

Redukcija šuma u dvo-fotonski laserski skeniranim mikroskopskim slikama u *wavelet* domenu

Tamara Škorić, Željens Trpovski, Dragana Bajić
 Univerzitet u Novom Sadu, Departman za energetiku,
 elektroniku i telekomunikacije
 Fakultet tehničkih nauka
 Novi Sad, Srbija
tamara.ceranic@gmail.com, zeljen@uns.ac.rs,
dragana.bajic@gmail.com

Dejan Pantelić, Brana Jelenković, Aleksandar Krmpot,
 Mihailo Rabasović
 Institut za Fiziku
 Beograd, Srbija
pantelic@ipb.ac.rs, branaj@ipb.ac.rs, krmpot@ipb.ac.rs,
rabasovic@ipb.ac.rs

Sažetak—U radu su prikazani rezultati redukcije šuma u *wavelet* domenu na dvofotonskim laserski skeniranim mikroskopskim slikama. Mikroskop je razvijen na Institutu za Fiziku u Beogradu. Obradi je prethodila detaljna analiza šuma u vremenskom i frekvencijskom domenu.

Ključne reči—*obrada mikroskopske slike; šum; (key words)*

I. UVOD

Dvo-fotonski laserski skenirani mikroskop predstavlja alternativu konfokalnim mikroskopima, uvodeći značajno unapređenje mogućnosti snimanja u dubinu kao i smanjenje fototoksičnosti uzorka. Kvalitet dobijene slike, međutim, u velikoj meri zavisi od broja emitovanih i detektovanih fotona. Ovaj broj predstavlja slučajan proces što otežava obradu slike, tako da poboljšanje njenog kvaliteta i dalje predstavlja izazov.

Nelinearni mikroskop konstruisan u Institutu za fiziku odlikuje se velikom mogućnošću razlaganja i po površini i po dubini, uz istovremeno minimalno oštećenje tkiva. Međutim, karakteristika 2D slika uzorka jeste jako nizak odnos signala i šuma te se snimanje ponavlja i do nekoliko desetina puta (čak i do 50 puta). Tek usrednjavanjem pojedinačnih snimaka dobija se zadovoljavajući kvalitet mikroskopske slike.

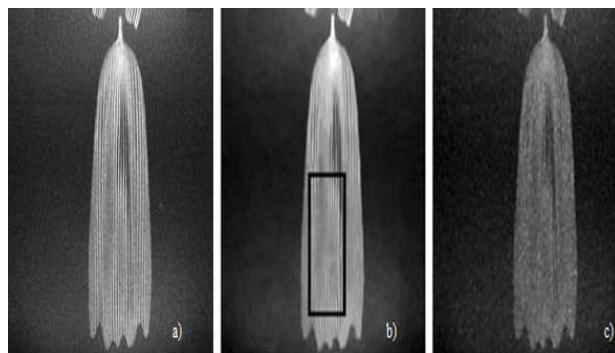
Istraživanja o unapređenju kvaliteta slike orijentisana su u dva smera. Prvi je modelovanje šuma, što i dalje predstavlja otvoreno pitanje. Drugi smer je posvećen razvoju novih složenih metoda koje se zasnivaju na prilagođavanju tradicionalnih metoda specifičnim potrebama fotonske slike. Metoda CANDLE (2012, *Collaborative Approach for Enhanced Denoising under Low-light Excitation*) namenjena je za obradu multifotonske laserski skenirane slike [1] a dve godine kasnije osmišljen BM3D (*Block Match*) 3D filtar, namenjen za obradu dvo-fotonske mikroskopske slike [2]. BM3D filtar zasnovan je na ideji kolaborativnog filtriranja gde se slični blokovi grupišu u 3D nizove i filtriraju [2] dok se u srži složene CANDLE metode nalazi adaptivni ONLM (*Optimized Nonlocal Means*) filtar čiji se koeficijenti sličnosti procenjuju na osnovu slike koja je prethodno filtrirana median filtrom [1]. Ove metode uspevaju u velikoj meri da eliminišu šum iz slike ali istovremeno redukuju informacioni sadržaj, što predstavlja njihovu veliku manu (Sl. 1).

Cilj ovog istraživanja je da se adekvatnom obradom izvorne slike smanji vreme utrošeno na ponovljena snimanja. Za tu svrhu bilo je neophodno detaljno analizirati karakteristike šuma (u vremenskom i frekvencijskom domenu). Predložena je eliminacija šuma u *wavelet* domenu kojoj prethodi potpuno empirijska predobrada slike.

