

Kvazispektrální analýza v digitální světelné mikroskopii

Dalibor Štys, Kirill Lonhus, Renata Štysová Rychtáriková

ATCZ215 – ImageHeadstart



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



ÚTAM AV ČR, v. v. i., Centrum excellence Telč

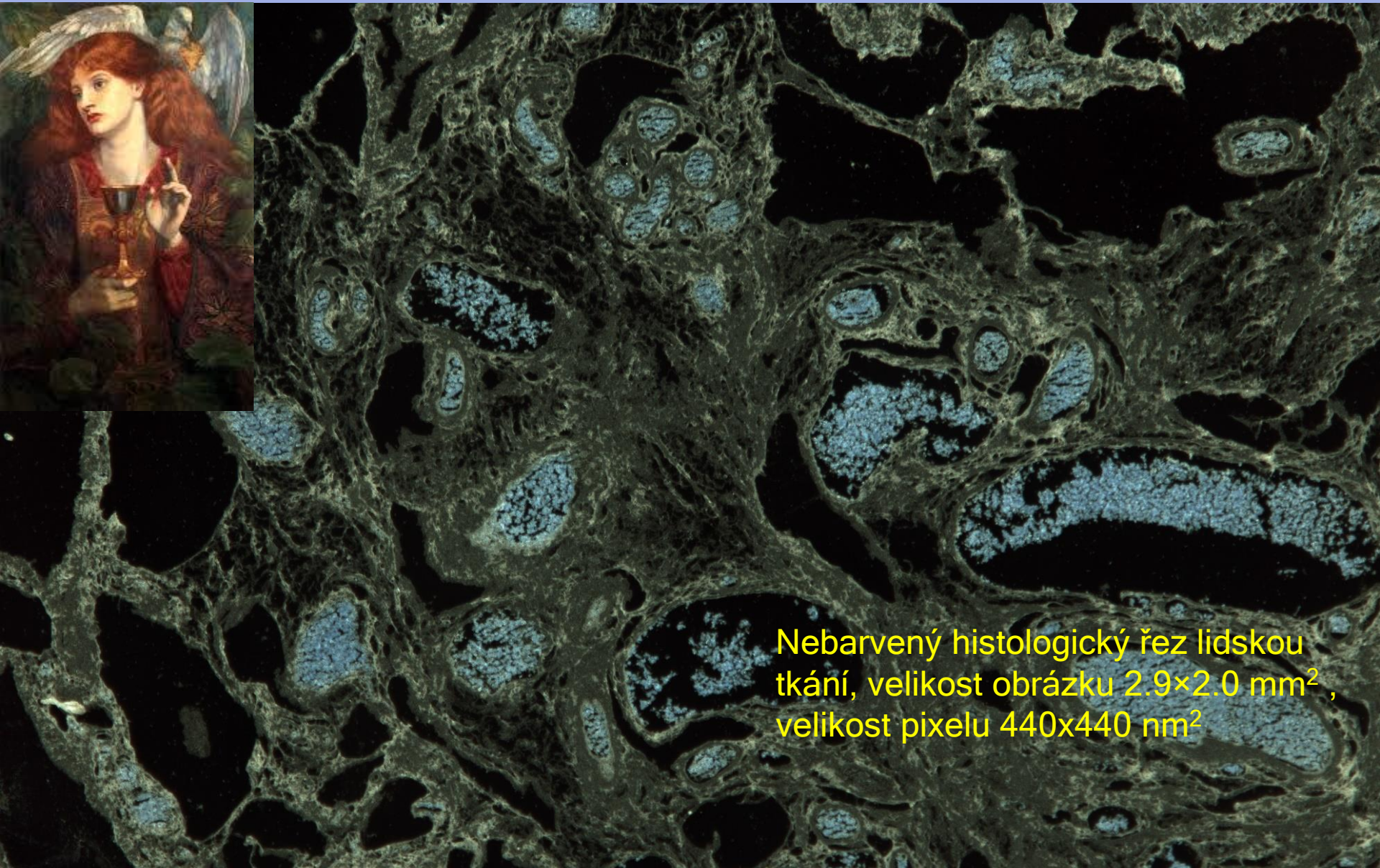


Donau-Universität Krems
Universität für Weiterbildung



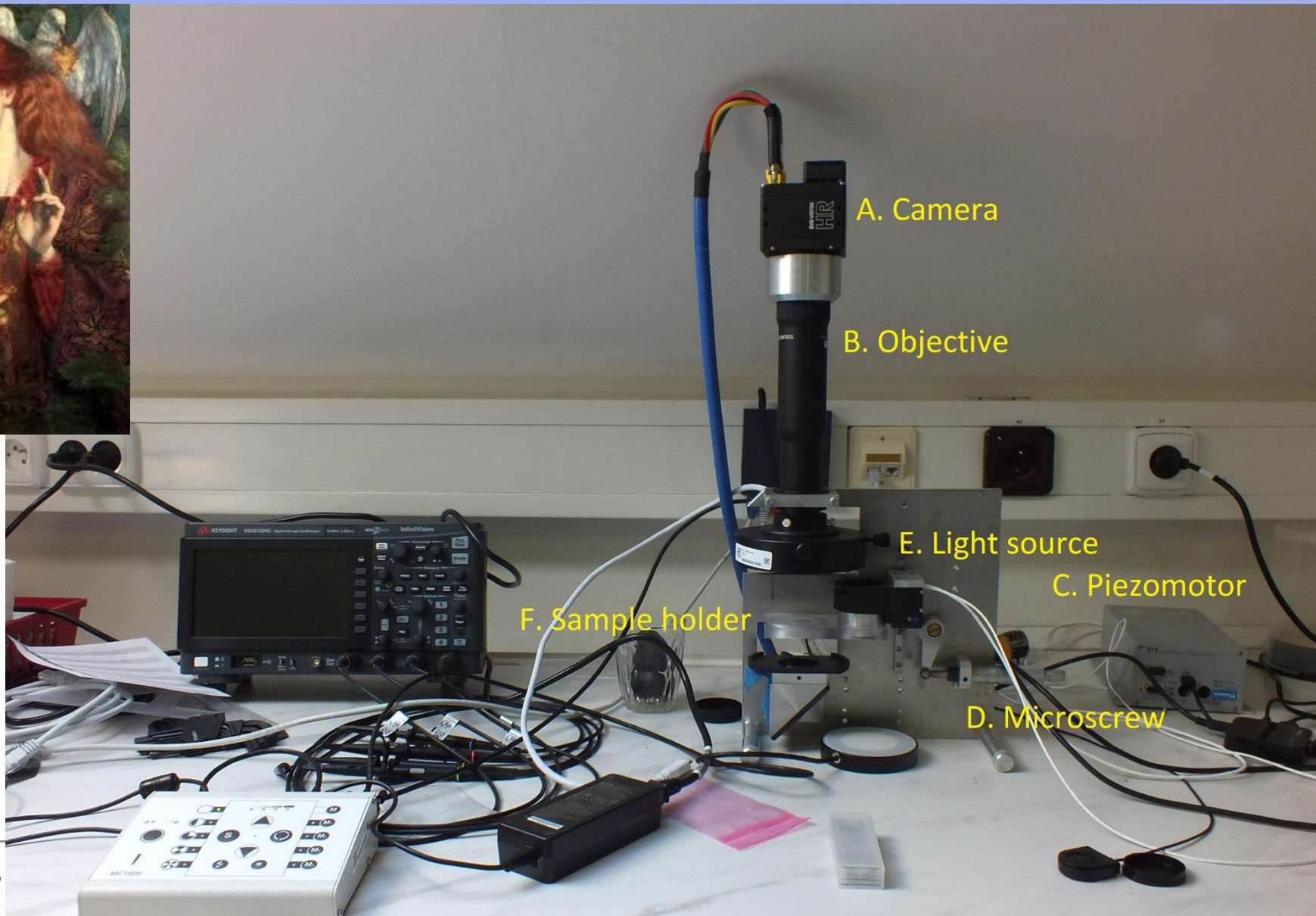
UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES
UPPER AUSTRIA
RESEARCH & DEVELOPMENT

Svatý grál světelné mikroskopie: velká scéna a zároveň superrozlišení, jasně pochopitelné obrázky a skvělá vizualizace pro šéfy a uživatele



Nebarvený histologický řez lidskou tkání, velikost obrázku $2.9 \times 2.0 \text{ mm}^2$, velikost pixelu $440 \times 440 \text{ nm}^2$

Svatý grál světelné mikroskopie – robustní a jednoduchý přístroj, který můžete kamkoliv umístit



