



Univerzita Komenského v Bratislave  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



**RNDr. Peter Topor**

**Autoreferát dizertačnej práce**

Bunková cytometria s vysokým priestorovým a spektrálnym rozlíšením

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia: 4.1.12 Biofyzika

Bratislava, 2012

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky FMFI UK v Bratislave.

**Predkladateľ:** RNDr. Peter Topor  
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK  
Mlynská dolina F2, 842 48 Bratislava

**Školiteľ:** RNDr. Dušan Chorvát, PhD.  
Medzinárodné laserové centrum  
Ilkovičova 3, 841 04 Bratislava 4

**Oponenti:** RNDr. Michal Cagalinec, PhD.  
Faculty of Medicine, University of Tartu  
Ravila 19 50411, Tartu Tartu maakond, EESTI

doc. RNDr. Jozef Uličný CSc.  
Katedra biofyziky, PF UPJŠ  
Jesenná 5, 040 01 Košice

Ing. Alexandra Zahradníková, DrSc.  
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV  
Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

**Obhajoba dizertačnej práce sa koná ..... o ..... h pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou predsedom odborovej komisie ..... 4.1.12 Biofyzika na FMFI UK, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava.**

**Predseda odborovej komisie:**  
Prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.  
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky  
Mlynská dolina – pavilón F1  
842 48 Bratislava 4

# Kapitola 1

## Súčasný stav

### 1.1 Hranice rozlíšenia v optickej mikroskopii

Základnými charakteristikami optického mikroskopu sú zväčšenie, numerická apertúra a rozlíšenie. Konfokálny mikroskop sa odlišuje od fluorescenčného mikroskopu najmä prítomnosťou konfokálnej pinholy v optickej ceste. Pinhola je tvorená malým otvorom (rádovo asi  $0.2\mu m$ ), ktorý je vsunutý pred detektor signálu z mikroskopu, pričom blokuje väčšinu svetla prichádzajúceho z mimoohniskových rovín vzorky. Zdrojom svetla je zvyčajne laserový lúč umožňujúci osvetlenie malého objemu vzorky. Konfokálny mikroskop sa v porovnaní s fluorescenčným mikroskopom vyznačuje najmä vyšším kontrastom a schopnosťou snímať iba jednotlivé priestorové rezy vo vzorkách. Na modelovanie obrazu vytvoreného mikroskopom využívame funkciu bodového rozostrenia (Point Spread Function - PSF), ktorá je obrazom bodového zdroja svetla. Priestorové rozlíšenie mikroskopu známe aj ako tzv. Rayleighovo kritérium je určené vzťahom [1]:

$$r = \frac{0.61\lambda}{n \sin \vartheta} \quad (1.1)$$

pričom  $r$  je najmenšia vzdialenosť 2 bodov, ktoré je možné vzájomne odlíšiť,  $\lambda$  je vlnová dĺžka použitého svetla a hodnota súčinu  $n \sin \vartheta$  je numerická apertúra použitého objektívu. Konfokálna pinhola modifikuje PSF mikroskopu, čoho dôsledkom je zvýšené laterálne rozlíšenia a taktiež axiálne rozlíšenie[2]:

$$r_{lateral} = \frac{0.44\lambda}{n \sin \vartheta} \quad r_{axial} = \frac{1.5\lambda}{n \sin^2 \vartheta} \quad (1.2)$$

Teoreticky dosiahnuteľné axiálne rozlíšenie je niekoľko krát nižšie ako laterálne. To spôsobuje komplikácie hlavne pri biologických objektoch, ktorých veľkosť sa pohybuje na hranici rozlíšenia mikroskopu. V reálnych experimentoch je dosiahnuté rozlíšenie nižšie ako teoretické, najmä z dôvodu prítomnosti rôznych zdrojov šumu, ale aj z dôvodu náhodnej emisie fotónov vzorkou. Pri nízkych svetelných intenzitách je množstvo detekovaných fotónov na detektore mikroskopu popísané Poissonovskou štatistikou. Vyváženie vplyvu degradácie obrazu a následné zvýšenie rozlíšenia je zvyčajne realizované konštrukčnými zásahmi do použitého mikroskopu (zdroj svetla, spôsob snímania,

a pod.) alebo výpočtovými metódami využitím modelov degradácie obrazu a nájdením inverznej operácie k nim.

## 1.2 Moderné metódy vysokého rozlíšenia

### Metódy v blízkom poli

#### TIRF mikroskopia

Skratka TIRF (Total internal reflection fluorescence) je modifikácia fluorescenčnej mikroskopie, ktorá využíva totálny odraz svetla, podľa Fresnelovho vzťahu pre šírenie svetla pri prechode médiami s rôznymi refrakčnými indexami. Keď uhol dopadajúceho lúča prekročí kritický uhol, lúč sa úplne odráža na rozhraní týchto dvoch prostredí. Zároveň platí, že svetelný lúč v mieste odrazu preniká do druhého prostredia ako tzv. tlmená vlna (evanescent wave) do hĺbky približne  $0,1\mu m$  [3]. Tento efekt umožňuje selektívnu excitáciu fluorescenčných molekúl [1] iba vo vrstve blízkej pri povrchu, a teda fluorescencia pozadia neprispieva do výsledného obrazu. Axiálne rozlíšenie TIRF mikroskopu je dané hrúbkou vrstvy, ktorá je excitovaná tlmenou vlnou, čo znamená približne  $r_{ax} \approx 100nm$ . TIRF mikroskopia sa využíva hlavne na štúdium povrchových dejov, napr. exocytózu a fúziu vezikúl s plazmatickou membránou [4, 5] alebo sledovanie pohybu častíc naviazaných na DNA fragmenty (DNA-tethered particles) [6].

