jak vidíme na obrázku 1.7, hranol jej rozdělí na dvě vlny - tzv. řádnou (ordinary, O) a mimořádnou (extraordinary, E), které mají vzájemně kolmé polarizace.



Obrázek 1.7: Wollastonův hranol. Převzato z [15].

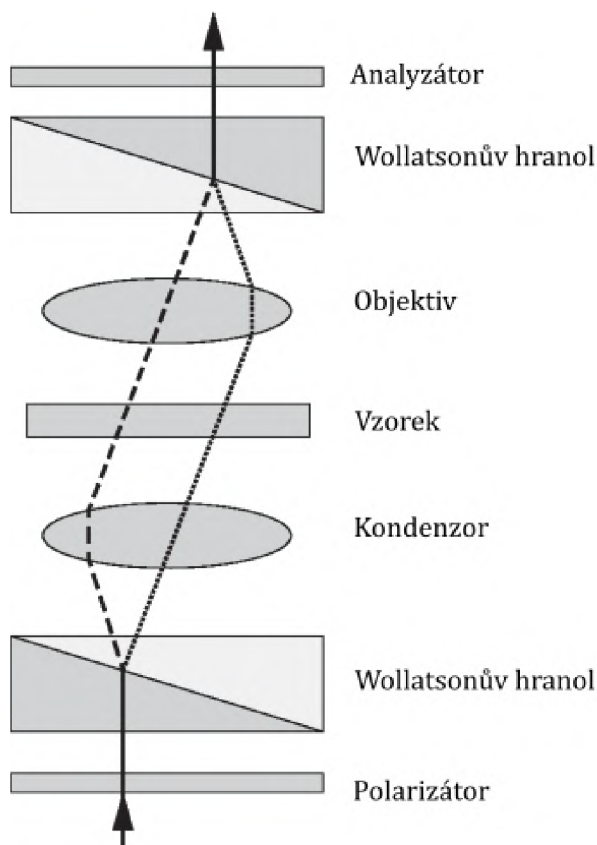
Schéma konstrukčního řešení mikroskopu pro metodu DIC je znázorněna na obrázku 1.8. Světlo nejprve prochází přes polarizátor, který vytvoří lineární polarizaci. Dále prochází přes Wollastonův hranol, který, jak bylo popsáno dříve, vytvoří řádnou a mimořádnou vlnu. Tyto vlny dále pokračují v mírně odlišných směrech až na kondenzor. Ten svazky zafokusuje na nekonečnou vzdálenost, směr těchto vln je pak paralelní. Vzdálenost svazků se nazývá "shear" neboli smyk a její velikost se pohybuje pod rozlišovací schopností objektivu [10].

Při průchodu vzorkem dojde ke změně optických vzdáleností svazků vlivem rozdílných indexů lomu a tloušťce vzorku. Svazky dále putují přes objektiv, který je zfokusuje na druhý Wollastonův hranol, kde spolu rekombinují. Pokud je rozdíl jejich fází nulový, vytvoří se spojením obou vln světlo s lineární polarizací, které je dále blokováno druhým polarizátorem, tzv. analyzátozem. Jestliže je ale vlivem vzorku rozdíl fází nenulový, vzniklé světlo má eliptickou polarizaci, a tak jeho část projde analyzátozem až na detektor.

Je důležité si všimnout, že se zde nevyskytuje žádná referenční větev, metoda zde porovnává dva blízké svazky, které spolu interferují. Nezobrazuje proto optickou dráhu, ale její změnu, proto název Diferenciální interferenční kontrast.

Tato metoda se vyznačuje vysokým rozlišením. Obraz se jeví, jako by byl objekt nasvícen z boku, a je také odstraněn halo efekt. Interpretace obrazu ale může být trochu složitější. Efekt, který se na fotce jeví jako stín, indikuje změnu optické dráhy, která nemusí být způsobena jen změnou tloušťky vzorku. Efekt se také vytváří jinak pro objekty s nižším a s vyšším indexem lomu, než jeho okolí. Například husté jádro buňky, které má vyšší

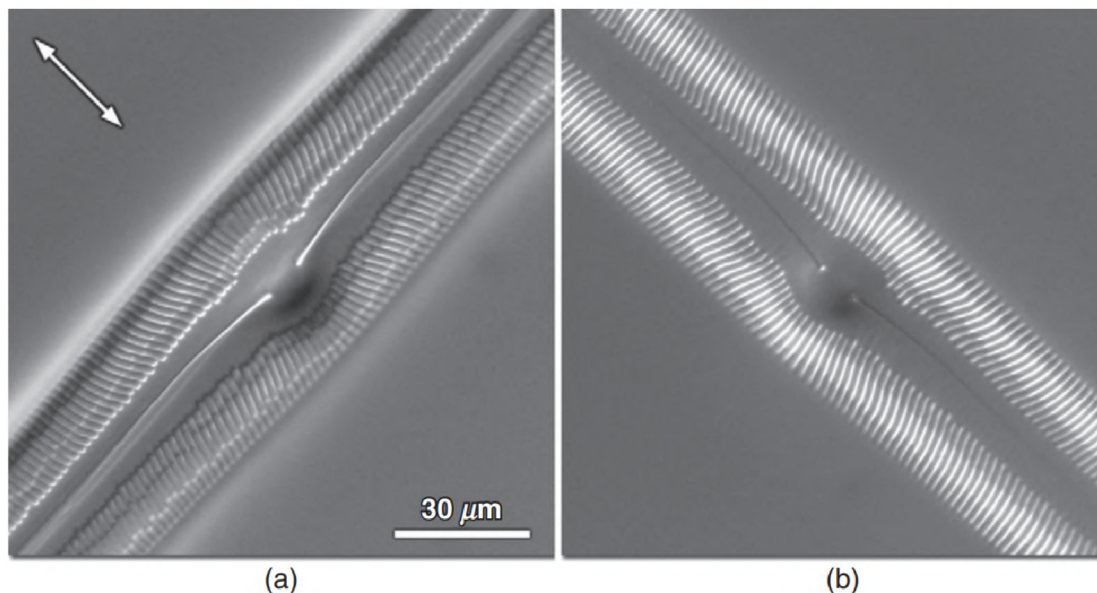
## 1. TECHNIKY KONTRASTU VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII



Obrázek 1.8: Schéma DIC mikroskopu. Převzato a upraveno z [16]

index lomu než okolí, se zobrazí jako vyvýšené, na rozdíl pro lipidové kapičky s nižším indexem lomu, pro které se efekt stínu zobrazí opačně a vznikne tak dojem propadliny. Další faktor, který ovlivňuje tvoření stínového efektu, je směr osy smyku, který je daný polohou Wollastonových hranolů. Kontrast je pak nejvyšší právě ve směru osy smyku, jak můžeme vidět na obrázku 1.9. Kvůli těmto důvodům není tato metoda vhodná na kvantitativní určování tloušťky vzorku [10, 14].

## 1.5. KVANTITATIVNÍ FÁZOVÝ KONTRAST



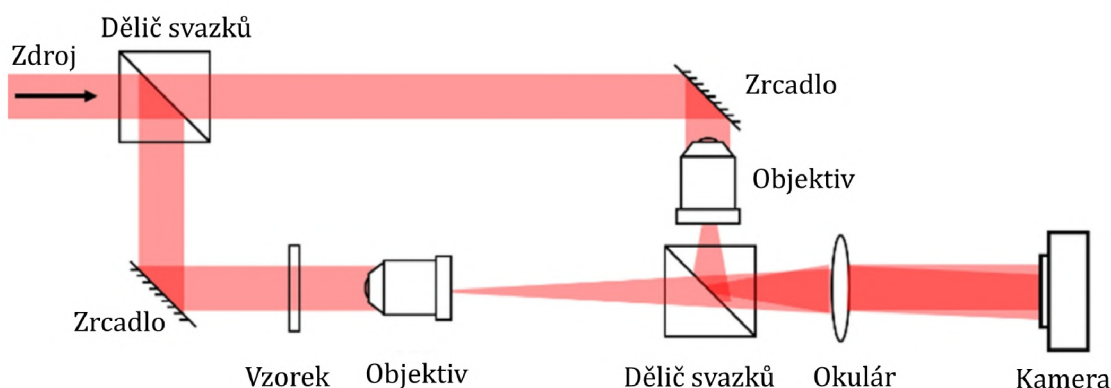
Obrázek 1.9: Zobrazení schránky rozsivky. Šipka v levém horním rohu na obrázku (a) udává směr smyku, který je stejný i pro obrázek (b). Na obrázku (a) lze vidět mnohem více detailů, a to kvůli vhodnému natočení vzorku. Převzato z [10].

### 1.5. Kvantitativní fázový kontrast

Mikroskopy, které umožňují pozorovat kvantitativní fázový kontrast se nazývají interferenční mikroskopy. Základním princem kvantitativního fázového kontrastu je interference dvou vln - vlny, která prošla vzorkem, s vlnou referenční. Obě tyto vlny musí být vzájemně koherentní, jedině tak dojde ke konstruktivní interferenci. Schéma jedné z mnoha variací mikroskopu pro metodu kvantitativního fázového kontrastu je zobrazeno na obrázku 1.10. Světlo putující ze zdroje se pomocí děliče rozdělí na dva svazky. Větev, která obsahuje pozorovaný vzorek, se nazývá předměťová, a větev, kde vzorek není, se nazývá referenční. Vlnoplocha světla, která prochází předměťovou větví, je pak vzorkem pozměněna vlivem rozdílného indexu lomu a tloušťky vzorku. Oba svazky pak putují přes dělič svazku, kde se spojí a na detektoru spolu interferují. Na detektoru pak vznikne interferenční obrazec, který obsahuje informaci jak o amplitudě výsledné vlny, tak i o její fázi. Díky tomu, že jsou větve kompletně oddělené, zde nedochází ke vzniku halo efektu [17, 8].

Podle úhlu, který spolu při rekombinaci svírají předměťový a referenční svazek, lze rozlišovat dvě základní skupiny mikroskopů pro metodu kvantitativního fázového kontrastu. Je-li úhel mezi svazky nulový, mluvíme o in-line interferenční mikroskopii. Výhodou tohoto uspořádání je možnost použít nízkokoherentní světlo. Díky tomu není obraz zatížen koherenčním šumem a parazitními interferencemi. Pro úplnou rekonstrukci fázového obrazu je ale nutno použít více snímků, což dělá toto uspořádání nevhodné pro pozorování dynamických jevů.

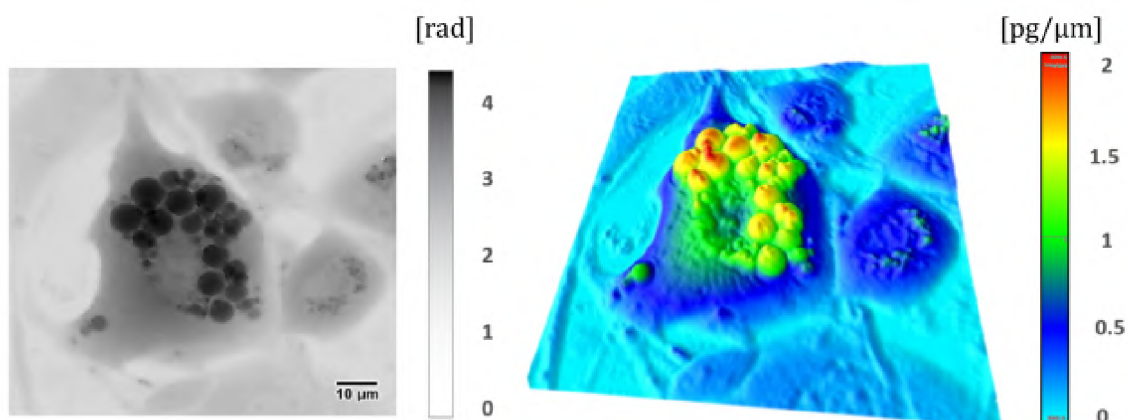
Pokud svazky svírají nenulový úhel, jedná se o mimoosové neboli off-axis uspořádání. Mikroskopy s tímto uspořádáním se také označují jako digitální holografické mikroskopy.



