

УДК 53.086

## **ФОРМИРОВАНИЕ ГИПЕРСПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ О МИКРООБЪЕКТАХ С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ НЕРАВНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ**

**И.П. Гуров, А.И. Лопатин, А.В. Мельников**

Предложен метод формирования гиперспектральных данных о микрообъектах, основанный на освещении наблюдаемого образца в микроскопе последовательно на различных длинах волн и подборе времени накопления фотоэлектрического заряда матричного фотоприемника для каждого участка изображения при изменении длины волны, что позволяет получать информацию без искажений на участках с малым и сильным отражением и сформировать результирующее изображение с улучшенным контрастом.

**Ключевые слова:** гиперспектральные приборы, микроскопия, спектрофотометрия.

### **Введение**

При наблюдении различных объектов методами микроскопии степень отражения излучения на отдельных локальных участках зависит от свойств конкретного объекта. В случае равномерного распределения оптической плотности микрообъекта на наблюдаемом участке при формировании гиперспектральных данных, когда объект освещается последовательно на различных длинах волн, необходимо учитывать средний уровень облученности на каждой длине волны, приходящийся на все элементы видеоматрицы, чтобы в зависимости от этого уровня выполнить необходимую процедуру подстройки времени накопления видеоматрицы (выдержки) или яркости источника излучения [1].

При наличии у микрообъекта высокой пространственной неравномерности распределения оптической плотности может возникнуть ситуация, при которой отдельные участки изображения микрообъекта могут быть передержаны, а другие недодержаны. В этой ситуации невозможно сформировать гиперспектральные данные по всему полю изображения микрообъекта без потери полезной информации. Подстройка времени накопления фотоэлектрического заряда видеоматрицы или яркости источника излучения не могут устранить этот недостаток, поскольку приводят к изменению интенсивности всех участков изображения микрообъекта, тогда как для компенсации пространственной неравномерности оптической плотности микрообъекта необходимо подстроить интенсивность только на определенном локальном участке для каждой длины волны.

Управление уровнем облученности отдельных участков может быть выполнено различными методами. Один из известных методов заключается в размещении перед видеоматрицей нейтрального светофильтра (управляемого транспаранта) с изменяемым локальным коэффициентом пропускания, величина которого может подстраиваться для каждого участка светофильтра. Однако применение данного метода заметно усложняет конструкцию гиперспектрального микроскопа, требует использования дополнительных дорогостоящих узлов и специализированного программного обеспечения для управления параметрами светофильтра.

В работах [2, 3] рассмотрены методы компенсации неравномерного распределения облученности объекта, которые основаны на получении набора изображений, записанных с различными значениями выдержки. Полученный набор изображений позволяет синтезировать результирующее изображение без участков, интенсивность которых выходит за пороговые значения. Процедура синтеза изображения заключается в последовательном определении наиболее подходящего значения выдержки при регистрации каждого участка изображения. В результате реализуется регистрация отдельных участков изображения с различными значениями выдержки и компенсируется неравномерное распределение облученности объекта.

В настоящей работе предложен метод компенсации неравномерности пространственного распределения оптической плотности наблюдаемого микрообъекта в гиперспектральной микроскопии при записи набора видеок кадров с различной выдержкой для каждой длины волны освещения и формирования гиперспектральных данных без потери полезной информации.

### Формирование гиперспектральных данных

При наблюдении микрообъекта гиперспектральные данные получают в форме набора изображений, записанных с различными значениями выдержки, на каждой длине волны  $\lambda$ . Для каждого участка изображения микрообъекта подбирается изображение из полученного набора, на котором интенсивность не выходит за пределы пороговых значений. Зависимость значения выдержки, которое является оптимальным для регистрации участка изображения микрообъекта, от дискретных координат  $x$  и  $y$  обозначим как  $t_{exp}(\lambda, x, y)$ .

Отдельный элемент видеоматрицы позволяет регистрировать энергетическую экспозицию, которая является произведением облученности соответствующего элемента видеоматрицы и времени накопления электрического заряда (выдержки) [4]:

$$H(\lambda, x, y) = E(\lambda, x, y)t_{exp},$$

где  $H(\lambda, x, y)$  – экспозиция;  $E(\lambda, x, y)$  – облученность отдельного элемента видеоматрицы;  $t_{exp}$  – время накопления фотоэлектрического заряда.

