

Prepaso Bases de Deconvolución

Procesamiento de imágenes y bioseñales

Preparado por:

Andrea Mendez, Jimena López, Iván Balarezo, Rodrigo Gálvez

Para: Procesamiento de Imágenes y Bioseñales I 2014,

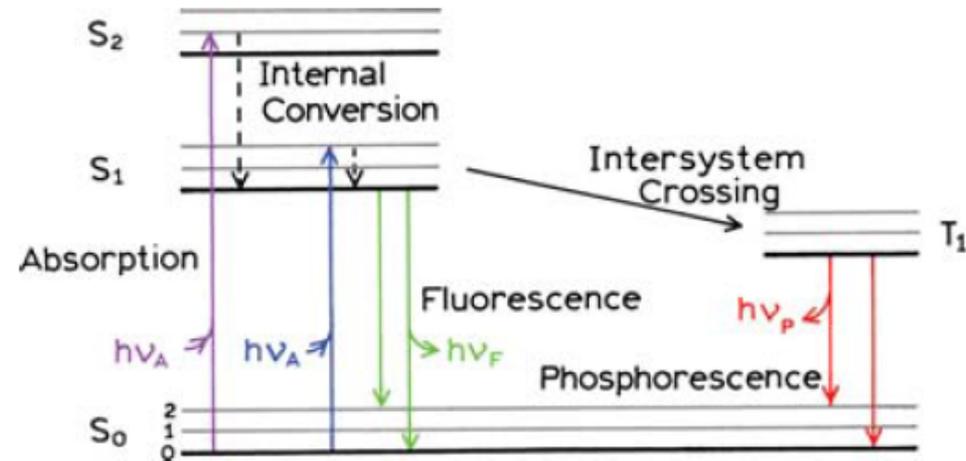
Profesor: Steffen Härtel

Temario

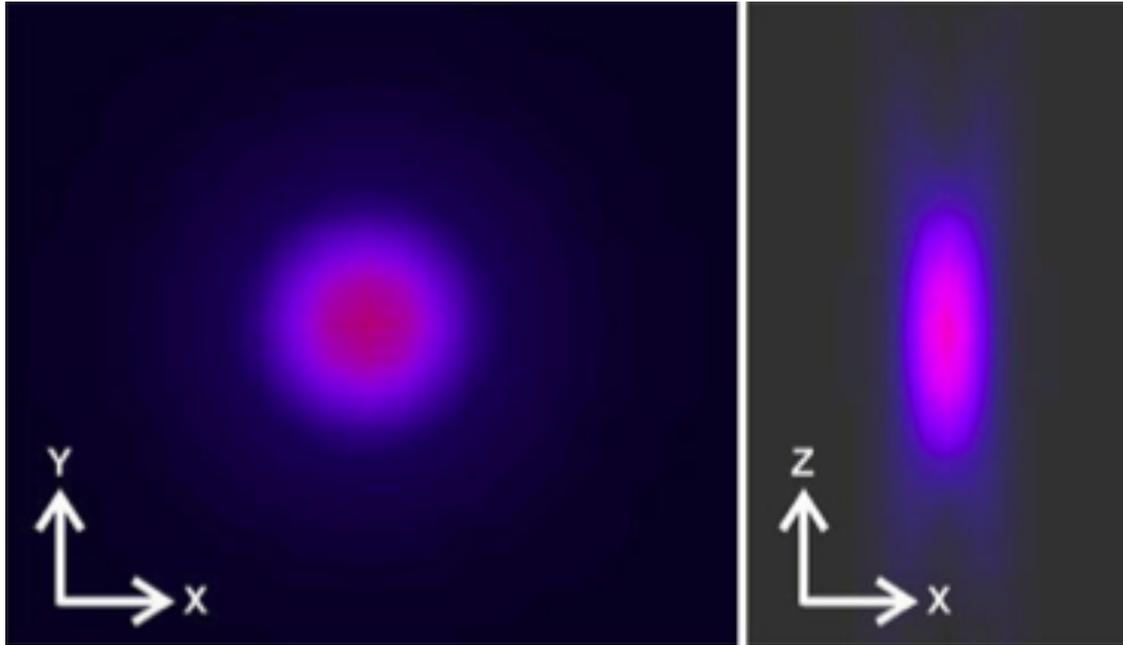
- ▼ Fluorescencia
- ▼ Microscopía óptica
- ▼ Deconvolución
- ▼ Microscopía confocal
- ▼ Caso: Concentraciones de sonda fluorescente intracelular por microscopía confocal
- ▼ Herramienta: Aplicación Huygens
- ▼ Discusión

Fluorescencia

- ▼ Sir John Fredrich William Herschel, 1845
 - ▼ Fenómeno de la fluorescencia
- ▼ Sir G. G. Stokes, 1852
 - ▼ Absorción UV, emisión azul, solo en la superficie del agua tónica
- ▼ Alexander Jablonski, 1930
 - ▼ Describe el cambio de estado de excitación de partículas



Microscopía óptica (PSF)



La imagen tridimensional que se registra de la fuente puntual se llama PSF (Point Spread Function).

Desempeñan un papel básico en la teoría de formación de imágenes en microscopía de fluorescencia, caracterizando la óptica del microscopio.

