

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра _____ *систем сбора и обработки данных* _____
(полное название кафедры)

Утверждаю

Зав. кафедрой _____ *ССОД* _____

_____ *Прохоренко Е.В.* _____
(подпись, инициалы, фамилия)

« ____ » _____ 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

_____ *Коваленко Дмитрия Викторовича* _____
(фамилия, имя, отчество студента – автора работы)

_____ *Модификация алгоритма повышения пространственного разрешения оптической* _____
(тема работы)

_____ *микроскопии* _____

_____ *Факультет автоматики и вычислительной техники* _____
(полное название факультета)

Направление подготовки *09.03.02 – Информационные системы и технологии* _____
(код и наименование направления подготовки бакалавра)

**Руководитель
от НГТУ**

_____ *Гужов Владимир Иванович* _____
(фамилия, имя, отчество)

_____ *д.т.н., профессор* _____
(ученая степень, ученое звание)

_____ _____
(подпись, дата)

**Автор выпускной
квалификационной работы**

_____ *Коваленко Дмитрий Викторович* _____
(фамилия, имя, отчество)

_____ *АВТФ, АТ-63* _____
(факультет, группа)

_____ _____
(подпись, дата)

Новосибирск 2020__

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра _____ *систем сбора и обработки данных* _____
(полное название кафедры)

УТВЕРЖДАЮ

Зав. кафедрой Прохоренко Е.В.
(фамилия, имя, отчество)

(подпись, дата)

**ЗАДАНИЕ
НА ВЫПУСКНУЮ КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ БАКАЛАВРА**

студенту _____ *Коваленко Дмитрию Викторовичу* _____
(фамилия, имя, отчество)

Направление подготовки _____ *09.03.02 – Информационные системы и технологии* _____
(код и наименование направления подготовки бакалавра)

_____ *Факультет автоматики и вычислительной техники* _____
(полное название факультета)

Тема Модификация оптического микроскопа для повышения пространственного разрешения _____
(полное название темы выпускной квалификационной работы бакалавра)

разрешения

Исходные данные (или цель работы) Повышение пространственного разрешения оптической микроскопии путём модификации оптического микроскопа и применения алгоритма субпиксельного сдвига

Структурные части работы Введение

1. Обзор алгоритмов повышения пространственного разрешения

2. Плоскопараллельный сканирующий пьезостол

3. Разработка системы

4. Описание аппаратуры для решения задач

5. Определение оптических параметров для повышения пространственного разрешения

6. Повышение пространственного разрешения

Заключение

Список литературы

Задание согласовано и принято к исполнению.

**Руководитель
от НГТУ**

Гужов Владимир Иванович

(фамилия, имя, отчество)

д.т.н., профессор

(ученая степень, ученое звание)

(подпись, дата)

Студент

Коваленко Дмитрий Викторович

(фамилия, имя, отчество)

АВТФ, АТ-63

(факультет, группа)

(подпись, дата)

Тема утверждена приказом по НГТУ № 937/2 от « 18 » февраля 2020 г.

изменена приказом по НГТУ № _____ от « ____ » _____ 2020 г.

ВКР сдана в ГЭК № _____, тема сверена с данными приказа

(подпись секретаря государственной экзаменационной комиссии по защите ВКР, дата)

Серебрякова Екатерина Евгеньевна

(фамилия, имя, отчество секретаря государственной
экзаменационной комиссии по защите ВКР)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР АЛГОРИТМОВ ПОВЫШЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ.....	6
1.1. Линейные методы.....	6
1.2. Нелинейные методы.....	8
1.3. Суперразрешение	8
2. ПЛОСКОПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ СКАНИРУЮЩИЙ ПЬЕЗОСТОЛИК.....	11
3. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ.....	15
3.1 Описание функционала приложения	15
3.2 Создание интерфейса приложения.....	16
3.3 Реализация алгоритма субпиксельного сдвига	18
4. ОПИСАНИЕ АППАРАТУРЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ	23
5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ	27
6. ПОВЫШЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ.....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	33
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	35

ВВЕДЕНИЕ

В данной работе решается задача модернизации микроскопа для повышения пространственного разрешения изображения. Для решения задачи разрабатывается система, реализующая модифицированный алгоритм субпиксельного сдвига, основанный на сдвиге регистрируемого объекта на долю пикселя низкоразрешающего растра и получении высокоразрешающего растра путём обработки полученных изображений, предварительно объединённых по определённому алгоритму.

Для корректного определения величины субпиксельного сдвига в настоящей работе рассчитывается разрешение оптического микроскопа, а также пространственное разрешение получившегося изображения. Далее из этих значений высчитывается размер видимого пятна, половину которого будет составлять искомая величина сдвига.

Для решения поставленной цели в работе применяется модифицированный оптический микроскоп с прикрепленной камерой и плоскопараллельным сканирующим столиком.

Актуальность работы заключается в модификации широко распространенных оптических микроскопов для повышения пространственного разрешения.

Новизна научной работы заключается в повышении пространственного разрешения выше критерия Рэлея, что позволит расширить область применения оптической микроскопии.

Цель работы: решить задачу повышения пространственного разрешения оптической микроскопии путём реализации модифицированного алгоритма субпиксельного сдвига.

Основные задачи:

- 1) разработать приложение на языке программирования C# для управления камерой и столиком;
- 2) определить разрешение оптического микроскопа и изображения с помощью собранной системы;

3) определить величину пространственного сдвига с помощью фиксации изображения и определения отношений между разрешением микроскопа и разрешением полученных изображений;

4) осуществить сдвиг регистрируемого объекта (голограммы) на субпиксельную величину и повысить пространственное разрешение восстановленного изображения.

1. ОБЗОР АЛГОРИТМОВ ПОВЫШЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Современные голографические микроскопы основаны на схемах увеличения изображения с помощью микрообъективов, таких же, как и в обычных оптических микроскопах. Однако, из-за этого разрешающая способность голографических микроскопов остается такой же, как у оптических, и определяется критерием Рэлея [2]:

$$R = 0,61 \frac{\lambda}{A}$$

где λ — длина волны, а A — числовая апертура микрообъектива. У лучших из них значение числовой апертуры может достигать 1.4. При усредненной длине волны видимого спектра в 500 нм получим разрешение:

$$R = 0.61 \frac{500 \times 10^{-9}}{1.4} = 217.85 \text{ нм.}$$

Таким образом, имея лучший микрообъектив, в области видимого излучения не удастся добиться разрешения, превышающего 200 нм. Поскольку при недостаточном разрешении информация о восстановленном оптическом изображении может теряться, мы будем терять информацию об объектах размером менее 200 нм.

Для того, чтобы избежать потери информации при восстановлении изображений объектов размером менее 200 нм, необходимо воспользоваться алгоритмом повышения пространственного разрешения. Далее приведен обзор на некоторые из существующих на данный момент алгоритмов.

1.1. Линейные методы.

Интерполяция — простейший метод увеличения разрешения изображений. При интерполяции изображение представляется в виде функции, где пиксели изображения — точки, в которых значения функции известны. Интерполяция — нахождение промежуточных значений по

дискретному набору известных значений. Методы интерполяции основаны на использовании свертки изображения и ядер разных типов. Однако, при использовании данного метода точное восстановление информации невозможно.

Самым простым и быстрым линейным методом интерполяции является метод «ближайшего соседа», заключающийся в растяжении пикселей изображения. В случае повышения разрешения в целое число раз он представляет собой простое повторение пикселей. Недостатком этого метода является ярко выраженный эффект ступенчатости.

