



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA INFORMAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF INFORMATION TECHNOLOGY

ÚSTAV POČÍTAČOVÉ GRAFIKY A MULTIMÉDIÍ

DEPARTMENT OF COMPUTER GRAPHICS AND MULTIMEDIA

KALIBRACE FLUORESCENČNÍHO OPTICKÉHO MIKROSKOPU S POMOCÍ ELEKTRONOVÉHO OBRAZU

FLUORESCENCE LIGHT MICROSCOPE CALIBRATION BASED ON IMAGE FROM ELECTRON

MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUKÁŠ ERLICH

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTIN ČADÍK, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce



147473

Ústav: Ústav počítačové grafiky a multimédií (UPGM)
Student: **Erlich Lukáš, Bc.**
Program: Informační technologie a umělá inteligence
Specializace: Vývoj aplikací
Název: **Kalibrace fluorescenčního optického mikroskopu s pomocí elektronového obrazu**
Kategorie: Zpracování obrazu
Akademický rok: 2022/23

Zadání:

1. Seznamte se s využitím skenovacího elektronového mikroskopu s integrovaným optickým modulem pro zpracování biologických vzorků.
2. Seznamte se s problematikou deformace obrazu pořízeného optickým mikroskopem.
3. Nastudujte dostupné metody pro potlačení deformací reflexního obrazu optického mikroskopu vzhledem k elektronovému obrazu.
4. Proveďte vydefinování správných vzorků a pořízení dat pro analýzu deformací.
5. Aplikujte vlastní metody na pořízená data a vyhodnoťte přesnost kalibrace.
6. Diskutuje použití získaných výsledků pro budoucí kalibraci obrazu optického modulu.

Literatura:

- GONZALES, Rafael C.; WOODS, Richard E. Digital Image Processing. Reading, MA: Addison-Wesley, 1987.
- GOLDSTEIN, Joseph I., et al. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Springer, 2017.
- KUBA, Jakub, et al. Advanced cryo-tomography workflow developments—correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out. Journal of microscopy, 2021, 281.2: 112-124.

Při obhajobě semestrální části projektu je požadováno:

Body 1-4 zadání

Podrobné závazné pokyny pro vypracování práce viz <https://www.fit.vut.cz/study/theses/>

Vedoucí práce: **Čadík Martin, doc. Ing., Ph.D.**
Konzultant: Ing. Radek Tichý
Vedoucí ústavu: Černocký Jan, prof. Dr. Ing.
Datum zadání: 1.11.2022
Termín pro odevzdání: 17.5.2023
Datum schválení: 8.12.2022

Abstrakt

Diplomová práca sa zaoberá témou korekcie obrazu fluorescenčného optického mikroskopu s využitím elektrónového obrazu ako vzoru. Cieľom je navrhnúť metódy na analýzu pozorovaných chýb v skúmaných mikroskopických systémoch a predložiť techniky na ich korekciu. V práci je taktiež predstavená navrhnutá kalibračná vzorka, ktorá je v nej využitá. Práca sa tiež zaoberá prehľadom niektorých existujúcich riešení na modelovanie a potlačenie skreslenia.

Abstract

This master's thesis deals with the topic of image correction in fluorescence optical microscopy using electron image as a template. The aim is to design methods to analyze observed distortions in investigated microscopic systems and propose techniques for their correction. The thesis also presents a calibration sample that is utilized within it. Additionally, the work provides an overview of some existing solutions for modeling and suppressing distortion.

Kľúčové slová

CLEM, Deformácie obrazu, Korekcia skreslenia, Homografia, Kalibrácia kamery, Detekcia kľúčových bodov, Python, Elektrónový mikroskop, Fluorescenčný mikroskop

Keywords

CLEM, Image distortions, Distortion correction, Homography, Camera Calibration, Feature detection, Python, Electron microscopy, Fluorescence microscopy

Citácia

ERLICH, Lukáš. *Kalibrace fluorescenčního optického mikroskopu s pomocí elektronového obrazu*. Brno, 2023. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta informačních technologií. Vedoucí práce doc. Ing. Martin Čadík, Ph.D.

Kalibrace fluorescenčního optického mikroskopu s pomocí elektronového obrazu

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne pod vedením pána doc. Ing. Martina Čadíka, Ph.D. Uviedol som všetky literárne pramene, publikácie a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpal.

.....

Lukáš Erlich

16. mája 2023

Podakovanie

Chcel by som sa touto cestou poďakovať vedúcemu práce doc. Ing. Martinovi Čadíkovi Ph.D. Ďalej by som sa chcel poďakovať ľuďom z firmy Thermo Fisher Scientific, ktorí mi pomáhali či už s prácou na mikroskopoch alebo s konzultáciami navrhnutých riešení a zistení. Menovite by som chcel poďakovať Ing. Radkovi Tichému a Ing. Radimovi Křížovi za pomoc hlavne začiatkom a Mgr. Michalovi Zanáškovi, Ph.D. za obrovskú pomoc pri manipulácii s mikroskopom, odborné rady a pomoc s prípravou vzoriek. Nakoniec by som chcel poďakovať rodine a manželke, ktorá mi bola oporou.

Obsah

1	Úvod	3
2	Získavanie obrazu v CLEM systémoch	4
2.1	Skenovací elektrónový mikroskop	4
2.1.1	Cryo Stage	5
2.2	Cryo-Tomography workflow	6
2.3	Optický mikroskop	6
2.3.1	Špecifikácia skúmaných optických mikroskopov	8
2.4	Vzorky	8
3	Deformácie a chyby obrazu fluorescenčného mikroskopu	10
3.1	Chyby pozorované v optických mikroskopoch	10
3.1.1	Geometrická distorzia	10
3.1.2	Chromatické aberácie	12
3.2	Chyby a výzvy v CLEM systémoch	13
4	Korekcia skreslenia	15
4.1	Kalibrácia kamery	16
4.2	Všeobecné polynomiálne modely skreslenia	16
4.3	Generické modely na korekciu deformácií mikroskopov	16
4.4	Techniky pre získavanie parametrov modelu	17
4.5	Korekcia obrazu	18
4.5.1	Interpolácia	18
5	Spracovanie snímok z mikroskopov	20
5.1	Prahovanie	20
5.1.1	Morfologické spracovanie obrazu	20
5.2	Detekcia objektov	22
5.2.1	Template matching	22
5.2.2	Detekcia škvŕn	23
5.3	Geometrické zobrazenia – transformácie	23
5.3.1	Afinné transformácie	24
5.3.2	Perspektívne zobrazenie	24
6	Metóda pre získanie kalibračného vzoru	26
6.1	Kalibračná vzorka	26
6.2	Zber kalibračných obrázkov	28
6.3	Použité technológie	28

6.4	Analýza obrazu a detekcia beads	29
6.4.1	Detekcia beads vo fluorescenčnom obraze	29
6.4.2	Detekcia beads v elektrónovom obraze	30
6.5	Priradenie dvojíc kľúčových bodov	33
6.5.1	Inicializačný krok pred hľadaním párov	33
6.5.2	Párovanie bodov	35
6.6	Experimenty a merania na skutočných obrázkoch	37
7	Analýza a tvorba modelu skreslenia	39
7.1	Simulačná dátová sada	39
7.2	Techniky merania a vizualizácie výsledkov	40
7.3	Analýza chromatických chýb optického mikroskopu	41
7.4	Navrhnuté metódy na reprezentáciu a korekciu skreslenia	42
7.4.1	Metóda 1: Kalibrácia kamery z knižnice OpenCV	42
7.4.2	Metóda 2 a 3: Afinná a perspektívna transformácia	43
7.4.3	Metoda 4: Vlastný model zvyškového skreslenia	44
7.5	Porovnanie metód a výsledky	45
7.6	Okolnosti ovplyvňujúce prácu na prototypu	46
7.7	Použitie navrhnutých metód v praxi a ďalší vývoj	48
8	Záver	49
	Literatúra	50
A	Obsah priloženého pamäťového média	52
B	Obrázky	53

Kapitola 1

Úvod

V reálnom svete sa stretávame s kamerami a objektívmi, disponujúcimi nejakými chybami alebo skreslením, ktoré spôsobujú, že obraz z nich je zdeformovaný, poznačený. Tieto chyby sú spôsobené nedokonalosťami optiky, či už sa jedná o nesprávne vycentrovanie samotných šošoviek, nedokonalosťami tvaru pri výrobe, alebo samotnými fyzikálnymi javmi ako index lomu, ktoré neboli nijak kompenzované.

Rovnako ako aj v bežných kamerách, tak aj v mikroskopoch sa stretávame s deformáciami obrazu. Mikroskopy od firmy Thermo Fisher Scientific skúmané v tejto práci sú zložené systémy pozostávajúce z viacerých mikroskopov – elektrónový, iónový a optický – a pri každom z nich sa stretávame s osobitnými výzvami, ktoré je potrebné prekonať, aby sme dosahovali čo najväčšiu presnosť a čistotu obrazu. Kombinácia optickej – zvyčajne fluorescenčnej a elektrónovej mikroskopie sa v literatúre označuje ako Correlative light-electron microscopy (CLEM)[17]. Mikroskopy spomínané ďalej v tejto práci sa primárne používajú na spracovanie biologických vzoriek a je pre ne kľúčové mať čo najpresnejší obraz a istotu, že to čo vidíme odpovedá skutočnosti. Chyby a skreslenie akéhokoľvek objektívu vedú na nepresnosť v získanom obraze. Vďaka kalibrácii dokážeme určiť vlastnosti tohoto skreslenia. Pomocou nich dokážeme korigovať niektoré vady, s ktorými sa stretávame. Hlavným cieľom tejto práce je skúmať a pokúsiť sa potlačiť skreslenia práve fluorescenčného mikroskopu, ktorý má aktuálne najhoršie vlastnosti z troch spomínaných.

Táto práca je rozdelená do niekoľkých kapitol. V kapitole 2 sú predstavené elektrónové a optické mikroskopy, techniky a princípy získavania obrazu a na záver sú stručne priblížené typické vzorky, s ktorými pracujú. Kapitola 3 nadväzuje na optické mikroskopy a sú v nej predstavené chyby a výzvy, s ktorými sa v konkrétnych mikroskopoch stretávame. Taktiež sú tu predstavené prvé a najbežnejšie modely skreslenia šošoviek. V kapitole 4 je vysvetlený proces tvorby modelu a predstavené niekoľko modely skreslenia v mikroskopoch. V nasledujúcej kapitole 5 sú stručne popísané techniky spracovania obrazu a detekcie objektov, využité pri práci s mikroskopickými obrázkami v nadväzujúcich kapitolách. Kapitola 6 vysvetľuje navrhnutý algoritmus na určenie kalibračného vzoru, ktorý bude využitý v poslednej kapitole 7, kde je analyzované namerané skreslenie, niektoré modely a výsledky. V kapitole 6 je taktiež ukázaná a popísaná navrhnutá špeciálna kalibračná vzorka.

Metódy a algoritmy na analýzu, vizualizáciu a modelovanie boli vyvíjané ako knižnica a skripty v jazyku Python s využitím niektorých štandardných knižníc určených na matematické výpočty a počítačové videnie. Na prácu so samotným mikroskopom boli využité oficiálne softvérové nástroje firmy Thermo Fisher Scientific.

Kapitola 2

Získavanie obrazu v CLEM systémoch

V tejto kapitole sú uvedené vlastnosti mikroskopických systémov, ktoré pracujú s biologickými vzorkami, dôležité pre pochopenie a významu problematiky, preberanej v ďalších kapitolách. Najskôr uvádzame typy a vlastnosti elektrónových mikroskopov používaných v druhej časti tejto kapitoly, ktorou je hlavný prípad použitia Cryo-tomografia, následne bude preberaný význam a princíp Optického fluorescenčného modulu, jeho výhody, nedostatky a v poslednej časti budú priblížené skutočné vzorky.

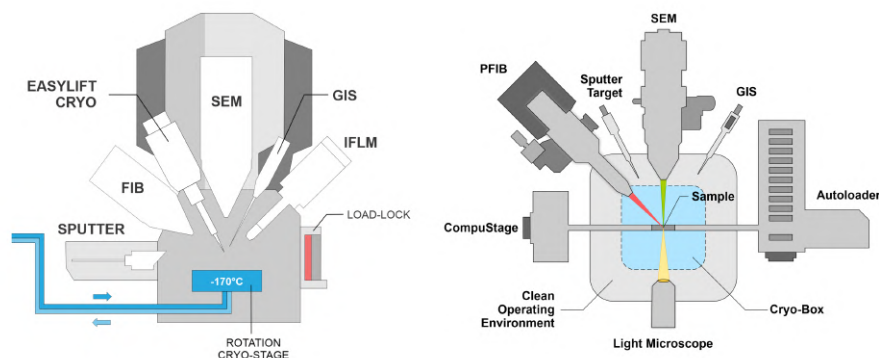
2.1 Skenovací elektrónový mikroskop

Elektrónový mikroskop(EM) funguje na podobnom princípe ako optický mikroskop. Hlavný rozdiel je v tom, že na miesto fotónu ako zobrazovacej častice používa elektróny a namiesto optických používa elektromagnetické šošovky, pomocou ktorých dokáže smerovať a meniť dráhu elektrónu. Sústava šošoviek a ďalších nevyhnutných súčastí, ktorými prechádza elektrón predtým než dorazí do komory sa nazýva elektrónový tubus.

V optických mikroskopoch je maximálne rozlíšiteľné zväčšenie definované vlnovou dĺžkou použitého (viditeľného) svetla. Z fyzikálnych vlastností svetla a elektrónov vyplýva aj najlepšie možné rozlíšenie optických mikroskopov – približne 250–420 nm pri bežných vlnových dĺžkach 400–700 nm[14], čo obmedzuje aj maximálne použiteľné zväčšenie na približne 2000x. Pre elektrónové mikroskopy je teoretické rozlíšenie medzi 0.12 - 0.23 nm podľa urýchľovacieho napätia (100keV – 300keV)[14] a približné maximálne použiteľné zväčšenie je až do 50,000,000x pre transmisné elektrónové mikroskopy.

Medzi dva typy elektrónových mikroskopov používaných v preberanej problematike, patria **Transmisné elektrónové mikroskopy** (TEM) a **Skenovacie/Rastrovacie elektrónové mikroskopy** (SEM). Pri TEM je princíp generovania obrazu podobný optickému mikroskopu, kde atómovou štruktúrou vzoriek prechádzajú elektróny generované zdrojom (urýchľovacie napätie 60-300kV) a tie sú zachytávané na druhej strane vzorky. Mnoho z nich je však zachytených a odrazených samotnou vzorkou. Podľa pomeru počtu vystrelených a senzorom zachytených častíc je potom rekonštruovaný obraz – odtieň sivej daného pixelu. Dôležité je, aby vzorka bola dostatočne tenká – aby boli elektróny schopné prechádzať skrz vzorku a zároveň dostatočne hrubá aby sme videli, čo potrebujeme. Hrúbka TEM vzoriek je závislá na type vzorky (materiál, použitie, ...) a zvyčajne sa pohybuje medzi 20 až 100 nm, v prípade biologických vzoriek medzi 100 až 300 nm.

SEM na rozdiel od TEM používa menšie urýchľovacie napätie (do 30kV), elektróny tým pádom nemajú dostatočnú energiu aby prešli skrz vzorku a pri kontakte s objektom (vzorkou) sú odrazené. Odrazené elektróny sú zachytávané pomocou špeciálnych detektorov a opäť z počtu odrazených elektrónov na konkrétnom mieste je rekonštruovaný obraz. Postupne je elektrónový lúč mierne vychyľovaný pomocou elektromagnetických šošoviek v osiach x, y a tým je získavaný celý obraz.



Obr. 2.1: Schéma Dual Beam mikroskopov Aquilos (vľavo) a Arctis (vpravo) použitých a skúmaných v tejto práci.

Kvôli rôznym prípadom použitia, je vhodné a pre cryo-tomografiu nevyhnutné, mať popri elektrónovom tubuse aj tzv. **iónový tubus** – Focused Ion Beam (FIB), ktorý namiesto elektrónov používa omnoho ťažšie a väčšie častice – ióny. Urýchlené ióny majú niekoľkonásobne väčšiu energiu ako elektróny v EM. Pri dopade takto energicky nabitej častice na vzorku sú z povrchu vyrazené aj častice – *atómy* vzorky. Kolíziami iónov a vzorky je možné postupne odprašovať vrstvy atómov a tým dokážeme upravovať vzorky priamo v mikroskope, bez toho aby sme ich museli pripravovať inou metódou a mimo komory. Systémy s elektrónovým aj iónovým tubusom sa nazývajú **Dual Beam**. V tejto diplomovej práci sú skúmané a využívané práve Dual Beam SEM mikroskopy.

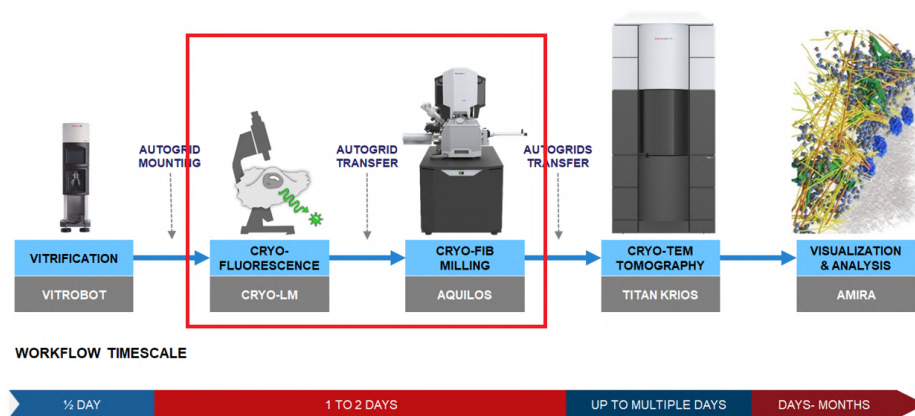
2.1.1 Cryo Stage

Dôležitou súčasťou mikroskopu je taktiež **stage** – pohyblivý mechanizmus (stolček), na ktorom leží a/alebo je ním pridržiavaná vzorka. Stage umožňuje pohybovať vzorkou v troch osiach X,Y,Z a okrem toho náklon vzorky. Pomocou neho je okrem samotnej navigácie po vzorke, zabezpečený aj prechod medzi jednotlivými tubusmi. Jednotlivé tubusy sú v mikroskopoch pevne zafixované a prechod z jedného obrazu do druhého teda môže vyžadovať pohyb stolčekom v prislúchajúcich osiach. Pohyb stolčeka je vyžadovaný s veľkou presnosťou, aby sme mali istotu, že jednotlivé tubusy smerujú na rovnaké miesto. Skonstruovať takto dokonalý pohyblivý mechanizmus však nie je možné úplne dosiahnuť vzhľadom na fyzikálne vlastnosti a limity pri výrobe a konštruovaní.

Samotný stolček a vzorka sú umiestnené vo vákuovej cryo komore, v ktorej je minimalizované znečistenie prachovými a inými vonkajšími časticami a udržiavaná požadovaná teplota. Okrem toho je nevyhnutné biologické vzorky špeciálne pripraviť inak by boli pri vstupe do komory znehodnotené alebo zničené.

2.2 Cryo-Tomography workflow

Hlavným prípadom použitia, kde budú nasadené techniky preberané v tejto práci je tzv. Cryo-Tomography (CT) workflow, ktorého výstupom je vizualizácia buniek v extrémnom rozlíšení, čo umožňuje vedcom a výskumníkom lepšie porozumieť biologickým štruktúram buniek, baktérií, vírusov a iným.



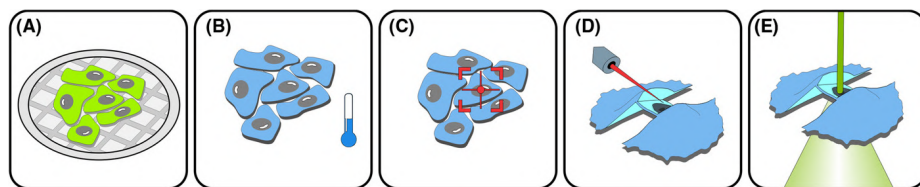
Obr. 2.2: Jednotlivé kroky pri Cryo-Tomography workflow.

Kroky CT workflow[9]:

1. Prvým krokom je príprava vzorky na pozorovanie. Keďže je pozorovacia komora vo vákuu, je dôležité vzorku správne zakonzervovať. Na toto sa používa proces tzv. **vit-rifikácia**, pomocou ktorej je vzorka ihneď zmrazená pod -140°C . Týmto prudkým zmrazením sa predíde vytváraniu kryštalických štruktúr na vzorke, ktoré by inak vznikali pomalším zmrazovaním a tým zmenili skutočnú štruktúru, ktorú chceme pozorovať. Takto pripravené vzorky sú v našom prípade vložené do fluorescenčného mikroskopu alebo priamo do EM s FLM (kap. 2.3), obr. 2.3B).
2. Druhým krokom je **identifikácia** validných jednotiek v skúmaných vzorkách a presná lokalizácia skúmaných vlastností. Za týmto účelom sú používané značkovacie fluorescenčné látky, vďaka ktorým je možné vidieť a lokalizovať body záujmu (vlastnosti) pod FLM. Výskumník si potom sám zvolí, ktoré body sú pre jeho výskum zaujímavé (Obr. 2.3C).
3. V bode záujmu je daná vzorka postupne opracovaná pomocou FIB – stenčená na požadovanú hrúbku pre TEM. Tento proces sa nazýva **milling** a výsledné spracované vzorky sa nazývajú **lamely** (Obr. 2.3D).
4. Lamely sú potom prenesené do transmisného mikroskopu (TEM) a pomocou neho je vytváraný samotný **tomograf** (Obr. 2.3E).

2.3 Optický mikroskop

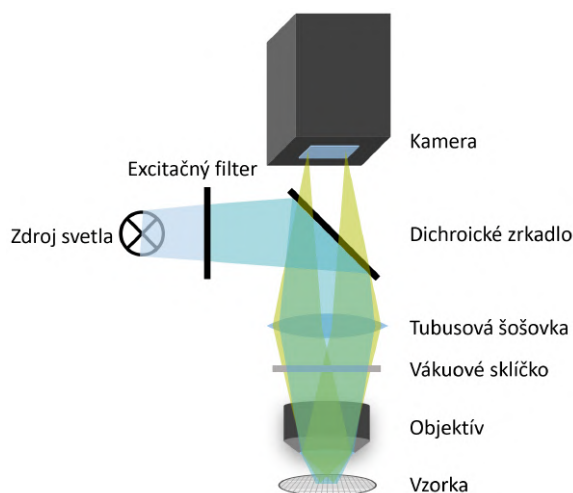
Z princípu ako funguje SEM nie je možné vidieť dovnútra vzorky a tým správne lokalizovať a identifikovať body záujmu, ktoré ležia práve tam. Za týmto účelom je EM kombinovaný



Obr. 2.3: Vzorky v jednotlivých krokoch CT workflow [9].

