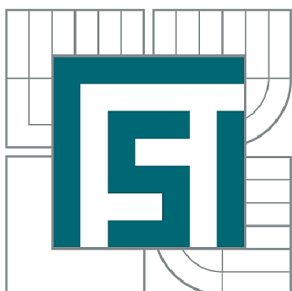




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVACÍ TECHNIKY V MULTIMODÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU

FLUORESCENCE IMAGING TECHNIQUES IN MULTIMODAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

DAVID VAŠÍČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA ČOLLÁKOVÁ

BRNO 2014

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2013/14

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): David Vašíček

který/která studuje v **magisterském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Fluorescenční zobrazovací techniky v multimodálním holografickém mikroskopu

v anglickém jazyce:

Fluorescence imaging techniques in multimodal holographic microscope

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Nově zkonstruovaný Multimodální holografický mikroskop (MHM) umožňuje kombinaci holografického modu (kvantitativního fázového zobrazování) s konvenční epi-fluorescenční technikou. Předpokládá se, že kombinace obou technik přinese nové poznatky o intracelulární části buněčného těla. Pomocí fluorescenčního zobrazovacího modu budou identifikovány jednotlivé části buněk, které se následně změří v holografickém modu. Ověření tohoto předpokladu je úkolem diplomové práce.

Cíle diplomové práce:

1. Rešerše fluorescenčních zobrazovacích technik a popis konstrukčního řešení MHM.
2. Výběr vhodných vzorků pro současné použití holografického a fluorescenčního modu.
3. Vypracovat metodu zpracování dat pořízených oběma technikami.

Seznam odborné literatury:

- [1] Uhlířová, H.: Mikroskopie časově proměnných biologických objektů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 72s. (2010).
- [2] Slabý, T., Kolman, P., Dostál, Z., Antoš, M., Lošťák, M. and Chmelík, R. "Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope," Opt. Express 21, 14747-14762 (2013).
- [3] Sluder, G., David E. Wolf, D. E.: Digital Microscopy, Volume 81, Third Edition: Methods in Cell Biology, Volume 81 (2007), ISBN: 978-0-12-374025-0.
- [4] Pawley, J.: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Springer, 3rd ed. (2006), ISBN 978-0-387-45524-2.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Čolláková

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2013/14.

V Brně, dne 29.11.2013



prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
Ředitel ústavu



prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá registrací obrazů snímků pořízených multimodálním holografickým mikroskopem (MHM). Rešerše je věnována fluorescenční a holografické mikroskopii a multimodálnímu holografickému mikroskopu, který oba tyto typy mikroskopie kombinuje. Aby bylo možné získat novou informaci kombinací obou typů snímků, je nutné každou dvojici snímků sesadit. Je popsán algoritmus pro registraci obrazů metodou fázové korelace a procedura vytvořená v prostředí MATLAB na základě tohoto algoritmu. Je popsán vliv nejdůležitějších parametrů procedury na úspěšnost registrace a jsou komentovány výsledky.

Abstract

The diploma thesis deals with the registration of images taken with the multimodal holographic microscope (MHM). The summary covers the fluorescent and holographic microscopy, and the multimodal holographic microscope combining both these microscopy types. Every pair of the images needs to be aligned in order to gain new information by combining both image types. The thesis contains an algorithm that registers images by phase correlation as well as a process created in MATLAB in accordance with the algorithm. The most important procedure parameters' influence on the registration success is described and the results are annotated.

VAŠÍČEK, David. *Fluorescenční zobrazovací techniky v multimodálním holografickém mikroskopu*. Brno, 2013/2014. Diplomová práce. VUT, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce Ing. Jana Čolláková.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Fluorescenční zobrazovací techniky v multimodálním zobrazovacím mikroskopu* vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených na seznamu, který tvoří přílohu práce.

29. 5. 2014 v Brně

David Vašíček

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Janě Čollákové za trpělivé vedení a předávaný optimismus, prof. RNDr. Miloslavu Druckmüllerovi, CSc. za cenné rady, pomoc při hledání chyb v algoritmu a poskytnutí procedury pro převod obrazu do logaritmicko-polárních souřadnic, Ing. Haně Druckmüllerové za pomoc při sestavování algoritmu a inspiraci, kterou mi byla její diplomová práce, Ing. Anetě Křížové za pomoc při měřeních s multimodálním holografickým mikroskopem a za přizvání k jejím měřením s živými buňkami, Bc. Ivaně Přikrylové za vytvoření grafického znázornění algoritmu, kolegům za rady a nápady, své přítelkyni za grafické úpravy diplomové práce, své sestře za gramatické úpravy diplomové práce a svým rodičům za emocionální a finanční podporu.

David Vašíček

OBSAH

ÚVOD	1
1 FLUORESCENCE	2
1.1 MECHANISMY FLUORESCENCE	2
1.2 EMISNÍ ZÁŘENÍ	5
1.3 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	5
1.4 PRINCIPY FLUOROSCENČNÍHO MIKROSKOPU	6
1.5 VYBĚLENÍ (PHOTOBLEACHING).....	7
1.6 FLUOROFORY	7
1.7 VÝHODY FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	8
2 HOLOGRAFIE.....	9
2.1 HISTORIE HOLOGRAFIE	9
2.1.1 Analogová holografie.....	9
2.1.2 Digitální holografie	12
2.2 HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE	13
2.2.1 Osové metody posouvání fáze (phase-shifting methods).....	15
2.2.2 Mimoosové metody (off-axis methods).....	16
2.2.3 Mimoosové metody s použitím achromatického interferometru.....	17
2.2.4 Paralelně zobrazující konfokální mikroskop (PMCM).....	18
2.2.5 Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM): První generace.....	20
2.2.6 Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM): Druhá generace.....	21
2.2.7 Multimodální holografický mikroskop (MHM)	23
2.2.8 Zpracování hologramu	25
3 ZPRACOVÁNÍ OBRAZU	27
3.1 DIGITÁLNÍ OBRAZ	27
3.2 ČERNOBÍLÝ A BAREVNÝ DIGITÁLNÍ OBRAZ.....	27
3.3 ZPRACOVÁNÍ OBRAZU	28
3.4 REGISTRACE OBRAZŮ	28
3.5 FÁZOVÁ KORELACE	28
3.6 DŮLEŽITÉ POJMY A TEORÉMY	29
3.6.1 Fourierova transformace.....	29
3.6.2 Diskrétní Fourierova transformace	30
3.6.3 Fourierův teorém o posuvu.....	31
3.6.4 Teorém o podobnosti	31
3.6.5 Definice cross-power spektra.....	31
3.6.6 Definice fázové korelace.....	32
4 REGISTRACE OBRAZŮ METODOU FÁZOVÉ KORELACE	33
4.1 TEORIE FÁZOVÉ KORELACE IDENTICKÝCH VZÁJEMNĚ POSUNUTÝCH OBRAZŮ.....	33
4.2 DEMONSTRACE FÁZOVÁ KORELACE IDENTICKÝCH, VZÁJEMNĚ POSUNUTÝCH OBRAZŮ	34
4.3 TEORIE FÁZOVÉ KORELACE PODOBNÝCH OBRAZŮ	36
4.4 DEMONSTRACE FÁZOVÉ KORELACE IDENTICKÝCH VZÁJEMNĚ POOTOČENÝCH OBRÁZKŮ S RŮZNÝMI MĚŘÍTKY.....	38
5 REGISTRACE OBRAZŮ METODOU FÁZOVÉ KORELACE V PROSTŘEDÍ MATLAB	42
5.1 VÝPOČETNÍ PROSTŘEDÍ MATLAB	42

5.2	ALGORITMUS PRO REGISTRACI OBRAZŮ	43
5.3	DETAILNÍ POPIS PROCEDURY PRO REGISTRACI OBRAZŮ	44
6	POZOROVÁNÍ VZORKU POMOCÍ MHM	54
6.1	DEFINICE POJMŮ.....	54
6.2	POUŽITÝ VZOREK.....	54
6.3	PARAMETRY VYBRANÝCH SOUČÁSTÍ MHM A POUŽITÝCH FLUOROFORŮ	54
6.3.1.	<i>Kamera pro holografický mód</i>	<i>54</i>
6.3.2	<i>Kamera pro fluorescenční mód</i>	<i>55</i>
6.3.3	<i>Fluorofor DAPI</i>	<i>55</i>
6.3.4	<i>Fluorofor Alexa Fluor 488 phalloidin</i>	<i>55</i>
6.3.5	<i>Osvětlení vzorku.....</i>	<i>56</i>
6.3.6	<i>Objektiv.....</i>	<i>56</i>
6.4	POZOROVÁNÍ.....	56
6.4.1	<i>Příprava mikroskopu</i>	<i>56</i>
6.4.2	<i>Pozorování.....</i>	<i>57</i>
6.4.3	<i>Podmínky pozorování.....</i>	<i>57</i>
6.4.4	<i>První pozorování.....</i>	<i>57</i>
6.4.5	<i>Druhé pozorování.....</i>	<i>58</i>
6.4.6	<i>Třetí pozorování.....</i>	<i>59</i>
6.5	ZPRACOVÁNÍ OBRAZŮ	60
6.5.2	<i>Vlastnosti obrazů</i>	<i>60</i>
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
7.1	PARAMETRY METODY FÁZOVÉ KORELACE	64
7.1.1	<i>Preprocessing.....</i>	<i>64</i>
7.1.2	<i>Velikost poloměru okénkové funkce.....</i>	<i>64</i>
7.1.3	<i>Konstanty p, q v polo-normalizovaném cross-power spektru.....</i>	<i>65</i>
7.1.4	<i>Váhová funkce</i>	<i>65</i>
7.1.5	<i>Výpočet středu hmotnosti</i>	<i>66</i>
7.2	NASTAVENÍ PARAMETRŮ	66
7.3	VÝSLEDKY OPTIMALIZOVANÉ PROCEDURY	66
7.3.1	<i>Kvalitativní analýza.....</i>	<i>66</i>
7.3.2	<i>Kvantitativní analýza</i>	<i>67</i>
7.3.3	<i>Výsledky automatické registrace obrazů.....</i>	<i>69</i>
7.3.4	<i>Diskuze výsledků automatické registrace obrazů</i>	<i>69</i>
7.3.5	<i>Procedura s možností zásahu uživatele.....</i>	<i>70</i>
7.3.6	<i>Výsledky registrace obrazů s možností zásahu uživatele</i>	<i>71</i>
7.3.7	<i>Diskuze výsledků registrace obrazů s možností zásahu uživatele</i>	<i>71</i>
7.4	MOŽNÉ ÚPLNÉ ŘEŠENÍ NESPRÁVNÉ REGISTRACE	72
7.5	POUŽITÍ PROCEDURY PRO REGISTRACI OBRAZŮ ŽIVÝCH BUNĚK	72
ZÁVĚR	74	
LITERATURA	76	
PŘÍLOHA A.....	82	
PŘÍLOHA B.....	85	

Úvod

Při zobrazování dochází k mapování určitých fyzikálních vlastností a jejich převedení do vizuální formy [1]. Fluorescenční mikroskopie mapuje koncentraci fluorescenčního barviva. Barvivo je navrženo tak, aby se navázalo na konkrétní zkoumaný objekt (např. DNA buňky) a bylo tak možné jej pozorovat. Nejčastěji se tento druh mikroskopie využívá v biologii a medicíně. V současnosti existuje velké množství nejrůznějších fluorescenčních barviv umožňujících pozorovat a zkoumat rozmanité biologické objekty, jejich části a procesy v nich probíhající [2].

Holografická mikroskopie umožňuje zobrazit fázové rozdíly předmětové vlny vůči referenční vlně vzniklé průchodem předmětové vlny fázovým objektem, např. buňkou. Takovéto zobrazení se nazývá zobrazení v kvantitativním fázovém kontrastu. Kvantitativní fázové zobrazování umožňuje tyto odchylky přepočíst s ohledem k pozorovanému vzorku na fyzikální veličiny, jako je index lomu vzorku, tloušťka vzorku či jeho hustota [1].

Multimodální holografický mikroskop (MHM) postavený na VUT ve spolupráci s TESCANA s.r.o. umožňuje kombinovat kvantitativní fázové zobrazování (holografický mód) s konvenční epi-fluorescenční technikou (fluorescenční mód). Fluorescenční mód umožňuje identifikovat části buněk, zatímco holografický mód tyto části dokáže kvantifikovat [3]. Kombinace obou módů by mohla přinést nové poznatky o částech buněčného těla.

Snímek zachycený CCD kamerou pro holografický mód se nekryje dobře se snímkem z kamery pro fluorescenční mód. Obecně mohou být snímky vůči sobě pootočené, mohou se nacházet v rozdílných vzájemných poměrech velikostí a mohou být vůči sobě laterálně posunuté. Pro kombinaci snímků z obou módů je nutné je sesadit. Sesazování obrazů na sebe se nazývá registrací obrazů. Tento proces komplikuje fakt, že oba módy mapují jiné fyzikální vlastnosti a obrazy tak mohou být velmi nepodobné. V této práci se zabývám vytvořením automatické procedury v prostředí MATLAB pro registraci obrazů pomocí metody fázové korelace, optimalizace jejich parametrů pro skládání obrazů z obou módů a zhodnocení úspěšnosti tohoto přístupu. Pro optimalizaci parametrů byl pozorován fixovaný biologický vzorek obsahující buňky potkaních fibroblastů.

1 Fluorescence

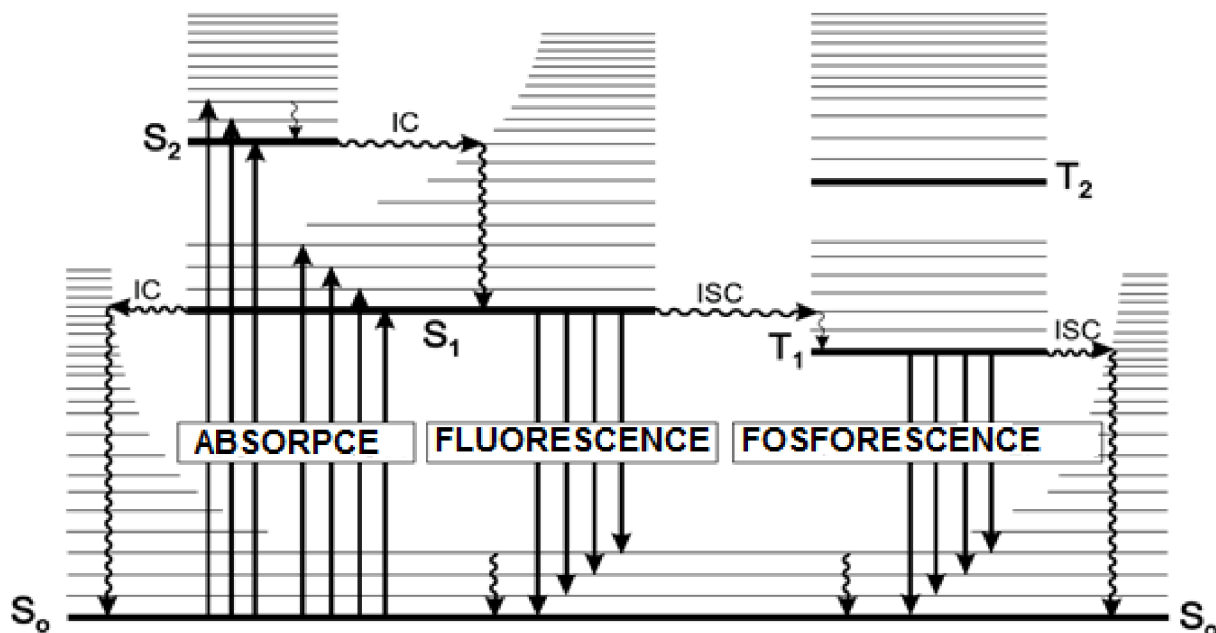
Luminiscence je spontánní emise světla způsobená relaxací z excitovaného do základního elektronového stavu fyzikálního systému. Excitace může být způsobena různými procesy, například u fotoluminiscence jde o excitaci absorpcí fotonu [4].

Fluorescence spolu s fosforescencí jsou jevy spadající pod proces fotoluminiscence. Fluorofor je látka, u které se objevuje jev fluorescence. Může jít o nejrůznější objekty, od anorganických kvantových teček a nanočástic přes organické molekuly až po geneticky upravené proteiny [2]. Při fluorescenci jde o spontánní emisi fotonu, způsobenou přechodem elektronu z excitované energetické hladiny do základní, s delší vlnovou délkou než měl foton excitační [5]. Fosforescence je proces podobný fluorescenci, jen je složitější; je způsoben zakázanými přechody elektronů mezi energetickými pásy. Nejdůležitějším rozdílem mezi těmito fenomény je doba, po kterou fluorofory září po odstranění vlivu excitačního záření. Zatímco fluorescence je rychlý proces, kdy fluorofory přestávají zářit řádově do několika nanosekund, fosforescence je pomalý proces, který může trvat i několik sekund [6].

1.1 Mechanismy fluorescence

Fluorescence je důsledek procesu o třech krocích: vybuzení excitovaného stavu pohlcením fotonu o dostatečné energii, vnitřní změny fluoroforu během doby existence excitovaného stavu a návrat do základního stavu, např. vyzářením fotonu, tj. fluorescencí [7].

Celý proces je ilustrován Perrinovým-Jablonského diagramem, viz obrázek 1.



Obrázek 1: Perrinův-Jablonského diagram ilustrující procesy probíhající ve fyzikálních systémech při fluorescenci a fosforescenci. Význam zkratk: IC – vnitřní přeměna, ISC – mezisystémové křížení, S₀ – základní stav, S₁ – první excitovaná singletová hladina, S₂ – druhá excitovaná singletová hladina, T₁ – první excitovaná tripletová hladina, T₂ – druhá excitovaná tripletová hladina. Převzato a upraveno z [6].

Vybuzení excitovaného stavu

Foton dodaný externím zdrojem o energii $h\nu_{EX}$ je pohlcen fluoroforem, ten je vybuzen do excitovaného singletového stavu, např. S₁. Absorpce je nesmírně rychlý proces trvající $\approx 10^{-15}$ s – je mnohem rychlejší než procesy relaxace [6].

Procesy v excitovaném stavu

Excitovaný stav existuje určitou dobu, typicky $10^{-10} - 10^{-7}$ s, během této doby prochází fluorofor vnitřními změnami, může dokonce interagovat se svým okolím. Rychlejší procesy mají obvykle vyšší pravděpodobnost. Mezi nejběžnější procesy vnitřních změn patří vnitřní přeměna a mezisystémové křížení [6].

Vnitřní přeměna (internal conversion)

Vnitřní přeměna je nezářivý přechod mezi dvěma elektronovými stavy stejné multiplicity např. S₂ → S₁. Obvykle je tento přechod následován vibrační relaxací směrem k nejnižší vibrační hladině daného elektronového stavu. Přebytek vibrační energie může být také předán okolním molekulám. Je častější u přechodu mezi hladinami, mezi kterými je těsnější rozdíl energií. Tedy je častější u přechodu mezi první a druhou excitační hladinou než mezi první excitační hladinou a základním stavem. Obvykle trvá kolem $10^{-11} - 10^{-9}$ s [6].

Mezisystémové křížení (intersystem crossing)

Mezisystémové křížení označuje nezářivý přechod mezi isoenergetickými vibračními hladinami stejných excitačních stavů různých multiplicit, např. $S_1 \rightarrow T_1$. Jde o zakázaný přechod umožněný pouze spin-orbitálním sprzęžením. Tento druh přechodu je pravděpodobnější u těžkých atomů. Jde o pomalý proces trvající $10^{-10} - 10^{-8}$ s. Obvykle je následován vnitřní přeměnou s vibrační relaxací; zpožděnou fluorescencí nebo fosforescencí. Při vyšších teplotách je pravděpodobnější vnitřní přeměna následovaná vibrační relaxací, což souvisí s výraznějším tepelným pohybem a tedy častějšími interakcemi s okolními molekulami. Při nižších teplotách je naopak pravděpodobnější fosforescence [6].

Fosforescence

Přechod mezi hladinami $T_1 \rightarrow S_0$ emisí fotonu s energií rovnou rozdílu těchto hladin se nazývá fosforescence. Jde o zakázaný přechod umožněný pouze spin-orbitálním sprzęžením. Obvykle následuje po mezisystémovém křížení a při vyšších teplotách vymizí [6].

Fluorescence

Fluorescence znamená přechod mezi hladinami $S_1 \rightarrow S_0$ emisí fotonu s energií rovnou rozdílu těchto hladin. Pokud už k fluorescenci dojde, pak energie a tedy i vlnová délka emitovaného fotonu nezávisí na energii excitačního fotonu. Vyšší teplota snižuje pravděpodobnost relaxace fluorescencí a zvyšuje pravděpodobnost relaxace vibračním přechodem [6].

Zpožděná fluorescence

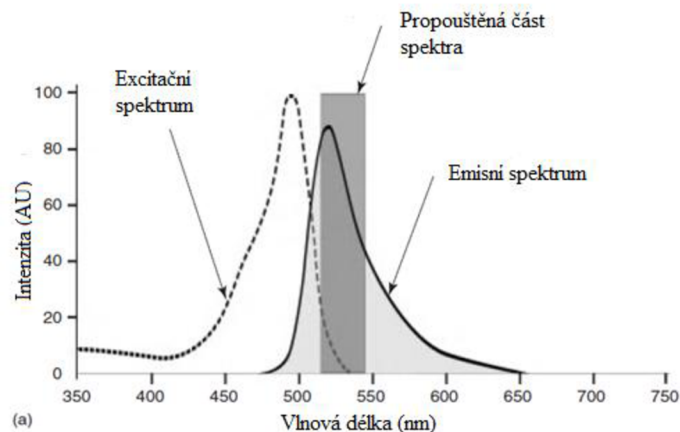
Může nastat situace, kdy dojde k dvojitému mezisystémovém křížení, tzn. $S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_1$, následovaném fluorescencí, pak se tato fluorescence nazývá zpožděnou. Proces mezisystémového křížení trvá jistou dobu, poté systém nějaký čas setrvává v tripletovém stavu a spolu s dalším mezisystémovým křížením značně prodlouží čas, po který u fluoroforu můžeme pozorovat fluorescenci (stejná spektrální složení emitovaného světla u klasické fluorescence). Fluorescence působená tímto jevem má tedy dlouhou extinkční dobu. Aby jev nastal, je nutný malý rozdíl energií mezi singletovým a tripletovým stavem (aby byl proces mezisystémového křížení pravděpodobný). Vyšší teplota tento děj podporuje [6].

1.2 Emisní záření

Fluorofor je při pozorování ozařován intenzivním svazkem excitačního záření, protože jen malé procento deexcitačních dějů skončí fluorescencí [2]. Při fluorescenci je vyzářen foton s energií rovnou rozdílu hladin počátečního a konečného stavu. Pokud by mezi excitací fluoroforu a jeho fluorescencí nedošlo k žádnému jinému přechodu, pak by emitované fotony a excitační fotony měly stejnou vlnovou délku, k tomu ale téměř nedochází. Během procesu excitace-emise téměř vždy proběhne nějaká vibrační relaxace, takže naprostá většina emitovaných fotonů má delší vlnovou délku než excitační fotony. Emisní spektrum je tedy posunuté vůči absorpčnímu k delším vlnovým délkám a někdy se částečně překrývá. Posun maxim těchto spekter se nazývá Stokesův posuv a udává se jeho vlnově. Pokud uvažujeme fluorescenci při pokojové teplotě, nachází se některé elektrony ve vyšších vibračních stavech. Může tak dojít k tomu, že některý emitovaný foton může mít kratší vlnovou délku než ten, který fluorescenci vybudil. K tomuto jevu ovšem dochází velmi zřídka [5].

1.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je efektivní formou mikroskopie zejména pro pozorování biologických vzorků. Využívá fluorofory navržené k tomu, aby infiltrovaly biologický vzorek a navázaly se na jeho konkrétní části, které chceme pozorovat. Vzorek je osvětlen světlem o takových vlnových délkách, aby se spektrální složení excitačního svazku co nejvíce krylo s absorpčním spektrem fluoroforu [7]. Fluorofor navázaný na konkrétní část vzorku emituje fotony tvořící emisní spektrum. Emisní spektrum je posunuté oproti absorpčnímu směrem k delším vlnovým délkám (viz obrázek 2). Důležitou součástí jsou filtry, které umožní oddělení relativně slabého emisního světla od silného excitačního. Dostatečný Stokesův posuv je nutný pro možnost efektivního oddělení obou druhů záření. Pomocí emisního světla lze vytvořit velmi kontrastní snímek zobrazující konkrétní část vzorku (např. buněčné jádro), na kterou je navázan fluorofor, na tmavém pozadí [2].

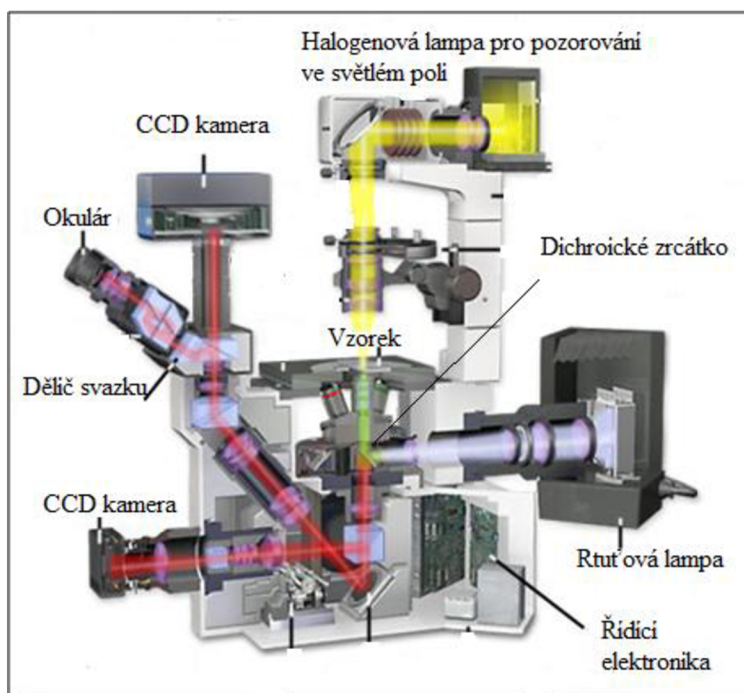


Obrázek 2: Ilustrační obrázek emisního a excitačního spektra. Filtry musí být tak nastavené, aby k detektoru propustily, co největší část emisního záření a nepropustily excitační záření, které se projevuje jako jeden ze zdrojů šumu v obraze. Převzato a upraveno z [2].

1.4 Principy fluorescenčního mikroskopu

Zdrojem excitačního světla fluorescenčního mikroskopu bývá obvykle rtuťová lampa (viz schéma fluorescenčního mikroskopu – obrázek 3), protože je schopná poskytnout dostatečně intenzivní světelný svazek a její emisní spektrum se pohybuje v rozsahu od ultrafialového světla až po infračervené. V trase svazku vystupujícího z lampy je umístěn excitační filtr. Jeho funkcí je propustit takovou část spektra svazku (excitační spektrum), aby docházelo k maximální absorpci excitačního světla použitým fluoroforem a zároveň spolu s funkcí dichroického zrcátka bylo možné oddělit excitační světlo od emisního. Na dichroickém zrcátce se odráží excitační svazek a je směřován ke vzorku. Vzorek pohlcuje excitační světlo a vyzařuje emisní spektrum. Nevyzařuje pouze fluorofor, ale i zbytek vzorku. Záření ze zbytku vzorku, tzv. parazitní světlo, tvoří pozadí a snižuje kvalitu zobrazení. Jen malá část absorbovaného světla vyvolá fluorescenci, navíc světlo je vyzařováno do všech směrů. Část vyzářená do kuželu daného konstrukcí mikroskopu se spolu s odraženým excitačním světlem vrací k dichroickému zrcátce, které funguje tak, že propustí jen světlo v úzkém rozmezí vlnových délek a zbytek odrazí. Volba použitého fluoroforu stanovuje požadavky na vzájemné naladění excitačního filtru a dichroického zrcátka. Excitační a emisní spektrum se obvykle překrývají, proto je nutné, aby dichroické zrcátko propustilo maximum emisního světla a minimum excitačního světla a zároveň blokovalo co největší část parazitního světla. Užší spektrální propust excitačního filtru snižuje intenzitu excitačního světla. Užší spektrální propust dichroického zrcátka snižuje intenzitu prošlého parazitního a excitačního světla, což snižuje šum v obraze, nicméně snižuje i intenzitu prošlého emisního svazku, takže je nutné použít buď delší expoziční doby, nebo zvýšit intenzitu emisního světla intenzivnějším

osvitem vzorku excitačním světlem pro vznik snímku. Nepříjemnými důsledky delší expozice či intenzivnějšího osvitu je urychlení fenoménu vybělení. Emisní světlo je vedeno dále až k oku pozorovatele či k CCD čipu [2].



Obrázek 3: Schéma fluorescenčního mikroskopu. Převzato a upraveno z [8].

1.5 Vybělení (photobleaching)

Vybělení je proces, při kterém fluorofor ztratí schopnost fluorescence – většinou nezvratně [2]. Při excitaci může fluorofor předat přebytek energie sousedním molekulám, případně s nimi chemicky interagovat. Vybělení obvykle znamená reakci s radikálem kyslíku. Jde o statistický jev s určitou pravděpodobností výskytu. Tomuto nežádoucímu vlivu se předchází použitím jen tak intenzivního osvitu fluoroforu a jen po tak dlouhou dobu, jak je nezbytně nutné. Alternativou mohou být substance vázající se ve vzorku na radikály kyslíku, čímž tento jev potlačují, tyto substance jsou ale obvykle toxické a často je nelze použít např. u živých vzorků [7].

1.6 Fluorofory

Jak již bylo řečeno výše, fluorofor je látka, u které se objevuje jev fluorescence. Od doby objevu fluorescenčního barvení se hledají vhodné substance umožňující infiltrovat vzorek, navázat se na definovanou část vzorku a sloužit jako fluorofor. Povaha pozorované části vzorku určuje výběr fluoroforu a ten zase určuje použitý excitační filtr a dichroické zrcátko.

1.7 Výhody fluorescenční mikroskopie

Metoda fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorovat konkrétní části vzorku (např. buněčné jádro, membrány atd.) s vysokým kontrastem. Největšími výhodami fluorescenčních metod jsou vysoká citlivost (některými metodami lze odhalit přítomnost i jednotlivých molekul), selektivita (barviva se navážou pouze na konkrétní objekty) a z toho plynoucí vysoký kontrast. Nevýhodou je diskutabilní použití pro kvantitativní měření. Ne všechno barvivo se naváže tam, kam má, tzn. větší množství barviva, a tedy vyšší jas, nemusí znamenat vyšší přítomnost sledovaných objektů (např. proteinů) [2]. Autofluorescencí generovaný parazitní jas dále snižuje přesnost případného měření.

2 Holografie

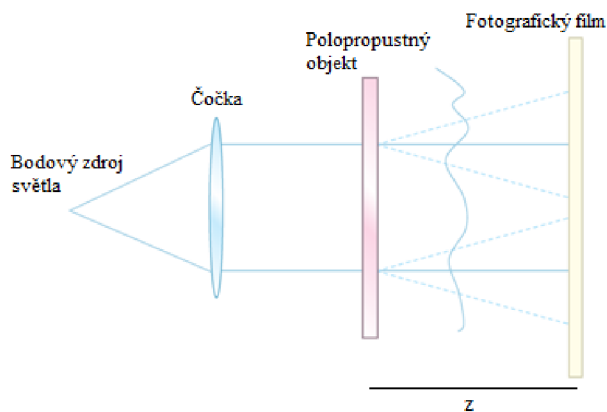
Holografie je metoda umožňující záznam a rekonstrukci předmětových světelných vln nesoucích informaci o zkoumaných objektech, a to jak v jejich amplitudě, tak fázi. Jde o proces o dvou krocích: nejdříve je pořízen hologram, tj. záznam intenzity interference dvou dopadajících světelných vln (referenční a předmětové), obsahující informaci o jejich amplitudě a fázi. Záznam je možné provádět analogově (na fotografickou desku) nebo digitálně (např. na CCD čip). Po analogovém záznamu následuje rekonstrukce předmětové vlny, která probíhá opticky tak, že se hologram osvítl referenční vlnou. Poté pozorujeme vznik dvou obrazů objektu – reálného a virtuálního. Pokud hologram zaznamenáváme digitálně, rekonstrukce předmětové vlny probíhá numericky.

