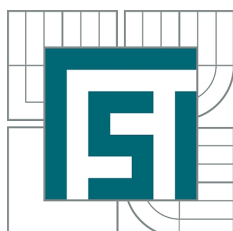


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

DIGITÁLNÍ METODY ZPRACOVÁNÍ TROJROZMĚRNÉHO ZOBRAZENÍ V RENTGENOVÉ TOMOGRAFII A HOLOGRAFICKÉ MIKROSKOPII

THE THREE-DIMENSIONAL DIGITAL IMAGING METHODS FOR X-RAY COMPUTED
TOMOGRAPHY AND DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPY

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. LUKÁŠ KVASNICA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. RADIM CHMELÍK, Ph.D.

BRNO 2015

Abstrakt

Disertační práce se zabývá metodami počítačového zpracování obrazových dat v rentgenové mikrotomografii a v digitální holografické mikroskopii. Práce si klade za cíl dosáhnout optimalizací a využitím masivně paralelních grafických karet (GPU – graphic processing unit) výrazného zrychlení algoritmů jak pro rekonstrukci tomografického zobrazení, tak pro rekonstrukci obrazu v holografické mikroskopii.

V oblasti mikrotomografie předkládá práce nové GPU akcelerované implementace filtrované zpětné projekce a filtrace zpětné projekce derivovaných dat. Dále je představena technika normalizace orientace a vyhodnocení 3D tomografických dat.

V části týkající se holografické mikroskopie je uveden popis jednotlivých kroků celého zpracování obrazu. Je představena nová původní technika navazování a korekce obrazové fáze poškozené výskytem optických vírů v nenavázané obrazové fázi. Následuje popis rychlé GPU implementace metody kompenzace deformací obrazové fáze a techniky trasování buněk. V závěru je krátce představen program Q-PHASE, který je výsledkem spojení všech algoritmů nezbytných jak pro ovládání, tak rekonstrukci obrazu v holografickém mikroskopu.

Summary

This dissertation thesis deals with the methods for processing image data in X-ray microtomography and digital holographic microscopy. The work aims to achieve significant acceleration of algorithms for tomographic reconstruction and image reconstruction in holographic microscopy by means of optimization and the use of massively parallel GPU.

In the field of microtomography, the new GPU (graphic processing unit) accelerated implementations of filtered back projection and back projection filtration of derived data are presented. Another presented algorithm is the orientation normalization technique and evaluation of 3D tomographic data.

In the part related to holographic microscopy, the individual steps of the complete image processing procedure are described. This part introduces the new original technique of phase unwrapping and correction of image phase damaged by the occurrence of optical vortices in the wrapped image phase. The implementation of the methods for the compensation of the phase deformation and for tracking of cells is then described. In conclusion, there is briefly introduced the Q-PHASE software, which is the complete bundle of all the algorithms necessary for the holographic microscope control, and holographic image processing.

Klíčová slova

počítačová tomografie, digitální holografická mikroskopie, kompenzace aberací, navazování fáze, GPU akcelerace, optické víry, konečná inverzní Hilbertova transformace, filtrovaná zpětná projekce

Keywords

computed tomography, digital holographic microscopy, aberration compensation, phase unwrapping, GPU acceleration, optical vortices, finite inverse Hilbert transform, filtered back projection

KVASNICA, L. *Digitální metody zpracování trojrozměrného zobrazení v rentgenové tomografii a holografické mikroskopii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 57 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval v celém rozsahu samostatně pod vedením prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D., a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Ing. Lukáš Kvasnica

Děkuji prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. za vedení a dobré nápady během celého mého studia, stejně jako všem kolegům z Laboratoře optické mikroskopie za skvělou spolupráci při hledání nových cest vědeckého poznání. Nemalé díky patří i mojí snoubence Veronice za trpělivou podporu, stejně jako mojí rodině a kamarádu Aramu Tigramovi.

Ing. Lukáš Kvasnica

OBSAH

1	Úvod	1
1.1	Rentgenová tomografie	1
1.2	Koherencí řízený holografický mikroskop	1
1.3	Cíle dizertační práce	2
2	Počítačová tomografie	3
2.1	Geometrická podstata tomografie	3
2.1.1	Paralelní projekce	4
2.1.2	Vějířová projekce	4
2.1.3	Kuželová projekce	5
2.1.4	Sinogram	6
2.2	Algoritmus Zpětná filtrovaná projekce	7
2.2.1	Zpětná projekce	7
2.2.2	Filtrace	9
2.3	Algoritmus Filtrace zpětné projekce	10
2.4	GPU akcelero vaný algoritmus	11
2.4.1	Popis realizovaného algoritmu FBP	11
2.4.2	Popis realizovaného algoritmu BPF	14
2.4.3	Popis programu	14
2.4.4	Experimentální výsledky	16
2.5	Vyhodnocování tomografických měření kostí	16
2.5.1	Normalizace orientace vzorku	17
2.5.2	Prahování dat	20
2.5.3	Detekce fragmentů	20
2.5.4	3D binární modus filtr	22
2.5.5	Vyhodnocení hranic kostí	22
2.6	Shrnutí výsledků	23
3	Holografická mikroskopie	25
3.1	Koherencí řízený holografický mikroskop	26
3.2	Zpracování obrazu v holografickém mikroskopu	27
3.3	Základní zpracování obrazu	28
3.3.1	Rychlá Fourierova transformace – FFT	28
3.3.2	Detekce nosné frekvence	30
3.3.3	Separace, apodizace a inverzní FFT spektra	31
3.4	Metody navazování fáze	32
3.4.1	Jednoznačnost navazování fáze a fázová rezidua	32
3.4.2	Nejmenší čtverce po blocích – BLS	33
3.4.3	Nejmenší čtverce – LS	34
3.4.4	Vážené nejmenší čtverce – WLS	35
3.4.5	Goldsteinův branch cuts algoritmus	35
3.5	Navazování fáze s korekcí fázových nespojitostí	36
3.5.1	Výchozí metoda navazování	36
3.5.2	Algoritmus korekce fázových nespojitostí	36

3.5.3	Numerické simulace	38
3.5.4	Experimentální ověření	39
3.6	Kompenzace deformací navázané fáze	40
3.7	Segmentace buněk	42
3.7.1	Trasování buněk	44
3.8	Software holografického mikroskopu Q-PHASE	45
3.8.1	GPU akcelerované zpracování obrazu a správa paměti	45
3.9	Shrnutí výsledků	47
Závěr		49
Literatura		51

1. ÚVOD

V průběhu svého doktorského studijního programu jsem se zaměřil především na vývoj a aplikaci algoritmů digitálního zpracování obrazu a 3D digitálního zobrazování. Digitální zpracování obrazu pomocí počítače je v současné době využíváno v každém moderním mikroskopu. Může se jednat o prosté snímání dnes již výhradně digitálními kamerami a následné zobrazování digitálních dat na obrazovce počítače s jednoduchými metodami úpravy histogramu, nebo o komplexní zpracování dat zahrnující různé matematické techniky úpravy původních dat vycházející ze znalosti fyzikální podstaty zobrazovacího zařízení tak, aby bylo dosaženo požadovaného typu a kvality zobrazení. Moji práci lze rozdělit do dvou hlavních podoblastí podle zobrazovacích technik, se kterými jsem mohl pracovat.

1.1. Rentgenová tomografie

Rok studia jsem využil ke stáži na Queen Mary University of London, kde jsem pracoval pod vedením prof. Alana Boyda. Zde jsem se seznámil s počítačovou rentgenovou tomografií (X-ray Computed Tomography), jež byla součástí projektu analýzy působení léků na růst krysích kostí, na němž jsem spolupracoval. Aby bylo možné projekt úspěšně vyřešit, museli jsme s Dr. Zikmundem vyvinout nové algoritmy například pro polohovou úpravu tomografických rekonstrukcí. Měřené kosti měly při vložení do tomografu velmi často nepřesně definované polohy, a proto jsme vytvořili postup a program pro jejich posunutí a rotaci tak, aby bylo možné následné vzájemné porovnávání tomografických obrazů jednotlivých kostí. Výsledky zpracování byly prezentovány na konferencích [1, 2].

Současně bylo nutno podstatně zrychlit prováděné výpočty, neboť objem zpracovávaných dat byl velký a čas na jejich zpracování byl omezený. Proto jsem některé procedury vyvinul jako paralelní, jejichž výpočet se velmi urychlil využitím grafické karty.

Při zpracovávání výsledků projektu se ukázalo také nezbytné využít získaných znalostí tomografických principů k vyvinutí rekonstrukčního algoritmu pro výpočet tomografických řezů akcelerovaného pomocí paralelního výpočtu na grafické kartě. Úspěšně jsem dokončil a ověřil dva typy algoritmů, z nichž jeden je nyní používán v tomografické laboratoři na Queen Mary University of London.

Na základě dosažených výsledků mi bylo umožněno prodloužení pobytu na univerzitě o dalšího půl roku na náklady Queen Mary University of London. V prodloužené době jsem se věnoval optimalizaci rekonstrukčních algoritmů pro tomografii a dokončení projektu analýzy krysích kostí.

Podrobnosti o provedeném výzkumu a výsledcích jsou pojednány v kapitole 2.

1.2. Koherencí řízený holografický mikroskop

Při studiu na VUT v Brně, Fakultě strojínského inženýrství, jsem se věnoval vývoji algoritmů pro zpracování obrazu a ovládání reflexní a transmisní verze koherencí řízeného holografického mikroskopu. V současné době, již jako zaměstnanec společnosti TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., pokračuji stále ve vývoji softwaru s názvem Q-PHASE pro ovládání a rekonstrukce obrazu z těchto mikroskopů. Pro účely digitální holografické mikroskopie jsem navrhl a implementoval celou řadu algoritmů. Na základě práce Ing. Tomáše Zikmunda,

Ph.D. jsem úspěšně implementoval algoritmus vyrovnávání zakřiveného pozadí rekonstruované fáze [3, 4]. Následně jsem vyvinul a implementoval algoritmus pro segmentaci a selekci buněk v obraze a jejich trasování v reálném čase. Výsledkům dosaženým v oblasti zpracování obrazu na tomto mikroskopu se věnuji v kapitole 3.

1.3. Cíle dizertační práce

Cíle dizertační práce byly v průběhu mého studia částečně modifikovány a doplněny v souvislosti s dlouhodobým zahraničním pobytem a spoluprací na projektu, který vedl prof. Alan Boyde. Současné cíle jsou:

1. Optimalizovat algoritmy pro tomografickou rekonstrukci k dosažení rekonstrukčních časů dostatečně krátkých ve srovnání s délkou trvání tomografického skenování a navrhnout algoritmy pro vyhodnocení pozorovaných vzorků.
2. Kompletně vyvinout software pro snímání hologramu v digitálním holografickém mikroskopu, zpracování rekonstrukce a vyhodnocování rekonstruovaného obrazu v modifikaci pro reflexní a transmisní CCHM. Implementovat algoritmy pro analýzu biologických objektů.

2. POČÍTAČOVÁ TOMOGRAFIE

Počítačová tomografie (CT – Computed Tomography) je metoda umožňující nedestruktivní zobrazení řezů objektem za pomoci rentgenových měření provedených při různých úhlech natočení objektu. Vynález tomografie měl velký dopad na diagnostickou medicínu a stejně tak v průmyslu na nedestruktivní zobrazování vnitřní struktury objektů. První počítačový tomograf sestavil a nechal si patentovat v roce 1972 anglický inženýr Godfrey N. Hounsfield [5]. Později v roce 1974 sestavil celotělový tomograf ACTA. V roce 1979 získal Nobelovu cenu za medicínu společně s Allanem M. Cormackem, který se zasloužil o matematický aparát pro tomografii. Ačkoliv čistě matematicky pro speciální případ byla úloha tomografické rekonstrukce vyřešena již v roce 1917 (Johann Radon, Radonova transformace a inverzní Radonova transformace [6]), prakticky použitelná se stala teprve s příchodem počítačů a nových výpočetních metod.

S počítačovou tomografií jsem se seznámil na studijní stáži v Londýně na Queen Mary University of London. Věnoval jsem se tomografickému zobrazování vzorků krysích kostí a následné obrazové analýze. Samozřejmě součástí mé práce bylo i porozumět principům funkce komerčního tomografu ScanCo Medical μ CT40 [7] a stejně tak i rekonstrukčním metodám.

Na stejném oddělení jsme se také mohli seznámit s unikátním systémem tomografie, který netrpí kruhovými artefakty, což je běžný neduh moderních tomografů. Autorem těchto tomografů je Dr. Graham Davis [8]. Tyto artefakty vznikají jako důsledek rozdílných citlivostí jednotlivých pixelů plošného snímače a v uvedeném typu tomografu jsou eliminovány díky časově integrovanému vyčítání z řádků detektoru (TDI – Time Delay Integration). Současně s tímto systémem je tomograf optimalizován na přesné určení hustoty zkoumaného vzorku.

V případě, že na mikrotomografu sledujeme větší objekty (např. zuby) a současně se snažíme o rozumné rozlišení v řádu mikrometrů, je velikost získaného souboru naměřených dat v řádech jednotek až desítek GiB ($1 \text{ GiB} = 2^{30} \text{ Bytes}$). Výpočetní čas potřebný ke zpracování takto velkého objemu dat je v běžných podmínkách enormní. Jedním z cílů se tedy stalo vyvinout výpočetní algoritmus, který by využil velkého výpočetního výkonu moderních grafických karet (GPU – Graphic Processing Unit) a umožnil rychlejší zpracování velkého množství dat. Dostupné akcelerované tomografické rekonstrukce byly omezeny především velikostí paměti GPU [9, 10] a pro větší objemy dat je nebylo možno použít.

Při analýze výsledků projektu měření krysích kostí se objevila potřeba definovat polohu kosti v obraze. Vyvinul jsem proto algoritmus založený na prahování obrazu a následném použití 3D modus filtru, který byl v detekci kostí poměrně úspěšný. Více se tomuto tématu věnuji v části 2.5.

2.1. Geometrická podstata tomografie

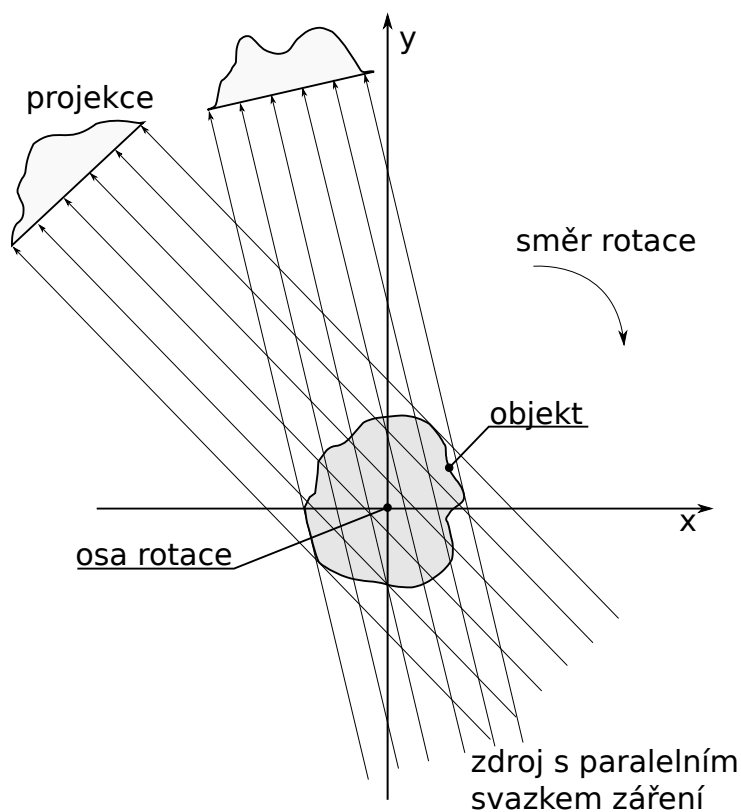
Geometrická podstata tomografie spočívá v získání sady projekcí zkoumaného vzorku pod různými úhly kolem zvolené osy rotace nejčastěji po kruhové trajektorii. Matematickými metodami lze z projekcí rekonstruovat rovinný řez vzorkem. Přesnost rekonstrukce závisí na počtu projekcí a rozlišení detektoru, zároveň je nutné zabezpečit přesně definovanou polohu vzorku. Podle typu použitého svazku lze tomografy rozdělit do tří skupin:

- paralelní projekce, obr. 2.1 (parallel beam),
- vějířová projekce, obr. 2.2 (fan beam),
- kuželová projekce, obr. 2.3 (cone beam).

2.1.1. Paralelní projekce

Paralelní projekce (viz obr. 2.1) je teoreticky nejjednodušší variantou a rekonstrukce takto získaných dat je velmi jednoduchá. Často se ostatní projekce přepočítávají na paralelní projekci (resortovací algoritmy [11], str. 92) a teprve potom se provádí rekonstrukce. Problém paralelní projekce spočívá v její technické realizaci. Je velmi obtížné vytvořit paralelní svazek rentgenového záření o dostatečné šířce tak, aby pokryl celý vzorek ve všech natočeních. Jinou možností je provádět měření pomocí bodového zdroje záření a bodového detektoru, tato metoda je ale velmi časově náročná. Paralelní projekce se proto obvykle nepoužívá.

Tomografická rekonstrukce z paralelních projekcí je řešitelná pomocí inverzní Radonovy transformace [6]. Rekonstrukce je z hlediska matematické teorie přesná, čímž se myslí, že rekonstruovaný řez není ovlivněn průměty z jiných rovin [11].

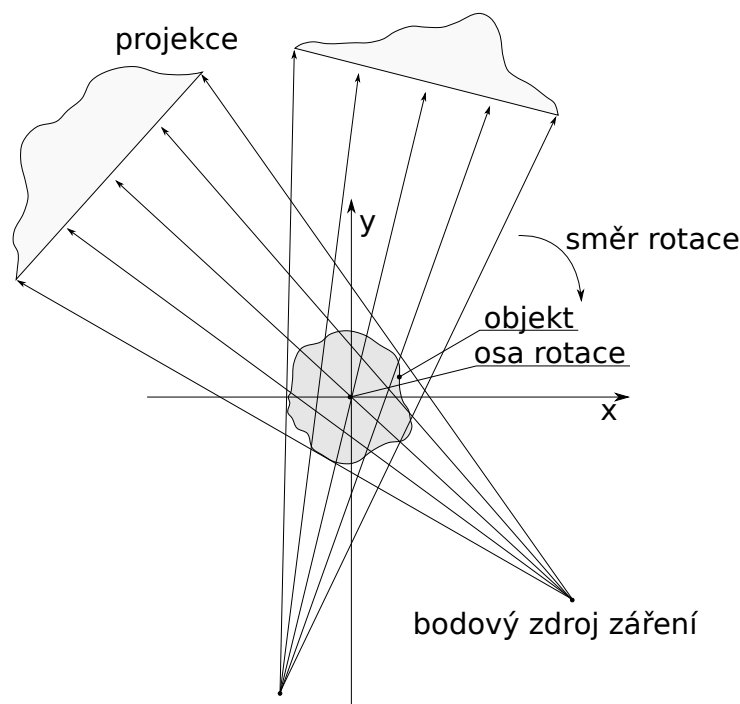


Obrázek 2.1: Paralelní tomografická projekce.

2.1.2. Vějířová projekce

Vějířová projekce (viz obr. 2.2) využívá bodového zdroje záření s divergentním svazkem a pole detektorů. Na rozdíl od paralelního uspořádání má několik výhod. První je pole detektorů, jež je obvykle tvořeno scintilátorem a CCD snímačem v případě rovinného detektoru, nebo polem diskrétních detektorů uložených na kružnici. Pro mikrotomografy

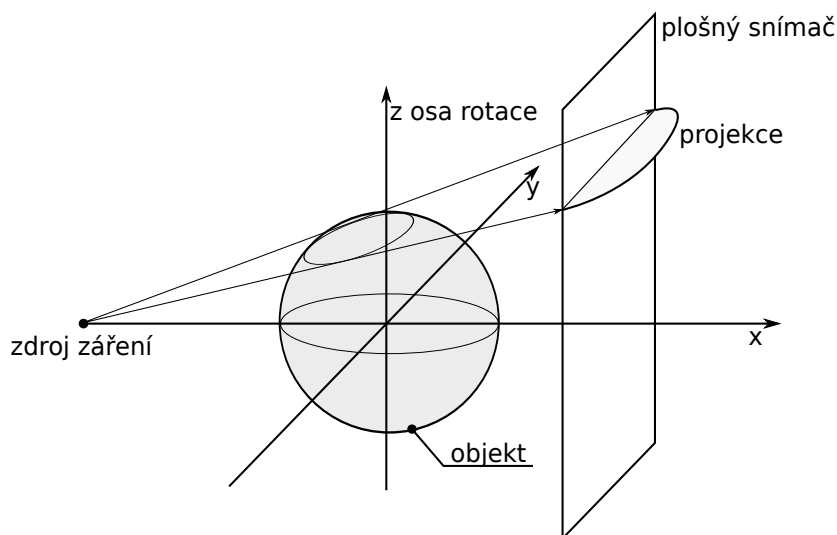
je obvyklejší rovinný detektor. V medicínských tomografech je vzhledem k velikosti častěji detektor zakřivený. V obou případech se jedná o jednořádkové detektory. Velkou výhodou je ovšem divergentní rentgenový svazek, neboť jím získáváme určité zvětšení. Čím blíže je vzorek ke zdroji záření, tím je projekce větší. Hlavní nevýhodou je tedy, že pro každý řez vzorkem je nutná jedna rotace tomografu. Rekonstrukce se řeší vhodným algoritmem a je stejně jako u paralelní projekce matematicky přesná [11].



Obrázek 2.2: Vějířová tomografická projekce.

2.1.3. Kuželová projekce

Kuželová projekce (viz obr. 2.3) je přechodem vějířové do tří rozměrů. Stejně jako u vějířové projekce mohou být použity dva typy detektorů, rovinné a sféricky zakřivené. Zdroj záření je bodový a signál se snímá plošným detektorem. Jedná se o nejrozšířenější uspořádání, se kterým je možné v jedné rotaci provést rekonstrukci mnoha řezů současně. V tomto případě závisí přesnost rekonstrukčního algoritmu také na trajektorii, po které se pohybuje soustava zdroj-detektor. V případě, že trajektorie je kruhová, je rekonstrukce matematicky přesná pouze z projekcí ležících v ploše definované trajektorií (zde je algoritmus shodný s vějířovou projekcí). Okolní rekonstruované řezy jsou pouze aproximací. Nicméně, pokud jako trajektorii zvolíme například spirálu (rotace zdroje-detektoru a současný posun vzorku po ose z), je možné provést přesnou rekonstrukci i s tímto uspořádáním. Matematický popis kuželové rekonstrukce po obecné křivce je uveden v [12]. S tomografem tohoto typu [7] jsem pracoval na QMUL.



Obrázek 2.3: Kuželová tomografická projekce.

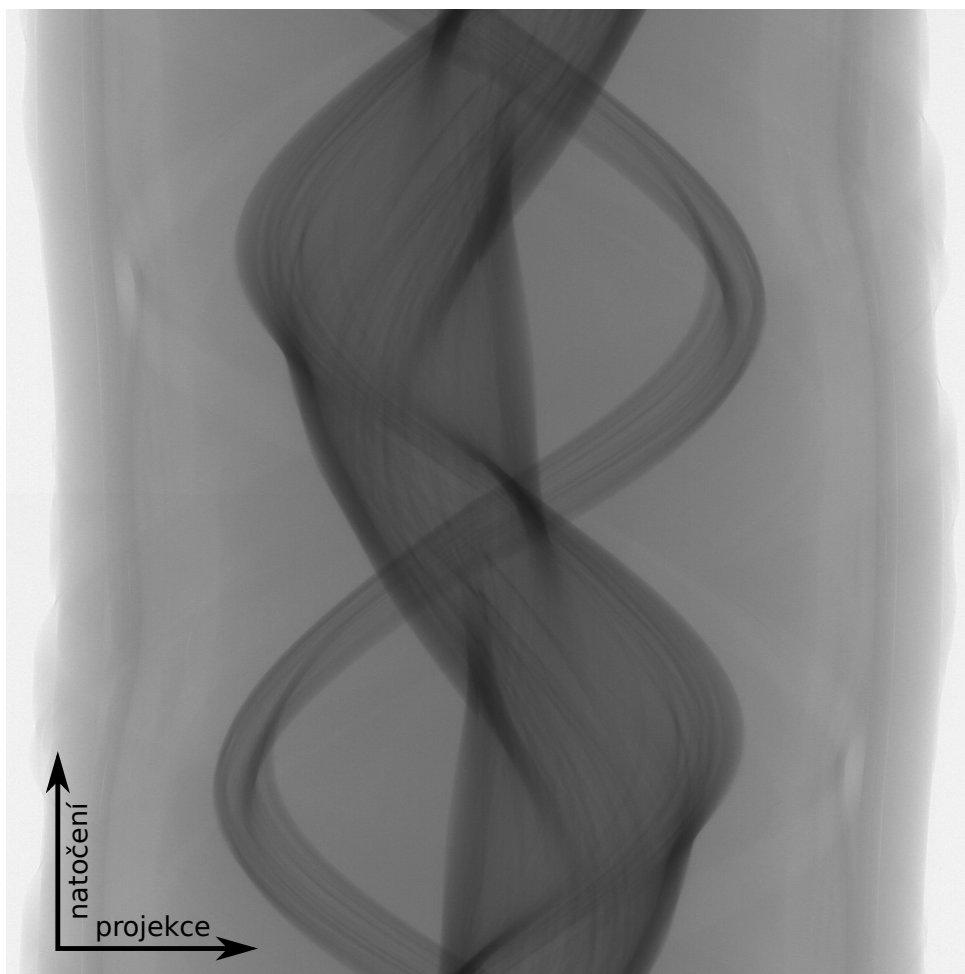
2.1.4. Sinogram

Sinogram (obr. 2.4) je způsob zobrazení naměřených tomografických dat (projekcí). Jedná se o 2D zobrazení naměřených dat tak, že každý řádek v sinogramu odpovídá projekci téhož tomografického řezu v jiném úhlu natočení. Na sinogramech jsou obvykle viditelné sinusové křivky vytvořené rotací vzorku a jeho částí kolem osy.

