

УДК 535.411.854

ПОВЫШЕНИЕ РАЗРЕШЕНИЯ В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ С ПОМОЩЬЮ СУБПИКСЕЛЬНЫХ СДВИГОВ

© В. И. Гужов, С. П. Ильиных, Е. В. Андрющенко, Д. С. Хайдуков

*Новосибирский государственный технический университет,
630073, г. Новосибирск, просп. К. Маркса, 20
E-mail: vigguzhov@gmail.com*

В статье рассматривается новый метод повышения разрешения в оптической микроскопии методом пространственных субпиксельных сдвигов, т. е. сдвигов на некоторую величину, меньшую, чем разрешение, обеспечиваемое объективом.

Разрешение оптических микроскопов определяется типом используемых объективов. Профессиональные микроскопы имеют набор микрообъективов с различным увеличением, которые монтируются на турели, содержащие несколько объективов. Иногда целесообразнее вместо набора микрообъективов использовать один объектив, если есть возможность обеспечить субпиксельные сдвиги.

Повышение пространственного разрешения осуществляется с помощью аналитического выражения для спектра сгенерированных изображений. При этом спектр функции дополняется множителем, вид которого зависит от вида апертуры объектива. Для определения высокоразрешающих элементов необходимо разделить Фурье-спектр изображения, полученного из нескольких сдвинутых на субпиксельную величину изображений, на множитель, зависящий от выбранной апертуры. Этот множитель называется апертурной функцией. Апертурная функция определяется типом используемого объектива и может являться его паспортной величиной.

В статье показан экспериментальный способ калибровки объектива (получение его апертурной функции) с низким разрешением ($8\times$) на основе изображений, полученных с помощью объективов с большим разрешением ($40\times$). Определив апертурную функцию, можно использовать один объектив с небольшим разрешением для получения изображений с любым разрешением менее разрешения выбранного объектива с большим разрешением ($40\times$).

Ключевые слова: сверхразрешение, субпиксельный сдвиг, голография, преобразование Фурье, синтезированная апертура, дискретизация.

DOI: 10.15372/AUT20240112

EDN: EZIJVG

Введение. Общая постановка задачи повышения пространственного разрешения оптической системы (например, фотоматрицы) с помощью субпиксельного сдвига (на величину меньшего сдвига, чем пространственное разрешение системы) описана в [1]. На рис. 1 показана схема регистрации одномерного сигнала при его сканировании с помощью некоторой апертуры, имеющей конечный размер. Если в результате измерений можно получить наборы значений $\{x\}$, усреднённых на апертуре $\{I\}$ с низким разрешением (низкоразрешающие элементы), сдвинутых относительно друг друга на некоторую величину, меньшую размера интегрирующей апертуры, то можно восстановить $\{x\}$ (высокоразрешающие элементы) с разрешением, равным величине сдвига [2–5]. В нашем случае под разрешением понимается общее число субпикселей, на которые могут быть разделены пиксели строки фотоматрицы.

Необходимо по элементам $\{x\}$, усреднённым на некоторой апертуре $\{I_j\}$, $j \in [1, \dots, L]$, восстановить высокоразрешающие элементы $\{x_i\}$, $i \in [1, \dots, L \times N]$. Здесь L — число высокоразрешающих элементов $\{x\}$ в одной апертуре, а N — число апертур (ячеек) в строке фотоматрицы.

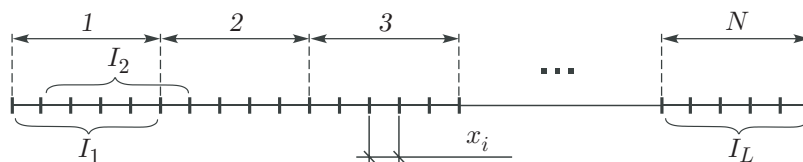


Рис. 1. Схема регистрации сигнала, усреднённого с помощью апертур, при субпиксельном сдвиге по одной строке [1]

В [6, 16] показано, что в области Фурье выражение для функции, которая состоит из элементов, усреднённых на некоторой апертуре $\{I_i\}$, примет следующий вид:

$$F_{\tau, \Delta x}(\omega) = \left(\left[F(\omega) \otimes \text{sinc} \left(\frac{\omega N}{2} \right) \right] \mathfrak{S}(\text{rect}_{\tau}(x)) \right) \otimes \text{comb}_{2\pi/\Delta x}(\omega), \quad (1)$$

где $F(\omega) \otimes \text{sinc}(\omega N/2) = \mathfrak{S}(f(x)) \otimes \text{sinc}(\omega N/2)$ — дискретный Фурье-образ функции, состоящей из $\{I_i\}$; $\mathfrak{S}(\text{rect}_{\tau}(x))$ — Фурье-образ используемой апертуры (апертурная функция); \otimes — обозначение операции свёртки; $\text{comb}_{2\pi/\Delta x}(\omega)$ — гребёнка Дирака, которая определяется как последовательность дельта-функций с шагом Δx ; ω — пространственная частота; N — число дельта-функций в гребёнке Дирака.

