VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

SIMULACE ZOBRAZENÍ HOLOGRAFICKÝM MIKROSKOPEM SE ZAHRNUTÍM OPTICKÝCH VAD OBRAZU

SIMULATION OF IMAGING IN REFLECTER-LIGHT HOLOGRAPHIC MICROSCOPE WITH OPTICAL ABERRATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR´S THESIS

AUTOR PRÁCE ADAM EFFENBERGER
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. MATĚJ TÝČ
SUPERVISOR

BRNO 2013

Abstrakt

Cílem této práce je simulace pozorování živé buňky pohybující se po zašuměném pozadí. Zkušeností, získaných při tvorbě této simulace, bylo využito pro korekci uměle vytvořených dat a následně dat z reálného měření.

K tomu bylo využito integrovaného vývojového prostředí Spyder, který je otevřeným softwarem, určeným pro vědecké programování v Pythonu.

Simulaci se vytvořit podařilo, úspěšně proběhla i korekce uměle vytvořených dat. Korekce reálných dat je účinná jen částečně, dává tak prostor k dalšímu vylepšení.

Klíčová slova

digitální holografická mikroskopie, simulace zobrazení, korekce obrazu

Abstract

The aim of this work is the simulation of a moving cell on a noisy backgroud. Experience gained during this work was used for correction of artificially created data. Subsequently it was used for the correction of real experiment a data.

Spyder, open source cross-platform IDE for scientific programming in the Python language, was used for it.

The simulation was successful, as well as the correction of artificially created data. The correction of real experiment data was only partly suscessfull . It gives us enough room for further improvement.

Key words

digital holographic microscope, simulation of imaging, image correction

Bibliografická citace této práce

EFFENBERGER, A. *Simulace zobrazení holografickým mikroskopem se zahrnutím optických vad obrazu.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Matěj Týč.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval v celém rozsahu samostatně pod odborným vedením Ing. Matěje Týče a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, uvádím v seznamu literatury.

V Brně 24. 5. 2013

.....…….

Adam Effenberger

Poděkování

Děkuji Ing. Matěji Týčovi za profesionální a velmi zodpovědné vedení a cenné připomínky. Dále děkuji za ochotu a pomoc Ing. Anetě Křížové. V neposlední řadě děkuji rodině za velkou podporu během studia.

Obsah

Úvod **10**

1.1 Cíl a motivace práce 10

Transmisní digitální holografický mikroskop **12**

2.1 Interferometrický mikroskop 12

2.2 Holografický mikroskop 13

2.3 Transmisní holografický mikroskop na VUT v Brně 13

Simulace šumu **17**

3.1 Tvorba bázových šumů 17

3.2 Výsledný šum 18

3.3 Měnící se šum 20

Simulace buňky **21**

4.1 Funkce pro vykreslení buňky 21

4.2 Prahování a normování buňky 21

4.3 Buňka v pohybu 22

4.4 Maska buňky 23

4.5 Zjišťování hmotnosti buňky 23

4.6 Buňka na zašuměném pozadí 24

Potlačení šumu **27**

5.1 Základní princip 27

5.2 Příprava dat pro korekci 28

5.3 Nahrání a uspořádání dat pro korekci 28

5.4 Tvorba matic hraničních šumů a jejich masek 28

5.5 Výpočet opraveného bodu (opravené oblasti) 29

5.6 Oprava kompletní sady testovacích dat 30

Reálná data.....33
6.1 Původ dat.....33
6.2 Příprava dat.....34
6.3 Data před korekcí.....34
6.4 Korekce dat.....35

Závěr.....39

Bibliografie.....41

Kapitola 1

Úvod

1.1 Cíl a motivace práce

Práce *„Simulace zobrazení holografickým mikroskopem s vadami obrazu“* se zabývá simulací pozorování živé buňky zkoumané transmisním, koherencí řízeným, holografickým mikroskopem vyvinutým zde na Ústavu fyzikálního inženýrství FSI.

Pozorování nádorových buněk LW13K2, fibroblastů inbredního kmene potkana Louis Lewis [2], dále označovaných jako buňky K2 a následné zjišťování jejich hmotností je zatížené chybami. Ty jsou z velké části způsobeny optickými vadami, způsobenými nerovnoměrnostmi na optické cestě (například škrábanci na optických členech, prachem na sklíčku kamery,...), které je obtížné kompenzovat. V pořizovaných snímcích vytváří nežádoucí šum. Podaří-li se jeho vliv potlačit, zpřesní se také měření.

Předběžným krokem k realizaci kompenzace je simulace zobrazení a snaha o kompenzaci dat z této simulace. Podaří-li se korekci úspěšně provést na těchto datech, nemělo by být příliš obtížné vytvořené algoritmy překonfigurovat na reálná data.

Cílem této práce je tedy vytvořit simulaci pohybující se buňky na zašuměném pozadí, které se pozvolna mění a naprogramovat algoritmus pro její *„vážení“*. Dále na vytvořená data navrhnout a aplikovat korekční algoritmus, který chyby tohoto vážení minimalizuje. V případě úspěchu se poté pokusit o přizpůsobení algoritmů pro data ze skutečného měření.

Kapitola 2

Transmisní digitální holografický mikroskop

2.1 Interferometrický mikroskop

Interferometrický mikroskop využívá dvou světelných svazků, které se nechávají interferovat pod co nejmenším, téměř nulovým, úhlem. Pro úplnou rekonstrukci předmětové vlny jsou třeba alespoň 3 snímky s lišícím se fázovým posuvem. Počítačové algoritmy pak ze snímků mohou zrekonstruovat trojrozměrný obraz pozorovaného předmětu. Pro potřebu více snímků jsou interferometrické mikroskopy vhodné zejména pro pozorování statických struktur, případně pro zkoumání pomalých dějů [1].

2.2 Holografický mikroskop

Holografický mikroskop využívá dvou světelných svazků - referenčního a předmětového, které se střetávají pod nenulovým úhlem. Výsledný interferenční obrazec vzniká jejich superpozicí. Protože jej lze celý získat z jediného snímku (tedy ne skládáním několika snímků, jako tomu je u interferometrického mikroskopu) je vhodný také pro pozorování rychlých dějů. Holografický mikroskop může být reflexní i transmisní. Reflexní nalézá uplatnění při zkoumání povrchů, transmisní při studiu vnitřních struktur tenkých průsvitných vzorků.

Nevýhodou většiny holografických mikroskopů je skutečnost, že nejsou achromatické. Zdrojem osvětlení pak musí být lasery, případně jiné zdroje koherentního záření. Proto je mimo jiné nelze využít pro studium vzorků umístěných v rozptylovém prostředí [1], [2].

2.3 Transmisní holografický mikroskop na VUT v Brně

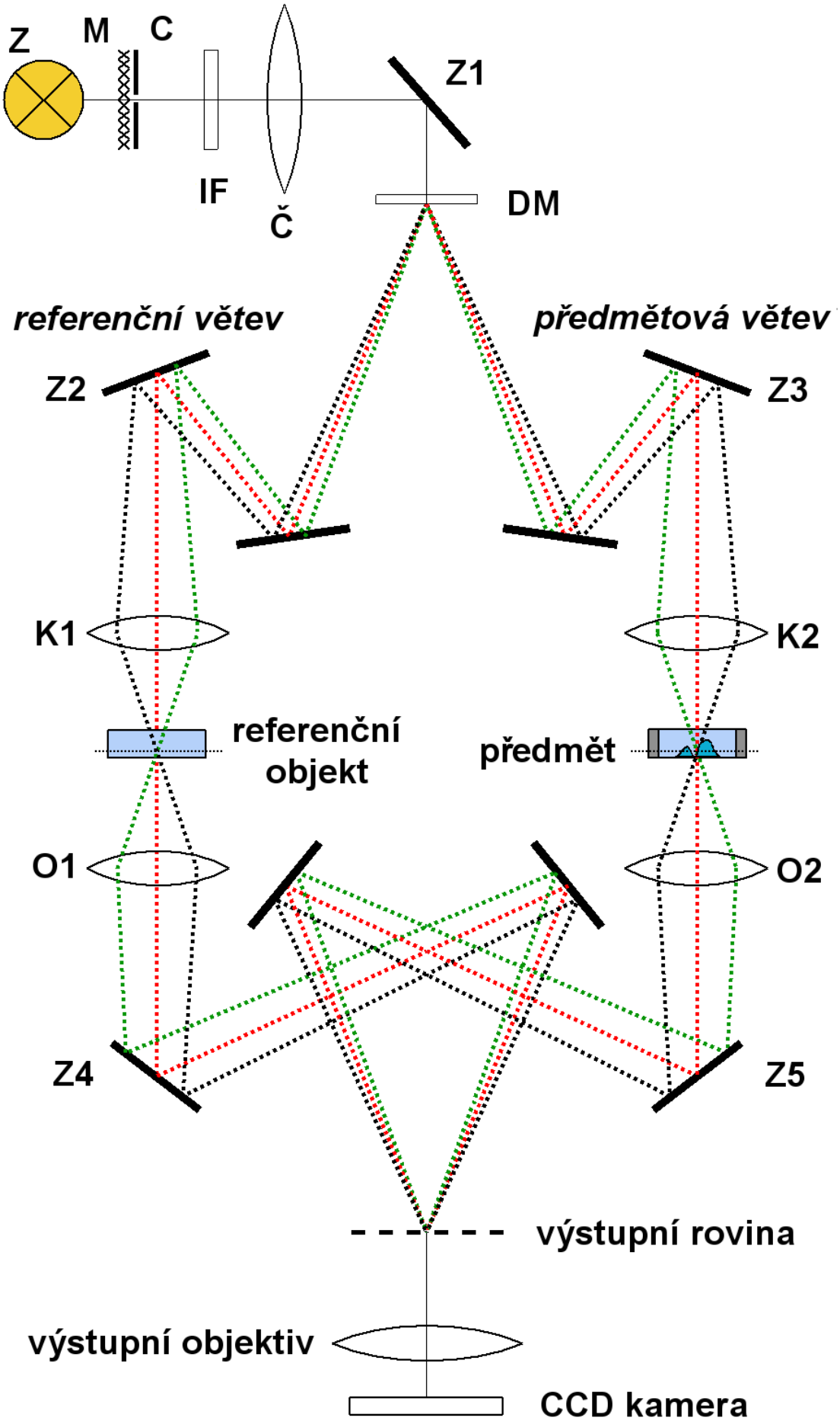
První prototyp transmisního holografického mikroskopu na VUT byl sestrojen v rámci doktorského studia M. Prokopové [3]. Na její práci navázal Pavel Kolman, který navrhl a zkonstruoval jeho vylepšenou verzi [1]. Snímky, které v této práci upravujeme byly pořízeny A. Křížovou právě na tomto přístroji.

Transmisní holografický mikroskop vyvinutý na Ústavu fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně spojuje výhody mikroskopů z kapitol 2.1 a 2.2 a odstraňuje jejich nevýhody. Od běžných holografických mikroskopů se liší typem interferometru. Využívá mřížkového interferometru, jehož výhodou je, že je achromatický a prostorově invariantní. Díky tomu lze jako zdroj světla použít téměř cokoli, třeba i obyčejnou halogenovou lampu. Protože změnou koherence zdroje lze upravovat jeho vlastnosti, používá se pro něj také označení *„koherencí řízený holografický mikroskop“* [1], [2].

