

Mikroskopie s kvantově provázanými fotony

MALVIN C. TEICH, BAHAA E. A. SALEH

*Quantum Optics Laboratory
Department of Electrical and Computer Engineering
Boston University, Boston, Massachusetts 02215, USA*

Entangled–Photon Microscopy

K 60. narozeninám profesora Jana Peřiny, již 25 let našeho kolegy a přítele

Všechny druhy mikroskopie, jež byly dosud vyvinuty, jsou založeny na klasických světelných zdrojích, které mají poměrně vysoký šum; fotony totiž přicházejí náhodně v čase i prostoru. Navrhujeme novou metodu dvoupaprskové optické mikroskopie, využívající neklasický světelný zdroj založený na kvantově provázaných párech fotonů generovaných procesem nelineární optické parametrické sestupné konverze. Mikroskopie s kvantově provázanými fotony (EPM, *Entangled–Photon Microscopy*) je schopna dosáhnout podstatného zlepšení ve srovnání s konfokální laserovou skanovací fluorescenční mikroskopii (CLSM, *Confocal Laser Scanning fluorescence Microscopy*) i s dvoufotonovou laserovou skanovací fluorescenční mikroskopii (TPLSM, *Two–Photon Laser scanning fluorescence Microscopy*). Posledně zmíněná technika je založena na úměrnosti mezi dvoufotonovou absorpcí a čtvercem hustoty toku optických fotonů; k lokalizaci oblasti, z níž je fluorescence pozorována, využívá výsoko fokusovaného optického svazku. Protože však v TPLSM je příchod fotonových párů náhodný, je zapotřebí poměrně vysokých hodnot hustoty fotonového toku, aby došlo ke koincidenci fotonů, a tudíž i k absorpcii. To však může vést k nežádoucí fototoxicitě budicího světla a k vybělování vzorku. EPM je naproti tomu založena na přítomnosti výsoko korelovaných fotonových párů, které účinnost dvoufotonové absorpcie významně zvyšují a umožňují použít nižších hodnot hustoty toku fotonů. Celý proces závisí na hustotě toku fotonů lineárně, nikoli kvadraticky. Navíc může být interakční oblast EPM řízena použitím dvou svazků, což poskytuje větší flexibilitu ve volbě požadované oblasti ve vzorku a což také vede k vyšší axiální i laterální rozlišovací schopnosti.

Úvod

Po několik set let nám mikroskop umožňuje nahlédnout do drobných oblastí, jež jsou pouhým okem neviditelné. Tento pozoruhodný přístroj, navržený Galileim na počátku 17. století a zdokonalený Abhem v roce 1873 [1], nám dodnes šlechetně slouží.

V posledních letech zažila mikroskopie celou řadu vylepšení, která vděčí významnému pokroku ve světelných zdrojích, optických součástkách, detekčních systémech a výpočetních metodách. Navíc se stalo možným volit k měření nejrůznější optické

atributy vzorku, nejen jeho obvyklé vlastnosti jako absorpcie a odrazivost. Ukazuje se, že jedním z nejúspěšnějších je optická fluorescencie, ať již vzorku samému, nebo externě dodaného selektivnho značkovače. V posledních letech se stala fluorescenční mikroskopie s širokým polem (WF, *wide field*) cennou technikou, užívanou ke zvýšení citlivosti i specifickosti mikroskopického zobrazování.

Zvláště významný přínos pro mikroskopii znamenal první konfokální mikroskop, který sestrojil Minski v r. 1957 [3]. Jak to vyjádřil Minski, konfokální

mikroskopie nabízí podstatné zlepšení oproti konvenční mikroskopii proto, že poskytuje metodu „jak odstranit všechno rozptýlené světlo kromě toho, které vychází z centrálního ohniskového bodu, tj. z osvětleného bodu ve vzorku“.

Spojení fluorescenčního zobrazení a konfokální mikroskopie se ukázalo zvláště účinné a doslova zahájilo novou éru mikroskopie [4,5]. Konfokální laserová skanovací fluorescenční mikroskopie (CLSM) má proti WF fluorescenční mikroskopii značné výhody v tom, že dramaticky omezuje světlo pocházející z mimoohniskových oblastí vzorku. CLSM dovoluje zobrazit tenké optické řezy uvnitř intaktního živého fluorescenčně označovaného vzorku, aniž by bylo nutné preparát fyzicky rozřezat na jednotlivé tenké řezy. Trojrozměrné rozdělení fluorescenčních značkovačů může být snadno rekonstruováno ze souboru optických řezů CLSM, s prostorovým rozlišením omezeným pouze difrací [6].

