



**FAKULTA
STROJNÍ
ČVUT V PRAZE**

Ústav přístrojové a řídicí techniky

Holografický mikroskop

Holographic microscope

DIPLOMOVÁ PRÁCE
2022

Bc. Ondřej Včelák

Studijní program: Automatizační a přístrojová technika

Studijní obor: Přístrojová technika

Vedoucí práce: Ing. Bc. Šárka Němcová, Ph.D.

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Včelák** Jméno: **Ondřej** Osobní číslo: **474997**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávací katedra/ústav: **Ústav přístrojové a řídicí techniky**
Studijní program: **Automatizační a přístrojová technika**
Specializace: **Přístrojová technika**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Holografický mikroskop

Název diplomové práce anglicky:

Holographic microscope

Pokyny pro vypracování:

Navrhnout holografický systém zobrazování předmětu o velikosti cca 0,5mm s rozlišením cca 0,02mm. Systém musí být vhodný pro biologickou aplikaci - sledování růstu embrya v inkubátoru.

- 1) rešerše metod digitální holografie
- 2) rešerše holografických mikroskopů
- 3) vytvoření programu pro rekonstrukci obrazu s využitím volně dostupných knihoven a programů
- 4) experimentální ověření principu snímání a funkčnosti rekonstrukce
- 5) návrh uspořádání mikroskopu
- 6) testy funkčnosti a kvality zobrazení navrženého mikroskopu

Seznam doporučené literatury:

Dvořáková P., Němcová Š., Václavík P.: Holografie, skripta ČVUT
Schnars U., Juepter W.: Digital Holography, Springer 2005
Rosen J.: Holography, Research and Technologies, InTech, 2011

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Bc. Šárka Němcová, Ph.D. odbor přesné mechaniky a optiky FS

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **29.04.2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **09.06.2022**

Platnost zadání diplomové práce: _____



Ing. Bc. Šárka Němcová, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce



podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry



doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

Datum převzetí zadání



Podpis studenta

Anotační záznam

Jméno autora: Bc. Ondřej Včelák

Název práce: Holografický mikroskop

Anglický název: Holographic microscope

Rozsah práce:

86 stran

42 obrázků

4 tabulky

Akademický rok: 2021/2022

Ústav: 12 110 Ústav přístrojové a řídicí techniky

Studijní program: Automatizační a přístrojová technika

Vedoucí práce: Ing. Bc. Šárka Němcová, Ph.D.

Klíčová slova: Digitální holografie, digitální holografická mikroskopie, in-line sestava, laser, interference, numerická rekonstrukce obrazu, propagace světla, sledování růstu embrya

Key words: Digital holography, digital holographic microscopy, in-line assembly, laser, interference, numerical image reconstruction, light propagation, embryo growth monitoring

Abstrakt

Jednou z metod asistované reprodukce je takzvaná in vitro fertilizace. Vajíčka jsou oplodněna mimo tělo ženy a vzniklá embrya jsou poté uložena v kultivačním prostředí uvnitř inkubátoru. Růst a vývoj embryí je následně přibližně 5 dní pozorován a nejkvalitnější embrya jsou následně přenesena zpět do dutiny děložní. Práce má za cíl prozkoumat možnosti využití digitální holografické mikroskopie ke sledování růstu embryí uvnitř inkubátoru. Práce samotná je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V teoretické jsou nejprve představeny principy digitální holografické mikroskopie a 2 druhy sestav mikroskopů. Následně jsou představeny současné aplikace a komerční holografické mikroskopy. Poté následuje popis matematického aparátu použitého k numerické rekonstrukci obrazu. V praktické části je představen postup návrhu a realizace jednotlivých experimentálních sestav digitálního holografické mikroskopu. Poté je představen program pro rekonstrukci obrazu. Následuje popis metodiky záznamu hologramu a vyhodnocení rekonstruovaného obrazu z experimentálních sestav. Nakonec jsou představeny výsledky v podobě vybraných rekonstruovaných hologramů, popisu parametrů mikroskopu a návrhu sestavy pro práci v inkubátoru.

Abstract

One of the methods of assisted reproduction is the so-called in vitro fertilization. The eggs are fertilised outside the woman's body and the resulting embryos are then stored in a culture environment inside an incubator. The growth and development of the embryos is then observed for approximately 5 days and the best quality embryos are then transferred back into the uterine cavity. This thesis aims to investigate the possibilities of using digital holographic microscopy to monitor embryo growth inside the incubator. The thesis itself is divided into theoretical and practical parts. In the theoretical part, firstly the principles of digital holographic microscopy and 2 types of microscope assemblies are introduced. Subsequently, current applications and commercial holographic microscopes are introduced. This is followed by a description of the mathematical tools used for numerical image reconstruction. In the practical part, the design and implementation procedure of the different experimental setups of the digital holographic microscope is presented. Then the image reconstruction program is presented. This is followed by a description of the hologram recording methodology and the evaluation of the reconstructed image from the experimental setups. Finally, the results are presented in the form of selected reconstructed holograms, a description of the microscope parameters and the design of the assembly for work in the incubator.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: “Holografický mikroskop” vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu použité literatury, jenž tvoří poslední kapitolu této práce.

V Praze dne:

.....

(podpis autora)

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce paní Ing. Bc. Šárce Němcové, Ph.D. za odborné vedení, asistenci při práci v laboratoři, a především za skvělou komunikaci a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Petru Lobazovi, Ph.D. za poskytnutí výpočtových skriptů a konzultace ohledně principů digitální holografie.

Obsah

Úvod	9
Teoretická část	10
1 Princip digitální holografické mikroskopie	10
1.1 Laser	11
1.2 In-line sestava.....	14
1.3 Off-axis sestava.....	16
2 Digitální holografické mikroskopy	19
2.1 Biologické aplikace	19
2.2 Měření Microlenses.....	22
2.3 Další aplikace	23
2.4 Přehled komerčních mikroskopů	24
3 Rekonstrukce obrazu	26
3.1 Vlnový model světla	26
3.2 Fázorová aritmetika.....	28
3.3 Helmholtzova rovnice.....	31
3.4 Propagace světla	32
3.4.1 Metoda úhlového spektra	33
3.4.2 Rayleigh-Sommerfeldův difrakční integrál.....	34
3.4.3 Fresnelova aproximace	36
3.4.4 Fraunhoferova aproximace	37
3.5 Diskretizace pro numerické výpočty	38
3.5.1 Vzorkování.....	38
3.5.2 Diskrétní Fourierova transformace	40
3.6 Pokročilejší algoritmy	42
3.6.1 Nastavitelné zvětšení	42
3.6.2 Rozbalení fáze	44
3.6.3 Zdvojený obraz	46
Praktická část.....	48
4 Návrh sestavy digitálního holografického mikroskopu	48
4.1 Sestava pro otestování principu.....	49
4.2 In – line experimentální sestava.....	51

4.3 Upravená sestava bez prostorového filtru	54
4.4 Upravená sestava s laserovou diodou.....	55
5 Program pro rekonstrukci	57
5.1 Popis programu	57
5.2 Další opensource alternativy.....	59
6 Metodika měření.....	61
6.1 Záznam a rekonstrukce	61
6.2 Zpracování získaného obrazu	63
7 Výsledky experimentů	65
7.1 Výběr z rekonstruovaných hologramů	65
7.2 Parametry sestaveného digitálního holografického mikroskopu	71
7.3 Návrh uspořádání mikroskopu pro sledování růstu embryí	74
Závěr	76
Seznam obrázků	78
Seznam tabulek	79
Seznam zkratk a symbolů	80
Seznam příloh.....	82
Použitá literatura.....	83

Úvod

Jednou z metod asistované reprodukce je takzvaná in vitro fertilizace (IVF). Při ní jsou vajíčka oplodněna spermiemi mimo tělo ženy v laboratorních podmínkách (proto in vitro). Pro větší úspěšnost oplodnění je využíváno přímé injekce spermií do vajíčka. Vzniklá embrya jsou přenesena do živného roztoku v kultivační misce a uložena v kultivačním boxu s optimálními podmínkami pro vývoj embrya. Zde je vývoj embryí pozorován po dobu přibližně 5 dní. Na základě pozorování jsou následně vybrána embrya, která se nejlépe vyvíjela a jsou přenesena do dutiny děložní. Zbylá nepoužitá kvalitní embrya je možné zamrazit pro případné další použití.

Motivací pro tvorbu této práce bylo prozkoumání možnosti využití digitální holografické mikroskopie při sledování růstu embryí v inkubátoru. Embrya musí být umístěna ve specifickém prostředí s konstantní teplotou a vlhkostí okolí. Embrya samotná jsou navíc uložena v kultivačním roztoku, jež je překryt vrstvou oleje, aby nedocházelo k vysychání. Na digitální holografický mikroskop jsou kladeny požadavky na rozměry, aby se celý systém vešel do inkubátoru o rozměrech cca $10 \times 10 \times 15 \text{ cm}$. Další požadavky jsou kladeny na kvalitu zobrazení. Mikroskop by měl být schopný zobrazit embrya o velikosti 150 až $300 \mu\text{m}$, při zachování dostatečného zorného pole, aby se na jeden snímek vešlo více embryí z jedné misky. Cílem mé práce je navrhnout digitální holografický mikroskop, který umožní zkoumání předmětu o velikosti přibližně $500 \mu\text{m}$ s rozlišením cca $20 \mu\text{m}$. Po nastudování metod digitální holografie navrhnu a sestavím experimentální holografický mikroskop. Protože fyzicky zaznamenaný obraz je nutné numericky rekonstruovat, vytvořím s pomocí dostupných knihoven program pro rekonstrukci obrazu ze zaznamenaných hologramů. Následně na vybraných vzorcích ověřím funkčnost vyrobené sestavy a programu pro rekonstrukci. Ze získaných poznatků vyvodím možný návrh digitálního holografického mikroskopu pro sledování embryí v inkubátoru.

Práce je rozdělena na dvě části. V teoretické je čtenář nejdříve seznámen s principy digitální holografické mikroskopie. Následně jsou představeny její současné aplikace a komerční holografické mikroskopy. Poté následuje popis matematického aparátu použitého k numerické rekonstrukci obrazu. V praktické části jsou představeny jednotlivé realizované podoby digitálního holografického mikroskopu a postup jejich návrhu. Poté je představen program pro rekonstrukci obrazu. Následuje popis metodiky záznamu hologramu a vyhodnocení rekonstruovaného obrazu z experimentálních sestav. Nakonec jsou představeny výsledky v podobě vybraných rekonstruovaných hologramů, popisu parametrů mikroskopu a návrhu sestavy pro práci v inkubátoru.

Teoretická část

Teoretická část práce je rozdělena do tří kapitol. V první kapitole je představen obecný princip digitální holografické mikroskopie společně s dvěma konfiguracemi pro záznam hologramu. Zároveň je popsán laser v návaznosti na jeho využití jako zdroj záření při záznamu hologramu. Ve druhé kapitole následuje rešerše možných aplikací digitální holografické mikroskopie společně s přehledem komerčních mikroskopů. Třetí kapitola rozsáhle popisuje matematický aparát sloužící pro rekonstrukci obrazu ze zaznamenaného hologramu.

1 Princip digitální holografické mikroskopie

Princip holografie byl objeven roku 1948 maďarským fyzikem Denisem Gaborem. K plnému využití jejího potenciálu došlo až o dekádu později, při objevu laseru. Za objev holografie byla následně v roce 1971 udělena Nobelova cena.[1] Holografie zaznamenává informaci o zobrazovaném objektu díky difrakci a následné interferenci světelných vln. K interferenci dochází mezi vlnou předmětovou, která buď prošla předmětem nebo se od něj odrazila, a vlnou referenční, která s předmětem nijak neinteragovala. Na záznamovém materiálu je zachycena intenzita interferenčního obrazce předmětové a referenční vlny. Tento záznam je označen jako hologram. Nepřímo v sobě nese informaci a amplitudě a fázi zachycené předmětové vlny. Při dalším zpracování hologramu je těchto informací využito k rekonstrukci předmětové vlny a získání výsledného obrazu. Výsledný trojrozměrný obraz snímaného předmětu je rekonstruován z rovinného záznamu. Tím se holografie odlišuje od běžné fotografie. Ta zaznamenává pouze intenzitu dopadající světelné vlny.

Digitální holografie funguje principiálně stejně jako analogová. V analogové holografii je nejdříve zaznamenán hologram na fotografický materiál, například halogenostříbnou emulzi.[2] Rekonstrukce je provedena prosvícením vyvolaného hologramu referenční světelnou vlnou, která byla použita při záznamu. U digitální holografie je hologram zaznamenán na čip kamery, v dnešní době nejčastěji typu CCD. Ve formě digitální informace je hologram uložen do paměti počítače. Má podobu matice, kde jednotlivé členy reprezentují pixely dané kamery a jejich hodnota reprezentuje intenzitu osvětlení daného pixelu. Rekonstrukce digitálního hologramu je provedena numerickými výpočty. Matematický aparát pro rekonstrukci obrazu vychází z metod difrakční optiky, například Kirchhoff – Helmholtzovy transformace, Fresnelovy transformace, Huygensovy konvoluce nebo úhlové spektrální metody.[3]

Digitální holografická mikroskopie (dále jen DHM) nachází v současnosti stále větší využití. Rozvoj je pevně spjatý s vývojem kamerových čipů pro kvalitnější záznam obrazu a také s vývojem počítačových čipů pro rychlejší numerické výpočty. DHM je využíváno v širokém

spektu aplikací, které těží z jejích výhod. Například pro jisté konfigurace DHM není zapotřebí jakýchkoliv optických prvků, což zjednodušuje a zlevňuje celou konstrukci.[4] Dále umožňuje numerické fokusování obrazu do zvolené roviny. Spojením těchto obrazů vznikne trojrozměrný obraz vzorku. Rychlý záznam hologramu a jeho rekonstrukce umožňují sledování pohybujících se vzorků v reálném čase a ve spojení s předchozím bodem i sledování jejich pohybu v prostoru. Výstupní digitální obrazy lze následně automaticky zpracovávat za pomoci algoritmů strojového učení. Například je možné sledovat růst či pohyb buněk v rámci vzorku.[5] Pro využití DHM v medicínských aplikacích jsou výhodné i další vlastnosti holografického záznamu. Sestavy DHM dosahují velkých zorných polí (dále FOV) při zachování dostatečného rozlišení. To je žádoucí například pro statistické zkoumání buněčných vzorků, kdy je vhodné zachytit na jednom snímku co nejvíc buněk. Standardní optické mikroskopy nedisponují všemi výše jmenovanými vlastnostmi naráz.[6] Využití DHM pro medicínské aplikace má navíc tu výhodu, že se jedná o metodu neinvazivního zkoumání. Většina buněčných vzorků je vysoce transparentní a v rámci absorpance a barvy se od svého okolí liší velmi nepatrně. To vede pouze k mírné změně amplitudy světelné vlny procházející vzorkem. Takovéto průhledné vzorky mohou nést označení fázové objekty, protože je možné je zkoumat na základě změny fáze procházející světelné vlny. Ve standardní optické mikroskopii je pro zvýraznění vzorků zapotřebí optických markerů. V digitální holografické mikroskopii není nutné díky informaci o fázi zachyceného světla pro zkoumání buněčných vzorků využívat optických markerů.[7]

V následujících podkapitolách bude popsán princip laseru jako zdroje záření pro záznam hologramu. Dále budou popsány dvě základní geometrie DHM sestavy a jejich vlastnosti.

1.1 Laser

Pro vznik hologramu jako interferenčního vzoru je nutné, aby předmětová a referenční vlna byly koherentní. Jen u koherentního záření lze pozorovat interferenční jevy čili zeslabování a zesilování amplitudy výsledné vlny v závislosti na fázovém rozdílu interferujících vln. Právě proto se v holografii využívá jako zdroj záření laser. Jedná se o zdroj koherentního záření. Koherentní záření reprezentují světelná vlnění o stejné frekvenci a polarizaci, jejichž vzájemný fázový rozdíl se v uvažovaném bodě v prostoru s časem nemění. Výsledná intenzita dvou interferujících vln obecně není pouze součtem intenzit jednotlivých vln I_1 a I_2 . Je dána interferenční rovnicí, ve které vystupuje i takzvaný interferenční člen.

$$I = I_1 + I_2 + \sqrt{I_1 I_2} \cos(\varphi) \quad 1$$

Hodnota interferenčního členu závisí na rozdílu fází jednotlivých vln $\varphi = \varphi_1 - \varphi_2$. Interferenci je možné pozorovat právě jen v případě, že je daný fázový rozdíl konstantní. V případě, že je

interferenční člen kladný, jedná se o konstruktivní interferenci, když je záporný tak je interference destruktivní. Tato podkapitola vychází převážně ze zdroje [3].

Generace záření v laseru je výsledkem přechodu atomů z vyšších energetických hladin E_2 na nižší E_1 . Přitom musí dojít k uvolnění energie ε , a ta je vyzářena ve formě fotonu.

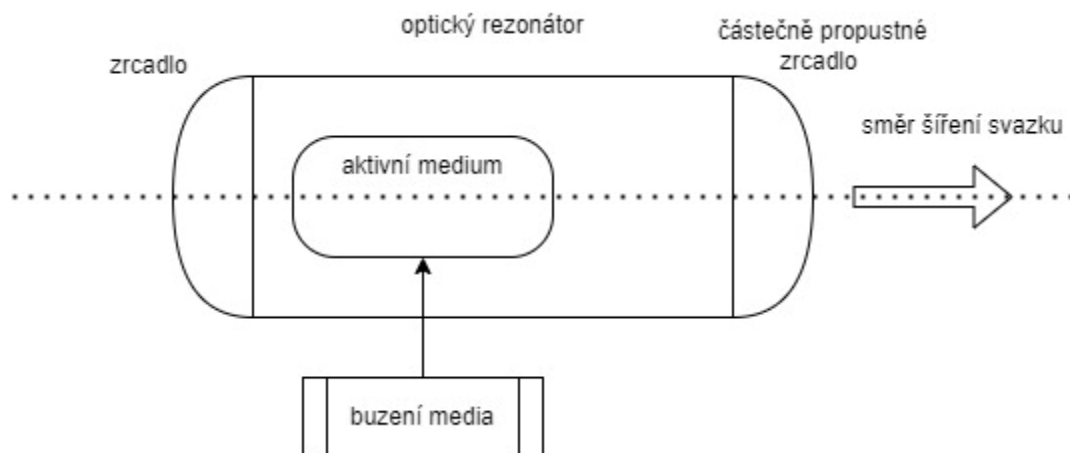
$$\varepsilon = E_2 - E_1 = h * f \quad 2$$

Energie fotonu jde dána Planckovou konstantou h a frekvencí f . S frekvencí je svázaná vlnová délka λ pomocí fázové rychlosti v přes vztah 3.

$$\lambda = \frac{v}{f} \quad 3$$

V ideálním případě jsou pro atomy dané látky hodnoty energetických hladin neměnné. Z toho plyne, že daná látka bude při přechodu mezi hladinami vždy vyzařovat foton o stejné frekvenci potažmo vlnové délce (v reálu vliv okolí způsobí rozšíření energetických hladin a odchylky ve frekvenci). Taková emise může být buď spontánní nebo stimulovaná. Při spontánní atom na základní energetické hladině E_1 absorbuje okolo letící foton a vystoupá na excitovanou hladinu E_2 . Poté dojde náhodně k emisi, foton je opět vyzářen a atom klesne na základní hladinu. U stimulované emise se atom již nachází v excitovaném stavu na hladině E_2 . Po absorpci okolo letícího fotonu dojde k vyzáření dvou fotonů o stejné frekvenci, polarizaci a směru šíření. Směr šíření je shodný se směrem původního fotonu. Atom poté klesne na základní hladinu. Na principu stimulované emise pracuje laser.

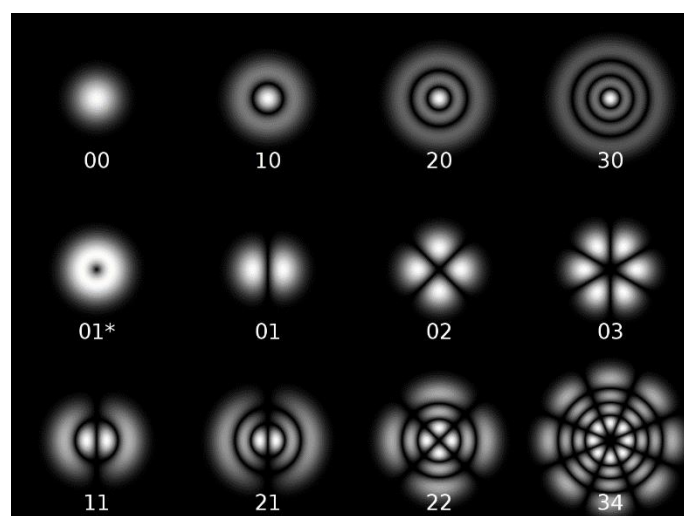
V obecném schématu je laser složen z aktivního prostředí, optického rezonátoru složeného ze dvou zrcadel a systému buzení. Jedno ze zrcadel je částečně propustné, ve směru kudy má z laseru vycházet svazek fotonů. Pro správnou funkčnost je nutné, aby se aktivní médium dostalo do stavu inverze populace hladin. To znamená, že hladina s vyšší energií E_2 bude obsazená více atomy než základní hladina.



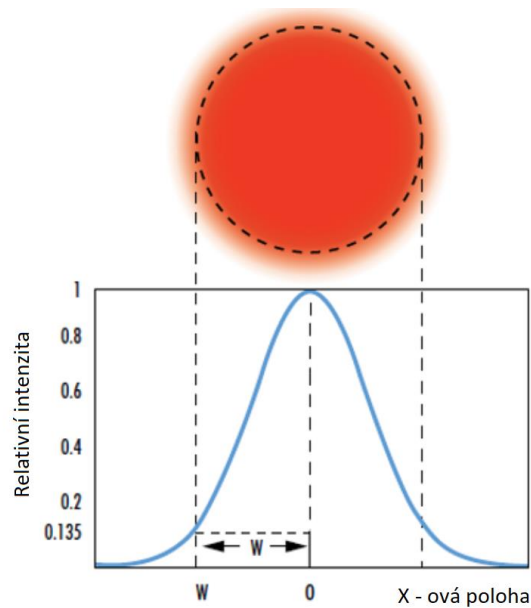
Obrázek 1 - Schéma laseru

Proces lze vysvětlit na helium-neonovém laseru. Vyzařuje na vlnové délce 632.8 nm . Směs plynů je umístěna ve výbojové trubici. Buzení média je vyvoláno doutnavým výbojem. Helium je excitačním prvkem a způsobí inverzi populací hladin neonu. Neon je látkou vyzařovací. Během doutnavého výboje dochází ke kolizím atomů helia a neonu. Excitují na vyšší energetické hladiny. Helium má jeden excitovaný stav, neon dva. Prostředí se nakonec bude nacházet ve stavu inverzní populace hladin pro neon, ve vztahu mezi základní a první excitovanou hladinou. Neon začne přecházet na nižší energetickou hladinu a vyzáří foton. Ten by mohl být absorbován dalším neonem, který už je na nižší energetické hladině. Díky inverzi je však větší pravděpodobnost, že přijde do kontaktu s již excitovaným atomem neonu. Po interakci tak dojde ke stimulované emisi dvou identických fotonů. Vlivem optického rezonátoru je zesilováno záření, které se šíří ve směru optické osy. Fotony postupující v jiném směru postupně opustí aktivní medium a stimulované emise se již nezúčastní. Skrze částečně propustné zrcadlo vychází z laseru ven záření. Vystupující záření z laseru má charakter rovinné monochromatické vlny.

Pro potřeby holografie se používají lasery emitující Gaussovský svazek. Ten pracuje v základním transverzálním elektrickém modu - TEM_{00} . Tento takzvaný příčný mód vymezuje vyzařovací charakteristiku laseru a profil emitovaného svazku. Na obrázku 2 jsou tvary světelných stop příslušející různým příčným módům. Gaussovský svazek (mód TEM_{00}) má sice ideální kruhovou stopu, neposkytuje ovšem rovnoměrné osvětlení předmětu. Intenzita osvětlení je kruhově symetrická okolo optické osy a klesá se zvětšující se vzdáleností od osy (obrázek 3). Zároveň se používají lasery podélně jednomodové. Ty jsou provozovány v jednom podélném modu. Konstruktivní interferencí uvnitř optického rezonátoru je během postupných odrazů zesílena daná vlnová délka. Ostatní jsou potlačeny destruktivní interferencí. Podélné mody tak určují vlnové spektrum laseru.



Obrázek 2 - Transverzální elektrické mody [8]

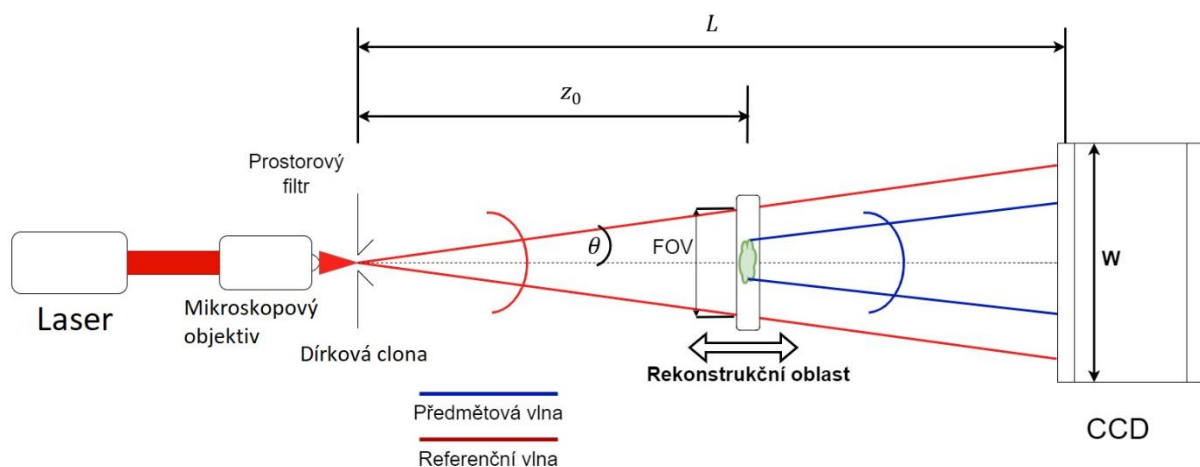


Obrázek 3 - Gaussovské rozložení intenzity [9]

Lasery se třídí dle různých parametrů. Dle způsobu provozu na pulzní a spojitě. Dle aktivního média na plynové (helium-neonový, CO_2), kapalinové, pevnolátkové a polovodičové (hranově vyzařující a VCSEL diody).

1.2 In-line sestava

In-line nebo také osová sestava vychází z původního Gaborova návrhu. Zleva doprava (obrázek 4) se skládá ze zdroje záření, prostorového filtru (složený z objektivu a dírkové clony), osvětleného vzorku a digitální kamery pro záznam hologramu. Při použití pouze s dírkovou clonou (bez objektivu) se jedná o bez-objektivovou sestavu. Dírková clona slouží jako sekundární zdroj koherentní sférické vlny. Vzorek je od dírkové clony umístěn ve vzdálenosti z a záznamový čip kamery ve vzdálenosti L . Všechny prvky sestavy jsou zarovnané v ose.



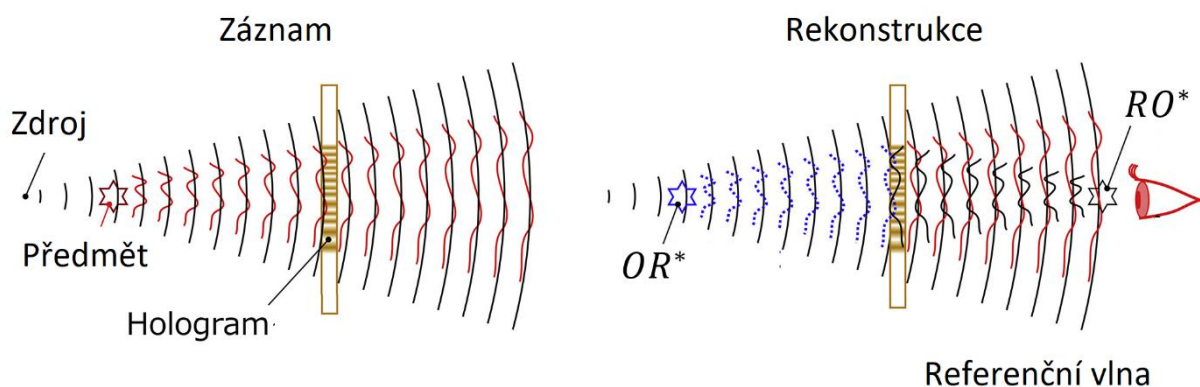
Obrázek 4 - Schéma In-line sestavy

Záznam hologramu probíhá následovně. Referenční vlna R se šíří od dírkové clony směrem ke vzorku. Zde dojde k difrakci světla na vzorku a část světla se rozptýlí. Tak dojde k vzniku předmětové vlny O . Referenční vlna se okolo vzorku šíří dále směrem ke kameře. Tyto dvě vlny spolu po zbytek cesty, díky koherenci, interferují až dorazí do roviny kamery. Zde je vytvořen hologram. Intenzita je v rovině hologramu rozložena dle vzorce 4.

$$I_H = |O|^2 + |R|^2 + OR^* + RO^* \quad 4$$

První dva členy v rovnici jsou intenzity předmětové a referenční vlny. Patří mezi členy nultého difrakčního řádu. Třetí a čtvrtý člen se nazývají interferenčními. Třetí člen OR^* reprezentuje skutečný obraz – primární. Čtvrtý člen RO^* je jeho komplexně sdruženou dvojicí a nazývá se sekundární obraz.[10]

Problém spojený s in-line sestavou je, že všechny čtyři složky se v hologramu překrývají a dochází tak k degradaci obrazu. Díky numerické rekonstrukci je možné s tímto problémem dále pracovat. Intenzita $|O|$ je výrazně menší než R . To za podmínky, že vzorek je dostatečně transparentní objekt. Nebo je tvořen spoustou méně transparentních vzorků, které však nezabírají velkou plochu ve výsledném hologramu. Díky tomu, že člen $|O|^2$ v rovnici jako jediný neobsahuje R , může být dále zanedbán. S druhým členem $|R|^2$ se lze vypořádat pomocí algoritmu odečtu pozadí. Na kameru se zachytí samotná referenční vlna bez průchodu vzorkem. Daný záznam se tak bude skládat pouze z intenzity referenční vlny $|R|^2$. Před rekonstrukcí hologramu se vzorkem od sebe lze odečíst hologram a záznam intenzity referenční vlny. V rovnici 4 už poté zůstávají pouze interferenční členy.[11] Sekundární obraz reprezentovaný členem RO^* se nazývá v anglické terminologii *twin image*. Jeho potlačení lze dosáhnout numericky.[12] Podrobnější matematický popis dané problematiky a vzniku interferenčního obrazce se nachází v kapitolách Fázorová aritmetika a Zdvojený obraz. Na obrázku 5 je zobrazen principiální záznam a rekonstrukce hologramu. V pravé části je naznačeno překrytí primárního a sekundárního obrazu v ose pozorovatele při použití in-line sestavy.