### Metódy v ďalekom poli

#### STED

Metóda STED (Stimulated Emission Depletion - vyprázdnenie stimulovanou emisiou) je spôsob super-rozlíšenia založený na nelineárnom saturačnom procese [7]. Princíp metódy spočíva v selektívnom zhášaní excitovaných fluorofórov na okraji ohniskového bodu využitím stimulovanej emisie. Krátky (približne  $0,2ps$ ) excitačný laserový impulz je nasledovaný dlhším ( $40 ps$ ) impulzom - vyvolá stimulovanú emisiu, ktorá núti prejsť excitované molekuly do vyššej vybračnej úrovne základného stavu, ktorého rýchly útlm bráni reexcitácii rovnakým lúčom [8, 9]. Fluorescenčný signál je takto detegovaný iba z oblasti výrazne ohraničenej stimulovanou emisiou. Modifikáciou excitačného svetla pri

tejto metóde, tak aby svetelná vlnoplocha pokrývala celý priestorový uhol, je možné dosiahnuť zhodné axiálne aj laterálne rozlíšenie na úrovni bez dodatočného spracovania je 80 nm [10].

## SIM

OTF (Optical transfer function) definuje priestorové frekvencie, ktoré dokáže mikroskop zobrazit' a mimo zobrazovaného rozsahu je funkcia nulová. Zvýšenie rozlíšenia je z pohľadu SIM prenesenie informácie z oblasti mimo tejto toroidálnej funkcie do jej viditeľnej časti. Táto informácia je principiálne pozorovateľná ako tzv. Moiréove obrazce (Moiré fringes), ale je potrebné ju extrahovať [11] - pri špeciálnom móde osvetľovania vzorky - daný sumou konečného počtu separovateľných komponent v axiálnom a laterálnom smere. Osvetľovaním a viacnásobným snímaním obrazu pri harmonicky modulovanom osvetlení s posunutou fázou, je možné jednotlivé komponenty (intenzity bodov vzorky) vypočítať zo série lineárnych rovníc. Podľa výsledkov [11] autorov bolo reálne demonštrované laterálne rozlíšenie 3D SIM mikroskopu  $r_{lat} = 125$  nm a axiálne  $r_{ax} < 300$  nm. Využitie SIM mikroskopie sa javí výhodnejšie v prípade tenších vzoriek (rádovo  $10\mu m$ ) s nižšou hustotou fluoreskujúceho materiálu. SIM mikroskopiu je možné využiť aj na zobrazovanie pomaly sa pohybujúcich štruktúr živých buniek, napr. mitochondrií [12].

## PALM/STORM

STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy) a PALM (Photoactivated localization microscopy) sú metódy vysoko rozlíšenej mikroskopie patriace do skupiny metód SMLM (Single molecule localization microscopy). V prípade, že všetky emitované fotóny pochádzajú z rovnakého fluorofóru, je možné stanoviť fitovaním, kde sa nachádza centrum hmoty (emitujúca molekula) s vyššou presnosťou ako v prípade získania iba jediného fotónu, pri ktorom je nepresnosť daná rozmermi PSF [7]. Zobrazovanie prebieha v cykloch, pričom v každom cykle sa zaznamenajú pozície časti fluorofórov, následne sa aktivujú a zaznamenajú pozície iných fluorofórov, až pokiaľ nie je nasnímaný dostatok dát. V typickom experimente je na rekonštrukciu vysoko-rozlíšeného obrazu potrebných rádovo tisíc obrázkov. Táto sada dát sa výpočtovo spracuje a výsledné dáta dosahujú rozlíšenie [7] približne  $r_{lat} \approx 30nm$  a  $r_{ax} \approx 60nm$ . PALM/STORM metodiky sú vhodné

najmä pre menšie objekty s nižšou hustotou, resp. pre filamentózne vzorky [7].

## Využitie rekonštrukčných algoritmov

Rekonštrukčné metódy využívajú na výpočet obrázku s vysokým rozlíšením sadu obrázkov s nízkym rozlíšením (resp. štandardným rozlíšením snímacieho zariadenia). Využívanie rekonštrukčných algoritmov nevyžaduje žiadne špecifické experimentálne zariadenia. Model degradácie obrazu je daný konvolúciou prístrojovej funkcie a originálnych dát. Inverzné (dekonvolučné) algoritmy vyžadujú váhovaciu funkciu (cost function) [13]- ktorá sa bude riešením inverzného problému minimalizovať, stanovenie regularizačnej funkcie, ktorá bude priestor riešení usmerňovať k správne riešeniu a obmedzovať propagáciu šumu a nakoniec aj určenie kritérií kvality obrazu, ktoré budú určovať optimálny počet iterácií. Dekonvolučné algoritmy vyžadujú znalosť PSF funkcie snímacieho zariadenia, resp. je možné prístrojovú funkciu odhadnúť z name- raných dát. Rekonštrukčné algoritmy sú výpočtovo a časovo náročné operácie. Riešia tzv. zle podmienený problém (ill-posed problem), ktorého exaktné riešenia nie je známe. Preto využívajú rôzne metódy aproximácie originálnych dát. Výskum využitia rekonštrukčných algoritmov je dôležitý aj z pohľadu ich univerzality - je možné ich použiť aj na fluorescenčnom mikroskope, kde umožňujú zvýšenie najmä axiálneho rozlíšenia, ale aj na iných typoch mikroskopov, kde hoci primárne rozlíšenie je vyššie v porovnaní s fluorescenčným mikroskopom, avšak dodatočným spracovaním snímaných dát sa rozlíšenie ešte zvýši [14].

## 1.3 Spektrálne zobrazovanie

Emisné a excitačné spektrum molekuly je charakteristikou danej molekuly a môže slúžiť na jej identifikáciu. Spektrálne zobrazovanie kombinuje prístupy spektroskopie, ktorá narába s dátami vo forme spektier  $I(\lambda)$  a digitálneho zobrazovania, ktoré pracuje s intenzitami jednotlivých pixelov obrazu  $I(x, y)$ . Dostávame tak 3D dáta vo forme  $I(x, y, \lambda)$ . Získavanie a analýzu takýchto dát môžeme rozdeliť na [15]:  $\lambda$ -skenovacie metódy, ktoré snímajú celý obraz pri jednej vlnovej dĺžke určenej optickým filtrom (pásmovým, AOTF, LCTF, a pod.), priestorovo-skenovacie metódy, ktoré snímajú celé spektrum z jedného bodu rozkladom na hranole alebo mriežke a časovo-skenovacie

metódy, ktoré využívajú Fourierovskú spektroskopiu a snímanie pomocou interferometra. Matematický model multispektrálneho zobrazovacieho systému navrhli Connah et al. [16], pričom na modeli ukázali, že najvhodnejší počet detekčných kanálov (poměr cena/zložitosť) je 5. Z ich výskumov vyplýva, že aj digitálna kamera môže byť využiteľná ako multispektrálny detektor s fixnými filterami.

