

Раздел I. Математическое моделирование

Я.А. Пчелинцев¹, А.В. Насонов¹, А.С. Крылов¹

РЕГУЛЯРИЗИРУЮЩИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СЕРИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ МЕРЦАЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Введение

Флуоресцентная микроскопия обладает рядом достоинств, среди которых высокая контрастность изображений и возможность маркировки разных структур разными красителями. Однако из-за дифракции света разрешающая способность изображений флуоресцентной микроскопии недостаточна для ряда современных задач.

Использование стохастически мигающих флуорофоров и длинной временной серии снимков позволяет получить дополнительную информацию для разделения сигналов от близко расположенных молекул флуорофора и повышения разрешающей способности. Такой подход не требует специального оборудования, поэтому в настоящее время получил широкое распространение и продолжает активно развиваться [1].

В рамках этого подхода существует несколько семейств алгоритмов повышения разрешающей способности (см. [1, 2]), одно из которых рассматривает исходную серию снимков как результат конечной серии наблюдений случайной величины и для построения резкого изображения использует ковариационную матрицу пикселей серии снимков.

Наблюдаемый размытый и зашумлённый образ $\mathbf{y}_t$ резкого изображения $\mathbf{x}_t$ серии снимков длиной T представляется в виде:

$$\mathbf{y}_t = \mathbf{A}\mathbf{x}_t + \mathbf{b} + \mathbf{n}_t,$$

где $\mathbf{A}$ — оператор свёртки с ядром размытия и последовательного понижения разрешения, $\mathbf{b}$ — стационарный фон, $\mathbf{n}_t$ — случайный гауссовский шум с нулевым матожиданием, одинаковой для всех пикселей дисперсией и диагональной ковариационной матрицей.

Основой алгоритма SOFI [2, 3] являются полуинварианты, и в случае 2-го порядка простейший вариант алгоритма сводится к вычислению диагонали ковариационной матрицы серии снимков. К сожалению, чувствительность полуинвариантов к шуму, быстро растущая с их порядком, сильно ограничивает качество результатов алгоритма, однако и в настоящее время продолжают работу над его улучшением [4, 5].

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет вычислительной математики и кибернетики, лаборатория математических методов обработки изображений, yakov.pchelintsev@gmail.com, nasonov@cs.msu.ru, kryl@cs.msu.ru

Использование же всей ковариационной матрицы [6, 7] даёт больше информации для построения изображения высокого разрешения, а предположение о независимости мигания молекул флуорофора делает процесс восстановления сравнительно простым.

В рамках такого подхода отправной точкой становится ковариационная матрица, которая представляется в виде:

$$R_y = AR_x A^T + R_n,$$

где R_x — ковариационная матрица изображения высокого разрешения, диагональная вследствие независимости мигания молекул флуорофора, а R_n — ковариационная матрица шума, на диагонали которой стоят равные элементы s , а вне её — нули. Именно диагональ $\mathbf{r}_x$ матрицы R_x и является искомым изображением.

В таком случае задача сводится к минимизации регуляризирующего функционала вида:

$$\frac{1}{2} \|R_y - AR_x A^T - sI\|_F^2 + \lambda \cdot \Omega(R_x) \rightarrow \min_{\mathbf{r}_x, s \geq 0}.$$

В рамках данной статьи функционал минимизировался методом градиентного спуска.

Рассматриваемые стабилизаторы

В данной статье рассматриваются несколько стабилизаторов Ω . Подобно авторам SPARCOM [6], мы рассматриваем l_1 -норму диагонали R_x и взвешенную l_1 -норму $\|\mathbf{w} \cdot \mathbf{r}_x\|_1$, где $\mathbf{w}_i = \frac{1}{(\tilde{\mathbf{r}}_x)_i + \epsilon}$, $\tilde{\mathbf{r}}_x$ — значение диагонали на предыдущем шаге оптимизации, ϵ — малое положительное число, которая имитирует l_0 -норму для получения более разреженного решения (в дальнейшем будем обозначать её l_{1w}).

