



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

REKONSTRUKČNÍ METODY V HOLOGRAFICKÉ MIKROSKOPII

RECONSTRUCTION METHODS IN HOLOGRAPHIC MICROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Findejsová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

BRNO 2019

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Anna Findejsová

ID: 173564

Ročník: 2

Akademický rok: 2018/19

NÁZEV TÉMATU:

Rekonstrukční metody v holografické mikroskopii

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte a popište princip holografické mikroskopie a zaměřte se především na aplikace v biologii živých buněk. 2) Proveďte rešerši zaměřenou na metody rekonstrukce amplitudové a fázové informace z interferogramů snímaných tzv. off-axis metodou. 3) Vybrané metody implementujte a zaměřte se na zlepšení kvality rekonstrukce. 4) Otestujte metody na dodaných datových sadách. 5) Dále se zaměřte modifikaci metod s cílem zpřesnění a zrychlení rekonstrukčních metod a s cílem rekonstrukce kvantitativní fázové informace za účelem vytvoření 3D reprezentace snímaného vzorku. 6) Navržený přístup aplikujte na dodanou sadu dat, vyhodnoťte a diskutujte dosažené výsledky.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Latychevskaia, T., Fink, H.-W.: Practical algorithms for simulation and reconstruction of digital in-line holograms. Applied Optics, 54(9), pp. 2424–2434, 2015.

[2] Cucho, E. et al.: Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. Applied Optics, 38(34), 6994-7001, 1999.

Termín zadání: 4.2.2019

Termín odevzdání: 17.5.2019

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Diplomová práce se věnuje rekonstrukci obrazů z holografického mikroskopu. Tato práce shrnuje problematiku holografie, popisuje její obecný princip a využití především v biologii živých buněk. Poté se zabývá popisem několika známých metod pro rekonstrukci off-axis hologramů. Teoretické podklady pro práci jsou uvedeny v první až třetí kapitole a následně využity v kapitole čtvrté, která se zabývá návrhem a implementací rekonstrukčního algoritmu, a paté, která shrnuje použité metody a popisuje modifikace metod vedoucích k 3D rekonstrukci pozorovaného objektu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Holografie, biologie živých buněk, holografická mikroskopie, off-axis, rekonstrukce, Matlab

ABSTRACT

This master's thesis focuses on the image reconstruction from holographic microscope. The first part of the thesis summarizes problems of holography, describes its principle and application particularly in live cell biology. In the second part the description of several methods used for off-axis hologram reconstruction is provided. The last part describes the implementation of the basic step in holographic reconstruction – the elimination of autocorrelation and twin image – and then also the reconstruction of 3D information of the sample.

KEYWORDS

Holography, live cell biology, holographic microscopy, off-axis, reconstruction, Matlab

FINDEJSOVÁ, Anna. Rekonstrukční metody v holografické mikroskopii [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-17]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/118357>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Radim Kolář.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Rekonstrukční metody v holografické mikroskopii“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne 17. května 2019

.....

(podpis)

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Radimu Kolářovi, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení, rady a konzultace. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia i tvorby této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala společnosti Tescan Orsay Holding, a. s. za poskytnutí testovacích dat.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	VII
SEZNAM TABULEK	VIII
ÚVOD	9
1 PRINCIP HOLOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE	11
1.1 Obecná definice holografie.....	11
1.1.1 Analogová holografie.....	11
1.1.2 Digitální holografie.....	12
1.2 Digitální holografická mikroskopie.....	12
1.2.1 Konfigurace DHM.....	13
1.2.1.1 In-line DHM.....	14
1.2.1.2 Off-axis DHM.....	15
2 APLIKACE V BIOLOGII ŽIVÝCH BUNĚK	16
2.1 3D mikroskopie a tomografie.....	16
2.1.1 Tomografická průtoková cytometrie.....	16
2.1.2 Holografická biometrie.....	16
2.2 Laserové manipulace s buňkami.....	17
2.2.1 Laserová mikrochirurgie buněk.....	17
2.2.2 Charakterizace optického tlaku a zachytávání.....	19
2.3 Analýza rakovinných buněk pomocí DHM.....	19
2.3.1 3D analýza migrace rakovinných buněk.....	19
2.3.2 Zobrazení růstu a odpovědi na léčbu v 3D modelech nádorů.....	20
3 REKONSTRUKČNÍ METODY	21
3.1 Základy Fresnelovy holografie.....	21
3.2 Rekonstrukce digitálních hologramů.....	22
3.2.1 Algoritmus jedné FFT.....	24
3.2.2 Přístupy na bázi konvoluce.....	24
3.2.2.1 Algoritmus tří FFT.....	25
3.2.2.2 Propagace úhlového spektra.....	25
3.2.3 Algoritmy s nastavitelným zvětšením.....	26
3.2.3.1 Metoda digitální kvadratické čočky.....	26
3.2.3.2 Fresnelova-Bluesteinova transformace.....	27

3.2.3.3	Aliases a repliky	28
3.2.4	Fresnelet dekompozice	28
3.2.5	Algoritmy založené na fázovém posunu	29
3.2.5.1	Complex wave retrieval (CWR) algoritmus	29
3.2.5.2	Rozbalení fáze	29
4	IMPLEMENTACE	30
4.1	MATLAB®	30
4.2	Struktura algoritmu	31
4.3	Proces rekonstrukce	32
5	MODIFIKACE METODY	35
5.1	Výběr spektra	35
5.2	Algoritmy pro rozbalení fáze	36
5.2.1	Funkce „unwrap“	36
5.2.2	Algoritmus pro rychlé rozbalení 2D fáze (2D-SRNCP)	37
5.2.3	Porovnání algoritmů	40
5.3	Aproximace pozadí	41
5.3.1	Polynomiální aproximace	41
5.3.2	Odečtení fázového obrazu autokorelační složky spektra	42
5.3.3	Porovnání metod z hlediska kontrastu a kvality	43
5.4	Rekonstrukce 3D informace	49
5.4.1	Implementace algoritmů	50
	ZÁVĚR	54
	SEZNAM LITERATURY	56
	SEZNAM ZKRATEK	59
	SEZNAM PŘÍLOH	60

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma optického záznamu a rekonstrukce hologramu [5]	11
Obrázek 2: Schéma nahrávání digitálního hologramu [8].....	13
Obrázek 3: Rekonstrukce digitálního hologramu [8].....	13
Obrázek 4: Schéma in-line DHM [4, 9]	14
Obrázek 5: Schéma off-axis DHM [4, 9]	15
Obrázek 6: Otisk prstu sejmutý pomocí fázové digitální holografie; (vlevo) amplituda; (vpravo) fáze [10].....	17
Obrázek 7: Kvantitativní fázové obrazy červených krvinek před a po řezání laserovými nůžkami [13].....	18
Obrázek 8: (a) Kvantitativní fázové obrazy v průběhu operace; (b) Rozdílové fázové obrazy vzhledem k počátečnímu obrazu [13]	18
Obrázek 9: Snímky kvantitativně rekonstruované fáze [20]	20
Obrázek 10: (a) Nahrávání hologramu v konfiguraci off-axis, (b) prostorová frekvenční reprezentace hologramu [14].....	22
Obrázek 11: Schéma úhlového pojetí procesu rekonstrukce [14].....	26
Obrázek 12: Schéma anti-aliasingové procedury [14]	28
Obrázek 13: Schéma implementovaného algoritmu	31
Obrázek 14: Původní hologram.....	32
Obrázek 15: Spektrum hologramu	33
Obrázek 16: Extrahovaná rozbalená fáze	34
Obrázek 17: Rekonstruovaná amplituda	34
Obrázek 18: Kruhový výřez spektra.....	36
Obrázek 19: Výpočet druhých diferencí v obraze [25]	37
Obrázek 20: (vlevo) Fáze rozbalená pomocí funkce unwrap; (vpravo) Fáze rozbalená pomocí algoritmu Fast 2D phase unwrapping.....	40
Obrázek 21: (vlevo) Snímek bez korekce; (uprostřed) Snímek pozadí; (vpravo) Fázový obraz po odečtení pozadí.....	41
Obrázek 22: Přiblížení konkrétní buňky	42
Obrázek 23: (vlevo) Snímek bez korekce; (uprostřed) Snímek pozadí; (vpravo) Fázový obraz po odečtení pozadí.....	42
Obrázek 24: Přiblížení konkrétní buňky	43
Obrázek 25: Snímek s číselným označením buněk pro měření kontrastu.....	45
Obrázek 26: Porovnání jasových profilů obrazů.....	46
Obrázek 27: Porovnání přiblížených oblastí z obrazů	47
Obrázek 28: Snímky před a po korekci skokových hodnot	48
Obrázek 29: Schéma 3D rekonstrukce	49
Obrázek 30: Původní hologramy.....	50
Obrázek 31: Rekonstruované hologramy pro (vlevo a vpravo): $z = 0.004$ m; (uprostřed): $z = 0.4$ m.....	51
Obrázek 32: Rekonstruované hologramy pro (vlevo a vpravo): $z = 0.0055$ m; (uprostřed): $z = 0.55$ m.....	51

Obrázek 33: Diferenční snímky	52
Obrázek 34: Rekonstruované snímky: (vlevo) $z = 0.005$ m, velikost pixelu = 0,0017 mm; (vpravo) $z = 0.004$ m, velikost pixelu = 0.0014 mm.....	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vypočtené hodnoty Weberova kontrastu pro porovnání vybraných metod	44
Tabulka 2: Vypočtené hodnoty Michelsonova kontrastu pro porovnání vybraných metod	45
Tabulka 3: Hodnoty parametrů potřebných pro 3D rekonstrukci	50

ÚVOD

Fyzik Dennis Gabor vynalezl holografii v roce 1948 jako metodu pro záznam a rekonstrukci amplitudy a fáze vlnového pole. Slovo holografie je odvozeno z řeckého slova "holos", které se dá přeložit jako "celý", a "graphein", což znamená "psát".

Digitální holografie je novou technologií v obecných zobrazovacích aplikacích. Nahrazením fotochemických postupů konvenční holografie elektronickým zobrazováním se otevírají dveře širokému spektru nových možností. Ačkoli mnoho pozoruhodných vlastností holografie bylo známo po celá desetiletí, jejich praktické aplikace byly doposud omezené.

V digitální holografii je holografický interferenční obrazec opticky generován superpozicí objektových a referenčních paprsků, která je digitálně vzorkována CCD kamerou a přenesena do počítače jako řada čísel. Šíření optických polí je zcela a přesně popsáno difrakční teorií, která umožňuje numerickou rekonstrukci obrazu jako pole komplexních čísel představujících amplitudu a fázi optického pole.

Digitální holografie nabízí řadu významných výhod, jako je schopnost získat hologramy rychle, dostupnost úplné amplitudové a fázové informace o optickém poli a všestrannost interferometrických technik a metod zpracování obrazu. Digitální holografie pomocí numerické difrakce optických polí umožňuje zobrazovací a obrazové zpracování, které je obtížné nebo neproveditelné v holografii v reálném prostoru.

Digitální holografická mikroskopie je digitální holografická zobrazovací technika s vysokým rozlišením a schopností kvantifikace buněčného stavu bez barvení nebo značení buněk. Z konkrétního hologramu mohou být vizualizovány a vypočteny různé buněčné parametry, včetně individuální buněčné oblasti, tloušťky, objemu a toku populace a počtu buněk. Jednou z výhod studia buněk pomocí digitální holografické mikroskopie je to, že buňky mohou být pěstovány a analyzovány v normálním růstovém médiu během celé studie. [2, 3]

Cílem této práce je pochopení, volba a implementace vhodného algoritmu pro rekonstrukci digitálních hologramů. K tomu je nutné se seznámit především s obecnými principy digitální holografie, digitální holografické mikroskopie a vlastnostmi jejich různých konfigurací, jež jsou popsány v první části práce.

V druhé kapitole této práce, která popisuje aplikace holografie a holografické mikroskopie v biologii živých buněk, byly vybrány především metody, které jsou velmi přínosné jak pro výzkum, tak diagnostiku.

Ve třetí části práce jsou popsány nejběžnější rekonstrukční metody hologramů získaných pomocí off-axis konfigurace holografického mikroskopu. Na tuto kapitolu navazuje čtvrtá i pátá část práce, které jsou zaměřeny na implementaci zvoleného rekonstrukčního algoritmu v programovacím prostředí Matlab, jeho strukturu a detailní popis. Nejprve je rekonstruována pouze fázová informace, která poskytuje okamžitý náhled na pozorované objekty či buňky. Následně se práce zaměřuje na rekonstrukci 3D informace o pozorovaném objektu, která je důležitá především pro analýzu stavu buněk a jejich populace, dále také pohybu buněk v rámci experimentu a v neposlední řadě například odpovědi rakovinných buněk na léčbu.

1 PRINCIP HOLOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE

1.1 Obecná definice holografie

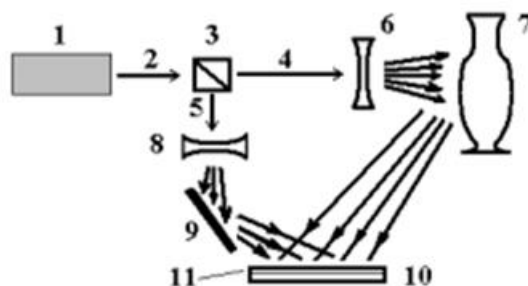
Holografie je technika, která se zabývá interferencí a difrakcí viditelného světla za účelem záznamu informací o objektech do amplitudových nebo fázových hologramů na holografickém materiálu a rekonstrukci vedoucí k vizualizaci pozorovaného objektu. [1]

Holografie je založena na záznamu fázové informace světelné vlny. Objekt je osvětlen koherentním referenčním paprskem – laserem. Světlo rozptýlené objektem interferuje s tímto referenčním světlem a vytváří interferenční vzor na fotosenzitivní desce, tzv. hologram. Kromě informace o intenzitě světla je tedy zaznamenávána i fázová informace, což je rozdíl oproti běžnému záznamu např. fotografií. Intenzita každého bodu na zaznamenaném interferenčním vzoru je tedy závislá jak na amplitudě, tak i na fázi původního objektového paprsku. [2]

Hologram je tedy záznam interferenčního vzoru ve dvou- nebo třírozměrném prostředí vytvořený tak, že bodový zdroj světla (referenční paprsek) s pevnou vlnovou délkou narazí na světlo stejné fixní vlnové délky přicházející z objektu (objektový paprsek). Zaznamenaný obraz tedy nese informaci o fázi, která ovšem není přímo zobrazena. Je tedy třeba provést další kroky vedoucí k zobrazení a rekonstrukci těchto informací. Potřebné metody budou popsány v dalších kapitolách. [3] [4]

1.1.1 Analogová holografie

Analogové (optické) nastavení pro proces záznamu hologramu zahrnuje zdroj koherentního světla, optické destičky, záznamové médium a optické mechaniky. Záznamová média by měla mít dostatečné rozlišení, např. může být použita emulzní vrstva halogenidu stříbrného nebo vrstva fotorezistu na skleněné desce.



Obrázek 1: Schéma optického záznamu a rekonstrukce hologramu [5]

Na snímku (Obrázek 1) je znázorněno principiální optické schéma pro záznam a rekonstrukci hologramu. Dělič paprsku (3) je použit k rozdělení primárního laserového paprsku (2) do dvou ramen: objektový paprsek (4) a referenční paprsek (5). Objektový paprsek prosvítí objekt (7) přes konkávní čočky (6). Rozšířený referenční paprsek je nasměrován zrcadlem (9) na tenkou fotosenzitivní vrstvu (11) umístěnou na povrchu skleněné desky (10). Světlo odražené a rozptýlené z povrchu objektu se překrývá s referenčním svazkem na povrchu vrstvy. Tam je po vhodné zvolené dobu nahráván vzorec interference referenčního paprsku a rozptýlené světlo. Po vývoji v kapalné vývojce je deska vysušena na vzduchu a tím je dokončena tvorba hologramu. [5]

1.1.2 Digitální holografie

Digitální holografie nyní převážně nahrazuje konvenční holografii a existuje významný počet publikací týkajících se numerické rekonstrukce digitálních hologramů. Díky nedávnému vývoji CCD kamer je nyní možné nahrávat hologramy v reálném čase. Již několik let je známo, že 3D umístění částic nebo vláken může být přesně určeno numerickou rekonstrukcí hologramů, které jsou přímo zaznamenány kamerou.

Digitální holografie se aplikuje na rekonstrukci malých částic v rovině, jejíž orientace je libovolná – specifikovaná uživatelem. Difrakční vzorek vytvářený částicemi je přímo zaznamenán konvenční CCD kamerou. Digitálně zaznamenaný obraz umožňuje rekonstrukci obrazů částic v několika zkoumaných paralelních rovinách. Poté je přidán pevný průzkumný řez odpovídající tenké vrstvě okolo teoretické libovolné nakloněné roviny. Pixely, jejichž 3D souřadnice patří tomuto řezu, jsou vybrány a umístěny vedle sebe pro obnovu obrazů částic. [6]

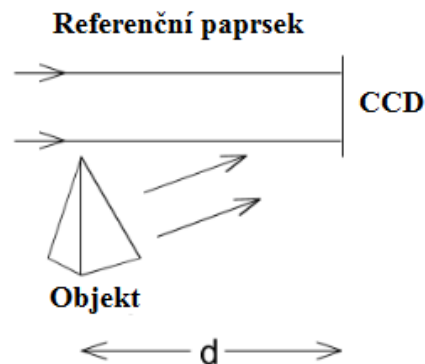
1.2 Digitální holografická mikroskopie

Digitální holografická mikroskopie (DHM) poskytuje kvantitativní zobrazování fázových kontrastů, které je vhodné jak pro zkoumání vysokých rozlišovacích schopností na reflexních plochách, tak pro analýzu živých buněk bez markerů.

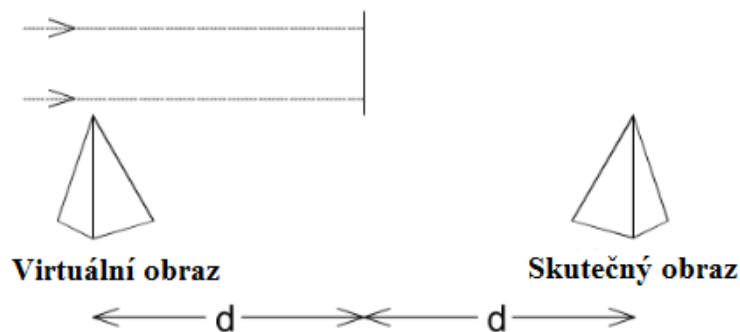
Digitální holografie je založena na klasickém holografickém principu s tím rozdílem, že holografické nahrávání je prováděno digitálním obrazovým snímačem, např. CCD nebo CMOS kamerou. Následná rekonstrukce holografického obrazu obsahujícího informace o objektovém svazku se provádí numericky za pomoci počítače. [7]

Koncept nahrávání digitálního hologramu je znázorněn na schématu (viz Obrázek 2). Referenční a objektový paprsek interferují na povrchu CCD snímače. Výsledný hologram je elektronicky nahrán a uložen. Objekt je obecně 3D tělo s difuzně odrazivým povrchem nacházející se ve vzdálenosti d od CCD.

Při optické rekonstrukci se virtuální obraz objevuje na pozici původního objektu a reálný obraz se vytváří ve vzdálenosti d , ale v opačném směru od CCD (viz Obrázek 3). Difrakční vzorec je vypočítán ve vzdálenosti d za CCD rovinou, což znamená, že dochází k rekonstrukci komplexní amplitudy v rovině skutečného obrazu. [8]



Obrázek 2: Schéma nahrávání digitálního hologramu [8]



Obrázek 3: Rekonstrukce digitálního hologramu [8]

1.2.1 Konfigurace DHM

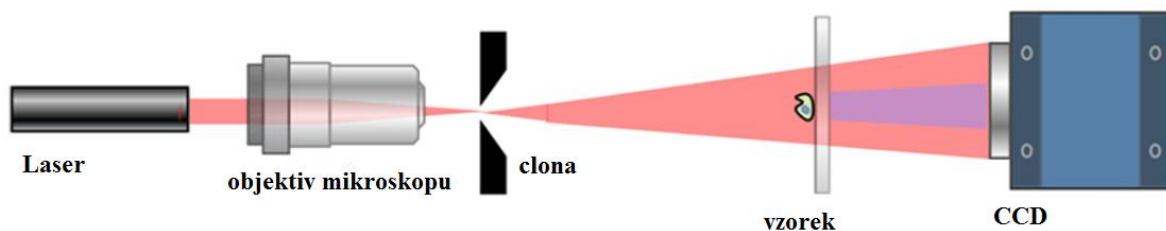
Základní nastavení DHM se skládá ze zdroje světla, interferometru, digitalizační kamery a počítače s potřebnými programy. Nejčastěji se používá laser pro osvětlování s potřebnou koherencí pro vytváření interference. Pro techniky s vícenásobnou vlnovou délkou mohou být do interferometru připojeny dva nebo více různých laserů nebo lze použít laditelný laser. Existují také techniky s nízkou koherencí za účelem snížení šumu a rušivého interferenčního šumu nebo vytváření obrysových nebo tomografických obrazů. Dokonce i LED má obvykle délku koherence cca $30 \mu\text{m}$, což může postačovat pro holografickou mikroskopii. [9]

V následujících kapitolách budou pro přehled popsány jednotlivé konfigurace DHM a následně jejich využití.

