

文章编号: 1002-1582(2025)06-0641-08

基于强度传输方程的生物显微多图像聚焦恢复技术

程鸿^{1*}, 张天一¹, 孔勤², 张成¹, 卞锦超¹

(1. 安徽大学 电子信息工程学院, 安徽 合肥 230601)

(2. 合肥师范学院 电子信息与集成电路学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要: 针对使用显微镜观察生物样本时, 视野出现的样本个体对应的聚焦位置不同造成无法全部聚焦成像的问题, 提出了一种基于强度传输方程的多图像聚焦恢复技术。通过设计的图像采集装置, 两个相机分别拍摄一次获取样本聚焦和散焦强度图, 结合强度传输方程求解出相位信息, 再利用角谱传播算法恢复不同深度细胞的聚焦状态。技术无需复杂、高成本的硬件改装即可避免传统方法中因机械调节带来的误差, 同时可以获得高精度相位信息。模拟的血红细胞实验表明, 算法恢复后细胞的聚焦误差降低到恢复前误差值的18.18%。利用植物组织和昆虫组织的实验验证了该技术对于离散和连续生物组织的聚焦位置恢复都有较好的普适性。

关 键 词: 显微成像; 多图像聚焦; 强度传输方程; 相位; 角谱传播

中图分类号: O438.2

文献标识码: A

Multi-image focus retrieval technology for biological microscopy based on the transport of intensity equation

CHENG Hong^{1*}, ZHANG Tianyi¹, KONG Meng², ZHANG Cheng¹, BIAN Jinchao¹

(1. School of Electronic and Information Engineering, Anhui University, Hefei 230601, China)

(2. School of Electronic Information and Integrated Circuits, Hefei Normal University, Hefei 230601, China)

Abstract: To address the issue of varying focal positions of individual sample objects in the field of view when observing biological samples under a microscope, which prevents full-focus imaging, a multi-image focus retrieval technique based on the Transport of Intensity Equation (TIE) is proposed. Using the designed image acquisition device, intensity maps of both focused and defocused states of the sample can be obtained without the need for mechanical movement. The phase information is then solved using the Transport of Intensity Equation, and the angular spectrum propagation algorithm is used to retrieve the focused states of cells at different depths. This technique avoids the errors introduced by mechanical adjustments in traditional methods without the need for complex or high-cost hardware modifications, while also providing high-precision phase information. Simulation experiments on red blood cells show that the focus error of the cells is reduced to 18.18% after retrieval. Experiments on plant tissue and insect tissue further validate the applicability of this technique for focus retrieval in both discrete and continuous biological tissues.

Keywords: microscopic imaging; in-focus; transport of intensity equation; phase; angular spectrum propagation

0 引 言

生物样本的聚焦图像相较于其散焦图像往往

能提供更多的样本细节, 例如微小细胞的位置、细胞壁的形态、细胞核的数量等。因此, 利用显微镜获取样本的聚焦图像, 在微生物结构观察及

收稿日期: 2025-04-01; 收到修改稿日期: 2025-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(62271005); 安徽省高等学校自然科学基金(KJ2020ZD02、2022AH050089)

作者姓名: 张天一(2000—), 男, 硕士研究生, 从事定量相位成像方面研究。2510336300@qq.com

程鸿(1981—), 女, 副教授, 博士, 从事信息处理、计算机视觉、定量相位成像方面的研究。

* 通讯作者: chenghong@ahu.edu.cn

数字病理诊断中具有重要意义^[1-3]。然而,使用显微镜观察生物样本时,视野中往往会出现大量不同的样本个体,此时每个细胞处于不同的平面上,即对应的聚焦位置不尽相同,通常需要通过频繁调整准焦螺旋拍摄大量图像^[4-7]获得。

为了解决生物样本中每个细胞聚焦图像难以获得的问题,很多专家学者进行了深入研究^[8]。2013年,南昌航空大学的邹方卫根据光学显微镜的结构特性,提出了基于经验位置的快速自动聚焦方法,该方法能够快速定位焦点,但是硬件设备复杂,且恢复结果仍存在较大的误差^[9]。2019年,Rivenson Yair等基于卷积神经网络,利用离焦图计算对焦图,但系统需要足够的训练成本、更换场景需重新训练^[10]。2022年,中国科学院大学金思宇等针对显微系统,提出了多层面快速自动对焦系统,可以快速实现多图像聚焦恢复,但是针对细胞等透明样本恢复效果欠佳^[11]。2024年,加州大学的Veronica Gomez Godinez等设计了一个双焦点相位成像元器件,将它与强度传输方程结合,可以观察到不同平面胚胎肾细胞的消融过程,但是该器件定制过程复杂,成本较高^[12]。

光场中的相位携带绝大部分的样本信息,如物体的深度、轮廓、折射率等,而CCD等光探测器无法获取。因此,以强度传输方程(Transport of Intensity Equation, TIE)为代表的非干涉相位恢复算法得到了广泛的运用^[13]。本文考虑结合光场信息获得生物样本中每个细胞的聚焦图像,提出了基于强度传输方程的多图像聚焦恢复技术。通过显微镜在无需机械移动的条件下采集样本的聚焦强度图和散焦强度图,结合强度传输方程求解相位结果,合成复振幅后传播合适的距离,便可恢复不同细胞聚焦时的状态。所提方法可以应用于普通光学显微镜,不需要复杂的硬件改装,并且避免了传统方法存在的机械误差。

