

5.5.1. Когерентная обработка

При описании двухступенчатого процесса формирования когерентного оптического изображения было показано, что качество изображения определяется информацией, получаемой от объекта. В частности, оно зависит от того, насколько верно составляющий его спектр пространственных частот воспроизводит спектр объекта. Мы также видели, что спектр пространственных частот доступен в плоскости дифракции. Рис. 1 представляет пример, иллюстрирующий ухудшение качества изображения при удалении высоких частот, которое осуществлялось путём простого размещения в плоскости дифракции апертуры (фильтра низких частот), ограничивающей вклад в изображение частот выше определенного значения.

Это был самый простой пример когерентной пространственной фильтрации, который теперь необходимо рассмотреть в более общем плане, поскольку имеются другие типы и методы фильтрации в частотной области, диапазон применимости которой чрезвычайно широк.

Основная схема воспроизводится в упрощённом виде на рис. 2. Объект представлен в виде транспаранта, который передаёт комплексную амплитуду $f(x)$; для упрощения математических выкладок взято только одно измерение. Транспарант освещается падающим на него перпендикулярно светом, например от системы лазер-расширитель пучка, создающей когерентное освещение плоской волной. На дифракционной плоскости мы имеем преобразование Фурье от транспаранта

$$F(u) = \int f(x) \exp(-2\pi i u x) dx. \quad (1)$$

Изображение формируется как очередная стадия преобразования Фурье.

Одним из вариантов пространственной фильтрации изображения в дифракционной плоскости и примере (рис. 1), приведённом в начале этого раздела, является амплитудная фильтрация (в частности, заграждающий фильтр, именуемый так оттого, что он либо полностью пропускает, либо блокирует любую данную частоту).

Применяется также комплексная фильтрация, т. е. фильтрация по фазе или по комбинации амплитуды и фазы.

Таким образом, оптическая фильтрация является особой формой оптической обработки, при которой пространственное фурье-преобразование объекта обеспечивает заранее определённое воздействие на изображение. Основы этого метода были заложены в теории формирования изображения, разработанной Аббе.

Приведённые ниже примеры трёх типов фильтрации помогут получить представление относительно диапазона их применения.

