ФГУП «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОПТИКО-ФИЗИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ»

На правах рукописи

МИНАЕВ ВЛАДИМИР ЛЕОНИДОВИЧ

НИЗКОКОГЕРЕНТНАЯ ФАЗОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ ОБЪЕКТОВ

Специальность 01.04.05 - оптика

Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук

Научный консультант д.т.н., проф. Г.Г. Левин

Москва - 2018

Оглавление

Введение7
Глава 1. Методы реконструкции фазового распределения
1.1 Фазовые объекты, как объекты исследования в микроскопии
1.2 Классификация методов вычисления фазы волнового фронта
1.3 Пространственные методы реконструкции фазы волнового фронта 36
1.3.1 Метод скелетизации 36
1.3.2 Метод с использованием преобразования Фурье
1.3.3 Метод с использование преобразования Гильберта 40
1.4 Временные методы реконструкции фазы волнового фронта (методы
фазовых шагов)
1.4.1 Двухволновая интерференция и 4-х шаговый алгоритм 42
1.4.2 Дискретное и непрерывное изменение фазы 44
1.4.3 Развертывание («сшивка») фазы 45
1.4.4 3-х шаговые алгоритмы 46
1.4.5 Алгоритм 2+1 47
1.4.6 Алгоритм Карре 48
1.4.7 Использование метода наименьших квадратов
1.4.8 4-х шаговый алгоритм по методу наименьших квадратов 50
1.4.9 Синхронное детектирование 50
1.4.10 5-ти шаговый алгоритм 51
1.4.11 5-ти шаговый алгоритм Харихарана-Швайдера 51
1.4.12 Алгоритмы, улучшенные с помощью весовых коэффициентов 52
1.5 Метод измерения фазового сдвига между интерферограммами 56
1.5.1 Частотный анализ метода вычисления фазового сдвига между
интерферограммами56
1.6 Анализ ошибок методов реконструкции фазы волнового фронта 62
1.6.1 Ошибка, вызванная неправильным значением сдвига фазы 62
1.6.2 Ошибка, вызванная вибрацией

163 Онибиа в разния налинайност ю датактора	65
	05
1.7 численное моделирование метода фазовых шагов	00
1.7.1 Параметры моделирования	67
1.7.2 Вычисление распределения фазы без шумов	69
1.7.3 Оценка влияния шума	69
1.7.4 Оценка влияния «раскалибровки» фазосдвигающего устройств	аи
источника излучения	73
1.8 Численное моделирование метода измерения фазового сдвига по разн	юсти
между интерферограммами	78
1.8.1 Оценка влияния шума	79
1.8.2 Оценка влияния дробной части полосы	80
1.8.3 Оценка влияния числа полос	83
1.9 Метод динамической фазовой микроскопии	84
1.10 Выводы	88
Глава 2. Особенности формирования фазового изображения в	
микроскопе	89
микроскопе	 89 89
микроскопе2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в	 89 89
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 89 91
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 89 91 91
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 89 91 91
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 91 91 91
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 91 91 95
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение. 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника. 2.2.1 Микроскоп Линника (МИИ-4М) 2.2.2 Область локализации интерференционного изображения и его контраст. 2.3 Исследование влияния опорного зеркала микроскопа на фазовое 	89 91 91 95
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	89 91 91 95 99
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 91 91 95 95 99 ение 105
 микроскопе	 89 91 91 95 95 99 ение 105
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника	 89 91 91 95 95 99 ение 105 106
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение	89 91 91 91 95 95 ение 105 106 108
 микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение. 2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника. 2.2.1 Микроскоп Линника (МИИ-4М) 2.2.2 Область локализации интерференционного изображения и его контраст. 2.3 Исследование влияния опорного зеркала микроскопа на фазовое изображение. 2.4 Исследование влияния фокусировки микроскопа на фазовое изображение. 2.4.1 Фокусировка по амплитудному изображению 2.4.2 Численное моделирование 	89 91 91 91 95 95 ение 105 106 108 111

2.6 Анализ латерального разрешения фазового микроскопа 121
2.6.1 Описание эксперимента 123
2.6.2 Методика измерений 125
2.6.3 Результаты измерений 128
2.7 Выводы
Глава 3 Исследование прозрачных объектов методами низкокогерентной
фазовой микроскопии 133
3.1 Измерение показателя преломления жидких и твердых веществ
3.2 Морфометрия клеток по фазовым изображениям
3.3 Измерения гомогенных объектов
3.4 Измерения негомогенных объектов
3.5 Динамические измерений. Анализ шума145
3.6 Измерение массы сухих веществ клетки
3.6.1 Оценка влияния изменения объема клетки на измерение массы
сухого вещества150
3.6.2 Оценка влияния рефракции света на измерение массы сухого
вещества
3.6.3 Оценка влияния стабильности микроскопа на измерений массы
сухого вещества154
3.6.4 Оценка влияния внутренних волн на измерение массы сухого
вещества154
3.7 Измерение инкремента показателя преломления живой клетки во времени
3.8 Метод динамической фазовой микроскопии на основе анализа
интенсивности интерферограммы162
3.9 Выводы
Глава 4. Томографическая фазовая микроскопия 166
4.1 Томографическая фазовая микроскопия на микроскопе Линника
4.1.1 Получение проекций 169

4.1.2 Предварительная обработка проекций и восстановление
томограммы 171
4.2 Томографическая фазовая микроскопия по дифференциальным
проекциям 173
4.2.1 Теоретическая часть 173
4.2.2 Описание экспериментальной установки 176
4.2.3 Результаты экспериментов с живыми клетками 181
4.3 Локальная томографическая фазовая микроскопия 185
4.3.1 Суммарное изображение из дифференциальных проекций 186
4.3.2 Томограмма из дифференциальных проекций 190
4.3.3 Численное моделирование локальной томографии 191
4.3.4 Описание эксперимента по локальной томографии клетки 194
4.4 Выводы
Глава 5 Исследование отражающих объектов методами
низкокогерентной фазовой микроскопии 198
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209
 низкокогерентной фазовой микроскопии
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый метод) 222
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более $\lambda/4$ (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225 Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более $\lambda/4$ (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225 Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых 227
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225 Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых 227 6.1 Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-1М. 227
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225 Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых 227 6.1 Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-1М 227 6.2 Динамический фазовый микроскоп МИА-Д 232
низкокогерентной фазовой микроскопии 198 5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей 198 5.2 Измерения моноатомных структур кремния 202 5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов 209 5.3.1 Численное моделирование 211 5.3.2 Экспериментальные исследования 215 5.3.3 Результаты 219 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более λ/4 (двухволновый метод) 222 5.5 Выводы 225 Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых 227 6.1 Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-1М 227 6.2 Динамический фазовый микроскоп МИА-2 232

Список литературы	258
Заключение	252
6.5 Выводы	251
6.4 Томографический фазовый микроскоп МИА-ТОМО	247
6.3.2 Исследование метрологических характеристик микроскопа	243
6.3.1 Описание интерференционного микроскопа	239

Введение

Следуя определению, данному в книге «Голографическая интерферометрия» [1], фазовыми называются такие объекты, которые изменяет фазовую составляющую комплексной амплитуды волнового фронта оптического излучения и описываются эйкональным приближением решения скалярного волнового уравнения [2]. Это означает, что рефракция на таких объектах пренебрежимо мала.

Электромагнитное поле может или отражаться от таких объектов или проходить через них, поэтому фазовые объекты могут быть как отражающие, так и прозрачные. Если фазовые объекты не изменяются во времени, то они являются статическими, если изменяются, то динамическими.

Фазовые объекты, исследуемые с помощью микроскопа, широко распространены. К отражающим фазовым объектам можно отнести изделия микроэлектроники, микроэлектромеханические системы (MOMC), оптические зеркальные поверхности, подложки лазерных зеркал, структурированные покрытия и пр. Примером прозрачных фазовых объектов могут служить оптические стекловолокна, микрорезонаторы, оптические микродетали, а также широкий класс биологических микрообъектов, включая клетки, бактерии и т.п.

Возникающая при взаимодействии с такими объектами модуляция фазовой составляющей поля, связана с их пространственными локальными параметрами: оптической разностью хода (ОРХ) для прозрачных объектов и двумерным распределением высот профиля поверхности для отражающих объектов. В общем случае OPX ЭТО интегральная величина OT пространственного распределения показателя преломления. С ним связаны другие физические параметры: концентрация, плотность, температура и др. [1]. Исходя из локальных параметров, можно вычислить важные интегральные шероховатость поверхности, морфологические параметры, такие как характеристики клеток, массу сухого вещества клетки и пр.

Современный уровень развития науки и техники требует разработки

новых бесконтактных методов и средств измерений параметров фазовых объектов, обладающих высокой разрешающей способностью и точностью. Например, современные технологии изготовления лазерных зеркал резонаторов кольцевых лазеров требуют измерения их шероховатости на уровне единиц ангстрем [3].

Новое направление в области получения оптических поверхностей из стекла открывают аддитивные технологии (АТ). Внедрение АТ в оптическое производство позволяет изготавливать уникальные по форме изделия [4]. Существуют различные методы изготовления оптически-прозрачных изделий с помощью аддитивных технологий и соответствующие 3D принтеры [5], однако, качество поверхности требует дополнительной полировки и контроля шероховатости. Как известно, изделия аддитивных технологий, изготовленные по методу селективного лазерного плавления (SLM), также имеют проблемы, связанные с шероховатостью поверхности. Например, при изготовлении элементов конструкции камеры сгорания авиационных двигателей, взаимодействующих с газовыми потоками, требуются их дополнительная шлифовка и полировка, а значит и контроль шероховатости.

Также, как и в случае с изделиями из пластмасс и металлических порошков требуется контроль внутренней структуры изделий, изготовленных методами АТ. Как известно, для этой цели в первом случае используются методы рентгеновской томографии, которые не подходят для прозрачных изделий. В качестве альтернативного решения можно использовать методы оптической фазовой томографии.

Особенно актуальной является проблема исследования живых биологических объектов: клеток. По сути это прозрачные динамические трехмерные объекты со сложной внутренней структурой. При этом необходимо исследовать не только их интегральные параметры (объем, вес, параметры формы), но и пространственные распределения различных веществ – локальный по пространству параметр внутри клетки. Так как живая клетка является динамическим объектом, то такие измерения нужно проводить в

динамике. Например, изменение формы эритроцита при воздействии на него различных веществ [6] или изменение структуры нейрона при проведении через него нервного импульса [7] и пр.

Проблема качественного исследования фазовых объектов решена. Для этой цели разработаны различные виды контрастирования. К ним относятся: поляризационный, фазовый и дифференциально-интерференционный контрасты (ДИК), а также метод темного поля и др. [8]. Однако, задача количественного измерения интегральных и локальных параметров статических и динамических фазовых объектов с высокой точностью является актуальной современной научно-технической задачей.

Количественным методом получения информации о фазовой модуляции электромагнитного поля исследуемым объектом является метод интерферометрии. Исходным измеряемым параметром трехмерного фазового объекта с помощью интерферометра является двумерное распределение сдвига фазы электромагнитного излучения, вносимого этим объектом. Так как это распределение тем или иным образом «изображает» фазовый объект, то оно называется фазовым изображением. Для отражающего объекта оно передает его высоты, т.е. топограмму поверхности, а для прозрачного объекта (с учетом эйконального приближения [2]) - это интегральная величина от показателя преломления вдоль направления распространения излучения

Для получения фазового изображения необходимо использовать алгоритмы реконструкции, позволяющие по одному или нескольким интерференционным изображениям, вычислять закодированное в них фазовое распределение. Начиная с 80-х годов, с появлением доступных персональных компьютеров, систем захвата изображений, высокоскоростных матричных приемников с большим числом элементов и систем фазового сдвига фазовая микроскопия вышла на новый количественный уровень [9]. Это позволило широко использовать ранее разработанные алгоритмы автоматизированной реконструкции фазы волнового фронта по интерферограммам, известные еще с 60-х годов.

В настоящее время существует большое число публикаций и принципы монографий, подробно описывающих автоматизированной обработки интерферограмм [10, 11]. В основном К НИМ относят пространственные и временные методы или методы фазовых шагов (фазового сдвига). Пространственные методы основаны на анализе искривлений полос по одной интерферограмме либо в пространственной области: определение центров полос (метод скелетизации), либо в частотной области с помощью фурье-анализа (FTM - Fourier transform method) и др. В методах фазовых шагов (PSM - Phase shifting method) вычисление фазы осуществляется с помощью записи во времени набора интерферограмм, полученных при различных фазовых сдвигах и их последующего анализа. Сюда можно отнести и т.н. компенсационный метод (метод временных интервалов) [12].

Далее будем называть методы микроскопии, которые позволяют получать фазовое изображение – фазовой микроскопией, а приборы их реализующие – фазовыми микроскопами. Сюда же будут относиться и интерференционные методы.

В фазовой микроскопии используются как пространственные, так и временные методы. Пространственные методы имеет меньшую точность по сравнению с временными методами, однако для их осуществления требуется лишь одно интерференционное изображение. Поэтому эти методы могут быть использованы для исследования динамических фазовых микрообъектов, а также реализованы в тех схемах, где невозможно обеспечить фазовый сдвиг по причине конструктивных особенностей, например, в микроскопе со схемой интерферометра с совмещенными ветвями или бокового сдвига. Другой особенностью этих методов является то, что для них необходимо обеспечить наличие разрешимого числа полос, что в некоторых случаях трудно реализовать, например, при использовании низкокогерентного источника (светодиода и т.п.) с малой длиной когерентности.

Методы фазовых шагов обладают большей точностью, чем пространственные методы. Однако, повышение точности требует увеличения

количества шагов, что приводит к увеличению времени получения данных, и, следовательно, уменьшает пригодность методов ДЛЯ исследования динамических фазовых объектов, например, таких как живые клетки. Также эти методы требуют наличия интерференционной схемы, в которой можно обеспечить фазовый сдвиг, а также самого фазосдвигающего устройства. Разработаны различные приемы для осуществления фазового сдвига одной волны относительно другой: сдвиг зеркала, сдвиг дифракционной решетки, использование акустооптической ячейки, вращение полуволновой пластинки и др. [11]. В предельном случае источником фазового сдвига может быть вибрация, приводящая к относительному изменению оптической длины пути предметного и опорного каналов интерферометра и случайному фазовому сдвигу. Существуют интерференционные схемы, в которых фазовый сдвиг осуществить трудно или невозможно, но обладающие определенной разностью хода между предметным и опорным каналами: неравноплечные интерферометры. К ним относят в основном двулучевые интерферометры, например, интерферометр Физо, неравноплечный вариант интерферометра Тваймана-Грина и др. В этом случае есть возможность обеспечить фазовый сдвиг за счет использования перестраиваемого по частоте лазерного источника [11].

Для обеспечения высокой точности измерения фазового изображения необходим тщательный учет всех влияющих факторов как аппаратной части, влияющей на качество получаемых интерферограмм и фазовый сдвиг между ними, так и параметров алгоритма реконструкции фазового изображения. Поэтому важной проблемой, связанной с использованием алгоритмов реконструкции и построением фазового микроскопа, является анализ погрешностей, связанных как с используемыми параметрами самого алгоритма: тип алгоритма, число шагов, число усреднений и пр., так и с аппаратными параметрами, влияющими на исходные данные: число градаций видеокамеры, уровень шумов, тип фазосдвигающего устройства, точность установки шагов и пр. Существует ряд работ, в которых проводились

подобные исследования [10, 11, 13]. Однако для точной оценки необходимо проводить численное моделирование метода реконструкции, используя конкретные условия его аппаратной и программной реализации.

Одним из важных факторов, влияющих на погрешность определения фазового изображения с помощью метода фазовых шагов, является точность задания или измерения шагов фазосдвигающего устройства, т.е. его калибровка. Проблема калибровки фазосдвигающего устройства рассмотрена в монографии [11].

Большинство алгоритмов реконструкции работает в предположении, что сдвиг между интерферограммами известен и равен $\pi/2$ (или незначительно отличается от него) [11, 13]. Отклонения от этого значения приводят к возникновению различных артефактов, наиболее значимым из которых является т.н. «вторая гармоника», которая проявляется на фазовом изображении гармонической модуляции, повторяющей В виде интерференционные полосы, но с удвоенной частотой. Существуют небольшой алгоритмы, обеспечивающие компенсацию раскалибровки фазосдвигающего устройства [14], однако, при измерении супергладких поверхностей этого оказывается недостаточно. Другой класс алгоритмов предполагает, что фазовый сдвиг неизвестен, но одинаков для всех интерферограмм [11].

Сравнительно новым направлением в интерферометрии фазового сдвига является появление алгоритмов, в которых фазовый сдвиг предварительно вычисляется по интерферограммам, а затем, например, путем аппроксимации интерференционного сигнала гармонической функцией, вычисляется само фазовое изображение. Этот класс алгоритмов называется самокалибрующиеся алгоритмы. Для вычисления фазовых сдвигов по интерферограммам предложены различные с использованием методы: двумерного преобразования Фурье, с использованием метода наименьших квадратов (MHK) переопределенной линейных уравнений, для системы С использованием корреляционной функции, с использованием аппроксимации

фигурами Лиссажу, с использованием обратных тригонометрических функций и пр. Хорошие обзоры данных методов представлены в [15-17]. Одним из перспективных направлений в развитии этих алгоритмов является использованием алгоритмов, основанных на анализе разности между интерферограммами [18].

Многие из представленных алгоритмов дают большую погрешность при малом числе полос. Это важный случай, возникающий при использовании низкокогерентного излучения, например, светодиода. Поэтому актуальной является задача разработки и численного моделирования алгоритма вычисления фазового сдвига по интерферограммам, способного работать и при малом числе полос.

Для исследования динамических объектов в основном используют пространственные методы, однако, с появлением быстрых камер появилась возможность использовать и методы фазовых шагов. Известен прибор, позволяющий проводить динамические фазовые измерения - микроскоп «Эйрискан» [19, 20] разработанный профессором В.П. Тычинским. В нем используется диссектор как фотоприемное устройство, а для реконструкции фазового изображения реализован метод временных интервалов [12]. Однако это увеличивает время захвата полного кадра. Поэтому данный микроскоп предназначен для исследования статических объекты, либо локальных динамических измерений. Таким образом, задача создания метода фазовой микроскопии, позволяющего исследовать динамические объекты с высокой точностью, является весьма актуальной.

Фазовая микроскопия начинает свое развитие с первой половины 20-го столетия и за прошедшее время имеет большие наработки в плане схемных решений [8, 21-23]. С момента ее появления она была в основном качественным методом визуального наблюдения. Однако начиная с середины 60-х годов появляться алгоритмы расшифровки интерферограмм, и фазовая микроскопия вышла на новый количественный уровень. Начиная с 80-х годов, с появлением доступных ПЭВМ и систем захвата изображений фазовая

микроскопия переживает «второе рождение» [9] - появляется большое количество различных типов алгоритмов расшифровки интерферограмм.

С изобретением когерентных источников света они стали широко использоваться в составе фазовых микроскопов. Однако, при всей легкости получения и настройки контрастной интерференционной картины, высокая пространственная и временная когерентность делает их не пригодными для проведения высокоточных измерений. Это обусловлено спекл-шумами, паразитной интерференцией и дифракцией.

С начала 2000-х годов наблюдается все большее использование низкокогерентных источников. В случае двухлучевой схемы для получения интерференционной картины требуется более тщательное выравнивание оптических длин путей предметного и опорного каналов. Поэтому, для таких источников более предпочтительными являются схемы с совмещенными ветвями.

Современная тенденция построения интерференционного микроскопа для исследования прозрачных фазовых объектов заключается в создании т.н. приставки [24], позволяющей преобразовать обычный световой микроскоп в фазовый. Такая приставка, как правило, устанавливается в выходной порт микроскопа, предназначенный для видеокамеры. В этом случае необходимо решить две задачи: создать опорный пучок из предметного и обеспечить запись интерферограмм с различным фазовым сдвигом, для того, чтобы в дальнейшем восстановить фазовое изображение. В случае, если удается обеспечить достаточное количество полос, то можно использовать пространственные методы реконструкции и по одной интерферограмме. Это направление в современной микроскопии называется количественная фазовая микроскопия (QPI - quantitative phase imaging).

Для этой цели могут быть использованы различные приемы. Один из них заключается в реализации преобразования Фурье аппаратным способом с помощью фурье-линзы и манипуляции с пространственным спектром интерферограммы. Это направление называется дифракционная фазовая

микроскопия (DPM - diffraction phase microscopy) [25]. В этом случае 4f используется оптическая система, которая представляет собой телескопическую систему, передняя фокальная плоскость которой совмещена с исходным изображением, задняя – с плоскостью матричного фотоприемника, совместного фокуса (фурье-плоскости) а В плоскости установлен пространственный фазовый модулятор. Ee использование позволяет пространственно разделить дифрагировавший (рассеянный объектом, предметный) и недифрагировавший (фоновый, опорный) пучки и осуществить сдвиг фазы последнего с помощью фазового модулятора. Сам модулятор может быть установлен на просвет (типа LCPM) [26] или отражение (типа TN-LC SLM) [27]. По сути это аналог фазово-контрастного метода Цернике с возможностью сдвига фазы опорного пучка (quantitative phase-contrast microscopy) [28, 29].

Другой вариант схемы, когда исходный пучок делится по амплитуде на получившихся пропускается два пучка, один ИЗ пучков через пространственный фильтр и из него формируется опорный пучок. Для деления пучка используются разные оптические элементы, такие как дифракционная решетка [25], светоделительный кубик [24, 30], призма Кёстреса [29]. Фильтрация излучения, позволяющая сформировать опорный пучок, может быть осуществлена, либо с помощью пространственного амплитудного модулятора, установленного на просвет [27], либо с помощью точечной диафрагмы на зеркале, установленной на отражение [28].

Это выявляет еще одну тенденцию, связанную со стремлением автоматизировать известные схемы интерференционных, фазо-контрастных и просто оптических микроскопов и сделать их не только средством визуального наблюдения, но и средством измерения. Это можно отнести и к сдвиговым микроскопам в частности дифференциально-интерференционного контраста, которые ранее использовались лишь для визуализации [31, 32].

Также одним из направления количественной фазовой микроскопии является цифровая голографическая микроскопия. В основе цифровых

голографических микроскопов лежат схемы Майкельсона или Маха-Цендера. Но в отличие от фазового микроскопа на матрицу фотоэлементов записывается не интерферограмма объекта, а его низкочастотная голограмма. Для получения фазовых изображений по голограммам используется преобразование Френеля [33]. Для улучшения качества реконструкции используется фильтрация пространственного спектра голограммы для уменьшения вклада нулевого и высокочастотных порядков дифракции. Этот метод похож на фурье-метод - для восстановления фазового изображения достаточно одной интерферограммы. Поэтому он применим для исследования динамических объектов. Его недостаток (также, как и у фурье-метода) – невысокая точность по сравнению с методом фазовых шагов.

Как было сказано, для получения высокой точности измерения фазового изображения необходимо обеспечить высокое качество интерференционных изображений. Для этого необходимо учитывать все влияющие факторы. Основными из них являются: когерентность источника и качество опорного волнового фронта, как правило, определяемого опорным зеркалом [11]. Поэтому, актуальной является задача исследования этих факторов.

Не редко отражающие фазовые объекты представляют собой сложные структуры, состоящие из различных материалов: микроэлектронные изделия, многослойные покрытия и др. При отражении от таких структур электромагнитное излучение будет приобретать дополнительный фазовый сдвиг (PCOR - phase change on reflection), зависящий от комплексного показателя преломления материалов [34]. Учет этого факта позволяет существенно повысить точность измерений.

Среди всех схем фазовых микроскопов наибольшей числовой апертурой и увеличением обладает схема Линника [23]. Поэтому, эта схема является наиболее предпочтительной для проведения высокоточных измерений. Особенностью данной схемы является то, что она позволяет работать с протяженным источником пространственно-некогерентного излучения, а, следовательно, обеспечивает высокое качество интерферограмм. Поэтому

вопрос формирования интерференционный картины в данном микроскопе является актуальным.

B связи c использованием низкокогерентных источников И автоматизированных методов новое значение в фазовой микроскопии приобретает схема сдвигового интерферометра с совмещенными ветвями. Она позволяет более простым способом получать интерференционную картину из уже прошедшего через объект (или отраженного от него) волнового фронта. Это достигается путем его деления по амплитуде на две волны и их интерференции с небольшим поперечным сдвигом. Получающееся в сдвиговом микроскопе фазовое изображение представляет собой разность двух смещенных на небольшую величину фазовых изображений, что, по сути, фильтрацию дифференцирующим фильтром. При представляет собой исследовании объектов, состоящих из различных мелких структур, возникает задача выбора поперечного сдвига, так чтобы информацию о них не была потеряна.

Фазовое изображение прозрачного объекта несет важную количественную информацию в интегральной форме И может быть измерения следующих параметров: использовано ДЛЯ плотности [1], концентрации [1], показателя преломления [35, 36]. С развитием нанотехнологий встала проблема измерения показателя преломления малоразмерных объектов: тонких пленок и малого количества вещества. Для определения высокомолекулярных весов по методу Дебая важным является измерение малых изменений показателя преломления растворов [52].

Важное применение находит фазовая микроскопия для биологических исследований. Это связано с тем, что данный метод позволяет проводить количественные измерения различных параметров живых клеток без их окрашивания. Фазовое изображение несет информацию о показателе преломления, морфометрических параметрах [37], величине двулучепреломления [38, 39] и массе сухих веществ клетки [40, 41].

Еще в 60-е годы была показана возможность использования фазового микроскопа для измерения массы сухих веществ внутри живой клетки в работах Barer [42, 43] и Devis и Wilkins [9]. Функциональная активность клетки определяется изменением ее параметров [44, 45], информация о которых может быть получена с помощью фазового микроскопа. Связь между белковыми структурами клетки и ее показателем преломления позволяет использовать фазовое изображение для диагностики ее функционального состояния. Поэтому использование метода фазовой микроскопии для количественного исследования прозрачных объектов, в том числе и биологических, имеет важное значение.

Метод фазовой микроскопии позволяет исследовать как одиночные живые клетки [46-49], так и их популяции [50]. Анализ параметров фазовых изображений, полученных для большого массива клеток, позволяет проводить диагностику состояния различных систем организма [50]. Корреляция между двумерным распределением ОРХ и функциональными параметрами живой клетки дает возможность анализа ее динамического состояния по ее фазовому изображению [19, 51].

Для прозрачного фазового объекта в эйкональном приближении при условии малого отличия показателя преломления окружающей среды и самого объекта можно пренебречь рефракцией света на нем и полагать, что его траектория является прямолинейной [1, 2]. Это позволяет применять томографические методы для измерения трехмерного распределения показателя преломления, являющегося локальным параметром [53]. В оптической томографии существуют методы реконструкции, учитывающие дифракцию и рефракцию электромагнитного излучения, однако, они не рассматриваются в этой диссертационной работе.

В терминах томографии фазовое изображение, полученное путем зондирования трехмерного объекта параллельным пучком, является двумерной параллельной проекцией, а конусным пучком – конусной двумерной проекцией. Для получения 3D пространственного распределения

показателя преломления необходимо восстановление по набору таких проекций, полученных под различными углами.

Это открывает уникальные возможности использования методов фазовой микроскопии совместно с методами вычислительной томографии для получения информации о внутренней структуре прозрачных объектов.

В настоящее время томографическая фазовая микроскопия бурно развивается и из лабораторного метода уже превращается в коммерческий продукт [54]. В этом случае микроскоп является томографом, назначение которого - регистрация проекций, полученных под разными зондирующими углами и восстановление томограмм.

Особенность томографической фазовой микроскопии заключается в решении нескольких важных задач:

1 Получение проекционных данных в максимально возможном угловом диапазоне (от 0 до 180 град), который ограничен числовой апертурой микрообъектива;

2 Восстановлении фазы волнового фронта, прошедшего через объект излучения, с максимальной точностью (т.к. решается некорректная задача томографической реконструкции);

3 Создание алгоритма реконструкции при ограниченном угле зондирования.

При исследовании динамических объектов необходимо решить еще две задачи:

1 Обеспечение максимального числа проекционных данных за малый период времени;

2 Разработка алгоритма реконструкции, позволяющего исследовать динамические объекты как целиком, так и в отдельных областях (локально).

Одной из главных задач при создании томографического микроскопа является создание системы сбора проекционных данных или системы зондирования встроенной в фазовый микроскоп [55].

В томографии зондирование исследуемого объекта может осуществлять либо набором параллельных лучей – параллельным пучком, либо набором лучей, пересекающихся в одной точке – коническим пучком. В одном случае проекции называются параллельными, а в другом – конические.

Существуют разные случаи зондирования:

- зондирование объекта вращающимся наклонным пучком;

- зондирование объекта путем наклона пучка;

- зондирование объекта путем его вращения или наклона относительно неподвижного пучка.

Более предпочтительным является первый и второй способы зондирования, т.к. объект неподвижен.

Создание наклонного пучка относительно неподвижного объекта может быть обеспечено за счет использования:

- вращения внеосевой точечной диафрагмы в передней фокальной плоскости микрообъектива [56];

- перемещение изображения точечного источника в передней фокальной плоскости микрообъектива за счет наклона гальванического зеркала [55, 57-64], использования матрицы микрозеркал DMD (Digital Micromirror Devices) [65], жидкокристаллического модулятора света, для генерации фазовой дифракционной решетки и ее поворот [66].

- линейки светодиодов, закрепленных на цилиндрической поверхности
 [67];

- управляемой от компьютера матрицы светодиодов [68];

- изменением длины волны зондирующего излучения в случае дифракционной томографии клеток [69, 70] (данный метод не учитывает дисперсию показателя преломления);

- перемещение точечного источника в плоскости апертурной диафрагмы микрообъектива [71-73].

Среди рассмотренных схем наиболее предпочтительны те из них, которые имеют двумерную траекторию зондирования. Однако, все указанные

схемы имеют один общий недостаток: угол зондирования ограничен числовой апертурой микрообъектива.

Для получения проекций объект может вращаться относительно зондирующего пучка. Известны следующие схемы: объект помещен во вращающийся капилляр [74-76], объект вращается с использованием микропипетки [77] и объект вращается с использованием оптического пинцета [78]. Такие схемы позволяют получать проекции в угловом диапазоне ±90°. Однако для правильного восстановления томограммы необходимо, чтобы при вращении объекта ось вращения проходила через этот объект. Если это условие не выполняется, то при вращении возникают биения и объект смещается в поперечном направлении и может выйти из фокуса микрообъектива. Для этого обеспечить аппаратные или программные необходимо средства ДЛЯ выравнивания микрообъекта относительно оси вращения и компенсирующие его смещение.

Как было сказано ранее, создание оптического томографа на базе микроскопа приводит к определенным ограничениями, связанным с процедурой получения проекций. Главное ограничение связано с уменьшением максимального угла зондирования (missing cone problem).

При использовании т.н. сухих микрообъективов с числовой апертурой менее 1 максимальный угол зондирования не превышает $\pm 45^{\circ}$. Т.е. в микроскопе практически невозможно обеспечить максимальный угол зондирования $\pm 90^{\circ}$, однако его можно приблизить к этому значению путем применения иммерсионных микрообъективов с числовой апертурой более 1.

Следующая важная задача томографический фазовой микроскопии - это получение количественных фазовых изображений (проекций) высокого качества с малыми фазовыми шумами. Так как томография относится к классу обратных задач, которые являются некорректными, то уровень шумов имеет очень важное значение. Томографические фазовые микроскопы, использующие когерентное лазерное излучение [57-64, 75-78], не обладают достаточной точностью проекционных данных и, как следствие, получаемых

томограмм. Исключение составляют работы [67, 68], в которых используется низкокогерентное светодиодное излучение. Однако такие безлинзовые томографы имеют низкое пространственное разрешение около 1 мкм, но при большом поле зрения.

Использование низкокогерентного источника составе В томографического микроскопа позволяет получать качественные проекционные данные и, следовательно, обеспечивает хорошее качество томограмм. Однако сканирование пучком относительно неподвижного объекта зачастую приводит к изменению оптических длин путей опорного и предметного каналов, а также к снижению контраста интерференционной картины. В связи с этим, актуальной задачей является разработка оптической томографического фазового микроскопа, работающей схемы В низкокогерентном свете.

Микроскопы общего пути [26, 79-80], где опорный пучок формируется путем пространственной фильтрации излучения в частотной плоскости 4f оптической системы с помощью точечной диафрагмы не пригодны для томографии, так как при изменении угла освещения пучок будет выходить из диафрагмы. Одним из решений данной проблемы является использование сдвигового интерферометра [25, 81-84]. Получающиеся после реконструкции фазы проекции представляют собой производную от фазового изображения по направлению сдвига и называются дифференциальными проекциями.

В современной вычислительной томографии используются следующие методы восстановления по проекциям [53]:

- использующие формулы интегральной геометрии;
- алгебраические;
- использующие преобразование Фурье;
- локальные.

В работе [55] показано, что в том случае, когда угол зондирования ограничен наиболее подходящими для восстановления томограмм являются

алгебраические и фурье-методы дополнительно использующие итерационные процедуры.

Так как при ограниченном угле зондирования увеличивается погрешность восстановления, то особенные требования предъявляются к траектории получения проекций [85]. Для выяснения вопроса выбора траектории в этой работе были проведены численные эксперименты с реконструкцией модели клетки. Для восстановления томограмм были использованы следующие методы: алгебраический метод (ART - Algebraic Reconstruction Technique) и комбинированный метод (cART – combine Algebraic Reconstruction Technique), представляющий собой комбинацию алгебраических и фурье-методов. Областью реконструкции являлся шар с единичным радиусом. Численное моделирование показало, что погрешность восстановления томограммы при угле зондирования менее 180 град зависит от траектории сканирования. Если эта траектория лежит в плоскости, а получаемые проекции лежат в углах квадратной сетки, то погрешность восстановления будет минимальной.

Особенные требования предъявляются к томографии динамических объектов. Появление быстрых камер позволяет производить захват большого числа интерферограмм, достаточного для получения нужной точности восстановления фазы.

Новые возможности томографического исследования открывают методы локальной томографии или ROI (Region Of Interest) томографии [86]. Этот вид томографии позволяет независимо и быстро без осуществления полного восстановления производить вычисления распределения искомой величины локально - в интересующей точке или же области. Это позволяет использовать ее для исследования динамических объектов. Особенный интерес представляет исследование этого вида реконструкции применительно к дифференциальным проекциям, получаемым с помощью томографического микроскопа на основе сдвигового интерферометра с низкокогерентным источником.

Поэтому разработка и исследование методов фазовой микротомографии по проекциям, полученным в параллельных и конусных пучках, а также исследование реконструкции по дифференциальным проекциям, в том числе с использованием локальных методов является актуальной задачей.

Важным применением методов фазовой микроскопии является исследование формы поверхности и шероховатости отражающих объектов. Современные технологии позволяют изготавливать оптические поверхности с шероховатостью около 1Å [87] и структуры, состоящие из моноатомных слоев кремния высотой 3,14 Å [88].

В современных фазовых микроскопах для исследования отражающих фазовых объектов в основном используются двулучевые интерферометры по схеме Майкельсона и Миро, конструктивно объединенные в один узел с микрообъективом, т.н. интерференционные объективы. Микрообъектив по схеме Майкельсона используется для исследования больших объектов (около мм), так как имеет самое низкое увеличение (до 5х) при числовой апертуре 0,2. Микрообъектив, но схема Миро обеспечивают среднее и большое увеличение от 10х до 100х при числовой апертуре от 0,25 до 0,55. Все крупные производители микроскопов выпускают такие микрообъективы [89, 90]. Их основное достоинство в малогабаритности, однако, из-за конструктивных большую особенностей невозможно получить числовую апертуру. В современном автоматизированном интерференционном микроскопе, как правило, используется набор таких микрообъективов.

Особо следует отметить схему Линника [23]. Она является частным случаем интерферометра Майкельсона, в котором используются два идентичных микрообъектива в опорном и предметном каналах. Так как в данной схеме можно использовать любые одинаковые микрообъективы, то данная схема может обеспечить любое увеличение и числовую апертуру. Ее недостаток в том, что микрообъективы должны быть идентичны – иметь одинаковое фокусное расстояние (с погрешностью не более 2%) [91].

Одной ИЗ проблем автоматизированной фазовой микроскопии, ограничивающей ее применение для исследования ступенчатых отражающих объектов, высотой более $\lambda/4$ или прозрачных объектов с резким изменением показателя преломления, обуславливающего изменение фазы более чем на π $(\lambda/2)$, связана с возникающими при реконструкции разрывами [10, 11]. Это обусловлено тем, что при расчете фазы используется функция арктангенс определенная в интервале $[-\pi/2; \pi/2]$. Используя знаки синуса и косинуса полученной фазы, можно однозначно определить ее значение в интервале $[-\pi;$ π] для функции арктангенса. При этом если фазовые искажения оказываются более чем 2π , то это приводит к т.н. разрывам. И поэтому следующим этапом в обработке результатов измерений является процедура устранения данных разрывов которая называется разворачивание или «сшивка» фазы: добавление к каждому элементу полученного фазового распределения $\pm 2\pi n$ где n – целое число. Главная проблема этой операции состоит в выборе п для конкретной точки. Существуют различные подходы для решения этой проблемы [10, 11].

Одним из возможных путей решения проблемы измерения объектов выше $\lambda/4$ является использование т.н. двухволнового метода, когда измерения фазы осуществляется на двух близких длинах волн [10]. Разность двух таких измерений эквивалентна фазе, полученной на длине волны $\lambda_{3кB}$ равной отношению произведения двух длин волн на их разность. Для получения максимального значения этой величины, длины волн должны быть близки.

Некоторым прорывом в области фазовой микроскопии, позволяющим решить проблему «сшивки» и использовать фазовый микроскоп для измерения параметров «высоких» объектов является т.н. сканирующая интерференционная микроскопия «белого света» (WLSI - white light scanning interferometry, CSI – coherent scanning interferometry) [92, 93]. В ее основе лежит интерференция с использованием источника с широким спектральным диапазоном – источника «белого света». Широкий спектральный диапазон обуславливает малую длину когерентности, поэтому максимальный контраст

полос получается в том случае, когда ОРХ между предметным и опорным каналом близка к нулю. При сканировании интерферометра относительно неподвижного объекта изменяется оптическая длина пути в предметном канале и записывается набор интерферограмм, из которого потом по максимуму огибающей интенсивности определяются высота объекта в каждой точке. Это т.н. «когерентная» информация о профиле, не имеющая разрывов, однако ее точность ограничена длиной когерентности источника излучения. Для повышения точности измерений в интерферометре белого света вместе с когерентной информацией используется информация о высоте, получаемая с помощью методов фазового сдвига. Их совместное использование позволяет обеспечивать высокую точность измерения в широком диапазоне высоты. Недостатком интерферометра белого света является наличие пьезопривода, который должен быть правильно откалиброван, для этого используется дополнительный пьезорезистивный или емкостной датчик перемещения, а также необходимо учитывать и компенсировать дисперсию, на оптических элементах, приводящую к сдвигу максимума огибающей [92].

Другое применение фазовой микроскопии связано с измерением статистических и динамических перемещений на плоскости, которое в настоящее время представляет собой большой интерес в различных областях науки И техники, например, для контроля параметров изделий микроэлектроники в процессе их производства, в материаловедении и фотонике, и так далее. При этом величины перемещений зачастую составляют десятки и единицы нанометров. Существуют разные методы измерения таких перемещений, наиболее малых известными ИЗ которых являются микроскопия, сканирующая электронная атомно-силовая микроскопия, ёмкостной метод и оптические методы.

Высокое аксиальное разрешение фазовых изображений, получаемых с помощью фазового микроскопа, позволяет использовать их для определения таких перемещений. Поэтому интерес также представляет исследование метода фазовой микроскопии для определения наноперемещений [94].

Цель работы

Разработка и исследование методов и аппаратуры для фазовой микроскопии и томографии, использующих низкокогерентное оптическое излучение, для прецизионных измерений интегральных и локальных параметров трехмерных фазовых объектов.

Цель предопределила задачи, решаемые в диссертационной работе:

- анализ методов реконструкции фазовых изображений по интерферограммам;

 исследование метода фазовых шагов и разработка метода измерения фазового сдвига между интерферограммами на основе спектрального анализа разностных интерферограмм;

- анализ влияния элементов оптической системы микроскопа на формирование фазового изображения;

- исследование прозрачных объектов методами низкокогерентной фазовой микроскопии;

- разработка методов и аппаратуры томографической фазовой микроскопии;

- разработка методов и аппаратуры томографической фазовой микроскопии по дифференциальным проекциям;

- исследование отражающих объектов методами низкокогерентной фазовой микроскопии;

- разработка параметрического ряда автоматизированных фазовых микроскопов в низкокогерентном свете.

Научная новизна работы

 Впервые проведено численное моделирование метода фазовых шагов с фиксированным фазовым сдвигом, которое установило его предельные возможности.

2. Впервые проведен спектральный анализ и численное моделирование метода вычисления фазового сдвига между интерферограмами по разности между ними, что позволило определить ограничения метода и предложить пути повышения точности вычисления фазовых сдвигов.

3. Впервые был разработан и экспериментально опробован метод динамической фазовой микроскопии на основе метода фазовых шагов с предварительным определением сдвига между интерферограммами и устройство его реализующее, позволяющий получать фазового изображения динамического фазового объекта с частотой до 30 Гц.

4. Впервые предложен и экспериментально исследован двухиммерсионный метод измерения показателя преломления нанообъемов жидкостей с использованием автоматизированного фазового микроскопа.

5. Впервые проанализирована погрешность измерения массы сухого вещества клетки на фазовом микроскопе и влияющие на нее параметры.

6. Впервые предложен и экспериментально опробован метод DIC томографии, позволяющий получать дифференциальные проекции в параллельных пучках и реконструировать по ним DIC томограммы.

7. Впервые предложен и экспериментально опробован метод реконструкции томограмм с использованием локальных алгоритмов, позволяющий исследовать прозрачные динамические фазовые объекты.

8. Впервые продемонстрирована возможность использования фазового микроскопа для измерения наноперемещений объектов.

Практическая ценность и использование результатов работы

Алгоритмы получения фазовых изображений, методы измерения интегральных и локальных параметров статических и динамических фазовых объектов, а также фазовые микроскопы их реализующие, использованы во ФГУП «ВНИИОФИ», ФГУП «ВНИИМС», Центре Аналитической Микроскопии (Пущино), Московском Областном Научно-Исследовательском

Институте им. Владимирского (МОНИКИ), на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ РЛ МГТУ им. Н.Э. Баумана, и ООО «ВЕСТТРЭЙД ЛТД». Методы и принципы, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы для создания фазовых микроскопов и томографических фазовых микроскопов, а также для модернизации имеющихся интерференционных микроскопов.

Апробация работы, публикации

Основные материалы, представленные в диссертации, были доложены на:

- «Научной сессии МИФИ 2003», 2003 г.;

- 7-ой международной научно-технической конференции «Оптические методы исследования потоков», 2003 г.;

- «Научной сессии МИФИ 2004», 2004 г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2004г.;

- International Conference and Exhibition MicroScience-2004, 2004 г.;

- 15-ой научно-технической конференции «Фотометрия и ее метрологическое обеспечение», 2005 г.;

- 9-ой международной научно-технической конференции «Оптические методы исследования потоков», 2005 г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2005г.

- International Conference «Focus on Microscopy», 2007 г.;

- 16-ой научно-технической конференции «Фотометрия и ее метрологическое обеспечение», 2006 г.;

- Международном форуме по нанотехнологиям Rusnanotech'08, 2008 г.

- 18-ой научно-технической конференции «Фотометрия и ее метрологическое обеспечение», 2009 г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2009г.;

- Международном форуме по нанотехнологиям Rusnanotech, 2009 г.;

- The IASTED International Conference on Automation, Control and Information Technology, 2010 г.;

- Конференция «Цитоморфометрия-2010», 2010 г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2010г.;

- Международном форуме по нанотехнологиям Rusnanotech, 2010 г.;

- «Научной сессии НИЯУ МИФИ 2011», 2011 г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2012г.;

- Научно-практической конференции «Голография в России и за рубежом. Наука и практика», 2013г.;

- Первая Всероссийская научно-техническая конференция «Метрология в нанотехнологиях», 2014 г.;

- «Focus on Microscopy», 2015 г.;

- SPIE «Advanced Microscopy Techniques IV; and Neurophotonics II», 2015 г.;

- V съезд биофизиков России, 2015 г.;

- 12-ая Международная научно-практическая конференция «Голография. Наука и практика», 2015 г.;

- 13-ая Международная научно-практическая конференция «Голография. Наука и практика», 2016 г.;

- 14-ая Международная научно-практическая конференция «Голография. Наука и практика», 2017 г.

- 15-ая Международная научно-практическая конференция «Голография. Наука и практика», 2018 г.

По теме диссертации опубликовано 75 научных работ, в том числе 36 тезисов докладов на отечественных и зарубежных научно – технических

конференциях, 34 стати в журналах «Optics Letters» (США), «Applied Optics» (США), «Microscopy and Analysis» (Англия), «Оптика и спектроскопия», «Приборы и техника эксперимента», «Автометрия», «Измерительная техника», «Метрология», «Оптический журнал» и «Оптико-электронные измерения. Сборник статей», 1 патент на полезную модель, 4 свидетельства о госрегистрации программ для ЭВМ.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы и приложения.

Общий объем составляет 284 страницы печатного текста, в том числе 91 рисунок, 17 таблиц, 26 страниц списка литературы.

Основные положения, выносимые на защиту

1 Предельное значение среднего квадратического отклонения от плоскости, которое достигается при реконструкции фазы из интерферограмм методом фазовых шагов по алгоритму Харихарана-Швайдера с фиксированным фазовым сдвигом, равным $\pi/2$, по 9-ти интерферограммам, полученным на длине волны λ , с динамическим диапазоном 235 градаций, в отсутствии шумов, составляет не более $\lambda/5000$.

2 Вычисление фазовых сдвигов по дисперсии от разности между тремя интерферограммами и их аподизация в пространственной области позволяет уменьшить относительную погрешность вычисления фазового сдвига до 0,06%.

3 Β микроскопе Линника с монохроматическим протяженным пространственно-некогерентным источником света формируемое ИМ изображение представляет собой сумму интерферограмм, образуемых точечными источниками, контрастная интерференционная a картина наблюдается в плоскости изображения предметного и опорного зеркал.

4 Фазовый микроскоп с монохроматическим пространственнонекогерентным источником света, в котором при осуществлении фазового сдвига плоскость опорного зеркала остается оптически сопряженной с плоскостью регистратора, позволяет измерять высоту исследуемого объекта с аксиальным разрешением 0,25 нм.

5 Использование дифференциальных проекций, получаемых в сдвиговом томографическом микроскопе, при сдвиге в направлении, ортогональном плоскости зондирования, позволяет реконструировать томограммы с использованием инверсного преобразования Радона.

6 Использование дифференциальных проекций, получаемых в сдвиговом томографическом микроскопе, при сдвиге в направлении, параллельном плоскости зондирования, позволяет реконструировать томограммы с использованием локальных алгоритмов реконструкции.

Глава 1. Методы реконструкции фазового распределения

1.1 Фазовые объекты, как объекты исследования в микроскопии

В обычном оптическом микроскопе фазовые объекты имеют низкий контраст, так как глаз или фотоприемник реагируют только на амплитуду поля. Поэтому для их наблюдения используют различные методы увеличения контраста. Самым простым методом является использование красителей. Окрашивание позволяет изменять коэффициент поглощения на определенных длинах волн и способность к флуоресценции объекта путем введения в него различных красителей или флуорофоров. При этом поступающие в объект красящие вещества селективно распределяются внутри объекта и тем самым определяют модуляцию амплитудной составляющей проходящего через него электромагнитного поля в зависимости от его внутренней структуры. Однако, поступление посторонних веществ может приводить к искажению результатов измерений. Особенно если объектом исследования является живая клетка, то введение красителей могут привести к нарушению ее структурных и функциональных характеристик. Поэтому такой способ контрастирования не удовлетворяет требованиям неинвазивности, что является важным для исследования живых клеток.

Однако для визуализации прозрачных и слабоконтрастных объектов разработаны различные виды контрастирования, основанные на использовании оптических свойств исследуемых объектов [8].

Они позволяют усилить контраст прозрачных объектов при их визуальном исследовании. Однако для фазовых объектов требуется не просто наблюдать и проводить визуальную оценку их характеристик, но осуществлять измерение количественных характеристик как локальных, так и интегральных с высокой точностью и в динамике.

Как было уже сказано, главной особенностью фазового объекта является его способность изменять фазу. Сдвиг фазы электромагнитного излучения $\phi(x,y)$, вносимого исследуемым трехмерным объектом, может быть измерен интерференционным методом. Так как это двумерное распределение тем или

иным образом «изображает» фазовый объект, то оно носит название фазового изображения.

