

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

**RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.**

**KORELAČNÍ MIKROSKOPIE,  
ALTERNATIVNÍ METODA  
VÍCEKANÁLOVÉHO KONFOKÁLNÍHO  
ZOBRAZENÍ**

**CORRELATION MICROSCOPY,  
AN ALTERNATIVE METHOD  
OF MULTICHANNEL CONFOCAL IMAGING**

Zkrácená verze habilitační práce



**Brno, 2002**

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

konfokální mikroskopie, trojrozměrná mikroskopie, nekoherentní holografie, aplikace holografie, fourierovská optika, funkce přenosu, profilometrie

## **KEYWORDS**

confocal microscopy, three-dimensional microscopy, incoherent holography, holography applications, Fourier optics, transfer function, profilometry

Habilitační práce je uložena v Areálové knihovně FSI VUT v Brně.

ISBN 80-214-2104-5

ISSN 1213-418X

©2002 Radim Chmelík

**Radim Chmelík** se narodil 31. ledna 1966 v Kyjově.

V letech 1984 – 1989 studoval obor fyzika pevných látek na Přírodovědecké fakultě MU v Brně, kde v roce 1989 obhájil diplomovou práci zaměřenou na problematiku dynamické difrakce rtg záření na vrstevnatých krystalech, ukončil studium státní zkouškou a obdržel titul RNDr.

Od roku 1989 byl zaměstnán v oddělení elektronové optiky Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně, kde se jeho vědecký zájem soustředil na skalární teorii difrakce, fourierovskou a vlnovou optiku, teorii zobrazení, holografii a difraktivní optiku pro viditelnou oblast spektra a měkké rtg záření.

V roce 1993 nastoupil jako odborný asistent na Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně, kde pracuje do současné doby. Zde se začal teoreticky i experimentálně zabývat konfokální mikroskopií a možnostmi její holografické implementace. V roce 1997 obhájil disertační práci nazvanou „Zobrazování difraktivní čočkou“ a obdržel titul Dr. (Ph.D.).

Vědeckou činnost rozvíjel jako odpovědný řešitel 2 projektů GA ČR, její výsledky zveřejnil prostřednictvím 19 původních publikací, přičemž technické řešení holografického konfokálního mikroskopu je patentově chráněno. Konceptně připravil a koordinuje budování laboratoře mikroskopie na ÚFI.

Během svého pedagogického působení byl školitelem 8 diplomantů a 3 doktorandů. Zavedl a vyučuje předmět „Mikroskopie“ v doktorském postgraduálním studiu, přednáší základní kurs „Fyzika I, II“ v magisterském studijním programu „Strojní inženýrství“, a podílí se na přednášce předmětu „Fourierovská optika“ a na další výuce v oborovém studijním programu „Fyzikální inženýrství“.

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>5</b>
<b>2 Zobrazení objektivem</b>	<b>6</b>
2.1 Souřadnicová soustava . . . . .	6
2.2 Trojrozměrná pupilová funkce . . . . .	7
2.3 Osvětlení . . . . .	8
2.3.1 Kritické osvětlení . . . . .	9
2.3.2 Köhlerovo osvětlení . . . . .	9
2.4 Zobrazení . . . . .	9
2.5 Interakce světla s objektem . . . . .	10
2.5.1 Volný prostor . . . . .	10
2.5.2 Slabě rozptylující objekt . . . . .	10
2.5.3 Odrazná plocha . . . . .	11
2.5.4 Posunutí objektu . . . . .	13
<b>3 Holografická a konfokální mikroskopie</b>	<b>13</b>
3.1 Holografické mikroskopy . . . . .	13
3.2 Konvenční konfokální mikroskop . . . . .	15
<b>4 Výpočet koherentní funkce přenosu</b>	<b>16</b>
4.1 Vlastní soustava souřadnic . . . . .	16
4.2 Integrační obor . . . . .	17
4.2.1 Konfigurace na průchod . . . . .	18
4.2.2 Konfigurace na odraz . . . . .	19
4.3 Aplanatické soustavy . . . . .	21
4.3.1 Slabě rozptylující vzorek . . . . .	21
4.3.2 Odrazná rovinná plocha . . . . .	23
<b>5 Experiment</b>	<b>24</b>
5.1 Holografický konfokální mikroskop . . . . .	24
5.2 Osová odezva pro rovinný objekt . . . . .	25
5.2.1 Osová intenzitní odezva . . . . .	25
5.2.2 Osová fázová odezva . . . . .	27
5.3 Profilometrie povrchů . . . . .	27
5.3.1 Princip měření . . . . .	27
5.3.2 Kalibrační měření . . . . .	29
5.3.3 Měření s jedním optickým řezem . . . . .	29
5.3.4 Měření s několika optickými řezy . . . . .	29
<b>Závěr</b>	<b>31</b>
<b>Summary</b>	<b>32</b>

# 1 Úvod

V uplynulých letech byly intenzivně teoreticky i experimentálně studovány techniky hloubkově diskriminovaného mikroskopického zobrazení založené na využití nekoherentní holografie, které dosahují hloubkového rozlišení prostřednictvím korelačních vlastností světla. Souhrnně je lze označit termíny korelační či holografická mikroskopie. Jednotlivé aplikace jsou známy pod názvy heterodynní mikroskopie,<sup>16</sup> holografická konfokální mikroskopie,<sup>7</sup> a mikroskopie s časoprostorovou holografií.<sup>12</sup> Zatímco nejdříve zmíněná technika poskytuje pouze zobrazení bodu a vyžaduje tedy použití rastrovací soustavy stejně, jako konvenční konfokální mikroskop, další dvě techniky snímají optický řez vzorkem v jediném okamžiku a přibližují se tak zobrazení v nerastrovacích optických mikroskopech. Zobrazovací proces pak lze interpretovat také jako paralelní zobrazení velkým počtem jednoduchých konfokálních mikroskopů, přičemž jednotlivé konfokální kanály jsou koherenčně separovány. Výstupní zobrazení je počítačově rekonstruováno ze snímaného hologramu pomocí fourierovských metod, což v současnosti nepředstavuje výrazné zpomalení zobrazovacího procesu.

Zatímco teorie trojrozměrného zobrazení konvenčním konfokálním mikroskopem byla vypracována i pro reálné mikroskopické zobrazení zprostředkované objektivou vysokých numerických apertur, ekvivalentní popis zobrazení pro holografické techniky hloubkově diskriminovaného zobrazení dosud neexistuje. Předložená práce proto vznikla s úmyslem odvodit teorii trojrozměrného zobrazení holografickým mikroskopem, která by nebyla omezena paraxiální aproximací, umožnila by popsat zobrazení objektivou vysokých numerických apertur s vysokým rozlišením a porovnat nalezené charakteristiky zobrazení, především trojrozměrnou funkci přenosu a impulsovou odezvu, s charakteristikami zobrazení konvenčním konfokálním mikroskopem.

Východiskem teoretické části práce je teorie lineárních invariantních systémů užívaná zejména ve fourierovské optice, která k popisu zobrazení užívá formalismu impulsové odezvy optické soustavy, její pupilové funkce a funkce přenosu ve frekvenční oblasti. Pro popis zobrazení trojrozměrných objektů je vhodnější použít obdobného, avšak trojrozměrného formalismu, jehož aplikace je běžná při popisu zobrazení v konvenčním optickém mikroskopu<sup>19,28</sup> i v konfokálním mikroskopu.<sup>21–23</sup> Trojrozměrné funkce přenosu pro nekoherentní zobrazení a pro koherentní konfokální zobrazení byly vypočteny z pupilových funkcí aplanatických soustav a soustav splňujících Herschelovu podmínku.<sup>24</sup> Rovněž byl publikován výpočet optické přenosové funkce pro kruhové a anulární čočky s otvorovou vadou a rozostřením<sup>13</sup> a trojrozměrné funkce přenosu pro konfokální zobrazení ve vláknovém konfokálním mikroskopu.<sup>4</sup> Analogicky skalární teorii lze vybudovat i teorii vektorovou, která bere v úvahu polarizaci světla.<sup>25,26</sup>

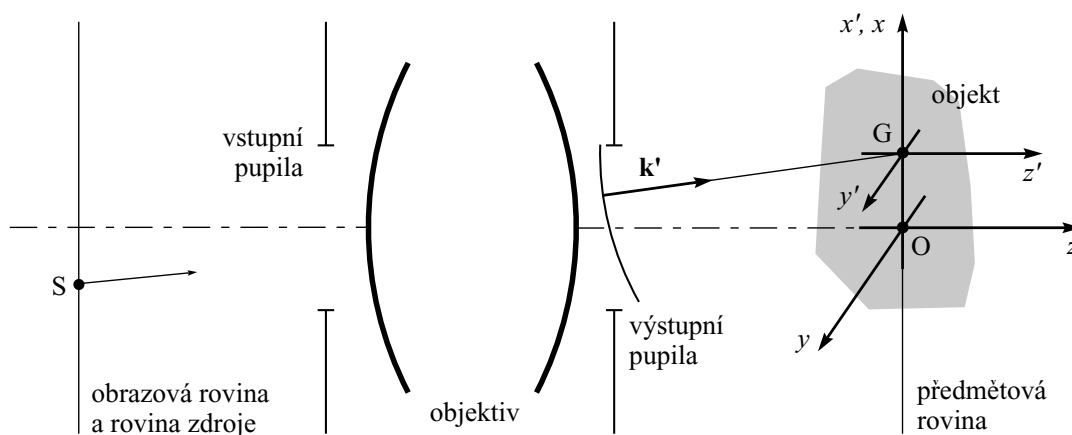
Práce má následující strukturu. V kapitole 2 je pomocí Debyeovy aproximace odvozena trojrozměrná pupilová funkce objektivu a její pomocí je popsáno zobrazení trojrozměrného objektu jednoduchou optickou soustavou složenou z osvětlovací soustavy a objektivu. Jsou odvozeny rovněž aproximace rozptylové funkce pro slabě rozptylující objekt a rovinný i nerovinný odrazný objekt. V kapitole 3 jsou odvozeny koherentní funkce přenosu pro holografický a konfokální mikroskop. Vlastnosti obou funkcí jsou dále zkoumány a vzájemně porovnány v kapitole 4, která detailně popisuje postup

při jejich výpočtu pro rotačně souměrné, případně také aplanatické soustavy. Rovněž jsou uvedeny některé významné výsledky výpočtů funkcí přenosu, impulsové odezvy a osově odezvy pro rovinný objekt. Podstatná odlišnost zobrazovacího procesu obou typů mikroskopu byla popsána v případě spektrálně širokopásmového osvětlení, kdy se v případě holografického mikroskopu mohou sčítat příspěvky různých vlnových délek koherentně a na rozdíl od konfokálního mikroskopu může tedy existovat příslušná polychromatická koherentní funkce přenosu. V kapitole 5 jsou uvedeny výsledky měření osově odezvy a povrchového profilu vzorku pomocí holografického konfokálního mikroskopu, jenž byl zkonstruován v rámci této práce.<sup>6–11</sup>

## 2 Zobrazení objektivem

### 2.1 Souřadnicová soustava

Na obrázku 1 je znázorněno osvětlení a zobrazení trojrozměrného předmětu odraženým či zpětně rozptýleným světlem. Osvětlující svazek generovaný zatím nespécifikovaným zdrojem prochází optickou soustavou (objektivem) a dopadá na trojrozměrný objekt, který leží v předmětovém prostoru v okolí předmětové roviny. Zobrazení je formováno tímtež objektivem v konjugované obrazové rovině. Pro jednoduchost je z náčrtku vypuštěn dělič svazku, takže v případě kritického osvětlení se rovina zdroje jeví totožná s obrazovou rovinou. Při zobrazení v procházejícím světle leží zobrazující optická soustava a obrazová rovina vpravo od předmětové roviny.



Obrázek 1: Schéma osvětlení a zobrazení předmětu v uspořádání na odraz.

Zavedme souřadnicovou soustavu  $O(x, y, z)$ , jejíž osy  $x, y$  leží v předmětové rovině a osa  $z$  leží na optické ose objektivu orientována ve směru šíření osvětlujícího svazku. Polohu bodu v předmětovém prostoru budeme popisovat vektorem souřadnic  $\mathbf{x} = (x, y, z)$  a polohu bodu v obrazové rovině souřadnicemi konjugovaného bodu (ve smyslu gaussovské optiky) v rovině předmětové.

## 2.2 Trojrozměrná pupilová funkce

Zobrazení trojrozměrného předmětu popíšeme prostřednictvím trojrozměrné pupilové funkce, kterou zde odvodíme. Výpočet omezíme na isoplanatickou oblast obrazové roviny.

Předpokládejme nejdříve, že v bodě S (viz obrázek 1) je umístěn bodový zdroj monochromatického světla s vlnočtem  $k$ , který je optickou soustavou zobrazen do předmětové roviny. V Gaussově obrazovém bodě G nechť leží počátek soustavy souřadnic  $x', y', z'$ , které jsou složkami polohového vektoru  $\mathbf{x}'$  bodu pozorování.