Из выражения (1) видно, что если Фурье-образ изображения из $\{I_i\}$ разделить на $\mathfrak{S}(\text{rect}_{\tau}(\omega))$, то получим Фурье-образ исходного изображения, состоящего из $\{x_i\}$.

Целью представленной работы является экспериментальное определение апертурной функции для реальных систем оптической микроскопии и восстановление изображений объективами, имеющими недостаточное разрешение, с таким же качеством, как и при использовании объективов с большим разрешением с помощью метода субпиксельных сдвигов.

Разработка модифицированного оптического микроскопа с возможностью внесения субпиксельного сдвига. Недостатком систем оптической микроскопии является фундаментальное ограничение на пространственное разрешение регистрируемых изображений. Это разрешение определяется критерием Рэлея:

$$R = 0,61 \frac{\lambda}{NA^{obj}}, \quad (2)$$

где NA^{obj} — числовая апертура, которая зависит от конструкции микрообъектива; λ — длина волны источника освещения. На практике при длине волны порядка 500 нм пространственное разрешение оптических микроскопов не превышает 200 нм [7, 8].

Если существует возможность перемещать изображение в объектной области микроскопа на величину, меньшую разрешения оптической системы, то по серии изображений, оцифрованных с низким разрешением, можно восстановить изображения с повышенным разрешением. Для этого была проведена модификация металлографического агрегатного микроскопа МЕТАМ-Р1 [9].

В качестве предметного столика использован плоскопараллельный сканирующий пьезосталик Ratis XYZ_H [10]. Использование этого столика позволило обеспечить диапазон перемещения в области XY 100 мм с минимальным шагом перемещения 1 нм. Для дискретизации изображений использовалась серийная цифровая беззеркальная камера Canon EOS M50 с CMOS-матрицей APS-C разрешением 24,1 мегапикселя (6000×4000 пикселей). Матрица имеет размер $22,3 \times 14,9$ мм, а размер пикселя в матрице составляет 3,7 мкм. Фотоаппарат подключается к компьютеру через USB-кабель.

Внешний вид модифицированного микроскопа показан на рис. 2.

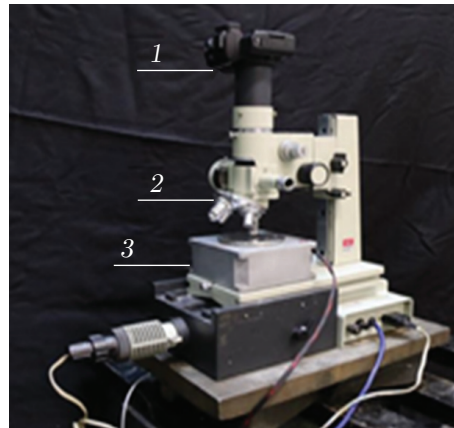


Рис. 2. Модифицированный микроскоп: 1 — цифровая камера, 2 — оптический микроскоп с набором микрообъективов, 3 — автоматизированный предметный столик

Таблица 1

Разрешение системы при использовании объективов ЛОМО с различным увеличением

Увеличение объектива	Разрешение объектива, мкм	Размер поля зрения на матрице фотокамеры, мм	Апертура, отн. ед.
8×	1,83	2,42	0,17
20×	0,92	1,08	0,34
40×	0,49	0,54	0,64

На микрообъективе всегда указывается коэффициент увеличения и числовая апертура. Размер числовой апертуры зависит от конструкции объектива. Зная числовую апертуру объективов, можно определить разрешение системы (табл. 1).

Экспериментальное определение апертурной функции. Для определения апертурной функции нужны тестовые изображения, в качестве которых использовались голограммы, полученные при различных углах α между объектным и опорным пучками. Голограммы были получены по схеме, предложенной Лейтом и Упатниексом [11–14].

Согласно теореме Котельникова, для корректного восстановления изображений из голограммы необходимо взять как минимум два отсчёта на полосу. Расстояние между смежными полосами при интерференции двух плоских пучков равно [15]

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2 \sin(\alpha/2)}. \quad (3)$$

Для демонстрации возможностей была получена голограмма с углом 30° между интерферирующими пучками (табл. 2). Использовался интерферометр с лазерным модулем DSL6505-0921 с длиной волны 510 ± 5 нм. Из табл. 2 следует, что выбранный угол между интерферирующими пучками удовлетворяет условию теоремы Котельникова.