1.2.1.1 In-line DHM

Obecně je uváděno, že v in-line holografii sdílí referenční a objektový paprsek stejnou optickou osu. Obvykle je experiment prováděn následovně: vlna prochází objektem umístěným v pozicích v rovině. Část vlny je rozptýlena objektem, čímž vzniká objektová vlna O, a neskrytá část vlny tvoří referenční vlnu R. Obě vlny interferují za objektem a interferenční vzor zaznamenaný v určité vzdálenosti se nazývá hologram. [15]

In-line DHM je typ mikroskopie bez objektivů, a jak je znázorněno na níže uvedeném snímku (Obrázek 4), jediný světelný paprsek směřující na díрку o průměru řádově v rozmezí vlnové délky osvětluje objekt umístěný obvykle několik tisíc vlnových délek od dírky. Objektový paprsek je částí dopadajícího světla, které je objektem rozptýleno, a neporušený zbytek světla je považován za referenční paprsek. Pokud je světelný zdroj koherentní, dírka není nezbytná. Objektové pole je automaticky zarovnáno s referenčním paprskem a interference objektového a referenčního paprsku vede k holografickému difrakčnímu vzoru, který je zaznamenán kamerou CCD a poté přenesen do počítače pro numerickou rekonstrukci. [9]



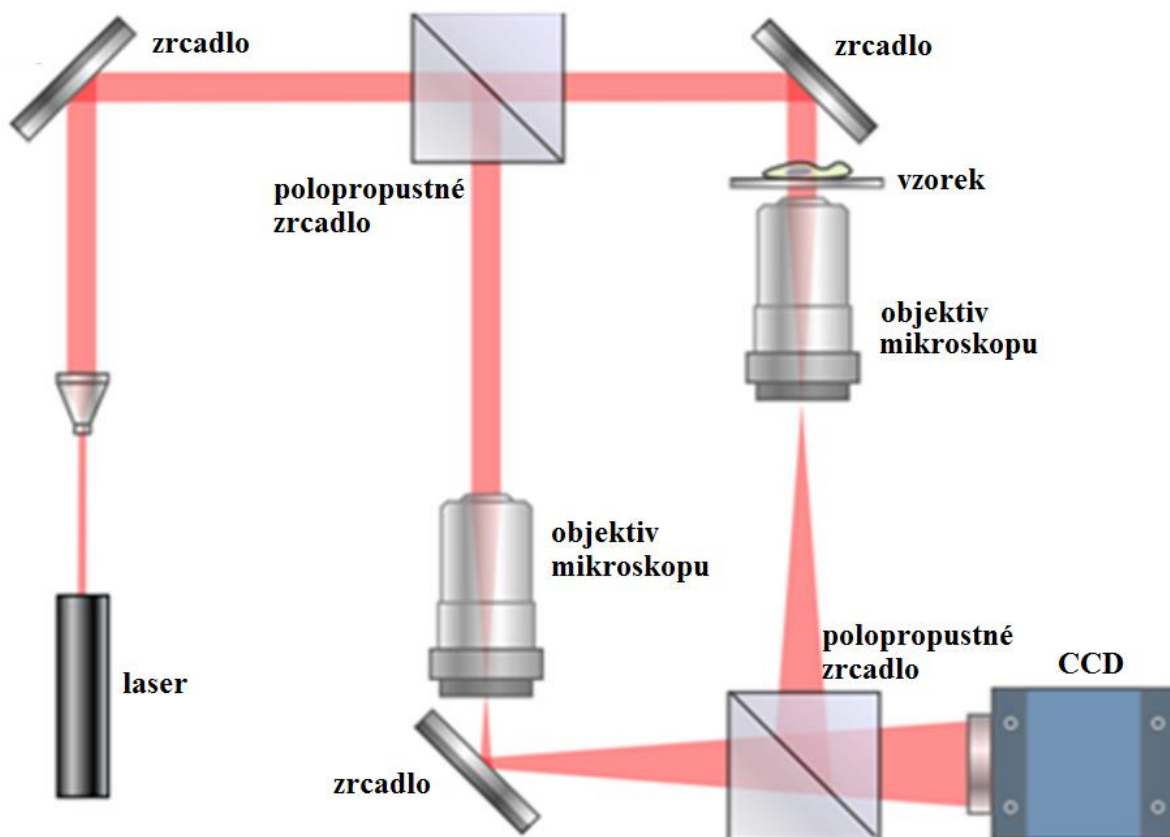
Obrázek 4: Schéma in-line DHM [4, 9]

Tím, že nejprve odstraníme efekty pozadí a pak rekonstruujeme pole objektu v různých rovinách, lze z jediného dvourozměrného obrazu vytvořit trojrozměrný obraz s využitím celkového počtu pixelů hologramu, což také vede ke kratším minimálním vzdálenostem pro rekonstrukci a vyššímu rozlišení výsledného obrazu. Díky jednoduchosti zařízení a velké hloubce ostrosti je in-line DHM zvláště užitečný pro analýzu obrazců částic. Ve spojení s algoritmem pro rekonstrukci lze určit 3D polohu částic a tu potom použít pro metody velocimetrie částic, jako je např. sledování malých částic nebo plovoucích buněk v tekutém proudu. [9]

1.2.1.2 Off-axis DHM

Při konfiguraci DHM mimo osy (z anglického off-axis) je použit Mach-Zehnderův interferometr, protože nabízí flexibilitu při vyrovnávání, zejména při použití mikroskopické zobrazovací optiky. Pro zvětšení objektu je zapotřebí objektiv mikroskopu a další je v referenčním rameni použit tak, aby odpovídal zakřivení objektů a referenčních vln. Níže je ilustrováno uspořádání holografické mikroskopie off-axis (viz Obrázek 5).

Objektové rameno této konfigurace obsahuje vzorek a objektiv mikroskopu, který promítá zvětšený obraz objektu na CCD kameru. Referenční rameno podobně obsahuje další objektiv a referenční a objektové vlny jsou posunuty o úhel, aby se zabránilo překrývání referenčního a zdvojeného obrazu, takže holografický interferenční vzor obsahuje okraje způsobené interferencí mezi rozloženým objektovým polem a off-axis referenčním polem. Zachycený holografický obraz se numericky převede do Fourierovy oblasti, aby bylo získáno úhlové spektrum, a poté je použit prostorový filtr, čímž dojde k výběru pouze té části spektra, která odpovídá reálnému obrazu. Filtrované úhlové spektrum je propagováno do vhodné vzdálenosti a pomocí inverzní Fourierovy transformace je rekonstruováno jako řada komplexních čísel obsahující amplitudové a fázové obrazy vzorku. Profily amplitudy i fáze lze dále analyzovat a kvantitativně určovat polohy objektů v 3D prostoru. [9]



Obrázek 5: Schéma off-axis DHM [4, 9]

2 APLIKACE V BIOLOGII ŽIVÝCH BUNĚK

2.1 3D mikroskopie a tomografie

Jedním z důležitých úkolů pro biomedicínskou optiku je neinvazivní trojrozměrné zobrazování, pro které již byly navrženy a jsou dostupné různé techniky. Konfokální skenovací mikroskopie například poskytuje snímky s vysokým rozlišením a snímky se zaostřením na vzorek. Nicméně tato metoda je omezena snímkovou frekvencí kvůli sériovému získání obrazových pixelů. Další technika, optická koherentní tomografie, je skenovací mikroskopická zobrazovací technika založená na interferometrii zpětně rozptýleného koherentního signálu z různých hloubek objektu. Díky rozmanitosti vlnových délek nebo úhlů v holografii je také možné aplikovat metodu tzv. holografické tomografie, kde jsou snímky pro různé směry osvětlení odděleně zaznamenány a následně mohou být digitálně spojeny. [10]

2.1.1 Tomografická průtoková cytometrie

Jedná se o in-line přístup tomografické fázové mikroskopie, který se díky zjednodušenému optickému nastavení stal atraktivním nástrojem pro analýzu jednotlivých buněk v kontinuálním toku.

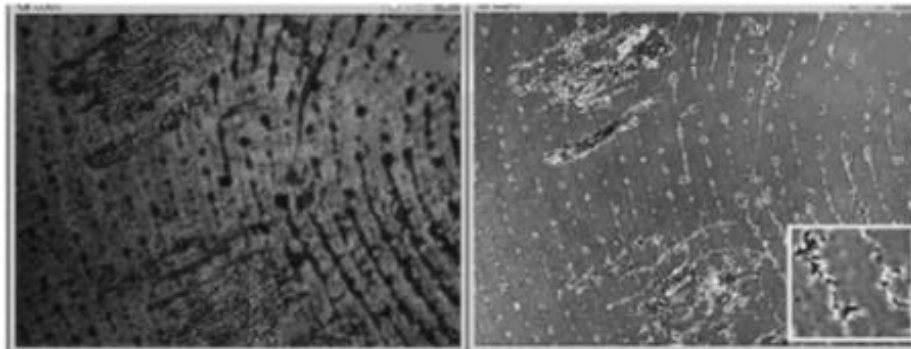
Byla sestavena optofluidní platforma, která poskytuje obrazy s vysokým rozlišením jak tekoucích, tak rotujících vzorků. Termín optofluidika je možné definovat jako použití světla k řízení toku tekutin, zejména v měřítku mikrometrů. Digitální holografický modul tohoto přístroje se skládá z laseru, který působí jako zdroj pro Mach-Zehnderův interferometr, jehož hlavní paprsek je nasměrován na upravený obrácený mikroskop s imerzním objektivem, což umožňuje zobrazování buněk v světlém poli. Referenční paprsek se rekombinuje s prvním paprskem pomocí děliče, čím dojde k vytvoření interferenčních vzorů (digitálních hologramů) pozorovaných vzorků, které jsou zaznamenávány CCD snímačem. [22]

2.1.2 Holografická biometrie

Ačkoli má dlouhou historii, zaznamenávání otisku prstů se v mnoha ohledech stále rozvíjí. Nový vývoj zahrnuje malé a levné přístroje pro zachycení otisků prstů, rychlý a levnější výpočetní hardware a vyšší míru autentizace, aby vyhovovaly potřebám mnoha aplikací.

Spolehlivost může být zlepšena rozšiřováním aplikačních oblastí a různých provozních prostředí, zvýšením informačního obsahu získaných dat prostřednictvím multimodálního zobrazování, vícerozměrného zobrazování a trojrozměrného zobrazování. Předmětem studií v poslední době je proveditelnost používání digitální holografie a interferografie (čerpání aditivní grafické informace z průniku světelných vln) k získání dvourozměrných a trojrozměrných obrazů otisků prstů.

Pouze pro názornost je uveden Obrázek 6, kde můžeme pozorovat latentní snímek otisků prstů získaný fázovou holografickou mikroskopií. Jak amplitudový, tak fázový snímek jasně zobrazují vzory třecích hřebenu. Toto měření bylo publikováno v článku „*Applications of Digital Holography in Biomedical Microscopy*“. [10, 11]



Obrázek 6: Otisk prstu sejmutý pomocí fázové digitální holografie; (vlevo) amplituda; (vpravo) fáze [10]

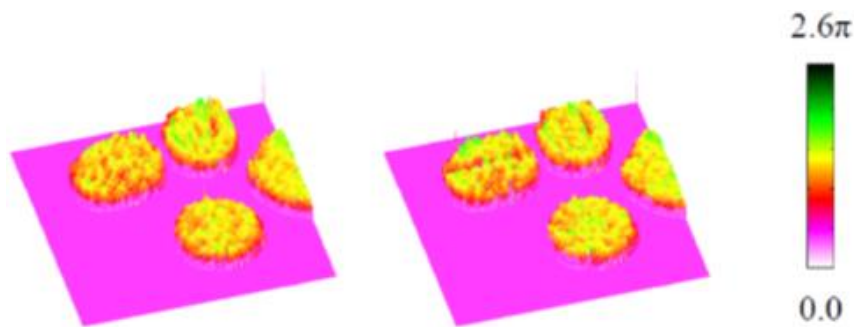
2.2 Laserové manipulace s buňkami

Manipulace s částicemi a buňkami pomocí optické síly vede k nové technologii, která objasňuje a modeluje působení fyzických sil na různé buněčné funkce včetně metastáz, metastatického potenciálu nebo motility. To je spojeno se schopností DHM digitální holografie kvantitativně a časově modelovat, monitorovat, sledovat a charakterizovat změny, ke kterým dochází na celulární úrovni.

Skloubení holografických optických pinzet a DHM je zvláště atraktivní. DHM poskytuje trojrozměrné umístění a zobrazování buněk, zatímco pinzety řídí polohu a pohyb. Od fúze se očekává, že se objeví řada nových funkcí, jako je inteligentní sledování a odchyt, uměle vzorkovaný růst a pohyb a automatické řízení buněčné mikromanipulace a mikrochirurgie. [10, 13]

2.2.1 Laserová mikrochirurgie buněk

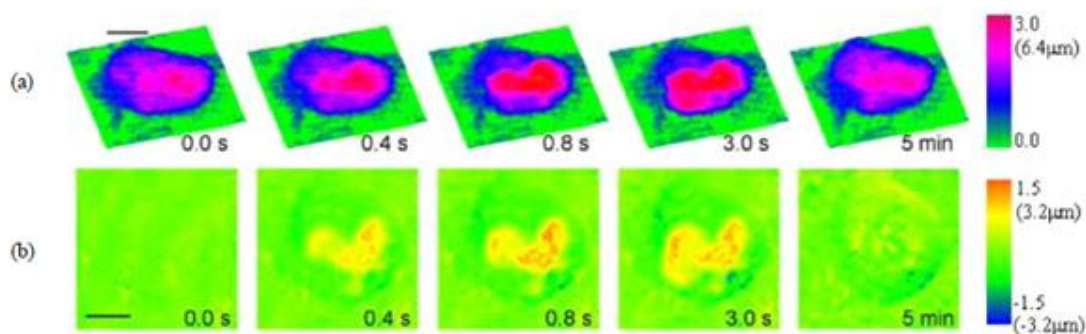
Laserové nůžky založené na mikroskopu používají zaměřený laserový paprsek ke změně a odstranění buněčných a tkáňových vzorků a také intracelulárních organel. Staly se důležitým nástrojem pro buněčné biology při studiu molekulárního mechanismu komplexních biologických systémů. Na snímku (Obrázek 7) je možné pozorovat kvantitativní fázové obrazy červených krvinek před a po střihu laserovými nůžkami. [10, 13]



Obrázek 7: Kvantitativní fázové obrazy červených krvinek před a po řezání laserovými nůžkami [13]

Vizualizace transparentních mikroskopických biologických vzorků, jako jsou živé buňky a jejich intracelulární složky manipulované laserovými nůžkami, je obtížná pomocí konvenční mikroskopie ve světlém poli. Pro nahrávání kvantitativních fázových obrazů v průběhu laserové mikrochirurgie bylo vytvořeno spojení laserových nůžek a off-axis digitální holografické mikroskopie. Zavedení kvantitativního zobrazování fází pomocí laserových nůžek umožňuje kvantitativně vyhodnotit poškození nebo opravu buněk a organel v reálném čase.

Obrázek 8 ukazuje obrazy epiteliálních buněk ledviny tarbíkomyši (PTK2), které byly odstraněny laserovým mikroskopem, kdy laser byl zaměřen na bod na chromozomu. Horní řádek snímků jsou kvantitativní fázové mikroskopické snímky nasnímané pomocí digitální holografie, zatímco druhý řádek znázorňuje rozdíl fázových obrazů vzhledem k počátečnímu stavu. Je zřejmé, že laserová ablace je doprovázena otokem buňky, jehož kvantitativní analýza je možná. [10, 13]



Obrázek 8: (a) Kvantitativní fázové obrazy v průběhu operace; (b) Rozdílové fázové obrazy vzhledem k počátečnímu obrazu [13]

2.2.2 Charakterizace optického tlaku a zachytávání

Pro studium buněčných charakteristik je důležité používat techniky, které ovlivňují subjekt co nejméně. Použití zaostřeného laserového paprsku k přímému zachycení částí buňky může vést k problémům s přehřátím, stejně jako neúmyslným změnám lokálních mechanických vlastností v důsledku toho, že materiály s velkým indexem lomu jsou přitahovány k ohnisku.

Vhodný přístup by měl tedy spočívat v aplikaci optického tlaku pomocí široké vlnoplochy nad povrchem buňky bez použití mezilehlých materiálů nebo invazivního ostření. Výsledná deformace poté může být pozorována a měřena pomocí digitálního holografického mikroskopu s příslušnou konfigurací, což nám poskytuje neinvazivní nástroj k vytváření kvantitativních fázových obrazů a filmů buňky v průběhu celého procesu. Z tohoto důvodu je možné měřit deformaci buňky s nanometrickou přesností, která umožňuje studovat mechanické vlastnosti buněk za použití manipulačních a zobrazovacích technik pouze za použití světla. [10, 12]

2.3 Analýza rakovinných buněk pomocí DHM

Kvantitativní analýzy lokomoce rakovinných buněk a změny tvaru v 3-D prostředí odhalují biologické charakteristiky pro klinické potřeby. [17]

2.3.1 3D analýza migrace rakovinných buněk

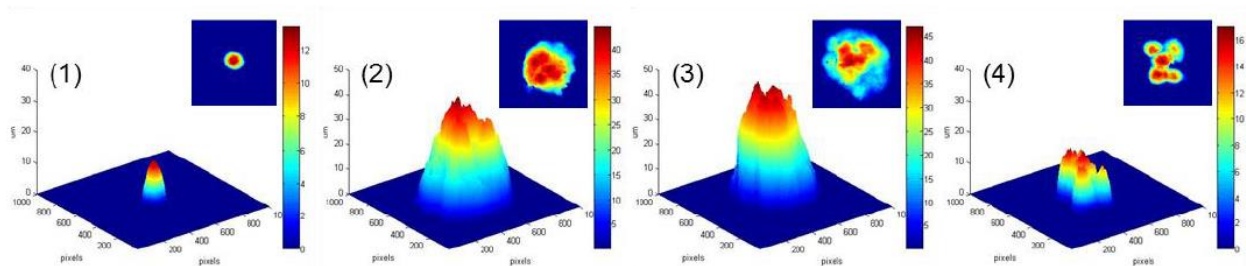
Efektivní neinvazivní metody jsou nezbytné k pádné analýze migrace rakovinných buněk v 3D prostředí a možných změn v důsledku léčby. V práci „*Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration*“ byl sestaven systém skládající se z TDHM (Transmisního digitálního holografického mikroskopu), kterým byly nasnímány záznamy, bez významného zkreslení v čase nebo ztráty informací, 3D struktury vzorku, která je *a posteriori* analyzována pomocí vhodného softwaru.

Částečně prostorová koherentní povaha optického zdroje poskytuje vysoce kvalitní obrazy, a to i v případě snímání vzorku rozptylujícího světlo (např. buněčné kultury v tlustých gelech). TDHM je zvláště využita při studiu živých biologických (průhledných) vzorků bez markerů. Tento přístup totiž nevyžaduje vložení fluorescenčních sond do buněk, které je senzibilizují ke světelnému poškození, a tím usnadňuje dlouhodobé zobrazování živých buněk v čase.

Díky těmto výhodám umožňuje DHM rozsáhlé buněčné kultivační analýzy ve 3D gelu v experimentálních podmínkách běžně se vyskytujících v laboratořích buněčné biologie. Vzhledem k tomu, že zvětšení může být změněno pomocí různých mikroskopických čoček (rekonstrukční algoritmy s nastavitelným zvětšením jsou popsány v kapitole 3.2.3), lze také sledovat podrobnou morfologii buněk a její dynamické změny. [17]

2.3.2 Zobrazení růstu a odpovědi na léčbu v 3D modelech nádorů

V článku „*Digital holographic microscopy for imaging growth and treatment response in 3D tumor models*“ je popsáno, jak byla pomocí *in vitro* 3D uzlů vytvořených překrytím buněk PANC-1 na lůžkách Matrigelu snižujícím růstový faktor vyhodnocována schopnost DHM longitudinálně a nedestruktivně monitorovat změny 3D morfologie v průběhu času. V kombinaci s rozumným odhadem optických vlastností rakovinných buněk je možné převést délku optické dráhy na výšku fyzického objektu a spolehlivě kvantifikovat objem nádoru v průběhu času bez použití rozsáhlé geometrické aproximace 3D profilu (elipsoid, sféroid atd.). Pro potvrzení správnosti tohoto přístupu byly hodnoceny změny ve 3D objemu za normálních podmínek růstu a v kulturách podléhajících intervenci s oxaliplatinou, chemoterapeutickým činidlem na bázi platiny. Pro tuto studii byla použita off-axis konfigurace DHM. [20]



Obrázek 9: Snímky kvantitativně rekonstruované fáze [20]

Na snímku výše (Obrázek 9) lze pozorovat snímky rekonstruované fáze hologramů 3D modelů tumorů nasnímaných pomocí off-axis DHM. Jsou zde podélně zobrazené neošetřené PANC-1 3D nádorové uzliny po 1 dni (1), 8 (2) a 11 dnech (3) v porovnání s reprezentativním uzlem, který byl zobrazen po třech dnech léčby (4). [20]

3 REKONSTRUKČNÍ METODY

V této části práce budou popsány nejběžnější rekonstrukční metody hologramů získaných pomocí off-axis konfigurace DHM.