Viacnásobné fluorescenčné značenie vzoriek poskytuje komplexné informácie o štruktúre a metabolizme bunky. Zvyšovaním počtu markerov narážame na problém ich vzájomného spektrálneho prekryvu. Najbežnejším riešením je úprava dizajnu experimentu tak, aby obsahoval iba dva markery [17], prípadne ich separácia sa vykonala iba bežnými grafickými programami [18]. Neskôr sa experimenty nastavovali tak, aby spektrálny prekryv použitých farbív bol nulový, resp. zanedbateľný, pričom jednotlivé farbivá sa oddelili kombináciou optických filtrov. Zavedením kvantových bodov bolo umožnené ďalej zvýšiť počet simultánných farbív [19, 20]. Prekrývajúce sa spektrá je možné separovať aj metódou lineárneho rozkladu [15]. Demonštráciou v [21] autori dokázali separovať spektrá so vzdialenosťou emisných maxím iba 7 nm. Ako vstup pre metódu lineárneho rozkladu je možné použiť aj kombináciu dát snímaných pri rôznych excitačných aj emisných vlnových dĺžkach [22]. V prípade, že medzi farbivami dochádza k rezonančnému prenosu energie, je nutné lineárny rozklad nahradiť komplexnejšími metódami [23, 24].

# Kapitola 2

## Ciele

Hlavným cieľom predkladanej dizertačnej práce je: vytvoriť, vyhodnotiť a aplikovať algoritmické prostriedky a meracie protokoly umožňujúce dosahovať vysoké rozlíšenie pri snímaní dát v konfokálnej mikroskopii zvýšením: priestorového rozlíšenia metódami dekonvolučného spracovania vstupných dát a spektrálneho rozlíšenia algoritmami spektrálnej separácie.

Hlavný cieľ možno rozdeliť na nasledovné čiastkové ciele:

1. pre oblasť vysokého priestorového rozlíšenia:
  - Navrhnuť, implementovať a prípadne upraviť dostupné algoritmy pre zvýšenie rozlíšenia založené na výpočtových metódach inverzného problému.
  - Otestovať odladené algoritmy na kalibračných vzorkách a kvantifikovať ich prínos.
  - Odladiť softvérový modul pre dávkové spracovanie vstupných dát.
  - Aplikovať získané algoritmy pre zvýšenie axiálneho rozlíšenia na spracovanie konfokálnych dát a kvantifikovať získaný prínos.
2. pre oblasť vysokého spektrálneho rozlíšenia:
  - Implementovať, prípadne upraviť existujúce algoritmy na spektrálnu separáciu fluorescenčných značiek.
  - Vyhodnotiť schopnosť jednotlivých algoritmov rekonštruovať spektrá a koncentrácie fluorescenčných farbív zo vzoriek s vysokým spektrálnym prekryvom (JC-1, Cell Tracker).
  - Aplikovať získané algoritmy pre zvýšenie spektrálneho rozlíšenia na spracovanie experimentálnych dát a kvantifikovať získaný prínos.



# Kapitola 3

## Metodika práce

### 3.1 Algoritmy vysokého priestorového rozlíšenia

Matematický model zobrazovania mikroskopom je v 1-rozmernom prípade daný vzťahom [25]:

$$g(x) = N(H(f(x)) + b(x)) \quad (3.1)$$

kde  $N$  je distribučná funkcia šumu,  $H$  je lineárny operátor a  $b(x)$  je funkcia pozadia. Vo všeobecnosti je  $H$  lineárny operátor, a preto môžeme vzťah upraviť ako:

$$g = N(h \otimes f + b) \quad (3.2)$$

kde znamienko  $\otimes$  predstavuje konvolúciu a  $h$  je funkcia bodového rozostretia (PSF). Na riešenie problému vo vzťahu č. 3.2 sme využili metódy založené na Richardson-Lucyho algoritme (RL), ktorý v zovšeobecnenom tvare môžeme zapísať ako [26]:

$$f^{(n+1)} = \left[ h^T \otimes \left( \frac{g}{(h \otimes f^{(n)})} \right) \right] \frac{f^{(n)}}{1 + \lambda \frac{\partial k}{\partial f}} \quad (3.3)$$

kde  $h$  označuje PSF,  $g$  pôvodné nasnímané dáta,  $f^n$  hľadané dáta v  $n$ -tej iterácii algoritmu,  $k$  potenciálovú funkciu a operátor  $\otimes$  označuje konvolúciu. Voľba potenciálovej funkcie regularizuje riešenie podľa našich apriórnych znalostí o dátach. Nami testované potenciálové funkcie (označované ako RL-Cus1 až RL-Cus4) boli v tvare [27]:

$$k_1(\eta) = -\gamma e^{-\frac{\eta^2}{\gamma}} \quad (3.4)$$

$$k_2(\eta) = -\frac{\gamma}{1 + \frac{\eta^2}{\gamma}} \quad (3.5)$$

$$k_3(\eta) = \gamma \ln \left( 1 + \frac{\eta^2}{\gamma} \right) \quad (3.6)$$

$$k_4(\eta) = \gamma |\eta| - \gamma^2 \ln \left( 1 + \frac{|\eta|}{\gamma} \right) \quad (3.7)$$

Okrem uvedených metód sme vyhodnocovali aj zvedené modifikácie RL algoritmu - RL s Tikhonov-Millerovou regularizáciou a RL s regularizáciou úplnej variácie [28]. Kvalitu rekonštrukcie sme na simulovaných dátach vyhodnocovali parametrami MSE

a SSIM [29]. Na reálnych dátach, kde originálne dáta nie sú známe, je nutné použiť ako optimum rekonštrukcie iné parametre. Vyhodnocovali sme parametre SURE [30] a PURE [31].

