

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

**Симакова Надежда Алексеевна**

**МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СОВМЕЩЕНИЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ  
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ**

Специальность 1.2.2 — Математическое моделирование,  
численные методы и комплексы программ

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
**на соискание ученой степени**  
**кандидата физико-математических наук**

Научный руководитель:  
кандидат физико-математических наук,  
с.н.с. Д. В. Сорокин

Москва, 2023

# Содержание

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Методы жесткого совмещения изображений</b>	
	<b>криоэлектронной микроскопии</b>	<b>12</b>
2.1	Постановка задачи . . . . .	15
2.2	Обзор методов жесткого совмещения для изображений	
	криоэлектронной микроскопии . . . . .	16
2.3	Корреляционный метод совмещения изображений	
	криоэлектронной микроскопии . . . . .	18
2.3.1	Описание метода . . . . .	18
2.4	Быстрый метод совмещения изображений криоэлектронной	
	микроскопии на основе преобразования Фурье-Бесселя . . . . .	24
2.4.1	Преобразования Ганкеля и Фурье-Бесселя . . . . .	25
2.4.2	Формула корреляции . . . . .	25
2.4.3	Дискретизация интегралов и пределы интегрирования . . . . .	28
2.4.4	Проекционный метод с использованием функций Лагерра для	
	преобразования Фурье-Бесселя . . . . .	30
2.4.5	Быстрый алгоритм расчета проекционных коэффициентов . . . . .	32
2.4.6	Количество операций . . . . .	34
2.4.7	Общий алгоритм работы метода . . . . .	35
2.5	Эксперименты и результаты . . . . .	36
2.6	Метод синтеза реалистичных данных криоэлектронной микроскопии оди-	
	ночных частиц и криоэлектронной томографии . . . . .	43
2.6.1	Метод построения трехмерной модели объекта . . . . .	44
2.6.2	Виды искажений криоэлектронной микроскопии . . . . .	45
2.6.3	Метод построения двумерных проекций . . . . .	47
2.6.4	Алгоритм получения трехмерных данных . . . . .	49
2.7	Выводы . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Методы нежесткого совмещения изображений</b>	
	<b>клеточных структур</b>	<b>53</b>
3.1	Постановка задачи . . . . .	56

3.2	Обзор существующих методов совмещения изображений	
	клеточных структур . . . . .	57
3.3	Нейросетевой метод совмещения последовательностей	
	изображений флуоресцентной микроскопии . . . . .	59
3.3.1	Предобработка данных . . . . .	59
3.3.2	Предложенная нейросетевая модель . . . . .	60
3.3.3	Экспериментальные результаты . . . . .	64
3.4	Метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой раз-	
	метки на основе совмещения изображений . . . . .	68
3.4.1	Задачи сегментации и трекинга клеток . . . . .	68
3.4.2	Дополнение слабой разметки данных с использованием методов	
	совмещения изображений . . . . .	69
3.4.3	Отличия аугментации данных от дополнения разметки с помощью	
	совмещения изображений . . . . .	71
3.4.4	Метод совмещения изображений клеток . . . . .	73
3.4.5	Нейронная сеть сегментации изображений . . . . .	73
3.4.6	Результаты . . . . .	76
3.5	Выводы . . . . .	81
<b>4</b>	<b>Программный комплекс реализации алгоритмов</b>	
	<b>совмещения биомедицинских микроскопических</b>	
	<b>изображений</b>	<b>83</b>
4.1	Программная реализация методов, основанных на обучении нейросетевых	
	моделей . . . . .	83
4.2	Программная реализация метода синтеза реалистичных данных криоэлек-	
	тронной микроскопии . . . . .	90
4.3	Программная реализация корреляционных методов совмещения изображений	91
<b>5</b>	<b>Заключение</b>	<b>95</b>
	<b>Список литературы</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Список опубликованных работ</b>	<b>96</b>

# 1 Введение

## Актуальность работы

В настоящее время анализ биомедицинских изображений играет большую роль в развитии биологии и медицины. Информация, извлеченная с помощью компьютерных методов анализа изображений, может быть использована, например, для постановки диагноза пациенту, или для построения трехмерной модели рассматриваемой частицы, что очень важно в исследованиях структурной биологии. Неотъемлемой частью анализа и обработки данных является использование методов совмещения изображений, которые широко применяются для различного спектра задач. Смысл совмещения пары изображений заключается в нахождении такого преобразования для одного из изображений, применение которого приводит к максимально возможному совпадению положения и формы объектов интереса на обоих изображениях. При этом, искомое преобразование находится исходя из выбранной модели движения, учитывающей особенности решаемой прикладной задачи. Таким образом, выполнив совмещение изображений, можно анализировать изображения совместно, т.к. объекты на них будут находиться в единой системе координат. Например, совмещая двумерные проекции в криоэлектронной микроскопии одиночных частиц можно вычислить среднее выровненных изображений и, таким образом, уменьшить уровень шума и уточнить детали строения частиц. Если рассматривать последовательность флуоресцентной микроскопии изображений клеточных структур, то здесь методы совмещения выполняют задачу компенсации глобального движения клеток, что позволяет анализировать особенности локального движения внутриклеточных субструктур и играет важную роль в фундаментальных исследованиях клеточной биологии.

Существуют различные алгоритмы совмещения, основанные как на классических математических моделях, так и на машинном или глубоком обучении, которые могут быть адаптированы для изображений различной природы. Современные методы все чаще используют нейронные сети. Для решения задачи совмещения в основном используют подход обучения без учителя, т.е. обучают нейронную сеть без наличия экспертной разметки. Обучение с учителем является более эффективным, однако имеет существенный недостаток. Для обучения нейросетевых методов требуется большой объем предварительно размеченных данных, получение которых является затруднительным для задач совмещения изображений, в особенности в случае нежесткого совмещения, где преобразование между изображениями определяется полем деформации, заданным в каждой точке изображения.

Основной сложностью совмещения биомедицинских микроскопических данных является низкое отношение сигнала к шуму. Например, для криоэлектронной микроскопии объект на изображении, полученном в результате взаимодействия образца с пучком электронов, обычно трудно отличить от фона человеческим глазом. Изображения оптической флуоресцентной микроскопии также обладают высоким уровнем шума и низким разрешением. Поэтому методы совмещения, используемые в других областях, например, в задаче поиска оптического потока по видео, часто не работают на биомедицинских данных. Помимо этого, часто методы совмещения применяются не к парам биомедицинских микроскопических изображений, а к последовательностям изображений живых клеток, изменяющих свою форму и положение в кадре с течением времени.

Данная работа посвящена математическим методам совмещения биомедицинских микроскопических изображений. Описанные подходы были разработаны с учетом особенностей, возникающих в прикладных задачах биомедицины, и адаптированы для соответствующих типов данных. В криоэлектронной микроскопии одиночных частиц процедура выравнивания двумерных проекций частиц с помощью методов совмещения является одной из основных операций в общем алгоритме восстановления трехмерной модели частицы. Поэтому усовершенствование данной операции и ее ускорение существенно влияет на качество восстановленных трехмерных моделей биологических структур. Вследствие этого создание новых более точных и быстрых методов совмещения является очень важной и безусловно актуальной задачей сегодня. Для последовательностей изображений клеточных структур также активно используют методы совмещения. В задачах клеточной биологии анализ движения субклеточных и клеточных структур крайне важен для понимания фундаментальных биологических механизмов, таких как репликация и восстановление ДНК, устройство ядрышек, или защита от вирусов. Для анализа движения субклеточных структур необходимо скомпенсировать движение клеток, для чего используется совмещение изображений. В случае анализа движения клеточных структур важно анализировать форму и особенности движения отдельных клеток, что делает задачу качественной сегментации отдельных клеток крайне актуальной. В данной работе также предложен метод сегментации клеток в последовательностях изображений флуоресцентной микроскопии, в котором улучшение качества сегментации достигается за счет использования информации с соседних кадров при помощи совмещения изображений.

Основное внимание в диссертации уделено методам совмещения изображений, применяющихся для следующих биомедицинских микроскопических данных:

- изображения криоэлектронной микроскопии, отличающиеся очень высоким уровнем шума и, соответственно, низким отношением сигнала к шуму (англ. *SNR*);
- последовательности изображений клеточных структур, полученные с помощью оптической флуоресцентной микроскопии, где рассматриваемый объект изменяет свое положение и форму с течением времени;
- последовательности изображений флуоресцентной микроскопии, содержащие много движущихся клеток или ядер;

Помимо этого, в работе представлен метод сегментации со слабой разметкой, разработанный для выделения отдельных клеток на последовательностях изображений флуоресцентной микроскопии. Предложенный метод основан на обучении нейросетевой модели. В описанном подходе разметка дополняется с помощью информации с соседних изображений последовательности, используя совмещение изображений. Применение такого подхода является крайне актуальным ввиду того, что получение экспертной разметки для микроскопических данных является очень трудным и ресурсоемким процессом.

## Цель работы

Целью диссертационной работы является разработка математических методов совмещения биомедицинских микроскопических изображений, их алгоритмическая и программная реализация для решения задач совмещения изображений криоэлектронной микроскопии, последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии, а также применения методов совмещения в задаче сегментации клеток.

## Научная новизна

В данной работе были разработаны:

1. Корреляционный метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии.
2. Быстрый метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии на основе вычисления преобразования Фурье-Бесселя с помощью проекционного метода с использованием функций Лагерра и быстрого алгоритма расчета проекционных коэффициентов.
3. Метод синтеза реалистичных данных криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и криоэлектронной томографии.
4. Нейросетевой метод совмещения последовательностей флуоресцентной микроскопии.

5. Метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанные в диссертационной работе методы совмещения биомедицинских микроскопических изображений могут применяться для различного спектра задач, таких как классификация и усреднение большого количества проекций частиц в задаче трехмерной реконструкции частицы, анализ внутриклеточных субструктур и анализ движения живых клеток. Для каждого описанного в работе метода создана его программная реализация, которая может применяться как независимо для решения прикладных задач анализа биомедицинских микроскопических изображений, так и в качестве составных частей комплексных алгоритмов анализа биомедицинских данных.

## **Апробация работы**

Основные результаты работы докладывались на:

1. 27-ой международной конференции по компьютерной графике и зрению «ГрафиКон'2017» (Пермь, Россия, 2017);
2. 7-ой международной конференции по теории обработки изображений, методам и применениям ИРТА (Монреаль, Канада, 2017);
3. Всероссийской конференции «Ломоносовские чтения - 2022», (Москва, 2022);
4. 11-ой международной конференции по теории обработки изображений, методам и применениям ИРТА (Зальцбург, Австрия, 2022);
5. Международной конференции «Photogrammetric and computer vision techniques for video Surveillance, Biometrics and Biomedicine (PSBB)», (Москва, 2023);
6. 33-ей международной конференции по компьютерной графике и зрению «ГрафиКон'2023» (Москва, Россия, 2023);

## **Публикации**

По теме исследования опубликовано 7 работ, из них 2 журнальные статьи, 4 работы, опубликованные в сборниках трудов, и 1 работа, представленная в виде тезисов в сборнике трудов конференции. Из всего списка публикаций 3 работы индексируются в базе данных

Web of Science, 1 работа индексируется в базе данных Scopus. Список опубликованных работ приведён в конце диссертационной работы.

## **Личный вклад**

Все результаты работы получены автором лично под научным руководством к.ф.-м.н., с.н.с. Д.В. Сорокина. В работах, написанных в соавторстве, вклад автора диссертации является определяющим и состоит в следующем: предложены методы совмещения биомедицинских микроскопических изображений, основанные на вычислении корреляционной функции [1,7], а также метод нежесткого совмещения изображений [4], метод синтеза изображений [2,5] и метод сегментации [3,6]; проведены численные эксперименты и сравнение с существующими подходами; предложенные методы реализованы в виде программного комплекса. В работах [1,3,4,6,7] соавторы участвовали в интерпретации результатов и редактировании текста. В работах [2, 5] соавторы участвовали в визуализации результатов синтеза и редактировании текста.

## **Объем и структура работы**

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы и списка публикаций автора. Общий объем диссертационной работы составляет 104 страницы, включая 43 рисунка, 5 таблиц и список литературы из 80 наименований.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Быстрые численные методы совмещения изображений криоэлектронной микроскопии одиночных частиц на основе анализа корреляционной функции с использованием математической модели движения, представленной композицией поворотов.
2. Численный метод нежесткого совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии на основе разработанной двухэтапной нейросетевой модели.
3. Метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений.
4. Программный комплекс для совмещения изображений крио-ЭМ одиночных частиц, а также совмещения изображений и сегментации клеток на изображениях флуоресцентной микроскопии.



## Содержание работы

Первая глава диссертационной работы посвящена методам жесткого совмещения изображений криоэлектронной микроскопии. Здесь рассматривается задача выравнивания двумерных проекций с помощью методов совмещения для построения трехмерной модели частицы исследуемого образца. Особенностью изображений крио-ЭМ [1] является низкое отношение сигнала к шуму. Применение методов совмещения нужно для того, чтобы выровнять большое количество случайно ориентированных в плоскости одинаковых проекций частиц и получить усредненную по всем выровненным картинкам проекцию. Такая процедура позволяет увеличить отношение сигнала к шуму и, как следствие, улучшить качество изображения проекции. Данный шаг очень важен в задаче трехмерной реконструкции частицы по ее двумерным проекциям, поскольку качество полученной модели напрямую зависит от качества используемых в реконструкции проекций. В задаче выравнивания проекций в основном принято использовать аналитические методы, основанные на использовании математического аппарата для совмещения изображений. Использование нейронных сетей в этой задаче пока не является практичным, потому что для каждой частицы требуется обрабатывать разные проекции, и метод должен быть гибким для работы с новыми изображениями проекций. Кроме того, обработка больших объемов данных за разумное время представляет трудности, особенно когда имеющееся оборудование не обладает графическими ускорителями.

В данной главе представлены двумерный корреляционный метод совмещения изображений и быстрый численный метод совмещения изображений на основе вычисления преобразования Фурье-Бесселя с помощью проекционного метода, а также применения быстрого алгоритма расчета проекционных коэффициентов. Первый из предложенных методов основан на вычислении кросс-корреляции в пространстве Фурье, использующейся как для оценки сдвига, так и поворота. Другой предложенный корреляционный метод выравнивания частиц основан на применении преобразования Фурье-Бесселя. Здесь поиск всех параметров движения происходит одновременно путем однократного вычисления корреляционной функции и нахождения ее максимального значения. Ключевой особенностью предложенного метода является способ вычисления преобразований Фурье-Бесселя, используемых в вычислении корреляции. В предложенном подходе используется проекционный метод вычисления преобразования Ганкеля с использованием функций Лагерра, что позволяет ускорить вычисления, в отличие от стандартного дискретного способа вычисления преобразований Фурье-Бесселя. Также, для обеспечения дополнительного ускорения предлагается использовать быстрый алгоритм расчета проекционных коэффициен-

тов. Предложенные методы были протестированы на реальных и синтетических данных, представленных в виде двумерных проекций частиц изображений крио-ЭМ. Помимо этого, проведено сравнение предложенных в первой главе подходов.

Помимо методов совмещения, в данной главе рассматривается процедура создания наборов двумерных и трехмерных синтетических изображений криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и томографии. Синтетические данные нужны для того, чтобы оценить качество работы методов совмещения изображений крио-ЭМ при отсутствии реальных данных с известными истинными значениями параметров аффинного преобразования между изображениями. Разработанный метод генерации синтетических данных был использован при тестировании описанных методов совмещения изображений крио-ЭМ.

Во второй главе описаны методы нежесткого совмещения изображений клеточных структур. Необходимость в применении таких методов возникает в задаче анализа поведения живых клеток, посвященной оценке движения клеточных и субклеточных структур. Это нужно для более глубокого понимания биологических процессов, таких как репликация и ремонт ДНК, сборка нуклеолусов или защита от вирусов. Биомедицинские данные представлены в данной задаче в виде последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии. Здесь движение разделяют на локальное движение внутриклеточных структур и глобальное движение клетки. С помощью методов совмещения все изображения последовательности выравниваются с точкой отсчета, которой обычно является первое изображение последовательности. Компенсируя таким образом глобальное движение рассматриваемой клеточной структуры, можно проанализировать локальное движение субклеточных структур, что обычно является объектом исследования у биологов.

В этой главе предложен нейросетевой метод совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии, который позволяет совмещать последовательности, на которых объект помимо своего положения изменяет свою форму с течением времени. Разработанный метод не требует экспертной разметки. Предложенный подход использует двухэтапную модель нейронной сети, которая предсказывает сначала матрицу аффинного преобразования, а затем поле деформации. Таким образом, разработанный метод решает совместно задачу жесткого и нежесткого совмещения и представляет модель движения живых клеток в виде комбинации аффинного преобразования и поля деформации. Предсказание искомых преобразований происходит внутри одной модели полного цикла. Предложенный подход был сравнен с другими методами, используемыми для решения задачи компенсации глобального движения, на открытом наборе данных с эталонной разметкой ключевых точек. Такая разметка ключевых точек, расположенных внутри и

на границе исследуемого объекта, позволяет протестировать методы совмещения и сравнить их результаты между собой. По результатам тестирования описанный подход показал свою эффективность и превзошел по качеству другие методы совмещения изображений с точки зрения ошибки смещения ключевых точек, особенно в комбинации с методом совмещения, основанном на информации о контурах клетки.

Также в данной главе представлен нейросетевой метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений для задачи трекинга клеток. Предложенный подход предлагает использовать методы нежесткого совмещения и с их помощью генерировать недостающие маски за счет использования имеющейся разметки маркеров треков клеток. Таким образом, термин слабая разметка означает дополнение исходной разметки данных масками клеток, сгенерированными с помощью методов совмещения изображений. Результаты проведенных экспериментов показали, что, используя слабую разметку на основе совмещения изображений при обучении нейронной сети, можно улучшить общие результаты сегментации. Используя предложенный в данной главе нейросетевой метод совмещения, можно получить разметку для объектов в последовательности изображений в режиме реального времени, которые изначально не были размечены. Преимущество такого подхода заключается в том, что это не увеличивает время предсказания результатов или сложность модели и применимо к любой нейросетевой модели сегментации. Разработанный метод был протестирован на реальных данных и вошел в число призеров по результатам сегментации одного из наборов данных в международном конкурсе по сегментации клеток в задаче трекинга (англ. *Cell Tracking Challenge*) [2].

В третьей главе описан программный комплекс методов анализа изображений на основе совмещения, а именно представлены ключевые моменты реализации основных алгоритмов, изложенных в предыдущих главах. Для методов глубокого обучения приведены графики обучения моделей и описан цикл обучения, а также функции, выполняющие совмещение входных данных на основе предсказаний нейронной сети. Для аналитических методов приведены основные детали их реализации. Реализации методов, описанных в данной главе, могут использоваться как для основной задачи, для которой изначально алгоритм был разработан, так и независимо, например, для решения смежных задач. Разработанные методы были реализованы на языках *Python*, *Matlab*.

В заключении диссертационной работы формулируются основные результаты.

## 2 Методы жесткого совмещения изображений криоэлектронной микроскопии

Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) является одной из самых развивающихся технологий изучения биомолекулярных структур, таких как вирусы, рибосомы, митохондрии, ионные каналы, ферментные комплексы и другие, в молекулярном разрешении [1]. Основным преимуществом такого вида электронной микроскопии является то, что исследуемый образец находится в естественной среде, ничем не окрашенный и предварительно не зафиксированный. Такого эффекта можно достичь, предварительно заморозив объект наблюдения при криогенных температурах, например температуре жидкого этана ( $-182^\circ$ ). Это позволяет анализировать различные биологические структуры в атомарном разрешении. Основная проблема получения атомарного разрешения заключается в обширном повреждении образца, вызванном взаимодействием пучка электронов с органическим веществом. Поэтому особенностью технологии является низкое отношение сигнала к шуму (англ. *SNR*). Предварительная заморозка образцов снижает повреждение в результате облучения и позволяет использовать более высокие дозы электронов для получения изображений при криогенных условиях. Существуют различные методы крио-ЭМ: криоэлектронная томография [3], криоэлектронная микроскопия одиночных частиц [4] и рентгеноструктурный анализ (англ. *X-ray crystallography*) [5], — все они успешно используются для анализа биологических структур в различных ситуациях.

В криоэлектронной томографии [6] для получения данных образцы, как и в криоэлектронной микроскопии, подвергают заморозке, предохраняя их от повреждений, возникающих в результате облучения. Пластинку, с замороженным образцом, содержащую большое количество изучаемых частиц, поворачивают под разными углами относительно электронного луча с шагом в  $1 - 2$  градуса в диапазоне от  $-60^\circ$  до  $+60^\circ$  и просвечивают в электронном микроскопе, получая двумерную проекцию образца для каждого угла. Полученную серию изображений используют для трехмерной реконструкции, которая, как правило, осуществляется с использованием взвешенного обратного проецирования [7]. В результате получается трехмерное томографическое изображение (Рис. 1), содержащее десятки одинаковых частиц, ориентированных различным образом. Чтобы получить трехмерное изображение частицы, где отношение сигнала к шуму значительно выше, в полученном трехмерном томографическом изображении локализуются все частицы. Далее, с помощью методов совмещения изображений, субтомограммы, содержащие найденные

частицы, преобразуются к одной ориентации в пространстве, а затем итеративно усредняются.

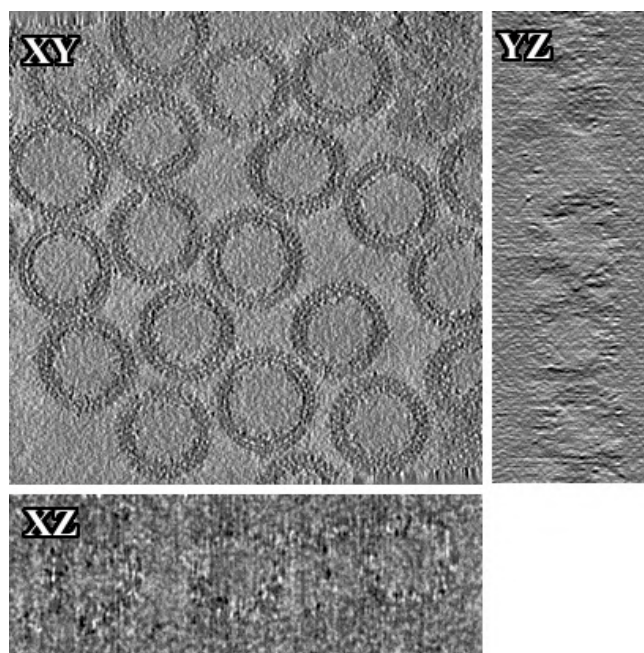


Рис. 1: Центральные срезы томографического изображения, содержащего одинаковые частицы (изображение из депозитария Protein Data Bank in Europe [8], набор данных EMD-4018).

Рассмотрим криоэлектронную микроскопию одиночных частиц [9]. Данная технология позволяет получать трехмерные модели исследуемого объекта в атомарном разрешении (до нескольких Ангстрем) по набору его двумерных проекций. Алгоритм состоит из следующих шагов (Рис. 2). Сначала, мы получаем микроскопическое изображение, содержащее большое количество случайно расположенных проекций частиц исследуемого образца (Рис. 3(a)). Затем, с помощью компьютерных методов локализации проекций и их кластеризации, из общего изображения вырезаются фрагменты, содержащие ровно одну проекцию исследуемой структуры, которые затем разделяются по группам (Рис. 3(б)). Каждая группа содержит изображения проекций, которые одинаково ориентированы в 3Д пространстве и отличаются друг от друга поворотом и смещением в плоскости проекции. Далее, применяя методы совмещения изображений, происходит выравнивание проекций внутри одного класса и их усреднение. Это позволяет повысить отношение сигнала к шуму и улучшить разрешение проекций. Стоит отметить, что количество проекций, которые необходимо выравнивать, составляет сотни, а иногда и тысячи. Далее происходит классификация изображений проекций на "хорошие" и "плохие". Поскольку исходное микроскопическое изображение имеет достаточно низкое отношение сигнала к шуму и процедура локализации проекций проводится автоматическими методами, в процедуре выделения

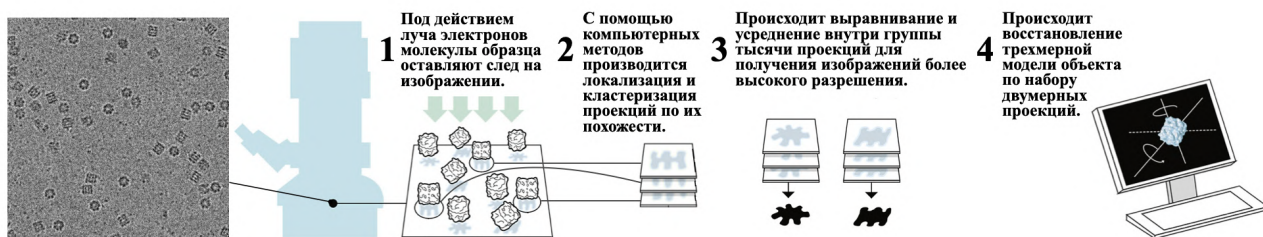


Рис. 2: Криоэлектронная микроскопия одиночных частиц: общий алгоритм работы.

проекций на изображении могут возникать ошибки, например, выделенная область может содержать только шум или локализованная проекция может не попадать целиком в выделенный фрагмент. Это приводит к ошибкам при усреднении внутри группы, которая содержит такие ошибочные экземпляры, и впоследствии влияет на качество реконструированной трехмерной модели. Для решения данной проблемы применяется классификация проекций, которая делит все выделенные проекции внутри каждой группы на "хорошие" и "плохие". Также, после усреднения проекций полученные изображения еще раз классифицируются для того, чтобы отфильтровать неверные или неточные проекции. Данный процесс классификации может идти несколько раз для достижения необходимой точности. Затем усредненные проекции используются для построения первичной трехмерной модели. Другое применение усредненных проекций состоит в исследовании симметрий частиц, а также кластеризации на группы для дальнейшего анализа. Процедура выравнивания проекций внутри группы, их усреднение и классификация является очень важным этапом в построении первичной трехмерной модели высокого разрешения.

В данной главе описаны методы совмещения двумерных изображений крио-ЭМ. Один из них основан на вычислении кросс-корреляции в пространстве Фурье, использующейся как для оценки сдвига, так и поворота. Для того, чтобы метод работал на изображениях крио-ЭМ, для которых характерен высокий уровень шума, было предложено несколько дополнений. Перед тем, как вычислять функцию кросс-корреляции, было предложено выделить объект интереса с помощью маски, предварительно размытой фильтром Гаусса для сглаживания краев на границе. Далее, было предложено применить полосовой фильтр в частотной области для подавления тех частот, которые соответствуют шуму. Для вычисления вектора смещения с субпиксельной точностью было решено использовать схожий с [10] подход. Предложенный метод был протестирован на реальных и синтетических данных и показал свою эффективность в применении к двумерным проекциям частиц изображений крио-ЭМ.

Другой предложенный быстрый метод выравнивания частиц основан на применении преобразования Фурье-Бесселя и является существенным улучшением метода [11]. Здесь также происходит вычисление функции корреляции пары изображений для поиска искоемых параметров совмещения. Результаты исследований на наборах данных с различным соотношением сигнал-шум ( $SNR$ ) показали, что такой метод устойчив к шуму и позволяет получать точные результаты даже при низких показателях  $SNR$ . В отличие от [11], где преобразование Фурье-Бесселя вычисляется с помощью вычисления интеграла стандартным дискретным способом, в данной работе предложен метод вычисления преобразования Фурье-Бесселя с помощью проекционного метода вычисления преобразования Ганкеля. Такое вычисление преобразования Ганкеля не только улучшает результат совмещения, но и существенно ускоряет метод. Помимо этого, было предложено использовать быстрый алгоритм расчета проекционных коэффициентов, чтобы получить дополнительное ускорение. Для демонстрации эффективности работы, предложенный метод был протестирован на синтетических и реальных наборах данных. Помимо этого, проведено сравнение предложенного метода с исходным методом [11] и предложенным в данной главе корреляционным методом, описанным в разделе 2.3.

Помимо методов совмещения, в данной главе описана процедура создания наборов двумерных и трехмерных синтетических изображений криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и томографии [12]. Синтетические данные нужны для того, чтобы оценить качество работы методов совмещения изображений. Для схожести с реальными изображениями предложенный подход генерирует трехмерную модель объекта, подобную реальным молекулярным комплексам, изучаемым с помощью методов криоэлектронной микроскопии и томографии. Далее для синтезированных изображений происходит моделирование процессов, происходящих при получении данных в электронном микроскопе, а именно: моделирование шума и функции переноса контраста, а также построение двумерных проекций в случае криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и моделирование эффекта потерянного клина для криоэлектронной томографии.

## 2.1 Постановка задачи

В криоэлектронной микроскопии одиночных частиц для совмещения большого количества двумерных проекций используются методы жесткого совмещения. Данный шаг является очень трудоемким ввиду большого количества проекций, требующих выравнивания. Для совмещения двумерных проекций используют следующую постановку задачи. Дана пара изображений  $g$  (называемое *подвижным*) и  $f$  (называемое *фиксированным*)

такие, что  $g(x) : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$  и  $f(x) : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$ . Нужно найти такое аффинное преобразование  $M_{\theta,x,y}$ , которое преобразует изображение  $g$  таким образом, что пиксели, относящиеся к объекту интереса на изображении  $g$  пространственно соответствуют пикселям объекта интереса на изображении  $f$ :

$$g \circ M_{\theta,x,y} \approx f. \quad (1)$$

Здесь  $g \circ M_{\theta,x,y}$  обозначает результат преобразования изображения  $g$ . В крио-ЭМ оди-  
ночных частиц предполагается, что все проекции имеют одинаковый масштаб, поэтому  
искмое преобразование представлено в виде композиции поворота на угол  $\theta$  и смещения  
на вектор  $(x, y)$ :

$$M_{\theta,x,y} = T_{x,y} \circ R_{\theta}. \quad (2)$$

Такие методы совмещения называются жесткими, поскольку объект интереса не изменяет  
свою форму, только положение и ориентацию.

## 2.2 Обзор методов жесткого совмещения для изображений криоэлектронной микроскопии

Для решения задачи совмещения изображений существуют различные подходы [13].  
Классические методы основаны на поиске параметров совмещения (угол поворота и дву-  
мерный вектор смещения) в пространственной области, что в большинстве случаев пред-  
ставляет из себя вычислительно затратный итеративный поиск [14]. Долгое время работы  
является существенным недостатком таких методов, поскольку процедуру совмещения  
необходимо выполнить для большого количества картинок.

Другая группа классических методов включает в себя поиск параметров совмещения  
в частотном пространстве и использует различные модификации преобразования Фурье.  
Большинство методов основаны на вычислении функции корреляции. Корреляция позво-  
ляет найти смещение объекта по паре изображений. В [15] для совмещения изображений  
использовалась техника фазовой корреляции, которая показывает отличную устойчивость  
к случайному шуму. Объекты на изображениях вращались, смещались и изменялись по  
размеру относительно друг друга. В [16] авторы использовали схожую технологию для  
стабилизации последовательности изображений. В [17] авторы выполняют итеративную  
оптимизацию минимизации функционала, основанного на вычислении корреляции через  
преобразование Фурье сначала для поиска вектора смещения, затем для поиска угла пово-  
рота. Для поиска угла поворота функция корреляции вычисляется в полярных координатах.  
В [10, 18] авторы также вычисляют функцию корреляции в частотном пространстве



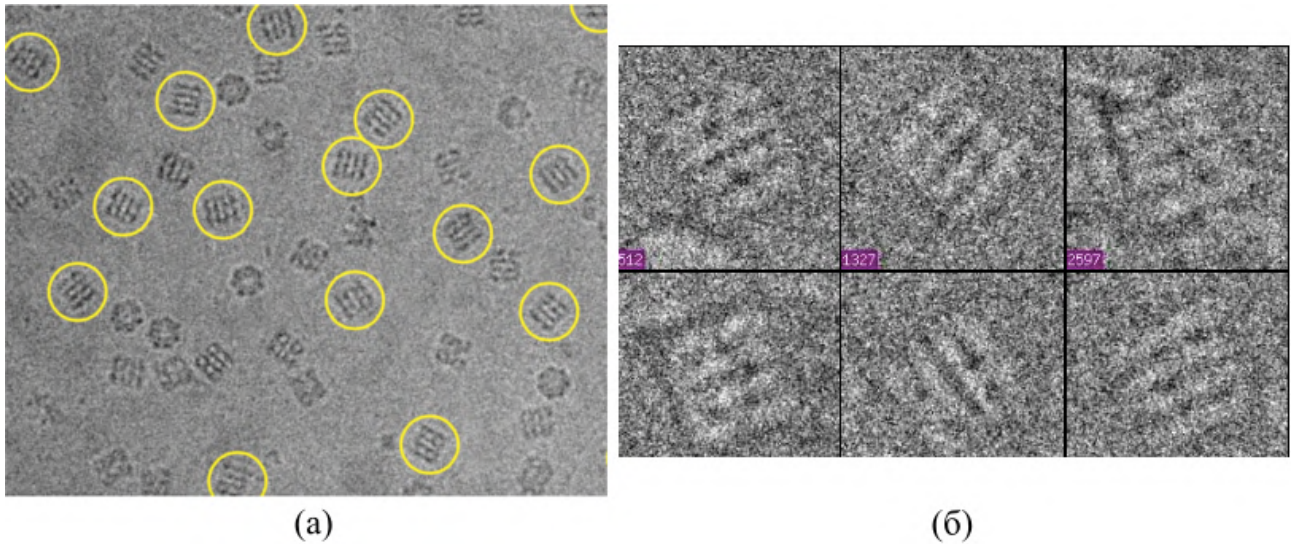


Рис. 3: а) Пример изображения криоэлектронной микроскопии одиночных частиц, желтыми кругами отмечены локализованные проекции частиц одного класса. б) Увеличенные изображения частиц одного класса с различной ориентацией.

для поиска параметров совмещения, а затем уточняют результат до требуемой субпиксельной точности путем интерполяции функции корреляции в окрестности положения ее максимального значения. В работе [19] для получения субпиксельной точности в два раза быстрее было предложено перейти к неравномерному быстрому преобразованию Фурье. Метод также может быть применен для совмещения трехмерных изображений. В работах [11, 20] авторы уходят от стандартной постановки задачи совмещения: в [20] модель движения, заданная матрицей преобразования  $M$ , представлена не композицией поворота и смещения, а двумя поворотами и смещением вдоль фиксированной оси (в данном случае вдоль оси  $x$ ). Это позволяет ускорить совмещение за счет быстрого поиска углов поворота через преобразование Фурье. Вычисление параметра смещения происходит итеративно, а в [11] авторы моделируют движение в виде композиции трех поворотов и, таким образом, производят поиск трех искоемых углов одновременно через однократное вычисление функции корреляции, используя преобразование Фурье-Бесселя.

Помимо этого, за последние годы появились методы, которые решают задачу выравнивания совместно с задачей кластеризации [21, 22]. Метод, представленный в [21], выполняет совмещение проекций с  $K$  фиксированными изображениями (т.е. изображениями, к которым приводятся все проекции внутри каждой группы соответственно, их еще называют шаблонами), соответствующими разным проекциям. Данный процесс происходит итеративно, и затем выровненная проекция классифицируется в ту группу, на шаблон которой она наиболее походит. Данная процедура выравнивания с последующей класси-

фикацией продолжается несколько раз до получения нужных усреднённых изображений каждой группы. В [22] авторы предложили использовать некоторое представление изображения, которое инвариантно к поворотам. Таким образом, опуская процесс кластеризации и применяя классификацию проекций по положению в пространстве, выравнивание частиц производится только для изображений и их ближайших по ориентации в пространстве соседей. Это позволяет существенно снизить время обработки данных и улучшить точность полученных усредненных проекций. А в [23] авторы предложили пропустить этап кластеризации и совмещения и получать проекции с более высоким отношением сигнала к шуму, которые обычно получены путем усреднения выровненных проекций, прямо из исходных наблюдений. Также были разработаны различные комплексы программного обеспечения (ПО), в которых реализованы процедуры выравнивания частиц и их усреднение, такие как CryoSPARC [24], RELION [25] и FREALIGN [26]. Наиболее популярным является RELION [25], где авторы используют метод максимального правдоподобия для решения задачи двумерной классификации и выравнивания проекций.