3.1 Základy Fresnelovy holografie

Digitální holografie se obvykle skládá ze záznamu optického pole vycházejícího z osvětleného objektu v difrakční rovině (např. v podmínkách šíření volného prostoru) a numerického výpočtu distribučního pole v rekonstrukční rovině z difrakčních modelů. V praxi se optické hologramy měří z interference rozbíhajícího se paprsku proti referenčnímu paprsku, který není narušován analyzovaným předmětem. Tento přístup poskytuje mapu komplexních hodnot difrakčního pole v rovině snímače. Komplexně hodnocené měření obsahuje relevantní informace o lokálním zpoždění difrakčního pole.

Byly navrženy techniky fázového a frekvenčního posunu, které zaznamenávají difrakční pole v kvadratuře. Interferenční vzor zaznamenaný plošným senzorem může být vyjádřen jako [14]:

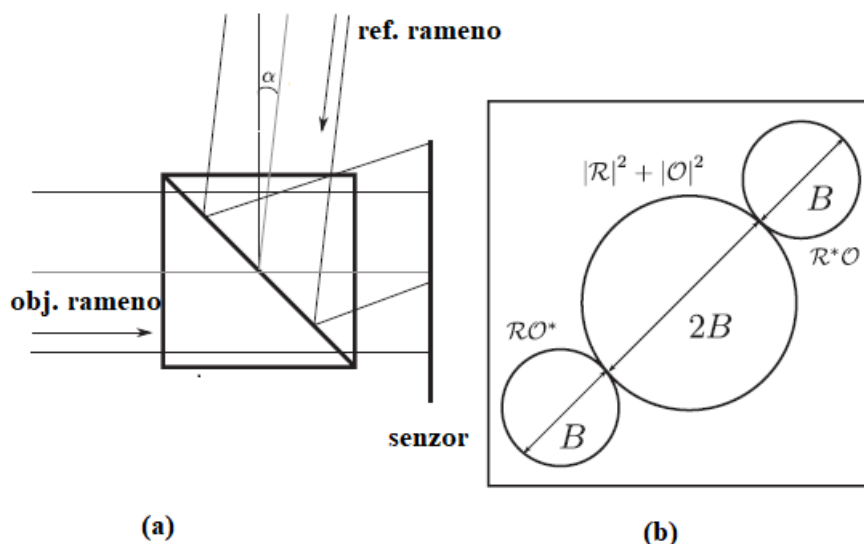
$$E(x, y) = |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2 + O^*(x, y)R(x, y) + O(x, y)R^*(x, y), \quad (3.1)$$

kde R a O označují optické pole referencí a objektů. Symboly označené hvězdičkou (*) jsou spojeny s komplexními hodnotami konjugátu.

Finální část off-axis Mach-Zehnderovy konfigurace je znázorněna na obr. 9 (a). Zde se referenční a objektový paprsek kombinují pod relativním úhlem α pomocí nepolarizující dělicí/spojovací krychle. Je třeba poznamenat, že úhel α by měl být zvolen tak, aby byl splněn vzorkovací teorém. Maximální hodnota, která vede k správnému vzorkování interferenčního vzoru, je proto dána v paraxiálních podmínkách:

$$\alpha_{max} \approx \frac{\lambda}{2\Delta x}, \quad (3.2)$$

kde Δx označuje vzorkovací frekvenci nahrávacího zařízení, tedy velikost pixelu senzoru. [14]



Obrázek 10: (a) Nahrávání hologramu v konfiguraci off-axis, (b) prostorová frekvenční reprezentace hologramu [14]

Úhel off-axis má za následek oddělení čtyř výrazů rovnice (3.1) v prostorové frekvenční oblasti (viz Obrázek 10 (b)). Centrální část spektra hologramu $(|R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2)$ je známá jako tzv. autokorelační teorém, jehož velikost je spojena s nejvyššími prostorovými frekvencemi objektu (B).

Skutečný a zdvojený obraz objektu jsou uvedeny jako OR^* a RO^* . Velikost těchto obrazů ve spektru je dvakrát menší než hodnota autokorelační rovnice. Pro zlepšení kvality rekonstrukce musí být zrušeny dopady autokorelace i zdvojeného obrazu, což znamená zrušení složek odpovídajících $R^2 + O^2$ a RO^* . Toho lze dosáhnout buď prostorovým filtrováním nebo fázovým posunem. Tímto způsobem je možné pouze rekonstruovat reálný obraz. Následující kapitola bude zaměřena na rekonstrukci hologramu. [14]

3.2 Rekonstrukce digitálních hologramů

Digitální rekonstrukce hologramu spočívá v *a posteriori* přesměrování původního objektu, což lze provést výpočtem zpětného šíření světla z hologramu do rekonstrukční roviny. Tento proces je ekvivalentní umístění nahraného hologramu zpět do referenčního svazku. Referenční paprsek se tak stává rekonstrukčním svazkem.

Při použití Huygens-Fresnelova principu lze vyvodit integrální formulaci intenzity E_{rec} v rekonstrukční rovině z nasnímaného off-axis hologramu E [14]:

$$E_{rec}(\xi, \eta) = -i \frac{z}{\lambda} \int_{R^2} E(x, y) \frac{\exp(ikr)}{r} dx dy. \quad (3.3)$$

Zde $E(x,y)$ odpovídá samotnému hologramu, z je vzdálenost objektu od rekonstrukční roviny, λ je vlnová délka použitého zdroje světla, $k = 2\pi/\lambda$ je vlnové číslo a vzdálenost r vypočítána jako:

$$r = \sqrt{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}, \quad (3.4)$$

(x, y) a (ξ, η) vyjadřují prostorové souřadnice v hologramu a v rekonstrukční rovině. Jelikož byl hologram nahrán v off-axis konfiguraci DHM, můžeme provést aproximaci vzdálenosti r pomocí Fresnelovy aproximace, a to následovně:

$$r = z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x - \xi}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y - \eta}{z} \right)^2 \right], \quad (3.5)$$

a rovnice (3.3) je po úpravách a odvozeních (které nejsou relevantní pro obsah této práce) transformována následovně:

$$E_{rec}(\xi, \eta) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda} z\right)}{i\lambda z} \int_{R^2} E(x, y) \times \exp\{[(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2]\} dx dy. \quad (3.6)$$

Tento vztah je používán k rekonstrukci off-axis intenzitních hologramů.

Dokud jsou proměnné v rovnici (3.6) separabilní, veškeré diskrétní formulace budou odvozeny v 1D případě. Generalizace pro 2D je již poté jednoduchá. Jednorozměrná diskrétní Fresnelova transformace je tedy definována následovně:

$$E_{rec}(p) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda} z\right)}{i\lambda z} \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} p^2 \Delta \xi^2\right) \sum_{n=0}^{N-1} E(n) \times \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} n^2 \Delta x^2\right) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda z} np \Delta x \Delta \xi\right), \quad (3.7)$$

kde $n\Delta x$ a $p\Delta \xi$ označují prostorové souřadnice v CCD snímači a rekonstrukční rovině a N je počet vzorkovacích bodů. [14, 17]

Přímá implementace rovnice (3.7) je časově náročný proces. Při pohledu na výše uvedené rovnice si lze uvědomit, že pro realizaci rekonstrukce digitálního hologramu mohou být navržena efektivní výpočetní schémata.

Rekonstrukční metody je poté možné rozdělit do dvou hlavních rodin: přístupy založené na Fourierovském principu (založené na použití jediné rychlé Fourierovy transformace (FFT)), které jsou vhodné pro zobrazování rozšířených objektů lokalizovaných daleko od snímače CCD nebo CMOS, a metody konvoluce vypočítané pomocí dvou nebo tří FFT. [14, 17]

3.2.1 Algoritmus jedné FFT

Efektivní implementaci rovnice (3.7) lze provést pomocí algoritmu FFT. V tomto případě spolu pixely rekonstrukční ($\Delta\xi$) i CCD roviny (Δx) souvisejí dle rovnice:

$$\Delta\xi = \frac{\lambda z}{N\Delta x} \quad (3.8)$$

Díky tomu můžeme rovnici (3.7) přepsat jako:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}z\right)}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{\pi\lambda z p^2}{N^2\Delta x^2}\right) \times F\left\{E(x)\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}x^2\right)\right\}, \quad (3.9)$$

Kde F značí právě implementaci algoritmu FFT. Je důležité poznamenat, že v této konfiguraci je poměr mezi rekonstruovaným horizontem a rozšířením sensorového pole úzce spojen s rekonstrukční vzdáleností. Pro účely této práce bude vnitřní zvětšení implementace single-FFT rekonstrukčního integrálu označováno jako [14]:

$$\gamma_0 = \frac{\lambda z}{N\Delta x^2}. \quad (3.10)$$

3.2.2 Přístupy na bázi konvoluce

Holografická rekonstrukce může být považována za lineární systém. Rovnice (3.6) je ve skutečnosti matematickým vyjádřením prostorové konvoluce mezi hologramem a Fresnelovou impulsní charakteristikou h_z , která je definována jako:

$$h_z(x) = \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}x^2\right). \quad (3.11)$$

Principy založené na konvoluci vedou k unitárnímu zvětšení, konkrétně $\Delta\xi = \Delta x$. [14]

3.2.2.1 Algoritmus tří FFT

Výpočet konvoluce mezi hologramem a holografickou impulsní odezvou může být efektivně implementován ve Fourierově doméně. Za použití FFT algoritmů můžeme rovnici (3.6) vyjádřit jako:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}z\right)}{i\lambda z} F^{-1}[F\{E(x)\}F\{h_z(x)\}], \quad (3.12)$$

kde F a F^{-1} označují dopřednou a zpětnou Fourierovu transformaci. [14, 17]

3.2.2.2 Propagace úhlového spektra

Metoda úhlového spektra nevyužívá žádné aproximace. Tato metoda je založena na představě, že šíření vln v rovině může být popsáno pomocí šíření jejich úhlových spekter. Tzv. rozptylový vektor je definován následovně [22]:

$$\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} (\cos \varphi \sin \theta, \sin \varphi \sin \theta, \cos \theta), \quad (3.13)$$

Jednotlivé komponenty tohoto vektoru se vztahují k souřadnicím Fourierovy domény (u, v) následujícím způsobem:

$$\begin{aligned} \cos \varphi \sin \theta &= \lambda u \\ \sin \varphi \sin \theta &= \lambda v, \end{aligned} \quad (3.14)$$

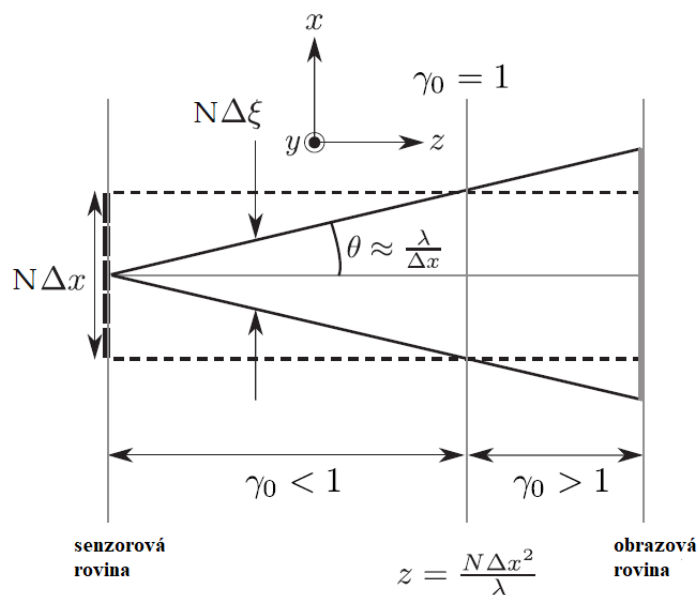
kde $(\lambda u, \lambda v)$ jsou směřové kosiny vektoru k . Výstupní vlna $t(x, y)$ je rozšířena (propagována) do roviny detektoru pomocí následující transformace:

$$H(x, y) = F^{-1} \left[F(t(x, y)) \exp\left(\frac{2\pi iz}{\lambda} \sqrt{1 - \lambda u^2 - \lambda v^2}\right) \right], \quad (3.15)$$

kde u a v jsou prostorové frekvence ve Fourierově doméně. Rekonstrukce hologramu je poté provedena následovně:

$$E_{rec}(\xi, \eta) = F^{-1} \left[F(E(x, y)) \exp\left(-\frac{2\pi iz}{\lambda} \sqrt{1 - \lambda u^2 - \lambda v^2}\right) \right] \quad (3.16)$$

Na schématu (Obrázek 11) je možné pozorovat úhlový přístup k rekonstrukci hologramu. Plné čáry odpovídají 1-FFT rekonstrukci a přerušované čáry konvolučnímu přístupu. [14]



Obrázek 11: Schéma úhlového pojetí procesu rekonstrukce [14]

3.2.3 Algoritmy s nastavitelným zvětšením

Single-FFT algoritmus ani konvoluční přístup neumožňují změnu zvětšení rekonstruovaného hologramu. U metody single-FFT je zvětšení závislé na vlnové délce a vzdálenosti při nahrávání hologramu, zatímco u konvolučního přístupu zůstává zvětšení konstantní. Pokud využijeme algoritmus s nastavitelným zvětšením, docílíme toho, že rekonstrukční horizont (pole, které je rekonstruováno numerickým procesem) bude nezávislý na parametrech nastavených při nahrávání hologramu.

Jednou z možností, jak upravit zvětšení, je rekonstrukce hologramu pomocí algoritmu, který se skládá ze dvou kroků. Každý z kroků obsahuje 1-FFT rekonstrukci. Pokud máme rekonstrukční vzdálenost z , zmíněné dva kroky (rekonstrukční vzdálenosti z_1 a z_2) jsou zvoleny tak, aby platilo $z = z_1 + z_2$.

V následujících podkapitolách budou popsány rekonstrukční metody, které umožňují úpravu zvětšení a jsou založeny buď na konvolučním principu, nebo na 1-FFT implementaci Fresnelovy transformace. [14, 17]

3.2.3.1 Metoda digitální kvadratické čočky

Tato metoda je založena na konvolučním přístupu. Před rekonstrukcí je hologram vyložen do požadovaného horizontu a následně vynásoben digitální sférickou vlnoplochou, která působí jako kvadratická čočka definovaná jako:

$$L(x) = \exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda R_c} x^2\right), \quad (3.17)$$

kde R_c značí poloměr zakřivení čočky L . Tento poloměr zakřivení lze definovat z hlediska zvětšení systému tak, že:

$$R_c = \left(\frac{\gamma z}{\gamma - 1} \right). \quad (3.18)$$

V rovnici (3.18) značí parametr γ poměr mezi CCD horizontem vloženého hologramu a fyzickým obsahem objektu. Díky práci se sférickou rekonstrukční vlnoplochou je fyzická rekonstrukční vzdálenost z modifikována jako $z' = \gamma z$. Tím pádem může být rekonstrukce hologramu realizována výpočtem následující rovnice s využitím 3-FFT schématu:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda} z'\right)}{i\lambda z'} F^{-1}[F\{E(x)L(x)\}F\{h_{z'}(x)\}], \quad (3.19)$$

nebo s využitím propagace úhlového spektra:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda} z'\right)}{i\lambda z'} F^{-1}[F\{E(x)L(x)\}H(u)]. \quad (3.20)$$

Alternativní metoda založená na tomto formalismu spojeném s prostorovým filtrováním rekonstruovaného hologramu 1-FFT umožňuje rekonstrukci lokálního pole objektu s nastavitelným zvětšením. Tato metoda umožňuje omezit vliv zkreslení referenčního svazku. Je však zapotřebí ještě jeden FFT (dva, když je zvažována implementace úhlového spektra), aby se vyřešil krok filtrování. [14, 17]

3.2.3.2 Fresnelova-Bluesteinova transformace

Tento algoritmus je založen na rozšíření metody 1-FFT popsané rovnicí (3.9). V tomto případě je zvětšení rekonstrukce nezávislé na parametrech snímání hologramu a může být libovolně měněno. V této formulaci lze rozšíření rovnice (3.9) chápat jako prostorovou konvoluci dvou funkcí f a g a Fresnelův-Bluesteinův rekonstrukční algoritmus může být shrnut jako:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda} z\right)}{i\lambda z} \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda z} \gamma (1 - \gamma) \Delta x^2 p^2\right] \times F^{-1}[F\{f(x)\}F\{g(x)\}]. \quad (3.21)$$

Nastavitelné zvětšení s využitím metody kvadratické čočky a algoritmu Fresnel-Bluestein poskytují stejné výsledky. [14, 17]

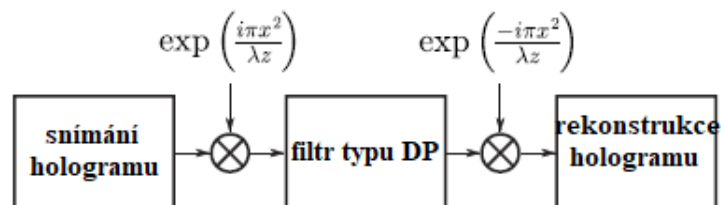
3.2.3.3 Aliasy a repliky

Popsané algoritmy s nastavitelným zvětšením umožňují buď zvětšení (přiblížení) detailů v rekonstruovaných snímcích, nebo rekonstruování objektů, jejichž rozměry jsou větší než rozměry záznamového zařízení. Nicméně je třeba věnovat pozornost tomu, že pokud pracujeme s rekonstrukčními horizonty menšími, než je fyzický rozsah objektu, mohou se v rekonstrukční rovině objevit aliasy, zatímco v opačném případě se mohou objevit repliky. Tyto nežádoucí účinky zhoršují kvalitu rekonstrukce a je třeba se jim vyhnout. [14, 19]

K omezení aliasingového efektu bylo navrženo schéma filtrace (viz Obrázek 12). Ještě před vlastní rekonstrukcí je hologram vynásoben komplexní chirp funkcí definovanou následovně:

$$C(x) = \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} x^2\right). \quad (3.22)$$

Vynásobený hologram je poté filtrován dolní propustí a nakonec násoben funkcí C^* , která je komplexně sdružená s C . Velikost filtrovacího okna je zvolena tak, aby odpovídala fyzickému rozsahu rekonstrukčního horizontu ve vzdálenosti z . Díky této filtraci je možné rekonstruovat hologram pomocí algoritmu s nastavitelným zvětšením. Artefakty aliasingů jsou zcela odstraněny, čímž vzniká kontrastní obraz rekonstruovaných objektů.



Obrázek 12: Schéma anti-aliasingové procedury [14]

Odstranění replik se provádí pomocí oříznutí rekonstruovaného hologramu tak, aby zůstaly zachovány pixely odpovídající původnímu snímanému objektu. Tento výběr je následně doplněn nulami do velikosti původního hologramu. [14, 19]

3.2.4 Fresnel dekompozice

Tato dekompozice je podobná víceúrovňovému vlnkovému rozkladu. Jedná se o rekonstrukci hologramu pomocí báze vlněk transformovaných pomocí Fresnelovy transformace. Výsledek této rekonstrukce je závislý právě na zvolené metodě transformace vlnkové základny. [14, 19]

3.2.5 Algoritmy založené na fázovém posunu

Interferometrie s fázovým posunem (phase-shifting) je důležitým prostředkem pro analýzu interferogramů, především pro obnovení fázové informace. Interferogramy byly tradičně měřeny umístěním středu hrany a následným sledováním podél okrajů. U interferometrie s fázovým posunem není nutné sledovat polohu hran, jelikož tato metoda umožňuje rekonstrukci vlny bod po bodu (point-by-point). [23]

3.2.5.1 Complex wave retrieval (CWR) algoritmus

CWR je algoritmus, který obnovuje komplexní vlnu z off-axis hologramu v registrační (záznamové) rovině. V tomto přístupu je prováděna nelineární změna proměnných tak, že informace o objektové vlně jsou získávány z jednoho hologramu podle koncepce prostorových fázových kroků.

