

## ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРЮВАННЯ КОНФОКАЛЬНОГО МІКРОСКОПА МЕТОДОМ ПРОГРАМНОЇ ОБРОБКИ

О. В. Кагановський<sup>1, а</sup>, П. В. Білан<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,  
Фізико-технічний інститут

<sup>2</sup>Державна наукова установа «Київський академічний університет»

<sup>3</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

### Анотація

Виявлення, класифікація та ідентифікація біологічних об'єктів різними методами світлової мікроскопії значним чином залежать від якості отриманих зображень. Вирішення зазначених задач майже неможливо, якщо зображення засвітлене, змазане або зашумлене. Саме тому актуальним є створення програмного комплексу для попередньої швидкої обробки зображень для поліпшення їх якості в реальному часі. В данній роботі ми пропонуємо такий комплекс для поліпшення якості знімків та відео, який заснований на двовимірному перетворенні Фур'є і розмиванні Гауса.

*Ключові слова:* програмний комплекс, інтенсивність, перетворення Фур'є, розмивання за Гаусом

### Вступ

Конфокальна мікроскопія – це унікальний сучасний метод дослідження біологічних об'єктів на клітинному рівні в стані функціональної активності. Він дозволяє отримувати оптичні зрізи товщиною менше 5 мкм в чотирьох вимірах (висота, ширина, глибина і час), диференціювати субпопуляції біологічного матеріалу, вимірювати їх товщину. Окрім того метод дає змогу візуалізувати біологічні об'єкти, оцінювати їх метаболічну активність, вивчати репаративно-відновні процеси [1].

Принцип конфокальної мікроскопії був запропонований в середині 1950-х рр. американським дослідником Мінським. Він змоделивав конфокальний мікроскоп зі скануючим рухомим предметним столиком, в якому освітлювач і об'єктив були сфокусовані на одній точці досліджуваного об'єкта, результати фіксувалися на фотоплівку. Основним недоліком цього приладу була мала швидкість сканування [2].

У 1960-х рр. цей недолік було виправлено Петраном і Еггерем, які змінили вихідну діафрагму, використавши обертовий диск Нипкова, що мав безліч центросиметричних, спірально розташованих отворів. Автори назвали даний тип мікроскопа тандемно-скануючим. Недоліками цього нового приладу були низька пропускання світла і необхідність в дуже високій точності при виготовленні і монтажі диска [3], [4].

Окрім того залишилась проблема артефактів первинного зображення, що суттєво ускладнюють подальшу його обробку.

Є два шляхи вирішення цієї проблеми:

1. Використання більш потужної цифрової камери з відео модулем.

За наявності потрібної камери можна досягти підсилення оптичного сигналу без збільшення шуму під час передачі даних і забезпечення високошвидкісної зйомки в умовах ультраяскравого світла. Відео модуль полегшить роботу і обробить інформацію недоступну оку. Чим досконаліший алгоритм обробки знімка, тим якісніше зображення. Проте потенціал відео блоку розкривається тільки з хорошими оптичними параметрами системи. Якщо у об'єктива мала роздільна сила, він пропускає мало світла, значить відео модуль не зніме гідне зображення і так далі. Оснащення лабораторії подібним обладнанням коштує чималу суму грошей (десятки тисяч доларів), тому створення програмного забезпечення, яке зможе істотно поліпшити кінцевий знімок, зроблений камерою мікроскопа є одним з кращих виходів з даної ситуації.

2. Окрема програмна обробка первинного зображення.

Математичний апарат спрощує фазовий аналіз, дозволяє обробляти результати вимірювання об'єктів з різною текстурою, зшиває панорамні знімки всього зразка і 3D моделі.

### 1. Алгоритми усунення дефектів

Визначимо три основних дефекти первинного зображення – низькі контрастність та яскравість, підвищений рівень шумів та розмитість.

<sup>а</sup>alexey.kv29@gmail.com

### 1.1. Фільтрація за двовимірним перетворенням Фур'є

Зображення зазвичай складається з масиву структурних одиниць (пікселів), кожен з яких визначається набором значень: червоним, зеленим, синім. Таким чином, кожен з кольорових каналів містить набір значень інтенсивності або шкали сірого. Також це відомо як растрове зображення в просторовій області. Таким чином зауважимо, що зображення визначається значеннями інтенсивності, яке воно має у кожному положенні в просторі. Але картину також може бути представлено іншим способом, відомим як «частотна область зображення». У цій області кожен канал представлений у вигляді синусоїдальних хвиль, а тоді функція може бути представлена суперпозицією синусоїдальних хвиль. У такій частотній області кожен канал має значення амплітуди, які зберігаються у місцях, описаних не просторовими координатами, а « $X$ ,  $Y$  частотами». Оскільки це цифрове представлення, частоти є кратними найменшої або одиничної частоти, а координати пікселів представляють індекси або цілі кратні множини цієї одиничної частоти [5].

