

Application of Fourier Transformation in Image Analysis of Microphotographs

VYUŽITÍ FOURIEROVY TRANSFORMACE PŘI OBRAZOVÉ ANALÝZE MIKROFOTOGRAFIÍ

M. Šlouf, T. Vacková

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 16206 Praha
slouf@imc.cas.cz

Keywords: Fourier transform, microscopy, image analysis, ImageJ, Python

Abstract

Fourier transform (FT) is one of advanced tools for image analysis of micrographs. In this contribution, we briefly summarize FT theory associated with image analysis. Then we focus on a fast and easy calculation and interpretation of (i) one-dimensional discrete fast FT (1D-DFFT) of line intensity profiles, (ii) two-dimensional discrete fast FT (2D-DFFT) of selected image areas and transformation of 2D-DFFT images to (iii) 1D radial profiles and (iv) 1D azimuthal profiles. On typical examples, we show how FT analysis reveals periodicity and symmetry of micro- and nanostructured materials.

Úvod

Fourierova transformace (FT) je jedním z pokročilých nástrojů, které lze využít při obrazové analýze mikrofotografií, neboli při „převodu obrázků na čísla“. V tomto příspěvku velmi stručně shrnujeme teorii FT, která souvisí se zpracováním mikrofotografií. Přitom se soustředíme na metody výpočtu a interpretace FT pro čtyři nejčastější případy v této oblasti: (i) jednorozměrnou diskretní rychlou FT (1D-DFFT) čárových profilů intenzit, (ii) dvourozměrnou diskretní rychlou FT (2D-DFFT) vybraných ploch, a převod vypočtených 2D-DFFT na (iii) 1D radiální profily na (iv) 1D azimutální profily. Na příkladech demonstrujeme, jak může FT pomoci zviditelnit periodické vzdálenosti a symetrii v mikro- a nanostruktuře různých polymerních i nepolymerních materiálů.

Materiály, mikroskopické metody a výpočty FT

Materiály a mikroskopické preparáty použité v této práci byly připraveny na pracovišti autorů v průběhu posledních 10–15 let. Použité experimentální metody zahrnují světelnou mikroskopii (LM), rastrovací elektronovou mikroskopii (SEM) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). Vzorky, jejich příprava a vlastní mikroskopie nejsou detailně popisovány, ale v případě potřeby jen stručně zmíněny u jednotlivých příkladů přímo v textu.

Pro zpracování mikrofotografií a/nebo výpočty FT existuje řada komerčních i volně šiřitelných programů. V této práci jsme použili dva volně šiřitelné programy: program pro zpracování (mikro)fotografií ImageJ [1] a interpretovaný programovací jazyk Python [2].

ImageJ je víceúčelový program, který dokáže při zpracování obrazu věci jednoduché (převody obrazových

formátů, úpravy jasu, kontrastu, gamma; kalibrace, interaktivní měření vzdáleností a ploch aj.) i složitější (jako je například zobrazení a uložení čárových profilů intenzity a výpočty 2D-DFFT). Zde jsme program použili pro předběžnou úpravu mikrofotografií, získání intenzitních profilů a kontrolní výpočty FT (finální výpočty FT byly provedeny v Pythonu, jak je popsáno dále).

Python je moderní interpretovaný programovací jazyk vysoké úrovně. Je o něco pomalejší než standardní kompilované programovací jazyky typu Fortran, C nebo C++, ale má rozsáhlé, dobře dokumentované, volně šiřitelné knihovny rychlých podprogramů pro širokou škálu vědeckých aplikací, včetně obrazové analýzy. V této práci jsme využili zavedené moduly pro čtení/zpracování/zápis obrázků (modul *Pillow*), převedení obrázků na rychlá pole (modul *NumPy*) a výpočet DFFT z vybraných profilů nebo oblastí (modul *SciPy*) a zobrazení výsledků ve formě grafů (modul *matplotlib*). Pro převod 2D-DFFT obrazů na 1D radiální a 1D azimutální profily byl napsán ještě vlastní modul (*mfft_utils.py*). Všechny uvedené moduly jsou standardní součástí mnoha volně šiřitelných distribucí Pythonu, například distribuce WinPython [3]; jedinou výjimkou je modul *mfft_utils.py*, jehož zdrojový kód je nutno stáhnout z internetu zvlášť [4]. Elektronická verze přednášky, odkazy na všechny potřebné programy a ukázkové příklady jsou umístěny na internetu [4]. V elektronické verzi přednášky lze nalézt též stručnou zmínku o modulu pro symbolické výpočty (*SymPy*), který umožňuje pro jednoduché případy počítat Fourierovu transformaci analyticky [5]. Dále v elektronické verzi přednášky i ukázkových příkladech můžeme dohledat zdrojové kódy skriptů v jazyce Python pro všechny zde popisované typy výpočtů. Skripty jsou krátké, jednoduše napsané a komentované tak, aby je bylo možno snadno modifikovat a aplikovat na libovolný analogický výpočet.