При этом для прозрачных объектов оно связано с двумерным распределением оптической разности хода (OPX) Δ(x,y) [96]:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta(x, y), \qquad (1.1)$$

где *λ* – длина волны света.

В эйкональном приближении [1] Δ (x,y) можно записать в следующем виде:

$$\Delta(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \int_{z=0}^{z=h(\mathbf{x}, \mathbf{y})} (n(\mathbf{x}, \mathbf{y}, z) - n_0) dz, \qquad (1.2)$$

где n(x,y,z) – функция пространственного распределения показателя преломления исследуемого объекта, n_0 – показатель преломления окружающей (иммерсионной) среды, h(x,y) – геометрическая длина пути световой волны. Как правило, иммерсионная среда однородна и имеет показатель преломления n_0 =const.

Для отражающего фазового объекта его фазовое изображение связано с топограммой поверхности h(x,y) соотношением:

$$\varphi(x, y) = \frac{4\pi}{\lambda} h(x, y) . \tag{1.3}$$

В частных случаях, в зависимости от вида пространственного распределения показателя преломления прозрачные фазовые объекты подразделяются на трехмерные, осесимметричные и двумерные.

При постоянстве показателя преломления вдоль оси z и одинаковой геометрической длине h вдоль этой оси, фазовый объект представляет собой плоский или двумерный объект:

$$n(x,y,z) = n(x,y),$$
 (1.4)

а функция $\Delta(x,y)$, преобразуется к виду:

$$\Delta(\mathbf{x},\mathbf{y}) = \Delta \mathbf{n}(\mathbf{x},\mathbf{y}) \mathbf{h}.$$
 (1.5)

Частным случаем является случай независимости показателя преломления от координат, т.е. его постоянство:

$$n(x, y, z) = n = const.$$
(1.6)

В этом случае функция $\Delta(x,y)$ имеет вид:

$$\Delta(x,y) = \Delta n \ h(x,y), \tag{1.7}$$

т.е. определяется функцией геометрической длины h(x,y) объекта вдоль оси z. Для этого случая фазовое изображение объекта передает его топологию.

Таким образом, исходным измеряемым параметром фазового объекта в фазовой микроскопии является фазовое изображение. Для отражающего фазового объекта она связана с его высотой (топологией), а для прозрачного фазового объекта это интегральная величина, связанная с трехмерных распределения показателя преломления вдоль направления проходящего через него света.

В терминах томографии, если фазовое изображение получено в параллельном пучке, то оно называется параллельной проекцией, а в конусном пучке – конусной проекцией.

В случае зондирования объекта в направлении (θ, ϕ) к оси z, проекция может быть записана следующим образом:

$$\varphi(x, y; \theta, \phi) = \frac{2\pi}{\lambda} \int \left(n(x - z \cdot tg\theta \cdot \sin\phi, y - z \cdot tg\theta \cdot \cos\phi, z) - n_0 \right) dz. \quad (1.8)$$

Для получения пространственного трехмерного распределения показателя преломления n(x,y,z), необходимо восстановление по набору таких проекций, полученных под различными углами с помощью методов вычислительной томографии.

Таким образом, фазовое изображение несет количественную информацию об отражающих и прозрачных фазовых объектах и может быть использовано для определения их интегральных и локальных параметров [95].

Информация о фазовом изображении содержится в интерферограммах, поэтому для получения фазовых изображений необходимо использовать

методы вычисления фазы волнового фронта из интерферограмм или методы расшифровки интерферограмм. Далее рассмотрим эти методы.

1.2 Классификация методов вычисления фазы волнового фронта

Методы вычисления фазы волнового фронта, основанные на анализе интерферограмм, принято разделять на пространственные (spatial) и временные (temporal) см. рис. 1.1.



Рисунок 1.1 – Классификация методов вычисления фазы волнового фронта.

1.3 Пространственные методы реконструкции фазы волнового фронта 1.3.1 Метод скелетизации

Метод скелетизации основан на анализе интерферограммы в пространственной области. Частным случаем этого метода является обработка интерферограмм путем анализа искривления полос в отдельных точках. Обычно такая обработка производится оператором вручную. Зная длину волны излучения (λ), период интерференционных полос (p) и величину искривления полос (d), находят фазовые (ϕ) или пространственные искажения (l) объекта в отдельных точках:
$$\varphi = \frac{\mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\pi} \cdot \mathbf{d}}{\mathbf{p}},\tag{1.9}$$

$$1 = \frac{\lambda \cdot d}{k \cdot p}, \qquad (1.10)$$

где k – коэффициент, зависящий от используемой оптической схемы (объекта исследования): k=1 для схемы на отражение (отражающий объект), k=2 для схемы на просвет (прозрачный объект).

В интерференционном микроскопе МИИ-4М для этой цели используется окуляр-микрометр. Погрешность измерения при такой ручной обработке составляет не менее $\lambda/10$.

Другой разновидностью этого метода является метод оценки искажений с помощью ПЭВМ. Для этого необходимо зарегистрировать статическое изображение интерферограммы, найти интерференционные максимумы и передать их координаты в компьютер. Ранее это делалось с помощью денситометра или графического планшета с помощью перфокарты, потом появилась возможность непосредственно подключать эти устройства к компьютеру. В настоящее время для этого используется видеокамера, подключаемая к ПЭВМ. Для анализа данные необходимо привести к сетке с постоянным шагом, обычно это делается с помощью полиномиальной аппроксимации. На сегодняшний день методики, использующие для вычисления фазы волнового фронта только положение интерференционных максимумов, являются сильно устаревшими.

1.3.2 Метод с использованием преобразования Фурье

Большую точность вычислений можно достичь, используя преобразования пространственного спектра интерферограммы. Рассмотрим кратко алгоритм, лежащий в основе реконструкции фазы волнового фронта на основе преобразования Фурье [97, 11].

В одномерном случае, при интерференции двух пучков: предметного и опорного возникает интерферограмма, которая описывается следующим соотношением:

$$I(x) = I_1(x) + I_2(x) + 2\sqrt{I_1(x) \cdot I_2(x)} \cdot \cos(\omega_0 x + \varphi(x)), \qquad (1.11)$$

где $I_1(x)$ $I_2(x)$ -интенсивности предметного и опорного пучков, ω_0 – пространственная частота интерференционных полос, $\varphi(x) = \varphi_0(x) + \varphi_1(x)$ – суммарный фазовый набег, связанный с фазовыми искажениями оптической системы $\varphi_0(x)$ и фазовым набегом на исследуемом объекте $\varphi_1(x)$, являющейся искомой величиной.

Положим $a(x)=I_1(x)+I_2(x), b(x)=2\sqrt{I_1(x)\cdot I_2(x)}$ и представим (1.11) в виде (1.12)

$$I(x) = a(x) + b(x) \cdot \cos(\omega_0 x + \varphi(x)). \tag{1.12}$$

Представляя функцию косинус в показательном виде получаем:

$$I(x) = a(x) + c(x) \cdot e^{i\omega_0 x} + c^*(x) \cdot e^{-i\omega_0 x},$$
(1.13)
где $c(x) = \frac{1}{2}b(x) \cdot e^{i\varphi(x)}$ и $c^*(x) = \frac{1}{2}b(x) \cdot e^{-i\varphi(x)}.$

Применяя к выражению (1.13) прямое фурье-преобразование и учитывая свойство сдвига получаем:

$$F[I(x)] = A(\omega) + C(\omega - \omega_0) + C^*(-\omega - \omega_0)$$
(1.14)

Таким образом, фурье-преобразование дает возможность пространственно разделить компоненты, входящие в уравнение интерферограммы.

Далее производится фильтрация полосовым фильтром и выделение +1 или -1 порядка $C(\omega - \omega_0)$ ($C^*(-\omega - \omega_0)$). Для этой цели обычно используются различные фильтрующие окна с аподизацией. Качество фильтрации во многом зависит от частоты полос (несущей) ω_0 , чем она больше, тем больше разойдутся порядки, и фильтр не будет воздействовать на другие порядки. После фильтрации производится обратное фурье-преобразование (1.15)

$$F^{-1}[C(\omega - \omega_0)] = D(x) = \frac{1}{2}b(x) \cdot e^{i\varphi(x)} \cdot e^{i2\pi g_0 x}.$$
(1.15)

Назовем интерферограмму без объекта интерферограммой базовой плоскости. Очевидно, что ее уравнение имеет вид аналогичный (1.11), но отличающийся лишь наличием компонента $\phi_0(x)$, связанного с фазовыми искажениями оптической системы:

$$I_0(x) = a(x) + b(x) \cdot \cos(\omega_0 x + \varphi_0(x)).$$
(1.16)

После осуществления действий аналогичных (1.13) - (1.15) над интерферограммой базовой плоскости получаем:

$$D'(x) = \frac{1}{2}b(x) \cdot e^{i\varphi_0(x)} \cdot e^{i\varphi_0 x} .$$
(1.17)

Далее (1.18) с учетом того, что $\phi(x)=\phi_0(x)+\phi_1(x)$ получаем

$$Arg\left(\frac{D(x)}{D'(x)}\right) = Arg\left(\frac{\frac{1}{2}b(x) \cdot e^{i\varphi(x)} \cdot e^{i2\pi g_0 x}}{\frac{1}{2}b(x) \cdot e^{i\varphi_0(x)} \cdot e^{i2\pi g_0 x}}\right) = Arg\left(e^{i\varphi_1}\right) = \varphi_1(x).$$
(1.18)

Вид функции (1.18) зависит от величины искривления интерференционных полос. Если искривление полос будет больше чем 2π , то функция (1.18) будет содержать разрывы в интервале [$-\pi$; π]. Для ее восстановления необходима т.н. операция разворота (сшивки) фазы. Алгоритм разворота заключается в добавлении к полученному фазовому распределению $+2\pi$ или -2π в зависимости от формы поверхности, определяемой ее градиентами.

Достоинством описанного метода (как и всех пространственных методов вообще) является возможность получения информации по одной интерферограмме, что имеет преимущество при измерениях динамически Однако изменяющегося объекта. необходимость фильтрации пространственного спектра предъявляет некоторые требования к интерферограмме и объекту: интерферограмма должна содержать такое количество полос, чтобы +1-ый и -1-ый порядки в фурье-спектре не перекрывались с 0-ым порядком. Сам объект не должен содержать резких

краев (высоких пространственных частот), в противном случае, после фильтрации они будут сглажены. Необходимость наличия достаточного числа полос на интерферограмме делает невозможным использование данного метода при реконструкции фазы в схемах интерферометров, работающих на т.н. «нулевой» полосе, например, в тех схемах, где используется низкокогерентное излучение.

1.3.3 Метод с использование преобразования Гильберта

Другой альтернативный подход, использующий одну интерферограмму для вычисления фазового распределения, состоит в применении преобразования Гильберта [98]. Преобразование Гильберта – это специальный линейный оператор, который осуществляет преобразование реальной функции g(t) в реальную функцию HT(g(t)) путем свертки с $1/(\pi t)$.

$$HT(g(t)) = g(t) * \frac{1}{\pi t}$$
 (1.19)

В частотной области преобразование Гильберта записывается как

$$F[HT(g(t))] = G(\omega) \cdot F\left[\frac{1}{\pi t}\right] = G(\omega) \cdot H(\omega), \qquad (1.20)$$

$$\Gamma \exists e^{-i \cdot sgn(\omega)} = \begin{cases} -i = e^{-i\frac{\pi}{2}}, \omega > 0\\ 0, \quad \omega = 0\\ i = e^{i\frac{\pi}{2}}, \omega < 0 \end{cases}$$

Из (1.20) видно, что преобразование Гильберта приводит к занулению постоянной составляющей сигнала, а также к повороту на $\pi/2$ отрицательных и на $-\pi/2$ положительных частот сигнала.

Для интерференционного сигнала вида (1.12) это преобразование даст следующий результат

$$HT(I(x)) = b(x) \cdot \sin(\omega_0 x + \varphi(x)). \tag{1.21}$$

Далее, удалив постоянную составляющую из исходного сигнала, разделив его на полученное значение и применив функцию арктангенс, получается искомое фазовое распределение

$$\varphi(x) - \omega_0 x = \operatorname{arctg}\left(\frac{HT(I(x))}{b(x) \cdot \cos(\omega_0 x + \varphi(x))}\right).$$
(1.22)

Для удаления составляющей $\omega_0 x$, можно использовать метод наименьших квадратов.

Преобразование Гильберта не требует фильтрации порядков, поэтому данный метод лучше передает пространственные частоты [98].

В работе [98] дополнительно предлагается применять преобразование Гильберта несколько раз и, таким образом, получить набор из четырех интерферограмм, по которым можно восстановить фазовое распределение методом фазовых шагов.

1.4 Временные методы реконструкции фазы волнового фронта (методы фазовых шагов)

Временные методы заключаются в обработке серии интерферограмм, полученных при различных фазовых сдвигах между интерферирующими световыми волнами. Распределение фазы волны связано с интенсивностью зарегистрированных изображений. Разность фаз между двумя интерферирующими волнами может быть вычислена по трем или более интерферограммам снятым при различных фазовых сдвигах. Эта методика получила название метод фазовых шагов (МФШ или PSI - phase-shifting interferometry).

Концепции МФШ уже давно использовались в радиоэлектронике для измерения разности фаз между двумя сигналами (см. синхронное детектирование). В 1960-х годах многие исследователи стали использовать МФШ. Первая работа по этой теме была опубликована в 1966 г. [99]. Методика развивалась за рубежом в 1960-х и 1970-х годах, однако, публикаций по этой теме было мало из-за того, что большинство работ было связано либо с

оборонными проектами, либо с закрытыми проектами различных компаний. Тема стала более популярной в 1980-х годах, когда появились высококачественные ПЗС-камеры и небольшие, но достаточно мощные компьютеры. В настоящее время МФШ является одним из основных методов обработки интерферометрических данных.

Далее рассмотрим основные положения МФШ, различные применяемые алгоритмы, источники ошибок, а также фазосдвигающие устройства.

1.4.1 Двухволновая интерференция и 4-х шаговый алгоритм

Интерференция двух световых волн описывается следующим выражением: $I(x, y) = I_A + I_B Cos(\theta(x, y))$ или $I(x, y) = I_{avg} (1 + \gamma Cos(\theta(x, y)))$.

Пусть фаза $\theta(x, y)$ представляет из себя сумму постоянной величины δ и функции координат $\varphi(x, y)$. Теперь интенсивность может быть переписана в виде:

$$I(x, y, \delta) = I_{avg} \left(1 + \gamma \ Cos(\varphi(x, y) + \delta) \right).$$
(1.23)

Преобразовывая выражение (1.23) по известной тригонометрической формуле для косинуса суммы получаем

$$I(x, y, \delta) = I_{avg} + \gamma I_{avg} Cos \delta Cos(\varphi(x, y)) - \gamma I_{avg} Sin \delta Sin(\varphi(x, y))$$
(1.24)

Обозначив

$$\begin{aligned} a_0 &= I_{avg} ,\\ a_1 &= I_{avg} \ \gamma \ Cos(\varphi(x, y)),\\ a_2 &= -I_{avg} \ \gamma \ Sin(\varphi(x, y)), \end{aligned}$$

мы теперь можем написать

$$I = a_0 + a_1 \cos\delta + a_2 \sin\delta \tag{1.25}$$

Важно отметить, что

$$tg\varphi = -\frac{a_2}{a_1} \tag{1.26}$$

И

$$\gamma = \frac{\sqrt{a_1^2 + a_2^2}}{a_0}.$$
 (1.27)

Выражения (1.25) и (1.26) наиболее часто используются в МФШ.

Важно отметить, что мы однозначно определили не только тангенс фазы, но и значения её синуса и косинуса. Это означает, что мы знаем в каком квадранте находится фаза, т.е. она однозначно определена в интервале от $-\pi$ до π . Как будет показано ниже, если значения фазы в соседних точках отличаются не более чем на π , то мы сможем восстановить («сшить») значения фазы с помощью коррекции на 2π (устранение неопределенности вызванной периодичностью тангенса).

Суть МФШ проще всего объяснить на примере т. н. 4-х шагового алгоритма. В дальнейшем мы будем использовать для интенсивности выражение (1.27), однако, в этом случае удобнее воспользоваться выражением (1.24).

Пусть постоянная составляющая фазы δ имеет четыре значения: $\delta_1 = 0; \ \delta_2 = \frac{\pi}{2}; \ \delta_3 = \pi; \ \delta_4 = \frac{3\pi}{2}.$

Для каждого из них вычислим интенсивность:

$$I_{1} = I(x, y, \delta_{1}) = I_{avg} (1 + \gamma \ Cos \varphi),$$

$$I_{2} = I(x, y, \delta_{2}) = I_{avg} (1 - \gamma \ Sin \varphi),$$

$$I_{3} = I(x, y, \delta_{3}) = I_{avg} (1 - \gamma \ Cos \varphi),$$

$$I_{4} = I(x, y, \delta_{4}) = I_{avg} (1 + \gamma \ Sin \varphi).$$

Можно легко проверить, что

$$tg\varphi = \frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}.$$
 (1.28)

Учитывая, что вычисления производятся для каждой точки мы видим, что благодаря вычитанию интенсивностей в числителе и знаменателе устраняется любой шум с постоянной во времени измерения структурой. Благодаря делению устраняется влияние колебаний чувствительности регистратора и изменения интенсивности, что в результате улучшает отношение сигнал-шум.

1.4.2 Дискретное и непрерывное изменение фазы

В приведенном выше алгоритме разность фаз должна изменяться дискретными шагами (phase stepping). Из практических соображений обычно лучше изменять фазу непрерывно с постоянной скоростью (phase shifting). Это связано с тем, что при скачкообразном изменении фазы приходится делать паузу после каждого сдвига, чтобы дождаться окончания колебательного переходного процесса в фазосдвигающем устройстве, так и в управляющей электронной системе. Во многих исследовательских задачах эта задержка крайне нежелательна, так как интерферограммы нужно захватить как можно быстрее во избежание влияния внешних условий. В методе непрерывного фазового сдвига (phase-shift or integrated bucket technique) [100] разность фаз меняется линейно во времени, ниже будет показано, что это приведет лишь к контраста изображения, незначительному ухудшению вызванному изменением фазы во время регистрации изображения.

Пусть Δ это время регистрации изображения, тогда регистрируемый сигнал может быть записан как

$$s = \frac{1}{\Delta} \int_{\delta_n - \Delta/2}^{\delta_n + \Delta/2} (1 + \gamma \ Cos(\varphi(x, y) + \delta))) d\delta$$
(1.29)

Вычислим интеграл и преобразуем полученное выражение:

$$s = I_{avg} \left(1 + \frac{\gamma \ Cos(\delta_n + \varphi(x, y)) \ Sin(\Delta/2)}{\Delta} \right) = I_{avg} \left(1 + \gamma \ Cos(\delta_n + \varphi(x, y)) \ Sin(\Delta/2) \right).$$
(1.30)

Из выражения (1.30) видно, что эффект интегрирования значения интенсивности при непрерывно меняющейся фазе состоит только в понижении контраста на величину равную *Sinc*($\Delta/2$). Чаще всего это изменение контраста незначительно. Например, если за время регистрации фаза меняется на $\pi/2$, то контраст ослабляется примерно в 0,9 раз. Такое ослабление контраста (на 10%) обычно допустимо и, когда данные необходимо зарегистрировать быстро, используется методика непрерывного сдвига. Следует отметить, что большинство алгоритмов МФШ применимы как при дискретном, так и при непрерывном методе изменения фазы.

1.4.3 Развертывание («сшивка») фазы

Так как фаза вычисляется с помощью арктангенса, в её значениях будут разрывы. Арктангенс считается однозначно определенным в диапазоне от $-\pi/2$ до $\pi/2$. Выше было сказано, что нам известны знаки синуса и косинуса, что дает нам возможность определить в каком квадранте лежит значение фазы [11]. Это означает, что вычисленные с учетом всего выше сказанного значения фазы будут лежать в интервале от $-\pi$ до π .

Для дальнейшего расширения диапазона введем ограничение на значение разности фаз между соседними точками (она не должна превышать π). Если разность фаз оказалась больше чем π , то фазу одной из точек необходимо увеличивать или уменьшать с шагом 2π до тех пор, пока разность фаз не станет меньше π . Эта процедура повторяется до тех пор, пока разность фаз между любыми двумя соседними точками на изображении не будет меньше π .

На практике часто приходится применять двумерные алгоритмы развертывания фазы. В них используют те же принципы что и одномерных, однако, реализуются они значительно сложнее из-за наличия шумов во входном сигнале. Необходимо проверить результат после того как было выполнено развертывание. Лучшие алгоритмы развертывания фазы оценивают контрастность сигнала в каждой точке и развертывают фазу сначала в точках с наивысшим контрастом (наименьшим уровнем шума). Неправильное развертывание фазы проявляется в виде характерных полос на изображении [10, 11].

1.4.4 3-х шаговые алгоритмы

Цель алгоритма, найти значение $\varphi(x, y)$. Если мы будем выполнять измерения распределения интенсивности при известных значениях δ , то из выражений (1.20) и (1.21) видно, что мы имеем три неизвестные I_{avg} , γ и $\varphi(x, y)$ или a_0, a_1 и a_2 соответственно. Измерив интенсивность при трех различных значениях, мы можем записать систему трех уравнений из которой можно найти все неизвестные. По формуле (1.22) мы находим значение фазы.

Далее, приведем несколько примеров 3-х шаговых алгоритмов.

Пример 1

Для первого примера зададим для δ следующие три величины: $\pi/4$, $3\pi/4$ и $5\pi/4$. Решая полученную систему трех уравнений находим, что

$$a_{1} = \frac{I_{1} - I_{2}}{\sqrt{2}}; \ a_{2} = \frac{I_{2} - I_{3}}{\sqrt{2}};$$
$$tg\varphi = -\frac{I_{2} - I_{3}}{I_{1} - I_{2}}.$$
(1.31)

Пример 2

Для второго примера зададим для δ следующие три величины: $-\pi/2$, 0 и $\pi/2$. Решая полученную систему трех уравнений находим, что

$$a_{1} = \frac{-I_{1} + 2I_{2} - I_{3}}{2}; a_{2} = \frac{-I_{1} + I_{3}}{2};$$

$$tg\varphi = \frac{I_{1} - I_{3}}{-I_{1} + 2I_{2} - I_{3}}.$$
(1.32)

Пример 3

Для второго примера зададим для δ следующие три величины: $-\alpha$, 0 и α . Решая полученную систему трех уравнений находим, что

$$a_1 = \frac{I_1 + 2I_2 + I_3}{-2 + 2Cos\alpha}$$
; $a_2 = \frac{-I_1 + I_3}{2Sin\alpha}$;

$$tg\varphi = -\frac{(I_1 - I_3)tg(\alpha/2)}{I_1 - 2I_2 + I_3}$$
(1.33)

При $\alpha = \pi/2$ получаем такой же результат, как и в примере 2.

1.4.5 Алгоритм 2+1

Алгоритм 2+1 [101] очень хорошо устраняет ошибки, вызванные вибрацией. В этом алгоритме быстро регистрируются две интерферограммы с изменением фазовым сдвигом на $\pi/2$, а несколько позднее регистрируется третья интерферограмма как результат усреднения двух интерферограмм полученных с фазовым сдвигом на π . Таким образом, мы имеем следующие значения для δ : 0, – $\pi/2$ и 0, π . Используя выражение (1.25) для интенсивности записываем выражения для a_1 и a_2

$$a_{1} = I_{1} - I_{3}; \ a_{2} = I_{3} - I_{2}$$

$$tg \varphi = \frac{-(I_{3} - I_{2})}{I_{1} - I_{3}} \cdot$$
(1.33)

Особенность этого алгоритма состоит в использовании ПЗС-матриц с построчным переносом для быстрой регистрации двух интерферограмм с фазовым сдвигом в 90°. В таких ПЗС-матрицах регистрация каждого изображения осуществляется последовательным переносом сохраненных пикселей. В то время как из сохраненных пикселей формируется видеосигнал, ПЗС-матрица формирует изображение следующего кадра. После экспозиции заряд накопленный в регистрирующих элементах переносится за несколько микросекунд в уже пустые элементы хранения и начинается регистрация следующего кадра. Таким образом, можно зарегистрировать два кадра с интервалом в несколько микросекунд, к тому же синхронизировав затвор с началом очередной регистрации. Само время регистрации составляет несколько миллисекунд. В данном методе интерферировали две ортогонально поляризованные волны, разность фаз между которыми изменялась с помощью ячейки Покельса. Хотя алгоритм 1+2 весьма эффективен, он находит ограниченное применение на практике из-за того, что использует малое количество интерферограмм для восстановления фазы. Это вызывает высокую чувствительность алгоритма к ошибкам, связанным с неправильной калибровкой или нелинейностью фазосдвигающего устройства.

1.4.6 Алгоритм Карре

Карре был первым исследователем, опубликовавшим работу по МФШ [99]. В настоящее время этот алгоритм сравнительно редко используется из-за того, что даже небольшая нелинейность фазосдвигающего устройства может привести к большим ошибкам в результатах измерений. Алгоритм представляет прежде всего, исторический интерес.

В алгоритме Карре фазовый сдвиг между последовательными измерениями составляет 2α , причем значение α не известно и может быть определено. Выполнив четыре измерения при значениях δ равных - 3α ; - α ; α ; 3α , мы можем записать систему четырех уравнений относительно четырех неизвестных (a_0 , a_1 , a_2 , α).

$$\begin{split} I_1 &= a_0 + a_1 Cos 3\alpha - a_2 Sin 3\alpha \\ I_2 &= a_0 + a_1 Cos \alpha - a_2 Sin \alpha \\ I_3 &= a_0 + a_1 Cos \alpha + a_2 Sin \alpha \\ I_1 &= a_0 + a_1 Cos 3\alpha + a_2 Sin 3\alpha \\ \end{split}$$

Легко проверить, что

$$\frac{(I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)}{-(I_1 + I_4) + (I_2 + I_3)} = -\frac{a_2}{a_1} Ctg\alpha = \frac{tg\varphi}{tg\alpha}$$

И

$$tg^{2}\alpha = \frac{3(I_{2} - I_{3}) - (I_{1} - I_{4})}{(I_{1} - I_{4}) + (I_{2} - I_{3})}$$

Теперь несложно найти значение тангенса фазы:

$$tg\varphi = \frac{\sqrt{3((I_2 - I_3) - (I_1 - I_4))((I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)))}}{(I_2 + I_3) - (I_1 + I_4)}.$$
(1.34)

1.4.7 Использование метода наименьших квадратов

Выше было показано, что для восстановления фазы волнового фронта необходимо зарегистрировать по меньшей мере три интерферограммы при разных фазовых сдвигах. На практике обычно стараются зарегистрировать более чем три интерферограммы, чтобы снизить влияние таких ошибок, как неверная величина фазовых шагов, нелинейность детектора, электрические шумы, турбулентные потоки в воздухе, вибрация и т. п. Один из способов вычисления фазы по более чем трем интерферограммам это использование метода наименьших квадратов (МНК) [102, 103].

МНК является весьма мощным средством синтеза алгоритмов МФШ. Использование этой методики позволяет использовать для восстановления фазы более трех зарегистрированных интерферограмм. Фазовые шаги при данной методике могут иметь разную величину и даже превосходить по величине 2π. Однако выбор значений фазовых шагов влияет на точность измерений. Ниже будет показано, что использование дополнительных весовых коэффициентов, применяемых к квадратам разностей перед процедурой дифференцирования, позволяет уменьшить погрешность, вызванную нелинейностью детектора и ошибками калибровки фазосдвигающего устройства.

Обычная процедура МНК состоит в том, что вначале находятся сумма квадратов разностей между измеренными значениями интенсивности и выражением (1.25) при соответствующем значении δ (квадраты невязок)

$$R(a_0, a_1, a_2) = \sum_{i=1}^n (I_i(x, y) - I(x, y, \delta_i))^2 .$$
(1.35)

Значение невязки необходимо минимизировать, для этого продифференцируем её по каждой из трех переменных (a₀, a₁, a₂) и приравняем производные к нулю. Решив полученную систему трех неизвестных, мы

можем определить значение тангенса фазы по формуле (1.26), как и в случае 3-х шаговых алгоритмов.

1.4.8 4-х шаговый алгоритм по методу наименьших квадратов

Применяя выше описанную методику можно получить различные четырехшаговые алгоритмы. Например, для четырех значений $\delta_i = (i-1)\pi/2$, $i = \overline{1,4}$ мы получим следующую формулу (аналогичную формуле (1.28))

$$tg\varphi = \frac{-I_2 + I_4}{I_1 - I_3}.$$
 (1.36)

Вычислим также величину ү из формулы (1.23)

$$\gamma = \frac{2\sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2}}{I_1 + I_2 + I_3 + I_4}.$$
(1.37)

1.4.9 Синхронное детектирование

Синхронное (квадратурное) детектирование часто применяется в системах связи. Оно состоит в умножении зашумленного детектируемого сигнала на синус и косинус соответствующей частоты и усреднении произведения по большому количеству периодов. Синхронное детектирования было впервые применено в МФШ Брунингом [102]. Очень интересен тот факт, что если сдвиги фазы δ между измерениями были равномерно распределены в интервале от 0 до 2π ($\delta_i = (i-1)\frac{2\pi}{n}$, $i = \overline{1,n}$), то алгоритмы, полученные методом синхронного детектирования и методом наименьших квадратов, будут совпадать.

Основная формула метода синхронного детектирования

$$tg\varphi = \frac{\sum_{i=1}^{n} I_i Sin\left(i\frac{2\pi}{n}\right)}{\sum_{i=1}^{n} I_i Cos\left(i\frac{2\pi}{n}\right)}.$$
(1.38)

Для примера пусть n=3

$$tg\varphi = \frac{\sqrt{3}(I_1 - I_2)}{I_1 + I_2 - 2I_3}.$$
(1.39)

Воспользовавшись методом наименьших квадратов для значений разности фаз $\delta_i = (i-1)\frac{2\pi}{3}$, $i = \overline{1,3}$ мы получим точно такой же результат.

1.4.10 5-ти шаговый алгоритм

5-ти шаговые алгоритмы значительно уменьшают влияние ошибок калибровки фазосдвигающего устройства на результаты измерений. Применяя метод наименьших квадратов для значений разности фаз $\delta_i = (i-1)\frac{2\pi}{3}$, $i = \overline{1,5}$ получаем следующую формулу 5-ти шагового алгоритма

$$tg\varphi = \frac{7(I_2 - I_4)}{-4I_1 + I_2 + 6I_3 + I_4 - 4I_5},$$
(1.40)

$$\gamma = \frac{\sqrt{49(I_2 - I_4)^2 + (-4I_1 + I_2 + 6I_3 + I_4 - 4I_5)^2}}{2I_1 + 3I_2 + 4I_3 + 3I_4 + 2I_5}.$$
(1.41)

1.4.11 5-ти шаговый алгоритм Харихарана-Швайдера

В 5-ти шаговом методе, полученном в предыдущем пункте, значения I_5 и I_1 будут одинаковыми так как изменение сдвига фаз между ними составляет 2π . Различаться они будут только из-за ошибок измерения. Из этих соображений, резонно при использовании метода наименьших квадратов поставить в выражении для невязки (1.35) перед 1-ым и 5-ым членами весовые коэффициенты в два раза меньшие, чем перед остальными членами.

$$R(a_0, a_1, a_2) = \sum_{i=1}^n b_i (I_i(x, y) - I(x, y, \delta_i))^2$$
$$b_1 = 1; \ b_2 = 2; \ b_3 = 2; \ b_4 = 2; \ b_5 = 1.$$

Проделав обычную процедуру метода наименьших квадратов, получим формулы:

$$tg\varphi = \frac{-2(I_2 - I_4)}{I_1 - 2I_3 + I_5},\tag{1.42}$$

$$\gamma = \frac{\sqrt{4(I_2 - I_4)^2 + (I_1 - 2I_3 + I_5)^2}}{I_1 + 2(I_2 + I_3 + I_4) + I_5}.$$
(1.43)

Этот алгоритм был выведен и впервые описан Швайдером [14] и позднее Харихэраном [104]. Он обладает меньшей чувствительностью к правильности калибровки фазосдвигающего устройства.

1.4.12 Алгоритмы, улучшенные с помощью весовых коэффициентов

Начиная с 90-х в различных публикациях было приведено множество улучшенных алгоритмов МФШ. Подавляющее большинство этих алгоритмов получалось с помощью процедуры предложенной Швайдером [14]. Швайдер первым указал на то, что многие источники ошибок, например, ошибка калибровки фазосдвигающего устройства проявляются на интерферограмме в виде периодической составляющей с частотой в два раз большей, чем частота интерференционных полос. Следовательно, производя измерения дважды с изменением сдвига фаз на 90° и усредняя полученные результаты, мы можем устранить эту ошибку, так как на двух фазовых изображениях она будет сдвинута на 180° по фазе. Если шаг изменения фазы равен 90°, то нет необходимости выполнять измерения два раза. В этом случае мы можем разбить полученные результаты измерений на две группы: первая от 1-го до (N-1)-го результата и от 2-го до N-го результата, произведя вычисления для каждой группы отдельно усреднить полученные значения. Такой подход позволяет значительно уменьшить погрешность, вызванную ошибками в калибровке фазосдвигающего устройства.

Сама методика усреднения результатов, полученных с изменением фазового сдвига на 90° была известна в интерферометрии задолго до Швайдера. Однако Швайдер в своей статье выполнил значительно более глубокие исследования и получил результаты, которые ранее не были широко

известны. Швайдер показал, что предпочтительней усреднить не значение фазы после вычислений, а значения числителя и знаменателя в формуле для тангенса фазы. Если два блока данных были получены по описанной выше методике, то значение тангенса фазы может быть вычислено по формуле:

$$tg\varphi = \frac{n_1 + n_2}{d_1 + d_2},\tag{1.44}$$

где n_i и d_i это числитель и знаменатель для алгоритмов, по которым вычисляется фаза для 1-го и 2-го блока данных.

Выше описанный алгоритм Швайдера-Харихэрана является примером применения такой методики. Воспользуемся полученным выше 4-х шаговым алгоритмом (1.36)

Применив алгоритм синтеза (а не просто заменяя индексы в выше указанной формуле!), описанный в 1.3.6 к блоку данных от 2-х до 5-ти получим новую формулу

$$tg\varphi = \frac{-I_2 + I_4}{I_5 - I_3}.$$
 (1.45)

Воспользовавшись формулой (1.44) получаем

$$tg\varphi = \frac{-2(I_2 - I_4)}{I_1 - 2I_3 + I_5},$$
(1.46)

это алгоритм Швайдера-Харихарана. Он обладает значительно меньшей чувствительностью к ошибкам калибровки фазосдвигающего устройства, чем взятый за основу 4-х шаговый алгоритм или аналогичный алгоритм с усреднением вычисленной фазы.

Увеличивая количество блоков данных, мы можем получить алгоритм с любым числом шагов. Однако, вместо непосредственных вычислений по формуле (1.44) гораздо удобнее воспользоваться методом наименьших квадратов с весовыми коэффициентами. Возьмем за основу выше приведенный 4-х шаговый алгоритм. Пусть N-количество блоков данных очевидно равное количеству измерений, тогда весовые коэффициенты *b_{LN}*

могут быть вычислены по формулам $b_{1,N} = b_{N,N} = 1$; $b_{i,N} = b_{i-1,N} + b_{i,N-1}$. Приведем таблицу весовых коэффициентов для некоторых N (таблица 1.2).

Число	Номер кадра і						
фазовых шагов	1	2	3	4	5	6	7
4	1	1	1	1	-	-	-
5	1	2	2	2	1	-	-
6	1	3	4	4	3	1	-
7	1	4	7	8	7	4	1
8	1	5	11	15	11	5	1

Таблица 1.2 - Весовые коэффициенты (b_i) для разности интенсивностей МНК

Пример улучшенного 6-ти шагового алгоритма:

$$tg\varphi = \frac{-3I_2 + 4I_4 - I_6}{I_1 - 4I_3 + 3I_5}.$$
(1.47)

Пример улучшенного 7-ми шагового алгоритма:

$$tg\varphi = \frac{-4I_2 + 8I_4 - 4I_6}{I_1 - 7I_3 + 7I_5 - I_7}.$$
(1.48)

Ниже будет показано, что эти алгоритмы обладают очень малой чувствительностью к ошибкам установки фазового сдвига.

формулы, представленные выше Анализируя можно заметить особенность, позволяющую очень легко получать формулы для алгоритмов с разным числом шагов не используя МНК. Она заключается в том, что для числителя дроби нужно просуммировать произведения соответствующих коэффициентов и интенсивностей, полученные для четного шага (i=2,4,6...), для знаменателя дроби нужно просуммировать нечетные значения интенсивностей (i=1,3,5...). При этом знаки коэффициентов чередуются (1.49).

$$tg\varphi_{N} = \frac{-b_{2,N}I_{2} + b_{4,N}I_{4} - b_{6,N}I_{6} + \dots}{b_{1,N}I_{1} - b_{3,N}I_{3} + b_{5,N}I_{5} -}.$$
(1.49)

В таблице 1.3 представлены соответствующие коэффициенты для разного числа шагов. Используя эту таблицу и формулу (1.50), можно просто получать различные алгоритмы

$$tg\varphi_{N} = \frac{\sum_{i=1}^{N} kn_{i} \cdot I_{i}}{\sum_{i=1}^{N} kd_{i} \cdot I_{i}}.$$
(1.50)

Таблица 1.3 – Весовые коэффициенты интенсивностей для числителя (kn_i) и знаменателя (kd_i)

Число	Коэффициенты	Номер кадра і						
фазовых	числителя kn и	1	2	3	1	5	6	7
шагов	знаменателя kd	1	2	5	4	5	0	/
1	kn	0	-1	0	1	-	-	-
4	kd	1	0	-1	0	-	-	-
5	kn	0	-2	0	2	0	-	-
	kd	1	0	-2	0	1	-	-
6	kn	0	-3	0	4	0	-1	-
	kd	1	0	-4	0	3	0	-
7	kn	0	-4	0	8	0	-4	0
	kd	1	0	-7	0	7	0	-1
8	kn	0	-5	0	15	0	-5	0
	kd	1	0	-11	0	11	0	-1

1.5 Метод измерения фазового сдвига между интерферограммами

Для получения фазовых изображений с помощью самокалибрующихся методов необходимо знать фазовый сдвиг между интерферограммами. Он может быть заранее задан или же измерен.

Наиболее широко распространённым способом задания фазового сдвига в интерферометрии является использование пьезоприводов. Однако гистерезис пьезокерамики не позволяет точно задавать фазовые сдвиги. Поэтому для более точного задания могут быть использованы устройства с обратной связью на основе тензорезисторов или емкостей. Однако потоки воздуха и вибрации являются дополнительным шумовым фактором, который бывает трудно устранить.

Более точным методом является измерение фазового сдвига по самим интерферограммам. Для этого существует много различных методов [15-17].

Среди них одним из самых быстродействующих и точным является метод измерения фазовых сдвигов рассмотренный в [18]. Для его реализации должно быть не менее трех интерферограмм. А вычисление фазовых сдвигов между ними осуществляется по дисперсиям разности между парами интерферограмм.

Ниже представлен частотный анализ данного метода, который позволил не только получить основные соотношения, но и выявить его потенциальные возможности, а также определить процедуры для повышения его точности [105-107].

1.5.1 Частотный анализ метода вычисления фазового сдвига между интерферограммами

Уравнение интерферограммы в общем виде может быть записано как:

$$I_{k}(x, y) = a(x, y) + b(x, y) \cdot \cos[u_{0}x + \phi(x, y) + \delta_{k}], \qquad (1.51)$$

где a – амплитуда фона; b – видность полос; $\varphi(x, y)$ – искомая фаза интерферограммы; u_0 – частота несущих полос; δ_k – фазовый сдвиг для k-го

шага k=0, 1, 2, При $u_0 \neq 0$ (1.51) - это интерферограмма, содержащая полосы. При $u_0 = 0$ (1.51) - это интерферограмма, полученная на т.н. нулевой полосе.

Согласно формуле Эйлера (1.51) можно записать как:

$$I_{k}(x,y) = a(x,y) + \frac{1}{2}b(x,y) \cdot e^{iu_{0}x} \cdot e^{i\varphi(x,y)} \cdot e^{i\delta_{k}} + \frac{1}{2}b(x,y) \cdot e^{-iu_{0}x} \cdot e^{-i\varphi(x,y)} \cdot e^{-i\delta_{k}} .$$
(1.52)

Далее обозначим слагаемые в (1.52) следующим образом:

$$c(x, y) = \frac{1}{2}b(x, y) \cdot e^{i\varphi(x, y)}, \ c^*(x, y) = \frac{1}{2}b(x, y) \cdot e^{-i\varphi(x, y)}, \ \alpha_k = e^{i\delta_k}, \ \alpha_k^* = e^{-i\delta_k}$$

и запишем (1.52) как:

$$I_{k}(x, y) = a(x, y) + c(x, y) \cdot e^{iu_{0}x} \cdot \alpha_{k} + c^{*}(x, y) \cdot e^{-iu_{0}x} \cdot \alpha_{k}^{*}.$$
(1.53)

Выполнив преобразование Фурье над (1.53) и введя новые обозначения для фурье-образов функций получим:

$$\hat{I}_{k}(u,v) = \hat{A}(u,v) + \alpha_{k} \cdot \hat{C}(u-u_{0},v) + \alpha_{k}^{*} \cdot \hat{C}^{*}(u+u_{0},v), \quad (1.54)$$

где *и*, *v* – координаты в частотной плоскости.

Следует сказать, что при выводе (1.54) была использована теорема о смещении. Это соотношение показывает, что спектр интерферограммы имеет три компоненты: 0, +1 и -1 порядки, разнесенные на величину u_0 .

Для расшифровки интерферограмм необходимо найти $\varphi(x,y)$ из соотношения (1.51) или $\hat{C}(u-u_0,v)$ из соотношения (1.54) соответственно.

Если несущая частота имеет большое значение, то первые порядки (1.54) расходятся, поэтому можно использовать метод, основанный на фурьепреобразовании [97] (см. 1.3.2). Если несущая частота мала, то порядки в спектре (1.54) перекрываются и использовать пространственные методы расшифровки нельзя. Но можно использовать временные методы. Однако при этом фазовый сдвиг между интерферограммами δ_k нужно точно знать.

В работе [18] был предложен метод вычисления фазовых сдвигов δ_k по разности между интерференционными изображениями. Описываемый метод, в отличие от [18], основан на частотном анализе разности между

интерферограмми [105-107] и все основные формулы выводятся посредством этого анализа.

Фурье-образ «разностной» интерферограммы (разность между двумя интерферограмми) (1.54) при разных фазовых сдвигах будет иметь вид:

$$\hat{\Delta}_{kl}(u,v) \equiv \hat{I}_{l}(u,v) - \hat{I}_{k}(u,v) = \alpha_{kl} \cdot \hat{C}(u-u_{0},v) + \alpha_{kl} \ast \hat{C} \ast (u+u_{0},v), \quad (1.55)$$

где

$$\alpha_{kl} = \alpha_l - \alpha_k = e^{i\delta_l} - e^{i\delta_k} . \tag{1.56}$$

Из (1.56) следует, что разность между интерферограмми приводит к занулению «0» порядка в ее спектре.

Если в выражении (1.55) изменять параметры k, l, то можно составить систему уравнений. Например, для k=0, l=1, 2, модно просто решить такую систему:

$$\hat{C}(u-u_0,v) = \frac{\alpha^*_{02} \cdot \hat{\Delta}_{01}(u,v) - \alpha^*_{01} \cdot \hat{\Delta}_{02}(u,v)}{\alpha_{01} \cdot \alpha^*_{02} - \alpha_{02} \cdot \alpha^*_{01}} \dots$$
(1.57)

Для получения комплексной функции *c*(*x*,*y*) фазовая составляющая которой является искомой величиной, необходимо использовать обратное фурье-преобразование. Это лежит в основе метода фазовых шагов.

Из этого следует, что знание величины фазового сдвига позволяет реализовать метод фазовых шагов. Далее рассмотрена процедура его вычисления.

Интеграл квадрата модуля спектра разности между интерферограмми имеет вид (1.55):

$$\sigma_{kl}^{2} = \frac{1}{4\pi^{2}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left| \hat{\Delta}_{kl}(u, v) \right|^{2} du dv \,.$$
(1.58)

Из (1.51) следует, что

$$\begin{aligned} \left| \hat{\Delta}_{kl}(u,v) \right|^2 &= \left| \alpha_{kl} \hat{C}(u-u_0,v) + \alpha_{kl}^* \hat{C}^*(u+u_0,v) \right|^2 = \left| \alpha_{kl} \right|^2 \left[\left| \hat{C}(u-u_0,v) \right|^2 + \left| \hat{C}(u+u_0,v) \right|^2 \right] + \\ &+ \alpha_{kl}^2 \hat{C}(u-u_0,v) \cdot \hat{C}(u+u_0,v) + \left[\alpha_{kl}^2 \hat{C}(u-u_0,v) \cdot \hat{C}(u+u_0,v) \right]^* \end{aligned}$$
(1.59)

В (1.59) второе и третье слагаемые являются произведением спектров +1-го и -1-го порядков. Назовем их «перекрестными» членами. Пусть

пространственная частота u_0 будет иметь большое значение, что приведет к тому, что первые порядки (+1 и -1) не будут пересекаться. При некотором допущении (см. ниже) следует, что второе и третье слагаемые в (1.59) будут зануляться и поэтому:

$$\left|\hat{\Delta}_{kl}(u,v)\right|^{2} \approx \left|\alpha_{kl}\right|^{2} \left[\left|\hat{C}(u-u_{0},v)\right|^{2} + \left|\hat{C}(u+u_{0},v)\right|^{2}\right]$$
(1.60)

При низкой пространственной частоте u_0 спектральные порядки 0 и +1 (-1) будут перекрываться. Для уменьшения этого эффекта предлагается из разностного спектра (1.59) вычитать его значение в нуле. По сути это т.н. режекторная фильтрация, которая может быть записана как:

$$\sigma_{kl}^{2} = \frac{1}{4\pi^{2}} \left(\int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \left[\left| \Delta_{kl} (u, v) \right|^{2} \right] du dv - \left| \Delta_{kl} (0, 0) \right|^{2} \right] \cdot$$
(1.61)

Тогда, используя формулу Парсеваля [108], получим следующее выражение для (1.61) пространственной области:

$$\sigma_{kl}^{2} = \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \left(\left| \partial_{kl} \left(u, v \right) \right|^{2} \right) dx dy - \left| \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \left(\partial_{kl} \left(u, v \right) \right) dx dy \right|^{2}.$$
(1.62)

Второе слагаемое в (1.62) соответствует среднему значению интенсивности на интерферограмме, а само выражение является известной формулой для вычисления дисперсии.

Следует заметить, что в работе [18] было использовано только первое слагаемое (1.62), однако само значение σ_{kl}^2 было, по всей видимости, ошибочно названо дисперсией.

Использование именно дисперсии позволяет увеличить точность вычисления, за счет снижения влияния перекрестного члена, путем вычитания квадрата среднего значения.

Подставляя (1.59) в (1.61) и, переходя в пространственную область, получаем:

$$\sigma_{kl}^{2} = 2\left|\alpha_{kl}\right|^{2} \left(\int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} \left|c(x,y)\right|^{2} dx dy - A\right) = \frac{\left|\alpha_{kl}\right|^{2}}{2} \left(\int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} b^{2}(x,y) dx dy - 4A\right),$$

где константа $A = \frac{1}{8\pi^2} \left[\left| \hat{C}(-u_0, 0) \right|^2 + \left| \hat{C}(u_0, 0) \right|^2 \right].$

Перепишем это выражение в следующем виде:

$$\sigma_{_{kl}}^{2} = \frac{B \cdot |\alpha_{_{kl}}|^{2}}{2}, \qquad (1.63)$$

где $B = \int_{-\infty}^{+\infty+\infty} b^{2}(x, y) dx dy - 4A$

Из приближенного выражения (1.60) следует, что интеграл взятый по площади от квадрата разности между интерферограммами будет пропорционален $|\alpha_{kl}|^{2}$.

При этом комплексное число α_{kl} можно рассматривать как разность между векторами α_k и α_l (см. рис. 1.2а), а $|\alpha_{kl}|^2$ - это квадрат длины этого вектора.



Рисунок 1.2 - Вектора фазовых сдвигов в комплексной плоскости: а – два вектора, б – три вектора.

Из рис. 1.2а следует, что фазовый сдвиг между интерферограммами δ_{kl} = $\delta_l - \delta_k = \angle LOK$ легко определить, используя формулу косинусов из треугольника *OLK*

$$LK^{2} = OL^{2} + OK^{2} - 2 \cdot OL \cdot OK \cdot \cos(\angle LOK)$$
(1.64)

Исходя из того, что OL=OK=1, $LK=|\alpha_{kl}|$, следует

$$\left|\alpha_{kl}\right|^{2} = 4\sin^{2}\left(\frac{\delta_{l} - \delta_{k}}{2}\right)$$
(1.65)

Таким образом, фазовый сдвиг δ_{kl} зависит от длины вектора $|\alpha_{kl}|$ (1.63).