Obrázek 1.10: Konfigurace interferenčního mikroskopu Mach-Zehnderova typu. Převzato a upraveno z [18].

Kompletní rekonstrukci obrazu lze provést z jednoho snímku, off-axis mikroskopy jsou proto vhodnější pro pozorování dynamických jevů. Jejich nevýhodou je, že nejsou achromatické, proto vyžadují koherentní zdroj osvětlení. Důsledkem toho má toto uspořádání oproti uspořádání osovému nižší příčné rozlišení a na obraze se také vyskytuje koherenční šum [19].

Dříve popsané metody pro pozorování fázových objektů jsou efektivní v jejich zobrazování, nedokáží ale tyto objekty přesně kvantitativně měřit. U Zernikeho metody se objevují artefakty - halo a shade-off efekt, díky kterým vzorek prakticky nejde kvantitativně popsat. DIC metoda tento popis umožňuje, musí se ale použít složité techniky pro zpracování obrazu. [12] Kvantitativní fázový kontrast dokáže kvantitativně popsat změnu fáze světla prošlého vzorkem, který se přitom nemusí obarvovat. Metoda je proto obzvláště vhodná pro pozorování živých buněk bez vlivu toxických efektů barviv. Fázový posuv je navíc přímo úměrný množství suché hmoty, lze tedy vzorky opticky vážit nebo sledovat změny hustoty vnitrobuněčné hmoty, jak je vidět na obrázku 1.11 [12, 20].



Obrázek 1.11: Kvantitativní fázový obraz embryonálních kmenových buněk (vlevo) a graf rozložení její suché buněčné hmoty (vpravo). Převzato a upraveno z [20].



## 1.5. KVANTITATIVNÍ FÁZOVÝ KONTRAST

CCHM mikroskop kombinuje výhody in-line a off-axis uspořádání, aniž by byl zatížen jejich nevýhodami. Jedná se o princip nekoherentní off-axis holografie s využitím difrakční mřížky pro zajištění achromaticity interferometru. Umožňuje tak pozorovat dynamické děje živých buněk při zachování vysokého rozlišení. Vhodným nastavením míry koherence osvětlení lze upravit vlastnosti zobrazení podle typu pozorovaného vzorku - odtud plyne jeho označení Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM z anglického Coherence-Controlled Holographic Microscope). Nevýhodou tohoto mikroskopu s nízkokoherentním zdrojem světla je jeho vysoká citlivost na rozdíl optických drah předmětové a referenční větve [19].

Schéma poslední generace CCHM mikroskopu je zobrazena na obrázku 1.12. Je zde využito Köhlerova osvětlení, kdy zdroj světla, který může být prostorově i časově nekoherentní, je kolektorem L zobrazen do přední ohniskové roviny kondenzorů  $C_1$ , resp.  $C_2$ . Za kolektorem L se nachází dělič svazku BS1, kterým je fokusovaný svazek rozdělen do dvou větví - předmětové a referenční. Kondenzory  $C_1$  a  $C_2$  v těchto větvích pak obrazy zdroje zobrazí do nekonečna a rovnoměrně osvětlí předmětovou rovinu vzorku SP respektive referenční rovinu R.

Rovina vzorku SP1 je objektivem  $O_1$  zobrazena do nekonečna a následně je tubusovou čočkou TL1 zobrazena do roviny zrcadla  $M_2$ . Po odrazu je následně přes dělič svazku BS<sub>2</sub> a výstupní objektiv OL<sub>1</sub> zobrazena do roviny detektoru OP. Nevýhodou použití každého děliče svazku BS je ztráta 50% intenzity světla. Referenční rovina je pomocí mikroskopového objektivu  $O_2$  a tubusové čočky TL<sub>2</sub> zobrazena kolmo do roviny difrakční mřížky DG. Odtud je odkloněn do směru +1. řádu pod úhlem  $\alpha$ , pro který platí vztah:

$$\sin \alpha = f_{DG} \cdot \lambda, \quad (1.1)$$

kde  $f_{DG}$  je prostorová frekvence vrypů na difrakční mřížce a  $\lambda$  je vlnová délka světla. Použití +1. řádu pro zajištění achromaticity mikroskopu vyplývá z výpočtů podle Leitha [21]. Ze vztahu 1.1 vyplývá, že dojde k disperzi světla. Často se zde používá blazovaná difrakční mřížka, tedy mřížka speciálně navržená tak, že maximum intenzity odraženého světla se nachází v jiném než nultém řádu [22]. Světlo pak pokračuje přes výstupní objektiv OL<sub>2</sub> a dopadá na rovinu detektoru OP pod úhlem  $\beta$ , jehož velikost je dáva vztahem:

$$\beta = \frac{\alpha}{m_{OL}}, \quad (1.2)$$

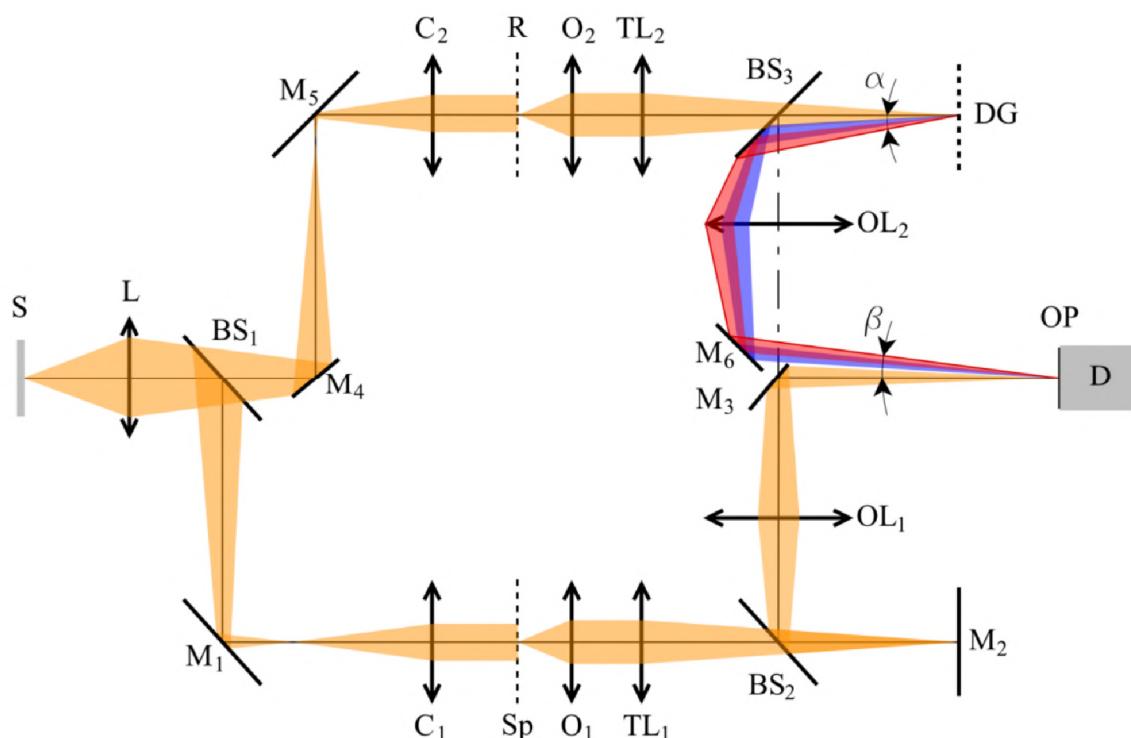
kde  $m_{OL}$  je zvětšení výstupního objektivu [23].

## 1. TECHNIKY KONTRASTU VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII

Na detektoru pak interferencí nultého řádu z předmětového svazku a prvního řádu z referenčního svazku vzniká interferenční obrazec. Výsledná struktura je tvořena rovnoběžnými proužky s tzv. nosnou frekvencí  $f_c$ , pro kterou platí:

$$f_c = \frac{f_{DG}}{m_{OL}}. \quad (1.3)$$

Frekvence  $f_c$  je stejná pro všechny vlnové délky, proto můžeme tento mikroskop považovat za achromatický. Po vložení vzorku do roviny vzorku Sp pak vzniká na detektoru interferenční obrazec s nosnou prostorovou frekvencí  $f_c$ , z kterého se následným matematickým zpracováním získá výsledný obraz [23]. Z principu fungování CCHM mikroskopu vyplývají požadavky na jeho konstrukční řešení.



Obrázek 1.12: Schéma CCHM mikroskopu. S - plošný polychromatický zdroj světla, L - kolektor, BS - dělič svazku, M - zrcadlo, C - kondenzor, Sp - rovina pozorovaného vzorku, R - rovina referenčního vzorku, O - mikroskopové objektivy, TL - tubusové čočky, DG - difrakční mřížka, OL - výstupní objektivy, OP - výstupní rovina, D - detektor. Převzato z [19].



## 2. Motivace a cíle práce

Pro testování nových zobrazovacích metod je třeba sestavit otevřenou laboratorní verzi CCHM mikroskopu. Tato práce se bude zabývat návrhem a sestavením jeho zobrazovací části. Pro snadné testování nových technik je nutné, aby sestava mikroskopu byla snadno přístupná a dostatečně modulární tak, aby bylo možné do ní vkládat nové optické komponenty, případně celou sestavu různě modifikovat. Jak plyne z předchozí části, je nutné dbát zejména na to, aby byla dodržena podmínka stejné optické dráhy v obou větvích pro zajištění vzájemné koherence obou svazků. Pro možnost snadného nastavení mikroskopu je proto nutné počítat s mechanismem umožňujícím vyrovnání rozdílu optických drah obou větví. Dále je vhodné uložit jednotlivé optické komponenty do centrážních mechanismů pro snadné sesazení obrazu. K úspěšnému splnění tohoto úkolu je třeba dosáhnout těchto dílčích cílů:

- Navrhnout teoretický model optické cesty.
- Zvolit vhodné optické komponenty.
- Zobrazovací část mikroskopu sestavit.
- Otestovat funkčnost zobrazovací části mikroskopu.





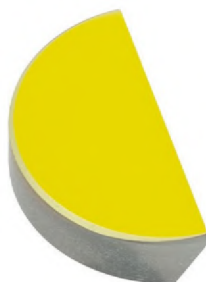
## 3. Návrh optického uspořádání

V rámci návrhu optického uspořádání jsem nejprve navrhl tři koncepční řešení, která jsou v této části práce představena a porovnána. Pro koncepty byly následně zvoleny vhodné optické komponenty a na základě provedeného optického trasování byl zvolen nejvhodnější koncept, který byl v další části rozpracován do konstrukčního řešení.

### 3.1. Koncepční řešení

V navrhovaných konceptech byl oproti stávajícím verzím CCHM mikroskopu dělič svazku pro rekombinaci nahrazen zrcátkem ve tvaru D (dále označováno jako D zrcátko). D zrcátko je rovinné zrcadlo ve tvaru kruhové výseče se středovým úhlem  $180^\circ$  (obrázek 3.1). Jeho použití by mělo umožnit snadnou separaci 1. difrakčního řádu v referenční větvi, také by nedošlo ke ztrátě 50% z intenzity světla, což je nevýhoda při použití děliče svazku v současných řešeních.

Využití D zrcátka dosud nebylo testováno, a není proto jisté, zda bude po konstrukční stránce proveditelné. Bude tedy třeba rekombinaci svazku experimentálně prověřit. V případě nefunkčnosti tohoto řešení lze nahradit v konceptech D zrcátko děličem svazku a prostorovým filtrem.



