

Rekonstruktion von 3D-Abbildungen in der Lichtschicht-Fluoreszenzmikroskopie mit Dekonvolutions- und Deep-Learning-Algorithmen

Chao Fan, Meike Hofmann, Shima Gharbi Ghebjagh, Stefan Sinzinger

Technische Universität Ilmenau, Fachgebiet Technische Optik, Postfach 100565, 98684 Ilmenau, Germany
mailto:meike.hofmann@tu-ilmenau.de

Diese Arbeit befasst sich mit dem Vergleich verschiedener Algorithmen zur direkten Dekonvolution von dreidimensionalen Abbildungen, die mit Hilfe der Lichtschicht-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) aufgenommen werden. Es wird auch die Verwendung einer Airy-Lichtschicht demonstriert, um das Sichtfeld (FOV) und den Dekonvolutionseffekt zu verbessern.

1 Einführung

Die Lichtschicht-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) ermöglicht die 3D-Darstellung von Proben, wie beispielweise lebender Zellen über einen längeren Zeitraum. Im Labor wurde ein Mikroskop auf der Grundlage der Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM) aufgebaut. Der Abbildungsprozess basiert hauptsächlich auf der axialen Bewegung (entlang der z-Achse) der Probe mit einem Servomotor, und die Kamera nimmt zwei-dimensionale Bilder der Probe in verschiedenen axialen Positionen (piezo-gesteuertes schrittweises Scannen) auf, wie in der Abb. 1 zu sehen ist.

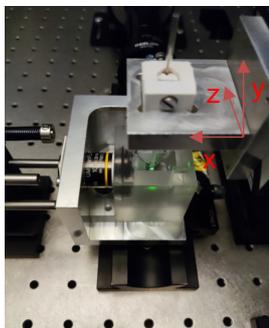


Abb. 1 Bewegungsrichtung der Probe

Eine Software verarbeitet diese Serie von Bildern zur Erstellung einer 3D-Darstellung (z-stack images). Beugungseffekte, Rauschen und Bewegungsunschärfe im Abbildungsprozess führen zu einer Reduktion von Auflösung und Kontrast in den aufgenommenen 3D-Abbildungen. Die axiale und radiale Auflösung der Mikroskopie sind daher unterschiedlich. Die Gaußsche Verteilung des Laserstrahls führt zusätzlich zu einer Verbreiterung der Lichtschicht zum Rand hin in axialer Richtung. Um die Abbildungsleistung und die räumliche Auflösung des Systems zu testen, wird zunächst die Messung der PSF durchgeführt. Bei dieser Messung sind die Proben orange fluoreszierende Mikrokugeln mit einem Durchmesser von etwa 1 μm , die in einer 10% Agaroselösung eingebettet

sind. Die Wellenlänge von 560 nm dominiert das Fluoreszenzspektrum nach Bestrahlung mit dem Laser bei 532 nm. Mit einem Objektiv ($NA = 0,5$) im Detektionsstrahlengang sind theoretisch die axiale und radiale Auflösung dieses Mikroskops jeweils 1,5 μm und 0,56 μm . Das Sichtfeld (FOV) beträgt 34 μm . Die Rekonstruktion der reinen Messwerte in der xz-Ebene sind in der Abb. 2 dargestellt.

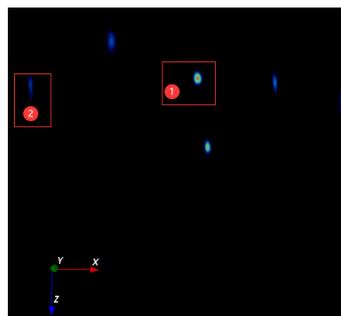


Abb. 2 Ursprüngliche Probepprofile in der xz-Ebene (Teilweise Vergrößerung von $94 \times 94 \times 22 \mu\text{m}^3$)

Die Halbwertsbreiten (FWHM) (in der xz-Ebene) der Proben ① und ② in der Abbildung sind 1,45 μm und 3,80 μm . Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Codes in MATLAB [1] durchgeführt. Um das ursprüngliche Bild in ein hochauflösendes Bild zu rekonstruieren, wird das Bild entfaltet.

2 Dekonvolution mit Gaußscher Lichtschicht

Die klassische Dekonvolution kann mit der Open-Source-Software Fiji [2] und ICY [3] durchgeführt werden. Praktische Erfahrungen zeigen, dass der auf Maximum Likelihood Estimation (MLE) basierende Richardson-Lucy Algorithmus und der Blind Dekonvolution Algorithmus sehr effizient sind. Der Algorithmus kann durch Iteration die tatsächlichen Parametergrößen schätzen und das Bild rekonstruieren, basierend auf einer bekannten PSF im System, die ein durch ein Plugin *PSF Generator* erzeugtes skalares PSF-Modell für dieses System ist. Im Vergleich dazu kann der Deep-Learning-Algorithmus (DLA) im Bereich der Dekon-

