

Khôi phục ảnh cho kính hiển vi quang học với kỹ thuật mã hoá mặt sóng bằng phin lọc Winner

Lê Văn Nhu^{1*}, Lê Đình Chính², Lê Hoàng Oanh³,
Vũ Ngọc Hà², Nguyễn Thị Hương Trang², Hà Thị Yến³

¹Học viện Kỹ thuật Quân sự;

²Bệnh viện Đa khoa Hà Đông;

³Trường Đại học Hoà Bình.

*Email: levannhuktq@gmail.com

Nhận bài: 15/7/2022; Hoàn thiện: 04/12/2022; Chấp nhận đăng: 02/02/2023; Xuất bản: 28/02/2023.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.85.2023.95-102>

TÓM TẮT

Kỹ thuật mã hoá mặt sóng là một công cụ mạnh nhằm mục đích mở rộng độ sâu trường ở hệ thống quang học. Tuy nhiên, các ảnh thu nhận trên đầu thu thường bị nhoè nên cần ứng dụng quá trình xử lý khôi phục ảnh rõ nét. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một phương pháp khôi phục ảnh bằng phin lọc Winner cho một kính hiển vi quang học với kỹ thuật mã hoá mặt sóng. Mô hình thiết bị thí nghiệm đã được xây dựng. Kết quả thực nghiệm đã thu nhận được. Kết quả ảnh khôi phục có chất lượng gần ảnh thu nhận được tại vị trí ảnh tốt nhất của kính hiển vi quang học truyền thống.

Từ khoá: Mã hoá mặt sóng; Khôi phục ảnh nhoè; Hiển vi quang học.

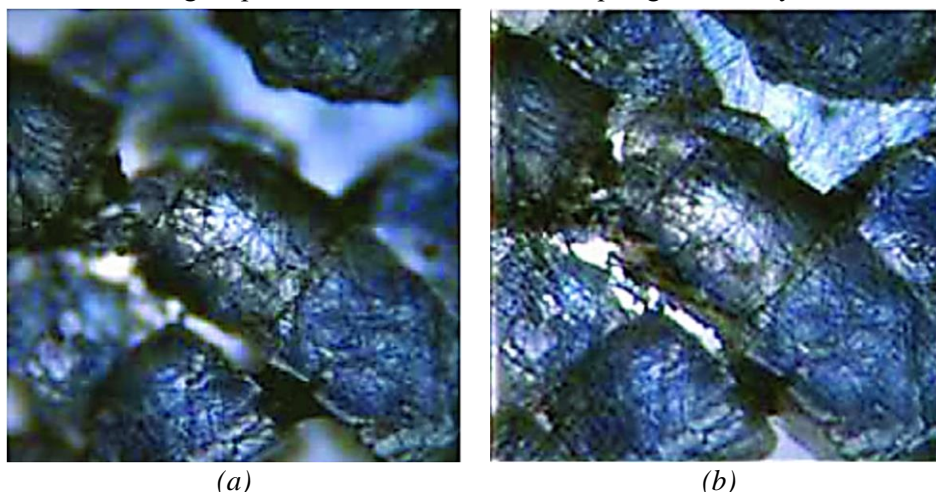
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kính hiển vi quang học là một thiết bị quan trọng dùng để quan sát và thu nhận hình ảnh của các mẫu vật có kích thước nhỏ và được trang bị phổ biến ở tất cả các bệnh viện, phòng nghiên cứu y sinh,... Với một kính hiển vi có khẩu độ số (NA) xác định, độ sâu trường và độ phân giải ngang là hai thông số rất quan trọng, phản ánh chất lượng cũng như khả năng quan sát các mẫu vật nhỏ của thiết bị. Trong khi độ sâu trường xác định khoảng không gian dọc trục cho hình ảnh sắc nét thì độ phân giải ngang lại đại diện cho khoảng cách nhỏ nhất mà người quan sát còn phân biệt được [1]. Với bước sóng ánh sáng λ và khẩu độ số NA , độ sâu trường của kính hiển vi bằng $2\lambda/NA^2$ và độ phân giải ngang bằng $0,61\lambda/NA$ [2]. Có thể thấy rằng, khi khẩu độ số NA lớn thì giá trị độ phân giải ngang của hệ nhỏ tương ứng với khả năng phân giải cao, tuy nhiên, độ sâu trường lại nhỏ dẫn đến độ sâu quan sát ảnh rõ nét bị hạn chế. Ngược lại, với hệ có khẩu độ số NA nhỏ, độ sâu trường lớn cho phép quan sát vật rõ nét trong vùng có độ sâu không gian lớn, nhưng khả năng phân giải kém.

