

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT  
FREIBURG  
INSTITUT FÜR INFORMATIK

Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung  
Prof. Dr. Hans Burkhardt



Entwicklung von Vorverarbeitungsverfahren (Entfaltung, etc.) für  
fluoreszenzmikroskopische 3D Volumendaten zur Verbesserung  
der nachfolgenden Erkennung mittels grauwertbasierter Invarianten

Studienarbeit

Thorsten Schmidt

August 2003 – Dezember 2003

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel erstellt wurde.

Freiburg, den

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Die Punktbildfunktion</b>	<b>7</b>
2.1	Allgemeine Bemerkungen zur Punktbildfunktion . . . . .	7
2.2	Bestimmung der Punktbildfunktion . . . . .	7
2.2.1	„Beads“ . . . . .	7
2.2.2	Vom bead zur psf . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Entfaltung von Pollen</b>	<b>15</b>
3.1	Bekannte Verfahren . . . . .	15
3.2	Wiener Entfaltung . . . . .	16
<b>4</b>	<b>Versuche und Ergebnisse</b>	<b>19</b>
4.1	Versuche mit kleinen beads ( $\varnothing 0.5\mu m$ ) . . . . .	19
4.2	Versuche mit grossen beads ( $\varnothing 1.0\mu m$ ) . . . . .	19
4.3	Ergebnisse . . . . .	19
<b>A</b>	<b>Dokumentation der erstellten Software</b>	<b>23</b>

## **Zusammenfassung**

In dieser Arbeit werden Methoden zur Restauration von 3D-Daten gewonnen aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen behandelt. Die dazu notwendige Bestimmung der Eigenschaften der Mikroskop-Optik wird auf theoretischem Wege erläutert und experimentell durchgeführt. Anschliessend wird aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen ein kurzer Einblick in die bekannten Restaurationsverfahren gegeben und ein spezielles Verfahren, die sogenannte „Wiener Entfaltung“ auf realen Beispieldaten (Pollen) ausgeführt und die Ergebnisse präsentiert.

# 1 Einführung

Die Gewinnung von dreidimensionalen Datensätzen aus einzelnen zweidimensionalen mikroskopischen Aufnahmen wird durch sogenanntes *Optical Sectioning* des Objektes unter dem Mikroskop erreicht. Das Verfahren ist einfach und basiert auf der Tatsache, dass immer genau eine Ebene des Objekts im Fokus der Mikroskop-Optik liegt. Durch schrittweises Durchfahren des Objekts können so Bilder aus äquidistanten fokalen Ebenen gewonnen werden. Setzt man diese wieder zusammen erhält man einen dreidimensionalen Datensatz in dem man das Objekt aus allen Richtungen gut erkennen kann.

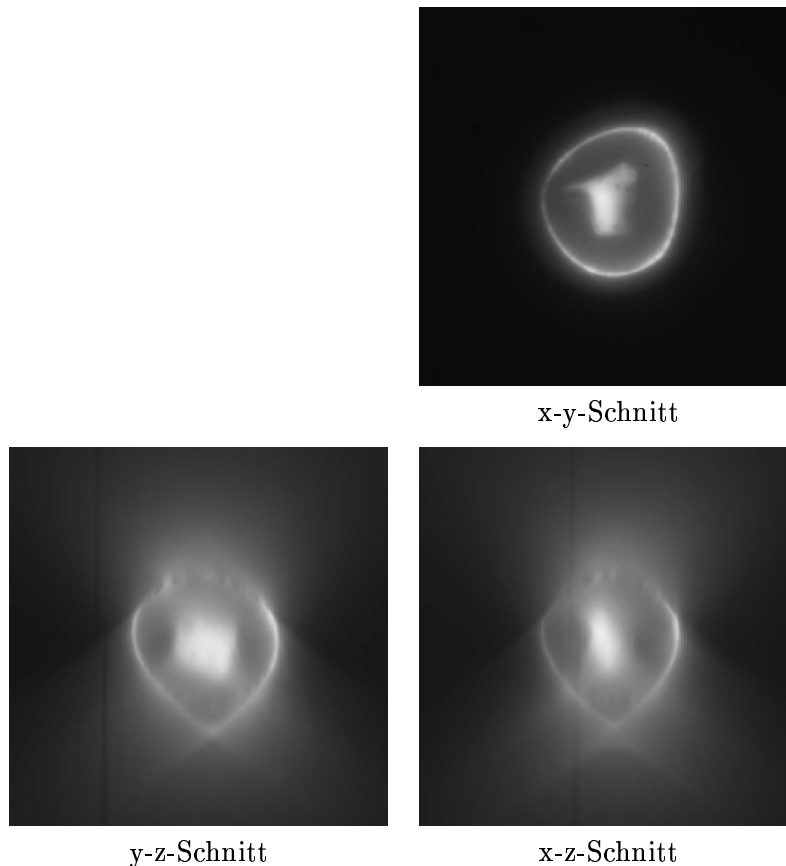


Abbildung 1.1: Schnitte durch einen Datensatz

Allerdings sieht man schon hier das Problem dieser Technik: In jedem aufgenommenen Bild sind nicht nur Informationen aus der fokalen Ebene enthalten, sondern auch „verschmierte“ Daten aus den benachbarten Ebenen, die bei dieser Aufnahme nicht im Fokus lagen und daher unscharf aufaddiert werden.

Es gibt eine Reihe von Ansätzen, mit diesen „Verschmierungen“ umzugehen, die alle unter dem Oberbegriff der Entfaltung zusammengefasst werden. Um die Namensgebung zu verstehen, betrachtet man das gängige Modell der Entstehung der Abbildung (vgl. [1, 2]) durch das Mikroskop, wie sie im folgenden kurz erläutert wird.

Die Eigenschaften der Optik des Mikroskops lassen sich unter gewissen Einschränkungen (vgl. [3]) durch die sog. dreidimensionale Punktbildfunktion (point spread function (psf))  $p(x, y, z)$  beschreiben. Faltet man diese Funktion mit dem Objekt  $o(x, y, z)$ , so erhält man das Bild  $i(x, y, z)$  des Objekts durch die Optik des Mikroskops betrachtet.

$$i(x, y, z) = o(x, y, z) * p(x, y, z) \quad (1.1)$$

Legt man obige Funktion zugrunde, wäre der optimale Weg die Daten des Objekts zurückzugewinnen, eine Faltung des Bildes mit der Inversen der psf, eine sog. Entfaltung.

$$o(x, y, z) = i(x, y, z) * p^{-1}(x, y, z) \quad (1.2)$$

Dabei stellt sich das erste Problem: Die Punktbildfunktion ist im Allgemeinen nicht invertierbar, so dass man bestenfalls eine gute Schätzung  $\tilde{o}(x, y, z)$  des Objektes mit Hilfe der Pseudoinversen der psf erhält. Dieses Problem sollte man sich bei der Betrachtung der Ergebnisse immer ins Bewusstsein rufen.

$$\tilde{o}(x, y, z) = i(x, y, z) * p^+(x, y, z) \quad (1.3)$$

Zusätzlich ist der Abbildungsprozess mit Rauschen  $n(x, y, z)$  behaftet, das durch den CCD Chip der verwendeten Kamera erzeugt und mit aufgenommen wird.

$$i(x, y, z) = o(x, y, z) * p(x, y, z) + n(x, y, z) \quad (1.4)$$

Im Allgemeinen liegt dem Rauschen eine Poisson-Statistik zugrunde, was soviel bedeutet, dass das Rauschen proportional mit der Signalintensität zunimmt. Betrachtet man die Entfaltung unter Berücksichtigung des Rauschens, erhält man folgende Formulierung:

$$\tilde{o}(x, y, z) + n(x, y, z) * p^+(x, y, z) = i(x, y, z) * p^+(x, y, z) \quad (1.5)$$

Man erkennt, dass ohne besondere Behandlung bei einer Entfaltung störende Einflüsse verursacht durch das Rauschen erhalten bleiben. Sie werden sogar durch betragsmässig grosse Werte in der inversen Punktbildfunktion erheblich verstärkt.

Um den Abbildungsprozess vollständig zu beschreiben, muss zusätzlich das Sampling der Daten in der Kamera berücksichtigt werden. Hierbei beschränke ich mich aber darauf zu prüfen, ob das Abtast-Theorem erfüllt ist. Dies lässt sich einfach nachrechnen, indem man zunächst bestimmt wie hoch die Auflösung der Optik ist. Diese ist durch die Numerische Apertur beschränkt und berechnet sich nach:

$$b = 0.5 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (1.6)$$

$$\Delta f = \frac{\lambda}{NA^2} \quad (1.7)$$

$b$  ist die minimale Linienbreite in  $x$ - $y$ -Richtung, die noch aufgelöst werden kann.  $\Delta f$  ist die Tiefenschärfe. Ist das Minimum der beiden Werte doppelt so gross, wie der Sampling-Abstand, so ist das Sampling-Theorem erfüllt. Darauf wird im folgenden Kapitel über die Gewinnung der Punktbildfunktion näher eingegangen.

Alternativ zu obiger Beschreibung im Ortsbereich wird in weiten Teilen dieser Arbeit die äquivalente Problemstellung im Frequenzbereich betrachtet. Dies ist praktisch, da sich dadurch sehr zeitintensive Berechnungen wie Faltungen auf eine punktweise komplexe Multiplikation reduzieren lassen.

$$f(x, y, z) * g(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1} \{ \mathcal{F} \{ f(x, y, z) \} \cdot \mathcal{F} \{ g(x, y, z) \} \} \quad (1.8)$$

Im weiteren Verlauf bezeichnen Kleinbuchstaben Daten im Ortsbereich und Grossbuchstaben Daten im Frequenzbereich, ausserdem werden als Frequenzeinheiten  $u, v, w$  eingeführt.

$$\mathcal{F} \{ f(x, y, z) \} = F(u, v, w) \quad (1.9)$$

# 2 Die Punktbildfunktion

## 2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Punktbildfunktion

Die Kenntnis der Punktbildfunktion ist für die meisten Entfaltungsalgorithmen notwendige Voraussetzung (Ausnahme: Blind Deconvolution (siehe Abschnitt 3.1)). Daher gibt es kommerzielle Programme, die für gegebene optische Systeme, die entsprechende Punktbildfunktion numerisch berechnen und damit ideal rauschfreie Punktbildfunktionen erzeugen. Diese können jedoch im Allgemeinen nicht alle einflussenden Faktoren berücksichtigen, wohingegen eine experimentell bestimmte Punktbildfunktion optimal an die verwendete Abbildungsumgebung angepasst ist. Zur Beschreibung der Eigenschaften ist jedoch die theoretische Punktbildfunktion besser geeignet.

Die Punktbildfunktion ist eine unendlich ausgedehnte Funktion in Abhängigkeit des Ortes. Folgende Parameter beeinflussen ihre Gestalt: Numerische Apertur ( $NA$ ) des Systems, die Wellenlänge  $\lambda$  des vom Objekt abgestrahlten Lichts, die Vergrößerung  $m$  und auch die verschiedenen Brechungsindizes der im Strahlengang auftretenden Medien (Luft, Öl, Glas und Einbettungsmedien wie Glycerin oder Gelvatol). Die theoretische Punktbildfunktion einer Optik ohne Berücksichtigung von Aberrationen (Linsenverzerrungen durch Linsenrandeffekte) ist rotationssymmetrisch um die  $z$ -Achse (längs des Strahlengangs). Sie bildet einen Doppelkegel, der in den im nächsten Kapitel gezeigten experimentellen Punktbildfunktionen (Abb. 3.2 obere Zeile) deutlich erkennbar ist.