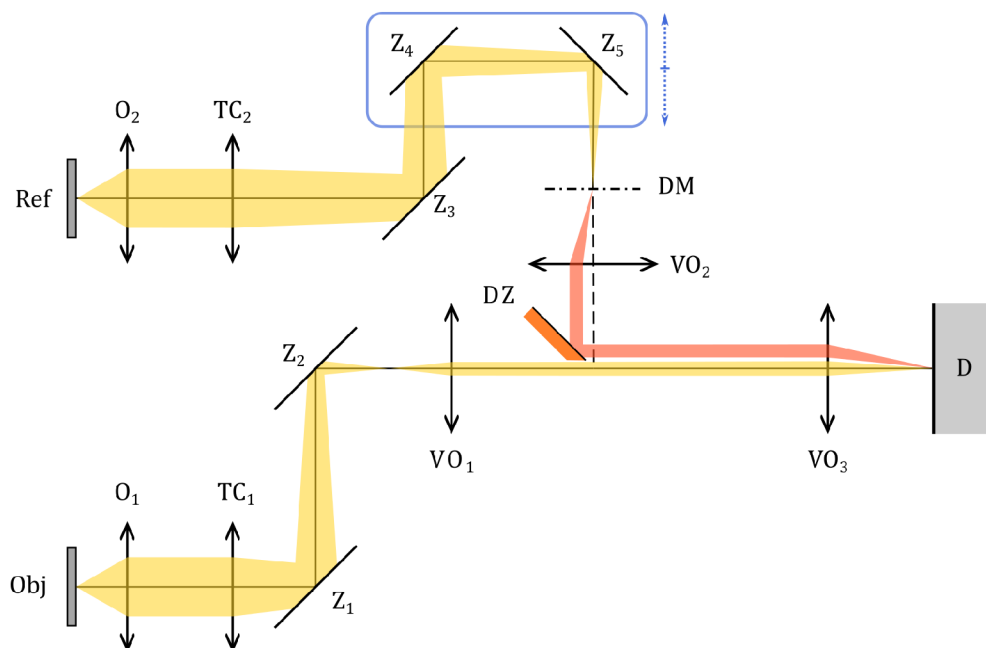
Obrázek 3.1: Obrázek D zrcátka. Převzato a upraveno z [24]

### 3.1. KONCEPČNÍ ŘEŠENÍ

#### 3.1.1. Rovnoběžné uspořádání

První koncepční uspořádání, nazvané jako rovnoběžné, je zobrazeno na obr. 3.2. V každé větvi je užito sudého počtu zrcadel. Umístění zrcadel  $Z_4$  a  $Z_5$  v referenční větvi je navrženo tak, aby jimi bylo možné pohybovat. Tím pádem je možné měnit délku referenční větve, a dosáhnout tak nulového rozdílu optické dráhy mezi touto a předmětovou větví.

Oproti schématu zobrazeném na obrázku 1.12 je předpokládáno využití transmisní difrakční mřížky DM, která vyhne světlo do směru +1. maxima. Umožní tak vložení D zrcátka do oblasti rekombinace svazků takovým způsobem, aby D zrcátko odrazilo světlo z +1. difrakčního řádu referenční větve, ale aby zároveň bylo umožněno světlu z předmětové větve projít.



Obrázek 3.2: Schéma rovnoběžného upořádání. Ref - referenční větev, Obj - předmětová větev, O - objektiv, TC - tubusová čočka, Z - zrcadla, VO - výstupní objektivy, DZ - D zrcátko, DM - difrakční mřížka, D - Detektor

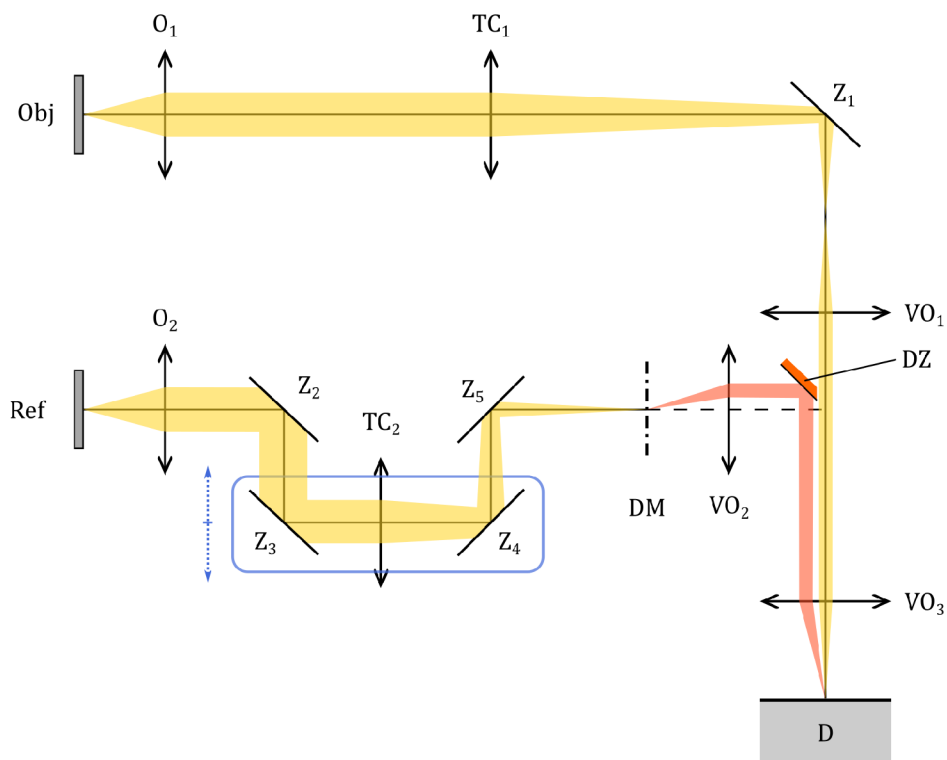
#### 3.1.2. Kolmé uspořádání

V druhém návrhu, zobrazeném na obrázku 3.3, je osa svazku dopadajícího na detektor kolmá na osy svazků, vycházejících z roviny vzorku, resp. referenční roviny. Kvůli této změně bylo nutné zaměnit předmětovou a referenční větev. V předmětové větvi je uloženo jedno zrcadlo  $Z_1$ , referenční větev pak obsahuje čtyři zrcadla a D zrcadlo. Zrcadla  $Z_3$  a  $Z_4$ , která umožňují změnu délky optické dráhy, byla opět umístěna do referenční větve a tubusová čočka  $TC_2$  byla umístěna mezi ně.

Nevýhoda tohoto designu spočívá v tom, že budou-li zrcadla  $Z_3$  a  $Z_4$  uložena na posuvu, který se bude pohybovat vůči zbytku sestavy, s každou změnou jejich polohy se změní také vzdálenost mezi tubusovou čočkou  $TC_2$  a difrakční mřížkou DM. Tím pádem dojde

### 3. NÁVRH OPTICKÉHO USPOŘÁDÁNÍ

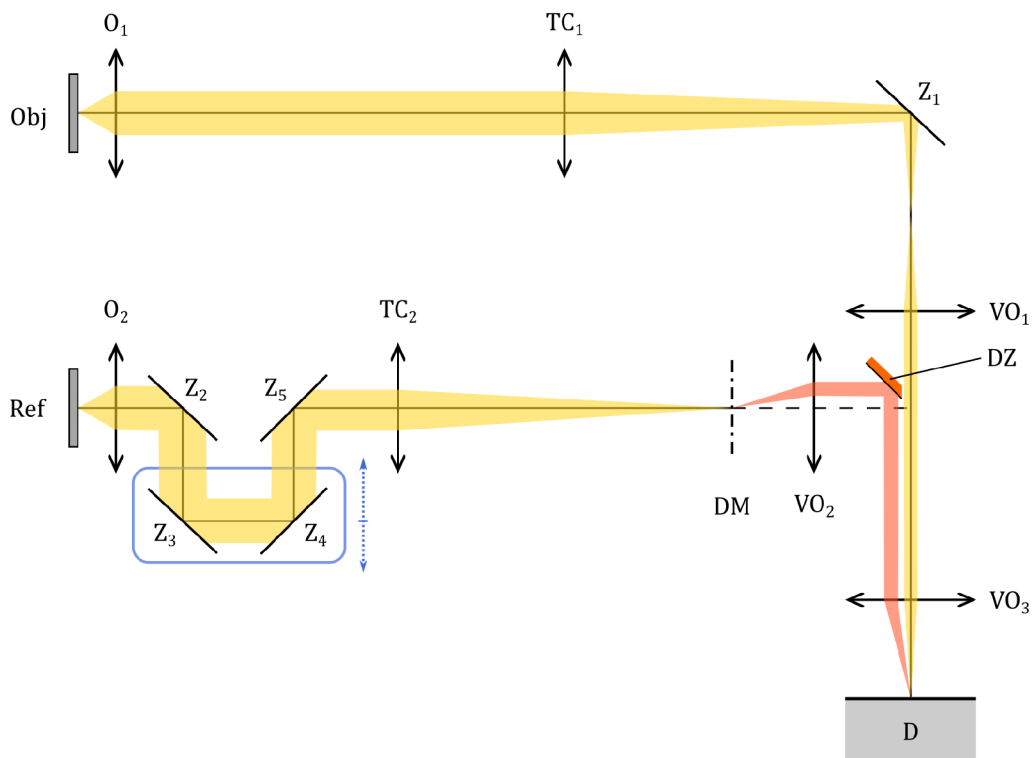
k defokusaci tubusové čočky a bude nutné opět nastavit její správnou pozici, proto tato varianta dále nebyla uvažovaná.



Obrázek 3.3: Schéma kolmého uspořádání. Ref - referenční větev, Obj - předmětová větev, O - objektiv, TC - tubusová čočka, Z - zrcadla, VO - výstupní objektivy, DZ - D zrcátko, DM - difrakční mřížka, D - Detektor

### 3.1.3. Kolmé uspořádání II

Toto uspořádání vychází z předchozího návrhu, přičemž řeší jeho nevýhodu - přestřování tubusové čočky. Skupina zrcadel  $Z_2$  až  $Z_5$  byla umístěna do prostoru mezi objektivem  $O_2$  a tubusovou čočkou  $TC_2$ . Toto uspořádání vyžaduje delší optickou vzdálenost mezi objektivem  $O_1$  a tubusovou čočkou  $TC_1$ , resp. mezi  $O_2$  a  $TC_2$ , jelikož je zde však chod paprsků rovnoběžný, není tato změna nijak omezující. Její schéma je zobrazeno na obrázku 3.4.



Obrázek 3.4: Schéma kolmého upořádání II. Ref - referenční větev, Obj - předmětová větev, O - objektiv, TC - tubusová čočka, Z - zrcadla, VO - výstupní objektivy, DZ - D zrcátko, DM - difrakční mřížka, D - Detektor

## 3.2. Výběr optických komponent

Pro představená koncepční řešení byly zvoleny optické komponenty. Výběr optických komponent byl proveden na základě konzultací s firmou Telight [8], s kterou probíhá spolupráce na vývoji nové generace CCHM mikroskopu. Jako objektivy  $O_1$ , a  $O_2$  byly zvoleny mikroskopové objektivy z řady Nikon CFI Plan Fluor, se zvětšením  $10\times$ ,  $20\times$  a  $40\times$ , neboť se jedná o nejčastěji používané objektivy pro biologická pozorování. K těmto objektivům byla zvoleny kompatibilní tubusové čočky  $TC_1$  a  $TC_2$  s ohniskovou vzdáleností  $f_{TC} = 200$  mm. Difrakční mřížka byla zapůjčena firmou Telight. Jedná se o blazovanou difrakční mřížku s frekvencí  $f_{DG} = 150$  mm<sup>-1</sup>. Tato mřížka byla vyrobená tak, aby odrážela maximum intenzity ve směru +1. difrakčního maxima. Jako výstupní objektivy  $VO_1$  a  $VO_2$  byly vybrány fotografické objektivy od firmy Basler s označením C10-5014-2M-S a ohniskovou

### 3. NÁVRH OPTICKÉHO USPOŘÁDÁNÍ

vzdáleností  $f_{VO_{1,2}} = 50$  mm. Za výstupní objektiv  $VO_3$  byl zvolen fotografický objektiv Samyang SMV-85M43 s ohniskovou vzdáleností  $f_{VO_3} = 85$  mm..

