

UŽITNÝ VZOR

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008 - 20395**
(22) Přihlášeno: **06.10.2008**
(47) Zapsáno: **08.12.2008**

(11) Číslo dokumentu

19150

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.

G02B 21/18 (2006.01)

G03H 1/06 (2006.01)

(73) Majitel:

Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ

(72) Původce:

Chmelík Radim doc. RNDr. Ph.D., Brno, CZ

Kolman Pavel Ing., Dačice, CZ

(54) Název užitého vzoru:

Holografický mikroskop

CZ 19150 U1

Holografický mikroskop

Oblast techniky

Technické řešení se týká mikroskopu, který s využitím holografického principu umožňuje konfokální zobrazení v procházejícím bílém světle a reálném čase. Podstatné je, že je využito nekoherentního (bílého) světla.

Dosavadní stav techniky

Současné mikroskopy využívající interference světla (interferenční či holografické mikroskopy) s oddělenou předmětovou a referenční větví lze rozdělit do dvou základních skupin, na mikroskopy interferometrické a mikroskopy holografické.

Interferometrické mikroskopy. Svazky interferují pod nulovým nebo téměř nulovým úhlem, takže hustota interferenčních proužků v interferogramu nesplňuje holografickou podmínku. Jelikož automatizované měření OPD (Optical Path Difference) vyžaduje získání úplné informace o předmětové vlně, je nutno zaznamenat alespoň tři snímky s různým fázovým posuvem. Proto tyto interferometry obsahují fázový kompenzátor (v různých podobách) a jsou označovány jako interferometry s řízenou fází (phase-shifting). Časový interval nutný k zaznamenání tří snímků vylučuje možnost zobrazovat rychlé děje. Také proudění v okolním prostředí a vibrace zařízení negativně ovlivňují výsledné zobrazení, protože každý ze tří snímků je zaznamenán za jiných podmínek. Příkladem je komerčně známý Mirauův objektiv, publikovaný v Yamaguchi, I., Zhang, T. 1997, „Phase-shifting digital holography“, Opt. Lett. Vol. 22, No. 16.

Výhodou těchto systémů je možnost použít zcela nekoherentního osvětlení (žárovka, výbojka), které odstraňuje koherenční zrnitost a umožňuje docílit efektu hloubkové diskriminace zobrazení [9], tj. vytvoření optických řezů vzorkem. Nevýhodou je nutnost vícenásobného záznamu.

Holografické mikroskopy. Takto se označují obvykle systémy s prostorovou nosnou frekvencí, tedy systémy využívající interference svazků pod nenulovým úhlem (off-axis holografie). Vznikající interferogramy splňují holografickou podmínku a výsledné zobrazení lze numericky rekonstruovat z jediného digitálního záznamu (hologramu). Aby interference nastala v celém obrazovém poli, je nutno použít koherentní, nebo částečně (prostorově) nekoherentní osvětlení. Technická řešení holografických mikroskopů, které využívají koherentního nebo částečně (prostorově) nekoherentního osvětlení jsou známa například z: Cuche E., Bevilacqua F., Depeursinge Ch. 1999, „Digital holography for quantitative phase-contrast imaging“, Optics Letters, Vol. 24, No. 5; Marquet P., Rappaz B., Magistretti P.J., 2005, „Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with sub-wavelength axial accuracy“, Optics Letters, Vol. 30, No. 5; Kemper B., Langehanenberg P., Bally von G., 2007, „Digital holographic microscopy. A new method for surface analysis and marker-free dynamic life cell imaging“, Optik & photonik, No. 2; Leith E.N., Chien W.-Ch. Mills K.D., Athey B.D., Dilworth D.S., 2003, „Optical sectioning by holographic coherence imaging: a generalized analysis“, J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 20, No., WO2008092107; US2008137933; EPI852890 nebo jako komerčně nabízené digitální holografické mikroskopy firmy Lyncée-Tec (www.lynceetec.com).