Nikdy nekončící snahy o další zdokonalení měřicích technik vedly k nedávným uvahám o několika alternativách k CLSM. Jedním takovým schématem je TPLSM, dvoufotonová laserová skanovací fluorescenční mikroskopie [7–9], která má v porovnání s CLSM řadu výhod vlastností, což diskutujeme v části 2. K lokalizaci oblasti, z níž je pozorována fluorescence, využívá tato technika vysoko fokusovaného optického svazku a je založena na úměrnosti dvoufotonové absorpcie a čtverce hustoty toku optických fotonů [10]. Toto kvadratické chování, jež je význačným rysem TPLSM, je výsledkem náhodné koincidence párů fotonů emitovaných klasickými světelnými zdroji [11]. Abi byla zajištěna dostatečně vysoká pravděpodobnost, že dva fotony dopadnou do pozorovaného místa současně a vyvolají dvoufotonovou absorpci, vyžaduje proto metoda TPLSM použití optických zdrojů o vysoké hustotě fotonového toku, často femtosekundových impulzních laserů. To však může vést k fototoxicitě světla a k vybělování vzorku.

Klasické světelné zdroje jak přírodní, tak umělé (např. obloha, sluneční světlo, světlo hvězd, žárovek, výbojkové světlo a světlo laseru) vykazují intrinsický šum, jenž je důsledkem náhodných příchodů jednotlivých fotonů [12]. V posledních letech byly využity neklasické (kvantové) zdroje světla, v nichž je intrinsický šum nějakým způsobem omezen [13–18]. Tato redukce šumu, je-li správně využita, může zvýšit věrnost zobrazení optické mikroskopie. Jak podrobnejší diskutujeme v části 3, zdroje kvantově provázaných fotonů emitují dvojice fotonů téměř současně [19], takže k dvoufotonové absorpcii může

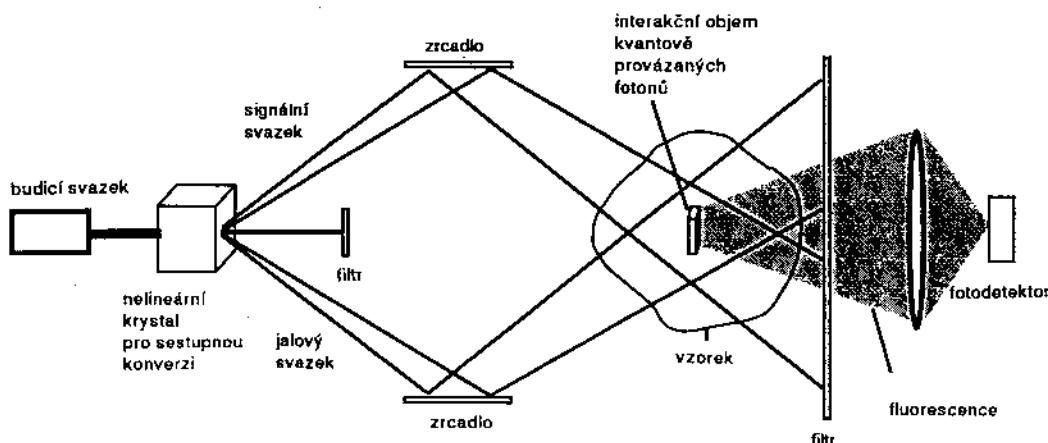
docházet při podstatně nižších intenzitách světla než v případě náhodných příchodů [20,21].

Navrhujeme schéma, jež nazýváme mikroskopii s kvantově provázanými fotony (EPM, *Entangled-Photon Microscopy*), které je s pomocí neklasických zdrojů světla schopno snížit hodnoty hustoty fotonového toku, při nichž dochází k dvoufotonové absorpci, a umožňuje se tak fototoxicitě a vybělování vyhnout. Protože každý foton z páru pochází z jiného optického svazku, lze objem oblasti jejich provázání nastavit, což skýtá další možnost řídit polohu i velikost požadované oblasti, kde k absorpci dochází. Přednosti metody EPM proti TPLSM jsou shrnutы v části 4.