1 基本原理

1.1 传统的基于强度传输方程的相位恢复算法

1983年,Teague利用亥姆霍兹方程在傍轴近似条件下首次推导得出强度传输方程^[13],表示为

$$-k \frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z} = \nabla_{\perp} [I(x, y, z) \nabla_{\perp} \phi(x, y, z)] \quad (1)$$

式中, k 为波数, $I(x, y, z)$ 为强度信息, $\frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z}$ 为光强的轴向微分; $\nabla_{\perp}$ 为梯度算子; $\phi(x, y, z)$ 表示待求解的相位。求解强度传输方程的传统算法有多种^[14-16], 其中最为经典的是傅里叶

变化解法^[17], 假设光波场的强度是均匀的, 在傍轴近似条件下, 对波动方程计算整理可以求解得到相位, 表示为

$$\phi(x, y, z) = F^{-1} \left[\frac{F \left(-\frac{k}{I(x, y, z_0)} \frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z} \right)}{4\pi^2 d z (f_x^2 + f_y^2)} \right] \quad (2)$$

式中, z_0 为传播距离, $I(x, y, z_0)$ 为 z_0 位置处像平面的强度分布; f_x 和 f_y 分别表示 x 方向和 y 方向的频率坐标; dz 是距离的轴向微分; F 表示为傅里叶变换, F^{-1} 表示为傅里叶逆变换。光强轴向微分 $\frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z}$ 可以用有限差分近似得到

$$\begin{aligned} \frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z} &= \frac{I(x, y, z_0 + \Delta z) - I(x, y, z_0)}{\Delta z} \end{aligned} \quad (3)$$

式中, $I(x, y, z_0 + \Delta z)$ 为 $z_0 + \Delta z$ 位置处像平面的强度分布, Δz 为距离步长。

传统的TIE相位恢复求解过程存在一些不足之处。首先 $I(x, y, z_0)$ 和 $I(x, y, z_0 + \Delta z)$ 是用光学显微镜通过两次拍摄得到的, 机械移动会导致误差。另外, 因为TIE是一个二阶椭圆偏微分方程, 其解的“良定性”和“唯一性”需要满足合适的边界条件, 例如Dirichlet边界条件和Neumann边界条件, 然而, 实验条件往往并不满足这一假设, 会导致出现边界伪影^[18]。

1.2 基于强度传输方程的多图像聚焦恢复算法

针对一幅样本图像中不同的细胞聚焦位置处于不同平面, 无法一次观察到所有细胞聚焦状态的问题。本文提出了基于强度传输方程的生物显微多图像聚焦恢复算法。该算法包括三个模块: 强度图像获取模块, 相位恢复模块以及角谱传播模块, 算法框图如图1所示。

1.2.1 强度图像获取模块

设计搭建的图像采集系统的装置原理图如图2所示, 其中图2(a)是显微镜。在显微镜出光口位置设置一个分束器, 如图2(c)所示, 分束器成90度角的两侧分别放置一个CCD相机, 一个位于焦点位置处, 另一个位于距离焦点 Δz 处, 相机如图2(d)所示, 两个CCD相机分别用相同的相机支架固定, 支架如图2(b)所示, 这样可以使使用两个相机分别拍摄一次得到一幅聚焦强度图

