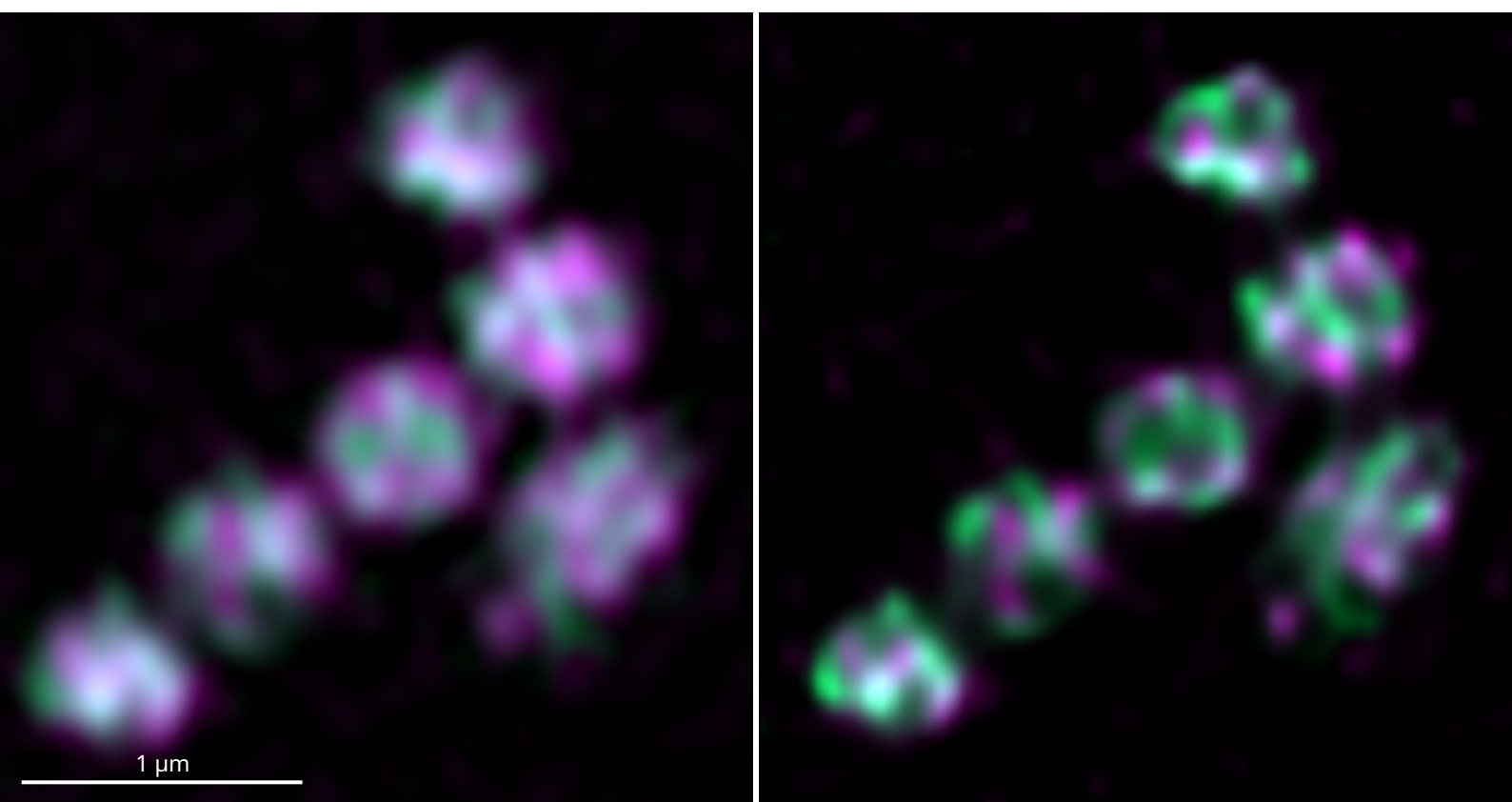


Практическо ръководство за деконволюция



Seeing beyond

Въведение

Какво е деконволюция? 4

Назначаване и преназначаване на фотони,

Какво означава това? 4

Присвояване (модел напред) 4

Преприсвояване (обърнато на модела напред) 4

Проблеми с преприсвояването 4

Алгоритми, внедрени в ZEISS ZEN (синьо издание) . . 4 Премахване на
размазването

Най-близък съсед (NN)

Регуляризиран обратен филтър (RIF) 4 Бърз

итеративен (метод на Майнел / Голд) 4 Бърз итеративен:

Класически итеративен метод на Ричардсън-Луси 5 Бърз

итеративен: Ускорен метод на Ричардсън-Луси 5 Итеративен

с ограничения: MLE 5 Комбинирана

(съвместна) деконволюция 5

Какво представлява функцията на разпространение на точки (PSF)? 5

Измерено

Теоретично

Вариант на дълбочината (теоретичен) 5

ZEN PSF стандарт: 5

Практическо ръководство

Общи препоръки

Какви са общите препоръки за настройките за заснемане на изображения,
ако получените изображения ще бъдат обработени

с алгоритъм за деконволюция? 6 Как

генерирате такова изображение от вашия образец? 6 Защо

имаме оптично изкривяване? 6 Шумът

произхожда от:

Как можете да се справите с този недостатък? 7 Ами

движеща се цел? 7 Ако изобразяването

изисква определена продължителност,

Как можете да ускорите времето за постигане на резултат? 7

Нещо друго, което да имате предвид? Няколко думи за обектива 7

3 Методи за деконволюция

8

Класическата деконволюция за флуоресцентна широкоъгълна микроскопия . . 8

Деконволюция за флуоресцентна микроскопия със светлинен лист 10

Деконволюция за Апотом – надеждна и лесна за употреба 11 Конфокална

деконволюция – LSM Plus 13 Какви са техническите

възможности на LSM Plus,

и каква е деконволюцията зад нея? 15 Какво стои

зад обработката LSM Plus? 15 Стъпка по стъпка

към 90 nm – Съвместна деконволюция на Airyscan (jDCV) 16 SR-SIM

с итеративен DCV: изображения с резолюция 60 nm 17

4

4 ЧЗВ: Деконволюция

18

Деконволюцията количествена ли е? 18 Как DCV

надвишава оптичната разделителна способност? 19 С колко мога да

подобря разделителната способност с деконволюция? 19 Мога ли да правя

деконволюция върху 2D изображения? 19 Трябва ли да използвам

теоретична PSF или измерена PSF? 20 Как се генерира измерена

PSF? 20 Трябва ли да деконволвирам всичките си

микроскопски изображения? 21 Мога ли да деконволвирам

изображения в светло поле, получени в пропусната светлина? 21

5

5 ЧЗВ: Артефакти за деконволюция

21

Откъде идват артефактите от деконволюция? 21 Как

изглеждат артефактите от деконволюция? 22 Как да

избегнем или компенсираме артефактите от деконволюция? . . . 22

6

6 Заключителни бележки

23

6

Въведение

От въвеждането на широкоъгълната флуоресцентна микроскопия през 1983 г., деконволюцията е свидетел на разработването на голямо разнообразие от алгоритми. Тя е успешно и рутинно прилагана към почти всички микроскопски техники. Наблюдава се особено рязък ръст на популярността на деконволюцията през последното десетилетие, подхранван главно от бързото усъвършенстване на компютърния хардуер, по-специално от напредъка на NVIDIA® CUDA® технологията и паралелната процесорна мощност на графичните процесори (GPU). Скоростта на деконволюцията, която преди беше пречка на метода, е драстично подобрена, например до 30 пъти по-бърза с модерен GPU в сравнение с традиционните централни процесори (CPU). Благодарение на тези предимства в компютърния хардуер, деконволюцията е напуснала донякъде остарялото си състояние и е преживяла впечатляващо възраждане. Сега тя е неразделна част от много приложения в микроскопията.

За широкоъгълната микроскопия, деконволюцията е предпочитаният метод за подобряване на качеството на изображението. Алгоритъмът пренасочва размазването извън фокус в 3D стека, основният източник на шум в широкоъгълната микроскопия, обратно към равнината във фокуса като сигнал. Резултатът е по-добър контраст, по-високо съотношение сигнал/шум (SNR) на фокусираните структури и повишена разделителна способност. По този начин, имплементацията на деконволюцията в движение за широкоъгълна флуоресцентна микроскопия осигурява нежна и бърза 3D възможност, изключително подходяща за приложения в клетъчната биология и бактериологията. През последните години изображения от лазерно сканиращи конфокални и въртящи се дискови конфокални микроскопи също редовно се обработват с деконволюция. Използвайки главно итеративни алгоритми, съчетани със сканиране на свръхсемплиране и намален размер на отвора, е доказано, че конфокалната деконволюция увеличава страничната и аксиалната разделителна способност отвъд теоретичната граница на дифракция. За сметка на скоростта и чувствителността, конфокалната деконволюция се превърна в най-достъпната техника за суперрезолюция (SR). Най-новите постижения в деконволюцията са в традиционните хардуерно-базирани SR микроскопи: структурирана илюминационна микроскопия (SIM) и сканираща микроскопия на изображения (ISM, като например ZEISS Airyscan). Като SIM, така и ISM изискват специализирано многофазно събиране на сурови данни. Последващият процес на реконструкция обикновено включва деконволюция, базирана на линейна обратна филтърна система, най-забележимо чрез Винеров филтър. Чрез внимателно прилагане на итеративен алгоритъм и специален модел с функция за разпространение на точки (PSF) обаче е възможно да се намали разделителната способност до домейна под 100 nm, което открива нови възможности за SR изобразяване на живи клетки. Това е успешно демонстрирано чрез двойния итеративен SIM процес на ZEISS Lattice SIM и процеса на съвместна деконволюция на ZEISS Airyscan 2.

Тази бяла книга има за цел да предостави практическо ръководство за потребителите на деконволюция на лесен за разбиране език и с минимално количество специализирани термини. Тя ще разгледа три основни въпроса: какво е деконволюция? Защо трябва да използвам деконволюция за моите микроскопски изображения?

Как да го използвам правилно?

Какво е деконволюция?

Най-общо казано, деконволюцията е математически метод, използван за обръщане на неизбежното въздействие на оптиката и електрониката.

Деконволюцията има различни области на приложение, като сеизмология и астрономия, както и микроскопия. Доказано е, че обръщането подобрява разделителната способност, контраста и съотношението сигнал/шум (SNR).

Функцията за разпръскване на точки (PSF) се използва за описание на размазването на пробата, наблюдавано в полученото изображение. Например, в широкогълната микроскопия PSF има двойна конусообразна форма, която се простира безкрайно в аксиална посока.

Присвояване и преназначаване на фотони, какво означава това?

Присвояване (модел за напред)

Картината на проба, видяна през микроскоп, често изглежда размазана. Това се дължи на факта, че оптиката обединява (чрез добавяне) информация от места, различни от специфични точки на интерес в пробата. По този начин размерът и формата на разпространение от тези места са известни като PSF. За разлика от това, това, което микроскопът прави, често се нарича суперпозиция или конволюция.

Преназначаване (обръщане на модела за пренасочване)

Идеята за обръщане на размазването на микроскопите е очевидна. Това би изисквало изваждане на интензитети, където са били добавени погрешно, но също така и добавяне на интензитети към местата, откъдето са взети. Като цяло, в този процес, наречен деконволюция, сумата от всички интензитети остава същата преди и след процедурата. Следователно, законът за запазване на енергията се запазва и могат да се провеждат количествени измервания.

Проблеми с преназначаването

За съжаление, деконволюцията не е лишена от несигурности както по отношение на местоположението, така и на интензитета на преназначаването. Тези несигурности произтичат от грешки в измерването на интензитета и PSF. Математическият термин, при който такива грешки променят резултата от преназначаването, се нарича *неправилно формулиран проблем*.

Деконволюцията цели да избере интензитетите от наблюдаваното изображение и да ги преназначи чрез конволюция на обратната функция на PSF. Поради липса на точност, оскъдни данни, шум и други фактори (като безкрайното разширение на PSF в случая на широко поле), деконволюцията се превръща в неправилно поставена задача, което означава, че няма единно решение. Това е причината, поради която са внедрени различни алгоритми.

Пространството на решенията обхваща и нежелани решения, като например отрицателни интензитети, причиняващи осцилиращи артефакти и други проблеми. От началото на 70-те години на миналия век съществува голям брой публикации, които разглеждат подобни проблеми от строга математическа гледна точка. Днес е добре известно, че елиминирането на нежелани решения е ключът към успешни реконструкции без артефакти. Решенията са внедрени и достъпни в деконволюционната рамка на ZEISS.

Алгоритми, внедрени в ZEISS ZEN (сinyo издание) *Премахване на размазването*

Премахването на размиването се опитва да извади приносите от приблизителната информация за области извън фокус. Основното предимство е, че ускорява изчисленията и по този начин позволява този метод да бъде част от събирането на данни. Премахването на размиването е известно още като липса на съсед или понякога като неостро маскиране. Поради това този метод не може да реконструира количествено правилни резултати.

Най-близък съсед (NN)

(NN) беше първият прагматичен опит (Castleman 1975) за премахване на размазването на 3D микроскопски данни с 2D метод, подобен на премахването на размазването. Поради изчислителните ограничения на времето, строгата математическа обработка не беше опция. Следователно, беше разгледан само опростен адитивен модел, при който приблизителните приноси от фокус бяха извадени от информацията в фокус. Той не отчита истинска 3D инверсия, както днешните строги методи. Вместо това, използва 2D равнини със страничния ефект на нечувствителност към аксиално семплиране. Това позволява успешно да се използват данни от изображения, които не се придържат към ограниченията за семплиране на Найкуист. В противен случай, по замисъл, този алгоритъм няма да предостави количествено правилни резултати.

Регуляризиран инверсен филтър (RIF)

RIF (или линейни най-малки квадрати) използва директна, линейна инверсия на директния модел. Може да се разглежда и като стандартен конволюционен филтър, използващ обръната PSF. За да се противодейства на нестабилността, дължаща се на неправилна позиция (напр. шум и сингулярности на PSF), се добавя регуларизация (Тихонов и Арсенин 1977), известна още като Винеров филтър (Винер 1949).

Бърза итеративна (метод на Майнел/Голд)

Около началото на 70-те години на миналия век е въведен нов, итеративен подход към едномерното възстановяване на спектрални данни. Там задачата за предварителна оценка се прилага към предположение-образ, което може да бъде избрано повече или по-малко от очаквания резултат в началото на алгоритъма. Резултатът от това се сравнява с наблюдаваното изображение и остатъкът се прилага за коригиране на предположението. Този процес се повтаря, докато коригиращият остатък излезне до много малки стойности. Такива алгоритми могат да бъдат реализирани, където въпросният остатък се изчислява като разлика (Jansson 1996, van Cittert 1931) или като съотношение (Meinel 1986). Поради възможността за налагане на коригиращи модификации с всяко предположение, тези видове алгоритми са известни още като ограничени итеративни. Най-популярното ограничение е позитивността. В случая на Meinel (който е наличен в рамката ZEISS), позитивността е имплицитна. Този алгоритъм изисква само няколко (по-малко от 10) итерации, за да се завърши и следователно е доста бърз. Има обаче едно предупреждение: този метод работи правилно само върху перфектно симетрични PSF, които, за съжаление, рядко се срещат, когато имерсионното масло е основният източник на аберации, неизвестни на системата.

Бързо повторение: класическа итерация на Ричардсън-Луси

За да се преодолее недостатъкът на алгоритъма на Майнел, който работи само върху перфектно симетрични PSF, е необходим строг статистически подход, като например максимална вероятност (Richardson 1972, Lucy 1974). Максималната вероятност на извадката се определя от даденото наблюдение и неговите параметри (напр. PSF). Изненадващо, това води до просто разширение на алгоритъма на Майнел. Единственият недостатък е, че са необходими много повторения (понякога хиляди). Също така, друго предупреждение е, че с нарастващ брой повторения резултатът става нестабилен и вероятността ще намалее отново в даден момент.

Бързо повторение: Ускорен Ричардсън-Луси

За да се намали големият брой повторения, е разработена донякъде евристична схема за ускорение, базирана на градиент, която показва потенциал за успех (Biggs 1986). Този алгоритъм по същество се сближава до почти същия резултат като алгоритъма на Ричардсън-Луси, но с около един порядък по-малко повторения

Ограничено повторение: MLE

Предвид обещаващите резултати от ускорения алгоритъм на Ричардсън-Луси, все още съществува възможност за нестабилност по време на много голям брой повторения поради липсваща регуларизация. Освен това, ускорението, базирано на линейни градиенти, може да не доведе до стабилно сближени резултати.