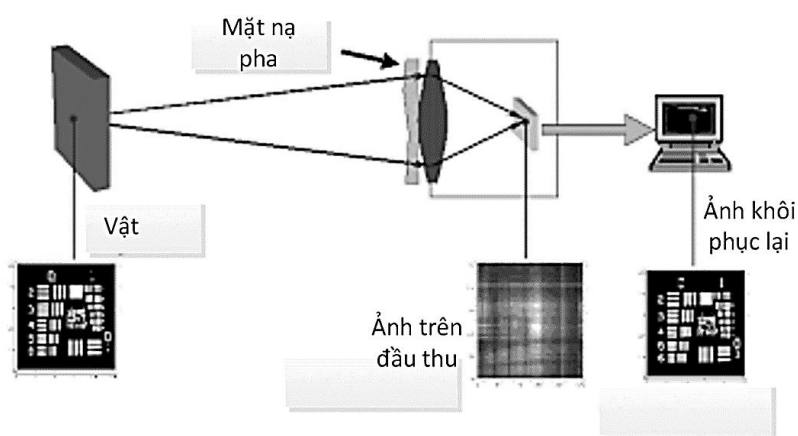
Quá trình quan sát mẫu thường được thực hiện theo hai bước. Bước một, chúng ta sử dụng vật kính hiển vi với giá trị NA thấp để quan sát, tìm kiếm khu vực mẫu cần quan tâm. Vật kính hiển vi với giá trị NA thấp có thị giới rộng, độ sâu trường lớn, nên thuận lợi cho tìm kiếm khu vực mẫu cần quan sát. Tuy nhiên, độ phân giải của nó thấp nên mức độ chi tiết mẫu chưa được rõ ràng. Để nhìn rõ chi tiết phần mẫu đã định vị, chúng ta cần chuyển sang sử dụng vật kính hiển vi với giá trị NA cao. Tuy nhiên, độ sâu trường của vật kính hiển vi này thường ngắn. Do vậy, quan sát các mẫu dày thì độ dày của mẫu thường lớn hơn độ sâu trường cho nên ảnh thu được sẽ có phần rõ nét và phần mờ như chỉ ra ở hình 1(a). Các phần mẫu nằm trong độ sâu trường sẽ có ảnh sắc nét, trong khi các phần mẫu nằm ngoài độ sâu trường sẽ có chất lượng thấp.

Phương pháp mã hóa mặt sóng được giới thiệu lần đầu tiên vào năm 1995 cho phép mở rộng độ sâu trường [4-10]. Ở phương pháp này, một thành phần mã hóa mặt sóng sẽ được đưa thêm vào hệ thống quang học truyền thống. Hình 2 biểu diễn sơ đồ của một hệ thống quang học mã hóa mặt sóng. Thành phần mã hóa mặt sóng có chức năng làm thay đổi mặt sóng của hệ thống quang học nhằm mục đích thu được các ảnh chất lượng bất biến với một khoảng rộng độ sâu

trường so với hệ thống quang học truyền thống. Hay nói cách khác, hàm nhòe điểm (PSF) của hệ thống quang học mã hóa mặt sóng gần như bất biến trên một khoảng rộng độ sâu trường, nên chúng ta có thể sử dụng một hàm nhòe điểm cho khôi phục ảnh sắc nét trên toàn bộ độ sâu trường. Trong bài báo này, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật mã hoá vào kính hiển vi quang học với khẩu độ $NA = 0.65$. Phin lọc Winner được nghiên cứu ứng dụng nhằm mục đích khôi phục ảnh sắc nét từ ảnh chất lượng thấp nhận được của kính hiển vi quang học với kỹ thuật mã hoá.



Hình 1. (a) Hình ảnh qua kính hiển vi của mẫu có độ dày lớn hơn độ sâu trường và (b) độ dày mẫu nằm trong độ sâu trường [3].