Při tomografických měřeních je snímána intenzita záření, které projde skenovaným vzorkem. Od tomografických rekonstrukcí ale očekáváme zobrazení rozložení hustoty ve zkoumaném vzorku. Vztah mezi hodnotou naměřené intenzity po průchodu vzorkem a hustotou vzorku je dán pomocí Lambertova-Beerova absorpčního zákona. Hustota materiálu je přímo závislá na jeho absorbanci (útlumu) A rentgenového záření, a proto je tedy nejprve nezbytné převést naměřená data z hodnot intenzity na hodnoty útlumu. Dle Lambertova-Beerova absorpčního zákona platí, že

$$A = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right),$$

kde A je absorbance, I je hodnota detekované intenzity a I_0 je hodnota intenzity zdroje. Na obrázku 2.4 je vidět sinogram jako záznam intenzity prošlého záření, místa s největším útlumem jsou nejtmavší. Před tomografickou rekonstrukcí je tedy nezbytné upravit surová data výše popsaným způsobem.



Obrázek 2.4: Sinogram.

2.2. Algoritmus Zpětná filtrovaná projekce

Zpětná filtrovaná projekce (FBP – Filtered Back Projection) je algoritmem nejčastěji používaným k výpočtu tomografických rekonstrukcí. Rekonstrukční metoda se obecně skládá ze dvou hlavních částí. V první části se provádí filtrace projekcí a ve druhé samotná zpětná projekce filtrovaných dat. Obě procedury vysvětlíme v následujícím textu. Abychom mohli tento algoritmus použít, musí mít detektor takovou šířku (v případě kuželové projekce plošný, u vějířové projekce řádkový), aby zaznamenal kompletní projekci celé šíře vzorku v každém úhlu otočení. Obvykle se snímá přes celé otočení vzorku o úhel 2π rad, ale existují i algoritmy dovolující menší úhel otočení ([11], str. 93).

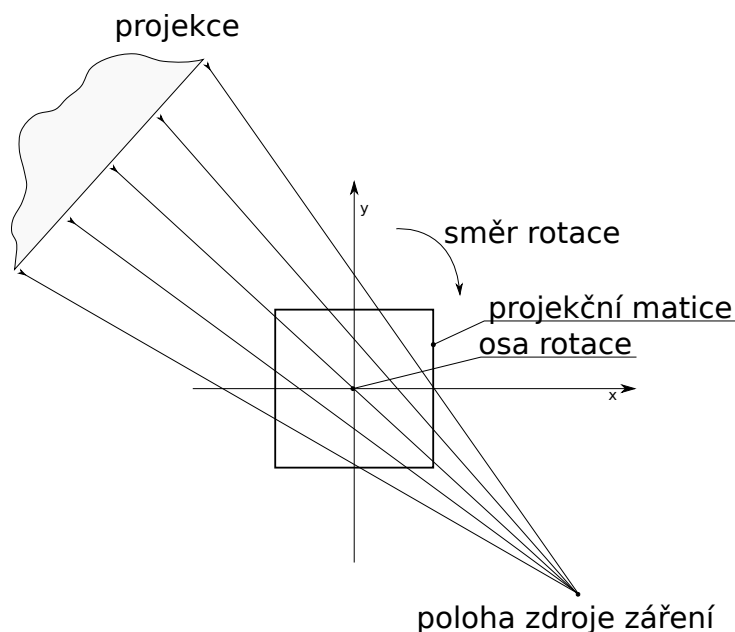
2.2.1. Zpětná projekce

Na základě fyzického uspořádání tomografu je zvolen odpovídající algoritmus zpětné projekce. Jak bylo popsáno v předešlých kapitolách, existuje celá řada způsobů, jak snímat tomografická data. Tyto způsoby se vzájemně liší v geometrickém uspořádání soustavy zdroj-detektor a v použité skenovací trajektorii. Zpětná projekce je v podstatě opačným procesem ke snímání dat v tomografu. Máme-li např. vějířový tomograf a známe-li jeho geometrii snímání (vzdálenosti zdroj - osa rotace - detektor, typ, rozměry a rozlišení

detektoru, počet úhlů natočení), provedeme zpětnou projekci v jednom úhlu natočení následovně:

1. Ve zvoleném souřadnicovém systému umístíme do osy rotace 2D projekční matici, která reprezentuje budoucí tomografickou rekonstrukci (viz obr. 2.5).
2. Ze známé geometrie tomografu stanovíme přímkové projekční paprsky směřující z pixelů detektoru do místa původní polohy zdroje.
3. Hodnota intenzity naměřená určitým pixelem detektoru je přičtena do všech prvků projekční matice, které protne projekční paprsek.

Celková zpětná projekce je následně součtem všech takto promítnutých dílčích zpětných projekcí z jednotlivých úhlů natočení.

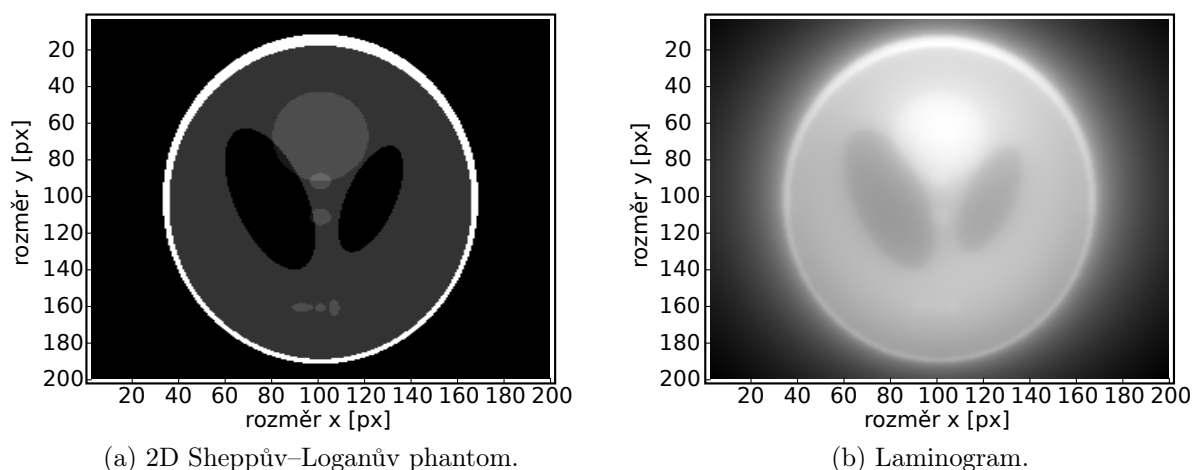


Obrázek 2.5: Zpětná projekce vějířové tomografie.

Testování rekonstrukčních algoritmů se v tomografii provádí na testovacích objektech (tzv. phantoms, např. Shepp–Logan phantom [13]), které mají přesně definované rozložení hmoty (obr. 2.6(a)). Po nasnímání testovacího objektu se provádí tomografická rekonstrukce a testování shody rekonstrukce a objektu.

V případě, že bychom provedli pouze zpětnou projekci bez filtrace vstupních dat, výsledný obraz by byl rozmazaný (viz obr. 2.7(b)) a ve středu rekonstrukce by byla velmi vysoká hodnota jako důsledek překrývání všech jednotlivých projekcí ve středu rotace, jedná se o tzv. laminogram.

Vznik laminogramu si lze také odvodit z věty o Fourierově transformaci průmětu. Jelikož Fourierova transformace projekce je řezem Fourierovou transformací objektu rovinou kolmou ke směru promítání a procházející nultou prostorovou frekvencí, lze rekonstrukci teoreticky provést součtem všech dílčích spekter projekcí. Ve výsledném spektru je ovšem nultá prostorová frekvence zastoupena příspěvkem od spektra každé projekce, zatímco nejvyšší frekvence mohou být zastoupeny výrazně méně. To způsobuje, že ve výsledné rekonstrukci jsou zvýrazněny nízké prostorové frekvence, obraz je tedy neostří. Podrobný popis algoritmu zpětné projekce je v publikaci [11].

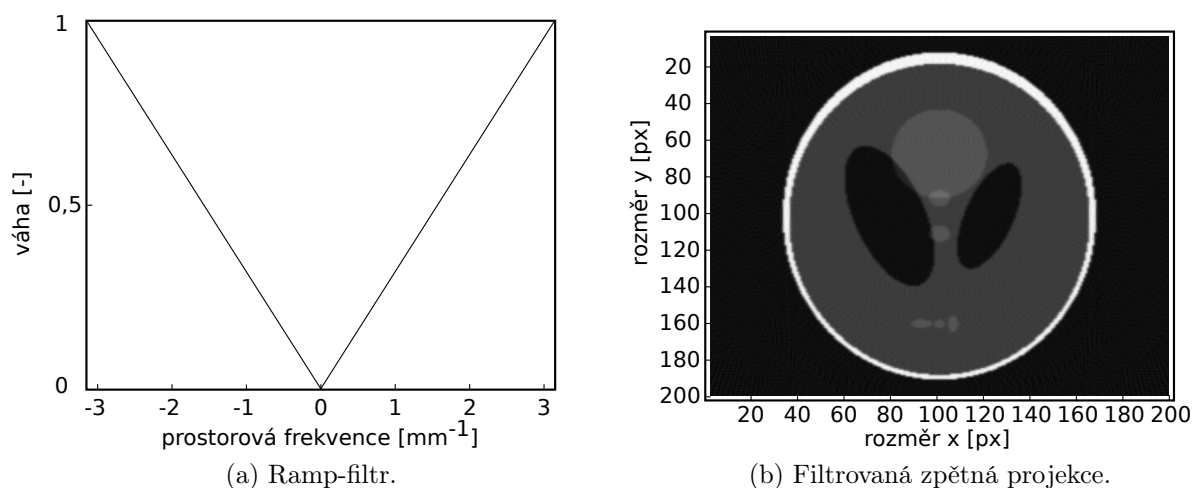


Obrázek 2.6: Testovací 2D objekt a jeho laminogram (nefiltrovaná zpětná projekce).

2.2.2. Filtrace

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, pouhou zpětnou projekcí tomografických dat získáme laminogram. Abychom získali ostrý rekonstruovaný obraz (viz obr. 2.7(b)), je nezbytné zavést filtraci dat, která potlačí nízké prostorové frekvence ve spektru rekonstrukce.

V sinogramu filtrujeme jednotlivé řádky (projekce) nezávisle. Filtraci provádíme obvykle ve frekvenční oblasti, kde jako filtrační funkci volíme tzv. ramp filtr (obr. 2.7(a)), který potlačuje nízké prostorové frekvence ([11], str. 72). V prostorové oblasti má filtrace za následek vznik záporných hodnot ve filtrovaných datech, což vede ke vzniku nejen konstruktivní, ale i destruktivní interference při zpětné projekci.



Obrázek 2.7: Ramp-filtr a filtrovaná zpětná projekce 2D Sheppova–Loganova phantomu.

2.3. Algoritmus Filtrace zpětné projekce

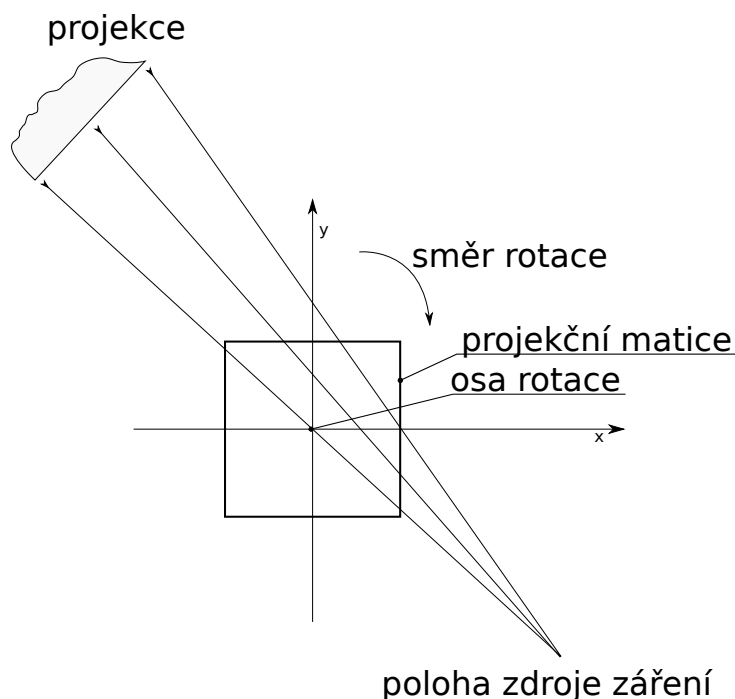
Filtrace zpětné projekce (BPF – Back Projected Filtration) je na rozdíl od FBP algoritmu poměrně nový algoritmus, jehož nezbytnou součástí je konečná inverzní Hilbertova transformace (IHT) [14]. Algoritmus BPF [15] lze rozdělit na tři základní části:

1. Nejprve se spočtou numerické derivace tomografických projekcí (jako alternativa k filtraci u FBP algoritmu [16]), které obraz převedou do Hilbertova prostoru.
2. Následuje zpětná projekce do 2D projekční matice (stejně jako u FBP algoritmu), kde vzniká Hilbertův obraz tomografického řezu (viz obr. 2.8).
3. V posledním kroku se na 2D projekční matici aplikuje 1D IHT samostatně na každý řádek matice.

Tento algoritmus má oproti FBP dvě hlavní výhody:

1. Pro výpočet rekonstrukce není třeba snímat celý průmět vzorku. Toho se obvykle využívá tak, že detektor je umístěn asymetricky vůči ose rotace a snímá se jen polovina vzorku při otočení o úhel 2π rad. Při zachování rozměrů detektoru srovnatelných s detektorem nezbytným pro algoritmus FBP získáme výrazně větší tomografickou rekonstrukci, nebo naopak při stejné velikosti tomografické rekonstrukce jako u FBP algoritmu můžeme snížit množství nasnímaných dat na polovinu.
2. Vlastnosti algoritmu BFP umožňují určit rozsah, ve kterém je nezbytné provést tomografické skenování tak, aby bylo možné provést jen částečnou tomografickou rekonstrukci v oblasti zájmu [14].

Nevýhodou je komplikovanější výpočet konečné inverzní Hilbertovy transformace.



Obrázek 2.8: Zpětná projekce vějířové tomografie s asymetricky umístěným detektorem.

2.4. GPU akcelerovaný algoritmus

Většina algoritmů pro tomografické rekonstrukce obsahuje v nějaké podobě zpětnou projekci dat, jak je popsána výše v části 2.2.1. Tato část rekonstrukce je obvykle nejvíce náročná na výpočetní výkon počítače. V případě trojrozměrné tomografické rekonstrukce se vždy počítá mnoho řezů současně a zatížení počítače je tak ještě větší.

Při vývoji rekonstrukčního algoritmu jsem vycházel z dobře známých a popsaných algoritmů FBP [11] a BPF [15, 17, 18]. Zásadním požadavkem bylo výrazné zrychlení výpočtu. Cílem bylo uvést algoritmus do stavu, ve kterém bude dobře použitelný současně k výpočtům velkých objemů dat a zároveň k využití GPU. Ačkoliv implementace publikované v [9, 10] jsou obecně o něco rychlejší, je objem počítaných dat omezen velikostí operační paměti grafické karty. Mnou navržené algoritmy toto omezení nemají a je možné je upravit na využití více GPU současně. Vzhledem k tomu, že výpočty všech pixelů jsou na sobě zcela nezávislé a přitom využívají stejná vstupní data, je možné dobře výpočet paralelizovat.

Na začátku vývoje algoritmu jsem musel zvolit způsob programování GPU. K dispozici byly tři možnosti:

1. AMD FireStream – řešení paralelních výpočtů na GPU výrobce AMD (dříve ATI), jehož podpora v době mé stáže právě zanikala (2006 - 2012).
2. NVidia CUDA (Compute Unified Device Architecture [19]) – paralelní výpočty pro grafické karty NVidia s velmi dobrou podporou a stále ve vývoji.
3. OpenCL (Open Computing Language [20]) – knihovna pro heterogenní programování (GPU i CPU), podporuje většinu moderních grafických karet a procesorů. V době, když jsem se rozhodoval, kterou knihovnu použít, neměla tato knihovna příliš dobrou dokumentaci.

Z těchto možností se nakonec nejlépe jevila knihovna NVidia CUDA v kombinaci s programovacím jazykem C++, zejména protože měla nejlepší dokumentaci, současně mnoho hotových rozšíření (např. hotovou implementaci FFT–Fast Fourier transform) a v neposlední řadě jsem měl k dispozici novou grafickou kartu nVidia Quadro 6000. Ačkoliv je tato karta osazena čtrnácti multiprocesory, z nichž každý dokáže současně pracovat na výpočtu až 1536 sumací, je výpočet jedné sumy na GPU o něco pomalejší než na běžném CPU, převážně proto, že zpětná projekce vyžaduje mnoho přístupů do globální paměti grafické karty.

V průběhu stáže na QMUL jsem realizoval oba výše zmíněné algoritmy (viz části 2.2 a 2.3). FBP algoritmus je v současné době používán k výpočtům tomografických rekonstrukcí na QMUL. Druhý algoritmus jsem dokončil před odjezdem z UK a byl několikrát použit pro urychlení výpočtu rekonstrukcí ze stolního tomografu ScanCo Medical [7]. O případném komerčním využití algoritmu jsme zahájili komunikaci se společností ScanCo Medical.

2.4.1. Popis realizovaného algoritmu FBP

Při realizaci implementace algoritmu se v první řadě musel brát zřetel na objem zpracovávaných dat. Nezřídka se stávalo, že velikost souboru obsahující nasnímané projekce se pohybovala i kolem 30 GiB. V případech, že je velikost zpracovávaných dat větší než

limit 32bitových architektur 4 GiB, je výhodné použít architekturu 64bitovou, která toto omezení nemá. Zároveň je nutné dbát na pořadí provádění výpočtů a definici všech proměnných, neboť v C++ jsou výpočty obvykle 32bitové.

Ačkoliv nejsme v 64bitovém systému omezení adresovatelnou pamětí, stále zůstává omezení dané v počítači fyzicky nainstalovanou pamětí, a to jak operační pamětí RAM, tak i pamětí na grafickém procesoru GPU. Implementaci algoritmu je tedy nutné optimalizovat tak, aby dokázala inteligentně zpracovávat i soubory projekcí mnohem větší než je velikost operační i grafické paměti. Výpočty byly prováděny se základní přesností (Single-precision floating-point format neboli float), jak je definována v [21]. Na obrázku 2.9 je znázorněno uspořádání implementace rekonstrukčního algoritmu.

Vstupními parametry jsou:

- velikost RAM GPU,
- velikost a počet sinogramů (šířka sx a výška sz detektoru a počet natočení N_φ),
- zvolená velikost rekonstrukce (rx, ry, rz),
- počet současně rekonstruovaných tomografických řezů ($slicesPerBlock$),
- velikost dostupné paměti GPU ($mGPUAvailable$),
- parametry tomografu a geometrie snímání.

Zjednodušeně lze provést rozdělení sinogramů následujícím způsobem. Nejprve je vypočtena velikost obsazené paměti jedné tomografické projekce $mProjection$ na základě velikosti detektoru sx, sz a velikosti paměťového typu použitého pro výpočty $SIZEOF(float)$. Podobně se vypočte i velikost jednoho sinogramu $mSinogram$, celková velikost všech sinogramů $mSinograms$, velikost rekonstrukce $mReconst$ a velikost bloku částečné rekonstrukce $mReconstBlock$,

$$\begin{aligned} mProjection &= sx \cdot sz \cdot SIZEOF(float), \\ mSinogram &= sx \cdot N_\varphi \cdot SIZEOF(float), \\ mSinograms &= mSinogram \cdot sz, \\ mReconst &= rx \cdot ry \cdot rz \cdot SIZEOF(float), \\ mReconstBlock &= rx \cdot ry \cdot slicesPerBlock \cdot SIZEOF(float). \end{aligned}$$

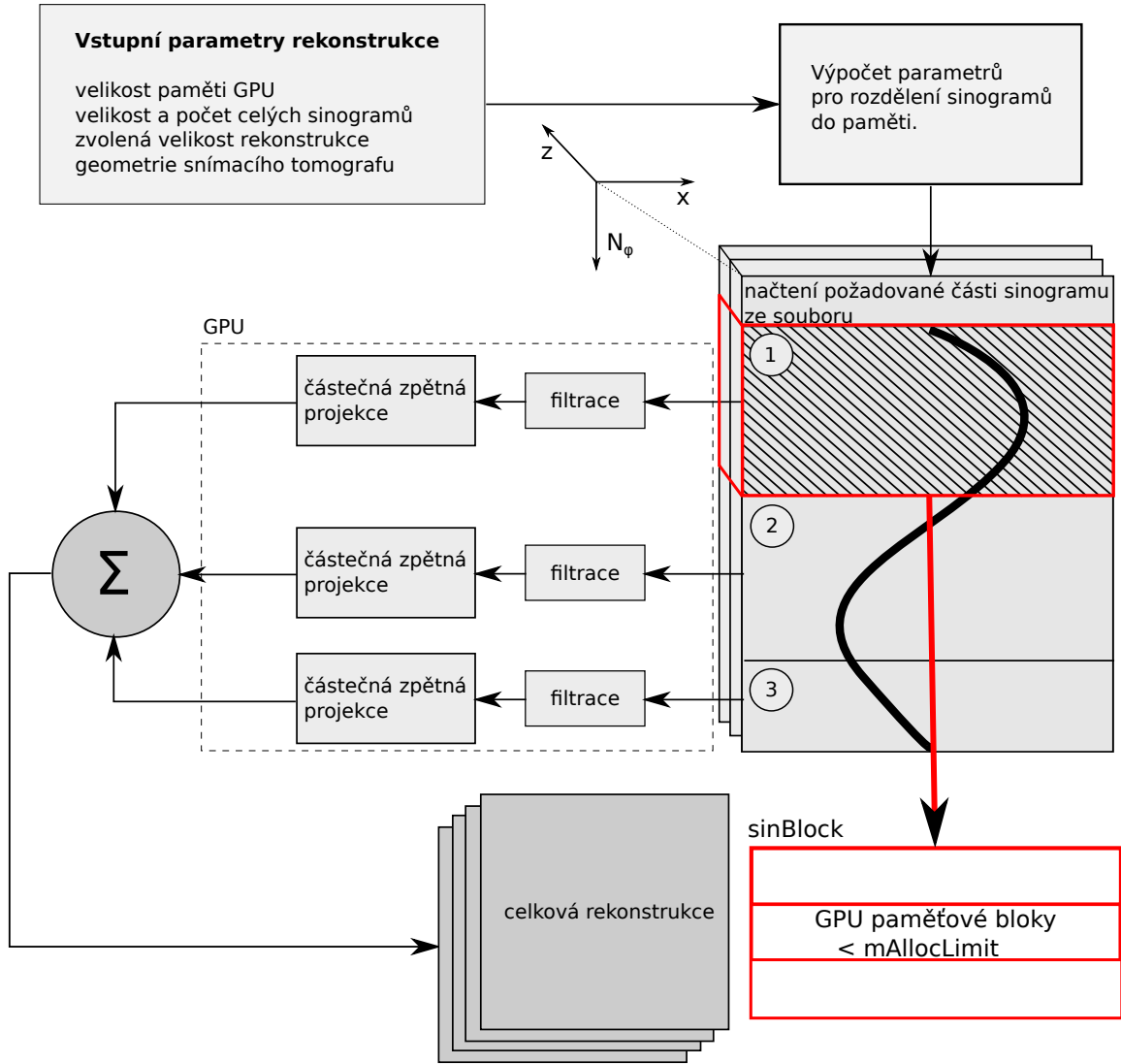
Na základě znalosti dostupné paměti GPU $mGPUAvailable$ a paměti zabrané v GPU částečnou zpětnou projekcí je vypočtena paměť GPU dostupná $mGPULimit$ pro vstupní data – sinogramy,

$$mGPULimit = mGPUAvailable - mReconstBlock.$$

Počet bloků částečné zpětné projekce $sinBlocks$, na které je nutno sinogramy rozložit, se spočte jako poměr celkové velikosti sinogramů a velikosti dostupné paměti GPU,

$$sinBlocks = \frac{mSinograms}{mGPULimit}.$$

Oproti zjednodušenému popisu nastávají v reálném řešení další problémy se správou paměti. Vzhledem k tomu, že rozdělení sinogramů na bloky je řízeno aktuální velikostí dostupné paměti GPU, nemusí počet bloků vycházet celočíselně, tzn. poslední blok sinogramů může mít v paměti jinou velikost, s čímž musí rekonstrukční algoritmus počítat.