По-бърза конвергенция (по-малко итерации), комбинирана с променливи избори за типовете вероятности и регуларизация, може да се постигне чрез обобщен алгоритъм за максимална вероятност с конюгиран градиент (Schaefer et al 2001). Това е настоящият стандарт на ZEISS за високопроизводителна деконволюция.

Комбинирана (съвместна) деконволюция

Добре известно е, че повече и разнообразно събрана информация около пробата може да разкрие по-големи детайли и следователно по-висока резолюция, отколкото наблюденията с единичен изглед. Днес, в ерата на SIM, ISM, LFM и SPIM, на пазара се появиха няколко инструмента, които биха могли да заснемат множество изгледи на една проба с очакването да разкрият повече информация. Въпреки че всеки от тези методи се фокусира върху различни физически свойства на осветеността и ъглите на наблюдение, получените изображения винаги имат поне едно или повече добавени измерения на суровите данни. По отношение на пробата това предлага не само възможността за реконструкция, но и включване на съответните им PSF в този процес. Алгоритъм, който може да обедини и преразпредели цялото събрано пространствено съдържание в една единствена реконструкция, наречена съвместна деконволюция, превъзхожда досега известните методи. Може да се покаже, че различните ъгли на гледане на пробата водят до по-голяма поддръжка на оптично-трансферната функция (OTF), в допълнение към наблюдаваните детайли от всеки изглед. Следователно, може да се очаква изключително увеличение на разделителната способност до и под 100 nm, което е показано със съвместната итеративна деконволюция на Airyscan, наскоро пусната от ZEISS.

Какво представлява функцията на разпространение на точки (PSF)?

PSF описва степента на размазване в дадена система за изображения. Оптималната PSF е ключова за подобряване на качеството на изображението в резултат на деконволюцията.

Видове PSF:

Измерено

Измерването на PSF (процент на пространствено инвариантна функция) се извършва чрез получаване на изображение на флуоресцентни перли с под-резолюция, обикновено с диаметър 100 nm. С помощта на софтуерен помощник потребителят може да избере перлите от партида, които са разположени на достатъчно разстояние една от друга и са в добро състояние. Избраните перли след това ще бъдат регистрирани автоматично и осреднени, за да се формира крайният PSF, инвариантен спрямо пространството.

Как да генерирам измерена PSF?

Използването на измерена PSF може потенциално да подобри резултата от деконволюцията, особено при данни, получени с помощта на обективи с висока NA ($NA > 1.2$). Измерването на PSF е също отличен подход за оценка на текущото оптично състояние на вашите микроскопи и трябва да се извършва редовно. Процедурата обаче е трудна за повечето потребители, които я използват за първи път, и изисква правилна подготовка и практика. Вижте кратко ръководство за това как да генерирате измерена PSF [тук](#)

Теоретично

По-бързо и по-лесно е да се изчисли PSF, отколкото да се използва физическият инструмент PSF. Тук можем да избираме между скаларни и векторни PSF модели. Векторната PSF обикновено е по-прецизна и позволява поляризирана светлина (Born, M. & Wolf, E. 1959). Повечето PSF модели в деконволюционната система ZEISS могат да бъдат коригирани за сферична aberация (Gibson, S. & Lanni, F. 1992), причинена от слоеве с различен индекс на пречупване поради монтирането на пробата. Тези слоеве се състоят от потапяне, покривно стъкло и материал за влагане.

Вариант на дълбочината (теоретичен)

Освен това, PSF може да се изчисли като променлива спрямо дълбочината на пробата под формата на множество PSF за всяка избрана дълбочина. В този случай повечето методи за обработка ще работят в режим на вариация на дълбочината, реконструирайки пространствени характеристики по оптичната ос, докато изображението не се подобри значително.

Стандарт ZEN PSF:

Форматът ZEN CZI на PSF е стандартизиран за всички налични микроскопи, произведени от ZEISS и други.

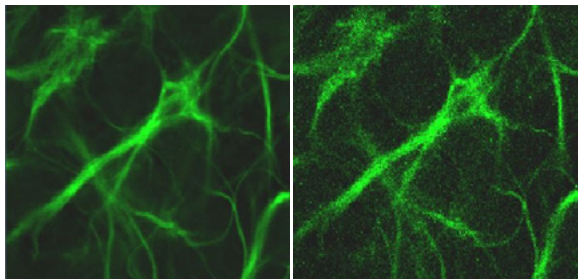
Ще работи с всички функционалности за деконволюция, въпреки евентуално различните им опции.

Защо имаме оптично изкривяване? Шум, разсейване, отблясъци, размазване (вижте също Wallace 2001)

Шумът произхожда от:

- 1) Генериране на флуоресценция и Поасоново разпределение на емисията като функция на наблюдението
- 2) Електронен шум, топлинен шум, шум от отчитане и дискретизационен шум (предимно адитивни Гаусови разпределения в наблюдението)

И двата източника са обхванати от модела на изобразяване



Фигура 1 Астроцити от миши мозък, маркирани за GFAP (Alexa 488). Сравнение на бавно (вляво) и бързо (вдясно) сканиране на LSM 800.

• **Разпръснато**

Причинява се от преминаване на светлина през мътна среда в пробата. Поради сложното моделиране това понастоящем не се разглежда.

• **Абсорбция**

Причинява се от преминаването на светлина през абсорбиращи, плътни среди в пробата. Поради нелинейност, не се взема предвид в модела на изобразяване.

• **Отблясъци**

Причинява се от вътрешни отражения на ярки източници на светлина в области със слаба осветеност. Това не може да се вземе предвид в модела на изобразяване.

• **Размазване**

Причинено от въздействието на PSF. Това е напълно обхванато в модела на изобразяване.

Практическо ръководство

Общи препоръки

Какви са общите препоръки за настройките за заснемане на изображения, ако получените изображения са предназначени за обработка с алгоритъм за деконволюция?

Ключът към най-добри резултати при деконволюция е да се представи оптимално входно изображение на алгоритъма. Оптималното изображение е това с възможно най-висок сигнал и възможно най-нисък шум. Освен това, честотата на дискретизация, която в конфокална система определя броя на пикселите в полученото изображение, трябва да бъде достатъчно висока. Какво е достатъчно висока? Честота на дискретизация

трябва да доведе до изображение, където размерът на всеки пиксел е по-малък от половината от размера на структурата, която искате да разрешите, при условие че системата поддържа това семплиране. Теоремата за такова семплиране се нарича критерий на Найкуист-Шанън за семплиране. Това означава, че трябва да знаете разделителната способност на оптичната система, за да получите правилно семплиране – особено ако семплирането може да се променя, както при конфокална система. Обикновено вашата конфокална система предоставя информация за текущата честота на семплиране за дадена настройка на придобиване. След това семплирането може да бъде променено, за да съответства на Найкуист или дори да надхвърли (като $2 \times$ Найкуист за Airyscan, както е описано подробно по-долу). Когато придобиването се извършва с камера, оптичната система е проектирана да съответства на Найкуист и настройките не е необходимо да се променят. Трябва обаче да бъдете внимателни, когато увеличавате размера на пикселите чрез бининг. Този метод изисква специално внимание и трябва да знаете разделителната способност на вашата система, за да можете да предвидите потенциалните последици.

Как генерирате такова изображение от вашия образец?

За широкогълните системи камерата има зададен брой пиксели, който обикновено е достатъчно висок, за да обработи получените изображения с деконволюция. За конфокалните системи семплирането трябва да бъде дефинирано за текущите оптични параметри, които включват обектива, увеличението и обхвата на детекция, освен размера на отвора. Съвременните потребителски интерфейси предоставят някакъв начин за задаване на семплирането на необходимата честота, за да съответства на критерия на Найкуист.

След като семплирането е зададено, параметрите на запис трябва да бъдат балансирани, за да се постигне ярък сигнал с нисък шум. При изображения от камера това означава оптимизиране на времето за експозиция, за да се получи ярко изображение. Яркостта обаче не трябва да надвишава стойността от 50% от общия динамичен диапазон. Това може да се провери, като се разгледа хистограмата – графика, показваща разпределението на интензитетите на сигнала в дадената сива скала. Ако интензитетите са разположени главно в диапазона до 50% от сивата скала, настройките са готови – за изобразяване на една равнина на пробата. За конфокални системи това условие е по-малко важно, защото приложените алгоритми се грижат за това. Във всеки случай, насищането на изображението абсолютно трябва да се избягва; нито един пиксел не трябва да е на или над максималното ниво на сивото. Проверете с индикатор за диапазон, който показва наситени пиксели в ясна цветова схема.

За конфокално придобиване има допълнителни начини за оптимизиране на съотношението сигнал/шум. Един от начините е да се увеличи възбуждащата светлина и да се намали усилването на детектора, но това може да доведе до фототоксични ефекти като избелване, които са нежелани ефекти, тъй като избелването отново намалява сигнала, но само в по-малка степен намалява шума. За да се намери добър баланс, един трик е да се имитира придобиването, първо без лазерна светлина, след което да се увеличи усилването на детектора до границата, където електронният шум все още не е видим. Други стратегии не променят настройките на лазера, а по-скоро...

променете времето на осветяване на пиксел чрез намаляване на скоростта на изобразяване или чрез осредняване на сигнала за 2 или повече сканирания

Но отново, това увеличава дозата светлина върху пробата.

Обикновено искате да разглеждате триизмерни структури, независимо дали използвате камера за изображения, може би дори вдвоена със структурирано осветление, или използвате конфокална система. Теоремата на Найкуист-Шанън, нашето предварително условие за семплиране, важи и за третото измерение. Необходимият брой изображения в Z отново се определя от емисионния сигнал на точката, както е посочено от PSF. Въпреки това, за да работи всеки алгоритъм за деконволюция с 3D данни, трябва да получите достатъчно „плътни“ изображения в Z, както и достатъчно изображения. Обикновено софтуерът предоставя някои указания за това как да изберете правилното семплиране в Z. За да определите диапазона от изображения, необходими в Z, трябва да знаете постижимата разделителна способност на вашата система. Ако знаете разширението на PSF в Z, изображеният Z-диапазон трябва да покрива поне 3 – 5 пъти размера на PSF. Когато използвате конфокална система, честотата на дискретизация зависи от дебелината на среза, посочена в потребителския интерфейс, като се предлагат оптимални настройки. Общият диапазон зависи от това, което искате да видите в Z, но са необходими минимум 5 среза, за да работи DCV. След като вече сте оптимизирали настройките, ще разберете, че това има някои последици за цялостния процес на изобразяване.

Първо и веднага наблюдавано е, че получаването на изображения отнема повече време. По-големият брой пиксели в XY и по-големият брой изображения в Z увеличават времето за получаване в сравнение с други настройки, при които не се вземат предвид тези параметри. Заснемането с цел прилагане на деконволюция може да отнеме много време, особено при използване на лазерни сканиращи конфокални микроскопи – но в повечето случаи си заслужава! По-дългото време за получаване на изображения обаче означава по-дълго време на възбуждане, което означава по-голям риск от избелване на пробата.

Как можете да се справите с този недостатък?

Най-ефективното нещо, което можете да направите, е да изберете възможно най-малка област за изобразяване, за да намалите зрителното поле само до необходимия размер. Високата резолюция или суперрезолюцията обикновено се прилага за вече малки, субклетъчни структури, така че ограничаването на сканираната област до структурите, които представляват интерес, намалява размера на кадъра и следователно времето за изобразяване за всеки кадър. Това не само помага за ускоряване на получаването на изображението, но и ускорява последващата обработка на данните. За широкофъгълна система това може да не е толкова уместно, но ако групирането на пиксели все още осигурява достатъчно висока честота на дискретизация, поне обработката на данните ще бъде по-бърза. Количеството данни, което алгоритъмът трябва да обработи, определя времето, необходимо за получаване на резултата.

Ако най-високата резолюция не е най-важният аспект, който трябва да се постигне с DCV, а по-скоро намаляването на шума и известно премахване на размазването, тогава използването на по-ниска честота на дискретизация може да е добър вариант. Това помага за ускоряване на заснемането на изображения и намалява въздействието на светлината върху пробата. Този подход все пак ще доведе до висококачествени изображения с по-добре видими структури, въпреки че те не са максимално разделени.

Ами движеща се цел?

Винаги, когато имате фиксирана проба и нищо не се движи, тогава точката на произход на емисионния сигнал е известна. Винаги, когато имате жива проба, като култивирани клетки, органоиди или цели организми с различен размер, структурата, която искате да разгледате, може да е в движение, докато получавате единично изображение или серия от изображения. В зависимост от скоростта на това движение, прилагането на деконволюция към тези изображения може да е невъзможно, не само при сканиращи системи, където точката на интерес може да се движи ред по ред, но и при изображения от камера. Дори кратко време на експозиция може да доведе до размазано изображение. Ако не можете да съкратите времето за изобразяване, опитайте се да забавите потенциалното движение на пробата. Познаването на пробата и нейния потенциал за движение е от решаващо значение в този случай.

Ако образната диагностика изисква определена продължителност, как можете да ускорите времето до получаване на резултата?

Общото количество необходими данни определя общото време за обработка. Гореспоменатите мерки на съвременното програмиране, използващи графични процесори, доведоха времето за получаване на резултат до диапазон, в който използването на алгоритми за деконволюция стана много по-привлекателно. Много добър подход за обработка на големи масиви от данни е това да се прави по време на заснемане на изображения. Предлагат се системни конфигурации с допълнителни компютри за обработка, с автоматично прехвърляне на данни за стартиране на обработката, когато са получени достатъчно данни. След това ще видите резултата малко след приключване на експеримента.

Има ли нещо друго, което да се има предвид? Няколко думи за

обектива Избраният от вас обектив е първото взаимодействие с пробата.

Всяко повреждане на обектива ще доведе до лоши изображения от самото начало, независимо как се грижите за останалата част от настройката. Поддържайте го чист. Изберете обектив, при който коефициентът на пречупване на имерсионната среда съвпада с индекса на вграждащата среда. По-високата числена апертура (NA) на обектива няма да реши проблема с получаването на по-висока разделителна способност, освен ако тези индекси не са правилни. Сменете вграждащата среда, ако е необходимо. – ще видите резултата веднага. За подробна информация относно почистването на микроскопи, моля, вижте [Брошура ZEISS „Чистият микроскоп“](#)

Методи за деконволюция

Класическата деконволюция за флуоресцентна широкоъгълна микроскопия

Флуоресцентната микроскопия значително е допринесла за напредъка на изследванията в областта на науките за живота. През миналия век много големи открития в клетъчната биология и невронауката бяха възможни само благодарение на директната визуализация на клетките, субклетъчните компоненти и тяхната мобилност и взаимодействие с други. Флуоресцентната микроскопия играе ключова роля в такава директна визуализация. Чрез маркиране на специфични молекули или структури със светоизлъчващ флуорофор, малки частици и деликатни структури могат да бъдат идентифицирани и количествено определени с много по-висока специфичност и прецизност. Флуоресцентната микроскопия е въведена от ZEISS в началото на XX век. Днес тя остава един от най-широко използваните инструменти във всяка биологична изследователска лаборатория.

Традиционният флуоресцентен широкоъгълен микроскоп има опростен, но елегантен дизайн на пътя на лъча с епи-осветление. Основната характеристика е да се осигури механизъм за осветяване на пробата с избран диапазон на дължината на вълната, след което да се отдели и детектира изместената флуоресцентна светлина с по-голяма дължина на вълната. Тъй като флуоресцентният сигнал обикновено е с три до шест порядъка по-слаб от осветителната светлина, предизвикателството е да се произведе мощно осветление, като едновременно с това се отдели и детектира слаба флуоресцентна емисия. Това исторически се постига чрез използване на мощна живачна дъгова лампа като източник на светлина и прилагане на специални късопропускащи, лентови или дългопропускащи филтри и разделители на лъча. Съвременните флуоресцентни широкоъгълни микроскопи се възползват изключително много от непрекъснатото развитие на оптиката, покритията, светодиодите (LED) и технологиите за детектори. Наличието на повече от дузина мощни светодиоди осигурява гъвкаво, стабилно и нежно флуоресцентно осветление. Апохроматичната оптика и обективи коригират изместването на цвета в целия диапазон на видимата светлина. Усъвършенстваната технология за покритие е довела ефективността на филтъра до близо 100%. Най-съвременните EMCCD и sCMOS камери откриват най-слабите флуоресцентни сигнали с квантова ефективност (QE) над 95%. Тези постижения направиха възможно наблюдението и записването на много сложни проби, като живи клетки и биомолекули в три измерения, за дълъг период от време с минимални смущения.