Большинство методов, разработанных за прошедшее десятилетие, являются аналитическими. Применение методов машинного обучения и нейронных сетей в задаче выравнивания и классификации частиц не является актуальным в виду того, что метод должен быть гибким в применении к новым изображениям проекций новых частиц. Поэтому, основная цель разработки новых методов в области крио-ЭМ — это увеличение скорости обработки данных и изобретение новых метрик схожести для усовершенствования процесса классификации частиц. Однако, нейронные сети широко применяются для других задач в рамках крио-ЭМ одиночных частиц. Например, в [27] авторы используют сверточную нейронную сеть для уменьшения количества шума на изображениях крио-ЭМ.

## 2.3 Корреляционный метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии

### 2.3.1 Описание метода

Предложенный метод основан на использовании функции кросс-корреляции, аналогично работе [28]. Для двух изображений  $f$  и  $g$  функция кросс-корреляции может быть эффективно вычислена с помощью преобразования Фурье:

$$f \otimes g = \mathcal{F}^{-1}(\hat{f} \cdot \bar{\hat{g}}), \quad (3)$$

где  $\mathcal{F}^{-1}$  - оператор обратного преобразования Фурье,  $\hat{f}$  и  $\hat{g}$  - преобразование Фурье для изображений  $f$  и  $g$  соответственно,  $\bar{\hat{g}}$  - комплексное сопряжение. Положение максималь-

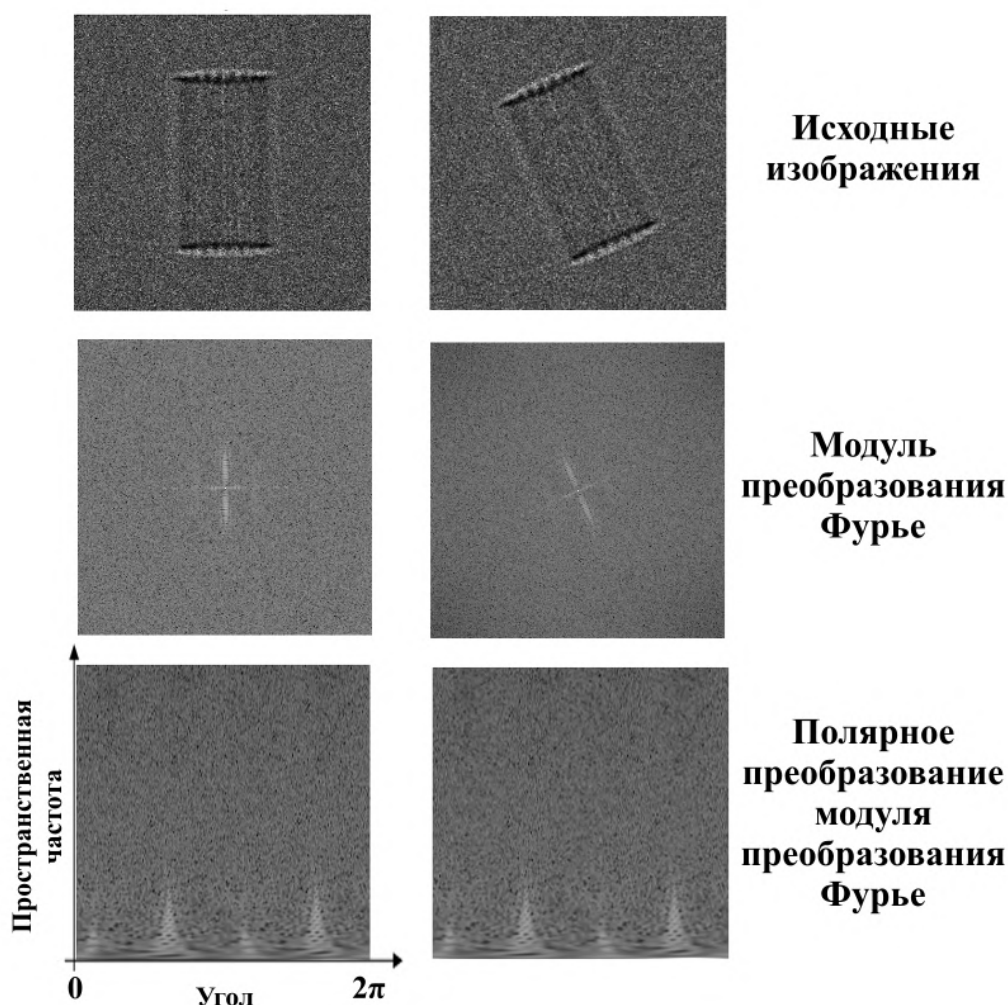


Рис. 4: Поиск угла поворота как вектор смещения через представление в полярных координатах.

ного значения функции  $f \otimes g$  определяет вектор смещения между изображениями. Для вычисления функции корреляции (3) изображений обычно используют быстрое преобразование Фурье (БПФ). Однако, если совмещаемый объект на изображениях повернут, то его относительное смещение не может быть найдено с помощью кросс-корреляции. Если рассматривать изображение  $f(x, y)$  в полярных координатах  $f_p(\rho, \varphi)$  (будем называть такое представление *полярным* преобразованием изображения), то поворот изображения вокруг его центра соответствует смещению в полярных координатах. Затем, после компенсации поворота, можно вычислить кросс-корреляцию изображений в декартовых координатах для определения вектора смещения.

Стоит заметить, что если между исходными изображениями есть смещение, их полярное преобразование значительно отличается друг от друга. Поэтому найти искомый угол поворота изложенным выше способом не получится. Эту проблему можно решить,



Рис. 5: Выделение области интереса с помощью маски, предварительно размытой гауссианой.

перейдя в частотное пространство Фурье и используя свойства преобразования Фурье (Рис. 4). Во-первых, вращение изображения  $f$  соответствует вращению его модуля преобразования Фурье  $|\hat{f}|$  [29]. Если  $x = \rho \cos \varphi, y = \rho \sin \varphi, u = w \cos \theta, v = w \sin \theta$ , то  $f(x, y)$  и  $\hat{f}(u, v)$  при переводе в полярные координаты станут  $f_p(\rho, \varphi)$  и  $\hat{f}_p(w, \theta)$  соответственно. По свойству преобразования Фурье получим:

$$f_p(\rho, \varphi + \varphi_0) \Leftrightarrow \hat{f}_p(w, \theta + \theta_0).$$

Во-вторых, информация о смещении объекта содержится в фазе преобразования Фурье. Таким образом спектр преобразования Фурье инвариантен относительно смещения объекта: если  $(a, b)$  — вектор смещения, то

$$\mathcal{F}\{f(x - a, y - b)\} = \hat{f}(u, v)e^{-j2\pi(au+bv)}.$$

**Выделение области интереса** Для корректной работы метода совмещения на изображениях криоэлектронной микроскопии нужно сделать предобработку данных, а именно выбрать область интереса на каждом совмещаемом изображении. Для изображений крио-ЭМ характерно большое количество шума, такое, что объект трудно увидеть человеческим глазом (Рис. 3(б)). Кроме того, изображения проекций обычно центрированы (т.е. объект интереса расположен приблизительно по центру изображения) ввиду автоматического процесса выделения проекций на исходном изображении с помощью специализированных программных комплексов, такого как, например, [30]. Поэтому для выбора области интереса к изображениям применяются квадратные маски, расположенные в центре изображения. Размер маски выбирается эмпирически в соответствии с ожидаемым размером объекта и типичными сдвигами. Для того, чтобы маска была непрерывной на границе, к ней предварительно применен фильтр Гаусса с  $\sigma = 8$  (Рис. 5).

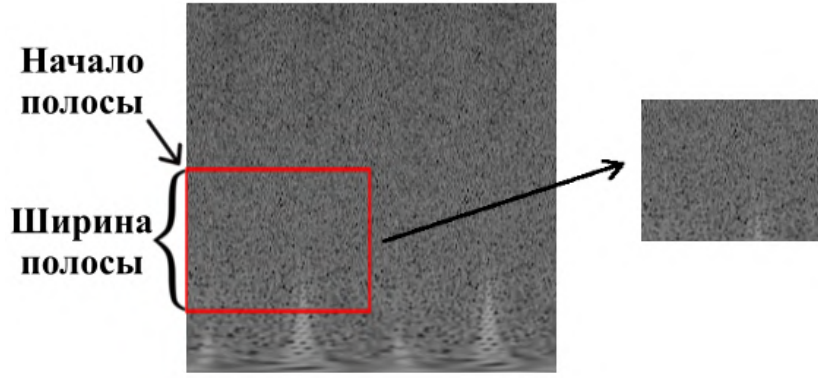


Рис. 6: Фильтрация полосовым фильтром, заданным двумя параметрами: положение начала и ширина полосы. Оптимальные значения параметров полосового фильтра были определены экспериментально.

**Вычисление угла поворота** Первым шагом предложенного корреляционного метода является вычисление преобразования Фурье  $\hat{f}(u, v)$  и  $\hat{g}(u, v)$  для каждого из совмещаемых изображений  $f(x, y)$  и  $g(x, y)$  и их представление в полярных координатах (здесь мы используем бикубическую интерполяцию)  $\hat{f}_p(w, \theta)$  and  $\hat{g}_p(w, \theta)$ . Поворот частицы на исходных изображениях  $f(x, y)$  и  $g(x, y)$  соответствует смещению  $|\hat{f}_p(w, \theta)|$  и  $|\hat{g}_p(w, \theta)|$ , тогда как смещение  $f(x, y)$  и  $g(x, y)$  не влияет на  $|\hat{f}_p(w, \theta)|$  и  $|\hat{g}_p(w, \theta)|$  (Рис. 4).

Затем для определения угла поворота объекта был использован полосовой фильтр для выбора пространственных частот, соответствующих масштабу объектов, поворот которых необходимо компенсировать. Вертикальная ось полярного преобразования спектра соответствует частотам, поэтому можно выполнить фильтрацию, взяв горизонтальную полосу полярного преобразования изображения (Рис. 6). Положение и ширина частотной полосы устанавливаются экспериментальным путем. Кроме того, мы используем только ту часть спектра, которая соответствует углам от 0 до  $\pi$  в полярных координатах  $(w, \theta)$ , так как преобразование Фурье действительной функции симметрично [31].

Для задания значений параметров полосового фильтра был проведен эксперимент на синтетических данных [12], чтобы определить размер и положение полосы. Было взято два изображения одного и того же объекта, повернутого относительно друг друга на заданный угол. Затем, последовательно проходя по всем возможным парам значений положения и ширины полосового фильтра, к паре изображений был применен предложенный корреляционный метод столько раз, сколько существует различных пар значений параметров частотного полосового фильтра (Рис. 6). Положение полосы определено координатой ее

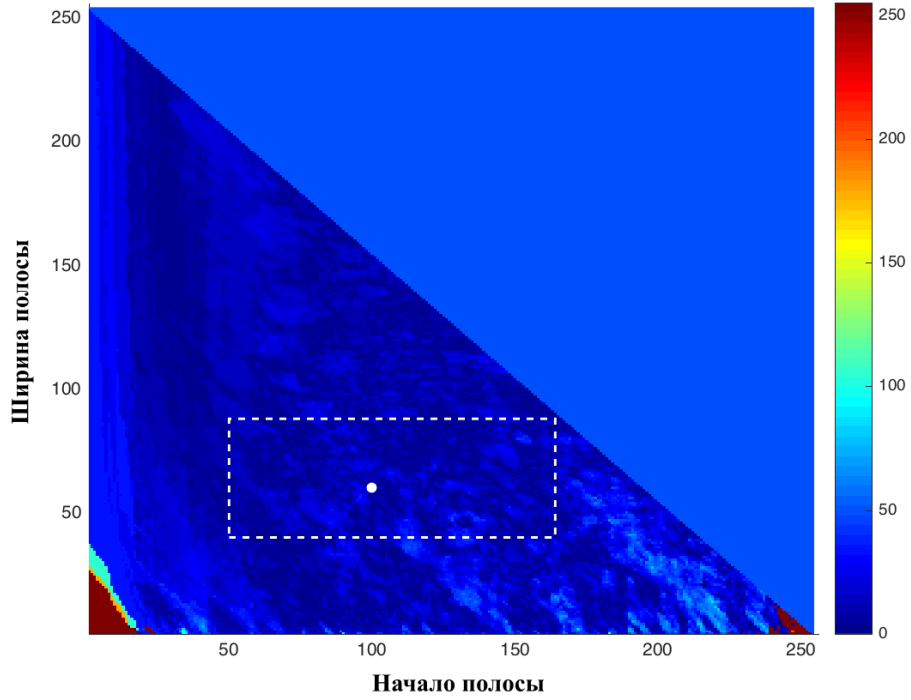


Рис. 7: Задание параметров полосового фильтра: график значений модуля разности искомого и заданного углов поворота для различных значений начала и ширины полосы частотного фильтра. Темно-синий цвет соответствует минимуму ошибки, белая точка показывает положение минимального значения. Белая рамка определяет регион положения минимальной ошибки для всех пар изображений, участвовавших в эксперименте.

начала. Таким образом, для каждой пары параметров была определена ошибка между полученным и заданным значением угла поворота (Рис. 7), равная модулю разности искомого и исходного значений угла поворота. Эксперимент был проведен для 6 пар синтетических изображений с различным уровнем шума, соответствующим разным показателям  $SNR$ , и для различных значений угла поворота. По результатам экспериментов на различных синтетических данных минимум ошибки совмещения по углу достигается в одной и той же области, соответствующей началу полосы от 50 до 164 и ширине полосы от 40 до 88 для изображений размером  $256 \times 256$ .

Наконец, искомому углу поворота соответствует угловая координата максимального значения кросс-корреляции двумерных полос  $|\hat{f}_p(w, \theta)|$  and  $|\hat{g}_p(w, \theta)|$ .

**Вычисление вектора смещения** Перед поиском вектора смещения необходимо повернуть изображение на угол, полученный на предыдущем шаге. Поворот выполняется вокруг центра изображения. Обычно, для вычисления вектора смещения используют функцию кросс-корреляции (3), а к изображениям также предварительно применяют полосовой

фильтр [28]. В данной работе используется подход, основанный на использовании дискретного преобразования Фурье [10], который позволяет достичь заданной субпиксельной точности  $\frac{1}{k}$  путем вычисления функции кросс-корреляции с повышенной частотой дискретизации. Для ускорения вычислений и уменьшения вычислительной сложности, субпиксельная точность вычисляется только в небольшой окрестности максимального значения функции корреляции изображений. Это обусловлено тем, что для вычисления кросс-корреляции изображений  $f(x, y)$  и  $g(x, y)$  размера  $M_1 \times M_2$  с субпиксельной точностью  $\frac{1}{k}$  необходимо вычислить кросс-корреляцию матриц размером  $kM_1 \times kM_2$ . Поскольку операция совмещения крио-ЭМ одиночных частиц выполняется для тысяч частиц, увеличение сложности вычисления кросс-корреляции в  $k$  раз значительно увеличит общее время вычислений. Для вычисления корреляции с субпиксельной точностью используется дискретное преобразование Фурье (ДПФ) вместо БПФ, поскольку вычисления производятся для патчей небольшого размера ( $1.5 \times 1.5$  пикселей) и ДПФ, которое реализовано в виде умножения матриц, работает быстрее БПФ для матриц маленького размера. Мы предполагаем, что  $k \ll M_1$  and  $k \ll M_2$ .

Алгоритм поиска вектора смещения состоит из двух этапов: сначала мы находим начальную оценку положения пика функции кросс-корреляции с использованием быстрого преобразования Фурье (3) с коэффициентом повышения дискретизации  $k_0 = 2$ . Для этого матрицы изображений дополнены нулями, таким образом увеличивая вдвое их размер. Затем нужно определить положение максимального значения (3) и поделить полученные координаты вектора на  $k_0$ . Второй этап состоит в уточнении полученного результата до заданной субпиксельной точности  $\frac{1}{k}$ : в окрестности размером  $1.5k \times 1.5k$  положения пика функции, найденного на предыдущем шаге, мы вычисляем функцию кросс-корреляции, реализованной в виде умножения матриц размеров  $1.5k \times M_1$ ,  $M_1 \times M_2$  и  $M_2 \times 1.5k$ :

$$C_{fg} = \sum_v \left[ e^{i2\pi \left( \frac{d_y v}{M_2} \right)} \right]_{1.5k \times M_1} \sum_u \left[ \hat{f}(u, v) \times \bar{\hat{g}}(u, v) \right]_{M_1 \times M_2} \left[ e^{i2\pi \left( \frac{d_x u}{M_1} \right)} \right]_{M_2 \times 1.5k}, \quad (4)$$

где заданные изображения  $f(x, y)$  и  $g(x, y)$  имеют размер  $M_1 \times M_2$ ,  $\hat{f}(u, v)$  и  $\hat{g}(u, v)$  - соответствующие дискретные преобразования Фурье,  $(d_x, d_y)$  - вектор смещения. Наконец, мы находим положение максимального значения функции  $C_{fg}$  (4), заданной матрицей размера  $1.5k \times 1.5k$  и тем самым уточняем предыдущее значение вектора смещения.

## 2.4 Быстрый метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии на основе преобразования Фурье-Бесселя

В данной главе был предложен еще один метод жесткого совмещения для выравнивания двумерных проекций криоэлектронной микроскопии. Предложенный метод отличается от стандартных корреляционных методов совмещения изображений тем, что движение объектов моделируется в виде композиции 3 поворотов в отличие от композиции преобразований, определенных в стандартной постановке задачи (1). Данная идея была взята из [11]. Представим искомую модель движения в виде композиций трех операторов: поворот на угол  $\psi$  вокруг центра, смещение на величину  $\rho$  вдоль оси  $x$  и поворот на угол  $\varphi$  вокруг центра, что эквивалентно повороту на угол  $\varphi + \psi$  вокруг центра и последующему смещению на величину  $\rho$  в направлении оси  $x$ , повернутой на угол  $\varphi$ :

$$M_{\varphi, \rho, \psi} = R_{\varphi} \circ T_{(\rho, 0)} \circ R_{\psi} = T_{(\rho \cos \varphi, \rho \sin \varphi)} \circ R_{\varphi + \psi} = M_{\varphi + \psi, \rho \cos \varphi, \rho \sin \varphi}.$$

Пусть точки изображений заданы в полярной системе координат, тогда для  $p(r, \lambda)$  и  $p'(r', \lambda')$ , связанных между собой следующим образом  $M(p') = p$ , справедливо следующее:

$$p = T_{(\rho \cos \varphi, \rho \sin \varphi)}(R_{\varphi + \psi}(p')).$$

Далее представим  $p$  и  $p'$  как комплексные числа  $p = re^{\lambda}$  и  $p' = re^{\lambda'}$ , тогда:

$$r'e^{\lambda'} = (re^{i\lambda} - \rho e^{i\varphi})e^{-i(\varphi + \psi)}.$$

Затем перейдем к композиции двух преобразований  $M_i(\varphi_i, \rho_i, \psi_i)$ ,  $i = 1, 2$ :  $M = M_1 \circ M_2$ :

$$\begin{aligned} M_1(M_2(p)) &= e^{i\varphi_1}(\rho_1 + e^{i\psi_1}e^{i\varphi_2}(\rho_2 + e^{i\psi_2}p)) \\ &= \rho_1 e^{i\varphi_1} + \rho_2 e^{i(\varphi_1 + \varphi_2 + \psi_1)} + e^{i(\varphi_1 + \varphi_2 + \psi_1 + \psi_2)}p. \end{aligned}$$

Модуль и аргумент полученного комплексного числа выглядят так:

$$\rho = |\rho_1 + \rho_2 e^{i(\varphi_2 + \psi_1)}| = \sqrt{\rho_1^2 + \rho_2^2 + 2\rho_1\rho_2 \cos(\varphi_2 + \psi_1)}, \quad (5)$$

$$\varphi + \psi = \varphi_1 + \varphi_2 + \psi_1 + \psi_2. \quad (6)$$

Рассмотрим функцию Бесселя  $J_n$  первого рода порядка  $n$  и формулу сложения данных функций [32]:

$$J_m(r'x)e^{im\lambda'} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n(rx)J_{n-m}(\rho x)e^{i[n(\lambda - \varphi) - m\psi]}, \quad (7)$$

где  $x \geq 0$  – вещественное число. Также введем композиционную формулу для функций Бесселя [33] для треугольника со сторонами  $\rho_1 x$ ,  $\rho_2 x$  и  $\rho x$ :

$$e^{i(n\varphi + m\psi)}J_{n-m}(\rho x) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} e^{i(n\varphi_1 + h(\varphi_2 + \psi_1) + m\psi_2)}J_{n-h}(\rho_1 x)J_{h-m}(\rho_2 x). \quad (8)$$



### 2.4.1 Преобразования Ганкеля и Фурье-Бесселя

Преобразование Ганкеля порядка  $\alpha$  определяется следующим образом:

$$H_\alpha [z(x)] = \tilde{z}_\alpha(u) = \int_0^\infty z(x) J_\alpha(ux) x dx, \quad H_\alpha : L_2[0, \infty) \rightarrow L_2[0, \infty], \quad (9)$$

где  $J_\alpha$  — функция Бесселя первого рода порядка  $\alpha \geq 0$ .

Обратное преобразование Ганкеля определяется симметрично:

$$H_\alpha^{-1} [\tilde{z}_\alpha(u)] = z(x) = \int_0^\infty \tilde{z}_\alpha(u) J_\alpha(ux) u du, \quad H_\alpha^{-1} : L_2[0, \infty) \rightarrow L_2[0, \infty].$$

Пусть функция  $f$  задана в полярных координатах  $f = f(r, \lambda)$ , тогда преобразованием Фурье-Бесселя функции  $f$  называется [33]:

$$F_m(x) = \int_0^\infty \hat{f}_m(u) J_m(ux) u du = H_m [\hat{f}_m(u)], \quad \forall x \geq 0, \quad (10)$$

где  $\hat{f}_m(u)$  — преобразование Фурье функции  $f$  вдоль угловой оси полярных координат для фиксированного радиуса  $u$ :

$$\hat{f}_m(u) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} f(u, \theta) e^{-im\theta} d\theta. \quad (11)$$

Применив обратное преобразование Ганкеля, получим

$$\hat{f}_m(u) = H_m^{-1} [F_m(x)] = \int_0^\infty F_m(x) J_m(ux) x dx.$$

Тогда, для функции  $f$  справедливо следующее разложение через обратное преобразование Фурье-Бесселя:

$$f(r, \lambda) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \hat{f}_m(r) e^{im\lambda} = \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{im\lambda} \int_0^\infty F_m(x) J_m(rx) x dx. \quad (12)$$

### 2.4.2 Формула корреляции

Пусть  $f : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$  и  $g : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$  — изображения, которые необходимо совместить. Определим оператор  $\Lambda_M$ , который принимает в качестве параметра изображение и возвращает его преобразованную версию:

$$\Lambda_{M, \varphi, \rho, \psi} = g \circ M^{-1}.$$

Для каждой точки  $p$  введем точку  $p' = M^{-1}(p)$ . Тогда:

$$\Lambda_M(g)(p) = g(p') = \sum_m e^{im\lambda'} \int_0^\infty G_m(x) J_m(r'x) x dx,$$

где  $G_m(x)$  – преобразование Фурье-Бесселя функции  $g$ . Используя формулу сложения (7) преобразуем уравнение следующим образом:

$$\Lambda_M(g)(p) = \sum_n e^{in\lambda'} \int_0^\infty \left( \sum_m G_m(x) J_{n-m}(\rho x) e^{-i(n\varphi+m\psi)} \right) J_n(rx) x dx,$$

и выразим из этого уравнения преобразование Фурье-Бесселя функции  $\Lambda_M(g)$ :

$$(G^M)_n(x) = \sum_m G_m(x) J_{n-m}(\rho x) e^{-i(n\varphi+m\psi)}. \quad (13)$$

Затем вычислим функцию корреляции между функциями  $f$  и преобразованной версией функции  $g$ , используя их разложения в ряд Фурье  $f(r, \lambda) = \sum_m e^{im\lambda} \hat{f}_m(r)$  и  $\Lambda_M(g)(r, \lambda) = \sum_n e^{in\lambda} \widehat{\Lambda_M(g)}_n(r)$ :

$$\begin{aligned} c(M) &= \int_{\mathbb{R}^2} f \cdot \Lambda_M(g) = \int_0^\infty \int_0^{2\pi} f(r, \lambda) \overline{\Lambda_M(g)(r, \lambda)} r d\lambda dr \\ &= 2\pi \sum_m \int_0^\infty \hat{f}_m(r) \overline{\widehat{\Lambda_M(g)}_m(r)} r dr. \end{aligned}$$

Применяя теорему Планшереля [33] и используя формулу (13) получим:

$$c(M) = 2\pi \sum_{m, m'} e^{i(m\varphi+m'\psi)} \int_0^\infty F_m(x) \overline{G_{m'}(x)} J_{m-m'}(\rho x) x dx.$$

Перейдем к композиции преобразований  $M = M_1 \circ M_2$  и сделаем замену переменных в (5), (6):

$$\begin{aligned} \varphi_1 &= \xi, & \rho_1 &= b, & \psi_1 &= 0, \\ \varphi_2 &= \eta + \varepsilon, & \rho_2 &= b, & \psi_1 &= \omega, \end{aligned} \quad (14)$$

где  $b = \frac{\rho_{max}}{2}$ ,  $\varepsilon$  – маленький угол для того, чтобы избежать повторяющихся значений в семплировании угла  $\eta$ . Значение  $\rho_{max}$  обозначает максимально возможную величину смещения изображений. В данной работе для изображения размером  $256 \times 256$  был выбран  $\rho_{max} = 7$ .

Таким образом значения тройки углов  $(\xi, \eta, \omega)$  являются параметрами движения  $M$ , заданного в виде композиции 3 поворотов, и соответственно аргументами функции корреляции  $c(M)$ , а аргументы максимального значения  $c(M)$  соответствуют искомым параметрам совмещения рассматриваемых изображений (Рис. 8).

Используя композиционную формулу для функций Бесселя (8), получим:

$$\begin{aligned} c(M) &= 2\pi \sum_{m, h, m'} e^{i(m\xi+h(\eta+\varepsilon)+m'\omega)} \\ &\times \int_0^\infty J_{m-h}(bx) J_{h-m'}(bx) F_m(x) \overline{G_{m'}(x)} x dx. \end{aligned}$$

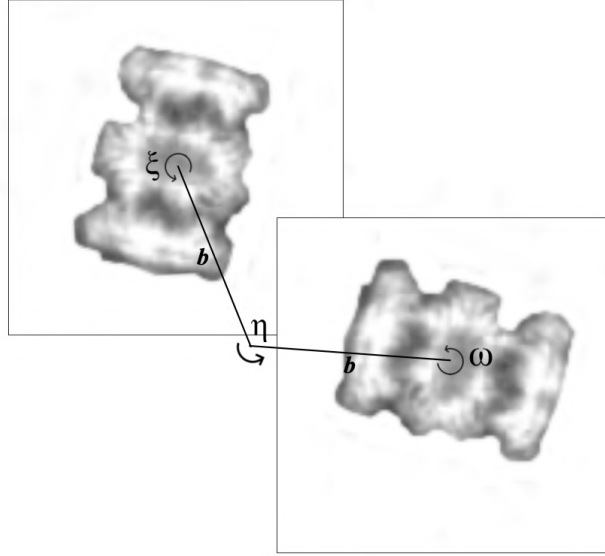


Рис. 8: Иллюстрация параметров метода. Изображение  $f$  зафиксировано, в то время как изображение  $g$  вращается на углы  $\xi, \eta$  и  $\omega$ . Длина плеча вращения  $b$  зафиксирована и выбирается как половина максимально возможного смещения  $\rho_{max}$ .

Затем сделаем еще одну замену индексов и переменных:

$$h = h_1 + m', \quad m = m_1 + h = m_1 + h_1 + m',$$

$$\eta' = \xi + \eta, \quad \omega' = \xi + \eta + \omega.$$

Тогда функция корреляции  $c(M)$  преобразуется в функцию  $c'(\xi, \eta', \omega')$ :

$$c(M) = c'(\xi, \eta', \omega') = 2\pi \sum_{m_1, h_1, m'} e^{i(m_1 \xi + h_1 (\eta' + \varepsilon) + m' (\omega' + \varepsilon))}$$

$$\times \int_0^\infty J_{m_1}(bx) J_{h_1}(bx) F_{m_1+h_1+m'}(x) \overline{G_{m'}(x)} x dx,$$

преобразование Фурье которой выражается следующим образом:

$$\hat{T}(m_1, h_1, m') = 2\pi e^{i(h_1+m')\varepsilon} \int_0^\infty F_{m_1+h_1+m'}(x) \overline{G_{m'}(x)} J_{m_1}(bx) J_{h_1}(bx) x dx. \quad (15)$$

Так, вычислив обратное преобразование Фурье для (15) получим функцию корреляции, положение максимального значения которой соответствует искомым параметрам. Эффективность данного метода в том, что процедура совмещения пары изображений сведена к однократному вычислению обратного преобразования Фурье. Также в формуле (15) некоторые значения под интегралом, а именно преобразования Фурье-Бесселя  $F_{m_1+h_1+m'}(x)$ ,  $\overline{G_{m'}(x)}$  и функции Бесселя  $J_{m_1}(bx)$ ,  $J_{h_1}(bx)$  могут быть вычислены однократно и затем переиспользоваться.

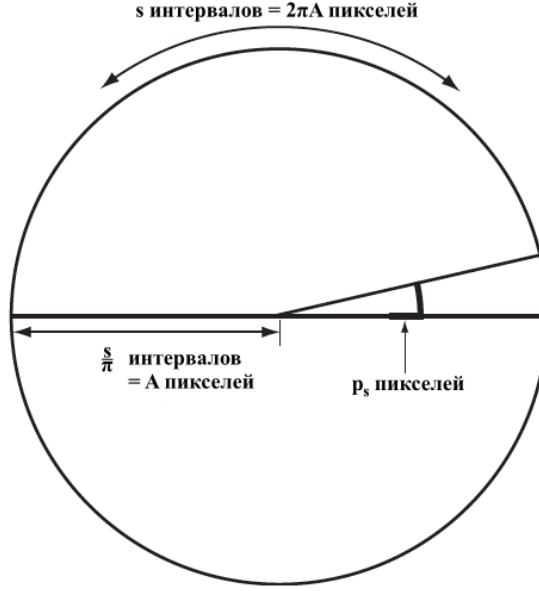


Рис. 9: Параметры, используемые для семплирования изображений. Радиус изображения –  $A$ , среднее количество пикселей на точку семплирования  $p_s$ . Таким образом, количество угловых точек семплирования  $\theta$  равно  $s = \frac{\pi A}{p_s}$ , а количество точек семплирования по радиусу  $u$  всего  $s/\pi$ .

### 2.4.3 Дискретизация интегралов и пределы интегрирования

Для вычисления выражения (15) необходимо задать сетку значений  $m_1 \times h_1 \times m'$ , а также задать область определения изображений и параметры дискретизации, необходимые для вычисления интегралов. Пусть  $A$  – радиус изображения в пикселях, т. е. окружность на изображении, внутри которой целиком помещается объект интереса, который необходимо совместить с объектом на другом изображении. Определим также значение  $p_s$ , которое отвечает за среднее количество пикселей на точку семплирования. Для вычисления преобразования Фурье-Бесселя изображений (10) необходимо задать сетку в полярных координатах. Определим значение  $s$  как количество угловых точек семплирования  $\theta$ . На Рис. 9 показано, что значение  $s$  на границе круговой области радиуса  $A$  отвечает значению  $2\pi A$  пикселей, т.е. каждый шаг между узлами сетки равен  $2\pi A/s$  пикселей при радиусе  $u = A$  и  $\pi A/s$  при радиусе  $u \in [0, A)$ . Тогда:

$$s = \frac{\pi A}{p_s}.$$

Таким образом получается  $A/p_s = s/\pi$  точек семплирования по радиусу  $u$ . Обозначим  $B = \frac{s}{2}$  предполагаемую полосу изображения, например, для подсчета преобразования Фурье в формуле (11): здесь используется  $2B$  точек семплирования переменной интегрирования  $\theta$  только для  $|m| < B$  (предполагается, что  $J_m(ux)$  затухают при  $|m| \geq B$ ). В качестве

верхнего предела интегрирования в формуле преобразования Фурье-Бесселя (10) возьмем значение  $A$  и посчитаем интеграл.

Далее определим пределы интегрирования по  $x$  в основной формуле (15): максимальное значение  $x$ , которое совместимо с количеством точек по радиусу, равно  $\frac{2B}{\pi}$ . Согласно теореме о частоте дискретизации сигнала, для его корректного восстановления частота дискретизации должна превышать частоту сигнала минимум в 2 раза. Тогда, учитывая поведение функции Бесселя получим:

$$\frac{2B}{\pi} = 2 \cdot \frac{x_{max}A}{2\pi} \cdot 2.$$

Следовательно:

$$x_{max} = \frac{B}{A}.$$

Следующим шагом определим пределы значений  $\xi$ ,  $\eta'$  и  $\omega'$ . Количество точек  $\xi$  равно количеству точек семплирования угловой координаты изображения, в то время как количество точек  $\eta$  равно количеству точек семплирования радиуса в полярном представлении изображения (Рис. 8). Так как  $p_s$  равно среднему расстоянию между точками семплирования, то обозначим

$$s_\xi = \frac{2\pi b}{p_s} = \pi k \text{ и } s_\eta = k,$$

где

$$k = \frac{2b}{p_s} = \frac{\rho_{max}}{p_s} \quad (16)$$

– количество точек семплирования для  $\rho_{max}$ . Для того, чтобы  $k$  значений  $\eta$  давали нам разные расстояния между центрами изображений (Рис. 10), положим  $\varepsilon = \pi/2k$  в формуле (14). Поскольку изначальная пара  $(\xi, \eta)$  имеет  $\pi k$  и  $k$  точек семплирования соответственно, тогда новая пара параметров после замены переменных  $(\xi, \xi + \eta)$  будет иметь такое же количество точек семплирования. В итоге получаем следующие соотношения, используя  $p_s = \pi A/2B$  и формулу (16):

$$\begin{aligned} |m_1| &< \frac{1}{2}s_\xi = \frac{\pi k}{2} = \frac{2Bb}{A}, \\ |h_1| &< \frac{1}{2}s_{\eta'} = \frac{k}{2} = \frac{2Bb}{\pi A}, \\ |m'| &< B. \end{aligned}$$

Последнее, что нам осталось определить – шаг дискретизации интеграла в формуле (15). Для вычисления преобразования Фурье-Бесселя (10) используют  $2B/\pi$  точек (Рис. 9). Поэтому определим шаг дискретизации по  $x$  так, чтобы тоже получилось  $2B/\pi$  точек:

$$\Delta x = \frac{B/A}{2B/\pi} = \frac{\pi}{2A}.$$

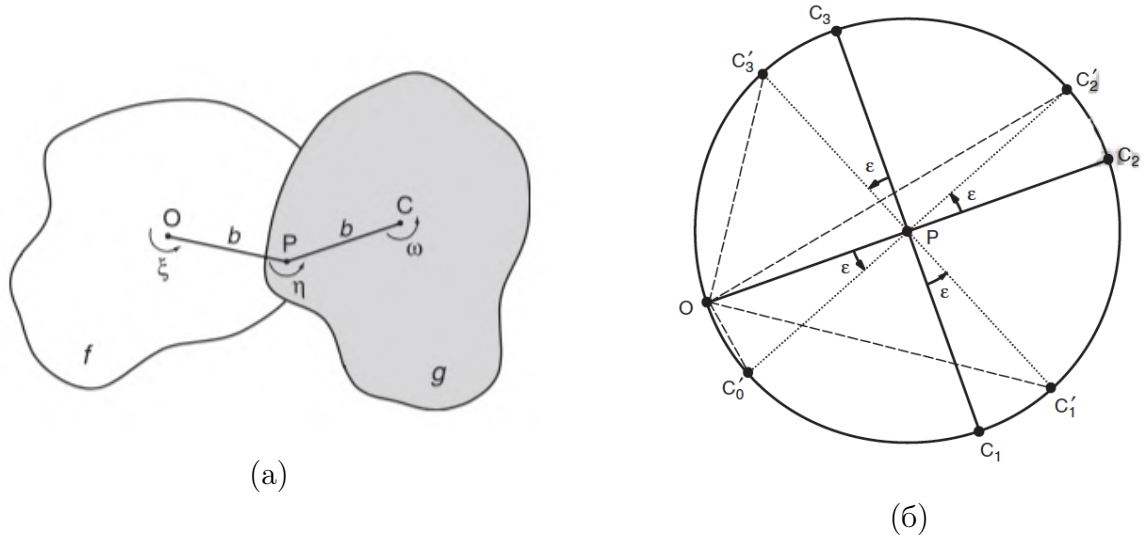


Рис. 10: Иллюстрация того, как, используя угол  $\varepsilon$ , избежать повторения расстояний до центров изображений. Слева (а) указаны обозначения центров масс изображений  $O$  и  $C$ , вокруг которых осуществляются повороты на углы  $\xi$  и  $\omega$  соответственно. Поворот на угол  $\eta$  производится вокруг точки  $P$ . Справа (б) показана генерация расстояний от точки  $O$  до точек  $C_s$ , соответствующих разным значениям  $\eta + \varepsilon$  для  $s_\eta = k = 4$ .