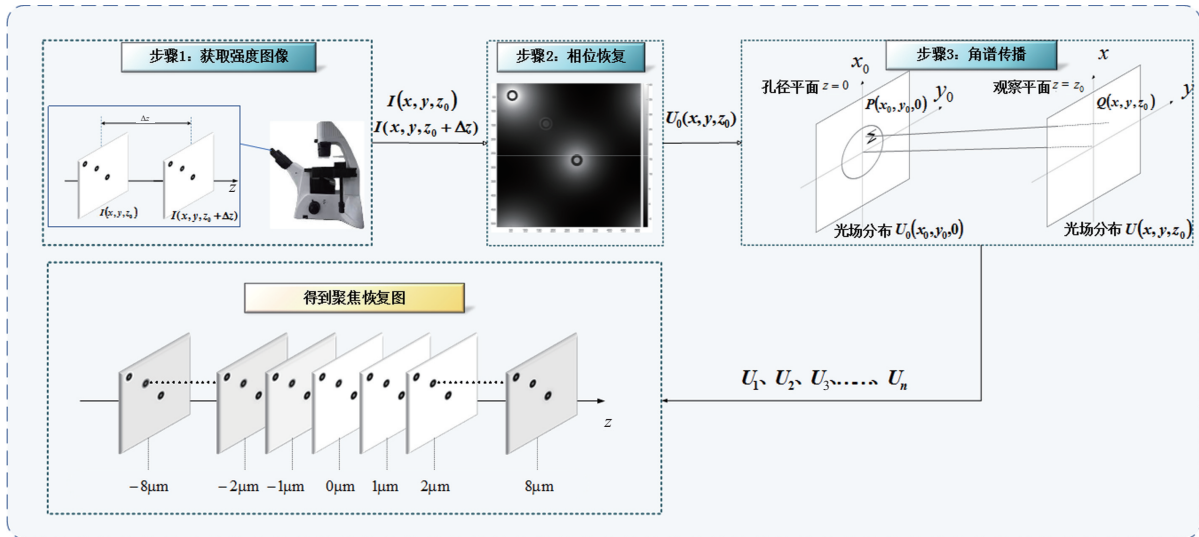


图1 算法框图

$I(x, y, z_0)$ 和一幅散焦强度图 $I(x, y, z_0 + \Delta z)$, 从而避免机械移动导致的误差。

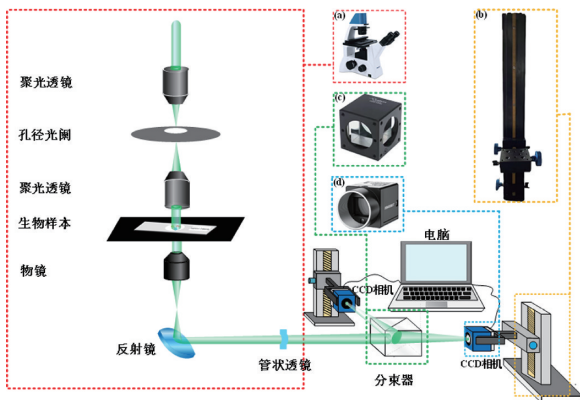


图2 图像采集系统的装置原理图

1.2.2 相位恢复模块

将 1.2.1 节采集得到的两幅强度图 $I(x, y, z_0)$ 、 $I(x, y, z_0 + \Delta z)$ 作为相位恢复模块的输入。为了解决传统 TIE 求解中存在的多种局限性, 本模块使用强度传输方程的通用解法^[19]。算法具体步骤如下所示, 首先设置迭代次数为 n , 强度轴向微分为 L_{n-1} , 迭代开始时令 $n=1$, 计算得到迭代开始时的强度轴向微分 $L_{n-1}|_{n=1}$, 表示为

$$L_{n-1}|_{n=1} = \frac{\partial I(x, y, z)}{\partial z} = \frac{I(x, y, z_0 + \Delta z) - I(x, y, z_0)}{\Delta z} \quad (4)$$

令 $\Delta L_{n-1}|_{n=1}$ 为强度轴向微分的初始变化量, $\Delta L_{n-1}|_{n=1} = L_{n-1}|_{n=1}$ 。设置初始相位 $\phi_0(x, y, z) = 0$ 。随后, 假设聚焦面上的强度分布是一个常量, 设这个常量为 $I_{\max}$, 这可以使 TIE

方程得到简化, 表示为

$$-kL_{n-1} = I_{\max} \nabla_{\perp}^2 \varphi_{n-1}(x, y, z) \quad (5)$$

式中 $\varphi_{n-1}(x, y, z)$ 为待更新的相位估计。式 (5) 这是一个标准的泊松方程, 其解法简单且避免了传统方法中光强接近零的情况导致误差变大的问题。在最大强度假设下, 强度传输方程的通用解法方法可以通过求解泊松方程得到相位的初始估计。泊松方程可以使用快速傅里叶变换来高效求解, 更新得到相位分布的表示为

$$\varphi_{n-1}(x, y, z) = -\frac{k}{I_{\max}} \nabla_{\perp}^{-2}(L_{n-1}) \quad (6)$$

将得到的新的相位估计 $\varphi_{n-1}(x, y, z)$, 代入式 (6), 计算得到新的强度轴向微分 L_n 为

$$L_n = -\frac{1}{k} \nabla_{\perp} \cdot [I(x, y, z) \cdot \nabla_{\perp} \varphi_{n-1}(x, y, z)] \quad (7)$$

第三步是计算当前迭代得到的强度轴向微分 L_n 与迭代前的强度轴向微分 L_{n-1} 之间的差异 ΔL_n , 表示为

$$\Delta L_n = L_n - L_{n-1} \quad (8)$$

将 ΔL_n 代入式 (2), 得到相位的修正值 $\Delta \varphi_n(x, y, z)$

$$\Delta \varphi_n(x, y, z) = -\frac{k}{I_{\max}} \nabla_{\perp}^{-2}(\Delta L_n) \quad (9)$$

于是可以得到新的相位估计 $\varphi_n(x, y, z)$

$$\varphi_n(x, y, z) = \varphi_{n-1}(x, y, z) + \Delta \varphi_n(x, y, z) \quad (10)$$

到这里为止完成了一次迭代。结束后判断是否符合迭代终止条件, 如果此时导数差异 ΔL_n 的范数不低于提前设定的阈值 ϵ , 则认为不收敛, 那么返回进行下一轮迭代。如果 ΔL_n 低于 ϵ , 则认为收敛, 得到的新的相位估计即需要求解的相位, 将最终的符合收敛条件相位估计设定为 $\phi(x, y, z_0)$ 。

1.2.3 角谱传播模块

将上节获取的相位 $\phi(x, y, z_0)$ 和强度图像 $I(x, y, z_0)$ 合成, 得到 $z = z_0$ 孔径平面的复振幅 $U_0(x, y, z_0)$, 表示为

$$U_0(x, y, z_0) = \sqrt{I(x, y, z_0)} e^{i\phi(x, y, z_0)} \quad (11)$$

将 $U_0(x, y, z_0)$ 进行角谱传播, 假设正向传播距离 Δd_1 后的观察平面复振幅表示为 $U_1(x, y, z_0 + \Delta d_1)$, 反向传播 Δd_2 距离后的复振幅表示为 $U_2(x, y, z_0 - \Delta d_2)$ 。以正向传播为例, 利用傅里叶性质, $U_1(x, y, z_0 + \Delta d_1)$ 与它的频谱函数为式 (12)。式中, $A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, z_0 + \Delta d_1\right)$ 称为观察平面复振幅的角谱, $e^{-2\pi i\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}x + \frac{\cos \beta}{\lambda}y\right)}$ 是传播方向余弦为 $(\cos \alpha, \cos \beta)$ 的单位振幅的单色平面波, λ 为波长。设置孔径平面复振幅的角谱为 $A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, z_0\right)$, 孔径平面和观察平面的角谱传播规律表示为

$$A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, z_0 + \Delta d_1\right) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U_1(x, y, z_0 + \Delta d_1) \cdot e^{-2\pi i\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}x + \frac{\cos \beta}{\lambda}y\right)} dx dy \quad (12)$$

$$A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, z_0 + \Delta d_1\right) = A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, z_0\right) \cdot e^{jk\Delta d_1\sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta}} \quad (13)$$