Однако, введя дополнительный фазовый сдвиг δ_m (рис. 1.2б), который приводит к появлению дополнительных разностных векторов α_{lm} , α_{km} и двух треугольников *MOL* и *MLK*, можно получить соотношения, независящих от этой величины. Используя теорему косинусов получаем следующие соотношения:

$$\cos(\angle LKM) = \frac{|\alpha_{km}|^{2} + |\alpha_{kl}|^{2} - |\alpha_{lm}|^{2}}{2 \cdot |\alpha_{km}| \cdot |\alpha_{kl}|} \cdot$$
(1.66)

Из (1.63) и (1.66) следует:

$$\cos \angle LKM = \left(\frac{\sigma_{km}^{2} + \sigma_{kl}^{2} - \sigma_{lm}^{2}}{2 \cdot \sigma_{km} \cdot \sigma_{kl}}\right).$$
(1.67)

$$\delta_{lm} = 2 \arccos\left(\frac{\sigma_{km}^2 + \sigma_{kl}^2 - \sigma_{lm}^2}{2 \cdot \sigma_{km} \cdot \sigma_{kl}}\right).$$
(1.68)

Аналогично получаем и для других фазовых сдвигов [106]:

$$\delta_{lk} = 2 \arccos\left(\frac{\sigma_{lm}^2 + \sigma_{km}^2 - \sigma_{kl}^2}{2 \cdot \sigma_{lm} \cdot \sigma_{km}}\right).$$
(1.69)

$$\delta_{km} = 2\pi - 2\arccos\left(\frac{\sigma_{lm}^2 + \sigma_{kl}^2 - \sigma_{km}^2}{2 \cdot \sigma_{lm} \cdot \sigma_{kl}}\right).$$
(1.70)

Искомые фазовые сдвиги зависят от интеграла (1.58). Его можно интерпретировать как дисперсию разности между интерферограмми (1.62), которую для трех интерферограмм $I_1(x,y)$, $I_3(x,y)$, $I_3(x,y)$ с числом пикселей Nx×Ny можно записать в следующем виде:

$$\sigma_{12}^{2} = \frac{1}{Nx \cdot Ny} \sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{1}(x, y) - I_{2}(x, y) \right]^{2} - \frac{1}{(Nx \cdot Ny)^{2}} \left(\sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{1}(x, y) - I_{2}(x, y) \right] \right)^{2}$$

$$\sigma_{23}^{2} = \frac{1}{Nx \cdot Ny} \sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{2}(x, y) - I_{3}(x, y) \right]^{2} - \frac{1}{(Nx \cdot Ny)^{2}} \left(\sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{2}(x, y) - I_{3}(x, y) \right] \right)^{2}$$
(1.71)

$$\sigma_{13}^{2} = \frac{1}{Nx \cdot Ny} \sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{1}(x, y) - I_{3}(x, y) \right]^{2} - \frac{1}{\left(Nx \cdot Ny \right)^{2}} \left(\sum_{Nx} \sum_{Ny} \left[I_{1}(x, y) - I_{3}(x, y) \right] \right)^{2}.$$

1.6 Анализ ошибок методов реконструкции фазы волнового фронта

В интерферометрии фазового сдвига существует большое количество источников ошибок, из которых можно выделить семь наиболее важных [13]:

- 1. Неверный фазовый сдвиг;
- 2. Вибрация;
- 3. Нелинейность детектора;
- 4. Рассеянное излучение;
- 5. Ошибка квантования;
- 6. Нестабильность частоты источника излучения;
- 7. Флуктуации интенсивности.

Далее рассмотри первые 3 как наиболее существенные.

1.6.1 Ошибка, вызванная неправильным значением сдвига фазы

Ошибка в значении фазового сдвига между регистрируемыми данными может возникнуть по многим причинам, таким как неправильная калибровка фазосдвигателя, вибрация или турбулентные потоки воздуха. Хотя ошибка в фазовом сдвиге может быть и нелинейной, например, из-за вибрации, чаще всего она всё-таки линейна. Ошибка выражается тем, что при требуемом фазовом сдвиге $n\pi/2$ действительный фазовый сдвиг будет $n\pi/2+n\varepsilon$. Данная ошибка проявляется в виде т.н. второй гармоники – гармоническим изменением в восстановленной фазе, повторяющим интерференционные полосы, но с частотой в два больше.

В таблице представлены результаты численного моделирования для различных типов алгоритмов при раскалибровке фазосдвигателя на 5% [13]. В

качестве оценки использовалась PV – разница между максимальным и минимальным значениями второй гармоники.

Таблица 1.4 – Ошибка измерения фазы, вызванная 5% раскалибровкой фазосдвигающего устройства [13]

Тип алгоритма	Фазовый сдвиг, рад	Ошибка PV, рад	
Трехшаговый алгоритм	π/2	0,0785398	
Четырехшаговый алгоритм	π/2	0,0785398	
Пятишаговый алгоритм	π/2	0,0153166	
Пятишаговый алгоритм	π/2	0,0030859	
Швайдера-Харихарана			
Шестишаговый алгоритм с	π/2	0,000121171	
весовыми коэффициентами			
Семишаговый алгоритм с	π/2	0,00000475669	
весовыми коэффициентами			

Из таблицы видно, что оптимальными алгоритмами, позволяющими очень хорошо подавлять ошибку, связанную с раскалибровкой, являются алгоритмы с весовыми коэффициентами.

1.6.2 Ошибка, вызванная вибрацией

Возможно, самой существенной проблемой препятствующей широкому использованию МФШ является его чувствительность к вибрациям. Это является следствием того, что фазовые шаги осуществляются во времени и вибрации приводят к неправильным фазовым сдвигам между интерферограммами. Они похожи на ошибки, вызываемые раскалибровкой фазосдвигателя, но их намного труднее корректировать, так как оптимальный алгоритм должен зависеть от как от частоты присутствующей вибрации, так и от фазы относительно фазового сдвига [109-111].

Для моделирования влияния вибрации задаются следующие ее параметры: амплитуда (в единицах от длины волны), частота (в единицах от частоты захвата камеры) и фаза [13].

Ha графике рис. 1.3 представлены результаты численного моделирования зависимости ошибки восстановленной фазы от относительной частоты четырехшагового алгоритма. Относительная для частота определяется как f_{зи}/f_в, где f_{зи} - частота захвата изображений, f_в - частота вибрации. Удвоенная амплитуда вибрации (PV) составляет 1/25 от длины волны.



Относительная частота $f_{3и}/f_B$, отн. ед.

Рисунок 1.3 – Зависимость ошибки восстановленной фазы от относительной частоты вибраций для четырехшагового алгоритма [13].

Из графика видно, что максимальное значение ошибки равно 0,25 рад, что эквивалентно 1/25 от длины волны. Т.е. значение ошибки и вызывающей ее вибрации совпадают. При этом максимум ошибки достигается при частоте вибрации в два раза меньшей, чем частота захвата камеры. Например, при частоте захвата 30 Гц (кадров/сек), наиболее сильно будет сказываться вибрация с частотой 15Гц. При использовании других алгоритмов значение максимальной ошибки при частоте равной половине частоты камеры будет сохраняться, однако боковые лепестки будут меньше (рис. 1.4).



Относительная частота f_{зи}/f_в, отн. ед.

Рисунок 1.4 – Зависимость ошибки восстановленной фазы от относительной частоты вибраций для пятишагового алгоритма [13].

1.6.3 Ошибка, вызванная нелинейностью детектора

Обычно ПЗС матрицы имеют хорошую линейную характеристику, однако иногда причиной нелинейности является электроника между детектором и цифровым преобразователем. При моделировании нелинейности детектора задаются два параметра – значение нелинейности (в %) и ее порядок (2-ой или 3-ий). Обычно эта ошибка проявляется в виде 4-ой или 3-ей гармоники.

В таблице 1.5 представлена ошибка измерения фазы в зависимости от 1% нелинейности 2-го и 3-го порядка [13].

Тип алгоритма	Фазовый	Ошибка PV при различном			
	сдвиг, рад	порядке нелинейности, рад			
		2-ой порядок	3-ий порядок		
Трехшаговый алгоритм	$\pi/2$	0,0196072	0,0584129		
Четырехшаговый	$\pi/2$	0	0,00480903		
алгоритм					
Пятишаговый алгоритм	$\pi/2$	0,00280112	0,0110769		
Пятишаговый алгоритм	$\pi/2$	0	0,00480903		
Швайдера-Харихарана					
Шестишаговый	$\pi/2$	0	0,00480903		
алгоритм с весовыми					
коэффициентами					
Семишаговый	$\pi/2$	0	0,00480903		
алгоритм с весовыми					
коэффициентами					

Таблица 1.5 – Ошибка измерения фазы, вызванная 1% нелинейностью детектора

1.7 Численное моделирование метода фазовых шагов

Представленный выше анализ методов фазовых шагов позволяет сделать вывод, что оптимальным по точности, среди алгоритмов реконструкции фазы с известным фазовым сдвигом, является алгоритм фазовых шагов с весовыми коэффициентами. Было разработано программное обеспечение «WinPhast» [112] в котором был реализован данный алгоритм.

Для выяснения его потенциальных возможностей применительно к условиям близким к реальным, а также для выбора оптимальных параметров как алгоритма, так и аппаратной части микроскопа было проведено численное моделирование [113]. Оно состояло в том, что синтезировались двумерные интерферограммы в полосах конечной ширины, имеющие размерность и число градаций, соответствующие видеокамере фазового микроскопа. На них накладывались шумы. И с помощью данной программы восстанавливалось двумерное распределение фазы. По сути, данные интерферограммы задают идеальную плоскость z=0. Ошибка восстановления оценивалась по двум показателям PV и rms. Проверялась нелинейность работы фазосдвигающего устройства и влияние источника излучения. Для уменьшения фазовых шумов использовалось два типа усреднения: усреднение интерферограмм и усреднение измерений.

1.7.1 Параметры моделирования

Исходными данными для моделирования являлись интерферограммы имеющие разный фазовый сдвиг, синтезированные по формуле:

$$f(A\min, A\max, x, y, \alpha, T, \Delta) = A\min \left\{ \frac{A\max - A\min}{2} \cdot \left(1 + \cos\left(\frac{2\pi}{T} \cdot (x \cdot \sin(\alpha) + y \cdot \cos(\alpha) + \Delta)\right) \right) \right\}, \quad (1.72)$$

где Amin, Amax – динамический диапазон в градациях серого;

α - угол наклона полос в плоскости ху;

Δ - фазовый сдвиг между интерферограммами;

Т – период полос.

При этом все значения, полученные с помощью (1.72) округлялось до ближайшего целого.

Для моделирования были выбраны следующие исходные параметры, представленные в таблице 1.6.

Параметр	Значение
Размер	1392×1040
Угол наклона полос	90°
Число интерферограмм	9
Устранение разрывов фазы	да
Вычитание «клина»	да
Перевод из радиан в нм	да
Пространственная фильтрация	нет
Вычитание аберраций	нет
Усреднение интерферограмм	нет
Усреднение фазовых изображений	нет

Таблица 1.6 – Исходные данные для моделирования.

Для получения фазовых изображений по синтезированным интерферограммам использовалось программа «WinPhast» [112], предназначенная для автоматизированной реконструкции фазы волнового фронта.

По сути синтезированные интерферограммы задают идеальную плоскость z=0, поэтому работа алгоритма оценивалась по двум показателям: квадратическому отклонению rms и максимальному отклонению PV.

$$rms = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^{n} y_i^2}{n}},$$
 (1.73)

$$PV = \max(y) - \min(y) \tag{1.74}$$

где у – полученное значение топограммы поверхности.

В ходе численного моделирования реконструкции фазовой составляющей волнового фронта при различных параметрах интерферограмм были получены следующие результаты, которые описаны в нашей работе [113].

1.7.2 Вычисление распределения фазы без шумов

1 Для восстановления фазовых изображений был использован 9-ти шаговый алгоритм. Параметры синтезированных интерферограмм были следующие: фазовый сдвиг между интерферограммами $\pi/2$, динамический диапазон интерферограммы - 235 градаций, соответствующий видеокамере с АЦП 8 бит (0 – 255 градаций). В этом варианте моделирования шумы на фазовом изображении обусловлены только особенностями метода фазовых шагов. Получены следующие результаты: rms = 0,10 нм, PV = 0,43 нм.

2 На следующем этапе, параметры моделирования были как в п. 1, но динамический диапазон сигнала уменьшен до 100 градаций (от 50 до 150). Этот вариант соответствует реальной ситуации, когда по некоторым причинам контраст интерферограммы может быть не очень высокий. В этом случае ошибка восстановления увеличилась до rms = 0,23 нм, PV = 0,95 нм. Исходя из этого, следует так настраивать оптическую схему, чтобы контраст полос имел максимальное значение, а гистограмма изображения имела диапазон, соответствующий динамическому диапазону видеокамеры.

Дальнейшее моделирование будет проводиться для двух динамических диапазонов градаций: 100 и 235.

1.7.3 Оценка влияния шума

1 Данный вариант моделирования отражает реальный процесс восстановления фазового распределения по набору интерферограмм с точно известным фазовым сдвигом между ними, но с наложенным на них аддитивным шумом. При этом СКО шума линейно возрастает от 1 до 2 градаций «серого», что соответствует реальному шуму ПЗС видеокамеры, полученному экспериментально (для ПЗС видеокамеры Видеоскан 285 USB с матрицей SONY ICX285). Остальные параметры интерферограмм такие же, как в 1.7.3 п.3.

В случае шумов ошибка восстановления фазы в сравнении с п. 1.7.2 п.2 увеличивается:

- при диапазоне 100 градаций: rms = 0,80 нм;

- при диапазоне 235 градаций: rms = 0,34 нм.

2 Для уменьшения погрешности реконструкции фазового изображения при влиянии случайного шума, можно использовать две процедуры усреднений: усреднение интерферограмм и усреднение фазовых изображений. Для усреднения интерферограмм используется программно реализованная функция, позволяющая накапливать видеоизображения интерферограмм в памяти ПЭВМ во время каждого фазового сдвига и в дальнейшем их усреднять. Далее по таким изображениям вычисляется фазовое изображение. Это приводит к уменьшению фотометрического шума видеокамеры. Другой тип усреднения – усреднение уже полученных фазовых изображений, позволяет подавлять ошибки алгоритма восстановления фазы.

Выбор оптимального количества усреднений является важной задачей. С одной стороны большое число усреднений позволяет, уменьшить фотометрические шумы, с другой приводит к увеличению времени захвата интерферограмм и усилению влияния различных внешних факторов, таких как вибрации, воздушные потоки, флуктуации источника и пр.

При моделировании параметры интерферограмм были такие же, как и в предыдущем пункте. Число усреднений интерферограмм: 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20. Были получены следующие результаты моделирования (рис. 1.5) при 10 усреднениях:

- при диапазоне 100 градаций rms=0,36 нм;

- при диапазоне 235 градаций rms=0,15 нм.

Далее для подавления шумов было рассмотрено усреднение по 10 интерферограммам как наиболее оптимальное с точки зрения времени захвата и ошибки восстановления.



Рисунок 1.5 - Зависимость rms (а) и PV (б) от количества усреднений интерферограмм.

3 В данном случае для уменьшения шумов проверяется влияние усреднения только фазовых изображения без усреднения интерферограмм. Данный вид усреднения позволяет уменьшить шумы, связанные с алгоритмом восстановления фазы. Так как усреднение фазовых изображений увеличивает время захвата и обработки данных, то необходимо найти оптимальное число усреднений.

Параметры интерферограмм такие же как в п. 1. Число усреднений фазовых изображений: 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20.

На рисунке 1.6 представлены результаты моделирования. Из них следует, что

- при диапазоне 100 градаций и 10 усреднениях rms = 0,33 нм;

- при диапазоне 235 градаций и 10 усреднениях rms = 0,18 нм.

Поэтому далее для подавления шумов было использовано усреднение по 10 фазовым изображениям, как наиболее оптимальное.



Рисунок 1.6 - Зависимости rms (а) и PV (б) от количества усреднений фазовых изображений.

4 В последнем случае рассмотрено влияние совместного усреднения интерферограмм и фазовых изображений на ошибку восстановления фазового распределения.

Параметры интерферограмм такие же как в п. 1. Число усреднений фазовых изображений: 10, а число усреднений интерферограмм: 5, 10, 15.

Были получены следующие результаты (рис. 1.7) при 10 усреднениях по интерферограммам и фазовым изображениям:

- при диапазоне 100 градаций rms = 0,25 нм;

- при диапазоне 235 градаций rms = 0,11 нм.


Рисунок 1.7 - Зависимости rms (а) и PV (б) от количества усреднений интерферограмм при усреднении по 10-ти фазовым изображениям.

1.7.4 Оценка влияния «раскалибровки» фазосдвигающего устройства и источника излучения

В процессе моделирования было рассмотрено два типа нарушения калибровки фазосдвигающего устройства:

- фазовый сдвиг одинаков, но не равен π/2. Тогда результирующий фазовый сдвиг будет чуть менее или более чем 4π при 9-ти фазовых шагов;

- фазовый сдвиг имеет разные (неэквидистантные) значения.

В ПО «WinPhast» есть процедура калибровки фазосдвигающего устройства, которая осуществляется визуально по экрану монитора. На экран выводится профиль интерферограммы, а изменение напряжения на

пьезоприводе производится путем перемещения курсора в окне программы. В этом случае синусоидальный профиль перемещается, пока он не пройдет дистанцию, равную двум периодам синусоиды. В зависимости от того как точно будет выставлен профиль относительно специального маркера зависит погрешность калибровки фазосдвигающего устройства.

1 Параметры интерферограмм такие же как в 1.7.3 п.1. Количество усреднений: 10 интерферограмм и 10 фазовых изображений. В данном случае была исследована «раскалибровка» первого типа.

Ошибка фазового сдвига между интерферограммами в радианах находится в диапазоне: -0,251, -0,126, 0, 0,126, 0,251 рад. Данные величины связаны с описанной процедурой калибровки и соответствуют ошибке установки профиля интерферограммы по экрану монитора на -20, -10, 0, 10, 20 пикселов.

На рисунке 1.8 представлены результаты моделирования в виде графиков зависимости rms и PV от ошибки фазового сдвига.



Рисунок 1.8 - Графики зависимости rms (а) и PV (б) от «раскалибровки» фазосдвигающего устройства 1-го типа.

2 Далее была рассмотрена «раскалибровка» 2-го типа. Параметры интерферограмм как в п. 1.7.3 п. 1. Величины фазовых сдвигов между интерферограммами соответствуют значениям, полученным из анализа всех 9 интерферограмм.

На рисунке 1.9 а представлено фазовое изображение полученное при неправильном фазовом сдвиге 2-го типа. На нем виден артефакт, который называется «2-ая гармоника», повторяющий интерферограмму, но только с удвоенной частотой полос.

Данный артефакт увеличивает ошибку восстановления фазы:

- при диапазоне 100 градаций rms = 0,62 нм;

 при диапазоне 235 градаций rms = 0,60 нм. Данный артефакт очень часто встречается на фазовых изображениях и свидетельствует о неправильной калибровке фазосдвигающего устройства.

3 Последний тип ошибки связан с плавными изменениями интенсивности источника излучения, возникающий во время захвата интерференционных изображений. Это приводит к изменению их амплитуды. При моделирование данного артефакта интенсивность изменялась линейно, что моделирует ситуацию выхода источника излучения на рабочий режим. Шаг изменения интенсивности составлял 2 градации.

Параметры интерферограмм как в п. 1.7.3 п. 1. На рисунке 1.9 а представлено восстановленное фазовое изображение при изменении интенсивности на интерферограммах для диапазона 100 градаций. Такое изменение приводит к появлению ошибки, которая повторяет саму интерферограмму. Данный артефакт носит название «1-ая гармоника».



Рисунок 1.9 – Фазовое изображение, содержащее артефакты: а - при «раскалибровке» фазосдвигающего устройства; б- при линейном изменении амплитуды исходных интерферограмм.

Таким образом, из полученного моделирования следует, что предельное значение среднего квадратического отклонения от плоскости, которое достигается при реконструкции фазы из интерферограмм методом фазовых шагов по алгоритму Харихарана-Швайдера с фиксированным фазовым сдвигом, равным $\pi/2$, по 9-ти интерферограммам, полученным на длине волны λ , с динамическим диапазоном 235 градаций, в отсутствии шумов, составляет не более $\lambda/5000$. Это первое научное положение.

1.8 Численное моделирование метода измерения фазового сдвига по разности между интерферограммами

Ранее (см. п. 1.5.1) был рассмотрен частотный анализ метода определения фазовых сдвигов по разностным интерферограммам, позволивший получить основные формулы (1.66) - (1.68). Используя такой же подход далее, можно определить способы уменьшения погрешности вычисления фазовых сдвигов в зависимости от различных факторов. Для этого было проведено численное моделирование на ПЭВМ.

Исходными данными для моделирования были три синтезированные интерферограммы, имеющие заданный фазовый сдвиг. Оценка погрешности вычисления фазового сдвига осуществлялась путем сравнения заданного фазового сдвига с вычисленным. Погрешность носила относительный характер и вычислялась как разность между полученным и заданным значениями сдвигов деленное на величину заданного сдвига.

Интерферограммы были синтезированы по формуле (1.72) и имели следующие параметры: размерность 640×480; видность полос – 0,3. На интерферограммы накладывался аддитивный шум, имеющий Гауссово распределение, уровень которого составлял 4% от максимального значения интенсивности.

1.8.1 Оценка влияния шума

Была проведено моделирование, позволившее оценить влияние шума с гауссовым распределением, аддитивно наложенного на интерферограммы, на относительную погрешность вычисления фазового сдвига. Его присутствие приводит к тому, что вектора на рис. 1.2 будут отличны от единицы [114], что в свою очередь ведет к изменению углов в треугольнике *MLK*.

Из чертежа, представленного на рис. 1.2 видно, что при наличии шума и при малых значениях фазовых сдвигов, будут меньше длины сторон *ML*, *LK* и при этом сами углы будут изменяться больше. Из этого следует, что аддитивный гауссов шум приводит к увеличению погрешности вычисления фазового сдвига. При этом она прямопропорционально зависит от его абсолютной величины.

Данный факт был проверен путем численного моделирования с использованием трех интерферограмм с одинаковым фазовым сдвигом между ними и аддитивным шумом. Они имели фазовый сдвиг $\pi/6$, $\pi/4$, $\pi/3$ и $\pi/2$ и различную величину шума (СКО шума в диапазоне 1-4%).

На рисунке 1.10 показаны результаты моделирования.



Рисунок 1.10 - Зависимость относительной погрешности вычисления фазового сдвига при различных параметрах СКО шума и фазовых сдвигах.

Из рис. 1.10 следует, что при СКО шума близкого к 1% и при фазовых сдвигах менее $\pi/6$ погрешность вычисления фазовых сдвигов большая. При этом при увеличении уровня шума она тоже резко увеличивается. Таким образом, данный метод дает лучший результат при фазовых сдвигах более $\pi/3$. В этом случае стороны треугольника *MLK* на рис. 1.2 увеличиваются и поэтому изменения углов треугольника меньше зависят от изменения его длин вследствие влияния шума.

1.8.2 Оценка влияния дробной части полосы

Как было показано ранее, погрешность измерения фазовых сдвигов зависит от ширины спектральных (+1 и -1) порядков и расстоянием между ними. Чем уже порядки, а расстояние между ними больше, тем меньше погрешность.

Наличие дробной части интерференционной полосы приводит к резкому изменению интенсивности на границе интерферограммы, что в свою очередь уширяет спектр в этих порядках и может привести к их перекрытию и, как следствие, к увеличению ошибки измерения. Это явление носит название утечка частот (от англ. spectral leakage) [115].

Для проверки этого факта и его влияния на погрешность измерения было проведено численное моделирования со следующими параметрами: целое число полос – 4; дробная часть изменялась от 0 до 2π (шаг изменения $\pi/5$), шума - 1%. Моделирование проводилось для двух значений фазового сдвига: $\pi/3$ и $\pi/2$. Результат численного моделирования представлен на рис. 1.11а.



а



Рисунок 1.11 – Зависимость относительной погрешности вычисления фазового сдвига для интерферограмм, содержащих дробную часть полосы: a – сдвиги π/3 и π/2; б – сдвиг π/2 без аподизации и с аподизацией.

По полученным результатам можно сделать следующие выводы. Представленный метод дает минимальную погрешность, когда интерферограмма содержит целое число полос или целое число и половину полосы и максимальную погрешность, когда интерферограммы содержат целое число полос и четверть полосы.

Данную проблему, связанную с наличием дробной части в поле зрения, можно решить двумя путями: настроить поле зрения интерферометра на целое число полос или же обрезать изображения до целого числа полос перед вычислением фазовых сдвигов. Если это сделать не получиться, то можно [115] использовать сглаживающие аподизирующие окна ИЛИ В пространственной области на этапе предобработки интерферограмм. Аподизация приводит к сужению спектральных порядков и уменьшению их перекрытия, что повышает точность вычисления фазового сдвига.

В ходе численное моделирования были синтезированы интерферограммам содержащие дробную часть. Перед расчетом они были сглажены по краям Гауссовым фильтром (рис. 1.12 б). Для сравнения представлен график для тех же интерферограмм, но без аподизации. Использование аподизации привело к уменьшению погрешность с 2% до 0,06%.

Таким образом с учетом вывода из раздела 1.5 следует, что вычисление фазовых сдвигов по дисперсии от разности между тремя интерферограммами и их аподизация в пространственной области позволяет уменьшить относительную погрешность вычисления фазового сдвига до 0,06%. Это второе научное положение.

1.8.3 Оценка влияния числа полос

Также было исследовано влияние числа полос на интерферограмме на погрешность вычисления фазового сдвига. При увеличении числа полос их пространственная частота увеличивается и увеличивается расстояние между спектральными порядками (+1 и -1). При этом сами порядки меньше оказывают влияние друг на друга и выражение (1.55) выполняется точнее.

Для проверки этого факта было проведено численное моделирование. Параметры моделирования следующие: число полос на интерферограммах от 1 до 10 с шагом 1. Интерферограммы содержат дробную часть равную $\pi/4$, фазовый сдвиг между ними $\pi/3$, уровень шума 1%. Результат моделирования представлен в виде графика (рис. 1.12). Он показывает, что относительная погрешность вычисления фазового сдвига менее 2%, если интерферограмма содержит не менее 4 полос.



Рисунок 1.12 – Зависимость относительной погрешности вычисления сдвига от числа полос (при дробной части π/4).

1.9 Метод динамической фазовой микроскопии

Настоящий раздел посвящен описанию метода динамической фазовой микроскопии на основе метода фазовых шагов с предварительным определением шагов по интерферограммам [116]. Данный метод похож на ранее описанный за исключением того, что для вычисления фазовых сдвигов здесь используется фурье-метод см. 1.3.2 [116].

При исследовании динамических объектов время съемки таких объектов должно быть минимальным, а сам объект не должен изменяться. При фазовых измерениях, в которых реализуется метод фазовых шагов, ситуация становится более сложной, так как за время съемки необходимо зарегистрировать как минимум три интерферограммы при различном фазовом сдвиге.

Метод был экспериментально опробован в динамическом фазовом микроскопе, в котором используется скоростная видеокамера, которая имеет частоту захвата 300 к/с, а также специальное фазосдвигающее устройство, позволяющее смещать опорное зеркало микроскопа с частотой 30 Гц.

Для восстановления фазового изображения реализован метод фазовых шагов с непрерывным фазовым сдвигом. Высокая точность измерения фазы достигается за счет захвата и обработки 10 интерферограмм [117], что обеспечивает получение фазовых изображений с частотой 30 Гц при частоте захвата кадров 300 к/с. В этом случае время, при котором объект должен оставаться неизменным, составляет 1/30 с.

Был реализован дискретного фазового метод сдвига И интерференционный автоматизированный микроскоп, В котором использовался дискретный фазовый сдвиг опорного зеркала. Дискретный фазовый сдвиг с небольшой паузой перед захватом интерферограмм позволяет снизить влияние колебательного процесса, возникающего в пьезоэлементе, однако увеличивает общее время получение данных и не подходит для исследования динамических объектов [118]. В описываемом методе динамической фазовой микроскопии реализован непрерывный фазовый сдвиг. Он обеспечивает высокую скорость регистрации интерферограмм, так как в этом случае зеркало движется без остановки синхронно с захватом кадров. В этом случае оптическая длина пути света в опорном канале изменяется непрерывно, непрерывно же изменяется и интерференционная картина. За время регистрации одного кадра контраст полос падает на sinc($\Delta/2$), где Δ – фазовый сдвиг. Если $\Delta = \pi/2$, то контраст упадет на 10%, что допустимо (см. 1.4.2).

Для расчета по методу фазовых шагов требуется N интерферограмм (N \geq 3), полученных при разных фазовых сдвигах $\Delta \phi$. На пьезоэлемент поступает напряжение, изменяющееся по треугольному закону, имеющему амплитуду U_{тр} и частоту f_{тp} (рис. 1.13 а). Интерферограммы записываются с помощью видеокамеры, имеющей частоту кадров f_{заx}. Величина перемещения зеркала D может быть записана как:

$$D = \frac{N\Delta\phi\lambda}{4\pi},\tag{1.74}$$

где λ – длина волны источника излучения.



Рисунок 1.13 - Циклограмма работы: а – напряжение на пьезоэлементе; б - импульсы камеры; в – фазовые сдвиги.

На пьезоэлемент опорного зеркала подается треугольный сигнал, а захват интерферограмм с различным фазовым сдвигом, имеющим одно и тоже направление (знак) происходит при движении зеркала в одну сторону. При этом частота напряжения f_{rp} на пьезоэлементе будет в два раза меньше, чем частотой фазовых изображений $f_{\phi u}$:

$$f_{\rm TP} = f_{\rm \phi \mu} / 2$$
. (1.75)

Частота захвата камеры f_{зах} для набора N интерферограмм будет равна:

$$f_{\text{sax}} = f_{\phi \mu} N. \tag{1.76}$$

Наличие гистерезиса на пьезокерамике приводит к нелинейности ее характеристики и необходимости калибровки. Для этой цели используется фурье-метод [117].

При увеличении и уменьшении напряжения на пьезоприводе фазовые сдвиги будут иметь разные знаки (см. рис. 1.13), поэтому сопоставляя

значения (знаки) полученных фазовых сдвигов с номерами кадров (интерферограмм), можно определить те из них, которые имеют одинаковое направление фазового сдвига. Это т.н. пачки, представляющая собой совокупность интерферограмм, имеющих одинаковый знак фазового сдвига между ними. Для того чтобы отсечь интерферограммы с малым фазовым сдвигом, значение которого может внести ошибку в дальнейшие вычисления, задаются два порога: Δφ и –Δφ. Если фазовый сдвиг между первой и второй интерферограммами меньше чем заданный порог, то вторая интерферограмма не включается в пачку.

На втором этапе по пачкам интерферограмм и соответствующим фазовым сдвигам восстанавливается фазовое изображение методом фазовых шагов. Суть этого метода заключается в аппроксимации гармонической функцией набора интенсивностей интерференционного изображения в каждом пикселе. Для это используется метод наименьших квадратов. Знание фазовых сдвигов позволяет линеаризовать получающуюся систему управлений [117].

В результате восстановления получается набор фазовых изображений, записанный с частотой следования $f_{\phi u}$ в течение времени захвата Т. Так как $f_{\phi u}$ = 30 Гц, то из этого набора можно смонтировать фильм в реальном времени.

1.10 Выводы

В главе рассмотрены основные параметры отражающих и прозрачных фазовых объектов, как объектов исследования в фазовой микроскопии. Проведен анализ методов реконструкции фазы волнового фронта. Проанализированы пространственные и временные методы. Рассмотрены основные источники ошибок методов фазовых шагов. Проведено численное моделирование метода фазовых шагов с дискретным фазовым сдвигом (алгоритм Харихарана-Швайдера) и выявлены его предельные возможности. Показано, что при наложении аддитивного шума на интерферограммы погрешность измерений возрастает, использование усреднений a интерферограмм и фазовых изображений позволяет ее снизить. Также показано, что неточное задание фазовых сдвигов обуславливает появление второй гармоники на фазовых изображениях, а изменение амплитуды интерферограмм - первой гармоники.

Проведен частотный анализ метода вычисления фазовых сдвигов по разностным интерферограмм и выведены его формулы. Показано, что использование в этих формулах дисперсии разностных интерферограмм позволяет увеличить точность измерения. Рассмотрено влияние числа полос и уровня шума на погрешность вычисления фазового сдвига. Показано, что использование аподизации интерферограмм в пространственной области позволяет увеличить точность данного метода.

Рассмотрен метод динамической фазовой микроскопии на основе предварительного определения фазовых сдвигов с помощью фурье метода.

Глава 2. Особенности формирования фазового изображения в микроскопе 2.1 Влияние когерентности источника на фазовое изображение

Важным фактором, определяющим качество получаемых интерференционных изображений и восстанавливаемым по ним фазовых изображений, является источник излучения. С появлением лазерных источников они стали широко использоваться в интерферометрии и фазовой микроскопии. Большая длина когерентности позволяла легко получать таких интерферограммы, однако качество изображений оказалось неудовлетворительным из-за присутствующих ШУМОВ. Спекл-шум. паразитные интерференционные полосы, дифракционные шумы и пр. артефакты, возникающие на изображении связанны с большой временной и пространственной когерентностью. На рис. 2.1 представлено фазовое изображение эритроцита, полученное в ходе выполнения данной работы для трех различных типов источников: лазерного излучения, лазерного излучения, прошедшего через вращающийся матовый диск и излучения точечного светодиода. Из него видно, что только понижая степень временной или пространственной когерентности можно получить увеличение качества фазового изображения.



Рисунок 2.1 - Фазовое изображение эритроцита, полученное для трех различных типов источников: а - лазерного излучения, б - лазерного излучения, прошедшего через вращающийся матовый диск и в - излучения точечного светодиода.

Применительно к фазовой микроскопии данный вопрос был рассмотрен в работах [119, 120]. Рассматривались СКО пространственных и временных шумов (стабильность) для источников с различной степенью пространственной и временной когерентности.

В работе [119] была рассмотрена зависимость СКО пространственного шума от длины когерентности источника. В случае использования лазера с длиной когерентности более 10 м уровень шума составил 220 мрад. При уменьшении степени пространственной и временной когерентности уровень шумов уменьшается со 120 мрад до 8,3 мрад [119]. Из зависимости длина когерентности/СКО шум следует:

- при увеличении пространственной когерентности с 0,408 до 11,8 мкм СКО шума увеличивается с 17 мрад до 120 мрад (со средним наклоном 0,57);

- при увеличении временной когерентности с 1,4 мкм до 63,3 мкм СКО шума увеличивается с 70 до 120 мрад (при постепенным уменьшением наклона от 0,22 до 0,08).

Сравнение наклонов кривых показывает, что уменьшение степени пространственной когерентности уменьшает СКО шума в 2.6 - 7.1 раз больше, чем уменьшение степени временной когерентности.

В работе [120] вопрос пространственных и временных шумов был исследован экспериментально путем анализа СКО фазового изображения для трех различных источников: лазерного излучения, лазерного излучения, прошедшего через вращающийся матовый диск и излучения точечного светодиода. В случае лазерного источника СКО пространственного шума и временного шума составило 8,2 нм (98 мрад) и 1,5 нм (18 мрад), для лазерного излучения, прошедшего через вращающийся матовый диск 2,4 нм (29 мрад) и 1,3 нм (16 мрад) и для излучения точечного светодиода 1,2 нм (14 мрад) и 0,5 нм (6 мрад).

Таким образом, для повышения качества получаемых фазовых изображений необходимо понижать степень когерентности используемого источника излучения.

2.2 Исследование формирования интерференционного изображения в микроскопе Линника

2.2.1 Микроскоп Линника (МИИ-4М)

В фазовой микроскопии важное значение имеет схема интерферометра Линника. Она является частным случаем схемы Майкельсона в которой, для получения изображения, используются два идентичных микрообъектива. Эта особенность позволяет получать изображения с использованием протяженного источника пространственно некогерентного излучения. Такой источник позволяет существенно уменьшить уровень когерентных шумов и интерференционных изображений. Использование улучшить качество различных микрообъективов позволяет добиваться большого увеличения и большой числовой апертуры. Двойное прохождение излучения через исследуемый объект увеличивает чувствительность данной схемы к измерению ОРХ. Использование протяженного источника определяет некоторые особенности формирования и локализации интерференционной картины. Исходя из этого, данная схема была выбрана в качестве основной для реализации фазовых микроскопов и подробно рассмотрена в данной диссертационной работе.

На основе этой схемы реализован микроскоп МИИ-4 который производится ОАО ЛОМО (Россия). Он предназначен для определения параметров шероховатости отражающих изделий по искривлению интерференционных полос, наблюдаемых в окуляр. Данный прибор был разработан под руководством советского академика В. П. Линником [23] и использовался для оценки качества полированных поверхностей.

Прибор имеет ряд недостатков, связанных с ручной обработкой интерферограмм и поэтому погрешность измерения не превышает λ/10. На основе это микроскопа был разработан автоматизированный вариант данного прибора – МИА-1М который рассмотрен в 6 главе.

МИИ-4 представляет собой инвертированный микроскоп. Его оптическая схема с протяженным источником пространственнонекогерентного света представлена на рисунке 2.2 [121]. Он включает в себя предметный 3,4,5,6,7 и опорный 3,8,9,10 каналы. Каждый канал представляет собой схему оптического микроскопа с освещением по Кёлеру [124]. С помощью проекционной линзы 11 и микрообъективов 5 и 9 изображение объекта 6 и зеркал 7, 10 формируется в плоскости регистратора 12 предметным и опорным пучками соответственно. В плоскости регистратора эти пучки создают интерференционное изображение. Таким образом на регистраторе одновременно имеется изображение объекта с наложенными на него интерференционными полосами. Следует сказать, в данной схеме оптическая разность хода предметного и опорного каналов близка к нулю, т.к. использование идентичных микрообъективов и конструкция данной схемы позволяет выровнять оптическую длину пути в опорном и предметном каналах. Таким образом, эта схема позволяет получать интерференционную картину как для монохроматического излучения, так и для «белого» света.



Рисунок 2.2 – Схема микроскопа Линника: 1 – протяженный источник света; 2, 11 – объективы; 3, 8 – передние фокальные плоскости микрообъективов; 4 – полупрозрачное зеркало; 5, 9 – микрообъективы; 6 – объект; 7, 10 –предметное и опорное зеркала; 12 – плоскость регистратора.

Протяженный пространственно-некогерентный источник света 1 можно представить в виде набора некогерентных точечных источников, например, A, B, C (рис. 2.2). Каждый точечный источник формирует свою интерферограмму в зависимости от расположения относительно оптической оси. Например, источник B переотображается линзой 2 в переднюю фокальную плоскость микрообъективов 5, 9 (на рис. обозначены цифрами 4 и 8). После микрообъективов идут параллельные пучки, которые освещают опорное зеркало 10 и предметное зеркало 7 с расположены на ним объектом 6. Отразившись от зеркал, пучок идет в обратную сторону и образует на регистраторе 12 свою интерференционную картину. Если оперное зеркало немного наклонено, то между пучками образует угол и на регистраторе образуется интерферограмма в полосах конечной ширины. Ширина полос интерферирующими пучками. Искажения зависит ОТ угла между интерференционных обусловлены формой фронта, полос волнового прошедшего через объект 6. Для одного точечного источника локализация и контраст интерференционной картины определяется зоной пересечения предметного и опорного пучков. От других точечных источников (А и С), лежащих в той же плоскости ход лучей будет подобен только что рассмотренному, поэтому на рис.2.2 с помощью пунктирных линий обозначены оси этих пучков, а на рис.2.3 показана схемы прохождения лучей через объект 6.



Рисунок 2.3 – Прохождение излучения через объект, находящийся на зеркале.

Объект 6 должен находиться в области пересечения пучков, идущих от точечных источников. Из рис. 2.2 и 2.3 следует, что после микрообъективов от других точечных источников распространяются наклонные к оптической оси параллельные пучки, максимальный угол которых зависит от числовой апертуры микрообъективов. Зона перекрытия пучков определяется положением зеркала 7. Если оно находится в задней фокальной плоскости микрообъектива 5, то перекрытие максимально. Это же относится к зеркалу 10 и микрообъективу 9.

Интерферограммы от любого точечного источника будут иметь одинаковую ширину полос, но разное искривление, так как для каждой такой интерферограммы объект будет зондироваться под другим углом и свет будет идти по другому пути через него.

Таким образом, в плоскости регистратора будет формироваться набор интерферограмм от каждого точечного источника, имеющих одинаковый период и ориентацию, определяемые углом наклона зеркал 7, 10.

Формируемая точечным источником интерферограмма будет иметь вид:

$$i(x, y; \theta, \phi, \alpha) = 1 + \cos\left[\frac{2\pi}{\lambda}(\Delta(x, y; \theta, \phi) + x \cdot \sin\alpha)\right], \quad (2.1)$$

где *i*' - интенсивность пучков, α - угол между интерферирующими пучками; *θ*,*φ* - полярный и азимутальный углы единичного вектора зондирования.

Если источник протяженный, то результирующая интерферограмма I(x,y) будет являться суммой интерферограмм от каждого точечного источника (2.2). При непрерывном наборе таких источников интерферограмма будет задаваться выражением:

$$I(x, y) = \iint_{\theta, \phi} i(x, y; \theta, \phi) \sin \theta d\theta d\phi$$
(2.2)

В (2.2) область интегрирования, зависит от углового размера источник и числовой апертуры микрообъектива.

2.2.2 Область локализации интерференционного изображения и его контраст

Из 2.2.1 следует, что схема Линника с протяженным источником имеет

локализованное вдоль оптической оси контрастное интерференционное изображение, которое совпадает с плоскостью регистратора 12 [121]. В этой же плоскости строится изображение объекта. Таким образом плоскость изображения и максимального контраста в микроскопе Линника совпадают.

Это было проверено экспериментальным путем и численным моделированием. Была исследована зависимость видности интерференционных полос от размера диафрагмы и величины дефокусировки (с шагом 3 мкм). Было захвачено 11 интерферограмм для диафрагмы от 1/1, 2/3, 1/2 (по лимбу микроскопа МИИ-4М) (рис. 2.4 а, б).





Рисунок 2.4 – Интерферограммы в микроскопе различной дефокусировке: а- в фокусе, б- дефокусировка 30 мкм.

Также численно было получено значение видности при дефокусировке на z. Уравнение интерферограммы может быть записано как:

$$i(x, y; \theta, \alpha) = 2i' \cdot \left\{ 1 + \cos \left[\frac{2\pi}{\lambda} (z \cos(\theta - \alpha) + x \cdot \sin \alpha) \right] \right\}.$$
 (2.3)



Рисунок 2.5 – Разности хода между интерферирующими лучами при дефокусировке на z.

Исходя из параметров захваченных интерферограмм по формуле (рис. 2.4) можно найти угол α:

$$\alpha = \frac{\arcsin(\frac{\lambda}{B})}{2} \tag{2.4}$$

где λ =632 нм - длина волны и В=6 мкм (ширина полос). Угол составил α =3,128°.

На рис. 2.6 а, б и в представлены графики видности полос при различных диафрагмах (1/1, 2/3, 1/2) при дефокусировке (от 0 до 30 мкм) полученные экспериментально (точки) и с помощью численного моделирования (сплошная линия) в программе MathCad. Из графиков видно, что в целом теоретические и экспериментальные зависимости показывают общую тенденцию к уменьшению видности при увеличении дефокусировки, причем при меньших значениях диафрагмы зависимость имеет более пологую форму и зона контрастных полос увеличивается.



Рисунок 2.6 – Сравнение видности полос, полученной теоретически (сплошная линия) и экспериментально (точки) от дефокусировки Z (мкм) и диафрагмы: а- 1/1, б- 2/3, в- ½.

Таким образом, в микроскопе Линника с монохроматическим пространственно-некогерентным источником света формируемое им изображение является суммой интерферограмм, образуемых различными точками источника света, а контрастная интерференционная картина наблюдается в плоскости, в которой формируются изображения предметного и опорного зеркал. Данное утверждение является третьим научным положением.

2.3 Исследование влияния опорного зеркала микроскопа на фазовое изображение

При исследовании супергладких поверхностей на микроскопе МИА-1М, созданном на базе микроскопа МИИ-4М по схеме Линника было обнаружено, что реализованный в нем способ фазового сдвига путем перемещения опорного зеркала, необходимый для реализации метода фазовых шагов [118, 121], приводит к небольшой дефокусировке изображения этого зеркала и, как следствие, к падению контраста интерференционных полос. Это в свою очередь увеличивает погрешность измерения фазы.

Для иллюстрации этого факта на рис. 2.6 а представлена оптическая схема опорного канала. Она включает следующие элементы: зеркало 1, микрообъектив 2 и проекционный объектив 3. Последние два элемента образуют телескопическую систему. Передняя фокальная плоскость микрообъектива совпадает с плоскостью зеркала. Задняя фокальная плоскости 3 совпадает проекционного объектива c плоскостью регистратора интерференционного изображения, например, матрицы видеокамеры.



Рисунок 2.6 - Схема опорного канала микроскопа Линника: 1 - зеркало; 2 – микрообъектив; 3 – проекционный объектив; 4 – плоскость регистратора; 5 – плоскость фокусировки. а) исходное состояние; б) состояние после сдвига зеркала 1; в) состояние после сдвига зеркала 1 и микрообъектива 2.

В микроскопе МИА-1М для обеспечения фазового сдвига используется смещение опорного зеркала 1 вдоль оптической оси (рис. 2.6 б). В этом случае, как видно из рис. 2.6 б, смещение зеркала приводит к смещению его изображения 5 относительно регистратора 4. Такой способ реализации фазового сдвига приводит к тому, что в плоскости регистратора 4 будут

интерферировать пучки с различным продольным сдвигом, что с одной стороны приведет к падению контраста интерференционного изображения, а также к изменению составляющей волнового фронта, связанной с шероховатостью и формой поверхности опорного зеркала. Таким образом, не идеальная поверхность опорного зеркала, содержащая различные дефекты и имеющая определенный микрорельеф при каждом фазовом шаге будет давать различный вклад, что в дальнейшем приведет к ошибками восстановления фазы волнового фронта, отраженного от исследуемого объекта.

Возможным решением данной проблемы является изменение способа задания фазового сдвига. Предлагается такой способ сдвига, при котором изображение опорного зеркала не будет дефокусироваться. Для этого достаточно совместно смещать микрообъектив 2 и зеркало 1 (см. рис. 2.6 в). В этом случае, так как между микрообъективом 2 и проекционным объективом 3 отраженный от зеркала пучок параллелен, то такой сдвиг не будет вносить изменения в изображение опорного зеркала в плоскости регистратора 4.

Получаемые интерферограммы содержат информацию как о топограмме измеряемой поверхности и опорного зеркала. Под словом «топограмма» в данном случае понимается совокупность высот исследуемой поверхности, относительно некой нулевой точки. Ее уравнение в плоскости регистратора можно записать в следующем виде:

$$I(x, y) = \left| Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}2z_{o\delta}(x,y)} + Be^{i[\frac{2\pi}{\lambda}2z_{on}(x,y)+\varphi(x,y)]} \right|^{2} = , \qquad (2.1)$$
$$= |A|^{2} + |B|^{2} + 2|A||B|\cos\left\{\frac{4\pi}{\lambda}[z_{o\delta}(x,y) - z_{on}(x,y)] - \varphi(x,y)\right\}$$

где A и B – амплитуды, соответственно, объектного и опорного пучков, $z_{ob}(x,y)$ и $z_{on}(x,y)$ – высота топограммы, соответственно, объекта и опорного зеркала в точке (x,y), λ - длина волны, $\phi(x, y)$ – фаза комплексной амплитуды волнового фронта, характеризующая аберрации оптической схемы микроинтерферометра.

Цифра 2 в показателе экспоненты вызвана тем, что в микроинтерферометре Линника объект и опорное зеркало работают «на отражение». В результате реконструкции фазы волнового фронта (2.5) реконструируется фазовое распределение:

$$\Phi_{o\delta}(x,y) = \frac{4\pi}{\lambda} [z_{o\delta}(x,y) - z_{on}(x,y)] - \varphi(x,y) = \frac{4\pi}{\lambda} \Delta z_{o\delta}(x,y) - \varphi(x,y), \qquad (2.6)$$

ГДе $\Delta z_{o\delta}(x, y) = z_{o\delta}(x, y) - z_{on}(x, y).$ (2.7)

Таким образом, вместо истинной топограммы $z_{ob}(x,y)$ восстанавливается разность между топограммой исследуемого объекта и опорного зеркала (2.7).