Výhodou těchto systémů je získání úplné informace o předmětové vlně z jediného snímku (off-axis holografie). Tudiž jsou vhodné pro pozorování dynamických procesů. Nevýhodou je nutnost použití téměř koherentního osvětlení, která vede k určitému stupni koherenčního zašumění obrazu, kompromisům v oblasti volby zdroje světla a nemožnosti pozorovat vzorky vnořené v rozptýlujícím prostředí, případně vzorky objemového charakteru.

Z CZ 8547 U je znám holografický konfokální mikroskop pro bílé světlo, který umožňuje pozorování vzorku ve vlnové nekoherentním světle, bez toho, že by bylo nutné použít monochromatické světlo a uměle vytvářet jeho prostorovou nekoherenci. Rychlost snímání tak není, oproti konvenčnímu konfokálnímu mikroskopu, omezena žádnou pohyblivou součástí optické soustavy.

Zařízení používá nekoherentní optický zdroj. Svazek paprsků je difraktován v 1. a -1. řádu fázovou difrakční mřížkou do optických větví. Prostřednictvím děliče svazků je optická osa objektivu ztotožněna s optickou osou osvětlovací optické cesty a zároveň s optickou osou zobrazovací optické cesty v každé z optických větví. Kompenzace stranového převrácení barev ve spektrálním rozkladu sekundárních zobrazení zdroje je dosaženo zrcadly a děliči svazku. Frekvenci snímá-
 5 ných konfokálních obrazů tak omezuje pouze rychlost záznamového zařízení a nikoliv optická soustava. Zařízení popsané v CZ 8547 U neumožňuje pozorování objektů přes disperzní prostředí v procházejícím světle.

Cílem předloženého technického řešení je rozšířit možnosti dosavadního stavu techniky.

10 Podstata technického řešení

Cíle předloženého technického řešení bylo dosaženo digitálním holografickým mikroskopem s prostorovou nosnou frekvencí zobrazujícím v procházejícím bílém světle, jehož podstata spočívá v tom, že je použito optické sestavy umožňující použít zcela nekoherentní osvětlení (bílé světlo plošného zdroje) bez nutnosti vícenásobného záznamu obrazu (stačí jediný snímek - hologram).
 15 Zařízení tak umožňuje pozorovat v reálném čase vzorky vnořené v rozptylujícím prostředí (bez použití zabarvení vzorku umělými barvivy) a objekty trojrozměrného charakteru.

Optická sestava je dvousvazkovým interferometrem osazeným zobrazovacími systémy. K dělení svazku je využito difrakční mřížky, čímž dochází k úhlové disperzi světla v pupile osvětlovacích objektivů. Ze zobrazujících objektivů vychází světlo s touž úhlovou disperzí a při dodržení ekvi-
 20 valence osvětlovací a zobrazovací části mikroskopu je možno docílit interference světla různých vlnových délek pod příslušnými úhly. Tím vznikají interferenční proužky téže frekvence pro všechny vlnové délky světla a formují nekoherentní obrazový hologram digitálně zaznamenaný a numericky dále zpracovaný.

Možnosti pozorování vzorku ve skutečně reálném čase bylo dosaženo především použitím off-axis uspořádání interferometru - předmětová a referenční větve se sbíhají pod nenulovým úhlem a vzniklý interferenční obrazec (hologram) splňuje holografickou podmínku. Zlepšení možnosti pozorování vzorků v disperzním prostředí bylo dosaženo především použitím časově a prostoro-
 25 vě nekoherentního zdroje světla a použitím referenčního objektu, který je v referenční větvi optické sestavy uložen ve stejné rovině jako je uložen pozorovaný vzorek v předmětové větvi optické sestavy.
 30

Potlačení násobně rozptýleného světla ve zobrazení bylo dosaženo především použitím světla s nízkou koherencí.

Použití difrakční mřížky je oproti použití prizmatu výhodné, protože pro vznik interferenčního obrazce lokalizovaného ve výstupní rovině není potřeba použít spojovacího členu.