Obrázek 2.9: GPU implementace FBP algoritmu.

Druhý, a mnohem závažnější problém je omezení maximální velikosti spojitě alokované paměti $mAllocLimit$ v operačním systému Windows[®] 7 a novějších. Dle dokumentace je maximální velikost dána

$$mAllocLimit = \text{MIN} \left(\frac{mSys - 512}{2}, 2048 \right),$$

kde $mSys$ je velikost operační paměti počítače v MiB. Běžně jsme tedy omezeni limitem 2048 MiB na jeden alokovaný blok paměti v GPU. Moderní grafické paměti však disponují pamětí mnohem větší než 2 GiB. Abychom GPU maximálně využili, je nezbytné každý blok sinogramů ukládat v paměti GPU v blocích menších než zmiňovaný limit. To s sebou nese další nezbytné výpočty reálně alokovaných paměťových bloků a algoritmus přechodu mezi nimi.

Dle popsaných parametrů je vypočítáno rozdělení sinogramů tak, aby bylo možné postupné načtení do paměti GPU. Následně je ze souboru načten jen zvolený blok sinogramů. Pomocí GPU je provedena filtrace a částečná zpětná projekce. Výpočet zpětných projekcí je prováděn postupně pro jednotlivé části sinogramů a nakonec je proveden součet výsledků do finální rekonstrukce. V případě, že máme instalováno více GPU, je možné

částečné projekce a filtrace rozložit mezi ně, a tak dosáhnout ještě většího zrychlení výpočtu.

2.4.2. Popis realizovaného algoritmu BPF

Algoritmus BFP je podobně jako FBP založen na zpětné projekci dat do 2D projekční matice. Proto je celá tato část algoritmu FBP převzatá současně i s technikami dělení sinogramů a správy paměti GPU. Rozdíl oproti FBP je v jiném způsobu přípravy sinogramových dat před zpětnou projekcí a navíc je BPF algoritmus rozšířen o další zpracování po zpětné projekci. Struktura algoritmu je tedy mírně odlišná, jak je ilustrováno na obrázku 2.10. Na rozdíl od FBP se v tomto algoritmu provádí nejprve numerická derivace $G(x, z, \varphi)$ sinogramu [15, 17] odpovídající analytickému vztahu

$$G(x, z, \varphi) = \left(\frac{\partial}{\partial \varphi} + \frac{x^2 + D^2}{D} \frac{\partial}{\partial x} \right) P(x, z, \varphi),$$

kde $P(x, z, \varphi)$ jsou sinogramy a D je vzdálenost zdroj-detektor. Parciální numerické derivace dle φ a x odhadujeme dvoubodovou metodou

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial \varphi} P(x, z, \varphi) &\approx \frac{P(x, z, \varphi + \Delta\varphi) - P(x, z, \varphi - \Delta\varphi)}{2\Delta\varphi}, \\ \frac{\partial}{\partial x} P(x, z, \varphi) &\approx \frac{P(x + \Delta x, z, \varphi) - P(x - \Delta x, z, \varphi)}{2\Delta x}, \end{aligned}$$

kde Δx je vzdálenost sousedních pixelů detektoru v ose x a $\Delta\varphi$ je úhlový krok natočení. Posléze následuje zpětná projekce stejně jako u FBP. Získaná data jsou reprezentací tomografických řezů v Hilbertově prostoru, na které se v posledním kroku numericky aplikuje konečná inverzní Hilbertova transformace (IHT) [14]

$$f(t) = \sum_{i=-R}^R \frac{k(R, r, i)}{(R - r)i} F(t - i),$$

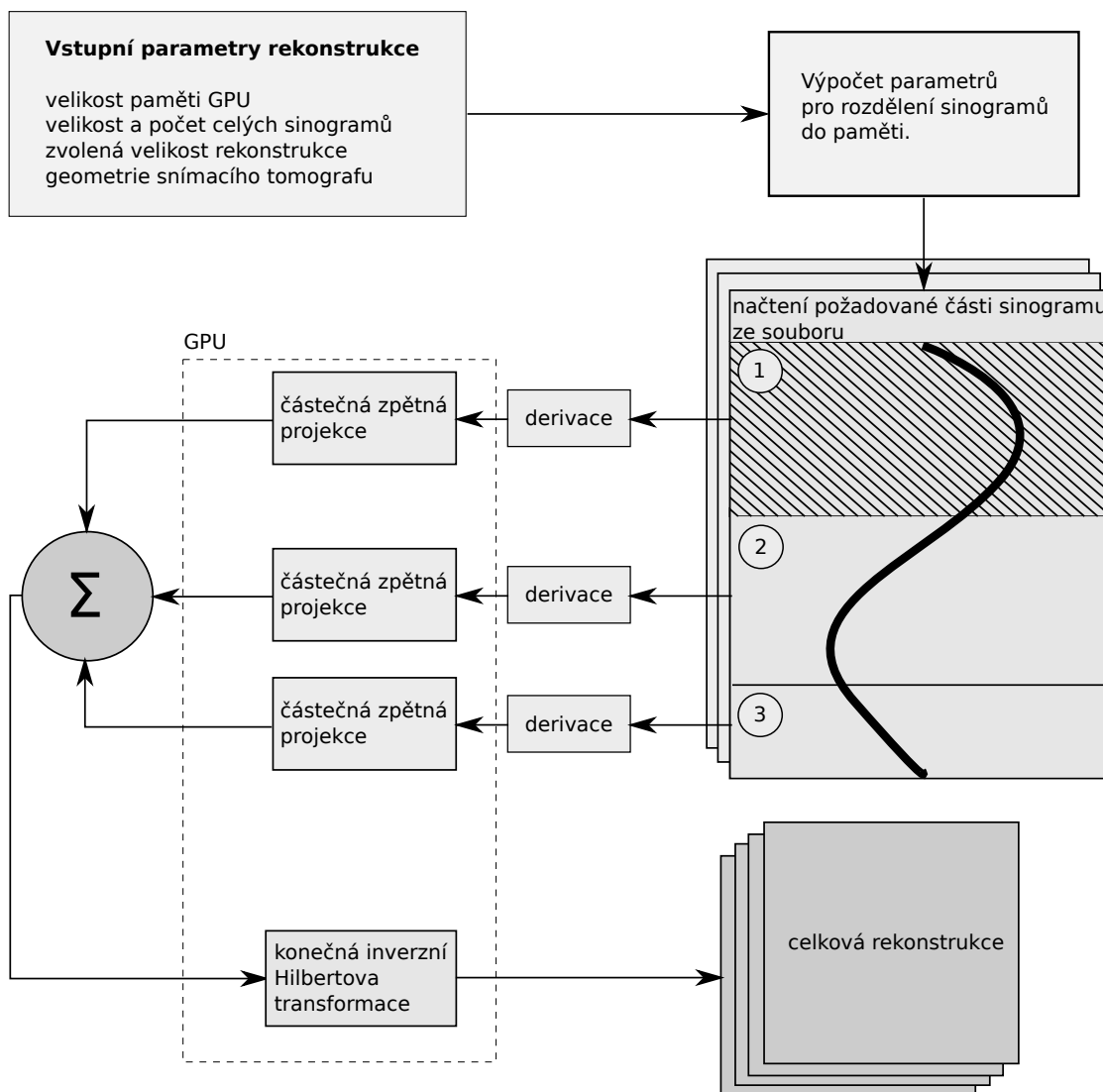
kde $F(t)$ je funkce v Hilbertově prostoru (řádky v projekční matici), integrační interval $\langle -R, R \rangle$ odpovídá délce jednoho řádku matice, $r = 0.98R$ a

$$k(R, r, t) = \begin{cases} -\frac{\sqrt{R^2+t^2}}{\pi} + \frac{\sqrt{r^2+t^2}}{\pi}, & 0 \leq |t| < r, \\ -\frac{\sqrt{R^2+t^2}}{\pi}, & r < |t| < R, \\ 0, & \text{jinak.} \end{cases}$$

Je vidět, že IHT je ve formě konvoluce, jejíž výpočet je také poměrně náročný. Za povšimnutí stojí singularita v IHT pro $i = 0$, které se dá v numerickém výpočtu vyhnout posunutím celého intervalu $\langle -R, R \rangle$ o polovinu šířky pixelu.

2.4.3. Popis programu

Program pro výpočet zpětné projekce je implementován jako konzolová aplikace s názvem *FBPG.exe*. Při spuštění vyžaduje jako jediný parametr soubor metadat s koncovkou *CRA*. Tento soubor obsahuje parametry tomografu a odkaz na binární bezhlavičkový soubor dat



Obrázek 2.10: GPU implementace BPF algoritmu.

s příponou CON. Výpis souboru s popisem je v tabulce 2.1. Po spuštění program vypíše informace o probíhající výpočtu, rozdělení paměti a času potřebném pro výpočet. Výpočet probíhá ve formátu float s přesností na 8 desetinných míst. Spouštění výpočtů na grafické kartě v systému Windows[®] 7 s sebou nese kromě paměťových omezení také omezení na maximální trvání výpočtu v případě, že je použita GPU současně k výpočtu i k zobrazování na monitoru. Jednotlivé výpočty nesmějí trvat déle než 5 s, potom je ovladač grafické karty restartován a výpočet selže. Toto nastavení je možné změnit změnou parametru TdrLevel v registru Windows

HKEY_LOCAL_MACHINE\System\CurrentControlSet\Control\GraphicsDrivers

na hodnotu 0. Při dlouhotrvajícím výpočtu pak dojde pouze k zamrznutí obrazu na dobu nezbytnou k jeho dokončení. Z tohoto pohledu bylo výrazně výhodnější použít v počítači dvě grafické karty, jednu pro výpočty a druhou k zobrazování.

Tabulka 2.1: Výpis parametrů rekonstrukce.

FILE NAME:	conetest.con	jméno souboru s binárními daty
SOURCE NAME:	wall_2.pol	označení vzorku
SAMPLE SPACING:	25 μ	velikost pixelu detektoru v mikrometrech
DISTANCE:	3 c	vzdálenost zdroje záření ke středu rotace
DETECTOR X PIXELS:	600	šířka detektoru v pixelech
DETECTOR Z PIXELS:	150	výška detektoru v pixelech
NUMBER OF PROJECTIONS:	501	počet projekcí na otáčku vzorku
X DIMENSION:	500	rozměr rekonstrukce ve směru X a Y
Z DIMENSION:	96	rozměr rekonstrukce ve směru Z
ROTATE ANGLE:	60	úhel počátečního pootočení
CENTRE:	299.498199	osa rotace v sinogramu

2.4.4. Experimentální výsledky

K výpočtům byl použit běžný počítač (v tabulce 2.2 označen **PC**). Jako normál pro srovnání výsledků a rychlosti implementace FBP byl použit program ConeRec, jehož autorem je Dr. Graham Davis. Oba programy byly pro srovnání spouštěny na stejném počítači. V průběhu vývoje rekonstrukčního software byl postupnou optimalizací algoritmus vylepšen a v poslední verzi bylo ve srovnání s původním software ConeRec dosaženo téměř jedenáctinásobného zrychlení výpočtu, což potvrzovaly i provedené rekonstrukce (tab. 2.3).

V případě implementace BPF jsme srovnávali rychlosti rekonstrukce s průmyslovým tomografem společnosti ScanCo Medical μ CT40 [7]. Tento tomograf je standardně vybaven počítačem v tabulce 2.2 označeným jako **HP Integrity rx2660**. I v tomto případě výsledky provedených experimentů potvrdily desetinásobné zrychlení výpočtu akcelero- vaným algoritmem oproti původnímu software (tab. 2.4).

Tabulka 2.2: Srovnání parametrů použitých počítačů.

	PC	HP Integrity rx2660
CPU	Intel® Core™ i7, 3.4 GHz	2x Intel® Itanium® 1.4 GHz
RAM	16 GiB	24 GiB
GPU	NVIDIA quadro 6000	Intel
OS	Windows® 7 64 bit	Open VMS 64 bit

Tabulka 2.3: Srovnání výsledků FBP implementace.

	ConeRec	FBP GPU
rozměry projekční matice	500 x 500 x 96 px ³	
počet projekcí	501	
velikost vstupních dat	172 MiB	
čas výpočtu	69 s	6,4 s

2.5. Vyhodnocování tomografických měření kostí

V průběhu práce na projektu vyhodnocování působení léků na krysí kosti jsme potřebovali vyřešit problém porovnávání různých vzorků mezi sebou. Pro vkládání vzorků do tomo-

Tabulka 2.4: Srovnání výsledků BPF implementace.

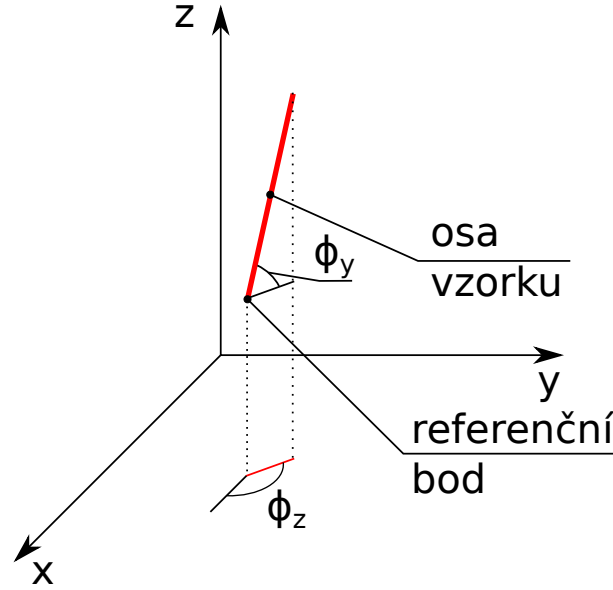
	ScanCo Medical μ CT40	BPF GPU
rozměry projekční matice	2048 x 2048 x 198 px ³	
počet projekcí	2000	
velikost vstupních dat	2 GiB	
čas výpočtu	70 min	7 min

grafu byly určeny válcové držáky vzorků vyrobené z PMMA (polymethylmethakrylát) o různých průměrech. Vzhledem k uspořádání tomografu s kuželovým svazkem obecně dosahujeme nejlepšího rozlišení se vzorkem v blízkosti zdroje záření. Je tedy výhodné použít nejmenší možný držák vzorku. Kvůli různému stavu preparovaných kostí, jejich různé délce a tvaru, nebylo možné je vkládat do držáku vždy stejně, a proto jsme museli provést stanovení osy kosti a vhodný typ normalizace dat. Po provedení normalizace jsme měli připravenou sadu obrazů kostí ve stavu vhodném k porovnávání. Středem našeho zájmu bylo hodnocení působení léků na celkovou tloušťku stěny kosti. Kosti byly ovšem velice různorodé, a proto bylo nutné vhodným způsobem definovat jak vnější, tak vnitřní hranici kosti. Definice vnější hranice je dána vnějším povrchem kosti a na tomografických snímcích je dobře detekovatelná pouze z odprahovaného obrazu. Naopak definovat vnitřní hranici kosti není jednoduché, vzhledem k tomu, že kost obsahuje velmi členitou vnitřní strukturu. Bylo tedy nezbytné nalézt vhodnou techniku stanovení vnitřního povrchu kosti, která je popsána dále. Po odprahování tomografického obrazu kosti (kap. 2.5.2) bylo třeba odstranit samostatné fragmenty obrazu. K tomuto účelu jsem navrhl jednoduchý algoritmus detekce fragmentů, který se později osvědčil i k separaci buněk v CCHM (kap. 3). Vnitřní povrch kosti v takto upraveném obraze stále obsahoval značné množství různých výrůstků, které nepatřičně ovlivňovaly stanovení její vnitřní hranice. Na jejich odstranění se osvědčil 3D modus filtr. Po odfiltrování dat jsme mohli provést měření vzdáleností vnitřního a vnějšího povrchu kosti k její ose a data vyhodnotit. Celkově lze postup shrnout do následujících kroků, z nichž některé jsou popsány dále:

1. Ruční stanovení osy kosti.
2. Normalizace orientace vzorku.
3. Prahování tomografických dat.
4. Odstranění fragmentů uvnitř kosti.
5. 3D modus filtrování dat.
6. Vyhodnocení hranic kostí vzhledem k její ose.

2.5.1. Normalizace orientace vzorku

Prvním krokem hodnocení bylo normalizování jednotlivých vzorků dat z tomografu. Nejprve jsme ručně definovali osu každé kosti pomocí dvou vhodně vybraných řezů v programu ImageJ [22]. Následoval výpočet úhlů, které osa svírala s původním souřadnicovým systémem, a vyrovnaní do nového souřadnicového systému. Vyrovnaní obnášelo načtení matice všech řezů do paměti počítače a jejich otočení a interpolaci do nové matice vyrovnaného souřadnicového systému. Tím jsme získali matici dat s definovanou osou kosti rovnoběžnou s osou Z matice (to současně odpovídá tomografickým řezům kolmým na osu kosti). Dále bylo nutné definovat pootočení kosti kolem její osy tak, aby všechna tomografická zobrazení vzorků byla ve stejné pozici.



Obrázek 2.11: Náčrt osy vzorku a její projekce s vyznačením úhlů rotací.

Pro tento účel jsem navrhl a sestavil program, který prováděl popsané natočení a převzorkování dat. Vstupní data byla ve standardním formátu DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) o velikosti 2048×2048 pixelů, každému tomografickému řezu odpovídal jeden soubor. Rozměr souborů (x-y) a jejich počet (z) definovaly výchozí souřadnicový systém. Počáteční bod úsečky stanovující osu kosti byl uvažován jako referenční, vůči němuž byly měřeny úhly natočení. Postup zpracování se dělil na čtyři kroky:

- Stanovení úhlů rotací ϕ_z a ϕ_y .
- Transformace datasetu dle stanovených rotací.
- Určení rotace ϕ_{zf} v transformovaném datasetu.
- Finální transformace a oříznutí.

Transformace byly prováděny v homogenní soustavě souřadnic [23, 24]. Homogenní transformační matice pro 3D transformace mají velikost 4×4 prvků a jednotlivé transformace lze složit do celkové transformace pomocí maticového násobení. Libovolný bod $P[x, y, z]$ je v homogenním souřadnicovém systému reprezentován sloupcovým vektorem

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} xW \\ yW \\ zW \\ W \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \\ W \end{bmatrix}, \quad (2.1)$$

kde $W \neq 0$ je váha bodu a X, Y, Z jsou homogenní souřadnice bodu P. Ve výchozím souřadnicovém systému můžeme zvolit $W = 1$, takže výchozí souřadnice bodu nabývají hodnot

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix},$$

kde x, y, z jsou přímo souřadnice voxelu.

Celkovou transformaci zahájíme posunem původního souřadnicového systému do referenčního bodu, následně provádíme rotaci kolem osy z o úhel ϕ_z , a tím je osa vzorku

přesunuta do roviny x-y. Pokračujeme rotací kolem osy y o úhel ϕ_y , čímž osa vzorku splynula s osou z. Ve finální transformaci následuje ještě jedna rotace ϕ_{zf} , která má uvést všechny vzorky do stejného natočení v ose vzorku. Na závěr se provede konečný posun zpět do původního souřadnicového systému pomocí matice \mathbf{T}_b a v případě finální fáze také oříznutí datasetu na požadované rozměry. Translační matice vyjádřená v homogenním formátu nabývá tvaru:

$$\mathbf{T}(t_x, t_y, t_z) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ t_x & t_y & t_z & 1 \end{bmatrix},$$

kde t_x , t_y a t_z jsou posunutí v jednotlivých osách (souřadnice referenčního bodu). Podobně pro jednotlivé rotace lze matice vyjádřit ve tvaru:

$$\mathbf{Y}(\phi_y) = \begin{bmatrix} \cos(\phi_y) & 0 & -\sin(\phi_y) & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ \sin(\phi_y) & 0 & \cos(\phi_y) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{Z}(\phi_z) = \begin{bmatrix} \cos(\phi_z) & \sin(\phi_z) & 0 & 0 \\ -\sin(\phi_z) & \cos(\phi_z) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

Nové souřadnice bodu $P[x, y, z]$ v transformovaném souřadnicovém systému určíme pomocí celkové transformační matice \mathbf{T} jako

$$\mathbf{P}' = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P},$$

kde \mathbf{P}' je zobrazení bodu \mathbf{P} v transformovaném souřadnicovém systému. Celkovou homogenní transformační matici \mathbf{T} je pro popsání kroků možné vyjádřit pomocí součinu dílčích transformací jako

$$\mathbf{T} = \mathbf{T}_f \cdot \mathbf{Z} \cdot \mathbf{Y} \cdot \mathbf{Z}_f \cdot \mathbf{T}_b,$$

kde \mathbf{T}_f je translace do referenčního bodu a \mathbf{T}_b zpět do původního souřadnicového systému. \mathbf{Z}_1 a \mathbf{Z}_2 jsou matice rotací kolem osy z a podobně \mathbf{Y} je rotace kolem osy y.

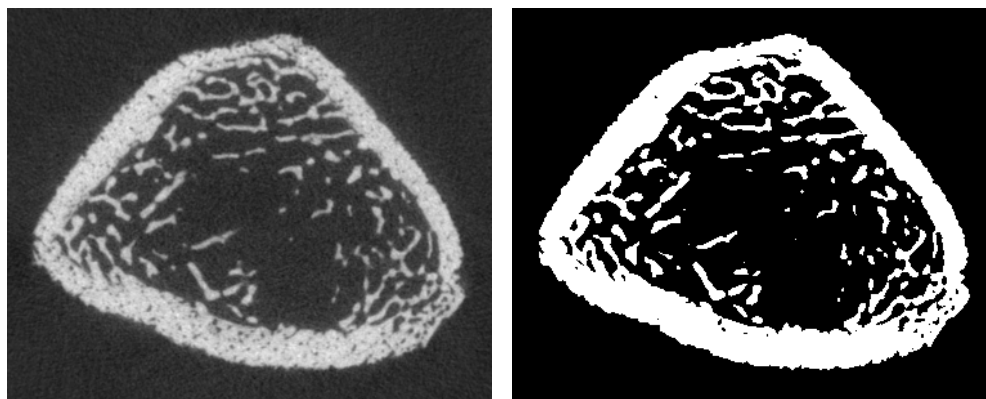
Bodu $P'[x', y', z']$ odpovídají v transformovaném homogenním souřadnicovém systému souřadnice

$$\mathbf{P}' = \begin{bmatrix} X' \\ Y' \\ Z' \\ W' \end{bmatrix},$$

kteřé musíme před použitím převést do standardních kartézských souřadnic. Výsledné souřadnice bodu jsou dle 2.1 dány

$$\mathbf{P}' = \begin{bmatrix} \frac{X'}{W'} \\ \frac{Y'}{W'} \\ \frac{Z'}{W'} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix}.$$

Popsaným způsobem provádíme zobrazení všech bodů (voxelů) tomografického zobrazení do nového transformovaného souřadnicového systému.



(a) Tomografický řez kostí.

(b) Binární obraz řezu kostí.

Obrázek 2.12: Tomografický řez kostí a jeho binární obraz.

2.5.2. Prahování dat

Data získaná z tomografu byla kalibrovaná na hustotu hydroxyapatitu (CaHAP – Calcium Hydroxyapatite, hlavní neorganická složka kostí, obr. 2.12(a)). Díky vysoké hustotě kostní hmoty bylo prahování všech vzorků jednoduše proveditelné pomocí pevně nastavené hodnoty prahu. Prahováním byla matice tomografických řezů převedena do binární formy, ve které hodnota 1 odpovídá místům s vysokým obsahem hydroxyapatitu (obr. 2.12(b)).

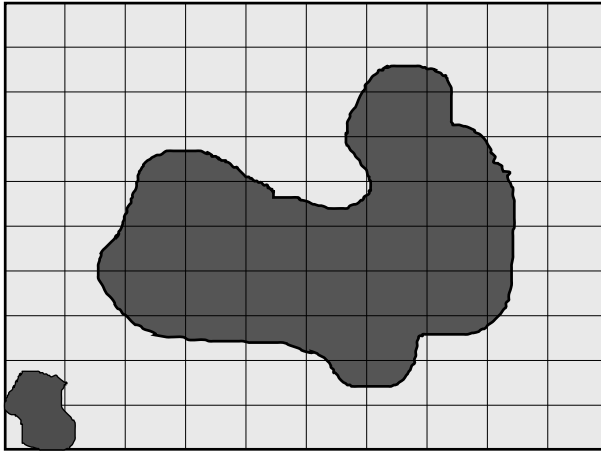
2.5.3. Detekce fragmentů

V mnoha případech měly kosti velmi rozvinutou vnitřní strukturu (obr. 2.12(a)), která byla pro hodnocení nežádoucí. Proto jsem vyvinul algoritmus identifikace a odstranění samostatných fragmentů v binárním obraze kosti. Algoritmus je založen na porovnávání hodnoty sousedních pixelů (obr. 2.13). Původní obraz objektu (obr. 2.13(a)) je nejdříve prahován. Tím se vytvoří binární obraz objektu, jak jej vidíme na obr. 2.13(b). Matice, která jej reprezentuje, je následně naplněna čísly tak, aby každý pixel původně odpovídající hodnotě 1, měl v rámci matice libovolnou jedinečnou hodnotu. Zbývající pixely mají hodnotu 0 (obr. 2.13(c)). Poté procházíme jednotlivé řádky cyklem, který v případě, že narazí na nenulovou hodnotu, nastaví všechny další hodnoty v řádku na stejnou hodnotu, dokud nenarazí opět na hodnotu nula (obr. 2.13(d)).

