

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

DETEKCE A ROZMĚŘENÍ ELEKTRONOVÉHO SVAZKU V OBRAZECH Z TEM

DETECTION AND MEASUREMENT OF ELECTRON BEAM IN TEM IMAGES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Simon Polcer

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Chmelík

BRNO 2020

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Simon Polcer

ID: 186679

Ročník: 2

Akademický rok: 2019/20

NÁZEV TÉMATU:

Detekce a rozměření elektronového svazku v obrazech z TEM

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Popište princip zobrazování a konstrukci transmisního elektronového mikroskopu. 2) Seznamte se s předloženým datovým souborem, popište jednotlivé módy osvětlení detekčního fluorescenčního stínítka a jejich vlastnosti z hlediska zpracování obrazů. Vytvořte hodnotící funkci, která bude porovnávat výsledky detekčního algoritmu s manuálním značením elektronového svazku. 3) Vytvořte metodu pro umělé rozšíření datového souboru vhodnou pro obrazy z transmisního elektronového mikroskopu. 4) Nastudujte a popište teorii konvolučních neuronových sítí. 5) V libovolném programovém prostředí realizujte algoritmus pro detekci a rozměření elektronového svazku využívající konvoluční neuronové sítě. 6) Proveďte zhodnocení a diskuzi dosažených výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HAN, J., D. ZHANG, G. CHENG, N. LIU a D. XU. Advanced Deep-Learning Techniques for Salient and Category-Specific Object Detection: A Survey. IEEE Signal Processing Magazine. 2018, 35(1), 84-100. DOI: 10.1109/MSP.2017.2749125. ISSN 1053-5888.

[2] SHORTEN, C. a T. M. KHOSHGOFTAAR. A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning. Journal of Big Data. 2019, 6(60), 1-48. DOI: 10.1186/s40537-019-0197-0. ISSN 2196-1115.

Termín zadání: 3.2.2020

Termín odevzdání: 29.5.2020

Vedoucí práce: Ing. Jiří Chmelík

Konzultant: Ing. Petr Walek, Ph.D.

prof. Ing. Stanislav Hanus, CSc.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá automatickou detekcí a rozměřením elektronového svazku ve snímcích z transmisního elektronového mikroskopu. V úvodní části práce je popsána konstrukce a nejdůležitější součástky elektronového mikroskopu. Dále jsou v teoretické části shrnuty módy osvětlení fluorescenčního stínítka, které vznikají při práci na mikroskopu. K automatické detekci elektronového svazku jsou použity metody strojového učení, konkrétně konvoluční neuronová síť U-Net. Následné rozměření elektronového svazku je provedeno na základě aproximace oblasti elektronového svazku elipsou, kde parametry elipsy udávají rozměry svazku. Jelikož při učení neuronových sítí je potřeba mít dostatečně rozsáhlou databázi snímků, jsou v práci popsány metody umělého rozšíření databáze. V práci je navržena vlastní augmentační metoda, která využívá geometrické transformace a aplikuje je na základě módu osvětlení fluorescenčního stínítka. V závěru práce jsou shrnuty a diskutovány dosažené výsledky. Úspěšnost algoritmu je zhodnocena na variabilní skupině snímků pokrývajících jednotlivé módy osvětlení fluorescenčního stínítka. Celková úspěšnost dosahuje 0,815 hodnoty DICE koeficientu, který udává míru překryvu dvou oblastí. Práce je kompletně zpracována v programovém prostředí Python.

KLÍČOVÁ SLOVA

transmisní elektronový mikroskop, fluorescenční stínítka, elektronový svazek, augmentace databáze, konvoluční neuronová síť, geometrické transformace

ABSTRACT

This diploma thesis deals with automatic detection and measurement of the electron beam in the images from a transmission electron microscope (TEM). The introduction provides a description of the construction and the main parts of the electron microscope. In the theoretical part, there are summarized modes of illumination from the fluorescent screen. Machine learning, specifically convolution neural network U-Net is used for automatic detection of the electron beam in the image. The measurement of the beam is based on ellipse approximation, which defines the size and dimension of the beam. Neural network learning requires an extensive database of images. For this purpose, the own augmentation approach is proposed, which applies a specific combination of geometric transformations for each mode of illumination. In the conclusion of this thesis, the results are evaluated and summarized. This proposed algorithm achieves 0.815 of the DICE coefficient, which describes an overlap between two sets. The thesis was designed in Python programming language.

KEYWORDS

transmission electron microscopy, fluorescent screen, electron beam, data augmentation, convolutional neural network, geometric transformations

POLCER, Simon. *Detekce a rozměření elektronového svazku v obrazech z TEM*. Brno, 2020, 80 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Ing. Jiří Chmelík

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Detekce a rozměření elektronového svazku v obrazech z TEM“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce panu Ing. Jiřímu Chmelíkovi a panu Ing. Petru Walkovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Brno

.....

podpis autora

Obsah

Úvod	11
1 Transmisní elektronový mikroskop	12
1.1 Popis TEM	12
1.1.1 Zdroj elektronů	13
1.1.2 Magnetické čočky	14
1.1.3 Objektiv	15
1.1.4 Clony	15
1.1.5 Vakuové systémy	16
1.1.6 Detektory	17
1.1.7 Držák vzorku	18
2 Módy osvětlení fluorescenčního stínítka	20
2.1 Snímky s plně zobrazeným elektronovým svazkem	20
2.2 Snímky s částečně zakrytým elektronovým svazkem	22
2.3 Snímky s úplným osvětlením fluorescenčního stínítka	22
2.4 Snímky se zvýrazněnými postranními vyzařovacími laloky	23
2.5 Snímky s rozptylem	24
2.6 Snímky se zřetelnými vadami optických prvků	25
2.7 Snímky s dosvitěním elektronového svazku	26
2.8 Snímky se vzorkem	26
2.9 Ostatní nestandardní podmínky	27
2.10 Snímky šumu	28
3 Strojové učení	29
3.1 Konvoluční neuronové sítě	30
3.1.1 Konvoluční vrstva	31
3.1.2 Podvzorkující (pooling) vrstva	33
3.1.3 Plně propojená vrstva	34
3.2 Proces učení neuronové sítě	34
3.3 Přehled architektur sítí	35
3.3.1 Plně konvoluční neuronové sítě	36
3.3.2 SegNet	37
3.3.3 Unet	37
4 Augmentace dat	39
4.1 Geometrické transformace	39
4.2 Přidání šumu	40

4.3	Úprava kontrastu barevných složek	40
4.4	Filtrace obrazu	41
4.5	Augmentační metoda Random Erasing	41
5	Metodika pro vyhodnocení výsledků	42
6	Realizace praktické části	45
6.1	Dostupná data	46
6.2	Navržená metoda augmentace dat	47
6.2.1	Pravidla augmentace	48
6.3	Analýza šumu	51
6.4	Popis navrženého algoritmu detekce a rozměření elektronového svazku	53
6.5	Průběh učení neuronové sítě	55
7	Vyhodnocení výsledků	58
7.1	Výsledky	58
7.2	Diskuze výsledků	62
8	Závěr	68
	Literatura	70
	Seznam symbolů, veličin a zkratk	76
	Seznam příloh	77
A	Krabicové grafy	78

Seznam obrázků

1.1	Základní součásti transmisního elektronového mikroskopu	12
1.2	Katody elektronových zdrojů	13
1.3	Schéma vakuového systému TEM	16
1.4	TEM mřížka	19
2.1	Ukázky snímků s plně zobrazeným elektronovým svazkem	20
2.2	Ukázka snímků pořízených mikroskopem s autoemisí elektronovou tryskou	21
2.3	Ukázka snímků pořízených mikroskopem s termoemisí elektronovou tryskou	21
2.4	Ukázka snímků s částečně zakrytým elektronovým svazkem	22
2.5	Ukázka snímků s plným osvětlením fluorescenčního stínítka	23
2.6	Ukázka snímků se zvýrazněnými bočními vyzařovacími laloky elek- tronového svazku	23
2.7	Ukázka snímků s rozptýleným elektronovým svazkem	24
2.8	Ukázka snímků s rozptýleným elektronovým svazkem bez primárního elektronového svazku	24
2.9	Ukázka snímků s vadami seřízení mikroskopu	25
2.10	Ukázka snímků s dosvitom fluorescenční vrstvy stínítka po změně pozice elektronového svazku	26
2.11	Ukázka snímků se vzorky	27
2.12	Ukázka snímků nestandardních podmínek	27
2.13	28
2.14	Ukázka snímku s přítomným šumem pozadí	28
3.1	Koláč umělé inteligence	30
3.2	Obecné schéma architektury konvoluční neuronové sítě.	31
3.3	Princip konvoluce	32
3.4	ReLU aktivační funkce	33
3.5	Princip sdružovacích metod	33
3.6	Omezení segmentace obrazu způsobené plně konvoluční sítí	37
3.7	Architektura Unet	38
5.1	Matice záměn	42
5.2	Ukázka principu hodnotící funkce	44
6.1	Blokové schéma navrženého algoritmu	45
6.2	Ukázka augmentace snímků	49
6.3	Ukázka nevhodné augmentace snímků	50
6.4	Ukázka nevhodné augmentace snímků dosvitu elektronového svazku .	51
6.5	Analýza spekter šumu z reálných snímků TEM	52

6.6	Blokové schéma návrhu generátoru šumu	52
6.7	Ukázka vzniku prázdných míst po aplikaci geometrické transformace .	53
6.8	Graf závislosti přesnosti učení na počtu epoch	56
6.9	Graf průběhu kriteriální funkce DICE v závislosti na počtu epoch . .	56
7.1	Krabicový graf DICE koeficientu před aproximací el. svazku	60
7.2	Krabicový graf DICE koeficientu po aproximaci el. svazku	61
7.3	Ukázka výsledné aproximace el. svazku elipsou	64
7.4	Ukázka výsledné aproximace el. svazku elipsou u mřížky	65
7.5	Ukázka chybné aproximace elektronového svazku elipsou na rozhraní stínítka	66
7.6	Ukázka chybné klasifikace obrazu neuronovou sítí	67
A.1	Krabicový graf senzitivity před aproximací el. svazku	78
A.2	Krabicový graf senzitivity po aproximaci el. svazku	78
A.3	Krabicový graf specifacity před aproximací el. svazku	79
A.4	Krabicový graf specifacity po aproximaci el. svazku	79
A.5	Krabicový graf TFS koeficientu před aproximací el. svazku	80
A.6	Krabicový graf TFS koeficientu po aproximaci el. svazku	80

Seznam tabulek

3.1	Příklady použití aktivačních funkcí posledních plně propojených vrstev pro konkrétní úlohy	34
6.1	Shrnutí aproximace elektronového svazku elipsou pro jednotlivé módy osvětlení fluorescenčního stínítka	46
6.2	Shrnutí pravidel augmentace dat	49
6.3	Shrnutí nastavení sítě.	54
6.4	Vývoj hodnot přesnosti a kriteriální funkce 1 - DICE během učení neuronové sítě.	57
7.1	Výsledné hodnoty zvolených metrik	60
7.2	Vzdálenosti kontur	62

Úvod

Transmisní elektronový mikroskop se stává v posledních letech nedílnou součástí biologických laboratoří nebo výzkumných center zkoumající vlastnosti materiálů. Od světelného mikroskopu se jednak liší svojí rozlišovací schopností, která je u elektronového mikroskopu mnohonásobně větší, tak i svojí konstrukcí. Přesným zobrazením struktur na atomární úrovni je možné sledovat vliv léčiv na jednotlivé buňky a urychlit tak vývoj léků.

Při sestavování elektronového mikroskopu je klíčové dodržovat čistotu ve výrobních prostorech. Vlivem nedokonalosti výroby spolu optické součástky stoprocentně nekorespondují a není možné dosáhnout požadované přesnosti zobrazení. Z toho důvodu je nutné mikroskop softwarově korigovat. Mezi základní procedury korekce mikroskopu patří úprava polohy elektronového svazku. Při každé změně zvětšení dochází k translaci elektronového svazku o určitou vzdálenost od středu fluorescenčního stínítka. Posun elektronového paprsku je způsoben změnou procházejícího proudu cívkami. Během výroby jsou do mikroskopu ukládány korekční faktory, které korigují tento posun. Dalším příkladem zmíněných výrobních procedur je úprava a snížení vlivu optických aberací. Asymetrie magnetického pole způsobuje astigmatismus elektronového svazku a dochází např. k narušení struktury krystalu během difrakce. Softwarový zásah je tedy z hlediska fungování a věrohodnosti zobrazení snímané scény mikroskopem nepostradatelný. Jelikož jsou procedury seřizení s časem nestabilní, je nutné procedury pravidelně opakovat. Jako řešení se nabízí tyto procedury zautomatizovat. Pro jejich automatizaci je nutné znát polohu elektronového svazku. K tomu se využívá aproximace kontury elektronového paprsku elipsou. Úpravou parametrů elipsy je možné měnit tvar paprsku a provádět např. korekci optických vad (korekce astigmatického elektronového paprsku na kružnicový tvar).

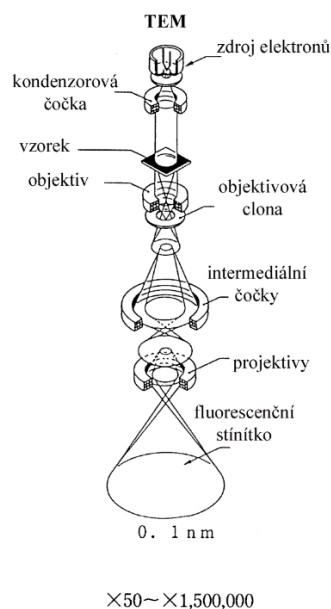
Hlavním úkolem diplomové práce je navrhnout algoritmus umožňující automatickou detekci a rozměření elektronového svazku v obrazech z TEM. Práce je zpracována ve spolupráci s Thermo Fisher Scientific, která se touto problematikou podrobně zabývá a pro zpracování práce poskytla databázi snímků. Cílem je navrhnout odlišný přístup, který bude využívat konvoluční neuronovou síť. Právě konvoluční neuronové sítě zažívají v poslední době obrovský rozmach a stávají se nedílnou součástí v oblastech zpracování obrazu a počítačového vidění. Učení neuronové sítě vyžaduje dostatečný počet reprezentantů snímků a bude tedy potřeba navrhnout metodu pro umělé rozšíření databáze. V úvodní části práce bude popsána konstrukce a základní součástky elektronového mikroskopu, módy osvětlení fluorescenčního stínítka a bude zpracována literární rešerše k oblasti konvolučních neuronových sítí. Praktická část bude zaměřená na popis a fungování navrženého algoritmu. V závěrečné části budou objektivně zhodnoceny a diskutovány dosažené výsledky.

1 Transmisní elektronový mikroskop

Transmisní elektronová mikroskopie byla vynalezena v 30. letech 20. století Maxem Knollem a Ernestem Ruskou, který později obdržel Nobelovu cenu za fyziku. V posledních letech došlo k jejímu významnému rozvoji. Byly vynalezeny nové experimentální techniky, došlo k vylepšení konstrukce mikroskopu a digitální registraci obrazu. Transmisní elektronový mikroskop (TEM) nachází uplatnění v biologických a materiálových laboratořích. V biologii a medicíně slouží pro zobrazení buněk, makromolekul, proteinů, virů a obecně objektů s velikostí ležící pod rozlišovací schopností světelného mikroskopu. U anorganických látek umožňuje rozlišit jejich mikrostrukturu až na atomární úroveň a pomocí elektronové difrakce lze určit symetrii krystalové mřížky. Pokud je elektronový mikroskop vybaven spektrometry, je možné u zkoumaných částic provést i lokální chemickou analýzu prvků.

1.1 Popis TEM

Elektronový mikroskop je velmi složitý a komplexní přístroj, který obsahuje okolo 20 - 25 tisíc součástek. Zjednodušené schéma je zobrazeno na Obr. 1.1. Mezi základní části patří zdroj elektronů, vakuový systém mikroskopu, řídicí elektronika, napájecí skříň, vysokonapěťový zdroj, magnetické čočky a detektor. V následujících podkapitolách budou podrobněji popsány jeho nejdůležitější části.[1]



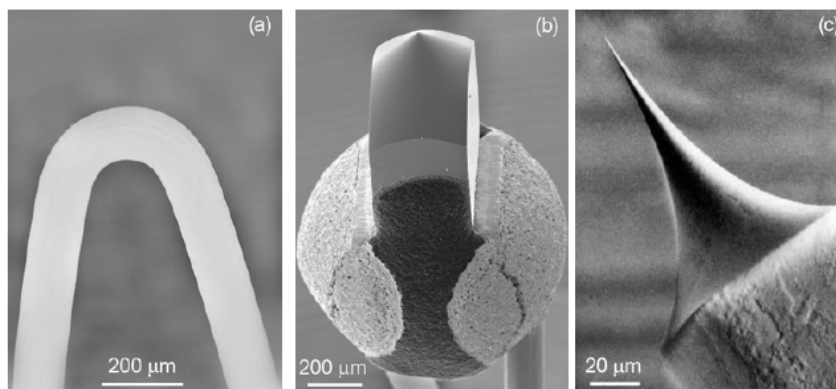
Obr. 1.1: Základní součásti transmisního elektronového mikroskopu, převzato z [2].

1.1.1 Zdroj elektronů

Vzorek zkoumaného materiálu umístěný na tenké folii je ozařován elektrony o energii řádově stovek keV. Elektrony jsou na atomech rovnoběžně rozptylovány ve směru dopadajícího elektronového svazku a vzniká množství různých signálů, které se využívají při pozorování vzorku. Zdrojem elektronů je v elektronovém mikroskopu elektronová tryska. Hlavní charakteristikou trysky je směrová proudová hustota B (viz rovnice 1.1). Proudová hustota popisuje proud I [A] vztahený na velikost plochy S [m²] a na prostorový úhel Ω [sr], do kterého jsou elektrony vyzařovány podle vztahu:

$$B = \frac{I}{S\Omega} \approx \frac{4I}{\pi^2\alpha_0^2 d^2}, \quad (1.1)$$

kde α je vyzařovací úhel svazku [rad] a d je průměr zdroje elektronů [m]. Existují různé elektronové trysky, které se liší vlastnostmi emitovaných elektronových svazků. Na Obr. 1.2 jsou zobrazeny různé typy katod elektronových trysek.



Obr. 1.2: Katody elektronových zdrojů: (a) wolframové vlákno, (b) vlákno z he-xaboridu lanthanu, (c) wolframový hrot autoemisní trysky součásti transmisního elektronového mikroskopu, převzato z [1].

Termoemisní trysky se skládají ze tří hlavních součástí: vlákna (katody), záporně polarizovaného Wehneltova válce a uzemněné anody. Katoda je žhavena na teplotu kolem 2700 Kelvinů (K). Emitované elektrony z katody prochází otvorem Wehneltova válce a konvergují v křižišti¹ mezi anodou a katodou. Wehneltův válec funguje jako elektrostatická čočka, jejíž velikost předpětí válce ovlivňuje vyzařovací úhel svazku. Pokud je předpětí válce nízké, je emisní proud vysoký, ale směrová proudová hustota je nízká a svazek je nehomogenní. Emisní proud je nulový, je-li předpětí válce moc vysoké. Katoda je vyrobena z tenkého wolframového drátku,

¹Křižišť je místo nejužšího zdroje elektronů, které lze upravit centrováním katody.

který se tvaruje do písmene V. Tvarováním se docílí zvýšení účinnosti emise elektronů. Používá se i jiný typ katody vyrobený z hexaboridu lanthanu LaB_6 . Tento typ elektrody má mnohem větší emisi elektronů, ale vyžaduje vyšší vakuum. Oproti wolframovému drátku má 10 až 15 krát větší životnost.

Autoemisní trysky mají hrot katody tvořený monokrystalem wolframu. Emise elektronů je způsobena tunelovým jevem. U hrotu katody je velmi silné elektrické pole, které je schopné vytrhávat elektrony z povrchu hrotu. Navzdory tomu, že hustota proudu je mnohem vyšší než u termoemisních trysek, je celkový emisní proud nižší. Z důvodu, že se autoemise elektronů snižuje působením zbytkových plynů na povrchu hrotu, je potřeba ultravysokého vakua. [1][3][4]

1.1.2 Magnetické čočky

Dráha elektronů je ovlivňovaná elektrostatickými nebo magnetickými čočkami. Nejčastěji používanou čočkou v elektronovém mikroskopu je čočka magnetická. Jedná se o malou cívku složenou z kruhových měděných závitů a pólových nástavců z měkkého železa. Elektrony jsou fokusovány silným magnetickým polem mezi pólovými nástavci. Magnetické čočky jsou chlazeny vodou, protože průchodem vysokého proudu vinutím dochází ke vzniku tepla. Jedná se o nepostradatelnou součást TEM, která plní mnoho funkcí: fokusace elektronového svazku, vychýlení svazku nebo samotné zvětšení snímaných objektů. V elektronové optice existuje pouze spojná čočka. Kromě dvoupólových magnetických čoček existují i vícepólové, které se používají pro korekci optických vad. Stejně jako u světelných mikroskopů i elektronové mikroskopy mají zobrazovací vady, které snižují rozlišovací schopnost. Mezi vady ovlivňující rozlišovací schopnost TEM patří osové aberace: sférická vada, chromatická vada, astigmatismus a koma.

Sférická vada patří k nejvýznamnější vadě objektivu TEM, na které závisí jeho rozlišovací schopnost. Vlivem této vady jsou okrajové elektrony oproti ostatním více vychylovány k optické ose. Pro opravu sférické vady byl vyvinut korektor, který se skládá ze dvou hexapólů a čtyř konvenčních magnetických čoček. Tím, že se vada snižuje až na úroveň mikrokometrů, lze dosáhnout rozlišovací schopností pod 0,1nm.

Chromatická vada je způsobena rozdílnou energií elektronů ve svazku. Na energii elektronů je závislá ohnisková vzdálenost čočky. Dráhy elektronů s odlišnou rychlostí jsou magnetickým polem vychylovány různě a protínají se v jiných bodech. Vadu je možné odstranit stabilizací urychlovacího napětí zdroje elektrodového svazku, monochromátorem nebo energiovým filtrem. Stabilizací napětí se docílí toho, že elektronový svazek se stane více monochromatický a koherentní.

Osový astigmatismus je vada způsobená nesymetrií elektronového svazku. Diference ohniskových vzdáleností dvou svazků, které se šíří v navzájem kolmých rovi-

nách se nazývá astigmatický rozdíl. Pro degradaci obrazu na atomární úrovni stačí astigmatický rozdíl v řádu několik desítek nm . Příčinou astigmatismu může být elipticita otvorů pólových nástavců, posun mezi pólovými nástavci a clonami nebo materiálem, ze kterého jsou nástavce vyrobeny. Ke korekci se používají kvadrupólové cívky - stigmátory, které korigují superpozici magnetického pole. [1],[5]

1.1.3 Objektiv

Objektiv stejně jako magnetické čočky patří ke klíčovým součástem mikroskopu, které hrají velkou roli při zobrazování zkoumaného vzorku. Kvalita objektivu určuje rozlišovací schopnost celého mikroskopu. V současnosti mají nejlepší objektivy koeficient sférické vady natolik nízký, že je s nimi možné rozeznat a zobrazit atomové struktury látek. Pokud je koeficient sférické vady nízký, je ohnisková vzdálenost čočky malá a pólové nástavce musí ležet blízko sebe, což limituje úhel naklápění při analýze vzorku. Při sledování mikrostruktury materiálu postačí vyšší koeficient sférické vady objektivové čočky, který umožní větší rozsah naklápění vzorku. [1]

1.1.4 Clony

V elektronovém mikroskopu se nachází různé druhy clon. Spolu s magnetickými čočkami se podílí na výsledném obrazu. Jsou to tenké součástky umístěny v optické soustavě s průměrem pohybujícím se kolem $10\text{--}300\ \mu m$. Některé clony jsou v mikroskopu pevně umístěny, ale s některými lze pohybovat – clona objektivu nebo selekční clona.

Clona kondenzoru se využívá při omezení úhlu dopadajícího elektronového svazku na vzorek. Umožňuje pracovat s více velikostmi clony, které se liší svým průměrem. V případě, že je mikroskop opatřen spektrometrem rentgenového záření, je nutné, aby clona měla větší tloušťku a odclonila nežádoucí záření dopadající na vzorek.

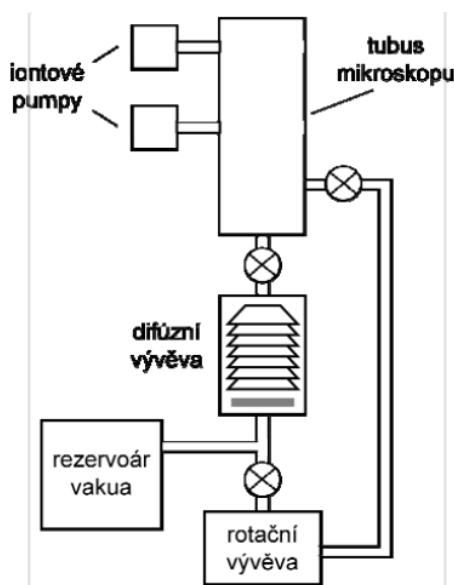
Clona objektivu se nachází v dolní části mikroskopu mezi preparátem a detektorem v tzv. projekční soustavě. Někdy se tato clona označuje jako difrakční, právě kvůli umístění v dolní části mikroskopu, kde vzniká difrakční obraz. Clona s malým průměrem slouží k výběru přímého nebo difraktovaného svazku. Naopak větší průměr clony okolo $200\text{--}300\ \mu m$ umožní projít větší množství elektronů, které pak vytváří obraz v interferenčním kontrastu.

Selekční clona se nachází za clonou objektivu v obrazové rovině objektivu, kde dochází ke vzniku prvního zvětšeného obrazu. Pomocí selekční clony je možné vybrat konkrétní oblast analyzovaného vzorku a získat obraz pouze z této oblasti. Zbylá část obrazu je clonou odstíněna. Selekční clona omezuje tedy pouze obraz, nikoliv

však místo, které je elektrony ozařováno. Během pozorování vzorku může dojít k degradaci preparátu i mimo sledovanou oblast. [1],[3]

1.1.5 Vakuové systémy

Vakuový systém zajišťuje optimální hodnoty vakua uvnitř elektronové mikroskopu. Vysoké hodnoty vakua jsou přítomny v okolí elektronové trysky a v komůrce, přes kterou se vkládá vzorek do mikroskopu. Vakuum zabraňuje kontaminaci analyzovaného vzorku. Čím vyšší a stabilnější je vakuum, tím se snižuje pravděpodobnost kontaminace vzorku uhlovodíky a vodními parami. Elektronový mikroskop potřebuje pro svoji práci vakuum, aby elektronový svazek byl koherentní a nedocházelo k jeho rozptylu vlivem přítomných částic v atmosféře. Vakuový systém se v TEM vypíná pouze v případě nutnosti oprav nebo údržby. Základní schéma vakuového systému pro TEM je zobrazeno na Obr. 1.3.



