

JAK ZACHYTIT NEVIDITELNÉ? Dokáže to holografický mikroskop!

Jak lze zobrazit objekt, který je natolik průhledný a nekонтastní, že je pro lidské oko téměř neviditelný? A co když je takový předmět navíc ponořený v zakaleném prostředí? Nebo jak změřit objekt vysoký jen několik nanometrů? V biologickém

i technickém výzkumu existuje celá řada vzorků, které mají právě takový charakter. Jejich pozorování pak vyžaduje speciální přístroj – například holografický mikroskop, vyvinutý na Vysokém učení technickém v Brně.

Princip holografie objevil v roce 1947 maďarsko-britský fyzik Dennis Gabor (1900–1979). Tento objev byl nečekaným výsledkem Gaborovy snahy o zlepšení rozlišení elektronového mikroskopu. V té době ještě neexistovaly vhodné zdroje světla, a proto velký rozvoj holografie způsobil až objev laseru v roce 1960.

Již v 60. letech se ovšem američtí vědci Emmett Leith (1927–2005) a Juris Upatnieks (*1936) zabývali možnostmi realizace holografického záznamu pomocí běžného bílého světla. Právě tato práce inspirovala profesora Radima Chmelíka a jeho spolupracovníky z Fakulty strojínského inženýrství VUT v Brně k přenesení principu holografie v bílém světle do optické mikroskopie. Po více než deseti letech výzkumu, pokračujícího nyní

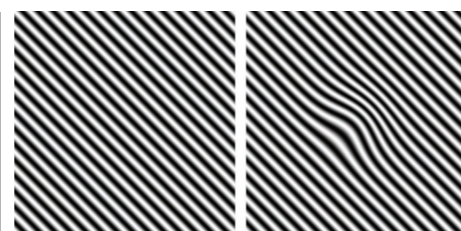
níci však pod pojmem hologram rozumějí holografický záznam, z něhož teprve optikou či digitální rekonstrukcí získáme trojrozměrný pohled na pozorovaný předmět. Holografické zobrazení je tedy dvoufázový proces, při němž nejprve zaznamenáme hologram a ten následně rekonstruujeme.

Dokonale lapené světlo

Holografický záznam je specifický tím, že umožňuje úplný záznam světelné vlny nesoící informaci o zkoumaném objektu, tj. umožňuje záznam dvou důležitých vlastností světelné vlny – intenzity a fáze. Běžné detektory, jako je například lidské oko nebo kamera, jsou citlivé pouze na intenzitu a fázi zaznamenat nedokážou. Právě proto také nejsou schopny zaznamenat zcela průhledné objekty – ty totiž mění pouze fázi světelné vlny. Fáze má přitom velký význam, protože vypovídá o tvaru či struktuře zkoumaného objektu.

Okuláry tu nehleďte

Jak tedy holografický mikroskop funguje? Nejprve se pomocí speciálního děliče rozdělí světlo ze zdroje na dva shodné svazky. Jeden svazek projde pozorovaným vzorkem (u průhledných vzorků – biologických), popř. se od něj odrazí (u neprůhledných vzorků – technických). Světelná vlna je při průchodu pozorovaným vzorkem modifikována jeho tvarem a také rozložením indexu lomu uvnitř vzorku. Druhý svazek projde mimo pozorovaný vzorek a světelná vlna v tomto svazku tedy nijak modifikována není. Oba svazky navíc projdou mikroskopovou optikou, která vytvoří zvětšený obraz vzorku. Následně se svazky opět pomocí děliče spojí dohromady a složením světla z obou svazků (tzv. interferencí) dojde ke vzniku hologramu. Na konci soustavy je umístěna kamera, která vznikající hologram zaznamenává.



Obr. 2 – A) detail prázdného hologramu, B) holografický záznam objektu zvonovitého tvaru, C) rekonstruovaná fáze světla z hologramu B

Holografický záznam je tedy pořízen v digitální podobě a následná rekonstrukce a zobrazení pozorovaného vzorku jsou již prováděny pomocí počítače (takovému postupu říkáme digitální holografie). U holografického mikroskopu byste proto marně hledali okuláry jako u běžných mikroskopů. Dívat se na holografický záznam očima by totiž nemělo žádný význam.