Также рассматриваются два стабилизатора из семейства RED (regularization by denoising) [8], в своей основе имеющие алгоритм подавления шума. Использование стабилизаторов из этого семейства для решения данной задачи было рассмотрено в [9], а в настоящей статье мы приводим более подробное сравнение качества результатов применения стабилизаторов при использовании «подавления шума», встроенного в невязку регуляризирующего функционала посредством члена sI , введённого в работе [7], в которой показано, что при схожих стабилизаторах, поощряющих разреженность решения, алгоритм с использованием этого члена производит меньше дефектов изображения, связанных с ложными детекциями мигания из-за шума в исходной серии снимков. В данной работе использованы алгоритмы подавления шума Non-Local Means (NLM) [10, 11] и алгоритм подавления шума с использованием полной вариации (TV) [12, 13]. Один из наиболее эффективных алгоритмов подавления шума BM3D [14] не включён в секцию результатов из-за высокой вычислительной сложности.

Методика анализа алгоритмов

В ходе анализа влияния стабилизаторов на качество результата решалась задача минимизации соответствующего регуляризирующего функционала методом градиентного спуска, в каждом случае было сделано 1000 итераций, перед осуществлением шага градиент нормировался для исключения влияния крутизны спуска на сходимость.

Оптимальные параметры методов подавления шума и параметр регуляризации находились оптимизацией метрики качества изображения SSIM [15] на паре «результат минимизации функционала» – «построенная по исходным данным диагональ ковариационной матрицы». Перед вычислением метрики, чтобы уменьшить влияние различия диапазонов интенсивностей пикселей на её результат, каждое изображение нормировалось на 99-й процентиль своих ненулевых значений.

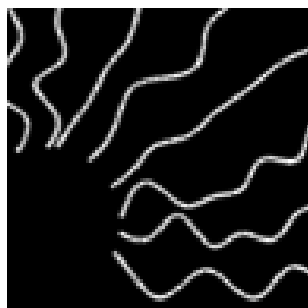
Исходными данными для проведения анализа послужили две реалистичные серии снимков структур микротрубочек, сгенерированные в рамках соревнования алгоритмов суперразрешения в флуоресцентной микроскопии с использованием мигающих флуорофоров [16, 17]:

1. «Bundled Tubes High Density» — серия из 361 изображения с высокой плотностью молекул флуорофора, низким уровнем шума, размером пикселя 100x100 нм и гауссовым ядром размытия с $\sigma = 110$ нм (см. Рис.1).

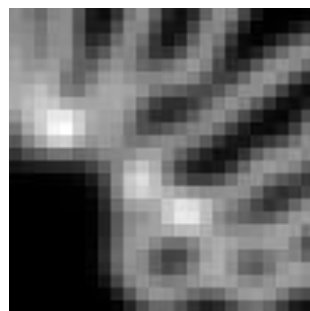
2. «MT0.N2.HD» — серия из 2500 изображений с высокой плотностью молекул флуорофора, высоким уровнем шума, размером пикселя 100x100 нм и гауссовым ядром размытия с $\sigma = 148$ нм (см. Рис.2).

Каждый набор данных содержит серию размытых снимков низкого разрешения с шумом, данные об условиях «съёмки» и таблицу с описанием мигания молекул флуорофора. На основе такой таблицы в ходе анализа строилась карта молекул флуорофора и искомая диагональ исходной ковариационной матрицы R_x в высоком разрешении путём нанесения молекул на сетку пикселей, увеличенную в 10 раз по сравнению с искомой, с небольшим размытием для устранения артефактов алиасинга при понижении разрешения до искомого.