II. MATERIJALI

A. Opis mikroskopa

Mikroskop koristi dvofotonsku fluorescenciju izazvanu femtosekundnim laserskim impulsima. To znači da je efekat izazvan simultanim delovanjem dva fotona, a ekvivalentan je ozračavanju jednim fotonom dvostruko veće energije. U praksi, lasersko zračenje se mikroskopskim objektivom fokusira na uzorak, a zatim se skanira po površini materijala. Zbog nelinearne prirode, dvofotonski efekti su lokalizovani u veoma maloj oblasti oko fokalne tačke. Time se dobija odlično razlaganje, kako po površini, tak i po dubini uzorka, što je jedna od najvažnijih prednosti ovakvog instrumenta. Osim toga, ozračavanje se vrši na jednoj talasnoj dužini (najčešće u infracrvenom delu spektra), sa optičkim efektima koji su ekvivalentni ozračavanju uzorka svetlošću dvostruko manje talasne dužine.



Slika 1. a) Slika ljuspice sa krila noćnog leptira (*Diachrysa chryssitis*) i b) slika nakon obrade BM3D filtrom i c) slika nakon obrade CANDLE filtrom.

Ovo je značajna prednost kod bioloških uzoraka jer se smanjuje ekvivalentni ozračavanju mogućnost oštećenja tkiva i ćelija. Mikroskop koji je konstruisan u Institutu za fiziku, za pobudu koristi titan-safirni laser, čija se talasna dužina može podešavati u intervalu od oko 800-900 nm. Laserski snop se preko dva skenerska ogledala uvodi u mikroskop, koji svetlost fokusira na površinu uzorka.

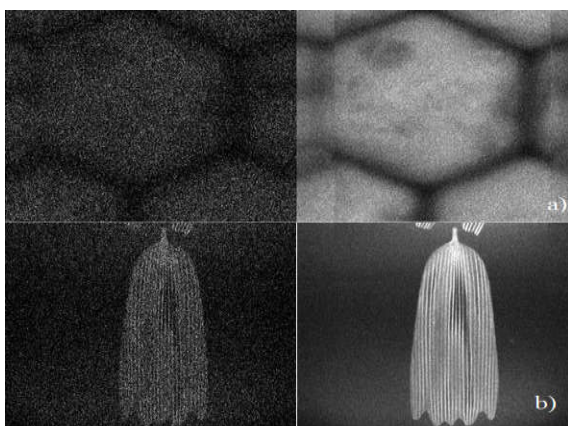
Zračenje dobijeno dvofotonskom pobudom odvaja se dihroičnim filtrom od pobudnog zračenja i detektuje fotomultiplikatorom. Računar upravlja procesom rasterskog skaniranja i detekcijom fluorescentnog signala, uz upotrebu akvizicione kartice.

B. Način snimanja uzorka

Izuzetno loš kvalitet slike zahteva ponovljeno snimanje uzoraka do nekoliko desetina puta (od 30 do 50 puta zavisno od uzorka koji se snima). Radi uštede vremena utrošenog na snimanje, uzorci se snimaju liniju po liniju tako da se tek nakon završenog višestrukog snimanja jedne linije prelazi na snimanje druge linije slike. Skeneri prvo pomeraju laserski snop u jednom smeru - sleva na desno. Potom se šalje signal za promenu smera kretanja skenera i započinje snimanje linije uzorka, zdesna nalevo. Promena smera unosi kašnjenje u signal jer ogledalo po inerciji nastavlja kretanje pre nego što uspe da promeni smer. Eksperimentalnim putem je procenjeno kašnjenje koji su uneli skeneri. Za analizu šuma koristili smo višestruko snimljene uzorke ljuspice sa krila noćnog leptira (*Diachrysis chrysitis*) i oka leptira (*Apatura ilia clythie*). Snimanja su ponovljena 50 puta. Usrednjavanjem ponovljenih pojedinačnih snimaka dobijen je zadovoljavajući kvalitet slike (uz i dalje prisutan šum).

C. Generisanje slike

Generisanje slike vrši se na osnovu podataka zapisanih u tekstualnom fajlu: dimenzije slike, broj ponovljenih snimanja kao i vrednosti piksela koje se nalaze u opsegu od 0 do 0.2. Na Sl. 2 prikazana je rekonstruisana slika pojedinačnog snimka uzorka (levo) kao i slika zadovoljavajućeg kvaliteta (desno) dobijena usrednjavanjem 50 ponovljenih snimanja.