从式 (13) 可知, 如果得到 $z = z_0$ 平面的角谱, 则可数学表达出正向传播距离 Δd_1 时的角谱, 最后对公式进行傅里叶反变换可以得到 $z = z_0 + \Delta d_1$ 平面复振幅。由此可知通过 $U_0(x, y, z_0)$ 可计算得到 $U_1(x, y, z_0 + \Delta d_1)$, 表示为

$$U_1(x, y, z_0 + \Delta d_1) = F^{-1}\left\{F\left\{U_0(x, y, z_0)\right\} \cdot e^{\frac{j2\pi}{\lambda}\Delta d_1\sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta}}\right\} \quad (14)$$

在角谱传播不同的距离得到不同传播平面的复振幅后, 取模求平方, 分别取其强度, 从而实现多样本图像的聚焦恢复。

1.3 计算复杂度分析

为了检验本文所提算法能否满足实际应用中

对快速成像的需求, 进行计算复杂度分析。

假设强度图像获取模块中拍摄得到的聚焦、散焦强度图分辨率为 $M \times N$, 相位恢复模块中迭代 Iter 次满足收敛条件, 角谱传播模块中传播 Num 次距离。其中, 相位恢复模块每次迭代都会用傅里叶变化解法求解一次泊松方程, 复杂度为 $O[\text{Iter} \times NM \log_2 MN]$, 角谱传播模块中每次传播涉及两次二维傅里叶变换, 则该模块复杂度为 $O[\text{Num} \times NM \log_2 MN]$, 最终得到本文算法计算复杂度 O 为

$$O = O[(\text{Iter} + \text{Num}) \times NM \log_2 MN] \quad (15)$$

分析式 (15), 可得影响总体复杂度的主导因素是图像分辨率, 其次为迭代次数和角谱传播的次数。

2 实 验

2.1 模拟实验

模拟实验使用的红细胞结构由函数模型^[20]得到, 物平面由三个红细胞与透明背景构成。图像像素数量为 512×512 , 像素尺寸为 $6\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$, 光波长为 532nm , 红细胞半径为 $3.325\mu\text{m}$ 。模拟显微成像 40 倍放大率下的红细胞。其中振幅为红细胞对光强的衰减效果 (根据朗伯比尔定律由细胞的厚度及吸收系数得出)。红细胞折射率设置为 1.40, 由此可根据所使用光波波长得到穿过细胞的波前相位。

假设三个红细胞的聚焦位置均处于同一平面, 此时物平面的强度图如图 3 (a) 所示。三个红细胞除位置不同外, 其余参数均相同, 因此聚焦时的状态也完全相同。对强度图中三个细胞分别命名为细胞 1、细胞 2、细胞 3。随后对细胞 2 和细胞 3 分别进行角谱传播, 令细胞 2 处于过焦状态 (距离此平面正向 $2\mu\text{m}$); 令细胞 3 处于欠焦状态 (距离此平面负向 $2\mu\text{m}$), 而保持细胞 1 不变, 传播后得到新的物平面强度图如图 3 (b) 所示。将图 3 (b) 沿反向传播 $1\mu\text{m}$ 后, 得到的强度图如图 3 (c) 所示。图 3 (g) 是图 3 (a) 中细胞 2 和细胞 3 的局部放大图, 作为参照物进行比较。图 3 (h)、(i) 是如图 3 (b) 中的细胞 2 和细胞 3 的局部放大图。

将图 3 (b)、(c) 作为强度传输方程的输入, 利用相位恢复模块恢复得到样本的相位如图 3 (f) 所示。将图 3 (f) 恢复得到的相位和图 3 (b) 的强度合成复振幅。以 $1\mu\text{m}$ 为步长, 将复振幅分别沿正向和负向以 $1\mu\text{m}$ 为单位最大传播 $3\mu\text{m}$, 分别取它们的振幅部分, 得到 5 幅强度图。将复振幅沿正向传播 $2\mu\text{m}$ 恢复得到细胞 2 的聚焦强度图, 将复