Obr. 1.3: Schéma vakuového systému TEM, převzato z [1].

Rotační vývěva se skládá z rotoru a dvou šoupátek. Jelikož se šoupátka během rotování dotýkají pracovní komory, je potřeba stěny chladit olejem. Rotační vývěva přecherává část mikroskopu po spuštění mikroskopu a je zapojena do série s difúzní vývěvou. Čerpaný prostor je přítomností oleje v pracovní komoře kontaminován olejovými parami. Jsou velmi spolehlivé, ale příliš hlučné.

Difúzní vývěva obsahuje ve spodní části topné těleso, které zahřívá olej. Po dosažení bodu varu stoupají olejové páry vzhůru a strhávají se sebou částice vzduchu

přítomné u vstupního hrdla mikroskopu. Plášť vývěvy je chlazen vodou a dochází ke kondenzaci molekul vzduchu na plášti, kde jsou následně uvolněny a odsáty rotační vývěvou.

Iontová vývěva využívá ionizace vzduchu a pracuje tak na jiném principu než předchozí dvě zmíněné vývěvy. Na titanové elektrody je přivedeno napětí a dochází k ionizaci molekul plynu. Atomy titanu zachycují molekuly plynu absorpcí². Se snižujícím se proudem iontů mezi elektrodami je dosaženo lepšího vakua. Vývěva se zapíná až po předchozím přečerpání difúzní vývěvou. U iontových vývěv nedochází ke vzniku kontaminace olejovými parami a přenosu vibrací, které jsou způsobené rotačně pohyblivými součástkami. Z toho důvodu je možné umístit vývěvu do blízkosti držáku vzorku nebo elektronové trysky. [1],[3],[5]

1.1.6 Detektory

Lidské oko není citlivé na elektrony a je potřeba převést změnu intenzity elektronů na změnu intenzity světla. K zobrazení a detekci elektronů slouží množství detektorů, které jsou založeny na jiných principech.

Fluorescenční stínítko se nejčastěji používá pro zobrazení preparátu nebo seřízení mikroskopu, kdy je potřeba zaostřit elektronový paprsek do malého bodu a postačí menší kvalita obrazu. Stínítko obsahuje fluorescenční vrstvu, která je většinou pokryta krystalky ZnS o velikosti $50 \mu m$. Dopadající elektrony na fluorescenční vrstvu jsou přeměňovány na viditelné světlo. Stínítko je velice efektivní z hlediska převodu signálu, ale po určité době dochází k degradaci vrstvy vlivem fokusace svazku do jednoho místa. Fluorescenční stínítko patří do oblasti scintilačních detektorů. Nevýhodou je tzv. dosvit, který trvá několik sekund, a proto není možné stínítko použít pro záznam rychlých změn obrazu. Signál ze stínítka je zesílen ve fotonásobiči. Vazba mezi scintilačním krystalem a fotonásobičem je realizována pomocí optického vlákna. Na fotokatodě fotonásobiče dojde vlivem fotoelektrického jevu k emitování elektronů, které jsou následně urychleny systémem dynod uvnitř fotonásobiče. Výsledný signál je několikanásobně zesílen. [3],[5]

CCD kamera se skládá ze scintilační vrstvy, která je spojena s polem polovodičových prvků. Dopadající částice světla nebo proud elektronů uvolní v polovodiči elektrony a ty jsou následně přitahovány kladnými elektrodami. CCD kamera je vybavena paměťovými registry, které umožňují určit přesnou polohu ozářeného prvku. Poté co jsou všechny hodnoty z prvků vyčteny, je možné znovu kameru použít pro záznam. Scintilační vrstva je mnohem náchylnější k degradaci než u fluorescenčního stínítka. Jeden aktivní snímací prvek o velikosti kolem $6-15 \mu m$ odpovídá jednomu

²Absorpce je proces, při kterém dochází k shromáždění částic na povrchu vlivem mezipovrchových přitažlivých sil.

pixelu. Rozlišení CCD kamery se v současné době pohybuje kolem 4000x4000 pixelů. Vlivem dlouhé expozice může dojít k přetečení náboje do sousedního detekčního prvku. Z toho důvodu je kamera opatřena elektronickou uzávěrkou, která dovoluje ovládat integrační dobu. Mezi výhody patří nízký poměr signál-šum a vysoký dynamický rozsah hodnot. [1],[3]

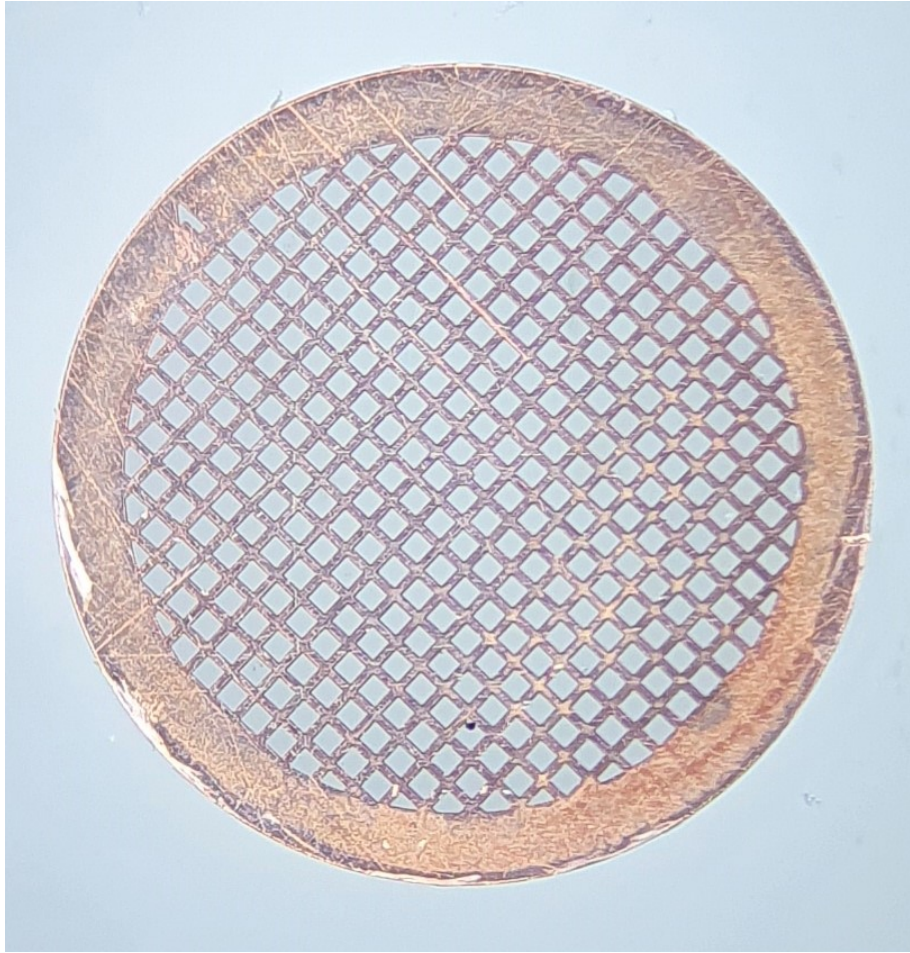
Digitální desky obsahují vrstvu krystalků, které jsou zality v pryskyřici. V mikroskopu jsou desky zasunuty do držáků fotografických kazet. Po expozici je nutné latentní obraz přechíst pomocí speciální čtečky. Desku je nutné pro další použití vystavit viditelnému světlu, aby došlo k smazání předchozí akvizice. Výhodou digitálních desek je citlivost na malé dávky elektronů, velikost detekční plochy a dynamický rozsah. Mezi nevýhody patří vyšší pořizovací cena, doba trvání čtení jednoho obrazu a její životnost. Digitální desku lze použít maximálně 1000×. [1]

Fotografické negativy nejsou v dnešní době moc často využívány, ale stále je možné se s nimi v laboratořích setkat. Výhodou fotografických filmů je jejich velikost zorného pole a vysoké rozlišení. Problémová je jeho manipulace v temných komorách a proces vyvolání. [1]

Faradayova klec je detektor, který umožňuje změřit celkový proud elektronů svazku. [3]

1.1.7 Držák vzorku

Držák vzorku je důležitá součást TEM, díky které je umožněna interakce elektronů se vzorkem. Jeho stabilita je velmi klíčová, protože každý otřes nebo vibrace snižuje kvalitu rozlišení výstupního obrazu. Příprava vzorku je velmi složitá a náročná a vyžaduje značnou trpělivost. Vzorek musí být tenký zhruba 40–100 nm, aby elektrony skrz něj mohly procházet. Aby nedocházelo při vkládání vzorku do TEM k porušení vakua, vkládá se vzorek do přechodové komory. Běžně připravené vzorky mají tvar terčů o průměru 3 mm. Existují však i držáky, které vyžadují menší průměr vzorku cca 2,3 mm. Tyto držáky umožňují větší úhel náklonu při pozorování fázových transformací. Vzorek je potřeba nejprve ztenčit a pak se drobné částice nanáší na TEM mřížku s uhlíkovou blankou (někdy též nazývaná měděná síťka). Ukázka TEM mřížky je zobrazena na Obr. 1.4. [5]



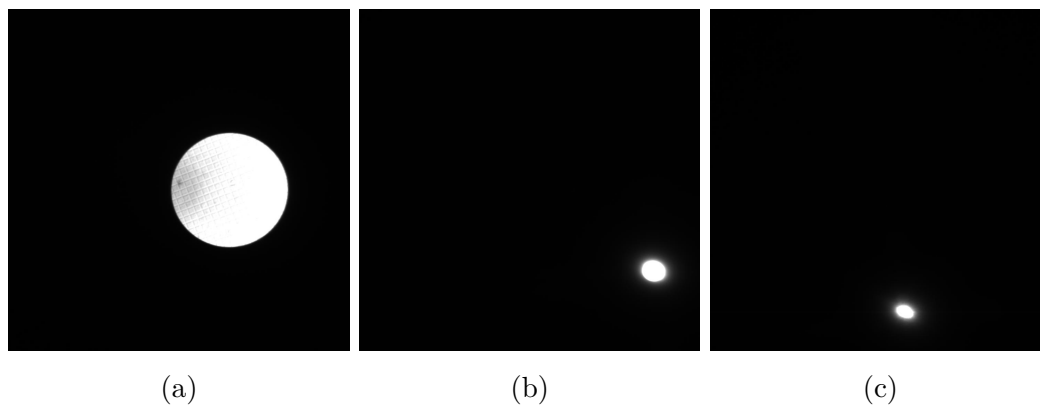
Obr. 1.4: TEM mřížka.

2 Módy osvětlení fluorescenčního stínítka

Cílem kapitoly je seznámení se s charakterem snímků a popis jednotlivých módů osvětlení fluorescenčního stínítka, která mohou v TEM nastat a zhodnocení možných potíží při automatizované detekci elektronového svazku z hlediska zpracování obrazů. Databáze snímků byla poskytnutá firmou Thermo Fisher Scientific. Jak již bylo zmíněno výše, schopnost detekovat a popsat vlastnosti elektronového svazku je nezbytná pro algoritmy provádějící automatické seřízení elektronového mikroskopu nebo automatizované korekce vad optických čoček. Různé typy (módy) osvitů fluorescenčního stínítka vykazují velkou variabilitu a je velmi obtížné navrhnout univerzální algoritmus, který by byl robustní vůči všem stavům osvětlení fluorescenčního stínítka. Módy osvětlení lze rozdělit do několika skupin.

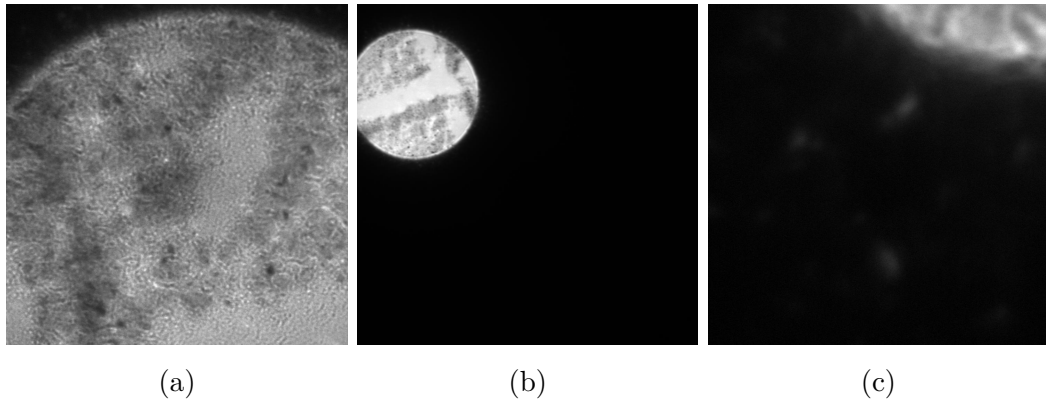
2.1 Snímky s plně zobrazeným elektronovým svazkem

První skupina obsahuje snímky, na kterých je zobrazen celý elektronový svazek, popřípadě jen jeho část a zbytek svazku je mimo oblast zájmu (fluorescenční stínítko). Na Obr. 2.1 jsou znázorněny příklady, které do této skupiny obrazů patří. Ve většině případů se jedná o obrazy elektronového svazku kruhovitých nebo elipsovitých tvarů dopadající na fluorescenční stínítko.



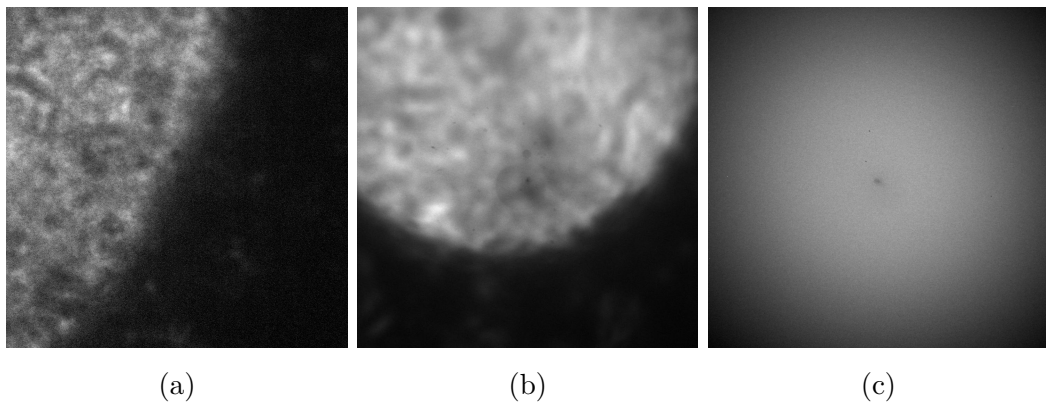
Obr. 2.1: Ukázky snímků s plně zobrazeným elektronovým svazkem. Zobrazené snímky se liší velikostí zvětšení a tvarem elektronového paprsku.

Vlastnosti elektronových svazků se od sebe liší na základě toho, jakým zdrojem elektronů je mikroskop vybaven. Při použití autoemisní elektronové trysky je hrana mezi elektronovým svazkem a pozadím při malém zvětšení dobře zřetelná. Naopak snímky pořízené s velkým zvětšením mají hranu hůře rozeznatelnou a gradient přechodu mezi elektronovým svazkem a pozadím je výrazně menší. Příklady snímků s autoemisní tryskou jsou uvedeny na Obr. 2.2.



Obr. 2.2: Ukázka snímků pořízených mikroskopy s autoemisí elektronovou tryskou. Obrázek (a) zobrazuje hranu elektronového svazku při zvětšení $310\,000\times$, (b) zobrazuje elektronový svazek s malým zvětšením $4\,300\times$, (c) vysoké zvětšení $1\,050\,000\times$. Při vysokém zvětšení je kontura elektronového svazku špatně zřetelná.

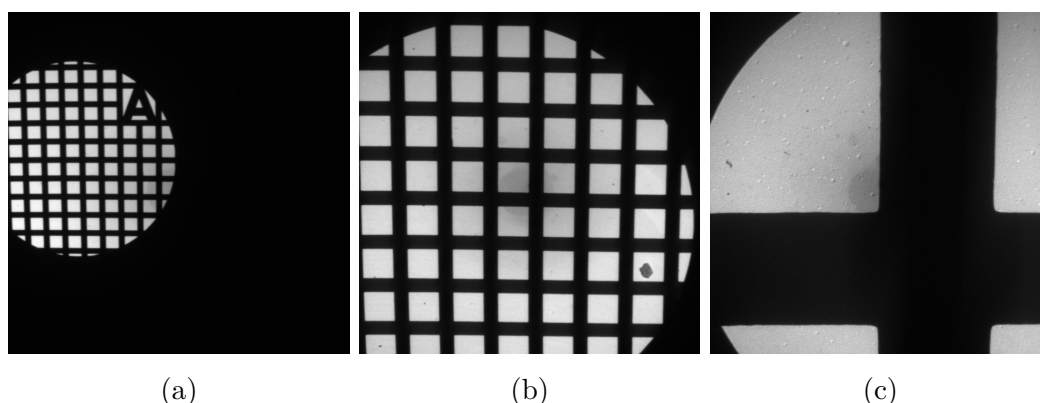
Snímky z mikroskopů vybavené termoemisí elektronovou tryskou mají nízký gradient přechodu a jsou zobrazeny na Obr. 2.3. Na Obr. 2.3c je znázorněn elektronový paprsek z termoemisí trysky. Na první pohled se může zdát, že se jedná o úplný osvit fluorescenčního stínítka, ale není tomu tak. Při velkém zvětšení nelze dosáhnout lepšího zaostření elektronového svazku do menší oblasti. Svazek je roztažený s postupným poklesem intenzity a špatně rozeznatelnou hranou. Tento typ osvětlení je obtížný z hlediska automatické detekce elektronového svazku.



Obr. 2.3: Ukázka snímků pořízených mikroskopy s termoemisí elektronovou tryskou. Obrázek (a,b) zvětšení $1\,050\,000\times$, obrázek (c) špatně rozeznatelná hrana elektronového paprsku emitovaného termoemisí tryskou.

2.2 Snímky s částečně zakrytým elektronovým svazkem

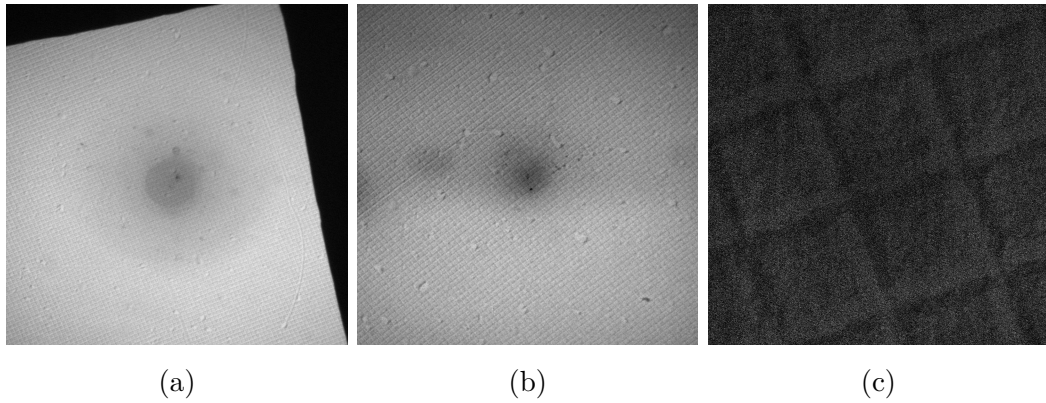
Druhou velkou skupinou jsou snímky, jejichž části jsou částečně zakryté některou z částí elektronového mikroskopu. Zakrytí elektronového svazku může vznikat mnoha způsoby, mezi které patří velmi často zakrytí elektronového svazku clonou nebo měděnou mřížkou. Měděná mřížka se používá pro nanesení velmi malých částic vzorků. Mřížkou neprochází elektronový svazek a dochází k zakrytí hrany mřížky (mřížka se v podstatě otiskne do obrazu elektronového svazku). Případy částečně zakrytých elektronových svazků jsou znázorněny na Obr. 2.4.



Obr. 2.4: Ukázka snímků s částečně zakrytým elektronovým svazkem a různou velikostí zvětšení, (a) snímek TEM mřížky s přítomným písmenem A, které se využívá jako referenční značka při úpravě pozice elektronového svazku. Při každém zvětšení dochází k pootočení svazku a je nutné tuto rotaci korigovat, (b) zvětšení 115 \times , (c) zvětšení 940 \times

2.3 Snímky s úplným osvitom fluorescenčního stínítka

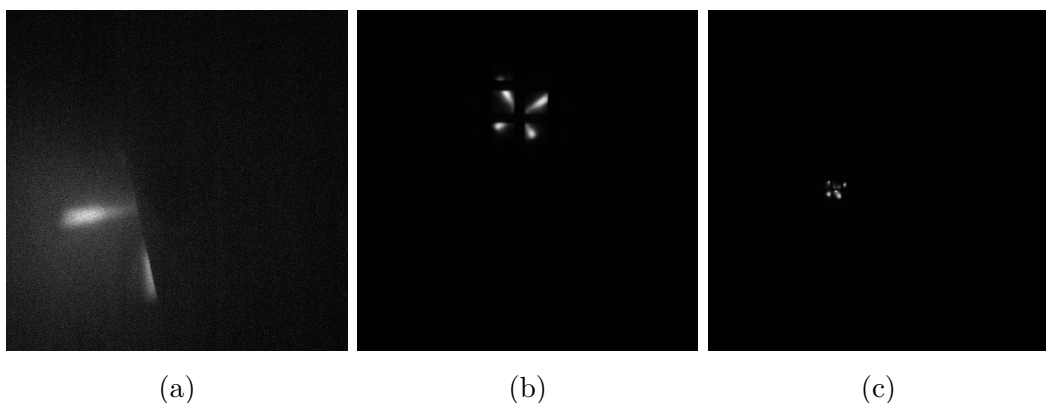
Pro tuto skupinu snímků je charakteristický plný osvit fluorescenčního stínítka a není tak viditelná žádná část kontury elektronového svazku. Úplné osvity jsou zobrazeny na Obr. 2.5. Obr. 2.5a zobrazuje plné osvětlení fluorescenčního stínítka při malém zvětšení, kdy došlo k ořezu svazku měděnou mřížkou. Je zde sice velmi dobře zřetelná hrana přechodu mezi osvětlenou a neosvětlenou částí stínítka, ale přesto není viditelná žádná část elektronového svazku, podle které by se dalo usuzovat na jeho lokalizaci nebo tvar. Obr. 2.5b zobrazuje degradaci fluorescenčního stínítka. Na obrázku 2.5c je zobrazen snímek s velmi roztaženým elektronovým svazkem, vlivem čehož dostaneme na fluorescenčním stínítku velmi malou intenzitu osvětlení.



Obr. 2.5: Ukázka snímků s plným osvětlením fluorescenčního stínítka. Snímek (a) zachycuje úplný osvit spolu s částečným zakrytím dvou stran stínítka. Snímky (b, c) zobrazují plný osvit stínítka s různou intenzitou osvětlení.

2.4 Snímky se zvýrazněnými postranními vyzařovacími laloky

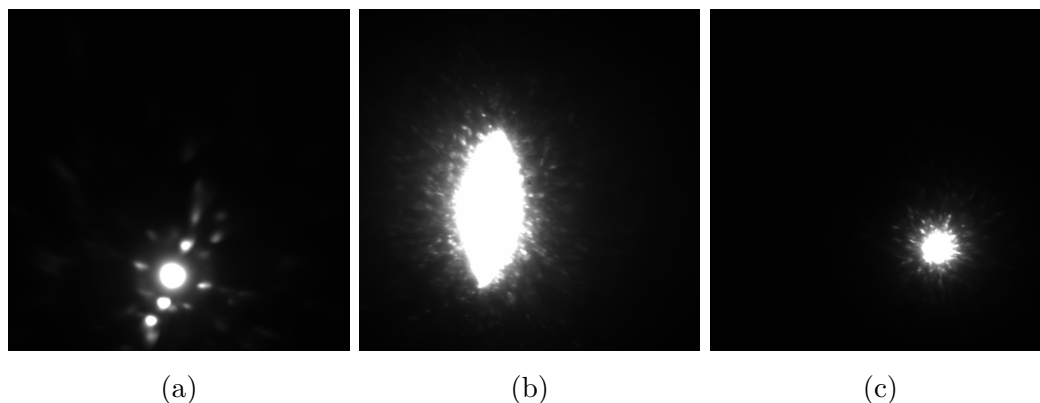
Vyzařovací charakteristika elektronového svazku má postranní laloky s intenzitou jasů lehce nad úrovní šumu. V přítomnosti primárního elektronového svazku nejsou úrovně intenzit bočních laloků za běžných podmínek zřetelné. Pokud je primární svazek fokusován a zcela zakryt mřížkou, ale boční laloky jsou stále viditelné, jsou tyto laloky velmi zvýrazněny automatickým prodlužováním expoziční doby. Jelikož u tohoto typu osvětlení chybí úplně obraz primárního svazku, není možné hranu elektronového svazku proložit elipsou a využít ji pro algoritmy automatického seřízení mikroskopu. Případy snímků se sekundárním elektronovým svazkem jsou uvedeny na Obr. 2.6.



Obr. 2.6: Ukázka snímků se zvýrazněnými bočními vyzařovacími laloky elektronového svazku. Snímky se odlišují velikostí zobrazených postranních laloků.