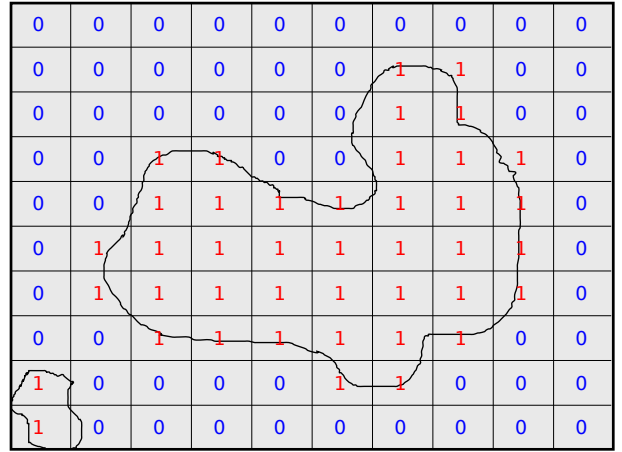
Následuje nový cyklus, ve kterém se srovnávají vždy dva sousední řádky matice (obr. 2.13(e)) nejprve shora dolů. V každém pixelu vyššího řádku se testuje, zdali pixel pod ním (v nižším řádku) má nenulovou hodnotu. V případě nenulovosti jsou pixely stejné hodnoty v tomto řádku nahrazeny hodnotou pixelu z řádku vyššího.

Při výpočtu může dojít k situaci, že do nižšího řádku přechází hodnota ze dvou různých pixelů řádku vyššího. Jelikož jsou řádky postupně vyhodnocovány zleva doprava, je po ukončení cyklu v nižším řádku hodnota pixelu, který splnil testovací podmínku jako poslední. Po ukončení prvního běhu cyklu se může stát, že jeden fragment je roztržěn na více částí. V následujícím chodu cyklu, který nyní začíná od spodního řádku, se detekovaný fragment sjednotí (obr. 2.13(f)).

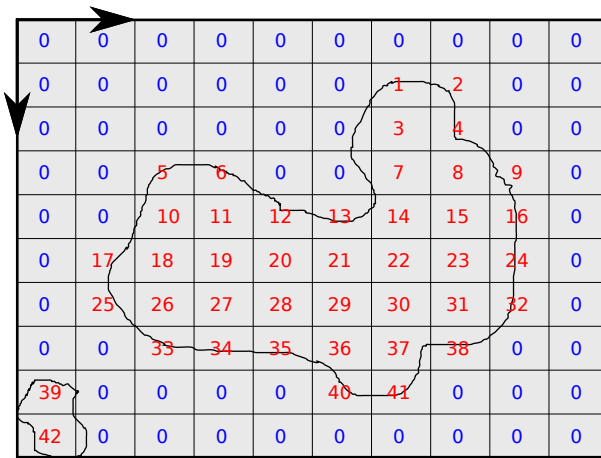
Změna směru cyklu se opakuje, dokud neprojde cyklus beze změny hodnoty pixelu. Obvykle stačí dvě iterace. Výsledná matice je naplněna čísly, která reprezentují samostatné fragmenty složené ze sousedních pixelů.



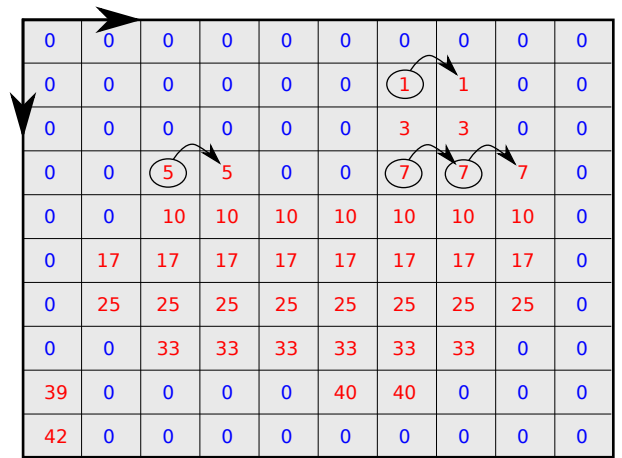
(a) Původní obraz s fragmenty.



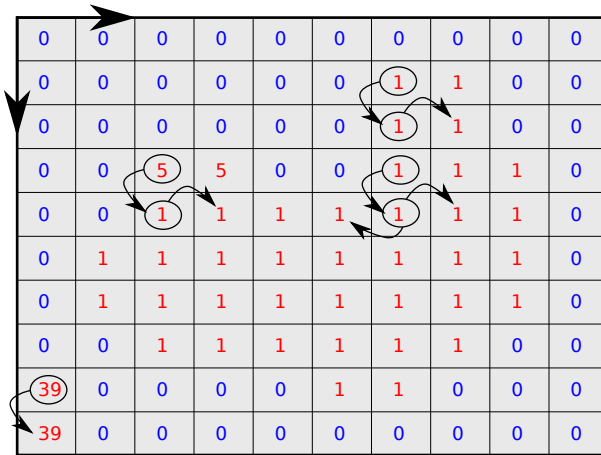
(b) Binární obraz po prahování.



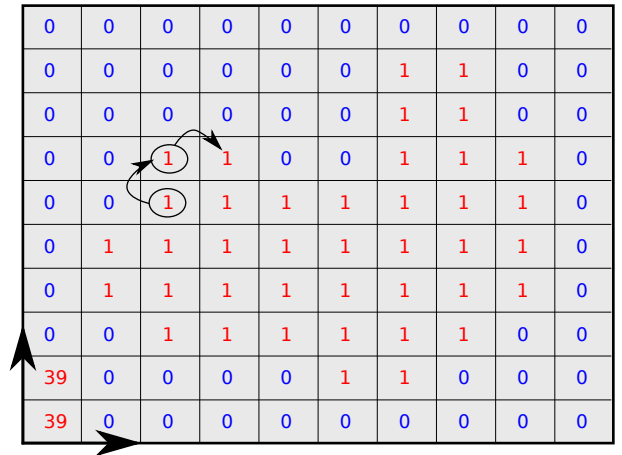
(c) Přidělení jedinečných hodnot pixelům.



(d) Sjednocení fragmentů v řádcích.



(e) Sjednocení mezi řádky ve směru shora dolů.



(f) Sjednocení mezi řádky ve směru zespodu nahoru.

Obrázek 2.13: K vysvětlení algoritmu detekce fragmentů.

Nyní můžeme spočítat plochu jednotlivých fragmentů a v případě binárních obrazů kostí vybrat největší objekt, jenž představuje binární obraz těla kosti.

2.5.4. 3D binární modus filtr

Vnitřní hranici jsme chtěli podobně jako vnější definovat vnitřní plochou kosti, která zůstane po odstranění všech vnitřních struktur kosti. Implementaci filtru jsem opět provedl s využitím paralelních výpočtů na GPU. Obvyklá velikost celé série řezů byla $1024 \times 1024 \times 3000$ voxelů, což odpovídá přibližně 3 GiB dat. Jádru filtru bylo tvaru koule s poloměrem 20 pixelů. Vstupní maticí je binární obraz kosti (zbavený volných fragmentů). Výstupní matice binárních filtrovaných dat má stejné rozměry jako vstupní matice. Algoritmus po jednotlivých voxelech prochází celý objem výstupní matice a počítá četnost binárních hodnot voxelů v kulovém okolí voxelu na stejných souřadnicích ve vstupní matici. Hodnota voxelu ve výstupní matici je nastavena dle binární hodnoty s vyšší četností. Filtrování je poměrně náročné a doba zpracování byla obvykle přibližně půl hodiny. Po ukončení filtrace získáváme binární obraz, ve kterém hodnota 1 odpovídá místu, které považujeme za tělo kosti (obr. 2.14).



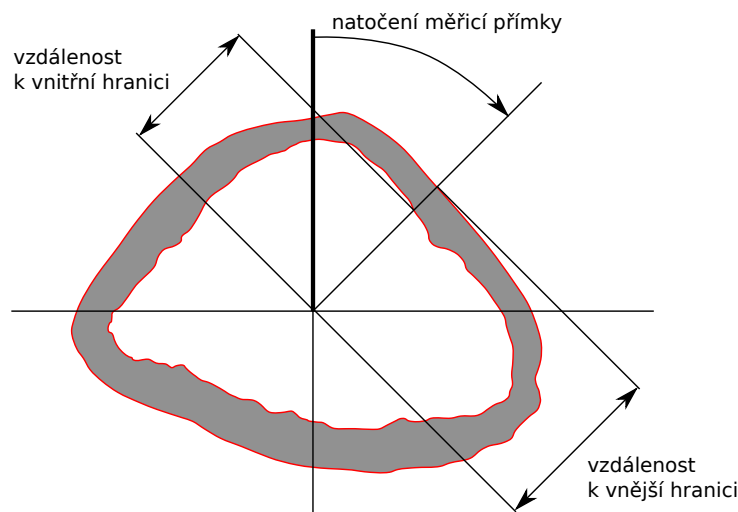
Obrázek 2.14: Binární obraz tomografického řezu kostí po použití metody odstranění fragmentů a 3D mediánového filtru.

2.5.5. Vyhodnocení hranic kostí

Pro porovnání tvarů různých sad obrazů kostí jsme jako porovnávací parametr zvolili vzdálenost detekované vnější a vnitřní hranice kosti k definované ose kosti (obr. 2.15). Měření vzdáleností probíhá v řezech kolmých na definovanou osu kosti, která je totožná s osou z. Pro vyhodnocování jsem vyvinul software, který automaticky provedl měření vzdáleností podle následujícího algoritmu.

Nejprve se zvolený obraz řezu kosti převede do polárních souřadnic s počátkem souřadnicového systému v ose kosti. Následně se zvolí úhel počátku vyhodnocování, na obrázku 2.15 byl počátek zvolen v úhlu 90° . S nastaveným úhlovým krokem (použili jsme 1°) se prochází celý obvod kosti virtuálním přímkovým měřítkem. Algoritmus začíná v počátku souřadnicové soustavy testovat pixely ležící na přímce a postupně směrem od středu počítá vzdálenost. V případě, že dojde ke změně hodnoty pixelu z 0 na 1, je detekována vnitřní hranice a spouští se detekce vnější hranice. Ta je naopak detekována přechodem hodnoty pixelu z 1 na 0. V obou případech se uloží údaj o změřené vzdálenosti. Tento postup se aplikuje na všechny binární obrazy řezů kosti podél osy z.

Ze změřených hodnot se následně generují dvě mapy vzdálenosti povrchu od osy kosti, jedna pro vnitřní, druhá pro vnější povrch kosti. Svislá osa mapy je rovnoběžná s defino-



Obrázek 2.15: Zpracování hranic kostí.

vanou osou kosti. Na vodorovné ose je vynesena změřená vzdálenost od osy kosti. Mapy povrchů jsou tvořeny reálnými hodnotami v jednotkách milimetrů.

Porovnávání výsledků se věnoval Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D., kterému se pro rychlé porovnání výsledků velmi osvědčilo převést tato reálná čísla na barevné mapy (o 16 barvách) a teprve ty vyhodnocovat. Zpracované výsledky jsou na obrázku 2.16 společně se škálou rozsahů hodnot vzdáleností od osy kosti.

Takto připravené mapy různých kostí bylo možné mezi sebou dobře porovnávat. Výsledky této práce byly prezentovány na konferenci [2].

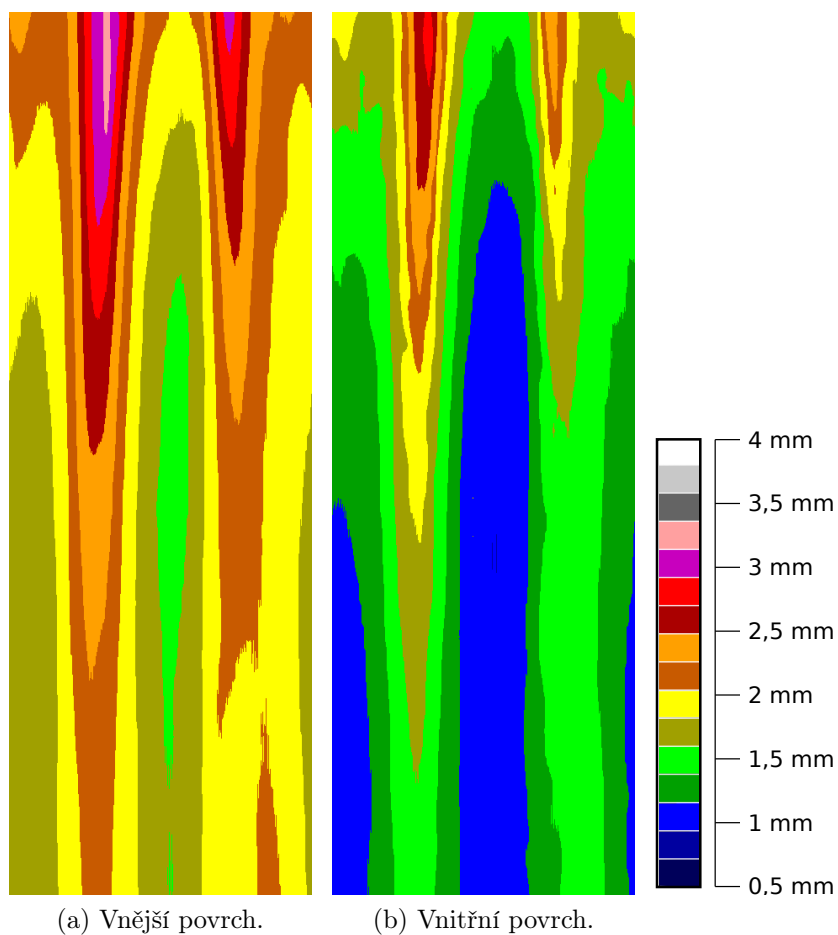
2.6. Shrnutí výsledků

V oblasti mikrotomografie jsem původním způsobem implementoval dvě metody tomografické rekonstrukce. První metoda je založena na standardní filtrované zpětné projekci FBP. Implementace je akcelerovala pomocí GPU, a tím umožnila více než desetkrát zrychlit výpočet a zkrátit časy potřebné k provádění tomografických experimentů v porovnání s původními neakcelerovalými algoritmy. V současné době je software aktivně používán v tomografické laboratoři Centre for Oral Growth & Development, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London a jeho vývoj stále pokračuje.

Druhý algoritmus BPF, který jsem implementoval, je založen na zpětné projekci derivovaných dat a následné aplikaci konečné inverzní Hilbertovy transformace. Tento algoritmus byl inspirován komerčním tomografem ScanCo Medical μ CT40 [7], který využívá uspořádání s kuželovou projekcí a asymetricky uloženým detektorem. Z tohoto důvodu nelze klasický FBP algoritmus použít. Moje implementace BPF algoritmu byla desetkrát rychlejší oproti komerční implementaci algoritmu.

Poslední částí mé práce v oblasti CT jsou původní algoritmy pro vyhodnocování tomografických obrazů kostí. Vyvinul a implementoval jsem algoritmy pro:

- normalizaci orientace kosti,
- prahování tomografických dat,



Obrázek 2.16: Mapy povrchů kosti.

- detekci fragmentů včetně třídění dle velikosti a odstranění malých fragmentů,
- filtrování 3D binárního datasetu pomocí 3D modus filtru, který dobře definuje vnitřní plochu kosti,
- algoritmus pro automatické měření vzdáleností vnitřní a vnější hranice kosti vzhledem k ose.

3. HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE

Digitální holografická mikroskopie (DHM) je široce uplatňována v biologickém výzkumu, zvláště pro pozorování živých buněk [25, 26, 27]. Na Ústavu fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně je již delší dobu vyvíjen koherencí řízený holografický mikroskop (zkráceně CCHM – coherence-controlled holographic microscope [28, 29, 30, 31, 32]). V tomto případě směřuje vývoj mikroskopu k využití pro neinvazivní sledování buněk. Holografický záznam a jeho numerická rekonstrukce dávají možnost současně s amplitudou sledovat a vyhodnotit i kvantitativní fázi (QPI [27]). Amplituda a fáze jsou získány jako modul a argument holograficky rekonstruované komplexní amplitudy [28]. Analogicky k ostatním interferometrickým metodám také holografická mikroskopie zobrazuje rozdíl v optických délkách objektové a referenční větve. V případě sledování živých buněk je získaná kvantitativní fáze úměrná plošné hustotě suché hmoty buňky [33, 34, 35]. Ve výstupní rovině mikroskopu je pomocí digitální kamery zaznamenáván interferogram s prostorovou frekvencí proužků dostatečně převyšující nejvyšší obrazovou frekvenci, takže jde o hologram, který nese kompletní informaci o vlnoploše obrazové vlny. Nedílnou součástí holografického mikroskopu je také systém pro počítačové zpracování obrazu.

Hodnoty fáze získané přímo numerickou rekonstrukcí hologramu jsou v intervalu $(-\pi, \pi)$, ačkoliv odpovídající rozdíl optických drah může být často mnohem větší. To je důvod, proč je ve většině případů součástí rekonstrukčního algoritmu navazování fáze (phase unwrapping), jímž je vypočteno spojitě fázové zobrazení odpovídající skutečné fázové funkci zkoumaného vzorku, resp. skutečný průběh rozdílu optických drah v referenční a předmětové větvi.

Návrh a implementace rekonstrukčních algoritmů pro CCHM představují další z cílů mé disertační práce. Implementace těchto rekonstrukčních algoritmů musí splňovat následující základní požadavky:

- Zpracování obrazu musí být možné jak v režimu on-line, tak v režimu off-line pro pozdější zpracování již naměřených dat.
- Vyžaduje se vysoká rychlost rekonstrukce obrazu, která je zvláště důležitá v režimu on-line pro zachycování rychlých dějů. Obzvláště se osvědčila při seřizování mikroskopu, kdy operátor získává takřka okamžitou zpětnou vazbu. Díky rychlé rekonstrukci bylo možné implementovat také algoritmy pro automatické seřizování mikroskopu.
- Mimo primární rekonstrukce obrazu musí být implementovány další algoritmy pro následné zpracování rekonstruované fáze a amplitudy. Patří sem hlavně metody navazování fáze, kompenzace pozadí navázané fáze, segmentace a trasování buněk a další, v této práci nepopisované metody, na jejichž implementaci jsem se podílel (simulované DIC, DPD, justážní algoritmy).
- Musí být možno uložit naměřené výsledky v některém ze standardních formátů souborů (obrázek TIFF - RGB nebo float).
- Naměřená data včetně metadat musí být možno ukládat do jediného souboru (formát CDF [36]).

V následujícím textu budou popsány rekonstrukční algoritmy, které jsem vyvinul, a jejich implementace v prostředí programu Q-PHASE.

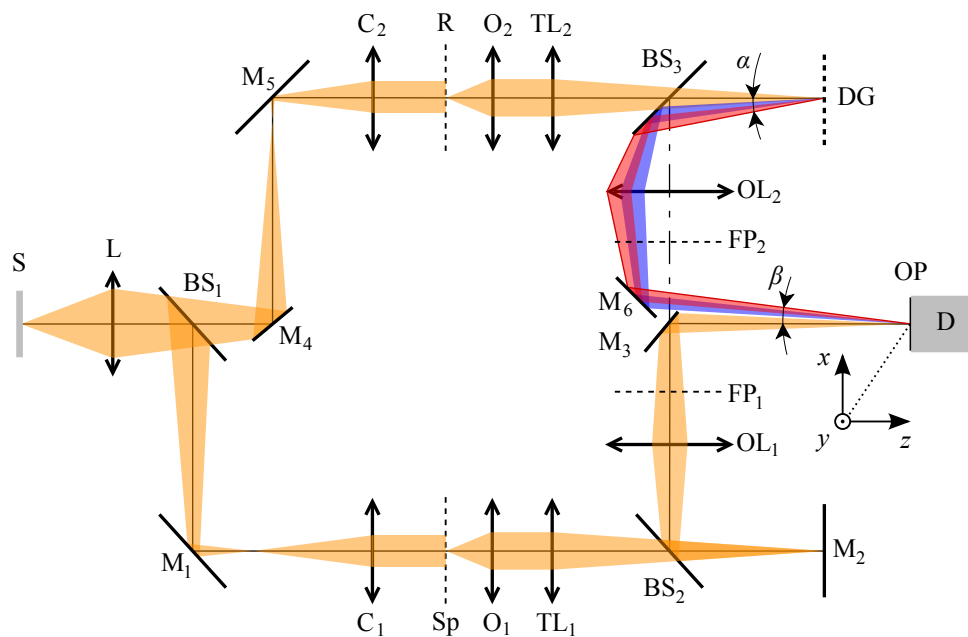
3.1. Koherenci řízený holografický mikroskop

Na obrázku 3.1 je schéma holografického mikroskopu v modifikaci pro procházející světlo. Světlo je do mikroskopu přivedeno pomocí optického kabelu ze zdroje světla, obvykle halogenové žárovky s regulací jasu a stabilním napájením. V osvětlovací soustavě mikroskopu S může být použit interferenční filtr a aperturní clonka pro úpravu časové a prostorové koherence světla. Světelný svazek je rozdělen pomocí děliče BS₁ a dále směřován soustavou zrcadel M₁, M₄, M₅ do referenční a předmětové větve, kde pomocí kondenzorů C₁ a C₂ osvětluje referenční objekt R a vzorek Sp.

V případě referenční větve je referenční rovina R pomocí mikroskopového objektivu O₂ a tubusové čočky TL₂ sdružena s rovinou difrakční mřížky DG. Difrakční mřížka DG je následně zobrazena pomocí výstupního objektivu OL₂ a zrcadla M₆ do výstupní roviny OP mikroskopu. Clona FP₂ umožňuje průchod pouze prvnímu difrakčnímu řádu.

Předmětová větev je v principu stejná jako referenční, pouze difrakční mřížka je nahrazena zrcadlem M₂.

Ve výstupní rovině vzniká interferenční svazků z obou větví hologram. Podmínkou pro vznik interferogramu je, že rozdíl optických délek obou větví mikroskopu musí být menší než koherenční délka použitého světla a stranová vzdálenost ekvivalentních obrazových bodů (týž bod osvětlovacího svazku zobrazený jednou a druhou větví do výstupní roviny) v obou větvích musí být menší než koherenční šířka. Hologram musí být zvětšen výstupními objektivy tak, aby byla jeho interferenční struktura dobře navzorkovaná snímací kamerou D.



Obrázek 3.1: Schéma optické soustavy CCHM 2. generace. S - zdroj světla, L - kolektor, BS - děliče svazku, M - zrcadla, DG - difrakční mřížka, C - kondenzory, R - referenční objekt, Sp - pozorovaný vzorek, O - objektivy, OP - výstupní rovina, OL - výstupní objektivy, D - CCD čip kamery, TL - tubusové čočky, FP - zadní ohniskové roviny výstupních objektivů. Převzato z [37].

Všechny provedené experimentální výsledky v kapitole 3 byly získány na mikroskopu v této sestavě. Parametry mikroskopu (pokud není uvedeno jinak) jsou:

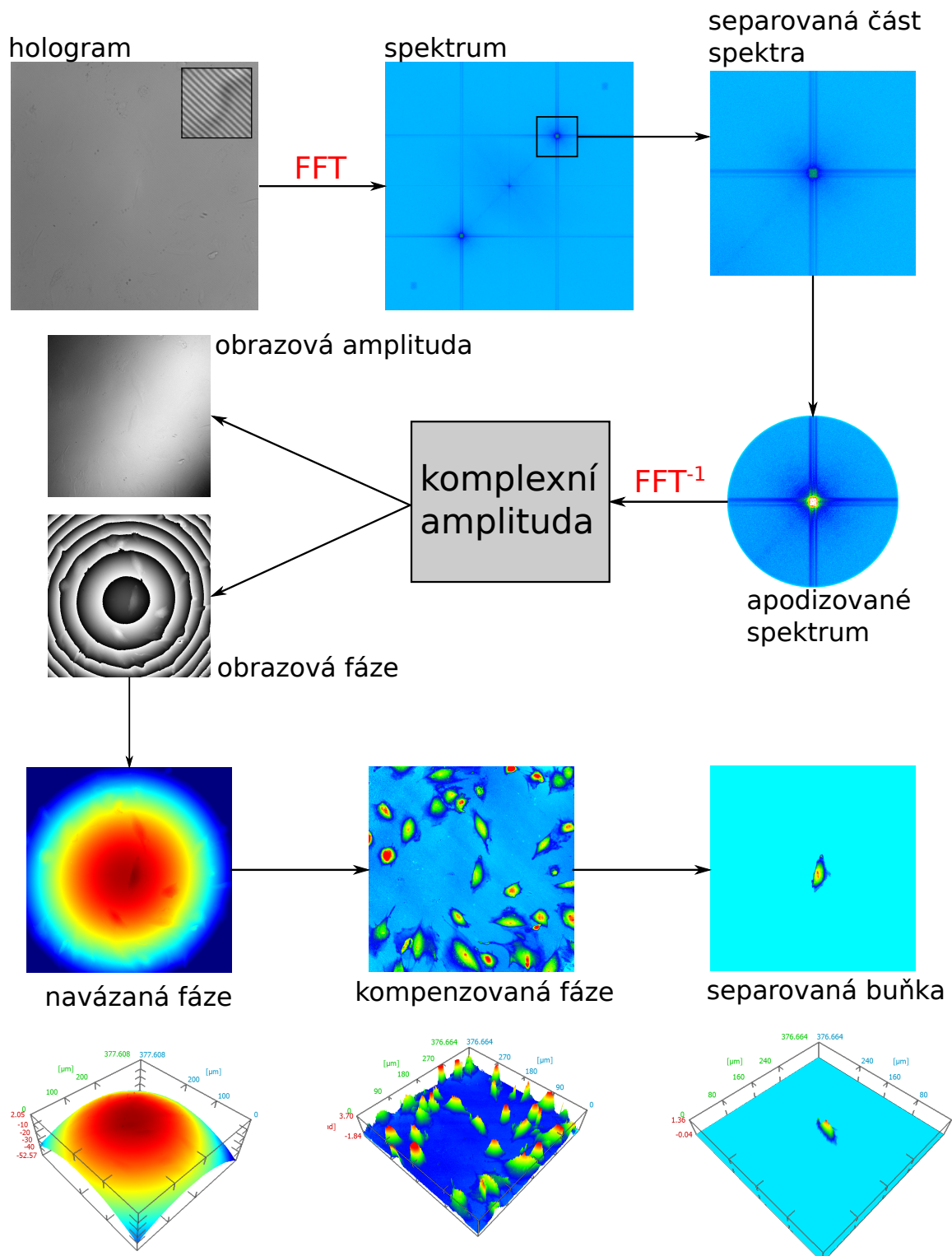
- Objektivy: Nikon $10\times/0,25$.
- Zdroj světla: Halogenová žárovka 150 W s interferenčním filtrem $\lambda = 650\text{ nm}$ s pološířkou spektrální propustnosti $\Delta\lambda = 10\text{ nm}$.
- Digitální CCD kamera Ximea s rozlišením čipu 2048×2048 pixelů. Snímkovací frekvence 5 Hz.
- Grafická karta NVidia GeForce GTX770 pro akceleraci výpočtů.
- Počítač Intel i7, 16GB RAM, Windows 7.