Восстановленная функция имеет более гладкий вид, если вместо ступенек соединять точки прямыми. Так осуществляется линейная интерполяция первого порядка. В результате применения данного метода появляются неярко выраженные эффекты ступенчатости и размытия изображения.

Наиболее распространенные негативные эффекты, возникающие при повышении разрешения изображений, связаны с искажением высокочастотной информации. Такими эффектами являются размытие, алиасинг (ступенчатость контуров) и эффект Гиббса (появление ложных ореолов возле контуров). Их влияние на изображение приведено на рисунке 1.

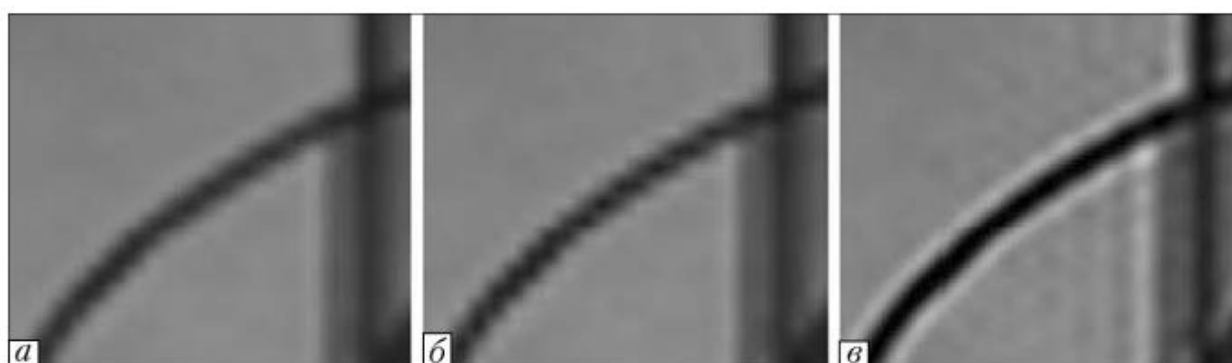


Рисунок 1 – Влияние размытия (а), алиасинга (б), эффекта Гиббса (в) [3].

1.2. Нелинейные методы

Избавиться от недостатков линейных методов интерполяции можно с помощью адаптивных нелинейных методов, для которых ядро задается отдельно для каждого интерполируемого пикселя и зависит от значений пикселей интерполируемого изображения.

Примером нелинейных методов является класс градиентных методов. Градиентные алгоритмы позволяют достичь лучших результатов при интерполяции вдоль контуров деталей изображения путем использования разных ядер вдоль и поперек границ (например, использование функции Гаусса с переменными радиусами по разным направлениям).

Другой метод, основанный на использовании градиента, – метод искаженного расстояния WADI (Warped Distance). В нем значение интерполируемого пикселя представляет собой взвешенную сумму значений четырех ближайших пикселей, а веса выбираются в зависимости от расстояния до этих пикселей и модуля производной в этих пикселях (чем больше производная, тем меньше весовые коэффициенты).

1.3. Суперразрешение

Суперразрешение – это построение изображения высокого разрешения по нескольким слабо отличающимся изображениям объекта. Основная идея заключается в использовании субпиксельных сдвигов снимаемого объекта для комбинации информации с нескольких изображений низкого разрешения, сдвинутыми на субпиксельную величину по осям x и y . Такой сдвиг может осуществляться, например, с помощью устройств, описанных в [1].

Пиксели имеют конечный размер, поэтому сигнал пикселя соответствует не значению яркости объекта в конкретной точке на реальном изображении, а является усреднением по некоторой окрестности точки. При

смещении изображения объекта на часть пикселя в разных кадрах усреднение производится по разным окрестностям.

На рисунке 2 приведена схема регистрации одномерного сигнала при его сканировании прибором с низким разрешением. Здесь n – количество элементов низкоразрешающего раstra (пикселей), l – количество высокоразрешающих элементов, попадающих в интегрируемую апертуру I_i , $i = 1 \dots n$. Тогда количество элементов высокоразрешающего раstra будет равно nl .

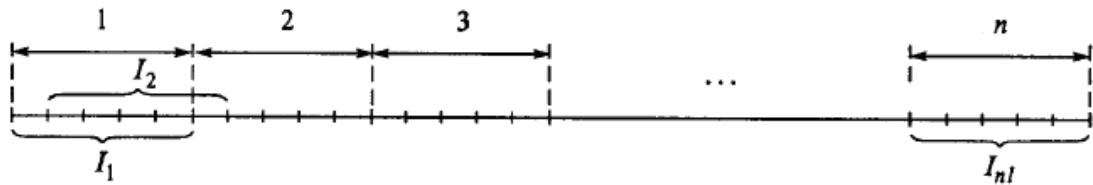


Рисунок 2 – Схема регистрации сигнала при субпиксельном сдвиге

В результате имеем систему уравнений, из которой необходимо определить высокоразрешающие элементы x_i :

$$\begin{cases} x_1 + x_2 + \dots + x_l = I_1 \\ x_2 + x_3 + \dots + x_{l+1} = I_2 \\ \dots \\ x_{(n-1)l+1} + x_{(n-1)l+2} + \dots + x_{nl} = I_{nl} \end{cases} \quad (1)$$

Систему уравнений (1) можно также представить в матричном виде:

$$A \cdot X = I \Rightarrow \begin{bmatrix} 1 & 1 & & & & 0 \\ & & 1 & \vdots & 1 & 1 \\ & & & 1 & 1 & \\ & & & \dots & & \\ & & & & 1 & 1 & 1 \\ & & & & \vdots & 1 & 1 \\ & & & & & \dots & \\ 0 & & & & & & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \dots \\ x_{nl-3} \\ x_{nl-2} \\ x_{nl-1} \\ x_{nl} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \\ \dots \\ I_{nl-3} \\ I_{nl-2} \\ I_{nl-1} \\ I_{nl} \end{bmatrix} \quad (2)$$

где A – матрица системы размером $nl \times nl$, X – вектор искомых элементов высокоразрешающего раstra размером nl , I – вектор низкоразрешающих апертур (пикселей), образованных последовательно расположенными

апертурами по строкам: I_1 – без сдвига, I_2 – со сдвигом на один элемент высокоразрешающего раstra, I_3 – со сдвигом на два элемента высокоразрешающего раstra и т.д. Общее число элементов в векторе I – nl элементов [6].

Решая систему уравнений (2) путём последовательного вычитания элементов вектора I «снизу - вверх», получим искомый вектор элементов X высокоразрешающего раstra.

Достоинствами метода являются его простота и эффективность: при сдвиге между изображениями в половину пикселя можно добиться увеличения пространственного разрешения в 2 раза.

При увеличении числа высокоразрешающих элементов или сдвигов система получается громоздкой, и ее расчет может занять много времени. Поэтому актуальна проблема нахождения элементов x_i без решения системы.

В настоящей работе рассматривается применение данного метода в голографической микроскопии, где в качестве регистрируемого объекта выступает голограмма. Голограмма – это объёмное изображение, полученное методом волновой интерференции.

Приведем схему построения изображения с повышенным разрешением на основе четырех изображений с низким разрешением. Пусть мы имеем изображения $I_1(x, y)$ без сдвига, $I_2(x, y)$ – сдвинутое по оси x на половину разрешения, $I_3(x, y)$ – сдвинутое по оси y на половину разрешения и $I_4(x, y)$ – сдвинутое по оси x и y . Тогда мы можем сформировать матрицу пикселей i -го изображения на j -ом столбце и k -ой строке $I_i(x_j, y_k)$, как показано в таблице 1, из которой можно восстановить изображение с повышенным разрешением с помощью преобразования Фурье.