Распределение точек топограммы поверхности шероховатого объекта z(x,y) представляет собой случайную функцию [125]. Поэтому функции $z_{ob}(x,y)$ и $z_{on}(x,y)$, входящие в (2.7), также являются случайными. Такие функции характеризуются статистическими параметрами - дисперсией и среднеквадратическим отклонением (СКО) σ профиля. Через СКО могут быть определены параметры шероховатости [125, 126]:

$$R_a = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \cdot \sigma \approx 0.8\sigma \tag{2.8}$$

$$R_z \approx 4\sigma \tag{2.9}$$

Так как «дисперсия разности двух случайных функций равна сумме дисперсий этих функций» [125], то из (2.7) следует:

$$\sigma^2(\Delta z_{o\delta}) = \sigma^2(z_{o\delta}) + \sigma^2(z_{on}), \qquad (2.10)$$

т.е. квадрат СКО измеренной топограммы шероховатой поверхности объекта $\sigma(\Delta z_{ob})$ складывается из квадрата СКО истинной топограммы поверхности объекта $\sigma(z_{ob})$ и квадрата СКО топограммы поверхности опорного зеркала $\sigma(z_{on})$.

Поэтому для измерения параметров шероховатости объекта надо уменьшать шероховатость поверхности опорного зеркала. В микроскопе МИИ-4М установлено зеркало, которое имело параметр шероховатости R_a равный 0,62 нм. Это подтверждено нашими измерениями на интерферометре Zygo NewView 6200.

Для уменьшения влияния шероховатости опорного зеркала на измерения, в микроскоп было установлено зеркало из ситалла, изготовленное по технологии, описанной в [87]. Предварительные измерения его шероховатости показали, что его $R_a = 0,16$ нм, что соответствует СКО $\sigma(z_{on})=0,2$ нм согласно (2.8).

Из (2.10) следует, что при измерении СКО поверхности необходимо корректировать полученное значение в соответствии с формулой:

$$\sigma(z_{o\delta}) = \sqrt{\sigma^2(\Delta z_{o\delta}) - \sigma^2(z_{on})}.$$

Дополнительной процедурой, позволяющей повысить точность измерений является процедура устранения аберраций оптической системы $\varphi(x,y)$ (см. (2.2)), представляющие собой систематическую погрешность. Для этого перед измерениями записывается топограмма (фазовое изображение) гладкого эталонного зеркала с малой шероховатостью и волнистостью, которая содержит эти аберрации. Она носит название файла ошибки. Далее оно вычитается из топограммы исследуемого объекта.

Фазовое изображение эталонного зеркала представляет разность между топограммой эталонного и опорного зеркал:

$$\Phi_{\Im T}(x,y) = \frac{4\pi}{\lambda} [z_{\Im T}(x,y) - z'_{on}(x,y)] - \varphi(x,y) = \frac{4\pi}{\lambda} \Delta z_{\Im T}(x,y) - \varphi(x,y), \qquad (2.11)$$

где $\Delta z_{3T}(x, y) = z_{3T}(x, y) - z'_{on}(x, y)$, Z_{3T} –топограмма эталонного зеркала, $z'_{on}(x, y)$ - топограмма опорного зеркала, которая отличается от $z_{on}(x, y)$ в (2.7), в силу случайности функции.

Для устранения аберраций из фазового изображения объекта (2.6) вычитается фазовое изображение эталонного зеркала (2.11):

$$\Delta \Phi(x, y) = \Phi_{o\delta}(x, y) - \Phi_{\Im T}(x, y) =$$

= $\frac{4\pi}{\lambda} [z_{o\delta}(x, y) - z_{on}(x, y) - z_{\Im T}(x, y) + z'_{on}(x, y)] = \frac{4\pi}{\lambda} \Delta z(x, y)'$ (2.12)

ГДе $\Delta z(x, y) = \Delta z_{oo}(x, y) - \Delta z_{\Im T}(x, y)$.

Отсюда СКО полученного фазового изображения будет равно

$$\sigma^{2}(\Delta z) = \sigma^{2}(\Delta z_{o\delta}) + \sigma^{2}(\Delta z_{\Im T}) = \sigma^{2}(z_{o\delta}) + 2\sigma^{2}(z_{on}) + \sigma^{2}(z_{\Im T}), \qquad (2.13)$$

здесь в предположении, что $\sigma^2(z_{on}) = \sigma^2(z'_{on})$.

Из этого следует, что при устранении фазовых аберраций микроскопа с помощью эталонного зеркала, СКО результирующей топограммы представляет собой сумму СКО измеряемого объекта, удвоенного СКО опорного зеркала и СКО эталонного зеркала.

Для вычитания аберраций мы использовали эталонное зеркало, изготовленное из карбида кремния из состава «Государственного вторичного эталона единицы длины в области измерения параметров шероховатости Rmax в диапазоне от 0,02 до 1,80 мкм и Ra номинального значения 0,0015 мкм» 2.1.ZZA.0034.2015. У него СКО топограммы шероховатой поверхности составляет $\sigma(z_{\text{эт}})=0,18$ нм.

Таким образом, при измерении шероховатости необходимо вычитать из полученного значения СКО опорного и эталонного зеркал:

$$\sigma(z_{oo}) = \sqrt{\sigma^2(\Delta z) - 2\sigma^2(z_{on}) - \sigma^2(z_{\Im T})} . \qquad (2.14)$$

Предложенное техническое решение было реализовано в фазовом микроскопе МИИ-4М с протяженным монохроматическим пространственно-Его работоспособность некогерентным источником света. было экспериментально подтверждено совместными измерениями профиля поверхности супергладких поверхностей на микроскопе МИА-1М, где был реализован данный метод и сканирующем микроскопе белого света Zygo NewView 6200 см. раздел 5.1.

Таким образом, фазовый микроскоп с монохроматическим пространственно-некогерентным источником света, в котором при осуществлении фазового сдвига плоскость опорного зеркала остается оптически сопряженной с плоскостью регистратора, позволяет измерять

высоту исследуемого объекта с аксиальным разрешением 0,25 нм. Это четвертое научное положение.

2.4 Исследование влияния фокусировки микроскопа на фазовое изображение

В [127] приведены результаты измерений латерального разрешения интерференционного микроскопа для разных значений длины волны оптического излучения и высоты прямоугольной фазовой ступеньки, показавшие зависимость этих результатов от соотношения между длиной волны и высотой ступеньки и возможность получения латерального разрешения, превосходящего дифракционный предел Аббе.

Фазовый объект в виде прямоугольной ступеньки образован двумя параллельными плоскостями, сдвинутыми по высоте на величину h и имеющими одинаковый коэффициент отражения. Объекты такого типа характерны для микроэлектромеханических систем и микроэлектроники в целом. Для получения максимального разрешения необходимо выполнить точную фокусировку. Однако при работе с фазовыми объектами в виде ступеньки необходимо учитывать, что обе плоскости не могут быть одновременно в фокусе. Либо одна, либо другая, или обе плоскости находятся вне фокуса, а при увеличении высоты ступеньки до значений, превышающих R_{Z} изображение будет глубину резкости одной ИЗ плоскостей расфокусировано.

Глубина резкости определяется по размеру пятна Эйри и рассчитывается по формуле:

$$R_{\rm z} = 2\lambda/(NA)^2 \tag{2.15}$$

где *λ* - длина волны оптического излучения, *NA* – числовая апертура.

При увеличении числовой апертуры *NA* значение *R_Z* уменьшается, а аксиальная разрешающая способность микроскопа повышается. Для максимальных значений числовой апертуры иммерсионных объективов

(*NA*=1,3) и λ =500 нм величина R_Z =590 нм, что требует очень точной фокусировки при построении изображений. Для сравнения: штатный объектив микроинтерферометра Линника МИИ-4М имеет значение числовой апертуры 0,65 и, соответственно, R_Z = 2,37 мкм.

Глубина резкости имеет большое значение для фокусировки, так как определяет возможные пределы перемещения плоского объекта вдоль оси без существенного ухудшения качества изображения. Очевидно, что фазовые объекты высотой меньше или больше глубины резкости ($h < R_Z$, $h > R_Z$) должны рассматриваться отдельно. В данном случае использовались ступеньки, высота которых была существенно меньше глубины резкости.

В связи с наличием постоянной дефокусировки изображения фазовой ступеньки были проведены экспериментальные исследования и численное моделирование зависимости латерального разрешения фазового микроскопа от фокусировки, а также оценка возможности точной фокусировки по амплитудному изображению [128].

2.4.1 Фокусировка по амплитудному изображению

В работе на фазовом микроскопе всегда присутствует этап фокусировки называемому, «живому» амплитудному изображению, ΠО, так или показывающему распределение в поле зрения микроскопа интенсивности излучения, отраженного от объекта. Процесс фокусировки завершен, когда границы деталей изображения становятся контрастными и легко различаются глазом. При этом суммарная интенсивность излучения, отраженного от объекта, максимальна. Это используется при построении алгоритмов автоматической фокусировки. Особенность изображения «живого» заключается в том, что основание и вершина ступеньки имеют одинаковый коэффициент отражения и практически не различимы визуально. На изображении наблюдается лишь граница между ними в виде одной или нескольких полос разной интенсивности, параллельных области перепада высот ступеньки. Эти полосы – результат интерференции излучения,

дифрагировавшего на краях верхней и нижней плоскостей. Они видны в небольшом интервале отклонений от фокуса, определяемом глубиной резкости. Их вид и количество зависят от высоты перепада, а также от положения ступеньки относительно плоскости фокусировки, что необходимо при настройке на фокус.

Применяя объектив с большой числовой апертурой можно видеть, что при малой высоте ступеньки (около $\lambda/10$) фокусировка сопровождается заметной трансформацией изображения в области перепада высот ступеньки с уменьшением количества полос, что создает возможность привязки структуры изображения к положению фокуса z_f . Изменение вида полос наблюдается при наклоне ступеньки вдоль плоскости перепада высот, когда положение ее разных участков, попадающих в поле зрения микроскопа, будет разным относительно фокуса. Значительно сложнее обстоит дело при большой высоте ступеньки (около $\lambda/4$ и больше). В этом случае вид дифракционного изображения изменяется слабо в процессе фокусировки, и практически невозможно определить положение фокуса визуально.

С учетом изложенного выше, настройка фокуса в фазовом микроскопе интерференционным полосам, осуществляется по формируемым при включении опорного канала. При этом добиваются максимального контраста профиля полос И синусоидальности полос. Одновременно с ЭТИМ регистрируется суммарная по поверхности интенсивность отраженного излучения и вид ее распределения (суммарный контраст интерференционной картины). При этом учитывается расположение области перепада высот относительно центра поля зрения, так как основание ступеньки и ее высота вносят разный вклад в суммарную интенсивность, и по-разному влияют на суммарный контраст интерференционной картины.

Таким образом, при измерениях следует отказаться от поиска точного фокуса, и изменить положение объекта относительно фокуса в пределах диапазона фокусировки контролируемым способом, например, при помощи

нанопозиционера провести измерения в каждой точке, затем выбрать ту, в которой будет достигнут ожидаемый результат.

Для демонстрации данного вывода измерены и рассчитаны численными линейных методами значения интервалов δx . разрешаемых интерференционным микроскопом при различном положении фазового объекта относительно фокуса $\Delta z = z - z_f$. Величина δx , как известно, определяет разрешающую способность (разрешение) микроскопа обратно И пропорциональна ей.

2.4.2 Численное моделирование

В связи с отсутствием набора фазовых ступенек, необходимого для подробного анализа зависимости разрешения от высоты, исследование проведено путем численного моделирования рассеяния электромагнитных полей на бесконечно протяженном объекте в виде прямоугольного выступа. Ширина выступа достаточна для того, чтобы каждую из двух ступенек рассматривать независимо. Высота ступенек изменялась в диапазоне 10–210 нм.

Моделирование осуществляли на основе приближенного решения уравнений Максвелла методом конечных разностей во времени (FDTD, Finite Difference in Time Domain) [129, 130]. Поле рассеянной волны регистрировали на некоторой плоскости, параллельной плоскости выступа, а затем пересчитывали в плоскость фокусировки микроскопа при помощи процедуры обратного распространения [130, 131]. Расстояние до фокуса оптической системы отсчитывали от середины ступеньки.

Для приема отраженного излучения использовали иммерсионный объектив с показателем преломления жидкости n = 1,46, поэтому оптическая высота фазовой ступеньки увеличивалась в n раз. Для упрощения представления результатов иммерсионную жидкость исключали из моделирования, а длины волн уменьшали в n раз. В результате вместо доступного в эксперименте интервала длин волн 458 – 633 нм для
моделирования использовался интервал 313 – 419 нм. Чтобы получить зависимости оптического разрешения от фокусировки, для каждой комбинации длина волны/высота ступеньки проводили расчет при разных положениях ступеньки относительно фокуса оптической системы в диапазоне –500... +500 нм с интервалом 100 нм.

Моделирование показало, что вид зависимости разрешения от величины и знака дефокусировки Δz определяется соотношением между длиной волны λ и высотой ступеньки h. При малой высоте ступеньки самое высокое разрешение получено при Δz =0, а при удалении от фокуса оно снижается, т.е. величина δx увеличивается, причем монотонным образом. При увеличении высоты ступеньки монотонность нарушается, а максимальное разрешение может быть, как в положении точного фокуса, так и вне его.

Ниже в таблице 2.1 приведены значения линейных интервалов δx в нанометрах для четырех значений высоты ступеньки. Значения 20 нм и 180 нм – это значения высоты ступенек, которые использовались в эксперименте. Для высоты ступеньки 140 нм получены минимальные значения разрешаемых линейных интервалов, т.е. максимальное разрешение. Высота ступеньки 120 нм выбрана потому, что она достаточно близка по величине к $\lambda/4$, когда согласно [132] разрешение должно быть максимальным, и при этом наблюдается высокое разрешение. Представленные в таблице данные показаны в логарифмическом масштабе (рис.2.2).



Рисунок 2.7 - Зависимость величины разрешаемого интервала δx от дефокусировки, полученная численным методом на длине волны 419 нм для ступенек, высотой: 20 нм (\blacklozenge), 120 нм (\circlearrowright), 140 нм (\blacktriangle), 180 нм (\blacksquare).

Таблица 2.1. Значения интервалов δх фазового микроскопа в нанометрах в зависимости от дефокусировки оптической системы для *λ*=419нм

Вы	Отклонение от фокуса <i>Д</i> z, нм										
сот а <i>h</i> .	-500	-400	-300	-200	-100	0	100	200	300	400	500
HM											
20	1280	1040	760	620	600	580	600	620	740	1060	128
120	40	40	60	80	120	120	140	160	160	180	0 180
140	60	40	20	40	20	20	40	20	40	40	40
180	200	180	180	180	160	160	160	160	160	160	180

Численное моделирование подтвердило возможность получения разрешения интерференционного микроскопа, превышающего дифракционный предел Аббе. Этот результат получается при некоторых определенных положениях ступеньки относительно фокуса оптической системы, зависящих от λ и h. Высота ступеньки, при которой достигается самое высокое разрешение, близка к $\lambda/3$, что отличается от высоты $\lambda/4$, приведенной в [132]. Можно отметить некоторые общие тенденции в характере зависимости разрешения от дефокусировки. При h около $\lambda/15$ зависимость практически симметрична относительно фокуса, при $\lambda/15 < h < \lambda/3$ разрешение выше (ступенька размещена к объективу ближе, чем фокус), а при $h > \lambda/3$ – дальше, чем фокус.

2.4.3 Экспериментальные исследования

Экспериментальные исследования проводились при помощи автоматизированного интерференционного микроскопа МИА-1, работающего по методу фазовых шагов. Оптическая схема эксперимента описана в [127]. В эксперименте был использован аргоновый и гелий-неоновый лазеры, обеспечивающие длины волн 458–514 нм и 632,8 нм соответственно. В качестве объектов исследований использовались эталонные меры высоты ступенек с прямоугольным профилем и номинальной высотой 179,4±2,0 нм и 19,9±0,8 нм из состава вторичного эталона единицы длины в области измерения параметров шероховатости (2.1.ZZA.0034.2015). Изображение формировалось иммерсионным объективом с глицерином в качестве иммерсионной жидкости.

Ступеньки наклоняли на небольшой угол относительно зондирующего пучка вдоль области перепада высот так, что положение крайних точек плоскости выступа (или плоскости основания) относительно друг друга отличалось приблизительно на 0,7 мкм. Это позволяло при регистрации одного фазового изображения получить ряд профилей ступеньки на различном удалении от фокуса. Во время измерений ступеньку сдвигали на высоту 300 нм при помощи нанопозиционера. Этот сдвиг вместе с наклоном ступеньки позволил получить необходимый набор данных о разрешении интерференционного микроскопа в зависимости от положения ступеньки

относительно фокуса с тем же интервалом дефокусировки, как и при численном моделировании.

При малой высоте ступеньки интервал бх, рассчитанный по фазовому изображению, был больше интервала, всегла соответствующего дифракционному пределу Аббе, и возрастал при увеличении длины волны. При этом он был меньше, чем показало численное моделирование, а его зависимость от дефокусировки не была такой сильной, хотя и была заметна, особенно на длине волны 633 нм. На рис. 2.8 приведены данные, полученные на длинах волн 458 и 633 нм для высоты ступенек 20 и 180 нм (с учетом иммерсии 29 нм и 263 нм, соответственно). Для ступеньки высотой 180 нм получены другие результаты. Во-первых, на длине волны 633 нм значения разрешаемого интервала δx меньше величины 178 интервала HM, соответствующего дифракционному пределу (Напомним, что величина разрешаемого интервала в [127] определялась по полуширине первой производной от профиля фазового изображения ступеньки). Зависимость разрешения ОТ дефокусировки показывает некоторое периодическое отклонение от среднего, что согласуется с видом зависимости разрешения, полученной численным методом. На длине волны 458 нм в некоторых положениях ступеньки относительно фокуса наблюдается аномально низкое разрешение. Это является следствием того, что дифракционные полосы на фазовом изображении сливаются вместе, и профиль сечения фазового изображения резко расширяется, что приводит к ошибкам измерения. В целом же, можно отметить, что для длины волны 458 нм и высоты ступеньки 263 нм (с учетом иммерсии) разрешение выше и ближе к центру диапазона фокусировки, где результаты измерений изменяются достаточно слабо и группируются вокруг некоторого среднего значения.



Рисунок 2.8 - Зависимость величины разрешаемого интервала δx от положения ступеньки в пределах диапазона фокусировки, полученная экспериментальным методом

Были проведены также измерения со ступенькой 180 нм без использования иммерсии. На длине волны 633 нм высота ступеньки оказывается между $\lambda/4$ и $\lambda/3$. В этом случае, иммерсионный объектив использовали не в штатном режиме, но это не помешало получить наилучший результат по разрешению, при котором $\delta x = 46$ нм. Отсутствие иммерсии привело к значительному увеличению глубины резкости и, соответственно, диапазона фокусировки. Зависимость величины δx от фокусировки для длин волн 633 и 458 нм показана на рис. 2.9. На длине волны 458 нм разрешение низкое, его относительное изменение в пределах диапазона фокусировки невелико. А вот на длине волны 633 нм четко видно, что величина интервала δx уменьшается на краях диапазона фокусировки, а в центре – повышается. Соответственно, разрешение на краях повышается, а в центре -понижается. Такого типа зависимость при численном моделировании (с учетом влияния

иммерсии) не наблюдалась. Заметим, что высокое разрешение получилось на обоих концах диапазона фокусировки, где приосевые и наклонные лучи играют разную роль в формировании фазового изображения.



Рисунок 2.9 - Зависимость величины разрешаемого интервала δx от положения ступеньки в пределах диапазона фокусировки для h=180 нм в отсутствие иммерсии.

Результаты измерений, в которых объектив предметного канала использовался в штатном режиме, не противоречат результатам численного моделирования, поскольку не показана четкая взаимосвязь между латеральным разрешением и качеством фокусировки (за исключением случая нештатного использования иммерсионного объектива).

2.5 Исследование влияния материала объекта на фазовое изображение

Интерференционные микроскопы с автоматизированной расшифровкой интерферограмм достигают аксиальной разрешающей способности до единиц ангстрем. При такой высокой разрешающей способности существенное влияние на результат измерений оказывают материалы, из которых изготовлен исследуемый объект. В частности, при отражении электромагнитной волны от участков поверхности, состоящих из материалов, имеющих разный

комплексный показатель преломления, возникает дополнительный фазовый сдвиг (PSOR – phase shift on reflection, сдвиг фазы при отражении) [133, 134].

Рассмотрим более подробно физику данного процесса. «Коэффициент отражения электромагнитной волны в случае ее нормального падения на границу раздела, состоящую из двух различных сред, имеющих показатели преломления n_0 и n_1 определяется как» [124]:

$$r = \frac{E_r}{E_i} = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1},$$
(2.16)

«где E_r и E_i – амплитуды отраженной и падающей волн, соответственно» [124].

«В общем случае показатель преломления носит комплексный характер *n'=n-ik* и включает *n* – показатель преломления и k – коэффициент поглощения» [124].

Падающее излучение отражается на границе воздух-поверхность или при использовании микрообъективов с числовой апертурой больше 1 от границы иммерсия-поверхность. В этом случае комплексный показатель преломления воздуха равен n_0 , а исследуемой поверхности – $n_1'=n_1-ik_1$. Подставляя эти числа в (2.16) и, выделяя действительные и мнимые части, получаем:

$$r = \frac{E_r}{E_i} = \frac{n_0^2 - (n_1^2 + k_1^2)}{(n_0 + n_1)^2 + k_1^2} + i \frac{2n_0k_1}{(n_0 + n_1)^2 + k_1^2} = a + ib.$$
(2.17)

Из (2.17) следует, что разность фаз отраженной E_r и падающей E_i волн будет определяться аргументом числа a + ib (2.17) и равна:

$$\Delta \varphi = \arg(r) = \frac{2n_0k_1}{n_0^2 - (n_1^2 + k_1^2)}.$$
(2.18)

В зависимости от знаков числителя и знаменателя возможны следующие случаи:

1 Если $n_0 > n_1$, $k_0 = k_1 = 0$, то $\Delta \phi = 0$. Это случай отражения от менее плотной среды. При этом фаза не изменяется.

2 Если $n_1 > n_0$, $k_0 = k_1 = 0$, то $\Delta \phi = \pi$. Это отражение от более плотной среды. При этом происходит потеря полуволны, фаза изменяется на π .

3 Если
$$n_0 = 1, k_0 = 0, n_1^2 + k_1^2 > n_0^2, \text{ то}$$

$$\Delta \varphi = \pi - \operatorname{arctg}\left(\frac{2k_1}{n_1^2 + k_1^2 - 1}\right). \tag{2.19}$$

Последний случай, соответствует отражению от границы раздела воздух-поверхность. При этом, если второй член в (2.19) равен нулю, то фазовый сдвиг соответствует 2-ому случаю и равен π .

Данный сдвиг фазы аналогичен сдвигу границы раздела воздухповерхность на Δh [34]:

$$\Delta h = \frac{\Delta \varphi \cdot \lambda}{4\pi} \,. \tag{2.20}$$

Одним из важных случаев, часто встречающихся на практике, при которых необходимо учитывать влияние дополнительного фазового сдвига, является измерение толщины покрытия с комплексным показателем преломления n_1 ', напыленного на подложку с комплексным показателем преломления n_2 '. При этом само покрытие образует ступень толщиной h_{ucm} (рис. 2.10), а измерения происходят на воздухе с показателем преломления n_0 .



Рисунок 2.10 – Отражение на границе раздела.

При отражении от покрытия и подложки возникают дополнительные фазовые сдвиги, которые приводят к смещению границ разделов на величину

 Δh_1 и Δh_2 соответственно. В этом случае измеренная толщина покрытия и истинная будут связаны соотношением:

$$h_{ucm} = h_{u_{3M}} + \Delta h_1 - \Delta h_2. \qquad (2.21)$$

Таким образом, используя (2.20) и (2.21) можно получить значение высоты с учетом дополнительного фазового сдвига, возникающего при отражении. Для этого нужно учитывать комплексный показатель преломления $(n \ u \ k)$. Эти сведения могут быть взяты из справочных данных или получены при измерении на эллипсометре.

В качестве экспериментальной проверки была измерена высота алюминиевого напыления на кремнии на разных типах приборов. На оптических профилометрах Zygo NewView 6200 (Zygo Corp., США) и МИА-1М (ВНИИОФИ, Россия) и атомно-силовом микроскопе Solver Pro (НТ-МДТ, Россия). На рис. 2.11-2.13 представлены сечения полученной топограммы.



Рисунок 2.11 – Топограмма поверхности ее сечение, полученная на интерференционном микроскопе Zygo NewView 6200 (Zygo Corp., США). Длина волны 550 нм.



Рисунок 2.12 – Топограмма поверхности ее сечения, полученная на интерференционном микроскопе МИА-1М (ВНИИОФИ, Россия). Длина волны 473 нм.



Рисунок 2.13 – Топограмма поверхности ее сечение, полученная на атомно-силовом микроскопе Solver Pro (НТ-МДТ, Россия).

Оптические постоянные *n* и *k* для кремния и алюминия полученные из справочника [135] и измеренные на эллипсометре alpha-SE (J.A. Woollam Co., Inc) представлены в таблице 2.2. Эти длины волн соответствуют длинам волн источников, использующихся в микроскопах МИА-1М и Zygo NewView 6200 соответственно. Также в таблице приведены значения фазового сдвига $\Delta \varphi$ и соответствующее ему значение Δh , вычисленные по (2.19) и (2.20).

Для измерения оптических констант *n* и *k* материалов использовался спектроскопический эллипсометр с вращающимся компенсатором alpha-SE (J.A. Woollam Co., Inc). Эллипсометр alpha-SE калибруется при помощи эллипсометрических стандартов серии L118SW-100 (Gaertner Scientific Corporation), которые представляют собой кремниевые пластины с термально осажденной пленкой из двуокиси кремния. Каждый стандарт сертифицирован по эллипсометрическим параметрам Δ и Ψ , а также вычисляемым по ним

толщине и показателю преломления слоя двуокиси кремния на кремниевом диске. Измерение оптических констант n и k осуществлялось в нескольких точках с последующим усреднением, для чего держатель образца эллипсометра alpha-SE был специально оборудован двухкоординатным столиком.

Результаты измерений высоты представлены в таблице 2.3 Из нее следует что, вычисление высоты с использованием оптических констант n и k, полученных эллипсометрическим методом дает значение более близкое к полученному на атомно-силовом микроскопе, считающееся истинным.

	По данным справочника		По данным эллипсометрии		
Характеристика	Длина	волны,	Длина волны, нм		
	НМ				
	473	550	473	550	
Коэффициент преломления кремния	4,47	4,07	4,41	4,04	
Коэффициент поглощения кремния	0,11	0,04	0,57	0,38	
Коэффициент преломления алюминия	0,70	0,96	1,04	1,14	
Коэффициент поглощения алюминия	5,80	6,70	2,39	2,71	
Фазовый сдвиг при отражении на границе кремний – воздух, град	0,66	0,29	3,48	2,81	
Изменение высоты при отражении на границе кремний – воздух, нм	0,44	0,22	2,27	2,15	
Фазовый сдвиг при отражении на границе алюминий – воздух, град	19,3	16,65	39,52	35,34	
Изменение высоты при отражении на границе алюминий – воздух, нм	12,68	12,72	25,8	27,00	

Таблица 2.2 Оптические постоянные и фазовые сдвиги [133]

Таблица 2.3. Результаты измерений толщина алюминиевой пленки на кремниевой пластине [133]

Прибор	Полученное	Корректированное	Корректированное		
	значение, нм	значение по данным	значение по данным		
		справочника, нм	эллипсометрии, нм		
Zygo					
NewView	70,1	82,6	94,9		
6200					
МИА-1М	70,3	82,6	93,8		
Solver Pro	99,3	-	-		

2.6 Анализ латерального разрешения фазового микроскопа

Интерференционная (или фазовая) микроскопия является мощным методом для проведения высокоточного трёхмерного анализа структуры поверхности различных объектов, оптических параметров нанообъектов и тонких плёнок, изготовленных из разных материалов, а также живых клеток. Современные фазовые микроскопы обладают в продольном (аксиальном) направлении чрезвычайно высоким разрешением, измеряемым долями нанометра. В поперечном (латеральном) направлении разрешение значительно хуже и оценивается на уровне, характерном для традиционных оптических микроскопов, т.е. на уровне дифракционного предела Аббе.

Задача повышения латерального разрешения вплоть до преодоления дифракционного предела является одной из главных проблем современной оптической микроскопии, в том числе и фазовой микроскопии. Эту задачу решают разными способами. Наибольший прогресс достигнут в разработке флуоресцентных оптических методов, часть из которых основана на оптической интерференции. Эти методы позволяют из изображений с обычным оптическим разрешением восстанавливать с помощью специальной математической обработки изображения с наномасштабным разрешением. Используются ОНИ, OCHOBHOM, В биологии исследования В ДЛЯ

внутриклеточных структур. Таких методов за последние два десятилетия предложено огромное количество [136]. В работе [137] предложен принципиально другой метод. Он позволяет при помощи обычного оптического микроскопа детектировать изменения размеров объектов в нанометровом масштабе за счёт измерения распределения отражённого от объекта поля при разном положении объекта относительно плоскости фокусировки микроскопа. Этот метод, в отличие от флуоресцентных методов, не требует специальной подготовки объекта и использования красителей, но для его реализации нужна априорная информация о форме объекта и соответствующие ей карты электромагнитных полей на различном удалении от поверхности объекта. Также, как и флуоресцентные методы, данный метод требует больших временных затрат на обработку результатов измерений.

В ряде задач, таких как измерение и контроль смещений объекта на расстояния нанометровой величины, требуется проводить измерения практически в реальном времени. В [139, 132] указывается на то, что критерий Рэлея и радиус Эйри r₀ не являются адекватными характеристиками пространственного разрешения в фазовых изображениях. При определённых условиях фазовые изображения могут иметь разрешение, превышающее традиционное рэлеевское разрешение [138]. Измерения на когерентном фазовом микроскопе «Эйрискан» сфер из латекса диаметром 100 нм на длине волны 633 HM показали возможность получения значительного сверхразрешения. Полуширина производной в области перепада высот, выбранная в качестве критерия разрешения, достигала значений порядка 20 Для получения такого результата требовались высокая точность HM. фокусировки (не хуже 30 нм), а также большая числовая апертура объектива (~95). Данный результат представляется достаточно интересным С практической точки зрения. Для его подтверждения и проверки были проведены дополнительные измерения с использованием фазовых объектов другого типа. Кроме того, в [132] указывается на принципиальное значение метода получения фазового изображения.

В настоящем разделе описываются экспериментальные исследования оптического разрешения фазовых изображений и приводятся результаты измерений, подтверждающие возможность получения фазовых изображений с разрешением, превышающим рэлеевское разрешение [127].

2.6.1 Описание эксперимента

Оптическая схема экспериментальной установки приведена на рисунке 2.14.

Эксперимент проводился с помощью автоматизированного интерференционного микроскопа МИА-1М, созданного на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4М. Данный микроскоп позволяет получать фазовые изображения микрообъектов методом фазовых шагов [140].

Для реализации данного метода зеркало опорного канала микроскопа было закреплено на пьезоэлементе, который обеспечивал дискретные перемещения опорного зеркала вдоль оптической оси с шагом $\lambda/8$. Получаемые серии интерферограмм регистрируются с помощью видеокамеры Видеоскан 205 (число пикселов 1392х1040, размер матрицы 6,32мм х 4,76мм) и обрабатываются на компьютере с помощью, разработанной во ФГУП «ВНИИОФИ» программы «WinPhast».



Рисунок 2.14 - Схема экспериментальной установки.

Для повышения латерального разрешения (увеличения) штатный объектив микроскопа с числовой апертурой NA=0,65 был заменён на иммерсионный объектив АПО-МИ (ЛОМО) с увеличением 90х и числовой апертурой NA=1,25. С этой же целью видеокамера устанавливалась в фотографический канал микроскопа МИИ -4M, имеющей большее увеличение чем окулярный в 4 раза. В результате чего размеры линейного поля зрения удалось уменьшить до 16 мкм х 12 мкм, а размер пиксела до 11,5 нм.

В эксперименте ставилась задача исследовать зависимость латерального разрешения от соотношения длины волны оптического излучения и высоты ступеньки. Поэтому измерения проводились на разных длинах волн. Для этого использовались Не-Ne лазер на длине волны 632,8 нм и аргоновый лазер с длинами волн 458 нм, 476 нм, 488 нм, 501 нм, 514 нм.

В качестве объектов исследования использовались эталонные меры высоты ступеньки номинальной высотой (179,4±2,0) нм и (19,9±0,8) нм из

состава вторичного эталона единицы длины в области измерения параметров шероховатости (2.1.ZZA.0034.2015). Ступеньки сформированы методом травления в слое кварца и покрыты тонким слоем хрома. Для эксперимента важно, чтобы реальная форма ступеньки была близка к идеальной. Сказать уверенно, что используемые ступеньки отвечают этому требованию в любом месте ступеньки, нельзя. Однако, предположить, что такие участки имеются у использованных ступенек, можно. Полученные результаты подтверждают это предположение.

Меры крепились к специальному держателю, устанавливаемому на пьезоэлектрическое устройство трёхкоординатного позиционирования нанопозиционера T-115 (MAD City Lab Inc., США), которое устанавливалось автоматизированного интерференционного на предметный столик микроскопа МИА-1М. Держатель меры позволял регулировать наклон меры оптической оси предметного канала относительно микроскопа, а нанопозиционер – дискретно перемещать меру вдоль оптической оси и в поперечном к ней направлении.

Устройство T-115 обеспечивает нанометровую точность позиционирования и, соответственно, указанное ранее качество фокусировки (не хуже 20 нм). Однако, имеются данные о том, что у данного прибора возможен дрейф по любой из координат [141]. Во избежание возможного в этом случае пропуска момента прохода через положение наилучшего фокуса, объект наклонялся вдоль длинной оси ступеньки на угол, при котором координаты крайних точек ступеньки отличались на величину от 300 нм до 700 нм, что существенно превосходило возможную величину дрейфа.

2.6.2 Методика измерений

Процесс измерений происходил следующим образом. Вначале определялся фокусировки (z1, z2), диапазон котором контраст В интерференционных полос был фазового достаточным для съёмки изображения. После этого проводилась регистрация интерферограмм в одной

из крайних точек этого диапазона. Затем с помощью нанопозиционера объект сдвигался на 300 нм вдоль оси Z, и снова проводилась регистрация фазового изображения, и так до достижения следующей крайней точки диапазона фокусировки. Измерения проводились на нескольких длинах волн, указанных ранее и приведённых ниже в таблице 2.4. В качестве иммерсионной жидкости использовался глицерин. В результате эффективная высота ступенек h увеличивалась в n раз, где n - показатель преломления глицерина 1,46. Таким образом, ступенька высотой 179,4 нм имела оптическую высоту 262 нм, а ступенька 19,9 нм, соответственно, 29 нм. Проводились также измерения со ступенькой 179,4 нм в отсутствие иммерсионной жидкости. В этом случае были получены наиболее интересные результаты.

Результатом каждого измерения была топограмма высот. В соответствии с разрешением используемой ПЗС матрицы (1392 х 1040 пикселов) и расположением ступеньки относительно осей матрицы, из топограммы можно было получить 1392 сечения (или профиля) поперёк ступеньки. Вид полученных профилей сильно зависел от высоты ступенек и длины волны и, в общем, был далёк от прямоугольной формы. Примеры профиля h ступеньки высотой 179,4 нм, полученные на длине волны 633 нм при использовании иммерсионной жидкости и без неё, приведены на рисунках 2.15а и в.

Массивы изображениях 0 фазовых подвергались данных математической обработке с помощью программы MathCad, в ходе которой выполнялись следующие действия. Для каждого профиля, т. е. для каждого столбца, проводилось вычисление первой производной от высоты профиля $p = \frac{\Delta h}{\Lambda}$ в зависимости от номера строки. Затем выбиралось максимальное значение первой производной на каждом столбце, а из всех этих локальных максимумов выбиралось максимальное значение И определялся соответствующий номер столбца j_{max}. Для этого номера столбца строилась

зависимость производной от номера строки и по ней вычислялась полуширина производной δPr.



Рисунок 2.15 Вид профиля фазового изображения ступеньки (h) и первой производной от профиля ступеньки (p_i) для ступеньки высотой 262 нм (a, б) и ступеньки высотой 179,4 нм (в, г) на длине волны 633 нм.

В ходе обработки изображений имелась также возможность вручную выбирать произвольные точки на изображении и выполнять для них описанную процедуру, что позволяло выполнять дополнительную проверку выбранных программой точек и исключать те из них, которые не попадают в область перепада высот. Вид зависимости первой производной от номера строки для разных ступенек показан на рисунках 2.15 б и г.

В процессе обработки выполнялась операция усреднения, необходимая для снижения уровня шумов. Усреднение проводилось вдоль строки по

нескольким столбцам $\overline{p}_{i,j\cdot k} = \frac{\sum\limits_{j=k}^{j} p_{ij}}{k+1}$. Такое усреднение может привести к искажению результата измерений, если ширина перепадов, представленных на усредняемых столбцах, сильно разнится от столбца к столбцу, т.е. если форма

ступеньки резко отличается от прямоугольной. В данном эксперименте физическое расстояние между соседними столбцами (и строками) равнялось 11,5 нм, поэтому при усреднении по 10 столбцам усреднялся участок длиной 115 нм. При такой малой величине весьма высока вероятность того, что форма ступеньки будет неизменной. Неидеальность формы ступеньки сильнее всего скажется при малых величинах полуширины производной, приводя к её увеличению. Поэтому получение очень малых значений полуширины производной напрямую указывает на то, что на использовавшейся мере имеются участки с прямоугольной формой ступеньки. После выполнения процедуры усреднения вдоль строки проводилось сглаживание полученных усреднённых профилей вдоль столбца (вдоль профиля).

2.6.3 Результаты измерений

Основные результаты измерений предельных значений оптического разрешения фазовых изображений приведены в таблице 2.4. Для ступеньки с номинальной высотой 19,9 HM измерения проводились только С иммерсионной жидкости, поскольку использованием реализуемая эффективная оптическая высота 29 нм значительно меньше, чем λ/4 для любой длины волны оптического излучения видимого диапазона.

Для сравнения в таблице приведены также значения пространственного разрешения, полученные для обычного микроскопа путём расчёта полуширины первой производной от распределения освещенности в дифракционном изображении точки (внутри диска Эйри). Расчёт проводился для реальных значений числовой апертуры NA и длины волны λ с использованием относительной функции освещенности (функции рассеяния точки) в отсутствие аберраций [8]:

$$E(W) = \frac{4 \cdot J_1^2(W)}{W^2},$$
 (2.22)

где J_{I} - функция Бесселя 1-го рода 1-го порядка, $W = \frac{2 \cdot \pi \cdot NA \cdot x}{\lambda}$.

Таблица 2.4 Минимальные значения полуширины производной δPr от изображения профиля ступеньки (соответствующие максимальным значениям производной).

Длина волны,	Высота сту	Полуширина		
НМ	19,9 нм х	179,4 нм х	179,4 нм	производной
	1,46 =29 нм	1,46 =262 нм		по Эйри, нм
458	207	207	357	128
472	-	207	-	132
488	242	196	219	137
501	-	127	-	141
514	253	161	173	145
633	299	115	46	178

Из таблицы видно, что наблюдается зависимость оптического разрешения от высоты ступеньки и длины волны. При этом для малой высоты ступеньки зависимость оптического разрешения фазового изображения от длины волны такая же, как и для обычного изображения, т. е. при увеличении длины волны полуширина первой производной от профиля изображения также увеличивается. Однако, если высота ступеньки сравнима по величине с $\lambda/4$, то вид зависимости становится другим: разрешение повышается при увеличении длины волны, при этом на длине волны 633 нм полуширина производной профиля фазового изображения становится меньше полуширины производной обычного изображения, т. е. преодолевается дифракционный предел разрешения. Это происходит как при использовании иммерсионного объектива в штатном режиме (эффективное значение высоты ступеньки 263 нм), так и при использовании того же объектива без иммерсионной жидкости (высота ступеньки при этом 179 нм).



Рисунок 2.16 - Зависимость полуширины производной профиля фазовой прямоугольной ступеньки от соотношения длины волны и высоты ступеньки. Ряд 1 – высота ступеньки 263 нм, ряд 2 – высота ступеньки 29 нм, ряд 3 – высота ступеньки 179 нм.

Данные из таблицы 2.4 можно представить в виде графиков (рис. 2.16). Это дает наглядное представление о ходе зависимости предельного разрешения от соотношения $\lambda/4h$. При приближении величины $\lambda/4h$ к 1 величина полуширины производной δ Pr уменьшается (разрешение увеличивается), при удалении $\lambda/4h$ от 1 полуширина производной увеличивается, а разрешение, соответственно, ухудшается.

2.7 Выводы

В главе исследовано влияние оптической системы микроскопа на получаемое фазовое изображение. Показано, что важное влияние на уровень шумов получаемых фазовых изображений имеет степень когерентности источника излучения. Для его уменьшения необходимо понижать степень временной или пространственной когерентности.

Исследовано формирование интерференционного изображения в фазовом микроскопе по схеме Линника с протяженным монохроматическим пространственно-некогерентным источником света. Показано, что это изображение является суммой элементарных интерферограмм, образуемых точечными источниками из которых состоит протяженный источника света. При этом контрастное изображение локализовано в плоскости регистратора, оптически сопряженной с предметным и опорным зеркалами.

Исследовано влияние опорного зеркала фазового микроскопа на погрешность измерения фазовых изображений. Показано, что для ее уменьшения, при реализации метода фазовых шагов, необходимо перемещать опорное зеркало совместно с микрообъективом. При измерении СКО отклонения от плоскостности поверхностей с низким уровнем шероховатости (супергладких поверхностей) необходимо учитывать СКО отклонения от плоскостности опорного зеркала. А при вычитании аберраций оптической системы с помощью эталонного зеркала – СКО отклонения от плоскостности эталонного зеркала.

Исследовано влияние комплексного показателя преломления отражающего фазового объекта на его фазовое изображение. Показано, что при измерении таких объектов, состоящих из различных материалов, необходимо учитывать дополнительный фазовый набег, возникающий на границе раздела воздух-материал, что было проверено экспериментально путем сравнительных измерений на атомно-силовом и интерференционных микроскопах. Данные эксперименты показали, что корректировка полученных значений с использованием измеренных на эллипсометре оптических констант (показателя преломления и коэффициента поглощения) позволила получить более точное значение высоты слоя.

Исследована зависимость латерального разрешения интерференционного микроскопа от расстояния между фазовой ступенькой и плоскостью фокуса объектива предметного канала микроскопа на разных длинах волн. Наиболее подробные исследования для большого числа значений

высоты фазовой ступеньки выполнены методом численного моделирования. Они показали сложную взаимосвязь между исследуемой зависимостью и соотношением между высотой фазовой ступеньки и длиной волны зондирующего излучения. Каждой высоте ступеньки соответствует свой вид зависимости латерального разрешения от величины дефокусировки, а положение максимального разрешения с большой вероятностью не совпадает с фокусом. Для поиска этого положения необходимо каждый раз снимать зависимость $\delta x(z)$ в пределах диапазона фокусировки. Измерения зависимости $\delta x(z)$ на двух ступеньках подтверждают данный вывод.

Проведены измерения пространственного разрешения (разрешающей способности) фазового микроскопа, созданного на основе микроинтерферометра Линника, использующего метод фазовых шагов для восстановления фазы. Полученные результаты показали, что пространственное разрешение фазового микроскопа зависит не только от длины волны, но и от высоты фазовой ступеньки. Наилучшее разрешение было получено на длине волны 633 нм для меры, имеющей номинальную высоту ступеньки 179,4 нм. Данные результаты подтверждают сделанный в [132] вывод о том, что критерий Рэлея и радиус Эйри не могут считаться адекватными характеристиками пространственного разрешения фазовых изображений. Кроме того, при определённых соотношениях между длиной волны λ и высотой фазовой ступеньки h, a именно, если $\lambda/4 \approx$ h, пространственное разрешение фазовых изображений значительно превосходит пространственное разрешение традиционных оптических изображений, ограниченное дифракционным пределом разрешения Аббе. Полученные результаты с использованием фазовых объектов в виде ступенек, согласуются, в целом, с результатами, полученными и описанными в [132] с использованием фазовых объектов в виде латексных сфер.

Глава 3 Исследование прозрачных объектов методами низкокогерентной фазовой микроскопии

3.1 Измерение показателя преломления жидких и твердых веществ

Одной из актуальных задач современной рефрактометрии является задача измерения показателя преломления жидких и твердых веществ объем которых составляет от 1,000 до 0,001 нл. Для ее решения предлагается использовать двухиммерсионный метод измерения с использованием фазового микроскопа.

Суть это метода в том, что если с высокой точностью измерить оптическую разность хода (OPX) $\Delta_1(x,y)$ излучения, прошедшего через среду с известным показателем преломления n_1 (первое измерение с эталонным раствором), и OPX $\Delta_2(x,y)$ излучения, прошедшего через среду с неизвестным показателем преломления n_2 (второе измерение с измеряемым раствором), то искомый показатель преломления n_2 может быть найден по формуле (3.1) [36, 143].

$$n_2 = n_1 \frac{\Delta_2(x, y)}{\Delta_1(x, y)}.$$
 (3.1)

Для повышения точности измерений можно проводить измерения не в одной точке, а измерять фазовый объем кюветы с эталонным и измеряемым растворами:

$$V_{1} = \iint_{S} \Delta_{1}(x, y) dx dy = n_{1} \iint_{S} h(x, y) dx dy,$$

$$V_{2} = \iint_{S} \Delta_{2}(x, y) dx dy = n_{2} \iint_{S} h(x, y) dx dy.$$
(3.2)

где h(x,y) – распределение высоты или топограмма кюветы.



Отношение фазовых объемов дает отношение показателей преломления измеряемых жидкостей:

$$n_2 = n_1 \cdot \frac{V_2}{V_1}.$$
 (3.3)

Для высокоточного измерения оптической разности хода был использован фазовый микроскоп МИА-1М [140]. Предварительно на микроскопе было записано фазовое изображение меры шероховатости из состава «Государственного вторичного эталона единицы длины в области измерения параметров шероховатости Rmax в диапазоне от 0,02 до 1,80 мкм и Ra номинального значения 0,0015 мкм» 2.1.ZZA.0034.2015 (PV = 7 нм, CKO = 0,083 нм), содержащее аберрации оптической системы, которое затем вычиталось из измерений. Проведенные Государственные испытания этого микроскопа показали, что погрешность определения высоты составляет 1,3 нм.

Распределение OPX реконструировалось по методу фазовых шагов. Для корректного выполнения соотношения (3.3) необходимо проводить вычисление фазовых объемов строго по одним и тем же областям измерительной кюветы. Однако изображения кюветы для двух измерений, как правило, оказываются смещенными относительно друг друга из-за смены двух растворов эталонного и искомого. Поэтому, вычисленные распределения OPX оказываются также смещенными со сдвигом на 1 – 2 мкм. Поэтому возникает необходимость совмещения фазовых поверхностей перед выполнением операции (3.2). Данная проблема решалась в два этапа.

1) Устранялась постоянная составляющая фазы и наклон за счет применения дифференциального оператора Собела [144].

2) Производилось совмещение изображений в плоскости XY по реперным точкам.

После совмещения поверхностей производится вычисление фазовых объемов по формуле (3.2) и вычисление показателя преломления по (3.3).

В процессе измерения исследуемые жидкости должны заливаться в специальную микролунку, являющуюся важным элементом измерительной системы. Предварительный расчет показал, что для измерения показателя преломления с погрешность не хуже 10^{-5} , необходимо, чтобы двумерное распределение ОРХ содержало не менее 1000 отсчетов при следующих начальных условиях: фазовый набег не менее λ , погрешность измерения ОРХ $\lambda/100$, диапазон изменения показателя преломления эталонного раствора $n_1=1...2$.

Микролунка должна удовлетворять следующим условиям:

1 Вносимая ей OPX должна восстанавливаться без разрывов, т.е. форма не должна содержать больших градиентов и скачков более чем λ/4.

2 Ее поперечный размер не должен превышать размера поля зрения.

3. Материал должен быть однородным, чтобы избежать возникновения сдвига фазы при отражении.

Для выполнения этим условиям микролунка была изготовлена методом тиснения нержавеющий полированной поверхности с помощью закаленного стального шарика (рис. 3.2 и 3.3) и имела сферическую форму. Объем микролунки составил 0,0042 нл.



Рисунок 3.2 Фото, изготовленной кюветы с микролункой



Рисунок 3.3 – а – интерференционное и б - фазовое изображения микролунки

Проведенные эксперименты показали, что расширенная неопределенность измерения показателя преломления предложенным двухиммерсионным методом с коэффициентом охвата k=3 составила 0.000015. Данный метод и кювета используется в Государственном первичном эталоне единицы показателя преломления (ГЭТ 138-2010).