Obrázek 5 - Princip in-line [13]

V sestavě bez použití objektivu mezi dírkovou clonou a kamerou je numerická apertura (NA) systému definována rovnicí 5. Kde n je index lomu prostředí, ve kterém probíhá propagace světla, a θ je poloviční úhel kužele světla mezi dírkovou clonou a kamerou.

$$NA = n * \sin(\theta) \quad 5$$

Pro případ geometrie dané in-line sestavy lze NA vypočítat pomocí vztahu 8. Předpoklady pro použití tohoto vztahu zahrnují velmi malý úhel θ a index lomu blízký 1.

$$\tan(\theta) = \frac{W}{2L} \quad 6$$

$$NA = \sin\left(\tan^{-1}\left(\frac{W}{2L}\right)\right) \quad 7$$

$$NA \cong \frac{W}{2} \left[\left(\frac{W}{2}\right)^2 + L^2 \right]^{-0.5} \quad 8$$

NA poté závisí na vzdálenosti L mezi zdrojem sférické vlny a kamerou a šířce W záznamového čipu. Ta je dána součinem počtu pixelů na jedné ose a jejich fyzické velikosti Δx . Parametry jsou zobrazeny v obrázku 4. Rozlišení daného systému lze definovat jako nejmenší vzdálenost mezi dvěma body, které lze od sebe ještě rozlišit. Dle Abbeho difrakčního limitu má větší hodnota NA příznivý vliv na teoretické hodnoty rozlišení systému v příčném a podélném směru. Příčné rozlišení δx značí vzdálenost, na kterou je ještě možné rozlišit dva body vedle sebe v jedné rovině. Podélné rozlišení δz značí vzdálenost, na kterou je možné rozlišit dva body ležící nad sebou ve dvou různých rovinách. Pro danou geometrii in-line sestavy jsou dány vztahy 9 a 10, kde λ je vlnová délka použitého zdroje.[14][15]

$$\delta x \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad 9$$

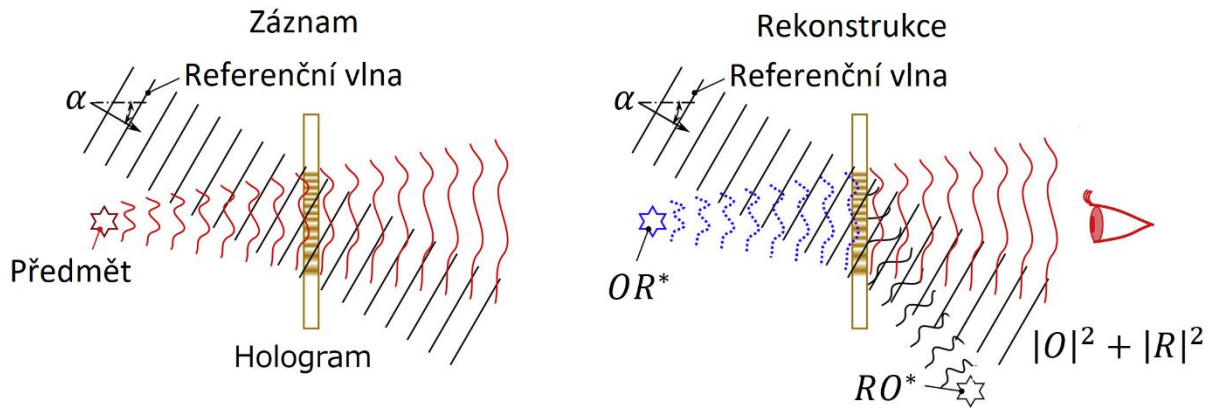
$$\delta z \geq \frac{\lambda}{2(NA)^2} \quad 10$$

In-line sestava pro tvorbu hologramu vyniká, oproti off-axis sestavě, svou jednoduchostí, kompaktností a lepším rozlišením.

1.3 Off-axis sestava

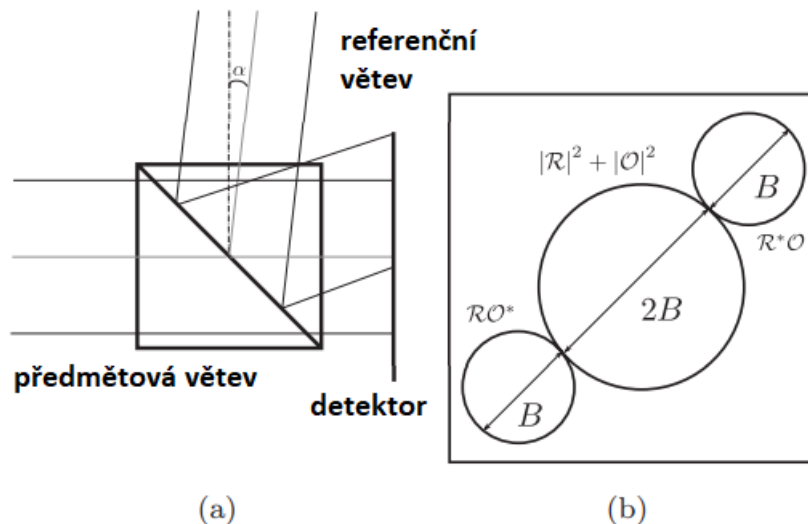
Principiálně vychází z Leith – Upatnieksova hologramu. Mimo-osou je sestava proto, že referenční a předmětová vlna spolu interferují pod úhlem α . Princip záznamu a rekonstrukce klasického hologramu je zobrazen na obrázku 6. Světlo procházející předmětem v ose hologramu je rozptýleno a šíří se směrem k rovině hologramu v podobě předmětové vlny. V rovině hologramu interferuje s referenční vlnou dopadající na hologram pod úhlem α . Při

rekonstrukci je hologram osvětlen referenční vlnou pod stejným úhlem. V tu chvíli se projeví výhoda této sestavy. Při rekonstrukci dojde k prostorové separaci jednotlivých interferenčních členů. Na rozdíl od line sestavy se tedy nebude navzájem překrývat primární a sekundární obraz s členy nultého difrakčního řádu.



Obrázek 6 - Princip off-axis [13]

Sestava může mít více podob. Ke sloučení předmětové a referenční vlny lze použít pouze jeden hranol, tak aby spolu obě vlny interferovaly na detektoru. Sofistikovanější způsob je použití Mach-Zehnderovy konfigurace. Příklad takového mikroskopu je na obrázku 15. Zde se pomocí děličů svazku nejprve rozdělí svazek na referenční a předmětovou větev. Ta projde skrze předmět. K interferenci obou větví dojde za polopropustným zrcadlem. Za ním se nachází detektor (viz obrázek 7 (a)). Z popisuje je patrné, že konfigurace je složitější než in-line sestava. Intenzita je na hologramu opět rozložena dle rovnice 4. Díky interferování dvou světelných vln pod úhlem, budou členy z rovnice 4 prostorově oddělené (viz obrázek 7 (b)).



Obrázek 7 - Off-axis [16]

Pro správnou rekonstrukci obrazu je nutné potlačit složky RO^* a $|O|^2 + |R|^2$. Toho lze docílit například prostorovým filtrováním.

Úhel α určuje rozteč interferenčních proužků vznikajících interakcí předmětové a referenční vlny. S větším úhlem se zmenšuje vzdálenost proužků d dle vztahu 11.

$$d = \frac{\lambda}{\sin(\alpha)} \quad 11$$

Teoreticky jde během záznamu zachytit i velmi tenké interferenční proužky, při záznamu na čip kamery s konečnou velikostí pixelů však vyvstává omezení dané Shannonovou podmínkou. Zjednodušeně říká, že maximální frekvence zaznamenaného signálu musí být alespoň dvakrát menší než frekvence, s jakou je signál zaznamenán. To znamená, že vzdálenost interferenčních proužků musí být alespoň dvakrát větší než šířka jednoho pixelu kamery Δx . Maximální hodnota úhlu α tedy musí volena s ohledem na správné vzorkování interferenčního vzoru dle vztahu 12. Obecný popis problematiky správného vzorkování je popsán v kapitole Vzorkování.

$$\alpha_{max} \approx \arcsin\left(\frac{\lambda}{2\Delta x}\right) \quad 12$$

2 Digitální holografické mikroskopy

Digitální holografická mikroskopie je v současné době, díky rychlému vývoji záznamových a výpočetních technologií, schopna konkurovat a v jistých aspektech i překonat klasické optické mikroskopy. Ty se na jednu stranu vyznačují velkým rozlišením, zvětšením a výslednou kvalitou obrazu. Na straně druhé je s velkým zvětšením spojeno menší zorné pole, pro ostření do různých rovin je zapotřebí mechanického pohybu soustavy a obecně jsou optické mikroskopy komplexní a velmi přesně vyrobená zařízení. V oblastech, kde je zapotřebí zkoumat velké množství částic na větší ploše, nebo dokonce v objemu, se s výhodou uplatní použití holografických mikroskopů. Ty se vyznačují velkým zorným polem při zachování dostatečného rozlišení. Zároveň díky numerické rekonstrukci výsledného obrazu z hologramu je možné ostřit do jednotlivých rovin poskládaných nad sebou až při výpočtu. Z těchto obrazů lze následně složit objemový obrazec celé zkoumané oblasti a dále s ním pracovat. Odpadá tak potřeba mechanického přeastřování.[17]

Komerčně dostupné DHM dosahují rozlišení až v řádech desetin mikrometrů [18]. Tomu už odpovídá cena. Zajímavé na DHM však je to, že kvalitních výsledků lze dosáhnout za zlomek ceny. Například studie [19] sestavila prototyp DHM, který při rozpočtu 250 USD dosahoval rozlišení $17.5 \mu\text{m}$.

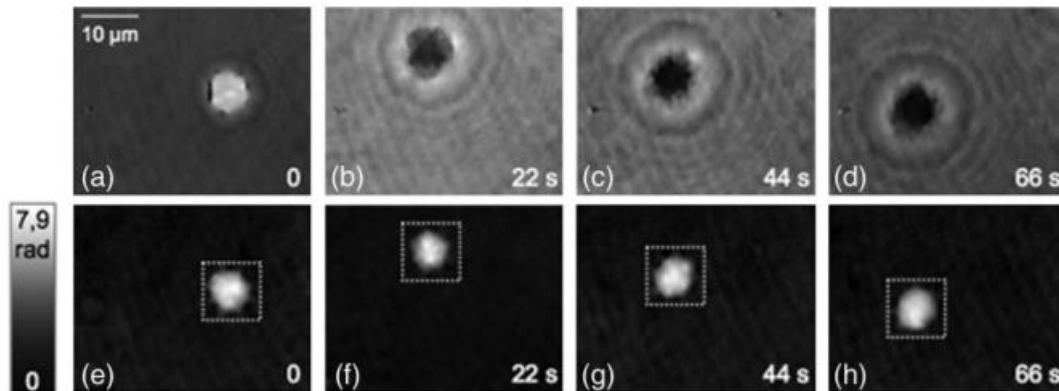
V následujících podkapitolách budou představeny některé z možností využití DHM při výzkumu. Nakonec budou zmíněny některé komerční příklady dostupných holografických mikroskopů.

2.1 Biologické aplikace

V rámci biologických aplikací má DHM další výhodu. Buněčné vzorky jsou běžně transparentní a pro zobrazení je nutné použití markerů. V té chvíli se metoda stává invazivní a dochází k poškození buněčného vzorku. Naopak u holografických metod není transparentnost vzorku překážkou a lze je tak neinvazivně zkoumat. To znamená absenci fluorescenčních markerů ve vzorku, dodržení správné teploty, umístění ve výživovém roztoku a zároveň zamezení poškození procházejícím zářením.

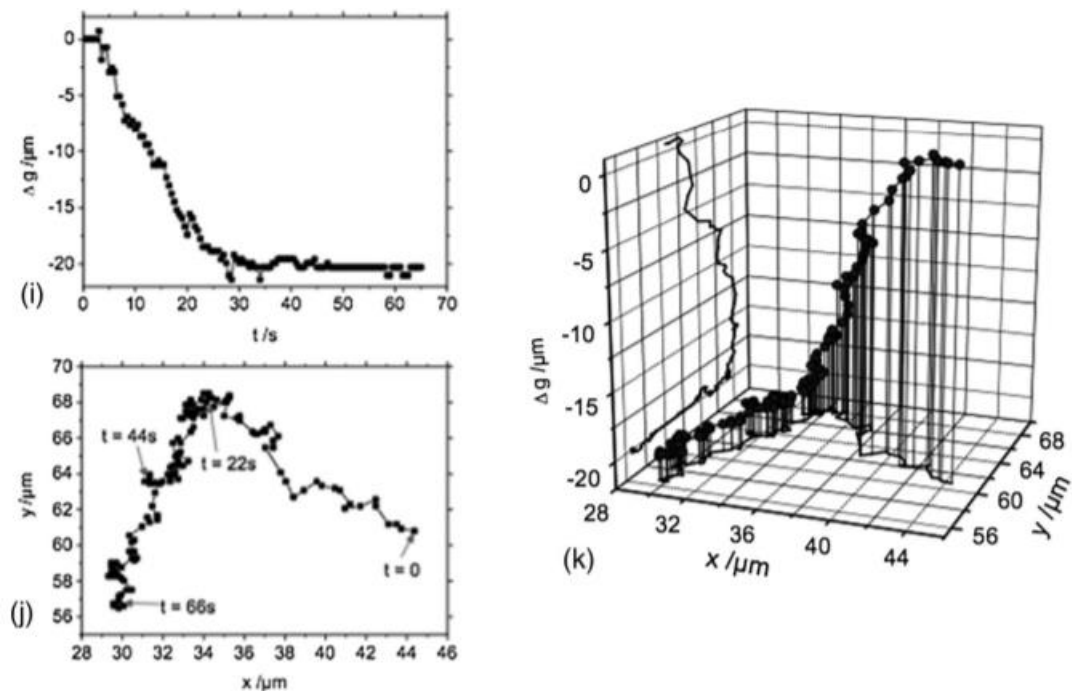
Studie [3] se mimo jiné zabývá komplexním sledováním buněk červených krvinek. Hologramy byly zaznamenány v sestavě in-line. Kontinuálním snímáním v čase byl zaznamenán pohyb v trojrozměrném prostoru i růst buněk. Dosažené příčné a podélné rozlišení bylo 0.3 respektive $1 \mu\text{m}$. Na obrázku 8 jsou v bodech (a) až (d) nezaostřené fázové snímky červených krvinek, zachycené v daných časových okamžicích. V bodech (e) až (h) jsou stejné snímky po aplikaci automaticky ostřicího algoritmu, který vyhodnocuje, v jaké vzdálenosti se objekt jeví

nejvíce zaostřen. Tečkovaný čtvereček označuje oblast, která byla sledována pro určení pohybu v horizontální poloze.



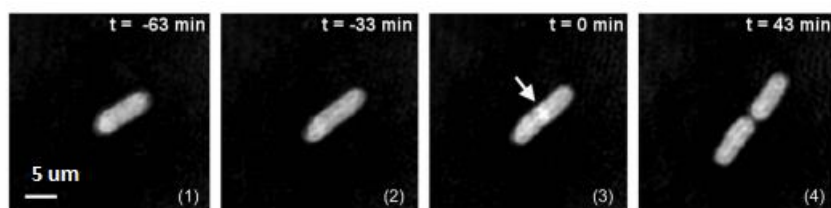
Obrázek 8 - Záznam červených krvinek [3]

Na obrázku 9 je zobrazen výsledný trojrozměrný pohyb (k) složený ze sledování ve vertikální (i) a horizontální (j) poloze v čase.



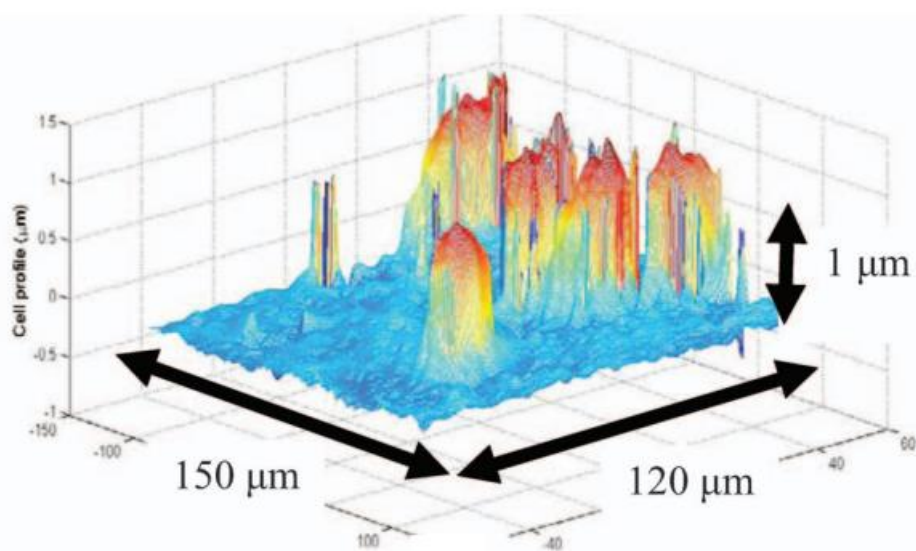
Obrázek 9 - Záznam pohybu červené krvinky [3]

Studie [20] pomocí DHM technik neinvazivně sledovala růst a následné buněčné dělení vzorků kvasinek. Na obrázku 10 je zobrazen postupný růst a dělení vzorku v čase.

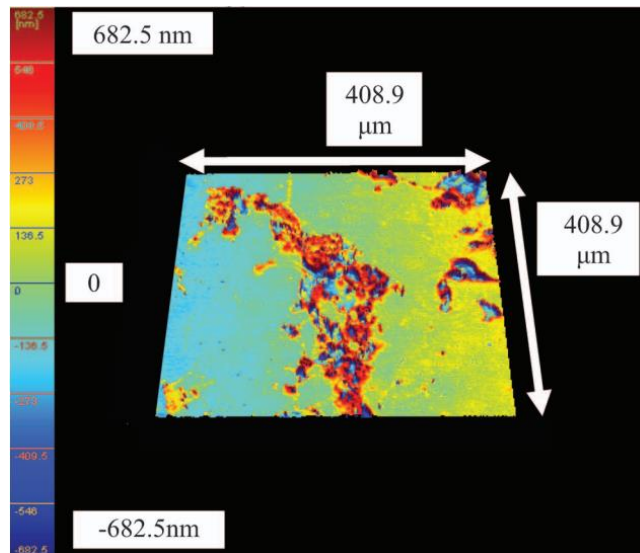


Obrázek 10 - Buněčné dělení [20]

Porovnáním experimentálních výsledků mezi prototypem in-line DHM a komerčního off-axis DHM se zabývá studie [4]. Pomocí in-line sestavy byl zaznamenán hologram nádorové buňky s označením MDA-MB-231. Pomocí algoritmu rozbalení fáze byla extrahována informace o fázi daného objektu. Z ní byl následně rekonstruován výškový profil buněk. Výška byla v tomto případě odhadnuta na přibližně $1 \mu\text{m}$. Stejný vzorek byl poté zaznamenán pomocí komerčního off-axis mikroskopu DHM Lynceotec. Výškový profil sestavený po rekonstrukci hologramu z komerčního mikroskopu udával výšku buněk přibližně $1.3 \mu\text{m}$. V rámci studie to bylo vyhodnoceno jako výsledek podporující využití bez-objektivové in-line DHM pro biomedicínské zobrazovací systémy. Obrázek 11 zobrazuje výškový profil buňky získaný rekonstrukcí z hologramu zachyceného prototypem DHM. Obrázek 12 ukazuje pro srovnání ukazuje výškový profil získaný pomocí komerčního DHM.



Obrázek 11 - Výškový profil z experimentálního DHM [4]

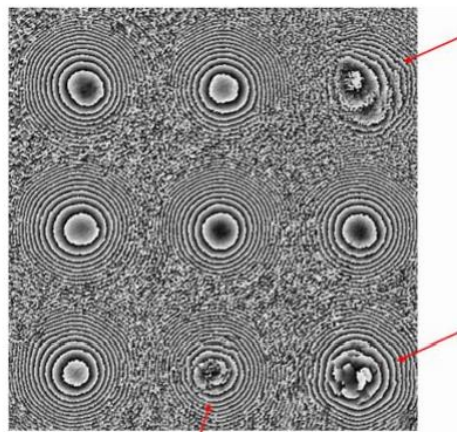


Obrázek 12 - Výškový profil z komerčního DHM [4]

2.2 Měření Microlenses

Microlenses jsou malé čočky s průměrem v řádech stovek mikrometrů. V současnosti nacházejí široké využití v oblasti optoelektroniky. Dělí se na pevné a tekuté. Tekuté mají tu výhodu, že změnou tloušťky dokážou měnit svojí ohniskovou vzdálenost. Pevné vyráběné z polymerů se zase levně vyrábí. Tekuté nachází využití v biomedicíně a displejích. Pevné slouží k soustředění svazků do optických vláken, jako čočky v mobilních fotoaparátech. Srovnané do maticového pole zlepšují účinnost sběru světla na čipy typu CCD nebo CMOS. Uplatnění začínají nacházet i ve fotovoltaice.

Právě ke kontrole kvality těchto čoček lze dle studií [21] a [22] využít DHM. Experimentální sestava byla off-axis ve formě Mach-Zehnder interferometru. Po zachycení hologramu byly zkoumány obrazy rozbalené fáze. Z nich lze pro každou čočku určit ohniskovou vzdálenost. Ohniskové vzdálenosti měřených čoček se pohybovaly v řádech stovek mikrometrů. Dalšími zkoumanými parametry byly tvar povrchu čočky a přítomné optické aberace.



Obrázek 13 - Fázový obraz pole mikročoček [21]

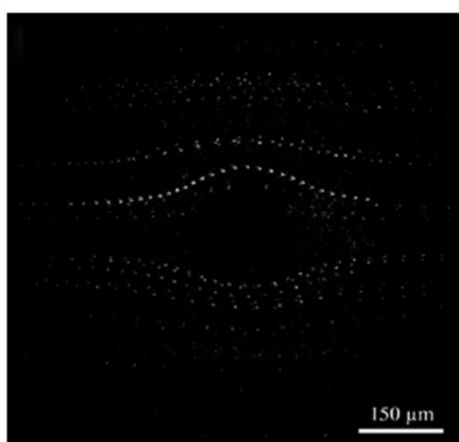
Jako příklad je na obrázku 13 uveden fázový obraz pole mikročoček. Šipky směřují na čočky s nízkou kvalitou, která se projeví nedokonalým interferenčním obrazcem.

2.3 Další aplikace

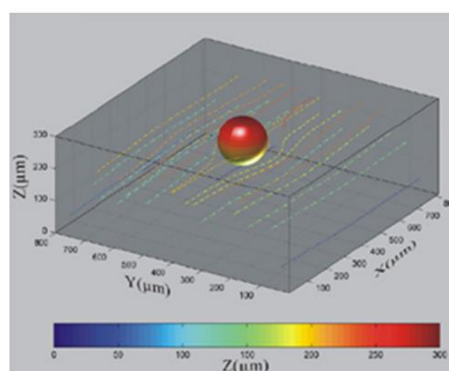
Na podobném principu jako je studování buněčných vzorků funguje i měření neživých částic. Pomocí DHM je možné měřit podélné i příčné rozměry optických vláken.[4] Za použití in-line sestavy se podařilo lokalizovat jádra dvou optických vláken, zachycených na jednom hologramu, v různých vzdálenostech od kamery. Jejich poloha se v osově souřadnici lišila o cca 1 mm.

In-line DHM sestavu lze využít i ke zkoumání neprůhledných vzorků, jakými jsou uhlíková vlákna ve vodním roztoku.[3] Po rekonstrukci obrazu se za použití binárního prahu vyfiltrovaly v každé rovině nezaostřené pixely. Ze zbylého objemového mračka bodů složeného ze všech rovin se proložením přímkami získaly aproximace polohy daných vláken. Z rozměru přímek byla dopočítána jejich délka.

Poslední zajímavou aplikací je studování chování microfluidics. O těch se hovoří v souvislosti s chováním kapalin v mikro rozměrech. Povrchové síly zde začínají převládat nad objemovými. Studování proudění v takovém prostředí je také možné za pomoci DHM. Experiment vypadá následovně.[3] Kulička o průměru $150 \mu\text{m}$ je umístěna do milimetr široké nádrže. Ta je naplněna vodou, ve které volně plují latexové kuličky řádově menších rozměrů, než je kulička hlavní. Budou sloužit ke zobrazení proudnic. Po spuštění průtoku vody skrze nádrž byla zaznamenána série hologramů. Ty byly od sebe pixel po pixelu odečteny a tím se eliminovala struktura pozadí a zachovala se informace o pohybujících se objektech. Po rekonstrukci hologramů bylo možné analyzovat rychlostní pole proudových čar okolo ústřední kuličky. Na obrázku 14 (a) je zobrazena rekonstrukce jednoho ze série hologramů, na obrázku 14 (b) je simulováno výsledné rychlostní pole.



(a)



(b)

Obrázek 14 - Analýza rychlostního pole [3]

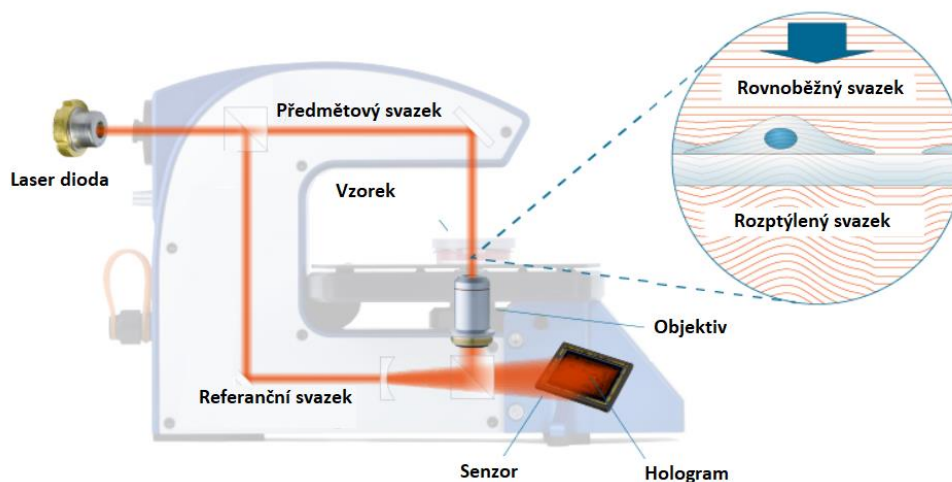
2.4 Přehled komerčních mikroskopů

Holografické mikroskopy jsou na trhu nabízeny i s příslušným softwarem. Všechny sdílí společnou základní funkcionalitu, tou je off-axis uspořádání. Umožňují neinvazivní zkoumání buněk, časosběrné záznamy sloužící k pozorování růstu a pohybu vzorků nebo kvantitativní fázové obrazy pro 3D zkoumání vzorků. Dostupné techniky najdou využití například při zkoumání růstu embryí, deformačních stavů červených krvinek, diagnóze cukrovky nebo změně morfologie buněk v závislosti na aplikaci léčiv. V tabulce níže jsou srovnané tři dostupné mikroskopy a jejich hlavní parametry.

	HoloMonitor	Holmarc	Nanolive
typ	M4	HO-DHM-UT01	3D Cell Explorer
příčné rozlišení [μm]	1	1	0.2
podélné rozlišení [μm]	-	0.05	0.4
zorné pole [μm]	50*50	185*124	85*85
vlnová délka [nm]	635	650	520
cena [Š]	-	16.667	-

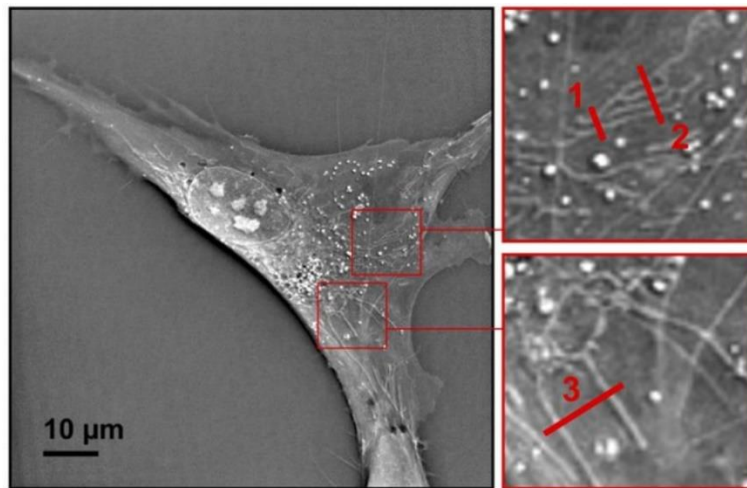
Tabulka 1 - Srovnání DHM

Přístroj firmy HoloMonitor slouží především pro dlouhodobou neinvazivní analýzu buněčných kultur přímo ve spojení s inkubátorem. K osvětlení vzorku používá nízko výkonný laser s intenzitou záření $2 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Vzorek díky tomu není negativně ovlivněn procházejícím zářením. Automaticky sbírá údaje o morfologii a pohybu jednotlivých buněk v reálném čase. Z obrázku je patrné, že stavba DHM vychází z off – axis sestavy. Laserový svazek z diody se pomocí polopropustných zrcadel nejdříve rozdělí na dvě samostatné větve a před záznamem na senzor je polopropustným zrcadlem opět sloučen do jednoho. Sestava je navržena tak, aby se pro zkoumání buněčných vzorků daly použít standardizované kultivační misky (35 mm Petriho miska) a kultivační několika jamkové destičky (6, 24 a 96 jamkové).