Um ein etwas besseres Verständnis für die Punktbildfunktion zu erhalten, betrachtet man zusätzlich zur  $psf$  im Bildraum, auch ihre Fourier-Transformierte, die sogenannte Objekt Transfer Funktion (OTF). Hier wird deutlich, welche Frequenzanteile durch die Optik überhaupt abgebildet werden können. Die OTF ist, wie auch ihr Pendant im Bildraum, rotationssymmetrisch um die  $z$ -Achse. Im Gegensatz zur  $psf$  (Doppelkegel) bildet die OTF einen Torus. Auch dies erkennt man in den experimentell bestimmten Punktbildfunktionen (Abb. 3.2 untere Zeile) im nächsten Kapitel deutlich. In der theoretischen OTF sind die Koeffizienten in den Bereichen ausserhalb des Torus 0. Das heisst, Frequenzen in diesen Bereichen können durch die Optik nicht erfasst werden. Dieses Problem wird als das sogenannte „Missing Cone“ Problem [3] bezeichnet, da die fehlenden Frequenzanteile der Punktbildfunktion einen Doppelkegel bilden. Mit linearen Restaurationsalgorithmen wie der später behandelten Wiener Entfaltung lassen sich diese Frequenzen nicht wiederherstellen!

## 2.2 Bestimmung der Punktbildfunktion

### 2.2.1 „Beads“

Die Punktbildfunktion ist die Impulsantwort der Optik des Mikroskops. Also ist es naheliegend, die Optik mit einem  $\delta$ -Impuls zu erregen und das Bild zu betrachten. Natürlich kann man den idealen  $\delta$ -Impuls nicht erzeugen, es ist aber möglich durch möglichst kleine, aber sehr helle Objekte nahezu den gleichen Effekt zu erzielen. Möglichst klein bedeutet, dass die Grösse des Objekts unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen muss.

Speziell zu diesem Zweck gibt es sogenannte „beads“. Das sind mit Fluoreszenz-Farbstoffen angereicherte Kunststoffkügelchen. Sie sind in verschiedenen Grössen erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit, finden „beads“ mit  $0.5$  und  $1.0\mu m$  Durchmesser Verwendung. Diese haben sich als brauchbar erwiesen bezüglich hinreichend geringer Grösse und ausreichender Leuchtstärke bei verhältnismässig geringer Anregungs-Energie. Um letzte Anforderung zu verstehen, muss man wissen, dass die „beads“ durch die Erregungsstrahlung ausbleichen. Je höher dabei die Energie, desto schneller der Ausbleichprozess.

Aus dem gleichen Grund wurden auch Versuche mit einer Neuentwicklung des IMTEK in Verbindung mit dem biologischen Institut unternommen, sogenannten Nanokristallen. Sie sind wie der Name sagt, erheblich kleiner als die beads und haben eine wesentlich grössere Leuchtkraft. Hinzu

kommt, dass sie quasi nicht ausbleichen, da die Gitterstruktur sehr stabil ist. Leider ist es nicht gelungen in kurzer Zeit ein Präparat herzustellen, dass die vorbereiteten bead-Präparate ersetzen konnte, weswegen hier keine Ergebnisse präsentiert werden können.

Die beads werden mit dem gleichen optical sectioning Verfahren aufgenommen, wodurch die gleichen Verhältnisse geschaffen werden, wie sie später auch bei den Proben, die entfaltet werden sollen auftreten. Dies schließt Besonderheiten in der Optik ebenso ein, wie das Kamerarauschen und systematische Störungen, wie Schmutz im Strahlengang oder Streulicht aus der nicht perfekt abgedunkelten Umgebung. Die systematischen Störungen lassen sich durch die Entfaltung allerdings nicht beheben, dies erfordert einen extra Vorverarbeitungsschritt, der jedoch nicht die Informationen „hinter den Schmutzpartikeln“ wiederherstellen kann. Er kann lediglich deren Einfluss dämpfen. Um ein Gefühl für die gewonnenen Daten zu erhalten, zeigt Abb. 2.1 Schnitte aus einer gewonnenen bead-Aufnahme.

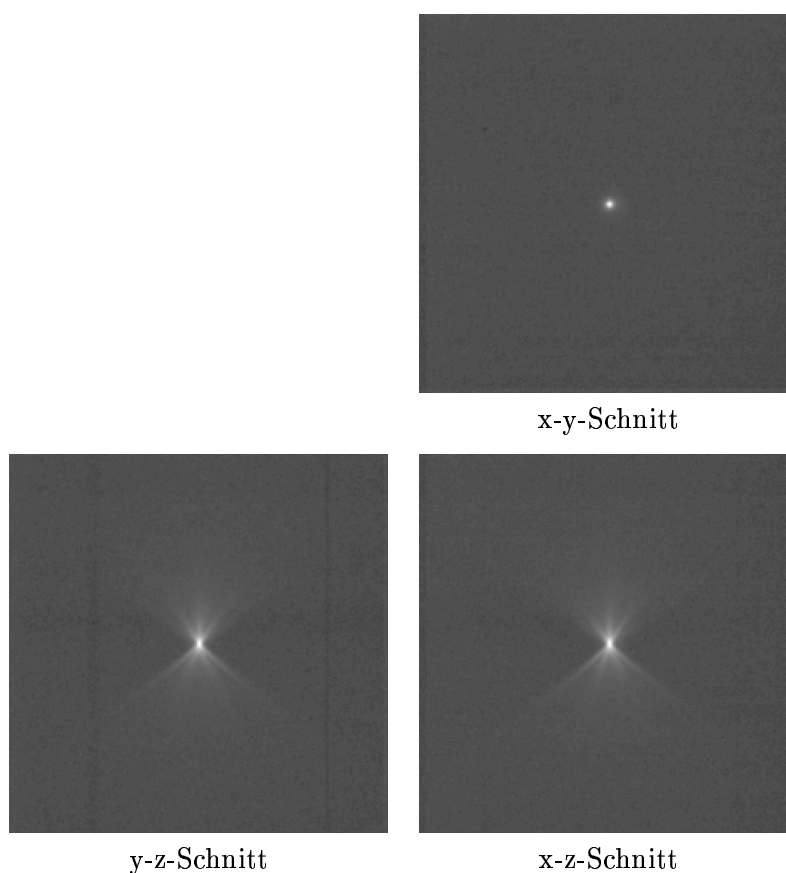


Abbildung 2.1: Schnitte durch die 3d Darstellung eines aufgenommenen beads

Die Abbildung zeigt einen bead mit Durchmesser  $0.5\mu m$ , aufgenommen mit einem  $100x$  Öl Immersions Objektiv mit numerischer Apertur 1.3 und einer Erregung mit  $450nm$  Wellenlänge. Die Schrittweite des Focus-Scans war so eingestellt, dass die Auflösung in x-y-Richtung der Auflösung in z-Richtung entspricht, das heisst die aufgenommenen Voxel sind innerhalb der Schrittmotor-Toleranzen kubisch und haben eine Ausdehnung von  $65nm \times 65nm \times 65nm$ . Die x-y-Auflösung des Mikroskops ist nach Formel 1.6  $173nm$ . Die Auflösung in z-Richtung ist nach Formel 1.7  $266nm$ . Damit ist das Sampling Theorem erfüllt, so dass von dieser Seite keine Artefakte zu erwarten sind. Die ursprünglich  $512^3$  Voxel wurden nach entsprechender Filterung auf  $256^3$  Voxel verkleinert, da sonst bei der weiteren Verarbeitung der Arbeitsspeicher der verwendeten Rechner nicht ausgereicht hätte und die Rechenzeiten von wenigen Sekunden auf einige Stunden angestiegen wären.

Bei der Betrachtung der Abbildung erkennt man gut die weitreichenden Ausläufer des Bildes des beads in Ebenen, die weit ausserhalb des eigentlich kugelförmigen beads liegen. Auch erkennt man, dass im Gegensatz zu den theoretischen Punktbildfunktionen die Symmetrie in z-Richtung nicht mehr vorhanden ist. Dies ist eine Eigenschaft des hier verwendeten Objektivs, das durch die theo-



retische psf nicht beschrieben werden kann. Trotz der Wahl eines relativ grossen beads, der viel Licht abstrahlt, liegen die Intensitäten seine Ausläufer recht bald unterhalb der Rauschintensität. Das heisst, die Gewinnung einer (unendlich ausgedehnten) Punktbildfunktion aus diesen Daten ist nicht möglich. Allerdings reicht der Teil, der erhalten bleibt aus, einen grossen Teil der der Faltung zugrunde liegenden Störungen zu entfernen. Ein weiteres Problem, dass sich ergibt wenn man obige Berechnungen der Auflösung des Mikroskops betrachtet, ist, dass der bead bereits zu gross ist um eine Punktlichtquelle zu beschreiben. Nur Objekte kleiner  $0.17\mu m$  sind für die Optik punktförmig. Auf dieses Problem wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

### 2.2.2 Vom bead zur psf

Wäre der bead klein genug gewesen um unter die Auflösungsgrenze des Mikroskops zu fallen, wäre man bereits bei der gewünschten Punktbildfunktion angelangt. Da dem aber nicht so ist, wie gerade erläutert, benötigt man noch ein Verfahren aus der Abbildung des kugelförmigen beads die Punktbildfunktion zu bestimmen.

Um dies noch eindrücklicher zu motivieren wird in Abb. 2.2 das Resultat einer Entfaltung mit einer „psf“ mit Radius  $1.0\mu m$  gezeigt.

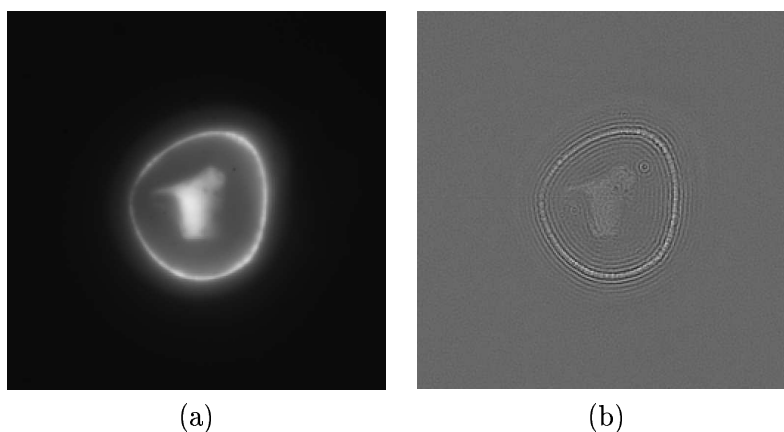


Abbildung 2.2: x-y-Schnitte durch einen Datensatz vor der Entfaltung (a) und nach der Entfaltung mit einer „Punktbildfunktion“ mit  $1.0\mu m$  Durchmesser (b)

Man erkennt deutlich die Linien-Artefakte entlang der Strukturen des hier gezeigten Eiben-Pollens. Intuitiv kann man sich deren Entstehung klar machen, wenn man die Strukturgrössen des Pollens mit dem Durchmesser des beads vergleicht. Die Strukturen sind teilweise so dünn, dass sie nicht durch die Faltung eines Objektes mit einer Kugel der Grösse des beads entstanden sein können. Um dies zu ermöglichen wären mehrere Linien mit positiven und negativen Intensitäten erforderlich. Dies ist natürlich in der Realität nicht möglich, aber die hier angewandte Wiener Entfaltung (siehe Abschnitt 3.2) ist nicht auf positive Werte beschränkt so dass gerade das gezeigte Bild entsteht. Alternativ kann man auch eine Erklärung im Frequenzbereich angeben: Da die Punktbildfunktion bei der Entfaltung invertiert wird und sie durch ihre Grösse im Frequenzbereich die charakteristischen Nullstellen einer Kugel enthält, werden Frequenzen nahe dieser Nullstellen bei der Entfaltung übergewichtet, was zu isotropen hochfrequenten Oberschwingungen führt.