Таблица 1 – Расположение элементов высокоразрешающей матрицы

$I_1(x_0, y_0)$	$I_2(x_0, y_0)$	$I_1(x_1, y_0)$	$I_2(x_1, y_0)$...
$I_3(x_0, y_0)$	$I_4(x_0, y_0)$	$I_3(x_1, y_0)$	$I_4(x_1, y_0)$	
$I_1(x_0, y_1)$	$I_2(x_0, y_1)$	$I_1(x_1, y_1)$	$I_2(x_1, y_1)$	
$I_3(x_0, y_1)$	$I_4(x_0, y_1)$	$I_3(x_1, y_1)$	$I_4(x_1, y_1)$	
...				...

В результате проведенного обзора было решено реализовать метод суперразрешения для повышения разрешения изображения, поскольку он предлагает небольшую стоимость вычисления по сравнению с нелинейными методами, а также лучшее качество получаемых изображений по сравнению с линейными методами увеличения разрешения. Помимо этого, метод суперразрешения лишен недостатков других методов, таких как размытие, алиасинг и эффект Гиббса.

2. ПЛОСКОПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ СКАНИРУЮЩИЙ ПЬЕЗОСТОЛИК

Ключевым устройством, без которого было бы невозможно выполнить настоящую работу, является плоскопараллельный сканирующий пьезостол Ratis компании NanoScan Technologies. Данное устройство позволяет выполнять перемещения в масштабах нанометров, что необходимо для осуществления сдвигов голограммы объекта на доли пикселей. Опишем далее, каким образом можно добиться управляемого перемещения на единицы нанометров.

В основе работы столика лежит применение пьезоэлектрического материала. Пьезоэлектрическими материалами называют кристаллические вещества, в которых под действием механических напряжений возникает

спонтанная поляризация – явление прямого пьезоэффекта. Наряду с прямым существует и обратный пьезоэффект, заключающийся в том, что внешнее электрическое поле вызывает механические напряжения внутри материала, которые приводят к изменению его геометрических размеров. Указанными свойствами обладают естественные монокристаллические вещества (кварц, сегнетова соль, турмалин) и искусственные поликристаллические твердые растворы, структура которых упорядочена предварительной поляризацией в электрическом поле (пьезокерамики – титанат и цирконат свинца, бария).

Каждый пьезоэлектрик является электромеханическим преобразователем. Если его поместить в переменное электрическое поле, то амплитуда механических колебаний будет меняться с частотой переменного поля. При совпадении частоты поля с собственной (резонансной) частотой пьезоэлектрика, амплитуда приобретает максимальное значение. Прямой пьезоэффект используют в технике для преобразования механических напряжений или деформаций в электрические сигналы (звукосниматели, датчики деформаций, приемники ультразвука и др.) Обратный пьезоэффект используется для преобразования электрических сигналов в механические (акустические излучатели, генераторы ультразвука, двигатели микроперемещений).

В сканирующем столике Ratis используются оптические датчики. Принцип действия таких датчиков отображен на рисунках 3 и 4. Датчик перемещения (рис 2.) состоит из оптической линейки периодом 10 мкм или 20 мкм, источником излучения (светодиод) красного диапазона, и селективного детектора излучения, выдающего на выходе сигналы, сдвинутые по фазе на 90 градусов.

$$A(x) = A_0 \times \sin\left(\frac{X}{X_{\text{реш}}}\right), \quad (3)$$

$$B(x) = B_0 \times \cos\left(\frac{X}{X_{\text{реш}}}\right), \quad (4)$$

где X – перемещение, $X_{\text{реш}}$ – период оптической решетки.

Эти сигналы в аналоговом виде обрабатываются специализированной микросхемой со встроенный \sin/\cos интерполятором, производя вычисление угла, как $\arctg(A/B)$. Таким образом перемещение сводится к вычислению угла, далее микросхема преобразует угол в импульсы, которые формируются при превышение минимально детектируемого угла поворота, α .

Далее перемещение вычисляется как:

$$X = S_n \times \alpha \times X_{\text{реш}}, \quad (5)$$

где S_n – сумма импульсов со специализированного счетчика.