Convolución/Deconvolución

▼ Convolución

- ▼ Es una combinación lineal simple del PSF ajustada a la intensidad del objeto en cada punto dentro del objeto.

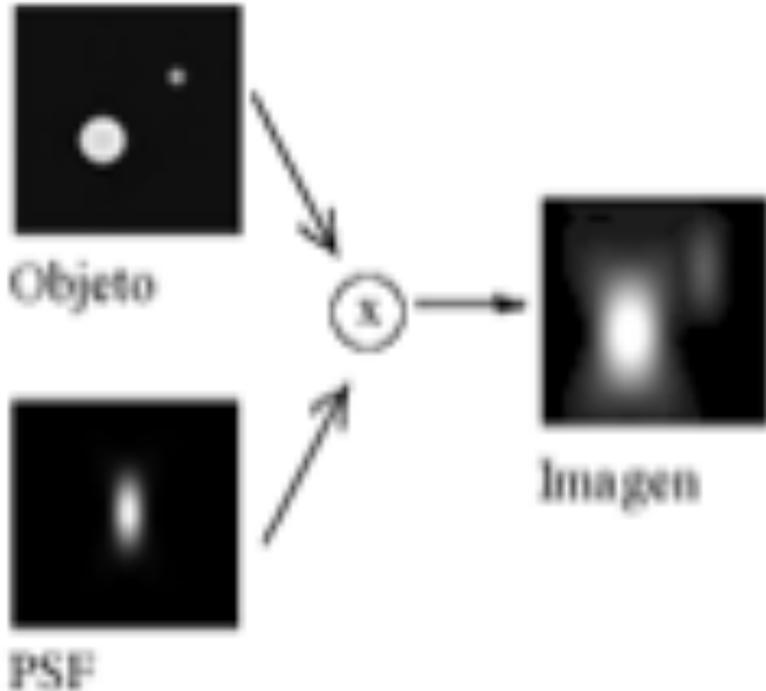
▼ Desenfoque

- ▼ Aparece inevitablemente en el límite de resolución del dispositivo debido a la difracción de la luz en las lentes.
- ▼ El “ruido fotónico”, se refiere a variaciones de flujo inherentes a propiedades estadísticas de los fotones.
- ▼ PSF (caracteriza la óptica del microscopio).

▼ Deconvolución

- ▼ Operación inversa a la convolución.
- ▼ Es una operación matemática basada en algoritmos usada para recuperar datos degradados por cualquier efecto físico.

Convolución

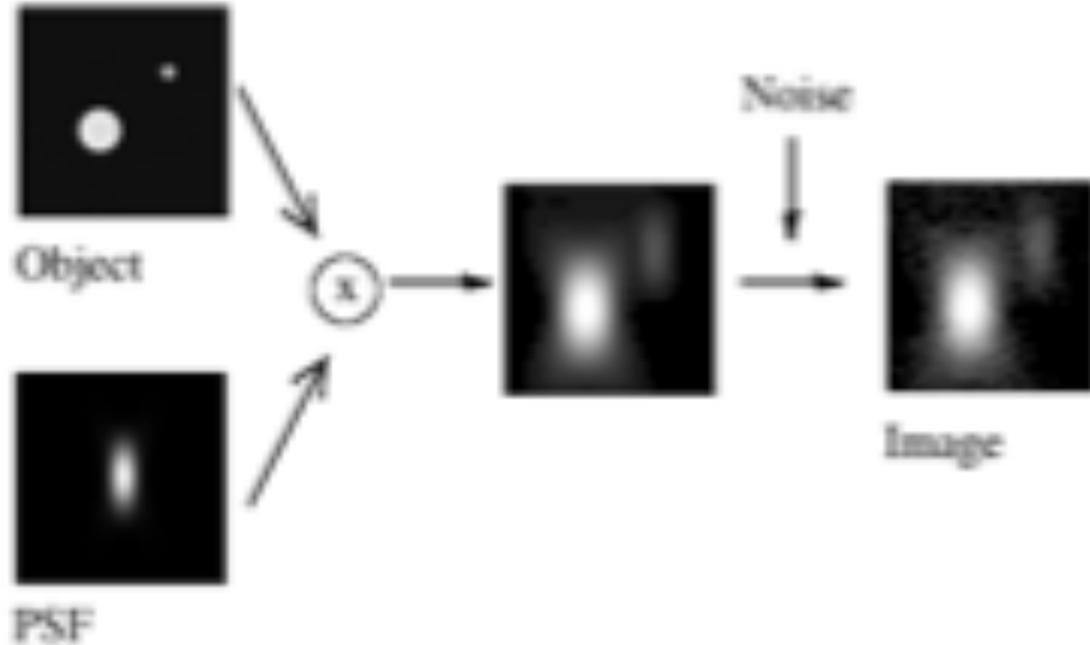


La imagen se forma reemplazando cada fuente de luz original, de tamaño menor que la resolución, por su PSF tridimensional (multiplicada por la intensidad correspondiente)

$$f * g = h$$

Donde la imagen g surge de la convolución de las fuentes reales de luz f (el objeto) y la PSF h .