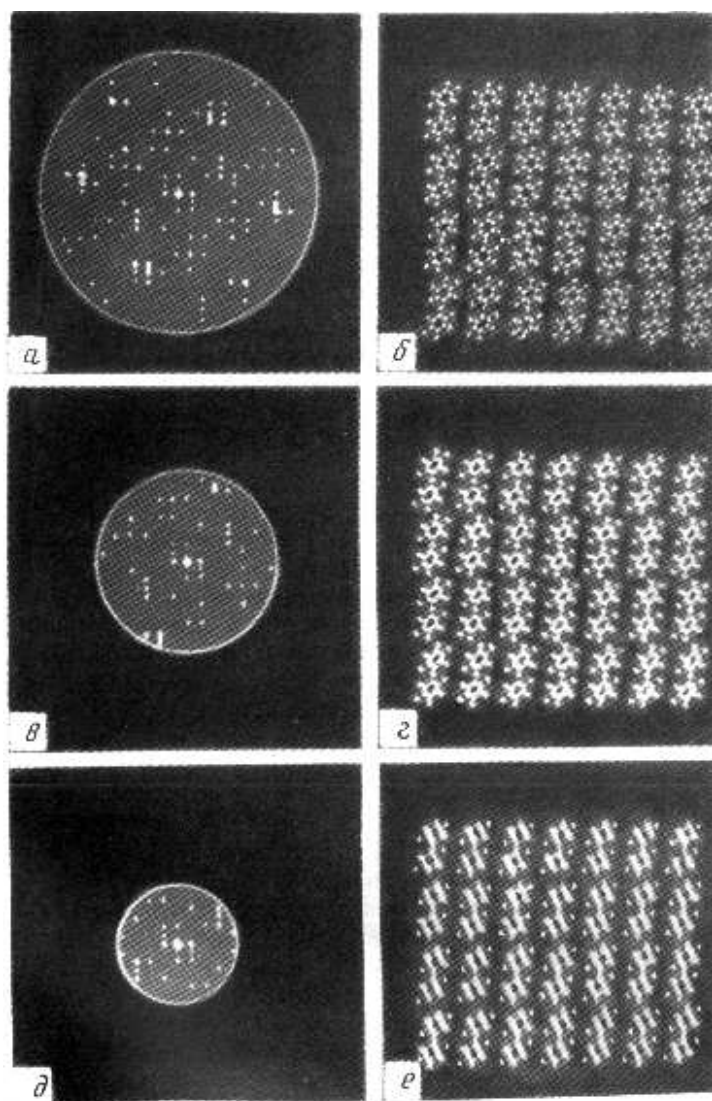


Рис. 1

1) Амплитудные фильтры

Ценным применением фильтрации этого типа стал разработанный в 1964 г. А. Клюгом и Дж.Е. Бергером анализ электронных микрофотографий больших биологических молекул на основе оптической дифракции с использованием электронной микрофотографии в качестве дифракционной маски.

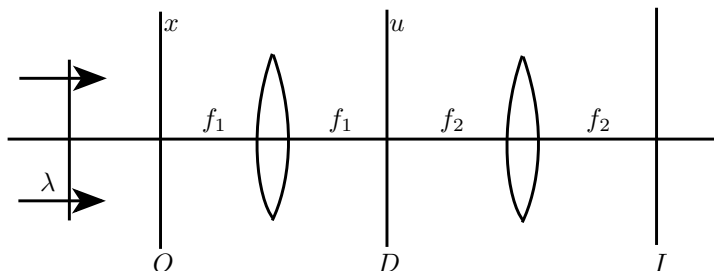


Рис. 2. Основная схема когерентной оптической фильтрации (O — плоскость объекта; D — дифракционная плоскость; I — плоскость изображения)

Многие биологические образцы содержат представляющие интерес компоненты с регулярной структурой, например системы белковых клеточных комплексов в вирусах. Однако зачастую в электронных микрофотографиях детали просматриваются недостаточно чётко, например, из-за наличия в образцах материала с неупорядоченной структурой. Процедуру, разработанную Клюгом и его сотрудниками, можно описать, ссылаясь на рис. 2. Электронная микрофотография располагается в объектной плоскости, а её картина в плоскости оптической дифракции фотографируется. Регулярную дифракционную картину создают только те компоненты объекта, которые имеют регулярную структуру. Другие дифракционные эффекты, вызванные наличием неупорядоченного материала, можно распознать и исключить с помощью соответствующей маски. Если электронная микрофотография по-прежнему находится в объектной плоскости, а в плоскости дифракции размещается фильтрующая маска, позволяющая использовать для обработки лишь выбранные дифрагированные лучи, то получается изображение, на котором гораздо яснее выделяется картина периодической компоненты объекта.

Другой пример иллюстрирует рис. 3. На рис. 3а показана электронная микрофотография трубчатой структуры, обнаруженной у одного из видов бактериофага. Внешний слой трубки состоит из белковых молекул с молекулярным весом примерно 50 000, расположенным по спирали подобно виткам пружины. Для получения этой картины образец сначала был помещён в среду с высокой электронной плотностью (муравьинокислый уранил). Такая обработка является обычной процедурой. Среда рас-