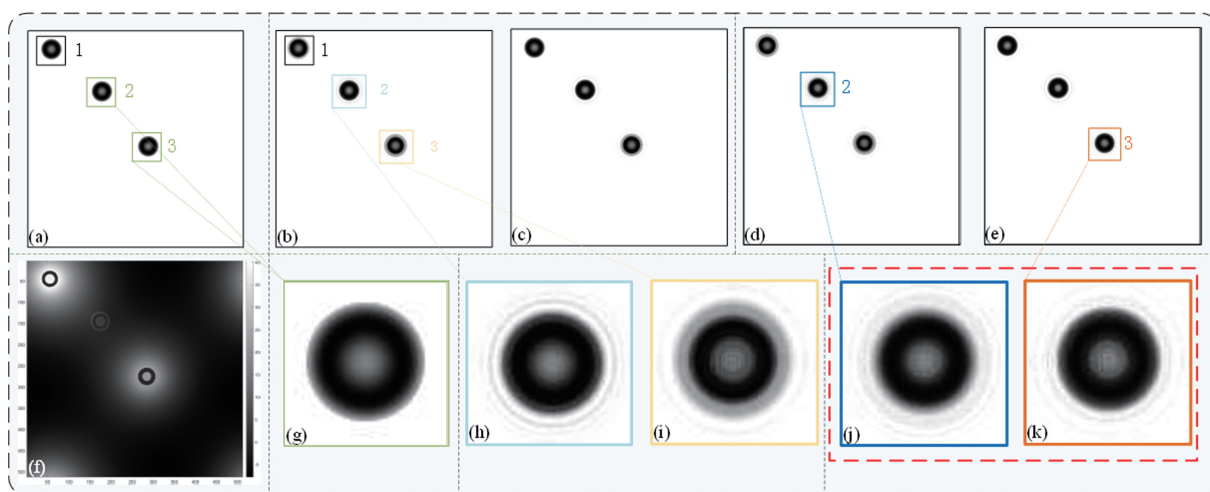


图3 三个血细胞的强度图和相位图

振幅沿负向传播 $2\mu\text{m}$ 恢复得到细胞3的聚焦强度图, 分别如图3 (d)、(e) 所示。将细胞2和细胞3的恢复结果进行局部放大, 得到图3 (j)、(k)。恢复后的结果与图3 (h)、(i) 对比, 发现算法有效改善了边界光圈和阴影现象, 更接近理想聚焦状态。

在图3 (a)、(b), 图3 (d)、(e) 上分别画一条位置相同的截线, 该截线经过细胞2和细胞3, 对应得到图4 (d) ~ (g)。绘制截线上的强度值随其延伸距离变化的示意图, 其中图4 (h) ~ (j) 蓝色虚线方框对应经过细胞2的截线强度变化, 图4 (a) ~ (c) 红色虚线方框对应经过细胞3的截线强度变化。其中, 横坐标为截线延伸的距离, 纵坐标为强度值。将算法恢复前后的截线强

度值与细胞聚焦时的截线强度值进行对比, 如果算法恢复后的结果更接近聚焦时的强度值, 则说明本文所提算法可以实现模拟实验中多样本图像的聚焦恢复。对比可发现, 当细胞2处于聚焦状态时, 经过细胞2的截线强度最低值为0.27, 算法恢复前经过细胞2的截线强度最低值为0.16, 而本文算法恢复后, 经过细胞2的截线强度最低值为0.29, 计算得到聚焦恢复误差降低到恢复前误差值的18.18%。当细胞3处于理想的聚焦状态时, 经过细胞3的截线强度最低值为0.00, 而使用本文算法恢复前经过细胞3的截线强度最低值为0.10, 恢复后, 经过细胞3的截线强度最低值为0.02, 计算得到聚焦恢复误差降低到恢复前误差值的20.00%。

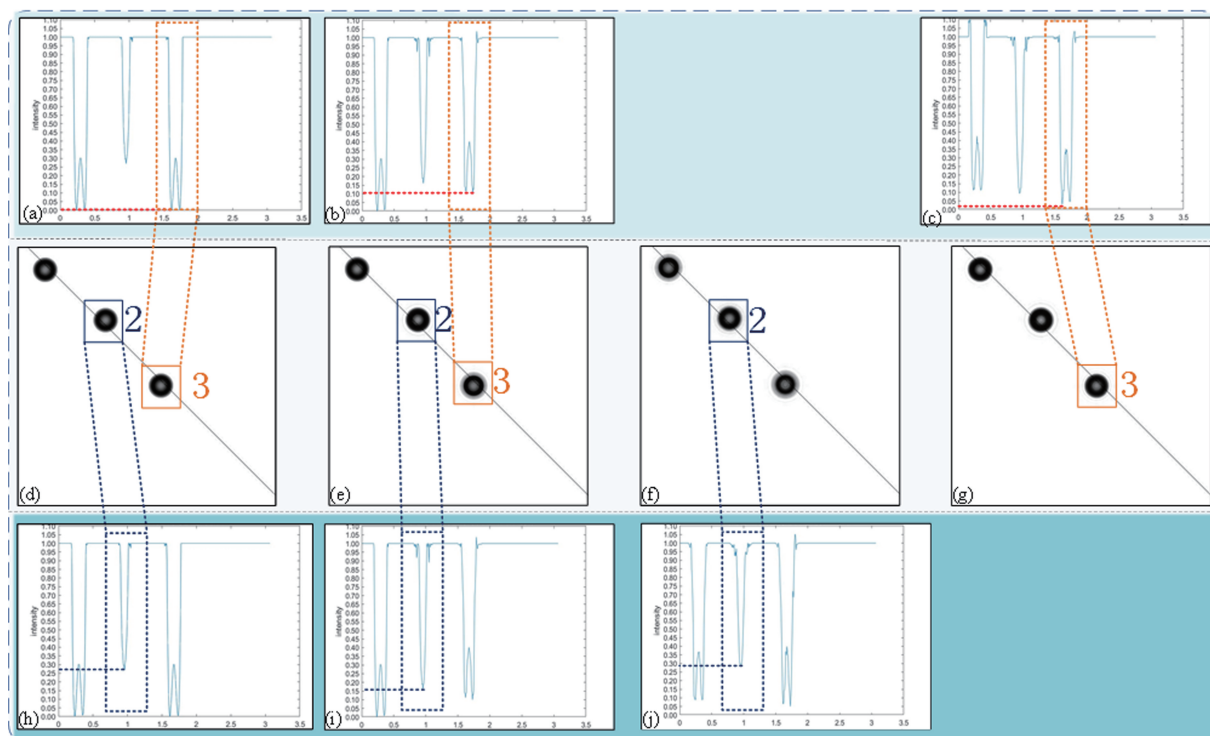


图4 聚焦恢复效果定量分析

为了更直观地对算法恢复效果,本文以细胞2为例,将理想聚焦状态、算法恢复前和算法恢复后的强度值曲线合并在一张图中,曲线分别用蓝色,绿色,红色表示,并将细胞2对应的曲线范围用紫色虚线框表示,随后局部放大,如图5所示。可以明显看出在紫色虚线框范围内,算法恢复后的曲线要和理想聚焦状态下的曲线更吻合。