Slika 2. a) Slika oka *Apatura ilia clythie* i b) krila noćnog leptira *Diachrysis chrysitis* (levo-pojedinačni snimka uzorka a desno- slika nastala usrednjavanjem 50 ponovljenih snimanja).

Analizom više pojedinačnih snimaka primećena je potpuno slučajna prostorna raspodela šuma.

III. ANALIZA ŠUMA

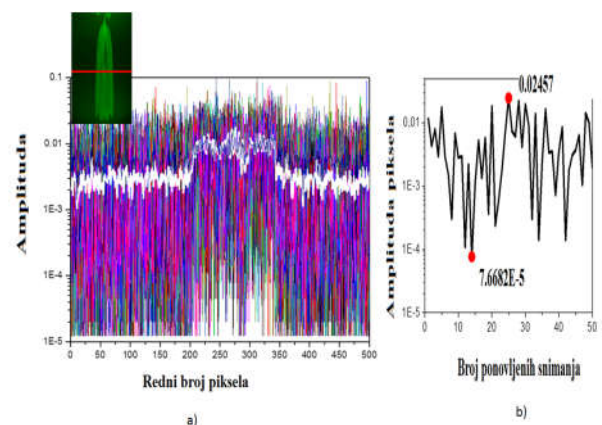
Izvori šuma dvofotonske mikroskopske slike mogu biti višestruki: termalni šum, šum fotonskog snopa, šum pozadine a neretko su zastupljeni istovremeno. Odabir odgovarajuće metode sa obradu pojedinačnih slika uzoraka zahtevao je detaljnije upoznavanje sa karakteristikama šuma, tj. analizu signala u vremenskom i frekvencijskom domenu.

Radi lakše vizuelizacije dinamike promene vrednosti piksela na istoj poziciji, kod ponovljenih snimanja uzorka posmatrali smo 1D signale (linija snimka uzorka). Nezavisnu analizu linijske slike omogućio je sam način snimanja uzorka. Na Sl. 3a prikazane su vrednosti piksela 250-te linije slike različitim bojama a belom bojom je označena odgovarajuća linija usrednjene slike. Primetno je odsecanje najnižih vrednosti amplituda. Na Sl. 3b prikazana je promena vrednosti piksela na istoj poziciji.

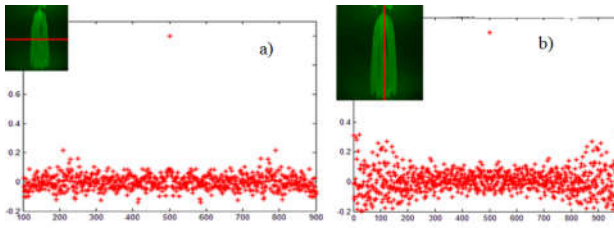
U cilju analize moguće linearne statističke zavisnosti između odmeraka pojedinačnih linija, analizirali smo autokorelaciju 1D signala (Sl. 4a -250-ta vrsta a Sl. 4b-250-ta kolona iste slike). Primetno je odsustvo bočnih lobova kao i da su vrednosti autokorelacione funkcije oko 0. Linearna međuzavisnost odmeraka 1D signala nije uočena ni kod analize 1D signala pozadine.

Mapu šuma konstruisali smo oduzimanjem pojedinačnih snimaka uzoraka (uzorci su statični u vremenu). Na Sl. 5 primećuje se pojačano prisustvo šuma na mestu gde se nalazi signal što potvrđuje jaku zavisnost šuma od signala. Možemo da pretpostavimo da je zavisnost signala od šuma posledica dominantnog prisustva šuma fotonskog snopa.

Frekvencijskom analizom Furijeovog spektra 1D signala kao i 2D signala, nismo mogli odrediti karakteristike filteri kojim bismo odstranili šum iz signala. Spektar usrednjene slike (50 ponovljenih snimaka) u velikoj meri se preklapa sa spektrom pojedinačnih snimaka.



Slika 3. a) Vrednosti piksela 250. linije 50 ponovljenih snimaka; bela linija označava odgovarajuću liniju usrednjene slike b) dinamika promena vrednosti piksela na istoj poziciji za 50 ponovljenih snimaka.