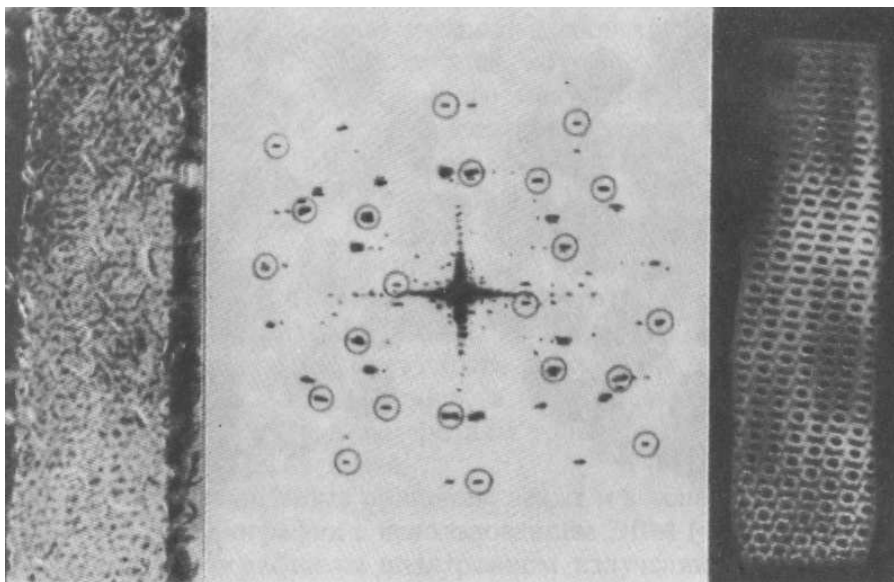


Рис. 3. Оптическая фильтрация в электронной микроскопии, а — электронная микрофотография негативно окрашенной уплощённой трубчатой структуры в бактериофаге ($\times 200000$); б — картина оптической дифракции от а (кружками обведены дифракционные пятна, связанные со структурой на одной стороне уплощённой трубки. Маска сделана так, что только эти пятна формируют изображение); в — результирующее отфильтрованное изображение, показывающее спиральную структуру из молекул, объединённых в шестигранники.

сеивает электроны более эффективно, чем белок, поэтому, заполняя отверстия и щели на поверхности, она подчёркивает её структуру. Однако трубчатые образцы, подобные указанному, выравниваются при подготовке к электронной микроскопии, и детали изображений задней и передней сторон трубки взаимно налагаются. На рис. 3б и в можно увидеть, каким образом эти изображения могут быть разделены. Оптическая дифракционная картина от образца а, полученная, как описано выше, показана на рис. б. Кружками обведены дифракционные пятна, которые можно отождествить со структурой одного определенного (например, заднего) слоя трубки. Картина, показанная на рис. 3в, была получена с маской, которая пропускает на плоскость изображения лишь составляющую от этих пятен. Размещение отдельных молекул (в шестигранниках) можно теперь наблюдать более отчётливо. Разумеется, эту работу следует выполнять с особой осторожностью, так как неправильный выбор дифракционных пятен создаёт ложное изображение.

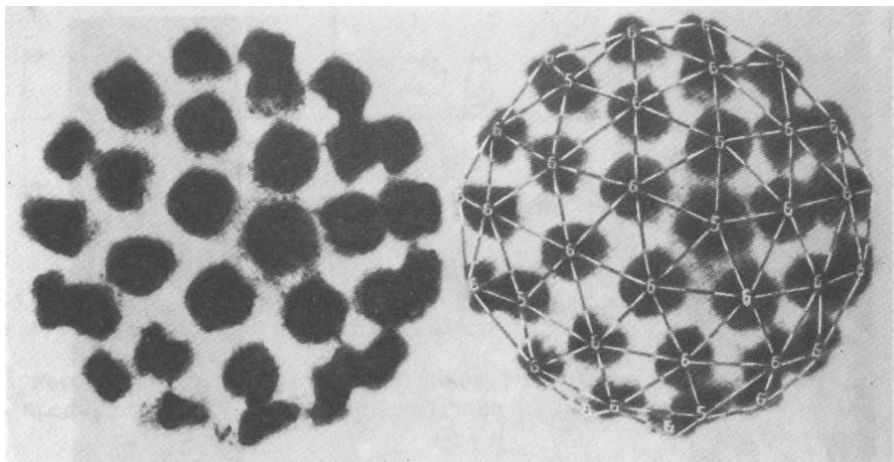


Рис. 4. а — трёхмерное восстановленное изображение вируса человеческой бородавки (диаметр примерно 500 Å); б — показана внутренняя двадцатигранная решетчатая поверхность, помечены вершины с 5 и 6 складками ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ м}$).

Те же принципы используются теперь для обработки электронных микрофотографий на ЭВМ. Фотографическое изображение преобразуется в цифровую форму путём измерения оптической плотности, а для выполнения преобразований Фурье и фильтрации используется ЭВМ. При применении этого метода сохраняется информация как о фазах, так и о интенсивностях, и в общем он обеспечивает более широкие возможности, чем оптический метод для коррекции аберраций и других нежелательных эффектов, связанных с электронной оптикой микроскопа. Если рассматривать электронную микрофотографию как апертурную функцию, хотя и очень сложную, то её преобразование Фурье может быть рассчитано полностью с учётом всех деталей распределения амплитуды и фазы. (Поскольку фазы «не видны», то, как правило, в оптической обработке о них с легкостью забывают, хотя в приложениях, подобных описанному, они могут быть столь же или даже более важными, чем амплитуда. Однако, как мы уже отмечали, оптические методы имеют свои преимущества.)