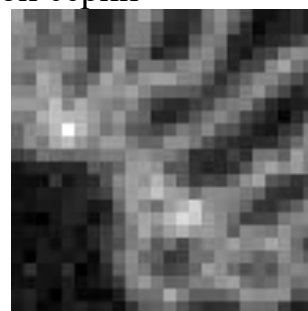
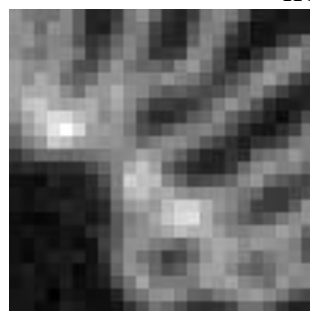
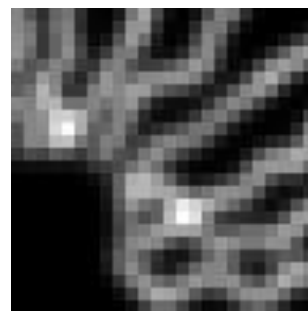
Помимо этого, для каждого из наборов была сгенерирована серия снимком с сильным гауссовским шумом для анализа работы алгоритмов в очень сложных условиях. Стандартное отклонение добавленного шума составило около 2 средних яркостей серии.



а) Расположение молекул



б) Временное среднее и диагональ R_y исходной серии



б) Временное среднее и диагональ R_y зашумлённой серии

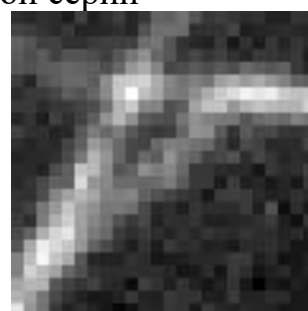
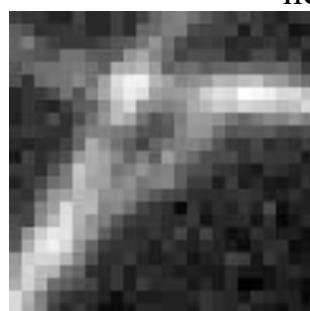
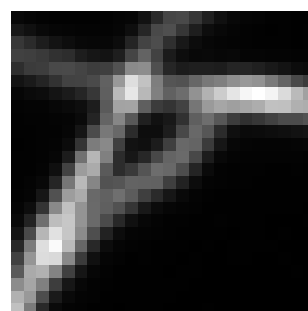
Рис.1 Набор данных «Bundled Tubes High Density»



