



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**MĚŘENÍ DIFUZNĚ ODRAZNÝCH POVRCHŮ POMOCÍ
VÍROVÉ TOPOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE**

MEASUREMENT OF DIFFUSELY REFLECTING SURFACES USING VORTEX TOPOGRAPHIC
MICROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TOMÁŠ POLA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR BOUCHAL, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Student: **Bc. Tomáš Pola**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Petr Bouchal, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Měření difuzně odrazných povrchů pomocí vírové topografické mikroskopie

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Vírová topografická mikroskopie je 3D zobrazovací technika, která byla teoreticky navržena a experimentálně úspěšně testovaná na Ústavu fyzikálního inženýrství. Metoda využívá speciálních optických svazků s vírovou fází k vytvoření rotující bodové rozptylové funkce. Použití rotující bodové rozptylové funkce umožňuje lokální měření axiální polohy v přesně definovaných příčných pozicích zorného pole. Cílem práce je testovat využití vírové topografické mikroskopie pro měření difuzně odrazných povrchů, které není možné měřit pomocí konvenčních interferometrických metod.

Cíle diplomové práce:

- Seznámení se s problematikou využití vírových stavů světla pro objemovou lokalizaci.
- Zvládnutí justáže a měření pomocí vírového topografického mikroskopu.
- Nalezení optimálního způsobu měření difuzně odrazných povrchů a vyhodnocení přesnosti měření.

Seznam doporučené literatury:

GOODMAN, J. V. Introduction to fourier optics, Roberts and Company Publishers, 2005.

KOMRSKA, J. Fourierovské metody v teorii difrakce a ve strukturní analýze, Brno: Akademické nakladatelství CERM, s.r.o. Brno, 2007. s. 1-242. ISBN: 978-80-214-3532- 2.

BARÁNEK, J., BOUCHAL, P., ŠILER, M. and BOUCHAL, Z. Aberration resistant axial localization using a self-imaging of vortices, Opt. Express 23, 15316-15331, 2015.

BOUCHAL, P., ŠTRBKOVÁ, L., DOSTÁL, Z. and BOUCHAL, Z. Vortex topographic microscopy for full-field reference-free imaging and testing, Opt. Express 25, 21428-21443, 2017.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2019/20

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce popisuje novou metodu měření topografie difúzně odrazných povrchů. Zkoumaný povrch je měřen nepřímo pomocí lokalizace nanočástic na něm nanesených. Obraz každé z částic je na kameře zachycen v podobě dvoulalokové bodové rozptylové funkce, jejíž úhlové natočení odpovídá lokální výšce měřeného povrchu. Využívaná bodová rozptylová funkce vzniká interferencí nedifrakčních vírových svazků, které jsou vytvářeny při průchodu světla spirální fázovou maskou. Práce nejprve představuje rešerši současných technik pro měření topografie povrchu. Poté je princip navrhovaného topografického měření popsán teoreticky a jeho praktické použití je testováno v experimentálních podmínkách. Pomocí numerických simulací je studován vliv poměru signálu k šumu a vzorkování obrazu na přesnost rekonstrukce topografie povrchu. Na tomto základě jsou pak navrženy optimální parametry experimentální sestavy. Praktický potenciál metody je demonstrován měřením topografie rovinných a kulových difuzních povrchů v rozsahu hloubek až 9krát přesahujícím hloubku ostrosti měřicího objektivu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vírová topografická mikroskopie, optické víry, nedifrakční svazky, rotující bodová rozptylová funkce

ABSTRACT

This thesis describes an innovative method for topographic measurement of diffuse surfaces. Tested surface is measured indirectly using nanoparticles distributed across the studied area. An image of every particle is captured by CCD camera as a double helix point spread function whose angular rotation corresponds to local surface height. Used point spread function is the result of an interference of non-diffracting vortex beams that are formed by a spiral phase mask from light originating from a nanoparticle. Diploma thesis presents an overview of current techniques for surface topography measurement. Next, working principle of proposed method is described and its experimental application is discussed. An influence of signal-to-noise ratio and image sampling on reconstruction precision is studied using numerical simulations and, as a result, optimal experimental parameters are proposed. Practical potential of the method is demonstrated by 3D reconstruction of planar and spherical surfaces in the depth range of up to 9 times the depth of focus of used microscope objective.

KEYWORDS

Vortex topographic microscopy, optical vortices, non-diffracting beams, rotating point spread function

POLA, T. *Měření difuzně odrazných povrchů pomocí vírové topografické mikroskopie*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2020. 57 s. Vedoucí práce Ing. Petr Bouchal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací na téma *Měření difuzně odrazných povrchů pomocí vírové topografické mikroskopie* vypracoval samostatně pod vedením Ing. Petra Bouchala, Ph.D. za použití odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Bc. Tomáš Pola

Mé poděkování patří především mému vedoucímu Ing. Petru Bouchalovi, Ph.D. za bezmeznou trpělivost, podporu, konzultace a pomoc při řešení problémů. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu nejen při studiu, ale i v každodenním životě. Největší díky patří mé starostlivé a milující ženě, že mne podporovala za každé situace a pečovala o mne.

Bc. Tomáš Pola

Obsah

1	Úvod a motivace práce	3
2	Přehled současných technik měření topografie povrchů	5
3	Princip vírové topografické mikroskopie	9
3.1	Teoretický model rotujícího zobrazení	9
4	Zpracování obrazu a numerická rekonstrukce dat	15
4.1	Předzpracování obrazu	15
4.1.1	Dilatace	16
4.1.2	Eroze	16
4.1.3	Otevření	17
4.1.4	Uzavření	18
4.1.5	Morfologická rekonstrukce	19
4.2	Rekonstrukce topografie povrchu z úhlového natočení	20
5	Experimentální měření difúzně odrazných povrchů	31
5.1	Testování a výběr nanesených částic	32
5.2	Experimentální sestava	34
5.3	Kalibrační měření	37
5.4	Měření planárních povrchů	39
5.5	Měření kulových povrchů	43
6	Závěr	47
	Literatura	49
	Seznam zkratk	57

1. Úvod a motivace práce

Měření topografie povrchů je důležité v mnoha průmyslových i vědeckých odvětvích, kde umožňuje přesnou kontrolu výroby a opotřebení funkčních komponent nebo studium tenkých vrstev a mikrostruktur na povrchu vzorků. Současným trendem je zejména využití optických měřících metod, které pro svou správnou funkci vyžadují zrcadlový odraz světla od zkoumaného povrchu. Obsah diplomové práce je zaměřen na optické měření topografie povrchů s difuzním odrazem, které nelze zkoumat pomocí těchto standardně využívaných metod. V práci je navržen a experimentálně ověřen nový způsob topografického měření. Navržený způsob měření využívá nedifrakčních vírových svazků k objemové lokalizaci fluorescenčních markerů rozprostřených po měřeném povrchu a umožňuje tak kvazi-spojitou rekonstrukci topografie povrchu s přesností nezávislou na jeho drsnosti. Teoreticky i experimentálně se práce opírá o nedifrakční vírový mikroskop vyvinutý na Ústavu fyzikálního inženýrství Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně. Problematika měření difuzních povrchů je řešena v rámci spolupráce s firmou Meopta optika, s.r.o. Vyvinutí vhodného způsobu měření difuzních povrchů by ve firmě Meopta umožnilo kontrolu tvaru optických komponent po procesech hrubého opracování, které předchází náročným procesům finální výroby.

V diplomové práci je provedena rešerše aktuálního stavu techniky v oblasti měření topografie povrchů. Stručně je popsán princip jednotlivých metod a diskutovány možnosti jejich využití. Navrhovaná metoda je tak zasazena do kontextu konkurenčních technik. V následujících kapitolách je proveden teoretický popis navrhovaného principu měření a jeho funkčnost je ověřena v experimentech s difúzními povrchy rovinného a kulového tvaru.

2. Přehled současných technik měření topografie povrchů

Techniky umožňující vyhodnocení topografie povrchů lze podle základního způsobu měření dělit na techniky kontaktní a bezkontaktní (optické).

Kontaktní metody zahrnují klasickou metodu profilometrického měření hrotem (stylusem) a také mikroskopii atomárních sil (AFM, Atomic Force Microscopy). Metoda měření profilu povrchu hrotem je stará desítky let. Stylus je přitlačěn k měřenému povrchu a jeho poloha je zaznamenávána pomocí optických nebo elektromechanických prvků [1]. Výhodou této metody je rychlé a levné mapování povrchu a měření jeho drsnosti. Protože hrot je objekt konečných rozměrů, nedokáže sledovat povrch dokonale. Tento nedostatek je obzvláště patrný, pokud jsou na měřeném vzorku náhlé výškové změny. Je-li hrot přitlačován příliš velkou nebo malou silou, může zkoumaný povrch poškodit nebo ho nezměřit s dostatečnou přesností [2]. Obdobného principu skenování hrotem se využívá také při měření pomocí AFM. Zde je však záznam výšky vzorku zapříčiněn působením atomárních sil na hrot. Na rameno s hrotem svítí laserové světlo, které se odráží do kvadrantového fotodetektoru, kde je detekovaná příčná pozice stopy a její posun je převáděn na ohnutí raménka. Výhodou je výborné rozlišení metody (jednotky nm) a to, že není nutná speciální příprava měřeného vzorku. Nevýhodou je malá velikost snímané oblasti, omezený rozsah měřených výšek (kvůli poškození vzorku i hrotu) a také časová náročnost metody [3].

Optické metody zahrnují mnoho různých technik a přístupů. Jejich společnými přednostmi, oproti metodám kontaktním, jsou vyšší citlivost k náhlým změnám výškového profilu (hrany, údolí), rychlost snímání a minimalizace (znemožnění) poškození vzorku. Většina optických technik využívá ke své funkci interference světla. Nejznámějším příkladem těchto technik je holografická mikroskopie, která umožňuje z interferenčního pole (hologramu) rekonstruovat fázové zpoždění světla způsobené měřeným vzorkem. Hologram je zaznamenán jako koherentní superpozice takzvané signální vlny (vlny ovlivněné vzorkem) a referenční vlny, která není vzorkem ovlivněna. V současných metodách digitální holografické mikroskopie je hologram zaznamenán na digitální kameru a jako číselná matice uložen do počítače. Následná rekonstrukce hologramu se provádí podle toho, v jaké konfiguraci byl hologram zaznamenán [4]. V metodách osové holografie, v nichž signální i referenční vlna dopadají na detektor souběžně, je možné hologram rekonstruovat pouze z několika (alespoň 3) hologramů s různým fázovým posuvem jedné z interferujících vln (tzv. krokování fáze [5]). Výhodou těchto metod je možnost jednocestného uspořádání, kde signální i referenční vlna prochází stejnou optickou cestou. Jednocestné metody jsou robustní a méně náchylné na vnější vlivy, jako jsou např. vibrace, ale z důvodu nutnosti vícenásobného záznamu nejsou použitelné pro snímání dynamických dějů. Druhou možností je využití mimoosové holografie [6]. V mimoosové holografii vlny dopadají na detektor pod rozdílným úhlem a vytvořený hologram je modulován strukturou proužků, které vytváří prostorovou nosnou frekvenci. Rekonstrukce holografické informace je pak realizována z jednoho snímku pomocí Fourierovských metod, jako bylo předvedeno např. na Ústavu fyzikálního inženýrství (ÚFI) [7–9]. Nevýhodou mimoosových metod je zpravidla nutnost komplexnější experimentální sestavy náchylnější na vlivy okolí a také menší zorné

pole [10]. Metody digitální holografické mikroskopie jsou používány k záznamu jak amplitudové, tak fázové informace o objektu [6, 11]. To umožňuje rekonstrukci komplexní funkce propustnosti zkoumaných objektů, nebo rekonstrukci optické dráhy signální vlny, která může nést informaci o rozložení indexu lomu uvnitř vzorku nebo o jeho tvaru. Výzkum a zlepšování holografických metod neustále pokračuje, jako např. v práci [12], kde bylo zlepšeno axiální i laterální rozlišení použitím difrakční mřížky, či v práci [13], kde byla zjednodušena numerická rekonstrukce obrazu záznamem hologramů pod různými úhly.

Pro měření topografie povrchu se nejčastěji využívá Mirau interferometrie založené na principech osové holografie. Mirau interferometr lze jednoduše vytvořit připojením Mirau interferenčního objektivu ke standardnímu mikroskopu. Tento interferenční objektiv představuje odolný jednocestný interferometr, protože pracuje s referenční vlnou integrovanou uvnitř objektivu [14]. Nevýhodou tohoto systému je omezení pouze na reflexní vzorky, potřeba krokování fáze signální vlny, jenž je nejčastěji realizováno přesným posuvem vzorku za pomoci piezoaktuátoru, a nutnost použití objektivu s dlouhou pracovní vzdáleností, což limituje numerickou aperturu objektivu. Snaha minimalizovat tyto negativní vlivy vedla k výzkumu nových technik, např. interferometrie se současným fázovým posunem [15], nebo numerické korekce fázových poruch, např. v práci [16]. Alternativou k metodám založeným na krokování fáze je užití bílého světla. V této modifikaci je sledován nultý interferenční proužek, který má maximální intenzitu v interferenčním obrazci a jehož pozice určuje absolutní rozdíl optických drah v detekční a referenční větvi [17]. Laterální poloha tohoto maxima na vzorku je určena polohou odpovídajícího pixelu detektoru. Mnoho práce bylo dedikováno rozvoji algoritmů pro sledování nultého proužku a vyhodnocení interferogramů [18], maximalizaci signálu [19] a studiu benefitů různých zdrojů světla [20].

Protože výše uvedené metody, stejně jako následující, měří distribuci fázové deformace, je nutné k získání spojitě rekonstrukce povrchu užít vhodných algoritmů pro rozbalení fáze (phase unwrapping). Experimentálně získané záznamy mohou být zatíženy nespojitostmi povrchu, šumem, absencí nosné frekvence a vadami, které korektnímu rozbalení fáze zabraňují. Velká míra pozornosti je proto věnována také algoritmům, které se zabývají korektním rozbalením fázových obrazů zatížených nežádoucími experimentálními vlivy. Malým výběrem z této oblasti jsou například práce [21–27].

Další možností topografického měření je využití metod založených na promítání interferenčních proužků. Tyto metody umožňují bezkontaktní 3D rekonstrukci povrchu v reálném čase bez nutnosti skenování a s vysokým rozlišením, a to v širokém aplikačním rozmezí [28–49]. Při měření je na vzorek promítán interferogram (většinou proužky se sinusoidálním průběhem), který je snímán sběrnou optikou a kamerou. Obraz z kamery je přenášén do počítače a výškový profil vzorku vyhodnocen z deformace promítaného vzoru [50]. Výhodou této techniky, krom výše zmíněných, je velký rozsah možných velikostí vzorku. Nevýhodou je však nutnost využití náročnějších metod rozbalování fáze, a také nejednotná spolehlivost měření [51, 52].

Zatížení a deformace povrchů se hojně měří koherenčními zrny, které vznikají zachycením obrazu koherentně osvětleného povrchu na kameru. Je-li zkombinován s dříve odkloněným referenčním svazkem, je získán interferenční obraz unikátní pro daný nehomogenní povrch. Když se poté aplikuje zátěž nebo je zkoumaný objekt deformován, a pořídí-li se identický snímek, dostane se z jejich rozdílu fázová mapa udávající směr a

velikost deformace [53, 54]. Protože získaný obraz nese v jednom snímku 3D informaci o celém povrchu je tato metoda vhodná zejména pro měření dynamických jevů [55].

Variabilní technikou pro měření topografie povrchů, a to včetně difuzních [56], je laserová triangulace. Jejím principem je promítání zdroje na bod povrchu, jehož výška je určena podle toho, kam se promítne obraz tohoto bodu na kameře ležící v ohniskové vzdálenosti sběrné čočky. Existují i varianty, ve kterých dochází k projekci jedné nebo několika čar místo bodu. Triangulace je vhodná metoda k měření 3D profilů v kompletním zorném poli 360 stupňů, jako např. vnitřních částí trubek [57], kůže [58], a je na ni založena i metoda náhrady zraku pro nevidomé [59]. Jejimi nedostatky jsou stínící efekt, poruchy laserového svazku na okrajích a ztížené měření vysoce odrazivých povrchů kvůli vytváření zdánlivého sekundárního zdroje na vzorku [60, 61].

Další zajímavý způsob měření 3D polohy nabízí metody založené na defokusačně citlivých změnách bodové rozptylové funkce (PSF z anglického Point Spread Function) zobrazovacího systému. Tyto postupy nachází své uplatnění zejména v superrozlišovacích fluorescenčních metodách, kde rozšiřují superrozlišovací schopnost systémů i do třetí dimenze a umožňují velmi přesnou objemovou lokalizaci kvazibodových objektů [62]. Aby byla PSF využitelná pro lokalizaci, nelze využít uspořádání známé z klasické mikroskopie, protože vytvořená PSF má obdobný tvar při kladném i záporném rozostření. V prvních experimentech byl tento problém vyřešen využitím astigmatické PSF [63, 64], která vzniká implementací válcové čočky do systému a u níž je možné rozlišit kladnou a zápornou defokusaci. V práci [65] bylo prokázáno, že vyšší přesnosti lokalizace lze dosáhnout pomocí PSF s defokusačně závislou rotací. Rotující PSF může být tvořena jedním nebo více laloky obíhajícími po kružnici se středem odpovídajícím pozici standardního obrazu. V aplikacích se nejčastěji využívá PSF tvořená dvěma protilehlými laloky, která se v anglické literatuře nazývá DH PSF (double helix PSF) [66–68]. Rozostření bodového objektu ležícího v předmětovém prostoru zobrazovacího systému je poté rekonstruováno z natočení DH PSF detekovaného ve výstupní rovině tohoto systému. Defokusačně závislé rotace DH PSF je nejčastěji dosaženo pomocí vírových stavů světla. Ty mohou být vytvářeny optoelektronickými prvky, nejčastěji prostorovými modulátory světla (PMS), nebo speciálními komponentami vyráběnými technikami elektronové litografie. PMS umožňuje jen čistě fázovou modulaci světla, jeho přednost však spočívá v možnosti měnit parametry masky. Litograficky vytvářené masky umožňují kombinovat jak fázovou, tak amplitudovou modulaci světla, ale jejich parametry jsou neměnné. Příkladem využití PMS ke generaci DH PSF je tvorba vhodných Laguerrových-Gaussových svazků [69] a jejich následná superpozice, či nezávislá modulace ortogonálních polarizačních stavů svazku [70]. Příkladem využití amplitudové a fázové modulace k vytvoření DH PSF je užití nedifrakčních vírových svazků [71–73].

Využití nedifrakčních vírových svazků bylo na ÚFI zkoumáno i v navazující práci [74] zaměřené na vliv parametrů fázové masky na experiment a přesnost 3D rekonstrukce. Optimalizované masky byly úspěšně využity při lokalizaci zlatých, polystyrenových a fluorescenčních markerů (velikosti řádu stovek nanometrů) i pro dynamické experimenty. Princip rotujícího zobrazení je využitelný i mimo lokalizační mikroskopii a na ÚFI byl úspěšně testován pro měření topografie povrchu se zrcadlovým odrazem [75]. Navržená metoda využívá strukturovaného osvětlení měřeného reflexního vzorku a spirální vírové masky k vytváření DH PSF. V osvětlovací části systému je vložena amplitudová maska tvořená mnoha mikrometrovými otvory. Ta je zobrazena do roviny měřeného vzorku, kde obrazy jednotlivých otvorů vytváří bodové zdroje s axiální pozicí danou lokální topografií

povrchu. Zobrazovací část systému převádí obrazy bodových zdrojů na DH PSF, které nesou informaci o lokální výšce měřeného povrchu. Metoda byla úspěšně testována při měření hladkého zakřiveného povrchu (kuličkového ložiska) a planárního povrchu s periodickou strukturou.

Měření povrchů pomocí metod popsaných v této rešeršní kapitole zpravidla vyžaduje zrcadlový odraz světla od vzorku a jejich použití je tak omezeno na přirozeně hladké nebo speciálně připravené leštěné povrchy. Obtížnějším problémem je měření difuzních povrchů, které při drsnosti porovnatelné s vlnovou délkou použitého světla randomizují fázi odražené vlny a znemožňují využití dominantně používaných interferenčních technik. V této diplomové práci je navržena a testována metoda umožňující měřit difuzní povrchy bez ohledu na jejich drsnost. Metoda navazuje na výše uvedený výzkum realizovaný na ÚFI a vychází z výsledků dosažených při topografickém zobrazování pomocí nedifrakčních vírových svazků. Při měření je využito DH PSF k lokalizaci bodových objektů nanesených na měřeném povrchu namísto přímého měření povrchu samotného. Princip a teoretický model metody je uveden v následující kapitole.

3. Princip vírové topografické mikroskopie

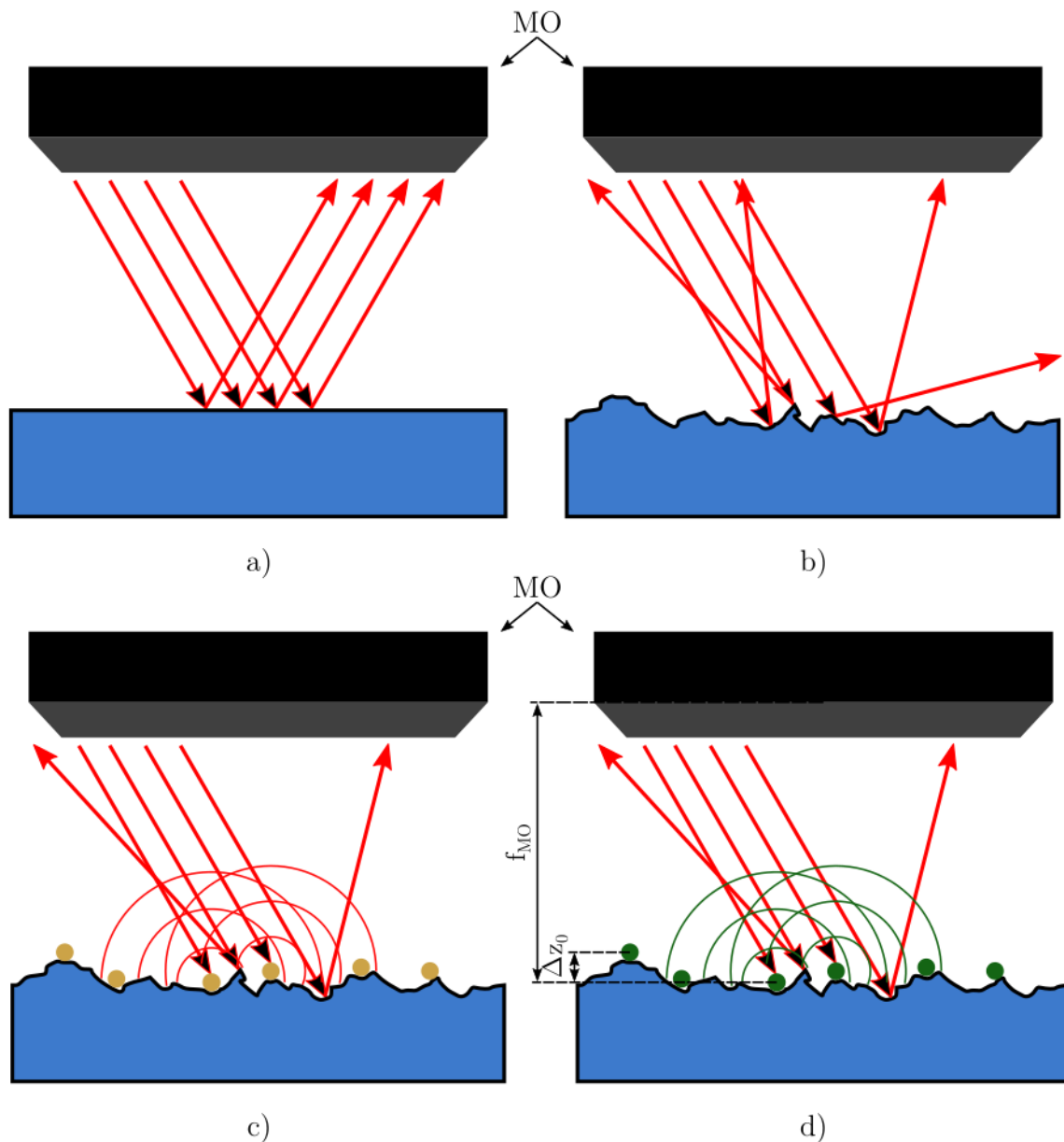
Při měření topografie povrchu se nejčastěji pracuje s odraznými vzorky a měření probíhá v systémech s reflexní konfigurací. Světlo dopadající na povrch s ním interaguje a je odraženo do prostoru. Způsob tohoto odrazu je závislý na různých faktorech. Zde je pozornost zaměřena zejména na drsnost povrchu. Drsnost povrchu je určena jeho mikroskopickým uspořádáním a nepravidelnostmi. Ty určují, jak se světlo od povrchu odráží, v závislosti na směru osvětlení a použité vlnové délce. Jsou-li tyto nepravidelnosti malé ve srovnání s užitou vlnovou délkou, pak je většina dopadajícího světla odražena zrcadlově v jednom směru. Povrch difúzně odráží světlo, pokud jsou nerovnosti povrchu s vlnovou délkou srovnatelné a dochází k vnitřnímu nebo několikanásobnému odrazu, přičemž zdroje sekundárních vln vzniklých při odrazu nejsou lokalizovatelné. V diplomové práci je problém difúzního odrazu světla originálně řešen nanesením kvazibodových objektů (markerů) na měřený povrch a rekonstrukcí jejich polohy pomocí metod známých z lokalizační mikroskopie. Při tomto zobrazení není nutné pracovat s difúzně odraženým světlem a topografii povrchu je možné rekonstruovat z lokálních měření v místech nanesených markerů. Jako lokalizační markery lze využít např. kovové nebo fluorescenční nanočástice. Na obr. 1 je schematicky znázorněn zrcadlový (obr. 1 a) a difúzní odraz světla od povrchu (obr. 1 b) a vznik kulových vln z osvětlených částic nanesených na měřeném povrchu (obr. c, d). Obr. 1 c) znázorňuje nanesené kovové nanočástice, které jsou sekundárním zdrojem kulových vln s vlnovou délkou shodnou s osvětlovací vlnou. Obr. 1 d) ukazuje fluorescenční nanočástice, které jsou zdrojem kulových vln s vlnovou délkou delší než u excitační vlny. Rekonstrukce podélné polohy nanočástic Δz_0 vzhledem k referenční pozici umožňuje lokální měření výšky studovaného povrchu a následnou kvazi-spojitou rekonstrukci jeho topografie.