3.2 Морфометрия клеток по фазовым изображениям

Другим важным применением низко-когерентной фазовой микроскопии является биологические исследования. В живом организме отдельные клетки – сложные и высокоорганизованные комплексы, обладающие рядом функций, направленные обеспечение жизнедеятельности всего организма в целом. Для получения наиболее полной информации о состоянии клетки необходимо одновременно оценивать большое число независимых параметров на различных уровнях ее организации, включая оценку формы, объема, состояния клеточных органелл и характеристики отдельных веществ, входящих в состав клетки. Необходимым условием при этом является использование методик, позволяющих оценивать, но не менять состояние живой клетки, т.е. проводить измерения состояния в условиях in vivo и in vitro на живых и функционирующих биологических объектах. Поэтому одной из актуальных задач современной биологии является исследование живых клеток с минимальным внешним воздействием. Сложность этой задачи обусловлена тем, что по своей природе клетки являются слабоконтрастными объектами (рис. 3.4 а), т.е. слабо изменяют амплитуду прошедшего через них излучения. Однако при этом они хорошо изменяют фазу излучения (рис. 3.4 б). Т.е. с точки зрения оптики они являются фазовыми объектами. Для визуализации фазовых объектов используют методы фазовой микроскопии. Эти методы позволяют не только наблюдать за живой клеткой, но и измерять ее параметры, так как они являются количественными [145-147].



Рисунок 3.4 -. Амплитудное (а) и фазовое (б) изображение стволовой клетки в растворе. Изображения получены с помощью микроскопа МИА-1М.

Для исследования живых клеток был использован автоматизированный интерференционный микроскоп МИА (ФГУП «ВНИИОФИ»). Он имеет две модификации МИА-1М МИА-Д. Первая И позволяет исследовать стационарные BO времени биологические объекты, так как имеет высокоразрешающую камеру с частотой захвата 7 к/с, вторая – динамические, 300 к/с. так как имеет высокоскоростную камеру Использование высокоскоростной камеры позволяет исследовать динамические процессы, происходящие в живой клетке, с частотой до 30 Гц.

Как было уже сказано, с помощью этого микроскопа восстанавливается двумерное распределение ОРХ. В некотором приближении ОРХ в каждой точке является произведением высоты z_i на соответствующий показатель преломления n_i вдоль направления луча [7]:

$$\Delta = \sum_{i} n_{i} z_{i} - n_{uM} \cdot z_{, \Gamma \Xi}$$
(3.4)

$$z = \sum_{i} z_i$$
 – общая высота.

Суммарное изменение величины ОРХ определяется вкладом отдельных органелл. В том случае если показатели преломления органелл клетки не сильно различаются и/или их размеры не велики, то они не вносят существенный вклад изменение ОРХ. В случае однородных гомогенных объектов (имеющих одинаковый показатель преломления), например, безъядерные эритроциты, мы можем использовать некий усредненный показатель преломления для клетки (различиями в показателях преломления цитоплазмы и мембраны в данном случае пренебрегают из-за очень маленького вклада мембраны, менее 1 процента, в величину ОРХ).

Использование усредненного показателя преломления позволяет ввести параметр, Δ_{cp} , характеризующий состояние клетки и представляющий из себя среднее арифметическое всех значений ОРХ в объекте [6]:

$$\Delta = \sum_{i} n_i z_i - n_{uM} \cdot z , \qquad (3.5)$$

$$\Delta_{cp} = (n_{o\bar{o}} - n_{uM}) \cdot z_{cp}, \tag{3.6}$$

где *п*_{им}-показатель преломления буферного раствора (иммерсии); *п*_{об}усредненный показатель преломления объекта; *z*_{cp} – средняя геометрическая высота (толщина) объекта.

Известно, что показатель преломления вещества в растворе линейно зависит от его концентрации, (С) в растворе [43]:

$$n = n_m + \alpha C, \qquad (3.7)$$

где α- экспериментально определяемый параметр, который зависит от типа вещества.

Если объект состоит только из одного вещества (например, безъядерный эритроцит, заполненный белком - гемоглобином), то, используя только измеряемые параметры: площадь объекта S, и среднее значение OPX_{cp} , можно рассчитать количество вещества, m, в объекте [6]:

$$m = \frac{1}{\alpha} OPX_{cp}S$$
(3.8)

Величина α зависит от удельной плотности вещества, ρ , показателя преломления вещества из которого состоит объект, $n_{\text{вещ}}$, а также показателя преломления окружающей среды, как отношение $\alpha = (n_{\text{вещ}} - n_{\delta})/\rho$.

Формулы (3.6) и (3.7) можно использовать и для объектов с неоднородным содержимым (например, клеток, содержащих ядро) однако в этом случае следует учитывать, что величина ОРХ в каждом пикселе будет определяться как общим количеством вещества, так и от соотношения различных веществ (главным образом, белком и ДНК).

3.3 Измерения гомогенных объектов

Типичным примером однородного гомогенного объекта является эритроцит. Эритроциты — форменные элементы клеток крови человека, позвоночных животных и некоторых беспозвоночных. Основной функцией эритроцитов является перенос кислорода из лёгких к тканям тела, и транспорт углекислого газа в обратном направлении. Перенос кислорода и углекислого газа осуществляется белком гемоглобином, способным присоединять к себе и отдавать кислород и углекислый газ. Форма и состояние красных клеток крови — эритроцитов, является одним из диагностических признаков, при многих заболеваниях [148].

Как было сказано ранее, фазовые изображения однородных по показателю преломления объектов характеризуют их форму. Поэтому получаемые с помощью МИА-1М фазовые изображения эритроцитов характеризуют собой их различные морфологические формы (рис. 3.5).



Рисунок 3.5 - Типичные изображения различных форм эритроцитов: стоматоцита (*a*); дискоцита (*б*) и эхиноцита (*в*). На рисунке представлены оптические (верхний ряд) и фазовые (средний ряд) изображения эритроцитов с горизонтальными сечениями (нижний ряд), проведенными по центру фазового изображения (белая линия).

При измерении эритроцитов обычно наиболее информативными являются следующие параметры:

площадь фазового изображения эритроцита – экспериментально измеряемый параметр, достоверное различие площадей эритроцитов может свидетельствовать об изменении характеристик их мембран;

среднее OPX клетки – рассчитывается как среднее арифметическое всех значений OPX, входящих в клетку, зависит от толщины клетки и количества вещества (гемоглобина), входящего в эритроцит;

содержание гемоглобина – расчетная величина, для каждой клетки определяется как произведение среднего ОРХ на площадь эритроцита, а также константы, зависящей от молекулярных характеристик гемоглобина (см. формулу 3.8); в этом случае ρ – удельная плотность гемоглобина, равная 1,36 г/см³, n_{sem} - показатель преломления гемоглобина, равный 1,615 [6].

морфологический индекс - для характеристики морфологической картины суспензии эритроцитов использовался морфологический индекс. Данный индекс рассчитывается по следующей методике. В соответствии с формой клетки на оптическом изображении ей присваивается определенный балл: стоматоцитам третьего типа - минус три, второго - минус два, первого – минус один, дискоцитам - ноль, эхиноцитам первого типа – плюс один, второго – плюс два, третьего – плюс три. Морфологический индекс определяется как отношение суммы полученных баллов [149] на общее количество клеток.

Таким образом, можно сказать, что фазовый микроскоп МИА-1М является диагностическим прибором, позволяющим с высокой точностью оценивать площадь эритроцита, количество гемоглобина, а также его морфологическим данным, не прибегая состояние ПО К процедуре окрашивания. Микроскоп МИА-1М был использован для оценки характеристик эритроцитов больных различными сердечно-сосудистыми заболеваниями [150], диабетом первого типа [151], а также при оценке состояния участников эксперимента Марс-105[152].

3.4 Измерения негомогенных объектов

К негомогенным объектам можно отнести подавляющее количество исследуемых клеток. В наиболее простых случаях можно выделить две основные части клетки, вносящие вклад в величину OPX – область ядра и цитоплазмы. Область цитоплазмы заполнена преимущественно белком, а концентрация вещества в ней обычно ниже, чем в области ядра. В области ядра величина OPX обусловлена ядром, содержащего сравнимое количество нуклеиновых кислот и белка, концентрация вещества в этой области обычно выше, чем в цитоплазме. К типичным представителям таких объектов можно отнести ядерные эритроциты амфибий [153] (рис 3.6).





В целом при оценке ядерных клеток можно использовать те же характеристики, что при работе с гомогенными объектами, однако в силу неоднородности, как уже упоминалось, величина ОРХ будет зависеть не только от толщины и концентрации вещества, но и от соотношения различных веществ, что повлияет на показатель преломления объекта.

Классификация ядерных клеток не соответствует той, которая применяется к эритроцитам, поэтому морфологический индекс для оценки эритроцитов не используется для оценки ядерных клеток, однако возможно

использовать другие виды классификации (например, соотношения длины и ширины клетки и т.д.).

Важным параметром, который можно использовать для характеристики клеток, но малоприменимым в случае безъядерных эритроцитов, является максимальное значение OPX клеток. В случае если концентрация вещества в цитоплазме ниже чем в ядре, то максимальная высота отражает изменение состояния ядра, в случае наличия в цитоплазме большого количества веществ и органелл, состоящих, главным образом, из белка, когда концентрации цитоплазмы и ядра сравнимы (например, неактивированные макрофаги), невозможно выделить ядро и оценить его вклад в величину OPX. Пример использования максимальной величины OPX для оценки доли живых и мертвых макрофагов в культуре приведено в работе [145].



Рисунок 3.7 - Фазовые изображения живого (*a*) и мертвого (*б*) макрофага. Максимальное значение ОРХ сильно различаются.
3.5 Динамические измерений. Анализ шума

Используя метод фазовой микроскопии можно оценивать форму, диаметр, площадь, среднее и максимальное значение OPX объекта, а также ряд других параметров. Измерение этих параметров с течением времени позволяет оценить динамические изменения состояния исследуемого объекта.

Помимо этого, также возможно оценивать изменение величины OPX в каждой конкретной точке объекта. При этом можно оценивать, как среднее значение OPX в точке с течением времени, так и разброс величины значений OPX с течением времени (см. рис. 3.8 в, где показано изменение величины OPX эритроцита с течением времени), так называемый «шум», величина которого зависит как от погрешности измерений, так и от характеристик самого объекта. Для успешной регистрации этих процессов необходимо, чтобы обусловленное ими изменение величины OPX был выше, чем разрешающая способность прибора. В случае микроскопа МИА-Д эта величина равна $\lambda/350$, что для лазера длиной волны 650 нм составляет около 1,9 нм.



Рисунок 3.8 - Схема оценки величины ОРХ объекта. а) фазовое изображение эритроцита; б) сечение фазового изображения эритроцита (белая линия на рисунке а); в) изменение величины ОРХ во времени (точка на рисунке а), оценка амплитуды колебаний; г) оценка характерных частот колебания ОРХ в точке. Пики соответствуют частоте регулярных процессов, протекающих в эритроците.

Известно, что при изменении состояния мембраны эритроцитов, может изменяться амплитуда колебаний самой мембраны (см., например, [49, 154,155]). Также при этом возможно анализировать и характер шума (см. рис. 3.8), выделяя определенные частоты колебаний и оценивая с их помощью динамические процессы, протекающие в клетках. Полученная таким образом информация позволяет охарактеризовать различные временные процессы, проходящие внутри биологических объектов, в частности на их мембране и/или ядре и цитоплазме [156-160]. Детальный математический анализ временных рядов локальных изменений ОРХ может быть использован для

выявления взаимодействия между процессами и определения характерных частот регулярных клеточных процессов [159, 160]. Оценку характерных частот объекта можно производить используя, например, методы Фурье-преобразований для более простых случаев или Вейвлет-анализа, включающего в себя и преобразования Фурье [161]. Наиболее подходящими методами анализа рядов данных при наличии взаимодействия между компонентами является Вейвлет-анализ.

3.6 Измерение массы сухих веществ клетки

Фазовое изображение клетки содержит в себе количественную информацию о ее различных характеристиках, но в интегральной форме. Этими характеристиками являются: различные морфологические параметры, масса сухих веществ, инкремент показателя преломления и пр. Фазовый микроскоп позволяет измерять эти характеристики как в стационарных условиях, когда клетка не изменяется или слабо изменяется во времени (например, когда она фиксирована), а также в динамике, когда за измеряемый промежуток времени клетка существенно изменяется.

На рис. 3.9 представлены фазовые изображения биологических клеток, полученные с помощью фазового микроскопа МИА-1М.





Рисунок 3.9 - Фазовые изображения различных биологических клеток, полученные с помощью микроскопа МИА-1М: а – эритроцит (25×25 мкм); б – мышечное волокно (25×25 мкм); в – бактерия микроколеус (49×80 мкм); г – макрофаги (46×66 мкм). Каждый цвет соответствует определенному значению ОРХ (мкм).

Фазовое изображение несет в себе информацию о распределении ОРХ света, прошедшего через прозрачный объект. Если он содержит только одно вещество, имеющее постоянный показатель преломления n(x,y,z)=const, то фазовое изображение передает его форму. Например, эритроцит, который содержит оболочку внутри только гемоглобин. Это позволяет использовать фазовое изображение для качественной оценки исследуемых объектов и

проводить классификацию их форм [162]. Например, представленный на рис. 3.9 а эритроцит по своей форме является дискоцитом.

Само по себе фазовое изображение, несущее информацию в интегральной форме, позволяет получать некоторые интегральные параметры. Например, к ним относится масса сухого вещества клетки.

В Главе 1 говорилось, что фазовое изображение в линейном (эйкональном) приближении определяется разностью оптических длин пути света или оптической разностью хода, прошедшего через объект и окружающую его среду вдоль направления оптической оси z:

$$\Delta(x, y) = \int \Delta n(x, y, z) dz, \qquad (3.9)$$

где Δn(x,y,z) - разность показателей преломления объекта n_o(x,y,z) и окружающей среды n_{im}:

$$\Delta n(x, y, z) = n_o(x, y, z) - n_{im}.$$
(3.10)

Из [42, 43] следует, что по интегралу (или сумме) всех значений ОРХ, полученных по площади можно определить массу сухого вещества, содержащегося в ней. Из соотношений (3.9), (3.10) следует:

$$M = \iint_{S} \Phi(x, y) dx dy = \iiint_{V} n_o(x, y, z) dx dy dz - n_{im} \cdot V , \qquad (3.11)$$

где S- площадь, занимаемая клеткой, V-объем клетки.

С другой стороны, показатель преломления клетки определяется концентрацией ρ содержащихся в ней сухих веществ [42, 43]:

$$n_o(x, y, z) = n_w + 100 \cdot \alpha \cdot \rho(x, y, z),$$
 (3.12)

где n_w - показатель преломления водной фазы клетки, α - удельный инкремент (приращение) показателя преломления растворенного вещества.

«Показатель преломления воды, содержащейся в клетке, близок к показателю преломления физраствора и равен 1,334. Инкремент показателя преломления клетки характеризует взаимодействие оптического излучения с веществом и зависит от поляризуемости молекул и их рефракционной способности и определяется экспериментально. Он определяется белками и нуклеиновыми кислотами и равен 0,0018 см³/г» [163].

Масса сухих веществ клетки определяется как:

$$P = \iiint_{V} \rho(x, y, z) dx dy dz_{.}$$
(3.13)

Из (3.4) и (3.11) следует:

$$P = \frac{M + (n_{im} - n_w) \cdot V}{100 \cdot \alpha} \,. \tag{3.14}$$

В случае близости значений показателя преломления иммерсионной среды и водной фазы клетки n_{im}=n_w, соотношение (3.14) для массы сухих веществ не зависит от объема клетки и равно:

$$P = \frac{M}{100 \cdot \alpha} \,. \tag{3.15}$$

Таким образом, с помощью фазового микроскопа можно измерять такую интегральную характеристику клетки как массу сухого вещества. Далее рассмотрено влияние различных факторов, влияющих на ее измерения.

3.6.1 Оценка влияния изменения объема клетки на измерение массы сухого вещества

При проникновении в клетку жидкости, имеющей показатель преломления n_p и объем ΔV , величину M можно записать как: $M_2 = M_1 + (n_p - n_{im}) \cdot \Delta V$, где M_1 и M_2 – нулевой момент фазового изображения до и после проникновения жидкости.

Для эритроцита относительное изменение *М* при условии, что показатели преломления имеют следующие значения: для гемоглобина n_o=1,39, для физраствора (окружающей среды) n_{im}=1,333, для жидкости (воды) n_p=1,331:

$$\delta M = \frac{M_2}{M_1} = 1 + \frac{(n_p - n_{im}) \cdot \Delta V}{(n_o - n_{im}) \cdot V} \approx 1 - 0.035 \cdot \frac{\Delta V}{V}.$$
 (3.16)

Из (3.16) следует, что изменение объема клетки на 1/3 приведет к изменению массы сухого вещества только на 1% [41].

3.6.2 Оценка влияния рефракции света на измерение массы сухого вещества

Для учета рефракции света, прошедшего через клетку на погрешность вычисления массы сухих веществ было проведено численное моделирование со следующими параметрами: клетка представляла собой гомогенный объект с показателем преломления $n_0=1,39$, показатель преломления окружающей среды $n_{im}=1,33$. Рассматривалась как сферическая форма клетки, так и эллиптическая, но с постоянным объемом. В [41] было показано, что *М* изменялась в диапазоне от 1,5 до 2,0 %. Основной вклад в изменение вносили граничные области, где происходило полное внутреннее отражение. Если их не учитывать, то погрешность вычисления *M* составляла от 0,3 до 0,4 %.

Было исследовано влияние изменения мембраны клетки на погрешность вычисления *M*. Ее модель имела верхнюю и нижнюю границы, описываемые с помощью гармонических функций (рис. 3.10): $f_1(x) = a + A\cos(\alpha \cdot x)$, $f_2(x) = -a + A\cos(\alpha \cdot x)$, где $\alpha = \frac{2\pi}{d}$; *d* - период неоднородности; *b* - плоскость постоянной фазы; -b - плоскость регистрации фазы.



Рисунок 3.10 - Ход луча в оптической неоднородности в виде функций

косинуса. 152 Для первого полупериода $0 \le x \le \frac{d}{2}$ были получены следующие выражения для величин l_1, l_2, l_3

$$Y_1 = A(1 - \cos\alpha \cdot x_0) \tag{3.17}$$

$$l_{2} = \left[(x_{1} - x_{0})^{2} + (2a + A\cos\alpha \cdot x_{0} - A\cos\alpha \cdot x_{1})^{2} \right]^{\frac{1}{2}}$$
(3.18)

$$l_{3} = \left[(x_{2} - x_{1})^{2} + A^{2} (1 + \cos \alpha \cdot x_{1})^{2} \right]^{\frac{1}{2}}$$
(3.19)

Для второго полупериода $\frac{d}{2} \le x \le d$ величины l_1, l_2, l_3 вычисляются по таким же формулам.

Набег фазы в плоскости регистрации будет равен

$$\varphi(x_2) = \frac{2\pi}{\lambda_0} (n_1 l_1 + n_2 l_2 + n_1 l_3), \qquad (3.20)$$

где λ_0 – длина волны излучения.

Параметры моделирования были следующие:

- толщина неоднородности 1 - 4 мкм;

- величина деформации мембраны 0,25 - 1,00 мкм

- число периодов синусоиды от 1 до 2.

При данных параметрах М изменялось на величину не более 1 %.

Таким образом, погрешность измерений M из-за рефракции света при очень существенных изменениях формы клетки составляет от 1,5 до 2,0 %. В реальных экспериментах это приводит к большим изменениям фазы и препятствуют ее измерению.

3.6.3 Оценка влияния стабильности микроскопа на измерений массы сухого вещества

Другим возможным фактором, влияющим на измерения массы сухого вещества, является сам фазовый микроскоп. Для исследования его стабильности были изготовлены различные объекты [41]:

1 Сферы, помещенные в жидкость с близким показателем преломления;

2 Кювета, заполненная однородной жидкостью.

Получение фазовых изображений проводились каждые 30 сек. Результаты экспериментов показали, что в процессе измерения происходят изменение интеграла величины *M*, которые составляют 2-3 % при изменении температуры препарата на 4-5 °C.

Учет температурных влияний показал, что изменение температуры менее чем на 0,5 °C приводило к изменению величины M не более чем на 0,1-0,2 % [41].

Учет возможной дефокусировки микроскопа, возникающей при длительном эксперименте, приводит к линейному изменению величины *M*. За время не превышающее 4-5 часов ее изменение не превышало 2-3%. В дальнейшем дефокусировка контролировалась визуально по фазовым изображениям клетки, а незначительный линейный тренд учитывался при проведении расчетов [41].

3.6.4 Оценка влияния внутренних волн на измерение массы сухого вещества

Наличие локального нагрева из-за воздействия лазерного излучения на кювету с иммерсионной жидкостью могло бы привести к возникновению в ней внутренних волн. В результате этого возможно существенное изменение формы клетки.

Для проверки этого в качестве объектов были исследованы неживые объекты: капли керосин и масла в растворах. В ряде экспериментов объект освещался только в момент измерений в течение 1 сек. В ходе экспериментов

была зарегистрирована высокая стабильность результатов измерений. Значения *М* практически не изменялись в течение 2-3 ч, а его погрешность не превышала 0,1-0,3% [41].

Относительная суммарная погрешность вычисления массы сухого вещества определяется через (3.15):

$$\Delta P = \frac{\partial P \cdot \Delta M}{\partial M}.$$
(3.21)

$$\frac{\Delta P}{P} = \frac{\Delta M}{M}.$$
(3.22)

Таким образом, относительная погрешность измерения сухого веса Р определяется погрешностью измерения нулевого момента фазового изображения М. Учитывая, что наиболее существенное влияние на изменение фазового изображения влияют рефракция, изменение температуры и дефокусировка оптической системы, то суммарная относительная погрешность измерения сухого веса составляет не более 2 %.

Проведенные экспериментальные и теоретические исследования погрешности измерения массы сухого вещества клетки на микроскопе МИА-1М показали хорошие потенциальные возможности данного прибора и используемой методики. Регистрируя фазовые изображения клеток, можно сравнительно быстро получить как качественную, так и количественную информацию.

Эксперименты по измерению сухого веса эритроцита человека на автоматизированном микроскопе Линника по описанной методике показали, что среднее значение сухого веса составило 27-28 пг, что лежит в пределах табличного значения для нормального эритроцита, измеренного по фотометрической методике (27-35 пг), и близко к значению сухого веса, измеренного Вагег R. (31,4 пг) [42].

3.7 Измерение инкремента показателя преломления живой клетки во времени

Приведенные в разделе 3.6.4 результаты были получены на неживых клетках. Они позволили сделать вывод, что квазиклеточные структуры не изменяют показаний прибора в течение измерений на протяжении нескольких часов. Однако при анализе живых клеток ситуация принципиально изменяется.

Был проведен ряд экспериментов по измерению массы сухого вещества эритроцитов. Препараты подготавливались по следующей методике. Кровь разводилась физраствором в соотношении 1:10, помещалась на зеркальную поверхность, закрывалась покровным стеклом и запаивалась парафином во избежание ее высыхания. В поле зрения микроскопа находилась единичная клетка и регистрировались ее фазовые изображения каждые 30 сек.

Суть экспериментов заключалась в исследовании изменения инкремента показателя преломления во времени при разных длинах волн освещающего клетку излучения. Если за время измерения количество вещества в клетке остается постоянным, то причина изменения М может быть обусловлена за счет изменения инкремента показателя преломления клетки ($\alpha = 1,8\cdot10^9$ мкм³/г (для белков)) [163].

Измерения проводились с помощью микроскопа МИА-1М. Результаты измерения на длине волны 0,632 мкм представлены на рис. 3.11 и 3.12. На рис. 3.13 и 3.14 представлены результаты измерений на длинах волн 0,820 и 0,546 мкм.



Рисунок 3.11 – Изменение инкремента показателя преломления эритроцита во времени для двух различных экспериментов (длина волны 0,632 мкм).



Рисунок 3.12 – Изменение инкремента показателя преломления эритроцита во времени для двух различных экспериментов (длина волны 0,632 мкм).

Вертикальные линии - момент гибели клетки.



Рисунок 3.13 – Изменение инкремента показателя преломления эритроцита во времени для двух различных экспериментов (длина волны 0,820 мкм).



Рисунок 3.14 – Изменение инкремента показателя преломления эритроцита во времени для трех различных экспериментов (длина волны 0,546 мкм).

На рис.3.15 а, б представлены фазовые изображения одной и той же клетки, полученные в разные моменты времени t_1 =47min, t_2 =66min. Разница инкремента показателя преломления между ними 18%.

На рис.3.15 в, г приведены графики вертикального и горизонтального сечений этих фазовых изображений, наложенные друг на друга. Из них видно,

что изменение инкремента приводит к изменению фазы, однако общая форма клетки не изменяется.



Рисунок 3.15 – Фазовое изображение эритроцита a) t=47 мин, б) t=66 мин. Распределение фазы вдоль вертикального в) и горизонтального г) сечений соответственно.

В таблице 3.1 представлены результаты обработки экспериментальных данных, представленных на графиках. В столбцах 2 и 3 указаны максимальное и минимальное значение инкремента показателя преломления, а в столбцах 4 и 5 - данное отклонение в процентах.

N⁰	Длина	Рисунок	Max	Min	Max	Min
	волны,	/клетка	значение в	значение в	отклонение в	отклонение
	HM		$\alpha imes 10^9$ мкм 3 /г	$\alpha \times 10^9$ мкм ³ /г	%	в %
1	546	рис.3.9 / кл. 1	1,88	1,72	4,5	4,5
2		рис.3.9 / кл. 2	1,92	1,64	6,7	8,6
3		рис.3.9 / кл. 3	1,94	1,63	8,0	9,0
4	632	рис.3.6 / кл. 1	2,03	1,59	12,5	11,0
5		рис.3.6 / кл. 2	1,96	1,67	8,0	7,0
6		рис.3.7 / кл. 1	1,92	1,68	7,0	7,0
7		рис.3.7 / кл. 2	1,89	1,68	6,0	5,0
8		рис.3.12	1,92	1,61	7,1	10,5
9	820 нм	рис.3.8 / кл. 1	1,92	1,67	7,0	6,5
10		рис.3.8 / кл. 2	1,88	1,71	4,5	4,3
11		рис.3.11	1,92	1,68	7,1	6,2

Таблица 3.1 - Результаты обработки экспериментальных данных.

На рис. 3.16 представлены результаты одновременного измерения двух клеток из одного поля. Видно, что эти изменения происходят синхронно и имеют одинаковую амплитуду.



Рисунок 3.16 – Изменение инкремента показателя преломления во времени для двух эритроцитов, находящихся в одном поле зрения, (длина волны 0,632 мкм).

Из представленных графиков видно, что изменение инкремента показателя преломления при воздействии видимого излучения носит колебательный характер. Воздействие УФ излучения приводит к изменению характера этих колебаний (рис. 3.17). Начало и конец облучения клетки указаны вертикальными линиями.



Рисунок 3.17 – Изменение инкремента показателя преломления эритроцита во времени для двух различных экспериментов (длина волны 0,632 мкм) при воздействии на клетку УФ излучения.

Вероятно, что такой характер изменений обусловлен распадом части молекул белка и как следствие уменьшение среднего значения инкремента показателя преломления.

На рис.3.18 представлен график изменения инкремента показателя преломления живого лимфоцита. Из него видно, что изменение инкремента показателя преломления носит более сложный характер, чем для эритроцитов. Возможная причина – наличие разных типов белков.



Рисунок 3.18 – Изменение инкремента показателя преломления лимфоцита (длина волны 0,632 мкм).

3.8 Метод динамической фазовой микроскопии на основе анализа интенсивности интерферограммы

Как было сказано, для нестационарных фазовых объектов (например, живых клеток) особую роль играет метод динамической фазовой микроскопии (ДФМ). Он позволяет исследовать динамические процессы, происходящие в этих объектах связанные с изменением их интегральных характеристик. Как правило, эти методы сочетают длительный временной съем данных на интерференционном микроскопе и дальнейшую их обработку.

Один из таких методов был реализован на компьютерном фазовом микроскопе Тычинского «Эйрискан» [51]. В качестве интегральной характеристики была выбрана значение ОРХ в определенных точках – «фазовая высота» [51]. Недостатком реализованного метода является то, что интерференционного изображения запись на данном микроскопе осуществляется попиксельно, путем развертки. При этом время съема данных зависит от количества отсчетов, в которых производятся измерения. Поэтому данный микроскоп подходит для исследования ЛИШЬ локальных динамических процессов.

Возможность применения метода фазовых шагов для динамической фазовой микроскопии ограничивается тем, что для получения одного восстановленного фазового изображения необходимо как минимум 3-и интерференционных изображения, т.е. 3-и кадра. Это увеличивает время съема данных и уменьшает максимальную оцениваемую частоту.

Таким образом, для лучшей реализации метода ДФМ необходимо использовать восстановление по одному кадру. В этом случае осуществляется непрерывный ввод изображения, а оцениваемая частота ограничена частотой ввода. Для восстановления по одному кадру может быть использован Фурьеметод [11].

Оценка фазовой динамики может быть произведена и по анализу интерференционного изображения исследуемого фазового объекта на бесконечно широкой полосе. Этот метод в отличие от Фурье-метода является

относительным. Его преимущество в простоте реализации [44]. Рассмотрим его подробнее.

В общем случае уравнение интерферограммы для двухлучевой интерференции на бесконечно широкой полосе может быть записано в виде (3.23) (предполагаем, что за время регистрации интенсивности предметного и опорного каналов не меняются):

$$I(x, y, t) = I_1(x, y) + I_2(x, y) + 2\sqrt{I_1(x, y) \cdot I_2(x, y) \cdot \cos(\Delta\Phi(x, y) + \Phi(x, y, t))}, \quad (3.23)$$

где $I_{1,2}(x,y)$ —интенсивности предметного и опорного каналов, $\Delta \Phi(x,y)$ – фазовый набег без объекта, $\Phi(x,y,t)$ – фазовый набег от объекта. Обозначив $A(x,y)=I_1(x,y)+I_2(x,y)$ и $B(x,y)=2\sqrt{I_1(x,y)}\cdot I_2(x,y)$ и выразив $\Phi(x,y,t)$ из (3.23) получим:

$$\Phi(x, y, t) = \arccos((I(x, y, t) - A(x, y)) / B(x, y) - \Delta \Phi(x, y)).$$
(3.24)

Если фазовый набег мал, объект исследования достаточно тонок и разность показателей преломления объекта и среды мала, и, следовательно, малы фазовые изменения, вносимые объектом. Тогда разность I(x,y,t)-A(x,y) будет мала и при разложении первого слагаемого в ряд можно ограничится первым членом разложения:

$$\Phi(x, y, t) = (I(x, y, t) - A(x, y)) / B(x, y) - \Delta \Phi(x, y)) .$$
(3.25)

Фурье-преобразование от (3.25), с учетом его свойств, будет иметь вид: $F[\Phi(x | y | t)] = 2\pi\delta(f) \cdot (-\Delta\Phi(x | y) - A(x | y) - 1/B(x | y)) \cdot F[I(x | y | t)]$ (2.26)

$$F[\Phi(x, y, t)] = 2\pi o(f) \cdot (-\Delta \Phi(x, y) - A(x, y) - 1/B(x, y)) \cdot F[I(x, y, t)].$$
(3.26)

Из (3.26) видно, что Фурье-спектр от $\Phi(x,y,t)$, пропорционален Фурьеспектру от I(x,y,t).

Для экспериментальной апробации этого метода были исследованы Rzнейроны сегментальных ганглиев медицинской пиявки. Они являются водителями ритма, в норме частота их ритмической активности 0,1-0,3 Гц. Изменение фазы излучения, проходящего через такой объект, связано с изменением показателя преломления, обусловленного проведением потенциала действия. Исследования проводились на микроскопе МИА-1М, с

когерентным осветителем (He-Ne лазер) и ПЗС-камерой в фотографическом канале.

Изображения размерность 512х512 пикселей (поле зрения 40х40мкм) вводились в компьютер с помощью платы ввода FlyVideo с частотой 25 кадров/с, по 256 изображений.

Из всех изображений извлекались данные из мембранной области по площадке 6x6 пикселей и усреднялись. После обработке в программе MathCad 11.0 по алгоритму БПФ получали спектры (рис.3.19).



Рисунок 3.19 – Спектры интенсивности, регистрируемой микроскопом Линника. Объект – Rz нейроны медицинской пиявки.

Как видно из рис. 3.19 спектры содержат максимумы в области частот характерных для данного объекта - 12 Гц.

3.9 Выводы

В главе рассмотрены различные аспекты использования автоматизированного фазового микроскопа для исследования прозрачных объектов.

Рассмотрен двухиммерсионный метод измерения показателя преломления жидких и твердых веществ. Позволяющий с высокой точностью измерять показатель преломления исследуемого раствора путем сравнения с показателем преломления эталонного раствора. Особенность метода в том, что измеряемый объем составляет нл.

Рассмотрены особенности морфометрии клеток по фазовым изображениям для случая гомогенных и негомогенных объектов, а также динамические измерения с использованием автоматизированного фазового микроскопа.

Фазовый микроскоп может быть использован для измерения массы сухого вещества клетки. Для оценки погрешности измерения исследованы различные факторы: изменение объема клетки, рефракция света, влияние микроскопа, влияние внутренних волн, которые показали, что относительная погрешность не превосходит 2%.

Проведены эксперименты по измерению инкремента показателя преломления живой клетки во времени показали, что для живой клетки характерно наличие получасовых изменений инкремента показателя преломления.

Рассмотрен метод динамической фазовой микроскопии на основе анализа интенсивности интерферограммы, позволяющий без использования методов восстановления проводить относительные измерения динамических объектов.

Глава 4. Томографическая фазовая микроскопия

Томография включает два этапа - получение проекций и восстановление по проекциям томограмм. Если второй этап универсален для всех приложений томографии, то методы получения проекций отличаются. В оптической томографии проекции получаются при зондировании объекта с различных сторон оптическим излучением. В оптической микроскопии ситуация осложнена тем, что для освещения и наблюдения объектов необходимо использовать микроскоп. Поэтому в томографической микроскопии возникают две проблемы:

1. Организация многоракурсной системы углового зондирования объекта, встроенной в микроскоп.

2. Регистрации зондирующего излучения и извлечение из него проекционных данных.

В томографии зондирование исследуемого объекта может осуществлять либо набором параллельных лучей – параллельным пучком, либо набором лучей, пересекающихся в одной точке – коническим пучком. В одном случае проекции называются параллельными, а в другом – конические.

Существуют разные случаи зондирования:

- зондирование объекта вращающимся наклонным пучком;
- зондирование объекта путем наклона пучка;

Основное требование томографии заключается в том, что надо собрать как можно больше проекций в максимальном угле обзора, который должен стремиться к 180 градусам. На практике трудно удовлетворить этому требованию. Часто число ракурсов зондирования, т.е. число проекций ограничено. В микроскопии же ограничен еще и угол обзора.

Возможные схемы сканирования по углу в микроскопии приведены на рис. 4.1. Как видно из рисунков, максимальный угол зондирования объекта 4, достижимый в этих схемах, определяется числовой апертурой объективов 3, 5.



Рисунок 4.1 – Различные варианты углового зондирования в томографической микроскопии: а-в) с неподвижным объектом; г, д) с подвижным объектом 1, 5 – передняя и задняя фокальные плоскости микрообъективов; 2, 4 – микрообъективы; 3 – объект; 6 – источник; 7 – держатель [55].

4.1 Томографическая фазовая микроскопия на микроскопе Линника

Для достижения минимальной погрешности получения томограмм в условии ограниченного угла зондирования траектория получения проекций должна быть двумерной и иметь равномерно расположенные узлы [85]. В микроскопе ее можно обеспечить, например, путем перемещения точечного источника излучения в плоскости апертурной диафрагмы микрообъектива (рис. 4.1 в).

Было предложено использовать для этой цели микроскоп по схеме Линника. При исследовании на нем прозрачных объектов излучение два раза проходит через них, так как они расположены на зеркале[164].

На рис. 2.3 показана схема прохождения излучения через объект, который находится на зеркале. В силу закона отражения, пучок дважды проходит сквозь объект, что отражено на эквивалентной схеме, в которой пучок проходит прямо (рис.4.2). Из нее видно, что кроме объекта присутствует его зеркальное отражение.



Рисунок 4.2 – Схема зондирования объекта, расположенного на зеркале, плоским пучком.

Связь функции, описывающей фазовый объект f(x, y, z), и его пространственного распределения показателя преломления n(x, y, z) имеет следующий вид:

$$f(x, y, z) = \frac{2\pi \cdot R_0 \cdot (n(x, y, z) - n_0)}{\lambda},.$$
 (4.1)

где *R*₀.- радиус шара в который можно заключить объект, n₀ – показатель преломления иммерсионной (окружающей) среды.

При перемещении начала координат вдоль оси z на величину R_0 (см. рис. 2.3), объект может быть записан как:

$$g(x, y, z) = f(x, y, z - R_0) + f(x, y, R_0 - z).$$
(4.2)

Из этого следует, что схема зондирования на отражение эквивалентна схеме зондирования на просвет, но при этом объект содержит свое зеркальное отражение и описывается функцией g(x,y,x) (4.2).

Параллельность плоскости регистратора (рис.2.2) и предметного зеркала, приводит к формированию двумерных планарных проекций вида [53]:

$$\Phi(x, y; \theta, \varphi) = \int g(x - z \cdot tg \theta \cdot \cos\varphi, y - z \cdot tg \theta \cdot \sin\varphi, z) dz, \qquad (4.3)$$

где (θ , ϕ) – полярный и азимутальный углы единичного вектора зондирования.

В плоскости регистратора формируется суммарное изображение из элементарных интерферограмм-проекций фазового объекта, как было показано в разделе 2.2.2. Так как элементарные интерферограммы суммируются, то это приводит к снижению контраста суммарной интерферограммы (2.19), (2.20) Для его увеличения можно уменьшить угловой размер источника света, но это может привести к появлению когерентных шумов.

С другой стороны, суммирование проекций приводит к снижению шумов суммарной интерферограммы (2.20). Увеличение размера источника будет приводить к уменьшению контраста интерференционных полос. Только в случае точечного источника на регистраторе формируется интерферограмма, соответствующая радоновской проекции (4.3). Для малого источника конечных размеров, проекция определяется суммой интерферограмм, поэтому лишь в некоторой степени может считаться радоновской. Эта ситуация характерна для любой оптической системы с конечной числовой апертурой.

4.1.1 Получение проекций

Проекции исследуемого объекта, представляющие собой фазовые изображения, были получены с использованием микроскопа Линника МИА-1. Для получения наклонного зондирующего излучения источник освещения [73, 118, 165] перемещался в плоскости апертурной диафрагмы. Для получения фазовых изображений использовалось ПО «Phast» (ФГУП «ВНИИОФИ»).

Объектом исследования явились клетки крови – лимфоциты. Живые лимфоциты были помещены между зеркалом и покровным стеклом в капле физраствора. Концентрация клеток была такой, что в поле зрения находились единичные экземпляры. Для проведения измерений была выбрана единичная клетка. Траектория зондирования - квадратная сетка [85], узлы которой соответствуют угловым координатам вектора зондирования (θ, φ):

- по углу ϕ от 0° до 150° с шагом 30°;

- по углу θ от 0° до 90° (для 100х микрообъектива с NA=1,25).

Погрешность установки углов составила 0,5°.

После реконструкции фазовых изображений в каждом его пикселе получается ОРХ, которая может быть записана следующим образом:

$$\Delta N_{i} = \int_{B_{i}}^{C_{i}} (n(s) - n_{0}) ds, \qquad (4.4)$$

где ΔN_i - OPX по *i*-му лучу; B_i , C_i - точки входа и выхода луча в клетку; n(s) – изменение показателя преломления клетки вдоль луча; n_0 - показатель преломления окружающей среды.

В ходе эксперимента было получено 43 проекции на сетке 256×256 в поле зрения 23×23 мкм. Общий вид проекций представлен на рис. 4.3.



Рисунок 4.3 – Проекции живого лимфоцита.

4.1.2 Предварительная обработка проекций и восстановление томограммы

При предварительной обработке были проведены следующие процедуры, обычные для томографической реконструкции:

- начала координат проекций были совмещен с центром масс;

- нормировка на нулевые моменты;

- вычитание фона путем вычитания из всех проекций уровня определяемого шумами вне области проекции клетки.

Восстановление томограммы клетки осуществлялось с использованием алгоритма сART [85]. При этом зеркало располагалось в плоскости Z=0. Данный алгоритм итерационный. После каждой итерации отрицательные значения на томограмме занулялись. Также занулялись значения лежащие вне области в виде двух сфер радиуса 0,5, расположенных симметрично относительно зеркала.

На рис. 4.4 представлен результат реконструкции внутренней структуры живого лимфоцита: в виде изоповерхностей с одинаковой оптической плотностью [166].

Представленная схема томографического микроскопа имеет следующие особенности:

- 1 Исследуемый объект неподвижен;
- Высокая чувствительность к измерению ОРХ из-за двойного прохождения излучения;
- 3 Относительно большой угол зондирования ±45°;
- 4 Возможность реализации траектории зондирования типа «квадрат», которая дает минимальную ошибку восстановления томограммы.

Однако данная схема, работающая на отражение, приводит к усложнению процесса восстановления по проекциям, полученным для объекта, находящегося на зеркале. Для преодоления этого недостатка необходимо было разработать схему на просвет с однократным прохождением зондирующего излучения сквозь исследуемый объект.



Рисунок 4.4 - Томограммы живого лимфоцита в виде изоповерхностей [55].

4.2 Томографическая фазовая микроскопия по дифференциальным проекциям

4.2.1 Теоретическая часть

Для получения качественных фазовых изображений с источником с низкой временной когерентностью предлагается использовать сдвиговую микроскопию с расшифровкой интерферограмм. Это метод подобен DIC микроскопии, поэтому это направление микротомографии фазовых объектов было названо DIC томографией [174]. Главная отличительная особенность DIC томографии заключается в том, что результатом томографической реконструкции является 3D DIC изображение, которое предлагается определять следующим образом:

$$DIC(x, y, z) = \frac{\partial f(x, y, z)}{\partial y},$$
 (4.5)

где $f(x,y,z)=n(x,y,z)-n_0$, n(x,y,z) - 3D распределение показателя преломления, n_0 - показатель преломления окружающей среды, (x,y,z) декартовые координаты, ось z совпадает с оптической осью микроскопа.

Ранее для реконструкции томограмм фазовых объектов использовались проекции, которые в эйкональном приближении без учета дифракции света на объекте, описываются преобразованием Радона [175] от функции f:

$$R(p, y; \theta) = \iint f(x, y, z) \delta(p - x \cos \theta - z \sin \theta) dx dz , \qquad (4.6)$$

где δ -дельта-функция Дирака, ось р составляет угол θ с осью х и лежит в плоскости (x,z), которую можно назвать плоскостью зондирования. Для фазовых объектов проекция (4.6) является 2D распределением OPX вдоль направления θ.

Обратное преобразование Радона будет иметь вид:

$$f(x, y, z) = \frac{1}{2\pi^2} \iint \frac{R(p, y; \theta)}{\left(x \cos \theta - z \sin \theta - p\right)^2} dp d\theta , \qquad (4.7)$$

здесь интегрирование по углу θ выполняется в диапазоне от 0 до π . В уравнениях (4.6), (4.7) координата у является параметром. Поэтому задача

восстановления 3D-томограммы из двумерных параллельных проекций сводится к задаче задач реконструкции 2D томограммы из 1D проекций.

В качестве новых проекций предлагается использовать частную производную от проекций (4.6) вдоль оси у, перпендикулярной плоскости зондирования:

$$\frac{\partial R(p, y; \theta)}{\partial y} = \iint \left(\frac{\partial f(x, y, z)}{\partial y} \right) \delta(p - x \cos \theta - z \sin \theta) dx dz$$
(4.8)

Из (4.8) видно, что такие модифицированные проекции также являются преобразованием Радона, но не от 3D распределения показателя преломления, а от 3D DIC изображения (4.5). Поэтому для восстановления 3D DIC изображения (4.5) можно использовать хорошо разработанные обычные томографические алгоритмы, например, обратное преобразование Радона, но только в качестве проекций использовать производную (4.7):

$$DIC(x, y, z) = \frac{1}{2\pi^2} \iint \frac{\partial R(p, y; \theta)}{\partial y} \frac{1}{(x \cos \theta - z \sin \theta - p)^2} dp d\theta .$$
(4.9)

Исходными данными для получения проекций вида (4.8) служат фазовые 2D DIC изображения объекта под различными углами θ, полученные при малом сдвиге Δу вдоль направления оси у. Они несут информацию о частной производной:

$$\frac{\partial R(p, y; \theta)}{\partial y} = \frac{\left[R(p, y + \Delta y; \theta) - R(p, y; \theta)\right]}{\Delta y}.$$
(4.10)

Томографическое восстановление 3D DIC изображения вместо 3D n(x,y,z) сильно упрощает схему томографического микроскопа, что будет показано ниже. При этом 3D DIC изображение имеет высокий контраст, подчеркивающий мелкие детали в распределении показателя преломления.

Поперечные сечения z=const 3D DIC изображения напоминают 2D DIC изображения, которые получаются в обычном DIC микроскопе при сканировании объектива или объекта вдоль оптической оси микроскопа для получения изображений при различной глубине фокусировки. В некоторых

работах [176, 177] восстановленные фазовые изображения путем цифровой обработки специально превращали в DIC изображения для подчеркивания контраста этих изображений.

Если делать сдвиг вдоль оси р, параллельной плоскости зондирования, то, казалось бы, можно воспользоваться формулой обращения преобразования Радона по производным от проекций [175]

$$f(x, y, z) = \frac{1}{2\pi^2} \iint \frac{\partial R(p, y; \theta)}{\partial p} \frac{1}{(x \cos \theta - z \sin \theta - p)} dp d\theta \qquad (4.11)$$

и восстанавливать само 3D n(x,y,z) распределение. Однако алгоритмы, основанные на данной формуле обращения (4.11), дают удовлетворительный результат при большом диапазоне углов, близком к 180°.

В томографической микроскопии диапазон углов зондирования ограничен числовой апертурой микрообъективов и не превышает 140°. В томографии эта проблема реконструкции томограмм в ограниченном диапазоне углов получила название «missing cone problem» [178]. В этом случае необходимо использовать различные итерационные алгоритмы [179], например, алгебраический ART [175] или Гершберга-Папулиса [180-182]. Однако в этих алгоритмах используются исходные проекции вида (4.6), а не их производные по переменной р.

Только совсем недавно в связи с развитием X-ray дифференциальной фазо-контрастной томографии стали появляться итерационные алгоритмы [183], в которых используются производные от проекций в направлении оси р. Однако они пока находятся в стадии исследования.

Другой путь применения DIC проекций состоит в интегрировании исходных данных и получении из производных проекций самих проекций [184]. Интегрирование вносит дополнительные шумы в проекционные данные, что неприемлемо для задачи томографической реконструкции, т.к. она является некорректной.

Таким образом, использование дифференциальных проекций, получаемых в сдвиговом томографическом микроскопе, при сдвиге в направлении, ортогональном плоскости зондирования, позволяет реконструировать томограммы с использованием инверсного преобразования Радона. Это пятое научное положение.

4.2.2 Описание экспериментальной установки

В основе экспериментальной установки томографического фазового микроскопа DIC-TOMO лежит прямой микроскоп с двумя идентичными иммерсионными микрообъективами для подсветки и получения изображения и интерферометр бокового сдвига [185 - 188]. На рис. 4.5 а представлена его оптическая схема, а на рис. 4.5 б – его внешний вид.





a

б

Рисунок 4.5 а – Схема томографического фазового микроскопа DIC-TOMO: LED – точечный светодиод; L0 – коллиматор; M0 – зеркало на гальваническом приводе; M1 – опорное зеркало; L1, L2 – объективы; O1, O2 – микрообъективы; F1, F2 – фурье-объективы; СК – светоделительная призма; M2 – зеркало, управляемое пьезоприводом; ПЗС – ПЗС видеокамера; б – внешний вид томографического фазового микроскопа DIC-TOMO.

Источником освещения был выбран т.н. точечный светодиод КЕD080RAXH [187] выпускаемый фирмой Kyosemi Co. (Япония). Он представляет собой источник низкокогерентного излучения с центральной длиной волны 652 нм и полушириной спектра 10 нм. Выходная мощность излучения 0,6 мВт (при токе 25 мА).

Основная особенность точечного светодиода в том, что он имеет малую излучающую область, размер которой для данной модели составляет около 80

мкм. Его использование совместно с коллимирующим объективом L0 позволяет получить квазимонохроматическое излучение с высокой пространственной когерентностью без существенной потери мощности. Оптическая схема представляет собой конфокальную систему – задняя фокальная плоскость первого компонента совпадает с передней фокальной плоскостью последующего.

