بیست و پنجمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و یازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه شیراز،
شیراز، ایران.
۹-۱۱ بهمن ۱۳۹۷

بازیابی تابع نقطه گستر(PSF) میکروسکوپ اپتیکی توسط تصویر برداری از اجسام بزرگ

مهدیه چرتاب جباری، امیر حسین برادران قاسمی، حمید لطیفی

دانشکده فیزیک، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده – در این مقاله تابع نقطه گستر PSF با استفاده از الگوریتم براورد بیشینه امید ریاضی در دو چیدمان اپتیکی مختلف و با استفاده از ذرات کروی در دو اندازه متفاوت بازیابی می‌شود. هدف در این آزمایش بررسی امکان براورد PSF یک سیستم تصویر برداری اپتیکی با استفاده از تصویر برداری از اجسامی است که اندازه آنها بسیار بزرگ‌تر از حد پراش رایلی در سیستم مورد نظر باشد. نشان خواهیم داد که حتی با وجود نویز در تصویر حاصل از جسمی با بزرگی بیش از دو برابر حد پراش اپتیکی، PSF سیستم قابل بازیابی است.

کلید واژه- تابع نقطه گستر، PSF، میکروسکوپ اپتیکی، الگوریتم براورد بیشینه امید ریاضی، ذرات پلی استایرن

Point Spread Function reconstruction of an optical microscope using large object imaging

Mahdieh Chartab Jabbari, Amir H. Baradaran Ghasemi, Hamid Latifi

Department of Physics, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract- In this paper, by using expectation–maximization for maximum likelihood estimation algorithm and by using spherical beads with two different sizes, the point spread function (PSF) is calculated in two different optical setups. The purpose of this experiment is to investigate the possibility of PSF reconstruction in an optical microscope through very large objects compared to that of the diffraction limit in the optical systems. We show that the PSF of an optical microscope can be estimated even through objects with size at least two times larger than the diffraction limit and with a noisy image.

Keywords: Point spread function, PSF, optical microscope, maximum likelihood estimation algorithm, Polystyrene beads