Для каждого элемента изображения рассчитывается отношение значений экспозиции, полученных при регистрации изображения микрообъекта, и базовой линии [5], соответствующей априорно известным значениям спектра источника излучения. Если изображение микрообъекта и базовая линия получены с разными значениями выдержки, то полученное значение необходимо умножить на поправочный коэффициент, равный отношению значений выдержки:

$$T(\lambda, x, y) = \frac{H(\lambda, x, y)}{H_0(\lambda, x, y)} \times \frac{t_{0exp}}{t_{exp}}, \quad (1)$$

где  $H_0(\lambda, x, y)$  – экспозиция при регистрации базовой линии;  $t_{exp}$  – значение выдержки при регистрации изображения микрообъекта;  $t_{0exp}$  – значение выдержки при регистрации базовой линии.

Поскольку видеоматрица при отсутствии падающего на нее излучения регистрирует уровень темнового тока, который необходимо учитывать при расчете [6], соотношение (1) принимает вид

$$T(\lambda, x, y) = \frac{H(\lambda, x, y) - H_{dc}(x, y)}{H_0(\lambda, x, y) - H_{dc}(x, y)} \times \frac{t_{0exp}}{t_{exp}}, \quad (2)$$

где  $H_{dc}(x, y)$  – уровень темнового тока элемента видеоматрицы с дискретными координатами  $x$  и  $y$ .

Если диапазона значений выдержки недостаточно, чтобы полностью компенсировать неравномерность пространственного распределения оптической плотности микрообъекта, то осуществляется подстройка яркости источника излучения при формировании набора изображений на каждой длине волны, например, изменением цветовой температуры источника [1]. При регистрации изображений, записанных с разной яркостью источника излучения в зависимости от длины волны, необходимо учитывать дополнительный поправочный коэффициент, равный отношению яркостей источника излучения при записи изображений микрообъекта и базовой линии. В этом случае выражение (2) имеет вид

$$T(\lambda, x, y) = \frac{H(\lambda, x, y) - H_{dc}(x, y)}{H_0(\lambda, x, y) - H_{dc}(x, y)} \times \frac{t_{0exp}}{t_{exp}} \times \frac{L_0(\lambda)}{L(\lambda)},$$

где  $L(\lambda)$  – яркость источника излучения при записи изображения микрообъекта;  $L_0(\lambda)$  – яркость источника при записи базовой линии. Результаты расчета поправочного коэффициента для галогенной лампы представлены в работе [1].

Подбор оптимального значения выдержки для каждого элемента изображения микрообъекта проводится таким образом, чтобы интенсивность находилась наиболее близко к середине динамического

диапазона видеоматрицы. На рис. 1 показан график зависимости интенсивности в отдельной точке изображения от значения выдержки видеоматрицы.

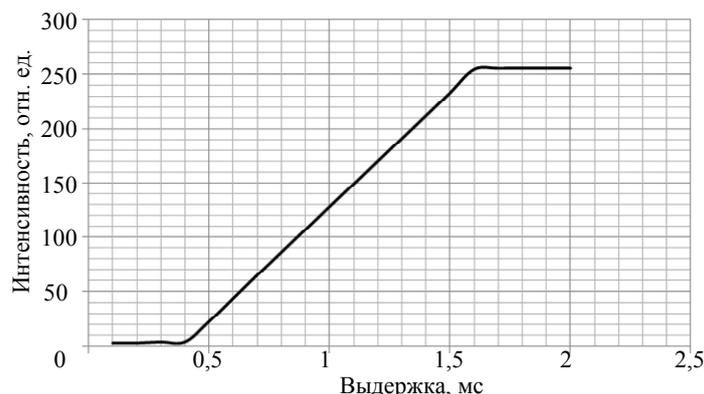


Рис. 1. Зависимость интенсивности в отдельной точке изображения от значения выдержки

В данном примере при значении выдержки, равном 1 мс, интенсивность наиболее близко расположена к середине динамического диапазона видеоматрицы.

### Экспериментальные результаты

Для апробации предложенного метода формирования гиперспектральных данных о микрообъектах с высокой степенью пространственной неравномерности распределения оптической плотности был создан экспериментальный образец микроскопа-гиперспектрофотометра, блок-схема которого показана на рис. 2.



Рис. 2. Блок-схема экспериментального образца микроскопа-гиперспектрофотометра

Микроскоп-гиперспектрофотометр построен на основе микроскопа Микмед-6 (вариант 7), освещаемого на различных длинах волн с помощью монохроматора МДР 206 с дифракционной решеткой 1200 штр/мм и осветителем с галогенной лампой. Для регистрации изображений использована черно-белая видеокамера VAC-135 форматом 1280×1024 элементов. Для формирования изображений микрообъектов в плоскости видеокамеры использовался адаптер с линейным полем зрения 1/2" и увеличением 1<sup>×</sup>. Микрообъективы имели увеличение и числовые апертуры 10<sup>×</sup>/0,25 и 40<sup>×</sup>/0,65 соответственно. Экспериментальный образец микроскопа-гиперспектрофотометра формирует гиперспектральные данные при последовательном изменении длины волны излучения, освещающего микрообъект.