Dvoufotonová laserová skanovací fluorescenční mikroskopie

Některé problémy spojené s CLSM, jako např. složitost optiky potřebné ke konfokální prostorové filtrace a omezení kladená na způsob detekce, shrnuli Pawley [5] a Sandison aj. [6]. Jedním ze slibnějších alternativních přístupů je dvoufotonová laserová skanovací fluorescenční mikroskopie (TPLSM). Dvoufotonovou fluorescenci pozorovali jako první Kaiser s Garrettem [22] již v roce 1961. Ačkoli určitou formu dvoufotonové optické mikroskopie použili Hellwarth a Christensen [23] již v roce 1974, zdá se, že první pojednání dvoufotonového laserového mikroskopického systému pochází zřejmě od Shepparda a Kompfnera [7]. Později tuto metodu implementoval Denk aj. [8] v konfiguraci postupné vlny. Brzy se ukázalo, že metoda TPLSM je užitečná k dynamickému zobrazování v stále větším počtu biologických systémů [24].

Metoda pracuje následujícím způsobem: dva fotony, které se setkají v blízkosti fluorescenční sondy [25] vázané na vzorek a které dopadnou v časovém intervalu kratším, než je její doba života [11], mohou vyvolat absorpci. Emise jediného fotonu pocházejícího z fluorescenční sondy je pak detekována konvenčními prostředky. Výsledkem je kvadratická závislost dvoufotonové absorpcie, a tudíž i emise fluorescenčních fotonů, na hustotě toku ϕ dopadajících fotonů [22]. Významné charakteristické vlastnosti TPLSM jsou právě důsledkem realizace této kvadratické závislosti v prostoru, což zase vede k zúžení aktivní fokusované oblasti budicího světelného svazku. To zase dále vyvolává zvýšení rozlišení v axiálním směru a snížení světla pozadí pocházejícího od fluorescence z mimoohniskové oblasti. TPLSM má proto určitou analogii s jednofotonovou (obyčejnou) CLSM.



Mikroskopie s kvantově provázanými fotony

Poněvadž však jsou časy příchodu klasických fotonů čistě náhodné, je zapotřebí dosáhnout relativně vysokých hustot fotonového toku, aby pář fotonů dorazil v úzkém časovém intervalu (doba života kvantového mezistavu vzorku) a tím vyvolal dvoufotonovou absorpci. Je proto obecně nutné použít optického buzení ve formě ultrakrátkých (femtosekundových) impulzů (obvykle generovaných lasery v režimu klíčování módů), aby vznikla dostatečně veliká špičková hustota fotonového toku – dostatečně vysoká na to, aby mohla nastat dvoufotonová absorpcie – a přitom střední hustota toku fotonů byla tak nízká, aby byla pro biologický vzorek ještě snesitelná.

Shrneme nyní některé z vlastností, kterými dvoufotonová mikroskopie vyniká nad konfokální laserovou skanovací fluorescenční mikroskopí [9, 26]:

- Tato technika nabízí excitaci vymezené hloubkové rozlišení podobné kvalitě jako CLSM, avšak bez nutnosti použít konfokální optické filtrace. Světlo pozadí pocházející z fluorescence mimo ohnisko je přitom potlačeno.
- Emitovaná fluorescence nemusí být fokusována, deskanována, či speciálně opticky zpracována, což umožňuje realizovat její detekci v rozmanitějších konfiguracích než v případě CLSM. To může být ku prospěchu při zobrazování v prostředích s určitými speciálními vlastnostmi. Příkladem je mozková tkáň, v níž je světlo rozptylováno silněji na kratších vlnových délkách než na delších. Dlouhovlnné světlo budicího zdroje proto může proniknout hlouběji do nitra vzorku, zatímco krátkovlnná

fluorescenční emise může být detekována v poměrně velkém prostorovém úhlu.