Při pořizování snímků užitých v této práci se ze zdroje (halogenové lampy) přes matnici a clonu šířilo světlo, které dopadalo na barevný interferenční filtr. Ten propouští vlnění o střední vlnové délce $\bar{\lambda} = 650$ nm s pološířkou $h = 10$ nm. Již červené světlo prochází čočkou, odráží se od zrcátka a dopadá na difrakční mřížku. Zde se dělí na dva svazky - předmětový a referenční. Předmětový svazek prochází kondenzorem, který zajišťuje rovnoměrné osvětlení předmětu. Světlo prochází předmětem, který v závislosti na své tloušťce a indexu lomu posouvá jeho fázi. Přes objektiv a soustavu zrcadel pokračuje k výstupní rovině, kde se střetává se svazkem referenčním. Jeho cesta byla principiálně téměř stejná. Jediným rozdílem je, že neprocházel skrze zkoumaný vzorek - v našem případě skrz buňky. Ve výstupní rovině mikroskopu oba svazky interferují a

vytváří tak hologram s interferenčními proužky. Světlo dále prochází objektivem, který hologram zvětšuje pro čip CCD kamery, jenž vše zaznamenává. Rekonstruovaný hologram prozradí fázový rozdíl mezi předmětovým a prostorovým svazkem. Známe-li index lomu vzorku, můžeme vypočítat jeho tloušťku [2], [4]. Podrobné schéma výše popsaného transmisního, koherencí řízeného, holografického mikroskopu ukazuje obrázek 1.

Zjišťovanou tloušťku ovlivňují některé nesnadno kompenzovatelné optické vady, které způsobují šum. Z nepřesné tloušťky se chyba přenáší i na vypočtenou hmotnost pozorovaného předmětu (v našem případě na hmotnost buňky). Předběžným krokem pro potlačení této chyby je simulace vzniklého šumu a pozorované buňky.



Obr. 1: Schéma transmisního holografického mikroskopu; Z - zdroj, M - matnice, C - clony, IF - interferenční filtr, Č - čočka, Z1-Z5 - zrcátka, DM - difrakční mřížka, K1 a K2 - kondenzory, O1 aO2 - objektivy. Převzato z [2]

Kapitola 3

Simulace šumu

3.1 Tvorba bázových šumů

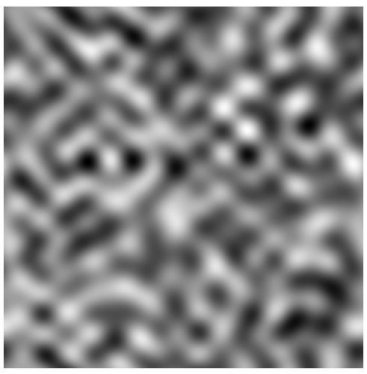
Prvním krokem při tvorbě bázového šumu je vygenerování pole náhodných čísel o vhodných rozměrech. Ty jsou určeny rozměry zorného pole a požadovanou frekvencí tohoto šumu. Při výpočtu jejich velikosti byly využity vztahy (3.1) a (3.2).

$$s_{np} = s_{zp} \cdot f \quad , \tag{3.1}$$

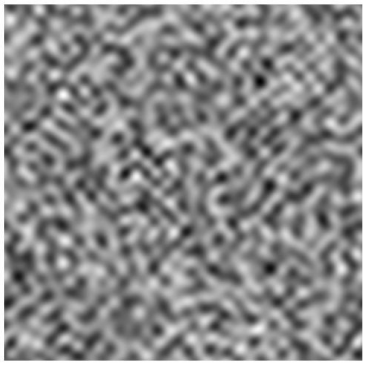
$$v_{np} = v_{zp} \cdot f \quad , \tag{3.2}$$

kde s_{zp} značí šířku zorného pole, v_{zp} jeho výšku a f je frekvence generovaného bázového šumu.

Frekvencí je tedy míněn poměr rozměrů původního vygenerovaného a výsledného převzorkovaného obrazu. Pole náhodných čísel je následně přepočítáno pomocí funkce *resample*. Tato funkce využívající Fourierovy metody provádí převzorkování podél zvolené osy interpolací s využitím funkce sinc(x). Výsledkem je šum o požadované frekvenci s rozměry shodnými s rozměry zorného pole. Příklady šumu s třemi různými frekvencemi (f_1 = 0,1, f_2 = 0,2 a f_3 = 0,6) ukazují následující obrázky.



Obr. 2: Nízkofrekvenční šum



Obr. 3: Šum střední frekvence

Obr. 4: Vysokofrekvenční šum

Z obrázků je vidět, že s rostoucí frekvencí se šum stává více a více zrnitý. Hodnoty se mění rychleji, barevný gradient se zvyšuje. Provázanost mezi sousedními pixely klesá.

3.2 Výsledný šum

Výsledný šum vzniká složením libovolného počtu bázových šumů o různých frekvencích. Po několika experimentech byla vybrána kombinace 4 bázových šumů s frekvencemi 0,1, 0,2 0,4 a 0,6. Tyto bázové šumy procházejí před spojením dvěma úpravami. V prvním kroku jsou prahovány, následně před výpočtem jejich váženého průměru ohodnoceny. Způsob prahování ukazuje vztah (3.3), výpočet váženého průměru pak vztah (3.4).

Pro každý prvek matice B_{ij} bázového šumu platí:

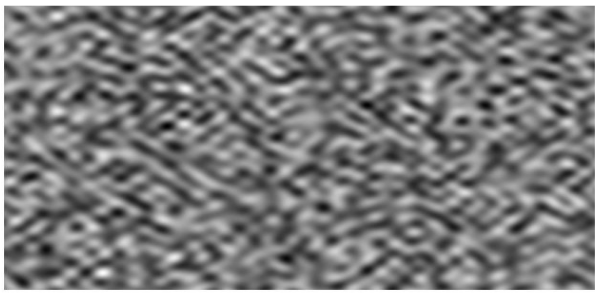
$$B_{ij} = \begin{cases} (B_{ij} - P) & pro\ B_{ij} > P \\ 0 & pro\ B_{ij} \leq P \end{cases}, \tag{3.3}$$

kde B_{ij} jsou prvky matice šumu a P je zvolená prahovací konstanta. Experimentálně bylo zjištěno, že pro nízkofrekvenční šumy je vhodné použít prahovací konstantu vyšší než pro šumy nízkofrekvenční. Hodnoty prahovacích konstant se pohybují mezi 10% a 20% maximální hodnoty šumu.
Pro výsledný šum S platí:

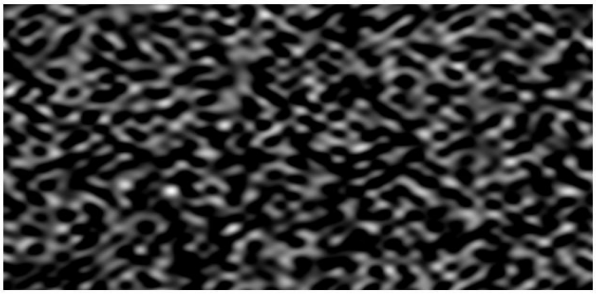
$$S = \frac{\sum_{i=1}^{n} B_i \cdot v_i}{\sum_{i=1}^{n} v_i}, \tag{3.4}$$

kde B_i je matice bázového šumu, v_i je jeho váha a n je počet použitých bázových šumů.

Prahování zvyšuje počet bodů s nulovou hodnotou. Všechna čísla menší než zvolená prahovací konstanta se nahradí 0, ostatní se zmenší o tuto konstantu (3.3). Tím je dosaženo realističtější podoby šumu.



Obr. 5: Šum před prahováním



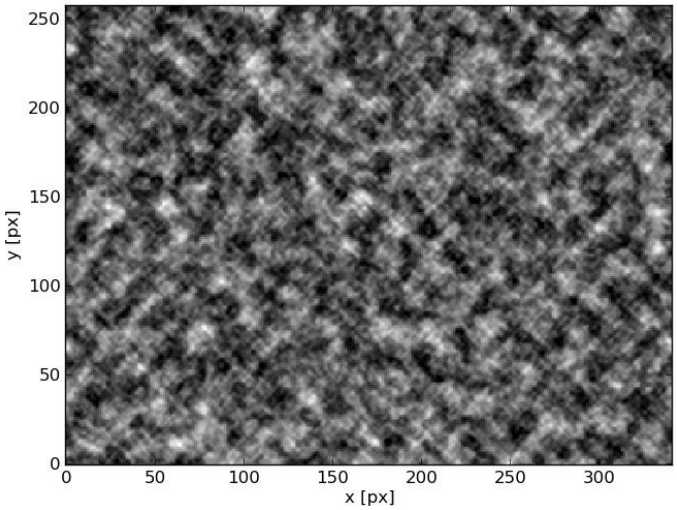
Obr. 6: Šum po prahování (P = 0,3)

Díky prahování se šum stává více kontrastnější. Vznikají tak také malé oblasti, které nejsou zašuměné vůbec.

Výsledný šum je získán výpočtem váženého průměru všech bázových šumů (vztah 3.4) a následným normováním (vztah 3.5). Větší váha je při výpočtu váženého průměru přikládána složkám s nižšími frekvencemi:

$$Vs = \frac{S}{max(S)} \quad , \tag{3.5}$$

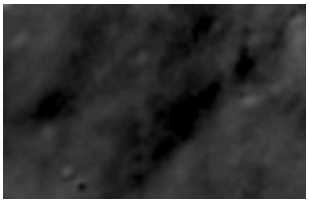
kde S je matice šumu před normováním a $max(S)$ je její největší hodnota. Po normování bude tedy maximální hodnotu šumu v matici rovna jedné.



Obr. 7: Výsledný šum

Šum na obrázku 7 má s šířkou 342 px a výškou 258 px rozměry stejné jako budou mít použité obrázky z reálného měření. Na obrázcích s buňkou bude působit méně výrazněji než zde, při použití stejného jasu by v něm většina buňky zanikala, nebyla by téměř vidět.

Možnost porovnat tento umělý šum se šumem skutečným dává obrázek 8, který je výřezem ze skutečného snímku. Tmavé a světlé oblasti jsou v něm sice větší, než v šumu umělém, strukturně si ale podobné oba trochu jsou.



Obr. 8: Skutečný šum

3.3 Měnící se šum

3.3.1 Tvorba šumu počátečního a koncového

Protože během měření není šum zcela statický, ale mírně se mění, je třeba nasimulovat také jeho změnu. Toho lze docílit vytvořením dvou sobě podobných šumů a následně přechodu mezi nimi.

Program vytvoří dva šumy - počáteční S_{poc} a pomocný S_{pom} - s podobnými vstupními parametry. Tyto šumy mají sice odlišná vstupní pole náhodných čísel, ale shodné složky frekvence a totožné úrovně prahování. Protože se takto vytvořené šumy stále příliš liší, není vhodné je v této podobě využít jako počáteční a koncový stav. Šum na konci simulovaného pozorování S_{kon} vznikne výpočtem váženého průměru obou šumů:

$$S_{kon} = \frac{S_{poc} \cdot v_{poc} + S_{pom} \cdot v_{pom}}{v_{poc} + v_{pom}} \quad , \tag{3.6}$$

kde v_{poc} je váha počátečního šumu a v_{pom} je váha pomocného šumu.