Prinzipiell ist es theoretisch möglich aus jedem beliebigen aufgenommenen Objekt die Punktbildfunktion des abbildenden Systems zu bestimmen, die einzige Voraussetzung ist die Kenntnis der wahren Form des Objekts. Um dies zu untermauern betrachtet man die allgemeine Formel (1.1) der rauschfreien optischen Abbildung aus der Einführung:

$$i(x, y, z) = o(x, y, z) * p(x, y, z)$$

Kennt man nun die Form des Objekts  $o(x, y, z)$ , sowie das Bild des Objekts  $i(x, y, z)$ , so lässt sich die Formel folgendermassen umstellen:

$$p(x, y, z) = o^{-1}(x, y, z) * i(x, y, z) \quad (2.1)$$

Man sieht, dass sich die Punktbildfunktion durch eine Entfaltung des Bildes mit der Form des Objekts bestimmen lässt. Natürlich muss auch hier das Rauschen berücksichtigt werden, was zu folgender Formulierung führt:

$$p(x, y, z) + o^{-1}(x, y, z) * n(x, y, z) = o^{-1}(x, y, z) * i(x, y, z) \quad (2.2)$$

Man sieht, dass wie auch in der eigentlichen Entfaltungsaufgabe auch hier das Rauschen potentiell verstärkt werden kann. Dies ist an Stellen mit einem hohen Signal zu Rauschverhältnis (SNR) relativ unkritisch, aber in Bereichen in denen das Signal nur sehr klein ist, kann das zu erheblichen Fehlern führen.

Vernachlässigt man diesen Fehler zunächst und betrachtet wieder das obige Ziel, nämlich die Bestimmung der Punktbildfunktion aus der Aufnahme eines beads, sieht man, dass in diesem Fall die Form des beads bekannt ist. Er ist nämlich kugelförmig mit einem festen und bekannten Radius  $r$ . Hier wird von einer gleichmässigen Verteilung der Fluoreszenz-Farbstoffe innerhalb des beads ausgegangen und daher eine solide Kugel verwendet. Dies ist nicht zwangsläufig korrekt, genaue Kenntnis über die Verteilung der Farbstoffe würde wahrscheinlich zu besseren Ergebnissen führen. Jedoch bereits unter dieser vereinfachenden Annahme wurden gute Ergebnisse erzielt.

Die Erzeugung einer Referenzkugel ist verhältnismässig einfach. Es ist nur zu beachten, dass das Frequenzspektrum der Kugel derartig begrenzt ist, dass ein Aliasing verhindert wird. Dies wurde gelöst, indem anstelle einer Stufenfunktion an der Kugelbegrenzung die Sigmoidfunktion (s. Abb 2.3) verwendet wurde.

Durch entsprechende Anpassung der Steigung an die verwendete Auflösung erhält man eine tief-

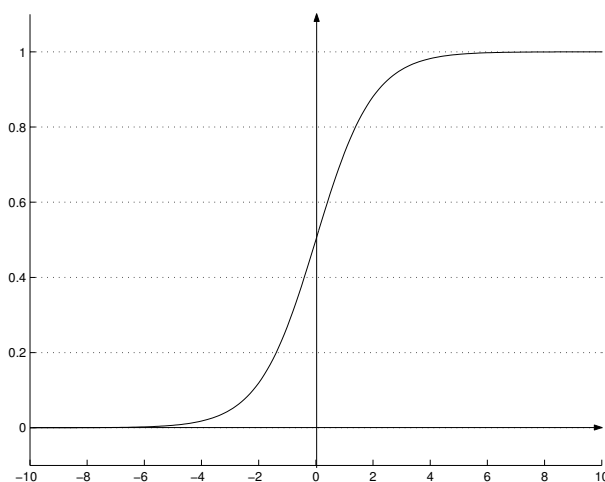


Abbildung 2.3: Die Sigmoid Funktion  $\sigma(x) = \frac{1}{1+e^{-x}}$

passgefilterte Kugel und damit ein begrenztes Frequenzspektrum.

Ein solches Spektrum wird in Abb. 2.4 in der zweiten Spalte gezeigt. Links daneben sieht man zum Vergleich das Spektrum eines beads der gleichen Grösse. Um die Ähnlichkeiten deutlich zu machen, wurde hier ein grösserer bead mit  $1.0\mu m$  verwendet, da die Frequenz der zugrunde liegenden  $\left(\frac{\sin x}{x}\right)^2$ -Funktion proportional mit der Kugelgrösse zunimmt und dadurch hier das erste Minimum dieser Funktion noch im dargestellten Spektrum liegt. Bei den kleinen beads mit  $0.5\mu m$  Durchmesser verschiebt sich diese soweit in Richtung der hohen Frequenzen, dass sie nur in den Ecken der Darstellung der DFT noch zu erkennen ist.

Zur Untermauerung der Ähnlichkeit zwischen den Spektren zeigt Abb. 2.5 die Funktionen der über alle Radien gemittelten Koeffizientenbeträge in verschiedenen Tiefen  $w$  der Frequenzspektren.

In der mittleren Ebene erkennt man sehr schön die Ähnlichkeiten der Spektren über einen weiten Bereich. Die Beträge der tiefen Frequenzen sind jedoch durch die Referenzkugel untergewichtet. Um zu prüfen, ob es sich dabei um eine der optischen Eigenschaften des Systems handelt, wurde der gleiche Versuch mit der Abbildung eines Pollens unternommen (ohne Abb.), auch hier erkennt man in der logarithmischen Darstellung einen ähnlichen Abfall der Beträge, so dass zu vermuten ist, dass dies die Tiefpass-Charakteristik der Optik beschreibt. Die unterschiedliche Form der Maxima der Spektren lässt sich dadurch jedoch nicht erklären. Diese kann ich nur durch die Annahme

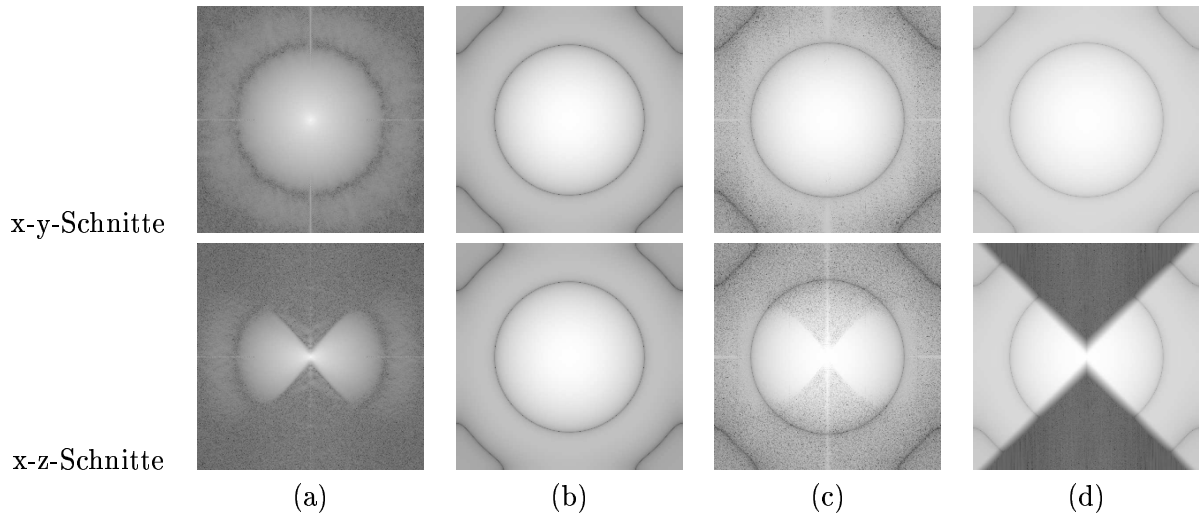


Abbildung 2.4: Schnitte durch die FFT eines  $1.0\mu\text{m}$  beads (a) neben Schnitten durch die FFT einer Kugel (b), nach Filterung mit Hilfe der Statistik eines kleineren beads (c) und nach Entfernen der Frequenzen die dem „missing cone“ zuzuordnen sind (d)

der Gleichverteilung der Fluoreszenzfarbstoffe im bead erklären, die so nicht ganz korrekt zu sein scheint. Im Bereich der hohen Frequenzen treten ebenfalls Unterschiede auf, die jedoch darauf zurückzuführen sind, dass hier das Signal bereits so weit abgefallen ist, dass das Rauschen dominiert (Zusätzlich standen ab einem Radius von mehr als 128px nicht mehr so viele Samples zur Verfügung, da der Bereich, in dem gemittelt wurde, ein Quadrat der Grösse  $256 \times 256 \text{px}$  war). In der synthetischen Kugel tritt dieses Rauschen nicht auf.

Je weiter man sich von der mittleren Ebene weg bewegt, desto grösser wird der Einfluss des „Missing Cone“, was durch ein Abflachen der Kurve im Bereich der tiefen Frequenzen zu erkennen ist. Alles was hier bleibt ist das Spektrum des Rauschens! Daher sind auch bei der „Missing Cone“-korrigierten Kugel die Fourierkoeffizienten-Beträge in diesem Bereich wesentlich geringer als im Spektrum des beads. Die Spektren wirken „diffuser“, als das Spektrum in der mittleren Ebene. Die Minima und Maxima sind nicht mehr so deutlich ausgeprägt und man erkennt deutliche Diskrepanzen zwischen den Maximalwerten von bead und Kugel. Eine genaue Analyse der Gründe sprengt jedoch den Rahmen dieser Arbeit und bleibt weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet überlassen.

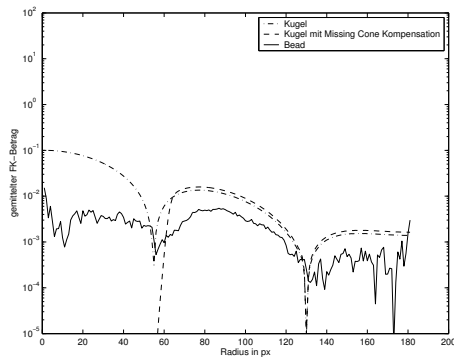
Wie man in den Schnitten (Abb. 2.4 2. Spalte) erkennt, ist die Fourier-Transformierte einer Kugel punktsymmetrisch. Durch den „Missing Cone“ geht im Frequenzbereich des beads, diese Kugelsymmetrie verloren, was im x-z-Schnitt des beads erkennbar wird. Würde man nun einfach den bead mit der Kugel entfalten, würden Frequenzen, die durch die Optik nicht erfasst werden, in diesen Bereichen verstärkt werden, da das Frequenzspektrum des beads an diesen Stellen nicht die theoretischen Nullwerte der Koeffizienten aufweist, sondern das Spektrum des Rauschens wiedergespiegelt wird. Da die Optik beschrieben werden soll, ist das ein unerwünschter Effekt. Man muss also den „missing cone“ künstlich in die Kugel einbringen, wozu ein generischer Operator  $\text{crop}(\cdot)$  eingeführt wird.

Erste Versuche in diese Richtung sind unter Zuhilfenahme der Statistik eines  $0.5\mu\text{m}$ -beads erfolgt, indem die Fourier-Transformierte der Kugel unter Verwendung dieser Statistik gefiltert wurde.