3.1. Teoretický model rotujícího zobrazení

Navrhovaná metoda topografického měření difúzních povrchů je založena na objemové lokalizaci nanočástic nanesených na měřený povrch. Lokalizace nanočástic je provedena rekonstrukcí jejich axiální pozice z měřené DH PSF tvořené interferencí nedifrakčních vírových svazků. Princip zobrazení lze vysvětlit pomocí schématu na obrázku 2.

Měřený povrch je umístěn v ohniskové rovině mikroskopového objektivu (MO) a jsou na něj naneseny nanočástice sloužící jako lokalizační markery. V případě kovových nanočástic je vzorek osvětlen rovinou vlnou. Při použití fluorescenčních nanočástic je vzorek osvětlen prostřednictvím standardního Köhlerova osvětlovače s fluorescenční kostkou vhodnou pro excitaci nanesených částic. Nanesené nanočástice se stávají zdrojem kulových vln. V případě fluorescence je každá fluorescenční molekula nezávislým zdrojem světla, a vlny vyzářené z jednotlivých nanočástic jsou zcela nekorelované. U kovových nanočástic osvětlených rovinou vlnou by mohlo docházet ke vzájemné korelaci, které je třeba zabránit zajištěním dostatečné vzdálenosti mezi částicemi. Vzdálenost musí být minimálně taková, aby nedocházelo k prostorovému překryvu signálů z jednotlivých nanočás-

3.1. TEORETICKÝ MODEL ROTUJÍCÍHO ZOBRAZENÍ

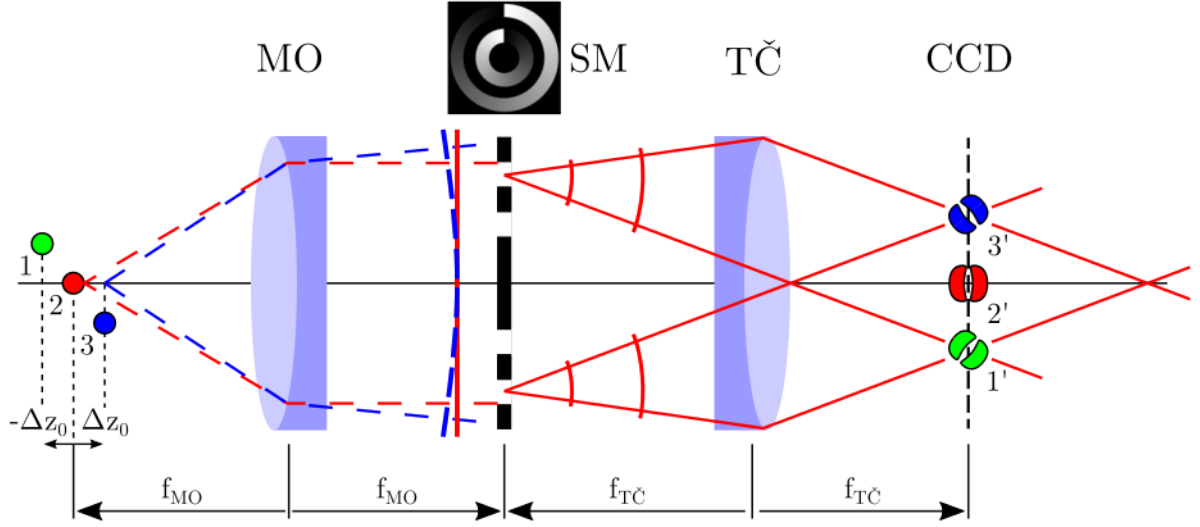


Obrázek 1: Znázornění odrazu světla od povrchu s různou drsností a schematické znázornění vzniku kulových vln z kvazibodových zdrojů nanosených na měřený povrch. a) Povrch se zrcadlovým odrazem, b) povrch s difúzním odrazem, c) difúzní povrch s nanosenými kovovými nanočásticemi a d) difúzní povrch s nanosenými fluorescenčními nanočásticemi.

tic na kameře. Při splnění těchto podmínek se stačí ve výpočetním modelu soustředit na světlo vyzářené nebo rozptýlené z jedné nanočástice umístěné v obecné poloze.

Kulové vlny vycházející z jednotlivých částic jsou MO transformovány na vlny rovinné, v případě částic v ohniskové vzdálenosti MO, nebo kulové, v případě částic umístěných mimo ohniskovou rovinu. V zadní ohniskové rovině MO je umístěna spirální fázová maska (SM), která je těmito vlnami osvětlena. Zadní ohnisková rovina MO společně s SM současně splývají s přední ohniskovou rovinou tubusové čočky (TČ). Vlny prochází spirální maskou, v níž dochází k vírové fázové modulaci. Světlo propuštěné SM je po-

3. PRINCIP VÍROVÉ TOPOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE



Obrázek 2: Zjednodušené schéma vírové topografické mikroskopie. MO - mikroskopový objektiv, SM - spirální fázová maska, TČ - tubusová čočka, CCD - kamera.

mocí TČ zobrazeno do roviny kamery (CCD) umístěné v zadní ohniskové rovině TČ. Na kameře dochází k interferenci vírových vln generovaných SM a k vytvoření DH PSF.

Pro vytvoření matematického popisu formování DH PSF budeme pozorovat vlnu šířící se z bodu o souřadnicích $(x_0, y_0, \Delta z_0)$, kde x_0 a y_0 určují příčnou polohu bodového zdroje a Δz_0 je axiální vzdálenost bodu od předmětové ohniskové roviny MO. Použijeme-li paraxiální aproximace kulové vlny, komplexní amplituda vlny v přední ohniskové rovině MO je popsána vztahem

$$u_0 \propto \exp \left(i \frac{\pi (\vec{r}_\perp - \vec{r}_{0\perp})^2}{\lambda \Delta z_0} \right), \quad (3.1)$$

kde $\vec{r}_{0\perp} = (x_0, y_0)$ je vektor polohy v rovině bodového zdroje, $\vec{r}_\perp = (x, y)$ je vektor polohy v přední ohniskové rovině MO a λ je vlnová délka.

Využitím Newtonovy zobrazovací rovnice může být vlna transformovaná MO zapsána v jeho zadní ohniskové rovině, splývající s rovinou SM, pomocí vztahu

$$u_{SM} \propto a_0 \exp \left(-i \frac{\pi \Delta z_0 (|\vec{r}_{SM\perp}|)^2}{\lambda f_{MO}^2} \right) \exp \left(i \frac{2\pi \vec{r}_{0\perp} \cdot \vec{r}_{SM\perp}}{\lambda f_{MO}} \right), \quad (3.2)$$

kde $\vec{r}_{SM\perp} = (x_{SM}, y_{SM})$ je vektor polohy v rovině fázové masky. Po průchodu vlny SM s funkcí propustnosti t je vlna transformována tubusovou čočkou, která opticky provádí Fourierovu transformaci. Komplexní amplituda vlny v zadní ohniskové rovině tubusové čočky je určena vztahem

$$u \propto a_0 \iint_{-\infty}^{\infty} t(x_{SM}, y_{SM}) \exp \left(-i \frac{\pi \Delta z_0 (|\vec{r}_{SM\perp}|)^2}{\lambda f_{MO}^2} \right) \exp \left(i \frac{2\pi \vec{r}_{SM\perp} \cdot \vec{R}}{\lambda f_{TČ}} \right) dx_{SM} dy_{SM}. \quad (3.3)$$

V rovnici 3.3 je $f_{TČ}$ ohnisková vzdálenost tubusové čočky, $\vec{R} = (X, Y)$ a $X = x_i - Mx_0$, $Y = y_i - My_0$, kde x_i , y_i jsou souřadnice v rovině obrazu a $M = -\frac{f_{TČ}}{f_{MO}}$ je zvětšení

3.1. TEORETICKÝ MODEL ROTUJÍCÍHO ZOBRAZENÍ

optického systému tvořeného MO a TČ. Přejdeme-li do polárních souřadnic $x_{\text{SM}} = r \cos \varphi$, $y_{\text{SM}} = r \sin \varphi$, $X = R \cos \Phi$, $Y = R \sin \Phi$, dostáváme vlnu ve tvaru

$$u \propto a_0 \int_0^{2\pi} \int_0^\infty t(r, \varphi) \exp\left(-i \frac{\pi \Delta z_0 r^2}{\lambda f_{\text{MO}}^2}\right) \exp\left(i \frac{2\pi r R \cos(\varphi - \Phi)}{\lambda f_{\text{TČ}}}\right) r dr d\varphi. \quad (3.4)$$

Protože DH PSF je podle [76] vytvořena interferencí dvou vírových vln, je funkce propustnosti spirální masky dána vztahem $t = \sum_{m=1}^2 t_m(r) \exp(il_m \varphi)$. Aby bylo dosaženo prostorové invariance DH PSF, optické víry musí být vytvářeny v úzkých anulárních zónách s poloměry r_1 a r_2 , kde $r_2 > r_1$. Pro zjednodušení výpočetního modelu a možnost analytického řešení integrálu 3.4 je možné amplitudovou propustnost masky zapsat pomocí Diracovy delta funkce $t_m(r) = \delta(r - r_m)$. Aplikujeme-li na rovnici 3.4 Jacobiho-Angerův rozvoj, dosadíme-li $t(r)$ a využijeme-li ortogonality trigonometrických funkcí, lze provést integraci výrazu přes φ , jejímž výsledkem je komplexní amplituda tvaru

$$u \propto 2\pi a_0 \sum_{m=1}^2 i^{l_m} \exp(il_m \Phi) \exp\left(-i \frac{\pi \Delta z_0 r_m^2}{\lambda f_{\text{MO}}^2}\right) J_{l_m}\left(\frac{2\pi R}{\lambda f_{\text{TČ}}} r_m\right) r_m, \quad (3.5)$$

kde J_{l_m} je Besselova funkce prvního druhu a l_m tého řádu.

Abychom obdrželi DH PSF se dvěma laloky, která umožňuje rekonstruovat pozici měřeného bodového zdroje, musí interferující optické víry splňovat podmínku pro rozdíl topologických nábojů $\Delta l = |l_1 - l_2| = 2$ [77]. Nejmenší stopy dosáhneme užitím topologických nábojů $l_1 = 1$ a $l_2 = -1$, neboť velikost DH PSF je určena řádem Besselových funkcí v rovnici 3.5.

Protože kamera detekuje pouze intenzitu světla, výsledný tvar DH PSF je dán interferencí vírových vln popsanych rovnicí 3.5. Intenzita DH PSF získaná z interferenčního zákona má tvar

$$I = (2\pi a_0)^2 \left[\sum_{m=1}^2 J_1^2\left(\frac{2\pi R}{\lambda f_{\text{TČ}}} r_m\right) + 2 J_1\left(\frac{2\pi R}{\lambda f_{\text{TČ}}} r_1\right) J_1\left(\frac{2\pi R}{\lambda f_{\text{TČ}}} r_2\right) \cos(\kappa \Delta z_0 + 2\Phi) \right], \quad (3.6)$$

kde

$$\kappa = \frac{\pi(1 - Q^2) N A_{\text{eff}}^2}{\lambda},$$

$$Q = \frac{r_1}{r_2}, \quad N A_{\text{eff}} = \frac{r_2}{f_{\text{MO}}},$$

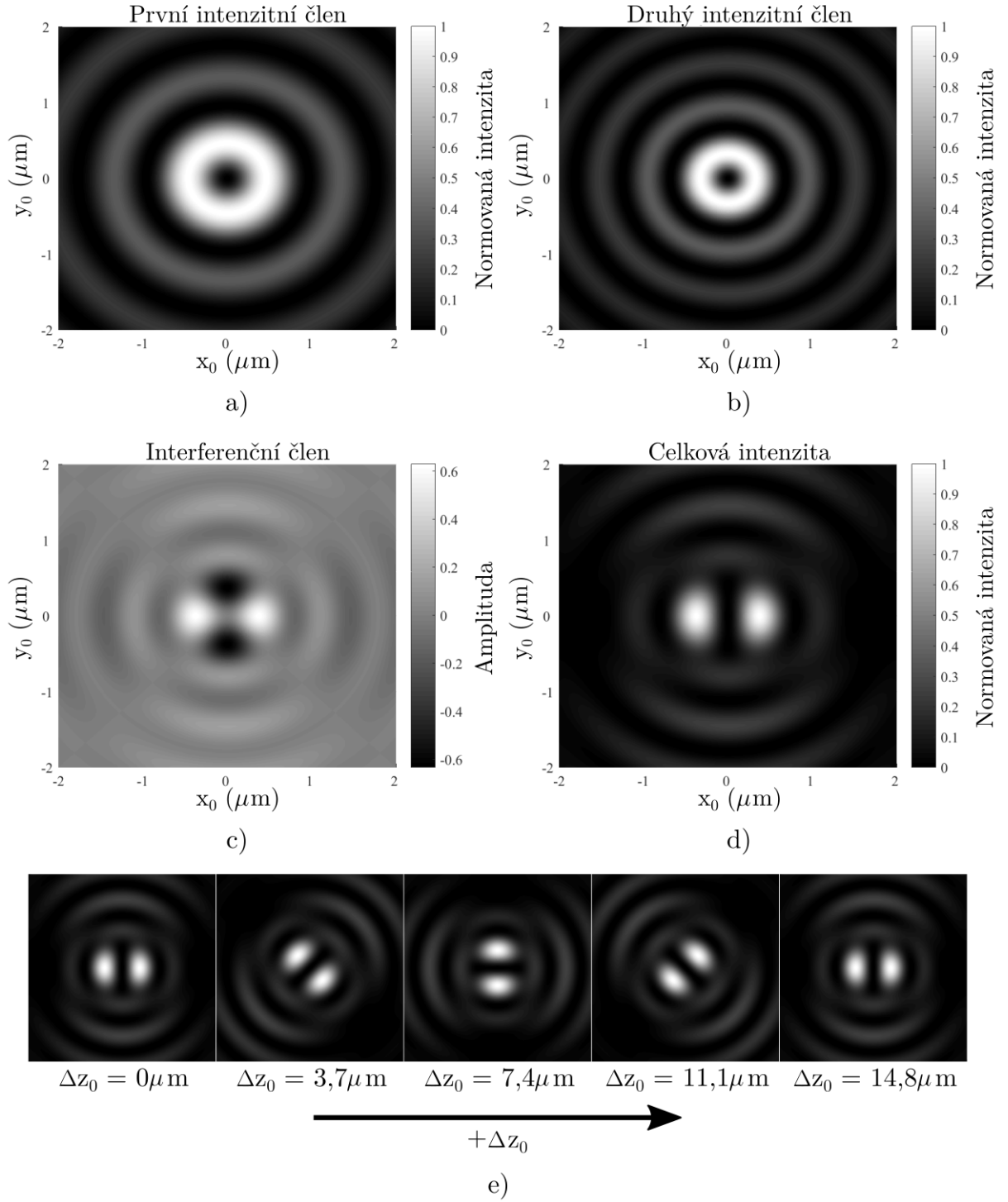
$$R = [(x_i - M x_0)^2 + (y_i - M y_0)^2]^{\frac{1}{2}},$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{y_i - M y_0}{x_i - M x_0}\right).$$

Jednotlivé členy vystupující v rovnici 3.6 a výsledná DH PSF jsou vykresleny na obr. 3. Pro simulaci byly použity parametry uvedené v tabulce 3.1.

Získaný obraz bodového zdroje je podle rovnice 3.6 tvořen interferencí vírových vln generovaných spirální maskou. Velikost a tvar DH PSF, ukázané na obr. 3 d), jsou určeny

3. PRINCIP VÍROVÉ TOPOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE



Obrázek 3: Tvar členů rovnice 3.6 přepočítaný do předmětové roviny, a) Besselova funkce tvořena první anulární zónou SM (první člen sumace v rovnici 3.6), b) Besselova funkce tvořena druhou anulární zónou SM (druhý člen sumace v rovnici 3.6), c) interferenční člen s azimutální závislostí, d) výsledná intenzita. e) rotace DH PSF se zvětšující se defokusací částice Δz_0 v rozsahu $\langle 0; 14,8 \rangle \mu\text{m}$.

součtem dvou intenzitních stop popsaných Besselovou funkcí (sumační člen), viz obr. 3 a),

3.1. TEORETICKÝ MODEL ROTUJÍCÍHO ZOBRAZENÍ

Parametr	r_1	r_2	f_{MO}	$f_{\text{TČ}}$	λ	Δz_0
Hodnota	2,69	3,80	10	400	532	$\langle 0; 14, 77 \rangle$
Jednotka	mm	mm	mm	mm	nm	μm

Tabulka 3.1: Parametry SM a zobrazovacího systému použité v simulaci pro výpočet členů rovnice 3.6.

b), a azimutální modulací tvořenou interferenčním členem, obr. 3 c). Důležitou vlastností vytvořené obrazové stopy je neměnnost její velikosti při rozostření. Tato vlastnost plyne z nezávislosti intenzitních členů v rovnici 3.6 na rozostření Δz_0 a je projevem nedifrakčního šíření světla generovaného spirální maskou. Při rozostření dochází pouze ke změně interferenčního členu, který provádí azimutální modulaci intenzitních stop a vytváří dva světlé laloky typické pro DH PSF. Pro popis vazby mezi rozostřením a rotací DH PSF je vhodné užít polárních souřadnic R a Φ s počátkem v (Mx_0, My_0) určeným zvětšením sestavy a souřadnicemi virtuálního zdroje (x_0, y_0) . Pak, když $\Delta z_0 = 0$, mají pozorované světlé laloky DH PSF maxima umístěna v úhlech $\Phi = 0$ a $\Phi = \pi$. Pro světlo pocházející z defokusevaného zdroje v hloubce Δz_0 je DH PSF úhlově natočena tak, že maxima jejích laloků leží pod úhly $\Phi = -\kappa\Delta z_0/2$ a $\Phi = \pi - \kappa\Delta z_0/2$. Určením úhlového natočení a laterální pozice středu DH PSF tedy získáme lokální hloubku Δz_0 měřeného povrchu v poloze (x_0, y_0) .

Citlivost měření rozostření z úhlového natočení DH PSF lze posoudit z hloubkové periody $\Lambda = 2\pi/\kappa$, která odpovídá rozostření, při němž dojde k natočení DH PSF o úhel π . Ta je závislá na NA_{eff} a poměru poloměrů zón fázové masky $\Lambda = \frac{2\lambda}{(1 - Q^2)NA_{\text{eff}}^2}$ [75]. Největší přesnosti měření je dosaženo pro nejkratší periodu Λ . Protože s rostoucím poloměrem r_2 větší ze zón se Q zmenšuje a NA_{eff} roste, je snaha maximalizovat r_2 . K plnému využití rozlišení dochází při maximální NA_{eff} , která je stejná jako numerická apertura MO, tedy při r_2 shodným s poloměrem pupily MO.

V praktických aplikacích je třeba přesnost měření přizpůsobit parametrům studovaných vzorků a axiálnímu rozsahu, ve kterém je DH PSF využívána. Jak bylo ukázáno v práci [77], kde byly provedeny výpočty se zohledněním vlastností nedifrakčních vírových svazků generovaných spirální maskou s konečnou šířkou anulárních zón, měření hloubky lze provádět v délkovém rozsahu

$$L \cong \frac{\lambda f_{\text{MO}}^2}{r_2 \Delta r}, \quad (3.7)$$

kde r_2 je střední poloměr větší ze zón fázové masky a Δr šířka anulárních zón. Jak je vidět, zvětšováním r_2 dochází ke zvýšení defokusační citlivosti DH PSF a zmenšení využitelného axiálního rozsahu. Volbou parametrů masky je dělán kompromis mezi přesností měření a jeho rozsahem.

Držíme-li se při měření v rozsahu určeném 3.7, pak se tvar ani velikost rozptylové funkce téměř nemění a blíží se teoretickému modelu předpokládajícímu zóny popsané Diracovou delta funkcí. Mimo tento rozsah se však PSF rozmazává, její laloky se deformují, a tím dochází k znesnadnění numerického zpracování a vyhodnocení dat a zhoršení přesnosti měření. Skutečný tvar DH PSF pozorovaný v experimentu je uveden v kapitole 5 na obr. 26.

Princip numerické rekonstrukce úhlového natočení DH PSF a způsob zpracování měřených dat je diskutován v následující kapitole.

4. Zpracování obrazu a numerická rekonstrukce dat

Topografické měření povrchů prováděné metodou popsanou v předchozí kapitole je založeno na zobrazení lokalizačních markerů umístěných na měřeném povrchu a vyhodnocením jejich pozice z modifikované rozptylové funkce zobrazovacího systému. Lokální výška měřeného povrchu je získána z příčné pozice a úhlového natočení DH PSF. Pro vyhodnocení experimentu s velkým počtem lokalizačních markerů je třeba využít automatické detekce měřených DH PSF a numerické rekonstrukce jejich natočení vázaných na rozostření v předmětovém prostoru. Pro potřeby zpracování měřených dat byl vytvořen rekonstrukční software v programu MATLAB [78]. Princip rekonstrukce úhlového natočení DH PSF je založen na metodách digitálního zpracování obrazu a využívá především procedur prahování, filtrování a segmentace obrazu technikou rozvodí s následným značením nalezených objektů.

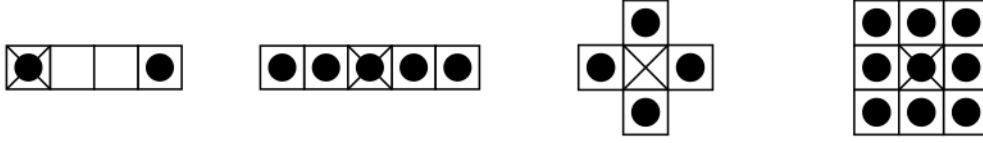
Segmentace obrazu je složitý proces, jehož náročnost souvisí s charakterem a vlastnostmi objektů v obraze. Úspěch segmentace je značně ovlivněn i vstupními daty. Velký podíl šumu nebo nerovnoměrné rozložení jasu v obraze mohou segmentaci úplně znemožnit. Pro zlepšení výsledků segmentačního algoritmu je vhodné data vstupního obrazu předzpracovat.

4.1. Předzpracování obrazu

Předzpracování obrazu je prováděno zejména k potlačení šumu v obraze, nerovnoměrnosti osvětlení a potlačení či zvýraznění rysů obrazu. K tomu je využíváno zejména metod matematické morfologie, která je zaměřena na tvar a formu objektů v obraze. Matematická morfologie je pak použita nejen k uvedeným účelům předzpracování obrazu, ale dále i k segmentaci obrazu, případně k provádění měření vedoucí k charakterizování obrazových objektů numerickými hodnotami, jako je velikost objektů, analýza dominantních směrů, aj. [79]. V rámci morfologie je definováno množství základních transformací, z nichž některé budou uvedeny i v této práci. Je nutné si uvědomit, že vzhledem ke složitosti problémů v analýze obrazu je jen zřídka možné vyřešit daný problém jedinou operací (transformací). To vede k užití kombinací elementárních transformací [80].

V dalším je předpokládán diskrétní binární signál definovaný v $\mathbb{Z}^N$, který dostaneme vzorkováním (digitalizací) signálu spojitého, definovaného v $\mathbb{R}^N$. Morfologická transformace je operátorová relace dvou bodových množin I a B , kde bodová množina I odpovídá obrazu a množina B se nazývá strukturní element (SE), který má definovaný počátek (v obrázcích značený křížkem). Příklady strukturních elementů jsou uvedeny v obr. 4. Tvar SE je vybrán s určitou znalostí geometrie relevantních (hledané objekty) či irrelevantních (šum, objekty k potlačení) struktur v obraze. Následně budou definovány pouze některé z morfologických transformací, a to dilatace, eroze, uzavření, otevření a následně morfologická rekonstrukce.

4.1. PŘEDZPRACOVÁNÍ OBRAZU



Obrázek 4: Příklady strukturních elementů B . Počátek je značen křížkem. Body obsažené v množině B jsou značeny černým kruhem. Množina B nemusí nutně obsahovat počátek.

4.1.1. Dilatace

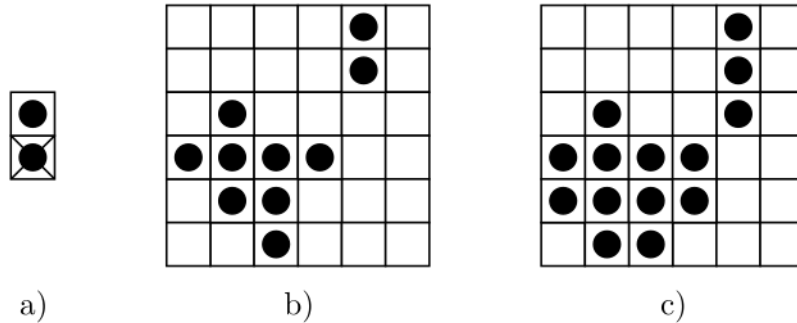
První ze dvou základních morfologických operací je morfologická transformace dilatace množiny bodů I SE B značená $\delta_B(I)$, což je taková množina bodů $\mathbf{i}$, ve kterých když je umístěn počátek B , pak průnik B s I je neprázdný [80]:

$$\delta_B(I) = \{\mathbf{i} \mid B_{\mathbf{i}} \cap I \neq \emptyset\}, \quad (4.1)$$

což je možné napsat také jako sjednocení množiny translací, které jsou určeny strukturním elementem:

$$\delta_B(I) = \bigcup_{b \in B} I_{-b}. \quad (4.2)$$

Příklad dilatace na binárním obrazu je uveden na obr. 5.