Základní teorie FT související s obrazovou analýzou

Využití FT při obrazové analýze zahrnuje zejména čtyři typy výpočtů, které byly zmíněny již v úvodu: (i) 1D-DFFT čárových profilů intenzity, (ii) 2D-DFFT vybraných oblastí a převod 2D-DFFT obrazů na (iii) 1D radiální profily a (iv) 1D azimutální profily. 1D-DFFT a 2D-DFFT se počítají podle rovnic (1, 2):

$$A_k = \sum_{x=0}^{M-1} f(x) \exp \left(-2\pi i \frac{xk}{M} \right) \quad (1)$$

$$A_{kl} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) \exp \left(-2\pi i \left(\frac{xk}{M} + \frac{yl}{N} \right) \right) \quad (2)$$



kde (x, y) jsou x-ová a y-ová souřadnice pixelu v obrázku, (M, N) jsou rozměry obrázku a $f(x, y)$ je intenzita pixelu (v šedé škále, místě daném souřadnicemi $[x, y]$). Koeficienty (k, l) udávají souřadnice pixelu v transformovaném obrázku a A_{kl} je (komplexní) amplituda v místě daném koeficienty $[k, l]$. V případě jednorozměrných čárových profilů jde samozřejmě jen o souřadnici x , koeficient k , délku profilu v pixelech M , intenzitu $f(x)$ a amplitudu A_k . Intenzity lze získat stejně jako v teorii difrakce jako absolutní hodnoty čtverců amplitud ($I_{kl} = |A_{kl}|^2$).

Pokud jde o následné zpracování a vizualizaci vypočtených FT obrazů, situace pro 1D a 2D případ se mírně liší. Pro 1D-DFFT je výstupem jednorozměrná funkce (A_k), u které se proměnná (k) přepočítává na frekvenci f tak, aby pro periodické vzdálenosti d v přímém obrazu platilo: $d \times f = 1$. Přepočet je nejlépe patrný z příložených zdrojových kódů [4] v jazyce Python, kde ho zajišťuje funkce `fftfreq`. Pro 2D-DFFT je výstupem dvourozměrná funkce (A_{kl}) a typickým výstupem je tudíž FT obrázek. Proměnné (k, l) se ponechávají v (téměř) původní podobě a udávají polohy pixelů ve vypočteném FT obrázku, který se ale modifikuje tak, aby nulové amplitudy/frekvence (A_{kl} pro $k = l = 0$) byly uprostřed. Přepočet je opět nejlépe patrný z příložených zdrojových kódů [4], v nichž ho zajišťuje funkce `fftshift`.

Pro kvantifikaci periodických vzdáleností a symetrie v přímém obrazu je výhodné přepočítat 2D-DFFT obrazy na (jednorozměrné) radiální a (jednorozměrné) azimutální profily. Oba typy profilů se přepočítávají z 2D-DFFT obrazů numericky. 1D radiální profil získáme přepočetem a zprůměrováním dvojrozměrných hodnot I_{kl} na jednorozměrnou funkci intenzity $I(r)$, kde r je vzdálenost od středu 2D-DFFT obrazu (což schematicky vyjadřuje rovnice 3). 1D azimutální profil získáme zprůměrováním dvojrozměrných hodnot I_{kl} tak, že spočítáme jednorozměrnou funkci intenzity v zadané vzdálenosti r od středu

2D-DFFT obrazu jako funkci azimutálního úhlu v rozsahu 0–360 stupňů (schématické vyjádření viz rovnice 4):