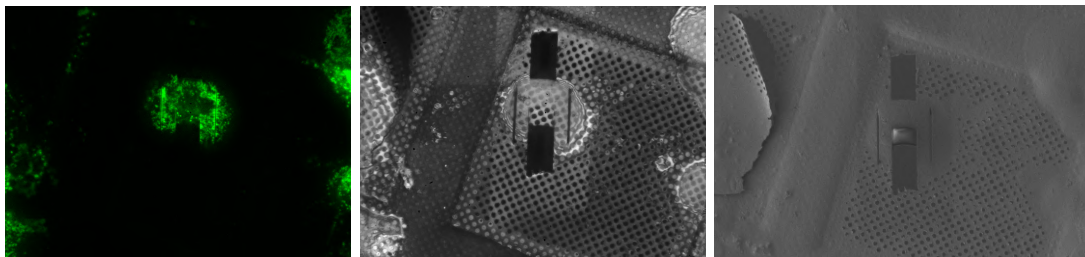
s optickým/fluorescenčným mikroskopom, ktorý pri prevádzkových zväčšeniach dokáže vidieť skrz aj dovnútra skúmanej vzorky. Samotný krok lokalizácie zaujímavých bodov je pre výskumníkov kľúčový. Nepresnosť v určení miesta millingu 2.2 má za následky stratu požadovanej informácie a znehodnotenie vzorky v danom mieste.

Aby bolo možné jednoduchšie rozlíšiť konkrétne vlastnosti – časti – vzoriek, je potrebné si vzorky označiť značkovacími látkami, ktoré fluoreskujú pri rôznych vlnových dĺžkach dopadajúceho svetla. Svetlo požadovanej vlnovej dĺžky je generované pomocou excitačného filtra, ktorý povolí prechod svetla len konkrétnej vlnovej dĺžky. V používaných mikroskopoch je často možný výber z viacerých excitačných filtrov, čím je možné rozlišovať viaceré označené vlastnosti naraz bez špeciálnych úprav mikroskopu. Svetelný lúč zo zdroja svetla (v tomto prípade LED diody) je odrazený cez dichroické zrkadlo a dopadá na vzorku. Vzorka prijme energiu zo svetla a pri pohyboch elektrónov medzi valenčnými vrstvami vyráža menej energicky nabité fotóny, širšej vlnovej dĺžky. Vyrazené fotóny prechádzajú dichroickým zrkadlom a dopadajú na detektor.



Obr. 2.4: Princíp fluorescenčného mikroskopu.

Keďže v elektrónovom obraze nevidíme vnútro vzorky a vo fluorescenčnom obraze vidíme len označené body (zvnútra bunky), je obecné náročné korelovať tieto dva obrazy a nájsť presne označené miesta pre milling. Za týmto účelom je vo optickom module (mikroskope) dostupný aj tzv. reflexný režim, ktorý z fyzikálneho hľadiska funguje podobne ako normálny mikroskop. Senzor zachytáva odrazené lúče rovnakej vlnovej dĺžky akou bolo na vzorku žiarené. To má za následok obraz bližší elektrónovému a to nám uľahčuje rozpoznať jednotlivé body v obrazoch z oboch mikroskopov.



Obr. 2.5: Vľavo fluorescenčný obraz typickej vzorky pre milling. Uprostred odpovedajúci reflexný a vpravo elektronový obraz toho istého miesta.

2.3.1 Špecifikácia skúmaných optických mikroskopov

V tejto práci sú skúmané mikroskopy Arctis¹ aj Aquilos 2² od firmy Thermo Fisher Scientific, na experimenty však bude primárne použitý prvý spomenutý. Optické mikroskopy oboch Dual-Beam systémov sú značne odlišné. Tieto mikroskopy sú dodávané externou firmou a následne mierne modifikované a integrované do konkrétnych mikroskopických sústav. Jedným z hlavných rozdielov je zväčšenie a pracovná vzdialenosť objektívu (WDO) a s nimi spojené zobrazovacie zorné pole (FOV). Pre Arctis je zväčšenie 100x s 0.75 N.A., WDO 4.0mm a FOV > 150μm. Pre Aquilos 2 s iFLM modulom³ je zväčšenie 20x s 0.7 N.A. a FOV > 350μm. Pri oboch sústavách sú pre fluorescenčnú mikroskopiu aktuálne používané excitačné vlnové dĺžky 385, 470, 565 a 625 nm, ktoré budú používané aj ďalej v texte.

2.4 Vzorky

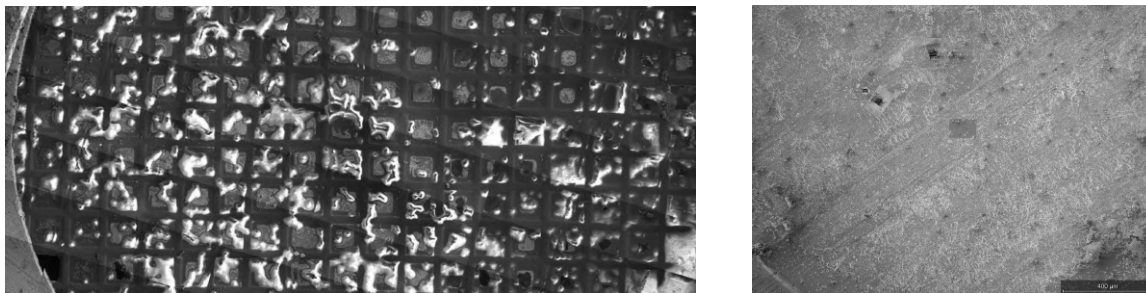
Biologické vzorky, ktoré sa bežne používajú v CLEM mikroskopických systémoch musia byť vo vákuu a hlboko zamrazené. Bežne pozorované vzorky môžu byť napríklad časti bunky alebo proteíny. Napríklad mitochondrie v bunke môžu byť veľké 0.5 až 3μm, proteíny na druhej strane len okolo 6 nm[3]. Takto malé znaky vzoriek sú podrobne skúmané až v TEM mikroskopoch, avšak dôležité je, aby sa požadovaná črta vyskytovala v pripravených vzorkách (kap. 2.2).

Ako bolo vyššie spomínané, je dôležité presne určiť tieto miesta, kde sa črty v skutočnosti nachádzajú. Jedna z používaných techník na jednoduchšiu lokalizáciu a orientáciu na vzorke je použitie fluorescenčných guľičiek tzv. **beads**. Beads sú polystyrénové guľičky (vyrábané v rôznych veľkostiach cca 100 - 1000 nm, podľa použitia), na ktoré sú (podľa potreby) nanosené fluorescenčné farbivá[13]. Fluorescenčné farbivá sa pri aktivovaní spotrebúvajú a teda fluorescenčné vzorky, ktorými sú beads strácajú časom svoju vlastnosť. Medzi ďalšie výhodné vlastnosti beads patrí to, že sú viditeľné aj v elektrónovom, v reflexnom aj vo fluorescenčných obrazoch, čo výskumníkom uľahčuje sa v obraze zorientovať a tak jednoduchšie lokalizovať miesta, ktoré sú pre nich zaujímavé. Na vzorky sa beads nanášajú v roztoku a nevieme presne určiť miesto kde sa na vzorke usadia, čo ovplyvnilo aj samotný

¹<https://www.thermofisher.com/de/en/home/electron-microscopy/products/dualbeam-fib-sem-microscopes/arctis-cryo-pfib.html>

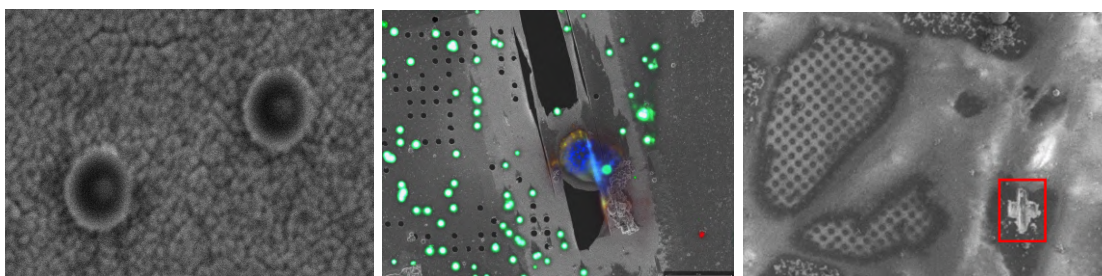
²<https://www.thermofisher.com/de/en/home/electron-microscopy/products/dualbeam-fib-sem-microscopes/aquilos-2-cryo-fib.html>

³Skratka FLM – Fluorescence Light Microscope. Špecifikácia na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Datasheets/iflm-aquilos-datasheet-ds0366.pdf>



Obr. 2.6: Snímka gridu, na ktorom je mnoho buniek (vľavo), špeciálna HPF (High pressure freezing) vzorka taktiež používaná v cryo-EM (vpravo). V oboch prípadoch nie je bez fluorescenčného obrazu jasné kde sú skúmané vlastnosti.

návrh procedúry korekcie skreslenia. Taktiež beads majú vlastnosť zhlukovať sa na jednom mieste (viď obr. 6.7).



Obr. 2.7: Detail fluorescenčných guľičiek beads z elektrónového mikroskopu (vľavo). Kombinovaná snímka el. a fluo. obrazu lamely (uprostred), ktorá má významnú fluorescenčnú informáciu (modrá a oranžová farba) a obsahuje beads (zelené body). Vzorka s fiducial značkou (vpravo).

V bežnej praxi sa pri automatizácii v dual-beam systémoch za účelom spresnenia miesta millingu do vzoriek zvyknú pomocou iónového tubusu vyrezať značky, tzv. fiducial – najčastejšie krížiky veľkosti primeranej skúmanej vzorky (obr. 2.7). Softvér dodávaný k mikroskopom umožňuje tvorbu aj vlastných vzorov vytvorených z dostupných základných tvarov (čiara, obdĺžnik, elipsa). Tvorba vlastných vzorov však môže byť časovo náročná a zložitejšie tvary môžu pri nie úplne správnom nastavení poškodiť iónami aj okolie na vzorke kde daný vzor vytvárame.

Kapitola 3

Deformácie a chyby obrazu fluorescenčného mikroskopu

Ako aj v bežných optických sústavách, tak aj pri skúmaných mikroskopických systémoch sa stretávame s viacerými chybami obrazu, spôsobenými nedokonalosťami pri ich výrobe. Pri týchto optických sústavách sú nároky na kvalitu konštrukcie vysoké a vzhľadom na veľkosti pozorovaných objektov (desiatky až stovky nanometrov) je dôležité minimalizovať dané chyby. V tejto kapitole budú preberané niektoré chyby a výzvy, s ktorými sa stretávame v dodávaných mikroskopoch a ktoré je potrebné prekonať, aby sme dokázali dosahovať čo najväčšiu presnosť pri spracovaní vzoriek. Prvá časť sa zaoberá samotnými optickými chybami relevantnými pre fluorescenčné mikroskopy a v druhej časti sú diskutované ďalšie nie optické chyby vychádzajúce z vlastností a nedokonalostí jednotlivých fyzických komponentov celých systémov (kap. 2.1.1), ktoré je tiež dôležité prekonať za účelom jednoduchšieho a presnejšieho spracovania biologických vzoriek v skúmaných mikroskopoch.

3.1 Chyby pozorované v optických mikroskopoch

3.1.1 Geometrická distorzia

Geometrické chyby môžu byť spôsobené mnohými nezávislými faktormi ako napríklad tvarom šošovky, chybami pri ich výrobe alebo pri výrobe celej kamery (mikroskopu) alebo vplyv na ne má aj uhol, pod ktorým je daný objekt fotografovaný. Tieto chyby spôsobujú napríklad, že rovné čiary v pozorovanom objekte už v obraze rovné nie sú, ale sú zdeformované, paralelné čiary strácajú svoj paralelizmus a body „nie sú“ na očakávaných miestach v obraze, ale posunuté. Obecne platí, že geometrické skreslenia pôsobia v rôznych častiach obrázku inak. Súradnice bodu, ktorý je zobrazovaný kamerou s geometrickými vadami môžeme vyjadriť ako:

$$\begin{aligned}u' &= u + \delta_u(u, v) \\v' &= v + \delta_v(u, v)\end{aligned}\tag{3.1}$$

kde u, v sú súradnice bodu v ideálnom neskraslenom obraze, u', v' sú súradnice bodu s prislúchajúcou geometrickou chybou a δ reprezentuje funkciu, ktorá pre dané u, v priraduje odpovedajúcu odchýlku od pôvodného obrazu. V prípade, ak poznáme funkciu δ , je možné dané geometrické chyby potlačiť.

Podľa [21] a [19] môžeme kategorizovať geometrické distorzie podľa príčiny na:

1. **Radiálne** skreslenie – je spôsobené nedokonalým zakrivením šošovky (objektívu), kde sa pozorované body zobrazujú bližšie (súdkovité skreslenie) alebo ďalej (poduškovité skreslenie) a to v závislosti na vzdialenosti od stredu obrázku (optickej osi). Takže rastúcou vzdialenosťou rastie aj chyba v konkrétnom bode obrazu. Podľa [21] môžeme radiálne skreslenie vyjadriť ako:

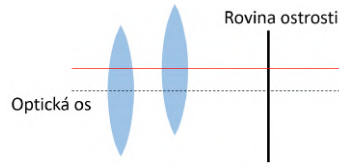
$$\begin{aligned}\delta_{ur}(u, v) &= u(k_1 r^2 + k_2 r^4 + k_3 r^6 + \dots) \\ \delta_{vr}(u, v) &= v(k_1 r^2 + k_2 r^4 + k_3 r^6 + \dots)\end{aligned}\quad (3.2)$$

kde k_1 až k_n sú koeficientami kruhového skreslenia a r je vzdialenosť bodu (u, v) od stredu skreslenia. Často sa zjednodušuje len na k_1 a k_2 .

2. **Decentralizačné** skreslenie – je spôsobené nedostatočným vycentrovaním optickej sústavy (šošoviek/objektívu) pozdĺž optickej osi pri jej skonštruovaní – šošovky (a iné časti) v objektívoch zložených z viacerých šošoviek sú vychýlené v optickej osi. Decentralizačné skreslenie môžeme podľa [21] vyjadriť ako:

$$\begin{aligned}\delta_{ud}(u, v) &= p_1(3u^2 + v^2) + 2p_2uv \\ \delta_{vd}(u, v) &= p_2(3v^2 + u^2) + 2p_1uv\end{aligned}\quad (3.3)$$

kde p_1 a p_2 sú koeficientami decentralizačného skreslenia.

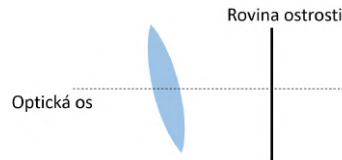


Obr. 3.1: Príklad chyby v optických sústavách – vychýlenie jednotlivých šošoviek z optickej osi, ktoré spôsobuje decentralizačné skreslenie.

3. **Skreslenie tenkého hranola** (thin prism distortion) – je taktiež spôsobené nedokonalosťami pri konštruovaní kamery, najčastejšie naklonením šošovky alebo senzoru. Body obrázku trpiace týmto ako aj decentralizačným skreslením môžu byť orotované a skosené opäť primerane vzdialenosti od stredu obrazu. Toto skreslenie je možné vyjadriť [21] [19] ako:

$$\begin{aligned}\delta_{up}(u, v) &= s_1(u^2 + v^2) \\ \delta_{vp}(u, v) &= s_2(u^2 + v^2)\end{aligned}\quad (3.4)$$

kde s_1 a s_2 sú koeficienty skreslenia tenkého hranola.



Obr. 3.2: Príklad chyby v optických sústavách, ktoré spôsobuje skreslenie tenkého hranola.

V reálnych optických sústavách môžeme stretávať s ich kombináciou, kde decentralizačné a skreslenie tenkého hranolu tvoria len menšinový podiel a v literatúre sa často označujú ako tangenciálne skreslenie. Celkový model skreslenia objektívu teda vieme po matematických úpravách vyjadriť podľa [21] vzorcom ako:

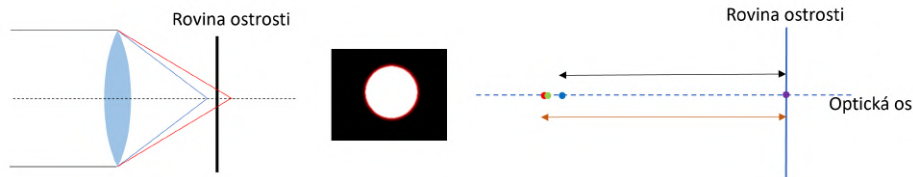
$$\begin{aligned}\delta_u(u, v) &= k_1 u(u^2 + v^2) + k_2 u(u^2 + v^2)^2 + (p_1(3u^2 + v^2) + 2p_2 uv) + s_1(u^2 + v^2) \\ \delta_v(u, v) &= k_1 v(u^2 + v^2) + k_2 v(u^2 + v^2)^2 + (p_2(3v^2 + u^2) + 2p_1 uv) + s_2(u^2 + v^2)\end{aligned}\quad (3.5)$$

Pri zložitejších optických sústavách ako aj zložitejších mikroskopoch, ktoré obsahujú viaceré šošovky a prvky. Preto je často náročné reprezentovať celkové skreslenie pomocou vyššie spomínaných vzorcov, ktoré vychádzajú zo znalosti daných optických sústav.

3.1.2 Chromatické aberácie

Longitudinálna chromatická aberácia

V optických mikroskopoch používaných vo vyššie spomínaných mikroskopických systémoch sa stretávame taktiež s tzv. chromatickými aberáciami. Tieto optické chyby vznikajú kvôli rozdielnemu indexu lomu pre rozdielne vlnové dĺžky svetla, pri prechode cez šošovku alebo obecné cez objektív. Prvou z pozorovaných chromatických chýb je longitudinálna chromatická aberácia (LoCA), ktorá vzniká, keď objektív nedokáže nasmerovať rozdielne farby do jednej roviny zaostrenia. Ohnisko jednotlivých farieb je teda v inej vzdialenosti od objektívu (šošovky), čo spôsobí rozmazanie v rôznych farbách. Vo fluorescenčnej mikroskopii je LoCA pozorovaná tým, že v jednej vlnovej dĺžke je obraz zaostrený.

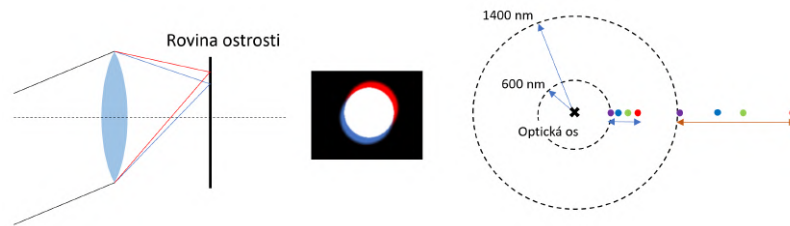


Obr. 3.3: Vznik longitudinálnej chromatickej chyby (vľavo). Ukážka chyby v obraze (v strede). Príklad z fluorescenčného mikroskopu so 4 vlnovými dĺžkami (vpravo).

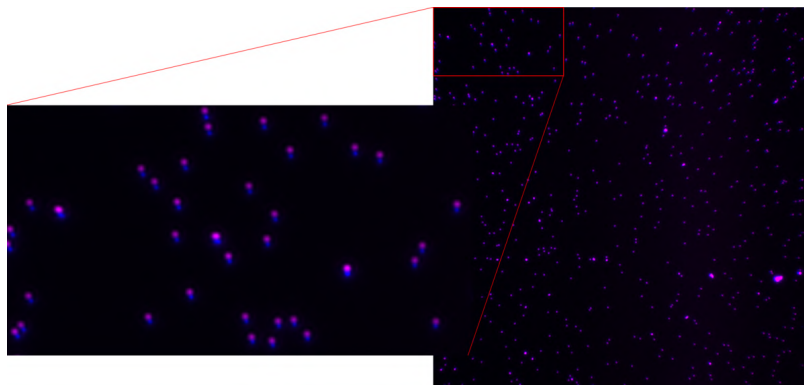
Laterálna chromatická aberácia

Druhá pozorovaná chromatická chyba je laterálna chromatická aberácia (LaCA), pri ktorej sú jednotlivé farby zaostrené – ohniská sú v jednej rovine, ale nie na rovnakej pozícii. Tento jav vzniká pri dopade lúčov na šošovku pod uhlom a je tým väčší a viac pozorovateľný čím ďalej sme od optickej osi. LaCA sa vo fluorescenčnej mikroskopii prejavuje nesprávnym zarovnaním fluoreskujúcich bodov v rôznych vlnových dĺžkach a to v rôznych oblastiach obrazu inak (viď obr. 3.5). Obe tieto chromatické chyby sú spojené s nedokonalosťami optických šošoviek a objektívu. V preberaných mikroskopoch sa veľkosti jednotlivých chýb líšia v každom vyrobenom kuse.

Vo fluorescenčných mikroskopoch sú pre jednotlivé vlnové dĺžky menené príslušné excitačné filtre a dichroické zrkadlá, čo má za následok ich odlišné chyby – nie len veľkosti, ale aj tvar deformácie (viď obr. 3.6). Vďaka tomu, že fluorescenčné snímky sú získavané osobitne pre vlnové dĺžky, dokážeme laterálnu chromatickú vadu spojiť s geometrickou vadou a následne korigovať obe tieto vady.

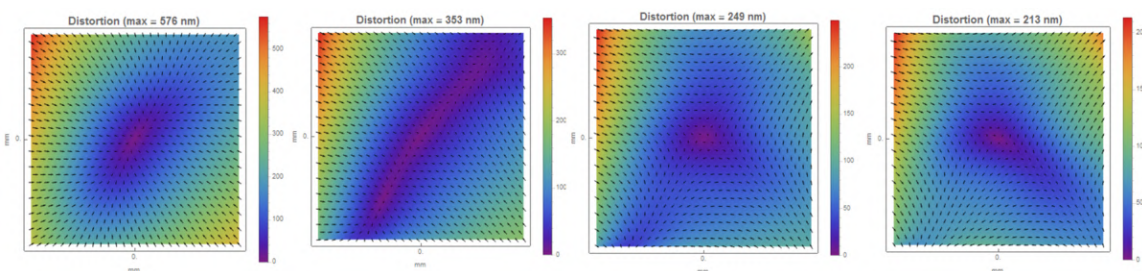


Obr. 3.4: Vznik laterálnej chromatickej chyby (vľavo). Ukážka chyby v obraze (v strede). Príklad z fluorescenčného mikroskopu so 4 vlnovými dĺžkami (vpravo).



Obr. 3.5: Laterálna chromatická chyba pozorovaná pri excitačných vlnových dĺžkach 385nm (modrá) a 625nm (ružová).

Na obrázku 3.6 je vizualizované skreslenie z oficiálnej dokumentácie dodávateľa mikroskopu, ktorá reprezentuje celkovú optickú chybu, teda geometrickú aj chromatickú chybu pre jednotlivé vlnové dĺžky. V prípade vlnovej dĺžky 385nm je chyba najväčšia. Maximálna chyba je okolo 600nm, čo v prepočte na pixel predstavuje približne 20 pixelov. Pre 625nm je deformácia najmenšia a maximálna chyba je okolo 10 pixelov.