Obrázek 15 - Schéma HoloMonitor M4 [23]

Přístroj firmy Nanolive je také navržen ve formě off-axis sestavy. Mezi digitálními holografickými mikroskopy vyniká díky dosažení rozlišení v řádu stovek nanometrů. Toho dosahuje pomocí speciálního záznamu více hologramů. Hologramy se zaznamenávají z různých směrů osvětlení na rovině vzorku a pozorují se tomografické změny vzorku. Na míru vytvořený algoritmus využívající realistické inverzní filtrování zaručuje detailní rekonstrukci komplexního pole.[24] Na obrázku 16 je zobrazena rekonstrukce organely mitochondrie, v místě zvýrazněných čar byla změřena tloušťka kanálků průměrně 220 nm.



Obrázek 16 - Mitochondrie [25]

3 Rekonstrukce obrazu

V této kapitole bude popsán matematický aparát, využívaný při výpočetních operacích s hologramy. Postupně bude uvedený vlnový model světla, nástroje fázorové aritmetiky, řešení Helmholtzovy rovnice a popis zaznamenané intenzity světla v podobě hologramu. Následně bude popsán princip výpočtu propagace světla, v rámci kterého se využije konvolučního teorému a operací ve frekvenčním spektru díky Fourierovým transformacím. Bude popsána metoda úhlového spektra, Rayleigh-Sommerfeldův difrakční integrál a jeho aproximace, jmenovitě Fresnelova a Fraunhoferova. Další podkapitola bude věnována vlastní diskretizaci numerických výpočtů. V rámci DHM se rekonstruuje digitální holografický záznam, jehož diskretizace probíhá z principu již při samotném záznamu na kameru. Bude obecně popsána problematika vzorkování a nastíněna podoba diskrétní Fourierovy transformace. Na závěr kapitoly budou nastíněny složitější algoritmy, které řeší některé z problémů vznikajících při numerické rekonstrukci obrazu. Mezi danou problematiku patří řešení algoritmů pro rozbalování fáze, algoritmy pro potlačení zdvojeného obrazu při in-line sestavě nebo algoritmus pro zvětšení obrazu pomocí Fresnel-Bluesteinovy transformace. Pokud nebude v textu uvedeno jinak, vychází tato kapitola ze zdroje [26].

3.1 Vlnový model světla

Obecně existují tři základní modely chování světla. Nejjednodušší paprskový, ve kterém cestuje světlo po přímkách, v prostředí, jehož rozměry jsou několika řádově větší než vlnová délka světla. Složitější je model vlnový, ve kterém se světlo šíří konečnou rychlostí a je považováno za elektromagnetické vlnění. Chování světla je zkoumáno v prostředí rozměrově blízkém vlnové délce světla. Nejsložitějším a nejméně intuitivním modelem je fotonový. V něm je světlo uvažováno jako soubor malých kvant energie v podobě fotonů. Je založen na poznacích z kvantové fyziky a pro potřeby holografie v této práci se jím není potřeba zabývat. Zjednodušeně lze říct, že vlnový model předpokládá pro každý bod v prostoru nějakou hodnotu, například amplitudu. Jednotlivé body jsou navzájem provázány a nazývají se pole. Hodnota daného bodu se mění v čase t a je označena $u(\mathbf{r}, t)$. Vektor \mathbf{r} značí polohu bodu v prostoru. Dalším předpokladem vlnového modelu je změna hodnoty u v závislosti na chování bodu označeného jako zdroj. Informace o změně přicházející ze zdroje cestuje prostorem o konečnou rychlostí c . Pokud zdroj vykazuje periodické chování, které lze popsat funkcí $\cos(\omega t)$, pak se bude hodnota každého bodu pole měnit dle vztahu 13.

$$u(\mathbf{r}, t) = \frac{A}{|\mathbf{r}|} \cos \left[\omega \left(t - \frac{|\mathbf{r}|}{c} \right) \right] \quad 13$$

Zde A je amplituda pole v dané vzdálenosti od zdroje a ω je úhlová frekvence oscilací zdroje. Člen $\omega \frac{|r|}{c}$ je nazýván fází. Klasickou analogií pro popsání periodického chování pole v závislosti na chování zdroje jsou vlny na hladině, vzniklé při vhození kamene do vody. Místo, kam dopadl kámen, reprezentuje oscilující zdroj, od kterého se do všech stran rovnoměrně šíří vlny v podobě kružnic. Periodicky se střídají vlny s kladnou a zápornou výchylkou. Jednotlivé kružnice reprezentují body s konstantní fází a nazývají se vlnoplochy. Mají tvar kružnic proto, že se v tomto případě jedná o bodový zdroj a vlnění je v tom případě nazýváno sférickým.

Tato vlnová podstata světla, naznačující že světlo se chová jako propojené body nějakého pole, byla dlouhou dobu neznámá. Že projevy světla jsou speciálním chováním elektromagnetického pole bylo dokázáno až díky Maxwellovým rovnicím.

Elektromagnetické pole je v každém bodě v prostoru popsáno dvěma vektorovými veličinami. Intenzitou elektrického pole \mathbf{E} a intenzitou magnetického pole \mathbf{H} . Tyto veličiny jsou spolu svázány čtveřicí Maxwellových rovnic. Ve vektorové formě vypadají následovně.

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mu \mathbf{H}}{\partial t} \quad 14$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{\partial \epsilon \mathbf{E}}{\partial t} \quad 15$$

$$\nabla \cdot \epsilon \mathbf{E} = 0 \quad 16$$

$$\nabla \cdot \mu \mathbf{H} = 0 \quad 17$$

Vektorové operátory $\nabla \times$ a $\nabla \cdot$ zde značí rotaci a divergenci. Symboly ϵ a μ reprezentují elektrickou permitivitu, respektive magnetickou permeabilitu prostředí. Následnou úpravou těchto rovnic lze odvodit vlnovou rovnici, která značí spojitost mezi zjednodušeným vlnovým modelem světla a elektromagnetickým vlněním. V textu se z ní bude nadále vycházet.

Nejdříve je na rovnici 14 opět aplikován operátor rotace.

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = -\nabla \times \left(\frac{\partial \mu \mathbf{H}}{\partial t} \right) \quad 18$$

Ta přejde po úpravě do tvaru 19.

$$\nabla \cdot (\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E} = -\nabla \times \left(\frac{\partial \mu \mathbf{H}}{\partial t} \right) \quad 19$$

Po dosazení z rovnice 16 a uvažování homogenního a nedisperzního prostředí, společně s konstantními ϵ a μ , je získán tvar 20.

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \mu \frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times \mathbf{H}) \quad 20$$

Po dosazení z rovnice 15 je získán vztah 21

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \epsilon\mu \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad 21$$

Při splnění podmínky že okolí je nemagnetické a permeabilita je rovna permeabilitě vakua μ_0 , lze definovat rychlost světla ve vakuu c a index lomu n .

$$c \equiv \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} \quad 22$$

$$n \equiv \sqrt{\frac{\epsilon}{\epsilon_0}} \quad 23$$

Po dosazení je získán finální vztah 24.

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad 24$$

V kartézském souřadnicovém systému lze vztah 24 rozepsat do tří skalárních složek pro každý směr. Příklad pro směr x je v rovnici 25. Pro zbylé dva směry dojde v zápisu k analogické změně indexů.

$$\frac{\partial^2 E_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z^2} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E_x}{\partial t^2} = 0 \quad 25$$

Každá ze skalárních rovnic má tedy stejnou strukturu v podobě rovnice 26.

$$\nabla^2 u(\mathbf{x}, t) - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 u(\mathbf{x}, t)}{\partial t^2} = 0 \quad 26$$

Člen $u(\mathbf{x}, t)$ je skalární funkcí pozice \mathbf{x} v prostoru a čase t . Podíl rychlosti světla a indexu lomu značí rychlost vlnění v daném prostředí v . Při uvažování vakua, kde platí $n = 1$, přejde rychlost v zpět na c . Rovnice 26 je tedy označena jako vlnová rovnice a dává do spojitosti vlnový model světla s elektromagnetickým vlněním. Je důležité mít na paměti, s jakými předpoklady odvození proběhlo.

3.2 Fázorová aritmetika

Bylo představeno, jak lze pro popis harmonického vlnění v prostoru použít vzorec s kosinovou funkcí. Pro připomínku jeho lehce upravená podoba 27.

$$u(\mathbf{x}, t) = A \cos(\omega t - \phi(\mathbf{x})) \quad 27$$

Fáze vlny je popsána funkcí $\phi(\mathbf{x})$. Pro matematické operace v následujícím textu je však mnohem výhodnější používat namísto kosinové formy formu exponenciální. Operace využívající násobení exponenciál namísto sčítání argumentů uvnitř kosinové funkce spadají do fázorové aritmetiky. K převodu kosinu na exponenciálu bude využito Eulerova vzorce 28, který svazuje exponenciální a goniometrické funkce prostřednictvím komplexní roviny.

$$\exp(j\varphi) = \cos(\varphi) + j\sin(\varphi) \quad 28$$

Rovnice 27 tak může být přepsána do následující podoby, kde kosinová funkce je rovna reálné složce komplexní exponenciály.

$$u(\mathbf{x}, t) = \operatorname{Re}\{A \exp\{j(\omega t - \phi(\mathbf{x}))\}\} \quad 29$$

Znak j symbolizuje imaginární jednotku ($j^2 = -1$). Výhoda takového zápisu vyjde najevo například při sčítání příspěvků od několika světelných zdrojů.

$$u_{\text{suma}}(\mathbf{x}, t) = \sum_i u_i(\mathbf{x}, t) = \sum_i A_i \cos(\omega t - \phi_i(\mathbf{x})) \quad 30$$

$$u_{\text{suma}}(\mathbf{x}, t) = \sum_i \operatorname{Re}\{A_i \exp\{j(\omega t - \phi_i(\mathbf{x}))\}\} \quad 31$$

$$u_{\text{suma}}(\mathbf{x}, t) = \sum_i \operatorname{Re}\{A_i \exp\{j\omega t\} \exp\{-j\phi_i(\mathbf{x})\}\} \quad 32$$

$$u_{\text{suma}}(\mathbf{x}, t) = \operatorname{Re}\left\{\exp\{j\omega t\} \sum_i A_i \exp\{-j\phi_i(\mathbf{x})\}\right\} \quad 33$$

Suma v rovnici 33 se nazývá fázor nebo komplexní amplituda.

$$U_{\text{suma}}(\mathbf{x}) = \sum_i A_i \exp\{-j\phi_i(\mathbf{x})\} \quad 34$$

Tato veličina v sobě nese informaci jak o amplitudě, tak fázi vlnění, v tomto případě světla. Protože kosinus je sudá funkce, platí rovnost 35.

$$\cos(\omega t - \phi_i(\mathbf{x})) = \cos(\phi_i(\mathbf{x}) - \omega t) \quad 35$$

Rovnice 33 je tak ekvivalentní rovnici 36.

$$u_{\text{suma}}(\mathbf{x}, t) = \operatorname{Re}\{\exp\{-j\omega t\} U_{\text{suma}}(\mathbf{x})\} \quad 36$$

Kde platí 37.

$$U_{\text{suma}}(\mathbf{x}) = \sum_i A_i \exp\{j\phi_i(\mathbf{x})\} \quad 37$$

Fázorová aritmetika umožňuje pomocí komplexní amplitudy U popsat jakoukoliv kombinaci pohybů světla v prostoru. Po definici veličin vlnová délka světla λ a vlnové číslo k , je možné přepsat rovnici sférické vlny 13, do tvaru komplexní amplitudy 40.

$$\lambda = 2\pi \frac{c}{\omega} \quad 38$$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad 39$$

$$U(\mathbf{x}) = \frac{A}{|\mathbf{x} - \mathbf{s}|} \exp\{jk|\mathbf{x} - \mathbf{s}| + \phi\} \quad 40$$

Kde \mathbf{s} značí polohu bodového zdroje sférické vlny. Popis rovinné vlny pomocí komplexní amplitudy vypadá následovně.

$$U(\mathbf{x}) = A \exp\{jk(\mathbf{x} \cdot \mathbf{n}) + \phi\} \quad 41$$

Z komplexní amplitudy U lze extrahovat informace o fázi ϕ a amplitudě A světla prostřednictvím následujících vztahů. Získání přesné hodnoty fáze však není v rámci digitální holografie triviální problém a bude diskutován v pozdější kapitole. Symbol U^* značí komplexně sdružený člen.

$$A = |U| = \sqrt{UU^*} \quad 42$$

$$\phi = \arg(U) = \arctan\left(\frac{\text{Im}\{U\}}{\text{Re}\{U\}}\right) \quad 43$$

Ze znalosti amplitudy světla lze určit intenzitu světla I . Ta může být vypočítána dle zjednodušeného vztahu 44.

$$I = A^2 = UU^* \quad 44$$

Díky tomuto a dalším výše uvedeným vztahům je nyní možné odvodit rovnici 4, pro připomenutí znovu uvedenou.

$$I_H = |O|^2 + |R|^2 + OR^* + RO^* \quad 4$$

Udává, z jakých členů se skládá výsledná intenzita v rovině hologramu, potažmo kterými složkami je tvořen výsledný obraz. Detektor je osvětlen referenční a předmětovou vlnou. R respektive O značí komplexní amplitudy těchto vln. Detektor tedy zaznamená složenou intenzitu dopadajícího světla $R + O$. V analogii se vztahem 44 je intenzita hologramu v bodě \mathbf{x} dána následovně.

$$I(\mathbf{x}) = [O(\mathbf{x}) + R(\mathbf{x})][O(\mathbf{x}) + R(\mathbf{x})]^* \quad 45$$

$$I(\mathbf{x}) = O(\mathbf{x})O(\mathbf{x})^* + R(\mathbf{x})R(\mathbf{x})^* + O(\mathbf{x})R(\mathbf{x})^* + R(\mathbf{x})O(\mathbf{x})^* \quad 46$$

Pokud se členy komplexně sdružené členy $O(\mathbf{x})$ a $O(\mathbf{x})^*$ rozepíšu v podobě komplexních amplitud,

$$O(\mathbf{x}) = A_o(\mathbf{x})\exp\{j\phi(\mathbf{x})\} \quad 47$$

$$O(\mathbf{x})^* = A_o(\mathbf{x})\exp\{-j\phi(\mathbf{x})\} \quad 48$$

je patrné, jejich vzájemného součinu vzejde kvadrát jejich amplitud, ve vzorci 4 značený jako kvadrát absolutní hodnoty komplexního čísla $|O|^2$.

$$O(\mathbf{x})O(\mathbf{x})^* = A_o(\mathbf{x})\exp\{j\phi(\mathbf{x})\} \cdot A_o(\mathbf{x})\exp\{-j\phi(\mathbf{x})\} \quad 49$$

$$O(\mathbf{x})O(\mathbf{x})^* = A_o(\mathbf{x}) \cdot A_o(\mathbf{x}) \cdot 1 = A_o(\mathbf{x})^2 \equiv |O(\mathbf{x})|^2 \quad 50$$

Analogický výpočet platí pro komplexně sdružený člen referenční vlny.

3.3 Helmholtzova rovnice

Pro záznam hologramu se používá monochromatické světlo. Tím je myšleno světlo, jehož zdroj kmitá jednou konstantní frekvencí $f = 2\pi/\omega$. Díky tomuto předpokladu stačí hledat pouze harmonická řešení $u(\mathbf{x}, t)$ vlnové rovnice 26. Tato řešení lze hledat skrze řešení Helmholtzovy rovnice. Jedná se o lineární diferenciální rovnici druhého řádu, která má v obecném tvaru vypadá následovně.

$$\nabla^2 f(\mathbf{x}) + C^2 f(\mathbf{x}) = 0 \quad 51$$

Kde $f(\mathbf{x})$ je hledané řešení a C je nějaká konstanta. Při aplikování Helmholtzovy rovnice na vlnění je touto konstantou vlnové číslo k . Propojení Helmholtzovy a vlnové rovnice bude nastíněno v následujícím odvození. [27][28] Hledané řešení vlnové rovnice má tvar 52.

$$u(\mathbf{x}, t) = \text{Re}\{\exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x})\} \quad 52$$

Derivováním dvakrát podle času dá vztahy 53 a 55.

$$\frac{\partial u(\mathbf{x}, t)}{\partial t} = -j\omega \exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x}) \quad 53$$

$$\frac{\partial^2 u(\mathbf{x}, t)}{\partial t^2} = (-j\omega)^2 \exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x}) \quad 54$$

$$\frac{\partial^2 u(\mathbf{x}, t)}{\partial t^2} = -\omega^2 \exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x}) \quad 55$$

Nyní po dosazení výrazů 52 a 55 do původního vztahu pro vlnovou rovnici 26, za předpokladu indexu lomu $n = 1$,

$$\nabla^2 \exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x}) - \frac{1}{c^2} (-\omega^2 \exp\{-j\omega t\}U(\mathbf{x})) = 0 \quad 56$$

$$\nabla^2 \exp\{-j\omega t\} U(\mathbf{x}) + \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \exp\{-j\omega t\} U(\mathbf{x}) = 0 \quad 57$$

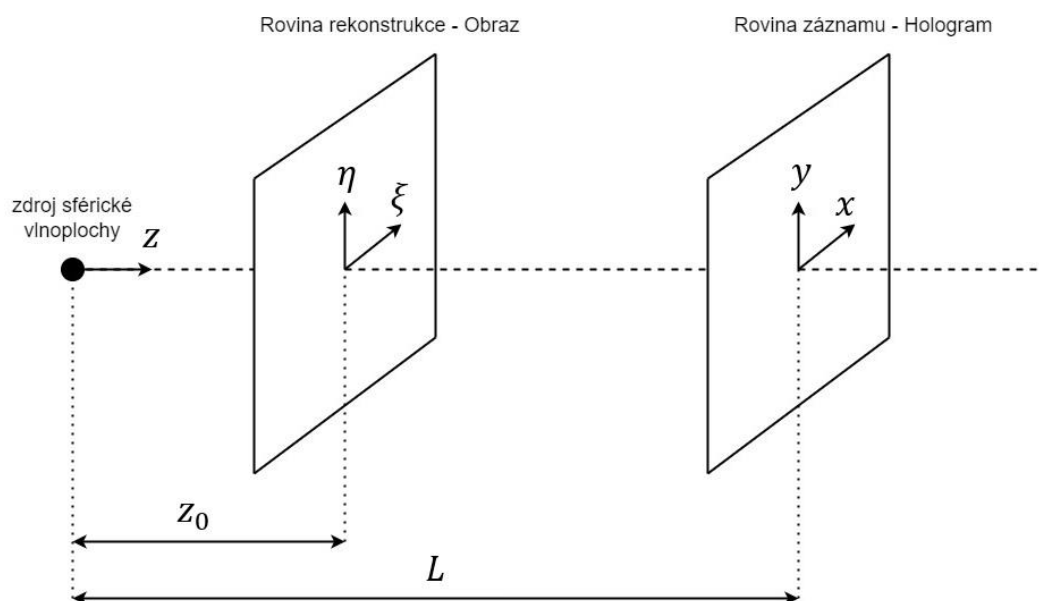
$$\nabla^2 U(\mathbf{x}) + (k)^2 U(\mathbf{x}) = 0 \quad 58$$

bude rovnice 58 ve tvaru Helmholtzovy rovnice 51. Komplexní amplituda $U(\mathbf{x})$, která je řešením Helmholtzovy rovnice, má například tvar rovinné 41 nebo sférické 40 vlny.

3.4 Propagace světla

Propagaci světla je možné nazývat proces, při kterém se informace o amplitudě a fázi světelného vlnění ve zkoumaném bodě v prostoru zjistí v závislosti na hodnotě amplitudy a fáze daného vlnění v nějakém známém bodě v prostoru. Přeneseně se tedy jedná o problém výpočtu hodnoty fázoru v rovině $z = z_0$, za předpokladu, že známe hodnotu fázoru v rovině $z = L$. Známým fázorem je tím pádem hologram zachycený na záznamové zařízení ve vzdálenosti L od zdroje sférické vlny. Hledaným fázorem je rekonstruovaný obraz zaostřený ve vzdálenosti z_0 od zdroje. Z vypočteného fázoru se prostřednictvím vztahů 42 nebo 43 získá buď amplitudový nebo fázový rekonstruovaný obraz. Pro úplnost je nutné dodat, že na kameru není zachycena rovnou komplexní amplituda hologramu, ale pouze intenzita v podobě šedotónové masky. Komplexní amplituda hologramu se získá až po jeho vynásobení simulovaným fázorem sférické vlny. Samotné výpočty propagace světla vedou na matematickou operaci zvanou konvoluce. Ta je v rámci optimalizace výpočtu počítána ve frekvenční oblasti.

Pro názornost a definování souřadných systémů v rovinách hologramu a rekonstruovaného obrazu je uveden obrázek 17.



Obrázek 17 - Definice souřadných systémů

3.4.1 Metoda úhlového spektra

V úvodu kapitoly bylo předestřeno, že při znalosti komplexní amplitudy v jedné rovině je možné vypočítat hodnoty komplexní amplitudy v jiné zvolené rovině. V následujícím odvození bude naznačeno, že při definici komplexní amplitudy v jedné rovině bude teoreticky hodnota komplexních amplitud ve všech dalších rovinách už fixně určena. Výsledek odvození bude zároveň metodou výpočtu propagace světla pomocí úhlového spektra.

Na začátku bude definován fázor světla v prostoru jako lineární kombinace rovinných vln.

$$U(\mathbf{x}) = \int_{\Omega} \bar{A}(\mathbf{n}) \exp\left(\mathbf{j} \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{n} \cdot \mathbf{x}\right) d\mathbf{n} \quad 59$$

Zde $\bar{A}(\mathbf{n})$ je amplituda rovinné vlny se směrem šíření \mathbf{n} . Integruje se přes všechny tři složky směru v prostoru $\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)$ s tím, že velikost vektoru \mathbf{n} je rovna jedné. Pro $z = 0$ platí dvojný integrál 60,

$$U(x, y, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} \bar{A}(n_x, n_y) \exp\left(\mathbf{j} \frac{2\pi}{\lambda} (n_x x + n_y y)\right) dn_x dn_y \quad 60$$

kde

$$\bar{A}(n_x, n_y) = \begin{cases} \bar{A}(\mathbf{n}) \text{ pro } \mathbf{n} = (n_x, n_y, \sqrt{1 - n_x^2 - n_y^2}) \\ 0 \text{ pokud } n_x^2 + n_y^2 > 1 \end{cases} \quad 61$$

Po definování

$$f_x \equiv \frac{n_x}{\lambda} \quad 62$$

$$f_y \equiv \frac{n_y}{\lambda} \quad 63$$

$$A(f_x, f_y) \equiv \bar{A}(f_x \lambda, f_y \lambda) = \bar{A}(n_x, n_y) \quad 64$$

lze zapsat upravený vztah 60 v podobě 65.

$$U(x, y, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(f_x, f_y) \exp(\mathbf{j} 2\pi (f_x x + f_y y)) df_x df_y \quad 65$$

Následně je pro další potřeby textu definována dvourozměrná Fourierova transformace $\mathcal{F}(g)$ komplexní funkce g , a inverzní Fourierova transformace $\mathcal{F}^{-1}(G)$.

$$\mathcal{F}\{g(x, y)\} = G(f_x, f_y) \equiv \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) \exp(-\mathbf{j} 2\pi (f_x x + f_y y)) dx dy \quad 66$$

$$\mathcal{F}^{-1}\{G(f_x, f_y)\} = g(x, y) \equiv \iint_{-\infty}^{\infty} G(f_x, f_y) \exp(\mathbf{j} 2\pi (f_x x + f_y y)) df_x df_y \quad 67$$

Fourierova transformace je jednou z matematických transformací. Slouží k převodu funkcí závislých na časové nebo prostorové proměnné na funkce závislé na prostorové nebo časové frekvenci. Transformace funkcí probíhá z tzv. časové (prostorové) oblasti do frekvenční oblasti, kteréžto pojmy budou v textu dále používány.

Porovnáním vtaů 65 a 66 je patrné, že Fourierova transformace komplexní amplitudy U je rovna funkci $A(f_x, f_y)$.

$$A(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U(x, y, 0)\} \quad 68$$

Funkce $A(f_x, f_y)$ je nazývána úhlové spektrum a rozložení $U(x, y, 0)$ do řady rovinných vln se nazývá rozklad úhlového spektra. Nyní už je možné přesněji popsat vztah mezi fázory v rovinách $z = L$ a $z = z_0$. Rozdíl těchto vzdáleností je $\Delta z = z_0 - L$.

$$U(\xi, \eta, z_0) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(f_x, f_y) \exp\left(j \frac{2\pi}{\lambda} (n_x x + n_y y + n_z \Delta z)\right) df_x df_y \quad 69$$

$$= \iint_{-\infty}^{\infty} A(f_x, f_y) \times \exp\left(j \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}\right) \exp(j 2\pi (f_x x + f_y y)) df_x df_y \quad 70$$

$$U(\xi, \eta, z_0) = \mathcal{F}^{-1}\left\{A(f_x, f_y) \exp\left(j \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}\right)\right\} \quad 71$$

Navíc po dosažení vztahu 71

$$U(\xi, \eta, z_0) = \mathcal{F}^{-1}\left\{\mathcal{F}\{U(x, y, L)\} \exp\left(j \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}\right)\right\} \quad 72$$

je vztah 72 nazýván propagace úhlového spektra. Potvrzuje předpoklad z úvodu podkapitoly. Při definovaném fázoru v rovině $z = L$, je fázor v libovolně zvolené rovině $z = z_0$ přímo určen rovnicí 72.

3.4.2 Rayleigh-Sommerfeldův difrakční integrál

V předešlé podkapitole byla propagace světla odvozena v podobě propagace úhlového spektra. Fakticky se jedná o zpětnou propagaci světla čili rozptyl světla je počítán ve směru kde světlo konverguje zpátky do zdroje sférické vlny. V této kapitole bude odvozeno, jak lze výpočet propagace provést pomocí konvoluce. Nejdříve bude definována dvourozměrná konvoluce funkcí $g(x, y)$ a $h(x, y)$, kdy funkce h se nazývá konvoluční jádro.

$$g(x, y) \otimes h(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(\xi, \eta) h(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta \quad 73$$

Dle konvolučního teorému lze složitý algoritmus výpočtu konvoluce obejít pomocí Fourierovy transformace. Konvoluci dvou funkcí převedenou do frekvenční oblasti, je možné identicky

zaměnit za jednoduchý součin samostatných Fourierových transformací daných funkcí. Platí tedy vztah 74.

$$\mathcal{F}\{g(x, y) \otimes h(x, y)\} = \mathcal{F}\{g(x, y)\} \cdot \mathcal{F}\{h(x, y)\} \quad 74$$

V tom případě lze propagaci úhlového spektra 72, přepsat do nové podoby 75.

$$U(\xi, \eta, z_0) = U(x, y, L) \otimes K_{RS}(x, y, \Delta z) \quad 75$$

Funkce $K_{RS}(x, y, \Delta z)$ se nazývá Rayleigh-Sommerfeldovo konvoluční jádro. Je definovaná následovně

$$K_{RS}(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \exp \left(j \frac{2\pi}{\lambda} z \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2} \right) \right\} \quad 76$$

$$K_{RS}(x, y, z) = -\frac{1}{2\pi} \frac{\partial}{\partial z} \frac{\exp(jkr)}{r} \quad 77$$

$$K_{RS}(x, y, z) = -\frac{1}{2\pi} \left(jk - \frac{1}{r} \right) \frac{\exp(jkr)}{r} \frac{z}{r} \quad 78$$

kde k je již zmíněné vlnové číslo a r je definované následovně:

$$r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \quad 79$$

Dosazením vztahu 78 do 75 je definován Rayleigh-Sommerfeldův difrakční integrál

$$U(\xi, \eta, z_0) = -\frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, L) \left(jk - \frac{1}{r_{01}} \right) \frac{\exp(jkr_{01})}{r_{01}} \frac{\Delta z}{r_{01}} dx dy \quad 80$$

kde

$$r_{01} = \sqrt{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2 + (z_0 - L)^2} \quad 81$$

Tento integrál bude dále použit při odvozování Fresnelovy aproximace. Tvar využívající konvoluce ve frekvenční oblasti, který je zároveň využit k reálnému výpočtu v praktické části této práce, má po zkombinování 74, 75 a 78 následující tvar. Aplikuje tři Fourierovy transformace, z toho jednu inverzní. Proto je o něm později v textu referováno jako o 3fft.

$$U(\xi, \eta, z_0) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F}\{U(x, y, L)\} \cdot \mathcal{F} \left\{ -\frac{1}{2\pi} \left(jk - \frac{1}{r_{01}} \right) \frac{\exp(jkr_{01})}{r_{01}} \frac{\Delta z}{r_{01}} \right\} \right\} \quad 82$$

Vlastností metod propagace světla založených na konvolučním principu je takzvané unitární zvětšení. Jedná se o pevné svázání velikostí pixelů roviny záznamové a roviny rekonstruované.[10][16] Velikost pixelu v rekonstruovaném obraze $\Delta\xi$ je rovna velikosti pixelu

hologramu Δx , která je daná použitou kamerou, viz vztah 83. Reálný projev této vlastnosti bude diskutován v praktické části práce.

$$\Delta x = \Delta \xi \quad 83$$

3.4.3 Fresnelova aproximace

V některých případech může být výhodnější využít namísto výpočtu Rayleigh-Sommerfeldova difrakčního integrálu jeho aproximovanou podobu. Pro delší propagační vzdálenosti Δz je výhodnější volit výpočet pomocí Fresnelovy aproximace. Předpoklady pro další odvození je prostorové omezení fázoru v záznamové rovině (limitováno konstantou a – rozměr senzoru kamery) a $\Delta z \gg a \gg \lambda$.

$$U(x, y, L) = 0 \text{ pro } x^2 + y^2 > a^2 \quad 84$$

Po dodržení těchto předpokladů lze zanedbat člen $-1/r_{01}$ z vyjádření 80. Protože x a y jsou velmi malé v porovnání se Δz , může být ve jmenovateli zaměněno $r_{01} \approx \Delta z$. Tato záměna však nemůže být použita uvnitř exponenciály, jelikož zde je člen r_{01} násoben velkým číslem k . Záměna tedy bude provedena pomocí prvních dvou členů Taylorova rozvoje v zápisu 85.

$$r_{01} \approx \Delta z + \frac{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2}{2\Delta z} \quad 85$$

Po substituci aproximací zpátky do Rayleigh-Sommerfeldova difrakčního integrálu, je získán upravený konvoluční vztah 87.

$$U(\xi, \eta, z_0) \approx \frac{1}{j\lambda\Delta z} \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, L) \exp \left[jk \left(\Delta z + \frac{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2}{2\Delta z} \right) \right] dx dy \quad 86$$

$$= \frac{\exp(jk\Delta z)}{j\lambda\Delta z} \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, L) \exp \left[jk \left(\Delta z + \frac{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2}{2\Delta z} \right) \right] dx dy \quad 87$$

Ten je následně možné přepsat do podoby Fresnelova difrakčního integrálu 88.

$$U(\xi, \eta, z_0) = \frac{\exp(jk\Delta z)}{j\lambda\Delta z} \exp \left(jk \frac{\xi^2 + \eta^2}{2\Delta z} \right) * \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, L) \exp \left(jk \frac{x^2 + y^2}{2\Delta z} \right) \exp \left(-j2\pi \frac{x\xi + y\eta}{\lambda\Delta z} \right) dx dy \quad 88$$

Definováním frekvenčních proměnných $f_x = \xi/\lambda\Delta z$ a $f_y = \eta/\lambda\Delta z$ lze odvodit tvar Fresnelovy aproximace 89.

$$U(\xi, \eta, z_0) = \frac{\exp(jk\Delta z)}{j\lambda\Delta z} \exp \left(jk \frac{\xi^2 + \eta^2}{2\Delta z} \right) \mathcal{F} \left\{ U(x, y, L) \exp \left(jk \frac{x^2 + y^2}{2\Delta z} \right) \right\} \quad 89$$

Ze vztahu výše plyne, že Fresnelovou aproximací lze vypočítat propagaci světla pouze pomocí jedné Fourierovy transformace. Dalo by se ukázat, že Fresnelovu aproximaci lze zapsat i v podobě konvoluce v prostorové oblasti algoritmem tří Fourierových transformací, vynásobením Fresnelovou transformační funkcí ve frekvenční oblasti algoritmem dvou Fourierových transformací. Matematicky jsou sice dané zápisy ekvivalentní, ale diskretizace přítomná při numerickém výpočtu způsobí, že dané způsoby výpočtu budou mít jiné vlastnosti. Výpočet s jednou Fourierovou transformací například svazuje velikosti pixelů v rekonstrukční a záznamové rovině jinou vazbou než při konvolučním výpočtu 83.[16]

$$\Delta\xi = \frac{\lambda\Delta z}{N\Delta x} \quad 90$$

Kde Δz je propagační vzdálenost a N počet vzorků.