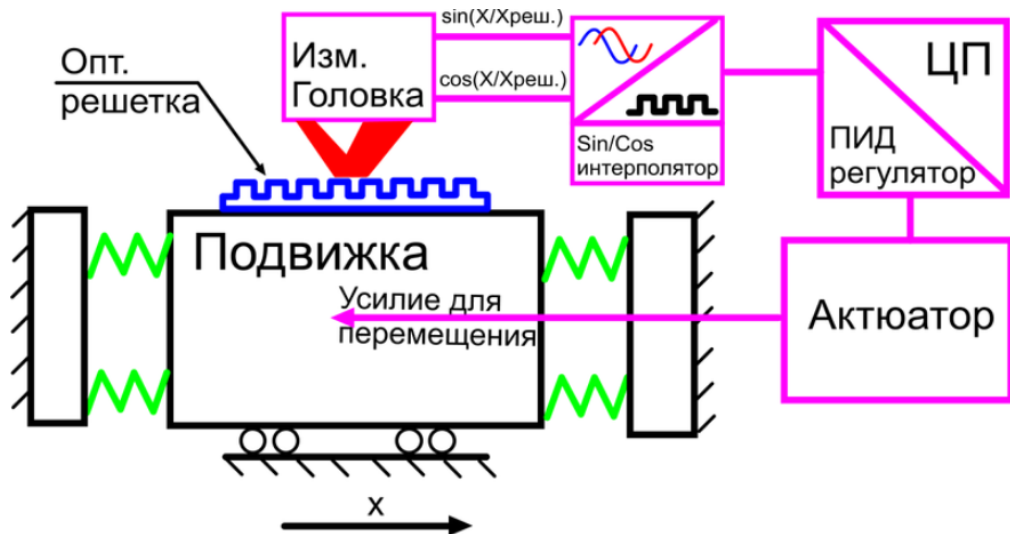


Рисунок 3 – Блок схема устройства обратной связи на основе оптических энкодеров

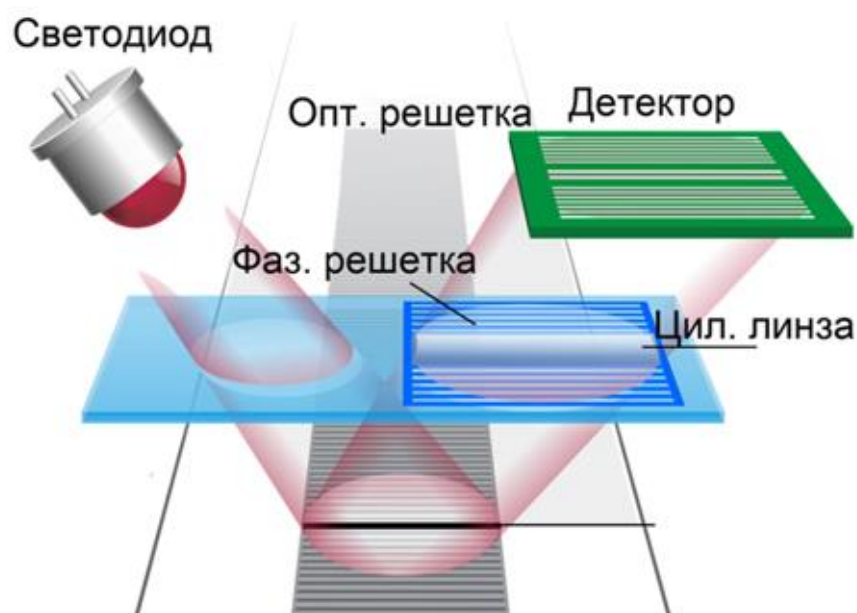


Рисунок 4 – Устройство оптического датчика положения

Оптические датчики производят вычисления смещения вдоль специального полотна, на котором нанесены риски с заданным периодом. Риски нанесены с помощью интерференции волн с заданными длинами, что приводит к высокой точности длины периода этих делений. При измерении расстояния происходит вычисление количества периодов или доли периода, которое было пройдено датчиком. Так как все явления в этом датчике привязаны к длинам волн, точность производимых измерений получается достаточно высокой. К тому же оптические датчики линейны, что заметно повышает эффективность их работы. Применение оптических датчиков имеет ряд неоспоримых преимуществ перед распространенными в сканирующей зондовой микроскопии и устройствах нано-перемещения емкостными датчиками. Прежде всего, абсолютная линейная калибровка по всему полю перемещения, в отличие от емкостных датчиков, имеющих ярко выраженную нелинейность, описываемую зависимостью $1/x$ и приводимую к сильной неоднородности настройки обратной связи и точности по всему полю перемещения. Емкостные датчики проявляют неустойчивость при незначительном измерении начального расстояния между обкладками, что приводит к необходимости повторной калибровки, это может быть вызвано как изменениями внешних условий, таких как температура, так и механических. Оптические датчики на основе \sin/\cos интерполяции лишены всех этих недостатков. При таком устройстве столик обладает следующими характеристиками:

- Точность перемещения: <1 нм
- Скорость измерения: 200 кГц
- Нелинейность: <0.1 %

3. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ

3.1 Описание функционала приложения

Для успешного решения задачи по повышению пространственного разрешения был реализован следующий функционал:

- загрузка оригинального изображения и изображений, смещенных относительно оригинального на субпиксельную величину;
- подключение к приложению цифровой камеры;
- подключение к приложению сканирующего столика;
- трансляция изображения с камеры на экран приложения в режиме реального времени;
- возможность перемещать сканирующий столик по осям x , y , z ;
- возможность совершения снимков с камеры из приложения;
- корректировка параметров изображения, таких как диафрагма, светочувствительность, экспозиция и т.д.;
- корректировка параметров движения столика, таких как интерфейс подключения, скорость движения по осям, наличие обратной связи для уменьшения ошибки в итоговой позиции столика;
- слияние фотографий для последующего восстановления изображения;
- возможность сжать изображение, посчитав среднее значение из значений интенсивности пикселей в задаваемой окрестности, в результате чего окрестность пикселей «стягивается» в один пиксель;
- получение изображения с увеличенным разрешением;
- возможность сохранить получившееся изображение с увеличенным разрешением, а также промежуточные изображения.

В результате было написано приложение на языке программирования C# в системе Windows Presentation Foundation с поддержкой взаимодействия

между программой и камерой Canon при помощи комплекта средств разработки EDSDK и столиком-сканером Ratis при помощи RatisSDK.

3.2 Создание интерфейса приложения

Для установления взаимодействия между фотокамерой и компьютером необходимо добавить элемент `ListBox`, содержащий обновляемый по нажатию на кнопку `RefreshSessionList` список сессий с камерами. После выбора камеры, с которой мы собираемся работать (в нашем случае Canon EOS M50) нажимаем на кнопку `OpenSession`, в результате чего устанавливается соединение камеры с компьютером, и ей можно посылать команды управления, а также получать с нее данные. После нажатия на кнопку `OpenSession` текст на кнопке, а также действие, сменяется на противоположное по значению `CloseSession`. Данное действие необходимо в случае, если сессия с указанной камерой больше не требуется.

Для управления параметрами изображения их необходимо расположить в соответствующих `ComboBox`, чтобы была возможность выбора из заранее занесенного списка возможных значений. Данный список автоматически заполняется на основе информации, полученной из камеры.

Для полноценного контроля за процессом съема фотографий предусмотрена возможность передачи на экран приложения текущего изображения на фотокамере в реальном времени, так называемый режим `LiveView`. Так, при изменении параметров изображения из приложения, либо фокуса на микроскопе, нет необходимости отключать камеру от компьютера и отслеживать изменения на ней самой, так как то же изображение транслируется на экране приложения.

Также необходимо добавить возможность выбора места сохранения зафиксированного изображения. Так, фотографию можно сохранить на камеру, на компьютер или в оба места. В случае, если изображение

сохраняется на компьютер, требуется указать путь до папки с сохраненными изображениями.

Первый экран приложения для управления камерой приведен далее на рисунке 5.

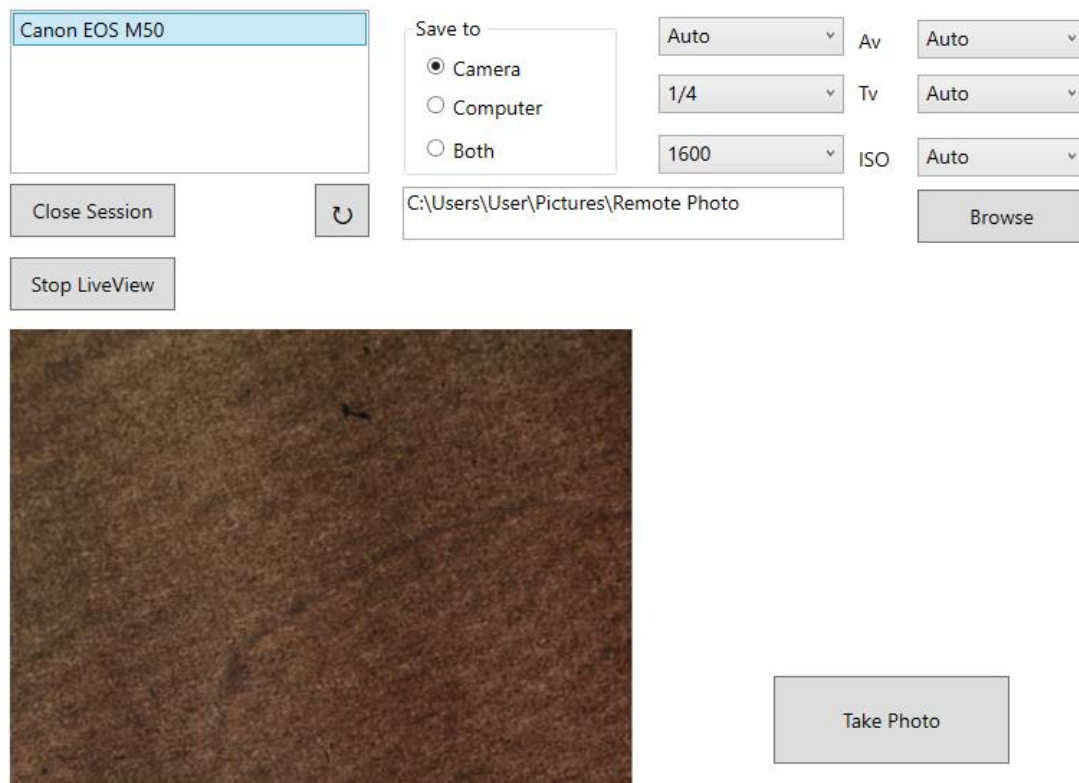


Рисунок 5 – Экран для управления камерой

Для того, чтобы иметь возможность выводить изображение на экран, а также масштабировать его, поместим на форму 2 элемента ZoomControl, служащие для масштабирования и содержащие в себе элемент Image, служащий для отображения изображения.

