

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA OPTIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optický mikroskop s prostorově  
strukturovanou fázovou destičkou



Vypracoval:	<b>Bc. Petr Úlehla</b>
Studijní program:	N0533A110003 Digitální a přístrojová optika
Studijní obor:	1701T054 Digitální a přístrojová optika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2022

# Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petr Úlehla
Název práce	Optický mikroskop s prostorově strukturovanou fázovou destičkou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra optiky
Vedoucí práce	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Prostorově strukturovaná fázová destička představuje efektivní nástroj pro generaci optických vírů a svazků s radiální nebo azimutální polarizací. Tato speciální světelná pole nachází v moderní optice mnoho aplikací. Například v mikroskopii mohou pomoci ke zvýšení kontrastu v obraze slabě absorbujících biologických vzorků. Cílem práce je experimentální realizace optického mikroskopu s prostorově strukturovanou fázovou destičkou.
Klíčová slova	mikroskopie, polarizace, singulární optika, optické víry
Počet stran	41
Počet příloh	0
Jazyk	český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Petr Úlehla
Title	Optical microscope with spatially structured half-waveplate
Type of thesis	Master
Department	Department of Optics
Supervisor	Mgr. Michal Baránek, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	Spatially structured half-waveplate is an effective tool for experimental generation of optical vortices and beams with radial and azimuthal polarization. Such light fields have various applications in a modern optics. For instance, they enable recording of the image with significantly higher contrast within microscopic observation of biological samples. The aim of this work is experimental realization of the microscopic system with spatially structured half-waveplate.
Keywords	microscopy, polarization, singular optics, optical vortices
Number of pages	41
Number of appendices	0
Language	czech

### **Prohlášení**

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

V Olomouci dne 2. května 2022

.....  
Bc. Petr Úlehla



## **Poděkování**

Děkuji především vedoucímu Mgr. Michalu Baránkovi, Ph.D. za systematický a pečlivý přístup, ochotu a především čas věnovaný konzultacím při vypracování této práce. Také děkuji zaměstnancům katedry optiky Univerzity Palackého v Olomouci za příjemnou a přátelskou atmosféru během studia a v neposlední řadě děkuji své rodině za podporu. Práce vznikla za podpory grantového projektu IGA\_PrF\_2022\_001 Moderní optika a její aplikace.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Motivace</b>	<b>8</b>
2.1	Světelná mikroskopie . . . . .	8
2.1.1	Kontrastní metody světelné mikroskopie . . . . .	8
2.1.2	Metody kvantitativního vyhodnocení fáze . . . . .	11
<b>3</b>	<b>Teorie</b>	<b>16</b>
3.1	Prostorově strukturovaná fázová destička . . . . .	16
3.2	4-f systém s prostorově strukturovanou fázovou destičkou . . . . .	18
3.2.1	Osová filtrace . . . . .	19
3.2.2	Mimoosová filtrace . . . . .	22
3.2.3	Vliv prostorové koherence na zobrazení . . . . .	24
3.2.4	Kvantitativní rekonstrukce fáze . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Experiment</b>	<b>28</b>
4.1	Mikroskop s prostorově strukturovanou fázovou destičkou . . . . .	28
4.2	Experimentální výsledky . . . . .	31
4.2.1	Osová filtrace . . . . .	31
4.2.2	Mimoosová filtrace . . . . .	33
4.2.3	Vliv prostorové koherence na zobrazení . . . . .	34
4.2.4	Kvantitativní rekonstrukce fáze . . . . .	37
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>39</b>
	<b>Literatura</b>	<b>40</b>

# Kapitola 1

## Úvod

Světelná mikroskopie, umožňující pozorovat detaily předmětů, které by jinak lidské oko nebylo schopno rozlišit, je obor zahrnující širokou škálu zobrazovacích metod [1, 2]. Některé typy předmětů, které se vyznačují nízkou absorpcí světla, nelze ale při zobrazení v klasickém světlém poli rozlišit s dostatečným kontrastem. Proto je nutné vybrat jinou metodu pro zobrazení, která tento kontrast dostatečně zvýší. Jednou z možností je použít speciální barviva, která však mohou předmět poškodit, zejména pokud se jedná o biologický vzorek. Jiná skupina metod zahrnuje použití speciálních optických prvků, které umožňují zvýšit kontrast obrazu bez nutnosti zásahu do vzorku.

Snaha o optimalizaci zobrazovacích metod vede k jejich neustálému vylepšování. Díky moderním výrobním procesům je například možné vyrobit prostorově strukturovanou fázovou destičku [3], pomocí které lze s využitím polarizace světla realizovat spirální fázový kontrast, pro který byla zapotřebí spirální fázová maska nebo prostorový modulátor světla [4, 5]. Díky kontrole polarizačního stavu na vstupu systému lze zobrazení pomocí strukturované fázové destičky navíc obohatit o další zobrazovací režimy.

Teoretická část práce se věnuje popisu prostorově strukturované fázové destičky a vlastnostem výsledného zobrazení po jejím začlenění do 4-f systému. Kromě izotropního zvýraznění hran a stínového efektu, charakteristického pro spirální fázový kontrast, je možné navíc selektivně zvýraznit hrany v požadovaném směru nebo regulovat intenzitu pozadí [6]. Dále je ukázáno využití série snímků stínových efektů pro kvantitativní rekonstrukci fáze, umožňujících získat informaci o výšce předmětu bez nutnosti použití kontaktních metod [7]. Teoretický popis je doplněn o počítačové simulace v programu MATLAB.

V experimentální části práce je sestaven optický mikroskop využívající prostorově strukturovanou fázovou destičku, kde je jako předmět pro zobrazování použit kvantitativní fázový test, na kterém jsou ověřeny vlastnosti zobrazení z teoretické části a také je vyzkoušena přesnost kvantitativní rekonstrukce. Experiment je navíc rozšířen o možnost jednoduchého ovládání prostorové koherence pomocí clony se stupnicí, která má na výsledné zobrazení další vliv.

# Kapitola 2

## Motivace

### 2.1 Světelná mikroskopie

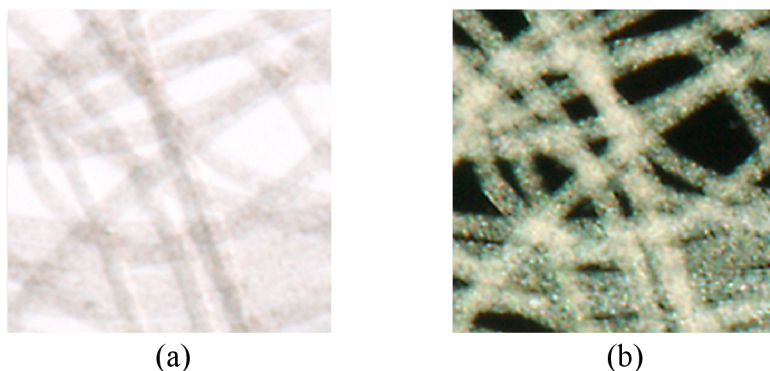
Při zobrazování ve světelné mikroskopii může u určitých typů předmětů nastat problém s nízkým kontrastem pozorovaného obrazu, protože se z velké části jedná o fázové předměty, které se vyznačují nízkou absorpcí. U těchto typů předmětů procházející světlo získá pouze fázové zpoždění, které při klasickém zobrazování ve světelné mikroskopii není možné zaznamenat s dostatečným kontrastem pomocí intenzitní detekce.

#### 2.1.1 Kontrastní metody světelné mikroskopie

Obtížná detekce fázových předmětů způsobila vznik velkého množství zobrazovacích metod umožňujících fázové změny po průchodu předmětem převést na změny intenzitní, které už je detektor schopen zaznamenat [1, 2].

##### Temné pole

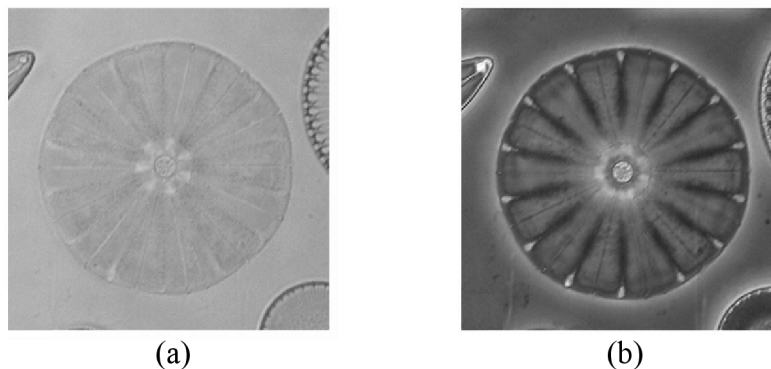
Zobrazování v temném poli spočívá v zablokování nedifraktovaného světla, které odpovídá pozadí. Systém je navržen tak, aby do mikroobjektivu dopadalo pouze světlo difraktované na struktuře vzorku. Obraz je pak jasně rozlišitelný na tmavém pozadí (Obr. 2.1). Hlavní nevýhoda spočívá v nízké energetické účinnosti, protože velká část světla je zablokována [1, 2, 8].



**Obrázek 2.1:** Zobrazení nylonových vláken ve světlém poli (a) a v temném poli (b) [2].

## Zernikův fázový kontrast

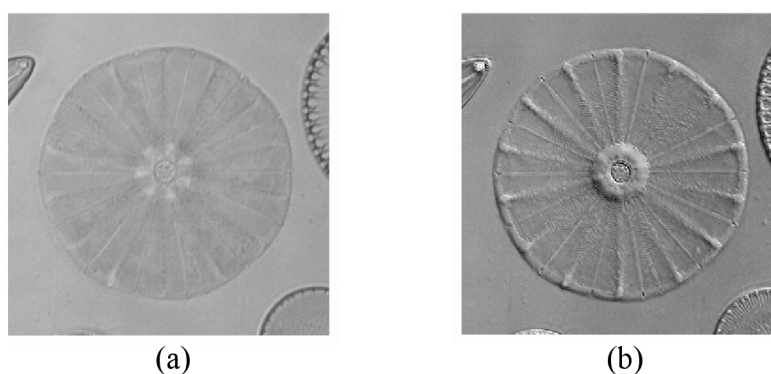
Zernikův fázový kontrast využívá úpravy osvětlovací části tak, aby pomocí speciální fázové destičky ve tvaru prstence zavedl fázový posun nedifraktovanému světlu, což způsobí zvýšení kontrastu. Na rozdíl od temného pole využívá veškerou světelnou energii. Nevýhodou je halo efekt v detekovaném obrazu (Obr. 2.2) [1, 2, 8].



**Obrázek 2.2:** Zobrazení rozsivky ve světlém poli (a) a pomocí Zernikova fázového kontrastu, který se vyznačuje halo efektem kolem hran (b) [9].

## Diferenciální interferenční kontrast

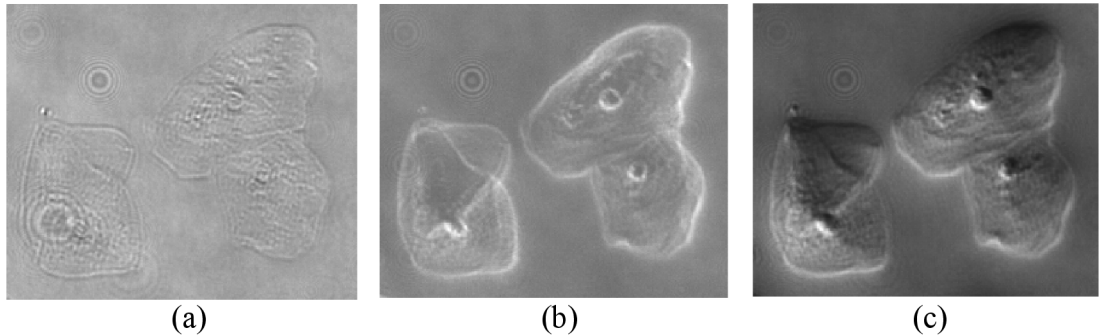
Diferenciální interferenční kontrast pracuje s prostorovým oddělením ortogonálních složek lineární polarizace Wollastonovým hranolem, které prochází vzorkem každá s jinou optickou dráhou bez vzájemného ovlivnění. Na výstupu je umístěn druhý Wollastonův hranol, který ortogonální složky nasměruje zpět do stejné roviny a analyzátor umožní jejich interferenci. Protože obě ortogonální složky polarizace po průchodu vzorkem nabraly jiná fázová zpoždění, je výsledný obraz charakteristický svým stínovým efektem, který dává představu o 3D struktuře pozorovaného předmětu (Obr. 2.3). Nevýhodou je nutnost použití dvojlomných prvků. Naopak oproti Zernikovu fázovému kontrastu výsledný obraz neobsahuje nežádoucí halo efekt [1, 2, 8, 10, 11].



**Obrázek 2.3:** Zobrazení rozsivky ve světlém poli (a) a pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu charakteristického stínovým efektem (b) [9].

## Spirální fázový kontrast

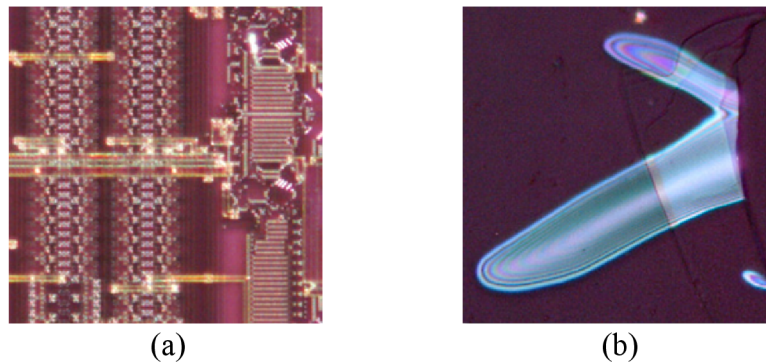
Spirální fázový kontrast využívá spirální fázovou masku [8, 12], požadovanou strukturu spirálního filtru promítnutého na prostorový modulátor světla [13, 14], nebo nově prostorově strukturovanou fázovou destičku [6, 15, 16]. Umožňuje zvýraznit struktury předmětu jak izotropně, tak anizotropně ve formě stínového efektu, a to pouze posunem masky [4, 5, 7, 14, 17].



**Obrázek 2.4:** Zobrazení lícních buněk ve světlém poli (a). Po zavedení spirální fázové masky dochází k izotropnímu zvýraznění hran (b). Po posunu masky mimo optickou osu získáváme stínový efekt (c) [8].

## Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie využívá vlastností dvojlomu. Mikroskop je navíc vybaven o polarizátor před vzorkem a o analyzátor za vzorkem. Průchod světla dvojlomným materiálem způsobí fázová rozposunutí pro řádný a mimořádný paprsek. Oba paprsky následně za analyzátozem interferují. Tato metoda umožňuje navíc kromě zviditelnění struktur získat informaci o pnutí v materiálu [2].



**Obrázek 2.5:** Zobrazení integrovaného obvodu v mikroprocesoru (a) a defektů na kovové tenké vrstvě (b) pomocí polarizační mikroskopie [2].

## 2.1.2 Metody kvantitativního vyhodnocení fáze

Pomocí některých metod získáváme jen kvalitativní povědomí o struktuře předmětu, ale už ne o jeho optické tloušťce. Ukazuje se, že s použitím dalších speciálních optických prvků lze kromě zvýšeného kontrastu získat také kvantitativní informaci o fázi. Novým směrem, kterým lze již existující metody na kvantitativní vyhodnocení fáze vylepšit, je práce s polarizovaným světlem.

### Fázový kontrast s řízeným fázovým posunutím

Fázový kontrast s řízeným fázovým posunutím vychází z principů Zernikova fázového kontrastu [1, 2], ale namísto fázové destičky ve tvaru prstence využívá fázový modulátor z kapalných krystalů, který zavádí požadovaný fázový posun  $\varphi$ . V rovině detektoru poté dochází k interferenci difraktovaného a nedifraktovaného světla. Komplexní amplitudu nedifraktovaného světla s označením jako referenční vlna  $U_r$ , a komplexní amplitudu difraktovaného světla s označením jako signální vlna  $U_s$ , lze zapsat ve tvaru

$$U_r = u_r e^{i\phi_r + \varphi}, \quad (2.1)$$

$$U_s = u_s e^{i\phi_s}, \quad (2.2)$$

kde  $u_r$  a  $u_s$  jsou amplitudy referenční a signální vlny s jejich fázemi  $\phi_r$  a  $\phi_s$ .