Obrázek 5: Příklad morfologické operace dilatace $\delta_B(I)$ obrazu I strukturním elementem B . a) Strukturní element B , b) obraz I , c) dilatovaný obraz $\delta_B(I)$.

Tato transformace má následující vlastnosti:

- Komutativnost: $\delta_B(A) = \delta_A(B)$
- Asociativnost: $\delta_C(\delta_B(A)) = \delta_A(\delta_B(C))$
- Rostoucí transformace: $A \subseteq C \Rightarrow \delta_B(A) \subseteq \delta_B(C)$
- Invariance k translaci: $\delta_B(A_T) = (\delta_B(A))_T$

4.1.2. Eroze

Eroze je vzhledem k dilataci transformací duální (vzhledem ke komplementu), nikoliv inverzní. Jejich sekvenční aplikací vznikne nový operátor, nikoliv však operátor restaurace původního obrazu. Platí mezi nimi vztah [79]:

$$\varepsilon_B(I) = [\delta_B(I^c)]^c. \quad (4.3)$$

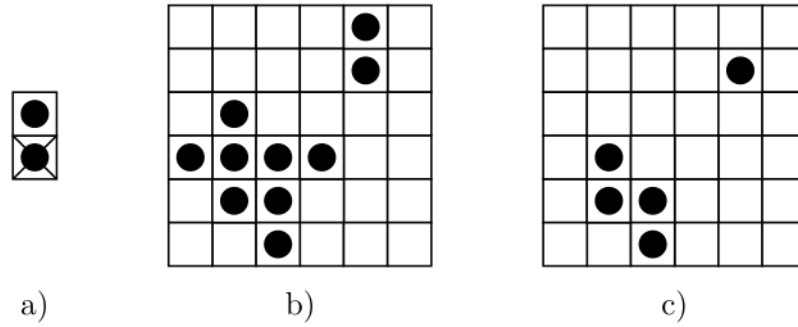
Eroze je pak definována následovně. Morfologická transformace eroze množiny bodů I SE B značená $\varepsilon_B(I)$ je taková množina bodů $\mathbf{i}$, že B je podmnožinou I , když počátek B je umístěn v bodě $\mathbf{i}$ [80]:

$$\varepsilon_B(I) = \{\mathbf{i} \mid B_{\mathbf{i}} \subseteq I\}, \quad (4.4)$$

což je možné napsat také jako průnik množiny translací, které jsou určeny strukturním elementem:

$$\varepsilon_B(I) = \bigcap_{b \in B} I_{-b}. \quad (4.5)$$

Příklad eroze na binárním obrazu je uveden na obr. 6.



Obrázek 6: Příklad morfologické operace eroze $\varepsilon_B(I)$ obrazu I strukturním elementem B . a) Strukturní element B , b) obraz I , c) erodovaný obraz $\varepsilon_B(I)$.

Tato transformace má následující vlastnosti:

- Antiextenzivnost: $\text{Počátek} \in B \Rightarrow \varepsilon_B(A) \subseteq A$
- Rostoucí transformace: $A \subseteq C \Rightarrow \varepsilon_B(A) \subseteq \varepsilon_B(C)$
- Invariance k translaci: $\varepsilon_B(A_T) = (\varepsilon_B(A))_T$
 $\varepsilon_{B_T}(A) = (\varepsilon_B(A))_{-T}$

4.1.3. Otevření

Sekvenční aplikací duálních transformací jsou získány transformace nové. Nejprve ale zavedme tzv. transponovanou bodovou množinu. Nechť B je bodová množina s počátkem v $\mathbf{o}$, pak transponovaná bodová množina $\check{B}$ je její symetrická bodová množina vzhledem k počátku:

$$\check{B} = \{-b \mid b \in B\}.$$

Aplikací dilatace transponovaným SE $\check{B}$ na obraz I erodovaný SE B dostaneme transformaci otevření, značenou $\gamma_B(I)$ [80]:

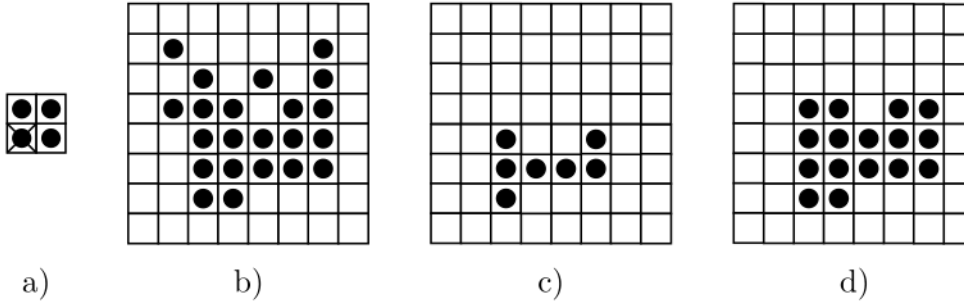
$$\gamma_B(I) = \delta_{\check{B}}[\varepsilon_B(I)]. \quad (4.6)$$

Tato operace zrestauruje (samozřejmě s ohledem na vybraný SE) většinu původního obrazu I , vyjma částí úplně odstraněných erozí. Eroze totiž nejen odstraní nežádoucí části obrazu, ale i ztenčí všechny neodstraněné. Příklad otevření je na obr. 7. Lze opět použít alternativního zápisu otevření $\gamma_B(I)$ jako sjednocení množiny všech posunutí SE B , jež jsou podmnožinou původního obrazu I :

$$\gamma_B(I) = \bigcup_i \{B_i \mid B_i \subseteq I\}. \quad (4.7)$$

Morfologické otevření redukuje míru šumu v obraze a rozpojuje objekty spojené úzkými „mosty“.

4.1. PŘEDZPRACOVÁNÍ OBRAZU



Obrázek 7: Příklad morfologické operace otevření $\gamma_B(I)$ obrazu I strukturním elementem B . a) Strukturní element B , b) obraz I , c) erodovaný obraz $\varepsilon_B(I)$, d) otevření $\gamma_B(I) = \delta_{\tilde{B}}[\varepsilon_B(I)]$.

4.1.4. Uzavření

Morfologická transformace uzavření, značená $\phi_B(I)$ vznikne erozí se SE $\tilde{B}$ obrazu dilato-
vaného SE B [80]:

$$\phi_B(I) = \varepsilon_{\tilde{B}}[\delta_B(I)]. \quad (4.8)$$

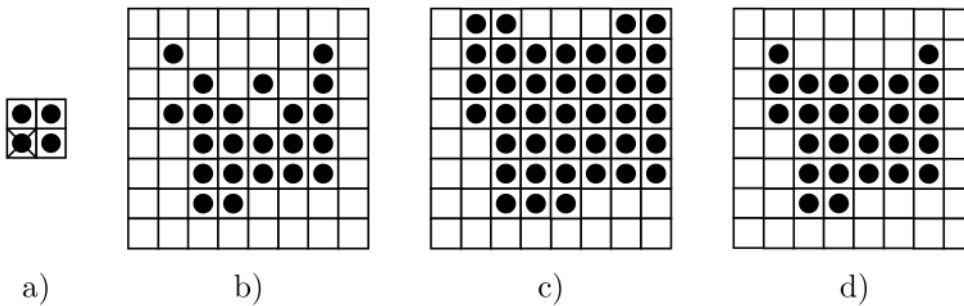
Uzavření je ekvivalentně formulováno jako průnik všech posunutí komplementu strukturního elementu B takových, že obraz I je v tomto komplementu obsažen:

$$\phi_B(I) = \bigcap_i \{B_i^c \mid I \subseteq B_i^c\}. \quad (4.9)$$

Protože otevření a uzavření jsou vzájemně duální transformace, lze také psát [81]:

$$\phi_B(I) = \left[\bigcup_i \{B_i \mid B_i \subseteq I^c\} \right]^c. \quad (4.10)$$

Transformace uzavření, na rozdíl od otevření, filtruje signál zvenku, vyplňuje všechny otvory menší než SE a spojuje blízké objekty, jak lze vidět na obr. 8.



Obrázek 8: Příklad morfologické operace uzavření $\phi_B(I)$ obrazu I strukturním elementem B . a) Strukturní element B , b) obraz I , c) dilatovaný obraz $\delta_B(I)$, d) uzavření $\phi_B(I) = \varepsilon_{\tilde{B}}[\delta_B(I)]$.

Užití operací uzavření a otevření snižuje množství segmentů v obraze, čímž zjednodušuje jeho strukturu, přičemž velikost objektu zůstává zachována. Je vhodné zde podotknout, že otevření i uzavření jsou transformace *idempotentní*, tzn. jejich opakovaným použitím na daný vstup (obraz) vznikne stejný výstup, jako v případě použití jediné [82].

Všechny uvedené definice je možné rozšířit na případ nebinárního signálu, a to nahrazením průniku množin operátorem bodové minimum (*point-wise minimum*) $\wedge$, sjednocení

množin pak bodovým maximem (*point-wise maximum*) $\vee$. Tyto jsou na obrazech f a g s identickým definičním oborem definovány pro každý bod x následovně [79]:

$$(f \wedge g)(x) = \min [f(x), g(x)], \quad (4.11)$$

$$(f \vee g)(x) = \max [f(x), g(x)]. \quad (4.12)$$

4.1.5. Morfologická rekonstrukce

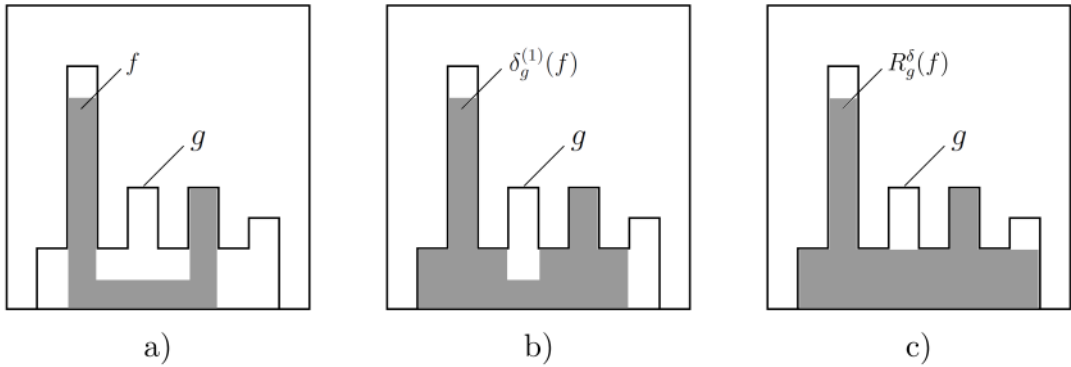
Chceme-li rekonstruovat původní obraz pouze v některých částech, které označíme značkami (ručně či automaticky), pak potřebujeme ne jeden, ale dva vstupní obrazy. První, f , který nazveme značkovačem (*marker*), a druhý, referenční, g , který nazveme maskou, a požadujeme $D_f = D_g$. Vynutíme-li u morfologické transformace aplikované na f , aby zároveň zůstala pod obrazem g , pak transformaci nazýváme geodetickou [79]. Za předpokladu $f \leq g$ je pak geodetická dilatace značkovače f velikosti 1 vzhledem k masce g definována

$$\delta_g^{(1)}(f) = \delta^{(1)}(f) \wedge g, \quad (4.13)$$

kde $\delta^{(1)}$ je elementární dilatace a $\wedge$ je výše definované bodové minimum. Podobně pro geodetickou erozi, kde požadujeme $g \leq f$:

$$\varepsilon_g^{(1)}(f) = \varepsilon^{(1)}(f) \vee g, \quad (4.14)$$

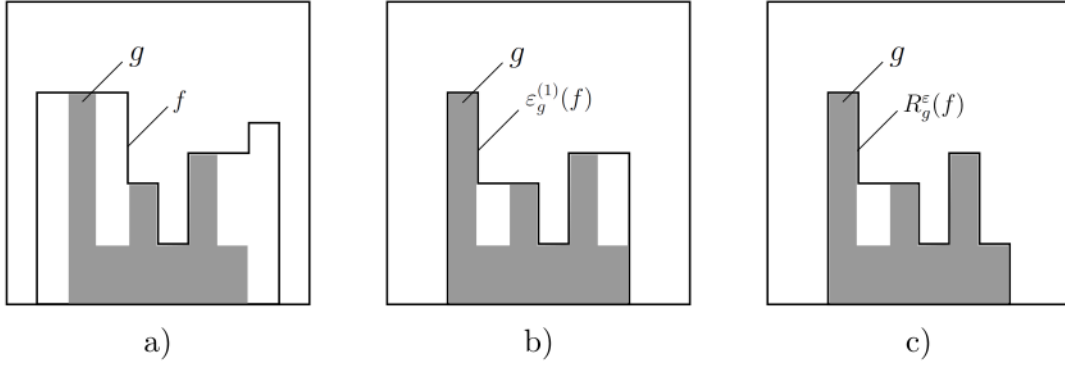
kde $\varepsilon^{(1)}$ je elementární eroze a $\vee$ je výše definované bodové maximum. Jsou-li tyto transformace aplikovány (iterovány) až do dosažení stability, pak je řeč o morfologické rekonstrukci dilatací resp. erozí, které značíme $R_g^\delta(f)$, resp. $R_g^\varepsilon(f)$ [79]. Jejich průběh je naznačen na obr. 9 a 10.



Obrázek 9: Morfologická rekonstrukce dilatací. a) Výchozí stav, marker f a maska g , b) geodetická dilatace, c) finální rekonstrukce dilatací, v tomto případě $R_g^\delta(f) = \delta_g^{(1)}(\delta_g^{(1)}(f))$.

V rámci přípravy obrazu získaného v experimentu byla využita zejména transformace otevření velkým strukturním elementem, aby byl potlačen vliv nerovnoměrnosti osvětlení. Dále byly využity uzavření a otevření velmi malým strukturním elementem k odstranění impulzního šumu, tzv. šum „sůl a pepř“. V takto připraveném obrazu byly následně detekovány jednotlivé DH PSF a bylo rekonstruováno jejich úhlové natočení odpovídající podle rovnice 3.6 hloubce umístění částice na studovaném povrchu.

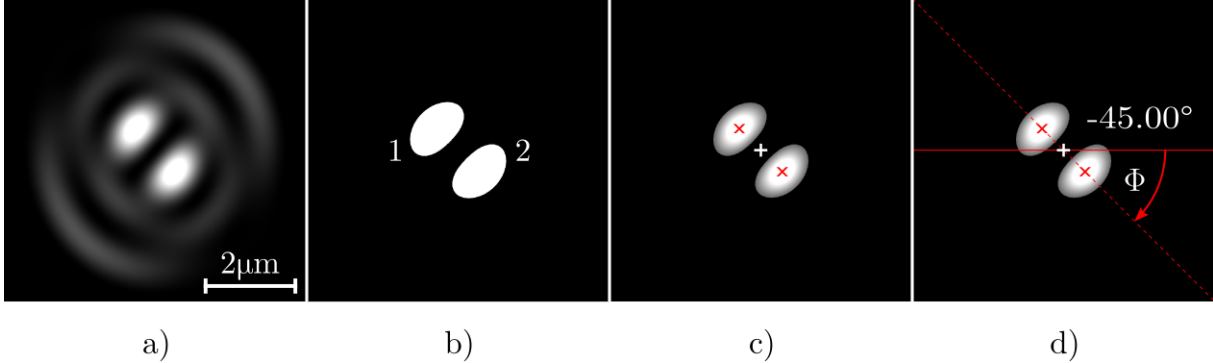
4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ



Obrázek 10: Morfologická rekonstrukce erozí. a) Výchozí stav, marker f a maska g , b) geodetická dilatace, c) finální rekonstrukce dilatací, v tomto případě $R_g^\varepsilon(f) = \varepsilon_g^{(1)}(\varepsilon_g^{(1)}(f))$.

4.2. Rekonstrukce topografie povrchu z úhlového natočení

Jednotlivé kroky rekonstrukce úhlového natočení DH PSF jsou na obrázku 11. DH PSF na obrázku 11 a) byla vytvořena numerickou simulací experimentu s parametry uvedenými v tabulce 4.1.



Obrázek 11: Schéma procesu numerické rekonstrukce úhlového natočení DH PSF, ukázáno na simulovaných datech. a) Vstupní data simulovaná s parametry z tabulky 4.1, b) adaptivní lokální prahování obrazu, vytvoření binární masky a označení jednotlivých laloků DH PSF, c) automatická detekce těžišť laloků (červená $\times$) ze vstupního snímku násobeného binární maskou, detekce těžiště soustavy (bílý kříž), d) určení rotace DH PSF.

Parametr	r_1	r_2	Δr	f_{MO}	Δz_0
Hodnota	2,69	3,80	0,75	10	3,6925
Jednotka	mm	mm	mm	mm	μm

Tabulka 4.1: Parametry SM a MO použité v simulaci rekonstrukce natočení DH PSF.

Obraz DH PSF je nejprve normován tak, aby intenzita v každém pixelu patřila do intervalu $\langle 0; 1 \rangle$. Tím je zmenšen vliv nehomogenosti jasu v obraze a roztažením histogramu

je zvětšen kontrast snímku. Pro automatickou detekci jednotlivých laloků DH PSF je nutné snímek prahovat a vytvořit jeho binární masku, jako je na obr. 11 b). Hodnota sledovaného parametru každého pixelu (v tomto případě intenzity) je porovnána se zvolenou hodnotou, prahem, a na základě tohoto porovnání je s daným pixelem provedena operace. Pro vytvoření binární masky je operací přidělení maximální (1), popř. minimální (0) intenzity v závislosti na tom, zda intenzita pixelu je větší než práh, popř. menší. V případě vytváření masek jiných než binárních a zvyšování kontrastu lze užít prahů i více. Prahovací metody je možné rozdělit primárně na globální a lokální. Globální metody hledají vhodnou hodnotu prahu napříč celým obrazem. To je prováděno na základě histogramu. Nejjednodušší volbou prahu je průměrná hodnota, případně medián. Druhou možností je v případě bimodálního rozdělení histogramu určit za práh hodnotu ležící mezi maximy histogramu.

V mnohých případech však není histogram obrazu jednoznačně rozdělen a k určení prahu je nutné užít složitějších metod. V této práci je používána Otsuho metoda automatického hledání prahu [83]. Ta je založena na hledání minimální sumy vážených rozptylů dvou tříd, popředí a pozadí. Hledání je prováděno iterativně přes všechny možné hladiny prahu. Máme-li histogram s N třídami, z nichž každá má četnost P , pak pro práh $T \in \langle 1; N \rangle$ vypočteme pro pozadí (b , z anglického background)

$$\begin{aligned} W_b(T) &= \sum_{i=1}^{T-1} P(i), \\ M_b(T) &= \sum_{i=1}^{T-1} \frac{iP(i)}{W_b(T)}, \\ \sigma_b^2(T) &= \sum_{i=1}^{T-1} [i - M_b(T)]^2 \frac{P(i)}{W_b(T)}. \end{aligned} \quad (4.15)$$

W_b je váha pozadí pro daný práh, M_b střední hodnota a $\sigma_b^2(T)$ je rozptyl třídy pozadí. Obdobně pro popředí (f , z anglického foreground) píšeme

$$\begin{aligned} W_f(T) &= \sum_{i=T}^N P(i), \\ M_f(T) &= \sum_{i=T}^N \frac{iP(i)}{W_f(T)}, \\ \sigma_f^2(T) &= \sum_{i=T}^N [i - M_b(T)]^2 \frac{P(i)}{W_f(T)}. \end{aligned} \quad (4.16)$$

Celkový vážený rozptyl $\sigma_W^2(T)$ pro danou hodnotu prahu T pak vypočteme

$$\sigma_W^2(T) = W_b(T)\sigma_b^2(T) + W_f(T)\sigma_f^2(T). \quad (4.17)$$

Rozptyly $\sigma_W^2(T)$ vypočtené pro všechny hodnoty T porovnáme a nalezneme minimum. Odpovídající hodnota T je pak zvolený práh.

Výše popsaná procedura prahování umožňuje stanovit v jednom kroku globální hodnotu prahu vhodnou pro celý obraz. Globální stanovení prahu v reálných podmínkách

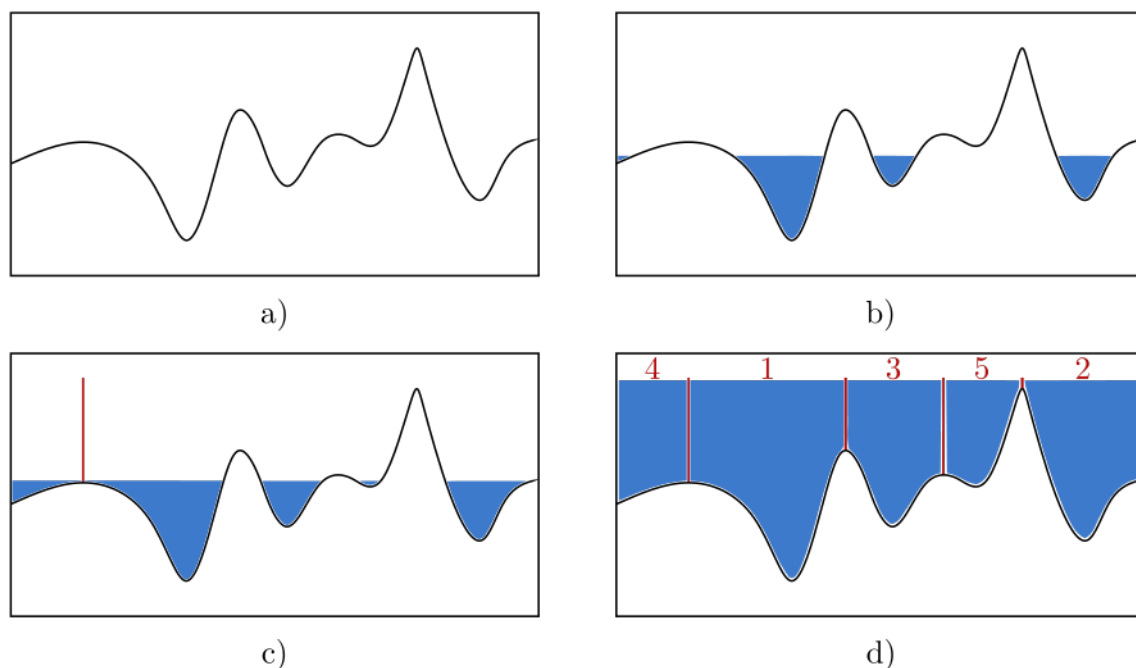
4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ

ale často naráží na problém nerovnoměrnosti osvětlení v obraze. Části výsledného obrazu jsou pak označeny za pozadí, protože spadají pod hranici stanoveného prahu T . Pro minimalizaci tohoto vlivu a získání přesnější binární masky ve všech částech obrazu je výhodné užít adaptivního lokálního prahování. To hledá hodnotu prahu pro každý pixel zvlášť na základě jeho okolí (neznamená nutně jen sousední pixely). Metoda adaptivního prahování použitá v této diplomové práci pochází od Bradleyho a Rotha [84] a je založena na prahování představeném Wellnerem [85]. Wellnerova metoda prahování je rychlá a vyžaduje pouze jeden průběh celým vstupním snímkem. Při tomto průběhu je hodnota intenzity každého pixelu porovnávána s klouzavým průměrem předchozích s pixelů. Je-li nižší o t procent než tento průměr, je pixel vyhodnocen jako pozadí a je mu přidělena intenzita minimální (0). V opačném případě je mu přidělena maximální intenzita (1). Pixely vstupního snímku jsou procházeny po řadách střídavě zleva doprava a zprava doleva, aby byla minimalizována chyba při přechodu na nový řádek. Tato metoda však na úkor své rychlosti vnáší chyby. Jedna je zřetelná zvláště na okrajích, kde jsou vytvářeny střídavé pruhy maxim a minim v závislosti na směru vyhodnocení daného řádku. Korekci této chyby navrhl už sám autor, a to průměrováním hodnoty pixelu s odpovídajícím pixelem v předchozím řádku. Druhým problémem je, jakou hodnotu přidělit prvním pixelům, jež jsou porovnávány s méně než s pixely. Autor navrhl vzít jejich měřenou hodnotu a porovnat ji se střední hodnotou z rozsahu intenzit snímku s tím, že případná chyba ovlivní pouze zanedbatelně malý počet pixelů. Hlavním problémem Wellnerovy metody a důvodem, proč Bradley a Roth metodu rozšířili, však je, že záleží na směru skenování ve snímku a také, že s předcházejících pixelů není dostatečným reprezentantem okolí zkoumaného pixelu. Jejich metoda adaptivního prahování počítá průměr z $s \times s$ okolních pixelů, s nímž porovnává hodnotu pixelu. Je-li $I(x, y)$ zkoumaná intenzita pixelu x -tého řádku a y -tého sloupce a $M(x, y)$ průměrná hodnota intenzity $s \times s$ okolí zkoumaného pixelu, pak platí kritérium

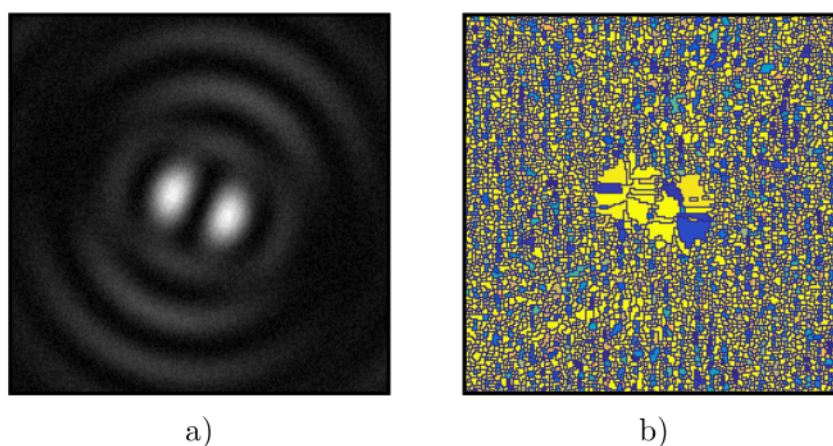
$$\begin{aligned} I(x, y) \leq M(x, y) \frac{100 - t}{100} &\rightarrow I(x, y) = 0, \\ I(x, y) > M(x, y) \frac{100 - t}{100} &\rightarrow I(x, y) = 1. \end{aligned} \tag{4.18}$$

Lokální adaptivní prahování provedené tímto způsobem je pomalejší než Wellnerovo, avšak pouze o jeden průběh snímku. Benefitem je výrazně přesněji určená hodnota prahu v každém pixelu a výsledný obraz neobsahující artefakty vzniklé na okrajích při přecházení na následující řádek. Je ovšem nutné volit vhodnou velikost oblastí s , neboť nevhodnou volbou je výrazně prodlužován výpočetní čas.