A. Camera

B. Objective

E. Light source

C. Piezomotor

F. Sample holder

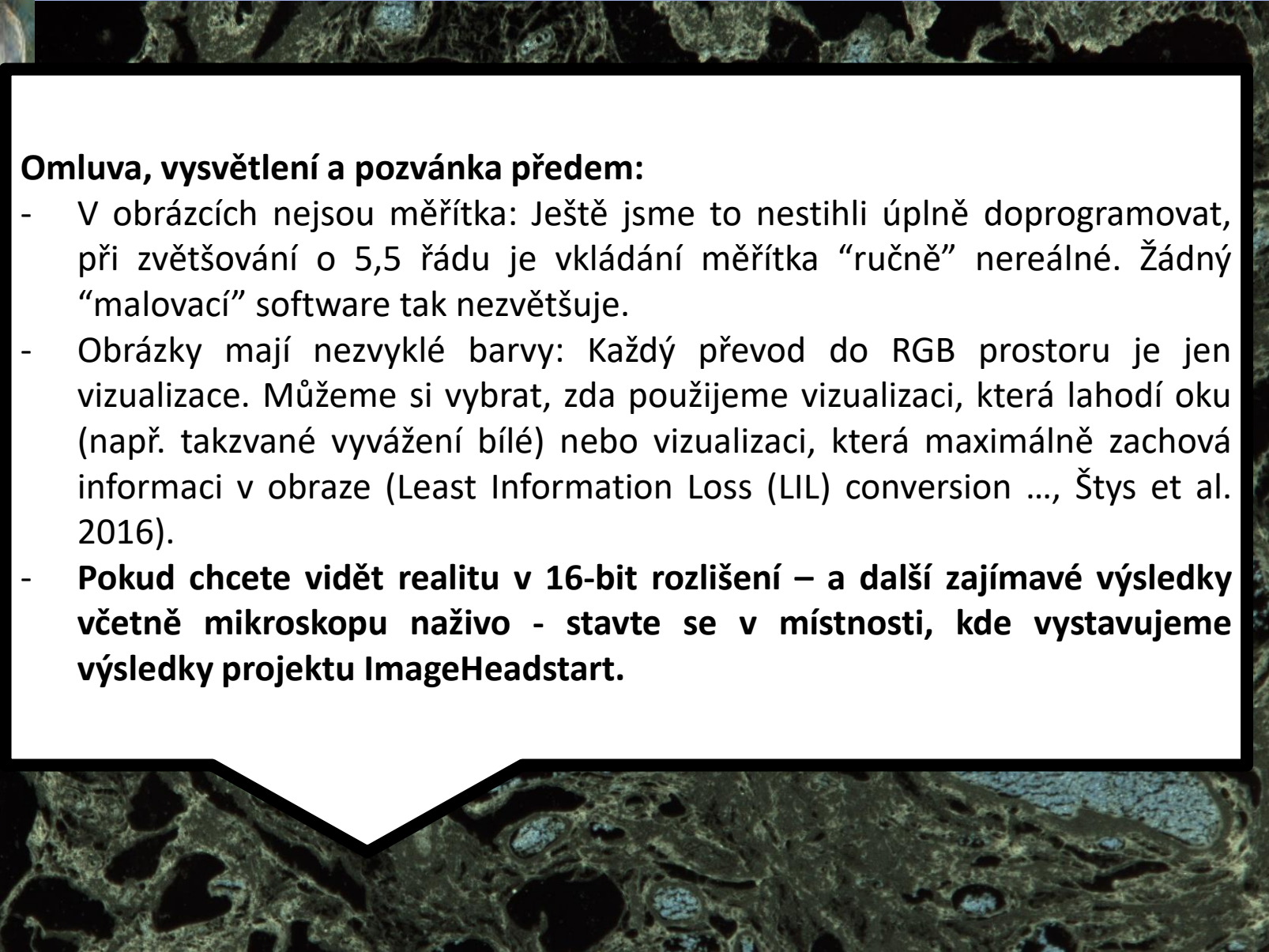
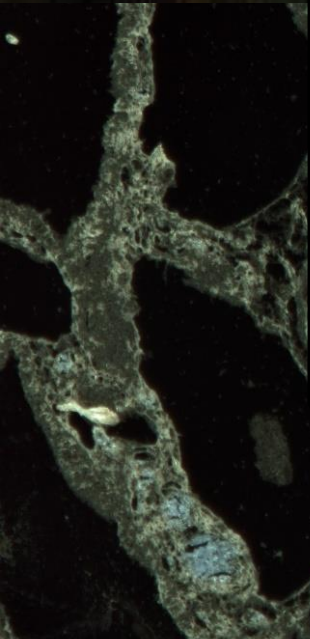
D. Microscrew

Svatý grál světelné mikroskopie: velká scéna a zároveň superrozlišení, jasně pochopitelné obrázky a skvělá vizualizace pro šéfy a uživatele



Omluva, vysvětlení a pozvánka předem:

- V obrázcích nejsou měřítka: Ještě jsme to nestihli úplně doprogramovat, při zvětšování o 5,5 řádu je vkládání měřítka “ručně” nereálné. Žádný “malovací” software tak nezvětšuje.
- Obrázky mají nezvyklé barvy: Každý převod do RGB prostoru je jen vizualizace. Můžeme si vybrat, zda použijeme vizualizaci, která lahodí oku (např. takzvané vyvážení bílé) nebo vizualizaci, která maximálně zachová informaci v obraze (Least Information Loss (LIL) conversion ..., Štys et al. 2016).
- Pokud chcete vidět realitu v 16-bit rozlišení – a další zajímavé výsledky včetně mikroskopu naživo - stavte se v místnosti, kde vystavujeme výsledky projektu ImageHeadstart.



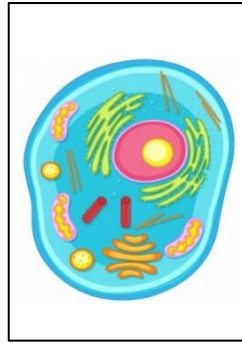
Model optického měření

Light source



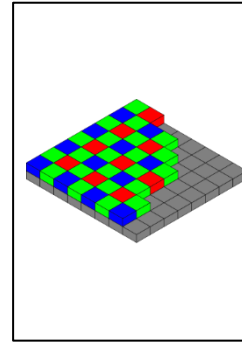
Spectrum
 $S(\lambda)$

Sample



Transparency
 $T(\lambda)$

Sensor filter



Transparency
 $F_c(\lambda)$

Signal

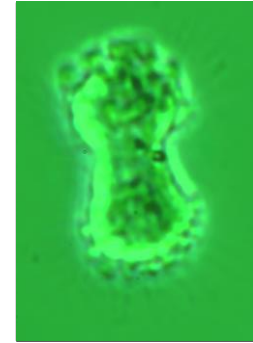


Image
 I_c



$$\sum_{c=1}^3 \int_{\lambda_-}^{\lambda_+} S(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot F_c(\lambda) d\lambda - I_c = 0$$

32 numbers

3 numbers (R, G, B)

Model měření

Should be minimized

Number of neighbours in consideration

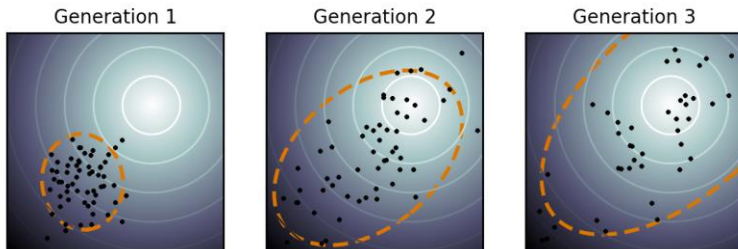
Root mean square between pixels m and n

Spectrum discretization

Variable

L2 norm

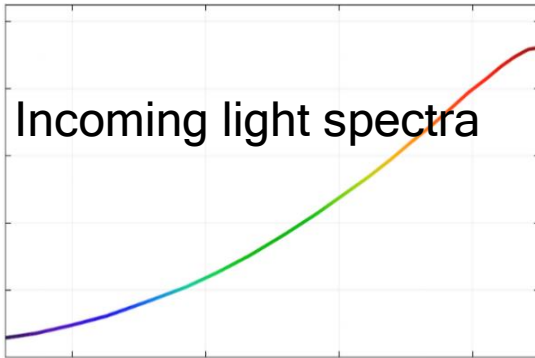
$$F_m = \underbrace{\sum_{c=1}^3 \exp \left| \int_{360}^{700} S(\lambda) F_c(\lambda) T_m(\lambda) d\lambda - I_c \right|}_{\text{Integral part}} + \underbrace{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \left\{ R_{mn} \sum_i^{32} (T_m(\lambda_i) - T_n(\lambda_i))^2 \right\}}_{\text{Mean field part}}$$



The pixel-wise optimization is done iteratively via CMA-ES algorithm

Lonhus K., Rychtáriková R., Platonova G., Štys D. Quasi-spectral characterization of intracellular regions in bright-field light microscopy images. Sci Rep 10, 18346 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75441-7>

Aplikace na mikroskopická data



32 wavelengths

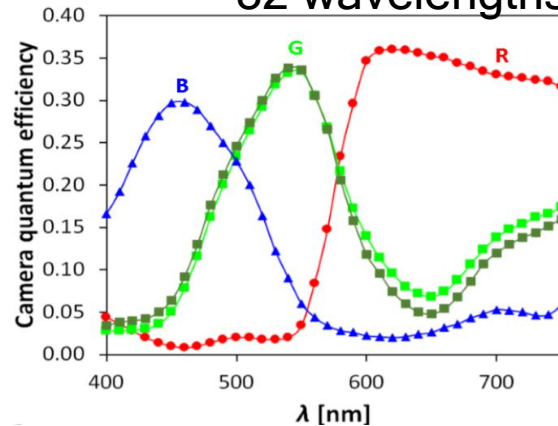
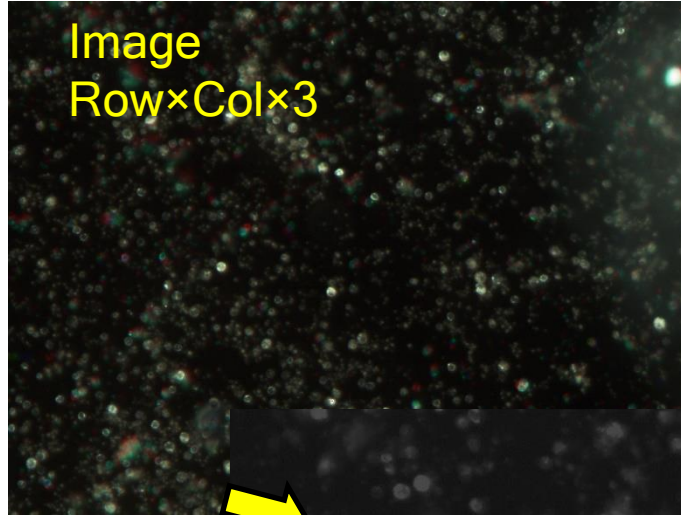


Image
Row×Col×3



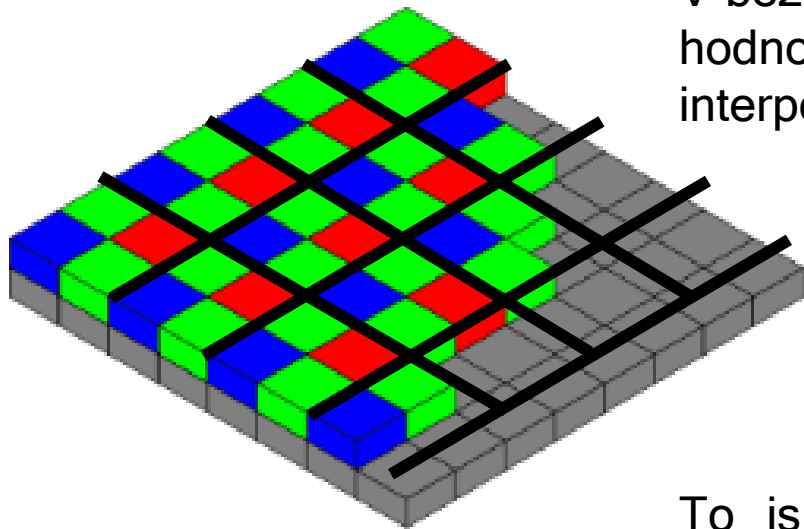
Images at wavelengths
400–680 nm



Method input

Velikost pixelu 110×110 nm²

Naivní demosaikování



V běžných vizualizačních softwarech se “chybějící” hodnoty intenzit pro jednotlivé pixely dopočítávají interpolací.