Jako detektor musí být vybrána kamera s čipem, který musí být schopen rozlišit interferenční proužky s nosnou frekvencí  $f_c$ , která je dána vztahem 1.3, kde zvětšení výstupní části  $m_{OL}$  se vypočítá pomocí vztahu:

$$m_{OL} = \frac{f_{VO_3}}{f_{VO_{1,2}}}, \quad (3.1)$$

což pro námi zvolené objektivy dává zvětšení  $m_{OL} = 1,7$ . Nosná frekvence interferenčních proužků je tedy rovna  $f_c = 88,24 \text{ mm}^{-1}$ . Tomu podle vztahu:

$$a = \frac{1}{f_c} \quad (3.2)$$

odpovídá perioda proužků  $a = 11,33 \text{ } \mu\text{m}$ .

Jako detektor byla vybrána kamera Moravian Instruments C2 - 12000. Tato kamera má rozlišení  $4112 \times 3008$  pixelů s velikostí detektoru  $14,91 \times 10,38$  mm a velikostí jednoho pixelu  $3,45 \times 3,45 \text{ } \mu\text{m}$ . Jedna perioda proužků interferenčního obrazce je tedy zobrazena pomocí tří pixelů a vzorkovací frekvence je podle Nyquistova kritéria vzorkování dostatečná, bude se ale pohybovat poměrně blízko nad hranicí rozlišitelnosti.

Celkové zvětšení tohoto mikroskopu se pak vypočítá pomocí vztahu:

$$m_{celk} = m_{ob} \cdot m_{OL}, \quad (3.3)$$

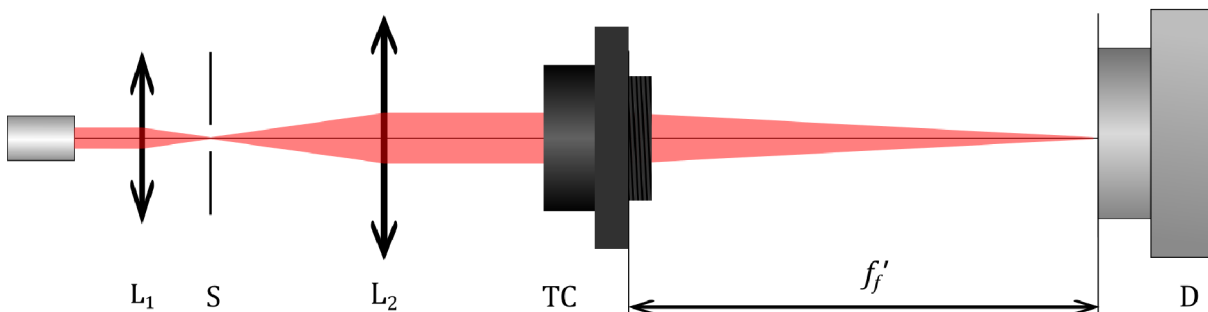
kde  $m_{ob}$  je zvětšení mikroskopového objektivu [2].

### 3.3. Trasování

Před samotným trasováním konceptů bylo nutné experimentálně naměřit vzdálenost mezi obrazovou ohniskovou rovinou a dosedací plochou závitů tubusových čoček  $TC_1$  a  $TC_2$ . Dále také bylo potřeba zjistit rozbíhavost difrakčních řádů za výstupním objektivem  $VO_2$  a rozbíhavost svazku za objektivem  $VO_2$  za účelem co nejvhodnějšího umístění D zrcátka.

#### 3.3.1. Měření ohniskové vzdálenosti tubusových čoček

Vzdálenost mezi obrazovou ohniskovou rovinou čočky a dosedací plochy závitů  $f_f$  se označuje anglickým výrazem Flange focal length (dále FFL). Tato hodnota nebyla výrobcem uvedena. Pro její nalezení byla použita sestava zobrazená na obrázku 3.5. K měření byl použit He-Ne laser, který má vlnovou délku  $\lambda = 632 \text{ nm}$ . Svazek světla putuje z laseru přes čočku  $L_1$ , která jej zaostří do roviny štěrbinu S o průměru  $20 \mu\text{m}$ . Svazek se dále šíří až k čočce  $L_2$ . Tato čočka pak světlo zaostří do nekonečné vzdálenosti a vytvoří se tak široký kolimovaný svazek. Ten poté prochází měřenou tubusovou čočkou TC, která světlo zaostří na rovinu ve vzdálenosti  $f_f$  od dosedací plochy jejího závitů. Tato rovina se určí pomocí detektoru D, kterým lze pohybovat ve směru osy sestavy. Detektor zaznamenává velikost stopy svazku. Tam, kde je stopa nejmenší, se nachází hledaná ohnisková rovina.



Obrázek 3.5: Schéma měření Flange focal length tubusových čoček  $TC_1$  a  $TC_2$ . L - čočky, S - štěrbinu D detektor.

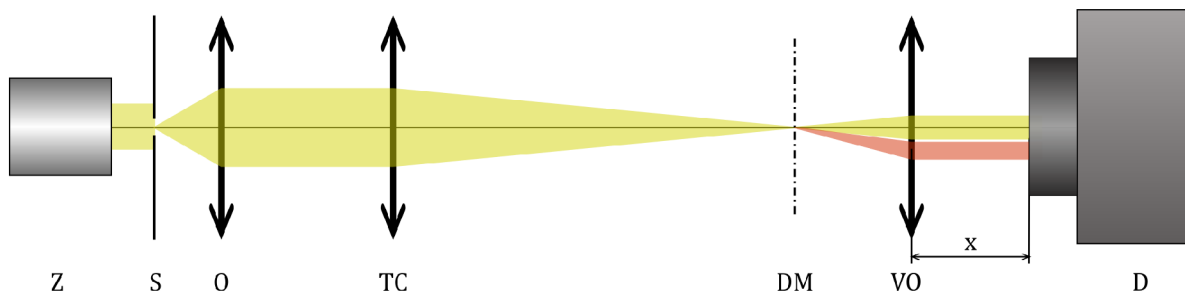
Měření jsem provedl pro obě tubusové čočky. Výsledné zaznamenaná hodnota FFL pro obě čočky byla  $f'_f = 154,40 \text{ mm}$ .

#### 3.3.2. Separace difrakčních řádů

Dále byla zkoumána rozbíhavost svazku za výstupním objektivem  $VO_2$ . Pro účely tohoto pozorování byla sestavena jedna větev mikroskopu v rovnoběžném uspořádání, které je zobrazeno na obrázku 3.6. Světlo z polychromatického zdroje světla osvětluje clonu S o velikosti zorného pole použitého objektivu O, umístěnou do jeho přední ohniskové roviny. Svazek z roviny clony S je kolimován objektivem O a následně je zaostřen tubusovou čočkou TC do její zadní ohniskové roviny, kde je umístěna difrakční mřížka DM. Vytvoří

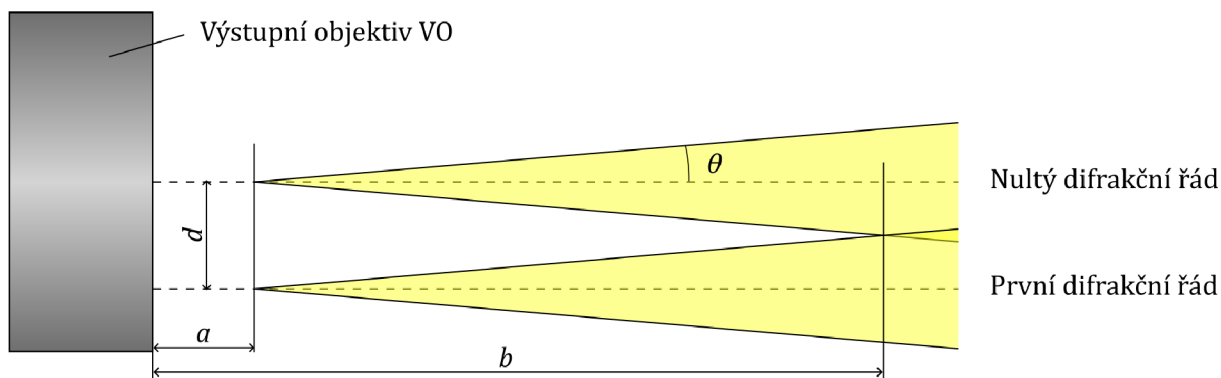
### 3. NÁVRH OPTICKÉHO USPOŘÁDÁNÍ

se tak difrakční řády, které jsou dále výstupním objektivem VO zaostřeny do nekonečné vzdálenosti. Detektorem D jsou zaznamenány velikosti světelných stop daných difrakčními řády.



Obrázek 3.6: Měření oddělení difrakčních maxim. Z - zdroj světla, S - clona, O - objektiv, TC - tubusová čočka, DM - difrakční mřížka, VO - výstupní objektiv, D - detektor.

Schéma měřené situace je na obrázku 3.7. Nejprve jsem provedl měření bez difrakční mřížky, byl tedy pozorován svazek odpovídající svazku z předmětové větve. Pro různé hodnoty vzdálenosti  $x$  detektoru D od výstupního objektivu VO byly zaznamenány příslušné průměry světlených stop svazků. Z naměřených dat pak byla určena velikost úhlu  $\theta$ , pod kterým se světelný svazek rozbíhá, a vzdálenost  $a$  výstupního objektivu VO a roviny, ze které svazek vychází. Poté byla do experimentální sestavy vložena difrakční mřížka. Opět byly pořízeny obrazy, ze kterých byla určena vzdálenost  $d$  mezi středy svazků nulového a prvního difrakčního řádu. Z naměřených a vypočítaných hodnot pak byla určena vzdálenost od výstupního objektivu  $b$ , kde se difrakční řády kříží. Výsledné hodnoty pro objektiv  $20\times$  jsou:  $\theta = 4,3^\circ$ ,  $a = 3,8\text{ mm}$ ,  $b = 37,9\text{ mm}$ ,  $d = 5,1\text{ mm}$ .

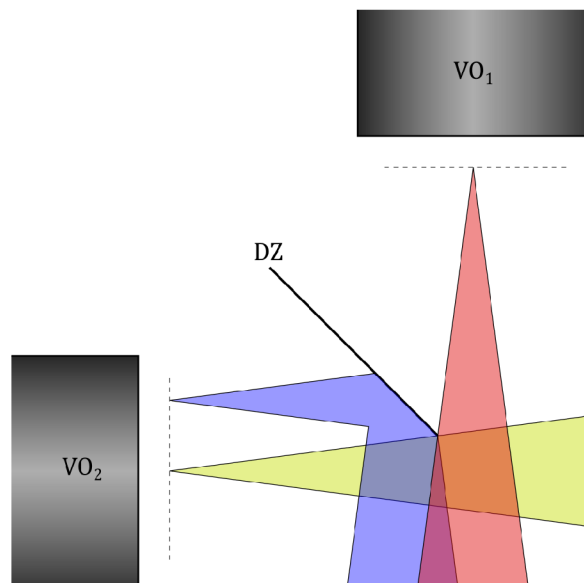


Obrázek 3.7: Schéma měřených veličin

Z těchto výsledků pak lze určit polohu D zrcátka, jak je zobrazeno na obrázku 3.8. D zrcátko je třeba umístit tak, aby odráželo první difrakční řád z referenční větve, ale aby zároveň neodráželo nulový řád referenční větve a neclonilo svazek z předmětové větve.