Obr. 3.6: Ukážka geometrickej chyby s laterálnou chromatickou vadou pre 4 používané vlnové dĺžky. Ukážka je poskytnutá výrobcom a dodávateľom optického mikroskopu. Poradie obrázkov pre vlnové dĺžky je: 385nm, 470nm, 565nm a 625nm.

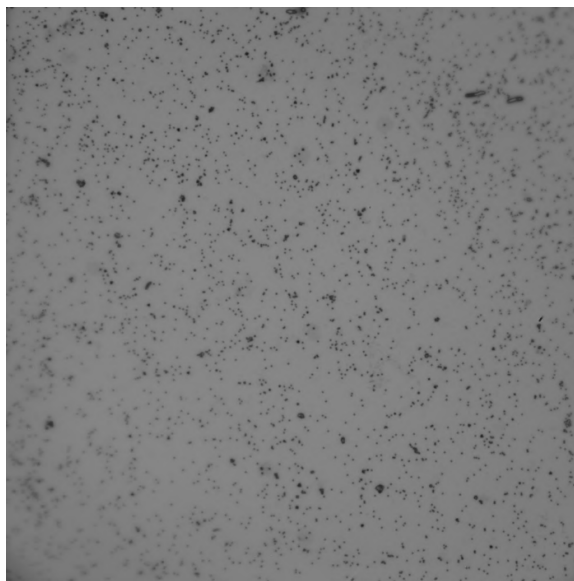
3.2 Chyby a výzvy v CLEM systémoch

Okrem vyššie spomínaných deformácií obrazu optickej sústavy mikroskopu sa v pozorovaných mikroskopoch stretávame aj s mnohými ďalšími výzvami, ktoré majú vplyv na výslednú

kvalitu získaných snímok. V CLEM ako aj dual-beam systémoch je často potrebné vzorku presúvať medzi tubusmi (mikroskopmi) a tým meniť jednotlivé pohľady. Vzhľadom na veľkosti skúmaných vzoriek je obzvlášť náročné skonštruovať pohyblivý mechanický stolček (kap. 2.1.1), ktorý by dokázal v daných prevádzkových podmienkach dosahovať pohybu s malou, ideálne žiadnou chybou. Presun medzi elektrónovým a iónovým tubusom je možné skorigovať softvérovou a je závislý od hrúbky vzorky, teda pre neštandardné vzorky je potrebné upraviť toto usmernenie. Presun do pohľadu optického mikroskopu prebieha v mikroskope Arctis ako otočenie vzorky o -180° . V prípade nesprávne usmerneného optického mikroskopu sa pri prechode medzi pohľadmi môže stať, že oblasť, ktorá je zobrazovaná optickým mikroskopom neodpovedá oblasti v elektrónovom obraze. Na usmernenie tejto chyby je aktuálne potrebný manuálny zásah do konštrukcie upevnenia mikroskopu, kedy je os optického mikroskopu korigovaná s osou elektrónového mikroskopu. Počas bežnej práce však nie je nutné túto korekciu vykonávať.

Tieto nedokonalosti v pohybe a vycentrovaní majú za následok, že pri zmene pohľadu vidíme nie vždy presne tú istú oblasť vzorky – tubus nesmeruje na očakávané miesto. V Thermo Fisher Scientific je kladený dôraz na precízne usmernenie všetkých tubusov a existujú navrhnuté procedúry na dočasné potlačenie týchto mechanických chýb buď automaticky, alebo vykonávanými skúsenými systémovými alebo servisnými inžiniermi.

Optický mikroskop má veľmi malú hĺbku ostrosti a prípadná aj malé naklonenie vzorky, alebo nie kolmý uhol osi mikroskopu na vzorku má veľký vplyv na snímku. Výsledkom je obrázok zaostrený iba z časti a nie je možné dosiahnuť aby bola celá snímka ostrá (viď obr. 3.7).



Obr. 3.7: Ukážka snímky mierne vychýlenej vzorky (cca $+0.2^\circ$). Stred obrázku je správne zaostrený, ale rohy obrázku sú rozmazané.

Kapitola 4

Korekcia skreslenia

V predchádzajúcej kapitole boli predstavené chyby obrazu, s ktorými sa stretávame v reálnych zobrazovacích systémoch a v skúmaných optických mikroskopoch. V tejto kapitole budú predstavené niektoré základné techniky na korekciu chýb zobrazovacích sústav. Korekcia obrazu je veľmi dôležitá v aplikáciách, ktoré vyžadujú presný, neskreslený obraz – napríklad v medicíne (hľadanie anomálií v CT, MRI)[15].

V optickom mikroskope v skúmaných dual-beam systémoch je dôležité mať obraz, ktorý tvarom odpovedá skutočnosti, alebo aspoň obrazu z elektrónového mikroskopu, ktorý je pre túto prácu dostatočne presný a používa sa na zameriavanie (targeting) skúmaných čít. Teda cieľom je, aby bolo možné presne zacieliť fluoreskujúce časti skúmaných vzoriek. Pre proces tvorby lamiel v biologických vzorkách (viď kap. 2.2) je toto dôležité, aby výsledná lamela skutočne obsahovala tie prvky, ktoré majú pre výskumníkov prínos – vopred označené časti buniek – a tým sa znížili celkové náklady na výskum. S ohľadom na to, že sa v skúmanom mikroskope nachádzajú súčasne viaceré chyby (LaCA aj geometrická chyba) môžeme ku korekcii oboch chýb pristupovať súčasne a korigovať ich priamo jednou metódou. Toto môžeme docieľiť vďaka tomu, že chromatická aberácia sa v rámci snímky z jednej vlnovej dĺžky prejavuje ako geometrická chyba a teda môžeme spojiť korekciu skreslenia fluorescenčných snímok na hľadanie jedného modelu reprezentujúceho obe chyby.

Korekcia skreslenia obecné pozostáva z nájdenia transformácie – modelu, ktorý mapuje body zo skresleného obrazu do súradníc neskresleného obrazu. Bežne táto reprezentácia vychádza z vopred známeho (určeného) modelu skreslenia (kapitola 3). Výber modelu, ktorý by odpovedal skúmanej sústave je náročná úloha. Existuje mnoho rôzne zložitých navrhnutých modelov[16], pričom nesprávne určený model môže viesť ku nestabilnej korekcii, ktorá výsledný obraz viac zdeformuje ako priblíži k realite. Dôležitou úlohou je teda správne určiť, navrhnuť model, ktorý odpovedá našej kamere. Pri samotnej korekcii obrázku sú pre každý bod skresleného obrázku vypočítané súradnice (x', y') , ktoré ale môžu mať za následok, že nie všetkým pixelom výsledného obrázku bude priradený pixel z pôvodného obrázku, prípadne ich bude priradených viac. Na určenie výslednej intenzity (farby) pixelu je preto vykonaná interpolácia hodnôt.

V tejto kapitole budú preberané techniky na odhad a výpočet modelu skreslenia v optických a mikroskopických sústavách.

4.1 Kalibrácia kamery

Kalibrácia kamery je proces, pri ktorom je získaný matematický model kamery a model skreslenia, ktorým popisujeme projekciu bodu z trojrozmerného priestoru do dvojrozmernej zobrazovacej roviny kamery. Pomocou kalibrácie dokážeme získať informácie, nielen o skreslení obrazu (čo nám umožní ich potlačenie), ale aj informácie o objektoch, ktoré sú v obraze (napríklad ich skutočnú veľkosť, polohu kamery v priestore a iné).

Prvá zo skúmaných techník korekcie obrazu v tejto práci vychádza z úplnej kalibrácie kamery s modelom dierkovej komory[21]. Samotný proces kalibrácie pozostáva z určenia projekčnej matice M a koeficientov modelu pozorovaného skreslenia. Projekčná matica M reprezentuje vonkajšie a vnútorné parametre kamery a vieme ju rozdeliť na maticu K , vyjadrujúcu vnútorné parametre kamery a maticu (R, t) , zloženú z matice R a vektora t , popisujúce rotáciu a posun kamery vzhľadom na sledovaný objekt.

Zobrazenie pozorovaného bodu z priestoru do zobrazovacej roviny kamery potom vieme vyjadriť ako:

$$wp = K(R, t) \times P = \begin{pmatrix} f_x & s & c_x \\ 0 & f_y & c_y \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & t_1 \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & t_2 \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & t_3 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \\ 1 \end{pmatrix} \quad (4.1)$$

kde P je pozorovaný bod v priestore, p je odpovedajúci bod v zobrazovacej rovine kamery a w je mierka pre zachovanie homogénnych súradníc.

Medzi vnútorné parametre kamery reprezentované maticou K patria: bod optického stredu v zobrazovacej rovine – (c_x, c_y) , ohniskové vzdialenosti f_x, f_y v pixeloch a koeficient skosenia s , ktorý je nenulový v prípade, že osi obrázku na seba nie sú kolmé. Medzi vnútorné parametre kamery ďalej radíme aj koeficienty skreslenia, ktoré je pozorované v danej optickej sústave. Existujú viaceré softvérové programy a knižnice, ktoré dokážu počítať rôzne modely skreslenia – väčšinou však radiálne a tangenciálne.

4.2 Všeobecné polynomiálne modely skreslenia

Bežným prístupom ku korekcii a modelovaniu skreslenia je jeho reprezentácia pomocou polynomiálnej funkcie kam patria aj najčastejšie modely radiálneho a tangenciálneho skreslenia. Avšak podľa [18, 16] je možné nájsť zovšeobecnenú geometrickú reprezentáciu bežných modelov so zachovaním jeho geometrických vlastností. Teda, že zložky geometrického skreslenia je možné zovšeobecniť na rôzne stupne a tvary polynomiálnych funkcií. V práci sú predstavené jednoduchšie a zložitejšie polynómy, ktorými J. Ronda dokázal reprezentovať známe modely skreslenia.

4.3 Generické modely na korekciu deformácií mikroskopov

Podľa [11] a [6], ako aj z obrázku 2.3 a vlastného pozorovania môžeme predpokladať, že geometrická deformácia mikroskopických optických sústav je zložitejšia ako u bežných kamier. Na tvar deformácie majú vplyv aj najmenšie nedokonalosti šošoviek. V oboch týchto prácach je predložený generický model skreslenia, ktorý nie je jednoducho vyjadriteľný matematickou funkciou. V [11] je navrhnutá metóda tzv. všeobecného asymetrického skreslenia, ktoré reprezentuje asymetrické skreslenie (ktorým je napríklad aj tangenciálne) ako

funkciu, ktorá má pre každý pixel pôvodného obrazu „lúč“ skreslenia, ktorým je táto deformácia reprezentovaná a korigovaná. Tento model sa nesnaží modelovať optickú sústavu ako bežné techniky korekcie[15, 21], ale považuje ju za čiernu skrinku, ktorej presné interné detaily nepoznáme, ale poznáme informáciu o skutočnom skreslení z mnohých oblastí. V [6] je opäť model deformácie reprezentovaný vektormi pre každý pixel.

Generický model skreslenia môže byť neskutočne presný, pretože pomocou neho dokážeme reprezentovať takmer akékoľvek skreslenie. Na druhú stranu vektorový model je náchylný na nepresnosti v meraní skreslenia a chybné namerané hodnoty môžu viesť ku nesprávnej (nepresnej) korekcii. Taktiež na určenie tohoto modelu potrebujeme mať informácie o skreslení z omnoho viac pixelov z obrazu ako u bežných modelov, reprezentujúcich optickú sústavu – ideálne zo všetkých. Miesta na ktorých nemáme informáciu o deformácii je potrebné správne odhadnúť. Jednou z techník na doplnenie modelu na nepopísaných miestach môže byť interpolácia. Táto technika je však veľmi náchylná na nepresnosti v meraní a môže viesť ku nesprávnej korekcii obrazu, napríklad keď nie sú rozoznané odľahlé hodnoty.

4.4 Techniky pre získavanie parametrov modelu

Na to, aby sme dokázali vypočítať alebo odhadnúť parametre (koeficienty) modelu je potrebné poznať informáciu o skreslení z konkrétnej kamery – v tomto prípade mikroskopu. Podľa [21, 15] môžeme techniky kalibrácie rozdeliť podľa spôsobu získavania modelu na:

- **Tradičné metódy založené na známom objekte** – kalibrácia kamery je vykonávaná pozorovaním známeho objektu (tzv. kalibračný objekt), ktorého geometriu presne poznáme. Vychádza z toho, že poznáme presné body v trojrozmernom priestore pozorovanom kamerou, tento známy vzor (rozloženie bodov) potom detegujeme často automaticky v nasnímanom obraze. Algoritmy z tejto skupiny sa snažia odhadnúť model minimalizovaním chyby počítanej projekcie bodov vzoru do odpovedajúcich bodov snímok z kamery. Tieto metódy bývajú často najefektívnejšie. Nevýhodou je nutnosť mať tento objekt, čo môže byť v niektorých prípadoch drahé alebo nemožné. Objekty často
- **Techniky založené na samo-kalibrácii** – tieto techniky nevyužívajú žiadny kalibračný objekt, ale samotné snímky. V snímkach využívajú známe geometrické vlastnosti, napríklad rovné čiary, mriežky, rozdiely medzi snímkami v pohybe atď. Tieto metódy sú výhodné v situáciách, kde je použitie kalibračného objektu nepraktické, nemožné alebo drahé. Výhodou je rýchlejšia a jednoduchšia kalibrácia ako v prvom prípade, ale nevýhodou je nižšia presnosť kalibrácie.

Táto diplomová práca sa venuje práve prvej spomínanej kategórii, kedy máme známy objekt v priestore (časť elektrónového obrazu) a jeho zdeformovanú podobu (fluorescenčný obraz). V týchto tradičných metódach je presnosť kalibrácie a teda aj korekcie závislá od presnosti merania kalibračného vzoru – teda presná detekcia a extrakcia súradníc bodov v ňom. Medzi metódy v tejto kategórii patria techniky využívajúce body v rovine[21] v trojrozmernom priestore (teda kalibračným objektom sú body roviny), ktorá zjednodušuje nároky na znalosť trojrozmerných súradníc v objekte.

4.5 Korekcia obrazu

Po tom ako získame parametre predpokladaného modelu jeho korekcia pozostáva v spätnej transformácii pozícií pixelov a výpočte intenzity pixelu vo výstupnom obrázku. Výpočet nových pozícií je principiálne jednoduchý ako:

$$x_u = x_d - \delta_x(x_d, y_d) \quad (4.2)$$

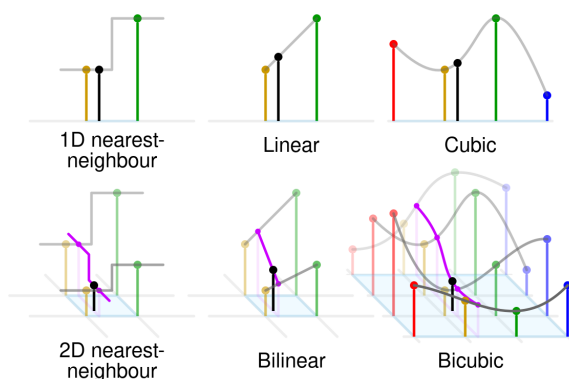
$$y_u = y_d - \delta_y(x_d, y_d) \quad (4.3)$$

$$(4.4)$$

kde (x_d, y_d) sú súradnice v skreslenom obraze, δ je zjednodušený tvar rovnice modelu skreslenia a (x_u, y_u) sú nové súradnice v neskreslenom obraze. Po transformácii všetkých pixelov môže nastať a nastáva, že na nových celočíselných koordinátoch nie je namapovaný žiadny pixel pôvodného obrazu alebo na druhú stranu danému pixelu je priradených viac. Na to aby sme určili výslednú hodnotu (intenzitu/farbu) pixelu sa používa technika interpolácie.

4.5.1 Interpolácia

Interpolácia je matematická technika určenia neznámych hodnôt funkcie medzi bodmi, ktoré poznáme. Úloha interpolácie teda spočíva v nájdení spojitej funkcie, ktorá prechádza týmito bodmi a teda vďaka nej dokážeme predikovať aj neznáme body a tým odhadnúť správanie pozorovaného „systému“ na celom skúmanom definičnom obore. Interpolácia sa používa v mnohých oblastiach matematiky, fyziky aj počítačového videnia. Podľa funkcie, ktorou body poznáme v kontexte počítačového videnia najčastejšie tieto typy interpolácie (viď obr.4.1):



Obr. 4.1: Vizualizované techniky interpolácie, čierny bod je interpolovaný. Vo vrchnom rade je interpolácia dvojrozmerných dát, v spodnom trojrozmerné, medzi ktoré môžeme radiť aj obrazové dáta, kde tretí rozmer reprezentuje intenzitu pixelu.¹

1. **Interpolácia najbližším susedom** – bodom neznámej oblasti je priradená hodnota najbližšieho bodu, pre ktorý poznáme jeho hodnotu.

¹Obrázok prevzatý z https://en.wikipedia.org/wiki/Bicubic_interpolation#/media/File:Comparison_of_1D_and_2D_interpolation.svg

2. **Lineárna (bilineárna) interpolácia** – v prípade lineárnej interpolácie je oblasť medzi známymi bodmi reprezentovaná lineárnou funkciou. Problém interpolácie v tomto prípade pozostáva z určenia koeficientov lineárnej funkcie, ktorá bodmi prechádza.
3. **Kubická (bikubická) interpolácia** – je prípad interpolácie, kde známe hodnoty prekladáme kubickým polynómom. Výsledkom je z týchto troch metód najplynulejší prechod medzi bodmi na úkor výpočetnej zložitosti.

V kontexte spracovania obrazu a počítačového videnia sa interpolácia používa napríklad pri zväčšovaní a zmenšovaní obrázkov, kedy je potrebné zvýšiť alebo zmenšiť rozlíšenie. Chýbajúce farby (intenzita) pixelov sú priradené na základe ich okolia. Okrem toho sa interpolácia používa aj pri sledovaní optického toku, kedy sa pohyb objektu medzi jednotlivými snímkami interpoluje, čím môžeme odhadnúť celú trajektóriu pohybujúceho sa objektu. Taktiež niektoré techniky kalibrácie využívajú interpoláciu na modelovanie skreslenia. V [10] je napríklad navrhnutá metóda, ktorá delí skreslený obraz na menšie oblasti a pre tie interpoluje namerané skreslenie bilineárnou funkciou.

Kapitola 5

Spracovanie snímok z mikroskopov

V tejto kapitole sú predstavené dôležité techniky počítačového videnia, spracovania obrazu a problematiky detekcie významných bodov v obraze, používané pri snímkach z mikroskopov a použité v tejto diplomovej práci. V závere tejto kapitoly bude predstavená transformácia homografie, ktorá bude neskôr využitá v navrhutej metóde kalibrácie.

5.1 Prahovanie

Prahovanie alebo thresholding, je technika spracovania obrazu, pri ktorej je hodnota každého pixelu porovnávaná s tzv. prahom a na základe výsledku porovnania je pixelu priradená nová hodnota. Prah v sivotónových obrázkoch je najčastejšie číselná hodnota reprezentujúca intenzitu pixelu medzi 0 a 255. Pixelom, ktoré majú hodnotu menšiu ako prah je priradená jedna hodnota a pixelom nad prahom druhá (formula 5.1). Najčastejšie je výsledkom prahovania binárny obrázok.

$$g(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } f(x, y) \leq T \\ 1 & \text{if } f(x, y) > T \end{cases} \quad (5.1)$$

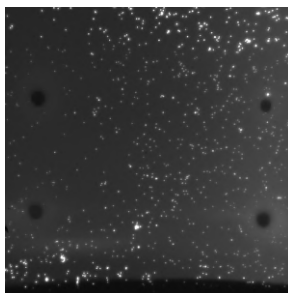
kde f je pôvodná hodnota pixelu a T je prah.

Adaptívne prahovanie

Adaptívne prahovanie je špeciálna technika prahovania, pri ktorej je počítaný prah pre každú oblasť obrázku zvlášť a výsledné hodnoty pixelov sú počítané na základe tohoto „lokálneho“ prahu. Táto technika je vhodná napríklad pre snímky, kde pozorované objekty nie sú rovnomerne osvetlené, napríklad vo fluorescenčných snímkach nemusí byť intenzita fluorescenčnej látky všade rovnaká, alebo sa v snímkach môže vyskytovať vedľajšie svetelené znečistenie (viď napr. obr. 5.1). Adaptívne prahovanie môže byť v niektorých prípadoch využité aj na extrakciu hrán[2]. Lokálny prah je najčastejšie vypočítaný ako stredná hodnota okolia pixelu alebo ako vážený súčet okolia, kde váhy sú v gaussovskom rozložení.

5.1.1 Morfologické spracovanie obrazu

Druhou dôležitou technikou spracovania obrazu je použitie tzv. morfologických operácií. Morfologické operácie (MO) sú väčšinou jednoduché matematické operácie, ktoré sú použité nad binárnymi snímkami alebo nad snímkami v odtieňoch sivej. Tieto operácie spracovávajú snímku na základe vyskytujúcich sa tvarov v nej. Pomocou nich dokážeme napríklad



Obr. 5.1: Obrázok z fluorescenčného mikroskopu, na ktorom je vidieť nerovnomerné svetelné rozloženie, na ktoré je vhodné použiť techniku adaptívneho prahovania.

extrahovať objekty (hrany, rohy, ...) pre ďalšie spracovanie. Morfológia vychádza z teórie množín a predpokladá, že celý obraz je možné reprezentovať ako bodové množiny, ktorými sú objekty v ňom reprezentované.

Okrem samotnej snímky je vstupom pre MO tzv. štrukturálny element – menšia bodová množina, ktorou je postupne spracovávaný obraz. Týmto elementom môže byť akýkoľvek tvar, napríklad obdĺžnik, elipsa alebo kríž. Vstupná snímka má obdĺžnikovitý tvar a aj preto je potrebné finálny štrukturálny element reprezentovať ako obdĺžnik. V podstate sa jedná o maticu (najčastejšie nepárnej veľkosti rozmerov), pozostávajúcu najčastejšie z jednotiek a núl (podľa príslušnosti). Samotnými operáciami sú potom prechody všetkými pixelmi vstupnej snímky týmto štrukturálnym elementom a výsledkom je obraz rovnakej veľkosti, kde hodnota pixelu je nahradená novou na základe porovnania (závislého od konkrétnej operácie) pôvodnej hodnoty pixelu a hodnôt jeho susedov. Použitie morfologických operácií je pestré a medzi najčastejšie prípady použitia patrí napríklad odstránenie šumu, zjednotenie tvaru pre ďalšie spracovanie, tvorba kostry a mnohé iné.

Pri definovaní jednotlivých operácií nám pomáhajú koncepty reflexie (formula 5.2) a translácie (formula 5.3) [5].

$$\hat{B} = \{w | w = -b, \text{ pre } b \in B\} \quad (5.2)$$

$$(B)_z = \{c | c = b + z, \text{ pre } b \in B\} \quad (5.3)$$

Medzi základné a významné morfologické operácie patria:

1. **Erózia** – odstraňuje body objektu v blízkosti jeho okrajov – stenčuje biele oblasti v binárnom obrázku – a odstraňuje objekty menšie ako štrukturálny element. Eróziu môžeme podľa [5] definovať ako:

$$A \ominus B = \{z | (B)_z \subseteq A\} \quad (5.4)$$

teda výsledkom je zhluk bodov z (v binárnych snímkach hodnota 1) takých, že štrukturálny objekt B je zahrnutý v A pri začiatku v z , tzn. v binárnych obrazoch, že pixel z pôvodnej snímky bude mať hodnotu 1 iba v prípade, že všetky pixely pod štrukturálnym elementom budú mať hodnotu 1.