Za předpokladu, že hodnota Fresnelova čísla je podstatně větší než jedna, což je v případě mikroskopického zobrazení obvykle splněno, lze světelné pole v okolí obrazového bodu (impulsovou odezvu) popsat v Debyeově aproximaci (viz například [27, kap. 16.1, 30]), která není omezena na paraxiální oblast. V případě velkých úhlových apertur nelze zanedbat vliv polarizace světla, teorii je nutno odvodit vektorově a světelné pole popsat komponentami elektrického a magnetického pole. Tímto postupem lze odvodit vektorové funkce přenosu.<sup>25</sup> Fokusací polarizovaného světla pomocí optické a zvláště pomocí aplanatické optické soustavy se zabývali Wolf a Richards.<sup>18,30</sup> V našem případě budeme předpokládat, že osvětlení se děje nepolarizovaným světlem, a polarizační efekty lze zanedbat. Světelné pole v okolí Gaussova bodu G pak popíšeme skalární komplexní amplitudou  $h(\mathbf{x}', k)$ . Vstupními hodnotami Debyeovy aproximace budou výsledky trasování paprsků optickou soustavou odečtené na referenční sféře vyplňující výstupní pupilu objektivu. Označíme-li  $\mathbf{k}'$  vektor popisující směr paprsku ve výstupní pupile ( $|\mathbf{k}'| = k$ ),  $p(\mathbf{k}')$  silový faktor paprsku<sup>30</sup> a  $W(\mathbf{k}')$  příslušnou vlnovou aberaci, platí

$$h(\mathbf{x}', k) = \iint_{\infty} \frac{p(\mathbf{k}')}{ik'_z} \exp 2\pi i [kW(\mathbf{k}') + \mathbf{k}' \cdot \mathbf{x}'] d^2 \mathbf{k}'_t, \quad k'_z = \sqrt{k^2 - k_t'^2}, \quad (1)$$

kde  $\mathbf{k}'_t = (k'_x, k'_y)$  je příčná složka vektoru  $\mathbf{k}'$ . Oblast nenulových hodnot funkce  $p(\mathbf{k}')$  je přibližně vymezena úhlovou aperturou  $\alpha$  optické soustavy. Předpokládejme, že  $p(\mathbf{k}')$  je nulová také v případě, kdy  $k^2 < k_t'^2$  a  $k'_z$  je ryze imaginární, takže integrovat lze formálně v nekonečných mezích. Označíme-li

$$P(\mathbf{k}') = \frac{p(\mathbf{k}')}{ik'_z} \exp[2\pi i kW(\mathbf{k}')], \quad (2)$$

platí vztah

$$h(\mathbf{x}', k) = \iint_{\infty} P(\mathbf{k}') \exp(2\pi i \mathbf{k}' \cdot \mathbf{x}') d^2 \mathbf{k}'_t, \quad (3)$$

který můžeme chápat jako vyjádření impulsové odezvy  $h(\mathbf{x}', k)$  superpozicí rovinných vln s úhlovým spektrem  $P(\mathbf{k}')$ , které nazýváme trojrozměrnou pupilovou funkcí objektivu.

Pro aplanatický objektiv platí sinová podmínka, z níž lze odvodit, že silový faktor  $p(\mathbf{k}')$  paprsku je úměrný funkci  $\cos^{\frac{1}{2}} \vartheta$ , kde  $\vartheta$  je úhel sevřený světelným paprskem a optickou osou,<sup>18</sup> a nezávislý na vlnočtu  $k$ . Vyjádříme-li kosinus podílem  $k'_z/k$  a položíme-li

konstantu úměrnosti rovnu jedné, platí pro pupilovou funkci

$$P(\mathbf{k}') = (kk'_z)^{-\frac{1}{2}} \exp[2\pi i k W(\mathbf{k}')] \mathcal{A}(\mathbf{k}') = \mathcal{P}(\mathbf{k}') \mathcal{A}(\mathbf{k}'), \quad (4)$$

kde  $\mathcal{A}(\mathbf{k}')$  označuje aperturní funkci, která je jednotková pro  $\vartheta < \alpha$  a nabývá nulových hodnot pro  $\vartheta \geq \alpha$ , nebo pro ryze imaginární hodnoty  $k'_z$ . Není-li objektiv aplanátem, je-li opatřen apodizačním filtrem, nebo není-li rozložení amplitudy ve vstupní pupile objektivu rovnoměrné, má funkce  $\mathcal{P}(\mathbf{k}')$  odlišný tvar.

Nakonec definujme trojrozměrnou monochromatickou pupilovou funkci  $P^{(\delta)}(\mathbf{k}', k)$  vztahem

$$P^{(\delta)}(\mathbf{k}', k) = P(\mathbf{k}') \delta(k'_z - \sqrt{k^2 - k_t'^2}), \quad (5)$$

v němž  $\delta$  označuje Diracovu funkci delta. Monochromatická pupilová funkce  $P^{(\delta)}(\mathbf{k}', k)$  tvoří s impulsovou odezvou  $h(\mathbf{x}', k)$  fourierovský pár, což se stane zřejmým, nahradíme-li ve vztahu (3) funkci  $P(\mathbf{k}')$  funkcí  $P^{(\delta)}(\mathbf{k}', k)$  a doplníme-li integraci podle  $k'_z$ .

Impulsovou odezvu  $h(\mathbf{x}', k)$  a následně pupilovou funkci  $P(\mathbf{k}')$  objektivu lze určit experimentálně.<sup>15</sup>

## 2.3 Osvětlení

Osvětlovací vlna je objektivem přenášena z roviny zdroje do roviny předmětu. Spektrální amplituda osvětlovací vlny v určitém bodě roviny zdroje pro vlnčet  $k$  nechť je dána funkcí  $a(\boldsymbol{\eta}, k)$ , kde  $\boldsymbol{\eta}$  je podle předpokladu vektor souřadnic konjugovaného bodu v předmětové rovině. Funkce  $a(\boldsymbol{\eta}, k)$  má tedy význam geometrického zobrazení amplitudy do předmětové roviny. Skutečné rozložení amplitudy v předmětovém prostoru je pak dáno jeho konvolucí s impulsovou odezvou (3) objektivu

$$u(\mathbf{x}, k) = \iint_{\infty} a(\boldsymbol{\eta}, k) h(\mathbf{x} - \boldsymbol{\eta}, k) d^2\boldsymbol{\eta}. \quad (6)$$

Dosadíme-li (3) za  $h(\mathbf{x}', k)$ , lze záměnou pořadí integrace a integrací podle  $\boldsymbol{\eta}$  odvodit vztah

$$u(\mathbf{x}, k) = \iint_{\infty} P(\mathbf{k}') A(\mathbf{k}'_t) \exp(2\pi i \mathbf{k}' \cdot \mathbf{x}) d^2\mathbf{k}'_t, \quad (7)$$

kde

$$A(\mathbf{k}'_t) = \iint_{\infty} a(\boldsymbol{\eta}, k) \exp(-2\pi i \mathbf{k}'_t \cdot \boldsymbol{\eta}) d^2\boldsymbol{\eta} \quad (8)$$

je úhlové spektrum amplitudy osvětlení. Součin

$$U(\mathbf{k}'_t) = P(\mathbf{k}') A(\mathbf{k}'_t) \quad (9)$$

je úhlovým spektrem osvětlení v předmětovém prostoru a pupilová funkce představuje současně koherentní funkci přenosu optické soustavy. Její hodnota  $P(\mathbf{k}')$  popisuje přenos rovinné vlny s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}'$  optickou soustavou.



### 2.3.1 Kritické osvětlení

Plošný zdroj nebo jeho zobrazení se v tomto případě nachází v obrazové rovině objektivu (viz obrázek 1). Koherentně jsou zobrazeny pouze jednotlivé body zdroje. Označíme-li souřadnici určitého bodu zdroje  $\boldsymbol{\eta}^S$  a jeho spektrální intenzitu  $I(\boldsymbol{\eta}^S, k)$ , platí

$$a(\boldsymbol{\eta}, \boldsymbol{\eta}^S) = \sqrt{I(\boldsymbol{\eta}^S, k)} \delta(\boldsymbol{\eta} - \boldsymbol{\eta}^S), \quad (10)$$

a podle vztahů (8) a (9) je úhlové spektrum vyjádřeno vztahem

$$U(\mathbf{k}'_t, \boldsymbol{\eta}^S) = P(\mathbf{k}') A(\mathbf{k}'_t, \boldsymbol{\eta}^S) = \sqrt{I(\boldsymbol{\eta}^S, k)} P(\mathbf{k}') \exp(-2\pi i \mathbf{k}'_t \cdot \boldsymbol{\eta}^S). \quad (11)$$

### 2.3.2 Köhlerovo osvětlení

Plošný zdroj je zobrazen do přední (obrazové) ohniskové roviny objektivu, takže každému bodu zdroje přísluší rovnoběžný svazek v předmětovém prostoru. Tedy také v obrazové rovině musí mít komplexní amplituda přibližně tvar rovinné vlny a platí

$$a(\boldsymbol{\eta}, \mathbf{k}) = X(\mathbf{k}) \exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\eta}), \quad (12)$$

kde  $\mathbf{k}$  je příslušný vlnový vektor v předmětovém prostoru. Ve skutečnosti jde o kulovou vlnu konvergující do příslušného bodu S zobrazení plošného zdroje v ohniskové rovině. Amplituda  $X(\mathbf{k})$  je tedy úměrná amplitudě  $\sqrt{I(S, k)}$  v tomto bodě zdroje. Polohu bodu S i vlnočet  $k$  lze určit rovněž příslušným vlnovým vektorem  $\mathbf{k}$  a psát

$$a(\boldsymbol{\eta}, \mathbf{k}) = \sqrt{I(\mathbf{k})} \exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\eta}). \quad (13)$$

Odpovídající úhlové spektrum má tvar

$$U(\mathbf{k}'_t, \mathbf{k}) = \sqrt{I(\mathbf{k})} P(\mathbf{k}') \delta(\mathbf{k}'_t - \mathbf{k}_t). \quad (14)$$

## 2.4 Zobrazení

Osvětlovací vlna v předmětovém prostoru interaguje se vzorkem a tím vzniká rozptýlená vlna s úhlovým spektrem  $G(\mathbf{k}'_t)$ . Uvažujme, jak je tato rozptýlená vlna přenesena do obrazové roviny.

V předchozích úvahách jsme ukázali, že hodnota  $P(\mathbf{k}')$  pupilové funkce popisuje přenos rovinné vlny s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}'$  objektivem. Předpokládejme, že přenos rovinné vlny, která se šíří opačným směrem, bude popsán toutéž hodnotou pupilové funkce. Z tohoto předpokladu vyplývají následující tvrzení.

1. Při zobrazení v procházejícím světle předpokládejme, že zobrazující optická soustava je středově souměrná s osvětlovací soustavou, přičemž středem souměrnosti je bod O. Přenos rovinné vlny s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}'$  oběma soustavami je pak popsán toutéž hodnotou  $P(\mathbf{k}')$  pupilové funkce. Úhlové spektrum zobrazení je dáno součinem  $P(\mathbf{k}')G(\mathbf{k}'_t)$ .

2. Při zobrazení v odraženém světle je přenos zpětně rozptýlené vlny s vlnovým vektorem  $-\mathbf{k}''$  popsán toutéž hodnotou  $P(\mathbf{k}'')$  pupilové funkce, jako přenos osvětlovací

vlny s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}''$ . Rozptýlené rovinné vlně s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}'$  tedy odpovídá hodnota  $P(-\mathbf{k}')$  pupilové funkce. Úhlové spektrum zobrazení je dáno součinem  $P(-\mathbf{k}')G(\mathbf{k}'_t)$ .

Při zobrazení v procházejícím, resp. odraženém světle tedy v obrazové rovině pozorujeme amplitudu

$$o(\boldsymbol{\xi}, k) = \iint_{\infty} P(\pm\mathbf{k}')G(\mathbf{k}'_t) \exp(2\pi i\mathbf{k}'_t \cdot \boldsymbol{\xi})d^2\mathbf{k}'_t. \quad (15)$$

## 2.5 Interakce světla s objektem

Předpokládejme, že rozptyl světla je pružný a lineární, tedy že úhlová spektra osvětlovací vlny  $U(\mathbf{k}'_t)$  a rozptýlené vlny  $G(\mathbf{k}'_t)$  spolu souvisejí prostřednictvím superpozičního integrálu

$$G(\mathbf{k}'_t) = \iint_{\infty} \mathcal{T}(\mathbf{k}', \mathbf{k}'')U(\mathbf{k}''_t)d^2\mathbf{k}''_t, \quad (16)$$

který obsahuje rozptylovou funkci  $\mathcal{T}(\mathbf{k}', \mathbf{k}'')$  objektu. Integraci je možno ponechat v nekonečných mezích, protože oblast nenulových hodnot funkce  $U(\mathbf{k}''_t)$  je vhodně omezena pupilovou funkcí ve výrazu (9). V mnoha případech je možno rozptylovou funkci rozložit na součin dvou funkcí

$$\mathcal{T}(\mathbf{k}', \mathbf{k}'') = \mathcal{T}_0(\mathbf{k}')T(\mathbf{k}' - \mathbf{k}''), \quad (17)$$

přičemž funkci  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k}')$  lze v některých případech nahradit konstantou a

$$T(\mathbf{k}') = \iiint_{\infty} t(\mathbf{x}) \exp(-2\pi i\mathbf{k}' \cdot \mathbf{x})d^3\mathbf{x}. \quad (18)$$

je Fourierova transformace tzv. rozptylového potenciálu  $t(\mathbf{x})$  předmětu. Dále odvodíme tvar zmíněných funkcí pro různé typy rozptylujících objektů.

### 2.5.1 Volný prostor

Při průchodu světla volným prostorem se jeho úhlové spektrum nezmění a tedy platí

$$G(\mathbf{k}'_t) = U(\mathbf{k}'_t). \quad (19)$$

Ze vztahů (16), (17) a (18) pak lze odvodit

$$\mathcal{T}_0(\mathbf{k}') = 1, \quad T(\mathbf{k}') = \delta(\mathbf{k}'_t) \quad \text{a tedy} \quad t(\mathbf{x}) = \delta(z). \quad (20)$$

### 2.5.2 Slabě rozptylující objekt

Slabý rozptyl rovinné vlny, tj. rozptyl, který dobře splňuje předpoklad kinematické (1. Bornovy) aproximace, že primární vlna není ovlivněna rozptylujícím objektem,

popsal Wolf.<sup>31</sup> Dopadá-li na polopropustný, slabě rozptylující objekt rovinná vlna s vlnovým vektorem  $\mathbf{k}$  a tedy s úhlovým spektrem

$$U(\mathbf{k}'_t, \mathbf{k}) = \delta(\mathbf{k}'_t - \mathbf{k}_t), \quad (21)$$

platí pro úhlové spektrum rozptýlené vlny vztah

$$G(\mathbf{k}'_t, \mathbf{k}) = \frac{k}{|k'_z|} \iiint_{\infty} t(\mathbf{x}) \exp[-2\pi i(\mathbf{k}' - \mathbf{k}) \cdot \mathbf{x}] d^3\mathbf{x}, \quad (22)$$

kde

$$t(\mathbf{x}') = i\pi k[n^2(\mathbf{x}) - 1] = i\pi k\chi_e(\mathbf{x}'). \quad (23)$$

Použili jsme označení  $n$  pro (komplexní) index lomu rozptylujícího objektu a  $\chi_e$  pro jeho elektrickou susceptibilitu. Do vztahu (22) a také do vztahu pro výpočet amplitudy rozptýlené vlny z úhlového spektra (vztah obdobný (7)) dosazujeme

$$k'_z = \pm \sqrt{k^2 - k_t'^2}, \quad (24)$$

pro přímo, resp. zpětně rozptýlenou vlnu.