2.1 Historie holografie

2.1.1 Analogová holografie

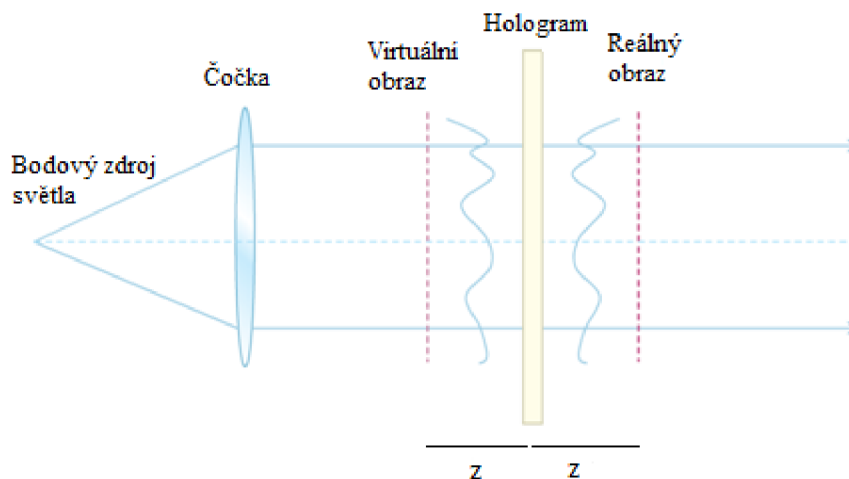
Princip holografie pochází od Gabora, který v roce 1948 navrhl optickou metodu pro čtení elektronových mikrogramů trpících tehdy značnými sférickými aberacemi a pojmenoval ji holografii [9]. V podstatě jde o záznam Fresnelova difrakčního obrazce objektu a následné použití tohoto obrazce pro rekonstrukci obrazu objektu [10].

Schéma pro záznam hologramu je na obrázku 4. Světlo z bodového zdroje bylo kolimováno čočkami na polopropustný objekt. Část světelného svazku byla na vzorku rozptýlena a část prošla nerozptýlena. Ve vzdálenosti z za objektem byla na fotografický film zaznamenána intenzita interference těchto částí svazku. Na fotografickém filmu vznikl hologram. Během záznamu hologramu je ovšem ztracena informace o fázi a důsledkem je nedokonalá rekonstrukce [10].



Obrázek 4: Gaborovo optické uspořádání pro záznam hologramu ve Fresnelově rovině. Převzato a upraveno z [1].

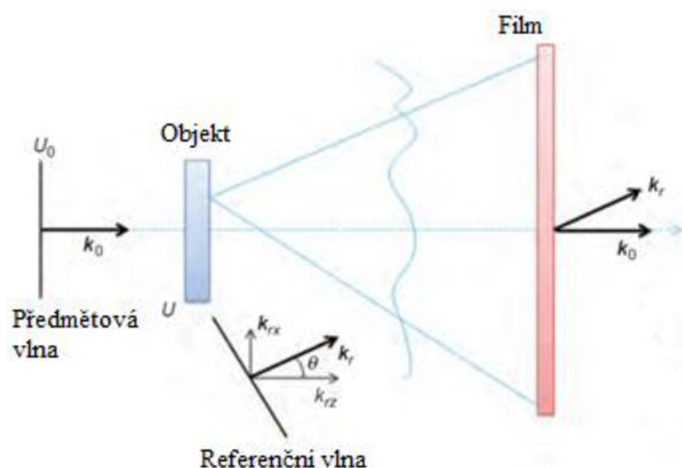
Osvícením hologramu stejným způsobem, jako by se jednalo o nový objekt, dojde k jeho rekonstrukci (přečtení), viz obrázek 5. Pozorovatel hledící ve směru chodu paprsků uvidí ve vzdálenosti z za hologramem obraz objektu, tzv. reálný obraz. Druhý (virtuální) obraz vznikne ve vzdálenosti z před hologramem. Při zaostření na jeden z obrazů a jeho pozorování dochází k překryvu druhým (mimo rovinu ostření) a ke značnému zhoršení kvality zobrazení [9,10].



Obrázek 5: Gaborovo optické uspořádání pro čtení hologramu zaznamenaného ve Fresnelově rovině. Převzato a upraveno z [1].

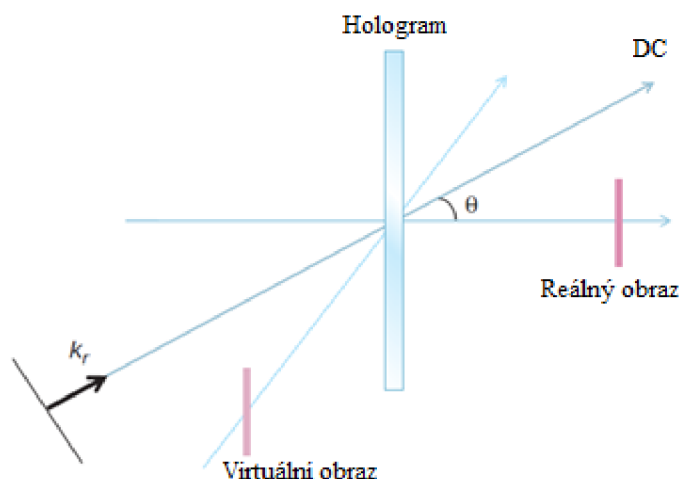
K významnému rozvoji holografie přispěli Leith a Upatnieks svými pracemi z let 1962 a 1963 [10, 11]. Navrhli několik mimoosových metod, které řešily problém překrývajících se obrazů a několika dalších rušivých jevů. Mimoosová metoda přidává k předchozímu Gaborovu uspořádání prostorovou modulaci, tzv. nosnou frekvenci [1].

Z principu záznamu hologramu na obrázku 6 je patrné přidání monochromatické rovinné referenční vlny dopadající na film pod úhlem θ (s ohledem na předmětovou vlnu). Interferencí těchto dvou vln (referenční a předmětové) vzniká hologram tvořený strukturou interferenčních proužků spolu s Fresnelovým difrakčním obrazcem objektu. Difrakční obrazec v podstatě narušuje uniformní strukturu interferenčních proužků. Změna amplitudy a fáze předmětové vlny vzniklá v důsledku průchodu objektem dává vzniknout právě difrakčnímu obrazci a má tedy vliv na strukturu proužků. Díky tomu je hologram kompletní, obsahuje informaci o amplitudě i fázi předmětové vlny [10].



Obrázek 6: Leithovo-Upatnieksovo uspořádání pro záznam hologramu ve Fresnelově rovině. Převzato a upraveno z [1].

Obrázek 7 znázorňující osvit hologramu referenční vlnou pod úhlem θ ukazuje prostorovou oddělenost virtuálního a reálného obrazu. Obrazy se již nepřekrývají, což vede k podstatnému zlepšení kvality obrazu. Také dochází k oddělení DC komponentů, tj. komponentů nesoucích konstantní informaci o jasu [12].

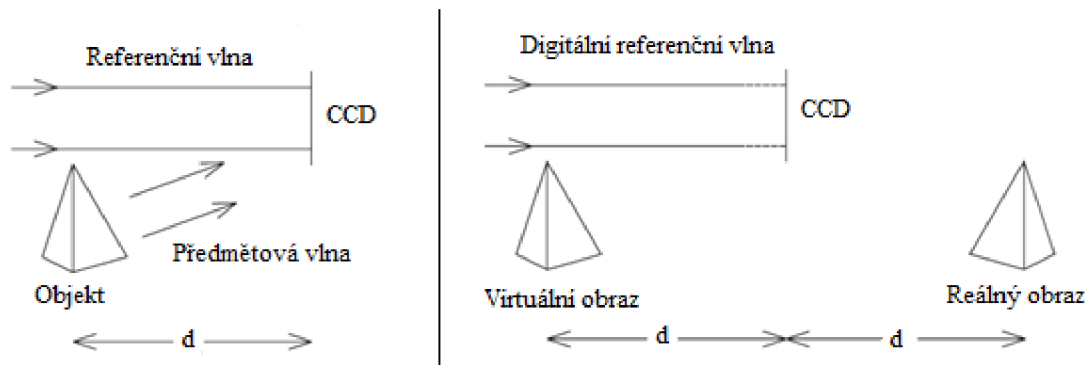


Obrázek 7: Leithovo-Upatnieksovo uspořádání pro čtení hologramu ve Fresnelově rovině. Převzato a upraveno z [1].

2.1.2 Digitální holografie

Pokrok ve výpočetní technice a vyřešení problému překryvu dvou obrazů umožnily v 80. a 90. letech experimentování s digitálním záznamem a čtením hologramů [12]. Prvními užitými numerickými metodami v holografii bylo vytvoření umělých hologramů a jejich následná optická rekonstrukce, například pro registraci obrazů [1]. Stejně tak docházelo k opačnému trendu, tj. optickému záznamu hologramu a jeho numerické rekonstrukci. Velkým posunem byl přímý záznam interferenčního obrazce na CCD čip, což umožnilo okamžitý digitální záznam a zpracování hologramů [12].

Obrázek 8 popisuje princip záznamu a čtení digitálního hologramu. Referenční a předmětová vlna dopadají pod vzájemným úhlem na CCD čip, na jehož povrchu vytváří interferenční obrazec. Intenzitní rozložení tohoto obrazce je zaznamenáno a uloženo do počítače. Komplexní amplituda předmětové vlny je rekonstruována z hologramu bez použití osvětlení referenční vlnou. Ta je aproximována teoreticky (musí odpovídat referenční vlně použité při tvorbě hologramu) a spolu s digitálním hologramem poskytuje dostatek informací k tomu, aby mohl být numericky vypočítán difrakční integrál a mohla být rekonstruována předmětová vlna, a to jak její amplituda, tak fáze. Komplexní amplituda předmětové vlny je počítána ve vzdálenosti d za CCD kamerou, tj. v rovině reálného obrazu [12].

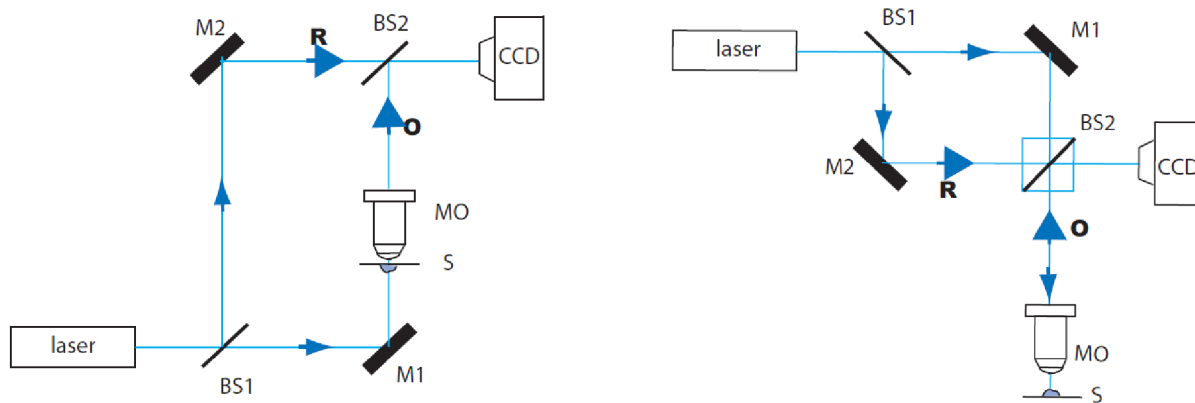


Obrázek 8: Princip záznamu a čtení digitálního hologramu. Převzato a upraveno z [13].

2.2 Holografická mikroskopie

Pokroky v holografii a digitální technice umožnily vznik digitálního holografického mikroskopu (DHM), který zobrazuje fázové rozdíly předmětové vlny vůči referenční vlně vzniklé průchodem předmětové vlny fázovým objektem (např. buňkou). Takovéto zobrazení se nazývá zobrazení ve fázovém kontrastu. Na rozdíl od např. Zernikeho fázového kontrastu zobrazuje DHM odchylky ve fázi kvantitativně, to znamená, že lze tyto odchylky přepočíst s ohledem k pozorovanému vzorku na fyzikální veličiny, jako je index lomu vzorku, tloušťka vzorku či jeho hustota [1]. Vzhledem k tomu, že jde o mikroskop, zobrazuje DHM vzorky se zvětšením. Mikroskop lze uspořádat tak, aby využíval odraženého světla, pak jde o reflexní mód. V tomto uspořádání se DHM využívá například pro profilometrii povrchů. Při profilometrii lze v axiálním směru dosáhnout přesnosti zlomků vlnové délky [13]. Při uspořádání využívajícím prošlé světlo, tzn. v transmisním módu vhodném pro biologické aplikace, lze určit se značnou přesností odchylky optické dráhy způsobené tloušťkou vzorku a jeho indexem lomu odlišným od prostředí, ve kterém se nachází [1].

První digitální holografické mikroskopy sestrojil Cuche *et al.* na bázi Michelsonova interferometru pro reflexní mód a Machova-Zehnderova interferometru pro transmisní mód [14, 15]. Pro ilustraci použití Michelsonova interferometru a Machova-Zehnderova interferometru při konstrukci holografického mikroskopu viz obrázek 9.



Obrázek 9: Ilustrace uspořádání holografického mikroskopu. Vlevo: Uspořádání pro transmisní mód využívá Machih-Zehnderův interferometr. Vpravo: Uspořádání pro reflexní mód využívá Michelsonův interferometr. BS1, BS2; děliče svazku. M1, M2; zrcadla. MO, objektiv mikroskopu. S, vzorek. R, referenční větev. O, předmětová větev. Převzato z [16].

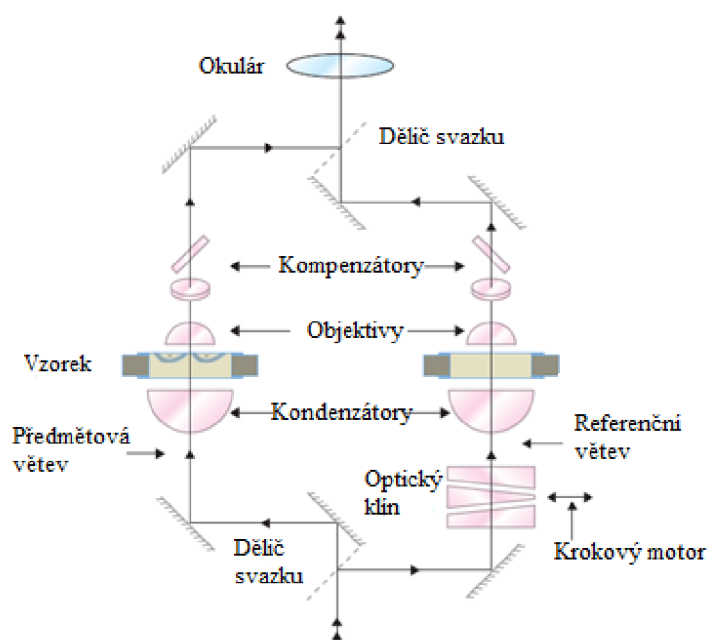
Digitální holografický mikroskop sestává ze zdroje osvětlení, interferometru, digitální kamery a počítače s nezbytnými programy. Pro osvětlení je nejčastěji použit laser generující světlo o dostatečné koherenční délce a šířce pro vznik interferenčních proužků, viz např. [Kem, 2007]. V interferometrech se světelné svazky šíří ve dvou větvích, referenční a předmětové. Optické dráhy v obou větvích jsou ideálně totožné až na umístěný vzorek v předmětové větvi. Vzorek způsobí změny (amplitudové i fázové) v předmětovém svazku, které chceme pozorovat. Svazky poté interferují na CCD čipu. V mimoosovém uspořádání dopadají na CCD čip pod vzájemným nenulovým úhlem, na rozdíl od osového uspořádání, kde je úhel nulový nebo téměř nulový. V holografických mikroskopech také často nalezneme polarizační prvky sloužící k vyvažování intenzit obou větví. Limitujícím faktorem zobrazení je na spodní hranici difrakční Airyho disk, nicméně při použití méně kvalitního CCD čipu nemusíme tohoto rozlišení dosáhnout. Zejména v minulosti byl počet a velikost pixelů rozhodujícím faktorem limitujícím rozlišení [12]. Jednotlivé konstrukce se také liší umístěním CCD čipu. Hologram lze nahrávat v podstatě ve třech pozicích [1]. CCD čip lze umístit do Fourierovy roviny, tj. do zadní ohniskové roviny čočky, pak nahráváme přímo Fourierovu transformaci hologramu [18]. V jiném případě lze vložit CCD čip mezi Fourierovu rovinu a obrazovou rovinu, pak nahráváme Fresnelův difrakční obrazec podobně jako u analogové holografie. Třetí možností je umístit CCD čip do roviny vznikajícího obrazu. Tato možnost zjednodušuje extrakci fázové informace a redukuje některé druhy šumu, proto je v současnosti nejpoužívanější [1].

Na CCD čip je zaznamenán jeden či více hologramů. CCD kamera samozřejmě zaznamenává pouze intenzitu, proto je nutné vhodným optickým uspořádáním a numerickou metodou

extrahovat fázovou informaci z hologramů. V současnosti lze hovořit o dvou směrech, kterými se ubírá holografická mikroskopie [1]. Tyto směry lze charakterizovat úhlem, pod kterým interferují světelné svazky, a s tím se pojící metodou extrakce fáze ze zaznamenaných hologramů. Jde o mimoosové metody a osové metody posouvání fáze.

2.2.1 Osově metody posouvání fáze (phase-shifting methods)

Metody využívající definované posouvání fáze jsou často užívané a jejich zřejmě nejcharakterističtější znakem je nutnost sejmutí tří a více hologramů pro vytvoření jednoho amplitudového a jednoho fázového snímku vzorku. Konstrukce mikroskopů založených na těchto metodách využívá prvky Machova-Zehnderova interferometru a nejčastěji je založena na modifikovaném Hornovu interferenčním mikroskopu (viz obrázek 10) [19].



Obrázek 10: Uspořádání holografického mikroskopu využívajícího posouvání fáze. Převzato a upraveno z [1].

Světlo ze zdroje je rozděleno do dvou větví – referenční a předmětové. Předmětový svazek prochází příslušnou větví a vzorkem, který způsobí fázové a amplitudové odchylky ve svazku. Referenční svazek prochází optickým klínem, který je možné krokovým motorem posouvat a tak referenční svazek definovaně fázově opozdit oproti předmětovému. Oba svazky se rekombinují pod nulovým či téměř nulovým úhlem, proto se tento druh mikroskopie nazývá osová [1].

Aby bylo možné vytvořit snímek ve fázovém kontrastu, je nutné nahrát tři a více hologramů s definovanými posuvy fáze mezi svazky. Nejčastěji se používá metoda čtyř snímků, při které

jsou nahrány hologramy s posuvy fáze 0, $\pi/2$, π , $3\pi/2$. Fázi je pak možné vypočítat následovně [20]:

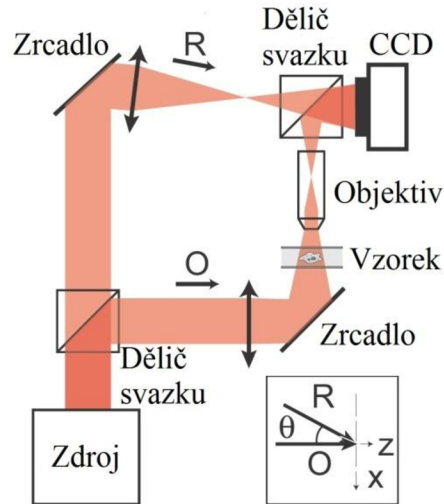
$$\varphi(x, y) = \operatorname{arctg} \left[\frac{I_{3\pi/2} - I_{\pi/2}}{I_0 - I_\pi} \right]. \quad (1)$$

Výhodou této metody je snadnost výpočtu obrazu amplitudy i fáze a naprosté vyřešení problému dvou obrazů [21]. Obecně poskytuje širší zorné pole než mimoosové metody [22]. Je také vhodnější pro využití v tomografii [1]. Nevýhodou je nutnost sejmutí několika hologramů pro každý obraz. Celý proces pořízení několika hologramů je brzděn zejména krokovým motorem a znemožňuje pozorování velmi rychlých dynamických dějů. Navíc vibrace a otřesy během procesu mohou způsobit zhoršení kvality obrazu.

2.2.2 Mimoosové metody (off-axis methods)

První digitální holografické mikroskopy navrhnuté Cuchem *et al.* [14, 15] byly postaveny na mimoosovém konceptu Leitha a Upatniekse. Byly vybavené pokročilou záznamovou technikou spolu s algoritmy pro extrakci fáze a umožňovaly získat zobrazení ve fázovém kontrastu z jediného hologramu. Čas potřebný pro pořízení snímku není omezen mechanickými součástmi mikroskopu jako u metod posouvání fáze, ale jen rychlostí snímání kamery a výpočetní schopností počítače. Výpočetní složitost extrakce fázové informace je řádově vyšší než u metod posouvání fáze, přesto s výkonným počítačem lze pozorovat i rychle se vyvíjející děje [1].

Schéma holografického mimoosového mikroskopu je podobné mikroskopům pro posouvání fáze, avšak liší se nenulovým úhlem mezi interferujícími svazky a absencí optického klínu v referenční větvi [1]. Pro ilustraci viz obrázek 11. CCD čipem je získán obrazec vzniklý interferencí svazků. Obrazec je zpracován počítačem, reálný obraz je oddělen od DC členů a virtuálního obrazu a pomocí numerického difrakčního modelu je získána jeho komplexní amplituda.



Obrázek 11: Uspořádání mimoosového holografického mikroskopu. R, referenční větev. O, předmětová větev. Převzato a upraveno z [23].

Bylo vypracováno více druhů numerického zpracování, jejichž použití závisí na místě záznamu hologramu (poloze CCD čipu vzhledem k obrazu) a výpočetním výkonu, a tedy rychlosti procesu a požadované přesnosti odchylek fáze ve snímku fázového kontrastu. Např. Cuche ve své práci [15] zaznamenal hologram ve Fresnelově rovině (mezi ohniskem a rovinou obrazu) a použil digitální model referenční vlny a Fresnelův integrál pro rekonstrukci předmětové vlny ve vzdálenosti CCD – obrazová rovina. Získal 2D matici komplexních čísel, komplexní amplitudu $C(x, y)$. Tu lze obecně rozdělit na reálnou amplitudu $A(x, y)$ a fázi $\varphi(x, y)$ takto [15]:

$$A(x, y) = [\operatorname{Re}(C)^2 + \operatorname{Im}(C)^2],$$

$$\varphi(x, y) = \left[\operatorname{arctg} \left(\frac{\operatorname{Re}(C)}{\operatorname{Im}(C)} \right) \right].$$

(2)

Pokud nahráváme hologram přímo v obrazové rovině, lze se vyhnout výpočtu Fresnelova integrálu. Díky prostorové modulaci jsou oba obrazy a DC členy v oblasti prostorových frekvencí odděleny. Proto většina metod numerického zpracování přímo či nepřímo užívá Fourierových transformací [12].

2.2.3 Mimoosové metody s použitím achromatického interferometru

Při klasické mimoosové digitální holografii se obvykle používá koherentního osvětlení vzorku laserem, a to proto, že se tím snižují požadavky na identičnost obou větví interferometru [17]. Osvětlení koherentním zdrojem světla usnadňuje interferenci svazků procházejících i

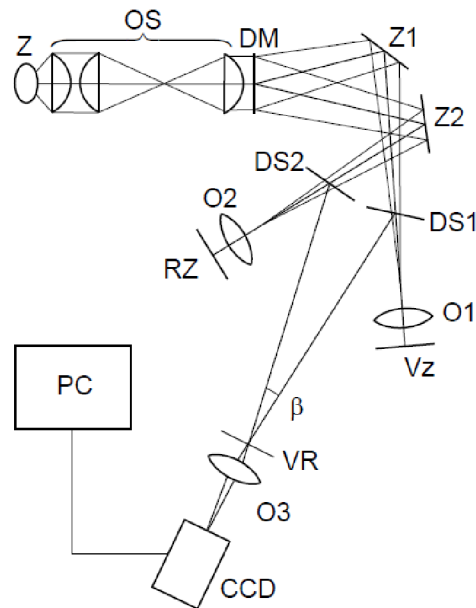
neekvivalentními optickými drahami a poskytuje kontrastní interferenční proužky. Nevýhodou je koherenční šum (spekle) a nežádoucí interference na optických plochách způsobující snížení kvality zobrazení.

V roce 1967 navrhli Leith a Upatnieks použít pro holografii achromatický interferometr, který spolu s nižší koherencí použitého světla umožní snížit koherenční šum a nežádoucí interference [24]. Při jejich experimentech byla jako světelný zdroj použita rtuťová výbojka poskytující světlo se značnou spektrální šířkou. Místo děliče svazků použili difrakční mřížku. Interferometr s mřížkou nastavili tak, aby do jeho větví prošlo jen světlo některých difrakčních řádů. Optické prvky uspořádali tak, aby se difrakční mřížka zobrazila do roviny hologramu. Tento systém umožnil vyrovnání rozdílných optických drah pro rozdílné vlnové délky. Formování proužků v rovině hologramu se tedy stalo nezávislé na vlnové délce.

Použití nekoherentního světla spolu s achromatickým interferometrem (prostorově invariantním) umožňuje vyhnout se koherenčnímu šumu a nežádoucím interferencím za stále dobrého kontrastu interferenčních proužků. Nekoherentní světlo navíc umožňuje dosáhnout dvakrát lepšího rozlišení než u koherentního světla a propůjčuje holografickému mikroskopu některé konfokální vlastnosti [13]. Nižší koherence světla nicméně snižuje vzdálenost, do které je možné numericky přeastřovat [25].

2.2.4 Paralelně zobrazující konfokální mikroskop (PMCM)

V roce 1999 publikovali Chmelík a Harna práce o nově postaveném mimoosovém holografickém mikroskopu využívajícím nekoherentní světlo a achromatický interferometr [26, 27]. Motivací ke stavbě bylo docílit optických řezů známých z konfokální mikroskopie nerastrovací metodou. Měl být využíván pro vysoce přesné měření povrchů, byla tedy zvolena varianta využívající odražené světlo. Schéma je na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma holografického mikroskopu sestaveného Chmelíkem a Harnou využívajícího odražené světlo. Z, zdroj. OS, osvětlovací optika. DM, difrakční mřížka. Z1, Z2; zrcadla. DS1, DS2; děliče svazků. O1, O2, O3; objektivy. RZ, referenční zrcadlo, Vz, vzorek, VR, výstupní rovina. Převezato z [28].

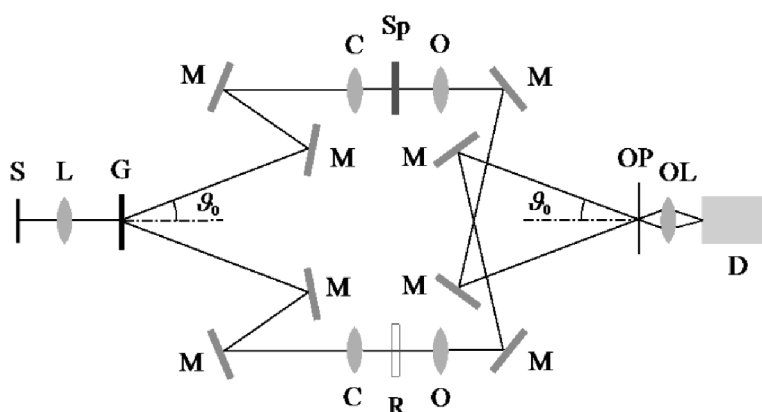
Světlo z plošného zdroje Z je vedeno osvětlovací optikou OS k difrakční mřížce DM , která slouží jako dělič svazku. Pro zobrazení je použit 1. a -1 . difrakční řád. Zdroj je zobrazen do ohniskových rovin objektivů $O1$ a $O2$, je tedy dosaženo Köhlerova osvětlení vzorku i referenčního zrcátka. Ve výstupní rovině VR dochází k tvorbě interferenčního obrazce. Ten je objektivem $O3$ zobrazen na CCD čip, který nahrává hologram. Výstupní rovina je také opticky konjugovaná s rovinou difrakční mřížky a s rovinou vzorku.

Digitálně zaznamenaný hologram je rekonstruován v reálném čase v připojeném počítači Fourierovským zpracováním spektra prostorových frekvencí. Výsledkem je komplexní amplituda $o = |o|exp(i\varphi)$. PMCM vytváří dvě výstupní obrazová pole: hloubkově diskriminovanou intenzitu $|o|^2$ a kvantitativní fázi φ .

Při použití prostorově nekoherentního zdroje světla vznikají vlivem koherenční brány optické řezy vzorkem [13]. Znamená to, že intenzita zobrazení $|o|^2$ povrchu vzorku se rychle snižuje se vzdáleností povrchu od předmětové roviny objektivu, což odpovídá optickým řezům v konfokálním mikroskopu. Kvantitativní fázi lze přímo převádět na distribuci výšky povrchu $h(x,y)$ s nanometrovou přesností. Oba typy zobrazení lze použít pro proměření topografie povrchu vzorku, jak bylo předvedeno Chmelíkem a Harnou [23, 27] a dále rozvinuto Lovicarem, Kvasnicou a Chmelíkem [29].

2.2.5 Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM): První generace

Dalším krokem ve vývoji bylo uspořádání vyvinuté Kolmanem a Chmelíkem [30]. Bylo využito zkušeností z předchozího modelu, tentokrát ovšem šlo o uspořádání v prošlém světle vhodném pro biologické vzorky. Mikroskop funguje při libovolném stupni koherence použitého světla, koherence se tedy stává parametrem definujícím vlastnosti mikroskopu [13]. Při použití zdroje poskytujícího vysoký stupeň koherence světla odpovídají vlastnosti komerčním digitálním holografickým mikroskopům. Objevuje se značný koherenční šum a nežádoucí interference, ale na druhou stranu je možné numericky přeastřovat ve značném rozsahu a z jediného hologramu vytvořit 3D zobrazení. Snižováním prostorové a časové koherence světla (případně obou) lze plynule přejít do druhého extrému, tj. zobrazování v nekoherentním světle. Začínají se projevovat konfokální vlastnosti působené koherenční bránou, vymizí koherenční šum a nežádoucí interference a dojde i ke zlepšení rozlišení [30]. Schéma je na obrázku 13.



Obrázek 13: Schéma CCHM: S, zdroj. L, čočka. G, difrakční mřížka. M, zrcadlo. C, kolektor. O, objektiv. Sp, vzorek. R, referenční větev. OP, výstupní rovina. OL, čočka. Převzato z [30].