На рис. 3 показана оцифрованная голограмма, полученная при угле между интерферирующими пучками 30° , и восстановленные из неё изображения, полученные с оцифрованной голограммы при использовании объектива 40×. Голограмма фиксировалась в области Фраунгофера, поэтому восстановление изображений производилось с помощью преобразования Фурье.

Из рис. 3 следует, что разрешение объектива 40× ($R = 0,488$ мкм) достаточно для восстановления голограммы с углом между интерферирующими пучками 30° .

Таблица 2

Необходимое разрешение для ввода голограммы

Угол между интерферирующими пучками	Расстояние между полосами, мкм	Необходимое разрешение, мкм
30°	0,98	0,49

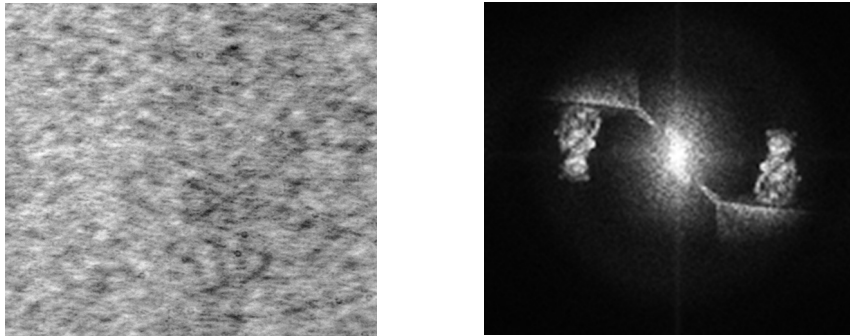


Рис. 3. Голограмма и восстановленные изображения при её оцифровке с объективом 40×

Теперь апертурную функцию $\mathfrak{F}(\text{rect}_\tau(x))$ можно получить в результате поэлементного деления спектра восстановленного изображения при увеличении 8× на спектр изображения при увеличении 40×. Обоснованием такого подхода может служить тот факт, что при регистрации голограммы одного и того же объекта с использованием объективов с различным увеличением спектры зарегистрированных голограмм различаются только видом спектра апертурной функции объектива (см. выражение (1)). Тогда в результате деления спектров вследствие линейности преобразования Фурье получим корректирующую апертурную функцию (рис. 4), которая преобразует апертурную функцию объектива 8× в апертурную функцию объектива 40×.

Восстановление голограмм при оцифровке с объективом, имеющим недостаточное разрешение. На рис. 5 показан процесс синтеза изображения с высоким разрешением из изображений с низким разрешением, полученных при различных субпиксельных сдвигах [16, 17]. Слева на рис. 5 расположены четыре оцифрованных изображения голограммы с низким разрешением, полученных с пространственными сдвигами: слева направо и сверху вниз 0, dx , dy , и dx и dy соответственно. В центре — схема образования синтезированного изображения голограммы. Справа — изображение голограммы с большим разрешением.

При синтезе голограмм с увеличением объектива в 8 раз (8×) использовался субпиксельный сдвиг (dx) величиной 900 нм, для 20× — 460 нм. После поэлементного деления спектров сгенерированных голограмм на спектр апертурной функции (см. рис. 4) получим восстановленные изображения (рис. 6).

На рис. 6, *a—c* показаны результаты восстановления цифровых голограмм, зарегистрированных объективами 8×, 20× и 40×, из которых следует, что удаётся удовлетворительно восстановить изображение только из голограммы, оцифрованной объективом 40×. На рис. 6, *d—f* приведены восстановленные изображения после поэлементного деления спектра сгенерированных голограмм, полученных с объективами 8× и 20×, на спектр апертурной функции (см. рис. 4). Видно, что качество восстановленных изображений сопо-