Ze vztahu (16) po dosazení spektra rovinné osvětlovací vlny (21) vyplývá

$$G(\mathbf{k}'_t, \mathbf{k}) = \mathcal{T}(\mathbf{k}', \mathbf{k}). \quad (25)$$

Porovnáním tohoto vztahu s (22) a vzhledem k (16), (17) vidíme, že rozptylová funkce slabě rozptylujícího předmětu je dána součinem Fourierovy transformace  $T(\mathbf{k}')$  rozptylového potenciálu (23) a funkce

$$\mathcal{T}_0(\mathbf{k}') = \frac{k}{|k'_z|}. \quad (26)$$

V konfiguraci na průchod je kromě rozptýleného světla zobrazena také nerozptýlená osvětlovací vlna. V tomto případě lze použít rozptylový potenciál ve tvaru (srov. [20, str. 156])

$$t(\mathbf{x}) = i\pi k[n^2(\mathbf{x}) - 1] + \delta(z). \quad (27)$$

Pro druhý člen odpovídající nerozptýlenému světlu (srov. (20)) bychom měli volit  $\mathcal{T}_0 = 1$ . Pro jednoduchost lze  $\mathcal{T}_0$  volit podle (26). Tím obdržíme jiný poměr amplitud rozptýlené a nerozptýlené vlny, avšak tento poměr není v kinematické aproximaci správně vypočten i bez této úpravy.

### 2.5.3 Odrazná plocha

Odrazná plocha je tvořena rozhraním dvou optických prostředí s rozdílnými (obecně komplexními) indexy lomu. Nechť je popsána rovnicí

$$z = \sigma(\mathbf{x}_t), \quad (28)$$

přičemž  $\mathbf{x}_t$  je vektor souřadnic  $x, y$ . Ze vztahů (7), (9) odvozujeme, že komplexní amplituda osvětlovací vlny je na této ploše popsána vztahem

$$u_\sigma(\mathbf{x}_t) = \iint_{\infty} U(\mathbf{k}'_t) \exp\{2\pi i[\mathbf{k}'_t \cdot \mathbf{x}_t + k'_z \sigma(\mathbf{x}_t)]\} d^2 \mathbf{k}'_t, \quad k'_z = \sqrt{k^2 - k'^2_t}. \quad (29)$$

Pro komplexní amplitudu  $g_\sigma(\mathbf{x}_t)$  odražené vlny s úhlovým spektrem  $G(\mathbf{k}'_t)$  platí obdobný vztah, pouze znaménko komponenty  $k'_z$  je opačné

$$g_\sigma(\mathbf{x}_t) = \iint_{\infty} G(\mathbf{k}'_t) \exp\{2\pi i[\mathbf{k}'_t \cdot \mathbf{x}_t - k'_z \sigma(\mathbf{x}_t)]\} d^2 \mathbf{k}'_t. \quad (30)$$

Bereme v úvahu rovněž evanescentní složku úhlového spektra, a proto také ve druhém případě integrujeme v nekonečných mezích.

Uvažujme nejprve rozhraní ležící v rovině  $z = \sigma(\mathbf{x}_t) = 0$ . Při odrazu se zachovává rovinnost vlny a proto zřejmě platí

$$G(\mathbf{k}'_t) = \mathcal{T}_0(\mathbf{k}') U(\mathbf{k}'_t), \quad (31)$$

přičemž hodnota funkce  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k}')$  je dána příslušnými Fresnelovými koeficienty. Podobně, jako při průchodu vlny volným prostorem, lze pak ze vztahů (16), (17) a (18) odvodit i druhou složku rozptylové funkce

$$T(\mathbf{k}') = \delta(\mathbf{k}'_t) \quad \text{a tedy} \quad t(\mathbf{x}) = \delta(z). \quad (32)$$

Rozptylový potenciál vyjádřený funkcí delta popisuje skutečnost, že k rozptylu dochází pouze v rovině rozhraní.

Považujeme-li rozhraní za ideální odražeč (ve smyslu [29, str. 164]), nezávisí odrazivost na úhlu dopadu a platí  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k}') = 1$ . Ze vztahů (29), (30) a (31) odvozujeme, že amplitudy osvětlovací a odražené vlny jsou si pak v rovině rozhraní rovny

$$g_\sigma(\mathbf{x}_t) = u_\sigma(\mathbf{x}_t). \quad (33)$$

Zřejmě je možno předpokládat, že rovnost amplitud nastane i v případě malých odchylek plochy od roviny. Rozšířme tedy úvahu i na nerovinnou plochu, která je ale natolik málo zvlněná, že je možno její odrazivost opět globálně aproximovat funkcí  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k}')$ . Protože k rozptylu dochází pouze na ploše rozhraní, předpokládejme, že analogicky k (32) existuje rozptylový potenciál popsáný vztahem

$$t(\mathbf{x}) = \delta[z - \sigma(\mathbf{x}_t)]. \quad (34)$$

Rozptylovou funkci pak lze vyjádřit vztahem (17) pomocí jeho Fourierovy transformace (18).

Je-li plocha ideálním odražečem, platí opět  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k}') = 1$ . Ověřme, zda je na odrazné ploše amplituda odražené vlny rovna amplitudě vlny osvětlovací. Rozptylovou funkci dosadíme do výrazu (16) a pomocí (29), (30) odvodíme vztah

$$g_\sigma(\mathbf{x}_t) = \iint_{\infty} D(\mathbf{x}_t, \mathbf{x}'_t) u_\sigma(\mathbf{x}'_t) d^2 \mathbf{x}'_t, \quad (35)$$

kde

$$D(\mathbf{x}_t, \mathbf{x}'_t) = \iint_{\infty} \exp(2\pi i \{ (\mathbf{x}'_t - \mathbf{x}_t) \cdot \mathbf{k}'_t + [\sigma(\mathbf{x}'_t) - \sigma(\mathbf{x}_t)] k'_z \}) d^2 \mathbf{k}'_t. \quad (36)$$

Funkce  $D(\mathbf{x}_t, \mathbf{x}'_t)$  má ostré maximum pro  $\mathbf{x}_t = \mathbf{x}'_t$  a pro amplitudy tedy platí

$$g_{\sigma}(\mathbf{x}_t) \approx u_{\sigma}(\mathbf{x}_t). \quad (37)$$

Rovnost nastává pro rovinnou plochu, kdy  $D(\mathbf{x}_t, \mathbf{x}'_t) = \delta(\mathbf{x}_t - \mathbf{x}'_t)$ .

### 2.5.4 Posunutí objektu

Při posunutí objektu o vektor  $\mathbf{x}_s$  (například při rastrování) je třeba původní rozptylový potenciál objektu  $t'(\mathbf{x})$  nahradit potenciálem  $t(\mathbf{x}) = t'(\mathbf{x} - \mathbf{x}_s)$ . Ze vztahu pro Fourierovu transformaci (18) vyplývá, že původní funkci  $T'(\mathbf{k}')$  je třeba nahradit funkcí

$$T(\mathbf{k}') = T'(\mathbf{k}') \exp(-2\pi i \mathbf{k}' \cdot \mathbf{x}_s). \quad (38)$$

## 3 Holografická a konfokální mikroskopie

V této kapitole odvodíme z předchozích výsledků výrazy popisující koherentní funkci přenosu pro různé typy mikroskopů s konfokálním zobrazením, tedy konvenční konfokální mikroskop, a holografické mikroskopy.

### 3.1 Holografické mikroskopy

Mikroskopy, které pro dosažení hloubkové diskriminace využívají nekoherentní holografie jako např. holografický konfokální mikroskop,<sup>8</sup> či mikroskop s časoprostorovou holografií,<sup>12</sup> jsou tvořeny dvěma opticky ekvivalentními větvemi. V předmětové větvi se vytváří zobrazení  $o$  předmětu, v referenční větvi zobrazení  $r$  referenční roviny a v detekční rovině obě zobrazení interferují. V prvním citovaném případě svírají svazky nenulový úhel, takže vzniká prostorová nosná frekvence, v případě druhém má referenční svazek časově proměnný fázový posuv, takže vzniká časová nosná frekvence. Popíšeme-li takto vnesený fázový posuv pomocí fázoru  $\exp(i\phi)$ , kde  $\phi$  je lineární funkcí času či prostorové souřadnice, jejímž koeficientem je právě nosná frekvence, platí pro intenzitu v bodě P detekční roviny vztah

$$\begin{aligned} I(\mathbf{P}) &= |o(\mathbf{P}) + r(\mathbf{P}) \exp(i\phi)|^2 = \\ &= |o(\mathbf{P})|^2 + |r(\mathbf{P})|^2 + o^*(\mathbf{P})r(\mathbf{P}) \exp(i\phi) + o(\mathbf{P})r^*(\mathbf{P}) \exp(-i\phi), \end{aligned} \quad (39)$$

kde hvězdička označuje komplexní sdružení. Rekonstruovaný signál získáme oddělením posledního členu a současnou eliminací nosné  $\exp(-i\phi)$ . Obě operace se provádějí numericky ve fourierovské oblasti (viz např. [8]).

Hloubková diskriminace nastává při osvětlení prostorově nebo časově nekoherentním světlem. V prvním případě je podmínkou nezávislost nosné frekvence na poloze bodu v ploše zdroje, ve druhém případě její nezávislost na vlnové délce v rozsahu

spektrálního pásma osvětlení. Obě podmínky jsou současně splněny například holografickým konfokálním mikroskopem.<sup>8</sup>

Předpokládejme, že plošný nekoherentní zdroj emituje světlo se spektrální intenzitou  $I(S, k)$ , kde  $S$  je bod zdroje a  $k$  vlnčet. Detekovanou intenzitu lze vypočítat pomocí zobecněného Hopkinsova vztahu [2, str. 534]. Omezíme-li výpočet pouze na poslední člen součtu (39) s eliminovaným fázorem  $\exp(-i\phi)$ , odvodíme pro rekonstruovaný signál výraz

$$\omega(P) = \int_0^\infty \iint_\sigma o(P, S, k) r^*(P, S, k) d\sigma dk, \quad (40)$$

kde  $o(P, S, k)$  označuje amplitudu v bodě  $P$  vybuzenou prostřednictvím předmětové větve myšleným monochromatickým bodovým zdrojem o vlnčet  $k$ , nulové fázi a amplitudě úměrné  $\sqrt{I(S, k)}$ , který je umístěn v bodě  $S$  plošného zdroje (podobně pro  $r$ ). Symbolem  $\sigma$  jsme označili plochu zdroje.

Předpokládáme, že v obou větvích je použito Köhlerova osvětlení, takže polohu myšleného bodového zdroje  $S$  v ohniskové rovině i vlnčet  $k$  jednoznačně udává vlnový vektor  $\mathbf{k}$  rovinné vlny v předmětovém prostoru. Amplitudu myšleného bodového zdroje popisuje funkce  $\sqrt{I(\mathbf{k})}$  a pro úhlové spektrum osvětlení platí vztah (14).

Úhlové spektrum rozptýleného světla v předmětové větvi vypočteme pomocí (16). Rozptylovou funkci dosazujeme ve tvaru (17) s Fourierovou transformací rozptylového potenciálu ve tvaru (38), který respektuje případný posuv  $\mathbf{x}_s$  objektu. V referenční větvi předpokládáme, že svazek prochází volným prostorem nebo je odražen rovinným ideálním odražečem, a pro úhlové spektrum rozptýlené vlny použijeme v obou případech vztah (19).

Amplitudy zobrazení v obou větvích jsou dány vztahem (15). Při úpravě provedeme substituci  $\mathbf{m} = \mathbf{k}' - \mathbf{k}$ . Pro amplitudu zobrazení v předmětové větvi vychází

$$o(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{k}) = \sqrt{I(\mathbf{k})} P(\mathbf{k}) \exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\xi}) \times \\ \times \iiint_{-\infty}^{\infty} P^{(\delta)}[\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m}), k] T_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) T(\mathbf{m}) \exp[2\pi i \mathbf{m} \cdot (\boldsymbol{\xi} - \mathbf{x}_s)] d^3 \mathbf{m}. \quad (41)$$

Pro amplitudu zobrazení v referenční větvi odvodíme za předpokladu rotačně souměrných pupilových funkcí, kdy  $P(-\mathbf{k}) = P(\mathbf{k})$ , vztah

$$r(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{k}) = \sqrt{I(\mathbf{k})} P^2(\mathbf{k}) \exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\xi}). \quad (42)$$

Protože polohu bodového zdroje charakterizujeme směrem vlnového vektoru  $\mathbf{k}$ , budeme při výpočtu amplitudy (40) rekonstruovaného zobrazení integrovat podle jeho složek  $k_x, k_y$  namísto integrace na ploše zdroje. Formálně je přechod mezi souřadnicemi v ohniskové rovině a složkami vlnového vektoru popsán sinovou podmínkou a jakobián transformace je tedy implicitně obsažen ve čtverci pupilové funkce prostřednictvím efektivní apodizace. Integrační proměnnou  $k$  nahradíme proměnnou  $k_z$ , jakobián transformace je roven  $k_z/k$ . Integrovat lze formálně v nekonečných mezích,

neboť integrační obor je omezen nosiči pupilových funkcí. Pro rekonstruovanou amplitudu tím odvodíme vztah ( $\mathbf{x}_G = \boldsymbol{\xi} - \mathbf{x}$ )

$$\omega(\mathbf{x}_G) = \iiint_{\infty} T(\mathbf{m})c(\mathbf{m}) \exp(2\pi i \mathbf{m} \cdot \mathbf{x}_G) d^3 \mathbf{m}, \quad (43)$$

který popisuje koherentní zobrazovací proces s koherentní funkcí přenosu vyjádřenou vztahem

$$\begin{aligned} c(\mathbf{m}) = & \iiint_{\infty} I(\mathbf{k})[P^*(\mathbf{k})]^2 P(\mathbf{k})\mathcal{T}_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) P[\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})] \times \\ & \times \delta \left[ \pm(k_z + s) - \sqrt{k^2 - (k_x + m)^2 - (k_y + n)^2} \right] \frac{k_z}{k} d^3 \mathbf{k}, \end{aligned} \quad (44)$$

přičemž  $\mathbf{m}$  je vektor prostorových frekvencí  $m, n, s$ .