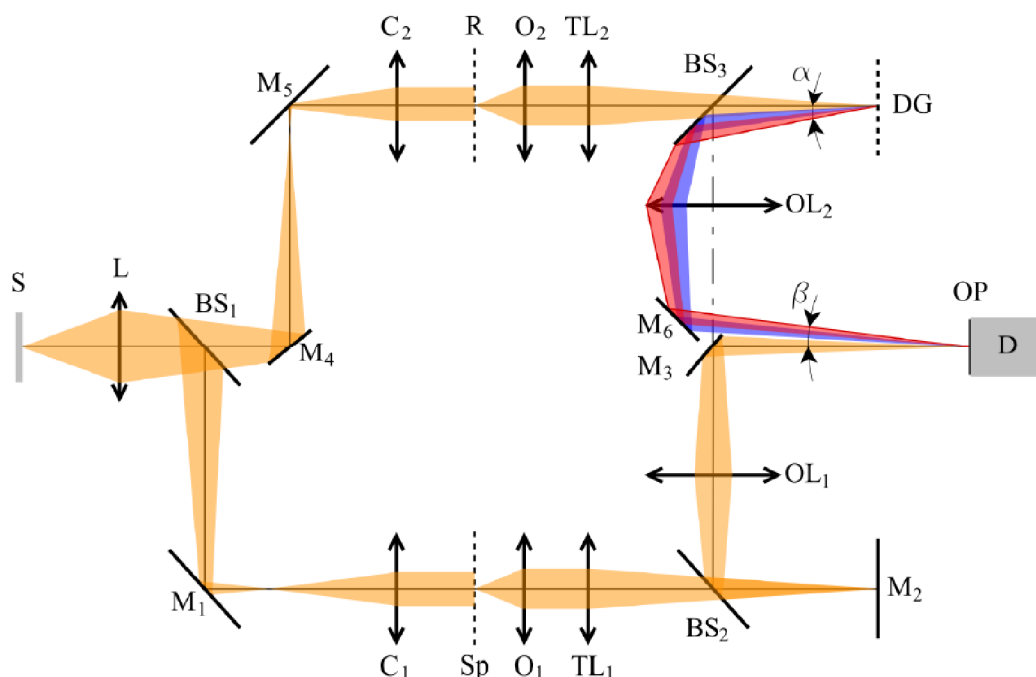
Efekt koherenční brány byl experimentálně ověřen hned několika pracemi [30, 31, 32, 33]. Společným prvkem bylo vložení difuzéru za vzorek, což mělo simulovat vzorek obklopený rozptylujícím prostředím, například buňky v kolagenovém prostředí. Pouze u malého procenta fotonů vystupujících ze vzorku nedojde k jejich dalšímu rozptylu na difuzéru. Při použití vysoce koherentního světla se interference ve výstupní rovině v důsledku dostatečné koherence účastní všechny fotony, což vede ke vzniku nekvalitního obrazu (nelze rozeznat ani základní obrysy). Při použití nekoherentního světla se interference ve výstupní rovině účastní pouze difuzérem nerozptýlené fotony. Obraz je sice o něco méně kontrastní vůči situaci, kdy není použit difuzér (méně fotonů se účastní interference), nicméně oproti situaci, kdy je použito koherenční světlo, jde o výrazné zlepšení.

Hlavním cílem při návrhu mikroskopu bylo pozorování živých buněk *in vitro*. Pozorování v kvantitativním fázovém kontrastu umožňuje zobrazit buňky s dostatečným kontrastem a bez použití fluorescenčních barviv, které mohou být pro buňku toxické. Celý mikroskop byl navržen tak, aby kromě samotné funkčnosti kvantitativního fázového zobrazování zároveň poskytoval i optimální podmínky pro přežití buněk *in vitro* po dobu desítek hodin a bylo tak umožněno dlouhodobé pozorování. Konstrukce mikroskopu byla uzpůsobena tak, aby byla robustní s antivibračními prvky, což dále minimalizuje šum ve fázovém zobrazení [34]. Dále byl mikroskop vybaven systémem pro vyhřívání a stabilizaci jeho teploty, což kromě poskytnutí optimálních podmínek pro přežití buněk ještě více omezí šum způsobený změnami hustoty vzduchu, kterými světelné svazky prochází. Důležitým prvkem je průtoková komůrka, ve které je umístěn vzorek s buňkami. Komůrka je naplněna kultivačním roztokem a je vyhřívána na optimální teplotu. Do kultivačního roztoku lze přidat nejrůznější chemické látky a farmaceutika a sledovat jejich vliv na chování buněk. Při pozorování buněk má naměřená fáze význam hustoty hmoty buňky za sucha. Časová změna v jejím rozložení indikuje změnu v rozložení buněčné hmoty, která má charakteristický průběh pro různé buněčné děje, například buněčnou smrt nebo reakci buňky na stresové podmínky. Sledování těchto pohybů buněčné hmoty rychle signalizuje změnu životních podmínek buňky a lze je využít například k testům cytopatogenicity či cytotoxicity látek [13]. Těmto měřením buněk se věnoval ve svých pracích například Antoš *et al.* [34] a Janečková *et al.* [33, 35].

2.2.6 Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM): Druhá generace

První generace CCHM znamenala velký krok vpřed a umožnila pozorování buněčných procesů kvantitativním fázovým kontrastem v reálném čase. Přesto vykazovala jisté nedostatky, které si vynutily vývoj druhé generace CCHM. Nejvýraznějším limitujícím faktorem byla spektrální propustnost mikroskopu pro vlnové délky lišící se od centrální vlnové délky, což je důsledek rozptylové schopnosti difrakční mřížky, která vytváří příčně posunuté obrazy zdroje ve vstupní pupile kondenzorů [36]. Pro vlnové délky lišící se od centrální vlnové délky dojde k oříznutí obrazů zdroje pupilou kondenzoru. Tím utrpí kvalita signálu a dojde i k mírné anizotropii přenosu prostorových frekvencí. Značně nepohodlné se ukázalo použití čtyř stejných objektivů, z nichž dva slouží jako objektivy a dva jako kondenzory. Omezovalo to pracovní prostor mezi objektivy a kondenzory, znesnadňovalo měnit zvětšení a zvyšovalo cenu konstrukce [37].

Nový koncept CCHM tzv. druhá generace překonává většinu nevýhod první generace a zachovává veškerá pozitiva vyplývající z mimoosového uspořádání, achromatického interferometru a použití nekoherentního světla. Schéma je na obrázku 14.



Obrázek 14: Optické schéma druhé generace CCHM. S, zdroj. BS₁, BS₂, BS₃; děliče svazků. M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, M₆; zrcadla. C₁, C₂; kondenzory. O₁, O₂; objektivy. TL₁, TL₂; tubusové čočky. DG, reflexní difrakční mřížka. OL₁, OL₂; objektivové čočky. Sp, vzorek. R, referenční rovina. OP, výstupní rovina. D, detektor. L, kolektorová čočka. Převzato z [36].

Plošný zdroj S generuje nekoherentní světlo, které je rozděleno děličem svazků do předmětové a referenční větve. Ještě před vstupem do děliče svazku světlo prochází kolektorem L tak, aby bylo dosaženo Köhlerova osvětlení. Obě větve jsou tvořeny identickými kondenzory, objektivy korigovanými na nekonečno a tubusovými čočkami. V referenční větvi se nachází odrazná difrakční mřížka DG , která svazek rozloží do difrakčních řádů, nicméně filtry umožní dále projít jen 1. difrakčnímu řádu. Ve výstupní rovině oba svazky interferují, tvoří interferenční obrazec nahrávaný CCD kamerou a ten je dále softwarově zpracován. Výstupem je obraz intenzity a obraz kompenzované navázané fáze. Roviny difrakční mřížky, vzorku a referenčního vzorku jsou konjugované s výstupní rovinou.

Pro achromaticnost interferometru je klíčové správné nastavení úhlu β pro všechny použité vlnové délky. V opačném případě je silně ovlivněn kontrast interferenčních proužků. To klade vysoké požadavky na precizní sesazení optických prvků soustavy [36].

Druhá generace umožňuje pracovat mikroskopu v transmisním i reflexním módu a navíc lze zkombinovat jeho holografickou část s fluorescenčním mikroskopem, případně s

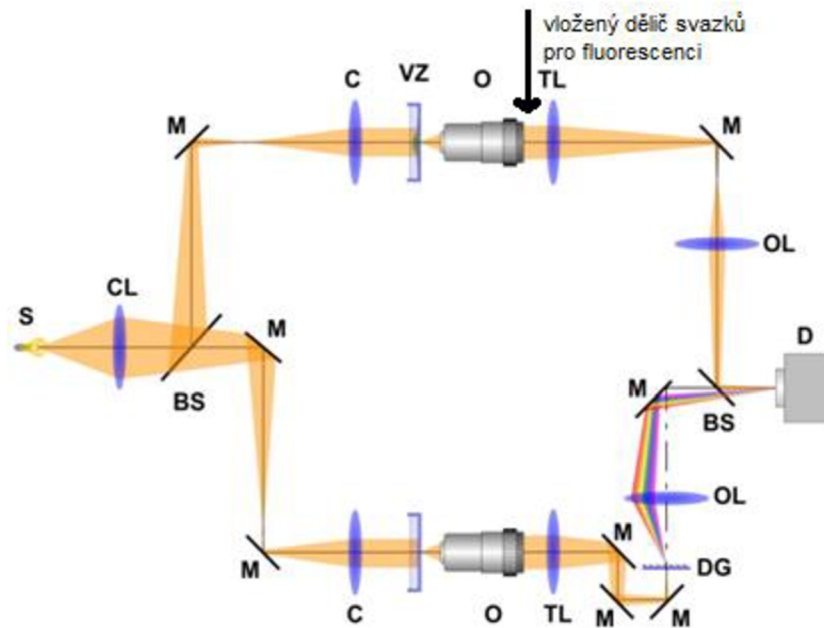
mikromanipulačními zařízeními (např. optickou pinzetou). Experimentálně byla druhá generace odzkoušena v reflexním i transmisním módu [36]. Byl proveden teoretický popis zobrazení v difuzních médiích [38] a jeho experimentální ověření [39].

2.2.7 Multimodální holografický mikroskop (MHM)

V roce 2006 Popescu *et al.* předvedli možnost kombinace epi-fluorescenční mikroskopie a digitální holografické transmisní mikroskopie pozorováním ledvinových buněk [3]. Pavillon *et al.* v roce 2010 pozorovali kombinací epi-fluorescenční mikroskopie a digitální holografické transmisní mikroskopie vnitrobuněčné procesy během umírání neuronů [40].

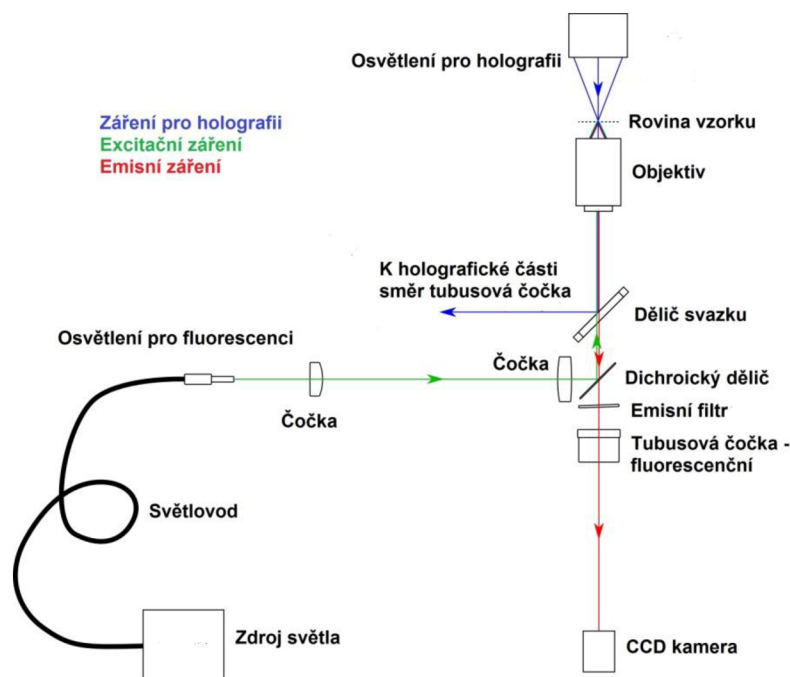
Multimodální holografický mikroskop kombinuje epi-fluorescenční mikroskop a digitální holografický mikroskop pro získání ucelenější informace o pozorovaném objektu. Ukazuje se, že by tento druh mikroskopu mohl být užitečný v buněčné biologii [1]. V současné době existuje velmi široká nabídka fluorescenčních barviv, díky nimž lze fluorescenční mikroskopii pozorovat buněčné komponenty nebo chemické látky přítomné v buňkách (i uměle dodané). Fluorescenční mikroskopie nám může dodat kontrastní snímek lokalizující přesně vybrané buněčné části. Při pozorování živých buněk můžeme například pozorovat vliv nabarvené chemické látky na buňku a její vstup do buňky. Digitální holografická mikroskopie nám umožňuje přidat k informaci z fluorescenční mikroskopie kvantitativní informaci o tvaru a objemu buňky, o změně hustoty hmoty buňky či o změně v indexu lomu [40]. Pokud se buňka pohybuje, lze pomocí holografického mikroskopu sledovat pohyb jejího těžiště a tak zkoumat její motilitu [41].

Multimodální holografický mikroskop navržený na VUT ÚFI v Brně zkonstruovaný ve spolupráci s firmou TESCAN Brno s.r.o. vychází z druhé generace koherencí řízeného holografického mikroskopu. Oproti druhé generaci byly provedeny změny pro zvýšení uživatelského komfortu. Nově kombinuje holografické módy transmisní a reflexní a epi-fluorescenční mód.



Obrázek 15: Optické schéma multimodálního holografického mikroskopu. S, zdroj. CL, kolektor. BS, dělič svazků. M, zrcadla. C, kondenzory. O, objektivy. TL, tubusové čočky. DG, difrakční mřížka. OL; objektivové čočky. Vz, vzorek. D, detektor.

Optické schéma na obrázku 15 je schématem pro holografický transmisní mód. Reflexní mód a epi-fluorescence jsou možné díky použití objektivů korigovaných na nekonečno. Mezi objektivem a tubusovou čočkou v předmětové větvi je vložena odbočka pro fluorescenci, viz obrázek 16.



Obrázek 16: Epi-fluorescenční mód multimodálního holografického mikroskopu.

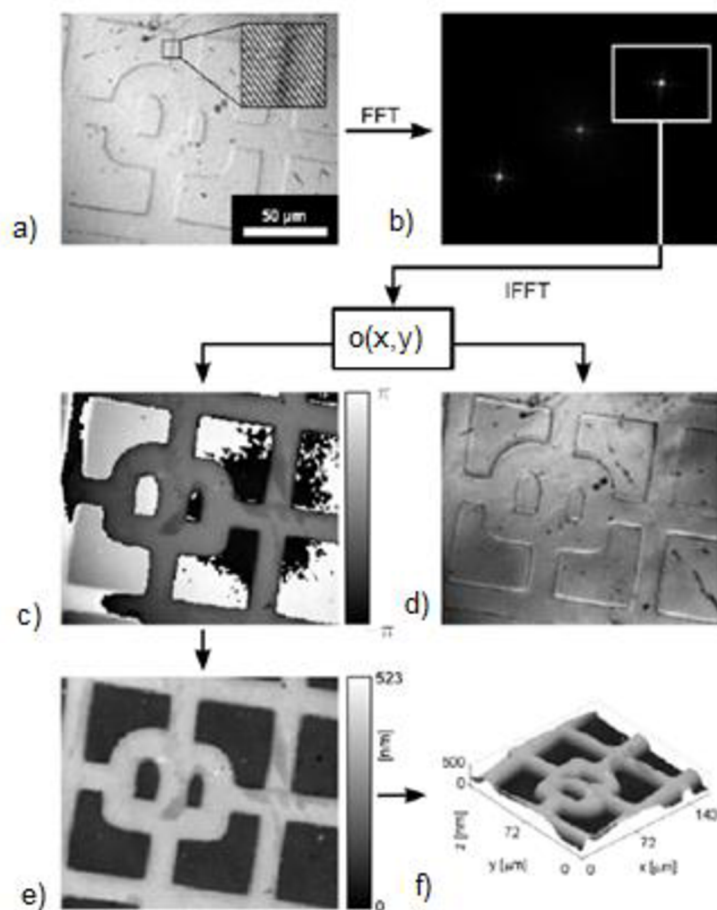
2.2.8 Zpracování hologramu

Hologram zachycený CCD kamerou je zpracován softwarem počítače. Metoda v současnosti používaná na VUT je odvozená od práce Kreise [42], který zpracovával hologramy pořízené mimoosovými digitálními holografickými mikroskopy pomocí Fourierových transformací a eliminace nosné frekvence. V současnosti používaná metoda funguje takto (viz obrázek 17), na zachycený digitální hologram je aplikována 2D rychlá Fourierova transformace (FFT). Ze spektra prostorových frekvencí je vybrána oblast odpovídající reálnému obrazu a na tuto oblast je aplikována okénková (window function) funkce (odstranění okrajů). Oblast je použita jako nové spektrum prostorových frekvencí, kde je nulová frekvence posunuta do středu. Komplexní amplituda objektové vlny je získána rychlou inverzní Fourierovou transformací (IFFT). Z komplexní amplitudy je vypočítána mapa fáze a intenzitní obraz. Intenzitní obraz odpovídá obrazu konvenčního konfokálního mikroskopu, mapa fáze odpovídá změně optické dráhy předmětové vlny oproti referenční, způsobené průchodem vzorkem [37].

V důsledku toho, že fáze je počítána pomocí vzorce

$$\varphi(x, y) = \arctan \left(\frac{\text{Im}[o(x, y)]}{\text{Re}[o(x, y)]} \right), \quad (3)$$

kde $o(x, y)$ je komplexní amplituda, nalézáme v místech, kde fáze dosahuje hodnot $-\pi, \pi$, prudké skoky (z $-\pi$ na π). Aby se tomu předešlo, musí se fáze navázat (unwrapping) [13]. Po navázání dostáváme obraz prostý těchto skoků. Další numerickou operací nutnou k získání dobrého obrazu je kompenzace deformací fáze. Obraz fáze je degradován časově proměnným nenulovým pozadím, připomínajícím zvlněnou hladinu. Tato deformace je způsobena nepřesnostmi optického systému, jeho aberacemi, nedokonalou rekonstrukcí předmětové vlny či neideální pozicí vzorku. Na VUT byly vyvinuty Zikmundem *et al.* dvě metody řešící tento problém [43]. Obě jsou postaveny na vytvoření polynomiální plochy procházející vybranými oblastmi a co nejvíce se blíží svým tvarem pozadí. Tato plocha je odečtena od obrazu fáze. Statická metoda vyžaduje manuální zásah, dynamická metoda je automatická.



Obrázek 17: Schéma numerického zpracování hologramu. Hologram (a) je pomocí 2D FFT převeden do prostoru prostorových frekvencí (b). Široké maximum ve středu odpovídá DC a pro další zpracování je neúčinné. Je tedy vyříznuta oblast odpovídající pouze spektru reálného obrazu. Na vyříznutou oblast je aplikována okénková funkce a 2D IFFT. Tím je získán komplexní obraz tvořený komplexní amplitudou. Pomocí přepočtu je z komplexní amplitudy získán obraz amplitudy (d) a fáze (c). Fáze je navázána a kompenzována (e). (f) je profil vzorku získaný přepočtem hodnot fáze na výšku vzorku. Převzato a upraveno z [37].

3 Zpracování obrazu

V této kapitole jsou uvedeny definice a popsány pojmy z oblasti zpracování obrazu důležitých pro další kapitoly.

3.1 Digitální obraz

Záření procházející optickým systémem tvoří v obrazové rovině spojité časově závislé 2D rozložení světelné energie [44]. Pro pořízení digitálního snímku je nutné spojité rozložení světelné energie zaznamenat zařízením citlivým na světlo (např. CCD kamerou), to převést na elektrický signál a provést vzorkování (sampling), tj. zredukovat analogový signál na diskrétní [45].

Prostorové vzorkování analogového signálu nastane kvůli nenulové velikosti senzorů a jejich geometrickému rozložení na CCD čipu [44]. V nejjednodušším případě jsou senzory uspořádány v čtvercové mřížce. Časové vzorkování proběhne, protože záznam obrazu se provádí jen po danou expoziční dobu, během této doby dopadají fotony na senzory čipu a shromažďuje se generovaný elektrický náboj. Po uplynutí expoziční doby se nashromážděný elektrický náboj převede pomocí AD převodníku na celočíselné hodnoty reprezentující intenzitu (jas) světla dopadlého na element obrazu (pixel). Rozpětí hodnot jasu závisí na vlastnostech kamery a softwaru, například pro 8 bitový obraz je možný rozsah hodnot pixelu od 0 do 255.

Výsledný digitální obraz je 2D maticí o rozměrech $M \times N$, daných velikostí osvětleného CCD čipu a rozměry jeho elementů, nabývající celočíselných hodnot v daném rozmezí [46]. Digitální obraz je možné uložit do počítače a dále s ním pracovat.

3.2 Černobílý a barevný digitální obraz

Černobílý digitální obraz je maticí čísel reprezentujících intenzitu (jas) obrazu. Je tvořen stupni šedi, černá a tmavě šedá odpovídá nízkým hodnotám, bílá a světle šedá vysokým hodnotám.

Barevný digitální obraz je v RGB barevném modelu tvořen třemi nezávislými monochromatickými obrazy (červeným, zeleným a modrým) tzv. kanály. Jejich sečtením dostáváme barevný obraz. Mnoho metod zpracování obrazu navržených pro monochromatické obrazy lze rozšířit i na barevné obrazy aplikací metody zvláště na každý barevný kanál [46].

3.3 Zpracování obrazu

Digitálně zaznamenaný obraz má tu výhodu, že pro získání některé z informací, které obraz nese nebo k jeho modifikaci lze použít v podstatě jakýkoliv myslitelný algoritmus či numerickou metodu. Ty berou jako vstupní informaci obraz, reprezentovaný buď funkcí $f(x, y)$, jejíž hodnoty jsou hodnotami jasu obrazu a kartézské souřadnice x, y udávají pozice těchto hodnot v obraze. Druhým přístupem je reprezentace obrazu maticí o rozměrech $M \times N$, jejíž hodnoty jsou opět hodnotami jasu obrazu. Místo kartézských souřadnic je pozice pixelů udávána jako pozice v matici, tedy číslem řádku a sloupce. Oba přístupy jsou ekvivalentní s drobnými odchylkami (viz kap. 4). Většina metod zpracování obrazu přistupuje k obrazu jako k 2D signálu a používá postupy typické právě pro zpracování signálu. Výstupem metod zpracování obrazu bývá upravený obraz, sada charakteristik či parametrů původního obrazu.

3.4 Registrace obrazů

Registrace obrazů je proces překrytí dvou nebo více snímků stejné scény pořízených v různém čase, v různých pozicích či různými senzory [47]. Rozdíly mezi snímky jsou způsobeny rozdílností podmínek při pořízení snímků. Smyslem registrace obrazu různých snímků je získat kombinovaný snímek s úplnější informací o scéně, než měly samostatné snímky. Metody registrace obrazu se obvykle dělí na dvě velké skupiny [48]: korelační metody využívající nejčastěji prostor Fourierových prostorových frekvencí a rychlou Fourierovu transformaci (FFT) a metody význačných prvků hledající ve snímcích výrazné prvky, jako jsou např. okraje, rohy či výrazné linie.

3.5 Fázová korelace

Fázová korelace je často používaná korelační metoda registrace obrazu. Mezi její nejvýraznější klady patří, že nevyžaduje hledání referenčních bodů, výrazných prvků a často ani preprocessing před samotnou aplikací metody [49]. Vykazuje značnou odolnost vůči náhodnému šumu i frekvenčně závislému šumu, vůči nepodobnosti snímků a v neposlední řadě u větších snímků značně šetří výpočetní čas [47]. Hodí se také pro registraci obrazu snímků s kolísavou intenzitou osvětlení (časově i prostorově) [50]. Princip metody je založen na teorému Fourierova posuvu a práci s Fourierovou reprezentací snímků v prostoru prostorových frekvencí, metoda hledá shodu snímků dle frekvenčních spekter [48]. Původně

byla navržena pro rozpoznání posuvu snímku v rovině xy , později byla rozšířena i pro rozpoznání vzájemného pootočení a poměru velikostí mezi snímky [51].

3.6 Důležité pojmy a teoremy

V dalších kapitolách bude často používána Fourierova transformace, proto je níže uvedena jedna z jejích definic. Protože digitální obraz není spojité prostředí, je nutné pracovat s diskrétní Fourierovou transformací, i její definice je uvedena. Matematická teorie metody fázové korelace je vystavěna s použitím Fourierovy transformace spojitých funkcí a takto je i níže uvedena. Nicméně v literatuře lze nalézt odvození i pro diskrétní Fourierovu transformaci (viz např. [53]). Cílem mé práce nebylo provést matematický rozbor metody, je tedy uvedeno jen tolik matematické teorie, aby došlo k základnímu pochopení metody, nutné pro její úspěšné používání.

Pozn. Pokud je níže uvedena Fourierova transformace aplikovaná na obraz, je tím myšlena diskrétní 2D Fourierova transformace počítaná algoritmem rychlé Fourierovy transformace (2D FFT).

3.6.1 Fourierova transformace

Nechť $f(x)$ je funkce definovaná na intervalu $(-\infty, \infty)$, která je mimo jiné absolutně integrabilní tj.

$$\int_{-\infty}^{\infty} |f(x)| dx < \infty. \quad (4)$$

Pak definujme funkci $\hat{f}(\omega)$

$$\hat{f}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-i2\pi\omega x} dx, \quad (5)$$

kde $-\infty < \omega < \infty$. Funkce \hat{f} se nazývá Fourierova transformace funkce f . Funkce \hat{f} se nachází ve frekvenční doméně, zatímco vstupní funkce f se nachází v prostorové doméně (pokud je x prostorová souřadnice). Důležitý je také inverzní vztah mezi f a \hat{f}

$$f(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \hat{f}(\omega) e^{i2\pi\omega x} d\omega. \quad (6)$$

Tento vztah se nazývá inverzní Fourierovou transformací [52].

3.6.2 Diskrétní Fourierova transformace

Nechť N je sudé kladné celé číslo a necht' f_n je řadou N komplexních čísel, kde $n = -\frac{N}{2} + 1 : \frac{N}{2}$. Potom diskrétní Fourierova transformace je řadou N komplexních čísel

$$F_k = \frac{1}{N} \sum_{n=-\frac{N}{2}+1}^{N/2} f_n \omega_N^{-nk} \quad (7)$$

pro $k = -\frac{N}{2} + 1 : N/2$.

Nechť N je liché kladné celé číslo a necht' f_n je řadou N komplexních čísel, kde $n = -\frac{N-1}{2} : \frac{(N-1)}{2}$. Potom diskrétní Fourierova transformace je řadou N komplexních čísel

$$F_k = \frac{1}{N} \sum_{n=-\frac{N-1}{2}}^{\frac{N-1}{2}} f_n \omega_N^{-nk} \quad (8)$$

pro $k = -\frac{N-1}{2} : \frac{(N-1)}{2}$.

Nechť N je sudé kladné celé číslo a necht' F_k je řadou N komplexních čísel, kde $k = -\frac{N}{2} + 1 : \frac{N}{2}$. Potom inverzní diskrétní Fourierova transformace je řadou N komplexních čísel

$$f_n = \frac{1}{N} \sum_{k=-\frac{N}{2}+1}^{N/2} F_k \omega_N^{nk} \quad (9)$$

pro $n = -\frac{N}{2} + 1 : N/2$.

Nechť N je liché kladné celé číslo a necht' F_k je řadou N komplexních čísel, kde $k = -\frac{N-1}{2} : \frac{(N-1)}{2}$. Potom inverzní diskrétní Fourierova transformace je řadou N komplexních čísel

$$f_n = \frac{1}{N} \sum_{k=-\frac{N-1}{2}}^{\frac{N-1}{2}} F_k \omega_N^{-nk} \quad (10)$$

pro $k = -\frac{N-1}{2} : \frac{(N-1)}{2}$ [52].

3.6.3 Fourierův teorém o posuvu

Nechť $f_1(x, y)$ má Fourierovo spektrum $F_1(\xi, \eta)$. Předpokládejme funkci:

$$f_2(x, y) = f_1(x - x_0, y - y_0), \quad (11)$$

kde $x_0, y_0 \in \mathbb{R}$ jsou dané konstanty. Nechť $F_2(\xi, \eta)$ je Fourierovo spektrum funkce $f_2(x, y)$. Nechť $A_1(\xi, \eta)$, $A_2(\xi, \eta)$ jsou amplitudová spektra a $\Phi_1(\xi, \eta)$, $\Phi_2(\xi, \eta)$ jsou fázová spektra funkcí $f_1(x, y)$, $f_2(x, y)$. Pak platí [53]:

$$\begin{aligned} F_2(\xi, \eta) &= e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)} F_1(\xi, \eta), \\ A_2(\xi, \eta) &= A_1(\xi, \eta), \\ \Phi_2(\xi, \eta) &= \Phi_1(\xi, \eta) \oplus (-\xi x_0 - \eta y_0). \end{aligned} \quad (12)$$

3.6.4 Teorém o podobnosti

Nechť $f_1(x, y)$ má Fourierovo spektrum $F_1(\xi, \eta)$. Předpokládejme funkci:

$$f_2(x, y) = f_1(\alpha x \cos \theta - \alpha y \sin \theta - x_0, \alpha x \sin \theta + \alpha y \cos \theta - y_0), \quad (13)$$

kde $\theta \in (0, 2\pi)$, $\alpha \in \mathbb{R}^+$, $x_0, y_0 \in \mathbb{R}$ jsou dané konstanty. Nechť $F_2(\xi, \eta)$ je Fourierovo spektrum funkce $f_2(x, y)$. Nechť $A_1(\xi, \eta)$, $A_2(\xi, \eta)$ jsou amplitudová spektra a $\Phi_1(\xi, \eta)$, $\Phi_2(\xi, \eta)$ jsou fázová spektra funkcí $f_1(x, y)$, $f_2(x, y)$. Pak platí [53]:

$$\begin{aligned} F_2(\xi, \eta) &= \frac{1}{\alpha^2} e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)} F_1\left(\frac{\xi}{\alpha} \cos \theta - \frac{\eta}{\alpha} \sin \theta, \frac{\xi}{\alpha} \sin \theta + \frac{\eta}{\alpha} \cos \theta\right), \\ A_2(\xi, \eta) &= \frac{1}{\alpha^2} A_1\left(\frac{\xi}{\alpha} \cos \theta - \frac{\eta}{\alpha} \sin \theta, \frac{\xi}{\alpha} \sin \theta + \frac{\eta}{\alpha} \cos \theta\right), \\ \Phi_2(\xi, \eta) &= \Phi_1\left(\frac{\xi}{\alpha} \cos \theta - \frac{\eta}{\alpha} \sin \theta, \frac{\xi}{\alpha} \sin \theta + \frac{\eta}{\alpha} \cos \theta\right) \oplus (-\xi x_0 - \eta y_0). \end{aligned} \quad (14)$$

3.6.5 Definice cross-power spektra

Nechť funkce $f_1(x, y)$, $f_2(x, y) \in \mathcal{L}(\mathbb{R}^2)$ mají Fourierova spektra $F_1(\xi, \eta)$, $F_2(\xi, \eta)$. Cross-power spektrum funkcí f_1 , f_2 je funkce $C_{f_1, f_2}(\xi, \eta): \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$ definovaná následovně:

$$C_{f_1, f_2}(\xi, \eta) = F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta). \quad (15)$$

Normalizované cross-power spektrum je funkce $Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta): \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$ definovaná následovně [53].:

$$Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta) = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_2(\xi, \eta)|} \quad (16)$$

a pokud $p, q \in \mathbb{R}^+$ jsou dané konstanty, je polo-normalizované cross-power spektrum funkce $Z_{f_1, f_2}^{p, q}(\xi, \eta): \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$ definovaná následovně [53].:

$$Z_{f_1, f_2}^{p, q}(\xi, \eta) = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{(|F_1(\xi, \eta)| + p) \cdot (|F_2(\xi, \eta)| + q)}. \quad (17)$$

3.6.6 Definice fázové korelace

Nechť funkce $f_1(x, y)$, $f_2(x, y)$ mají Fourierova spektra $F_1(\xi, \eta)$, $F_2(\xi, \eta)$. Funkce $P_{f_1, f_2}(x, y): \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$ definována následovně:

$$P_{f_1, f_2}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta)\} = \mathcal{F}^{-1}\left\{\frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_2(\xi, \eta)|}\right\} \quad (18)$$

se nazývá funkce fázové korelace funkcí f_1, f_2 [53]. Funkce $P_{f_1, f_2}^{p, q}(x, y): \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$ definována následovně:

$$P_{f_1, f_2}^{p, q}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{Z_{f_1, f_2}^{p, q}(\xi, \eta)\} = \mathcal{F}^{-1}\left\{\frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{(|F_1(\xi, \eta)| + p) \cdot (|F_2(\xi, \eta)| + q)}\right\} \quad (19)$$

se nazývá funkce modifikované fázové korelace funkcí f_1, f_2 [53].

4 Registrace obrazů metodou fázové korelace

V této kapitole lze nalézt teorii registrace obrazů metodou fázové korelace a její demonstraci na jednoduchých obrázcích.