### 3.3. TRASOVÁNÍ



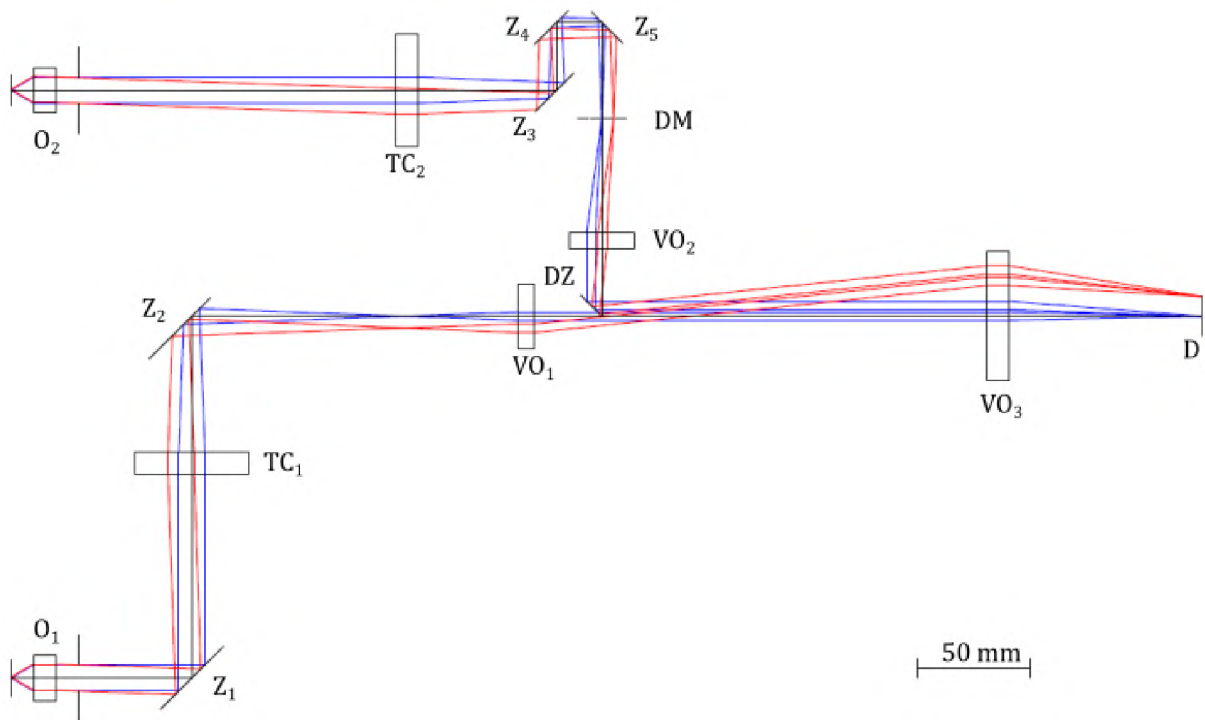
Obrázek 3.8: Schéma separace nultého a prvního řádu pomocí D zrcátka. VO - výstupní objektivy, DZ - D zrcátko, modrý paprsek - 1. řád z referenční větve, žlutý paprsek - 0. řád z referenční větve, červený paprsek - svazek světla z předmětové větve.

#### 3.3.3. Trasování koncepčních návrhu

Vzhledem k tomu, že přesné parametry jednotlivých optických komponent nebyly výrobcí uvedeny, bylo provedeno zjednodušené trasování v prostředí Solidworks pro obě uvažovaná koncepční uspořádání. Trasovány byly dva body - osový bod a krajní bod předmětu, tedy takový bod, který se zobrazí na okraj detektoru, tj. 8,8 mm od středu obrazové roviny. To nám dalo informace o parametrech komponent, například o velikosti zrcadel či vzdálenosti mezi osou předmětové a referenční větve. Trasování bylo nejprve provedeno v paraxiální aproximaci. Paraxiální čočky byly následně doplněny o hlavní roviny, jak je zobrazeno na obrázcích 3.9 a 3.10.

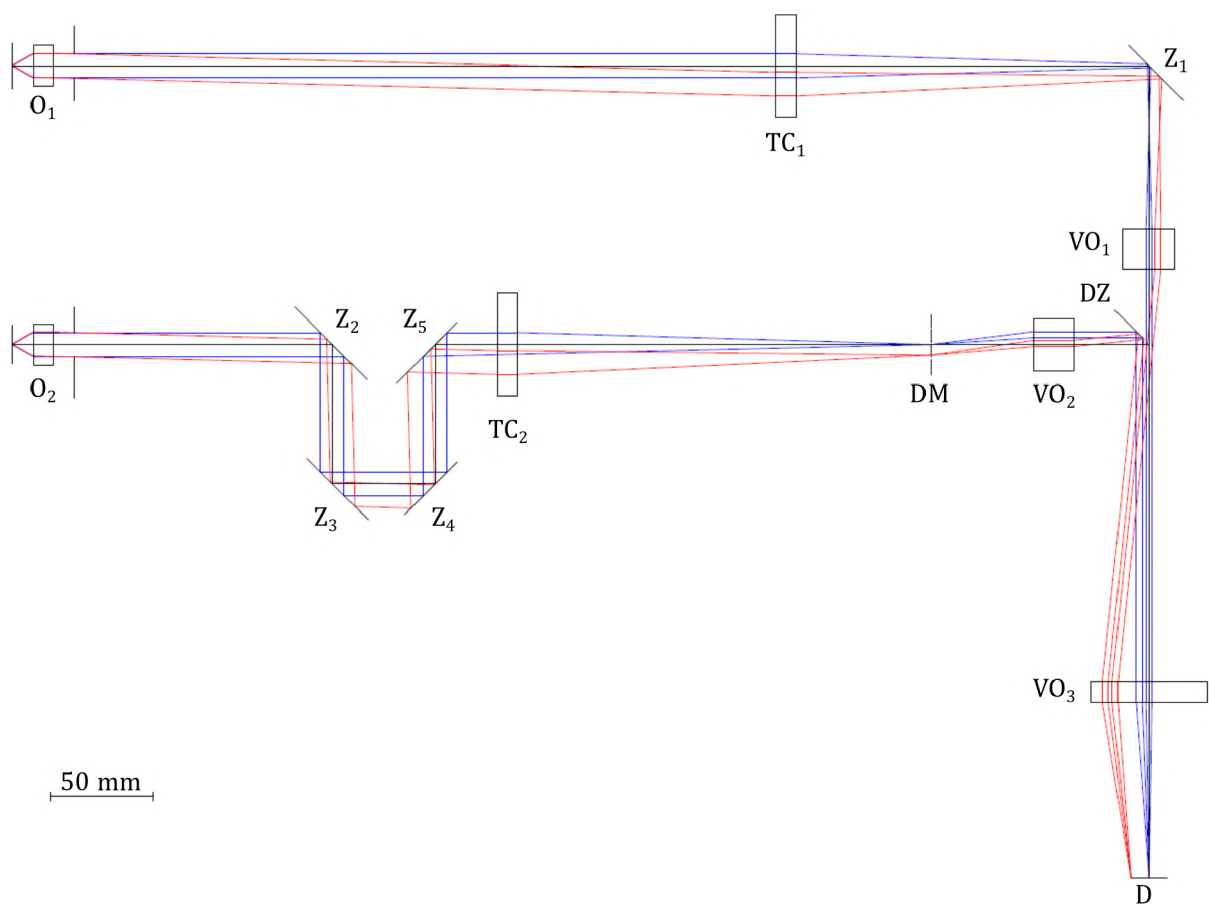
Trasování bylo nutné konzultovat tak, aby bylo kompatibilní s osvětlovací částí mikroskopu, kterou se zabývá práce [25]. Jednalo se zejména o požadavek na vzdálenost mezi mikroskopovými objektivy 135 mm. Z trasování vyplývá, že u konceptu rovnoběžného uspořádání by kvůli tomuto požadavku docházelo k mechanickým kolizím mezi uložení zrcátek v referenční větvi. Z těchto důvodů bylo jako výsledný koncept zvoleno kolmé uspořádání II.

### 3. NÁVRH OPTICKÉHO USPOŘÁDÁNÍ



Obrázek 3.9: Trasování rovnoběžného uspořádání pro středový bod modře a pro krajní bod pole červeně. O - mikroskopové objektivy, TC - tubusové čočky, Z - zrcadla, VO - výstupní objektivy, DM - difrakční mřížka, DZ - D zrcátko, D - detektor.

### 3.3. TRASOVÁNÍ



Obrázek 3.10: Trasování kolmého uspořádání II pro středový bod modře a pro krajní bod pole červeně. O - mikroskopové objektivy, TC - tubusové čočky, Z - zrcadla, VO - výstupní objektivy, DM - difrakční mřížka, DZ - D zrcátko, D - detektor.

## 4. Konstrukční řešení holografického mikroskopu

Konstrukční řešení bylo vytvořeno v prostředí Solidworks. Pro konstrukční řešení byly použity díly od firmy Thorlabs, zejména díly z řady Cage systém, což je modulární systém umožňující snadnou konstrukci optických sestav. Optické komponenty jsou připevněny do polohovatelných uložení, kterými lze velmi přesně nastavit polohu daného prvku, a které jsou spojeny s dalšími prvky pomocí vodících tyčí. Celkově je tak možné pomocí těchto dílů vytvořit jeden velký systém, který lze lehce modifikovat a doplňovat, čímž je splněn základní požadavek konstrukčního řešení.

Thorlabs nabízí široký výběr komponent, ne vždy však tyto komponenty umožňují pokročilou justáž některých prvků použitých v navržené sestavě. Proto bylo nutné navrhnout následující podsestavy:

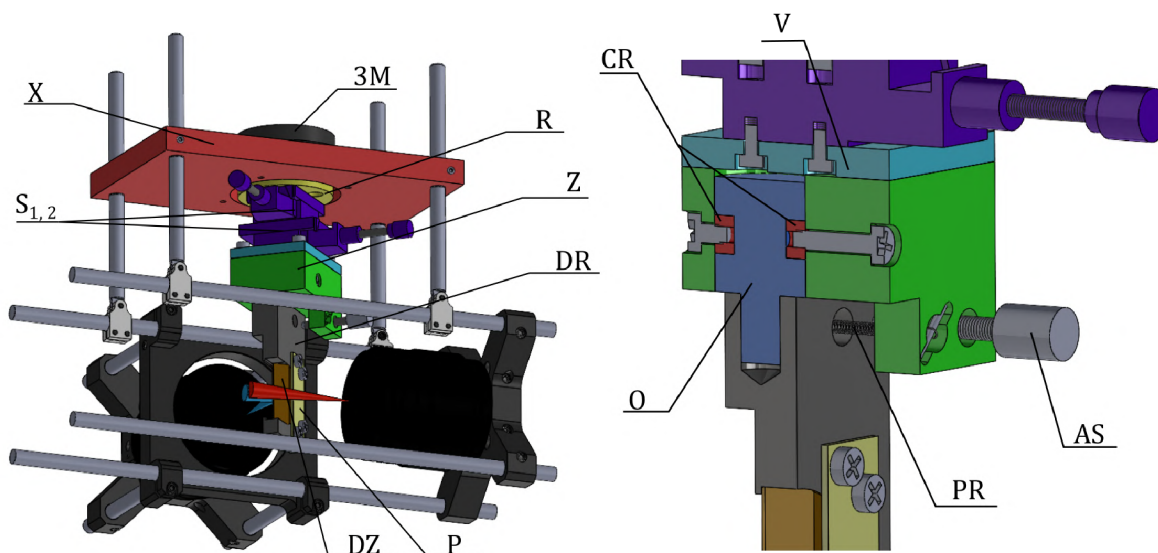
1. Podsestava upevnění D zrcátka
2. Podsestava pro změnu délky referenční větve
3. Podsestava upevnění difrakční mřížky

Díly a podsestavy byly navrženy tak, aby byly kompatibilní s Cage systémem.