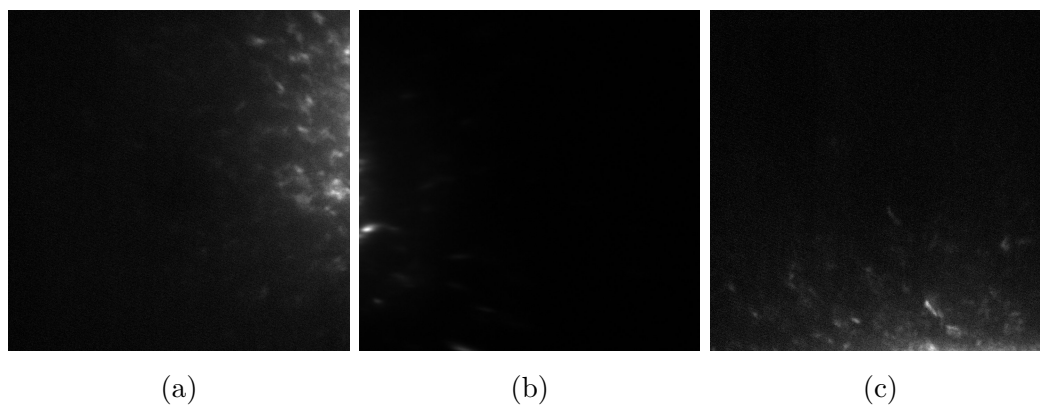
2.5 Snímky s rozptylem

Snímky zachycující rozptyl elektronového svazku je možné rozdělit do dvou skupin: snímky s rozptylem a přítomným primárním elektronovým svazkem a snímky s rozptylem bez primárního elektronového svazku. Na Obr. 2.7 jsou uvedeny typické příklady rozptylů s přítomným primárním svazkem.



Obr. 2.7: Ukázka snímků s rozptýleným elektronovým svazkem, (a) primární elektronový svazek s rozptýlenými oblastmi mající vysokou jasovou hodnotu, (b) rozptýlený astigmatický paprsek, (c) rozptyl paprsku s malým zvětšením.

Jak už bylo zmíněno výše, k rozptylu dochází i v případech, kdy je elektronový svazek mimo fluorescenční stínítko viz Obr. 2.8.



Obr. 2.8: Ukázka snímků s rozptýleným elektronovým svazkem bez primárního elektronového svazku, (a, b, c) zachycují rozptyl elektronového svazku mimo fluorescenční stínítko pokaždé z jiné strany.

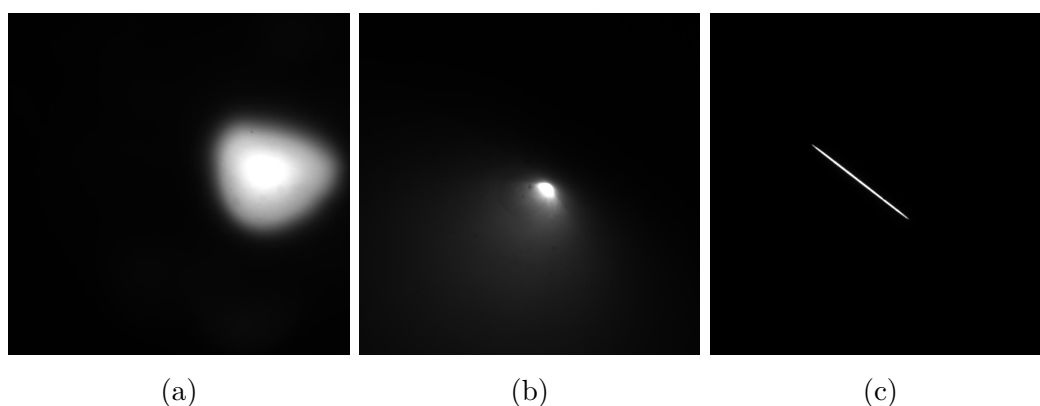
Vzorek materiálu ve formě tenké fólie je v transmisním elektronovém mikroskopu ozařován elektrony o energii řádově stovek kiloelektronvolt (keV). Vysokoenergetické

elektrony jsou rozptylovány do směru rovnoběžného se směrem dopadajícího svazku. Při průchodu elektronového svazku vzorkem dochází k emitování sekundárních elektronů ze vzorku. Vyražené elektrony dopadají na oblasti fluorescenčního stínítka mimo primární elektronový svazek a vzniká tak nežádoucí artefakt - rozptyl.

2.6 Snímky se zřetelnými vadami optických prvků

Nekorigované vady optických prvků mikroskopu snižují hodnoty jeho klíčových kvalitativních parametrů, zejména pak rozlišovací schopnost. Mezi nejběžnější optické vady patří astigmatismus a koma, které jsou zobrazeny na Obr. 2.9. Obě tyto vady jsou u elektronových mikroskopů korigovatelné. Astigmatismus je způsobený asymetrií magnetického pole. Ohnisková vzdálenost je pro dva svazky odlišná a elektrony prochází čočkou v různých rovinách. Během pozorování vzorku dochází ke zkreslení vzdáleností. Zvláštním případem astigmatismu je čárový fokus. Jedná se o extrémní případ, kdy elektronový svazek má tvar velmi tenké protáhlé elipsy. Astigmatismus se dá upravit pomocí stigmátorů, což jsou kvadrupólové magnetické cívkky, které upravují superpozici magnetického pole.

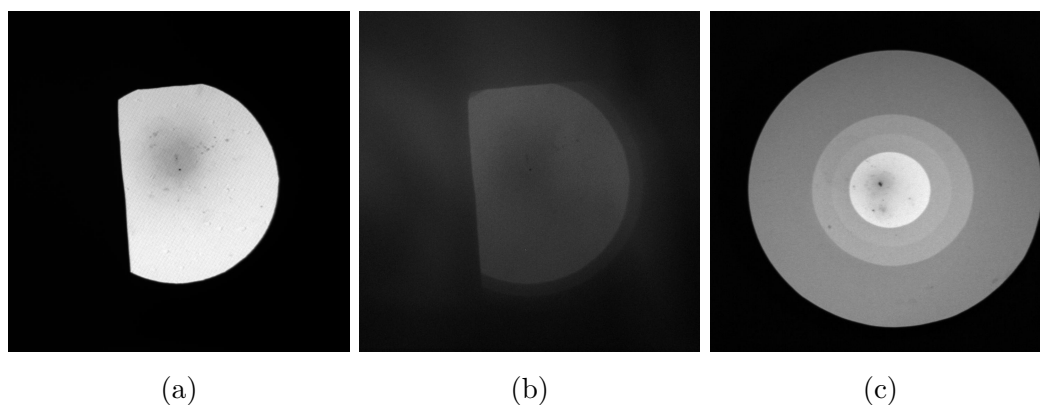
Koma je asymetrická vada, která způsobuje deformaci bodu při šikmém osvětlení. Bod je zobrazen jako skvrna připomínající kometu s postupně snižující se intenzitou. Vlivem přítomnosti komy se snižuje kontrast. Princip korekce spočívá v periodickém střídání dvou obrazů na stínítku a porovnání jejich rozostření. Vychylovací cívkky naklání primární svazek. Pokud je primární svazek nakloněný vůči optické ose, jsou dva obrazy různě rozostřené.



Obr. 2.9: Ukázka snímků s vadami seřízení mikroskopu, (a) trojčetný astigmatismus, (b) koma, (c) čárový fokus (tenký roztažený elektronový paprsek).

2.7 Snímky s dosvitem elektronového svazku

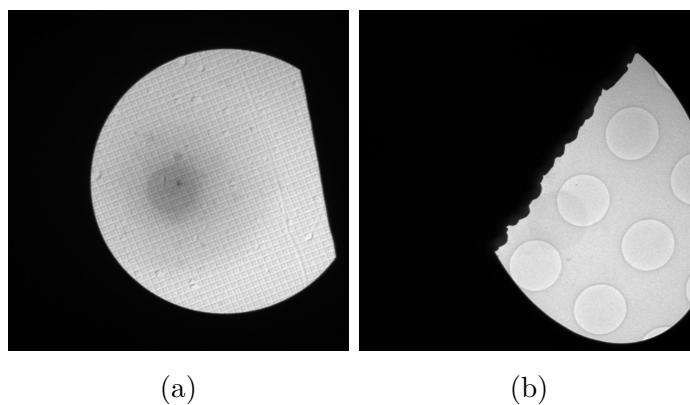
Dosvit je dynamický děj, který lze pozorovat na fluorescenčním stínítku při rychlé změně pozice elektronového svazku. Pokud dojde k posunu nebo změně velikosti elektronového svazku, dochází v původní oblasti na stínítku po určitou dobu k dohasínání fluorescenčního jevu. Dosvity jsou znázorněny na Obr. 2.10. Problém nastává v rozpoznání dosvitu od validního elektronového svazku. Snímky nelze od sebe odlišit na základě intenzity světla. Dosvit může mít větší intenzitu světla než validní světlo v horších optických podmínkách.



Obr. 2.10: Ukázka snímků s dosvitem fluorescenční vrstvy stínítka po změně pozice elektronového svazku, (a) validní elektronový svazek před změnou pozice svazku (b) dosvit stejného elektronového svazku po změně pozice, (c) dosvit postupně rozostřeného elektronového svazku.

2.8 Snímky se vzorkem

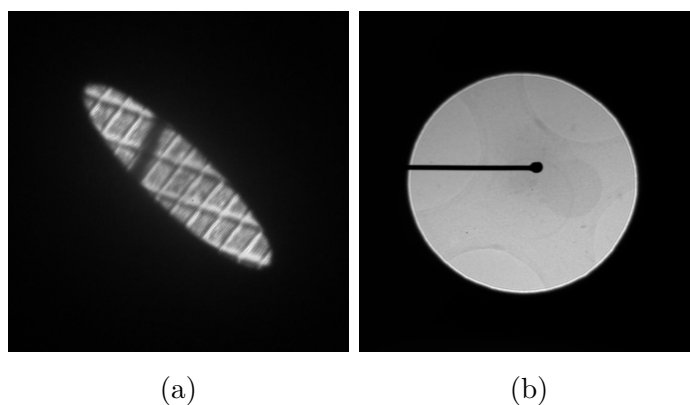
Obr. 2.11a zobrazuje zakrytí elektronového svazku při velkém zvětšení kalibračního vzorku. Kalibrační vzorek má na svém povrchu pravidelně umístěné malé čtverečky (tzv. cross grating), které se používají při seřízení mikroskopu (např. kalibrace zvětšení). Na Obr. 2.11b je zobrazen quantifoil, který se využívá při analýze biologických vzorků. Jedná se o perforovanou uhlíkovou folii s přesně umístěnými, různě definovanými tvary otvorů. Hrbolatá hrana oříznutého svazku je způsobena nepřesností při výrobě měděné mřížky.



Obr. 2.11: Ukázka snímků se vzorky, (a) částečně zakrytý kalibrační vzorek obsahující pravidelné mřížky, (b) částečně zakrytý quantifoil, který se používá pro fixaci biologických preparátů.

2.9 Ostatní nestandardní podmínky

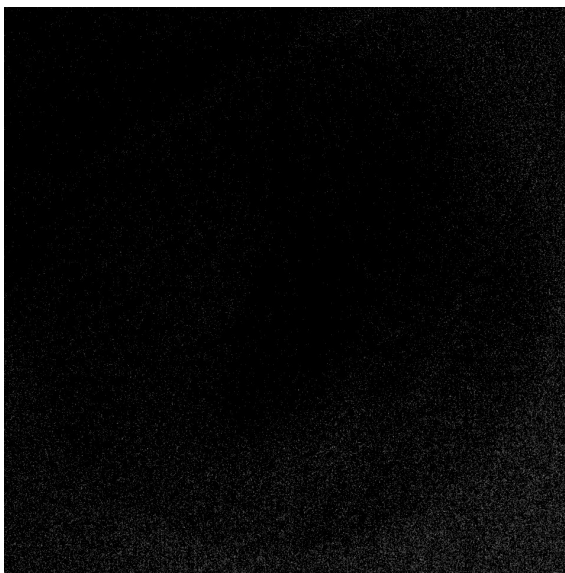
Na Obr. 2.12 jsou uvedeny příklady snímků, které nespádají do žádné s předchozích skupin, ale jsou něčím zvláštní. Dalším charakteristickým znakem těchto snímků je zašedlá plocha uprostřed stínítka. V průběhu času dochází k opotřebení fluorescenční vrstvy a snížení citlivosti přeměny elektronů na viditelné světlo. Degradace stínítka a propad homogenity osvitu jsou způsobeny tím, že většina analýz je směřována do středu. Tyto nepravidelnosti představují komplikaci při prokládání elipsy obrazem.



Obr. 2.12: Ukázka snímků nestandardních podmínek, (a) kontaminace vzorku způsobená při přípravě vzorku, (b) jehla se používá při řadě analýz a zasahuje do oblasti elektronového svazku.

2.10 Snímky šumu

Tyto snímky vznikají, pokud je primární elektronový svazek mimo oblast pozorování a na fluorescenční stínítko nedopadá žádná část elektronového svazku. Ukázka snímku bez elektronového svazku je zobrazena na Obr. 2.14. Podrobnější analýza charakteru tohoto šumu je popsána v kapitole 6.3.



Obr. 2.13

Obr. 2.14: Ukázka snímku s charakteristickým šumem pro TEM.

3 Strojové učení

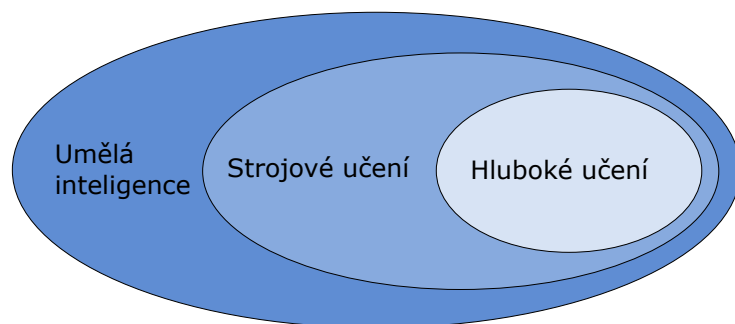
Strojové učení je oblast umělé inteligence, která se zabývá návrhem a použitím algoritmů umožňující počítači se samostatně rozhodovat. K tomu, aby byl systém schopen automaticky provádět vlastní předpovědi, je zapotřebí vytvořit matematický model¹ na vzorových datech. Algoritmy strojového učení provádí identifikaci vzorů v datech. Přesnějších výsledků strojového učení je možné dosáhnout s větším množstvím dat. V posledních letech zažívá tato oblast umělé inteligence obrovský rozvoj a nabízí širokou oblast použití. Se strojovým učáním je možné se setkat při rozpoznávání řeči nebo psaného textu, počítačovém vidění, data miningu, u virtuálních asistentů s hlasovou podporou, ve zdravotní diagnostice, v internetových vyhledávačích, robotice a v mnoha dalších oblastech. Výběr vhodného algoritmu závisí na daném typu dat, která jsou k dispozici. Algoritmy je možné rozdělit do tří velkých skupin: učení s učitelem, učení bez učitele a zpětnovazební učení [16].

Učení s učitelem využívá expertního značení dat. Každý datový bod je označen příslušnou hodnotou nebo zařazen do konkrétní třídy. Učení je založené na porovnání predikované hodnoty s expertním značením, při kterém dochází k úpravě parametrů modelu, dokud predikovaná hodnota nedosahuje požadované přesnosti. Skupina zahrnuje algoritmy rozhodovacího stromu [17], náhodného lesa [18], lineární regrese, Naivní Bayesovský klasifikátor [19], metodu podpůrných vektorů, metodu nejbližšího souseda [20], umělé neuronové sítě a další.

Učení bez učitele je skupina algoritmů strojového učení, kde data neobsahují expertní značení. Algoritmy využívají pouze samotná data, která se snaží uspořádat do clusterů na základě vnitřních vazeb mezi daty. Příkladem algoritmů je například metoda K-means [21], analýza hlavních komponent [22] nebo skryté Markovovy modely [23].

Zpětnovazební učení je skupina strojového učení, která využívá předchozích výsledků učení a na základě nich se rozhoduje jakou akci následně provede. Algoritmus po každé akci systému obdrží zpětnou vazbu, ze které zjistí, jestli byla volba správná nebo chybná. Mezi algoritmy zpětnovazebního učení patří algoritmy jako Monte Carlo, Q-learning nebo Sarsa [24].

¹Model popisuje systém na základě parametrů a matematických struktur reprezentující stavy systému a vzájemné vztahy mezi proměnnými a parametry.



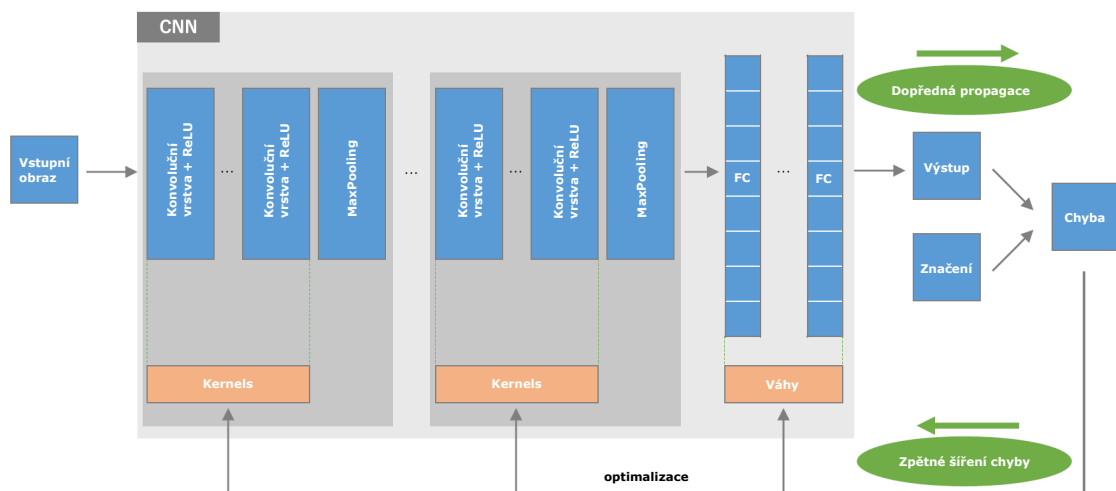
Obr. 3.1: Koláč umělé inteligence

Hluboké učení je specifickou skupinou strojového učení a jak již bylo zmíněno výše, společně s ním spadá do oblasti umělé inteligence. Pro lepší představu rozdělení oblastí umělé inteligence jsou vztahy zobrazeny v Obr. 3.1. Modely hlubokého učení obsahují velké množství skrytých vrstev a jejich počet určuje hloubku modelu. Při hlubokém učení jsou tyto vrstvy naučeny prostřednictvím neuronových sítí. Učení je proces, při kterém se hledá kombinace parametrů modelu, které vedou k minimalizaci ztrátové funkce mezi predikovanými a expertními hodnotami dat. Oproti klasickým umělým neuronovým sítím se liší v tom, že není potřeba extrakce a selekce vhodných příznaků datové sady. Výběr a návrh příznaků je mnohdy velmi komplikovaný a časově náročný krok při předzpracování dat. Výhodou hlubokého učení je, že si model během učení vytváří vhodné příznaky sám automaticky. Vývoj rychlých paralelních čipů grafických karet v poslední letech umožnil výrazný rozvoj konvolučních neuronových sítí a počítačového vidění [25],[26].

3.1 Konvoluční neuronové sítě

Konvoluční neuronové sítě (zkráceně CNN, odvozeno z anglického spojení Convolutional Neural Network) jsou součástí skupiny vícevrstvých dopředných umělých neuronových sítí. V poslední době se jedná o univerzální model hlubokého učení, který se uplatňuje při řešení řady úkolů počítačového vidění. CNN jsou tvořeny mnohokrát vrstevnatými stavebními bloky a jsou navrženy tak, aby se automaticky a adaptivně učily prostorovou hierarchii vzorů. Oproti klasickým neuronovým sítím se liší nejen svojí architekturou, ale i vstupními daty, která neobsahují příznakový vektor. CNN tedy nevyžadují předem extrahované příznaky. Mezi další výhody CNN patří snadnější trénování sítě nebo menší počet parametrů k optimalizaci oproti plně propojeným neuronovým sítím se stejným počtem skrytých vrstev. Důvod menšího počtu parametrů je ten, že jednotlivé váhy neuronů jsou mezi neurony sdíleny. Neurony jsou spojovány do podoblastí tak, aby byla pokryta celá plocha obrazu. Během

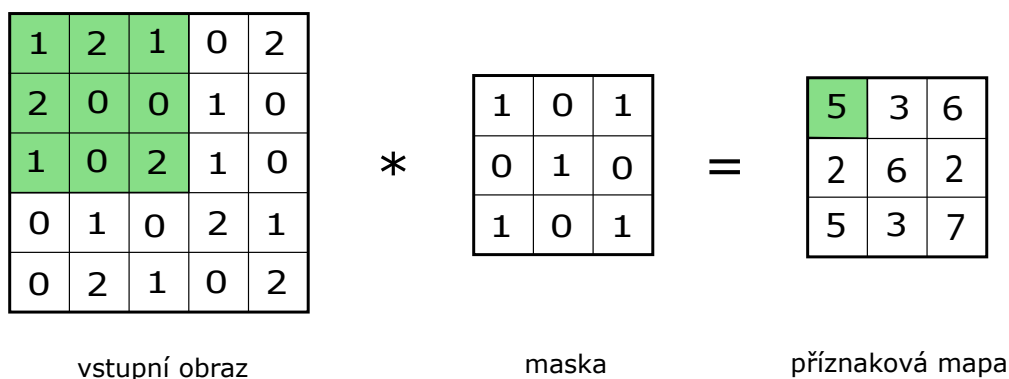
trénování dochází k optimalizaci vah a parametrů filtrů (kernels) algoritmem zpětného šíření chyby. Získání prostorové znalosti vzorů probíhá postupně od rozpoznání malých lokálních vzorů (jako je například hrana), přes získání znalosti základních tvarů až po vytvoření komplexních abstraktních vizuálních vjemů. Mezi základní vrstvy CNN patří: aktivační, konvoluční, podvzorkující (pooling) a plně propojená vrstva. První dvě zmíněné vrstvy se starají o extrakci příznaků, zatímco plně propojená vrstva se zabývá vyvozením výsledné predikce z extrahovaných příznaků. Na Obr. 3.2 je zobrazena ukázka obecné architektury konvoluční neuronové sítě. V následujících odstavcích budou popsány jednotlivé vrstvy podrobněji [27],[28].



Obr. 3.2: Obecné schéma architektury konvoluční neuronové sítě. CNN se skládá z několika stavebních bloků (konvolučních, podvzorkujících a plně propojených vrstev). Správnost modelu je ověřena výpočtem kritériální funkce, na základě které jsou následně upraveny váhy vrstev algoritmem zpětného šíření chyby. Převzato a upraveno z [29].

3.1.1 Konvoluční vrstva

Konvoluční vrstva je základní stavební jednotkou všech CNN, která využívá k extrakci příznaků operaci, podle které nese název jak samotná vrstva, tak i neuronová síť – konvoluce. Konvoluce je lineární matematický operátor, jehož výstupem je příznaková mapa. Konvoluční filtr je definován maskou, která provádí transformaci hodnot intenzity jasu vstupního obrazu nebo informace z jiné příznakové mapy předchozí konvoluční vrstvy. Masku filtru prochází pixely obrazu z levého horního k pravému dolnímu rohu. Pixely obrazu, které se nacházejí pod příslušnými pixely masky jsou mezi sebou vynásobeny. Součiny jsou sečteny a přiřazeny na odpovídající místo příznakové mapy. Princip je zobrazen na Obr. 3.3.



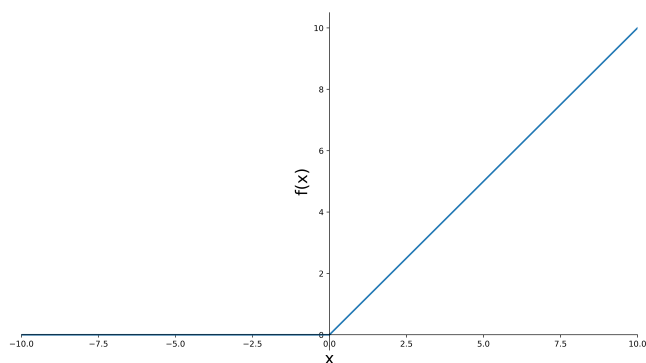
Obr. 3.3: Princip konvoluce.

Pro identifikaci objektů v obraze je potřeba použít více filtrů a získat větší počet příznakových map. Jeden filtr určí vždy jen jeden příznak neboli příznakovou mapu. Prostorové umístění vstupních příznaků odpovídá stejnému prostorovému umístění na výstupní příznakové mapě (levý horní roh výstupu obsahuje informace o levém horním rohu vstupu). Velikost masky a počet filtrů jsou klíčové hyperparametry, které ovlivňují velikost výstupu konvoluční vrstvy. Rozměr masky je většinou 3×3 pixely, ovšem lze se setkat i s většími maskami 5×5 nebo 7×7 . Počet filtrů definuje hloubku příznakové mapy. Šířka a výška výstupu se může lišit od šířky a výšky vstupu vlivem okrajového efektu konvoluce nebo použitím kroků (strides), o které se posouvá filtr.

Zero padding je způsob, jak předejít okrajovému efektu způsobeného aplikací konvolučních filtrů. Aby nedocházelo ke zmenšení rozměrů příznakové mapy po každé konvoluci, přidává se požadovaný počet nulových řádků a sloupců na každé straně vstupních příznaků. Střed masky je pak umístěn na původní okraj vstupu. Tím je dosaženo stejné velikosti vstupu a výstupu.

Kroky (strides) jsou druhým zmíněným faktorem, který ovlivňuje velikost výstupu příznakové mapy. Kroky určují vzdálenost, o kterou se filtr posouvá mezi dvěma po sobě jdoucími pixely. Výchozí hodnota je rovna 1. Vyšší hodnoty než 1 se používají k dosažení podvzorkování mapy [28],[29].