4.1 Teorie fázové korelace identických vzájemně posunutých obrazů

Nechť obraz A je reprezentován funkcí $f_1(x, y)$ a jeho Fourierovým spektrem $F_1(\xi, \eta)$. Obraz B je identický s obrazem A jen je vůči němu posunut o vektor (x_0, y_0) , kde $x_0, y_0 \in \mathbb{Z}$. Funkce reprezentující obraz B je dána jako $f_2(x, y) = f_1(x - x_0, y - y_0)$ a Fourierovo spektrum obrazu B je $F_2(\xi, \eta)$. Z Fourierova teorému o posuvu (viz kap. 3.6.3) plyne, že amplitudová spektra těchto funkcí f_1, f_2 jsou identická, liší se pouze fází

$$F_2(\xi, \eta) = e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)} F_1(\xi, \eta). \quad (20)$$

Při výpočtu cross-power spektra

$$C_{f_1, f_2}(\xi, \eta) = F_1(\xi, \eta) \cdot F_1^*(\xi, \eta) e^{i(\xi x_0 + \eta y_0)} \quad (21)$$

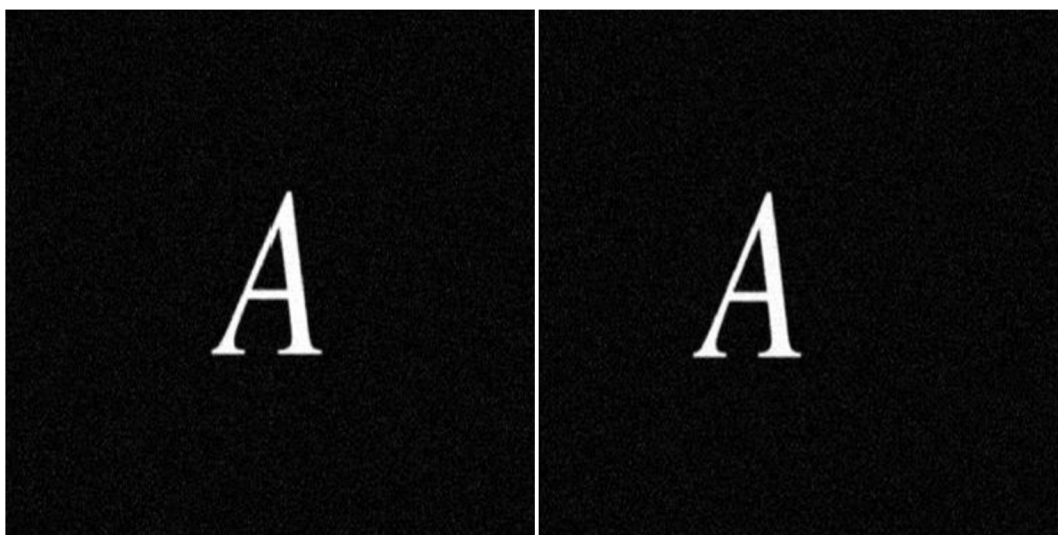
se zajímáme pouze o fazi. Normalizováním cross-power spektra obdržíme fazi

$$Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta) = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_2(\xi, \eta)|} = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_1^*(\xi, \eta) (e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)})^*}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_1(\xi, \eta) e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)}|} = e^{i(\xi x_0 + \eta y_0)}. \quad (22)$$

Aplikováním inverzní Fourierovy transformace dostáváme v případě identických obrazů a ideálních podmínek Diracovo rozdělení posunuté o $(-x_0, -y_0)$ [53]. Výše uvedené prezentuje metodu, kterou lze nalézt vzájemný posuv mezi dvěma funkcemi. Funkce fázové korelace dvou vzájemně posunutých funkcí je funkcí, kde je nenulová pouze hodnota v bodě $(-x_0, -y_0)$. Čísla x_0, y_0 udávají vektor, o který je druhá funkce posunutá vzhledem k první, a pokud posuneme druhou funkci f_2 o $(-x_0, -y_0)$, dostaneme funkci identickou s funkcí f_1 .

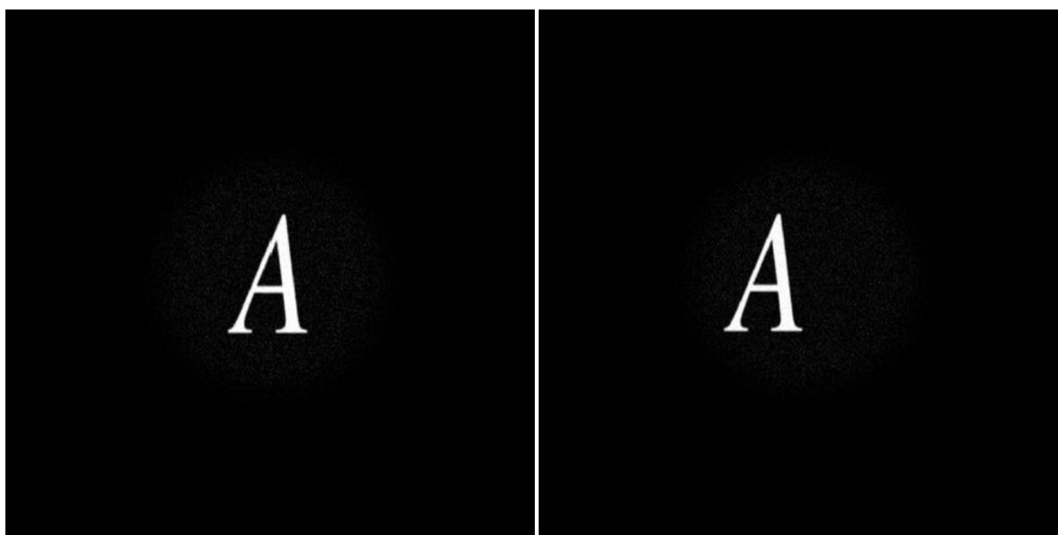
4.2 Demonstrace fázová korelace identických, vzájemně posunutých obrazů

Pro demonstraci nalezení vzájemného posunu obrazů metodou fázové korelace byly vybrány dva identické obrazy A a B , které byly vůči sobě posunuty v rovině xy o vektor (x_0, y_0) , viz obrázek 19.



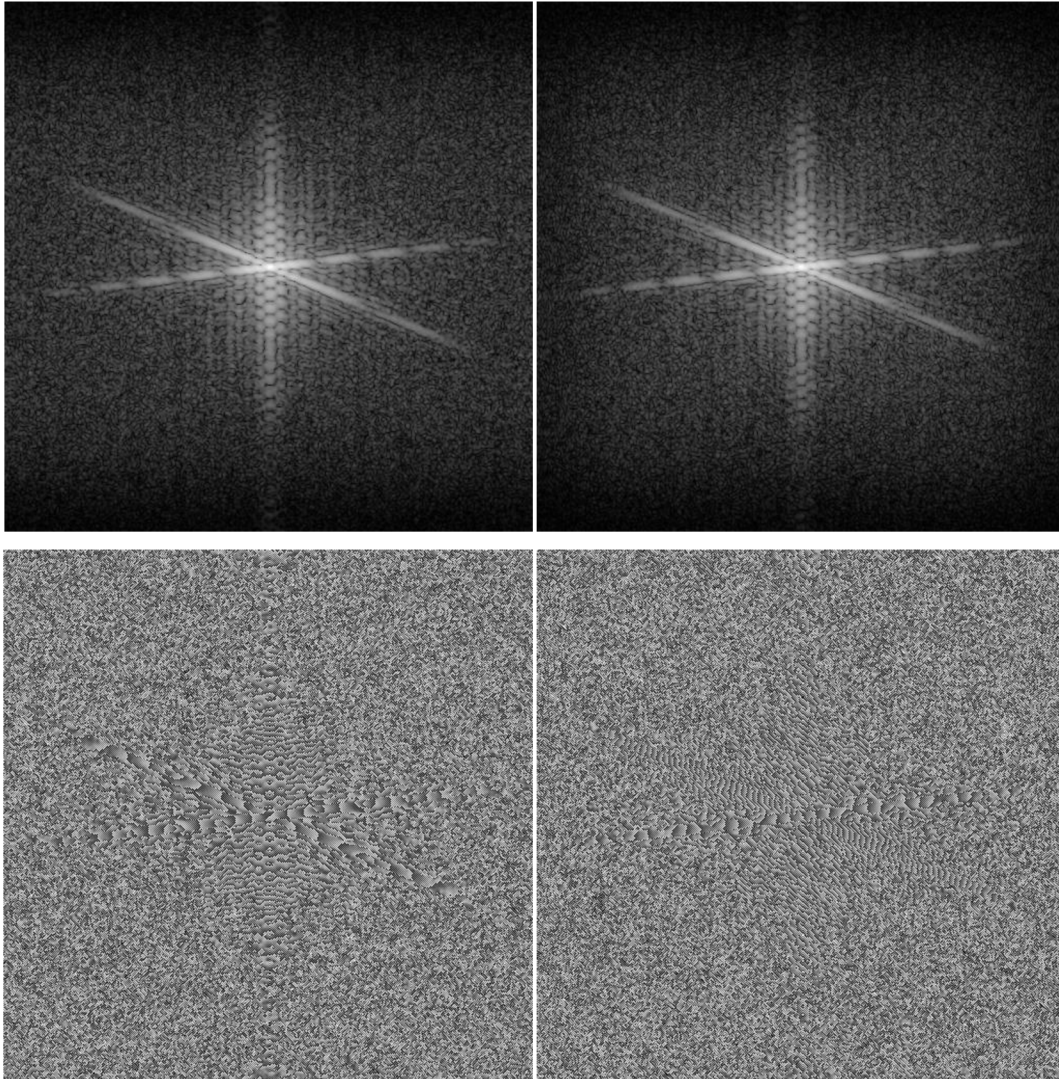
Obrázek 19: Obraz A (vlevo) a identický obraz B (vpravo) posunutý vůči obrazu A o vektor (x_0, y_0) . Pozadí obrazů není zcela identické.

Na obrazy byly aplikovány okénkové (window) funkce (o nich více v kap. 5), viz obrázek 20.



Obrázek 20: Obrazy A a B po aplikaci okénkových funkcí.

Jsou vypočítána Fourierova spektra $F_1(\xi, \eta)$, $F_2(\xi, \eta)$ obrazů A a B reprezentovaných funkcemi $f_1(x, y)$, $f_2(x, y)$, viz obrázek 21.



Obrázek 21: Fourierova spektra $F_1(\xi, \eta)$, $F_2(\xi, \eta)$ jsou komplexní funkce, proto se obvykle zobrazují jejich amplitudy. Hodnoty amplitudy se navíc zobrazují v logaritmické stupnici, aby se daly pozorovat i slabší vysoké frekvence jinak zastíněné dominantními nízkými frekvencemi. Obrázky ilustrují Fourierův teorém o posuvu hovořící o tom, že Fourierova spektra posunutých identických obrázků se neliší v amplitudě (horní řada), ale pouze ve fázi (spodní řada). Drobné odchytky jsou způsobeny nestejným pozadím obrázků A a B .

Následuje výpočet normalizovaného cross-power spektra

$$Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta) = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_2(\xi, \eta)|} = \frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_1^*(\xi, \eta) (e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)})^*}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_1(\xi, \eta) e^{-i(\xi x_0 + \eta y_0)}|} = e^{i(\xi x_0 + \eta y_0)}. \quad (23)$$

Fázová korelace je inverzní Fourierovou transformací normalizovaného cross-power spektra

$$P_{f_1, f_2}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{Z_{f_1, f_2}(\xi, \eta)\} = \mathcal{F}^{-1}\left\{\frac{F_1(\xi, \eta) \cdot F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) \cdot F_2(\xi, \eta)|}\right\}, \quad (24)$$

vytvoří obraz s výrazným globálním maximem na pozici (x_0, y_0) , v ideálním případě jde o Diracovu funkci, viz obrázek 22.



Obrázek 22: Obrázek vlevo znázorňuje fázovou korelaci identických vzájemně posunutých obrazů. Pozice maxima udává vektor posunutí. Obrázek vpravo je kombinací obrazu A a obrazu B posunutého o záporně vzatý nalezený vektor posunutí. Obrazu A byl přiřazen červený kanál RGB, obrazu B modrý kanál RGB. Fialová barva dokazuje shodu obou obrazů.

4.3 Teorie fázové korelace podobných obrazů

Podobnými obrazy v tomto případě rozumíme obrazy vzájemně posunuté, pootočené nebo s různými měřítky, případně vše dohromady. Registrace tohoto typu obrazů vychází z teoremu o podobnosti (viz kap. 3.6.4). Nejdříve se vypořádáme s pootočením. Nechť obraz A je reprezentován funkcí $f_1(x, y)$, obraz B je identický s obrazem A , jen je vůči němu pootočen o úhel $\varphi \in \langle 0, 2\pi \rangle$ a je popsán funkcí

$$f_2(x, y) = f_1(x \cos \varphi - y \sin \varphi, x \sin \varphi + y \cos \varphi). \quad (25)$$

Pootočení je komplikováno diskrétní povahou obou funkcí, proto musí být hodnoty funkce f_2 interpolovány z hodnot funkce f_1 . Použití okénkových funkcí řeší problém oblastí nulových hodnot funkce f_2 v některých jejích oblastech. Hledání vzájemného pootočení obou obrazů by mohlo být řešeno převodem obou obrazů do polárních souřadnic, pak bychom měli na osách poloměr a úhel. Pootočení se tak změnilo na posuv. Obrazy ovšem mohou být pootočeny kolem různých počátků, proto se do polárních souřadnic převádí amplitudy jejich Fourierových spekter majících tuto vlastnost:

$$A_2(\xi, \eta) = A_1(\xi \cos \varphi - \eta \sin \varphi, \xi \sin \varphi + \eta \cos \varphi). \quad (26)$$

To znamená, že vzájemné pootočení obrazů odpovídá vzájemnému pootočení amplitud jejich Fourierových spekter, navíc amplitudy jsou vždy pootočené kolem společného počátku [53]. Pro amplitudy spekter převedených do polárních souřadnic platí

$$A_2^p(\rho, \theta) = A_1^p(\rho, \theta + \varphi), \quad (27)$$

kde ρ je poloměr a θ úhel udávající pozici pixelu v polární soustavě souřadnic. Aplikací metody fázové korelace na amplitudy Fourierových spekter A_1^p, A_2^p jako by šlo o nové obrazy a hledáním posuvu, lze nalézt vzájemné posunutí původních obrazů A a B [54].

Nyní předpokládejme, že obraz B je nejen pootočený vzhledem k obrazu A , ale má i rozdílné měřítko, je zvětšený o faktor $\alpha \in \mathbb{R}^+$. Při zanedbání diskrétní povahy obou obrazů a funkcí je reprezentujících lze psát

$$f_2(x, y) = f_1(\alpha x \cos \varphi - \alpha y \sin \varphi, \alpha x \sin \varphi + \alpha y \cos \varphi). \quad (28)$$

Pro hledání vzájemného pootočení a měřítka je vhodné použít převod do *logaritmicko-polární soustavy souřadnic*.

Nechť $f(x, y)$ je funkcí $\mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{C}$. Funkce $f(x, y)$ převedená do logaritmicko-polární soustavy souřadnic je funkcí $f^{lp}(\rho, \varphi): \mathbb{R} \times \langle 0, 2\pi \rangle \rightarrow \mathbb{C}$ kde

$$\begin{aligned} e^\rho &= \sqrt{x^2 + y^2}, \\ x &= e^\rho \cos \theta, \\ y &= e^\rho \sin \theta. \end{aligned} \quad (29)$$

Podle teoremu o podobnosti (kap. 3.6.4) je amplituda Fourierova spektra funkce f_2 (až na násobení konstantou) pootočená o úhel φ a zvětšená o faktor $\frac{1}{\alpha}$ ve vztahu k amplitudě Fourierova spektra funkce f_2

$$A_2(\xi, \eta) = \frac{1}{\alpha^2} A_1\left(\frac{\xi}{\alpha} \cos \varphi - \frac{\eta}{\alpha} \sin \varphi, \frac{\xi}{\alpha} \sin \varphi + \frac{\eta}{\alpha} \cos \varphi\right). \quad (30)$$

Amplitudy Fourierových spekter $A_1^{lp}(\rho, \theta), A_2^{lp}(\rho, \theta)$ převedené do logaritmicko-polární soustavy souřadnic jsou ve vztahu

$$A_2^{lp}(\rho, \theta) = A_1^{lp}(\rho - \ln \alpha, \theta + \varphi), \quad (31)$$

proto se hledání vzájemného poměru velikosti a pootočení opět mění na hledání posuvu pomocí fázové korelace mezi amplitudami Fourierových spekter $A_1^{lp}(\rho, \theta), A_2^{lp}(\rho, \theta)$. Na ose ρ vektor posuvu reprezentuje logaritmus poměru velikostí $\ln \alpha$ a na ose φ vektor posuvu reprezentuje pootočení θ [53].

Nakonec uveďme příklad, kdy obraz B má nejen rozdílné měřítko a je pootočený oproti obrazu A , ale je navíc i posunutý v rovině xy

$$f_2(x, y) = f_1(\alpha x \cos \varphi - \alpha y \sin \varphi - x_0, \alpha x \sin \varphi + \alpha y \cos \varphi - y_0), \quad (32)$$

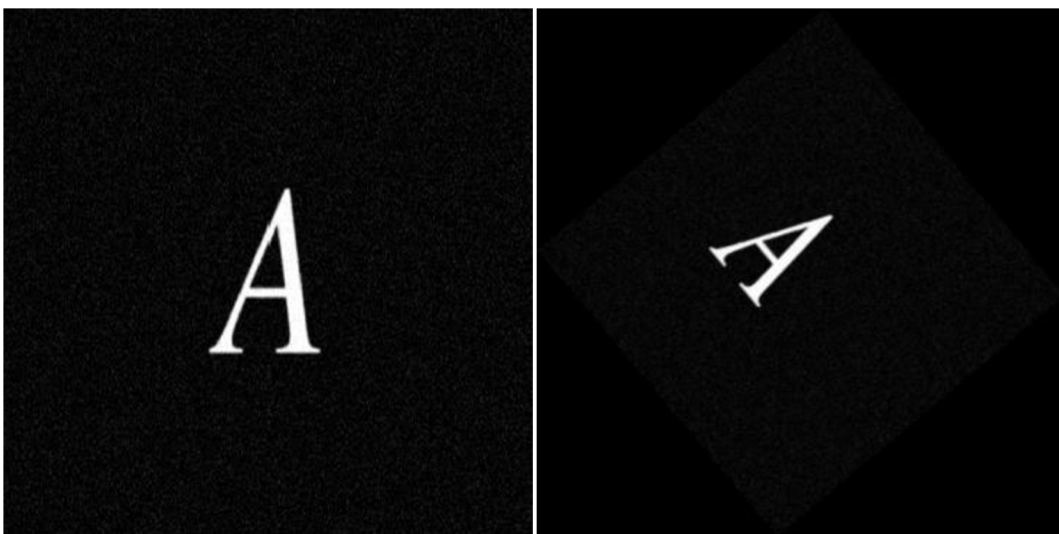
kde $x_0, y_0 \in \mathbb{Z}$, $|x_0|, |y_0| < N$. Z teoremu podobnosti vyplývá, že posun v rovině xy nemá vliv na amplitudy Fourierových spekter

$$A_2(\xi, \eta) = \frac{1}{\alpha^2} A_1\left(\frac{\xi}{\alpha} \cos \varphi - \frac{\eta}{\alpha} \sin \varphi, \frac{\xi}{\alpha} \sin \varphi + \frac{\eta}{\alpha} \cos \varphi\right). \quad (33)$$

Z výše uvedeného vyplývá pro fázovou korelaci podobných obrazů: nejdříve je nalezen úhel θ a poměr velikostí α pomocí metody užívající převod do logaritmicko-polární soustavy souřadnic. Poté je obraz B pootočen o úhel $(-\theta)$ a zvětšen/zmenšen o faktor $\left(\frac{1}{\alpha}\right)$, tím vznikne obraz C , který se liší vůči obrazu A jen posunutím v rovině xy . Poté je metodou fázové korelace identických vzájemně posunutých obrazů (kap. 4.1) nalezen vzájemný posuv obrazů A a C [53, 54].

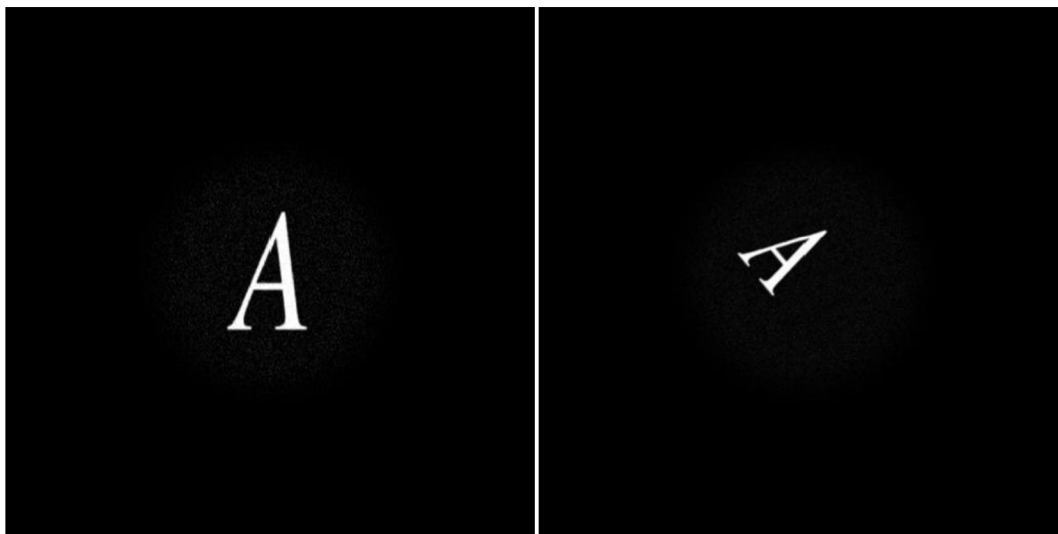
4.4 Demonstrace fázové korelace identických vzájemně pootočených obrázků s různými měřítky

Pro demonstraci metody fázové korelace pro nalezení poměru velikostí mezi obrazy, jejich vzájemného natočení a posunu byly vybrány dva identické vzájemně posunuté obrazy A a B (stejně jako při demonstraci vzájemného posunu). Obraz B byl pootočen a zmenšen, viz obrázek 23.



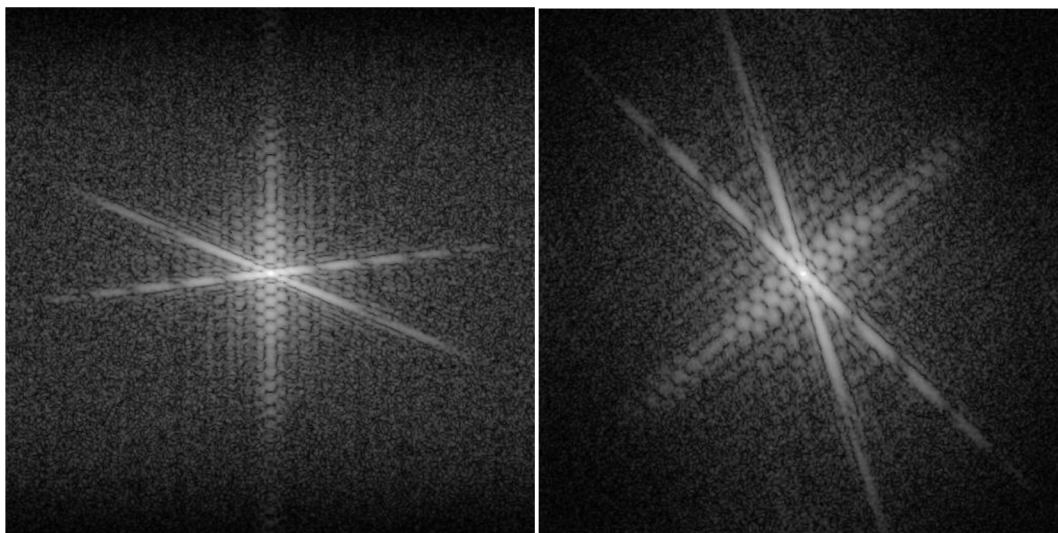
Obrázek 23: Obraz A (vlevo) a identický obraz B (vpravo) posunutý vůči obrazu A o vektor (x_0, y_0) . Obraz B byl následně otočen a zmenšen.

Na obrazy byly aplikovány okénkové (window) funkce (o nich více v kap. 6), viz obrázek 24.



Obrázek 24: Obraz A a obraz B vynásobený okénkovými funkcemi.

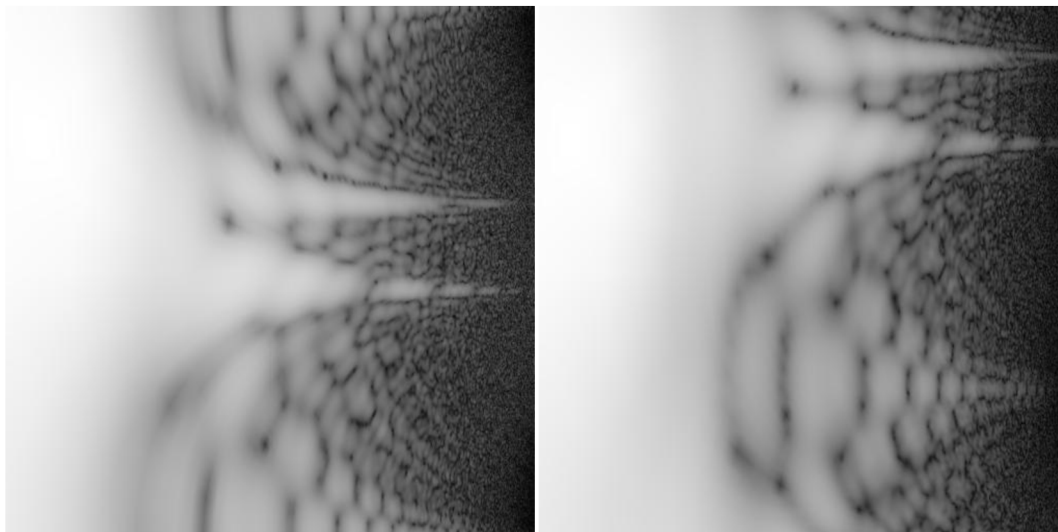
Jsou vypočítána Fourierova spektra $F_1(\xi, \eta)$, $F_2(\xi, \eta)$ obrazů A a B reprezentovaných funkcemi $f_1(x, y)$, $f_2(x, y)$. Ve spektrech se odráží pootočení i různá měřítko obrazů, viz obrázek 25.



Obrázek 25: Amplitudy Fourierových spekter $A_1(\xi, \eta)$, $A_2(\xi, \eta)$ obrazů mají tu vlastnost, že jsou vůči sobě pootočený o stejný úhel jako obrazy, jen vždy kolem stejného bodu (počátku). Drobné odchylinky jsou způsobeny nesterým pozadím obrazů A a B .

Amplitudy spekter $A_1(\xi, \eta)$, $A_2(\xi, \eta)$ jsou převedeny do logaritmicko-polárních souřadnic. Tyto amplitudy se později použijí jako nové obrazy pro fázovou korelaci. Nejnižší frekvence nesoucí informaci pouze o jasu či difuzním světle jsou velmi silné ve srovnání s vyššími

frekvencemi, které nesou informaci o struktuře obrazu. Proto je vhodné před dalším zpracováním převést do logaritmické míry i hodnoty pixelů tzn. $\ln(1 + A(\rho, \varphi))$.



Obrázek 26: Amplitudy Fourierových spekter A_1^{lp} , A_2^{lp} v logaritmicko-polárních souřadnicích. Hodnoty pixelů jsou rovněž v logaritmické míře. Na horizontální ose je nyní poměr velikostí mezi obrazy, na vertikální ose je úhel pootočení.

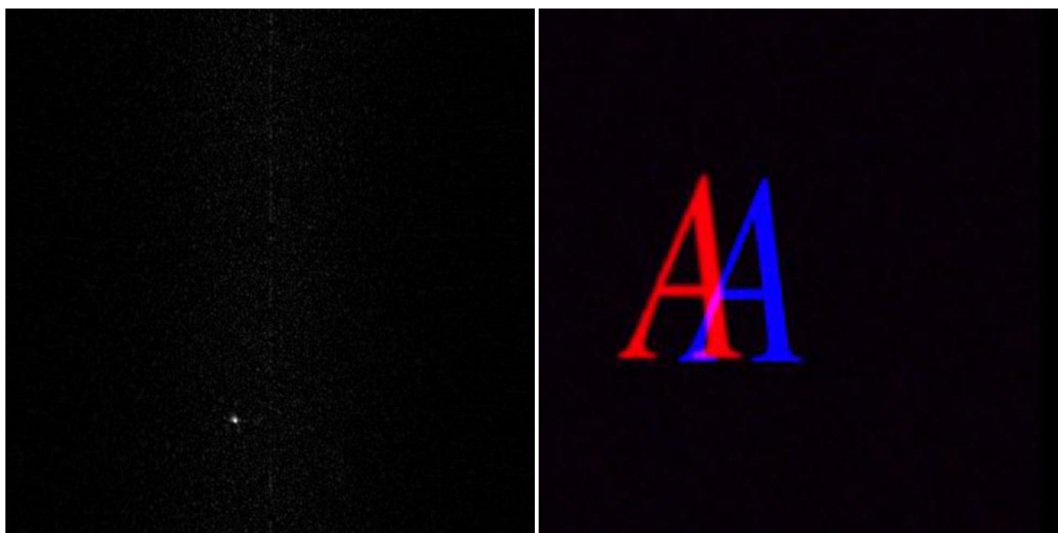
Amplitudy Fourierových spekter A_1^{lp} , A_2^{lp} v logaritmicko-polárních souřadnicích jsou použity jako nové obrazy, viz obrázek 26. Nalezením vzájemného posuvu mezi A_1^{lp} , A_2^{lp} vlastně získáme poměr velikostí a pootočení mezi obrazy A a B . Pro nalezení vzájemného posuvu jsou vypočítána Fourierova spektra $F_{A_1}(\xi, \eta)$, $F_{A_2}(\xi, \eta)$ obrazů A_1^{lp} , A_2^{lp} . Výpočtem normalizovaného cross-power spektra

$$Z_{A_1^{lp}, A_2^{lp}}(\xi, \eta) = \frac{F_{A_1}(\xi, \eta) \cdot F_{A_2}^*(\xi, \eta)}{|F_{A_1}(\xi, \eta) \cdot F_{A_2}(\xi, \eta)|} \quad (34)$$

následovaným inverzní Fourierovou transformací – fázovou korelací

$$P_{A_1^{lp}, A_2^{lp}}(x, y) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ Z_{A_1^{lp}, A_2^{lp}}(\xi, \eta) \right\}, \quad (35)$$

nalezneme vzájemný posun mezi A_1^{lp} , A_2^{lp} , tedy i poměr velikostí a pootočení mezi obrazy A a B . V obraze se vyskytují i nenulové členy, proto hledáme globální maximum udávající poměr velikostí a pootočení mezi obrazy, viz obrázek 27.



Obrázek 27: Vlevo: Maximum v zobrazené fázové korelaci udává poměr velikostí a pootočení mezi obrazy. Drobná vedlejší maxima jsou vždy výraznější než u hledání pouhého posunutí. Vpravo: Oba obrazy jsou nyní ve stejném poměru a stejně pootočené, nyní je třeba aplikovat nalezení posunutí v rovině xy .

Se znalostí poměru velikostí a pootočení můžeme obraz B definovaně zvětšit/zmenšit a pootočit. Nalezení případného posunutí v rovině xy mezi novým obrazem a obrazem A je provedeno dle kap 4.2.

5 Registrace obrazů metodou fázové korelace v prostředí MATLAB

V této kapitole je popsána procedura vytvořená pro registraci obrazů metodou fázové korelace naprogramovaná v prostředí MATLAB a pomocné funkce, které využívá.