Na rozdíl od konvenčního algoritmu fázového posunu se zde však hodnoty intenzity neberou z několika nezávislých interferogramů s nekonečnými hranami pro výpočet fáze každého pixelu, ale z okolních pixelů v blízkosti hrany, které jsou uspořádány na jednom hologramu. [23, 24]

3.2.5.2 Rozbalení fáze

Je důležité si uvědomit, že získanou fází interferogramu (tj. rozdíl původních fází) známe pouze v intervalu $(-\pi, \pi)$, zatímco výška objektu (pozorovaného vzorku), kterou chceme z interferogramu získat, může nabývat jakýchkoli (reálných) hodnot. Je proto třeba fázi rozbalit, aby nabývala jakýchkoli reálných hodnot a odpovídala reliéfu (různým výběžkům na povrchu vzorku) objektu. [23]

4 IMPLEMENTACE

Byla provedena implementace metody pro rekonstrukci fázové informace z hologramu, která vychází z algoritmů založených na fázovém posunu popsanych v kapitole 3.2.5, v programovacím prostředí MATLAB. Metoda zahrnuje načtení obrazu, inicializaci vstupních parametrů, implementaci dopředné a zpětné Fourierovy transformace, výběr objektové oblasti spektra a v neposlední řadě zobrazení rekonstruované fázové a amplitudové informace získané z hologramu.

4.1 MATLAB®

MATLAB (MATrix LABoratory, maticová laboratoř) je výkonné interaktivní prostředí pro technické výpočty, které zahrnuje výpočetní, vizualizační a programovací prostředí. MATLAB je navíc moderním programovacím prostředím: má sofistikované datové struktury, obsahuje vestavěné nástroje pro úpravy a ladění a podporuje objektově orientované programování. Tyto faktory činí z MATLABu vynikající nástroj pro výuku a výzkum.

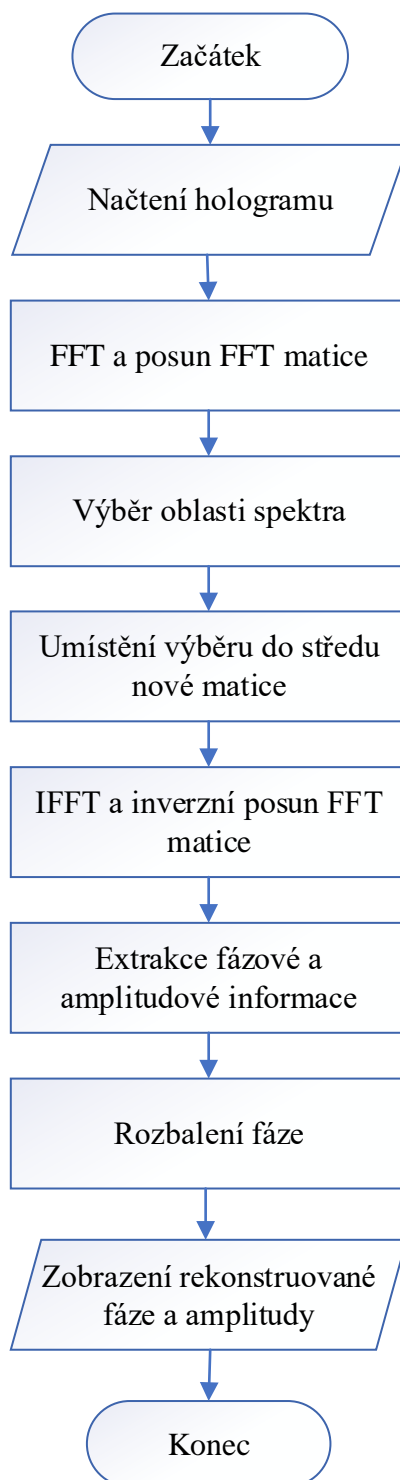
K jeho základním vlastnostem patří vysokoúrovňový jazyk, otevřený a rozšiřitelný systém, velké množství aplikačních knihoven, podpora vícerozměrných polí a datových struktur, interaktivní nástroje pro tvorbu GUI, import/export dat do mnoha formátů, komunikace s externími přístroji v reálném čase nebo rozšiřitelnost modulů o jazyky C, C++ nebo Java.

MATLAB má ve srovnání s běžnými počítačovými jazyky (např. C, FORTRAN) mnoho výhod pro řešení technických problémů. Jedná se o interaktivní systém, jehož základním datovým prvkem je pole, které nevyžaduje kótování (dimenzování). Má výkonné vestavěné rutiny, které umožňují velmi širokou škálu výpočtů. Má také snadno použitelné grafické příkazy, které okamžitě zpřístupní vizualizaci výsledků. Konkrétní aplikace jsou shromažďovány v balíčcích označovaných jako toolbox. Existují nástroje pro zpracování signálů, symbolické výpočty, teorie řízení, simulace, optimalizace a několik dalších oblastí aplikované vědy a techniky. [21] [30]

Pro své výše popsané výhody bylo právě toto programovací prostředí zvoleno pro implementaci metod v rámci této diplomové práce, a to konkrétně ve verzi MATLAB R2016a.

4.2 Struktura algoritmu

Obrázek 13 znázorňuje schéma navrženého algoritmu pro extrakci fázové a amplitudové informace z hologramu. Realizace jednotlivých bloků je blíže popsána dále v kapitole 4.3.

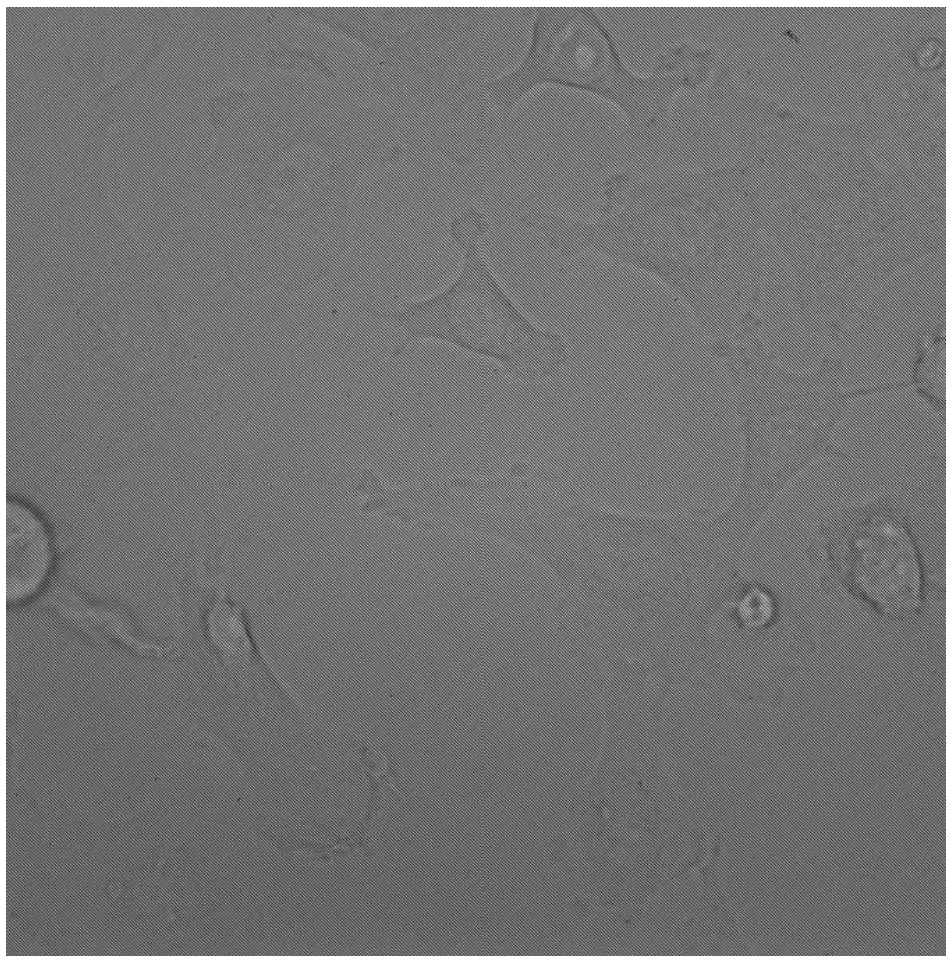


Obrázek 13: Schéma implementovaného algoritmu

4.3 Proces rekonstrukce

V této kapitole jsou popsány jednotlivé kroky procesu rekonstrukce hologramu spolu s ukázkami použitých příkazů, funkcí a dosažených výsledků. Prozatímní testovací data byla poskytnuta společností Tescan Orsay Holding, a. s.

V první řadě je třeba načíst daný hologram, tento je zobrazen na snímku níže (Obrázek 14). Můžeme zde pozorovat velmi zřetelný interferenční vzor. Úkolem rekonstrukčních algoritmů je mimo jiné také odstranění tohoto vzoru.

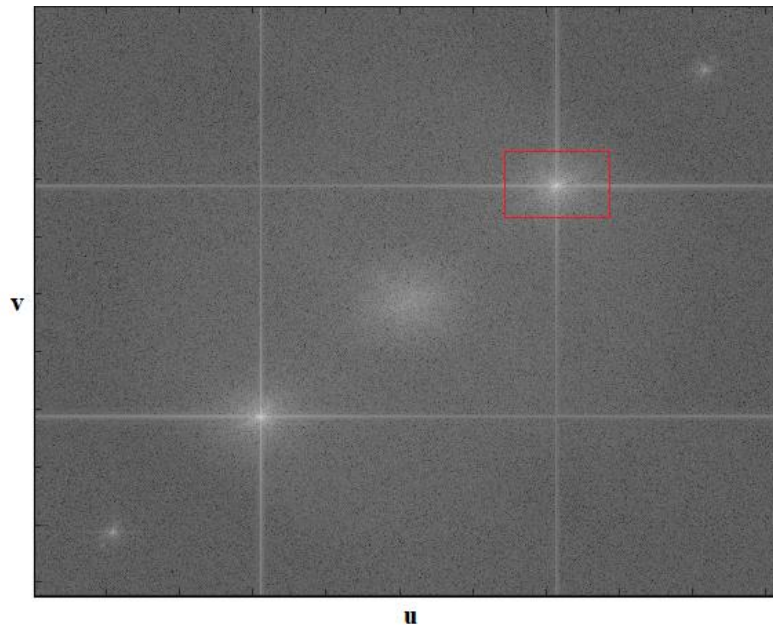


Obrázek 14: Původní hologram

Dalším krokem algoritmu je provedení FFT načteného obrazu pomocí funkce *fft2*, která je již implementována v programovacím prostředí Matlab. V tomto kroku je také třeba posunout nulovou frekvenční složku do středu spektra, a to pomocí funkce *fftshift*.

Následně si zobrazíme amplitudové spektrum hologramu v takovém módu, aby bylo možné z něj vyříznout pouze objektovou část tohoto spektra, čímž se vyhneme tvorbě replik ve výstupním obraze. Spektrum je možné pozorovat níže (viz Obrázek 15).

Na spektru lze střed soustavy souřadnic, tedy bod $[0,0]$, pozorovat uprostřed – jedná se o bod ve středu autokorelační části spektra. Červeně vyznačený úsek je právě vybraná oblast spektra, dojde tedy k potlačení dvou zbývajících složek spektra – autokorelační (R^2+O^2) a zdvojeného obrazu (RO^*).



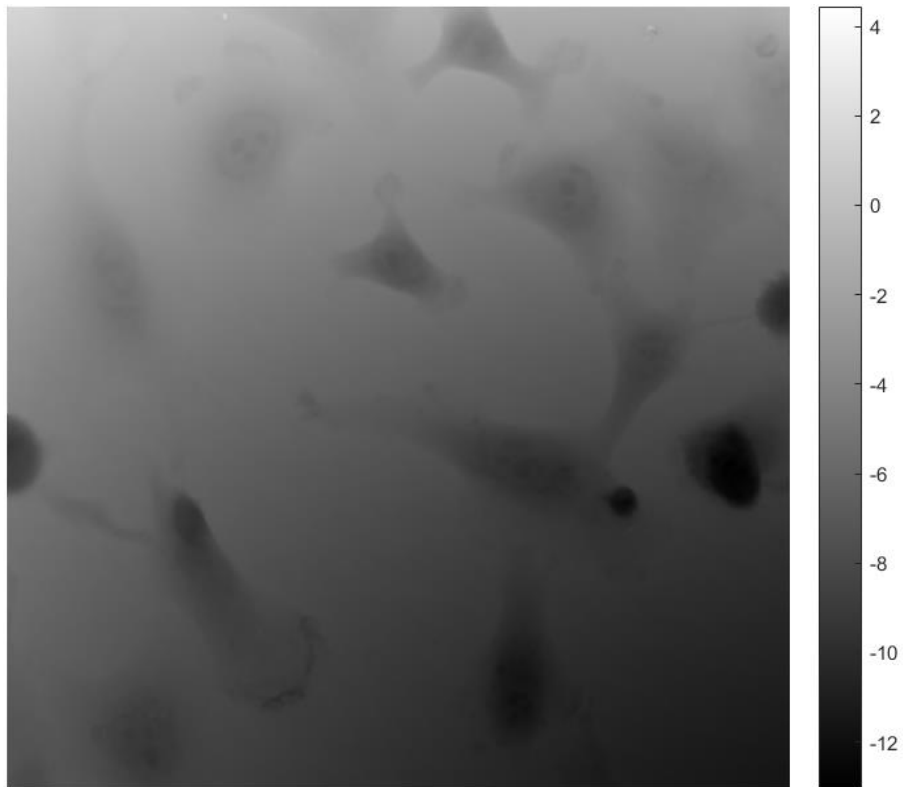
Obrázek 15: Spektrum hologramu

Výběr zájmové oblasti je proveden nakreslením obdélníkového tvaru kolem nejjasnějšího bodu spektra. Byla otestována i varianta automatického výběru oblasti zájmu, která se jeví jako možnost šetřící výpočetní čas algoritmu, bohužel ale došlo ke snížení kvality, proto zatím metoda využívá manuálního výběru. Vybraná oblast je vložena do prázdné matice a posunuta do jejího středu.

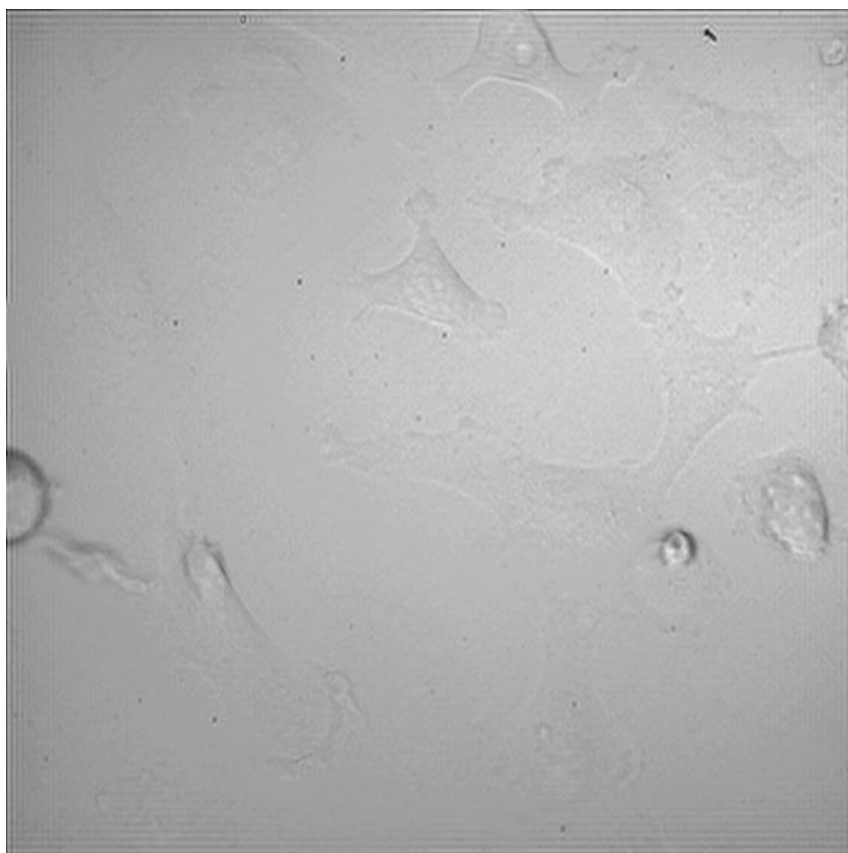
Dalším krokem je provedení inverzního posunu nulové frekvenční složky a následně inverzní FFT za pomoci příkazů *ifftshift* a *ifft2*.

Extrakce fázové informace je provedena pomocí funkce *angle* a fáze je posléze rozbalena. Jak bylo již zmíněno, rozbalení fáze je důležitým krokem proto, aby získaná fáze nabývala jakýchkoli reálných hodnot a odpovídala tak reálnému prostorovému uspořádání pozorovaného objektu. V Matlabu je rozbalení fáze provedeno za pomoci funkce *unwrap*. Výsledný snímek rozbalené fáze extrahované ze vstupního hologramu je zobrazen na následujícím snímku (Obrázek 16). Na dalším snímku (Obrázek 17) je poté zobrazena extrahovaná amplituda (amplitudovou informaci lze v Matlabu získat pomocí funkce *abs*) po úpravě kontrastu.

V následující kapitole 5 jsou popsány modifikace tohoto jednoduchého algoritmu, které vedou k dosažení co nejvyšší kvality získaného fázového obrazu.



Obrázek 16: Extrahovaná rozbalená fáze



Obrázek 17: Rekonstruovaná amplituda

5 MODIFIKACE METODY

Vybranou metodu pro rekonstrukci fázové informace z původního interferogramu je třeba upravit, aby došlo ke zpřesnění a zrychlení rekonstrukční metody, cílem je rekonstrukce kvantitativní fázové informace za účelem vytvoření 3D reprezentace snímaného vzorku.

V této kapitole jsou popsány modifikace navržené metody, mezi kterými je např. změna výběru spektrální oblasti, jiné algoritmy pro rozbalení fáze, filtrace extrahovaného fázového snímku a v neposlední řadě algoritmus pro 3D rekonstrukci snímaného objektu.

5.1 Výběr spektra

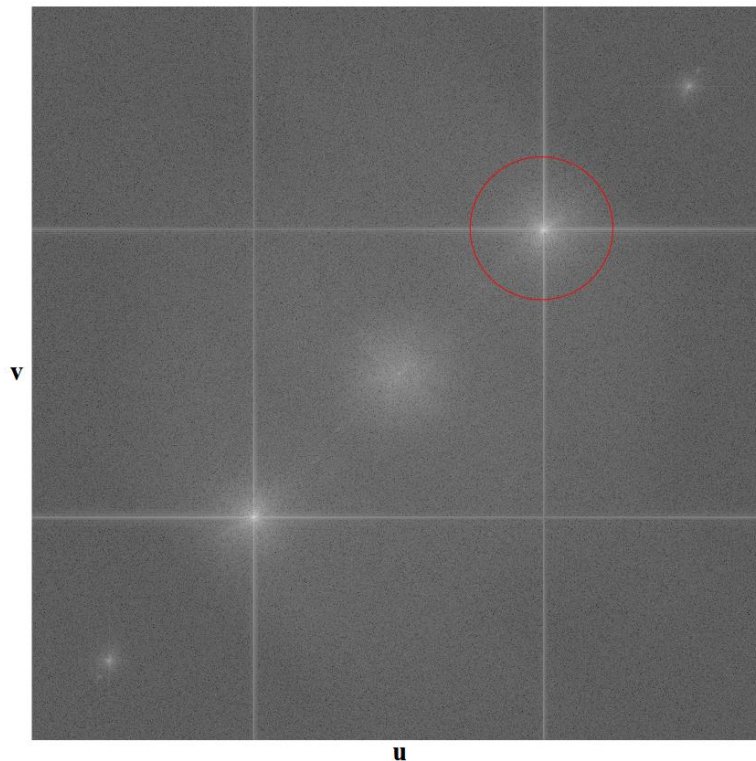
Manuální výběr oblasti spektra se z několika hledisek jeví jako neefektivní, jelikož není možné vybrat v každém běhu programu stejnou oblast, dále není možné odhadnout, zda se nejvyšší hodnota objektové části spektra bude nacházet přesně ve středu vybrané oblasti a v neposlední řadě manuálně vybereme oblast nepravidelného tvaru, přičemž vhodnější je vybrat symetrickou čtvercovou nebo kruhovou oblast, aby vzdálenost nejvyššího vrcholu (resp. počátku objektového spektra) ve spektru od hrany výběru byla ve všech bodech stejná.

Po převedení digitálního hologramu, který obsahuje $N \times N$ pixelů, do spektrální oblasti, obdržíme matici komplexních hodnot také o velikosti $N \times N$. Následně je tedy vhodné vybrat oblast objektového spektra podle polohy nejvyšší hodnoty v této oblasti, jedná se o nejjasnější bod. Kolem tohoto bodu tedy vybereme oblast o velikosti $N/4 \times N/4$. Snížení počtu pixelů v matici zabalené fáze také výrazně urychlí proces rozbalení. Ve skutečnosti, po oříznutí objektové části spektra, není třeba se vracet k matici, která má stejnou velikost jako původní obraz ($N \times N$), ale je dostačující pokračovat v práci s oříznutou maticí obsahující pouze $N/4 \times N/4$ pixelů. [27]

Po porovnání velkého množství snímků z dostupné datové sady naměřené v rámci jednoho experimentu bylo zjištěno, že poloha maxima ve spektru zůstává po celý běh měření stejná, pozici tedy není nutné vyhledávat v každém obraze zvlášť, jelikož by docházelo ke zbytečnému zvyšování časové náročnosti, ale je možné používat pro všechny snímky stejný výběr oblasti spektra.