3.2. Zpracování obrazu v holografickém mikroskopu

Základní zpracování obrazu je založeno na filtraci spektra prostorových frekvencí hologramu za pomoci rychlé Fourierovy transformace (FFT — Fast Fourier Transform) podobně, jako je popsáno v [28, 38, 39]. Schéma celého procesu zpracování je graficky znázorněno na obr. 3.2. Pomocí FFT získáváme spektrum prostorových frekvencí hologramu. V něm provádíme detekci nosné frekvence (kap. 3.3.2) a následně separaci nosné frekvence a jejího okolí. Poté aplikujeme vhodnou váhovou funkci (apodizaci, kap. 3.3.3) a pomocí zpětné FFT získáme komplexní amplitudu a z ní následně obrazovou amplitudu a fázi. Mikroskop tedy umožňuje jak intenzitní, tak fázové zobrazení. Protože fáze může nabývat hodnot pouze v rozsahu $(-\pi, \pi)$ rad, je nutné ji v případě opticky tlustších vzorků navazovat, což je další krok zpracování obrazu (kap. 3.4). K navazování fáze jsem implementoval několik různých metod, z nichž jedna je původní. Fáze po navázání není obvykle ve stavu vhodném pro další zpracování, často je zatížena deformací, kterou vnášejí do fázového zobrazení předmětu vady optiky mikroskopu. Další postup tedy vede ke korekci fázové deformace (kap. 3.6). K tomuto účelu byl vyvinut algoritmus dynamické kompenzace fázové deformace, na jehož vývoji jsem spolupracoval a který byl také publikován [3, 4]. Kompenzovaná fáze je už přímo využitelná ke kvantitativnímu vyhodnocení. V případě pozorování buněk může dále navazovat jejich detekce a trasování (kap. 3.7).

Popsaným způsobem získáváme nejen informaci nesenou amplitudou vlny, jako je tomu u většiny ostatních zobrazovacích metod, ale také informaci nesenou její fází. Rekonstruovaná fáze reprezentuje v případě sledování transparentních biologických vzorků množství suché hmoty buňky [34]. Interpretace fázových výsledků v biologických měřeních je uvedena v [33, 34, 35, 40]. U reflexních vzorků odpovídá rekonstruovaná fáze jejich výškovému profilu.

V poslední době jsem v rámci zrychlování rekonstrukčního procesu přepracoval většinu algoritmů tak, aby využívaly ke zpracovávání dat paralelního výpočtu na grafické kartě, což rekonstrukční proces výrazně zrychlilo. Realizované algoritmy zpracovávají datová pole typu *double* (64 bitů s plovoucí desetinnou čárkou dle [21]) a jsou popsány v následujícím textu.



Obrázek 3.2: Postup zpracování obrazu v koherenci řízeném holografickém mikroskopu.

3.3. Základní zpracování obrazu

3.3.1. Rychlá Fourierova transformace – FFT

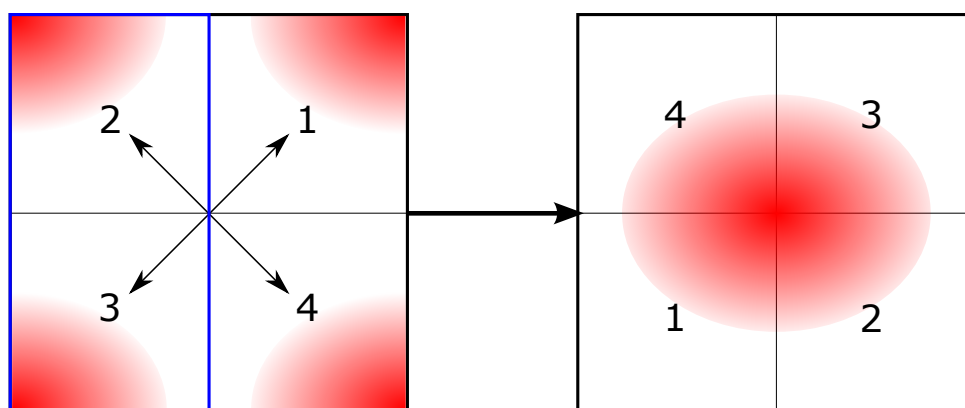
Hlavní součástí rekonstrukčního algoritmu je bezesporu FFT. Na sejmutý snímek hologramu aplikujeme dvourozměrnou FFT, čímž získáváme spektrum prostorových frekvencí

obrazu. Spektrum je tvořeno centrálním maximem, které odpovídá součtu autokorelačních funkcí spekter komplexní amplitudy v referenční a v předmětové větvi, a dvěma vedlejšími maximy, která jsou tvořena spektrem prostorových frekvencí zobrazení vzorku posunutým o nosnou frekvenci interferenčních proužků [41]. Vedlejší maxima leží buď v 1. a 3. kvadrantu nebo ve 2. a 4. kvadrantu – podle orientace CCD kamery otočené pod úhlem 45° nebo -45° tak, aby separovaná část spektra nezasahovala do centrálního kříže spektra (což je artefakt tvaru kříže vznikající v důsledku konečných rozměrů hologramu). Z celého spektra prostorových frekvencí je vybrána právě část obsahující nosnou frekvenci včetně jejího okolí tak, aby tato vybraná oblast byla co největší, a přitom nezasahovala do centrálního maxima. Maximální smysluplnou velikost oblasti lze odvodit z parametrů mikroskopu, ze kterých je možno usoudit, jaká je maximální přenesená prostorová frekvence [37, 41]. Vybraná část spektra je nejprve apodizována (násobena váhovou funkcí pro odstranění přechodových jevů při zpětné FFT, kap. 3.3.3), následně se aplikuje inverzní FFT, a tak získáme komplexní amplitudu zobrazení. Obrazovou amplitudu lze získat jako modul komplexní amplitudy a obrazová fáze je pak argument.

Pro programovou implementaci jsem zvolil knihovnu pro výpočet rychlé Fourierovy transformace FFTW — Fastest Fourier Transform in the West, která je dostupná na webových stránkách [42]. Jedná se o kompletní a rychlou implementaci FFT s podporou paralelního výpočtu na CPU. Pro praktické použití je však nezbytné doplnit FFT o další pomocné algoritmy, o které se základní rekonstrukční schéma (obrázek 3.2) rozšíří.

Vlastností FFT algoritmu je, že kvadranty vypočteného spektra $F = (f_{i,j})_{m,n}$ velikosti $m \times n$ nejsou v obvyklých polohách (viz obr. 3.3 vlevo). Nulová prostorová frekvence je v prvku $f_{1,1}$. Spektrum je tedy vhodné před zobrazením a následnými úpravami převést do správného tvaru tak, aby se nulová prostorová frekvence přesunula dle zvyklostí do středu spektra.

Při implementaci se osvědčilo vytvořit matici indexů o stejné velikosti jako je matice spektra a následně přistupovat do jednotlivých kvadrantů spektra pomocí indexů. Tento postup je rychlejší než přesouvání kvadrantů v paměti počítače. V případě FFT reálné



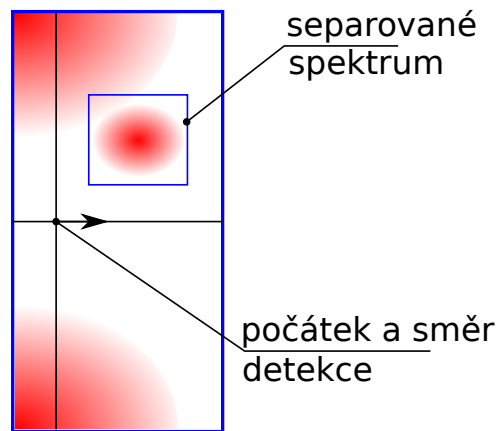
Obrázek 3.3: Způsob přemístění kvadrantů spektra.

funkce, kterou obraz zaznamenaný kamerou bezesporu je, je modul spektra prostorových frekvencí středově symetrický, informace v druhé polovině spektra je redundantní, a proto je FFT algoritmus optimalizován pouze pro výpočet poloviny spektra (v obrázku 3.3 je modře ohraničena). Takto se šetří výpočetní výkon počítače.

Jako alternativu ke knihovně FFTW jsem využil knihovnu cuFFT [43], která má velmi podobný interface a je akcelerovala pomocí GPU. V porovnání s FFTW dosahuje tato knihovna až 10× kratších výpočetních časů.

3.3.2. Detekce nosné frekvence

Aby byla rekonstrukce obrazu možná, musíme znát polohu nosné frekvence ve spektru, neboť v jejím okolí leží část spektra určená k separaci a dalšímu zpracování. Polohu nosné frekvence můžeme zjistit buď pomocí výpočtu, jak je uvedeno v [37], anebo pomocí detekčního algoritmu. Na obrázku 3.4 je schematicky znázorněno rozložení prostorových frekvencí ve spektru po výpočtu FFT hologramu. Natočení nosné frekvence vůči centrálnímu maximu spektra je dáno natočením interferenčních proužků vůči čipu kamery. Vzdálenost od středu spektra je dána prostorovou frekvencí interferenčních proužků na čipu kamery. Detekci nosné frekvence jsem implementoval jako vyhledávání maximální



Obrázek 3.4: Detekce nosné frekvence a separace části spektra.

amplitudy ve spektru prostorových frekvencí. Obecně vyjadřuje amplitudové spektrum úroveň zastoupení daných prostorových frekvencí v obraze. Za nosnou frekvenci považujeme frekvenci interferenčních proužků, které ve výstupní rovině mikroskopu vznikají skládáním referenční a předmětové rovinné vlny pod úhlem β (viz obr. 3.1). Tato frekvence má ve spektru maximální amplitudu v případě, že se referenční a předmětová rovinná vlna šíří v referenční a předmětové rovině ve směru optických os. V případě, že je v předmětové rovině vložen klínový vzorek, nešíří se procházející rovinná vlna ve směru optické osy, ale svírá s ní úhel. Interferencí s referenční vlnou vznikají interferenční proužky jiné frekvence a tato frekvence bude mít nyní ve spektru maximální amplitudu. V tomto případě nelze tedy detekci nosné frekvence použít a ta musí být fixovaná před započítím měření.

Amplituda nosné frekvence je globálně menší než amplituda nulté prostorové frekvence. Proto je třeba vyhledávání zahájit v dostatečné vzdálenosti od ní. Vyhledávání jsem nakonec implementoval jako prohledávání jednotlivých sloupců spektra tak, jak je to načrtnuto na obrázku 3.4 pomocí černé svislé čáry, kde šipka ukazuje směr prohledávání. V případě stabilně orientované kamery vůči mikroskopu lze oblast vyhledávání nosné výrazně zmenšit, proto jsem algoritmus v poslední verzi rozšířil o možnost manuálního omezení oblasti detekce nosné ze všech směrů. Po sestavení mikroskopu lze tedy nastavit minimální oblast detekce a vyhledávání tím zjednodušit.

3.3.3. Separace, apodizace a inverzní FFT spektra

Se znalostí polohy nosné frekvence můžeme provést separaci části spektra v jejím okolí. Separace se provádí kopírováním části spektra do nové paměti, na kterou bude následně aplikována inverzní FFT, čímž získáme komplexní amplitudu. Před samotným výpočtem FFT je nezbytné provést apodizaci spektra, tím se rozumí násobení spektra váhovou funkcí, neboť FFT očekává periodické spektrum prostorových frekvencí. Po separaci však vzniká na hranici spektra nespojitost, která se v rekonstruované amplitudě projevuje zákmity na jejích okrajích. Váhová funkce musí být zvolena tak, aby dobře potlačovala nespojitosti na okrajích spektra a současně netlumila frekvence, které mikroskop spolehlivě přenáší.

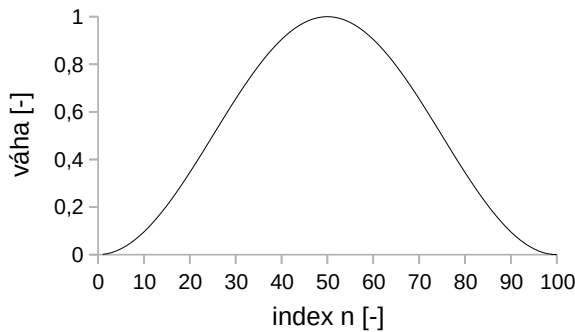
V počáteční implementaci jsme používali Hannovo okno $h(n)$, které má v jednorozměrném případě vyjádření [44]

$$h(n) = 0,5 - 0,5 \cos\left(\frac{2\pi n}{N}\right),$$

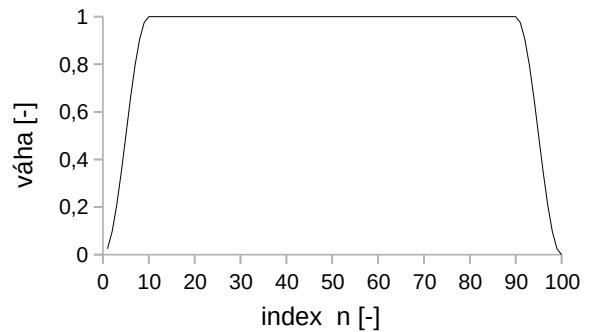
kde n je index frekvence ve spektru a N je celková šířka spektra. V našem případě, pro zpracování 2D dat, je Hannovo okno rotačně symetrické. Tato váhová funkce ovšem nadměrně tlumila i vyšší frekvence přenesené mikroskopem. Proto v současné době používáme její modifikaci $w(n)$, která tlumí intenzivně na okrajích spektra v pásmu tlumení d a současně neomezuje ostatní frekvence

$$w(n) = \begin{cases} 0,5 - 0,5 \cos\left(\frac{\pi n}{d}\right), & 0 \leq n \leq d, \\ 1, & d < n < N - d, \\ 0,5 - 0,5 \cos\left(\frac{\pi(N-n)}{d}\right), & N - d \leq n \leq N. \end{cases}$$

Při použití této funkce nastavujeme automaticky velikost separované oblasti spektra na $N \times N$, kde N je dáno velikostí maximální opticky přenesené prostorové frekvence [41] a zvolenou šířkou tlumicího pásma d . Průběhy obou funkcí jsou zobrazeny v grafech na obrázku 3.5 (jsou zobrazeny řezy rotačně symetrickými 2D funkcemi). Graf modifikované váhové funkce na obrázku 3.5(b) je zobrazen pro parametry $N = 100$ a $d = 10$.



(a) Hannova váhová funkce, $N = 100$.



(b) Modifikovaná váhová funkce.

Obrázek 3.5: Průběhy použitých váhových funkcí.

Po separaci a apodizaci následuje výpočet inverzní FFT. V apodizovaném frekvenčním spektru je nejprve nezbytné přeskupit kvadranty opačně k obr. 3.3, tj. nultá prostorová frekvence se ze středu spektra F přesouvá zpět do prvku $f_{1,1}$. Následně můžeme aplikovat

inverzní FFT a získat tak rekonstruovanou komplexní amplitudu. I v tomto případě k výpočtu inverzní FFT využíváme dva přístupy, buď pomocí knihovny FFTW, anebo GPU akcelerovanou cuFFT.

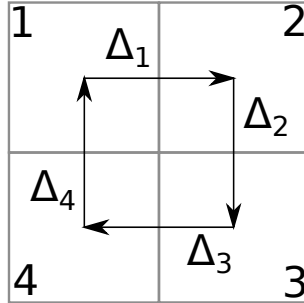
3.4. Metody navazování fáze

3.4.1. Jednoznačnost navazování fáze a fázová rezidua

Hodnoty fáze získané přímo numerickou rekonstrukcí hologramu jsou v intervalu $(-\pi, \pi)$ rad, ačkoliv odpovídající rozdíl optických drah může být často mnohem větší. Z tohoto důvodu musíme ve většině případů provést navazování fáze (*phase unwrapping*), abychom získali spojitě fázové zobrazení odpovídající skutečné fázové funkci zkoumaného vzorku.

Navazování fáze je část rekonstrukčního procesu, která je velmi citlivá na výskyt fázových reziduí v nenavázané fázi. Přitom standardní algoritmy navazování fáze (zmíněné níže) problém fázových reziduí neřeší způsobem, který by vyhovoval požadavkům na kvantitativní fázové zobrazování objektů. Fázové reziduuum leží ve středu optického víru, kde je amplituda komplexního signálu nulová [28]. V okolí fázového rezidia je navazování fáze nejednoznačné, resp. je závislé na zvolené cestě. V první řadě je tedy nutné rezidua detekovat. To můžeme jednoduše provést přímo v obrazové fázi, protože fázová rezidua nesplňují podmínku nezávislosti navazování na zvolené dráze (jak je definována v [45]). Detekce rezidia v diskrétním fázovém obraze je provedena jako součet (rovnice 3.1) fázových diferencí ve čtyřech sousedních pixelech (viz obr. 3.6). Dle výsledného znaménka sumy lze reziduu přiřadit kladný nebo záporný topologický náboj C ,

$$C = \sum_{i=1}^4 \Delta_i . \quad (3.1)$$



Obrázek 3.6: Detekce rezidia ve čtyřech pixelech.

Rezidua se mohou vyskytovat jako následek příliš vysokého gradientu fázové funkce vzorku vzhledem k velikosti oblasti hlavního maxima bodové rozptylové funkce mikroskopu (PSF – point spread function). Tyto gradienty se projevují jako místa s výrazně nižší hodnotou obrazové amplitudy, kterou můžeme využít jako dobrý indikátor spolehlivosti rekonstruované fáze (mapu kvality fáze [46]). Pixely s nízkou hodnotou amplitudy odpovídají většímu rozptylu hodnot fáze [47], takže je můžeme využít ke generování křivek nespojitosti (branch cut – křivka definující nespojitost ve fázovém zobrazení) pro navázání a následně ke korekci navázané fáze.

Fázová rezidua jsou hlavním zdrojem poruch při navazování fáze. V případě výskytu fázových reziduí v obraze je výsledná navázaná fáze silně závislá na zvolené navazovací metodě.

Z hlediska přístupu různých metod k navazování fáze je vhodné rozdělit navazovací metody do dvou skupin:

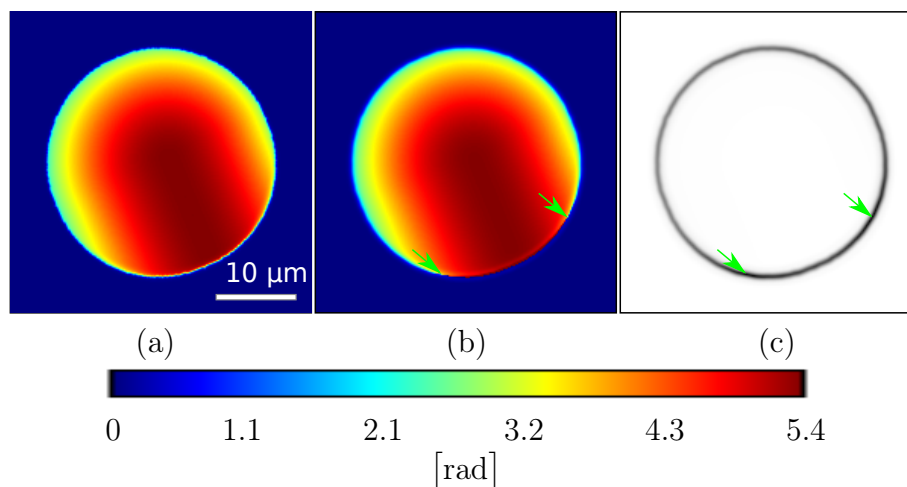
1. **Cestu sledující algoritmy** (Path-Following methods) – Goldstein’s Branch Cut [48], Quality-Guided Path Following [49, 50], Mask Cut [51, 46], atd.

Cestu sledující algoritmy navazují fázi pixel po pixelu podle cesty, která je dána zvoleným algoritmem. Tento přístup zaručuje, že hodnoty fáze v každém pixelu jsou upraveny pouze přidáním $n2\pi$ rad, kde n je celočíselná hodnota. Tyto algoritmy jsou obvykle rychlejší a paměťově úspornější než globální metody, ale některé z nich dávají rozumné výsledky pouze s fází, která neobsahuje rezidua.

2. **Globální algoritmy** (Minimum-Norm methods) – Weighted Least-Squares [52], Minimum L^p -Norm, atd.

Globální algoritmy jsou založeny na minimalizaci rozdílu mezi gradienty navázané a nenavázané fáze. Na rozdíl od předchozí skupiny algoritmů není zaručeno, že hodnoty fáze jsou změněny jen o celočíselné násobky 2π , proto se po navázání obvykle provádí ještě další zpracování. Globální metody obvykle zaručují spojitý výsledek navázání, a to i v případě, že jsou v obraze fázová rezidua.

Schopnost algoritmů navazovat fázi s rezidui jsme otestovali na modelu fázového objektu (obr. 3.7), ve kterém se vyskytují fázová rezidua.



Obrázek 3.7: Modelový objekt pro testování metod navazování fáze a jeho zobrazení: (a) původní fáze funkce propustnosti modelu, (b) fázové zobrazení (zelené šipky vyznačují polohy reziduí), (c) odpovídající obrazová amplituda. Pro výpočet zobrazení byla uvažována numerická apertura objektivů $NA = 0,25$, osvětlení plošným zdrojem vyplňujícím pupilu kondenzoru s vlnovou délkou $\lambda = 650$ nm.

3.4.2. Nejmenší čtverce po blocích – BLS

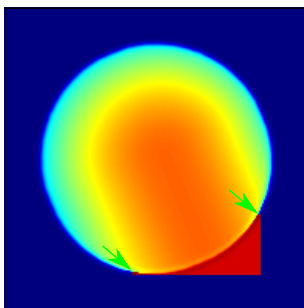
Block Least-Squares (BLS) je kombinovaná metoda navazování fáze. Díky zpracování fáze po blocích je metoda méně výpočetně náročná a současně velmi rychlá. Navazování fáze touto metodou [53] lze rozložit do následujících tří kroků.

1. Nejprve je fázový obraz rozdělen na bloky, z nichž každý musí obsahovat pouze jeden fázový skok.
2. Následně se provede navázání fáze v jednotlivých blocích některou z jednoduchých navazovacích metod.
3. V posledním kroku se provede spojení bloků do výsledné navázané fáze. Při spojování jednotlivých bloků se pomocí metody nejmenších čtverců hledá celočíselný r -násobek 2π , který minimalizuje sumu S ,

$$S = \sum_{i=0}^N (\Delta\varphi_i + 2\pi r)^2,$$

kde $\Delta\varphi_i$ je rozdíl hodnot fáze sousedících pixelů na hranici spojovaných bloků a N je jejich počet.

Odolnost proti nejednoznačnosti navazování způsobené výskytem fázových reziduí je demonstrována na obrázku 3.8, kde je navázána fáze zobrazení na obrázku 3.7. Je vidět že metoda selhává.



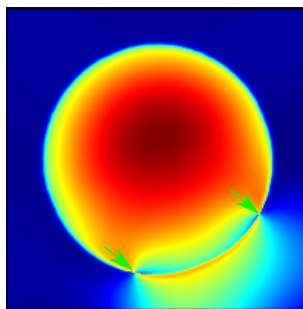
Obrázek 3.8: Selhání navazování fáze na obr. 3.7 metodou BLS.