### 3.2 Algoritmy vysokého spektrálneho rozlíšenia

V rámci výpočtového zvyšovania spektrálneho rozlíšenia sme sa zamerali na separáciu spektier zo vzoriek farbených Cell Tracker-om a JC-1. Emisné spektrum Cell Trackera v závislosti od lokácie vo vzorke môže úplne prekryvať prvý emisný pík JC-1, čo znemožňuje ich správnu separáciu. Na ich oddelenie je potrebné použiť okrem samotnej separácie aj metódy odhadu spektra z nameraných dát. Medzi použité metódy patria - metóda lineárneho rozkladu, metóda analýzy hlavných komponentov (PCA) [33], metóda analýzy nezávislých komponentov (ICA) [34] a metóda nezápornej faktorizácie matíc (NMF) [35]. Metódy PCA, ICA a NMF sme použili na odhad spektier z každého bodu vzorky, pričom tieto spektrá tvorili vstup metódy lineárneho rozkladu. Tá vychádza z predpokladu, že intenzita získaného signálu zo vzorky je daná lineárnou kombináciou príspevkov jednotlivých značiek a že spektrá sú navzájom lineárne nezávislé:

$$S(\lambda) = \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda) \quad (3.8)$$

kde  $S$  je namerané výsledné spektrum,  $A$  je matica váhovacích koeficientov a  $R$  je matica referenčných spektier vyskytujúcich sa vo vzorke. Koeficienty  $A_i$  je možné určiť fitovaním metódou najmenších štvorcov z podmienky[32]:

$$\begin{aligned} \sum_j \{S(\lambda_j) - \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda_j)\}^2 &< \min \\ \frac{\partial}{\partial A_i} \sum_j \{S(\lambda_j) - \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda_j)\}^2 &= 0 \end{aligned} \quad (3.9)$$

Získané výsledky na simulovaných dátach sme porovnávali s pôvodnými dátami a kvalitu rekonštrukcie sme určovali hodnotami parametrov MSE, prípadne FoM [36]. Okrem zavedených metód sme navrhli a aplikovali aj vlastný algoritmus odhadu spektier zo vzorky. Spektrum Cell Tracker sme považovali za konštantné, pričom sme odhadovali iba tvar spektra JC-1. V spektre JC-1 boli pre nás optimalizovanými parametrami normalizovaná hodnota maximálnych pík emisného spektra JC-1 ( $max_1, max_2$ ), plochy a šírky

oboch píkav. Hodnota minima emisného spektra medzi obomi píkmí tvorila vstup algoritmu. Algoritmus odhadu pozostáva z nasledujúcich krokov:

1. Vyber jednu dvojicu  $max_1, max_2$  z množiny všetkých možných kombinácií pomeru normalizovaných maxím spektra JC-1,
2. vypočítaj spektrum JC-1 pre danú dvojicu  $max_1, max_2$  minimalizovaním jej parametrov vzhľadom na chybovú funkciu definovanú nižšie,
3. získané spektrum JC-1 a fixné spektrum Cell Tracker použi na výpočet koncentrácií oboch markerov a parametrov kvality rekonštrukcie,
4. vyhodnoť kvalitu rekonštrukciu výpočtom rozdielu medzi vstupnými dátami a simuláciou z odhadnutých spektier a koncentrácií oboch farbív,
5. opakuj od kroku 1. pokiaľ nie je nájdená optimálna hodnota.

Navrhovaná chybová funkcia má v algoritmickej tvare podobu:

1. Vezmi zo vstupu hodnoty  $max_1, max_2$  a hodnoty spektrálneho priebehu v bode (resp. priemeru z oblasti) simulovaných dát,
2. Prelož fitovaním parametrov súčet 2 Lorentzovských funkcií cez 3 body definované nasledovne: relatívna hodnota maxima prvého a druhého píku JC-1 a kvázi stacionárny bod spektra JC-1,
3. Ohodnoť vstupné hodnoty nasledovným výrazom:  $R = (L(X_{max1}) - max_1)^2 + 2(L(X_{max2}) - max_2)^2 + 0,5(L(X_{stac}) - C_1)^2$ . Funkcia  $L(x)$  je hodnota súčtu odhadov 2 Lorentzovských funkcií v bode  $x$ .

### 3.3 Simulované a experimentálne dáta

Simulované dáta boli tvorené sadou generovaných geometrických objektov s celkovými rozmermi 128x128x128 pixelov a následne boli degradované Poissonovským šumom. Rozostupy medzi jednotlivými objektami pre algoritmy zvyšovania axiálneho rozlíšenia sa v axiálnom smere zmenšovali na úroveň 1 pixelu, čo reprezentovalo minimálnu možnú vzdialenosť objektov. Simulované dáta pre spektrálnu separáciu boli tvorené pravidelnými štvorcovými oblasťami s rozmermi 50x50 pixelov, pričom každá oblasť

reprezentovala iný pomer koncentrácií farbív JC-1 a CellTracker rovnomerne rozdelených v intervale 0-90. Dáta mali rozmer 500x500x15 pixelov, tj. reprezentovali 100 rôznych vzájomných pomerov koncentrácií farbív snímaných na 15 kanáloch rozdelených v intervale 499-650nm s krokom 10,7 nm, ktorý zodpovedal šírke spektrálneho kanála konfokálneho mikroskopu.