- Mohou být zkonstruovány systémy, které k detekci přítomnosti dvoufotonové excitace používají značkovače založených na jiné vlastnosti, než je optická fluorescence. Jedna z takových modifikací, nedávno vyvinutá Denkem [27], se nazývá dvoufotonová skanovací fotochemická mikroskopie (TPSPM). V jedné z jejích konkrétních implementací vyvolává lokální dvoufotonová absorpcie uvolnění molekul neurotransmíteru z fotoaktivovatelné sondy; vazba volného neurotransmíteru na blízký iontový kanál s ligandovým hradlem je pak detekována pomocí indukovaného buněčného iontového toku. Takové schéma bylo použito k zobrazení acetylcholinových receptorů na buněčné membráně pomocí carbamoylcholinu jako sondy [27]. Byly také navrženy další implementace této metody, jako např. uvolnění fotoaktivovatelných reaktivních látek.

Dvoufotonová absorpcí neklasického světla

Hlavní rozdíl mezi dvoufotonovou absorpcí z klasického fotonového zdroje a ze zdroje kvantově provázaných fotonů vystihuje jednoduchý pravděpodobnostní model, v němž se s fotony zachází jako s částicemi [21].

V modelu se uvažuje, že proces absorpcie se skládá ze dvou kroků: první foton iniciuje přechod z nižšího (základního) stavu hmotného systému do virtuálního mezistavu a druhý foton vyvolává přechod do konečného stavu. Pro náhodně přicházející fotony z

klasického světelného zdroje udává pravděpodobnostní analýza četnost přechodů R_r (počet elementárních absorpčních dějů za sekundu), která závisí pouze na jednofotonovém absorpčním účinném průřezu materiálu σ a na době života τ virtuálního stavu. Výsledná dvoufotonová absorpce je pak

$$R_r = \delta_r \phi^2,$$

kde dvoufotonový účinný průřez δ_r je dán vztahem

$$\delta_r = \sigma^2 \tau,$$

viz [28].

Všimněme si nyní kvantově korelovaných fotonových páru ze zdroje kvantově provázaných fotonů [29], které přicházejí do absorbujejícího prostředí s párovou hustotou toku $\phi/2$ (počet páru/cm² s). V tomto případě závisí absorpcie materiálu na pravděpodobnosti $\zeta(T_e)$, že dva fotony emitované v intervalu T_e dopadnou v časovém intervalu τ , a také na pravděpodobnosti $\zeta(A_e)$, že dva fotony emitované v oblasti A_e dopadnou do oblasti σ . Dvoufotonová korelovaná absorpce je tedy $R_e = \sigma_e \phi$, s účinným průřezem

$$\sigma_e = 1/2 \sigma \zeta(T_e) \zeta(A_e).$$

Tato absorpce musí být doplněna o člen představující náhodný příchod páru v intervalu τ do oblasti σ , čímž dostaneme celkovou dvoufotonovou absorpci R [21]

$$R = R_e + R_r = \sigma_e \phi + \delta_r \phi^2. \quad (1)$$

Je zřejmé, že pro malé hodnoty hustoty toku fotonů převažuje korelovaná dvoufotonová absorpce nad náhodnou dvoufotonovou absorpcí. Kritická hustota fotonového toku ϕ_c , při níž jsou si oba procesy rovny, je

$$\phi_c = \sigma_e / \delta_r. \quad (2)$$

Pro $T_e \ll \tau$ a $A_e \ll \sigma$, jsou pravděpodobnosti $\zeta(T_e)$ a $\zeta(A_e)$ rovny jedné, a dostáváme tedy

$$\sigma_e = \delta_r / 2\sigma\tau.$$

V experimentálně důležitém případě, kdy $T_e \gg \tau$ a $A_e \gg \sigma$, jsou pravděpodobnostní funkce $\zeta(T_e) = \tau/T_e$ a $\zeta(A_e) = \sigma/A_e$, z čehož plyne

$$\sigma_e = \delta_r / 2A_e T_e,$$

takže

$$\phi_c = (2A_e T_e)^{-1}.$$

Nedávno byl proveden podrobný kvantově-mechanický výpočet lineární dvoufotonové absorpce s kvantově vázaným světlem [21]. Výsledky potvrzují rovnici (2), avšak také odhalují nemonotoní změny absorpce R_e jako funkce doby provázání (*entanglement time*) i dráhového zpoždění mezi oběma budicími svazky. Důležitým rysem těchto změn je významné zesílení absorpčního účinného

průřezu σ_e pro určité hodnoty parametrů. Kvadratický dvoufotonový absorpční účinný průřez δ_r pro klasické světlo naproti tomu takové zesílení nevykazuje [30].