35 Použití soustavy zrcadel umožňuje snadnou obsluhu mikroskopu a zajišťuje kompenzaci stranové inverze barev.

Výhodná provedení technického řešení jsou předmětem závislých nároků na ochranu a jsou blíže popsána v příkladném provedení technického řešení.

Přehled obrázků na výkrese

40 Technické řešení je schematicky znázorněno na výkrese jako schéma optické sestavy sestávající z osvětlovací soustavy, difrakční mřížky, předmětové a referenční větve optické sestavy mikroskopu a ze zobrazovací soustavy (vše obr. 1).

Příkladné provedení technického řešení

Příklad 1

Mikroskop je tvořen jednomřížkovým dvousvazkovým achromatickým interferometrem se čtyřmi shodnými mikroskopovými objektivy, z nichž dva slouží jako kondenzory K1 a K2 a dva jako objektivy O1 a O2 (viz obrázek 1). Vzhledem k použití nekoherentního světla jsou větve interferometru navrženy jako opticky ekvivalentní.

Osvětlovací soustava mikroskopu je tvořena plošným zdrojem světla NZ, který může být současně prostorově i časově nekoherentní (např. halogenovou lampou nebo výbojkou), aperturní clonou proměnné velikosti pro regulaci prostorové koherence osvětlení, výměnnými neutrálními filtry a výměnnými barevnými filtry pro regulaci časové koherence a kolektorovou čočkou C1 zobrazující plošný zdroj do ohniskových rovin kondenzorů K1 a K2. Osa osvětlovací soustavy je sjednocená s osou interferometru.

Osvětlovací soustava přivádí osvětlovací svazek kolmo na difrakční mřížku DM, na níž svazek difraktuje a zrcátka se vybírá 1. a -1. difrakční řád tvořící svazky referenční a předmětové větve. Prostorová frekvence difrakční mřížky je zvolena tak, aby difrakční a interferenční úhly α svazků byly malé. Není tak potřeba použít spojovacího členu a interferenční obrazec je lokalizovaný ve výstupní rovině mikroskopu.

Svazek paprsků předmětové větve je z difrakční mřížky DM zrcadly Z5 a Z6 směřován do osvětlovacího objektivu K2, který plní funkci kondenzoru. Poté svazek paprsků předmětové větve prochází přes pozorovaný předmět P, kterým může být komůrka s buňkami naplněná médiem. Na pozorovaný předmět je zaostřen objektiv O2. Objektiv O2 zobrazí předmět do výstupní roviny mikroskopu pomocí soustavy zrcadel Z7 a Z8.

Svazek paprsků referenční větve je z difrakční mřížky DM zrcadly Z1 a Z2 směřován do osvětlovacího objektivu K1, který plní funkci kondenzoru. Poté svazek paprsků referenční větve prochází přes referenční objekt R, kterým může být komůrka naplněná pouze médiem. Na referenční objekt je zaostřen objektiv O1. Objektiv O1 zobrazí předmět do výstupní roviny mikroskopu pomocí soustavy zrcadel Z3 a Z4.

Soustavy zrcadel Z3, Z4 a Z7, Z8, které přivádějí svazky paprsků z objektivů O1 a O2 do zobrazovací roviny, jsou uspořádány tak, že zobrazovací svazek vycházející z objektivu O2 umístěného na pravé straně od osy interferometru přichází do výstupní roviny z levé strany a zobrazovací svazek vycházející z objektivu O1 umístěného na levé straně od osy interferometru přichází do výstupní roviny z pravé strany. Tímto překřížením předmětové větve s referenční větví dojde ke kompenzaci stranově invertovaného pořadí barev ve spektrálním rozkladu.

Zobrazovací soustava je tvořena objektivem C2 a digitální kamerou DK. Objektiv C2 zobrazuje hologram vzniklý ve výstupní rovině na čip digitální kamery DK. Osa zobrazovací soustavy je sjednocená s osou interferometru.