Volbou vah těchto šumů pak lze snadno nastavit odlišnost šumu na počátku a na konci měření. Lze tedy simulovat krátká i dlouhotrvající měření. Také tak lze regulovat, jak rychle se šum mění.

Protože chceme získat šum, jehož minimální hodnota je rovna nule a maximální rovna jedné, prochází takto vzniklý šum ještě prahováním (3.4) a následným normováním (3.5). Prahování nám vytvoří malé oblasti, které šumem nejsou postiženy, normování pak zabrání velkým výkyvům celkového šumu - abnormálnímu nárůstu jeho vlivu, případně přílišnému poklesu.

3.3.2 Šum v čase

Chceme-li získat šum v čase *t*, kdykoli mezi výchozím a koncovým stavem, stačí pak vypočítat jejich vážený průměr (3.7) a výsledek opět znormovat (3.5).

$$S_t = \frac{S_{poc} \cdot v_{poc} + S_{kon} \cdot v_{kon}}{v_{poc} + v_{kon}} \quad , \tag{3.7}$$

kde v_{poc} je váha počátečního šumu a v_{kon} je váha konečného šumu, pro jejichž výpočet platí:

$$v_{poc} = t_{kon} - t \quad \text{a} \tag{3.8}$$

$$v_{kon} = t - t_{poc} \quad , \tag{3.9}$$

kde t_{kon} je čas na konci a t_{poc} čas na počátku simulace. Dále budeme uvažovat, že $t_{poc} = 0$ a tedy $t_{kon} = T$.

Vytvořili jsme funkci na výpočet šumu v libovolném čase *t*. Pomocí ní jsme nechali vygenerovat obrázky zobrazující plynulý přechod mezi šumem výchozím a šumem koncovým a ty pak následně nechali uložit.

Kapitola 4

Simulace buňky

4.1 Funkce pro vykreslení buňky

Objektem pozorování jsou nádorové buňky K2. Proto je důležité dokázat nasimulovat také je. Buňky se během pozorování nejen pohybují, ale také mírně deformují. Proto bylo třeba vytvořit funkci, jejímž grafem, vykresleném v odstínech šedi, je světlá skvrna na tmavém pozadí, s jasně definovanou polohou a natočením a mírně se měnícími rozměry, která připomíná skutečnou buňku.

Dospělo se tak k funkci (4.1), která splňuje všechny požadavky. Vizualizací dostaneme malou elipsu se středem v bodě [*X,Y*], s výškou a šířkou úměrnou *v*, respektive *s* a natočením *φ*. Její matematický zápis ukazuje následující vztah:

$$f(x,y) = \exp\left\{-\left[\left(\frac{a}{s} - X\right)^2 + \left(\frac{b}{v} - Y\right)^2\right]\right\} \quad , \tag{4.1}$$

kde

$$a = x \cdot \cos(\varphi) + y \cdot \sin(\varphi) \tag{4.2}$$

a

$$b = -x \cdot \sin(\varphi) + y \cdot \cos(\varphi) \quad . \tag{4.3}$$

4.2 Prahování a normování buňky

Aby buňka měla jasně definovanou hranici, musí se každá matice, reprezentující rozložení hmotnosti buňky, po svém vytvoření zprahovat. Prahování buňky je po matematické stránce velmi podobné jako prahování šumu. Hodnoty, které jsou menší než zvolená úroveň prahování *P* nahradíme nulou. Na rozdíl od prahování šumu se od zbylých hodnot neodečítá celá prahovací konstanta, ale prahovací konstanta vynásobená redukční konstantou *k*, kde $k \in \langle 0\,;1 \rangle$. Volbou této hodnoty lze nastavit ostrost hranice buňky. Pro $k = 0$ je rozdíl mezi hranicí a jejím okolím největší. Naopak pro $k = 1$ by tu nebyl rozdíl žádný. Buňka by přešla plynule v barvy pozadí. Pro jednotlivé prvky matice buňky tedy platí:

$$B_{ij} = \begin{cases} 0 & pro\, B_{ij} \le P \\ (B_{ij} - k \cdot P) & pro\, B_{ij} > P \end{cases} \quad . \tag{4.4}$$

Protože reálná buňka během pozorování svou hmotnost samovolně nemění, je třeba zajistit, aby také hmota nasimulované buňky zůstávala konstantní. Referenční hodnota hmotnosti byla zvolena 1000 pg. Proto každý prvek matice buňky B_{ij} se musí přepočítat podle vztahu (4.5):

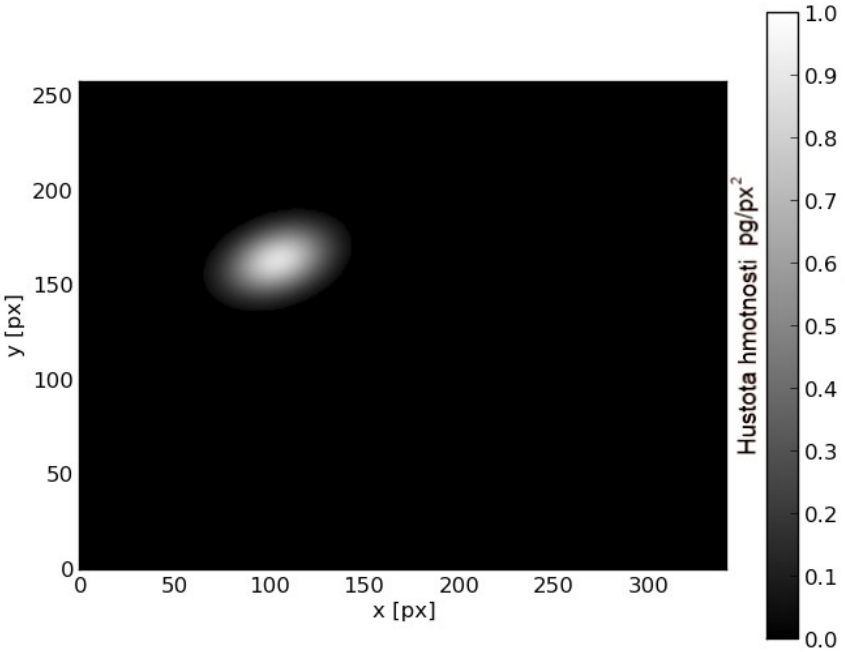
$$B_{ij} = 1000 \cdot \frac{B_{ij}}{m} \quad , \tag{4.5}$$

kde *m* - hmotnost celé buňky - je dána vztahem (4.6):

$$m = \sum_i m_i \quad , \tag{4.6}$$

kde m_i jsou hmotnosti jednotlivých částí buňky - v našem případě hodnoty prvků matic buňky.

Buňku vzniklou s využitím vztahů (4.1) - (4.6) v zorném poli 342x258 px pro P = 0,1 a k =0,5 ukazuje obrázek 7.



Obr. 9: Simulace buňky

Hranice buňky je sice ostrá, ne ale příliš výrazná. Tím je napodobena skutečnost, že reálná buňka je u svých okrajů tenčí než v částech jiných.

4.3 Buňka v pohybu

Hlavním cílem práce je potlačení vlivu šumu na měření hmotnosti reálné buňky. K tomuto potlačení využijeme skutečnosti, že se buňka během měření pohybuje. Proto bylo třeba naprogramovat také pohyb simulované buňky.

Bylo rozhodnuto, že dráhu, po které se bude buňka pohybovat, je třeba pevně definovat. Hmotnost buňky je během pokusu konstantní, může ale docházet k deformacím jejího tvaru. Během svého pohybu se tedy buňka mírně deformuje, přičemž změny jejích rozměrů, udanými ve vztahu (4.1) parametry *s* a *v*, jsou náhodné.

Jako testovací trajektorie byla zvolena elipsa. To protože má jednoduché parametrické vyjádření (vztahy 4.7 a 4.8) a buňka po ní projde velkou částí vybraného zorného pole.

$$X = a \cdot \cos(t) \quad , \tag{4.7}$$

$$Y = b \cdot \cos(t) \quad , \tag{4.8}$$

kde *a* je délka hlavní poloosy elipsy a *b* je délka její vedlejší poloosy.

Tímto způsobem byla vygenerována série matic, reprezentujících buňku v pohybu. Ty byly

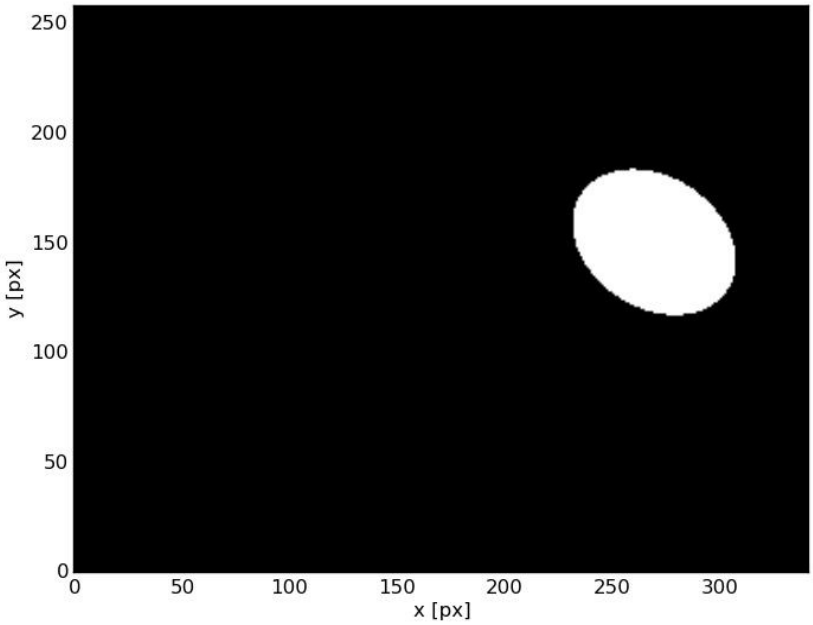
vizualizovány a spojeny do krátkého videa, které lze najít v příloze.

4.4 Maska buňky

Maska každé buňky určuje její polohu. Ta je důležitá při výpočtu buněčné hmotnosti. Při reálném měření polohu buňky známe (maska je poskytnuta spolu s naměřenými daty), pro simulaci ji je ale třeba zjistit. Protože matice uměle vytvořené buňky je mimo prvky náležící této buňce díky prahování (4.4) nulová, můžeme tu jako buňku označit všechny body s nenulovou hodnotou. Maska buňky se pak vytvoří tak, že všechny body buňky nahradíme hodnotou 1. Pro jednotlivé prvky matice masky M_{ij} tedy platí:

$$M_{ij} = \begin{cases} 1 & pro\ B_{ij} > 0 \\ 0 & pro\ B_{ij} = 0 \end{cases}, \tag{4.9}$$

kde B_{ij} jsou příslušné prvky matice buňky. Masku buňky z obrázku 7 ukazuje obrázek 8.



Obr. 10: Maska buňky

Pro masku tedy není důležité rozložení hmotnosti buňky. Říká nám pouze, kde se buňka nalézá, respektive kde není.