To jsme nikdy nedělali. V našich dosavadních softwarech jsme používali “naivní” demosaikování a proto jsme měli 4× menší obrázky. Také v prvním článku o kvazispektrální analýze (Lonhus et al. 2020) jsme použili naivní demosaikování. Jelikož ale optimalizujeme přes celý obrázek, problém nesprávného vzorkování je do značné míry eliminován. Jelikož obrázek má přes 120×10^6 pixelů, lze asi říci, že problém je zanedbatelný.

Seminaivní vzorkování a interpolace ve 32-rozměrném prostoru.

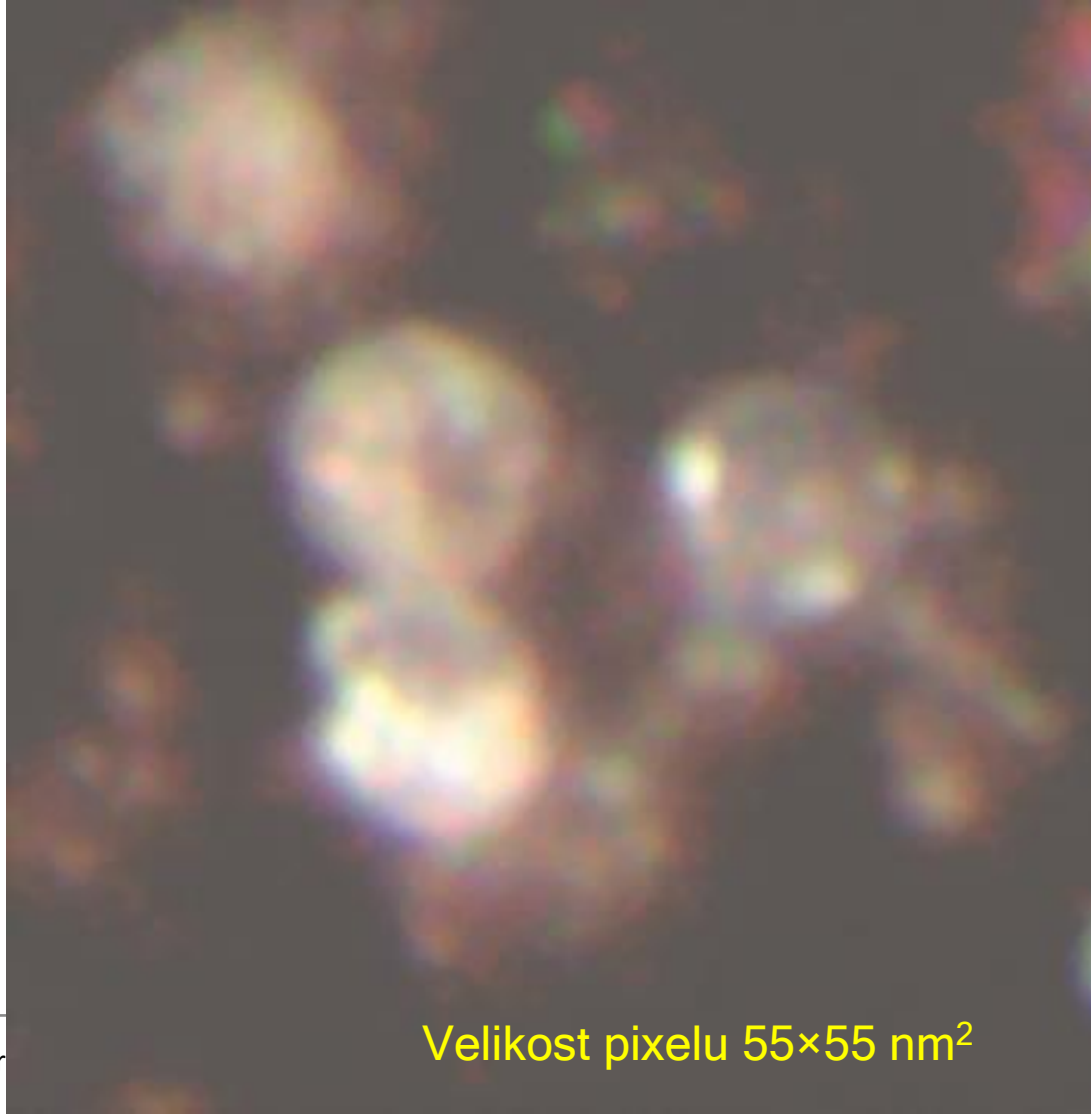
Navíc můžeme posunout rámec o jeden pixel a dostat nové vzorkování. Pak, aniž bychom se zprotivili jakýmkoliv zásadám práce s primárními daty, dostaneme původní rozlišení. Navíc si kvazispektrální analýzou kompenzujeme možné technické nedokonalosti kamery.

Mějme stále na paměti, že standardní uživatelská data jsou interpolovaná. Uživatelé jsou na interpolování a vyhlazování zvyklí.

My máme pro každý bod (např.) 32 hodnot. Pokud teď interpolujeme, děláme to v 32-rozměrném prostoru a výsledek vizualizujeme v 3D prostoru RGB. Oproti 3D je ve 32D spousta místa, a tak je interpolace velmi jednoznačná. Troufli jsme si zatím vložit mezi naměřené body dva další. **V praxi** máme mnohem více experimentálních chyb z jiných zdrojů.

32 obrázků pro každou rovinu ostrosti – jak to využít, aby se to šéfovi a zákazníkům líbilo?

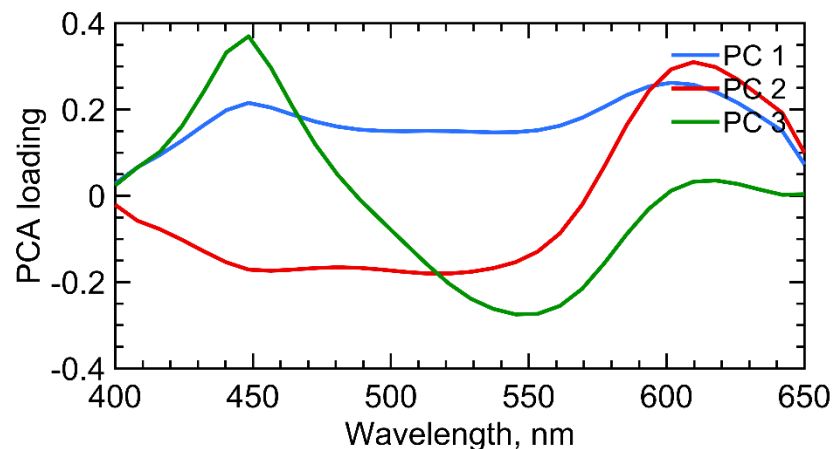
Například můžeme standardizovat vizualizace – třeba jako kdyby zdrojem
světla bylo slunce ($T = 5800\text{ K}$)