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

مقدمه

در یک میکروسکوپ نوری در دست داشتن یک شیئ با کیفیت بالا تاثیر بسزایی در دریافت تصویری با کیفیت مطلوب خواهد داشت. با این وجود یک سیستم تصویربرداری متعارف حتی با داشتن اجزاء اپتیکی بی‌نقص، قادر به ایجاد تصویر ایده‌آل نخواهد بود. به دلیل وجود حد پراش اپتیکی، تصویر تولید شده توسط سیستم از یک جسم نقطه‌گونه هیچگاه نقطه نخواهد شد بلکه ابعاد آن پهن می‌گردد. لذا تصویر جسم همواره درجه‌ای از تاری و بهم ریختگی خواهد داشت. این فرایند تخریب در یک سیستم تصویربرداری توسط تابعی به نام تابع نقطه گستر PSF بیان می‌شود. در علم اپتیک، PSF تابعی است که پاسخ سیستم تصویربرداری به یک جسم نقطه‌ای (الگوی پراش نور از یک منبع نقطه‌ای) را توضیح می‌دهد و بعنوان معیاری از کیفیت سیستم در نظر گرفته می‌شود. در یک سیستم ایده‌آل، شکل PSF تابع ایری با پهنای بسیار کوچک است. در صورت معلوم بودن PSF سیستم تصویربرداری، تصویر حاصل از سیستم توسط عمل پیچش (Convolution) تابع نقطه گستر با تابع جسم بدست می‌آید. بنابراین با استخراج PSF سیستم و تصویر حاصل شده از جسم توسط سیستم، پروفایل شدت جسم با عمل واپیچش(Deconvolution) قابل محاسبه خواهد بود. لذا عمل واپیچش، فرایند تخریب در کیفیت تصویر را جبران می‌کند و تصویری با وضوح بیشتر بازیابی می‌گردد. بنابراین استخراجPSF یک سیستم تصویربرداری از اهمیت زیادی برخوردار است و روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آن توسعه یافته‌اند [1]. چالش اصلی در استخراج PSF این است که جسم مورد استفاده باید نقطه‌ای باشد. لذا از آنجایی که جسم نقطه‌ای ابعادش از حد پراش بسیار کوچکتر می‌باشد لذا سیستم تصویربرداری توان تفکیک مناسب برای تشکیل تصویر واضح نخواهد داشت و مرزهای تصویر حاصل شده تار و غیر قابل تشخیص خواهد بود. از طرفی دیگر بدلیل کوچکی جسم نقطه‌ای تصویر ایجاد شده روی CCD سیستم، تعداد پیکسل‌های کمی را در بر می‌گیرد و عملا خطای زیادی در استخراج ابعاد تصویر بوجود می‌آید. روش‌های سنجش PSF معمولا به دو دسته غیر آگاهانه (Blind) و آگاهانه (Non-Blind) طبقه‌بندی می‌شوند [۲و۳]. در روش آگاهانه جهت عمل واپیچش و بازیابی PSF از تصویر یک جسم از پیش طراحی شده استفاده می‌شود. به عنوان مثال جسم مفروض می‌تواند از یک صفحه شطرنجی با لبه‌های مشخص و تباین زیاد آماده شود. همچنین در این روش می‌تواند از یک روزنه بسیار کوچک روی منبع نوری بعنوان جسم نقطه‌ای جهت استخراج PSF استفاده شود. ولی در روش غیر-آگاهانه جسم مورد استفاده جهت بازیابی PSF سیستم کاملا اختیاری است و معمولا از ناحیه‌ای اختیاری از تصویر جسم برای عمل واپیچش استفاده می‌گردد. از مزیت‌های این روش می‌تواند به کوتاه بودن زمان اجرای الگوریتم محاسباتی توسط رایانه اشاره گردد. ولی این روش تنها برای تصاویری با سیگنال به نویز بالا مناسب است و تخمین PSF، حساسیت بالایی نسبت به خطای آزمایش خواهد داشت [۲] . یکی از روش‌های مطرح برای انجام عمل واپیچش روشی تکرار شونده به نام الگوریتم برآورد بیشینه درست‌نمایی با بیشینه‌سازی امید ریاضی می‌باشد، بصورتی که در هر بار تکرار تصویر بازیابی شده بهبود می‌یابد[۴و۳]. هدف پژوهش حاضر محاسبه دقیق PSF در یک میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی زیاد توسط روش آگاهانه می‌باشد. محاسبه عمل واپیچش در آن توسط برآورد بیشینه امید ریاضی در پردازش تصویر انجام می‌گردد. در این مقاله تلاش شده است که از تصویر ذرات کروی نقطه‌گونه با قطر مشخص در الگوریتم برآورد بیشینه امید ریاضی برای محاسبه PSF استفاده شود. این امر باعث می‌گردد که حدس اولیه معتبرتری برای حل الگوریتم براورد بیشینه امید ریاضی در نظر گرفته شود. در ادامه بعد از بیان الگوریتم محاسباتی عمل واپیچش، به دو چیدمان اپتیکی مناسب برای سیستم تصویربرداری

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

پرداخته می‌شود. سپس نتایج حاصل در استخراج PSF آنها، بیان می‌گردند.

تئوری

الگوریتم برآورد بیشینه امید ریاضی یک روش تکرارشونده است که به دنبال یافتن برآوردی با بیشترین درست نمایی برای یک توزیع پارامتری است. با استفاده از این الگوریتم و عمل واپیچش، تابع نقطه گستری که سیستم تصویربرداری برای ایجاد تصویر بر روی جسم اعمال می‌کند، قابل بازیابی می‌شود [۴]. در یک سیستم میکروسکوپی، اگر جسمی که از آن تصویر برداری می‌شود، نقطه‌ای باشد، معادله زیر برای تصویر حاصل، مطرح می‌باشد،

$$h_m(r) = p(r) \otimes h_o(r) \quad (۱)$$

بدین صورت که p تابع جسم نقطه‌ای، h_o تابع نقطه گستر و h_m تصویر حاصل از جسم نقطه‌ای است. با پیاده سازی الگوریتم بیشینه سازی امید ریاضی برای p(r) و همچنین معادله (۲) برآورد دقیقی از تابع نقطه گستر یک سیستم تصویربرداری بدست می‌آید،

$$h_{o,k+1}(x) = h_{o,k}(x)\int[\frac{p(x.y)}{\int(p(y-x)h_{o,k}(x)+b)dx}]h_m(y)dy \quad (۲)$$

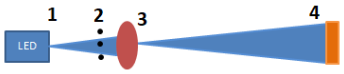
بطوریکه، $h_{o,k}$ تابع نقطه گستر تخمین‌زده شده kام برای سیستم تصویربرداری است. همچنین x و y بترتیب مختصات صفحه جسم و تصویر می‌باشند و b میانگین شدت پس‌زمینه است [۳].