V obrazové ohniskové rovině tubusové čočky vzniká obraz, který je přezobrazen 4-f systémem na CCD kameru. Ve společných ohniskových rovinách čoček  $L_1$  a  $L_2$  je umístěn odrazný fázový modulátor z kapalných krystalů, kterým lze přesně zavést fázový posun  $\varphi$  referenční vlně a zaznamenat tak 4 snímky s kroky  $\varphi_{1,2,3,4} = 0, \pi/2, \pi$  a  $3\pi/2$ , které jsou potřebné pro vyhodnocení fázového rozdílu  $\Delta\phi$  (Obr. 2.6). Intenzitu světla dopadajícího na detektor lze pak rozepsat jako [18]

$$I_\varphi = |U_r|^2 + |U_s|^2 + 2 |U_r| |U_s| \cos(\Delta\phi + \varphi), \quad (2.3)$$

kde fázový rozdíl lze spočítat ze 4 intenzitních záznamů jako [18, 19]

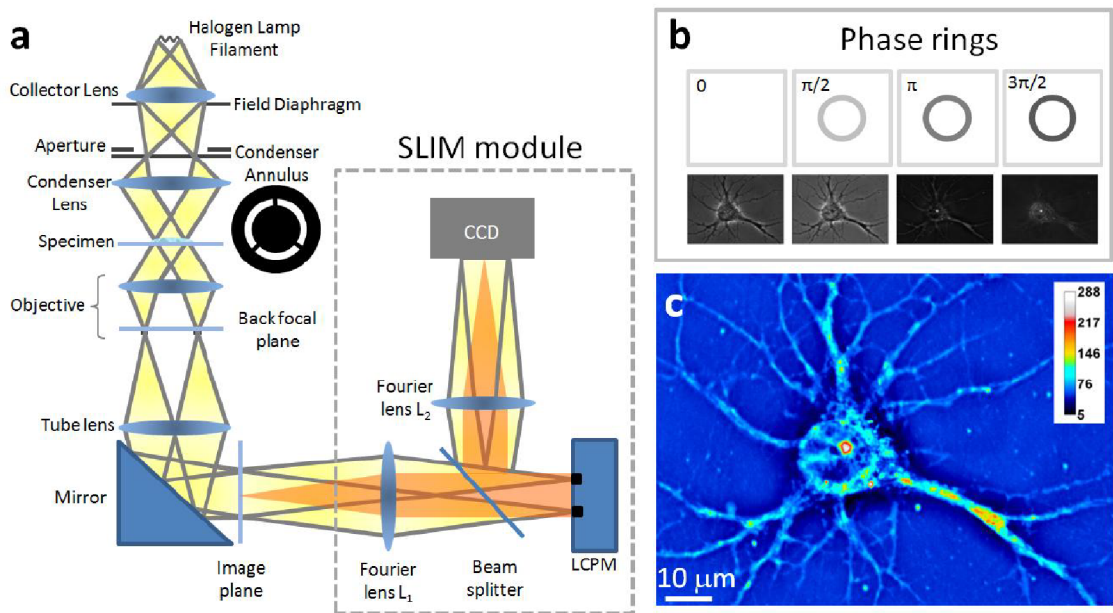
$$\Delta\phi = \tan^{-1} \left( \frac{I_{3\pi/2} - I_{\pi/2}}{I_0 - I_\pi} \right). \quad (2.4)$$

Jelikož signální vlna, na rozdíl od referenční vlny, nedopadá na celou plochu CCD, na některých místech nedochází k interferenci mezi těmito vlnami, a detekujeme tak pouze intenzitu referenční vlny  $|U_r|^2$ . Při rekonstrukci fázového rozdílu by to vedlo k tomu, že v oblastech bez interference bychom dostali prudké změny  $\Delta\phi = \pm\pi$  [19]. Pro správné vyhodnocení fáze je možné využít vztah [18, 19]

$$\phi = \tan^{-1} \left[ \frac{\alpha \sin(\Delta\phi)}{1 + \alpha \cos(\Delta\phi)} \right], \quad (2.5)$$

kde

$$\alpha = \frac{|U_s|}{|U_r|}. \quad (2.6)$$



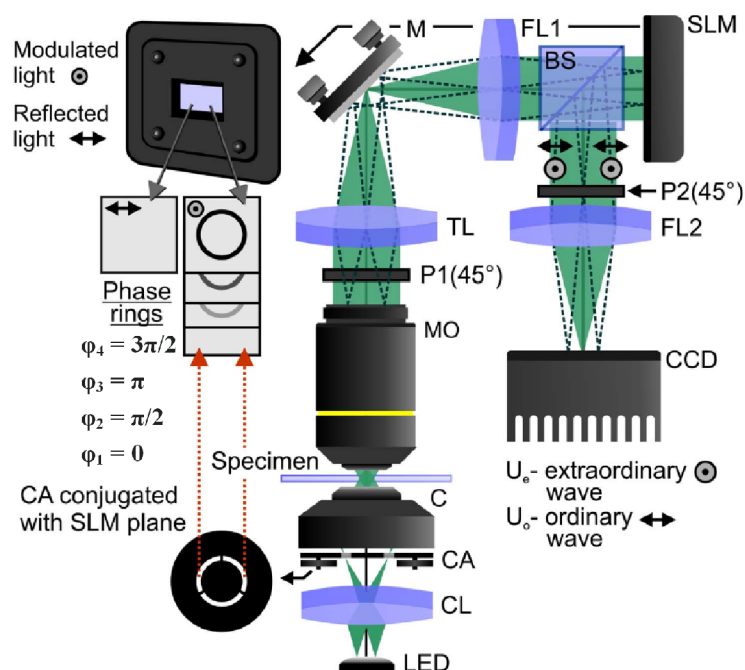
**Obrázek 2.6:** Schéma fázového kontrastu s řízeným fázovým posunutím (a). Fázové masky ve tvaru prstence v rovině modulátoru z kapalných krystalů zavádějící fázové posuny  $\varphi_{1,2,3,4} = 0, \pi/2, \pi$  a  $3\pi/2$  referenční vlně (b). Kvantitativní fázové zobrazení neuronu (c) [18].

### Polarizační mikroskop s řízeným fázovým posunutím

Fázový kontrast s řízeným fázovým posunutím, popsáný v předchozí části, lze vylepšit využitím polarizace.

Tato metoda se liší tím, že je před tubusovou čočkou umístěn lineární polarizátor orientovaný pod úhlem  $45^\circ$ , který dopadající světlo rozdělí na dvě ortogonální složky polarizace. V rovině odrazného prostorového modulátoru světla jsou fázové posuvy zavedeny pouze jedné složce polarizace  $U_e$  a druhá složka  $U_o$  se odráží neovlivněna. Umístění analyzátoru orientovaným pod úhlem  $45^\circ$  umožňuje následnou interferenci těchto dvou složek na detektoru (Obr. 2.7). Po pořízení čtyř záznamů lze, stejně jako u předchozí metody, získat výsledný fázový profil pomocí čtyřkrokového algoritmu popsaného ve vztazích 2.4 a 2.5 [19].





**Obrázek 2.7:** Schéma polarizačního mikroskopu s řízeným fázovým posunutím. Prostorový modulátor světla zavádí fázový posun  $\varphi_{1,2,3,4} = 0, \pi/2, \pi$  a  $3\pi/2$  vlně  $U_e$  a vlnu  $U_o$  nechává beze změny [19].

### Diferenciální fázový kontrast s řízenou osvětlovací částí

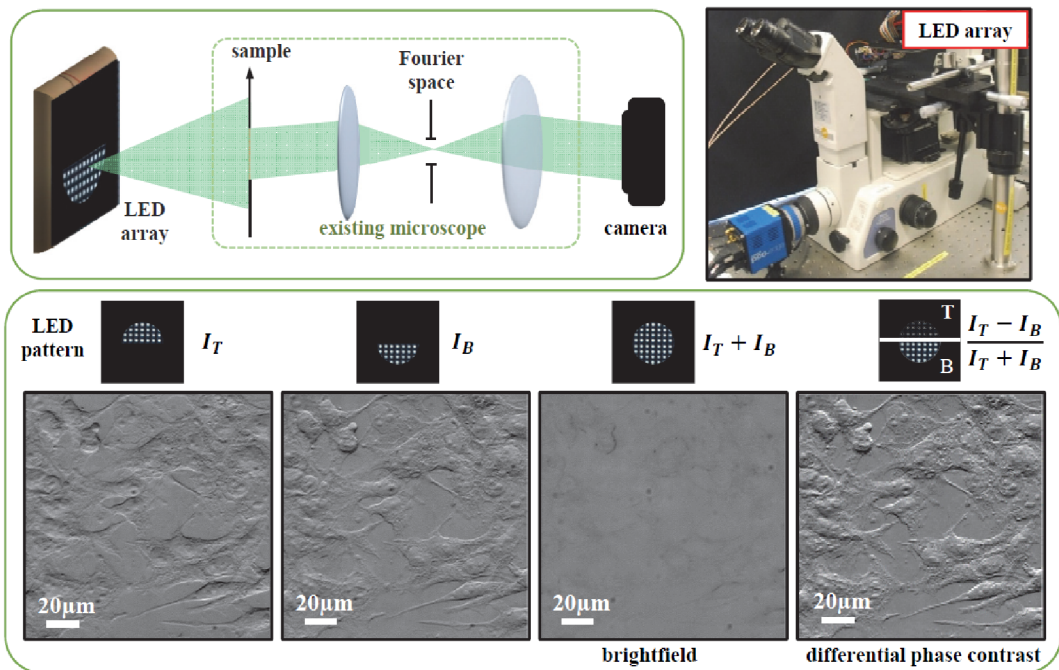
Diferenciální fázový kontrast s řízenou osvětlovací částí je zobrazovací metoda, která využívá záznamu několika obrazů z různých osvětlovacích úhlů. Hlavní výhodou spočívá v jednoduchém začlenění do již existujících mikroskopových zobrazovacích systémů, a to pouze modifikací osvětlovací části, kterou lze provést umístěním displeje z kapalných krystalů do obrazové ohniskové roviny kondenzoru [20], nebo přímo nahrazením zdroje světla programovatelnými maticovými LED zdroji [21].

Pro získání obrazu diferenciálního fázového kontrastu jsou potřeba alespoň dva záznamy se vzájemným natočením masek o  $180^\circ$  (Obr. 2.8). Výsledná intenzita se poté spočítá jako [21]

$$I = \frac{I_T - I_B}{I_T + I_B}, \quad (2.7)$$

kde  $I_T$  značí intenzitu prvního snímku a  $I_B$  intenzitu druhého snímku s maskou otočenou o  $180^\circ$ .

Z intenzity získané ve vztahu 2.7 lze poté spočítat fázový profil pomocí rekonstrukčního algoritmu [21].



**Obrázek 2.8:** Schéma diferenciálního fázového kontrastu s řízenou osvětlovací částí. Různé směry osvětlení lze jednoduše realizovat maticovými LED zdroji světla [21].

S využitím polarizace světla lze do kondenzoru umístit polarizační masku rozdělenou na čtyři části, které propouští lineární polarizaci orientovanou pod úhly  $\alpha = 0^\circ$ ,  $\beta = 135^\circ$ ,  $\gamma = 45^\circ$  a  $\delta = 90^\circ$ . Poté lze s využitím speciální polarizační kamery, která má každý pixel rozdělen na 4 subpixely s lineárními polarizátory stejně orientovanými jako u polarizační masky, zaznamenat čtyři snímky čtyř různých směrů nasvícení zároveň (Obr. 2.9). Intenzity detekované na subpixelech 1,2,3 a 4 lze poté zapsat jako [20]

$$\begin{aligned}
 I_1 &= I_\alpha + 0.5 I_\beta + 0.5 I_\gamma \\
 I_2 &= I_\beta + 0.5 I_\alpha + 0.5 I_\delta \\
 I_3 &= I_\gamma + 0.5 I_\alpha + 0.5 I_\delta \\
 I_4 &= I_\delta + 0.5 I_\beta + 0.5 I_\gamma,
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

kde  $I_\alpha$ ,  $I_\beta$ ,  $I_\gamma$ ,  $I_\delta$  značí detekované intenzity z jednotlivých částí polarizační masky.

Požadované intenzity  $I_A$ ,  $I_B$ ,  $I_C$  a  $I_D$  potřebné pro získání snímku fázového kontrastu lze získat z [20]

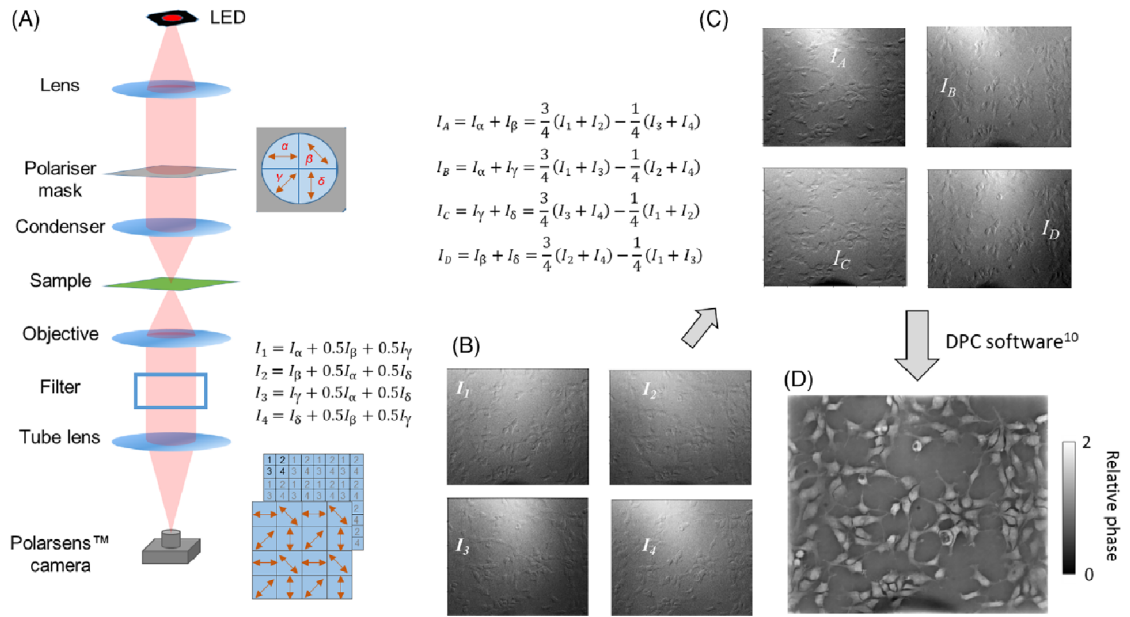
$$\begin{aligned}
 I_A = I_\alpha + I_\beta &= \frac{3}{4}(I_1 + I_2) - \frac{1}{4}(I_3 + I_4) \\
 I_B = I_\alpha + I_\beta &= \frac{3}{4}(I_1 + I_3) - \frac{1}{4}(I_2 + I_4) \\
 I_C = I_\alpha + I_\beta &= \frac{3}{4}(I_3 + I_4) - \frac{1}{4}(I_1 + I_2) \\
 I_D = I_\alpha + I_\beta &= \frac{3}{4}(I_2 + I_4) - \frac{1}{4}(I_1 + I_3),
 \end{aligned} \tag{2.9}$$

Snímky fázového kontrastu pak lze spočítat jako [20]

$$I_{phase_1} = \frac{2(I_A - I_C)}{(I_A + I_C)}$$

$$I_{phase_2} = \frac{2(I_B - I_D)}{(I_B + I_D)}$$
(2.10)

Z intenzit spočítaných v rovnicích 2.10 lze pomocí numerické rekonstrukce získat výsledný fázový profil [20].



**Obrázek 2.9:** Schéma diferenciálního fázového kontrastu s polarizačním záznamem. Různé směry osvětlení se realizují maskou rozdělenou na čtyři segmenty s orientací lineárních polarizátorů pod úhly  $\alpha = 0^\circ$ ,  $\beta = 135^\circ$ ,  $\gamma = 45^\circ$  a  $\delta = 90^\circ$ . Jednotlivé subpixely kamery 1,2,3 a 4 detekují polarizačně rozlišené intenzity  $I_\alpha$ ,  $I_\beta$ ,  $I_\gamma$ ,  $I_\delta$  (a), ze kterých se získají snímky  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  a  $I_4$  (b). Snímky diferenciálního fázového kontrastu  $I_A$ ,  $I_B$ ,  $I_C$ ,  $I_D$  z různých směrů osvětlení (c). Výsledný fázový profil po numerické rekonstrukci (d) [20].

# Kapitola 3

## Teorie

Jak je vidět u předchozí kapitoly, práce s polarizovaným světlem podstatně rozšiřuje možnosti při zobrazení, což s rozvojem výrobních metod vede ke vzniku nových polarizačních prvků, jako je například prostorově strukturovaná fázová destička.