#### 2.4.4 Проекционный метод с использованием функций Лагерра для преобразования Фурье-Бесселя

Ниже предложен способ ускорения метода совмещения изображений на основе Фурье-Бесселя путем применения проекционного метода с использованием функций Лагерра для вычисления преобразования Ганкеля в (10).

Построим проекционный метод вычисления преобразования Ганкеля (9) [34], используя систему собственных функций данного преобразования – функций Лагерра [35]. Нормированные функции Лагерра определены следующим образом:

$$\psi_n^\alpha(x) = \frac{1}{\sqrt{n! \Gamma(n + \alpha + 1)}} x^{\alpha/2} e^{-x/2} L_n^\alpha(x), \quad (17)$$

$$L_n^\alpha(x) = (-1)^n x^{-\alpha} e^x \frac{d}{dx^n} (x^{n+\alpha} e^{-x}),$$

где  $L_n^\alpha(x)$  – полином Лагерра,  $n = 0, 1, \dots$ . Для их вычисления можно использовать рекуррентное соотношение:

$$\begin{aligned} \psi_{n+1}^\alpha(x) &= \frac{(x - \alpha - 2n - 1)}{\sqrt{(n+1)(n+\alpha+1)}} \psi_n^\alpha(x) - \sqrt{\frac{n(n+\alpha)}{(n+1)(n+\alpha+1)}} \psi_{n-1}^\alpha(x), \quad n = 0, 1, \dots, \\ \psi_0^\alpha(x) &= \frac{1}{\sqrt{\Gamma(\alpha+1)}} x^{\alpha/2} e^{-x/2}, \quad \psi_{-1}^\alpha(x) \equiv 0. \end{aligned}$$

Функции Лагерра  $\psi_n^\alpha(x^2)$  являются собственными функциями преобразования Ганкеля на полупрямой:

$$H_\alpha [\psi_n^\alpha(x^2)] = \int_0^\infty \psi_n^\alpha(x^2) J_\alpha(ux) x dx = (-1)^n \psi_n^\alpha(u^2), \quad n = 0, 1, \dots \quad (18)$$

Перейдем к ортонормированной системе функций  $\{\hat{\psi}_n^\alpha(x)\}$ :  $\hat{\psi}_n^\alpha(x) = \sqrt{2x} \psi_n^\alpha(x^2)$ . Пусть

$$\hat{H}_\alpha [z(x)] = \int_0^\infty z(x) J_\alpha(ux) \sqrt{ux} dx,$$

тогда

$$H_\alpha [z(x)] = \int_0^\infty z(x) J_\alpha(ux) x dx = \frac{1}{\sqrt{u}} \int_0^\infty (z(x) \sqrt{x}) J_\alpha(ux) \sqrt{ux} dx = \frac{1}{\sqrt{u}} \hat{H}_\alpha [z(x) \sqrt{x}]. \quad (19)$$

где  $H_\alpha$  – оператор преобразования Ганкеля на полупрямой (9), а функции  $\hat{\psi}_n^\alpha(x)$  являются собственными функциями оператора  $\hat{H}_\alpha$ :

$$\begin{aligned} \hat{H}_\alpha [\hat{\psi}_n^\alpha(x)] &= \int_0^\infty \hat{\psi}_n^\alpha(x) J_\alpha(ux) \sqrt{ux} dx = \int_0^\infty \sqrt{2x} \psi_n^\alpha(x^2) J_\alpha(ux) \sqrt{ux} dx = \\ &= \sqrt{2u} H_\alpha [\psi_n^\alpha(u^2)] = \sqrt{2u} (-1)^n \psi_n^\alpha(u^2) = (-1)^n \hat{\psi}_n^\alpha(u). \end{aligned} \quad (20)$$

Таким образом, для вычисления преобразования Фурье-Бесселя, являющегося преобразованием Ганкеля от функции  $\hat{f}_m(u)$  (10), достаточно выполнить разложение данной функции в ряд по функциям Лагерра:

$$\left(\hat{f}_m(u) \sqrt{u}\right) = \sum_{n=0}^{N-1} c_n \hat{\psi}_n^m(u), \quad c_n = \int_0^\infty \left(\hat{f}_m(u) \sqrt{u}\right) \hat{\psi}_n^m(u) du, \quad n = 0, \dots, N-1, \quad (21)$$

а далее, используя уравнения (10), (19), (20) и вычисленные коэффициенты разложения  $c_n$  (21), можно получить преобразование Фурье-Бесселя:

$$\begin{aligned} F_m(x) &= H_m [\hat{f}_m(u)] = \frac{1}{\sqrt{x}} H_m [\hat{f}_m(u) \sqrt{u}] = \frac{1}{\sqrt{x}} H_m \left[ \sum_{n=0}^{N-1} c_n \hat{\psi}_n^m(u) \right] = \\ &= \frac{1}{\sqrt{x}} \sum_{n=0}^{N-1} c_n H_m [\hat{\psi}_n^m(u)] = \frac{1}{\sqrt{x}} \sum_{n=0}^{N-1} (-1)^n c_n \hat{\psi}_n^m(x). \end{aligned} \quad (22)$$

Ключевым шагом данного метода является выбор параметра  $N$ , от которого зависит точность восстановления преобразования Фурье-Бесселя. Помимо этого, необходимо задать параметр масштабирования сетки  $a$ :  $\bar{x}_i = ax_i$ . Параметр масштабирования задается таким образом, чтобы функции Лагерра помещались целиком на заданной сетке, а именно имели пики соответственно параметрам  $n$  и  $m$  и ближе к концу заданной сетки затухали к нулевому значению. Пример вычисления преобразования Фурье-Бесселя (10) стандартным дискретным способом и с помощью проекционного метода разложения по функциям Лагерра представлен на Рис. 11.

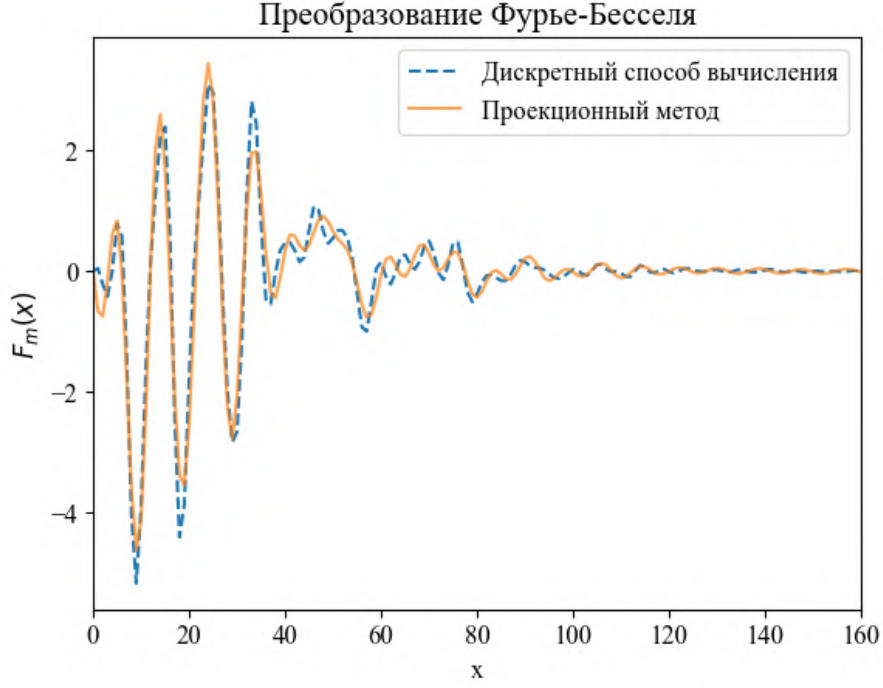


Рис. 11: Вычисление преобразования Фурье-Бесселя (10) стандартным дискретным способом и с помощью разложения по функциям Лагерра.

#### 2.4.5 Быстрый алгоритм расчета проекционных коэффициентов

Помимо ускорения за счет применения проекционного метода в вычислении преобразования Фурье-Бесселя (10) в данном разделе предлагается использовать быстрый алгоритм вычисления проекционных коэффициентов  $c_n$  [34], основанный на применении квадратуры Гаусса-Лагерра. В формуле расчета коэффициентов (21) возникают уравнения вида:

$$c_n = \int_0^\infty \hat{f}(u) \hat{\psi}_n^m(u) du,$$

где

$$\hat{f}(u) = \left( \hat{f}_m(u) \sqrt{u} \right).$$

Преобразуем уравнение:

$$\begin{aligned} c_n &\approx \int_0^\infty \hat{f}(u) \hat{\psi}_n^m(u) du = \int_0^\infty \hat{f}(u) \sqrt{2u} \psi_n^m(u^2) du = \\ &= \int_0^\infty \hat{f}(u) (2u)^{-\frac{1}{2}} \psi_n^m(u^2) d(u^2). \end{aligned} \quad (23)$$

Сделаем следующую замену переменных  $u^2 = t$  и  $\beta_n^m = \sqrt{n!(n+m+1)}$ , тогда

$$\begin{aligned} \int_0^\infty \hat{f}(u) (2u)^{-\frac{1}{2}} \psi_n^m(u^2) d(u^2) &= \frac{1}{\sqrt{2}} \int_0^\infty \hat{f}(\sqrt{t}) t^{-\frac{1}{4}} \psi_n^m(t) dt = \\ &= \frac{1}{\sqrt{2}} \int_0^\infty t^m e^{-t} \left( \hat{f}(\sqrt{t}) \frac{1}{\beta_n^m} t^{-\frac{m}{2}-\frac{1}{4}} e^{\frac{t}{2}} L_n^m(t) \right) dt. \end{aligned} \quad (24)$$



Принимая во внимание (23), уравнение (24) может быть преобразовано так:

$$c_n \approx \frac{1}{\sqrt{2}} \int_0^\infty t^m e^{-t} y(t) dt, \quad (25)$$

где

$$y(t) = \hat{f}(\sqrt{t}) \frac{1}{\beta_n^m} t^{-\frac{m}{2}-\frac{1}{4}} e^{\frac{t}{2}} L_n^m(t). \quad (26)$$

Интеграл (25) может быть вычислен с помощью квадратуры Гаусса-Лагерра [36]:

$$\int_0^\infty t^m e^{-t} y(t) dt \approx \sum_{k=1}^M A_k f(t_k) + R_M, \quad (27)$$

где

$$A_k = \frac{(\beta_M^m)^2 t_k}{(L_{M+1}^m(t_k))^2}, \quad (28)$$

а  $t_k$  – нули полинома Лагерра  $L_N^m$ ,  $M$  – нужное количество нулей полинома и  $R_M$  – остаток. В данной работе был использован метод Эберса [37] для нахождения нулей полинома  $L_M^m$ . Такой выбор обусловлен тем, что применение стандартных вычислительных методов, например, метод Ньютона или метод деления отрезка пополам и т.д., для данной задачи затруднено в связи с плотным расположением нулей полинома Лагерра для больших  $M$  ( $M > 100$ ). Стандартные методы находят не все нули или иногда просто расходятся. Значения коэффициентов  $A_k$  для  $\alpha = 0$  и различных значений  $t_k$  и  $M$  представлены в таблице 1 [36].

$$M = 1$$

$$t_1 = 1.000\,000\,000\,000 \quad A_1 = 1.000\,000\,000\,000$$

$$M = 2$$

$$t_1 = 0.585\,786\,437\,627 \quad A_1 = 0.853\,553\,390\,593$$

$$t_2 = 3.414\,213\,562\,373 \quad A_2 = 0.146\,446\,609\,407$$

$$M = 7$$

$$t_1 = 0.193\,043\,676\,560 \quad A_1 = 0.409\,318\,951\,701$$

$$t_2 = 1.026\,664\,895\,339 \quad A_2 = 0.421\,831\,277\,862$$

$$t_3 = 2.567\,876\,744\,951 \quad A_3 = 0.147\,126\,348\,658$$

$$t_4 = 4.900\,353\,084\,526 \quad A_4 = 0.(1)\,206\,335\,144\,687$$

$$t_5 = 8.182\,153\,444\,563 \quad A_5 = 0.(2)\,107\,401\,014\,328$$

$$t_6 = 12.734\,180\,291\,798 \quad A_6 = 0.(4)\,158\,654\,643\,486$$

$$t_7 = 19.395\,727\,862\,263 \quad A_7 = 0.(7)\,317\,031\,547\,900$$

Таблица 1: Значения коэффициентов  $A_k$  для  $\alpha = 0$ .

Однако, если использовать (28) для вычисления коэффициентов  $A_k$ , то это приведет к уменьшению точности аппроксимации и увеличению вычислительной сложности алгоритма. Перепишем (27), принимая во внимание (26):

$$\begin{aligned}
\int_0^\infty t^m e^{-t} y(t) dt &\approx \sum_{k=1}^M A_k f(t_k) + R_M = \\
&= \sum_{k=1}^M \frac{(\beta_M^m)^2 t_k \hat{f}(\sqrt{t_k}) t_k^{-\frac{m}{2} - \frac{1}{4}} e^{\frac{t_k}{2}} L_n^m(t_k)}{(L_{M+1}^m(t_k))^2 \beta_n^m} + R_M = \\
&= \sum_{k=1}^M \frac{\hat{f}(\sqrt{t_k}) t_k^{\frac{3}{4}} \psi_n^m(t_k)}{\left(\frac{\beta_{M+1}^m}{\beta_n^m}\right)^2 (\psi_{M+1}^m(t_k))^2} + R_M = \\
&= \sum_{k=1}^M \frac{\hat{f}(\sqrt{t_k}) t_k^{\frac{3}{4}} \psi_n^m(t_k)}{(M+1)(M+m+1) (\psi_{M+1}^m(t_k))^2} + R_M.
\end{aligned}$$

Тогда коэффициенты разложения  $c_n$  могут быть эффективно вычислены с помощью следующей формулы:

$$c_n \approx \frac{1}{\sqrt{2}M(M+m)} \sum_{k=1}^M \hat{f}(\sqrt{t_k}) \mu_{M+1}^n(t_k), \quad (29)$$

где

$$\mu_M^n(t_k) = \frac{t_k^{\frac{3}{4}} \psi_n^m(t_k)}{(\psi_M^m(t_k))^2}.$$

Значения  $\hat{f}(\sqrt{t_k})$  могут быть вычислены с помощью линейной интерполяции для достаточно гладкой функции  $\hat{f}$ , поскольку узлы сетки  $t_k$  расположены достаточно разреженно.

Для того, чтобы ускорить время работы метода, поиск нулей полинома можно выполнить заранее, поскольку эти данные определяются двумя параметрами, а именно количество нулей  $M$  и порядок  $m$  полинома Лагерра  $L_n^m$ . Также нахождение нулей для полиномов больших порядков может занять значительное время. В данной работе нули полинома  $L_n^m$  были вычислены предварительно и сохранены в файл.

#### 2.4.6 Количество операций

Главным преимуществом вычисления преобразования Фурье-Бесселя с помощью проекционного метода (2.4.4) в данной работе является существенное ускорение вычислений. В рассуждениях ниже предполагается, что значения функций Бесселя и функций Лагерра вычислены заранее на необходимых сетках и переиспользуются. Так, при вычислении  $F_m(x)$  по формуле (10) необходимо выполнить  $O(K^2)$  умножений, где  $K$  это количество точек в сетке по координатам  $u$  и  $x$  (считаем его одинаковым). При вычислении  $F_m(x)$  проекционным методом по формуле (22), необходимо посчитать  $N$  коэффициентов разложения  $c_n$  для вычисления каждого из которых требуется порядка  $O(K)$  умножений, а

также посчитать взвешенную сумму из (22). Таким образом, общее количество операций имеет порядок  $O(N * K)$ , что дает существенное ускорение, при значении  $N$  существенно меньшем чем  $K$ . В экспериментах, проведенных в данной работе  $N = 50$ ,  $K = 256$ , а общее ускорение для совмещения пары изображений составило 3.75 раза.

Использование алгоритма быстрого расчета проекционных коэффициентов (2.4.5) по формуле (29) с помощью квадратуры Гаусса-Лагерра позволяет дополнительно ускорить вычисления. В сравнении с проекционным методом, количество операций, необходимое для вычисления  $c_n$  с помощью квадратурной формулы на равномерной сетке, пропорционально количеству точек сетки и имеет порядок  $O(M)$ , в данном случае сетке из нулей полинома  $t_k$ . Если вычислить  $\mu_M^n(t_k)$  заранее, то общее количество операций для вычисления  $F_m(x)$  имеет порядок  $O(N)$ . Количество нулей  $M$  может быть подобрано исходя из необходимой точности аппроксимации и времени выполнения. В экспериментах, проведенных в данной работе  $N = 50$ ,  $K = 256$ ,  $M = 2N$ , а общее ускорение для совмещения пары изображений составило 5 раз в сравнении со стандартным подходом и 1.43 раза в сравнении с предложенным методом (2.4.4), использующим проекционный метод для вычисления  $F_m(x)$ . Ускорение было вычислено на паре изображений из реального набора данных, каждое изображение имеет размер  $128 \times 128$ .

Предложенный в данной главе проекционный метод совмещения на основе преобразования Фурье-Бесселя, а также его ускоренная версия с применением быстрого алгоритма расчета проекционных коэффициентов из раздела 2.4.5 были сравнены с корреляционным методом из раздела 2.3. Данный метод использует порядка  $O(P \log P)$  операций для совмещения пары изображений, где  $P$  задает количество пикселей одного из совмещаемых изображений.

#### 2.4.7 Общий алгоритм работы метода

Пусть даны шаблонное изображение  $f$  и подвижное  $g$ , которое необходимо совместить с  $f$ . Предложенный метод состоит из следующих этапов:

1. Для входных изображений определить:
  - Радиус изображения  $A$ , т.е. радиус круговой области, внутри которой полностью содержится объект интереса на обоих изображениях.
  - Среднее количество пикселей на точку семплирования  $p_s$ .
  - Значение максимально возможного расстояния  $\rho_{max}$ , на которое может быть сдвинут объект.

2. Задать сетку значений  $m_1 \times h_1 \times m'$ .
3. Для каждого изображения для всех значений параметров  $(m_1, h_1, m')$  вычислить преобразования Фурье-Бесселя  $F_{m_1+h_1+m'}$  и  $G_{m'}$ .
4. Посчитать преобразование Фурье  $\hat{T}(m_1, h_1, m')$  функции корреляции  $c(M)$  по формуле (15).
5. Вычислить обратное преобразование Фурье  $T(\xi, \eta', \omega')$ .
6. Найти аргументы максимального значения функции  $T(\xi, \eta', \omega')$ , которые соответствуют параметрам искомой модели движения.
7. Провести преобразования, соответствующие поворотам на искомые углы.

## 2.5 Эксперименты и результаты

Предложенные в данной главе методы были протестированы на синтетических наборах данных, а также на реальном наборе проекций изображений криоэлектронной микроскопии из банка данных EMDb [38]. Было проведено сравнение предложенного корреляционного метода из раздела 2.3, базового метода на основании преобразования Фурье-Бесселя [11], предложенных проекционного и быстрого проекционного методов из раздела 2.4 и итерационного метода. Алгоритм итерационного подхода состоит из следующих шагов: на каждой итерации подвижное изображение поворачивают на  $i$ -й угол и затем вычисляют функцию кросс-корреляции между фиксированным и подвижным преобразованным изображениями. Искомый угол соответствует значению той итерации, на которой было достигнуто максимальное значение кросс-корреляции изображений среди всех итераций. Искомый вектор смещения соответствует положению максимального значения кросс-корреляции, вычисленной между фиксированным и повернутым на искомый угол подвижным изображением.

Результаты проведенных экспериментов для предложенного корреляционного метода из раздела 2.3 были представлены на 7-ой международной конференции по теории обработки изображений, методам и применениям ИРТА (Монреаль, Канада, 2017) и опубликованы в [39]. Доклад по результатам предложенных проекционного и быстрого проекционного методов из раздела 2.4 был представлен на 33-й международной конференции по компьютерной графике и зрению «ГрафиКон'2023» (Москва, Россия, 2023).

**Эксперименты с синтетическими данными** Для того, чтобы количественно оценить ошибку предложенных методов в поиске параметров, были проведены эксперименты на различных наборах синтетических данных, где для каждой пары совмещаемых изображений были известны искомые угол поворота и вектор смещения (англ. *ground truth* или *GT*). Было сгенерировано два набора данных (Рис. 12), используя алгоритм, предложенный в разделе 2.6: каждый набор данных был создан путем проектирования трехмерной модели на плоскость, заданную вектором нормали  $\mathbf{n}$ . Затем к полученной проекции был добавлен пуассоновский шум так, чтобы соответствовать различным значениям *SNR*. Наборы данных отличаются трехмерными моделями, проекции которых были использованы при создании набора. Полученные проекции затем поворачивали на случайный угол в диапазоне  $[-180^\circ, 180^\circ]$ , и смещали на случайный вектор длины до 10 пикселей. Было сгенерировано 100 изображений для двух проекций разных моделей. При синтезе проекций был использован различный уровень шума, соответствующий следующим значениям отношения сигнала к шуму (*SNR*):  $[0.1, 0.5, 1.0, 2.0]$ . Отношение сигнала к шуму определено следующим образом:

$$SNR = \frac{\mu_{\text{изображение}}}{\sigma_{\text{шум}}},$$

где  $\mu_{\text{изображение}}$  – среднее значение пикселей изображения без шума,  $\sigma_{\text{шум}}$  – стандартное отклонение уровня шума. Для выравнивания проекций было выбрано эталонное изображение, равное первому кадру последовательности.

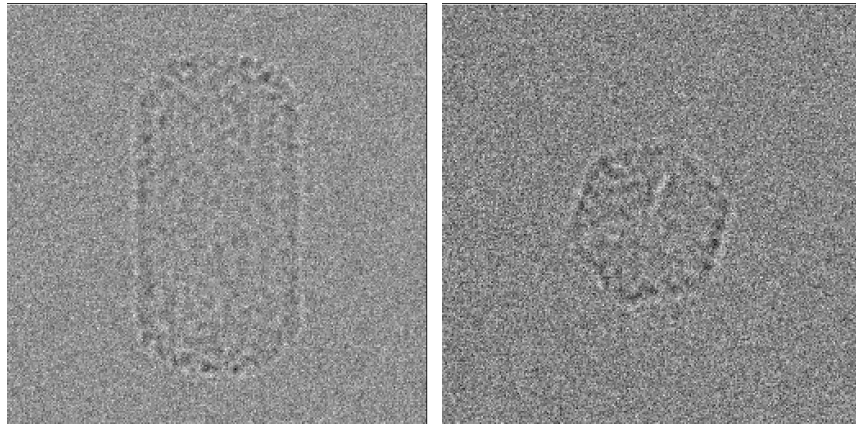


Рис. 12: Примеры изображений проекций из синтетических наборов данных с  $SNR=1.0$ .

Для вычисления ошибок совмещения были выбраны следующие метрики. Ошибка угла поворота определена как  $e_\theta = |\theta_{gt} - \theta|$  в градусах, где  $\theta_{gt}$  – заданный угол поворота,  $\theta$  – найденный угол поворота. Ошибка вектора смещения вычислена так  $e_d = \|d_{gt} - d\|$ , где  $d_{gt} = (x_{gt}, y_{gt})$  – заданный вектор смещения,  $d = (x, y)$  – найденный вектор смещения и  $\|\cdot\|$  обозначает Евклидово расстояние. Мы не учитывали ошибку, равную  $180^\circ$ , по-

скольку выбранные проекции частиц являются симметричными и трудноразличимыми. Было проведено сравнение предложенных методов с методом на основе преобразования Фурье-Бесселя из [11] и итерационным методом для каждого значения  $SNR$ . Результаты проведенных экспериментов приведены на графиках на Рис. 13 и Рис. 14, а также в таблице 2: здесь представлены значения ошибок угла поворота  $e_\theta$  и вектора смещения  $e_d$ , а также приведено время работы каждого метода совмещения для пары изображений. Время работы измерено на ПК с процессором *Apple M1*. Также на Рис. 15 приведен график зависимости ошибок найденных параметров от уровня шума ( $SNR$ ) для Модели 1.

SNR	Методы	Время работы	Модель 1		Модель 2	
			Средняя ошибка угла поворота $e_\theta$	Средняя ошибка вектора смещения $e_d$	Средняя ошибка угла поворота $e_\theta$	Средняя ошибка вектора смещения $e_d$
0.1	Проекционный метод*	1.02 c	<b>0.63</b>	2.45	<b>0.56</b>	2.58
	Быстрый проекционный метод*	0.67 c	0.65	2.47	5.00	5.52
	Метод Фурье-Бесселя [11]	6.84 c	1.4	<b>1.85</b>	0.58	<b>2.05</b>
	Корреляционный метод*	0.13 c	32.82	13.94	46.7	20.38
	Итерационный метод	33.57 c	37.29	84.41	37.95	83.87
0.5	Проекционный метод*	1.02 c	<b>0.61</b>	2.25	0.59	2.67
	Быстрый проекционный метод*	0.67 c	<b>0.61</b>	2.23	0.61	2.94
	Метод Фурье-Бесселя [11]	6.84 c	0.8	<b>1.84</b>	0.59	1.95
	Корреляционный метод*	0.13 c	15.82	3.30	2.37	2.2
	Итерационный метод	33.57 c	1.68	5.44	<b>0.3</b>	<b>1.8</b>
1.0	Проекционный метод*	1.02 c	0.62	2.33	0.57	2.74
	Быстрый проекционный метод*	0.67 c	0.62	2.34	0.63	2.84
	Метод Фурье-Бесселя [11]	6.84 c	0.72	1.86	0.56	1.97
	Корреляционный метод*	0.13 c	6.48	2.29	1.22	2.06
	Итерационный метод	33.57 c	<b>0.61</b>	<b>1.68</b>	<b>0.3</b>	<b>1.76</b>
2.0	Проекционный метод*	1.02 c	0.61	2.39	<b>0.58</b>	2.76
	Быстрый проекционный метод*	0.67 c	0.61	2.39	<b>0.58</b>	2.81
	Метод Фурье-Бесселя [11]	6.84 c	0.69	1.85	<b>0.58</b>	1.92
	Корреляционный метод*	0.13 c	1.4	1.69	1.07	<b>1.84</b>
	Итерационный метод	33.57 c	<b>0.6</b>	<b>1.63</b>	44.85	2.54

\*Предложенные в данной работе методы.

Таблица 2: Сравнение работы методов на синтетических данных с разным уровнем шума, определенные различными значениями  $SNR$ .

По результатам экспериментов можно сделать вывод, что предложенный проекционный метод совмещения изображений незначительно уступает по качеству (ошибка в

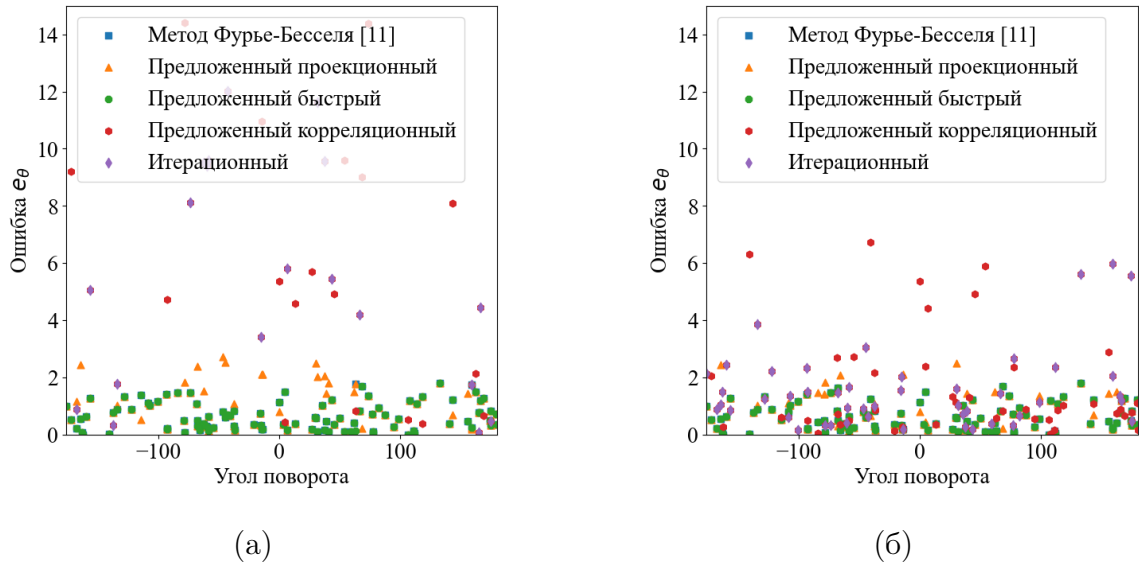


Рис. 13: Графики зависимости ошибки угла поворота  $\epsilon_\theta$  от величины угла для разных уровней шума  $SNR = 0.1$  (а) и  $SNR = 1.0$  (б).

среднем в пределах  $1^\circ$  для угла поворота) методу на основе преобразования Фурье-Бесселя и имеет более высокую скорость вычисления (общее ускорение в среднем в 6.7 раз). Использование быстрого метода вычисления проекционных коэффициентов также не сильно увеличивает ошибку совмещения, в то время как ускоряет проекционный метод (общее ускорение в среднем в 1.5 раз в сравнении с предложенным проекционным методом и в 10.2 раза в сравнении с базовым методом Фурье-Бесселя). В сравнении с предложенным корреляционным методом, предложенные подходы на основе преобразования Фурье-Бесселя более устойчивы к большому уровню шума, что соответствует низкому отношению сигнала к шуму ( $SNR=0.1$ ), и имеют меньшую ошибку в нахождении угла поворота (Рис. 13). Однако для вектора смещения при высоком отношении сигнала к шуму, а именно при  $SNR=2.0$ , ошибки предложенных методов, как и метода на основе Фурье-Бесселя, больше в сравнении с корреляционным методом (Рис. 14). Это может быть связано с тем, что количество точек в вычислении трехмерной функции корреляции по осям, соответствующим углам, отвечающим за смещение объекта, в три раза меньше, чем количество точек для параметра, соответствующего углу поворота. Также для Модели 2 применение быстрого алгоритма несколько ухудшает результаты по углу поворота и вектору смещения для данных с высоким уровнем шума. Это может быть связано с неточным выбором параметров, необходимых для работы быстрого метода, таких как, например, количество нулей полинома  $L_n^m$ . В сравнении с итерационным методом (здесь шаг по углу был выбран  $1^\circ$ ) предложенные подходы демонстрируют значительное ускорение по времени работы. При малых значениях  $SNR$  итерационный метод уступает по точно-

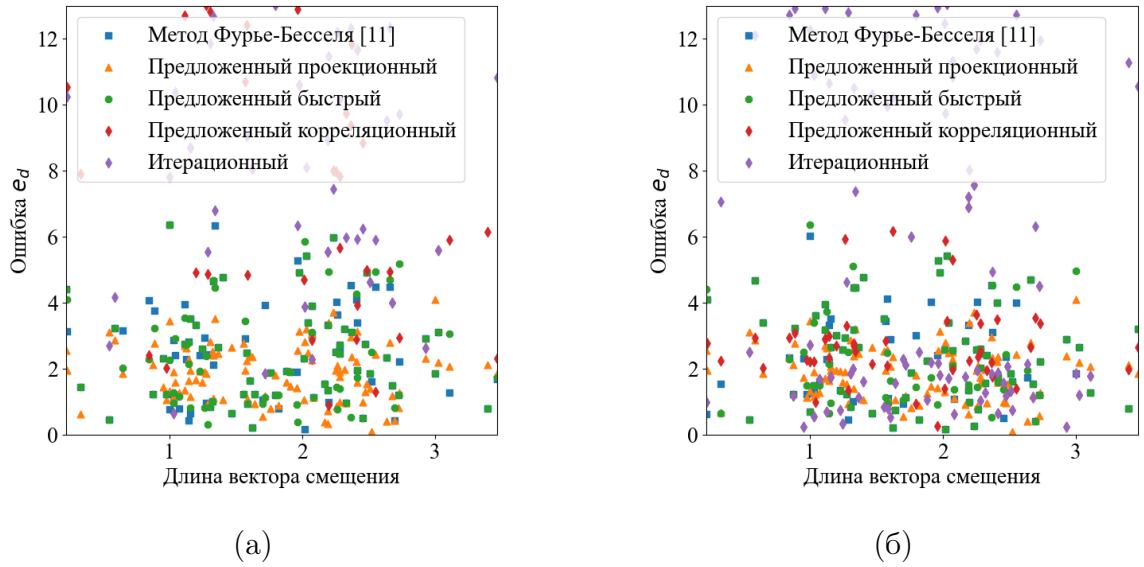


Рис. 14: Графики зависимости ошибки вектора смещения  $e_d$  от длины вектора смещения для разных уровней шума  $SNR = 0.1$  (а) и  $SNR = 1.0$  (б).

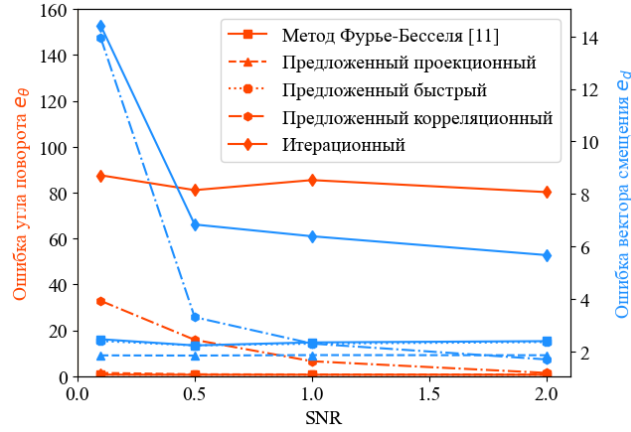


Рис. 15: Ошибки угла поворота  $e_\theta$  и длины вектора смещения  $e_d$  для разных значений уровня шума ( $SNR$ ) для Модели 1.