Svět pod proužkovaným ubrusem

A jak takový hologram vypadá? Pokud se detailně podíváte na hologram pořízený holografickým mikroskopem, zjistíte, že je tvořen velkým množstvím jemných rovnoběžných proužků (**obr. 2A**) – jedná se o tzv. interferenční proužky. Pokud do mikroskopu vložíme vzorek, tyto proužky se zjednodušeně řečeno „zprohýbají“ podle tvaru či

struktury daného vzorku (**obr. 2B**). To je způsobeno právě interferencí nemodifikované „prázdné“ vlny s vlnou modifikovanou vzorkem.

Vypadá to tedy podobně, jako kdybychom pozorovali předmět umístěný na stole a překrytý proužkovaným ubrusem. Z průběhu proužků lze numericky dekodovat intenzitu i fázi pozorovaného vzorku pomocí podobného principu, jaký je používán například u známého AM a FM rádiového vysílání. Detekovanou fázi je pak možno použít k vytvoření 3D zobrazení vzorku, které vypovídá o jeho tvaru či struktuře (**obr. 2C**).

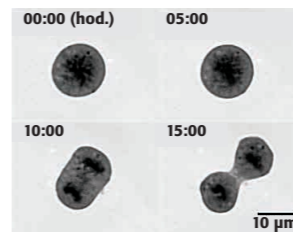
Světlo z obyčejné žárovky je výhodnější!

Klíčovou roli v holografické mikroskopii hraje zdroj světla. V dosavadních typech komerčně dostupných holografických mikroskopů, jimiž lze sledovat živé buňky a povrchy technických materiálů, se pro osvětlení používá laser nebo laserová dioda. Použití laseru je nutné pro správnou funkci těchto přístrojů, to však zároveň přináší nežádoucí účinky – výsledný obraz je v horším rozlišení a v záznamu se objevují nejrůznější artefakty, vlnky nebo proužky, které snižují kvalitu záznamu a znehodnocují naměřená data. Týmu profesora Chmelíka se však podařilo navrhnout a zkonstruovat holografický mikroskop, který umí využít zdroje bílého světla, tedy například obyčejnou žárovku, LED

diodu nebo výbojku. Díky těmto zdrojům lze získat holografický záznam bez nežádoucích artefaktů a s rozlišením až dvakrát jemnějších detailů vzorku.

Verze pro biology i techniky

Pro pozorování průhledných vzorků se používá tzv. transmisní holografický mikroskop. Své hlavní uplatnění nachází v buněčné a molekulární biologii – například při pozorování rakovinných buněk, červených krvinek, neuronů, srdečních buněk či spermií. Umožňuje neinvazivním způsobem sledovat pohyb, růst či dělení buněk, změny v rozložení jejich hmoty a reakce na nejrůznější látky či podněty.

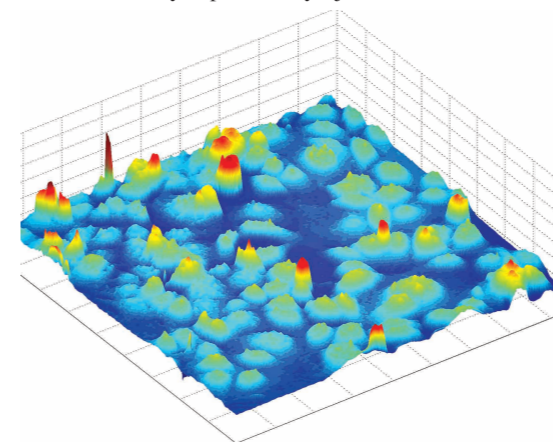


Obr. 5 – Dělení krysí nádorové buňky mikroskopem zachytil v různých okamžicích

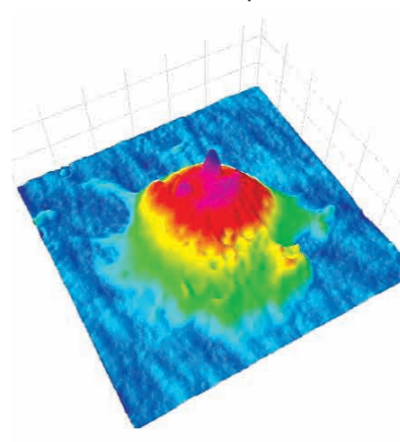
V případě odrazných (neprůhledných) vzorků přichází na řadu reflexní holografický mikroskop. Využití najde především při zkoumání povrchů a struktur nejrůznějších materiálů. Z těchto dat lze vyhodnocovat drsnost povrchů, kontrolovat rozměry struktur nebo detekovat povrchové defekty. Velkou předností mikroskopu je vysoká citlivost, která umožňuje rozlišit výšku struktury s přesností pod jeden nanometr. A také rychlost – uživatel má okamžitě k dispozici 3D zobrazení sledovaného povrchu. ■