2. **Dilatácia** – rozširuje/zväčšuje objekty a vyplňuje menšie objekty okolím. Môžeme ju vyjadriť [5] ako:

$$A \oplus B = \{z | (\hat{B})_z \cap A \neq \emptyset\} \quad (5.5)$$

teda zhhluk bodov z takých, že B obsiahne aspoň jeden bod (element) v A pri začiatku v z , tzn. pixel bude mať hodnotu 1 v prípade, že aspoň jeden pixel pod štruktúrnym elementom má hodnotu 1.

3. **Otvorenie** – je kombinácia erózie nasledovaná dilatáciou. Erózia odstráni nežiadúce objekty a stenčí všetko ostatné, následná dilatácia spôsobí priblíženie sa k pôvodnému tvaru. Výsledkom morfológického otvorenia ako aj uzavretia získame zjednodušený obraz a ich opätovné použitie ďalej nemení výsledok.

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (5.6)$$

4. **Uzavretie** – je dilatácia nasledovaná eróziou. Dilatácia odstráni nežiadúce diery v objektoch a zároveň zväčší všetko ostatné, eróziou sa opäť priblížime k pôvodnému tvaru.

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (5.7)$$

Pomocou kombinácie týchto operácií dokážeme realizovať rôznorodé transformácie nad snímkami. Napríklad je možné detekovať hrany primeranou eróziou a následným odčítaním výsledku od pôvodnej snímky. Mnoho ďalších aj s ich použitím je spomínaných v [5].

5.2 Detekcia objektov

Jeden z krokov v algoritme navrhnutom v tejto práci je detekcia kľúčových bodov, na základe ktorých bude počítaný samotný model skreslenia. Keďže sa jednotlivé obrazy (EM, FM, refl.) značne líšia, aj detekcia v nich je odlišná. V tejto kapitole budú predstavené niektoré z použitých a testovaných algoritmov na detekciu objektov (črt) v obraze.

5.2.1 Template matching

Template matching je v kontexte spracovania obrazu proces, v ktorom hľadáme určitý vzor (šablónu) vo všeobecnosti malých objektov vo väčšom vstupnom obraze. Prístupy ku template matching môžeme rozdeliť na template-based a feature-based. V prvom spomenutom vyhľadávanie prebieha priamo porovnávaním hodnôt pixelov vstupu a vzoru. Pri feature-based, sú porovnávané extrahované črty – hrany, krivky alebo rohy.

Template-based

Vyhľadávanie vzoru v tejto metóde prebieha postupným posúvaním vzoru/šablóny pixel po pixeli a v každom bode je počítaná hodnota, ktorá reprezentuje podobnosť vzoru s miestom vo vstupnej snímke – výpočet hodnoty závisí na konkrétnom algoritme. Vo všeobecnosti platí, že vzor musí byť obdĺžnikového tvaru, avšak s použitím masky je možné hľadať vzor akéhokoľvek tvaru. Maska v tomto prípade má rovnaký tvar ako a hodnoty pixelov v nej určujú, či sa zodpovedajúci pixel zo vzoru použije pri výpočte podobnosti alebo nie. Medzi najčastejšie algoritmy na výpočet zhody sú používané napríklad rozdiel štvorcov, vzájomná korelácia alebo korelačný koeficient¹. Jednou z hlavných nevýhod tejto metódy je závislosť na mierke a otočení vzoru a obrazu, ako aj veľkosť a otočenie samotných objektov. Taktiež vplyv na efektívnosť má aj osvetlenie, farby a tvar objektu. Zmeny v nich majú

¹https://docs.opencv.org/4.x/df/dfb/group__imgproc__object.html#ga3a7850640f1fe1f58fe91a2d7583695d

za následok radikálne zníženie efektivity tohoto prístupu. Na potlačenie niektorých slabín tohoto prístupu existujú rôzne prístupy popísané aj v[1].

Feature-based

Tento prístup pozostáva z viacerých krokov, prvým krokom je detekcia črt – lokalizovanie významnej vlastnosti v obraze. Druhým krokom je ich extrakcia – popísanie charakteristík týchto črt pomocou deskriptoru (týmto môžu byť napr. tvar alebo farba). Samotný matching potom prebieha porovnávaním týchto extrahovaných črt.

Medzi najčastejšie používané metódy v tejto kategórii patria napríklad SIFT, SURF, ORB[8]. Tieto metódy sú nezávislé od otočenia a zmeny veľkosti vzoru a cieľového obrázku. V prípade mikroskopie sú tieto metódy často používané napríklad na detekciu niektorých štruktúr vo vzorkách alebo pri analýze zmien na vzorke. Aj napriek kvalite týchto detektorov a nezávislosti od niektorých faktorov sú pre porovnávanie diametrálne odlišných pohľadov (fluorescencie a elektrónového) nepoužiteľné.

5.2.2 Detekcia škvŕn

Detekcia škvŕn (blob detection) je jednou z techník, používaných na detekciu významných črt/vlastností v obraze. Škvŕnou v tomto kontexte rozumieme oblasť v obraze, ktorej pixely disponujú nejakou podobnou vlastnosťou, napríklad intenzitou alebo farbou. Existujú viaceré viac aj menej sofistikované techniky tejto detekcie. V mikroskopických snímkach môžeme pomocou škvŕn napríklad reprezentovať svetelné body vo fluorescencii.

SimpleBlobDetector²

Tento detektor ako napovedá aj jeho názov je implementovaný ako jednoduchý algoritmus využívajúci prahovanie. Algoritmus najskôr prevedie vstupný obrázok na binárny pomocou viacnásobného prahovania s rozdielnou hodnotou prahu. Následne detekuje v každom binárnom obraze kontúry a zistí ich stredy, stredy zoskupí na základe polohy v obraze a vzájomnej vzdialenosti. Na záver odhadne tvar a veľkosť finálnej škvŕny.

Jeho hlavnou výhodou je jednoduchosť a s ňou spojená rýchlosť, okrem toho taktiež umožňuje výsledky detekcie filtrovať na základe vlastností škvŕn, ako sú napríklad **veľkosť** škvŕny, **kruhovitosť** – ako veľmi je tvar škvŕny kruhovitý, **zotrvačnosť** – ako veľmi je tvar predĺžený alebo **konvexnosť** – je v tomto kontexte vyjadrená ako pomer veľkosti škvŕny a veľkosti jej konvexného obalu. Filtrovaním výsledkov dokážeme z mikroskopických obrázkov jednoduchým spôsobom odstrániť detekované znečistenie alebo iné detekované črty, ktoré nie sú relevantné pre ďalšie spracovanie.

5.3 Geometrické zobrazenia – transformácie

V poslednej časti tejto kapitoly sú predstavené geometrické transformácie, ktoré sú často pri korelačnej (CLEM) ako aj v samotnej elektrónovej mikroskopii potrebné počítať aby sme dokázali interpretovať informáciu o pozorovanom objekte získanú z viacerých pohľadov. Ako bolo naznačené v predchádzajúcej kapitole geometrické transformácie môžu byť použité aj na korekciu skreslenia, spôsobeného nedokonalosťami sústav.

²https://docs.opencv.org/3.4/d0/d7a/classcv_1_1SimpleBlobDetector.html

5.3.1 Afinné transformácie

Afinná transformácia je lineárna geometrická transformácia v rámci jednej roviny, ktorá zachová kolinearitu – body ležiace v jednej priamke budú ležať v jednej priamke aj po transformácii a zachováva aj pomer vzdialeností medzi bodmi. Po transformácii paralelných čiar tieto čiary zostávajú rovnobežné. Medzi afinné zobrazovania patria posun (translácia), zmena mierky, skosenie a rotácia a akékoľvek ich kombinácie.

Afinné zobrazovanie môžeme reprezentovať maticou ako:

$$p' = A \cdot p, \quad A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & b_1 \\ a_{21} & a_{22} & b_2 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.8)$$

kde A je afinné zobrazovanie, členy $a_{i,j}$ poskytujú všetky vyššie spomínané transformácie okrem translácie, tá je reprezentovaná b_1 a b_2 . Posledný riadok matice je rozšírenie kvôli zachovaniu výpočtov s homogénnymi súradnicami.

5.3.2 Perspektívne zobrazovanie

Perspektívnou transformáciou (alebo inak aj homografiou) v kontexte počítačového videnia rozumieme projektívnu transformáciu, ktorá bodom priestoru alebo jednej roviny priraduje body druhej, zobrazovacej roviny (obrázku), väčšinou sa jedná o rozličné pohľady (projekcie) na ten istý objekt. Homografia je perspektívna transformácia, pre ktorú platí, že rovné čiary zachováva rovnými. Pre homogénne súradnice je homografia definovaná ako matica 3x3 a transformáciu bodu môžeme vyjadriť ako:

$$p' = H \cdot p, \quad H = \begin{pmatrix} h_{11} & h_{12} & h_{13} \\ h_{21} & h_{22} & h_{23} \\ h_{31} & h_{32} & 1 \end{pmatrix} \quad (5.9)$$

kde p sú homogénne súradnice bodu v prvom obraze, H je matica homografie a p' sú odpovedajúce súradnice bodu p v druhom obraze. Po rozpísaní a vyjadrení x' a y' dostávame:

$$\begin{aligned} x' &= \frac{h_{00} \cdot x + h_{01} \cdot y + h_{02} \cdot z}{h_{20} \cdot x + h_{21} \cdot y + h_{22} \cdot z} \\ y' &= \frac{h_{10} \cdot x + h_{11} \cdot y + h_{12} \cdot z}{h_{20} \cdot x + h_{21} \cdot y + h_{22} \cdot z} \end{aligned} \quad (5.10)$$

pričom z je v homogénnom tvare pôvodného bodu p rovné 1 a h_{ij} je prvok matice H na pozícii i, j .

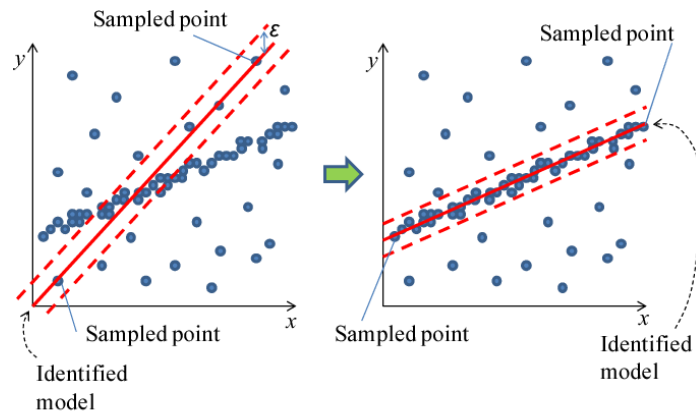
Na výpočet všetkých 9 prvkov matice H stačí poznať 4 dvojice odpovedajúcich si bodov a používaná je technika DLT (Direct Linear Transformation)³. Vo všeobecnosti však platí, že body použité pri výpočte matice môžu byť zašumené alebo inak poznačené a teda homografia s využitím len týchto bodov nebude presná. Na zvýšenie presnosti sa v praxi používajú robustnejšie metódy, ktoré využívajú viaceré dvojice bodov ako napríklad RANSAC, LMedS, PROSAC a iné.

³Metóda je dobre popísaná napríklad v [7]

RANSAC

Random Sample Consensus (RANSAC) [4] je iteratívny algoritmus na výpočet riešenia problémov, ktorý sa snaží nájsť optimálne riešenie zo zašumených alebo inak poznačených dát. Algoritmus RANSAC a iné jemu podobné algoritmy sa často používajú v počítačovom videní v aplikáciách, kde pracujeme s obrázkami, v ktorých sa môžu vyskytovať väčšie množstvá nesprávne určených bodov, napríklad pri úlohách rozpoznávania objektov, párovaní a hľadani črt a pre túto diplomovú prácu dôležité pri úlohách zarovnania obrázkov.

Algoritmus postupne vyberá náhodné podmnožiny bodov (pre homografiu 4) z pôvodnej množiny všetkých známych bodov a pre túto podmnožinu nájde riešenie problému. RANSAC potom vyhodnotí kvalitu tohoto riešenia pre zvyšné body a spočíta body, ktoré sú konzistentné s riešením (inliers) a ktoré nezapadajú do riešenia (outliers). Tento proces je opakovaný viackrát s rôznymi náhodne vybranými hodnotami a na záver je vybrané riešenie s najväčším počtom inliers bodov. Pomocou tohoto algoritmu dokážeme nájsť správne riešenie aj v zašumených dátach s odľahlými hodnotami.



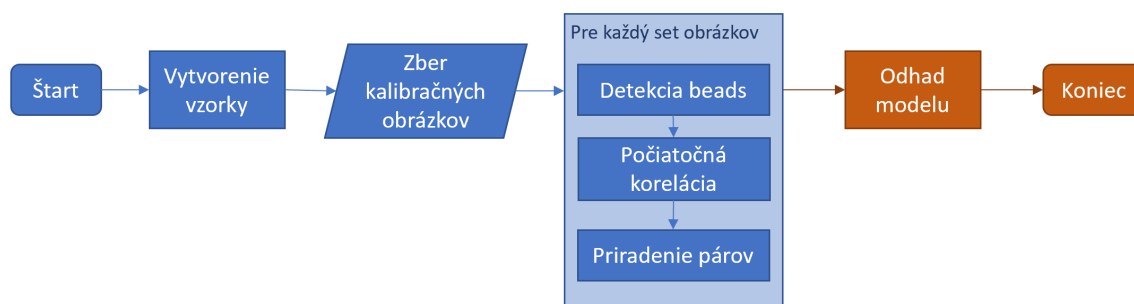
Obr. 5.2: Princíp algoritmu RANSAC prevzatý z [20]. Na obrázku sú dve riešenia z podmnožín vstupnej množiny a červeným pásmom sú oddelené inliers a outliers hodnoty. V tomto prípade je v riešení vpravo viac inliers takže by algoritmus vybral riešenie vpravo.

Kapitola 6

Metóda pre získanie kalibračného vzoru

V skenovacích elektrónových mikroskopoch sú objekty pozorované hlavne za účelom študovania štruktúry danej vzorky. Existujú viaceré výrobné aj užívateľské procedúry, ktoré majú za cieľ zdokonaľiť elektrónový obraz a odstrániť chyby, s ktorými sa v elektrónovom obraze stretávame. V našej práci považujeme obraz získaný elektrónovým mikroskopom za už dokonalý, neskreslený a vzdialenosti a uhly medzi jednotlivými bodmi sú „skutočné“.

V tejto kapitole bude vysvetlená navrhnutá procedúra pre analýzu, meranie a následnú kalibráciu fluorescenčného obrazu s využitím elektrónového obrazu, vyjadrená diagramom na obrázku 6.1. Na začiatku kapitoly bude predstavená navrhnutá kalibračná vzorka, následne bude vysvetlený proces získania kalibračného vzoru z elektrónového obrazu a na záver bude opísaná samotná kalibrácia.



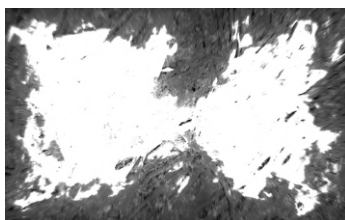
Obr. 6.1: High level diagram navrhutej procedúry kalibrácie.

6.1 Kalibračná vzorka

V prvom kroku je potrebné pripraviť vhodnú kalibračnú vzorku. Za účelom kalibrácie fluorescenčného obrazu vzhľadom na elektrónový obraz je potrebné mať viditeľné rovnaké významné črty v elektrónovom (EO) aj vo fluorescenčnom (FO) obraze pre všetky pozorované vlnové dĺžky. Ako bolo vyššie spomínané pri fluorescencii v skúmaných mikroskopoch pracujeme so 4 vlnovými dĺžkami. V tejto práci sú ako črty použité beads (kap. 2.4), ktoré sú dobre viditeľné vo všetkých obrazoch. Použité fluorescenčné farbivá reagujú najviac pri

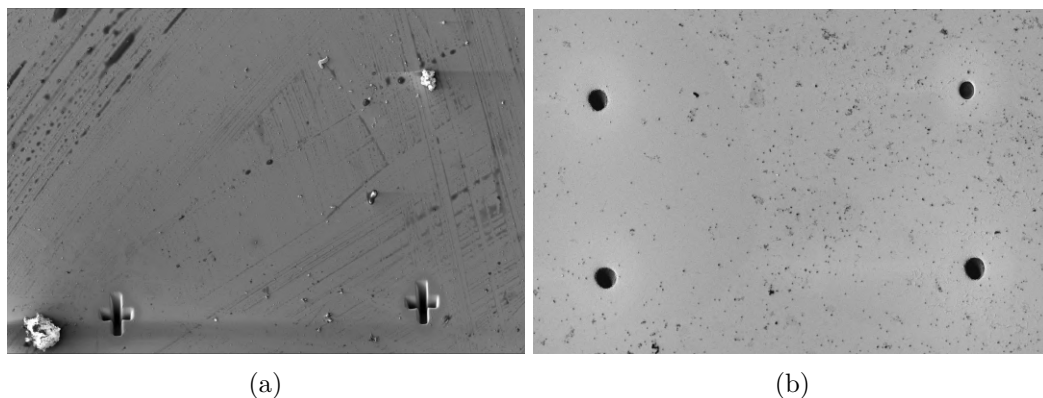
vlnových dĺžkach z kapitoly 2.3.1. Kvôli zachovaniu presnosti je potrebné aplikovať beads na čo najrovnejší podklad, čo v skúmanom merítke nie je vždy jednoduché dosiahnuť.

Ako dve najbežnejšie techniky pre vzorky, ktoré sa za týmto účelom používajú sú špeciálne zaфіrové sklenené podkladové sklíčka a kremíkové dosťičky. Sklenené sklíčka samotné sú nevodiče a dopad elektrónov na povrch spôsobuje, že sa povrch sklíčka elektricky nabíja (viď obr.6.2), čo má za následok znehodnotenie obrázku, prípadne aj samotnej vzorky. S cieľom odstrániť toto znehodnotenie je ako riešenie možné sklíčko poprášiť vodivým materiálom (napríklad zlatom), čím docielime, že elektróny sú odvádzané po povrchu a následne cez vidličku stolčeka preč z obrazovej plochy. Druhým často používaným podkladom je špeciálna kremíková dosťička¹, ktorá sa vyznačuje úplne rovným a hladkým povrchom bez záhybov alebo zvlnení, čo by mohlo mať za následok nepresnosti a ťažkosti pri kalibrácii spôsobené bodmi, ktoré nie sú v jednej rovine.



Obr. 6.2: Ukážka elektrického nabíjania skleneného sklíčka pod elektrónovým tubusom – biele oblasti v obrázku časom pod prúdom elektrónov narastajú (vľavo).

Pri návrhu vzorky a experimentoch boli použité oba prístupy. Vzorka je kruhového tvaru s priemerom 3mm, čo odpovedá veľkosti bežne používaných vzoriek (gridom) v skúmaných mikroskopoch. Zaфіrové sklíčko bolo pokryté 100nm hrubou vrstvou zlata. Na povrch týchto podkladov, ako bolo vyššie spomínané, sú nanosené guľičky beads pomocou špeciálneho roztoku, ktoré po zaschnutí ostávajú na svojom mieste. Počas návrhu som experimentoval s rôznymi veľkosťami beads (priemer guľčiek 100, 150, 250nm, nakoniec zvolené **250nm**) a rôznymi pomermi riedenia roztoku.



Obr. 6.3: Navrhnuté kalibračné vzorky. (a) Prvá navrhnutá kalibračná vzorka na kremíkovej dosťičke s dvoma kalibračnými krížmi. (b) Druhá verzia kalibračnej vzorky na pozlátenom zaфіrovom sklíčku so štyrmi zjednodušenými značkami.

¹Získavaná z waferov, na výrobu polovodičových súčiastok.

Okrem beads sú na kalibračnej vzorke pomocou iónového tubusu vytvorené značky – pôvodne kríže, neskôr len kruhy, ktoré sú viditeľné a jednoznačne rozlíšiteľné v reflexnom obraze aj v elektrónoch. Tieto značky sú použité na jednoduchú koreláciu ako inicializačný krok pri určovaní odpovedajúcich si párov bodov (viac v kap. 6.5).

Beads vystavené priamemu žiareniu elektrónov pri zbere obrázkov strácajú svoju svietivosť a po jednom až dvoch zberoch (kapitola 6.2) sa stávajú nepoužiteľné. Na jeden zber obrázkov je pozorovaná len oblasť šírky cca $230\mu m$, čo umožňuje pri správnej manipulácii znovupoužitie vzorky. Vzorku je potrebné uchovávať mimo dosahu svetla a nie v teplom prostredí, kde by sa vzorka mohla rýchlo vybiť, čo by znemožnilo jej použitie.

6.2 Zber kalibračných obrázkov

Za účelom kalibrácie potrebujeme informácie o skreslení z čo najviac oblastí (bodov) v pozorovanom obraze. Aj vďaka použitiu beads je týchto bodov v jednej snímke dostatočný počet (viac ako 1000 v neriedenom roztoku) – v závislosti od kvality nanášania, pomeru riedenia a „čerstvosti“ vzorky.

Samotný zber snímok pozostáva z 3 etáp. V prvej je nastavená poloha vzorky (stolčeka) a z elektrónového mikroskopu získaná prvá snímka, ktorá slúži ako referenčný obrázok (ground truth). Po nasnímaní obrázku je potrebné zmeniť pohľad na optický mikroskop. V druhom kroku je získaná snímka reflexného obrazu, ďalej použitá v kapitole 6.5.1. Nakoniec sú získané 4 fluorescenčné snímky z vyššie spomínaných používaných vlnových dĺžok. Medzi každou vlnovou dĺžkou je potrebné mikroskop preosť, čo je zapríčinené longitudálnou chromatickou chybou (viac v kapitole 7.3).

Značky, ktoré boli v predchádzajúcom kroku urobené do vzorky majú za následok deštrukciu beads a tým pádom aj stratu samotnej informácie o skreslení v daných oblastiach. Aby sme získali viac informácií aj o týchto častiach obrazu, vzorku (stolček) mierne posúvame v osiach x,y. Pre každý takto získaný set obrázkov je kalibračný vzor počítaný samostatne (viď nasledovné kapitoly).