Poté co jsou laloky DH PSF prahováním odděleny od pozadí snímku, je nutné provést jejich označení a přidělit jim jednoznačný identifikátor. Metod značení je velké množství. V následujícím textu je rozvedena pouze technika rozvodí, užitá při zpracování dat v této práci. Tato morfologická metoda segmentace je založena na představě obrazu jako topografického reliéfu postupně zaplavovaného vodou. Jednotlivé oblasti (povodí) jsou zaplňovány vodou z lokálních minim obrazu. V místech, kde by mohlo dojít ke spojení dvou povodí jsou vytvořeny hráze. Proces zaplavování je zastaven při dosažení maxima obrazu. Výsledný obraz je rozdělený do oblastí jednotlivých povodí oddělených hrázemi. Poté jsou všechny pixely spadající do jednoho povodí označeny stejným unikátním identifikátorem. Princip techniky je naznačen na obr. 12. Problémem této techniky je nadměrná segmentace obrazu, jak lze vidět na obr. 13. Ta je způsobena šumem či lokálními



Obrázek 12: Princip segmentace obrazu technikou rozvodí, zde ukázáno na datech z 1D detektoru. a) Profil intenzity, b) zaplňování oblastí z lokálních minim, c) vytvoření hráze, kde by došlo ke spojení dvou oblastí, d) dosaženo maximum intenzity, všechny hráze vytvořeny, oblastem přiděleny identifikátory (zde čísla 1 až 5).

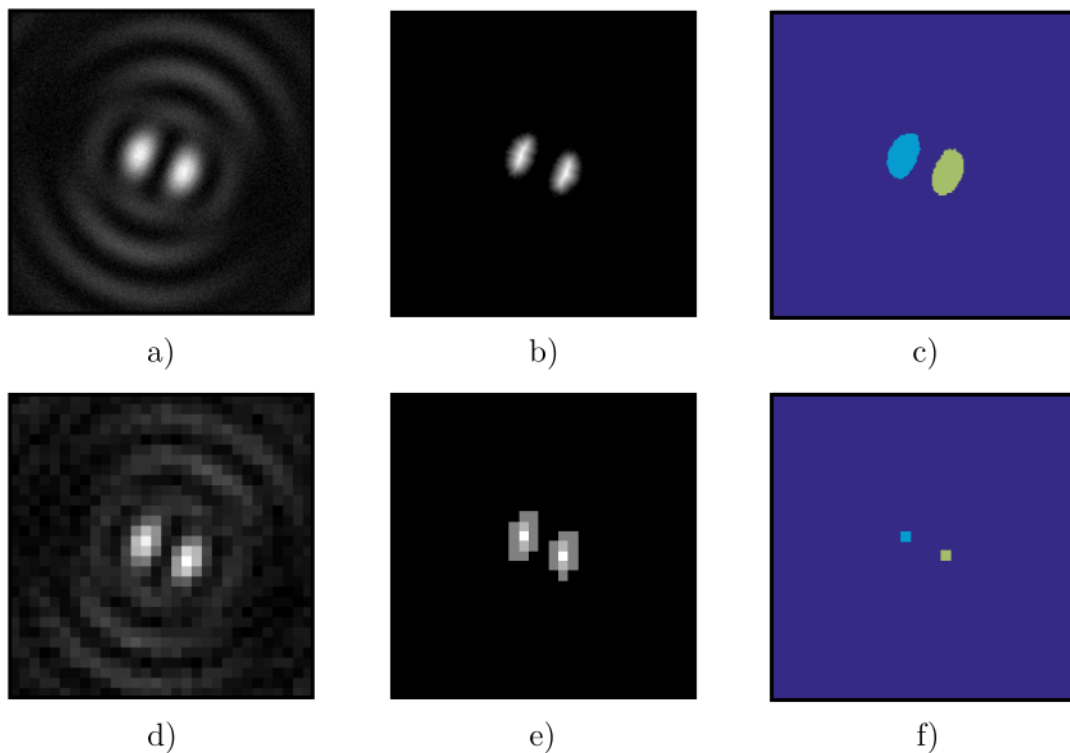


Obrázek 13: Nadměrná segmentace obrazu technikou rozvodí. a) Vstupní obraz, b) technika rozvodí aplikovaná přímo na komplement vstupního obrazu. Jednotlivé barvy označují dané identifikátory, hráze jsou značeny černě. Vstupní obraz obsahuje šum s rovnoměrným rozdělením.

nepravidelnostmi, které poté způsobují vznik podoblastí, protože každé lokální minimum je počátečním bodem povodí. Tato technika je tedy vždy buď předcházena eliminací málo významných minim nebo je následována spojováním oblastí patřících do stejného segmentu. Při rekonstrukci natočení DH PSF je v tomto kroku nutné v odprahovaných lalocích vytvořit lokální minima pro použití techniky rozvodí. To je možné provést buď

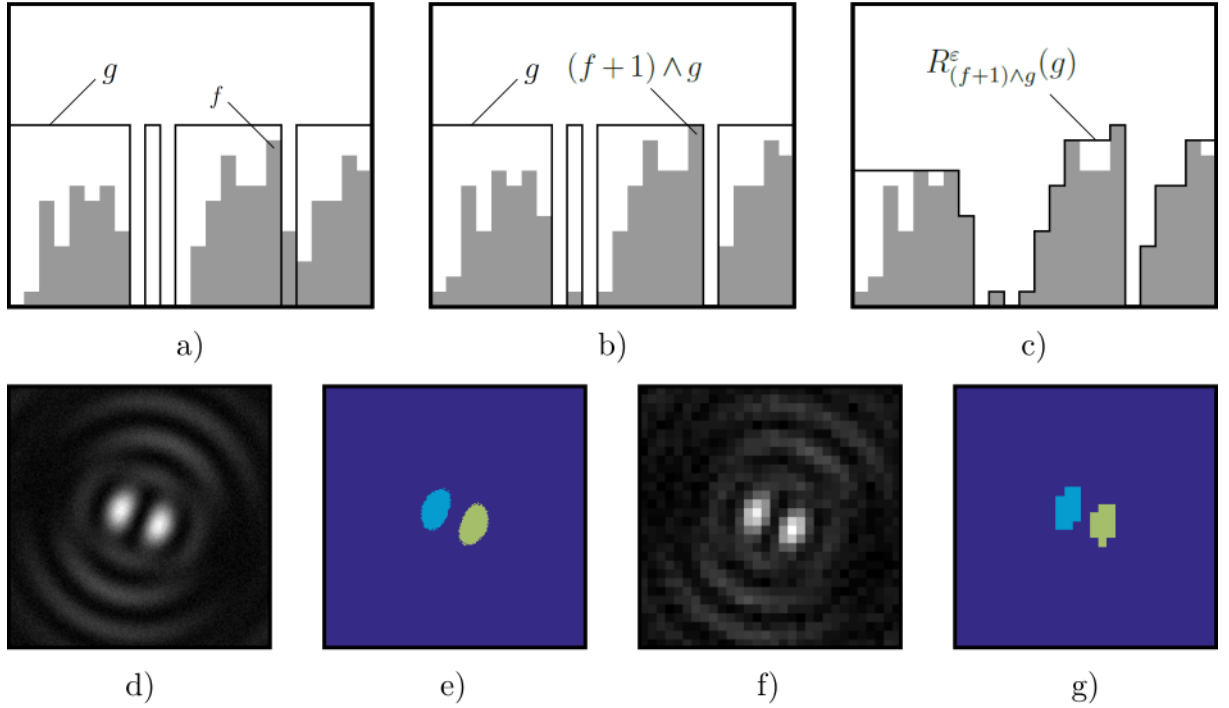
4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ

inverzí intenzity obrazu, nebo použitím funkce měřící vzdálenost daného pixelu od nejbližšího nenulového pixelu. Při užití druhé z možností je možno dosáhnout přesnějších výsledků, avšak pouze pokud je počet pixelů spadajících na jeden lalok dostatečně velký. V takovém případě je výhodné užít funkce vzdálenosti na komplement obrazu, který je následně invertován. V případě, že počet pixelů spadajících na jeden lalok je malý, je vhodnější v obraze s invertovanou intenzitou imponovat minima, což potlačí všechna ostatní lokální minima. Varianta první, využívající funkce vzdálenosti, je demonstrována na obr. 14. Druhá varianta, využívající impozice minim, vychází z rekonstrukce erozí, popsané v části 4.1.5, a její výsledky jsou na obr. 15 pro stejná vstupní data jako v případě prvním. Vzhledem k tomu, že technika s impozicí minim je použitelná v obou případech vzorkování DH PSF, byla upřednostněna při zpracování dat naměřených v experimentu. Aplikací techniky rozvodí získáváme dva odprahované laloky s přiřazenými číselnými identifikátory (čísla 1 a 2 v obr. 11 b).



Obrázek 14: Řešení nadměrné segmentace obrazu technikou rozvodí užitím funkce vzdálenosti (*distance function*). a) Vstupní obraz s velkým vzorkováním - počtem pixelů pod laloky DH PSF, b) funkce vzdálenosti aplikovaná na a), c) segmentace rozvodím z komplementu b), d) vstupní obraz s malým vzorkováním laloků, e) funkce vzdálenosti aplikovaná na d), f) segmentace rozvodím z komplementu e). Lze vidět, že pro malé vzorkování není použití vzdálenostní funkce optimální.

Poté, co je obraz DH PSF odprahován a její laloky jsou označeny identifikátorem (obr. 11 b), je binární maska DH PSF vynásobena původním obrazem. V jednotlivých lalocích DH PSF označených identifikátorem je možné nezávisle detekovat těžiště. Při jejich výpočtu je brána hodnota intenzity pixelu jako jeho váha. V obr. 11 c) jsou těžiště značena červenými $\times$. Pro určení laterální polohy částice na vzorku je v tomto kroku také určena poloha celkového těžiště vyhodnocované DH PSF, viz bílý kříž na obr. 11 c).

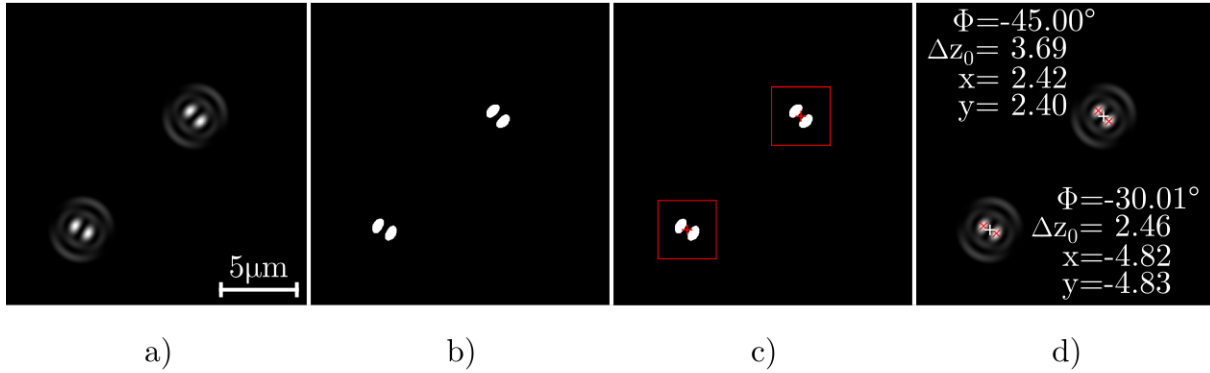


Obrázek 15: Řešení nadměrné segmentace obrazu technikou rozvodí za použití impozice minim. a) - c) Princip impozice minim, d) - g) Aplikace techniky na simulovaný obraz s rozdílným vzorkováním. a) Vstupní signál f a značkový signál pro pozici minim g , b) bodové minimum mezi $f + 1$ a g , tzn. $(f + 1) \wedge g$, c) rekonstrukce erozí signálu $(f + 1) \wedge g$ ze značkovacího signálu g . d) Vstupní obraz s velkým vzorkováním - počtem pixelů pod laloky DH PSF, e) segmentace rozvodím z komplementu d) s imponovaným minimem v každé z laloků DH PSF, f) vstupní obraz s malým vzorkováním laloků, g) segmentace rozvodím z komplementu f) s imponovanými minimy.

Těžiště laloků DH PSF jsou poté proložena přímkou. Odchylka této přímky od referenčního souřadného systému je vyhodnocena jako natočení DH PSF, viz obr. 11 d). Zjištěný úhel natočení DH PSF pak odpovídá lokální výšce měřeného povrchu, jak bylo ukázáno v rovnici 3.6.

V reálném experimentu je současně měřeno velké množství DH PSF a jejich polohu a natočení je nutné rekonstruovat automaticky. Rekonstrukční algoritmus byl nejprve testován na teoretických datech, která nejsou ovlivněna negativními experimentálními vlivy. Pro testování principu rekonstrukce více bodových objektů byla vytvořena dvojice DH PSF. Experimentální parametry sestavy byly opět zvoleny podle tabulky 4.1. Příčná a podélná poloha vztažená k přední ohniskové rovině mikroskopového objektivu byla $[-4, 75; -4, 75; 2, 46] \mu\text{m}$ pro první bod a $[2, 38; 2, 38; 3, 69] \mu\text{m}$ pro druhý z bodů. Tomu dle vztahu 3.6 odpovídá teoretické úhlové natočení DH PSF 30° a 45° . Natočení každé z DH PSF je možné rekonstruovat postupem popsáným při diskuzi obrázku 11. Aby bylo možné postup aplikovat, je nutné nejprve nalézt pozice jednotlivých DH PSF, a dále pracovat jen s malým výřezem kolem jejich středu. Pak je možné aplikovat postup rekonstrukce natočení na každou DH PSF samostatně. Situace je schematicky znázorněna na obr. 16. Obrázek 16 a) ukazuje simulovaný záznam dvou DH PSF v odlišných hloubkách. Pro nalezení příčných pozic jednotlivých DH PSF je provedeno lokální adaptivní prahování

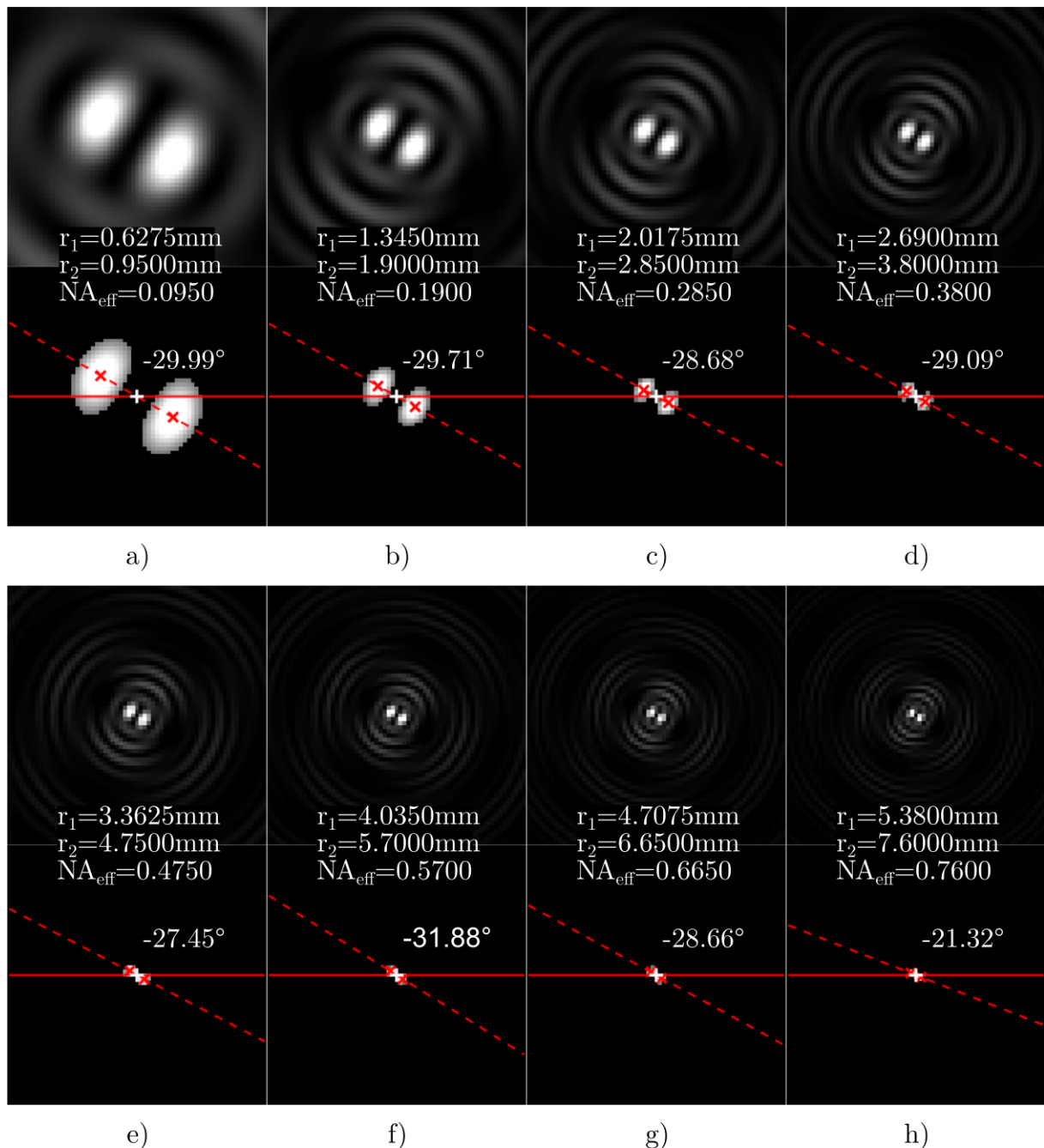
4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ



Obrázek 16: Schéma procesu automatické detekce DH PSF v obraze a následná numerická rekonstrukce úhlového natočení DH PSF. Ukázáno na simulovaných datech s polohami $[-4, 75; -4, 75; 2, 46] \mu\text{m}$ a $[2, 38; 2, 38; 3, 69] \mu\text{m}$. a) Vstupní snímek simulovaný s parametry z tabulky 4.1, b) adaptivní lokální prahování obrazu, vytvoření binární masky, c) označení jednotlivých DH PSF a automatická detekce jejich těžišť, kolem kterých je proveden výřez, d) rekonstruovaná natočení provedená postupem na obr. 11.

obrazu, viz obr. 16 b). Aby bylo možné detekovat centrum, kolem kterého bude proveden výřez, jsou objekty označeny technikou rozvodů. Objekty bližší než jistá vzdálenost, která je určena z parametrů DH PSF, jsou označeny jako součásti jednoho objektu, jehož identifikátor pak slouží k označení dané DH PSF a jehož těžiště je určeno za centrum výřezu. To je ukázáno na obr. 16 c). Poté je proveden výřez velikosti 31×31 pixelů a natočení každé z DH PSF je rekonstruováno postupem uvedeným v obrázku 11. Simulované DH PSF byly programem zpracovány a úhlové natočení DH PSF bylo rekonstruováno s vysokou přesností odpovídající $0,01^\circ$. Při uvedených parametrech simulované DH PSF odpovídá této nepřesnosti rekonstruovaného úhlu chyba v detekci podélné pozice asi 80 nm. Tato chyba je při celkovém pracovním rozsahu $18,67 \mu\text{m}$ malá. Výsledek ale ukazuje nemožnost zcela přesné rekonstrukce úhlového natočení DH PSF i na úrovni simulovaných dat. To je způsobeno vzorkováním DH PSF a konečným počtem pixelů pod jejími laloky. Při zpracování reálných experimentálních dat se kromě vzorkování DH PSF podílí na přesnosti rekonstrukce také množství šumu v obraze. Vliv těchto dvou efektů na rekonstrukci natočení DH PSF je testován v následujících simulacích.

Velikost a defokusační citlivost DH PSF je určena NA_{eff} , popsanou v rovnici 3.6, která je závislá na ohniskové vzdálenosti mikroskopového objektivu a parametrech masky. Při konstantní ohniskové vzdálenosti MO se velikost DH PSF zmenšuje s rostoucím poloměrem zón spirální masky. Zmenšování velikosti DH PSF může při uvážení konečné velikosti pixelu detektoru vést ke snížení přesnosti rekonstrukce jejího natočení nebo úplné nemožnosti jednotlivé laloky rozlišit. Vyhodnocení vlivu vzorkování na přesnost rekonstrukce DH PSF je na obr. 17. Vzorkování použité v simulaci bylo získáno přepočtem velikosti pixelu CCD kamery do předmětového prostoru. Pro přepočet byly použity reálné parametry CCD a experimentální sestavy tak, jak jsou později využívány v experimentální části. Velikost pixelu CCD je $7,4 \mu\text{m}$ a po vydělení celkovým zvětšením systému $40\times$ získáváme velikost pixelu v předmětovém prostoru $0,185 \mu\text{m}$. Simulované DH PSF jsou vytvořeny pro mikroskopový objektiv s ohniskovou vzdáleností $f_{\text{MO}} = 10 \text{ mm}$ a velikost obrazových stop je škálována změnou poloměrů radiálních zón spirální masky. Natočení DH PSF bylo 30° ve všech simulovaných případech. Z výsledků simulací na obrázku



Obrázek 17: Testování přesnosti rekonstrukce úhlového natočení DH PSF v závislosti na vzorkování zaznamenaného obrazu. Vzorkování obrazu je simulováno pro velikost jednoho pixelu CCD $7,4 \mu m$ a celkové zvětšení systému $40\times$. Parametry SM jsou voleny tak, aby byl vytvořen reprezentativní vzorek DH PSF umožňující demonstraci vlivu vzorkování na přesnost rekonstrukce úhlového natočení. Od případu f) muselo být pro vyhodnocení použito kombinace lokálního a globálního prahování.

17 je patrné, že se zvyšováním vzorkování laloků DH PSF je zvyšována přesnost rekonstrukce jejího úhlového natočení. Nejmenší přesnosti je dosaženo v případě nejhoršího vzorkování, které v krajním případě znemožní rotaci DH PSF vyhodnotit. Při těchto úvahách je však nutné vzít v potaz také změnu citlivosti měření na defokusaci způsobenou klesající hodnotou NA_{eff} . Optimální vzorkování DH PSF způsobené snížením NA_{eff}

4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ

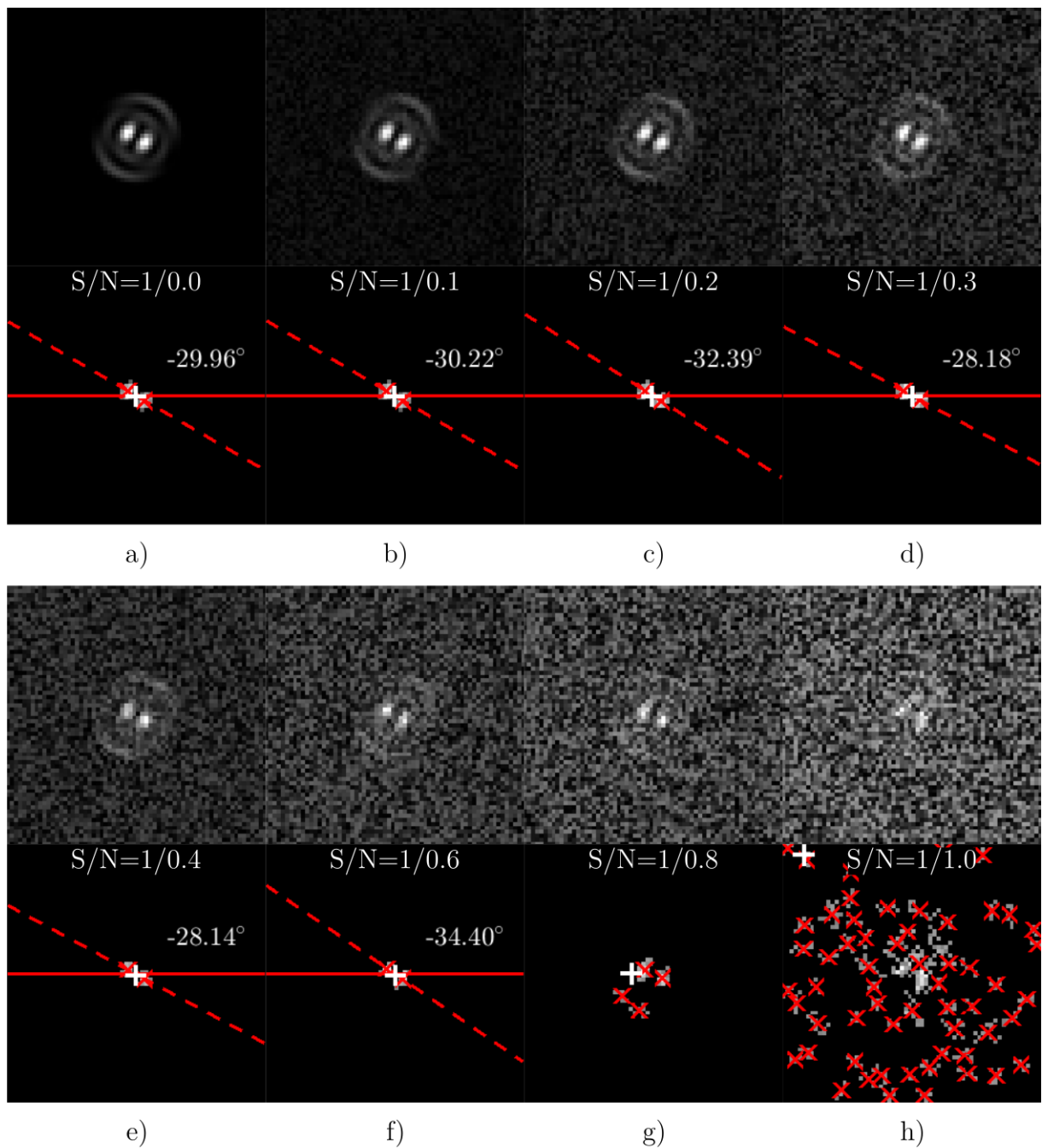
snižuje přesnost měření vlivem menší citlivosti DH PSF na rozostření. Při rekonstrukci DH PSF byla z nepřesnosti rekonstrukce úhlového natočení vypočtena odchylka určení polohy δz_0 v závislosti na NA_{eff} , jež je vynesena v tabulce 4.2. Lze pozorovat zvyšování přesnosti určení polohy se zvyšující se hodnotou NA_{eff} , a to i přes rostoucí chybu určení rotace. Vzhledem k přesnosti určení úhlového natočení a přitom dostatečně velké citlivosti měření byly jako optimální parametry určeny $r_1 = 2,69$ mm a $r_2 = 3,80$ mm, které budou později využity v experimentální části.