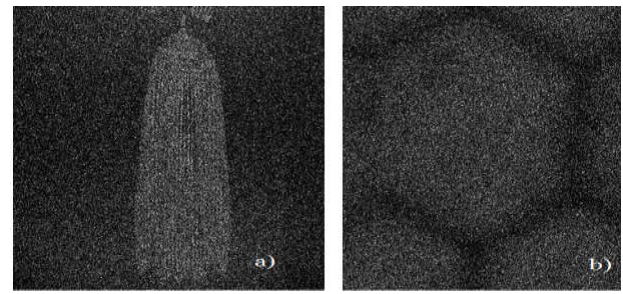
Slika 4. a) Autokorelacija linije 250 i b) autokorelacija kolone 250 slike uzorka ljušpice sa krila noćnog leptira.

IV. METODA

Redukciju uticaja šuma na sliku vršili smo u *wavelet* domenu. Kako bismo postigli što bolji efekat odstranjivanja šuma iz slike, prethodno smo izvršili predobradu svakog snimka pojedinačno. Cilj predobrade jeste stabilizovati nagle promene u vrednostima piksela usled pojačanog delovanja šuma fotonskog snopa. Posmatrali smo 1D signale formirane od piksela na istim pozicijama više ponovljenih snimaka uzorka. Nakon formiranja 1D signala, sortirali smo vrednosti piksela i odredili apsolutnu razliku između susednih vrednosti piksela. Sve vrednosti nakon maksimalne promene smo zanemarili. Potom smo tražili prvu sledeću najveću vrednost. Ako je tražena vrednost prvi sused maksimalne promene proverili smo vrednost njenog prethodnika. Ako je vrednost prethodnika treća vrednost po veličini, razliku susednih piksela iskoristili smo za definisanje praga. U suprotnom, posmatrali smo prethodnu maksimalnu promenu. Naime, veću vrednost piksela koja odgovara pomenutoj razlici, odabrali smo za prag. Ako je vrednost posmatranog piksela u slici veća ili jednaka predloženoj vrednosti praga, dodeljujemo joj minimalnu vrednost iz posmatranog 1D signala. U suprotnom sačuvamo izvornu vrednost piksela. Dinamičnije promene vrednosti piksela očekuju se na mestima gde se skenira signal zbog prirode šuma fotonskog snopa. Na ovaj način predobradom bismo uspešno stabilizovali nagle promene nastale na mestima gde se nalazi signal.

Koeficijente detalja svake pojedinačne slike uzorka izdvojili smo primenom DWT (*Discrete wavelet transform*). Smatrajući da je vrlo verovatno da male vrednosti koeficijenata odgovaraju šumu a veće vrednosti korisnom delu signala, opredelili smo se za odstranjivanje šuma na osnovu unapred zadatog praga. U literaturi postoje mnogobrojni radovi koji se bave određivanjem pragova za redukciju šuma u *wavelet* domenu. Možemo ih podeliti na grubu (*hard-thresholding*)/meku (*soft-thresholding*) primenu praga ili globalni prag/prag na nivou waveleta. Radi naglašene zavisnosti između signala i šuma, opredelili smo se za *soft-thresholding*. *Soft-thresholding* za razliku od *hard-thresholding* utiče i na vrednosti koeficijenata koje su veće od zadatog praga.

Varijansa šuma procenjena je pomoću estimatora:



Slika 5. Razlika dva pojedinačna snimka uzorka a) ljušpice sa krila noćnog leptira (*Diachrysis chrysitis*) i b) oka *Apatura ilia clythie*.

$$\hat{\sigma} = \frac{\text{median}(|c_i|)}{0.6745} \quad (1)$$

pojedinačno za svaki c_i koeficijent detalja (horizontalni, vertikalni i dijagonalni) a koeficijenti detalja modifikovani su u skladu sa izrazom

$$\hat{c}_i = \text{sign}(c_i)(|c_i| - \hat{\sigma}) \quad (2)$$

[3]. Nakon obrade sve slike su sumirane. Wavelet tipa *Haar* se pokazao kao najbolji izbor.