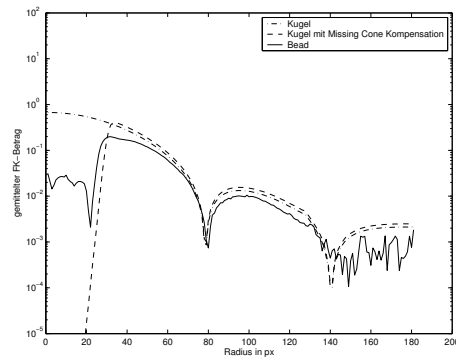
$$\text{crop}_1(X) = \frac{X \cdot |S|^2}{|S|^2 + |N|^2} \quad (2.3)$$

$|S|$  ist dabei das Leistungsspektrum des Signals der Aufnahme des  $0.5\mu\text{m}$  beads und  $|N|$  das Leistungsspektrum des Rauschens in der Aufnahme. Für die Bestimmung dieser Spektren sei auf Abschnitt 3.2 verwiesen. Die obige Vorschrift ist an die Wiener Entfaltung (Abschnitt 3.2) angelehnt unter Annahme der Identität als Punktbildfunktion.

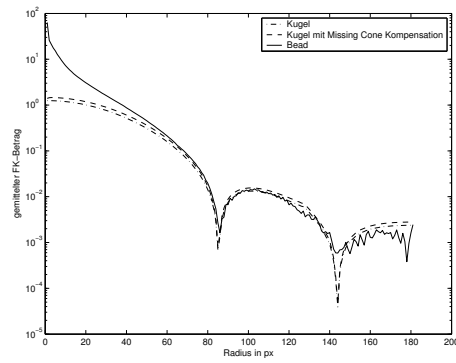
Dies unterdrückt die Frequenzen im „Missing Cone“ mit einem konstanten Faktor, das heisst, die charakteristische  $\left(\frac{\sin x}{x}\right)^2$ -Form des Frequenzspektrums bleibt erhalten. Hinzu kommt, dass man sich weitere Störungen im Bereich der korrekt abgebildeten Frequenzen einhandelt, da auch der kleine



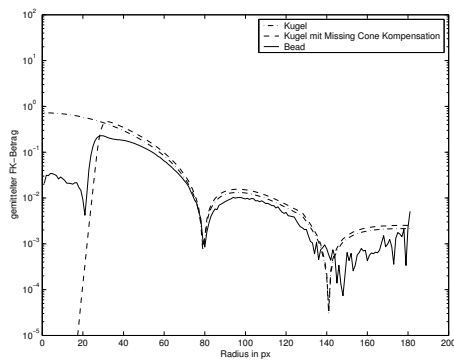
$z = -64\text{px}$



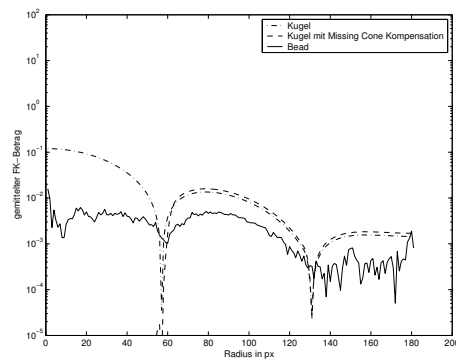
$z = -32\text{px}$



Mittlere Ebene ( $z = 0\text{px}$ )



$z = 32\text{px}$



$z = 64\text{px}$

Abbildung 2.5: Über den Radius gemittelte Beträge der Fourierkoeffizienten in verschiedenen z-Ebenen der Frequenzspektren eines beads, einer Kugel und einer Kugel nach Entfernen der Frequenzen die dem Missing Cone zugeordnet wurden

bead, nichts anderes als eine kleine Kugel ist, wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde. Insgesamt ist also zu erwarten, dass die Ergebnisse nicht optimal sein werden.

Im zweiten Versuch wurde deshalb das a-priori Wissen, über die Lage des „Missing Cone“ direkt ausgenutzt und die Fourierkoeffizienten an diesen Stellen explizit unterdrückt. Die Grenzen zwischen abgebildeten Frequenzen und den Frequenzen des „Missing Cone“ lassen sich für theoretische Punktbildfunktionen analytisch bestimmen. Da jedoch die Erzeugung einer theoretischen Punktbildfunktion unter Berücksichtigung aller Parameter ein schwieriges Problem darstellt und es nicht Teil dieser Arbeit sein soll, wurde hier der Rand geschätzt und der Übergang unter Verwendung der bereits erwähnten Sigmoid-Funktion unscharf maskiert.

$$\text{crop}_2(X(u, v, w)) = \sigma(\alpha(\sqrt{u^2 + v^2} - \beta w + \gamma)) \cdot X \quad (2.4)$$

Mit dem Parameter  $\alpha$  lässt sich dabei die Steigung der Sigmoid-Funktion einstellen und damit die Schärfe der Grenze festlegen.  $\beta$  bestimmt den Öffnungswinkel des konischen Bereiches, der als „Missing Cone“ angenommen wird und  $\gamma > 0$  garantiert, dass die tiefen Frequenzen (insbesondere der Mittelwert) ungedämpft erhalten bleiben. Allgemein kann man unter Verwendung von  $\gamma$  bestimmen, ob die einzelnen Kegel des „Missing Cones“ (der einen Doppelkegel bildet), getrennt sind, oder sich überschneiden. Im Beispiel wurde  $\beta = 1$  gewählt, da der „Missing Cone“ in unserem Fall etwa einen Öffnungswinkel von  $90^\circ$  hat. Der Tatsache, dass es sich dabei nur um eine optische Schätzung handelt, wurde Rechnung getragen indem mit  $\alpha = 2$  noch ein relativ breiter Unschärfbereich angenommen wurde. Dies ist sicherlich keine theoretisch fundierte Vorgehensweise und es wird empfohlen weitere Versuche unter Verwendung der echten Grenze zu unternehmen um damit die Ergebnisse noch zu verbessern.

Nach dieser Vorbereitung der Kugel, kann nun die Punktbildfunktion nach folgender Vorschrift geschätzt werden:

$$\widetilde{\text{psf}}(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{\mathcal{F} \{ \text{bead}(x, y, z) \}}{\text{crop}(\mathcal{F} \{ \text{sphere}(x, y, z) \})} \right\} \quad (2.5)$$

Für  $\text{crop}(\cdot)$  wird einer der oben eingeführten Operatoren eingesetzt oder ein beliebiger anderer Operator, der die Wirkung des Rauschens in Bereichen niedriger Koeffizienten des Frequenzspektrums des beads dämpft.

Die erhaltene Punktbildfunktion enthält, trotz der Entfaltung mit der Kugel in der der „Missing Cone“ berücksichtigt wurde, noch immer einen hohen Rauschanteil insbesondere in den hohen Frequenzen. Auch sind alle systematischen Fehler der Aufnahme noch enthalten. Um diese Störungen auch noch bestmöglich zu entfernen, kann man das Vorwissen über die Rotationssymmetrie der Punktbildfunktion, bzw. deren Frequenzspektrum nutzen, indem man ebenenweise für alle Radien die Intensität, bzw. die Koeffizienten mittelt. Dies setzt voraus, dass die psf perfekt im Datenblock zentriert ist (zumindest bzgl  $x$ - und  $y$ -Koordinate), was jedoch einfach zu erreichen ist, da nur das Maximum der Intensität der psf gefunden und in die Mitte des Blocks geschoben werden muss. Sei  $\text{circle}(x, y) := \{(i, j) | \sqrt{x^2 + y^2} = \sqrt{i^2 + j^2}\}$  die Menge aller Punkte die mit  $(x, y)$  auf einem Kreis liegen.

Die korrigierte Schätzung der psf ist dann:

$$\widehat{\text{psf}}(x, y, z) = \frac{1}{|\text{circle}(x, y)|} \sum_{(i, j) \in \text{circle}(x, y)} \widetilde{\text{psf}}(i, j, z) \quad (2.6)$$

Oder im Frequenzspektrum:

$$\widehat{\text{psf}}(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \widehat{\text{OTF}}(u, v, w) \right\} = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{1}{|\text{circle}(u, v)|} \sum_{(i, j) \in \text{circle}(u, v)} \widetilde{\text{OTF}}(i, j, w) \right\} \quad (2.7)$$

Um eine genaue Schätzung zu erreichen, muss dabei sehr fein abgetastet werden. In der Implementation wurde eine Abtastung von 100 Werten pro Pixel gewählt, womit die Fehler reduziert aber nicht vollständig entfernt wurden.

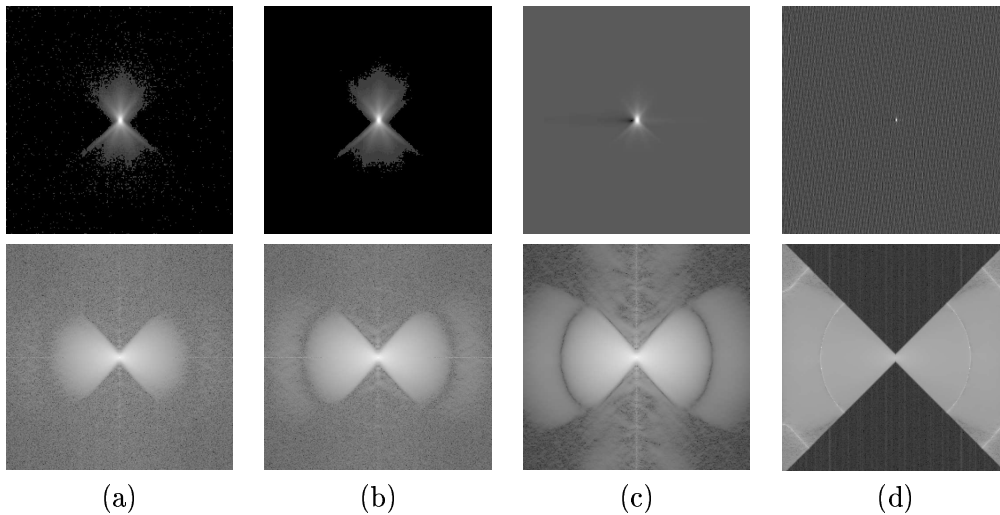


Abbildung 2.6: x-z-Schnitt durch die Aufnahme eines  $1.0\mu m$  beads im Ortsbereich (oben) und im Frequenzbereich (unten) (a), der Mittelwert aus 10 Aufnahmen dieses beads (b), nach Ausnutzung der Rotationssymmetrie (c), nach Entfaltung mit einer Kugel (d)

In Abbildung 2.6 ist der Prozess der Schätzung der Punktbildfunktion dargestellt.

Wie man in der letzten Spalte erkennt, ist der Prozess der Entfaltung mit der Kugel bei den verhältnismässig grossen beads von  $1.0\mu m$  sehr fehlerbehaftet. Dies liegt daran, dass die Koeffizienten entlang der Minima des Kugelspektrums zu stark angehoben werden, was an den hellen Ringen des Frequenzspektrums zu erkennen ist. Den Grund dafür findet man in Abb. 2.5, wenn man die Minima der Kurven vergleicht. Man sieht, dass die Minima der Referenzkugel etwas tiefer liegen, als die des beads, während der Rest der Kurve in dieser Umgebung recht gut angeglichen ist. Das überlagerte Muster im Bildbereich ist gerade das Muster, dass durch die Überlagerung der Frequenzen in diesen Ringen erzeugt wird. Bei der Entfaltung wird das Spektrum invertiert, das heisst diese Frequenzen werden dann untergewichtet, was zu optisch unmerklichen Artefakten führt.