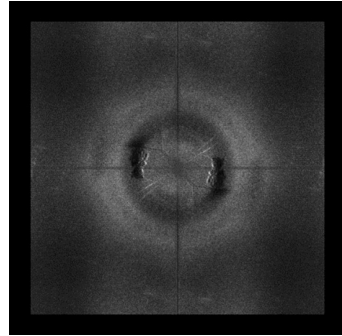


Рис. 4. Амплитуда корректирующей апертурной функции

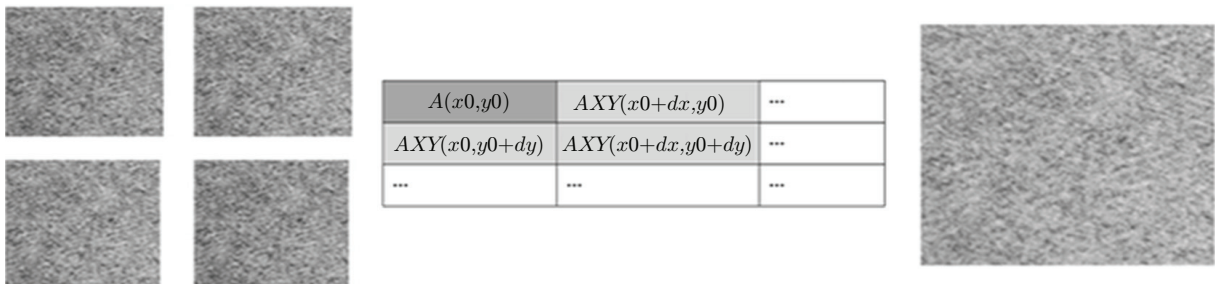


Рис. 5. Синтез цифровой голограммы при субпиксельных сдвигах

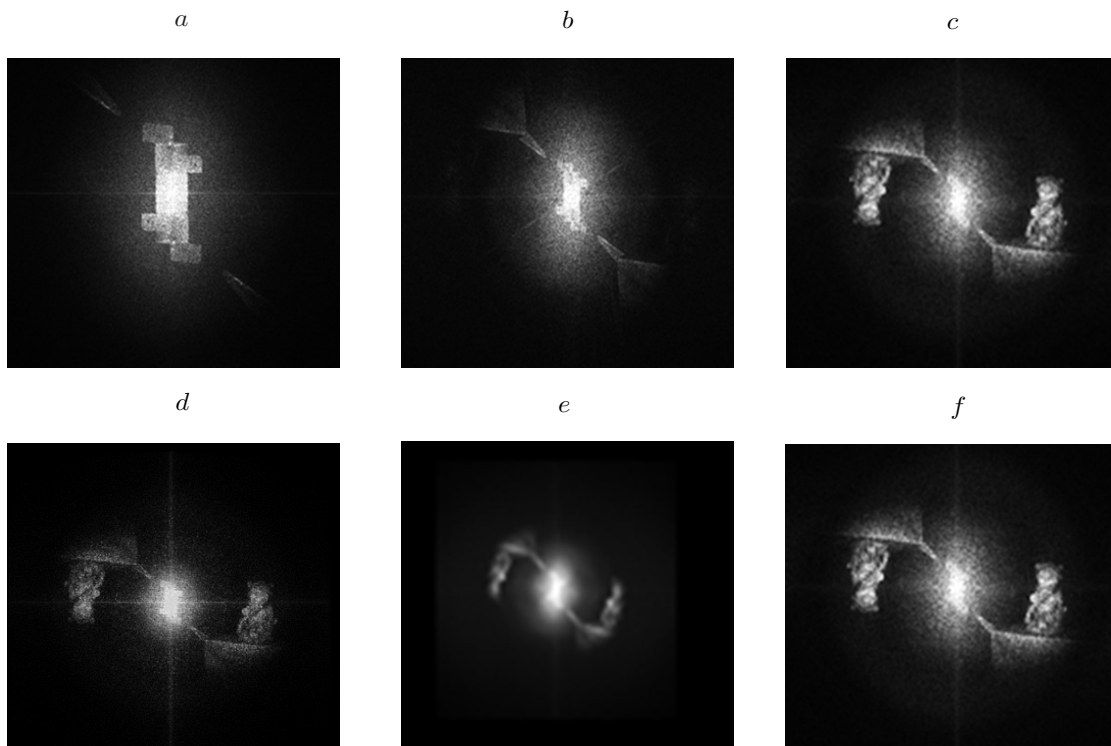


Рис. 6. Восстановленная часть изображения из голограмм, полученная из четырёх голограмм при субпиксельных сдвигах с углом между интерферирующими пучками 30° , зарегистрированных объективами $8\times$, $20\times$ и $40\times$: без сдвигов ($a—c$) и при субпиксельных сдвигах ($d—f$)

ставимо с качеством изображения, зарегистрированного объективом $40\times$. Таким образом, показано, что использование объектива с меньшим разрешением позволяет качественно получить такие же результаты, как и при использовании объективов, имеющих большее разрешение, в случае если апертурная функция определена верно. Для точной калибровки необходимо более точное получение апертурной функции.