В выпадающем меню «Изображение» находятся действия, связанные с работой с изображениями.

Так, загрузка изображения осуществляется с помощью кнопки «Загрузить изображение», сохранение обработанного изображения происходит по кнопке «Сохранить изображение». Помимо этого, в меню также содержатся кнопки, отвечающие за сжатие изображения, за его

обрезание, объединение нескольких изображений, а также за вызов быстрого преобразования Фурье.

Миниатюры изображений отображаются на элементе ImageViewer. По нажатию на миниатюру, соответствующее изображение откроется в элементе Images, заполнив его по ширине. Для вызова функций, таких как объединение или сжатие, включающих в себя несколько изображений, необходимо выбрать миниатюры необходимых изображений и нажать на соответствующую кнопку, после чего результат выполнения функции запишется в левый элемент Images. Результат разработки данного экрана представлен на рисунке 6.

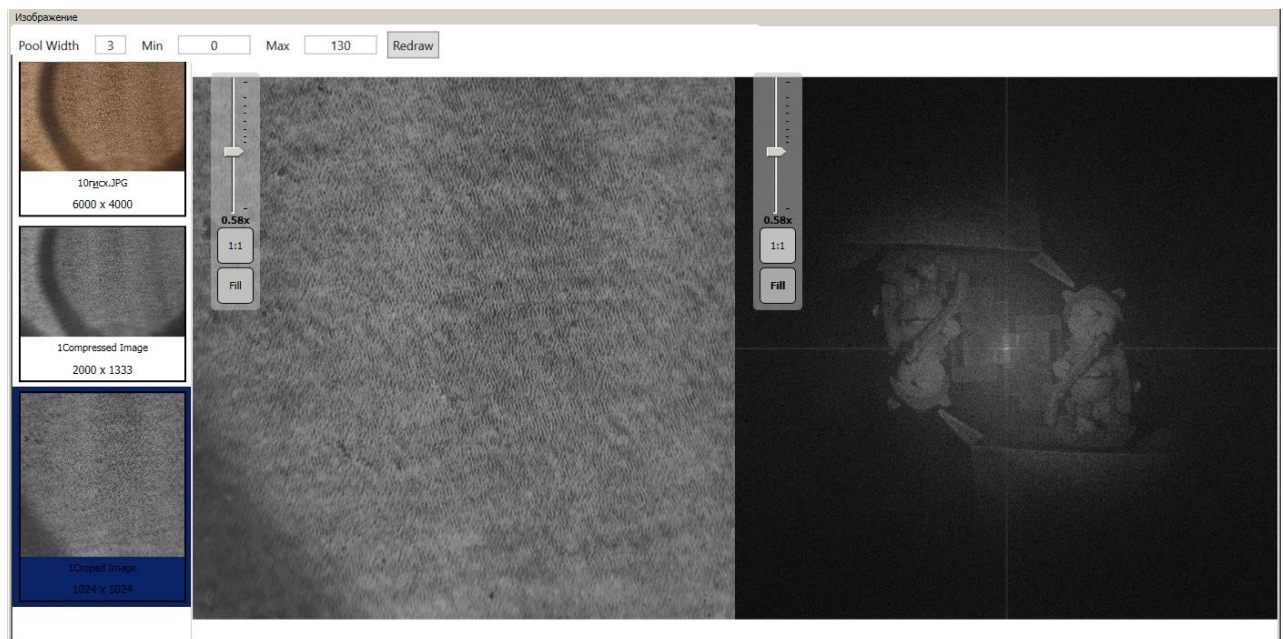


Рисунок 6 – Экран для обработки изображений

3.3 Реализация алгоритма субпиксельного сдвига

Приведем фрагмент кода, реализующий данный алгоритм.

Изначально все 4 изображения, представленные в виде матриц с 3 каналами цветов R, G, B, загружаются в память программы. Для всех матриц производится перевод из 3 каналов R, G, B в 1 серый канал посредством усреднения значения каналов.

```

1.   newMatrix = new RealMatrix(grayScaleMatrices[0].RowCount * 2,
    grayScaleMatrices[0].ColumnCount * 2);
2.   for (int i = 0; i < grayScaleMatrices[0].RowCount; i++)
3.   {
4.       for (int j = 0; j < grayScaleMatrices[0].ColumnCount; j++)
5.       {
6.           newMatrix[i * 2, j * 2] = grayScaleMatrices[0][i, j];
7.           newMatrix[i * 2, j * 2 + 1] = grayScaleMatrices[1][i, j];
8.           newMatrix[i * 2 + 1, j * 2 + 1] = grayScaleMatrices[2][i, j];
9.           newMatrix[i * 2 + 1, j * 2] = grayScaleMatrices[3][i, j];
10.      }
11.  }

```

В строке 1 создается выходное изображение, заполненное нулями, с разрешением, превышающее исходное в 2 раза по ширине и высоте.

Далее для всех строк и столбцов (строки 2-11) выполняется объединение изображений по алгоритму, приведенному в таблице 1, а именно:

1. В позицию $2i, 2j$ выходной матрицы помещается значение i, j пикселя оригинального изображения без сдвигов в строке 6.
2. В позицию $2i, 2j + 1$ выходной матрицы помещается значение i, j пикселя изображения, сдвинутого по оси x на половину пикселя в строке 7.
3. В позицию $2i + 1, 2j + 1$ выходной матрицы помещается значение i, j пикселя изображения, сдвинутого по осям x и y на половину пикселя в строке 8.
4. В позицию $2i + 1, 2j$ выходной матрицы помещается значение i, j пикселя изображения, сдвинутого по оси y на половину пикселя в строке 9.

Затем полученную матрицу обрезаем по высоте и ширине до ближайшего значения, равного степени двойки. Данный этап необходим для подготовки изображения для применения быстрого преобразования Фурье. К полученному изображению применяем быстрое преобразование Фурье.

После преобразования Фурье применяем к изображению логарифмическую трансформацию, поскольку выходное изображение содержит большой разброс значений, в результате чего при отсутствии трансформации самые светлые пиксели сильно затеняют остальную часть изображения. Иллюстрация подобного искажения приведена на рисунке 7. В

результате применения данной трансформации самые светлые пиксели становятся темнее, а самые темные светлее, таким образом сокращая размах значений.



Рисунок 7 – Иллюстрация искажений в яркости изображения при наличии особо яркого пятна

Для последующего уменьшения искажений зафиксируем значения интенсивности пикселей, выше определенного порогового значения, оставляя значения ниже порога неизменными. То есть значение интенсивности равно:

$$I = \max(I, p), \quad (3)$$

где p – некоторое пороговое значение.

В результате получим изображение, аналогичное рисунку 8.

Для ускорения объединения и последующей обработки изображений исходные матрицы можно сжать по описанному далее алгоритму в теории без потери исходной информации.



Рисунок 8 – Результат фиксации яркости изображения

```
1.  int width = Convert.ToInt32(PoolWidth);
2.  int newRowCount = grayScaleMatrix.RowCount / width;
3.  int newColumnCount = grayScaleMatrix.ColumnCount / width;
4.  RealMatrix newMatrix = new RealMatrix(newRowCount, newColumnCount);
5.  for (int i = 0; i < newRowCount; i++) {
6.      for (int j = 0; j < newColumnCount; j++) {
7.          int row = 0, col = 0;
8.          double sum = 0;
9.          while (row < width) {
10.             sum += grayScaleMatrix[i * width + row, j * width + col];
11.             col++;
12.             row += col / width;
13.             col %= width;
14.          }
15.          newMatrix[i, j] = sum / (width * width);
16.      }
17. }
```

Прежде всего в строке 1 получим с окна формы значение элемента PoolWidth, которое задает ширину окна, которым мы будем проходить по изображению, «стягивая» окрестность пикселей вокруг точки, и присваиваем это значение переменной width.