### 4.1. Podsestava upevnění D zrcátka

Pro správné umístění D zrcátka byla navržena podsestava, která umožňuje pohyb ve všech šesti stupních volnosti, čímž bude zaručeno správné nastavení polohy D zrcátka vůči referenčnímu a předmětovému svazku. Podsestava je zobrazena na obrázku 4.1. D zrcátko DZ je uloženo v držáku DR a připevněno pomocí planžety P. Do držáku D je vlisován čep O, který je přichycen v základně Z pomocí dvou upevňovacích C-kroužků CR tak, aby se mohl volně otáčet. Pomocí justážního šroubu AS je možné nastavit natočení D zrcátka DZ kolem osy čepu O, která leží na povrchu zrcátka. Základna Z je dále spojena s víkem V, které je přišroubováno ke dvěma lineárním posuvným stolkům  $S_1$  a  $S_2$ . Ty jsou k sobě upevněny tak, že posouvají D zrcátko ve dvou směrech kolmých na osu čepu O. Posuvné stolky  $S_1$  a  $S_2$  jsou dále připevněny přes redukční destičku R na tříbodové uložení 3M, pomocí něhož lze D zrcátko natáčet kolem dvou os kolmých na osu čepu O. Tříbodové uložení 3M také umožňuje drobný pohyb ve směru osy čepu O. Celá tato sestava je pomocí základní desky X připevněna k sestavě mikroskopu.

## 4.2. PODSESTAVA PRO ZMĚNU DÉLKY REFERENČNÍ VĚTVE



Obrázek 4.1: Podsestava upevnění D zrcátka. X - základní deska, S - posuvné stolky, 3M - třibodové uložení, R - redukční destička, Z - základna, DR - držák D zrcátka, DZ - D zrcátko, P - planžeta, CR - C kroužek, V - víko, O - čep, AS - justážní šroub, PR - pružina.

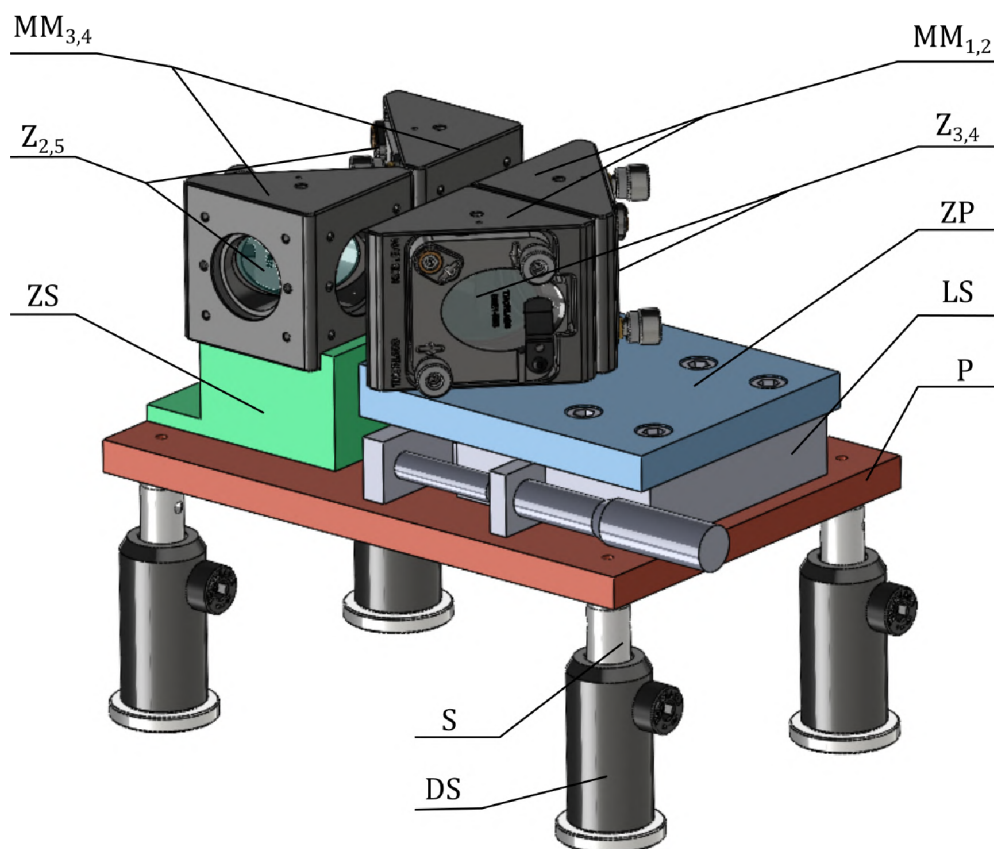
## 4.2. Podsestava pro změnu délky referenční větve

Podsestava pro změnu délky referenční větve je zobrazena na obrázku 4.2. Účelem této podsestavy je umožnit nastavení správné délky optické dráhy v referenční větvi mikroskopu. Držáky  $MM_1$  a  $MM_2$  eliptických zrcadel  $Z_3$  a  $Z_4$  jsou zesponu přišroubovány k základně ZP. Ta je šrouby spojena k lineárně posuvnému stolku LS. Stolek je upevněn k podstavci P. Držáky  $MM_3$  a  $MM_4$  na zrcadla  $Z_2$  a  $Z_2$  jsou pevně přichyceny přes základnu US k podstavci P, jejich poloha je tedy zafixovaná. Posuvným stolkem LS pak lze měnit vzdálenost mezi základnami ZP a ZS, a tím tedy i mezi zrcadly, čímž se mění délka optické dráhy v referenční větvi. Držáky  $MM_1$  až  $MM_4$  v sobě obsahují třibodové kinematické systémy, které umožňují správný směr odrazu světelného svazku. Celá tato sestava je potom připevněna ke čtyřem sloupkům S, které jsou uloženy ve sloupkových držácích DS.

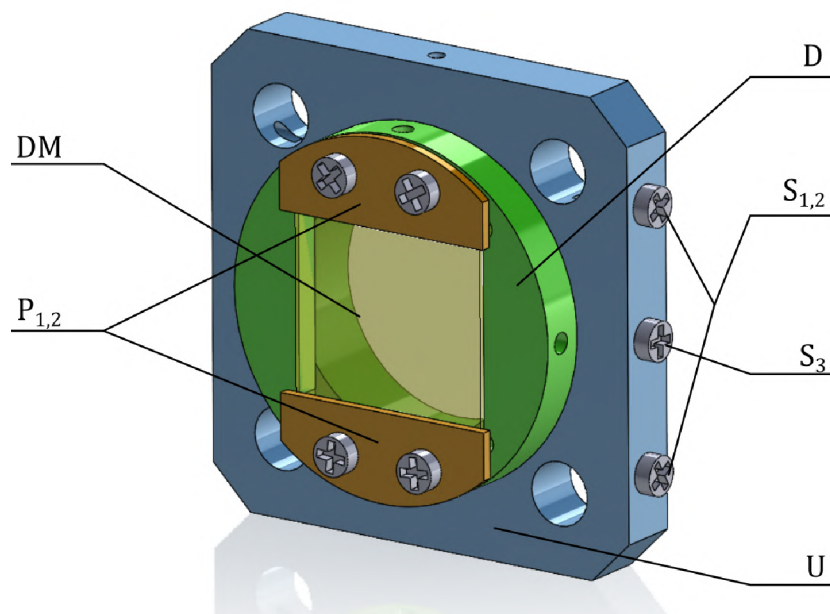
## 4.3. Podsestava upevnění difrakční mřížky

Na obrázku 4.3 je zobrazena podsestava na upevnění difrakční mřížky. Správné nastavení mikroskopu záleží také na natočení difrakční mřížky kolem osy svazku. Držák D slouží k upevnění difrakční mřížky DM pomocí dvou planžet  $P_1$  a  $P_2$ . Následně je tento držák umístěn v uložení U, které je připevněno na tyčích Cage systému. Pomocí šroubů  $S_1$  a  $S_2$  je zajištěna poloha této podsestavy v Cage systému. Pokud je šroub  $S_3$  povoleno, difrakční mřížka DM se společně s držákem D může v uložení U otáčet. Naopak jeho utahováním tlačí tento šroub na držák D a tím pak otočnému pohybu zamezuje.

#### 4. KONSTRUKČNÍ ŘEŠENÍ HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU



Obrázek 4.2: Podsestava pro změnu délky referenční větve. Z - zrcadla, MM - držáky eliptických zrcadel, ZS - stálá základna, ZP - posouvací základna, LS - posuvný stolek, P - podstavec, S - sloupek, DS - sloupkový držák.

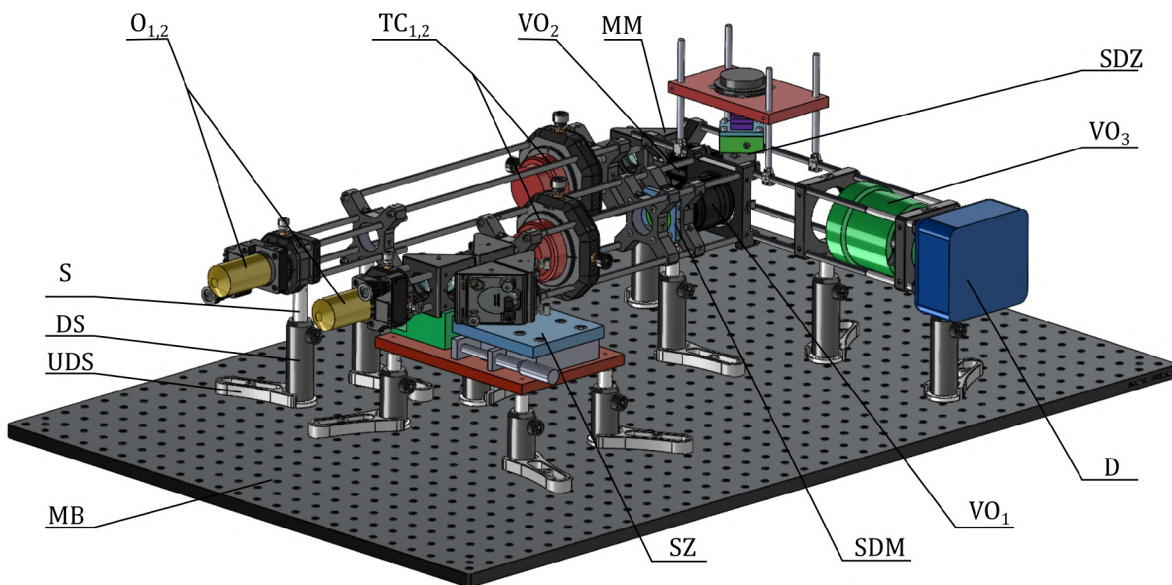


Obrázek 4.3: Podsestava upevnění difrakční mřížky. DM - difrakční mřížka, P - planžety, D - držák, U - uložení, S - šrouby.