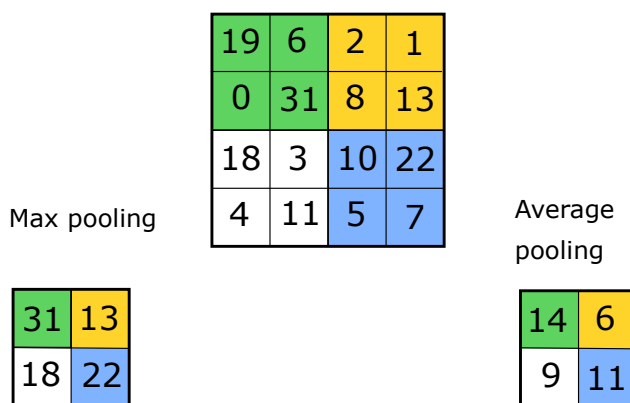
Po konvoluční vrstvě následuje aktivační funkce, která provádí nelineární transformaci neuronu. Mezi nejběžnější aktivační funkce patří signum, sigmoidea nebo hyperbolický tangens. V současné době se velmi často používá ReLU (zkráceně z anglického rectified linear unit) aktivační funkce [34]. ReLU funkce je zobrazena na Obr. 3.4, z kterého je patrné, že funkce nahrazuje všechny záporné hodnoty nulou. Výhodou ReLU funkce v porovnání s ostatními nelineárními funkcemi používanými v CNN je její snadno proveditelná derivace a mnohonásobně rychlejší učení sítě.



Obr. 3.4: ReLU aktivační funkce.

3.1.2 Podvzorkující (pooling) vrstva

Vrstva slouží k podvzorkování příznakové mapy, které je prováděno na základě sdružování hodnot v daných oblastech, vlivem čehož dochází k redukci velikosti mapy. Příznaková mapa snižuje svoji šířku a výšku. Hloubka zůstává nezměněná. Redukce prostorových dimenzí má za následek zjednodušení výstupu z konvolučních vrstev a celkové snížení parametrů, výpočetní náročnosti a paměťových nároků. Vrstva neobsahuje žádné parametry, které se během učení optimalizují. Na Obr. 3.5 je zobrazen princip dvou nejpoužívanějších sdružovacích metod.



Obr. 3.5: Princip sdružovacích metod s krokem (stride) 2.

Max-pooling je sdružovací metoda, která využívá okna o velikosti 2×2 . Okno se posouvá po příznakové mapě podobně jako v případě konvoluce. Ovšem zde je zvolen i krok (stride). Pro okno velikosti 2×2 je krok roven 2. Ze vstupních hodnot příznakové mapy je vybrána maximální hodnota. Na podobném principu funguje

i sdužovací metoda average-pooling. Rozdíl těchto dvou sdužovacích metod spočívá ve výběru hodnoty v posuvném okně. U average-poolingu se vypočítá průměr z hodnot okna namísto dosažení maximální hodnoty. Cílem je co nejlépe a nejeftivněji zakódovat prostorovou přítomnost příznaku nebo tvaru v určité oblasti. Max-pooling se jeví jako lepší volba právě z důvodu, že reprezentuje maximální přítomnost různých příznaků [29], [30].

3.1.3 Plně propojená vrstva

Konečným stavebním blokem, který uzavírá celou architekturu CNN je plně propojená vrstva. Příznakové mapy z poslední konvoluční nebo pooling vrstvy jsou transformovány do jedno-dimenzionálního vektoru. Každá hodnota vektoru je spojena vahou se všemi vstupy jedné popřípadě více plně propojených vrstev. Samotné váhy určují významnost a důležitost hodnot jednotlivých neuronů. Aktivační funkce finální plně propojené vrstvy se liší od ostatních a je obvykle zvolena podle typu řešeného problému. Počet výstupů v poslední vrstvě odpovídá počtu tříd [29], [30].

V Tab.3.1 jsou uvedeny často používané aktivační funkce plně propojených vrstev pro konkrétní úlohu. Typickým příkladem může být aktivační funkce softmax, která se používá pro klasifikační problémy. Softmax normalizuje výstupní hodnoty plně propojené vrstvy od 0 do 1 a převádí je na pravděpodobnost pro konkrétní třídy.

Tab. 3.1: Příklady použití aktivačních funkcí posledních plně propojených vrstev pro konkrétní úlohy

řešené úkoly	aktivační funkce
binární klasifikace	sigmoid
klasifikace do více tříd s jednou označenou třídou	softmax
klasifikace do více tříd s více označenými třídami	sigmoid
regrese pro libovolnou hodnotu	lineární se sklonem 45°
regrese pro hodnotu mezi 0 a 1	sigmoid

3.2 Proces učení neuronové sítě

Principem učení neuronové sítě je nalezení kombinace parametrů a vah vrstev modelu, které minimalizují rozdíly mezi výstupy pro daný soubor trénovacích dat a jejich odpovídajícími cíly. Výkon modelu se hodnotí kriteriální funkcí, na základě které jsou aktualizovány váhy a parametry vrstev pomocí algoritmu zpětného šíření chyby a optimalizačního algoritmu gradientního sestupu. Kriteriální funkce udává shodu mezi výslednou predikcí neuronové sítě a expertně značenými daty. Na začátku

učení sítě je potřeba zvolit kritériální funkci s ohledem na konkrétní typ řešeného problému [30].

Gradientní sestup je běžně používaný optimalizační algoritmus, který iterativně upravuje parametry a váhy sítě. Gradient kritériální funkce udává směr nejstrmějšího růstu. Všechny váhy a parametry jsou upraveny v negativním směru gradientu s danou velikostí kroku nazývanou učební krok. Výsledkem je snížení kritériální funkce. Velikost učebního kroku je jeden z klíčových hyperparametrů, které je potřeba vhodně nastavit před učením sítě. Rovnice 3.1 popisuje aktualizaci vah

$$w = w_0 - \alpha \frac{\partial L}{\partial w}, \quad (3.1)$$

kde w_0 jsou váhy neuronové sítě, α je učební krok a $\frac{\partial L}{\partial w}$ je derivace chybové funkce.

Gradient se většinou počítá pro tzv. mini-dávku (mini-batch) trénovacích dat a následně se použije pro aktualizaci vah. Tento optimalizační algoritmus se nazývá minibatch stochastic gradient descent. Existuje řada optimalizačních algoritmů, které kromě aktuální velikosti gradientu berou při výpočtu do úvahy i předchozí aktualizaci vah. Mezi tyto algoritmy patří stochastic gradient descent s hybností, Adagrad, RMSprop, Adam a další. Hybnost, která se používá v mnoha z těchto variant, řeší problémy rychlosti konvergence a lokálních minim. Použití optimalizačního algoritmu Adam navíc umožňuje adaptivně měnit rychlost učení pro jednotlivé parametry na základě znalosti gradientů v předchozích iteracích. Algoritmus si ukládá průměrnou hodnotu gradientu z předchozích iterací a průměrnou hodnotu druhých mocnin gradientů, kde obě tyto hodnoty jsou postupně exponenciálně zapomínány [31],[39].

3.3 Přehled architektur sítí

Jednotlivé architektury CNN se od sebe liší počtem a uspořádáním vrstev. Mezi první architektury patří LeNet (1998) a AlexNet (2012), které jsou si velmi podobné. Jedná se o relativně mělké sítě, obsahující dvě až pět konvolučních vrstev. Hyperbolický tangens, který byl do té doby běžnou volbou, byl nahrazen ReLU aktivační funkcí. Díky AlexNetu se staly CNN výchozí volbou při řešení úloh počítačového vidění. Od roku 2012 probíhá neustálý vývoj nových architektur. O pár let později přichází architektura nazvaná VGG 19 (číslo udává počet vrstev), která přichází s inovativní myšlenkou a to se zařazením konvolučních filtrů o velikosti 3×3 do série. Tím bylo dosaženo stejného výsledku jako u větších konvolučních filtrů (AlexNet 11×11), ale s nižší výpočetní náročností. Mezi revoluční sítě patří architektura Re-

snet, která řeší problém vymizení gradientu² pomocí konvolučních a identity bloků. Síť používá batch-normalizaci, při které jsou sjednoceny různé rozsahy hodnot příznakových map. Jedná se o jeden ze způsobů regularizace sítě. Mezi výhody batch normalizace patří: nastavení většího kroku učení, snížení vlivu počáteční inicializace vah a snížení rizika přeučení sítě [41]. Současně s Resnet architekturou vzniká GoogleLeNet architektura. GoogleLeNet zavádí vlastní Inception blok, který obsahuje paralelní větve s různými velikostmi konvolučních filtrů. Výsledné příznaky jsou z větví zřetězeny a vyvedeny do jednoho výstupu [32], [33].

Jelikož při zpracování diplomové práce bude použita segmentační CNN, budou v následujících odstavcích představeny často používané segmentační architektury. Segmentace obrazu patří mezi běžné úlohy při zpracování obrazů a právě CNN se jeví jako vhodný a účinný nástroj. Segmentační síť provádí klasifikaci jednotlivých pixelů do tříd podle pravděpodobnosti. Obecně platí, že se zvyšujícími rozměry vstupního obrazu, roste i výpočetní náročnost, zejména pak vysoké požadavky na výkon grafických karet.

3.3.1 Plně konvoluční neuronové sítě

Plně konvoluční neuronové sítě se používají pro segmentaci obrazu a řešení mnoha úloh počítačového vidění. Jednou z klíčových vlastností této sítě je, že je použitelná pro různé velikosti vstupních dat. Síť využívá naučené vrstvy klasifikačních architektur a jemným doladěním vah provádí segmentaci obrazu. Plně propojené vrstvy jsou nahrazeny 1×1 konvoluční vrstvou s N třídami. K dosažení stejné velikosti výstupního obrazu jako vstupního, se provádí v dekonvoluční vrstvě bilineární interpolace. Výstupem je pravděpodobnostní mapa, která udává pravděpodobnost pixelů k jednotlivým třídám. Plně konvoluční síť má řadu omezení, mezi která patří limitní velikost receptivního pole viz Obr. 3.6. Jinými slovy objekt, který je větší nebo menší než receptivní pole, může být špatně zařazen do více tříd. Stejně tak malé objekty jsou často ignorovány nebo chybně označeny jako pozadí. [35].

²Vymizení gradientu je problém, který nastává při zpětném šíření chyby. U velmi hlubokých CNN může docházet k zeslabení či k úplné ztrátě gradientu. Síť pak ztrácí schopnost učení.



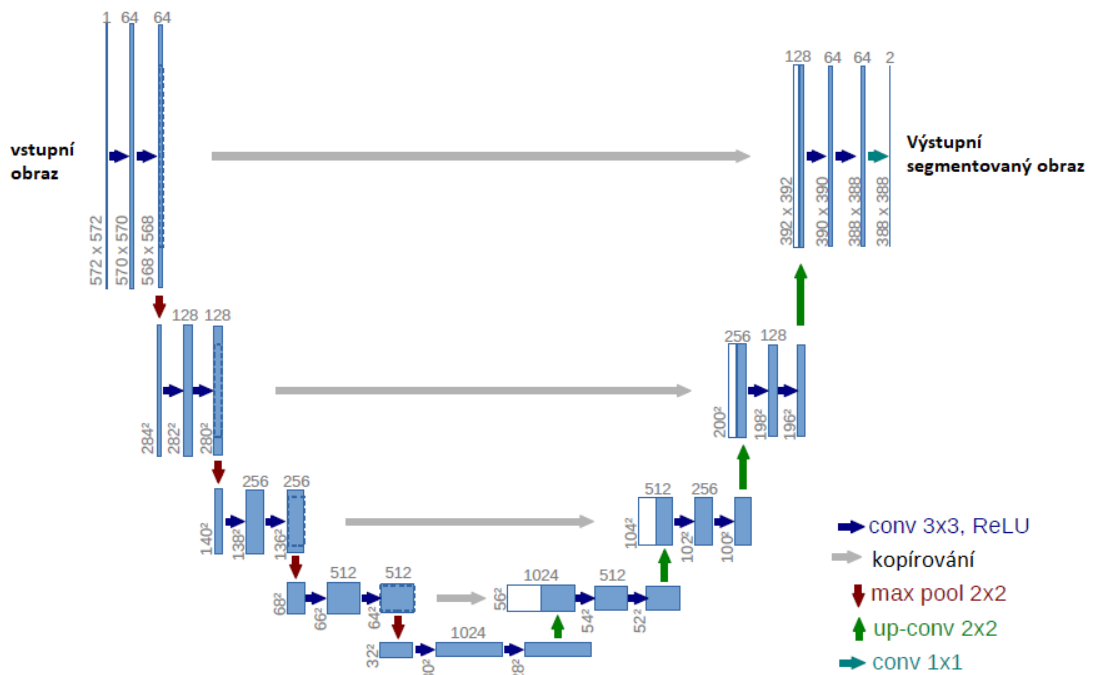
Obr. 3.6: Omezení segmentace obrazu způsobené plně konvoluční sítí. Na levé straně je původní obraz, uprostřed je expertní značení, napravo výsledek segmentace, převzato z [35].

3.3.2 SegNet

SegNet obsahuje dva základní bloky enkodér-dekodér. Cílem enkodéru je co nejlépe zakódovat prostorovou informaci obrazu, která je následně použita pro definování oblasti segmentovaných objektů. Enkodér SegNetu obsahuje vrstvy z architektury VGG 16. Během podvzorkování příznakové mapy je uložena informace o pozici příznaku. Pozice je zakódovaná 2 bity do okna velikosti 2×2 a propojena dlouhými spojeními (long connections) s příslušnou vrstvou dekodéru. Vrstvy dekodéru jsou zrcadlově uspořádány podle enkodéru. Dekodér využívá uložených pozic příznaků pro převzorkování a dosažení původních rozměrů obrazu. Na konec celé architektury je umístěna aktivační funkce Softmax, která klasifikuje pixely do jednotlivých tříd [36].

3.3.3 Unet

Unet architektura je používána pro účely segmentace biomedicínských obrazů, kde dosahuje velmi vysoké úspěšnosti i v případě malého množství trénovacích dat. Architektura sítě je zobrazena na Obr. 3.7.



Obr. 3.7: Architektura Unet, převzato a upraveno z [37].

Síť obsahuje dvě symetrické větve: sestupnou (enkodér) a vzestupnou (dekodér). Sestupná část architektury neboli tzv. enkodér provádí podvzorkování obrazu. Stavební prvky enkodéru a jejich uspořádání se moc neliší od klasifikačních architektur CNN. Pro zvýšení efektivity učení se někdy nahrazuje sestupná část předučenou klasifikační CNN (VGG nebo Resnet). Enkodér obsahuje konvoluční vrstvy s velikostí masky filtru 3×3 , které jsou následovány aktivační funkcí ReLU a max-pooling vrstvou. Při průchodu obrazu pooling vrstvou dochází k redukcí jeho rozměrů na polovinu. Vzestupná část provádí zpětné převzorkování obrazu na původní rozměry. K tomu využívá spojení mezi odpovídajícími vrstvami enkodérové a dekodérové části a transponovanou konvolucí [37].

4 Augmentace dat

Augmentace dat je umělé rozšíření trénovací sady. Používá se zejména pro účely strojového učení, kdy je k dispozici pouze malá trénovací sada dat. Rozšíření množiny dat umožní zvýšení klasifikační robustnosti a snadnější trénování neuronové sítě, než kdyby byla použita jen data originální. Navíc se jedná o způsob, jak předejít přeučení¹ neuronové sítě. V následující kapitole budou popsány metody, které jsou nejčastěji využívány pro rozšíření množiny dat.

4.1 Geometrické transformace

Geometrické transformace se vyznačují převedením pozičních souřadnic originálního obrazu do nových pozičních souřadnic výstupního obrazu. Při většině geometrických transformací jsou transformované souřadnice neceločíselné a je potřeba jasové hodnoty interpolovat. Mezi časté interpolační metody patří metoda nejbližšího souseda, lineární nebo kubická interpolace. Nové poziční souřadnice jsou vypočteny z původních souřadnic násobené transformační maticí. Je důležité, aby při aplikaci geometrických transformací obrazu nedocházelo ke vzniku dat, která neodpovídají reálným případům. Nereálná data by mohla vést ke špatnému výsledku strojového učení [7].

- **Překlopení** patří k nejjednoduššímu typu geometrické transformace z hlediska implementace. U běžných fotografií se častěji používá překlopení kolem horizontální osy než vertikální. Při překlápění snímků z TEM je volba osy libovolná. Pro datasey obsahující pouze text není vhodná, protože při překlopení textu vznikají neexistující písmena.
- **Rotace** - Augmentace pomocí rotace probíhá otáčením obrazu směrem doleva nebo doprava podle středu rotace v rozsahu od 1° do 359° . Při rotaci obrazu mohou vznikat v novém obrazu místa, která nemají v původním obraze ekvivalent a hodnota pixelu těchto míst je rovna 0. Chybějící hodnoty pixelů je nutné doplnit např. barvou nejbližšího pixelu, barvou pozadí nebo se obraz ořeže.
- **Posun** obrazu doleva, doprava, nahoru nebo dolů může být velmi užitečnou transformací v případě, že se v trénovací množině dat vyskytuje prvek na stejném místě. Příkladem může být úloha na rozpoznání obličeje, kde je ve většině případu obličej umístěn uprostřed obrazu. Testovací model bude pak vyžadovat vždy přesně vycentrované obličeje. Implementací posunu dojde k zamezení přeučení modelu na určitou polohu.

¹Přeučení je stav, kdy se model přizpůsobí množině trénovacích dat a selhává na validačních datech.

- **Změna měřítka** - Původní velikost obrazu je při změně měřítka pro výsledný obraz zachována. Pokud probíhá změna měřítka směrem dolů jsou okraje doplněny průměrnou hodnotou okolí nebo hodnotou nejbližšího pixelu. Pokud změna měřítka je vedena směrem nahoru, potom se výsledný obraz ořízne na původní velikost [6],[15].

4.2 Přidání šumu

Přidáním šumu do obrazu dojde ke zvýšení robustnosti a zobecnění modelu. Model si snadněji poradí s drobnými změnami v obrazu. Velmi často se přidává do obrazu Gaussovský bílý šum. Mezi jeho výhody patří prostorová nekorelovanost, tzn. že hodnota intenzity jednoho pixelu bílého šumu je nezávislá na hodnotě šumu sousedního pixelu. Ke každému pixelu je přičtena hodnota šumu s určitým rozptylem a nulovou střední hodnotou. Výkonové spektrum Gaussovského šumu je rovnoměrné a všechny jeho frekvence jsou zastoupeny se stejnou pravděpodobností.

Dalším často přidávaným typem šumu do obrazu je impulzní šum (někdy označovaný jako pepř a sůl). Šum postihuje pouze jednotlivé pixely nebo menší skupiny pixelů. Intenzita původního pixelu je nahrazena vysokou hodnotou šumu, která často způsobuje saturaci obrazu na extrémní hodnotu. Mezi další šумы patří: Moiré šum, Perlinův šum, Gaborův šum a mnoho dalších [8],[6].

4.3 Úprava kontrastu barevných složek

Barevný prostor lze úpravou kanálů obrazu využít pro vytvoření nových světelných podmínek. Změnou barevného prostoru se bude model zaměřovat na tvary objektů než na samotnou barvu. Barevný prostor se dá modifikovat úpravou histogramu, spojením matic jednotlivých barevných kanálů, přičtením nebo odečtením konstanty od hodnot pixelů a dalšími úpravami. Ekvalizace histogramu je neklesající lineární transformace kontrastu. Cílem ekvalizace je vytvoření obrazu s přibližně rovnoměrným rozložením jasových hodnot. Jiný způsob úpravy kontrastu je založen na vytvoření po částech lineární transformace, která transformuje jasové hodnoty na celý rozsah jasových hodnot.

Pseudobarvení je operace, pomocí které je možné přiřadit šedotónovému obrazu barvu. Přiřazená barva většinou neodpovídá skutečným barvám objektu. Každý stupeň šedi je převeden na kombinaci barevných RGB složek. [9],[10],[11].

4.4 Filtrace obrazu

Augmentace dat pomocí filtrace obrazu je založena na aplikaci lokálních operátorů. Lokální operace s obrazem jsou realizovány konvolucí obrazu a masky. Rozmazání obrazu zvyšuje robustnost modelu, kdy trénovací data obsahují obrazy s rozostřeným pohybem. Zostřené obrazy vedou ke zvýraznění detailů. Pomocí úpravy centrálního prvku masky je možné regulovat míru ostření. Mediánový filtr patří k lokálním operátorům a je často používán pro potlačení šumu nebo vyhlazení obrazu. Pro výpočet výstupní hodnoty pixelu používá masku, která se posouvá po obraze. Výhodou mediánové filtrace je, že zachovává hrany v obraze [6],[12],[15].

4.5 Augmentační metoda Random Erasing

Metoda byla navržena pro případy rozpoznání objektů v obraze, kdy některé části v něm nejsou zcela jasné. Mohou být určitým způsobem znehodnocené (např. rozmazané, neostře, šum). Nově získaná data umožní modelu analyzovat více charakteristických prvků v obraze a zabránit přeučení se na jeden konkrétní vizuální prvek. V obraze je náhodně vybraná oblast o velikosti $N \times M$, kde jsou její hodnoty pixelů nahrazeny průměrnou hodnotou pixelů v dané oblasti nebo náhodnou hodnotou [15].

5 Metodika pro vyhodnocení výsledků

K objektivnímu zhodnocení výsledků predikce CNN byly vybrány metriky, které jsou běžně používány při ověření přesnosti a kvality segmentace. Všechny uvedené metriky jsou založeny na ohodnocení míry překryvu, která vychází z matice záměn. Matice záměn shrnuje výkon klasifikátoru s ohledem na testovací data. Jedná se o dvoudimenzionální matici, kde jedna dimenze odpovídá referenčním datům a druhá dimenze odpovídá predikci klasifikátoru viz Obr. 5.1.

		Predikce klasifikátoru	
		<i>Pozitivní</i>	<i>Negativní</i>
Referenční data	<i>Pozitivní</i>	TP	FN
	<i>Negativní</i>	FP	TN

Obr. 5.1: Matice záměn.

Matice záměn při řešení binární klasifikace obsahuje čtyři třídy, do kterých může být predikovaná hodnota (pixelu) zařazena. První třída TP (z anglického true positive) vyjadřuje počet pixelů, které byly správně zařazeny do oblasti segmentovaného objektu na základě referenčního značení. Třída TN (z anglického true negative) vyjadřuje počet pixelů, které byly správně označeny jako pozadí. Třída FN (z anglického false negative) vyjadřuje počet pixelů, které byly chybně označeny jako pozadí objektu. Poslední třída FP (z anglického false positive) vyjadřuje počet pixelů, které byly chybně označeny jako součást segmentovaného objektu. Z této matice je možné vyjádřit na základě rozřazení hodnot do těchto čtyřech tříd sadu ukazatelů [42],[43]. Mezi nejzákladnější ukazatele patří přesnost (Acc z anglického accuracy) 5.1 a chyba (Err z anglického error) 5.2

$$Acc = \frac{TP + TN}{TP + FN + FP + TN}. \quad (5.1)$$

Přesnost je běžně používaný ukazatel pro hodnocení binární klasifikace. Vyjadřuje poměr mezi správně zařazenými hodnotami (pixelu) a celkovým počtem všech hodnot. V případě segmentace znázorňuje správnost označení pixelu za pozadí nebo objekt. Z přesnosti je možné jednoduše vyjádřit chybu

$$Err = 1 - Acc. \quad (5.2)$$

Senzitivita je ukazatel, který udává úspěšnost zachycení přítomnosti sledovaného stavu neboli udává poměr mezi počtem správně označených pixelů objektu a všemi pixely označenými jako objekt. Senzitivitu lze vyjádřit pomocí vztahu 5.3.

$$Senzitivita = \frac{TP}{TP + FN} \quad (5.3)$$

Dalším ukazatelem je **specificita** 5.4, která reprezentuje poměr vzorků datové množiny, které byly správně označeny jako negativní k celkovému počtu všech negativních vzorků. Vyjadřuje schopnost klasifikátoru vybrat případy, kdy sledovaný stav nenastává tzn. označí správně pixel za pozadí. Stejně jako senzitivita nabývá hodnot od 0 po 1.

$$Specificita = \frac{TN}{TN + FP} \quad (5.4)$$

Dice koeficient je někdy též nazýván jako index překrytí nebo F1 skóre. Jedná se o nejčastěji používanou metriku při evaluaci segmentace biomedicínských obrazů a slouží k přímému porovnání predikce a expertního značení. Dice koeficient je možné vyjádřit pomocí vztahu 5.5 a nabývá hodnot z intervalu $\langle 0;1 \rangle$, kde 1 vyjadřuje 100% překryv oblastí [43].

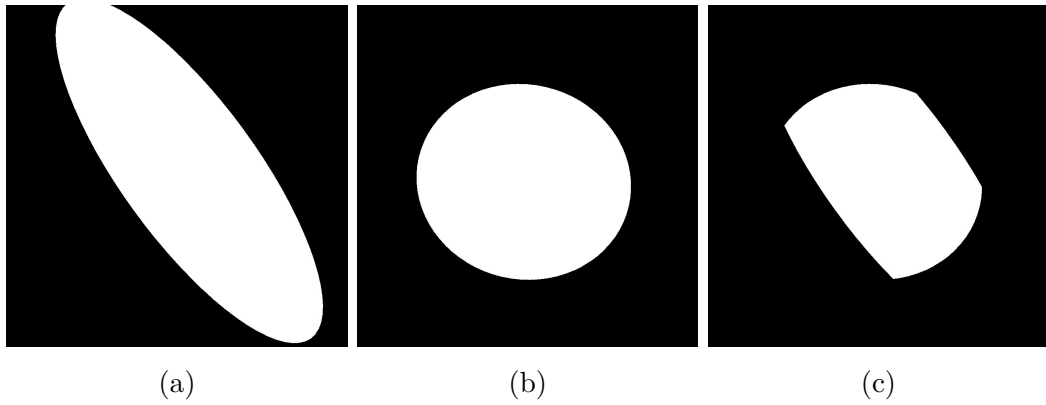
$$DICE = \frac{2TP}{2TP + FP + FN} \quad (5.5)$$

Hodnotící funkce Thermo Fisher skóre, zkráceně TFS

Pro zhodnocení kvality parametrů elipsy prokládající elektronový svazek byla navržena hodnotící funkce, která porovnává výsledky detekčního algoritmu s manuálním značením elektronového svazku z metadat. Jelikož je práce zpracovávána ve spolupráci s firmou Thermo Fisher Scientific, je tato funkce použita pro případné možné srovnání výsledků navrženého algoritmu s algoritmem používaným ve firmě. Jedná se o funkci, která se ve firmě primárně používá k hodnocení úspěšnosti algoritmů. Do funkce vstupují dva obrazy s parametry elipsy. Princip spočívá v tom, že dojde k převedení parametrů elipsy na binární obraz a vnitřní část elipsy je vyplněna 1 a pozadí 0. Funkci je možné vyjádřit pomocí vztahu 5.6.

$$TFS = \frac{obraz1 \cap obraz2}{\max(\Sigma obraz1, \Sigma obraz2)} \quad (5.6)$$

Výsledkem je skóre, které popisuje překrývající oblasti obrazů. Pokud je výsledné skóre rovno 1, znamená to, že detekovaná elipsa odpovídá manuálně zaznačenému elektronovému svazku a naopak. Pro názornější pochopení je výsledek funkce znázorněn na Obr. 5.2.