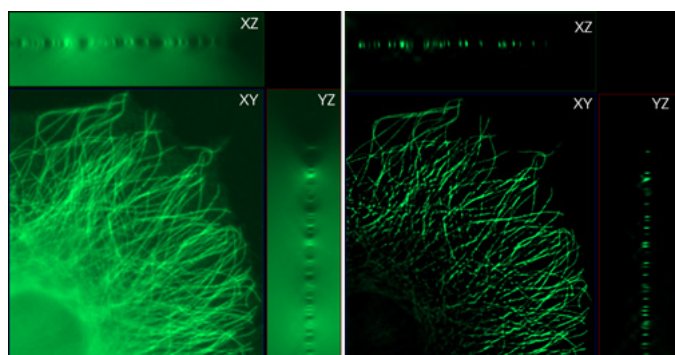
Тези хардуерни разработки обаче не решават фундаментален проблем на флуоресцентната широкоъгълна микроскопия: влошаване на изображението и оптично размазване, причинени от дифракцията на светлината през оптична система. Все по-добрата чувствителност на хардуера прави това влошаване още по-очевидно. Моделът на оптичното размазване се основава на концепцията за PSF. Във флуоресцентен широкоъгълен микроскоп формата на PSF се доближава до пясъчен часовник, а размерът (или нивото на разсейване) се определя от дължината на вълната и числената апертура (NA) на обектива.

PSF служи като основен градивен елемент на изображението. Всичко по-малко от PSF не е директно разделяемо, независимо от увеличението или размера на пиксела. За съжаление, при флуоресцентната широкоъгълна микроскопия, разпространението на PSF в аксиална посока е много по-дълго, отколкото в странична посока. Аксиалното разширение е теоретично безкрайно и значително ограничава аксиалната резолюция. Нещо повече, такова нежелано аксиално разширение (или размазване извън фокус) се смесва със сигнала във фокус в друг слой, което допълнително намалява съотношението сигнал/шум (SNR) на фокусираната структура. Често полученото флуоресцентно широкоъгълно изображение е свързано с по-ниска резолюция, лошо SNR и намален контраст, особено при обективи с висока числова апертура (NA) и дебели проби. Популярни методи за оптично секциониране, като конфокално, подобряват разделителната способност и контраста чрез физическо премахване на такива размазвания извън фокус. Хардуерната имплементация на лазерно точково осветление и отвор за микроскоп може ефективно да предотврати достигането на размазванията извън фокус до откриване. Този процес обаче неизбежно премахва значителен брой фотони от пробата и намалява общата ефективност на откриване. Не би ли било по-добре да се „използват повторно“ такива размазани изображения извън фокус? Това е целта на възстановителната широкоъгълна 3D деконволюция. Да предположим, че имаме изключително тънка проба и оптичната система генерира перфектно PSF (плоскостна функция на фокуса), без аберации и шум. В този случай можем математически да преназначим всички размазани изображения обратно във фокалната точка с висока степен на сигурност. За съжаление, такова перфектно условие за получаване на изображение не съществува. На практика трябва да се справим с множество артефакти при получаване на изображение, като разсейване на светлината, сферична аберация и допълнителен шум от пробата и камерата.

В предишните раздели вече беше обсъдено като цяло как правилно да се получават изображения за деконволюция. За флуоресцентна широкоъгълна микроскопия има някои допълнителни съображения.

- 1) Работете само с тънки проби, в идеалния случай в рамките на 10 μm .
Разсейването на светлината е строго случаен феномен. Нивото на разсейване зависи от дължината на светлинната вълна (по-дългата дължина на вълната има по-малко разсейване), оптичната хетерогенност на тъканта и най-вече от дебелината на тъканта. Дебелата тъкан значително рандомизира всички сигнали. Без допълнителен механизъм за разграничаване на сигнали във фокус и извън фокус, като например отвора в конфокалната проекция или мрежовата проекция в апотома, „преназначаването“ на деконволюционните фотони е помрачено от грешки.
- 2) Обърнете специално внимание на семплирането на изображението и аксиалните диапазони. Флуоресцентното широкоъгълно изображение има фиксиран размер на пиксела с даден набор от обективи, тръбни лещи, камера и адаптер за камера. То няма гъвкавостта на размера на пиксела на конфокална или предварително калибрирана конфигурация, както в SR-SIM. В много случаи потребителят е длъжен да потвърди размера на пиксела и семплирането ръчно. Повечето софтуерни програми за микроскопи автоматично ще изчислят и покажат размера на пиксела. Въпреки това все още е необходимо...

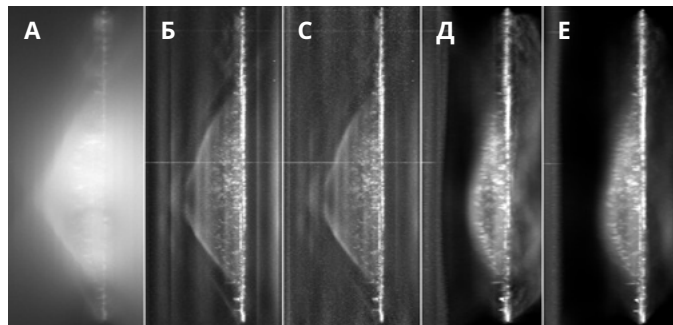
Необходимо е да се сравни това с теоретичната резолюция. GFP канал за изображения, използващ обектив $63\times / 1.4$ с $1\times$ тръбна леща, монокамера ZEISS AxioCam 705 и адаптер за камера $0.63\times$, дават размер на пиксела от 87 nm. Теоретичната резолюция е ~ 220 nm, което се превръща в странична честота на семплиране от $2.5\times$ – идеална за деконволюция. Аксиалната честота на семплиране може да се контролира от Z мотора и много видове софтуер за изображения биха предложили „оптимално“ $2\times$ семплиране. За широкоъгълна деконволюция е препоръчително да се получат аксиални диапазони малко над и под физическата дебелина на пробата, около половината от аксиалния размер на PSF, така че да могат да се използват и допълнителните размазвания извън фокус (вижте Фигура 2). Ако дадено флуоресцентно широкоъгълно изображение няма оптимално семплиране, се препоръчва да се използва алгоритъм, базиран на съседни, като например най-близък съсед.



Фигура 2 Ортогонална проекция на широкоъгълно 3D набор от данни преди и след деконволюция. Напречните сечения на суровите данни ясно показват наличието на сигнали за размазване извън фокус, но също така подчертават липсата на артефакти в изображението. Такъв набор от данни е особено подходящ за деконволюция. Напречното сечение на деконволюираните данни потвърждава пренасочването на размазването извън фокус и увеличеното съотношение сигнал/шум (SNR).

3) Сферичната аберация може да бъде частично коригирана с алгоритъм за дълбочинна дисперсия. Сферичната аберация обикновено се причинява от неправилна дебелина на покривното стъкло или несъответствие на индекса на пречупване между средата за потапяне на обектива и средата за монтиране на пробата. Това води до аксиална асиметрия във формата на PSF, а нивото на асиметрията варира при различни дълбочини на изображението. По време на заснемане на изображението е изключително важно да се съчетае типът на потапяне на обектива със средата за монтиране на пробата, например, като се използва воден обектив за живи клетки, култивирани във водна среда, или маслени обективи с фиксирани проби. На практика съвпадението никога не е идеално. Повечето търговски среди за монтиране имат индекс на пречупване от 1,41 до 1,49, докато маслото за потапяне на обектива е 1,52. Различните материали също реагират различно на температурните промени. Някои усъвършенствани обективи имат специален коригиращ пръстен, за да компенсират такива вариации, но процедурата обикновено е досадна и корекцията рядко е пълна. Деконволюцията предоставя ценна алтернатива за справяне със сферичната аберация за флуоресцентна широкоъгълна микроскопия (вижте

Фигура 3). Чрез задаване на коефициента на пречупване както на имерсионната, така и на вграждащата среда, програмата може да симулира множество PSF на различни дълбочини на изображаване. Тези множество PSF след това се използват на различни дълбочини в суровите данни за деконволюция.



Фигура 3 Пример за подобрене на деконволюцията чрез допълнителни корекции. А) напречно сечение на суровите данни на U2OS клетка в PBS разтвор, получени с помощта на Plan Achromat $63\times / 1.4$ обектив за маслена имерсия. Налице е силна сферична аберация поради несъответствие на коефициента на пречупване. В) Ограничена итеративна деконволюция по подразбиране. С) Ограничена итеративна деконволюция с активирана корекция на фона. D) Ограничена итеративна деконволюция с корекция на фона и корекция на аберациите на PBS като среда за вграждане. E) Ограничена итеративна деконволюция с корекция на фона, корекция на аберациите и корекция на дълбочинната дисперсия с 10 PSF. Всичко е направено със ZEN Deconvolution.

4) Възможно е да се извърши онлайн деконволюция. Деконволюцията е изчислително трудна и времето, прекарано в нея, е било многократно по-дълго от това, прекарано в заснемане на изображения. Благодарение на бързото развитие на компютърния хардуер, особено на GPU ускорението, скоростта на деконволюцията се е увеличила драстично. GPU-ускорените изчисления са използването на GPU за улесняване и ускоряване на повтарящите се изчисления на определени алгоритми за обработка на изображения, като например деконволюция. Много търговски софтуерни приложения за деконволюция са имплементирали GPU ускорение. С подходяща NVIDIA...CUDA®C поддържана графична карта, ZEN Deconvolution може да осигури до 30 пъти по-бърза производителност от традиционните алгоритми, базирани на процесор. Това увеличение на скоростта прави възможно извършването на онлайн деконволюция или деконволюция в движение. Например, ZEN модулът за директна обработка може значително да подобри използваемостта и да спести време чрез паралелизиране на стъпките за заснемане и деконволюция на изображението. За да получи възможно най-ранна обратна връзка, той започва да обработва най-малкия обработваем обект веднага щом заснемането му е завършено. В случай на деконволюция, това обикновено е Z-стек за един канал. Ще можете да наблюдавате обработения резултат в движение, което е много полезно за експеримент с разширена времева серия.

В обобщение, флуоресцентната широкоъгълна микроскопия се възползва най-много от деконволюцията. Хардуерната имплементация също така използва някои ключови предимства в сравнение с други методи за изображаване:

1. Настройката е проста и може да бъде ефективно автоматизирана за високопроизводително изображаване
2. Скоростта на заснемане е бърза и е ограничена само от честотата на кадрите на камерата и яркостта на образеца.
3. Простият път на лъча води до висока чувствителност
4. По-достъпно е.

С внедряването на деконволюция в движение, той е много подходящ за изобразяване на тънки монослойни клетъчни култури, дрожди, бактерии, тънки тъканни срези, *C. elegans*, цитогенетични проби, приготвени чрез флуоресценция *in situ* хибридизация, и много други.

Деконволюция за флуоресцентна микроскопия със светлинен

лист Light sheet fluorescence microscopy (LSFM) is one of the most recently introduced microscopic techniques, yet it witnessed the fastest growth in development and application in the past decade . The basic principle of LSFM is the generation of a thin sheet of light for sample illumination, with the illumination and detection decoupled at a perpendicular geometry . Contrary to the traditional epi-illumination, LSFM has an inherent optical sectioning capability . The perpendicular light sheet does not illuminate regions that are not in the focal plane, which leads to significantly less sample phototoxicity and photobleaching. LSFM, such as ZEISS Lightsheet 7, has been used widely for gentle and fast imaging of living cells, organoids, plants, and embryos over extended periods. The fast acquisition speed, large field of view, and the possibility to adapt sample holders and optics for a higher refractive index of 1.33 to 1.58 also makes LSFM the method of choice to image centimeter-sized optically cleared brains, tissues, and even entire animal models. To further improve the axial resolution, a lattice illumination pattern can be generated to replace the standard Gaussian beam, which reduces the light sheet thickness down to 550 nm . Lattice light sheet microscope, such as ZEISS Lattice Lightsheet 7, brings all the advantages of LSFM to isotropic subcellular resolution With camera-based detection, LSFM deconvolution is similar to widefield deconvolution, but it possesses a few unique exceptions:

1 PSF е уникална. Теоретичната PSF на LSFM трябва да бъде

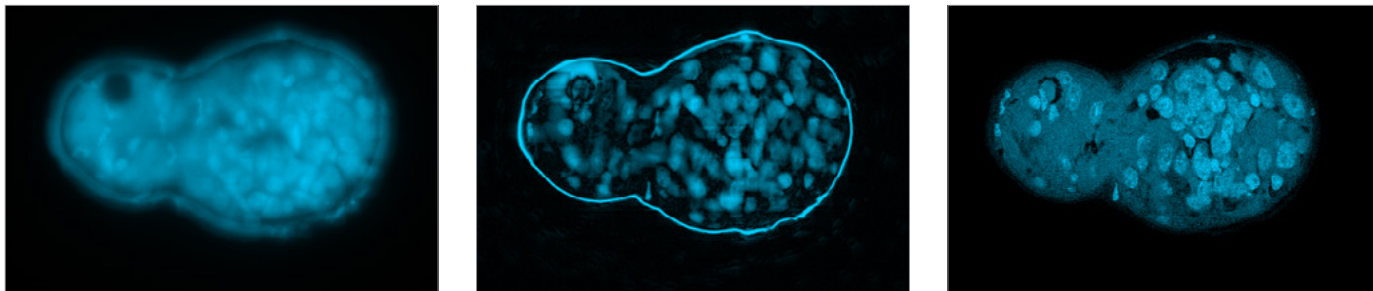
произведението между осветяването и детекцията. Ако светлинният слой е значително по-дебел от аксиалната разделителна способност на детекторния обектив, общата аксиална разделителна способност се доминира само от детекторния обектив. Това може да се случи чрез използване на Гаусов светлинен слой заедно с детекторни обективи с висока NA (>0.8). От друга страна, когато се използва Гаусов светлинен слой с обективи с ниска NA или се използва тънък решетъчен светлинен слой, дебелината на светлинния слой ще доминира аксиалната разделителна способност и значително ще повлияе на теоретичната PSF (функционална функция на изображението). И в двата случая аксиалното калибриране между осветяването и детекцията преди заснемане на изображението е от решаващо значение. Дори само с няколко нанометра изместване, качеството на изображението може да се влоши драстично. Адекватно моделиран PSF може частично да възстанови такова влошаване на изображението. Уникалният PSF може да се използва и за коригиране на страничните лобове на решетъчния светлинен слой.

Страничните лобове са често срещани за решетъчния светлинен слой, когато човек се опитва да генерира възможно най-тънкия лист. Наличието на страничните лобове намалява контраста на изображението. Деконволюцията с подходящ PSF модел (със страничните лобове) може отново да се използва за коригиране на страничните лобове в получените данни, което подобрява разделителната способност и контраста.

2. Внимавайте с размера на файла. Добре известно е, че LSFM генерира големи количества данни. Типично приложение може да бъде целият 3D обем, който се изобразява на всеки 5 минути в продължение на 24 часа за ембрион на зебра риба, или рутина за изобразяване с размер 10 на 10 плочки с хиляди Z-стекове за изчистен мозък на мишка. Размерът на файла може бързо да достигне терабайт. Дори и с най-модерния GPU хардуер, деконволюцията на едно изображение може да отнеме дни. На практика може да се наложи да се подмножат оригиналните данни към интересувания ни регион, време и канал, преди да се изпратят за деконволюция. За непрозрачни проби е полезно да се подмножат ограничени Z диапазони. За настройките за деконволюция, ограничената итерация би била предпочитаният метод, но може да се наложи итерацията да се ограничи до по-малък брой, например 10, за да се съкрати времето за обработка.

3. Pay attention to LSFM-related image processing. LSFM, because of its unique beam path and sample mounting, has a few special image acquisition and processing steps, noticeably dual-side fusion, multi-view reconstruction, and lattice light sheet deskewing . The perpendicular light sheet illumination of LSFM can be introduced from either side of the sample sequentially . Such dual-side illumination gives a more homogenous result but requires an online or offline fusion of the two images . Some special dual-side fusion algorithms are nonlinear, and the results cannot be used for deconvolution. One such example is the maximum fusion, where the two images are compared pixel to pixel, and only pixels with higher intensity values are kept . Another unique LSFM image processing routine is multi-view reconstruction Multi-view imaging is the sequential acquisition of multiple Z-stacks from different directions via sample rotation.