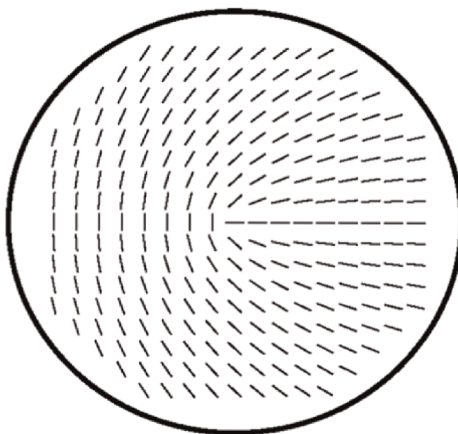
### 3.1 Prostorově strukturovaná fázová destička

Prostorově strukturovaná fázová destička (PSFD) je  $\lambda/2$  fázová destička, jejíž optická osa se postupně stáčí v závislosti na azimutálním úhlu (Obr. 3.1) [3]

$$\theta = 2 \cdot \alpha, \quad (3.1)$$

kde  $\theta$  značí azimutální úhel a  $\alpha$  lokální natočení optické osy  $\lambda/2$  fázové destičky.

Pro PSFD se taktéž užívá komerční název S-waveplate. Vyráběna je pomocí pulzního laseru a vyznačuje se vysokým prahem zničení. Využívá se pro generaci optických vírů s kruhovou polarizací nebo pro tvorbu svazků s radiální a azimutální polarizací [3, 22].



**Obrázek 3.1:** Grafické znázornění lokálního stočení optických os na struktuře PSFD [22].

Pro výpočty s PSFD je vhodné použít Jonesův formalismus pro transformaci polarizovaného světla. Klasická  $\lambda/2$  fázová destička má transformační matici určenou jako

$$\mathbf{T}_{\lambda/2} = \begin{pmatrix} \cos 2\alpha & \sin 2\alpha \\ \sin 2\alpha & -\cos 2\alpha \end{pmatrix}, \quad (3.2)$$

kde  $\alpha$  značí úhel natočení optické osy.

S využitím vztahu 3.1 a dosazením do matice 3.2 lze transformační matici PSFD zapsat ve tvaru

$$\mathbf{T}_{PSFD} = \begin{pmatrix} \cos \theta & \sin \theta \\ \sin \theta & -\cos \theta \end{pmatrix}. \quad (3.3)$$

Pokud PSFD otáčíme, její transformační matice vypadá jako

$$\mathbf{T}_{PSFD} = \begin{pmatrix} \cos(\theta + \beta) & \sin(\theta + \beta) \\ \sin(\theta + \beta) & -\cos(\theta + \beta) \end{pmatrix}, \quad (3.4)$$

kde  $\beta$  značí úhel natočení PSFD.

Při posvícení lineárně polarizovaným světlem a umístěním analyzátoru za PSFD, můžeme výsledný Jonesův vektor zapsat pomocí matic

$$\mathbf{J}' = \mathbf{T}_{LP_2} \cdot \mathbf{T}_{PSFD} \cdot \mathbf{J}_{LP_1}, \quad (3.5)$$

kde  $\mathbf{J}_{LP_1}$  označuje Jonesův vektor pro vstupní lineární polarizaci a  $\mathbf{T}_{LP_2}$  transformační matici pro analyzátor.

Rozepsáním vektoru 3.5 dostaneme

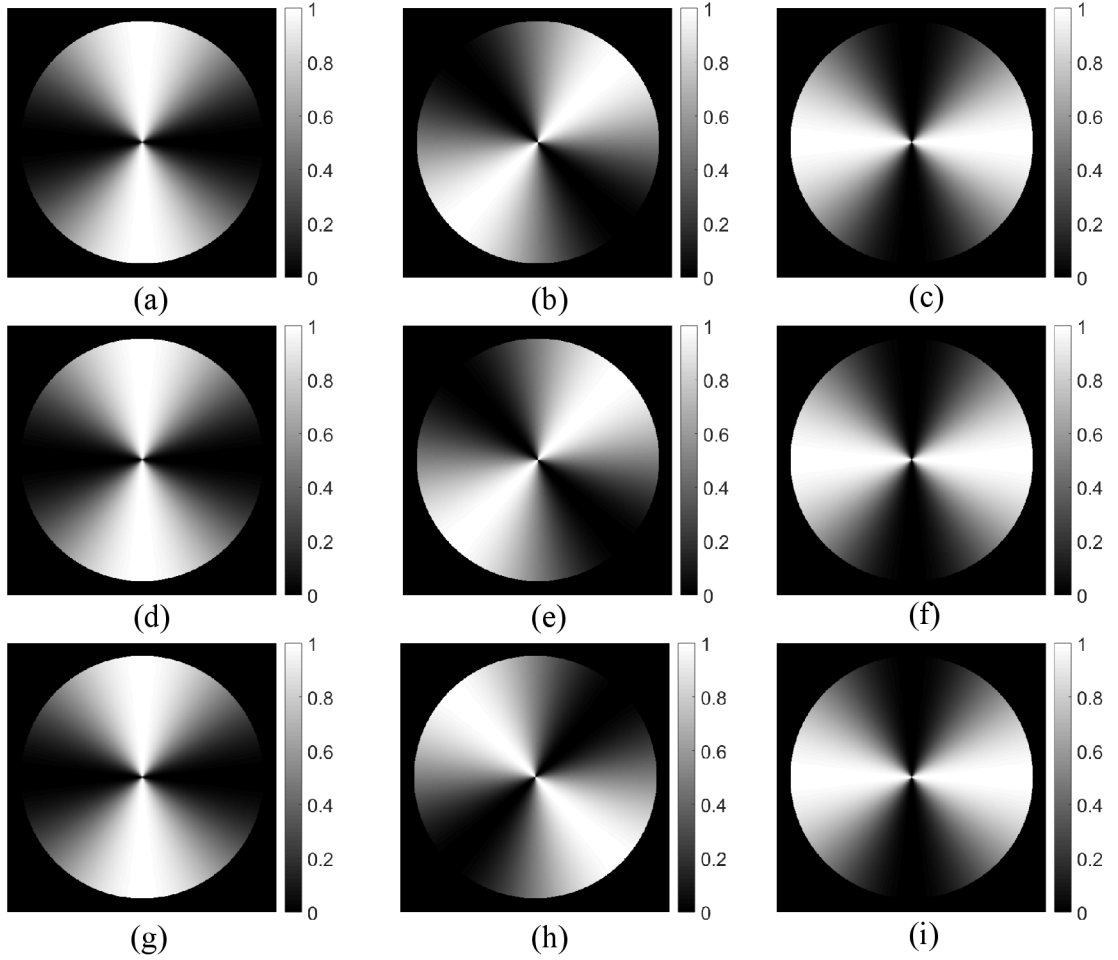
$$\begin{aligned} \mathbf{J}' &= \begin{pmatrix} \cos^2 \alpha_{LP_2} & \sin \alpha_{LP_2} \cos \alpha_{LP_2} \\ \sin \alpha_{LP_2} \cos \alpha_{LP_2} & \sin^2 \alpha_{LP_2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(\theta + \beta) & \sin(\theta + \beta) \\ \sin(\theta + \beta) & -\cos(\theta + \beta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \alpha_{LP_1} \\ \sin \alpha_{LP_1} \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} \cos \alpha_{LP_2} \cos(\theta + \beta - \alpha_{LP_1}) + \sin \alpha_{LP_2} \sin(\theta + \beta - \alpha_{LP_1}) \\ \cos \alpha_{LP_2} \sin(\theta + \beta - \alpha_{LP_1}) - \sin \alpha_{LP_2} \cos(\theta + \beta - \alpha_{LP_1}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \alpha_{LP_2} \\ \sin \alpha_{LP_2} \end{pmatrix}, \end{aligned} \quad (3.6)$$

kde  $\alpha_{LP_1}$  a  $\alpha_{LP_2}$  označují úhel natočení polarizátoru a analyzátoru.

Chceme-li zjistit, jak bude vypadat výsledná intenzita po průchodu PSFD, stačí vynásobit spočítaný Jonesův vektor  $\mathbf{J}'$  s jeho transponovanou verzí  $\mathbf{J}'^T$

$$\mathbf{I} = \mathbf{J}'^T \cdot \mathbf{J}' = \cos^2(\theta + \beta - \alpha_{LP_1} - \alpha_{LP_2}). \quad (3.7)$$

Ze vztahu 3.7 je vidět, že natočení PSFD o úhel  $\beta$  má díky opačnému znaménku za následek otáčení intenzitního obrazce opačným směrem, než kdybychom o stejný úhel ve stejném směru natočili polarizátor nebo analyzátor (Obr. 3.2).

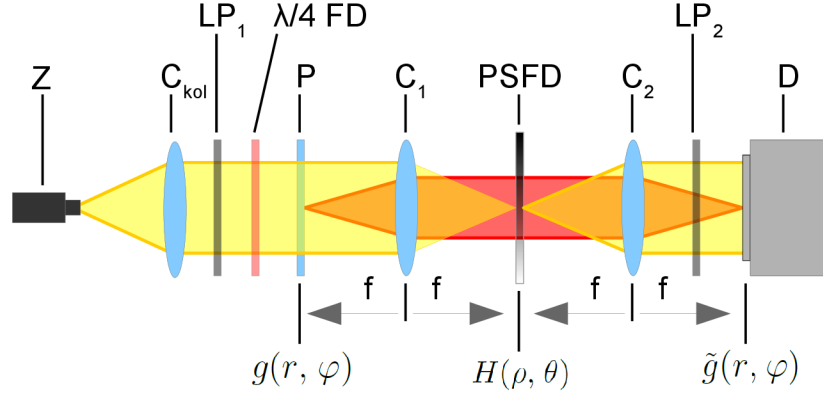


**Obrázek 3.2:** Simulace intenzitního rozložení světla po průchodu PSFD při natočení polarizátoru o úhly  $\alpha_{LP_1} = 0^\circ$  (a),  $45^\circ$  (b) a  $90^\circ$  (c). Úhel natočení analyzátoru je  $\alpha_{LP_2} = 0^\circ$  a natočení PSFD  $\beta = 0^\circ$ . Intenzitní rozložení při natočení analyzátoru o úhly  $\alpha_{LP_2} = 0^\circ$  (d),  $45^\circ$  (e) a  $90^\circ$  (f). Úhel natočení polarizátoru je  $\alpha_{LP_1} = 0^\circ$  a natočení PSFD  $\beta = 0^\circ$ . Intenzitní rozložení při natočení PSFD o úhly  $\beta = 0^\circ$  (g),  $45^\circ$  (h) a  $90^\circ$  (i). Úhel natočení polarizátoru je  $\alpha_{LP_1} = 0^\circ$  a natočení analyzátoru  $\alpha_{LP_2} = 0^\circ$ .

Ve veškerých následujících simulacích je výchozí úhel natočení PSFD  $\beta = 0^\circ$ .

### 3.2 4-f systém s prostorově strukturovanou fázovou destičkou

Umístěním PSFD do 4-f systému lze provést vhodnou filtraci spektra pozorovaného předmětu a zvýraznit tak jeho strukturu. 4-f systém se skládá ze dvou čoček  $C_1$  a  $C_2$ , do jejichž společné ohniskové roviny je PSFD umístěna. V předmětové ohniskové rovině čočky  $C_1$  je umístěn pozorovaný předmět  $P$ , který je osvětlen kolimovaným zdrojem osvětlení. Za kolimační čočkou  $C_{kol}$  je umístěn lineární polarizátor  $LP_1$  a  $\lambda/4$  fázová destička pro generaci požadovaného polarizačního stavu na vstupu. Výsledný obraz následně vzniká po průchodu analyzátozem  $LP_2$  na detektoru  $D$  (Obr. 3.3).



**Obrázek 3.3:** Grafické znázornění 4-f systému s PSFD:  $Z$  - zdroj osvětlení,  $C_{kol}$  - kolimační čočka,  $LP_1$  – lineární polarizátor,  $\lambda/4 FD$  -  $\lambda/4$  fázová destička,  $P$  - předmět,  $C_1$  a  $C_2$  - čočky 4-f systému,  $LP_2$  - analyzátor,  $D$  - detektor.

Tento systém lze bez použití analyzátoru  $LP_2$  popsat pomocí vstupního polarizačního stavu  $\mathbf{J}$  dopadajícího na předmět  $g(r, \varphi)$  a přenosové funkce  $\mathbf{H}(\rho, \theta)$ , která je v našem případě daná transformační maticí  $\mathbf{T}_{PSFD}$  ze vztahu 3.3, s příčným prostorovým omezením ve tvaru kruhové apertury o poloměru  $R$ . Pak lze výsledný filtrovaný obraz  $\tilde{g}(r, \varphi)$  psát ve tvaru [6, 16]

$$\tilde{g}(r, \varphi) = \mathcal{F}\{\mathbf{H}(\rho, \theta)\} * g(r, \varphi) \mathbf{J} = h(r, \varphi) * g(r, \varphi) \mathbf{J}, \quad (3.8)$$

kde  $\mathcal{F}$  označuje Fourierovu transformaci,  $*$  konvoluci a  $h(r, \varphi)$  impulzní odezvu systému, kterou lze spočítat Fourierovou transformací přenosové funkce  $\mathbf{H}(\rho, \theta)$  v polárních souřadnicích jako [6, 16]

$$h(r, \varphi) = \frac{A}{i\lambda f} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \mathbf{H}(\rho, \theta) \mathbf{J} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f} r \rho \cos(\theta - \varphi)} \rho d\rho d\theta, \quad (3.9)$$

kde  $A$  značí konstantní faktor a  $\lambda$  použitou vlnovou délku.

Následně jsou popsány případy pro dopadající lineárně nebo kruhově polarizované světlo, a to při umístění PSFD na optické ose, kdy se pak jedná o osovou filtraci předmětu, a při umístění PSFD mimo optickou osu, kdy je filtrace mimoosová.

### 3.2.1 Osová filtrace

#### Vstupní kruhová polarizace

Natočením optické osy  $\lambda/4$  fázové destičky pod úhlem  $45^\circ$  vůči optické ose polarizátoru  $LP_1$  získáme kruhově polarizované světlo, které osvětluje předmět. Jonesův vektor pro kruhovou polarizaci je pak dán jako

$$\mathbf{J}_{KP} = \begin{pmatrix} 1 \\ \pm i \end{pmatrix}, \quad (3.10)$$

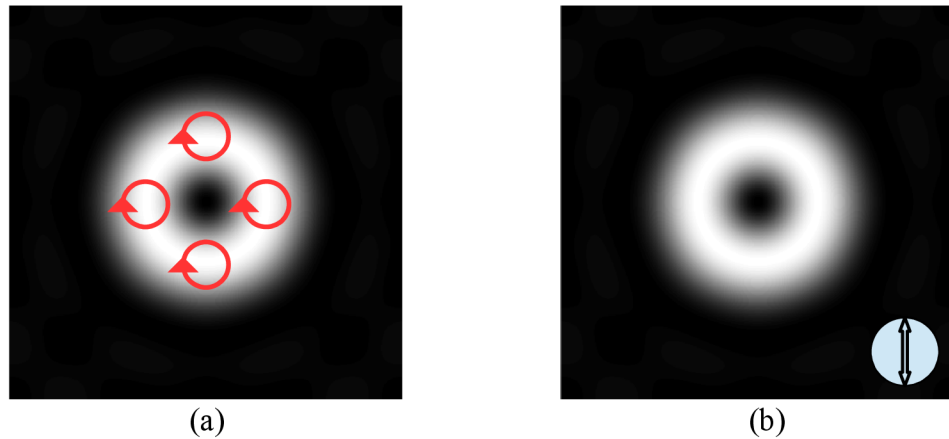
a po dosazení do vztahu 3.9 získáme impulzní odezvu ve tvaru [6, 16]

$$h(r, \varphi) = -\frac{2\pi A}{\lambda f} \begin{pmatrix} 1 \\ \mp i \end{pmatrix} e^{\pm i\varphi} \int_0^R J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda f} r \rho\right) \rho d\rho, \quad (3.11)$$



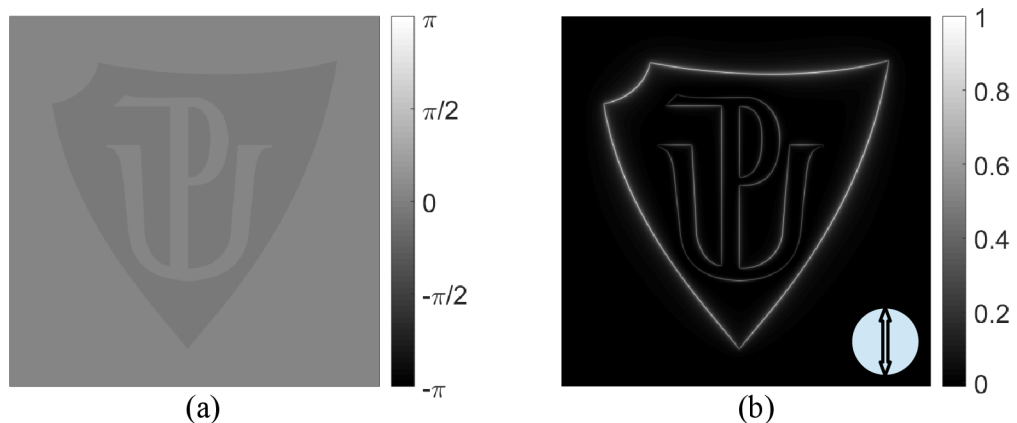
kde  $J_1$  značí Besselovu funkci prvního řádu prvního druhu.