5.1 Výpočetní prostředí MATLAB

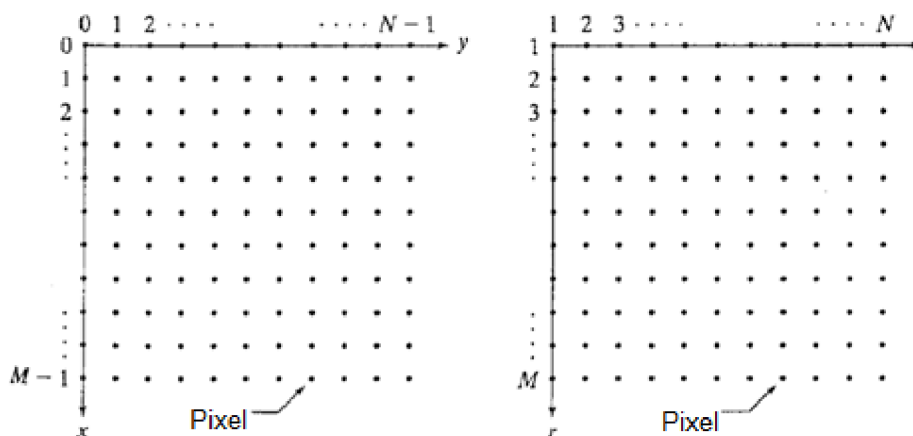
Metody zpracování obrazu, mezi které patří i registrace obrazů, vyžadují často spousty experimentování, testů a optimalizací, než dojde k nalezení správného řešení daného problému. Důkladná rešerše může ulehčit a urychlit nalezení tohoto řešení, přesto při hledání řešení unikátního problému je vhodné použít výpočetní systém obsahující mnoho užitečných integrovaných funkcí. Takovým systémem je MATLAB.

MATLAB je efektivní programovací jazyk pro technické výpočty. Umožňuje provádět výpočty, programovat a vykreslit zpracovaná data. Díky mnoha tematicky řazeným rozšířením (včetně rozšíření pro zpracování obrazu) lze tento systém použít pro nejrůznější aplikace [55].

Pro registraci obrazů nasnímaných multimodálním holografickým mikroskopem jsem zvolil systém MATLAB pro jeho jednoduchost a mnoho integrovaných funkcí zpracování obrazu. Při registraci obrazů bylo experimentováno s nejrůznějšími formami preprocesingu (o tom více v kap. 6) a bylo by nepohodlné a časově náročné tvořit takové funkce nebo je hledat na webu. Výhodou systému MATLAB, jak již bylo zmíněno, je široká databáze časově optimalizovaných funkcí, které jsou navíc dobře popsány v nápovědě systému. Samozřejmě MATLAB neobsahuje všechny funkce, které jsem při své práci potřeboval, proto jsou užívány jak integrované, tak vlastní funkce.

V prostředí MATLAB jsou obrazy reprezentovány maticí hodnot jasu. Místo kartézských souřadnic, používaných ve většině knih a článků, kterými jsou udávány pozice hodnot jasu a ve kterých má první hodnota souřadnici (0,0), používá MATLAB přístup bližší maticovému pojetí. Hodnoty jasu jsou lokalizovány dle svého pořadí ve sloupcích a řádcích, takže první hodnota je na pozici (1,1). S touto odlišností je třeba počítat při tvorbě vlastních funkcí [46].

Popis funkcí je v této práci uváděn v klasickém tvaru (x, y) .



Obrázek 28: Vlevo je konvenční popis souřadnic hodnot jasu obrazu pomocí kartézských souřadnic (x, y) . Vpravo je popis souřadnic hodnot jasu obrazu v prostředí MATLAB, souřadnice (r, c) mají význam řádku a sloupce.

5.2 Algoritmus pro registraci obrazů

V této části je uveden bod po bodu shrnující popis vytvořeného algoritmu pro registraci obrazů. Detailní popis následuje v části 5.3. V příloze A je přiloženo grafické znázornění algoritmu.

1. Načtení obrazů A a B reprezentovaných funkcemi $f_1(x, y)$ a $f_2(x, y)$.
2. Preprocessing obrazů do vhodnějšího tvaru $f_{1p}(x, y)$ a $f_{2p}(x, y)$.
3. Převedení obrazů pomocí funkce *centering* na stejné rozměry - $f_{1p}^{c1}(x, y)$ a $f_{2p}^{c1}(x, y)$.
4. Vynásobení obrazů okénkovými (window) funkcemi - $f_{1p}^{c1,w1}(x, y)$ a $f_{2p}^{c1,w1}(x, y)$.
5. Výpočet Fourierových spekter $F_1(\xi, \eta)$ a $F_2(\xi, \eta)$ funkcí $f_{1p}^{c1,w1}(x, y)$ a $f_{2p}^{c1,w1}(x, y)$ a amplitud Fourierových spekter $A_1(\xi, \eta)$ a $A_2(\xi, \eta)$.
6. Převod amplitud Fourierových spekter do logaritmického měřítka a převod těchto modifikovaných amplitud do logaritmicko-polárních souřadnic - $A_1^{n,lp}(\xi, \eta)$ a $A_2^{n,lp}(\xi, \eta)$.
7. Výpočet Fourierových spekter $F_1^A(\xi, \eta)$ a $F_2^A(\xi, \eta)$ amplitud v logaritmicko-polárních souřadnicích a polo-normalizovaného cross-power spektra $Z_{f_1, f_2}^{p,q}(\xi, \eta)$.
8. Vynásobení polo-normalizovaného cross-power spektra váhovou funkcí $H_{r_1, r_2}^{\sigma_1, \sigma_2}$.
9. Výpočet modifikované fázové korelace $P_{f_1, f_2}^{p,q}(x, y)$.
10. Nalezení maxima, výpočet středu hmotnosti a přepočtení na poměr velikostí a vzájemné pootočení.
11. Pootočením a změnou velikosti jednoho z obrazů dostáváme $f_{2p,z}^{c1}(x, y)$, dále používáme $f_{1p}^{c1}(x, y)$ a $f_{2p,z}^{c1}(x, y)$.

12. Převedení obrazů pomocí funkce centering na stejné rozměry $f_{1p}^{c2}(x, y)$ a $f_{2p,z}^{c2}(x, y)$.
13. Vynásobení obrazů okénkovými (window) funkcemi - $f_{1p}^{c2,w2}(x, y)$ a $f_{2p,z}^{c2,w2}(x, y)$.
14. Výpočet Fourierových spekter $F_1^{II}(\xi, \eta)$ a $F_2^{II}(\xi, \eta)$ a polo-normalizovaného cross-power spektra $Z_{f_1, f_2}^{p, q, II}(\xi, \eta)$.
15. Výpočet modifikované fázové korelace $P_{f_1, f_2}^{p, q, II}(x, y)$ polo-normalizovaného cross-power spektra $Z_{f_1, f_2}^{p, q, II}(\xi, \eta)$ vynásobeného váhovou funkcí $H_{r_3, r_4}^{\sigma_3, \sigma_4}$.
16. Nalezení maxima, výpočet středu hmotnosti a získání vektoru posunutí v rovině xy .
17. Posunutí obrazu $f_{2p,z,p}^{c2}(x, y)$ o vektor posunutí.
18. Převedení obrazů pomocí funkce centering na stejné rozměry $f_{1p}^{c3}(x, y)$ a $f_{2p,z,p}^{c3}(x, y)$.
19. Oříznutí obou obrazů dle rozměrů menšího z obrazů vynásobeného o poměr velikostí.
20. Export a vizualizace obou obrazů a kombinovaného obrazu.

5.3 Detailní popis procedury pro registraci obrazů

Načtení snímku

Snímky jsou načteny příkazem *imread*. Tato integrovaná funkce dokáže načíst obrazy v nejrůznějších formátech, jak černobílých tak barevných [55].

Načtené snímky se nachází nejčastěji v datových formátech *int8*, *int16*, *uint8* nebo *uint16*. *int* znamená, že hodnoty v obrazové matici jsou celočíselné, *uint*, že jsou navíc pouze kladné, číslo za zkratkou udává rozsah hodnot ($2^8 = 256$, $2^{16} = 65536$). Datový formát načtených obrazů je změněn na *double* (formát pro komplexní čísla) příkazem *im2double* tak, aby bylo možné měnit hodnoty v obrazové matici v rozsahu komplexních čísel.

Preprocessing

Některé hodnoty jasu v načtených obrazech nemusí být kladné. Proto je vždy distribuce hodnot jasu posunuta (přičtením vhodného čísla) tak, aby byla nejnižší hodnota nejméně 0. Možný rozsah hodnot také nemusí být využit v plném rozsahu, nebo je histogram obrazu nevyvážený (většina hodnot se nachází v úzkém rozsahu). MATLAB navíc vyžaduje, aby obrazy typu *double* byly v intervalu $\langle 0,1 \rangle$. Proto využívám následující dvě metody:

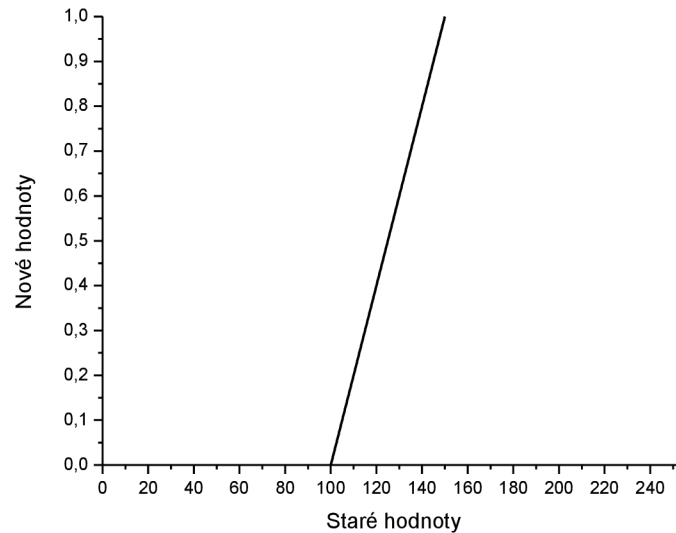
Lineární škálování

Nechť obraz A je reprezentován funkcí $f_1(x, y)$. Pak funkce $f_{1p}(x, y)$ reprezentující upravený obraz je dána takto:

$$f_{1p}(x, y) = (f_1(x, y) - a)/(b - a), \quad (36)$$

kde $a = \min(f_1(x, y))$, $b = \max(f_1(x, y))$.

Takto upraven je každý obraz. Hodnoty nového obrazu se nacházejí v intervalu $\langle 0,1 \rangle$. V tomto intervalu se musí nacházet všechny hodnoty obrazů typu *double*, které chceme v prostředí MATLAB zobrazovat. U obrazů využívající pouze úzký interval možných hodnot navíc zlepši kontrast [44].

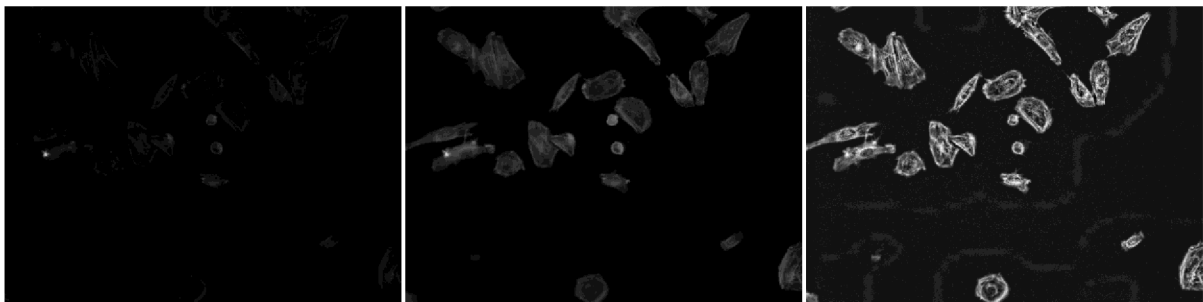


Obrázek 29: Ilustrace metody lineárního škálování. Hodnoty jasu původního 8 bitového obrazu s rozsahem hodnot jasu 0-255 se nacházejí v úzkém intervalu 100-150. Metodou lineárního škálování jsou hodnoty jasu roztaženy do intervalu 0-1, které MATLAB umí zobrazit jako obraz. Navíc je zlepšen kontrast obrazu.

Adaptivní ekvalizace histogramu

Integrovaná funkce *adapthisteq* zlepšuje kontrast černobílého obrazu transformací jeho hodnot jasu pomocí kontrastem omezené adaptivní ekvalizace histogramu (CLAHE).

CLAHE pracuje s malými oblastmi obrazu, tzv. dlaždicemi. Kontrast každé dlaždice je zlepšen tak, že histogram každé dlaždice odpovídá histogramu požadovaného tvaru. Sousední dlaždice jsou zkombinovány použitím bilineární interpolace kvůli odstranění artefaktů na hranicích [55].



Obrázek 30: Fluorescenční obrázek buněk nabarvených barvivem Alexa Fluor. První obrázek je modifikován pouze lineárním škálováním, u druhého je ekvalizován kontrast funkcí *adapthisteq* s původním nastavením. U třetího obrázku je použito funkce *adapthisteq* s upravenými parametry.

Centering

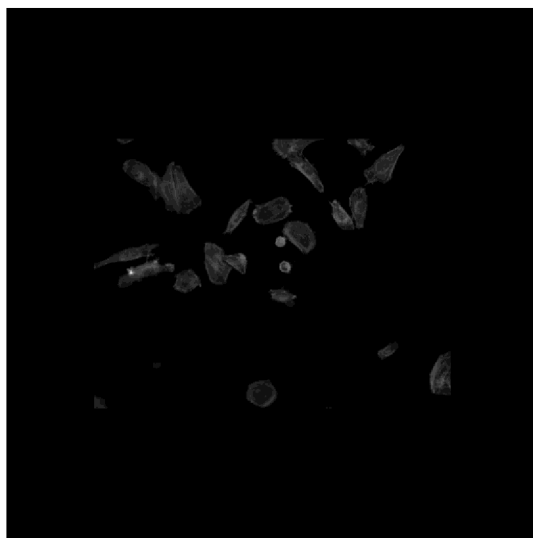
Oba snímky nemusejí mít stejné rozměry, to může ztížit nebo znemožnit některé z dále zmíněných operací. Proto byla vytvořena funkce *centering*, která funguje následovně:

Obraz A je reprezentován funkcí $f_1(x, y)$ o rozměrech $m \times n$. Zvolme nové rozměry $N \times N$ tak, aby $m \leq N$ a $n \leq N$. Nový obraz reprezentovaný funkcí $f_1^{c1}(x, y)$ vypadá následovně:

$$f_1^{c1}(x, y) = \begin{cases} f_1(x - m_0, y - n_0) & \text{pokud } m_0 \leq x \leq m_0 + m - 1; n_0 \leq y \leq n_0 + n - 1 \\ 0 & \text{jinak} \end{cases}, \quad (37)$$

kde $m_0 = \lfloor \frac{N-m}{2} \rfloor$, $n_0 = \lfloor \frac{N-n}{2} \rfloor$.

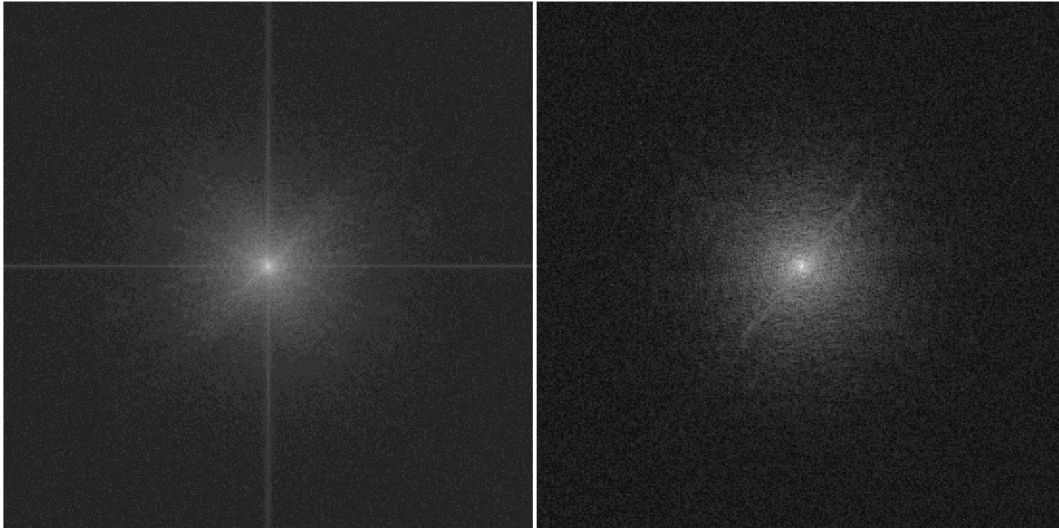
Upravený obraz je vlastně původním obrazem obklopeným nulami. *Centering* se provede na obou skládaných obrazech (se stejným N). Nyní mají oba skládané obrazy stejné rozměry [53].



Obrázek 31: Funkce *centering* aplikovaná na fluorescenční obrázek buněk nabarvených barvivem Alexa Fluor. Původní rozměry **1038 x1376**. $N = 2048$.

Okénkové funkce (window functions)

Dále se budou počítat Fourierova spektra upravených obrazů. Pokud bychom ponechali obrazy tak, jak jsou, budou nejvýraznějšími prvky spektra linie vedoucí horizontálně a vertikálně. Linie jsou způsobeny skokovou změnou hodnot jasu na okrajích obrazů. To by mohlo vést k nesprávné registraci obrazu.



Obrázek 32: Amplitudy Fourierových spekter s hodnotami jasu v logaritmické míře. Jasný kříž na obrázku vlevo je způsoben skokovou změnou v hodnotách jasu na okrajích. Amplituda Fourierova spektra na obrázku vpravo pochází z totožného obrázku vynásobeného okénkovou funkcí.

Okénková funkce, kterou je možné vyřešit tento problém, je definována následovně [53]:

Nechť je dána množina bodů

$$W = \{(x, y); x^2 + y^2 \leq r^2\}, \quad r \in \mathbb{R}_0^+. \quad (38)$$

Nechť $\sigma \in \mathbb{R}^+$ je daná konstanta. Nechť $\rho(X, W)$ je vzdálenost bodu $X = (x, y)$ od množiny bodů W tzn.

$$\rho(X, W) = \inf\{d \in \mathbb{R}, d = \rho(X, Y), Y \in W\}, \quad (39)$$

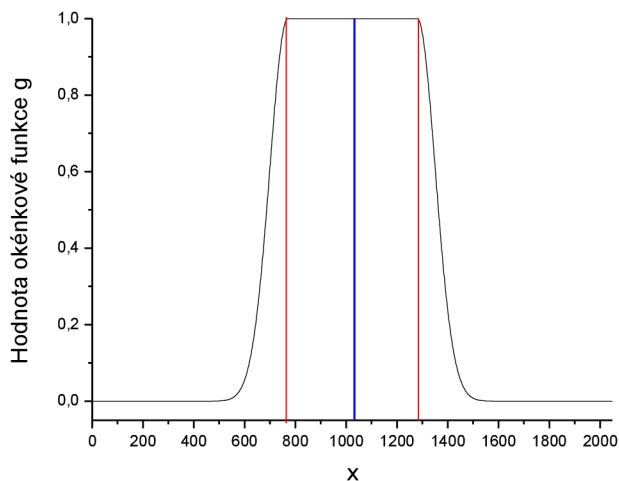
kde $\rho(X, Y)$ je Eukleidovská metrika.

Funkce

$$g(x, y) = e^{-\frac{\rho^2(X, W)}{\sigma^2}} \quad (40)$$

se nazývá kruhová Gaussovská okénková funkce.

Okénková funkce, tak, jak byla definována, je symetrická se středem v $(0,0)$. Před jejím použitím na obrazy ji posuneme o $(\frac{N}{2}, \frac{N}{2})$. Obrazy jsou tedy vynásobeny okénkovou funkcí $g(x - \frac{N}{2}, y - \frac{N}{2})$. Okénková funkce ponechá střed obrazu a díky pozvolnému klesání k nule v blízkosti okrajů odstraní nežádoucí efekty ve Fourierově spektru. Velikost oblasti zachované okénkovou funkcí je jedním z důležitých parametrů ovlivňujících registraci obrazu [53].

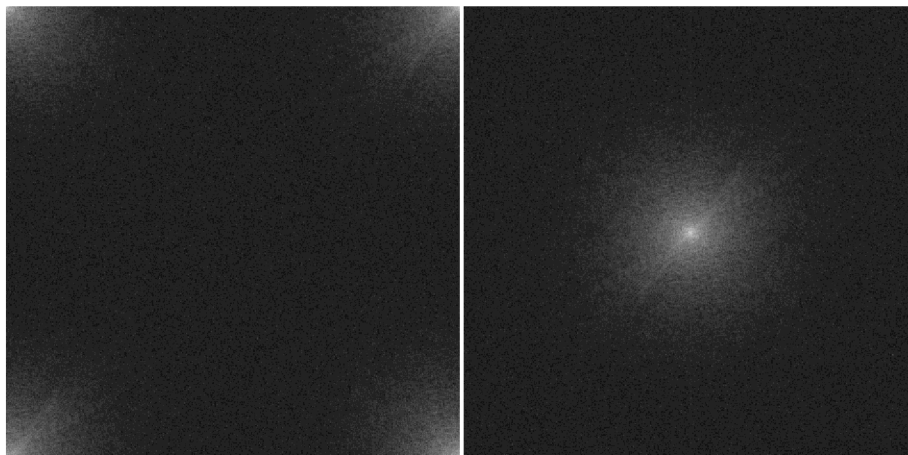


Obrázek 33: Obrázek vlevo je řezem okénkovou funkcí. Její střed (modrá čára) odpovídá středu obrazu, na který bude aplikována. Oblast vymezená červenými čarami určuje oblast neovlivněnou okénkovou funkcí. Od červené čáry směrem k okrajům obrazu dochází k pozvolnému tlumení jasu obrazu až k nulovým hodnotám. Na obrázek vpravo byla aplikována okénková funkce.

Výpočet amplitud Fourierových spekter upravených obrazů

Výpočet Fourierových spekter obrazů se v prostředí MATLAB provádí pomocí funkce *fft2*. *fft2* provede 2D diskretní Fourierovu transformaci pomocí algoritmu rychlé Fourierovy transformace (2D FFT). Vypočítané Fourierovo spektrum má stejné rozměry jako obraz, ze kterého je počítáno [55].

Vypočítané Fourierovo spektrum je v takovém tvaru, kde nízké frekvence se nacházejí v levém horním rohu a zvyšují se směrem od něj. Se spektrem se lépe pracuje, pokud je nulová frekvence ve středu a zvyšují se směrem od něj. Toho lze dosáhnout příkazem *fftshift*. Amplitudu dostaneme z Fourierova spektra příkazem *abs*.



Obrázek 34: Obrázek vlevo je amplitudou Fourierova spektra v logaritmické míře. Obrázek vpravo zobrazuje amplitudu Fourierova spektra posunutého příkazem *fftshift*.

Převod amplitud Fourierových spekter do logaritmicko-polárních souřadnic

Před samotnou transformací je nutné, jak již bylo naznačeno v kap. 4, přepočítat amplitudy tak, aby došlo k vyrovnání intenzity mezi nízkými (výraznými) a vysokými (slabými) frekvencemi. To se provede následovně:

$$A_1^n = \ln(1 + A_1), \quad (41)$$

kde A_1^n je nová amplituda Fourierova spektra a A_1 je původní amplituda Fourierova spektra. Převod amplitud Fourierových spekter do logaritmicko-polárních souřadnic je proveden procedurou od profesora Druckmüllera (která byla použita v jeho práci, viz [49]). Procedura byla napsána v prostředí Delphi, proto musela být upravena, aby byla kompatibilní s prostředím MATLAB. Další změny musely být provedeny kvůli rozdílnému značení pozic pixelů obou výpočetních prostředí. Teorie transformace do logaritmicko-polárních souřadnic byla již komentována v kap. 5. Pro transformaci je používána bilineární transformace pro svou univerzálnost a dobrý poměr mezi výpočetní dobou a přesností [47].

Výpočet polo-normalizovaného cross-power spektra

Amplitudy Fourierových spekter v logaritmicko-polárních souřadnicích jsou použity jako nové obrazy, nalezení vzájemného posunu těchto obrazů znamená nalézt poměr velikostí a natočení mezi původními obrazy [54]. Z amplitud Fourierových spekter v logaritmicko-polárních souřadnicích jsou vypočítána Fourierova spektra. Následuje výpočet polo-normalizovaného cross-power spektra

$$Z_{f_1, f_2}^{p, q}(\xi, \eta) = \frac{F_1^A(\xi, \eta) \cdot F_2^{A*}(\xi, \eta)}{(|F_1^A(\xi, \eta)| + p) \cdot (|F_2^A(\xi, \eta)| + q)}, \quad (42)$$

kde $Z_{f_1, f_2}^{p, q}$ je polo-normalizované cross-power spektrum, $F_1^A(\xi, \eta)$, $F_2^A(\xi, \eta)$ jsou Fourierova spektra obou amplitudových obrazů a p, q jsou dané konstanty.

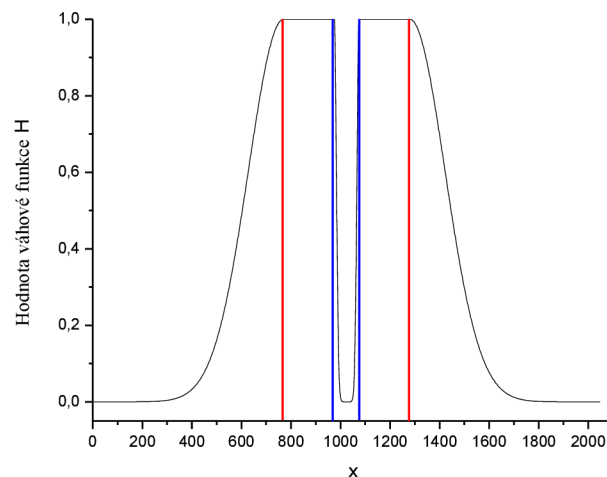
Oproti klasickému cross-power spektru se ve jmenovateli nachází konstanty p, q . Volbou těchto konstant lze přecházet mezi fázovou korelací (když $p, q \rightarrow 0, 0$) a křížovou korelací (když p, q je relativně vysoké). Při použití čisté fázové korelace jsou hodnoty cross-power spektra normalizovány jeho amplitudou, což znamená, že všechny prostorové frekvence mají stejnou váhu. Míra normalizace odpovídá množství informace na dané frekvenci. Křížová korelace oproti tomu pracuje s cross-power spektrem tak, jak je, což může být výhodou, pokud se ve spektru vyskytují frekvence, které nenesou žádné informace (dělilo by se nulou). Avšak maxima z křížové korelace bývají podstatně širší než ty z fázové korelace. Proto je

výhodné pracovat s polo-normalizovaným cross-power spektrem s konstantami p, q nastavenými optimalizací [53, 54].

Váhová funkce

Při skládání obrazů obsahujících odlišné struktury a šum, jsou-li dokonce snímány různými kamerami, je pro hledání vzájemného posuvu, měřítka a pootočení nutné použít jen určitý rozsah prostorových frekvencí [56]. Nulové a nejnižší prostorové frekvence nesou informaci pouze o celkovém jasu, difuzním světle a vinětaci, proto nejsou vhodné pro registraci obrazu [49]. Vysoké prostorové frekvence obsahují nejvíce šumu a obvykle nesou nejvíce informací o neodpovídajících strukturách obrazů [53]. Tyto frekvence je vhodné odfiltrovat, k tomu poslouží váhová funkce typu pásmová propust.

Váhová funkce pásmové propusti je velmi podobná okénkové funkci. Je kruhově symetrická vzhledem ke středu v $(\frac{N}{2}, \frac{N}{2})$. Lze ji nastavit pomocí čtyř parametrů $r_1, r_2, \sigma_1, \sigma_2$, kde $r_1 < r_2$. V mezikruží s poloměry r_1 a r_2 má váhová funkce hodnotu 1. Podobně jako u okénkové funkce, v oblastech s poloměrem větším než je r_2 , klesají její hodnoty ve směru od kružnice s poloměrem r_2 k okrajům Gaussovsky k nule. Rozdílem oproti okénkové funkci je oblast o poloměru $r < r_1$. Hodnoty zde Gaussovsky klesají ve směru od kružnice s poloměrem r_1 ke středu [53].



Obrázek 35: Řez váhovou funkcí H . Váhová funkce má hodnotu 1 v mezikruží mezi poloměrem r_1 (modré čáry) a r_2 (červené čáry). V oblastech s větším poloměrem než r_2 nebo menším poloměrem než r_1 váhová funkce klesá k nule.

Modifikovaná fázová korelace

Polo-normalizované cross-power spektrum vynásobíme váhovou funkcí a provedeme inverzní Fourierovu transformaci, tím získáme modifikovanou fázovou korelaci

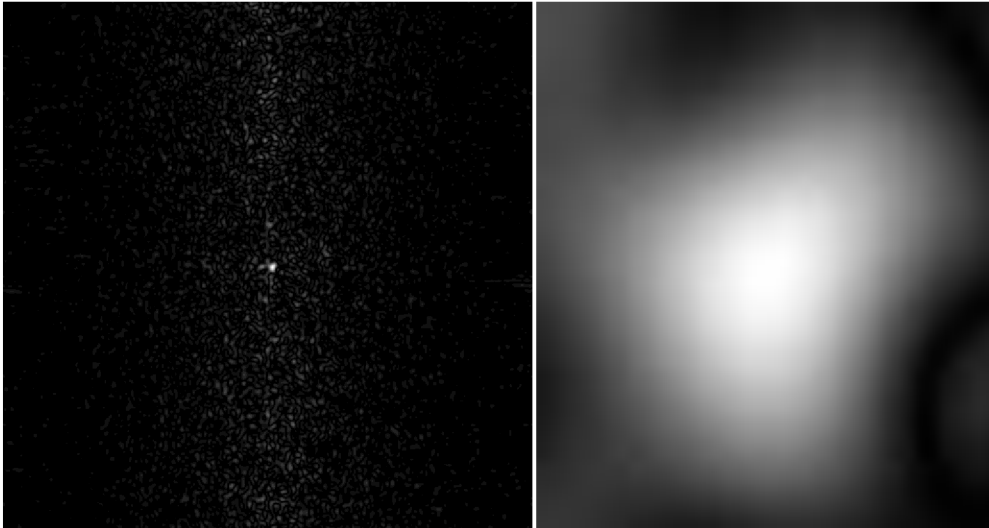
$$P_{f_1, f_2}^{p, q}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{H_{r_1, r_2}^{\sigma_1, \sigma_2}(\xi, \eta) \cdot Z_{f_1, f_2}^{p, q}(\xi, \eta)\}, \quad (43)$$

kde $H_{r_1, r_2}^{\sigma_1, \sigma_2}$ je váhová funkce, $Z_{f_1, f_2}^{p, q}$ je polo-normalizované cross-power spektrum a $P_{f_1, f_2}^{p, q}$ je modifikovaná fázová korelace.

Inverzní Fourierova transformace je provedena funkcí *iffi2* a je následována funkcí *fftshift*.

Hledání maxima

Zobrazením modifikované fázové korelace dostáváme obraz, ve kterém je ideálně jedno výrazné globální maximum dané vektorem (x_0, y_0) . Pozice maxima udává poměr velikostí mezi obrazy a jejich vzájemné natočení. Maximum se může nacházet na vrcholku struktury přesahující oblast několika pixelů, zvláště pokud používáme výrazné filtrování prostorových frekvencí váhovou funkcí, viz obrázek 36.



Obrázek 36: Obrázek vlevo je modifikovaná fázová korelace obrazu výrazně filtrovaného váhovou funkcí. Obrázek vpravo je přiblížená struktura obsahující maximum dané vektorem (x_0, y_0) . Použit jako maximum pixel s nejvyšší hodnotou by nemuselo být příliš přesné. Vyšší přesnosti může být dosaženo výpočtem těžiště struktury obsahující maximum.

Proto použít jako maximum bod s nejvyšší hodnotou nemusí být tou nejlepší volbou. Přesnějšího určení maxima může být dosaženo výpočtem těžiště struktury obsahujícího maximum [57].