Vzhledem ke známým vlastnostem amplitudového spektra obrazu byla také zvažena možnost kruhového výběru objektové oblasti spektra zobrazená na obrázku 18, která by následně lépe posloužila pro další kroky procesu rekonstrukce, jelikož by vzdálenost nejvyššího vrcholu ve spektru od hrany výběru byla ve všech bodech stejná (poloměr R). Tento postup však nebyl použit pro další kroky rekonstrukce vzhledem k tomu, že je složité určit, jak velký poloměr R zvolit, aby byla ve výběru spektrální oblasti obsažena celá prostorově-frekvenční oblast vlnoplochy.

Na základě rešerše dostupných článků věnujících se tomuto tématu bylo tedy posouzeno, že není reálný důvod pro volbu kruhového výřezu spektra.



Obrázek 18: Kruhový výřez spektra

5.2 Algoritmy pro rozbalení fáze

V této kapitole jsou detailně popsány a následně porovnány algoritmy, jež lze využít pro rozbalení fáze a které byly otestovány na dodané datové sadě. Na základě podrobné analýzy je vybrán algoritmus, který poskytuje nejlepší výsledný obraz rozbalené fáze, tedy obraz vysoké kvality a s dostatečným kontrastem, vhodný pro další úpravy v procesu rekonstrukce.

Jak již bylo zmíněno výše, argumentem výsledné komplexní matice je zabalená fáze a je vystavena dvojznačnosti 2π v případech, kdy optická tloušťka je větší než vlnová délka osvětlení. V těchto případech je potřeba aplikovat algoritmus pro 2D rozbalení fáze, čímž dojde k získání matice představující rozbalenou fázi bez dvojznačností 2π . [27]

5.2.1 Funkce „unwrap“

Funkce *unwrap* je již implementována v programovacím prostředí Matlab a fázi rozbaluje tak, že koriguje radiánové fázové úhly ve fázovém poli přidáním násobků $\pm 2\pi$, jsou-li absolutní skoky mezi po sobě následujícími prvky pole větší nebo rovné výchozí skokové toleranci π radiánů. Jestliže je fáze uložena jako matice, rozbalí se po sloupcích.

Příklad použití funkce: $Q = \text{unwrap}(P)$, kde Q je výstupní proměnná, tedy matice obsahující hodnoty rozbalené fáze, a P je vstupní fázová mapa obsahující ještě „zabalené“ hodnoty.

Tolerance skoku menší než π má stejný účinek jako tolerance π . Pro toleranci menší než π , pokud je skok větší než tolerance, ale menší než π , by přidání $\pm 2\pi$ vedlo k většímu skoku než existující, takže rozbalení vybere aktuální bod. Pokud je naším cílem odstranit skoky, které jsou menší než π , je třeba použít jemnější mřížku v doméně. [21]

5.2.2 Algoritmus pro rychlé 2D rozbalení fáze (2D-SRNCP)

V rámci této práce byl otestován také algoritmus pro dvourozměrné rozbalování fází, který pracuje na takovém principu, že k rozbalení zabalené fáze využívá mapování kvality (dále pouze 2D-SRNCP algoritmus). Algoritmy pro rozbalení fáze, u kterých je cesta rozbalení řízená mapou kvality, řeší dva hlavní problémy: výběr funkce spolehlivosti (reliability function) a návrh cesty rozvinutí.

Kvalitou řízené algoritmy používají k určení spolehlivosti bodu určité kritérium. Toto kritérium je obvykle založeno na gradientech nebo diferencích mezi pixelem a jeho sousedy. Ty body s nejnižšími gradienty modulu 2π vzhledem k jejich sousedům jsou určeny jako nejlepší body, a proto jsou zpracovávány jako první. Jelikož použití absolutní hodnoty gradientu pro určení funkce spolehlivosti s sebou přináší různé komplikace, které vedou ke vzniku zkreslených naměřených hodnot funkce spolehlivosti, jsou pro tyto výpočty používány druhé difference pixelů v obraze. Tyto difference poskytnou informaci o stupni konvexnosti či konkávnosti fázové funkce, čímž zajištěna lepší detekce možných nesrovnalostí ve fázové mapě. Výpočet těchto druhých diferencí je vysvětlen níže pomocí obrázku 19.

$(i-1, j-1)$	$(i, j-1)$	$(i+1, j-1)$
$(i-1, j)$	(i, j)	$(i+1, j)$
$(i-1, j+1)$	$(i, j+1)$	$(i+1, j+1)$

Obrázek 19: Výpočet druhých diferencí v obraze [25]

Pro výpočet druhé diference pro každý pixel v obraze je potřeba mít k dispozici hodnoty jeho ortogonálních a diagonálních sousedů v matici (okně) o velikosti 3×3 . Pixely $(i, j - 1)$, $(i, j + 1)$, $(i - 1, j)$ a $(i + 1, j)$ sousedící s pixely (i, j) se nazývají ortogonální sousední pixely, zatímco pixely $(i - 1, j - 1)$, $(i + 1, j - 1)$, $(i - 1, j + 1)$ a $(i + 1, j + 1)$ se nazývají diagonální sousední pixely.

Druhou diferencí D pro pixel (i, j) lze spočítat podle rovnice:

$$D(i, j) = [H^2(i, j) + V^2(i, j) + D_1^2(i, j) + D_2^2(i, j)], \quad (5.1)$$

kde:

$$H(i, j) = \gamma[\varphi(i - 1, j) - \varphi(i, j)] \\ - \gamma[\varphi(i, j) - \varphi(i + 1, j)]$$

$$V(i, j) = \gamma[\varphi(i, j - 1) - \varphi(i, j)] \\ - \gamma[\varphi(i, j) - \varphi(i, j + 1)]$$

$$D_1(i, j) = \gamma[\varphi(i - 1, j - 1) - \varphi(i, j)] \\ - \gamma[\varphi(i, j) - \varphi(i + 1, j + 1)]$$

$$D_2(i, j) = \gamma[\varphi(i - 1, j + 1) - \varphi(i, j)] \\ - \gamma[\varphi(i, j) - \varphi(i + 1, j - 1)], \quad (5.2)$$

kde $\gamma(\cdot)$ je jednoduchá operace rozbalení pro odstranění všech 2π skoků mezi dvěma po sobě jdoucími pixely. Druhé diference lze vypočítat pro všechny pixely v obrázku kromě hranic. Hodnoty diference D u pixelů na okrajích obrazu jsou nastaveny na nekonečno, aby byly v rámci algoritmu vyřešeny jako poslední.

Spolehlivost pixelu R je definována jako:

$$R = \frac{1}{D}. \quad (5.3)$$

Z čehož plyne, že pixely jsou tím spolehlivější, čím jsou jejich druhé diference nižší.

Hrana je průsečík dvou pixelů, které jsou spojeny vodorovně nebo svisle. Jakýkoliv pixel s levým, pravým, horním nebo dolním sousedním pixelem může vytvořit hranu. Každé dva ortogonální sousední pixely mohou vytvořit hranu. Spolehlivost hrany je definována jako součet spolehlivosti dvou pixelů, které hrana spojuje. Cestu rozbalení fáze nelze definovat s ohledem na spolehlivost pixelů. Místo toho je definována pohledem na hodnotu spolehlivosti hran. Definice dráhy rozbalení je relativně jednoduchá: Nejprve se rozbálí hrany s vyšší spolehlivostí. Hrany jsou uloženy v poli a tříděny do skupin podle hodnoty spolehlivosti. Nejprve se vyřeší hrany s vyšší spolehlivostí. Každé dva pixely, které spolu tvoří hranu, by měly být rozbaleny s ohledem na sebe navzájem.

Na počátku předpokládáme, že žádný z pixelů nenáleží do skupiny. V procesu rozbalení mohou nastat 3 případy:

- Ani jeden z pixelů nebyl předtím rozbalen. Pixely jsou tedy rozbaleny s ohledem na sebe navzájem a zařazeny do jedné skupiny rozbalených pixelů.
- Jeden z pixelů byl zpracován dříve (a již tedy patří do určité skupiny rozbalených pixelů), ale druhý ne (nepatří zatím do žádné skupiny). Pixel, který nebyl zpracován dříve, je rozbalen vzhledem ke druhému pixelu a přidán do skupiny druhého pixelu.
- Oba pixely byly zpracovány dříve. Pokud nepatří do stejné skupiny, musí být obě skupiny rozbaleny s ohledem na sebe. Nejmenší skupina je rozbalena s ohledem na největší skupinu. Tato operace zahrnuje rozbalení pixelu patřícího do nejmenší skupiny vzhledem k druhému pixelu a přičtení stejné konstanty, která je přičtena k pixelu, ke zbytku nejmenší skupiny. Nakonec jsou obě skupiny spojeny do jedné nové skupiny.

Shrnutí této metody je tedy následující: nejprve jsou rozbaleny pixely nejvyšší kvality, a pixely nejnižší kvality jsou rozbaleny až jako poslední, algoritmus tedy provede nepřerušovaný proces rozbalení. Tento algoritmus je velmi robustní a rychlý a poskytuje konzistentní výsledky, i když jsou ve fázovém obrazu přítomny nespojitosti nebo zašuměné oblasti. Implementace tohoto algoritmu byla převzata z MathWorks File Exchange. [25] [26]

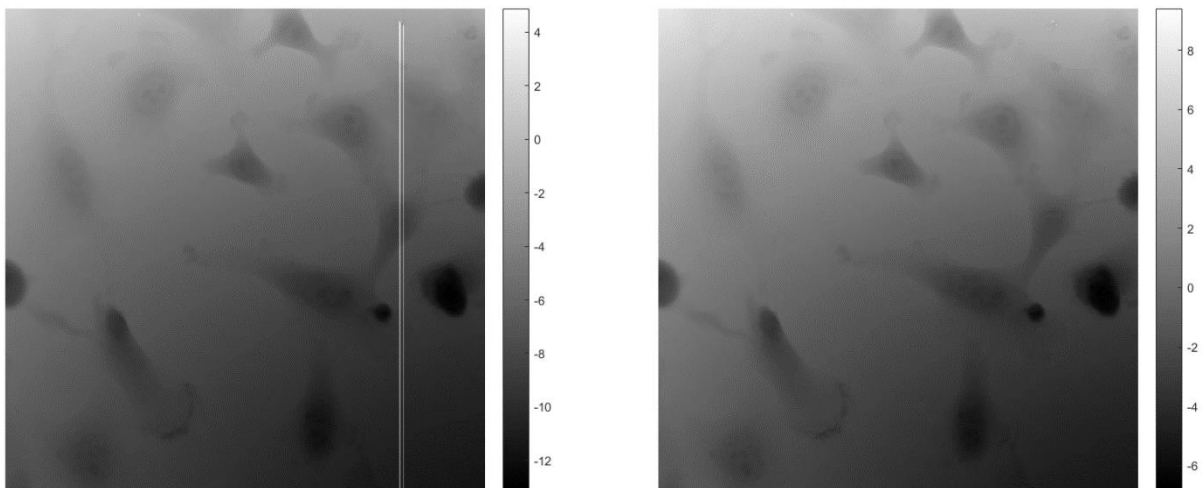
5.2.3 Porovnání algoritmů

Při porovnání dostupných algoritmů je třeba brát v úvahu především kvalitu a kontrast výsledného snímku, přítomnost nebo absenci artefaktů a v neposlední řadě možnost využití tohoto snímku pro další operace související s procesem rekonstrukce digitálního hologramu.

U funkce *unwrap* bylo prokázáno, že výsledek procesu rozbalení fáze je závislý na výběru objektového úseku spektra. Při různé velikosti a umístění (minimální posun) jsou výsledky výrazně odlišné, a v mnohých případech se také objevují artefakty v rozbaleném fázovém obraze, které se projevují jako bílé pruhy viditelné na snímku 19 (vpravo). Artefakty byly přítomny v obrazech i pro fixní výběr oblasti spektra.

Výsledný snímek má také oproti snímku získanému pomocí algoritmu Fast 2D phase unwrapping výrazně nižší kontrast. Hodnoty kontrastu byly vypočteny a porovnány vždy ze stejné oblasti snímku, a to jak v místě buňky, tak mimo ni – v pozadí daného snímku. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1 níže v kapitole 5.3.3, která obsahuje porovnání všech využitých metod.

Na obrázku 20 (vlevo) lze vidět fázi rozbalenou za použití integrované matlabovské funkce *unwrap* a na snímku vpravo je fáze rozbalená pomocí implementace algoritmu Fast 2D phase unwrapping.



Obrázek 20: (vlevo) Fáze rozbalená pomocí funkce *unwrap*; (vpravo) Fáze rozbalená pomocí algoritmu Fast 2D phase unwrapping

5.3 Aproximace pozadí

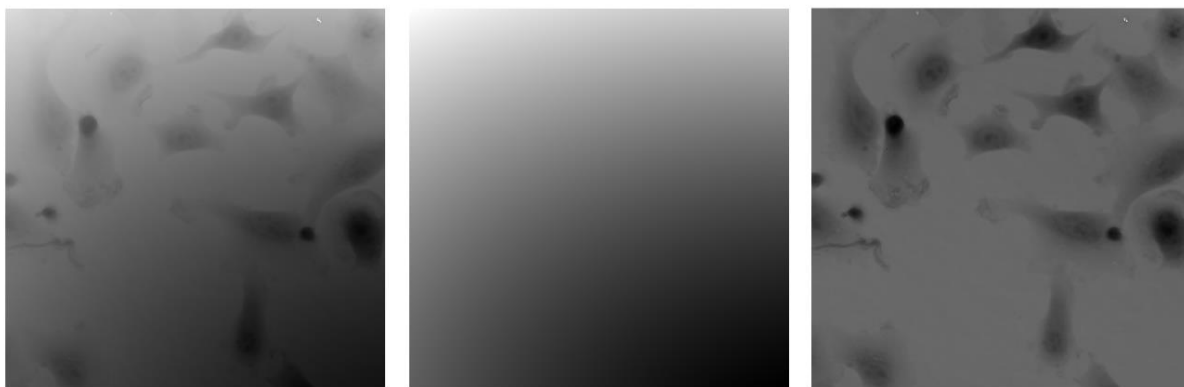
Pro získání co nejlepšího obrazu pozorovaného vzorku je třeba také provést aproximaci pozadí, aby došlo k odstranění viditelného jevu nerovnoměrného rozložení jasu a vylepšení kontrastu v obraze. Pro tyto úpravy byly otestovány dvě metody, a to proložení regresním polynomiálním modelem a také odečtení fázového obrazu autokorelační složky.

Ideálním způsobem, jak odstranit nestejně osvětlení, aberace a zakřivení fázového profilu, by bylo získání holografického snímku pozadí (tedy snímku pouze podložního sklíčka bez zkoumaného objektu) nasnímaného se stejnými parametry jako ostatní snímky objektů, a jeho následné odečtení od obrazu rozbalené fáze. Tento snímek bohužel v dostupném datasetu není k dispozici, proto jsou níže popsány jiné možné varianty odstranění fázových nerovnoměrností v obraze.

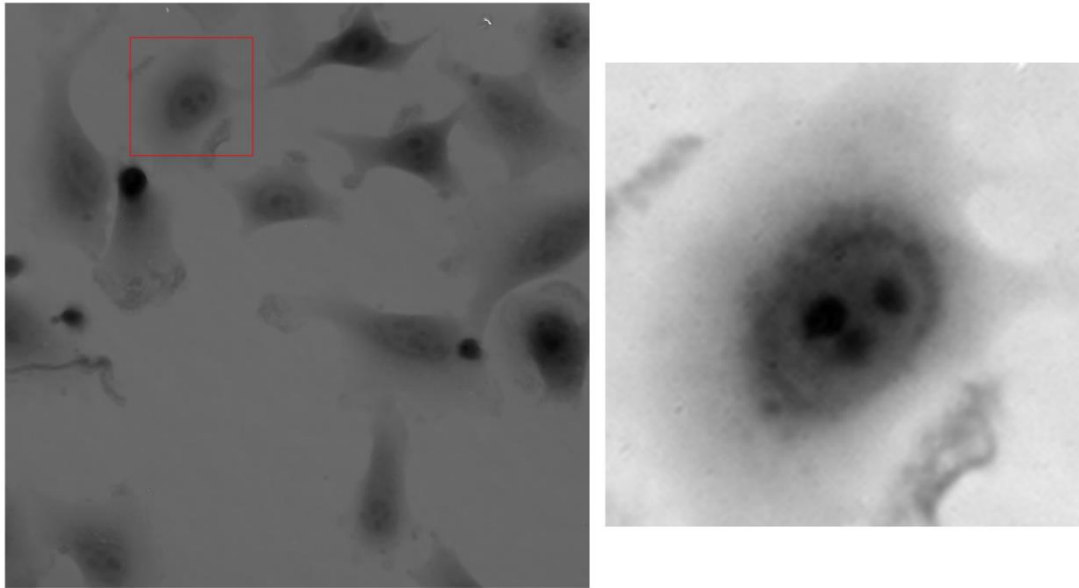
5.3.1 Polynomiální aproximace

Pro oddělení pozadí od popředí snímku je použita metoda aproximace polynomem, ke které byl využit toolbox `PolyfitnTools` získaný z MathWorks File Exchange, jež obsahuje funkci `polyfitn`. Tato funkce umožňuje získat polynomiální regresní model jedné nebo více nezávislých proměnných. Ze snímku rozbalené fáze byly rovnoměrně vybrány body odpovídající pozadí obrazu a použitím funkce `polyfitn` byly získány koeficienty polynomiální rovnice (5.4) popsané níže.

$$p(x, y) = a * x^2 + b * y^2 + c * x + d * y + e * (x * y) + f, \quad (5.4)$$



Obrázek 21: (vlevo) Snímek bez korekce; (uprostřed) Snímek pozadí; (vpravo) Fázový obraz po odečtení pozadí

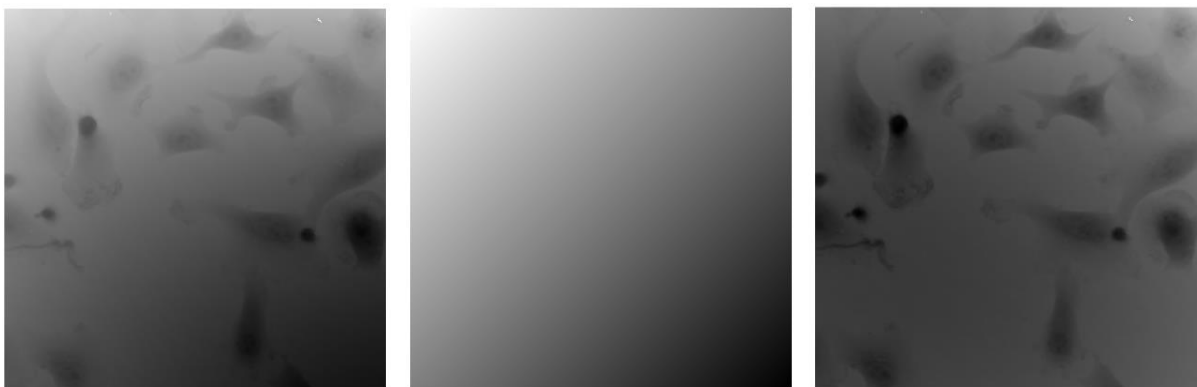


Obrázek 22: Přiblížení konkrétní buňky

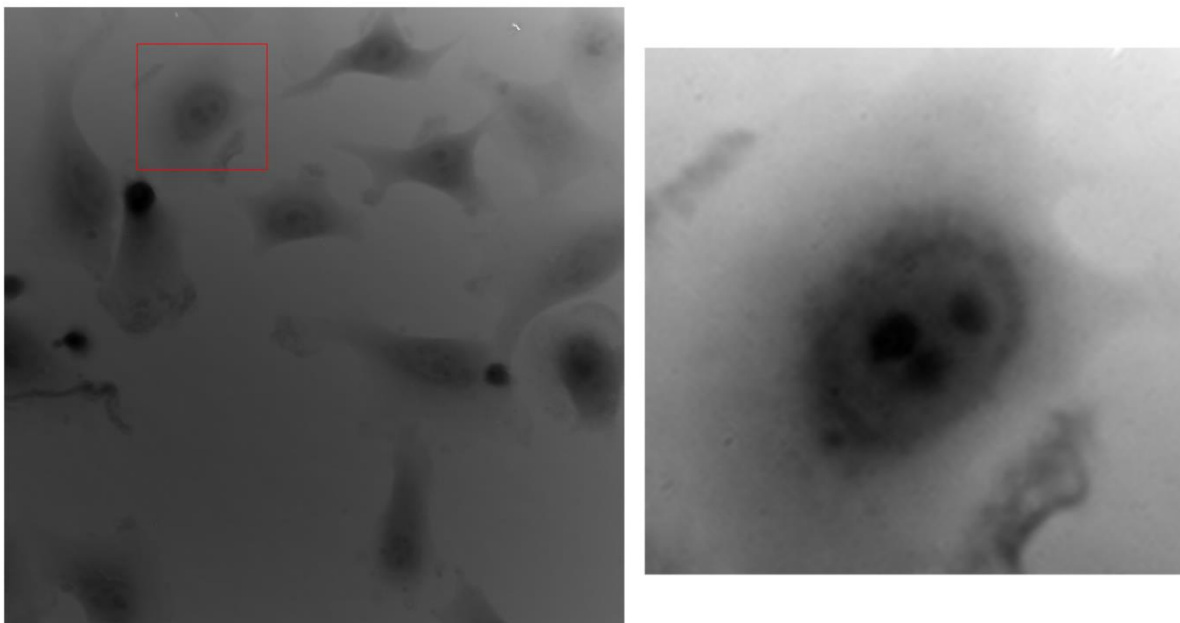
Na základě rovnice polynomu byla vytvořena plocha odpovídající pozadí obrazu, která byla odečtena od snímku rozbalené fáze. Získaný obraz pozadí je zobrazen na obrázku 21 (uprostřed) a rozdílový snímek na obrázku 21 (vpravo). Jak lze pozorovat níže, výsledný obraz po odečtení pozadí má vylepšený kontrast, díky kterému lze přehledně rozeznat strukturu pozorovaných buněk, což lze porovnat především oproti původnímu snímku bez korekce pozadí, který je zobrazen na snímku 21 (vlevo).