Aby výpočet Fresnelovou aproximací počítal přesné výsledky, musí být chyba aproximace Taylorova rozvoje velmi malá. To vnáší do výpočtu podmínku na minimální propagační vzdálenost Δz . [16] Podmínka zároveň počítá s prostorovým omezením proměnných x, y, ξ, η na malé hodnoty viz rovnice 84.

$$\Delta z^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} [(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2]^2 \quad 91$$

3.4.4 Fraunhoferova aproximace

Výpočetní algoritmus se dá ještě více zjednodušit, pokud se světlo propaguje do velkých vzdáleností. Pokud pro vzdálenost platí následující

$$\Delta z \gg k(x^2 + y^2) \quad 92$$

je možné zanedbat exponenciálu, vztahující se k rovině hologramu, ve vztahu 88.

$$U(\xi, \eta, z_0) \approx \frac{\exp(jk\Delta z)}{j\lambda\Delta z} \exp\left(jk \frac{\xi^2 + \eta^2}{2\Delta z}\right) * \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, L) \exp\left(-j2\pi \frac{x\xi + y\eta}{\lambda\Delta z}\right) dx dy \quad 93$$

$$U(\xi, \eta, z_0) = \frac{\exp(jk\Delta z)}{j\lambda\Delta z} \exp\left(jk \frac{\xi^2 + \eta^2}{2\Delta z}\right) \mathcal{F}\{U(x, y, L)\} \quad 94$$

Vztah výše se nazývá Fraunhoferova aproximace. Lze s ním počítat pouze při velkých propagačních vzdálenostech a v rekonstrukci reálných hologramů tak nenajde mnoho

uplatnění. Kvůli malé výpočetní náročnosti se ale používá v rámci počítačem generované holografie. Například k tvorbě simulovaných holografických stereogramů.

3.5 Diskretizace pro numerické výpočty

Pro numerické výpočty propagace světla je nutné nahradit spojité modely výpočtu za diskrétní. Při holografických výpočtech je spojitá proměnná vzdálenost nahrazena diskrétní vzdáleností. Vstupní informací pro celý výpočet rekonstrukce je již diskrétní holografický obraz zachycený v rovině xy . Jeho diskretizace vzniká již při záznamu na digitální kameru. Zde je obraz zachycen na senzor konečných rozměrů $M \times N$, daných konečným počtem pixelů $m \times n$ fixní velikostí pixelů Δx a Δy . Velikost pixelu se nazývá vzorkovací vzdálenost a odvozuje se z ní velikost vzorkovací frekvence.

Během diskretizace dochází k aproximaci neurčitých integrálů na určité a poté jejich náhrada za konečné sumace. Tímto postupem je aproximována i Fourierova transformace na diskrétní Fourierovu transformaci, která je efektivně počítána pomocí algoritmů rychlé Fourierovy transformace. Přejít ze spojitých proměnných na diskrétní přináší do výpočtů jisté překážky, ale při správném zacházení lze dosáhnout výsledků očekávaných od řešení spojitých funkcí. V rámci digitální holografie je nutné sledovat korektní vzorkování, optimální zatížení paměti a s tím související výpočetní čas, na který jsou kladeny nároky například při dynamickém sledování vzorků.

3.5.1 Vzorkování

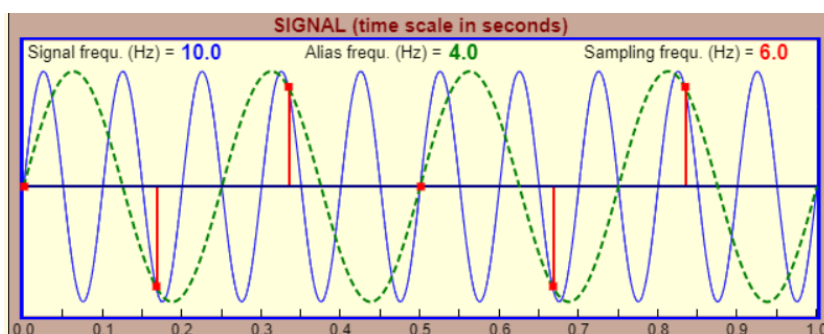
Předpokladem pro správnou numerickou rekonstrukci obrazu je, že spojitá funkce, figurující v propagaci světla, lze správně vzorkovat. Vzorkováním se rozumí převod spojitě funkční závislosti na posloupnost diskrétních hodnot. Problematiku vzorkování je možné přiblížit na příkladu 1D sinusového signálu. Spojitý signál přiváděný na vstup do čtecího zařízení je nutné zaznamenat pomocí posloupnosti vzorků. Signál je zaznamenáván po dobu $t = 1s$ a má maximální frekvenci $f_{max} = 10 Hz$. Ve čtecím zařízení je tento průběh zaznamenán konečným počtem vzorků. Počet vzorků na jednu záznamovou periodu bude reprezentován vzorkovací frekvencí f_s . Její převrácená hodnota v tomto případě symbolizuje časový krok, se kterým byly vzorky zaznamenány, tzv. vzorkovací perioda. Čím více vzorků bude, tím přesněji bude zaznamenaný diskrétní signál kopírovat spojitý vstupní signál. Na druhou stranu, zbytečně velký počet vzorků klade větší nároky na paměť záznamového zařízení a časovou náročnost následných výpočtů. Při zbytečně vysoké vzorkovací frekvenci se hovoří o převzorkování. Pokud je však vzorků zaznamenáno příliš málo, není možné dostatečně přesně kopírovat původní spojitý průběh. Rekonstruovaný průběh z mála vzorků má jinou frekvenci než původní. Tato chyba vznikající při tzv. podvzorkování se nazývá aliasing. Frekvence této chybné rekonstrukce je dána vztahem 95, kde $c = 1,2, \dots$ [29]

$$f_a = |f_{max} - cf_s| \quad 95$$

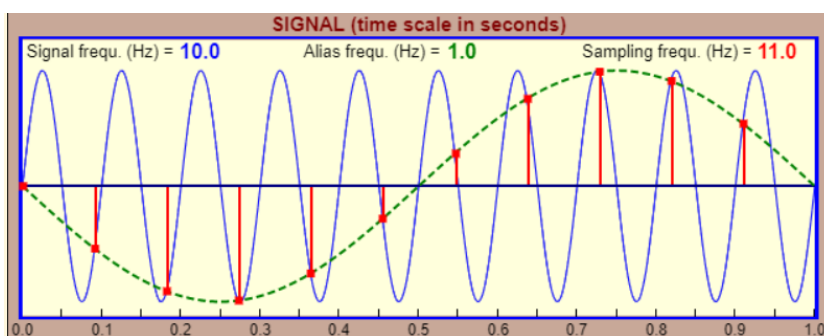
Výpočetně výhodné tedy je mít vzorkovací frekvenci co nejbližší možnému spodnímu limitu. K určení správné vzorkovací frekvence se v obecné teorii zpracování signálu používá Shannonova podmínka 96.[29][30]

$$f_s > 2 * f_{max} \quad 96$$

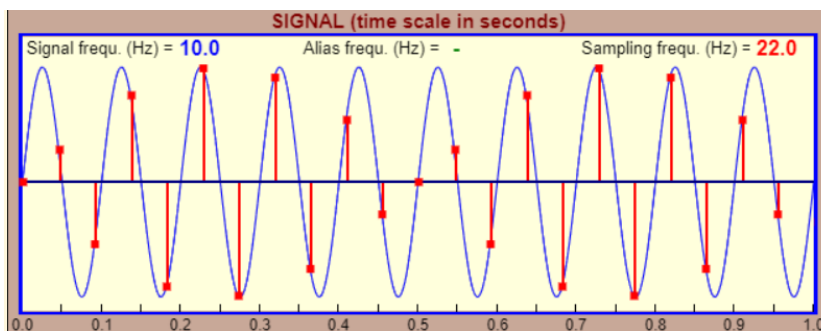
Správná vzorkovací frekvence, při které nedojde ke ztrátě informace o zaznamenávaném signálu, musí být minimálně dvakrát větší než maximální frekvence obsažená v daném signálu. Názorná ukázka vzorkování sinusoidy o frekvenci 10 Hz z odstavce výše je na následujících obrázcích. Modrý průběh je spojitý sinusový signál, červené body reprezentují zaznamenané vzorky a případný zelený průběh symbolizuje chybně zaznamenaný průběh – aliasing. Na prvních dvou obrázcích je použita vzorkovací frekvence nižší, než by měla dle kritéria 96 být. Dává tak vzniknout aliasingu s frekvencí dle vztahu 96. Na posledním obrázku je již korektně vzorkovaná sinusoida, díky vzorkovací frekvenci více než dvojnásobné oproti frekvenci původního signálu.



Obrázek 18 - Chybné vzorkování 1 [29]



Obrázek 19 - Chybné vzorkování 2 [29]



Obrázek 20 - Korektní vzorkování [29]

V případě záznamu hologramu na čip kamery je vzorkovací frekvence pevně daná. Vzorkovací perioda je symbolizována šířkou pixelu kamery Δx (případně i Δy , není-li pixel čtvercový). Vzorkovací frekvence je pak dána vztahem 97. A zároveň udává hodnotu maximální možné zaznamenané frekvence 98.

$$f_s = \frac{1}{\Delta x} \quad 97$$

$$f_{max} < \frac{1}{2\Delta x} \quad 98$$

Při výpočtech propagace světla je výhodné uvažovat, že dochází ke vzorkování konečně velikých signálů. Informace v rovině záznamu hologramu se nachází oblasti omezené body $x_{min} \leq x \leq x_{max}$ a $y_{min} \leq y \leq y_{max}$. Poté lze například pro Rayleigh-Sommerfeldovo konvoluční jádro uvažovat jeho lokální frekvence na omezeném rozsahu. Těmto maximálním lokálním frekvencím bude náležet dosažitelnější vzorkovací perioda Δx , se kterou bude obraz korektně vzorkován, než by tomu bylo při uvažování maximální neomezené globální frekvence daného konvolučního jádra. Díky této vlastnosti se pak jednotlivá konvoluční jádra více hodí buď pro delší nebo kratší rekonstrukční vzdálenosti.

Při rekonstrukci reálných hologramů je vzorkovací frekvence daná fyzickými rozměry čipu kamery, a navíc limitována i dalšími faktory souvisejícími s numerickým výpočtem. Nepřesnému vzorkování se tak nedá zabránit a je nutné řešit jeho následky, například v podobě aliasingu. Jednou z možností je aplikace filtru dolní propust na jádro konvolučního kernelu, a vzorkování provést až následně pro nižší maximální frekvence. Musí se však počítat s tím, že dojde k fyzické změně obrazu, například poklesu ostrosti.

3.5.2 Diskrétní Fourierova transformace

Obecně je lineární diskrétní konvoluce dvou 2D signálů $a[m, n]$ a $b[p - m, q - n]$ definována vztahem 99 (hrnaté závorky v této kapitole symbolizují diskrétní signály). Kde platí rozsahy vzorků $m \in \{0, 1, \dots, M - 1\}$, $n \in \{0, 1, \dots, N - 1\}$, $p \in \{0, 1, \dots, P - 1\}$ a $q \in \{0, 1, \dots, Q - 1\}$.

$$(a \otimes b)[p, q] \equiv c[p, q] = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} a[m, n] \times b[p - m, q - n] \quad 99$$

Dle analogie se vztahem 75 lze použít diskretní konvoluci k výpočtu diskretní propagace světla. Namísto a se dosadí komplexní amplituda obrazu v rovině hologramu, za b příslušné konvoluční jádro a výsledek bude komplexní amplitudou obrazu ve zvolené rovině rekonstrukce.

$$U[] = U_0[] \otimes K[] \quad 100$$

Pro výpočet diskretní konvoluce je nutné uvažovat i vzorky mimo výše zmíněné rozsahy. V případě lineární diskretní konvoluce se předpokládá, že signály a a b nabývají mimo dané rozsahy hodnoty 0. Při takzvané cyklické diskretní konvoluci se naopak předpokládá, že signály a a b jsou periodické s periodou M a N . Volba typu konvoluce závisí na tom, zda je pro další výpočty výhodnější uvažovat mimo stanovený rozsah nulové hodnoty nebo periodické opakování. Představa periodicity je výhodnější pro použití s Fourierovou transformací.[31]

Signál $b[p - m, q - n]$ operuje ve vztahu 99 na rozsazích $-(M - 1) \leq p - m \leq P - 1$ a $-(N - 1) \leq q - n \leq Q - 1$. Jeho rozsah je tedy $(M + P - 1) \times (N + Q - 1)$ vzorků. Po definování počtu vzorků $C_x = M + P - 1$ a $C_y = N + Q - 1$ a rozsahů $m \in \{0, 1, \dots, C_x - 1\}$, $n \in \{0, 1, \dots, C_y - 1\}$, $p \in \{0, 1, \dots, C_x - 1\}$ a $q \in \{0, 1, \dots, C_y - 1\}$, lze zapsat vztah pro diskretní cyklickou konvoluci. Zápis $(p - m)_{C_x}$ znamená $(p - m)$ modulo C_x .

$$c_{ck}[p, q] = \sum_{m=0}^{C_x-1} \sum_{n=0}^{C_y-1} a[m, n] \times b[(p - m)_{C_x}, (q - n)_{C_y}] \quad 101$$

Pro diskretní Fourierovu transformaci platí stejně jako pro její spojitou variantu konvoluční teorém. Při uvažování cyklické diskretní konvoluce lze brát následující vyjádření jako identická a nahradit konvoluci při výpočtu vztahu 100 součinem ve frekvenční oblasti.

$$c[] = a[] \otimes b[] \Leftrightarrow c[] = \text{IDFT}\{ \text{DFT}\{a[]\} \odot \text{DFT}\{b[]\} \} \quad 102$$

Znaménko \odot reprezentuje tzv. Hadamardův součin, sloužící k násobení dvou matic po jednotlivých složkách. Matice musí mít stejné rozměry. Důvodem této záměny je optimalizace celkového výpočtu. Výpočet přímou konvolucí 101 vyžaduje $\sigma\{C_x^2 C_y^2\}$ aritmetických operací v podobě komplexního násobení a sčítání. Naproti tomu výpočet diskretní Fourierovy transformace 102 za využití algoritmů rychlé Fourierovy transformace (*FFT*) vyžaduje pouze $\sigma\{C_x C_y \log(C_x C_y)\}$ aritmetických operací. Algoritmus *FFT* využívá pro urychlení mimo jiné toho, že některé z komplexních součinů se v rámci výpočtu konvolucí opakují.[30]

Diskrétní Fourierova transformace 2D signálu 103 a její inverzní podoba 104 jsou definovány následovně.

$$G[p, q] = \sum_{m=0}^{C_x-1} \sum_{n=0}^{C_y-1} g[m, n] \exp \left[-j2\pi \left(\frac{mp}{C_x} + \frac{np}{C_y} \right) \right] \quad 103$$

$$g[m, n] = \frac{1}{C_x C_y} \sum_{p=0}^{C_x-1} \sum_{q=0}^{C_y-1} G[p, q] \exp \left[j2\pi \left(\frac{mp}{C_x} + \frac{np}{C_y} \right) \right] \quad 104$$

3.6 Pokročilejší algoritmy

V uplynulém textu byly zmíněny některé z problémů, kterou mohou při rekonstrukci digitálních hologramů nastat, ať už vlivem numerického výpočtu nebo principem samotné tvorby hologramu. Výhodou digitální holografické mikroskopie však je, že tyto překážky lze z části odstranit pomocí upravených algoritmů. V této podkapitole budou některé z nich stručně představeny. U výpočtu propagace světla pomocí konvolučních metod a metody jedné Fourierovy transformace byla zmíněna limitace velikosti vzorkovací frekvence v rovině rekonstruovaného obrazu. Od ní se pak odvíjí výsledné rozlišení. Současně to znamená, že nelze libovolně měnit zvětšení při rekonstruování hologramů. Mezi algoritmy, které umožňují numericky měnit zvětšení během výpočtu, patří dvou krokový algoritmus, metoda digitální kvadratické čočky a tzv. Fresnel – Bluesteinova transformace. Další problematikou je korektní rozbalování fáze pro získání přesných fázových obrazů zkoumaných vzorků. Numericky lze také řešit problém sekundárního obrazu (*twin image*) vzniklého při in – line konfiguraci mikroskopu.

3.6.1 Nastavitelné zvětšení

Jak již bylo zmíněno, při výpočtu Fresnelovou aproximací pomocí jedné Fourierovy transformace je reálná velikost pixelu v rovině rekonstruovaného obrazu (čili zvětšení oproti velikosti pixelu v rovině hologramu), sice proměnná, ale pevně svázána s použitou vlnovou délkou, velikostí pixelu kamery a rekonstrukční vzdáleností (vztah 90). Zvětšení γ je poté dáno následujícím poměrem 105.

$$\gamma = \frac{\Delta\xi}{\Delta x} = \frac{\lambda z}{N\Delta x^2} \quad 105$$

První metodou umožňující nastavitelné zvětšení při Fresnelově aproximaci je Fresnel – Bluesteinova transformace. Dle [16] a [32] je odvození, při uvažování jednoho souřadnicového směru, následující. Fresnelova aproximace pro 1D je definována vztahem 106, kde N je celkový počet vzorků a $n\Delta x$ respektive $p\Delta\xi$ určují polohu souřadnic v rovině hologramu a rekonstruovaného obrazu.

$$U(p) = \frac{\exp(\mathbf{j}kz)}{\mathbf{j}\lambda z} \exp\left(\mathbf{j} \frac{\pi\lambda z p^2}{N^2\Delta x^2}\right) * \sum_{n=0}^{N-1} U(n) \exp\left(\mathbf{j}k \frac{n^2\Delta x^2}{2z}\right) \exp\left(-\mathbf{j}2\pi \frac{np}{N}\right) \quad 106$$

Pro součin $2np$ v poslední exponenciále platí rovnost $2np = n^2 + p^2 - (p - n)^2$. S použitím vztahu 90 a dané rovnosti se Bluesteinovou substitucí do vztahu 106, se získá upravený výraz.

$$U(p) = \frac{\exp(\mathbf{j}kz)}{\mathbf{j}\lambda z} \exp\left(-\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} \Delta\xi (\Delta x - \Delta\xi) p^2\right) * \sum_{n=0}^{N-1} U(n) \exp\left(\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} \Delta x (\Delta x - \Delta\xi) n^2\right) \exp\left(\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} \Delta x \Delta\xi (p - n)^2\right) \quad 107$$

Po dosažení nezávislého nastavitelného zvětšení $\gamma_a = \Delta\xi / \Delta x$ je získán výsledný tvar Fresnel – Bluesteinovy transformace 108. Zvětšení je možné libovolně měnit změnou parametru $\Delta\xi$, Δx je stále dáno rozměry kamery.

$$U(p) = \frac{\exp(\mathbf{j}kz)}{\mathbf{j}\lambda z} \exp\left(-\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} \gamma_a (1 - \gamma_a) \Delta x^2 p^2\right) * \sum_{n=0}^{N-1} U(n) \exp\left(\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} (1 - \gamma_a) \Delta x^2 n^2\right) \exp\left(\frac{\mathbf{j}\pi}{\lambda z} \gamma_a (p - n)^2 \Delta x^2\right) \quad 108$$

Zvětšení je dosaženo nezávisle na vzdálenosti, vlnové délce a počtu pixelů, což umožňuje použití metody v metrologických aplikacích a barevné digitální holografii. [32]

Druhý přístup uvažuje Fresnelovu aproximaci jako lineární systém. Pro použití při rekonstrukci díky tomu platí, že fáze ve vzdálenosti z lze postupně zrekonstruovat po vzdálenostech z_1 a z_2 . Pro ně platí $z_1 + z_2 = z$.

$$U(\xi, z) = U(x) \exp(\mathbf{j}\pi\lambda z x^2) \quad 109$$

$$U_{z_1}(\xi, z_1) = U(x) \exp(\mathbf{j}\pi\lambda z_1 x^2) \quad 110$$

$$U(\xi, z) = U_{z_1}(x) \exp(\mathbf{j}\pi\lambda z_2 x^2) \quad 111$$

Nastavitelné zvětšení je potom dáno poměrem vzdáleností 112. [33] Upravuje se volbou vzdálenosti z_1 . Tu lze libovolně zvolit mezi rovinou hologramu a rovinou zaostřeného rekonstruovaného obrazu ve vzdálenosti z .

$$\gamma_a = \frac{\Delta\xi}{\Delta x} = \frac{|z_2|}{|z_1|} \quad 112$$

U metod s konvolučním přístupem je naproti tomu zvětšení (v podobě poměru velikosti pixelů) v celém rozsahu rekonstrukčních vzdáleností konstantní, pro připomenutí dle vztahu 83. Takové zvětšení se nazývá unitární. Pro velmi malé objekty to může znamenat problém, protože v rekonstruovaném obrazu budou rozprostřeny po malém množství pixelů (v závislosti na velikosti pixelu kamery). V dřívějších studiích byl pro zvětšení rekonstruovaného pole využit *zero-padding* (rozšíření oblasti přidáním nulových prvků). Při výpočtu však tato metoda zvyšovala zátěž paměti a výpočetní čas. Sofistikovanějším přístupem je použití tzv. digitální kvadratické čočky. [16][34] Před samotnou rekonstrukcí je hologram rozšířen na vhodné zvolený rozměr (*padding*) a vynásoben simulovanou kulovou vlnoplohou 113.

$$C(x) = \exp\left(-j\frac{\pi}{\lambda R_c}x^2\right) \quad 113$$

Symbol R_c značí poloměr zakřivení dané kulové plochy. Ve vztahu ke zvětšení je definován takto:

$$R_c = \frac{\sigma z}{\sigma - 1} \quad 114$$

kde σ značí poměr mezi velikostí rozšířeného hologramu a fyzickou velikostí vzorku. Výpočet tímto algoritmem je podmíněn použitím sférické vlnoplochy jako zdroje záření, která v tomto případě upraví rekonstrukční vzdálenost do podoby $z' = z\sigma$. Samotná rekonstrukce poté probíhá standardně dle vztahu 82.

3.6.2 Rozbalení fáze

Pro jisté aplikace je výhodné použít rekonstruovaný fázový obraz. Jedná se například o zkoumání vysoce transparentních (fázových) vzorků. Další možností může být kombinace fázového a amplitudového obrazu k určení správné polohy vzorku v objemu, dle toho, v jaké rovině je jeho obraz zaostřený.[3] Informace o fázi předmětové vlny není zaznamenána přímo v zachyceném hologramu. Ten je technicky stále pouze zachycená intenzita interferenčního pole. Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, komplexní amplituda hologramu (nesoucí informaci o amplitudě i fázi) se získá pomocí simulovaného prosvícení hologramu sférickou vlnou. S daným fázorem pak probíhá rekonstrukce obrazu metodami propagace světla. Ve zvolené rekonstrukční rovině pak lze získat buď amplitudový nebo fázový obraz. Amplitudový obraz se dá teoreticky získat pomocí vztahu 42 a fázový pomocí vztahu 43, pro připomenutí uvedeny níže.

$$A = |U| = \sqrt{UU^*} \quad 42$$

$$\phi = \arg(U) = \arctan\left(\frac{\text{Im}\{U\}}{\text{Re}\{U\}}\right) \quad 43$$

Fáze komplexního čísla získaná vztahem 43 je však principiálně omezena do intervalu $\{-\pi, \pi\}$. Reálná hodnota fáze však může nabývat i hodnot mimo tento interval, například v závislosti na tloušťce daného vzorku. Takto získaná fáze bude obsahovat nespojitosti v místech, kde by reálná hodnota měla být mimo interval 2π . Ty se projeví jako fázové skoky právě o periodu 2π . Tato fáze se označuje jako zabalená (z anglického *wrapped*) a pro získání správné fázové informace je nutné provést její rozbalení (z anglického *unwrapping*). Základní algoritmy pro získání rozbalené fáze fungují na principu detekcí nespojitostí, ve kterých následně dojde k přičtení nebo odečtení celočíselného násobku 2π , viz rovnice 115.[35] Nespojitosti jsou určovány na základě toho, zda mezi sousedícími body dojde ke změně fáze větší, než jaká je prahová hodnota. Ta bývá v základu nastavena na hodnotu π . Takto funguje například funkce *unwrap* v prostředí Matlab či Octave.

$$\phi_{uw} = \phi_w + 2\pi n \quad 115$$

Při rozbalování fáze reálných rekonstruovaných obrazů je obraz zatížen šumem a dalšími artefakty, díky čemuž tento základní algoritmus nedokáže správně určit, v jakém místě kolik má přičíst. Vznikla tak řada složitějších algoritmů, které se snaží rozbalovat fázi za první efektivně vzhledem k počítačovým výpočtům a za druhé správně, aby se fázové obrazy daly využít k další práci.

Algoritmy se dělí do tří typů na globální, lokální a algoritmy sledující trasu (*path-following*). Lokální algoritmy rozdělí obraz do menších oblastí, na nich izolovaně provedou rozbalení fáze a opět složí obraz dohromady. Rozdělení oblastí určuje dle gradientu fáze v obraze. Algoritmy sledující trasu se řídí nějakým kritériem, které určí pořadí rozbalování jednotlivých bodů, tedy pixelů v obraze. Kritérii nejčastěji bývá hodnota gradientu nebo diference mezi sousedícími pixely.[36]

Studie [37] představuje tzv. kvalitou řízený algoritmus. Kritériem je v tomto případě hodnota druhé diference mezi pixely v daném obraze. Při výpočtu druhé diference pro daný pixel se využívají hodnoty pixelů v jeho nejbližším okolí daném rozměrem masky 3×3 . Během výpočtu jsou vzájemně porovnávány hodnoty jednotlivých pixelů po základním rozbalení fáze, odstraňujícím 2π nespojitosti. Body s nejnižší hodnotou diference jsou označeny jako nejkvalitnější a jsou rozbaleny jako první, body s nejvyšší hodnotou jsou rozbaleny jako poslední. Algoritmus si dokáže poradit s nespojitostmi i přítomností šumu v obraze.