Deconvolución

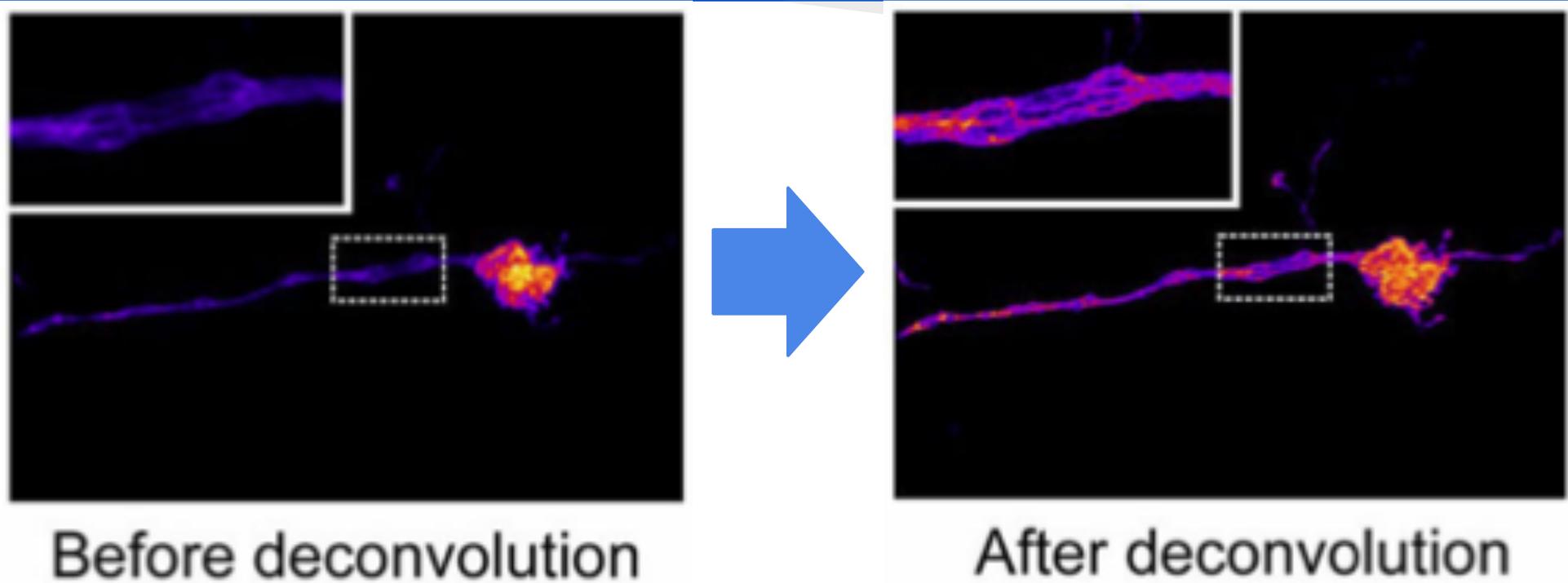


Si la convolución implica reemplazar cada fuente luminosa puntual original por su correspondiente *PSF* para producir una imagen borrosa, el proceso de restauración sigue el camino inverso, recolectando toda la luz dispersa y poniéndola en su sitio de nuevo. Esto produce una mejor representación del objeto real, más clara a los ojos. (El brillo de la imagen parece disminuir mientras que aumenta el contraste entre objetos y fondo, y el rango dinámico se agranda).

$$k = f * h + \varepsilon$$

La imagen registrada k proviene de la convolución de las fuentes reales f y la *PSF* h + ruido fotónico ε

Convolución/Deconvolución



Microscopía confocal

▼ Problema

- ▼ Medir concentración de tinte dentro de las células

▼ Solución

- ▼ Crear un receptáculo virtual que es más pequeño que el grosor de la célula
- ▼ Es un efecto óptico

▼ Mide

- ▼ Concentración del tinte
- ▼ La emisión de luz es proporcional a la concentración del tinte

Concentraciones de sonda fluorescente intracelular por microscopía confocal

*Intracellular Fluorescent Probe Concentrations by Confocal
Microscopy, Finck et al. 1998*