Hình 2. Sơ đồ nguyên lý của phương pháp mã hóa mặt sóng. Một mặt nạ pha làm thay đổi mặt sóng được đặt vào hệ thống quang học truyền thống.

Bài báo này được bố cục bao gồm mục 1 là phần đặt vấn đề, mục 2 là phương pháp, mục 3 là xây dựng mô hình thí nghiệm và kết quả thực nghiệm, cuối cùng mục 4 là kết luận.

2. PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết kế mặt nạ pha

Mặt nạ pha là thành phần quan trọng trong hệ thống quang học mã hoá mặt sóng. Trong bài báo này, mặt nạ pha bậc ba được sử dụng thêm vào hệ thống quang học của kính hiển vi. Phương trình mặt nạ pha có dạng [5]:

$$f(x, y) = a * (x^3 + y^3) \quad (1)$$

ở đây x và y là các toạ độ được qui chuẩn, f có đơn vị radian. Trước hết, chúng ta cần xác định

tham số của mặt nạ pha. Đây là một tham số quan trọng điều khiển mặt sóng ra của hệ thống quang học. Để đảm bảo độ sâu trường được mở rộng hơn 6 lần với vật kính hiển vi với $NA = 0,65$, ở bài báo này tham số mặt nạ pha trong bài báo được chọn là $a = 30$. Do vậy, chúng tôi chọn tham số này để gia công mặt nạ pha.

Vật liệu PMMA (Polymethylmethacrylate-PMMA) được sử dụng gia công mặt nạ pha, vật liệu này có chiết suất $n_\lambda = 1,4906$ tại bước sóng $\lambda = 587 \text{ nm}$. Kỹ thuật mã hoá mặt sóng có thể hiệu chỉnh ảnh hưởng của sắc sai [11]. Thêm vào đó, các hệ thống quang học khi được thiết kế thường được tối ưu để giảm ảnh hưởng của sắc sai. Do vậy, ảnh hưởng của sắc sai đến chất lượng ảnh của hệ thống quang học mã hoá mặt sóng có thể bỏ qua.

Phương trình mặt nạ pha bậc ba ở dạng thực có dạng: $G(X, Y) = \beta(X^3 + Y^3)$ và đưa đến biểu thức quang sai mặt sóng vào hàm đồng tử là:

$$f(X, Y) = \frac{2\pi}{\lambda} * (n - 1)\beta(X^3 + Y^3) \tag{2}$$

ở đây đơn vị của f là radian, X và Y là tọa độ thực trên mặt nạ pha và có đơn vị là mm. Gọi R là bán kính của mặt nạ pha bậc ba. Sử dụng qui chuẩn tọa độ x, y như sau:

$$x = X/R; y = Y/R \tag{3}$$

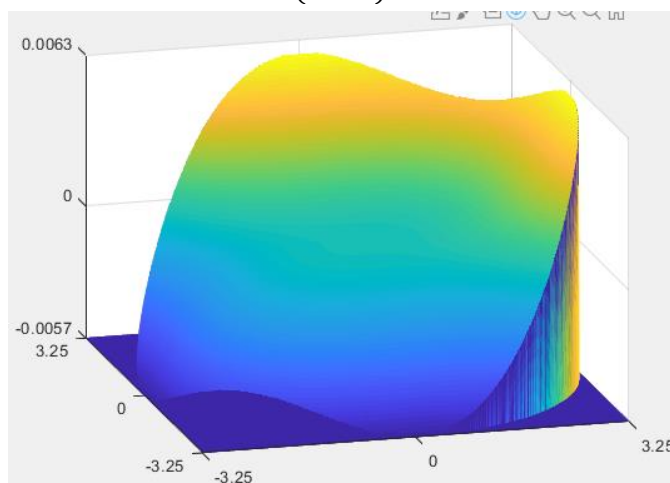
Khi đó, biểu thức (2) sẽ có dạng như sau:

$$f(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} * (n - 1)\beta * R^3 * (x^3 + y^3) \tag{4}$$

Biểu thức (4) ứng với các tọa độ đã được qui chuẩn như biểu thức (1). Điều này đưa đến biểu thức sau:

$$\frac{2\pi}{\lambda} * (n - 1)\beta * R^3 = 30 \tag{5}$$

$$\beta = \frac{30 * \lambda}{2\pi * (n - 1) * R^3} \tag{6}$$



Hình 3. Biên dạng mặt nạ pha bậc ba. Đơn vị các trục là mm.