Nebo můžeme hledat největší kontrast

Analýza hlavní komponenty – G =
PC1, R = PC2, B = PC3

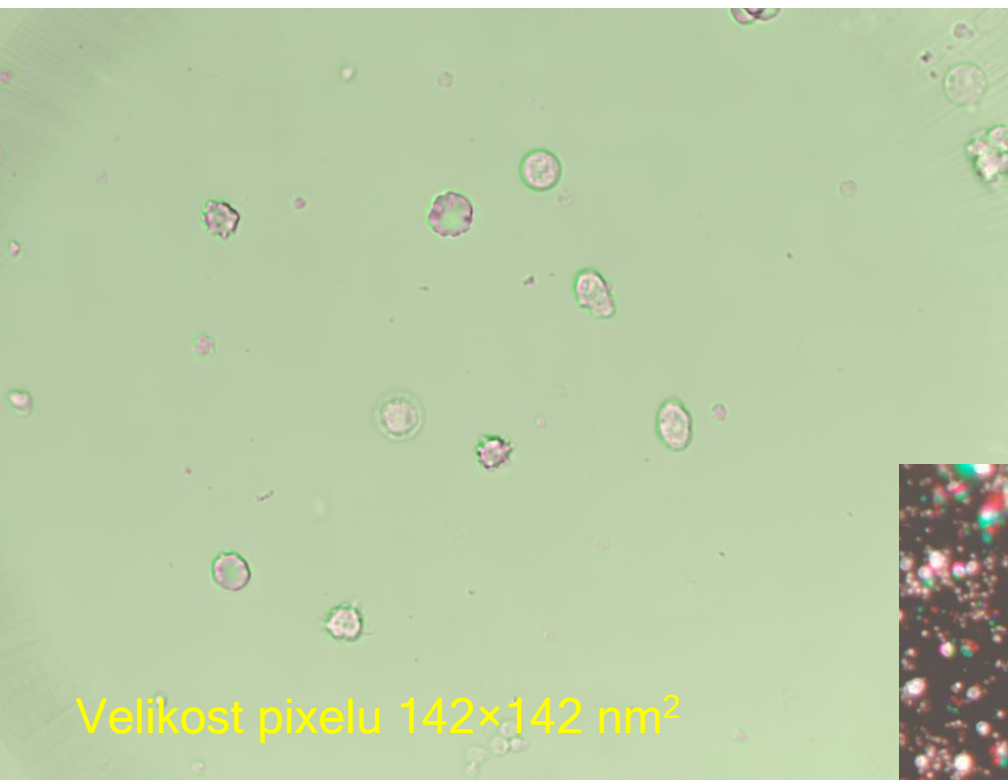
PCA v RGB



PC1 obrázek ve
spektrálně
homogenním
zdroji světla

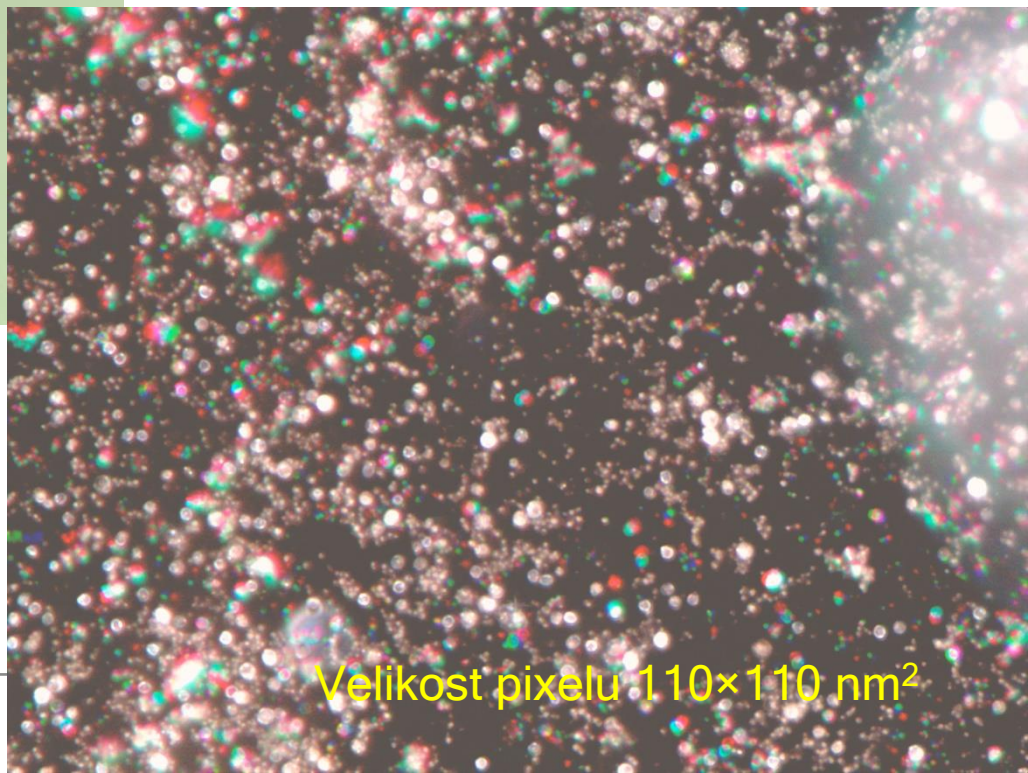
PC2 Největší
dosažitelný kontrast

Telecentrický a “biologický” objektiv



Velikost pixelu $142 \times 142 \text{ nm}^2$

Biologický objektiv, procházející světlo, videozesílení.



Velikost pixelu $110 \times 110 \text{ nm}^2$

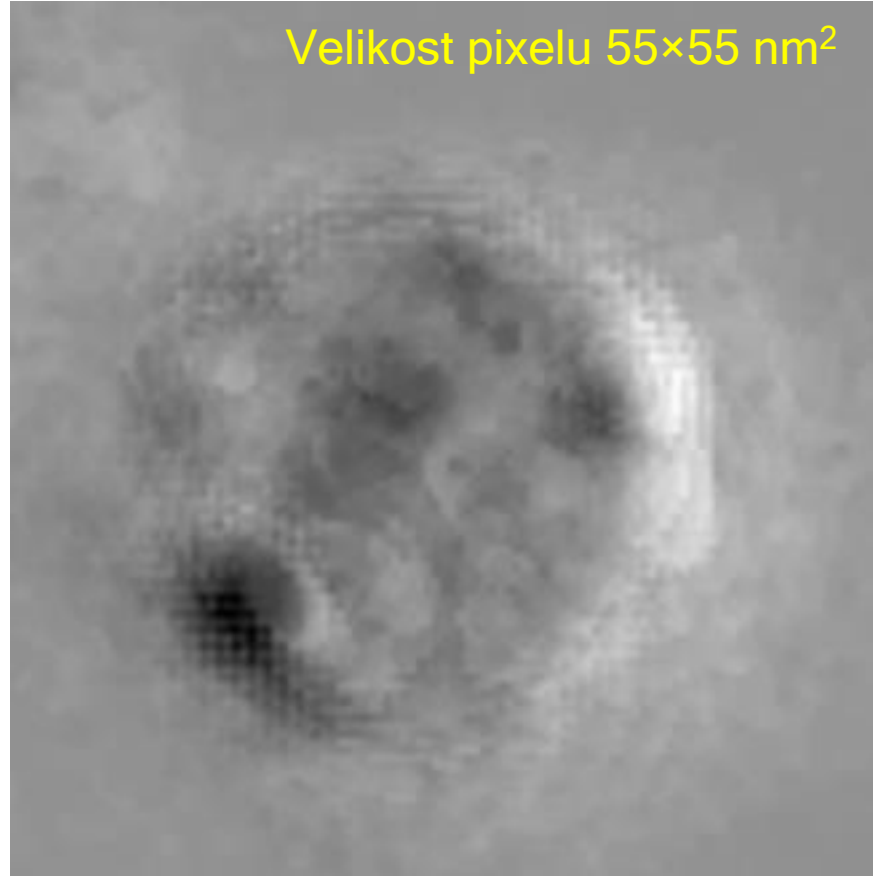
PC2 biologický vs telecentrický objektiv po fúzi rovin zaostření, CD4 lymfocyt

Velikost pixelu $71 \times 71 \text{ nm}^2$



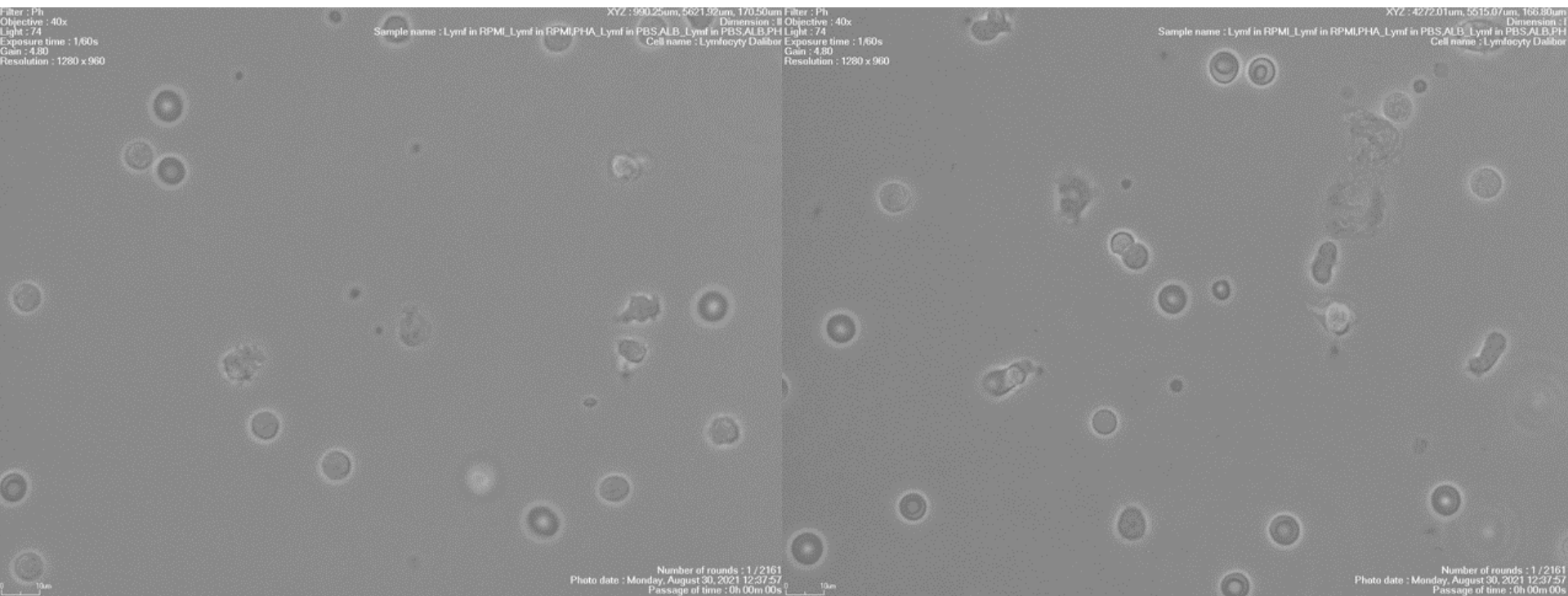
Biologický objektiv, procházející
světlo, videozesílení