### 3.2 Konvenční konfokální mikroskop

Popišme ideální konfokální mikroskop s bodovými aperturami zdroje a detektoru (viz např. [29, str. 8]). Předmět je pak kriticky osvětlen jediným bodovým zdrojem umístěným na optické ose a úhlové spektrum osvětlení je popsáno vztahem (11). Předpokládáme-li navíc, že zdroj je monochromatický s jednotkovou intenzitou, platí

$$U(\mathbf{k}_t, \mathbf{0}) = P(\mathbf{k}). \quad (45)$$

Spektrum rozptýleného světla vypočteme pomocí vztahu (16) po dosazení rozptylové funkce pozorovaného předmětu ve tvaru (17). Protože předpokládáme použití rastrovací soustavy, dosadíme Fourierovu transformaci rozptylového potenciálu (38) respektující posuv vzorku  $\mathbf{x}_s$ . Zobrazení je detekováno bodovým detektorem umístěným na optické ose. Podle vztahu (15) platí pro amplitudu

$$o(\mathbf{0}, k) = \iiint_{\infty} P(\pm \mathbf{k}') G(\mathbf{k}'_t) d^2 \mathbf{k}'_t. \quad (46)$$

Dosadíme (16), (17) a (45) do (46), převedeme integrace podle  $\mathbf{k}'_t$  na integrace podle  $\mathbf{k}'$  (přitom využijeme monochromatických pupilových funkcí), zavedeme substituci  $\mathbf{m} = \mathbf{k}' - \mathbf{k}$  a vztah upravíme. Amplituda je popsána výrazem pro koherentní zobrazovací proces ( $\mathbf{x}_G = -\mathbf{x}_s$ )

$$o(\mathbf{x}_G) = \iiint_{\infty} T(\mathbf{m})c(\mathbf{m}) \exp(2\pi i \mathbf{m} \cdot \mathbf{x}_G) d^3 \mathbf{m} \quad (47)$$

s koherentní funkcí přenosu vyjádřenou vztahem

$$\begin{aligned} c(\mathbf{m}) = & \iiint_{\infty} \delta(k - k_0) P(\mathbf{k})\mathcal{T}_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) P[\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})] \times \\ & \times \delta \left[ \pm(k_z + s) - \sqrt{k^2 - (k_x + m)^2 - (k_y + n)^2} \right] \frac{k_z}{k} d^3 \mathbf{k}. \end{aligned} \quad (48)$$

Do integrandu jsme doplnili funkci  $\delta(k - k_0)$ , kde  $k_0$  označuje vlnčet osvětlení, a současně jsme doplnili integraci podle vlnčtu  $k$ , kterou jsme převedli na integraci podle  $k_z$  s jakobiánem transformace  $k_z/k$ .

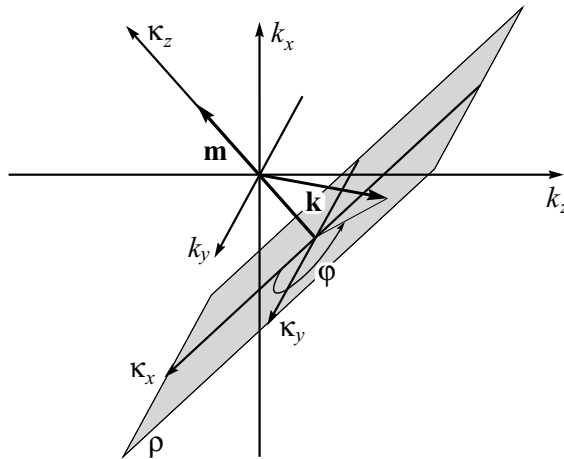
Zobrazení v holografickém a konfokálním mikroskopu jsou po této úpravě popsána identickými vztahy (43) a (47). Funkce přenosu pro holografický mikroskop (44) je vyjádřena obdobným integrálem, jako funkce přenosu pro konfokální mikroskop (48). Integrand však navíc obsahuje člen  $[P^*(\mathbf{k})]^2$  popisující zobrazení referenční větvi a na místě funkce  $\delta(k - k_0)$  stojí spektrální intenzita  $I(\mathbf{k})$ , která může popisovat i spektrálně širokopásmové osvětlení. Zobrazovací proces v holografickém mikroskopu tedy zůstává čistě koherentním nejen při osvětlení plošným nekoherentním zdrojem, ale dokonce i při použití polychromatického osvětlení! Naproti tomu, v konvenčním konfokálním mikroskopu se příspěvky jednotlivých vlnových délek sčítají nekoherentně, v intenzitě, a nelze proto očekávat podstatný rozdíl mezi vlastnostmi monochromatického a polychromatického zobrazení.

## 4 Výpočet koherentní funkce přenosu

### 4.1 Vlastní soustava souřadnic

Funkce delta ve vztazích (44), (48) vyjadřuje předpoklad pružného rozptylu světla ve vzorku, neboť při zadaném  $\mathbf{m}$  omezuje integraci na rovinu v  $k$ -prostoru, na níž je splněna podmínka  $|\mathbf{k} + \mathbf{m}| = k$ . Pro dané  $\mathbf{m}$  odvodíme jemu vlastní kartézskou soustavu souřadnic, jejíž dvě osy budou ležet v rovině integrace.

V triviálním případě  $\mathbf{m} = (0, 0, s)$  a pro odražené světlo, kdy je  $s < 0$ , jde zřejmě o rovinu  $k_z = -s/2$ .



Obrázek 2: Vlastní soustava souřadnic.

V obecnějším případě jde o rovinu  $\rho$  kolmou k vektoru  $\mathbf{m}$  a obsahující bod  $-\mathbf{m}/2$  (viz obr. 2). Předpokládejme  $m > 0, n = 0$ . Pokud jsou pupilové funkce objektivů



rotačně souměrné, bude také funkce přenosu rotačně souměrná a tento předpoklad lze splnit vhodnou volbou souřadnicové soustavy  $O(k_x, k_y, k_z)$ . V opačném případě je nutno při transformaci souřadnicové soustavy otočit také pupilové funkce.

Vlastní soustavu souřadnic  $\kappa_x, \kappa_y, \kappa_z$  definujeme pro vektor  $\mathbf{m}$  vztahy

$$k_x = \frac{s}{\mu}\kappa_x + \frac{m}{\mu}\kappa_z - \frac{m}{2}, \quad k_y = \kappa_y, \quad k_z = -\frac{m}{\mu}\kappa_x + \frac{s}{\mu}\kappa_z - \frac{s}{2}, \quad (49)$$

kde  $\mu = |\mathbf{m}|$ . Protože je transformace složena z otočení a posunutí, je její jakobián roven 1.

Při převodu funkce delta využijeme vztahu

$$\delta[f(\kappa_z)] = \frac{\delta(\kappa_z)}{f'(\kappa_z)|_{\kappa_z=0}} \quad (50)$$

a platí

$$\delta \left[ \pm(k_z + s) - \sqrt{k^2 - (k_x + m)^2 - (k_y + n)^2} \right] = \frac{|k_z + s|}{\mu} \delta(\kappa_z). \quad (51)$$

Po transformaci souřadnic popsané vztahy (49), integraci přes souřadnici  $\kappa_z$  a úpravě mají integrály (44), (48) tvar

$$c(\mathbf{m}) = \mu^{-1} \iint_{\infty} P_{\text{ef}}(\mathbf{k}) \mathcal{T}_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) P[\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})] k_z |k_z + s| k^{-1} d\kappa_x d\kappa_y, \quad (52)$$

kde

$$P_{\text{ef}}(\mathbf{k}) = \begin{cases} I(\mathbf{k}) [P^*(\mathbf{k})]^2 P(\mathbf{k}) & \text{pro holografické mikroskopy,} \\ \delta(k - k_0) P(\mathbf{k}) & \text{pro konfokální mikroskop,} \end{cases} \quad (53)$$

představuje efektivní „pupilovou funkci osvětlovací soustavy“, neboť závisí na vlnovém vektoru  $\mathbf{k}$  osvětlovací vlny. Složky vektoru  $\mathbf{k}$  závisí na integračních proměnných vztahy (49) pro  $\kappa_z = 0$ .

## 4.2 Integrační obor

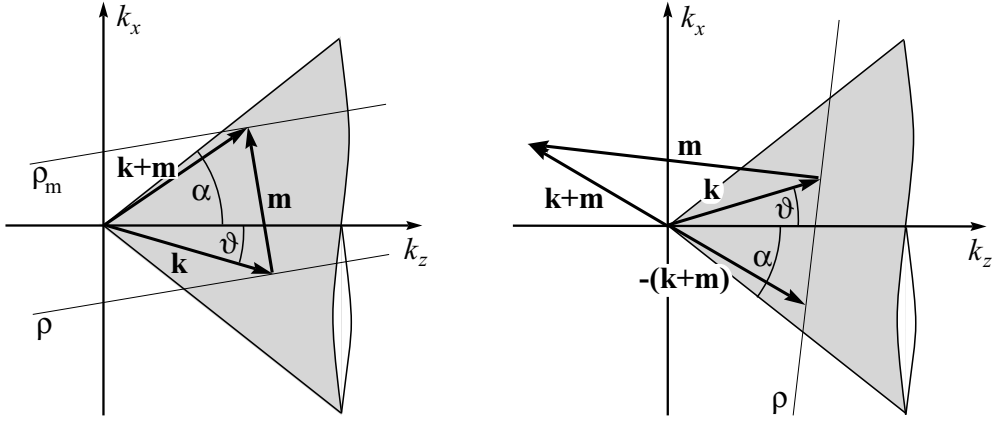
Protože je výhodné integrovat podle vlnočtu  $k$ , převedeme (52) k integračním proměnným  $k, \varphi$  (viz obr. 2), které souvisejí se souřadnicemi  $\kappa_{x,y}$  vztahy

$$\kappa_x = \sqrt{k^2 - (\mu/2)^2} \cos \varphi, \quad \kappa_y = \sqrt{k^2 - (\mu/2)^2} \sin \varphi; \quad (54)$$

jakobián transformace je roven  $k$ .

Ze vztahu (4) vyplývá, že pupilové funkce jsou nenulové, právě když odchylky  $\vartheta$  vektoru  $\mathbf{k}$  osvětlovací vlny, resp. vektoru  $\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})$  rozptýlené vlny od osy  $k_z$  nepřevyšují úhlovou aperturu objektivu  $\alpha$ , tedy platí-li

$$k_z > k \cos \alpha, \quad \text{resp.} \quad \pm(k_z + s) > k \cos \alpha. \quad (55)$$



Obrázek 3: Řez  $k$ -prostorem pro konfiguraci na průchod (vlevo) a na odraz (vpravo). Aperturní funkce  $\mathcal{A}$  a tedy i pupilové funkce  $\mathcal{P}$  jsou nenulové, leží-li vektory  $\mathbf{k}$ ,  $\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})$  uvnitř polokružele zvýrazněného šedě.

Obě podmínky vyjádříme v soustavě souřadnic  $k, \varphi$  prostřednictvím vztahů (49), (54), a tím odvodíme zúžený integrační obor  $K$ , resp.  $F$  integrálu vzhledem k proměnné  $k$ , resp.  $\varphi$ . Pak lze z integrandu vypustit aperturní funkce  $\mathcal{A}$ , což formálně znamená nahradit funkce  $\mathcal{P}$  funkcemi  $\mathcal{P}$  (viz definici (4)). Provedeme-li tutéž záměnu ve vztahu (53), dostaneme funkci  $\mathcal{P}_{\text{ef}}$  a platí

$$c(\mathbf{m}) = \mu^{-1} \int_K \int_F \mathcal{P}_{\text{ef}}(\mathbf{k}) \mathcal{T}_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) \mathcal{P}[\pm(\mathbf{k} + \mathbf{m})] k_z |k_z + s| d\varphi dk. \quad (56)$$

#### 4.2.1 Konfigurace na průchod

Vlnové vektory i vektor rozptylu jsou znázorněny na obrázku 3 vlevo, kde je zakreslen také polokružel, uvnitř kterého platí  $\vartheta < \alpha$ . Koncový bod vektoru  $\mathbf{k}$  leží v rovině  $\rho$ , koncový bod vektoru  $\mathbf{k} + \mathbf{m}$  v rovině  $\rho_m$  posunutá o  $\mathbf{m}$  vůči  $\rho$ . Pokud obě roviny protínají polokružel, tedy v případě, kdy odchylka  $\mathbf{m}$  od osy  $k_x$  není vyšší než  $\alpha$  a platí

$$|s| < m \operatorname{tg} \alpha, \quad (57)$$

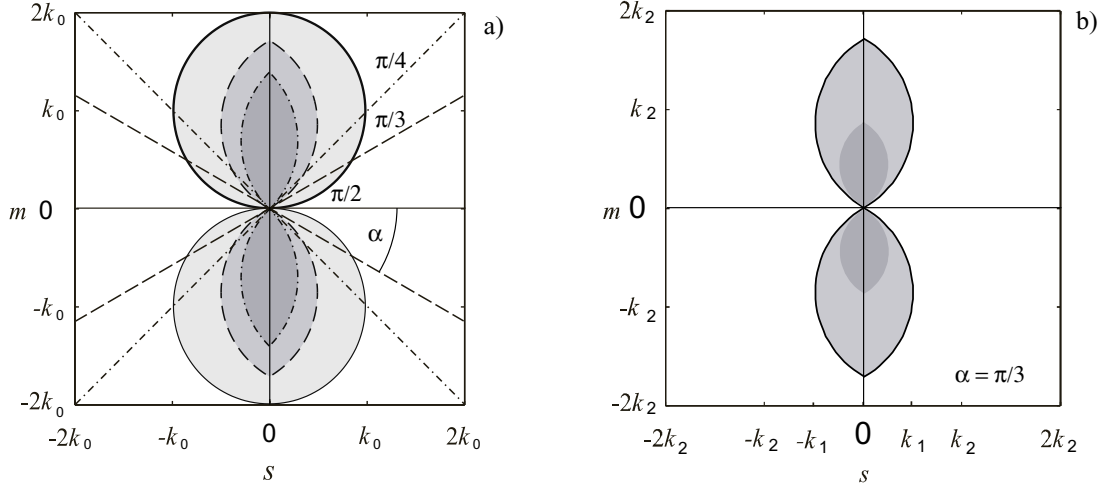
lze obě podmínky (55) splnit pro dostatečně vysoké  $k$  (viz obrázek 3). Aby byly opravdu splněny, musí platit

$$\cos \varphi < \gamma_T = -\frac{\mu |s| + 2k \cos \alpha}{m \sqrt{4k^2 - \mu^2}} < 0. \quad (58)$$

Této nerovnosti lze dosáhnout pro libovolné  $k \in K = (k_{\min}, \infty)$ , kde

$$k_{\min} = \frac{\mu^2}{2} \frac{1}{m \sin \alpha - |s| \cos \alpha}, \quad (59)$$

volbou  $\varphi \in F = (\varphi_0, 2\pi - \varphi_0) \subset (\pi/2, 3\pi/2)$ , kde  $\varphi_0 = \arccos \gamma_T$ . Pro  $k \leq k_{min}$  nelze nerovnosti dosáhnout žádnou volbou  $\varphi$ , neboť  $\gamma_T \leq -1$ , a integrál (56) má nulovou hodnotu.