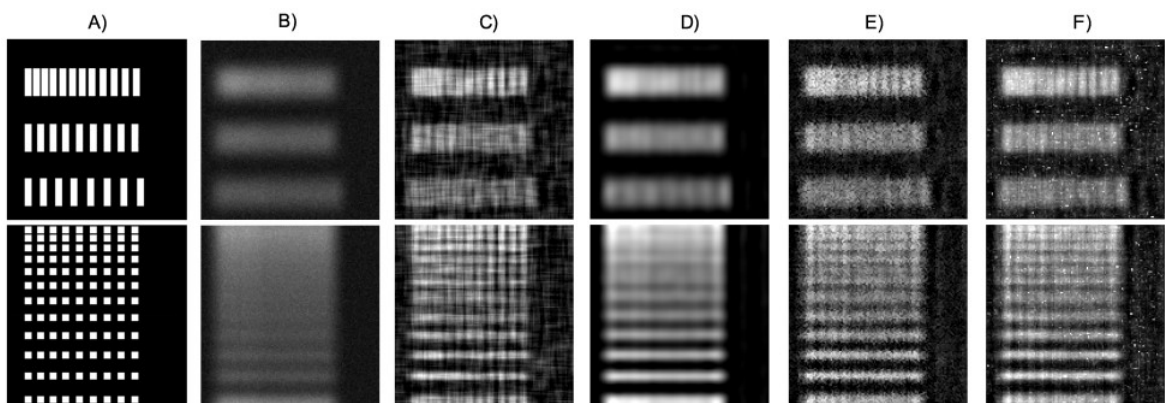
Experimentálne dáta pre ktoré sme zvyšovali axiálne rozlíšenie tvorili vzorky mitotických polyténnych chromozómov *Drosophila melanogaster* farbené Hoechstom a ľudské gliómové bunky línie U-87-MG, farbené JC-1. Experimentálne dáta, pre ktoré sme výpočtovo zvyšovali spektrálne rozlíšenie boli bunky ľudského pažeráku línie KYSE-450 a KYSE-70, farbené Cell Trackerom a JC-1.

# Kapitola 4

## Výsledky

### 4.1 Vysoké priestorové rozlíšenie simulovaných dát

Simulované dáta sme rekonštruovali dekonvolučnými algoritmami a pre jednotlivé algoritmy sme vyhodnocovali parametre kvality rekonštrukcie. Príklad výstupov rekonštrukcie je na Obr. 4.1.



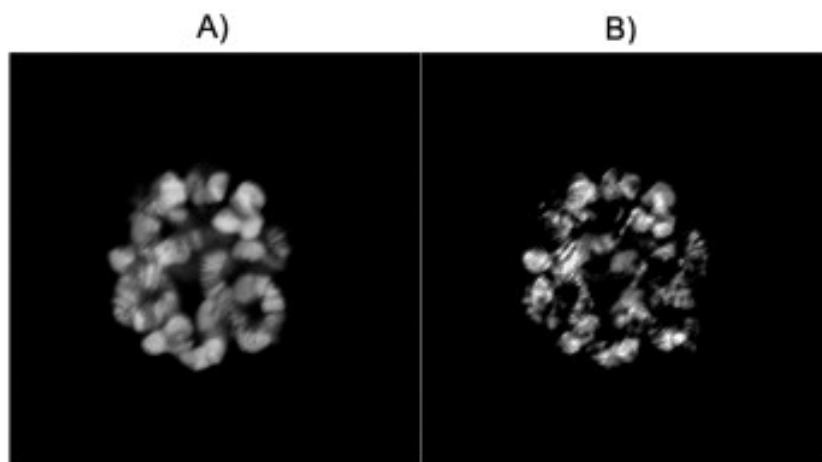
Obr. 4.1: *Prehľad rekonštrukcie modelových dát rôznymi algoritmami - XY rez (vrchný rad), XZ rez (spodný rad). A) pôvodné dáta, B) dáta blurované a degradované šumom, C) rekonštrukcia RL algoritmom, 4765 iterácií, D) rekonštrukcia RL-TM, pre  $\lambda = 0,000005$ , 3000 iterácií, E) rekonštrukcia pomocou RL-TV,  $\lambda = 0,0001$ , 1500 iterácií, F) rekonštrukcie RL-Cus1,  $\lambda = 0,0000001$ , 1700 iterácií.*

Ako vidieť aj na obrázku, každý algoritmus preferuje zachovávanie určitých vlastností dát počas rekonštrukcie. Z pohľadu dosiahnutého axiálneho rozlíšenia poskytoval najlepšie výsledky neregularizovaný RL algoritmus. Na dosiahnutie optimálneho výsledku bolo potrebných 31 iterácií. Rekonštrukcia v dôsledku prítomnosti šumu postupne generuje rôzne artefakty, ktoré po prekročení optimálneho počtu iterácií v dátach prevládajú. Optimálny počet iterácií je problém stanoviť objektívnym kritériom. Zvyčajným parametrom optimálnosti riešenia býva ustálenie konvergenie výpočtu meranej hodnotou MSE ako rozdielu medzi dvomi nasledujúcimi iteráciami výpočtu. Táto hodnota, ako sme ukázali je na určenie optima počtu iterácií nedostatočná. Rovnako

aj parametre SURE a PURE, ktoré vykazujú hľadané minimum v polohe globálneho minima MSE pre dáta degradované iba šumom, pri rekonštrukcii dekonvolučnými algoritmi už pri nájdení globálneho minima MSE zlyhavajú. Naďalej je preto potrebné optimálnosť rekonštrukcie kontrolovať vizuálne.