Obr.	NA_{eff}	Λ (μm)	$\Delta\Phi$ ($^\circ$)	Δz_0 (μm)
17 a)	0,095	236,316	0,01	0,013
17 b)	0,190	59,079	0,29	0,095
17 c)	0,285	26,257	1,32	0,193
17 d)	0,380	14,770	0,91	0,075
17 e)	0,475	9,453	2,55	0,134
17 f)	0,570	6,564	1,88	0,069
17 g)	0,665	4,823	1,34	0,036
17 h)	0,760	3,692	8,68	0,178

Tabulka 4.2: Tabulka závislosti citlivosti měření na NA_{eff} . Chyba určení Δz_0 vypočtena z chyby úhlové rotace $\Delta\Phi$ a periody rotace Λ . Za optimální parametry SM z hlediska citlivosti a přesnosti rekonstrukce úhlového natočení DH PSF byly určeny parametry v případě d), tedy $r_1 = 2,69$ mm a $r_2 = 3,80$ mm.

Druhým významným faktorem, který ovlivňuje reálná experimentální data a zhoršuje přesnost rekonstrukce natočení DH PSF, je šum. Vlivy šumu zapříčiňují nedostatečný kontrast obrazu, kterým je i při použití adaptivního prahování způsobena špatná detekce jednotlivých DH PSF. Tou může být jak určení DH PSF za součást pozadí, nebo naopak označení částí pozadí jako falešných DH PSF. Vliv šumu na rekonstrukci úhlového natočení je demonstrován na obr. 18. Simulované DH PSF byly vytvořeny pro parametry zvolené na základě předchozí simulace přesnosti rekonstrukce úhlového natočení. Byly zvoleny parametry z obr. 17 d), tedy poloměry zón fázové masky $r_1 = 2,69$ mm, $r_2 = 3,80$ mm a ohnisková vzdálenost mikroskopového objektivu $f_{\text{MO}} = 10$ mm. Natočení DH PSF bylo zvoleno 30° pro všechny případy. Obrázek 18 a) zachycuje simulovanou DH PSF bez šumu. V obrázcích 18 b)-h) byla přidávána rostoucí hladina šumu s rovnoměrným rozdělením vyjádřená poměrem signálu vůči šumu S/N. Z obrázku je patrné, že s rostoucí hladinou šumu se snižuje přesnost určení úhlového natočení DH PSF, až je při velké hladině šumu rekonstrukce znemožněna, viz obr. 18 g), h). Z provedených simulací byla určena hladina šumu, pro kterou je rekonstrukce proveditelná s přiměřeně malou odchylkou úhlového natočení a pro kterou je rekonstrukce opakovatelná. Tato hodnota, vyjádřená v poměru signálu k šumu je S/N = 1/0,4.

V numerických simulacích byly testovány dva hlavní vlivy ovlivňující přesnost rekonstrukce úhlového natočení DH PSF. Z výsledků numerických simulací vyplývá, že při realizaci experimentu je v získaném záznamu důležité maximalizovat poměr signálu vůči šumu. Pro optimální přesnost rekonstrukce natočení DH PSF je dále nutné volit parametry fázové masky takové, aby byly laloky DH PSF vzorkovány dostatečným množstvím pixelů detektoru a přitom byla zachována vysoká defokusační citlivost. Defokusační citlivost rotace je zároveň vázána na axiální rozsah, v rámci kterého je zachován neměnný tvar DH PSF. Experiment je tedy nutné provádět i s ohledem na parametry studovaného vzorku.

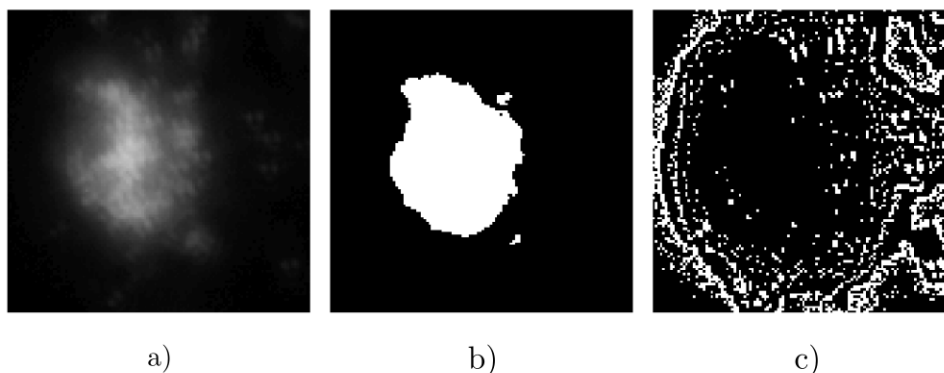


Obrázek 18: Vliv šumu na rekonstrukci úhlového natočení DH PSF. Míra šumu je kvantifikována poměrem signálu vůči šumu S/N . Obrázek a) ukazuje simulovanou DH PSF bez šumu. Následující snímky ukazují nárůst nepřesnosti rekonstrukce úhlového natočení DH PSF se snižující se hodnotou S/N . Při mezní hodnotě S/N je rekonstrukce znemožněna, viz obr. g), h).

4.2. REKONSTRUKCE TOPOGRAFIE POVRCHU Z ÚHLOVÉHO NATOČENÍ

5. Experimentální měření difúzně odrazných povrchů

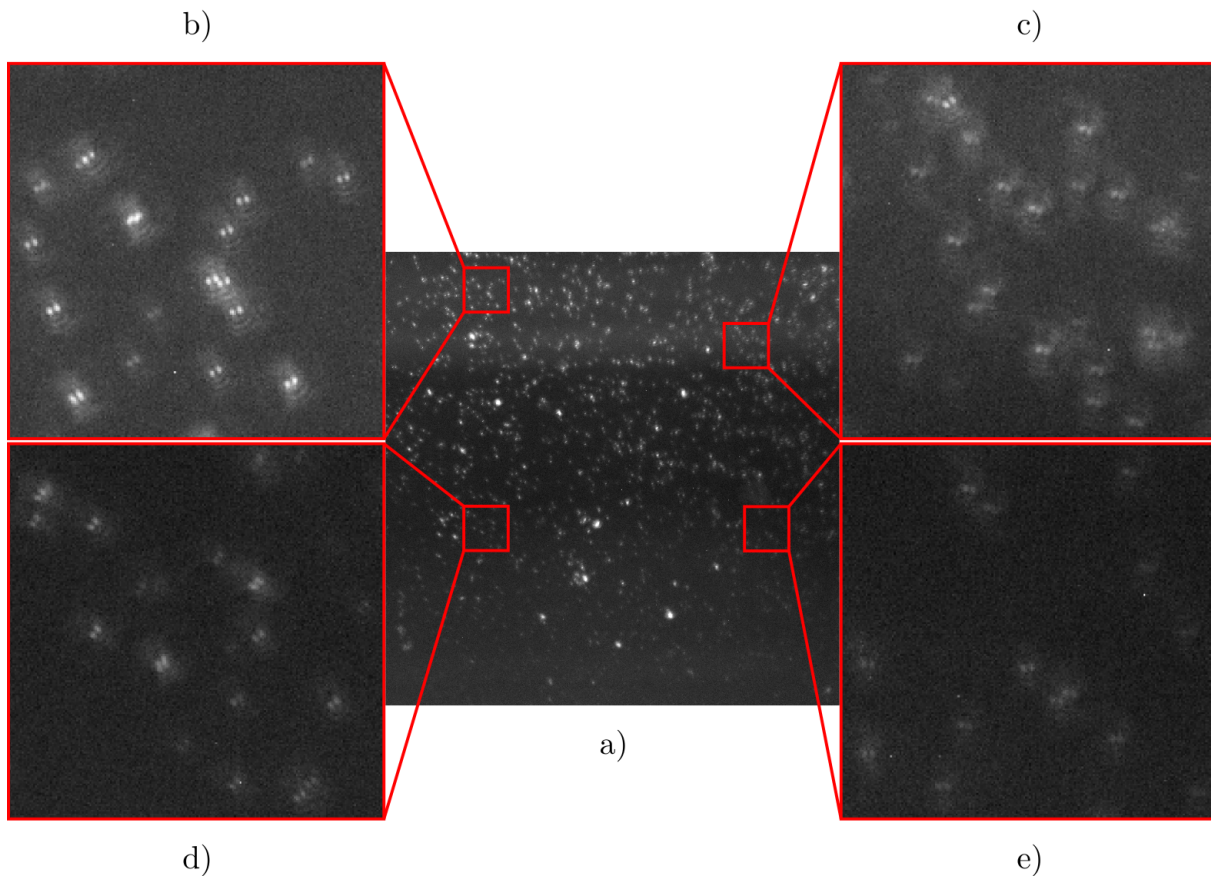
Jak bylo ukázáno na počátku kapitoly 3, difúzní vzorky lze zobrazovat nepřímo detekcí částic nanesených na jejich povrchu. Předně je třeba zajistit rovnoměrnost rozložení nanočástic po zkoumaném povrchu a rovnoměrnost osvětlení povrchu. Jsou-li částice nahromaděny, jejich DH PSF se překrývají, což znesnadňuje jejich rekonstrukci, viz obr. 19. Na obr. 19 a) je výřez snímku z kamery, na kterém je shluk částic, jež se vzájemně překrývají. Na obrázcích 19 b), resp. 19 c) je pak prahování daného snímku pouze globálním, resp. lokálním prahem. Nerovnoměrné osvětlení povrchu nebo nanesení



Obrázek 19: Shluky částic vytvořené při jejich nerovnoměrném rozprostření po měřeném povrchu. a) výřez snímku z kamery, b) prahování globální, c) prahování lokální. Je patrné, že ani jedním druhem prahování použitým samostatně není možné vytvořit použitelnou binární masku.

částic pouze do částí zorného pole znemožňuje rekonstrukci topografie povrchu v určitých oblastech, a tím je celková přesnost měření zhoršena. Nerovnoměrné rozložení částic na povrchu a nerovnoměrnost osvětlení jsou demonstrovány na obr. 20. Obrázek 20 a) ukazuje celé zorné pole, obrázky 20 b) - e) výřezy jednotlivých částí zorného pole, jejichž hladina osvětlení a počty nanesených částic se různí. V horní části zorného pole je lepší poměr S/N, než v části dolní. Dochází zde však k překryvu některých částic, což znemožňuje rekonstrukci jejich polohy. V dolní části je zase nízký poměr S/N, což, jak bylo ukázáno v závěru předchozí kapitoly, rekonstrukci znesnadní až znemožní. Pravá dolní část obr. 20 a), tedy výřez e), obsahuje řídce rozmístěné částice. V pokročilém provedení experimentu je možnost využít částic např. magnetických či jiných nanočástic, jež by umožnily jejich kontrolované nanesení a rozmístění po povrchu.

V této práci je proveden pouze základní experiment, kde je náhodného rozmístění nanočástic dosaženo jejich Brownovským pohybem v roztoku naneseném na měřený povrch. Aby nedocházelo k překryvu DH PSF z důvodu přílišného množství částic na povrchu, je koncentrovaný roztok částic nejprve rozředěn vodou. Pipetou je nanesena kapka na měřený povrch vzorku a přikryta krycím sklíčkem v případě planárních povrchů. U kulových povrchů je přikrytí nemožné, kapka tedy byla pouze rozetřena po povrchu.

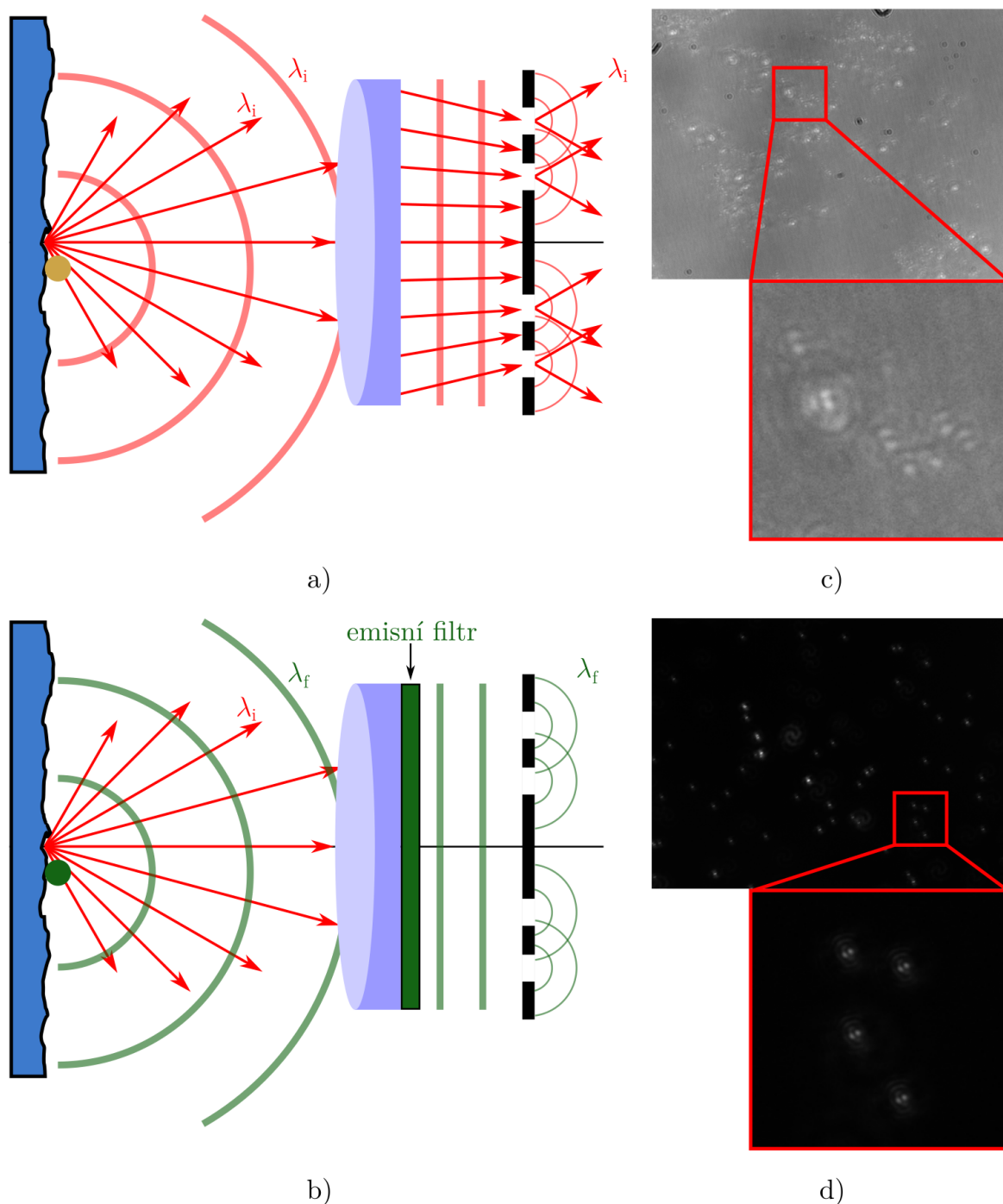


Obrázek 20: Demonstrace nerovnoměrnosti osvětlení a nanesení částic na povrchu. a) vstupní snímek celého zorného pole. a) - d) přiblížené výřezy. Snímky ukazují úbytek rekonstruovatelných DH PSF při postupu do pravé dolní části celkového zorného pole. Výřez e) neobsahuje prakticky žádné rekonstruovatelné DH PSF.

Po vyschnutí roztoku a ulpění všech částic na měřeném povrchu byl vzorek připraven k měření a uložen na piezoelektrický posuv.

5.1. Testování a výběr nanesených částic

Jak bylo vyhodnoceno v předchozí kapitole, je pro velkou přesnost rekonstrukce povrchu důležité, krom rovnoměrnosti osvětlení a nanesení částic, maximalizovat poměr signálu k šumu a kontrast a zajistit dostatečné vzorkování jednotlivých DH PSF. Experiment je možné provádět s různými druhy částic použitými jako lokalizační markery. V diplomové práci bylo testováno použití zlatých nanočástic a fluorescenčních polystyrenových kuliček. V obou případech je nutné potlačit difúzně odražené světlo, které má Lambertovské rozložení [86]. Toho je dosahováno rozdílnými prostředky podle druhu částic. V případě kovových nanočástic je dopadající světlo odráženo, má tedy stejnou vlnovou délku λ_i jako difúzně odražené světlo. K potlačení difúzního odrazu při zobrazení kovových nanočástic je možné využít vlastností spirální masky, která se při vytváření nedifrakčních svazků chová jako prostorový filtr. Rovinné vlny dopadající na difúzní povrch jsou odráženy pod různými úhly. Většina těchto vln je pak blokována amplitudovou maskou, s výjimkou některých, které mají takový odklon, že v zadní ohniskové rovině objektivu jsou lokali-



Obrázek 21: Užívané mechanismy k potlačení světla difúzně odraženého od povrchu v případě nanesení kovových a fluorescenčních částic na měřený povrch a), b), a snímky z kamery v obou případech c), d). a) Prostorová filtrace difúzně odraženého světla amplitudovou propustností masky při užití kovových částic, b) filtrace difúzně odraženého světla emisním filtrem při užití fluorescenčních částic, c) snímek z kamery při užití kovových částic, d) snímek z kamery při užití fluorescenčních částic. Velikost jedné částice je 100 nm u zlatých částic a 500 nm u fluorescenčních.

zovány v transparentních zónách masky. Tím je potlačena většina difúzně odraženého světla. Negativním efektem je částečné potlačení signálu pocházejícího také od kovové

5.2. EXPERIMENTÁLNÍ SESTAVA

nanočástice. Popsaný mechanismus je schematicky znázorněný na obr. 21 a). Světlo od nanočástic dále prochází sestavou způsobem již popsaným v kapitole 3. Fluorescenční částice jsou excitovány dopadající vlnou s vlnovou délkou λ_i . Kulová vlna z nich následně vyzářená má vlnovou délku $\lambda_f > \lambda_i$. Difúzně odražené světlo je pak potlačeno emisním filtrem na základě vlnové délky. Mechanismus je vyobrazen na obr. 21 b). Obrázky 21 c) a 21 d) ukazují DH PSF získané při použití kovových a fluorescenčních nanočástic. Rozdíl v kontrastu je očividný. Použité částice měly velikost 100 nm v případě zlatých částic a 500 nm v případě fluorescenčních.

Pro hodnocení kvality obrazu je běžně využíváno poměru signálu k šumu (SNR , signal-to-noise ratio), případně špičkového poměru signálu k šumu ($PSNR$, peak signal-to-noise ratio) definovaného jako:

$$SNR = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{P_{\text{signál}}}{P_{\text{šum}}} \right) = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{\mu_s}{MSE} \right), \text{ příp.} \quad (5.1)$$

$$PSNR = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{MAX_I^2}{MSE} \right), \quad (5.2)$$

kde $P_{\text{signál}}$ je průměrný výkon signálu a $P_{\text{šum}}$ je průměrný výkon šumu, které jsou ve zpracování obrazu standardně počítány jako průměrná hodnota signálu (pixelu) μ_s a střední kvadratická odchylka MSE (mean squared error). Pro špičkový poměr signálu k šumu je namísto průměrné hodnoty pixelu užívána maximální hodnota pixelu obrazu MAX_I . Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Částice	Velikost (nm)	SNR	$PSNR$
Zlaté	100	11,62	73,83
Fluorescenční	500	21,03	97,34

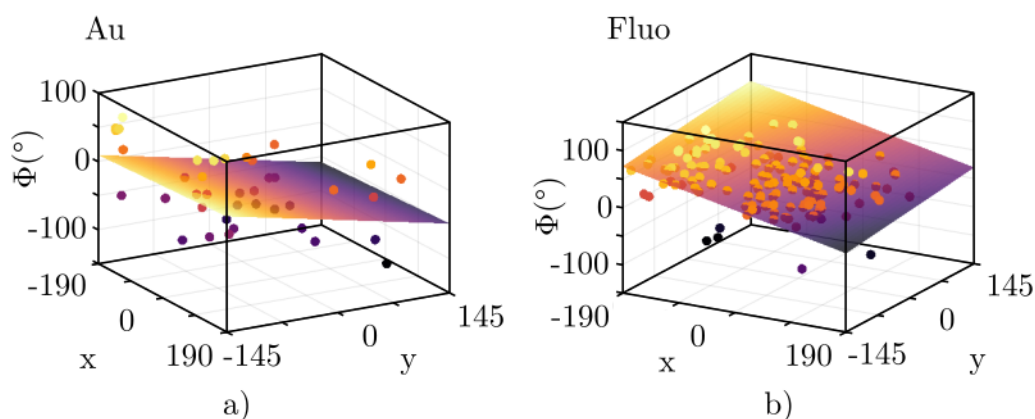
Tabulka 5.1: Vypočtené poměry signálu k šumu pro různé částice, měřeno ze snímků na obr. 21 c) a 21 d).

Protože SNR je i v případě zlatých částic lepší, než hraniční hodnota SNR umožňující rekonstrukci $SNR = 10 \cdot \log_{10} (1/0,4) = 3,98$ z obrázku 18, je možné využít k měření i tyto částice. To je demonstrováno na měření rovinného povrchu na obr. 22 a). Stejný povrch byl změřený i pomocí fluorescenčních částic a je ukázán na obr. 22 b). Jak bylo diskutováno v závěru kapitoly 4, je vhodnější pracovat se snímky s vyšším kontrastem a snadnějším prahováním. Vliv volby prahu na segmentaci je vidět na obr. 23 a), b).

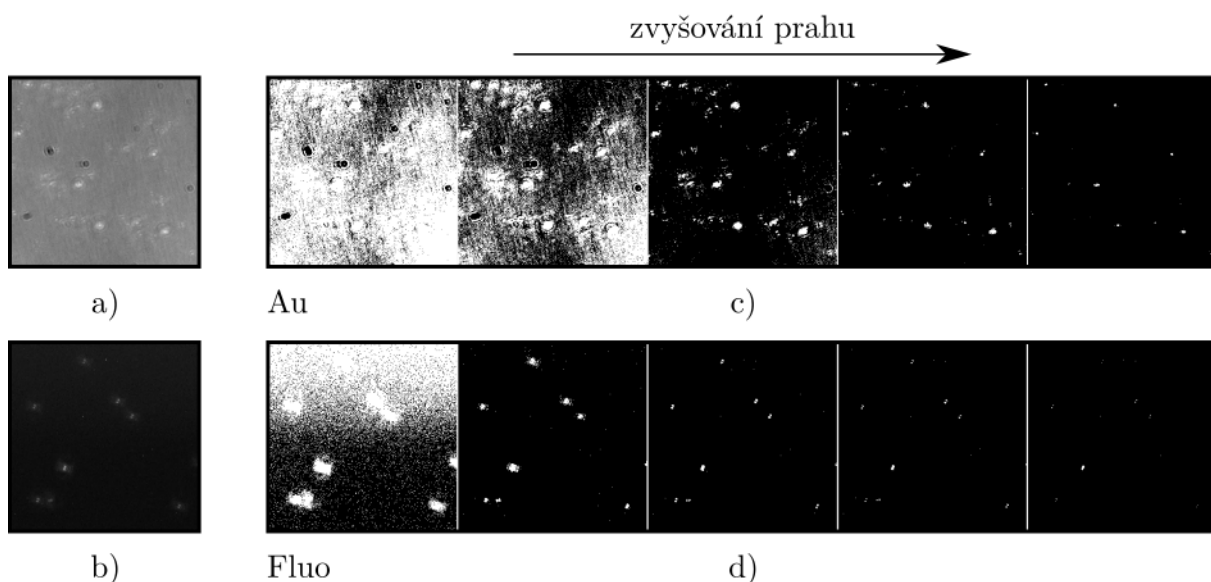
Ač jsou obě varianty v experimentu použitelné, volba fluorescenčních částic skýtá lepší kontrast a poměr signálu k šumu. Použití zlatých nanočástic vyžaduje zvláště citlivou volbu prahu (obr. 23). V případě zlatých částic je třeba dbát také na dostatečnou vzájemnou separaci, aby se signály na kameře nepřekrývaly a nedocházelo k interferenčním efektům mezi jednotlivými DH PSF. Proto jsme pracovali s fluorescenčními částicemi a v dalším textu budou částicemi rozuměny částice fluorescenční a použité části sestavy budou tomu odpovídající.