3.4.3. Nejmenší čtverce – LS

Tato metoda patří čistě do skupiny globálních metod, které hledají navázanou fázi v celém zobrazení řešením soustavy vhodných rovnic. Metoda nejmenších čtverců [45] minimalizuje sumu čtverců odchylek mezi gradienty nenavázané fáze a hledané navázané fáze. Možným způsobem řešení výpočtu navázané fáze pomocí metody nejmenších čtverců je sestavení soustavy lineárních rovnic a její následné vyřešení. Soustava rovnic takto vytvořená obsahuje přibližně $2N$ rovnic (běžně stovky tisíců), kde N je celkový počet pixelů v obraze navazované fáze. Tím vzrůstá nejen náročnost výpočtu, ale také náročnost na obsazenou paměť počítače. Soustavu rovnic lze řešit přímo pomocí metod pro práci s řídkými maticemi, nebo převodem na problém řešení Poissonovy rovnice. Podrobný popis je uveden v [45].

Metodu jsem implementoval tak, že k řešení Poissonovy rovnice jsem využil diskrétní kosinovou transformaci (DCT). Tato metoda dává velmi dobré výsledky v případě, že se ve fázových datech nevyskytují fázová rezidua. Vypočtená navázaná fáze je spojitá, ale její hodnoty nemusejí přesně odpovídat hodnotám původní nenavázané fáze (jde o optimální řešení). Metoda je vhodná pro zpracování obrazové fáze biologických vzorků, neboť zaručuje spojitý průběh navázané fáze, který u biologických vzorků můžeme očekávat. I tato metoda není zcela vhodná pro navazování fáze v případě výskytu fázových reziduí, jejich

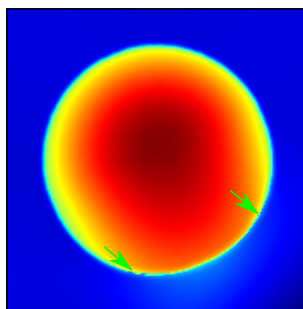
výskyt ovlivňuje poměrně velkou oblast v jejich okolí, jak je demonstrováno na obrázku 3.9.



Obrázek 3.9: Selhání navazování fáze na obr. 3.7 metodou nejmenších čtverců.

3.4.4. Vážené nejmenší čtverce – WLS

Algoritmus výpočtu navázané fáze váženou metodou nejmenších čtverců vychází z předchozího algoritmu, který je rozšířen o možnost definovat relativní váhu jednotlivým hodnotám vzorků fáze. Implementovaný algoritmus je znám pod označením PCG (Preconditioned Conjugate Gradient [54]). Jedná se o rychlou iterační metodu, která jako svou hlavní



Obrázek 3.10: Navazování fáze na obr. 3.7 metodou vážených nejmenších čtverců.

část využívá algoritmus výpočtu navázané fáze metodou nejmenších čtverců. Přesný popis algoritmu je uveden ve [45, 52]. Jako váhové koeficienty používáme obecně mapu kvality, což může být např. derivace fáze nebo v holografii amplituda signálu. V holografické mikroskopii používáme jako dobrý ukazatel kvality fáze právě amplitudu, jež má v místech fázových reziduí minimální hodnoty. Algoritmus je v tomto případě výrazně odolnější vůči výskytu reziduí, neboť samotná rezidua a jejich okolí mají při navazování velmi nízkou váhu. Nicméně i v tomto případě dochází k ovlivnění jistého okolí v navázané fázi.

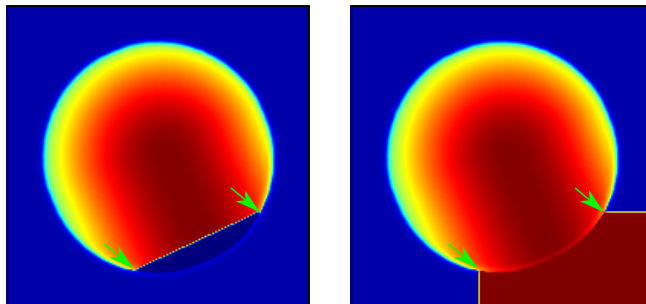
3.4.5. Goldsteinův branch cuts algoritmus

Jedná se o klasickou cestu sledující metodu navazování fáze [48], tentokrát ovšem rozšířenou o techniku, která zaručuje jednoznačnost navazování. Navazování probíhá v následujících třech hlavních krocích:

1. Nejprve se detekují fázová rezidua.
2. Následuje propojení reziduí pomocí vhodného algoritmu [55] (vytvoření křivek nespojitosti). Fázová rezidua lze propojovat do dipólů, nebo větších skupin tak, aby suma všech topologických nábojů reziduí byla nulová.

3. V posledním kroku se provádí navázání fáze s tím, že navazovací algoritmus se zastavuje na vytyčených křivkách nespojitosti.

Tímto způsobem lze zabezpečit jednoznačné navázání fáze (viz obr. 3.11). Výsledný průběh navázané fáze však silně závisí na metodě, která je použita k propojení reziduí. V místech křivek nespojitosti však po navázání zůstávají fázové skoky.



Obrázek 3.11: Dva možné výsledky navazování fáze na obr. 3.7(b) metodou Goldstein's branch cuts.

3.5. Navazování fáze s korekcí fázových nespojitostí

S ohledem k požadavkům naší laboratoře na přesné vážení buněk a jejich částí na základě záznamu kvantitativního fázového zobrazení a současném častém výskytu reziduí v jejich fázových obrazech jsem vyvinul a implementoval nový algoritmus pro zpracování nenavázané fáze patřící do skupiny cestu sledujících algoritmů. Hlavní výhoda algoritmu spočívá ve způsobu, jakým koriguje poškozenou fázi v okolí fázových reziduí.

3.5.1. Výchozí metoda navazování

Metoda navazování vychází z Flynnova mask cut algoritmu [46], který je variantou Goldsteinova branch cuts [48] algoritmu. Křivky nespojitosti jsou v tomto případě generovány s ohledem na hodnoty amplitudy. Všechny křivky nespojitosti v jednom fázovém obraze nazýváme primární maskou.

Z principu metod využívajících pro navazování křivky nespojitosti plyne, že skok v navázané fázi zůstává právě v místech, kde byly křivky nespojitosti definovány. Pokud se tyto fázové nespojitosti vyskytují v buňce nebo jejím těsném okolí, znemožňují provést její vážení, nebo je výsledná hmotnost silně ovlivněna optickým vírem a jeho okolím. Proto musí být metody využívající křivky nespojitosti rozšířeny o algoritmus korekce těchto nespojitostí.

3.5.2. Algoritmus korekce fázových nespojitostí

Na vstupu algoritmu je obrazová fáze a amplituda v podobě 2D polí reálných čísel, fáze je v intervalu $(-\pi, \pi)$ a amplituda je kladná. Výstup je navázaná fáze bez nespojitostí ve 2D poli reálných čísel o stejné velikosti, jako má vstup. Algoritmus vnitřně používá dvě binární masky taktéž stejné velikosti, jako mají vstupní data. Podobně jako u [46] jsou nejprve detekována fázová rezidua; jejich polarity a pozice jsou uloženy do seznamu. Algoritmus následně zvolí jedno reziduum, nastaví jeho polohu v primární masce na jedna.

Na počátku tedy primární maska pokrývá pouze jediný bod – reziduum. Následně algoritmus hledá v těsném okolí primární masky amplitudu s minimální hodnotou. Jakmile je nalezena, na poloze bodu s minimální amplitudou je v primární masce nastavena hodnota jedna. Detekce minimální amplitudy se provádí opakovaně, čímž se primární maska postupně rozrůstá do okamžiku, než je suma polarit reziduí překrytých primární maskou rovna nule. Tak dojde k propojení a vybalancování nejméně dvou reziduí. Tímto způsobem je primární maska vytvořena pro všechna rezidua v obrazové fázi. V následujícím kroku provádí Flynnův algoritmus erozi se zachováním konektivity reziduí, což může být nezbytné, neboť primární maska může být poměrně velká. Erodivaná maska je následně použita jako křivka nespojitosti. V mém algoritmu se tento krok vynechává a přímo se provádí navázání fáze v místech, kde je primární maska nulová (obr. 3.12(d)). V místech, kde primární maska byla rovna jedné, je v tento okamžik fáze nedefinovaná.

Korekce fáze začíná dilatací primární masky s použitím dilatačního jádra stejné velikosti jako je průměr oblasti hlavního maxima PSF mikroskopu. Výsledkem této operace je sekundární maska překrývající všechny pixely, jejichž hodnota by mohla být poškozena optickým vírem. Předpokládáme totiž, že optický vír vzniká v okolí místa s vysokým gradientem fázové funkce vzorku (například okraj buňky), které ovlivní fázi zobrazení přibližně do vzdálenosti dané právě výše uvedeným parametrem PSF. Všechny hodnoty fáze pokrývané sekundární maskou tedy považujeme za nespolehlivé.

Hodnoty fáze v oblasti sekundární masky můžeme rychle a snadno vypočítat pomocí metody image-inpainting [56]. Tyto hodnoty jsou dobrým odhadem fáze jak v místě, kde není definována (primární maska), tak i v místech, kde ji považujeme za nespolehlivou (sekundární maska). Odhad hodnot fáze je založen na maskované konvoluci navázané fáze s jádrem o velikosti 3×3 (tabulka 3.1), která nám dává hladký výsledek, jak je vidět na obrázku 3.12(f). Konvoluce může být provedena podle potřeby opakovaně s přihlédnutím k poměru velikosti PSF a konvolučního jádra. V posledním kroku algoritmu je spočítána normalizovaná amplituda v prostoru, kde sekundární maska je rovna jedné. Následně je normalizovaná amplituda použita jako váhový koeficient navázané fáze w_s . Váhový koeficient odhadnuté fáze volíme jako komplementární $w_i = 1 - w_s$. Výsledná korigovaná fáze φ je nakonec spočtena jako vážený aritmetický průměr (3.2) z odhadu fáze φ_i a z navázané fáze φ_s ,

$$\varphi = \frac{w_s \varphi_s + w_i \varphi_i}{w_s + w_i} = w_s \varphi_s + w_i \varphi_i. \quad (3.2)$$

Tabulka 3.1: Konvoluční jádro použité k doplnění chybějící fáze metodou image-inpainting [56].

0.125	0.125	0.125
0.125	0	0.125
0.125	0.125	0.125

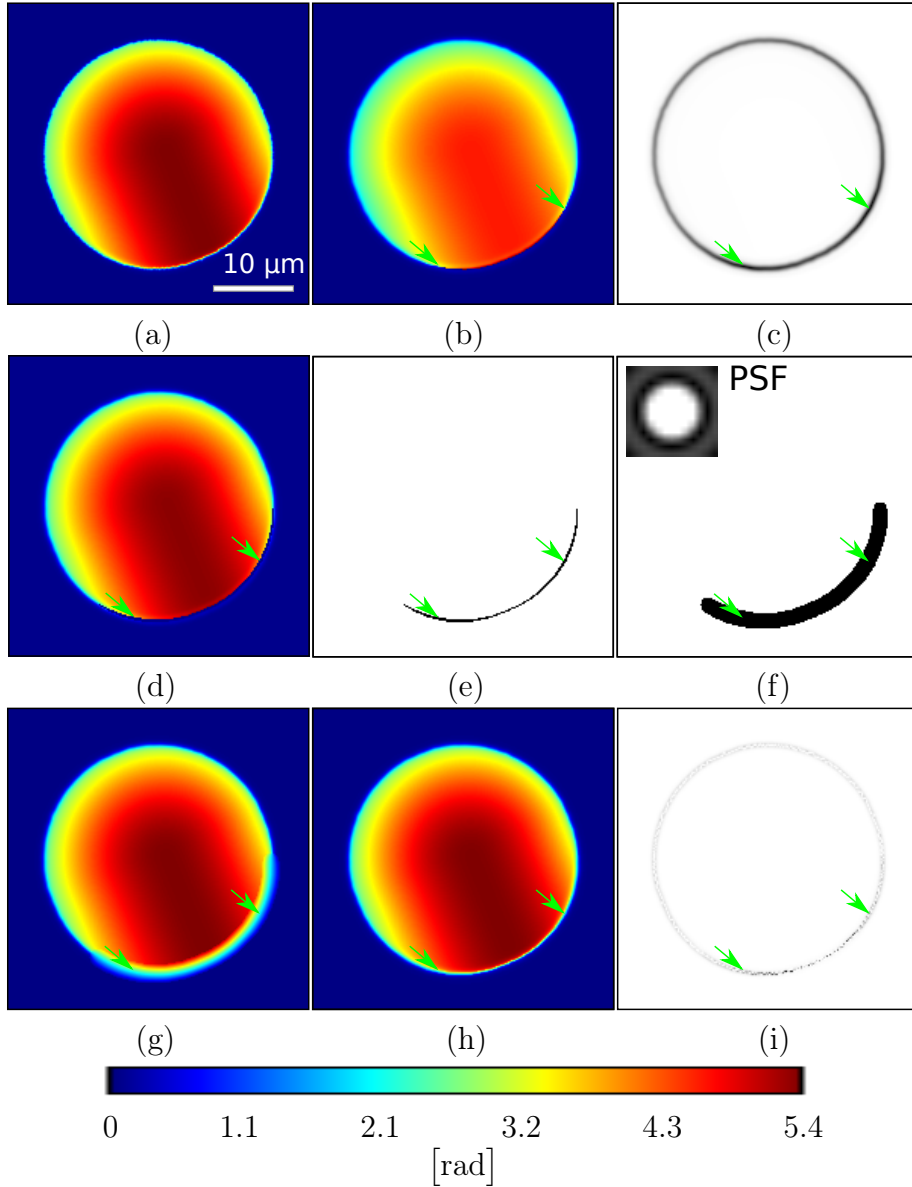
Výsledek výpočtu pomocí popsaného algoritmu je na obrázku 3.12(h). Celý korekční algoritmus lze shrnout v šesti krocích:

1. Detekce fázových reziduí.
2. Generování křivek nespojitosti ve formě primární masky trasováním hodnot amplitudy.
3. Navázání fáze.

4. Generování sekundární masky s ohledem na velikost PSF mikroskopu.
5. Odhad fáze v místech, kde je sekundární maska rovna jedné.
6. Výpočet korigované fáze.

3.5.3. Numerické simulace

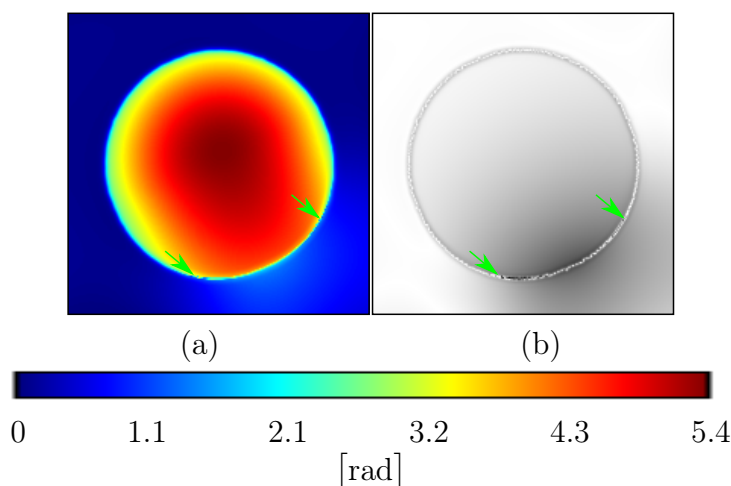
K ověření funkčnosti algoritmu byla použita numerická simulace. Model buňky byl vytvořen jako funkce propustnosti s fázovou funkcí zobrazenou na obr. 3.12(a). Následně bylo



Obrázek 3.12: Numerická simulace rekonstrukce a korekce fázového obrazu ovlivněného optickými víry pomocí nově navrženého algoritmu: (a) původní fáze funkce propustnosti modelu, (b) fázové zobrazení (zelené šipky v místech reziduí), (c) odpovídající obrazová amplituda, (d) navázaná fáze, (e) primární maska (branch cut – křivky nespojitosti), (f) PSF mikroskopu (3x zvětšená) a sekundární maska dilatovaná vzhledem k PSF, (g) odhadnutá fáze, (h) korigovaná fáze, (i) absolutní hodnota rozdílů mezi korigovanou a původní fází.

spočteno zobrazení (obr. 3.12(b)) pomocí metody popsané v [57] pro mikroskopový objektiv 10x/0,25 a osvětlení plošným zdrojem, který vyplňoval pupilu kondenzoru, s vlnovou délkou světla 650 nm.

Korigovaná fáze, jak je zobrazena na obr. 3.12(h), odpovídá velmi dobře původní fázi modelu (obr. 3.12(a)). Jak se dalo očekávat, největší rozdíly (viz obr. 3.12(i)) jsou patrné v okolí korigované oblasti, kde byla fáze silně ovlivněna optickými víry. Rozdíly podobných hodnot však můžeme vidět i v oblastech, kde korekce nebyla provedena, pouze jako důsledek omezené rozlišovací schopnosti mikroskopu dané PSF znázorněnou v obrázku 3.12(f). Globální rozdíl mezi fází modelu a korigovanou obrazovou fází můžeme vyjádřit součtem absolutních hodnot rozdílů přes celý obraz. V tomto případě je úhrnná chyba korekce 194 rad. Můžeme porovnat tento přístup se standardním navazováním pomocí nejmenších čtverců [52], výpočet pomocí PCG (preconditioned conjugate gradient) s 250 iteracemi, což je globální metoda s amplitudou využitou jako váhový koeficient. Z výsledného srovnání s fázovou funkcí modelu je patrné (obr. 3.13), že rozdíly jsou mnohem výraznější a součet absolutních hodnot rozdílů je v tomto případě 120 409 rad, tedy přibližně o tři řády vyšší než v případě mnou navržené metody.

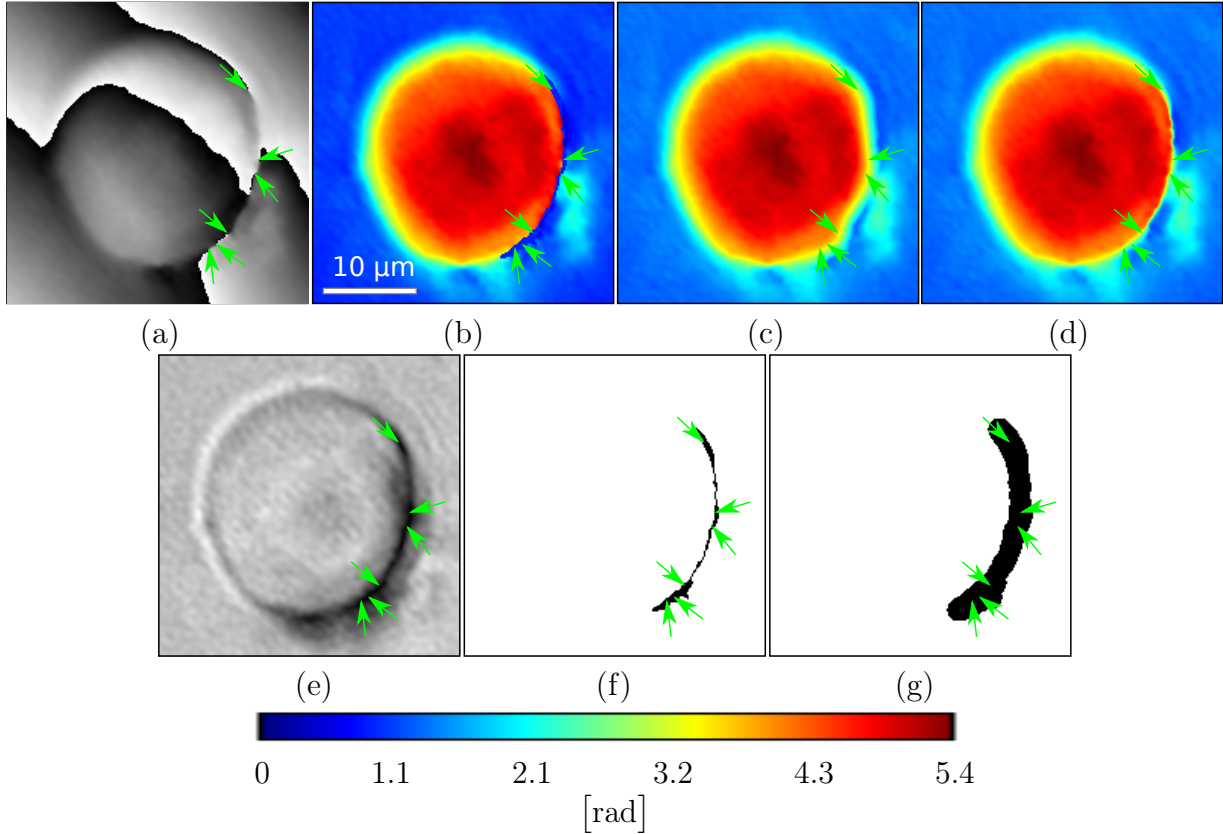


Obrázek 3.13: Numerická simulace rekonstrukce fázového obrazu ovlivněného optickými víry: (a) fáze navázaná metodou vážených nejmenších čtverců, (b) absolutní hodnota rozdílů mezi navázanou a původní fází.

3.5.4. Experimentální ověření

Korekční algoritmus byl experimentálně otestován při sledování živých buněk na koherenci řízeném holografickém mikroskopu (CCHM [37]) s objektivem 10x/0,25. Použili jsme plošný zdroj s vlnovou délkou 650 nm, který vyplňoval pupilu kondenzoru. Sledovaným vzorkem byla krysí spontánně transformovaná rakovinná buňka LW13K2 [58] ve standardním médiu M1H. Obrázek 3.14(a) a 3.14(e) ukazuje její obrazovou fázi a amplitudu po holografické rekonstrukci. Je zřejmé, že minimální hodnoty amplitudy se vyskytují společně s fázovými rezidui na okraji buňky. Po navázání fáze (obr. 3.14(b)) byla primární maska (obr. 3.14(f)) rozšířena a sekundární maska (obr. 3.14(g)) byla použita k odhadu chybějících hodnot fáze (obr. 3.14(c)). Nakonec byla spočtena chybějící fáze dle (3.2). Výsledek korekce na obr. 3.14(d) lze považovat za velmi dobrý. Podobný výsledek posky-

tuje popsaná metoda ve většině případů rekonstrukce fázového zobrazení živých buněk postiženého přítomností fázových reziduí.

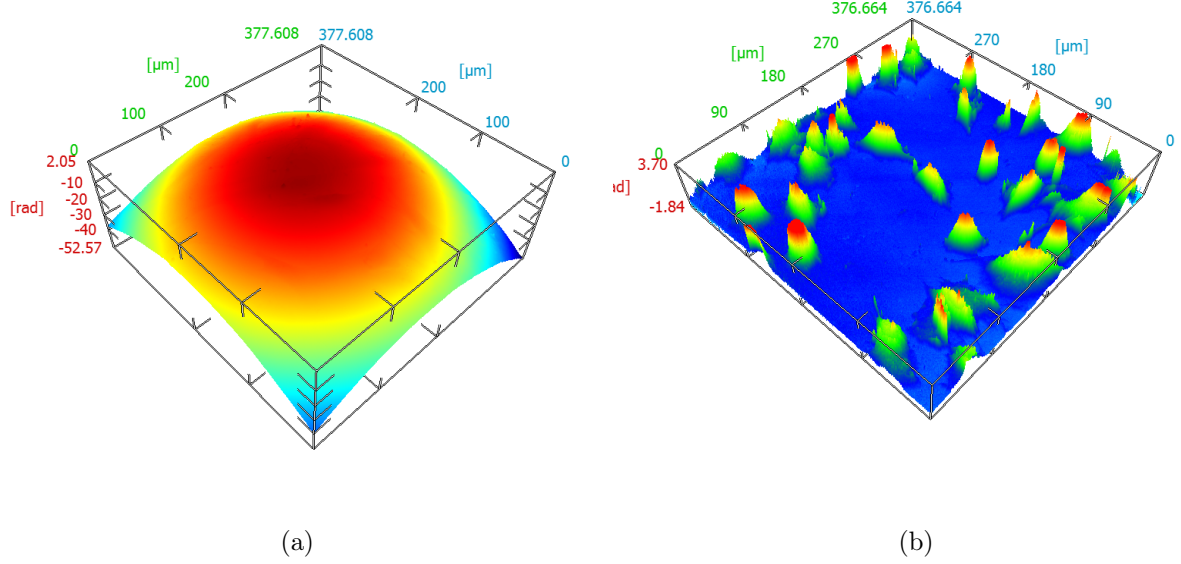


Obrázek 3.14: Rekonstrukce a korekce fázového zobrazení živé rakovinné krysí buňky LW13K2 [58] postiženého optickými víry: (a) obrazová fáze získaná z CCHM (s objektivem 10x/0,25 a plošným zdrojem světla s vlnovou délkou světla $\lambda = 650$ nm), (b) navázaná fáze, (c) odhadnutá chybějící fáze, (d) korigovaná fáze, (e) obrazová amplituda, (f) primární maska, (g) sekundární maska.