6.3 Použité technológie

Pri výbere technológií použitých v softvérovej časti tejto diplomovej práce bol zohľadnený proces vývoja softvéru vo firme Thermo Fisher Scientific (TFS) a na meranie, analýzu a korekciu bola navrhnutá knižnica v jazyku `python`. V knižnici sú využité niektoré štandardné knižnice, z ktorých by som chcel priblížiť nasledovné:

NumPy

Je open-source knižnica primárne na manipuláciu a výpočty s maticami. Maticové operácie sú vo všeobecnosti výpočetne náročné, preto táto knižnica používa optimalizované algoritmy a implementovaná je v jazyku C/C++. NumPy sa vo veľkom používa aj v niektorých ostatných knižniciach pre `python` ako sú SciPy, TensorFlow, Pandas, OpenCV a iné. Taktiež umožňuje hardvérovú akceleráciu na GPU a podporuje distribuované výpočty. V knižnici sú dostupné rôzne matematické funkcie, metódy lineárnej algebry, generátory náhodných čísel a iné.

OpenCV

Je multiplatformná open-source knižnica, vyvinutá a optimalizovaná v jazyku C/C++, zameraná na počítačové videnie. Knižnica poskytuje mnoho klasických aj state-of-the-art algoritmov. Napríklad obsahuje algoritmy na detekciu a rozpoznávanie objektov, sledovanie objektov vo videu, rekonštrukciu 3D scény a mnohé iné². Knižnica je vhodná aj pre využitie v aplikáciách, ktoré spracovávajú obraz v reálnom čase a umožňuje akceleráciu pomocou rozhraní CUDA (rozhranie pre použitie grafických kariet od NVidia) a OpenCL (rozhranie pre paralelné programovanie umožňujúce výpočty súčasne na viacerých rozličných procesoroch (CPU, GPU, FPGA, ...)).

Scipy

Je opäť open-source knižnica určená primárne na vedecké výpočty, využívajúca NumPy. SciPy obsahuje mnohé algoritmy na spracovanie vo všeobecnosti signálov ako sú funkcie na riešenie interpolačných problémov, poskytuje metódy na algebraické výpočty, metódy na riešenie diferenciálnych rovníc, štatistické metódy a mnohé ďalšie. Knižnica je taktiež napísaná a optimalizovaná v C/C++.

6.4 Analýza obrazu a detekcia beads

Jednou z hlavných častí celej kalibrácie je získanie presných pozícií bodov, podľa ktorých budú neskôr vykonané merania, analýza a kalibrácia optického mikroskopu. Ako bolo vyššie spomenuté, objekty v elektrónovom a fluorescenčnom obraze vyzerajú značne odlišne a kvôli tomu je aj prístup k detekcii beads v nich odlišný.

Experimenty so SIFT a ORB algoritmami

V rámci vývoja algoritmu na párovanie bodov som otestoval aj štandardné detektory kľúčových bodov. V zdrojových súboroch k tejto práci sú len zjednodušené ukážky detekcie pomocou nich. Algoritmy založené na detekcii hrán alebo rohov ako napríklad FAST alebo Harris, sú pre detekciu beads neefektívne a inklinujú k detekcii zhlukov beads, nečistôt a okrajov beads. Na druhú stranu napríklad algoritmus SIFT, využívajúci na hľadanie kľúčových bodov algoritmus Difference of Gaussian (DoG), dokáže pomerne efektívne detegovať osamotené beads, detektor však deteguje aj niektoré nečistoty a zhluky. Ďalšou nevýhodou je, že algoritmus SIFT je proprietárny. V elektrónovom obraze, ktorý v sebe obsahuje aj mnoho znečistenia je použitie feature-based algoritmov náročné až nemožné.

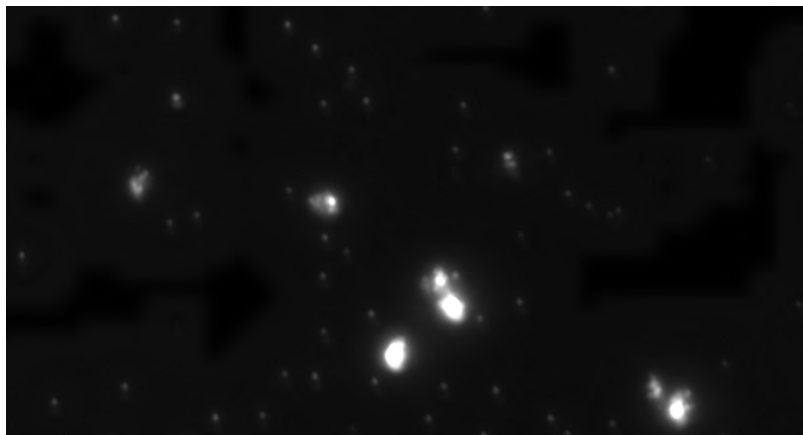
Tieto pozorovania viedli k návrhu vlastných detekčných algoritmov, ktoré vychádzajú priamo z tvarom očakávaných kľúčových bodov a z vlastností pozorovaných obrázkov.

6.4.1 Detekcia beads vo fluorescenčnom obraze

Vo fluorescencii vidíme beads ako svetelné body široké pár jednotiek pixelov (viď napríklad obr. 6.4). Výhodou však je, že výrazne vidíme len body, ktoré sú označené fluorescenčnou látkou, prípadne svetelné znečistenie, spôsobené odrazivosťou niektorých nedokonalostí vzorky – vonkajšie znečistenie zanesené pri manipulácii so vzorkou. Pre ne však vo všeobecnosti platí, že svetlo takto odrazené je menšie ako svetlo priamo vyžiarené zo zdroja (beads).

²Všetky moduly a podrobná dokumentácia aktuálne najnovšej verzie dostupná na: <https://docs.opencv.org/4.7.0/>

Ďalšou výzvou pri detekcii vo fluorescenčnom obraze sú zhluky, ktoré vznikajú pri nanášaní beads (kap. 2.4). Tieto zhluky sa preukazujú, oproti osamoteným beads, ako väčšie a výraznejšie svetelné body (viď. obr. 6.4) a nie je možné presne určiť ich stred/stredy ako pri osamotených.



Obr. 6.4: Zhluky beads (veľké biele body) vo fluorescenčnom obraze.

Pred samotnou detekciou je FO predspracovaný, čím je minimalizovaný počet falošných kľúčových bodov, ktoré by inak boli detekované, ale pre účely kalibrácie nežiadúce a maximalizovaný počet relevantných (osamotených) beads, z ktorých vieme presne získať stredy týchto beads, ktoré považujeme za kľúčové body. Navrhnuté predspracovanie je použiteľné v tej istej forme na všetky skúmané vlnové dĺžky aj napriek odlišnej svietivosti v nich.

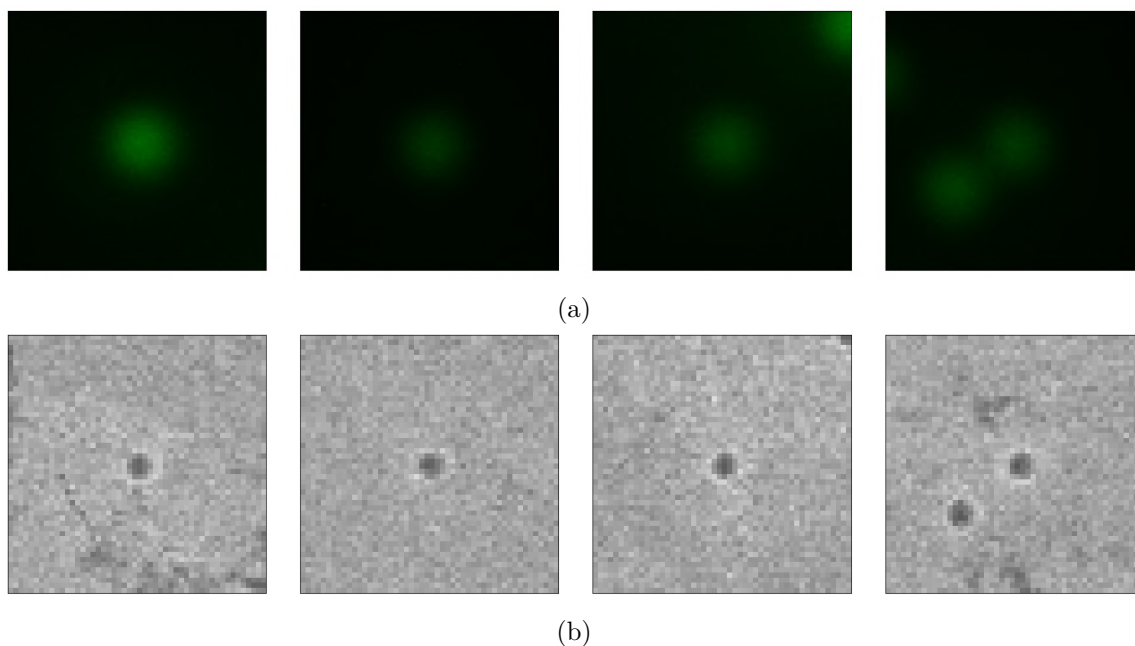
Kroky predspracovania:

1. **Stredné rozostrenie** – mierne rozmazanie obrázku, čo zlepšuje výsledky prahovania na úkor miernej straty informácie.
2. **Adaptívne prahovanie** – pomocou prahovania sa zbavíme nedôležitých hodnôt v obraze. Adaptívnym prístupom, ktorý sám počíta prah pre časti obrázku, je možné dosiahnuť lepších výsledkov aj pre svetelne znečistené snímky.
3. **Morfologické uzavretie** – odstráni vzniknutý šum po prahovaní.
4. **Morfologické otvorenie** – pomocou tejto druhej morfologickej operácie *opening* s odlišným štruktúrnym elementom je potlačená detekcia niektorých zhlukov beads, ktoré po predchádzajúcom spracovaní tvoria menšie škvrny po okrajoch zhuku. Touto operáciou sú tieto nežiadúce škvrny spojené a tak ďalej nedetekované ako kľúčové body.

Na detekciu beads v už spracovanom fluorescenčnom obraze je použitý vyššie spomínaný `SimpleBlobDetector` dostupný v knižnici OpenCV, ktorý dokáže nájsť kruhové „škvrny“ v obraze – v našom prípade beads a umožňuje jednoducho filtrovať výsledky na základe tvaru a veľkosti, čím v spojení s predchádzajúcim predspracovaním dokážeme efektívne eliminovať zhluky a nečistoty vyskytujúce sa na vzorke.

6.4.2 Detekcia beads v elektrónovom obraze

V elektrónovom obraze na rozdiel od fluorescenčného vidíme akékoľvek štruktúry, ktoré sa na vzorke nachádzajú – takže okrem samotných beads vidíme jasne aj nedokonalosti a



Obr. 6.5: Ukážka odpovedajúcich si detekovaných beads vo fluorescenčnom (a) a elektrónovom obraze (b). Na obrázkoch sú zobrazené s okolím definovaným deskriptorom z podkapitoly 6.5.2.

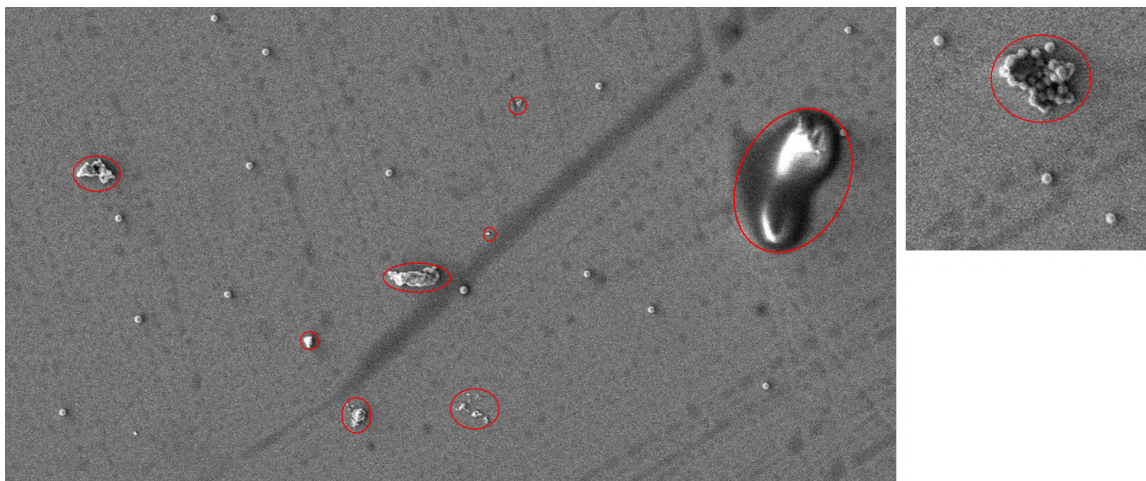
znečistenia, ktoré vznikajú napríklad pri manipulácii vzorky mimo vákuovú komoru, pri príprave a prenose vzorky alebo taktiež pri opracovávaní vzorky iónovým tubusom. Toto prináša znečistenie odprášeným materiálom, ktorý ostáva v komore môže sa zachytiť opäť na vzorke (viď obr. 6.7). Ďalej popísaný navrhnutý algoritmus detekcie v EO je reprezentovaný diagramom 6.6.



Obr. 6.6: Diagram algoritmu detekcie beads so subpixelovou presnosťou v elektrónovom obraze.

Za účelom detekcie beads v EO je v prvom kroku použitý jednoduchý template matching, ktorý sa ukázal ako spoľahlivý pre rozoznanie beads. Ako vzor využíva priemerný obrázok beads získaný ako priemer hodnôt pixelov v obrázkoch osamotených beads, získaných z viacerých snímok, čím dokážeme zvýšiť presnosť vzoru oproti jednému vzoru. Ako metóda porovnania vzoru je použitá `cv2.TM_CCORFF_NORMED` (normovaná verzia korelačného koeficientu³). Keďže výskytov v obraze je mnoho a potrebujeme ich určiť ideálne čo najviac, tak nehľadáme len maximálne hodnoty porovnania, ale hodnoty, ktoré sú nad istou hranicou (prahom). Toto nám pomôže nájsť viacero zhôd, ale na druhú stranu medzi zhody pridá aj ďalšie výskyty v blízkom okolí už nájdených. Na zamedzenie týchto nežiadúcich

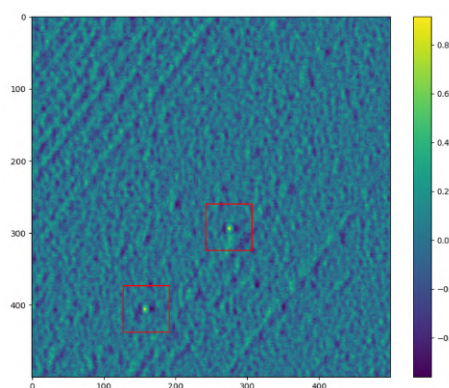
³Viac napríklad v https://docs.opencv.org/4.x/df/dfb/group__imgproc__object.html



Obr. 6.7: Znečistenie viditeľné v elektrónovom obraze (vľavo), zhuk viacerých beads (vpravo).

zhôd je použitá funkcia `non_max_suppression()` z knižnice `imutils`⁴, ktorá v okolí vyberie len lokálne maximá a ostatné z výsledkov zahodí.

V kalibračných snímkach sú pre nás zaujímavé iba beads, ktoré majú tvar takmer dokonalej gule a teda otočenie beads na vzorke nemá vplyv na vzor. Všetky beads na vzorke majú približne rovnakú veľkosť, tým pádom priemerný vzor jednej veľkosti je pre naše účely postačujúci.



Obr. 6.8: Ukážka výsledkov porovnávania vo vybranej časti obrázku pomocou metódy `cv2.TM_CCOEFF_NORMED` – maximálna hodnota ukazuje predpokladaný výskyt.

Samotný template matching dokáže spoľahlivo rozoznať bead od znečistenia, ale presnosť určenia stredu beads je nedostačujúca (pozorovaná presnosť do 3 pixelov). Aby sme zvýšili presnosť detekcie používame opäť detektor škvŕn ako v kapitole 6.4.1 v kombinácii s jednoduchším predspracovaním (kontrast, jas a rozostrenie). Ešte pred samotnou detekciou je na snímku aplikovaná maska vytvorená z očakávaných výskytov beads z kroku template matchingu. Pomocou masky zamedzíme detekcii nežiadúcich artefaktov na vzorke. Výsledná detekcia dosahuje presnosti pod 1 pixel.

⁴Zdrojové súbory dostupné na: <https://github.com/PyImageSearch/imutils>

6.5 Priradenie dvojíc kľúčových bodov

Po tom ako sú detekované kľúčové body (beads) v snímkach z jednotlivých mikroskopov je dôležité určiť zodpovedajúce si dvojice – pre bod vo fluorescencii jednoznačne priradiť odpovedajúci bod v elektrónovom obraze – a tým ďalej z elektrónového obrazu určiť očakávaný kalibračný vzor a jeho charakteristiku. V prvom – inicializačnom kroku tejto časti je získaná jednoduchá transformácia homografie medzi optickým a elektrónovým mikroskopom, ktorú neskôr použijeme pri samotnom párovaní. V druhej časti tejto podkapitoly sú predstavené deskriptory popisujúce okolia detekovaných bodov, za pomoci ktorých budú priradované dvojice bodov.

6.5.1 Inicializačný krok pred hľadaním párov

Z kapitoly 3.2 vieme, že presun medzi elektrónovým a optickým obrazom prináša pomerne nedeterministickú chybu a pozorovaná oblasť je mierne odlišná – posunutá, otočená alebo skosená (podľa osi). Algoritmus na priradenie párov navrhnutý v tejto práci vychádza zo znalosti očakávanej polohy bodov v obraze a jednoduchých deskriptorov (viac v 6.5.2). Aby sme tieto polohy bodov získali, potrebujeme nájsť závislosť (transformáciu) medzi pohľadmi EM a OM. Kvôli tomu sú vo vzorke pomocou FIB urobené 4 špeciálne jednoznačné značky, viditeľné v elektrónoch a reflexnom móde optického mikroskopu – ktorých stredy sú použité pre výpočet homografie medzi nimi.

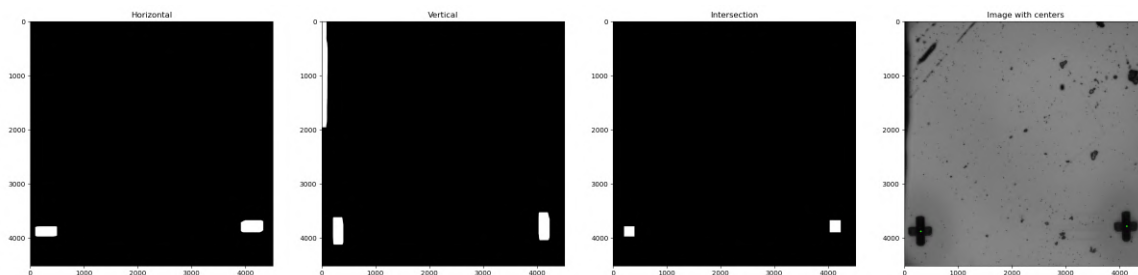
Detekcia krížov v obraze

Spočiatku sme sa inšpirovali kalibračnými krížmi (obr. 2.7) bežne používanými s template matchingom napríklad na automatizáciu v aplikáciách Thermo Fisher Scientific a z toho sme odvodili vlastnú detekciu ako:

Zo znalosti vlastností konkrétnych mikroskopov, procedúr na ich ladenie a získaných snímok môžeme predpokladať, že chyba zobrazenia nie je priveľmi veľká a značky budú vždy aspoň približne rovnako otočené (jednotky stupňov), vďaka čomu môžeme na detekciu stredov krížov použiť nasledovný algoritmus:

1. **Predspracovanie snímky** – mierne rozmazanie a binárne prahovanie
2. **Detekcia horizontálnych čiar** – pomocou morfologického otvorenia s obdĺžnikovitým štruktúrnym elementom tvaru (x, y) , kde $x \gg y$, transformujeme obrázok, tak že v ňom ostanú iba hrubé horizontálne čiary.
3. **Detekcia vertikálnych čiar** – morfologické otvorenie ako v kroku 2, ale tvar štrukt. elementu je (y, x) , má za výsledok obraz len s vertikálnymi čiarami.
4. **Prienik výsledkov** – prienikom obrazov z kroku 2 a 3 získame oblasti (obecne tvaru obdĺžnika), ktoré sú spoločné a teda sú oblasťami, kde sa časti kríža pretínajú.
5. **Určenie ťažiska** – určením ťažiska získaných prienikov získame ich stredy, ktoré môžu byť použité na výpočet homografie.

⁵Poznámka: na obrázku je z technických príčin zobrazená vzorka len s dvomi krížmi, ale na výpočet homografie sú potrebné aspoň 4.

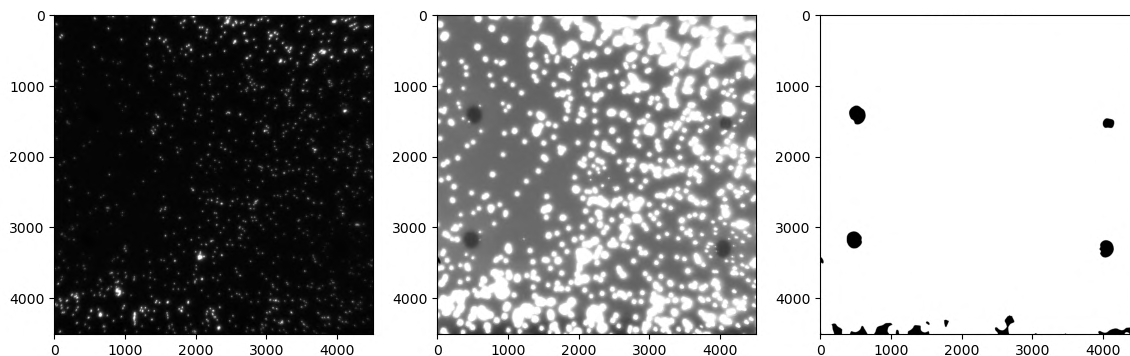


Obr. 6.9: Výsledky krokov 2-5 algoritmu na detekciu krížov v reflexnom obraze⁵.

Detekcia kalibračných dier

Pri ďalších vzorkách sme navrhli efektívnejšiu metódu využívajúcu jednoduchšie značky, kruhové diery (viď obr. 6.3b), ktorých hĺbka nemusí byť tak veľká ako v prípade krížov a tým sa niekoľkonásobne znižuje aj čas na prípravu (kríže cca 15min, diery max 5min). Samotná detekcia týchto značiek pozostáva z predspracovania ako v kroku 1 algoritmu s krížmi a jednoduchej detekcie kruhov napríklad vyššie spomínaným `SimpleBlobDetector` alebo kruhovou Houghovou transformáciou. Stredy týchto dier (kruhov) sú použité ako body na výpočet inicializačnej homografie medzi optickým a elektrónovým obrazom, ktorá reprezentuje prvý hrubý odhad ich vzťahu. Na jej výpočet je použitá funkcia `cv2.findHomography()`⁶ z knižnice OpenCV.

Po podrobnejšej analýze sa ukázalo, že fluorescenčný obraz pri ideálnych podmienkach obsahuje informáciu aj o dierach vo vzorke. Tento krok algoritmu sme teda v niektorých sadách snímok dokázali optimalizovať a detegovať diery priamo vo fluorescenčnom obraze (viď obr. 6.10), čím je možné urýchliť zber obrázkov a vyradiť reflexný obraz úplne z procedúry. Táto informácia však nie je vždy dostupná vo fluorescenčných snímkach, preto je v tejto diplomovej práci načrtnutá len okrajovo.