5.2. Experimentální sestava

Princip měření difúzních povrchů navrhovanou metodou, byl ověřen a realizován pomocí experimentální sestavy na obr. 24. V osvětlovací části sestavy se využívá komerčně dos-



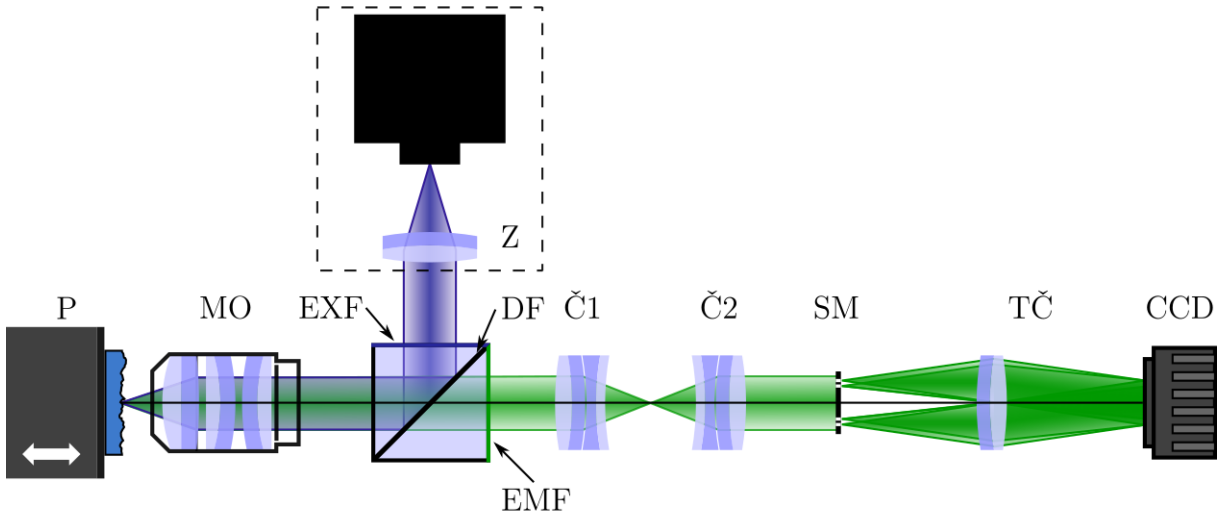
Obrázek 22: Rekonstrukce rovinného povrchu lokalizací rozdílných druhů částic nanesených na měřeném povrchu. a) kovové (zlaté) nanočástice o velikosti 100 nm, b) fluorescenční nanočástice o velikosti 500 nm. Je patrné, že v případě a) je citlivá volba prahu nezbytností, a i tehdy je výrazný vliv pozadí.



Obrázek 23: Demonstrace vlivu volby prahu při použití rozdílných typů částic. a), b) Výřez z obrazu povrchu s nanesenými zlatými, resp. fluorescenčními částicemi velikosti 100 nm, resp. 500 nm. c), d) Získané binární masky pro zvyšující se hladinu prahu zleva doprava.

tupná osvětlovací část fluorescenčního mikroskopu a přes dichroický filtr DF (Nikon B-2A) a objektiv mikroskopu MO (Nikon CFI Plan Fluor 20x/0.5) je světlo přenášeno na vzorek. Vzorek je umístěn na piezoelektrickém posuvu P (Physik Instrumente P-621.ZCD), který je využíván k přesnému a kontrolovanému posuvu v podélném směru optické osy. Fluorescenční částice (Phosphorex 2103A, velikost 500 nm, excitační vlnová délka 400–480 nm, emisní vlnová délka 480–550 nm) nanesené na vzorku jsou excitovány a emitují světlo, jež je zpětně sbíráno mikroskopovým objektivem využívaným pro excitaci. Světlo postupující do zobrazovací části systému je filtrováno emisním filtrem, který propustí světlo pouze od nanesených nanočástic. Fázová maska SM nemůže být umístěna v zadní ohniskové

5.2. EXPERIMENTÁLNÍ SESTAVA



Obrázek 24: Schéma experimentální sestavy pro měření difúzních vzorků vírovou topografickou mikroskopií. Součásti: Z - zdroj osvětlení, DF - dichroický filtr, EXF - excitační filtr, EMF - emisní filtr, MO - mikroskopový objektiv, P - piezoelektrický posuv, Č1 a Č2 - teleskopický systém, SM - spirální fázová maska, TČ - tubusová čočka, CCD - kamera.

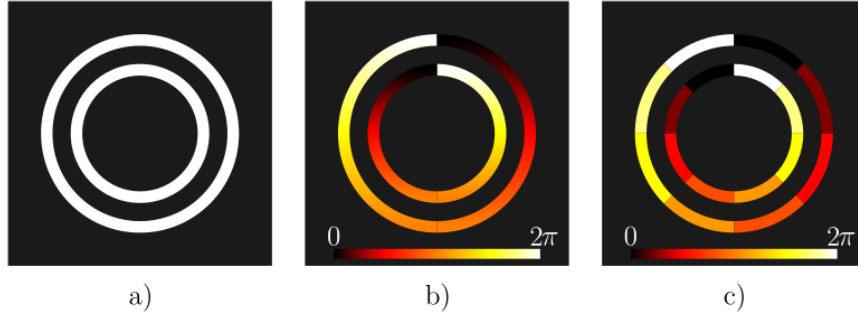
rovině objektivu, protože by ležela v osvětlovací části sestavy a bránila by excitaci částic na vzorku. Zadní ohnisková rovina MO je tedy zobrazena 4f systémem do roviny SM. Teleskopický systém, jenž je složen z čoček Č1 a Č2 o ohniskové vzdálenosti $f_{\text{Č1}} = f_{\text{Č2}} = 200 \text{ mm}$, promítá zadní ohniskovou rovinu MO do roviny SM s jednotkovým zvětšením, proto jsou zachovány podmínky použité v části 3.1.

SM moduluje dopadající světlo jak amplitudově, tak fázově. Amplitudovou modulaci zajišťují oblasti tvořené tenkou kovovou vrstvou, které zastavují dopadající světlo, viz obr. 25 a). Zbylé oblasti, propouštějící světlo, zajišťují fázovou modulaci retardací svazku zvětšující se s azimutálním úhlem. Teoretický model byl vytvořen pro SM s transparentními zónami popsány Diracovou delta funkcí a spojitou změnou vírové fáze, viz obr. 25 b). Toho však v experimentu nelze dosáhnout, je třeba pracovat s konečnou šířkou zón a fází rozdělenou do omezeného počtu diskretních úrovní. Propustné zóny SM jsou tvaru mezikružů se šířkou Δr a středními poloměry r_1 a r_2 . Dostatečný počet úrovní vírové fáze je 8 [74]. Aplikovaná modulace tvoří vírové svazky s topologickými náboji $l_1 = 1$ a $l_2 = -1$. Podobu experimentální fázové masky lze vidět na obr. 25 c), její parametry pak v tabulce 5.2. V experimentu je potřeba navrhnout parametry masky v závislosti

Parametr	r_1	r_2	Δr	fáze	počet úrovní fáze
Hodnota	2,69 mm	3,80 mm	0,75 mm	$\langle 0; 2\pi \rangle$	8

Tabulka 5.2: Parametry SM použité v experimentu.

na požadavcích měření a přitom hledat kompromis mezi přesností měření a rozsahem, ve kterém se bude měřit, a světelnou účinností. Z rovnice 3.7 vyplývá, že rozšíření zón vede ke zmenšení rozsahu hloubky měření, ale naopak zvětšuje světelnou účinnost. Jak již bylo ukázáno v kapitole 3, poloměry zón ovlivňují jak rozsah měření, tak jeho přesnost. Toto, společně s mnoha dalšími vlivy daných parametrů fázové masky, bylo zkoumáno v [76]. Použitá SM byla navržena již v [75] a vyrobena elektronovou litografií. Pro použitý zo-



Obrázek 25: Podoba spirální fázové masky a modulace, kterou aplikuje na dopadající světelný svazek. a) Amplitudová modulace, b) teoretická fázová modulace, c) fázová modulace použitá v experimentu. Parametry jsou uvedeny v tabulce 5.2.

brazovací systém dostáváme hodnoty pro axiální lokalizaci $L = 18,67 \mu\text{m}$ s rotací DH PSF o periodu při rozostření o $\Lambda = 14,77 \mu\text{m}$.

Z fázové masky umístěné v přední ohniskové rovině tubusové čočky TČ (Thorlabs AC508-400-A0) je světlo přenášeno v podobě dvou nedifrakčních vírových svazků na kameru (Ximea MR4021MC-BH) umístěnou v zadní ohniskové rovině TČ. Zde svazky interferují a pro každý měřený bod vytváří DH PSF, z nichž je poté rekonstruován měřený povrch.

Funkčnost systému a míra korelace s teorií a numerickou simulací je ukázána na obr. 26 v rozsahu hloubek $21 \mu\text{m}$. Parametry použité v simulaci odpovídají experimentálním a jsou shrnuty v tabulce 5.3. V oblastech kolem okrajů rozsahu L podle rovnice 3.7 dochází k degradaci DH PSF až ke znemožnění její rekonstrukce. Simulace tímto defektem netrpí, neboť je u ní předpokládána infinitezimální šířka anulárních zón fázové masky SM.

Parametr	r_1	r_2	f_{MO}	$f_{\text{TČ}}$	λ	Δz_0
Hodnota	2,69	3,80	10	400	532	$\langle 1; 21 \rangle$
Jednotka	mm	mm	mm	mm	nm	μm

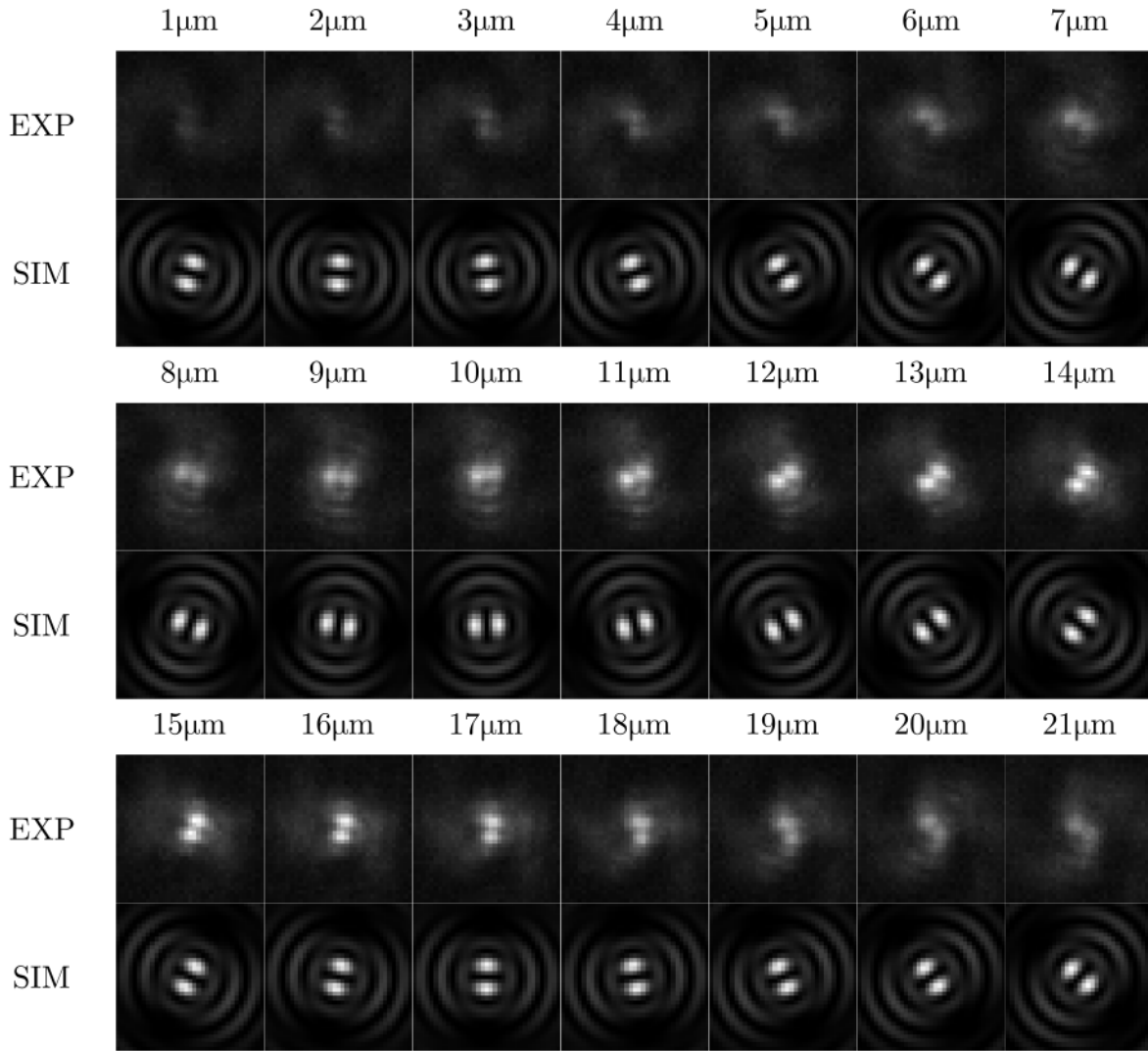
Tabulka 5.3: Parametry SM a zobrazovacího systému použité v simulaci DH PSF pro srovnání s experimentem.

5.3. Kalibrační měření

Hloubka Δz_0 v jednotlivých laterálních bodech (x_0, y_0) je měřena z úhlového natočení Φ DH PSF. Rovnice 3.6 pro ni předpokládá lineární závislost. Pro ověření této závislosti bylo provedeno kalibrační měření. Piezoelektrickým posuvem, který má výrobcem garantovanou přesnost $0,2 \text{ nm}$, bylo provedeno přesně definované rozostření a pro něj bylo rekonstruováno natočení DH PSF.

Kalibrační měření bylo prováděno v rozsahu $15 \mu\text{m}$. Na podložní sklíčko mikroskopu byl nanesen roztok fluorescenčních částic, který byl zakryt krycím sklíčkem. Tento vzorek byl na piezoelektrickém posuvu měřen ve 30 pozicích vzdálených od sebe 500 nm . Měření bylo opakováno 17krát. V každém snímku, který odpovídá zornému poli $380 \mu\text{m}$, byly detekovány DH PSF rozložené v celé ploše obrazu a z nich byla vypočtena rotace. Získaná data závislosti úhlové rotace na hloubce určené piezoelektrickým posuvem byla proložena

5.3. KALIBRAČNÍ MĚŘENÍ

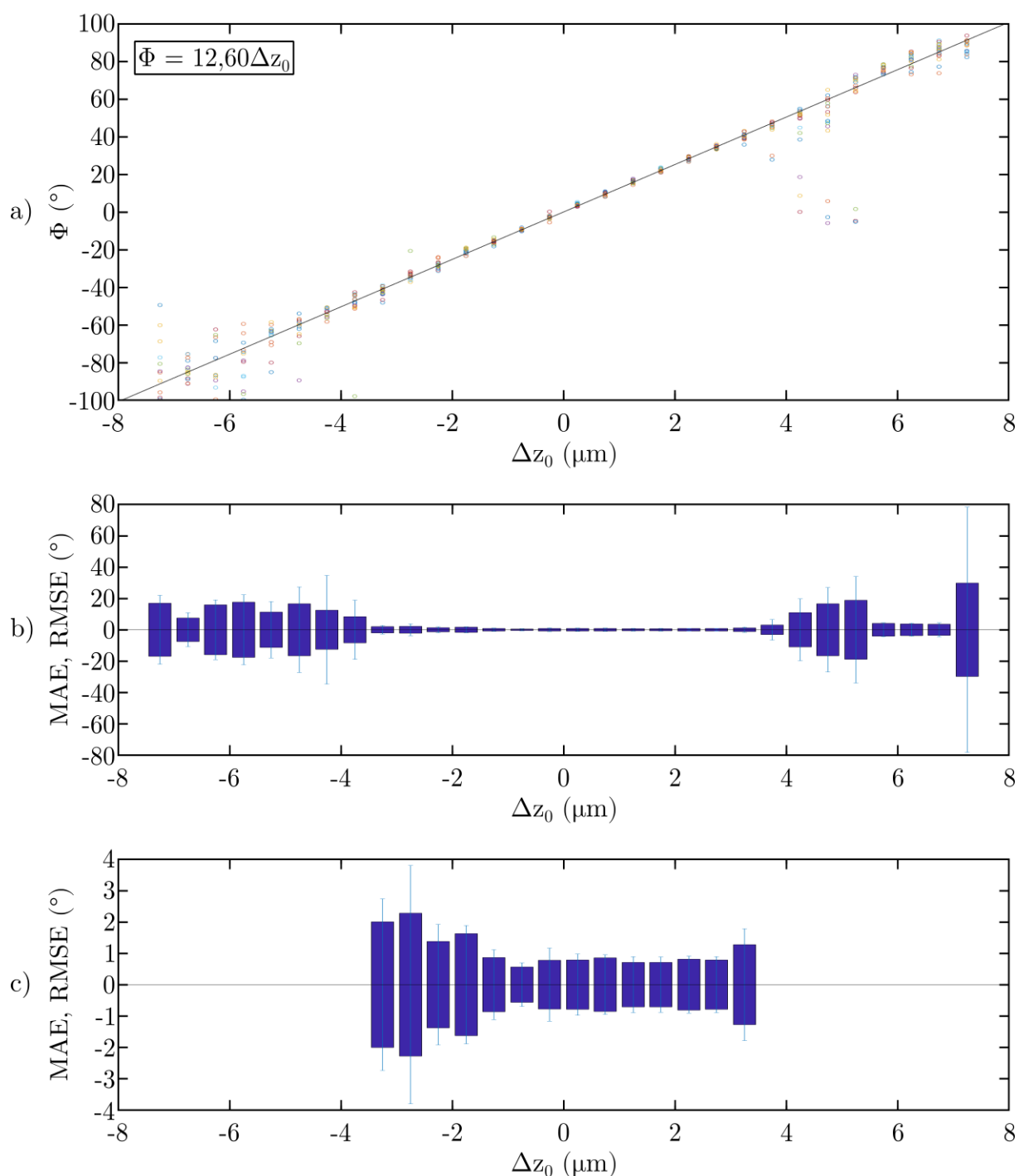


Obrázek 26: Srovnání DH PSF ze simulace a experimentu v rozsahu $\Delta z_0 = 21 \mu\text{m}$. Parametry simulace odpovídají těm z experimentu a jsou uvedeny v tabulce 5.3. Je patrné, že v oblastech mimo rozsah L dochází k degradaci DH PSF.

přímkou, kterou lze vidět na obr. 27 a). Směrnice této přímky byla použita v dalších experimentech k přepočtu měřených natočení DH PSF na lokální hloubku. Proložená přímka má rovnici

$$\Phi = 12,60 \Delta z_0. \quad (5.3)$$

Na obr. 27 b) je vynesena střední kvadratická chyba ($RMSE$, Root Mean Squared Error) a střední absolutní chyba (MAE , Mean Absolute Error). Tyto dosahují maximální velikosti $RMSE = 78,15^\circ$ a $MAE = 29,88^\circ$, což po přepočtu na hloubku odpovídá $RMSE = 6,20 \mu\text{m}$ a $MAE = 2,37 \mu\text{m}$ v nejhorším případě. Stojí za povšimnutí, že nepřesnost se zvyšuje s rostoucím rozostřením DH PSF. To je dáno degradací DH PSF a zhoršením poměru signálu k šumu, jak bylo vidět na obr. 26. Pokud vezmeme pouze poloviční rozsah, odpovídající $(-\Lambda/4; \Lambda/4)$, pak $RMSE$ a MAE klesnou na hodnoty $RMSE = 3,80^\circ \cong 0,30 \mu\text{m}$ a $MAE = 2,28^\circ \cong 0,18 \mu\text{m}$. I při tomto omezení rozsahu za účelem zvýšení přesnosti stále dochází k zobrazení z hloubek přesahující hloubku ostrosti použitého MO $\sim 3,5\times$.

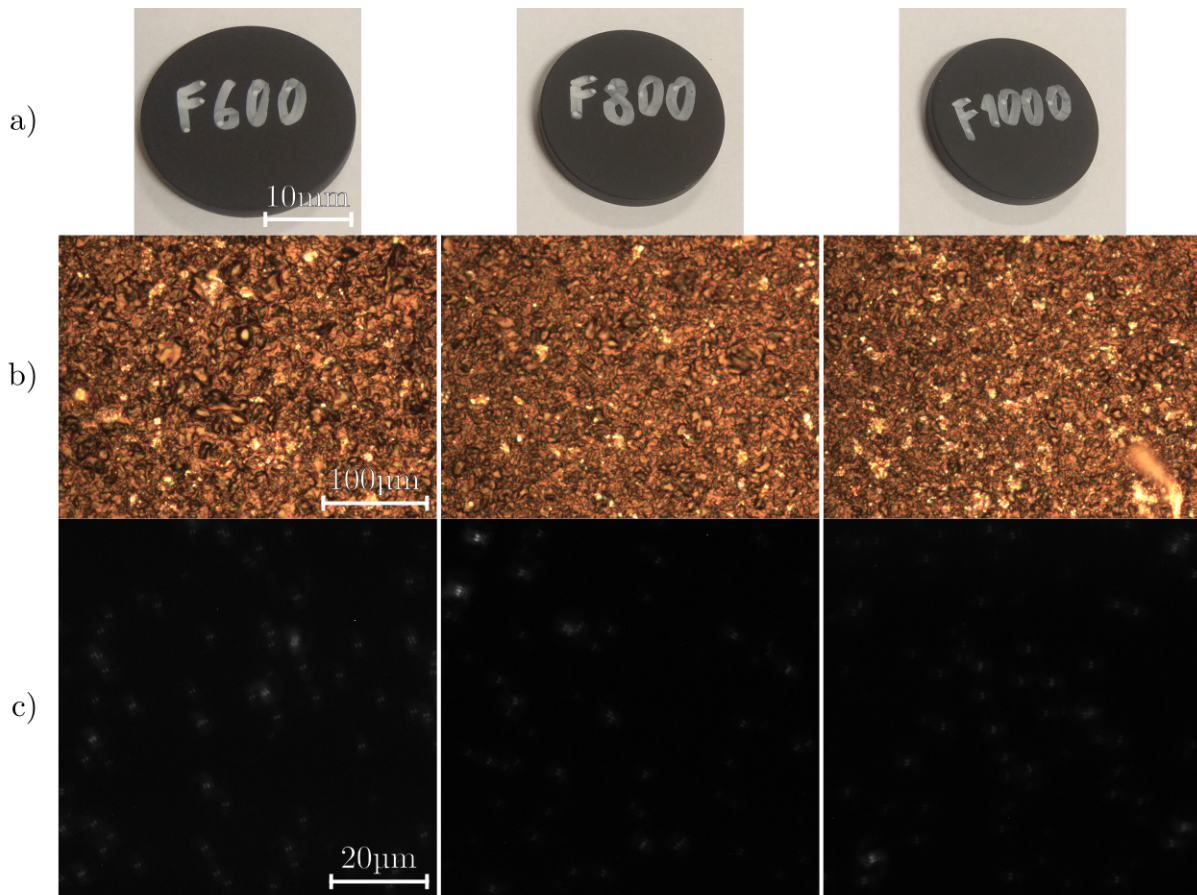


Obrázek 27: Kalibrační měření vírové topografické mikroskopie pro difúzní povrchy. a) Měřená závislost úhlového natočení Φ DH PSF vynesena proti hloubce Δz_0 určené piezoelektrickým posuvem s proloženou přímkou. b) Vynesena střední absolutní chyba (MAE, modré obdélníky) a střední kvadratická chyba měření (RMSE, světle modré chybové úsečky). c) Přiblížená střední absolutní chyba (MAE) a střední kvadratická chyba měření (RMSE) v prostřední části kalibrační křivky.