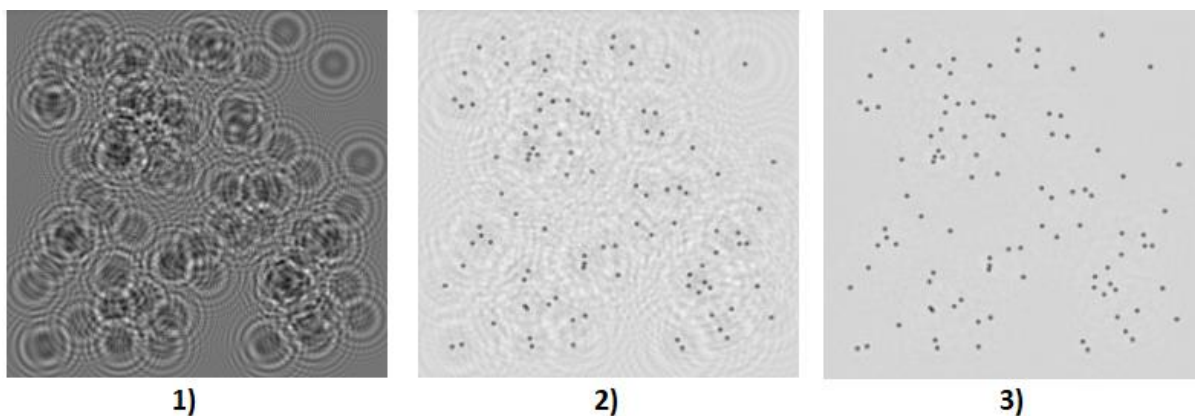
Zajímavým propojením digitální holografické mikroskopie a strojového učení se zabývá studie [36]. K získání rozbalené fáze používá neuronové sítě typu GAN (*generative adversarial network*). K tvorbě hologramů rakovinových buněk bylo využito DHM v off – axis sestavě. Jako trénovací data pro neuronovou síť byly na vstupu použity rekonstruované obrazy s dosud zabalenou fází, které byly na výstupu porovnány s obrazy rozbalené fáze. Ty byly získány

přímým výpočtem metodou vycházející ze studie [37]. Po natrénování byl model využit k rozbalení rekonstruovaných obrazů, jež nebyly použity v rámci trénovací sady. Výsledky rozbalené fáze pak byly opět srovnány s výsledky po přímém výpočtu. Bylo vyhodnoceno, že výsledky z neuronové sítě jsou dostatečně kvalitní, a navíc je lze získat velmi rychle. Tento model výpočtu lze tedy využít pro sledování buněčných vzorků v reálném čase.

3.6.3 Zdvojený obraz

V kapitole 1.2 bylo zmíněno, že jednou z nevýhod in-line sestavy je překryv komplexně sdružených interferenčních členů, z nichž každý generuje obraz předmětu. Primární obraz je zaostřen v místě vzorku, komplexně sdružený sekundární obraz se nachází ve stejné vzdálenosti od zdroje, ale virtuálně na opačné straně.[15] V rovině, kde je primární obraz OR^* zaostřen, bude zároveň překryt rozostřeným obrazem komplexně sdruženého interferenčního členu RO^* . Obraz se tímto artefaktem může jevit degradovaný. Jako řešení tohoto principiálního problému byla v minulosti mimo jiné navržena off-axis sestava. Díky změně geometrie záznamu dojde v obrazové rovině k prostorové separaci jednotlivých interferenčních členů. Off-axis sestava však přináší vyšší požadavky na přesnost a robustnost celé konstrukce mikroskopu. Byly tedy vypracovány postupy, jak řešit problematiku zdvojeného obrazu (*twin image*) numericky, až po záznamu obrazu v sestavě in-line.

Souhrn používaných algoritmů a návrh nového přístupu pro potlačení zdvojeného obrazu mikročástic v objemu je uveden ve studii [12]. Velikost amplitudy zdvojeného obrazu v rekonstruované rovině dává studii do souvislosti s rekonstrukční vzdáleností a reálnou velikostí vzorku. Amplituda zdvojeného obrazu roste s rozměry rekonstruovaného objektu, zároveň ale klesá se zvětšující se rekonstrukční vzdáleností. Mezi používané metody potlačování zdvojeného obrazu studie udává inverzní filtraci ve Fourierově spektru nebo iterativní techniky využívající rekonstrukci fázové informace. Nově navržená metoda funguje na principu binární masky. V rekonstruovaném obraze se určí zaostřené body (polohy mikročástic) a v jejich poloze bude mít maska hodnotu nula. Masku se po vyplnění vynásobí s původním hologramem. Takto upravený hologram se zrekonstruuje a teoreticky by měl obsahovat pouze rozostřený zdvojený obraz. Odečtením původní a nové rekonstrukce v dané rovině vznikne ostrý obraz bez artefaktů daných překrytím obrazů.



Obrázek 21 - Potlačení zdvojeného obrazu [12]

Na obrázku 21 zobrazen výsledek daného algoritmu. Zleva doprava je nejdříve hologram, standardní rekonstrukce, a nakonec výsledný upravený obraz.

Studie [4] a [15] však upozorňují, že při použití konfigurací in-line DHM s pracovními vzdálenostmi násobně většími, než je vlnová délka světla, bude vliv zdvojení obrazu na degradaci rekonstrukce zanedbatelný. V podstatě bude přebitý standardně přítomným šumem. Na větší rekonstrukční vzdálenosti bude zdvojený obraz dostatečně rozostřený a zároveň rozprostřený po celé ploše rekonstruovaného obrazu.

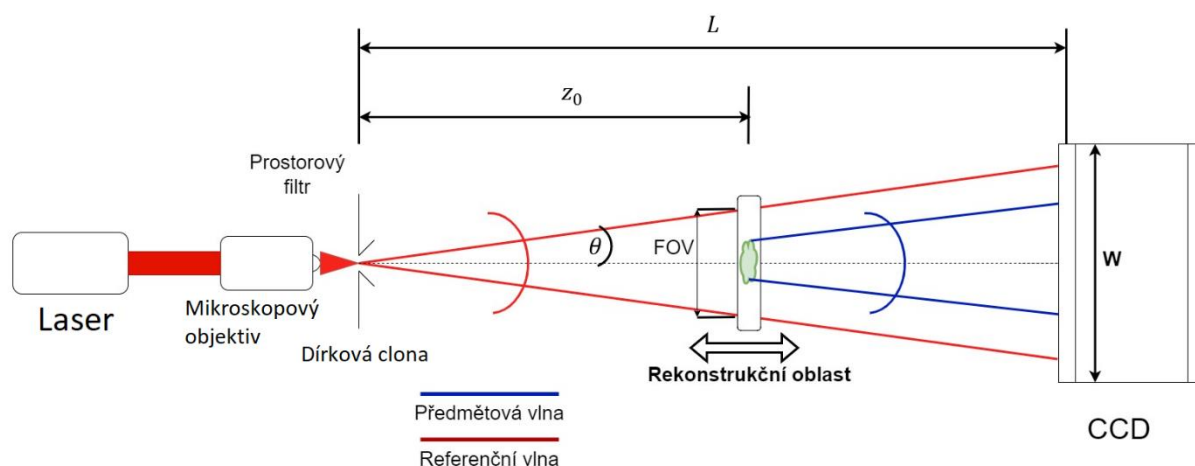
Praktická část

Praktická část práce navazuje na teoretickou dalšími čtyřmi kapitolami. Ve čtvrté kapitole je popsán postup návrhu a realizace experimentální sestavy digitálního holografického mikroskopu. Sestava jsem postupně upravoval do kompaktnějších podob. Od sestavy využívající rozměrný helium-neonový laser s prostorovým filtrem až po finální sestavu s laserovou diodou a dírkovou clonou. V páté kapitole je představen algoritmus sloužící k digitální rekonstrukci obrazu společně s popisem obsluhování kompletního programu při samotném experimentování. V šesté kapitole je popsán pracovní postup pro záznam hologramu a jeho rekonstrukci pomocí experimentálního mikroskopu a programu pro rekonstrukci. Následně je popsána mnou navržená metodika pro rozměrovou analýzu vzorků v rekonstruovaném obraze. Sedmá kapitola zahrnuje ukázky některých rekonstruovaných hologramů, souhrn parametrů experimentální sestavy digitálního holografického mikroskopu a návrh uspořádání mikroskopu do inkubátoru.

4 Návrh sestavy digitálního holografického mikroskopu

Jedním z cílů mé diplomové práce bylo navrhnout, vyrobit a sestavit experimentální sestavu digitálního holografického mikroskopu. Ve spojení s programem pro rekonstrukci obrazu měla sloužit k ověření principu digitální holografické mikroskopie a její úspěšné reprodukci v laboratorních podmínkách. Experimentální sestava měla být navržena tak aby splňovala několik kritérií. Zaprvé měla umožnit libovolnou změnu pracovních vzdáleností mezi zdrojem sférické vlny, vzorkem a kamerou. Postupnými pokusy s rekonstrukcí obrazu v různých vzdálenostech mělo dojít k vyhodnocení optimální vzájemné polohy zmíněných tří členů na základě kvality rekonstrukce, velikosti zorného pole a také velikosti konstrukčních rozměrů celé sestavy při dané pracovní vzdálenosti. Zadruhé měla být sestava dostatečně robustní, aby bylo možné provádět opakovatelná měření bez nutnosti opakovaného seřizování jednotlivých prvků. Třetím a důležitým kritériem byla možnost zkoumání vzorků uložených v kapalném médiu. Z informací získaných při provádění experimentů s danou sestavou se bude dále vycházet při návrhu mikroskopu použitelného ke zkoumání růstu embryí v inkubátoru.

Nejprve bylo nutné zvolit mezi typy sestavy in-line a off-axis. Pro svůj návrh jsem si vybral sestavu in-line. Konstrukčně je méně složitá, všechny prvky se soustředí do jedné optické osy, využívá méně optických prvků a lze dosáhnout kompaktnější sestavy. Pro připomenutí je přiložen obrázek 4 se schématem in-line sestavy.



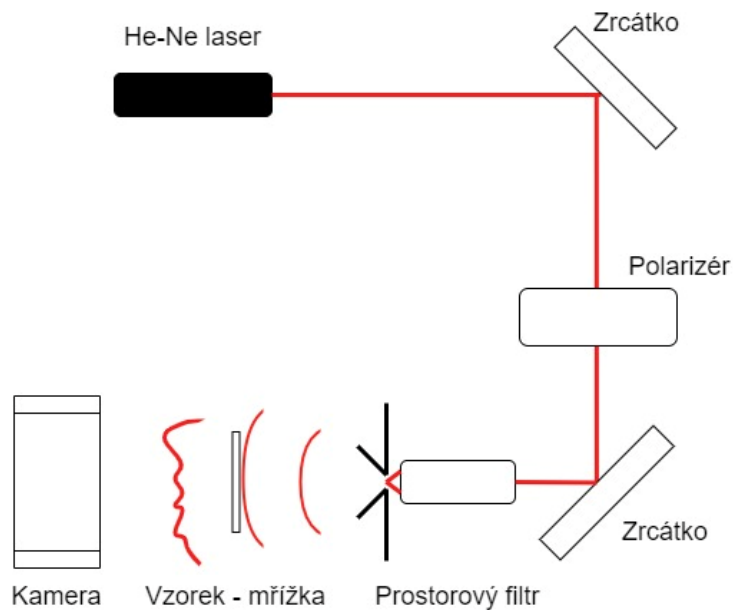
Obrázek 4 – Schéma in-line sestavy

4.1 Sestava pro otestování principu

První uspořádání mikroskopu jsem použil pouze k ozkoušení funkčnosti programu pro rekonstrukci obrazu ze zachyceného hologramu. Jednotlivé funkční prvky sestavy byly volně umístěny na stojanech na optickém stole. Jako zdroj rovnoběžného laserového svazku byl použit helium-neonový laser s vlnovou délkou 632.8 nm . Svazek je soustavou zrcadel dopraven do prostorového filtru. Cestou však ještě prochází polarizérem, který umožňuje regulovat velikost intenzity světla dopadající na kameru, protože světlo z použitého laseru je lineárně polarizované. Prostorový filtr sestává z mikroskopového objektivu a dírkové clony. Pomocí přesného vedení je ohnisko objektivu fokusováno přímo do dírkové clony. Dírková clona slouží jako filtr prostorových frekvencí pro vyčištění koherentního svazku od nežádoucích vad vzniklých po cestě (prach na zrcadlech) a zároveň je zdrojem sférické vlny. Dírková clona použitá v prostorovém filtru má průměr $30 \mu\text{m}$. Původní laserový svazek z dírkové clony tedy vystupuje v podobě sférické divergentní vlny sloužící jako referenční vlna pro záznam hologramu. Jako vzorek k rekonstrukci jsem použil optickou mřížku stojící na dalším samostatném stojanu. Za mřížkou se na dalším stojanu nacházela kamera zaznamenávající interferenční vzor.



Obrázek 22 - Testovací sestava



Obrázek 23 - Schéma testovací sestavy

Jako záznamové zařízení jsem v této i v dalších sestavách použil monochromatickou kameru DMK 33UX178 od firmy *Imaging Source*. Pro záznam obrazu musí být spojena s počítačem pomocí USB rozhraní. Software *IC Capture 2.5* použitý pro ovládání kamery pochází od stejné firmy. Uživatelské prostředí umožňuje mimo jiné volit délku expozice, zobrazit histogram jasu nebo měnit frekvenci záznamu snímků. V tabulce 2 jsou uvedeny základní parametry kamery.

rozlišení	3,072 x 2048
max frame rate	60 fps
typ senzoru	CMOS
velikost pixelu	2,4 x 2,4 μm
rozměry	29 x 29 x 43 mm
expozice	20 μs až 60 s

Tabulka 2 - Parametry DMK 33UX178

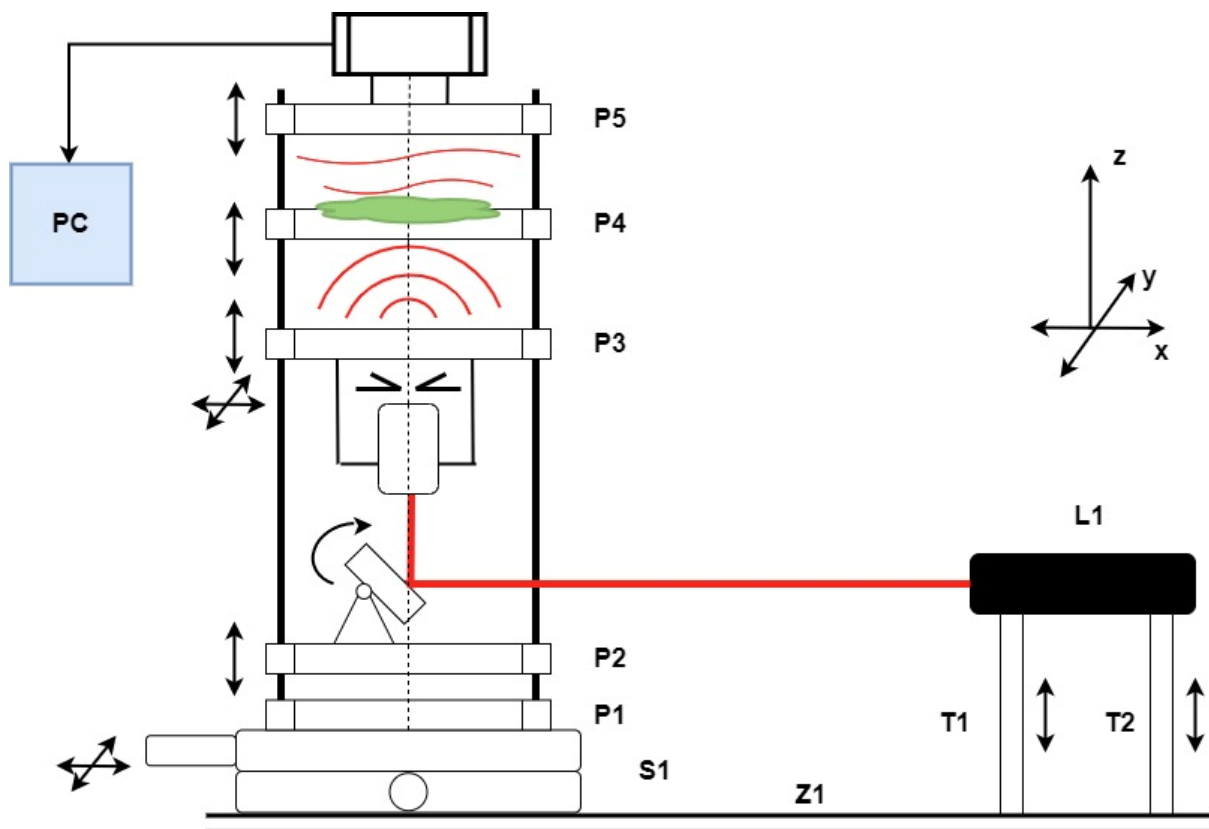
V této jednoduché sestavě se mi podařilo zaznamenat hologram optické mřížky a úspěšně z něj v počítači rekonstruovat zaostřený obraz. Hologramů bylo zaznamenáno více v několika různých vzdálenostech. Vzdálenosti byly měřeny pomocí posuvného měřítka. Funkčnost základního principu byla potvrzena a mohl jsem tedy přejít k návrhu experimentálního holografického mikroskopu.

4.2 In – line experimentální sestava

Jak bylo zmíněno v úvodu kapitoly, návrh experimentálního mikroskopu musel splňovat tři podmínky. Možnost volitelné změny pracovních vzdáleností vzorku a kamery, dostatečnou robustnost a záznam vzorků uložených v kapalině. Z třetí podmínky vyplývá, že ta část mikroskopu, ve které bude uložen vzorek, bude muset být v horizontální poloze a sférická světelná vlna bude tímto místem procházet vertikálně. Abych zjednodušil konstrukci a omezil počet zrcadel pro změnu cesty laserového svazku na minimum, rozhodl jsem se mikroskop navrhnout celý ve vertikální poloze. Optická osa mikroskopu tedy bude ve vertikálním směru a jednotlivé části mikroskopu budou uloženy jedna nad druhou horizontálně. Pro tvorbu sestavy, která by umožňovala posuv jednotlivých částí, jsem se inspiroval optickým cage systémem od firmy Thorlabs. Libovolné komponenty se skrze čtyři otvory nasazují na kovové vodící tyče a utažením šroubků se fixují do zvolené polohy. Pro sestavu jsem využil tyče *ER18* o průměru 6 mm a délce 18".

Sestavu jsem navrhl následovně. Na základní desce je na dvou axiálně posuvných podpěrách umístěn helium – neonový laser o vlnové délce 633 nm. Proti němu je na základní desce připevněn posuvný XY stolek. Na něm je pomocí dvou šroubů připevněna základová platforma, ve které jsou uloženy vodící tyče. Otvory v této platformě mají dvojí rozteč, pro přišroubování v posuvnému stolku i pro přišroubování k desce optického stolu až nebude posuvný stolek potřeba (po náhradě helium-neonového laseru za laserovou diodu). První posuvná platforma slouží k připevnění zrcátka. Na něm je horizontálně vedený svazek z laseru, zalomen o 90° a nasměrován vertikálně do prostorového filtru. Zrcátko je k platformě připevněno pomocí kinematického držáku KM100PM/M od firmy Thorlabs. Jeho pomocí lze zrcátko polohovat jak v ose z (vertikální díky posuvu celé platformy), tak i v osách x a y. Další platforma slouží k připevnění prostorového filtru. Nad ní se nachází platformy pro uložení vzorku a k uchycení

kamery. Platformy jsou navrženy tak, že všechny prvky jsou teoreticky centrovány do jedné osy. Při montáži je centrování doladěno výše zmíněnými posuvnými stolky a kinematickými držáky. Na obrázku 24 je schématické zobrazení sestavy mikroskopu s popisky jednotlivých částí připojených v tabulce 3. Šipky znázorňují možný pohyb komponent, který je využit při kalibraci celé sestavy nebo změně pracovních vzdáleností. Podrobnější popis odměřování pracovních vzdáleností bude uveden v kapitole 6 Metodika měření.



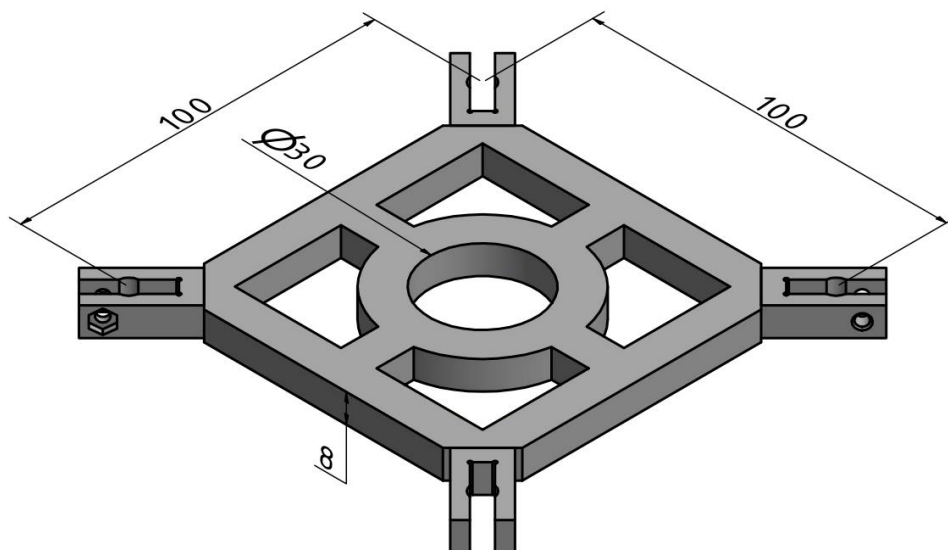
Obrázek 24 - Schéma experimentální sestavy

S1	XY polohovací stolek	P1	Základní platforma
L1	He-Ne Laser	P2	Platforma držící zrátko
T1	Posuvná podpěra	P3	Platforma držící prostorový filtr
T2	Posuvná podpěra	P4	Platforma pro uložení vzorku
Z1	Základní deska	P5	Platforma držící kameru

Tabulka 3 – Vysvětlivky

Platformy sloužící k uchycení komponent jsem navrhl v prostředí Autodesk Inventor a vytiskl z materiálu PLA na 3D tiskárně Prusa i3 MK3. K uchycení platform k vodícím tyčím je využito čtyř svěrných spojů, zajišťujících po utažení zafixování pozice. Zároveň se dají snadno uvolnit a platforma se může posunout. Tuhost celé sestavy je zajištěna právě utažením všech nasazených platform a uložení vodících tyčí v základové platformě. Na obrázku 25 je zobrazen 3D model platformy sloužící k uložení vzorku. Rozměry středového otvoru jsou primárně navrženy pro zkoumání vzorků v plastových miskách, jež byly dostupné v laboratoři

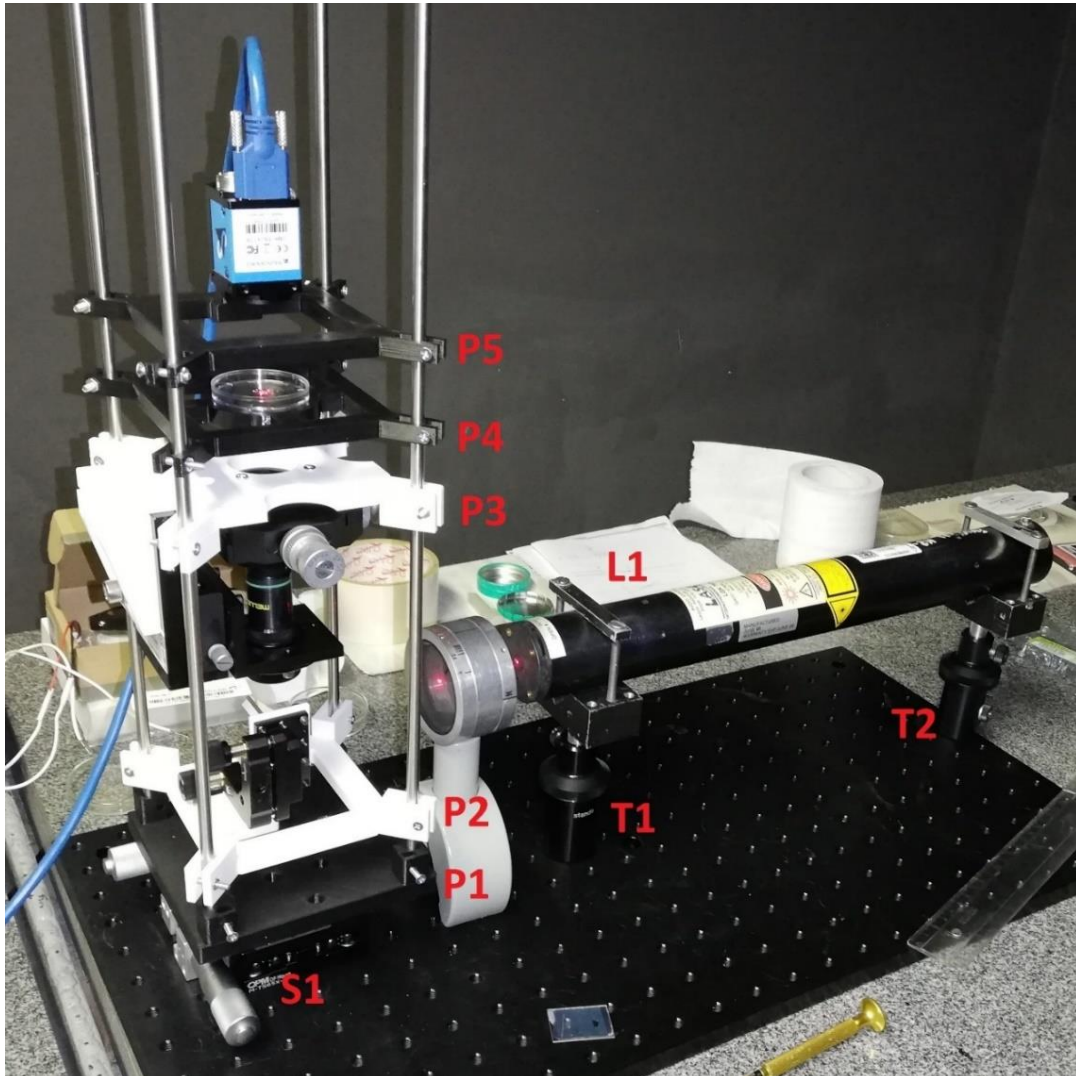
odboru Přesné mechaniky a optiky. Rozteč vodících tyčí zakótovaná v obrázku je 100 mm. Tento rozměr udávající zároveň celkový půdorys mikroskopu, jsem zvolil tak aby se mezi vodící tyče vešel prostorový filtr. Obecně jsem platformy navrhoval tak aby byly dostatečně tuhé při použití minima tiskového materiálu. Všechny navržené modely jsou součástí přílohy této diplomové práce. Součástí je i obecná platforma, u které si lze navrhnout vlastní funkci nosné části. Svěrné spoje a další rozměry však zůstanou zachovány. V laboratořích optiky mohou platformy v budoucnu sloužit jako odzkoušený, jednoduchý návrh vertikálního uložení.



Obrázek 25 - Platforma pro uložení vzorku

Na obrázku 26 je zobrazena sestava digitálního holografického mikroskopu. Reálná sestava splnila požadavky z úvodu kapitoly. Kombinací posuvů podpěr laseru, XY stolku a platformy s držátkem zrcátka se podařilo nasměrovat laserový svazek do objektivu prostorového filtru. Prostorový filtr byl nejdříve nahrubo seřízen mimo sestavu a následně kalibrován přímo v sestavě mikroskopu. Směrem ke vzorku a kameře tedy po prvotním seřízení mířila požadovaná sférická vlnová plocha. Navržené svěrné spoje po utažení zamezily posuvu platformy se zrcátkem i prostorovým filtrem a mimo rozebrání a opětovného složení mikroskopu nebylo nutné sestavu v průběhu času znovu kalibrovat. Naproti tomu s platformami pro vzorek a kameru se dalo libovolně posouvat bez negativního vlivu na seřízení celé sestavy. Mnou navržený a sestavený experimentální digitální holografický mikroskop umožňuje opakovaný záznam hologramů vzorků uložených v horizontální poloze. Pracovní vzdálenost čili polohu vzorku a kamery od zdroje sférické vlny lze mezi jednotlivými experimenty měnit a pomocí posuvného měřítka měřit. Nejmenší dosažitelná vzdálenost z (vzorek od zdroje sférické vlny) je cca 48 mm. Limitací je konstrukční uspořádání prostorového filtru a tloušťka platformy pro uchycení filtru a vzorku. Díky horizontálnímu uložení vzorku je možné, aby byl zkoumán v kapalném médiu, což je při biologických aplikacích často nezbytné.

Nedostatkem dané sestavy je, především díky její vertikální povaze, náchylnost k vibracím. Na ty je holografický záznam citlivý. Pokud se po manipulaci se vzorkem nechala sestava chvíli ustávit a notebook zaznamenávající informace z kamery byl uložen na odděleném stole, nebyl pozorován negativní vliv vibrací na kvalitu zaznamenaného hologramu.

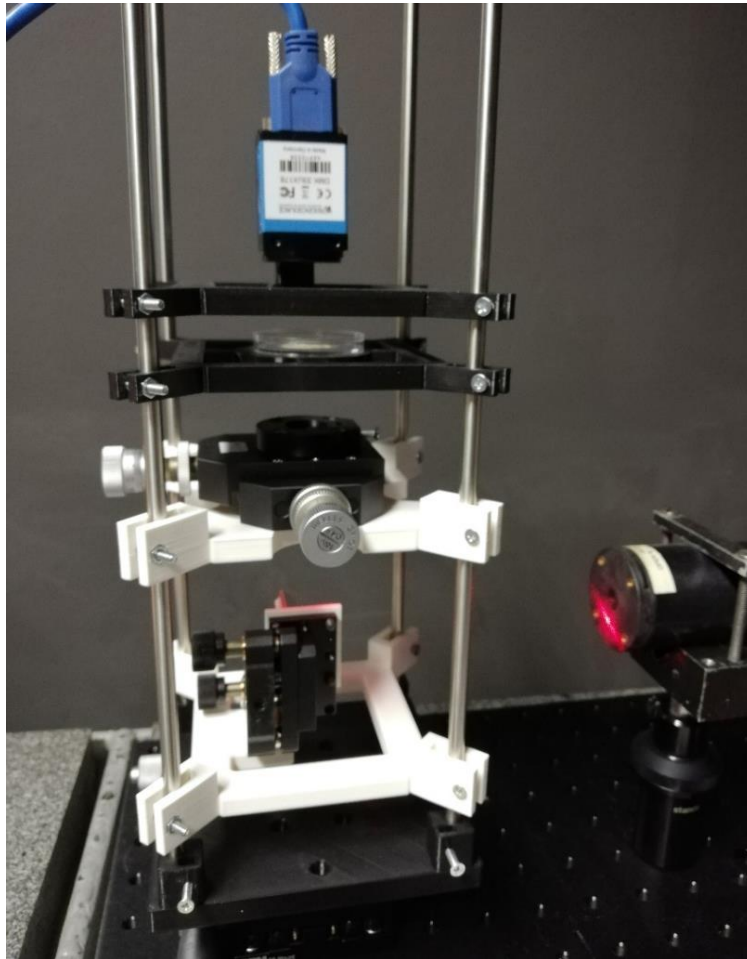


Obrázek 26 - Experimentální sestava

4.3 Upravená sestava bez prostorového filtru

Finální návrh digitálního holografického mikroskopu by měl mít ideálně co nejmenší dosažitelné rozměry. Ideálně by tedy neměl obsahovat celý rozměrný prostorový filtr a samostatně stojící laser vyžadující zrcadlo pro změnu dráhy svazku by měl být nahrazený vestavěnou laserovou diodou. Mezikrokem k této soustavě byl návrh kde v rámci zvýšení kompaktnosti, dosažení plně bez-objektivové sestavy a zvětšení rozsahu pracovních vzdáleností byl vyjmut prostorový filtr. Místo něj slouží jako zdroj sférické vlnové plochy samostatná dírková clona, na které dochází k ohybu světla a následnému šíření sférické vlny. V této sestavě je použita dírková clona o průměru $15 \mu\text{m}$, zajišťující dostatečný ohyb světla při

zachování potřebné intenzity. Ta je pomocí držáku navrženého a vytištěného na 3D tiskárně připevněna k polohovacímu XY stolku z původního prostorového filtru. Ten je připevněn k původní platformě. Tento komplet je však otočen o 180° kolem osy x a dírková clona se nyní nachází blíže ke vzorku, než když byla uložena v prostorovém filtru. Nejmenší dosažitelná vzdálenost z je cca 10 mm. Změna kvality rekonstruovaných obrazů z této sestavy bude diskutována v kapitole Výsledky. Na obrázku 27 je zobrazena upravená sestava. Zdrojem je stále samostatně stojící laser.