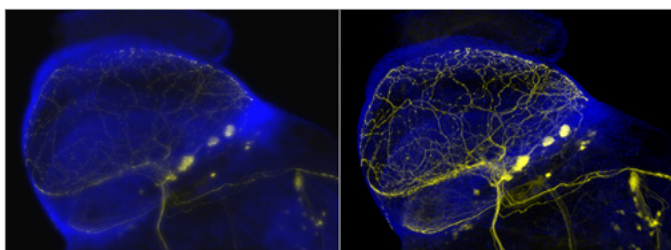
Когато са адекватно регистрирани и слети, многоизгледното изобразяване подобрява изображенията, като комбинира допълващата се информация от всеки ъгъл и постига изотропна 3D резолюция. Обикновено деконволюцията се извършва само след многоизгледната реконструкция и PSF моделът, вече със „звездовидна форма“, също трябва да вземе предвид множеството PSF под различни ъгли. Възможно е също така да се деконволюира всеки изглед преди регистрацията или преди сливането, но подобни практики отнемат значително повече време. Последната техника за обработка на изображения в дискусиата, изравняването на ъгъла (deskewing), е свързана само с решетъчен светлинен лист. Прилагането на решетъчен светлинен лист за тънки проби на базата на покривно стъкло обикновено има нестандартен ъгъл на осветяване. Например, ZEISS Lattice Lightsheet 7 осветява пробата от 30 градуса и детектира при 60 градуса. При извършване на обемно сканиране чрез хоризонтално преместване на пробата, суровите данни от Z-стека са изкривени и изискват допълнителна трансформация „deskew“ преди визуализация и анализ. Процесът на изравняване на ъгъла има тенденция да увеличава размера на файла, тъй като запълва измествения и уголемен обем с „празни“ данни. За ускоряване е необходимо да се извърши деконволюция преди процеса на изравняване на профила. Ако се избере първо да се извърши изравняване на профила, PSF също ще се нуждае от...



Фигура 4 Гигантски жив метил, оцветен с Hoechst 33342. Хомогенната флуоресценция във вътрешните части на широкоъгълното изображение (вляво) представлява сериозен проблем за алгоритмите за корекция на фона (в центъра). Някои структури остават, но като цяло има твърде много черни пространства между клетките. Това става видимо при сравняване на резултатите с оптичен разрез, получен с ZEISS Apotome (вдясно). Забележително е, че изпъкналият ръб около структурата, както се вижда на коригираното за фон изображение в централния панел, е артефакт от интерференция в широкоъгълното изображение, който не се вижда с оптична система за секциониране.

да бъдат вътрешно трансформирани, за да съответстват на геометрията на изравнените данни. За да се опрости работният процес и да се избегнат потенциално неправилни PSF, обработката с ZEN Lattice Lightsheet комбинира стъпките на деконволюция и изправяне в една операция

Деконволюция за Apotome – надеждна и лесна за употреба Оптичното секциониране позволява ефективно минимизиране на светлината извън фокус, за да се създадат ясни изображения и 3D рендеринги. ZEISS Apotome 3 използва решетка, за да генерира модел на разлики в интензитета. След като се получи флуоресценция на позиция на решетката, решетката се премества към следващата позиция. Ако в определена област от пробата има светлина извън фокус, решетката става невидима. От отделните изображения, получени със структурирано осветление, могат да се изчислят надеждни оптични сечения, като се използват добре документирани алгоритми.



Фигура 5А Конвенционална флуоресценция **Фигура 5Б** Апотом 3

Неврони на дрозофила, синьо: DAPI, жълто: GFP. Обектив: Plan-Apochromat 20x/0.8. С любезното съдействие на М. Кох, Молекулярна и развойна генетика, Университет в Льовен, Белгия.

Въпреки хардуерно-базираните методи за създаване на оптични срези, през последните години се появиха чисто софтуерно-базирани решения. Тъй като чисто софтуерните решения могат да използват само полученото широкоъгълно изображение, потребителите трябва да се доверят, че тези решения тип „черна кутия“ създават реални структури и не премахват структури при „подобряване“ на изображението.

Фигура 4 показва сравнение на широкоъгълно изображение, изображение с изваден фон, обработено с помощта на софтуерен алгоритъм, и изображение, получено с ZEISS Apotome. Въпреки че изображението с изваден фон показва висок контраст, който е приятен за окото, липсват характеристики и структурите изглеждат...

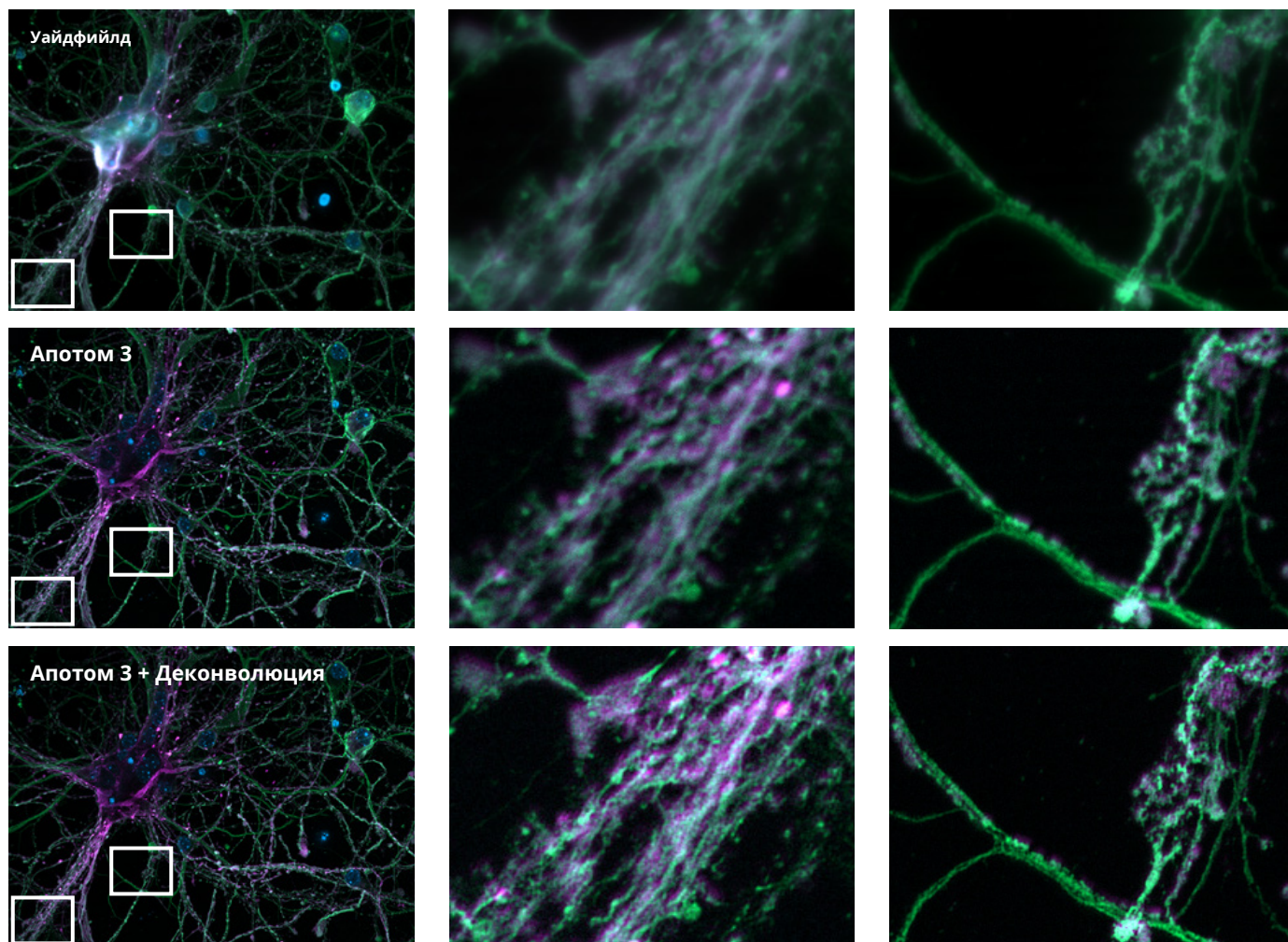
съвсем различно. Без да се знае истинското изображение, е почти невъзможно да се осъзнае това. С Apotome, количествените оптични секционни изчисления могат да се използват за различни проби.

Деконволюцията подобрява още повече качеството и разделителната способност на изображенията, получени с Apotome. В сравнение с деконволюцията на широкоъгълни изображения, патентованият алгоритъм за деконволюция на Apotome използва допълнителната информация, налична от структурираното осветление. Това позволява по-добра реконструкция на пробата без въвеждане на артефакти. Деконволюцията на Apotome използва линейни подходи за получаване на количествени резултати. Съотношението сигнал/шум е подобро и може да се постигне по-висока оптична разделителна способност.

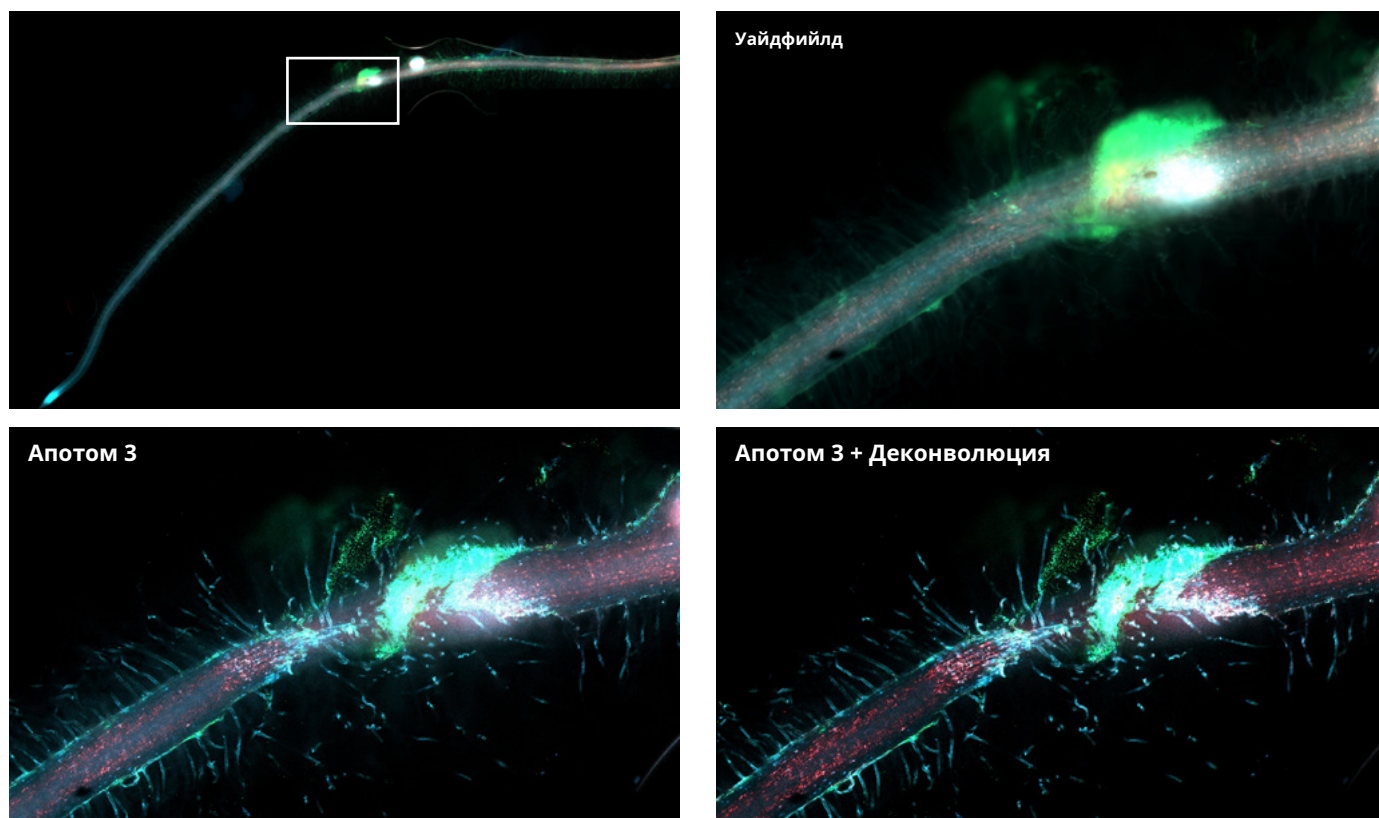
Едно от предимствата на Apotome 3 е лекотата на използване. Трябва да се вземат предвид общите препоръки по отношение на съотношението сигнал/шум и вземането на проби от образеца. Въпреки това, е необходимо да се коригират няколко допълнителни настройки. Най-важният параметър е броят на изображенията с проектираната мрежа. Въпреки че Apotome се нуждае от поне 3 изображения с проектираната мрежа за обработка на оптичния сегмент, увеличаването на броя до 5 или 7 изображения може да подобри качеството на изображението. По-нататъшното увеличаване на броя на позициите на мрежата за оптичен сегмент не води до значителни подобрения, но намалява честотата на кадрите и може да доведе до избелване на снимките.

Деконволюцията с Apotome също е лесна за използване. По подразбиране теоретичният PSF се изчислява автоматично, използвайки информацията в метаданните. Силата на деконволюцията се избира автоматично от софтуера, но може да се зададе ръчно, въпреки че съществува риск от въвеждане на артефакти за настройки, които не съответстват на параметрите на пробата и събирането на информация. Индексът на пречупване на пробата и разстоянието до покривното стъкло могат да бъдат зададени, ако е известно, че коригират аберации.

За изчисляване на оптичния разрез, със или без деконволюция, изображението може да бъде коригирано за избелване. Локалното избелване коригира избелването за всеки пиксел и обикновено дава най-добри резултати. Като алтернатива, може да се избере никаква или глобална корекция за избелване. Освен това, може да се използва Фурие филтър с различна сила.



Фигура 6 Кортикални неврони, оцветени за ДНК, микротубули и протеини, свързани с микротубулите. С любезното съдействие на Л. Берендт, Институт по стареене „Лайбниц“ – Институт „Фриц-Липман“ eV (FLI), Германия.



Фигура 7 Автофлуоресценция на корен на *Lotus japonicus*, заразен със симбиотични бактерии, оцветен с череша. С любезното съдействие на Ф.А. Дитенгу, Университет на Фрайбург, Германия.

може да се използва, ако в изображението се наблюдават останали ивици. Избелването и корекцията с филтъра на Фурие също могат да се комбинират, ако е необходимо.

Когато използвате деконволюция на апотома във функцията за обработка на ZEN, са налични допълнителни опции за обработка, но обикновено те не са необходими. Тези корекции не са специфични за апотома и могат да се прилагат и към други методи за деконволюция.