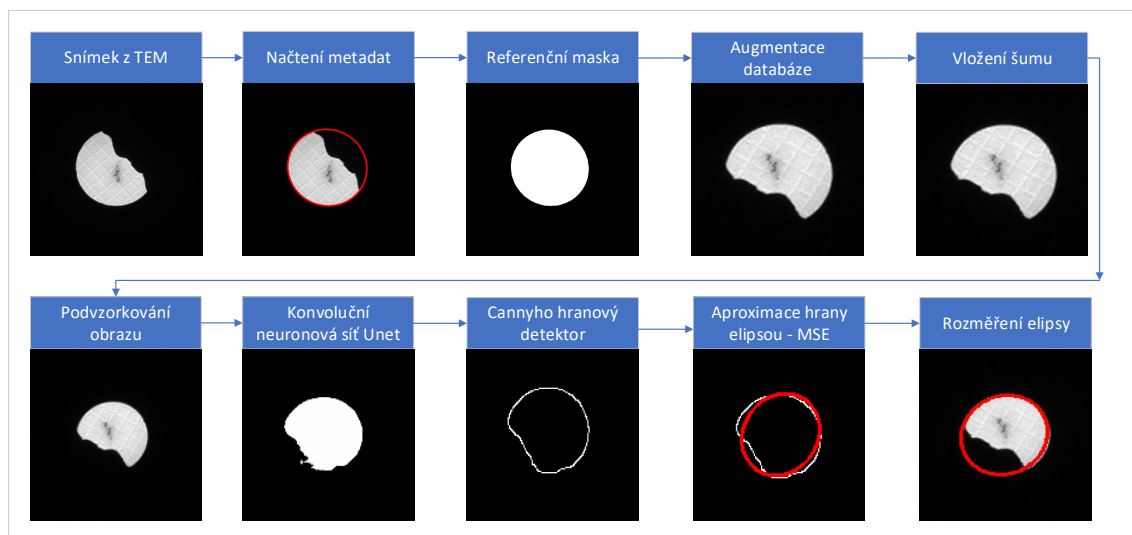


Obr. 5.2: Ukázka principu hodnotící funkce s hodnotou skóre 0,557. (a) binární obraz detekovaného elektronového svazku, (b) binární obraz manuálně zaznačeného elektronového svazku, (c) míra překryvu dvou obrazů.

6 Realizace praktické části

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole, cílem diplomové práce je navrhnout algoritmus, který bude schopen detekovat elektronový svazek v obrazech z TEM a následně zjistit jeho přesné rozměry. Právě díky obrovskému rozmachu strojového učení v poslední době, bylo rozhodnuto použít tyto metody i při zpracování této práce. Vzhledem ke složitosti řešeného problému a široké variabilitě jednotlivých módů osvětlení fluorescenčního stínítka, je výhodné použít konvoluční neuronové sítě. Po prostudování dostupné literatury zabývající se architekturami CNN, byla jako nejvhodnější síť pro daný problém vybrána architektura Unet. Právě tato CNN dosahuje velmi vysoké úspěšnosti při segmentaci i na snímcích z elektronového mikroskopu¹.

Celý algoritmus je zpracován v programovém prostředí Python 3.7.3 z důvodu dostupnosti velkého množství knihoven zabývajících se právě zpracováním obrazu a hlubokým učením. Jelikož je detekce elektronového svazku zprostředkována pomocí CNN, je pro její snazší implementaci použita knihovna Pytorch. Jednotlivé kroky programu jsou uspořádány pro lepší pochopení v blokovém schématu 6.1, kde každý krok je opatřen ukázkovým snímkem charakterizujícím jeho výstup. Podrobnější popis částí algoritmu je uveden později v kapitole 6.4. K učení neuronové sítě byl použit počítač s procesorem Intel Xeon E5-2640, operační paměť 512 GB a s výkonnou grafickou kartou NVIDIA Quadro P5000 s pamětí 16 GB.



Obr. 6.1: Blokové schéma navrženého algoritmu

¹Architektura Unet vyhrála ISBI 2015 EM Segmentation Challenge. Soutěž byla zaměřena na segmentaci nervového systému larev octomilek na 30 snímcích z elektronového mikroskopu. V té době překonala dosavadní nejlepší skóre (warping error 0.000353) a obsadila první místo [37].

6.1 Dostupná data

V této kapitole jsou popsána data, která jsou použita při řešení automatické detekce a rozměření elektronového svazku. Poskytnutá databáze firmou Thermo Fisher Scientific má okolo 1800 snímků. Při sběru dat pro tuto databázi byly použity různé konfigurace mikroskopů. Jsou zde obsaženy snímky pořízené jak autoemisní, tak i termoemisní tryskou. Proto mají snímky různou kvalitu a liší se jejich intenzita elektronového svazku dopadajícího na fluorescenční stínítko. Každý snímek je doplněn o rozsáhlé množství popisných informací, které jsou uloženy v metadatech daného snímku. Přiložená metadata obsahují nejen informace o nastavení elektronového mikroskopu během akvizice (velikost zvětšení, expoziční čas, napětí, typ elektronové trysky a mnohé další ...), ale i informace o pořízené scéně snímku. Jsou zde uloženy informace o typu módu osvětlení fluorescenčního stínítka a parametry elipsy, která prokládá elektronový svazek a přesně definuje jeho rozměry a pozici. Parametry elipsy jsou uvedeny v případě, pokud se jedná o mód osvětlení fluorescenčního stínítka, kde je žádoucí a dává smysl detekovat elektronový svazek. V Tab. 6.1 je shrnuto, pro které módy osvětlení je zapotřebí detekovat elektronový svazek, a pro které je naopak nutné říci, že detekce svazku není nutná. V databázi se nachází snímky s různými módy osvětlení fluorescenčního stínítka.

Tab. 6.1: Shrnutí aproximace elektronového svazku elipsou pro jednotlivé módy osvětlení fluorescenčního stínítka

Módy osvětlení fluorescenčního stínítka	Aproximace elipsou
Snímky s plně zobrazeným elektronovým svazkem	ano
Snímky s částečně zakrytým elektronovým svazkem	ano
Snímky s úplným osvitom fluorescenčního stínítka	ne
Snímky se zvýrazněnými postranními vyzařovacími laloky	ne
Snímky s rozptylem	ano i ne
Snímky se zřetelnými vadami optických prvků	ano
Snímky s dosvitom primárního elektronového svazku	ne
Snímky šumu	ne
Snímky se vzorkem	ano
Ostatní nestandardní podmínky	ano

Jelikož databáze pokrývá širokou škálu různého osvětlení stínítka, ale není zde dostatečný počet různých reprezentantů pro jednotlivé módy (databáze není primárně určena pro strojové učení), je nutné jednotlivé případy uměle rozšířit. Pro trénování a testování neuronové sítě je potřeba mít dostatečně velkou množinu dat.

V následující kapitole bude popsána navržená metoda pro umělé rozšíření databáze snímků z TEM.

6.2 Navržená metoda augmentace dat

Pro realizaci augmentace dat je použita knihovna OpenCV, která je zaměřená na počítačové vidění, zpracování obrazu a strojové učení. K rozšíření databáze snímků jsou použity geometrické transformace obrazu: změna měřítka, translace a rotace. Vybrané transformace jsou zvoleny záměrně, protože jejich použití simuluje reálné chování elektronového svazku při práci s mikroskopem. Geometrické transformace probíhají vynásobením původních pozičních souřadnic obrazu transformační maticí viz 6.1:

$$r_n = T(r_s), \quad (6.1)$$

kde $r_n = (x', y')$ je nový vektor souřadnic, T je transformační matice a $r_s = (x, y)$ je starý vektor souřadnic. Translace neboli posun se používá pro změnu pozice objektů v obraze a její transformační matice viz 4.2 vypadá:

$$\Delta r = \begin{bmatrix} 1 & 0 & tx \\ 0 & 1 & ty \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (6.2)$$

kde tx a ty jsou parametry, které mění souřadnice obrazu ve směru osy x a osy y . Změna měřítka (škálování) patří k nejjednodušším pružným transformacím, které způsobují deformaci struktur v obraze a změnu vzdálenosti mezi jednotlivými pixely. Škálovací matice má tvar:

$$S = \begin{bmatrix} sx & 0 & 0 \\ 0 & sy & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (6.3)$$

kde sx a sy jsou parametry škálování v osách x a y v intervalu $(0; \infty)$. Rotace probíhá kolem bodu (středu) rotace a ve 2D prostoru je dána úhlem rotace a rotační maticí:

$$B = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) & 0 \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (6.4)$$

kde θ je úhel rotace. Jelikož je nutné, aby společně s obrazem byly transformovány i parametry manuálně značené elipsy a odpovídalo expertní značení v novém obraze, je potřeba namísto klasické rotační matice použít rotační matici s libovolným středem rotace. V případech, kdy konkrétní TEM snímek obsahuje v metadatech uložené parametry elipsy, je střed elipsy zvolen za střed rotace. Pokud se jedná o snímek bez

parametrů elipsy (tzn. mód osvětlení bez detekce elektronového svazku), je střed rotace zvolen jako střed snímku. Jednotlivé transformační matice jsou posléze mezi sebou vynásobeny a vznikne výsledná transformační matice, která je vynásobená s původními pozičními souřadnicemi. Po geometrické transformaci leží nově získané pozice souřadnic mimo pravidelnou pravoúhlou mřížku a je nutné nové hodnoty pixelů interpolovat. K tomu je použita kubická interpolace.

6.2.1 Pravidla augmentace

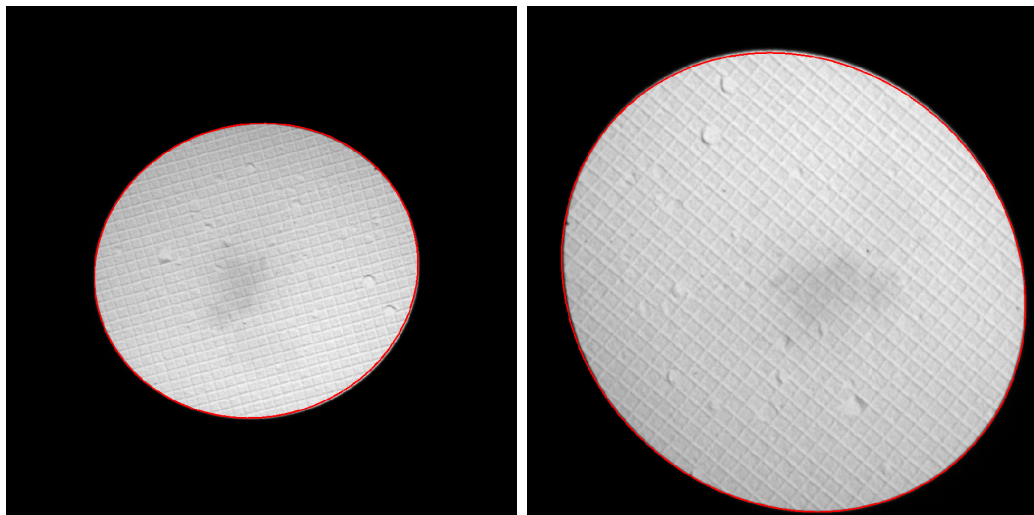
Z důvodu, že jsou snímky módů osvětlení fluorescenčního stínítka hodně variabilní viz kapitola 2, je nutné přistupovat ke každému typu osvětlení zvlášť a vytvořit pro něj určitá pravidla augmentace. Vytvořením pravidel se zabrání vzniku dat, která by neměla správné expertní značení elipsy a zbytečně by snižovala úspěšnost neuronové sítě. Každý snímek obsahuje ve svých metadatech označení módu osvětlení fluorescenčního stínítka. Právě toto značení je možné použít pro návrh pravidel na míru konkrétnímu módu osvětlení. Nevýhodou je, že módy osvětlení jsou rozděleny pouze do čtyř velkých skupin: partial (plně nebo částečně viditelný elektronový svazek), full illumination (úplný osvit fluorescenčního stínítka), afterglow (dosvit) a none (elektronový svazek je mimo fluorescenční stínítko).

U snímků s plně zobrazeným elektronovým svazkem je možné provést všechny tři používané transformace. Ovšem je zde potřeba ošetřit dotýkání svazku hran fluorescenčního stínítka. Uměle vytvořené snímky by pak tvořily převážně snímky s částečně zakrytým svazkem a databáze by obsahovala malý počet snímků s plně zobrazeným elektronovým svazkem. Tato situace je ošetřena restrikcí transformačních parametrů (t_x a t_y) translace. Před samotnou augmentací je vytvořena prázdná matice, do které je vykreslena elipsa korespondující s elektronovým svazkem. Elipsa je v matici reprezentována hodnotou 1 a pozadí 0. Pokud je součet prvního nebo posledního sloupce větší než 0, znamená to, že se svazek dotýká levé nebo pravé strany. Transformační parametr t_x je omezen pouze na hodnoty, které udávají opačný směr než je dotyk elektronového paprsku hrany fluorescenčního stínítka. Stejný princip je aplikován pro řádky tzn. dotyk svazku horní nebo spodní hrany stínítka. Jestliže nastává situace, kdy se paprsek dotýká všech stran, jsou transformační parametry translace nastaveny na 0 a provádí se pouze škálování a rotace se středem snímku s násobky 90° . Mód úplného osvětlení fluorescenčního stínítka a dosvit primárního elektronového svazku je možné transformovat pouze o násobky 90° . Při použití dalších geometrických transformací nastávají nereálné typy osvitů. Pravidla použití jednotlivých geometrických transformací jsou shrnuta pro všechny módy osvětlení v Tab. 6.2.

Tab. 6.2: Shrnutí pravidel augmentace dat.

Mód osvětlení	Změna měřítka	Rotace	Translace
Plně zobrazený el. svazek	ano	ano	ano
Částečně zakrytý el. svazek	ne	ne	ne
Úplný osvit stínítka	ne	násobky 90°	ne
Postranní vyzařovací laloky	ne	ne	ne
Rozptyl s primárním el. svazkem	ano	ano	ano
Vady optických prvků	ano	ano	ano
Dosvit primárního el. svazku	ne	násobky 90°	ne
Snímky šumu	ne	ne	ne
Snímky se vzorkem	ano	ano	ano
Ostatní nestandardní podmínky	ano	ano	ano

Všechny transformační parametry jsou generovány náhodně. Pro translaci v obou směrech bylo zvoleno rozmezí od -100 do +100 pixelů, pro rotaci rozmezí od 0 – 360 stupňů a škálovací parametr je zvolen v intervalu $(0; 2)$. Při změně měřítka snímků je nutné dodržet, aby transformace byla izotropní. Na Obr. 6.2 je zobrazena ukázka správně provedené augmentace snímku s plně přítomným elektronovým svazkem.

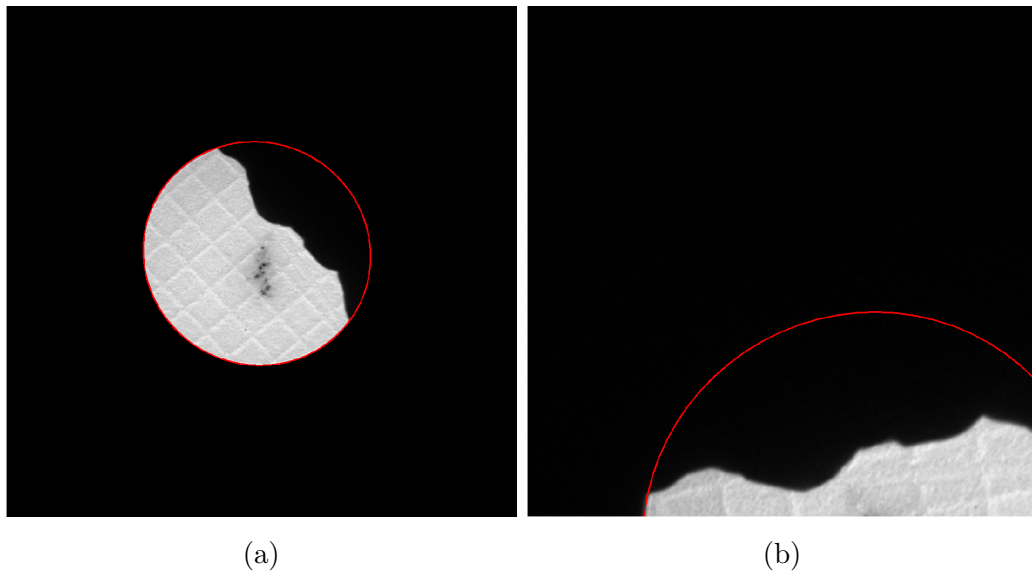


(a)

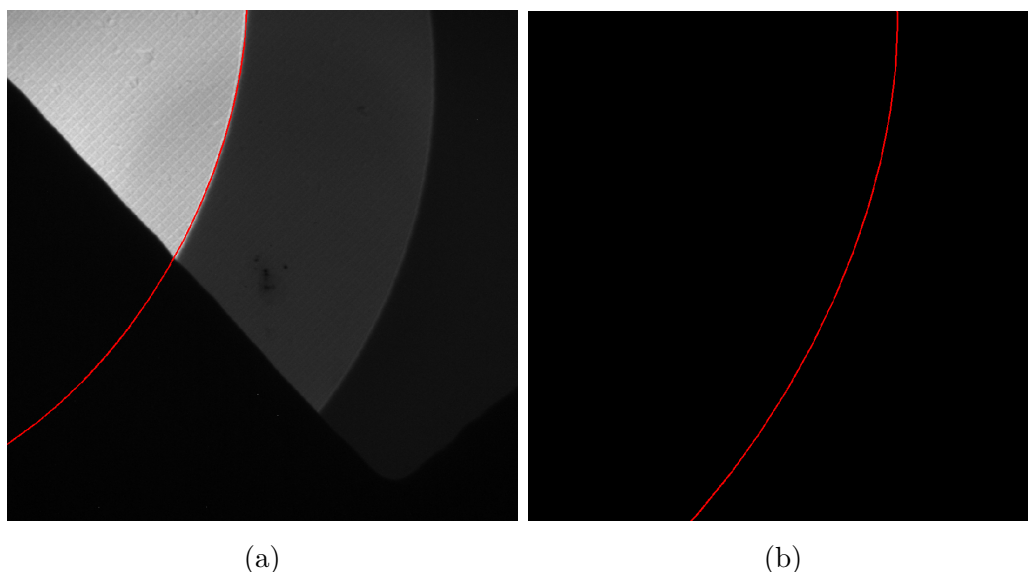
(b)

Obr. 6.2: Ukázka augmentace snímků (a) původní obraz s expertně značenou elipsou, (b) transformovaný obraz: posun ve směru x o -135 pixelů, ve směru y o -150 pixelů, škálování 1,5; úhel rotace 125°.

Následují ukázky snímků, kdy augmentace dat selhává a nebude u nich probíhat žádná nebo jen omezená transformace (např. jen rotace o 90°). Při augmentaci těchto snímků dochází ke ztrátě korespondence expertního značení. Obr. 6.3 zobrazuje nevhodnou augmentaci snímků, protože elektronový paprsek je z velké části mimo fluorescenční stínítko. Na obrázku 6.4 je na původním obrazu zobrazen částečný dosvit, který po geometrické transformaci zcela zmizí a zobrazí se pouze elipsa, která by zasahovala do oblasti mimo fluorescenční stínítko. Tento typ osvětlení je tedy možné jen rotovat v omezeném rozsahu a to o 90° . Nově přepočítané parametry jsou ukládány do csv souboru.



Obr. 6.3: Ukázka nevhodné augmentace (a) částečně zakrytý elektronový svazek a expertní značení, (b) transformovaný obraz: posun ve směru x -150 pixelů a y +30 pixelů, škálování 2,0; úhel rotace 59° .



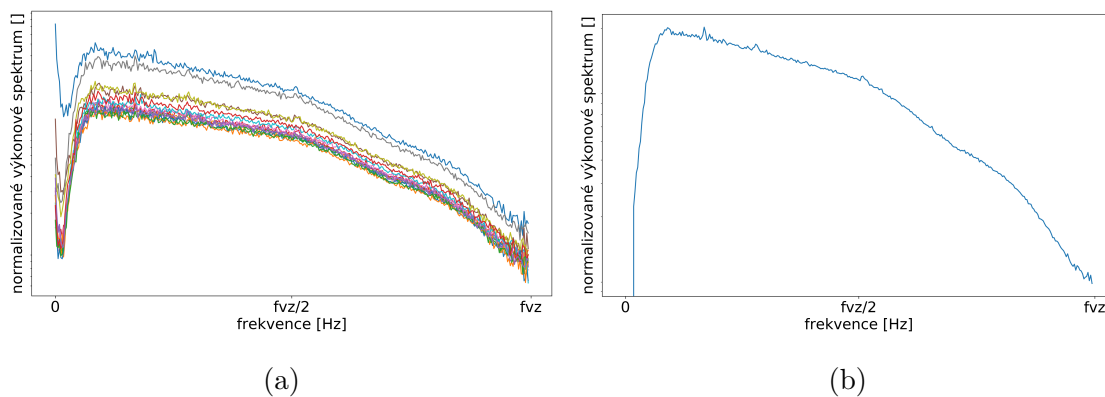
Obr. 6.4: Ukázka nevhodné augmentace dosvitu elektronového svazku (a) dosvit elektronového svazku s expertním značením, (b) transformovaný. obraz: posun ve směru x +4 pixely a y +71 pixelů, škálování 1,43; úhel rotace 173°.

6.3 Analýza šumu

Při geometrické transformaci vznikají v transformovaném obraze oblasti, které nemají v originálním obraze ekvivalent a hodnoty těchto pixelů jsou rovny nule. Z důvodu vzniku velkých oblastí vyplněných nulami je lepší hodnoty pixelů nahradit hodnotami šumu. Jelikož je požadováno, aby v průběhu augmentace dat vznikaly snímky odpovídající skutečnosti, je nutné použít typ šumu s vhodnou charakteristikou. K analýze šumu je použito 15 snímků fluorescenčního stínítka, které neobsahují elektronový svazek.

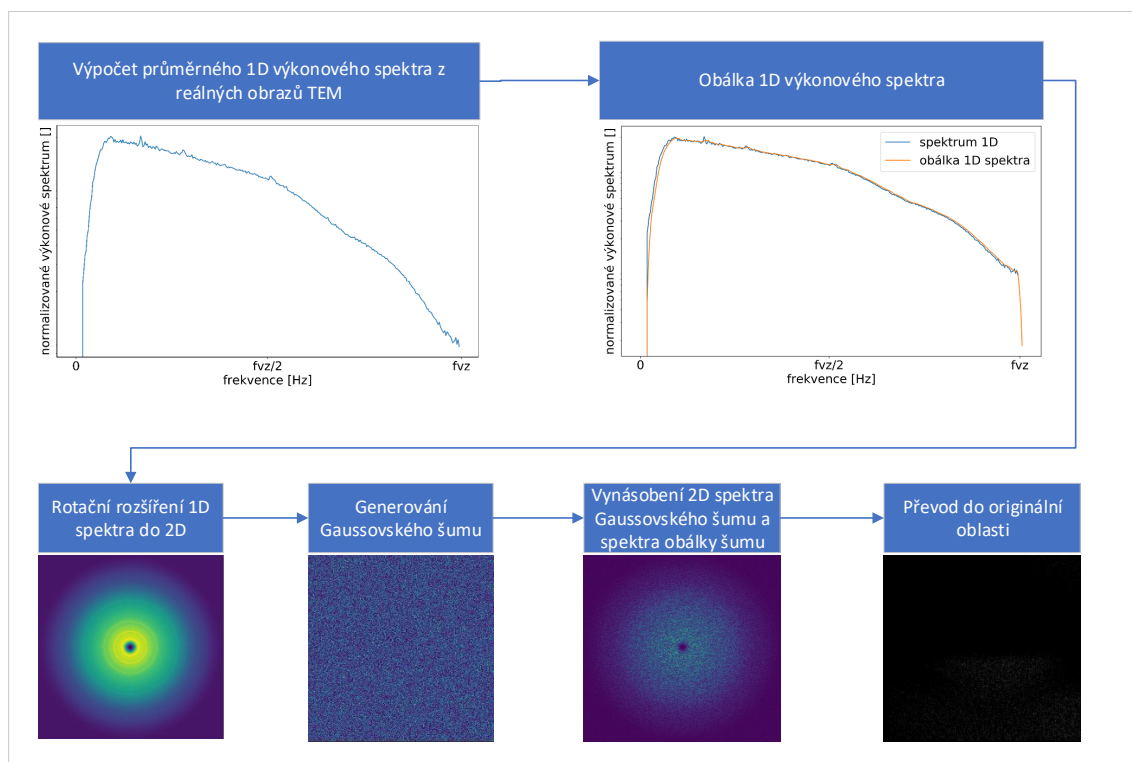
Ze snímků je odfiltrována pomocí Gaussovského filtru o velikosti masky 35x35 stejnosměrná složka. Následně je pro každý snímek spočítáno 1D výkonové spektrum, které je získáno jako rotační průměr 2D spektra. Průběhy spekter jsou zobrazeny v obraze 6.5a. Všechny spektra mají přibližně stejný tvar (obálku) a lze odvodit, že šum z TEM je stacionární (jeho charakteristiky se s časem nemění). Významným znakem TEM šumu je pokles šumu s vysokými frekvencemi. Z průběhů 1D spekter je vytvořeno průměrné 1D spektrum 6.5b.

Celý postup vytvoření generátoru šumu je znázorněn v blokovém schématu Obr. 6.6. Princip návrhu generátoru šumu spočívá ve vytvoření obálky výkonového spektra, která reprezentuje charakteristiku šumu z TEM obrazů. Obálka spektra je získána pomocí průměrujícího filtru o velikosti impulsní charakteristiky 5. Model obálky je z 1D oblasti rotačně rozšířen do 2D prostoru. Následně je vygenerována



Obr. 6.5: Analýza spekter šumu z reálných snímků TEM, (a) průběhy 1D spekter šumu z 15 TEM snímků, (b) průměrné 1D spektrum šumu po filtraci stejnosměrné složky.

matice Gaussovského šumu, který má rovnoměrné spektrum a jeho hodnoty jsou nezávislé na ostatních hodnotách. Spektrum tohoto šumu je vynásobeno se spektrem obálky reprezentující charakteristiku TEM šumu, čímž dochází k zavedení prostorové korelace hodnot do systému. Výsledný součin je následně převeden inverzní Fourierovou transformací do originální oblasti.