4.5 Zjišťování hmotnosti buňky

Při zjišťování váhy buňky nás zajímá její suchá hmota, tedy hmotnost bezvodného obsahu buňky. Ta je přímo úměrná fázi indukované vzorkem [2], který pozorujeme. Fáze je dána optickou délkou dráhy, kterou světlo transmisního holografického mikroskopu procházelo. V našem případě je tedy hmotnost přímo úměrná zjištěným číselným hodnotám matice buňky.

Pro jednoduchost budeme předpokládat, že konstanta úměry mezi hodnotami prvků matic buňky a hmotnostmi těchto částí je rovna jedné. Pak lze hmotnost buňky *m* zjistit takto:

$$m = \sum_i m_i = \sum_i B_{ij} \cdot M_{ij} \quad , \tag{4.10}$$

kde B_{ij} je hodnota prvku matice buňky a M_{ij} je hodnota prvku matice její masky.

Pro testování funkčnosti algoritmů masky a vážení bylo využito buňky pohybující se na nezašuměném pozadí. Jejich správnost byla potvrzena - vypočtená hmotnost zůstávala v průběhu měření konstantní.

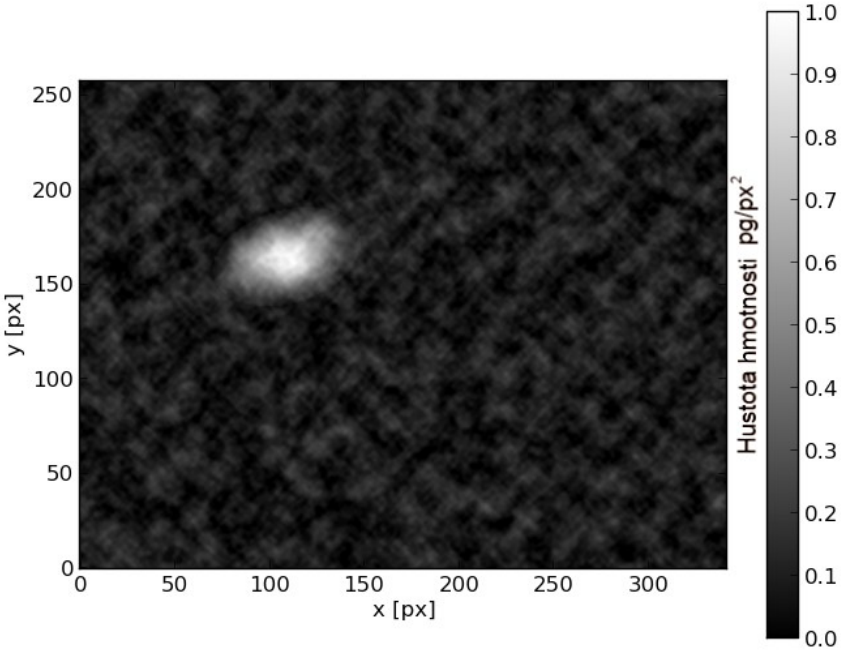
4.6 Buňka na zašuměném pozadí

Bylo třeba vytvořit sérii matic pohybující se buňky na měnícím se zašuměném prostředí. Klíčovým krokem v této fázi bylo také zjištění hmotnosti buňky pro každý okamžik a následné vykreslení jejího vývoje v čase během simulovaného měření.

Matice buňky zkreslené šumem vznikne součtem matice buňky *B* a jí příslušné matice šumu *S*. Pro regulaci jeho vlivu jsou všechny prvky jeho matice nejprve vynásobeny redukční konstantou S_S. Pro nově vzniklou matici zašuměné buňky B_Z tedy platí:

$$B_Z(t) = B(t) + S_S \cdot S(t) \quad . \tag{4.11}$$

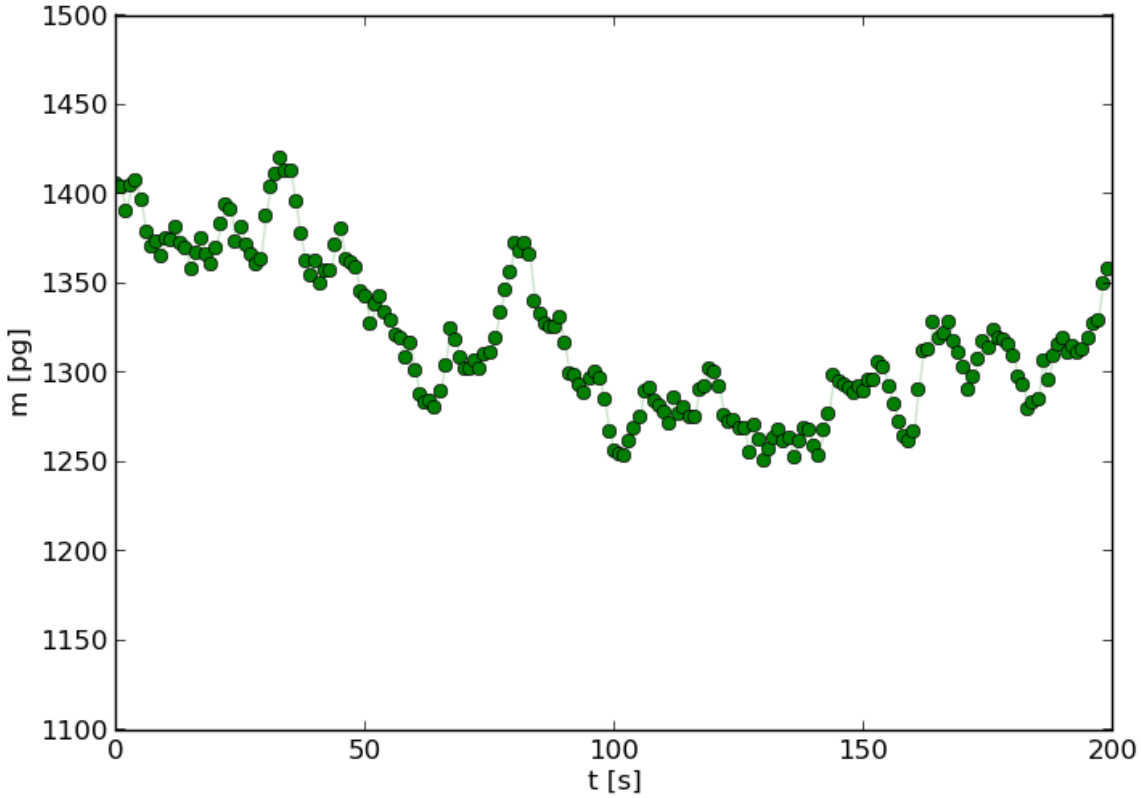
Příklad takto vzniklé buňky pro $S_S = 0{,}2$ ukazuje obrázek 11. Pro takovouto konstantu tvoří šum přibližně 30% zjišťované hmotnosti.



Obr. 11: Buňka na zašuměném pozadí

Na obrázku 11 je vidět, že šum může informaci o buňce značně zkreslit. Na rozdíl od buňky na čistém černém pozadí (obrázek 9) není její okraj tak jasně patrný. Nejvýrazněji se vliv šumu projevuje v částech, kde je buňka nejtenčí.

Buňku z obrázku 11 jsme nechali putovat po měnícím se zašuměném prostředí. Během jejího pohybu byla průběžně zjišťována její hmotnost. Výsledek tohoto měření ukazuje graf na obrázku 12.



Obr. 12: Graf zjištěné hmotnosti buňky na zašuměném pozadí (S_S=0,2) v závislosti na virtuálním čase; Skutečná hmotnost je 1000 pg.

Při pohledu na osu s hmotností vidíme, že šum zvyšuje její zjišťovanou hodnotu. Hmotnost generované buňky byla normována na 1000 pg, šum ale způsobuje, že zjišťujeme hodnoty přibližně o třetinu vyšší. Navíc se v průběhu měření hmotnost mění v rozmezí téměř 200 pg, což je více než 15% velikosti měřených hodnot.

Kapitola 5

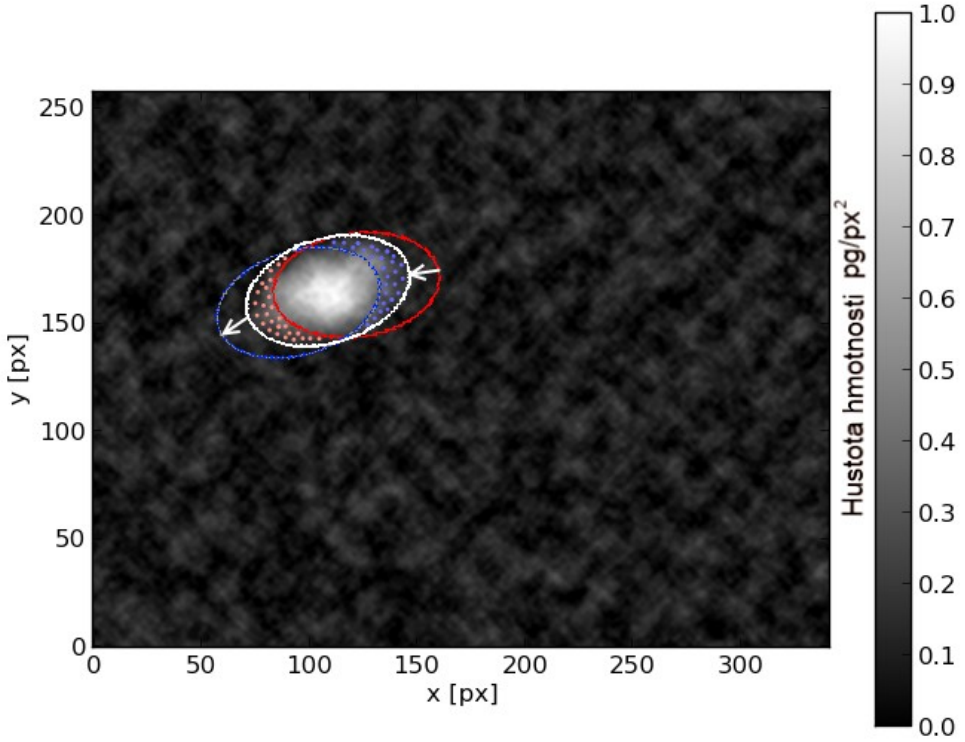
Potlačení šumu

5.1 Základní princip

Jak bylo ukázáno v kapitole 4.5, šum může výrazně ovlivnit měřené hodnoty. Proto vzniká přirozená snaha jeho vliv nějak potlačit. Asi nejjednodušším způsobem je odečíst od všech prvků získané matice hodnotu průměrného šumu. Tím docílíme zpřesnění při určování průměrné hmotnosti buňky v průběhu dlouhého měření. Naměřené hodnoty budou mít sice stejně velký rozptyl, budou ale alespoň oscilovat v okolí skutečné hmotnosti.

Výše popsaná metoda je sice výpočetně nenáročná a principiálně jednoduchá, nemusí být ale příliš účinná. Připustíme-li ale možnost opravy početně i časově náročnější, takové, která bude probíhat až po ukončení celého měření, lze navrhnou metody sofistikovanější a účinnější.