Следующим большим успехом Ключа и его сотрудников была разработка метода получения трёхмерного изображения больших биологических молекул с высоким разрешением [13]. Рис. 4 иллюстрирует пример «восстановления» трёхмерного изображения вируса человеческой бородавки. Рассчитанное путём комбинаций членов Фурье для ряда обычных двухмерных фотографий в электронном микроскопе, полученных при разных углах наклона образца, трёхмерное изображение оказывается гораздо

до более четким, чем любое из исходных двухмерных. Это достигнуто исключением путаницы, свойственной отдельным изображениям, из-за наложения деталей, которые лежат в пределах глубины фокуса объектива электронного микроскопа. До этих исследований, глубина фокуса объектива рассматривалась как фундаментальное ограничение, присущее электронной микроскопии.

За эту работу Клюг был награжден в 1982 г. Нобелевской премией в области химии.

Получение трёхмерного изображения этим методом представляет собой развитие концептуальной основы рентгеновской кристаллографии. Главное различие здесь состоит в том, что в электронной микроскопии амплитуды и фазы могут быть рассчитаны, как отмечалось выше, по имеющемуся изображению, в то время как в рентгеновской кристаллографии доступна измерениям только интенсивность дифрагированных рентгеновских лучей.

Во многом аналогичные принципы лежат и в основе новых методов: рентгеновской томографии с использованием ЭВМ («рентгеновское сканирование»), томографии на позитронном излучении и томографии на основе ядерного магнитного резонанса).

Отмечая важную роль фазы и необходимость сохранения информации о ней, мы отчасти затронули содержание следующих разделов. Другие приложения амплитудной фильтрации включают удаление следов развёртки из телевизионных кадров, удаление точечной структуры полутонных изображений (двумерный эквивалент удаления развёртки раstra), исключение аддитивного шума и управление контрастностью изображения. Последняя операция из перечисленных производится путём изменения баланса вкладов высоких и низких частот в изображение.

2) Фазовые фильтры

Мы упоминали в предыдущем подразделе о важности, а зачастую и необходимости данных, касающихся фазы. Приложение фильтрации, в котором фазы играют ведущую роль, относится к области оптической микроскопии.

Срезы биологических материалов, проверяемые в оптической микроскопии, нередко бывают в значительной степени или даже полностью прозрачными. Говоря без преувеличения, это создаёт трудность в наблюдении их структуры, если не использован какой-либо особый приём. Для таких материалов характерно изменение от точки к точке показателя преломления и, следовательно, их оптической толщины. Так как это явление создаёт только фазовое различие между светом, прошедшим через разные области, оно не оказывает влияния на амплитуду прошедшего света и, следовательно, не воспринимается человеческим глазом. По очевидным причинам материалы этого типа называют фазовыми объектами в

противоположность амплитудным объектам, которыми мы в основном интересовались.

Классическим способом выявления структуры материалов, подобных описанным, является использование селективного химического окрашивания, и значение этого метода нельзя недооценивать. Однако существует и более прямой метод определения различия между областями с различным показателем преломления (и, следовательно, разного биологического состава). Таким методом является фазоконтрастная микроскопия, предложенная первоначально Цернике приблизительно в 1935 г., за что он был удостоен Нобелевской премии по физике 1953 г.

Рисунок 5 иллюстрирует в упрощённом виде основные принципы этого метода. Векторы, обозначенные A , представляют освещённость в двух точках на плоскости изображения фазового объекта. Они имеют одинаковую амплитуду A , но их фазы отличаются из-за различия в оптической толщине объекта. Если к полю добавляется освещённость, имеющая постоянную амплитуду и фазу, как представлено пунктирным вектором, обозначенным B , то появляется интерференция и результирующие векторы R различаются как по амплитуде, так и по фазе. Следовательно, различие оптических длин пути оказывается «видимым». Одна из простейших установок,