## 4.4. Sestava zobrazovací části CCHM mikroskopu

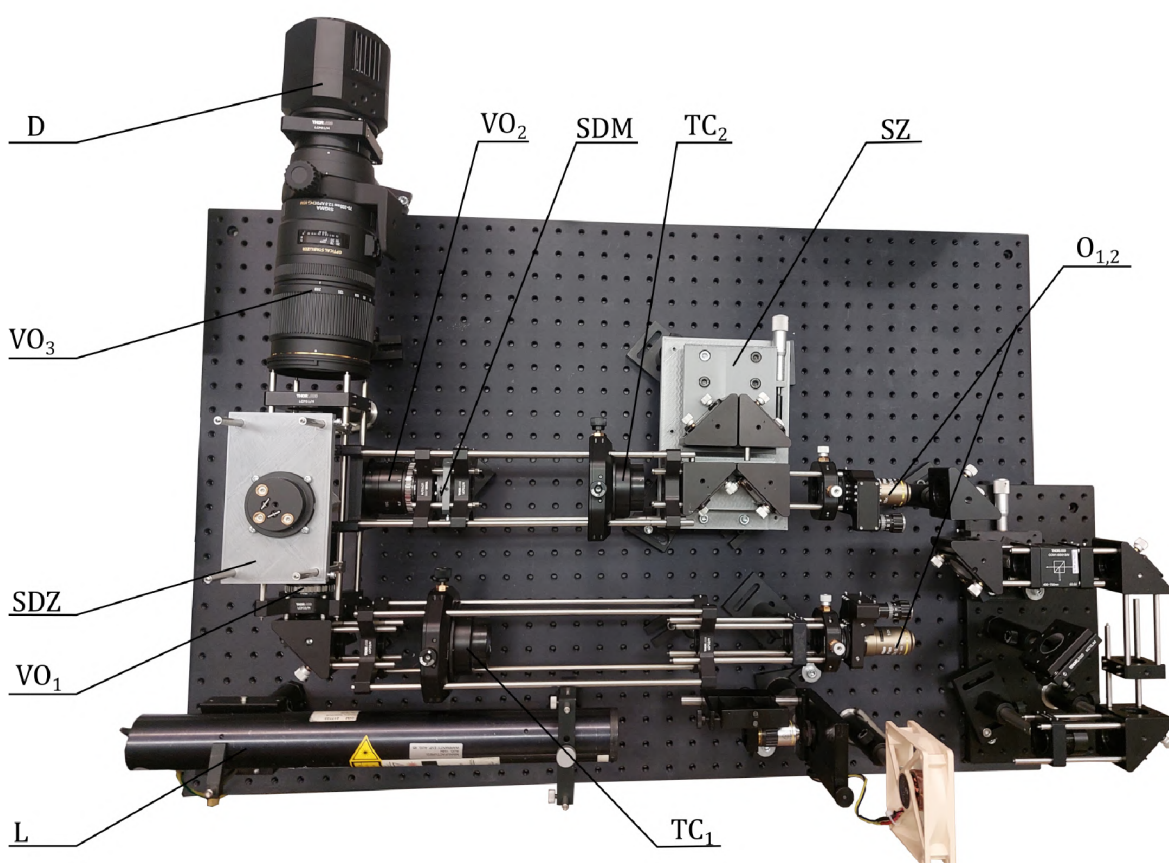
Celková sestava zobrazovací části mikroskopu je zobrazena na obrázku 4.4. Mikroskopové objektivy  $O_1$  a  $O_2$  jsou uloženy v justážních mechanismech, které umožňují jak přesné nastavení polohy v rovině kolmé na osu svazku, tak i jemné ostření. Tubusové čočky  $TC_1$  a  $TC_2$  jsou umístěny v centrážních mechanismech, které umožňují pohyb v rovině kolmé k ose svazku, jejich ostření je umožněno pomocí posuvu v rámci Cage systému. V referenční větvi je mezi objektivem  $O_2$  a tubusovou čočkou  $TC_2$  vložena podsestava pro změnu délky referenční větve  $SZ$ , dále je za tubusovou čočkou  $TC_2$  umístěna podsestava upevnění difrakční mřížky  $SDM$ . V předmětové větvi se za tubusovou čočkou  $TC_1$  nachází zrcadlo uložené v tříbodovém kinematickém mechanismu  $MM$ , které umožňuje správné nastavení směru odrazu paprsku. Kvůli omezenému prostoru nejsou výstupní objektivy  $VO_1$ ,  $VO_2$  a  $VO_3$  v křížových posuvech, bude tedy nutné ladit ostatní komponenty podle těchto objektivů. Jejich ostření je umožněno pomocí posuvu v rámci Cage systému. Mezi tyto výstupní objektivy je uložena podsestava upevnění D zrcátka  $SDZ$ . Komponenty jsou vzájemně uchyceny pomocí vodících tyčí a upevněny o stejné výšky pomocí sloupků  $S$  a sloupkových držáků  $DS$  a celá sestava je pak upevněna pomocí úchytů  $UDS$  na základní desku  $MB$ . Pro díly a podstavy, které jsem sám navrhl, byla vypracována výkresová dokumentace.



Obrázek 4.4: Model celé sestavy. O - mikroskopové objektivy, TC - tubusové čočky, VO - výstupní objektivy, SDM - sestava upevnění difrakční mřížky, SZ - Podsestava pro změnu délky referenční větve, D - kamera, SDZ - podsestava upevnění D zrcátka, S - sloupek, DS - držák na sloupek, UDS - úchyt sloupkového držáku, MB - hlavní základna.

## 5. Testování zobrazovací sestavy mikroskopu

Dílčí podsestavy a celková sestava byly smontovány a seřizeny. Za účelem testování byl namísto osvětlovače použit zkolimovaný svazek He-Ne laseru, který byl děličem svazku rozdělen do dvou větví se stejnou optickou vzdáleností. Koherentní zdroj byl použit k ověření základní funkčnosti mikroskopu z důvodu snazší justáže. Celá sestava je zobrazena na obrázku 5.1.



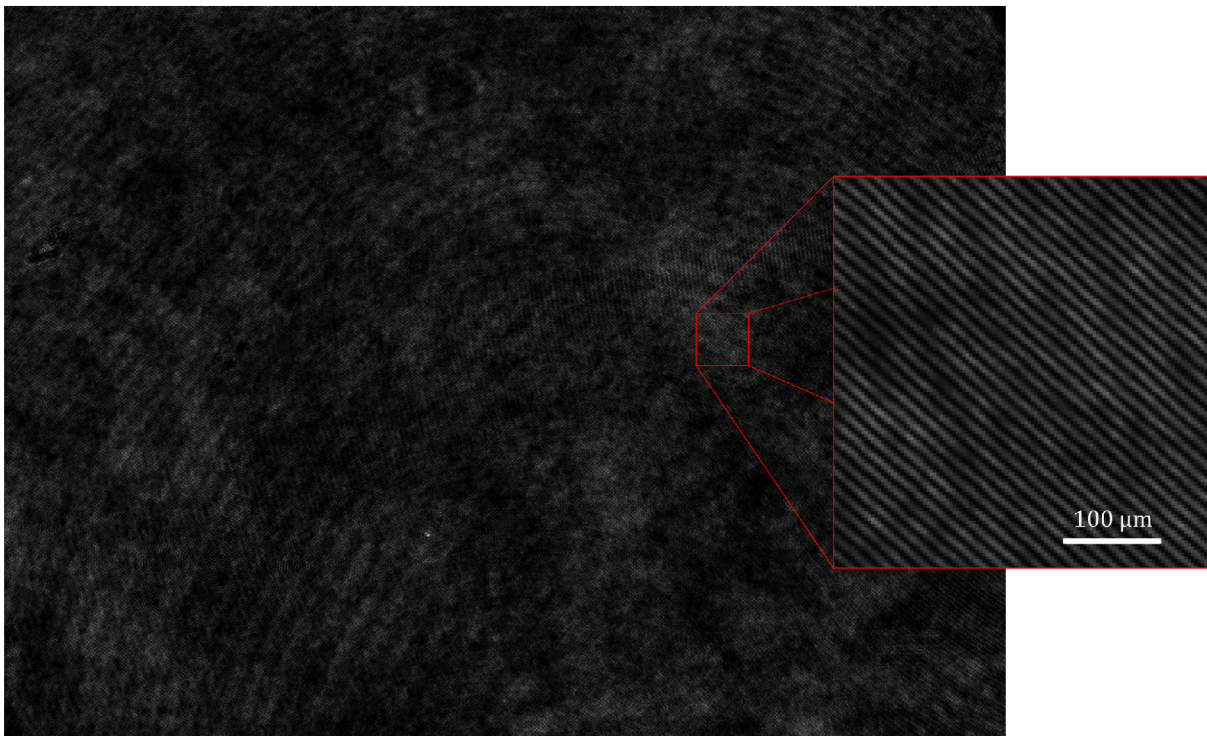
Obrázek 5.1: Fotografie sestavy. O - mikroskopové objektivy, TC - tubusové čočky, VO - výstupní objektivy, D - kamera, SDZ - podsestava upevnění D zrcátka, SDM - podsestava upevnění difrakční mřížky, SZ - podsestava pro změnu délky referenční větve, L - He-Ne laser.

Nejprve byla sestavena pouze sestava bez čoček za účelem seřízení zrcadel  $Z_1$  až  $Z_5$ . Každé zrcadlo bylo postupně ve směru šíření světla nastaveno tak, aby se svazek světla odrazil do směru optické osy. Následně byly do justážních mechanismů postupně upevněny čočky. Ty pak byly nastaveny justážními mechanismy tak, aby byly správně zaostřeny a aby byl jejich střed v optické ose. Nakonec bylo pomocí zobrazení jednotlivých svazků na kaměře nastaveno D zrcátko tak, aby odrazilo právě první difrakční řád z referenční větve a zároveň nestínilo svazku z předmětové větve.



Pozorováním bylo zjištěno, že D zrcátko ořezává přibližně 25 % svazku z předmětové větve a odráží přibližně 90 % prvního difrakčního řádu z větve referenční. To je způsobené tím, že zrcadlo má poměrně tlustou fazetu, kterou stíní světlu z předmětové větve. Tento nedostatek se dá přinejmenším z části odstranit zbrúšením zrcátka. Další možností je navrhnout a nechat vyrobit zrcátko s menší fazetou. Dále také na D zrcátku dochází k 20% překryvu prvního difrakčního řádu s druhým difrakčním řádem. S nultým difrakčním řádem překryv nenastává.

Podle teorie měly být na kameře viditelné interferenční proužky. Při našem pozorování ale tyto proužky nebyly patrné. Tento výsledek se přikládá zejména faktu, že velikost proužků se nacházela těsně nad hranicí rozlišovací schopnosti kamery, vlivem vibrací a parazitních interferencí tak interferenční proužky mohly zaniknout v šumu. Jako výstupní objektiv VO<sub>3</sub> byl proto použit jiný fotografický objektiv SIGMA 70-200 f/2.8 DG OS HSM s měnitelnou ohniskovou vzdáleností od 70 mm do 200 mm. Zvětšení výstupní části pak při nastavení 200 mm dosahovalo podle vztahu 3.1 hodnoty 4×. Při použití této ohniskové vzdálenosti již byly interferenční proužky viditelné, jak je vidět na obrázku 5.2.



Obrázek 5.2: Zobrazení interferenčních proužků.