Đường kính thông quang của các vật kính hiển vi sử dụng tại Bệnh viện Đa Khoa Hà Đông là 6.5 mm, tham số của mặt nạ pha được gia công sẽ là:

$$\beta = \frac{30 * \lambda}{2\pi * (n - 1) * R^3} = 166.5 \times 10^{-6} (1/\text{mm}^{-2}) \tag{7}$$

Với tham số mặt nạ pha nhận được ở biểu thức (7), biên dạng mặt nạ pha được chỉ ra trên hình 3.

2.2. Khôi phục ảnh bằng phin lọc Winner

Ảnh cường độ của hệ thống quang học có thể được biểu diễn bằng biểu thức:

$$g = o \otimes h + n \quad (8)$$

Trong đó: o là đối tượng quan sát; h là hàm nhòe điểm, PSF; n là nhiễu; Ký hiệu \otimes là toán tử tích chập.

Ở miền tần số, biểu thức (8) được biểu diễn bằng:

$$G = O \times H + N \quad (9)$$

Trong đó: G là biến đổi Fourier của ảnh, g ; O là biến đổi Fourier của vật, o ; H là biến đổi Fourier của hàm nhòe điểm, h .

Để phân tích khả năng giải mã ở quá trình xử lý số hóa, ở đây nhiễu được bỏ qua. Do PSF của hệ thống quang học mã hóa mặt sóng với mặt nạ pha bậc ba ít thay đổi với độ lệch tiêu và các góc thị giới, quá trình xử lý số hóa với phin lọc Winner được dùng với OTF tại tiêu điểm để khôi phục ảnh tại tất cả các vị trí lệch tiêu. Phin lọc Winner được mô tả bằng:

$$F = \frac{H_{ideal}}{H_{in-focus}} \quad (10)$$

Trong đó: $H_{in-focus}$ là OTF tại tiêu điểm của hệ thống mã hóa mặt sóng với mặt nạ pha bậc ba; H_{ideal} là OTF tiêu điểm giới hạn nhiễu xạ của hệ thống quang học không chứa mặt nạ pha.

Biến đổi Fourier của ảnh khôi phục được biểu diễn:

$$O' = F \times G \quad (11)$$

Ở biểu thức (11), ảnh khôi phục sẽ gần tương đương với ảnh tốt nhất tại vị trí tiêu điểm của hệ thống quang học không chứa mặt nạ pha. Thực hiện phép biến đổi Fourier ngược ta thu được ảnh o' sau xử lý. Ảnh này chính là ảnh khôi phục của hệ thống.

3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

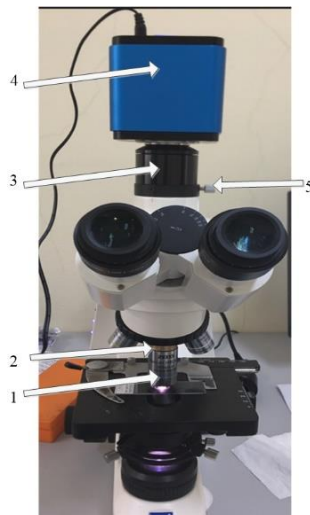
Mô hình thí nghiệm được xây dựng trên kính hiển vi quang học Primo Star 3 của Bệnh viện Đa khoa Hà Đông như chỉ ra trên hình 4. Các tham số kính hiển vi được sử dụng: vật kính hiển vi $NA = 0,65$ và độ phóng đại $40\times$, cụm quang học ghép nối có độ phóng đại $0,5\times$, camera có số lượng pixel là 1920×1080 và độ lớn mỗi pixel là $2,8 \mu m$. Phổ làm việc là 488 nm đến 670 nm . Với vật kính hiển vi này, độ sâu trường của hệ thống quang học không có mặt nạ pha gần $0,9 \mu m$.