Temario

Caracterización

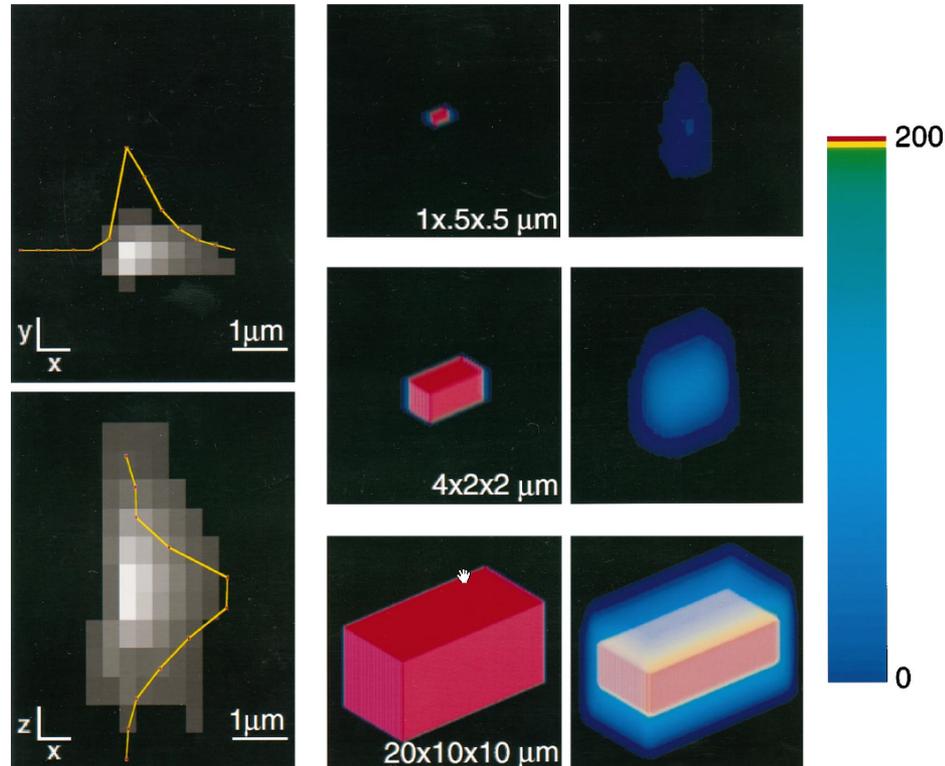
Medición de la forma

Medición del volumen

Medición de la membrana

Medición de la carga eléctrica de la mitocondria

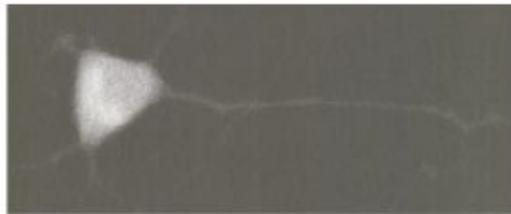
Caracterización del microscopio confocal por convolucionar una imagen modelada con PSF



Concentración intracelular de fura-2



1 μm
above coverslip

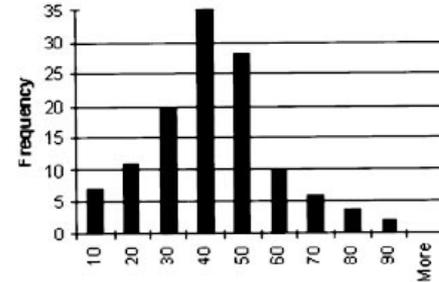
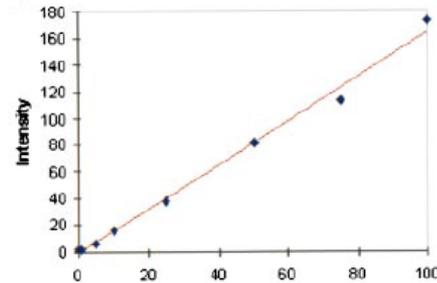
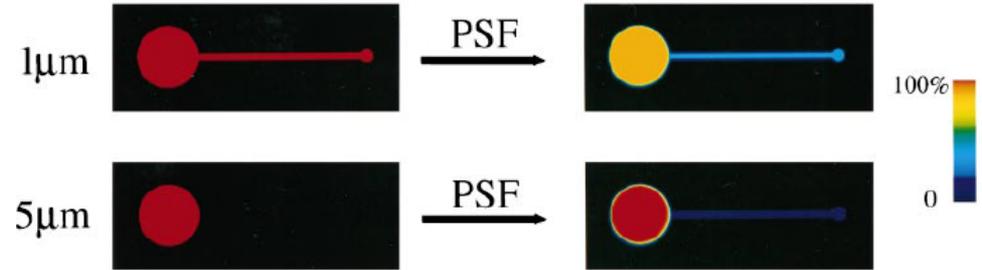


5 μm
above coverslip



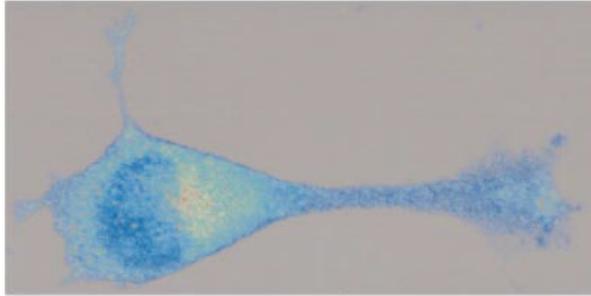
10 μm
above coverslip

— 45 μm



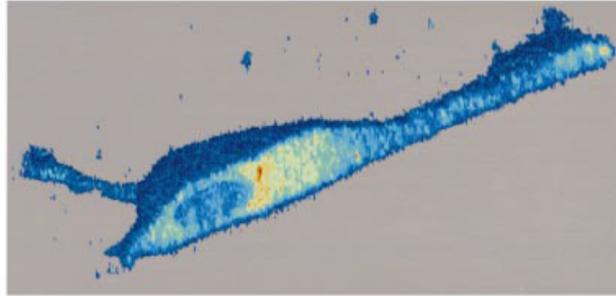
Estimación de la distribución del marcador intracelular