а) Расположение молекул



б) Временное среднее и диагональ R_y исходной серии

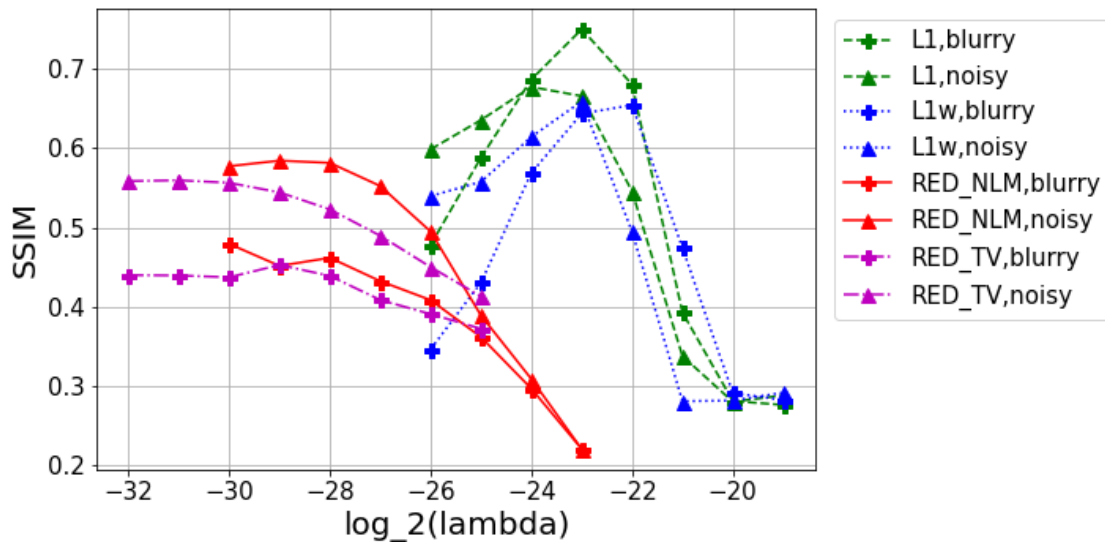


б) Временное среднее и диагональ R_y зашумлённой серии

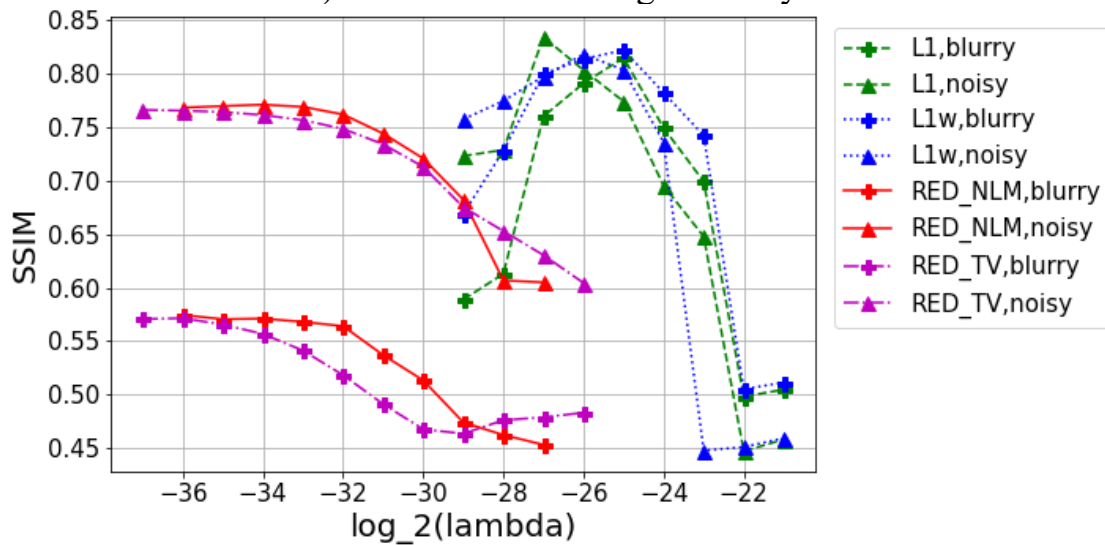
Рис.2 Набор данных «MT0.N2.HD»

Результаты

Функционалы с l_1 - и l_{1w} -нормами в качестве стабилизаторов показали чёткие пики значений SSIM, успешно справляясь с данными до и после добавления шума. В то же время стабилизаторы на основе NLM и TV показали пологие кривые качества с неустойчивым характером работы на сильно зашумлённых данных. На Рис. 3 представлены графики зависимости метрики от двоичного логарифма параметра регуляризации λ . «L1», «L1w», «RED_NLM», «RED_TV» указывают на соответствующие четыре стабилизатора, а «blurry» и «noisy» — на набор данных без и с добавлением дополнительного шума. На Рис. 4 и Рис. 5 представлены результаты работы алгоритмов, соответствующие их максимумам метрики SSIM на графиках на Рис. 3.

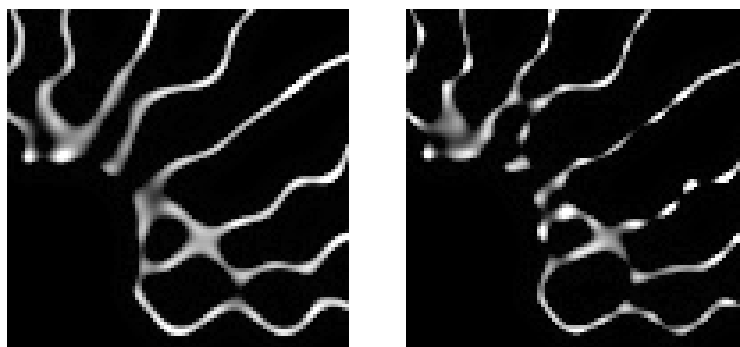


а) «Bundled Tubes High Density»