сти совмещения, в то время как ошибки искоемых параметров на наборе данных с низким уровнем шума ниже, чем у предложенных подходов. Однако, время работы метода является определяющим фактором для задачи выравнивания проекций в криоэлектронной микроскопии одиночных частиц ввиду их большого количества, поэтому разработанные методы более оптимальными с точки зрения вычислительной сложности для данного этапа, несмотря на незначительно более высокие ошибки совмещения. Итак, предложенные методы на основе преобразования Фурье-Бесселя существенно ускоряют базовый алгоритм из [11], незначительно изменяя при этом качество совмещения, и являются устойчивыми к низкому отношению сигнал-шум, в то время как предложенный корреляционный метод является наиболее быстрым методом и может эффективно совмещать изображения, имея



при этом погрешность в нахождении искомых параметров для шумных изображений с  $SNR < 1.0$ .

Также был проведен эксперимент для сравнения работы предложенного корреляционного метода из раздела 2.3 и итерационного подхода. Для этого были также созданы 3 различных набора данных с разным уровнем шума: для генерации повернутых и смещенных проекций частиц была использована комбинация 4 случайных значений угла в пределах  $[0^\circ, 90^\circ]$  и 3 случайных векторов смещения величиной от 0 до 10 пикселей. При таком задании параметров совмещения средние ошибки угла поворота и вектора смещения слабо зависят от уровня шума ( $SNR$ ) (Рис. 16).

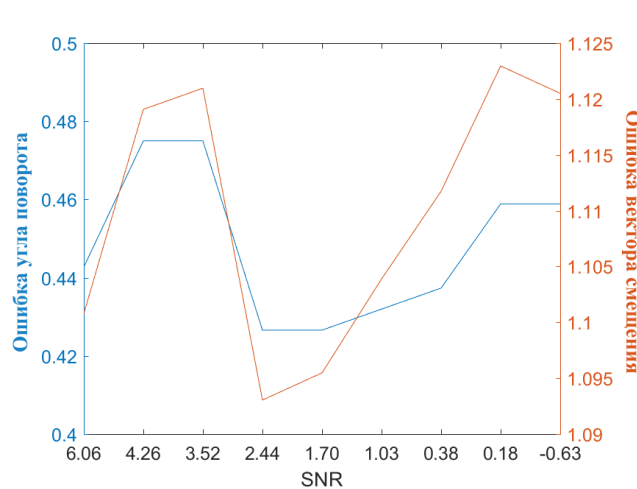


Рис. 16: Зависимость ошибок угла поворота  $e_\theta$  и вектора смещения  $e_d$  от уровня шума ( $SNR$ ).

Помимо этого был проведен эксперимент совмещения изображений из набора данных, созданного следующим образом: сначала была сгенерирована случайным образом проекция (т.е. шаблон или фиксированное изображение, согласно которому выравнивают все изображения в наборе). Затем был сделан цикл по углу в пределах  $[0^\circ, 180^\circ]$  с шагом  $5^\circ$ . На каждой итерации был произведен поворот шаблонного изображения на заданный угол, определенный  $i$ -ым значением угла и добавлением к нему случайного значения из отрезка  $[-0.5^\circ, 0.5^\circ]$ . Затем из повернутой версии проекции было сделано еще 10 различных смещенных версий с помощью смещения на вектор длиной, выбранной случайным образом, от 1 до 10 пикселей. Таким образом, был создан набор данных из 360 проекций. К созданному набору данных были применены итерационный алгоритм с шагом  $3^\circ$ ,  $1^\circ$  и  $0.5^\circ$  и предложенный корреляционный метод. На Рис. 17 представлены результаты сравнения методов в виде графиков усредненных ошибок угла поворота и вектора смещения. Там, где есть зависимость на графике от угла поворота, усреднение выполнено по

10 случайным векторам смещения для каждого угла. Там, где зависимость на графике от вектора смещения, усреднение ошибки выполнено для изображений с одинаковой длиной вектора смещения и разным углом поворота. По результатам экспериментов на синтети-

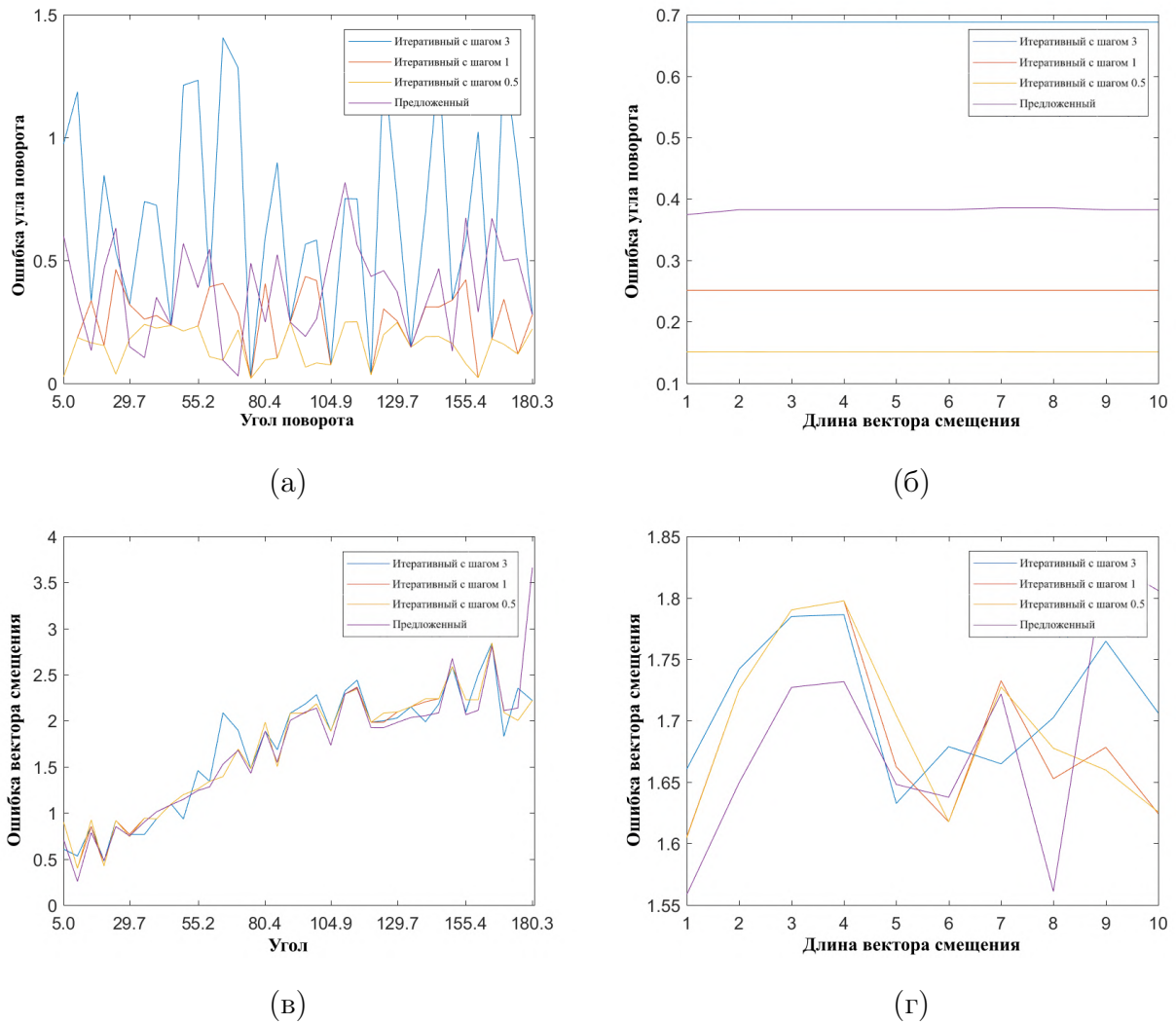


Рис. 17: Зависимость усредненных ошибок угла поворота  $e_\theta$  (а и б) и вектора смещения  $e_d$  (в и г) от угла поворота (а и в) и длины вектора смещения (б и г). График построен по результатам работы итеративного метода с шагом  $3^\circ$ ,  $1^\circ$  и  $0.5^\circ$  и предложенного метода на наборе синтетических данных.

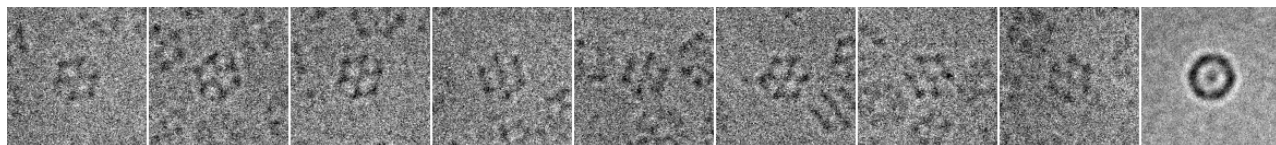
ческих данных средняя ошибка угла поворота  $e_\theta$  предложенного метода составила  $0.38^\circ$ . Для итеративного метода средняя ошибка угла поворота  $e_\theta$  составила  $0.68^\circ$  для метода с шагом  $3^\circ$ ,  $0.25^\circ$  для метода с шагом  $1^\circ$  и  $0.15^\circ$  для метода с шагом  $0.5^\circ$ . Средняя ошибка вектора смещения  $e_d$  составила 1.68 пикселей для предложенного метода и 1.71, 1.69, и 1.69 пикселей для итеративного метода с шагом  $3^\circ$ ,  $1^\circ$  и  $0.5^\circ$  соответственно.

**Эксперименты с реальными данными** Помимо тестирования метода на наборе синтетических данных с известным  $GT$ , разработанные методы были протестированы на наборе реальных проекций. Набор проекций был взят из банка данных EMDb [38]. Он состоит из 50 изображений проекций Icosahedral Bacillus stearothermophilus pyruvate dehydrogenase E2 core [40]. Все проекции единой пространственной ориентации и отличаются друг от друга только поворотом и смещением внутри плоскости изображения. На Рис. 18(а) изображены некоторые проекции из набора (были взяты 1-ая, 8-ая, 15-ая, 22-ая, 29-ая, 36-ая, 43-ья и 50-ая проекции для иллюстрации) до совмещения. Все проекции приводились к первому изображению в наборе (соответствует крайнему левому изображению в каждом ряду). Крайнее правое изображение в каждом ряду соответствует усредненной по всему набору данных проекции до совмещения (Рис. 18(а)) и после совмещения указанным методом (Рис. 18(б-е)). Анализируя результат усреднения проекций после выравнивания набора, можно сделать вывод, что результаты всех методов сравнимы и совмещение этими методами несомненно улучшает качество усредненного изображения и уточняет внутренние детали частицы, если посмотреть на усредненную проекцию до совмещения и после работы методов. В случае усреднения проекций набора без их предварительного выравнивания объект на усредненном изображении имеет округлую форму, не схожую частицей из банка данных EMDb. В случае усреднения после выравнивания проекций одним из сравниваемых методов, полученные усредненные проекции похожи друг на друга и имеют симметричную, но не округлую форму, типичную для данной частицы. Несмотря на то, что итоговый результат сравниваемых методов на Рис. 18(б-е) практически повторяет друг друга, вычислительная эффективность разработанных методов значительно выше.

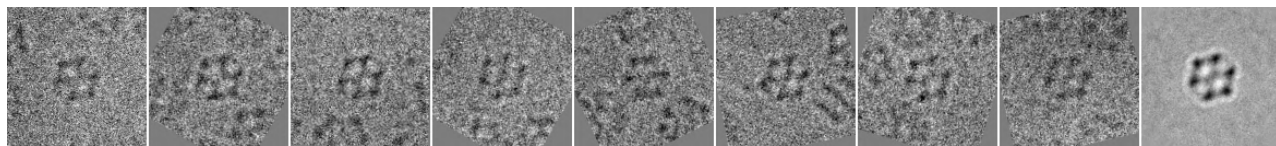
## **2.6 Метод синтеза реалистичных данных криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и криоэлектронной томографии**

В данной работе предложен метод генерации наборов двумерных реалистичных данных криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и трехмерных наборов данных криоэлектронной томографии. Описанный подход моделирует искажения, возникающие при получении данных в реальном электронном микроскопе, а именно типичный для данного вида микроскопии шум, функцию переноса контраста, построение двумерных проекций для криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и моделирование эффекта отсутствующего клина для криоэлектронной томографии.

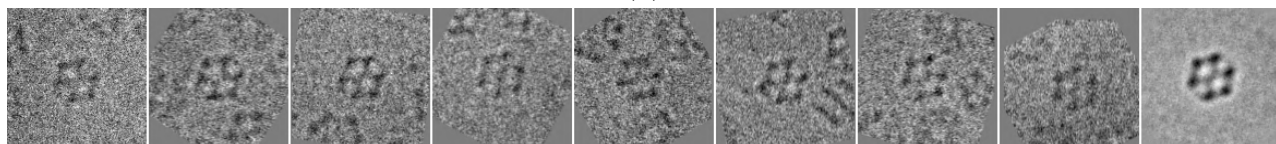
Этот метод был представлен на 27-ой международной конференции по компьютерной графике и зрению «ГрафиКон'2017» (Пермь, Россия, 2017) и опубликован в [12].



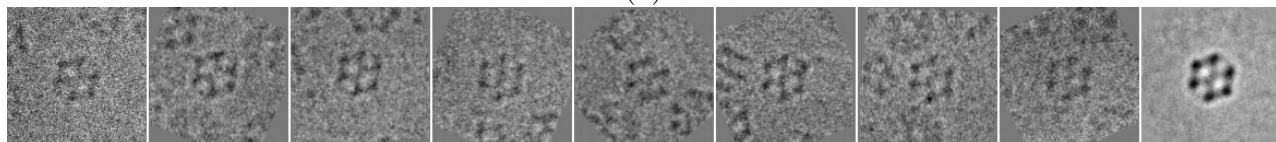
(a)



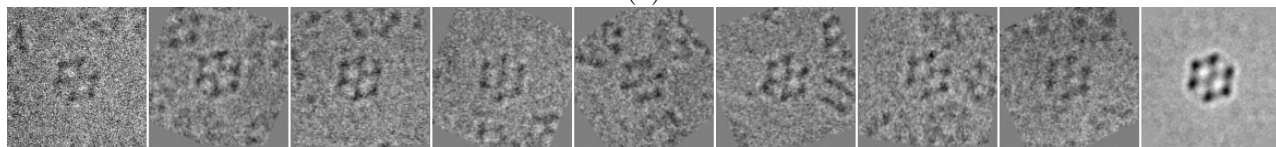
(б)



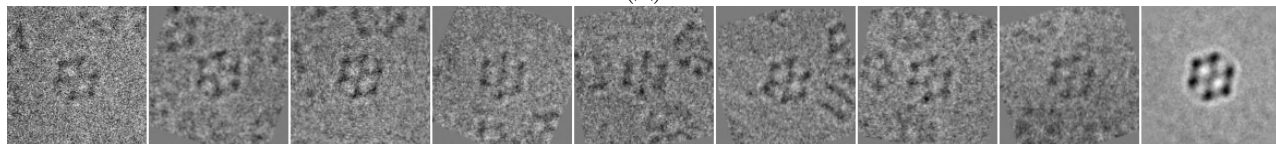
(в)



(г)



(д)



(е)

Рис. 18: Применение методов совмещения к реальному набору данных из базы EMDb. (а) Подмножество проекций из набора до совмещения. (б) Результат работы итерационного метода. (в) Результат работы корреляционного метода из раздела 2.3. (г) Результат работы базового метода на основе преобразования Фурье-Бесселя [11]. (д) Результат работы проекционного метода из раздела 2.4. (е) Результат работы быстрого проекционного метода из раздела 2.4.

### 2.6.1 Метод построения трехмерной модели объекта

За основу построения трехмерного объекта может быть использована любая структура реального образца, выбранная исходя из особенностей решаемой задачи. В данной работе для построения синтетического объекта был взят белковый комплекс, имеющий

цилиндрическую форму. Предложенный метод строит модель объекта, описывая его уравнением цилиндрической поверхности (Рис. 19(а)). За основание цилиндрического объекта возьмем окружность и добавим колебания по поверхности объекта:

$$C = \rho + C_1 \sin(C_2 \varphi),$$

где  $C$  – радиус основания цилиндра,  $C_1, C_2$  – некоторые константы. Для моделирования интенсивности объекта используется функция, зависящая от радиуса  $\rho$  и высоты  $h$  в цилиндрической системе координат, имеющая более одного максимума. В данной работе для задания интенсивности использовалась функция

$$f(\rho, h) = f_1(\rho)f_2(h),$$

где  $f_1(\rho)$  – полиномиальная функция четвертого порядка с коэффициентами  $p_0 = 3, p_1 = 4.4341, p_2 = -0.9049, p_3 = 0.0685, p_4 = -0.0017$ , зависящая от радиуса  $\rho$ , а  $f_2(h)$  – тригонометрическая функция, зависящая от высоты цилиндрического объекта  $h$ .

Стоит отметить, что высота цилиндра, функция  $f_2(h)$  и прочие параметры алгоритма построения 3D объекта подбираются эмпирически для получения объекта необходимой формы и интенсивности. Точность подбора этих параметров не имеет большого значения, здесь важно достижение необходимого уровня визуального сходства. После построения и моделирования интенсивности объекта было сделано моделирование искажений, типичных для крио-ЭМ. К трехмерной модели была применена функция переноса контраста и добавлен пуассоновский шум.

### 2.6.2 Виды искажений криоэлектронной микроскопии

**Шум** Появление пуассоновского шума обусловлено статистической природой электромагнитных волн, таких как рентгеновское излучение, видимый свет и гамма-лучи. Источники рентгеновских лучей излучают определенное число фотонов в единицу времени. Такие источники имеют случайные колебания числа испускаемых фотонов. В результате полученное изображение имеет пространственную и временную случайность, соответствующую распределению Пуассона (Рис. 19(в)):

$$P(\lambda, k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, \lambda > 0, k \in N. \quad (30)$$

В электронном микроскопе в результате взаимодействия электронов с органическим веществом образец постепенно сгорает, поэтому полученные изображения обладают низким отношением сигнала к шуму ( $SNR$ ) [41]. Также разрешение полученных изображений зависит от функции переноса контраста.

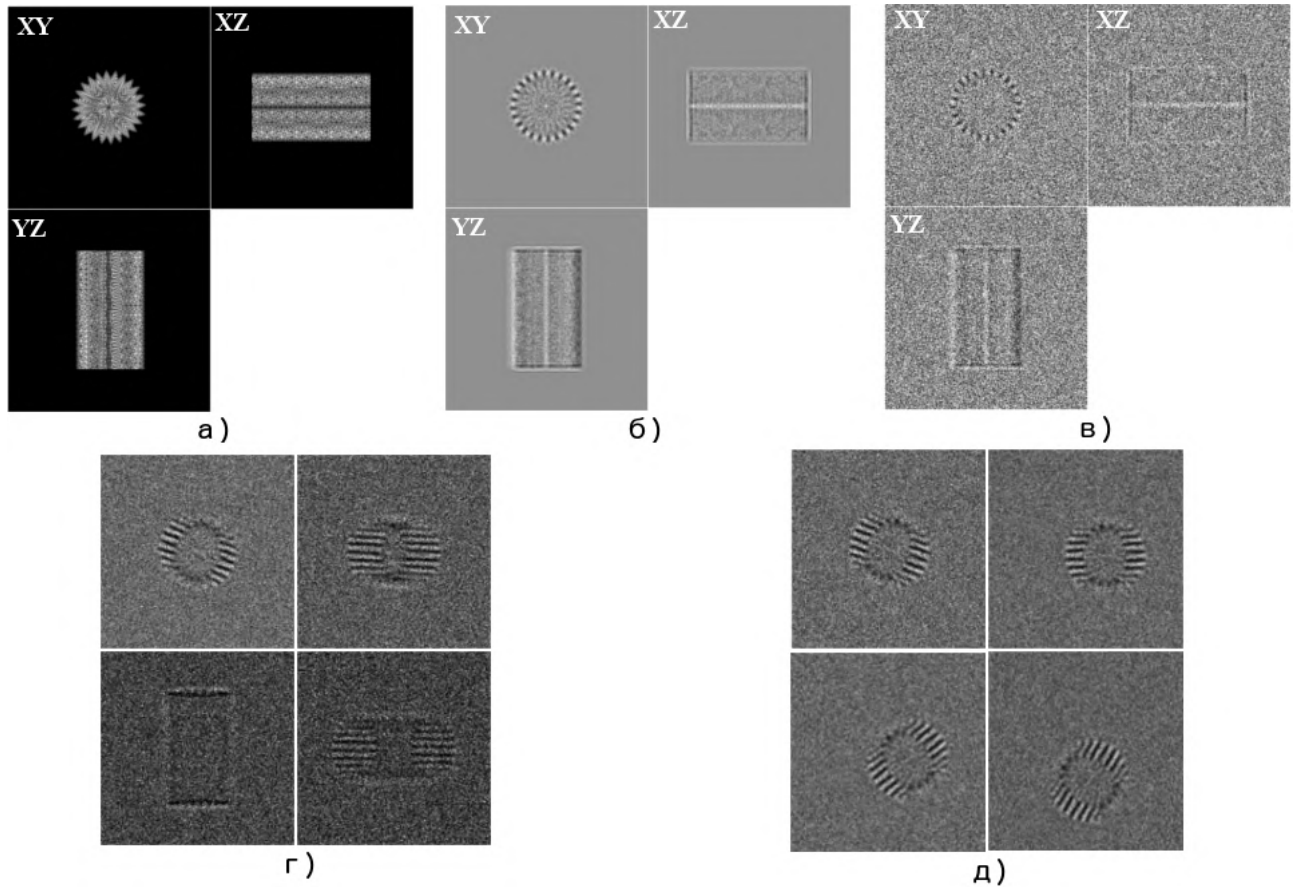


Рис. 19: (а) Трехмерная модель объекта. (б) Результат применения функции переноса контраста. (в) Добавление пуассоновского шума. (г) Примеры различных проекций трехмерного объекта, построенные с помощью предложенного метода с различным уровнем шума. (д) Проекция одинаковых частиц, отличающихся смещением и поворотом.

**Функция переноса контраста** Для большинства образцов криоэлектронной микроскопии не существует амплитудного значения контраста, поскольку электроны очень слабо взаимодействуют с легкими атомами образцов. В таких условиях можно сгенерировать фазовую контрастность изображений с помощью дефокусировки микроскопа: дефокусировка объектива генерирует низкочастотную контрастность за счет снижения контрастности на более высоких частотах. Это полезно, однако передача информации из микроскопа происходит необычным образом. Перемещение сигнала от образца до плоскости изображения в электронном микроскопе описывается функцией переноса контраста [41] (Рис. 19(б)): эта осциллирующая функция в пространственной частотной области описывает, как аберрации в просвечивающем электронном микроскопе изменяют изображение образца:

$$\text{CTF}(f) = A(\sin(\pi\lambda f^2(\Delta z - 0.5\lambda^2 f^2 c_s)) + B \cos(\pi\lambda f^2(\Delta z - 0.5\lambda^2 f^2 c_s))), \quad (31)$$

где  $f$  – пространственная частота,  $\Delta z$  – дефокусировка,  $c_s$  – сферическая аберрация,  $\lambda$  – длина волны электрона,  $A$  – зависящая от дефокусировки огибающая функция, соот-

ветствующая затуханию сигнала для заданной угловой апертуры,  $B$  – доля амплитудного значения контраста [42].

**Эффект потерянного клина (англ. *missing wedge*).** В криоэлектронной томографии эффект потерянного клина возникает вследствие того, что двумерные проекции образца, из которых восстанавливается томограмма, получают в ограниченном диапазоне углов (обычно  $\pm 60^\circ$ ). Это происходит из-за физических ограничений при наклоне тонкой пластинки с образцом (при наклоне на большие углы, толщина образца становится слишком большой). Согласно теореме о центральном сечении [43], двумерный Фурье-образ проекции равен сечению трехмерного Фурье-образа исходного объекта, проходящему через начало координат в частотной области под тем же углом, под которым была получена проекция. Таким образом, эффект потерянного клина моделируется с помощью наложения клиновидной маски на исходное изображение в частотной области:

$$I_{mw} = \mathfrak{F}^{-1}(\hat{I} \cdot M),$$

где  $I_{mw}$  – результат моделирования,  $\hat{I}$  – преобразование Фурье исходного изображения,  $M$  – маска для удаления клина (Рис. 20).

### 2.6.3 Метод построения двумерных проекций

Для того, чтобы получить двумерное изображение, нужно спроецировать модель трехмерного объекта на плоскость, которая задается нормалью  $\mathbf{n}$ . Для того, чтобы получить случайную ориентированность проекции на плоскости, перейдем к сферическим координатам нормали  $(\rho, \varphi, \theta)$  и зададим случайным образом углы  $\varphi$  и  $\theta$ . Чтобы обеспечить схожесть с реальными данными, к координатам нормали в сферической системе координат  $(\rho, \varphi, \theta)$  для построения проекции 3D объекта на плоскость добавлялась погрешность  $\delta \in [0^\circ, 2^\circ]$  к углам  $\varphi$  и  $\theta$  соответственно, которая выбиралась случайным образом (Рис. 19(г)).

Общий алгоритм получения двумерных данных (Рис. 19) выглядит следующим образом:

1. Сгенерировать трехмерное модельное изображение с заданием параметров  $C_1$  и  $C_2$  и функции моделирования интенсивности.
2. Для созданного изображения применить функцию переноса контраста и добавить пуассоновский шум.
3. Спроецировать объект на плоскость, заданную нормалью  $\mathbf{n}$ .

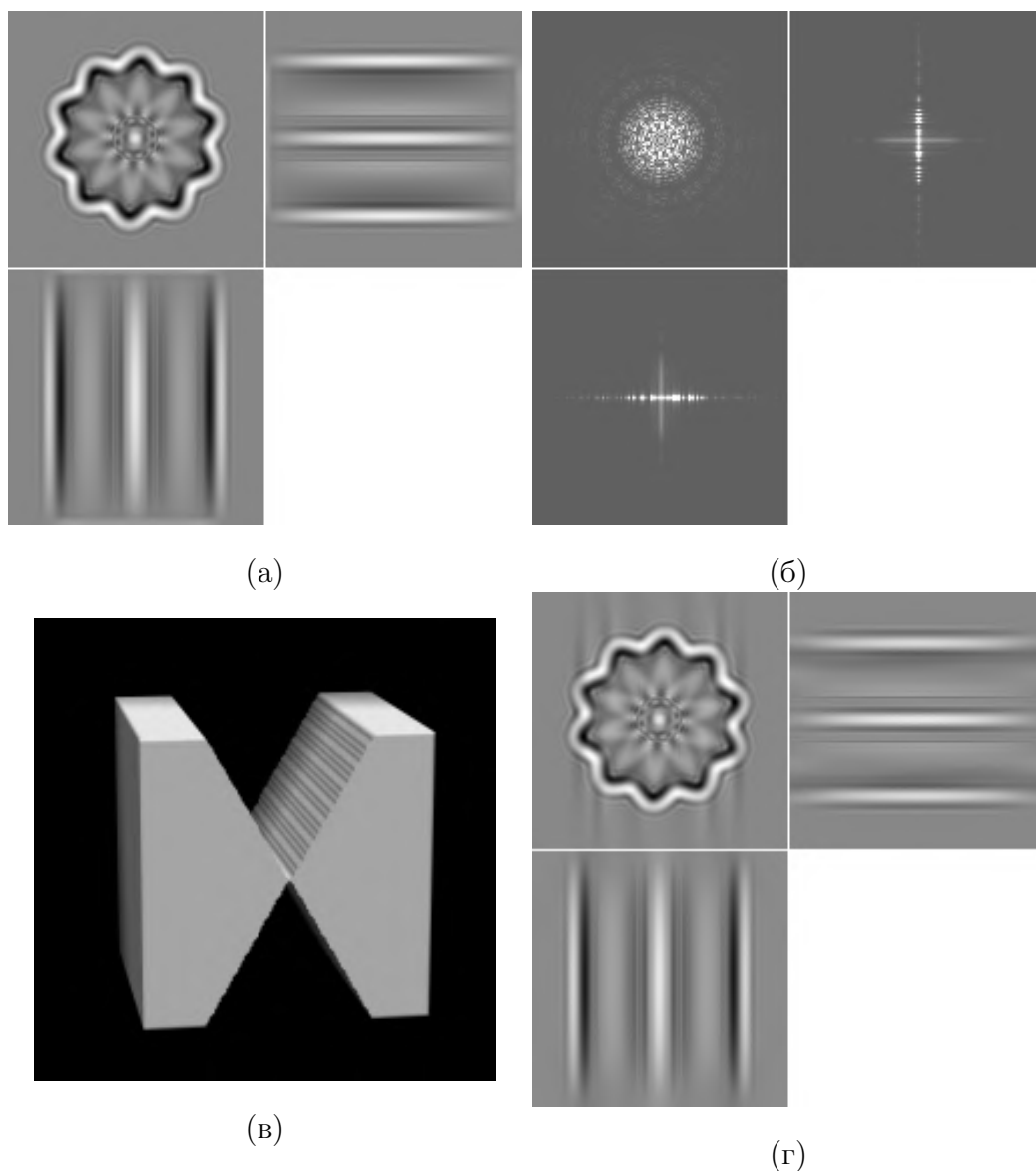
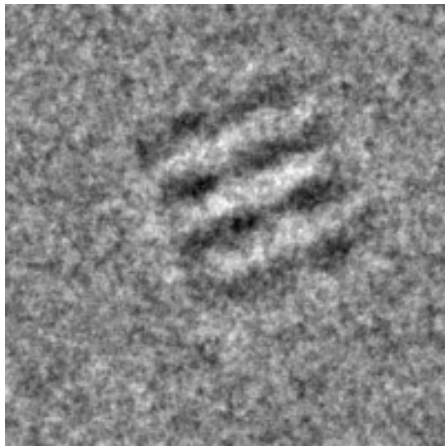


Рис. 20: (а) Модельное 3D изображение. (б) Фурье-образ изображения (а). (в) Маска потерянного клина. (г) Результат удаления клина в частотной области

4. Полученные двумерные проекции повернуть на заданные углы и переместить на заданные вектора смещения для формирования набора данных для тестирования жестких методов совмещения.

Результатом является набор двумерных проекций трехмерного объекта с различными искажениями, характерными для крио-ЭМ одиночных частиц. Каждая картинка содержит лишь одну проекцию частицы, расположенную вблизи центра изображения. Параметры характерных искажений и углы проецирования, задающие нормаль к плоскости проекции в сферических координатах, а также углы поворота и вектора смещения проекций частиц задаются пользователем, что позволяет получать различные наборы данных для тестирования алгоритмов совмещения (Рис. 19(д)).





(a)



(б)

Рис. 21: Сравнение синтетических и реальных данных. (а) Реальные данные (набор данных EMPIAR-10029 [44]). (б) Синтетические данные.

В сравнении с реальными данными, объект на синтетических данных виден более явно, однако это позволяет подобрать необходимые параметры и наладить работу метода. При изменении различных параметров можно добиться наибольшего сходства с различными реальными данными (Рис. 21).

#### 2.6.4 Алгоритм получения трехмерных данных

Для создания набора трехмерных данных необходимо выполнить следующие шаги:

1. Сгенерировать трехмерное модельное изображение с заданием параметров  $C_1$  и  $C_2$  и функции моделирования интенсивности.
2. Получить несколько трехмерных изображений из полученного в предыдущем пункте, выполнив повороты на заданные углы вокруг всех трех осей координат и сдвинув на заданные векторы смещения.
3. Смоделировать эффект потерянного клина на полученных изображениях.
4. Для полученных изображений применить функцию переноса контраста и добавить пуассоновский шум.

Результатом является набор трехмерных изображений объекта, ориентированного различным образом, с применением искажений характерных для криоэлектронной томографии (Рис. 22). Параметры данных искажений, а также углы поворота и векторы смещения задаются пользователем, что позволяет получать различные наборы данных для тестирования алгоритмов совмещения трехмерных изображений криоэлектронной томографии.

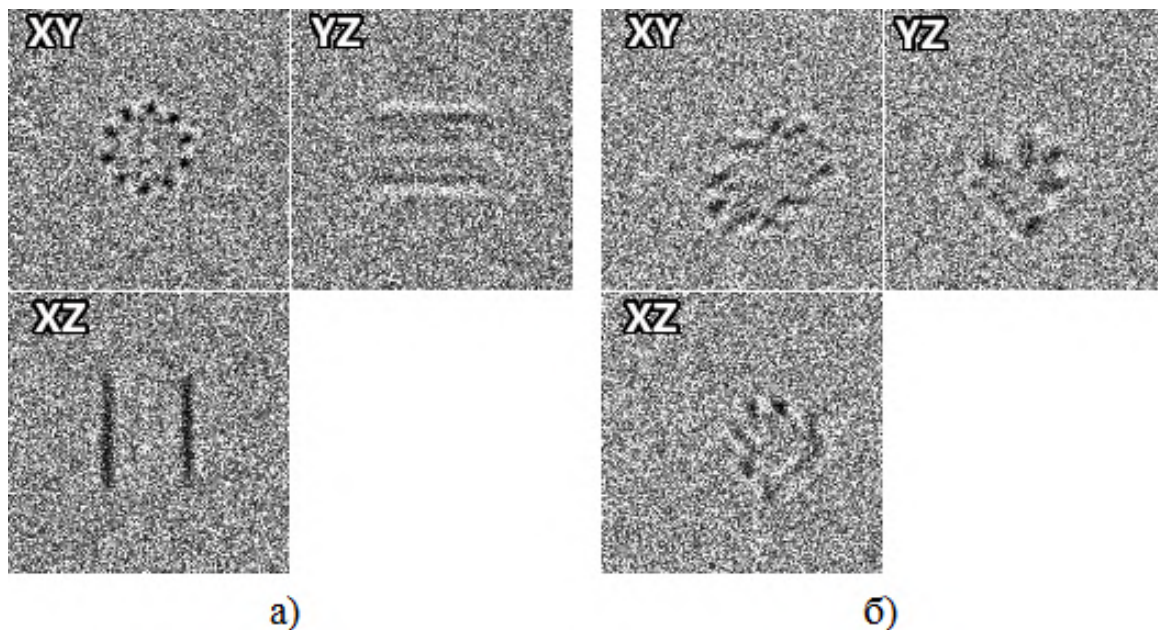


Рис. 22: Пример созданных трехмерных изображения одного объекта с разных ракурсов: изображение (б) отличается от (а) поворотом вокруг оси- $X$  на  $\pi/6$ , вокруг оси- $Y$  на  $-\pi/4$  и сдвигом на вектор  $[10, 15, 1]$ .

Сравнение с реальными данными показывает, что в результате синтеза изображений с помощью предложенного алгоритма можно получить синтетические данные, близкие по структуре к данным полученным при криоэлектронной томографии, а моделируемые эффект потерянного клина, функция переноса контраста и пуассоновский шум воссоздают искажения, получаемые при съемке в электронном микроскопе (Рис. 23).