Je vidět, že po filtraci je pravotočivá kruhová polarizace transformována na levotočivou, a naopak levotočivá na pravotočivou. Vyskytuje se zde i optický vír  $e^{\pm i\varphi}$  [23]. Dostáváme tedy vírové pole s kruhovou polarizací (Obr. 3.4a), kde bodová rozptylová funkce  $|h(r, \varphi)|^2$  má tvar prstence. Po umístění analyzátoru před detektor se výsledné intenzitní rozložení nemění, pouze získáme homogenní rozložení lineární polarizace a intenzita klesne na polovinu (Obr. 3.4b).



**Obrázek 3.4:** Simulace bodové rozptylové funkce  $|h(r, \varphi)|^2$ , je-li na vstupu použita kruhová polarizace  $\mathbf{J}_{KP}$ , kde červené šipky znázorňují směr vektoru elektrické intenzity (a). Intenzitní rozložení se po umístění analyzátoru  $LP_2$ , jehož orientace je znázorněna šipkou v modrém poli, nemění (b).

Při osové filtraci s použitím kruhové polarizace tedy vždy získáme izotropní zvýraznění hran u pozorovaného obrazu, a to bez ohledu na to, zda je použit analyzátor či nikoliv (Obr. 3.5b).



**Obrázek 3.5:** Simulace fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$  (a). Po zavedení PSFD do 4-f systému dochází k izotropnímu zvýraznění hran (b).



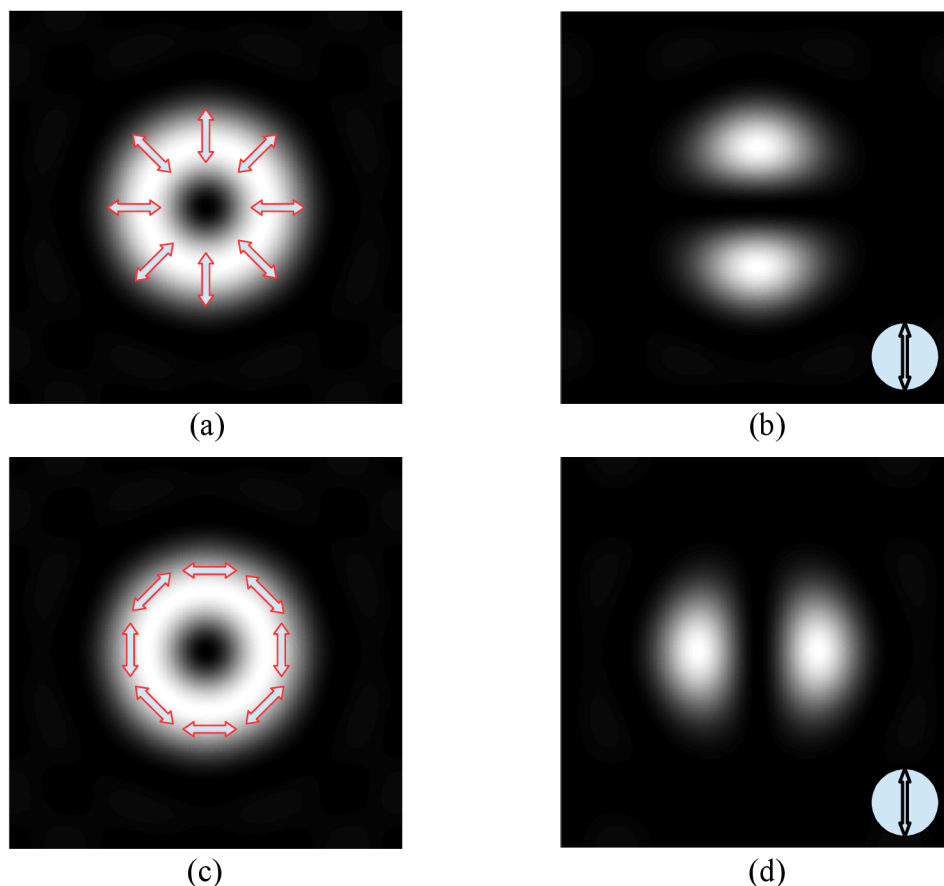
## Vstupní lineární polarizace

Zpětným natočením optické osy  $\lambda/4$  fázové destičky do polohy  $0^\circ$  vůči lineárnímu polarizátoru  $LP_1$  získáme na vstupu lineární polarizaci  $\mathbf{J}_{LP_1}$ , kde po dosazení do vztahu 3.9 vypadá impulzní jako [6, 16]

$$h(r, \varphi) = -\frac{2\pi A}{\lambda f} \begin{pmatrix} \cos(\varphi - \alpha_{LP_1}) \\ \sin(\varphi - \alpha_{LP_1}) \end{pmatrix} \int_0^R J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda f} r \rho\right) \rho d\rho, \quad (3.12)$$

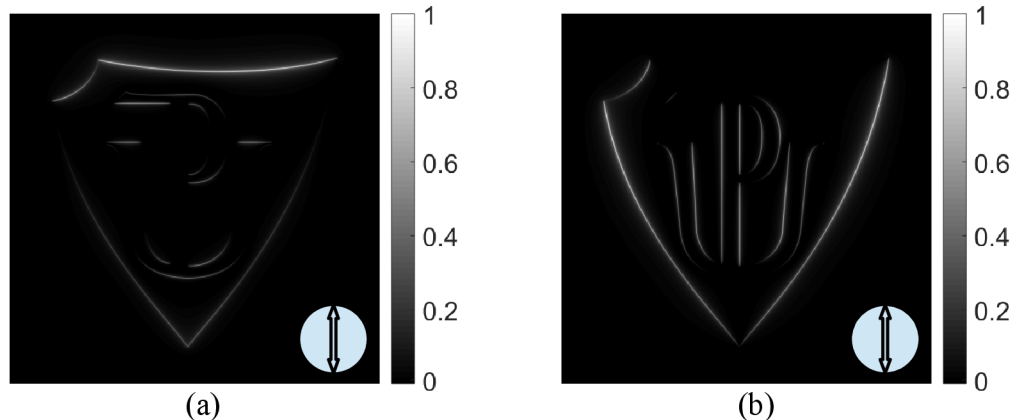
Zde se vyskytuje závislost na azimutální souřadnici  $\varphi$  a na úhlu natočení vstupní lineární polarizace  $\alpha_{LP_1}$ , a to bez vírového členu. Intenzitní profil je bez použití analyzátoru stejný jako v případě vstupní kruhové polarizace (Obr. 3.6a, c).

Pokud na vstupu použijeme lineární polarizaci orientovanou pod úhlem  $\alpha_{LP_1} = 0^\circ$ , na výstupu dostaneme radiální polarizaci (Obr. 3.6a). Když bude na vstupu lineární polarizace orientovaná pod úhlem  $\alpha_{LP_1} = 90^\circ$ , získáme polarizaci azimutální (Obr. 3.6c). To je možné ověřit umístěním analyzátoru před detektor, kde s natočením analyzátoru pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  je u radiální polarizace docíleno intenzitního profilu ve tvaru laloků orientovaných vertikálním směrem (Obr. 3.6b) a u azimutální polarizace horizontálním směrem (Obr. 3.6d). Rotací analyzátoru lze pak měnit orientaci intenzitního rozložení.



**Obrázek 3.6:** Simulace bodové rozptylové funkce  $|h(r, \varphi)|^2$  radiální (a) a azimutální polarizace (c). Červené šipky znázorňují směry vektoru elektrické intenzity. Intenzitní rozložení po umístění analyzátoru orientovaného pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  v případě radiální (b) a azimutální polarizace (d).

Tvar impulzní odezvy (Obr. 3.6b, d) má za následek, že po filtraci má výsledný obraz zvýrazněny hrany pouze v jednom preferovaném směru, a to v závislosti na vzájemné orientaci vstupní lineární polarizace, PSFD a analyzátoru (Obr. 3.7).



**Obrázek 3.7:** Simulace obrazu fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$  po zavedení PSFD do 4-f systému s analyzátozem orientovaným pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$ . V případě radiální polarizace dochází k selektivnímu zvýraznění hran v horizontálním směru (a). U azimutální polarizace dochází ke zvýraznění hran naopak ve směru vertikálním (b).

### 3.2.2 Mimoosová filtrace

Mimoosovou filtrací předmětu lze docílit dalších zobrazovacích režimů, které navíc umožňují zvýraznit strukturu obrazu stínovým efektem a také kontrolovat intenzitu pozadí podle příslušné aplikace.

Posuneme-li PSFD příčně mimo optickou osu ve směru  $\theta_0$  o vzdálenost  $\rho_0$  nepřesahující velikost apertury  $R$ , transformační matice posunuté PSFD je pak dána jako [6, 16]

$$\mathbf{T}_{PSFD_p}(\rho, \theta) = \frac{1}{\sqrt{\rho^2 + \rho_0^2 - 2\rho\rho_0\cos(\theta - \theta_0)}} \times \begin{pmatrix} \rho \cos \theta - \rho_0 \cos \theta_0 & \rho \sin \theta - \rho_0 \sin \theta_0 \\ \rho \sin \theta - \rho_0 \sin \theta_0 & \rho_0 \cos \theta_0 - \rho \cos \theta \end{pmatrix}. \quad (3.13)$$

### Vstupní kruhová polarizace

Při dopadající kruhové polarizaci  $\mathbf{J}_{KP}$  má potom s použitím matice 3.13 a dosazením do vztahu 3.9 výsledná impulzní odezva tvar [16]

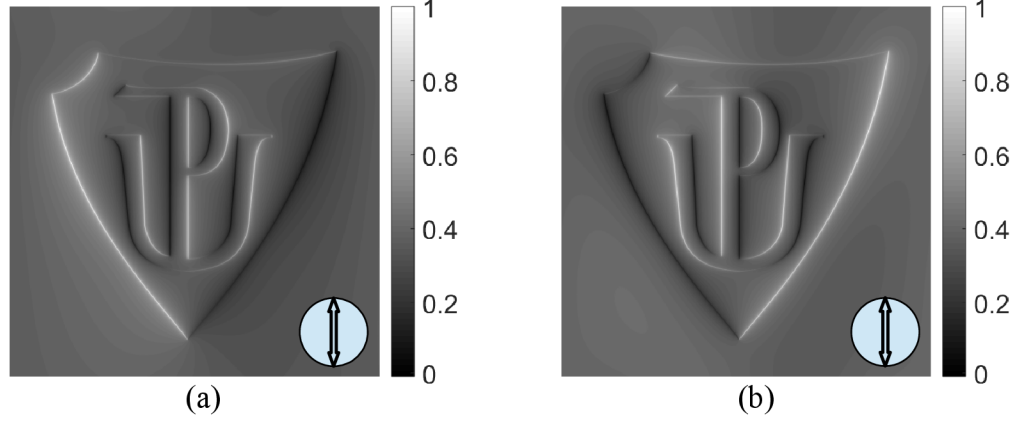
$$h(r, \varphi) = -\frac{A}{\lambda f} \begin{pmatrix} 1 \\ \mp i \end{pmatrix} e^{\pm i\varphi} \int_0^R \rho J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda f} r \rho\right) B(\rho; \rho_0, \theta_0) \rho d\rho - \frac{iA}{\lambda f} \rho_0 \begin{pmatrix} 1 \\ \mp i \end{pmatrix} e^{\pm i\theta_0} \int_0^R J_0\left(\frac{2\pi}{\lambda f} r \rho\right) B(\rho; \rho_0, \theta_0) \rho d\rho, \quad (3.14)$$

kde  $J_0$  označuje Besselovu funkci prvního druhu a nultého řádu, a

$$B(\rho; \rho_0, \theta_0) = \frac{2}{\rho + \rho_0} \left[ C\left(\frac{\theta}{2}, \frac{2\rho\rho_0}{(\rho + \rho_0)^2}\right) - C\left(\frac{\theta - 2\pi}{2}, \frac{2\rho\rho_0}{(\rho + \rho_0)^2}\right) \right] e^{\frac{i\pi}{\lambda f} \rho^2}, \quad (3.15)$$

kde  $C(\theta, m)$  značí eliptický integrál prvního druhu.

Impulzní odezva pro posunutou PSFD ve vztahu 3.14 se tak skládá z členu s vírovou fází  $e^{\pm i\varphi}$  a z členu s nevírovou fází  $e^{\pm i\theta_0}$ , která způsobuje anizotropní zvýraznění hran formou stínového efektu v závislosti na velikosti a směru posunutí PSFD [16]. Tento stínový efekt je obdobný jako v případě použití spirální fázové masky pro zobrazování ve spirálním fázovém kontrastu (Obr. 3.8) [4, 5, 7, 8, 14, 17].



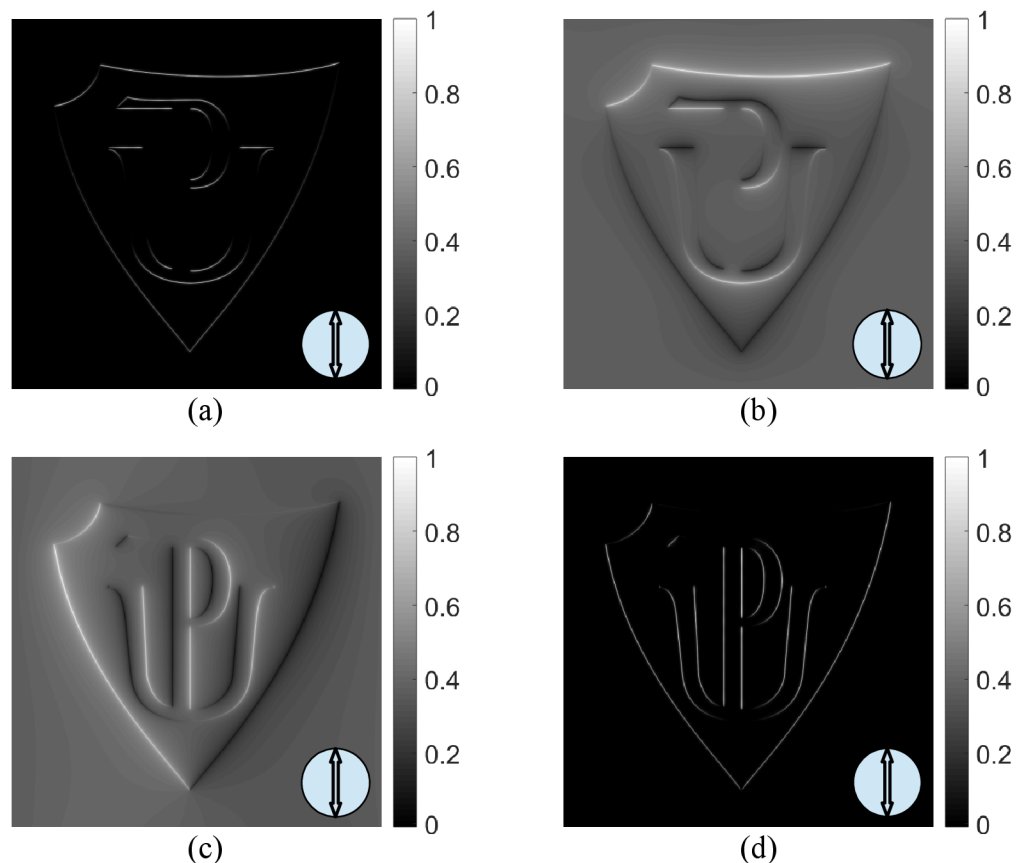
**Obrázek 3.8:** Simulace obrazu fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$ . Po zavedení vyosené PSFD do 4-f systému ve směru  $\theta_0 = 0$  (a) a  $\pi$  (b) dochází k anizotropnímu zvýraznění hran ve formě stínového efektu. Analyzátor orientovaný pod jakýmkoliv úhlem nemá na výsledné rozložení intenzity vliv.