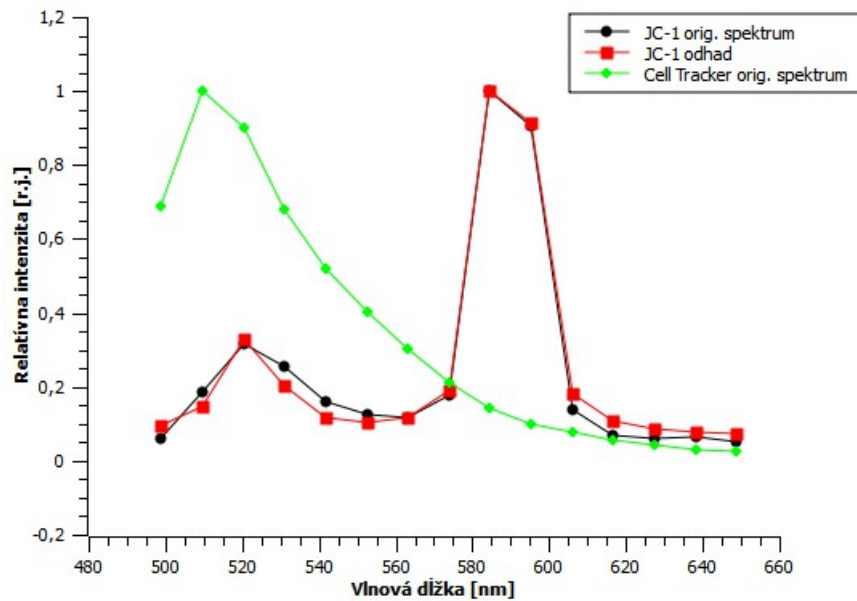
## 4.2 Vysoké priestorové rozlíšenie experimentálnych dát

Rekonštrukciu experimentálnych dát sme realizovali neregularizovaným algoritmom RL. Príklad vstupu a výstupu rekonštrukcie je na Obr. 4.2. Rekonštrukciou sa nám



Obr. 4.2: Porovnanie dát polyténnych chromozómov *Drosophily melanogaster*: A) vstupné dáta, B) dáta rekonštruované 26 iteráciami RL algoritmu s využitím experimentálne odhadnutej PSF funkcie.

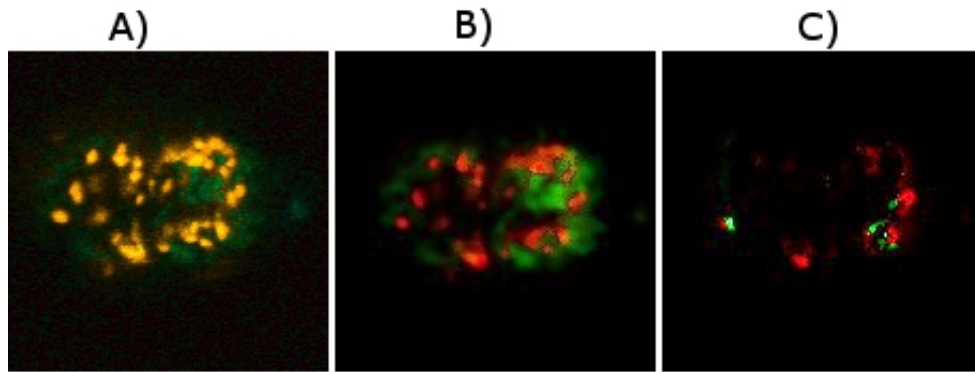
podarilo zvýšiť rozlíšenie dát z pôvodných  $r_{ax} = 1,29\mu m$  na hodnotu  $r_{ax} = 0,88\mu m$ . V percentuálnom vyjadrení došlo k zvýšeniu axiálneho rozlíšenia o 32%. Dosiiahnuté rozlíšenie však stále nedosahuje teoretické rozlíšenie dané difrakčným limitom - v našom prípade  $r_{ax} = 0,47\mu m$ . Naše experimenty ukázali aj fakt, že použité teoretické modely PSF funkcií nezodpovedajú reality. Reálna PSF funkcia mikroskopu vykazuje viaceré priestorové a tvarové deformácie. Rekonštrukcia modelovanými PSF funkciami viedla k okamžitej tvorbe artefaktov od prvých iterácií, čo znemožnilo ďalšiu rekonštrukciu. Správne experimentálne stanovená PSF funkcia je nevyhnutná na optimálnu rekonštrukciu a ku kvalite rekonštrukcie prispieva väčšou mierou ako voľba regularizácie RL algoritmu.



Obr. 4.3: Originálne spektrá Cell Tracker, JC-1 monomér a spektrum JC-1 monomér odhadnuté navrhnutým algoritmom.

### 4.3 Zvýšenie spektrálneho rozlíšenia simulovaných dát

Simulované dáta sme rekonštruovali postupne algoritmi ICA (PCA bola jej prvým krokom), NMF. Z odhadnutých spektier sme počítali priestorové rozloženie koncentrácie oboch farbív - Cell Tracker aj JC-1. Naše výsledky ukazujú, že v prípade úplného prekrytia prvého píku JC-1 spektrom Cell Trackera, metódy nedokážu správne odhadnúť celý tvar spektra. Metódy zlyhali aj na nezašumených dátach. Dôsledkom toho je, že koncentrácie určené lineárnym rozkladom nie sú správne. Tento fakt nás viedol k navrhnutiu algoritmu, ktorý by bol optimalizovaný pre tento konkrétny typ experimentu. Dvojnásobná nelineárna optimalizácia voliteľných parametrov algoritmu viedla na nezašumených dátach k správnej rekonštrukcii spektra (Obr. 4.4). Pridaním degradácie Poissonovským šumom sa kvalita rekonštrukcie zhoršila a na dosiahnutie výsledku normalizovanej intenzity s presnosťou o 1 rád vyššou ako nameraná hodnota, bolo potrebné vstupné dáta predfiltrovať mediánovým filtrom s veľkosťou 100 pixelov. Dosiahnutie takej presnosti vedie k výraznému zníženiu efektívneho rozlíšenia dát. Presnosť navrhnutého algoritmu je v budúcnosti možné zvýšiť spresnením predpokladov použitého modelu.



Obr. 4.4: Ukážka spracovania experimentálnych dát. A) originálne dáta - projekcia intenzity a farby s najintenzívnejšieho kanála, B) spracované dáta - pseudo-farebné kódovanie (zelená - koncentrácia Cell Tracker, červená - koncentrácia JC-1) C) spracované dáta - farba a intenzita pixelu zodpovedá pomeru intenzít píkov JC-1.