Top View

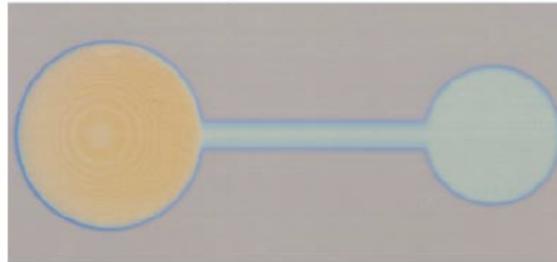


— 25 microns

Cross Section

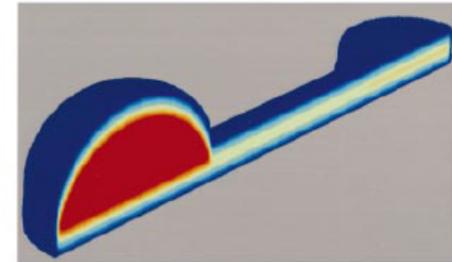


Top View



— 25 microns

Cross Section

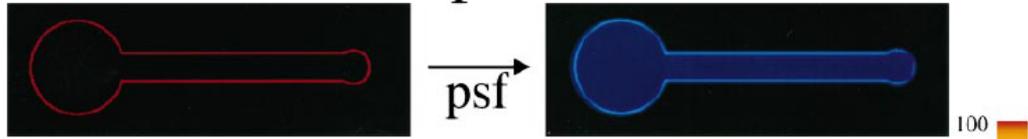


Distribución de las moléculas de la superficie

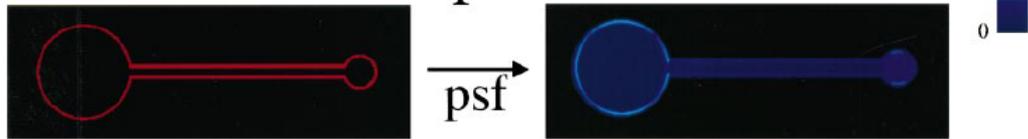
model

blurred model

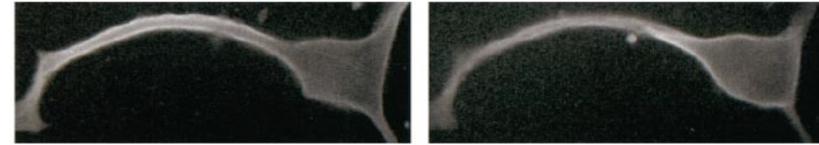
thick process



thin process



— 20 μm



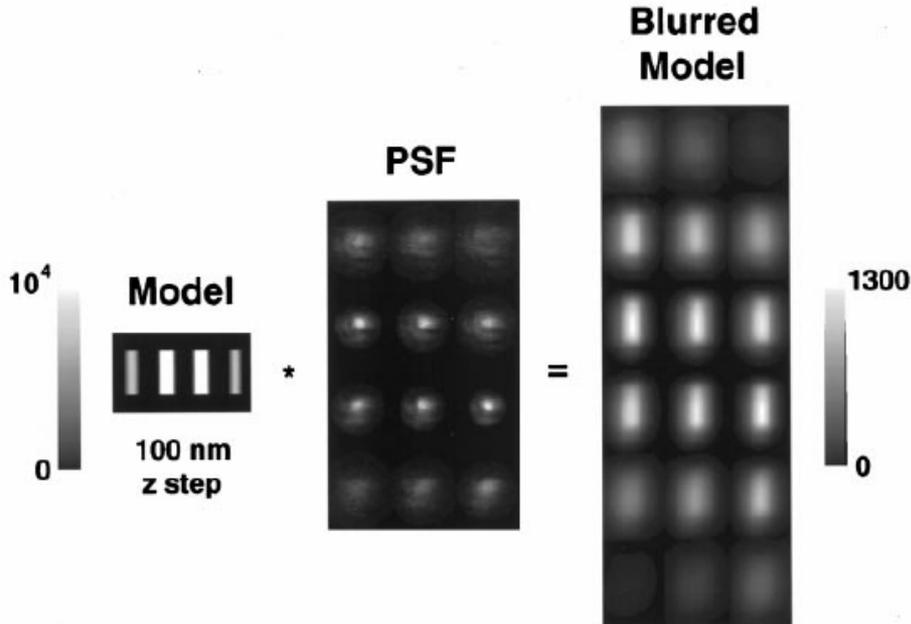
2.5 μm above
coverslip

6 μm above
coverslip

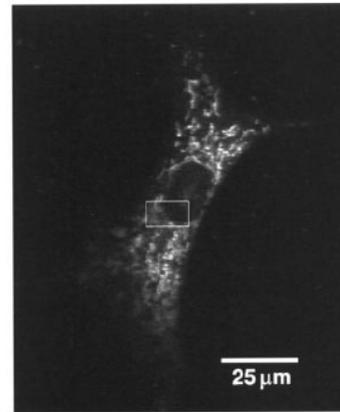
— 20 μm

Potencial de la membrana de una mitocondria individual dentro de una célula viva

NIH 3T3 Cell Model Mitochondrion

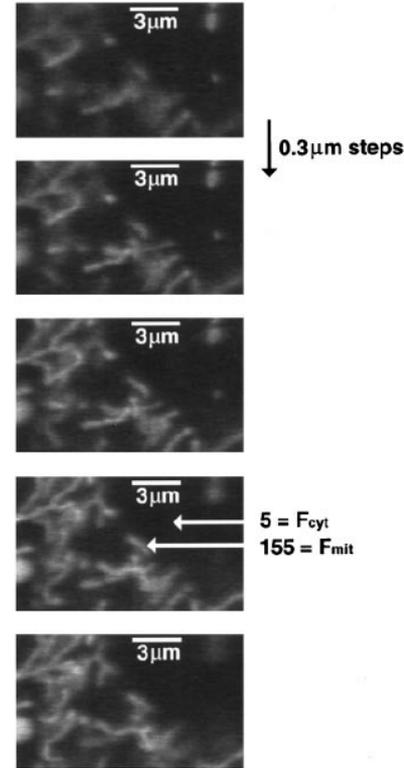


Membrane Potential of Mitochondria in NIH 3T3 Cell



$$V_{mit} = -60 \log \left(\frac{7.6 * 155}{5} \right)$$

$$= -143 \text{ mV}$$



Observaciones del autor

- El microscopio confocal, calibrado con imágenes modeladas y combinadas con PSF, permite conocer la concentración de un marcador intracelular, la distribución de estructuras intracelulares y moléculas, y calcular el potencial de una membrana