3.6. Kompenzace deformací navázané fáze

Po navázání rekonstruované fáze bychom v případě ideálního holografického mikroskopu bez vložení vzorku očekávali konstantní hodnoty navázané fáze. Ve většině případů se ovšem do zobrazení fáze promítají ne zcela shodný průběh optických parametrů referenční a předmětové větve, takže vzniká fázová deformace. Fázová deformace bývá často výrazně větší než užitečná informace o zkoumaném vzorku (viz obr. 3.15). Proto je nutné provést kompenzaci fázové plochy například pomocí algoritmu dynamické kompenzace deformace fáze, který navrhl Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D. [3, 4, 59], který jsem implementoval a optimalizoval pro zpracování obrazu v reálném čase. Algoritmus je založen na proložení obrazové fázové plochy kompenzační plochou pomocí metody nejmenších čtverců. Při inicializaci je v navázané fázi ručně označena oblast, považovaná za pozadí obrazu, v němž by fáze měla nabývat konstantní hodnoty. Hodnoty pozadí jsou následně proloženy metodou nejmenších čtverců kompenzační plochou, která je posléze odečtena od navázané fáze. Tím získáváme kompenzovanou fázi, ze které lze prahováním získat binární

masku pozadí i mimo ručně specifikované oblasti. V následujícím obraze navázané fáze se hodnoty pozadí získávají využitím binární masky získané v předchozím kroku. Metoda vyžaduje neúplné pokrytí zorného pole buňkami a předpokládá dostatečně malou změnu polohy buněk mezi dvěma následujícími zobrazeními.



Obrázek 3.15: 3D zobrazení (a) navázané a (b) kompenzované fáze. Dynamický rozsah fáze před kompenzací je přibližně 54 rad, zatímco užitečná data jsou pouze v rozsahu 5 rad, jak je vidět na zobrazení po kompenzací. Jde o zobrazení krysích rakovinných buněk LW13K2 [58] v mikroskopu CCHM s objektivem 10x/0,25 a plošným zdrojem světla s vlnovou délkou světla $\lambda = 650$ nm.

Vstupními parametry algoritmu je sloupcový vektor hodnot pozadí navázané fáze \vec{Z} o m prvcích, těmito hodnotám příslušející vektory souřadnic \vec{X} a \vec{Y} stejné délky v souřadnicovém systému fázového obrazu a zvolený stupeň kompenzačního polynomu *polyDegree*. Dle stupně polynomu vygenerujeme matici hodnot \mathbf{A} o rozměrech $m \times n$, kde

$$n = (\text{polyDegree} + 1)(\text{polyDegree} + 2)/2$$

a řádky matice \mathbf{A} mají dle stupně polynomu tvar:

1. $\mathbf{A}_i = [1, x, y]$,
2. $\mathbf{A}_i = [1, x, y, x^2, xy, y^2]$,
3. $\mathbf{A}_i = [1, x, y, x^2, xy, y^2, x^3, x^2y, xy^2, y^3]$,

kde $x = X_i$ a $y = Y_i$ jsou hodnoty na i -té pozici vektoru. Výpočet vektoru koeficientů kompenzačního polynomu \vec{B} je proveden jako

$$\vec{B} = \mathbf{A}^+ \vec{Z},$$

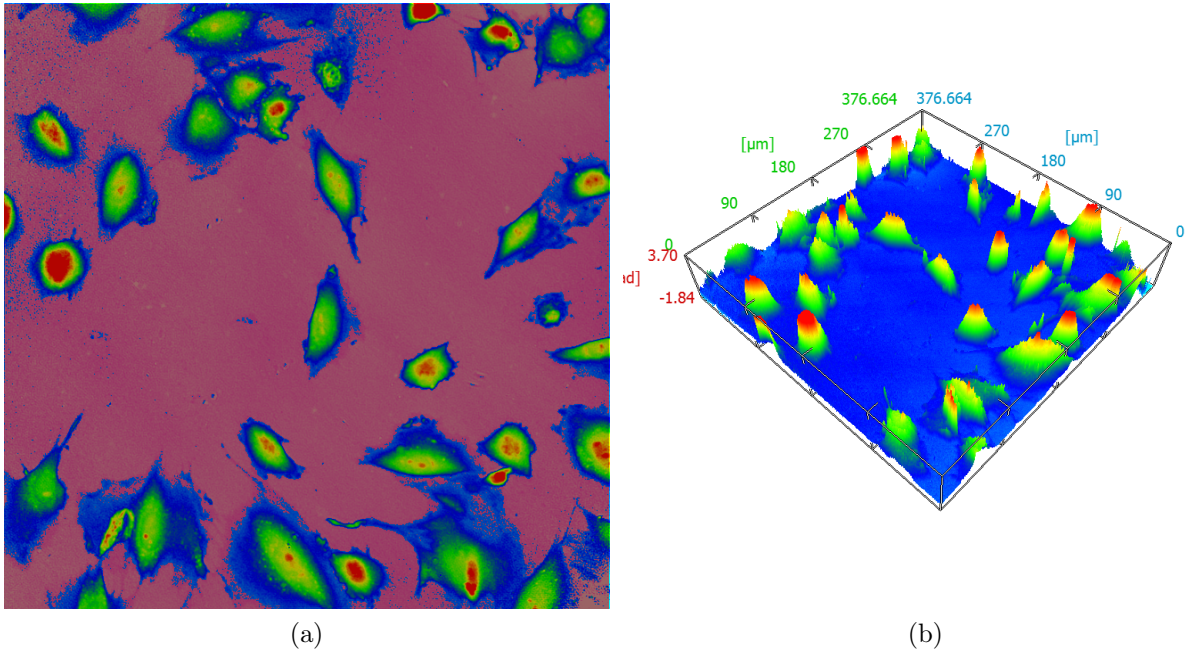
kde \mathbf{A}^+ je Moore-Penroseova pseudoinverze

$$\mathbf{A}^+ = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T.$$

Výpočet inverzní matice jsem provedl pomocí LU dekompozice [60].

Protože velikost matice \mathbf{A} je dána převážně délkou vstupních vektorů m , která je přímo závislá na velikosti plochy pozadí fáze v obraze, může nabývat poměrně velkých hodnot (např. 100000×6). Z tohoto důvodu jsou maticová násobení ve výpočtu pseudoinverzní matice výpočetně velmi náročná. Proto jsem i v tomto algoritmu využil GPU akcelerace k urychlení výpočtů. NVidia CUDA disponuje knihovnou cuBLAS [61], která je určena pro lineární maticové výpočty. Knihovna umožnila výrazné zrychlení maticového násobení, které tvořilo převážnou část výpočetního času. Důležitou částí kompenzace je také výpočet inverzní matice pomocí LU dekompozice, a ačkoliv algoritmus výpočtu LU dekompozice je vysloveně sériový a výpočetně náročný, velikost čtvercové matice $\mathbf{A}^T \mathbf{A}$, ze které se inverze počítá, je $n \times n$ a je výrazně menší než velikost matice \mathbf{A} . Díky tomu i celkový čas na výpočet inverzní matice je krátký.

Na obrázku 3.16 je příklad fázového obrazu buněk poté, co bylo vyrovnáno pozadí pomocí kompenzačního algoritmu. Růžová barva označuje všechny fázové hodnoty považované za hodnoty pozadí, v tomto případě již dynamicky vybrané. Pozadí tvoří přibližně 70 % celkové plochy obrazu (při velikosti obrazu $680 \times 680 \text{ px}^2$), k vyrovnání byl použit polynom třetího řádu. Matice \mathbf{A} tedy v tomto případě obsahovala 320000×10 prvků.



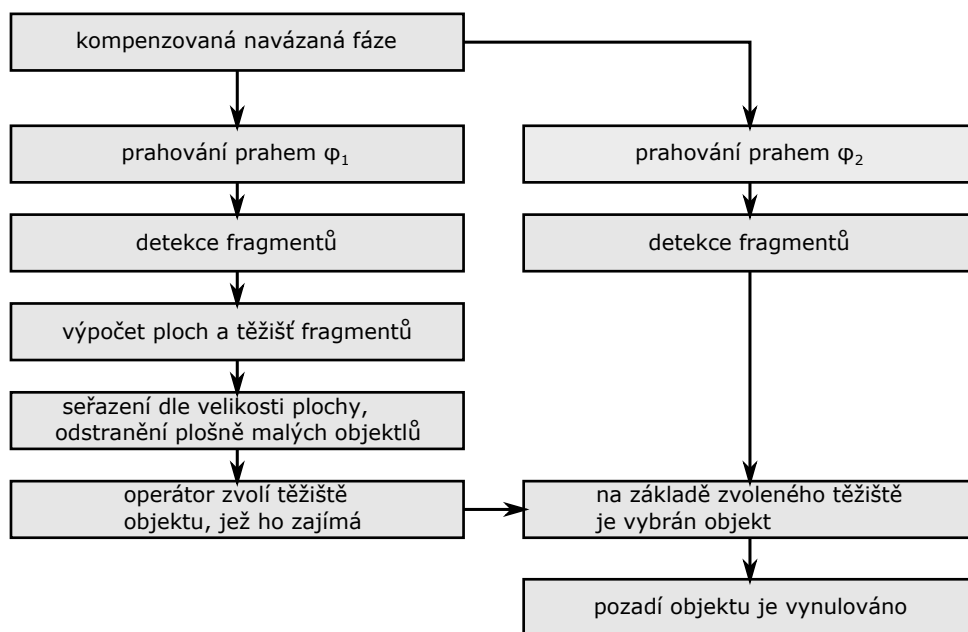
Obrázek 3.16: (a) Fázový obraz buněk s vyrovnaným pozadím a (b) jejich 3D zobrazení. Krysí rakovinné buňky LW13K2 [58] v mikroskopu CCHM s objektivem 10x/0,25 a plošným zdrojem světla s vlnovou délkou světla $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Po narovnání fázové plochy můžeme přistoupit k segmentaci a dalšímu zpracování obrazu buněk.

3.7. Segmentace buněk

Segmentace buněk vychází z algoritmu pro detekci fragmentů tak, jak je popsán v kapitole 2.5.3 s tím, že je rozšířen o některé další funkce. Na obrázku 3.17 je diagram popisující

funkci algoritmu detekce buněk. Algoritmus zpracovává kompenzovanou, a dle potřeby



Obrázek 3.17: Algoritmus segmentace a detekce buněk.

i korigovanou (kap. 3.5), navázanou fází.

V prvním kroku se provede dvojí prahování s hodnotou fáze φ_1 a φ_2 . φ_1 je nejnižší hodnota fáze, kterou ještě bezpečně považujeme za signál buňky, obvykle ji nastavujeme tak, aby se odprahovala pouze jádra buněk v obraze. φ_2 je nejvyšší hodnota fáze považovaná bezpečně za fázové pozadí. Nastavujeme ji tedy tak, aby pokryla všechny hodnoty fáze, které považujeme za pozadí a současně nezasahovala do buněk v obraze. Aplikováním prahování podle obou prahů získáváme dva binární obrazy, na které v dalším kroku aplikujeme detekci fragmentů podle algoritmu popsaneho v části 2.5.3.

Detekce fragmentů vygeneruje seznam samostatných částí binární masky. Následně se spočte plocha každé z nich a provede se seřazení podle velikosti plochy. V tento okamžik si operátor může zvolit, jakou nejmenší plochu má algoritmus ještě předat k dalšímu zpracování. Tímto způsobem lze odfiltrovat malé objekty, které obvykle vznikají v okolí buňky jako důsledek prahování, případně pixely zasažené impulsním šumem, nebo nečistoty v obraze.

Detekovaným fragmentům, které splní předchozí podmínku, je vypočten geometrický střed a těžiště. Geometrickým středem fragmentu C rozumíme průměrnou polohu všech pixelů fragmentu

$$x_C = \frac{\sum_{i=0}^n x_i}{n}, \quad y_C = \frac{\sum_{i=0}^n y_i}{n},$$

kde n je počet pixelů fragmentu, x_i a y_i jsou souřadnice polohy jednotlivých pixelů. Podobně je vypočtena i poloha těžiště

$$x_T = \frac{\sum_{i=0}^n m_i x_i}{m}, \quad y_T = \frac{\sum_{i=0}^n m_i y_i}{m},$$

kde m je celková hmotnost fragmentu (proporcionálně závislá na fázi) a m_i jsou dílčí hmotnosti v jednotlivých pixelech fragmentu.

Těžiště a geometrický střed se v programu Q-PHASE (program ovládání mikroskopu a zpracování obrazu v CCHM, kap. 3.8) na vyhovujících objektech zobrazí jako červený

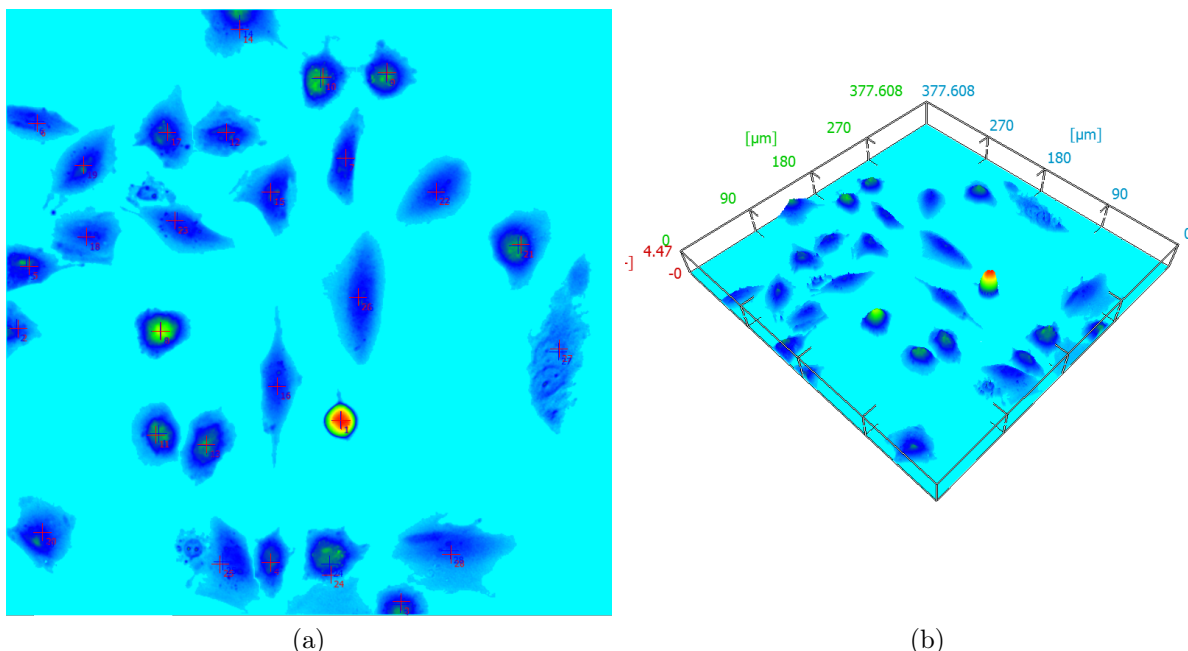
a modrý křížek. V následujícím kroku je nutný zásah operátora, který kliknutím na křížek těžiště zvolí buňku, již chce sledovat. Algoritmus zvolí buňku tak, že nejprve provede inverzi masky pozadí (určená pomocí φ_2) a následně vybere objekt odpovídající polohou poloze zvoleného těžiště. Okolí zvolené buňky je vynulováno a obraz buňky se zobrazí, případně uloží do souboru.

3.7.1. Trasování buněk

Trasováním buněk se rozumí vyhodnocení změn polohy vybrané buňky během experimentu. Protože procedura segmentace buněk nám předává mimo oddělených fragmentů také souřadnice jejich geometrických středu a těžišť, můžeme tyto údaje využít ke sledování změn polohy buněk v čase. Algoritmus sledování buněk je rozšířením segmentačního algoritmu o automatickou selekci buňky. Automatický výběr buňky funguje za předpokladu malých změn v její poloze mezi jednotlivými snímky. Známe-li těžiště buňky v čase t_n , lze jej použít k automatické selekci buňky v čase t_{n+1} místo manuálního zásahu operátora. Při trasování lze současně počítat řadu dalších parametrů:

- plochu buňky,
- celkovou hmotu buňky,
- polarizace (vektor směřující z geometrického středu do těžiště),
- rychlost růstu,
- rychlost pohybu buňky,
- morfologické parametry.

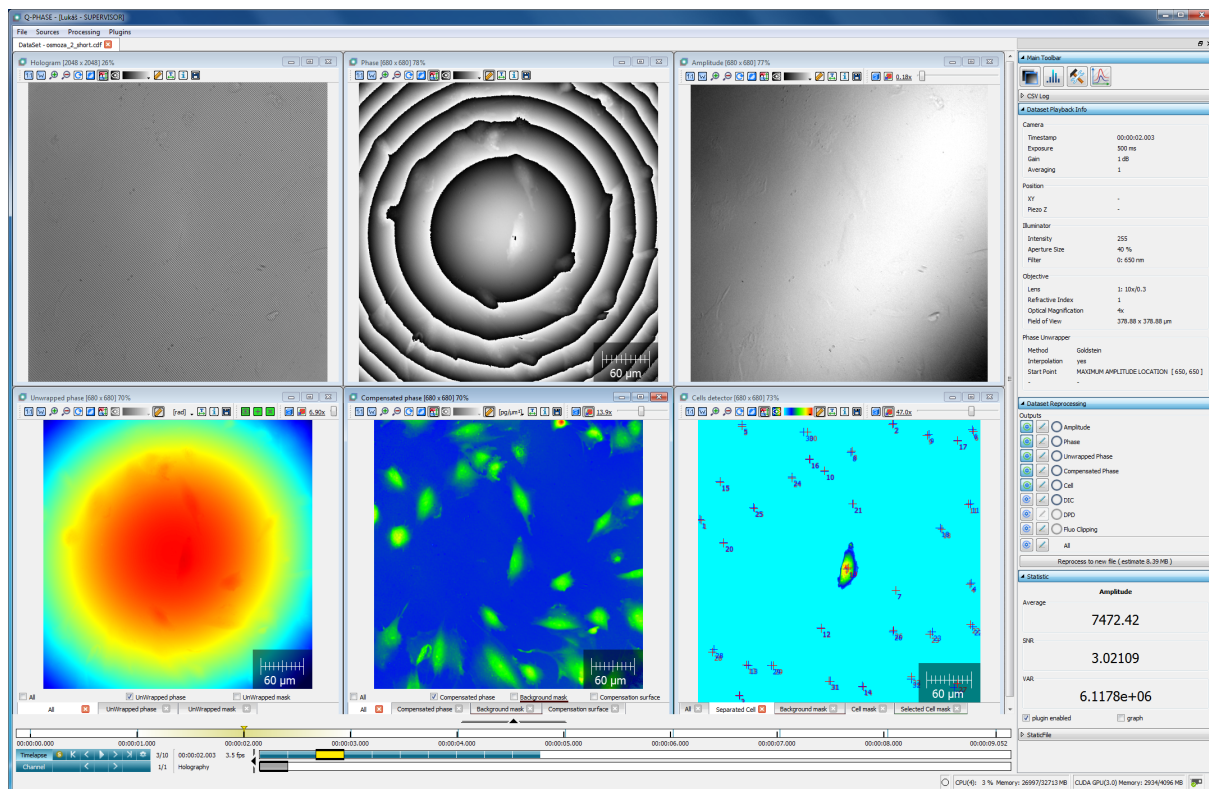
Na obrázku 3.18 jsou zobrazeny segmentované buňky z obrázku 3.16 s vynulovaným pozadím. V průběhu měření jsou buňky neustále trasovány a výsledná data mohou být uložena. Křížky v obraze představují geometrické středy a těžiště buněk.



Obrázek 3.18: (a) Fázový obraz buněk dle obr. 3.16 s odstraněným okolím a (b) jejich 3D zobrazení.

3.8. Software holografického mikroskopu Q-PHASE

Software mikroskopu je vyvíjen ve společnosti TESCANA ORSAY HOLDING, a.s. pod označením Q-PHASE, obr. 3.19. Strukturu softwaru jsem navrhl s ohledem na možnost budoucího rozšíření jako modulární, kde jsou jednotlivé algoritmy zpracování obrazu reprezentovány moduly (viz obr. 3.20). Je tak možné snadno přidat nové metody zpracování obrazu a vyhnout se úpravám celého programu. Modularita programu je jednou ze dvou stěžejních vlastností programu. Druhou důležitou vlastností Q-PHASE je podpora zpra-

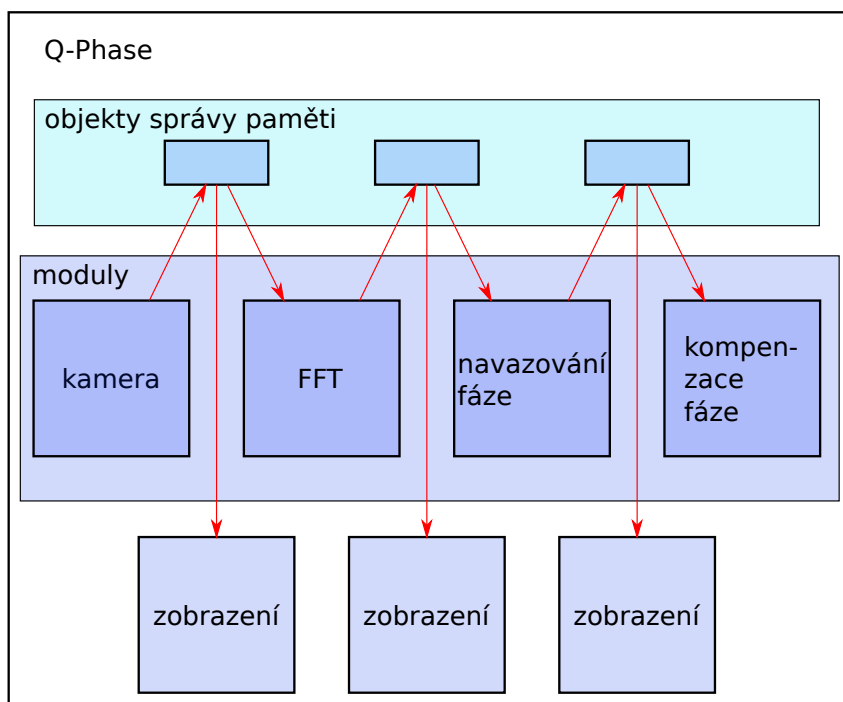


Obrázek 3.19: Ukázka uživatelského rozhraní programu Q-PHASE.

cování obrazu pomocí grafické karty (GPU), která výrazně zvyšuje obnovovací frekvenci zobrazení rekonstrukcí v On-Line módu a zkracuje dobu analýzy dat v Off-Line módu. Aby byla možná snadná interakce modulů s algoritmy akcelerovanými pomocí GPU s moduly, které akceleraci nemají (není výhodná, nebo nebyla dosud implementována), vyvinul jsem objekt pro správu paměti.

3.8.1. GPU akcelerované zpracování obrazu a správa paměti

Zpracování obrazu v holografickém mikroskopu je výpočetně velice náročné. Každý algoritmus, který je zařazen do fronty zpracovávající obraz, způsobuje další zpomalení rekonstrukčního procesu. Jedním z cílů vývoje algoritmů pro zpracování obrazu v holografickém mikroskopu se tedy přirozeně stává maximalizace rychlosti zpracování tak, aby uživatel mikroskopu získal pocit sledování v reálném čase, jak je tomu u běžných optických mikroskopů.



Obrázek 3.20: Základní struktura programu Q-PHASE.

Mnoho algoritmů pracujících s 2D daty je možné dobře paralelizovat, a tím zvýšit rychlost zpracování. V současné době je jednou z možností využití dostupných grafických karet (GPU), které jsou konstruované k provádění masivně paralelních výpočtů, čímž se myslí tisíce současně běžících vláken pracujících nezávisle na vstupních datech.

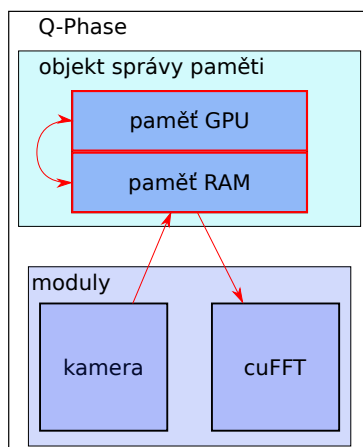
Z důvodů předchozích zkušeností jsem opět zvolil vývojové prostředí CUDA od společnosti Nvidia. Jedná se o balík již hotových algoritmů (cuFFT, sparseMatrix, ...) dobře integrovaný do vývojového prostředí MS Visual Studio C++. Ačkoliv umožňuje paralelizace na GPU výrazné zrychlení výpočtů, vzniká při implementaci nový problém se správou pamětí. Zatímco v případě standardních výpočtů s využitím procesoru počítače máme k dispozici jeden druh operační paměti RAM, do které můžeme libovolně přistupovat, v případě práce s GPU musíme dbát zvýšené pozornosti při přístupech do paměti. Paměť GPU se sice vyskytuje ve stejném adresovém prostoru jako paměť RAM, ale nelze do ní přistupovat způsobem obvyklým pro práci s RAM, je tedy pouze na programátorovi, aby rozlišil, které přístupy jsou do paměti RAM a které do paměti GPU. Pro tyto účely jsem vyvinul objekt pro správu paměti a synchronizaci dat mezi pamětí GPU a pamětí RAM počítače.

Při zpracování obrazu lze očekávat, že některé algoritmy budou běžet výhradně na CPU, zatímco jiné bude možné dobře paralelizovat a spouštět na GPU. Objekt, který zaručuje přesun dat z paměti RAM do paměti GPU a zpět, musí být pokud možno transparentní.