### Vstupní lineární polarizace

Při dopadající lineární polarizaci  $\mathbf{J}_{LP_1}$  a vyosené PSFD má impulzní odezva tvar [16]

$$h(r, \varphi) = -\frac{A}{\lambda f} \begin{pmatrix} \cos(\varphi - \alpha_{LP_1}) \\ \sin(\varphi - \alpha_{LP_1}) \end{pmatrix} \int_0^R \rho J_1 \left( \frac{2\pi}{\lambda f} r \rho \right) B(\rho; \rho_0, \theta_0) \rho d\rho - \frac{iA}{\lambda f} \rho_0 \begin{pmatrix} \cos(\theta_0 - \alpha_{LP_1}) \\ \sin(\theta_0 - \alpha_{LP_1}) \end{pmatrix} \int_0^R J_0 \left( \frac{2\pi}{\lambda f} r \rho \right) B(\rho; \rho_0, \theta_0) \rho d\rho. \quad (3.16)$$

Horní člen připomíná výsledek osové filtrace ve vztahu 3.12 a dolní člen odpovídá pozadí a stínovému efektu. Jak pozadí, tak stínový efekt, jsou na rozdíl od horního členu homogenně lineárně polarizovány ve směru  $\theta_0 - \alpha_{LP_1}$ , což s vhodným natočením analyzátoru o úhel  $\alpha_{LP_2} = \theta_0 - \alpha_{LP_1} + \pi/2$  umožňuje jeho odstranění (Obr. 3.9) [16].



**Obrázek 3.9:** Simulace obrazů fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$ . Po zavedení vyosené PSFD do 4-f systému ve směru  $\theta_0 = 0$  s analyzátozem orientovaným pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  dochází v případě radiální polarizace k potlačení stínového efektu a pozadí, což dá více vyniknout zvýrazněným horizontálním hranám (a). Při vyosení ve směru  $\theta_0 = \pi/2$  dostáváme stínový efekt s potlačenými vertikálními hranami (b). V případě azimutální polarizace získáváme při vyosení ve směru  $\theta_0 = 0$  stínový efekt s potlačenými horizontálními hranami (c) a při směru vyosení  $\theta_0 = \pi/2$  je stínový efekt s pozadím potlačen a více vyniknou vertikální hrany (d).

### 3.2.3 Vliv prostorové koherence na zobrazení

Uvedený teoretický model 4-f systému s PSFD pracuje s koherentním zdrojem světla, jako je například laser, nicméně v experimentech se ukazuje, že tento popis je dostatečný pro demonstraci vlastností plynoucích při zobrazování pomocí PSFD i při použití částečně koherentního zdroje, jako je LED. Ve výsledném obraze se to projeví poklesem kontrastu, ale na rozdíl od laseru se zde nevyskytují parazitní interferenční jevy, nebo jsou do značné míry potlačeny [8, 15]. Teoretický popis studovaného systému pro částečně koherentní světlo je předmětem aktuálních výzkumů [24].

### 3.2.4 Kvantitativní rekonstrukce fáze

Kromě kvalitativní představy o struktuře obrazu je možné snímky se stínovými efekty ze spirálního fázového kontrastu použít pro kvantitativní rekonstrukci fáze. To vyžaduje pořízení alespoň tří záznamů s různými směry vyosení PSFD, které musí být rovnoměrně rozmístěny v intervalu 0 až  $2\pi$ . Intenzitu těchto tří zaznamenaných snímků můžeme poté zapsat jako [7]

$$\begin{aligned} I_{out_{1,2,3}} &= \left| (E_{in} - E_{in_0}) * t e^{i\theta_{0,1,2,3}} + E_{in_0} \right|^2 \\ &= \left| (E_{in} - E_{in_0}) * t \right|^2 + |E_{in_0}|^2 \\ &+ [(E_{in} - E_{in_0}) * t] E_{in_0}^* e^{i\theta_{0,1,2,3}} \\ &+ [(E_{in} - E_{in_0}) * t]^* E_{in_0} e^{-i\theta_{0,1,2,3}}, \end{aligned} \quad (3.17)$$

kde  $E_{in}$  značí komplexní amplitudu vstupního pole,  $E_{in_0}$  nultý řád vstupního pole,  $t$  propustnost spirálního filtru  $t(\rho, \theta) = e^{i\theta}$ , která je realizována PSFD se vstupní kruhovou polarizací. Symbol  $*$  označuje konvoluci a  $*$  komplexní sdružení.

Pro další vyhodnocení je potřeba známé intenzity  $I_{out_{1,2,3}}$  vynásobit známými směry posunutí  $e^{-i\theta_{0,1,2,3}}$  a poté je zprůměrovat jako [7]

$$I_c = \frac{1}{3} [I_{out_1} e^{-i\theta_{01}} + I_{out_2} e^{-i\theta_{02}} + I_{out_3} e^{-i\theta_{03}}], \quad (3.18)$$

což za podmínky, že směry posunutí jsou rovnoměrně rozmístěny v intervalu 0 až  $2\pi$ , vynuší fázové členy ve vztahu 3.17.

Hledanou vstupní komplexní amplitudu je poté možné spočítat z [7]

$$|E_{in}| e^{i(\phi_{in} - \phi_{in_0})} = \frac{(I_c * t^{-1} + |E_{in_0}|^2)}{|E_{in_0}|}, \quad (3.19)$$

až na zanedbatelný fázový posuv  $\phi_{in_0}$ . Je však potřeba znát intenzitu nultého difrakčního řádu  $|E_{in_0}|^2$ . K tomu je potřeba zprůměrovat zaznamenané snímky podobně jako v rovnici 3.18, ale již bez násobení fázovými členy ve tvaru [7]

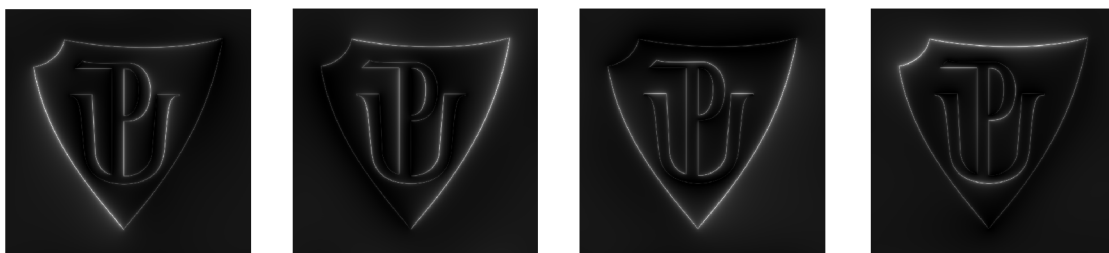
$$I_{avg} = \frac{1}{3} (I_{out_1} + I_{out_2} + I_{out_3}). \quad (3.20)$$

Intenzitu nultého řádu pak lze ze znalosti  $I_{avg}$  a  $I_c$  vypočítat z [7]

$$|E_{in_0}|^2 = \frac{1}{2} I_{avg} \pm \frac{1}{2} \sqrt{I_{avg}^2 - 4 |I_c|^2}. \quad (3.21)$$

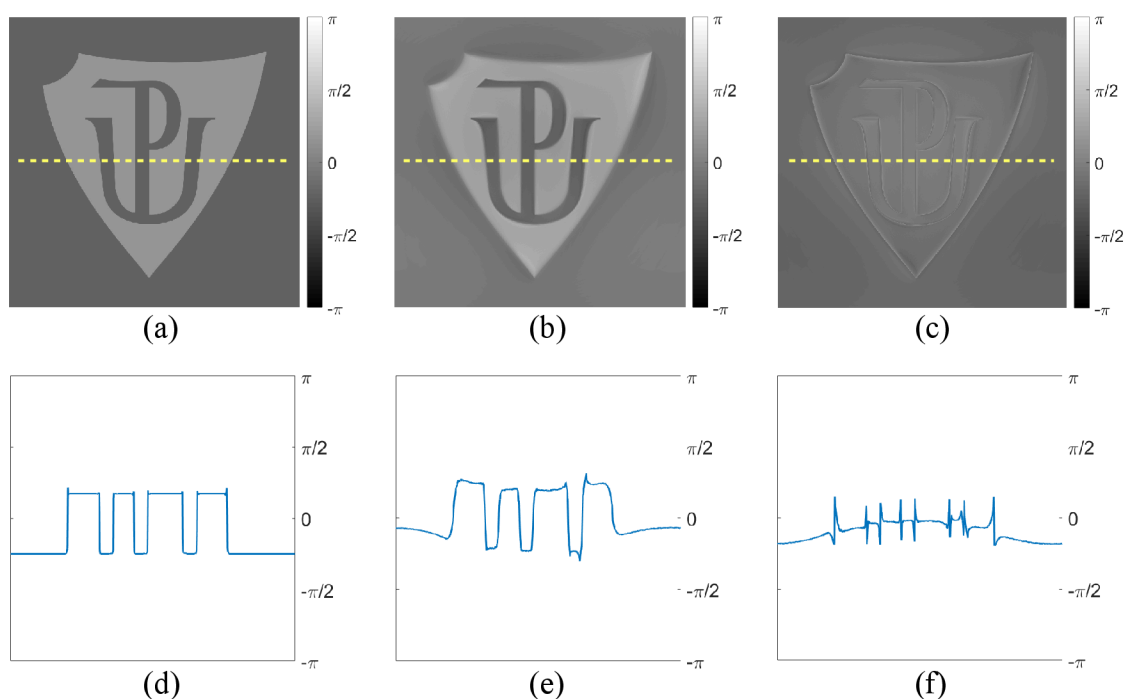
Pro výpočet  $|E_{in_0}|^2$  jsou možná dvě řešení kvůli znaménku  $\pm$  před odmocninou. Kladné znaménko je třeba použít v případě, kdy zobrazujeme amplitudové předměty nebo fázové předměty s nízkou modulací. Záporné znaménko se týká fázových předmětů s velkou hloubkou fázové modulace, zpravidla  $\pi$  a vyšší. Po dosazení  $|E_{in_0}|^2$  ze vztahu 3.21 do rovnice 3.19 pak již máme informaci o fázovém profilu předmětu [7].

Pro ověření postupu byly provedeny simulace předmětů s hloubkou fázové modulace  $\pi/4$  a  $\pi/16$  s příslušnými stínovými efekty po vyosení PSFD ve směrech  $\theta_{0,1,2,3,4} = 0, \pi/2, \pi, \text{ a } 3\pi/2$  (Obr. 3.10, 3.12). Jedná se tedy o rekonstrukci ze čtyř snímků namísto ze tří, a to z toho důvodu, že při následné experimentální realizaci je posun PSFD prováděn na posuvu s horizontálními a vertikálními směry.

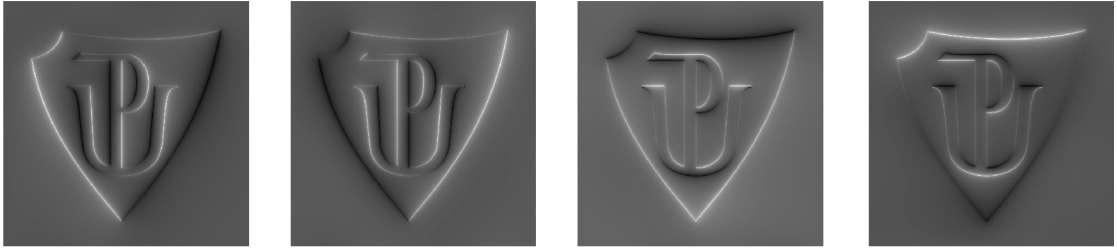


**Obrázek 3.10:** Simulace stínových efektů u předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/4$  až  $\pi/4$ , které jsou potřebné pro kvantitativní rekonstrukci.

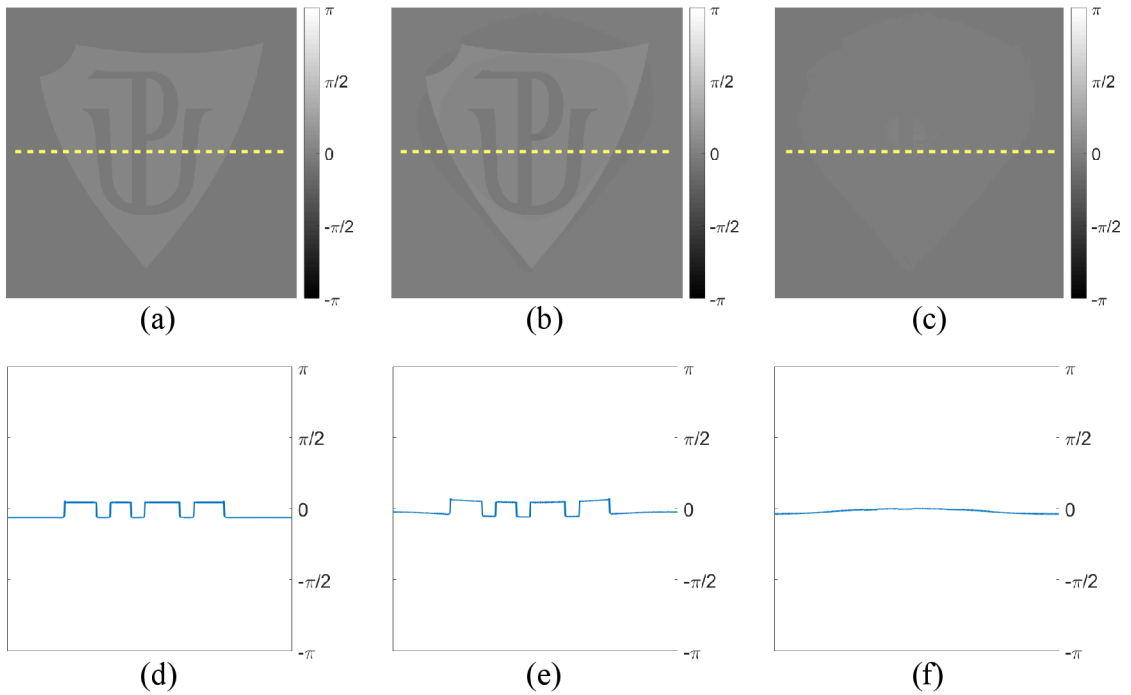
Po numerické rekonstrukci ze stínových efektů je získán fázový profil, který se od původního snímku mírně odlišuje v závislosti na rozsahu fázové modulace. To lze demonstrovat na rozdílu původního předmětu a rekonstruovaného předmětu, kde s rostoucím rozsahem fázové modulace roste i tento rozdíl (Obr. 3.11, 3.13).



**Obrázek 3.11:** Simulace původního fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/4$  až  $\pi/4$  (a). Simulace předmětu po numerické rekonstrukci ze snímků stínových efektů (b). Rozdíl původního a rekonstruovaného předmětu (c). Řezy středy korespondujících snímků ve směru osy  $x$  (d, e, f).



**Obrázek 3.12:** Simulace stínových efektů předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$ .



**Obrázek 3.13:** Simulace původního fázového předmětu s rozsahem fázové modulace  $-\pi/16$  až  $\pi/16$  (a). Simulace předmětu po numerické rekonstrukci ze snímků stínových efektů (b). Rozdíl původního a rekonstruovaného předmětu (c). Řezy středy korespondujících snímků ve směru osy  $x$  (d, e, f).

Výsledné prohnutí v obraze je pravděpodobně způsobeno numerickými artefakty a prostorovým omezením. Projevují se i při rekonstrukci ze snímků pořízených v laboratoři, jak bude ukázáno v experimentální části. Pro předměty s nižším rozsahem fázové modulace výsledná rekonstrukce vychází přesněji.

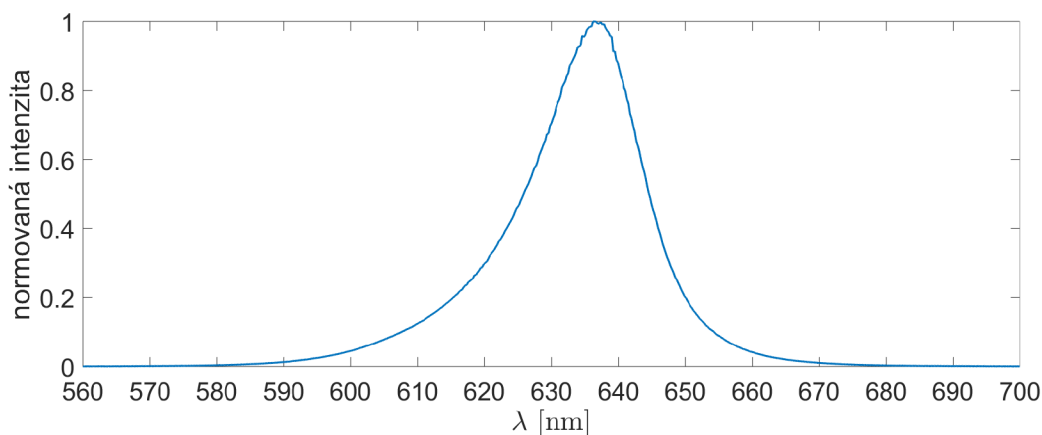
# Kapitola 4

## Experiment

Experimentální část práce ověřuje vlastnosti 4-f systému využívajícího PSFD, které jsou popsány v teoretické části. Je taktéž ukázán vliv prostorové koherence na zobrazení, která je v experimentu ovladatelná clonou se stupnicí. Dále je realizována kvantitativní rekonstrukce fáze ze snímků stínových efektů podle postupu popsaného v teoretické části.