Zrcadla Z2, Z3, Z6, Z7 jsou naklápěna ve dvou osách a kondenzory K1, K2 jsou posouvány ve směrech kolmých k optické ose, což umožňuje nastavit osvětlující svazek do osy příslušných objektivů a sjednotit zobrazení difrakční mřížky oběma větvemi ve výstupní rovině. Tím je dosaženo splnění podmínky pro interferenci svazků.

Difrakční mřížka DM, soustavy zrcadel Z1, Z2 a Z5, Z6 a kondenzory K1, K2 jsou posuvné ve směru osy interferometru. Tím je možné po ukončení justáže rozostřit zobrazení mřížky v předmětových rovinách kondenzorů K1 a K2.

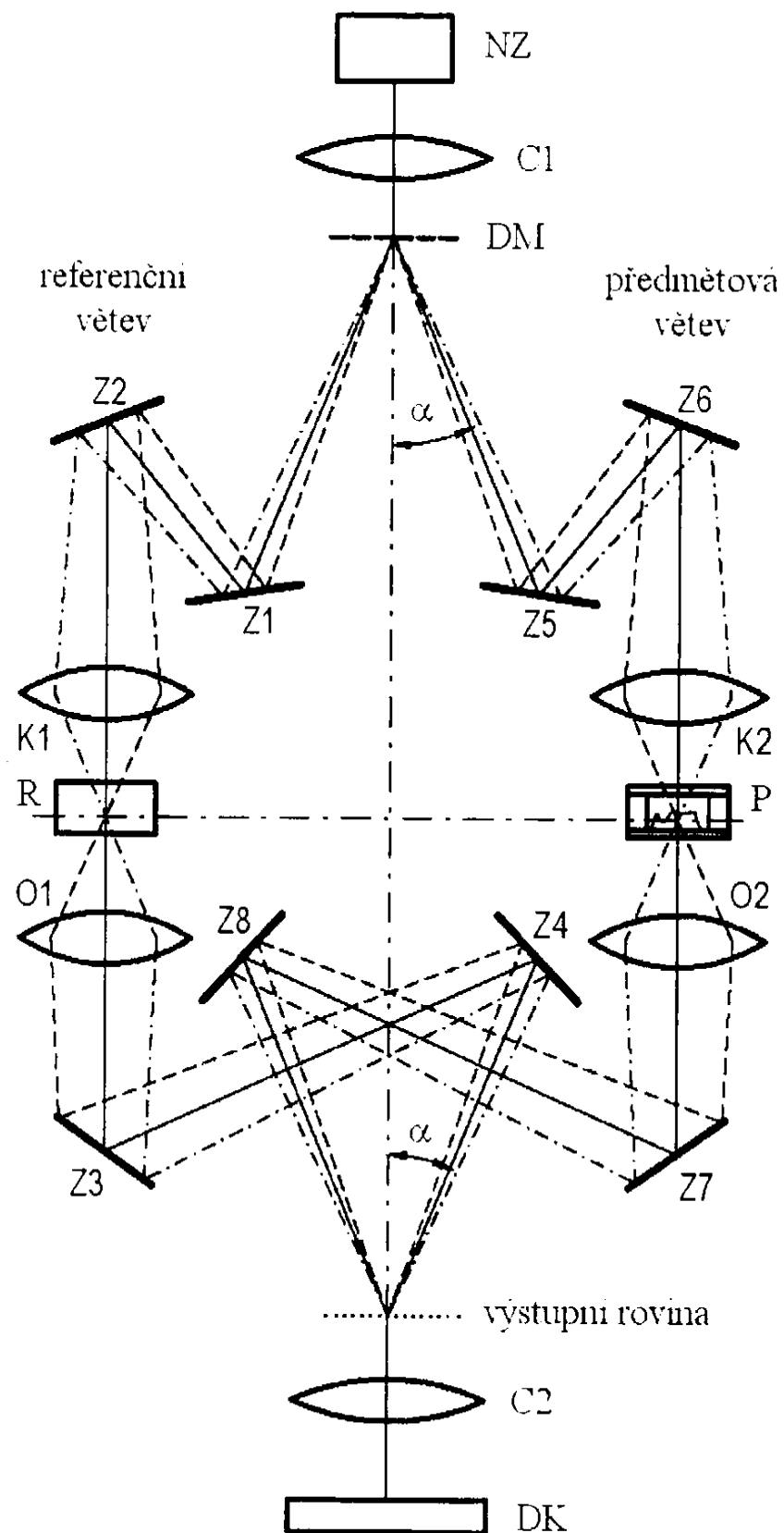
Zrcadlo Z6 a objektiv O2 jsou nezávisle posuvné ve směru osy interferometru pomocí mikrometrických šroubů. Tímto opatřením lze nastavit shodnou optickou délku předmětové a referenční větve mikroskopu.