Для зондирующего создания наклонного пучка излучения использовалось гальваническое двухосевое зеркало МО ("Атеко-ТМ", г. Москва). Для этого плоский волновой фронт, сформированы коллимирующим объективом L0, отражается от поверхности зеркала M0 и с помощью линзы L1 собирается в передней фокальной плоскости иммерсионного (NA 1.30) 100× микрообъектива O1 (модель UPlanFLN100X02, Olympus Corp., Япония). При наклоне зеркала сфокусированный пучок перемещается в этой плоскости. Это приводит к тому, что из микрообъектива МО выходит параллельный пучок под различными углами. Пучок проходит через исследуемый объект и попадает на второй микрообъектив О2 идентичный О1. Между этими микрообъективами имеется пространство 400 мкм, в которое вставляется препарат – раствор с клетками, находящийся между двух покровных стекол толщиной 100 мкм, 100 разделенных прокладкой толщиной около МКМ. Использование иммерсионных объективов позволило достичь максимального угла зондирования \pm 62 °.

Для получения интерферограмм в микроскопе реализован сдвиговый интерферометр [11]. Он состоит из зеркал М1, М2 и светоделителя СК. Положение зеркал М1, М2 совпадает с задним фокусом фурье - объектива F1 и передним фокусом фурье - объектива F2. Наклон зеркала М1 на угол α приводит к поперечному сдвигу на Δr отраженного от него пучка (рис. 4.6). Таким образом, интерферирующие пучки практически параллельны и при их интерференции образуется бесконечно широкая полоса.

Сдвиг Δr (рис. 4.6 а) выбирается такой, что его величина не превышает размер дифракционного изображения точки для используемого

микрообъектива. В этом случае сдвиговая интерферограмма будет соответствовать производной волнового фронта, а восстановленное фазовое изображение будет являться производной от проекции. Далее будем называть производную от проекции дифференциальной проекцией.



Рисунок 4.6 – Схема сдвига пучков в интерферометре Майкельсона.

Зеркало М1 располагается в двухосевом наклонном держателе. Направление сдвига определяется ориентацией оси вращения зеркала М1. Если гальваническое зеркало М0 вращается вокруг оси, перпендикулярной плоскости рисунка, то зеркало М1 должно быть повернуто вокруг оси, параллельной плоскости рисунка (рис. 4.7).



а



Рисунок 4.7: а – схема зондирования объекта, горизонтальная стрелка – направление зондирования; б – схема сдвига пучков, вертикальная стрелка – направление сдвига.

Для восстановление дифференциальных проекций исследуемого объекта использовался метод фазовых шагов. Фазовый сдвиг обеспечивался за счет продольного перемещения зеркала М2 при помощи пьезоактюатора типа КП-19 («Элпа», Россия) вдоль оптической оси. В данной схеме не используется точечная диафрагма, размешенная в плоскости одного зеркал и предназначенная для фильтрации пучка, как это сделано в [30], что значительно упрощает ее настройку. Для управления зеркала используется плата АЦП/ЦАП типа L-205 (LCard, Россия). Интерферограммы записывались с помощью видеокамеры «Videoscan-285» («Видеоскан», Россия). Размер матрицы 1392×1040 пикселей.

Для управления фазовым сдвигом, захватом интерферограмм и получением фазовых изображений использовалось ПО «WinPhast» (ВНИИОФИ, Россия).

Для угловой калибровки использовались фотографии пучка, проходящего через емкость с прозрачными стенками, заполненную глицерином, полученные перпендикулярно оптической оси (рис. 4.8).


Рисунок 4.8 – Угловая калибровка микроскопа. а, б – фотографии пучка, проходящего через емкость с прозрачными стенками, заполненную глицерином.

4.2.3 Результаты экспериментов с живыми клетками

Для проведения экспериментов были использованы эритроциты и лимфоциты. Некоторые DIC проекции, полученные под различными углами зондирования, представлены на рис. 4.9 Эти изображения представляют собой производную от OPX прошедшего через клетку излучения. Сдвиг выполняется в вертикальном направлении (у). Направление углового сканирования совпадает с горизонтальным направлением (х). Размер проекции был 256 × 256 пикселей (17,2 × 17,2 мкм), размер пикселя 67 нм, боковой сдвиг составлял 440 нм.





Рисунок 4.9 - а, б, в - DIC-проекции эритроцита под углом зондирования -47°, 0° + 47°; г, д, е - DIC-проекции эритроцита под углом зондирования -50°, 0° + 50°.

3D DIC томограмма была реконструирована по 50 DIC проекциям. Для реконструкции 3D DIC томограммы использовался итерационный ART алгоритм, который представляет собой метод Качмажа по решению системы линейных алгебраических уравнений (СЛАУ) [175, 189]. Размер 3D-томограммы составлял 256 × 256 вокселей, размер воксела составлял 63 нм. Для устранения влияния шумов использовалось сглаживание решения на каждой итерации в окне 3х3х3, и его фильтрация в Фурье пространстве методом Гершберга-Папулиса [55, 190-192]. Некоторые сечения z=const 3D DIC томограммы лимфоцита представлены на рис.4.10.



Рисунок 4.10 - Сравнение обычных DIC изображений лимфоцита, полученных при различной фокусировке (a-f) и сечений 3D DIC томограммы, полученных на тех расстояниях от фокуса.

На рис. 4.10 приведено сравнение обычных DIC изображений и томограмм одного и того же объекта. Из него видно, что структура DIC томограмм изменяется с увеличением расстояния от центральной секции z = 0, в частности, изменяет размер и контраст изображения. Томограммы показывают, что эта клетка имеет форму шарика, а ее диаметр составляет около 6 мкм. В левой части рисунка 4.10 представлены обычные DIC изображения, полученные при зондировании под нулевым углом при разной глубине фокусировки (рис. 4.10 а - f). Реконструированные двумерные фрагменты томограммы 3D DIC (рис. 4.10 g – l) и обычные изображения DIC были получены на том же расстоянии от фокуса.

Существует четкое соответствие между томограммами DIC и изображениями DIC на одной и той же глубине. Но в плоскости фокуса (рис. 4.10 i) и вне фокуса (рис.4.10 g, h, j – l) структуры, такие как ядра и цитоплазменные гранулы, могут видны на томограмме DIC, тогда как на обычном изображении DIC (рис.4.10 a – f) эти структуры размыты. DIC изображения вне фокуса показывают потерю пространственного разрешения этих структур. Чем дальше от центральной части, тем меньше диаметр клетки становится на DIC томограммах, но при этом она не изменяется на DIC изображениях.

Преимущества предложенного метода DIC-томографии заключаются в следующем:

- простая схема конструкции, имеющая однокоординатный сканер;

- отсутствует точечная диафрагма (пинхол);

- осевая (on-axis) схема, поэтому можно использовать квазимонохроматический свет от точечного источника, например, точечного светодиода (point source LED)

- можно использовать метод фазовых шагов для высокоточной реконструкции фазы из сдвиговых интерферограмм.

Если есть необходимость восстановления истинного распределения показателя преломления, то можно проинтегрировать вдоль оси смещения

восстановленную 3D DIC томограмму. При этом лучше интегрировать восстановленную томограммы чем интегрировать проекционные данные.

Представленный томографический микроскоп также может быть использован для реализации методов локальной томографии, которые рассмотрены далее.

4.3 Локальная томографическая фазовая микроскопия

Как уже говорилось ранее, методы томографической фазовой микроскопии широко развиваются и их основная задача – получение трехмерного распределения показателя преломления. Особенно эта задача актуальна при исследовании живых клеток [55, 58, 60, 118 193-194].

Обычно в схеме томографического микроскопа объект просвечивается параллельным пучком под различными углами. Как правило, при этом сам пучок имеет размер больше чем размер исследуемого объекта. Однако нередко это условие не выполняется. В частности, при исследовании клеток это может быть обусловлено следующими факторами:

- большим увеличением микроскопа, что приводит к тому, что клетка занимает все поле зрения, а ее границы, находятся вне его;

 - сильной рефракцией/дифракцией на мембране клетки, что приводит к потере информации о ней на проекциях и невозможности восстановления фазы в этой области;

 необходимостью исследования отдельных структур клетки (выбор зоны интереса), для увеличения объема получаемой полезной информации в единицу времени.

Все эти факторы приводят к тому, что размер проекционных данных оказывается меньше размера объекта. В томографии для этого случая разработано отдельное направление, которое называется локальная томография [86]. В англоязычной литературе данное направление называется ROI – томографией от англ. Region-Of-Interest, так как при локальной томографии можно выбрать т.н. зону интереса (Region-Of-Interest) и

восстановить информацию в ней. Ее главная особенность в том, что она позволяет восстанавливать томограммы без использования инверсных преобразований, что увеличивает скорость вычислений. Это открывает новые возможности для исследования динамических объектов.

Среди алгоритмов локальной томографии стоит особо выделить алгоритмы, основанные на суммировании обратных проекций (backprojection), в которых используют частные производные первого или второго порядков от получаемых проекций [195-196]. Далее будем называть такие проекции – дифференциальные проекции 1-го и 2-го порядка.

Дифференциальные проекции 1-го порядка в фазовой микроскопии легко получить, например, используя методы DIC-контраста и интерферометрии сдвига [11].

Перейдем к рассмотрению математических аспектов локальных алгоритмов [197-198].

4.3.1 Суммарное изображение из дифференциальных проекций

Представим исследуемый объект в виде трехмерного распределения показателя преломления, описываемого функцией $f(x,y,z)=n(x,y,z)-n_0$, где, n_0 – показатель преломления окружающей этот объект среды. Тогда трехмерную томограмму можно представить в виде набора двумерных томограмм, описываемых функцией f(x, y=const, z). Поэтому для простоты в дальнейшем будем рассматривать задачу восстановления функции f(x,y).

Для восстановления функции f(x,y) используются проекции $p(r;\varphi)$, описываемые преобразованием Радона [175]:

$$p(r;\varphi) = \int_{-\infty}^{\infty} f(r\cos\varphi - s\sin\varphi, r\sin\varphi + s\cos\varphi)ds, \qquad (4.12)$$

где (r,s) - система координат ориентированная под углом φ относительно (x,z).

Важное значение в томографии занимает теорема о центральном слое [53, 108], которая задает связь между фурье-образом (заглавные буквы) проекции $P(r; \varphi)$ и объекта F(x, z):

$$P(\rho;\varphi) = F(\rho \cos\varphi, \rho \sin\varphi), \qquad (4.13)$$

$$p(r;\varphi) = \int_{-\infty}^{\infty} P(\rho;\varphi) e^{i2\pi\rho r} d\rho, \qquad (4.14)$$

$$f(x,z) = \iint_{-\infty}^{\infty} F(u,w) e^{i2\pi(ux+wz)} dudw, \qquad (4.15)$$

где *р*, *u*, *w* - фурье-сопряженные координаты, соответственно, пространственным координатам *r*, *x*, *z*.

Дифференцируя проекции $p(r;\varphi)$ по r можно получить т.н. дифференциальные проекции 1-го и 2-го порядка. Дифференцируя по этой координате выражение (4.14) и используя известное выражение для производной фурье-образа [108], получаем дифференциальные проекции 1-го и 2-го порядка:

$$p'(r;\varphi) \equiv \frac{\partial p(r;\varphi)}{\partial r} = 2\pi \int_{-\infty}^{\infty} i\rho P(\rho;\varphi) e^{i2\pi\rho r} d\rho, \qquad (4.16)$$

$$p''(r;\varphi) \equiv \frac{\partial^2 p(r;\varphi)}{\partial^2 r} = -4\pi^2 \int_{-\infty}^{\infty} \rho^2 P(\rho;\varphi) e^{i2\pi\rho r} d\rho.$$
(4.17)

Суммируя обычные и дифференциальные проекции в угловом диапазоне от 0 до π, получаем суммарные изображения:

$$b(x,z) = \int_0^{\pi} p(x\cos\varphi + z\sin\varphi;\varphi)d\varphi, \qquad (4.18)$$

$$b'(x,z) = \int_0^{\pi} p'(x\cos\varphi + z\sin\varphi;\varphi)d\varphi, \qquad (4.19)$$

$$b''(x,z) = \int_0^{\pi} p''(x\cos\varphi + z\sin\varphi;\varphi)d\varphi.$$
(4.20)

Следует отметить, что в данных формулах символ апострофа обозначает, что данные суммарные изображения получены из дифференциальных проекций 1-го и 2-го порядка.

Далее определим взаимосвязь полученных суммарных изображений с исходной функцией f(x,z). Из формул (4.18) - (4.20), (4.14) - (4.17) следует:

$$b(x,z) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P(\rho;\varphi) \, e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} d\rho d\varphi, \qquad (4.21)$$

$$b'(x,z) = 2\pi \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} i\rho P(\rho;\varphi) \, e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} d\rho d\varphi, \qquad (4.22)$$

$$b''(x,z) = -4\pi^2 \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \rho^2 P(\rho;\varphi) \, e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} d\rho d\varphi. \tag{4.23}$$

Подставляя выражения

$$\rho = |\rho| sgn(\rho), \, \rho^2 = |\rho| \cdot |\rho| \,, \tag{4.24}$$

где sgn(x) - знаковая функция:

$$sgn(x) = \begin{cases} 1, & x > 0, \\ -1, & x < 0. \end{cases}$$

в (4.22), (4.23) и применяя теорему о центральном слое (4.13), получим:

$$b(x,z) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{|\rho|} F(\rho \cos\varphi, \rho \sin\varphi) e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi+z\sin\varphi)} |\rho| d\rho d\varphi,$$

$$b'(x,z) =$$
(4.26)

$$2\pi \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} isgn(\rho) F(\rho \cos\varphi, \rho \sin\varphi) e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} |\rho| d\rho d\varphi,$$
$$b''(x, z) =$$
(4.27)

$$-4\pi^2 \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} |\rho| F(\rho \cos\varphi, \rho \sin\varphi) e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi+z\sin\varphi)} |\rho| d\rho d\varphi.$$
(4.27)

Заменяя полярные переменные на декартовые ($u = \rho cos \varphi$, $w = \rho sin \varphi$), и учитывая, что $sgn(\rho) = sgn(\rho sin \varphi) = sgn(w)$ для углов φ из диапазона [0, π], получим:

$$b(x,z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{u^2 + w^2}} F(u,w) e^{i2\pi(ux + wz)} du dw, \qquad (4.28)$$

$$b'(x,z) = 2\pi \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} isgn(w)F(u,w) e^{i2\pi(ux+wz)} dudw,$$
 (4.29)

$$b''(x,z) = -4\pi^2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \sqrt{u^2 + w^2} F(u,w) e^{i2\pi(ux+wz)} dudw.$$
(4.30)

(4.42) можно переписать как:

$$b(x,z) = f(x,z) \otimes \otimes \frac{1}{\sqrt{x^2 + z^2}},$$
(4.31)

где ⊗⊗ - значок 2D свертки.

Суммарное изображение (4.28) состоит из низких пространственных частот объекта [53].

Выражение (4.43) можно представить в виде:

$$b'(x,z) = -2\pi H_z[f(x,z)], \qquad (4.32)$$

где *H*_z - оператор преобразования Гильберта вдоль *z*.

Локальный алгоритм, описываемый (4.32), был рассмотрен в [199], а его применение для томографии в [200].

Выражение (4.44) можно представить в виде:

$$b''(x,z) = -4\pi^2 \Lambda[f(x,z)], \qquad (4.33)$$

где Λ - оператор задающий фильтрацию с помощью ρ-фильтра вида:

$$\sqrt{u^2 + w^2} = |\rho|. \tag{4.34}$$

Локальный алгоритм, описываемый (4.33), был рассмотрен в работе [201]. Также этот вид локальной томографии называется Λ (лямбда) томографией [196].

Стоит заметить, что суммарные изображения (4.30) и (4.31) не являются истинными томограммами. Для получения томограмм необходимо использовать обратное преобразование Гильберта для суммарного изображения (4.32) [202] и выполнить низкочастотную фильтрацию для суммарного изображения (4.33).

На сегодняшней день методы локальной томографии активно развиваются. В основном они находят свое применение в медицинской томографии, а также в т.н. фазоконтрастной томографии, использующей синхротронное рентгеновское излучение [86, 203, 204].

4.3.2 Томограмма из дифференциальных проекций

Рассмотренная ранее связь между исходной функцией (томограммой) и суммарным изображением описывала локальный алгоритм реконструкции. Так как для получения суммарного изображения требовалась операция суммирования, которая носит локальный характер. В классическом алгоритме для восстановления необходима еще операция фильтрации, которая не носит локальный характер. Для сравнения рассмотрим, что получится, если использовать классический (нелокальный) алгоритм для восстановления по дифференциальным проекциям 1-го и 2-го порядка.

Восстановление томограммы методом фурье-синтеза [53] описывается следующим выражением:

$$f(x,z) = 2\pi \int_0^\pi \int_{-\infty}^\infty P(\rho;\varphi) |\rho| \, e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} d\rho d\varphi. \tag{4.35}$$

Используя дифференциальные проекции (4.30), (4.31), получим:

$$f'(x,z) = 2\pi \int_0^\pi \int_{-\infty}^\infty i\rho P(\rho;\varphi) |\rho| \, e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi+z\sin\varphi)} d\rho d\varphi, \tag{4.36}$$

$$f''(x,z) = -4\pi^2 \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \rho^2 P(\rho;\varphi) \left| \rho \right| e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi + z\sin\varphi)} d\rho d\varphi.$$
(4.37)

В этих формулах, как и ранее, символ апострофа обозначает, что томограммы получены из дифференциальных проекций 1-го и 2-го порядка.

Из теоремы о центральном слое (4.13) и выражения (4.24) следует:

$$f'(x,z) =$$

$$2\pi \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} isgn(\rho) F(\rho sin\varphi, \rho cos\varphi) |\rho| e^{i2\pi\rho(xcos\varphi+zsin\varphi)} |\rho| d\rho d\varphi,$$

$$f''(x,z) =$$

$$(4.38)$$

$$-4\pi^2 \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\rho \sin\varphi, \rho \cos\varphi) \rho^2 e^{i2\pi\rho(x\cos\varphi+z\sin\varphi)} |\rho| d\rho d\varphi.$$
(4.39)

Перейдя к декартовым координатам ($u = \rho cos \varphi$, $w = \rho sin \varphi$), получим:

$$f'(x,z) =$$
(4.40)

$$2\pi \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} isgn(w) \left[\sqrt{u^2 + w^2}F(u, w)\right] e^{i2\pi(ux + wz)} dudw,$$

$$f''(x,z) = -4\pi^2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} (u^2 + w^2) F(u,w) e^{i2\pi(ux+wz)} dudw.$$
(4.41)

Применяя выражения (4.32), (4.33) можно записать (4.40) и (4.41) в следующем виде [205]:

$$f'(x,z) = -2\pi H_z \{ \Lambda[f(x,z)] \},$$
(4.42)

$$f''(x,z) = 4\pi^2 \Delta f(x,z).$$
(4.43)

4.3.3 Численное моделирование локальной томографии

Для верификации представленного алгоритма локальной томографии было проведено численное моделирование на фантоме клетки размером 800×800 пикселов (см. рис.4.11 а). Он состоит из следующих элементов: внешнее кольцо диаметром 640 пикселов (заполнение 2 у.е.); пространство внутри внешнего кольца (заполнение 1 у.е.), внутренний круг (заполнение 2 у.е.), гауссиана (заполнение 2 у.е.). Данные элементы имитируют различные структуры клетки.



Рисунок 4.11 – а – фантом клетки; б - синограмма из обычных проекций; в - синограмма из дифференциальных проекций 1-го порядка; г - синограмма из дифференциальных проекций 2-го порядка.

Используя численный алгоритм преобразования Радона была получена синограмма из «широких» проекции. Для получения проекций с помощью прямого преобразования Радона была использована соответствующая функция («radon») в среде математического моделирования MatLab. Синограмма фантома, составленная из 90 проекций, полученных через 2 градуса, представлена на рис.4.11 б. Численным дифференцированием этих проекций были получены синограммы, составленные из дифференциальных проекций 1-го и 2-го порядков (рис. 4.11 в, г.). «Узкие» проекции размером 300 пикселов (рис. 4.12) были получены из ее центральной части.



Рисунок 4.12 - Суммарные изображения из «широких» (а, в, д) и «узких» (б, г, е) проекций: а, б – обычные проекции; в, г - дифференциальные проекции 1-го порядка; д, е - дифференциальные проекции 2-го порядка.

Отключив режим фильтрации («unfiltered backprojection data») в функции обратного преобразования Радона («iradon») в среде математического моделирования MatLab, были получены суммарные изображения из «широких» (рис. 4.12 а, в, д) и из «узких» (рис. 4.12 б, г, е) проекций.

Анализируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы:

- суммарное изображение (рис. 4.12 а, б) из обычных проекций соответствуют исходному изображения, пропущенному через фильтр нижних частот, поэтому изображения мелких структур имеют низкий контраст и плохо различимы (см. (4.45));

- суммарное изображение (рис. 4.12 в, г) из дифференциальных проекций 1-го порядка, соответствуют преобразованию Гильберта исходного изображения вдоль вертикальной оси (см. (4.46)). Границы основных структур, имеющих как резкие, так и плавные границы хорошо видны;

- суммарное изображение (рис. 4.12 д, е) из дифференциальных проекций 2-го порядка вида, соответствуют преобразованию Лапласса исходного изображения (см. (4.47)). На нем хорошо видны структуры, имеющие резкие границы, но плохо видны структуры с плавной границей;

- соответствующие области на суммарных изображения, полученных по «широким» (левый столбец на рис. 4.12) и «узким» проекциям (правый столбец на рис. 4.12), совпадают, что доказывает локальность представленных алгоритмов.

На наш взгляд наиболее информативными являются суммарные изображения, полученные из дифференциальных проекций 1-го порядка.

4.3.4 Описание эксперимента по локальной томографии клетки

Для экспериментов был использован фазовый томографический микроскоп, описанный в разделе 4.2.2 (рис. 4.5). Отличие заключалось лишь в том, что направление сдвига было в направлении параллельном направлению зондирования, а не перпендикулярном, как было ранее (рис. 4.12), что позволило получать дифференциальные проекции по оси р.

Объектом исследования была выбрана ядерная клетка – лягушачий эритроцит, содержащий ярко выраженное ядро. С помощью томографического микроскопа было получено 119 дифференциальных фазовых проекций 1-го порядка (рис. 4.13 а). Диапазон углового зондирования составил от - 60° до + 58°.

На всех проекциях было выбрано одно и тоже центральное сечение (см. штриховую линию на рис. 4.13 а), вдоль которого были получены 1D «широкие» проекции, из которых была сформирована синограмма (рис. 4.13 б). Для получения «узких» проекций на синограмме была выделена центральная часть шириной 120 пикселов, охватывающая область ядра (см. штриховые линии на рис. 4.13 б).

На рис. 4.13 представлено суммарное изображение, полученное из «узких» проекций. На нем хорошо видны мелкие детали в области ядра клетки. Также имеются т.н. лучевые артефакты, которые обусловлены ограниченным углом зондирования.

Проведенная экспериментальная проверка показывает возможность применения методов локальной томографии для исследования внутренней структуры клетки.

Таким образом, использование дифференциальных проекций, получаемых в сдвиговом томографическом микроскопе, при сдвиге в направлении, параллельном плоскости зондирования, позволяет реконструировать томограммы с использованием локальных алгоритмов реконструкции. Это шестое научное положение.



Рисунок 4.13 – Результаты эксперимента по томографии эритроцитов лягушки : а - дифференциальная проекция 1-го порядка, пунктирной линией указано горизонтальное сечение по которому выделялись 1D проекции; б - синограмма из 1D проекций; в - суммарное изображение, полученное из "узких" проекций.

4.4 Выводы

В главе рассмотрены методы томографической фазовой микроскопии и томографические микроскопы их реализующие на основе схемы Линника и сдвигового интерферометра.

Схема томографического микроскопа Линника имеет следующие преимущества: двойное прохождение излучения через объект, что в два раза повышает чувствительность к измерению ОРХ; объект зондируется подвижным пучком, при этом сам объект неподвижен; схема обеспечивает угол зондирования - 90°; траектория зондирования «квадрат» обеспечивает минимальную ошибку реконструкции.

Однако двойной проход излучения через объект приводит К возникновению «зеркальных» проекций. При восстановлении томограмм по таким проекциям объект дополняется своим зеркальным двойником, поэтому необходимо обеспечивать дополнительно разделение объекта И его зеркального двойника, что вносит дополнительные сложности в оптическую схему и алгоритм томографической реконструкции.

Для преодоления этих недостатков была разработана схема на основе сдвигового микроскопа, в которой прозрачный объект исследуется «на просвет». Наличие сдвигового микроскопа приводит к тому, что вместо обычных проекций получаются T.H. дифференциальные проекции, представляющие собой частную производную 1-го порядка от обычных проекций. Причем в зависимости от направления производной возможны два перпендикулярно различных варианта: И параллельно плоскости зондирования.

В первом случае получается метод DIC томографии. DIC томограммы различных сечений отображают производную от распределения показателя преломления. Томографический фазовый микроскоп такого типа - это простой сдвиговый интерферометр, который обладает высокой механической стабильностью и может работать с использованием низкокогерентного источника получать высококачественные проекционные И данные.

Приводятся результаты экспериментов с различными клетками по DIC томографии.

Во втором случае восстановление томограмм производится с помощью т.н. локальных алгоритмов. Так как проекции представляют собой частные производные 1-го и 2-го порядка, то для данного случая был выбран локальный алгоритм, основанный на суммировании обратных проекций. Суммарное изображение соответствует преобразованию Гильберта и Λ преобразованию исходной функции. Это было подтверждено компьютерным моделированием и экспериментом по томографии лягушачьих эритроцитов.

Глава 5 Исследование отражающих объектов методами низкокогерентной фазовой микроскопии

Наиболее важным применением методов низкокогерентной фазовой микроскопии является измерение формы отражающих объектов. Использование низкокогерентных источников, позволяет снизить шумы и уменьшить аксиальное разрешение до единиц и долей Å, что является важным измерении шероховатости супергладких поверхностей, например, при лазерных зеркал. В настоящем разделе приводятся экспериментальные результаты ПО измерению шероховатости отражающих объектов на микроскопе по Линника.

5.1 Измерения шероховатости супергладких поверхностей

Микроскоп МИИ-4М, выпускаемый ОАО «ЛОМО» был автоматизирован [140, 206]. Он называется микроскоп интерференционный автоматизированный МИА-1М и внесен в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений под №48171-11 (см. раздел 6.1). Для автоматической реконструкции фазы волнового фронта в нем используется метод фазовых шагов. Автоматизация этого прибора позволила повысить точность измерений до единиц нанометров.

Однако, при измерении шероховатости супергладких поверхностей, значения шероховатости которых лежит в субнанометровом диапазоне, встала задача тщательного исследования шумов на восстановленном фазовом изображении. Для этого было проведено моделирование, учитывающее влияние как программного обеспечения (см. разделы 1.6 и 1.7) [113], так и опорного зеркала данного микроскопа (см. раздел 2.2) [121 - 123].

Согласно определению шероховатости, данному в ГОСТ 2789-73 [126] следует, что в пределах базовой длины шероховатость определяет высокочастотную (ВЧ) составляющая топограммы поверхности. Также есть и низкочастотная (НЧ) составляющая топограммы поверхности. Она называется отклонение формы или волнистость. Ее причиной могут быть как сама

поверхность, так и аберрации оптической измерительной системы. Также можно выделить и еще более НЧ составляющую, которая характеризует шумы прибора и не связана с топограммой поверхности.

Таким образом, в общем случае топограмму поверхности можно представить в виде суммы трех компонент: высокочастотной (шероховатость), низкочастотной (волнистость) и шума. Далее будем подразумевать, что шумовая составляющая включена в НЧ составляющую, т.е. в шероховатость.

Для разделения ВЧ- и НЧ-составляющих топограммы могут быть использованы различные методы, описанные в стандарте ISO 16610. В данной работе был использован пространственный фильтр Гаусса [208].

Для данного фильтра уравнение фильтрующей функции имеет следующий вид:

$$s(x) = \frac{1}{\alpha \cdot \lambda_c} \exp\left[-\pi \left(\frac{x}{\alpha \cdot \lambda_c}\right)^2\right],$$
(5.1)

где $\alpha = \sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi}}$, $\lambda_c -$ т.н. длина волны среза, она определяет пропускание

фильтра равное 50% от его максимального значения.

Данная функция позволяет выделить НЧ составляющую. Для получения ВЧ составляющей, нужно из профиля вычесть НЧ составляющую:

$$z_{BY}(x) = z(x) - z_{HY}(x).$$
(5.2)

Особенностью фильтра Гаусса является искажение сигнала на краю, поэтому после фильтрации краевые области должны быть обрезаны. На рис. 5.1 представлены результаты фильтрации профиля подложки лазерного зеркала. В данном случае длина волны среза была равна $\lambda_c = 200$.



поверхности.

Важным аспектом правильной фильтрации является выбор длины волны среза λ_c . В ISO 4288-1996 [209] указаны рекомендуемые значения λ_c , однако, они не подходят при измерении шероховатости в субнанодиапазоне.

Для выбора λ_c предлагается следующий подход, учитывающий характер НЧ составляющей, которая должна удовлетворять критериям непрерывности и гладкости:

- выбирается предполагаемый диапазон значений λ_c;

- проводится фильтрация профиля с использованием значений λ_c из этого диапазона;

- по фильтрованным профилям вычисляется первая производная;

- строятся зависимости максимума производной от длины волны среза λ_c (рис. 5.2 a, б);

- для фильтрации выбирают то значение λ_c, при которой зависимость выходят на постоянное значение.

Из рис. 5.2 видно, что для первой производной значение $\lambda_c=300$.



Рисунок 5.2 – Зависимость максимума первой производной от длины волны среза λ_c.

Были проведены эксперименты по измерению шероховатости супергладких поверхностей на автоматизированном интерференционном микроскопе МИА-1М. Для этого с помощью интерферометра белого света Zygo NewView 6200 и микроскопа МИА-1М были исследованы 11 образцов, представляющих собой подложки лазерных зеркал, имеющих шероховатость в субнанодиапазоне. По указанной выше методике были получены СКО топограммы поверхности, которая связана с ее шероховатостью (см. (2.8) и (2.9)).

На рис.5.3 представлены результаты совместных измерений СКО топограммы поверхности на двух приборах в порядке возрастания этого параметра.



Рисунок 5.3 – Результаты измерений СКО топограммы поверхности.

По ним можно сделать следующие выводы:

- микроскоп МИА-1М регистрирует увеличение параметра СКО начиная с 5-ой подложки (СКО 0,25 нм);

- СКО на подложках с малой шероховатостью отличаются, что связано с влиянием шума микроскопа (уровень 0,1 нм) [113].

 автоматизированный интерференционный микроскоп МИА-1М может быть использован для измерения шероховатости супергладких поверхностей с погрешностью не хуже 0,25 нм [210].

5.2 Измерения моноатомных структур кремния

Развитие технологии производства различных гладких оптических поверхностей, например, подложек лазерных зеркал, обусловливает необходимость выполнения измерений в субнанометровом диапазоне высот профиля поверхности [3, 87]. В настоящее время в Российской Федерации имеются рабочие средства измерений (РСИ), позволяющие проводить бесконтактные диапазоне. К измерения В этом ним относятся интерференционные и атомно-силовые микроскопы [140, 211]. Эти приборы

обладают неопределённостью измерений высоты профиля поверхности единицы и доли единицы ангстрема, при этом нижняя граница диапазона измерения составляет единицы ангстрем. Для передачи единицы при калибровке (поверке) указанных микроскопов используются меры высоты типов МШПС, TGZ и VLSI. Меры обеспечивают диапазон измерений от единиц до десятков нанометров и обладают неопределённостью в единицы ангстрем, сравнимой с неопределённостью РСИ. Таким образом, при калибровке (поверке) микроскопов с помощью данных мер возникает проблема как проверки нижнего диапазона измерений, так и оценки неопределённости измерений. Это связано с тем, что допустимая неопределённость измерений существующих мер совпадает или превышает РСИ, измерений неопределённость что приводит К увеличению неопределённости РСИ за счёт неопределённости мер. Следовательно, необходимо использовать меры, высота рельефа которых находится в диапазоне единиц нанометров, а неопределённость измерений заведомо меньше, чем исследуемых РСИ. В качестве таких мер можно применять наноструктуры кремния. Для передачи единицы длины от Государственного первичного эталона метра этим мерам можно использовать лазерный интерферометр.

Уникальная технология создания кремниевых наноструктур, представляющих набор моноатомных слоёв, разработана специалистами Института физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН (ИФП СО РАН). Технология основана на управлении морфологией поверхности монокристаллического кремния на атомном уровне благодаря эффектам самоорганизации, возникающим на атомно-чистой поверхности при прогреве в сверхвысоком вакууме [88]. Особенностью мер на основе моноатомных многослойных наноструктур кремния является то, что размер моноатомного слоя в горизонтальной плоскости может достигать сотни микрометров. Данная особенность позволяет применять такие меры в качестве эталона высоты не микроскопов, только ДЛЯ атомно-силовых но И ДЛЯ оптических

интерференционных микроскопов, латеральная разрешающая способность которых ограничена дифракционным пределом [213, 212].

Конструктивно меры имеют вид пластины кремния с разными по высоте участками. Меры состоят из определённого числа ориентированных в направлении кристаллографической плоскости (111) моноатомных слоев кремния высотой 3,14 Å. Единица длины, воспроизводимая мерой, измеряется между двумя моноатомными слоями, составляющими ступень. Расстояние между ними кратно высоте одного моноатомного слоя, при этом число слоев может варьироваться от 1 до 100. Размер области, свободной от моноатомных ступеней составляет не менее 1×5 мкм. Размер кремниевой пластины, на которой изготавливаются меры составляет не менее $2,0 \times 10,0 \times 0,4$ мм.

Описанная позволяет технология также создавать кремниевую структуру, состоящую из одного моноатомного слоя размером до 200 мкм. Такая структура может являться мерой плоскостности в субнанометровом диапазоне. При использовании этой структуры в качестве опорного зеркала интерференционного микроскопа существенно повышается точность обладает микроскопом, поскольку данное зеркало измерений малой шероховатостью.

Набор мер, состоящих из заданного числа моноатомных слоев кремния высотой 3,1; 9,4; 31,4; 131,9; 219,5; 298,3 Å изготовили в ИФП СО РАН. Высоту этих мер измеряли с помощью сканирующего интерференционного микроскопа белого света Zygo NewView 6200 (Федеральный информационный фонд СИ № 44714-10) из состава оборудования Центра коллективного пользования высокоточных измерительных технологий в области фотоники, созданного на базе ВНИИОФИ.

Интерферометрия «белого света» широко применяется для изучения формы поверхности различных отражающих деталей. В основе таких исследований лежит принцип интерференции с использованием источника белого света с широким спектральным диапазоном. Широкий спектральный диапазон определяет малую длину когерентности, поэтому максимальный

контраст полос получается, когда оптическая разность хода между предметным и опорным каналами близка к нулю. При изменении оптической длины пути в предметном канале записывается информация о координате и интенсивности каждой точки матрицы видеокамеры. Максимальному контрасту соответствует максимум кривой изменения интенсивности. Далее по специальному алгоритму находят координаты точек, соответствующих максимуму огибающей. Эти координаты и являются высотой профиля. Для пьезоприводом этого используют управляемые так называемые интерференционные микрообъективы, сочетающие интерферометр И микрообъектив и совмещающие плоскости фокусировки и максимального контраста. В зависимости от увеличения и числовой апертуры применяют интерференционные микрообъективы различных типов. Микрообъектив по схеме Майкельсона (увеличение до 5^{\times} , числовая апертура до 0,2) служит для исследования больших объектов; схема Миро обеспечивает среднее увеличение микрообъектива 10-50[×] при числовой апертуре 0,25-0,55. Наибольшими увеличением и числовой апертурой обладает микрообъектив по схеме Линника: до 100^{\times} при апертуре до 0,95.

Сканирование в режиме совмещения плоскостей фокусировки и максимального контраста позволяет измерять объекты любой высоты, в отличие от интерферометров фазового сдвига. Исследование высоких объектов такими интерферометрами затруднительно, так как приводит к разрыву полос и, как следствие, к неопределённости при реконструкции фазы, при этом также ограничена глубина фокусировки микрообъектива. Использование источника белого света вместо лазерного обеспечивает отсутствие когерентных шумов.

Для получения профиля поверхности мер были проведены 10 измерений одного и того же участка меры с последующим усреднением с применением программного обеспечения микроскопа. Дальнейшую обработку проводили по программе математических вычислений MathCad 13.0. Перед измерением перепада высоты *h* изображение топограммы предварительно обрабатывали.

Полученное изображение топограммы меры имеет остаточный наклон. Для его определения на плоский (центральный) участок меры без перепада высоты накладывается прямоугольная маска и по области внутри маски с помощью метода наименьших квадратов рассчитываются параметры наклонной плоскости, которые затем вычитаются из измеренных данных. Изображение топограммы после предварительной обработки представлено на рис. 5.4.



Рисунок 5.4 – Изображение топограммы меры, состоящей из моноатомных слоев, после предварительной обработки.

Для измерения перепада высот необходимо получить сечение выбранной области изображения (найти поперечный размер d сечения), усреднить получаемые значения с одной и другой стороны границы перепада и найти их разницу (рис. 5.5). Для вычисления перепада высот необходимо координату границы перепада; число пикселов, на которые задать: необходимо отступить от границы перепада в обе стороны (количество пикселов не должно быть слишком большим, так как при данном отступлении увеличивается наклон топограммы моноатомных слоев); число пикселов, по которым будет проводится усреднение значений высоты.



Рисунок 5.5 – График сечения топограммы меры вблизи перепада в один моноатомный слой (по оси х – пикселы, по оси у – нм).

Для каждой меры были получены 10 одномерных сечений и 10 значений высоты. Результаты измерений (среднее по 10 значениям) и вычисленные средние квадратические отклонения (СКО) результатов сведены в таблицу 5.1.

Номинальная	Результат	СКО результата
высота h_{H} , Å	измерений h, Å	измерений, Å
3,1	3,1	0,1
9,4	9,2	0,2
31,4	32,0	0,5
131,9	132,9	0,5
219,8	220,0	0,3
298,3	298,9	0,3

Таблица 5.1 - Результаты измерений высоты профиля мер

Также были проведены измерения параметров шероховатости R_a и Rms в пределах моноатомного слоя с применением микроскопа Zygo NewView 6200 с полем зрения 137×102 мкм. Профиль получен в результате усреднения по 200 измерениям. Для вычисления параметров шероховатости была использована высокочастотная фильтрация [208], позволяющая убрать волнистость. Найдены параметры шероховатости слоя $R_a = 0,43$ Å; rms = 0,58

Å. На рис. 5.6 представлены трехмерные изображения топограммы профиля поверхности меры после обработки высокочастотным (*a*) и низкочастотным (*б*) фильтрами для исключения шумов. На рисунках наблюдаются структуры, представляющие собой моноатомные слои кремния.



Рисунок 5.6 – Топограмма меры, полученная на микроскопе ZygoNew View 6200 и обработанная: а – ВЧ фильтром; б – НЧ фильтром.

5.3 Измерение наноперемещений фазовых объектов

статистических и динамических Определение перемещений на плоскости в настоящее время представляет собой большой интерес в различных областях науки и техники, например, для контроля параметров изделий микроэлектроники в процессе их производства, в материаловедении и фотонике, и так далее. При этом величины перемещений зачастую составляют десятки и единицы нанометров. Существуют разные методы измерение таких малых перемещений, наиболее известными из которых являются сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, ёмкостной метод и оптические методы. Оптические методы имеют ряд известных преимуществ перед другими методами (бесконтакность, доступность прецизионных оптических элементов и систем) и, поэтому, привлекают постоянное внимание исследователей и разработчиков средств измерений.

Современные интерференционные микроскопы позволяют измерять фазу поля с точностью до одной тысячной длины волны [214-216] и, соответственно, определять нанометровые смещения объекта, направленные вдоль оси оптического пучка. Однако на практике требуется измерять и смещения объекта, направленные поперёк оптического пучка, так называемые латеральные смещения или смещения in-plane. При этом нанометровые смещения находятся за пределами разрешающей способности оптических систем и номинального разрешения ПЗС-матриц современных микроскопов. В этом случае точность определения положения объекта ограничивается длиной волны оптического излучения, которая также как и размер пиксела много больше нанометровых смещений.

Проведённые исследования показали, что субволновые и субпиксельные смещения можно зарегистрировать и измерить путём специальной математической обработки оптических изображений объекта, полученных для разного положения объекта. В настоящее время известно немало алгоритмов субпиксельной регистрации изображений, предназначенных, как правило, для

практических изучения вибраций решения конкретных задач: для микроэлектромеханических систем [217] и микроструктур на твёрдом теле [218], для решения задачи прецизионного определения положения границ [219, 220], а также в областях, далёких от микромира, таких как географическая привязка изображений, полученных с помощью аэро- и космической фотосъёмки [222, 223], и т. д. Общим условием для всех методов субпиксельного разрешения получения является высокое отношение сигнал/шум. Для этого требуется использование специализированного высококачественного оборудования и/или нанесение на поверхность объекта специальной текстуры.

Фазовые изображения, полученные с использованием интерференционного микроскопа, имеют более высокое соотношение сигнал/шум, особенно, для объектов, имеющих слабый оптический контраст, например, живых клеток, микрочипов. Для получения фазовых изображений был использован сканирующий интерференционный микроскоп белого света.

Известные алгоритмы субпиксельной регистрации работают В пространстве изображений и в Фурье-пространстве (см. напр.[216]). Фурьеалгоритмы более приспособлены для обработки изображений, содержащих резкие границы, пространственный спектр которых богат высокочастотными составляющими. Если изображение имеет плавные вариации яркости и быстро спадающий на высоких частотах пространственный спектр, то лучше использовать алгоритмы, работающие непосредственно в пространстве изображений [225]. Такой тип изображений получается при реальном разрешении ПЗС матриц, используемых в современных интерференционных микроскопах. В этой группе алгоритмов предпочтительными являются алгоритмы на основе интерполяции корреляционных функций [216], что и было учтено при выборе алгоритма субпиксельной обработки изображений [221, 224].

5.3.1 Численное моделирование

В качестве объекта перемещений рассмотрена модельная структура в виде ступенчатого перепада плоской поверхности:

$$z(x) = \begin{cases} h/2, x > 0; \\ -h/2, x < 0 \end{cases}.$$
 (5.3)

Профиль поверхности объекта, восстановленный по фазе изображения при не очень большой высоте ступени *h* приблизительно равен [129]:

$$h(x) \approx \frac{2h}{\pi} Si(K_x x) \tag{5.4}$$

и имеет вид, показанный на рис.5.7. Входными данными является пара восстановленных профилей поверхности $h_1(x)$ и $h_2(x)$, сдвинутых друг относительно друга на малую величину δx , при этом при небольших ошибках измерений $h_1(x) \approx h_2(x + \delta x)$.



Рисунок 5.7 – Восстановленная форма прямоугольного профиля.

Ошибка восстановления формы профиля, в основном, определяется погрешностью измерения фазы. Для реального интерференционного микроскопа и высоты ступеньки около четверти длины волны может составлять единицы и даже доли процента.

По результатам измерений можно определить взаимную корреляционную функцию (ВКФ) двух профилей:

$$F(i) = \sum_{j} h_1(x_j) h_2(x_{i+j}) \approx \int h(x) h(x + \delta x + i\Delta) dx$$
(5.5)

на сетке отсчётов x_i , определяемой номинальной разрешающей способностью ПЗС-матрицы микроскопа, т.е. размером её пиксела Δ в масштабе регистрируемого изображения. ВКФ представляет собой автокорреляционную функцию исходного изображения профиля, смещённую на величину δx , где δx – смещение одного изображения относительно другого. Таким образом, для определения смещения профиля (или изображения) достаточно определить по данным ВКФ смещение автокорреляционной функции, которое, как показали оценки, может быть определено с высокой точностью.

Без ограничения общности можно считать, что величина δx не Тогда превышает размера одного пиксела. максимум ВКΦ будет T.e. $F(i)_{\max} = F(0)$. соответствовать нулевому значению индекса i, Аппроксимируя корреляционную функцию в окрестности максимума квадратным многочленом $ax^2 + bx + c$, можно определить положение его максимума по формуле $x = -\frac{b}{2a}$. Коэффициенты *a*,*b*,*c* находятся методом линейной регрессии.

Простейшая оценка смещения получается на основе локальной параболической аппроксимации корреляционной функции по трём отсчётам [216]:

$$\delta x^{(3)} = \frac{F(-1) - F(1)}{2(F(-1) - 2F(0) + F(1))}$$
(5.6)

Получены формулы для оценки смещений на основе аппроксимации корреляционной функции по большему количеству отсчётов.

В соответствии с изложенным подходом проведено численное моделирование смещений объекта в форме ступеньки в присутствии шумов различного уровня. При этом предполагалось, что шумы распределены по

нормальному закону, шумы каждого пиксела не зависят от шумов любого другого пиксела, в том числе и относящегося к другому изображению. Величина отношения сигнал/шум (где сигнал это высота ступеньки) полагалась равной 10, 30, 100 и 300. Период дискретизации, определяемый размером пиксела, выбирался равным 220 нм при длине волны λ=0,55 мкм (или $0,4\lambda$), что соответствует характеристикам использованного в работе λ_{10} , соответствует предельным микроскопа, И ЧТО возможностям современных интерференционных микроскопов. Аппроксимация корреляционной функции проводилась по трём, пяти, семи и девяти отсчётам.

Моделирование показало возможность регистрации перемещений, измеряемых десятками и, даже, единицами нанометров, в зависимости от пиксела. Уменьшение размера пиксела даёт размера возможность зарегистрировать более мелкие смещения. При размере пиксела $\lambda/_{40}$ основным фактором, влияющим на точность определения величины δx , являются шумы. Влияние числа значений ВКФ, учитываемых при её параболической аппроксимации N_k , на точность определения смещения незначительно. Более того, увеличение числа отсчётов ВКФ может привести к появлению систематической погрешности, связанной с отличием локального поведения ВКФ от многочлена второго порядка, а применение для локальной аппроксимации ВКФ полиномов более высокого порядка вызывает снижение устойчивости получаемых оценок по отношению к шумам измерений. Поэтому ниже на рис. 5.8 приведены результаты моделирования для уровня шума 1/30 и 1/100 при N_k=3.



гисунок 5.8 – Оценка взаимного смещения двух изооражении по трем значениям корреляционной функции. Размер пиксела 14 нм (λ/40). Уровень шума 1/30 (а) и 1/100 (б).

Для пиксела размером 220 нм точность определения смещения зависит не только от шума, но и от величины N_k . При $N_k=3$ рассчитанное значение смещения имеет значительную систематическую погрешность (до 40нм) (см. рис. 5.9), и для её устранения необходимо увеличивать число точек локальной аппроксимации ВКФ, например, до 7 (см. рис. 5.10).



Рисунок 5.9 – Оценка взаимного смещения двух изображений по трем значениям корреляционной функции. Размер пиксела 220 нм (0,4λ). Уровень шума 1/30 (а) и 1/100 (б).



Рисунок 5.10 – Оценка взаимного смещения двух изображений по семи значениям корреляционной функции. Размер пиксела 220 нм (0,4λ). Уровень шума 1/30(а) и 1/100 (б).

5.3.2 Экспериментальные исследования

С целью оценки точности регистрации перемещений объекта в плоскости с использованием описанного выше подхода были проведены экспериментальные исследования. Схема эксперимента показана на рис.5.11.



Рисунок 5.11 – Экспериментальная установка на основе интерферометра белого света NewView 6200: 1 – ПЗС камера, 2 – проекционный объектив, 3 – светоделитель, 4 – источник света, 5 – интерференционный микрообъектив, 6 – исследуемый объект, 8 – нанопозиционер, 7 – направление сдвига исследуемого объекта.

Суть эксперимента состояла в том, что объект наблюдений последовательно смещался в горизонтальной плоскости с некоторым шагом. После выполнения каждого шага формировалось фазовое изображение выбранного участка эталонной пластинки. Соответствующий цифровой массив данных использовался для расчёта взаимной корреляционной функции и определения смещений пластинки.
Регистрация оптического излучения в интерференционном канале и канале наблюдения осуществлялась с помощью ПЗС – матрицы разрешением 640×480 пикселей при поле зрения микроскопа 140×100мкм². Размер пиксела в масштабе изображения при этом равнялся ~220 нм или 0,4λ.

В качестве объекта наблюдений использовалась эталонная пластинка фирмы VLSI Standards Inc., предназначенная для латеральной калибровки интерференционного микроскопа. Данная пластинка имеет на поверхности систему периодических решёток с периодом от 3 мкм до 500 мкм. Решётки состоят из выступов практически прямоугольной формы с плоскими поверхностями, позволяющими получить удобные для обработки фазовые изображения. Высота выступов, измеренная на интерференционном микроскопе, приблизительно равна 40 нм. Была выбрана решётка с периодом 10 мкм.