综上,通过定性和定量实验,证明了对于欠焦和过焦状态下细胞强度图,经过本文算法恢复后强度值都要明显接近于理想状态下聚焦的效果。

2.2 真实实验

本文实际搭建的强度图像获取模块如图6(a)所示。实验装置放置在WSZ-1D型精密光学平台上,该平台表面相邻孔位间距25mm,每个孔直径6mm,如图6(b)所示。将倒置显微镜(MI52, M shot)放置在台上,并在其出光孔前方125mm处安装调节支座(GCM-030334M),该支座底部配有M6螺栓,可稳固固定于平台孔位上。BS分光棱镜安装于调节支座之上,如图6(c)所示。在支座上固定分光棱镜使其中心与出光孔中心在

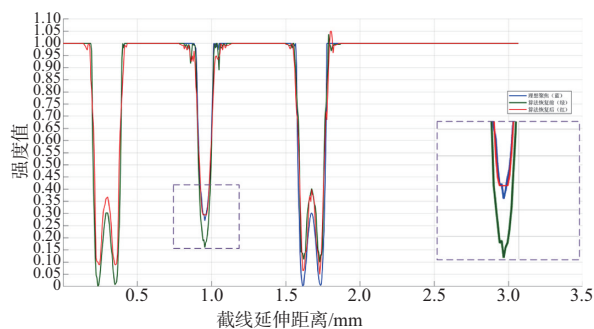


图5 细胞2聚焦恢复效果定量分析

装置搭建完毕后,开始实验。使用倒置显微镜内置的LED的白光作为光源,随后通过一个中心波长为650nm、半高宽为22mm的滤光片进行滤波,滤波后穿过显微镜出光孔,照射在BS分光棱镜上,分光棱镜两侧的CCD相机分别拍摄得到聚焦强度图和散焦强度图。相机通过线缆与电脑连接,使用配套的MVS拍摄软件拍摄图像。

首先选用动物组织昆虫走路足进行实验,其中昆虫走路足主要以连续的细胞为主。用0.6NA的40倍物镜观察到的昆虫走路足组织的聚焦、散焦强度图如图7(a)、(b)所示,图像分辨率为 2048×2048 ,散焦距离为 $10\mu\text{m}$ 。首先对比本文所用TIE通用算法和传统傅里叶变化解法^[17]对相位边界伪影问题的解决情况,将图7(a)、(b)作为两种相位恢复算法的输入,求解得到相位分别如图7(c)、(d)所示,其中本文算法经过4次迭代

一条直线上。图6(d)、(e)分别展示了相机支架的局部结构细节。其中,图6(d)为支架底座结构图,其相邻孔位间距为50mm。在分光棱镜支座两侧、与其呈90度夹角且距其中心200mm的位置处,分别使用M6螺钉固定两个相机支架底座。图6(e)是相机支架的纵轴、横轴和水平方向、竖直方向的滑块。滑块和横、纵轴都有刻度,相邻刻度均为 $10\mu\text{m}$ 。两个滑块分别由蓝色旋钮控制,竖直方向的滑块夹取相机,上下移动来调整相机竖直方向的位置,水平方向的滑块上固定支架的纵轴,可以前后移动滑块来调整相机水平方向的位置。固定好两个底座后,两个支架夹子分别夹取一个CCD相机(MV-CU120-UC)。随后分别调整两个支架竖直方向的滑块,使它们的“0”刻度都对准纵轴的“45”刻度处,再调节水平方向的滑块,使其中一个支架的滑块“0”刻度对准支架横轴“75”刻度处,另一个支架的滑块“0”刻度对准支架横轴“74”刻度处,这样就使两个相机都处于同一水平高度,并且分别拍摄聚焦、散焦强度图,散焦距离为 $10\mu\text{m}$ 。

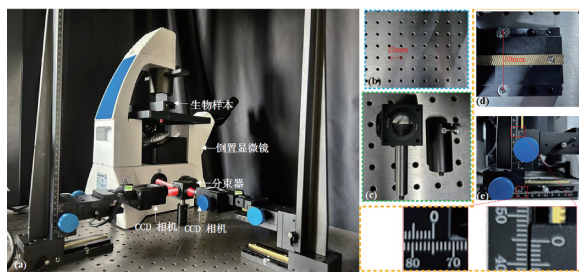


图6 硬件装置示意图

后收敛。分别用红色和蓝色实线方框标记图7(c)、(d)位置相同的边界区域,并进行局部放大,对应得到图7(e)~(h),分别对比图7(e)、(g)和图7(f)、(h),可以看出本文所用相位恢复算法相较于传统算法,对边界伪影有抑制作用。