## 2.7 Выводы

В данной главе описаны исследования методов жесткого совмещения, применяемых в криоэлектронной микроскопии одиночных частиц на этапе выравнивания двумерных проекций. Был разработан корреляционный метод совмещения изображений проекций частиц крио-ЭМ, описанный в разделе 2.3. Разработанный метод использует функцию кросс-корреляции для поиска угла поворота и вектора смещения. Поиск параметров происходит последовательно: сначала идет поиск угла поворота, причем для того, чтобы обеспечить инвариантность изображений к сдвигу, корреляция вычисляется в частотной области между изображениями, представленными в полярных координатах. Для корректности работы и улучшения точности метода в применении к шумным микроскопическим изображениям был использован частотный полосовой фильтр для выделения тех частот, которые соответствуют объекту интереса. Положение и размер полосы частотного фильтра были установлены экспериментально. Затем производится поворот подвижного изображения

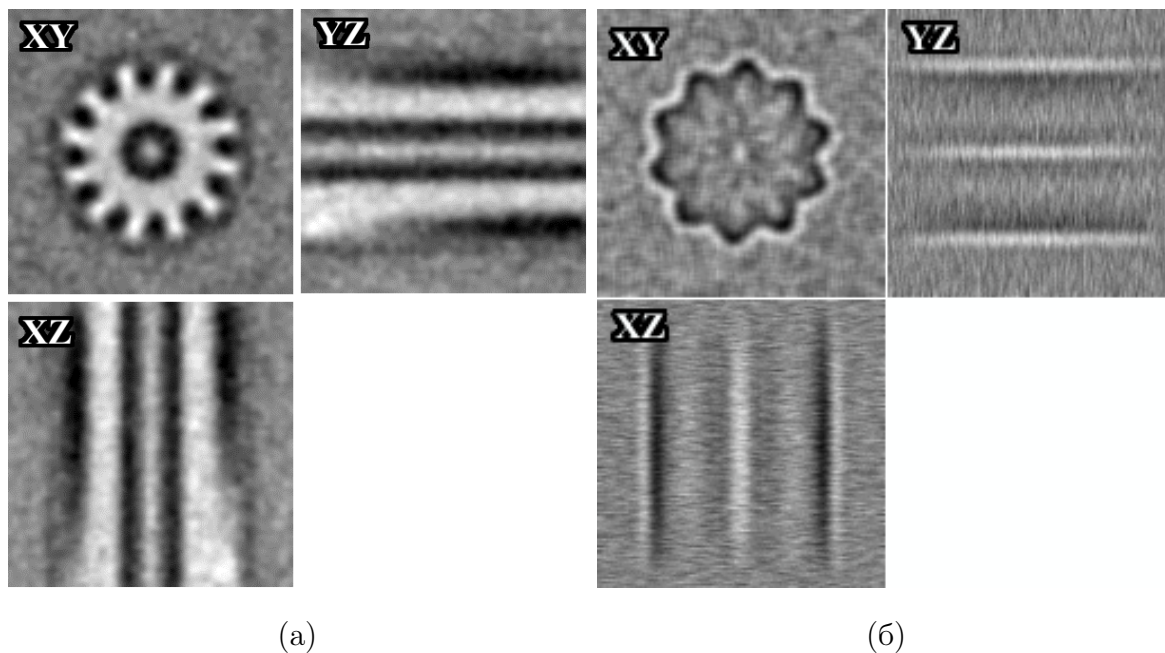


Рис. 23: (а) Изображение реального объекта криоэлектронной томографии. (б) Результат моделирования трехмерного изображения.

на искомый угол. Для поиска вектора смещения с субпиксельной точностью, используется двухэтапный метод вычисления кросс-корреляции, где второй этап используется для уточнения полученных результатов. В сравнении со стандартным итеративным подходом, предложенный метод продемонстрировал свое преимущество в скорости вычислений.

Также в данной главе был предложен быстрый численный метод на основе преобразования Фурье-Бесселя и проекционного вычисления преобразования Ганкеля, а также применения быстрого алгоритма расчета проекционных коэффициентов на основе квадратуры Гаусса-Лагерра, изложенный в разделе 2.4. Предложенный подход был также разработан для выравнивания двумерных проекций в криоэлектронной микроскопии одиночных частиц. Использование проекционного метода в вычислении преобразования Фурье-Бесселя является существенным улучшением метода [11] с точки зрения вычислительной эффективности и при этом без потери в качестве совмещения. Применение быстрого алгоритма для вычисления проекционных коэффициентов также дает дополнительное ускорение, не сильно изменяя искомое преобразование. Нахождение искомых параметров сводится к однократному вычислению трехмерной корреляции в Фурье-пространстве с помощью проекционного метода вычисления преобразований Фурье-Бесселя и вычислению обратного преобразования Фурье для перехода в координатное пространство. Результаты проведенных экспериментов на синтетических и реальных данных продемонстрировали эффективность разработанного метода и его устойчивость к большому уровню шума, характерному для изображений крио-ЭМ. В сравнении с корреляционным методом, описан-

ным в разделе 2.3, предложенный метод является более устойчивым (результаты сравнения работы методов представлены в таблице 2 и на графиках на Рис. 13 и Рис. 14, а также Рис. 15) к большому уровню шума, что соответствует малым значениям  $SNR$ , в то время как менее эффективным по скорости вычисления.

Помимо методов совмещения, используемых для выравнивания двумерных проекций в криоэлектронной микроскопии одиночных частиц, был предложен метод генерации реалистичных данных криоэлектронной микроскопии и томографии, описанный в разделе 2.6. Разработанные алгоритмы генерации данных позволяют получить наборы изображений с контролируемыми параметрами искажений, а также контролируемыми углами поворота и смещения для тестирования алгоритмов совмещения изображений. Данный метод генерации реалистичных данных был использован для тестирования и сравнения описанных выше в данной главе методов совмещения. Еще предложенный синтез данных позволяет создавать наборы трехмерных изображений для тестирования алгоритмов совмещения изображений, используемых в криоэлектронной томографии. Стоит отметить, что основное внимание здесь было уделено моделированию искажений, возникающих при получении данных в реальном электронном микроскопе. При этом, при практическом применении предложенного метода, геометрическая форма синтезируемого объекта может быть заменена на любую другую, исходя из особенностей решаемой задачи, для которой генерируются синтетические данные.

Методы совмещения изображений, предложенные в данной главе, были сравнены между собой как на синтетических данных, созданных с помощью предложенного в данной главе метода генерации, так и на реальных данных. Визуальное сравнение показало эффективность как корреляционного метода, так и быстрого метода совмещения на основе преобразования Фурье-Бесселя. Качественное сравнение работы методов на синтетических наборах данных показало, что меньшую ошибку в угле поворота удастся достичь, используя быстрый метод на основе преобразования Фурье-Бесселя и его вычисления с помощью проекционного метода из раздела 2.4, в то время как ошибка смещения минимальная при использовании предложенного в разделе 2.3 корреляционного метода. Предложенные методы могут быть встроены в общий процесс обработки данных криоэлектронной микроскопии одиночных частиц. С технической точки зрения, в реализации методов используются стандартные функции математического аппарата и, таким образом, нет существенных трудностей реализовать предложенный метод на любом языке программирования.

### 3 Методы нежесткого совмещения изображений клеточных структур

Задача нежесткого совмещения изображений часто возникает в микроскопии при анализе поведения клеток [45]. Обычно, объектами исследования являются живые клетки, которые двигаются и изменяют свою форму с течением времени. Среди данных для анализа наиболее часто встречаются последовательности изображений флуоресцентной микроскопии или набор изображений одного и того же объекта, полученных разными способами, например, с помощью электронного и светового микроскопов. Оптическая флуоресцентная микроскопия [46] – это технология получения увеличенного изображения с помощью методов люминесценции или свечения объектов. Образец предварительно подкрашивают веществом, содержащим флуорофоры, способные излучать свет определенной длины волн при возбуждении. Так под действием источника света с большей частотой флуорофоры излучают свет определенного цвета, который можно визуализировать с помощью детекторов. Таким образом флуоресцентная микроскопия позволяет исследовать структуру и функции биологических образцов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Благодаря возможности использовать разнообразные вещества для подкрашивания образцов, флуоресцентная микроскопия стала незаменимым инструментом в биологических и медицинских исследованиях. Часто последовательности изображений флуоресцентной микроскопии используют для изучения поведения живых клеток.

В этой главе предложен метод нежесткого совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии живых клеток (Рис. 24) на основе разработанной двухэтапной нейросетевой модели. Данный метод не требует экспертной разметки. Предложенный подход использует нейронную сеть, которая предсказывает не только поле деформации, но и матрицу аффинного преобразования. Таким образом разработанный метод решает совместно задачу жесткого (1) и нежесткого (32) совмещения и представляет движение во временных последовательностях живых клеток в виде комбинации аффинного преобразования и полей деформации. Использование блока для предсказания матрицы аффинного преобразования является опциональным и может быть пропущено. Предлагаемая модель машинного обучения предсказывает матрицу аффинного преобразования и поле деформации внутри одной модели полного цикла. Для снижения уровня шума к паре входных изображений предварительно применен сглаживающий фильтр. По результатам сравнения предложенного подхода с другими методами на открытом наборе данных флуоресцентной микроскопии, позволяющем протестировать методы совме-

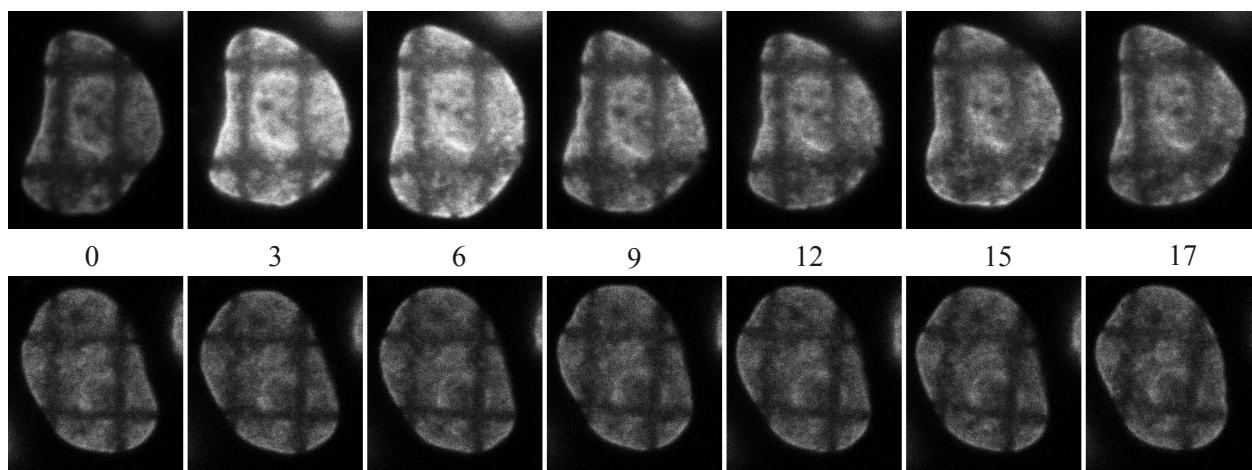


Рис. 24: Обзор набора данных: каждый ряд демонстрирует последовательность изображений флуоресцентной микроскопии живых клеток. Цель задачи состоит в выравнивании всех кадров последовательности с кадром, соответствующим точке отсчета, которой обычно является первый кадр последовательности. Это нужно для дальнейшего анализа движения клетки. Числа соответствуют отметкам по времени. Разные наборы данных имеют разное количество кадров.

ния [47], данный подход показал свою эффективность относительно качества совмещения. Также в сочетании с контурным подходом совмещения [48], предложенный метод показал наилучшие среди сравниваемых методов результаты.

Помимо этого, в этой главе предложен нейросетевой метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений для задачи трекинга клеток. Здесь исходная разметка, которая часто очень неполная, дополнена недостающими масками, сгенерированными с помощью методов совмещения изображений. Таким образом, обучая нейронную сеть сегментации на наборе данных с дополненной с помощью совмещения изображений разметкой, можно улучшить общие результаты сегментации. Используя предложенный в данной главе нейросетевой метод совмещения, можно получить разметку для объектов в последовательности изображений в режиме реального времени, которые изначально не были размечены. Преимущество такого подхода заключается в том, что это не увеличивает время предсказания результатов или сложность модели и применимо к любой нейросетевой модели сегментации. Исходя из изученной литературы, предложенный подход ранее не использовался в задаче сегментации и трекинга клеток. При этом, результаты, полученные в данной работе, демонстрируют, что применение предложенного метода позволяет улучшить качество сегментации в задаче трекинга клеток. В [50] авторы использовали похожий подход для сегментации опухолей



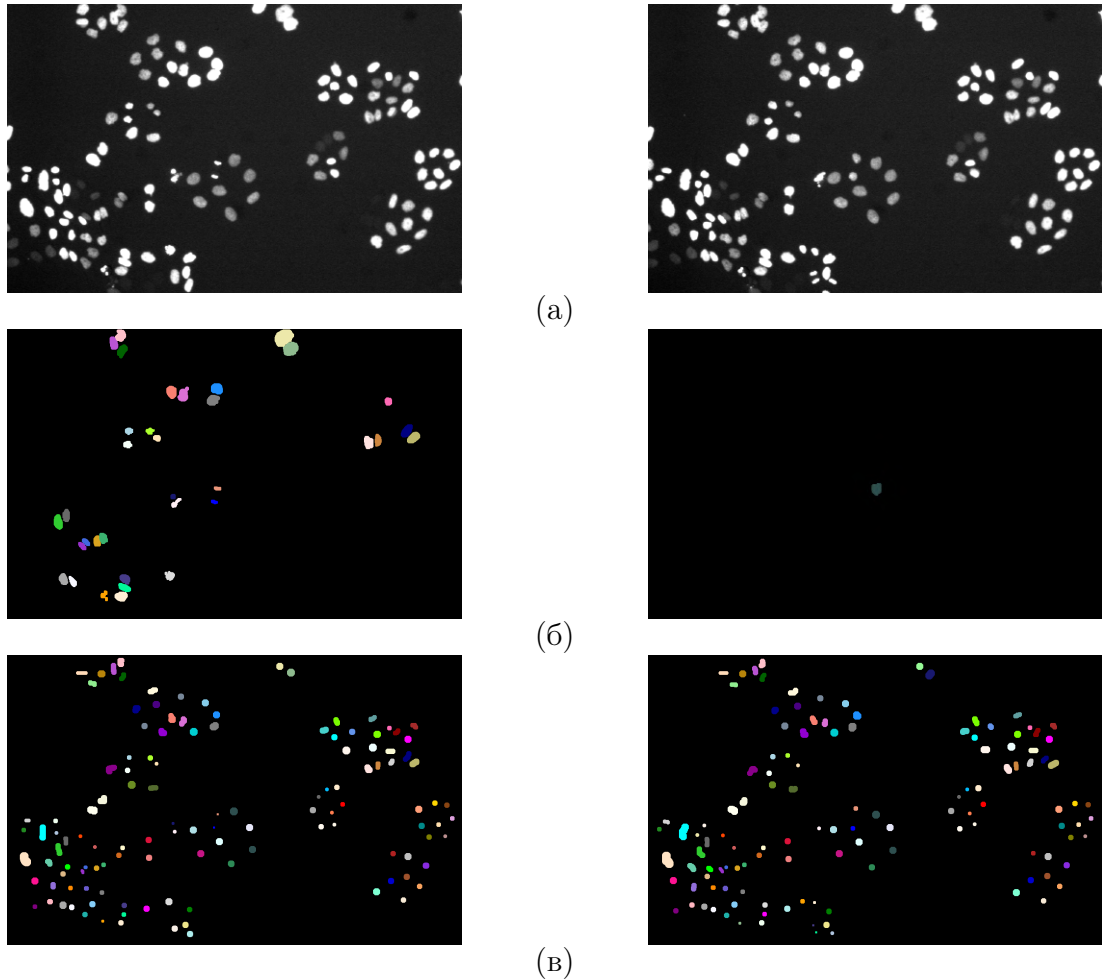


Рис. 25: Пример последовательных кадров из набора данных HeLa cells stably expressing H2b-GFP [49] с разметкой для сегментации и трекинга. (а) Отконтрастированные исходные изображения. (б) Экспертная разметка масок сегментации для некоторых клеток на изображениях. (в) Разметка треков для клеток на изображениях. Одинаковые цвета на (б) и (в) соответствуют разметке одного и того же объекта. Левая и правая колонки соответствуют разметке каждого кадра.

головного мозга. Однако сегментация клеток в задаче трекинга клеток имеет особенности, которые необходимо учитывать. Входные данные - это временные последовательности изображений, и размеченная маска сегментации (*ground truth* или *GT*) не всегда имеется для каждого объекта в кадре (Рис. 25(б)). В то же время, разметка для треков присутствует для каждого объекта на всех кадрах (Рис. 25(в)). Трек представляет собой набор маркеров, которыми отмечается положение клетки на каждом изображении последовательности. Маркеры каждой клетки во всех изображениях имеют уникальной числовой идентификатор, что позволяет проследить положение клетки во всей последовательности изображений. Данные маркеры не являются точной маской клетки, и в большинстве случаев представляют собой круги, не выходящие за границу клетки. Таким образом, мы

можем вырезать фрагменты, содержащие каждую отдельную частицу, из кадра и, используя методы совмещения, взять пару клеток внутри одного трека (т.е. одну и ту же клетку из разных кадров временной последовательности), одна из которых имеет маску сегментации. Совместив такую пару вырезанных фрагментов и, повторив все искомые преобразования над маской, мы получим разметку сегментации для второй клетки из пары. Методы совмещения клеток могут быть жесткими как, например, методы из разделов 2.3 или 2.4, предполагая, что модель движения объекта определена только композицией поворота и смещения, и нежесткими, например, [48] или [51], предполагая, что объект изменяет свою форму со временем, и эти изменения определяются полем деформации. Нежесткие методы больше подходят для совмещения изображений клеток в задаче трекинга, поскольку здесь клетки могут делиться или соединяться (Рис. 26).

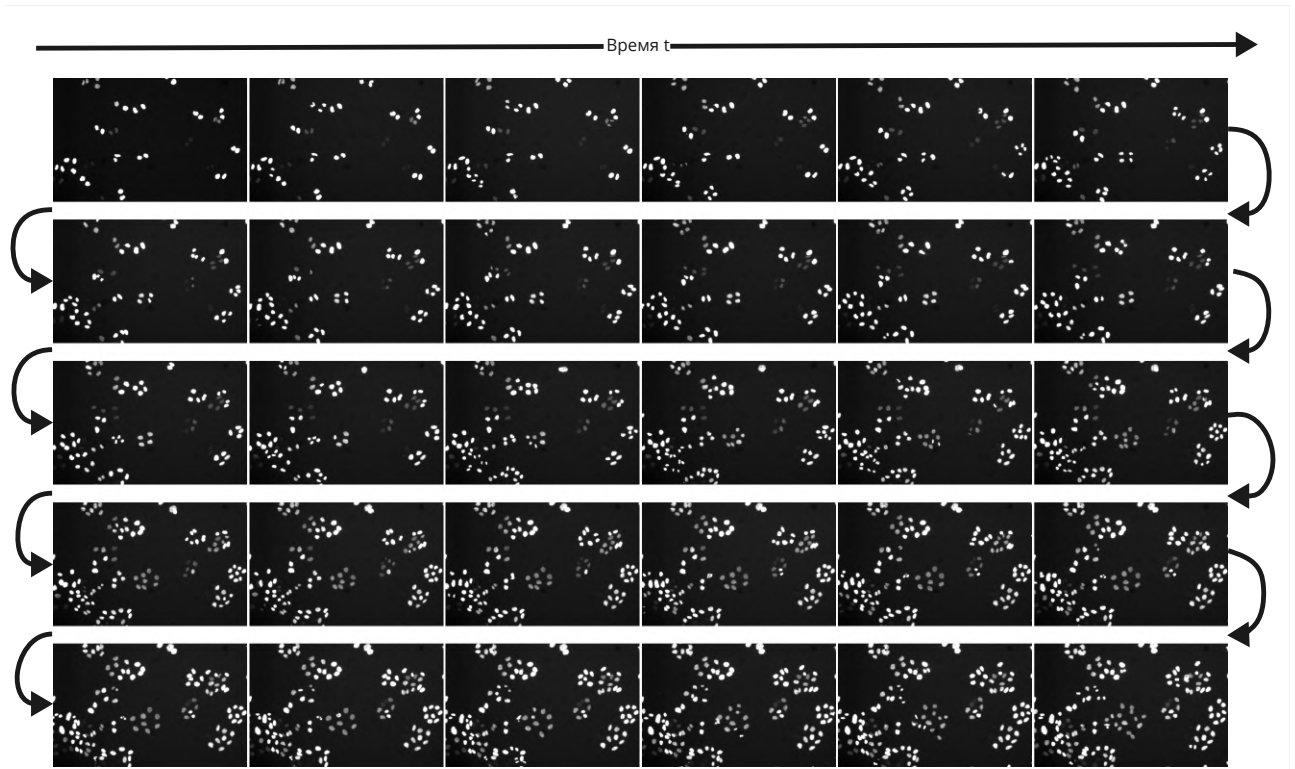


Рис. 26: Пример последовательности изображений флуоресцентной микроскопии в задаче трекинга клеток. Можно заметить, что с течением времени количество клеток на изображении изменяется.

### 3.1 Постановка задачи

Задачу нежесткого совмещения можно сформулировать так: для двух изображений  $f : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$  и  $g : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$  нужно найти такое преобразование, представленное в виде поля



деформации  $\varphi : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}^2$ , что:

$$g \circ \varphi \approx f. \quad (32)$$

Здесь  $g \circ \varphi$  обозначает результат применения векторного поля деформации  $\varphi$  к подвижному изображению  $g$ . Помимо этого, определим задачу оптимизации для нежесткого совмещения:

$$\hat{\varphi} = \arg \min_{\varphi, \theta} \mathcal{L}_R(f, g \circ \varphi) + \gamma \mathcal{L}_S(\varphi).$$

Функционал  $\mathcal{L}_R$  используется для оценки разницы между двумя изображениями, а  $\mathcal{L}_S$  - функционал регуляризации, используется для сглаживания искомого поля деформации. Значение параметра  $\gamma$  подбирается эмпирически, в зависимости от порядка значений  $\mathcal{L}_R$ .

В этой главе были разработаны методы нежесткого совмещения изображений, которые применимы к последовательностям изображений флуоресцентной микроскопии в задаче анализа движения клеточных и субклеточных структур. Здесь движение разделено на глобальное движение клеточных и локальное движение внутриклеточных структур. Для компенсации глобального движения клетки используются жесткие (1) и нежесткие (32) методы совмещения изображений. С помощью методов совмещения изображений все изображения последовательности выравниваются с точкой отсчета, которой обычно является первое изображение последовательности.

## 3.2 Обзор существующих методов совмещения изображений клеточных структур

Среди методов, использующихся в задаче анализа движения клеточных структур, можно выделить две основные группы: классические методы и методы машинного обучения. Среди классических методов есть алгоритмы жесткого совмещения (1), основанные на интенсивности. К таким методам относятся корреляционные [28] и [52]. В [28] авторы применили подход, основанный на корреляции, к последовательностям изображений движущихся клеток, меняющих свою форму со временем. В [52] авторы используют метод совмещения, основанный на вычислении корреляции локальных регионов изображения для компенсации "дрожания" на видеопоследовательностях микроскопических данных, для улучшения результатов трекинга клеток. Также в [53] авторы представили блочный метод для совмещения цветовых каналов изображений флуоресцентной микроскопии с множеством тэгов. В [54] описан параметрический метод стабилизации подвижных живых клеток на последовательности изображений флуоресцентной микроскопии для оценки глобального движения и изменения интенсивности. Другие классические методы не учи-

тывают интенсивность изображений: например, контурный подход, который выполняет нежёсткое совмещение [48]. Здесь авторы использовали динамическую модель упругости для моделирования движения и деформации ядра на основе движения его контуров. В [55] авторы предложили использование положения субклеточных структур для получения аффинного преобразования между различными изображениями. Также к классическим методам относятся подходы, основанные на использовании оптического потока, решающие задачу нежесткого совмещения (32). Такие методы основаны на известных моделях движения клеток или других физических принципах и показали свою эффективность на практике. В [56] авторы расширили модель оптического потока Лукаса-Канаде для оценки поля деформации между последовательными кадрами. Затем эту работу продолжили в [57], где авторы ставили задачу совмещения не для пары изображений, а для нескольких соседних кадров последовательности, и улучшили устойчивость к шуму. В [58] авторы представили глобальную модель оптического потока для нежесткого совмещения изображений клеток.

В последнее время наиболее популярными и более эффективными по скорости вычисления являются методы машинного обучения. Среди таких методов наиболее перспективным является глубокое обучение и применение сверточных нейронных сетей для анализа изображений. Преимущество таких подходов заключается в обучении движения, используя только информацию из входных данных. Однако, для обучения требуется большое количество обучающих примеров. Кроме того, для обучения моделей требуется экспертная разметка. Существуют подходы обучения без учителя, которые изначально нашли свое применение для медицинских данных (МРТ, КТ или УЗИ). В [51] авторы обучают нейросеть без предварительной разметки для задачи нежесткого совмещения (32), а в [59] предложили решение сразу для задач жесткого (1) и нежесткого совмещения. Эти методы превзошли традиционные итеративные методы оптимизации [60, 61]. Затем в работе [62] был предложен подход глубокого обучения для совмещения последовательности изображений живых клеток. Здесь, совместно с решением задачи жесткого совмещения, авторы выполнили удаление шума изображения (англ. *Denoising*), что особенно важно для флуоресцентной микроскопии живых клеток, так как они очень чувствительны к уровню шума. Помимо этого, авторы объединили свой подход с нейросетевым методом нежесткого совмещения VoxelMorph [51] и превзошли современные методы совмещения временных последовательностей живых клеток по точности совмещения.

### 3.3 Нейросетевой метод совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии

Задача совмещения, которую выполняет предложенный метод, состоит из комбинации (1) и (32):

$$(g \circ A_\theta) \circ \varphi \approx f. \quad (33)$$

Разработанный метод представляет собой двухэтапную модель нейронной сети, которая принимает на вход пару изображений и выполняет их жесткое и нежесткое совмещение. Результатом является преобразованное изображение, матрица аффинного преобразования и поле деформации. Предполагается, что входные изображения подаются на вход нейронной сети в градациях серого.

#### 3.3.1 Предобработка данных

Для обучения модели сверточной нейронной сети мы использовали набор данных, который состоит из четырех последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии (Рис. 24). На каждом шаге обучения случайным образом выбирается последовательность из обучающего набора данных, а затем из нее случайным образом выбираются два изображения. После этого каждое изображение нормализовано в соответствии с его минимальным и максимальным значением. Поскольку клетка движется и изменяет свою форму с течением времени, гистограммы каждого изображения могут отличаться по диапазону интенсивности. Мы выполняем эквализацию гистограмм для того, чтобы сопоставить диапазоны интенсивностей изображений и уменьшить ошибку совмещения. На вход нейросети подаются изображения размера  $256 \times 256$ , но последовательности из обучающего набора данных имеют разные размеры. Поэтому сначала каждое изображение дополнено нулями до квадратной формы, а затем мы изменяем его размер до  $256 \times 256$ , используя билинейную интерполяцию. Для аугментации данных используется вертикальное и горизонтальное отражение, смещения на небольшие по длине вектора, повороты и масштабирование, а также случайные изменения яркости. Аугментация применяется случайным образом к обоим изображениям из входной пары. Для уменьшения уровня шума к изображениям применен билатеральный фильтр с параметрами  $\sigma_{\text{color}} = 3.9$  и  $\sigma_{\text{space}} = 4.4$ . Для последовательностей изображений также доступны маски клеток, и каждое изображение умножено на соответствующую маску, чтобы выделить контуры клеток. Результат предварительной обработки данных можно увидеть на Рис. 27.

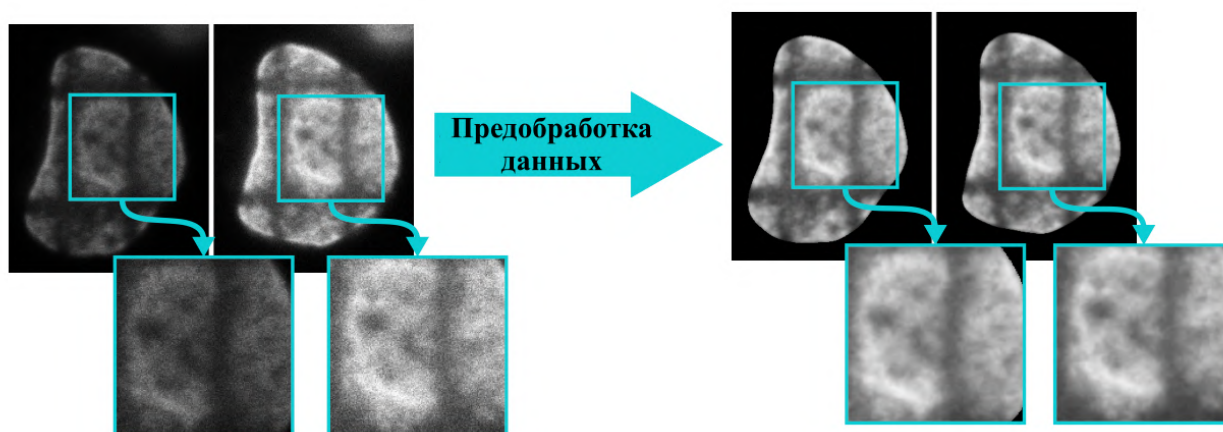


Рис. 27: Предобработка данных: интенсивность каждого изображения из входной пары нормализована, проведена эквализация гистограмм для соответствия одному и тому же диапазону интенсивности. К изображениям применен сглаживающий фильтр для уменьшения количества шума и каждое изображение умножено на соответствующую маску объекта.

### 3.3.2 Предложенная нейросетевая модель

**Архитектура нейронной сети** Архитектура (Рис. 28) предложенной сверточной нейронной сети состоит из двух частей: сеть локализации для предсказания аффинного преобразования и сверточная сеть на основе архитектуры U-Net [63] для предсказания поля деформации. Сеть локализации состоит из двух сверточных слоев, за которыми следуют слои Maxpool с активацией ReLU и два полносвязных слоя. Выходом сети локализации является аффинная матрица преобразования размером  $2 \times 3$ . Сверточные блоки в модели U-Net содержат два сверточных слоя, за которыми следуют батч-нормализация и активация ReLU. Затем идет слой Maxpool с размером ядра 2. В декодере модели U-Net используются транспонированные свертки для повышения разрешения.

Предсказание параметров совмещения происходит в 2 этапа. Сначала входные данные передаются в сеть локализации. Затем, взяв идею из [64], мы используем слой пространственного преобразования, который позволяет явно преобразовать входные данные внутри

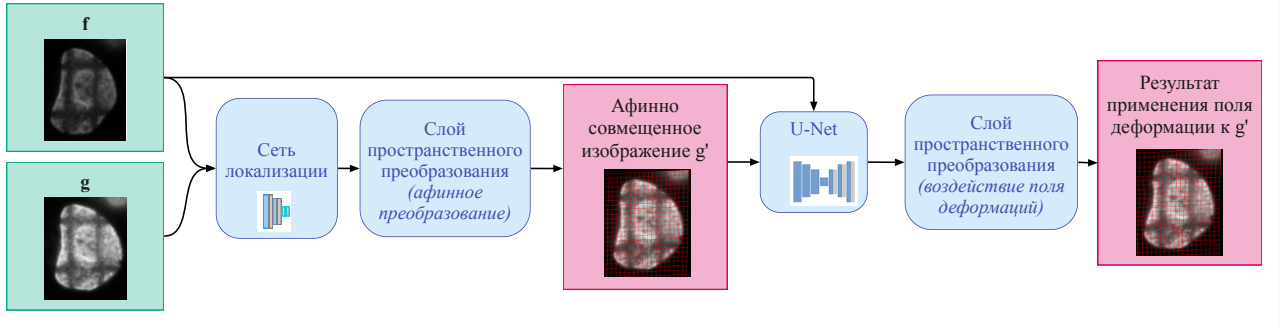


Рис. 28: Архитектура разработанной двухэтапной нейронной сети: сеть локализации предсказывает параметры матрицы аффинного преобразования, сверточная сеть на основе архитектуры U-Net предсказывает поле деформации. Внутри модели есть два слоя пространственного преобразования для того, чтобы применить найденное преобразование к подвижному изображению внутри модели и, таким образом, посчитать функцию потерь между входным и преобразованным изображением.

нейронной сети. Мы применяем аффинное преобразование к подвижному изображению:

$$\begin{pmatrix} x'_i \\ y'_i \end{pmatrix} = A_\theta \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} \theta_{11} & \theta_{12} & \theta_{13} \\ \theta_{21} & \theta_{22} & \theta_{23} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \\ 1 \end{pmatrix}, \quad (34)$$

где  $(x'_i, y'_i)$  - координаты преобразованной регулярной сетки на подвижном изображении,  $(x_i, y_i)$  - исходные координаты на подвижном изображении, а  $A_\theta$  - матрица аффинного преобразования. Мы пропускаем этот шаг, если не хотим использовать аффинное совмещение.

Затем мы создаем новую пару фиксированного и аффинно преобразованного подвижного изображений и помещаем их в ранее описанную сверточную сеть для получения искомого поля деформации  $\varphi$ . Здесь снова используется дифференцируемый слой пространственного преобразования [51], чтобы вычислить  $g \circ A_\theta \circ \varphi$ . Для каждого пикселя соответствующее смещение на вектор поля деформации вычисляется как  $p' = p + \varphi(p)$ , используя билинейную интерполяцию:

$$g \circ \varphi(\mathbf{p}) = \sum_{\mathbf{q} \in \mathcal{Z}(\mathbf{p}')} g(\mathbf{q}) \prod_{d \in \{x, y\}} (1 - |\mathbf{p}'_d - \mathbf{q}_d|),$$

где  $\mathcal{Z}(\mathbf{p}')$  является множеством соседних пикселей, а  $d$  перебирает все индексы пикселей изображения  $\Omega$ .

**Обучение** Процедура обучения длилась  $\approx 1000$  эпох. Для обучения предложенной модели мы использовали метод оптимизации Adam [65] с коэффициентом скорости обучения

$1e-3$  для первых 100 эпох и затем  $1e-4$  для последующих. На вход нейросети подавались батчи, состоящие из пар изображений размера  $256 \times 256$ . Для обучения были использованы следующие функции потерь:

1. Нормализованная кросс-корреляция:

$$\mathcal{L}_{NCC}(f, g') = -\frac{\sum_{x \in \Omega} (f(x) - \bar{f})(g'(x) - \bar{g}')}{\sqrt{\sum_{x \in \Omega} (f(x) - \bar{f})^2 \sum_{x \in \Omega} (g'(x) - \bar{g}')^2}}. \quad (35)$$

2. Среднеквадратичная ошибка:

$$\mathcal{L}_{MSE}(f, g') = \frac{1}{|\Omega|} \sum_{x \in \Omega} (f(x) - g'(x))^2. \quad (36)$$

Здесь  $g'$  обозначает преобразованное подвижное изображение,  $\bar{f}$  обозначает среднее значение интенсивности изображения  $f$ ,  $\bar{g}'$  обозначает среднее значение интенсивности изображения  $g'$ ,  $\Omega$  представляет пространство всех пикселей. Среднеквадратичная ошибка  $\mathcal{L}_{MSE}(f, g \circ A_\theta)$  была вычислена между фиксированным  $f$  и аффинно преобразованным подвижным  $g \circ A_\theta$  изображениями, взвешенная сумма нормализованной кросс-корреляции  $\mathcal{L}_{NCC}(f, g \circ A_\theta \circ \varphi)$  и среднеквадратичной ошибки  $\mathcal{L}_{MSE}(f, g \circ A_\theta \circ \varphi)$  была вычислена между фиксированным  $f$  и финальным преобразованным подвижным  $g \circ A_\theta \circ \varphi$  изображениями.