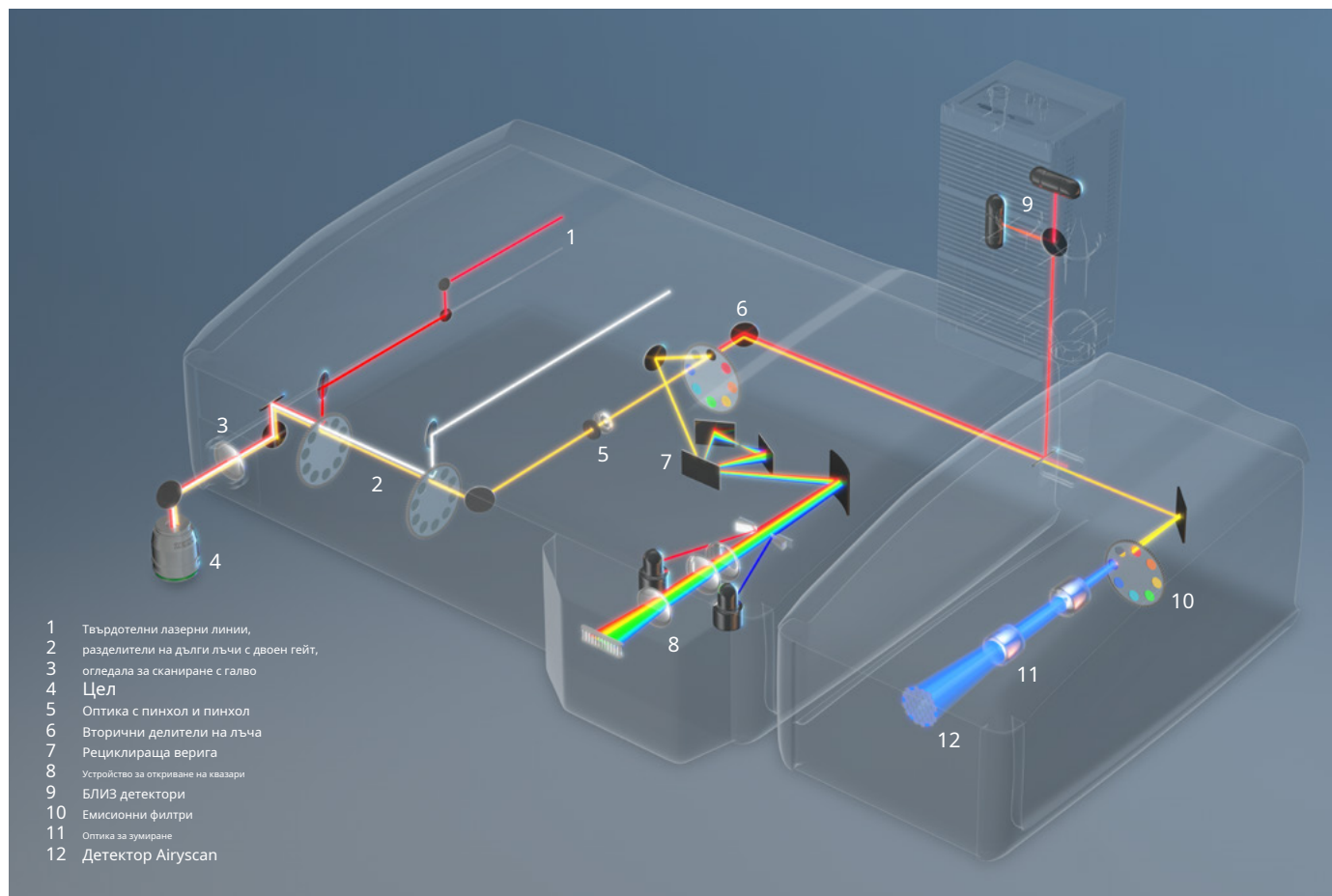
За да се премахнат отместванията, може да се използва опцията за изваждане на фона, за да се извади интензитетът на изгладена средна стойност. Ако за заснемане на изображение са използвани източници на светлина с непостоянен светлинен поток, може да се приложи корекция на трептенето. Съвременните LED източници на светлина обикновено не страдат от трептене и използването им подобрява качеството на данните по време на заснемане. Функцията за корекция на пикселите замества лошите пиксели, които камерите могат да имат, като взема предвид средната стойност на съседните пиксели. Съвременните CMOS камери като ZEISS AxioCam са проектирани за научни приложения и обикновено имат само няколко, ако изобщо има такива, лоши пиксела. Корекцията на затихването на флуоресценцията компенсира избелването по време на Z-стек. Ако избелването е налице и не е коригирано, то значително променя резултатите от деконволюцията. Тази опция използва средния интензитет на отделните срезове на Z-стека, за да коригира избелването и подобрява резултатите от деконволюцията за Z-стекове с забележимо избелване, като по този начин подобрява резултата от деконволюцията за този тип данни.

Въпреки че 2D деконволюцията може да се приложи към апотомни изображения, 3D деконволюцията подобрява резултатите, защото е налична повече информация. Фигури 6 и 7 показват примери за широкоъгълни, апотомни и апотомни + деконволюционни изображения, показващи повишаване на качеството на изображението и разделителната способност.

Конфокална деконволюция – LSM Plus

Историята на деконволюцията за конфокални данни е доста дълга, но историята на наистина вградената и персонализирана деконволюция в конфокалните системи е доста кратка. Напредъкът в разработката се е случил едва през последните няколко години. В ZEISS този напредък е довел до новите LSM Plus конфигурации на LSM 900 и LSM 980.

През последните 10 години ZEISS разработи две основни подобрения на своите конфокални инструменти: паралелно спектрално детектиране, представено от дизайна на детектора Quasar (Quiet Spectral Array), и детектиране с разделителна способност и скорост, представено от Airyscan. И за двете ZEISS внедри паралелизация при заснемането като инструмент за повишаване на съотношението сигнал/шум (SNR) и минимизиране на напрежението в пробата. Това изпълнява мечтата, изразена от много потребители, да се комбинират тези методи за детекция в конфокални инструменти. Това беше и един от катализаторите за серията LSM 9, представена през 2019 г., която осигурява първото внедряване на тези разработки.



Фигура 8 Път на лъча на LSM 980 с Airyscan 2 и NIR детекция

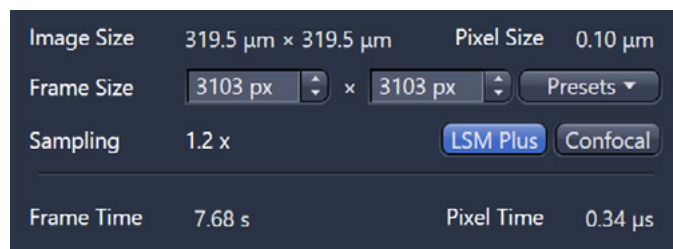
През 2021 г. ZEISS направи голяма крачка в посока на вградената и персонализирана деконволюция като важна технология с пускането на новия LSM Plus. И така, какво точно беше направено тук? Спектралното детектиране се разшири от 32 канала (8 с 4 отчитания) до 36 канала. Пошироката честотна лента за данни, включително онлайн снемане на пръстови отпечатъци и GaAsP катодна технология, също допринесоха за повишена гъвкавост през последните няколко години. Това означаваше по-рентабилно 6-канално решение през 2018/19 г. и по-мощно 36-канално решение, включително специални NIR детекторни канали, в началото на 2021 г., всички интегрирани в един и същ доказан работен процес за ламбда стек и спектрално размесване.



Фигура 9 Графичен потребителски интерфейс за спектрално откриване, интегриращ няколко типа детектори, които могат да се използват с LSM Plus.

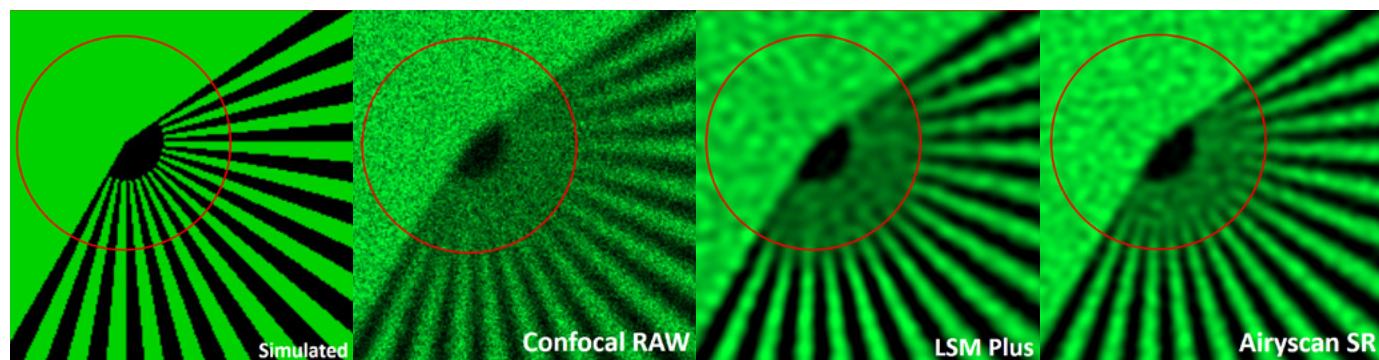
Детекцията с Airyscan се разви от SIM-подобна суперрезолюция с подобрено SNR, до паралелизирана бърза суперрезолюция и напредна до незабавна 2D подобрена обработка (2D SR режим за заснемане в една равнина), по-бърза обработка за големи данни (4-пръстенов формат) и дори по-бързо чувствително заснемане (8× паралелизиран MPLX режим). Всички тези методи се основават на вградена персонализирана деконволюция от страна на обработката, която включва математическите стъпки на генериране на претеглена Sheppard Sum (Sheppard 1988), точно PSF моделиране за ZEISS LSM и линейна количествена Wiener деконволюция. Всичко това може да работи в реално време с предварителен преглед и има само един параметър за контрол на силата, който дори може да бъде автоматизиран.

Съчетаването на двете технологии беше предизвикателство за ZEISS, тъй като и двете функции произвеждат големи количества данни на получен пиксел. Помислете за спектрално детектиране с до 36 канала и Airyscan с 32 елемента. Това би довело до 36×32 , общо 1152 канални елемента за всеки пиксел, натоварване с данни, което надвишава всяка електроника за отчитане на пазара сега и в обозримо бъдеще. Така че, ако спектралното Quasar детектиране не може да се използва напълно в Airyscan, може ли част от Airyscan да се използва в Quasar? Това наистина беше пробивът, който ZEISS започна да разработва преди две години и който стана продукт през 2021 г. като функция LSM Plus за всички ZEISS LSM 900 и 980.

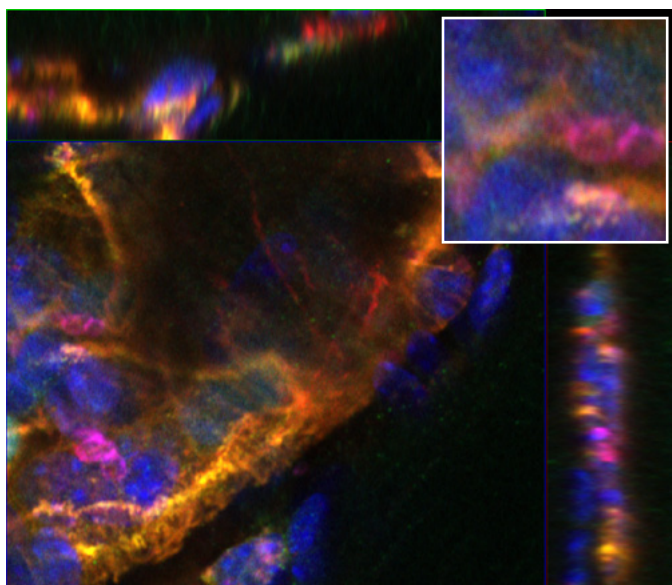
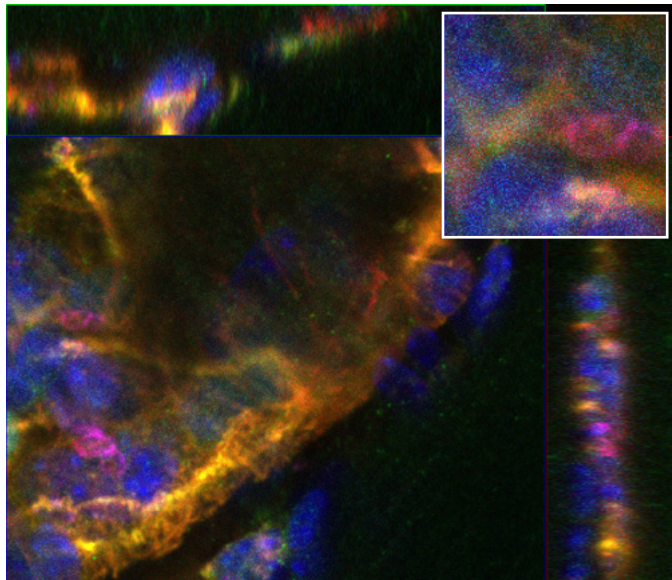


Фигура 10 Функция LSM Plus с оптимизирани настройки за събиране на данни. Дискретизацията се настройва автоматично и е взаимосвързана с настройката за пинхол.

LSM Plus използва компоненти за обработка от Airyscan, под формата на точно PSF моделиране за ZEISS LSM и линейна количествена Винерова деконволюция, приложена към текущия 36-канален, NIR съвместим Quasar детектор. LSM Plus може отново да работи в реално време с предварителен преглед на обработката и има само един контролен параметър, който отново може да бъде автоматизиран. Функцията за незабавно онлайн снемане на отпечатъци също беше подобрена чрез добавяне на страничните PMT на Quasar и NIR детекторите, оптимизиран работен процес и възможността за обработка на LSM Plus, дори по най-автоматизирания начин – с директна обработка, използваща автоматична сила на обработка. Въпреки че LSM Plus работи с всички детектори, включително недесканирани детектори (NDD) за многофотонно изобразяване, той не е ограничен до употреба в много скъпи системи. Той също така е оборудван с 2-канален ZEISS LSM 900.



Фигура 11 Граници на разделителната способност на конфокалното, LSM Plus (конфокално Wiener DCV) и Airyscan SR детектиране. В допълнение към повишаването на разделителната способност, както Airyscan, така и LSM Plus намаляват шума и подобряват видимостта.



Фигура 12 Миши кремастерен мускул, многоцветен етикет с Hoechst (син), Prox-1 Alexa488 (зелен), неутрофилни клетки Ly-GFP, PECAM1 Dylight549 (жълт), SMA Alexa568 (оранжев), VEGF-R3 Alexa594 (червен), тромбоцити Dylight649 (магента). Получени с 32-канален GaAsP детектор, използвайки Online Fingerprinting на ZEISS LSM 980, без (горе) и с LSM Plus (долу).

Пример, предоставен с любезното съдействие на д-р Стефан Фолкери, MPI за молекулярна биомедицина, Мюнстер, Германия

Освен това, има истинско сътрудничество между Quasar и Airyscan, когато се използва режимът на многопроследяване. Тук Airyscan се превръща в допълнителен канал в системата за спектрално събиране на данни, осигурявайки изключително висока резолюция в допълнение към обработените от LSM Plus канали. В този режим се обработват повече от 40 канала за данни и след стъпките на деконволюция на Airyscan и LSM Plus, получените канали могат да претърпят спектрално размесване за перфектно разделяне на багирлата. Чрез затваряне на отвора в каналите на LSM Plus, резолюцията може да се увеличи допълнително, за да се получи оптимално съответствие с канала на Airyscan.

Какви са техническите възможности на LSM Plus и каква е деконволюцията зад него?

Резолюция	Конфокален	LSM Плюс напр. 0,8 AU	LSM Плюс напр. 0,3 AU (затворен РН)	Ейрискан SR* (1 0,25 AU)
X/ Y	250 нм	160 нм**	120 нм**	120 нм**
З	700 нм	500 нм	500 нм	350 нм
Спектрален диапазон	380 – 900 нм	380 – 900 нм	380 – 900 нм	400 – 750 нм

* без Airyscan jDCV;

** измерено с Nanoruler ДНК оригами проби с разстояние 160 nm / 120 nm

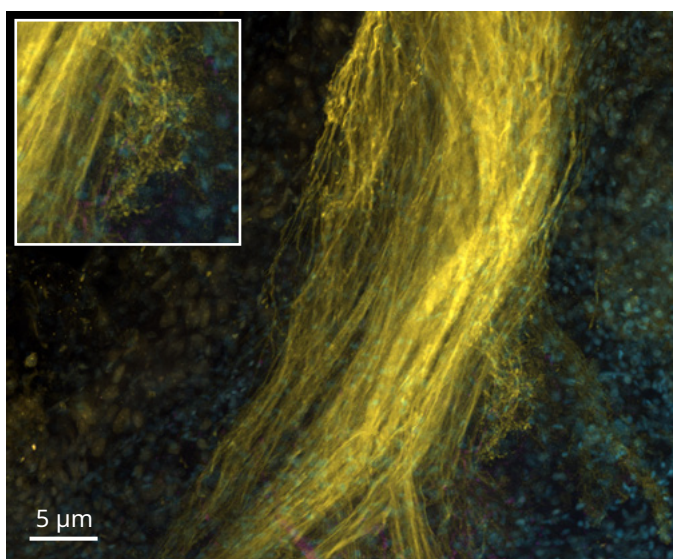
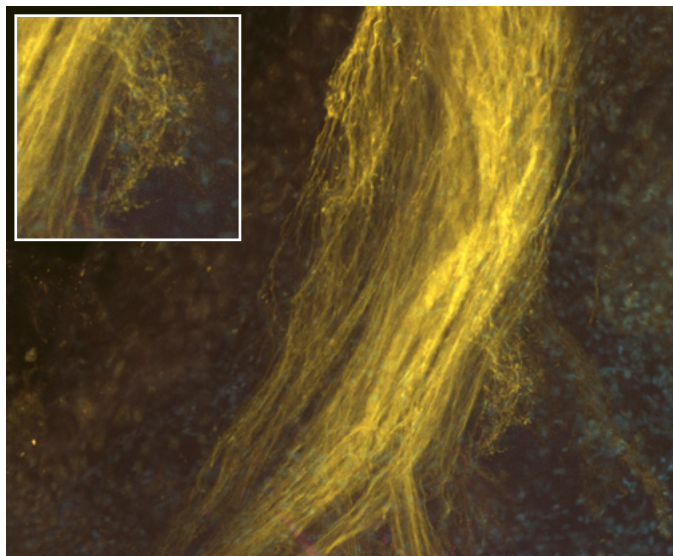
Какво стои зад обработката на LSM Plus?