روش انجام آزمایش

در چیدمان اپتیکی شکل(۱)، نور ناهمدوس با استفاده از یک منبع نور هالوژن به یک شیئ ۱۰۰x–oil با روزنه عددی (NA) برابر با ۱,۲۵ تابانده می‌شود. بعد از شیئ یک عدسی نازک با فاصله کنونی ۷,۵cm و با NA برابر با ۰,۵ و در فاصله ۷cm از آبجکتیو، قرار داده می‌شود. تصویر نمونه توسط یک CCD و یک عدسی مرکب با فاصله کانونی برابر با ۳,۵cm ذخیره می‌گردد. فاصله کاری عدسی مرکب برابر با ۲۰cm و F/# آن تا ۱,۴ قابل تغییر می‌باشد. بزرگنمایی حاصل از این چیدمان ۳۳۴۳ بدست‌آمد. در چیدمان اپتیکی شکل(۲) از یک عدد میکروسکوپ تجاری استفاده شده است. شیئ مورد استفاده در چیدمان شکل(۱) در این آزمایش نیز استفاده می‌شود. همچنین از یک CMOS با توانایی تصویربرداری ۱۸ مگاپیکسل برای ذخیره تصویر حاصل از این میکروسکوپ استفاده شد. بزرگنمایی حاصل ۱۹۳۷ بدست آمد.



شکل (۱) چیدمان اپتیکی اول. ۱: منبع نوری، ۲: نمونه، ۳: شیئ، ۴: عدسی اول، ۵: عدسی دوم، ۶: CCD



شکل (۲) چیدمان اپتیکی دوم. ۱ منبع نوری، ۲ نمونه، ۳: شیئ، ۴ گیرنده نوری

در این آزمایش از کره‌های پلی استایرن به عنوان جسم نقطه‌گونه در دو اندازه ۱۰۰۰ نانومتر و ۳۸۲ نانومتر استفاده شده است. با در نظر داشتن اندازه پیکسل‌ها برای هر کدام از عناصر معادله، یعنی p و $h_{o,k}$، پروفایل شدت مربوطه به دست می‌آیند. حل معادله فوق به روش تکرار انجام می‌گیرد. برای شروع محاسبات $h_{o,k}$ اولیه با استفاده تابع حد پراش رایلی محاسبه می‌گردد. بنابراین با استفاده از تصاویر تجربی حاصل از ذرات کروی و به کمک انتگرال حاصل از روش بیشینه سازی امید ریاضی، PSF چیدمان اپتیکی محاسبه می‌شود.

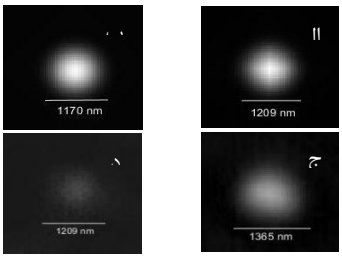
نتایج

پروفایل‌های شدت تابع نقطه گستر و تصاویر گرفته شده بترتیب برای چیدمان شکل‌های(۱) و (۲) با استفاده از دو نوع جسم کروی در شکل‌های (۳) و (۴) قابل مشاهده هستند. همچنین در شکل (۵) پروفایل شدت در امتداد خط گذرنده از وسط تصاویر شکل‌های (۳) و (۴) رسم شده‌اند. با مقایسه تصاویر شکل ۳(ج و د) و همچنین شکل

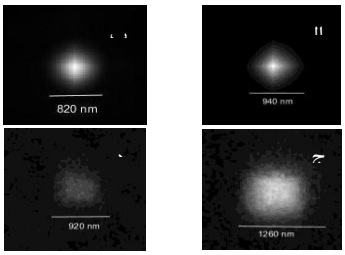
این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

۴(ج و د) مشخص است که با بزرگ شدن اجسام هر چند که همچنان اجسام نقطه‌گونه به حساب می‌آیند ولی اندازه تصاویر آنها نیز بزرگ می‌شوند.