Разработанный метод совмещения на основе сверточных нейронных сетей был применен к четырем последовательностям флуоресцентной микроскопии живых клеток B1-B4 [47]. Для обучения были использованы случайные пары, созданные из двух разных изображений одной и той же последовательности. Сначала модель была обучена на двух последовательностях (B2 и B4) и дополнительных последовательностях живых клеток, которые не имели разметки ключевых точек (см. раздел 3.3.3). Для валидации была использована последовательность B1, для тестирования - последовательность B3. Однако было обнаружено, что обученным моделям трудно обобщаться на полностью неизвестные тестовые последовательности изображений. Чтобы решить эту проблему, мы добавили часть изображений каждой из последовательностей в процесс обучения и оставили оставшиеся изображения для тестирования и валидации.

В [62] авторы сообщили, что они случайным образом разделили набор последовательностей B1-B4 на 80% для обучения, 10% для валидации и 10% для тестирования, а для другого дополнительного набора данных использовали все изображения для обучения. Однако оценка методов на открытом используемом наборе данных (включая ранее предложенные методы, не основанные на машинном обучении) требует вычисления метрик на

всей последовательности изображений, включая обучающую часть набора данных, что означает, что методы оцениваются на данных, которые они уже видели.

В данной работе в итоге был использован такой же подход: все изображения последовательностей участвовали для обучения модели, чтобы она была согласована с другими методами. Мы не рассматривали это как проблему переобучения, потому что различные последовательности клеток приводят к сдвигу доменов, и обученная модель показывает худшие результаты совмещения. Мы рассматривали процесс обучения как задачу оптимизации, взяв идею из [66], чтобы улучшить обобщающую точность совмещения живых клеток. Такое решение было принято потому, что обычно для биомедицинских данных не удастся получить большое количество изображений в виду специфики данных и особенностей их создания с помощью микроскопа. В то же время, данная задача не использует разметку движения клеток. Таким образом, проблема переобучения здесь не является актуальной, поскольку здесь важен результат совмещения для конкретных последовательностей.

**Функции регуляризации для сглаживания деформации** Для обеспечения гладкости поля деформации и во избежание переобучения были протестированы различные функции регуляризации деформации:

1. Условие гладкости деформации [67]:

$$\mathcal{L}_S^1(\varphi) = \int_{\Omega} \left( \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} \right)^2 + \left( \frac{\partial^2 \varphi}{\partial y^2} \right)^2 + 2 \left( \frac{\partial^2 \varphi}{\partial xy} \right)^2 dx dy.$$

2. Регуляризатор, основанный на уравнении упругости [68]:

$$\mathcal{L}_S^2(\varphi, \mu, \lambda) = \exp \left\{ -\frac{1}{2} \mu s \right\} \cdot \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\lambda + \mu) t \right\},$$

где

$$s = \|\mathbf{D}_x u\|^2 + \|\mathbf{D}_y u\|^2 + \|\mathbf{D}_x v\|^2 + \|\mathbf{D}_y v\|^2,$$

$$t = \|\mathbf{D}_x u + \mathbf{D}_y v\|^2.$$

Здесь  $\mu$  и  $\lambda$  – коэффициенты Ламэ;  $u \in \mathbb{R}^N$  и  $v \in \mathbb{R}^N$  представляют  $x$ - и  $y$ -компоненты поля деформации  $\varphi$  соответственно;  $\mathbf{D}_x$  и  $\mathbf{D}_y$  представляют матрицы первых частных производных  $u$  и  $v$  по  $x$  и  $y$ -соответственно; и  $\|\cdot\|$  представляет  $l_2$  норму.

3. Условие несжимаемости деформации:

Пусть изображение  $I_m(x, y)$  представляет собой функцию плотности, зависящую от времени,  $I_m = I(x, y, t)$ , и плотность пикселей равна их интенсивности. Обозначим

$I(x, y, 0) = I_m(x, y)$  подвижное изображение, и  $I(x, y, 1) = I_m(x, y) \circ \varphi$  совмещенное подвижное изображение. Тогда полная производная по времени равна:

$$\frac{dI(x, y, t)}{dt} = \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial t} + u(x, y) \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial x} + v(x, y) \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial y}.$$

Данное уравнение описывает скорость изменения плотности вдоль траектории движения изображения. Поток является несжимаемым, когда  $\frac{dI(x, y, t)}{dt} = 0$ . Затем, используя условие несжимаемости потока и уравнение непрерывности:

$$\frac{\partial I}{\partial t} + \operatorname{div}(I \cdot \varphi) = 0 \iff \frac{dI}{dt} + I \cdot \operatorname{div}(\varphi) = 0,$$

получено условие несжимаемости деформации:

$$\mathcal{L}_S^3(\varphi) = \frac{1}{|\Omega|} \sum_{x, y \in \Omega} \|\operatorname{div}(\varphi(x, y))\|^2, \quad (37)$$

где  $\|\cdot\|$  –  $l_2$  норма.

Мы также попытались использовать регуляризатор на основе полной вариации деформации, аналогично [69]. Однако эксперимент с такой функцией регуляризации не показал хороших результатов.

### 3.3.3 Экспериментальные результаты

Для оценки качества предложенного подхода были использованы последовательности флуоресцентной микроскопии живых клеток. Этот набор данных позволил вычислить точность совмещения предложенным методом и провести количественное сравнение с другими подходами, включая контурный подход на основе динамического уравнения упругости [48], метод на основе оптического потока [58], метод совместного решения задач совмещения и удаления шума [62], а также его комбинация с нежестким методом совмещения VoxelMorph [51]. Также было проведено сравнение предложенного подхода с его комбинацией с контурным методом [48].

Предложенный метод и результаты проведенных экспериментов были представлены на международной конференции "Photogrammetric and computer vision techniques for video Surveillance, Biometrics and Biomedicine (PSBB)" (Москва, 2023) и опубликованы в трудах конференции [70].

**Набор данных для оценки работы методов** Для оценки работы метода был использован набор данных, состоящий из четырех последовательностей флуоресцентной микроскопии живых клеток с линиями, сделанными с помощью лазера, образующими сетку на



клетке [47] (Рис. 29). Эти линии являются частью структуры клетки, и их движение повторяет движение самой клетки. На основе линий определены еще два типа ключевых точек: граничные и внутренние. Граничные точки указывают на конец линий и расположены на контуре клетки. Внутренними названы точки пересечения линий внутри клетки. Такая разметка на изображении позволяет оценить методы совмещения изображений клеток путем вычисления метрик (38) и (39).

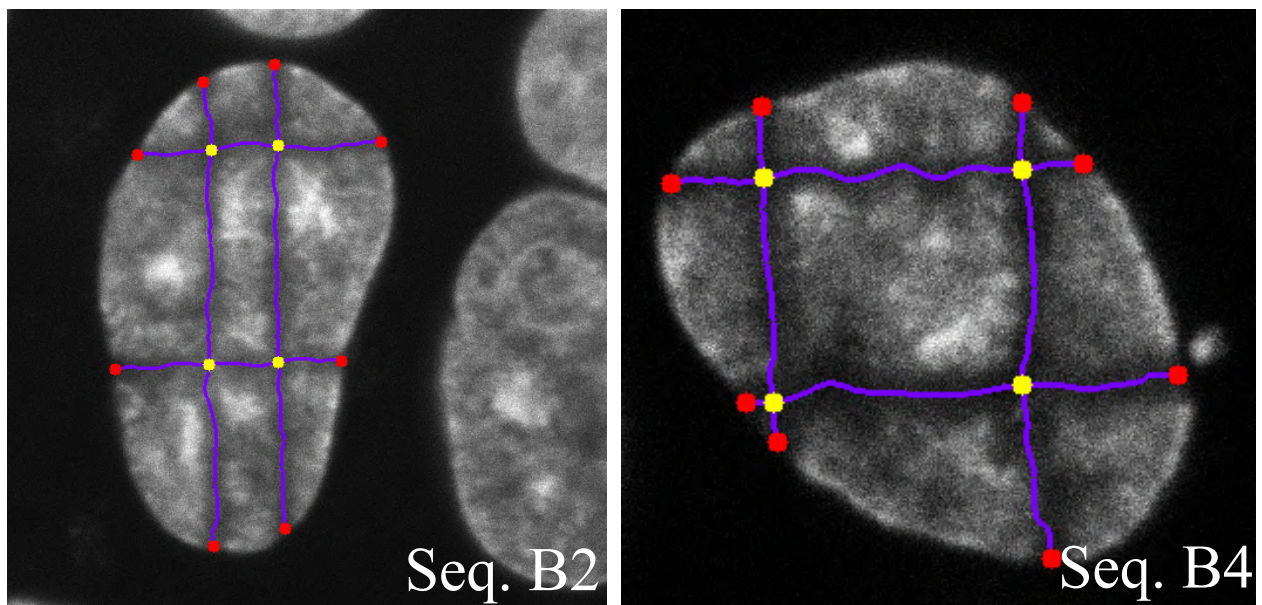


Рис. 29: Набор данных для оценки работы методов. Граничные точки обозначены красным, внутренние - желтым, а линии, проходящие вдоль клетки - фиолетовым. Все изображения во всех последовательностях набора данных имеют разметку таких ключевых точек и линий.

**Метрики для оценки работы методов** Чтобы компенсировать глобальное движение живой клетки, представленной в виде последовательности изображений, мы совмещали все изображения последовательности с первым кадром. Для каждой размеченной внутренней и граничной точки была вычислена функция ошибки, равная Евклидову расстоянию между положением рассматриваемой точки на совмещенном изображении и положением этой точки на первом кадре:

$$e_i^k = \|\mathbf{p}_i^k - \mathbf{p}_i^1\|, \quad (38)$$

где  $\mathbf{p}_i^k$  обозначает координаты  $i$ -ой точки на  $k$ -ом кадре последовательности. Для оценки совмещения по линиям было вычислено расстояние Фреше между текущей линией на  $k$ -ом

и на первом кадрах последовательности:

$$\mathcal{F}(A_k, A_1) = \inf_{\alpha, \beta} \max_{t \in [0, 1]} \{\|A_k(\alpha(t)) - A_1(\beta(t))\|\}, \quad (39)$$

где  $A_k$  представляет собой множество точек, образующих текущую линию на  $k$ -ом кадре последовательности, функции  $\alpha$  и  $\beta$  определены на интервале  $[0, 1]$  от максимума по всем  $t \in [0, 1]$ . Для применения искомым преобразований к ключевым точкам и линиям была использована билинейная интерполяция поля деформации и было сделано прямое применение деформаций для каждой точки.

**Результаты** Ошибка совмещения  $e_{mean}$ , усредненная по всем точкам и всем линиям для последовательностей В1-В4, показана в таблице 3. Для методов [58, 62] были использованы значения метрик, указанные в статьях, так как исходный код для этих подходов не находится в открытом доступе. Таким образом, значения ошибок для линий в таблице 3 отсутствуют для этих методов ввиду их отсутствия в статьях авторов, а также нет визуального сравнения с этими методами на Рис. 30.

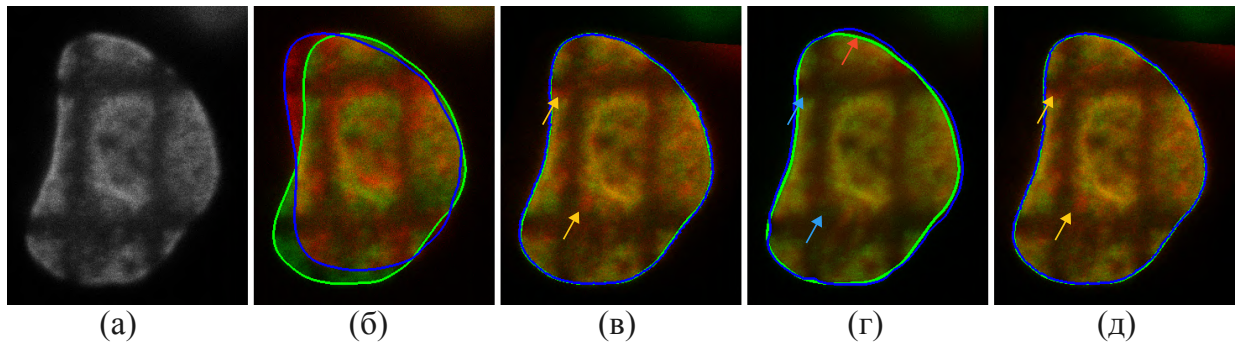


Рис. 30: Сравнение методов на примере последовательности В1: (а) Первый кадр. (б) 37-й кадр до совмещения. (в) Выравнивание 37-го кадра контурным методом. (г) Выравнивание 37-го кадра предложенным методом. (д) Выравнивание 37-го кадра с использованием комбинации контурного и предложенного методов. Синие линии представляют собой наложение текущего контура изображения клетки, а зеленые линии - наложение контура клетки из первого кадра. Синие стрелки указывают на места, где совмещение улучшено, а оранжевые стрелки указывают на места, где совмещение сработало хуже в сравнении с другими методами. Красная стрелка показывает на ошибку в предсказании формы клетки.

Исходя из результатов совмещения можно сделать вывод, что предложенный метод в сочетании с контурным подходом превосходит существующие методы, используемые на данный момент, по точности совмещения внутренних точек и линий. Для точек на границе описанный выше подход улучшает результаты контурного подхода. Но в сравнении

Последовательность	Внутренние точки					Граничные точки					Линии				
	B1	B2	B3	B4	Среднее	B1	B2	B3	B4	Среднее	B1	B2	B3	B4	Среднее
Исходные значения	11.3	5.71	8	6.79	7.95	18.15	6.4	9.3	8.13	10.49	22.79	11.37	12.34	11.82	14.58
Контурный метод	7.92	5.22	2.76	3.04	4.74	3.69	2.02	2.17	2.43	2.58	9.61	7.69	5.23	6.83	7.34
Метод, основанный на оптическом потоке	<b>6.71</b>	4.99	<b>2.35</b>	2.85	4.23	3.36	1.42	1.82	1.86	2.12			N/A		
DenoiseReg	7.46	5.39	2.94	3.18	4.74	4.76	3.07	3.05	2.05	3.23			N/A		
DenoiseReg + VM	6.77	4.74	2.37	3.02	4.23	<b>2.87</b>	1.85	1.77	<b>1.52</b>	<b>2.00</b>			N/A		
Предложенный метод ( $c \mathcal{L}_S^1$ )	9.13	5.28	5.04	3.92	5.84	3.39	<b>1.7</b>	<b>1.71</b>	2.61	2.35	11.61	8.11	6.2	7.84	8.44
Предложенный метод ( $c \mathcal{L}_S^2$ )	8.23	6.44	3.31	3.34	5.33	3.98	3.29	1.79	1.99	2.76	10.01	8.47	4.62	7.93	7.76
Предложенный метод ( $c \mathcal{L}_S^3$ )	10.61	5.26	4.52	3.91	6.06	6.76	3.13	2.52	2.96	3.84	12.2	8.37	6.47	7.36	8.6
Предложенный + Контурный методы ( $c \mathcal{L}_S^1$ )	6.79	4.24	2.36	<b>2.72</b>	<b>4.03</b>	3.45	1.88	1.75	2.64	2.43	<b>8.61</b>	<b>7.11</b>	<b>4.24</b>	6.67	<b>6.66</b>
Предложенный + Контурный методы ( $c \mathcal{L}_S^2$ )	7.23	<b>4.23</b>	2.43	2.77	4.17	3.51	2.02	1.85	2.55	2.48	8.9	7.13	4.45	<b>6.65</b>	6.78
Предложенный + Контурный методы ( $c \mathcal{L}_S^3$ )	7.88	4.73	2.81	3.09	4.63	3.63	1.95	2.02	2.41	2.50	9.32	7.46	4.99	6.89	7.17

Таблица 3: Экспериментальные результаты и сравнение с другими методами: для каждой последовательности вычислены ошибки совмещения для граничных и внутренних ключевых точек (38) и линий (39), значение усреднено по всем точкам одного типа внутри одного изображения и по всем кадрам последовательности.

с результатами комбинации методов DenoiseReg+VM [62] и метода, основанного на оптическом потоке [58], разработанный метод сработал в среднем хуже для граничных точек, однако он превзошел результаты конкурирующих методов на последовательностях В2 и В3. Предполагается, что для уменьшения ошибки описанного подхода для точек на границе нужно использовать более точный алгоритм очищения данных от шума.

Анализируя различные функции регуляризации можно сделать вывод, что регуляризатор на основе ограничения гладкости деформации, основанный на вычислении вторых производных, показал наилучшие результаты в среднем для всех типов точек и линий для всех последовательностей, участвующих в экспериментах. Хотя регуляризация, основанная на уравнении упругости, дала лучшие результаты, чем первый вариант, для внутренних точек и линий в последовательностях В2 и В4 разница была в пределах 0.02. Регуляризация на основе условия несжимаемости дала наихудшие результаты, за исключением граничных точек последовательности В4. Такое несхожее поведение вероятно вызвано отличительным движением этой клетки по сравнению с другими.

### **3.4 Метод сегментации клеток на изображениях с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений**

В данном разделе предложен нейросетевой метод сегментации клеток с использованием слабой разметки для задачи трекинга клеток. Слабая разметка заключается в следующем: обычно разметка исходных данных неполная, т.е. маски сегментации представлены не для каждой частицы на изображении и, кроме того, имеются не для всех кадров последовательности. В данном разделе предложено использовать методы нежесткого совмещения и с их помощью генерировать недостающие маски за счет использования имеющейся разметки маркеров треков клеток. Такой подход был использован для сегментации в задаче трекинга клеток. Таким образом, термин слабой разметки означает дополнение исходной разметки данных масками клеток, сгенерированными с помощью методов совмещения изображений.

#### **3.4.1 Задачи сегментации и трекинга клеток**

Задача трекинга клеток является одной из наиболее сложных в биомедицинских исследованиях. Благодаря трекингу клеток можно понять основные механизмы поведения клеток и анализировать сложные биомеханические процессы, такие как рост, миграция или деление клеток [71]. Обычно это делается путем анализа количественной информации

о характеристиках отдельных клеток, полученной из последовательности изображений флуоресцентной микроскопии. Последовательности изображений флуоресцентной микроскопии живых клеток могут содержать сотни или тысячи отдельных движущихся клеток (Рис. 26). Ручное выделение отдельных частиц и их отслеживание через кадры является очень трудоемким процессом. Поэтому в последнее время автоматические подходы обработки изображений активно разрабатываются в задаче трекинга клеток.

Алгоритм работы трекинга клеток состоит из следующих шагов: сначала нужно сегментировать все частицы на каждом кадре и затем соединить выделенные клетки в цепочки между кадрами. Каждая цепочка (называемая треком) состоит из одной и той же клетки, выделенной на каждом кадре последовательности. Сегментация клеток является важным этапом задачи трекинга клеток. Среди методов сегментации существуют как классические подходы, например метод пороговой обработки и детектирования границ [72], так и более сложные методы на основе минимизации энергии [73] и техник машинного обучения [63], [74].

Для содействия развитию новых и надежных алгоритмов трекинга клеток, научное сообщество организовало соревнование Cell Tracking Challenge (CTC) [75], которое привлекло множество ученых по всему миру для решения сложной задачи трекинга клеток с использованием стандартизированных открытых аннотированных наборов данных и метрик качества. Такие соревнования позволяют оценить и сравнить различные подходы. Из-за высокой эффективности сегментации на основе машинного обучения большинство предложенных методов основаны на использовании нейронных сетей.

### **3.4.2 Дополнение слабой разметки данных с использованием методов совмещения изображений**

Методы, основанные на машинном обучении, требуют ручной разметки данных для обучения модели и решения задачи. В задаче трекинга клеток обычно необходима разметка изображений, состоящая из двух частей: маски сегментации клеток и маркеры положения отдельной клетки на каждом кадре последовательности, формирующие треки движения данной клетки [75].

Для обучения модели сегментации нужна разметка, которая состоит из набора масок клеток. Обычно создание такой разметки является трудоемким процессом (точное рисование маски клетки для каждой клетки в кадре для каждого кадра последовательности может потребовать много времени), однако маски многих клеток достаточно похожи в пределах последовательности изображений. Таким образом, в типичном наборе данных

маски всех клеток размечены только в нескольких кадрах, в то время как в других кадрах присутствуют маски только для сложных случаев клеток (Рис. 25(б)).

Разметка движения клетки состоит из набора маркеров для каждого кадра (Рис. 25(в)), где текущая частица появляется частично или полностью, внутри рассматриваемой последовательности. Набор таких маркеров формирует трек клетки. Обычно большинство частиц в последовательности изображений являются частью каких-то треков.

В данном разделе предложен нейросетевой метод сегментации с обучением на данных со слабой разметкой. Для того, чтобы получить недостающие маски клеток для всех кадров последовательности был разработан следующий алгоритм:

1. Для каждого трека клетки идет поиск кадра, для которого имеется маска сегментации для текущей клетки. После этого мы проверяем, есть ли разметка сегментации для этой клетки на соседних кадрах.
2. В случае, если такая разметка отсутствует, то мы вырезаем частицы из изображений, а также имеющуюся маску из карты сегментации. Размер получившегося фрагмента в 1.2 раза больше, чем ограничивающий прямоугольник вокруг маски частицы.
3. Затем, пара вырезанных фрагментов, одна из которых имеет размеченную маску сегментации, подается на вход нейросетевому методу совмещения, который выдает поле деформации и матрицу аффинного преобразования.
4. Наконец, найденные преобразования применяются к исходной маске, и так формируется разметка для частицы на соседнем кадре с изначально отсутствующей разметкой.

Таким образом получены маски клеток в кадрах, где они изначально отсутствовали. Кроме этого, контуры полученных масок клеток слегка сглаживаются, чтобы уменьшить артефакты бинарной карты сегментации при применении плотного поля деформации. В случае перекрывающихся масок частиц исходно размеченная маска остается неизменной, а для маски, сгенерированной с помощью метода совмещения, перекрываемые значения были обрезаны. В случае, если маски двух клеток, сгенерированные с помощью метода совмещения, наложились друг на друга, то первая из них была оставлена без изменений, а перекрываемые значения второй маски были обрезаны.

Результаты сгенерированных предложенным способом масок клеток показаны на Рис. 31 для кадра, где вручную размеченные маски изначально отсутствовали. Здесь добавлено визуальное сравнение с эталонной разметкой, которая является компьютерно-сгенерированной сегментацией (ST), полученной путем объединения результатов лучших

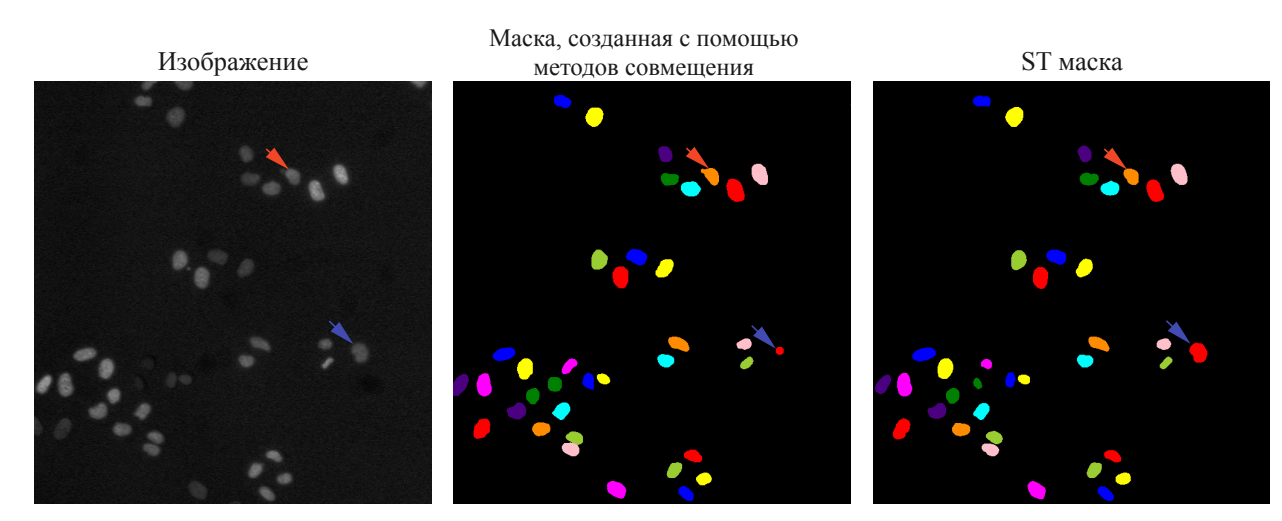


Рис. 31: Сравнение масок клеток, сгенерированной с помощью метода совмещения, и масок клеток, сгенерированной с помощью объединения работы методов сегментации (ST). Красные стрелки показывают улучшение разметки масок клеток, сгенерированной с помощью метода совмещения, по сравнению с маской, сгенерированной с помощью объединения работы нескольких методов сегментации. Синие стрелки показывают неправильную генерацию маски при использовании метода совмещения и ее замену маркерной разметкой по сравнению с картой сегментации, сгенерированной с помощью объединения работы нескольких методов сегментации, где клетка более точно размечена.

методов конкурса СТС, предоставленной организаторами. Исходя из визуального сравнения можно заключить, что сгенерированные предложенным выше методом маски сегментации очень похожи на компьютерно-сгенерированную эталонную разметку.

Для уменьшения влияния неточностей ввиду ошибок работы метода совмещения при генерации масок сегментации, к маскам клеток была применена весовая карта. Маски клеток, размеченные экспертами, имеют вес в два раза больше, чем сгенерированные маски. В случае ошибок в полученных деформациях (чрезвычайно больших значений), приводящих к неправильно сгенерированным маскам клеток, такие маски либо пропускаются, либо заменяются маркером, который взят из разметки трека клетки. Таким образом, мы дополняем существующую разметку для каждого трека клетки во всей последовательности.

### 3.4.3 Отличия аугментации данных от дополнения разметки с помощью совмещения изображений

Предложенный метод дополнения разметки с помощью совмещения изображений отличается от стандартных техник аугментации данных. Стандартная аугментация данных



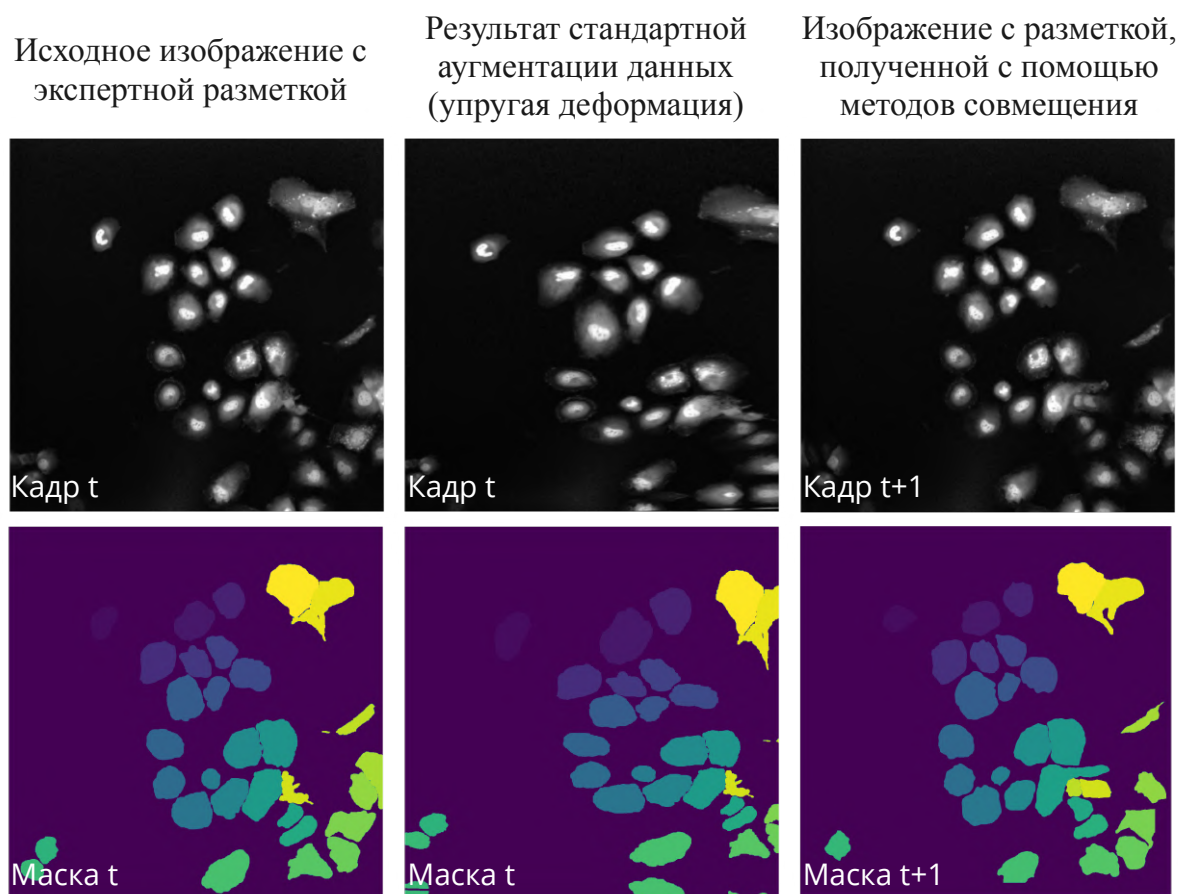


Рис. 32: Различие между стандартной аугментацией, представленной в виде случайного применения упругой деформации (англ. *elastic transform*) и предложенной техникой дополнения разметки с помощью совмещения изображений. Отличительная особенность в том, что при применении стандартных методов аугментации изменению подвергается все изображение для текущего шага времени  $t$ , в то время как предложенный метод дополнения разметки генерирует отдельно маску для каждой частицы на соседнем кадре  $t + 1$ , который изначально не имел экспертной разметки.

может состоять из различных методов, которые изменяют изображение и его маску одинаковым образом. Наиболее распространенными подходами являются изменение контраста и яркости, размытие, геометрические преобразования (повороты, отражения, аффинные преобразования) и случайные применения различных деформаций (например, упругих). Основное отличие стандартных методов размножения данных от предложенного подхода заключается в том, что в описанный метод создает новую уникальную пару изображения и маски, и разметка генерируется для изображения, для которого она ранее не существовала. В то время как в стандартных методах аугментации данных мы изменяем существующую пару изображения и маски (Рис. 32). Кроме того, предложенный метод



дополнения разметки с помощью совмещения изображений генерирует отдельно маску для каждой клетки, присутствующей на изображении, а в случае процедуры стандартной аугментации изменяется целиком весь кадр последовательности и его карта сегментации соответственно.

Так, использование описанного подхода помогает увеличить количество различных образцов в наборе данных. Более того, дополнив разметку описанным методом, можно применить методы аугментации данных к расширенному набору данных. Таким образом, мы можем расширить исходный набор данных, воспользовавшись всеми инструментами.

#### 3.4.4 Метод совмещения изображений клеток

Для совмещения изображений был использован нейросетевой метод, описанный в разделе 3.3. Схема, иллюстрирующая работу метода совмещения, показана на Рис. 33. На вход модель принимает пару изображений: фиксированное  $f$  и подвижное  $g$ . Результатом работы метода является преобразованное подвижное изображение, искомое поле деформации и матрица аффинного преобразования. В модели представлено два слоя пространственного преобразования, как в [64], которые позволяют применять искомые преобразования к изображению внутри нейронной сети, т. е. все операции применения преобразования являются дифференцируемыми. Лучше всего совмещать образцы, расположенные на соседних кадрах, иначе клетка может сильно изменить свою форму или разделиться на дочерние клетки. Для того, чтобы получить маску для кадров, расположенных далеко от кадра с экспертной разметкой, лучше применять итеративное совмещение объектов с соседних кадров. Предложенный метод совмещения не требует предварительной разметки и, благодаря слоям пространственного преобразования, функция потерь может быть вычислена между фиксированным и преобразованным подвижным изображением. Для обучения сети были использованы вырезанные из общих изображений патчи с клетками, причем положение патча было взято из разметки трека рассматриваемой клетки, которая имеется для всех частиц и всех кадров последовательности.

#### 3.4.5 Нейронная сеть сегментации изображений

Для сегментации была использована сверточная нейронная сеть архитектуры U-Net [63] с предобученным энкодером ResNet34 [76]. Сеть была обучена на целых кадрах последовательности, предварительно обрезанных по краям до нужного размера с сохранением всех пропорций. Помимо бинарных масок сегментации, сеть также выдавала вероятностную карту маркеров всех связных компонент. Эта идея была заимствована из [77], так как

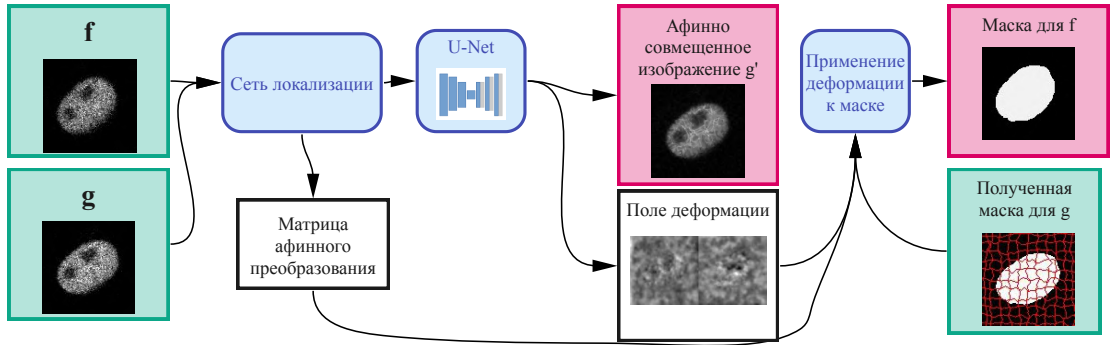


Рис. 33: Модель совмещения изображений для метода дополнения разметки: для генерации недостающей разметки используются вырезанные фрагменты, которые подаются в модель совмещения, позволяющую получить недостающие маски клеток для соседних кадров.

она хорошо решает проблему слияния масок смежных клеток. Кроме этого, поскольку маски клеток, сгенерированные описанным методом дополнения разметки все еще могут содержать некоторые ошибки, вызванные неправильным совмещением, в функции потерь были использованы карты весов, содержащие разные веса для сгенерированных масок клеток и исходной экспертной разметки (см. раздел 3.4.2). Также были посчитаны стандартные карты весов аналогично описанному в [63] и добавлены к первоначальной карте весов. Таким образом, итоговая карта весов была рассчитана по следующей формуле:

$$w(p) = w_l(p) + w_0 \cdot \exp \left( -\frac{(d_1(p) + d_2(p))^2}{2\sigma^2} \right),$$

где функция  $w_l(p)$  определяет вес пикселя  $p$  в зависимости от его разметки (экспертная или сгенерированная),  $d_1 : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$  и  $d_2 : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$  – функции, определяющие расстояние до ближайшей границы объекта для двух соприкасающихся частиц соответственно,  $w_0 = 10$  и  $\sigma = 5$ .