V této práci využíváme skutečnosti, že pozorovaný objekt (buňka), se v průběhu měření pohybuje. Odkrývá tak oblasti, které byly v předchozích snímcích skryty pod ní. Zjistíme-li hodnotu šumu, která byla ve zkoumaném bodě těsně před tím, než jej buňka zakryla a také chvíli poté, co jej odkryla, můžeme toho efektivně využít (obrázek 13). Pro jednoduchost předpokládáme, že derivace změny šumu nenabývá příliš velkých hodnot - změna se příliš nemění. Pak stačí od naměřených hodnot odečíst vážený průměr z těchto krajních okamžiků. Při lineární změně šumu by pak korekce byla prakticky dokonalá.



Obr. 13: Buňka v pohybu - vysvětlení principu korekce

Aktuální poloha buňky na obrázku 13 je zvýrazněna bílou barvou. Červená ukazuje její polohu na předchozím snímku a modrá na snímku následujícím (posuny jsou pro názornost zveličeny). Pro odhad šumu pod červeně vytečkovanou částí bílé buňky bude určující především

šum na snímku s červenou buňkou a pro korekci šumu pod modře vytečkovanou oblastí bílé buňky bude klíčová informace ze snímků s buňkou modrou.

Korekce probíhá bod po bodu. Bodem je míněno jednorozměrné pole, zachycující chování tohoto bodu v čase (obrázek 14). To tedy znamená, že vždy opravíme jeden bod pro všechny zpracovávané snímky a poté se přesuneme na bod další. Důsledkem toho je pro algoritmus z hlediska výpočetního času stejně náročné zkorigovat právě jeden záznam jako opravit všechny záznamy zároveň.

5.2 Příprava dat pro korekci

Testovací algoritmus si vytvoří série matic zobrazujících buňku v pohybu, její masky pro jednotlivé okamžiky a měnící se šum. Jak deformující se tvar buňky, tak měnící se šum, jsou do určité míry náhodné. Díky tomu můžeme experiment smysluplně opakovat bez ruční změny jakýchkoli parametrů. Stejně jako při opakování reálného experimentu tak získáme data, která nejsou kopií těch z měření předchozího, ale částečně se liší.

Následuje sloučení buňky se šumem (více v kapitole 4.5) a uložení takto vytvořených dat. V případě, že nechceme generovat nová data, ale opravit data již existující - například při testu opravného algoritmu po nějaké dílčí úpravě - předešlé kroky přeskočíme. Ty tedy přeskočíme také při korekci reálně naměřených dat.

5.3 Nahrání a uspořádání dat pro korekci

Prvním krokem k samotné korekci je vytvoření dvou velkých trojrozměrných polí. Pole zašuměné, pohybující se buňky a pole její masek. Při použitém rozlišení pozorování (342 px x 258 px) a 200 vygenerovaných maticích pak každé takové pole má necelých 18 milionů prvků. To je přibližně 144 MB na jedno pole. Na počítačích s malou a zaplněnou pamětí RAM už s o mnoho většími strukturami pracovat najednou nelze. Chce-li proto uživatel program aplikovat na snímky s větším rozlišením, případně na výrazně větší počet snímků, měl by využít počítače, který má tuto paměť dostatečně velkou.

Trojrozměrné pole vytvoříme tak, aby v časové dimenzi mělo o dva prvky více, než kolik bylo pozorování. Data z něj do pole nahrajeme tak, aby první a poslední prvek pole zůstaly volné pro hraniční šumy.

5.4 Tvorba matic hraničních šumů a jejich masek

Opravný algoritmus nastíněný v kapitole 5.1 by se dostával do problémů v okamžicích, kdy buňka na počátku či na konci měření zkoumaný bod zakrývá. Tento vážný zádrhel lze ale vyřešit velmi elegantně - přidáním dvou speciálních okrajových matic šumu. Šumu počátečního a koncového.

Pro místa, která jsou na počátku měření či na jeho konci zakryta buňkou, spočítáme průměrnou hodnotu šumu v těchto bodech z okamžiků, kdy je buňka jinde. Pokud některý bod buňka za celé pozorování neodkryje, nic o něm nevíme a proto ho ponecháváme bez korekce. Matematicky lze výpočet hodnoty okrajového šumu S_o pro daný bod zapsat takto:

$$S_o = \frac{\sum_{t=0}^{N} \left(m_t - m_t \cdot M_t \right)}{N - \sum_{t=0}^{N} M_t} \quad , \tag{5.1}$$

kde m_t je "hmotnost" zkoumaného bodu v okamžik t, M_t je maska v daném bodě v patřičný okamžik a N je celkový počet zkoumaných okamžiků. Čitatel nám tedy dá součet všech šumů ve zkoumaném bodě a jmenovatel počet těchto šumů. Výsledkem je průměrný šum v tomto bodě.

Korekce tu sice není tak dobrá jako u bodů, kde tyto krajní šumy není třeba znát, stále ale bude velmi přínosná.

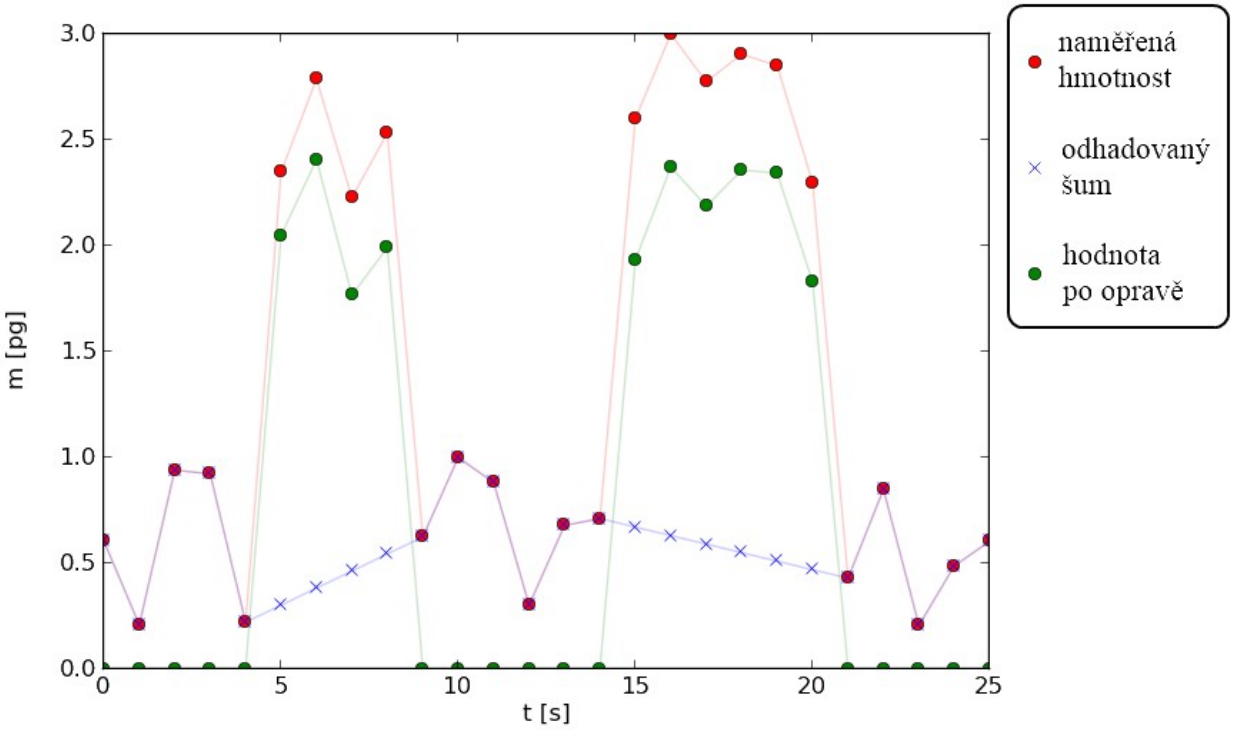
K hraničním šumům je třeba vytvořit také masky. To je velmi jednoduché, žádné buňky se tu totiž nenalézají. Hraniční masky jsou proto obyčejné nulové matice s rozměry zorného pole.

5.5 Výpočet opraveného bodu (opravené oblasti)

Nyní máme vše potřebné pro výpočet opraveného bodu. Stačí zjistit, jaký tu byl šum v jednotlivých okamžicích a pak tyto hodnoty odečíst od hodnot naměřených.

V místech, která nejsou zakryta žádnou částí buňky je šum známý - je to hodnota, kterou pozorujeme. Problémovější jsou ale oblasti, které nám buňka skrývá. Bohužel právě ty jsou pro nás nejdůležitější. Hodnoty šumu pod buňkou můžeme pouze odhadovat. Náš odhad je založen na předpokladu, že šum se mění pomalu a ne příliš nelineárně. Zjistíme proto šum v krajních okamžicích, které jsou známé - tedy těsně před zakrytím daného bodu a okamžik po jeho odkrytí. Odhadovaný šum mezi těmito okamžiky určíme lineární interpolací mezi nimi.

Když jsme zjistili, jaký šum byl pravděpodobně ve zkoumaném bodě v průběhu celého měření, odečteme tyto hodnoty od těch naměřených. Získáme tak jeden opravený bod. Vývoj zjišťované hmotnosti v bodě, odhad šumu a následnou opravu tohoto bodu ukazuje graf na obrázku 13.



Obr. 14: Graf měřené hmotnosti malé oblasti v závislosti na čase - data ze simulace. Červené body ukazují naměřené hodnoty. Modré křížky znázorňují zjištěný šum.

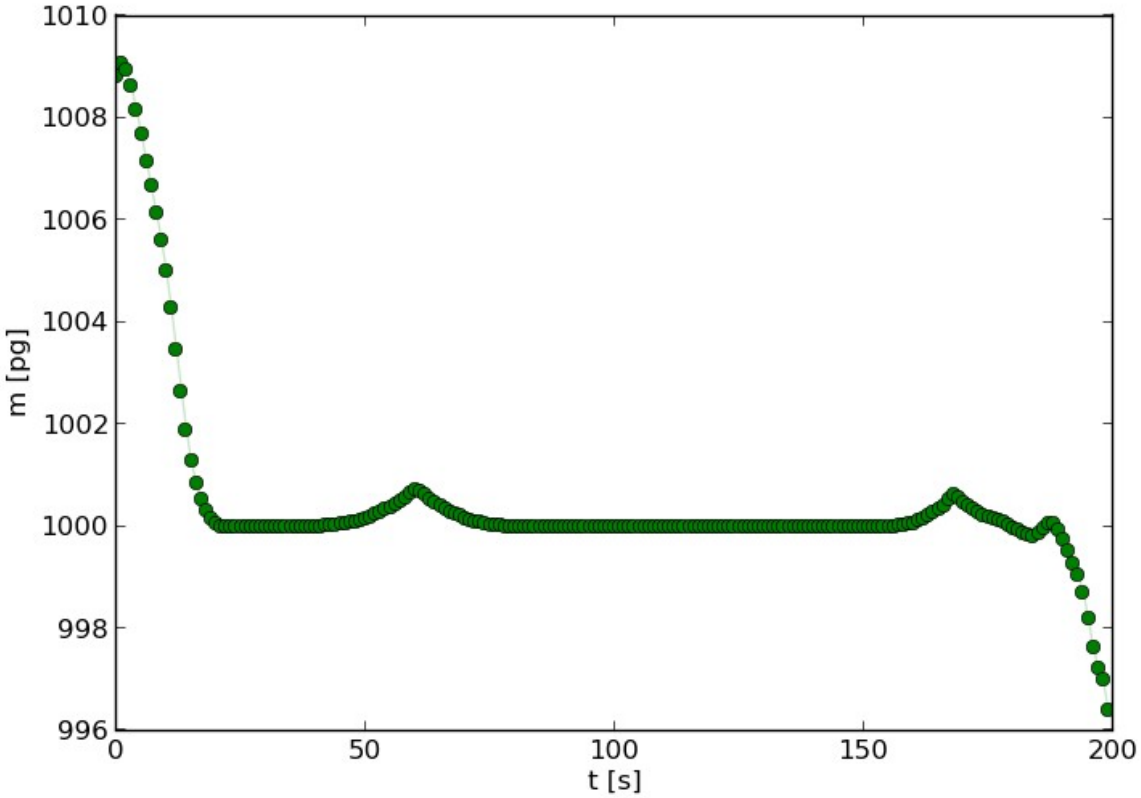
Graf na obrázku 14 zobrazuje malou oblast, kterou v průběhu 25 vteřin dlouhého měření