Ở mô hình thí nghiệm này, mặt nạ pha bậc ba (2) sẽ được đặt ngay sau vật kính hiển vi (1). Để kết nối hai chi tiết này, mối liên kết ren sẽ được sử dụng. Cụm quang học kết nối (3) được gắn vào kính hiển vi bằng vít định vị (5). Cụm quang học kết nối có độ phóng đại bằng $0,5\times$ nhằm nhận được phạm vi quan sát mẫu rộng hơn.

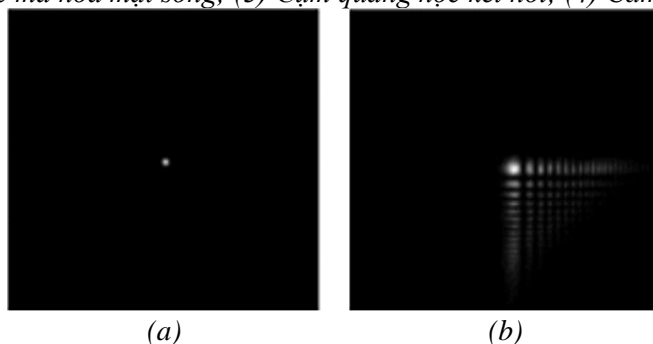
Để thực nghiệm, chúng tôi thực hiện trên mẫu mô bệnh học. Quá trình thực hiện mẫu mô bệnh học: Bệnh phẩm được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% ngay sau khi cắt khối cơ thể bệnh nhân. Các mẫu bệnh phẩm được cắt lọc tìm vị trí tổn thương, độ dày 3 - 5 mm để vừa trong khuôn nhựa rồi được chuyển sang máy xử lý mô tự động STP 120 trong 17 tiếng. Bệnh phẩm sau khi chuyển được đúc trong khối Parafin, và cắt với độ dày 2 - 3 μm rồi dán trên lam kính. Chúng tôi nhuộm các tiêu bản theo phương pháp nhuộm Hematoxylin - Eosin (H-E) thường quy.

Mẫu mô bệnh học được làm với độ dày dưới 3 μm . Để nhận được ảnh khôi phục bằng phương pháp Winner, chúng ta cần xác định hàm PSF của kính hiển vi quang học với mặt nạ pha đã được thiết kế. Trên cơ sở các tham số kính hiển vi quang học, đầu thu, mặt nạ pha, hàm PSF được tính toán tại vị trí tiêu điểm cho hệ thống quang học không chứa mặt nạ pha và hệ thống quang học với mặt nạ pha bậc ba cho bước sóng $\lambda = 587 \text{ nm}$. Kết quả các hàm PSF tính toán

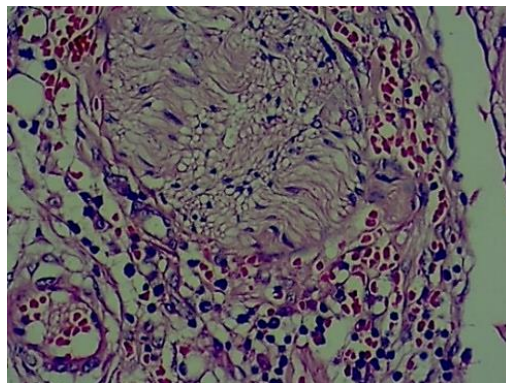
được biểu diễn ở hình 5. Khi hàm PSF tính toán được, hàm OTF nhận được bằng biến đổi Fourier của hàm PSF. Như vậy, phin lọc Winner sẽ được xác định. Hình 6 là ảnh tốt nhất nhận được bằng hệ thống quang học không chứa mặt nạ pha. Hình 7(a) chỉ ra ảnh nhận được bằng hệ thống quang học với mặt nạ pha bậc ba. Bằng sử dụng phin lọc Winner, ảnh khôi phục của kính hiển vi quang học với mặt nạ bậc ba được chỉ ra ở hình 7(b). Có thể thấy rằng, ảnh khôi phục của kỹ thuật mã hoá mặt sóng có chất lượng gần với ảnh nhận được ở hình 6.