Obrázek 4: Přenosová pásma s osou  $s$  rotační souměrnosti pro uspořádání na průřehod. Hranice pásem jsou pro vyznačené úhlové apertury  $\alpha$  odlišeny typem čáry. a) Pásma pro monochromatické osvětlení s vlnčetem  $k_0$  jsou (v řezu) ohraničena čtyřmi kruhovými oblouky, pro spektrálně neohraničené osvětlení dvěma přímkami s odchylkou  $\alpha$  od osy  $m$  tečnými k obloukům. b) Pásma pro osvětlení spektrálně omezené na interval vlnčetů  $(k_1, k_2)$ ,  $k_1 = k_2/2$ ,  $\alpha = \pi/3$ . Tmavším odstínem šedé je vyznačeno pásmo pro vlnčet  $k_1$ .

Pro zadaný vlnčet  $k_0$  osvětlení lze ze vztahu (59) odvodit, že nerovnost  $k_0 > k_{min}$  platí pro prostorové frekvence, které vyhovují relaci

$$(m - k_0 \sin \alpha)^2 + (|s| + k_0 \cos \alpha)^2 < k_0^2. \quad (60)$$

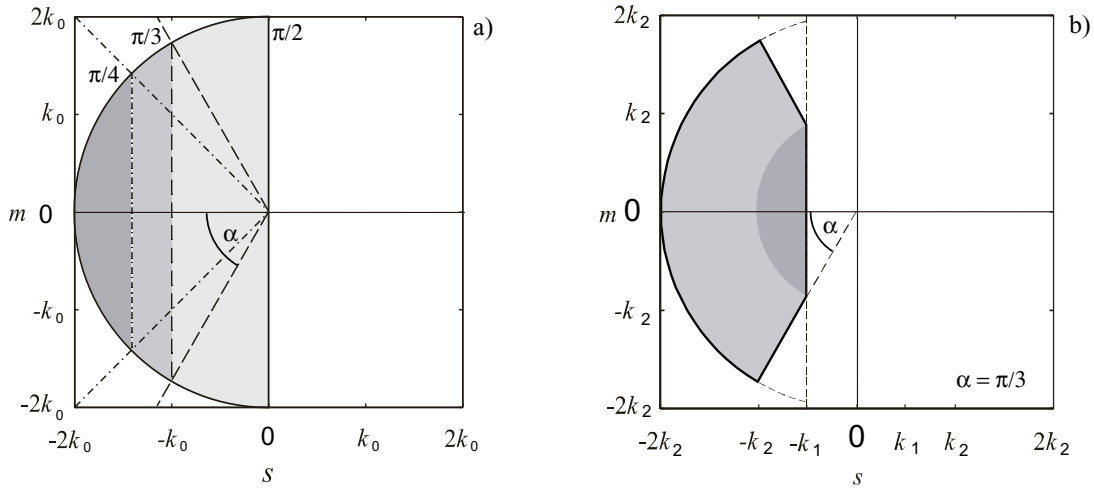
Tato relace definuje přenosové pásmo pro vlnčet  $k_0$  (viz obrázek 4). Při změně vlnčtu se zřejmě nemění tvar přenosového pásma, ale pouze jeho velikost, přičemž pásmo leží vždy uvnitř oblasti (57).

#### 4.2.2 Konfigurace na odraz

Vlnové vektory i vektor rozptylu jsou znázorněny na obrázku 3 vpravo. Koncové body vektorů  $\mathbf{k}$  a  $-(\mathbf{k} + \mathbf{m})$  leží v rovině  $\rho$ , vektor  $-\mathbf{m}$  pŕlí úhel jimi sevřený. Pokud odchylka vektoru  $-\mathbf{m}$  od osy  $k_z$  není vyšší než  $\alpha$ , tedy pokud platí

$$s < -m \cot \alpha, \quad (61)$$

lze zřejmě pro určité hodnoty  $k$  splnit obě podmínky (55). Aby byly splněny, musí



Obrázek 5: Přenosová pásma s osou  $s$  rotační souměrnosti pro uspořádání na odraz. Hranice pásem jsou pro vyznačené úhlové apertury  $\alpha$  odlišeny typem čáry. a) Pásma pro monochromatické osvětlení s vlnčetem  $k_0$  je (v řezu) tvořeno kruhovou úsečí. Pásma pro spektrálně neohraničené osvětlení je ohraničeno polopřímkami s počátečním bodem  $(0, 0)$  procházejícími vrcholy úseče. b) Pásma pro osvětlení spektrálně omezené na interval vlnčetů  $(k_1, k_2)$ ,  $k_1 = k_2/2$ ,  $\alpha = \pi/3$ . Tmavším odstínem šedé je vyznačeno pásma pro vlnčet  $k_1$ .

platit

$$-\gamma_R < \cos \varphi < \gamma_R, \quad \text{kde} \quad \gamma_R = \frac{\mu |s| - 2k \cos \alpha}{m \sqrt{4k^2 - \mu^2}}. \quad (62)$$

Při úpravě jsme vzali v úvahu, že  $s$  může nabývat pouze záporných hodnot. Nerovnost (62) může nastat pro libovolné  $k \in K = (\mu/2, k_{\max})$ , kde

$$k_{\max} = \frac{|s|}{2 \cos \alpha}. \quad (63)$$

Pokud  $k \leq k_1$ , kde

$$k_1 = \frac{\mu^2}{2} \frac{1}{m \sin \alpha + |s| \cos \alpha}, \quad (64)$$

je  $\gamma_R \geq 1$  a podmínka je splněna pro libovolnou hodnotu  $\varphi \in F = (0, 2\pi)$ . Pokud  $k > k_1$ , je podmínka splněna pouze pro  $\varphi \in F = F_1 \cup F_2$ , kde  $F_1 = (\varphi_0, \pi - \varphi_0) \subset (0, \pi)$ ,  $F_2 = (\pi + \varphi_0, 2\pi - \varphi_0) \subset (\pi, 2\pi)$  a kde  $\varphi_0 = \arccos \gamma_R$ . Pro  $k \geq k_{\max}$  nelze podmínku splnit žádnou volbou  $\varphi$ , neboť  $\gamma_R \leq 0$ , a integrál (56) má nulovou hodnotu.

Přenosové pásma pro vlnčet  $k_0$ , které je zobrazené na obrázku 5, je dáno nerovnostmi

$$\mu < 2k_0, \quad |s| > 2k_0 \cos \alpha, \quad (65)$$

přičemž pásma přenosu leží vždy uvnitř oblasti (61).

### 4.3 Aplanatické soustavy

Za předpokladu, že optické soustavy jsou aplanatické a difrakčně limitované, lze definici (53) a integrál (56) dále upravit dosazením vztahu  $\mathcal{P}(\mathbf{k}) = (kk_z)^{-1/2}$ , který vyplývá ze vztahu (4) pro nulovou vlnovou aberaci  $W = 0$ .

#### 4.3.1 Slabě rozptylující vzorek

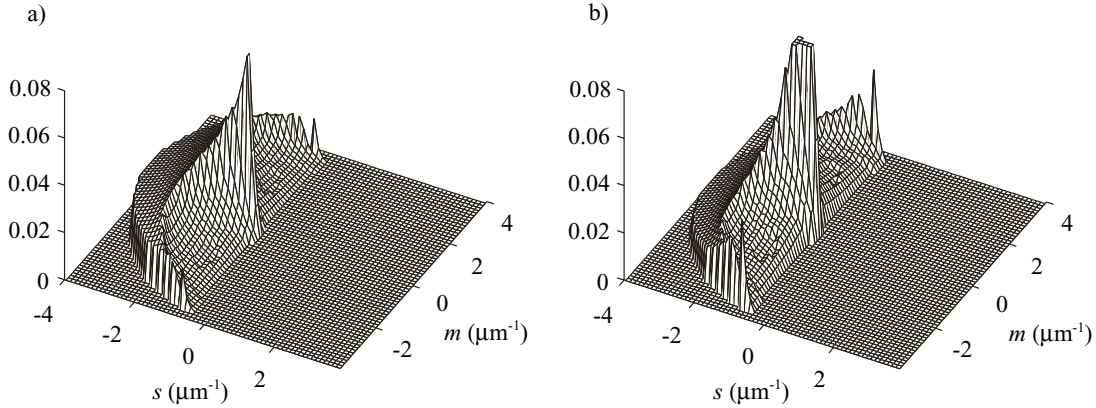
Po popsání úpravě a dosazení funkce  $\mathcal{T}_0(\mathbf{k} + \mathbf{m}) = k/|k_z + s|$  podle vztahu (26) do integrálu (56), a za předpokladu plošně rovnoměrného osvětlení, kdy  $I(\mathbf{k}) = I(k)$ , pro holografické mikroskopy platí

$$c(\mathbf{m}) = \mu^{-1} \int_K \int_F I(k) k^{-1} (k_z |k_z + s|)^{-1/2} d\varphi dk. \quad (66)$$

Pro konfokální mikroskop s monochromatickým osvětlením o vlnočtu  $k_0$  lze (56) integrovat podle  $k$  a platí

$$c(\mathbf{m}) = \mu^{-1} \int_F k_z^{1/2} |k_z + s|^{-1/2} d\varphi \quad \text{pro } k_0 \in K, \quad \text{jinak } c(\mathbf{m}) = 0. \quad (67)$$

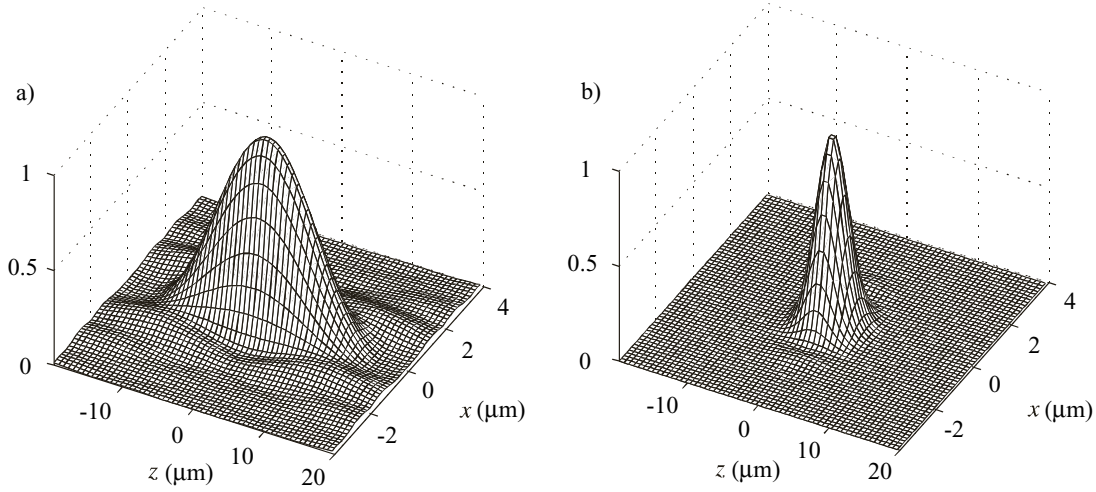
Je zřejmé, že pro monochromatické osvětlení, kdy  $I(k) = \delta(k - k_0)$  lze dokončit také



Obrázek 6: Řez rotačně souměrnou funkcí přenosu vypočtenou pro slabě rozptylující objekt, vlnovou délkou monochromatického osvětlení 547 nm a reflexní konfiguraci a) konfokálního mikroskopu, b) holografického mikroskopu s aplanatickými objektivy o numerické apertuře 0,99 ( $\alpha \approx 82^\circ$ ).

integraci (66) podle  $k$ . Obě funkce přenosu pak mají shodný integrační obor  $F$  a tedy i shodné oblasti nenulových hodnot znázorněné na obrázcích 4 a) a 5 a), liší se pouze tvarem integrandu. Tato odlišnost se projeví odchylkou průběhu funkcí přenosu, jejichž

příklad pro uspořádání na odraz je znázorněn na obrázku 6. Při nízkých hodnotách úhlové apertury ( $NA < 0,5$ ) navíc platí  $k_z \approx k \approx |k_z + s|$ , takže oba integrandy lze aproximovat konstantami a normalizované funkce přenosu pro oba typy mikroskopů považovat za shodné. Rovněž normalizované impulsové odezvy obou typů mikroskopu, které jsou vyjádřeny čtverci modulů amplitud (43), (47) pro  $t(\mathbf{x}) = \delta(\mathbf{x})$  a tedy pro  $T(\mathbf{m}) = 1$ , jsou za uvedených podmínek shodné. Normalizační konstanty, které nejsou ve vztazích uvedeny, odvozujeme na základě požadavku jednotkové hodnoty impulsové odezvy v počátku.