volution zur Erhöhung der Auflösung den Durchsatz erheblich steigern. Ein unüberwachtes Lernmodell kann nach dem Training ohne Vorkenntnisse (z.B. der PSF) eine in alle Richtungen isotrope rekonstruierte 3D-Darstellung erzeugen, wobei die Auflösung die höchste Auflösung dieses Systems in jeder Richtung ist [4]. In dieser Arbeit wurden die Dekonvolutionsergebnisse dieser verschiedenen Dekonvolutionsalgorithmen verglichen. Die Qualität der Bildrekonstruktion wird anhand des PSNR-Werts (Signal to Noise Ratio) des rekonstruierten Bildes und der Intensitätsverteilung (FWHM) der Probe im Bild bewertet. Das von Park et al. [4] entwickelte Deep-Learning-Framework Dekonvolutionsverfahren wurde auf dem Server der TU Ilmenau mit einer Nvidia A100 GPU ausgeführt. Der Vergleich zeigt, dass Fiji einen stärkeren Effekt in der xy-Ebene hat, aber es nicht mehr Rauschen verursacht. Die Isotropie des mit ICY rekonstruierten Bildes sieht besser aus, verursacht aber ohne Regularisierungsfunktion viel Rauschen. Der Trainingsaufwand ist zwar erheblich, aber die Ergebnisse mit dem DLA sind hervorragend, wie in der Tab. 1 dargestellt ist. Die eigentliche Rekonstruktion des Bildes auf dem Server ist sehr schnell. Der PSNR-Wert wurde mit Hilfe eines Codes in MATLAB [5] berechnet.

Pixelzahl	1100 x 672 x 300	
Sichtfeld (μm^3)	257 x 157 x 30	
Trainingszeit	36 Stunden	
Rekonstruktionszeit	48 Sekunden	
Proben	①	②
FWHM (μm)	1,25	2,00
PSNR	30,30 dB	

Tab. 1 Dekonvolutionsergebnisse mit dem DLA

Wie die Daten in der oberen Tabelle zeigen, sind die Probenprofile (FWHM) auch im rekonstruierten Bild noch unterschiedlich, was auf die Gaußsche Verteilung der Lichtschicht im Beleuchtungsstrahlengang zurückzuführen ist. Die Verwendung eines nicht-gebeugten Strahles wie z.B. eines Airy-Strahls, kann dem entgegenwirken.

3 Dekonvolution mit Airy-Lichtschicht

Eine verkippte Zylinderlinse kann Aberration höherer Ordnung (Koma) erzeugen [6], um eine eindimensionale Airy-Lichtschicht zu erzeugen. In der Praxis wurde eine Zylinderlinse mit 40 mm Brennweite um 40° im Strahlengang verkippt, um einen kollimierten Laserstrahl in eine Airy-Lichtschicht zu überführen. Abb. 3 zeigt die praktische Messung dieser Airy-Lichtschicht im Labor. Abb. 4 ist ein rekonstruiertes Bild der Proben mit der Airy-Lichtschicht, wobei die FWHM-Werte ca. $1\mu\text{m}$ sind. Die rekonstruierte Abbildung ist jedoch stark verrauscht.

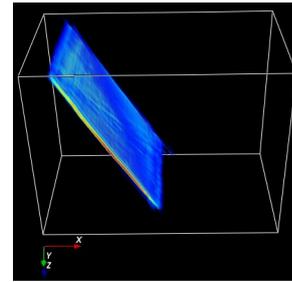


Abb. 3 3D-Darstellung der Airy-Lichtschicht in einem Würfel von $117 \times 68 \times 90 \mu\text{m}^3$

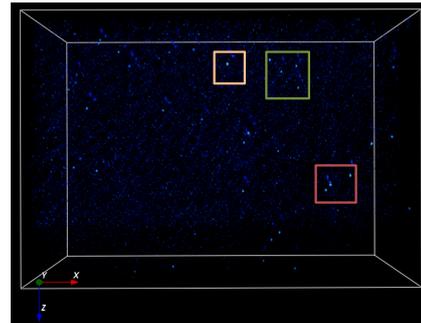


Abb. 4 Dekonvolutionsergebnisse mit dem DLA mit Airy-Lichtschicht ($144 \times 72 \times 100 \mu\text{m}^3$)

4 Zusammenfassung

Der Deep-Learning-Algorithmus kann den Durchsatz im Bereich der Dekonvolution erhöhen und ist für die Airy-Lichtschicht geeignet. Das Sichtfeld der LSFM wird durch die Airy-Lichtschicht deutlich vergrößert und das Problem der Inhomogenitäten wird gelöst. Allerdings verursacht die Airy-Lichtschicht auch Rauschen, das den Kontrast der Bilder verringert.

Literatur

- [1] <https://github.com/raacampbell/measurePSF>.
- [2] D. Sage, L. Donati, F. Soulez, D. Fortun, G. Schmit, A. Seitz, R. Guiet, C. Vonesch, and M. Unser, "DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy," *Methods* **115**, 28–41 (2017).
- [3] F. Soulez, L. Denis, Y. Tourneur, and É. Thiébaud, "Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy," in *2012 9th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pp. 1735–1738 (IEEE, 2012).
- [4] H. Park, M. Na, B. Kim, S. Park, K. H. Kim, S. Chang, and J. C. Ye, "Deep learning enables reference-free isotropic super-resolution for volumetric fluorescence microscopy," *Nature Communications* **13**(1), 3297 (2022).
- [5] https://github.com/volcanofly/ssim_and_psnr_3d.
- [6] Z. Yang, M. Prokopas, J. Nylk, C. Coll-Lladó, F. J. Gunn-Moore, D. E. Ferrier, T. Vettenburg, and K. Dhoklakis, "A compact Airy beam light sheet microscope with a tilted cylindrical lens," *Biomedical optics express* **5**(10), 3434–3442 (2014).