На рис. 3 показан пример набора изображений микрообъекта *Uterus quer mit Larven*, сформированных с помощью микрообъектива с увеличением 40<sup>×</sup> при освещении микрообъекта на длине волны 550 нм и зарегистрированных с различным временем выдержки. Из рис. 3 видно, что для отображения структуры микрообъекта без потери информации по всему полю зрения некоторые участки изображения должны быть получены при малых выдержках, а другие участки изображения – при больших выдержках.

На рис. 4 показаны два изображения микрообъекта, полученные с микрообъективом 40<sup>×</sup> при двух значениях выдержки, 0,5 мс и 2,0 мс, на длине волны 600 нм. С учетом изображения базовой линии по формуле (1) были рассчитаны коэффициенты пропускания для локального участка 1 ( $T_1 = 19,0\%$ ) с использованием изображения, полученного с выдержкой 0,5 мс, а для локального участка 2 ( $T_2 = 1,4\%$ ), приходящемся на оптически более плотную область микрообъекта, – с использованием второго изображения, полученного с выдержкой 2,0 мс. Из рис. 4 видно, что детали микроструктуры на локальном участке 1 ясно различимы на рис. 4, а, тогда как изображение на рис. 4, б, содержит информацию о структу-

ре микрообъекта на локальном участке 2. Таким образом, совместное использование набора изображений, сформированных и зарегистрированных в соответствии с предлагаемым методом, позволяет получить полную информацию о структуре микрообъекта по всему полю зрения в различных длинах волн.