5.3.2 Odečtení fázového obrazu autokorelační složky spektra

Jako další přijatelná varianta se jeví využití autokorelační oblasti spektra ($R^2 + O^2$), také o velikosti $N/4 \times N/4$, střed vybrané oblasti je opět v nejvyšším vrcholu dané spektrální oblasti. Pokud opět provedeme umístění dané oblasti na střed prázdné matice, aplikujeme algoritmus pro rozbalení fáze a takto získaný snímek odečteme od snímku obsahujícího objekty, také dojde k poměrně dobrému odstranění nerovnoměrného osvětlení. Kontrast ve výsledném snímku je také lepší, i když ne tak výrazně jako u metody polynomiální aproximace.



Obrázek 23: (vlevo) Snímek bez korekce; (uprostřed) Snímek pozadí; (vpravo) Fázový obraz po odečtení pozadí



Obrázek 24: Přiblížení konkrétní buňky

5.3.3 Porovnání metod z hlediska kontrastu a kvality

Aby byly metody objektivně porovnány, byly otestovány některé dostupné metody pro měření kontrastu popsané níže.

Weberův kontrast

Došlo k proměření průměrné hodnoty jasu v různých oblastech obrazu, z nichž byl vypočten kontrast podle vztahu [28]:

$$I = \left| \frac{I_{cell} - I_{bgr}}{I_{bgr}} \right|, \quad (5.5)$$

kde I_{cell} je průměrná hodnota jasu v homogenní oblasti buňky (bez buněčných kompartment) a I_{bgr} je průměrná hodnota jasu v oblasti pozadí. Absolutní hodnota byla přidána, jelikož počítáme s fázovým obrazem, který může nabývat i záporných hodnot.

Bylo provedeno 5 měření v různých oblastech obrazu a v tabulce 1 níže jsou uvedeny vypočtené hodnoty kontrastu pro obrazy získané pomocí dvou různých algoritmů pro rozbalení fáze a následně pro dvě různé metody rozbalení fáze.

Měření	Fast 2D Phase Unwrapping		Matlab funkce „unwrap“	
	Polynomiální aproximace	Odečtení autokor. složky	Polynomiální aproximace	Odečtení autokor. složky
1	20,0203	0,9985	2,3554	0,1222
2	52,5831	0,8420	9,8957	0,3832
3	27,5242	2,5809	14,4520	0,2038
4	19,5068	1,2614	16,7014	0,3906
5	21,3508	1,1827	1,4083	0,1456

Tabulka 1: Vypočtené hodnoty Weberova kontrastu pro porovnání vybraných metod

V tabulce 1 lze pozorovat, že hodnoty kontrastu jsou závislé na konkrétní oblasti měření, pokud byla tedy vybrána velmi tmavá buňka, jako je tomu např. v bodě 2, hodnota kontrastu v porovnání s výrazně světlejším pozadím je vysoká. Hodnoty Weberova kontrastu jsou nejvyšší při kombinaci algoritmu Fast 2D Phase Unwrapping s metodou polynomiální aproximace pozadí. Při použití matlabovské funkce unwrap s toutéž metodou jsou dosažené kontrasty také poměrně vysoké, nicméně hodnoty v různých oblastech obrazu (pro různé buňky a jejich okolí) výrazně kolísají. Proto bylo třeba zvolit ještě další metodu pro výpočet kontrastu v obraze, který obsahuje jak buňky, tak pozadí (tzv. bi-populační obraz). [28]

Michelsonův kontrast

Jako další metoda pro stanovení kontrastu byl použit Michelsonův kontrast, který lze vypočítat podle vzorce [28]:

$$I = \frac{|I_{bgr} - I_{cell}|}{|I_{bgr} + I_{cell}|}. \quad (5.6)$$

V tabulce 2 níže jsou zobrazeny naměřené hodnoty kontrastu, opět bylo provedeno 5 měření ze stejných buněk, které jsou zobrazeny a očíslovány na obrázku 26, aby bylo zřetelné, z jakých oblastí byly hodnoty naměřeny. Vždy jsou brány hodnoty uvnitř buňky bez přítomnosti kompartment a následně oblast pozadí co nejbližší dané buňky.

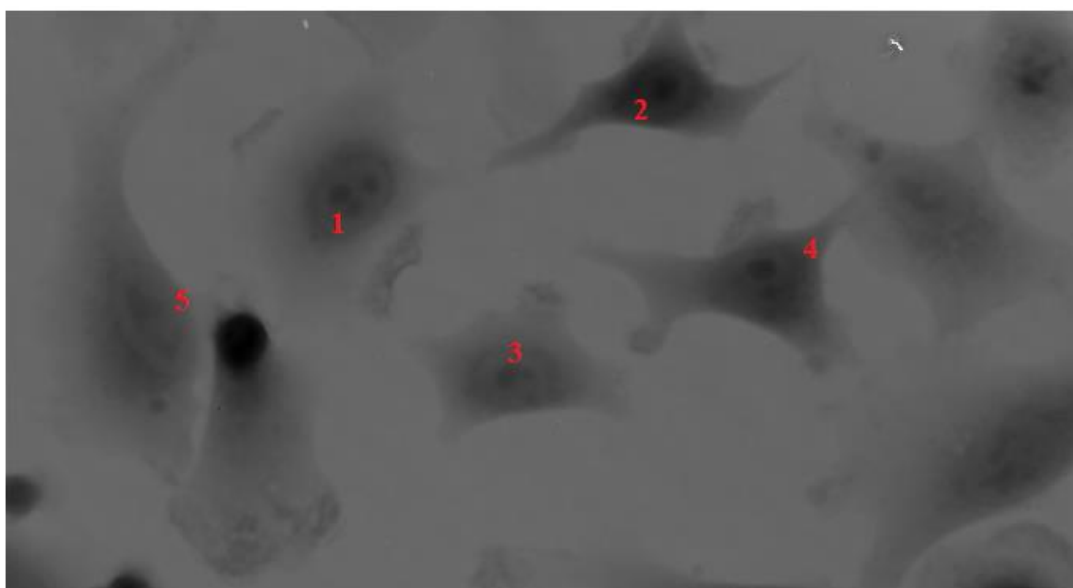
Měření	Fast 2D Phase Unwrapping		Matlab funkce „unwrap“	
	Polynomiální aproximace	Odečtení autokor. složky	Polynomiální aproximace	Odečtení autokor. složky
1	0,7236	0,4025	0,5478	0,0778
2	0,9705	4,2093	0,9847	0,1663
3	1,0337	0,4322	1,0133	0,0888
4	0,9384	0,9573	0,9259	0,1562
5	0,9515	0,3955	0,6460	0,0538

Tabulka 2: Vypočtené hodnoty Michelsonova kontrastu pro porovnání vybraných metod

V tabulce 2 lze pozorovat, že hodnoty Michelsonova kontrastu jsou taktéž nejvyšší při kombinaci algoritmu Fast 2D Phase Unwrapping s metodou polynomiální aproximace pozadí, avšak při použití matlabovské funkce *unwrap* s toutéž metodou jsou dosažené kontrasty téměř srovnatelné, ačkoliv je také přítomné kolísání hodnot pro různé oblasti.

Na základě porovnání hodnot Weberova i Michelsonova kontrastu ve snímcích získaných pomocí otestovaných metodik a jejich kombinací lze konstatovat, že nejlepších hodnot kontrastu ve výsledném fázovém obraze bylo dosaženo při kombinaci algoritmu rozbalení fáze založeném na funkci spolehlivosti (Fast 2D Phase Unwrapping) s metodou polynomiální aproximace pozadí.

Na obrázku 25 níže jsou čísla 1-5 označeny buňky, z jejichž vnitřních a vnějších oblastí byly měřeny průměrné hodnoty jasu pro výpočet kontrastů uvedených v tabulkách 1 a 2.

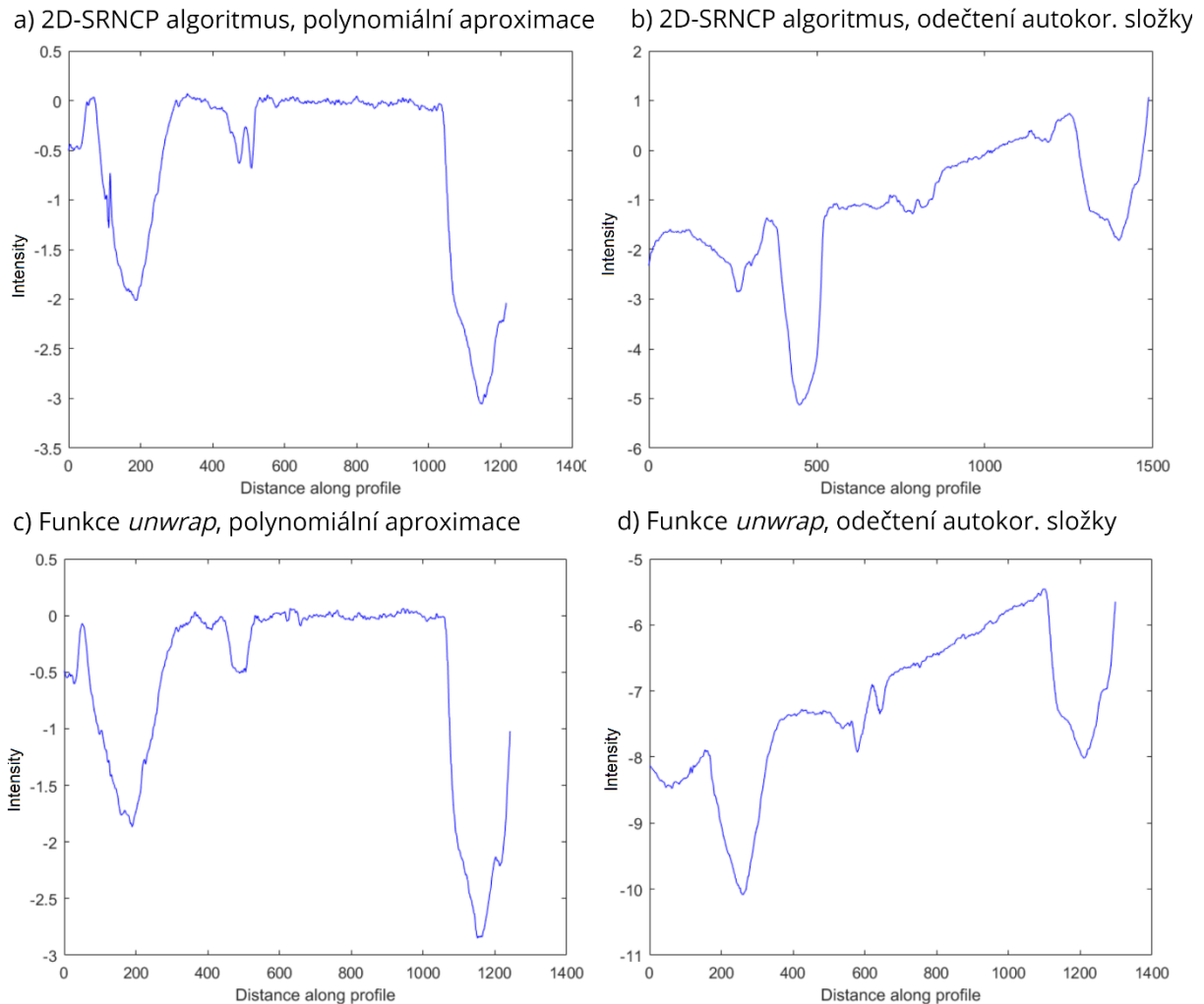


Obrázek 25: Snímek s číselným označením buněk pro měření kontrastu

Jasový profil

Jasový profil obrazu je množina hodnot jasu převzatá z pravidelně rozmístěných bodů podél úsečky nebo víceřádkové cesty v obraze. Pro body, které nespádají do středu pixelu, jsou hodnoty intenzity interpolovány (nejčastěji pomocí metody nejbližšího souseda). [30]

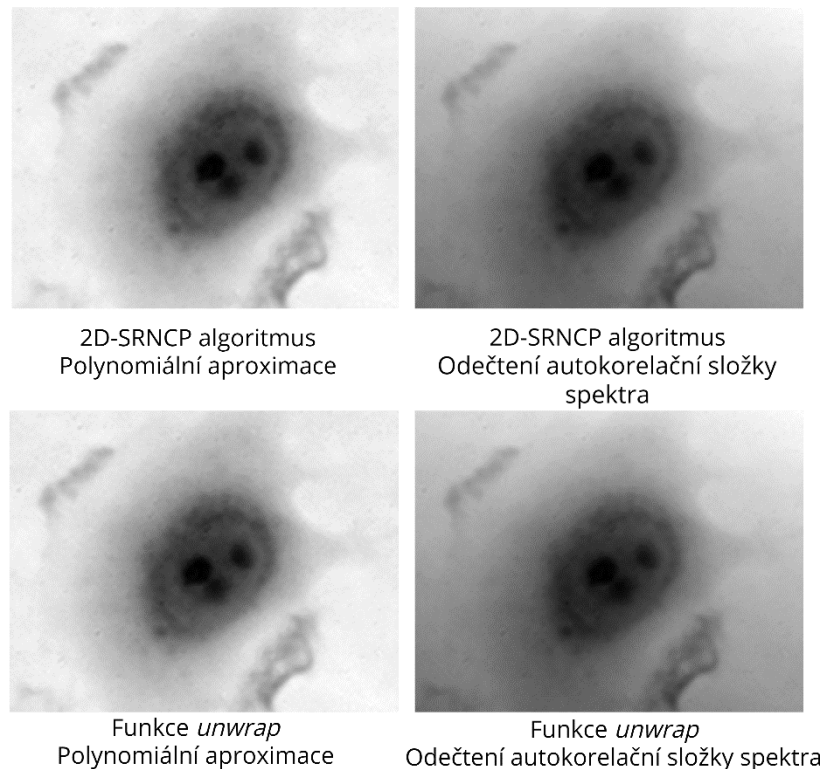
K získání jasového profilu jednotlivých snímků byla použita funkce *improfile*. Profily jsou zobrazeny níže na snímku 26.



Obrázek 26: Porovnání jasových profilů obrazů

Lze posoudit, že větší vliv na jasový profil obrazů má volba metody aproximace pozadí, zatímco při změně algoritmu pro rozbalení fáze nedojde k tak výrazné změně. U metody polynomiální aproximace pozadí nedochází k tak velkému kolísání intenzit jako u metody odečtení autokorelační složky spektra.

Snímky byly také porovnány subjektivně z hlediska kvality, kdy došlo k přiblížení konkrétní oblasti obrazu, nejlépe oblasti s výskytem buněk, které obsahují výrazné prvky, aby bylo viditelné, zda konkrétní metoda poskytuje lepší či horší rozlišení a zda při pohledu pouhým okem lze rozlišit, která metoda je v tomto ohledu robustnější. Porovnání těchto přiblížených snímků je zobrazeno na obrázku 27.

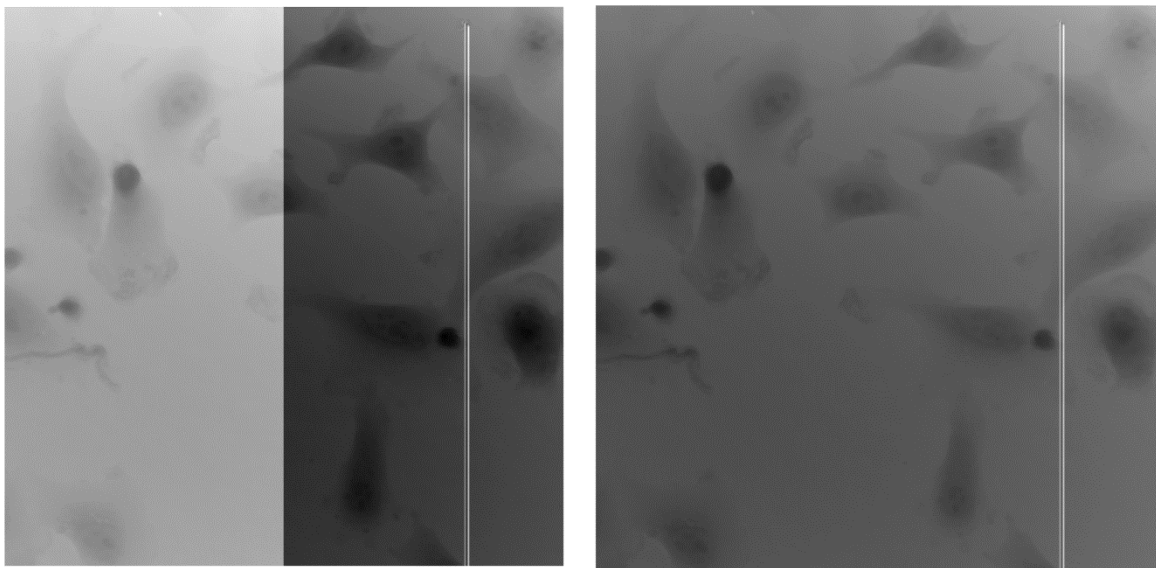


Obrázek 27: Porovnání přiblížených oblastí z obrazů

Je evidentní, že pro metodu **polynomiální aproximace pozadí** obrazu bylo pro obě metody rozbalení fáze dosaženo lepší kvality, což lze vidět i pouhým pohledem, a také výrazně lepšího kontrastu, to lze usoudit jak pohledem, tak nahlédnutím do tabulek 1 a 2 výše. Na obrázcích vlevo získaných po odečtení aproximované plochy pozadí lze pozorovat výraznější hranice buněk a také jejich vnitřní kompartmenty, které jsou na snímcích vpravo viditelné téměř nepatrně, a také hranice mezi buňkami a pozadím jsou poměrně rozmazané a nejasné. Snímky zobrazené vlevo jsou také výrazně jasnější. Snímky vpravo by tedy byly nevhodné pro další operace s obrazem, jako např. segmentace buněk od pozadí.

Metoda **odečtení autokorelační složky spektra** je oproti polynomiální aproximaci výhodná tím, že nevyžaduje manuální zadávání bodů pro aproximaci plochy, je tedy v tomto ohledu automatizována. Je také poměrně jednoduše implementovatelná, jelikož využívá pouze opakovanou aplikaci postupu pro vyjmutí oblasti spektra. Dvojnásobným využitím algoritmu pro rozbalení fáze bohužel však u této metody dochází ke zvýšení časové náročnosti, což by mohlo být problematické například u velkého množství dat.

Aby bylo možné kombinovat metodu odečtení fázového obrazu autokorelační složky spektra s využitím funkce *unwrap*, bylo třeba upravit výsledné hodnoty – odstranit skokové přechody ve fázovém obraze, čehož bylo dosaženo aplikací jednoduchých *for* cyklů procházejících fázový obraz, kdy v místě skokových přechodů mezi hodnotami byla přičtena hodnota 2π . Následně bylo provedeno další rozbalení fázových hodnot. I v upraveném snímku jsou však stále přítomné artefakty zhoršující kvalitu obrazu. Pro ilustraci je níže na snímku 28 zobrazeno porovnání před a po úpravě skokových hodnot. Hodnoty kontrastu ve výše uvedených tabulkách 1 a 2 byly vypočteny z již upraveného obrazu.