Výpočet maxima spadá pod tzv. metody registrace se sub-pixelovou přesností. To proto, že vypočítaná pozice maxima zpravidla nebývá celočíselná. Pozice maxima je vypočítána následovně:

$$(\bar{x}_0, \bar{y}_0) = \left(\frac{M_{1,0}}{M_{0,0}}, \frac{M_{0,1}}{M_{0,0}} \right), \quad (44)$$

kde $M_{k,l}$ jsou geometrické momenty vypočítané z kruhu se středem v (x_0, y_0) a s poloměrem $\varepsilon \in \mathbb{R}^+$. Momenty $M_{k,l}$ jsou dány

$$M_{k,l} = \sum_{x^2+y^2 < \varepsilon} \sum x^k y^l P(x_0 + x, y_0 + y), \quad k, l = 0, 1, \quad (45)$$

kde $P(x, y)$ je modifikovaná fázová korelace. Bod (\bar{x}_0, \bar{y}_0) může být považován za střed hmotnosti maxima a jeho okolí o poloměru ε . Vektor (\bar{x}_0, \bar{y}_0) je přepočítán na poměr velikostí mezi obrazy a jejich vzájemné natočení [53].

Změna velikosti a pootočení jednoho z obrazů

Pro další práci budou použity obrazy $f_{1p}^{c1}(x, y)$ a $f_{2p}^{c1}(x, y)$ z bodu 3. $f_{2p}^{c1}(x, y)$ je pootočen o úhel nalezený modifikovanou fázovou korelací. Pootočení je provedeno funkcí *imrotate*. Funkce je nastavena tak, aby používala bilineární interpolaci a zachovávala původní velikost obrazu. Otočený obraz je zvětšen/zmenšen poměrem velikostí, nalezeným modifikovanou fázovou korelací, funkcí *imresize*. Funkce je opět nastavena tak, aby používala bilineární interpolaci [55].

Další postup registrace obrazů

Oba obrazy jsou nyní ve stejném měřítku a nejsou vůči sobě pootočené. Budeme hledat jejich vzájemný posun v rovině xy . Protože byl jeden z obrazů v předešlém kroku zvětšen funkcí *imresize* je nutné znovu provést *centering* a mít znovu obě matice obrazů o stejných rozměrech. Nové rozměry jsou nastaveny podle největšího z rozměrů tak, aby vznikly dvě stejně velké čtvercové matice a nedošlo k ztrátě informace na okrajích obrazů.

Na oba obrazy je aplikována okénková funkce podobně jako v kroku 4.

Jsou vypočítána Fourierova spektra obou obrazů a polo-normalizované cross-power spektrum. Polo-normalizované cross-power spektrum je vynásobeno váhovou funkcí a poté je vypočítána inverzní Fourierova transformace.

V obrazu modifikované fázové korelace je nalezeno globální maximum a je vypočítán střed hmotnosti. Souřadnice středu hmotnosti udávají vektor posunutí.

Obraz je posunut o nalezený vektor funkcí *posunuti_obrazku*. Funkce vypadá podobně jako *centering*, kolem obrazu je vytvořen široký okraj tvořený nulami, poté je obraz posunut ve směru nalezeného vektoru posunutí.

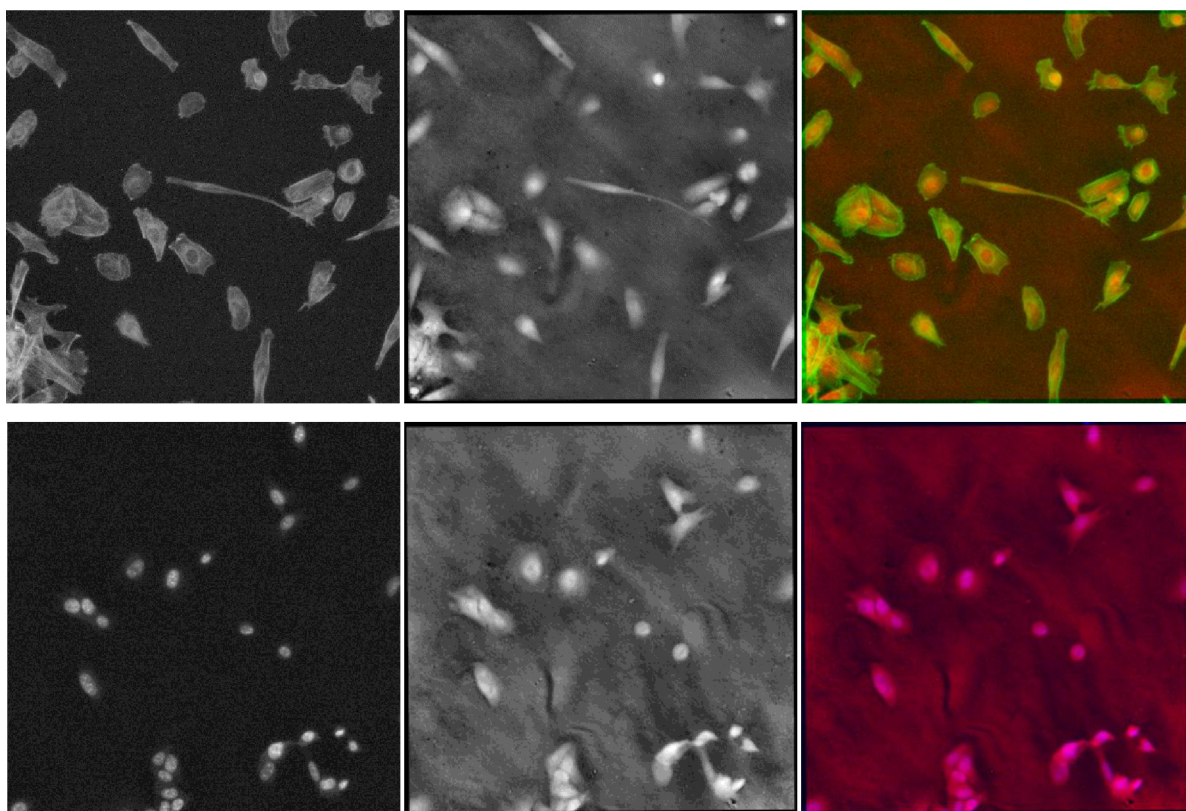
Obrazové matice nemají stejnou velikosti, proto je proveden třetí *centering*.

Oříznutí

Oba obrazy mají stejné rozměry, ale jsou hustě obklopeny nulovými hodnotami. Integrovanou funkcí *imcrop* jsou oba obrazy oříznuty na rozměry menšího z obrazů vynásobené poměrem velikostí. Oba obrazy dobře sedí na sobě a obsahují stejné zorné pole.

Export, složení a vizualizace

Oba oříznuté obrazy jsou integrovanou funkcí *imwrite* zapsány na disk počítače. Pro názornost a vizuální kontrolu správnosti složení je vytvořený kombinovaný snímek. Kombinovaný snímek obsahuje v jednom RGB kanálu jeden obraz a v druhém RGB kanálu druhý obraz.



Obrázek 37: Exportované složené snímky. Vrchní řada: Fluorescenční snímek Alexa Fluor, holografický snímek, kombinovaný snímek. Spodní řada: Fluorescenční snímek DAPI, holografický snímek, kombinovaný snímek. U všech snímků byl zvýšen kontrast.

6 Pozorování vzorku pomocí MHM

V této kapitole je popsáno pozorování vzorku obsahujícího buňky potkaních fibroblastů pomocí multimodálního holografického mikroskopu.

6.1 Definice pojmů

Holografickým snímkem či obrazem necht' je nazýván obraz ve fázovém kontrastu pořízený holografickým módem MHM.

Fluorescenčním snímkem či obrazem necht' je nazýván obraz vzniklý emisním zářením fluoroforů pořízený fluorescenčním módem MHM.

Fluorescenčním snímkem DAPI necht' je nazýván obraz vzniklý emisním zářením fluoroforu DAPI.

Fluorescenčním snímkem Alexa Fluor necht' je nazýván obraz vzniklý emisním zářením fluoroforu Alexa Fluor.

6.2 Použitý vzorek

Pozorovány byly buňky buněčné linie RsK4 - spontánně transformované embryonální fibroblasty odvozené z potkana imbredního kmene Lewis. Buňky byly fixovány a nabarveny fluorescenčními barvivy DAPI a Alexa Fluor 488 phalloidin.

6.3 Parametry vybraných součástí MHM a použitých fluoroforů

6.3.1. Kamera pro holografický mód

Pro holografii byla použita CCD kamera XIMEA MR4021MC-VELETA. Tento typ kamery je chlazen a umožňuje pouze černobílý záznam. Snímá obraz s rozlišením 2048×2048 pixelů, čip má rozměry $15,2 \times 15,2$ mm s velikostí senzoru $7,4 \times 7,4$ μm a kvantovou účinností 55 %. Výrobce uvádí kapacitu elektronových pastí na 40.000 elektronů a temný proud na 40 elektronů na pixel za sekundu (při pracovní teplotě). Orientační hodnota šumu vzniklého AD převodníkem je 7,5 elektronu.

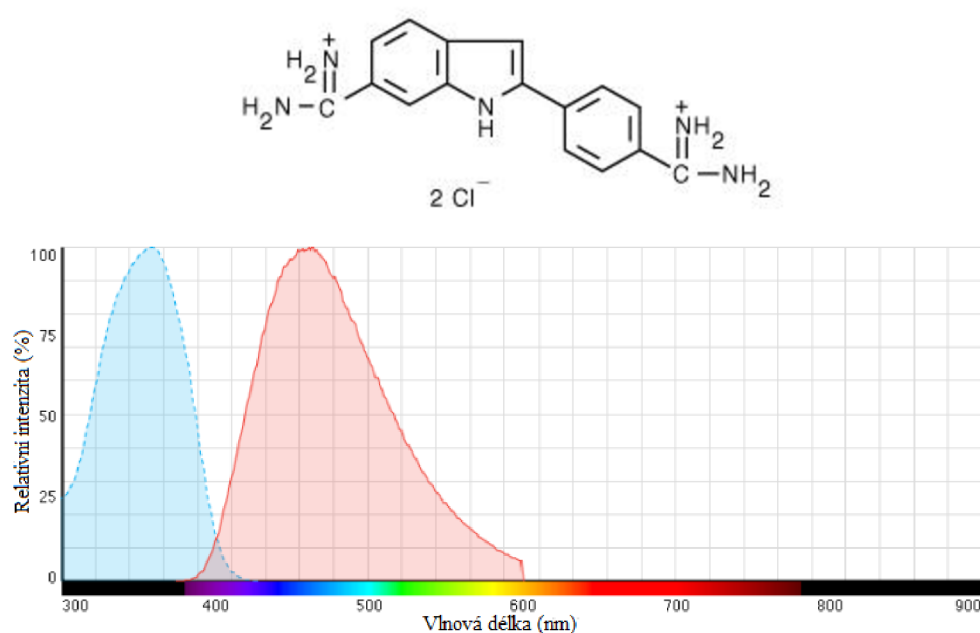
Vzhledem k metodě zpracování hologramu mají obrazy rozlišení 604×604 pixelů.

6.3.2 Kamera pro fluorescenční mód

Pro epi-fluorescenci byla použita CCD kamera XIMEA MR285MC-BH. Tento typ kamery je chlazen a umožňuje pouze černobílý záznam. Snímá obraz s rozlišením 1392×1040 pixelů, čip má rozměry $10,0 \times 8,3$ mm s velikostí senzoru $6,45 \times 6,45$ μm . Výrobce uvádí kapacitu elektronových pastí na 24.000 elektronů a temný proud na 9 elektronů na pixel za sekundu (při pokojové teplotě). Orientační hodnota šumu vzniklého AD převodníkem je 7,5 elektronu. Kamera pracuje v módu poskytující obrazy v rozlišení 1376×1038 pixelů.

6.3.3 Fluorofor DAPI

DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) je fluorescenční barvivo, které se váže na DNA a vykazuje modrou fluorescenci [7]. Používá se pro fluorescenční barvení DNA v jádrech fixovaných buněk. Nabarvená DNA během pozorování jasně září na tmavém pozadí cytoplazmy [58]. Je poměrně fotostabilní a rozpustné ve vodě.

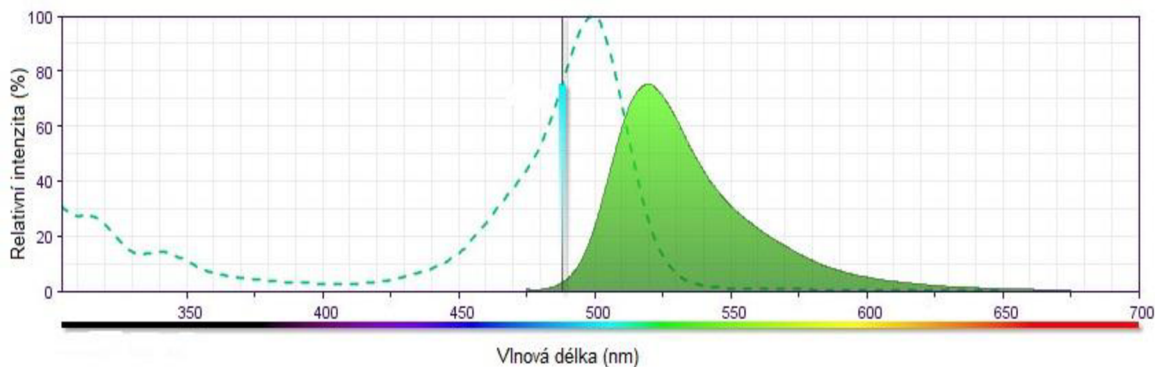


Obrázek 38: Nahoře – Struktura DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Dole – Absorpční (modré) a emisní (červené) spektrum. Maximum absorpčního spektra je 350 nm, maximum emisního spektra 450 nm, tj. v modré oblasti viditelného spektra. Převzato a upraveno z [59].

6.3.4 Fluorofor Alexa Fluor 488 phalloidin

Phalloidin je peptid patřící mezi toxiny izolované z houby *amanita phalloides* [60]. Běžně se používá ve fluorescenci, protože se váže na F-aktin. F-aktin je druh aktinu, který se nalézá ve všech eukariotických buňkách, tvoří mikrofilamenty, které jsou součástí cytoskeletu buňky.

Na phalloidin se naváže Alexa Fluor 488, která vykazuje intenzivní zelenou fluorescenci se značnou fotostabilitou [7]. Phalloidin s navázanou Alexa Fluor 488 se při barvení naváže na cytoskelet buňky, který následně můžeme při fluorescenční mikroskopii pozorovat.



Obrázek 39: Absorpční (čárkované) a emisní (zelené) spektrum. Maximum absorpčního spektra je 495 nm, maximum emisního spektra 519 nm, tj. v zelené oblasti viditelného spektra. Převzato a upraveno z [60].

6.3.5 Osvětlení vzorku

Pro holografii je použita halogenová lampa se spektrálním filtrem, je vybrán světelný svazek s centrální vlnovou délkou 650 nm a spektrální šířkou 10 nm.

Pro fluorescenci je použita rtuťová lampa s excitačním filtrem odpovídající pozorovanému fluoroforu.

6.3.6 Objektiv

Vzorek je pozorován objektivem se zvětšením 10x a numerickou aperturou 0,3. Celkové zvětšení pole při holografii je 40x a velikost zorného pole při holografii je **330,24 × 330,24** μm.

6.4 Pozorování

6.4.1 Příprava mikroskopu

Mikroskop je zapnut, stejně tak fluorescenční lampa. Na počítači je spuštěn řídicí program a je zvolen transmisní mód. Následuje inicializace motorů objektivů a osvětlovacího systému holografické části. Jsou spuštěny kondenzory do pracovní polohy, vzorek je vložen do předmětové větve a kompenzace skla do referenční větve. Pomocí absolutního ostření (pohyb oběma větvemi) je zaostřeno na rovinu vzorku. Vložením polní clony a pozorováním pouze v referenční větvi je zaostřeno na polní clonu na kameře manuálním ostřením kondenzorů. Je

přepnuto pouze na předmětovou větev a relativním ostřením (pohyb pouze předmětovou větví) je zaostřeno na polní clonu na kameře. Na konec je vysunuta polní clona. Následují automatické procedury, které sesadí obrazy z obou větví a naladí mikroskop na nejlepší signál. Další ostření na roviny vzorku je prováděno pohybem stolečku se vzorkem.

6.4.2 Pozorování

Je nalezeno vhodné zorné pole vzorku obsahující buňky, je pořízen holografický snímek. Poté je přepnuto na fluorescenční mód a je vybrán správný filtr dle použitého barviva. Mírně se přeostří pro získání ostrého snímku. Vždy je pořízen jeden holografický snímek a dva fluorescenční snímky, DAPI a Alexa Fluor, stejné oblasti vzorku. Při každém pozorování je vždy několik snímků mimo správnou rovinu ostření, přisudme to nezkušenosti experimentátora.

6.4.3 Podmínky pozorování

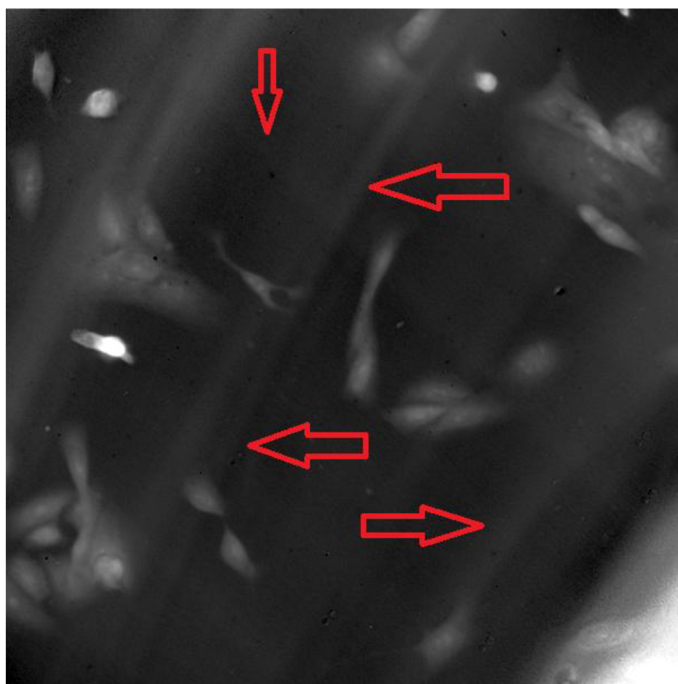
Byly provedeny celkem 3 pozorování stejného vzorku za různého technického stavu mikroskopu. Vždy bylo pořízeno 24 trojic snímků. Trojice: holografický snímek, fluorescenční snímek fluoroforu DAPI a fluorescenční snímek fluoroforu Alexa Fluor. Při každém pozorování byly parametry, jako je expoziční doba či intenzita osvětlení konstantní. Intenzita osvětlení byla vždy použita maximální. Expoziční doby u fluorescenčních snímků bylo nutné prodloužit, protože se začal projevovat jev vybělení. Následuje tabulka podmínek pozorování.

Tabulka č. 1: Podmínky pozorování.

Číslo pozorování	1.	2.	3.
Expoziční doba DAPI [ms]	114,51	118,15	125,68
Expoziční doba AlexaFluor [ms]	49,87	159,42	168,32
Expoziční doba holografie [ms]	68,19	68,72	200,00
Průměrování snímků	3	3	3

6.4.4 První pozorování

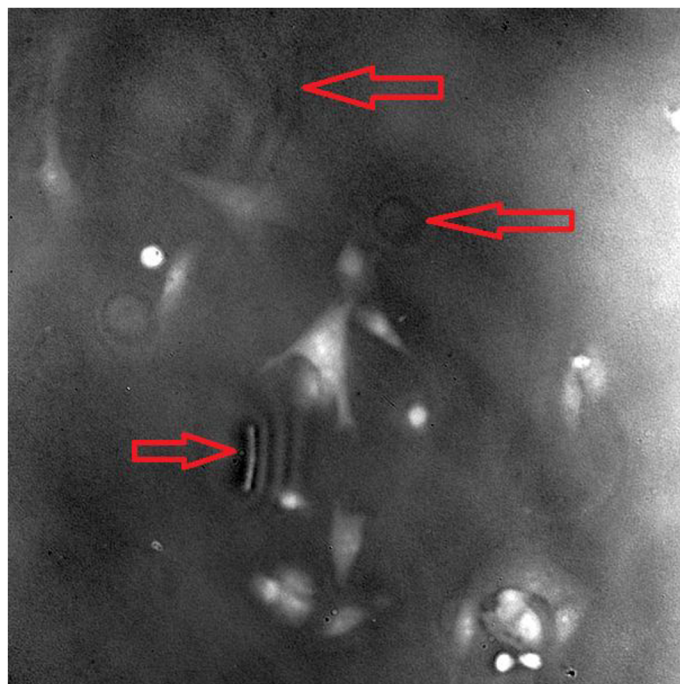
Prvních 24 trojic snímků bylo pořízeno v době, kdy byl v holografické části multimodálního holografického mikroskopu poškozen dělič svazku. Snímky navázané fáze jsou silně ovlivněny přítomností šumu ve formě pásů. Snímky nebyly vyřazeny, místo toho byly použity pro zjištění vlivu tohoto druhu šumu na chod skládací procedury. Viz obrázek 40.



Obrázek 40: Obraz navázané fáze z prvního pozorování. Čáry a šmouhy jsou způsobeny trhlinami na blankovém děliči svazků. Snímek je upraven expanzí kontrastu.

6.4.5 Druhé pozorování

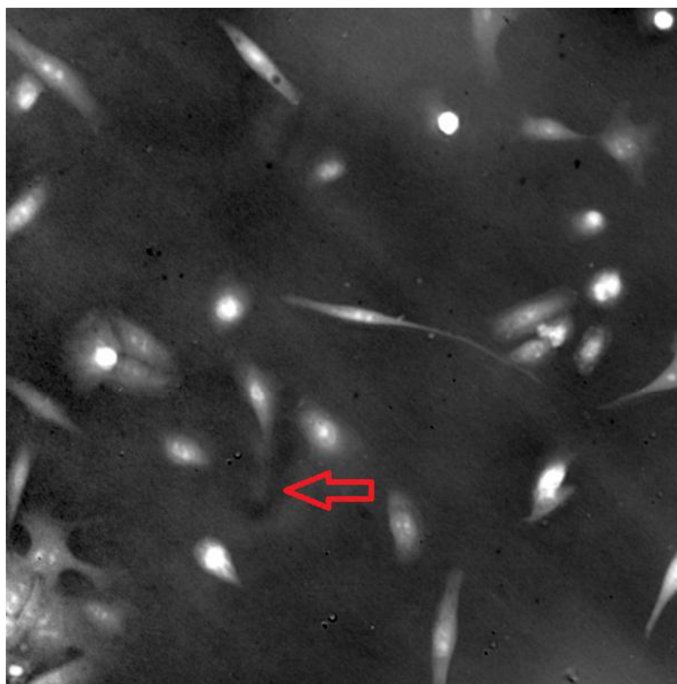
Druhé pozorování 24 trojic proběhlo krátce po výměně vadného děliče svazků. Bohužel tentokrát se projevil vliv nějaké opticky konjugované roviny s rovinou vzorku, obsahující nečistoty. Obraz navázané fáze obsahuje několik artefaktů opakujících se u každého holografického snímku. Sada snímku byla použita pro ověření vlivu nekorespondujících objektů ve snímcích na chod skládací procedury. Viz obrázek 41.



Obrázek 41: Obraz navázané fáze z druhého pozorování. Artefakty v obraze jsou způsobeny vlivem opticky konjugované roviny s rovinou vzorku obsahující nečistoty. Snímek je upraven expanzí kontrastu.

6.4.6 Třetí pozorování

Třetí pozorování 24 trojic proběhlo po úpravách na MHM. Vliv opticky konjugované roviny s rovinou vzorku obsahující nečistoty je mnohem slabší než během druhého pozorování. Holografické snímky vzniklé během tohoto pozorování jsou nejkvalitnější. Viz Obrázek 42.



Obrázek 42: Obraz navázané fáze z třetího pozorování. Artefakty v obraze jsou mnohem slabší než při druhém pozorování. Snímek je upraven expanzí kontrastu.

6.5 Zpracování obrazů

6.5.2 Vlastnosti obrazů

Program ovládající multimodální holografický mikroskop umožňuje export obrazů navázané fáze přímo ze snímaných hologramů. Snímky jsou 16 bitové a mají rozměr 604×604 pixelů. Fluorescenční snímky jsou rovněž 16 bitové a mají rozměr 1376×1038 pixelů. Fluorescenční snímky obsahují větší oblast vzorku než holografické snímky.

Holografický snímek

Obraz navázané fáze je tvořen amplitudovými a fázovými změnami předmětové vlny oproti referenční vlně. Tyto změny nastávají v důsledku průchodu předmětové vlny vzorkem. Vzorek tyto změny vyvolává, protože jeho části mají odlišný index lomu než jeho okolí [13]. Například buňky mají odlišný index lomu oproti prostředí, ve kterém se nachází. Hmota s odlišným indexem lomu se nachází v objemu buňky. Proto množství jasu holografického snímku je úměrné množství hmoty buňky v daném místě. Během mých pozorování bylo charakteristickým znakem buněk jejich rozložení hmoty znázorněné na obrázku 43.



Obrázek 43: Buňka přisedlá na sklíčku, jádro se nachází v nejtlustší oblasti Převzato z [1].

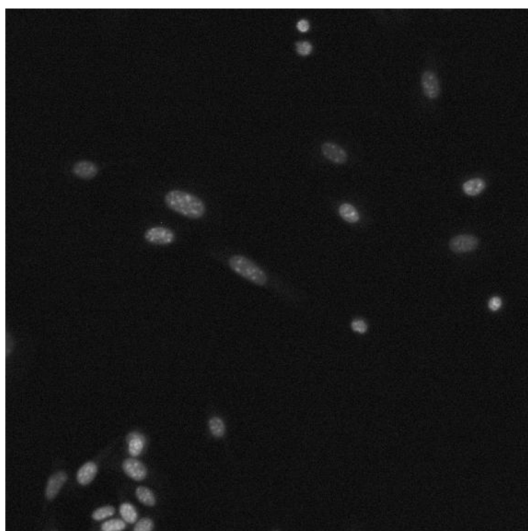
Buňky byly nejčastěji přisedlé ke sklíčku, jejich tloušťka pozvolna klesala od jádra směrem ke krajům. Kraje buňky se ztrácely v šumu a často byly části těchto krajů kompenzační metodou (během numerického zpracování hologramu) označeny za šum a odstraněny z obrazu. Profil buňky ve fázovém kontrastu je tedy takový, že je velmi jasný střed a jeho okolí a směrem od něj jas klesá, až se ztratí v šumu, viz Obrázek 44.



Obrázek 44: Jeden ze snímků pořízený v holografickém módu. Buňky v horní části snímku se velmi málo liší od pozadí a jejich okraje jsou nejasné.

Fluorescenční snímek s fluoroforem DAPI

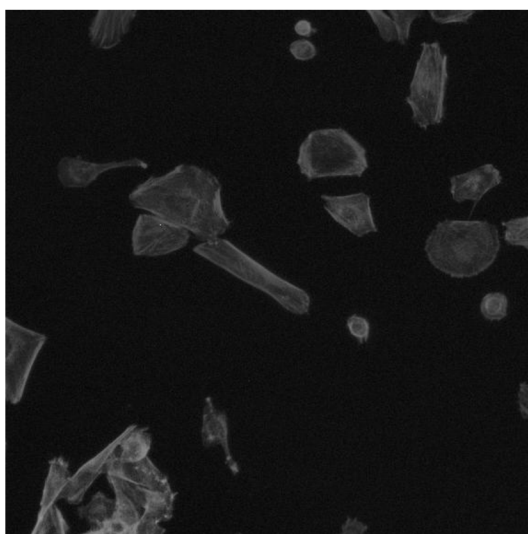
Fluorescenční snímek je v tomto případě tvořen emisním světlem fluoroforu DAPI. DAPI se váže na DNA, které se nachází v jádru buňky. Dostáváme snímek s jasně zářícími jádry buněk na slabém pozadí, viz obrázek 45.



Obrázek 45: Fluorescenční snímek DAPI. Jádra září velmi intenzivně se skokovým přechodem v jasů na okrajích jádra.

Fluorescenční snímek s fluoroforem Alexa Fluor

Fluorescenční snímek je v tomto případě tvořen emisním světlem fluoroforu Alexa Fluor. Alexa Fluor s phalloidinem se váže na cytoskelet buněk, ten se nachází při obvodu buňky. Dostáváme obraz s jasnými strukturami dobře ohraničujícími buňky, slabě zářícími vnitřky buněk a tmavým pozadím. Viz obrázek 46.



Obrázek 46: Fluorescenční snímek Alexa Fluor. Pozorujeme jasné struktury cytoskeletu, buňka je ostře ohraničena. Buňka jako celek září téměř konstantním jasnem, nejjasnější jsou okraje.

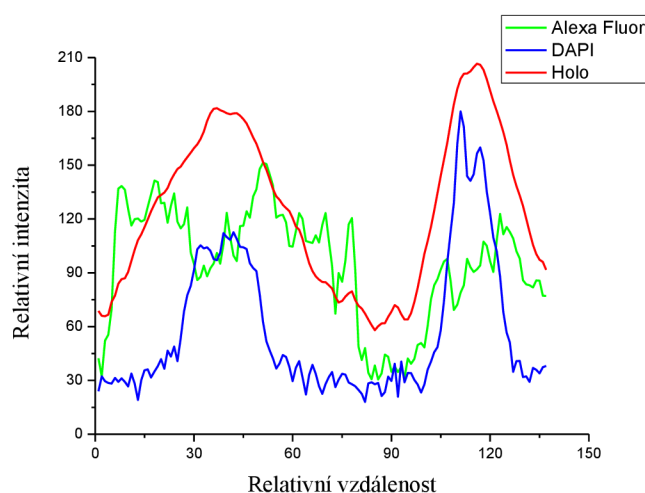
Vlastnosti snímků

Povaha holografických snímků je do jisté míry opačná oproti fluorescenčním snímkům Alexa Fluor. Zatímco holografické snímky mají jasný střed a jas klesá směrem ke krajům buňky, buňky ve fluorescenčních snímcích Alexa Fluor mají velmi jasné hranice a tmavší střed. Ostré přechody v intenzitě na hranicích buňky jaké lze vidět u fluorescenčního snímku, u

holografického zkrátka nenajdeme. Na druhou stranu pokud situaci zjednodušíme lze říci, že profil buňky je u fluorescenčního snímku plochý až prohnutý směrem k nižším hodnotám.

Fluorescenční snímek DAPI je podobný vůči holografickému snímku tím, že oba snímky dosahují vysokých hodnot jasu v oblasti jádra buňky, ale zatímco u fluorescenčního snímku DAPI dochází k rychlému propadu intenzity při vzdalování se od jádra, u holografického snímku je klesání intenzity velmi pozvolné.

Vše dobře ilustruje profily jasu podél totožné linie složených obrazů. Profil protíná fixovanou buňku.



Obrázek 47: Profil dvou buněk v kombinovaném snímku obsahující ve svých barevných kanálech: Holografický, fluorescenční DAPI a fluorescenční Alexa Fluor snímek. U Alexi Fluor je vidět, že nejjasnější jsou okraje a dojde k mírnému propadu jasu v oblasti jádra. U DAPI je vidět intenzivní jádro a tmavé okolí. Holografie znázorňuje tloušťku, proto jsou vrcholy široké a nestrmé.

Vzhledem k rozdílné povaze fluorescenčních obrazů při použití rozdílných barviv bylo přikročeno k vytvoření procedur s odlišným nastavením parametrů pro registraci obrazů: jedna sada parametrů pro holografický snímek a fluorescenční snímek DAPI, a druhá sada parametrů pro holografický snímek a fluorescenční snímek Alexa Fluor.

7 Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou uvedeny výsledky registrace holografických a fluorescenčních obrazů potkaních fibroblastů procedurou popsanou v kapitole 6.