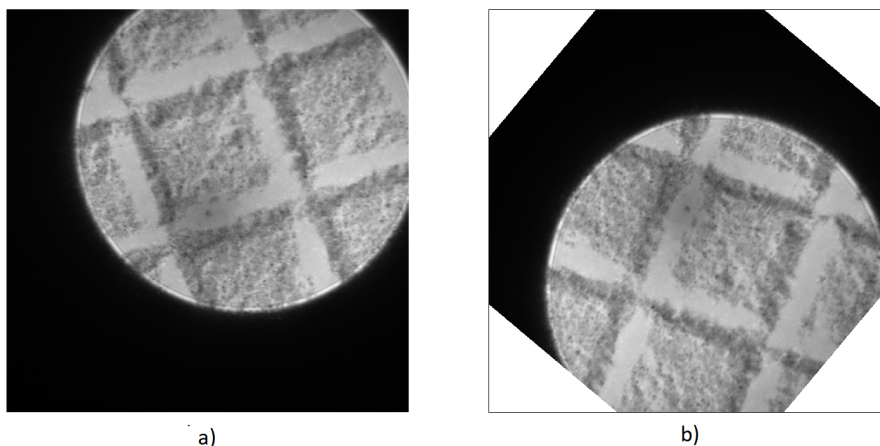
Obr. 6.6: Blokové schéma návrhu generátoru šumu.

6.4 Popis navrženého algoritmu detekce a rozměření elektronového svazku

V této kapitole je popsán algoritmus, jehož cílem je detekovat elektronový svazek v obrazech z TEM a zjistit jeho přesné rozměry paprsku. Případy, kdy dochází k zjištění rozměrů paprsku, jsou shrnuty v tabulce 6.1.

Prvním krokem celého algoritmu je vytvoření binární masky k příslušnému TEM snímku. Masky je vytvořena na základě přiložené anotace, kde jsou obsaženy informace nejen o podmínkách samotné akvizice, ale i expertně značená oblast elektronového svazku. Kolem elektronového paprsku je manuálně zaznačena elipsa, která koresponduje s jeho konturou. Elipsu je možné přesně definovat pomocí jejího středu, hlavní a vedlejší osy a úhlu natočení od osy x. Pomocí těchto parametrů je vykreslena elipsa do matice nul o stejné velikosti jako TEM snímek. Vnitřek elipsy je vyplněn hodnotou 1, tzn. že hodnota 1 udává oblast elektronové paprsku a 0 pozadí.

Databáze poskytnutých snímků není primárně určena pro metody hlubokého učení a je potřeba ji uměle rozšířit na základě navržených pravidel uvedených v tabulce 6.2 pro jednotlivé typy osvětlení. Původní databáze čítající kolem 1800 snímků byla rozšířena na 78 773 snímků. Během augmentace databáze byla místa v obrazech, která neměla v původním obraze ekvivalent, nahrazena charakteristickým šumem pro TEM viz 6.7.



Obr. 6.7: Ukázka vzniku prázdných míst po aplikaci geometrické transformace: (a) původní snímek (b) snímek transformovaný geometrickou transformací, bílá barva znázorňuje pixely, které nemají ekvivalent v původním obraze. Tyto pixely je vhodné nahradit charakteristickým šumem pro TEM, z důvodu, aby umělý obraz co nejvíce korespondoval se skutečností.

Pro urychlení procesu učení CNN a sjednocení různorodosti rozlišení původních TEM snímků, byly snímky podvzorkovány na 224x224 pixelů. Upravené snímky jsou

následně rozděleny do skupiny pro účely trénování a pro účely testování neuronové sítě v poměru 2:1 s rovnoměrným zastoupením všech typů osvětlení fluorescenčního stínítka. Do neuronové sítě vstupují dva soubory: TEM snímek a k němu příslušná binární maska. Tento pár je načítán pomocí batche neboli dávky do neuronové sítě, která umožňuje úpravu vah po každé iteraci učení. Počet snímků, který byl během jedné iterace načten do neuronové sítě, byl nastaven na 220 snímků. Vyšší počet snímků nebylo možné použít z důvodů limitů dostupného hardwaru.

Architektura neuronové sítě Unet je zakončena sigmoideální aktivační funkcí. Výstupem CNN je tedy pravděpodobnostní mapa, která udává, s jakou pravděpodobností patří pixel pozadí nebo objektu. Důležitý prvek, který je při implementaci neuronové sítě vhodně zvolit, je kritériální funkce. Jelikož se tato práce zabývá segmentační CNN, byla vybrána Dice kritériální funkce. Při procesu učení je žádoucí, aby hodnota této kritériální funkce byla na konci poslední epochy² rovna nule. Pravděpodobnostní mapa je naprahována tak, aby obsahovala pouze dvě hodnoty 0 (pozadí) a 1 (objekt). K tomu je použito prosté prahování s prahem 0,5, tzn. hodnoty větší, jak tento práh jsou nastaveny na 1 a naopak. Z referenční binární masky a naprahované mapy je spočtena chyba sítě.

Při implementaci neuronové sítě byly provedeny určité modifikace původního návrhu architektury Unet. Autoři použili při trénování sítě optimalizační algoritmus nazývaný stochastický gradientní sestup. V době vzniku sítě byl tento optimalizační algoritmus velmi často používán. Ovšem stejně jako v jiných oblastech, tak i tento algoritmus byl s odstupem času vylepšen a byly vytvořeny různé modifikace. V této práci je použit optimalizační algoritmus nazývaný Adam. Další změnou oproti původnímu návrhu je zavedení batch normalizace z důvodu rychlejšího trénování sítě a konvergence ke globálnímu řešení. Vrstva batch normalizace je přidána za každou konvoluční vrstvu. Jednotlivé parametry a nastavení sítě jsou shrnuty v Tab. 6.3.

Tab. 6.3: Shrnutí nastavení sítě.

parametr sítě	hodnota
aktivační funkce	sigmoid
krok učení	0,001
velikost batche	220
batch normalizace	ano
optimalizační algoritmus	Adam

Výstupem neuronové sítě jsou šedotónové snímky neboli pravděpodobnostní mapy, kde hodnoty pixelů udávají pravděpodobnost příslušnosti k objektu nebo pozadí.

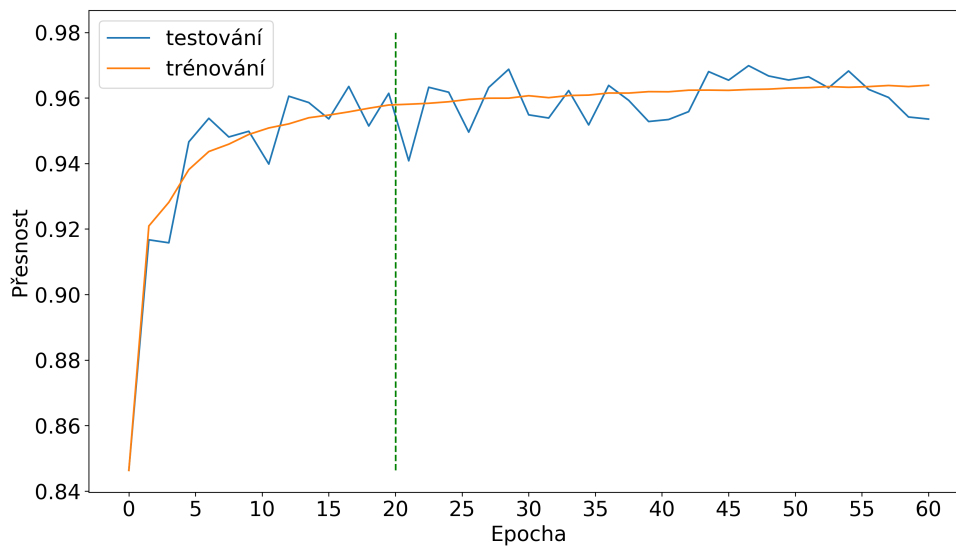
²Epocha je doba, za kterou dojde k průchodu celé trénovací množiny neuronovou sítí.

Předtím než následuje fáze rozměření elektronového svazku, je potřeba predikovaný snímek upravit. Z důvodu vzniku falešných objektů ve výsledných snímcích ze CNN je provedena analýza spojených komponent. V některých snímcích dochází k tomu, že se kolem elektronového svazku ve výsledném snímku objevují drobné oblasti (menší objekty), které jsou falešně označeny za objekt a jsou tedy chybně segmentovány. Vznik těchto oblastí je způsobený rozptýleným elektronovým svazkem. Z pozorování výsledků bylo zjištěno, že největší objekt pokaždé reprezentuje elektronový svazek, a proto je vždy tento objekt vybrán. Menší objekty jsou odstraněny, aby nezanášely do rozměření elektronového svazku chybu.

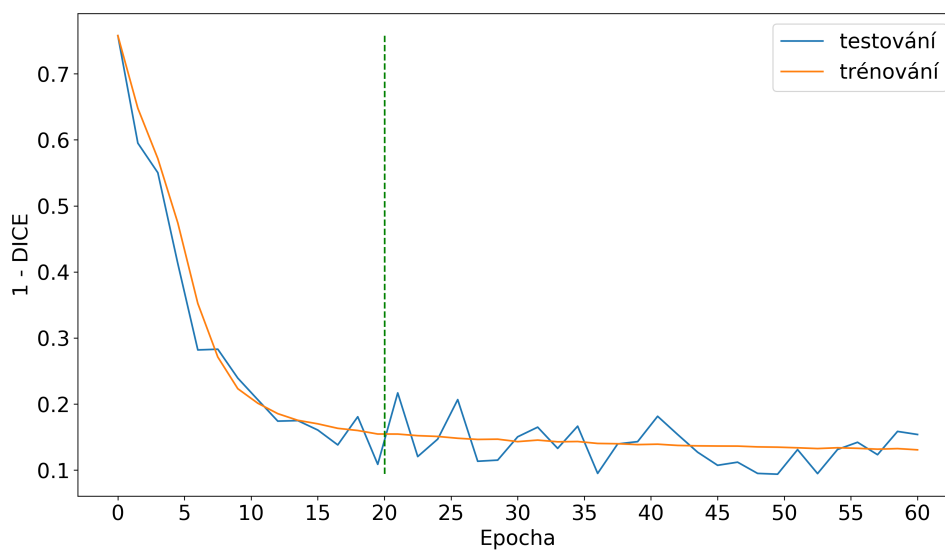
Predikované snímky vstupují do Cannyho hranového detektoru. Pomocí něj jsou nalezeny hrany segmentovaného objektu. Výhodou detektoru oproti klasickému prahování je, že je méně citlivý na šum. Výstupem je binární obraz reprezentující hrany objektu. Pixely jsou následně proloženy rovnicí elipsy pomocí metody nejmenších čtverců, kde se minimalizuje součet čtverců odchylek. Výsledná rovnice elipsy definuje pozici a velikost elektronového svazku. Výstupem je 5 parametrů elipsy (střed, velikost hlavní a vedlejší osy, úhel natočení oproti ose x).

6.5 Průběh učení neuronové sítě

Učení neuronové sítě proběhlo na augmentované databázi s 78 773 snímky. Databáze snímků byla rozdělena do dvou skupin (pro trénování a testování). Trénování sítě bylo uskutečněno na 51 776 snímcích. Výsledná síť byla otestována na 26 997 snímcích. Učení bylo spuštěno celkově pro 60 epoch. Na Obr. 6.8 je zobrazen graf závislosti přesnosti během trénování a testování neuronové sítě v závislosti na počtu epoch. Predikovaný výsledek je v průběhu učení uložen a převeden na binární obraz. Z něj je vypočítaná přesnost jako průměr shody pixelů predikovaného obrazu s referenční maskou. V ideálním případě by měla dosahovat hodnoty 1. Jak je z grafu patrné, křivka přesnosti během trénování i testování má rostoucí charakter. S rostoucím počtem epoch by se měly výsledky zpřesňovat. Druhý graf na Obr. 6.9 zobrazuje průběh DICE kriteriální funkce v závislosti na počtu epoch. Během učení neuronové sítě je žádoucí dosáhnout úpravou vah vrstev co nejmenší hodnoty kriteriální funkce. V grafu je možné pozorovat klesající trend DICE kriteriální funkce. Čím nižší je hodnota DICE kriteriální funkce, tím je dosaženo vyšší míry překryvu mezi predikovaným a referenčním snímkem.



Obr. 6.8: Graf závislosti přesnosti učení na počtu epoch. Zelená přímka znázorňuje epochu, pro kterou bylo provedeno vyhodnocení výsledků.



Obr. 6.9: Graf průběhu kritériální funkce DICE v závislosti na počtu epoch. Zelená přímka znázorňuje epochu, pro kterou bylo provedeno vyhodnocení výsledků.

Vzhledem k tomu, že po 20. epoše začalo docházet ke kolísání hodnot a nedocházelo k výraznému zlepšení obou metrik, bylo učení neuronové sítě zastaveno ve 20. epoše. V této epoše bylo při testování neuronové sítě dosaženo přesnosti 0,9614 a

hodnoty kriteriální funkce DICE 0,1087. Tím, že učení sítě bylo zastaveno dříve než v 60. epoše, byla významně snížena časová náročnost učení. V Tab.6.4 jsou uvedeny průběžné hodnoty přesnosti a DICE kriteriální funkce v dané epoše. Například v 50. epoše bylo při testování dosaženo lepšího výsledku přesnosti o 0,004 a kriteriální funkce DICE o 0,0149 ovšem za více než dvojnásobný čas.

Tab. 6.4: Vývoj hodnot přesnosti a kriteriální funkce 1 - DICE během učení neuro-nové sítě.

epocha	trénování		testování		celkový čas
	přesnost	1 - DICE	přesnost	1 - DICE	
0	0,8463	0,7578	0,8463	0,7578	0 hod. 21 min.
5	0,9381	0,4741	0,9466	0,4125	1 hod. 50 min.
10	0,9488	0,2232	0,9498	0,2392	3 hod. 00 min.
15	0,9547	0,1700	0,9536	0,1606	4 hod. 09 min.
20	0,9578	0,1546	0,9614	0,1087	5 hod. 27 min.
25	0,9595	0,1482	0,9495	0,2067	6 hod. 36 min.
30	0,9606	0,1431	0,9548	0,1504	7 hod. 50 min.
35	0,9615	0,1403	0,9673	0,0950	9 hod. 07 min.
40	0,9618	0,1392	0,9534	0,1815	10 hod. 19 min.
45	0,9623	0,1364	0,9654	0,1072	11 hod. 31 min.
50	0,9630	0,1347	0,9654	0,0938	12 hod. 47 min.
55	0,9634	0,1329	0,9626	0,1421	13 hod. 56 min.
60	0,9638	0,1306	0,9535	0,1539	15 hod. 05 min.

7 Vyhodnocení výsledků

V následujících odstavcích budou shrnuty a diskutovány výsledky. Hodnocení přesnosti segmentace spočívá ve srovnání metrik vzdálenosti a podobnosti mezi segmentovaným a referenčním obrazem obsahující expertní značení. V případě binární segmentace obrazu rozlišujeme pixely, které patří buď objektu anebo pozadí. Na základě příslušnosti pixelů do těchto tříd lze provádět objektivní hodnocení.

7.1 Výsledky

Jak již bylo naznačeno v kapitole 6.5, vyhodnocení výsledků proběhlo na predikovaných snímcích ze CNN z 20. epochy. K objektivnímu zhodnocení navrženého algoritmu bylo náhodně vybráno 500 snímků. Snímky byly následně rozděleny do 10 skupin reprezentující jednotlivé módy osvětlení fluorescenčního stínítka popřípadě problematické varianty osvitů stínítka. Skupina TEM snímků s částečně zakrytým svazkem 2.2 se pro účely hodnocení výsledků rozdělila na dvě podskupiny i přesto, že data jsou podobná z hlediska jejich vzniku. První skupina se nazývá TEM mřížka, kde je vidět celá mřížka a druhá skupina zakrytý svazek, kde je elektronový svazek pouze částečně zakrytý mřížkou. Důvodem rozdělení je ukázat chování neuronové sítě k těmto snímkům. Rozdělení snímků do skupin je následující:

- **Astigmatismus** - snímky zatížené astigmatickou optickou vadou, viz 2.6.
- **Dosvit** - snímky s dosvitem elektronového svazku, viz 2.7.
- **Koma** - snímky zatížené touto optickou vadou, viz 2.6.
- **Nestandardní podmínky** - snímky s jehlou, se vzorkem, viz 2.8, 2.9.
- **Plný osvit** - snímky s úplným osvitem fluorescenčního stínítka, viz 2.3.
- **Plně zobrazený svazek** - snímky s plně viditelným elektronovým svazkem, viz 2.1.
- **Rozptyl** - snímky s rozptýleným elektronovým svazkem, viz 2.5.
- **Rozhraní stínítka** - snímky s primárním elektronovým svazkem dotýkající se rohu nebo jedné z hran fluorescenčního stínítka, viz 2.1.
- **TEM mřížka** - snímky, kde oblast primárního svazku je pravidelně v celé jeho ploše překryta TEM mřížkou, viz 2.2.
- **Zakrytý svazek** - snímky s částečně zakrytým svazkem, kde primární elektronový svazek je z větší části viditelný, ovšem je i částečně z jedné strany zakrytý mřížkou, viz 2.2.

Jelikož algoritmus obsahuje dva kroky, které mohou ovlivňovat výslednou chybu, je hodnocení navrženého algoritmu rozděleno do dvou částí. První část hodnocení je zaměřena na porovnání míry překryvu segmentovaných oblastí s referenčními maskami

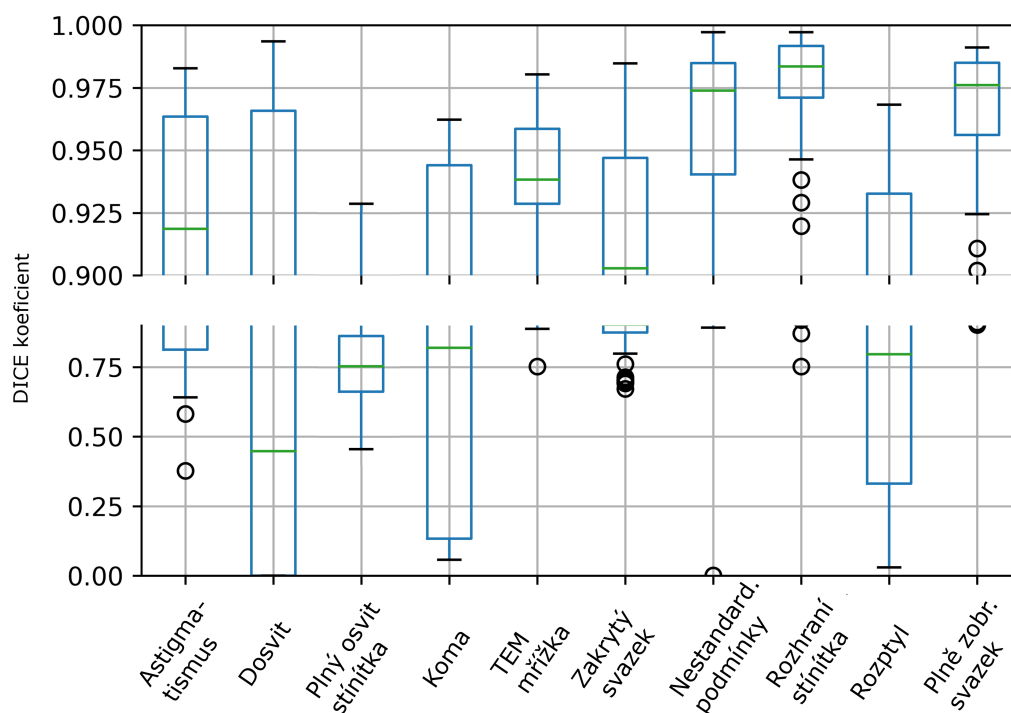
TEM snímků. Přesnost výsledné segmentace je vyjádřena pomocí DICE koeficientu, TFS hodnotící funkce, senzitivity a specifity. DICE koeficient je metrika, která se hojně používá v případech porovnání míry překryvu binárních obrázků. Z toho důvodu jsou hodnoty DICE koeficientu brány jako směrodatné a výsledky v textu jsou zaměřeny na jeho popisu. Zbylé metriky jsou brány jako doplňkové. Algoritmus byl otestován jak na snímcích rozdělených do jednotlivých skupin, tak i pro všech 500 snímků současně. Výsledný DICE koeficient se při testování na množině všech snímků dohromady pohyboval okolo 0,842. Druhým krokem algoritmu je rozměření elektronového svazku, které je provedeno proložením svazku elipsou. Vnitřní část elipsy je vyplněna hodnotou 1 a vnější část 0. Tento výsledný binární obraz je porovnán s referenční maskou. Výsledný DICE koeficient vypočítaný na množině všech snímků po proložení elektronové svazku elipsou je 0,815. V Tab. 7.1 jsou uvedeny hodnoty metrik pro jednotlivé skupiny před a po proložení elektronového svazku elipsou.

Hodnoty použitých metrik se po aproximaci elektronového svazku elipsou ve většině případů snížily. Pokles byl v průměru o 0,014 hodnoty DICE koeficientu. Nejvyšší hodnota DICE koeficientu byla před provedenou aproximací zaznamenána u skupiny snímků, kdy se elektronový svazek dotýká nebo leží na hraně fluorescenčního stínítka. V tomto případě dosahoval DICE koeficient hodnoty 0,974. Ovšem po aproximaci došlo k významnému poklesu DICE koeficientu na 0,923. Výsledná úspěšnost správného proložení elektronového svazku na rozhraní fluorescenčního stínítka je ovlivněna velikostí viditelné části primárního svazku. Pokud snímek obsahuje velmi malé množství informace o elektronovém svazku, tzn. že elektronový paprsek se nachází z velké části mimo fluorescenční stínítko, je pro algoritmus velmi obtížné provést správnou aproximaci svazku. Pro tyto případy snímků existuje pak velké množství řešení.

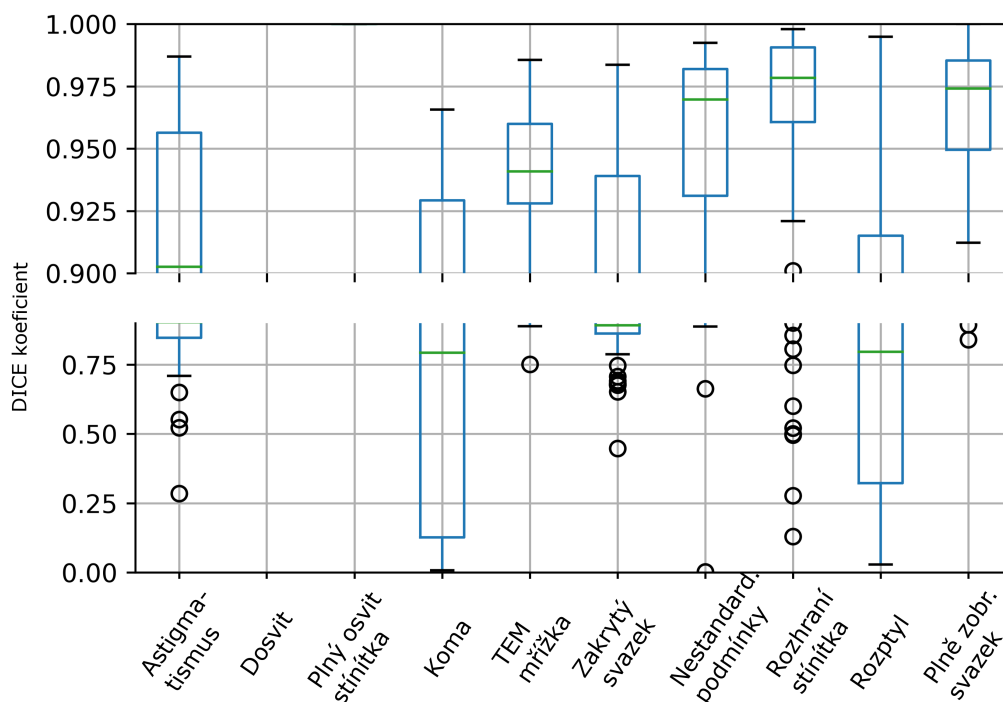
Nejlepší výsledek navrženého algoritmu byl dosažen na snímcích s plně viditelným elektronovým svazkem. U těchto snímků se DICE pohyboval před aproximací 0,967 a po aproximaci 0,964. Nejnižší výsledek DICE byl zaznamenán u skupiny snímku s dosvitem, kde hodnota DICE před aproximací byla 0,480. Tento nízký výsledek je způsobený právě charakterem snímků, kde původní osvětlená oblast postupně vyhasíná. Jasové hodnoty této oblasti jsou stále výrazné oproti jasovým hodnotám pozadí a ve výsledné segmentaci neuronové sítě jsou tyto místa pozitivně detekovány jako objekt. Rozdělení a variabilita DICE koeficientu pro jednotlivé skupiny je vizualizována před aproximací pomocí krabicového grafu na Obr. 7.1 a po aproximaci na Obr.7.2. Svislá osa u obou těchto grafů je přerušena, aby hodnoty byly lépe viditelné. Krabicové grafy pro ostatní metriky jsou obsaženy v příloze A.

Tab. 7.1: Výsledné hodnoty zvolených metrik před a po proložení elektronového svazku elipsou. Pomlčka znamená, že hodnota nebyla spočítána, protože v těchto případech osvětlení fluorescenčního stínítka nedochází ke aproximaci svazku elipsou.