Obrázek 7: Řez rotačně souměrnou impulsovou odezvou pro slabě rozptylující objekt, střední vlnovou délku 547 nm a reflexní konfiguraci holografického mikroskopu s aplanatickými objektivy o numerické apertuře 0,25 ( $\alpha \approx 15^\circ$ ). Výpočet byl proveden pro Gaussovskou spektrální hustotu osvětlení (68) s disperzí a)  $\Delta k = 0,002 \mu\text{m}^{-1}$  ( $\Delta\lambda \approx 10 \text{ nm}$ ,  $L \approx 30 \mu\text{m}$ ), b)  $\Delta k = 0,04 \mu\text{m}^{-1}$  ( $\Delta\lambda \approx 30 \text{ nm}$ ,  $L \approx 10 \mu\text{m}$ ). Znázorněna je intenzita světla.

Podstatně odlišné jsou přenosové vlastnosti holografického mikroskopu uspořádaného na odraz se širokopásmovým osvětlením. Polychromatická funkce přenosu má rozšířenou oblast nenulových hodnot ve směru osy  $s$  (viz obr. 5 b)), takže její šířka odpovídá vyšší úhlové apertuře objektivu a impulsová odezva je tedy v osovém směru užší. Osové rozlišení mikroskopu může být tímto způsobem podstatně zlepšeno oproti úzkopásmovému osvětlení, což je zřejmé z obrázku 7, kde jsou znázorněny impulsové odezvy holografického mikroskopu vypočtené pomocí vztahů (43), (66). Spektrální hustotu osvětlení jsme aproximovali Gaussovou křivkou ve tvaru

$$I(k) = \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{k - k_0}{\Delta k} \right)^2 \right], \quad (68)$$

kde  $k_0$  označuje střední vlnčet osvětlení a  $\Delta k$  jeho disperzi. V popisu obrázku jsou rovněž uvedeny hodnoty pološířky  $\Delta\lambda$  pásma vlnových délek a jí odpovídající hodnoty koherenční délky osvětlení  $L = \lambda_0^2/\Delta\lambda$ . Z obrázku je rovněž patrné, že použití

širokopásmového osvětlení vede k potlačení vedlejších maxim. Výstupní signál tedy obsahuje méně světla rozptýleného mimo předmětovou rovinu a hloubková diskriminace je výraznější.

Při pozorování objemového vzorku širokopásmovým osvětlením může být výsledný interferenční jev porušen vlivem disperze vnitřního prostředí vzorku. Pak je třeba použít osvětlení s užším spektrálním pásmem, nebo disperzi kompenzovat v referenční větvi.

### 4.3.2 Odrazná rovinná plocha

V případě odrazné rovinné plochy platí podle vztahu (32)  $T(\mathbf{m}) = \delta(m)\delta(n)$  a ve výrazech (43), (47), které popisují amplitudu zobrazení, figuruje pouze funkce  $c(0, 0, s)$ . Jsou-li  $m = n = 0$ , pak pro velikost  $\mu$  vektoru  $\mathbf{m}$  platí  $\mu = |s|$ , přičemž  $s < 0$ , a ze vztahu (49) pro  $\kappa_z = 0$  odvozujeme rovnost

$$k_z = |k_z + s| = -\frac{s}{2}, \quad (69)$$

kteřou využijeme při úpravě integrandu (56) pro aplanatické soustavy. Z výsledků odvozených v oddílu 4.2.2 a z uvedených předpokladů dále odvozujeme, že integrační obor  $K = (-s/2, -s/2 \cos \alpha)$ , a protože podle vztahů (63), (64) platí  $k_1 = k_{\max}$ , integrační obor  $F = (0, 2\pi)$ . Integrand ve vztahu (56) na  $\varphi$  nezávisí a integraci podle  $\varphi$  lze tedy dokončit pro libovolné  $k$ . Funkce  $\mathcal{T}_0$  je podle oddílu 2.5.3 rovna úhlové odrazivosti rovinné plochy vyjádřené kupříkladu Fresnelovými koeficienty, takže v případě izotropního odražeče stačí předpokládat její závislost na  $k$  a  $s$ , v případě ideálního odražeče  $\mathcal{T}_0 = 1$ . V takovém případě dojdeme po dosazení a integraci (56) podle  $\varphi$  k výsledku

$$c(0, 0, s) = 2\pi|s|^{-1} \int_{-s/2}^{-s/(2 \cos \alpha)} I(k)k^{-2}dk \quad (70)$$

pro holografický mikroskop. Pro konfokální mikroskop uvažujeme pouze monochromatické osvětlení s vlnčetem  $k_0$  a integraci podle  $k$  odvodíme

$$c(0, 0, s) = \pi k_0^{-1} \quad \text{pro } s \in (-2k_0, -2k_0 \cos \alpha), \quad \text{jinak } c(0, 0, s) = 0. \quad (71)$$

Je-li osvětlení monochromatické, liší se normované funkce přenosu obou typů mikroskopů pouze závislostí na  $s$ . Pro nízké numerické apertury ( $\text{NA} < 0,5$ ), kdy se hodnota  $s^{-1}$  uvnitř přenosového pásma nezmění o více než 15 %, lze přenosovou funkci holografického mikroskopu aproximovat konstantou, takže v normovaném tvaru odpovídá funkci přenosu pro konfokální mikroskop. Normovaná osová komplexní amplitudová odezva pro rovinu definovaná vztahy (43), (47) pro  $T(\mathbf{m}) = \delta(m)\delta(n)$  pak může být v obou případech vypočtena analyticky dosazením (71), integrací podle  $s$  a normalizací výsledného vztahu. Platí

$$\omega(z_G) \approx o(z_G) = \exp[-2\pi i k_0(1 + \cos \alpha)z_G] \text{sinc}[2\pi k_0(1 - \cos \alpha)z_G]. \quad (72)$$

Použili jsme označení  $\text{sinc } x = \sin x/x$ . Přesný vztah pro osovou odezvu holografického mikroskopu, který odvodíme integrací (70) podle  $k$ , dosazením výsledku do (43)

a úpravou, má tvar

$$\omega(z_G) = \frac{1}{\ln(\cos \alpha)} [E_1(4\pi i k_0 z_G) - E_1(4\pi i k_0 \cos \alpha z_G)], \quad (73)$$

v němž symbol  $E_1$  označuje exponenciální integrál definovaný například v [1, str. 228].

Vrátíme-li se k nízkým numerickým aperturám, lze odvodit aproximativní vztah pro osovou odezvu holografického mikroskopu se širokopásmovým osvětlením. Předpokládáme, že spektrální hustota  $I(k)$  je nenulová pouze na intervalu  $(k_1, k_2)$ . Funkci přenosu  $c(0, 0, s)$  aproximujeme nenulovou konstantou uvnitř přenosového pásma, tedy na intervalu  $(-2k_2, -2k_1 \cos \alpha)$  (viz obrázek 5). Vně přenosového pásma je nulová. Integrací (43) s takto aproximovanou funkcí přenosu odvodíme vztah

$$\omega(z_G) \approx \exp[-2\pi i(k_2 + k_1 \cos \alpha)z_G] \operatorname{sinc}[2\pi(k_2 - k_1 \cos \alpha)z_G]. \quad (74)$$

Pološířky hlavních maxim modulů osové odezvy (74) holografického mikroskopu s polychromatickým osvětlením a osové odezvy (72) konfokálního či holografického mikroskopu s monochromatickým osvětlením jsou v poměru

$$\frac{k_0(1 - \cos \alpha)}{k_2 - k_1 \cos \alpha}. \quad (75)$$

V témže poměru jsou také osová rozlišení obou mikroskopů, která jsou úměrna pološířce osové intenzitní odezvy.<sup>14</sup>

Výsledky výpočtu osové odezvy jsou uvedeny v následující kapitole 5 spolu s výsledky jejího měření.

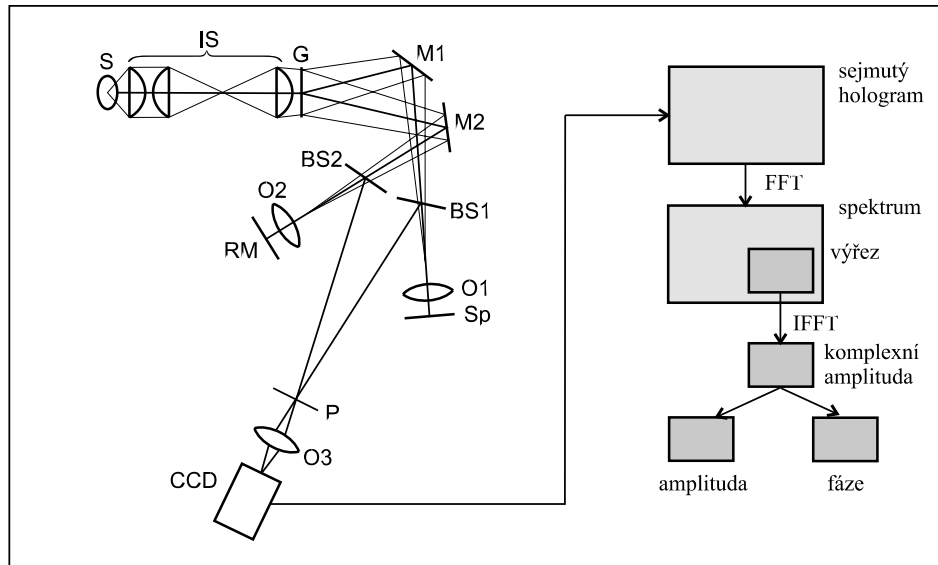
## 5 Experiment

### 5.1 Holografický konfokální mikroskop

Teoretické výsledky byly konfrontovány s experimentem na holografickém konfokálním mikroskopu, který byl navržen a zkonstruován v laboratoři mikroskopie ÚFI FSI VUT v Brně.<sup>6-11</sup> V principu je mikroskop (viz obrázek 8) achromatickým interferometrem s fázovou binární mřížkou G jako děličem svazku. Toto uspořádání umožňuje nekoherentní holografii v bílém světle.<sup>8,17</sup> Konfokální zobrazení optického řezu vzorkem je numericky rekonstruováno z obrazového hologramu s prostorovou nosnou frekvencí, který se vytváří ve výstupní rovině P mikroskopu. Hloubková diskriminace zobrazení je důsledkem prostorové a případně i časové nekoherence použitého osvětlení.

Při experimentech jsme jako spektrálně širokopásmového zdroje využívali halogenové žárovky. Spektrální pásmo bylo v případě potřeby zúženo interferenčním filtrem s maximem propustnosti pro vlnovou délku 547 nm a pološířkou maxima 15 nm. Jako spektrálně úzkopásmový zdroj rovněž sloužila kontinuálně pracující laserová dioda I-Flex 600 se svazkem vevázaným do jednomodového vlákna. Výstupní výkon z vlákna činí 10 mW na vlnové délce 659 nm. Svazek v tomto případě prochází soustavou pevné





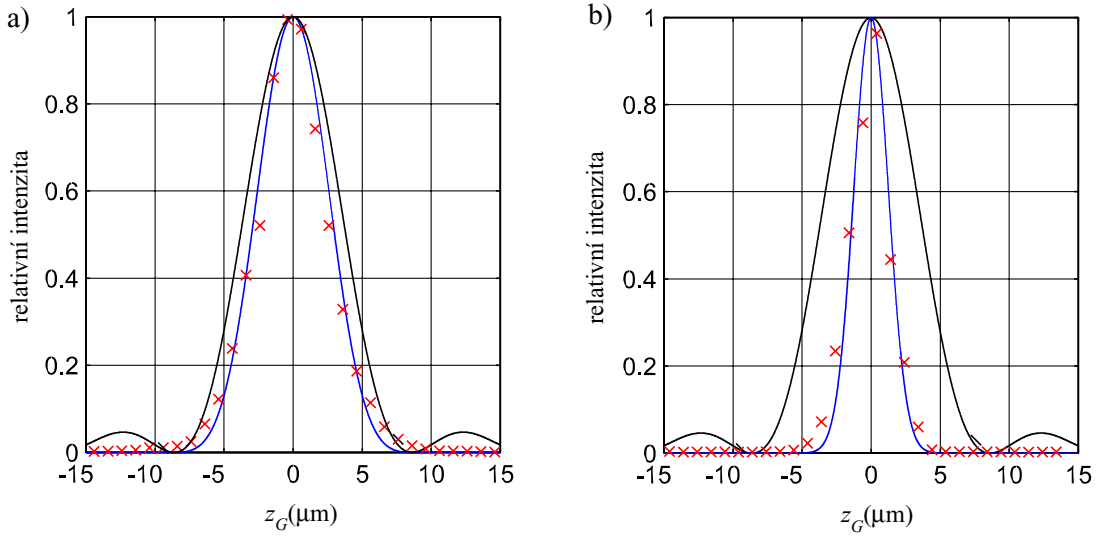
Obrázek 8: Schéma experimentálního uspořádání holografického konfokálního mikroskopu a numerické rekonstrukce zobrazení.

a rotující matnice; vznikající stopa na matnici představuje plošný prostorově nekoherentní zdroj světla S. Osvětlení Köhlerova typu vzniká prostřednictvím osvětlovací soustavy IS a justážních zrcadel M1 a M2 zobrazením zdroje S do ohniskových rovin objektivů O1 a O2. Jde o planachromatické objektivy Nikon 10×/NA=0,25. Vzorek Sp a referenční zrcadlo RM jsou objektivy O1 a O2 a prostřednictvím děličů svazků BS1 a BS2 zobrazeny do výstupní roviny P. V této rovině interferuje předmětový svazek se svazkem referenčním a tím vzniká interferenční struktura obrazového hologramu s nosnou prostorovou frekvencí 300 čar/mm pro každou vlnovou délku osvětlení. Po zvětšení objektivem O3 je registrována televizní kamerou a současně digitální chlazenou kamerou SBIG ST-7. Holografický obrazec je v počítači transformován algoritmem rychlé Fourierovy transformace (FFT). Obrazové spektrum v postranním pásmu je separováno v obdélníkovém výřezu, jehož střed leží v bodě, který odpovídá nosné frekvenci. Separované obrazové spektrum je násobeno Hanningovou vahovou funkcí a transformováno na komplexní obrazovou amplitudu pomocí inverzní FFT (IFFT). Z komplexní amplitudy je nakonec oddělena reálná amplituda (modul) a fáze (argument).