Velikost pixelu $55 \times 55 \text{ nm}^2$



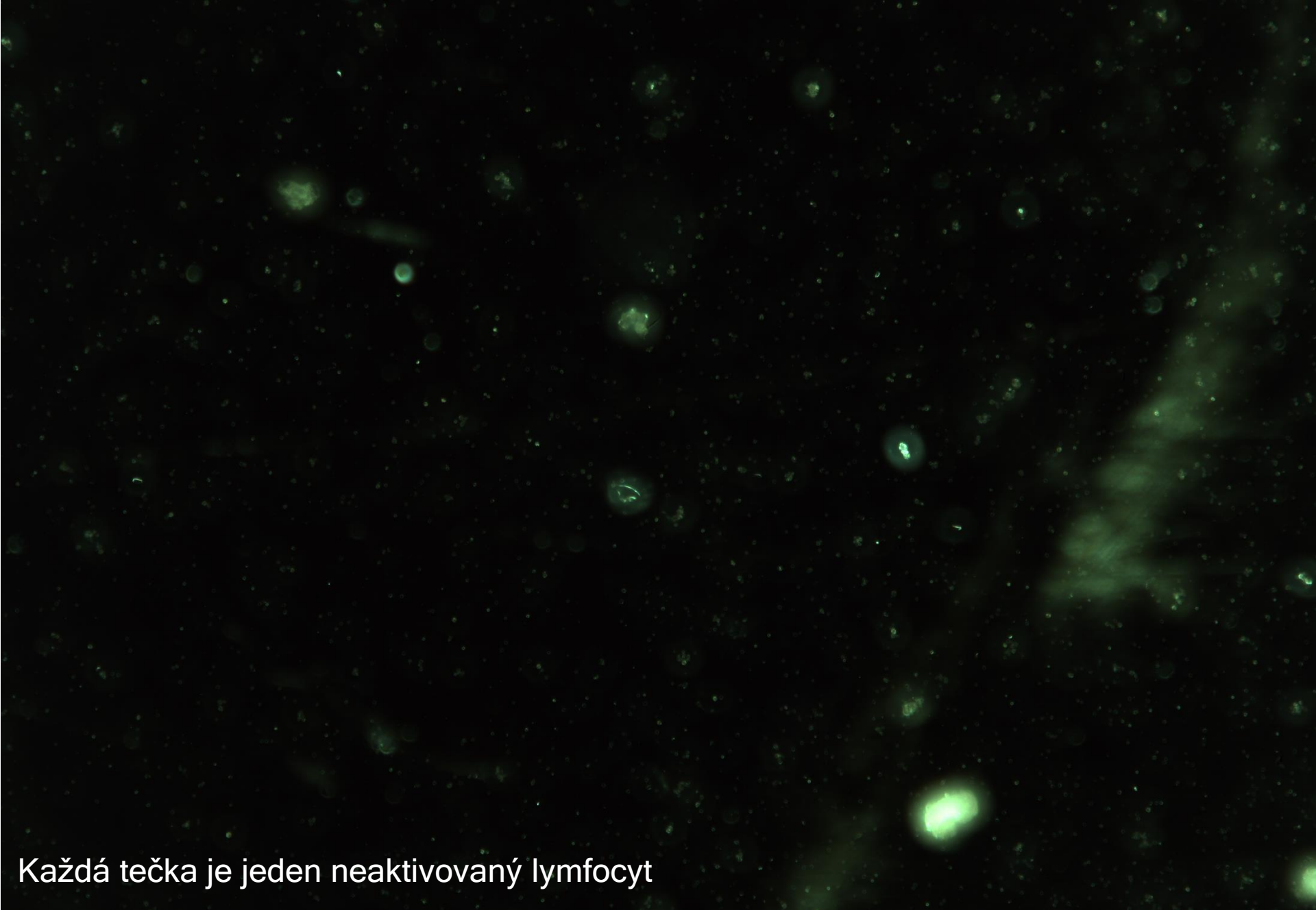
Telecentrický objektiv,
odražené světlo, fúze rovin
zaostření

Snímání živých buněk



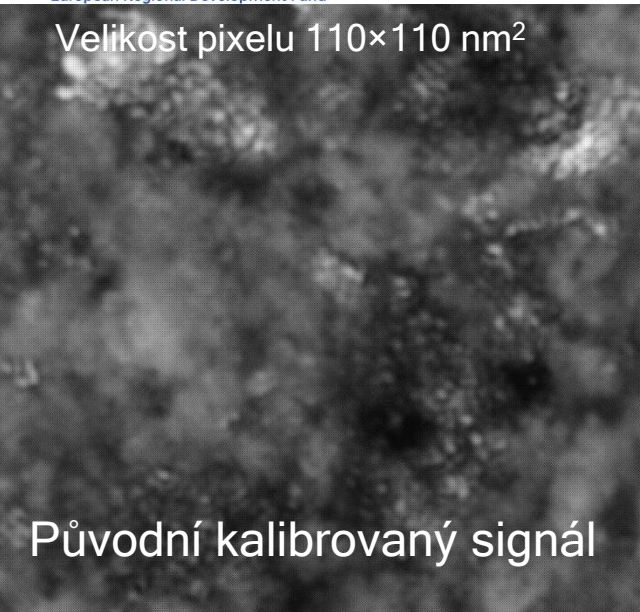
Neaktivované lymfocyty

Aktivované lymfocyty



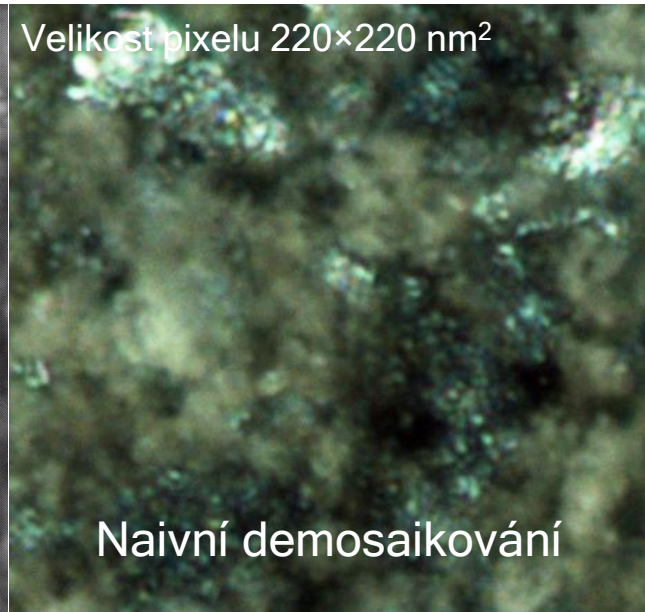
Každá tečka je jeden neaktivovaný lymfocyt