	DICE		TFS		Senzitivita		Specifita	
	před	po	před	po	před	po	před	po
Astigmatismus	0,875	0,869	0,817	0,809	0,829	0,824	0,987	0,990
Dosvit	0,480	-	0,468	-	0,479	-	0,860	-
Plný osvit stínítka	0,748	-	0,708	-	0,676	-	0,763	-
Koma	0,603	0,586	0,549	0,529	0,852	0,835	0,991	0,990
TEM mřížka	0,937	0,938	0,915	0,918	0,934	0,944	0,993	0,993
Zakrytý svazek	0,882	0,866	0,817	0,800	0,840	0,827	0,989	0,985
Nestandard. podm	0,941	0,929	0,922	0,901	0,956	0,946	0,988	0,988
Rozhraní stínítka	0,974	0,923	0,955	0,895	0,985	0,921	0,987	0,985
Rozptyl	0,656	0,650	0,571	0,561	0,964	0,971	0,993	0,993
Plně zobraz. svazek	0,967	0,964	0,945	0,939	0,980	0,986	0,994	0,993
Všechny snímky	0,842	0,815	0,803	0,771	0,895	0,877	0,978	0,982



Obr. 7.1: Krabicový graf DICE koeficientu před aproximací el. svazku. U jednotlivých skupin je možné pozorovat variabilitu hodnot metrik. Zelená příčka rozdělující obdélník grafu znázorňuje medián. Odlehlé hodnoty jsou znázorněny kuličkami.



Obr. 7.2: Krabicový graf DICE koeficientu po aproximaci el. svazku. Po proložení oblasti elektronového svazku elipsou došlo v některých případech (skupina snímků s dotykem rohu elektronového svazku) ke vzniku vyššího počtu odlehlých hodnot způsobené právě proložením segmentované oblasti elipsou. Skupina s plně osvětleným fluorescenčním stínítkem a dosvit nemají krabicový graf z důvodu, že u těchto snímků nedochází k aproximaci svazku elipsou.

Dále je provedeno zhodnocení vzdálenosti kontury elipsy referenční masky a kontury po aproximaci segmentovaného TEM snímku elipsou. K tomu je použita Hausdorffova vzdálenost [44]. Hausdorffova vzdálenost říká, o kolik pixelů jsou od sebe dvě kontury vzdáleny. V Tab. 7.2 jsou uvedeny vypočítané hodnoty pro porovnání vzdáleností kontur v jednotlivých skupinách. V průměru jsou od sebe kontury vzdáleny o 5,937 pixelů. Největší průměrná vzdálenost kontur je rovna 8,749 pixelů. Tato hodnota byla naměřena u snímků s astigmatickým elektronovým svazkem.

Tab. 7.2: Vzdálenosti kontur vyjádřené pomocí Hausdorffovy vzdálenosti. Pomlčka znamená, že hodnota nebyla spočítána, protože v těchto případech osvětlení fluorescenčního stínítka nedochází ke aproximaci svazku elipsou.

	Hausdorffova vzdálenost
Astigmatismus	8,749
Dosvit	-
Plný osvit stínítka	-
Koma	7,507
TEM mřížka	2,689
Zakrytý svazek	7,574
Nestandardní podmínky	5,438
Rozhraní stínítka	2,548
Rozptyl	6,234
Plně zobrazený svazek	1,448
Všechny snímky	5,937

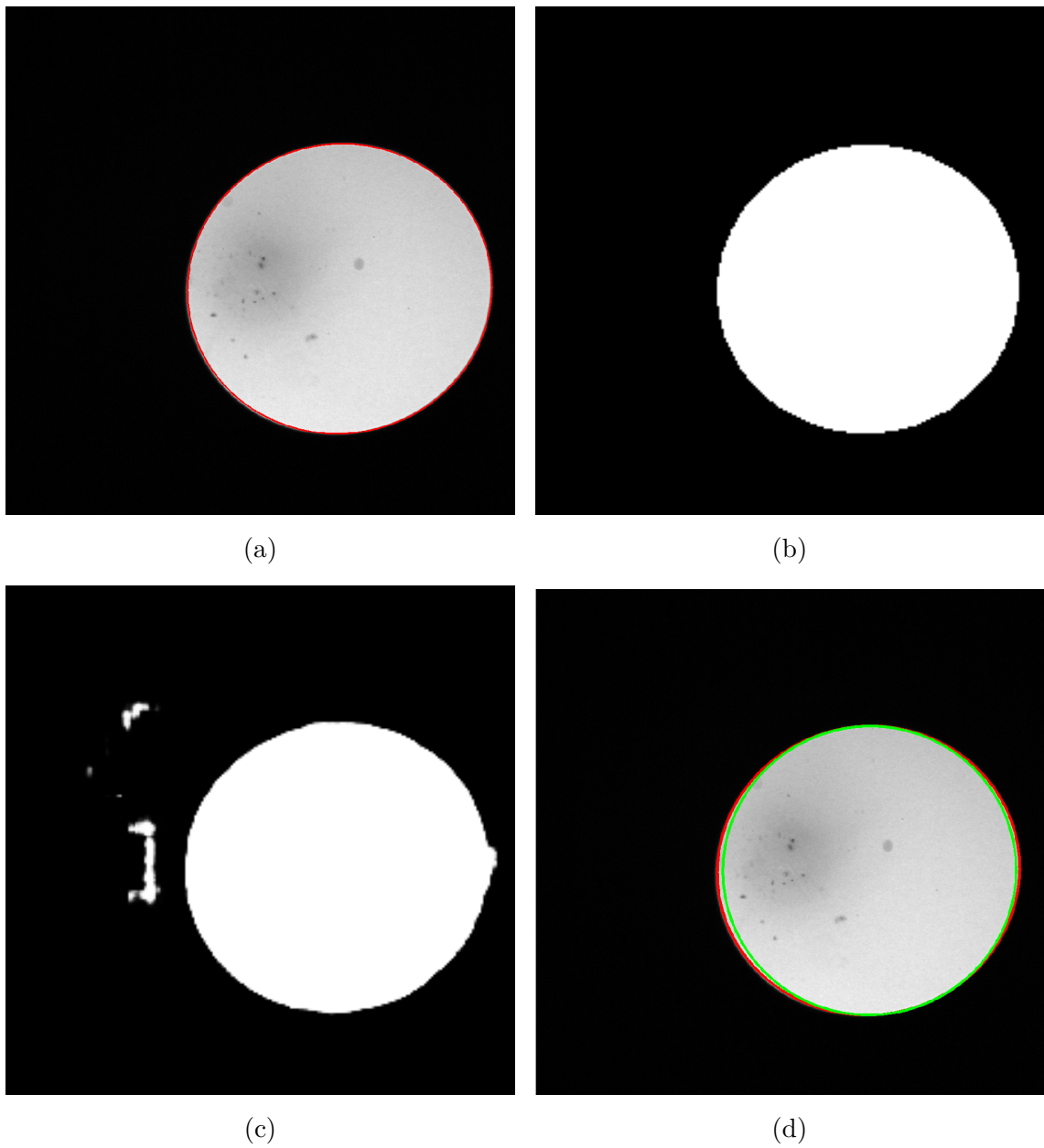
Cílem práce je vyzkoušet při návrhu řešení aplikaci konvolučních neuronových sítí a otestovat výslednou úspěšnost při dané variabilitě dat. Jelikož neexistují publikované články, které by se zabývaly stejnou problematikou, tzn. automatickou detekcí a rozměření elektronového svazku, není možné porovnat navržený algoritmus s ostatními autory. Jak již bylo zmíněno několikrát, práce je zpracovávána ve spolupráci s Thermo Fisher Scientific, která vyvíjí pro tyto účely vlastní algoritmus. Jeho obsah je obchodním tajemstvím a není možné jej v této práci podrobně popsat. V rámci spolupráce je provedeno objektivní porovnání těchto dvou algoritmů využívající odlišné přístupy a metody při řešení. K porovnání je vybráno 325 snímků, které pokrývají variabilitu dat a obsahují dostatečný počet zástupců pro daný mód osvětlení fluorescenčního stínítka. Výsledná úspěšnost algoritmů je vyjádřena pomocí hodnotící funkce TFS, která je popsána v kapitole 5. Tato metrika je vybrána z důvodu, že je používána ve zmíněné firmě při hodnocení úspěšnosti nových algoritmů. Navržený algoritmus dosahuje podle TFS skóre míry překryvu s referenční maskou 80,7%. Úspěšnost algoritmu společnosti je 84,82%.

7.2 Diskuze výsledků

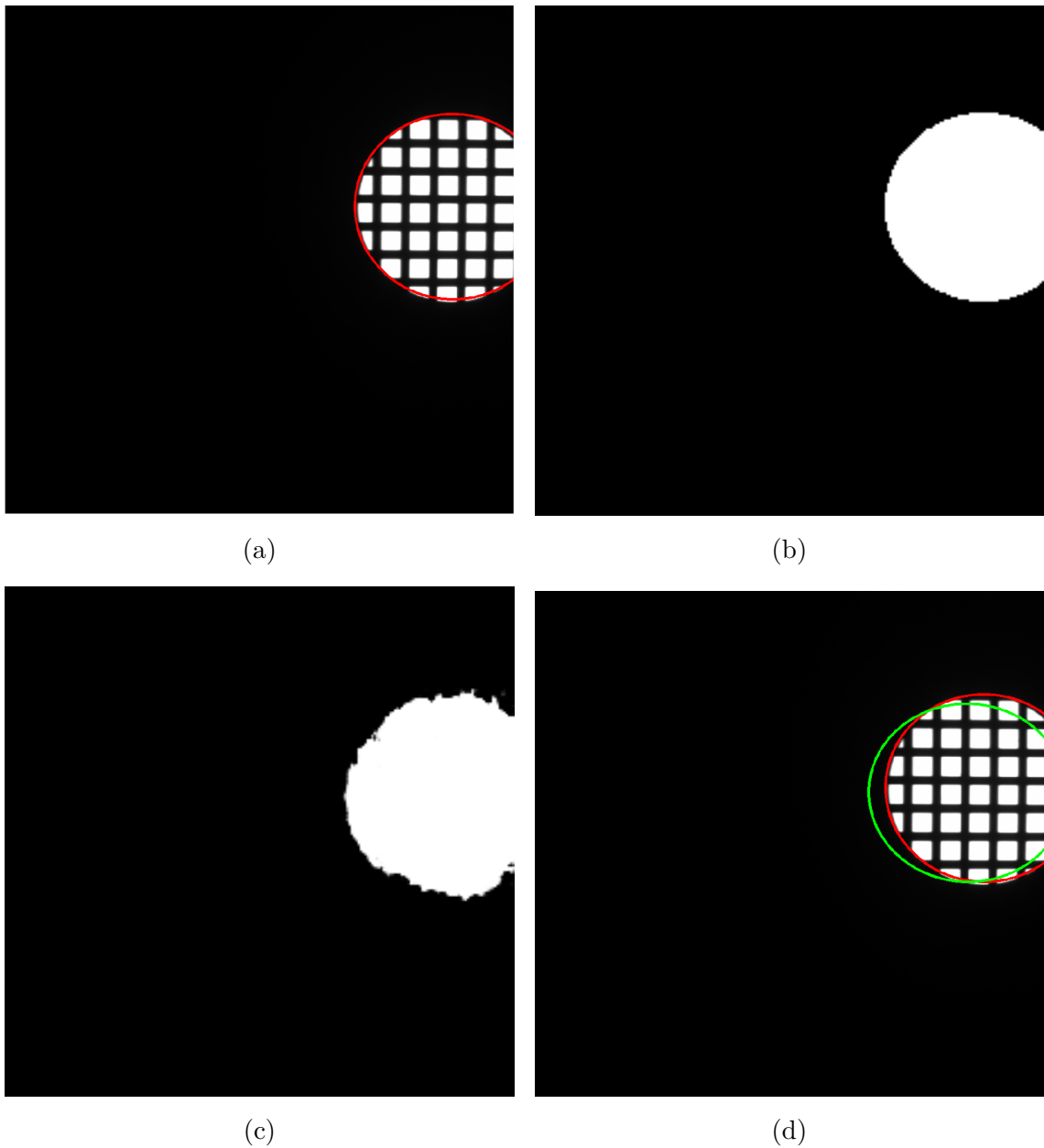
V této kapitole budou diskutovány dosažené výsledky, popřípadě možné oblasti zlepšení algoritmu. Na Obr. 7.3 je zobrazena výsledná aproximace elektronového svazku s nejlepším dosaženým výsledkem DICE koeficientu 0,974. Obrázek obsahuje pů-

vodní snímek, referenční masku, predikci masky a výsledné rozměření elektronového svazku, kde je zobrazena ručně značená a automaticky určená elipsa korespondující s konturou elektronového svazku. Z obrázku je možné pozorovat, že kontury jsou téměř identické. Algoritmus je opatřen analýzou spojitých komponent, která pomáhá odstranit nežádoucí falešně pozitivní oblasti viz Obr. 7.3c. Při zpracování výsledků bylo pozorováno, že algoritmus dosahuje velmi dobré úspěšnosti u snímků s plně zobrazeným elektronovým svazkem. Čas nutný pro detekci a rozměření el. svazku se u jednoho snímku pohybuje okolo 0,458 sekundy. Ovšem tuto hodnotu nelze brát zcela jako objektivní vzhledem ke zpracování výsledků na počítači s nadstandardní hardwarovou výbavu viz kapitola 6. Rychlost algoritmu společností se liší na módu osvětlení. V průměru se čas zpracování jednoho snímku pohybuje kolem 0,35 sekundy. Při práci s mikroskopem se navíc pracuje s obrázky s vyšším rozlišením, což má vliv na výpočetní náročnost. V tomto případě byly snímky podvzorkovány v rámci úspory času. Velkým překvapením je to, jak si neuronová síť dokáže poradit se snímky, kde je primární svazek celý překrytý TEM mřížkou. Mřížka se používá pro fixaci vzorku a je tedy běžné se s tímto typem obrazu setkat velmi často. Na Obr. 7.4 je uvedena ukázka detekce a rozměření elektronového svazku na snímku s TEM mřížkou. Hodnota DICE koeficientu se v tomto případě pohybuje okolo 0,916. Neuronová síť se během svého učení naučila spojovat jednotlivé čtverečky mřížky do jedné oblasti a výsledná maska neobsahuje přerušovaná místa. Byl předpoklad, že tyto snímky budou pro neuronovou síť komplikací. Aproximace elektronového svazku by v případě falešně segmentovaných čtverečků v masce způsobovala velkou chybu míry překryvu. Z hlediska predikce masky se jeví pro CNN problematické snímky plného osvětlení fluorescenčního stínítka viz 7.6. Během používání elektronového mikroskopu se postupem času degraduje střední oblast fluorescenčního stínítka. Důvodem je to, že většina experimentů je směřována do tohoto místa. Pro neuronovou síť je tato degradace fluorescenční vrstvy matoucí a dochází k falešné detekci těchto pixelů. Ovšem u těchto snímků má být vrácena prázdná matice. Pokud by v budoucnu bylo rozhodnuto využívat pro automatickou detekci svazku CNN, je potřeba zajistit v databázi dostatečně rovnoměrný počet reprezentantů některých módů osvětlení (např. plný osvit fluorescenčního stínítka nebo rozptylu). Snímky je možné obstarat samotnou akvizicí nebo vytvořením propracovanější metody augmentace nebo generátorem módů osvětlení. V současné době není databáze primárně určena pro strojové učení. Další slabinou navrženého algoritmu je pokles míry překryvu s referenční maskou po proložení elektronového svazku elipsou. U skupiny snímků, kde se elektronový svazek nachází na rohovém rozhraní stínítka, aproximace svazku v některých případech selhává viz Obr 7.5. Úspěšnost proložení závisí na velikosti oblasti svazku, která leží mimo stínítko. Pro aproximaci se nabízí použít sofistikovanější optimalizační algoritmus, než je metoda nejmenších čtverců (např. metodu RANSAC,

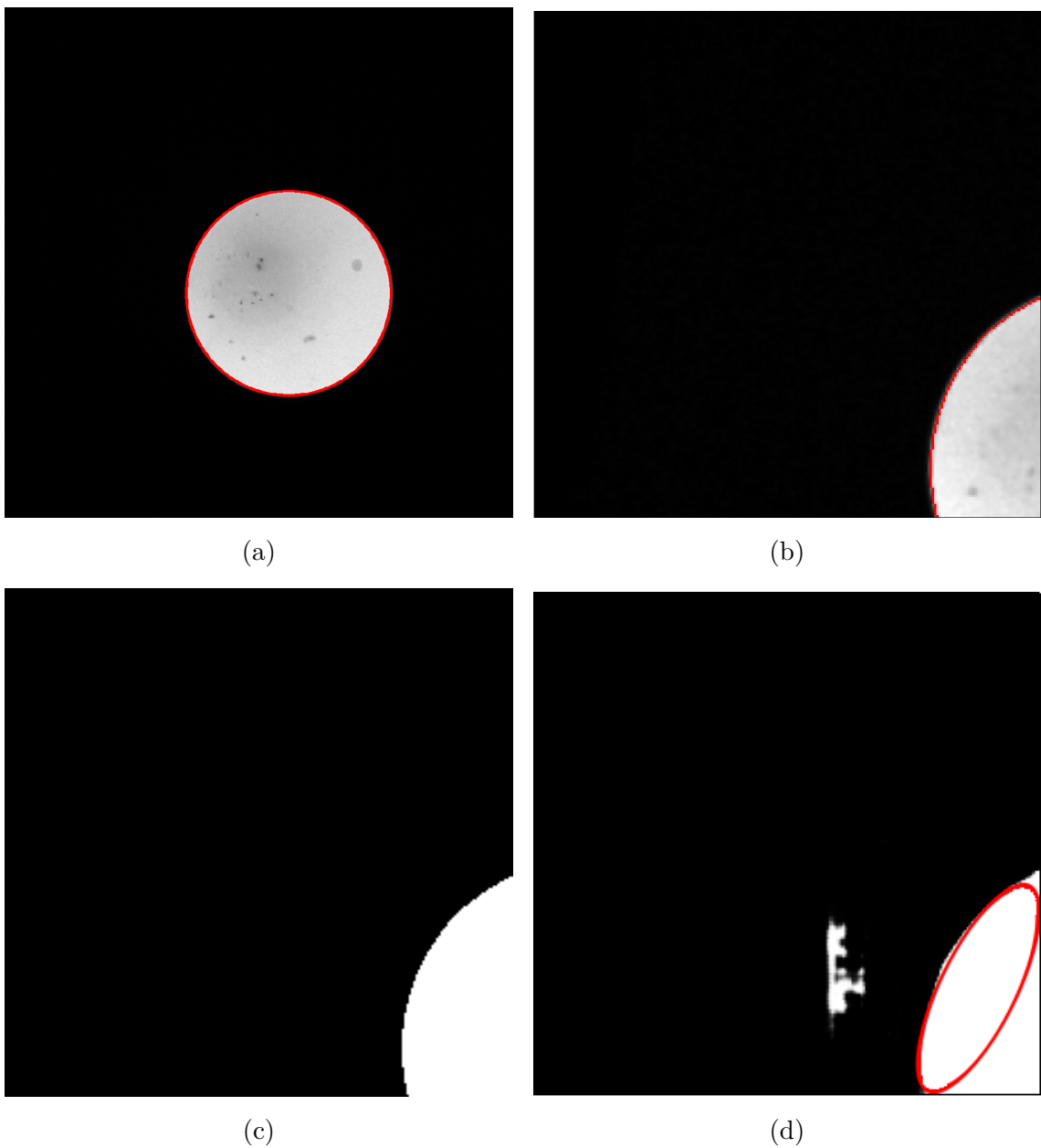
kteřá nepracuje při aproximaci s odlehlými hodnotami).



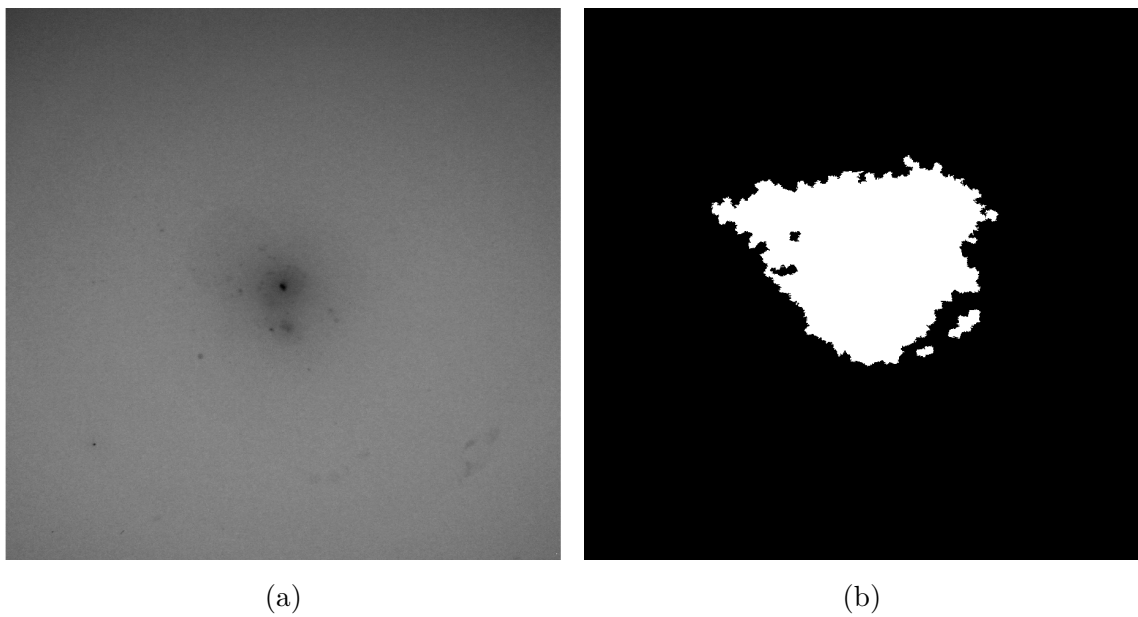
Obr. 7.3: Ukázka výsledné aproximace el. svazku elipsou. (a) zobrazuje původní TEM snímek, (b) zobrazuje referenční masku ručně značeného elektronového svazku, (c) zobrazuje predikce elektronového svazku ze CNN, (d) zobrazuje porovnání elips, červená kontura zobrazuje elektronový svazek, který je ručně značený, zelená kontura je výsledkem navrženého algoritmu.



Obr. 7.4: Ukázka výsledné aproximace el. svazku elipsou u mřížky. (a) zobrazuje původní TEM snímek, (b) zobrazuje referenční masku ručně značeného elektronového svazku, (c) zobrazuje predikce elektronového svazku ze CNN, (d) zobrazuje porovnání elips, červená kontura zobrazuje elektronový svazek, který je ručně značený, zelená kontura je výsledkem navrženého algoritmu.



Obr. 7.5: Ukázka výsledné chybné elektronového svazku elipsou na rozhraní stínítka. (a) zobrazuje původní TEM snímek, (b) zobrazuje elektronový svazek po geometrické transformaci, (c) zobrazuje referenční masku, (d) zobrazuje chybně aproximovanou elipsu elektronového svazku.



Obr. 7.6: Ukázka chybné klasifikace obrazu neuronovou sítí. (a) zobrazuje původní TEM snímek při plném osvětlení fluorescenčního stínítka, (b) zobrazuje falešně pozitivní pixely predikované masky. V případě plného osvitu fluorescenčního stínítka má být vrácena maska obsahující pouze samé nuly a nemá docházet k aproximaci elektronového svazku elipsou.

8 Závěr

Cílem diplomové práce bylo navrhnout algoritmus umožňující automatickou detekci a rozměření elektronového svazku v obrazech z transmisního elektronového mikroskopu. V úvodní části práce je popsána konstrukce mikroskopu a některé jeho nejdůležitější součásti. Následuje kapitola, která se zabývá detailním popisem různorodosti jednotlivých módů osvětlení fluorescenčního stínítka. Pořízené snímky se od sebe odlišují nejen charakterem a vlastnostmi obrazu, ale i samotným vznikem. Jelikož pro detekci elektronového paprsku byla použita konvoluční neuronová síť, byla vypracována literární rešerše popisující obecný úvod do oblasti strojového učení, jeho základní dělení, jednotlivé vrstvy CNN a proces učení sítě. Jsou zde vybrány a popsány významné architektury. Kapitola 4 se zaměřuje na popis metod augmentace, které je při nedostatečném množství trénovacích dat nutné použít.

V praktické části je popsán navržený algoritmus. Předtím než započalo ladění a trénování neuronové sítě, bylo potřeba rozšířit počet snímků v poskytnuté databázi. Pro tyto účely byla vytvořena vlastní augmentační metoda. Metoda využívá expertního značení oblasti elektronového svazku, kterým je každý snímek databáze opatřen. Na základě tohoto značení jsou použity pro daný typ osvětlení geometrické transformace. Z geometrických transformací byly vybrány tři transformace: translace, rotace a škálování. Jejich aplikací je možné simulovat reálné chování paprsku při práci na mikroskopu a zajistit tak vznik umělých dat odpovídající skutečnosti.

Dále byla provedena analýza šumu, který je charakteristický pro TEM snímky. K tomuto účelu bylo použito 15 snímků neobsahující primární elektronový svazek. Bylo zjištěno, že TEM šum je s časem stacionární a nedochází ke změně charakteristiky. Pro účely augmentace databáze byl dále vytvořen generátor šumu pro TEM snímky. Během zpracování diplomové práce byla použita databáze obsahující 1800 snímků, která byla pro účely učení neuronové sítě rozšířena na 78 773 snímků. Následně se praktická část zaměřuje na detailní popis jednotlivých kroků algoritmu a jejich implementaci. Po nastudování odborné literatury byla pro řešení daného problému vybrána architektura konvoluční neuronové sítě Unet. Síť dosahuje velmi vysoké úspěšnosti i v případech snímků z elektronové mikroskopie. Je zde popsán výběr aktivační funkce, optimalizačního algoritmu a nastavení parametrů sítě. Kapitola je zakončena popisem principu rozměření elektronového svazku, které je provedeno na základě aproximace paprsku elipsou.

Objektivní zhodnocení úspěšnosti celého algoritmu bylo provedeno na 500 snímcích náhodně vybraných z testovací množiny. Výsledky jsou popsány pomocí Dice koeficientu udávající míru překryvu mezi dvěma množinami. Ovšem jsou zde zmíněny hodnoty i jiných statistických metrik. Výsledný Dice koeficient se před rozměřením

elektronového svazku pohybuje kolem 0,842 a po 0,815. Jelikož je práce zpracována ve spolupráci s firmou, která používá svůj vlastní algoritmus, byly algoritmy mezi sebou porovnány. Celá práce byla zpracována v programovém prostředí Python. Použití neuronové sítě se při této různorodosti snímků jeví jako velice výhodné.