#### 4.4 Zvýšenie spektrálneho rozlíšenia experimentálnych dát

Navrhnutým algoritmom sme rekonštruovali experimentálne dáta predspracované mediánovým filtrom v laterálnej rovine s polomerom 2 pixely. Príklad spracovania dát je na Obr. 4.4. Na rekonštruovaných dátach vidieť, že mitochondrie sú aj v rámci jednej bunky v rôznom metabolickom stave. Farebné kódovanie je možné upraviť podľa podmienok konkrétneho experimentu, aby boli hľadané metabolické stavy mitochondrií výraznejšie. Navrhovaný algoritmus je možné použiť v súčasnej podobe na kvalitatívnu analýzu vzoriek farbených farbivami so spektrálnym prekryvom, pričom je možné stanoviť tvar spektra a zároveň koncentráciu farbiva. Spresneniu algoritmu môže rozšíriť paletu biologických experimentov o súčasné kvantitatívne sledovanie vzoriek farbených 2 farbivami, ktoré bolo doteraz nutné farbiť, sledovať a analyzovať samostatne.



# Kapitola 5

## Záver

Výsledky práce je vzhľadom na stanovené ciele možné zhrnúť do nasledovných bodov:

- Využitím existujúcich dekonvolučných algoritmov je možné dosiahnuť zvýšenie axiálneho rozlíšenia dát v relatívnej mierke až o 30%. Kvalita rekonštrukcie závisí v prvom rade od presnosti odhadu PSF funkcie mikroskopu a až následne od použitého algoritmu. Optické charakteristiky mikroskopu môžu vykazovať veľké anomálie a nesymetriu, čo môže znemožniť používanie modelových PSF funkcií na rekonštrukciu dát.
- Na optimálnosť rekonštrukcie v zmysle počtu vykonaných iterácií algoritmu nie je známe optimálne kritérium a je nutné sledovať kvalitu rekonštrukcie vizuálne. Parametre PURE a SURE by po úpravách v budúcnosti mohli slúžiť ako kritérium optimálnosti rekonštrukcie.
- Implementované algoritmy sú dostatočne stabilné a rýchle. Je odporúčané ich používať v rutínnej prevádzke na spracovávanie všetkých experimentálnych dát.
- Prekrytie časti spektra pri zložených spektrách citlivých na prostredie môže znemožniť ich analýzu vo vzorkách metódou lineárneho rozkladu. Odhad spektra je nutné robiť v každom bode vzorky.
- V špeciálnych prípadoch (napr. kombinácia farbenia Cell Trackerom a JC-1) odhad spektier zo vzorky zavedenými metódami (ICA, NMF) nie je korektný. Správny odhad spektier je možný zavedením dodatočných predpokladov (tvar spektra, znalosť fixných bodov spektra, a pod.) do algoritmu odhadu.
- Nami navrhnutý algoritmus odhadu spektier a spektrálnej separácie dokáže zo vzoriek farbených Cell Trackerom a JC-1 v definovanej presnosti určiť tvar spektier a distribúciu použitého farbiva vo vzorke. Algoritmus takto umožňuje realizovať experimenty s viacnásobným fluorescenčným farbením, ktoré bolo doteraz nutné realizovať samostatne.

# Kapitola 6

## Použitá literatúra

- [1] Herman B. (1998), *Fluorescence Microscopy*, Springer, Second edition, USA.
- [2] Webb R.H. (1996), *Confocal optical microscopy*, Rep. Prog. Phys. 59, pp. 427-471.
- [3] Axelrod D. (2001), *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology*, Traffic 2:764-774.
- [4] Schmoranzler J., Goulian M., Axelrod D., Simon S.M. (2000), *Imaging Constitutive Exocytosis with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*, J. Cell Biol. 149(1):23-31.
- [5] Ma L., Bindokas V.P., Kuznetsov A., Rhodes C., Hays L., Edwardson J.M., Ueda K., Steiner D.F., Philipson L.H. (2004), *Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion*, PNAS 101(25):9266-9271.
- [6] Blumberg S., Gajraj A., Pennington M.W., Meiners J.C. (2005), *Three-Dimensional Characterization of Tethered Microspheres by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*, Biophys. J. 89:1272-1281.
- [7] Schermelleh L., Heintzmann R., Leonhardt H. (2010), *A guide to super-resolution fluorescence microscopy*, J. Cell Biol., 190 (2): 165-175.
- [8] Klar T.A., Jakobs S., Dyba M., Egner A., Hell S.W. (2000), *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, PNAS, Vol. 97, No. 15.
- [9] Klar T.A., Engel E., Hell S.W. (2001), *Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes*, Physical Review E, Vol. 64.
- [10] Hell S.W., Dyba M., Jakobs S. (2004), *Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy*, Current Opinion in Neurobiology, 14, pp. 599-609.

- [11] Gustafsson M.G.L., Shao L., Carlton P.M., Wang C.J.R., Golubovskaya I.N., Cande W.Z., Agard D.A., Sedat J.W. (2008), *Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination*, *Biophys. J.* 94:4957-4970.
- [12] Hirvonen L.M., Wicker K., Mandula O., Heintzmann R. (2009), *Structured illumination microscopy of a living cell*, *Eur. Biophys. J.* 38:807-812.
- [13] Farsiu S., Robinson D., Elad M., Milanfar P. (2004), *Advances and Challenges in Super-Resolution*, *Int. J. Imaging Syst. Technol.* 14: 47-57.
- [14] Pawley J. B. (2006), *Handbook of biological confocal microscopy*, 3rd edition, Springer, New York.
- [15] Garini Y., Young I.T., McNamara G. (2006), *Spectral Imaging: Principles and Applications*, *Cytometry Part A*, 69A, pp. 735-747.
- [16] Connah D., Westland S., Thomson M.G.A. (2001), *Recovering spectral information using digital camera systems*, *Color. Technol.*, 117, pp. 309-312.
- [17] Mossberg K., Ericsson M. (1990), *Detection of doubly stained fluorescent specimens using confocal microscopy*, *Journal of Microscopy*, 158, pp. 215-224.
- [18] Lehr H.A., Van der Loos C.M., Teeling P., Gown A.M. (1999), *Complete Chromogen Separation and Analysis in Double Immunohistochemical Stains Using Photoshop-based Image Analysis*, *J. Histochem. Cytochem.*, 47(1), pp. 119-125.
- [19] Arndt-Jovin D.J., Lidke D.S., Lidke K.A., Rieger B., Jovin T.M. (2006), *Quantum dots shed light on processes in living cells*, *SPIE Newsroom*, SPIE.
- [20] Ballou B., Ernst L.A., Waggoner A.S. (2005), *Fluorescence Imaging of Tumors In Vivo*, *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp. 795-805.
- [21] Dickinson M.E., Bearman G., Tille S., Lansford R., Fraser S.E. (2001), *Multi-Spectral Imaging and Linear Unmixing Add a Whole New Dimension to Laser Scanning Fluorescence Microscopy*, *BioTechniques*, Vol. 31, No. 6.
- [22] Zimmermann T., Rietdorf J., Pepperkok R. (2003), *Spectral imaging and its applications in live cell microscopy*, *FEBS Letters*, 546, pp. 87-92.