- Se desarrolla un sistema para calcular un factor de corrección
- El factor se puede aplicar a imágenes campo amplio.
- Próximos pasos: desarrollar un algoritmo para generar un modelo uniforme basado en las imágenes experimentales.

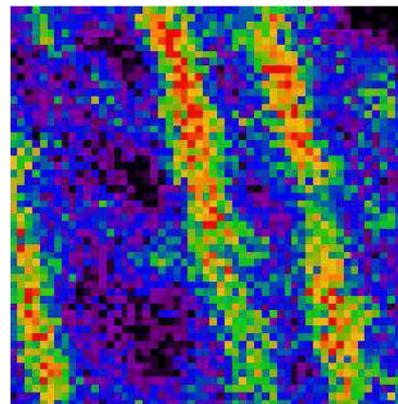
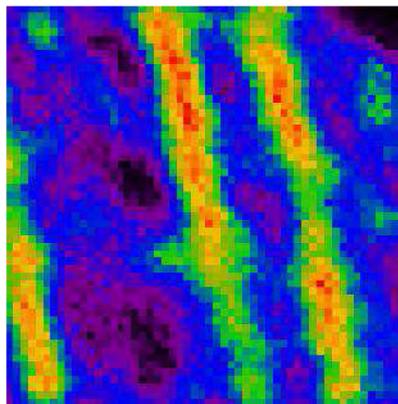
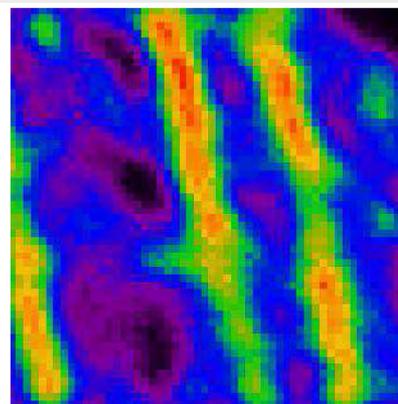
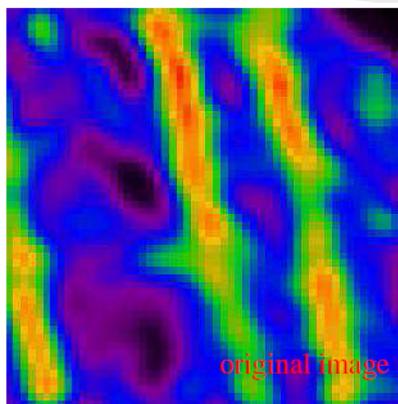
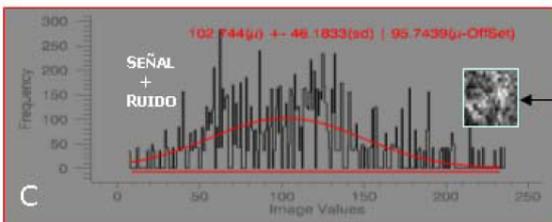
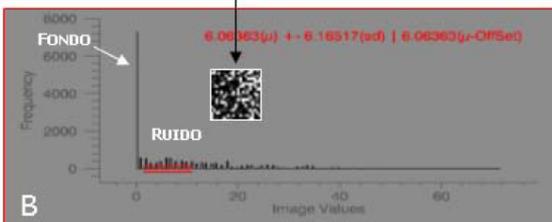
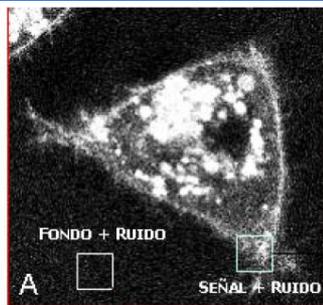
Guía de aplicación profesional Huygens

Huygens Professional User Guide from SVI, S. Härtel, 2004

Características

- ▼ Qué es:
 - ▼ Es un software procesador de imágenes, diseñado para la deconvolución de imágenes microscópicas.
 - ▼ Imágenes 2D de gran angular a imágenes 4D multi canal confocales de dos fotones, o para escanear desde microscopios de disco confocal.
- ▼ Funciones de deconvolución:
 - ▼ Algoritmos de restauración MLE acelerados, optimizados para imágenes de baja luminosidad.
 - ▼ Herramienta de reconstrucción PSF para corregir micro perlas de tamaño finito.