接下来验证本文聚焦恢复算法的效果,用蓝色、红色、黄色虚线方框分别标记出图7(a)聚焦强度图的区域1、2、3,如图8(a)所示。为了和算法恢复后的结果做对比,分别将算法恢复前的三个区域进行局部放大,得到图8(b)~(d)。将图7(c)的相位和图7(a)的聚焦强度合成为复振幅,反向角谱传播 $24\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$,取其强度,从而恢复得到区域1、2、3的聚焦状态,如图8(e)~(g)所示。为了对比,将算法恢复得到的结果分别进行局部放大,得到图8(h)~(j)。分别与图8(b)~(d)对比,可以观察区域1、2和区域3恢复后的结果相较于恢复前,能较明显看出昆虫

足组织的毛刺轮廓。通过式 (15), 计算得到本次实验的计算复杂度为 $O[7 \times 2048^2 \log_2 2048]$ 。

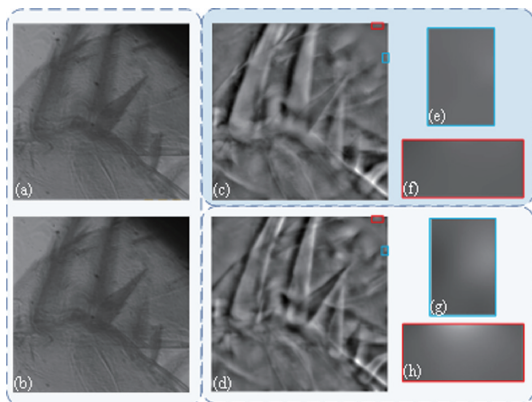


图7 本文所用相位恢复算法与传统相位恢复算法对比

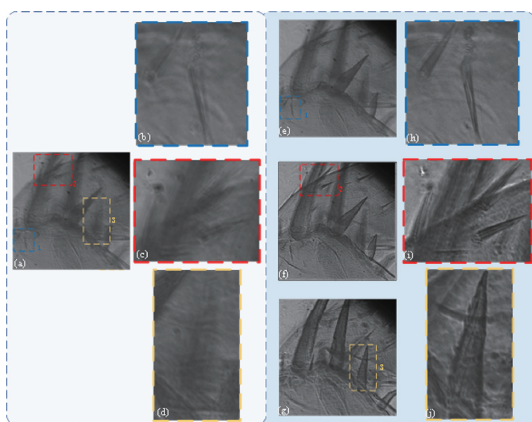


图8 算法恢复前后的昆虫走路足组织图片

为了证明本文算法的普遍性, 本节再使用植物组织团藻进行第二组实验, 选取的团藻组织中以离散的团藻细胞为主。用0.4NA的20倍物镜观察到的团藻组织的聚焦强度图如图9(a)所示, 用蓝色、红色、黄色虚线方框分别标记出细胞1的局部结构, 细胞2和细胞3, 无法同时观察到它们的细节。为了和算法恢复后的结果做对比, 分别进行局部放大, 得到图9(d)~(f)。图9(b)为另一个CCD相机拍摄得到的团藻组织的散焦强度图, 散焦距离为10 μm 。将图9(a)、(b)作为2.2节相位恢复模块的输入, 恢复得到的相位如图9(c)所示。

将图9(c)的相位和图9(a)的聚焦强度合成为复振幅, 反向角谱传播32 μm 和正向角谱传播40 μm , 52 μm , 分别取其强度, 恢复的到细胞1、2、3的聚焦状态, 如图9(g)~(i)所示。对应的局部放大图为图9(j)~(l)。分别与图9(d)~(f)对比, 可以观察到细胞1恢复后的结果相较于恢复前, 体现了更多的细节, 细胞2和细胞3恢复后的结果相较于恢复前, 较明显的体现出细胞核的形态。

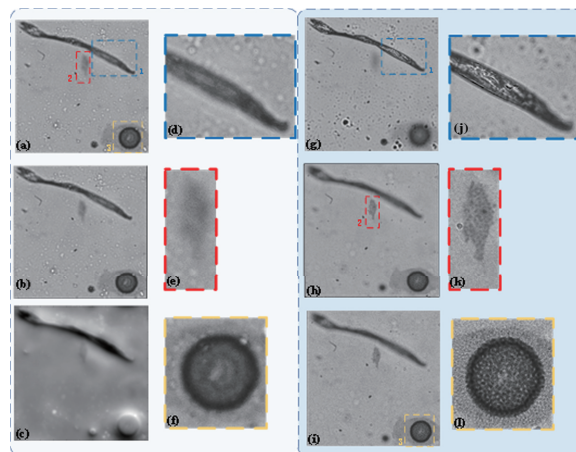


图9 算法恢复前后的团藻组织。

以上两组真实实验, 证明了使用本文算法可以恢复出多样本生物图像中不同细胞的聚焦状态, 本文算法既可以应用于离散细胞为主的植物组织, 也可以应用于以连续细胞为主的动物组织, 具备一定的普适性。

3 结论

针对多样本生物图像中不同细胞的聚焦位置处于不同平面, 难以观察不同细胞细节的问题, 本文研究了基于强度传输方程的生物显微多图像聚焦恢复技术。首先用搭建的实验装置中的两个相机分别拍摄一次获取一幅聚焦强度图和一幅散焦强度图, 随后通过求解强度传输方程得到定量相位结果。将相位结果和聚焦强度图合成复振幅, 传播不同的距离, 取其强度, 从而恢复得到处于不同平面细胞的聚焦图像。本文先使用血细胞模型进行定性和定量实验, 验证了算法的准确性, 随后分别使用团藻组织切片和昆虫足组织切片进行真实实验, 实验结果表明, 基于强度传输方程的多图像聚焦恢复技术可以有效恢复细胞的聚焦效果, 提供更多的细节信息。未来可以探究优化TIE相位恢复算法中的迭代步骤, 在提高相位恢复精度的同时减少迭代所用时间, 从而满足实际应用中快速成像的需求。