- [23] Berney C., Danuser G. (2003), *FRET or No FRET: A Quantitative Comparison*, Biophysical Journal, 84, pp. 3992-4010.
- [24] Gordon G.W., Berry G., Liang H., Levine B., Herman B. (1998), *Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy*, Biophysical Journal, 74, pp. 2702-2713.
- [25] Verveer P.J., Gemkow M.J., Jovin T.M. (1998), *A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy*, Journal of Microscopy, 193, pp. 50-61.
- [26] Zimányi M. (2006), *Model based reconstruction for volume visualization*, PhD Thesis, Univerzita Komenského, Bratislava.
- [27] Li, S.Z. (2009), *Markov Random Field Modeling in Image Analysis*. Springer-Verlag, London, 3. vydanie.
- [28] Dey N., Blanc-Féraud L., Zimmer C., Roux P., Kam Z., Olivo-Marin J.C., Zerubia J. (2006), *Richardson–Lucy Algorithm With Total Variation Regularization for 3D Confocal Microscope Deconvolution*, Microscopy research and technique, 69, pp. 260-266.
- [29] Wang Z., Bovik A.C., Sheikh H.R., Simoncelli E.P. (2004) Image Quality Assessment: From Error Visibility to Structural Similarity. *IEEE T. Image. Process.* **13**(4), 600-612.
- [30] Van De Ville D. (2009), *SURE-Based Non-Local Means*, IEEE Sig. Process. Lett., 16(11), pp. 973-976.
- [31] Luisier F. (2009), *The SURE-LET Approach to Image Denoising*, Thesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland.
- [32] Hiraoka Y., Shimi T., Haraguchi T. (2002), *Multispectral Imaging Fluorescence Microscopy for Living Cells*, Cell Structure and function, 27, pp. 367-374.
- [33] Shlens J. (2005), *A Tutorial on Principal Component Analysis*, Institute for Non-linear Science, UCSD, USA.

- [34] Hyvärinen A., Oja E. (2000), *Independent Component Analysis: Algorithms and Applications*, Neural Networks, 13(4-5), pp. 411-430.
- [35] Lee D.D., Seung H.S. (2001), *Algorithms for Non-negative Matrix Factorization*, Advances in Neural Information Processing Systems, 13, pp. 556-562.
- [36] Neher R., Neher E. (2004), *Optimizing imaging parameters for the separation of multiple labels in a fluorescence image*, J. Microsc., 213, pp. 46-62.

# Kapitola 7

## Zoznam publikácií autora

- ADC01      **Topor P.**, Zimányi M., Mateašik A.: Increasing axial resolution of 3D data sets using deconvolution algorithms, *Journal of Microscopy*. - Vol. 243, No. 3 (2011), s. 293-302.
- AFE01      Uherek M., Kirchnerová J., **Topor P.**, Štrbák V., Chorvát D. Jr.: Study of INS-1E insulinoma cells using autofluorescence imaging [elektronický dokument] SFM'08 : Saratov Fall Meeting. - Saratov : Chair of Optics and Biomedical Physics SSU, 2008.
- AFG01      **Topor P.**, Mateasik A., Bacharová L.: Reconstruction of mitochondria 3D images using image processing techniques, MC 2009 : First Joint Meeting of Dreiländertagung & Multinational Congress on Microscopy. - Graz : Verlag der TU, 2009. - S. 423-424. - ISBN 978-3-85125-062-6.
- AFH01      **Topor P.**, Mateašik A., Bacharová L.: Visualization of mitochondria spatial distribution in living cells, IV. Slovak Biophysical Symposium. - Bratislava : Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, 2010. - S. 81-82.
- AFL01      Kirchnerová J., **Topor P.**, Uherek M., Štrbák V., Chorvát D. Jr.: NAD(P)H/flavin autofluorescence imaging of INS-1E insulinoma cell metabolism, *Proceedings of the III. Slovak Biophysical Symposium*. - Bratislava : FMFI UK, 2008. - S. 67-68. - ISBN 978-80-89186-31-0.
- AFL02      **Topor P.**, Šrámek M., Mateašik A.: Iterative deconvolution algorithms in confocal data reconstruction, *Proceedings of the III. Slovak Biophysical Symposium*. - Bratislava : FMFI UK, 2008. - S. 73-74. - ISBN 978-80-89186-31-0.

# Kapitola 8

## Summary

This thesis analyses various methods of increasing the resolution of confocal microscopy data. Spatial resolution is determined by microscope characteristics, degradation due to the imperfect optics and noise presence. The mathematic model of microscope imaging can serve as a basis for solving inversion problem in order to increase the axial resolution. We analysed various versions of the Richardson-Lucy algorithm and their ability to increase the axial resolution of simulated and experimental data. Unregularized Richardson-Lucy algorithm is shown to increase the axial resolution by 32%. Linear unmixing of samples with dyes showing spectral overlap and location dependent spectral shape is impossible. The reference spectrum has to be estimated in every pixel of the data. Proposed algorithm of spectral estimation was successfully applied to estimation of the spectral shape and its matching dye concentration using simulated and experimental data marked with Cell Tracker and JC-1 dye.