## 5.2 Osová odezva pro rovinný objekt

### 5.2.1 Osová intenzitní odezva

Osová intenzitní odezva holografického mikroskopu pro rovinný objekt charakterizuje jeho schopnost hloubkové diskriminace. Definujeme ji jako závislost druhé mocniny modulu rekonstruované komplexní amplitudy zobrazení  $|\omega|^2$  na rozostření  $z_G$  rovinného objektu. Zajímalo nás především, jak tato charakteristika závisí na šířce spektrálního pásma osvětlení.



Obrázek 9: Teoretická (plná čára) a experimentální (křížky) osová intenzitní odezva holografického konfokálního mikroskopu pro objektivu s numerickou aperturou 0,25, osvětlení se střední vlnovou délkou 547 nm a gaussovskou spektrální hustotou s dispersí a)  $\Delta k = 0,02 \mu\text{m}^{-1}$  ( $\Delta\lambda \approx 15$  nm,  $L \approx 20 \mu\text{m}$ ), b)  $\Delta k = 0,06 \mu\text{m}^{-1}$  ( $\Delta\lambda \approx 42$  nm,  $L \approx 7 \mu\text{m}$ ). Křivka s nejvyšší pološířkou hlavního maxima je teoretickou odezvou pro monochromatické osvětlení o vlnové délce 547 nm.

Při měření osově intenzitní odezvy (viz obrázek 9) byl holografický konfokální mikroskop uspořádán tak, jak je popsáno výše. Zdrojem širokopásmového osvětlení byla halogenová žárovka, zúžení pásma bylo dosaženo aplikací interferenčního filtru. Jako vzorku jsme použili rovinného zrcadla.

Pro výpočet osově odezvy pomocí vztahu (43) s  $T(\mathbf{m}) = \delta(m) \delta(n)$  jsme využili hodnot přenosové funkce  $c(0, 0, s)$  předem vypočtených pomocí vztahu (70). Pro jednoduchost jsme předpokládali gaussovskou závislost spektrální hustoty osvětlení popsanou vztahem (68). V případě úzkopásmového osvětlení jsme volili rozptyl  $\Delta k = 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ , který přibližně odpovídá pološířce  $\Delta\lambda = 15$  nm maxima propustnosti interferenčního filtru. V případě širokopásmového osvětlení byla šířka maxima funkce spektrální hustoty omezena spektrální křivkou mikroskopu, přičemž nejlepší shoda teoretické závislosti s experimentálními daty nastala pro hodnotu  $\Delta k = 0,06 \mu\text{m}^{-1}$ . Teoretické křivky jsou porovnány s naměřenými hodnotami na obrázku 9; v popisu obrázku jsou uvedeny rovněž hodnoty pološířky  $\Delta\lambda$  pásma vlnových délek osvětlení a jí odpovídající hodnoty koherenční délky  $L$ . Z obrázku je zřejmé, že pološířka hlavního maxima je při širokopásmovém osvětlení poloviční oproti osvětlení úzkopásmovému a hloubková diskriminace je podstatně výraznější. Vedlejší maxima jsou potlačena již při úzkopásmovém osvětlení.

Poměr pološířek maxim odezvy vypočtených pro polychromatické a monochromatické osvětlení činí v případě úzkopásmového osvětlení asi 0,7 a v případě širokopásmového osvětlení asi 0,4. Odhad (75) tohoto poměru vypočtený pro  $k_{1,2} = k_0 \mp \Delta k$  má

v prvním případě hodnotu přibližně 0,6 a ve druhém případě 0,3. Srovnání je pouze ilustrační, protože osvětlení s gaussovskou spektrální hustotou nemá ohraničené spektrální pásmo.

### 5.2.2 Osová fázová odezva

Znalost osově fázové odezvy, tedy závislosti fáze  $\Phi$  na rozostření  $z_G$ , je důležitá v profilometrii povrchů, kdy je fázové zobrazení povrchu vzorku převáděno na jeho výškovou mapu. Protože v tomto případě není známa poloha bodu  $z_G = 0$ , je nutno závislost fáze na rozostření aproximovat lineárním vztahem. Ten lze odvodit z aproximace (72) pro oblast hlavního maxima funkce sinc ve tvaru

$$\Phi(z_G) \approx \Phi_A(z_G) = -2\pi k_0(1 + \cos \alpha)z_G. \quad (76)$$

Pokud výškový profil povrchu vypočteme z naměřených hodnot fáze pomocí výše uvedeného aproximativního vztahu, vznikne odchylka  $\Delta z_G(z_G)$ , jejíž velikost lze odhadnout pomocí vztahu

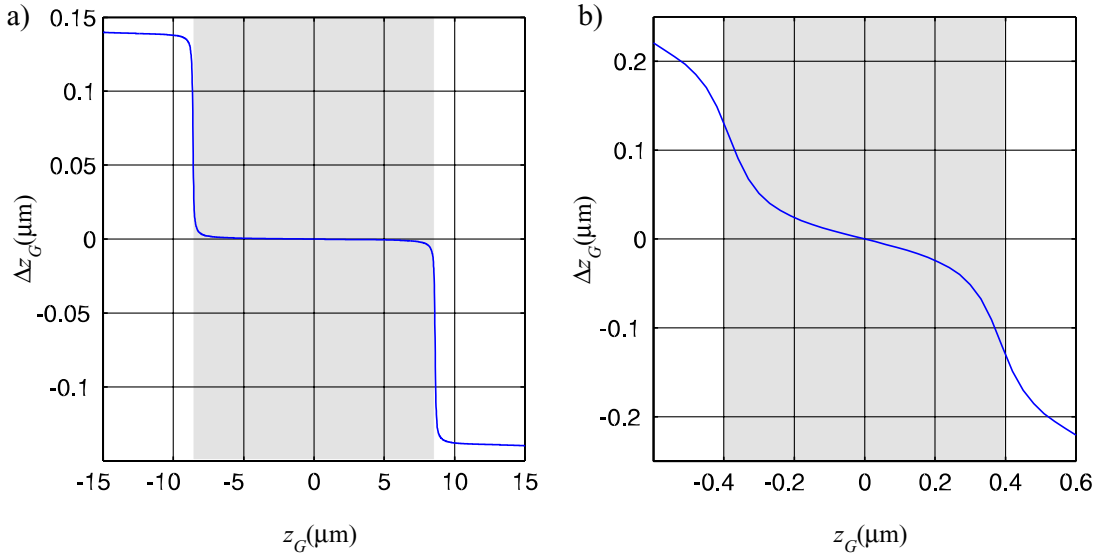
$$\Delta z_G(z_G) \approx \frac{\Phi_A(z_G) - \Phi(z_G)}{2\pi k_0(1 + \cos \alpha)} = \frac{-\Phi(z_G)}{2\pi k_0(1 + \cos \alpha)} - z_G, \quad (77)$$

kde  $\Phi(z_G)$  označuje přesně vypočtené hodnoty fáze. Závislost tohoto odhadu na rozostření je znázorněna na obrázku 10. Přesné hodnoty fázové funkce  $\Phi(z_G)$  jsme vypočetli pomocí vztahu (43) využitím hodnot přenosové funkce předem vypočtených pro ideální odrazeč a pro monochromatické osvětlení pomocí vztahu (70). Z obrázku je zřejmé, že pro nízké numerické apertury objektivů je aproximace použitelná téměř na celé oblasti hlavního maxima intenzity. Pro objektivy s vysokou numerickou aperturou je navržená aproximace nepřesná, avšak závislost fáze zůstává v oblasti maxima intenzity přibližně lineární a konstantu úměrnosti lze stanovit například pomocí kalibračního měření.

## 5.3 Profilometrie povrchů

### 5.3.1 Princip měření

Vysoce přesné měření povrchů pomocí interferenční mikroskopie může selhat v místech se skokovou změnou výšky povrchu, která způsobuje nejednoznačnost naměřené fázové změny. Nejednoznačnost může být eliminována současným měřením povrchového profilu jinou metodou. Lze využít například konfokální mikroskopie, která umožňuje profilometrii povrchů se střední přesností a dává jednoznačné výsledky i v případě skokových změn výšky.<sup>14</sup> Současné měření oběma metodami umožňuje například rastrovací konfokální interferenční mikroskop.<sup>5</sup> Využíváme-li interferenčního jevu při detekci fáze, je výhodné využít jej také pro dosažení konfokálního zobrazení bez rastrovací soustavy klasického konfokálního mikroskopu. Tuto vlastnost mají právě holografické mikroskopy. Byla navržena dvě základní schémata, která nevyužívají rastrovací soustavy: holografická konfokální mikroskopie<sup>7</sup> a mikroskopie s časoprostorovou holografií.<sup>12</sup> V naší laboratoři jsme k profilometrii povrchů využili dříve zmíněné techniky,



Obrázek 10: Odhad závislosti odchytky  $\Delta z_G$  výpočtu výškové souřadnice  $z_G$  pomocí aproximativního vztahu pro fázi (76). Vypočteno pomocí (77) pro monochromatické osvětlení s vlnovou délkou 547 nm a numerickou aperturu objektivů a) 0,25, b) 0,95. Zvýrazněna je oblast hlavního maxima intenzity.

keré k rekonstrukci jednoho optického řezu postačuje pouze jeden snímek kamery, a tak je možné pozorovat optický řez časově kvazispojitě.

Protože jde o holografickou techniku, obsahuje rekonstruované zobrazení přirozeně amplitudovou i fázovou složku. Pomocí vztahu (76) je fázová složka zobrazení převedena na výškovou mapu pozorované oblasti. Nejpřesnější mapu lze vypočíst z fázového zobrazení, které odpovídá nejvyšší hodnotě modulu  $|\omega(z_G)|$  komplexní amplitudy, tedy střední části optického řezu, a to ze dvou důvodů: (1) Na této oblasti poskytuje aproximativní vztah (76) nejpřesnější výsledky a fázová závislost je přibližně lineární dokonce pro objektivy s vysokou numerickou aperturou (viz obrázek 10). (2) Střední kvadratická odchytká měření fáze způsobená šumem je nepřímo úměrná viditelnosti interferenčních proužků<sup>3</sup> a tedy také nepřímo úměrná  $|\omega(z_G)|$ .

Povrch s velkým výškovým rozsahem je proto vhodné měřit v několika optických řezech a výslednou výškovou mapu sestavit z několika fázových map. Vzdálenosti sousedních řezů lze vypočíst z fázového posuvu bodů povrchu, které leží v oblasti vzájemného překryvu obou řezů.

Pokud takový povrch obsahuje oblast uzavřenou čarou skokové změny výšky, může se ve výškové mapě objevit nejednoznačnost  $m\Delta z_G = m\lambda/(1 + \cos \alpha)$ , která má původ v nejednoznačnosti fáze  $m2\pi$ . Neznámé celé číslo  $m$  lze určit nezávislým měřením výškového skoku, které je založeno na schopnosti hloubkové diskriminace mikroskopu. Nezbytného osového rozlišení, které musí být lepší než  $\Delta z_G$ , dosahujeme i bez použití objektivů s vysokou numerickou aperturou, a to pomocí spektrálně širokopásmového osvětlení ve shodě se vztahem (75).

### 5.3.2 Kalibrační měření

Při stálých experimentálních podmínkách a zčásti různých hodnotách  $|\omega(z_G)|$  byla zaregistrována série zobrazení povrchu vysoce kvalitního zrcadla s rovinností  $\lambda/20$ . Na této sérii zobrazení bylo ověřeno, že naměřené hodnoty fáze mají normální rozdělení, a že platí tvrzení o úměrnosti směrodatné odchylky tohoto měření převrácené hodnotě modulu  $|\omega(z_G)|$ . Rovněž jsme odhadli konstantu této úměrnosti a tím jsme získali možnost odhadovat směrodatnou odchylku měření výšky ze známé hodnoty amplitudy zobrazení  $|\omega(z_G)|$ . Uložili jsme mapu nežádoucích fázových posuvů způsobených optickou soustavou, abychom je při pozdějším měření profilu vzorků mohli numericky eliminovat.

### 5.3.3 Měření s jedním optickým řezem

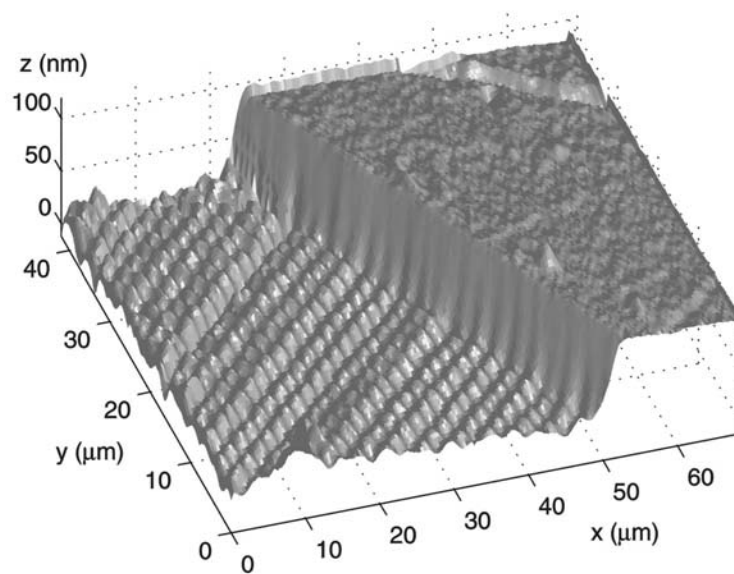
Po elektronově litografické expozici byl do rovinného křemíkového substrátu vyleptán výškový skok o střední velikosti asi 60 nm, která byla změřena pomocí raménkového profilometru Talystep. Pak byl povrch tohoto vzorku změřen pomocí holografického konfokálního mikroskopu ve výše popsané konfiguraci. Zdrojem osvětlení byla v tomto případě laserová dioda I-Flex 600. Hologram byl zaznamenán digitální kamerou SBIG ST-7.