Velikost pixelu $110 \times 110 \text{ nm}^2$



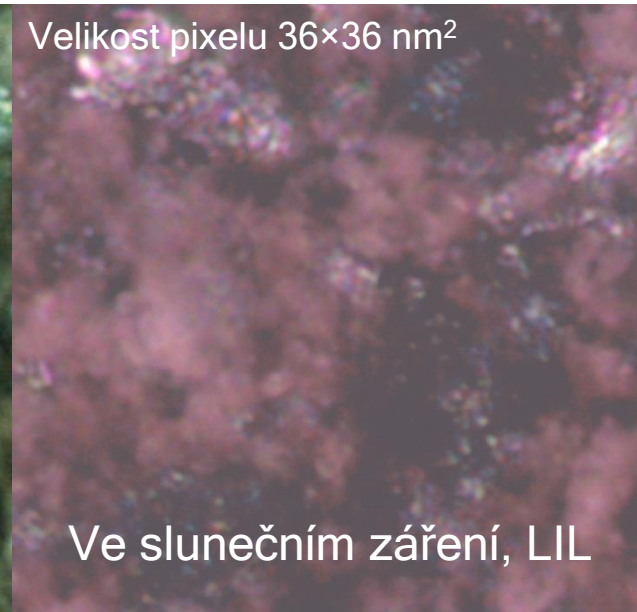
Původní kalibrovaný signál

Velikost pixelu $220 \times 220 \text{ nm}^2$



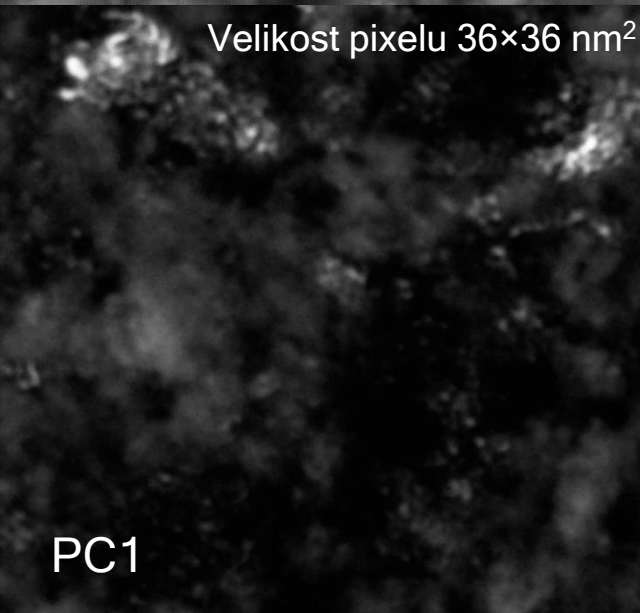
Naivní demosaikování

Velikost pixelu $36 \times 36 \text{ nm}^2$



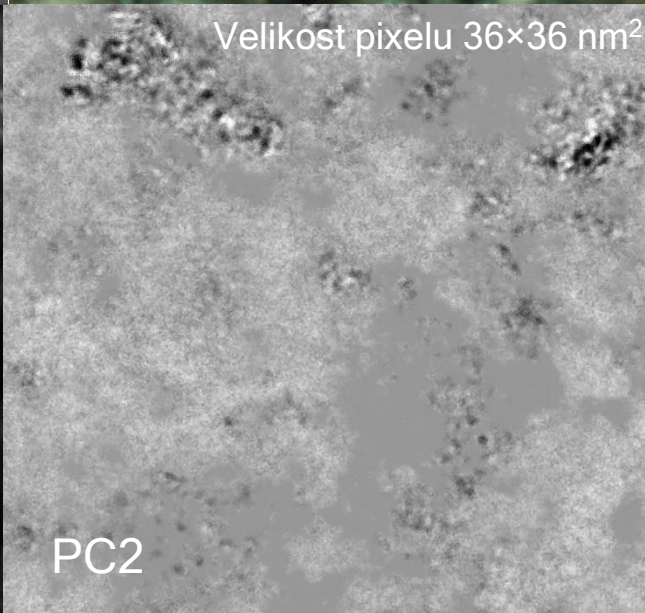
Ve slunečním záření, LIL

Velikost pixelu $36 \times 36 \text{ nm}^2$



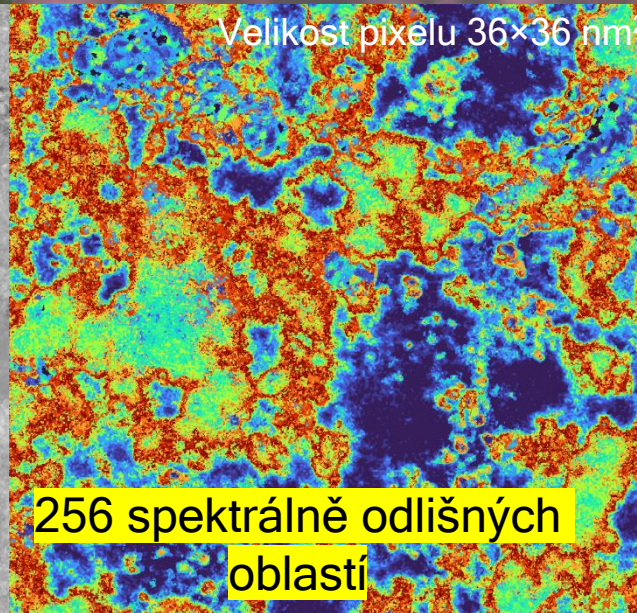
PC1

Velikost pixelu $36 \times 36 \text{ nm}^2$



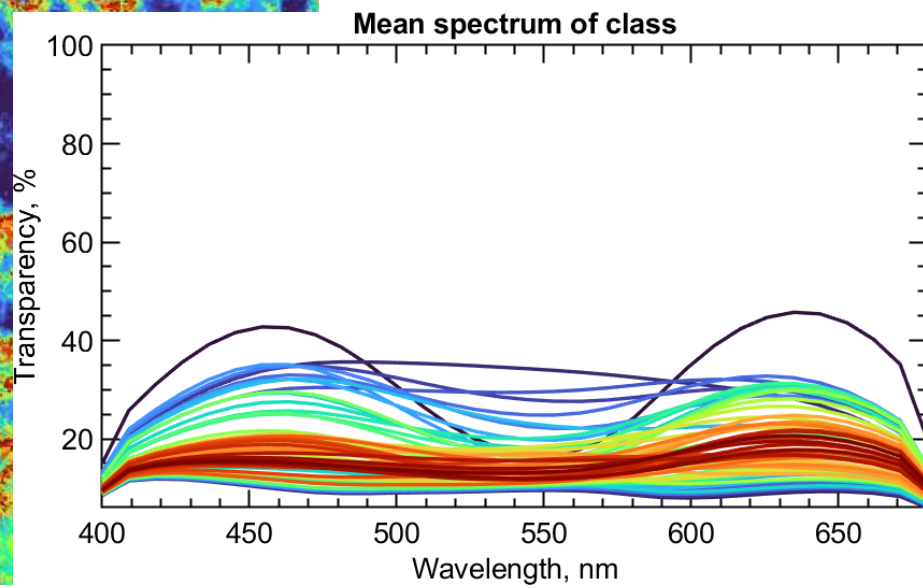
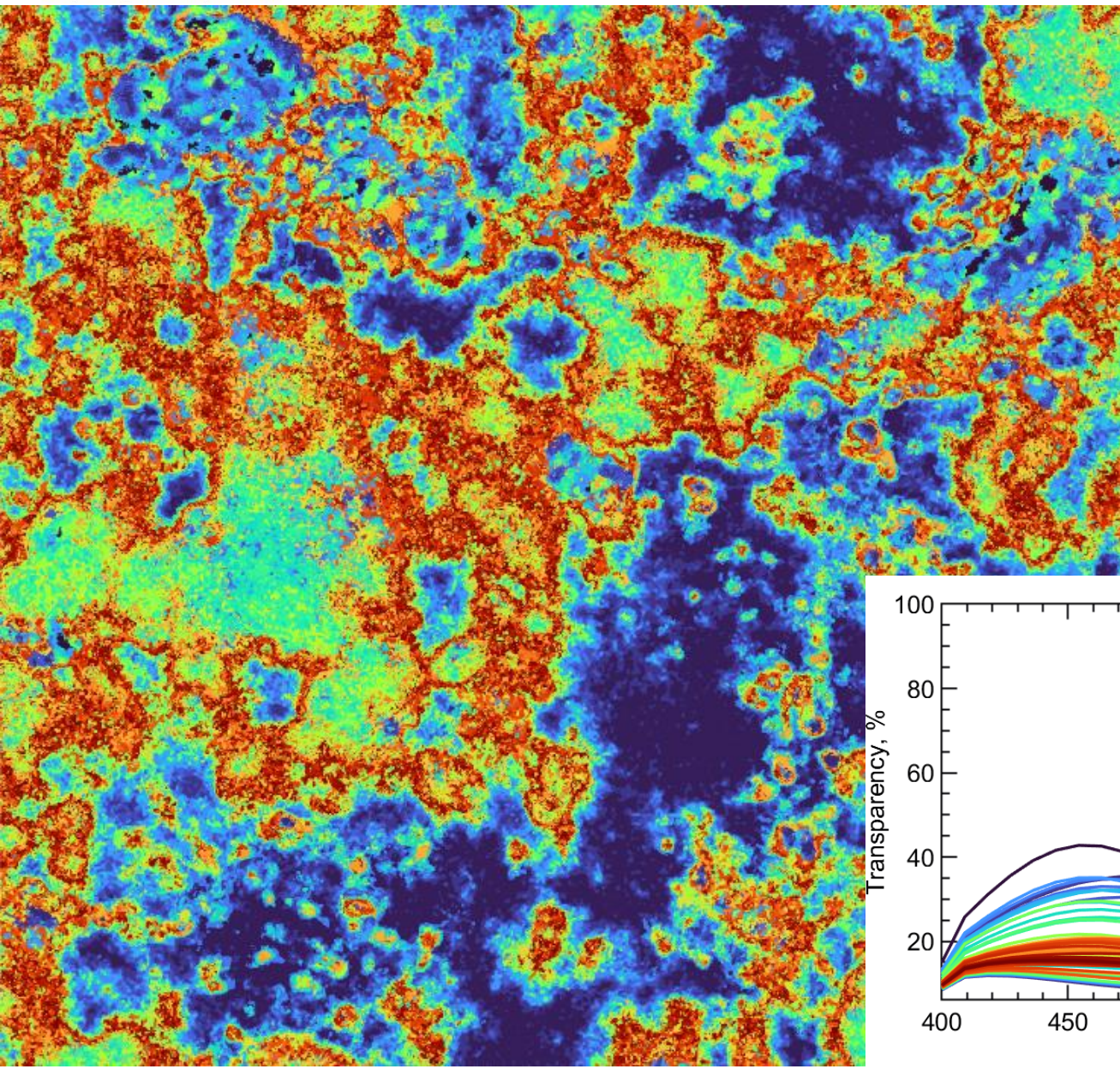
PC2

Velikost pixelu $36 \times 36 \text{ nm}^2$



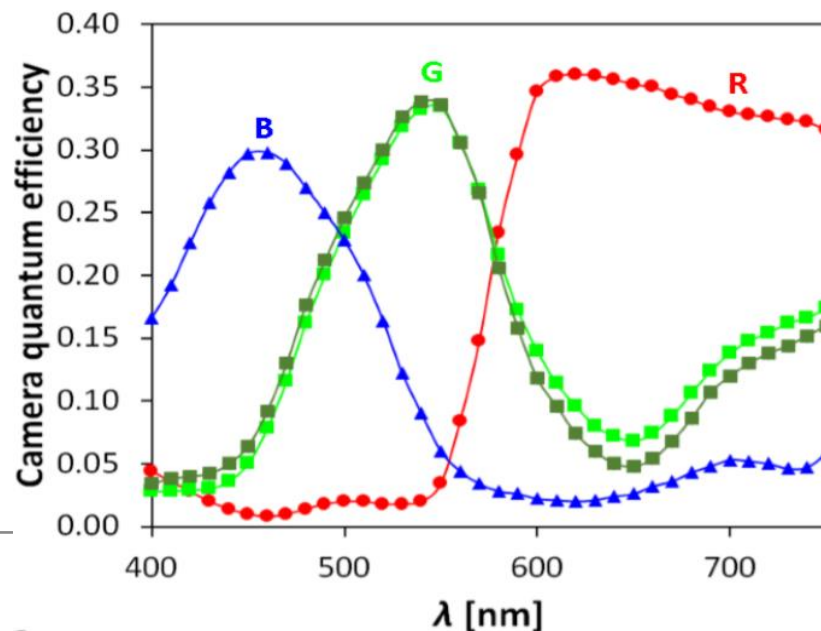
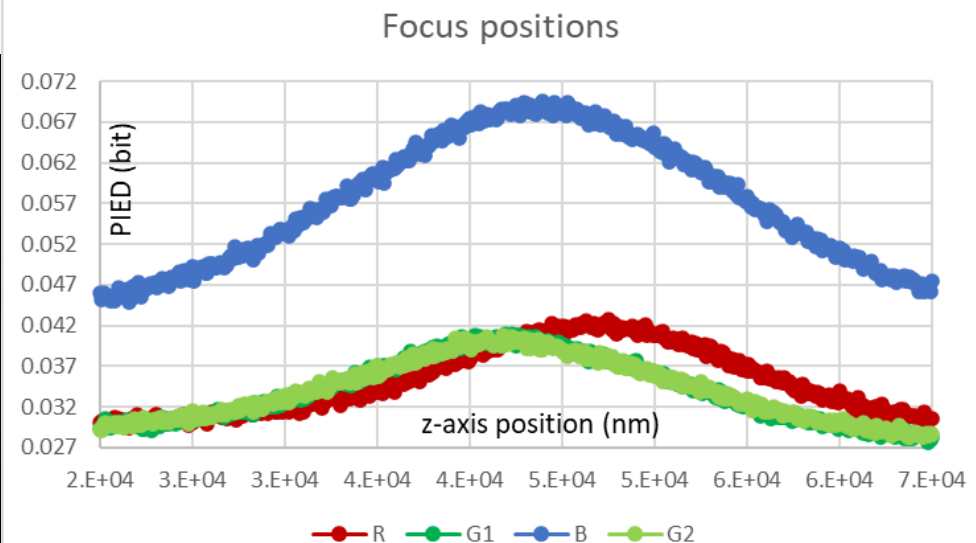
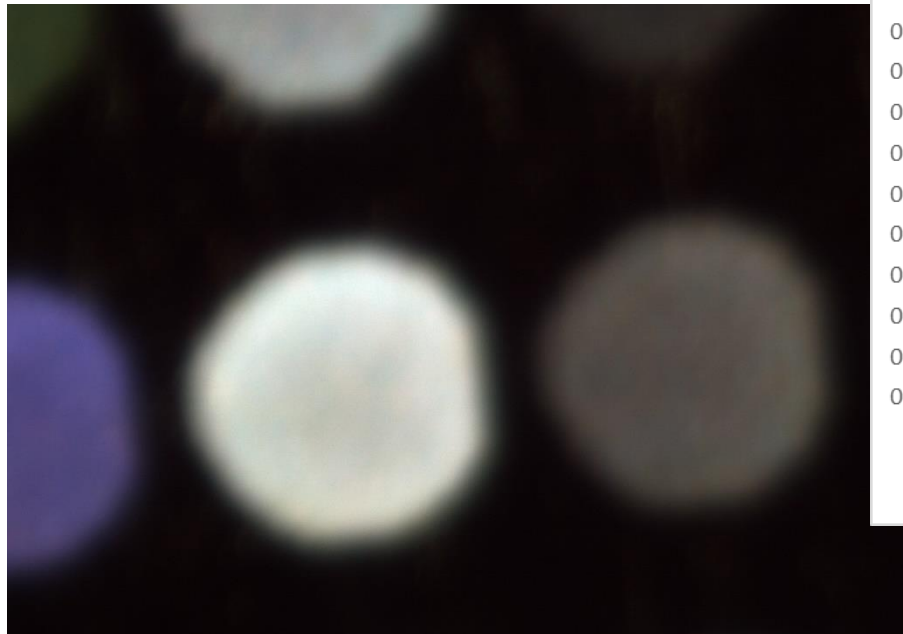
256 spektrálně odlišných
oblastí

Velikost pixelu $36 \times 36 \text{ nm}^2$



Jsou získaná spektra fyzikálně reálná?