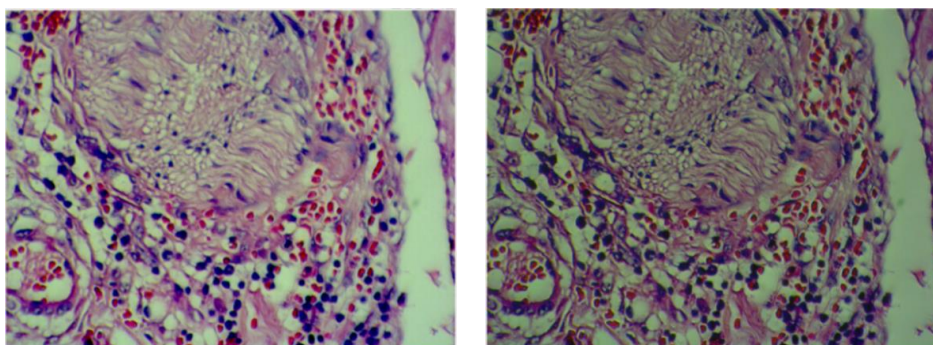
Hình 4. Mô hình thí nghiệm kính hiển vi với kỹ thuật mã hoá mặt sóng: (1) Vật kính hiển vi; (2) Cụm quang học mã hoá mặt sóng; (3) Cụm quang học kết nối; (4) Camera; (5) Vít định vị.



Hình 5. Hàm nhòe điểm tại vị trí ảnh tốt nhất cho (a) hệ thống quang học không chứa mặt nạ pha và (b) hệ thống quang học với mặt nạ pha bậc ba.



Hình 6. Ảnh nhận được tại vị trí mặt phẳng ảnh tốt nhất ứng với hệ thống quang không chứa mặt nạ pha.



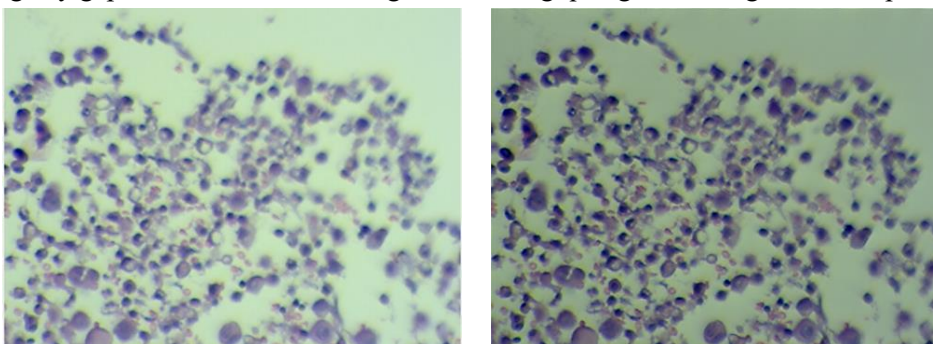
(a)

(b)

Hình 7. Ảnh nhận được với hệ thống quang học mã hoá mặt sóng:

(a) Ảnh trước khi xử lý; (b) Ảnh khôi phục từ hình (a) bằng phin lọc Winner.

Hình 8 và hình 9 chỉ ra kết quả nhận được của hệ thống quang học trên cơ sở kỹ thuật mã hoá mặt sóng ở các mô bệnh học khác tại vị trí ảnh tốt nhất. Hình 8(a) và hình 9(a) chỉ ra ảnh nhận được của hệ thống quang học mã hoá mặt sóng. Các ảnh này bị nhoè và chưa rõ nét. Hình 8(b) và hình 9(b) là các ảnh khôi phục tương ứng các ảnh ở hình 8(a) và hình 9(a). Nhận thấy rằng, các ảnh ở hình 8(b) và hình 9(b) đã sắc nét và rõ ràng. Điều này nói lên rằng, ảnh đã được khôi phục thành công. Hình 10 chỉ ra hai ảnh nhận được của hệ thống quang học với kỹ thuật mã hoá mặt sóng tại vị trí ảnh chất lượng tốt nhất và vị trí độ sâu trường lệch đi một lượng $3.1 \mu\text{m}$ (tương ứng độ sâu trường của hệ thống quang học với mặt nạ pha là $6,2 \mu\text{m}$). Ảnh khôi phục sắc nét, và rõ ràng. Độ sâu trường này gấp hơn 6 lần độ sâu trường của hệ thống quang học không có mặt nạ pha.