### 4.1 Mikroskop s prostorově strukturovanou fázovou destičkou

Jako zdroj částečně koherentního osvětlení je použita kolimovaná LED M625C4 o spektrální šířce  $\Delta\lambda \approx 40$  nm (Obr. 4.1)[25].



**Obrázek 4.1:** Spektrum LED M625C4 z dat poskytnutých společností ThorLabs [25].

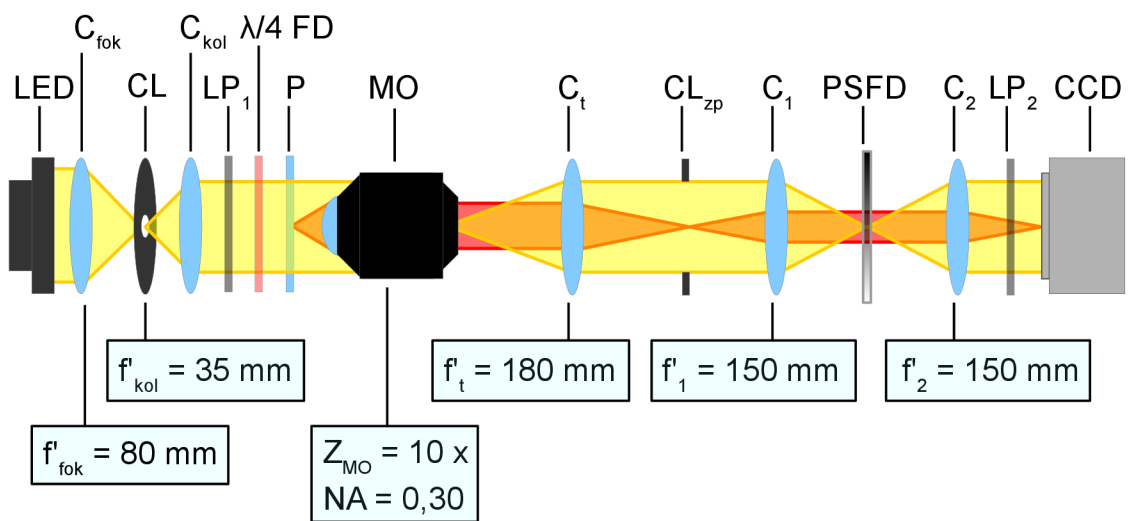
Kolimovaný svazek ze zdroje *LED* je soustředěn fokusační čočkou  $C_{fok}$  o obrazové ohniskové vzdálenosti  $f'_{fok} = 80$  mm do její obrazové ohniskové roviny, ve které je umístěna clona *CL* se stupnicí pro ovládání prostorové koherence zdroje. Poté je svazek opět zkolimován kolimační čočkou  $C_{kol}$  o obrazové ohniskové vzdálenosti  $f'_{kol} = 35$  mm. Následuje polarizátor  $LP_1$  a  $\lambda/4$  fázová destička  $\lambda/4$  *FD* pro generaci požadovaného polarizačního stavu. Vhodným natočením  $\lambda/4$  *FD* vůči  $LP_1$  lze jednoduše přepínat mezi lineární a kruhovou polarizací. Pozorovaný předmět *P* je zobrazen mikroobjektivem *MO* Olympus se zvětšením  $Z_{MO} = 10 \times$  a numerickou aperturou  $NA = 0,30$  v kombinaci s tubusovou čočkou  $C_t$  o obrazové ohniskové vzdálenosti  $f'_t = 180$  mm



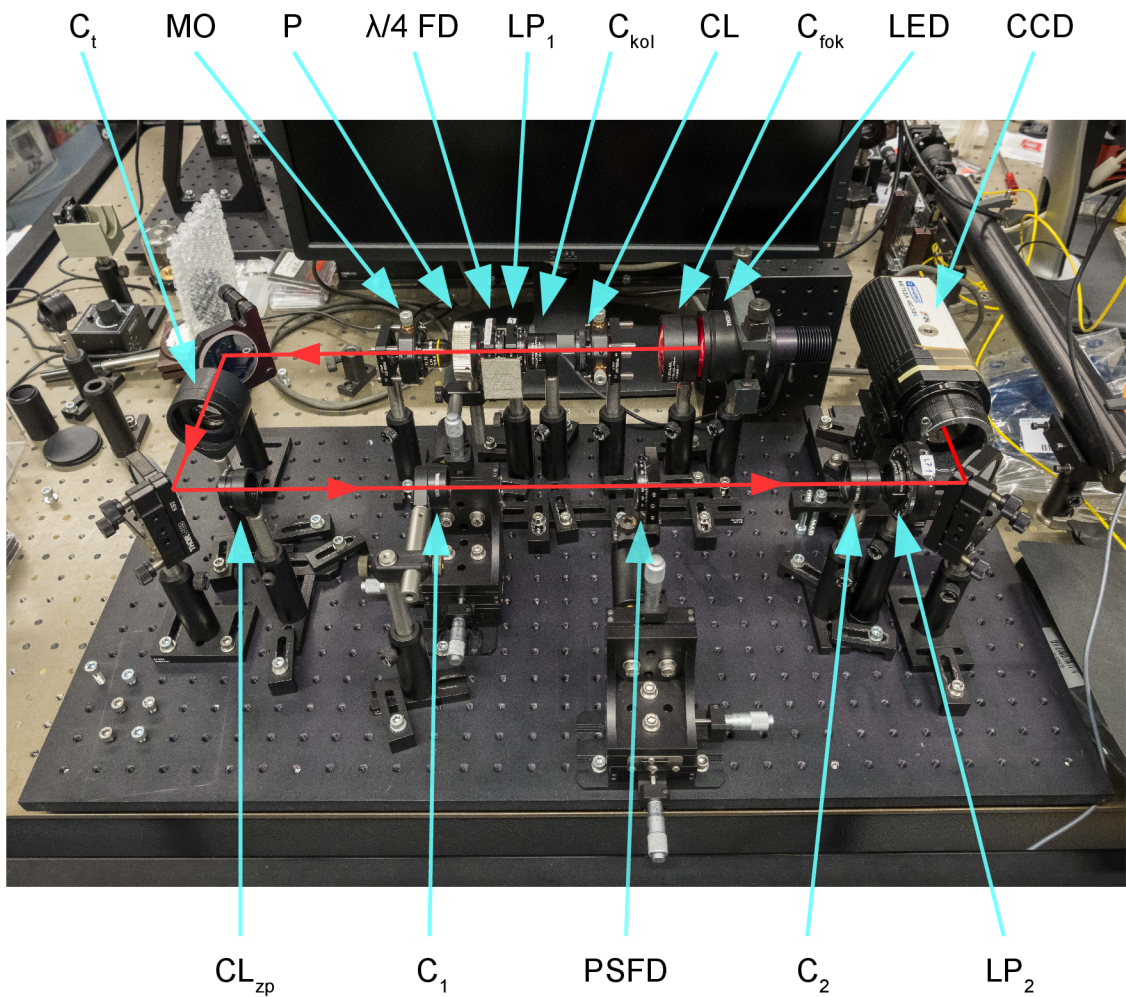
do její obrazové ohniskové roviny, kde je umístěna clona zorného pole  $CL_{zp}$ , odkud je předmět přezobrazěn pomocí 4-f systému s čočkami  $C_1$  a  $C_2$  o obrazových ohniskových vzdálenostech  $f'_1 = 150$  mm a  $f'_2 = 150$  mm na  $CCD$  kameru Retiga 4000R. Kamera má rozlišení  $2048 \times 2048$  pixelů s velikostí jednoho pixelu  $7,4 \times 7,4$   $\mu\text{m}$ .  $PSFD$  je umístěna ve společných ohniskových rovinách čoček 4-f systému na 3D mikrometrických posuvech pro přesné posuny a odečtení vzdálenosti. Před kamerou je umístěn analyzátor  $LP_2$  pro selektivní zvýraznění hran v případě použití radiální a azimutální polarizace (Obr. 4.2, 4.3).

Zvětšení mikroobjektivu je výrobcem uváděno s tubusovou čočkou, jaká je použita v experimentu, není tedy nutný jeho přepočít. Příčné zvětšení celé soustavy je

$$Z = Z_{MO} \frac{f'_2}{f'_1} = 10 \frac{150}{150} = 10 \times . \quad (4.1)$$



**Obrázek 4.2:** Schéma mikroskopu s PSFD:  $C_{fok}$  - fokusační čočka,  $CL$  - clona pro ovládání prostorové koherence,  $C_{kol}$  - kolimační čočka,  $LP_1$  - lineární polarizátor,  $\lambda/4 FD$  -  $\lambda/4$  fázová destička,  $P$  - předmět,  $MO$  - mikroobjektiv,  $C_1$  a  $C_2$  - čočky 4-f systému,  $LP_2$  - analyzátor.



**Obrázek 4.3:** Realizace experimentu v laboratoři:  $C_{fok}$  - fokusační čočka,  $CL$  - clona pro ovládání prostorové koherence,  $C_{kol}$  - kolimační čočka,  $LP_1$  - lineární polarizátor,  $\lambda/4 FD$  -  $\lambda/4$  fázová destička,  $P$  - předmět,  $MO$  - mikroobjektiv,  $C_1$  a  $C_2$  - čočky 4-f systému,  $LP_2$  - analyzátor.

## 4.2 Experimentální výsledky

Jako předmět byl nejprve použit kvantitativní fázový test USAF 1951 s výškami struktur 100 nm, 250 nm a 350 nm, na kterém jsou demonstrovány vlastnosti při využití PSFD pro zobrazování fázových předmětů. Následovala kvantitativní rekonstrukce, která byla provedena na fázovém předmětu se strukturami Siemensovy hvězdy o výškách 100 nm a 350 nm [26].

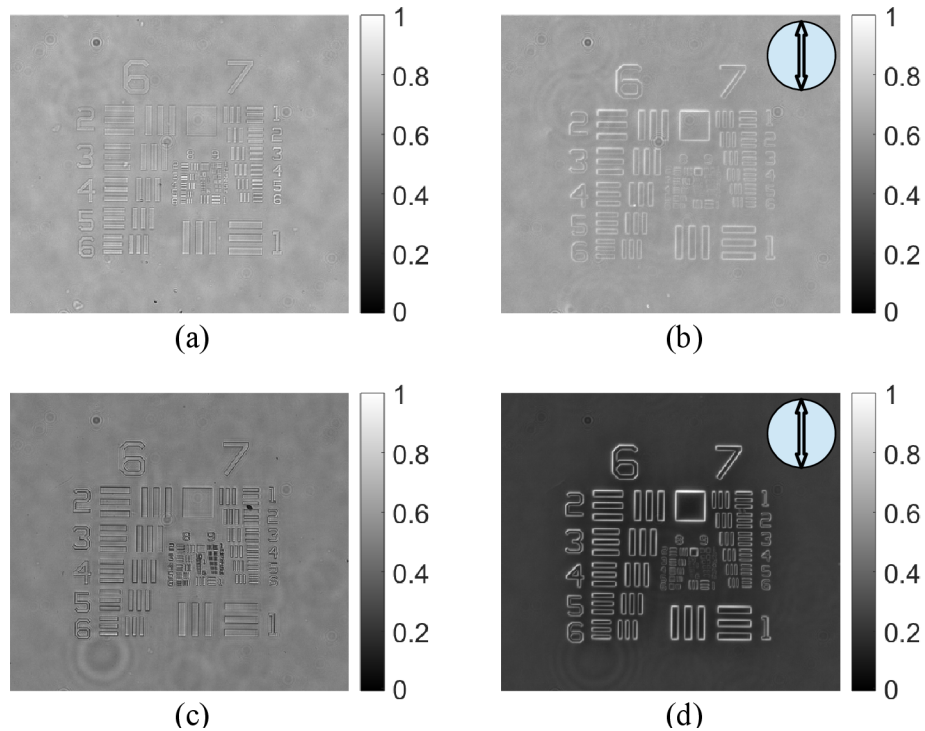
### 4.2.1 Osová filtrace

Nejdříve byl střed PSFD umístěn na střed optické osy pro dosažení požadované osově filtrace předmětu a na vstupu byla použita kruhová a lineární polarizace. Výchozí úhel natočení PSFD je  $\beta = 0^\circ$ .

#### Vstupní kruhová polarizace

U kruhové polarizace na vstupu po filtraci dochází k izotropnímu zvýraznění hran. Analyzátor byl před detektorem natočen pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  bez vlivu na výsledné zobrazení.

Při zobrazení bez použití PSFD má obraz u 100 nm (Obr. 4.4a) i 350 nm výšky (Obr. 4.4c) nízký kontrast, který je po zavedení PSFD značně zvýšen (Obr. 4.4b, d). Ukazuje se, že s tlustšími strukturami je kontrast pozorovaného obrazu při izotropním zvýraznění vyšší (Obr. 4.4d).

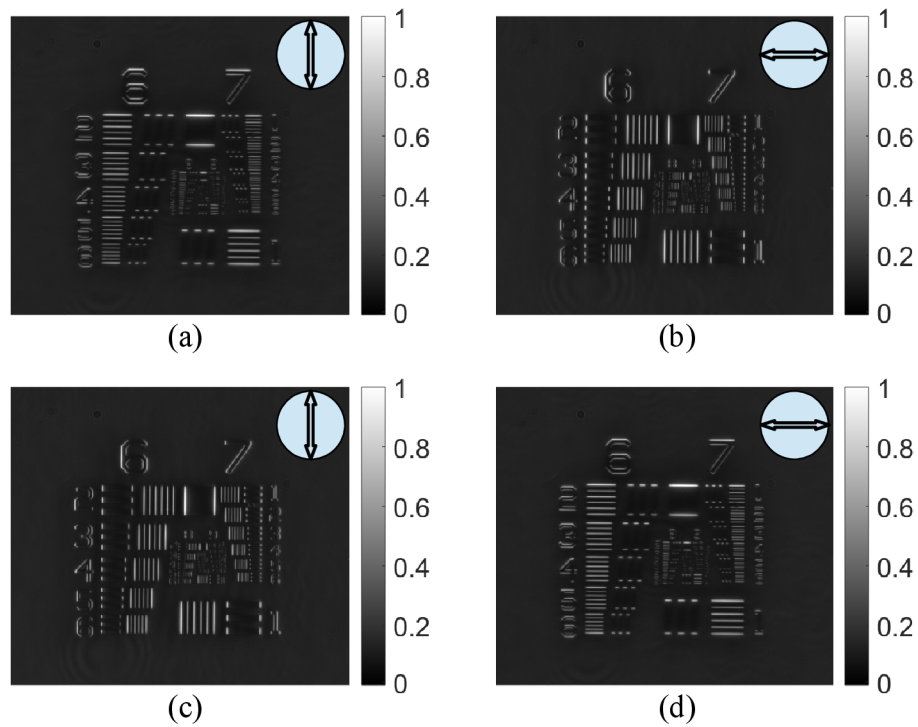


**Obrázek 4.4:** Snímky fázového testu USAF 1951 s výškou 100 nm (a) a 350 nm (c) bez použití PSFD. Po osově filtraci se PSFD dochází k izotropnímu zvýraznění hran (b, d). Orientace analyzátoru nemá vliv na výslednou podobu obrazu.

## Vstupní lineární polarizace

Se vstupní lineární polarizací už při zavedení analyzátoru dochází k selektivnímu zvýraznění hran, na kterém je možné ověřit vlastnosti světelného pole na výstupu s radiální nebo azimutální polarizací.

V případě radiální polarizace je dosaženo zvýraznění hran v horizontálním směru při orientaci analyzátoru  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  (Obr. 4.5a) a při orientaci  $\alpha_{LP_2} = 0^\circ$  jsou zvýrazněny hrany vertikální (Obr. 4.5b). U azimutální polarizace je tomu přesně naopak. Nejdříve jsou zvýrazněny vertikální hrany (Obr. 4.5c) a poté hrany horizontální (Obr. 4.5d).



**Obrázek 4.5:** Snímky fázového testu USAF 1951 s výškou 350 nm po filtraci PSFD s radiální (a, b) a azimutální polarizací (c, d) při použití analyzátoru orientovaného pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  (a, c) a  $\alpha_{LP_2} = 0^\circ$  (b, d).

Pouhým natáčením analyzátoru lze tedy zvýšit nebo snížit kontrast struktury obrazu v libovolném směru podle potřeby dané aplikace.