Výšková mapa na obrázku 11 byla konvertována prostřednictvím vztahu (76) z fázového zobrazení povrchu vzorku, které odpovídá maximu  $|\omega(z_G)|$ . V dolní oblasti povrchu je zřejmá mřížková struktura, která vznikla nerovnoměrnou expozicí fotorezistu při přípravě vzorku. Odhad směrodatné odchylky měření způsobené šumem je nižší než 1 nm téměř na celé pozorované oblasti.

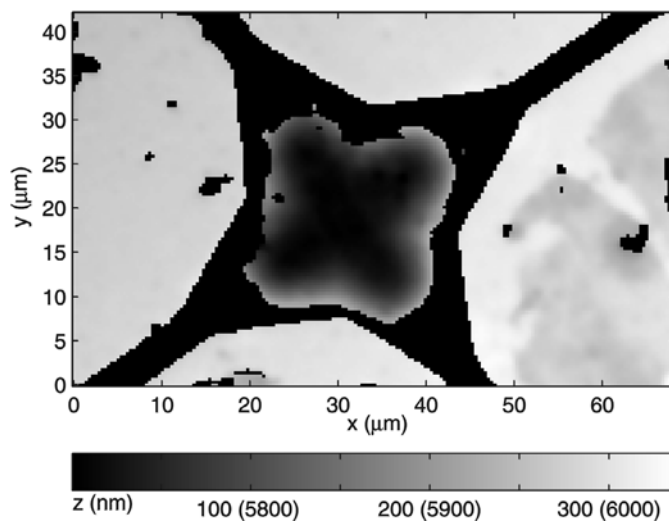
### 5.3.4 Měření s několika optickými řezy

V povrchu rovinného křemíkového substrátu byla vyleptána čtyřčetná hvězda (viz obrázek 12) do hloubky asi 6  $\mu\text{m}$ . Tím vznikl testovací povrch s velkými výškovými skoky, který jsme měřili holografickým konfokálním mikroskopem. Mikroskop měl konfiguraci popsanou v předchozí sekci 5.3.3 s výjimkou osvětlení, které bylo v tomto případě zajištěno halogenovou žárovkou s odnímatelným interferenčním filtrem.

Měření profilu proběhlo ve dvou krocích. Nejdříve byly odděleně změřeny dvě výškové mapy povrchu, jedna v poloze optického řezu odpovídající dolní (na obrázku 12 vnitřní) oblasti, druhá odpovídala horním (vnějším) oblastem pozorovaného pole. Přitom bylo použito postupu popsaného v předcházející sekci 5.3.3. Odhad směrodatné odchylky měření stanovený podle naměřených hodnot modulu  $|\omega(z_G)|$  byl nižší než 1 nm pro dolní oblast a nižší než 2 nm pro horní oblasti. Oblasti s vyššími hodnotami směrodatné odchylky byly vyříznuty z výsledné výškové mapy a na obrázku 12 jsou znázorněny černě. Ve druhém kroku byly obě výškové mapy propojeny. Z fázové mapy odpovídající dolní oblasti byla určena střední vzdálenost  $(143 + m277,85)$  nm mezi hladinami nulové výšky obou fázových map. Hodnota  $m$  pak byla určena nezávislým měřením osového posunutí vzorku mezi body, v nichž byla detekována maximální intenzita zobrazení v dolní a v horní oblasti. Potřebného osového rozlišení jsme dosáhli



Obrázek 11: Profil povrchu vzorku s výškovým skokem vypočtený z fázové složky jediného optického řezu.



Obrázek 12: Výškový profil povrchu vzorku s vyleptanou čtyřčetnou hvězdou znázorněný v odstínech šedé. Profil byl převeden z fázových složek dvou optických řezů. Výškové měřítko pro horní (vnější) oblasti je uvedeno v závorkách.

vyjmutím interferenčního filtru, které vedlo k rozšíření spektrálního pásma osvětlení. Osové posunutí bylo určováno ze středního fázového posuvu všech bodů zobrazení pro střední vlnovou délku širokopásmového osvětlení 508 nm. Tímto měřením byla určena hodnota  $m = 20$  a jí odpovídající výškový rozdíl 5700 nm mezi nulovými hladinami obou výškových map. Při odhadu chyby měření, který leží pod 25 nm, bylo nutno vzít v úvahu také možnou nepřesnost hodnot vlnové délky a efektivní numerické apertury, které byly použity při výpočtu  $\Delta z_G$ . Na obrázku 12 je znázorněna výsledná výšková mapa.

Přesnost měření vzorků s velkými výškovými skoky může být zvýšena přesným stanovením konstanty úměrnosti fáze a výšky, které lze provést měřením kalibračního vzorku s přesně definovaným výškovým rozdílem.

Dvojměrná fázová mapa povrchu vzorku může být rekonstruována téměř v reálném čase. To nám poskytuje možnost měřit rychlé povrchové procesy nebo přesně určovat polohu a sklon vzorku během měření, aniž by bylo nutno používat dodatečných detektorů polohy.

## Shrnutí

Habilitační práce shrnuje autorův přínos v oblasti hloubkově diskriminovaného mikroskopického zobrazení pomocí nekoherentní holografie v reálném čase. Původním způsobem je vypracována teorie zobrazení holografickým mikroskopem s objektivu vysoké numerické apertury. Její základ tvoří teoretický popis osvětlení vzorku a jeho koherentního zobrazení objektivem. Přitom je užito formalismu trojrozměrných pupilových funkcí zavedených v Debyeově a skalární aproximaci. Úhlové spektrum světla rozptýleného polopropustným vzorkem je vyjádřeno zobecněním Wolfovy teorie na obecný tvar vlnoplochy primární vlny. Základ odvození původního vztahu pro amplitudu zobrazení holografickým mikroskopem tvoří zobecněná Hopkinsova formule. Koherentní funkce přenosu holografického a konfokálního mikroskopu jsou odvozeny ve formálně shodném tvaru. K jejich výpočtu je použito nového postupu, který využívá vhodné transformace souřadnic. Výsledky ukazují, že pro monochromatické osvětlení se zobrazení oběma typy mikroskopu téměř neliší. Při spektrálně širokopásmovém osvětlení však má zobrazovací proces v holografickém mikroskopu podstatně odlišné vlastnosti, neboť zůstává i v tomto případě čistě koherentním. Důsledkem je podstatné osové zúžení impulsové odezvy i osové odezvy pro rovinu, které svědčí o zesílení hloubkové diskriminace mikroskopu, a které se podařilo prokázat také experimentálně. Prostřednictvím holografického konfokálního mikroskopu, který byl vyvinut a zkonstruován v rámci této práce, byla experimentálně demonstrována jedna z aplikací holografické mikroskopie — profilometrie povrchů. Konverzí fázové složky zobrazení byla nalezena výšková mapa povrchu testovacího vzorku s chybou měření řádu jednotek nanometrů. Nejednoznačnosti výškové mapy vznikající v místě skokové změny výšky byly odstraněny nezávislým měřením profilu povrchu, které využívá hloubkové diskriminace zobrazení v mikroskopu.

## Summary

The work summarizes the author contribution to the field of depth-discriminated microscopic imaging by means of an incoherent real-time holography. The theory of imaging by a holographic microscope with high-numerical-aperture objectives is developed on the basis of the theoretical description of illumination and coherent imaging by an objective. The formalism of three-dimensional pupil functions introduced in the Debye and scalar approximation is used. The angular spectrum of the light scattered by a semitransparent specimen is expressed by the Wolf theory generalized for arbitrary form of the incident waveform. The original expression for an image amplitude in a holographic microscope is derived on this basis from the generalized Hopkins formula. The coherent transfer functions of both the holographic and confocal microscope are derived in the formally identical form. The new approach to their calculation is used, based on the suitable transform of coordinates. The results of the calculation show that the imaging process of the two types of microscopes is almost equivalent for the monochromatic illumination. However, the imaging process of a holographic microscope remains coherent even for the spectrally broadband illumination, and then it has properties substantially different from those of the conventional confocal microscope. As a consequence, its impulse response and the axial response for a plane are axially contracted, which shows the enhancement of the depth-discrimination property of the microscope, and which was proved also experimentally. By means of the holographic confocal microscope which had been developed and constructed in the frame of this work, the application of a holographic microscopy — a high-resolution surface profilometry — was demonstrated. The height map of the test surface with the measurement error of several nanometers was found by the conversion of its phase image component. The ambiguity of the height map was removed by the independent profile measurement which was performed taking advantage of the depth-discrimination property of the microscope.

## Literatura

- [1] *Handbook of Mathematical Functions* (M. Abramowitz, and I. A. Stegun, Eds.) Dover, New York 1972.
- [2] M. Born, and E. Wolf, *Principles of Optics, 6th Ed.* Cambridge Univ. Press, Cambridge 1998.
- [3] J. W. Goodman, *Statistical Optics.* John Wiley & Sons, New York 1985.
- [4] M. Gu, X. Gan, and C. J. R. Sheppard, “Three-dimensional coherent transfer functions in fiber-optical confocal scanning microscopes”. *J. Opt. Soc. Am. A* **8**, 7 (1991) 1019–1025.
- [5] D. K. Hamilton, and H. J. Matthews, “The confocal interference microscope as a surface profilometer”. *Optik* **71**, (1985) 31–34.
- [6] R. Chmelik, and Z. Harna, “Parallel-Mode Confocal Microscopy” (BiOS Europe’98, Stockholm, Sweden). *Proc. SPIE* **3568**, (1998) 101–109.



- [7] R. Chmelík, and Z. Harna, “Holografická konfokální mikroskopie”. *Jemná mechanika a optika* **43**, 4 (1998) 116–119.
- [8] R. Chmelík, and Z. Harna, “Parallel-Mode Confocal Microscopy”. *Optical Engineering* **38**, (1999) 1635–1639.
- [9] R. Chmelík, and Z. Harna, “Přenos prostorových frekvencí holografickým konfokálním mikroskopem”. *Jemná mechanika a optika* **44**, (1999) 348–351.
- [10] R. Chmelík, and Z. Harna, “Závislost osově odezvy holografického konfokálního mikroskopu na spektrální hustotě osvětlení”. *Jemná mechanika a optika* **46**, 4 (2001) 127–129.
- [11] R. Chmelík, “Holographic Confocal Microscopy” (Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics, XIIth Czech-Slovak-Polish optical conference, Velké Losiny 2000, invited paper). *Proc. SPIE* **4356**, (2001) 118–123.
- [12] G. Indebetouw, and P. Klysubun, “Imaging through scattering media with depth resolution by use of low-coherence gating in spatiotemporal digital holography”. *Optics Letters* **25**, 4 (2000) 212–214.
- [13] D. G. A. Jackson, M. Gu, and C. J. R. Sheppard, “Three-dimensional optical transfer function for circular and annular lenses with spherical aberration and defocus”. *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 6 (1994) 1758–1766.
- [14] H. J. Jordan, M. Wegner, and H. Tiziani, “Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy”. *Measurement Science and Technology* **9**, (1998) 1142–1151.
- [15] R. Juškaitis, M. Neil, and T. Wilson, “Characterising High Quality Objective Lenses”. In *Abstracts of papers presented at Focus on Microscopy 1999*. Heidelberg 1999, 31.
- [16] M. Kempe, W. Rudolph, and E. Welsch, “Comparative study of confocal and heterodyne microscopy for imaging through scattering media”. *J. Opt. Soc. Am. A* **13**, 1 (1996) 46–52.
- [17] E. N. Leith, and G. J. Swanson, “Achromatic interferometers for white light optical processing and holography”. *Appl. Opt.* **19**, (1980) 638–644.
- [18] B. Richards, and E. Wolf, “Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system”. *Proc. R. Soc. Lond. A* **253**, (1959) 358–379.
- [19] C. J. R. Sheppard, and X. Q. Mao, “Three-dimensional imaging in a microscope”. *J. Opt. Soc. Am. A* **6**, 9 (1989) 1260–1269.
- [20] C. J. R. Sheppard, and C. J. Cogswell, “Three-dimensional Imaging in Confocal Microscopy”. In *Confocal Microscopy, 2nd Ed.* (T. Wilson, Ed.) Academic Press, London 1990, 143–169.
- [21] C. J. R. Sheppard, and C. J. Cogswell, “Three-dimensional image formation in confocal microscopy”. *Journal of Microscopy* **159**, Pt. 2 (1990) 179–194.
- [22] C. J. R. Sheppard, M. Gu, and X. Q. Mao, “Three-dimensional coherent transfer function in a reflection-mode confocal scanning microscope”. *Optics Communications* **81**, 5 (1991) 281–284.
- [23] C. J. R. Sheppard, and M. Gu, “The significance of 3-D transfer functions in confocal scanning microscopy”. *Journal of Microscopy* **165**, 3 (1992) 377–390.

- [24] C. J. R. Sheppard, and M. Gu, “Three-dimensional transfer functions for high-aperture systems”. *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 2 (1994) 593–598.
- [25] C. J. R. Sheppard, and K. G. Larkin, “Vectorial pupil functions and vectorial transfer functions”. *Optik* **107**, 2 (1997) 79–87.
- [26] C. J. R. Sheppard, “Vectors and Fourier transforms in optics”. *Optik* **110**, 3 (1999) 157–160.
- [27] J. J. Stamnes, *Waves in Focal Regions*. Adam Hilger, Bristol and Boston 1986.
- [28] N. Streibl, “Three-dimensional imaging by a microscope”. *J. Opt. Soc. Am. A* **2**, 2 (1985) 121–127.
- [29] T. Wilson, “Confocal Microscopy”. In *Confocal Microscopy* (T. Wilson, ed.) Academic Press, London 1990.
- [30] E. Wolf, “Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field”. *Proc. R. Soc. Lond. A* **253**, (1959) 349–357.
- [31] E. Wolf, “Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data”. *Optics Communications* **1**, 4 (1969) 153–156.