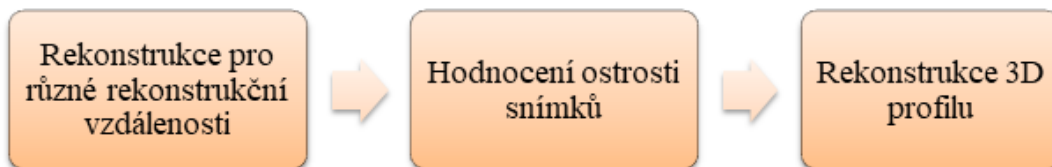


Obrázek 28: Snímky před a po korekci skokových hodnot

Manuální zadávání bodů při polynomiální aproximaci pozadí je sice také poměrně časově náročné (obvykle bylo zadáváno přibližně 20 bodů), ale při testování metody byla stejně aproximovaná plocha použita pro několik snímků z dostupného datasetu (z různých fází měření), kdy došlo k získání velmi dobrých výsledků. Pokud by tedy byla dostupná data s podobným umístěním buněk v rámci celého experimentu (pohyb v rámci experimentu minimální či žádný), dala by se pro rekonstrukci celého datasetu použít stejná aproximovaná plocha získaná z jednoho snímku. Většinou však v rámci jednoho experimentu buňky v médiu migrují, pohybují se, bylo by tedy třeba provádět aproximaci pozadí několikrát během rekonstrukce, a to ručně s ujištěním, že se v dané oblasti pozadí nenacházejí objekty, které by za prvé zkreslovaly hodnoty pozadí, a za druhé by mohlo dojít k odečtení důležité oblasti obsahujícího pozorované buňky.

5.4 Rekonstrukce 3D informace

Proces 3D rekonstrukce hologramu probíhá obecně ve třech krocích, které jsou uvedeny na schématu na obrázku 28. Nejprve je třeba provést rekonstrukci snímků pro různé rekonstrukční vzdálenosti, čímž dojde k získání různě ostrých snímků. Ostré oblasti se objeví tam, kde bude v dané rekonstrukční rovině přítomná konkrétní oblast pozorovaného objektu. V dalším kroku tedy dojde k posouzení a vyhodnocení ostrosti těchto snímků, čím získáme soubor vzdáleností, pro které je dosaženo ostrého zobrazení objektů. Posledním bodem je rekonstrukce 3D profilu snímané scény právě na základě získaných rekonstrukčních vzdáleností.



Obrázek 29: Schéma 3D rekonstrukce

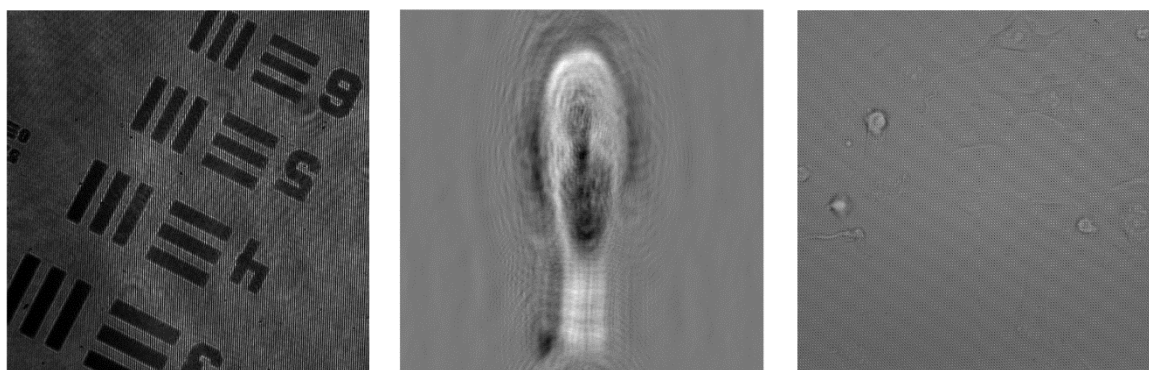
Pro 3D rekonstrukci pozorovaného objektu byly zvoleny metody: algoritmus jednorozměrné FFT a propagace úhlového spektra popsané v kapitolách 3.2.1. a 3.2.2.2. Aby bylo možné navržené metody aplikovat na dodanou datovou sadu, je třeba znát parametry provedeního měření, a to především vlnovou délku použitého zdroje světla, objektovou vzdálenost z , která značí, jak daleko byl pozorovaný objekt od rekonstrukční roviny, a také fyzické rozměry obrazu a použité zvětšení objektivu. Pro ověření správnosti metod byla také využita počítačově simulovaná sada 3D hologramů dostupná ze stránky: <http://www.erc-interfere.eu/downloads.html> a snímek hologramu obsahujícího tzv. USAF [31] obrazec vytvořený na sklíčku pomocí fotolitografie získaný z měření na ÚBMI.

Informace o nastavení měřicí soustavy použité pro získání datových sad, s nimiž bude dále pracováno v rámci 3D rekonstrukce, jsou uvedeny v tabulce 3. Nutno uvést, že tyto parametry jsou pouze odhadnuté či experimentálně stanovené z dostupných informací o měřicí soustavě, jak lze vidět na rekonstruovaných snímcích, ne vždy se pomocí těchto parametrů podaří dosáhnout přesné rekonstrukce prostorové informace.

Obraz	Vlnová délka [nm]	Vzdálenost z [m]	Velikost obrazu	Velikost pixelu [μm]	Zvětšení
Reálný snímek fotolitografie	532	0,005	960×1280	1,56	10×
Simulace 3D hologramu	632,8	0,5	1920×1080	8	-
Reálný snímek s buňkami	650	0,005	2048×2048	0,0918	20×

Tabulka 3: Hodnoty parametrů potřebných pro 3D rekonstrukci

Na obrázku č. 30 níže je možné vidět všechny tři původní hologramy z dostupných dat, jejichž rekonstrukční parametry jsou popsány v tabulce 3. Obrázek vlevo znázorňuje čáry a číslice nanesené na sklíčko pomocí fotolitografie, snímek uprostřed zobrazuje hologram sochy Venuše získaný pomocí počítačové simulace a obraz vpravo obsahuje živé buňky.



Obrázek 30: Původní hologramy

5.4.1 Implementace algoritmů

V této kapitole jsou popsány implementace dvou vybraných algoritmů pro rekonstrukci 3D informace z dostupných hologramů a také jsou prezentovány dosažené výsledky pomocí obou metod.

Metoda propagace úhlového spektra

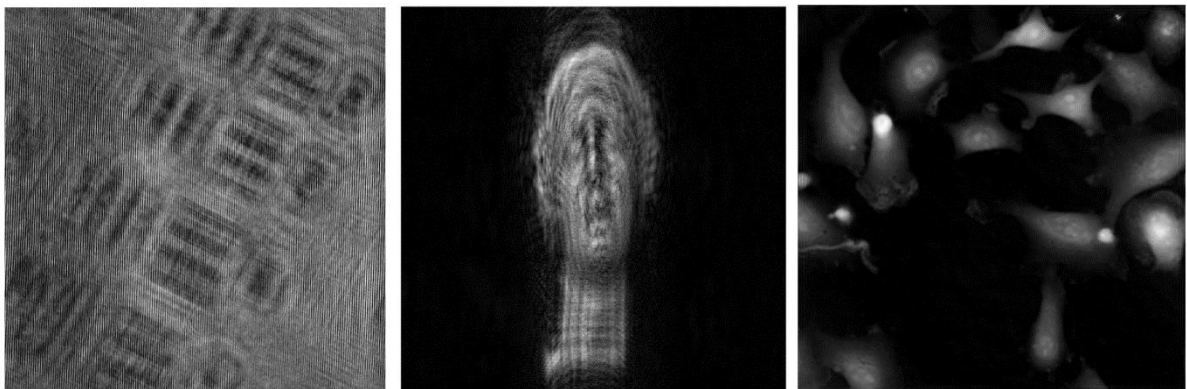
Implementace byla inspirována přílohami zdroje [15] a některé funkce byly použity. Postup této numerické metody lze interpretovat následujícím způsobem. Nejprve je Fourierovou transformací vstupního vlnového pole a rovinné vlny získáno úhlové spektrum. Díky teorému Fourierova posunu (*Fourier shift theorem*) je úhlové spektrum tohoto produktu posunuto o úhlové frekvence u a v ve srovnání s úhlovým spektrem samotného vstupního vlnového pole.

Úhlové spektrum tohoto produktu se následně násobí modifikovanou přenosovou funkcí posunutého úhlového spektra. Upravená přenosová funkce bere v úvahu, že úhlové frekvence jsou posunuty o u a v . Výsledné úhlové spektrum, které je stále posunuté, je následně transformováno inverzní Fourierovou transformací. [29]

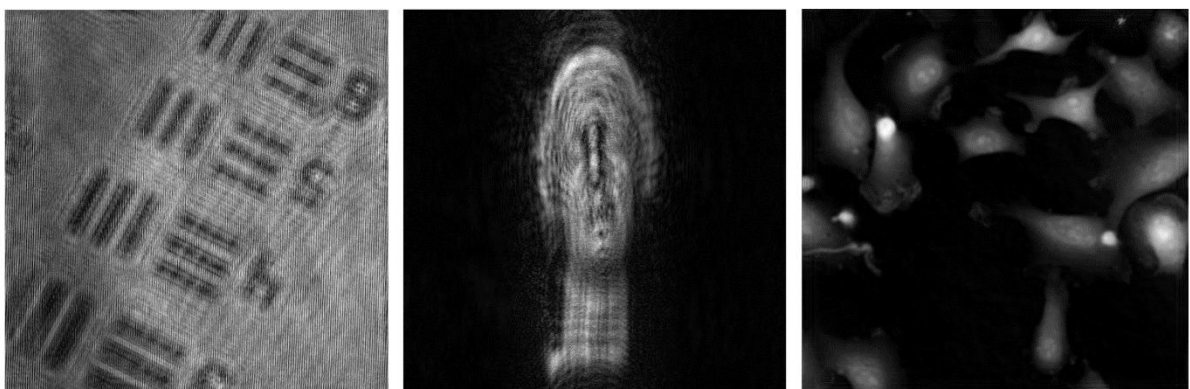
Rekonstrukční proces se tedy skládá z následujících kroků [15]:

1. Výpočet Fourierovy transformace hologramu $H_0(X, Y)$.
2. Simulace propagační funkce: $\exp\left(-\frac{2\pi iz}{\lambda}\sqrt{1-\lambda u^2-\lambda v^2}\right)$.
3. Vynásobení výsledků z bodů 1 a 2.
4. Výpočet zpětné Fourierovy transformace pro výsledek z bodu 3.

Výsledné snímky jsou získány propagací úhlového spektra pro různé objektové vzdálenosti z , čímž je získána prostorová informace pro různé úrovně snímané scény. Pokud aktuální objektová vzdálenost odpovídá poloze konkrétního objektu ve snímané scéně, oblast obrazu obsahující tento objekt se jeví jako ostrá, objekty jsou na snímku jakoby v popředí a okolí je méně ostré, nebo není téměř vůbec vidět. Na snímcích č. 31 a 32 níže jsou zobrazeny právě některé ze snímků pro různé vzdálenosti z a pro dostupná testovací data.

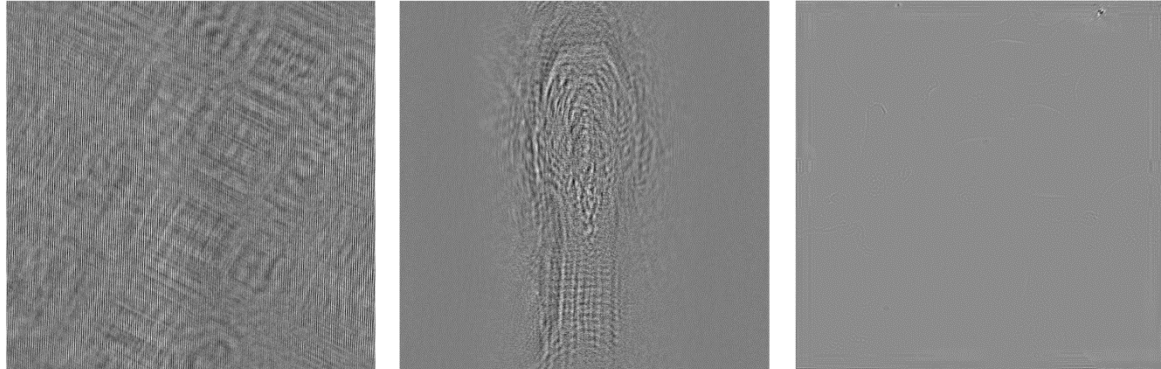


Obrázek 31: Rekonstruované hologramy pro (vlevo a vpravo): $z = 0.004$ m; (uprostřed): $z = 0.4$ m



Obrázek 32: Rekonstruované hologramy pro (vlevo a vpravo): $z = 0.0055$ m; (uprostřed): $z = 0.55$ m

Rozdíly pro jednotlivé snímky nejsou takto příliš dobře viditelné, což je způsobeno pravděpodobně především odhadem/experimentálním určením rekonstrukčních parametrů. Pokud se ale podíváme na diferenční snímky níže na obrázku 33, rozdíly v zobrazení určitých struktur v obraze jsou více patrné.



Obrázek 33: Diferenční snímky

Algoritmus jedné FFT

Jedná se o implementaci rovnice (3.9), která je popsána v kapitole 3.2.1. Tato rovnice je však uvedena pouze pro 1D rozměr, a proto bylo nutné ji transformovat a implementovat ve 2D podobě pro obrazy. Rovnice transformovaná do 2D tvaru je uvedena níže:

$$E_{rec}(\xi) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}z\right)}{i\lambda z} \left[\exp\left(i\frac{\pi\lambda z p^2}{N^2\Delta x^2}\right) + \exp\left(i\frac{\pi\lambda z n^2}{N^2\Delta y^2}\right) \right] \quad (5.7)$$

$$\times F\left\{E(x)\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(x^2 + y^2)\right)\right\},$$

Na základě výše uvedených parametrů jsou vypočteny souřadnice objektu ve snímané rovině a následně v rovině rekonstrukční, které jsou dosazeny do rovnice. Rovnice byla pro přehlednost implementace rozdělena na více částí, níže je ukázka implementace v prostředí Matlab.

```
part3 = exp(1i*(pi/(lambda*z)*(x.*x+y.*y))); % implementace 3. části
rovnice
part3fft = fft2(obr.*part3); % aplikace Fourierovy transformace
[p,n] = meshgrid([- (N-1)/2 : (N-1)/2], [- (N-1)/2 : (N-1)/2]); % indexy
(2D souřadnice v rekonstrukční rovině)
```

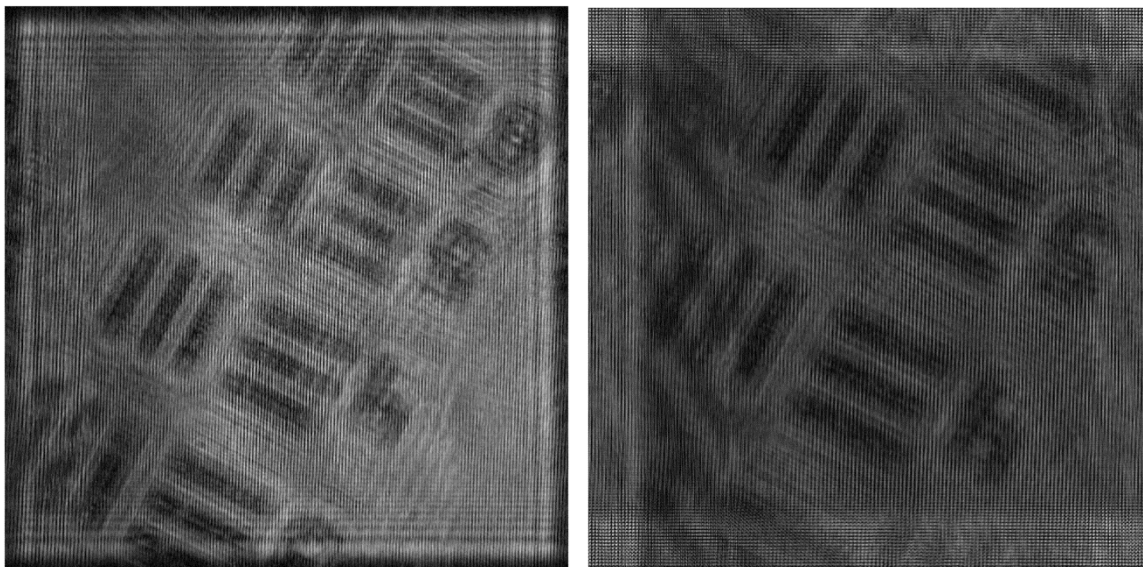
```

part2 = exp(1i*(pi*lambda*z*p.^2)/(N*N*dx*dx)
+ 1i*(pi*lambda*z*n.^2)/(N*N*dx*dx)); % implementace 2. části
rovnice - výstupem je matice komplexních čísel
part1 = (1/(1i*lambda*z))*exp(1i*(2*pi*z/lambda)); % implementace 1.
části rovnice - výstupem je číslo
out = fftshift(part1*part2.*part3fft); % posun ve spektrální oblasti

```

Opět byla provedena rekonstrukce pro několik různých objektových vzdáleností z s předpokladem, že bude dosaženo zobrazení různých rovin rekonstruované scény jako u předchozího algoritmu. U metody jedné FFT závisí zvětšení rekonstruovaného snímku na objektové vzdálenosti, jak bylo uvedeno v kapitole 3.2.1 (rovnice (3.10)), proto pro různé vzdálenosti dochází ke změnám zvětšení a velikosti zobrazené scény.

Na obrázku 34 níže jsou zobrazeny 2 rekonstruované snímky testovacího USAF obrazce pro různé vzdálenosti z . Výše popsáný jev je zde jasně viditelný, při změně vzdálenosti z došlo ke změně zvětšení a velikosti zobrazené scény. Tento výsledek neodpovídá předpokladům, jelikož při změně objektové vzdálenosti by mělo docházet právě k zobrazení různě ostrých oblastí v obraze podle toho, zda se aktuální objektová rovina shoduje s pozicí prostorových objektů v pozorované scéně.



Obrázek 34: Rekonstruované snímky: (vlevo) $z = 0.005$ m, velikost pixelu = 0,0017 mm; (vpravo) $z = 0.004$ m, velikost pixelu = 0.0014 mm

ZÁVĚR

Úvodní část práce se věnuje rozpracování teoretických podkladů pro účely této práce. Je rozdělena do více dílčích částí, zabývá se nejprve problematikou holografie, a to především principy digitální holografické mikroskopie. Dále jsou zde popsány mikroskopické konfigurace in-line a off-axis, z nichž vychází principy rekonstrukce hologramů.

Druhá kapitola obsahuje popis vybraných aplikací holografie, holografické mikroskopie a interferografie především v biologii živých buněk. Jednotlivé podkapitoly se věnují aplikacím v 3D tomografii a mikroskopii živých buněk, laserovým manipulacím s buňkami, jako je mikrochirurgie, a v neposlední řadě také analýze rakovinných buněk, jejich migrace, motility a odpovědi na léčbu.

Třetí část se následně zabývá rozбором a matematickým popisem algoritmů pro rekonstrukci hologramů. Metody jsou rozděleny do několika skupin podle principů, ze kterých vycházejí, ať už jsou to metody na bázi konvoluce, algoritmy na principu fázového posunu či metody s nastavitelným zvětšením, jejichž největší výhodou je nezávislost rekonstrukčního horizontu na vstupní konfiguraci systému.

Čtvrtá kapitola je zaměřena prakticky na implementaci zvoleného algoritmu pro rekonstrukci fázové informace z interferogramu, obsahuje jeho popis, strukturu a ukázky funkcí z programovacího prostředí MATLAB R2016a. Metoda byla otestována na dodaných snímcích poskytnutých společností Tescan Orsay Holding, a. s. a výstupy je možné pozorovat ve zmíněné kapitole. Metoda založená na extrakci a rozbalení fáze je výhodná, jelikož fázový snímek obsahuje prvotní informace o snímané scéně, z nichž následně dokážeme určit některé buněčné parametry, ujistit se, že snímané objekty jsou správně umístěny. Metoda poskytuje náhled na snímanou scénu, který bývá v procesu rekonstrukce hologramů vždy prvním krokem i v pokročilých rekonstrukčních softwarech dodávaných firmami spolu s mikroskopy.

Pátá kapitola navazuje na výše zmíněné, dochází k modifikacím metody pro extrakci fázového kontrastu, je diskutován vliv algoritmů pro rozbalení fáze, následně jsou navrženy dvě metody pro odstranění neuniformního osvětlení rozbaleného fázového snímku, jejichž výstupy byly taktéž porovnány a diskutovány z hlediska kontrastu a kvality snímků. Dle této analýzy je jako optimální metoda zvolena kombinace algoritmu pro rozbalení fáze založeném na funkci kvality a metody polynomiální aproximace pozadí.