7.1 Parametry metody fázové korelace

Aby bylo možné přizpůsobit proceduru k efektivní registraci obrazů snímaných multimodálním holografickým mikroskopem, bylo nutné prozkoumat vliv jejich nejdůležitějších parametrů na správnost a přesnost registrace:

7.1.1 Preprocessing

Největší měrou se na správném fungování registrace obrazu podílí preprocessing. Pro registraci obrazů neexistuje univerzální návod, jak obrazy zpracovat před aplikací metody fázové korelace. Byl testován globální thresholding obou obrazů s automaticky hledanou hranicí, detekce hran Prewittovou, Sobelovou, Robertsovou a Cannyho metodou či hledáním přechodu přes nulu. Tyto metody se ukázaly jako nepoužitelné kvůli charakteru holografického snímku. Fixované buňky v holografickém snímku nejsou ostře ohraničené, v podstatě se plynule vynořují z pozadí. Proto je nelze odprahovat či najít automatickou metodou jejich hranice. Bylo experimentováno s metodami expanze kontrastu integrovanými v prostředí MATLAB, konkrétně *imadjust* a *histeq* upravující kontrast obrazu globálně a *adapthisteq* upravující kontrast lokálně. Pro skládání fluorescenčního snímku DAPI a holografického snímku se ukázalo jako nejlepší použít pouze lineární škálování (viz kap. 5.3.2). Pro skládání fluorescenčního snímku Alexa Fluo a holografického snímku se osvědčilo lineární škálování následované adaptivní expanzí kontrastu integrovanou funkcí *adapthisteq* s defaultním nastavením.

7.1.2 Velikost poloměru okénkové funkce

Okénková funkce kromě toho, že odstraňuje negativní vliv okraje na Fourierovo spektrum obrazu, reguluje také množství informace obrazů použitých pro registraci obrazů. Míra podobnosti obou obrazů určuje intenzitu správného maxima, zatímco míra nepodobnosti určuje intenzitu falešných maxim [61].

Pro hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení fluorescenčního snímku DAPI a holografického snímku se ukázalo jako nejlepší použít okénkovou funkci ponechávající asi 65 % obrazu a mizející asi 15 % od okraje. Pro hledání vzájemného posuvu v rovině xy této dvojice poskytovala nejlepší výsledky okénková funkce ponechávající asi 85 % obrazu a dosahující nuly až téměř na okraji.

Pro hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení fluorescenčního snímku Alexa Fluor a holografického snímku se ukázalo jako nejlepší použít okénkovou funkci ponechávající asi 85 % obrazu a dosahující nuly až téměř na okraji. Pro hledání vzájemného posuvu v rovině xy této dvojice poskytovala nejlepší výsledky okénková funkce ponechávající asi 85 % obrazu a dosahující nuly až téměř na okraji.

7.1.3 Konstanty p, q v polo-normalizovaném cross-power spektru

Konstanty p, q ve jmenovateli polo-normalizovaného cross-power spektra (viz vzorec 17) zprostředkovávají přechod mezi křížovou a fázovou korelací (více v kap. 6) [53]. Jde o to nastavit tyto konstanty tak, aby došlo k potlačení falešných maxim a nebyla příliš ovlivněna přesnost rozšířením správného maxima. Jako první byly testovány konstanty v rozmezí $(0,01 - 0,1)$ krát maximální hodnota amplitudy Fourierova spektra obrazů.

Optimalizace ukázala jako nejvhodnější použít obě konstanty na $3 \cdot 10^{-5}$ krát maximální hodnoty amplitudy Fourierova spektra obrazů pro hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení u holografického snímku a fluorescenčního snímku DAPI i u holografického snímku a fluorescenčního snímku Alexa Fluor. Při hledání vzájemného posunutí holografického snímku a fluorescenčního snímku Alexa Fluor bylo dosaženo nejlepšího výsledku při velmi nízké hodnotě $p, q \rightarrow 0,0$, zatímco u holografického snímku a fluorescenčního snímku DAPI se jako nejvýhodnější ukázalo použít hodnoty p, q $6 \cdot 10^{-5}$ krát maximální hodnoty amplitudy Fourierova spektra obrazů.

7.1.4 Váhová funkce

Pro skládání neidentických objektů je naprosto zásadní použít váhovou funkci a hledat shodu obrazů pouze v určitém rozmezí prostorových frekvencí (více o váhové funkci v kapitole 6). Ukázalo se, že filtrování nejnižších frekvencí příliš neovlivňuje fázovou korelací, naproti tomu vysoké frekvence nesoucí šum a zejména odlišnosti struktur obou obrazů je nutné velmi razantně potlačit. Je zajímavé, že pro oba typy fluorescenčních snímků kombinovaných s holografickými, a to jak pro hledání poměru velikostí a pootočení, i hledání vzájemného

laterálního posuvu, se ukázala být nejvhodnější váhová funkce velmi podobných parametrů. Konkrétně s poloměrem asi 6 % poloměru obrazu polo-normalizovaného cross-power spektra, dosahující nuly ve 12 %.

7.1.5 Výpočet středu hmotnosti

Výpočet středu hmotnosti vrcholu obsahující maximum nalezené modifikovanou fázovou korelací má vliv na přesnost metody. Ukázalo se, že vhodným poloměrem kruhu obklopujícího maximum, ze kterého je počítán střed hmotnosti, je 10 pixelů.

7.2 Nastavení parametrů

Během tvorby procedury v prostředí MATLAB byly její parametry odhadnuty pomocí odborných článků, prací předchůdců či rad zkušenějších. V době, kdy procedura již fungovala, byla optimalizace parametrů prováděna na souboru obrazů pozvolnými změnami těchto parametrů a sledováním vlivu na správnost registrace a její přesnosti. Primárním ukazatelem kvality nastavení procedury necht' je procentuální úspěšnost registrace, tj. kolik procent dvojic obrazů je složeno správně. Správná registrace je taková, kdy procedura správně identifikuje vrchol obsahující maximum. Sekundárním ukazatelem kvality je přesnost, tzn., jak moc se liší hodnoty poměru velikostí, vzájemného pootočení a vektoru posunutí v rovině xy vypočítané procedurou od těch správných.

7.3 Výsledky optimalizované procedury

Pomocí optimálně nastavené procedury byly skládány dvojice obrazů.

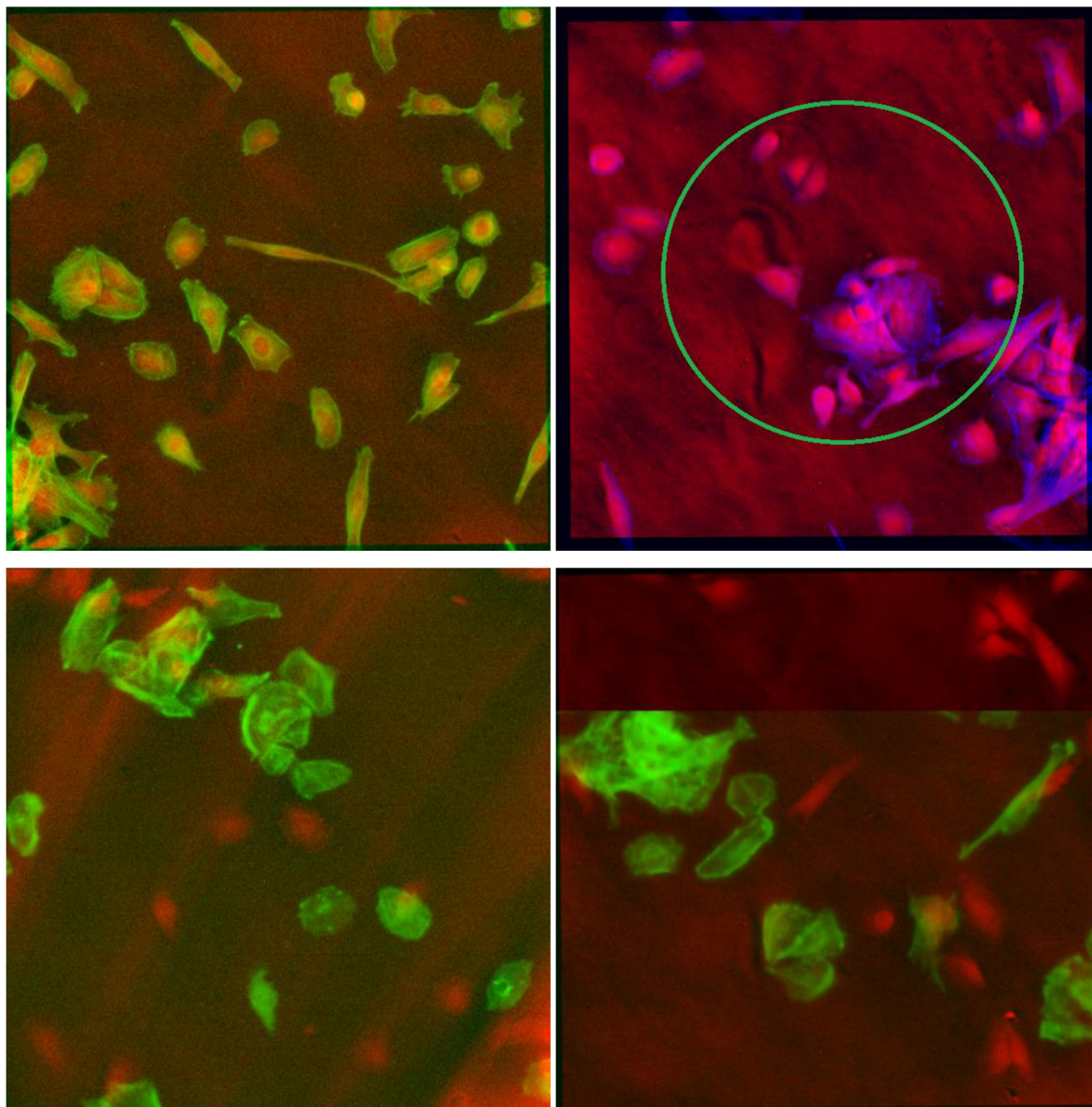
7.3.1 Kvalitativní analýza

Nejjednodušším ověřením správného složení je kvalitativní vizuální kontrola složeného snímku. Výsledky složení rozdělme do 4 kategorií (znázornění na obrázku 48):

1. Složení proběhlo správně, byl nalezen správný poměr velikostí, vzájemné pootočení i vzájemné posunutí v rovině xy . Obrazy na sobě dobře sedí.
2. Nebyl nalezen správný poměr velikostí a vzájemného pootočení, ale hodnota se blíží té správné. V tomto případě často dojde k tomu, že bude nalezena správná hodnota vzájemného posunutí v rovině xy . Obrazy na sobě dobře sedí v centrální oblasti, struktury se nepřekrývají na okrajích.

3. Byl nalezen správný poměr velikostí a vzájemné pootočení, ale nebyla nalezena správná hodnota vzájemného posunutí v rovině xy . Obrazy vůbec nesedí.

4. Nebyl nalezen správný poměr velikostí nebo vzájemné pootočení, některá z hodnot se liší od té správné výrazně. Pak nemůže dojít k nalezení správné hodnoty vzájemného posunutí v rovině xy . Obrazy vůbec nesedí.



Obrázek 48: Kategorie výsledků registrace: Obrázek vlevo nahoře spadá do 1. kategorie – správně složen. U obrázku vpravo nahoře byl poměr velikostí chybně určen, liší se o 3 %, ale vzájemný posun byl nalezen správně – 2. kategorie. Uvnitř oblasti ohraničené zelenou kružnicí se neprojevuje chybnost složení o víc než 2 pixely. U obrázku vlevo dole byla zjištěna správná hodnota vzájemného pootočení a rotace, ale byl nalezen chybný vektor posunutí – 3. kategorie. Obrázek vpravo dole je zcela chybně registrován.

7.3.2 Kvantitativní analýza

Hlubší analýzu výsledků dělím na 2 logické části.

Poměr velikostí a vzájemné pootočení

Pro určení přesnosti nalezeného poměru velikostí a vzájemného pootočení je třeba znát hodnotu správného poměru velikostí a vzájemného pootočení. Ta principiálně není známa. Proto byla nahrazena průměrem z hodnot poměru velikostí a vzájemného pootočení úspěšně složených snímků, viz tabulka 2. Bylo předpokládáno, že správná hodnota poměru velikostí a vzájemného pootočení dvojic obrazů pořízených během stejné sady pozorování je víceméně stejná. Během pozorování sice dochází k mírnému přestřování, ale ne k takovému, aby to mělo výraznější vliv na poměr velikostí a vzájemné pootočení.

Tabulka 2: Správné hodnoty poměru velikostí a vzájemného pootočení snímků.

DAPI	1. Sada	2. Sada	3. Sada	Alexa Fluor	1. Sada	2. Sada	3. Sada
Poměr velikostí	1,041	1,039	1,071	Poměr velikostí	1,039	1,040	1,068
Pootočení	0,715	0,559	0,542	Pootočení	0,441	0,334	0,346

Studium zpracovaných snímků ukázalo, že odchylka poměru velikostí 0,015, tj. 1,5 %, není pozorovatelná. U snímku s velikostí 604×604 pixelů to odpovídá u samého okraje snímku 5 pixelům. Stejně tak rozdíl pootočení o 1 stupeň není pozorovatelný. Tyto hodnoty necht' jsou maximálními odchylkami.

Hodnoty poměru velikostí a rotace spadající do intervalu daného průměrnou hodnotou a maximálními odchylkami jsou považovány za správné a výsledek procedury za úspěšný.

Pokud se hodnoty poměru velikostí a rotace těsně nevejdou do tohoto intervalu, nedojde k vytvoření dokonale se překrývajících snímků, nicméně nepřesnosti mohou být pozorovány někdy až na úplných krajích snímků. Záleží pak, k jakému účelu budou snímky použity. Někdy může stačit oříznout špatně sesazené okraje.

U výsledku, kdy se hodnota poměru velikostí nebo pootočení nevejde do intervalu správných hodnot jen těsně a dojde k nalezení správného vzájemného posunu, bude psáno, že byla procedura částečně úspěšná.

Vzájemný posun v rovině xy

Studium zpracovaných snímků ukázalo, že kvalita registrace obrazů se velmi odvíjí od nalezení správného vektoru posunutí. Vzhledem k povaze snímků je pozorovatelná odchylka již 3 pixely a to zejména proto, že se projeví v celém obraze v plné míře.

Byly pozorovány v podstatě jen dvě situace. Buď je nalezeno správné maximum a s ním i správná hodnota vzájemného posunu s přesností ± 1 pixel, nebo je identifikováno falešné maximum, a pak je vektor posunutí zcela zavádějící.

7.3.3 Výsledky automatické registrace obrazů

Výsledky automatické registrace obrazů shrnuje Tabulka 3. Pro jednotlivé výsledky registrace s nalezenými hodnotami poměru velikostí a vzájemného pootočení a informaci o úspěšném nalezení vektoru posunutí viz Přílohu B.

Tabulka 3: Úspěšnost registrace.

Barvivo	Sada Pozorování	Úspěšné složení		Částečně úspěšné složení		Neúspěšné složení	
		počet	podíl (%)	počet	podíl (%)	počet	podíl (%)
DAPI	1.	23	95,8 %	0	0 %	1	4,2 %
DAPI	2.	24	100 %	0	0 %	0	0 %
DAPI	3.	22	97,8 %	0	0 %	2	8,4 %
Průměr		23	95,8 %	0	0 %	1	4,2 %
Alexa Fluor	1.	11	45,8 %	1	4,2 %	12	50 %
Alexa Fluor	2.	12	50 %	3	12 %	9	38 %
Alexa Fluor	3.	12	50 %	1	4 %	11	46 %
Průměr		11,3	47 %	1,6	7,6 %	10,6	44,4 %

7.3.4 Diskuze výsledků automatické registrace obrazů

Holografický snímek a fluorescenční snímek DAPI

Procedura funguje velmi dobře při registraci holografických snímků a fluorescenčních snímků DAPI. Při hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení modifikovaná fázová korelace poskytuje obraz s výrazným vrcholem obsahující maximum. Při hledání vzájemného posunutí pozorujeme i další vrcholy, ale jsou slabé ve srovnání s tím, který obsahuje maximum.

Při registraci obrazů metodou fázové korelace je zřejmě nalezena dobrá shoda na prostorových frekvencích reprezentujících jádra buněk. U fluorescenčního snímku DAPI v podstatě nepozorujeme nic jiného než jádra a u holografického snímku jsou jádra nejjasnějšími strukturami nedeformovanými šumem ani kompenzační metodou při numerickém zpracování hologramů.

Holografický snímek a fluorescenční snímek Alexa Fluor

Při registraci holografických snímků a fluorescenčních snímků Alexa Fluor je úspěšnost zhruba 50:50. Při hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení modifikovaná fázová korelace poskytuje obraz se strukturou skládající se z několika prolnutých kruhových vrcholů, ty zpravidla obsahují pixel se správnou hodnotou poměru velikostí a vzájemného pootočení, ten ale obvykle není maximum. Vrcholy s vysokou intenzitou jasu se obvykle nacházejí také v oblasti odpovídající poměru velikostí 1:1 a nulové rotaci. Mimo to lze také najít vrcholy s vysokou intenzitou ve vyloženě nesmyslných oblastech.

Při hledání vzájemného posunutí je situace jiná, pozorujeme malý jasný vrchol obsahující maximum.

U kombinace holografického snímku a fluorescenčního snímku Alexa Fluor je tedy největším problémem nalezení poměru velikostí. Strukturu s více spojenými maximy lze vysvětlit na základě toho, že zatímco u DAPI lze pozorovat jen malé jasné struktury jader, které lze snadno spojit s jasnými strukturami jader v holografickém snímku a i relativně malé odchylky v poměru velikostí lze dobře pozorovat v poměrně značné části snímku. U holografického snímku a fluorescenčního snímku Alexa Fluor dochází k hledání shody dle jasné a ploché struktury cytoskeletu nejjasnější na okrajích buňky a mnohdy nejasné struktury fixovaných buněk s okraji ztrácejícími se v šumu. Nejjasnější struktury buněk pozorovaných v emisním světle Alexa Fluor se tedy nacházejí tam, kde se struktury buněk v holografickém snímku ztrácejí.

Procedura vcelku nemá problém sesadit struktury na sebe, to dokazuje vysoce úspěšné hledání vektoru vzájemného posunutí, má naopak problém se sesazením *správných částí* struktur na sebe. U složených snímků těchto dvou typů obrazů mnohdy lze poznat chybné určení poměru velikostí až na okrajích těchto snímků. Proto se zřejmě tvoří široká propojená jasná struktura v oblasti správné hodnoty zvětšení a automatická procedura má problém nalézt tu správnou hodnotu.

7.3.5 Procedura s možností zásahu uživatele

Hlavním nedostatkem procedury pro registraci obrazů je její neschopnost (u kombinace holografický snímek – fluorescenční snímek Alexa Fluor) rozlišit správný vrchol od falešných. To se projevuje nalezením chybných hodnot poměru velikostí a vzájemného pootočení při registraci. Optimalizací se tento jev podařilo potlačit jen z určité části. Dalšího zlepšení bylo dosaženo zabudováním interaktivních prvků do procedury.

Po proběhnutí procedury je uživateli nabídnut k nahlédnutí kombinovaný snímek. Pokud dobře neseďí, je možnost eliminovat falešný vrchol a jeho okolí a hledat druhé maximum. Dříve nebo později by tímto přístupem bylo nalezeno správné maximum, nicméně v rámci vynaloženého času bylo bráno v úvahu maximálně 5 opravných průběhů. Zatímco první průběh trvá cca 2 minuty, opravný trvá asi 20-30 vteřin.

7.3.6 Výsledky registrace obrazů s možností zásahu uživatele

Výsledky registrace obrazů s možností zásahu uživatele shrnuje Tabulka 4. Pro jednotlivé výsledky registrace s nalezenými hodnotami poměru velikostí a vzájemného pootočení a informaci o úspěšném nalezení vektoru posunutí, viz Příloha B.

Tabulka 4: Úspěšnost registrace obrazů

Barvivo	Sada Pozorování	Úspěšné složení		Částečně úspěšné složení		Neúspěšné složení	
		počet	podíl (%)	počet	podíl (%)	počet	podíl (%)
DAPI	1.	23	95,8 %	0	0 %	1	4,2 %
DAPI	2.	24	100 %	0	0 %	0	0 %
DAPI	3.	22	97,8 %	0	0 %	2	8,4 %
Průměr		23	95,8 %	0	0 %	1	4,2 %
Alexa Fluor	1.	18	75 %	3	12,5 %	3	12,5 %
Alexa Fluor	2.	15	62,5 %	3	12,5 %	6	25 %
Alexa Fluor	3.	17	70,8 %	4	16,7 %	3	12,5 %
Průměr		16,7	69,4 %	3,3	14 %	10,6	16,6 %

7.3.7 Diskuze výsledků registrace obrazů s možností zásahu uživatele

Holografický snímek a fluorescenční snímek DAPI

Výsledky registrace obrazů holografických snímků a fluorescenčních snímků DAPI nebyly ovlivněny možností eliminace falešných maxim. Pokud nedojde k úspěšnému složení, pak je maximum skryté v husté síti falešných maxim či úplně chybí.

Holografický snímek a fluorescenční snímek Alexa Fluor

Úspěšnost nalezení správného poměru velikostí a vzájemného pootočení se zvýšila průměrně o 20 %. Také se zvýšila průměrná šance na nalezení částečně úspěšného řešení o 7 %. Eliminace falešného maxima zejména pomáhá při existenci dvou silných maxim či jednoho protáhlého. Téměř 17 % špatných složení je výsledkem zobrazení modifikované fázové

korelace obsahující hustou síť falešných maxim, ať už při hledání poměru velikostí a vzájemného pootočení či vektoru vzájemného posunutí.

Pokud je modifikovaná fázová korelace plná vrcholů s falešnými maximy (více než 10) je úspěšná registrace obrazů nemožná. Tento jev nastává, pokud množství nepodobností značně převládne nad podobností obrazů na frekvencích, na kterých hledáme shodu. V tomto případě někdy pomůže změna velikosti okénkové funkce nebo tvar váhové funkce.

7.4 Možné úplné řešení nesprávné registrace

Hromadné zpracování

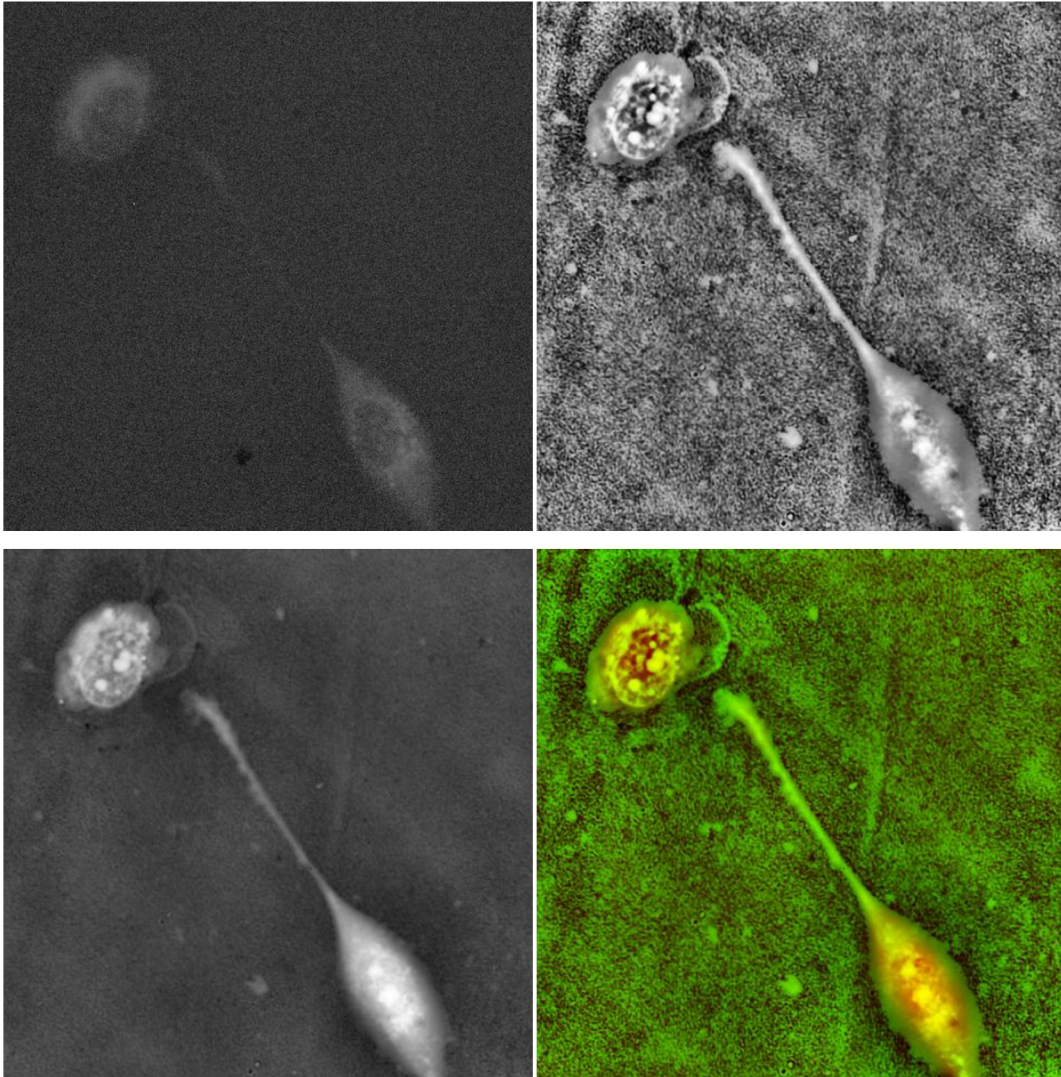
Při pořízení více jak 20 dvojic snímků různých zorných polí vzorku lze použít některé statistické prvky k registraci obrazů. Nejdříve je nalezen poměr velikostí a vzájemné pootočení každé dvojice snímků procedurou. Odstraní se hodnoty nejvíce vzdálené průměrné hodnotě. Spočítá se histogram a jsou vybrány vrcholy s největší četností hodnot. Hodnoty odpovídající středům intervalů vrcholů jsou použity jako hranice. Z pěti hodnot vyšších než je hranice (nejbližších hodnot) a z pěti nižších je spočítán průměr. Hodnoty těchto průměrů jsou nabídnuty uživateli (obvykle jich není více než 3), kontrolně se složí jeden náhodný snímek a pokud kombinovaný snímek sedí, sesadí se všechny. Tato metoda zcela řeší problém špatného poměru velikostí a vzájemné rotace, ale lze ji použít jen za výše uvedených podmínek.

Nabarvení vzorku více barvivy

Při pozorování biologických vzorků se často barví několika fluorescenčními barvivy. Barvivo DAPI se používá v kombinacích s dalšími barvivy velmi často. Použití data registrace obrazů holografického snímku s fluorescenčním snímkem DAPI i pro registraci holografického snímku a fluorescenčního snímku Alexa Fluor se přímo nabízí.

7.5 Použití procedury pro registraci obrazů živých buněk

Procedura byla využita také pro studium živých rakovinných buněk. Fluorescenční barvivo se aplikovalo na buňky v průběhu experimentu a mělo detekovat apoptickou reakci buněk na studovanou látku (programovaná buněčná smrt). Procedura zatím není optimalizována pro pozorování živých buněk, nicméně s použitím eliminace falešných maxim bylo dosaženo úspěšných registrací (viz obrázek 49).



Obrázek 49: Horní řada: Fluorescenční snímky živých buněk. U prvního snímku je jen slabě zvýšený kontrast, u druhého již masivně. Dolní řada: Holografický snímek živé buňky a kombinovaný snímek.

Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá fluorescenční a holografickou mikroskopií v multimodálním holografickém mikroskopu a registrací obrazů snímků z obou těchto technik. V úvodu této práce jsem provedl důkladnou rešerši holografické mikroskopie vedoucí až k sestavení multimodálního holografického mikroskopu. S tímto mikroskopem jsem se seznámil a pomocí něj jsem pozoroval fixovaný vzorek obsahující buňky potkaních fibroblastů nabarvený fluorescenčními barvivy DAPI a Alexa Fluor. Pozorování probíhalo v transmisním holografickém módu a v epi-fluorescenčním módu. Každý mód je snímán vlastní kamerou. Při pozorování stejného místa vzorku oběma módy dostáváme snímky, které jsou vůči sobě v určitém poměru velikostí a jsou vůči sobě pootočené a laterálně posunuté. To znemožňuje získat kombinovanou informaci o pozorovaném objektu. Bylo tedy nutné tyto snímky sesadit, provést registraci obrazů.

Z tohoto důvodu byl sestaven algoritmus pro registraci obrazů metodou modifikované fázové korelace, který byl implementován do programovacího prostředí MATLAB. Od začátku byl kladen důraz na automatizaci veškerých procesů, a to z důvodu pozdější integrace do softwaru multimodálního mikroskopu. Byl prozkoumán vliv nejdůležitějších parametrů této procedury na úspěšnost a přesnost registrace. Byla provedena optimalizace těchto parametrů pro registraci snímků získaných z pozorování fixovaného vzorku obsahujícího buňky potkaních fibroblastů nabarvený fluorescenčními barvivy DAPI a Alexa Fluor.

Snímání obrazů rozdílnými technikami zaznamenávající různé fyzikální veličiny úkol registrace dále komplikují. Literatura obvykle uvádí registraci obrazů pořízených stejnou technikou, obrazů velmi podobných, lišících se pouze šumem či vzájemnou polohou. Slícování obrazů bylo řešeno použitím jen úzkého intervalu prostorových frekvencí obrazů. Toto řešení fungovalo pouze částečně.

Procedura dosahuje velmi dobrých výsledků, konkrétně 96 % úspěšnosti při registraci obrazů holografických snímků a fluorescenčních snímků DAPI. K dobré shodě a snadné registraci dochází z důvodu vazeb barviva DAPI na jádra buněk, které poté jasně září na tmavém pozadí, ty jsou srovnávány s holografickými snímky, které také mají nejjasnější místa v oblastech jader. Při registraci holografických snímků a fluorescenčních snímků Alexa Fluor je dosahováno úspěšnosti necelých 50 %. Ve fluorescenčních snímcích Alexa Fluor jsou nejjasnějšími oblastmi okraje buněk, oproti tomu u holografických snímků jsou okraje buněk ztraceny v šumu. To je pravděpodobně jedním z důvodů, proč má procedura při skládání obou

snímků velké problémy nalézt vzájemný poměr velikostí. Pro zvýšení úspěšnosti procedury bylo rozsáhle experimentováno s preprocesingem snímků, ale ten měl spíše negativní vliv.

Při upuštění konceptu úplné automatizace byla do procedury vložena možnost jednoduché zpětné vazby od uživatele k proceduře. Úspěšnost složení holografických snímků se snímkem Alexa Fluor vzrostla na 70 %. Další skupinu snímků, zhruba 14 % případů, lze označit za částečně sesazené, když je dobře sesazeno zhruba 50 % plochy snímků kolem jejich středů. Naprogramována byla také možnost statistického zpracování, ta zcela řeší špatně určený poměr velikostí, ale lze ji použít pouze v případě série 20 a více snímků. Procedura byla také použita při studiu rakovinných buněk, a přestože na tento typ buněk nebyla optimalizována, dosahovala uspokojivých výsledků.

Při dalším vývoji by měla být procedura převedena do přívětivějšího, pokud možno grafického prostředí. Také by mělo být upuštěno od konceptu automatizace, protože při vhodné volbě parametrů kvalifikovaným operátorem a práci se zobrazením fázové korelace obsahující maxima s významem poměru velikostí, vzájemného pootočení a vzájemného laterálního posuvu, lze registrovat téměř každou dvojici snímků.

Literatura

- [1] POPESCU, Gabriel. *Quantitative phase imaging of cells and tissues*. New York: McGraw-Hill, 2011, 362 s. McGraw-Hill biophotonics. ISBN 00-716-6342-8.
- [2] KUBITSCHECK, Ulrich *et al.* *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. Weinheim (Německo): Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-3-527-32922-9.
- [3] POPESCU, Gabriel *et al.* Diffraction phase and fluorescence microscopy. *Optics Express*. 2006, vol. 14, issue 18, s. 8263-8268. DOI: 10.1364/OE.14.008263.
- [4] DI BARTOLO, Baldassare a John COLLINS. Principles of Photoluminescence. MCHALE, Jeanne L. a Leah BERGMAN. *Handbook of Luminescent Semiconductor Materials*. Hoboken: CRC Press, 2011, s. 1-21. ISBN 9781439834800.
- [5] MONDAL, Partha Pratim a Alberto DIASPRO. *Fundamentals of fluorescence microscopy: exploring life with light*. 1st edition. Dordrecht: Springer, 2014. ISBN 978-940-0775-442.
- [6] VALEUR, Bernard *et al.* *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim (Německo): Wiley-VCH, 2012. ISBN 978-352-7328-376.
- [7] HAUGLAND, Richard P., Michelle T. SPENCE a Iain D. JOHNSON. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6th ed. Oregon, USA: Molecular Probes, 1996, 680 s. ISBN 09-652-2400-7.
- [8] Microscopyu: the source for microscopy education. *Nikon* [online]. 2000 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [9] GABOR, Dennis. A New Microscopic Principle. *Nature*. 1948, vol. 161, issue 4098, s. 777-778. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/161777a0>.
- [10] LEITH, Emmett N. a Juris UPATNIEKS. Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. *Journal of the Optical Society of America*. 1962, Vol. 52, Issue 10, s. 1123-1128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/JOSA.52.001123>.
- [11] LEITH, Emmett N. a Juris UPATNIEKS. Wavefront Reconstruction with Continuous-Tone Objects. *Journal of the Optical Society of America*. 1963, vol. 53, issue 12, s. 1377-1381. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/josa.53.001377>.