Изчислението, използвано за LSM Plus, се базира на Wiener филтрирането на Airyscan, но с използване само на един канал и PSF за конфокалното изображение. Това води до всички предимства на това изчисление, като бърза линейна обработка и онлайн преглед. Обработката е количествена и използва само един параметър на силата, който се задава автоматично на предложена най-добра стойност за напасване.

Размерът на отвора е допълнителен параметър, който влияе върху представянето на честотите и максималната възможна резолюция. По-малкият отвор води до по-високи пространствени честоти и следователно до по-високи използвани честоти на дискретизация, което допринася положително за постижимата резолюция. Затварянето на отвора, разбира се, изисква достатъчно сигнал от пробата.

Коефициентът на усилване на разделителната способност на LSM Plus може да бъде по-висок от обичайния DCV фактор от 1,4. Причината за това е качеството на оптимизирани PSF модели, които могат да се адаптират към свойствата на инструмента по същия начин, както при Airyscan. Друго предимство е устойчивостта на използваното тук Винерово филтриране, което се прилага в случай на шум или аберации в изображението. Такова несъответствие не създава досадни артефакти, но намалява максималната разделителна способност, която може да бъде постигната. Възприеманото съотношение сигнал/шум (SNR) винаги е по-добро с LSM Plus, дори и при неоптимални семпли.

LSM plus предлага вградена и оптимално настроена деконволюция, която подобрява спектралните свойства на ZEISS LSM 980 и ZEISS LSM 900 и допълва други функции на LSM, като NIR детекция, онлайн пръстови отпечатъци, многофотонно изобразяване или Airyscan.



Фигура 13 Мозъчни неврони на хлебарки (Alexa 488: жълто, Alexa 647: магента) и ДНК (Hoechst: циан), без (отгоре) и с LSM Plus (отдолу).

Пример, предоставен с любезното съдействие на М. Паоли, лаборатория „Галиция“, Университет в Констанц, Германия

Стъпка по стъпка до 90 nm – Съвместна деконволюция на Airyscan (jDCV) ZEISS

Airyscan разполага с 32-канален площен детектор с галиев арсенид фосфиден фотоумножител (GaAsP-PMT), който събира изображение в равнината на пинхол във всяка позиция на сканиране. Всеки детекторен елемент функционира като единичен пинхол с размери 0,2 AU, където данните от всеки елемент носят не само информация за интензитета, но и информация за разпределението на светлината и местоположението. Общо 1,25 AU се събират от целия детектор. 0,2 AU на всеки елемент определят сечението и разделителната способност по XY и Z, докато 1,25 AU определя чувствителността. Чрез изместване на всички изображения обратно в централната позиция, което може да се направи лесно, тъй като величините на техните премествания са известни, се генерира изображение, наречено „сума на Шепард“. Това изображение има 1,4× по-висока разделителна способност в сравнение с тази на класическо конфокално изображение.

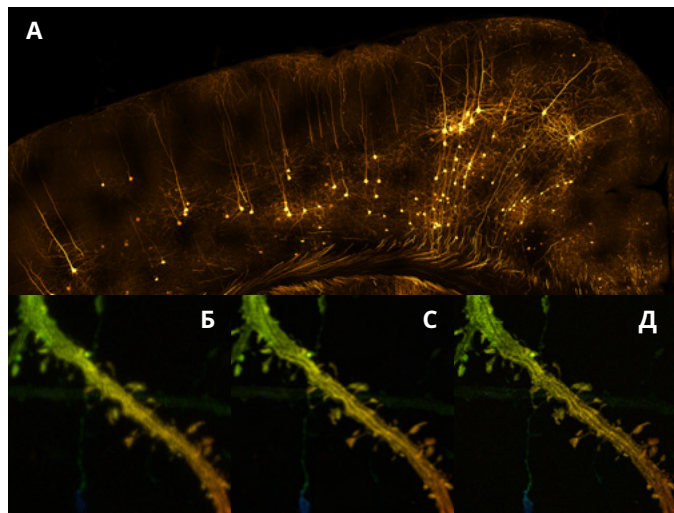
Класическата обработка на Airyscan, която включва линейно Винерово филтриране, води до едновременно увеличение от 4–8 пъти на съотношението сигнал/шум, както и до двукратно подобрение на пространствената резолюция.

над класическия конфокален. По този начин, изборът на Винеров шумов филтър ще балансира между по-висока резолюция и по-добро съотношение сигнал/шум (SNR) в изображението. Промяната на параметъра на Винеровия филтър води до избор на различни честотни ленти и тяхното индивидуално усилване. Сигналът от всеки детекторен елемент се деконволюира отделно и приносът на всеки детекторен елемент се претегля. Това позволява стабилна DCV, като се взема предвид и информацията за позицията на детекторните елементи, което води до резолюция от 120 nm странично и 350 nm аксиално за възбуждане 488 nm.

От въвеждането си през 2014 г., Airyscan непрекъснато се е усъвършенствал с течение на времето, позволявайки например 120 nm странична резолюция без получаване на Z-стек с режима на 2D SR суперрезолюция. Този режим се възползва от факта, че функцията за разпространение на конфокалната точка заплита информация от X,

Y и Z равнини в равнината на отвора. Airyscan може да измерва разпределението на емисионната флуоресценция в едно заснемане на изображение, като по този начин дава информация за това как сигналът е преплетен. Алгоритъмът на 2D SR режима със суперрезолюция позволява да се разграничи и отдели светлината, произхождаща от фокалната равнина, от светлината, произхождаща извън фокалната равнина. Еволюцията на Airyscan продължи и през 2019 г. ZEISS представи Airyscan 2 и режима Multiplex. Режимът Multiplex обработва данните от изображението по начин, който намалява размера на данните и подобрява времената за реконструкция, като отговаря на необходимостта от улавяне на структурна динамика, клетъчна сигнализация, молекулярен трафик и събития на дифузия със суперрезолюция в реално време и превъзходно SNR. Вместо да се носят 32 елемента информация на пиксел, подобрените схеми за обработка на данни позволиха нова стъпка на предварителна обработка, при която информацията от 32-та елемента се трансформира в 4 „пръстена“ информация на пиксел. Промяната в структурата на данните води до 6,6× намаление на размера на суровите данни и подобрява времето за обработка с коефициент 5.

Новата jDCV обработка на Airyscan, за разлика от класическата обработка на Airyscan, включва ускорен съвместен алгоритъм Richardson-Lucy, поддържащ изображения със сурови данни на Airyscan, както и изображения, предварително обработени с пръстеновидни методи. Възползвайки се от уникалната концепция на Airyscan, включваща информация за разпределението на светлината и местоположението от равнината на отвора на всеки детекторен елемент, тази „многоизгледна информация“ се използва за постигане на по-добър резултат от реконструкцията, особено за шумни изображения и изображения с ниско съотношение сигнал/шум, в сравнение с имплементацията на Wiener филтър в класическата обработка на Airyscan. По-добрата статистическа интерпретация и допълнителната априорна информация (разпределение на шума и неотрицателност) водят до подобрение на разделителната способност в зависимост от пробата до 90 nm. Това прави достъпна информация, която не е била достъпна преди, например разпределение на гръбначните влакна и морфология за количествени оценки (Фигура 14). Тези предимства могат да бъдат разширени до многофотонно възбуждане, за да се постигнат значителни подобрения в разделителната способност и съотношението сигнал/шум.



Фигура 14 Миши мозък, експресиращ невронния маркер Thy1-eGFP, изобразен на LSM900 с Airyscan 2. A: Мултиплексен режим SR-4Y, Plan-Apochromat 20x/0.8 NA в диапазон на Z-стек от 14 μm мозъчна кора и показана като проекция на максимален интензитет. Сравнение; B: Конфокална, 1 AU, Дискретизация 1.0x, Z-обхват на стека от 11 μm; C: Airyscan SR, Sampling 2.0x, Z-диапазон на стека от 11 μm, класическа 3D обработка на Airyscan, Strength 5.0; D: Airyscan SR, Sampling 2.0x, Z-стек диапазон от 11 μm, съвместна деконволюция на Airyscan, максимални итерации 20) на маркираното FOV и показано като цветно кодирана проекция на максимален интензитет.

При новата обработка на Airyscan jDCV е необходимо да се вземат предвид само два параметъра:

1. Максимален брой итерации, който може да бъде избран от наличните предварително зададени настройки в падащ списък (Плътен, Стандартен и Разреден) или свободно избрани с плъзгач. В случаите на повече от един флуорофор, квадратчето за отметка „Настройка на канал“ е налично и итерациите могат да бъдат избрани поотделно за всеки флуорофор. „Започни с последен резултат“, което е налично след първоначалната първа обработка, запазва междинните резултати от обработката и позволява започване на обработката въз основа на последната изчислена итерация.

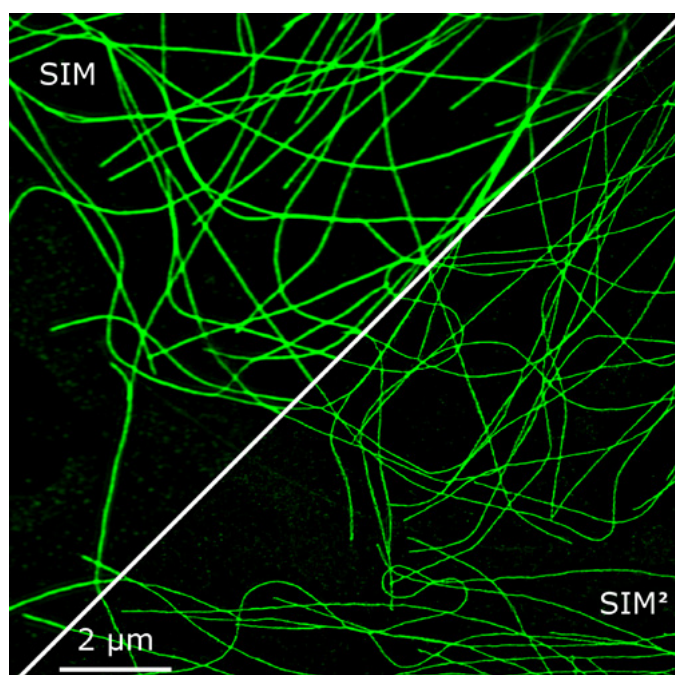
2. Прагът на качеството представлява алтернативен „критерий за спиране“.

Итеративната DCV обработка спира, когато разликата в качеството на съответствие между двете последни итерации е по-малка от стойността на прага на качеството.

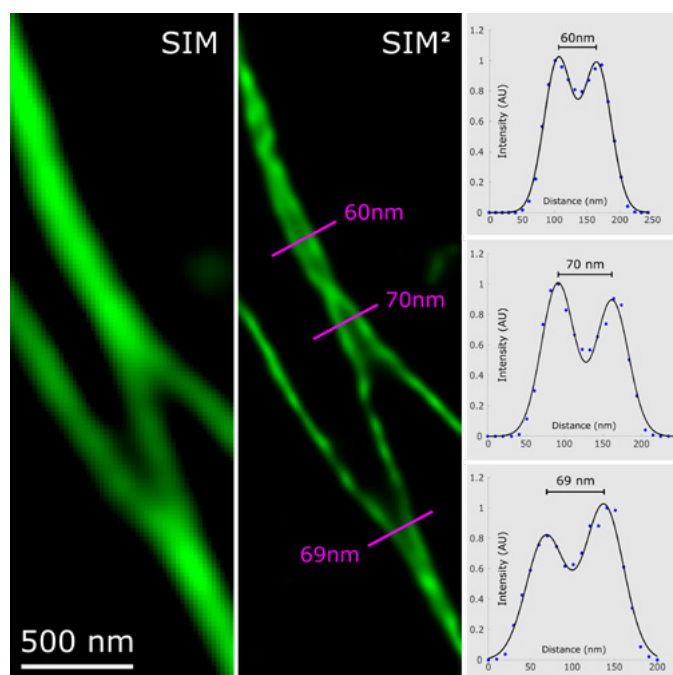
Постоянните усилия за развитие отново разширяват границите на Airyscan, започвайки със 140 nm странична резолюция през 2014 г., 120 nm странична резолюция без придобиване на Z-стек през 2018 г. и сега постигайки подобрения в разделителната способност до 90 nm за възбуждане от 488 nm. В същото време, съотношението сигнал/шум се е увеличило 4–8 пъти и сега е възможно да се постигне бързо обемно изобразяване в режим Multiplex за Airyscan 2. По-важното е, че тази технология е лесна за използване и достъпна за всички с няколко кликания в опростен графичен потребителски интерфейс за обработка.

SR-SIM с итеративен DCV: изображения с резолюция 60 nm

Структурираната осветителна микроскопия със свръхрезолюция (SR-SIM) е добре установен инструмент за бързо и гъвкаво многоцветно изобразяване отвъд дифракционната граница. Обикновено SR-SIM системите са микроскопи, базирани на ширококопелни камери, и те удвояват разделителната способност на конвенционалните системи за изобразяване. Но използването на итеративни методи за деконволюция може допълнително да увеличи разделителната способност до 60 nm [SIM_01]. В SR-SIM системите структурираното осветление интерферира с пробата, което води до така наречените Моаре ресни. Моаре ресни кодират информацията за свръхрезолюцията на пробата, но са доста мащабни структури. По този начин високочестотната информация на пробата се измества към честотите, откриваеми за използвания обектив. За да се постигне свръхрезолюция, пробата се изобразява на различни позиции (фази) на модела на осветяване. Тези фазови изображения след това се деконволюират в полученото SR изображение [SIM_02]. По този начин деконволюцията е неразривно свързана със SR-SIM.



Фигура 15 Изображения на Cos-7 клетки, оцветени с анти-алфа-тубулин Alexa fluor 488, бяха обработени с конвенционалните SIM алгоритми, базирани на обобщен Винеров филтър и с реконструкция SIM². Изображенията показват подобрение на разделителната способност за SIM² в сравнение със SIM. Превъзходната способност за секциониране на SIM² е показана във филма. Обектив: Plan-Apochromat 63x / 1.4 Oil



Оптимизирането на SR-SIM системите означава главно повишаване на качеството на реконструкцията на изображението. Това може да се постигне чрез подобряване на кодирането на информацията с висока резолюция по време на заснемане на изображението и на декодирането по време на деконволюцията. От страна на кодирането, използването на 2D решетъчно осветление, както е реализирано в ZEISS Elyra 7, води до по-висок модулационен контраст и подобро качество на изображението в сравнение с конвенционалните 1D SIM системи с лентови модели [SIM_03]. Освен това, за разлика от лентовото осветление, решетъчното осветление не изисква въртливо движение и по този начин позволява бързо заснемане на изображението. Повишената ефективност на решетъчното осветление е и много щадяща по отношение на фототоксичността, което прави Elyra 7 Lattice SIM система за изобразяване на живи клетки. Потребителят на Elyra 7 има гъвкавостта да избира между 13- или 9-фазово заснемане на изображението.

За постигане на най-високи резолюции се препоръчват 13-фазови изображения. Когато се изследват живи проби с висока динамика, 9-фазовите изображения може да са предимство поради повишената честота на кадрите. Важно е да се спомене, че и двата режима извършват 3D микроскопия със свръхрезолюция, дори когато изображенията се получават само в 2D. Като цяло е напълно достатъчно да се получат изображения само в рамките на пробата. Потребителят може лесно да идентифицира областта на пробата чрез видимостта на светлинния модел. За оптимална работа на Elyra 7 се препоръчва да се използват само 10 – 15% от пълния диапазон на сивите стойности, т.е. интензитети до 6000 – 8000. За по-слаби проби е предимство да се достигнат поне 100 – 200 стойности на сивото над фоновия шум.