В строках 2-4 создаем новую матрицу, размер которой будет в width раз меньше исходного размера по ширине и высоте.

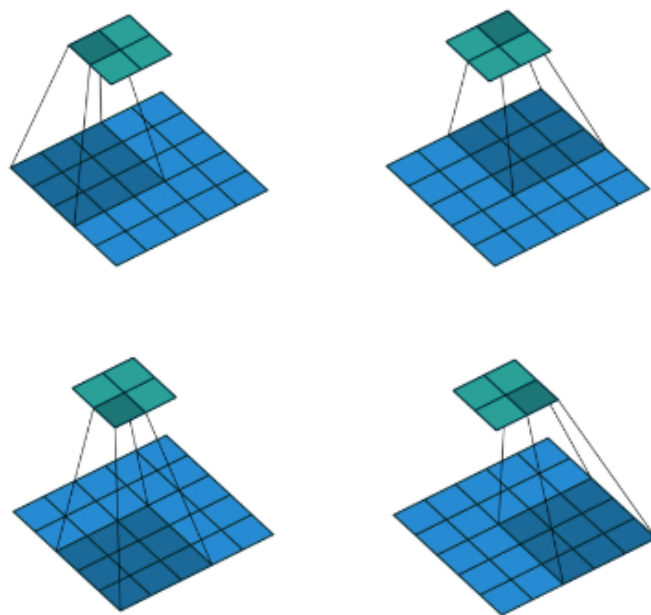


Рисунок 9 – Иллюстрация прохождения окна по изображению

Во внешнем цикле `for` (строки с 5 по 17) проходим по всем строкам результирующего изображения.

Для каждого столбца в цикле `for` (строки с 6 по 16) проводим следующие действия:

1. Создаем индексы строки и столбца внутри окна на строке 7.
2. Создаем переменную для подсчета суммы в строке 8.
3. В цикле `while` в строках с 9 по 14 вычисляем сумму элементов внутри окна и записываем в переменную `sum`.
4. Наконец, присваиваем элементу на позиции i, j среднее значение окна шириной `width`.

Иллюстрация данного процесса приведена на рисунке 9.

Таким образом, мы заполняем матрицу с разрешением, уменьшенным в заданное число раз.

Однако, чтобы не потерять информацию об исходном объекте, значение переменной `width` должно быть достаточно мало (от 2 до 5).

Число 5, а также отсутствие потери информации об объекте вытекает в результате следующих заключений:

Как будет показано далее в пункте 5, минимальный размер пятна, которое мы можем различить, равен 915 нм. Разрешающая способность изображения равна 179 нм на пиксель. Таким образом, поделив 915 на 179, получим 5.1 пикселей, из которых состоит пятно, которое можно сжать в один пиксель без потери информации.

4. ОПИСАНИЕ АППАРАТУРЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ

Для наблюдения за малыми объектами, неразличимыми глазом, в данной работе используется оптический микроскоп (рисунок 10). В основе работы оптического микроскопа лежат следующие физические процессы: дифракция, отражение и преломление электромагнитного излучения (света) при взаимодействии с исследуемым объектом и последующая регистрация излучения для построения изображения. Увеличение оптического микроскопа без дополнительных линз между объективом и окуляром равно произведению их увеличений.



Рисунок 10 – Оптический микроскоп

Рассмотрим основные элементы микроскопа подробнее:

- Объектив микроскопа – это сложная оптическая система, которая формирует увеличенное изображение объекта и является основной и наиболее важной частью микроскопа. Объектив создает изображение, которое просматривается через окуляр. Поскольку окуляры могут давать значительное увеличение, оптическое искажение, вносимое объективом, также будет увеличиваться окуляром. Это накладывает на качество объектива значительно большие требования чем на окуляр. Объективы микроскопа характеризуются двумя параметрами, а именно увеличением и числовой апертурой. Увеличение обычно колеблется от 5 до 100, а апертура – от 0,14 до 0,7.

- Окуляр – это цилиндр, содержащий две или более линзы (рисунок 11). Его функция – сфокусировать изображение, попадающее на глаз. Окуляр вставляется в верхнюю часть корпуса. Окуляры являются взаимозаменяемыми, и можно устанавливать много разных окуляров с разной степенью увеличения. Типовые увеличения окуляров для микроскопов составляют от 5 до 25 единиц.



Рисунок 11 – Маркировка микрообъективов

- Конденсор – короткофокусная линза или система линз, используемая в оптическом приборе для освещения рассматриваемого или проецируемого предмета. Конденсор собирает и направляет на предмет лучи от источника света, в том числе и такие, которые в его отсутствие проходят мимо предмета; в результате такого «сгущения» светового потока резко возрастает освещённость предмета. Разрешающая способность микроскопа повышается с увеличением апертуры его конденсора, поэтому конденсоры микроскопов — обычно сложные двух или трёхлинзовые системы.

- Предметный столик выполняет роль поверхности, на которой размещают микроскопический препарат. В разных конструкциях микроскопов столик может обеспечить координатное движение препарата в поле зрения объектива, по вертикали и горизонтали, или поворот препарата на заданный угол. В данной работе предметным столиком является плоскопараллельный сканирующий пьезостолик Ratis (рисунок 12).



Рисунок 12 – Плоскопараллельный сканирующий пьезостолик Ratis

Для создания изображений и передачу их на компьютер использовалась цифровая камера Canon EOS M50, изображенная на рисунке 13. В качестве датчика в ней используется CMOS-матрица с разрешением 24 мегапикселя (6000 x 4000 пикселей). Размер матрицы: 22,3 x 14,9 мм. Физический размер пикселя в матрице составляет 3,7 мкм. Изображение проецируется на матрицу фотоприёмника напрямую без использования объектива. Фотоаппарат подключается к компьютеру через USB-кабель. По нему можно проецировать получаемое камерой изображение в графическое окно приложения в режиме реального времени, а также передавать полученное изображение с высоким разрешением в память компьютера.



Рисунок 13 – Камера Canon EOS M50

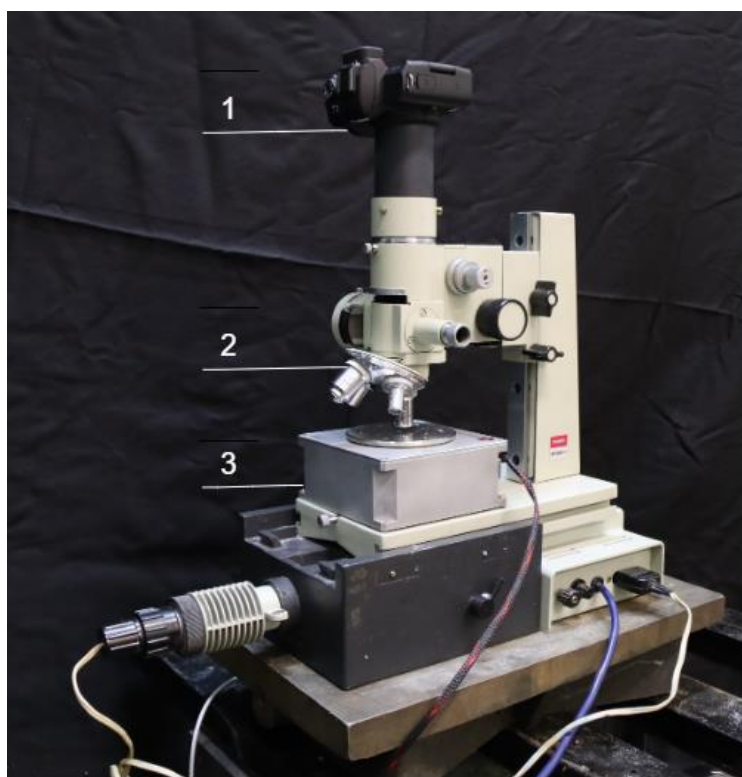


Рисунок 14 – Собранный прибор для проведения экспериментов

Цифрами на рисунке 14 обозначены:

- 1) фотоаппарат;
- 2) оптический микроскоп;
- 3) автоматизированный предметный столик;

Имеющаяся аппаратура позволяет решить задачу повышения пространственного разрешения.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Для корректного определения субпиксельной величины, на которую необходимо сдвигать изображение относительно исходного, для начала определим размер самого пикселя. Для этого подключим к компьютеру камеру и запустим сессию работы с ней. Далее разместим под объективом миллиметровую линейку так, чтобы 2 штриха входили в изображение. С помощью любого графического приложения определим количество точек на изображении, приходящееся на один миллиметр регистрируемого объекта, а также разрешающую способность микроскопа при 10- и 20-кратном увеличении.

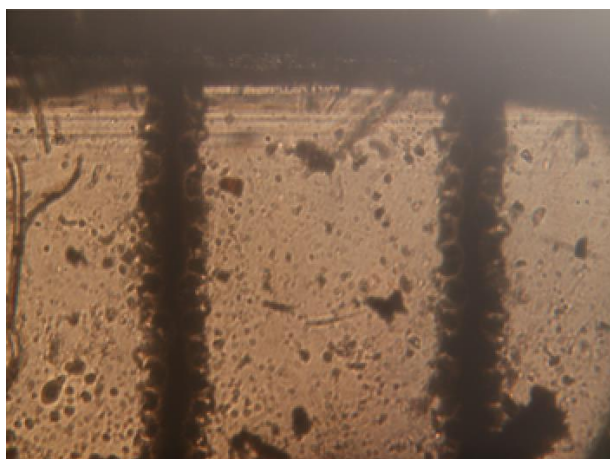


Рисунок 15 – Изображение линейки при 10-кратном увеличении

Получив изображение линейки при 10-кратном увеличении и отобразив его, например, в Paint, определим ширину миллиметра в пикселях (рисунок 15). Ширину миллиметра определим, как расстояние в пикселях между центрами штрихов. В результате было определено, что на один миллиметр приходится 2900 пикселей. Таким образом, размер пикселя, или разрешение изображения, равен:

$$r = \frac{1 \text{ мм}}{2800} = 357 \text{ нм} \quad (6)$$

Числовая апертура микрообъектива с 10-кратным увеличением составляет 0,3. Определим разрешающую способность микроскопа по формуле (1) при длине волны 0,6 мкм:

$$R = 0.61 \frac{0.6 \times 10^{-6}}{0.3} = 1.22 \text{ мкм} \quad (7)$$

Как можно заметить, разрешающая способность микроскопа в 4 раза больше разрешения изображения. Таким образом, мы получили избыточное увеличение изображения. Следовательно, для сокращения количества проводимых операций можно сжать изображения, полученные с 10-кратным увеличением, в 4 раза. Также, для увеличения разрешения изображения в 2 раза нам необходимо сдвинуть изображение на половину пикселя, или 180 нм.

Проведем аналогичные действия для микрообъектива с 20-кратным увеличением.



Рисунок 16 – Изображение линейки при 20-кратном увеличении

Подсчитав количество пикселей между штрихами, мы определили, что их 5600. Таким образом, разрешение изображения равно:

$$r = \frac{1 \text{ мм}}{5600} = 179 \text{ нм} \quad (8)$$

Числовая апертура микрообъектива с 20-кратным увеличением составляет 0.4. Вычислим разрешающую способность микроскопа:

$$R = 0.61 \frac{0.6 \times 10^{-6}}{0.4} = 915 \text{ нм} \quad (9)$$

Таким образом, разрешающая способность микроскопа в 5 раз превышает разрешение изображения. В данном случае, можно сжать исходные изображения в 5 раз, а также для увеличения разрешения изображения в 2 раза необходимо выполнить сдвиг на 90 нм.

6. ПОВЫШЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Для записи голограмм была использована схема, приведенная на рисунке 17.

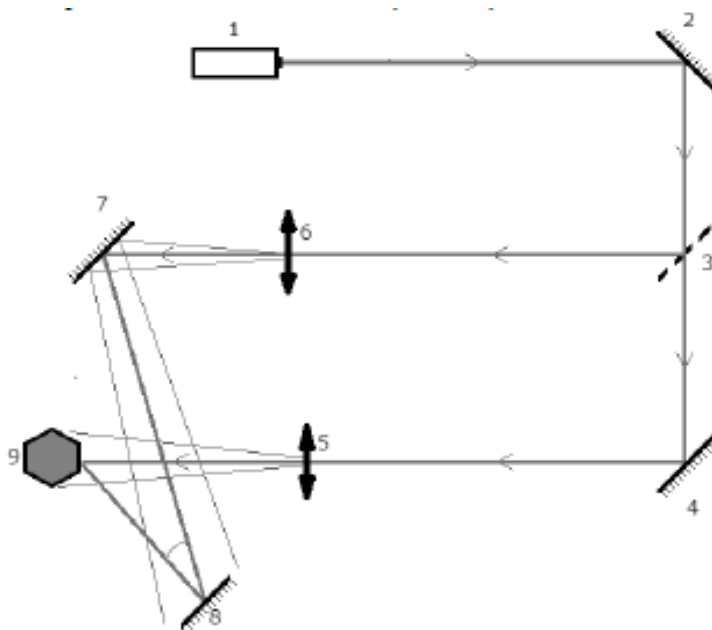


Рисунок 17 – Схема записи голограммы

На рисунке 15 цифрами обозначены: 1 – лазер; 2, 4, 7 – отражающие зеркала; 3 – делитель светового пучка; 5, 6 – расширители пучка; 8 – фотопластинка; 9 – объект.

Луч от лазера (1) с помощью полупрозрачного зеркала (3) делится на два луча. После расширителей (5, 6) один из пучков используется в качестве опоры, другой освещает объект (9). Результат интерференции волнового поля, отраженного от объекта и опорного пучка, регистрируется на фотопластинке (8).

На рисунке 18 приведена фотография установки, собранной для записи голограмм. Используемые обозначения элементов аналогичны обозначениям

на рисунке 17. На рисунке 19 показана керамическая фигурка, взятая в качестве объекта. Размер объекта: 2,5 см [8].



Рисунок 18 – Установка для записи голограмм



Рисунок 19 – Объект для записи голограммы

На рисунке 20 приведены восстановленные изображения объекта, зафиксированные при различных углах между опорным и объектным пучками света. Для восстановления изображения из голограммы использовался алгоритм быстрого преобразования Фурье с количеством точек, равным степени двойки по ширине и высоте. Так, как можно заметить, чем больше угол между пучками, тем больше информации об исходном объекте теряется. Без применения дополнительной обработки к изображению при 30 градусах от исходного объекта остается лишь малая часть информации.



а)

б)

в)

Рисунок 20 – Восстановленные изображения объекта при 10 градусах (а), при 20 градусах (б) и при 30 градусах (в) между пучками света

При последующей обработке алгоритмом объединения 4 смещенных друг относительно друга изображений, описанном в пункте ** данной работы, изображение, полученное при угле в 30 градусов между опорным и объектным пучками света, удалось восстановить почти до такого же уровня, как при зафиксированной при 20 градусах голограмме (рисунок 21).