参考文献:

- [1] 海涌杰, 易定容, 黄彩虹, 等. 基于物方差动共焦轴向测量引导的显微镜自动对焦方法[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2024, 45(01):16—21.
Hai Yongjie, Yi Dingrong, Huang Caihong, et al. Microscope automatic focusing method based on height-Guidance of object-Side differential confocal axial measurement[J]. Journal of Huaqiao University(Natural Science), 2024, 45(01):16—21.
- [2] 何思琦, 樊润东, 陈智昊, 等. 超广角长出瞳距共聚焦眼底成像系统光学设计(特邀)[J]. 红外与激光工程, 2024, 53(10):72—80.

- He Siqi, Fan Rundong, Chen Zhihao, et al. Design of free-form uncooled infrared off-axis three-mirror optical system (Invited)[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2024, 53(10):72—80.
- [3] 张琪, 赵娜, 熊伟清. 基于离散 Curvelet 变换与自适应能量模型的多聚焦图像融合算法[J]. *光学技术*, 2018, 44(05):622—629.
- Zhang Qi, Zhao Na, Xiong Weiqing. Multi focus image fusion algorithm based on discrete Curvelet transform and adaptive energy model[J]. *Optical Technique*, 2018, 44(05):622—629
- [4] 吴洪妍, 孙玉鑫, 于秋阳, 等. 基于分区搜索算法的快速聚焦策略研究[J]. *光学技术*, 2023, 49(02):245—249
- Wu Hongyan, Sun Yuxin, Yu Qiuyang, et al. Research on fast auto focusing strategy based on partition search algorithm[J]. *Optical Technique*, 2023, 49(02):245—249.
- [5] 赵英然, 闫克丁, 杨树蔚. 小型 Wi-Fi 智能显微镜设计[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(22):198—203.
- Zhao Yingran, Yan Keding, Yang Shuwei. Small Wi-Fi smart microscope design[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(22):198—203.
- [6] Lucas B, Nicole J, Layland S L, et al. Raman imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy for diagnosis of cancer state and metabolic monitoring[J]. *Cancers*, 2021, 13(22):5682—5682.
- [7] Rajput S K, Kumar M, Xiangyu Q, et al. Three-dimensional fluorescence imaging using the transport of intensity equation[J]. *Journal of biomedical optics*, 2019, 25(3):1—7.
- [8] 李婧, 张恒义, 张乐, 等. 激光扫描共聚焦显微镜自动对焦研究[J]. *激光杂志*, 2006, (06):37—39.
- Li Jing, Zhang Hengyi, Zhang Le, et al. Study on auto focusing of laser scanning confocal microscopy[J]. *Laser Journal*, 2006, (06):37—39.
- [9] 邹方卫. 基于网络控制的自聚焦显微镜系统研究与实现[D]. 南昌: 南昌航空大学, 2013.
- Zou Fangwei. Research and implementation on microscope auto-focusing system based on network[D]. Nanchang Hangkong University, 2013. platforms[D]. Nanchang: Nanchang Hangkong University, 2013.
- [10] Yair R, Yichen W, Hongda W, et al. Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning[J]. *Nature methods*, 2019, 16(12):1323—1331.
- [11] 金思宇. 显微系统多层面快速自动对焦系统光学设计与验证[D]. 长春: 中国科学院大学(中国科学院长春光学精密机械与物理研究所), 2022.
- Jin Siyu. Optical design and verification of multi-layer rapid autofocus system for microscopic systems[D]. Changchun: University of Chinese Academy of Sciences (Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences), 2022.
- [12] Godinez VG, Zhou J X, Tian F L, et al. Eagle-Eye inspired meta-device for phase imaging[J]. *Advanced Materials*, 2024, 36(32):0935—9648
- [13] Teague M R. Deterministic phase retrieval: a Green's function solution[J]. *Josa*, 1983, 73(11):1434—1441
- [14] Kumar M, Awatsuji Y, Murata T, et al. Monitoring the dynamics of cultured tobacco cells division by TIE-based 3D fluorescence microscopy with two-synchronized image sensors[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2024, 178, 1—8.
- [15] Cheng H, Zhang H, Lu W, et al. An enhanced multimode phase imaging method based on the transport of intensity equation[J]. *Journal of Biophotonics*, 2024, 17(8), 3—9.
- [16] Bandyopadhyay J, Nguyen C M, Sakib A N, et al. Single-shot transport-of-intensity equation using a lateral-displacement-beam-splitter module for biological samples[J]. *Current Optics And Photonics*, 2024, 8(6):650—658.
- [17] Ichikawa K, Lohmann A W, Takeda M. Phase retrieval based on the irradiance transport equation and the Fourier transform method: Experiments[J]. *Applied Optics*, 1988, 27(16):3433—3436.
- [18] Zuo Chao, Chen Qian. Computational optical imaging: An overview[J]. *Infrared and Laser*, 2022, 51(02):158-341.
- [19] Zhang J, Chen Q, Sun J, et al. On a universal solution to the transport-of-intensity equation[J]. *Opt Lett*, 2020, 45:3649—52.
- [20] Park H J, Hong S H, Kim K, et al. Characterizations of individual mouse red blood cells parasitized by *Babesia microti* using 3-D holographic microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1):10827.