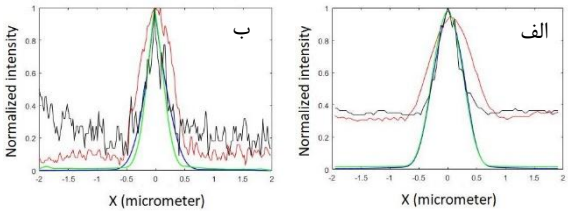


شکل (۳) PSF اندازه‌گیری شده برای چیدمان شکل(۱) با ذرات پلی استایرن در اندازه های (الف) ۱۰۰۰nmو (ب) ۳۸۲nm. تصاویر گرفته شده از ذرات پلی استایرن (ج) ۱۰۰۰nmو (د) ۳۸۲nm توسط چیدمان شکل(۱)



شکل (۴) PSF اندازه‌گیری شده برای چیدمان شکل(۲) با ذرات در اندازه های (الف) ۱۰۰۰nm و (ب) ۳۸۲nm. تصاویر گرفته شده از ذرات (ج) ۱۰۰۰ nmو (د) ۳۸۲nm توسط چیدمان شکل(۲)

لذا با اطمینان نمی‌توان گفت چه اندازه‌ای از جسم نقطه‌گونه برای تخمین مستقیم PSF برای یک میکروسکوپ مناسب است. ولی همانطور که در شکل ۳(الف و ب) و همچنین ۴(الف و ب) مشاهده می‌شود با پیاده‌سازی الگوریتم بازیابی تابع نقطه گستر روی دو اندازه ذکر شده از جسم نقطه‌گونه حتی در ابعاد بزرگ‌تر (بیش از دو برابر حد پراش) مربوط به میکروسکوپ‌ها، به یک جواب مشخص برایPSF هر یک از میکروسکوپ‌ها می‌رسیم. نکته مهم اینکه حتی اگر نویز در تصاویر حاصل از سیستم میکروسکوپی موجود باشد (رنگ‌های سیاه و قرمز در شکل۵)، با پیاده سازی این الگوریتم امکان بازیابیPSF سیستم همچنان امکان‌پذیر است، (رنگ‌های سبز و آبی در شکل (۵) که تقریبا با خطای قابل قبول روی هم افتاده‌اند). پهنا در نصف بیشینه تابع نقطه گستر در چیدمان‌های شکل (۱) و (۲) به ترتیب ۸۳۳nm و ۴۴۴nm محاسبه می‌شوند.



شکل (۵) شدت پروفایل‌های PSF الف) در امتداد خط گذرنده از میانه شکل (۳) و ب) در امتداد خط گذرنده از میانه شکل (۴). در هر دو تصویر منحنی آبی، PSF حاصل از کره ۱۰۰۰nmو منحنی سبز، PSF حاصل از کره ۳۸۲nm و منحنی قرمز، تصویر کره ۱۰۰۰nmو همچنین منحنی سیاه، تصویر کره ۳۸۲nm می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بطور تجربی با تصویربرداری از کره‌های هم اندازه در دو اندازه ۳۸۲nm (حدود حد پراش رایلی) و ۱۰۰۰nm نانومتر (بیش از دو برابر حد پراش) به بازیابی PSF یک میکروسکوپ آزمایشگاهی و یک میکروسکوپ تجاری توسط حل عددی معادله واپیچش بروش الگوریتم برآورد بیشینه امید ریاضی، پرداخته شد. نتیجه مهم اینکه با استفاده از این روش حتی با تصویربرداری از اجسام خیلی بزرگتر از حد پراش سیستم اپتیکی، PSF سیستم قابل بازیابی می‌باشد.

سپاس‌گزاری

این پژوهش بر اساس قرارداد شماره ۱۳پ ۹۵ توسط ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی ایران مورد حمایت قرار گرفته است.

مرجع‌ها

[1]Cole, Richard W., Tushare Jinadasa, and Claire M. Brown. "Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control." *Nature protocols* 6.12 (2011): 1929.

[2] van Kempen, Geert MP, et al. "Comparing maximum likelihood estimation and constrained Tikhonov-Miller restoration." *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 15.1 (1996) 76-83.

[۳] Yoo, H., I. Song, and D-G. GWEON. "Measurement and restoration of the point spread function of fluorescence confocal microscopy." Journal of microscopy 221.3 (2006) 172-176.

[۴] Markham, Joanne, and José-Angel Conchello. "Fast maximum-likelihood image-restoration algorithms for three-dimensional fluorescence microscopy." *JOSA A* 18.5 (2001): 1062-1071.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]