dvakrát zakryje buňka. První překrytí nastalo mezi pátou a devátou vteřinou, druhé mezi patnáctou a dvacátou vteřinou. Z grafu je patrné, že v okamžiku, kdy buňka oblast nezakrývá, je šum totožný s naměřenou hodnotou. Modré křížky leží na červených bodech. V okamžicích, během kterých je oblast skrytá pod buňkou je váha šumu odhadována - předpokládá se, že se mění lineárně. Zelené body ukazují hodnoty po korekci - po odečtení šumu (modré křížky) od naměřených hodnot (červené body).

5.6 Oprava kompletní sady testovacích dat

Aplikujeme-li algoritmus popsaný v kapitole 5.5 na všechny body zorného pole, dostaneme již požadovaná opravená data. Na tato opravená data můžeme opět aplikovat algoritmus vážení a hmotnosti poté vynést do grafu.

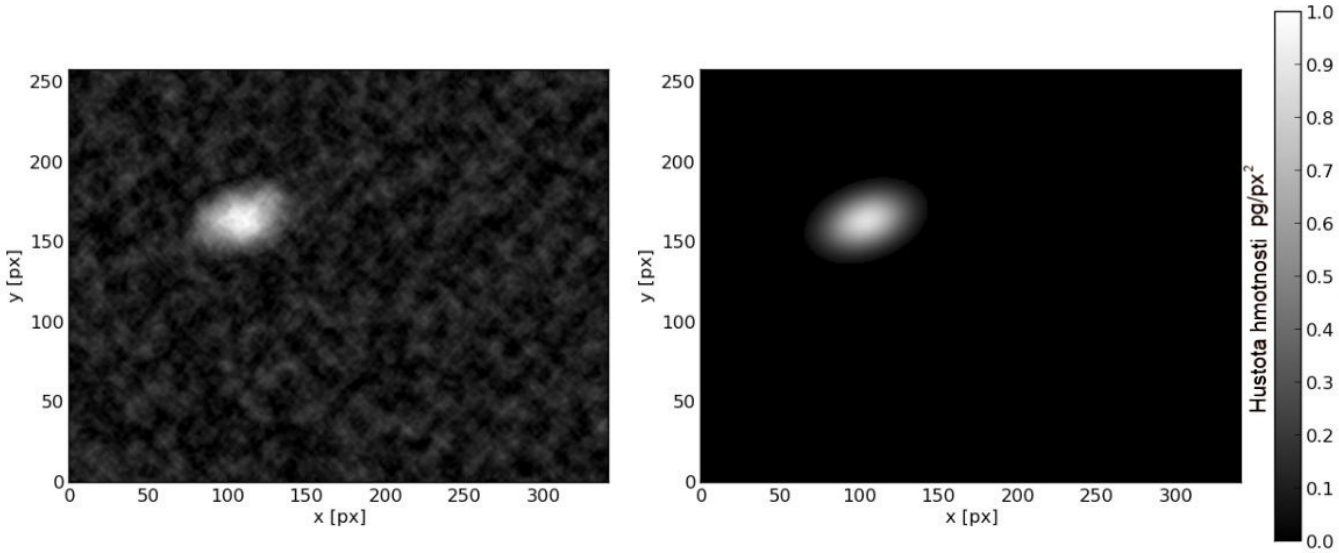
Provedli jsme okolo dvaceti takovýchto fiktivních měření. Simulace probíhaly na dvoujádrovém procesoru Intel Atom s taktovací frekvencí 1,66 GHz. Jedno měření, trvalo počítači přibližně půl hodiny. Simulace potvrdily funkčnost všech použitých algoritmů. Obrázek 15 ukazuje jeden z grafů, zachycujících vývoj měřené hmotnosti buňky. V příloze pak lze nalézt grafy dalších měření. Obrázek 16 pak ukazuje porovnání původní a opravené umělé buňky. Krátké video pohybující se buňky po korekci lze také nalézt v příloze.



Obr. 15: Graf zachycující závislost měřené hmotnosti buňky v závislosti na čase

Graf na obrázku 15 ukazuje, že zjišťovaná hodnota hmotnosti je po korekci již velmi blízká té skutečné - 1000 pg. Shoda je dle očekávání horší na začátku a na konci měření. Tam se projevuje skutečnost, že přesně známe pouze hodnotu šumu až poté, co buňka bod opustí (pouze před tím, než ho zakryje). Při porovnání s daty bez korekce (obrázek 12) je ale vidět, že i v tyto extrémní

okamžiky se původní chybu podařilo snížit na přibližně 2-3% té původní. Malé hrbolky, které tvoří řádově pouze pár tisícin původní chyby a jsou tedy ve srovnání s ostatními vlivy vyskytujícími se při reálném měření zanedbatelné, vznikají při normování generovaného šumu. Tuto domněnku jsme ověřili vygenerováním několika měření, ve kterých jsme normování neprováděli. V žádném z nich se tyto hrbolky neobjevily.



Obr. 16: Buňka před opravou (vlevo) a po opravě (vpravo)

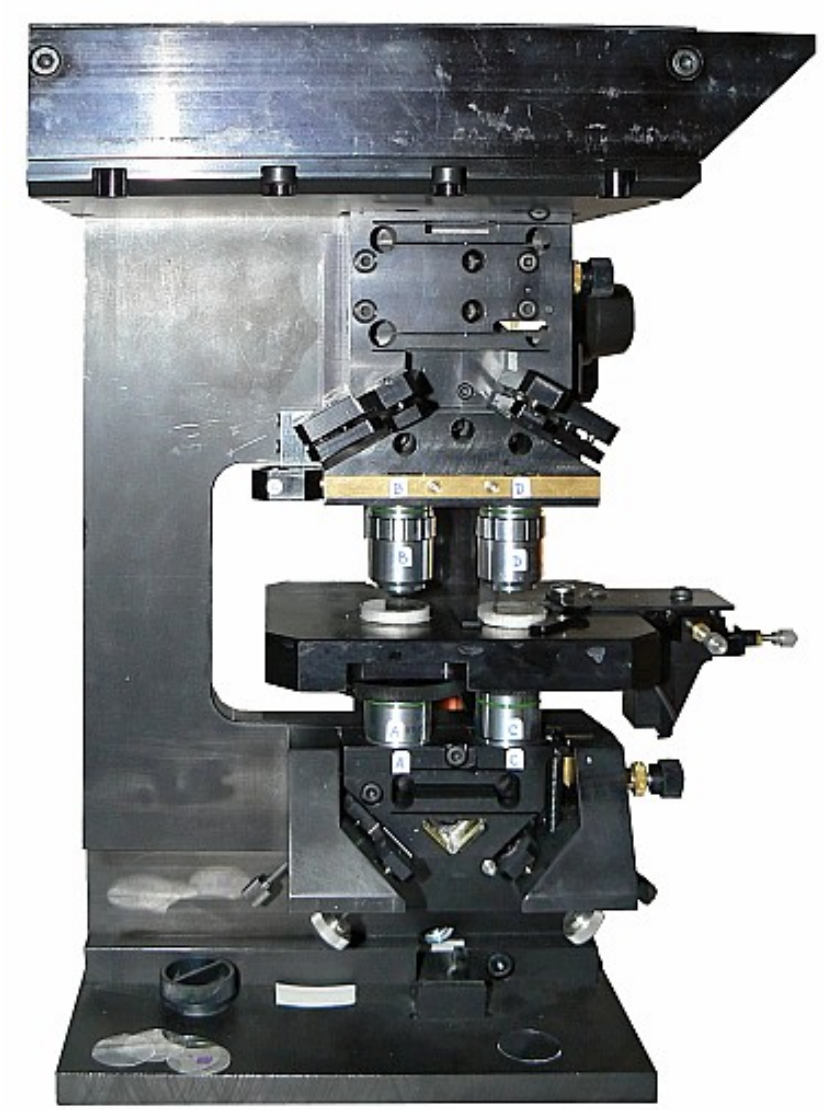
Snímky na obrázku 16 pěkně ukazují, velkou účinnost opravného algoritmu na umělých datech. Opravená buňka na první pohled vypadá stejně, jako by byla vygenerována přímo na černém pozadí. Nedokonalosti se projeví až při bližší analýze, například při vykreslení grafu (viz obrázek 15).

Kapitola 6

Reálná data

6.1 Původ dat

Opravné algoritmy jsme vyvíjeli pro pozorování nádorových buněk K2 [2]. Snímky, na které byl program použit, pořídila A. Křížová za pomocí transmisního holografického mikroskopu (obrázek 17), jenž navrhl a zkonstruoval P. Kolman v rámci své disertační práce [1]. Při pozorování těchto buněk bylo použito časově i prostorově nekoherentního světelného zdroje. Světlo z něj prochází barevným filtrem, který propouští vlnění o střední vlnové délce $\bar{\lambda}=650$ nm s pološířkou $h=10$ nm. Před tím, než se pořízená data dostala ke korekci, k nim byly vytvořeny masky ve formátu ".mat".