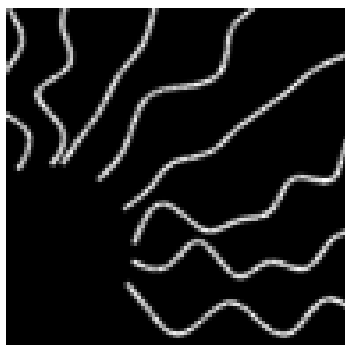


б) «MT0.N2.HD»

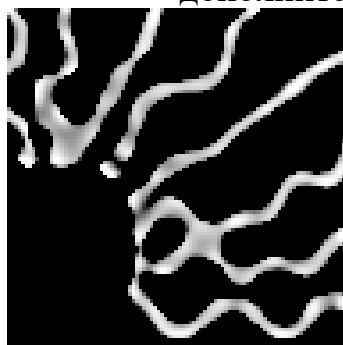
Рис.3 Графики зависимости метрики качества SSIM от логарифма параметра регуляризации



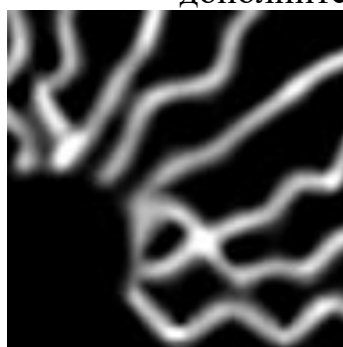
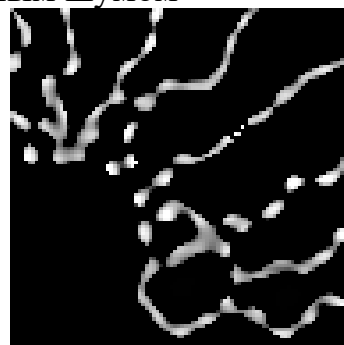
б) Метод «L1», результат на данных без и с дополнительным шумом



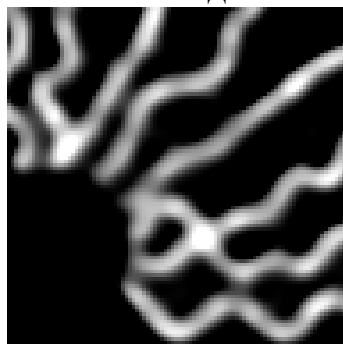
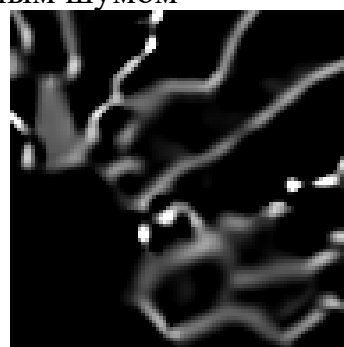
а) Расположение молекул флуорофора



в) Метод «L1w», результат на данных без и с дополнительным шумом



г) Метод «RED_NLM», результат на данных без и с дополнительным шумом



д) Метод «RED_TV», результат на данных без и с дополнительным шумом

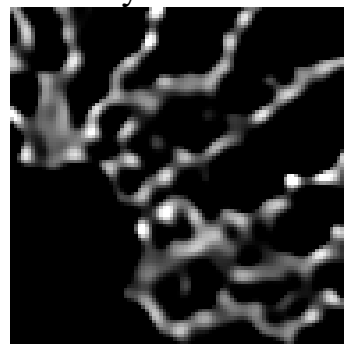
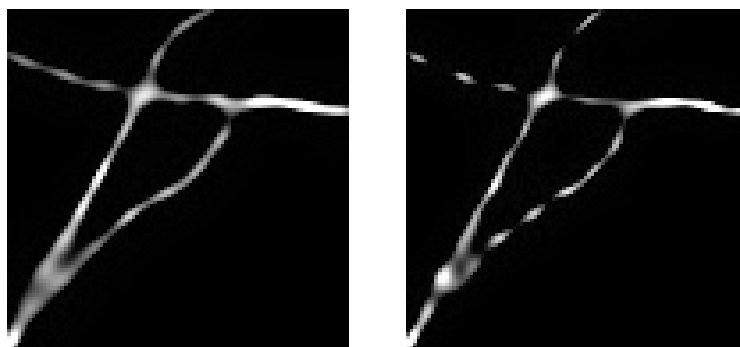