Snímek barevných standardů

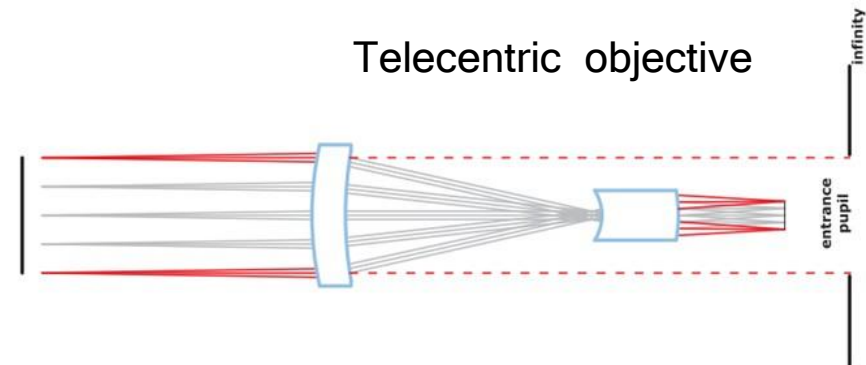
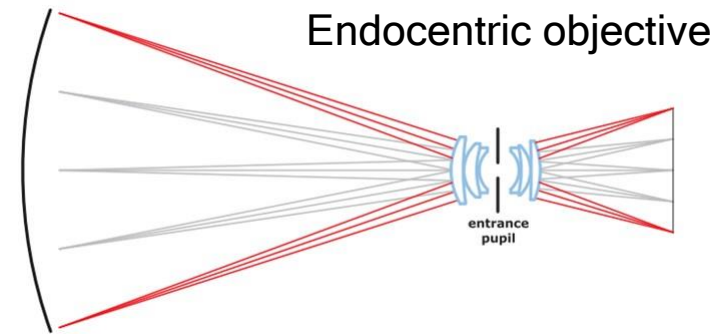


Fyzikálně realistická spektra nemohou být nikdy správně spočítána kvůli šířce a tvaru spektrálního profilu barevného filtru a rozdílnosti projekcí jednotlivých vlnových délek. Proto máme pro různá spektra dopadajícího záření různý posun roviny zaostření, a ani ten není nikdy úplně správný. Jen si dovoluujeme zdvořile upozornit, že při používání tzv. hyperspektrálních kamer nebo ozařování vzorku zdrojem různých vlnových délek se také nikdo nezabývá přeostršováním.

Jaký je vztah obrázku ke struktuře pozorovaného objektu?

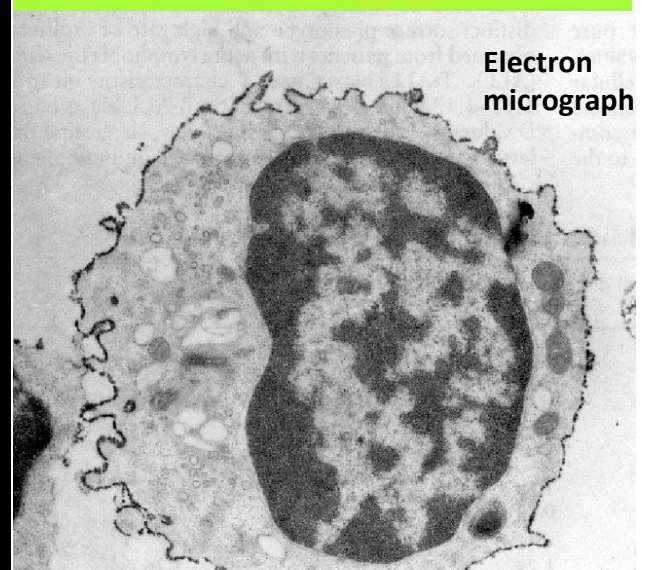
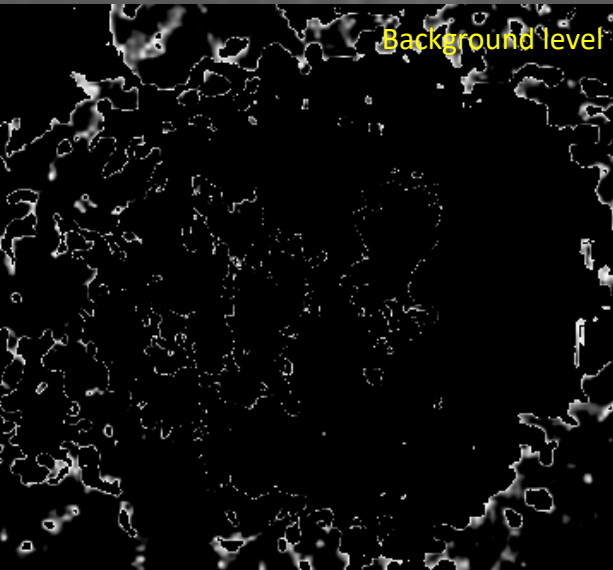
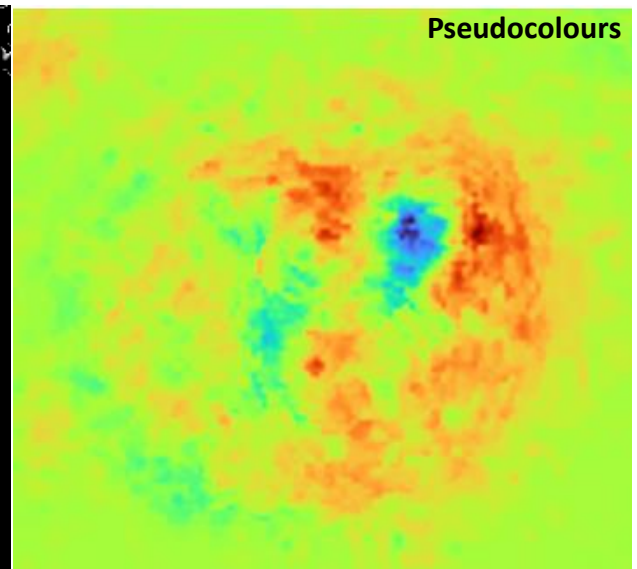
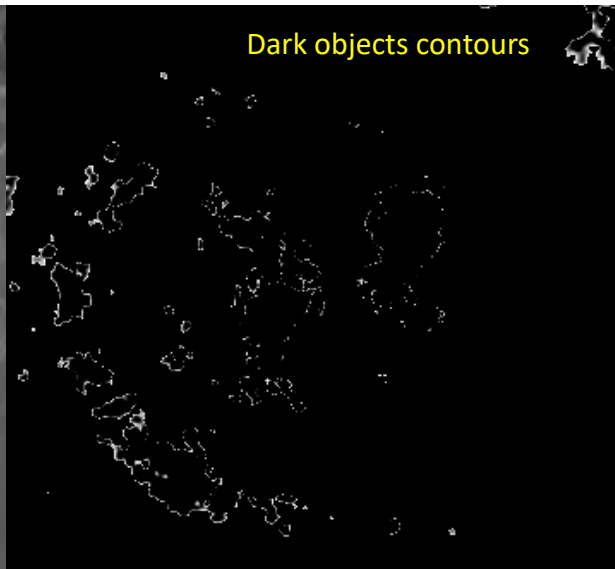
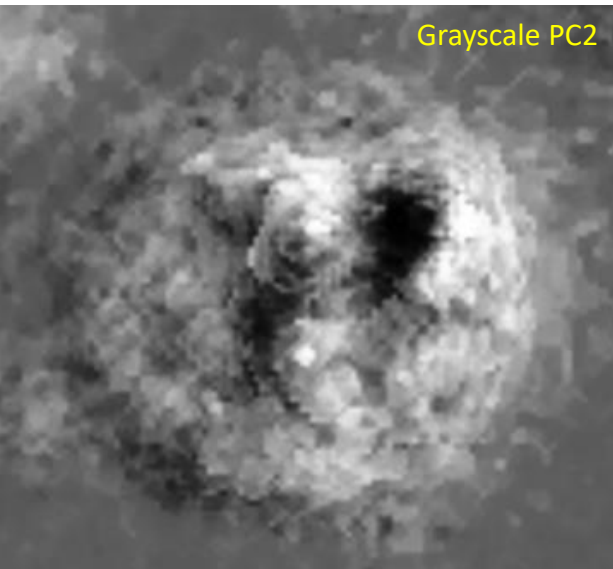
PC2 - s jistotou pozorujeme objekty velikosti 1 pixel

Velikost pixelu $37 \times 37 \text{ nm}^2$



Moje seminaivní vysvětlení je, že telecentrický objektiv vybírá planární vlnoplochu, která byla modifikována vzorkem. Vzájemná poloha těchto modifikací zůstává stejná i po zvětšení a detekujeme ji na čipu kamery. Proto vidíme to, co podle teorie vidět nesmíme.