Korelovaná fotonová fluorescenční mikroskopie

Korelovaná fotonová fluorescenční mikroskopie (EPM), znázorněná na obrázku 1, využívá světelný zdroj tvořený dvěma svazky kvantově provázaných fotonů, které vykazují vysokou korelací dob výskytu fotonových páru. Takové svazky mohou být generovány nelineárním optickým procesem, jako je spontánní parametrická sestupná konverze [31]. Poněvadž se energie v tomto procesu zachovává, korelované fotony vznikají téměř současně a každý z nich má vlnovou délku větší než originál. Hybnost se rovněž zachovává, což vede k jednoznačné korespondenci mezi směrem dráhy fotonu v jednom svazku a směrem odpovídajícího fotonu v druhém svazku [32]. Protože oba fotony sdílejí energii a hybnost fotonu původního, říká se, že fotonová „dvojčata“ jsou navzájem kvantově „provázána“ [17, 18].

Jestliže je kritická hustota fotonového toku ϕ_c dostatečně vysoká, má mikroskopie s kvantově provázanými fotony řadu vlastností, kterými dvoufotonovou laserovou skanovací mikroskopii předčí. Probereme podrobněji některé z těchto výhod, které mají prvotní původ v kvantově-mechanické korelací fotonových páru:

- EPM funguje při intenzitách světla nižších než u TPLSM, čímž je minimalizována nežádoucí fototoxicita a fotovybělování; to může být zvláště důležité pro citlivé biologické vzorky. Nízké hladiny intenzity světla také minimalizují posuv přirozených energiových hladin vzorku, jako např. toho, který je vyvolán Starkovým efektem.
- Oba budicí svazky mohou být optickými soustavami nasměrovány tak, aby se navzájem protínaly s proměnným relativním dráhovým zpožděním, což dovoluje zvolit ve vzorku oblast, do níž provázané fotony dopadají současně. Pozorované místo ve vzorku může být proto měněno nebo systematicky skanováno (jak axiálně, tak laterálně) pouhou změnou optické soustavy. Nadto lze toku provázaných fotonů uspořádat tak, že protínají vzorek v celé řadě různých konfigurací – a to i na více místech současně. Součásti optických soustav směrujících a řídících oba svazky mohou být zrcadla, čočky, hrany, mřížky, holografické komponenty, optické součástky s proměnným indexem lomu, optická vlákna a příslušenství. V TPLSM se obecně využívá mechanického skanování.