# 3 Entfaltung von Pollen

## 3.1 Bekannte Verfahren

Wie bereits in der Einführung erwähnt gibt es eine ganze Reihe von Verfahren zur Rekonstruktion von 3D Daten aus einem Stapel von Abbildungen optischer Schnitte (vgl. [1, 2]). Da es wichtig ist sich einen Überblick über gängige Verfahren zu verschaffen, zähle ich diese kurz mit den wichtigsten Eigenschaften auf:

- *Iterative Verfahren*

Meist werden zur Entfaltung iterative Methoden eingesetzt, da sie den Vorteil haben unter gewissen Voraussetzungen und Nebenbedingungen die Frequenzen des „Missing Cones“ wiederherstellen zu können (vgl. [4]), wozu, wie bereits erwähnt, die linearen Verfahren nicht in der Lage sind. Daher haben sich die nachfolgenden Verfahren zu den Standardverfahren entwickelt und sind aktives Forschungsgebiet.

- *Iterativ unter Nebenbedingungen*

Ziel der iterativen Verfahren ist unter Kenntnis der Punktbildfunktion das Originalobjekt schrittweise zu rekonstruieren. Um dabei die Güte der Schätzung in jedem Schritt zu bestimmen, wird eine geeignete Bewertungsfunktion benötigt, die maximiert werden soll (alternativ kann man auch den geschätzten Fehler minimieren). Dabei werden in jedem Schritt bestimmte Voraussetzungen und Nebenbedingungen überprüft und gegebenenfalls die Schätzung entsprechend korrigiert. Die einfachste und intuitivste Bedingung, die in jedem Schritt gegeben sein muss, ist die Positivität der rekonstruierten Daten, da die Darstellung auf Lichtintensitäten beruht, die nicht negativ sein können. Eine zweite verwendete Bedingung ist ein Glattheitskriterium, das sicherstellt, dass Oberflächen stetig sind. Man kann beliebig viel Vorwissen in Form solcher und ähnlicher Bedingungen in iterative Verfahren einbauen, womit sie sehr flexibel, aber im Vergleich zu den linearen Verfahren sehr langsam sind. Der wohl bekannteste Algorithmus, dieser Gruppe ist der *Expectation Maximization* Algorithmus.

- *ML Entfaltung (Maximum Likelihood)*

Maximum Likelihood Entfaltung bezieht in seine iterative Rekonstruktion ein probabilistisches Modell mit ein und versucht unter diesem Modell die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass die Schätzung dem Originalobjekt entspricht. Vergleiche haben gezeigt, dass mit Algorithmen dieser Klasse sehr gute Ergebnisse zu erzielen sind (vgl. [2, 4]).

- *Blind Deconvolution*

Blind Deconvolution nimmt eine Sonderrolle unter allen vorgestellten Entfaltungsverfahren ein. Unter Verwendung dieses Algorithmus ist die Kenntnis der Punktbildfunktion nicht erforderlich. Man erhält sie mit der Rekonstruktion der Daten als Ausgabe des Algorithmus. Dies macht dieses Verfahren sehr populär, da die Bestimmung der realen Punktbildfunktion einer Optik ein Problem darstellt, insbesondere in der Durchlichtmikroskopie, und die theoretischen Punktbildfunktionen nicht alle Einflüsse berücksichtigen. (vgl. [5])

- *lineare Verfahren*

- *k-nächste Nachbar Entfaltung (nearest neighbor deblurring)*

Die k-nächste Nachbar Entfaltung ist genau genommen keine Entfaltung im eigentlichen Sinne, sondern ein Algorithmus, der als Ziel hat die Bildqualität zu verbessern unter Zuhilfenahme der Punktbildfunktion. Es ist quasi eine Ressourcen sparende Version des Inversen Filters, da hier ebenenweise das Objekt durch Verwendung der k nächstliegenden Ebenen verbessert wird. Dabei wird keine Vollständige Entfaltung durchgeführt,

sondern man beschränkt sich auf das Entfernen des Einflusses der benachbarten Ebenen auf die momentan betrachtete. Dadurch ist er sehr schnell und wird verwendet, wenn wenig Rechenleistung und Speicherplatz zur Verfügung steht.

– *Inverse Filter (Wiener Entfaltung)*

Die Grundlage des Inversen Filters wurde bereits in der Einführung zu dieser Arbeit gegeben. Das Ziel ist die Pseudoinverse der psf zu bestimmen und anschliessend die aufgenommenen 3D-Daten mit dieser Pseudoinversen zu falten. Unter Berücksichtigung des Rauschens erhalten wir die Wiener Entfaltung, die im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

## 3.2 Wiener Entfaltung

Wie in der Einführung motiviert wurde, führt das Rauschen beim inversen Filter zu erheblichen Störungen im entfalteten Datenblock. Um nun die Einflüsse des Rauschens zu unterdrücken, wurde das Wiener Filter entwickelt, das nachweislich die Daten unter genauer Kenntnis des Rauschens optimal (bzgl. des Mittleren Fehlerquadrats) rekonstruieren kann. Diese Eigenschaft lässt sich in vielen Büchern zur digitalen Signalverarbeitung nachlesen, in denen diese Eigenschaft auch einfach nachgewiesen wird. Ich verweise hierzu auf die Numerical Recipes [6].

Für die Anwendung des Wiener Filters muss das Rauschen in den zu entfaltenden Daten bestimmt werden. Es zu schätzen ist möglich, wenn mehr als eine Aufnahme des gleichen Objekts zur Verfügung steht, dabei gilt, je mehr Aufnahmen, desto besser, da eine Statistik zu bestimmen ist. Eine Serie von Aufnahmen eines Objektes aufzunehmen, erfordert jedoch viel Zeit und in der Praxis wird man selten nur ein Objekt entfalten wollen, sondern man sucht nach einer Vorschrift mit der man ohne weitere vorbereitende Massnahmen eine ganze Reihe von Objekten einer Probe rekonstruieren kann.

Aus diesem Grund wird das Rauschen vom Signal entkoppelt und damit die eigentlich zugrunde liegende Poisson Statistik durch eine Gauss'sche Statistik ersetzt. Dadurch gewinnt man die Möglichkeit, das Rauschen bereits bei Bestimmung der Punktbildfunktion mit zu schätzen.

Unter der Gauss'schen Annahme ist der Wiener Filter durch folgende Formel bestimmt:

$$W(u, v, w) = \frac{|\bar{X}(u, v, w)|^2}{\text{OTF}(u, v, w) \cdot (|\bar{X}(u, v, w)|^2 + |\sigma(X(u, v, w))|^2)} \quad (3.1)$$

$\bar{X}(u, v, w)$  ist der Mittelwert der Verteilung für den Koeffizienten  $(u, v, w)$ ,  $\sigma(X(u, v, w))$  ist die Standardabweichung dieser Verteilung. Alle Operatoren sind punktweise zu verstehen.

Die Schätzung von Mittelwert und Standardabweichung der Fourierspektren ist wie bereits erwähnt unter Verwendung mehrerer Aufnahmen des gleichen Objektes möglich. Praktisch stösst man dabei auf eine Maximalzahl, die durch die Ausbleichzeit der beads bestimmt ist. Ein kleines Rechenbeispiel:

Eine gut aufgelöste Aufnahme hat  $512 \times 512 \text{ Pixel}$ . Um die Ausläufer der beads in  $z$ -Richtung mit ausreichend breitem Rand vollständig zu erfassen, benötigt man 512 dieser Aufnahmen pro Block. Legt man eine Framerate von  $15 \text{ fps}$  zugrunde, erfordert die Aufnahme eines Blocks mindestens  $\frac{512}{15 \text{ s}^{-1}} \approx 34 \text{ s}$ . Für  $n$  Blöcke also  $n \cdot 34 \text{ s}$ . Bei minimaler Leistung der erregenden Lampe strahlt der bead nach ca. 5 min nur noch halb so stark. Dadurch werden auch die Ausläufer kleiner und die psf unvollständiger. 10 Aufnahmen haben sich als praktikabel erwiesen, wenn die Verschlusszeit der Kamera konstant gehalten wird.

Mit diesen Datensätzen lassen sich nun die Parameter der Verteilung wie folgt schätzen:

Seien  $b_0, \dots, b_9$  die aufgenommenen Voxelblocks und  $B_0, \dots, B_9$  die korrespondierenden Fourier-Transformierten. Sei weiterhin  $S$  ein Block bestehend aus den voxelweisen Mittelwerten der Fourier-Transformierten und  $N$  die voxelweisen Standardabweichungen.

$$S(u, v, w) = \frac{1}{10} \cdot \sum_{i=1}^{10} B_i(u, v, w) \quad (3.2)$$

$$N(u, v, w) = \sqrt{\frac{1}{10} \cdot \sum_{i=1}^{10} |B_i(u, v, w) - S(u, v, w)|^2} \quad (3.3)$$



Nimmt man die Daten in einer Serie nacheinander auf, kann unter Umständen ein unerwartetes Problem auftreten: Durch die Toleranzen in den Antrieben des Mikroskops in Verbindung mit der starken Vergrößerung, kann es passieren, dass die Positionen der Beads in den Aufnahmen variieren. Diese Variationen liegen meist im Subpixelbereich, können aber auch einige Pixel betragen. Bildet man nun aber über diese untereinander verschobenen beads den Mittelwert, führt dies zu einer neuerlichen „Verschmierung“ der in den einzelnen Aufnahmen klar begrenzten Linien. Die Standardabweichung wird in diesen Bereichen wesentlich ansteigen und nach einer Wiener Filterung gehen sehr viele wichtige Details verloren.

Um sicherzugehen, dass die einzelnen Aufnahmen optimal zueinanderpassen (im Rahmen der Pixelgenauigkeit), wurde vor der weiteren Verarbeitung eine der Aufnahmen als Referenz gewählt und alle anderen entsprechend dem Maximum der Kreuzkorrelation zwischen der jeweiligen Aufnahme und der Referenzaufnahme verschoben.

Da eine subpixelgenaue Positionierung dadurch aber nicht möglich war, wurde das Verfahren der Aufnahme der Daten modifiziert. Anstatt die einzelnen Datenblöcke nacheinander aufzunehmen, wurden nach der Positionierung des Fokustriebes gleich 10 Aufnahmen der entsprechenden Ebene gemacht und dies für alle Ebenen wiederholt. Da zwischen den Aufnahmen nun keine Bewegung mehr stattfinden muss, sind die Daten perfekt zueinander ausgerichtet und eine spätere individuelle Verschiebung der Datenblöcke wird überflüssig.

Die Wahl der beads zur Bestimmung der Statistik bringt zwei Vorteile mit sich:

1. Im Frequenzspektrum eines idealen Punktes sind alle Koeffizientenbeträge konstant und gleich. Das heisst alle Frequenzen sind gleichermassen enthalten, so dass das Rauschen bestmöglich für alle Koeffizienten geschätzt werden kann. Nach der Abbildung durch die Optik gilt dies zwar nicht mehr für den „Missing Cone“, aber hier ist klar, dass die Mittelwerte 0 sein müssen.
2. Eine Mittelung über die Spektren aller Daten der beads kann als weiterer Vorverarbeitungsschritt für die Bestimmung der Punktbildfunktion verwendet werden, da schon durch die Mittelwertbildung das Rauschen unterdrückt wird.

Auch hier ist es, wie zuvor bei der Bestimmung der Punktbildfunktion, möglich die Rotationssymmetrie auszunutzen. Für das Signal ist das genau die Analyse, wie sie bereits präsentiert wurde. Führt man die gleiche Analyse für das Rauschen durch, erhält man die Kurven in Abb. 3.1.