Posledním bodem práce je rekonstrukce 3D informace z dostupných snímků. Byly využity snímky ze společnosti Tescan Orsay Holding, a. s., počítačově simulované hologramy z online zdroje a také jeden testovací hologram naměřený na experimentálně sestaveném holografickém mikroskopu na ÚBMI. V tomto bodě bylo problematické, že nebyly známy přesné akviziční parametry získaných snímků potřebné pro procesy rekonstrukce, čímž došlo ke zkreslení výsledků.

Hlavním cílem diplomové práce bylo zpracování teoretických podkladů, ze kterých bude vycházet návrhová i realizační část, návrh možné struktury řešení a implementace zvolených algoritmů. Metody byly navrženy tak, aby bylo možné je využít na různá data získaná měřením pomocí digitálního holografického mikroskopu v konfiguraci off-axis. Za předpokladu znalosti akvizičních parametrů dané konfigurace by bylo možné použít především navrženou metodu propagace úhlového spektra k rekonstrukci 3D informace o snímaných objektech, jelikož na základě dosažených výsledků lze usoudit, že se jedná o efektivní způsob, jak získat informace o jednotlivých rekonstrukčních rovinách pro různé objektové vzdálenosti.

SEZNAM LITERATURY

- [1] KIM, N., Y-L. PIAO a H-Y. WU. *Holographic Optical Elements and Application* [online]. IntechOpen, 2017 [cit. 2018-12-28]. ISBN 978-953-51-3038-3. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5772/67297>
- [2] TOAL, Vincent. *Introduction to Holography*. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-1869-5.
- [3] JEONG, Tung H. *Holographic imaging and materials: 19-20 August 1993, Québec, Canada*. Bellingham, Wash., USA: SPIE, c1994. Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering, v. 2043. ISBN 081941302X.
- [4] 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.
- [5] ANDRULEVIČIUS, Mindaugas. Methods and Applications of Optical Holography. *MATERIALS SCIENCE* [online]. 2011, 17(4) [cit. 2018-12-28]. ISSN 2029-7289. Dostupné z: <http://www.matsc.ktu.lt/index.php/MatSc/article/view/771>
- [6] LEBRUN, D., A. BENKOUIDER, S. COËTMELLE a M. MALEK. Particle field digital holographic reconstruction in arbitrary tilted planes. *Optics Express* [online]. 2003, 11(3), 6 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/OE.11.000224>
- [7] KEMPER, B., P. LANGEHANENBERT a G. von BALLY. Digital Holographic Microscopy: A New Method for Surface Analysis and Marker-Free Dynamic Life Cell Imaging. *Optik&Photonik* [online]. 2007, 44(2), 4 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/opph.201190249>
- [8] SCHNARS, Ulf a Werner JÜPTNER. *Digital Holography: Digital Hologram Recording, Numerical Reconstruction, and Related Techniques* [online]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005 [cit. 2018-09-30]. ISBN 978-3-540-26911-3. Dostupné z: <https://www.springer.com/in/book/9783642060182>
- [9] YU, X., J. HONG, Ch. LIU a Myung K. KIM. Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking. *Optical Engineering* [online]. 2014, 53(11), 22 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/1.OE.53.11.112306>
- [10] KIM, Myung K. Applications of Digital Holography in Biomedical Microscopy. *Journal of the Optical Society of Korea* [online]. 2010, 14(2), 13 [cit. 2018-12-28]. DOI: 10.3807/JOSK.2010.14.2.077. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/josk/abstract.cfm?URI=josk-14-2-77>

- [11] POTCOAVA, M. a M. K. KIM. Fingerprint biometry applications of digital holography and low-coherence interferography. *Applied Optics* [online]. 2009, **48**(34) [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ao/viewmedia.cfm?uri=ao-48-34-H9&seq=0>
- [12] CLARK, D. C., L. KRZEWINA a M. K. KIM. Quantitative Analysis by Digital Holography of the Effect of Optical Pressure on a Biological Cell. *Biomedical Optics and 3-D Imaging* [online]. 2010 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/BIOMED.2010.JMA23>
- [13] DUFRESNE, E. C. a D. G. GRIER. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1998, **69** [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1148883>
- [14] VERRIER, N. a M. ATLAN. Off-axis digital hologram reconstruction: some practical considerations. *Applied Optics* [online]. 2011, **50**(34), 14 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-50-34-H136>
- [15] LATYCHEVSKAIA, T. a H. W. FINK. Practical algorithms for simulation and reconstruction of digital in-line holograms. *Applied Optics*[online]. 2015, **54**(9), 28 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-54-9-2424>
- [16] YAMAGUCHI, I., J. KATO, S. OHTA a J. MIZUNO. Image formation in phase-shifting digital holography and applications to microscopy. *Applied Optics* [online]. 2001, **40**(34) [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-40-34-6177>
- [17] DUBOIS, F., C. YOURASSOWSKY, O. MONNOM, P. VAN HAM, R. KISS a Ch. DECAESTECKER. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2006, **11**(5), 6 [cit. 2018-12-28]. DOI: 10.1117/1.2357174. Dostupné z: <http://www.researchgate.net/publication/6705461>
- [18] LIEBLING, M., T. BLU a M. UNSER. Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram. *Journal of the Optical Society of America A*[online]. 2004, **21**(3) [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-21-3-367>
- [19] KELLY, D. P., B. M. HENNELLY a N. PANDEY. Resolution limits in practical digital holographic systems. *Optical Engineering* [online]. 2009, **48**(9), 13 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: http://eprints.maynoothuniversity.ie/2469/1/BH_Resolution_Limits.pdf
- [20] LI, Y., L. PETROVIC, J. LA a C. S. YELLESWARAPU. Digital holographic microscopy for imaging growth and treatment response in 3D tumor models. *J Biomed Opt.* [online]. 2014, **19**(11), 8 [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364948>

- [21] KARBAN, Pavel. *Výpočty a simulace v programech Matlab a Simulink*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2016. ISBN 80-251-1301-9.
- [22] MEROLA, F., P. MEMMOLO, L. MICCIO, et al. Tomographic flow cytometry by digital holography. *Light: Science & Applications* [online]. 2017, (6), 7 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1038. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/lsa2016241>
- [23] FREISCHLAD, K. a C. L. KOLIOPOULOS. Fourier description of digital phase-measuring interferometry. *Journal of the Optical Society of America A* [online]. 1990, 7(4) [cit. 2018-12-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/JOSAA.7.000542>
- [24] BELASHOV, A., N. PETROV, X. J. LAI a C-J. CHENG. Comparison of phase reconstruction algorithms accuracy in off-axis digital holography. *Conference Paper* [online]. 2014, , 3 [cit. 2019-01-01]. DOI: 10.13140/2.1.1839.0088. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/269763714_Comparison_of_phase_reconstruction_algorithms_accuracy_in_off-axis_digital_holography
- [25] HERRÁEZ, M. A., D. R. BURTON, M. J. LALOR a M. A. GDEISAT. Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path. *Applied Optics* [online]. 2002, 41(35), 10 [cit. 2019-03-23]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/AO.41.007437>
- [26] M. F. Kasim, "Fast 2D phase unwrapping implementation in MATLAB", https://github.com/mfkasim91/unwrap_phase/ (2017).
- [27] GIRSHOVITZ, P. a N. T. SHAKED. Real-time quantitative phase reconstruction in off-axis digital holography using multiplexing. *Optics Letters* [online]. 2014, 8(39), 4 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1364/OL.39.002262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/OL.39.002262>
- [28] FAIGENBAUM-GOLOVIN, S., B. SOBER, E. TURKEL a E. PIASETZKY, SHAUS, A., ed. Potential Contrast – A New Image Quality Measure. In: *IS&T International Symposium on Electronic Imaging Science and Technology 2017: Image Quality and System Performance XIV*. Burlingame, California, USA: Curran Associates, 2017, s. 7. ISBN 9781510846197.
- [29] RITTER, A. Modified shifted angular spectrum method for numerical propagation at reduced spatial sampling rates. *Opt. Express* [online]. 2014, 22(21) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/OE.22.026265>
- [30] POON, Ting-Chung a Jung-Ping LIU. *Introduction to modern digital holography: with Matlab*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-1-107-01670-5.
- [31] R1DS1P - Positive 1951 USAF Test Target, Ø1". *ThorLabs*. [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=R1DS1P>

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
CCD	Charge-coupled device
CMOS	Complementary Metal–Oxide–Semiconductor
DHM	Digital holographic microscopy
FFT	Fast Fourier Transform
IFFT	Inverse Fast Fourier Transform
2D	Dvoudimenzionální
3D	Trojdimenzionální
2D-SRNCP	Two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path
1951 USAF resolution test chart	Zařízení pro testování mikroskopického optického rozlišení původně definované standardem US Air Force MIL-STD-150A z roku 1951. [31]

SEZNAM PŘÍLOH

A	ZDROJOVÝ KÓD – EXTRAKCE FÁZE	61
B	ZDROJOVÝ KÓD – POLYNOMIÁLNÍ APROXIMACE POZADÍ	63
C	ZDROJOVÝ KÓD – ODEČTENÍ AUTOKORELAČNÍ OBLASTI SPEKTRA	64
D	ZDROJOVÝ KÓD – VÝPOČET KONTRASTU	66
E	ZDROJOVÝ KÓD – PROPAGACE ÚHLOVÉHO SPEKTRA	67
F	ZDROJOVÝ KÓD – METODA JEDNÉ FFT	68
G	OBSAH PŘILOŽENÉHO CD	70

A ZDROJOVÝ KÓD – EXTRAKCE FÁZE

```
%% Inicializace, načtení dat
I1 = imread('Hologram-001-001-023.tiff'); % I1 - původní
hologram
I_size = size(I1);

%% FFT a proces posunu FFT matice
spect = fft2(I1);
shifted_spect = fftshift(spect);

%% Výběr objektové části spektra
% MANUÁLNĚ:

% figure(2);
% imagesc(log10(abs(shifted_spect)));
% colormap('Gray');
% title('Vyberte oblast - nakreslete obdelníkový tvar kolem
vybraného úseku spektra');
% rect = getrect; % Výběr oblasti pro extrakci fázové
informace - nakreslení obdelníkového útvaru
% rect = round(rect);
% figure(2);
%
% imagesc(log10(abs(shifted_spect)));
% colormap('Gray');

% AUTOMATICKY:
m1 = 1429; % vždy poloha maxima
m2 = 625;

X_min = m1 - I_size(1)/8;
Y_min = m2 - I_size(1)/8;
rect = [X_min Y_min (I_size(1)/4)-1 (I_size(1)/4)-1];
ImCropped = imcrop(abs(shifted_spect),rect);
%% Zkopírování vybrané oblasti do prázdné matice
object_spect = zeros(I_size);
object_spect(rect(2):rect(2) + rect(4),rect(1) : rect(1) +
rect(3)) = shifted_spect(rect(2):rect(2) + rect(4),rect(1) :
rect(1) + rect(3));
spect_value = max(max(abs(object_spect))); [r,c,~] =
find(abs(object_spect) == spect_value); % Finding of peak
location.
%% Posun do středu
Obj_shift_to_center =
circshift(object_spect, [(round(I_size(1)/2) - r)
(round(I_size(2)/2) - c)]);
%% Inverzní FFT
obj_shifted = ifftshift(Obj_shift_to_center);
inv_out = ifft2(obj_shifted);
```

```
%% Extrakce fázové informace
phase_out = angle(inv_out); % Výpočet fáze
phase_out = unwrap_phase(phase_out); % Rozbalení fáze -
algorithmus Fast 2D Phase Unwrapping
% phase_out = unwrap(phase_out); % matlabovská funkce "unwrap"
amp_out = abs(inv_out); % Extrakce amplitudy
```

B ZDROJOVÝ KÓD – POLYNOMIÁLNÍ APROXIMACE POZADÍ

```
imshow(phase_out,[]) % Vykreslení
hold on
colorbar
title('Rekonstruovaná rozbalená fáze');
[x,y] = getpts;
hold off

%% Plocha - polynomiální aproximace
v = zeros(1,numel(x));
for ii = 1:numel(x)
    v(ii) = phase_out( round(y(ii)), round(x(ii)) );
end

p = polyfitn([x(:), y(:)], v(:), [0 0;1 0;2 0;0 1;0 2; 1 1]);

coeff = p.Coefficients;
[X,Y] = meshgrid(1:2048,1:2048);
plocha = coeff(3)*X.^2 + coeff(5)*Y.^2 + coeff(2)*X +
coeff(4)*Y + (coeff(6)*(X.*Y)) + coeff(1);

figure(4)
imshow(plocha,[])

diff = phase_out - plocha;
figure(5);
subplot(131); imshow(phase_out, [] );
subplot(132); imshow(plocha, []);
subplot(133);
```

C ZDROJOVÝ KÓD – ODEČTENÍ AUTOKORELAČNÍ OBLASTI SPEKTRA

```
%% Výběr autokorelační oblasti spektra
maxValue = max(max(shifted_spect));
[bgr_rows, bgr_cols] = find(shifted_spect == maxValue);
X_min_bgr = bgr_rows - I_size(1)/8;
Y_min_bgr = bgr_cols - I_size(1)/8;
rect_bgr = [X_min_bgr Y_min_bgr (I_size(1)/4)-1 (I_size(1)/4)-
1];
ImBgrCropped = imcrop(abs(shifted_spect), rect_bgr);
% Umístění výběru do centra prázdné matice
autocorr_spect = zeros(I_size);
autocorr_spect(rect_bgr(2):rect_bgr(2) +
rect_bgr(4), rect_bgr(1) : rect_bgr(1) + rect_bgr(3)) =
shifted_spect(rect_bgr(2):rect_bgr(2) +
rect_bgr(4), rect_bgr(1) : rect_bgr(1) + rect_bgr(3));
autocorr_spect_value = max(max(abs(autocorr_spect)));
[r2, c2, ~] = find(abs(autocorr_spect) == autocorr_spect_value);
% Finding peak location.

Autocorr_shift_to_center =
circshift(autocorr_spect, [(round(I_size(1)/2) - r2)
(round(I_size(2)/2) - c2)]);

autocorr_shifted = ifftshift(Autocorr_shift_to_center);
autocorr_out = ifft2(autocorr_shifted);

phase_out_bgr = angle(autocorr_out); % Výpočet fáze
phase_out_bgr = unwrap_phase(phase_out_bgr); % Rozbalení fáze
-
% algoritmus Fast Phase Unwrapping

%% UNWRAP MATLAB - aproximace pozadí
% phase_out_bgr = unwrap(phase_out_bgr); % Rozbalení fáze -
matlabovská funkce "unwrap"
%
% for i = 2:size(phase_out_bgr,1)
%     for j = 2:size(phase_out_bgr,2)
%         if phase_out_bgr(i-1,j-1) > 1.5*phase_out_bgr(i,j)
%             phase_out_bgr(i-1,j-1) = phase_out_bgr(i,j) +
2*pi;
%             else phase_out_bgr(i-1,j-1) = phase_out_bgr(i,j);
%         end
%     end
% end
%
% phase_out_bgr = unwrap(phase_out_bgr); % Rozbalení fáze -
matlabovská funkce "unwrap"
```

```
%% Odečtení pozadí a zobrazení
diff = phase_out - phase_out_bgr; % odečtení pozadí od snímku

figure(4);
subplot(131); imshow(phase_out, []);
subplot(132); imshow(phase_out_bgr, []);
subplot(133); imshow(diff, [])
```

D ZDROJOVÝ KÓD – VÝPOČET KONTRASTU

```
%% Výpočet kontrastu
figure(5)
imshow(diff, [])
hold on
rect_cell = getrect; % výběr oblastí pro výpočet kontrastu
hold on
rect_bgr = getrect;
hold off

ImCell = imcrop(diff, rect_cell);
ImBgr = imcrop(diff, rect_bgr);

meanGrayLevelCell = mean2(ImCell); % výpočet průměrné hodnoty
jasu v dané oblasti
meanGrayLevelBgr = mean2(ImBgr);

% Weberův kontrast
contrWb = abs((meanGrayLevelCell -
meanGrayLevelBgr)/meanGrayLevelBgr)

% Michelsonův kontrast
contrMich = abs((meanGrayLevelBgr -
meanGrayLevelCell)/(meanGrayLevelBgr + meanGrayLevelCell))
```

E ZDROJOVÝ KÓD – PROPAGACE ÚHLOVÉHO SPEKTRA

```
%% Parametry (pro snímky z Tescanu)
lambda = 650*10^(-9); % Vlnová délka [m]
N = size(I1,1); % Počet pixelů
pixelSize = 0.0000000918; % Velikost pixelu [m]
area = N* pixelSize; % Velikost rekonstruované oblasti [μm]
z = 0.005; % Objektová vzdálenost [m]
h = 0.00000001; % Výška pozorovaných prostorových objektů [m]
z0_start = 0.004; % Počáteční objektová vzdálenost [m]
z0_end = 0.006; % Konečná objektová vzdálenost [m]
z0_step = 0.0005; % Krok rekonstrukce [m]

%% Propagace úhlového spektra
hologram0 = diff; % jako vstupní obraz je použit fázový snímek
po aproximaci pozadí

%% Rekonstrukce pro různé objektové vzdálenosti
p = zeros(N,N);
S = round((z0_end - z0_start)/z0_step); % počet
rekonstrukčních kroků
reconstr0 = zeros(N,N,S);

for i = 1:S
    z0 = z0_start + i*z0_step;
    area = z * h/z0;
    for ii = 1:N
        for jj = 1:N
            alpha = lambda*(ii - N/2 - 1)/area; % výpočet
            % úhlových frekvencí v
            beta = lambda*(jj - N/2 - 1)/area;
            if (alpha^2 + beta^2) <= 1
                p(ii,jj) = exp(-2*pi*ii*z0*sqrt(1-alpha^2 -
                    beta^2)/lambda);
            end
        end
    end
    prop = p;
    rec0 = abs(IFT2Dc(FT2Dc(hologram0).*prop));
    reconstr0(:,:,i) = rec0(:,:,i);
    figure(3)
    imshow((abs(reconstr0(:,:,i))), []);
    colormap(gray)
    pause(0.01);
end
```

F ZDROJOVÝ KÓD – METODA JEDNÉ FFT

```
%% Inicializace a nastavení parametrů
obr = imread('p33.tiff');
% obr = imread('Hologram-001-001-023.tiff');
obr = double(obr(:,:,1));
obr = double(obr);
obr = obr/(max(max(obr)));
[nr, nc] = size(obr);

N = min([nr nc]) - 1; % zmenšení snímku o 1 k získání lichého
počtu pixelů na každé straně od středu [0,0]
obr = obr(1:N, 1:N);

% Objektová vzdálenost z v metrech
z = 0.005; % USAF hologram i Tescan hologram

% Velikost pixelu zobrazované scény (Field of view) v metrech
fov = 0.0021; % USAF hologram
% fov = 0.000188; % hologram Tescan

% Vlnová délka v metrech
lambda = 532e-9; % USAF hologram
% lambda = 650e-9; % hologram Tescan

% dx - velikost pixelu v hologramu/v rovině senzoru
dx = fov/nc;

% Zvětšení - může být upraveno
% magn = lambda*z/(N*dx*dx); % aby bylo zvětšení 1 - z musíme
vypočítat
% z = 1/z*(N*dx*dx)

% dksi - velikost pixelu v rekonstrukční rovině
dksi = (lambda*z)/(N*dx);

% Souřadnice v rovině senzoru
[x,y] = meshgrid( [-(N-1)/2:(N-1)/2], [-(N-1)/2:(N-1)/2] ); %
souřadnice
x = dx*x;
y = dx*y;

%% Implementace rovnice pro metodu jedné FFT
part3 = exp(j*(pi/(lambda*z)*(x.*x+y.*y))); % 3. člen
part3fft = fft2( obr.*part3 ); % 2D FFT - 3. člen
[p,n] = meshgrid( [-(N-1)/2:(N-1)/2], [-(N-1)/2:(N-1)/2] ); %
k vytvoření 2D souřadnic
part2 = exp(j*(pi*lambda*z*p.^2)/(N*N*dx*dx) +
j*(pi*lambda*z*n.^2)/(N*N*dx*dx)); % 2D matice komplexních
čísel - 2. člen
```

```
part1 = (1/(j*lambda*z))*exp(j*(2*pi*z/lambda)); % číslo - 1.  
člen  
out = fftshift(part1*part2.*part3fft);  
  
figure(1);  
subplot(121); imshow( obr, []);  
subplot(122); imshow( abs(out), []);
```

G OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

Přiložené CD obsahuje následující položky:

- Elektronická verze diplomové práce
- Funkce pro rozbalení fáze *unwrap_phase.m* [26]
- Zdrojové kódy pro extrakci fázové informace a aproximaci pozadí
 - Metoda polynomiální aproximace
 - Metoda odečtení autokorelační složky spektra
- Zdrojový kód pro metodu propagace úhlového spektra
- Zdrojový kód pro metodu jedné FFT
- Data poskytnutá společností Tescan Orsay Holding, a. s.