V okamžiku inicializace libovolného modulu zpracování obrazu se pomocí paměťového objektu provede alokace paměti podle potřeb tohoto algoritmu. Algoritmus také zvolí, ve které paměti (RAM nebo GPU) je alokace primárně provedena. Následuje spuštění algoritmu. Potom, co je algoritmus ukončen, je paměťový objekt předán k dalšímu zpracování. Následující algoritmus zažádá paměťový objekt o přístup k datům a současně specifikuje, jestli požaduje přístup v paměti RAM nebo GPU. Paměťová struktura automaticky zaručí přesun dat mezi GPU a RAM a jejich následnou synchronizaci.

Výhoda tohoto přístupu spočívá v univerzálnosti, paměť je alokována pouze tehdy, je-li do ní vyžadován přístup. Stejně tak je kopie paměti v GPU nebo RAM vytvořena a synchronizována až v případě, že je požadován přístup do paměti opačného typu, než je alokovaná paměť.

Na obrázku 3.21 je znázorněn popsany přístup k paměti v případě modulu snímání obrazu kamerou a zpracování rekonstrukce pomocí FFT. Kamera jako prvotní zdroj dat je reprezentována modulem, jehož data jsou uložena primárně v paměti RAM počítače. Základní rekonstrukční algoritmus je reprezentován modulem s označením cuFFT, což je FFT akcelerovaná pomocí GPU. Modul pro svoji funkci vyžaduje data v paměti GPU, při žádosti o přístup k datům v paměťovém objektu dojde k automatické alokaci paměti v GPU a kopii dat z RAM počítače do GPU. Do okamžiku žádosti modulu cuFFT existovala alokovaná paměť pouze v RAM, dále už se udržují paměti RAM a GPU synchronizované.



Obrázek 3.21: Synchronizace paměti RAM a GPU.

Výše popsany paměťový objekt je integrován v programu Q-PHASE. Výhody popsaného paměťového objektu jsou zřejmé v případě dvou zcela nezávislých modulů zpracování dat. Žádný z modulů se nemusí zajímat o skutečné místo uložení svých zdrojových dat ve smyslu GPU nebo RAM, místo toho specifikuje, kde data očekává. Datový objekt následně provádí kopírování podle potřeby, a to umožňuje snadnou rozšiřitelnost programu o nové moduly technik zpracování obrazu.

3.9. Shrnutí výsledků

V této kapitole byly shrnuty základní algoritmy nezbytné pro rekonstrukci obrazu v holografickém mikroskopu. Algoritmy původně prováděly výpočty běžným způsobem pomocí procesoru počítače. Protože se většinou jedná o operace dobře paralelizovatelné, většinu z nich jsem v posledním roce přepracoval, takže nyní využívají k výpočtům grafické karty. To umožnilo výrazné zrychlení zpracování obrazu a přiblížilo obrazový výstup mikroskopu k zobrazení v reálném čase. Základní rekonstrukce obrazu získává nenávanou fázi o velikosti $700 \times 700 \text{ px}^2$ z hologramu $2048 \times 2048 \text{ px}^2$ rychlostí téměř 30 snímků za sekundu. S příchodem výkonnějších grafických karet lze očekávat další zrychlení bez změn v kódu algoritmů.

V oblasti navazovacích algoritmů jsem implementoval několik metod, z nichž metoda navazování fáze s korekcí fázových nespojitostí (kap. 3.5) je původní. Tato metoda koriguje fázový obraz degradovaný v důsledku výskytu optických vírů v obraze, což je v případě živých buněk a kvantitativního zobrazování zásadní. Její popis byl zaslán k publikaci [62]. Algoritmus funguje uspokojivě nejen v případě navazování kvantitativního fázového zobrazení živých buněk, jak je uvedeno v publikaci, ale i v případě technických povrchů, kde může strmý skok také způsobit vznik optických vírů, a tím znemožnit jednoduché navazování fáze.

Metodu kompenzace deformace navázané fáze vyvinutou ve spolupráci s Ing. Tomášem Zikmundem, Ph.D., jsem nejprve optimalizoval a následně implementoval GPU akcelerovanou verzi. Vzhledem k popsání technice výpočtu kompenzační plochy a velikosti zpracovávaných matic je tato část rekonstrukce jednou z nejvíce náročných na výpočetní rychlost počítače. Výpočetní náročnost se navíc mění s velikostí detekovaného fázového pozadí.

Segmentace buněk využívá techniku detekce fragmentů, kterou jsem původně vyvinul pro odstranění fragmentů kostí v tomografii, k detekci buněk po odprahování fázového obrazu. Současně s detekcí buněk je vypočten také geometrický střed a těžiště, pomocí kterých je trasován pohyb buňky.

Funkčnost algoritmů na zpracování obrazu byla úspěšně ověřena na prototypu mikroskopu Q-PHASE.

ZÁVĚR

Tato dizertační práce je rozdělena do dvou hlavních směrů. Jelikož jsem při odborné stáži v Londýně získal cenné zkušenosti v oblasti rentgenové mikro-tomografie, tomografických rekonstrukcí a současně paralelních výpočtů na grafických kartách, je první polovina zaměřena na rentgenovou mikrotomografii, zatímco druhá se týká mojí současné práce v digitální holografii. V obou případech se zabývám technikou numerického zpracování obrazu a digitálního zobrazování.

V kapitole 2 jsou popsány výsledky mé práce na GPU akcelerované tomografické rekonstrukci. Nově provedená implementace klasického algoritmu FBP přináší jako hlavní výhodu především zvýšenou rychlost rekonstrukce. Je možné ji provozovat na běžném počítači vybaveném grafickou kartou NVidia a oproti mně známým implementacím není omezena velikostí rekonstruovaných ani zdrojových dat. Tato implementace umožnila více než desetkrát zrychlit výpočet a zkrátit časy potřebné k provádění tomografických experimentů v porovnání s původními neakcelerovanými algoritmy. V současné době je software aktivně používán v tomografické laboratoři Centre for Oral Growth & Development, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London a jeho vývoj stále pokračuje.

Současně jsem také nově implementoval modernější verzi tomografické rekonstrukce BPF, která má oproti předchozímu algoritmu některé výhody. Jde především o možnost provést tomografickou rekonstrukci z neúplných dat (ve smyslu FBP). Například při umístění detektoru asymetricky vzhledem k ose rotace zachytí detektor jen polovinu průmětu zkoumaného objektu, z tohoto důvodu nelze v tomto případě použít standardní algoritmus FBP.

Další výhodou je, že pokud požadujeme částečnou tomografickou rekonstrukci jen oblasti zájmu, je možno provést pouze částečné snímání nezbytných tomografických projekcí, což může v některých případech výrazně urychlit proces tomografického zobrazování.

Při řešení úkolu analýzy tomografických obrazů kostí jsme ve spolupráci s Ing. Tomášem Zikmundem, Ph.D., navrhli postup pro porovnávání různých vzorků. Součástí postupu byla

- definice osy tomografického obrazu kosti,
- její ztotožnění s osou z souřadného systému zobrazení,
- detekce fragmentů vnitřní struktury kosti,
- 3D modus filtrování,
- měření vzdáleností vnitřního a vnějšího povrchu kosti.

Pro ztotožnění obrazů tomografických řezů s osou z jsem vyvinul algoritmus, který provede transformaci původní sady snímků do nové sady patřičně transformované dle orientace osy kosti.

Algoritmus detekce fragmentů vnitřní struktury kosti společně s 3D binární modus filtrací umožňuje dobře definovat vnitřní povrch kosti, a to i přesto, že uvnitř kosti je složitá struktura, která jeho detekci silně znesnadňuje.

K měření vzdáleností vnitřního a vnějšího povrchu kosti jsem sestavil program, který provede měření a sestaví mapu vzdáleností povrchů od osy kosti.

Po aplikaci uvedené procedury na všechny vzorky kostí je možné porovnávat jednotlivá data mezi sebou a sledovat rozdíly v geometrii kostí. Výsledky práce v této oblasti byly prezentovány na konferencích [1, 2].

V oblasti holografické mikroskopie (kapitola 3) bylo cílem implementovat a optimalizovat algoritmy numerické rekonstrukce obrazu. Původně byly základní rekonstrukční výpočty prováděny pomocí matematického prostředí Matlab, což bylo vhodné pro vývoj a ověření funkčnosti, ne však pro praktické využívání mikroskopu.

Používané algoritmy jsem postupně přepracoval a optimalizoval, k realizaci jsem využil programovací jazyk C++. Výpočty byly původně prováděny standardně pomocí procesoru počítače, následně jsem v některých algoritmech využil částečné paralelizace pomocí OpenMP. V zatím poslední fázi jsem algoritmy přepracoval s pomocí paralelní architektury CUDA. Za významný výsledek považuji také původní algoritmus pro navazování kvantitativního fázového zobrazení s korekcí vlivu fázových singularit [62]. Tato metoda koriguje fázový obraz degradovaný v důsledku výskytu optických vřív v obraze, což je v případě živých buněk a kvantitativního zobrazování zásadní. Algoritmus funguje uspokojivě nejen v případě navazování kvantitativního fázového zobrazení živých buněk, jak je uvedeno v publikaci, ale i v případě technických povrchů, kde může strmý skok také způsobit vznik optických vřív, a tím znemožnit jednoduché navazování fáze.

Kapitola 3 je koncipovaná tak, že algoritmy zpracování obrazu jsou popsány dle jejich provádění v mikroskopovém software:

- Základní rekonstrukce obrazu pomocí FFT.
- Detekce nosné frekvence a separace spektra prostorových frekvencí.
- Algoritmy navazování fáze [62].
- Dynamická kompenzace deformace fázového pozadí [3, 4].
- Detekce buněk.
- Prahování, selekce buněk, trasování buněk a výpočet jejich parametrů [63].
- Výpočet DPD [64].
- Simulovaný DIC.

Všechny algoritmy jsem implementoval do kompaktního programu Q-PHASE, který vyvíjím v rámci společnosti TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., a s jehož pomocí se v současné době provádí veškerá měření na CCHM.

LITERATURA

- 1 SEED, M.; ZIKMUND, T.; KVASNICA, L., et al. Development of a robust rat model of glucocorticoid induced osteoporosis as assessed by microCT, SEM, and confocal LM. In: *17th International Inflammation Research Association Conference*. Basel, Switzerland: Springer Basel AG, 2012, s. 23. ISSN: 1023-3830.
- 2 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; BOYDE, A. Correlation between 3D imaging methods in studying bone architecture: SEM, microCT and confocal LM. *Journal of Anatomy*. 2012, vol. 221, no. 1, s. 86.
- 3 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; LOVICAR, L.; UHLÍŘOVÁ, H.; CHMELÍK, R. Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In: *Proceedings of SPIE*. Bellingham WA, USA: SPIE press, 2010, s. 77460K–7. ISBN 9-780-81948-236-5.
- 4 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; TÝČ, M., et al. Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*. 2014, vol. 256, no. 2, s. 117–125.
- 5 HOUNSFIELD, G. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *British Journal of Radiology*. 1973, vol. 46, s. 1016–1022.
- 6 RADON, J. On the determination of functions from their integral values along certain manifolds. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 1986, vol. 5, no. 4, s. 170–176.
- 7 *MicroCT 40*. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <http://www.scanco.ch/index.php?id=microct40>.
- 8 DAVIS, G.; EVERSLED, A.; ELLIOTT, J.; MILLS, D. Quantitative x-ray microtomography with a conventional source. In: *Developments in X-Ray Tomography VII*. Bellingham WA, USA: SPIE press, 2010, s. 78040I–8. ISBN 9-780-81948-300-3.
- 9 OKITSU, Y.; INO, F.; HAGIHARA, K. Accelerated cone-beam backprojection using GPU-CPU hardware. *Lecture Notes in Computer Science*. 2008, vol. 5374, s. 108–119.
- 10 PAPENHAUSEN, E.; ZHENG, Z.; MUELLER, K. GPU-Accelerated Back-Projection Revisited: Squeezing Performance by Careful Tuning. In: *Workshop on High Performance Image Reconstruction (HPIR)*. 2011.
- 11 KAK, A. C.; SLANEY, M. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. Philadelphia, USA: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001. ISBN 978-0-89871-494-4.
- 12 YE, Y.; WANG, G. Filtered backprojection formula for exact image reconstruction from cone-beam data along a general scanning curve. *Medical physics*. 2005, vol. 32, s. 42–48.
- 13 SHEPP, L.; LOGAN, B. The Fourier reconstruction of a head section. *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 1974, vol. 21, no. 3, s. 21–43. ISSN 0018-9499.
- 14 ZENG, G. L.; YOU, J.; HUANG, Q.; GULLBERG, G. T. Two Finite Inverse Hilbert Transform Formulae for Region-of-Interest Tomography. *International journal of imaging systems and technology*. 2007, vol. 17, no. 4, s. 219–223.

- 15 LI, L.; CHEN, Z.; ZHANG, L.; XING, Y.; KANG, K. A New Cone-Beam X-Ray CT System with a Reduced Size Planar Detector. *High energy physics and nuclear physics-chinese edition*. 2006, vol. 30, no. 8, s. 812–817.
- 16 NOO, F.; CLACKDOYLE, R.; PACK, J. D. A two-step Hilbert transform method for 2D image reconstruction. *Physics in Medicine and Biology*. 2004, vol. 49, no. 17, s. 3903.
- 17 LI, L.; CHEN, Z.; ZHANG, L.; XING, Y.; KANG, K. A cone-beam tomography system with a reduced size planar detector: A backprojection-filtration reconstruction algorithm as well as numerical and practical experiment. *Applied radiation and isotopes*. 2007, vol. 65, s. 1041–1047.
- 18 ZOU, Y.; PAN, X.; SIDKY, E. Y. Image reconstruction in regions-of-interest from truncated projections in a reduced fan-beam scan. *Physics in Medicine and Biology*. 2005, vol. 50, no. 1, s. 13–27.
- 19 NVidia CUDA. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: http://www.nvidia.com/object/cuda_home_new.html.
- 20 OpenCL. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <https://www.khronos.org/opencl/>.
- 21 IEEE Standard for Floating-Point Arithmetic. *IEEE Std 754-2008*. 2008, s. 1–70.
- 22 ABRAMOFF, D. M. D.; MAGALHES, D. P. J.; RAM, D. S. J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004, vol. 11, no. 7, s. 36–42.
- 23 MORTENSON, M. E. *Mathematics for Computer Graphics Applications*. 2nd. New York, USA: Industrial Press, Inc., 1999. ISBN 0-8311-3111-X.
- 24 MCCONNELL, J. *Computer Graphics: Theory Into Practice*. Burlington, USA: Jones and Bartlett Publishers, 2006. ISBN 978-0-763-72250-0.
- 25 MARQUET, P.; RAPPAZ, B.; MAGISTRETTI, P. J., et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters*. 2005, vol. 30, no. 5, s. 468–470.
- 26 KEMPER, B.; CARL, D.; SCHNEKENBURGER, J., et al. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2006, vol. 11, no. 3, s. 034005–8.
- 27 POPESCU, G. *Quantitative phase imaging of cells and tissues*. Illinois, USA: McGraw Hill Professional, 2011. ISBN 978-0-071-66342-7.
- 28 CHMELIK, R.; SLABA, M.; KOLLAROVA, V., et al. The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy. *Progress in Optics*. 2014, vol. 59, s. 267–335. ISSN 0079-6638.
- 29 LOŠŤÁK, M.; CHMELÍK, R.; SLABÁ, M.; SLABÝ, T. Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express*. 2014, vol. 22, no. 4, s. 4180–4195.
- 30 SLABÝ, T.; KOLMAN, P.; DOSTÁL, Z., et al. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21, no. 12, s. 14747–14762.

- 31 TÝČ, M.; KVASNICA, L.; SLABÁ, M.; CHMELÍK, R. Numerical refocusing in digital holographic microscopy with extended-sources illumination. *Optics Express*. 2013, vol. 21, no. 23, s. 28258–28271.
- 32 KOLMAN, P.; CHMELÍK, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, vol. 18, no. 21, s. 21990–22003.
- 33 DAVIES, H. G.; WILKINS, M. H. F. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*. 1952, vol. 169, no. 4300, s. 541–541.
- 34 BARER, R. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*. 1952, vol. 169, no. 4296, s. 366–367.
- 35 BARER, R. Refractometry and Interferometry of Living Cells. *Journal of the Optical Society of America*. 1957, vol. 47, no. 6, s. 545–556.
- 36 MCGUIRE, R. *Common Data Format* [online]. [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <http://cdf.gsfc.nasa.gov/>.
- 37 SLABÝ, T.; KOLMAN, P.; DOSTAL, Z., et al. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21, no. 12, s. 14747–14762.
- 38 KREIS, T. Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. *Journal of the Optical Society of America*. 1986, vol. 3, no. 6, s. 847–855.
- 39 CHMELÍK, R.; HARNA, Z. Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 1999, vol. 38, s. 1635.
- 40 JANEČKOVÁ, H. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Disertační práce, Vysoké učení technické v Brně 2009.
- 41 SLABÝ, T. *Koherencí řízený holografický mikroskop nové generace*. Disertační práce, Vysoké učení technické v Brně 2015.
- 42 *Fastest Fourier Transform in the West*. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <http://www.fftw.org>.
- 43 *NVidia CUDA Fast Fourier Transform library*. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <https://developer.nvidia.com/cuFFT>.
- 44 OPPENHEIM, A. V.; SCHAFER, R. W.; BUCK, J. R. *Discrete-Time Signal Processing*. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999. ISBN 978-0-137-54920-7.
- 45 GHIGLIA, D. C.; PRITT, M. D. *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms and Software*. New York: Wiley-Interscience, 1998. ISBN 978-0-471-24935-1.
- 46 FLYNN, T. Consistent 2-D phase unwrapping guided by a quality map. In: *Geoscience and Remote Sensing Symposium*. New York, USA: IEEE Press, 1996, s. 2057–2059. ISBN 0-7803-3068-4.
- 47 CHMELÍK, R. *Korelační mikroskopie, alternativní metoda vícekanálového konfokálního zobrazení*. Habilitační práce, Vysoké učení technické v Brně 2001.
- 48 GOLDSTEIN, R. M.; ZEBKEN, H. A.; WERNER, C. L. Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping. *Radio Science*. 1988, vol. 23, no. 4, s. 713–720.
- 49 BONE, D. J. Fourier fringe analysis: the two-dimensional phase unwrapping problem. *Applied Optics*. 1991, vol. 30, no. 25, s. 3627–3632.

- 50 LIM, H.; XU, W.; HUANG, X. Two new practical methods for phase unwrapping. In: *Geoscience and Remote Sensing Symposium*. New York, USA: IEEE Press, 1995, s. 196–198. ISBN 0-7803-2567-2.
- 51 DERAUW, D. Phase unwrapping using coherence measurements. In: *Proceedings of SPIE*. Bellingham WA, USA: SPIE press, 1995, s. 319–324. ISBN 9-780-81941-948-4.
- 52 GHIGLIA, D. C.; ROMERO, L. A. Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods. *Journal of the Optical Society of America*. 1994, vol. 11, no. 1, s. 107–117.
- 53 STRAND, J.; TAXT, T.; JAIN, A. K. Two-dimensional phase unwrapping using a block least-squares method. *IEEE Transactions on Image Processing*. 1999, vol. 8, no. 3, s. 375–386.
- 54 GOLUB, G. H.; VAN LOAN, C. F. *Matrix computations*. 3rd ed. Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press, 1996. ISBN 0-8018-5414-8.
- 55 LI, C.; ZHU, D.-Y. A Residue-Pairing Algorithm for Insar Phase Unwrapping. *Progress In Electromagnetics Research*. 2009, vol. 95, s. 341–354.
- 56 OLIVEIRA, M. M.; BOWEN, B.; MCKENNA, R.; CHANG, Y. Fast digital image inpainting. In: *Proceedings of the international conference on visualization, imaging and image processing*. Alberta, Canada: ACTA Press, 2001, s. 261–266. ISBN 0-88986-309-1.
- 57 CHMELIK, R.; SLABA, M.; KOLLAROVA, V., et al. The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy. *Progress in Optics*. 2014, vol. 59, s. 267–335.
- 58 VESELY, P.; MELEZINKOVA, H.; KRENOVA, D., et al. Spontaneously metastasizing rat sarcomas LW13K2 and RPS: assessment by the immunogenetic test of malignancy, in vitro behaviour and karyology. *Folia Biologica*. 1989, vol. 35, no. 1, s. 1–12.
- 59 ZIKMUND, T. *Matematické metody pro zpracování obrazu v biologických pozorováních*. Disertační práce, Vysoké učení technické v Brně 2014.
- 60 PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. *Numerical Recipes, The Art of Scientific Computing*. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007. ISBN 978-0-521-88068-8.
- 61 *NVidia CUDA Basic Linear Algebra Subroutines*. [online]. 2015 [cit. 2015-5-1]. Dostupný z WWW: <https://developer.nvidia.com/cuBLAS>.
- 62 KVASNICA, L.; SLABA, M.; TYC, M.; CHMELIK, R. Processing of living-cells quantitative phase images affected by phase residues. *Journal of Biomedical Optics*. 2015. (v recenzním řízení).
- 63 KRIZOVA, A.; COLLAKOVA, J.; DOSTAL, Z., et al. Quantitative Phase Imaging brings forth Innovation in the Evaluation of Live Cell Dynamics. *Journal of Biomedical Optics*. 2015. (v recenzním řízení).
- 64 JANECKOVA, H.; VESELY, P.; CHMELIK, R. Proving tumour cells by acute nutritional/energy deprivation as a survival threat: a task for microscopy. *Anticancer research*. 2009, vol. 29, no. 6, s. 2339–2345.

SEZNAM NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH ZKRATEK

BFP	Back Projected Filtration
BLS	Block Least-Squares
CCD	Charge-Coupled Device
CCHM	Coherence-Controlled Holographic Microscope
CPU	Central Processing Unit
CT	Computed Tomography
cuBLAS	CUDA Basic Linear Algebra Subprograms
CUDA	Compute Unified Device Architecture
cuFFT	CUDA Fast Fourier Transform
DCT	Discrete Cosine Transform
DIC	Differential Interference Contrast
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DPD	Dynamic Phase Difference
FBP	Filtered Back Projection
FFT	Fast Fourier Transform
FFTW	Fastest Fourier Transform in the West
GiB	Gibibyte – giga binary byte 2^{30} bytů
GPU	Graphic Processing Unit
IHT	Inverse Hilbert Transform
LS	Least-Squares
PCG	Preconditioned Conjugate Gradient
PSF	Point Spread Function
RAM	Random-Access Memory
WLS	Weighted Least-Squares

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

- 1 KVASNICA, L.; SLABA, M.; TYC, M.; CHMELÍK, R. Processing of living-cells quantitative phase images affected by phase residues. *Journal of Biomedical Optics*. 2015. (v recenzním řízení).
- 2 LOVICAR, L.; KVASNICA, L.; CHMELÍK, R. Surface observation and measurement by means of digital holographic microscope with arbitrary degree of coherence. In: *Proceedings of SPIE*. Bellingham WA, USA: SPIE press, 2008, s. 71411S–8. ISBN 9-780-81947-383-7.
- 3 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; BOYDE, A. Correlation between 3D imaging methods in studying bone architecture: SEM, microCT and confocal LM. *Journal of Anatomy*. 2012, vol. 221, no. 1, s. 86.
- 4 SEED, M.; ZIKMUND, T.; KVASNICA, L., et al. Development of a robust rat model of glucocorticoid induced osteoporosis as assessed by microCT, SEM, and confocal LM. In: *17th International Inflammation Research Association Conference*. Basel, Switzerland: Springer Basel AG, 2012, s. 23. ISSN: 1023-3830.
- 5 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; LOVICAR, L.; UHLÍŘOVÁ, H.; CHMELÍK, R. Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In: *Proceedings of SPIE*. Bellingham WA, USA: SPIE press, 2010, s. 77460K–7. ISBN 9-780-81948-236-5.
- 6 ZIKMUND, T.; KVASNICA, L.; TÝČ, M., et al. Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*. 2014, vol. 256, no. 2, s. 117–125.
- 7 DOSTAL, Z.; SLABY, T.; KVASNICA, L., et al. Automated Alignment Method for Coherence Controlled Holographic Microscope. *Journal of Biomedical Optics*. 2015. (v recenzním řízení).
- 8 KRIZOVA, A.; COLLAKOVA, J.; DOSTAL, Z., et al. Quantitative Phase Imaging brings forth Innovation in the Evaluation of Live Cell Dynamics. *Journal of Biomedical Optics*. 2015. (v recenzním řízení).
- 9 TÝČ, M.; KVASNICA, L.; SLABÁ, M.; CHMELÍK, R. Numerical refocusing in digital holographic microscopy with extended-sources illumination. *Optics Express*. 2013, vol. 21, no. 23, s. 28258–28271.

OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

- **FBP_qmul** – Zdrojové kódy GPU akcelerované filtrované zpětné projekce (kap. 2.2).
- **BPF_scanco** – Zdrojové kódy GPU akcelerované filtrace zpětné projekce pro poloviční sinogram (kap. 2.3).
- **Stack_norm** – Normalizace orientace vzorku vůči datasetu (kap. 2.5.1).
- **3D_analysis** – Zdrojové kódy GPU akcelerované modus filtrace, detekce fragmentů a měření vzdáleností od osy kosti k jejímu povrchu (kap. 2.5).
- **Conetest** – Původní software QMUL pro tomografickou rekonstrukci.
- **Test_data** – Testovací tomografická data.