Заключение. В статье рассмотрена задача повышения пространственного разрешения оптических микроскопов с помощью устройства субпиксельного сдвига. Показано, что за счёт предлагаемого подхода использование объективов с малым пространственным разрешением ($8\times$) может дать такие же результаты, как и применение объективов с большим увеличением ($20\times$ или $40\times$). Это позволяет изменять пространственное разрешение оптического микроскопа без необходимости смены объективов.

Исходя из полученных результатов, считаем целесообразным введение описания апертурной функции в паспорт объектива. Это позволит создавать системы оптической микроскопии с одним объективом с разрешением, не уступающим более сложным и дорогим объективам.

Некоторым недостатком можно считать необходимость введения добавочного устройства для внесения субпиксельного пространственного сдвига. Однако объективы с меньшим увеличением обладают большим полем зрения, чем объективы с большим увеличением. Отметим, что объективы с большим увеличением имеют более сложную конструкцию и, соответственно, более дорогостоящие. Кроме того, возможность избавиться от необходимости иметь набор объективов с различным увеличением позволит создавать более простые устройства оптической микроскопии.

Финансирование. Работа проводилась при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-29-00006 «Разработка методов цифровой голографической интерферометрии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Васьков С. Т., Ефимов В. М., Резник А. Л.** Быстрая цифровая реконструкция сигналов и изображений по критерию минимума энергии // *Автометрия*. 2003. **39**, № 4. С. 13–20.
2. **Paturzo M., Merola F., Grilli S. et al.** Super-resolution in digital holography by a two-dimensional dynamic phase grating // *Opt. Express*. 2008. **16**, Iss. 2. P. 17107–17118.
3. **Claus D.** High resolution digital holographic synthetic aperture applied to deformation measurement and extended depth of field method // *Appl. Opt.* 2010. **49**, N 16. P. 3187–3198.
4. **Tipple A. E., Kumar A., Fienup J. R.** High-resolution synthetic-aperture digital holography with digital phase and pupil correction // *Opt. Express*. 2011. **19**, Iss. 13. P. 12027–12038.
5. **Блажевич С. В., Селютин Е. С.** Повышение разрешения цифрового изображения с использованием субпиксельного сканирования // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Математика. Физика*. 2014. **176**, № 5, вып. 34. С. 186–190.
6. **Гужов В. И., Марченко И. О., Трубилина Е. Е., Трубилин А. А.** Дискретизация сигналов с помощью конечного набора апертур // *Омский науч. вестн.* 2021. **1**, № 175. С. 55–58. DOI: 10.25206/1813-8225-2021-175-55-58.
7. **Виноградова Г. Н., Захаров В. В.** Основы микроскопии. Ч. 1. СПб.-б.: Университет ИТМО, 2018. 133 с.
8. **Виноградова Г. Н., Захаров В. В.** Основы микроскопии. Ч. 2. СПб.-б.: Университет ИТМО, 2020. 248 с.
9. **Микроскоп** металлографический агрегатный METAM-P1. URL: <https://scopica.ru/proj/mikroskop-metallograficheskiiy-agregatnyi-metam-r1> (дата обращения: 24.07.2023).
10. **Ratis XYZ_H** — трёхкоординатный плоскопараллельный сканер. URL: <http://www.nanoscantech.com/ru/products/stage/stage-100.html> (дата обращения: 24.07.2023).

11. **Leith E. N., Upatnieks J.** Reconstructed wavefronts and communication theory // JOSA. 1962. **52**, N 10. P. 1123–1130.
12. **Кольер Р., Беркхарт К., Лин Л.** Оптическая голография. М: Мир, 1973. 686 с.
13. **Априль Ж., Арсено А., Баласубраманьян Н. и др.** Оптическая голография / Под ред. Колфилда Г. М.: Мир, 1982. 735 с.
14. **Милер М.** Голография. Л.: Машиностроение, 1979. 140 с.
15. **Гужов В. И.** Компьютерная голография. Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2018. 270 с.
16. **Гужов В. И., Ильиных С. П., Захаров К. В., Майер О. Ю.** Восстановление изображений из серии голограмм, зарегистрированных с низким разрешением с помощью нового уравнения дискретизации // Автометрия. 2022. **58**, № 4. С. 125–139. DOI: 10.15372/AUT20220413.
17. **Гужов В. И., Марченко И. О., Трубилина Е. Е.** Повышение пространственного разрешения сигналов в оптических системах // Компьютерная оптика. 2022. **46**, № 1. С. 65–70. DOI: 10.18287/2412-6179-CO-924.

Поступила в редакцию 24.07.2023

После доработки 18.08.2023

Принята к публикации 28.08.2023