Итак, на вход модели сегментации подавались:

- Изображение с клетками, которые необходимо сегментировать (Рис. 34(а)).
- Бинарная маска всех клеток на изображении (Рис. 34(б)).
- Бинарная маска маркеров связных компонент, где каждый маркер указывает на отдельную частицу (Рис. 34(в)).
- Карта весов, состоит из суммы весов уверенности достоверности масок клеток (большой вес соответствует экспертной разметке, меньший вес соответствует сгенериро-

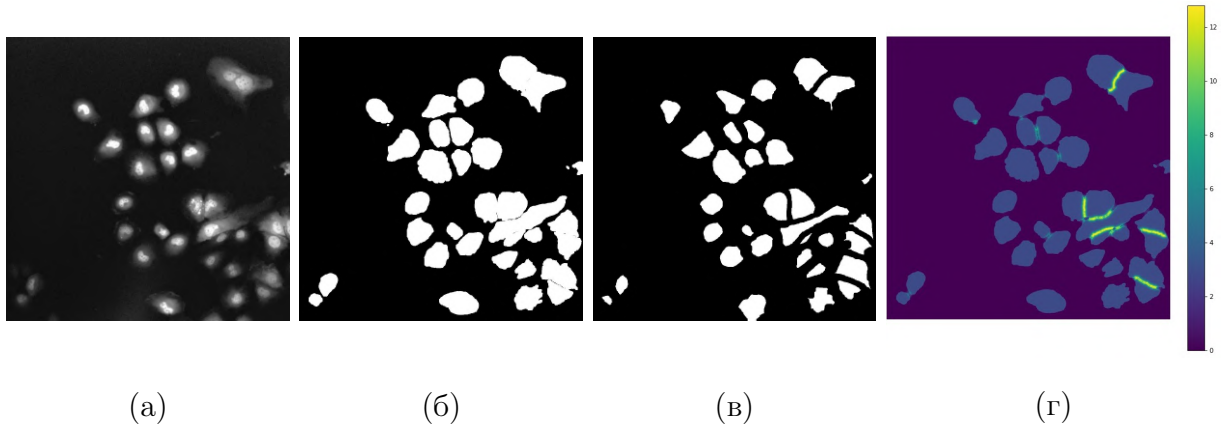


Рис. 34: Входные данные для модели сегментации: (а) Изображение. (б) Бинарная маска сегментации. (в) Бинарная маска маркеров связанных компонент. (г) Карта весов.

ванной предложенным методом дополнения разметки маске) и стандартных весов модели сегментации U-Net (Рис. 34(г)).

Для обучения модели сегментации была выбрана следующая стратегия обучения:

1. Предобученные веса энкодера изначально были заморожены, т. е. не обучались, и в качестве функции потерь была использована сумма следующих функций:

- Центральная функция потерь (англ. *Focal loss*) [78]:

$$FL(p_t) = -(1 - p_t)^\gamma \log p_t, \quad (40)$$

где  $p_t$  определено как:

$$p_t = \begin{cases} p & \text{если } y = 1 \\ 1 - p & \text{иначе,} \end{cases}$$

- функция потерь на основе меры Сёренсена (англ. *Dice loss*):

$$DL(y, p) = 1 - \frac{(2yp + 1)}{(y + p + 1)}. \quad (41)$$

Здесь  $y \in \pm 1$  обозначает значения масок экспертной разметки и  $p \in [0, 1]$  – это вероятностная карта сегментации для класса с меткой  $y = 1$ , выданная моделью. Значение параметра  $\gamma = 2$  в формуле (40). Такое обучение продолжалось  $\approx 70$  эпох.

2. Затем обучение велось для всех весов и функция потерь (40) была заменена на взвешенную кросс-энтропию с весами, определенной для каждой картинке:

$$CE(p_t) = -w_t * (1 - p_t) \log p_t. \quad (42)$$

Такое обучение продолжалось  $\approx 100$  эпох.

3. Следующий этап является опциональным и улучшает результаты сегментации лишь для нескольких наборов данных. Здесь была использована функция потерь, основанная на стандартной кросс-энтропии, и обучение велось до тех пор, пока значение функции потерь не переставало уменьшаться.

Последний шаг – применение алгоритма водораздела [79] с использованием карты маркеров, которые выдает модель вместе с вероятностной картой сегментации. Дополнительно были применены морфологические операции для удаления шума и отверстий внутри предсказанных масок.

### 3.4.6 Результаты

Предложенный метод сегментации был протестирован на трех наборах данных соревнования Cell Tracking Challenge [75]: Fluo-N2DH-GOWT1, Fluo-N2DL-HeLa и Fluo-C2DL-Huh7. Каждый набор данных содержит две последовательности изображений флуоресцентной микроскопии с экспертной разметкой. Во всех экспериментах для обучения была использована только первая последовательность изображений, а результаты были тестирования метода были вычислены для второй последовательности. Существует два вида разметки для задачи сегментации. Первый - это экспертная разметка (так называемый *ground truth* или *GT*), которая содержит как минимум два полностью размеченных кадра для каждой последовательности и также некоторые сложные случаи клеток для других кадров. Второй — это компьютерно-сгенерированная сегментация (ST), полученная путем объединения результатов лучших методов конкурса Cell Tracking Challenge, предоставленной организаторами.

Был проведен следующий эксперимент: сначала, была обучена модель сегментации только на исходном наборе данных с экспертной разметкой (GT) для нескольких кадров и применением стандартных методов аугментации данных. Будем называть модель, обученную таким образом, базовой. Затем мы обучили модель с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений, также применив стандартную аугментацию данных поверх сгенерированных масок сегментации. В обоих методах была использована одна и та же модель сегментации, описанная в разделе 3.4.5. На всех трех наборах данных предложенный подход обучения со слабой разметкой продемонстрировал улучшение по сравнению с базовой моделью.

Мы сравнили результаты сегментации, используя следующие метрики. Пусть  $R$  обозначает множество пикселей, принадлежащих экспертной разметке объекта, а  $S$  обозна-

Набор данных	IoU		SEG	
	Базовая модель	Модель сегментации со слабой разметкой	Базовая модель	Модель сегментации со слабой разметкой
Fluo-N2DH-GOWT1	0.941	<b>0.943</b>	0.932	<b>0.949</b>
Fluo-N2DL-HeLa	0.903	<b>0.944</b>	0.848	<b>0.855</b>
Fluo-C2DL-Huh7	0.872	<b>0.892</b>	0.765	<b>0.782</b>

Таблица 4: Сравнение значений метрик IoU и SEG на наборах данных Fluo-N2DH-GOWT1, Fluo-N2DL-HeLa, и Fluo-C2DL-Huh7 для базовой модели и модели, обученной с использованием предложенного метода дополнения разметки.

чает множество пикселей, принадлежащих соответствующему выделенному с помощью метода сегментации объекту. Тогда метрики определены так:

- индекс Жаккарда

$$IoU = \frac{|R \cap S|}{|R \cup S|}. \quad (43)$$

- Метрика SEG [75] основана на индексе Жаккарда множеств пикселей сопоставляемых объектов:

$$J(S, R) = \frac{|R \cap S|}{|R \cup S|}. \quad (44)$$

Эталонная маска  $R$  и маска - результат работы метода  $S$  считаются совпадающими только в том случае, если выполняется следующее условие:

$$|R \cap S| > 0.5 \cdot |R|.$$

Результаты сравнения предложенного подхода с базовой моделью представлены в таблице 4. Метрика SEG (44) была вычислена между результатом модели и экспертной разметкой (GT), аналогично как и в конкурсе Cell Tracking Challenge. Особенность этой метрики в том, что она учитывает неполноту разметки и вычисляет качество сегментации только для тех областей сегментации, для которых имеются маски. Метрика IoU (43) была вычислена между результатами модели и компьютерно-сгенерированной разметкой (ST), полученной путем объединения результатов лучших методов конкурса CTC. Так сделано потому, что для корректного отражения результатов работы, используя метрику IoU, необходимо, чтобы эталонная разметка была полной.

Визуальное сравнение полученных масок сегментации проиллюстрировано на Рис. 35. Для набора данных Fluo-N2DH-GOWT1 предложенный подход с дополнением разметки привел к увеличению среднего значения карты вероятности выхода сети по сравнению с

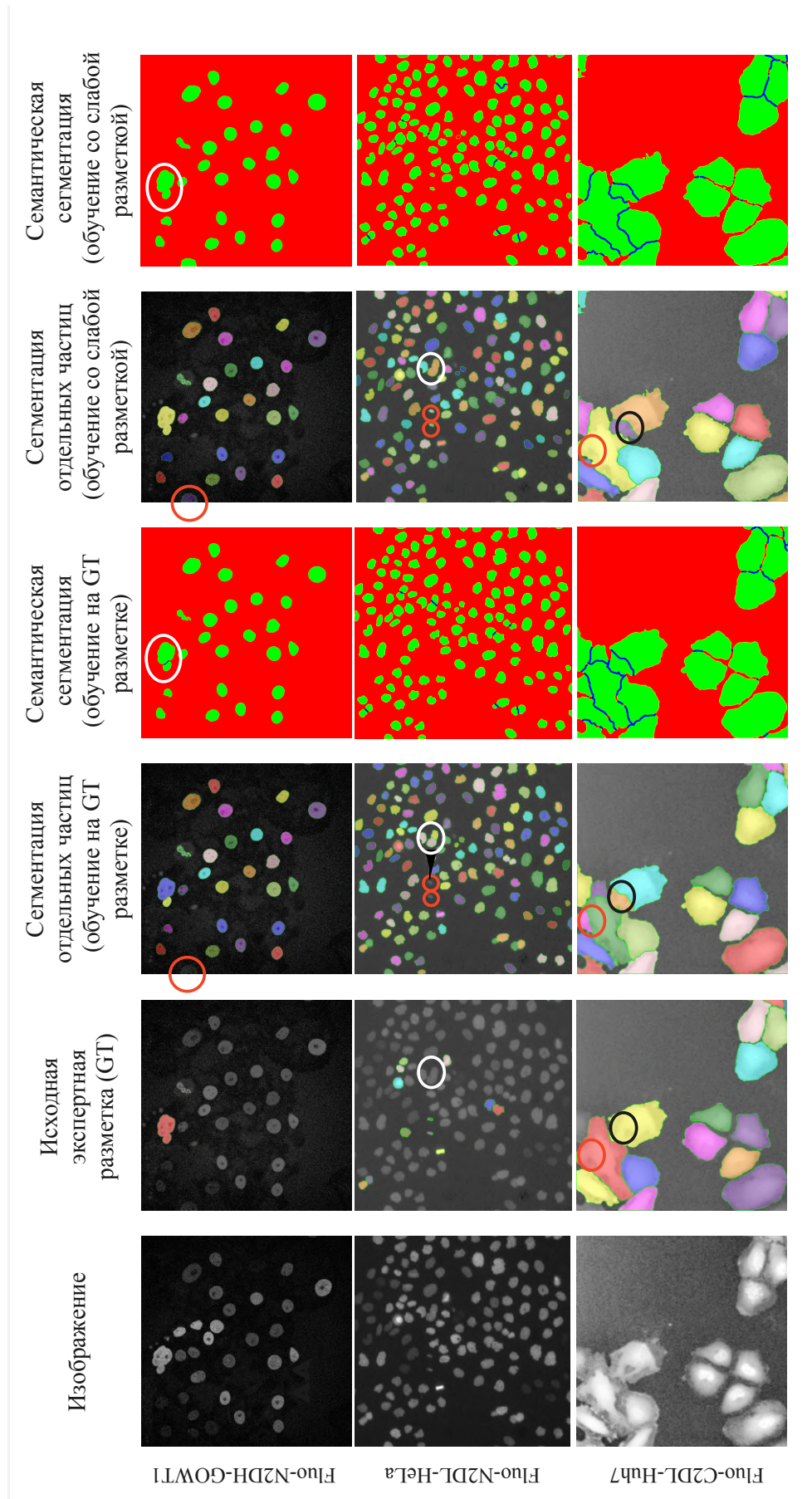


Рис. 35: Результаты сегментации для наборов данных Fluo-N2DH-GOWT1, Fluo-N2DL-HeLa, и Fluo-C2DL-Huh7. Красные кружки указывают на улучшение, полученное при использовании метода сегментации с использованием слабой разметки: здесь сегментированы клетки вдоль границы кадра по сравнению с базовым методом сегментации, обученным на исходных данных. Белые кружки демонстрируют улучшение для соприкасающихся клеток. Черные кружки показывают ошибки, сделанные в обоих подходах, для набора данных Fluo-C2DL-Huh7.

экспериментом с базовым методом, обученным на исходных данных. Это означает, что сеть стала более уверенной в своих ответах. Использование предсказанных маркеров для разделения смежных клеток также сработало хорошо (Рис. 35). Для набора данных Fluo-N2DL-HeLa использование маркеров для разделения смежных клеток не работало хорошо как для базового, так и для предложенного подходов и может быть улучшено с помощью использования других моделей сегментации отдельных частиц. В кадрах присутствуют клетки разных размеров, и иногда маркеры пропускаются для маленьких образцов, что приводит к слиянию их масок. Предложенный подход с использованием метода дополнения разметки помогает получить более полную карту вероятности, как это видно в результатах значений метрики IoU (43) в таблице 4.

Полученные результаты масок сегментации отдельных частиц с использованием предложенного метода дополнения разметки были отправлены на конкурс Cell Tracking Challenge. По итогам конкурса разработанный метод попал в число лучших методов сегментации для набора данных Fluo-C2DL-Huh7 (Рис. 36).

Мы также провели эксперимент с разным количеством размеченных данных для набора данных Fluo-C2DL-Huh7. Мы взяли 25%, 50%, 75% и 100% от имеющихся размеченных данных и обучили сеть сегментации на каждом подмножестве с и без использования слабой разметки на основе совмещения изображений. Результаты показаны в таблице 5. Здесь можно видеть, что для предложенного подхода с дополнением разметки качество сегментации уменьшается гораздо медленнее с уменьшением количества данных в обучающем наборе. Если взять 50% изначально размеченных данных, метрика SEG уменьшится на 0,064 (8,3%) для базового подхода и на 0,015 (1,9%) для подхода с использованием дополнения разметки. Однако, когда количество размеченных данных слишком мало (для набора данных Fluo-C2DL-Huh7, 25% размеченных данных содержат только 2 изображения), и данные имеют сложную структуру, использование слабой разметки на основе совмещения изображений может ухудшить качество сегментации, поскольку здесь приходится генерировать маски для кадров последовательности, которые находятся слишком далеко во времени от кадра с имеющейся разметкой, что приводит к ошибочно сгенерированным маскам.

Предложенный метод сегментации клеток с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений был доложен на 11-й международной конференции по теории обработки изображений, методам и применениям ИРТА (Зальцбург, Австрия, 2022) и опубликован в [80].



	BF-C2DL-HSC	BF-C2DL-MUSC	DFC-C2DL-Hela	Fluo-C2DL-Huh7	Fluo-C2DL-MSC	Fluo-C3DH-A549	Fluo-C3DH-H157	Fluo-C3DL-MDA231	Fluo-N2DN-GOWT1	Fluo-N2DL-Hela	Fluo-N3DH-CE	Fluo-N3DH-CHO	Fluo-N3DL-DRO	Fluo-N3DL-TRIC	PhC-C2DL-TRIF	PhC-C2DH-U373	PhC-C2DL-PSC	Fluo-C3DH-A549-SIM	Fluo-N2DH-SIM+	Fluo-N3DH-SIM+
OP <sub>CSB</sub>	0.908	0.883	0.925	0.885 <sup>(3)</sup>	0.761 <sup>(1)</sup>	0.954	0.938 <sup>(1)</sup>	0.807 <sup>(3)</sup>	0.952 <sup>(1)</sup>	0.957 <sup>(5)</sup>	0.830 <sup>(1)</sup>	0.926 <sup>(1)</sup>	0.863 <sup>(2)</sup>	0.906 <sup>(2)</sup>	0.895	0.959	0.859 <sup>(2)</sup>	0.977	0.905	0.949
	0.905 <sup>(2)</sup>	0.876 <sup>(2)</sup>	0.912	0.879 <sup>(2)</sup>	0.760	0.952	0.930 <sup>(2)</sup>	0.771	0.948	0.957 <sup>(1)</sup>	0.816	0.913	0.742	0.891 <sup>(1)</sup>	0.886 <sup>(3)</sup>	0.958 <sup>(2)</sup>	0.975	0.905	0.885 <sup>(5)</sup>	
	0.901	0.873	0.912	0.859	0.746 <sup>(1)</sup>	0.931	0.900	0.770 <sup>(1)</sup>	0.948	0.954	0.811 <sup>(1)</sup>	0.913	0.722	0.875	0.850 <sup>(2)</sup>	0.956 <sup>(5)</sup>	0.943 <sup>(5)</sup>	0.899 <sup>(2)</sup>	0.866 <sup>(2)</sup>	
SEG	0.826	0.782	0.870	0.811 <sup>(2)</sup>	0.687	0.908	0.888 <sup>(1)</sup>	0.710 <sup>(2)</sup>	0.938	0.923 <sup>(5)</sup>	0.729 <sup>(1)</sup>	0.917	0.738 <sup>(2)</sup>	0.821 <sup>(1)</sup>	0.793	0.929 <sup>(2)</sup>	0.743 <sup>(2)</sup>	0.955	0.832	0.906
	0.818 <sup>(2)</sup>	0.774 <sup>(2)</sup>	0.866	0.701 <sup>(2)</sup>	0.645 <sup>(1)</sup>	0.903	0.884	0.646	0.933	0.923	0.705	0.914	0.607	0.818 <sup>(2)</sup>	0.776 <sup>(3)</sup>	0.927	0.740	0.951	0.830	0.786 <sup>(5)</sup>
	0.809	0.770	0.863	0.782	0.645	0.862	0.878 <sup>(2)</sup>	0.642	0.931	0.922 <sup>(1)</sup>	0.688 <sup>(1)</sup>	0.903	0.562 <sup>(1)</sup>	0.782	0.708 <sup>(2)</sup>	0.927	0.733	0.886 <sup>(5)</sup>	0.827 <sup>(2)</sup>	0.759 <sup>(2)</sup>
DET	0.995	0.983	0.979	0.968 <sup>(3)</sup>	0.876 <sup>(1)</sup>	1.000	0.988 <sup>(1)</sup>	0.907 <sup>(1)</sup>	0.980	0.994 <sup>(2)</sup>	0.990 <sup>(2)</sup>	0.954 <sup>(1)</sup>	0.988 <sup>(2)</sup>	0.994 <sup>(2)</sup>	0.997	0.991	0.975 <sup>(2)</sup>	1.000	0.983 <sup>(5)</sup>	0.992
	0.993	0.982 <sup>(3)</sup>	0.961	0.959 <sup>(2)</sup>	0.851 <sup>(1)</sup>	1.000	0.982 <sup>(2)</sup>	0.904 <sup>(2)</sup>	0.976 <sup>(1)</sup>	0.992 <sup>(1)</sup>	0.981	0.945 <sup>(1)</sup>	0.970	0.994 <sup>(2)</sup>	0.997 <sup>(3)</sup>	0.990 <sup>(5)</sup>	0.975	1.000	0.981	0.984 <sup>(5)</sup>
	0.991 <sup>(2)</sup>	0.979	0.960	0.956 <sup>(5)</sup>	0.832	1.000	0.978	0.901	0.970 <sup>(4)</sup>	0.992 <sup>(1)</sup>	0.979	0.934	0.962 <sup>(2)</sup>	0.969	0.992 <sup>(2)</sup>	0.988 <sup>(2)</sup>	0.972	1.000	0.980	0.974 <sup>(2)</sup>

BFR-GE (1-2)	BGU-IL (1-5)	CALT-US	CSU-CN	CUNI-CZ
DESU-US	DKFZ-GE	DREX-US	FR-Ro-GE	HD-Wag-GE
HDU-CN	IGFL-FR	JAN-US	KIT-Loe-GE	KIT-Sch-GE (1-2)
KTH-GE (1-5)	LEID-NL	MON-AU	MPI-Ar-GE	MPI-Br-GE (1-2)
MSU-RU	MU-Ba-US	MU-CZ	MU-Lux-CZ	MU-Wa-US
ND-US (1-2)	OX-UK	PURD-US	RWTH-GE (1-3)	TUG-AT
UCH-CL	UCSB-US	UNSW-AU	UVA-NL	WARW-UK

Created on 2022-03-14, [www.celltrackingchallenge.net](http://www.celltrackingchallenge.net)

Рис. 36: Результаты конкурса Cell Tracking Challenge для задачи сегментации в задаче трекинга клеток. Белые кружочки показывают результаты предложенного подхода, занявшего третье место для набора данных Fluo-C2DL-Huh7.



Процент размеченных данных для обучения	Базовая модель	Модель сегментации со слабой разметкой
25%	<b>0.689</b>	0.675
50%	0.701	<b>0.767</b>
75%	0.740	<b>0.775</b>
100%	0.765	<b>0.782</b>

Таблица 5: Сравнение значений метрики SEG (44) для наборов данных Fluo-C2DL-Huh7 для моделей, обученных на разном количестве размеченных данных с использованием метода дополнения разметки и без него.

### 3.5 Выводы

В данной главе были представлены методы нежесткого совмещения изображений клеточных структур. Предложенные методы были адаптированы для данных, представленных в виде последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии, содержащие как один объект в кадре, так и много объектов.

Был разработан нейросетевой метод совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии. Такие данные содержат один объект в кадре, и задача состояла в совмещении всех кадров последовательности с точкой отсчета, обычно представленной первым кадром последовательности. Предложенный метод комбинирует в себе задачи жесткого и нежесткого совмещения, и предсказывает матрицу аффинного преобразования и поле деформаций. Предложенная модель была обучена на парах изображений. Экспериментальные результаты показали эффективность разработанного метода (см. таблицу 3). В комбинации с контурным подходом [48], разработанный метод превзошел результаты других сравниваемых методов.

Помимо этого, в данной главе был представлен метод сегментации клеток с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений. Данный подход был применен в задаче трекинга клеток. Последовательности изображений, анализируемые в задаче трекинга клеток, содержат много частиц на каждом кадре. Предложенный метод сегментации с обучением с использованием слабой разметки был протестирован на трех различных наборах данных, предоставленных организаторами соревнования Cell Tracking Challenge [75]. Было экспериментально подтверждено, что с помощью такого дополнения разметки можно добиться улучшения результатов нейросетевой модели сегментации.

Разработанный метод вошел в число призеров для набора данных Fluo-C2DL-Huh7 на соревновании Cell Tracking Challenge для задачи сегментации. Предложенный алгоритм сегментации с использованием слабой разметки был применен к нейронной сети сегментации U-Net и может быть применен и к другим нейросетевым моделям. Также был проведен эксперимент на выявление зависимости качества работы модели, представленного в виде метрики SEG (44), от количества размеченных данных для обучения с использованием предложенного метода дополнения разметки. Было выявлено, что, используя обучение со слабой разметкой на основе совмещения изображений, можно добиться сравнимого качества, имея при этом мало размеченных примеров (см. таблицу 5). Применение такой техники в задаче трекинга клеток позволило улучшить результаты сегментации клеток.

## 4 Программный комплекс реализации алгоритмов совмещения биомедицинских микроскопических изображений

Данная глава посвящена программной реализации методов, описанных в предыдущих главах. В данной работе рассматривались задачи совмещения изображений и последовательностей изображений, задачи сегментации со слабой разметкой и синтеза двумерных и трехмерных данных. Для написания программ, реализующих описанные алгоритмы были использованы языки программирования *Python3* и *Matlab*. Ввиду того, что все методы, описанные в данной работе, были разработаны для конкретной задачи, каждый разработанный алгоритм реализован в виде независимого программного модуля. Написанные программные модули можно разделить на две части: модули, реализующие нейросетевые методы и модули, реализующие математические методы. Ниже представлены основные детали реализаций.

### 4.1 Программная реализация методов, основанных на обучении нейросетевых моделей

Для обучения нейросетевых моделей была использована программная библиотека *Pytorch 1.10.0*. Обучение моделей было реализовано в виде скриптов на языке *Python3*. Для обучения модели нужно реализовать класс модели, наследуемый от базового класса `torch.nn.Module`, содержащий методы прямого и обратного прохода по модели, реализующий выбранную архитектуру нейронной сети. Помимо этого, необходимо задать функцию потерь, которая обычно реализована в программных библиотеках машинного обучения. Однако, иногда требуется их доработка, например, добавление весовой карты в вычислении кросс-энтропии в модели сегментации с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений (см. раздел 3.4). В обоих предложенных в данной работе нейросетевых методах (см. раздел 3.4) и (см. раздел 3.3) функция потерь была задана в виде взвешенной суммы нескольких функций.

Для обработки входных данных был реализован класс для работы с данными. Данный класс наследуется от базового класса `torch.utils.data.Dataset`, содержащий основные функции для организации подачи данных на вход модели. Внутри такого класса была реализована загрузка данных, их обработка, например нормализация или эквализация гистограмм, аугментация данных и формирование обучающих примеров в виде кортежей

(изображение, карты сегментации) для задачи сегментации, или, в случае решения задачи совмещения, пар изображений.

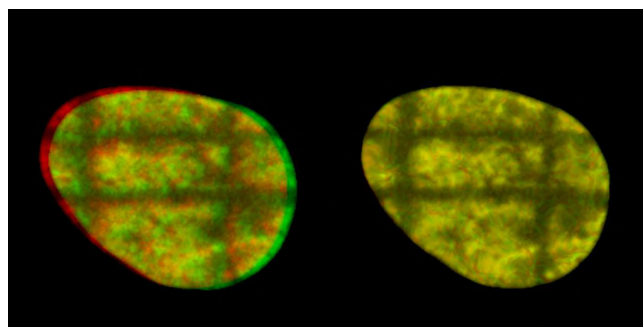
Еще одна процедура, которую необходимо реализовать для обучения нейросетевых моделей – цикл обучения. Многие программные библиотеки реализуют этот шаг внутри себя, однако он содержит стандартный набор шагов, таких как проход через модель, вычисление функции потерь, вычисление обратного распространения ошибки и выполнение шага оптимизации. В данной работе цикл обучения был реализован независимо и были добавлены различные пользовательские дополнения:

1. Каждые  $n$  шагов (данное значение задается в конфигурации обучения) происходит сохранение для случайного изображения из обучающей выборки коллажа изображений до и после совмещения в случае задачи совмещения изображений (Рис. 37(а)) и коллаж из входного изображения и предсказанной маски и маркеров в случае задачи сегментации изображений (Рис. 38). В случае задачи совмещения фиксированное изображение представлено в красном канале, а подвижное до совмещения (слева) и после (справа) в зеленом канале. Аналогичные коллажи изображений также сохранены для входного примера валидационной выборки (Рис. 37(б)).
2. После каждой эпохи в стандартный поток вывода печатается информация об отдельных функциях потерь, а также и об их взвешенной комбинации (основная функция потерь, с помощью которой идет оптимизация модели)(Рис. 39).
3. В случае, если значение функции потерь меньше, чем на предыдущей эпохе, веса модели сохраняются. Также реализована возможность сохранения весов по нажатию клавиш *Ctrl+C*.
4. Во время обучения модели происходит построение графиков функций потерь, используя программную библиотеку *Tensorboard* (Рис. 40).

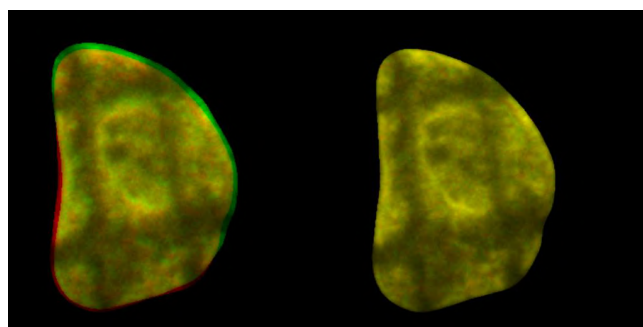
Обучение проводилось на удаленном сервере с использованием одного или нескольких графических процессоров *NVIDIA GeForce RTX 3080Ti* или *NVIDIA RTX A6000*. Программная реализация распределенного обучения доступна в программной библиотеке *Pytorch*.

Для задания всех параметров обучения был организован конфигурационный файл в *.yaml* формате (Рис. 41). Для чтения параметров из конфигурационного файла используется библиотека *PyYAML*. Конфигурационный файл задает следующие параметры:

- Размер батча изображений, подаваемого на вход нейронной сети.



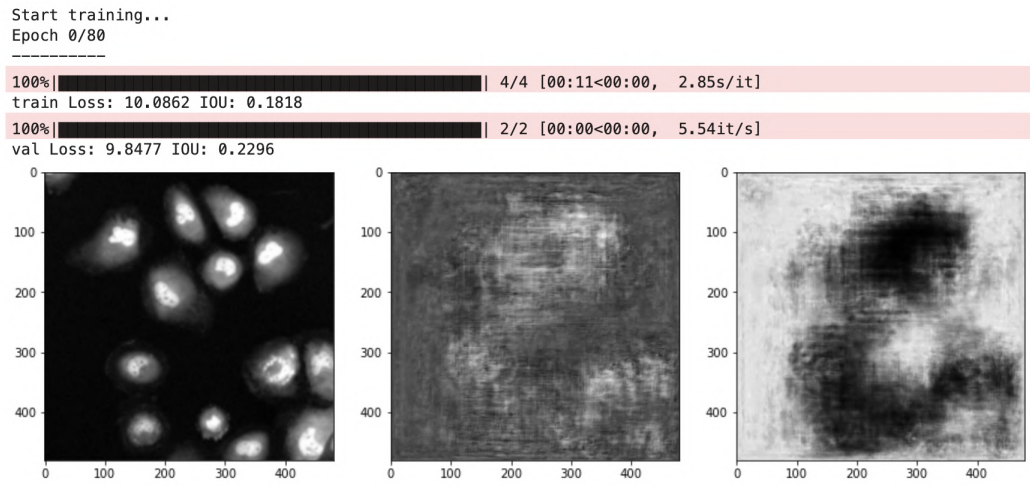
(a)



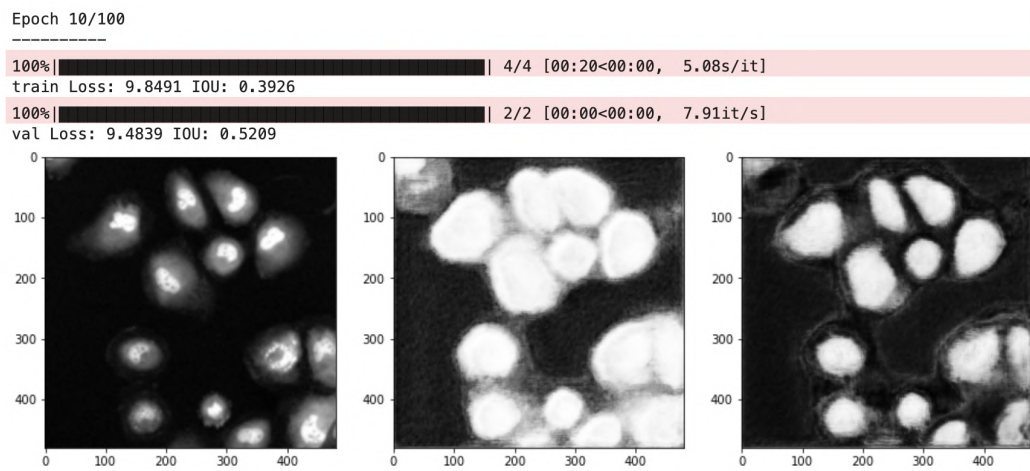
(б)

Рис. 37: Коллажи изображений, иллюстрирующие работу обучаемой модели (3.3): в красном канале помещено фиксированное изображение, в зеленом канале помещено подвижное изображения до совмещения (слева) и после (справа). (a) Пример входной пары из обучающей выборки. (б) Пример входной пары из валидационной выборки.

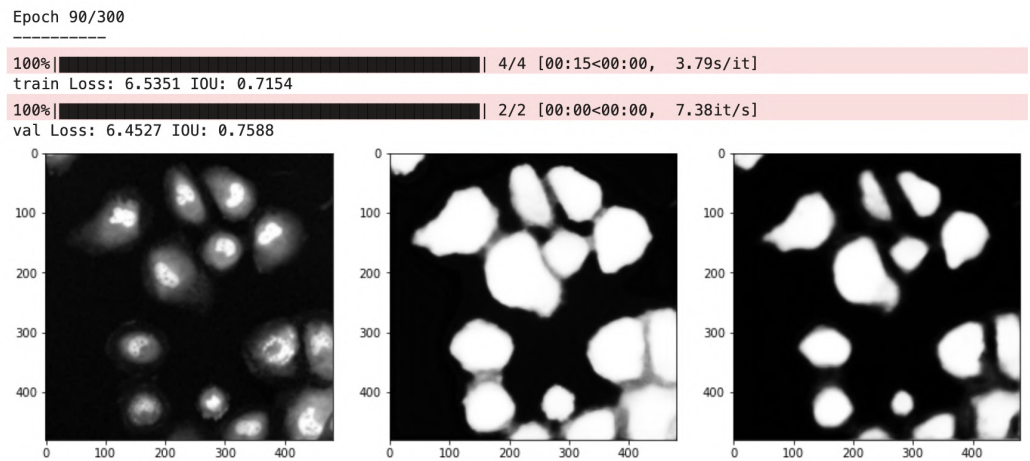
- Функция потерь: состоит из взвешенной суммы нескольких функций, для каждого слагаемого задается функция потерь, необходимые входные данные для ее вычисления, ее вес, флаг, указывающий, нужно ли отдельно выводить значения этой функции в стандартный поток вывода во время обучения и дополнительные параметры, подаваемые в виде словаря, необходимые для вычисления функции.
- Параметры для класса, агрегирующего данные. В конфигурационном файле задается отдельный набор параметров для обучающей и валидационной выборки, он включает в себя: размер изображений, флаг, указывающий на то, нужно ли обрезать изображение до нужного размера или преобразовывать его размер, флаг указывающий на то, нужно ли применять аугментацию при генерации входного примера и другие параметры, задаваемые для конкретных задач.
- Название устройства, на котором происходит обучение.



(а)



(б)



(в)

Рис. 38: Пример снимка экрана с информационным выводом во время обучения модели (3.4) карт сегментации (по центру) и маркеров (справа) для изображения (слева) из валидационной выборки для трех этапов обучения (см. раздел 3.4). (а) Начало обучения с (40) и (41). (б) 10-ая эпоха второго этапа обучения с (42) и (41). (в) 90-ая эпоха третьего этапа обучения с (42).

```

time for epoch = 8.60660719871521
Time to reset: 7.891654968261719e-05 sec
average time for batch = 0.4085401058197021
average time for val batch = 0.2642543315887451
Epoch 4 train_loss/test_loss: -0.9910482327143352 / -0.9908159971237183
Epoch 4 NCCLoss train/test: -0.9921326677004496 / -0.9922892451286316
Epoch 4 MSELoss train/test: 0.0005351151087476561 / 0.0007246622117236257
Epoch 4 DeformationSmooth train/test: 2.8427633515093477e-05 / 4.785087003256194e-05
Successfully saved state_dict in /srv/fast1/n.anoshina/DefReg/logs/test/defregnet_loss_best

Epoch 4 points_error_l2 error: 1.6738990545272827
Epoch 4 points_error_l2_prev error: 2.80484676361084

time for epoch = 9.164164543151855
Time to reset: 0.00010275840759277344 sec
average time for batch = 0.4046179453531901
average time for val batch = 0.9052917957305908
Epoch 5 train_loss/test_loss: -0.9913174629211425 / -0.9910151362419128
Epoch 5 NCCLoss train/test: -0.9923911253611247 / -0.992462158203125
Epoch 5 MSELoss train/test: 0.0005274653822804491 / 0.0007074653403833508
Epoch 5 DeformationSmooth train/test: 3.7457774669746866e-05 / 6.413993105525151e-05
Successfully saved state_dict in /srv/fast1/n.anoshina/DefReg/logs/test/defregnet_loss_best

Epoch 5 points_error_l2 error: 1.6818360090255737
Epoch 5 points_error_l2_prev error: 2.80484676361084

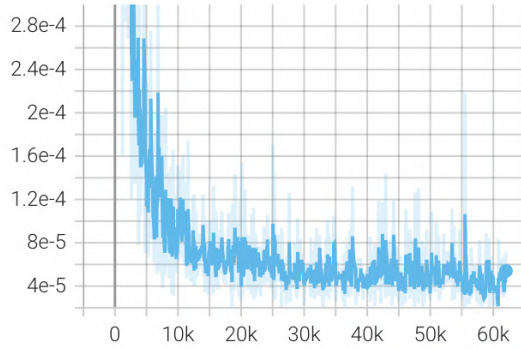
time for epoch = 9.570271730422974
Time to reset: 0.00011444091796875 sec
average time for batch = 0.4096936861673991
average time for val batch = 0.6236639022827148
Epoch 6 train_loss/test_loss: -0.9912011424700419 / -0.9911665320396423
Epoch 6 NCCLoss train/test: -0.9922820925712585 / -0.9925988912582397
Epoch 6 MSELoss train/test: 0.0005281504476442933 / 0.0006948612281121314
Epoch 6 DeformationSmooth train/test: 4.930869545205496e-05 / 8.521482959622517e-05
Successfully saved state_dict in /srv/fast1/n.anoshina/DefReg/logs/test/defregnet_loss_best

```

Рис. 39: Снимок экрана с выводом в стандартный поток вывода значений функций потерь для обучающей и валидационной выборки после каждой эпохи во время обучения модели (см. раздел 3.3).