Ing. Tomáš Slabý

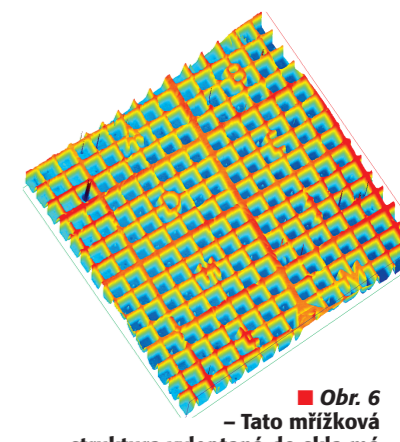
Výzkumná skupina prof. Radima Chmelíka Středoevropský technologický institut (CEITEC) při VUT v Brně



Obr. 3 – Buňky lidského nádoru prsu



Obr. 4 – Krysí nádorová buňka



Obr. 6 – Tato mřížková struktura vyleptaná do skla má hloubku pouhých 350 nanometrů

4 VÝHODY PRO ŽIVÉ BUŇKY

Holografický mikroskop má oproti jiným mikroskopickým metodám řadu výhod. Vybrali jsme čtyři, které jsou k nezaplacení především při pozorování biologických vzorků.

1 ŠETRNOST

Na rozdíl od běžných metod, jako je třeba fluorescenční mikroskopie, nevyžaduje holografická mikroskopie barvení vzorku kontrastními látkami. To vědcům umožňuje provádět dlouhodobější pozorování živých buněk, trvající až několik dní. Kontrastní látky totiž mohou živé buňky ohrozit i zahubit. Navíc mohou ovlivňovat chování buněk, takže pak není jasné, zda buňka reaguje na testovanou látku nebo použité barvivo.

2 JEDNODUCHÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

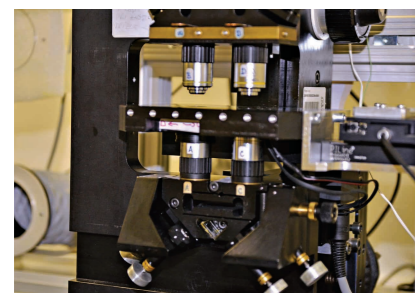
Podstatnou výhodou holografického zobrazení je také fakt, že naměřená data jsou kvantitativní – signál mikroskopu umožňuje měřit hmotu buněk. Takový signál lze velmi jednoduše zpracovávat a vyhodnocovat pomocí počítače a pohyb či růst buněk je možné díky tomu vyhodnocovat automaticky. U červených krvinek lze dokonce automaticky detekovat například malárii, onemocnění jater či neurologické poruchy.

3 RYCHLOST

Pro vytvoření 3D zobrazení vzorku je zapotřebí jediný hologram, a snímání je tedy omezeno pouze rychlostí kamery. Díky tomu je možné sledovat a vyhodnocovat velmi rychlé děje, jako jsou například kontrakce srdečních buněk.

4 PRONIKAVÝ „ZRÁK“

Unikátní vlastností nového mikroskopu je schopnost zobrazování objektů ponořených v kalných, neprůhledných prostředích. To umožňuje sledovat reakce buněk na látky, které nejsou zcela průhledné. Taková pozorování nelze s pomocí běžných mikroskopů realizovat. ■



Obr. 1 – Transmisní holografický mikroskop se využívá pro pozorování biologických vzorků

i pod hlavičkou Středoevropského technologického institutu (CEITEC), mnoha dílčích projektech a navázaných spolupracích má Vysoké učení technické patentován unikátní holografický mikroskop.

Dva kroky k třetímu rozměru

Pod pojmem hologram se pravděpodobně většině lidí vybaví nějaký trojrozměrný objekt či postava vznášející se ve vzduchu z některého ze známých sci-fi filmů. Odbor-