Объект наблюдений устанавливался на пьезоэлектрический нанопозиционер марки Nano T115 (Mad City Labs Inc., США), с помощью которого перемещался на заданное расстояние. Величина перемещения контролировалась пьезорезистивным датчиком. Нанопозиционер, в свою очередь, устанавливался на рабочий стол интерференционного микроскопа NewView 6200 (Zygo Corp., США).

Было выполнено несколько серий измерений. В каждой серии задавался определённый шаг, с которым объект наблюдения последовательно смещался в горизонтальной плоскости. Величина задаваемого суммарного смещения была не меньше размера пиксела. Были выбраны шаги следующих размеров: 10нм, 20 нм и 50 нм, значительно меньше по величине как длина волны λ (0, 550 мкм), так и размеру пиксела.

Расчёт ВКФ проводился как между парами соседних изображений, так и между всеми возможными парами. В результате вычислялись расстояния между соседними положениями, а также между текущим положением и каждым из предыдущих положений. Такой подход позволяет получать усреднённые значения смещения и выявлять явные ошибки вычислений. В

этом смысле интересна величина суммарного смещения L_T , вычисленного как разница между последним и начальным положениями объекта. Абсолютное значение погрешности его расчёта не должно отличаться от абсолютного значения погрешности расчёта отдельного смещения, что значительно повышает относительную точность определения суммарного смещения L_T по сравнению с отдельным смещением.

После проведения основных измерений проводились независимые измерения смещений, создаваемых нанопозиционером. Для ЭТОГО использовался тот же интерферометр NewView6200. С помощью зеркал и интерферометрического объектива большим рабочим С расстоянием смещения позиционера по оси X (или Y) были повёрнуты в направление Z, и измерены с малой погрешность (~1нм). При этом задавались те же значения шага смещения. Оказалось, что реальные значения суммарного смещения позиционера выше запрограммированных на 10÷20%. При этом отличие отдельных смещений от запрограммированных было разным. Наблюдались даже случаи (при малом шаге задаваемого смещения) когда позиционер перемещал объект в противоположном направлении (рис. 5.12). Кроме того, показания собственного датчика позиционера отличались от задаваемой величины шага смещения. Также наблюдался дрейф, величина которого могла достигать 60 нм, при этом его изменение во времени не было монотонным.



а b Рисунок 5.12 Величина шага смещения нанопозиционера T115 по оси Х. Ряд 1 – по данным датчика нанопозиционера, ряд 2 – по данным оптических измерений. а) шаг смещения – 10 нм, среднее значение – 10,4 нм и 20,7 нм. b) шаг смещения – 50 нм, среднее значение – 50,3 нм и 58,9 нм.

При таком поведении позиционера для получения строгой зависимости расчётного смещения от реального требуется измерять реальное смещение позиционера синхронно с получением фазового изображения. К сожалению, в эксперименте сложно выполнить это требование, и два этих вида измерений проводились в разное время. Тем не менее, результаты прямых измерений помогают объяснить полученные результаты расчёта смещений по оптическим фазовым изображениям.

5.3.3 Результаты

Обобщённые результаты расчёта смещений объекта наблюдений для трёх серий измерений с задаваемым шагом 10 нм, 20 нм и 50 нм приведены в таблице 5.2.

Размер	Кол-во	Ожидаемое	Общее	Сумма	Среднее	Среднее	СКО
шага <i>l</i> ,	шагов	смещение	смещение	смещений	смещение	смещение	НМ
НМ	Ν	<i>L</i> , нм	L_T ,	L_{Σ} , нм	$l_{iT} = L_T / N,$	$l_{i\Sigma} = L_{\Sigma}/N,$	
			НМ		HM	НМ	
50	14	700	789	738	56,4	52,7	10,3
20	30	600	680	752	22,7	25,1	8,9
10	45	450	551	1085	12,3	24,1	12

Таблица 5.2 – Обобщённые результаты измерений смещений объекта [94].

Общее смещение нанопозиционера, L_T , для всех трёх шагов оказалось выше ожидаемого, т.е. задаваемого программным способом. В свою, очередь, величина этого смещения отличается от суммы отдельных последовательных смещений L_{Σ} , причём разница может быть, как положительной, так и отрицательной. Результаты определения величины смещения характеризуются достаточно большой дисперсией с величиной стандартного отклонения порядка 10 нм. При этом в некоторых случаях расчётное смещение оказывалось направленным против заданного направления.

Данные результаты, в целом, неплохо согласуются с результатами моделирования и независимых измерений смещений нанопозиционера. Вопервых, ожидаемое (устанавливаемое) смещение для использованного позиционера можно увеличить изменением калибровки датчика путём введения поправочного коэффициента (например, для шага 50 нм и 20 нм его величина ~1,1) и уменьшить отличие между итоговым показанием датчика и измеренным смещением. При этом необходимо учесть, что дрейф по-разному влияет на показания датчика и положение объекта, что с учётом сказанного ранее и разной продолжительности циклов измерений не позволяет более поправочного коэффициента. Во-вторых, точно определить величину достаточно большая дисперсия отдельных смещений объясняется, с одной стороны, неоднозначностью зависимости показаний датчика и реальных смещений, с другой, размером пиксела. Согласно результатам а

моделирования, при размере пиксела 220 нм и отношении сигнал/шум $30 \div 100$ точность регистрации отдельного смещения составляет около 5 нм. Такая точность может объяснить и разницу между суммарным смещением L_T и суммой смещений L_{Σ} при шаге 50 нм и 20 нм. Для шага 10 нм возможной причиной повышенной разницы могут быть разнонаправленные смещения позиционера, о которых говорилось выше (рис.5.12).

Таким образом, полученные результаты, в целом, подтверждают правильность алгоритма расчёта величины перемещений, ортогональных к оси светового пучка фазового микроскопа. Для реальных параметров использованного микроскопа смещение величиной 10 нм можно считать неким пределом, при превышении которого можно определить смещение объекта по оптическому фазовому изображению. Более точно определить погрешности метода и алгоритма расчёта можно при наличии более точной информации о реальных смещениях нанопозиционера и при уменьшении размера пиксела. 5.4 Измерение ступенчатых объектов высотой более $\lambda/4$ (двухволновый метод)

Методы фазовых шагов имеют один значительный недостаток, связанный с измерением ступенчатых объектов более чем $\lambda/4$, имеющих большой градиент высоты (рис. 5.13). Так как при исследовании таких объектов возникают разрывы полос на интерферограмме (рис. 5.14), что приводит к неоднозначности ее интерпретации. Вследствие которого ошибка измерения будет кратна π из-за пропуска целого числа полос.

$$3\lambda/4 \neq \lambda/4$$

Рисунок 5.13 – Ошибка измерения ступенчатого объекта.



Рисунок 5.14 – Разрыв полос на интерферограмме ступенчатого объекта.

Для решения этой проблемы необходимо увеличивать длину волны источника излучения, но технически это сложно сделать. Поэтому был разработан т.н. двухволновый метод [11].

Его суть заключается в том, что разность двух фазовых изображений, полученных на двух различных длинах волн, эквивалентна фазовому изображению, полученному на эквивалентной длине волны λ_{экв.}

Для ступени высотой h, измеренной на двух разных длинах волн λ_1 и λ_2 :

$$\Delta_1(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda_1} \cdot h(x, y)$$
(5.7),

$$\Delta_2(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda_2} \cdot h(x, y)$$
(5.8).

Откуда получаем выражение для разности $\Delta_1(x,y)$ и $\Delta_2(x,y)$:

$$\Delta_1(x,y) - \Delta_2(x,y) = 2\pi \left(\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2}\right) \cdot h(x,y) = \frac{2\pi}{\lambda_{_{3KB}}} \cdot h(x,y), \qquad (5.9)$$

где

$$\lambda_{_{3\kappa\theta}} = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{\left|\lambda_2 - \lambda_1\right|} \tag{5.10}.$$

Из выражения (5.10) видно: чем ближе длины волн у используемых источников излучения, тем больше эквивалентная длина волны и, соответственно, тем более высокие объекты можно исследовать на фазовом микроскопе.

Данный метод был реализован в микроскопе МИА-1М: было разработано специальное ПО, реализующее данный метод, а также осветительный блок с двумя полупроводниковыми лазерами с близкими длинами волн: 635 и 650 нм, для которых

$$\lambda_{_{3K6}} = \frac{650 \cdot 635}{|650 - 635|} [HM] \approx 27500 [HM].$$

Таким образом, реализованный в фазовом микроскопе двухволновый метод позволяет расширить диапазон измерения ступенчатых объектов до 6.8 мкм (= $\lambda_{3 \text{кв}}/4$).

5.5 Выводы

В главе представлены результаты сравнительных измерений экспериментов по измерению СКО гладких поверхностей с использованием микроскопа МИА-1М и интерферометра белого света Zygo NewView 6200. Которые показали, что чувствительность МИА-1М по глубине составляет 0.25 нм.

Рассмотрена задача измерения профиля поверхности наноструктур кремния, состоящих из моноатомных слоев, с помощью интерференционного метода. Для проведения измерений использовался сканирующий интерференционный микроскоп белого света Zygo NewView 6200 из состава Центра коллективного пользования высокоточных измерительных технологий в области фотоники (ckp.vniiofi.ru). Продемонстрирована потенциальная возможность использования моноатомных структур кремния в качестве мер В субнанометровом диапазоне. Используя запатентованную высоты технологию, можно изготавливать меры, высота которых кратна 3,1 Å. Допустимая неопределённость измерения высоты профиля меры будет составлять около 0,5 Å. Данные меры могут применяться для калибровки (поверки) не только атомно-силовых, но и оптических интерференционных микроскопов.

Рассмотрен метод измерения наноперемещений с использованием фазового микроскопа при влиянии фазовых шумов. Проведены эксперименты по смещению ступени с помощью нанопозиционера и анализа получаемых фазовых изображений. Показана возможность регистрации перемещений до 10нм.

Проведён сравнительный анализ известных методов субпиксельной регистрации и обработки изображений. Выбран алгоритм, наиболее подходящий для обработки фазовых изображений, получаемых с помощью интерференционного микроскопа. Численным моделированием показана возможность определения малых перемещений объекта с помощью выбранного алгоритма и выполнены оценки влияния шумов измерений.

Проведённые практические оценки смещений реального объекта по данным измерений на интерференционном микроскопе находятся в хорошем согласии с величинами задаваемых нанопозиционером смещений, составляющих менее одной десятой длины волны.

Описан двухволновый метод реконструкции интерферограмм, позволяющий расширить диапазон измерения ступенчатых объектов в фазовой микроскопии.

Глава 6 Параметрический ряд автоматизированных фазовых микроскопов

Проведенные теоретические и экспериментальные исследования (см. выше) позволили создать параметрический ряд фазовых микроскопов, предназначенных для измерения отражающих и прозрачных фазовых объектов, как стационарных во времени, так и динамических [226, 227].

6.1 Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-1М

Во ФГУП «ВНИИОФИ» был разработан и прошел государственные испытания с целью утверждения типа фазовый автоматизированный микроскоп МИА-1М [140], созданный на базе микроинтерферометра МИИ-4М (ОАО «ЛОМО», Россия). Для расшифровки интерферограмм в нем реализован метод фазовых шагов.

Сама расшифровка интерферограмм производится в несколько этапов:

- с помощью видеокамеры захватываются, оцифровываются и передаются в персональный компьютер (ПЭВМ) интерферограммы при различных положениях опорного зеркала;

- с помощью метода фазовых шагов (алгоритм Харихарана-Швайдера или самокалибрующийся алгоритм по Guo), производится вычисление фазового изображения. Если записанные интерферограммы в полосах конечной ширины, то фазовое распределение будет содержать разрывы;

- с помощью алгоритма «сшивки» устраняются разрывы фазы;

- устранение наклона, связанного с регистрацией интерферограмм в полосах конечной ширины, с помощью метода наименьших квадратов;

- нормировка на длину волны (см. 1.3);

На нем могут быть исследованы как отражающие объекты, так и прозрачные, находящиеся на зеркале.

Так как оптическая система микроскопа вносит систематическую ошибку в виде аберраций (около 15 -20 нм), то для ее устранения и повышения точности измерений из полученного фазового изображения может быть

вычтено ранее записанное фазовое изображение гладкой пластины (систематическая приборная ошибка).

Общий вид микроскопа представлен на рисунке 6.1. Для расширения диапазона измеряемых высот до 6,8 мкм в микроскопе реализован двухволновый метод, когда объект измеряется на двух близких длинах волн.

В составе прибора имеется программное обеспечение WinPhast [112], предназначенное для управления захватом изображений с помощью видеокамеры, управления платой сдвига опорного зеркала и обработки записанных интерферограмм. ПО запускается на ПЭВМ и работает под управлением операционной системы Windows XP, Windows 7.



Рисунок 6.1 – Общий вид фазового микроскопа МИА-1М

Метрологические и технические характеристики микроскопа представлены в описании типа этого прибора [228].

В 2011 году микроскоп прошел государственные испытания с целью утверждения типа и включен в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений под № 48171-11.

Поверка микроскопа осуществляется по документу «Микроскопы интерференционные автоматизированные МИА-1М. Методика поверки».

Основные средства поверки: Рельефная мера высоты SHS-180QC, высота ступеньки 19,9 \pm 0,8 нм. Прецизионная опорная пластина ZYGO (Номер модели 1776-666-013). В центральной области диаметром 25 мм для участков с базовыми размерами: максимальный перепад высоты PV= 5 нм, CKO – <1Å (паспортизованное значение 0,83 Å) Объект-микрометр ОМО ДТ7.216.009ПС, длина шкалы 1 \pm 0,0005 мм, цена деления 5 \pm 0,3 мкм. Межповерочный интервал – 1год.

Микроскоп находит широкое применение для решения измерительных задач в различных областях от промышленных до биологических. Ниже представлены некоторые результаты его использования.

Высокая разрешающая способность микроскопа позволяет проводить измерения топограммы плоских отражающих микрообъектов (зеркал, оптических элементов, пластин и пр.) с разрешением 0,1 нм. Особенность работы микроскопа позволяет измерять топограмму поверхности под прозрачным защитным покрытием [121, 229].





б

Рисунок 6.2 – Топограммы поверхности: а - участок поверхности компакт-диска (поле зрения 25х18 мкм), глубина канавок 90 нм, б – голографической решетки, тесненной на полимерной носителе (поле зрения 28×50 мкм),

Микроскоп позволяет измерять толщину как прозрачных, так и отражающих покрытий. При этом оно должно быть нанесено на подложку частично, т.е. чтобы была четкая граница между областью без покрытия и с покрытием. Если измеряемый объект состоит из различных по своим электрическим свойствам участков, то необходимо учитывать их комплексные показатели преломления, чтобы скорректировать измеряемую высоту покрытия [133, 134].



Рисунок 6.3 – Измерение высоты алюминиевого покрытия на кремниевой подложке.

Получение топограммы поверхности отражающих объект с высокой аксиальной разрешающая способностью, позволяет по измеренным данным определять шероховатость в микро и нанодиапазонах [230].



Рисунок 6.4- Топограмма поверхности гладкой плоскости из карбида кремния (Ra = 0,3 нм)

Использование специальной проточной кюветы позволяет измерять показатель преломления нанообъемов жидкостей двухиммерсионным методом [36].

Реализуемый в микроскопе метод интерференционного контраста позволяет исследовать живые неокрашенные нефиксированные биологические микрообъекты (клетки, клеточные структуры), а также проводить измерения их параметров (объем, высота, площадь, средний радиус, двулучепреломление и пр.) [38, 147]. Получаемые на микроскопе данные о двумерном распределении оптической разности хода, прошедшего через клетку излучения также позволяют измерять массу сухих веществ внутри нее [41].

6.2 Динамический фазовый микроскоп МИА-Д

Динамический фазовый микроскоп МИА-Д [146] разработан во ФГУП «ВНИИОФИ». Основное назначение микроскопа - измерение топограммы поверхности отражающих динамических объектов в микро- и нанодиапазоне высот, а также для исследования динамических процессов в живых клетках.

Микроскоп также разработан на базе серийно выпускаемого микроинтерферометра по схеме Линника МИИ-4М (ЛОМО). Общая последовательность получения измерительной информации такая же как и у МИА-1М. Однако заключается в том, что зеркало опорного канала в МИА-Д [232]. Интерференционные движется дискретно, а непрерывно не изображения измеряемого объекта при различных фазовых сдвигах опорного излучения оцифровываются и передаются в ПЭВМ с помощью цифровой высокоскоростной видеокамеры и платы захвата. Это приводит к тому, что фазовые сдвиги между интерферограммами могут быть произвольными. Поэтому расшифровки интерферограмм для используется самокалибрующийся алгоритм, реализованный в ПО «WinPhastDinamic» [231].

На рис. 6.5 представлена структурная схема микроскопа. Она состоит из следующих элементов: интерференционный микроскоп 2, двумерный фотоприемник 15 - высокоскоростная цифровая видеокамера (FastVideo 300 ООО «НПО Астек», г. Москва, размер матрицы 600×800, частота захвата кадров 300 Гц), фазосдвигающее устройство 11 на основе пьезоактюатора (ОАО «НИИ Элпа», г. Зеленоград) и приклеенного к нему зеркала.

Осветительный блок 1 включает в себя источник монохроматического пространственно-некогерентного излучения – полупроводниковый лазер 4 КLM-650/20 (ЗАО "ФТИ-Оптроник", г. Санкт-Петербург) с длиной волны 660 нм и мощностью 20 мВт, вращающийся диффузор 6 и схему управления 5.

В микроскоп оптическое излучение заводится по световолоконного жгута 7. Исследуемый объект расположен над микрообъективом 12. Это

может быть зеркальный объект или прозрачный объект на зеркале 13. Управление микроскопом производится с помощью ПЭВМ 3.



Рисунок 6.5 - Структурная схема микроскопа МИА-Д: 1 - осветительный блок; 2 – интерференционный микроскоп Линника; 3 – ПЭВМ; 4 – лазер; 5 – схема управления; 6 – вращающийся диффузор; 7 – световолоконный жгут; 8, 14 – объективы; 9 – светоделитель; 10, 12 – микрообъективы; 11 – опорное зеркало с пьезоактюатором; 13 – исследуемый объект; 15 – видеокамера; 16 – график напряжения на пьезоактюаторе.

Фотография микроскопа представлен на рис. 6.6.



Рисунок 6.6 – Общий вид интерференционного микроскопа МИА-Д.

Метрологические и технические характеристики микроскопа МИА-Д представлены в его описании типа [233].

Погрешность измерения микроскопа была определена путем измерения меры шероховатости имеющей параметр Rmax 19,9±0.8 нм и входящей во вторичный эталон единицы длины в области измерения параметров шероховатости (2.1.ZZA.0034.2015). Перед измерением были записаны фазовые аберрации микроскопа с помощью меры шероховатости, имеющей RMS=0,83Å, которые затем вычитались из всех измерений. В таблице 6.3 представлены результаты измерений высоты ступеньки.

N⁰	Средняя	Диапазон	СКО высот в
	высота	разброса высот в	серии, нм
	ступени, нм	серии, нм	
1	19,49	19,32-19,65	0,094
2	19,21	19,14-19,31	0,054
3	19,38	19,30-19,51	0,060

Таблица 6.3 - Результаты измерений высоты ступеньки [116]

4	19,52	19,41-19,60	0,075
5	19,56	19,50-19,67	0,061
6	19,32	19,23-19,42	0,064
7	19,31	19,19-19,41	0,072
8	19,68	19,55-19,75	0,066
9	19,78	19,66-19,89	0,064
10	20,16	20,10-20,24	0,048

В 2011 году микроскоп прошел государственные испытания с целью утверждения типа и включен в Федеральный информационный фонд СИ под № 48172-11. Устройство было запатентовано как полезная модель [17].

Поверка микроскопа осуществляется по документу «Микроскопы интерференционные автоматизированные МИА-Д. Методика поверки». Основные средства поверки: рельефная мера высоты SHS-180QC, объектмикрометр ОМО ДТ7.216.009ПС, осциллограф цифровой Tektronix TDS 2012В. На микроскоп получен патент на полезную модель № 96234 (Россия) [234].

Сфера применения микроскопа – измерение топограммы и параметров динамических объектов. В частности, микроскоп использовался для изучения динамических характеристик живых клеток [235] рис. 6.7.





б

Рисунок 6.7 - а – нервное волокно, б – график изменения оптической разности хода во времени. Частота реконструкций 29.5 к/с.

Для проверки возможности микроскопа регистрации динамического процесса был проведен эксперимент по измерению во времени движущихся полистироловых шариков диаметром 5±0,5 мкм в иммерсии (глицерин). На рис. 6.8 а, б представлены фазовые изображения полистироловых шариков, полученные в разные промежутки времени (между кадрами 8,6 с). Частота восстановления фазовых изображений 25 к/с.



a



б



Рисунок 6.8 – Изображения шариков из полистирола, полученные на микроскопе МИА-Д в разные моменты времени (а, б) и их 3D визуализация фазового изображения (в).

6.3 Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-2

Автоматизированный фазовый микроскоп МИА-2 [236, 237] разработан во ФГУП «ВНИИОФИ». Основное назначение микроскопа - измерение топограммы поверхности отражающих динамических объектов в микро- и нанодиапазоне высот.

Исследования метрологических характеристик микроскопа МИА-1М показали [210], что существенный вклад в погрешность измерения вносит шероховатость опорного зеркала, а также способ реализации фазового сдвига. Получаемое в микроскопе фазовое распределение представляет собой разность фаз двух волновых фронтов – предметного и опорного. Для уменьшения влияния опорного волнового фронта нужно уменьшать шероховатость опорного зеркала.

Также работе [210] было фазовый В показано, что СДВИГ, осуществляемый путем перемещения только опорного зеркала, приводит к интерференционных ухудшению контраста полос, что увеличивает погрешность измерений (см. п. 2.3). В этой же работе [210] показано, что для повышения точности измерений необходимо перемещать одновременно опорное зеркало совместно с микрообъективом (см. п. 2.3).

Кроме этого, большое влияние на погрешность измерения оказывает источник излучения. В микроскопах МИА-1М и МИА-Д было использовано монохроматическое излучение с низкой пространственной когерентностью, собой лазерное излучение, которое представляло прошедшее через вращающийся диффузор. Большая длина когерентности обеспечивает возможность получения контрастной интерференционной картины даже при большой разности оптической длины пути в предметном и опорном каналах, например, обусловленной прозрачным покрытием или наличием покровного стекла. Однако использование такого источника приводит возникновению шумов, связанных с его монохроматичностью. Наиболее часта причина, ведущая к появлению паразитных интерференционных полос и спекл-шума – это дифракция когерентного излучения на краях апертуры, рассеяние света на

различных неоднородностях внутри оптических элементов и пылинках, а также многократные переотражения света от поверхностей этих элементов.

Также микроскоп МИИ-4М, на базе которого были разработаны указанные приборы, имеет инвертированную схему и фиксированное увеличение, что не всегда удобно при решении целого ряда измерительных задач. Например, при исследовании качества поверхности оптических зеркал или подложек необходимо их укладывать на рабочий стол исследуемой поверхностью вниз, что приводит к ее загрязнению. Кроме этого, экспериментальное исследование этого микроскопа показало, что при длительном исследовании объектов имеется дрейф значений получаемого фазового распределения, обусловленный вертикальным смещением блока интерферометра относительно неподвижного корпуса и рабочего стола микроскопа, что ведет к постепенной дефокусировке изображения.

Таким образом, целью создания микроскопа стало повышении точности измерения интерференционным методом за счет использования пространственно-когерентного монохроматического источника и опорного зеркала в виде супергладкой моноатомной структуры, а также повышение стабильности измерений во времени и удобства работы путем создания новой неинвертированной конструкции по сравнению с МИА-1М.

6.3.1 Описание интерференционного микроскопа

С учетом выше изложенных замечаний, была разработана и создана новая конструкция микроскопа по схеме Линника, обеспечивающая высокую точность и стабильность измерений.

Микроскоп имеет схему прямого микроскопа (рис. 6.9), когда исследуемый объект находится на столе исследуемой поверхностью к микрообъективу. Источником излучения является светодиод с длиной волны 530 нм и оптической мощностью 370 мВт, полуширина спектра составляет 33 нм. Для уменьшения ширины спектра дополнительно устанавливается интерференционный светофильтр, имеющий полуширину пропускания 3 нм.



Рисунок 6.9 – Оптическая схема интерференционного микроскопа МИА-2.



а



Рисунок 6.10 – Общий вид микроскопа МИА-2: а – 3D модель, б – фотография.

Изображение источника излучения 1 строится с помощью оптической системы, состоящий из двух ахроматических линз 2 и 4 в плоскости апертурной диафрагмы 5. Между линзами в области параллельного пучка расположен интерференционный светофильтр 3. С помощью конденсора 7, это изображение переотображается в передние фокальные плоскости идентичных микрообъективов 9 и 12 после предварительного разделения на предметный и опорный пучки с помощью светоделителя 8. Предметный пучок (вертикальный) падает на исследуемый объект 10 и отразившись от него проходит через тот же микрообъектив и светоделитель. Опорный пучок (горизонтальный) падает на опорное зеркало 13. Отраженный от опорного зеркала пучок также проходит через микрообъектив и светоделитель. Оба пучка (предметный и опорный) проходят через проекционную линзу 15 и строят изображение предмета и опорного зеркала в плоскости фотодетектора - матрицы видеокамеры 16. Видеокамера управляется от ПЭВМ 17. В передней фокальной плоскости конденсора 7 расположена полевая диафрагма 6, оптически сопряженная с плоскостью опорного зеркала, объекта и матрицей камеры. В опорном канале расположен затвор 11, который позволяет перекрывать опорный канал, выключать интерференционный режим работы и переводить микроскоп в режим оптического микроскопа на отражение.

Опорное зеркало 13 вместе с микрообъективом 12 составляют единый узел 19, который установлен на подвижке и может грубо перемещаться с помощью встроенного в нее специального микрометрического винта 14. В этот винт также установлен пьезопривод, который обеспечивает тонкое перемещение для реализации метода фазовых шагов. Пьезопривод управляется через блок управления от ПЭВМ 17.

Для уменьшения влияния шероховатости опорного зеркала вместо стеклянной поверхности с напыленным отражающим слоем перед микрообъективом установлена кремниевая пластина, в центральной части которой сформирована моноатомная структура. Такая структура изготавливается по специальной запатентованной технологии [88] и имеет

шероховатость около 0,05 нм. Диаметр сформированной поверхности составляет 200 мкм, что определяет максимальное поле зрения микроскопа.

Оптическая система интерферометра размещается на вертикальной плите, которая устанавливается с помощью кронштейнов на сотовый столик. На этой же плите закреплен трехкоординатный предметный столик. Таким образом, сам интерферометр, в отличие от МИИ-4М, неподвижен, а подвижной частью является предметный Такая стол. компоновка обеспечивает хорошую жесткость и стабильность во времени и позволяет получать устойчивые интерференционные полосы без дополнительной виброизоляции, что получило подтверждение в ходе экспериментов, описанных в следующем разделе.

Настройка интерференционных полос осуществляется путем выравнивания оптических длин путей предметного и опорного каналов. Для этого узел 19 перемещается с помощью микрометрического винта.

В микроскопе МИИ-4М не предусмотрено изменение увеличения, т.к. нет возможности замены микрообъективов опорного и предметного каналов. В предложенном микроскопе это делается за счет того, что меняется объектив 9 в предметном канале и соответствующий ему узел 19 в опорном. Конструктивно данный узел 19 выполнен в виде герметично закрытой трубки, внутри который установлен микрообъектив и опорное зеркало. С одной стороны трубки имеется присоединительная резьба, которая позволяет легко делать замену узла 19. При смене объективов также необходимо выровнять оптическую длину с помощью микрометрического винта 14.

В микроскопе реализован метод дискретного фазового сдвига. Для этого на пьезопривод, перемещающий блок 19, синхронно с захватом изображений подаются дискретные значения напряжения от ПЭВМ 17. Такой режим работы позволяет на каждом шаге записывать и усреднять интерферограммы, что ведет к уменьшению фотометрических шумов. Для той же цели используется режим биннинга (2х2) при захвате изображений видеокамерой. Для

уменьшения случайных фазовых шумов также производится усреднение полученных фазовых изображений.

Управление захватом изображений, расшифровка интерферограмм, визуализация и обработка полученных результатов осуществляется с помощью собственной программы «WinPhast». Для реконструкции интерферограмм был самокалибрующийся использован алгоритм, основанный на предварительной оценке фазовых сдвигов по разностным 105], интерферограммам [18, И дальнейшим вычислением фазового распределения путем аппроксимации временной зависимости интенсивности в каждом пикселе по методу наименьших квадратов [11].

6.3.2 Исследование метрологических характеристик микроскопа

Для исследования метрологических характеристик интерференционного микроскопа были использованы моноатомные структуры кремния [238]. Технология управлении морфологией ИХ изготовления основана на поверхности монокристаллического кремния на атомном уровне за счет использования эффектов самоорганизации, возникающих на атомно-чистой поверхности при прогреве в сверхвысоком вакууме [88]. Данные структуры состоят определенного числа ориентированных направлении ИЗ В кристаллографической плоскости (111) моноатомных ступеней кремния высотой 3,14 Å.

Особенность этих структур в том, что размер моноатомного слоя в горизонтальной плоскости достигает десятков микрометров, что позволяет использовать их для испытания оптических интерференционных микроскопов, имеющих ограниченное поперечное разрешение.

Перед проведением измерений для компенсации ошибки, вносимой оптической системой микроскопа, был записан профиль поверхности пластины из карбида кремния из состава вторичного эталона единицы длины в области измерения параметров шероховатости (2.1.ZZA.0034.2015). Она имеет *rms*=0,83Å и отклонение от плоскостности *PV*=7 нм на диаметре 40 мм.

Для уменьшения влияния профиля пластины на измерения были записаны ее различные участки. Профиль несет информацию об аберрациях оптической системы и вычитается из каждого измерения.

Были исследованы две структуры, имеющие номинальную высоту перепада 3,1 Å (1 ступень) и 298,3 Å (95 ступеней). Номинальное значение высоты структур было определено по количеству моноатомных слоев, измеренных с помощью атомно-силового микроскопа.

Для получения профиля исследуемых структур были проведены 10 измерений одного и того же участка с последующим усреднением. Перед измерением перепада высоты была проведена предварительная обработка изображения поверхности, которая позволила устранить имеющийся остаточный наклон. После чего ступень имела строго горизонтальную ориентацию.

Измерение перепада высоты осуществлялось по сечению. Для этого были найдены и усреднены значения высоты с одной и другой стороны от границы перепада и затем была найдена их разница (рис. 6.11). Для каждой меры были получены 10 одномерных сечений и получены 10 значений высоты. Результатом было среднее арифметическое по 10 измерениям. В таблице 6.4 представлены результаты измерений и среднеквадратическое отклонение.





а

б

Рисунок 6.11 - Изображение моноатомной структуры кремния: a – 3,1 Å и б – 298,3 Å с горизонтальным и вертикальным сечением в программе «WinPhast».

Таблица 6.4 – Результаты измерений моноатомных структур кремния

Номинальное	Результат	СКО	
значение высоты, Å	измерений, Å	измерений, Å	
3,1	3,2	0,6	
298,3	298,5	0,8	

Разработанный прибор может быть также использован для исследования прозрачных объектов, расположенных на зеркальной поверхности или отражающих объектов под защитным покрытием. Для компенсации, возникающей при этом дополнительной оптической разности хода, зеркало 13 имеет возможность перемещаться с помощью микрометрической подвижки.

Для определения временной стабильности микроскопа, которая имеет важное значение, например, при мониторинге живой клетки в течении нескольких часов, был изготовлен тестовый образец в виде шариков из диоксида кремния диаметром 5 мкм (44054-5ML-F) фирмы Sigma-Aldrich, показатель преломления которых n=1,47 в иммерсионной среде – глицерине с показателем преломления n₀=1,46.

Шарики были помещены на зеркало под покровным стеклом. Было сделано 60 измерений в течение одного часа с интервалом в 1 минуту. При этом флуктуация температуры в помещении не превышала 2° С. Для оценки стабильности измерений OT восстановленных фазовых изображений вычислялся интеграл по площади (нулевой геометрический момент). На рисунке 6.12 а приведено фазовое изображение шарика, а на рисунке 6.12 б график изменения нулевого момента во времени. Видно, что относительное максимальное изменение этой величины за время измерения не превышает 1%.









В



Г

Рисунок 6.12 – а – интерферограмма, б - «несшитая» фаза, в - фазовое изображение шарика диоксида кремния. Поле зрения 17х17 мкм; г – зависимость нулевого момента от времени.

6.4 Томографический фазовый микроскоп МИА-ТОМО

Многофункциональный томографический микроскоп МИА—ТОМО предназначен для измерения распределения показателя преломления различных объектов, в том числе: оптоволокон, микрорезонаторов, твердых стеклянных объектов и пр. Он получает фазовые проекции исследуемого объекта в угловом диапазоне от 0 до 180 град по которым, с помощью алгоритмов вычислительной томографии, восстанавливается пространственное распределение показателя преломления.



Рисунок 6.13 – Внешний вид многофункционального томографического микроскопа МИА-ТОМО.

Область применения – научные исследование, оптическое приборостроение, микроэлектроника, материаловедение, аддитивные технологии.

Многофункциональный томографический микроскоп МИА—ТОМО создан на основе интерференционного микроскопа по схеме Линника. При отключенном опорном канале томограф может работать в режиме оптического прямого микроскопа. При включенном опорном канале томограф работает в режиме интерференционного микроскопа и позволяет получать фазовые изображения объекта. Для этого в нем реализован метод дискретного фазового сдвига при помощи управляемого от компьютера опорного зеркала на пьезоэлементе. Интерферограммы, получаемые при различных положениях зеркала с помощью, встроенной цифровой видеокамеры, поступают в персональный компьютер, где производится их автоматическая обработка, в результате которой, восстанавливается двумерное распределение оптической разности хода.

Для получения томограмм исследуемый объект поворачивается на различные углы относительно оптической оси микроскопа. Для этой цели томографический микроскоп МИА—ТОМО был оснащенный системой крепления и вращения объекта, позволяющей поворачивать объект с шагом до 1° в диапазоне от 0 до 180 град. Для каждого углового положения восстанавливается фазовое изображение объекта, которое является проекцией. Далее по набору таких проекций с помощью алгоритмов вычислительной томографии происходит реконструкция томограммы.

Для уменьшения относительного фазового набег, исследуемый объект должен быть помещен в иммерсионную жидкость с показателем преломления близким по значению к показателю преломления самого объекта.

Результаты измерений в виде двумерного распределения показателя преломления и графиков сечений отображаются на экране компьютера.

На рис. 6.14а представлена оптическая схема микроскопа, она подобна оптической схеме микроскопа МИА-2. А также схема прохождения излучения

через исследуемый объект (рис. 6.14 b) и объект исследования (в данном случае оптический микрорезонатор), находящийся в кювете с иммерсией (рис. 6.14 b) [239].



Рисунок 6.14: а — Оптическая схема микроскопа: 1 — источник; 2, 3, 5 — линзы; 4 — диафрагма; 6 — светоделитель; 7,9 — микрообъективы; 8 опорное зеркало 10 — зеркало; 11— проекционная линза; 12 — матрицы видеокамеры; 13 — персональный компьютер; 14 — график напряжения, подаваемого на пьезоэлемент опорного зеркала; 15 —микрорезонатор; b — Схема прохождения луча через микрорезонатор: α — угол падения луча; ΔХ поперечное смещение луча; Х — прицельный параметр; с — Кювета с микрорезонатором: 1 — покровное стекло; 2 — глицерин; 3 микрорезонатор; 4 — зеркало; 5 —кювета.

Основным требованием, позволяющим получать проекции объекта исследования с использованием данной схемы, и в тоже время использовать алгоритмы вычислительной томографии по Радону (без учета рефракции)

является требование на разность показателей преломления объекта и окружающей его иммерсии. Согласно проведенным расчетам она не должна превышать 0,002 [239].

Использование низкокогерентного источника излучения позволяет получать качественные проекции с низкими шумами (рис. 6.15).



Рисунок 6.15 а — интерференционное и б — фазовое изображения микрорезонатора.

На рис. 6.16 представлены результаты экспериментов по реконструкции внутренней структуры оптических микрорезонаторов с различной добротностью, изготовленных из кварцевого волокна [239 - 241].



Рисунок 6.16 Томограммы микрорезонаторов с различной добротностью: а — с добротностью 3.5·10⁹, б — с добротностью 1.7·10⁹

6.5 Выводы

В главе представлено описание разработанного во ФГУП «ВНИИОФИ» параметрического ряда автоматизированных фазовых микроскопов: МИА-1М, МИА-Д, МИА-2 и МИА-ТОМО.

Микроскопы МИА-1М и МИА-Д предназначен для измерения высоты профиля поверхности отражающих объектов в микро- и нанодиапазоне. Отличие в том, что в микроскопе МИА-Д используется высокоскоростная камера, которая позволяет ему получать фазовые изображения с частой 30 Гц и использовать его для исследования динамических объектов.

Микроскоп МИА-2 является модернизированной версией микроскопа МИА-1М с улучшенными метрологическими и эксплуатационными характеристиками.

Многофункциональный томографический микроскоп МИА—ТОМО предназначен для измерения распределения показателя преломления различных объектов, в том числе: оптоволокон, микрорезонаторов, твердых стеклянных объектов, в том числе, полученных методами аддитивных технологий и пр. Он позволяет получать фазовые проекции исследуемого объекта в угловом диапазоне от 0 до 180 град по которым, с помощью алгоритмов вычислительной томографии, восстанавливается пространственное распределение показателя преломления.

Заключение

В ходе выполнения диссертационной работы получены следующие результаты.

1 Рассмотрены основные параметры отражающих и прозрачных фазовых объектов, как объектов исследования в фазовой микроскопии.

2 Проведен анализ методов реконструкции фазы волнового фронта. Проанализированы пространственные и временные методы.

3 Рассмотрены основные источники ошибок методов фазовых шагов.

4 С помощью численного моделирования исследован метода фазовых шагов с дискретным фазовым сдвигом (алгоритм Харихарана-Швайдера) и выявлены его предельные возможности. Показано, что при наложении аддитивного шума на интерферограммы погрешность измерений возрастает, а использование усреднений интерферограмм и фазовых изображений позволяет ее снизить. Также было показано, что неточное задание фазовых сдвигов обуславливает появление второй гармоники на фазовых изображениях, а изменение амплитуды интерферограмм - первой гармоники.

5 С помощью частотного анализ исследован метод вычисления фазовых сдвигов по разностным интерферограмм и выведены его формулы. Показано, что использование в этих формулах дисперсии разностных интерферограмм позволяет увеличить точность измерения. Рассмотрено влияние числа полос и уровня шума на погрешность вычисления фазового сдвига. Показано, что использование аподизации интерферограмм в пространственной области позволяет увеличить точность данного метода.

6 Исследован метод динамической фазовой микроскопии на основе предварительного определения фазовых сдвигов с помощью фурье метода.

7 Исследовано влияние оптической системы микроскопа на получаемое фазовое изображение. Показано, что важное влияние на уровень шумов получаемых фазовых изображений имеет степень когерентности
источника излучения. Для его уменьшения необходимо понижать степень временной или пространственной когерентности.

8 Исследовано формирование интерференционного изображения в фазовом микроскопе по схеме Линника с протяженным монохроматическим пространственно-некогерентным источником света. Показано, что это изображение является суммой элементарных интерферограмм, образуемых точечными источниками из которых состоит протяженный источника света. При этом контрастное изображение локализовано в плоскости регистратора, оптически сопряженной с предметным и опорным зеркалами.

9 Исследовано влияние опорного зеркала фазового микроскопа на погрешность измерения фазовых изображений. Показано, что для ее уменьшения, при реализации метода фазовых шагов, необходимо перемещать опорное зеркало совместно с микрообъективом. При измерении СКО отклонения от плоскостности поверхностей с низким уровнем шероховатости (супергладких поверхностей) необходимо учитывать СКО отклонения от плоскостности опорного зеркала. А при вычитании аберраций оптической системы с помощью эталонного зеркала – СКО отклонения от плоскостности эталонного зеркала.

10 Исследовано влияние комплексного показателя преломления отражающего фазового объекта на его фазовое изображение. Показано, что при измерении таких объектов, состоящих из различных материалов, необходимо учитывать дополнительный фазовый набег, возникающий на границе раздела воздух-материал, что было проверено экспериментально путем сравнительных измерений на атомно-силовом и интерференционных микроскопах. Данные эксперименты показали, что корректировка полученных значений с использованием измеренных на эллипсометре оптических констант (показателя преломления и коэффициента поглощения) позволила получить более точное значение высоты слоя.

11 Исследована зависимость латерального разрешения интерференционного микроскопа от расстояния между фазовой ступенькой и

плоскостью фокуса объектива предметного канала микроскопа на разных длинах волн. Наиболее подробные исследования для большого числа значений высоты фазовой ступеньки выполнены методом численного моделирования. Они показали сложную взаимосвязь между исследуемой зависимостью и соотношением между высотой ступеньки и длиной волны зондирующего излучения. Каждой высоте ступеньки соответствует свой вид зависимости латерального разрешения от величины дефокусировки, а положение максимального разрешения с большой вероятностью не совпадает с фокусом. Для поиска этого положения необходимо каждый раз снимать зависимость производной от координаты фокуса в пределах диапазона фокусировки, что подтверждается экспериментами на двух ступеньках.

12 Исследовано пространственное разрешение фазового микроскопа, созданного на основе микроинтерферометра Линника, использующего метод фазовых шагов для восстановления фазы. Полученные результаты показали, что пространственное разрешение фазового микроскопа зависит не только от длины волны, но и от высоты фазовой ступеньки. Наилучшее разрешение было получено на длине волны 633 нм для меры, имеющей номинальную высоту ступеньки 179,4 нм. При определённых соотношениях между длиной волны λ и высотой фазовой ступеньки h, a именно, если $\lambda/4 \approx$ h, разрешение фазовых изображений пространственное значительно превосходит пространственное разрешение традиционных оптических изображений, ограниченное дифракционным пределом разрешения Аббе.

13 Рассмотрены различные аспекты использования автоматизированного фазового микроскопа для исследования прозрачных объектов.

14 Исследован двухиммерсионный метод измерения показателя преломления жидких и твердых веществ. Он позволяет с высокой точностью измерять показатель преломления исследуемого раствора путем сравнения с показателем преломления эталонного раствора. Особенность метода в том, что измеряемый объем составляет нл.

15 Рассмотрены особенности морфометрии клеток по фазовым изображениям для случая гомогенных и негомогенных объектов, а также динамические измерения с использованием автоматизированного фазового микроскопа.

16 Исследован метод измерения массы сухого вещества клетки с помощью фазового микроскопа и его погрешность. Для оценки погрешности измерения исследованы различные факторы: изменение объема клетки, рефракция света, влияние микроскопа, влияние внутренних волн, которые показали, что относительная погрешность не превосходит 2%.

17 Проведены эксперименты по измерению инкремента показателя преломления живой клетки во времени. Оно показали, что для живой клетки характерно наличие получасовых изменений инкремента показателя преломления.

18 Исследован метод динамической фазовой микроскопии на основе анализа интенсивности интерферограммы, позволяющий без использования методов восстановления проводить относительные измерения изменения фазы волнового фронта. Представлены эксперименты по измерению динамических характеристик клеток.

Исследован томографический фазовой микроскопии на основе 19 схемы Линника и сдвигового интерферометра. Показано, что схема томографического микроскопа Линника имеет следующие преимущества: двойное прохождение излучения через объект, что в два раза повышает чувствительность к измерению OPX; объект зондируется подвижным пучком, при этом сам объект неподвижен; схема обеспечивает угол зондирования - 90°; траектория зондирования «квадрат» обеспечивает минимальную ошибку реконструкции. Однако двойной проход излучения через объект приводит к возникновению «зеркальных» проекций. При восстановлении томограмм по таким проекциям объект дополняется своим зеркальным двойником, поэтому необходимо дополнительно обеспечивать разделение объекта И его

зеркального двойника, что вносит дополнительные сложности в оптическую схему и алгоритм томографической реконструкции.

20 Исследован томографический фазовый микроскоп сдвигового типа на основе схемы сдвигового интерферометра в которой прозрачный объект исследуется «на просвет». Наличие сдвигового интерферометра приводит к тому, что вместо обычных проекций получаются т.н. дифференциальные проекции, представляющие собой частную производную 1-го порядка от обычных проекций. Он обладает высокой механической стабильностью и может работать с использованием низкокогерентного источника для получения высококачественные проекционных данных.

21 Исследован метод DIC томографии, реализуемый с помощью томографического фазового микроскопа сдвигового типа, когда направление производной получаемых дифференциальных проекций перпендикулярно плоскости зондирования. DIC томограммы различных сечений отображают производную от распределения показателя преломления. Приводятся результаты экспериментов с различными клетками по DIC томографии.

22 Исследован локальный алгоритм, основанный на суммировании обратных проекций и реализуемый с помощью томографического фазового микроскопа сдвигового типа, когда направление производной получаемых дифференциальных проекций параллельно плоскости зондирования. Показано, что для дифференциальных проекций, представляющих собой частные производные 1-го и 2-го порядка суммарное изображение соответствует преобразованию Гильберта и Л преобразованию исходной функции. Это было подтверждено компьютерным моделированием и экспериментом по томографии лягушачьих эритроцитов.

23 Проведены сравнительные измерения СКО супергладких поверхностей с использованием микроскопа МИА-1М и интерферометра белого света Zygo NewView 6200. Которые показали, что чувствительность МИА-1М по глубине составляет 0,25 нм.

24 Проведены измерения профиля поверхности наноструктур кремния, состоящих из моноатомных слоев, с помощью интерференционного метода. Для проведения измерений использовался сканирующий интерференционный микроскоп NewView 6200 белого света Zygo Продемонстрирована потенциальная возможность использования моноатомных структур кремния в качестве мер высоты в субнанометровом диапазоне для калибровки (поверки) не только атомно-силовых, но и оптических интерференционных микроскопов.

25 Разработан и исследован метод измерения малых перемещения с помощью фазового микроскопа. Численным моделированием показана возможность определения малых перемещений объекта с помощью разработанного метода алгоритма и выполнены оценки влияния шумов измерений. Проведены эксперименты по смещению ступени с помощью нанопозиционера и анализа получаемых фазовых изображений. Показана возможность регистрации перемещений до 10нм.

26 Исследован двухволновый метод реконструкции интерферограмм, позволяющий расширить диапазон измерения ступенчатых объектов в фазовой микроскопии.

27 Разработан параметрический ряд автоматизированных фазовых микроскопов: МИА-1М, МИА-Д, МИА-2 и МИА-ТОМО.

Таким образом, в настоящей работе решена актуальная научнотехническая проблема разработки методов и аппаратуры для прецизионных измерений параметров трехмерных фазовых объектов, что имеет существенное для оптической микроскопии и оптической значение томографии.

Список литературы

- 1 Вест Ч. Голографическая интерферометрия. М.: Мир, 1982.-504 с.
- 2 Рытов С. М., Кравцов Ю. А., Татарский В. И. Введение в статистическую радиофизику. Ч.2. Случайные поля. — М.: Наука, 1978.
- 3 М. М. Барышева, Ю. А. Вайнер и др. Особенности изучения шероховатости подложек для многослойной рентгеновской оптики методами малоугловой рентгеновской рефлектометрии, атомно-силовой и интерференционной микроскопии: Известия РАН. Серия физическая, 2011, том 75, № 1, с. 71–76.
- Luo J. et al Additive manufacturing of glass for optical applications // Proceeding of SPIE 9738. Laser 3D Manufacturing III. 2016. doi: 10.1117/12.2218137.
- 5 Klein J. et al Additive manufacturing of optically transparent glass // 3D printing and additive manufacturing. 2015. Vol. 2. № 3. P. 92 105. doi: 10.1089/3dp.2015.0021.
- 6 Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Brysgalova N.Y., Brazhe A.R., Brazhe NA, Lomakin A.G. Laser interference microscopy in erythrocyte study //J Appl Phys. 2009. Vol. 105. № 10 doi: 10.1063/1.3116609.
- 7 Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Браже Н.А., Лазарев Г.Л. et al. Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии. Квант электроника 2006;36(9):874-8.
- 8 Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы. -Машиностроение.- Ленинград.- 1969г.- 512 с.
- 9 Dunn G. A. Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time // Proceedings of the Royal Microscopical Society. 1998. 33. P. 189-196.
- 10 Malacara D., Servin M. and Malacara Z. Interferogram Analysis for Optical Testing (Taylor & Francis, CRC, 2005).