Рисунок 21 – объединенное и восстановленное изображение голограммы, зафиксированной при угле в 30 градусов между пучками

Таким образом, полный процесс восстановления изображения представляет из себя следующую последовательность действий:

- 1) Фиксируем 4 изображения, смещенных на 90 нм.
- 2) Сжимаем изображения по окрестности шириной в 5 точек.

- 3) Объединяем изображения.
- 4) Обрезаем получившееся изображение до разрешения, соответствующего степени двойки.
- 5) Применяем быстрое преобразование Фурье

Схематично данный процесс также представлен на рисунке 22 с пропуском шагов 2 и 4.

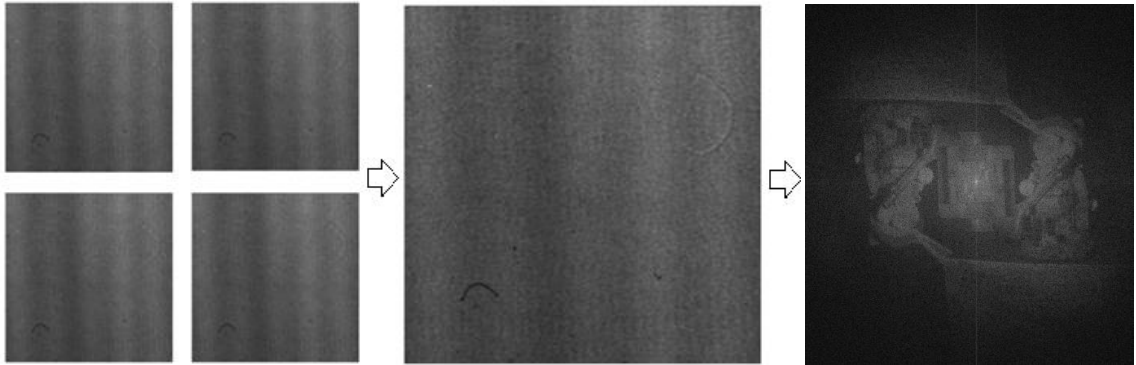


Рисунок 22 – Процесс восстановления изображения методом суперразрешения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения выпускной квалификационной работы решена задача повышения пространственного разрешения в оптической микроскопии при помощи модернизации оптического микроскопа.

Применение алгоритма субпиксельного сдвига позволило определить его достоинства: простота реализации, эффективность и возможность обойти ограничения оптических микроскопов, не прибегая к более дорогим электронным микроскопам.

В результате изучения литературы по методам повышения разрешения было определено, что метод суперразрешения является наиболее предпочтительным для данной задачи, так как при его использовании не возникает искажений, как при использовании линейных методов повышения разрешения, а также являются более простыми в реализации и обладают примерно таким качеством, как нелинейные методы.

Разработка приложения включала следующие этапы:

- 1) работа над интерфейсом приложения, в результате чего были созданы окно для управления камерой и окно для обработки изображений (рис. 5-6);
- 2) написание логики загрузки и обработки изображений;
- 3) программная реализация выше указанных методов определения сдвига и объединения изображений.

Для решения задачи повышения разрешения применялось разработанное приложение и модернизированный микроскоп, изображенный на рисунке 14. Для увеличения изображения использовались микрообъективы с 10- и 20-кратным увеличением. С помощью разработанной системы было определено разрешение полученных изображений (рисунки 15-16): 345 нм и 178 нм соответственно. По формуле (1) была рассчитана разрешающая способность микроскопа при использовании объективов: 1220 нм и 915 нм. Рассчитанные значения превосходят разрешение изображения в 4 и 5 раз соответственно, что означает избыточное увеличение. Поэтому для

уменьшения дальнейших вычислительных операций полученные массивы цифровых значений можно усреднить по окрестностям от 2 до 5 точек.

Для решения задачи повышения пространственного разрешения было решено использовать микрообъектив с 20-кратным увеличением и сдвигать изображение на 90 нм, что соответствует половине разрешения изображения.

Необходимость в увеличении пространственного разрешения в оптической микроскопии продемонстрирована в п. 6 работы. Из разных голограмм были восстановлены изображения объекта (рисунок 19) при углах между опорным и объектным пучком 10, 20 и 30 градусов (рисунок 20). При угле 30 градусов из-за недостатка разрешения пропадают детали изображения. Поэтому для расшифровки голограмм, полученных при больших углах сдвига, необходимо увеличивать разрешение при оцифровке.

После получения 4 изображений при угле в 30 градусов с осуществлением необходимого сдвига и последующим объединением было получено изображение голограммы с высоким разрешением. Увеличение разрешения позволило восстановить изображение объекта (рисунок 21).

Тестирование разработанного приложения показало, что все реализованные в нём функции, алгоритмы и методы работают корректно.

Тем не менее, реализованные в приложении программные средства позволили решить задачу повышения пространственного разрешения оптической микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. RatisXY(Z) – двухкоординатный плоскопараллельный сканер. – URL: nanoscantech.com/ru/products/stage/stage-76.html.
2. Коронкевич В.П. Формирование изображения в оптических системах: Учеб.пособие. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2005. – 76 с.
3. Крылов А. С., Насонов А. В. Компьютерное повышение разрешения изображений с использованием методов математической физики Учебно-методическое пособие. — МАКС Пресс Москва, 2011. — 72 с.
4. Блажевич С.В., Винтаев В.Н., Ушакова Н.Н. Синтез космического изображения с улучшенной разрешающей способностью на основе субпиксельного сканирования // Соврем. проблемы дистан. зондирования Земли из космоса. – 2010. – Т. 7. – № 2. – С. 9—13.
5. Farsiu S. A fast and robust framework for image fusion and enhancement. – Ph.D. dissertation, Electrical Engineering, UC Santa Cruz. – 2005. – December. – P. 42—84
6. Метод повышения пространственного разрешения в цифровой голографической микроскопии / Гужов В.И., Ильиных С.П., Марченко И.О. // Автометрия. - 2018. - Т. 54, № 3. - С. 104-110
7. Голография. Методы и аппаратура. Под. ред. Г60 В. М. Гинабург и Б. М. Степанова. М., «Сов. радио», 1974. – 376 с.
8. Восстановление изображений из реальных голограмм, зафиксированных на фотопластинках / В.И. Гужов, Е.Н. Денежкин, О.В. Чернов, Н.С. Зарубин // Автоматика и программная инженерия, Новосибирск – 2017 – №1(19) – С. 76–80
9. Бобцов А.А., Бойков В.И., Быстров С.В., Григорьев В.В., Карев П.В. Исполнительные устройства и системы для микроперемещений. - СПб: Университет ИТМО, 2017. - 134 с.
10. Ярославский Л. П., Мерзляков Н. С. Цифровая голография. М.: Наука, 1982. 219 с.

11. Милер М. Голография: Пер. с чеш. – /Пер. Сударушкин А. С., Лусников В. И. – Л.: Машиностроение. Ленингр. отд-ние, 1979 – 207 с.
12. Воронцов М. А., Корябин А. В., Шмальгаузен В. И. Управляемые оптические системы. – М.: Наука, 1988, 270 с.
13. Сисакян И. Н., Сойфер В. А. Компьютерная оптика. Достижения и проблемы //сб. "Компьютерная оптика" под ред. акад. Велихова Е.П. и акад. Прохорова А. М., 1987, в.1, с.5-19.