Для роботи, будь-яке зображення, що не є квадратним, або зображення з непарним розміром буде заповнено за допомогою віртуальних пікселів квадратним значенням максимальної ширини або висоти зображення. Щоб забезпечити належне центрування джерела в центрі зображення, він також повинен мати рівні розміри.

На основі перетворення Фур'є можна робити фільтрацію сигналів. Зображення з камери є функція амплітуди світлової хвилі від двох координат  $I(x, y)$ .

Після застосування зворотного перетворення Фур'є, зображення необхідно обрізати до його початкових розмірів, щоб видалити заповнення.

Оскільки перетворення Фур'є складається з комплексних чисел, результат перетворення не може бути візуалізовано безпосередньо. Тому комплексне перетворення розділяється на два роздільних зображення.

Нормальне математичне представлення комплексних чисел являє собою пару значень з плаваючою точкою, що складаються з "реальних- $(a)$  і "уявних- $(b)$  компонентів. На жаль, ці два числа можуть містити негативні значення і, таким чином, не утворюють видимих зображень. Пряме числове представлення комплексних чисел не дуже корисно для роботи із зображеннями. Але при виведенні значень на двовірну площину можна конвертувати в полярне, що складається з компонентів «Величина» ( $r$ ) і «Фаза» ( $\varphi$ ) [6].

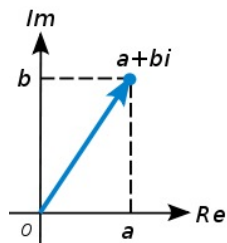


Рис. 1. Нормальне математичне представлення комплексних чисел

Ця форма дуже корисна при обробці зображення, особливо компонента амплітуди, що по суті визначає всі частоти, які йдуть на формування зображення. Компонент величини містить тільки позитивні значення і тільки безпосередньо зіставляється зі значеннями зображення. Вона не має фіксованого діапазону значень, хоча, за винятком кольору або нульової частоти, значення, як правило, будуть досить малими.

Шляхом масштабування величини і застосування логарифмічного перетворення значень інтенсивності, зазвичай потрібно вивести будь-яку візуальну деталь. Логарифмічно перетворену картину величини називають спектром. Однак слід пам'ятати, що для зворотного перетворення має використовуватися зображення величини, а не спектра.

Нульова частота, колір, який з'являється в центрі, буде середнім значенням кольору для всього зображення. Крім того, оскільки вхідні зображення не містять уявних компонентів, значення фази також завжди матиме нульову фазу, створюючи чисто сірий колір. Компонент фази, знаходиться в діапазоні від  $-\pi$  до  $\pi$ . На це спочатку впливають змінюючи діапазон на від 0 до  $2\pi$ . Внаслідок цього нульова фаза буде мати тільки сіру величину (відповідну кожному каналу), в той час як від'ємна фаза буде чорною (0) величиною, на чому фільтрування і буде завершено.

### 1.2. Фільтрація за розмиванням Гауса

Шум – це хаотичні коливання, що відрізняються складністю часової і спектральної структури. Щоб відфільтрувати зображення та позбутися цього ефекту, ми використали метод Гауса.

Гаусове розмивання (матрична згортка) з  $\sigma = 1$  (піксель) – це є ні що інше як просторовий фільтр низьких частот. Він пропускає низькі частоти – тобто переходи інтенсивності з великим кроком будуть видимі, а піксельний шум – ні.

У згорці дві математичні функції об'єднуються для отримання третьої. При обробці зображень, функції зазвичай називаються ядрами. Ядро – це ні що інше, як квадратний масив пікселів (так би мовити, маленьке зображення). Зазвичай значення в ядрі складаються в одиницю. Це зроблено для того, щоб переконатися, що енергія не додається і не видаляється з зображення після операції. Зокрема, ядро Гауса (кернел) являє собою квадратний масив пікселів, де значення пікселів відповідають значенням кривої Гауса (в 2D).

Кожен піксель в зображенні множиться на ядро Гауса. Це робиться шляхом розміщення центрального пікселя ядра на пікселі зображе-

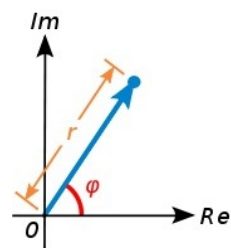


Рис. 2. Представлення комплексних чисел у полярних координатах

ння і множення значень в первинному зображенні на пікселі в ядрі, що перекриваються. Значення, отримані в результаті цих умножень, підсумовуються, і цей результат використовується для значення в цільовому пікселі. Дивлячись на зображення, ви повинні помножити значення в  $(0,0)$  у вхідному масиві на значення в  $(i)$  в масиві ядра, значення в  $(1,0)$  у вхідному масиві на значення в  $(h)$  в масиві ядра і так далі. і потім додайте всі ці значення, щоб отримати значення для  $(1,1)$  на вихідному зображенні.