Man erkennt, dass das Rauschen in diesem logarithmischen Massstab näherungsweise linear abfällt. In den Numerical Recipes [6], wird diese Linearität als Grundlage der Schätzung von Signal und Rauschen verwendet um die Parameter der Wiener Entfaltung zu finden. Das experimentell bestimmte Rauschen in dieser Arbeit bestätigt damit dieses Modell (sieht man von einer Überhöhung bei den tiefen Frequenzen ab). Wenn man nun annimmt, dass das Rauschen wirklich linear abfällt und die Abweichung von der Geraden statistische Schwankungen sind, sollte eine lineare Approximation das Rauschen in der Aufnahme besser beschreiben. Tatsächlich führte dies zu einer leichten optischen Verbesserung der entfalteten Daten, was anhand eines beads in Abb 3.2 angedeutet wird. Dazu wurde die Statistik des beads bestimmt und aufgrund dieser Statistik eine Wiener Entfaltung durchgeführt unter Verwendung der Identität als Punktbildfunktion, um die reine Wirkung des Wiener Filters zu zeigen.

Nach Berechnung des Wiener Filters ist die Entfaltung sehr einfach. Man multipliziert einfach die Fourier-Transformierte des Voxelblocks  $I$ , der die zu entfaltenden Daten enthält mit dem Filter und berechnet die inverse Fourier-Transformierte der erhaltenen Daten.

Alles in allem führt das zu folgender Formel:

$$\tilde{o} = \mathcal{F}^{-1} \left\{ I \cdot \frac{|S|^2}{\text{OTF} \cdot (|S|^2 + |N|^2)} \right\} \quad (3.4)$$

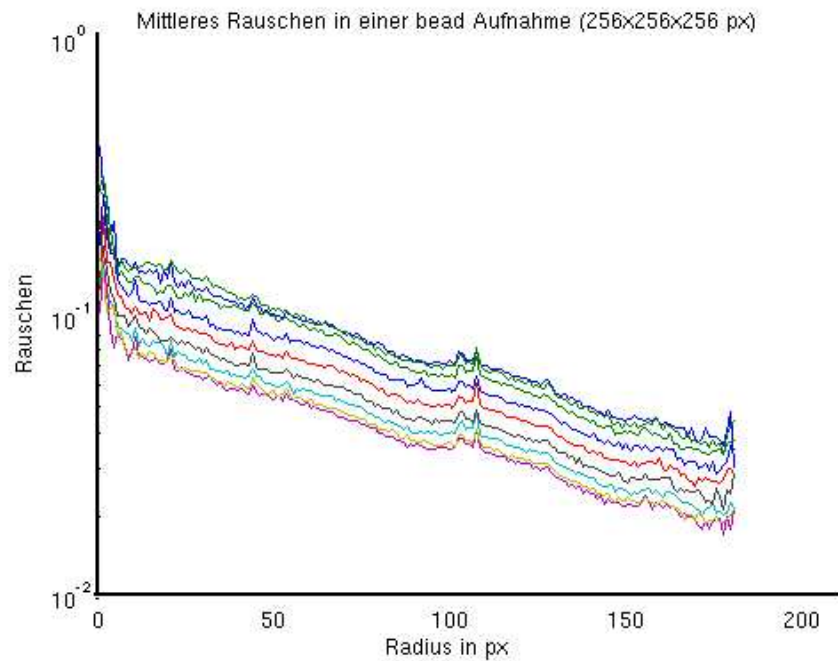


Abbildung 3.1: Gemitteltetes Rauschen aus verschiedenen Ebenen in Abh. des Radius

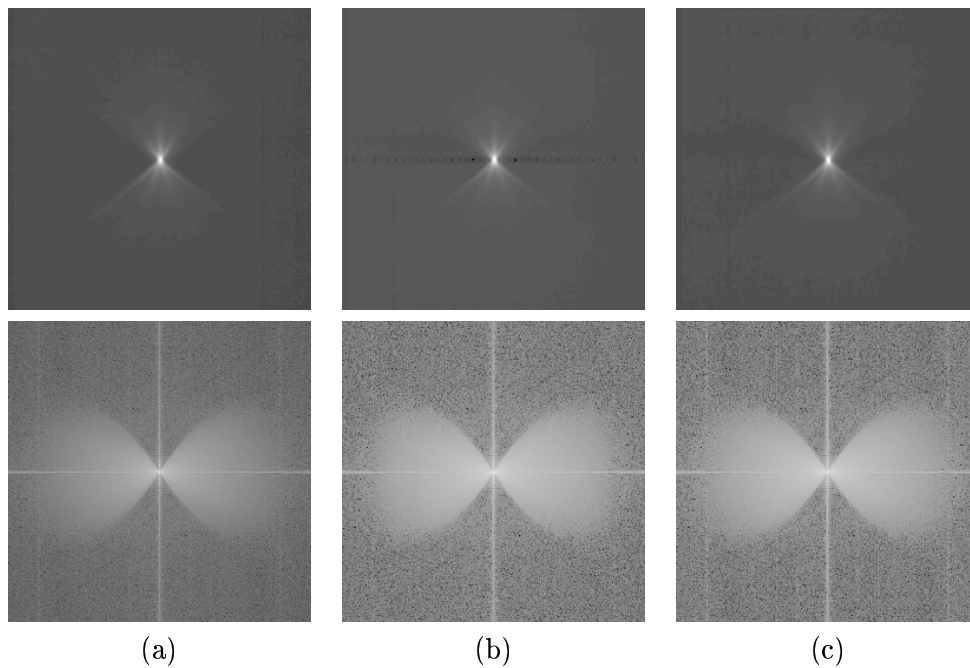


Abbildung 3.2:  $x$ - $z$ -Schnitte durch einen  $0.5\mu m$  bead im Bildbereich (oben) und  $u$ - $w$ -Schnitte durch die korrespondierenden Spektren (unten) vor der Wiener Filterung (a), nach der Wiener Filterung unter Verwendung des gemessenen Rauschens (b) und mit der linearen Approximation des Rauschens (c)

## 4 Versuche und Ergebnisse

### 4.1 Versuche mit kleinen beads ( $\varnothing 0.5\mu m$ )

Da die Idee der Entfaltung der beads mit einer entsprechenden Referenzkugel erst im Laufe der Arbeit hinzukam und die Verkleinerung sehr fehlerbehaftet ist, wurden die meisten Versuche mit verhältnismässig kleinen beads unternommen. Ihr Nachteil ist natürlich die geringe Leuchtkraft und das schnelle Ausbleichverhalten, aber die Ergebnisse übertreffen die der grösseren beads durch eine wesentlich bessere Kantenschärfe. Dafür sind die erzielten Kontraste nach der Entfaltung erheblich schlechter, als bei den Versuchen mit den grossen beads, weswegen beide Vorgehensweisen in verschiedener Hinsicht wieder ihre Berechtigung haben.

Die Bestimmung der Punktbildfunktion läuft genau nach dargestelltem Schema ab. Das heisst der erhaltene Wiener Filter ist:

$$W(u, v, w) = \frac{|S(u, v, w)|^2}{S(u, v, w) \cdot (|S(u, v, w)|^2 + |N(u, v, w)|^2)} \quad (4.1)$$

Die Ergebnisse der Entfaltung verschiedener Pollen mit diesem Filter sind in den Abbildungen 4.1 - 4.3 in der jeweils zweiten Spalte dargestellt.

### 4.2 Versuche mit grossen beads ( $\varnothing 1.0\mu m$ )

Nach Einführung der „Kugel-Entfaltung“ wurde diese natürlich auch anhand der etwas grösseren beads getestet. Der Ausdruck für den Wiener Filter wird entsprechend ein wenig komplizierter:

$$W(u, v, w) = \frac{crop(R(u, v, w))}{S(u, v, w)} \cdot \frac{|S(u, v, w)|^2}{|S(u, v, w)|^2 + |N(u, v, w)|^2} \quad (4.2)$$

Der  $crop(\cdot)$ -Operator spielt dabei eine entscheidende Rolle. Wie bereits im letzten Kapitel erläutert wurden in dieser Arbeit zwei Versuche bezüglich des Operators unternommen, nämlich die Wiener Filterung mit der Statistik eines beads mit Durchmesser  $0.5\mu m$ :

$$crop(\cdot) := \mathcal{W}_{(S_{0.5\mu m}, N_{0.5\mu m})} \{ \cdot \} \quad (4.3)$$

sowie die explizite Unterdrückung eines Frequenzdoppelkegels, der weitestgehend mit dem „Missing Cone“ übereinstimmt. Die Ergebnisse, unter Verwendung des Filters im  $crop$ -Operator sind in der jeweils dritten Spalte der Abbildungen 4.1 - 4.3 zu erkennen, die Ergebnisse mit direkter Unterdrückung der Frequenzen des geschätzten „Missing Cone“ in der jeweils vierten Spalte.

### 4.3 Ergebnisse

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Entfaltung verschiedener Pollenaufnahmen. Hierbei wurden alle Werte genau so beibehalten, wie sie durch die Entfaltung auftreten, was insbesondere bedeutet, dass negative Werte auch dargestellt werden. Diese können jedoch zur Kontrastverbesserung auf Null gesetzt werden (vgl. [3]).

Der in Abb. 4.1 dargestellte Eiben-Pollen stammt aus einer speziell gesammelten und präparierten Probe und stellt damit den nahezu schmutzfreien Idealzustand dar. Man erkennt, dass für solche gute Datensätze die Entfaltung mit der Punktbildfunktion gewonnen aus einem  $0.5\mu m$  bead ohne besondere Behandlung der Kugelgestalt (b) noch einen guten Kontrast liefert und gegenüber den Entfaltungen mit den Schätzungen aus den Aufnahmen des  $1.0\mu m$  beads (c) und (d) eine verbesserte Kantenschärfe aufweist. Man erkennt weiterhin, dass die zweite Variante des  $crop(\cdot)$ -Operators