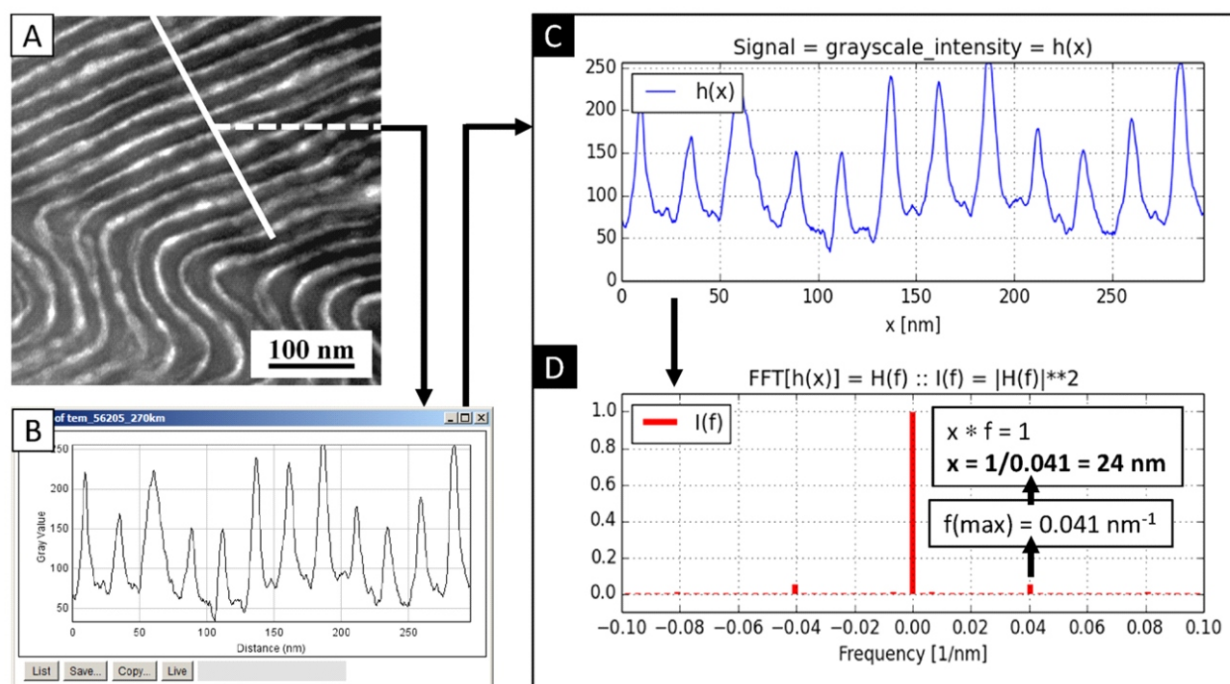
$$I = I(r) \quad (3)$$

$$I = I(\theta) \quad (4)$$

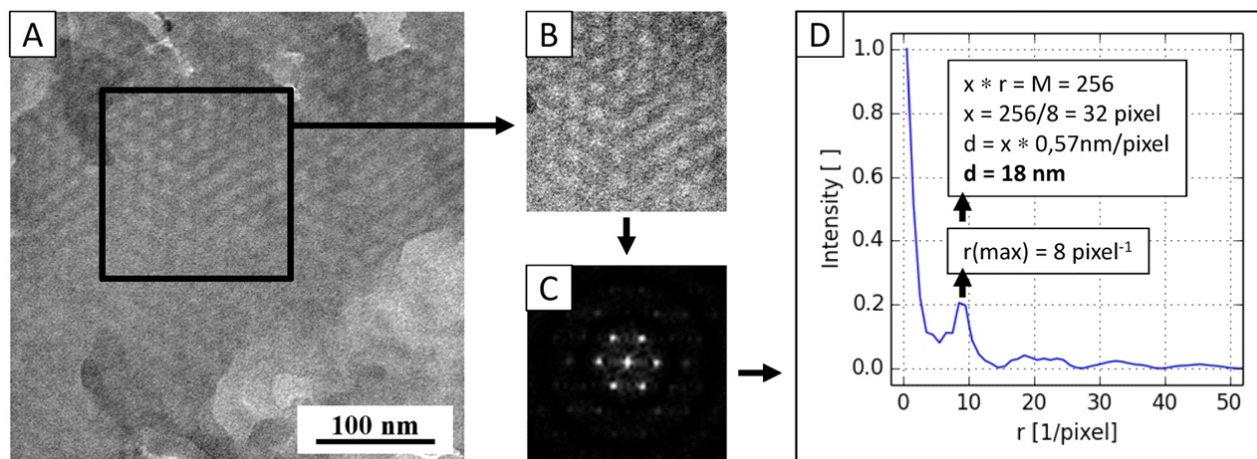
Obrazová analýza s využitím FT: příklady z praxe