Relación señal/ruido (SNR)

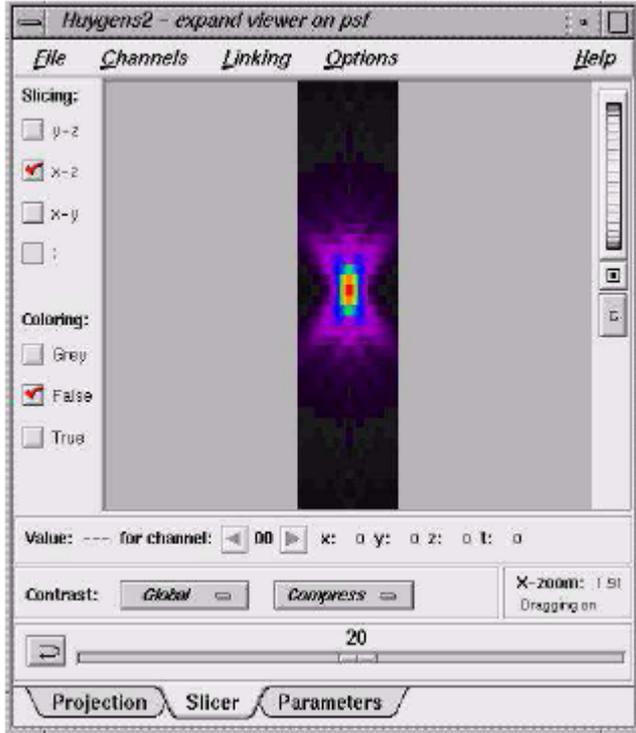


Cuociente señal/ruido (SNR) es un parámetro variable que requiere el sistema de deconvolución, para estimar para cada píxel dentro de la imagen si su contenido corresponde a un evento aleatorio o una señal real.

Diferentes radios de SNR: Original, SNR=30, SNR=15, SNR=5.

Debe ser estimado a partir de la calidad de la imagen.

PSF



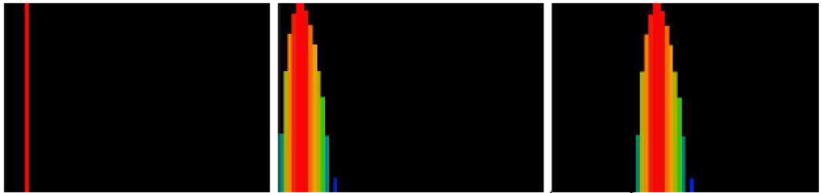
“PSF” es la manera en que se ve un punto del objeto original en la imagen capturada.

Busca calcular la medida de la distorsión en los tres ejes x,y,z.

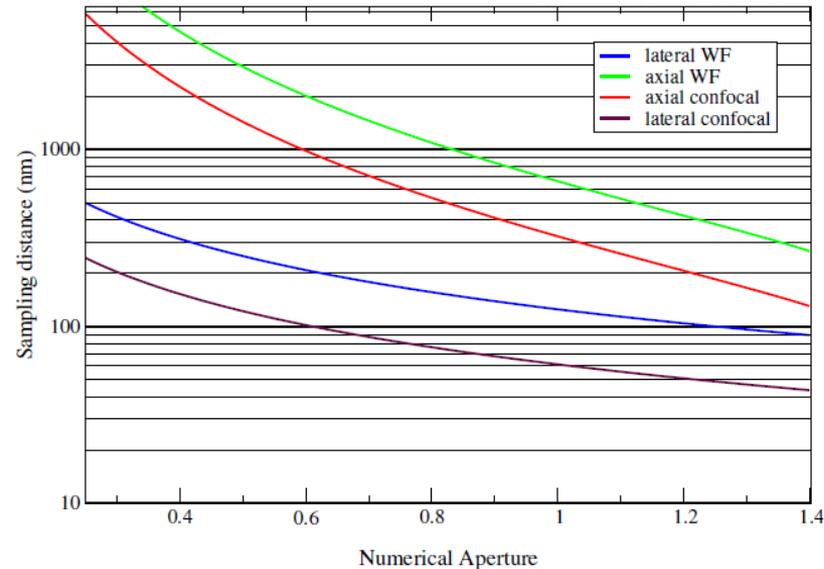
Se usa en el paso final de la deconvolución.

Se determina usando perlas con un diámetro conocido (180 nm) reconstruyendo la PSF desde la imagen de la perla, o calculando una PSF teórica de acuerdo a la información que se tiene de la configuración del microscopio.