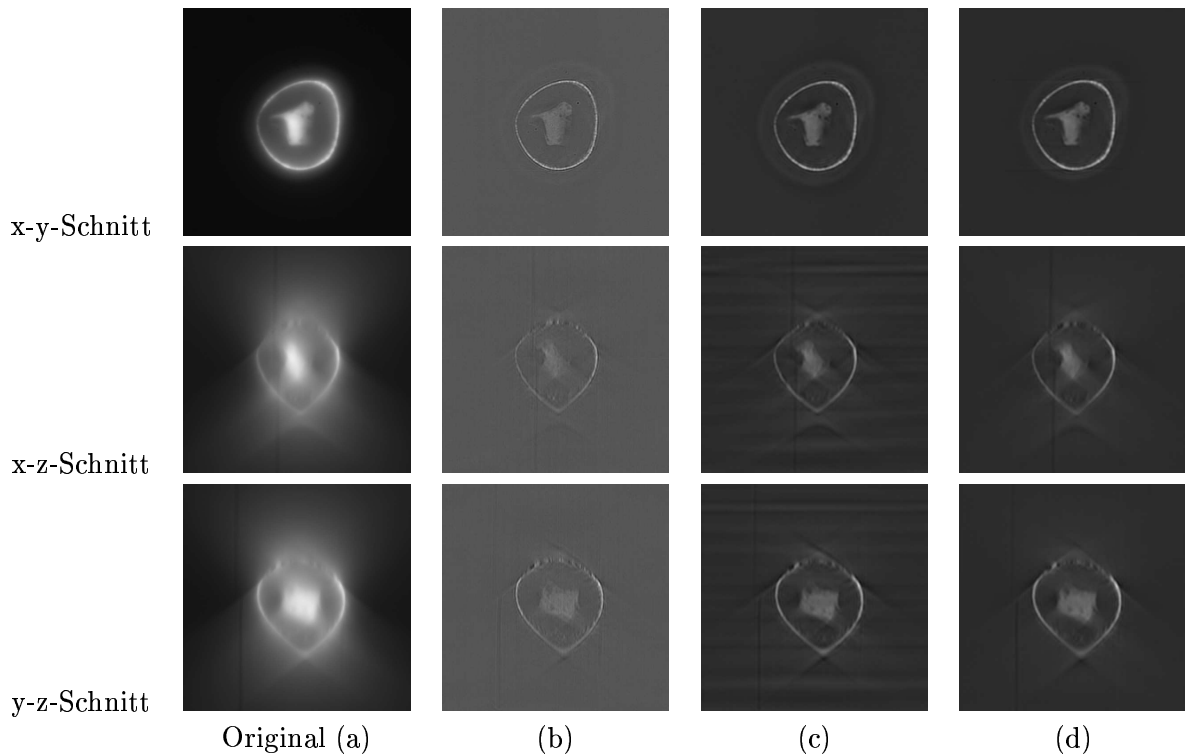


Abbildung 4.1: Entfaltung eines Eiben-Pollens (a) mit einer aus einem  $0.5\mu m$  bead geschätzten Punktbildfunktion ohne Berücksichtigung der Kugelcharakteristik (b), mit einer aus einem  $1.0\mu m$  bead geschätzten Punktbildfunktion unter Verwendung von  $crop_1$  (c) und unter Verwendung von  $crop_2$  (d)

(d) erheblich bessere Resultate liefert, als der Versuch mit der Filterung mit der Statistik des  $0.5\mu m$  beads (c).

In Abb. 4.2 wurden die gleichen Versuche an einem Hasel Pollen aus einer älteren gesammelten Probe des Wetterdienstes durchgeführt. Die Probe war in etwas schlechterem Zustand, insbesondere war das Einbettungsmedium nicht mehr perfekt homogen. Die Ergebnisse zeigen, dass unter diesen etwas verschärften Bedingungen die Entfaltung mit der Schätzung der Punktbildfunktion aus dem  $0.5\mu m$  bead wesentlich weniger Kontrast aufweist, als das bei der Eibe der Fall war. Der Versuch mit den grossen beads erhält den Dynamikumfang der Daten wesentlich besser, wobei der  $crop_1$ -Operator erhebliche Schwankungen in den Intensitäten der einzelnen Ebenen aufweist. Diese sind eine Folge der Frequenzen der Kugel im „Missing Cone“ der psf. Unter Verwendung des Operators  $crop_2$  entfallen diese Variationen und man erhält eine gute Rekonstruktion, wenn man von einigen Einschränkungen absieht, die am Ende dieses Kapitels erläutert werden.

Abschliessend wurden die Schätzungen der Punktbildfunktionen auf einen Pollen einer Luftstaubprobe angewandt. Dies wird in Abb. 4.3 gezeigt. Die Bedingungen in diesem Fall sind die realen Bedingungen wie sie auch in der Praxis bei der Pollenerkennung auftreten. Neben den Pollen wird natürlich viel Schmutz mit aufgefangen, der die Aufnahme stört. Die Fluoreszenzeigenschaften der Schmutzpartikel sind aber gewöhnlich nicht besonders ausgeprägt [7], wodurch bei der Fluoreszenz Mikroskopie dieser Schmutz meist nur Schatten im Bild erzeugt. Wie die Abbildung zeigt, erfüllt die Entfaltung unter Verwendung des grossen beads und des  $crop_2$ -Operators auch hier ihren Dienst ohne Verluste im Dynamikumfang. Die bereits in der Entfaltung des Hasel-Pollens gesehenen Streifen unter Verwendung des  $crop_1$ -Operators sind hier noch erheblich verstärkt. Nach einem Mittelwertangleich (ohne Abb.) erreicht man hier jedoch wieder etwa die Qualität, die die Entfaltung des Hasel-Pollens ergeben hat. Das Ergebnis der Entfaltung mit der Schätzung aus dem  $0.5\mu m$  bead ist ebenso wie im Versuch zuvor sehr kontrastarm, wofür ich jedoch keine plausible Erklärung habe.

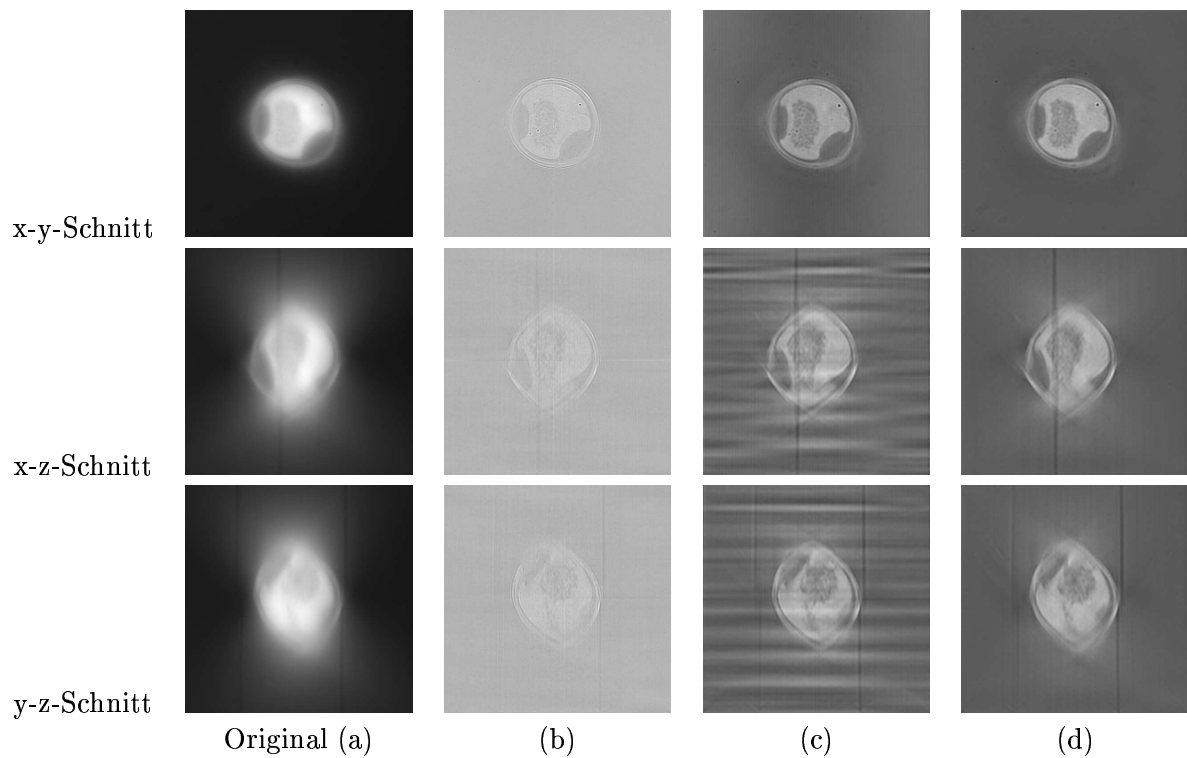


Abbildung 4.2: Entfaltung eines Hasel-Pollens (a) mit einer aus einem  $0.5\mu\text{m}$  bead geschätzten Punktbildfunktion ohne Berücksichtigung der Kugelcharakteristik (b), mit einer aus einem  $1.0\mu\text{m}$  bead geschätzten Punktbildfunktion unter Verwendung von  $\text{crop}_1$  (c) und unter Verwendung von  $\text{crop}_2$  (d)

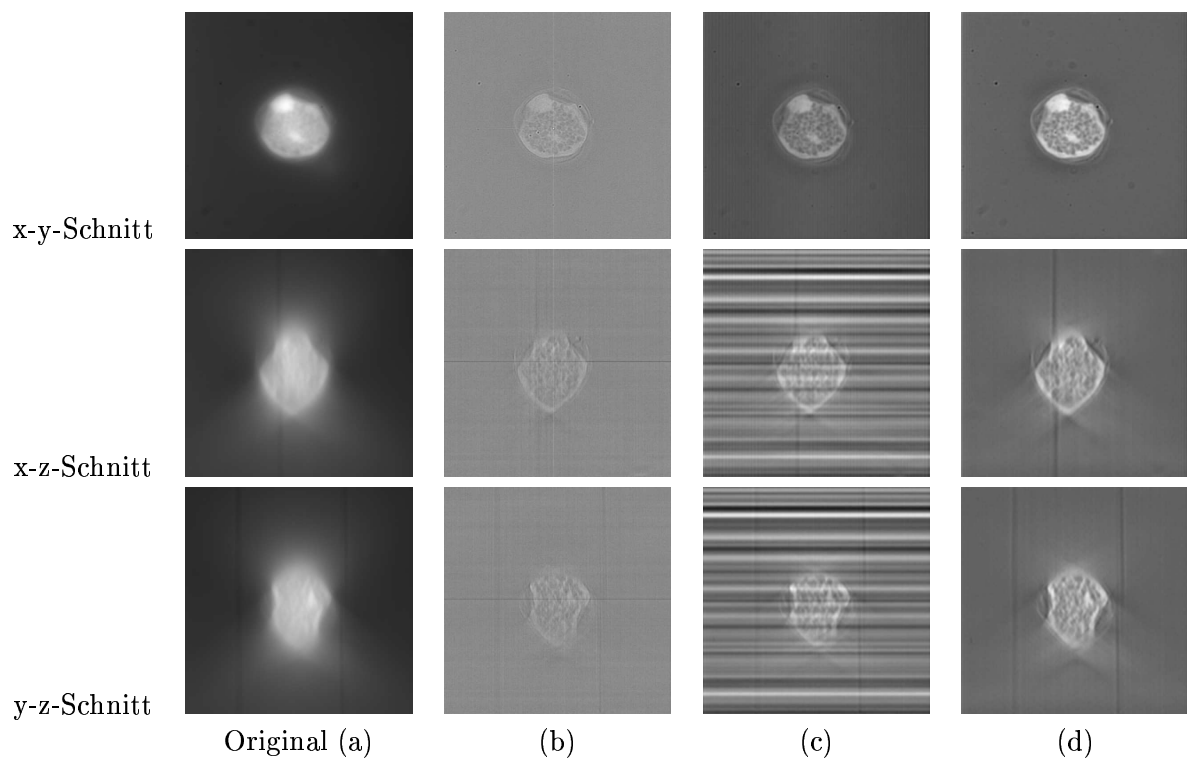


Abbildung 4.3: Entfaltung eines Pollens einer echten Luftstaubprobe (a) mit einer aus einem  $0.5\mu\text{m}$  bead geschätzten Punktbildfunktion ohne Berücksichtigung der Kugelcharakteristik (b), mit einer aus einem  $1.0\mu\text{m}$  bead geschätzten Punktbildfunktion unter Verwendung von  $\text{crop}_1$  (c) und unter Verwendung von  $\text{crop}_2$  (d)

Zur abschliessenden Analyse werden bevorzugt die Ergebnisse unter Verwendung der Punktbildfunktion der letzten Kategorie verwendet ( $1.0\mu m$ ,  $crop_2$ ), da diese eine hohe Stabilität gegenüber allen betrachteten äusseren Einflüssen gezeigt hat. Was alle Ergebnisse gemein haben, ist die Tatsache, dass in allen die Schärfe der Objekte verbessert wurde, was Ziel der Entfaltung war. Leider wurde nicht die optimale Punktbildfunktion gefunden, die die Schärfe des kleinen beads mit den Kontrasten der letzten Schätzung kombiniert, aber es gibt bereits neue Ideen in diese Richtung, die jedoch aus Zeitmangel nicht mehr behandelt werden konnten.