První příklad (obr. 1) ukazuje využití jednorozměrné diskrétní rychlé Fourierovy transformace (1D-DFFT) pro určení periodicity ve vzorku blokového kopolymery polystyren-*b*-poly(styren-co-akrylonitril) s lamelární strukturou (polymer PS-*b*-SAN; [6]). Z kusového vzorku byl nejprve připraven ultratenký řez (tloušťka 50 nm) pomocí ultramikrotomie (diamantový nůž, chlazení kapalným dusíkem). Jednotlivé složky byly odlišeny kontrastováním v parách RuO₄ a struktura byla zobrazena pomocí TEM (obr. 1a). Z TEM mikrofotografie byl získán čárový profil intenzity signálu napříč lamelami pomocí programu ImageJ (obr. 1b). Ze zmíněného profilu byla pomocí skriptu v programu Python vypočtena 1D-DFFT (obr. 1c, d), přičemž hlavní frekvence v FT obrazu odpovídala 0,041 nm⁻¹, což po přepočtu odpovídalo průměrné periodické vzdálenosti mezi lamelami $d = 1/0,041 = 24$ nm, která byla v dobré shodě jak s TEM mikrofotografiemi, tak s teoretickou předpovědí.

Druhý příklad (obr. 2) demonstruje využití dvourozměrné diskrétní rychlé Fourierovy transformace (2D-DFFT) pro názorné potvrzení šesterečné symetrie a periodicity ve vzorku blokového kopolymery P(MMA-co-GMA)-*b*-PMAPOSS [6]. Ze vzorku byl opět připraven ultratenký řez, který byl po kontrastování zobrazen v TEM,



Obrázek 1. Určení periodicity lamel v PS-*b*-SAN: (a) TEM mikrofotografie, (b) čárový profil intenzity v programu ImageJ a (c, d) výstup ze skriptu v programu Python – načtený profil, jeho 1D-DFFT a výpočet periodické vzdálenosti.

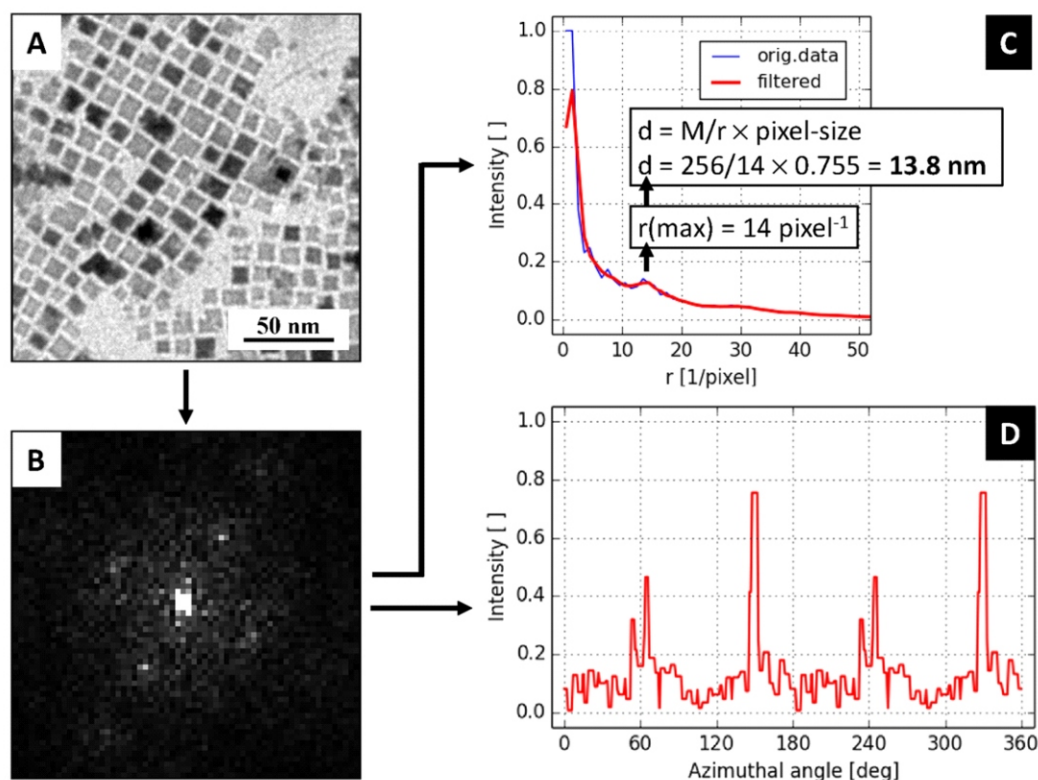


Obrázek 2. Potvrzení hexagonální struktury v P(MMA-co-GMA)-b-PMAPOSS: (a) TEM mikrofotografie, (b) vybraná oblast, (c) 2D-FFT z vybrané oblasti, 4x zvětšeno a (d) 1D radiální profil s výpočtem vzdálenosti d mezi sloupci.