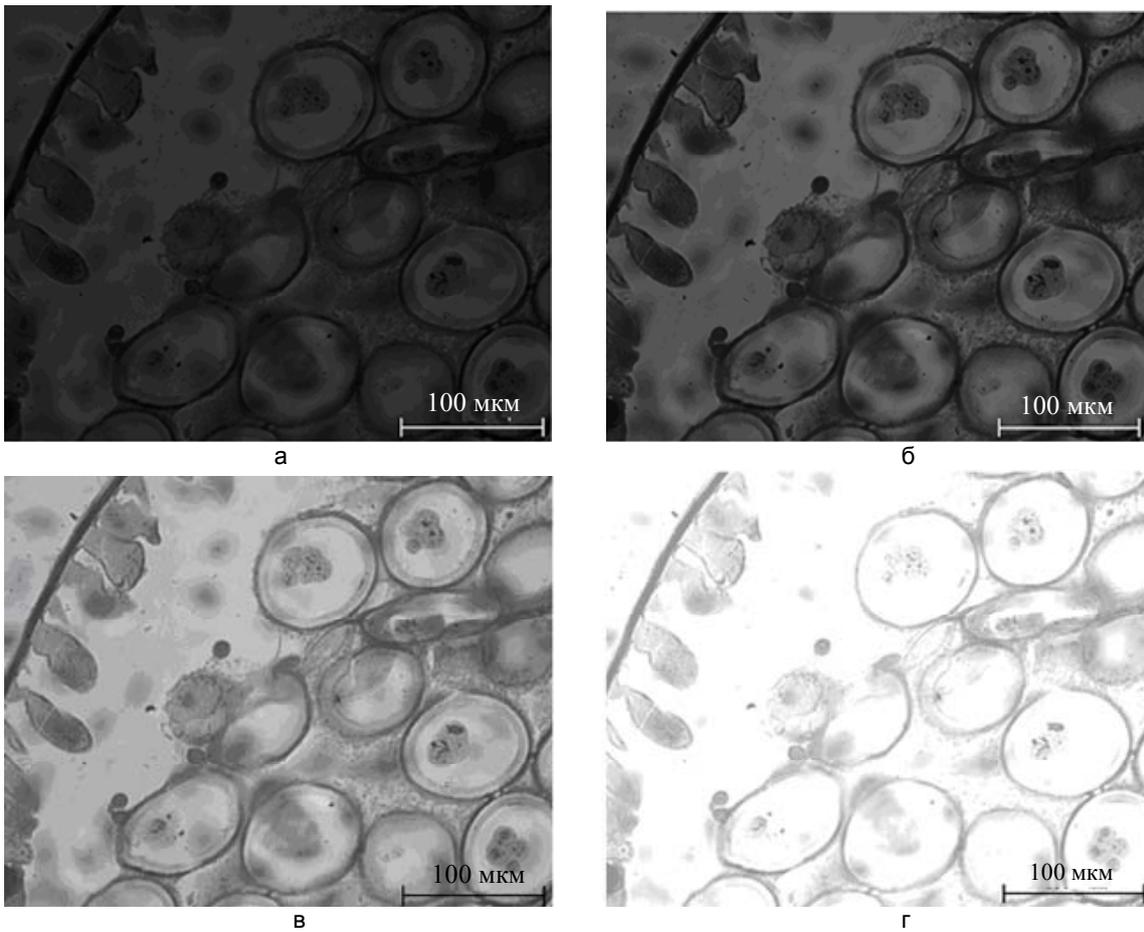


Рис. 3. Набор изображений, полученный на длине волны 550 нм с микрообъективом 40<sup>х</sup> и выдержкой 0,2 мс (а); 0,8 мс (б); 1,4 мс (в); 2,0 мс (г)

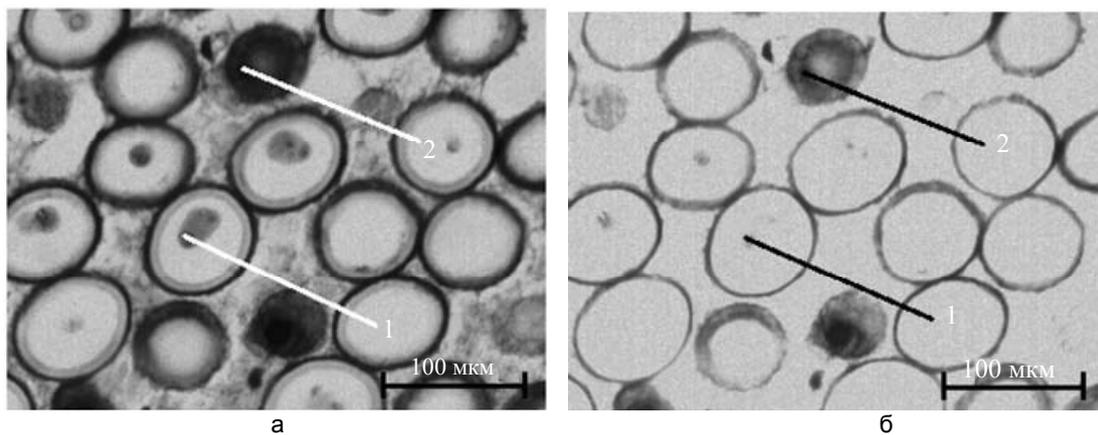


Рис. 4. Изображения, полученные на длине волны 600 нм с микрообъективом 40<sup>х</sup> и выдержкой 0,5 мс (а); 2,0 мс (б). Коэффициенты пропускания локальных участков 1 и 2 равны  $T_1 = 19,0\%$  и  $T_2 = 1,4\%$

#### Заключение

Экспериментальная апробация предложенного метода формирования гиперспектральных данных о микрообъектах с высокой степенью пространственной неравномерности распределения оптической плотности показала возможность его применения для исследования спектральных свойств локальных особенностей медицинских и биологических препаратов.

Метод показал высокую эффективность при регистрации спектра пропускания различных участков микроструктуры клеток, который имеет большой диапазон изменения оптической плотности. Разработанные алгоритмы и компьютерные программы позволяют использовать микроскоп-гиперспектрофотометр во многих областях биомедицинских исследований.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

#### **Литература**

1. Гуров И.П., Лопатин А.И., Мельников А.В. Метод компенсации спектральной неоднородности источника излучения подстройкой его цветовой температуры для гиперспектральных приложений в микроскопии // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2012. – № 5 (81). – С. 38–42.
2. Nayar S.K., Branzoi V. Adaptive dynamic range imaging: optical control of pixel exposure over space and time // Proc. the Ninth IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). – 2003. – V. 2. – P. 1168–1175.
3. Nuske S., Roberts J., Wyeth G. Extending the dynamic range of robotic vision // Proc. IEEE Int. Conference on Robotics and Automation. – 2006. – P. 162–167.
4. Понс Ж., Форсайт Д. Компьютерное зрение: Пер. с англ. – М.: Вильямс, 2004. – 928 с.
5. Белашенков Н.Р., Гуров И.П., Лопатин А.И., Мельников А.В. Микроскоп-спектрофотометр с матричным фотоприемником // Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО. – 2007. – № 9 (43). – С. 260–265.
6. Бобровников Л.З. Электроника. – СПб: Питер, 2004. – 560 с.

- Гуров Игорь Петрович** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой, gurov@mail.ifmo.ru
- Лопатин Александр Иосифович** – ОАО «ЛОМО», кандидат физ.-мат. наук, главный оптик, ailopatin@gmail.com
- Мельников Алексей Викторович** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, инженер-исследователь, melnikov.alexey@gmail.com