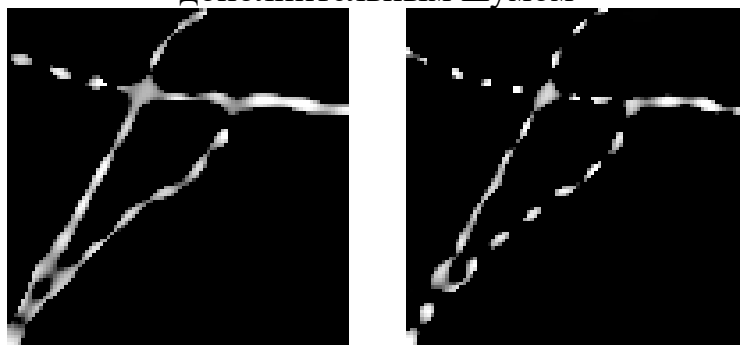
Рис.4 Результаты работы методов на наборе данных «Bundled Tubes High Density»



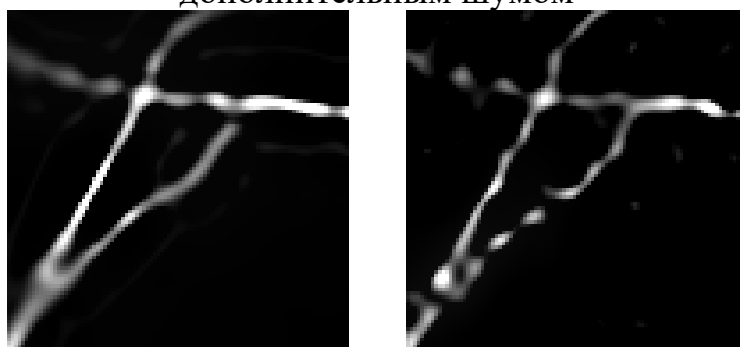
б) Метод «L1», результат на данных без и с дополнительным шумом