analogicky jako v předchozím příkladu. Nízkoúhlový rozptyl paprsků X (SAXS) naznačoval, že by polymer měl vykazovat hexagonální strukturu. V některých oblastech TEM mikrofotografií byla hexagonální struktura zčásti patrná (obr. 2a), ale kontrast byl velice malý a ani úpravy v programu ImageJ příliš nepomohly (obr. 2b). Proto byl vybraný obrázek v ImageJ binarizován, v programu Python vypočtena 2D-FFT (obr. 2c) a následně i 1D radiální distribuce (obr. 2d). Symetrie 2D-FFT obrazu jasně potvrdila hexagonální symetrii, zatímco z 1D radiální

distribuce bylo možno vypočítat průměrnou vzdálenost mezi hexagonálně uspořádanými sloupci ($d = 18$ nm), která byla ve shodě s výsledky SAXS ($d = 20$ nm).

Třetí příklad (obr. 3) je rozpracovaná úloha, v níž se pokoušíme pomocí obrazové analýzy s využitím FT charakterizovat stupeň samouspořádání monovrstev anorganických nanočástic. Jeden z testovacích případů – kubické nanočástice CeO_2 – ukazuje výchozí TEM mikrofotografie (obr. 3a). Ze zdrojové mikrofotografie (obr. 3a) byl vypočten 2D-FFT obraz (obr. 3b), který jsme následně



Obrázek 3. Charakterizace samouspořádání CeO_2 nanočástic na tenkém uhlíkovém filmu: (a) TEM mikrofotografie, (b) 2D-FFT obraz celé mikrofotografie, z něhož je ukázána 4x zvětšená centrální část, (c) radiální profil s výpočtem průměrné periodické vzdálenosti d mezi nanočásticemi, (d) azimutální profil potvrzující čtvercové samouspořádání.



přepočítali na radiální distribuci (obr. 3c) a azimutální distribuci (obr. 3d). Zatímco přímý obraz (obr. 3a) nám poskytl jen kvalitativní informaci, na FT obrazu (obr. 3b) bylo možno pozorovat slabé píky v charakteristickém čtvercovém uspořádání, které bylo možno dále kvantifikovat: z polohy píku na radiální distribuci byla dopočtena průměrná periodická vzdálenost mezi částicemi (obr. 3c) a pravidelné opakování píků na azimutální distribuci intenzit potvrdilo tendenci nanokostek CeO_2 uspořádat se do čtvercové mřížky (obr. 3d). Přitom intenzita a šířka píků v grafu azimutální distribuce zřejmě souvisí se stupněm samouspořádání nanočástic. Tímto způsobem plánujeme v budoucnu charakterizovat stupeň samouspořádání u dalších typů nanočástic.

Závěr

Fourierova transformace je jedním z nástrojů obrazové analýzy. Hlavním cílem obrazové analýzy je extrahovat číselné informace z obrázků, v našem případě mikrofotografií. FT se nevyužívá příliš často, ale při vhodném použití poskytuje cenné kvantitativní informace a navíc elegantní, názorné výstupy. V tomto příspěvku jsme stručně popsali uživatelsky definovatelné, flexibilní metody výpočtu FT pomocí programovacího jazyka Python, nastínili základní teorii FT související s analýzou obrazu a uvedli několik příkladů z praxe. Další aplikace (seřizování astigmatismu, semikrystalické polymery aj.) jsou uvedeny

v elektronické verzi přednášky [4]. V souhrnu můžeme konstatovat, že FT analýza mikrofotografií může významně pomoci při charakterizaci periodických vzdáleností a symetrie uspořádání materiálů v mikroskopické škále (stovky mikrometrů – jednotky nanometrů).

Literatura

1. Domovská stránka programu ImageJ: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
2. Hlavní stránka programovacího jazyka Python: <https://www.python.org/>.
3. Hlavní stránka distribuce WinPython, včetně modulů: <http://winpython.sourceforge.net/>.
4. Odkaz na elektronickou verzi přednášky a použité programy, včetně modulu `mfft_utils.py`: http://www.imc.cas.cz/vymena/morpho_data/IMA-FFT/000index.htm.
5. Hlavní stránka modulu SymPy: <http://sympy.org/en/index.html>.
6. D. Gromadzki, J. Lokaj, M. Šlouf, P. Štěpánek, *Polymer* **50**, (2009), 2451.
7. L. Matějka, M. Janata, J. Pleštil, A. Zhigunov, M. Šlouf, *Polymer* **55**, (2014), 126.

Acknowledgements

TAČR TE01020118, GAČR P108/14-17921S.