- Ladění korelační doby může být kombinováno s laděním dráhového zpoždění a tak umožňuje definovat malé oblasti vzorku, do nichž přichází dvojice provázaných fotonů téměř současně [21], což umožňuje zlepšit rozlišení (zmenšit šířku oblasti simultánnosti fotonů) a lokalizaci (ostré odeznívání oblasti simultánnosti se vzdáleností) v obou směrech, axiálním i laterálním. V metodě EPM je proto rozlišovací schopnost a lokalizace určována nastavením optických komponent, kdežto v TPLSM jsou tyto veličiny dány kvadratickou závislostí na hustotě fotonového toku v ohnisku svazku. (Rozlišovací schopnost v TPLSM je přibližně stejná, ale lokalizace je lepší než u CLSM [27].) Ve srovnání s TPLSM může proto být v EPM radikálně sníženo světlo pozadí, jež pochází z fluorescence mimo ohniskovou oblast.
 - Lineární závislost dvoufotonové absorpcie na hustotě fotonového toku v EPM způsobuje, že rozlišovací schopnost a lokalizace je nezávislá na fluktuacích výkonu laseru. V TPLSM mění tyto fluktuace velikost i ostrost ohrazení oblasti dvoufotonové absorpcie a způsobují tak, že rozlišení a lokalizace jsou závislé na čase [9]. Podobně je u EPM výrazněji redukován vliv chyb v justáži optické soustavy.
 - Nízká hladina intenzity světla požadovaná pro EPM připouští možnost použít spíše kontinuálních než impulzních světelných zdrojů. Pro svazky provázaných fotonů, které jsou poměrně monochromatické, to může znamenat podstatné snížení škodlivých jevů spojených s disperzním rozšířením krátkých pulzů procházejících optickými komponenty v TPLSM [9], právě tak jako zlepšené ovládání svazku. Dokonce i pro nemonochromatické a impulzní svazky kvantově provázaných fotonů může být disperzní rozšíření někdy nelokálně kompenzováno vhodnou volbou optických materiálů (to je důsledkem antikorelaci frekvenčních složek provázaných fotonů, které vyplývají ze zákona zachování energie [33, 34]). Jeden příklad, kdy koincidence fotonů zůstává zachována při průchodu korelovaných svazků, nastává, když dvojice korelovaných svazků se šíří materiály, jejichž disperzní koeficienty mají stejnou velikost, ale opačné znaménko. V metodě EPM lze proto k transportu a zpracování světla použít optických vláken. Naproti tomu v TPLSM jsou femtosekundové pulzy podstatně rozšířeny a jejich amplituda proto snížena následkem disperze spojené s průchodem optickými součástkami mikroskopu, což vede k snížení pravděpodobnosti dvoufotonové absorpcie [9].
 - Délka optického pulzu v TPLSM musí být proto zvolena dostatečně dlouhá, aby tento efekt nenastával.
 - Poněvadž k transportu světla v EPM lze užít optických vláken, existuje možnost s kvantově provázanými fotony realizovat mikroskopii blízkého pole (NFEPM, *Near-Field Entangled-Photon Microscopy*).
 - Materiály s úzkými spektry dvoufotonové absorpcie mohou být metodou EPM účinně studovány, protože frekvenční spektrum součtové energie korelovaného fotonového páru je úzké [21, 32]. To je opět důsledkem antikorelaci frekvenčních komponent páru kvantově provázaných fotonů. V TPLSM musí být absorpční spektrum materiálu dostatečně široké, aby pojalo rozšíření součtové energie obou fotonů, což vede k požadavku, aby optické pulzy nebyly příliš krátké.
- Podobně jako u TPLSM nemusí být emitované fluorescenční záření fokusováno, deskanováno, či zpracováváno speciální optikou, a umožňuje proto detekci v rozmanitějších konfiguracích než technika CLSM. To může být prospěšné pro zobrazování v určitých prostředích, jako takových, které rozptylují světlo silněji na kratších vlnových délkah než na delších. Dlouhovlnné budicí světlo pak může pronikat dovnitř vzorku, zatímco krátkovlnnou fluorescenci lze detektovat v poměrně velkém prostorovém úhlu. Další vlastnosti, kterou se vyznačuje jak EPM, tak TPLSM, je schopnost k signalizaci přítomnosti dvoufotonové excitace používat jiných značkovačů než jen zdrojů optických fluorescenčních fotonů. V analogii s dvoufotonovou fotochemickou mikroskopíí (TPSPM) [27] může absorpcie kvantově provázaných fotonů vyvolat uvolnění molekul neurotransmiteru; vazba volného neurotransmiteru na blízké iontové kanály s ligandovým hradlem pak může být detekována prostřednictvím buněčného iontového toku. Korelovaná verze může být nazvana fotochemickou mikroskopíí s kvantově provázanými fotony (EPPM, *Entangled-Photon Photochemical Microscopy*). Je možné si představit další aplikace; mezi příklady patří lokalizované uvolňování chemikalií, elektronů [11], nebo termální či akustická emise, vyvolaná absorpcí provázaných fotonových párů.
- Nakonec dodejme, že mikroskopie s kvantově provázanými fotony může být rozšířena do třetího řádu, použijeme-li uspořádání, ve kterém se absorpcie účastní tři provázané fotony – v analogii s trifotonovou laserovou skanovací fluorescenční mikroskopíí [35–37]. Lze si také představit další zoubecnění do ještě vyšších řádů, kde by bylo použito mnohonásobně provázaných fotonů.