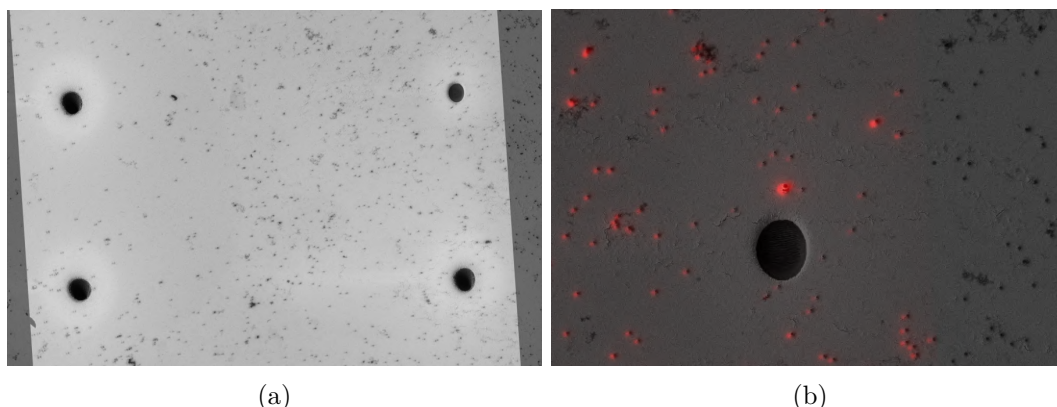


Obr. 6.10: Spracovanie a detekcia kalibračných značiek(dier) priamo vo fluorescenčnom obraze.

⁶https://docs.opencv.org/4.7.0/d9/d0c/group__calib3d.html#ga4abc2ece9fab9398f2e560d53c8c9780

6.5.2 Párovanie bodov

Vzhľadom na uniformný vzhľad každej detekovanej beads je čisto z vlastností a vedomosti blízkeho okolia náročné presne určiť, o ktorý bead z druhého obrazu sa jedná. Z tohto dôvodu v tejto práci pristupujeme ku párovaniu na základe predpokladanej polohy bodov v obraze. To znamená, že poznáme presnú polohu vo fluorescenčnom obraze a pomocou nej a homografie z predchádzajúceho kroku určíme približné miesto (okolie) v elektrónovom obraze, kde predpokladáme, že sa daná bead nachádza.



Obr. 6.11: (a) Ukážka transformovanej reflexnej snímky pomocou vypočítanej homografie z podkapitoly 6.5.1. (b) Ukážka preloženia elektrónového a fluorescenčného obrazu pomocou rovnakej transformácie.

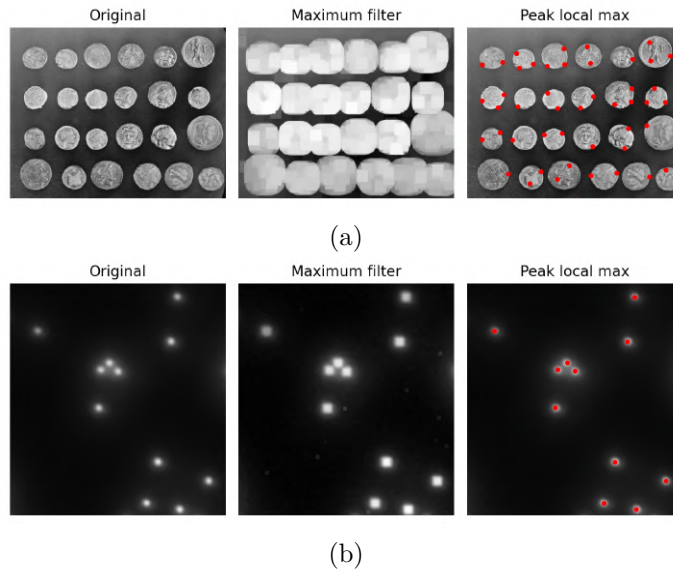
V prvom kroku tejto časti sú súradnice bodov z fluorescence, za použitia homografie z predchádzajúcej podkapitoly, transformované do súradnicového systému elektrónového obrazu (viď obr. 6.11b). Homografiu získanú z reflexného obrazu môžeme použiť vďaka predpokladu, že vieme, že medzi optickým a elektrónovým mikroskopom je nejaká chyba (odchýlka) stolčeka a táto chyba je rovnaká aj pre reflexný aj fluorescenčný obraz oproti elektrónom. Z reflexného obrazu, kde vieme detekovať rovnaké body ako v elektrónoch, sme určili transformáciu medzi nimi. Medzi reflexným a fluorescenčným obrazom už žiadny posun nie je, jedná sa len o nastavenie režimu snímacieho senzoru a použitia odlišných filtrov.

Aby sme dokázali jednoznačne priradiť dvojice (páry) odpovedajúcich si bodov vo fluorescence a elektrónovom obraze každému detekovanému bodu je určený deskriptor, reprezentujúci okolie daného bodu. V zdrojových súboroch k tejto práci sú ukázané viaceré vyskúšané metódy na reprezentovanie okolia bodu, ale v práci je bližšie popísaný len jeden. Veľkosť okolia vo fluorescence je vopred definovaná a prepočítaná na odpovedajúcu veľkosť v EO v závislosti od skutočnej veľkosti jedného pixelu. Vo fluorescence je vo finálnej podobe deskriptoru okolie popísané výskytmi lokálnych extrémov intenzity pixelov – teda vrcholy ďalších fluoreskujúcich prvkov vzorky (zhluky, beadsy, ...). Tieto extrémny sú detekované pomocou funkcie `peak_local_max` z knižnice `skimage`, ktorá interne používa filter založený na morfolologickej operácii dilatácie (viď obrázok 6.12). Aby táto metóda fungovala správne na fluorescenčných snímkach je potrebné pridať parameter prahu, nad ktorým sú odfiltrované lokálne maximá spôsobené šumom a odrazivosťou vzorky. Súradnice lokálnych maxim sú následne prepočítané na vzdialenosť od detekovaného bead v osiach x a y (podobne ako 6.1, kde $K = 1$), čím dostávame informáciu o smere a vzdialenosti nezávislej od polohy v snímke. Pri implementácii tejto časti sa pri popisovaní okolia žiarivejších (väčších)

beads ukázalo, že v niektorých prípadoch metóda `peak_local_max` detekuje viac lokálnych maxím blízko seba aj tam, kde je len jedna bead. Na vyriešenie tohoto problému sme metódu na výpočet deskriptorov upravili a v spomínanom prípade je extrém počítaný ako stred zoskupených lokálnych maxím. V elektrónovom obraze je okolie členitejšie a náročnejšie a nakoniec v tejto práci popísané iba výskytmi ďalších detekovaných beads v okolí, deskriptor je počítaný obdobne ako vo fluorescencii, teda výsledok je vzdialenosť ďalších detekovaných bodov od aktuálneho bodu v x, y v pixeloch, prepočítaná na odpovedajúce pixely vo fluorescencii ako:

$$v_i = ((x_i - x_0) * K, (y_i - y_0) * K), \quad K = \frac{pixel_{ele}}{pixel_{flu}} \quad (6.1)$$

kde v_i je zložka počítaného deskriptoru, x_i, y_i sú súradnice bodu v okolí, x_0, y_0 sú súradnice bead pre ktorý je počítaný deskriptor a K je pomer veľkosti pixelu v elektrónovom a vo fluorescenčnom obraze. Vďaka tomuto prepočtu je možné porovnávať deskripty z EO priamo s deskriptormi z FO.



Obr. 6.12: Algoritmus na detekciu lokálnych maxím `peak_local_max`. (a) Ukážka z dokumentácie ku knižnici, vizualizuje použité dilatácie ako filter. (b) Aplikovaný filter a detekcia na časť fluorescenčného obrázku.

Celá metóda priradenia párov po vypočítaní deskriptorov potom pozostáva z dvoch krokov. Body z fluorescencie sú pomocou homografie z predchádzajúceho kroku transformované do EO. Pre každý detekovaný bod v EO je získaná množina kandidátnych (transformovaných) bodov z fluorescencie na základe maximálnej tolerovanej vzdialenosti od očakávaného výskytu. Pre túto množinu sú porovnávané deskripty s aktuálnym bead z EO. Porovnávaná je dĺžka deskriptora (počet detekovaných črt) a absolútny rozdiel v jednotlivých zložkách deskriptoru. V prípade, že po porovnaní zostane len jeden vyhovujúci bod, tento bod je mu priradený a považuje sa za zhodu. Ak sa v okolí v EO, po porovnávaní bude vyskytovať viac ako jeden beads s odpovedajúcim deskriptorom tak pre daný bead nebolo možné jednoznačne určiť pár. Ak sa v okolí nenachádza žiadny fluorescenčný bod, jedná sa o detekované znečistenie v elektrónoch, alebo detekovaný bead stratil svoju fluorescenčnú vlastnosť (farbivo spotrebovalo všetku energiu), ale na kalibračnej vzorke sa stále nachádza

a pre elektróny je stále viditeľný. Dôležitým krokom je efektívne určiť veľkosť okolia na výpočet deskriptorov a toleranciu, v ktorej sa môže daný bod vyskytovať. V prípade malej tolerancii v oblasti s veľkou chybou môžeme informáciu o chybe stratiť, v prípade naopak veľkého okolia sa môže zvýšiť riziko priradenia viacerých bodov a tým priniesť prvok neistoty a taktiež spomaliť výpočet. Tolerancia bola teoreticky aj experimentálne skúmaná a vychádza z dokumentácie optického mikroskopu, kde maximálna chyba presne nastaveného mikroskopu by mala byť približne do $600nm$, čo odpovedá približne 22 pixelom, kvôli nedokonalostiam pri integrácii a nastavovaní optického mikroskopu však z pozorovania bolo potrebné toto okolie zväčšiť na 35 pixelov.

6.6 Experimenty a merania na skutočných obrázkoch

V experimentoch vykonaných s navrhnutou kalibračnou vzorkou – verziou s kremíkovou dosičkou aj pozláteným zafírovým sklíčkom s automatickým aj manuálnym inicializačným krokom (viď kap. 6.5.1) bola demonštrovaná funkcionalita a efektivita navrhnutého riešenia detekcie a párovania bodov z oboch skúmaných obrazov. V elektrónovom obraze je počet beads väčší hlavne kvôli tomu, že pohľad elektrónového mikroskopu pri tejto procedúre zaberá väčšiu časť vzorky (väčšie zorné pole) ako fluorescenčný. V tabuľke 6.1 sú výsledky detekcie a párovania bodov v jednotlivých obrazoch pre vzorku na pozlátenom sklíčku.

	Electrons	F385	F470	F565	F625
Detected	1826	1339	1281	1322	1290
Pairs	–	789	747	789	748
Miss rate (%)	–	41.1	41.7	40.3	42.0
Bad matches	–	1	2	2	1

Tabuľka 6.1: Počty detekovaných beads v elektrónovom obraze a jednotlivých vlnových dĺžkach fluorescence a počty úspešne nájdených párov pre vzorku na pozlátenom sklíčku s novou metódou detekcie a párovania.

	Electrons	F385	F470	F565	F625
Detected	699	768	542	443	693
Pairs m_1	–	464	332	271	431
Pairs m_2	–	415	303	251	389
Bad matches m_1	–	14	13	6	17
Bad matches m_2	–	2	0	1	1

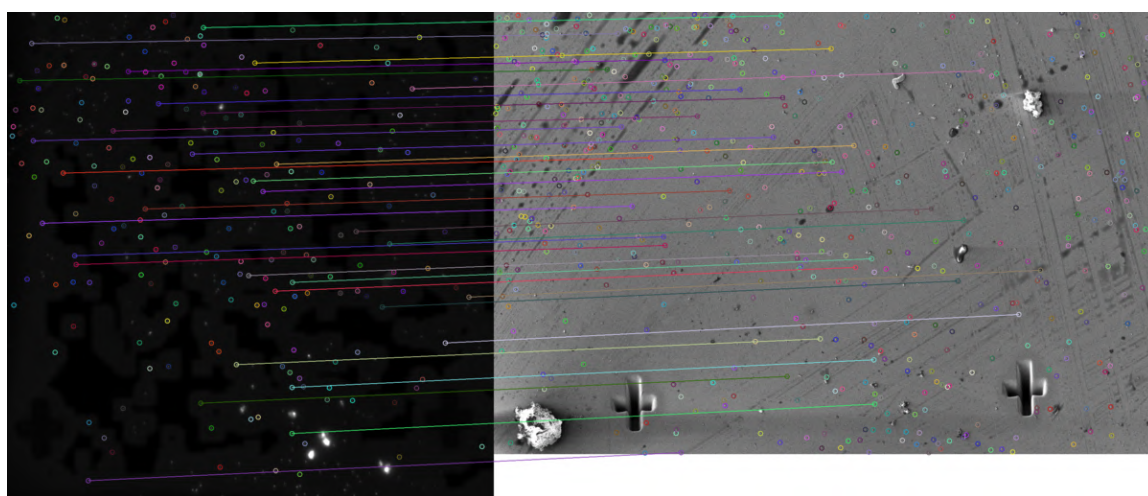
Tabuľka 6.2: Porovnanie dvoch techník párovania bodov, m_1 je metóda založená čisto na porovnávaní očakávaného výskytu (po transformácii) a metóda m_2 je metóda popísaná v predchádzajúcej podkapitole pracujúca aj s deskriptormi.

Z tabuľky 6.1 je vidieť, že predstavená metóda je za istých podmienok použiteľná. Veľmi podobné výsledky (detekovaných ± 150 , párov ± 70 , chybné páry ≤ 2) boli pozorované aj na ďalších sadách z iných oblastí vzorky. Pomerne vysoká neúspešnosť párovania je spôsobená rozdielnym zorným poľom, náročnosťou detekcie v elektrónovom obraze a nie úplne rovnakými deskriptormi (blízke zhluky nie sú popísané v deskriptoroch v elektrónoch ale vo

fluorescencii áno). Napriek tomu chybné priradenie párov je úplne minimalizované (viď tab. 6.1).

V tabuľke 6.2 je porovnaná metóda párovania bodov založená čisto na očakávanej polohe a kombinovaná technika s deskriptormi. Skúmaná vzorka obsahovala menej beads (riedený roztok) a elektrónový obraz nepokrýva celú oblasť fluorescence (čo má tiež vplyv na úspešnosť párovania). Z tabuľky je zreteľný rozdiel v chybnom párovaní týchto dvoch prístupov, kde metóda s deskriptormi dokáže potlačiť tieto chyby a tým zlepšiť ďalšie kroky a samotnú kalibráciu. Metóda s deskriptormi je taktiež nevyhnutná pre vzorky s neriedeným roztokom (pri vzorkách s väčším počtom detekovaných beads), kedy je pravdepodobnejší stav, pri ktorom sa v očakávanom okolí nachádza viac beads – metóda bez deskriptorov zlyháva (s rovnakou vzorkou ako v tabuľke 6.1 dokáže nájsť menej ako 70 párov na obrázok).

Na obrázku 6.13 je zobrazená vizualizácia niektorých nájdených párov – pre prvú vzorku na kremíkovej dosičke.



Obr. 6.13: Ukážka nájdených párov v elektrónovom a fluorescenčnom obraze na prvej vzorke z kremíkovej dosičky.

Kapitola 7

Analýza a tvorba modelu skreslenia

V prvej časti tejto kapitoly budú predstavené použité techniky na vizualizáciu a meranie skreslenia, ktoré sú zohľadnené pri analýze a návrhu algoritmu na jeho korekciu. V druhej časti bude interpretované pozorované skreslenie a budú diskutované použité modely na jeho korekciu.

7.1 Simulačná dátová sada

Okrem obrázkov získaných z prototypov reálnych mikroskopov sme za účelom návrhu algoritmov a testovania navrhli metódu na generovanie sád umelých – simulačných obrázkov fluorescenčného mikroskopu. Každá dátová sada pozostáva z neskreslených (ground truth) a skreslených obrázkov, pričom skreslenie je pre každú použitú vlnovú dĺžku iné. Neskreslené obrázky slúžia na získanie vzoru (ako z elektrónového obrazu pri reálnych snímkach) na kalibráciu a na meranie výsledkov v nasledujúcich podkapitolách.

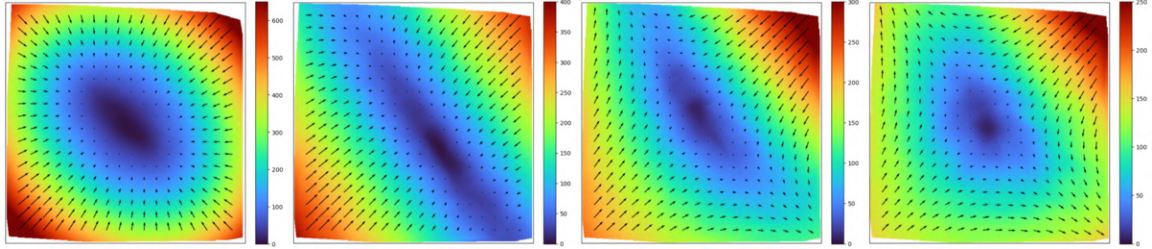


Obr. 7.1: Ukážka časti vygenerovaného testovacieho obrázku.

Simulačné obrázky majú podobu čierneho obrazu s bielymi bodkami približne rovnakej veľkosti na náhodných pozíciách – čím sa chceme čo najviac priblížiť reálnym vzorkám, kde tiež nemáme kontrolu nad rozložením beads. Tieto obrázky sú považované za spomínané neskreslené vzory. V druhej časti sa na ne aplikuje skreslenie približne odpovedajúce tvaru a veľkosti skreslenia zdokumentovaného od výrobcu optického mikroskopu (viď obr. 3.6). Na

aplikovanie skreslenia som použil knižnicu **Wand**¹, ktorá je založená na populárnej aplikácii **ImageMagick**², ktorá poskytuje množstvo funkcií na úpravu a konverziu obrázkov.

Knižnica **Wand** obsahuje funkciu `distort()`, ktorej parametre umožňujú vybrať metódu(`typ`) deformácie a jej argumenty. Zohľadňujúc dokumentáciu mikroskopu a vlastné pozorovania sme zvolili pre simulačné obrázky kombinácie radiálneho a polynomiálneho³ skreslenia, čím sme docielili tvar a veľkosť deformácie adekvátne dokumentácii. Okrem obrázkov so stredom skreslenia v strede obrazu sme vytvorili sadu s chybou pozorovanou napríklad na mikroskope s kremíkovou vzorkou so stredom skreslenia bližšie k okraju obrazu.



Obr. 7.2: Ukážka simulovaného skreslenia pomocou knižnice **Wand**, pre jednotlivé vlnové dĺžky.

7.2 Techniky merania a vizualizácie výsledkov

Za účelom analýzy a merania chyby pôvodného, aj kalibrovaného obrazu sme používali viacero techník. Ako základná metrika slúži tzv. chyba reprojekcie (*reprojection error*). Táto metrika je počítaná ako absolútna normovaná vzdialenosť projekcie bodov vzoru – v tomto prípade z elektrónového obrazu do obrazu fluorescenčnej kamery – od detekovaných bodov v pôvodnom fluorescenčnom obraze. Táto hodnota vyjadruje ako blízko realite je odhadnutý model kamery a model skreslenia, čím je bližšie táto metrika nule, tým je model presnejší. Nevýhodou je, že v niektorých prípadoch, kedy je pomer detekovaných bodov v strede a na okraji skreslenia nerovnomerný, nebude výsledná hodnota odpovedať celému obrazu, ale viac len časti v ktorej sú body detegované.

Druhou technikou použitou pri analýze tvaru skreslenia bola vizualizácia pomocou dvojrozmerných vektorových polí a tzv. tepelných máp (viď obr. 7.3). Prvky vektorového pola sú počítané ako:

$$\vec{v}_i = (pt_{0_i}, d_i), \quad (7.1)$$

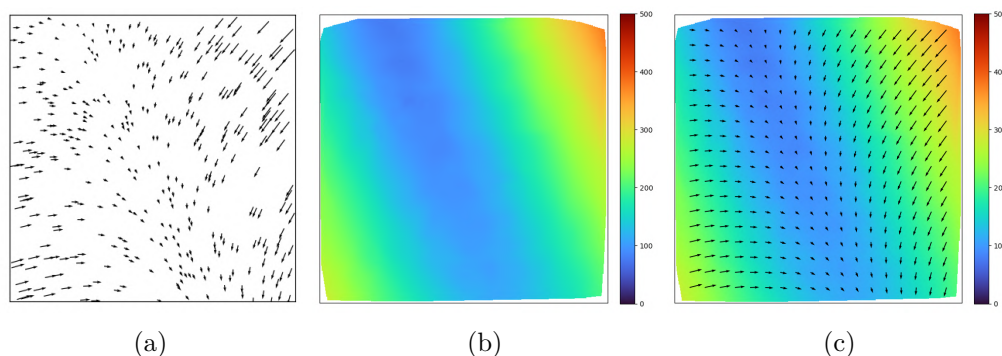
kde v_i je vektor reprezentovaný počiatkom v bode pt_{0_i} a dĺžkou a smerom $d_i = (d_{x_i}, d_{y_i})$ v osiach x, y . Dĺžka a smer je počítaná ako rozdiel súradníc originálneho a skresleného bodu. Pomocou techniky interpolácie, môžeme odhadnúť hodnoty (v tomto prípade vektory) medzi známymi hodnotami, ktoré inak nemáme – v daných oblastiach neboli detegované body, alebo tam kde neboli nájdené páry. V dvojrozmerných obrazových dátach sa jedná o reprezentáciu plochy medzi známymi bodmi. Interpolácia vo všeobecnosti však prináša chyby pri riedkych a zašumených dátach. V prípade skreslenia obrazu môže mať vplyv na interpolované hodnoty chyba detekcie (pri menšom skreslení, má aj malá chyba zreteľný

¹<https://docs.wand-py.org/en/0.6.11/>

²<https://imagemagick.org/index.php>

³<https://docs.wand-py.org/en/0.6.11/guide/distortion.html#polynomial>

efekt). Na interpoláciu vektorov v dvojrozmernom poli s požadovanou hustotou sme použili funkciu `griddata` z knižnice `scipy`⁴.



Obr. 7.3: Príklady navrhnutých a použitých vizualizačných techník na simulačných snímkach. Farby v dvoch zobrazených príkladoch si neodpovedajú. (a) Vektorové pole vytvorené z korešpondujúcich dvojíc bodov v deformovanom a v pôvodnom obraze. (b) Rovnaká oblasť reprezentovaná tepelnou mapou, kde farba vyjadruje veľkosť deformácie v danom mieste (hodnoty sú interpolované aby bola mapa spojitá). (c) Kombinovaná mapa s interpolovaným vektorovým poľom.