От страна на декодирането, реконструкцията на изображението се състои от няколко стъпки: разделяне по ред, оценка на параметрите, филтриране на Фурие, изместване на реда (и претегляне), комбиниране по ред и деконволюция. Обикновено алгоритмите за SIM реконструкция се основават на обобщено филтриране на Винер, а комбинирането по ред и деконволюцията се извършват в една стъпка.

Обобщеното Винерово филтриране е линеен процес, водещ до напълно количествени резултати и може да се извършва с висока скорост. В Elyra 7 Винеровото филтриране се нарича SIM обработка. Потребителят може лесно да реконструира изображенията, като избира между различните сили (слаба, стандартна, силна) на деконволюцията според нивата на сигнал-фон на получените сурови данни или ръчно да дефинира стойността на силата. Въпреки това, обобщеният Винеров филтър има определени ограничения: а) Постижимите латерални и аксиални резолюции са ограничени до двукратно подобрение, б) Артефакти от свръхобработка се появяват при данни с ниско съотношение сигнал-фон и в) Не може да се използва итеративна деконволюция [SIM_01]. Първите две ограничения са резултат от неоптималната PSF, използвана по време на реконструкцията на изображението. Накратко, PSF на микроскопа, използвана за Винерово филтриране, не отразява промените, приложени по време на първите стъпки на обработката. Поради това е полезно да се разделят стъпките на SIM обработка и деконволюция и да се коригира PSF. Недостатъчност на подобряване само на DCV чрез прилагане на...

Итеративни подходи са демонстрирани в множество случаи [SIM_04, SIM_05]. По този начин, ZEISS Elyra 7 съдържа двуетапна SIM² обработка на изображения, където в първата стъпка SIM обработката се извършва не само върху суровите изображения, но и върху PSF на микроскопа. Получената SIM-PSF след това се използва за последващата итеративна DCV. По този начин SIM² може да удвои конвенционалната SR-SIM резолюция в XY и да подобри качеството на секциониране (Фигура 15). Освен това, SIM² е много по-устойчив на артефакти от прекомерна обработка. Внедряването на SIM² алгоритмите в софтуера ZEN е толкова лесно, колкото извършването на конвенционална SIM обработка. Въз основа на качеството на сигнала към фона на суровите данни, потребителят може да избере един от параметрите по подразбиране, Слаб, Стандартен или Силен, за фиксирани и живи проби. Съществува допълнителен режим за реконструкция на големи хомогенни структури, като ядра, клетки, експресиращи свободни флуорофори и др. За заинтересованите потребители е достъпна и ръчна настройка на параметрите за деконволюция, като например брой итерации, тегло на регуляризацията, входно SNR и семплиране, за да се увеличи максимално производителността на SIM². Но силно препоръчваме първо да се извърши обработката по подразбиране.

В обобщение, SR-SIM е бърза, съвместима с живи клетки техника за изобразяване, способна да удвои или учетвори резолюцията в зависимост от използвания метод на деконволюция.

ЧЗВ: Деконволюция

Деконволюцията количествена ли е?

Количественият метод се дефинира тук като: в изображението преди и след деконволюцията се запазва сумата от всички интензитети (с изключение на интензитетите, които не са събрани). Накратко, някои алгоритми за деконволюция са количествени. Алгоритмите за деконволюция обикновено могат да бъдат категоризирани в три групи: базирани на съседи, базирани на инверсия и базирани на итерация. Алгоритмите, базирани на съседи, известни също като методи за премахване на размазване, са фундаментално субтрактивни по природа. Те се стремят да оценят приноса на сигналите извън фокус във всеки кадър и да го премахнат.

Алгоритмите, базирани на съседи, са само качествени. Инверсните алгоритми, включително известният Винеров филтър, са линейни методи за възстановяване, които се прилагат в една операция. Инверсните алгоритми обикновено включват специфична „регуляризация“ за справяне с шума, но цялостният процес е строго линеен и количествен.

Итеративно-базирани алгоритми, в опростен поглед, са повтаряща се операция за сравнение между текущия резултат от модела с преден план и измерените данни. Резултатът от всяко повторение се прилага със смислени „ограничения“ и предишният изход се използва като следваща оценка, докато се постигне подходящ резултат. За сурови данни с добро съотношение сигнал/шум (SNR), итеративно-базирани алгоритми са проектирани да бъдат количествени, независимо дали съдържат линейни или нелинейни изчислителни компоненти.

Как DCV превишава оптичната резолюция?

По принцип, деконволюцията (DCV) е техника за обработка на изображения, която се стреми да пренасочи разфокусираната или замъглената светлина към правилното ѝ фокусно място или да я премахне напълно. С помощта на тази процедура се подобрява съотношението сигнал/шум (SNR), както и съотношението сигнал/фон (SBR) или дори контрастът на изображението. Но как може да се подобри разделителната способност дори отвъд постижимата оптична разделителна способност на микроскопската техника, използвана за запис на изображения?

Ако изображението се моделира като конволюция на обекта с функцията за разпространение на точки (PSF), тогава теоретично DCV на суровото изображение би трябвало да възстанови обекта. Въпреки това, предвид фундаменталните ограничения на всяка система за изображения и модели за формиране на изображения, най-доброто, което може да се получи, е оценка на обекта. Операциите по конволюция се изчисляват най-добре чрез математическата техника на преобразуване на Фурие, тъй като във Фурие или честотното пространство конволюцията е просто произведение на преобразуването на Фурие на PSF, така наречената оптична трансферна функция (OTF), с преобразуването на Фурие на изображението. Полученото изображение на Фурие може просто да бъде обратно трансформирано в реално пространство. И това ни връща към въпроса за разделителната способност.

Колкото по-високи са честотите, поддържани от OTF, толкова по-висока ще бъде разделителната способност по отношение на разстоянията във възстановеното изображение. Шумът обаче съдържа най-високите честоти, така че много алгоритми използват подход, наречен регуляризация, за да избегнат или намалят усилването на шума. Ако е възможно да се направят предположения за структурите на обекта, който е създал изображението, може да е възможно да се зададат определени ограничения за получаване на най-вероятната оценка. Например, знанието, че една структура е гладка, води до изхвърляне на изображение с груби ръбове. Регуляризиран обратен филтър, като филтъра на Винер, използва точно този подход. Чрез този метод се получават високи честоти, произтичащи от структури, които иначе биха били засенчени от високи шумови честоти, и разделителната способност ще бъде подобрена. Само такъв линеен подход обаче би могъл да постигне теоретично възможната разделителна способност на оптичната система. Или с други думи, разделителната способност е ограничена до поддръжката на OTF. И така, какво да кажем за превишаване на оптично възможната разделителна способност?

Това може да се постигне чрез ограничени итеративни алгоритми, които подобряват производителността на обратните филтри. Както подсказва името им, те работят в последователни цикли. Обикновено се прилагат ограничения върху възможните решения, които не само помагат за минимизиране на шума, но и увеличават мощността за възстановяване на размития сигнал. Такива ограничения включват регуляризация, но също така и други ограничения, като неотрицателност. Неотрицателността е разумно предположение, тъй като един обект не може да има отрицателна флуоресценция. Такива алгоритми не само повишават високите честоти на OTF носителя, но освен това са в състояние да разширят OTF носителя. А това от своя страна означава по-високи честоти от тези, пренасяни през оптичната система, и следователно, по-висока от оптично постижима разделителна способност.

Доколко мога да подобря разделителната способност с деконволюция?

Трудно е да се определи точна цифра. Въпреки това понякога се твърди, че с деконволюция може да се постигне до 2 пъти по-добра резолюция. Противно на общоприетото схващане, резолюцията на микроскопията не може да бъде измерена директно. Най-приетият стандарт за измерване на резолюцията се основава на така наречения критерий на Рейли. Тук най-малкият разделим детайл се определя, когато два точкови обекта са толкова близо един до друг, че централният максимум на диска на Ейри на едната точка попада върху първия минимум на останалите. На практика, за да се потвърди резолюцията, се измерва конкретна извадка от два точкови обекта (като Gattaquant Nanoruler) или два линейни обекта (като калибровъчно стъкло Argolight) с определени разстояния.

Друг опростен и често използван метод е измерването на пълната ширина на половината от максимума (FWHM) на обект с подрезолюция. Измерването на профила през центъра на диск на Ейри апроксимира Гаусова крива (по-точно функция на Бесел), а разделителната способност се определя като дължината на FWHM на Гаусовата крива.

Итеративно-базираната деконволюция изглежда се радва на известно предимство при подобряване на разделителната способност, особено за проби с малки и ясно дефинирани структури, а разделителната способност се измерва с метода FWHM. Да предположим, че имате ярка и нископлътна проба от 100 nm флуоресцентни перли и използвате итеративно-базирана деконволюция със силна структура и повече итерации.

В този случай можете бързо да получите предполагаема FWHM резолюция по-малка от 100 nm. Определянето на подобрението на резолюцията в реални биологични проби със сложни структури е още по-предизвикателно. Прекомерната обработка на деконволюцията е силно свързана с артефакти и винаги трябва да се избягва при данни от биологични проби.

И накрая, потенциалното подобрене на разделителната способност е постижимо само когато суровите данни са правилно или до известна степен прекалено дискретизирани по метода на Найкуист. В обобщение, деконволюцията наистина подобрява разделителната способност, но не бива сяпа да ѝ приписваме число и да очакваме един и същ резултат всеки път.

Мога ли да правя деконволюция на 2D изображения?

Да. Въпреки че деконволюцията дава най-добрия резултат за оптимално семплирани 3D стекове, можете да извършите деконволюция върху едно 2D изображение. Не можете обаче да използвате алгоритъма за най-близък съсед, който изисква съседни кадри отгоре и отдолу. Ако използвате ZEN, се препоръчва да използвате метода „Премахване на размазването“ за 2D изображения.

Трябва ли да използвам теоретична PSF или измерена PSF? Зависи. Има плюсове и минуси и при двата метода. Теоретичната PSF може да се генерира автоматично от метаданните на файловете и може лесно да побере различни входни данни за изображението, например данни, получени с различни обективи или дължини на вълните. Теоретичната PSF е по своята същност без шум и може да адаптира сферичната аберация чрез използване на различни PSF при различни дълбочини на изображението (имплементация на дисперсията на дълбочината в ZEN). Теоретичната PSF обаче предполага перфектен хардуер и експериментални условия, които рядко са реалистични. Тези неоптимални условия на изображение водят до артефакти от деконволюцията. Измерената PSF, от друга страна, трябва да представлява „реалната“ PSF и да включва всички възможни аберации (с изключение на някои SR техники). Но на практика измерената PSF (получена чрез изобразяване и осредняване на флуоресцентни перли с подрезолюция; моля, вижте „Как се генерира измерена PSF?“) изисква значителни усилия и резултатът обикновено е много шумен. Измерената PSF е също така по-малко толерантна към сферична аберация, типична за дебели проби или проби, които не са директно прикрепени към покривното стъкло. И накрая, измерената PSF представлява само текущите условия на микроскопа, когато се получава изображението от перлите. Тези условия, като оптични подравнявания, трептения на лампите, шумове от детекторите и стайна температура, могат лесно да се променят с течение на времето. Такива промени неизбежно влияят на PSF и правят измерената PSF вече не толкова „реална“. На практика е най-добре да се започне с теоретична PSF. Ако резултатът не е задоволителен и има налични ресурси, тогава можете да продължите с измерената PSF.

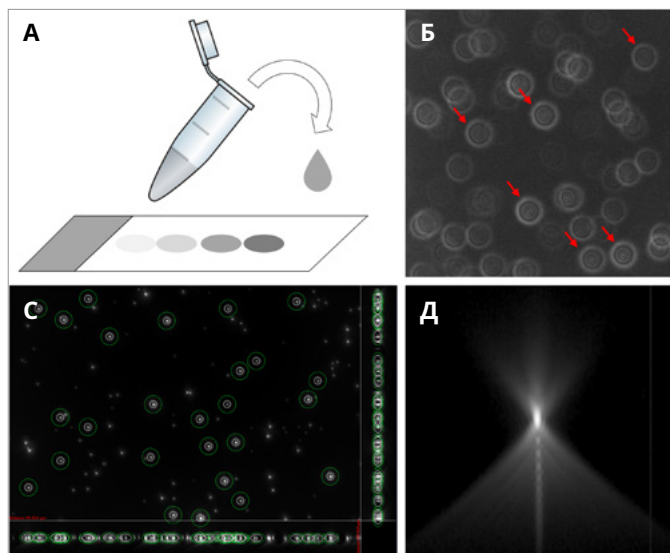
Как се генерира измерен PSF?

Използването на измерена PSF може потенциално да подобри резултата от деконволюцията, особено при данни, получени с помощта на обективи с висока NA ($NA > 1.2$). Измерването на PSF е също отличен подход за оценка на текущото оптично състояние на вашите микроскопи и трябва да се извършва редовно. Процедурата обаче е трудна за повечето потребители, които я използват за първи път, и изисква правилна подготовка и практика. Този раздел предоставя кратко ръководство за това как да се генерира измерена PSF.

1 Всичко започва с добра подготовка на пробата. Обикновено

Използвайте добре разделени флуоресцентни перли с под-резолюция, приготвени при същите условия на изобразяване, както използваните в суровите данни. Размерът на перлите трябва да се вземе предвид първо. В идеалния случай диаметърът трябва да е малко по-малък от физическата разделителна способност на вашия микроскоп, например за обектив с 1.4 NA и GFP канал се препоръчва перла с диаметър 150 nm. Имайте предвид, че по-малките перли са по-трудни за локализиране, имат по-слаби сигнали и могат да бъдат по-лесно фотоизбелени. Флуоресцентни перли с различни размери и многоцветни могат да бъдат закупени в търговската мрежа, например от Polysciences или Invitrogen. Второ, плътността на перлите трябва да бъде...

контролирано правилно. В идеалния случай, това трябва да е един слой от перли с минимално припокриване, когато перлите са дефокусирани (вижте Фигура 16). На практика, можете да обработите с ултразвук и да разреждате основния разтвор на перлите до множество концентрации в етанол и да капнете 3–5 от тях върху едно и също покривно стъкло, след което да ги оставите да изсъхнат на въздух. Накрая, перлите трябва да бъдат приготвени със същите условия на изобразяване, както вашите сурови данни. Това включва използване на покривно стъкло и идентична среда за заливане, дълбочина на пробата и температура. Обърнете внимание, че е полезно да има агент против избледняване в средата за заливане.



Фигура 16 Илюстрация за генериране на измерена PSF. А) Капнете различни концентрации от разтвор на гранули с под-резолюция върху висококачествено покривно стъкло от 170 μm (#1.5) и изсушете на въздух. В) регулирайте правилно накланянето на пробата, намерете област, където можете ясно да разпознаете добре отделени гранули, когато са разфокусирани, настройте експозицията на камерата да запълва >50% динамичен диапазон, дефинирайте странична и аксиална честота на дискретизация, в идеалния случай откъд Nyquist, получите z-task до изчезването на сигналите извън фокус. С) използвайте софтуерен инструмент за извършване на селекция на гранули и осредняване. Г) запазете измерената си PSF с подходящо име.

2. Заснемете изображението с точните хардуерни настройки. След това

При нивелиране на пробата от мъниста върху предметната маса на микроскопа е изключително важно да се използват същите хардуерни настройки, както в суровите данни: обективи, настройки на корекционната яка, имерсионна среда, източник на светлина, филтри и други уникални настройки, като например размер на конфокална дупка. Можете да използвате същите странични и аксиални семплирания, както в суровите данни (изисква се семплиране по Nyquist или по-добро), но понякога е препоръчително честотата на семплиране да се зададе малко над изискването на Nyquist. Динамичният диапазон е важен тук, тъй като трябва да записвате както ярки сигнали на фокус, така и слаби сигнали извън фокус. Препоръчително е да използвате 12-битови или по-високи настройки на детектора и да запълните поне 50% от хистограмата. Накрая, когато дефинирате Z-стековете, уверете се, че сте заснемали достатъчно пространства над и под мънистата, докато сигналът от пръстена изчезне.

3. Оценете, обработете и запазете измерената PSF. След като измерването на PSF е завършено, първо трябва да проверите и оцените качеството на PSF, като използвате инструментите за ортогонално гледане. PSF трябва да е ясен, прав и симетричен. Ако PSF показва значителни артефакти, като например наклоняване или неравномерни дифракционни пръстеновидни модели, е разумно да инспектирате оптичните компоненти на микроскопа и да повторите изобразяването на перлите. Сферичната аберация не може да бъде напълно коригирана, така че лека аксиална асиметрия е приемлива. PSF от една перла обикновено има високо ниво на шум. Необходимо е да се осреднят множество перли, за да се подобри SNR. Софтуерният пакет ZEN Deconvolution има специални инструменти за осредняване на перли. Следвайте софтуерния съветник, като изберете единични и добре разделени перли, за да формирате крайния измерен PSF. Накрая, запазете измерената PSF с подробно описание на датата, целите и дължината на вълната.