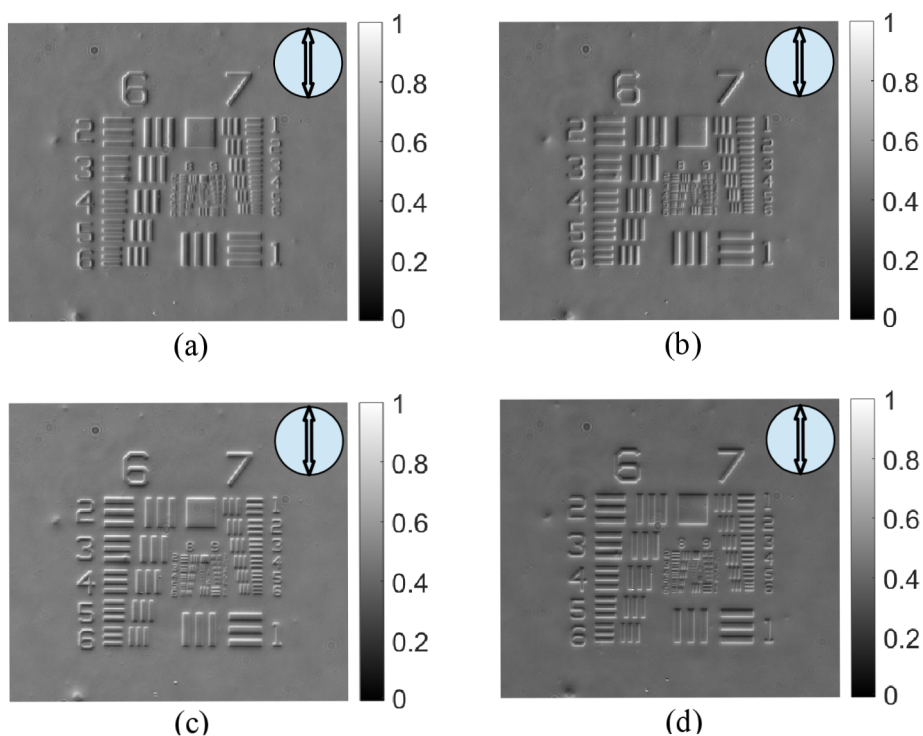
## 4.2.2 Mimoosová filtrace

Mimoosová filtrace byla realizována příčným posunem PSFD o vzdálenost  $\rho_0$  ve směru  $\theta_0$  od optické osy systému na 3D mikrometrických posuvech. Použita byla vstupní kruhová a lineární polarizace.

### Vstupní kruhová polarizace

Se vstupní kruhovou polarizací je po posunu PSFD ve směrech  $\theta_0 = 0, \pi, \pi/2$  a  $3\pi/2$  dosaženo stínového efektu ze čtyř směrů, a to bez žádného vlivu analyzátoru na zobrazení (Obr. 4.6).

Velikost posunutí PSFD závisí na velikosti obrazu zdroje v rovině PSFD, která je kontrolována clonou se stupnicí, jejíž efekty pro různé velikosti budou popsány později.

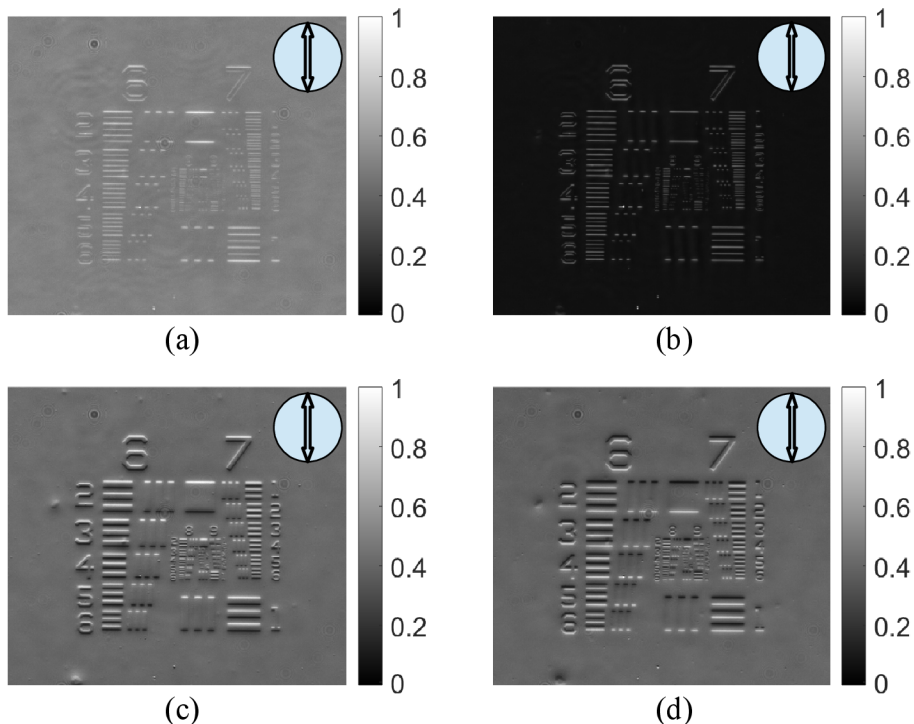


**Obrázek 4.6:** Snímky stínových efektů u fázového testu USAF 1951 s výškou 100 nm po filtraci PSFD s kruhovou polarizací na vstupu po vyosení ve směru  $\theta_0 = 0$  (a),  $\pi$  (b),  $\pi/2$  (c) a  $3\pi/2$  (d).



## Vstupní lineární polarizace

Se vstupní lineární polarizací v případě radiální polarizace dochází při vyosení PSFD ve směru  $\theta_0 = 0$  a natočení analyzátoru pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  k úplnému potlačení pozadí (Obr. 4.7b), kdežto při směrech  $\theta_0 = \pi/2$  a  $3\pi/2$  získáváme stínový efekt s odfiltrovanými vertikálními hranami (Obr. 4.7c, d).



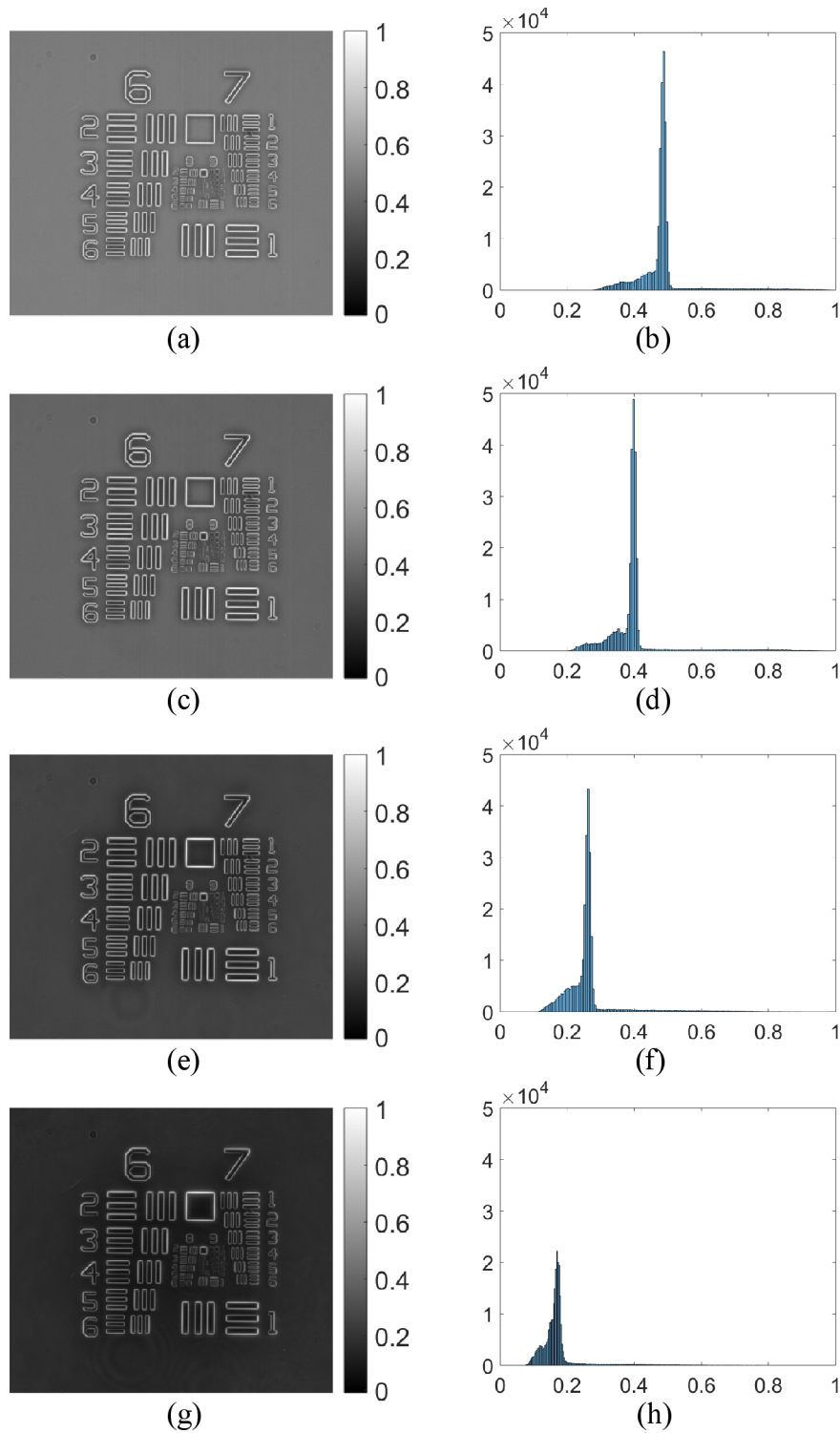
**Obrázek 4.7:** Snímky fázového testu USAF 1951 s výškou 100 nm po osové filtraci PSFD s radiální polarizací se selektivním zvýrazněním hran při použití analyzátoru orientovaného pod úhlem  $\alpha_{LP_2} = 90^\circ$  (a). Potlačení pozadí po vyosení PSFD ve směru  $\theta_0 = 0$  a stínové efekty po vyosení ve směrech  $\theta_0 = \pi/2$  (b) a  $3\pi/2$  (c).

### 4.2.3 Vliv prostorové koherence na zobrazení

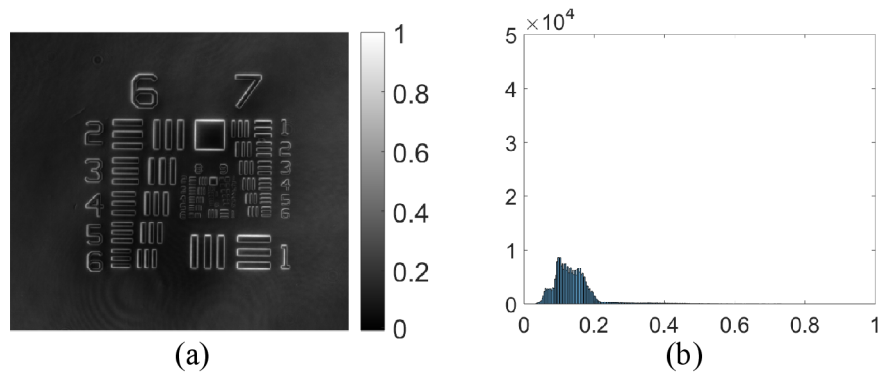
Jak již bylo zmíněno v předchozí podkapitole, na výsledné zobrazení má podstatný vliv prostorová koherence zdroje, která je kontrolována velikostí clony, v jejímž důsledku je obraz zdroje v rovině PSFD různě velký v závislosti na konkrétním nastavení velikosti clony a zvětšení čoček před samotnou PSFD. Proto se konkrétní hodnoty velikosti clony u požadovaného zobrazení mohou pro jiný systém lišit. Ukazuje se, že se zmenšujícím se průměrem clony klesá intenzita pozadí a kontrast obrazu narůstá (Obr. 4.8).

V ideálním případě se nabízí nastavit velikost clony na co nejmenší pro co nejvyšší kontrast, jenže při těchto hodnotách je většina energie u LED zablokována a jsou potřeba dlouhé expoziční časy. Navíc pod velikost 0,5 nm už se začíná projevovat parazitní interference, která byla hlavním důvodem pro použití LED namísto laserového zdroje záření, kde jsou tyto efekty výrazné (Obr. 4.9).

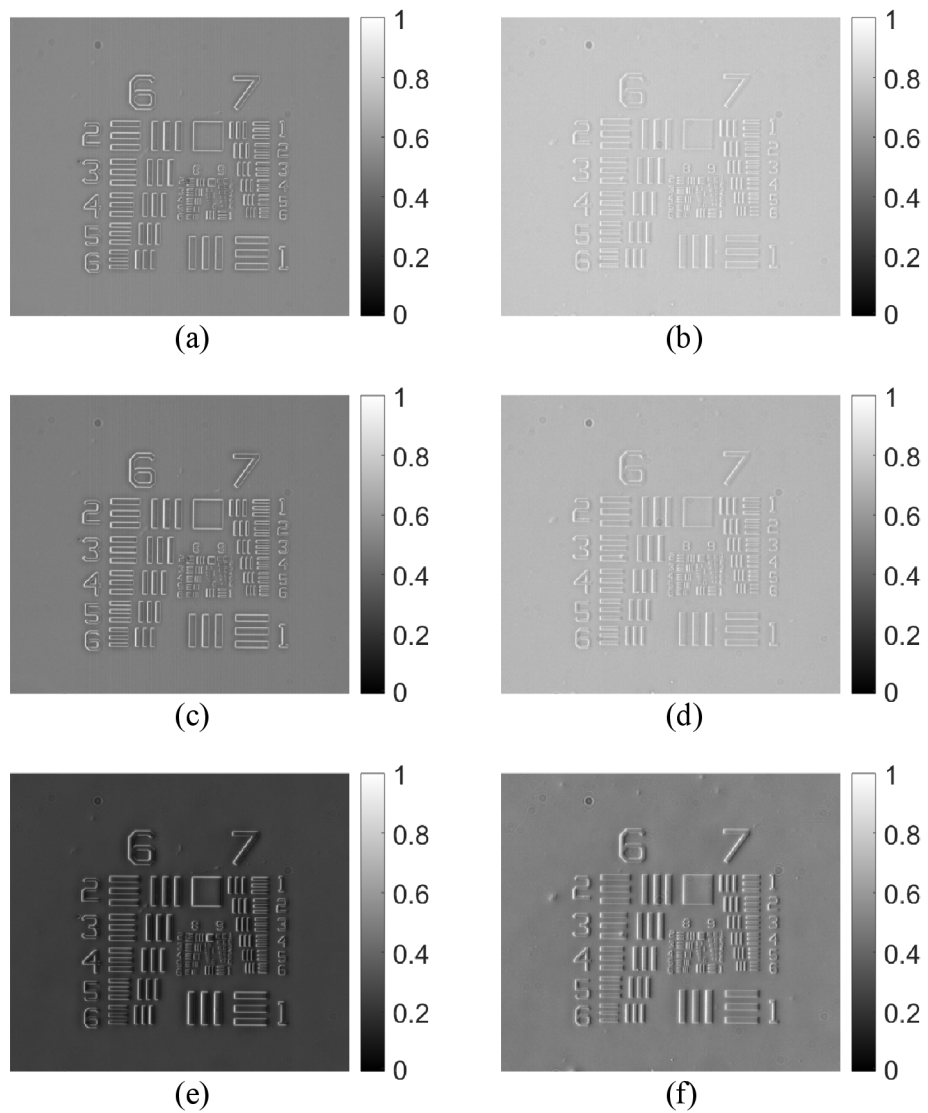
Velikost clony má také při vyosené PSFD vliv na sílu stínového efektu, kde s klesající velikostí clony se snižuje také vzdálenost potřebná pro jeho dosažení (Obr. 4.10). Ze snímků lze také vypořadovat, že stínový efekt je výraznější pro předměty s nižší výškou (Obr. 4.10f).



**Obrázek 4.8:** Izotropní zobrazení fázového testu USAF 1951 s výškou 350 nm a s průměrem clony 3 mm (a), 2 mm (c), 1 mm (e) a 0,5 mm (g). Histogramy ze snímků pro příslušné hodnoty velikosti clony ukazují postupný pokles intenzity pozadí se zmenšující se clonou (b, d, f, h).



**Obrázek 4.9:** Izotropní zobrazení fázového testu USAF 1951 s výškou 350 nm a s průměrem clony 0,25 mm (a), kde se již začíná projevovat parazitní interference. Histogram ze snímku (b).



**Obrázek 4.10:** Stínové efekty fázového testu USAF 1951 s výškou 250 nm (a, c, e) a 100 nm (b, d, f) s průměrem clony 5 mm (a, b), 3 mm (c, d) a 1 mm (e, f) při vyosené PSFD o vzdálenost  $\rho_0 = 100 \mu\text{m}$  ve směru  $\theta_0 = 0$ .