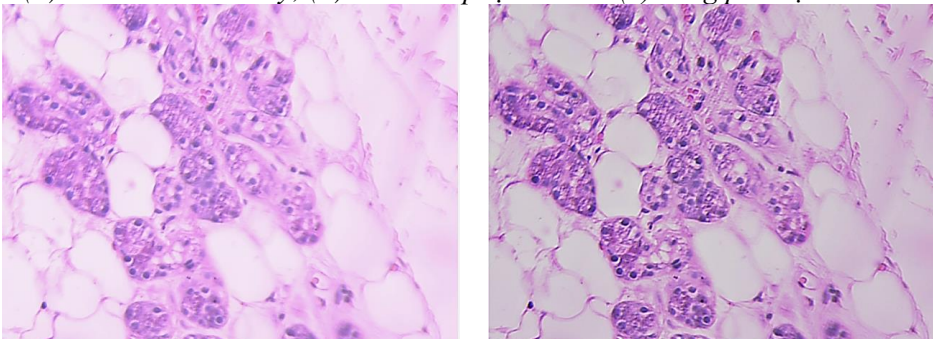


(a)

(b)

Hình 8. Ảnh nhận được với hệ thống quang học mã hoá mặt sóng:

(a) Ảnh trước khi xử lý; (b) Ảnh khôi phục từ hình (a) bằng phin lọc Winner.

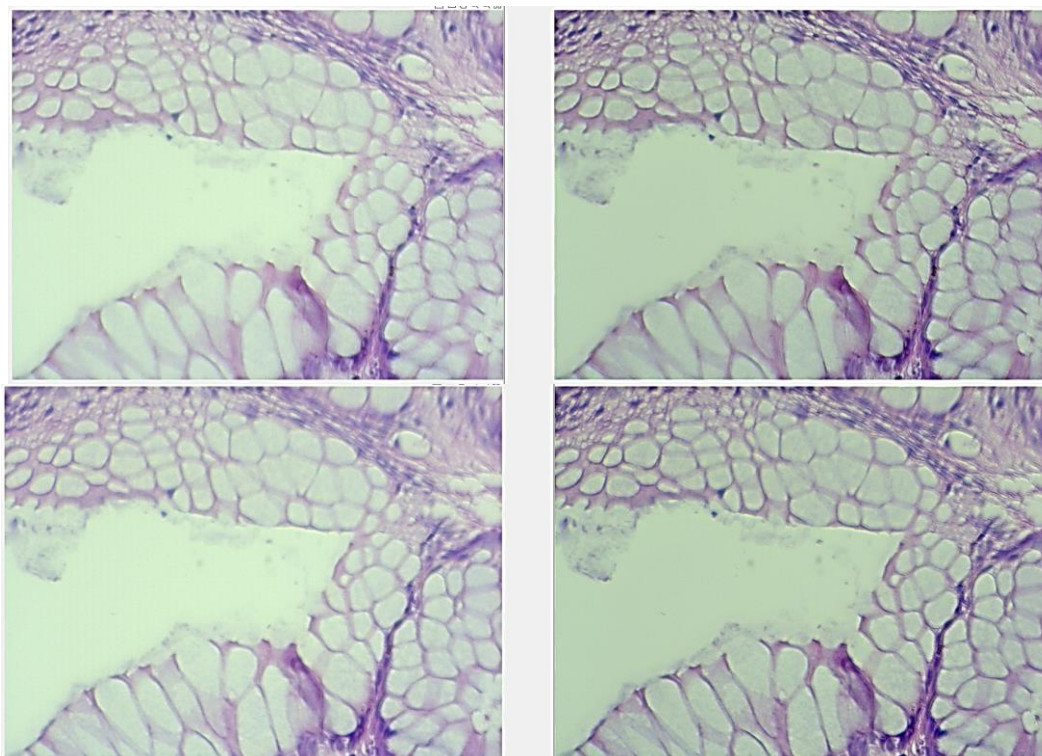


(a)

(b)

Hình 9. Ảnh nhận được với hệ thống quang học mã hoá mặt sóng:

(a) Ảnh trước khi xử lý; (b) Ảnh khôi phục từ hình (a) bằng phin lọc Winner.