Obr. 17: Fotografie transmisního holografického mikroskopu.
Převzato z [5]

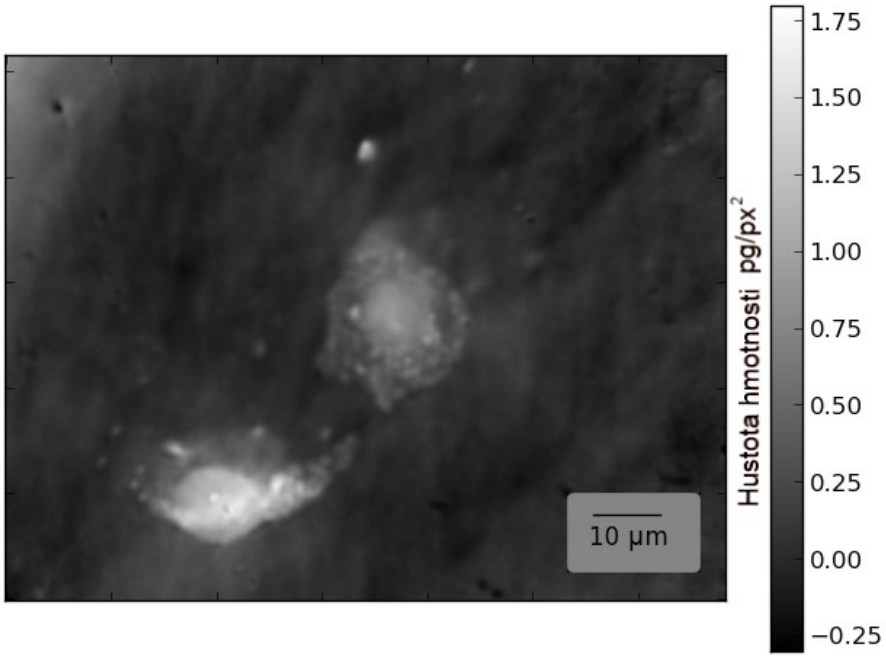
6.2 Příprava dat

Na rozdíl od práce s umělými daty, není třeba v případě reálných dat nic vytvářet. Soubory s buňkami i s maskami program rovnou dostává. Je všestrannější, již nepočítá s konkrétními názvy souborů. Uživatel pouze zadá, ve které složce se naměřená data nalézají a algoritmus si je již sám setřídí a nahraje do mezipaměti.

Během měření byl vzorek snímán jedenkrát každou vteřinu. Protože celý experiment probíhal něco málo přes půl hodiny, dostáváme více než 1200 souborů. Samotné soubory zabírají na disku přes 500 MB. Zpracování všech najednou na použitém počítači s pamětí RAM 1 GB tedy není možné. V závislosti na aktuálním zaplnění zvládne pojmout přibližně 300-400 souborů. To ovšem nevadí. Program umožňuje zpracovat jen každý n-tý soubor. Při většině výpočtů s těmito daty jsme vybírali každý šestý snímek.

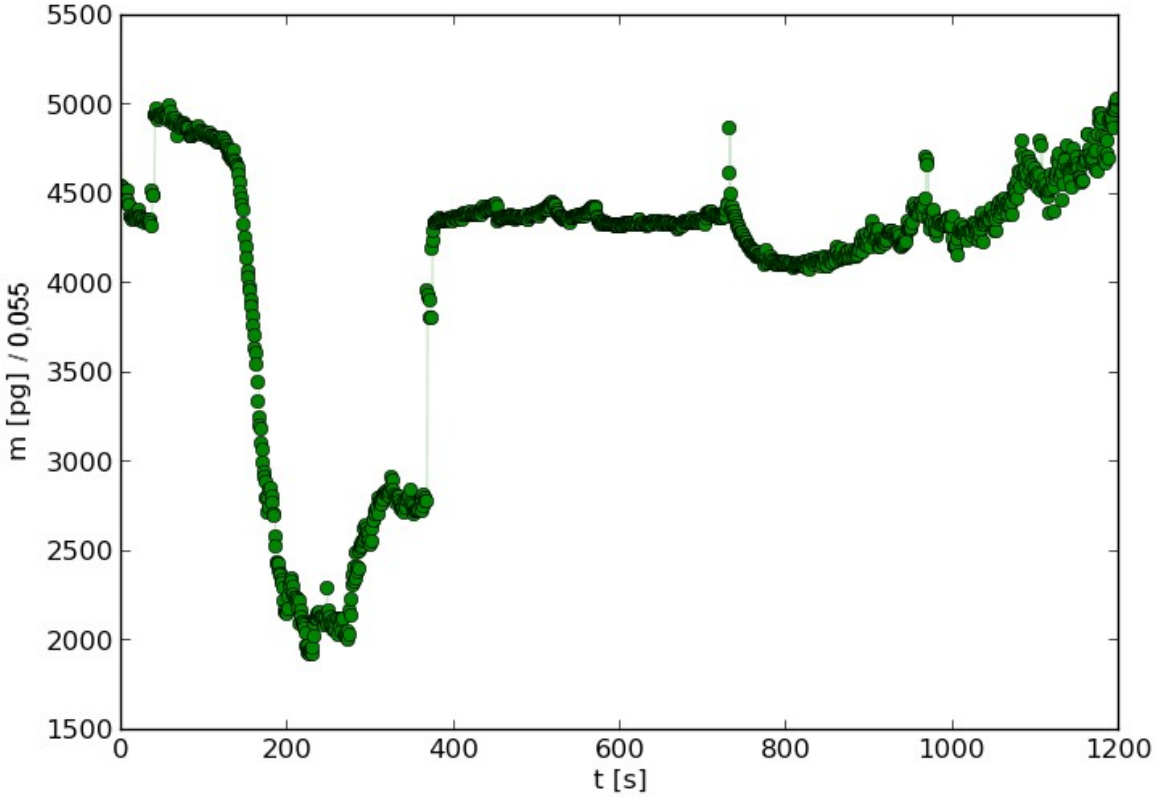
6.3 Data před korekcí

Zkoumané snímky zaznamenávají pohyb dvou buněk. Během jejich pozorování jedna z nich sledovanou oblast částečně opustí a poté se do ní vrátí. jeden ze snímků před korekcí ukazuje obrázek 18, graf zjištěné hmotnosti v závislosti na čase je pak na obrázku 19.



Obr. 18:: Snímek 2 buněk K2 před korekcí

Na obrázku si lze prohlédnout dvě buňky. Jednu v jeho středu, druhou poblíž levého dolního rohu. V ideálním případě by pozadí buněk bylo černé. Je vidět, že k ideálnímu případu má snímek daleko. Šum, který vzhled buněk zkresluje, je hlavní příčinou velké nejistoty při měření jejich hmotností.



Obr. 19: Graf závislosti měřené fáze (suché hmoty) buněk na čase - před opravou

Graf ukazuje, jak se se během půlhodinového měření vyvíjela hodnota měřené fáze pozorovaných buněk - a tedy i jejich hmotnost, která je na fázi přímo úměrná. Výrazný pokles měřených hodnot přibližně mezi 150. a 400. vteřinou je způsobený tím, že jedna z buněk dočasně opustila zorné pole. Měřené hodnoty jsou značně nestálé i mimo tuto oblast. To je způsobeno nedokonalými maskami buněk, jejichž tvorba je velmi problematická. Mimo jiné také proto, že se obě buňky v některých okamžicích téměř dotýkají.

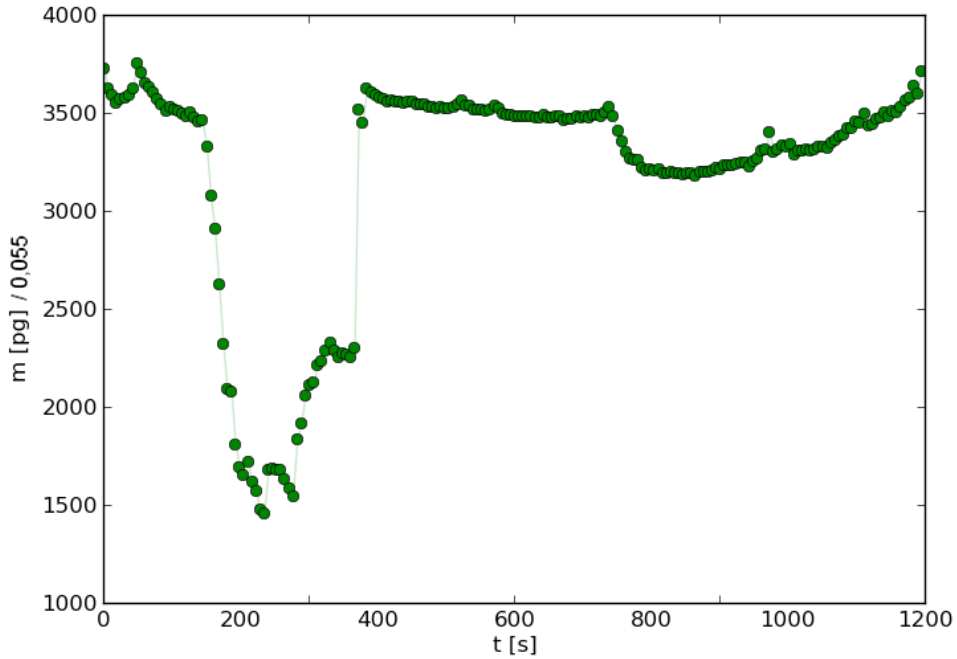
6.4 Korekce dat

Prvním krokem pro korekci je vytvoření a výpočet průměrného šumu v každém bodu zorného pole. Ten probíhá stejně jako v případě dat umělých (viz kapitola 5.4), nebudeme ji proto dále rozepisovat.

Matice průměrných šumů následně rozšíří trojrozměrné pole všech naměřených hodnot. Podobně je rozšířena také matice masek. Nyní již můžeme přistoupit ke klíčovému kroku - výpočtu pravděpodobného šumu pro všechny body a všechny okamžiky pořízeného měření. Tato procedura je podrobně popsána v kapitolách 5.6 a 5.7.

Máme-li všechen šum zmapovaný, můžeme jej již odečíst od naměřených dat. Získáváme tak opravené měření. To se automaticky uloží do připraveného adresáře. Má-li uživatel zájem, může si nechat vypsat a vykreslit vývoj měřené hmotnosti v čase.

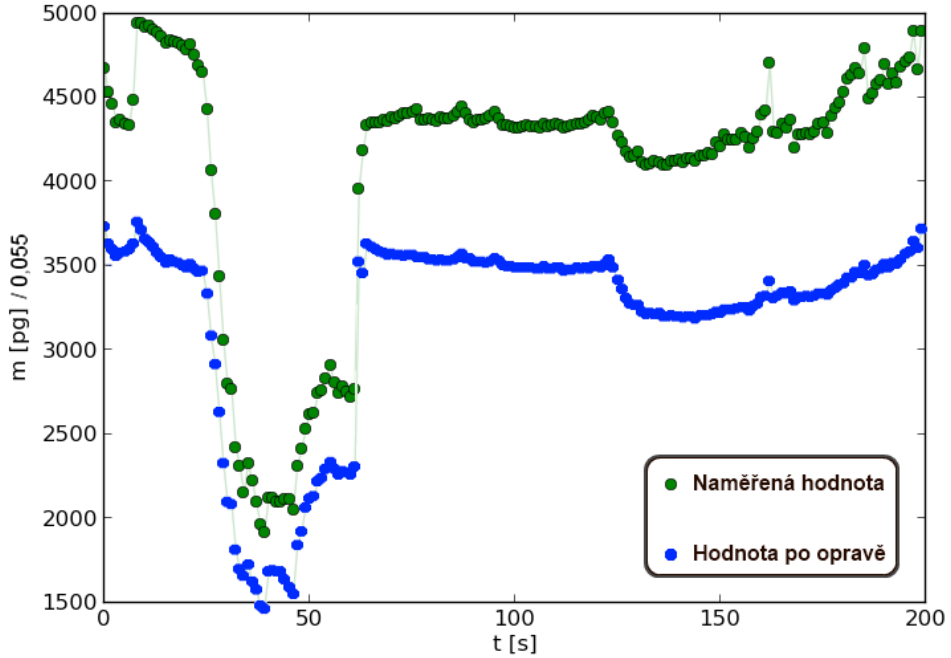
Tuto závislost ukazuje graf na obrázku 20, jeden z obrázků buněk K2 poté, co prošel opravným algoritmem je pak na obrázek 21.