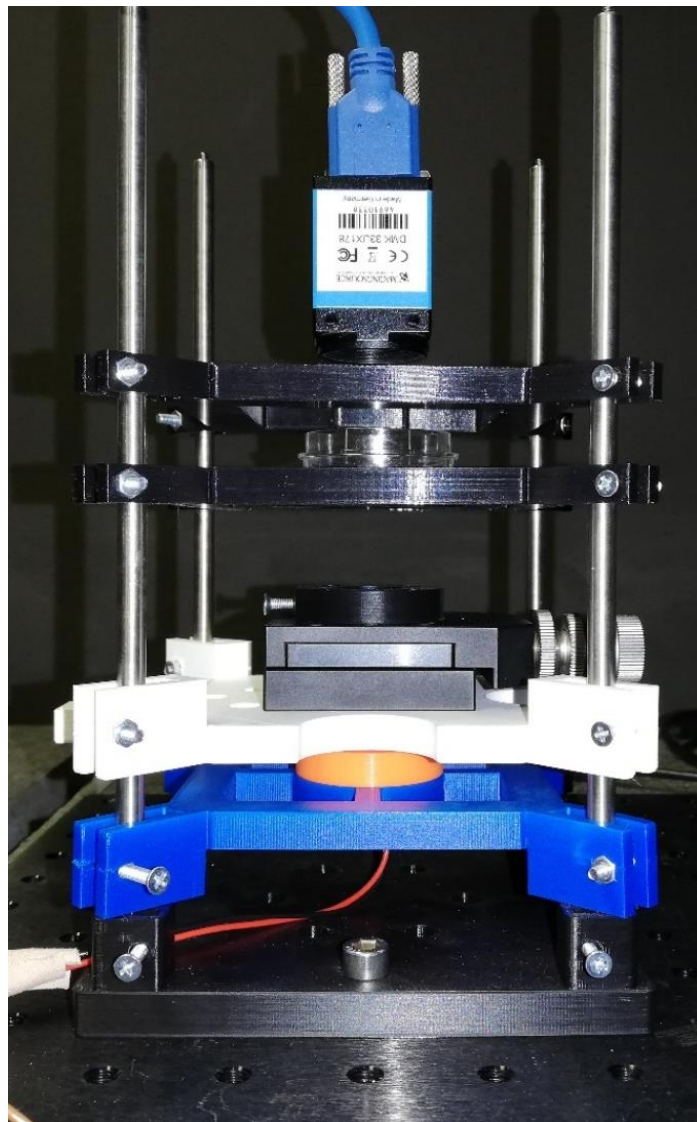
Obrázek 27 - Sestava bez prostorového filtru

4.4 Upravená sestava s laserovou diodou

Posledním krokem k vytvoření finální kompaktní experimentální sestavy byla náhrada rozměrného a samostatně stojícího helium–neonového laseru za laserovou diodu. Ze sestavy tak mimo něj vypadne i XY polohovací stůl, na kterém stojí základní platforma a platforma se zrcátkem pro zalomení svazku. V předchozí variantě sestavy bylo ozkoušeno, že rekonstrukce úspěšně proběhne i bez použití prostorového filtru.

Jako zdroj záření byl použit jednoduchý laserový modul sestávající z hranově vyzařující diody a kolimační čočky. Vyzařující laserový svazek je tedy bodový. Dle specifikací vyzařuje na vlnové

délce $\lambda = 650 \text{ nm}$, s výkonem 5 mW a je napájen DC napětím o velikosti 3 V . Rozměry modulu jsou 20 mm na délku a 9 mm v průměru. Modul není zapotřebí dále chladit. K drátům vedoucím z modulu jsem připájel delší s vhodnou koncovkou, aby bylo možné modul lehce propojit s laboratorním zdrojem s nastavitelným napětím. Pro použití s experimentální sestavou bylo zapotřebí navrhnout a vytisknout novou platformu pro uchycení laserového modulu, tak aby svítil ve vertikální ose mikroskopu. V rámci této soustavy je dioda fixně uchycená v teoretické ose a centruje se dírková clona pomocí XY stolku s otvorem jako v předchozí sestavě. Oproti soustavě s plyným laserem je při použití diody nutné provádět záznamy hologramů ve tmě, jinak je obraz na kameře příliš zašuměný. Rozměry sestavy jsou cca $120 \times 120 \times 150 \text{ mm}$ (za použití kratších vodících tyčí ER6 o délce 6").



Obrázek 28 - Sestava s laserovou diodou

5 Program pro rekonstrukci

Pro numerickou rekonstrukci obrazu ze zachyceného hologramu byla použita knihovna programů *CGDH Tools* [38], jejímž autorem je Ing. Petr Lobaz, Ph.D. Knihovna se skládá ze sady edukačních skriptů, pomocí kterých si může uživatel vyzkoušet práci s algoritmy digitální holografie. Jednotlivé skripty jsou dostatečně okomentované a provedou uživatele celým programem. Společně s hotovými skripty obsahuje knihovna také sadu jednotlivých funkcí, pomocí kterých lze vytvářet vlastní programy. Názvy proměnných se snaží jasně reprezentovat jejich fyzikální či matematický význam tak, aby bylo vše dostatečně přehledné. Skripty lze spustit v prostředí MATLAB, ale primárně jsou spustitelné v opensource prostředí Octave. To samo o sobě přispívá k nižší ceně celého holografického mikroskopu. V rámci práce na tvorbě holografického mikroskopu byly vyzkoušeny i další opensource programy či knihovny pro rekonstrukci hologramů. U žádné z nich ale nebylo dosaženo stejně kvalitních výsledků jako s knihovnou *CGDH Tools*. Navíc použití knihovny *CGDH Tools* umožňovalo přímé konzultace s autorem kódu. Další pokusy tedy byly dále vedeny v prostředí Octave. Pro úplnost jsou knihovny uvedeny v druhé podkapitole.

5.1 Popis programu

Sestavený skript jsem navrhnul s ohledem na využití s mnou navrženou experimentální sestavou DHM. Úvodní část se skládá z posloupnosti *input* funkcí, skrze které uživatel dle daných příkazů vyplňuje parametry pro provedení výpočtu. Po spuštění programu slouží v *Command Window* jako jednoduché uživatelské prostředí. Výpočtová část skriptu vychází ze skriptu pro rekonstrukci poskytnutého Ing. Lobazem. Do skriptu jsem přidal algoritmus odečtu referenčního hologramu. Na něm je zachycen pouze referenční svazek, bez průchodu vzorkem. V in-line uspořádání je takováto operace možná a vylepší výslednou kvalitu rekonstruovaného obrazu. Tato problematika byla popsána v kapitole 1.2. V algoritmu samotném jsou oba hologramy, jak hlavní, tak referenční, normalizovány. Následně jsou od sebe numericky odečteny a výsledný hologram je opět normalizován.

Program se skládá ze skriptu s názvem *Rekonstrukce_obrazu.m* a složky s knihovnou funkcí *cgdhtools*. Pro správnou funkčnost musí být skript spouštěn z adresáře, kde se nachází složka s funkcemi. Po spuštění je uživatel v okně *Command Window* vyzván, aby vyplnil hodnoty související s měřením. Nejprve zadá vlnovou délku použitého zdroje záření. Poté zvolí mezi použitým typem experimentální sestavy, buď s prostorovým filtrem nebo bez. Od toho se odvíjí přepočítání pracovních vzdáleností. Ty jsou dopočítány automaticky z hodnot zadaných uživatelem (metodika odměřování vzdáleností bude popsána v kapitole 6). Poměr vzdáleností jsem použil k automatickému určení velikosti rekonstruovaného okna. Obrázky se poté zbytečně nerekonstruují ve velikosti 3072x2048 jako se zaznamenává hologram. Následně se

zadáva rozmezí vzdáleností, ve kterém má proběhnout rekonstrukce. Protože odměřování vzdáleností (reálná poloha čipu kamery, rovina zaostření ve vzorku) probíhá s určitou nejistotou, je vhodné volit interval $\pm 2 \text{ mm}$ od očekávané polohy zaostřeného obrazu. Z rekonstruovaných obrázků se následně zjistí nejlepší rekonstrukční vzdálenost. Dále uživatel zadá velikost pixelu kamery a cesty pro nahrávání hologramů a ukládání výsledných rekonstrukcí. Může se rozhodnout, zda proběhne výpočet s odečtem referenčního hologramu nebo bez něj, pokud není z nějakého důvodu zaznamenaný. Poté proběhne algoritmus rekonstrukce ve zvoleném rozsahu vzdáleností. Hotové rekonstruované amplitudové obrázky jsou uloženy ve zvolené složce.

Výpočtová část skriptu je sestavena z několika funkcí, významnější z nich budou na následujících řádcích blíže popsány.

V proměnné *hologram* je uložena informace o intenzitě světla dopadajícího na senzor kamery (případně s odečtenou složkou referenční vlny). Ta je vynásobena výstupem funkce *sphericalWave* a výsledek je uložen do proměnné *hologramIlluminated*. Tímto krokem je získán fázor hologramu nasvíceného kulovou vlnou. Nese v sobě informaci o amplitudě i fázi simulovaného světla, v kapitole 3 byla taková veličina značená písmenem *U*. Poté v kódu následuje několik řádků počítajících apodizaci fázoru hologramu. Ta slouží jako filtr pro potlačení nežádoucího difrakčního vzoru, vzniklého na ostré hraně hologramu. Fázor hologramu je vynásoben váhovou funkcí, která má na okrajích hodnotu nula a uprostřed obrazu hodnotu jedna.

Následuje *for* cyklus, v rámci kterého jsou rekonstruovány jednotlivé obrazy v rozmezí vzdáleností zadaných uživatelem. Výpočet zpětné propagace světla do dané roviny probíhá uvnitř funkce *propagate*. Jejími vstupními parametry jsou fázor hologramu, vzorkovací perioda v rovině hologramu a rekonstruovaného obrazu, poloha hologramu a rekonstruovaného obrazu, vlnová délka použitého zdroje záření a poté tři parametry určující metodu výpočtu zpětné propagace. Pokročilejší uživatel může volit mezi různými metodami. Celková podoba výpočtu je určena propagační metodou, typem použitého jádra (kernel) v dané metodě a typem filtru spojeného s ošetřením aliasingu v rámci jádrové funkce. Metody jsou rozdělené dle počtu FFT na *1fft*, *2fft* a *3fft*. Ke každé z metod se následně volí příslušné jádro. U *3fft* se dá volit mezi *RayleighSommerfeldExact*, *RayleighSommerfeldSimple*, *FresnelXY* a *SphericalWave*. U *2fft* lze volit mezi *AngularSpectrumExact*, *AngularSpectrumNoEvanescent* a *Fresnel*. U *1fft* je na výběr jen mezi *Fresnel* a *Fraunhofer*. Všechny metody pak mají společné tři možnosti filtrů, a to *localExact*, *localRect* nebo nemusí být zvolen žádný. Bližší popisy daných možností jsou uvedeny v komentářích příslušných funkcí.

<i>1fft</i>	$U = kernel * fft(U_0 * kernel)$
<i>2fft</i>	$U = ifft(fft(U_0) * kernel)$
<i>3fft</i>	$U = ifft(fft(U_0) * fft(kernel))$

Tabulka 4 – Symbolické rozdělení metod

Výstupem funkce *propagate* je fázor rekonstruovaného obrazu ve zvolené vzdálenosti. Proměnná *reconstruction* je v tu chvíli stále složená z komplexních čísel. Pomocí absolutní hodnoty se získá matice reálných čísel reprezentující výsledný amplitudový obraz. Ten je uložen do vybrané složky, v popisku má uvedeno, v jaké vzdálenosti je rekonstruován.

Ze skriptu Ing. Lobaze jsem převzal strukturu výpočtu a vybral potřebné funkce. Do samotného výpočtu jsem přidal algoritmus pro odečet referenčního hologramu. Dále jsem kód upravil a o rozšířil o jednoduché uživatelské prostředí, navázané na experimenty s sestavami mnou navrženými mikroskopy.

5.2 Další opensource alternativy

Jednou z alternativ je knihovna funkcí *HoloPy*. Knihovna je souborem nástrojů pro práci s digitálními hologramy a rozptylem světla, fungující v prostředí *python*. Funkcionality knihovny lze využít k analýze hologramů dvěma vzájemně provázanými způsoby. Pomocí algoritmů zpětného šíření světla lze z hologramů rekonstruovat trojrozměrné objemy. Dále díky algoritmům dopředného šíření světla vypočítat rozptyl po průchodu prvkem rozptylujícím světlo. Výpočty jsou určeny pro sestavu mikroskopu v in-line podobě. *HoloPy* poskytuje výkonné a uživatelsky přívětivé python rozhraní implementované v kódu Fortran a C. Podrobnosti a pokyny k instalaci lze najít zde [39].

Další volně dostupnou variantou je plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy (DLHM)*. Funguje v rámci softwaru pro práci s obrazem *ImageJ*. Plugin obsahuje jak simulační modul, tak modul pro rekonstrukci obrazu. Práce s programem je při rekonstrukci velmi přímočará. Z grafického uživatelského rozhraní *ImageJ* se spustí DLHM rekonstrukční modul. Otevře se nové okno, ve kterém uživatel vybere hologram předmětu a reference a vyplní několik parametrů vztahujících se k reálnému měření. Výpočty jsou opět vázány na in-line sestavu mikroskopu. Podrobný popis práce s programem a ukázky experimentálních výsledků je možné nahlédnout v rámci studie zde [40].

Poslední varianta je opensource jen z části. Toolbox *HoloRec3D* je sice volně dostupný, ale funguje pouze v prostředí *Matlab*. Opět je postavený na míru in-line sestavě mikroskopu. Kromě klasických výpočtů zpětné propagace světla pro rekonstrukci obrazu nabízí i jiný přístup. Metoda výpočtu se nazývá *Inverse Problem Approach*. Na rozdíl od zpětné propagace

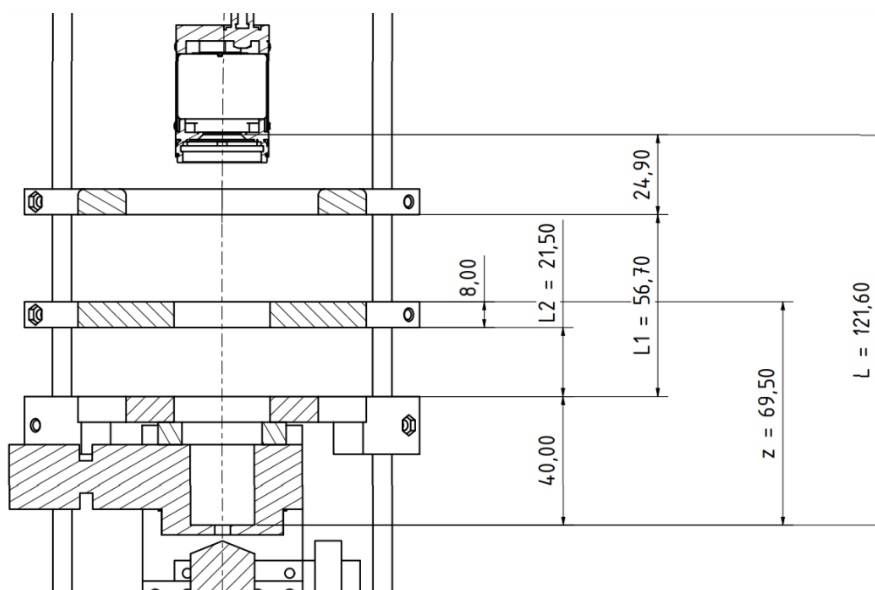
světla nerekonstruuje hologram, ale provádí detekci a lokalizaci objektů porovnáním s modelem hologramu. Uvádí, že tím dochází ke zlepšení osově přesnosti a rozšíření rekonstruovaného pole. Tato metoda by se však měla aplikovat především na menší sférické objekty typicky kapky, bublinky nebo mikrokuličky. [41]

6 Metodika měření

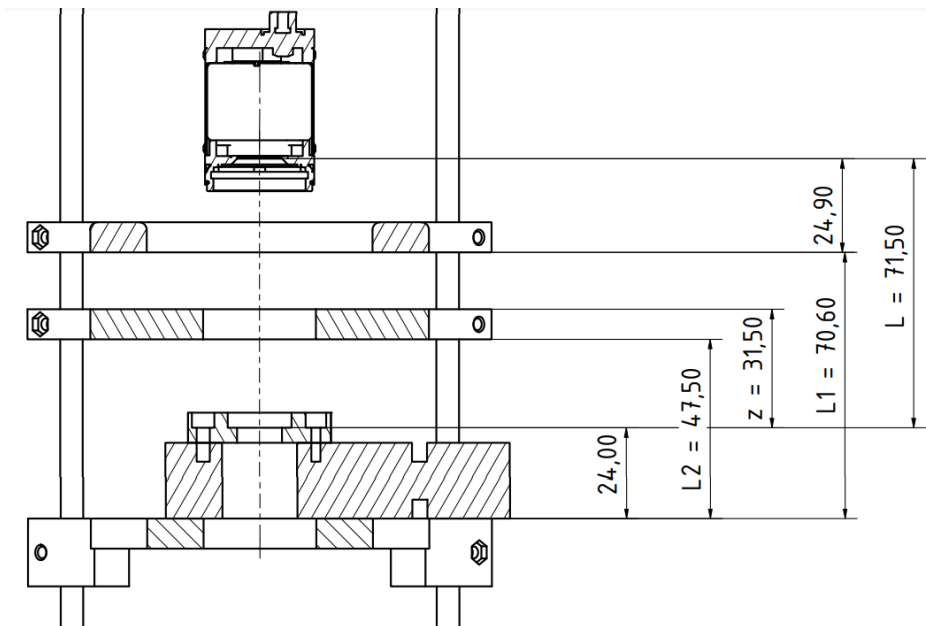
V této kapitole bude nejdříve popsán pracovní postup při experimentu. Pomocí schémat bude ukázáno, jaké vzdálenosti je třeba změřit pro zadání do programu rekonstrukce. Dále bude popsáno, jakou metodiku jsem zvolil pro vyhodnocení získaného obrazu. K určování rozměrů v obraze jsem využil znalosti rozměrů optické mřížky sloužící jako rastr a prostředí *IC Measure*, které umožňuje po správné kalibraci rychlé a jednoduché odměřování vzdáleností.

6.1 Záznam a rekonstrukce

Postup pro záznam hologramu je následující. Platformy pro kamerou a vzorek se umístí do zvolených pracovních vzdáleností od zdroje záření. Ve zvolené pozici se utáhnou šroubky svěrných spojů. Následuje odměření vzdáleností posuvným měřítkem, které se budou následně zadávat do programu. Změřené hodnoty označené ve schématech i v dialogovém okně programu pro rekonstrukci se nazývají $L1$ a $L2$. $L1$ se měří od spodní hrany platformy s kamerou k horní hraně platformy, na které je buď připevněný prostorový filtr, nebo jen polohovací XY stolek s dírkovou clonou. $L2$ se měří analogicky akorát od spodní hrany platformy pro uložení vzorku. Zbylé konstantní vzdálenosti, které dohromady tvoří reálné pracovní vzdálenosti L a z , jsou automaticky dopočítány v programu. V něm během zadávání uživatel zvolí, jakou sestavu použil, jelikož dle toho se liší dané konstrukční vzdálenosti.



Obrázek 29 - Vzdálenosti pro sestavu s prostorovým filtrem



Obrázek 30 - Vzdálenosti pro sestavu s dírkovou clonou

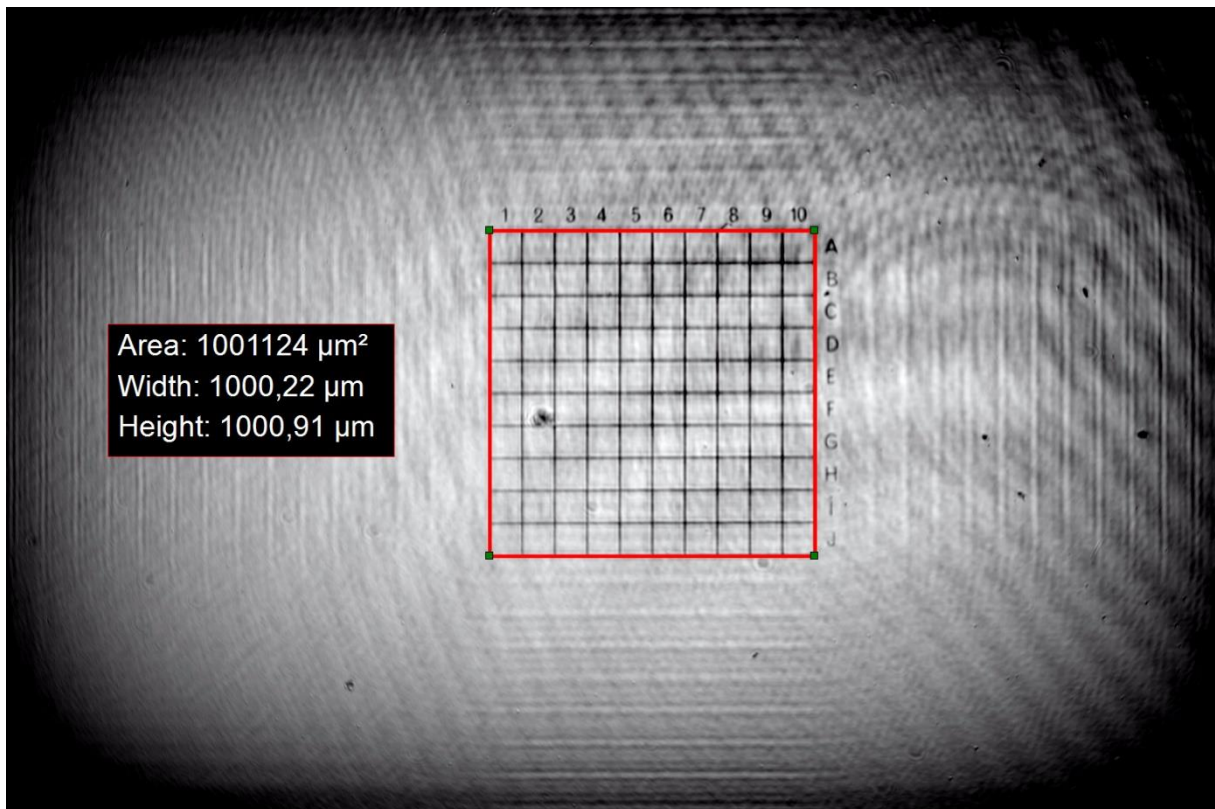
Po zaznamenání vzdáleností dojde k samotnému záznamu hologramu. Nejdříve se spustí zdroj záření, buď laser nebo laserová dioda. Kamera se připojí přes USB rozhraní k počítači a spustí se v prostředí *IC Capture 2.5*. Do dráhy laserového svazku se na příslušnou platformu uloží zkoumaný vzorek. Na displeji se zkontroluje podoba hologramu, případně je možné nastavením expozice ladit intenzitu zachyceného světla. Obraz z kamery se zachytí a uloží do počítače. Následně se opatrně vyndá vzorek ze sestavy a provede se záznam hologramu samotné referenční vlny, který poslouží k odečtení od původního hologramu a zlepšení kvality rekonstruovaného obrazu. Je nutné zdůraznit, že záznam tohoto takzvaného pozadí je nutné provést za stejných podmínek a identického nastavení kamery.

Po spuštění programu *rekonstrukce.m* v prostředí Octave zadá uživatel požadované hodnoty. Při použití laboratorního laseru zadává vlnovou délku 632.3 nm , při použití laserové diody 650 nm . Dále zadá naměřené vzdálenosti dle odstavce výše. Po provedení rekonstrukce najde obrazy rekonstruované ve zvoleném rozmezí vzdáleností, uložené v dříve zadaném adresáři. Z nich lze subjektivně zvolit nejlepší rekonstrukci čili správně zaostřený obraz a s ním dále pracovat. Pixelový rozměr $M \times N$ rekonstruovaných obrazů se automaticky při výpočtu mění dle poměru vzdáleností kamery a zvolené rekonstruované roviny. Velikost okna rekonstrukce se lineárně zmenšuje s rostoucí vzdáleností od kamery ke zdroji záření. Je tedy zbytečné a časově náročné rekonstruovat obrazy ve stejném rozměru v jakém je zaznamenán hologram ($3072 \times 2048 \text{ pix}$). Zjednodušeně při vzdálenosti $L = 100 \text{ mm}$ a $z = 50 \text{ mm}$ bude velikost rekonstruovaného obrazu $1536 \times 1024 \text{ pix}$.

6.2 Zpracování získaného obrazu

Pro další práci s rekonstruovaným obrazem jsem použil program *IC Measure*, také od společnosti *Imaging Source*. Program umožňuje kromě funkcí pro změnu jasu, či kontrastu také jednoduché odměřování vzdáleností. Nejprve je však nutné program zkalibrovat. Toho jsem docílil s pomocí rekonstruovaného obrazu optické mřížky. Jedná se rytý rastr na skle. Čtvercová mřížka má délku strany $1\text{ mm} = 1000\ \mu\text{m}$. Tento údaj jsem ověřil pomocí optického mikroskopu s posuvným měřicím stolek. Jednotlivé sloupce a řádky jsou navíc označeny čísly a písmeny, čehož je později využito při určení rozlišení.

Po zobrazení rekonstruovaného obrazu v programu *IC Measure*, jsem označil stranu mřížky jako kalibrační linii a zadal její reálnou délku $1000\ \mu\text{m}$. Následně je možné vynášet úsečky, obdélníky nebo kružnice přes oblasti zájmu v obraze a program automaticky udává naměřený rozměr. Na obrázku 31 je zobrazen rekonstruovaný obraz mřížky (s upraveným kontrastem a jasem) ve vzdálenosti $z = 66.7\text{ mm}$, ohraničený měřicím čtvercem. Hologram byl zachycený ve vzdálenosti $L = 120\text{ mm}$.



Obrázek 31 - Rekonstrukce optické mřížky

Program si spojí zadanou kalibrační délku s počtem pixelů v obraze. Při otevření nového rekonstruovaného obrazu vzorku o neznámých rozměrech je poté v programu možné určit jeho rozměry, například ohraničení kruhového předmětu kružnicí pro určení průměru. Nový rekonstruovaný obraz se navíc nemusí nacházet ve stejné rekonstrukční vzdálenosti jako

původní obraz mřížky, dle které byl program zkalibrován. To je možné díky vlastnosti použité metody propagace světla, založené na konvolučním principu zmíněné na konci kapitoly 3.4.2. Při ní je velikost pixelu v libovolné rekonstrukční rovině rovna velikosti pixelu v rovině záznamové. Tím je velikost pixelu kamery, v případě použití kamery DMK 33UX178 je $\Delta x = 2.4 \mu m = \Delta \xi$. Ověření této skutečnosti se dá provést následovně. Hologram optické mřížky se zaznamená různých pracovních vzdálenostech. Například postupně pro poměr $L/z = 2.3, 2, \text{ a } 1.7$. U rekonstruovaných obrazů bude s rostoucím poměrem klesat jejich rozměr $M \times N$. Společně s ním se bude zmenšovat i zorné pole (FOV), čili jak velká část roviny vzorku se zobrazí na kameře. Velikost zobrazeného předmětu však zůstane stále stejná. Mřížka o délce strany $l = 1000 \mu m$ bude stále zabírat cca 416 pixelů v rekonstruovaném obraze.

$$l/\Delta \xi \cong \text{počet pixelů} \quad 116$$

$$1000/2.4 \cong 416 \quad 117$$

Z tohoto poznatku plyne, že je výhodné umisťovat vzorek blíže ke kameře, jelikož nedochází k žádnému zvětšení při delší rekonstrukční vzdálenosti. Navíc čím blíže vzorek bude, tím větší bude FOV.

7 Výsledky experimentů

V této kapitole budou ukázány a okomentovány některé z rekonstruovaných hologramů. Dále porovnáám experimentální určení rozlišení holografického mikroskopu s teoretickými vypočtenými hodnotami a shrnu zbylé parametry experimentální sestavy. Poté bude následovat podkapitola, ve které na základě získaných poznatků z provedených experimentů navrhnu uspořádání mikroskopu pro sledování růstu embryí v inkubátoru.

7.1 Výběr z rekonstruovaných hologramů

Během postupné práce jsem zaznamenal pár desítek hologramů. Rekonstrukce některých se nepodařila. Příčinou byla povětšinou chyba při záznamu anebo nevhodnost samotného vzorku pro holografický záznam. Soubor vybraných hologramů a jejich provedených rekonstrukcí je součástí přílohy.