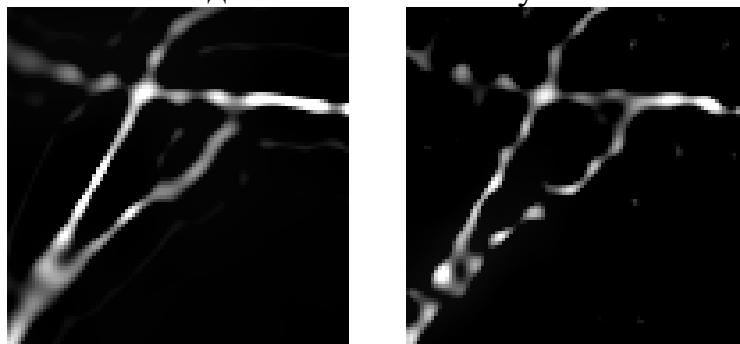
а) Расположение молекул флуорофора



в) Метод «L1w», результат на данных без и с дополнительным шумом

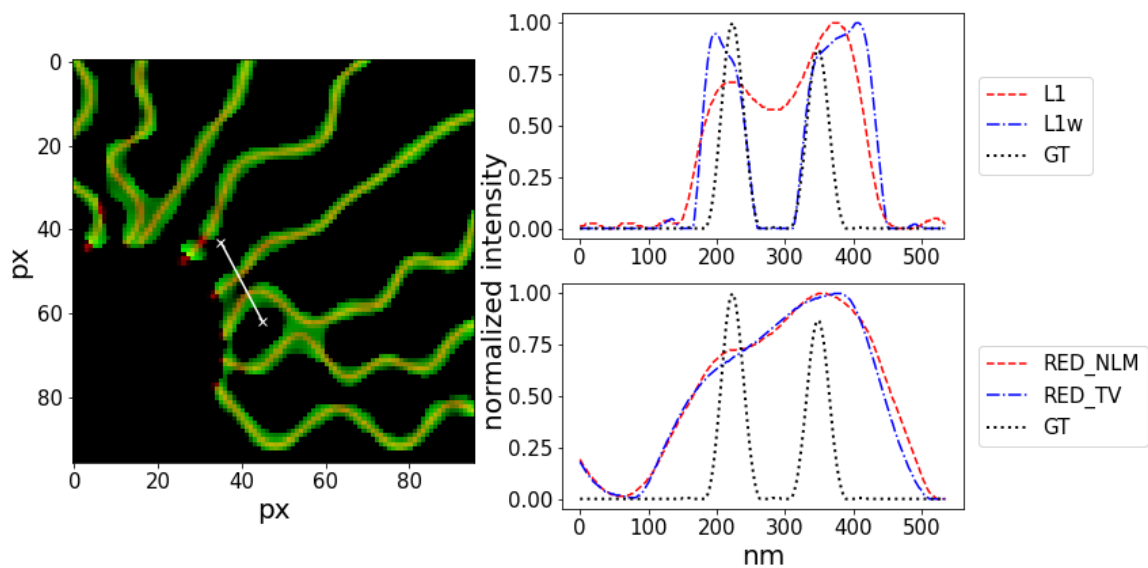


г) Метод «RED_NLM», результат на данных без и с дополнительным шумом

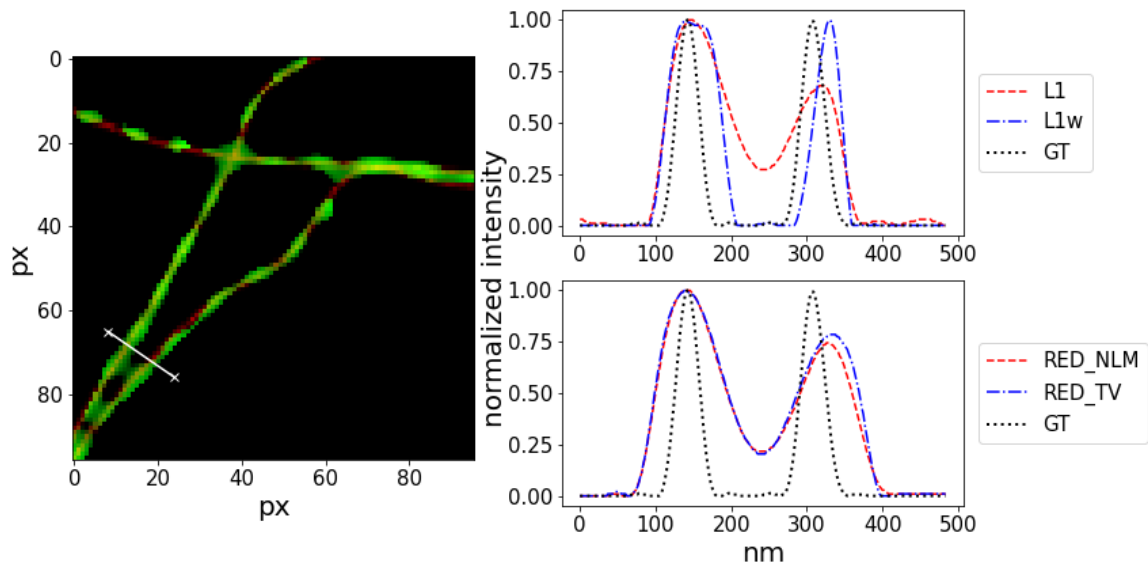


д) Метод «RED_TV», результат на данных без и с дополнительным шумом

Рис.5 Результаты работы методов на наборе данных «MT0.N2.HD»



а) Набор данных «Bundled Tubes High Density»