Farebné mapy vyjadrujú magnitúdu (veľkosť) skreslenia v jednotlivých oblastiach obrazu. V kontexte vektorov je to dĺžka vektoru skreslenia v danom bode. Oproti vektorovému poľu nám tento údaj nedáva žiadnu informáciu o smere skreslenia, ale pridáva vizuálnu informáciu o absolútnej veľkosti. Interpolácia je pri farebných mapách dôležitá aby sme videli spojitý obraz aj pri nespojitých vstupných dátach. Poslednou vizualizačnou technikou je trojrozmerná tepelná mapa, kde tretí rozmer (osa z) reprezentuje tiež magnitúdu skreslenia. Táto technika tiež pomáha k lepšiemu odhadu distribúcie skreslenia pre návrh modelu. Farebné mapy nám lepšie pomáhajú vo vizualizácii veľkosti skreslenia a vektorové pole na druhú stranu vizualizuje jeho tvar.

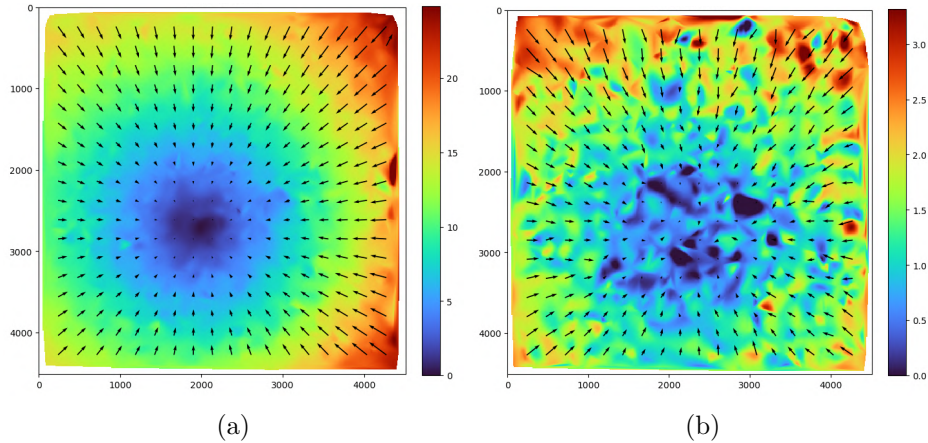
7.3 Analýza chromatických chýb optického mikroskopu

Longitudálna chromatická aberácia (kapitola 3.1.2), s ktorou sa na skúmanom mikroskope stretávame, vplýva na snímky tak, že jednotlivé vlnové dĺžky sú zaostrené v rôznych ohniskových vzdialenostiach. Spôsob akým optickým mikroskopom zaostrujeme obraz spočíva iba v približovaní a oddaľovaní objektívu k a od vzorky – teda mikroskop nedisponuje iným ostriacim mechanizmom. V prípade obrázkov s beads toto znamená, že medzi snímaním obrázkov pre rôzne dĺžky musíme mikroskop preosť aby sme dostali relevantné snímky. Na korekciu tejto chyby stačí v kontexte skúmaných mikroskopov poznať rozdiely medzi optimálnymi ohniskovými vzdialenosťami medzi vlnovými dĺžkami a tie aplikovať pri zbere snímok. Ďalej na korekciu tejto vady existujú optické súčiastky, ktoré dokážu kompenzovať rozdielne ohniskové vzdialenosti a aktuálne prebieha ich rozbor a výber.

Laterálna chromatická aberácia, má za následok, že beads aj v prípade rovnakej geometrickej chyby medzi jednotlivými dĺžkami nie sú na rovnakom mieste (viď obr. 3.5) a to v závislosti od vzdialenosti od stredu skreslenia. Na obrázku 7.4 sú zobrazené rozdiely priamo

⁴<https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.interpolate.griddata.html#scipy.interpolate.griddata>

v niektorých vlnových dĺžkach, čo v princípe vyjadruje chromatickú chybu. Vizualizované boli pomocou techniky popísanej v predchádzajúcej podkapitole. Porovnávané boli odpovedajúce si detekované body medzi sebou a párované boli technikou popísanou v kapitole 6.5.2 s deskriptormi okolia bodov. Veľkosť skreslenia je v tomto prípade vyjadrená v pixeloch, kde jeden pixel vo fluorescencii odpovedá približne 27.7nm. Teda maximálna nameraná chyba medzi F385 a F470 v jednej dátovej sade je okolo 680nm. Škrvny (nerovnomernosti) v interpolovanom poli – hlavne na obrázku 7.4b sú spôsobené práve miernymi odchýlkami a nepresnosťami v detekcii na fluorescenčných snímkach zapríčinenými napríklad šumom alebo svetelnými artefaktmi spôsobenými odrazivosťou podložky alebo iným znečistením.



Obr. 7.4: Ukážka porovnania vlnových dĺžok medzi sebou reprezentujúca chromatickú chybu. (a) Porovnané vlnové dĺžky F385 s F470. (b) Porovnané vlnové dĺžky F565 s F625. Mierka je v pixeloch.

Ako bolo v predchádzajúcich kapitolách zhrnuté, ku deformáciám alebo chybám pozorovaného fluorescenčného mikroskopu môžeme pristupovať súčasne – teda korigovať chromatickú aj geometrickú chybu súčasne. V ďalších častiach v tejto práci sa teda bude pristupovať ku korekcii a modelovaniu skreslenia v spojení laterálnej chromatickej chyby s geometrickou chybou, ktorými daná sústava disponuje.

7.4 Navrhnuté metódy na reprezentáciu a korekciu skreslenia

7.4.1 Metóda 1: Kalibrácia kamery z knižnice OpenCV

Prvou testovanou technikou je štandardná kalibrácia kamery na základe známej roviny (plane-based calibration[15]) z knižnice OpenCV. Kalibrácia v tomto prípade pozostáva z určenia modelu kamery, vonkajších parametrov a odhadu koeficientov modelu skreslenia (kapitola 4.1). V knižnici OpenCV sú parametre modelu skreslenia reprezentované ako množina koeficientov:

$$\text{distCoeffs} = (k_1, k_2, p_1, p_2[, k_3[, k_4, k_5, k_6[, s_1, s_2, s_3, s_4[, \tau_x, \tau_y]]]])$$

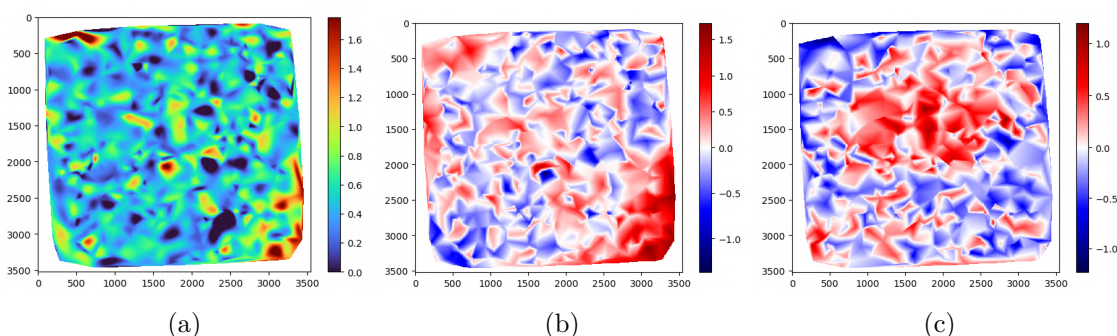
vyjadrujúca koeficienty radiálneho ($k_1, k_2, \dots k_6$), decentralizačného (p_1, p_2), koeficienty skreslenia tenkého hranola (s_1 až s_4) a koeficienty perspektívneho skreslenia (τ_x a τ_y), vyskytujúceho sa v špeciálnych optických sústavách (popísané viac napríklad v [12]).

Vstupom do funkcie `cv2.calibrateCamera()` sú dvojice súradníc bodov vzoru a odpovedajúceho (projektovaného) bodu z nasnímaného obrazu – tzv. *object/image points*. OpenCV ďalej umožňuje nastavenie predpokladaného modelu skreslenia, pre ktorý budú počítané koeficienty. Výstupom kalibrácie je matica kamery, odhadnuté koeficienty skreslenia a vonkajšie parametre vyjadrujúce pozíciu a natočenie kamery voči rovine (objektu), z ktorej bol získaný kalibračný vzor. Pre získanie vstupných parametrov do tejto funkcie boli použité algoritmy z kapitoly 6, teda body kalibračného vzoru sú body, detekované v elektrónoch, ktorým bol úspešne priradený jeden bod vo fluorescenčnom obraze. Odpovedajúce body reprezentujú potom projektované body. Testy kalibrácie boli vykonané s viacerými dátovými sadami. Z pozorovania a z prvých testov kalibrácie vyplynulo, že väčšinu pozorovaného skreslenia dokážeme korigovať pomocou lineárnej transformácie. V tomto prípade projekcie bodov vzoru pomocou externých parametrov a matice kamery (viď kapitolu 7.5). Pridanie radiálneho a decentralizačného modelu malo len mierne priaznivý účinok na výsledky.

7.4.2 Metóda 2 a 3: Afinná a perspektívna transformácia

Už pri prvých pozorovaniach a testoch s kalibráciou sme prišli s hypotézou, že väčšina skreslenia na pozorovanom mikroskope a chromatická aberácia je korigovateľná a reprezentovateľná pomocou jednoduchšej geometrickej transformácie. V metóde 2 je na korekciu skreslenia z korešpondujúcich bodov počítaná afinná a v metóde 3 perspektívna transformácia, ktoré reprezentujú priame mapovanie medzi skresleným (fluorescenčným) a skutočným obrazom (elektrónovým).

Na výpočet boli použité funkcie z knižnice OpenCV, `cv2.estimateAffine2D()`, ktorá počíta afinnú transformáciu a `cv2.findHomography()`, ktorá počíta perspektívnu transformáciu H a pri výpočte obe využívajú minimalizáciu chyby spätnej projekcie. Pomocou algoritmov ako RANSAC, LMeDS alebo RHO dokážu optimalizovať riešenie a zanedbať odlahlé body, ktoré majú nepriaznivý vplyv na výpočet transformácie. Výsledky korekcie skreslenia pomocou čistej perspektívnej transformácie sa ukazujú ako prekvapivo dostatočne efektívne (obrázok 7.5, viac v kapitole 7.5).



Obr. 7.5: Ukážka zvyškového skreslenia po aplikovaní perspektívnej transformácie z metódy 3 na snímku z vlnovej dĺžky f385. (a) Celková absolútna veľkosť (magnitúda) zvyškového skreslenia. Maximálna hodnota magnitúdy odpovedá približne 45nm. (b) Distribúcia skreslenia v smere x snímky. Kladné hodnoty značia smer zľava doprava, záporné sprava doľava. (c) Distribúcia skreslenia v ose y snímky. Kladné hodnoty značia smer zhora dole, záporné zdola nahor.

Afinné a perspektívne transformácie sú počítané aj v aplikáciach na automatizáciu pri korelácii medzi reflexným a elektrónovým obrazom (viď kapitolu 2.2). V týchto aplikáciách sú aktuálne počítané len medzi reflexiou. V tejto práci sa však ukazuje, že jednoduché geometrické transformácie počítané priamo medzi fluorescenciou a EO dokážu potlačiť väčšinu deformácie, s ktorou sa v skúmanom mikroskope stretávame.

7.4.3 Metoda 4: Vlastný model zvyškového skreslenia

Po podrobnejšej analýze zvyškového skreslenia z metódy 3 som navrhol vlastnú neštandardnú metódu, vychádzajúcu z [18, 10], ktorá aproximuje model tohoto skreslenia pomocou funkcie všeobecného dvojrozmerného polynomiálneho rozvoja:

$$f(x, y) = c_0 + c_1x + c_2y + c_3x^2 + c_4xy + c_5y^2 + \dots + c_mx^ny^n \quad (7.2)$$

kde n je maximálny stupeň polynómu a c_i sú konštanty – koeficienty, ktoré sú neznáme a úlohou kalibrácie je ich určiť aby sa funkcia prispôsobila čo najlepšie nameraným dátam (skresleniu). Pri tvorbe tohoto modelu je skreslenie reprezentované dvomi polynómami osobitne pre skreslenie v ose x a v ose y ako:

$$\begin{aligned} d_x(x, y) &= c_{0_x} + c_{1_x}x + c_{2_x}y + c_{3_x}x^2 + c_{4_x}xy + c_{5_x}y^2 + \dots + c_{m_x}x^ny^n \\ d_y(x, y) &= c_{0_y} + c_{1_y}x + c_{2_y}y + c_{3_y}x^2 + c_{4_y}xy + c_{5_y}y^2 + \dots + c_{m_y}x^ny^n \end{aligned} \quad (7.3)$$

Alebo maticovým zápisom:

$$\begin{pmatrix} d_x \\ d_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{0_x} & c_{1_x} & c_{2_x} & \dots & c_{m_x} \\ c_{0_y} & c_{1_y} & c_{2_y} & \dots & c_{m_y} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x^0y^0 \\ x^1y^0 \\ x^0y^1 \\ \dots \\ x^ny^n \end{pmatrix} \quad (7.4)$$

Odhad koeficientov prebieha pomocou metódy najmenších štvorcov⁵. Metóda hľadá optimálne riešenie minimalizovaním súčtu štvorcov rozdielov medzi skutočnými hodnotami a hodnotami získanými z predikovaného modelu (funkcie)⁶. Matematicky môžeme minimalizovanú hodnotu pre dvojrozmerné dáta vyjadriť výrazom:

$$S = \sum (z_{ij} - f(x_i, y_j))^2 \quad (7.5)$$

kde v prípade nášho modelu z_i je namerané skreslenie pre bod (x_i, y_j) , f je model skreslenia, ktorého parametre počítame.

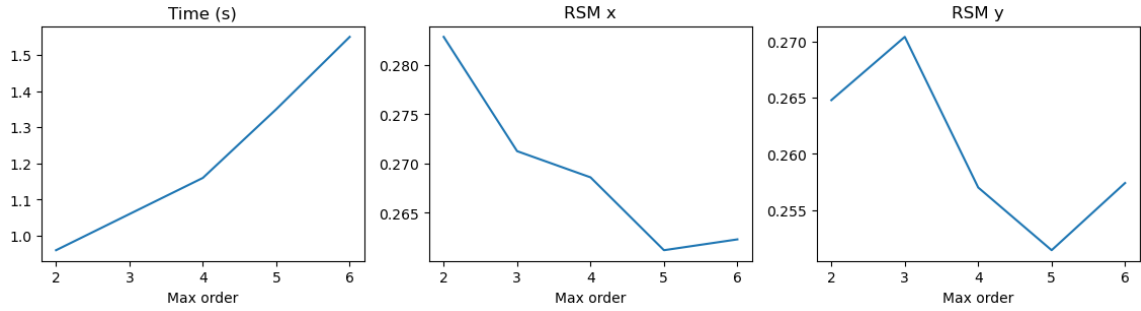
V implementácii sú v prvom kroku predvypočítané hodnoty jednotlivých členov polynómu pre všetky známe pozície (x, y) s koeficientami rovnými 0, ktoré tvoria spolu s nameraným skreslením vstupnými parametrami funkcie `numpy.linalg.lstsq()`. Táto funkcia potom rieši rovnicu:

$$Ax = b \quad (7.6)$$

kde A je matica tvaru (m, n) , pričom m je počet členov polynomiálneho rozvoja a n je počet nameraných hodnôt, vstupujúcich do výpočtu, b je riešenie rovnice, v tomto prípade namerané skreslenie a x sú počítané koeficienty, ktoré sú výstupným parametrom funkcie. Na obrázku 7.6 sú porovnané časy a odchýlka riešenia rovníc s rôznymi maximálnymi stupňami.

⁵<https://numpy.org/doc/stable/reference/generated/numpy.linalg.lstsq.html>

⁶Kód na výpočet koeficientov modelu bol inšpirovaný <https://scipython.com/blog/linear-least-squares-fitting-of-a-two-dimensional-data/>



Obr. 7.6: Porovnanie riešenia modelu s rôznym maximálnym stupňom polynómu. RSM_x a RSM_y je odchýlka vypočítaného riešenia od skutočných dát pre skreslenie v ose x a y.

Po porovnaní zvyškového skreslenia po homografii medzi vlnovými dĺžkami a zároveň aj medzi jednotlivými obrázkovými sadami (viď obrázok B.2) sa ďalej ukázalo, že tvar a veľkosti tohoto skreslenia zostávajú podobné. V meraniach v nasledujúcej podkapitole je s ohľadom na tieto pozorovania počítaný jeden model pre všetky vlnové dĺžky, ktorý by mal lepšie odhadnúť zvyškovú geometrickú chybu.

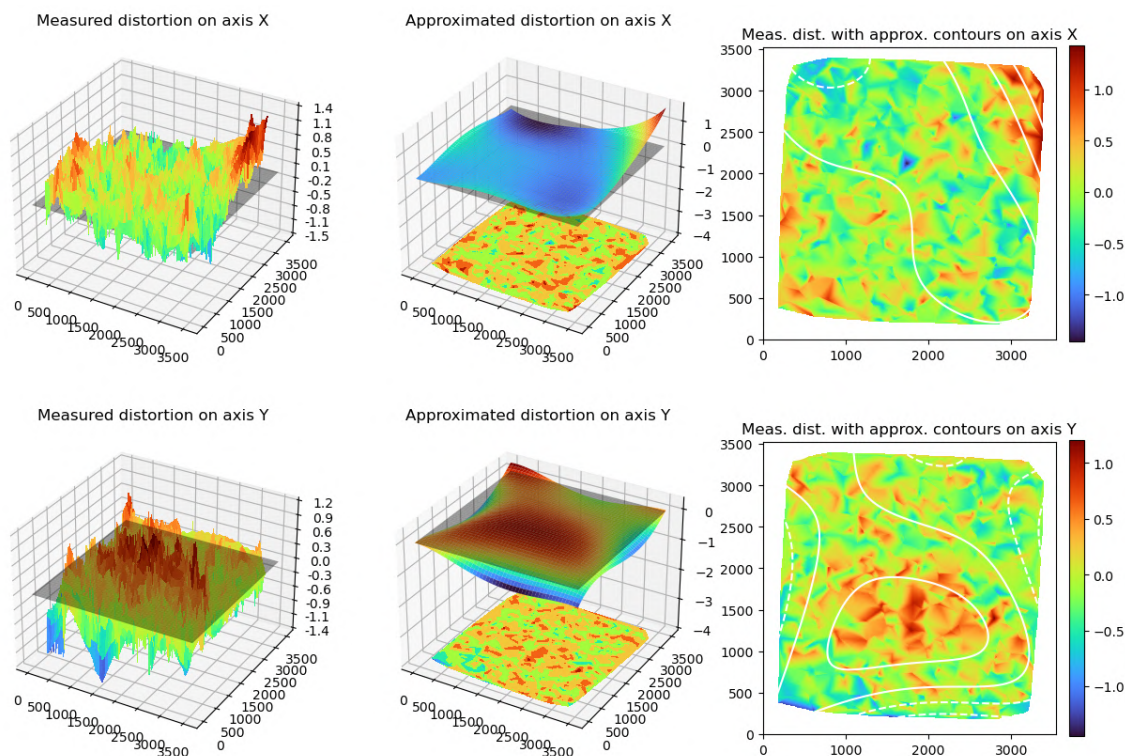
7.5 Porovnanie metód a výsledky

V tejto kapitole sú predstavené a interpretované výsledky rôznych metód na snímky z prototypov mikroskopov Arctis(kap. 2.3.1). Vykonané boli viaceré experimenty s rôznymi metódami a v tabuľke 7.1 sú namerané hodnoty chyby reprojekcie. Metóda M1 ext reprezentuje aplikovanie len vonkajších parametrov (posun a rotácia) získaných kalibráciou z OpenCV. Metóda M1 využíva celú kalibráciu z OpenCV teda aj s aplikovaním radiálneho a tangenciálneho modelu skreslenia. Knižnica umožňuje použiť aj zložitejšie modely, ale tie neprinesli takmer žiadny prínos a metóda M1+M3 dosahuje horších výsledkov ako pri jednoduchšom modeli. M2 je chyba reprojekcie po aplikovaní afinnej transformácie a metóda M3 po aplikovaní perspektívnej transformácie homografie. V metóde M3+M4 je kombinovaná homografia a zvyškový polynomiálny model. V poslednom stĺpci je odstránené skreslenie modelované metódou 1 a na takto transformovaný obraz je aplikovaná homografia z M3.

	M1 ext	M1	M2	M3	M3+M4	M1+M3
F385	1.30	1.06	1.02	0.81	0.47	0.74
F470	1.19	1.11	0.96	0.86	0.51	0.85
F565	1.38	1.14	0.95	0.89	0.47	0.87
F625	1.50	1.31	1.05	1.00	0.53	0.88

Tabuľka 7.1: Chyba reprojekcie vyššie popísaných metód pre jednotlivé vlnové dĺžky.

Z tabuľky aj z pozorovaní sa ukazuje, že jednoduché geometrické transformácie sú v prípade dobrej detekcie postačujúce na potlačenie väčšinového skreslenia(viď 7.8 a 7.9). Zvyšková chyba všetkých štyroch metód je v porovnaní s pôvodnou, zdokumentovanou dodávateľom (viď 3.6), malá až zanedbateľná. Metóda s modelom zvyškového skreslenia sa ďalej ukazuje ako najpresnejšia, avšak môže byť nestabilná napríklad keď stupeň polynómu



Obr. 7.7: Vizualizácia zvyškového skreslenia a odhadnutého modelu skreslenia pomocou dvojrozmerného polynómu s maximálnym rádom 4. Horný rad predstavuje skreslenie v ose x a spodný v y . Graf vľavo je trojrozmerná reprezentácia nameraného zvyškového skreslenia. V strede je zobrazený odhadnutý model skreslenia. Vpravo je dvojrozmerná farebná mapa skreslenia v oboch smeroch s vizualizovaným modelom.

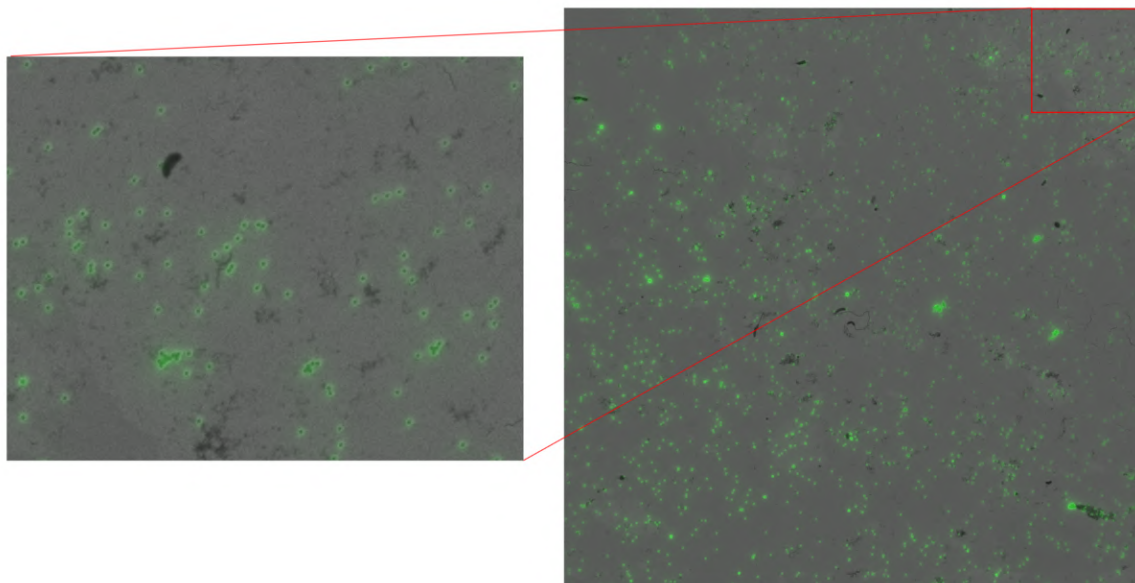
neodpovedá skutočnému tvaru alebo pri nepresnej detekcii a mnohých odľahlých hodnotách keď sa model prispôsobí týmto hodnotám a ovplyvní aj pixely v okolí extrémov.