Pro praktické využití algoritmu je ovšem nutné provést vylepšení některých jeho částí. Mezi hlavní slabiny algoritmu patří bezesporu část zabývající se rozměřením elektronového paprsku, kdy ve většině případech módu osvětlení dochází k poklesu míry překryvu. Zde se nabízí použít během aproximace sofistikovanější optimalizační algoritmus, než je metoda nejmenších čtverců. Je možné použít i regresní typ konvoluční neuronové sítě, která by na základě referenčních parametrů elipsy, prováděla automatické určení rozměrů elektronového paprsku. Dále by bylo potřeba vytvořit databázi snímků určenou ke strojovému učení, která by obsahovala rovnoměrný počet reprezentantů módů. Navržená augmentační metoda nedokáže simulovat zatím všechny typy osvětlení. Výstupem práce je augmentační metoda pro účely rozšíření databáze snímků, generátor TEM šumu a algoritmus umožňující detekci a rozměření elektronového svazku.

Literatura

- [1] KARLÍK, Miroslav. Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.
- [2] Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. In: Jointlab.upol [online]. [cit. 2019-11-30]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/E1_mikr/E1_mikr.html
- [3] REIMER, Ludwig a H. KOHL. Transmission electron microscopy: physics of image formation. 5th ed. New York, NY: Springer, c2008. ISBN 978-0-387-40093-8.
- [4] ORLOFF, Jon. Handbook of charged particle optics. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis, c2009. ISBN 978-1-4200-4554-3.
- [5] WILLIAMS, David B. a C. Barry CARTER. Transmission electron microscopy: a textbook for materials science, 2nd ed. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-76500-6.
- [6] JAN, Jiří. Medical image processing, reconstruction, and restoration: concepts and methods. Boca Raton, FL: Taylor a Francis, 2006. ISBN isbn0-8247-5849-8.
- [7] WALEK, Petr, Martin LAMOŠ a Jiří JAN. Analýza biomedicínských obrazů: Počítačová cvičení [online]. 2. Brno, 2015. ISBN 978-80-214-4792-9.
- [8] ZUR, Richard M., Yulei JIANG, Lorenzo L. PESCE a Karen DRUKKER. Noise injection for training artificial neural networks: A comparison with weight decay and early stopping. Medical Physics [online]. 2009, 36(10), 4810-4818 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1118/1.3213517. ISSN 00942405. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1118/1.3213517>
- [9] RAGHUVANSHI, Rajbahadur Singh a Ashutosh DATAR. Comparison of gradient operator based pseudocolored enhanced medical images. In: 2013 Fourth International Conference on Computing, Communications and Networking Technologies (ICCCNT), [online]. IEEE, 2013, s. 1-5 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1109/ICCCNT.2013.6726765. ISBN 978-1-4799-3926-8. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6726765/>
- [10] SHEET, Debdoot, Hrushikesh GARUD, Amit SUVEER, Manjunatha MAHADEVAPPA a Jyotirmoy CHATTERJEE. Brightness preserving dynamic fuzzy histogram equalization. IEEE Transactions on Consumer Electronics [online]. 2010, 56(4), 2475-2480 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1109/TCE.2010.5681130. ISSN 0098-3063. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5681130/>

- [11] SAJJAD, Muhammad, Salman KHAN, Khan MUHAMMAD, Wanqing WU, Amin ULLAH a Sung Wook BAIK. Multi-grade brain tumor classification using deep CNN with extensive data augmentation. *Journal of Computational Science* [online]. 2019, 30, 174-182 [cit. 2019-11-08]. DOI: 10.1016/j.jocs.2018.12.003. ISSN 18777503. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877750318307385>
- [12] WEI FAN, KAI WANG, Francois CAYRE a ZHANG XIONG. Median Filtered Image Quality Enhancement and Anti-Forensics via Variational Deconvolution. *IEEE Transactions on Information Forensics and Security* [online]. 2015, 10(5), 1076-1091 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1109/TIFS.2015.2398362. ISSN 1556-6013. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7027174/>
- [13] ZHENG, You-yi, Ji-lai RAO a Lei WU. Edge detection methods in digital image processing. In: 2010 5th International Conference on Computer Science a Education [online]. IEEE, 2010, 2010, s. 471-473 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1109/ICCSE.2010.5593576. ISBN 978-1-4244-6002-1. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5593576/>
- [14] ZHANG, Yu-Dong, Zhengchao DONG, Xianqing CHEN, Wenjuan JIA, Sidan DU, Khan MUHAMMAD a Shui-Hua WANG. Image based fruit category classification by 13-layer deep convolutional neural network and data augmentation. *Multimedia Tools and Applications* [online]. 2019, 78(3), 3613-3632 [cit. 2019-11-08]. DOI: 10.1007/s11042-017-5243-3. ISSN 1380-7501. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11042-017-5243-3>
- [15] SHORTEN, Connor a Taghi M. KHOSHGOFTAAR. A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning. *Journal of Big Data* [online]. 2019, 6(1) [cit. 2019-10-13]. DOI: 10.1186/s40537-019-0197-0. ISSN 2196-1115. Dostupné z: <https://journalofbigdata.springeropen.com/articles/10.1186/s40537-019-0197-0/>
- [16] KUBAT, Miroslav. *An Introduction to Machine Learning* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2020-04-2]. DOI: 10.1007/978-3-319-63913-0. ISBN 978-3-319-63912-3.
- [17] DRMOTA, Michael. *Random Trees* [online]. Vienna: Springer Vienna, 2009 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1007/978-3-211-75357-6. ISBN 978-3-211-75355-2.
- [18] BREIMAN, Leo. Random Forests. *Machine Learning* [online]. 2001, 45(1), 5-32 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1023/A:1010933404324. ISSN 08856125. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010933404324>

- [19] AL-AIDAROOS, Khadija Mohammad, Azuraliza Abu BAKAR a Zalinda OTHMAN. Naïve bayes variants in classification learning. In: 2010 International Conference on Information Retrieval and Knowledge Management (CAMP) [online]. IEEE, 2010, 2010, s. 276-281 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1109/INFRKM.2010.5466902. ISBN 978-1-4244-5650-5. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5466902/>
- [20] YU, Xiaopeng a Xiaogao YU. The Research on an Adaptive k-Nearest Neighbors Classifier. In: 2006 5th IEEE International Conference on Cognitive Informatics [online]. IEEE, 2006, 2006, s. 535-540 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1109/COGINF.2006.365542. ISBN 1-4244-0475-4. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4216459/>
- [21] JAIN, Anil K. Data clustering: 50 years beyond K-means. Pattern Recognition Letters [online]. 2010, 31(8), 651-666 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1016/j.patrec.2009.09.011. ISSN 01678655. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167865509002323>
- [22] MULLER, K.-R., S. MIKA, G. RATSCH, K. TSUDA a B. SCHOLKOPF. An introduction to kernel-based learning algorithms. IEEE Transactions on Neural Networks [online]. 12(2), 181-201 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1109/72.914517. ISSN 10459227. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/914517/>
- [23] RABINER, L.R. A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition. Proceedings of the IEEE [online]. 77(2), 257-286 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1109/5.18626. ISSN 00189219. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/18626/>
- [24] KAELBLING, L. P., M. L. LITTMAN a A. W. MOORE. Reinforcement Learning: A Survey. Journal of Artificial Intelligence Research [online]. 1996, 4, 237-285 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1613/jair.301. ISSN 1076-9757. Dostupné z: <https://www.jair.org/index.php/jair/article/view/10166>
- [25] GUO, Yanming, Yu LIU, Ard OERLEMANS, Songyang LAO, Song WU a Michael S. LEW. Deep learning for visual understanding: A review. Neurocomputing [online]. 2016, 187, 27-48 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.neucom.2015.09.116. ISSN 09252312. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925231215017634>
- [26] LEE, June-Goo, Sanghoon JUN, Young-Won CHO, Hyunna LEE, Guk Bae KIM, Joon Beom SEO a Namkug KIM. Deep Learning in Medical Imaging:

- General Overview. Korean Journal of Radiology [online]. 2017, 18(4) [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.3348/kjr.2017.18.4.570. ISSN 1229-6929. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3348/kjr.2017.18.4.570>
- [27] LECUN, Yann, Yoshua BENGIO a Geoffrey HINTON. Deep learning. Nature [online]. 2015, 521(7553), 436-444 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1038/nature14539. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature14539>
- [28] LITJENS, Geert, Thijs KOOI, Babak Ehteshami BEJNORDI, et al. A survey on deep learning in medical image analysis. Medical Image Analysis [online]. 2017, 42, 60-88 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.media.2017.07.005. ISSN 13618415. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1361841517301135>
- [29] YAMASHITA, Rikiya, Mizuho NISHIO, Richard Kinh Gian DO a Katori TOGASHI. Convolutional neural networks: an overview and application in radiology. Insights into Imaging [online]. 2018, 9(4), 611-629 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1007/s13244-018-0639-9. ISSN 1869-4101. Dostupné z: <https://insightsimaging.springeropen.com/articles/10.1007/s13244-018-0639-9>
- [30] CHOLLET, François. Deep learning v jazyku Python: knihovny Keras, TensorFlow. Přeložil Rudolf PECINOVSKÝ. Praha: Grada Publishing, 2019. Knihovna programátora (Grada). ISBN 978-80-247-3100-1.
- [31] LECUN, Y., L. BOTTOU, Y. BENGIO a P. HAFFNER. Gradient-based learning applied to document recognition. Proceedings of the IEEE [online]. 86(11), 2278-2324 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/5.726791. ISSN 00189219. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/726791/>
- [32] LAVINIA, Yukhe, Holly H. VO a Abhishek VERMA. Fusion Based Deep CNN for Improved Large-Scale Image Action Recognition. In: 2016 IEEE International Symposium on Multimedia (ISM) [online]. IEEE, 2016, 2016, s. 609-614 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/ISM.2016.0131. ISBN 978-1-5090-4571-6. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7823698/>
- [33] SZEGEDY, Christian, WEI LIU, YANGQING JIA, et al. Going deeper with convolutions. In: 2015 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) [online]. IEEE, 2015, 2015, s. 1-9 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/CVPR.2015.7298594. ISBN 978-1-4673-6964-0. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7298594/>

- [34] LAU, Mian Mian a King HANN LIM. Review of Adaptive Activation Function in Deep Neural Network. In: 2018 IEEE-EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES) [online]. IEEE, 2018, 2018, s. 686-690 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/IECBES.2018.8626714. ISBN 978-1-5386-2471-5. Dostupné z: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8626714/>
- [35] LONG, Jonathan, Evan SHELHAMER a Trevor DARRELL. Fully convolutional networks for semantic segmentation. In: 2015 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) [online]. IEEE, 2015, 2015, s. 3431-3440 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/CVPR.2015.7298965. ISBN 978-1-4673-6964-0. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7298965/>
- [36] OH, Hyeonwoo, Seunghoon HONG a Bohyung HAN. Learning Deconvolution Network for Semantic Segmentation. In: 2015 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV) [online]. IEEE, 2015, 2015, s. 1520-1528 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1109/ICCV.2015.178. ISBN 978-1-4673-8391-2. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7410535/>
- [37] RONNEBERGER, Olaf, Philipp FISCHER a Thomas BROX. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. NAVAB, Nassir, Joachim HORNEGGER, William M. WELLS a Alejandro F. FRANGI, ed. Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015 [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-11-18, s. 234-241 [cit. 2020-04-05]. Lecture Notes in Computer Science. DOI: 10.1007/978-3-319-24574-4-28. ISBN 978-3-319-24573-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24574-4_28
- [38] KINGMA, Diederik P. and BA, Jimmy. Adam: A Method for Stochastic Optimization. arXiv.org [online]. 30 January 2017. [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1412.6980>
- [39] RUDER, Sebastian. An overview of gradient descent optimization algorithms. arXiv.org [online]. 15 June 2017. [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1609.04747>
- [40] SUDRE, Carole H, LI, Wenqi, VERCAUTEREN, Tom, OURSELIN, Sébastien and CARDOSO, M. Jorge. Generalised Dice overlap as a deep learning loss function for highly unbalanced segmentations. arXiv.org [online]. 14 July 2017. [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1707.03237>

- [41] IOFFE, Sergey and SZEGEDY, Christian. Batch Normalization: Accelerating Deep Network Training by Reducing Internal Covariate Shift. arXiv.org [online]. 2 March 2015. [2020-04-05]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1502.03167v3>
- [42] THARWAT, Alaa. Classification assessment methods. Applied Computing and Informatics [online]. 2018 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.aci.2018.08.003. ISSN 22108327. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210832718301546>
- [43] TAHA, Abdel Aziz a Allan HANBURY. Metrics for evaluating 3D medical image segmentation: analysis, selection, and tool. BMC Medical Imaging [online]. 2015, 15(1) [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1186/s12880-015-0068-x. ISSN 1471-2342. Dostupné z: <http://bmcmimedimaging.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12880-015-0068-x>
- [44] HUTTENLOCHER, D.P., G.A. KLANDERMAN a W.J. RUCKLIDGE. Comparing images using the Hausdorff distance. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence [online]. 15(9), 850-863 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1109/34.232073. ISSN 01628828. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/232073/>

Seznam symbolů, veličin a zkratk

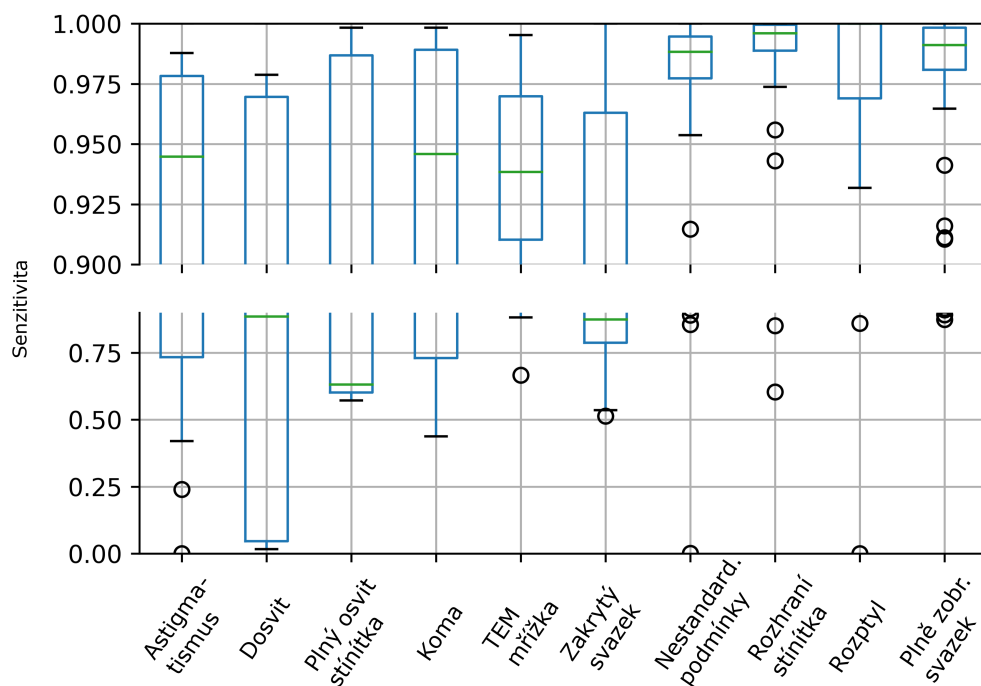
A	ampér
Adam	Adaptive moment estimation - optimalizační algoritmus
CCD	charge-couple device
CNN	konvoluční neuronová síť
FN	false negative - falešně negativní
FP	false positive - falešně pozitivní
GB	gigabajt
K	Kelvin
keV	kiloelektronvolt
kV	kilovolt
m	metr
MSE	Mean Squared Error - Průměrná směrodatná odchylka
nm	nanometr
Obr	obrázek
rad	radián
ReLU	Rectified Linear Unit (aktivační funkce)
RGB	barevný model červená-zelená-modrá
RMSE	Root Mean Squared Error - Střední kvadratická odchylka
sr	steradián
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TF	true false - pozitivně negativní
TP	true positive - pozitivně pozitivní
ZnS	sulfid zinečnatý

Seznam příloh

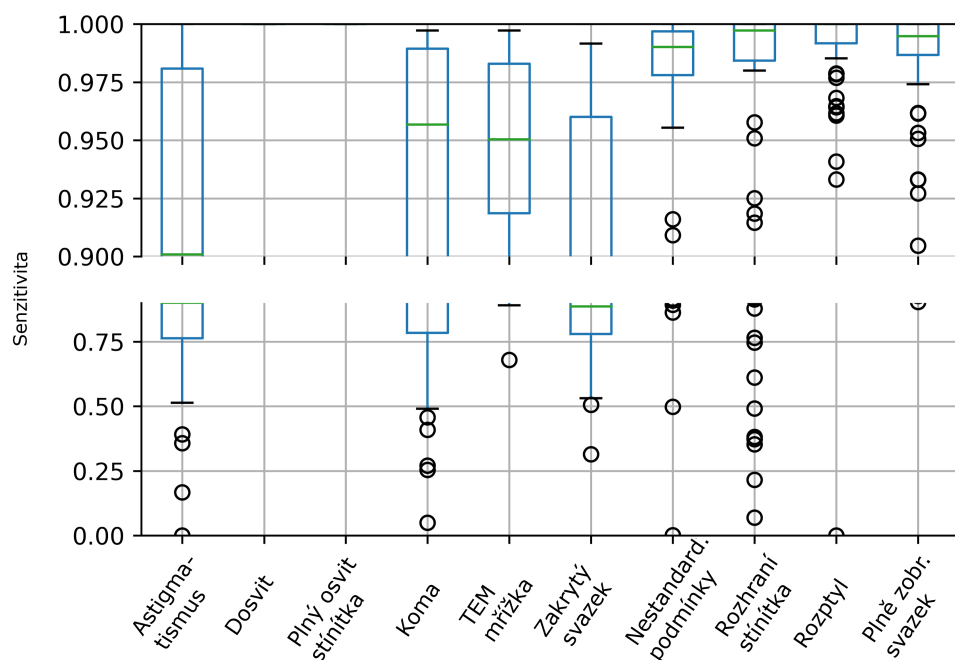
A Krabicové grafy

78

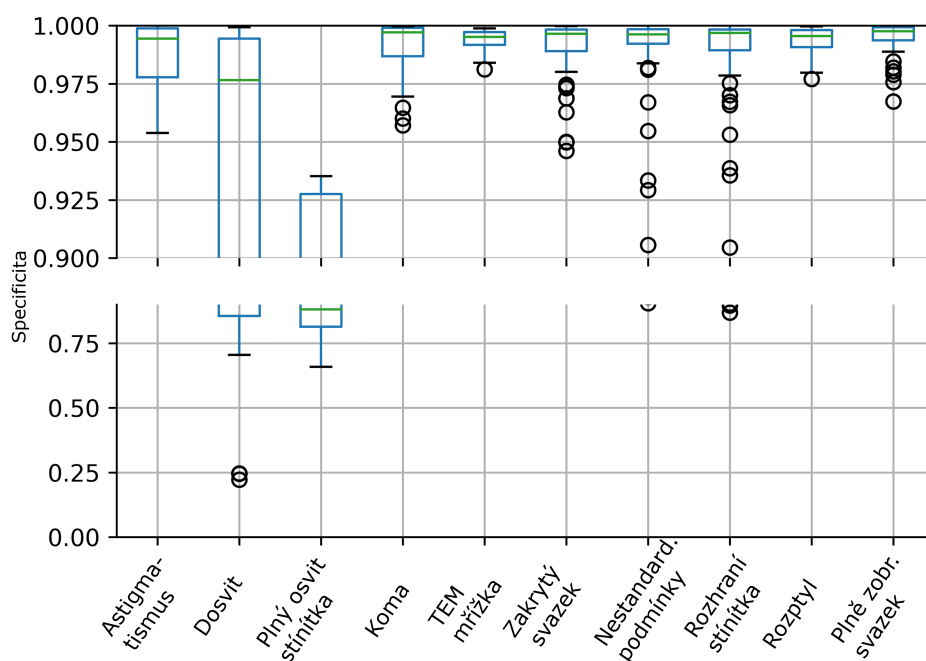
A Krabicové grafy



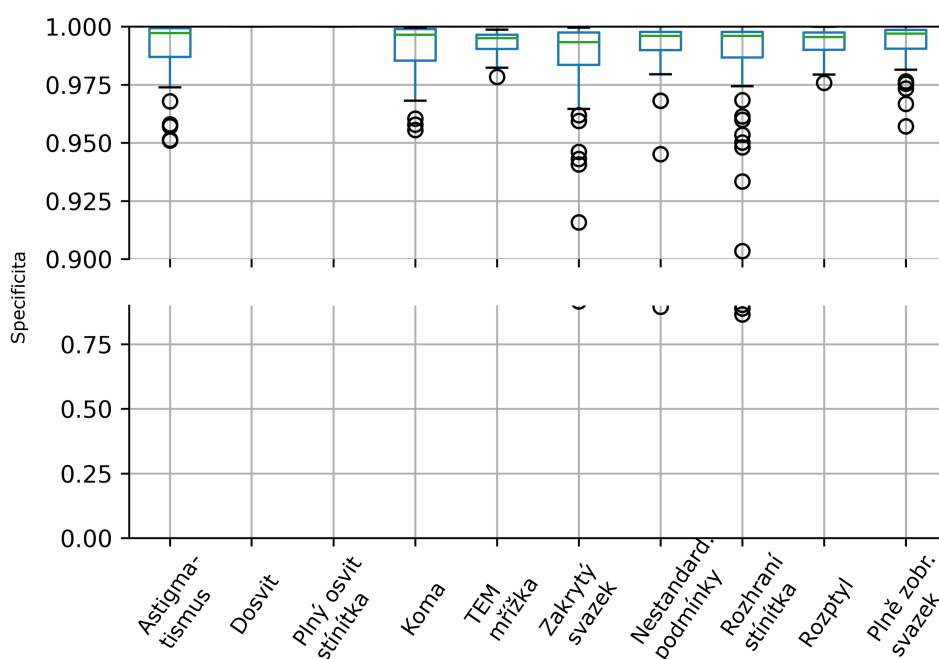
Obr. A.1: Krabicový graf senzitivity před aproximací el. svazku.



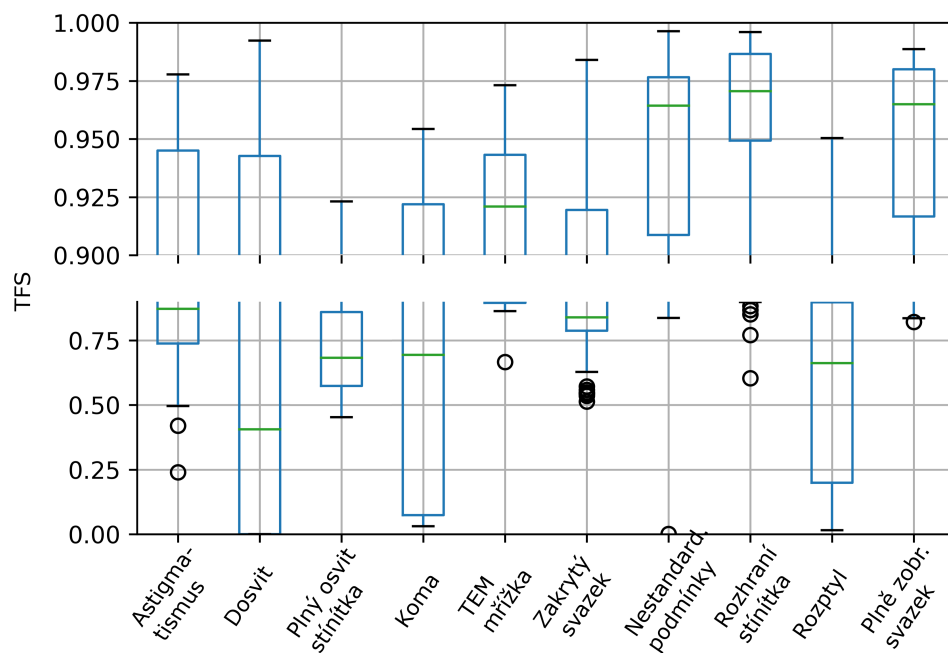
Obr. A.2: Krabicový graf senzitivity po aproximaci el. svazku.



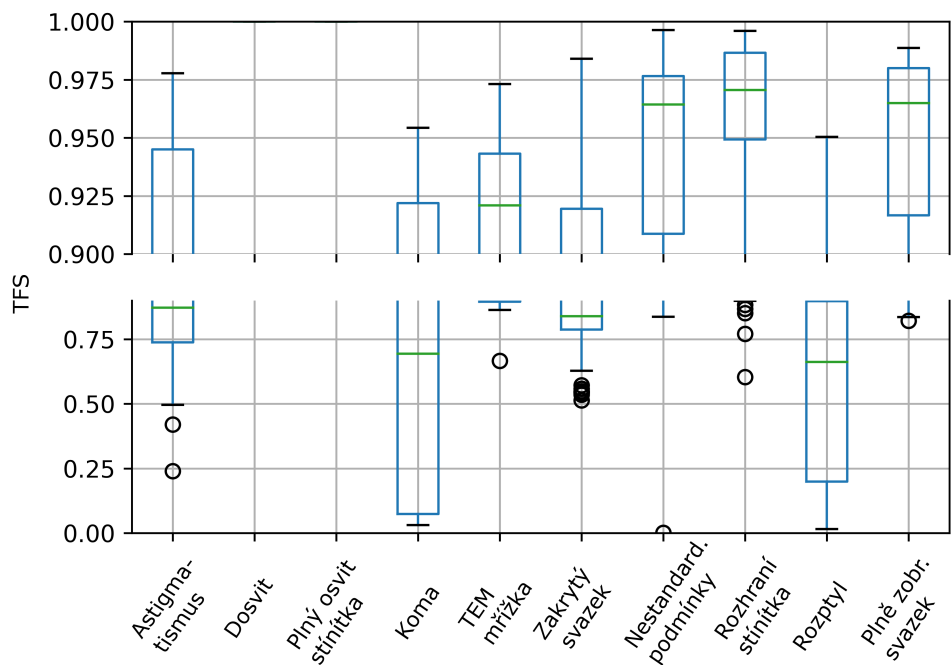
Obr. A.3: Krabicový graf specifičnosti před aproximací el. svazku.



Obr. A.4: Krabicový graf specifičnosti po aproximaci el. svazku.



Obr. A.5: Krabicový graf TFS koeficientu před aproximací el. svazku.



Obr. A.6: Krabicový graf TFS koeficientu po aproximaci el. svazku.