- 11 Malacara D., ed., Optical Shop Testing, 3rd ed. (John Wiley and Sons, 2007).
- 12 Тычинский В.П. Измерение дробной доли интерференционной полосы методом временных интервалов // Измерительная техника.- 1977.- №12, 39.
- 13 Wyant. Phase-Shifting Interferometry (<u>https://wp.optics.arizona.edu/jcwyant/wp-</u> content/uploads/sites/13/2016/08/Phase-Shifting-Interferometry.nb_.pdf)
- Schwider J., Burow R., Elssner K.-E., Grzanna J., Spolaczyk R., Merkel K.
 Digital wave-front measuring interferometry: some systematic error sources //
 Applied Optics. 1983. Vol. 22. № 21. P. 3421-3432 doi: 10.1364/AO.22.003421.
- Larkin K. A self-calibrating phase-shifting algorithm based on the natural demodulation of two-dimensional fringe patterns // Optics Express. 2001. Vol. 9. № 5. P. 236-253. doi: 10.1364/OE.9.000236.
- Du H., Yan J., Wang J. Random phase-shifting algorithm by constructing orthogonal phase-shifting fringe patterns // Applied Optics. 2017. Vol. 56. № 11. P. 3071-3076. doi: 10.1364/AO.56.003071.
- Yatabe K., Ishikawa K., Oikawa Y. Simple, flexible, and accurate phase retrieval method for generalized phase-shifting interferometry // Journal of the Optical Society of America A. 2017. Vol. 34. № 1. P. 87-96. doi: 10.1364/JOSAA.34.000087.
- 18 Guo H. Zhang Z. Phase shift estimation from variances of fringe pattern differences// Applied Optics. 2013. Vol. 52. № 26. P 6572-6578. doi: 10.1364/AO.52.006572.
- 19 Тычинский В. П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // Успехи физических наук.- 2001.- Т.171.-№6.
- 20 Тычинский В.П. Компьютерный фазовый микроскоп. М.: Знание, 1989.
 64с.
- 21 Захарьевский А.Н., Кузнецова А.Ф. Интерференционные биологические микроскопы // Цитология.- 1961.- Т.3.- №2.- С.213-224.

- 22 Smartt R., Steel W. Point-diffraction interference microscopy // Applied Optics. 1985. Vol. 24. №10, P. 1402-1403. doi: 10.1364/AO.24.001402.
- 23 Линник В.П. Прибор для интерференционного исследования отражающих объектов под микроскопом ("микроинтерферометр") // ДАН СССР.- 1933.- №1.- С.18-23.
- 24 Shaked N., Girshovitz P. Portable low-coherence interferometer for quantitative phase microscopy of live cells // Proceedings of SPIE. Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XX. 2013. Vol. 8589. doi: 10.1117/12.2001758.
- 25 Bhaduri B et al Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences // Optics letters. 2014. Vol. 6. № 1. P. 57-119. doi: 10.1364/AOP.6.000057.
- Wang Z., Millet L., Mir M., Ding H., Unarunotai S., Rogers J., Gillette M.,
 Popescu G. Spatial light interference microscopy (SLIM) // Optics Express.
 2011. Vol. 19, №. 2. P. 1016-1026. doi: 10.1364/OE.19.001016.
- Nguyen T., Popescu G. Spatial Light Interference Microscopy (SLIM) using twisted-nematic liquid-crystal modulation // Biomedical Optics Express. 2013.Vol. 4. № 9. P. 1571-1583. doi: 10.1364/BOE.4.001571.
- 28 Popescu G. Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues // McGraw Hill Professional, 2011, ISBN 0071663428, OCLC 659763966.
- Lee K., Kim K., Jung J., Heo J., Cho S., Lee S., Chang G., Jo Y., Park H., Park Y. Quantitative Phase Imaging Techniques for the Study of Cell Pathophysiology: From Principles to Applications // Sensors. 2013. Vol. 13. Nº4. P. 4170–4191. doi:10.3390/s130404170.
- 30 Shaked N. Quantitative phase microscopy of biological samples using a portable interferometer // Optics Letters. 2012. Vol. 37. № 11. P. 2016-2018. doi: 10.1364/OL.37.002016.
- 31 Arnison M., Larkin K., Sheppard C., Smith N., Cogswell C. Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy // Journal of

Microscopy. 2004. Vol. 214, № 1, P.7-12. doi: 10.1111/j.0022-2720.2004.01293.x.

- 32 Kou S., Sheppard C. Quantitative phase restoration in differential interference contrast (DIC) microscopy // Proceedings of SPIE. Optical and Digital Image Processing. 2008. Vol. 7000. doi: 10.1117/12.780912.
- 33 Marquet P., Rappaz B., J. Magistretti P., Cuche E., Emery Y., Colomb T., Depeursinge C. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy // Optics letters. 2005. Vol. 30. № 5. P. 468-470. doi: 10.1364/OL.30.000468.
- Doi T., Toyoda K., Tanimura Y. Effects of phase changes on reflection and their wavelength dependence in optical profilometry // Applied Optics. 1997.
 Vol. 36. № 28. P. 7157-7161. doi: 10.1364/AO.36.007157.
- Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Ломакин А.Г. Измерение 35 преломления веществ показателя жидких при помощи автоматизированного интерференционного микроскопа // Сборник международной 7-ой научно-технической конференции трудов «Голография. Наука и практика». – М.2010.-С.237-240.
- 36 Минаев В. Л., Лощилов К.Е., Ломакин А.Г., Золотаревский С.Ю. Интерференционный метод измерения показателя преломления нанообъемов жидких и твердых веществ // Сборник тезисов докладов научно-технологических секций международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech'10. М. - 2010.
- 37 Метелин В.Б., Минаев В.Л., Валов А.Л., Конрадов А.А., Василенко И.А., Бабакова С.В. Компьютерная фазово-интерференционная микроскопия в биологии и медицине // Сборник научных трудов. -2003.- г. Красноярск. -С.10.
- 38 Сребницкая Л.К., Вишняков Г.Н., Нейман С.А., Рождественская З.Е., Андреев О.А., Левин Г.Г. Двумерная восстановление карты двулучепреломления саркомера скелетной мышцы в релаксированном и

ригорном состояниях по данным интерференционной микроскопии // Биофизика. – 2001. – Т.46. – Вып. 3. – С. 518-523.

- 39 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Оптические методы измерения двулучепреломления мышечных волокон // Биофизика. – 2002. – Т.47. -№4. – С.659-662.
- 40 Γ.Γ., Г.Н., Минаев В.Л. Левин Вишняков Использование автоматизированного микроинтерферометра МИИ-4 для измерения сухого веса одиночных клеток : Тез. докл. Пятнадцатая научнотехническая конференция «Фотометрия И ee метрологическое обеспечение». -М., 2003.- С. 123.
- Левин Г.Г., Ковалев А.А., Минаев В.Л., Сухоруков К.А. Оценка точности измерения сухой массы клетки на автоматизированном интерференционном микроскопе// Измерительная техника. 2004. №4. С.62-67.
- 42 Barer R. Determination of dry mass, thickness, solid and water concentration in living cells// Nature. 1953. Vol. 172. P.1097-1098.
- 43 Barer R., Joseph S. Refractometry of living cells // Journal of Cell Science.
 1954. Vol. s3-95. № 32. P. 399-423.
- 44 Минаев В. Л., Сухоруков К.А. Реализация метода динамической фазовой микроскопии: Тез. докл. Седьмая международная научно-техническая конференция «Оптические методы исследования потоков». - М., 2003.- С. 75.
- 45 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Ломакин А.Г. Динамические фазовые измерения на интерференционном микроскопе // Тез. докл. Научно-практическая конференция «Голография в России и за рубежом. Наука и практика». –М., 2009.- С. 71.
- 46 Levin G., Kozinets G., Novoderzhkina I., Streletskaya E., Vishnyakov G.
 Blood cells research using methods of microinterferometry // Proceedings of SPIE. 1997. Vol. 2982. P.490-495. doi: 10.1117/12.273652.

- 47 Вишняков Г.Н., Закарян К.С., Левин Г.Г., Стрелецкая Е.А. Исследование оптически прозрачных объектов при помощи томографического микроскопа Линника // Изм. Техника.- 1999.- №1.-С.46-49.
- 48 Levin G., Bulygin T., Kalinin E., Vishnyakov G. Application of computerized interference microscope for monitoring oscillations of dry cell weight and morphology of the living cells // Proceedings of SPIE. Optical Diagnostics of Living Cells IV. 2001. Vol. 4260. P. 149-154. doi: 10.1117/12.426766.
- 49 Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках // Цитология. 2005. Т.47. №4. С.348-356.
- 50 Стрелецкая Е.А., Цыба Н.Н., Козинец Г.И., Левин Г.Г., Вишняков Г.Н. Сопоставление интегральных характеристик лимфоцитов здоровых людей и больных хроническим лимфолейкозом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - №4. – С.21-23.
- 51 Вышенская Т. В., Кретушев А.В. и др. Квазипериодические изменения фазовой высоты отдельно взятой митохондрии, индуцированные работой мембранных протонных насосов// Биологические мембраны.- 2002.-Т.19.- №6.- С. 491-498.
- 52 Бетцлер К., Грёне А., Шмидт Н., Фойгт П. Интерферометрический метод измерения показателя преломления // Приборы для научных исследований. – 1988. - № 4. - С. 134-135.
- 53 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н. Оптическая томография. М.: Радио и связь, 1989.-224 с.
- 54 <u>http://www.tomocube.com</u>
- 55 Vishnyakov G.N., Levin G.G, Minaev V.L., Pickalov V.V., Likhachev A.V. Tomographic interference microscopy of living cells // Microscopy and Analysis. 2004. Vol. 87. P. 19-21.
- Kawata S., Nakamura O., and Minami S. Optical microscope tomography. I.
 Support constraint // Journal of the Optical Society of America A. 1987, Vol.
 4, P. 292-297. doi: 10.1364/JOSAA.4.000292.

- 57 Vishnyakov G., Levin G. Optical microtomography of phase objects // Optics and Spectroscopy. 1998. Vol.85. № 1. P. 73-77.
- 58 Lauer V. Observation of biological objects using an optical diffraction tomographic microscope // Proceedings of SPIE 2000 Vol. 4164. P. 122-133. doi: 10.1117/12.410638.
- 59 Matthieu D., Bertrand S., Vincent G., Olivier H., Vincent L. Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples // Measurement Science and Technology. 2008. Vol. 19. № 7. P. 074009.
- 60 Sung Y., Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K., Dasari R., Feld M. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging // Optics Express. 2009. Vol. 17. №. 1. P. 266-277. doi: 10.1364/OE.17.000266.
- Cotte Y., Toy F., Jourdain P., Pavillon N., Boss D., Magistretti P., Marquet P., Depeursinge C. Marker-free phase nanoscopy // Nature Photonics. 2013. Vol. 7. № 2. P. 113-117. doi:10.1038/nphoton.2012.329.
- 62 Kim Y., Shim H., Kim K., Park H., Heo J., Yoon J., Choi C., Jang S., Park Y. Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells // Optics Express. 2014. Vol. 22. № 9. P. 10398-10407. doi: 10.1364/OE.22.010398.
- Kim K., Yaqoob Z., Lee K., Kang J., Choi Y., Hosseini P. So T., Park Y. Diffraction optical tomography using a quantitative phase imaging unit // Optics Letters. 2014. Vol. 39. № 24. P. 6935-6938. doi: 10.1364/OL.39.006935.
- Kamilov U., Papadopoulos I., Shoreh M., Goy A., Vonesch C., Unser M., Psaltis D. Learning approach to optical tomography // Optica. 2015. Vol. 2. №
 6. P. 517-522. doi: 10.1364/OPTICA.2.000517.
- 65 Dlugan A., MacAulay C., Lane P. Microscopic optical tomography // 7th Congress of the European Society for Analytical Cellular Pathology, 1-5 April 2001, report Z003.
- 66 Kuś A., Krauze W., Kujawińska M. Limited-angle holographic tomography with optically controlled projection generation // Proceeding of SPIE Three-

Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXII. 2015. Vol. 9330. 933007. doi: 10.1117/12.2078111.

- 67 Isikman S., Bishara W., Ozcan A. Partially coherent lensfree tomographic microscopy [Invited] // Applied Optics. 2011. Vol. 50. № 34. P. H253-H264. doi: 10.1364/AO.50.00H253.
- 68 Zuo C., Sun J., Zhang J., Hu Y., Chen Q. Lensless phase microscopy and diffraction tomography with multi-angle and multi-wavelength illuminations using a LED matrix // Optics Express. 2015. Vol. 23. № 11. P. 14314-14328. doi: 10.1364/OE.23.014314.
- Kim T., Zhou R., Mir M., Babacan S., Carney P., Goddard L., Popescu G.
 White-light diffraction tomography of unlabelled live cells // Nature Photonics.
 2014. Vol. 8. № 3. P. 256-263. doi: 10.1038/nphoton.2013.350.
- Hosseini P., Sung Y., Choi Y., Lue N., Yaqoob Z., So P. Scanning color optical tomography (SCOT) // Optics Express. 2015. Vol. 23. №15. P. 19752-19762. doi: 10.1364/OE.23.019752.
- Vishnyakov G.N., Levin G.G., Zakerian C.S., Likhachov A.V., Pickalov V.V., Kozinets G.I., Novoderzhkina I.K., Streletskaya G.A. Three – dimensional limited – angle microtomography of blood cells: experimental results // Proceedings of SPIE. Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing V. 1998. Vol.3261. P.159-164. doi: 10.1117/12.310549.
- 72 Vishnyakov G.N., Levin G.G., Zakerian C.S. Interferometric computed microtomography of 3D phase objects // Proceedings of SPIE. Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing IV. 1997. Vol. 2984. P.64-71. doi: 10.1117/12.271278.
- 73 Vishnyakov G.N., Levin G.G. Optical tomography of living cells using phaseshifting Linnik microscope // Proceedings of SPIE. Optical Biopsies and Microscopic Techniques III. 1999. Vol. 3568.- P.197-200. doi: 10.1117/12.336834.

- Cogswell C., Larkin K., Klemm H. Fluorescence microtomography: Multiangle image acquisition and 3D digital reconstruction // Proceedings of SPIE.
 Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing III. 1996.
 Vol. 2655. P. 109-115. doi: 10.1117/12.237467.
- 75 Kozubek M., Skalnikova M., Matula P., Bartova E., Rauch J. Automated microaxial tomography of cell nuclei after specific labeling by fluorescence in situ hybridization // Micron. 2002. Vol. 33. P. 655-665. doi: 10.1016/S0968-4328(02)00023-9.
- Matula P., Kozubek M., Staier F., Ha74usmann M. Precise 3D image alignment in micro-axial tomography// Journal of Microscopy. 2003. Vol.209. P.126-142. doi: 10.1046/j.1365-2818.2003.01104.x.
- Charrière F., Pavillon N., Colomb T., Depeursinge C., Heger T., Mitchell E., Marquet P., Rappaz B. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba // Optics Express. 2006. Vol. 14.
 № 16. P. 7005-7013. doi: 10.1364/OE.14.007005.
- 78 Habaza M., Gilboa B., Roichman Y., Shaked N. Tomographic phase microscopy with 180° rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers // Optics Letters. 2015. Vol. 40. № 8. P. 1881-1884. doi: 10.1364/OL.40.001881.
- Vertu S., Ochiai M., Shuzo M., Yamada I., Delaunay J.-J., Haeberlé O., Okamoto Y. Optical projection microtomography of transparent objects // Proceedings of SPIE. 2007. Vol. 6627. P. 66271A-66271A-6. doi: 10.1364/ECBO.2007.6627_62.
- 80 Kostencka J., Kozacki T., Kuś A., Kujawińska M. Accurate approach to capillary-supported optical diffraction tomography // Optics Express. 2015. Vol. 23. № 6. P. 7908-7923. doi: 10.1364/OE.23.007908.
- Girshovitz P., Shaked N., Compact and portable low-coherence interferometer with off-axis geometry for quantitative phase microscopy and nanoscopy // Optics Express. 2013. Vol. 21. № 5. P. 5701-5714. doi: 10.1364/OE.21.005701.

- 82 King S., Libertun A., Piestun R., Cogswell C., Preza C. Quantitative phase microscopy through differential interference imaging // Journal of Biomedical Optics. 2008. Vol. 13. № 2. P. 024020-024020. doi: 10.1117/1.2907328.
- 83 Kou S., Waller L., Barbastathis G., Sheppard C. Transport-of-intensity approach to differential interference contrast (TI-DIC) microscopy for quantitative phase imaging // Optics Letters. 2010. Vol. 35. № 3. P. 447-449. doi: 10.1364/OL.35.000447.
- Fu D., Oh S., Choi W., Yamauchi T., Dorn A., Yaqoob Z., Dasari R., Feld M. Quantitative DIC microscopy using an off-axis self-interference approach // Optics Letters. 2010. Vol. 35. № 14. P. 2370-2372. doi: 10.1364/OL.35.002370.
- 85 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Лихачев А.В., Пикалов В.В. Фазовая томография трехмерных биологических микрообъектов: численное моделирование и экспериментальные результаты // Оптика и спектроскопия. – 1999. - Том 87. - №3. - С.448-454.
- 86 Clackdoyle R. Tomographic Reconstruction in the 21st Century [Text] / R. Clackdoyle, M. Defrise // IEEE Signal Processing Magazine. 2010. Vol. 27, № 4. P. 60–80. doi: 10.1364/OL.35.002370.
- Вишняков Г.Н., Цельмина И.Ю. Качество оптической поверхности, обработанной с применением полиуретана. // Оптический журнал. 2012.
 Т. 79. №12. С. 68.
- 88 Щеглов Д. В., Косолобов С. С., Родякина Е. Е, Латышев А. В. Способ изготовления ступенчатого высотного калибровочного стандарта для профилометрии и сканирующей зондовой микроскопии // Патент (Россия) № 2371674 от 27.10.2009.
- 89 <u>https://www.edmundoptics.com/microscopy/infinity-corrected-objectives/nikon-interferometry-objectives/</u>
- 90 https://www.olympus-ims.com/en/microscope/wli/
- 91 Коломийцев Ю.В. Интерферометры. Основы инженерной теории. Применение. Л. Машиностроение. - 1976. - 296 с.

- 92 de Groot P. Principles of interference microscopy for the measurement of surface topography // Advances in Optics and Photonics. 2015. Vol. 7. №1. P. 1-65. doi: 10.1364/AOP.7.000001.
- 93 Вишняков Г.Н., Левина Э.Ю., Минаев В.Л., Моисеев Н.Н., Цельмина И.Ю. Применение интерферометра "белого света" для измерения профиля и шероховатости оптических деталей // Сборник тезисов докладов научно-технологических секций международного форума по нанотехнологиям. М. -2009.
- 94 Левин Г. Г., Илюшин Я. А., Минаев В. Л., Моисеев Н. Н. Определение наноперемещений объекта по оптическому фазовому изображению // Измерительная техника.- 2010. - №7.- С.38 - 42.
- 95 Минаев В.Л. Интерференционные методы измерения интегральных и локальных параметров фазовых объектов // Оптико-электронные измерения. Сборник статей / Под ред. В.С. Иванова. – М. – Университетская книга. – 2005.- С.380.
- 96 ГОСТ 7601-78 Физическая оптика. Термины, буквенные обозначения и определения основных величин.
- 97 Takeda M., Mutoh K. Fourier transforms profilometry for the automatic measurement of 3D object shapes // Applied Optics. 1983. Vol. 22. №24. P. 3977-3982. doi: 10.1364/AO.22.003977.
- 98 Wang S., Xue L.; Lai J.; Li Z. An improved phase retrieval method based on Hilbert transform in interferometric microscopy // Optik - International Journal for Light and Electron Optics. 2013. Vol. 124. № 14, P. 1897-1901 doi: 10.1016/j.ijleo.2012.05.029.
- 99 Carré P. Installation et Utilisation du Comparateur Photoelectrique et Interferentiel du Bureau International des Poids de Mesures // Metrologia . 1966. Vol. 2 № 1. P.13-23. doi: 10.1088/0026-1394/2/1/005.
- 100 Wyant J. Use of an ac heterodyne lateral shear interferometer with real-time wavefront correction systems // Applied Optics. 1975. Vol. 14. № 11. P. 2622
 2626. doi: 10.1364/AO.14.002622.

- 101 Wizinowich P. L. Phase shifting interferometry in the presence of vibration: a new algorithm and system // Applied Optics. 1990. Vol. 29. № 22. P. 3271 3279. doi: 10.1364/AO.29.003271.
- 102 Bruning J., Herriott D., Gallagher J., Rosenfeld D., White A., Brangaccio D. Digital wavefront measuring interferometer for testing optical surfaces and lenses // Applied Optics. 1974. Vol. 13. № 11. P. 2693 – 2703. doi: 10.1364/AO.13.002693.
- 103 Phillion D. General methods for generating phase-shifting interferometry algorithms // Applied Optics. 1997. Vol. 36. № 31. P. 8098 – 8115. doi: 10.1364/AO.36.008098.
- Hariharan P., Oreb B., Eiju T. Digital phase-shifting interferometry: a simple error-compensating phase calculation algorithm // Applied Optics. 1987. Vol. 26. № 13. P. 2504 2506. doi: 10.1364/AO.26.002504.
- 105 Vishnyakov G., Levin G., Minaev V., Nekrasov N. Advanced method of phase shift measurement from variances of interferogram differences // Applied Optics. 2015. Vol. 54. № 15. P. 4797-4804. doi: 10.1364/AO.54.004797.
- 106 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Спектральный анализ метода измерения фазового сдвига по интерферограммам // Измерительная техника. - 2015 - №.11- С.34-37.
- 107 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Метод измерения фазового сдвига на основе фурье-анализа разностных интерферограмм // Оптика и спектроскопия. 2015. Т. 118. № 6. С. 1005-1011. doi: 10.7868/S0030403415060240.
- 108 Папулис А. Теория систем и преобразований в оптике // М.: «Мир», 1971. Papoulis A. Systems and Transforms with Applications in Optic. New-York: «McGRAW-HILL BOOK COMPANY».
- Brophy C. Effect of intensity error correlation on the computed phase of phase-shifting interferometry // Journal of the Optical Society of America A. 1990.
 Vol. 7. № 4. P. 537 541. doi: 10.1364/JOSAA.7.000537.

- 110 de Groot P. and L. Deck Numerical simulations of vibration in phase-shifting interferometry // Applied Optics. 1996. Vol. 35. № 13. P. 2172 - 2178. doi: 10.1364/AO.35.002172.
- 111 Deck L. and de Groot P. Punctuated quadrature phase-shifting interferometry
 // Optics Letters. 1998. Vol. 23. № 1. P. 19 21. doi: 10.1364/OL.23.000019.
- 112 Свидетельство о госрегистрации программы для ЭВМ № 2012660300 «WinPhast», Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Ломакин А.Г., Приоритет изобретения 27 сентября 2012 г.,зарегистрировано в Гос. Реестре РФ 14 ноября 2012 г.
- 113 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Цельмина И.Ю. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Численное моделирование // Оптика и спектроскопия. – 2013.том 115.- № 6 - С. 1039. doi: 10.7868/S0030403413120222.
- 114 Cheng-Shan Guo et.al. Determination of global phase shifts between interferograms by use of an energy-minimum algorithm // Applied Optics. 2003. Vol. 42. № 32. P. 6514 6519. doi: 10.1364/AO.42.006514.
- Harris F. On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform // Proc. IEEE. 1978. Vol. 66. №1. P. 51 83. doi: 10.1109/PROC.1978.10837.
- 116 Левин Г.Г. Вишняков Г.Н. Минаев В.Л. Автоматизированный интерференционный микроскоп для измерения динамических фазовых объектов // Приборы и техника эксперимента - 2014 - №1 .- С. 79-84. doi: 10.7868/S0032816214010066.
- 117 Goldberg K.A., Bokor J. Fourier-transform method of phase-shift determination // Applied Optics. 2001. V. 40. № 17. P. 2886 - 2894. doi: 10.1364/AO.40.002886.
- 118 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Томографический микроскоп Линника для исследования оптически прозрачных объектов // Изм. техника. – 1998. – №10. – С. 18-22.

- 119 Shin S., Kim K., Lee K., Lee S., Park Y. Effects of spatiotemporal coherence on interferometric microscopy // Optics Express. 2017. Vol. 25. № 7. P. 8085-8097 doi: 10.1364/OE.25.008085.
- 120 Латушко М.И. Оценка уровня шумов фазовых изображений, получаемых с помощью сдвигового интерференционного микроскопа // Измерительная техника.- 2015. №11.- С.38-40.
- 121 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Томографическая микроскопия трехмерных фазовых объектов в пространственно-некогерентном свете// Оптика и спектроскопия. – 2003.- том 95.- №1. - С. 142-146.
- 122 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Цельмина И.Ю. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине // Сборник трудов 10-ой международной научно-технической конференции «Голография. Наука и практика». – М. 2013.
- 123 Вишняков Г. Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Цельмина И.Ю. Интерференционная микроскопия для измерения шероховатости оптических деталей // Сборник трудов 9-ой международной научнотехнической конференции «Голография. Наука и практика». – М.2012
- 124 Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1970.-856 с.
- 125 Топорец А.С. Оптика шероховатой поверхности. Л.: Машиностроение. Ленинградское отделение, 1988. 191 с.
- 126 ГОСТ 2789-73. Шероховатость поверхности. Параметры и характеристики.
- 127 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Моисеев Н.Н., Минаев В.Л. О латеральном разрешении интерференционного микроскопа // Измерительная техника - 2013 - №5.- С.16-19.
- 128 Левин Г.Г., Моисеев Н.Н., Илюшин Я.А., Минаев В.Л. Влияние фокусировки на латеральное разрешение интерференционного микроскопа // Измерительная техника - 2014 - №.1- С.45-48.

- 129 Totzeck M., Tiziani H.J. Interference microscopy of sub-lambda structures: A rigorous computation method and measurements. // Optics Communications – 1997 – V.136 – P.61-74.
- 130 Yee K. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media // IEEE Trans. Anten. Propagat. 1966.
 V. 14. P. 302–307. doi: 10.1109/TAP.1966.1138693.
- Taflove A., Brodwin M. Numerical solution of steady-state electromagnetic scattering problems using the time-dependent Maxwell's equations. // IEEE Trans. Microwave Theory Tech. 1975. V. 23. P. 623–630. doi: 10.1109/TMTT.1975.1128640.
- 132 Тычинский В. П.. Сверхразрешение и сингулярности в фазовых изображениях. // УФН. – 2008. – Том 178. С. 1205-1214.
- 133 Минаев В.Л., Лощилов К.Е. Влияние эффекта изменения фазы отраженной волны на измерения формы поверхности объектов // Измерительная техника.- 2010. - №7.- С.36 - 38.
- 134 Levin G., Vishnyakov G., Moiseev N., Minaev V. Influence of phase changes on reflection on surface measurements in optical profilometry // The IASTED International Conference on Automation, Control and Information Technology 2010. Vol. 1. P.279-281.
- 135 http://refractiveindex.info [Электрон. pecypc]
- 136 Левин Г. Г., Моисеев Н. Н. Сверхразрешающая оптическая микроскопия живых объектов. //Тезисы лекций и докладов 2-ой Международной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и медицина, стр. 39.
- 137 Attota R., Germer T., Silver R. Through-focus scanning-optical-microscope imaging method for nanoscale dimensional analysis // Optics Letters. 2008. Vol. 33. № 17. P. 1990 1992. doi: 10.1364/OL.33.001990.
- 138 Левин Г.Г., Моисеев Н.Н., Минаев В.Л. Сравнение латеральных разрешений оптического и интерференционного микроскопов // Измерительная техника - 2013 - №9.- С.48 – 50.

- 139 Тычинский В. П., Куфаль Г. Э., Вышенская Т. В., Переведенцева Е. В., Никандров С. Л. Измерения субмикронных структур на лазерном фазовом микроскопе «Эйрискан» // Квантовая электроника.- 1997.- 24.- .-№8. С. 754-758.
- 140 Минаев В.Л. Интерференционный микроскоп для измерения формы поверхности в микро и нанодиапазонах // Метрология - 2012 - №7 - С.19-24.
- 141 Levin G., Minaev V., Moiseev N. Definition of object near nanometer shifting by 2D optical path difference // The IASTED International Conference on Automation, Control and Information Technology. 2010. Vol. 1. P.282-286.
- 142
- 143 Корнышева С.В., Ломакин А.Г., Минаев В.Л. Измерение показателя преломления микрообъемов жидких веществ // Тезисы докладов. Научная сессия НИЯУ МИФИ-2011. Научно-техническая конференциясеминар по фотонике и информационной оптике.- М., 2011.- С. 26-27.
- 144 Р. Гонсалес, Р. Вудс. Цифровая обработка изображений // М.: Техносфера, 2006 - 1072 с.
- 145 Загубиженко М.В., Юсипович А.И., Пирутин С.К., Минаев В.Л., Кудряшов Ю.Б. Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для исследования состояния перитонеальных макрофагов мыши, облучённых уф(б) светом // Радиационная биология. Радиоэкология.- 2011.- Том. 51.-№6.- С. 715.
- 146 Минаев В.Л. Динамический интерференционный микроскоп для измерения параметров живых биообъектов // Метрология 2012 №8 С.24-27.
- 147 Минаев В.Л., Юсипович А.И. Использование автоматизированного интерференционного микроскопа в биологических исследованиях // Измерительная техника - 2012 - №7.- С.66–69.
- 148 Шиффман ФД. Патофизиология крови. Невский диалект ed. Санкт-Петербург: 2001.

- 149 Gedde MM, Yang E, Huestis WH. Shape response of human erythrocytes to altered cell pH. Blood 1995 Aug 15;86(4):1595-9.
- 150 Юсипович А.И., Брызгалова Н.Ю., Паршина Е.Ю., Ломакин А.Г., Родненков О.В., Левин Г.Г., et al. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2008; 3:357-60.
- 151 Митянина В.А., Паршина Е.Ю., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Селищева А.А. Исследование кислородсвязывающих свойств эритроцитов у детей с разными сроками заболевания сахарным диабетом 1-го типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Том 153. № 4: С. 499-503.
- 152 Браже Н.А., Байжуманов А.А., Паршина Е.Ю., Юсипович А.И., Ахалая М.Я., Ярлыкова Ю.В. Исследование состояния антиоксидантной системы крови и кислородтранспортных свойств эритроцитов человека в условиях 105-суточной изоляции // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2011.1(45):40-5.
- 153 Yusipovich A., Zagubizhenko M., Levin G., Platonova A., Parshina E., Grygorzcyk R. et al. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index // Journal of microscopy. 2011. Vol. 244. №3. doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x.
- 154 Rappaz B, Marquet P, Cuche E, Emery Y, Depeursinge C, Magistretti P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy // Optics Express. 2005. Vol. 13. № 23. P. 9361-9373. doi: 10.1364/OPEX.13.009361.
- 155 Costa M., Ghiran I., Peng C., Nicholson-Weller A., Goldberger A. Complex dynamics of human red blood cell flickering: alterations with in vivo aging // Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2008. doi: 10.1103/PhysRevE.78.020901.

- 156 Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaya T., Tikhonov A. Coherent phase microscopy in cell biology: visualization of metabolic states // Biochim Biophys Acta. 2005. doi: 10.1016/j.bbabio.2005.04.002.
- Brazhe A., Brazhe N., Rodionova N., Yusipovich A., Ignatyev P., Maksimov G. et al. Non-invasive study of nerve fibres using laser interference microscopy // Philos Transact A Math Phys Eng Sci 2008. doi: 10.1098/rsta.2008.0107.
- 158 Brazhe A., Brazhe N., Maksimov G., Ignatyev P., Rubin A., Mosekilde E. et al. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study // J Biomed Opt 2008. doi: 10.1117/1.2937213.
- Brazhe N., Brazhe A., Sosnovtseva O., Pavlov A., Erokhova L., Yusipovich A. et al. Unraveling cell processes: interference imaging weaved with data analysis // Journal of Biological Physics. 2006. doi: 10.1007/s10867-006-9012-1.
- 160 Sosnovtseva O., Pavlov A., Brazhe N., Brazhe A., Erokhova L., Maksimov G. et al. Interference microscopy under double-wavelet analysis: a new approach to studying cell dynamics // Phys Rev Lett .2005. doi: 10.1103/PhysRevLett.94.218103.
- 161 Antonini M., Barlaud M., Mathieu P., Daubechies I. Image coding using wavelet transform // IEEE Trans Image Process 1992;1(2):205-20.
- 162 Пятницкий А.М., Соколинский Б.З. Методика и применение автоматизированной эритроцитометрии. Литературный обзор// <u>http://mecos.ru</u>.
- 163 Введение в количественную цитохимию. Пер. с англ./Ред. В.Я. Бродский-М.: Мир, 1969.-439с.
- Bekker A.M., Levin G.G. Tomographic study of objects with reflecting surfaces // Proceeding of SPIE. 1991. Vol.1843. P.31-40. doi: 10.1117/12.131874.
- 165 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н. Способ оптической томографии трехмерных микрообъектов и микроскоп для его осуществления // Патент (Россия) №2145109 от 09.03.99.

- 166 <u>http://www.itam.nsc.ru/lab17/WIN/rw-pick.htm</u>
- 167 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Использование многоракурсного зеркального конденсора для интерференционного томографического микроскопа: Тез. докл. Девятая международная научно-техническая конференция «Оптические методы исследования потоков».-М., 2005.- С. 124.
- 168 Vishnyakov G., Levin G., Minaev V. Tomographic microscope with wideangle illumination // International Conference «Focus on Microscopy». 2007. P.296.
- 169 Medicki H., Tejnil E., Goldberg K., Bokor J. Phase-shifting point diffraction interferometer// Optics letters. 1996. Vol.21. №19. P.1526-1528. doi: 10.1364/OL.21.001526.
- 170 Pawley J. Handbook of Biological Confocal Microscopy // Edited by Plenum Press.- New York and London.- 1990.
- 171 Минаев В.Л. Конфокальный микроскоп для интерференционной томографии фазовых объектов: Тез. докл. Научная сессия МИФИ - 2003.-М., 2003.- С. 210-211.
- 172 Ландсберг Г.С. Оптика// М.- «Наука».-1976.-928 с.
- 173 Минаев В.Л. Улучшение качества интерференционных томографических проекций: Тез. докл. Девятая международная научно-техническая конференция «Оптические методы исследования потоков».-М., 2005.- С. 498.
- 174 Vishnyakov G., Levin G., Minaev V., Latushko M., Nekrasov N., Pickalov V.
 Differential interference contrast tomography // Optics Letters. 2016. Vol. 41.
 №13. P. 3037-3040. doi: 10.1364/OL.41.003037.
- 175 Herman G. Image reconstruction from projections: the fundamentals of computerized tomography (Academic Press, 1980).
- 176 Lue N., Choi W., Popescu G., Ikeda T., Dasari R., Badizadegan K., Feld M. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy //

Applied Optics. 2007. Vol. 46, № 10. P. 1836-1842. doi: 10.1364/AO.46.001836.

- 177 Kim M., Choi Y., Fang-Yen C., Sung Y., Kim K., Dasari R., Feld M., Choi W. Three-dimensional differential interference contrast microscopy using synthetic aperture imaging // BIOMEDO. 2012. Vol. 17. № 2. P. 0260031-0260037. doi: 10.1117/1.JBO.17.2.026003.
- 178 Lim J., Lee K., H. Jin K., Shin S., Lee S., Park Y., Ye J. C. Comparative study of iterative reconstruction algorithms for missing cone problems in optical diffraction tomography // Optics Express. 2015. Vol. 23. №13. pp. 16933-16948.
- 179 Su L., Ma L., Wang H. Improved regularization reconstruction from sparse angle data in optical diffraction tomography // Applied Optics. 2015. Vol. 54. Nº 4. P. 859-868.
- 180 Gerchberg R. Super-resolution through Error Energy Reduction // Optica Acta: International Journal of Optics. 1974. Vol. 21. № 9. P. 709-720.
- 181 Papoulis A. A new algorithm in spectral analysis and band-limited extrapolation // Circuits and Systems, IEEE Transactions on. 1975. Vol. 22. № 9. P. 735-742.
- 182 Vishnyakov G.N., Gilman G.A., Levin G.G. Tomogram reconstruction at restricted projection quantity. Iterative methods // Optics and Spectroscopy. 1985. Vol. 58 № 2. P. 406-413.
- 183 Cong W., Momose A., Wang G. Fourier transform-based iterative method for differential phase-contrast computed tomography // Optics Letters. 2012. Vol. 37. № 11. P. 1784-1786.
- 184 Sperl J., Bequé D., Kudielka G., Mahdi K., Edic P., Cozzini C. A Fourierdomain algorithm for total-variation regularized phase retrieval in differential X-ray phase contrast imaging // Optics Express. 2014. Vol. 22. № 1. P. 450-462.

- 185 Levin G., Vishnyakov G., Minaev V. LED interference microscope for living cells tomography // «Focus on Microscopy 2015 Göttingen, Germany March 29 - April 1, 2015». 2015, P. 388.
- 186 Levin G., Vishnyakov G., Minaev V., Latushko M., Pickalov V., Belyakov V., Sukhenko V., Demyanenko A. Shearing interference microscopy for tomography of living cells // Proceeding of SPIE. Advanced Microscopy Techniques IV and Neurophotonics II 95360G. 2015. Vol. 9536. doi: 10.1117/12.2183717.
- 187 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Сдвиговая интерференционная микроскопия и микротомография с излучением от точечного светодиода // Сборник трудов 12-й международной научно-технической конференции «Голография. Наука и практика». - С.121-124.
- 188 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Латушко М.И., Бочкарева С.С., Пикалов В.В., Максимов Г.В. Новые аспекты исследования живых клеток методом оптической микротомографии // V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ 4-10 октября 2015 г.Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет Тезисы докладов, Южный федеральный университет. – 2015. - С. 32.
- 189 Kazantsev I., Pickalov V. On the accuracy of line-, strip- and fan-based algebraic reconstruction from few projections // Signal Processing. 1999. Vol. 78. № 1. P. 117-126.
- 190 Likhachov A., Pickalov V. Frequency filtration in algebraic algorithms for three-dimensional tomography // Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing. 1995. № 4, P. 80-86.
- 191 Sato T., Norton S., Linzer M., Ikeda O., Hirama M. Tomographic image reconstruction from limited projections using iterative revisions in image and transform spaces // Applied Optisc. 1981. Vol. 20. № 3. P. 395-399.
- 192 Likhachov A., Pickalov V. Three-dimensional tomography with finite aperture beams // Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. (A). 1998. Vol. 405. № 2-3. P. 506-510.

- 193 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л. Томографическая интерференционная микроскопия живых клеток: Тез. докл. Научнопрактическая конференция «Голография в России и за рубежом. Наука и практика». –М., 2004.- С. 70.
- 194 Levin G.G, Vishnyakov G.N., Minaev V.L. Tomographic interference microscopy of living cells // International Conference and Exhibition MicroScience-2004.- 2004 - P.26.
- 195 Zeng G. Image reconstruction via the finite Hilbert transform of the derivative of the backprojection // Medical Physics. 2007. Vol. 34. № 7. P. 2837 - 2843. doi: 10.1118/1.2739813.
- 196 Faridani A., Ritman E., Smith K. Local Tomography // SIAM. J. Appl. Math.
 1992. V. 52. № 2. P. 459-484. doi: 10.1137/0152026.
- 197 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Локальная томографическая фазовая микроскопия по дифференциальным проекциям // Оптика и спектроскопия. – 2016.- том.121 - № 6. - С.1020-1028. doi: 10.7868/S0030403416120278.
- 198 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Ермаков М.М. Исследование метода локальной оптической томографии по дифференциальным проекциям // Оптика и спектроскопия. [в печати].
- 199 Гельфанд И.М., Граев М.И. Функция Крофтона и формулы обращения в вещественной интегральной геометрии // Функциональный анализ и его приложения. 1991. Т. 25. № 1. С. 1 - 6.
- 200 Noo F., Clackdoyle R., Park J. A two-step hilbert transform. method for 2D image reconstruction // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 3903-3923.
- 201 Вайнберг Э.И., Казак И.А., Курозаев В.П. Восстановление внутренней пространственной структуры объектов по интегральным проекциям в реаль ном масштабе времени // ДАН СССР. - 1981. - Т. 257. -№ 1. С. 89-94.

- 202 Anastasio M.A., Pan X. Region-of-interest imaging in differential phasecontrast tomography // Optics Letters. 2007. Vol. 32. № 21. P. 3167 - 3169. doi: 10.1364/OL.32.003167.
- 203 Pfeiffer F. et al Region-of-interest tomography for grating-based X-ray differential phase-contrast imaging // Phys. Rev. Letters. 2008. V. 101. № 16.
 P. 168101(4). doi: 10.1103/PhysRevLett.101.168101.
- 204 Sunaguchi N., Yuasa T., Gupta R., Ando M. An efficient reconstruction algorithm for differential phase-contrast tomographic images from a limited number of views // Appl. Phys. Letters. 2015. V. 107. № 25. P. 253701. doi: 10.1063/1.4938211.
- 205 Ramm A.G., Katsevich A.I. The radon transform and local tomography. CRC Press, 1996.
- 206 Минаев В.Л. Автоматизированный интерференционный микроскоп Линника: Тез. докл. Пятнадцатая научно-техническая конференция «Фотометрия и ее метрологическое обеспечение». –М., 2005.- С. 100.
- 207 Минаев В.Л., Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Автоматизированный интерференционный микроскоп: Тез. докл. Научно-практическая конференция «Голография в России и за рубежом. Наука и практика». – М., 2005.- С. 71.
- 208 ISO 16610-21:2011 Геометрические характеристики изделий (GPS). Фильтрация. Часть 21. Линейные профильные фильтры: Фильтры Гаусса.
- 209 ISO 4288:1996 Геометрические характеристики изделий (GPS). Структура поверхности. Профильный метод. Определение и параметры структуры.
- 210 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Цельмина И.Ю. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Экспериментальные исследования// Оптика и спектроскопия. – 2014.- Том116. - № 1- С.170. doi: 10.7868/S003040341401022X.

- 211 Сысоев Е.В., Выхристюк И.А., Куликов Р.В., Поташников А.К., Разум В.А., Степнов Л.М. Интерференционный микроскоп-профилометр // Автометрия. 2010. 46, №2. С.119-128.
- 212 Вишняков Г.Н., Золотаревский Ю.М., Минаев В.Л., Моисеев Н.Н., Латышев А.В., Щеглов Д.В. Измерение профиля наноструктуры из моноатомных слоев кремния на интерференционном микроскопе МИА-1М // Первая Всероссийская научно-техническая конференция «Метрология в нанотехнологиях». 2014. М.: ФГУП «ВНИИОФИ», 2014, с. 41.
- 213 Минаев В.Л., Левин Г.Г., Латышев А.В., Щеглов Д. В. Измерения профиля поверхности моноатомной многослойной наноструктуры кремния интерференционным методом // Измерительная техника – 2017.-№ 11- С.12-14.
- 214 Hemmert W., Mermelstein M.S., Freeman D.M. Nanometer resolution of three-dimensional motions using video interference microscopy // Research Laboratory of Electronics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA – 1999 – P.302.
- 215 Левин Г.Г., Ломакин А.Г., Илюшин Я.А., Куницын В.Е. Применение техники апертурного синтеза в оптической интерференционной микроскопии // Оптика и спектроскопия – 2009 – Т.107 – №2 – С.338.
- 216 Tian Q., Huhns M.N. Algorithms for Subpixel Registration // Computer Vision, Graphics and Image Processing 1986 V.35 P.20-233.
- 217 Serio B., Hunsinger J.J., Cretin B. In-plane measurements of microelectromechanical systems vibrations with nanometer resolution using the correlation of synchronous images // Rev. Sci. Instrum – 2004 – V.75 – P.3335.
- 218 Sandoz P., Friedt J.-M., Carry M. In-plane rigid-body vibration mode characterization with a nanometer resolution by stroboscopic imaging of a microstructured pattern // Rev. Scient. Instr. – 2007 – V.78 – P.23706.

- 219 Canny J.A. Computational approach to edge detection // IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intell – 1986 – V.8 – N.6 – P.679.
- 220 Koplowitz J., Greco V. On the edge location error for local maximum and zerocrossing edge detectors // IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intell – 1994 – V.16 – N.12 – P.1207.
- 221 Левин Г.Г., Минаев В.Л., Моисеев Н.Н., Илюшин Я.А. Определение наноперемещений объекта по оптическому фазовому изображению: Тез. докл. научно-технологических секций Международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech'08, том 1. – М., 2008.-С.197-199.
- 222 Cracknell A.P., Paithoonwattanakij K. Pixel and sub-pixel accuracy in geometrical correction of AVHRR imagery // Int. J. Remote Sensing – 1989 – V.10 – N.4-5 – P.661.
- 223 Efrat A., Gotsman C. Subpixel image registration using circular fiducials // Int.
 J. Comput. Geom. Applicat 1994 V.4 N.4 P.403.
- 224 Левин Г.Г., Минаев В.Л., Илюшин Я.А., Ошлаков В.Г. Калибровка матричных фотоприемников и прецизионное позиционирование объектов по растровым изображениям // Измерительная техника – 2017.-№ 6- С.37-41.
- 225 Kim S. P., Su W.Y. Subpixel accuracy image registration by spectrum cancellation // Proc. ICASSP'93 1993 V.5 P.153.
- 226 Вишняков Г., Левин Г., Минаев В. Аппаратура ВНИИОФИ для интерференционных измерений // Сборник трудов 14-ой международной научно-технической конференции «Голография. Наука и практика».-2017. С.26-31.
- 227 Вишняков Г., Левин Г., Минаев В. Автоматизированные интерференционные приборы ВНИИОФИ // Автометрия. – 2017. – Том 53. – №5, С.131 – 138. doi: 10.15372/AUT20170513.
- 228 Описание типа микроскопа МИА-1М (№ 48171-11).
- 229 Ломакин А.Г., Минаев В.Л. Измерение интегральных и локальных параметров зеркальных и фазовых объектов на автоматизированном

интерференционном микроскопе Линника // Метрология (Ежемесячное приложение к ж-лу «Измерительная техника»).- 2005. - №11.- С.30.

- 230 Левин Г. Г., Минаев В. Л., Моисеев Н. Н., Золотаревский С.Ю. Применение оптических интерферометров в эталонном комплексе по определению шероховатости поверхности // Сборник тезисов докладов научно-технологических секций международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech'09. М. -2009.
- 231 Свидетельство о госрегистрации программы для ЭВМ № 2012619707 «WinPhastDinamic», Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Ломакин А.Г., Приоритет изобретения 05 сентября 2012 г., зарегистрировано в Гос. Реестре РФ 26 октября 2012 г.
- 232 Минаев В.Л., Мищенко С.Я. Исследование частотной характеристики пьезокорректора // Тез. докл. Восемнадцатая научно-техническая конференция «Фотометрия и ее метрологическое обеспечение». –М., 2009.- С. 143.
- 233 Описание типа микроскопа МИА-Д (№ 48172-11).
- 234 Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л., Ломакин А.Г. Динамический интерферометр // Патент на полезную модель (Россия) № 96234 от 17.02.2010, Бюл. № 20.
- 235 Вишняков Г.Н., Левин Г.Г., Минаев В.Л., Юсипович А.И. Динамическая фазовая микроскопия живых клеток // Тез. докл. «Цитоморфометрия-2010». –М., 2010.- С. 10-12.
- 236 Минаев В.Л. Вишняков Г.Н. Левин Г.Г. Интерференционный микроскоп с низкокогерентным источником и супергладким опорным зеркалом // Приборы и техника эксперимента - 2018 - №6. - С. 79-84.
- 237 Минаев В.Л., Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Интерференционный микроскоп Линника с супергладким опорным зеркалом // Сборник трудов 13-ой международной научно-технической конференции «Голография. Наука и практика».- 2016.- С.374-377.

- 238 Щеглов Д.В., Косолобов С.С., Федина Л.И., Родякина Е.Е., Гутаковский А.К., Ситников С.В., Кожухов А.С., Загарских С.А., Копытов В.В., Евграфов В.И., Шувалов Г.В., Матвейчук В.Ф., Латышев А.В. Высокоточные меры линейных размеров в нанодиапазоне // Российские нанотехнологии. -2013. - Т.8. - № 7-8. – С. 84-94.
- 239 Левин Г.Г., Минаев В.Л., Миньков К.Н., Ермаков М.М., Самойленко А.А. Исследование внутренней структуры микрорезонаторов методом оптической томографии// Оптика и спектроскопия. [в печати].
- 240 Левин Г.Г., Минаев В.Л., Миньков К.Н., Ермаков М.М. Исследование твердых прозрачных объектов методом оптической томографии // Сборник трудов 15-ой международной научно-технической конференции «Голография. Наука и практика». - 2018. С. 27-28.
- 241 Миньков К.Н., Минаев В.Л., Левин Г.Г. Исследование внутренних неоднородностей показателя преломления оптического диэлектрического резонатора с модами шепчущей галереи методом оптической томографии // Труды школы-семинара «Волны-2018». Спектроскопия и томография. С.46-47.