Průmyslová využitelnost

Základní aplikační oblastí pro holografický mikroskop zobrazující v procházejícím bílém světle je biologie a medicína. Zařízení může být s výhodou použito při pozorování fixovaných i živých buněk a mikroorganismů a jejich reakcí na vnější podněty. Holografický mikroskop zobrazující v procházejícím bílém světle umožňuje s výhodou pozorovat živé buňky v suspenzi v reálném čase. Buňky jsou zviditelněny fázovým zobrazením a není tedy třeba využívat barvení buněk umělými barvivy, která jsou toxická a potlačují přirozené buněčné reakce.

N Á R O K Y N A O C H R A N U

1. Holografický konfokální mikroskop tvořený osvětlovací soustavou, zobrazovací soustavou a dvousvazkovým interferometrem se čtyřmi shodnými mikroskopovými objektivy, z nichž dva slouží jako kondenzory (K1 a K2) a dva jako objektivy (O1 a O2) a se čtyřmi soustavami zrcadel, z nichž dvě soustavy zrcadel (Z1, Z2 a Z5, Z6) slouží pro usměrnění svazku paprsků v osvětlovací části interferometru a dvě soustavy zrcadel (Z3, Z4 a Z7, Z8) slouží pro usměrnění svazku paprsků ve zobrazovací části interferometru, **vyznačující se tím**, že předmětová a referenční větve interferometru jsou navrženy jako opticky ekvivalentní.
2. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zdroj světla (NZ) v osvětlovací soustavě je časově a prostorově nekoherentní.
3. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že referenční objekt (R) se ukládá mezi objektivy (K1 a O1) referenční větve interferometru do stejné roviny jako se ukládá zobrazený objekt (P) mezi objektivy (K2 a O2) předmětové větve interferometru.
4. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že soustavy zrcadel (Z3, Z4 a Z7, Z8) jsou uspořádány tak, že dochází k překřížení svazku paprsků předmětové větve interferometru se svazkem paprsků referenční větve interferometru.
5. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zrcadla (Z2, Z3, Z6, Z7) se dají naklápět ve dvou osách, kondenzory (K1, K2) a objektivy (O1, O2) jsou posuvné ve směrech kolmých k optické ose, a že difrakční mřížka (DM), soustavy zrcadel osvětlovací části mikroskopu (Z1, Z2 a Z5, Z6) a oba kondenzory (K1, K2) jsou posuvné ve směru osy interferometru.
6. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň jedno ze zrcadel (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8) je nezávisle posuvné tak, aby tímto posuvem bylo možné nastavit shodnou délku obou větví interferometru.
7. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden z objektivů (O1, O2, K1, K2) je nezávisle posuvný ve směru optické osy tak, aby bylo možné zobrazit difrakční mřížku (DM) do výstupní roviny nezávisle v obou větvích interferometru.
8. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že děličem svazku paprsků, který vstupuje z osvětlovací soustavy do interferometru, je lineární fázová difrakční mřížka (DM).
9. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že prostorová frekvence difrakční mřížky (DM), která je umístěna jako dělič svazku paprsků vstupujících z osvětlovací soustavy do interferometru, je zvolena tak, aby difrakční úhel (α) byl nabýval hodnot v rozmezí 1,5 až 3,5 stupňů.



Obr. 1

Konec dokumentu