Was auch in allen Objekten auftritt ist eine scheinbare Verlängerung der Objekte in z-Richtung. Dies ist ein Effekt des „Missing Cone“. Horizontale Kanten werden nicht korrekt dargestellt, sondern es bildet sich eine Spitze aus, die im wirklichen Objekt nicht vorhanden ist. Dieser Effekt ist mit dem Wiener Filter auch nicht zu beseitigen, da wie schon diskutiert die Frequenzen des „Missing Cone“ nicht durch lineare Verfahren wiederhergestellt werden können.

Ein weiterer sichtbarer Effekt ist die Ausbildung von X-förmigen Strukturen, die vom Objekt ausgehen und deren Intensität langsam abnimmt, je weiter sie vom Objekt entfernt sind. Ursprünglich wurde dieser Effekt auf die zu kleine Punktbildfunktion geschoben, aber dem scheint nicht so zu sein (vgl. [3]).

Bleiben noch senkrechte Streifen in den Bildern, die zu erklären jedoch recht einfach ist. Diese Streifen entstanden bei der Aufnahme durch Partikel im letzten Stück des Strahlengangs in Richtung Kamera, in der das Licht parallel läuft und damit alle dazwischen liegenden Partikel einen scharf begrenzten Schatten werfen. Dieser Schatten tritt in allen Aufnahmen auf und bildet einen Streifen in z-Richtung. Eine Prüfung der genauen Position des Schmutzes mit anschliessender Reinigung der betroffenen Teile beseitigt diese Störung wesentlich effektiver als es ein Algorithmus könnte.

Dementsprechend sind die Ergebnisse nahezu optimal unter gegebenen Voraussetzungen!

Was die Nutzbarkeit unter Verwendung von Grauwertinvarianten [7] angeht, was Ziel dieser Arbeit war, muss gesagt werden, dass die Verlängerung in z-Richtung die Rotationsinvarianz um x- und y-Achse stört. Daher sollte ein anderes Verfahren zur Entfaltung gewählt werden, das die Frequenzen des „Missing Cone“ möglichst optimal rekonstruieren kann. Das heisst in weiteren Arbeiten sollten iterative Verfahren bevorzugt analysiert werden um die Rekonstruktion bezüglich vollständiger Rotationsinvarianz zu optimieren.

# A Dokumentation der erstellten Software

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Sammlung an nützlichen Werkzeugen entstanden, die nicht nur für die Entfaltung verwendet werden können. Daher wird hier ein kurzer Überblick über die entwickelte Software gegeben.

```
calcffft <infile (float)> <outfile (complex<float>>>
calcinfft [-s] <infile (complex<float>>> <outfile (float)>
```

Die obigen Funktionen berechnen aus der ersten Variablen der gegebenen net-CDF Datei die (inverse) Fourier-Transformierte und speichern das jeweilige Ergebnis in eine netCDF-Datei deren Name in *outfile* übergeben wird. Der Schalter *s* der inversen FFT verschiebt die Daten nach der Transformation, so, dass der Voxel der in der linken oberen Ecke lag dann in der Mitte liegt. (Wrapper für fftRC)

```
translate -x xShift -y yShift -z zShift <infile (float)> <outfile (float)>
```

*Translate* verschiebt die Daten des Voxelblocks, der in der ersten Variable von *infile* gespeichert ist um (*xShift*, *yShift*, *zShift*) und speichert das Ergebnis nach *outfile*.

```
multiply <infile1 (complex<float>>>
        <infile2 (complex<float>>>
        <outfile complex<float>>
```

Multipliziert die jeweils ersten Variablen der Eingabefiles und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
subtract <infile1 (float)> <infile2 (float)> <outfile (float)>
```

Subtrahiert die erste Variable von *infile2* von der ersten Variablen von *infile1* und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
subtractConstant <infile (float)> <constant (float)> <outfile (float)>
```

Zieht den konstanten Wert *constant* von allen Werten der ersten Variablen von *infile* ab und speichert das Ergebnis in *outfile*.

```
subtractByMask <infile (float)> <mask (unsigned int)> <outfile (float)>
```

Zieht den Maximalwert der ausmaskierten Voxel aus *mask* von der ersten Variablen in *infile* ab mit anschließendem Abschneiden aller negativen Werte. Das Ergebnis wird nach *outfile* geschrieben.

```
maximum -i <infile (float)> <outfile (float)>
```

Bildet das voxelweise Maximum aus den ersten Variablen der Eingabefiles und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
conv <infile1 (float)> <infile2 (float)> <outfile (float)>
```

Berechnet die Faltung der jeweils ersten Variablen der Eingabefiles und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
deconv <infile (float)> <infile2 (float)> <outfile (float)>
```

Entfaltet die erste Variable von *infile1* mit der ersten Variablen von *infile2* und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
clamp <infile (float)> <outfile (float)>
```

Setzt negative Werte in der ersten Variablen von *infile* auf Null und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
invert <infile (float)> <outfile (float)>
```

Invertiert das Fourier-Spektrum der ersten Variablen von *infile* und schreibt die Daten im Bildbereich nach *outfile*.

```
removePhases <infile (complex<float>>) <outfile (complex<float>>)
```

Ersetzt die komplexen Werte der ersten Variablen von *infile* durch deren Betrag und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
calcConjugate <infile (complex<float>>) <outfile (complex<float>>)
```

Berechnet für alle Werte der ersten Variablen aus *infile* deren konjugiert komplexen Wert und schreibt diese Werte nach *outfile*.

```
calcHistogram [-b #bins] <infile (float)> <outfile (int)>
```

Berechnet das Histogramm der ersten Variablen von *infile* unter Verwendung von *#bins* Bins (Standardmässig 256) und schreibt die Werte nach *outfile* in Form einer durch Kommas getrennten Liste (csv-Format).

```
equalize [-e] [-n] [-z] [-t threshold (float)] [-m]  
        <infile (float)> <outfile (float)>
```

*Equalize* dient der Vorverarbeitung von den 3D-Daten. Ohne Optionen führt es einen Ausgleich der Ebenenmittelwerte in alle drei Raumrichtungen durch, wobei hier über den *threshold* das Signal ausgespart werden kann, wenn nur der Hintergrund angeglichen werden soll. Standardmässig liegt der Threshold bei 99% aller Voxel. Der Schalter *e* deaktiviert den Ausgleich der Ebenenmittelwerte. Der Schalter *n* normalisiert die Daten auf Werte zwischen 0 und 1 nach der Verarbeitung und der Schalter *z* führt eine Mittelung der mittleren Ebenen der FFT der Daten aus. Wählt man den Schalter *m* wird anstelle des Ausgleichs nur die durch den *threshold* erzeugte Maske nach *outfile* geschrieben, ansonsten die gefilterten Daten aus der ersten Variablen von *infile*.

```
zShrink <infile (float)> <outfile (float)>
```



Entfernt jede zweite Ebene aus der ersten Variablen von *infile* und schreibt den dadurch nur noch halb so grossen Datensatz nach *outfile*.

```
smoothShrink [-x xfactor] [-y yfactor] [-z zfactor]  
             <infile (float)> <outfile (float)>
```

Führt eine Verkleinerung der ersten Variable von *infile* um (*xfactor*, *yfactor*, *zfactor*) durch und schreibt den verkleinerten Datensatz nach *outfile*. Die Standardwerte für alle Faktoren sind 2. Die Daten werden um das Abtast-Theorem auch nach der Verkleinerung zu erfüllen, vor der Verkleinerung Gauss'sch gefiltert.

```
centerbead [-r reference (float)] <infile (float)> <outfile (float)>
```

Sucht nach dem Maximum in der ersten Variablen von *infile* und verschiebt den Block derart, das das Maximum in der Ecke zu liegen kommt. Alternativ wird wenn *reference* gegeben ist der Voxelblock derart zyklisch verschoben, dass die Korrelation zwischen *reference* und der ersten Variablen von *infile* maximal wird. Das Ergebnis wird nach *outfile* geschrieben.

```
calcstatistics -i <infiles (complex<float>>) <statfile>
```

Bestimmt die voxelweisen Mittelwerte und die voxelweisen Standardabweichungen der ersten Variablen der gegebenen Eingabefiles und schreibt zwei Variablen (FFT\_mean, stddev) nach *statfile*.

```
denoise [-s <statfile>] <infile (float)> <outfile (float)>
```

Führt eine Wiener Entfaltung unter Verwendung der Statistik in *statfile* und der Identität als Punktbildfunktion auf der ersten Variable von *infile* durch und schreibt das Ergebnis nach *outfile*.

```
average_psf <statfile in> <statfile out>
```

Berechnet die rotationssymmetrischen Versionen der Variablen in *statfile in* und ersetzt die Standardabweichung durch einen optimalen linearen Fit. Die daraus resultierende rotationssymmetrische Statistik wird nach *statfile out* gespeichert.

```
cropMissingCone [-a slope] [-b angle] [-c overlap]  
                <infile (complex<float>>) <outfile (complex<float>>)
```

Entfernt die Frequenzen die in einem Doppelkegel mit Winkel *angle* liegen unter Benutzung einer Sigmoidfunktion mit Steigung *slope*. *Overlap* bestimmt die Anzahl Pixel, die die beiden Kegel dabei überlappen. Die Daten, auf die dieser Operator angewandt wird kommen aus der ersten Variablen von *infile* und die bearbeiteten Daten werden nach *outfile* geschrieben.

```
getImageStack [-m magnification] [-x xRes] [-y yRes] [-z zRes] [-c #copies]  
              <outfilemask (unsigned char)>
```

Nimmt *#copies* Bildstapel des unter dem Mikroskop momentan im Fokus liegenden Objekts auf (Standardwert: 1). *Magnification* sollte der Vergrößerung des verwendeten Objektivs entsprechen (Standardwert: 100). Die Grösse des Zielblocks ist (*xRes*, *yRes*, *zRes*) (Standardwert: 512<sup>3</sup>). Ist *#copies* = 1, so ist *outfilemask* der Dateiname der erzeugten Datei, ansonsten wird die übergebene Maske um einen laufenden Index und die Endung „.nc“ erweitert.

# Literaturverzeichnis

- [1] T. J. Holmes, "Background of deconvolution," tech. rep., ©AutoQuant Imaging, 2002.
- [2] P. J. Verveer, *Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*. PhD thesis, Technische Universiteit Delft, December 1998.
- [3] J. G. McNally, C. Preza, J.-A. Conchello, and L. J. T. Jr., "Artifacts in computational optical-sectioning microscopy," *Journal of the optical society of America A*, vol. 11, pp. 1056–1067, March 1994.
- [4] T. J. Holmes, "Maximum-likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging," *Journal of the optical society of America A*, vol. 5, pp. 666–673, May 1988.
- [5] T. J. Holmes and N. O'Connor, "Blind deconvolution of 3d transmitted light brightfield micrographs," *Journal of Microscopy*, vol. 200, pp. 114–127, November 2000.
- [6] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *Numerical Recipes in C++*. Cambridge University Press, 2 ed., 2002.
- [7] O. Ronneberger, E. Schulz, and H. Burkhardt, "Automated pollen recognition using 3d volume images from fluorescence microscopy," *Aerobiologia*, vol. 18, pp. 107–115, 2002.