Literatura

- [1] Abbe E.: Beiträge zur theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Schultzes Archiv für Mikroskopische Anatomie* **9** (1873), 413.
- [2] Svanberg S.: Real-word applications of laser spektroscopy, *Optics and Photonics News* **7** (1996), 16.
- [3] Minsky M.: Microscopy Apparatus, U. S. Patent No. 3,013,467 (Filed Nov. 7, 1957, Issued Dec. 19, 1961).
- [4] Inoué S.: Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., J. B. Pawley ed. (Plenum, New York, 1995), 1.
- [5] Pawley J.: Fundamental limits in confocal microscopy in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed. J. B. Pawley ed. (Plenum, New York, 1995), 19.
- [6] Sandison D. R. a kol.: Quantitative Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., J. B. Pawley ed. (Plenum, New York, 1995), 39.
- [7] Sheppard C.J. R., Kompfner R.: Resonant scanning optical microscope, *Applied Optics* **17** (1978), 2879.
- [8] Denk W., Strickler J. H., Webb W. W.: Two photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science* **248** (1993), 73.
- [9] Denk W a kol.: Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* 2nd ed., J. B. Pawley ed. (Plenum, New York, 1995), 445.
- [10] Göppert – Mayer M.: Über Elementerakte mit zwei Quantensprüngen, *Annalen der Physik* **9**, (1931), 273.
- [11] Teich M. C., Wolga G. J.: Multiple-photon processes and higher order correlation functions, *Phys. Rev. Lett.* **16** (1966), 625.
- [12] Salch B. E. A.: Photoelectron Statistics (Springer, Heidelberg/Berlin/New York, 1978).
- [13] Peřina J.: Coherence of Light, 2nd. ed. (D. Reidel, Dordrecht/Boston, 1985), 1. vyd. 1971.
- [14] Teich M. C., Saleh B.E. A.: *Quantum Optics* **1** (1989), 153.
- [15] Teich M. C., Saleh B.E. A.: *Physics Today* **43** (1990), 26.
- [16] Peřina J.: *Quantum Statistics of Linear and Nonlinear Optical Phenomena*, 2nd ed. (Kluwer, Dordrecht/Boston, 1991), 1. vyd. 1984.
- [17] Peřina J., Hradil Z., Jurčo B.: *Quantum Optics and Fundamentals of Physics* (Kluwer, Boston, 1994)
- [18] Mandel L., Wolf E.: *Optical Coherence and Quantum Optics* (Cambridge, New York, 1995).
- [19] Friberg S. a kol.: Measurement of time delays in the parametric production of photon pairs, *Phys. Rev. Lett.* **54** (1985), 2011.
- [20] Javanainen P., Gould P. L.: Linear intensity dependence of a two-photon transition rate, *Phys Rev A* **41** (1990), 5088.
- [21] Fei H. B. a kol.: submitted to *Phys. Rev. Lett.* (1996).
- [22] Kaiser W., Garret C. G. B.: *Phys. Rev. Lett.* **7** (1961), 229.
- [23] Hellwarth R., Christensen P.: *Optics Commun.* **12** (1974), 318.
- [24] Denk W.: *Journ. of Biomedical Optics* **1** (1996), 296.
- [25] Tsien R. Y., Waggoner A.: in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed. J. B. Pawley ed. (Plenum, New York, 1995), 267.
- [26] Lindek S., Stelzer E. H. K., Hell S. W.: Two new high-resolution confocal fluorescence microscopies (4pi, theta) with one- and two-photon excitation in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., J. B. Pawley ed., (Plenum, New York, 1995), 417.
- [27] Denk W.: *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **91** (1994), 6629.
- [28] Mainfray G., Manus C.: Normal Multiphoton ionization of atoms (experimental) on Multiphoton Ionization of Atoms, ed. S. L. Chin (Academic, Toronto, 1984), 7.
- [29] Larchuk T. S. a kol.: *Annals of the New York Academy of Sciences* **755** (1995), 680.
- [30] Bebb H. B., Gold A.: *Phys. Rev.* **143** (1966), 1.
- [31] Burnham D. C., Winberg D.L.: *Phys. Rev. Lett.* **25** (1970), 84.
- [32] Joobeur A. a kol.: *Phys. Rev. A* **53** (1996), 4360.
- [33] Franson J. D.: *Phys. Rev. A* **45** (1992), 3126.
- [34] Larchuk T. S. a kol.: *Phys. Rev. A* **52** (1995), 4145.
- [35] Hell S. a kol.: *Journ. of Biomedical Optics* **1** (1996), 71.
- [36] Gu M.: *Optics Letters* **21** (1996), 988.
- [37] Xu C. a kol.: *Biophys. Journ.* **70** (1996), A429.

Přeložil Ivan Gregora