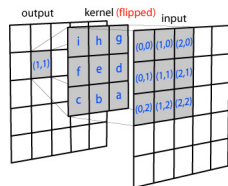


Рис. 3. Схема утворення кінцевого зображення за згорткою

Треба зазначити, що чим більше ядро, тим більш витратна операція. Таким чином, чим більше радіус розмиття, тим більше часу займе цей процес.

Як було пояснено вище, згортання можна зробити, помноживши кожен вхідний піксель на все ядро. Однак якщо ядро симетричне (яким є ядро Гауса), ви можете також множити кожну вісь  $(x)$  та  $(y)$  незалежно, що зменшить загальну кількість множень. У правильному математичному плані, якщо матриця відокремлена, її можна розкласти на  $(M \times 1)$  та  $(1 \times N)$  матриці. Тобто ми множимо кожен піксель у вхідному зображенні на обидва ядра та додаємо отримані значення, щоб обрахувати значення для вихідного пікселя.

### 1.3. Афінні перетворення зображень

При роботі зі знімком біологічного матеріалу важливим завданням є перетворення як всього зображення в цілому, так і його окремих фрагментів: переміщення, поворот навколо заданого центру, зміна лінійних розмірів і т.д. Також результатом роботи з конфокальним мікроскопом може бути і тривимірне зображення, звідки впливає задача дослідження об'єкту з різних кутів зору. Дані завдання вирішуються використанням афінних перетворень.

Афінні перетворення на площині можна записати в матричному вигляді:

$$\begin{cases} X = Ax + By + C \\ Y = Dx + Ey + F. \end{cases}$$

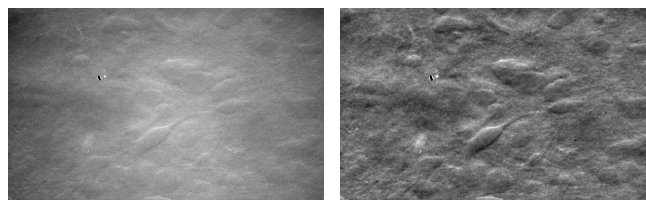
де  $A, B, C, D, E, F$  – деякі константи

Якщо перетворення проводиться над системою координат, то значення  $(x, y)$  з системи рівнянь інтерпретуються як координати точки в старій системі координат, а значення  $(X, Y)$  – координати точки в новій системі координат. Перетворенню можуть піддаватися ще й самі об'єкти дослідження (тобто фрагменті первинного зображення). При перетвореннях об'єктів на площині за  $(x, y)$  приймемо координати точки до перетворення,  $(X, Y)$  – нові координати точки після перетворення [7].

## 2. Результати обробки

Створений на основі, вище приведенного математичного апарату, програмний комплекс було використано для вивчення нервової клітини з сомою рівною 20 мкм.

Результат оптимізації первинного зображення цієї клітини, одержаного методом конфокальної мікроскопії в реальному часі представлено на рисунках 4а і 4б.



(а) До обробки

(б) Після обробки

Рис. 4. Результат обробки первинного зображення

Порівнюючи їх ми спостерігаємо значне поліпшення глибини, а також контрастності зображення. Більш різкі та виражені контури окремої живої клітини дають можливість одержати якісну візуальну інформацію навіть при такому малому розмірі об'єкту.

## Висновки

Використання таких складових математичного апарату як двовимірне перетворення Фур'є, Гаусове розмиття і афінне перетворення дозволяє створити спеціальний програмний комплекс обробки первинного зображення конфокального мікроскопу. Як результат, з'являється можливість істотно поліпшити візуалізацію біологічного об'єкту з метою одержання більш інформативних даних.

## Перелік використаних джерел

1. Jalbert I. In vivo corneal microscopy of human cornea – 2003 P. 225-236
2. Lemp, M.A. and Dilly, P.N. and Boyde, A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea – 1985. – P. 205-209
3. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope – 1988. – P. 128-138
4. Egger, M.D. and Petran M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cell – 1967. – P. 306-307
5. Гудмен Дж. Введение в Фурье-оптику – 1970.
6. Дмитриев А.Л. Оптические методы обработки информации. Учебное пособие – 2005.
7. Кудрина, М.А. and Мурзин А.В. Аффинные преобразования объектов в компьютерной графике – P. 1-2.