б) Набор данных «MT0.N2.HD»

Рис.6 Сравнение профилей результатов обработки исходных данных

Стоит отметить, что хотя возможность получить сильно зашумлённые данные имеется, например, при сильном уменьшении выдержки каждого снимка в случае сильного оптического увеличения микроскопа, всё же более практичным является использование данных, которые ближе к исходным данным упомянутого соревнования. Оба стабилизатора на основе алгоритмов подавления шума справились с задачей регуляризации, что подтверждает их принципиальную применимость в данной задаче микроскопии, однако l_1 - и l_{1w} -нормы выигрывают у них по скорости работы в среднем на порядок и дают более резкие изображения. Стабилизатор на основе l_{1w} -нормы склонен дробить

структуры на несколько связных областей, что может быть нежелательно при некоторых видах анализа клеточных структур, однако позволяет разделить близкорасположенные объекты (см. Рис.6; «GT» изображает настоящий профиль).

Заключение

В работе рассмотрена задача повышения качества временных последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии. Для решения задачи использован современный регуляризирующий метод и проведено сравнение результатов работы для различных стабилизаторов, в том числе основанных на шумоподавлении — подходе RED. Тестирование показало практическую применимость рассмотренных стабилизаторов для решения поставленной задачи.

Литература

1. Мишин А.С., Лукьянов К.А. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения живых клеток //Успехи биологической химии, 2019, т.59. с.39-66.
2. Dertinger T. et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) //Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, т.106, №52, с.22287-22292.
3. Dertinger T. et al. Achieving increased resolution and more pixels with Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI) //Optics express, 2010, т.18, №18, с.18875-18885.
4. Wang X. et al. Enhanced temporal and spatial resolution in super-resolution covariance imaging algorithm with deconvolution optimization //Journal of Biophotonics, 2020, с.e202000292.
5. Bierbuesse F. et al. Model-free pixelation correction in SOFI imaging //OSA Continuum, 2021, т.4, №1, с.77-86.
6. Solomon O. et al. SPARCOM: Sparsity based super-resolution correlation microscopy //SIAM Journal on Imaging Sciences, 2019, т.12, №1, с.392-419.
7. Stergiopoulou V. et al. COLORME: COvariance-based l_0 super-Resolution Microscopy with intensity Estimation //arXiv preprint, arXiv, 2010, 13477.
8. Romano Y., Elad M., Milanfar P. The little engine that could: Regularization by denoising (RED) //SIAM Journal on Imaging Sciences, 2017, т.10, №4, с.1804-1844.
9. Пчелинцев Я.А., Насонов А.В., Крылов А.С. Регуляризирующие методы повышения резкости изображений мерцающей флуоресцентной микроскопии //Ломоносовские чтения-2020. Секция Вычислительной математики и кибернетики, М., 2020, с.120-121.

10. *Buades A., Coll B., Morel J.M.* A non-local algorithm for image denoising //2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05), IEEE, 2005, т.2, с.60-65.
11. *Darbon J. et al.* Fast nonlocal filtering applied to electron cryomicroscopy //2008 5th IEEE International Symposium on biomedical imaging: from nano to macro, IEEE, 2008, с.1331-1334.
12. *Goldstein T., Osher S.* The split Bregman method for L1-regularized problems //SIAM journal on imaging sciences, 2009, т.2, №2, с.323-343.
13. *Getreuer P.* Rudin-Osher-Fatemi total variation denoising using split Bregman //Image Processing On Line, 2012, т.2, с.74-95.
14. *Dabov K. et al.* Image denoising by sparse 3-D transform-domain collaborative filtering //IEEE Transactions on image processing, 2007, т.16, №8, с.2080-2095.
15. *Wang Z. et al.* Image quality assessment: from error visibility to structural similarity //IEEE transactions on image processing, 2004, т.13, №4, с.600-612.
16. *Sage D. et al.* Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy //Nature methods, 2015, т.12, №8, с.717-724.
17. *Sage D. et al.* Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software //Nature methods, 2019, т.16, №5, с.387-395.