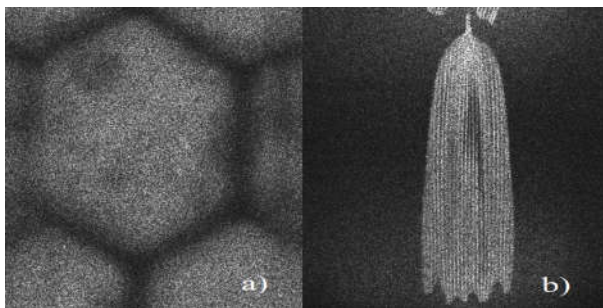
V. REZULTATI

Za procenu kvaliteta obrađene slike opredelili smo se za objektivnu meru SSIM (*Structural SIMilarity Index*) parametra. Naime, ljudsko oko je visoko obučeno za izdvajanje strukturnog sadržaja sa slike. Uobičajna mera kao što je srednja kvadratna greška može imati približno slične vrednosti a da mogućnost vizuelne ekstrakcije strukturne informacije nije ista [4].

Na Sl. 6 prikazani su rezultati obrade 12 slika. Nažalost, slika zadovoljavajućeg kvaliteta dobijena usrednjavanjem 50 ponovljenih snimaka i dalje sadrži značajnu količinu šuma, te se nije mogla koristiti kao referentna slika. Ručno smo kreirali sliku oka *Apatura ilia clythie* u poređenju sa kojom smo vršili procenu SSIM. SSIM indeksi ($\alpha = 0.1, \beta = 0.1, \gamma = 1$) procenjeni su na lokalnom nivou (blokovi 11x11) da bi se obezbedila stacionarnost statističkih momenata. Srednja vrednost SSIM parametara (MSSIM) obrađene slike (Sl. 6a) u poređenju sa referentnom slikom iznosi 113.055 dok za istu sliku dobijenu nakon usrednjavanja 12 slika vrednost parametra iznosi 56.507.

VI. ZAKLJUČAK

Akvizicija slika vršena je dvofotonski laserskim skeniranim mikroskopom ručno razvijenim na Institutu za fiziku u Zemun. Loš kvalitet slike i potpuno slučajna raspodela šuma zahtevali su velik broj, čak 50 snimanja, da bi se usrednjavanjem dobila slika prihvatljivog kvaliteta.



Slika 6. Razlika dva pojedinačna snimka uzorka a) ljuspice sa krila noćnog leptira (*Diachrysa chrysitis*) i b) oka *Apatura ilia clythie*.

Detaljnijom analizom šuma primećena je dominantna zavisnost šuma od signala što ukazuje na prisutnost šuma fotonskog snopa (verovatno posledica upotrebe fotomultiplikatorske cevi).

Obradom slike savremenim složenim metodama, razvijenim za obradu laserskih multifotonskih slika kao što su CANDLE, BM3D značajno je redukovano šum iz pozadine slike ali i redukovano informacioni sadržaj iz signala. Iz tih razloga predložena je predobrada slike sa namerom da se stabilizuju nagle promene vrednosti piksela na istim pozicijama kao i redukcija šuma u *wavelet* domenu. Vrednost praga određena je na osnovu procenjene varijanse šuma koeficijentata detalja. Korišćen je *soft-thresholding*. Slika zadovoljavajućeg kvaliteta dobijena je nakon 12 ponovljenih snimanja, što značajno redukuje vreme utrošeno na akviziciju slike.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je delimično finansiran projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR32040, III45016 i ON171038.

LITERATURA

- [1] P. Coupe, M. Munz, J. V. Manjon, E. S. Ruthazer, and D. L. Collins, "A CANDLE for a deeper in vivo insight," *Med. Image Anal.*, vol. 16, pp. 849-864, May 2012.
- [2] A. Danielyan, Y. W. Wu, P. Y. Shih, Y. Dembitskaya, and A. Semyanov, "Denoising of two-photon fluorescence images with Block-Matching 3D filtering," *Methods*, vol. 68, pp. 308-316, Jul 2014.
- [3] D.L. Donoho, and I.M. Johnstone, "Ideal spatial adaptation via wavelet shrinkage," *Biometrika*, vol. 81, pp. 425-455, September 1994.
- [4] Z. Wang, A. C. Bovik, H. R. Sheikh, and E. P. Simoncelli, "Image quality assessment: from error visibility to structural Similarity," *IEEE Trans. on Image Process.*, vol. 13, pp. 1-14, April 2004.

ABSTRACT

This paper presents results of noise reduction from laser scanning two-photon microscopy images in *wavelet* domain. The microscope was developed at the Institute of Physics in Belgrade. Processing was preceded by detailed analysis of noise in the time and frequency domain.

Noise reduction from laser scanning two-photon microscopy images in wavelet domain

Tamara Škorić, Željko Trpovski, Dejan Pantelić, Brana Jelenković, Aleksandar Krmpot, Mihailo Rabasović i Dragana Bajić