- [12] SCHNARS, Ulf a Werner JUEPTNER. *Digital holography: digital hologram recording, numerical reconstruction, and related techniques*. Berlin: Springer, 2005, 164 s. ISBN 35-402-1934-X.
- [13] CHMELÍK, Radim. *Koherenci řízená holografická mikroskopie: Coherence-controlled holographic microscopy : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika*. Brno: VUTUM, 2011, 23 s. ISBN 978-80-214-4336-5.
- [14] CUCHE, Etienne, Frédéric BEVILACQUA a Christian DEPEURSINGE. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics Letters*. 1999, vol. 24, issue 5, s. 291-293. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/ol.24.000291>.
- [15] CUCHE, Etienne, Pierre MARQUET a Christian DEPEURSINGE. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Applied Optics*. 1999, vol. 38, issue 34, s. 6994-7001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/ao.38.006994>.
- [16] KOU, Shan S. a Colin J. SHEPPARD. Imaging in digital holographic microscopy. *Optics Express*. 2007, vol. 15, issue 21, s. 13640-13648. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/oe.15.013640>.
- [17] KEMPER, Björn et al. Techniques and applications of digital holographic microscopy for life cell imaging. *SPIE: Biophotonics*. 2007, roč. 6633, 66330D. DOI: doi:10.1117/12.728262.
- [18] JEONG, Kwan, John J. TUREK a David D. NOLTE. Fourier-domain digital holographic optical coherence imaging of living tissue. *Applied Optics*. 2007, vol. 46, issue 22, s. 4999-5008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/ao.46.004999>.
- [19] DUNN, Graham A. a Daniel ZICHA. Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1993, č. 47, s. 91-106.
- [20] KIM, Myung K. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews*. 2010, Volume 1, Issue 1, s. 51. DOI: 10.1117/6.0000006.
- [21] MICO, Vicente, Zeev ZALEVSKY a Javier GARCÍA. Common-path phase-shifting digital holographic microscopy: A way to quantitative phase imaging and superresolution. *Optics Communications*. 2008, vol. 281, issue 17, s. 4273-4281. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.optcom.2008.04.079>.

- [22] YAMAGUCHI, Ichirou, Jun-ichi KATO, Sohgo OHTA a Jun MIZUNO. Image Formation in Phase-Shifting Digital Holography and Applications to Microscopy. *Applied Optics*. 2001, vol. 40, issue 34, 6177–6186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/ao.40.006177>.
- [23] COLOMB, Tristan. Enhancing the performance of digital holographic microscopy. *SPIE Newsroom*. 2007. DOI: 10.1117/2.1200709.0872.
- [24] LEITH, Emmett N. a Juris UPATNIEKS. Holography with Achromatic-Fringe Systems. *Journal of the Optical Society of America*. 1967, vol. 57, issue 8, s. 975-979. DOI: <http://dx.doi.org/10.1887/0750309121/b1394b4>.
- [25] TÝČ, Matěj et al. Numerical refocusing in digital holographic microscopy with extended-sources illumination. *Optics Express*. 2013, vol. 21, issue 23, s. 28258-28271. DOI: 10.1364/OE.21.028258.
- [26] CHMELÍK, Radim a Zdeněk HARNA. Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 1999, vol. 38, issue 10, s. 1635-1639. DOI: 10.1117/1.602217.
- [27] CHMELÍK, Radim a Zdeněk HARNA. Surface profilometry by a parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 2002, vol. 41, issue 4, s. 744-745. DOI: 10.1117/1.1461832.
- [28] MACHÁLEK, Marek. *Zobrazení biologických vzorku v holografickém konfokálním mikroskopu*. Brno, 2001. Diplomová práce. VUT Brno, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [29] LOVICAR, Luděk, Lukáš KVASNICA a Radim CHMELÍK. Surface observation and measurement by means of digital holographic microscope with arbitrary degree of coherence. *16th Polish-Slovak-Czech Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1117/12.822410>.
- [30] KOLMAN, Pavel a Radim CHMELÍK. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, vol. 18, issue 21, s. 21990-22003. DOI: 10.1364/OE.18.021990.
- [31] LOŠŤÁK, Martin et al. Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, vol. 7746, 9 s. DOI: 10.1117/12.882198.
- [32] KOLMAN, Pavel et al. In vitro dynamic observations in a low-coherence holographic microscope. *15th Czech-Polish-Slovak Conference on Wave and Quantum Aspects of*

- Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2007, Vol. 6609, 7 s. DOI: 10.1117/12.739502.
- [33] JANEČKOVÁ, Hana *et al.* Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination. *Optical and Digital Image Processing*. Proceedings of the SPIE, 2008, 70002E, 8 s. DOI: 10.1117/12.800392.
- [34] ANTOŠ, Martin *et al.* System for coherence-controlled holographic microscopy of living cells. *18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2012, č. 8697, 12 s. DOI: 10.1117/12.2001495.
- [35] JANEČKOVÁ, Hana, Pavel VESELÝ a Radim CHMELÍK. Proving Tumour Cells by Acute Nutritional/Energy Deprivation as a Survival Threat: A Task for Microscopy. *Anticancer research*. 2009, č. 29, s. 2339-2346.
- [36] SLABÝ, Tomáš *et al.* Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21, issue 12, s. 14747-14762. DOI: 10.1364/OE.21.014747.
- [37] SLABÝ, Tomáš *et al.* Coherence-controlled holographic microscope. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, č. 7746, 8 s. DOI: 10.1117/12.882048.
- [38] HENZLOVÁ, Michala *et al.* Theoretical study of coherence-controlled holographic microscopy in the presence of scattering media. *18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2012, č. 8697, 13 s. DOI: 10.1117/12.2012361.
- [39] LOŠT'ÁK, Martin *et al.* Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express*. 2014, vol. 22, issue 4, s. 4180-4195. DOI: 10.1364/OE.22.004180.
- [40] PAVILLON, Nicolas *et al.* Cell morphology and intracellular ionic homeostasis explored with a multimodal approach combining epifluorescence and digital holographic microscopy. *Journal of Biophotonics*. 2010, vol. 3, issue 7, s. 432-436. DOI: 10.1002/jbio.201000018.
- [41] YU, Xiao, Changgeng LIU a Myung K. KIM. Four dimensional motility tracking of biological cells by digital holographic microscopy. *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*. Washington, D.C.: OSA, 2013, DM4A-6, 2 s. DOI: 10.1364/DH.2013.DM4A.6.

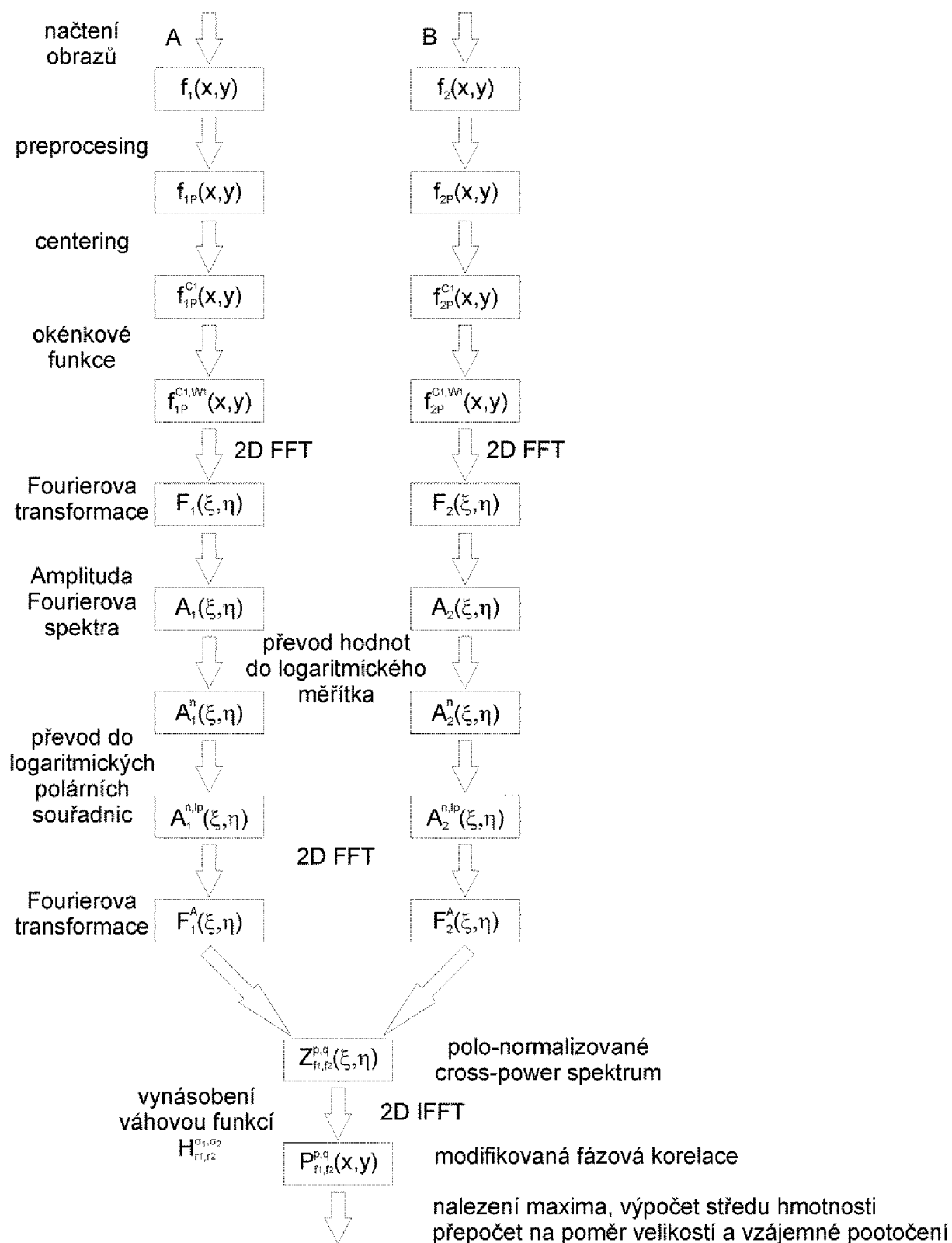
- [42] KREIS, Thomas. Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. *Journal of the Optical Society of America A*. 1986, vol. 3, issue 6, s. 847-855. DOI: 10.1364/JOSAA.3.000847.
- [43] ZIKMUND, Tomáš et al. Dynamical deformation compensation of phase in digital holographic microscopy. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, č. 7746, 7 s. DOI: 10.1117/12.882171.
- [44] BURGER, Wilhelm a Mark J. BURGE. *Principles of digital image processing: fundamental techniques*. London: Springer, 2009, 260 s. ISBN 978-1-84800-190-9.
- [45] MCANDREW, Alasdair. *An introduction to digital image processing with MATLAB*. 1st ed. Belmont: Brooks/Cole, 2004, 260 s. ISBN 05-344-0011-6.
- [46] GONZALEZ, Rafael C, Richard E WOODS a Steven L EDDINS. *Digital Image processing using MATLAB*. 2nd ed. Natick: Gatesmark Publishing, 2009, 826 s. ISBN 978-0-9820854-0-0.
- [47] ZITOVÁ, Barbara a Jan FLUSSER. Image registration methods: a survey. *Image and Vision Computing*. 2003, vol. 21, issue 11, s. 977-1000. DOI: 10.1016/S0262-8856(03)00137-9.
- [48] REDDY, B.S. a B.N. CHATTERJI. An FFT-based technique for translation, rotation, and scale-invariant image registration. *IEEE Transactions on Image Processing*. 1996, vol. 5, issue 8, s. 1266-1271. DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/83.506761>.
- [49] DRUCKMÜLLER, M. Phase correlation method for the alignment of total solar eclipse images. *The Astrophysical Journal*. 2009, vol. 706, issue 2, s. 1605-1608. DOI: 10.1088/0004-637X/706/2/1605.
- [50] OJANSIVU, Ville a Janne HEIKKILA. Image Registration Using Blur-Invariant Phase Correlation. *IEEE Signal Processing Letters*. 2007, vol. 14, issue 7, s. 449-452. DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/lsp.2006.891338>.
- [51] KELLER, Y. a A. AVERBUCH. A projection-based extension to phase correlation image alignment. *Signal Processing*. 2007, vol. 87, issue 1, s. 124-133. DOI: 10.1016/j.sigpro.2006.04.013.

- [52] BRIGGS, William L. a Van Emden HENSON. *The DFT: an owner's manual for the discrete Fourier transform*. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1995, xv, 434 p. ISBN 08-987-1342-0.
- [53] DRUCKMÜLLEROVÁ, Hana. *Registrace obrazů pomocí fázové korelace*. Brno, 2009/2010. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=27760. Diplomová práce. VUT, Fakulta strojního inženýrství, Ústav matematiky. Vedoucí práce Mgr. Jana Procházková, Ph.D.
- [54] KARAS, Pavel. *Studium metod registrace obrazu*. Brno, 2009. 86 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Filip Hroch, Ph.D.
- [55] *Mathworks: Matlab* [online]. 1994 [cit. 2014-05-29]. Dostupné z: <http://www.mathworks.com/products/matlab/>
- [56] SARVAIYA, Jignesh, Suprava PATNAIK a Kajal KOTHARI. Image Registration Using Log Polar Transform and Phase Correlation to Recover Higher Scale. *Journal of Pattern Recognition Research*. 2012, vol. 7, issue 1, s. 90-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.13176/11.355>.
- [57] LE MOIGNE, J. et al First evaluation of automatic image registration methods. *IEEE*. 1998, vol. 1, s. 315-317. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198528418>.
- [58] Piercenet: DAPI Nuclear Counterstain. *Piercenet* [online]. 2014 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/dapi-nuclear-counterstain>
- [59] Lifetechnologies: DAPI. *Lifetechnologies* [online]. 2014 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D1306>
- [60] *BD Biosciences* [online]. 2014 [cit. 2014-05-29]. Dostupné z: <http://www.bdbiosciences.com/eu/index.jsp>
- [61] FOROOSH, H., J. B. ZERUBIA a M. BERTHOD. Extension of phase correlation to subpixel registration. *IEEE Transactions on Image Processing*. 2002, vol. 11, issue 3, s. 188-200. DOI: 10.1109/83.988953.

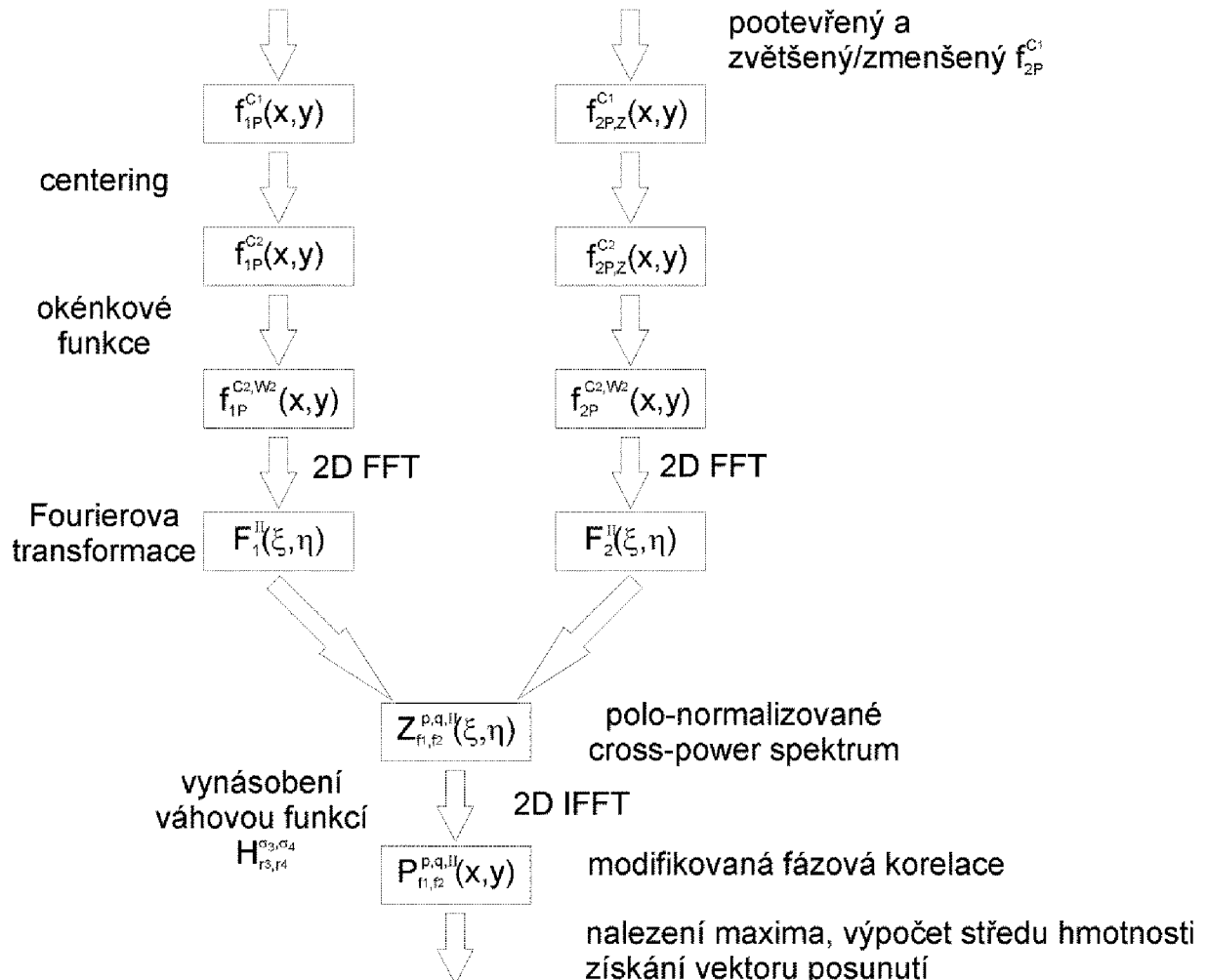
Příloha A

Grafické znázornění první části algoritmu pro registraci obrazů (detailněji v kapitole 5).

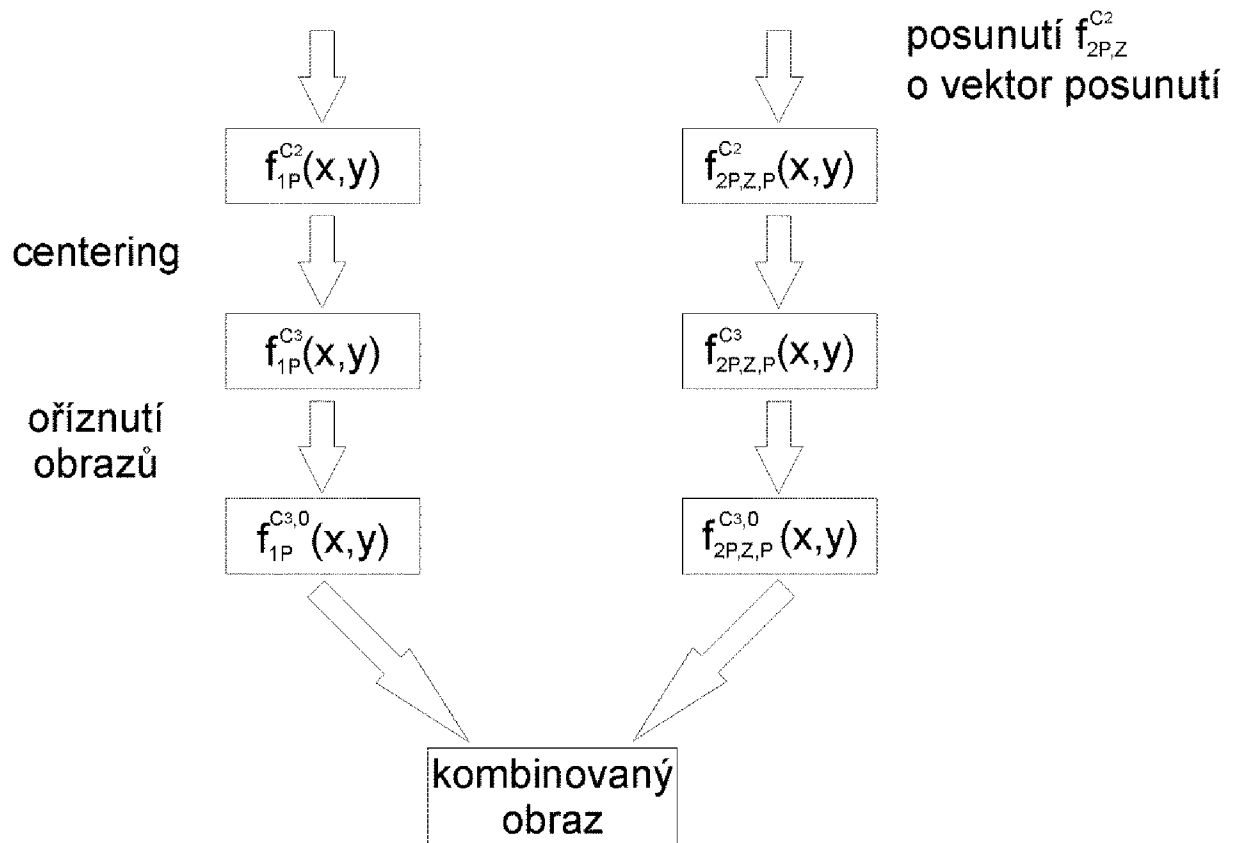
V této části algoritmu dojde k nalezení poměru velikostí a vzájemného pootočení mezi obrazy.



Grafické znázornění druhé části algoritmu pro registraci obrazů (detailněji v kapitole 5). Jeden z obrazů je potočen a zvětšen/zmenšen a je dále použit společně s druhým nezměněným k nalezení vektoru vzájemného posunutí.



Grafické znázornění třetí části algoritmu pro registraci obrazů (detailněji v kapitole 5). Pootočený a zvětšený/zmenšený obraz je posunutý o nalezený vektor posunutí, dojde ještě k několika dalším úpravám a následuje export obou obrazů, které na sobě přesně sedí. Kombinovaný snímek je tvořený 2 barevnými RGB kanály, jeden kanál je zaplněn holografickým snímkem, druhý fluorescenčním.



Příloha B

Tabulka 5: Výsledky automatické registrace holografických snímků a fluorescenčních snímků DAPI navrženou procedurou. Červeně je značena neúspěšná registrace, bíle úspěšná.

DAPI	1. Sada			2. Sada			3. Sada		
	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun
1	1,0270	63,1257	N	1,0452	0,5238	A	1,0704	0,7865	A
2	1,0411	0,5136	A	1,0383	0,5136	A	1,0742	0,7033	A
3	1,0419	0,7160	A	1,042	0,5284	A	1,0781	0,6181	A
4	1,0315	0,4381	A	1,0422	0,5308	A	1,0694	0,6067	A
5	1,0409	0,9741	A	1,0414	0,6899	A	1,0664	0,6097	A
6	1,0417	0,8842	A	1,041	0,5255	A	1,0671	0,5344	A
7	1,0413	0,7840	A	1,0488	0,5230	A	1,0742	0,5193	A
8	1,0490	0,6936	A	1,0447	0,5172	A	1,0696	0,3344	A
9	1,0381	0,6112	A	1,0378	0,5296	A	1,0704	0,2606	A
10	1,0237	0,1704	A	1,0411	0,6205	A	1,0701	0,5226	A
11	1,0461	0,8023	A	1,0345	0,4253	A	1,0738	0,5175	A
12	1,0426	0,6073	A	1,0378	0,6228	A	0,9218	0,0139	N
13	1,0380	0,8017	A	1,0376	0,6078	A	1,0737	0,7956	A
14	1,0451	0,6233	A	1,0450	0,6125	A	1,0744	0,6272	A
15	1,0416	0,7888	A	1,0347	0,4208	A	1,0699	0,8011	A
16	1,0412	0,4302	A	1,0342	0,536	A	1,0709	0,3444	A
17	1,0455	0,7835	A	1,0386	0,7889	A	1,0741	0,2640	A
18	1,0374	1,3342	A	1,0388	0,6194	A	1,0704	0,5373	A
19	1,0489	0,7068	A	1,0417	0,6016	A	1,0662	0,5147	A
20	1,0411	0,7014	A	1,0384	0,4438	A	1,0778	0,7039	A
21	1,0451	0,8076	A	1,0348	0,7055	A	1,0735	0,4435	A
22	1,0414	0,698	A	1,0412	0,5135	A	0,8815	0,2500	N
23	1,0384	0,8007	A	1,0376	0,5227	A	1,0626	0,4333	A
24	1,0415	0,9756	A	1,0416	0,5183	A	1,0701	0,4384	A

Tabulka 6: Výsledky automatické registrace holografických snímků a fluorescenčních snímků Alexa Fluor navrženou procedurou. Červeně je značena neúspěšná registrace, bíle úspěšná, zeleně částečně úspěšná.

Alexa Fluor	1. Sada			2. Sada			3. Sada		
	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun
1	1,041	0,910	A	1,041	0,261	A	1,071	0,270	A
2	0,990	0,230	A	1,038	0,442	A	1,040	0,090	A
3	1,042	0,180	A	1,049	0,178	A	0,980	-0,010	A
4	1,002	0,155	A	1,023	0,269	A	1,073	0,530	A
5	1,003	3,320	A	1,355	-73,375	A	1,053	0,330	A
6	0,997	1,850	A	1,007	0,081	A	1,006	-0,240	A
7	1,046	0,710	A	1,023	2,303	A	1,020	0,170	A
8	1,062	0,610	A	1,053	0,441	A	1,041	0,170	A
9	1,009	0,350	A	0,990	0,255	A	0,990	0,166	A
10	1,003	0,168	A	1,006	0,157	A	1,067	0,530	A
11	1,045	0,420	A	1,032	0,090	A	1,064	0,250	A
12	1,440	0,082	A	1,042	0,621	A	1,056	0,340	N
13	1,049	0,610	A	1,038	0,536	A	1,075	0,600	A
14	1,005	-0,107	A	0,990	-0,147	A	1,057	-0,370	A
15	1,013	0,085	A	1,045	0,325	A	1,071	0,350	A
16	1,024	0,092	A	1,025	0,095	A	1,074	0,610	A
17	1,027	0,090	A	0,999	20,201	A	0,990	-0,070	A
18	1,035	0,700	A	1,028	-1,961	A	1,084	0,430	A
19	1,010	-0,001	A	0,998	0,178	N	1,093	-0,010	A
20	1,035	0,620	A	1,020	0,427	A	0,990	0,020	A
21	1,042	0,010	A	1,031	0,356	A	0,997	-0,007	A
22	0,993	0,070	N	1,048	0,367	A	0,999	0,350	A
23	1,003	0,181	A	0,993	0,354	A	1,063	-0,160	A
24	1,028	0,165	A	1,016	0,173	A	1,052	0,240	A

Tabulka 7: Výsledky registrace s možností zásahu uživatele holografických snímků a fluorescenčních snímků DAPI navrženou procedurou. Červeně je značena neúspěšná registrace, bíle úspěšná.

DAPI	1. Sada			2. Sada			3. Sada		
	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun
1	1,0270	63,1257	N	1,0452	0,5238	A	1,0704	0,7865	A
2	1,0411	0,5136	A	1,0383	0,5136	A	1,0742	0,7033	A
3	1,0419	0,7160	A	1,042	0,5284	A	1,0781	0,6181	A
4	1,0315	0,4381	A	1,0422	0,5308	A	1,0694	0,6067	A
5	1,0409	0,9741	A	1,0414	0,6899	A	1,0664	0,6097	A
6	1,0417	0,8842	A	1,041	0,5255	A	1,0671	0,5344	A
7	1,0413	0,7840	A	1,0488	0,5230	A	1,0742	0,5193	A
8	1,0490	0,6936	A	1,0447	0,5172	A	1,0696	0,3344	A
9	1,0381	0,6112	A	1,0378	0,5296	A	1,0704	0,2606	A
10	1,0237	0,1704	A	1,0411	0,6205	A	1,0701	0,5226	A
11	1,0461	0,8023	A	1,0345	0,4253	A	1,0738	0,5175	A
12	1,0426	0,6073	A	1,0378	0,6228	A	0,9218	0,0139	N
13	1,0380	0,8017	A	1,0376	0,6078	A	1,0737	0,7956	A
14	1,0451	0,6233	A	1,0450	0,6125	A	1,0744	0,6272	A
15	1,0416	0,7888	A	1,0347	0,4208	A	1,0699	0,8011	A
16	1,0412	0,4302	A	1,0342	0,536	A	1,0709	0,3444	A
17	1,0455	0,7835	A	1,0386	0,7889	A	1,0741	0,2640	A
18	1,0374	1,3342	A	1,0388	0,6194	A	1,0704	0,5373	A
19	1,0489	0,7068	A	1,0417	0,6016	A	1,0662	0,5147	A
20	1,0411	0,7014	A	1,0384	0,4438	A	1,0778	0,7039	A
21	1,0451	0,8076	A	1,0348	0,7055	A	1,0735	0,4435	A
22	1,0414	0,698	A	1,0412	0,5135	A	0,8815	0,2500	N
23	1,0384	0,8007	A	1,0376	0,5227	A	1,0626	0,4333	A
24	1,0415	0,9756	A	1,0416	0,5183	A	1,0701	0,4384	A

Tabulka 8: Výsledky registrace s možností zásahu uživatele holografických snímků a fluorescenčních snímků Alexa Fluor navrženou procedurou. Červeně je značena neúspěšná registrace, bíle úspěšná, zeleně částečně úspěšná, modře úspěšná po zásahu uživatele.

Alexa Fluor	1. Sada			2. Sada			3. Sada		
	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun	Zvětšení	Otočení	Posun
1	1,041	0,910	A	1,041	0,261	A	1,071	0,270	A
2	1,036	0,262	A	1,038	0,442	A	1,079	0,562	A
3	1,042	0,180	A	1,049	0,178	A	1,074	-0,173	A
4	1,042	0,161	A	1,023	0,269	A	1,073	0,530	A
5	1,055	0,627	A	1,355	-73,375	A	1,053	0,330	A
6	0,997	1,850	A	1,007	0,081	A	1,073	1,511	A
7	1,046	0,710	A	1,023	2,303	A	1,064	0,358	A
8	1,062	0,610	A	1,053	0,441	A	1,083	0,074	A
9	1,052	0,512	A	0,990	0,255	A	1,062	0,249	A
10	1,045	0,256	A	1,045	0,157	A	1,067	0,530	A
11	1,045	0,420	A	1,032	0,090	A	1,064	0,250	A
12	1,440	0,082	A	1,042	0,621	A	1,056	0,340	N
13	1,049	0,610	A	1,038	0,536	A	1,075	0,600	A
14	1,047	0,039	A	1,061	0,426	A	1,057	-0,370	A
15	1,059	0,007	A	1,045	0,325	A	1,071	0,350	A
16	1,024	0,092	A	1,025	0,095	A	1,074	0,610	A
17	1,027	0,090	A	1,031	0,831	A	1,078	1,951	A
18	1,035	0,700	A	1,028	-1,961	A	1,084	0,430	A
19	1,041	0,752	A	0,998	0,178	N	1,093	-0,010	A
20	1,035	0,620	A	1,020	0,427	A	1,072	0,169	A
21	1,042	0,010	A	1,031	0,356	A	0,997	-0,007	A
22	1,072	0,186	N	1,048	0,367	A	0,999	0,350	A
23	1,048	0,258	A	1,035	0,155	A	1,063	-0,160	A
24	1,028	0,165	A	1,016	0,173	A	1,052	0,240	A