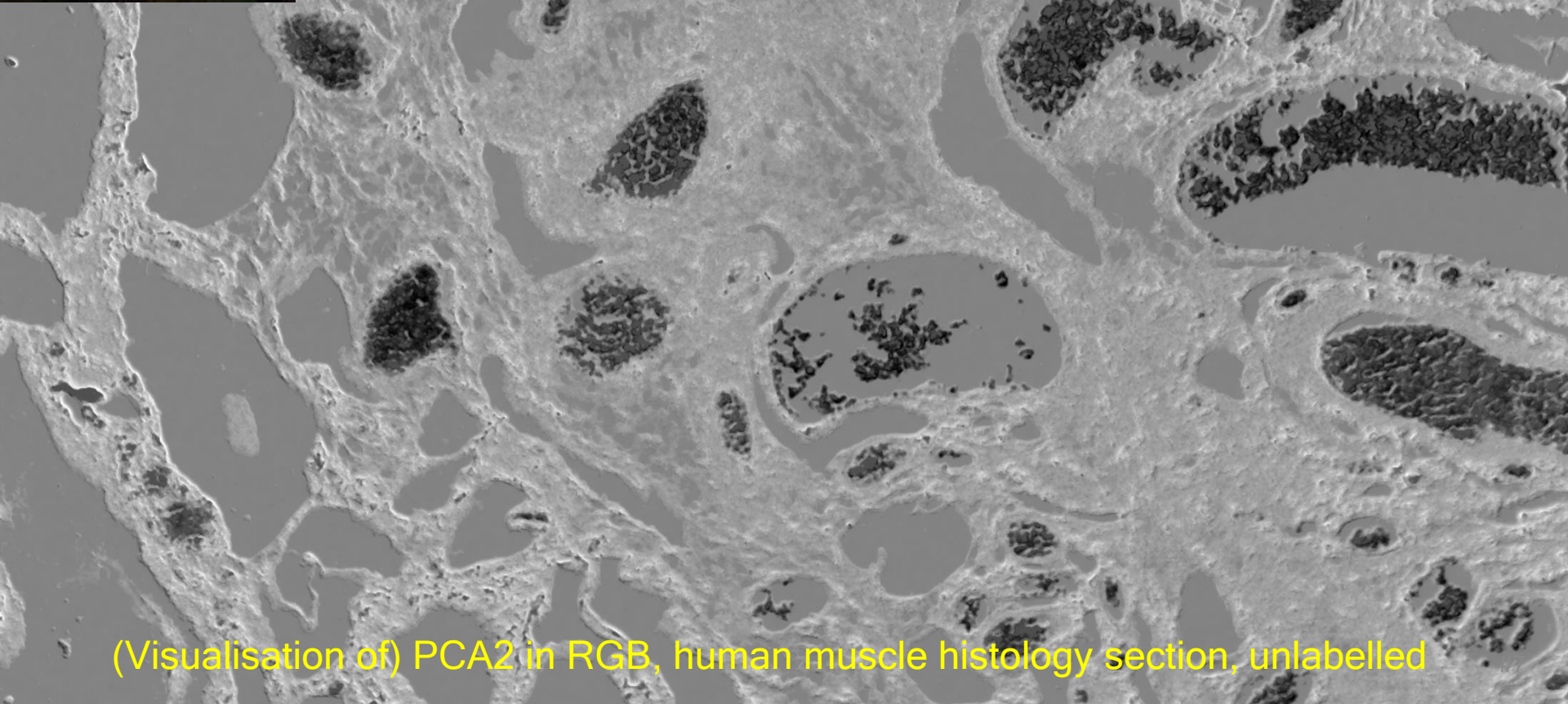
Pěkné vizualizace pro šéfy a uživatele – T-lymfocyt (d = 10 μm)



Velikost pixelu 55×55 nm²



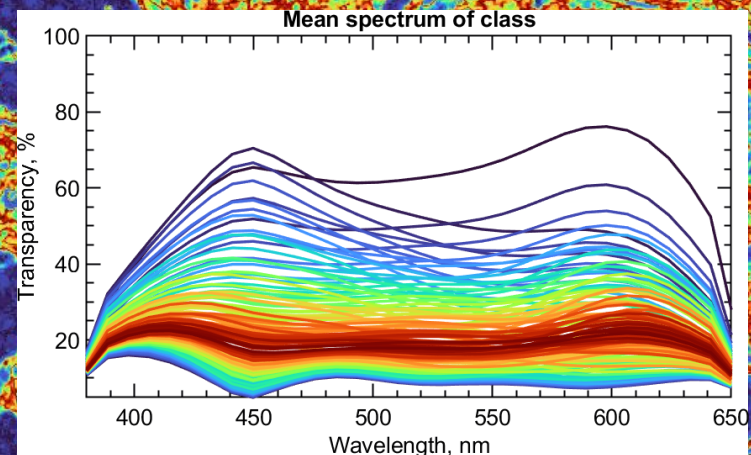
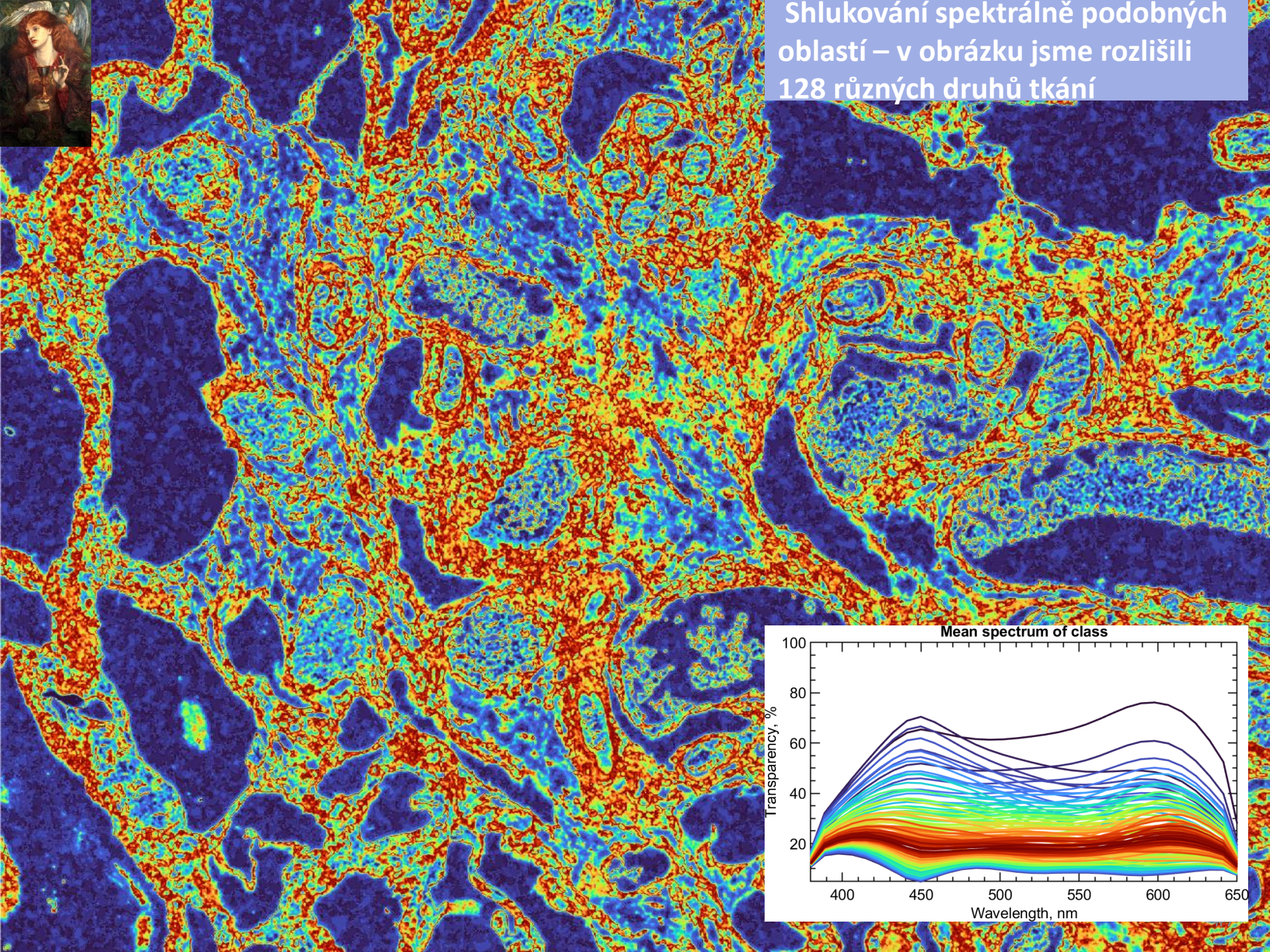
PC2, nebarvený standardní histologický řez, velikost sekce $2,9 \times 2,0 \text{ mm}^2$, velikost pixelu $75 \times 75 \text{ nm}^2$. Reflektanční spektrum je známo pro každý bod v obrázku.



(Visualisation of) PCA2 in RGB, human muscle histology section, unlabelled



Shlukování spektrálně podobných oblastí – v obrázku jsme rozlišili 128 různých druhů tkání



- Funguje to!!!
- Získáváme výborný kontrast u nemodifikovaných vzorků
- Máme největší dosažitelnou velikost scény a současně velmi malý detail (≈ 5 řádů)
- Výstupy reprezentujeme maximálně fyzikálně korektně
- Dat je takové množství, že se neobejdeme bez automatizované analýzy



- Rozšířit do 3D
- Urychlit a rozšířit na celé obrázky (= cca 1 mld pixelů)
- Co nejvíce se přiblížit fyzikálnímu spektru a ověřit matematickou korektnost expanze obrázku
- Postavit mikroskopy pro uživatele: histologický/materiálový mikroskop, mikroskop pro analýzu rohovek, mikroskop pro sledování živých buněk atd.
- **Vyvinout vizualizační nástroje pro různé uživatele - Ukázka ve vedlejší místnosti**

Publikace:

- Platonova, G., Štys, D., Souček, P., Lonhus, K., Valenta, J., Rychtáriková, R., 2021. Spectroscopic Approach to Correction and Visualisation of Bright-Field Light Transmission Microscopy Biological Data. Photonics 8(8):333*
- Lonhus, K., Rychtáriková, R., Ghaznavi, A., Štys, D., 2021. Estimation of rheological parameters for unstained living cells. The European Physical Journal Special Topics 230: 1105-1112.*
- Rychtáriková, R., Korbel, J., Macháček, P., Císař, P., Urban, J., Štys, D., 2016. Point Information Gain and Multidimensional Data Analysis. Entropy 18(10), 372.*
- Štys, D., Náhlík, T., Macháček, P., Rychtáriková, R., Saberioon, M., 2016. Least Information Loss (LIL) conversion of digital images and lessons learned for scientific image inspection. Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) 9656, pp. 527-536.*

Funding:

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic-projects CENAKVA (LM2018099) and from the European Regional Development Fund in frame of the project Image Headstart (ATCZ215) in the Interreg V-A Austria-Czech Republic Programme and by the project GAJU 017/2016/Z of the Grant Agency of the University of South Bohemia.