Obr. 20: Graf závislosti měřené fáze (suché hmoty) buněk na čase - po opravě

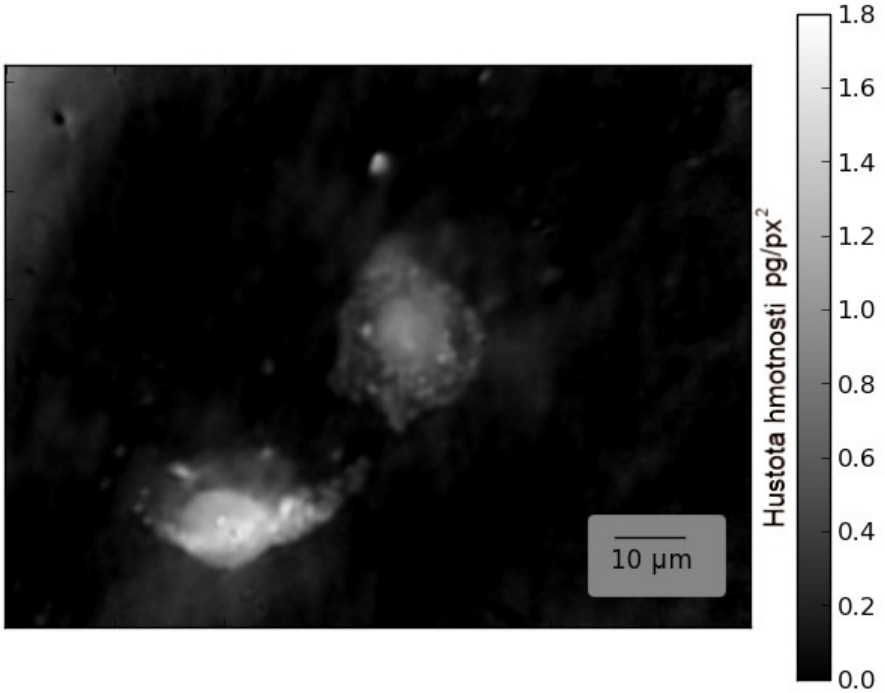
Graf na obrázku 20 ukazuje naměřenou fázi pozorovaných buněk v závislosti na čase poté, co tato data prošla korekcí. Z popisu os je vidět, že průměrná hodnota naměřené hmotnosti po korekci klesla. Zmenšil se také rozptyl zjištěných hodnot. Téměř zmizela i skoková změna v čase okolo 50 s. Data jsou tedy celkově uhlazenější.

Pro snadnější porovnání změn způsobených opravou slouží graf na obrázku 21. Ukazuje hmotnosti každého šestého snímku. Zelenou barvou jsou znázorněny hmotnosti před korekcí, modrou data po ní.

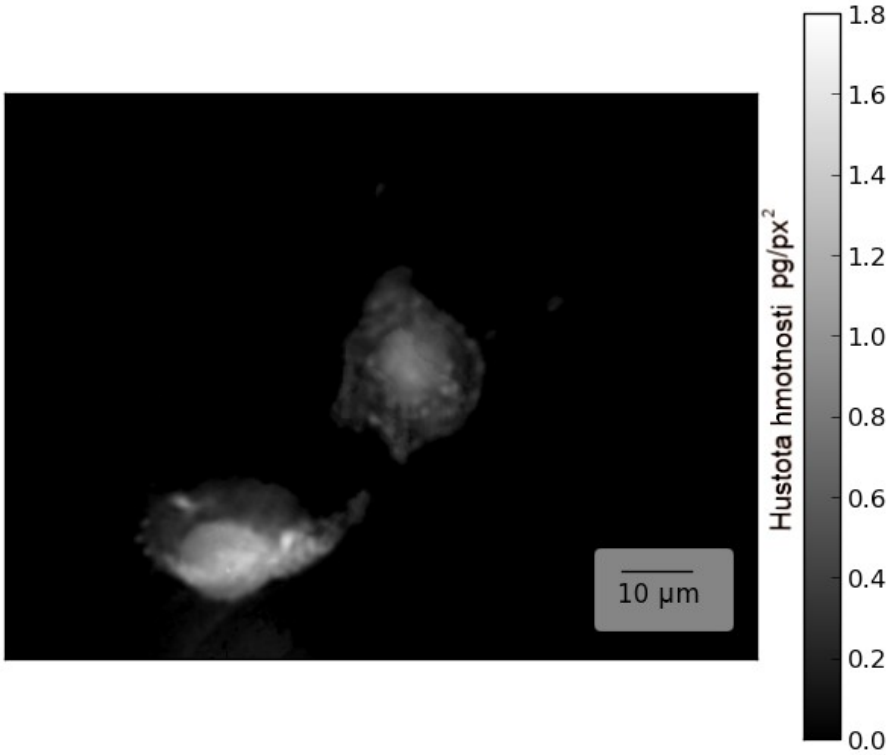


Obr. 21: Grafy závislostí měřené fáze (suché hmoty) buněk na čase - před opravou a po ní

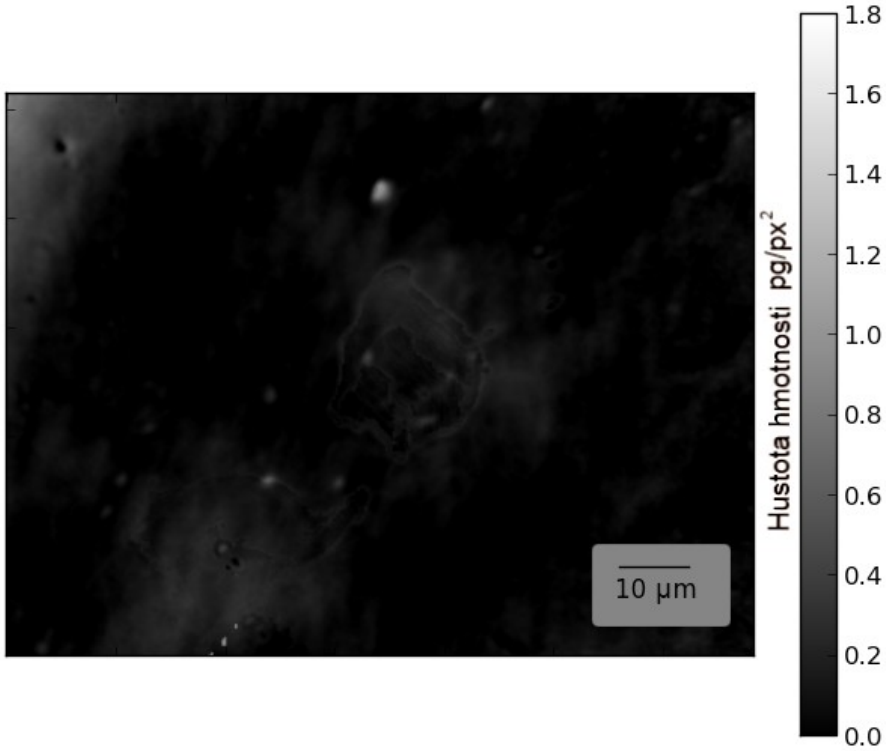
Na závěr uvádíme tři obrázky, které účinnost oprav ukazují přímo na snímcích buňky. Na prvním je buňka před korekcí, druhý ukazuje její vzhled po korekci a na třetím je vyobrazený odečítaný šum.



Obr. 22: Buňka před korekcí



Obr. 23: Buňka po korekci



Obr. 24: Odečítaný šum (viz kapitola 5.4)

Při porovnání obrázků 22 a 23 je vidět značné zlepšení. Pozadí je téměř černé a buňky jsou mnohem lépe patrné. To, že korekci ještě lze vylepšit, prozrazuje především velká tmavá čmouha pod levou dolní buňkou a dvě malé nenápadné skvrnky ležící napravo od buňky umístěné ve středu zorného pole.

Na obrázku ukazujícím odečítaný šum (24), je docela dobře patrný obrys buňky ve středu zorného pole. Nedokonalý odhad šumu lze tušit také v blízkosti jejího středu. To je způsobeno především tím, že na všech snímcích byla buňka poblíž středu zorného pole a svou polohu vůči němu příliš neměnila. Některé oblasti proto pod ní zůstaly skryty po celou dobu měření.

Kapitola 7

Závěr

V této práci se nám podařilo nasimulovat v čase proměnný šum, reprezentující vady fázového zobrazení mikroskopu, pohybující se buňku i pohyb buňky po měnícím se zašuměném pozadí. Vytvořili jsme také algoritmus na vážení buňky, využívající znalosti její polohy (její masky). K těmto datům jsme navrhli algoritmus na potlačení šumu a následně úspěšně ověřili jeho funkčnost.

Výsledný šum vzniká spojením 4 bázových šumů, jejichž tvorba je popsána v kapitole 3.1, následným prahováním a normováním (kapitola 3.2). Proměnný šum je simulován přechodem mezi dvěma ne příliš odlišnými šumy. Při simulaci lze zvolit rychlost, s jakou se šum mění (kapitola 3.3).

Funkce popisující buňku (kapitola 4.1) umožňuje snadné nastavení její polohy, šířky, výšky i jejího natočení. Díky masce, jejíž tvorba je popsána v kapitole 4.4, lze zjistit její hmotnost (kapitola 4.5). Při slučování buňky se šumem (kapitola 4.6), můžeme nastavit vliv tohoto šumu na buňku.

Při korekci šumu využíváme skutečnosti, že se buňka během měření pohybuje (kapitola 5.1). Odhadneme, jak v celém zorném poli šum vypadal v průběhu měření a poté jej odečteme od získaných experimentálních dat.

Korekce reálných dat může být pro počítač paměťově náročná. Velká paměť RAM, která umožňuje počítání s více daty najednou je pro uživatele programu výhodou. Na počítači s touto pamětí o velikosti 1 GB by, u snímků s rozlišením 342x258 px, měl počítač v závislosti na aktuálním zaplnění RAM zvládnout pojmout přibližně 300-400 souborů.

Provedli jsme korekci reálného měření, které sledovalo nádorovou buňku K2 v čase. Zjišťovaná hmotnost je negativně ovlivňována nepřesnými maskami, jejichž tvorba je velmi problematickou záležitostí. Jak ale ukazují obrázky v kapitole 6.4, je korekce docela úspěšná, ponechává však dostatek prostoru pro budoucí inovace.

Kapitola 8

Bibliografie

[1] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

[2] JEBÁČKOVÁ, A.: *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*, Brno, 2012. 59 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Vedoucí diplomové práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

[3] PROKOPOVÁ, M. *Transmisní holografický konfokální mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2002. Pojednání ke státní doktorské zkoušce. Školitel doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

[4] BARTONÍČEK, J. *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

[5] *Coherence-controlled holographic microscope*, dosupné z http://biophot.cz/sites/default/files/T-DHM.png (20.5.2013)