Při volbě vzorků pro záznam hologramu jsem postupoval následovně. Pro ověření funkčnosti celkového principu a k následnému testování správné kalibrace sestavy mikroskopu jsem jako vzorek používal optickou mřížku. Jedná se dobře kontrastní a transparentní objekt u kterého lze poměrně přesně vizuálně určit, zda se rekonstrukce povedla či nikoliv. Dalšími vzorky byla sada rozdílných kultivačních mistichek dodaných doktorem Hlinkou. Z nich jsem měl vybrat, který typ bude použitelný pro záznam složitějších vzorků v tekutém médiu. Na výběr byly tři typy, plastová obdoba Petriho misky s hladkým dnem, miska s 12 velkými jamkami a miska s 9 mikro jamkami. Rekonstrukce obrazu se povedla pouze při použití misky s hladkým dnem. U misky s 9 mikro jamkami jsem jako příčinu vyhodnotil nedostatečnou transparentnost materiálu v okolí jamek.



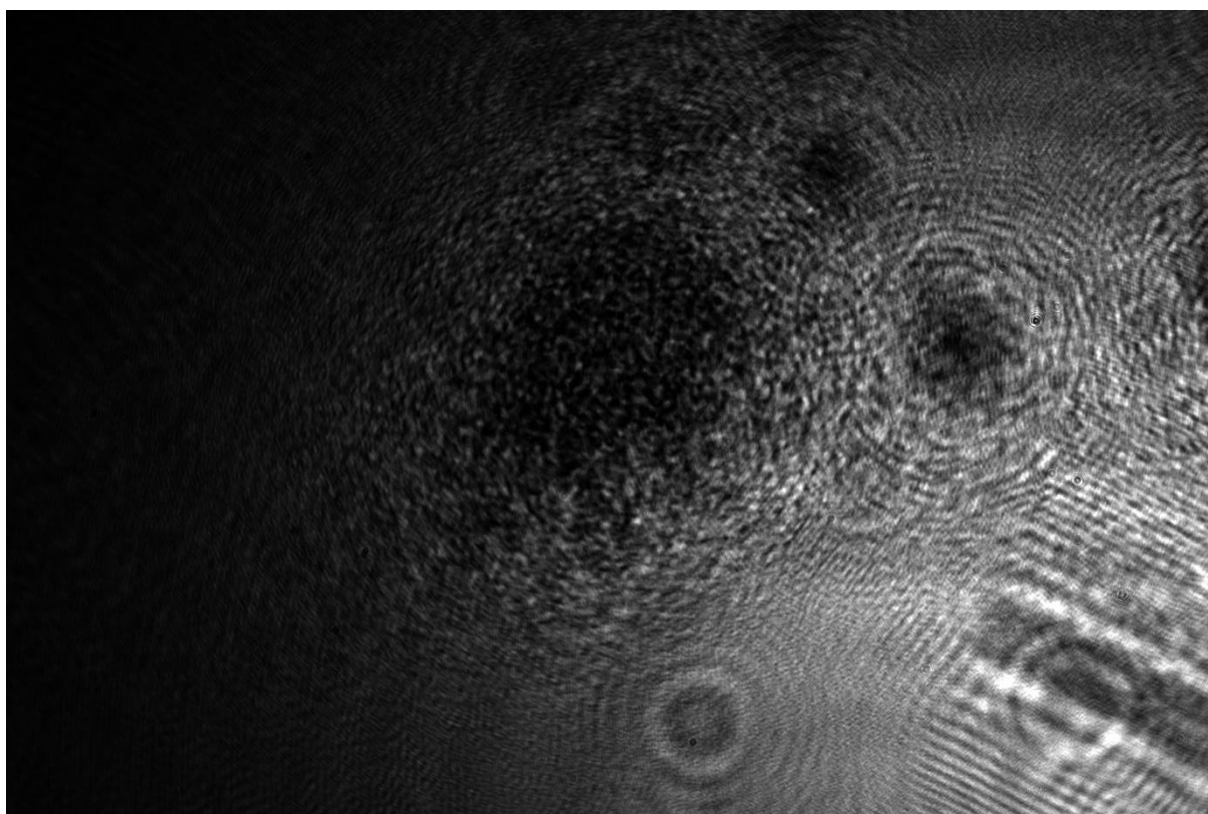
Obrázek 32 - Misky na uložení vzorků

Po výběru misky byly jako další vzorek zvolena pylová zrnka uložená v odzkoušené misce. Po úspěšné rekonstrukci pylových zrněk uložených v misce takzvaně na sucho, byla pylová zrnka využita i jako předmět pro simulaci rekonstrukce předmětu v tekutém médiu. Embrya jsou totiž v kultivačních miskách uložena v kultivačním roztoku. Jedná se o izotonický vodný roztok obsahující potřebné soli, aminokyseliny či proteiny. Tento roztok je překryt olejnatým médiem, aby nedocházelo k vysychání. Nejkomplexnější zkoumaný vzorek tedy byla pylová

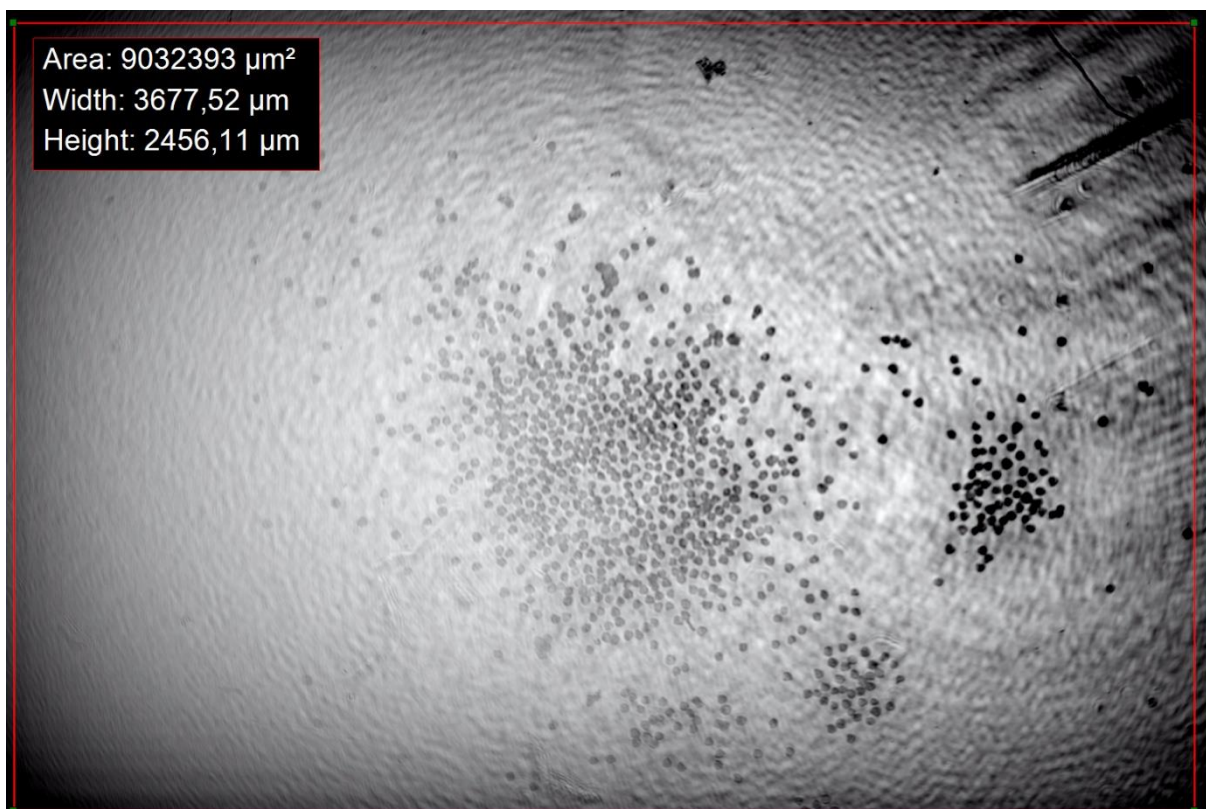
zrnka uložená v cca 2 mm vody překrytých cca 2 mm vrstvou oleje. To celé přiklopené víčkem o identické struktuře jako miska.

Výše uvedené záznamy hologramů byly prováděny na sestavě s prostorovým filtrem. K ověření funkčnosti sestavy se samotnou dírkovou clonou a následně ještě s laserem nahrazeným diodou jsem použil opět záznam hologramu optické mřížky.

V této podkapitole budou postupně představeny reprezentativní rekonstruované obrazy ze zmíněných experimentů. Rekonstrukce optické mřížky byla představena v předchozí kapitole, přejdu tedy rovnou k hologramu a rekonstruovanému obrazu pylových zrněk. Na obrázku 33 je pro ilustraci zobrazen zachycený hologram. Pod ním následuje příslušný rekonstruovaný obraz. Červený obdélník vyznačuje přibližnou velikost zorného pole, kterého bylo v obraze dosaženo cca $3.5 \times 2.5 \text{ mm}$. Tento údaj později vynikne při srovnání s klasickým optickým mikroskopem.

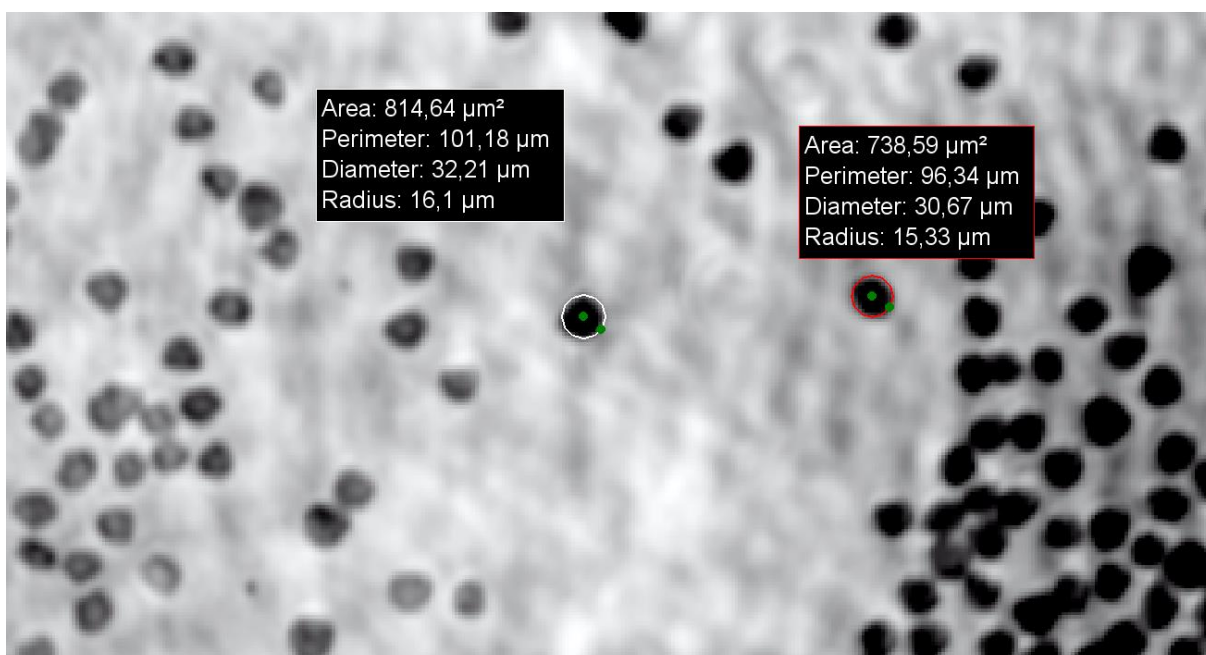


Obrázek 33 - Hologram pylových zrněk



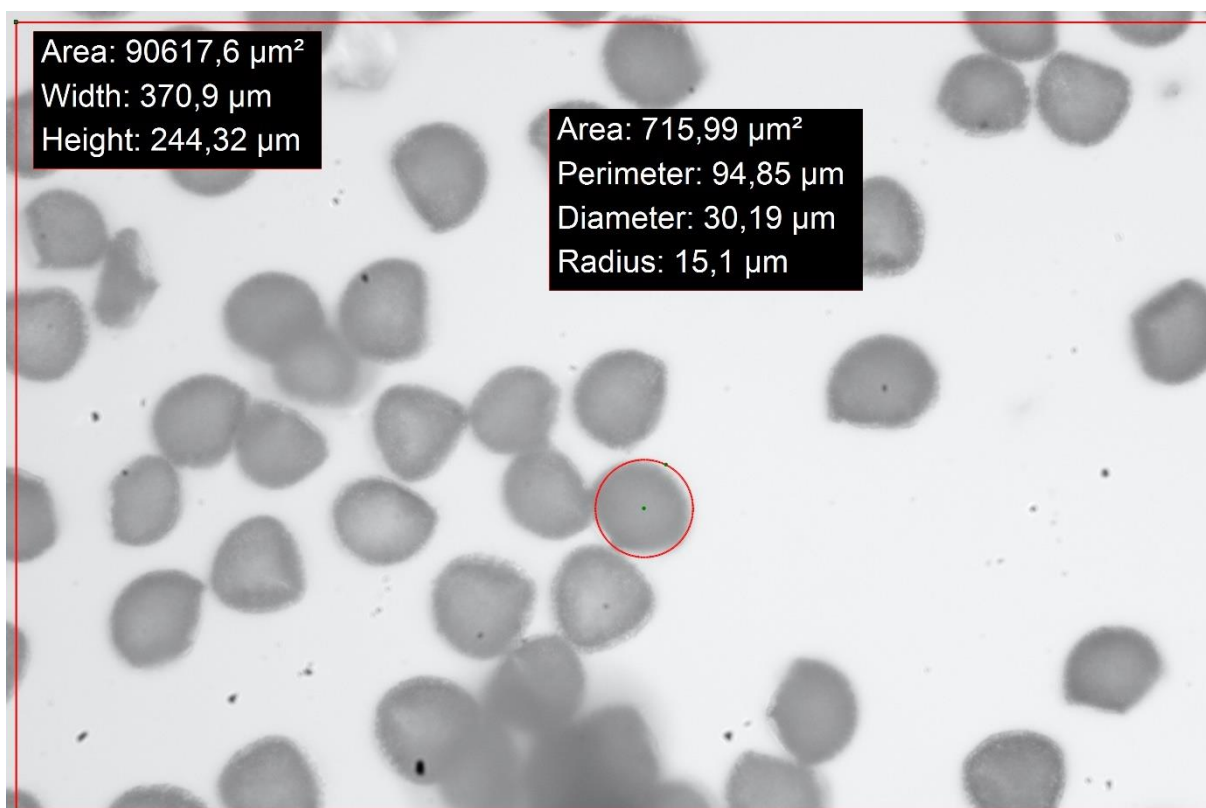
Obrázek 34 - Rekonstrukce pylových zrnok

Obrázek 35 je vyříznutý a přiblížený z obrázku 34. Lze na něm blíže zkoumat zachycená pylová zrnka. Jednotlivá zrnka jsou od sebe jasně rozeznatelná a lze pozorovat změny tvaru jednotlivých zrnok. Pomocí metodiky popsané v předchozí kapitole jsem změřil průměrnou velikost zrnok okolo 30 μm .



Obrázek 35 - Přiblížená pylová zrnka

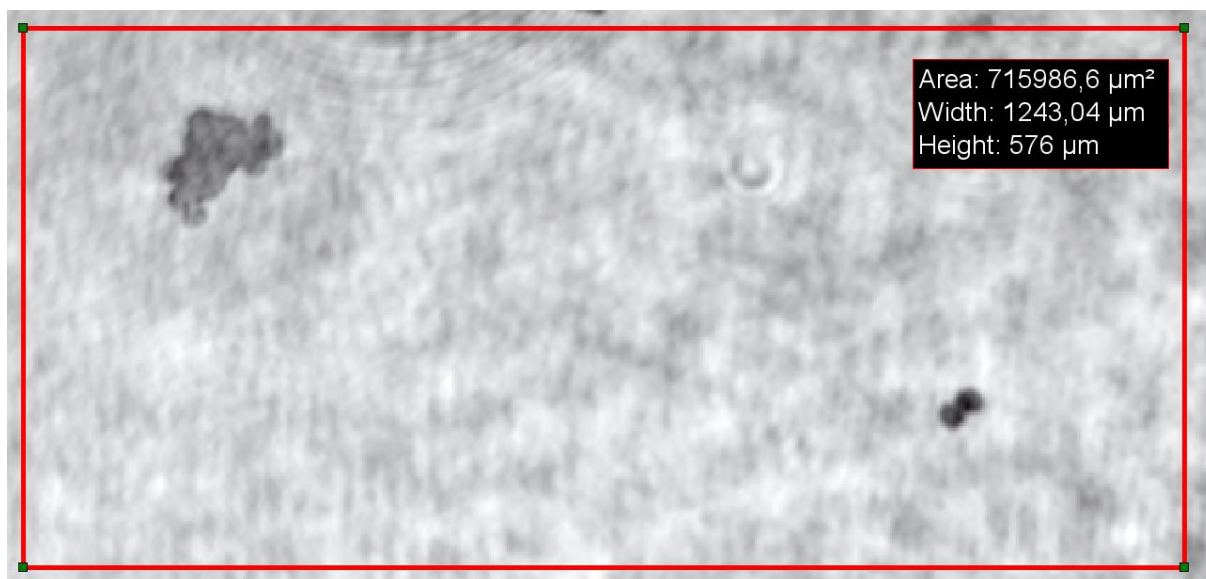
Pro porovnání jsem pylová zrnka v kultivační misce zkoumal pomocí optického mikroskopu Olympus – BX43 se zvětšením 200x. Mikroskop umožňuje připojení kamery k záznamu obrazu. Na obrázku 36 je tedy zachycený obraz přímo z mikroskopu. Zobrazení je samozřejmě kvalitnější, s vyšším rozlišením a pylová zrnka zobrazuje větší. Avšak oproti záznamu z holografického mikroskopu má optický mikroskop řádově menší zorné pole. Vzdálenosti v obraze jsem odměřoval pomocí stejné metodiky jako u rekonstruovaných hologramů, pouze bylo nutné získat i obraz optické mřížky na daném mikroskopu, aby mohl být nově zkalibrován program. Velikost zrněk i v tomto případě vychází cca 30 μm , takže původní určení velikosti bylo správné.



Obrázek 36 - Pylová zrnka pod optickým mikroskopem

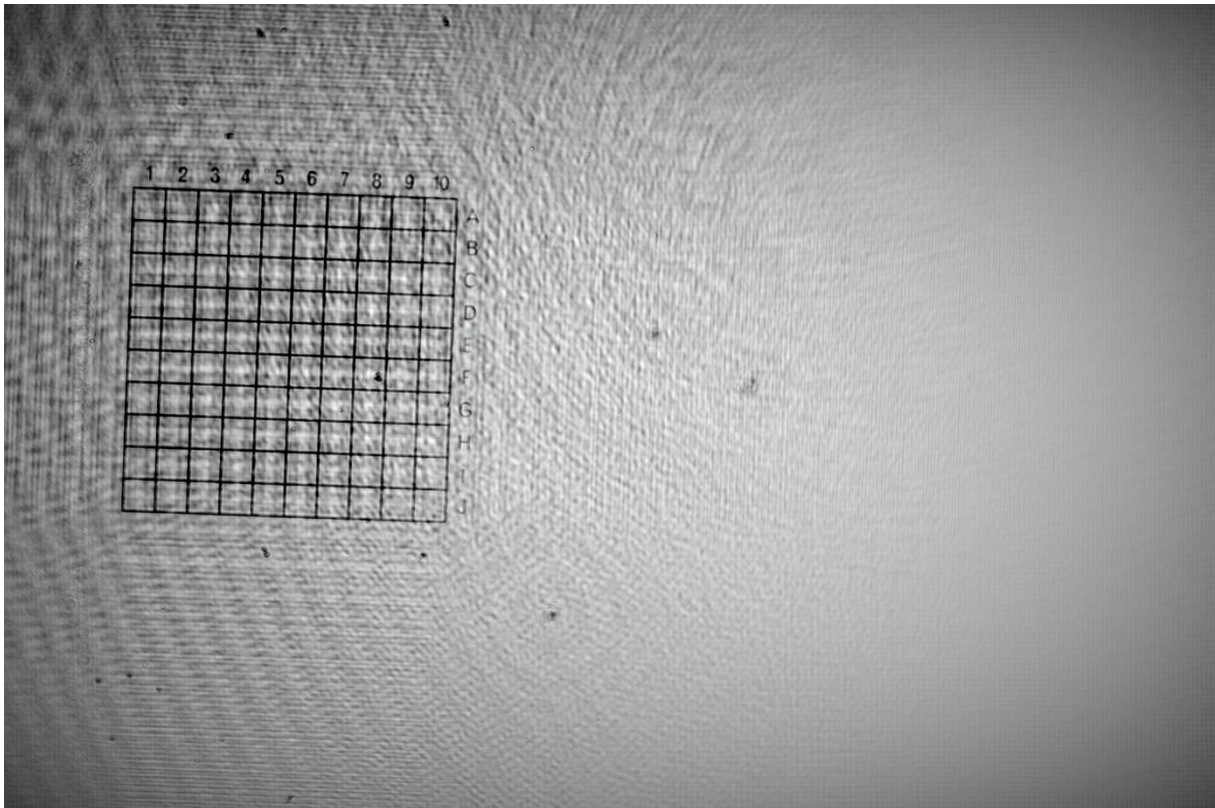
Na obrázku 37 je zobrazena rekonstrukce pylových zrněk v tekutině. Celkový snímaný vzorek se skládal z kultivační misky s víčkem a vrstvy vody kde plavala pylová zrnka překrytá vrstvou oleje. Světlo tak muselo procházet několika optickými prostředími. Z celkového rekonstruovaného obrazu je ukázána pouze vyříznutá část. Díky pohybu zrněk v tekutině bylo obtížné zaznamenat větší shluk zrněk najednou a většina obrazu tak zrnka neobsahuje. V levém horním rohu jsou spleená zrnka dohromady, ale stále možné pozorovat tvar jejich hranice. V pravém dolním rohu jsou dvě zrnka u sebe, s dostatečně rozlišitelným tvarem a patrnou mezerou mezi nimi. Rekonstruovaný obraz je méně kvalitní než při zkoumání zrněk

bez roztoku, ale i tak holografický mikroskop obstál při zkoumání vzorku v několika milimetrové vrstvě tekutiny.

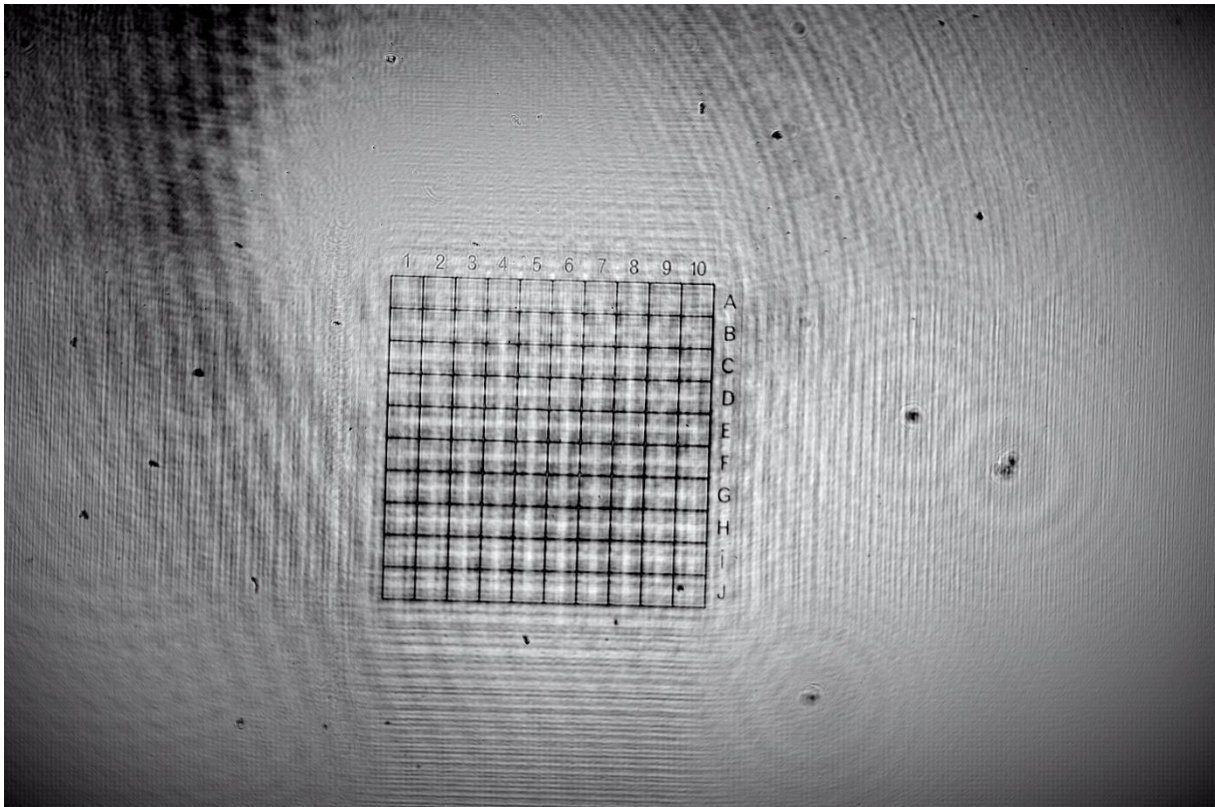


Obrázek 37 – Rekonstrukce pylových zrn v roztoku

Obrázky 38 a 39 jsou rekonstrukcemi hologramu optické mřížky zaznamenaným pomocí sestavy s dírkovou clonou místo prostorového filtru, respektive pomocí finální sestavy s dírkovou clonou a laserovou diodou jako zdrojem světla. Porovnáním s obrázkem 31 lze konstatovat, že došlo k poklesu kvality obrazu. Zároveň je ale mřížka stále dobře rozlišitelná. Povedená rekonstrukce obrázku 39 navíc potvrzuje, že použitá laserová dioda má dostatečnou koherentní délku pro vytvoření interferenčního vzoru v rovině hologramu a lze jí použít k náhradě za helium – neonový laser. Tento krok vede k podstatné minimalizaci rozměrů celkové soustavy a dalšímu zjednodušení konstrukce, díky absenci zrcátka pro zalomení svazku do vertikální osy.



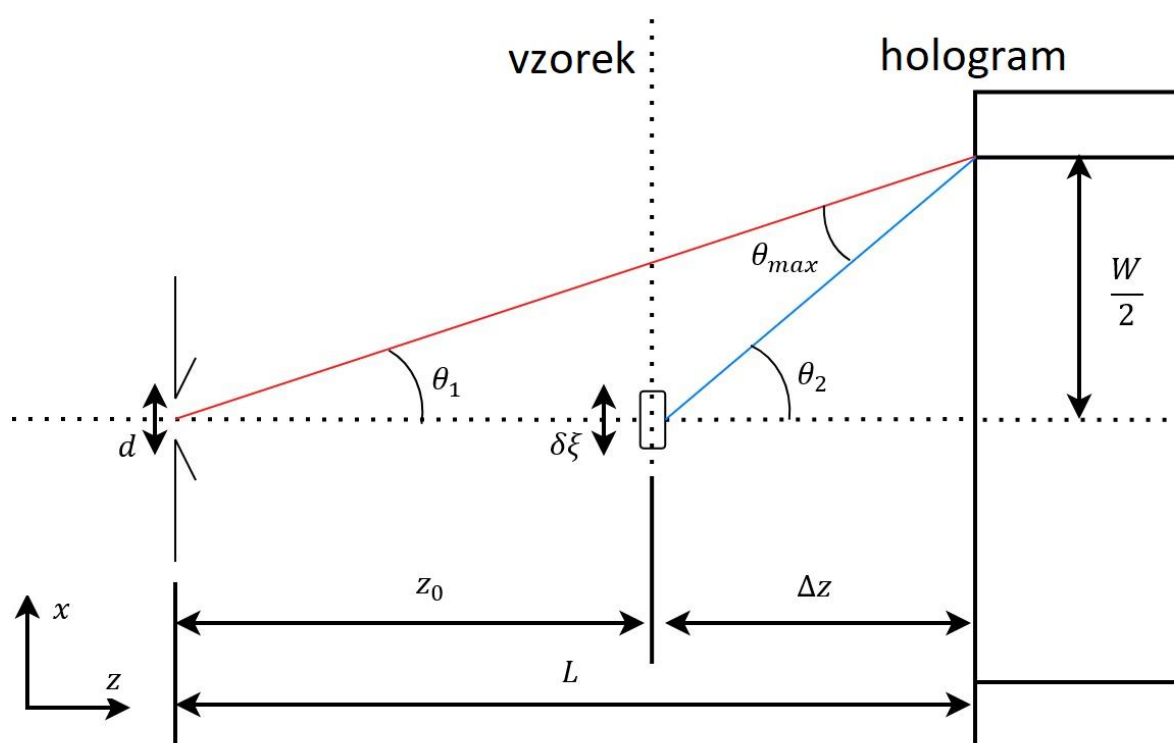
Obrázek 38 - Rekonstrukce optické mřížky v sestavě bez prostorového filtru



Obrázek 39 - Rekonstrukce optické mřížky v sestavě s laserovou diodou

7.2 Parametry sestaveného digitálního holografického mikroskopu

Nejprve provedu porovnání teoreticky dosažitelných hodnot rozlišení proti experimentálně určenému rozlišení z rekonstruovaného obrazu. Rozlišení lze definovat jako minimální vzdálenost dvou bodů či čar, při které je lze od sebe v obraze jednoznačně rozeznat. Na obrázku 40 je zobrazeno schéma, pomocí kterého odvodím velikost nejmenšího možného zaznamenaného detailu a s tím souvisejícího rozlišení. Odvození je provedeno pro sestavu s laserovou diodou a dírkovou clonou.