Namerané zvyškové skreslenie zjavne trpí zašumením spôsobeným nedokonalosťami detekcie. Kvôli tomu boli priebežne upravované algoritmy na detekciu aj v elektrónoch aj vo fluorescencii čo prinieslo istý progres. Ďalší vývoj už v priebehu písania tejto práce nepriniesol zlepšenie. Za účelom zvýšenia presnosti detekcie ďalej navrhujem klásť dôraz pri ostrení a získavaní snímok. Nepresnosti v meraní sú odhadované do 0.5 pixelu podľa pozorovania skutočnej polohy – určenej manuálne v nástroji ImageJ⁷ – a detekovanej pozície.

7.6 Okolnosti ovplyvňujúce prácu na prototyp

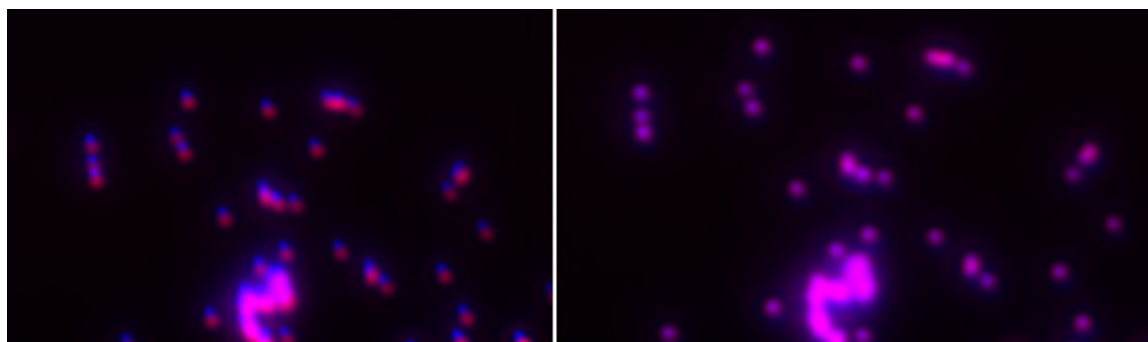
Mikroskopy, na ktorých boli vykonávané merania a zbery obrázkov boli prototypy reálnych systémov, čo so sebou prináša mnohé úskalia. Na tieto mikroskopy má prístup mnoho ľudí a často sa stávalo, že prototyp nebol v stave na zber kalibračných obrázkov. Na prototypoch sú často testované nové algoritmy, prebiehajú tu pravidelné testy existujúcich riešení a stavu hardvéru, taktiež sa na prototypoch školia noví technici. Tieto manipulácie často ovplyvňujú funkčnosť zložitých mikroskopických sústav.

⁷Open-source program na úpravu a analýzu snímok z mikroskopov <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, umožňuje targeting s presnosťou na tri desatinné miesta pixelu.



Obr. 7.8: Snímky z elektrónového a fluorescenčného mikroskopu (f385) preložené perspektívnou transformáciou. Na obrázku je vidieť, že vo všetkých oblastiach fluorescenčná snímka odpovedá beadsom v elektrónovom obraze.

Najčastejšie problémy boli spôsobené nevycentrovaným optickým mikroskopom (viď kap. 3.2), čo značne sťažovalo zber ako aj analýzu skreslenia. Takto rozladenú sústavu bolo treba manuálne skúseným technikom skalibrovať, aby sa dalo správne pracovať s optickým mikroskopom. Ďalšou výzvou bolo nastavenie tzv. eucentriky elektrónového a iónového tubusu, aby lúče smerovali do toho istého miesta. Kalibračná vzorka (aj kremíková aj pozlátené sklíčko) majú odlišnú hrúbku ako štandardné vzorky, pre ktoré je táto hodnota prednastavená. Eucentrika je dôležitá pri tvorbe vzoru – kalibračných značiek (kap. 6.1 a 6.5.1), kedy pri nesprávne nastavenej hodnote bude vyznačený vzor na nesprávnom mieste. Okrem ťažkostí s optickým mikroskopom a pohyblivým stolčekom bolo pomerne náročné pri pozorovaných veľkostiach v elektrónoch ($230\mu m$) zaostriť elektrónový zväzok na beads ($250nm$). Pri ostrení v elektrónovom obraze narozdiel od bežnej kamery sú ladené viaceré parametre, okrem samotnej ostrosti je potrebné zarovnať aj astigmatizmus a pohyb zväzku.



Obr. 7.9: Ukážka chromatickej chyby na pozlátenej vzorke pred (vľavo) a po aplikovaní metódy s homografiou (vpravo).

Tieto parametre je možné v niektorých situáciách získať pomocou automatizačných funkcií, avšak konkrétne na kalibračnú vzorku, ktorá ideálne neobsahuje žiadne hrany alebo iné väčšie objekty sú tieto metódy pri pozorovacích veľkostiach málo efektívne a je potrebné ručné doladovanie.

Práca na reálnych mikroskopoch je oproti prototypom deterministickejšia a s väčšinou problémov sa pri nich nestretávame, stav mikroskopu musí spĺňať normy. Do konštrukcie mikroskopu sa pri bežnom používaní nezasahuje, len výnimočne pri údržbe a softvér na manipuláciu s mikroskopom je stabilný.

7.7 Použitie navrhnutých metód v praxi a ďalší vývoj

Na základe výsledkov popísaných v tejto a predchádzajúcej kapitole som navrhol viaceré možné použitia popísaných techník a algoritmov v aplikáciách na prácu s mikroskopmi a automatizáciu ich procesov. Metódy perspektívnej a afinnej transformácie sa ukázali ako dostatočne presné (chyba reprojekcie okolo 1px, čo odpovedá v skúmaných snímkach približne 37nm) a zároveň výpočetne nenáročné (čas výpočtu homografie okolo 1ms pre pozorované snímky). Snímky aktuálne používané v existujúcich aplikáciách majú dokonca väčšinou menšie rozlíšenie ako snímky použité na merania v rámci tejto diplomovej práce.

Ako prvý príklad použitia v praxi je možné predvypočítavať transformácie z M2 alebo M3 (prípadne polynomiálny model) pre fluorescenčný mikroskop vopred v rámci tzv. štandardných alignment mikroskopu – procedúry na úpravy parametrov mikroskopu v aplikáciách na manipuláciu s ním. Po jeho získaní môže byť model uložený a použitý v automatizačných aplikáciách priamo na získané snímky a tým by bolo možné zlepšiť, alebo/a uľahčiť lokalizáciu významných fluorescenčných vlastností. Z testov vykonaných počas písania tejto práce (aj kvôli prácam na prototypu) nebolo jasné ako na chybu optiky bude vplývať okolie mikroskopu a teda, či sa po čase a manipulácii optický mikroskop „nerozladí“. V prípade, ak sa v ďalšom vývoji zistí, že áno, bude navrhnutý odporúčaný protokol na periodicitu obnovy modelu.

Okrem toho by sa navrhnutá technika výpočtu optimálnej perspektívnej alebo afinnej transformácie (M2, M3) mohla použiť na automatickú koreláciu a korekciu fluorescenčných obrázkov. Niektoré typy biologických vzoriek⁸ (viď napr. 2.4) je možné posypať fluorescenčnými beads. V takto označených vzorkách by prebehol výpočet transformácie obdobne ako v navrhnutom algoritme a získaná transformácia homografie by umožnila automaticky korelovať snímky z elektrónového a fluorescenčného obrazu s vysokou presnosťou. V inej podobe by sme teoreticky mohli v budúcnosti využiť techniky detekcie a párovania bodov pre kalibráciu na rekonštrukciu trojrozmerných objektov, napríklad buniek.

Posledným navrhnutým prípadom použitia v tejto časti môže byť pomoc pri manuálnom nastavovaní častí objektívu systémovým technikom. Systémový technik pri tejto procedúre jemne centruje šošovky objektívu. Techniky predstavené v tejto práci na vizualizáciu skreslenia a chromatickej chyby môžu byť v tomto prípade užitočné.

Metódy navrhnuté v tejto diplomovej práci si vyžadujú aj ďalšie skúmanie na ďalších mikroskopoch. V nadväznosti na detekciu beads hlavne v elektrónovom obraze v reálnych vzorkách je možné aplikovať metódy strojového učenia a klasifikácie, na účely kalibrácie sú však postačujúce tradičné detekčné algoritmy predstavené v predchádzajúcich kapitolách.

⁸Nie všetky vzorky umožňujú aplikáciu beads na ich povrch.

Kapitola 8

Záver

Cieľom tejto výskumnej práce bola hlavne analýza a korekcia skreslení, pozorovaných vo fluorescenčnom optickom mikroskope v systémoch na korelačnú mikroskopiu od firmy Thermo Fisher Scientific, primárne určených pre spracovanie biologických vzoriek. V práci boli predstavené skúmané mikroskopické systémy, nedokonalosti ich optických modulov a výzvy, ktoré je treba prekonávať za účelom čo najpresnejšieho obrazu a spoľahlivej práce s mikroskopom. Ďalej boli ukázané techniky modelovania a korekcie skreslenia obrazu kamier.

Po analýze dostupných materiálov a možností som navrhol jednoduchú a pomerne lacnú kalibračnú vzorku, ktorá slúži ako kalibračný objekt pri modelovaní skreslenia. V práci boli navrhnuté algoritmy na detekciu a párovanie fluorescenčných bodov (tzv. beads) s korešpondujúcimi bodmi v elektrónovom obraze, ktoré sa ukázali ako dostatočne spoľahlivé. Ďalej boli navrhnuté techniky detekcie niektorých ďalších objektov vo vzorke, ktoré boli použité v ďalších krokoch algoritmu.

Počas snahy vizualizovať a zmerať celkové skreslenie sa ukázalo, že navrhnutá metóda, ktorá počíta transformáciu homografie medzi fluorescenčným a elektrónovým obrazom už koriguje väčšinu deformácií s ktorými sa stretávame a teda touto metódou nedokážeme zmerať celkové skreslenie, ktorým daný mikroskop disponuje, ale dokážeme ho ňou priamo korigovať. Na základe ďalších pozorovaní bola navrhnutá metóda modelujúca zvyškové skreslenie po prvej transformácii. Táto metóda je výpočetne náročná a v niektorých prípadoch môže byť nestabilná, kedy sa model prispôsobí nedokonalostiam detekcie alebo anomáliám v obraze. Výsledkom získaných modelov a transformácií je obraz, ktorý sa v elektrónoch a fluorescencii prekrýva na všetkých miestach v snímke. Slabou stránkou korekcie obrazu popísanej v tejto diplomovej práci je, že v prípade zdeformovaného elektrónového obrazu sa mu počítaný model prispôsobí a teda korekcia bude nesprávna a výsledkom je inak zdeformovaná snímka.

Zatiaľ sa navrhnuté metódy javia postačujúce a v závere práce boli predstavené praktické ich využitia na vizualizáciu a korekciu skreslenia a ďalších úloh počítačového videnia a ďalšie možné smerovanie práce. Programové riešenie bolo navrhnuté ako knižnica funkcií v jazyku Python, ktorý sa na prototypovanie používa aj vo firme Thermo Fisher Scientific a pri výbere knižníc bol z veľkej časti braný ohľad na možnú budúcu konverziu niektorých funkcií do jazyka C#/C++. Algoritmy na korekciu skreslenia ďalej vyžadujú v blízkej budúcnosti testovanie a analýzu na kompletných a stabilných mikroskopických systémoch. V prípade, ak by sa ukázalo, že tieto mikroskopy disponujú inou chybou ako bola pozorovaná na prototypoch navrhnuté zložitejšie metódy na modelovanie skreslenia môžu byť užitočné.

Literatúra

- [1] BRUNELLI, R. *Template Matching Techniques in Computer Vision: Theory and Practice*. 1. vyd. Wiley Publishing, 2009. ISBN 978-0-470-51706-2.
- [2] DAVIES, E. R. *Computer and Machine Vision: Theory, Algorithms, Practicalities*. 4. vyd. Elsevier, 2012. 912 s. ISBN 978-0-12-386908-1.
- [3] ERICKSON, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological procedures online*. 2009, zv. 11, s. 32–51. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.
- [4] FISCHLER, M. A. a BOLLES, R. C. Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM*. 1981, zv. 24, s. 381–395.
- [5] GONZALEZ, R. C. a WOODS, R. E. *Digital Image Processing (4th Edition)*. 4. vyd. Pearson Education Limited, 2018. ISBN 9781292223049.
- [6] HARING, M., LIV, N., ZONNEVYLLE, A., NARVÁEZ, A., VOORTMAN, L. et al. Automated sub-5 nm image registration in integrated correlative fluorescence and electron microscopy using cathodoluminescence pointers. *Scientific Reports*. Marec 2017, zv. 7, s. 43621. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep43621>.
- [7] HARTLEY, R. I. a ZISSERMAN, A. *Multiple View Geometry in Computer Vision*. Second. Cambridge University Press, 2004. ISBN 9780511811685.
- [8] KARAMI, E., PRASAD, S. a SHEHATA, M. Image Matching Using SIFT, SURF, BRIEF and ORB: Performance Comparison for Distorted Images. November 2015.
- [9] KUBA, e. a. Advanced cryo-tomography workflow developments – correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out. *Journal of Microscopy*. 2021, zv. 281, č. 2, s. 112–124. DOI: <https://doi.org/10.1111/jmi.12939>.
- [10] LI, J., SU, J. a ZENG, X. A solution method for image distortion correction model based on bilinear interpolation. *Computer Optics*. Február 2019, zv. 43, s. 99–104. DOI: <https://doi.org/10.18287/2412-6179-2019-43-1-99-104>.
- [11] LIU, X., LI, Z., ZHONG, K., CHAO, Y., MIRALDO, P. et al. Generic distortion model for metrology under optical microscopes. *Optics and Lasers in Engineering*. 2018, zv. 103, s. 119–126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2017.12.006>. ISSN 0143-8166.

- [12] LOUHICHI, H., FOURNEL, T., LAVEST, J. M. a AISSIA, H. B. Self-calibration of Scheimpflug cameras: an easy protocol. *Measurement Science and Technology*. IOP Publishing Ltd. 2007, zv. 18, č. 8, s. 2616. DOI: <https://doi.org/10.1088/0957-0233/18/8/037>.
- [13] OKADA, T. a OGURA, T. High-resolution imaging of living mammalian cells bound by nanobeads-connected antibodies in a medium using scanning electron-assisted dielectric microscopy. *Scientific Reports*. 2017, zv. 7. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep43025>.
- [14] PENCZEK, P. A. Resolution measures in molecular electron microscopy. *Methods in enzymology*. 2010, zv. 482, s. 73–100. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)82003-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82003-8).
- [15] QI, W., LI, F. a ZHENZHONG, L. Review on Camera Calibration. Jún 2010, s. 3354 – 3358. DOI: <https://doi.org/10.1109/CCDC.2010.5498574>.
- [16] RICOLFE VIALA, C. a SÁNCHEZ SALMERÓN, A.-J. Lens Distortion Models Evaluation. *Applied optics*. Október 2010, zv. 49, s. 5914–28. DOI: <https://doi.org/10.1364/AO.49.005914>.
- [17] RIJNSOEVER, C. van, OORSCHOT, V. a KLUMPERMAN, J. Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat Methods*. 2008, zv. 5, s. 973–980. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1263>.
- [18] RONDA, J. a VALDÉS, A. Geometrical Analysis of Polynomial Lens Distortion Models. *Journal of Mathematical Imaging and Vision*. Marec 2019, zv. 61, s. 16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10851-018-0833-x>.
- [19] WANG, J., SHI, F., ZHANG, J. a LIU, Y. A new calibration model of camera lens distortion. *Pattern Recognition*. 2008, zv. 41, č. 2, s. 607–615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2007.06.012>.
- [20] WATANABE, T. A fuzzy RANSAC algorithm based on reinforcement learning concept. *2013 IEEE International Conference on Fuzzy Systems (FUZZ-IEEE)*. 2013, s. 1–6. DOI: <https://doi.org/10.1109/FUZZ-IEEE.2013.6622582>.
- [21] WENG, J., COHEN, P. a HERNIOU, M. Camera calibration with distortion models and accuracy evaluation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 1992, zv. 14, č. 10, s. 965–980. DOI: <https://doi.org/10.1109/34.159901>.

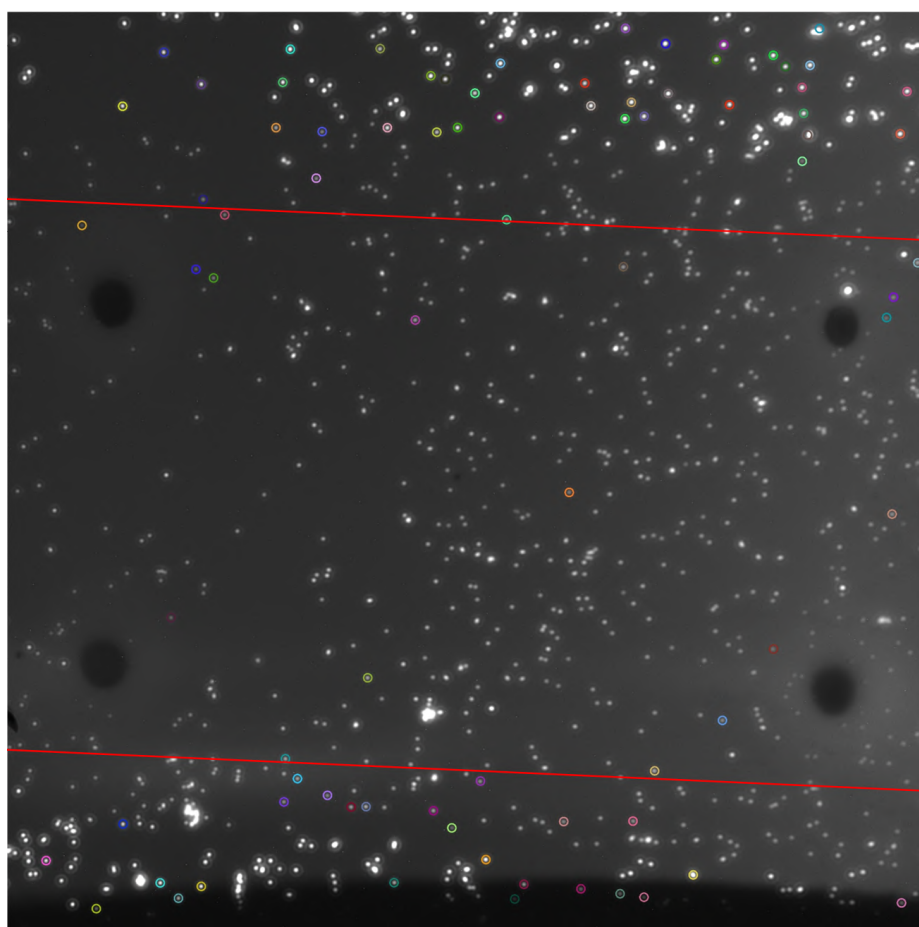
Príloha A

Obsah priloženého pamäťového média

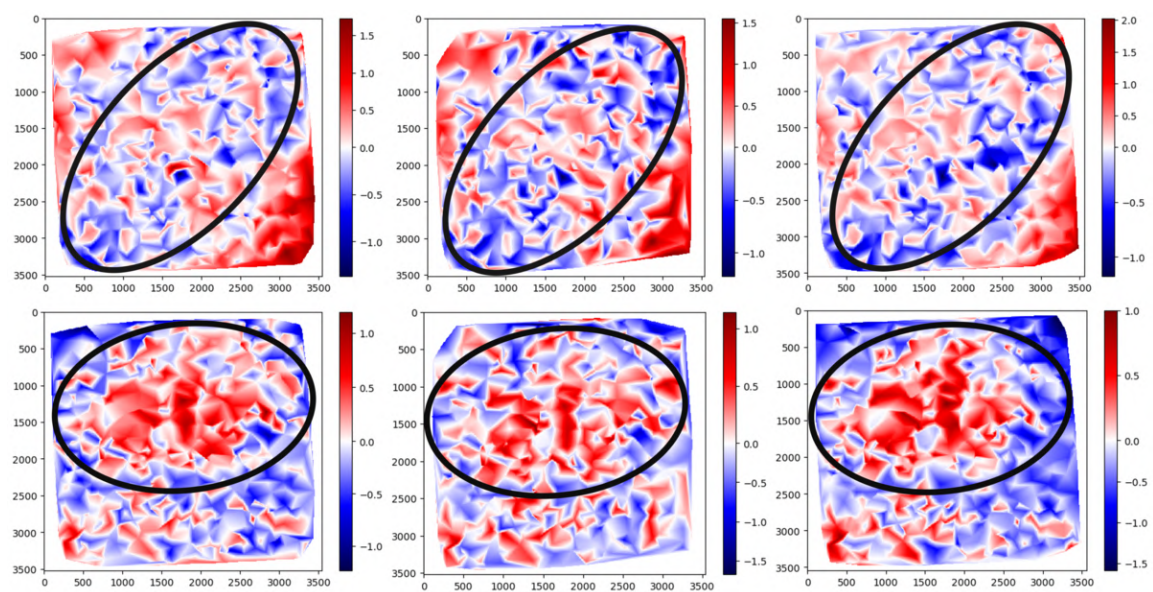
- Elektronická verzia písomnej práce vo formáte PDF
- Zdrojové súbory písomnej práce vytvorenej v $\text{\LaTeX}$
- Readme.txt obsahujúci postup pre nastavenie prostredia pre navrhnutú knižnicu a popísané jednotlivé zdrojové súbory
- Navrhnutá knižnica v jazyku Python
- Zdokumentované Jupyter notebook súbory demonštrujúce funkcionality knižnice
- Obrázkové ukážky z vývoja algoritmov a príklad obrázkových dátových sád

Príloha B

Obrázky



Obr. B.1: Ukážka chyby hľadania párov spôsobenej rozdielnou pozorovanou oblasťou pri vzorke z pozláteným sklíčkom, pre vlnovú dĺžku 470nm.



Obr. B.2: Ukážka porovnaného zvyškového skreslenia z jedného zberu obrázkov. Horný rad je zvyškové skreslenie v osi x, spodný v osi y. Stĺpec vľavo je pre vlnovú dĺžku 385nm, uprostred pre 565nm a vpravo pre 385nm zo sady 2 (mierny náklon vzorky oproti prvej sade).