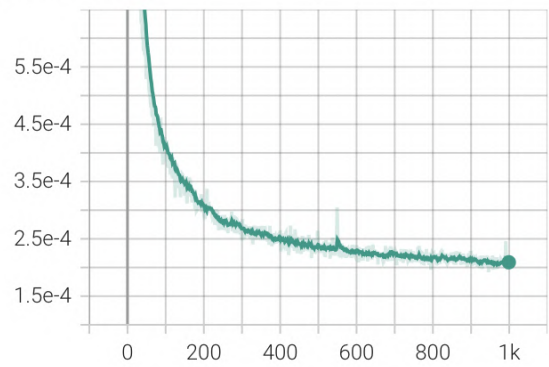
- Путь, в который происходит сохранение весов модели, промежуточных коллажей изображений, описанных выше, графиков обучения и копии всего кода, участвующего в обучении.
- Параметры модели обучения: название, количество входных каналов и другие дополнительные параметры архитектуры нейронной сети.
- Количество эпох обучения и шаг сохранения промежуточных изображений (Рис. 37 и Рис. 38).
- Возможность загрузить веса модели, сохраненные с предыдущего эксперимента или итерации, и продолжить обучение модели с новыми параметрами (например, на других данных или с другой функцией потерь).

MSELoss  
tag: MSELoss



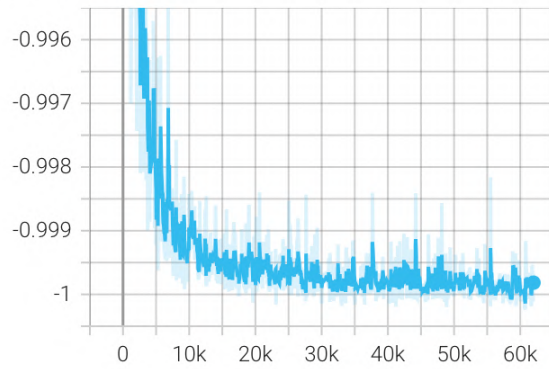
(а)

epoch\_MSELoss  
tag: epoch\_MSELoss



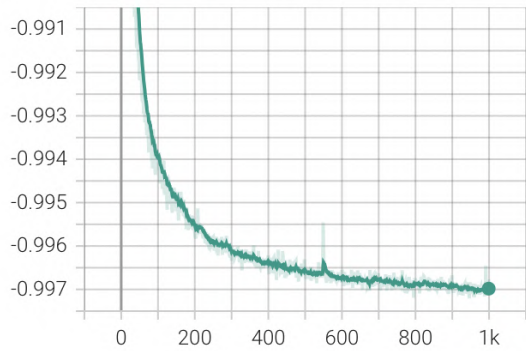
(б)

NCCLoss  
tag: NCCLoss



(в)

epoch\_NCCLoss  
tag: epoch\_NCCLoss



(г)

Рис. 40: Примеры графиков обучения в графическом интерфейсе программной библиотеки *Tensorboard* для метода (3.3). На (а) и (б) представлены графики для среднеквадратичной ошибки (36), на (в) и (г) представлены графики функции потерь, основанной на нормализованной кросс-корреляции (35). Слева на (а) и (в) представлены графики значений функций потерь, усредненных по каждому батчу входных изображений. Справа на (б) и (г) представлены графики значений функций потерь, усредненных по каждой всем изображениям в рамках одной эпохи обучения.



```

criterion:
  losses:
    - input_keys:
        input: predicted_image
        target: fixed_image
      loss_name: MSELoss
      loss_parameters:
        reduction: mean
      return_loss: false
      weight: 1.0
    - input_keys:
        pred: predicted_image
        target: fixed_image
      loss_name: L1Loss
      loss_parameters: {}
      return_loss: false
      detach_values: []
      weight: 1.0

```

(a)

```

dataset:
  im_size: !!python/tuple
    - 1
    - 256
    - 256
  image_keypoints: []
  image_sequences: []
  register_limit: 5
  train: true
  use_crop: false
  use_masks: true
  multiply_mask: true
  gauss_sigma: -1.

```

(б)

Рис. 41: Пример конфигурационного файла для задания параметров обучения для метода (3.3). (a) Параметры для задания функции потерь. (б) Параметры для загрузки и обработки входных данных из обучающей выборки.

- Метод оптимизации модели: его название, шаг оптимизации (англ. *learning rate*) и другие дополнительные параметры, заданные в виде словаря и необходимые для конкретного метода.

Для работы с изображениями использовались программные библиотеки *OpenCV 4.5.0*, *Skimage 0.17.2*, *ImageIO 2.9.0* и математическая библиотека *Numpy 1.21.2*. Для оптимизации гиперпараметров использовалась программная библиотека *Optuna 2.10.0*.

Предсказания результатов реализованы отдельными скриптами. Для метода (3.3) обученная модель используется для совмещения последовательности изображений. Было рассмотрено две стратегии выравнивания последовательности, обе из них реализованы отдельно друг от друга в виде скриптов:

- В качестве фиксированного изображения всегда берем точку отсчета, к которой нужно преобразовать все остальные кадры последовательности, и пропускаем через нейронную сеть совмещения столько пар изображений, сколько кадров в последовательности, не учитывая шаблонный кадр. Данный подход плохо работает для тех последовательностей изображений, на которых клетка сильно видоизменяется, и

ошибка совмещения больше, чем больше расстояние между кадрами, которые нужно совместить.

- Пары изображений, которые подаются на вход модели совмещения, состоят из соседних кадров. Таким образом, сначала находим искомые преобразования между соседними кадрами, затем последовательно применяем найденные преобразования так, что для  $i$ -го кадра, который в итоге нужно выровнять с первым кадром последовательности, сначала применяем преобразования, предсказанные по паре  $(i-1, i)$ , где первое изображение является фиксированным, второе - подвижным, затем  $(i-2, i-1)$  и т.д. до применения преобразований, предсказанным по входной паре кадров  $(1, 2)$ . Данный подход является более правильным, поскольку соседние кадры больше похожи друг на друга. Однако, здесь большую роль играет сглаженность деформации, поскольку при слишком резких сдвигах в поле деформации изображение сильно видоизменяется и при последовательном применении к нему нескольких полей деформации изображение портится.

Код методов совмещения, основанных на обучении нейронных сетей доступен по ссылкам: <https://github.com/ANadya24/DefReg> для метода из раздела 3.3 и <https://github.com/ANadya24/WeakSupervision> для метода из раздела 3.4.

## 4.2 Программная реализация метода синтеза реалистичных данных криоэлектронной микроскопии

Данный метод был реализован на языке *Matlab* с использованием программной библиотеки *Image Processing Toolbox*. Генерация трехмерного объекта реализована в виде отдельной функции, принимающей на вход требуемые размеры модели и флаг на итоговый вывод на экран трех проекций построенного объекта. Для каждого уникального объекта была реализована своя функция трехмерной генерации. Генерация набора данных также была реализована в виде отдельного скрипта.

Для тестирования методов были сгенерированы несколько наборов данных для разного уровня шума, соответствующего следующим значениям отношения сигнала к шуму ( $SNR$ ):  $[0.1, 0.5, 1.0, 2.0]$ . Было построено три трехмерных модели, затем для каждой модели был выбран вектор нормали  $\mathbf{n}$ , задающий плоскость проецирования, в которой находится двумерная проекция. Затем было выбрано три интервала по величине значений компонент вектора смещения и наборы данных с заданными параметрами смещения сохранялись в следующие папки (Рис. 42): папке *small\_trans* соответствует ин-

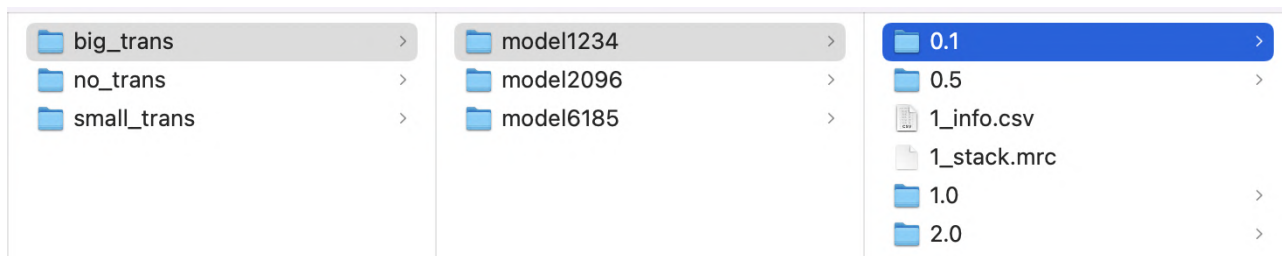


Рис. 42: Файловая структура сгенерированных наборов данных.

тервал  $[-2, 2]$ , папке *big\_trans* соответствует интервал  $[-5, 5]$  и папке *no\_trans* соответствует отсутствие смещения на изображениях. Затем было сгенерировано 100 случайных пар значений вектора смещения в заданном интервале и значений угла поворота в интервале  $[0^\circ, 360^\circ]$ . Исходная двумерная проекция была повернута и смещена в соответствии со сгенерированными параметрами, а сами параметры были сохранены в файл *info.csv*. При этом, последовательность была сохранена в файле в формате *.mrc*. Данный формат является стандартным форматом данных криоэлектронной микроскопии и криоэлектронной томографии и был разработан в научно-исследовательском институте "MRC Лаборатория Молекулярной Биологии"<sup>1</sup>. Далее к полученной сформированной последовательности применялся алгоритм добавления пуассоновского шума для соответствующих значений *SNR*:  $[0.1, 0.5, 1.0, 2.0]$ .

### 4.3 Программная реализация корреляционных методов совмещения изображений

Корреляционный метод совмещения изображений крио-ЭМ (2.3) был реализован на языке *Matlab* с использованием программной библиотеки *Image Processing Toolbox*. Для вычисления быстрого преобразования Фурье и фильтрации изображений были использованы встроенные функции. Метод совмещения реализован в виде функции *CorrMethod* которая принимает на вход пару изображений *img0* и *img1*, параметры полосового частотного фильтра *bandwidth*, а также размер маски изображения *msize*. Для выбора положения и ширины частотного полосового фильтра необходимо провести эксперимент: он реализован отдельно в виде скрипта. Перед совмещением изображений нужно запустить данную программу и затем запускать корреляционный метод совмещения с найденными параметрами полосы. Также был реализован стандартный итеративный метод в виде функции *IterMethod*, принимающий на вход также пару изображений и шаг по углу, с которым происходило сравнение предложенного подхода.

<sup>1</sup><http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/>

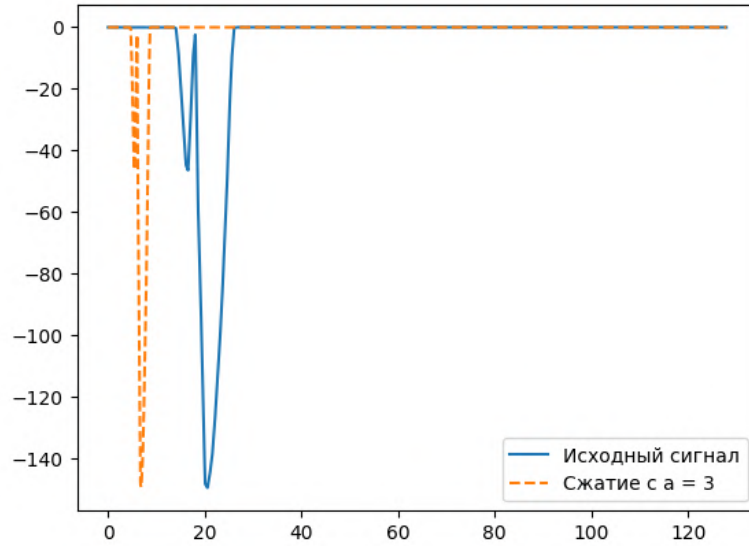


Рис. 43: Применение сжатия сигнала с  $a = 3$  для корректного его разложения по функциям Лагерра.

Быстрый метод совмещения изображений крио-ЭМ на основе преобразования Фурье-Бесселя, описанный в разделе 2.4, был реализован на языке *Python3*. Для работы с изображениями использовались программные библиотеки *OpenCV 4.5.0*, *Skimage 0.17.2*, а также математические библиотеки *Numpy 1.21.2* и *Scipy 1.10.1*. Для построения графиков использовалась библиотека *Matplotlib 3.6.1*. Сначала был реализован базовый метод [11], затем было реализовано вычисление преобразования Фурье-Бесселя (10) через преобразование Ганкеля (9) и его разложения по функциям Лагерра (22).

Для того, чтобы разложение по функциям Лагерра было корректным, нужно было подобрать параметр масштабирования сетки  $a$ :  $\hat{x}_i = ax_i$ , для этого нужно сжать или расширить исходный сигнал (Рис. 43). В данной работе значение  $a$  было подобрано эмпирически для каждого набора данных изображений крио-ЭМ. Реализация разложения по функциям Лагерра представлена в виде класса **Laguerre**, внутри которого реализованы следующие функции:

```
class Laguerre:
    def create_functions(self, max_number: int, alpha: int,
                        x: List[float], a: float)

    def create_functions_x2_2sqrtx(self, max_number: int, alpha: int,
                                    x: List[float], a: float)

    def transform_forward(self, numberOfFunctions: int,
```

```
data: List[Any], lag: List[List[float]],
x: List[float], a: float)
```

```
def transform_forward_fast_x2sqrtx_laguerre_quad(self,
laguerre_zeros: List[float], n_coef: int,
alpha: int, data: List[Any], x: List[float])
```

```
def transform_backward(self, coefs: List[float],
lag: List[List[float]])
```

- функция `create_functions` рассчитывает систему функций Лагерра  $\psi_n^\alpha(x)$  для фиксированного  $\alpha$  и  $n = 0, \dots, N$ . Параметры:
  - `max_number` задает количество функций  $N$ ,
  - `alpha` - порядок преобразования Ганкеля  $\alpha$ ,
  - `x` - сетка для расчетов  $x_i$ ,
  - `a` - параметр масштабирования сетки.
- функция `create_functions_x2_2sqrtx` рассчитывает систему нормированных функций Лагерра  $\hat{\psi}_n^\alpha(x)$  – собственных функций преобразования Ганкеля. Параметры задаются аналогично функции `create_functions`.
- функция `transform_forward` реализует расчет коэффициентов разложения функции в ряд по системе функций. Параметры:
  - `numberOfFunctions` задает количество членов разложения,
  - `data` задает функцию в виде массива значений, которую необходимо разложить на коэффициенты,
  - `lag` - система функций Лагерра  $\hat{\psi}_n^\alpha(x)$ ,
  - `x` - сетка для расчетов  $x_i$ ,
  - `a` - параметр масштабирования сетки.
- функция `transform_forward_fast_x2sqrtx_laguerre_quad` реализует быстрый алгоритм расчета коэффициентов разложения функции в ряд по системе функций. Параметры:

- `laguerre_zeros` задает массив нулей полинома Лагерра  $L_n^\alpha(x)$ ,
  - `n_coef` задает количество членов разложения,
  - `alpha`: порядок преобразования Ганкеля  $\alpha$ ,
  - параметры `data` и `h` задаются аналогично функции `transform_forward`.
- функция `transform_backward` реализует восстановление функции. Параметры:
    - `numberOfFunctions` задает число членов разложения,
    - `coefs`- коэффициенты разложения,
    - `lag`- система функций Лагерра  $\hat{\psi}_n^\alpha(x)$ .

Для вычисления преобразования Фурье-Бесселя (10) через преобразование Ганкеля (9) и его разложения по функциям Лагерра нужно сначала создать систему функций с помощью функции `create_functions_x2_2sqrtx`, затем рассчитать коэффициенты разложения, используя `transform_forward`, затем по коэффициентам соответственно формуле (22), используя функцию `transform_backward` посчитать преобразование Фурье-Бесселя.

Код метода совмещения, основанного на вычислении преобразования Фурье-Бесселя и применении проекционного метода для вычисления преобразования Ганкеля из раздела 2.4 доступен по ссылке <https://github.com/ANadya24/FOURIER-BESSEL-REGISTRATION>.

## 5 Заключение

Диссертация посвящена разработке математических методов совмещения биомедицинских микроскопических изображений. Основные результаты работы заключаются в следующем:

1. Предложен корреляционный метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии.
2. Разработан быстрый численный метод совмещения изображений криоэлектронной микроскопии на основе преобразования Фурье-Бесселя, вычисляемого с помощью проекционного метода с использованием функций Лагерра и быстрого алгоритма расчета проекционных коэффициентов.
3. Создан метод синтеза реалистичных данных криоэлектронной микроскопии одиночных частиц и криоэлектронной томографии и сгенерированы наборы данных проекций двумерных частиц.
4. Разработан нейросетевой метод совмещения последовательностей изображений флуоресцентной микроскопии.
5. Реализован метод сегментации с использованием слабой разметки на основе совмещения изображений. Предложенный метод вошел в число призеров по результатам сегментации в задаче отслеживания клеток на международном конкурсе Cell Tracking Challenge.
6. Реализован программный комплекс для совмещения изображений крио-ЭМ одиночных частиц, а также совмещения изображений и сегментации клеток на изображениях флуоресцентной микроскопии.

## 6 Список опубликованных работ

Научные статьи, опубликованные в журналах WoS, Scopus, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности 1.2.2:

1. Anoshina N.A., Krylov A.S., Sorokin D.V. Correlation-based 2D registration method for single particle cryo-EM images // 2017 Seventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. — 2017. — Pp. 1–6. **WoS, Scopus**
2. Anoshina N.A., Sagindykov T.B., Sorokin D.V. A Method for Generation of Synthetic 2D and 3D Cryo-EM Images // Programming and Computer Software. — 2018. — Vol. 44, no. 4. — Pp. 240–247. **WoS, Scopus, импакт-фактор SJR: 0.232**
3. Anoshina N.A., Sorokin D.V. Weak supervision using cell tracking annotation and image registration improves cell segmentation // 2022 Eleventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. — 2022. — Pp. 1–5. **WoS, Scopus**
4. Anoshina N.A., Sorokin D.V. Cnn-Based Unsupervised Registration of Time-Lapse Microscopy Image Sequences // The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences. — 2023. — Vol. 48. — Pp. 9–14. **Scopus, импакт-фактор SJR: 0.274**

### Иные публикации:

5. Аношина Н.А., Сагиндыков Т.Б., Сорокин Д.В. Метод синтеза реалистичных данных крио-электронной микроскопии одной частицы и крио-электронной томографии // GraphiCon2017: труды 27-й Междунар. конф. по компьютерной графике и машинному зрению. — Перм. гос. нац. исслед. ун-т, г. Пермь, 2017. — С. 243–247.
6. Аношина Н.А., Сорокин Д.В. Метод дополнения разметки с помощью совмещения изображений в задаче сегментации // Научная конференция Ломоносовские чтения. Тезисы докладов. 14-22 апреля 2022 г. - секция Вычислительной математики и кибернетики, Факультет вычислительной математики и кибернетики - Москва, 2022. — С. 133–135.
7. Аношина Н.А., Сорокин Д.В. Метод совмещения изображений крио-ЭМ одиночных частиц на основе преобразования Фурье-Бесселя и быстрого проекционного метода с использованием функций Лагерра. // Прикладная Математика и информатика. —



Т.73 из Труды факультета ВМК МГУ им. М.В. Ломоносова. — МАКС Пресс Москва  
Москва: 2023. — С. 4-22.

## Список литературы

1. Cryo-electron microscopy—a primer for the non-microscopist / J. Milne, M. Borgnia, A. Bartesaghi et al. // *FEBS Journal*. — 2013. — Vol. 280, no. 1. — Pp. 28–45.
2. Cell Tracking Challenge. — <http://celltrackingchallenge.net/>.
3. *Tocheva Elitza I., Li Zhuo, Jensen Grant J.* Electron cryotomography // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. — 2010. — Vol. 2, no. 6. — P. a003442.
4. Cryo-electron microscopy of vitreous sections / Ashraf Al-Amoudi, Jiin-Ju Chang, Amélie Leforestier et al. // *The EMBO journal*. — 2004. — Vol. 23, no. 18. — Pp. 3583–3588.
5. *Drenth Jan.* Principles of protein X-ray crystallography. — Springer Science & Business Media, 2007.
6. *Schmid Michael.* Single-particle electron cryotomography (cryoET) // *Adv Protein Chem Struct Biol*. — 2011. — Vol. 82. — Pp. 37–65.
7. Tomographic three-dimensional reconstruction of cilia ultrastructure from thick sections / B.F. McEwen, M. Radermacher, C.L. Rieder, J. Frank // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1986. — Vol. 83, no. 23. — Pp. 9040–9044.
8. PDBe: protein data bank in Europe / Sameer Velankar, Christoph Best, Barbara Beuth et al. // *Nucleic acids research*. — 2010. — Vol. 38, no. suppl\_1. — Pp. D308–D317.
9. A primer to single-particle cryo-electron microscopy / Y. Cheng, N. Grigorieff, P. Penczek, T. Walz // *Cell*. — 2015. — Vol. 161, no. 3. — Pp. 438–449.
10. *Guizar-Sicairos M., Thurman S., Fienup J.* Efficient subpixel image registration algorithms // *Optics Letters*. — 2008. — Vol. 33, no. 2. — Pp. 156–158.
11. *Kovacs J., Abagyan R., Yeager M.* Fast bessel matching // *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*. — 2007. — Vol. 4, no. 1. — Pp. 84–95.
12. *Anoshina N.A., Sagindykov T.B., Sorokin D.V.* A Method for Generation of Synthetic 2D and 3D Cryo-EM Images // *Programming and Computer Software*. — 2018. — Vol. 44, no. 4. — Pp. 240–247.
13. *Joyeux L., Penczek P.* Efficiency of 2D alignment methods // *Ultramicroscopy*. — 2002. — Vol. 92, no. 2. — Pp. 33–46.

14. SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs / Tanvir R. Shaikh, Haixiao Gao, William T. Baxter et al. // *Nature Protocols*. — 2008. — Vol. 3, no. 12. — Pp. 1941–1974.
15. Reddy B.S., Chatterji B.N. An FFT-based technique for translation, rotation, and scale-invariant image registration // *IEEE Transactions on Image Processing*. — 1996. — Vol. 5, no. 8. — Pp. 1266–1271.
16. Ertürk S. Translation, rotation and scale stabilisation of image sequences // *Electronics Letters*. — 2003. — Vol. 39, no. 17. — Pp. 1245–1246.
17. Penczek Pawel, Radermacher Michael, Frank Joachim. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice // *Ultramicroscopy*. — 1992. — Vol. 40, no. 1. — Pp. 33–53.
18. Wang Xiangwen, Lu Yonggang, Liu Jiaxuan. A fast image alignment approach for 2D classification of cryo-EM images using spectral clustering // *Current Issues in Molecular Biology*. — 2021. — Vol. 43, no. 3. — Pp. 1652–1668.
19. Yang Zhengfan, Penczek Pawel. Cryo-EM image alignment based on nonuniform fast Fourier transform // *Ultramicroscopy*. — 2008. — Vol. 108, no. 9. — Pp. 959–969.
20. Cong Y., Kovacs J., Wriggers W. 2D fast rotational matching for image processing of biophysical data // *Journal of structural biology*. — 2003. — Vol. 144, no. 1-2. — Pp. 51–60.
21. Iterative stable alignment and clustering of 2D transmission electron microscope images / Zhengfan Yang, Jia Fang, Johnathan Chittuluru et al. // *Structure*. — 2012. — Vol. 20, no. 2. — Pp. 237–247.
22. Zhao Zhizhen, Singer Amit. Rotationally invariant image representation for viewing direction classification in cryo-EM // *Journal of structural biology*. — 2014. — Vol. 186, no. 1. — Pp. 153–166.
23. Heterogeneous multireference alignment for images with application to 2D classification in single particle reconstruction / Chao Ma, Tamir Bendory, Nicolas Boumal et al. // *IEEE Transactions on Image Processing*. — 2019. — Vol. 29. — Pp. 1699–1710.
24. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination / Ali Punjani, John Rubinstein, David Fleet, Marcus Brubaker // *Nature methods*. — 2017. — Vol. 14, no. 3. — Pp. 290–296.

25. Scheres S. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination // *Journal of structural biology*. — 2012. — Vol. 180, no. 3. — Pp. 519–530.
26. Grigorieff N. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures // *Journal of structural biology*. — 2007. — Vol. 157, no. 1. — Pp. 117–125.
27. Enhancing the signal-to-noise ratio and generating contrast for cryo-EM images with convolutional neural networks / Eugene Palovcak, Daniel Asarnow, Melody Campbell et al. // *IUCrJ*. — 2020. — Vol. 7, no. 6. — Pp. 1142–1150.
28. Wilson Cyrus A., Theriot Julie A. A correlation-based approach to calculate rotation and translation of moving cells // *IEEE Transactions on Image Processing*. — 2006. — Vol. 15, no. 7. — Pp. 1939–1951.
29. Bracewell R.N. The Fourier transform and its applications // *New York*. — 1986.
30. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy / Guang Tang, Liwei Peng, Philip R. Baldwin et al. // *Journal of structural biology*. — 2007. — Vol. 157, no. 1. — Pp. 38–46.
31. Chen Qin-sheng, Defrise Michel, Deconinck Frank. Symmetric phase-only matched filtering of Fourier-Mellin transforms for image registration and recognition // *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. — 1994. — Vol. 16, no. 12. — Pp. 1156–1168.
32. Watson G.N. A treatise on the theory of Bessel functions. — The University Press, 1922. — Vol. 2.
33. Vilenkin N.I. Special functions and the theory of group representations. — American Mathematical Soc., 1978. — Vol. 22.
34. Sorokin D.V., Krylov A.S. Laguerre projection method for finite Hankel transform of arbitrary order // *Moscow University Computational Mathematics and Cybernetics*. — 2010. — Vol. 34. — Pp. 149–156.
35. Sorokin D.V., Krylov A.S. A projection local image descriptor // *Pattern Recognition and Image Analysis*. — 2012. — Vol. 22. — Pp. 380–385.
36. Крылов В.И. Приближенное вычисление интегралов. — М.: Наука, 1967. — С. 116–147.
37. Aberth Oliver. Iteration methods for finding all zeros of a polynomial simultaneously // *Mathematics of computation*. — 1973. — T. 27, № 122. — С. 339–344.

38. Electron Microscopy Data Bank. — <https://www.ebi.ac.uk/emdb/>.
39. *Anoshina N.A., Krylov A.S., Sorokin D.V.* Correlation-based 2D registration method for single particle cryo-EM images // 2017 Seventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. — 2017. — Pp. 1–6.
40. *Rosenthal Peter, Henderson Richard.* Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy // *Journal of Molecular Biology.* — 2003. — October. — Vol. 333, no. 4. — Pp. 721–745.
41. *Vulovic M.* Modeling of Image Formation in Cryo-Electron Microscopy. — TU Delft, Delft University of Technology, 2013.
42. *Wade R.H.* The phase contrast characteristics in bright field electron microscopy // *Ultramicroscopy.* — 1978. — Vol. 3. — Pp. 329–334.
43. *Sigworth F.* Principles of cryo-EM single-particle image processing // *Microscopy.* — 2016. — Vol. 65, no. 1. — Pp. 57–67.
44. *Russo Christopher, Passmore Lori.* Ultrastable gold substrates for electron cryomicroscopy // *Science.* — 2014. — Vol. 346, no. 6215. — Pp. 1377–1380.
45. *Сорокин Д.В.* Совмещение изображений флуоресцентной микроскопии для компенсации движения живых клеток: обзор // *GraphiCon 2017.* — 2017. — Pp. 284–288.
46. *Lichtman J.W., Conchello J.-A.* Fluorescence microscopy // *Nature methods.* — 2005. — Vol. 2, no. 12. — Pp. 910–919.
47. Visualizing stable features in live cell nucleus for evaluation of the cell global motion compensation / D.V. Sorokin, J. Suchánková, E. Bártová, P. Matula // *Folia biologica.* — 2014. — Vol. 60, no. S1. — P. 45.
48. Non-rigid contour-based registration of cell nuclei in 2-D live cell microscopy images using a dynamic elasticity model / Dmitry V. Sorokin, Igor Peterlik, Marco Tektonidis et al. // *IEEE transactions on medical imaging.* — 2017. — Vol. 37, no. 1. — Pp. 173–184.
49. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes / Beate Neumann, Thomas Walter, Jean-Karim Hériché et al. // *Nature.* — 2010. — Vol. 464, no. 7289. — Pp. 721–727.

50. Data augmentation via image registration / J. Nalepa, G. Mrukwa, S. Piechaczek et al. // Proceedings of the IEEE International Conference on Image Processing (ICIP) / IEEE. — 2019. — Pp. 4250–4254.
51. VoxelMorph: a learning framework for deformable medical image registration / G. Balakrishnan, A. Zhao, M. Sabuncu et al. // *IEEE transactions on medical imaging*. — 2019. — Vol. 38, no. 8. — Pp. 1788–1800.
52. *Goobic Adam P., Tang Jinshan, Acton Scott T.* Image stabilization and registration for tracking cells in the microvasculature // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 2005. — Vol. 52, no. 2. — Pp. 287–299.
53. RAMTaB: robust alignment of multi-tag bioimages / Shan-e-Ahmed Raza, Ahmad Humayun, Sylvie Abouna et al. // *PLoS One*. — 2012. — Vol. 7, no. 2. — P. e30894.
54. Robust parametric stabilization of moving cells with intensity correction in light microscopy image sequences / Solene Ozere, Patrick Bouthemy, Fabien Spindler et al. // 2013 IEEE 10th International Symposium on Biomedical Imaging / IEEE. — 2013. — Pp. 468–471.
55. *Matula Petr, Kozubek Michal, Dvorák Vladimír.* Fast point-based 3-D alignment of live cells // *IEEE Transactions on Image Processing*. — 2006. — Vol. 15, no. 8. — Pp. 2388–2396.
56. Nonrigid registration of 2-D and 3-D dynamic cell nuclei images for improved classification of subcellular particle motion / Il-Han Kim, Yi-Chun M Chen, David L. Spector et al. // *IEEE Transactions on Image Processing*. — 2010. — Vol. 20, no. 4. — Pp. 1011–1022.
57. Non-rigid multi-frame registration of cell nuclei in live cell fluorescence microscopy image data / Marco Tektonidis, Il-Han Kim, Yi-Chun M. Chen et al. // *Medical Image Analysis*. — 2015. — Vol. 19, no. 1. — Pp. 1–14.
58. *Gao Qi, Rohr Karl.* A global method for non-rigid registration of cell nuclei in live cell time-lapse images // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. — 2019. — Vol. 38, no. 10. — Pp. 2259–2270.
59. A deep learning framework for unsupervised affine and deformable image registration / B. de Vos, F. Berendsen, M. Viergever et al. // *Medical image analysis*. — 2019. — Vol. 52. — Pp. 128–143.

60. Symmetric diffeomorphic image registration with cross-correlation: evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain / Brian B. Avants, Charles L. Epstein, Murray Grossman, James C. Gee // *Medical Image Analysis*. — 2008. — Vol. 12, no. 1. — Pp. 26–41.
61. Advanced normalization tools (ANTs) / Brian B. Avants, Nick Tustison, Gang Song et al. // *Insight j.* — 2009. — Vol. 2, no. 365. — Pp. 1–35.
62. Denoisereg: Unsupervised Joint Denoising and Registration of Time-Lapse Live Cell Microscopy Images Using Deep Learning / Kerem Celikay, Vadim Chagin, Cristina Cardoso, Karl Rohr // 2022 IEEE 19th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) / IEEE. — 2022. — Pp. 1–4.
63. *Ronneberger O., Fischer P., Brox T.* U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation // Proc. of the Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015 / Springer. — 2015. — Pp. 234–241.
64. Spatial transformer networks / Max Jaderberg, Karen Simonyan, Andrew Zisserman et al. // Advances in neural information processing systems. — 2015. — Pp. 2017–2025.
65. *Kingma Diederik P., Ba Jimmy.* Adam: A method for stochastic optimization // *arXiv preprint arXiv:1412.6980*. — 2014.
66. Test-time training for deformable multi-scale image registration / Wentao Zhu, Yufang Huang, Daguang Xu et al. // 2021 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA) / IEEE. — 2021. — Pp. 13618–13625.
67. *Wahba Grace.* Spline models for observational data. — SIAM, 1990.
68. Non-rigid registration of live cell nuclei using global optical flow with elasticity constraints / Qi Gao, Vadim Chagin, Cristina Cardoso, Karl Rohr // 2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) / IEEE. — 2021. — Pp. 1457–1460.
69. AirLab: autograd image registration laboratory / Robin Sandkühler, Christoph Jud, Simon Andermatt, Philippe C. Cattin // *arXiv preprint arXiv:1806.09907*. — 2018.
70. *Anoshina N.A., Sorokin D.V.* Cnn-Based Unsupervised Registration of Time-Lapse Microscopy Image Sequences // *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*. — 2023. — Vol. 48. — Pp. 9–14.

71. *Franz C.M., Jones G.E., Ridley A.J.* Cell migration in development and disease // *Developmental cell*. — 2002. — Vol. 2, no. 2. — Pp. 153–158.
72. *Chen X., Zhou X., Wong S. T.C.* Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy // *IEEE Tran. on Biomedical Engineering*. — 2006. — Vol. 53, no. 4. — Pp. 762–766.
73. Segmentation of nuclei and cells using membrane related protein markers / C. Ortiz-de Solórzano, R. Malladi, S.A. Lelievre, S.J. Lockett // *Journal of Microscopy*. — 2001. — Vol. 201, no. 3. — Pp. 404–415.
74. Instance segmentation and tracking with cosine embeddings and recurrent hourglass networks / C. Payer, D. Štern, T. Neff et al. // Proc. of the Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2018 / Springer. — 2018. — Pp. 3–11.
75. A benchmark for comparison of cell tracking algorithms / M. Maška, V. Ulman, D. Svoboda et al. // *Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 30, no. 11. — Pp. 1609–1617.
76. Deep residual learning for image recognition / Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, Jian Sun // Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. — 2016. — Pp. 770–778.
77. *Lux F., Matula P.* DIC Image Segmentation of Dense Cell Populations by Combining Deep Learning and Watershed // Proceedings of the IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019). — 2019. — Pp. 236–239.
78. Focal loss for dense object detection / T.-Y. Lin, P. Goyal, R. Girshick et al. // Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. — 2017. — Pp. 2980–2988.
79. *Mangan A.P., Whitaker R.T.* Partitioning 3D surface meshes using watershed segmentation // *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*. — 1999. — Vol. 5, no. 4. — Pp. 308–321.
80. *Anoshina N.A., Sorokin D.V.* Weak supervision using cell tracking annotation and image registration improves cell segmentation // 2022 Eleventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. — 2022. — Pp. 1–5.