Obrázek 40 - Schéma pro odvození teoretického rozlišení

Dle [26] a [42] je maximální rozlišitelná prostorová frekvence interferenčního vzoru dána maximálním úhlem θ_{max} mezi referenční a předmětovou vlnou. Ty jsou dány úhly θ_1 respektive θ_2 .

$$f_{max} = \frac{2 * \sin(\theta_{max}/2)}{\lambda} \quad 118$$

Maximální prostorová frekvence musí pro záznam na detektoru zároveň splňovat vzorkovací podmínku, viz vztah 98.

$$f_{max} < \frac{1}{2\Delta x} \quad 98$$

Dle analogie se [42] jsem dal tyto dva vztahy do rovnosti a vypočítal hodnotu θ_{max} .

$$\begin{aligned} \theta_{max} &= 2 * \arcsin\left(\frac{\lambda}{4\Delta x}\right) \\ \theta_{max} &= 2 * \arcsin\left(\frac{650 * 10^{-9}}{4 * 2.4 * 10^{-6}}\right) \quad 119 \\ \theta_{max} &= 0.1355 \text{ rad} \end{aligned}$$

Následně jsem dle vztahu pro polohu ohybového minima při ohybu světla na štěrbině vypočítal úhel θ_1 . Myšlenou štěrbinou je v tomto případě použitá dírková clona o průměru $15 \mu m$.

$$\begin{aligned} \theta_1 &= \arcsin\left(\frac{\lambda}{d}\right) \\ \theta_1 &= \arcsin\left(\frac{650 * 10^{-9}}{15 * 10^{-6}}\right) \quad 120 \\ \theta_1 &= 0.0433 \text{ rad} \end{aligned}$$

Ze znalosti úhlů θ_1 a θ_{max} lze pomocí trigonometrie a geometrie dané schématem na obrázku 40 dopočítat úhel θ_2 .

$$\begin{aligned} \theta_2 &= \pi - (\pi - \theta_1 - \theta_{max}) \\ \theta_2 &= 0.1788 \text{ rad} \quad 121 \end{aligned}$$

Hodnotu úhlu θ_2 jsem použil ve vztahu pro ohyb světla na štěrbině. Jako štěrbinu v tomto případě uvažuji minimální velikost detailu v rovině vzorku $\delta\xi$, na kterém se světlo ohne pod požadovaným úhlem.

$$\begin{aligned} \delta\xi &= \frac{\lambda}{\sin(\theta_2)} \\ \delta\xi &= 3.65 \mu m \quad 122 \end{aligned}$$

Jak již bylo řečeno v kapitole 6.2, je velikost pixelu v libovolné rekonstrukční rovině rovna velikosti pixelu v rovině záznamové $\Delta\xi = \Delta x = 2.4 \mu m$. Detail $\delta\xi$ tedy překryje necelé dva pixely. Pro rozlišení dvou těchto detailů od sebe bude zapotřebí aby mezi nimi byl alespoň jeden další pixel. Dohromady pět pixelů dává následující teoretickou velikost rozlišení.

$$\delta x = 2.4 * 5 = 12 \mu m \quad 123$$

Dále je ze schématu možné určit doporučené vzájemné polohy záznamového zařízení, vzorku a zdroje záření pro dosažení požadovaného rozlišení.

Vzdálenosti jsou určeny výše vypočtenými úhly a velikostí čipu záznamového zařízení
 $W = M * \Delta x = 3072 * 2.4 * 10^{-3} = 7.37 \text{ mm}$.

$$L = \frac{W/2}{\tan(\theta_1)} \quad 124$$

$$L = 85 \text{ mm}$$

$$z_0 = L - \frac{W/2}{\tan(\theta_2)} \quad 125$$

$$z_0 = 64.6 \text{ mm}$$

Pro určení druhé teoretické hodnoty rozlišení jako minimální vzdálenosti dvou bodů jsem využil vztah 9.

$$\delta x \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad 9$$

Výpočet přibližné velikosti numerické apertury jsem provedl dle vztahu 8, s hodnotami W a L vypočtenými výše.

$$NA \cong \frac{W}{2} \left[\left(\frac{W}{2} \right)^2 + L^2 \right]^{-0.5} \quad 126$$

$$NA \cong 0.0433$$

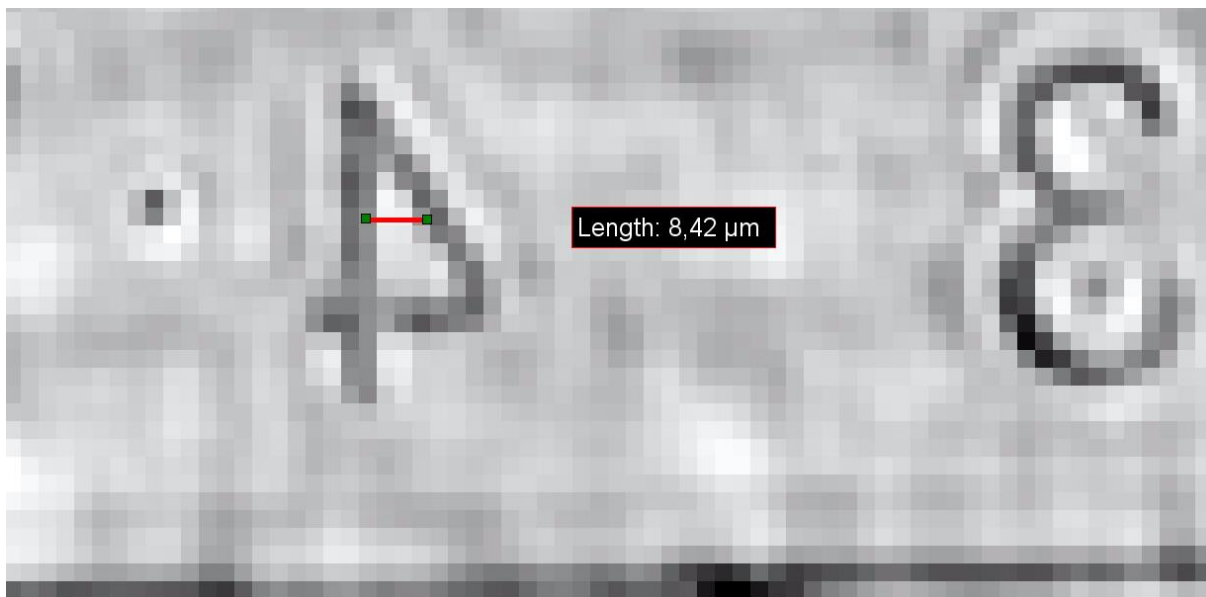
Rozlišení dané Abbeho rozlišovacím kritériem má při dané pracovní vzdálenosti L a použití laserové diody s dírkovou clonou následující hodnotu.

$$\delta x \geq \frac{650 * 10^{-9}}{2 * 0.0433} \quad 127$$

$$\delta x \geq 7.5 \mu m$$

Nakonec jsem určil rozlišení experimentálně na rekonstruovaném obraze. Na obrázku 41 je přiblížený a oříznutý obraz rekonstrukce optické mřížky zaznamenané na sestavě s laserovou diodou a dírkovou clonou. Záznam proběhl při pracovních vzdálenostech $L = 68.9 \text{ mm}$ a $z_0 = 50.3 \text{ mm}$. Rozlišení jsem stanovil jako vzdálenost mezi rozlišitelnými čarami u číslice čtyři. Odměření vzdálenosti proběhlo v programu *IC Measure*, dle metodiky představené v kapitole 6.2. Dosažené rozlišení je v tomto případě následující.

$$\delta x \cong 8.4 \mu m \quad 128$$



Obrázek 41 - Experimentálně určené rozlišení

Pracovní vzdálenosti mikroskopu L a z_0 jsem během experimentování volil v různých kombinacích. Kvalitních výsledků bylo dosahováno pro propagační vzdálenost $\Delta z = L - z_0 \cong 20 \sim 50 \text{ mm}$. Z hlediska FOV, které se úměrně zmenšuje s rostoucím poměrem L/z_0 , nemá smysl volit tento poměr větší než 2. Za předpokladu že čip kamery je při záznamu osvětlen celý, tak pro poměr $L/z_0 = 2$ je velikost zorného pole cca poloviční oproti velikosti čipu kamery, tj. $FOV \cong 3.5 \times 2.5 \text{ mm}$ (viz obrázek 34). Vzhledem k požadavku na kompaktní rozměry celé sestavy zároveň nemá smysl volit vzdálenost L zbytečně velkou. Z těchto poznatků vyplývá, že ideální by bylo volit $L = 70 - 80 \text{ mm}$ a vzdálenost $z_0 = 40 - 50 \text{ mm}$.

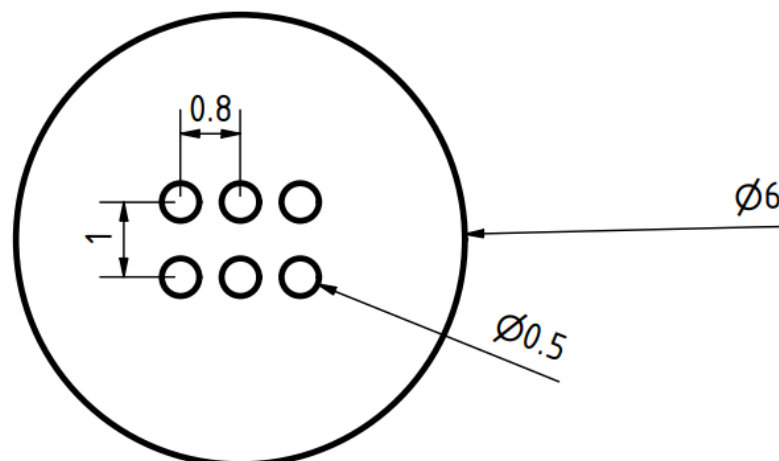
Celkové rozměry sestavy se mi při použití laserové diody a dírkové clony povedlo snížit na cca $120 \times 120 \times 150 \text{ mm}$. Samozřejmě za předpokladu že zdroj napájení laserové diody se nachází mimo a ze sestavy jsou k němu vedeny pouze kabely. Rozměry 120×120 lze dále efektivně snižovat. Limitem je rozměr XY polohovacího stolku pro polohování dírkové clony. Při návrhu a stavbě jsem pracoval s komponenty dostupnými v laboratořích. Náhradou použitého stolku by mohl být polohovací stůl od firmy ThorLabs *CXYZ05A/M*. Jeho největší příčný rozměr je cca 70 mm . Podélný rozměr se pohybuje okolo 150 mm , v závislosti na zvolených pracovních vzdálenostech. Přibližně polovinu z něj zabírá kamera, která je s připojeným kabelem dlouhá cca 70 mm .

7.3 Návrh uspořádání mikroskopu pro sledování růstu embryí

Návrh uspořádání musí vyhovět několika požadavkům. Mikroskop musí být umístěn v prostředí kde lze regulovat teplotu na konstantních cca 37°C . Dále musí být v prostředí udržována vlhkost na hranici 90%, při směsi plynů s obsahem 5% CO_2 a 5% O_2 . Prostor pro

mikroskop je dále limitován na rozměry $10 \times 10 \times 15 \text{ cm}$. Důležitým požadavkem pro zkoumání růstu embryí je dále dodržení minimální manipulace se vzorky během jejich vývoje. Ideálně jsou do inkubátoru pouze jedenkrát uloženy a následně vyjmuty. Záznam jejich růstu a vývoje probíhá formou *time-lapse*. Se zvolenou časovou periodou proběhne záznam hologramu, který bude následně rekonstruován. Software bude tedy uzpůsoben tak aby se laserová dioda a kamera spouštěli vždy jen v požadovaný okamžik. Záznam referenčního hologramu pro následný odečet intenzity během rekonstrukce stačí zaznamenat pouze jednou před vložením misky s embryi a bude následně použit pro odečtení u dalších zaznamenaných hologramů se vzorky.

Kamera a laserová dioda budou vůči sobě uloženy pevně na jednom místě, protože již nebude nutné měnit pracovní vzdálenosti a miska s embryi se tím pádem bude vkládat ze strany. Řazení prvků bude vertikální stejně jako v experimentálních sestavách. Z inkubátoru budou ven vyvedeny napájecí drátky od diody a kabel od kamery. Kamera tak měří cca 40 mm , miska s víčkem cca 15 mm a laserová dioda v kombinaci s dírkovou clonou cca 30 mm . Pracovní vzdálenosti navrhuji $L = 70 \text{ mm}$ a $z_0 = 40 \text{ mm}$. Tím pádem zbude mezi podložkou s otvorem pro uložení misky a kamerou dost místa pro manipulaci s miskou. Při těchto pracovních vzdálenostech by mělo být dosažitelné FOV cca $4.2 \times 2.8 \text{ mm}$. Při uvažování maximální velikosti embrya 0.3 mm bych navrhoval následující podobu misky pro uložení 6 embryí najednou. Při zvolených pracovních vzdálenostech by mělo zorné obsáhnout všech 6 komůrek pro embrya. Pro úspěšnou rekonstrukci bych navrhoval, aby dno i víko misky bylo hladké a co nejvíce transparentní. Zároveň komůrky budou vymezeny zvýšeným okrajem na obvodu a ne jako prohnuté dno.



Obrázek 42 - Návrh misky

Závěr

V diplomové práci jsem se zabýval problematikou digitální holografické mikroskopie. Cílem práce bylo navrhnout a otestovat digitální holografický mikroskop, který bude schopen zobrazovat přibližně $500\ \mu\text{m}$ předměty s rozlišením cca $20\ \mu\text{m}$. V průběhu práce jsem se postupně seznámil s principy digitální holografie, jejího využití pro zkoumání mikroskopických vzorků a také s matematickým aparátem potřebným pro pochopení algoritmů propagace světla sloužících k rekonstrukci obrazů ze zaznamenaných hologramů. Pro návrh mikroskopu jsem zvolil sestavu in-line, především kvůli konstrukční jednoduchosti. Navrhnul jsem podobu vertikální sestavy mikroskopu a pomocí 3D tisku vyrobil potřebné komponenty. Sestava byla navíc dopředu navržena dostatečně modulárně tak, aby šlo díly využít pro různé komponenty během postupného vývoje. Mikroskop jsem sestavil v laboratořích odboru Přesné mechaniky a optiky. První verze byla rozměrná a náročnější na seřízení kvůli použití samostatně stojícího helium-neonového laseru. Ten ale na druhou stranu ve spojení s prostorovým filtrem představoval kvalitní zdroj koherentního záření pro vznik sférické vlny, nutné pro záznam hologramu. Nakonec se však povedlo provést i úspěšnou rekonstrukci obrazu s kompaktní zjednodušenou sestavou využívající jako zdroj laserovou diodu ve spojení s pouhou dírkovou clonou. K fyzickému mikroskopu pro záznam hologramu bylo nutné vyrobit program pro numerickou rekonstrukci. Ten jsem sestavil s využitím knihovny funkcí a ukázkových skriptů *CGDH Tools*, jejímž autorem je Ing. Petr Lobaz, Ph.D. Do samotného výpočtu jsem přidal algoritmus pro odečet hologramu referenční vlny, který vede ke zkvalitnění rekonstrukce při použití sestavy in-line. Dále jsem program upravil o jednoduché uživatelské prostředí, které ve spojení s metodikou záznamu hologramu, popsanou v této práci, umožní použití experimentální sestavy mikroskopu dalším studentům.

Pomocí mikroskopů ve jmenovaných sestavách jsem provedl řadu záznamů hologramů, jež jsem úspěšně rekonstruoval použitým programem. Úspěšně se mi povedlo získat obraz optické mřížky s délkou strany $1000\ \mu\text{m}$, poté jsem dle výsledků pokusů vybral pro další experimenty misku s hladkým dnem. V té se mi podařilo rekonstruovat pylová zrnka a pomocí mnou vymyšlené metodiky změřit jejich velikost cca $30\ \mu\text{m}$. Ta byla potvrzena i při změření na klasickém optickém mikroskopu. Pylová zrnka následně posloužila jako vzorek ve 4 mm široké tekuté vrstvě skládající se z vrstvy vody a olejnatého roztoku, to celé ještě překryto víčkem. Úspěšná rekonstrukce tohoto vzorku simulujícího embrya v kultivačním roztoku ukázala, že mikroskop si poradí i s takovýmto optickým prostředím. Dosažené rozlišení u dobře transparentního a kontrastního vzorku bylo určeno na cca $8.5\ \mu\text{m}$. Experimenty byla zároveň potvrzena vlastnost digitální holografické mikroskopie – dosažení dobrého rozlišení při velkém zorném poli. Tím vyniká oproti klasickým optickým mikroskopům. Z poznatků získaných při

experimentech jsem navrhl podobu misky a rozměrové rozložení mikroskopu pro použití v inkubátoru. Splnění rozměrových požadavků není limitováno principem záznamu, ale spíše použitými komponenty.

Další práce na toto téma by se mohla věnovat především vylepšení softwarové části. Jak je nastíněno v teoretické části, existují různé algoritmy pro zkvalitnění rekonstrukce, zlepšení rozlišení nebo korektní rozbalení fázové informace. Rekonstruované obrazy pylových zrnků by dle mého názoru mohly být zajímavou sadou dat pro tvorbu algoritmu na segmentaci prvků v obraze. Dále by bylo možné upravit algoritmus pro rekonstrukci do podoby pro automatický sběr snímků, využitelný pro *time-lapse* sledování růstu embryí.

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma laseru	12
Obrázek 2 - Transverzální elektrické mody [8]	13
Obrázek 3 - Gaussovské rozložení intenzity [9]	14
Obrázek 4 - Schéma In-line sestavy	14
Obrázek 5 - Princip in-line [13]	15
Obrázek 6 - Princip off-axis [13]	17
Obrázek 7 - Off-axis [16]	17
Obrázek 8 - Záznam červených krvinek [3]	20
Obrázek 9 - Záznam pohybu červené krvinky [3]	20
Obrázek 10 - Buněčné dělení [20]	21
Obrázek 11 - Výškový profil z experimentálního DHM [4]	21
Obrázek 12 - Výškový profil z komerčního DHM [4]	22
Obrázek 13 - Fázový obraz pole mikročoček [21]	22
Obrázek 14 - Analýza rychlostního pole [3]	23
Obrázek 15 - Schéma HoloMonitor M4 [23]	24
Obrázek 16 - Mitochondrie [25]	25
Obrázek 17 - Definice souřadných systémů	32
Obrázek 18 - Chybné vzorkování 1 [29]	39
Obrázek 19 - Chybné vzorkování 2 [29]	39
Obrázek 20 - Korektní vzorkování [29]	40
Obrázek 21 - Potlačení zdvojeného obrazu [12]	47
Obrázek 22 - Testovací sestava	50
Obrázek 23 - Schéma testovací sestavy	50
Obrázek 24 - Schéma experimentální sestavy	52
Obrázek 25 - Platforma pro uložení vzorku	53
Obrázek 26 - Experimentální sestava	54
Obrázek 27 - Sestava bez prostorového filtru	55
Obrázek 28 - Sestava s laserovou diodou	56
Obrázek 29 - Vzdálenosti pro sestavu s prostorovým filtrem	61
Obrázek 30 - Vzdálenosti pro sestavu s dírkovou clonou	62
Obrázek 31 - Rekonstrukce optické mřížky	63
Obrázek 32 - Misky na uložení vzorků	65
Obrázek 33 - Hologram pylových zrněk	66
Obrázek 34 - Rekonstrukce pylových zrněk	67
Obrázek 35 - Přibližná pylová zrnka	67
Obrázek 36 - Pylová zrnka pod optickým mikroskopem	68
Obrázek 37 - Rekonstrukce pylových zrněk v roztoku	69
Obrázek 38 - Rekonstrukce optické mřížky v sestavě bez prostorového filtru	70
Obrázek 39 - Rekonstrukce optické mřížky v sestavě s laserovou diodou	70
Obrázek 40 - Schéma pro odvození teoretického rozlišení	71
Obrázek 41 - Experimentálně určené rozlišení	74
Obrázek 42 - Návrh misky	75

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Srovnání DHM.....	24
Tabulka 2 - Parametry DMK 33UX178.....	51
Tabulka 3 – Vysvětlivky	52
Tabulka 4 – Symbolické rozdělení metod.....	59

Seznam zkratek a symbolů

IVF	In vitro fertilizace
DHM	Digitální holografická mikroskopie
CCD	Charge-coupled device
FOV	Zorné pole – <i>Field of view</i>
I	Intenzita světla
φ, ϕ	Fáze vlnění
λ	Vlnová délka
f	Frekvence
n	Index lomu světla
VCSEL	Vertical-cavity surface-emitting laser
z, z_0	Vzdálenost vzorku od zdroje sférické vlny
L	Vzdálenost kamery od zdroje sférické vlny
NA	Numerická apertura
W	Šířka záznamového čipu
δx	Příčné rozlišení
δz	Podélné rozlišení
CMOS	Complementary Metal–Oxide–Semiconductor
\mathbf{r}	Vektor značící polohu bodu v prostoru
A	Amplituda
j	Imaginární jednotka
U	Komplexní amplituda/fázor vlnění
k	Vlnové číslo
Δx	Velikost pixelu kamery
$\Delta \xi$	Velikost pixelu v rekonstruovaném obraze
x, y	Souřadnice v rovině záznamu
ξ, η	Souřadnice v rovině rekonstrukce

f_s	Vzorkovací frekvence
m, n	Počet pixelů v rovině záznamu
p, q	Počet pixelů v rovině rekonstrukce
<i>FFT</i>	Rychlá Fourierova transformace
<i>CGDH</i>	<i>Computer generated digital holography</i>
<i>DLHM</i>	<i>Digital Lensless Holographic Microscopy</i>

Seznam příloh

Příloha 1	3D modely navržených součástí
Příloha 2	Program rekonstrukce obrazu
Příloha 3	Hologramy + Rekonstrukce

Použitá literatura

- 1) The Nobel Prize in Physics 1971. *The Nobel Prize* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1971/summary/>
- 2) ING. DVOŘÁKOVÁ, Pavla, Ing. Šárka NĚMCOVÁ, PH.D. a Ing. Pavel VÁCLAVÍK. *Holografie*. Praha: Česká technika - nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 978-80-01-04018-8.
- 3) Yu, Xiao & Hong, Jisoo & Liu, Changgeng & Kim, Myung. (2014). Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking. *Optical Engineering*. 53. 112306. 10.1117/1.OE.53.11.112306.
- 4) Ryle, James & McDonnell, Susan & Sheridan, John. (2011). Lensless multispectral digital in-line holographic microscope. *Journal of biomedical optics*. 16. 126004. 10.1117/1.3659681.
- 5) VIČAR, Tomáš Sledování buněk v obrazech z holografického mikroskopu: diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústavu biomedicínského inženýrství, 2016. 74 s. Vedoucí práce byl doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.
- 6) Allier, et al. (2014). Video lensfree microscopy of 2D and 3D culture of cells. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 8947. 10.1117/12.2038098.
- 7) Pierre Marquet, Benjamin Rappaz, Pierre J. Magistretti, Etienne Cuche, Yves Emery, Tristan Colomb, and Christian Depeursinge, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy," *Opt. Lett.* 30, 468-470 (2005)
- 8) By DrBob at English Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4008320>
- 9) Gaussian Beam Propagation. *Edmund optics* [online]. [cit. 2022-05-16]. Dostupné z: <https://www.edmundoptics.com/knowledge-center/application-notes/lasers/gaussian-beam-propagation/>
- 10) BC. MOŤKA, Libor. *Základní principy, experimentální ověření a aplikace digitální 'in-line' holografie*. 2012. Diplomová práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA KATEDRA OPTIKY. Vedoucí práce Prof. RNDr. Zdeněk Bouchal, Dr.
- 11) Molony, Karen & Hennelly, Bryan & Kelly, Damien & Naughton, Thomas. (2010). Reconstruction algorithms applied to in-line Gabor digital holographic microscopy. *Optics Communications - OPT COMMUN*. 283. 10.1016/j.optcom.2009.11.012.
- 12) Denis, Loic & Fournier, Corinne & Fournel, Thierry & Ducottet, Christophe. (2008). Numerical suppression of the twin-image in in-line holography of a volume of micro-objects. *Measurement Science and Technology*. 19. 10.1088/0957-0233/19/7/074004.
- 13) KAWATA, Satoshi a Miyu OZAKI. Surface-Plasmon Holography. *IScience* [online]. 2020, 23(12) [cit. 2022-05-22]. ISSN 2589-0042. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004220310762>
- 14) Ryle, James & Molony, Karen & McDonnell, Susan & Naughton, Thomas & Sheridan, John. (2009). Multispectral lensless digital holographic microscope: Imaging MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell

- cultures. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering. 7442. 10.1117/12.826882.
- 15) Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jürgen Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," *Appl. Opt.* 45, 836-850 (2006).
 - 16) Verrier, Nicolas & Atlan, Michael. (2011). Off-axis digital hologram reconstruction: Some practical considerations. *Applied optics*. 50. H136-46. 10.1364/AO.50.00H136.
 - 17) Allier, Cédric. (2015). Lensfree microscopy: a new framework for the imaging of viruses, bacteria, cells and tissue.
 - 18) The 3D Cell Explorer: A revolutionary label-free microscope to look instantly inside living cells in 3D. *Nanolive.ch* [online]. [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://www.nanolive.ch/products/3d-microscopes/cx/>
 - 19) Shiraki, Atsushi & Taniguchi, Yusuke & Shimobaba, Tomoyoshi & Masuda, Nobuyuki & Ito, Tomoyoshi. (2012). Handheld and low-cost digital holographic microscopy.
 - 20) Rappaz, Benjamin & Cano, Elena & Colomb, Tristan & Kühn, Jonas & Depeursinge, Christian & Simanis, Viesturs & Magistretti, Pierre & Marquet, Pierre. (2009). Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*. 14. 034049. 10.1117/1.3147385.
 - 21) Merola, Francesco & Miccio, Lisa & Coppola, Sara & Vespini, Veronica & Paturzo, Melania & Grilli, Simonetta & Ferraro, Pietro. (2010). Exploring the capabilities of Digital Holography as tool for testing optical microstructures. *3D Research*. 2. 1-8. 10.1007/3DRes.01(2011)3.
 - 22) Kozacki, T., Józwick, M. and Józwicki, R.. "Determination of optical field generated by a microlens using digital holographic method" *Opto-Electronics Review*, vol. 17, no. 3, 2009, pp. 211-216. <https://doi.org/10.2478/s11772-009-0005-z>
 - 23) The principle design of HoloMonitor. In: *Phiab.com: Holographic Microscopy* [online]. [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://phiab.com/holomonitor/holographic-microscopy/>
 - 24) Cotte, Yann & Toy, M. Fatih & Jourdain, Pascal & Pavillon, Nicolas & Boss, Daniel & Magistretti, Pierre & Marquet, Pierre & Depeursinge, Christian. (2013). Marker-free phase nanoscopy. *Nat Photon*. 7. 418. 10.1038/nphoton.2012.329.
 - 25) How does the 3D Cell Explorer produce cell images with better than 200 nm lateral resolution?. In: *Nanolive.ch* [online]. [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.nanolive.ch/technology/live-cell-imaging/nanolive-imaging/200-nm-lateral-resolution/>
 - 26) LOBAZ, Petr. *Computer generated display holography: Introduction and the state of the art*. Plzeň: University of West Bohemia, 2016.
 - 27) POPOVIC, Jelena. *A Fast Method for Solving the Helmholtz Equation Based on Wave Splitting*. Stockholm: KTH School of Computer Science and Communication, 2009. ISBN 978-91-7415-370-5.
 - 28) KRAMÁŘ, Martin. *Metoda konečných prvků pro Helmholtzovu rovnici*. Ostrava, 2009. Diplomová práce. Technická univerzita Ostrava, Katedra aplikované matematiky. Vedoucí práce Ing. Dalibor Lukáš, Ph.D.

- 29) Prof. Efstathiou Constantinos. *Signal Sampling: Nyquist - Shannon Theorem* [online]. [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: http://195.134.76.37/applets/AppletNyquist/Appl_Nyquist2.html.
- 30) Prof. Ing. Pavel Zítek, DrSc. *Matematické a simulační modely 1: Modely v komplexním oboru*. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2001.
- 31) SOJKA, Eduard, Jan GAURA a Michal KRUMNIKL. *Matematické základy digitálního zpracování obrazu*. Plzeň: Západočeská Univerzita v Plzni, 2011.
- 32) John F. Restrepo and Jorge Garcia-Sucerquia, "Magnified reconstruction of digitally recorded holograms by Fresnel–Bluestein transform," *Appl. Opt.* 49, 6430-6435 (2010)
- 33) Fucai Zhang, Ichirou Yamaguchi, and L. P. Yaroslavsky, "Algorithm for reconstruction of digital holograms with adjustable magnification," *Opt. Lett.* 29, 1668-1670 (2004)
- 34) Li, Jun-Chang & Tankam, Patrice & Peng, Zu-Jie & Picart, Pascal. (2009). Digital holographic reconstruction of large objects using a convolution approach and adjustable magnification. *Optics letters*. 34. 572-4. 10.1364/OL.34.000572.
- 35) Marvin A. Schofield and Yimei Zhu, "Fast phase unwrapping algorithm for interferometric applications," *Opt. Lett.* 28, 1194-1196 (2003)
- 36) Seonghwan Park, Youhyun Kim, and Inkyu Moon, "Automated phase unwrapping in digital holography with deep learning," *Biomed. Opt. Express* 12, 7064-7081 (2021)
- 37) Miguel Arevallilo Herráez, David R. Burton, Michael J. Lalor, and Munther A. Gdeisat, "Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path," *Appl. Opt.* 41, 7437-7444 (2002)
- 38) Lobaz, P. "CGDH Tools: Getting started in computer generated display holography." In: *Proceedings of the 11th International Symposium on Display Holography*. In press. 2018
- 39) *HoloPy: Holography and Light Scattering in Python* [online]. Manoharan Lab, Harvard University, 2016 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: <https://holopy.readthedocs.io/en/master/index.html>
- 40) Carlos Trujillo, Pablo Piedrahita-Quintero, and Jorge Garcia-Sucerquia, "Digital lensless holographic microscopy: numerical simulation and reconstruction with ImageJ," *Appl. Opt.* 59, 5788-5795 (2020)
- 41) M. Seifi, C. Fournier and L. Denis, "HoloRec3D : A free Matlab® toolbox for digital holography", HAL-UJM, Oct 2012.
- 42) Di, Jianglei & Rajendran, Arvind & Kariwala, Vinay & Asundi, Anand & Zhao, Jianlin. (2011). Imaging mechanisms analysis of compact digital holographic microscope for microparticles measurement. *Physics Procedia*. 19. 200-206. 10.1016/j.phpro.2011.06.149.