Hình 10. Ảnh nhận của hệ thống quang học mã hoá mặt sóng tại vị trí độ sâu trường cách nhau $3.1 \mu\text{m}$: ảnh trên là ảnh tại vị trí chất lượng tốt nhất và ảnh dưới là ảnh tại vị trí lệch đi một lượng $3.1 \mu\text{m}$. Bên trái là ảnh trước khi xử lý, bên phải là ảnh khôi phục từ hình bên trái bằng phin lọc Winner.

4. KẾT LUẬN

Trong bài báo này, chúng tôi đã áp dụng phin lọc Winner nhận được ảnh khôi phục chất lượng tốt cho kính hiển vi quang học với kỹ thuật mã hoá mặt sóng. Một mặt nạ pha bậc ba đã được tính toán, gia công và lắp đặt vào kính hiển vi quang học Primor Star 3. Mô hình thiết bị thí nghiệm đã được thực hiện. Kết quả ảnh khôi phục có chất lượng ảnh tốt gần với ảnh của kính hiển vi quang học tại mặt phẳng tốt nhất.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Khoa học và Kỹ thuật Thành phố Hà Nội mã số: 01C-01/02-2021-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Yongzhuang Zhou, Michael Handley, Guillem Carles, and Andrew R. Harvey. "Advances in 3D single particle localization microscopy". APL Photonics, 4, pp. 060901, (2019).
- [2]. José-Angel Conchell & Jeff W Lichtman. "Optical sectioning microscopy". Nature methods. Vol.2 No.12, pp. 920, (2005).
- [3]. https://en.wikipedia.org/wiki/Depth_of_field#/media/File:DOF-ShallowDepthofField.jpg
- [4]. Lê Văn Nhu, Hoàng Văn Đáng, Trần Văn Huyền, Phan Nguyên Huệ, Mai Văn Huy, Lê Huy Kiên. "Mở rộng độ sâu trường cho hệ thống quang học qua sử dụng nhiều ảnh dọc theo trục quang học". Nghiên cứu khoa học Kỹ thuật. pp. 1859-1043, (2019).
- [5]. Dowski ER, Cathey WT. "Extended depth of field through wavefront coding". Appl Opt. 34(11), pp. 59-66, (1995).
- [6]. Van Nhu Le, Zhigang Fan, Nghia Pham Minh, and Shouqian Chen. "Optimized square root phase

-
- mask used to generate defocus invariant modulation transfer function in hybrid imaging systems*". Optical Engineering, 54(3), pp. 035103, (2015).
- [7]. Ugur Akpinar, Erdem Sahin, Monjurul Meem, Rajesh Menon, and Atanas Gotchev. "Learning Wavefront Coding for Extended Depth of Field Imaging". IEEE Transactions on Image Processing, pp.99, (2019).
- [8]. P. Zammit, A. R. Harvey, G. Carles, "Extended depth-of-field imaging and ranging in a snapshot", Optica, Vol. 1, pp. 209-216, (2014).
- [9]. Meihua Liao, Dajiang Lu, Giancarlo pedrini, Wolfgang osten, Guohai Situ, Wenqi He and Xiang Peng. "Extending the depth-of-field of imaging systems with a scattering diffuser. Scientific Report". Vol. 9, pp. 1-7, (2019).
- [10]. Le Van Nhu, Phan Nguyen Nhue, Le Hoang Hai. "An advanced logarithmic phase mask for extending depth". Communications in Physics, Vol. 27, No. 1, pp. 45-53, (2017).
- [11]. Hans B. Wach, Edward R. Dowski, and W. Thomas Cathey. "Control of chromatic focal shift through wavefront coding". Applied Optics, Vol. 37, Issue 23, pp. 5359-5367, (1998).
- [12]. <https://www.biotek.com/resources/application-notes/z-stacking-of-single-plane-digital-widefield-fluorescent-images/>.

ABSTRACT

Image restoration for microscopy with wavefront coding technique by Winner filter

Wavefront coding is a powerful technique to extend the depth of field in incoherent imaging systems. However, the quality of images captured by the camera is low, so digital processing is used to restore sharp images. In this paper, we present digital processing for wavefront coding technique in optical microscopy by Winner filter. The experimental model is built. The experimental images are shown. The restored images of the wavefront coding technique are near to the diffraction-limited image of traditional microscopy.

Keywords: Wavefront coding; Blurred image recovery; Microscopy.