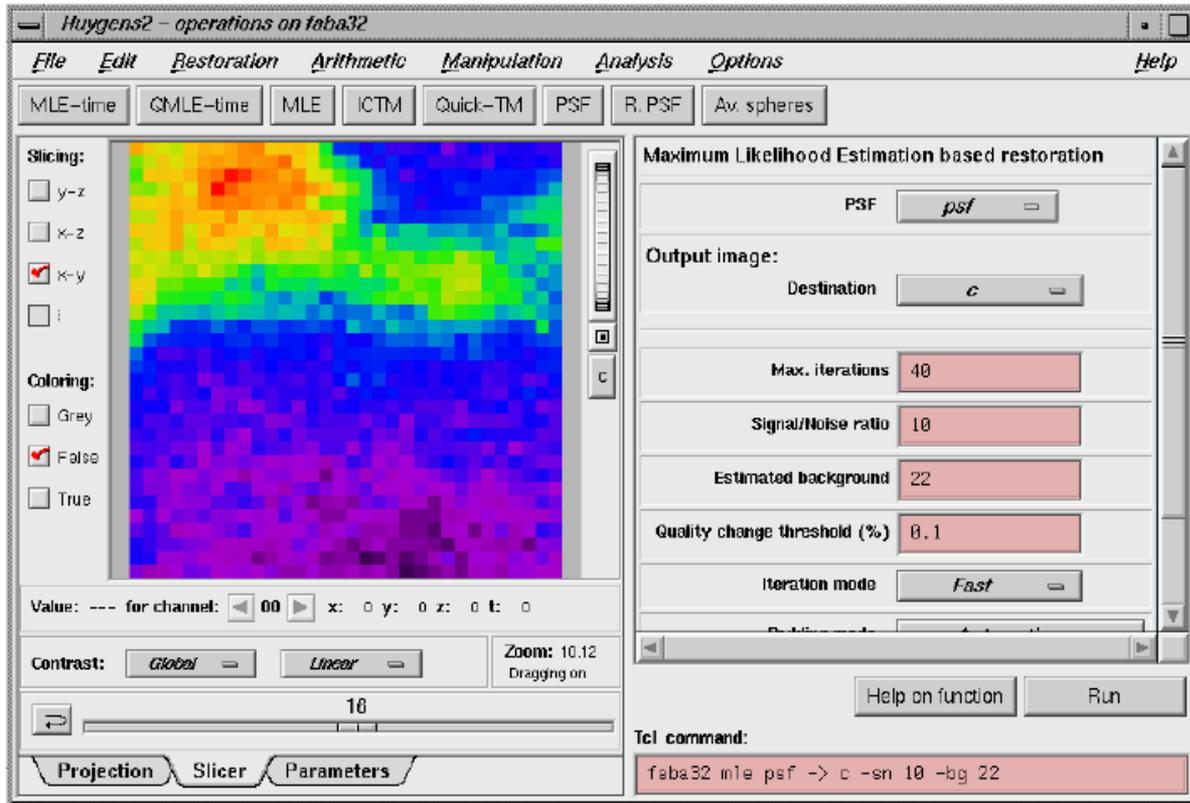
Parámetros de la imagen



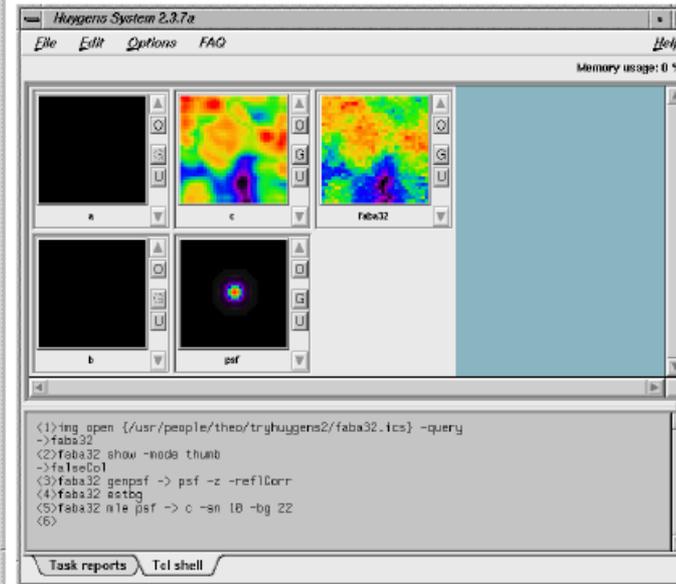
- ▼ Nivel de negro
 - ▼ Reduce el rango dinámico efectivo del microscopio. Es tomado en cuenta automáticamente.
 - ▼ La imagen puede tener un nivel de negro negativo.
- ▼ Densidad de muestreo
 - ▼ Radio de Nyquist
 - ▼ Hay relación entre la distancia y el NA
 - ▼ Confocal: la onda excitadora determina el muestreo.
 - ▼ No afecta el pinhole, pero puede atenuar estructuras finas al límite de la resolución.
 - ▼ Aumentar en 50 %.



Deconvolución



- ▼ Parámetros:
 - ▼ Iteraciones, SNR, fondo, umbral de calidad,...
- ▼ Repetir varias veces.



Observaciones sobre la herramienta

Huygens Pro hace una estimación de calidad de la primera imagen obtenida, determinada por la diferencia entre una imagen “estimada” por la aplicación y la imagen que se está analizando. El factor de calidad afecta las iteraciones efectivas de la deconvolución. Es el principal criterio para detener el proceso de deconvolución.

La calidad de imagen es afectada negativamente por una PFS de mala calidad.

Discusión

El proceso de deconvolución permite procesar las imágenes obtenidas a partir de un microscopio confocal, mejorando la distorsión de la imagen.

El ensayo propuesto tiene múltiples aplicaciones, que ayudan a resolver preguntas de investigación.

Gracias...