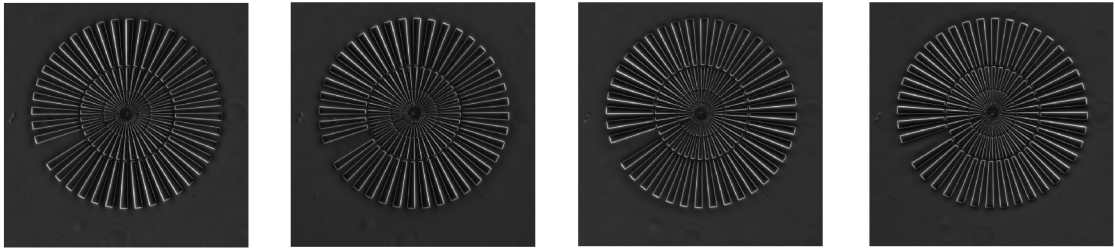
#### 4.2.4 Kvantitativní rekonstrukce fáze

Kvantitativní rekonstrukce byla provedena na struktuře Siemensovy hvězdy o výšce 100 nm a 350 nm, což jsou cílové hodnoty udávané výrobcem [26]. Se samotným kvantitativním testem je také dodáván výsledek kontrolních testů výsledných výšek po výrobě, které činí 114 nm a 384 nm. Pro každou strukturu byla pořízena série snímků stínových efektů ze čtyř směrů (Obr. 4.11, 4.13). Po numerické rekonstrukci byl fázový profil  $\Delta\phi$  přepočten na výšku  $h$  pomocí

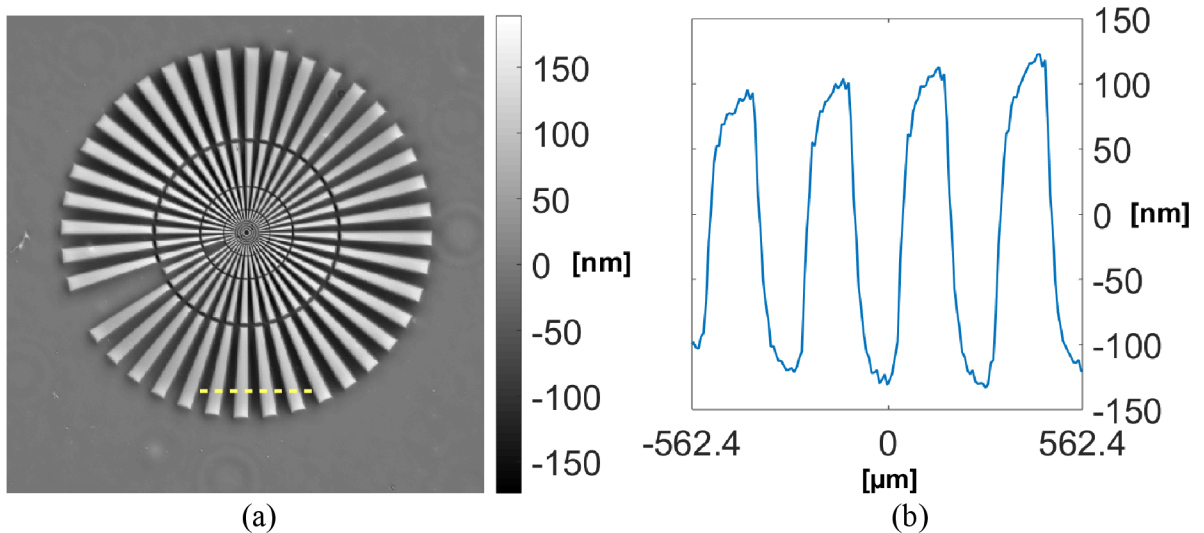
$$h = \frac{\Delta\phi}{(n-1)k}, \quad (4.2)$$

kde  $n$  je index lomu předmětu a  $k$  vlnové číslo. Index lomu výrobce uvádí 1,52 a jako vlnová délka byla použita střední vlnová délka LED  $\lambda_0 = 635$  nm.

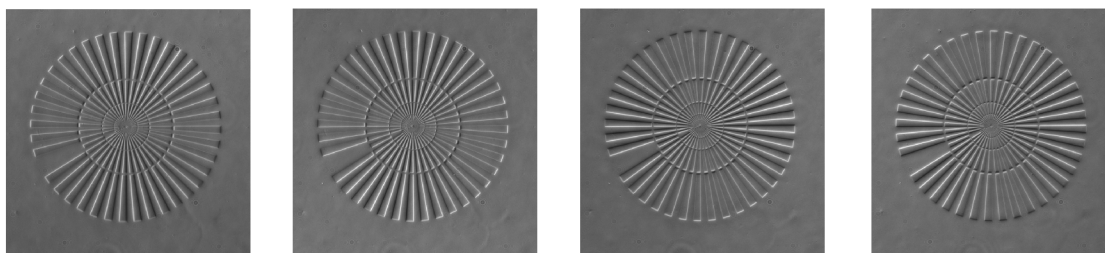
Z výsledků numerické rekonstrukce je vidět, že u obou struktur se ve výsledném obraze projevuje obdobné prohnutí pozorované v simulacích kvantitativní rekonstrukce. Také v souladu se simulacemi lze vyzorovat větší deformaci hran u struktury s vyšší tloušťkou (Obr. 4.12). Vypočtená výška vychází kvůli výslednému prohnutí a deformaci u 114 nm struktury v rozsahu od  $\approx 50$  nm do  $\approx 100$  nm a u 384 nm struktury v rozmezí od  $\approx 130$  nm do  $\approx 300$  nm.



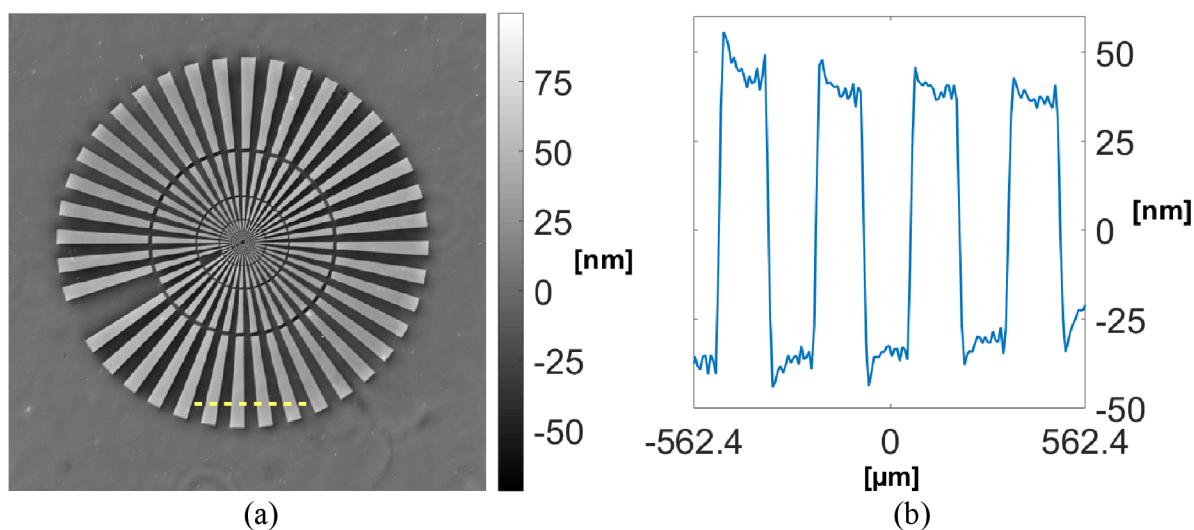
**Obrázek 4.11:** Série snímků stínových efektů u struktury Siemensovy s výškou 384 nm.



**Obrázek 4.12:** Fázový profil po numerické rekonstrukci ze stínových efektů Siemensovy hvězdy s výškou 384 nm přepočtený na výšku v nanometrech (a). Řez strukturou Siemensovy hvězdy v oblasti znázorněné žlutou čarou (b).



**Obrázek 4.13:** Série snímků stínových efektů u struktury Siemensovy hvězdy s výškou 114 nm.



**Obrázek 4.14:** Fázový profil po numerické rekonstrukci ze stínových efektů Siemensovy hvězdy s výškou 114 nm přepočtený na výšku v nanometrech (a). Řez strukturou Siemensovy hvězdy v oblasti znázorněné žlutou čarou (b).

Výsledné nepřesnosti v určení výšky jsou kromě numerických artefaktů pravděpodobně způsobeny prostorovým omezením optických prvků a nižší prostorovou koherencí zdroje, protože popsaný model pro kvantitativní rekonstrukci fáze vychází z plně koherentního zdroje záření. Jak ze simulací, tak z experimentu lze vypožorovat, že u předmětů s nižší výškou a tím pádem menšími fázovými změnami lze dosáhnout přesnějších výsledků. Nicméně i u tlustších předmětů je výsledný obraz jasně rozlišitelný a dává základní představu o struktuře předmětu.

# Kapitola 5

## Závěr

V úvodu práce byly zmíněny vybrané metody světelné mikroskopie umožňující pozorovat obraz předmětu se zvýšeným kontrastem. Taktéž byly uvedeny vylepšené metody umožňující získat navíc kvantitativní informaci o fázi, pro kterou je ale nutné zaznamenat více snímků s fázovým posunem.

V teoretické části práce byla popsána prostorově strukturovaná fázová destička, která využívá vlastností polarizovaného světla. Jejím umístěním do 4-f systému byly na simulaci zobrazení fázového předmětu demonstrovány jednotlivé zobrazovací režimy v závislosti na tom, jaká vstupní polarizace byla použita. Se vstupní kruhovou polarizací bylo dosaženo vlastností typických pro spirální fázový kontrast - izotropní zvýraznění hran a stínový efekt. Se vstupní lineární polarizací bylo možné navíc s použitím analyzátoru realizovat selektivní zvýraznění hran, snížení intenzity pozadí a stínový efekt se selektivně potlačenými hranami. Tyto režimy zobrazení byly navíc doplněny o počítačové simulace v programu MATLAB.

Na simulacích fázového předmětu, s použitím stínových efektů realizovaných posunem prostorově strukturované fázové destičky mimo optickou osu systému, byla numericky provedena kvantitativní rekonstrukce fáze, kde se ukázalo, že přesnost této rekonstrukce klesá u předmětů s větší tloušťkou.

V experimentální části práce byl sestaven mikroskop s prostorově strukturovanou fázovou destičkou umístěnou v 4-f systému za použití částečně koherentního LED zdroje osvětlení, jehož prostorová koherence byla kontrolovatelná clonou se stupnicí. Přestože teoretický popis vychází z plně koherentního zdroje, ukázalo se, že veškeré zobrazovací režimy fungují i s LED zdrojem osvětlení za cenu nižšího kontrastu, ale s nižší mírou parazitní interference, čímž je ve výsledku získán čistší obraz. Tím, že byla prostorová koherence kontrolována, bylo umožněno jednoduše měnit kontrast obrazu podle potřeby. Bylo také ukázáno, že s různým nastavením velikosti clony bylo potřeba prostorově strukturovanou fázovou destičku pro dosažení stínového efektu posunout do jiné vzdálenosti.

Na snímcích stínového efektu, kde byl jako předmět použit kvantitativní fázový test, byla provedena kvantitativní rekonstrukce fáze, která ukázala, že její přesnost klesá se zvyšující se tloušťkou předmětu, nicméně stále poskytuje informaci o jeho struktuře.

Jako možné rozšíření této práce se nabízí teoretický popis a simulace pro zobrazovací model pracující s částečně koherentním světlem a vyzkoušení přesnosti kvantitativní rekonstrukce pro světlo s různou prostorovou koherencí, na základě čehož by bylo možné zvolit optimální parametry pro co nejvyšší přesnost výsledné rekonstrukce. Experiment by dále mohl být vylepšen o elektronicky řízené posuvy a rotace polarizačních prvků.

# Literatura

- [1] TKACZYK, Tomasz S. *Field Guide to Microscopy*. Bellingham, Wash.: SPIE Press, 2010. ISBN 978-0-8194-7246-5.
- [2] Techniques. *MicroscopyU (en-US) - The Source for Microscopy Education* [online]. Nikon Instruments Inc. © 2022 [cit. 15.03.2022].  
Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques>
- [3] ALTECHNA R&D S-waveplate. Linear to radial/azimuth polarization converter. Operation manual. *Workshop of Photonics*, 2013, 1-8.
- [4] FÜRHAPTER, S.; JESACHER, A.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. Spiral phase contrast imaging in microscopy. *Optics Express*, 2005, Vol. 13, No. 3, 689-694.
- [5] JESACHER, A.; FÜRHAPTER, S.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. Shadow effects in spiral phase contrast microscopy. *Physical review letters*, 2005, Vol. 94, No. 23, 233902 1-4.
- [6] ZHANG, B.; CHEN, Z.; SUN, H.; XIA, J.; DING, J. Vectorial optical vortex filtering for edge enhancement. *Journal of Optics*, 2016, Vol. 18, 1-9.
- [7] BERNET, S.; JESACHER, A.; FÜRHAPTER, S.; MAURER, C.; RITSCH-MARTE, M. Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy. *Optics Express*, 2006, Vol. 14, No. 9, 3792-3805.
- [8] ÚLEHLA, P. *Zobrazování metodou spirálního fázového kontrastu*. Olomouc, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra optiky.
- [9] PIPER, T.; PIPER, J. Variable multimodal light microscopy with interference contrast and phase contrast; dark or bright field. *Journal of Microscopy*, 2014, Vol. 255, No. 1, 30-41.
- [10] LANG, W. Nomarski differential interference-contrast microscopy. *Zeiss information*, 1968, No. 70, 114-120.
- [11] LANG, W. Nomarski differential interference-contrast microscopy. II. Formation of the interference image. *Zeiss information*, 1969, No. 71, 12-16.
- [12] RPC Products - Vortex Phase Plates - VPP-m633. *RPC Photonics* [online]. RPC Photonics Inc. © 2007-2022 [cit. 23.03.2022].  
Dostupné z: <https://www.rpcphotonics.com/product/vpp-m633>

- [13] PEŠÁTOVÁ, A. *Mikroskop řízený prostorovým modulátorem světla*. Olomouc, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra optiky.
- [14] MAURER, C.; JESACHER, A.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M. What spatial light modulators can do for optical microscopy. *Laser Photonics Reviews*, 2011, Vol. 5, No. 1, 81-101.
- [15] MIKESKA, F. *Polarizačně řízené zobrazování pomocí půlvlnné prostorově strukturované fázové destičky*. Olomouc, 2020. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra optiky.
- [16] LI, D.; FENG, S.; NIE, S.; MA, J.; YUAN, C. Scalar and vectorial vortex filtering based on geometric phase modulation with a Q-plate. *Journal of Optics*, 2019, Vol. 21, 1-10.
- [17] SITU, G.; PEDRINI, G.; OSTEN, W. Spiral phase filtering and orientation-selective edge detection/enhancement. *Journal of the Optical Society of America A*, 2009, Vol. 26, No. 8, 1788-1797.
- [18] WANG, Z.; MILLET, L.; MIR, M.; DING, H.; UNARUNOTAI, S.; ROGERS, J.; GILLETTE, M. U.; POPESCU, G. Spatial light interference microscopy (SLIM). *Optics Express*, 2011, Vol. 19, No. 2, 1016-1026.
- [19] BOUCHAL, P.; CHMELÍK, R.; BOUCHAL, Z. Dual-polarization interference microscopy for advanced quantification of phase associated with the image field. *Optics Letters*, 2018, Vol. 3, No. 19, 427-430.
- [20] KALITA, R.; FLANAGAN, W.; LIGHTLEY, J.; KUMAR, S.; ALEXANDROV, Y.; GARCIA, E.; HINTZE, M.; BARKOULAS, M.; DUNSBY, C.; FRENCH, P. M. W. Single-shot phase contrast microscopy using polarisation-resolved differential phase contrast. *Journal of Biophotonics*, 2021, 1-6.
- [21] TIAN, L.; WALLER, L. Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope. *Optics Express*, 2015, Vol. 23, No. 9, 11394-11403.
- [22] MATIJOŠIUS, A.; STANISLOVAITIS, P.; GERTUS, T.; SMILGEVIČIUS, V. Formation of second order optical vortices with a radial polarization converter using the double-pass technique. *Optics Communications*, 2015, Vol. 349, 24-30.
- [23] BOUCHAL, Z. Optické víry – Nový směr rozvoje singulární optiky. *Československý časopis pro fyziku*, 2003, roč. 53, č. 1, 11-19.
- [24] VISSER, D. T.; AGRAWAL, G. P.; MILONNI, P. W. Fourier processing with partially coherent fields. *Optics Letters*, 2017, Vol. 42, No. 22, 4600-4602.
- [25] Products Home - Incoherent Sources - Light Emitting Diodes (LEDs). *Thorlabs* [online]. Thorlabs Inc. © 1999-2022 [cit. 09.04.2022].  
Dostupné z: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=2692](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=2692)
- [26] *Benchmark Technologies* [online]. Benchmark Technologies © 2017 [cit. 18.04.2022].  
Dostupné z: <https://www.benchmarktech.com/quantitativephasemicroscop>