5.4. Měření planárních povrchů

Provedená kalibrace byla nejprve použita pro měření planárních povrchů dodaných společností Meopta optika, s.r.o. Byly dodány tři vzorky s různou drsností, na kterých

5.4. MĚŘENÍ PLANÁRNÍCH POVRCHŮ

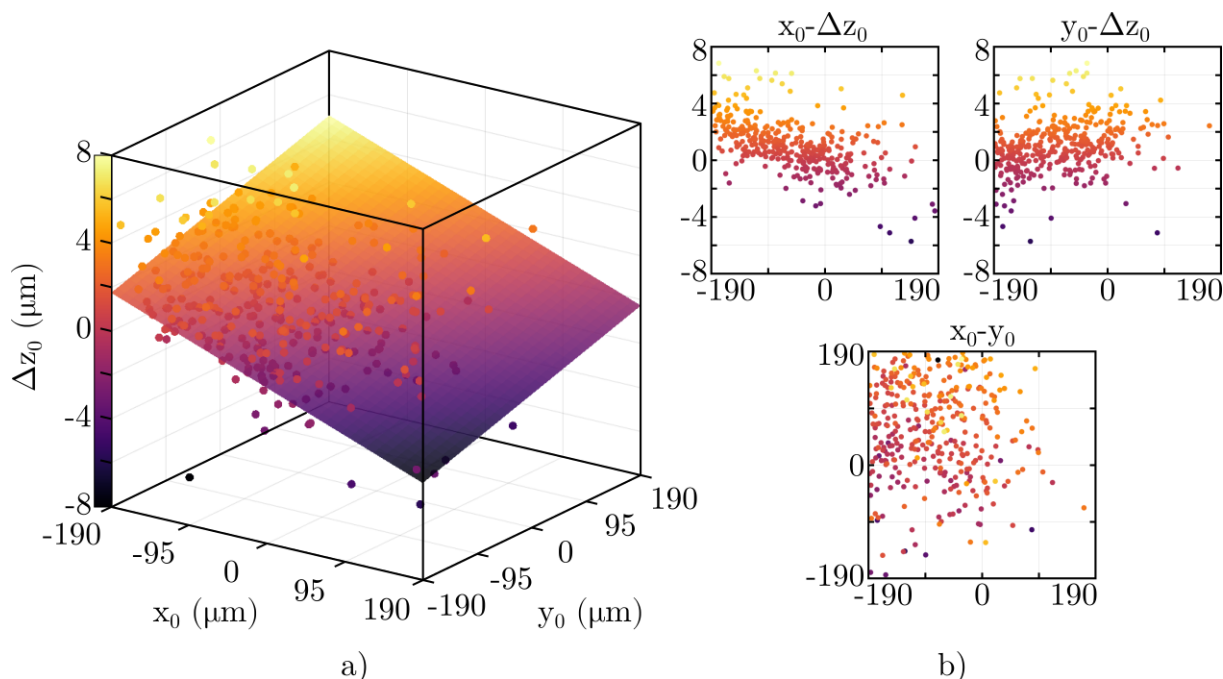


Obrázek 28: Vzorky rovinných povrchů od společnosti Meopta optika, s.r.o s drsnostmi $R_q(F600) = 0,7 \mu\text{m}$, $R_q(F800) = 0,5 \mu\text{m}$ a $R_q(F1000) = 0,4 \mu\text{m}$. a) fotografie vzorku, b) snímek povrchu ve světelném mikroskopu, c) povrch s nanesenými fluorescenčními částicemi zobrazený do roviny CCD.

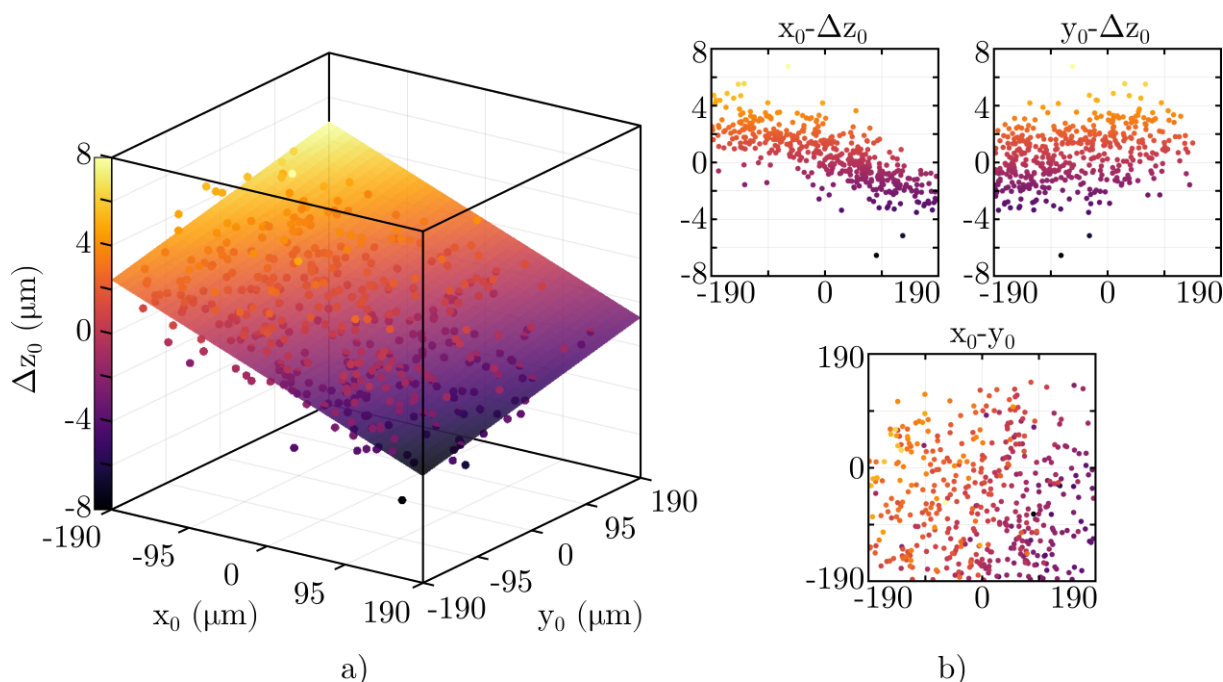
byly předtím vybroušeny lapováním. Fotografie připravených vzorků jsou na obr. 28 a). Na obr. 28 b) je povrch připravených vzorků zobrazený v mikroskopu ve světelném poli. Obrázek 28 c) ukazuje povrch s nanesenými fluorescenčními částicemi zobrazenými do roviny CCD ve formě DH PSF. Měření pak proběhlo pouze na dvou vzorcích, které odpovídaly největší (F600) a nejmenší (F1000) drsnosti povrchu. Bylo provedeno 8 měření pro každý povrch ve stejné hloubce. V každém měření byla vyhodnocena rotace 350 až 450 DH PSF, podle úspěšnosti automatické detekce. Poté byl povrch z dat rekonstruován a proložen plochou $\Delta z_0 = a_0 + a_1 x_0 + a_2 y_0$, viz obr. 29 a) a 30 a). Z těchto dat byly spočítány jednotlivé parametry regrese a_0, a_1, a_2 , a nejistota jejich určení, které jsou uvedeny v tabulce 5.4.

Vzorek	a_0	a_1	a_2
F600	$1,8992 \pm 0,0281$	$-0,0138 \pm 0,0002$	$0,0074 \pm 0,0002$
F1000	$1,7856 \pm 0,0141$	$-0,0151 \pm 0,0002$	$0,0062 \pm 0,0002$

Tabulka 5.4: Vypočtené parametry proložené roviny pro planární povrchy. Vykreslené plochy jsou na obrázcích 29 a 30.



Obrázek 29: Měření planárního povrchu vzorku F600 vyrobeného společností Meopta optika, s.r.o. a) 3D vizualizace měřeného povrchu s proloženou rovinou, b) průměty povrchu do ortogonálních rovin $x_0 - y_0$, $x_0 - \Delta z_0$, $y_0 - \Delta z_0$.

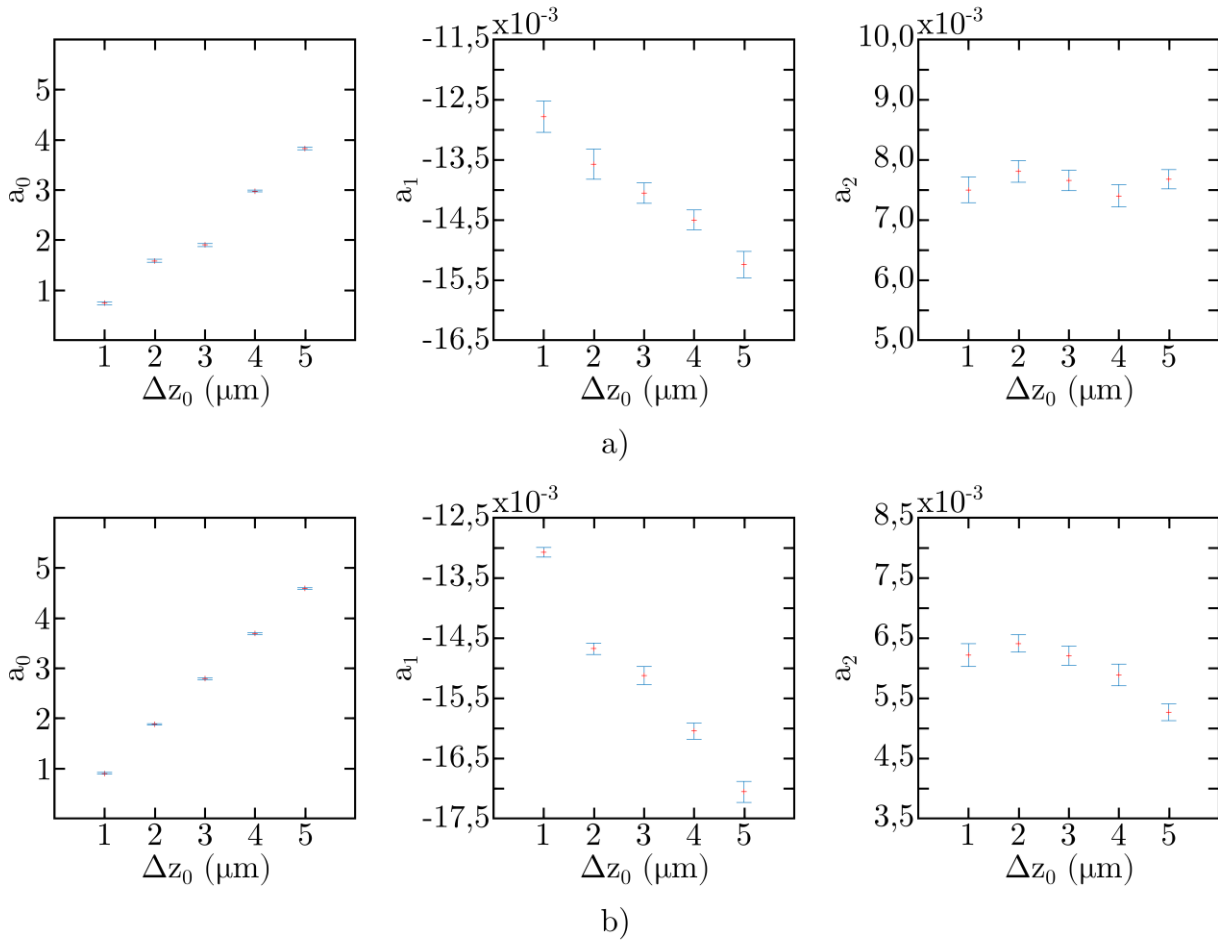


Obrázek 30: Měření planárního povrchu vzorku F1000 vyrobeného společností Meopta optika, s.r.o. a) 3D vizualizace měřeného povrchu s proloženou rovinou, b) průměty povrchu do ortogonálních rovin $x_0 - y_0$, $x_0 - \Delta z_0$, $y_0 - \Delta z_0$.

Na obr. 29 b) a 30 b) jsou vykresleny průměty do rovin $x_0 - y_0$, $x_0 - \Delta z_0$, $y_0 - \Delta z_0$. Jak je z obrázku patrné, vzorky nebyly uloženy na posuvníku v rovině, ale nakloněné. Toho bylo následně využito a byly provedeny měření v pěti axiálních pozicích vzájemně

5.4. MĚŘENÍ PLANÁRNÍCH POVRCHŮ

vzdálených $1\text{ }\mu\text{m}$ pro ověření přesnosti rekonstrukce v hloubkovém rozsahu $L = 18,7\text{ }\mu\text{m}$, který byl ukázán dříve teoretickým výpočtem v kapitole 3. Tento rozsah několikanásobně přesahuje hloubku ostrosti mikroskopového objektivu s danými parametry, jež je $2,13\text{ }\mu\text{m}$. Naklonění povrchů způsobilo, že body byly měřeny v rozsahu hloubek $\sim 9\text{ }\mu\text{m}$, což v kombinaci s axiálním posuvem dává ověřený rozsah $\sim 14\text{ }\mu\text{m}$. Srovnání jednotlivých parametrů a nepřesností jejich určení jsou uvedeny na obr. 31 a) pro povrch F600 a na obr. 31 b) pro povrch F1000. Parametr a_0 dle očekávání roste s hloubkou lineárně, přičemž jeho nejistota určení se s hloubkou mění v 10^{-3} až 10^{-4} řádu bez pozorovatelného trendu. Velikost parametru a_1 s hloubkou taktéž roste (větší záporné číslo), zatímco parametr a_2 se s proměnnou hloubkou mění málo. Pro oba tyto parametry je nejistota jejich určení proměnlivá v 10^{-5} řádu, opět s nevýrazným trendem. Protože jsou tyto tendence stejné pro oba povrchy, podporují dřívější proklamaci o nezávislosti této měřicí techniky na drsnosti povrchu. Změnu velikosti parametru a_1 je možné připsat nejistotě určení úhlového natočení, pokud body na okraji zorného pole (ve směru x_0) přesáhnou krajní hodnoty 0° a 180° .



Obrázek 31: Srovnání rekonstrukce planárních povrchů F600 a F1000 v hloubkovém rozsahu $5\text{ }\mu\text{m}$ pro srovnání parametrů rekonstrukce. a) Povrch F600, b) povrch F1000.

Rekonstruované povrchy byly vybroušeny na drsnost $R_q(\text{F600}) = 0,7\text{ }\mu\text{m}$ a $R_q(\text{F1000}) = 0,4\text{ }\mu\text{m}$. Jak bylo uvedeno v závěru kapitoly 2, tato topografická metoda by neměla být závislá na drsnosti měřeného povrchu. Na obrázcích 29 a 30 bylo ukázáno, že je možné

povrch rekonstruovat v obou případech. Protože rekonstruované DH PSF nejsou ovlivněny pouze topografií, ale i strukturou povrchu, dalo by se usuzovat, že jejich odchylky od proložené roviny ukazují na drsnost povrchu. Drsnost povrchu R_q se vypočítá jako

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L (z^2(x)) dx}, \quad (5.4)$$

kde L je délka měřeného profilu a $z(x)$ je funkce výšky povrchu. Tato rovnice nese velkou podobnost s rovnicí pro výpočet střední kvadratické odchylky $RMSE$, proto byla zvolena hodnota této odchylky k porovnání s uvedenou drsností. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.5. Z výsledku je patrné, že při použití stávajících parametrů experimentu není možné metodu využít na měření drsnosti povrchu, neboť chyba měření podle obr. 27 b) je větší než drsnost měřeného povrchu. V případě takového uložení vzorku, že by hloubkový rozsah měřených bodů byl $(-\Lambda/4; \Lambda/4)$, by bylo možné drsnost změřit i při použití prezentované experimentální sestavy, viz obr. 27 c). Vyhodnocením provedeného měření je možné správně určit, který z testovaných povrchů má větší drsnost, a tak kromě topografie povrchu stávající měření poskytuje i kvalitativní informaci o jeho drsnosti. Při plošném měření rovinného povrchu hodnoty $RMSE$, neboli odchylky měření od proložené roviny, jež jsou uvedené v tabulce 5.5, odpovídají přesnosti měření získané v kalibračních experimentech (obr. 27).

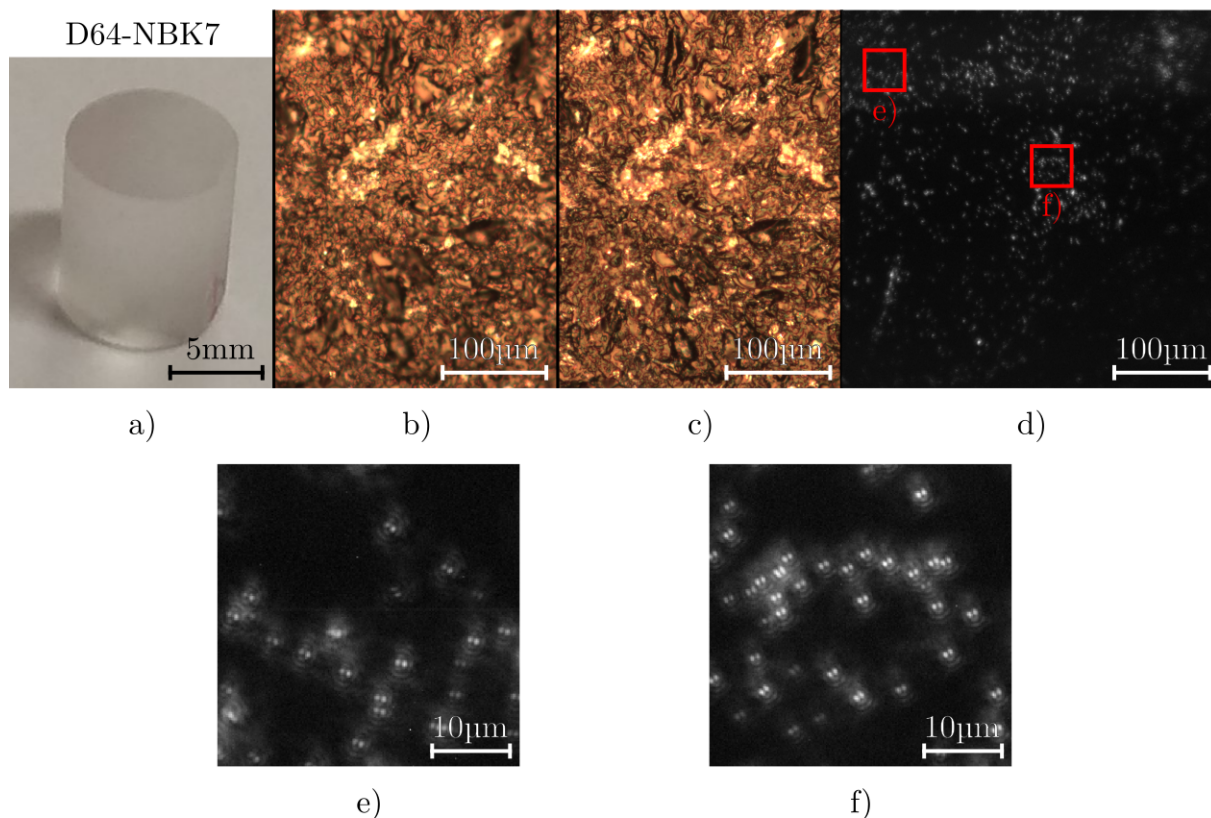
Vzorek	R_q (μm)	$RMSE$ (μm)	$RMSE$ ($^\circ$)
F600	0,7	1,54	19,40
F1000	0,4	1,08	13,61

Tabulka 5.5: Srovnání uváděné drsnosti povrchů R_q od výrobce s vypočtenou střední kvadratickou odchylkou $RMSE$ z experimentu. Vypočtené hodnoty jsou větší než výrobcem uváděné, a to $\sim 2,5\times$, nicméně je možné jednoznačně určit povrch drsnější.

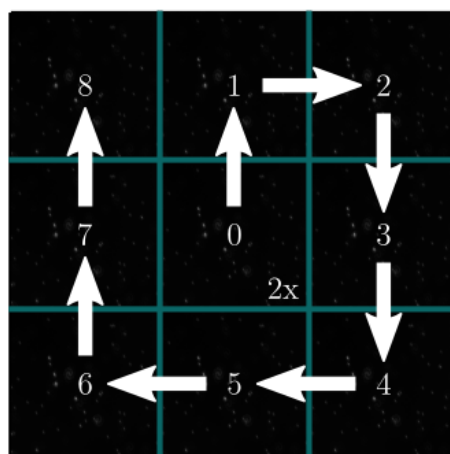
5.5. Měření kulových povrchů

Měřený kulový povrch byl vzorek lapovaného optického borosilikátového skla. Fotografie kulového vrchlíku je na obr. 32 a), snímek povrchu vzorku zobrazený v mikroskopu ve světlém poli na obr. 32 b), c). Obrázek 32 d) ukazuje povrch s nanesenými fluorescenčními částicemi zobrazenými do roviny CCD ve formě DH PSF. Kvůli nemožnosti užití krycího skla k rovnoměrnému rozprostření roztoku fluorescenčních částic po povrchu byl roztok opatrně nanesen pipetou a následně rozetřen. Z měření a získaných dat bylo patrné, že se však nepodařilo částice rozmístit rovnoměrně, proto v části obrazu zachyceného na kameru vidíme jednoznačný úbytek částic k rekonstrukci. Pro pojetí větší plochy povrchu, a tím i přesnější rekonstrukci, a pro otestování měřicího rozsahu techniky byl povrch změřen v rozsahu několika zorných polí. Výsledek byl proložen kulovou plochou a poloměr byl určen i přes to, že měření obsáhne pouze malou část povrchu. Pořadí měření jednotlivých zorných polí je na obr. 33, výsledky pak na obrázcích následujících (34, 35 a 36). Povrch D64-NBK7 na obr. 34 byl změřen ve středové části (pole 0 podle obr. 33) v rozsahu $13\mu\text{m}$. Měření bylo opakováno v $1\mu\text{m}$ krocích. Obrazy byly v jednotlivých hloubkách rekonstruovány. Stejně jako v části 5.4 byla pozorována degradace DH PSF

5.5. MĚŘENÍ KULOVÝCH POVRCHŮ

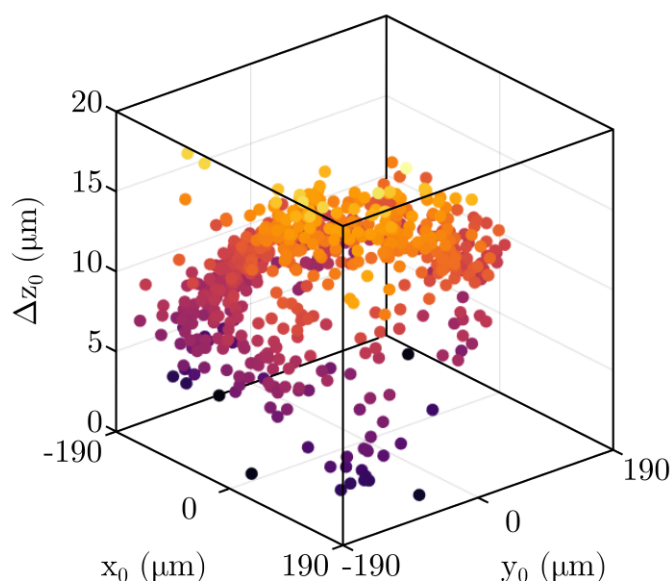


Obrázek 32: Vzorek kulového povrchu od společnosti Meopta optika, s.r.o s poloměrem 5 mm. Přesná hodnota drsnosti povrchu D64-NBK7 nebyla společností poskytnuta. a) Fotografie vzorku, b) snímek povrchu ve světelném mikroskopu zaostřený na střed, c) snímek povrchu ve světelném mikroskopu zaostřený na kraje, d) povrch s nanesenými fluorescenčními částicemi zobrazený do roviny CCD, e) a f) přiblížený výřez z krajní a střední části snímku d).



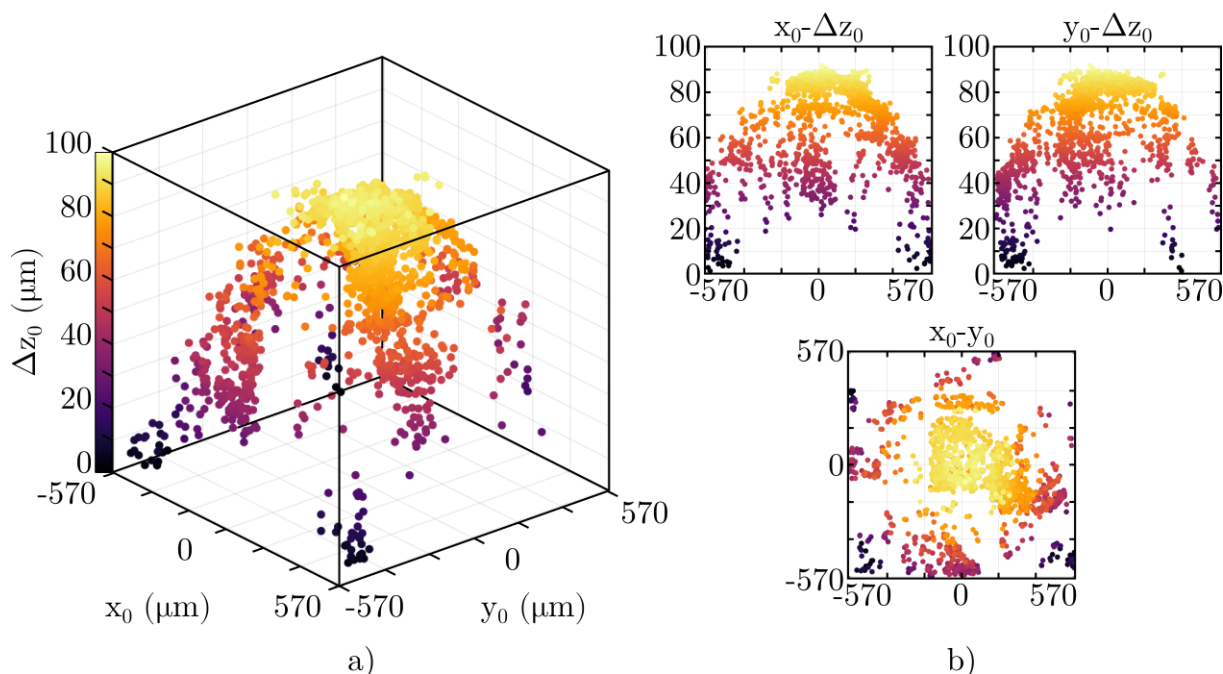
Obrázek 33: Navázání zorných polí při topografickém měření sférického difúzního povrchu. Centrální část byla proměřena dvakrát, s krokem $4\text{ }\mu\text{m}$ a $1\text{ }\mu\text{m}$.

v oblastech mimo lokalizační rozsah. Obr. 34 ukazuje měření ze střední části rozsahu. Poté byl povrch měřen v rozšířením zorném poli (pole 0 – 8 podle obr. 33, a to v rozsahu



Obrázek 34: Měření kulového povrchu D64-NBK7, ve střední části (pole 0 podle obr. 33). Změřeno v rozsahu $13\ \mu\text{m}$.