The metadata should contain all necessary parameters, but you don't want to assign the wrong PSF to your raw data . Since the optical alignment and hardware conditions vary over time, it might be a good practice to update the measured PSF regularly

Should I deconvolve all my microscopy images? If you have the resource and the technical know-how, you probably should . Deconvolution is proven to improve image quality . You can expect better contrast for 2D images or for 3D images with non-optimal sampling using neighbor-based methods. For optimally sampled 3D images, using inverse-based or iterative-based methods can increase resolution and SNR

If you carefully control the parameters, deconvoluted images remain quantitative . The only drawbacks are the long processing time, possible deconvolution artifacts, and duplication of data. Deconvolution artifacts need to be carefully reviewed (see section “FAQ: Deconvolution artifacts”), and over-processing needs to be avoided in most cases . It is also advisable to keep the raw data for future processing and comparison

Мога ли да деконволюирам изображения в светло поле в пропусната светлина? Обикновено деконволюцията не може да обработва данни от светло поле поради следните две причини: 1) PSF би била грешна, тъй като не включва кондензера; 2) Сигналите от светло поле произлизат от абсорбцията на светлина, която е нелинеен процес и математически не може да се проследи.

Въпреки това, съществува едно общоприето линейно приближение, възможно при следните условия: 1) Пробата е приблизително неабсорбираща или поне много тънка, така че абсорбцията може да бъде пренебрегната; 2) Изображението трябва да бъде инвертирано в нивата на сивото, след което деконволюирано като флуоресцентно изображение (изображението може да бъде инвертирано отново след това); 3) Системата за светло поле трябва да е достатъчно добра Кьолерова, така че PSF да стане близка до тази на флуоресцентна система.

FAQ: Deconvolution artifacts

To confidently use deconvolution first requires an understanding of what can potentially go wrong . This section covers the origins and appearance the most common deconvolution artifacts, as well as how to avoid them

Where do deconvolution artifacts come from? 1

Erroneous raw data

Many mishaps can happen during image acquisition . From the instrument side, optical misalignment, light source flickering (mercury lamps, metal halide lamps, lasers), and detector artifact (camera dead pixel or electromagnetic interference of PMT) impact image quality . From the sample side, photobleaching during z-stack acquisition, using of non-standard cover glass, sample movement, and high background signal (resulting for example from tissue autofluorescence, fluorescent signals in cell culture medium or immersion medium, or environmental stray light) also can influence quality. And from the imaging side, incorrectly recorded metadata (e.g., objective NA or emission wavelength), poor lateral/axial sampling, and detector over-saturation can skew the data collected

2 Incorrect deconvolution settings

PSF setting is critical to deconvolution performance, especially for the iterative-based algorithms where the same PSF is repeatedly applied . Incorrect PSF settings lead to strong artifacts and for theoretical PSF, the wrong metadata input. Most software assumes the same refractive indices between embedding and immersion media, thus you need to change them manually when, for example, using oil objectives on a water embedded sample when working with the theoretical PSF

За измерена PSF (функция на функционалност на фотона), ще трябва да използвате PSF, получена с условия на изобразяване, съответстващи на състоянието на вашата проба (обективи, дължина на вълната, коефициенти на пречупване на вграждащите и имерсионните среди и размер на отвора). Параметърът регуларизация се занимава с шума. Обикновено, колкото по-високо е нивото на шум, толкова по-висок ред на регуларизация е необходим.

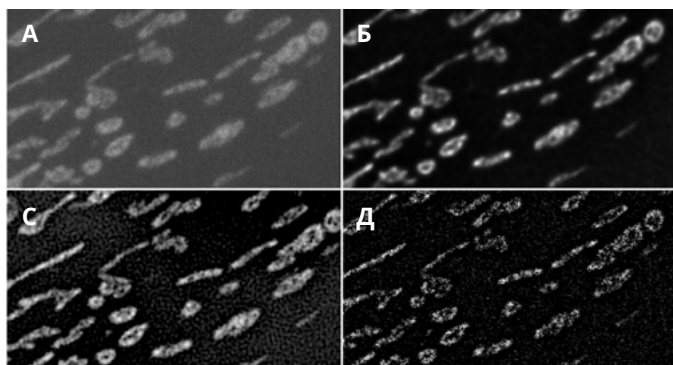
3 Прекомерна обработка

Прекомерната обработка е често срещана при деконволюцията, особено когато целта е максимално подобрение на разделителната способност. Обикновено това се случва, когато е избрана много висока „сила“ на възстановяване или са извършени твърде много итерации при използване на итеративен метод, или и двете. Суровите данни с нисък динамичен диапазон и лошо съотношение сигнал/шум (SNR) е по-вероятно да имат артефакти от прекомерна обработка.

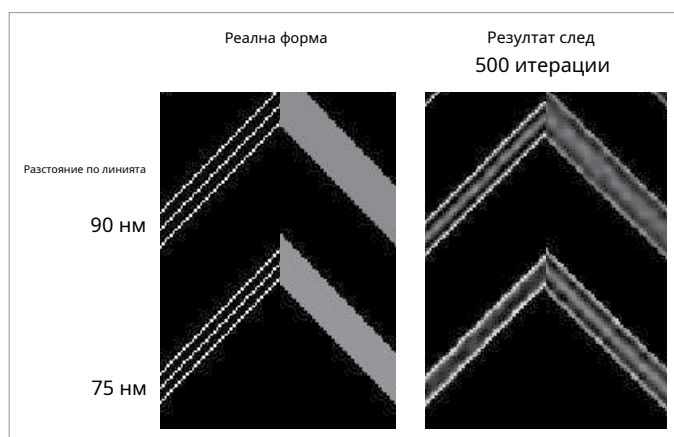
Как изглеждат артефактите от деконволюцията? ¹

Изчезващи или неточни структури

Често срещано е да се губят деликатни и бледи структури след деконволюционна обработка. Това най-вероятно се дължи на намаляването на шума от регуляризационния филтър или прекомерната употреба на изглаждащия филтър. Използването на измерена PSF с високо ниво на шум също може да доведе до изчезване на малки структури. От друга страна, деконволюцията може да увеличи и разшири много ярки структури отвъд физическия им размер, особено ако пикселите са наситени. Допълнителни модели могат да се генерират и на заден план за сурови данни с лош динамичен диапазон и висок фонов шум, особено когато се използва методът, базиран на обратен филтър. Вижте Фигура 17 за примери за няколко артефакта от деконволюцията.



Фигура 17Пример за артефакти от деконволюция. А) сурови данни за митохондриални структури, получени с помощта на широкоъгълен флуоресцентен микроскоп. В) добър пример за деконволюция, използваващ метода на ограничените итеративи. С) лош пример за деконволюция, показващ „изобретяване“ на структури на заден план. D) лош пример за деконволюция, показващ засилен шум „сол и черен пипер“ и изчезване на структури.



Фигура 18Симулирани обекти, имитиращи единични линии или една плътна линия. Линиите могат да се появяват и изчезват, когато се приложат твърде много итерации за деконволюция.

2 Аксиално изкривяване

Аксиалното изкривяване обикновено се формира от силна сферична аберация и не е артефакт от деконволюцията. То би трябвало да е видимо в суровите данни, но е по-забележимо след деконволюцията, тъй като съотношението сигнал/шум и контрастът са подобрени. Аксиалното изкривяване може да бъде коригирано с помощта на усъвършенстван алгоритъм за дълбочинна дисперсия. Вижте Фигура 3 за подробности.

3 Шум от сол и черен пипер

Остатъчният шум от сол и черен пипер може да се вижда и след деконволюция, когато филтърът за регуляризация е твърде нисък.

4 Модели с шарки/райета отгоре и отдолу

Деконволюцията може да засили хоризонтален или вертикален линеен модел, причинен от мъртъв пиксел на камерата или изключително ярка структура, намираща се близо до получения обем. Силната сферична аберация на суровите данни или използването на грешно измерена PSF може да доведе до светъл слой над и под пробата. Вижте Фигура 3 за пример.

5 Звънящ артефакт

Артефактът от звънене е появата на един или множество шарки около ярки структури в деконволюираното изображение. Това се случва най-вече при методи, базирани на съседни или инверсни филтри. Промяната към итеративен метод би трябвало да го реши.

Как да се избегнат или компенсират артефактите от деконволюцията? ¹

Разгледайте суровите данни

Чрез внимателно настройване на яркостта и контраста на суровото изображение и показване на 3D набора от данни в ортогонален изглед (едновременен изглед на XY, XZ и YZ проекции, вижте Фигура 2), могат да бъдат идентифицирани много проблеми с изображенията, като например сферична аберация или фотоизбелване. Такава информация ще ни насочи към правилните настройки или корекции.

2 Започнете с параметъра за деконволюция по подразбиране

Повечето търговски софтуер за деконволюция, като например ZEN Deconvolution, имат интелигентна настройка по подразбиране. В зависимост от

което се получава от изображението,
автоматично ще присвои набор от
включващи алгоритъма, възстановяване

сила (определена автоматично с помощта на метода за обобщена кръстосана валидация), регуляризация, брой итерации и други. Безопасно е да започнете с такива настройки по подразбиране

3 Сравнете суровите данни с деконволюираното изображение Деконволюцията може да подобри разделителната способност и съотношението сигнал/шум, но не бива да създава, променя или премахва съществуващи структури в суровото изображение. Винаги се препоръчва да се запазват суровите данни и да се сравняват деконволюираните и суровите изображения в синхронизиран изглед, като например функцията за разделен изглед в ZEN.

4. Сравнете различни алгоритми или настройки за деконволюция Когато предполагаем артефакт от деконволюция не е визуално наличен в суровите данни, опитайте различен алгоритъм за деконволюция, например преминаване от ограничен итеративен метод към регуляризиран инверсен филтърен метод. Различните алгоритми могат да имат различно въздействие върху определена структура или фон. Внимателното сравнение на данните може да разкрие артефакта. Освен това, намаляването на силата на възстановяване или броя на итерациите също може да доведе до по-малко артефакти.

5 Активирайте корекцията на изображението, когато е налична Някои артефакти в изображенията, като фотоизбеляване, мъртви пиксели на камерата, трептене на лампата, флуоресцентен фон и сферична аберация, могат да бъдат математически компенсирани в програмата за деконволюция. Активирайте една или няколко такива корекции, когато в суровите данни бъдат идентифицирани артефакти в изображенията.

Заключителни бележки

Деконволюцията се е превърнала във важен актив за почти всеки метод за микроскопско изобразяване, независимо дали е базиран на камера или точков детектор. Фразата „боклук вътре, боклук излязъл“ обаче може да се приложи и към DCV (дугово-цифровата конволюция), така че трябва да се уверите, че суровите ви данни са с достатъчно качество, преди да започнете. След това на въпроса дали итеративните алгоритми ще дадат количествени резултати може да се отговори с „да“ с чиста съвест. Освен това, DCV не само ще играе своята сила в премахването на размазването и увеличаването на SNR (сигнално-шумното съотношение), но и ще осигури значително увеличение на разделителната способност. Тъй като алгоритмите продължават да се усъвършенстват и ограниченията са по-добре съобразени със структурите на пробите, можем да очакваме DCV да играе все по-голяма роля в обработката на изображения.

Библиография

- Бигс, DSC: Ускорена итеративна сляпа деконволюция. Докторска дисертация, Университет на Окленд, Нова Зеландия (1996 г.)
- Борн, Макс и Волф, Емил: Принципи на оптиката, Pergamon Press (1959)
- van Cittert, PH: „Zum Einfluß der Spaltbreite auf die Intensitätsverteilung in Spektrallinien. II,“ Z. Phys. 69, 298–308 (1931)
- Гибсън, С. Ф. и Лани, Ф.: Експериментален тест на аналитичен модел на аберация в маслено-иммерсионен обектив, използван в триизмерна светлинна микроскопия, JOSAA, том 9, брой 1 (1992)
- [SIM_02] MGL Gustafsson, J. Microsc. 2000, 198, 82.
- Холмс Т. Дж., Бигс Д., Абу-Тариф А.: Сляпа деконволюция. В: Поули Дж. (ред.) Наръчник по биологична конфокална микроскопия. Springer, Бостън, Масачузетс. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_24 (2006)
- [SIM_04] X. Huang, J. Fan, L. Li, H. Liu, R. Wu, Y. Wu, L. Wie, H. Mao, A. Лал, П. Сие, Л. Танг, YZ, Y. Лиу, С. Тан, Л. Чен, Национална биотехнология 2018 г. 36, 451.
- Янсон, Пенсилвания, ред.: Деконволюция на изображения и спектри (2-ро издание) (Academic Press, Inc., Орландо, Флорида, САЩ (1996)
- [SIM_01] А. Льошбергер, Й. Новикау, Р. Нец, М.-К. Шпиндлер, Р. Бенавенте, Т. Клайн, М. Зауер, И. Клеле, „Образи със свръхрезолюция чрез микроскопия с двойно итеративно структурирано осветление“, Carl Zeiss Microscopy GmbH, април 2021 г.
- Луси, Л.Б.: Итеративна техника за коригиране на наблюдавани разпределения, Astron. J., 1974, 79:745-754
- Майнел, Едуард С.: Произход на линейни и нелинейни рекурсивни алгоритми за възстановяване, J. Opt. Soc. Am. A 3, 787-799 (1986)
- Ричардсън У. Х., Байесов итеративен метод за възстановяване на изображения. J. Opt. Soc. Am., 1972, 62 (6): 55-59
- Рот С. и др.: Микроскопия за оптично пренасочване на фотони (OPRA) (2013), arXiv:1306.6230
- Шефер Л.Х., Шустер Д., Херц Х.: Обобщен подход за ускорено възстановяване на изображения, базирано на максимална вероятност, приложен към триизмерна флуоресцентна микроскопия. J Microsc. 2001 ноември;204(Част 2):99-107. doi: 10.1046/j.1365-2818.2001.00949.x. PMID: 11737543
- Schaefer et. al. „Структурирана илюминационна микроскопия: анализ и намаляване на артефакти с помощта на подход за оптимизация на параметри“ Journal of Microscopy, том 216, част 2, ноември 2004 г., стр. 165–174
- Schaefer, Lutz & Schuster, D.: Микроскопия със структурирано осветление: подобрена пространствена резолюция с помощта на регулизирано обратно филтриране (2006)
- Шепърд К.Дж.Р.: Свръхрезолюция в конфокалната диагностика, Optik - Международно списание за светлинна и електронна оптика 80(2):53 (1988)
- Sheppard C.J.R.: Развитие на микроскопията за свръхрезолюция: конфокална микроскопия и микроскопия за сканиране на изображения (2021), Applied Sciences 11(19):8981
- [SIM_03] Д-р Йорг Зибенморген, д-р Яухени Новикау, Ралф Волешенски, д-р Клаус Вайсхарт, д-р Инго Клеле, „Представяне на решетъчна SIM за микроскопия със структурирано осветление ZEISS Elyra 7 с 3D решетка за изобразяване на живи клетки“, декември 2018 г.
- Тихонов, А.Н. и Арсенин, В.Ю.: Решения на некоректно поставени проблеми. Уайли, Ню Йорк (1977)
- Ван дер Ворт, ХТМ и Страстерс, К.К.: Възстановяване на конфокални изображения за количествен анализ. J. Microsc., 178, 165-181 (1977)
- Вервир, Питър Дж. и Йовин, Томас М.: Ефективни алгоритми за възстановяване със свръхрезолюция, използващи максимални апостериорни оценки с приложение във флуоресцентна микроскопия. J. Opt. Soc. Am. A, 14, 1696-1706 (1997)
- Уолъс, У. и др.: Ръководство за деконволюция за работещ, Biotechniques, ноември 2001 г., том 31, № 5
- Винер, Норберт: Екстраполация, интерполация и изглаждане на стационарни времеви редове. Уайли, Ню Йорк, Ню Йорк (1949)
- [SIM_05] Й. Джанг, С. Ланг, Х. Уанг, Дж. Ляо, Й. Гонг, J. Opt. Soc. Am. A 2019, 36, 173



Carl Zeiss Microscopy GmbH

07745 Йена, Германия

microscopy@zeiss.com

www.zeiss.com/microscopy