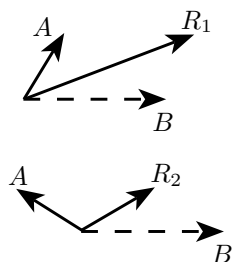


Рис. 5

позволяющая достигнуть этого, показана схематически на рис. 6. Свет фокусируется на образце S линзами конденсора C . Диафрагма D в форме кольцевой щели расположена в фокальной плоскости конденсора, и свет, который не дифрагирует на образце, формирует её изображение в виде светлого кольца на задней фокальной плоскости (P) объектива O . Эффект, показанный на рис. 5, может быть достигнут, следовательно, введением сдвига по фазе между этой «опорной» освещённостью и светом, дифрагирующим на образце. (Небольшая часть дифрагированного света, которая прошла через кольцо на задней фокальной плоскости, просто ослабляет эффект.) Фазовый сдвиг вводится посредством фазовой пластинки в P , состоящей из оптически параллельной стеклянной пластины, на которую нанесен тонкий слой диэлектрика либо по зоне кольца, либо всюду, исключая зону кольца, создавая соответственно «отрицательный» или «положительный» фазовый контраст. Пример, показанный на рис. 7, представляет чешуйчатые клетки из слизистой оболочки рта. Детали строения клетки видны более чётко с фазовым контрастом (а), чем при нормальном поле яркой освещённости (б).

После основополагающих исследований Цернике были разработаны более сложные методы, которые в целом можно назвать интерференционной микроскопией. Они обычно предусматривают наличие какого-либо

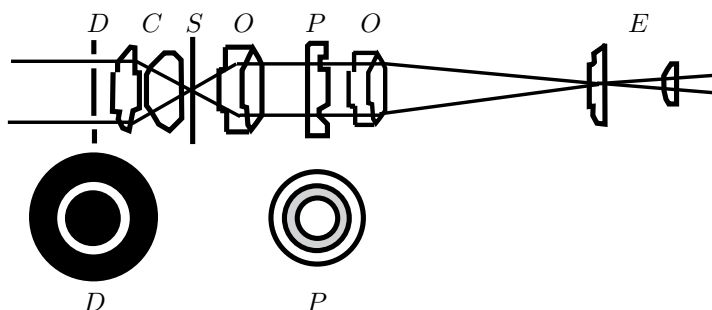


Рис. 6. Фазоконтрастная микроскопия (обозначения: *D* — диафрагма; *C* — конденсор; *S* — образец; *O* — детали объектива; *P* — фазовая пластинка; *E* — окуляр) [2].

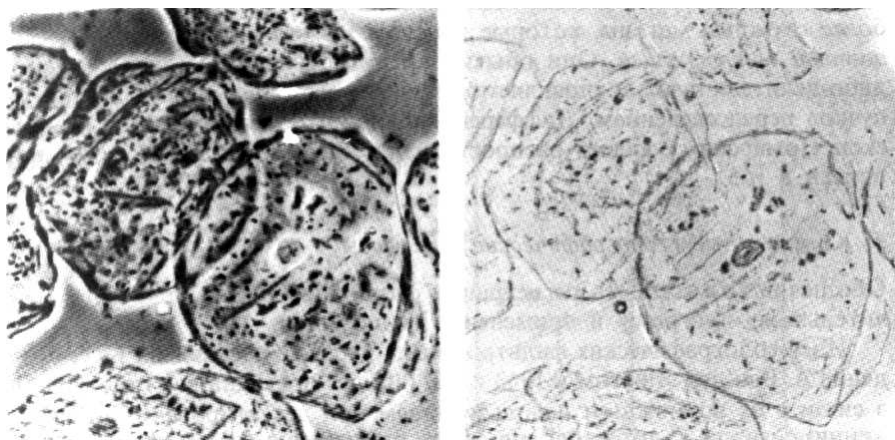


Рис. 7. Пример фазоконтрастной микроскопии. Оптические микрофотографии чешуйчатых клеток из слизистой рта (размер поля зрения примерно 100 мкм), а — фазовый контраст; б — обычный случай яркого поля (с разрешения д-ра М. Стюарда, Манчестерский университет).

делителя пучка и управляемое введение фазового сдвига в один из пучков перед сведением. Дифференциально-интерференционный микроскоп Номарски особенно распространён в настоящее время и хорошо описан в литературе.

Список литературы смотрите в книге Стюарда «Введение в Фурье-оптику».