$40\ \mu\text{m}$ každé zorné pole, opakováno v odstupech $4\ \mu\text{m}$ pro proměření okrajových částí ležících mimo měřicí rozsah. Rekonstruovaný povrch lze vidět na obr. 35.

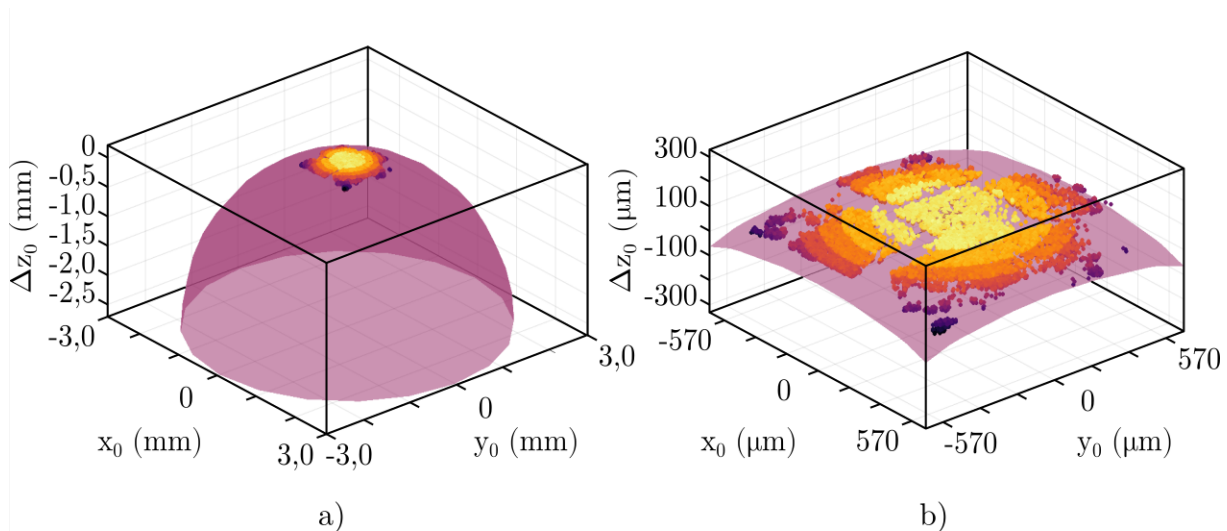


Obrázek 35: Měření kulového povrchu D64-NBK7 v rozšířeném zorném poli (0 – 8 podle obr. 33). Měření provedeno v rozsahu $40\ \mu\text{m}$ s krokem $4\ \mu\text{m}$, k rekonstrukci využito technik rozbalení fáze. a) 3D vizualizace, b) průměty do rovin $x_0 - y_0$, $x_0 - \Delta z_0$, $y_0 - \Delta z_0$.

Pole 6 – 8 byly pokryty fluorescenčními částicemi nedostatečně oproti polím ostatním, i tak však byly do měření zahrnuty. Automatické zpracování DH PSF umožňuje

5.5. MĚŘENÍ KULOVÝCH POVRCHŮ

rozpoznání úhlu pouze v rozsahu $\langle 0^\circ; 180^\circ \rangle$. Při zpracování obrazu s větším hloubkovým rozsahem pak dochází k nejednoznačnosti určení úhlového natočení. Podobný problém je známý z oblasti optické interferometrie a holografie a jeho řešení lze provést obdobou algoritmu pro navazování fáze. Měřený povrch pak dokážeme rekonstruovat v rozsahu přesahujícím Λ , samozřejmě za předpokladu dostatečné kvality DH PSF nutné k rekonstrukci. Proložení kulové plochy měřenými body (obr. 35) je realizováno na obr. 36. Pro daný povrch D64-NBK7 byl vypočten poloměr křivosti $R = (2,765 \pm 0,129)$ mm. Odchylka od teoretické hodnoty $R = 5$ mm je způsobena proměřením pouze malého zorného pole. Experiment však ukázal možnost měření zakřivených difúzních povrchů. Zlepšení měření by vyžadovalo automatizaci experimentu a skenování vzorku, jež jsou nad rámec této práce, která je zaměřena na ověření základního principu měření.



Obrázek 36: Proložení měřeného kulového povrchu kulovou plochou. Vypočtený poloměr křivosti je $R = (2,765 \pm 0,129)$ mm. a) Polokoule o poloměru R s měřenými body, b) přiblížený pohled.

6. Závěr

V této diplomové práci byla představena nová metoda měření topografie difúzně odrazných povrchů, jež je vyvíjena ve spolupráci s firmou Meopta optika, s.r.o. Firma má zájem na rozvoji této techniky, neboť by jí umožnila kontrolu tvaru optických komponent před náročnými závěrečnými procesy výroby.

V první části (kap. 2) byla provedena rešerše současných technik topografického měření povrchů a studovaná metoda byla zasazena do kontextu standardně využívaných technik. Využitím principů známých z lokalizační mikroskopie má metoda schopnost měřit topografii povrchů s přesností nezávislou na jejich drsnosti, na rozdíl od technik standardních, které jsou omezeny na měření povrchů se zrcadlovým odrazem. V této části byl také představen předchozí výzkum v této oblasti probíhající na Ústavu fyzikálního inženýrství, z něhož metoda vychází a jehož je rozšířením.

V následující části 3 byl představen princip měření. Metoda využívá objemové lokalizace částic nanesených na měřeném povrchu namísto snímání povrchu samotného. Světlo z částic nanesených na povrchu je transformováno fázovou maskou na nedifrakční vírové svazky, které spolu interferují a vytváří bodovou rozptylovou funkci (DH PSF) s defokusací indikovaným úhlovým natočením. V této kapitole byl v rámci teoretické části proveden matematický popis zobrazení, který ukazuje proces formování DH PSF využívané k rekonstrukci topografie měřených povrchů. Matematický model předpovídá lineární závislost mezi úhlovým natočením DH PSF a lokální hloubkou povrchu (rovnice 3.6). Dále jsou diskutovány předpoklady nutné pro vznik DH PSF a také vliv parametrů fázové masky na experiment.

V kapitole 4 je pojednáváno o procesu numerické rekonstrukce topografie vzorku z detekovaných DH PSF, který využívá především metod matematické morfologie, prahování obrazu a jeho segmentace. Pomocí simulovaných DH PSF je diskutován vliv vzorkování a šumu na přesnost rekonstrukce. Výsledkem numerických simulací je získání optimálních parametrů experimentální sestavy a popis požadavků a vhodných podmínek pro provedení experimentu.

Poslední kapitola 5 se nejprve zabývá výběrem částic vhodných pro experiment. Dále je provedena kalibrace měření, již je ověřena předpovězená lineární závislost úhlového natočení a hloubky povrchu z rovnice 3.6. Vzniklá kalibrační přímka $\Phi = 12,60 \Delta z_0$ je užita v dalších experimentech pro přepočítání natočení DH PSF na rozostření. Nejprve je použita metoda testována na vzorcích rovinných (kapitola 5.4), v nichž je demonstrován rozsah měřitelných hloubek, který je pro použité komponenty roven $L = 18,7 \mu\text{m}$. Dále je měřena drsnost povrchu R_q a porovnává s výrobními parametry testovaných povrchů. Závěrem je provedeno měření vzorku tvaru kulového vrchlíku (kapitola 5.5), jehož topografie je rekonstruována a je spočten jeho poloměr křivosti roven $R = (2,765 \pm 0,129) \text{ mm}$. Odchylku od výrobcem udávané hodnoty je do budoucna možné odstranit automatizací experimentu a skenováním většího zorného pole. V této části je taktéž demonstrováno rozšíření hloubkového rozsahu metody pomocí modifikace postupů využívaných k rozbalování fáze v optické interferometrii a holografii.

Literatura

- [1] Mike Conroy. Acomparison of surface metrology techniques. *Journal of Physics: Conference Series*, 13(1):458–465, 2005.
- [2] Richard Leach and Anne Hart. *A comparison of stylus and optical methods for measuring 2D surface texture*. 2002.
- [3] Gerd Binnig, Calvin F. Quate, and Christoph E. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930–933, březn 1986.
- [4] Myung K. Kim. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews*, 1(1):1 – 51 – 51, 2010.
- [5] Parameswaran Hariharan, Bozenko F. Oreb, and Tomoaki Eiju. Digital phase-shifting interferometry: a simple error-compensating phase calculation algorithm. *Applied optics*, 26(13):2504–2506, 1987.
- [6] Nicolas Verrier and Michael Atlan. Off-axis digital hologram reconstruction: some practical considerations. *Appl. Opt.*, 50(34):H136–H146, prosinec 2011.
- [7] Pavel Kolman and Radim Chmelík. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, 18(21):21990–22003, říjen 2010.
- [8] Tomáš Slabý, Pavel Kolman, Zbyněk Dostál, Martin Antoš, Martin Lošťák, and Radim Chmelík. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. 21(12):14747–14762, červen 2013.
- [9] Jana Čolláková, Aneta Křížová, Zbyněk Dostál, Martin Antoš, David Vašíček, and Radim Chmelík. Multimodální holografický mikroskop - společný projekt vut a tes-can. 59(6-7/2014):160–162, červenec 2014.
- [10] Ulf Schnars, Claas Falldorf, John Watson, and Werner P. O. Jüptner. *Digital holography and wavefront sensing: Principles, techniques and applications*. leden 2015.
- [11] Ichirou Yamaguchi and Tong Zhang. Phase-shifting digital holography. *Optics Letters*, 22:1268–1270, srpen 1997.
- [12] Melania Paturzo, Francesco Merola, Simonetta Grilli, Sergio De Nicola, and Pietro Ferraro. Digital holography in combination with diffraction grating to get super-resolution. *Proc SPIE*, květen 2008.
- [13] Yasuhiro Takaki and Hitoshi Ohzu. Hybrid holographic microscopy: visualization of three-dimensional object information by use of viewing angles. *Applied optics*, 39:5302–8, listopad 2000.
- [14] Bharat Bhushan, James C. Wyant, and Chris L. Koliopoulos. Measurement of surface topography of magnetic tapes by mirau interferometry. *Applied Optics*, 24(10):1489–1497, květen 1985.

- [15] Liang-Chia Chen, Sheng-Lih Yeh, Abraham Mario Tapilouw, and Jui-Chin Chang. 3-d surface profilometry using simultaneous phase-shifting interferometry. *Optics Communications*, 283:3376–3382, září 2010.
- [16] Zewei Cai, Xiaoli Liu, Hao Jiang, Dong He, Xiang Peng, Shujun Huang, and Zonghua Zhang. Flexible phase error compensation based on hilbert transform in phase shifting profilometry. *Optics Express*, 23(19):25171–25181, září 2015.
- [17] Jeonggon Harrison Kim. An all fiber white light interferometric absolute temperature measurement system. *Sensors*, 8:6825–6845, listopad 2008.
- [18] Quangsang Vo, Fengzhou Fang, Xiaodong Zhang, and Huimin Gao. Surface recovery algorithm in white light interferometry based on combined white light phase shifting and fast fourier transform algorithms. *Appl. Opt.*, 56(29):8174–8185, říjen 2017.
- [19] Jeonggon Harrison Kim. High precision signal processing algorithm for white light interferometry. *Sensors*, 8, prosinec 2008.
- [20] D. N. Wang, Y. N. Ning, K. T. V. Grattan, A. W. Palmer, and K. Weir. Three-wavelength combination source for white-light interferometry. *IEEE Photonics Technology Letters*, 5(11):1350–1352, listopad 1993.
- [21] T. R. Judge and Peter Bryanston-cross. A review of phase unwrapping techniques in fringe analysis. *Optics and Lasers in Engineering*, 21(4):199–239, prosinec 1994.
- [22] Dennis C. Ghiglia, Gary A. Mastin, and Louis A. Romero. Cellular-automata method for phase unwrapping. *J. Opt. Soc. Am. A*, 4(1):267–280, leden 1987.
- [23] Richard M. Goldstein, Howard A. Zebker, and Charles L. Werner. Satellite radar interferometry - two-dimensional phase unwrapping. *Radio Science*, 23(4):713–720, červenec–srpen 1988.
- [24] Donald J. Bonec. Fourier fringe analysis: the two-dimensional phase unwrapping problem. *Appl. Opt.*, 30(25):3627–3632, září 1991.
- [25] Mitsuo Takeda, Kazutoshi Nagatome, and Yasuharu Watanabe. Phase unwrapping by neural network. In *Proceedings of the Second International Workshop on Automatic Processing of Fringe Patterns Fringe'93*, pages 136–141. Akademie, Berlin, 1993.
- [26] David P. Towers, T. R. Judge, and Peter Bryanston-Cross. A quasi heterodyne holographic technique and automatic algorithms for phase unwrapping. *SPIE*, 1163, listopad 1989.
- [27] Werner P. O. Jüptner and Wolfgang Osten. Phase unwrapping by neural network. In *Proceedings of the Second International Workshop on Automatic Processing of Fringe Patterns Fringe'93*, pages 19–21. Akademie, Berlin, 1993.
- [28] Katia Genovese and Carmine Pappalettere. Whole 3d shape reconstruction of vascular segments under pressure via fringe projection techniques. *Optics and Lasers in Engineering*, 44(12):1311–1323, 2006.

- [29] Francis Lilley, Michael J. Lalor, and David R. Burton. Robust fringe analysis system for human body shape measurement. *Optical Engineering*, 39(1):187–195, leden 2000.
- [30] C. J. Moore, D. R. Burton, O. Skydan, P. J. Sharrock, and M. Lalor. 3d body surface measurement and display in radiotherapy part i: Technology of structured light surface sensing. In *International Conference on Medical Information Visualisation - BioMedical Visualisation (MedVis'06)*, pages 97–102, červen 2006.
- [31] Abdelmalek Hanafi, Tijani Gharbi, and Jean-Yves Cornu. In vivo measurement of lower back deformations with fourier-transform profilometry. *Appl. Opt.*, 44(12):2266–2273, duben 2005.
- [32] Fiona Berryman, Paul Pynsent, Jeremy Fairbank, and Simon Disney. A new system for measuring three-dimensional back shape in scoliosis. *Eur Spine J.*, 17(5):663–672, květen 2008.
- [33] Torsten Hain, Rainer Eckhardt, Karin Kunzi-Rapp, and Bernhard Schmitz. Indications for optical shape measurements in orthopaedics and dermatology. *Medical Laser*, 17(1):55–58, 2002.
- [34] Y. Ferraq, D. Black, J.M. Lagarde, A.M. Schmidt, S. Dahan, J.L. Grolleau, and S. Mordon. Use of a 3-d imaging technique for non-invasive monitoring of the depth of experimentally induced wounds. *Skin Res Technol.*, 13(4):399–405, listopad 2007.
- [35] S. Jaspers, H. Hopermann, G. Sauermann, U. Hoppe, R. Lunderstädt, and J. Ennen. Rapid in vivo measurement of the topography of human skin by active image triangulation using a digital micromirror device. *Skin Research and Technology*, 5(3):195–207, 1999.
- [36] J.M. Lagarde, C. Rouvrais, D. Black, S. Diridollou, and Y. Gall. Skin topography measurement by interference fringe projection: a technical validation. *Skin Research and Technology*, 7(2):112–121, leden 2002.
- [37] C. Quan, Chojui Tay, Xiaoyuan He, Xin Kang, and H. M. Shang. Microscopic surface contouring by fringe projection method. *Optics & Laser Technology*, 34(7):547–552, říjen 2002.
- [38] Xiaoyuan He, Wei Sun, Xiang Zheng, and Meng Nie. Static and dynamic deformation measurements of micro beams by the technique of digital image correlation. *Key Engineering Materials*, 326–328:211–214, prosinec 2006.
- [39] Tunç S. Yilmaz, Umut D. Özugurel, Karahan Bulut, and M. Naci Inci. Vibration amplitude analysis with a single frame using a structured light pattern of a four-core optical fibre. *Optics Communications*, 249(4–6):515–522, květen 2005.
- [40] Qican Zhang and Xianyu Su. High-speed optical measurement for the drumhead vibration. *Opt. Express*, 13(8):3110–3116, duben 2005.
- [41] Marella De Angelis, Sergio De Nicola, Pietro Ferraro, Andrea Finizio, and Giovanni Pierattini. Liquid refractometer based on interferometric fringe projection. *Optics Communications*, 175(4–6):315–321, březn 2000.

- [42] Qi-Can Zhang and Xian-Yu Su. An optical measurement of vortex shape at a free surface. *Optics & Laser Technology*, 34(2):107–113, březn 2002.
- [43] Pablo Javier Cobelli, Agnès Maurel, Vincent Pagneux, and Philippe Petitjeans. Global measurement of water waves by fourier transform profilometry. *Experiments in Fluids*, 46(6):1037–1047, leden 2009.
- [44] Rogér Ernst, Albert Weckenmann, and Roman Velgan. Local wall thickness measurement of formed sheet metal using fringe projection technique. *Proceedings, XVII IMEKO World Congress*, page 1802–1805, 2003.
- [45] Peisen S. Huang, Feng Jin, and Fu-Pen Chiang. Quantitative evaluation of corrosion by a digital fringe projection technique. *Optics and Lasers in Engineering*, 31(5):371–380, květen 1999.
- [46] Ping-Rey Jang, Rangaswami Arunkumar, Teresa Leone, Zhiling Long, Melissa A. Mott, Olin Norton, Walter P. Okhuysen, Yi Su, David L. Monts, Paula G. Kirk, and John Ettien. Quantitative imaging characterization of aluminum pit corrosion in oak ridge research reactor pool. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 6377(63770S), říjen 2006.
- [47] Giuseppe Schirripa Spagnolo and Dario Ambrosini. Diffractive optical element based sensor for roughness measurement. *Sensors and Actuators A: Physical*, 100(2–3):180–186, zřří 2002.
- [48] Liang-Chia Chen and Yi Wei Chang. High accuracy confocal full-field 3-d surface profilometry for micro lenses using a digital fringe projection strategy. *Key Engineering Materials - KEY ENG MAT*, 364–366:113–116, leden 2008.
- [49] Jan Burke, Thorsten Bothe, Wolfgang Osten, and Cecil F. Hess. Reverse engineering by fringe projection. *Proc. SPIE*, 4778:312–324, řerven 2002.
- [50] Sai Siva Gorthi and Pramod Rastogi. Fringe projection techniques: Whither we are? *Optics and Lasers in Engineering*, 48(2):133–140, 2010.
- [51] J. M. Huntley and Henrik O. Saldner. Error-reduction methods for shape measurement by temporal phase unwrapping. *Journal of the Optical Society of America*, 14(12):3188–3196, 1997.
- [52] Jindong Tian, Xiang Peng, and Xiaobo Zhao. A generalized temporal phase unwrapping algorithm for three-dimensional profilometry. *Optics and Lasers in Engineering*, 46(4):336–342, duben 2008.
- [53] A. E. Ennos. Speckle interferometry. In J. C. Dainty, editor, *Laser Speckle and Related Phenomena*, chapter 6, pages 203–253. Springer, Berlin, 1975.
- [54] John Neil Butters and J. A. Leendertz. Speckle pattern and holographic techniques in engineering metrology. *Optics & Laser Technology*, 3(1):26–30, řnor 1971.
- [55] Catherine Wykes. Use of electronic speckle pattern interferometry (espi) in the measurement of static and dynamic surface displacements. *Optical Engineering*, 21(3):400, řerven 1982.

- [56] Maurice Halioua, Ravi S. Krishnamurthy, Hsin-Chu Liu, and Fu-Pen Chiang. “automated 360° profilometry of 3-d diffuse objects,.” *Applied Optics*, 24(14):2193–2196, 1985.
- [57] Pedro Buschinelli, Tiago Pinto, F. Silva, Armando Albertazzi, and José Santos. Laser triangulation profilometer for inner surface inspection of 100 millimeters (4”) nominal diameter. *Journal of Physics: Conference Series*, 648(1):13, říjen 2015.
- [58] D. Nita, J. Mignon, M. Chuard, and M. Sofa. 3-d profilometer using a ccd linear image sensor: application to skin surface topography measurement. skin research and technology. *Skin Res Technol.*, 4(3):121–129, srpen 1998.
- [59] René Farcy, B. Denise, and Roland Damaschini. Triangulating laser profilometer as a navigational aid for the blind: optical aspects. *Appl. Opt.*, 35(7):1161–1165, březn 1996.
- [60] Gareth Bradshaw. *Non-Contact Surface Geometry Measurement Techniques*. Technical Report TCD-CS, 1999.
- [61] Derek D. Lichti and Bruce R. Harvey. The effects of reflecting surface material properties on time-on-flight laser scanner measurements. symposium on geospatial theory, processing and applications. *Geomatics Research Australasia*, 2002.
- [62] Lothar Schermelleh, Rainer Heintzmann, and Heinrich Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 190(2):165–175, 2010.
- [63] Laurent Holtzer, Tobias Meckel, and Thomas Schmidt. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells. *Applied Physics Letters*, 90(5):053902, leden 2007.
- [64] Bo Huang, Wenqin Wang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864):810–813, únor 2008.
- [65] Yoav Shechtman, Steffen J. Sahl, Adam S. Backer, and William E. Moerner. Optimal point spread function design for 3d imaging. *Physical Review Letters*, 113(13–26):133902, září 2014.
- [66] Rafael Piestun, Yoav Y. Schechner, and Joseph Shamir. Propagation-invariant wave fields with finite energy. *Journal of the Optical Society of America A*, 17(2):294–303, 2000.
- [67] Sri Rama Prasanna Pavanini, Michael A. Thompson, Julie S. Biteen, Samuel J. Lord, Na Li, Robert J. Twieg, Rafael Piestun, and William E. Moerner. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9):2995–2999, březn 2009.

- [68] Mikael P. Backlund, Matthew D. Lew, Adam S. Backer, Steffen J. Sahl, Ginni Grover, Anurag Agrawal, Rafael Piestun, and W. E. Moerner. Simultaneous, accurate measurement of the 3d position and orientation of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47):19087–19092, listopad 2012.
- [69] Sri Rama Prasanna Pavani and Rafael Piestun. High-efficiency rotating point spread functions. *Optics Express*, 16(5):3484–3489, 2008.
- [70] Clemens Roider, Alexander Jesacher, Stefan Bernet, and Monika Ritsch-Marte. Axial super-localisation using rotating point spread functions shaped by polarisation-dependent phase modulation. *Optics Express*, 22(4):4029–4037, 2014.
- [71] Jim Durnin, John J. Miceli, and Joseph H. Eberly. Diffraction-free beams. *Phys. Rev. Lett.*, 58:1499–1501, duben 1987.
- [72] Ginni Grover, Sean Quirin, Callie Fiedler, and Rafael Piestun. Photon efficient double-helix psf microscopy with application to 3d photo-activation localization imaging. *Biomed. Opt. Express*, 2(11):3010–3020, listopad 2011.
- [73] Sudhakar Prasad. Rotating point spread function via pupil-phase engineering. *Optics Letters*, 38(4):585–587, 2013.
- [74] Petr Bouchal and Zdeněk Bouchal. Flexible non-diffractive vortex microscope for three-dimensional depth-enhanced super-localization of dielectric, metal and fluorescent nanoparticles. *Journal of Optics*, 19(10):105606, 2017.
- [75] Petr Bouchal, Lenka Štrbková, Zbyněk Dostál, and Zdeněk Bouchal. Vortex topographic microscopy for full-field reference-free imaging and testing. *Optics Express*, 25(8):21428–21443, 2017.
- [76] Michal Baránek and Zdeněk Bouchal. Rotating vortex imaging implemented by a quantized spiral phase modulation. *J. Europ. Opt. Soc. Rap. Public*, 8:13017, 2013.
- [77] Michal Baránek, Petr Bouchal, Martin Šiler, and Zdeněk Bouchal. Aberration resistant axial localization using a self-imaging of vortices. *Opt. Express*, 23(12):15316–15331, 2015.
- [78] MATLAB. *version 9.2.0.538062 (R2017a)*. The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, 2017.
- [79] Pierre Soille. *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer-Verlag, Berlin, 2 edition, 2003.
- [80] Jean Serra. *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Academic Press, Inc., New York, 1982.
- [81] Reinhard Klette and Piero Zamperoni. *Handbook of image processing operators*. John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
- [82] Jean Serra. *Theoretical advances*. Acad. Press, London, 1988.

- [83] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1):62–66, leden 1979.
- [84] Derek Bradley and Gerhard Roth. Adaptive thresholding using the integral image. *J. Graphics Tools*, 12:13–21, leden 2007.
- [85] Pierre D. Wellner. Adaptive thresholding for the digitaldesk. *Xerox, EPC1993-110*, pages 1–19, 1993.
- [86] R.T. Smith and Warren J. Smith. *Modern Optical Engineering: The Design of Optical Systems*. Optical and electro-optical engineering series. McGraw-Hill, 1966.

Seznam zkratek

AFM	Atomic Force Microscopy, mikroskopie atomárních sil
ÚFI	Ústav fyzikálního inženýrství, Fakulta strojního inženýrství, VUT Brno
PSF	Point Spread Function, bodová rozptylová funkce
DH PSF	Double Helix Point Spread Function, bodová rozptylová funkce se dvěma laloky
PMS	Prostorový modulátor světla
MO	Mikroskopový objektiv
SM	Spirální fázová maska
TČ	Tubusová čočka
CCD	Charge-coupled device
SE	Strukturní element
SNR	Signal-to-noise Ratio, poměr signálu k šumu
PSNR	Peak Signal-to-noise Ratio, špičkový poměr signálu k šumu
RMSE	Root Mean Squared Error, střední kvadratická chyba
MAE	Mean Absolute Error, střední absolutní chyba