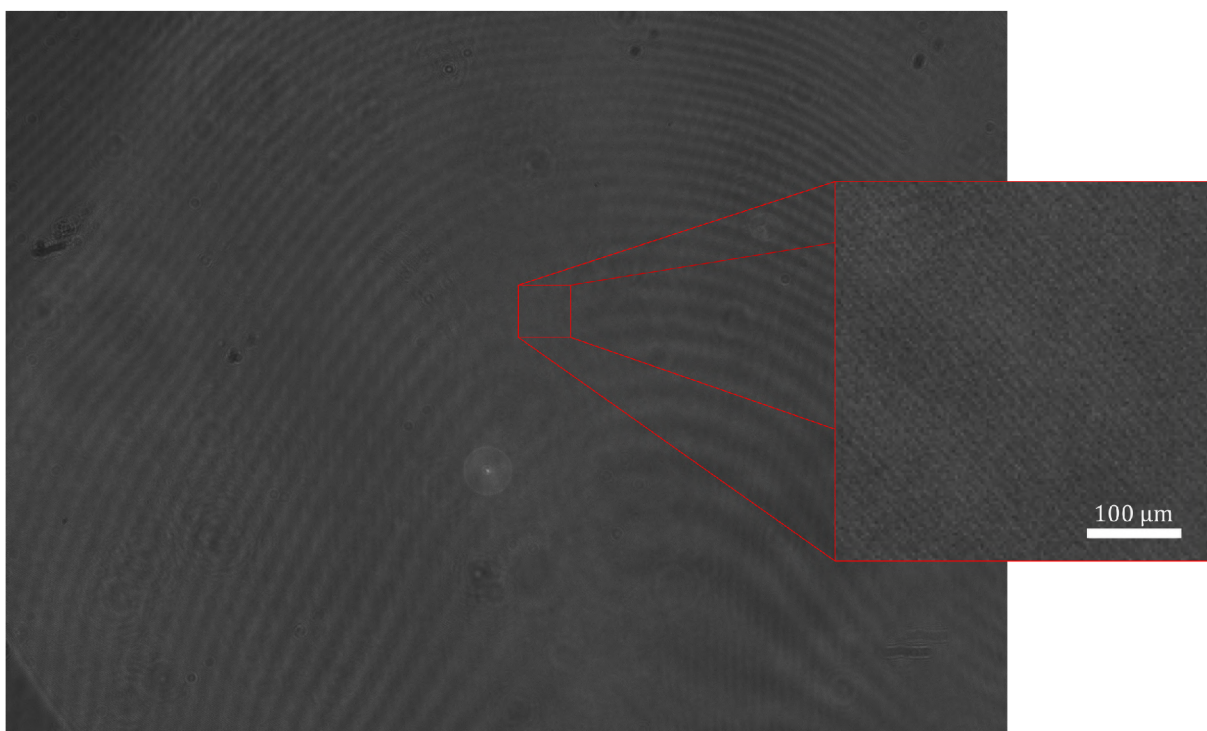
Obraz byl kvůli použití vysoce koherentního zdroje zatížen parazitními interferencemi, proto byla za účelem zlepšení obrazu dále vložena do optické dráhy světla rotující matice, která snížila prostorovou koherenci osvětlení a tím zamezila parazitní interferenci. Z důvodu snížení prostorové koherence zdroje bylo nutné lépe sesadit stopy svazků na čipu kamery. Toho bylo dosaženo vložением clony do kolimovaného osvětlovacího svazku před jeho rozdělením. Omezená stopa svazku pak byla použita jako reference k sesazení. Pou-

## 5. TESTOVÁNÍ ZOBRAZOVACÍ SESTAVY MIKROSKOPU

žitím matnice bylo sníženo množství artefaktů v obraze, zároveň byl ale snížen kontrast pozorovaných interferenčních proužků, jak je vidět na obrázku 5.3, což lze přičíst nedokonalé sesazenému obrazu a přítomnosti matnice, která snižuje celkovou intenzitu obrazu. Díky tomu bylo potřeba použít delší expozice, kdy se výrazněji projeví vliv vibrací.

Pro obraz 5.3 byla pak sestrojena Fourierova transformace obrazu, zobrazená na obrázku 5.4, v níž je nosná frekvence proužků jasně patrná. Z obrazu byla určena frekvence proužků  $f_{exp} = 76,92 \text{ mm}^{-1}$ , což odpovídá přibližně dvojnásobku frekvence vypočítané podle vztahu 1.3, kterou udává teorie, tedy  $f_{teor} = 37,5 \text{ mm}^{-1}$ . Vzhledem k tomu, že se od D zrcátka odráží 20% druhého difrakčního řádu, lze tento výsledek interpretovat jako interferenci mezi druhým difrakčním řádem referenční větve a svazkem z předmětové větve. Druhý difrakční řád vychází z difrakční mřížky pod dvojnásobným úhlem než první difrakční řád. Podle vztahu 1.2 je pak úhel dopadu na rovinu detektoru také dvojnásobný oproti úhlu odpovídajícímu prvnímu difrakčnímu řádu a při interferenci se svazkem z předmětové větve tak vytvoří interferenční proužky o dvojnásobné frekvenci.

Posunutí D zrcátka do takové pozice, aby k překryvu prvního a druhého difrakčního řádu nedošlo, není z důvodu malého manipulačního prostoru proveditelné. Odstranění druhého difrakčního řádu může být do budoucna snadno realizováno pomocí prostorového filtru, který se umístí mezi výstupní objektiv VO<sub>2</sub> a D zrcátko.



Obrázek 5.3: Zobrazení interferenčních proužků za použití matnice



Obrázek 5.4: Fourierova transformace obrazu [5.2](#).

# Závěr

První část této bakalářské práce je věnována popisu metod vytváření kontrastu ve světlené mikroskopii, s důrazem na interferenční mikroskopii a popis koherencí řízeného holografického mikroskopu. Na základě teoretické části byly dále představeny tři koncepty možného uspořádání zobrazovací části mikroskopu, ve kterých je uvažováno použití zrcátka ve tvaru D namísto děliče svazku pro rekombinaci svazků z předmětové a referenční větve. Dále byly vybrány vhodné optické komponenty, pro které byly experimentálně naměřeny jejich neznámé parametry. Pro úspěšnou separaci difrakčních řádů byla provedena měření, díky nimž byla určena nejvhodnější pozice D zrcátka. Dále bylo provedeno optické trasování v prostředí Solidworks, díky němuž bylo zvoleno výsledné uspořádání. Pro toto uspořádání pak bylo vypracováno jeho konstrukční řešení, opět v prostředí Solidworks, s využitím Cage systému od firmy Thorlabs. Díky tomu je zaručena snadná modifikace sestavy při experimentech. Sestava zobrazovací části, založená na Cage systému, byla doplněna o tři vlastní podsestavy, které umožňují pokročilou justáž některých vybraných prvků v sestavě.

Zobrazovací část mikroskopu byla následně sestavena a otestována. Při testování nebyly nejprve interferenční poučky na kameře patrné, proto byl použit jiný výstupní objektív, který vytvořil obraz s větším zvětšením, a díky tomu byly interferenční proučky již viditelné. Následně byla pro odstranění parazitní interference použita rotující matnice, která snížila prostorovou koherenci použitého osvětlení. Při analýze obrazu byla zjištěna nosná frekvence rovna dvojnásobku její teoreticky určené hodnoty. Tato skutečnost je přisuzována nechtěné interferenci druhého difrakčního řádu referenční větve se svazkem z předmětové větve díky nedokonalé separaci řádů pomocí D zrcátka. Pro odstranění tohoto nedostatku bylo navrženo řešení za použití prostorového filtru, který by zachoval pouze první difrakční řád.

Výsledkem této práce je tedy funkční zobrazovací část koherencí řízeného holografického mikroskopu, kterou půjde po drobných úpravách použít pro další rozvoj holografické mikroskopie. Díky modulárnímu designu sestava umožňuje testovat nové přístupy a metody pozorování, aniž by bylo třeba výrazněji zasahovat do její konstrukce.



# Literatura

- [1] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. Microscope Illumination. *Olympus* [online]. [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/illumination/>
- [2] BAJER, Jiří, 2018. *Optika 1*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-4532-8.
- [3] DAVIDSON, M. W. and ABRAMOWITZ, M.: *Optical microscopy*. In J.P. Horniak (Ed.): Encyclopedia of Imaging Science and Technology. Second edition. New York: John Wiley and Sons, 2002. 1106-1141 p. ISBN 0-471-33276-3.
- [4] GOULETTE, Travis, Charles D. HOWARD a Michael W. DAVIDSON. Infinity Optical Systems. *Nikon's MicroscopyU* [online]. [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems>
- [5] Reflective Versus Transmission Light. *Phaos Technology* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://phaostech.com/index.php/2021/03/29/reflective-versus-transmission-light/>
- [6] ROTTENFUSSER, Rudi a Michael W. DAVIDSON. Reflected light microscopy. *Carl Zeiss Microscopy Online* [online]. [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/reflected.html>
- [7] Inverted and Upright Microscopy at a Glance. *Ibidi* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://ibidi.com/content/212-inverted-and-upright-microscopy>
- [8] Telight Q-phase. *Telight* [online]. [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://telight.eu/products/telight-q-phase/>
- [9] FUKA, J. a HAVELKA, B.: *Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961. 846 s
- [10] MURPHY, Douglas B. a Michael W. DAVIDSON, 2012. *Kód: 01389567 Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Second Edition. Wiley-Blackwell. ISBN 9780471692140.
- [11] SCHÄDLER, Kevin. An Introduction to the Light Microscope, Light Microscopy Techniques and Applications. *Technology Networks* [online]. September 2, 2021 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/an-introduction-to-the-light-microscope-light-microscopy-techniques-and-applications-351924>

## LITERATURA

- [12] MERTZ, Jerome, 2019. *Introduction to optical microscopy*. Second edition. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. ISBN 978-110-8428-309.
- [13] Phase Contrast and Microscopy. *Leica Microsystems* [online]. March 16, 2023 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/phase-contrast-and-microscopy/>
- [14] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. Differential Interference Contrast - Introduction. *Olympus* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/dic/dicoverview/>
- [15] Wollaston prism, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Wollaston\\_prism](https://en.wikipedia.org/wiki/Wollaston_prism)
- [16] KOOS, Krisztian, Jozsef MOLNAR a Peter HORVATH, 2015. *DIC Microscopy Image Reconstruction Using a Novel Variational Framework*. *2015 International Conference on Digital Image Computing: Techniques and Applications (DICTA)*. IEEE, 2015, 1-7. ISBN 978-1-4673-6795-0. Dostupné z DOI: 10.1109/DICTA.2015.7371252
- [17] WAYNE, Randy. Light and Video Microscopy: Second Edition. *Light and Video Microscopy: Second Edition*. 2014, s. 1–350. ISBN 9780124114845. Dostupné z DOI: 10.1016/C2012-0-07122-0.
- [18] SIRICO, Daniele Gaetano, Lisa MICCIO, Zhe WANG, et al., 2022. Compensation of aberrations in holographic microscopes: main strategies and applications. *Applied Physics B*. **128**(4). ISSN 0946-2171. Dostupné z DOI: 10.1007/s00340-022-07798-8
- [19] SLABÝ, Tomáš, Pavel KOLMAN, Zbyněk DOSTÁL, Martin ANTOŠ, Martin LOŠTÁK a Radim CHMELÍK, 2013. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. **21**(12). ISSN 1094-4087. Dostupné z DOI: 10.1364/OE.21.014747
- [20] How Quantitative Phase Imaging can change the way you look at cells. *FocalPlane* [online]. 18 May 2022 [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: <https://focalplane.biologists.com/2022/05/18/how-quantitative-phase-imaging-can-change-the-way-you-look-at-cells/>
- [21] LEITH, E. N. a J. UPATNIEKS, 1967. Holography with Achromatic-Fringe Systems. *Journal of the Optical Society of America*. **57**(8). ISSN 0030-3941. Dostupné z DOI: 10.1364/JOSA.57.000975

- [22] Diffraction gratings tutorial. *Thorlabs* [online]. [cit. 2023-05-22]. Dostupné z: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=9026](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=9026)
- [23] SLABÝ, Tomáš, 2015. *Koherencí řízený holografický mikroskop nové generace* [online]. Brno. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [24] D-Shaped Pickoff Mirrors. *Thorlabs* [online]. [cit. 2023-05-23]. Dostupné z: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=2632](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=2632)
- [25] PACHL, Přemysl. *Návrh osvětlovacího modulu pro CCHM mikroskop*. Brno, 2023. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.