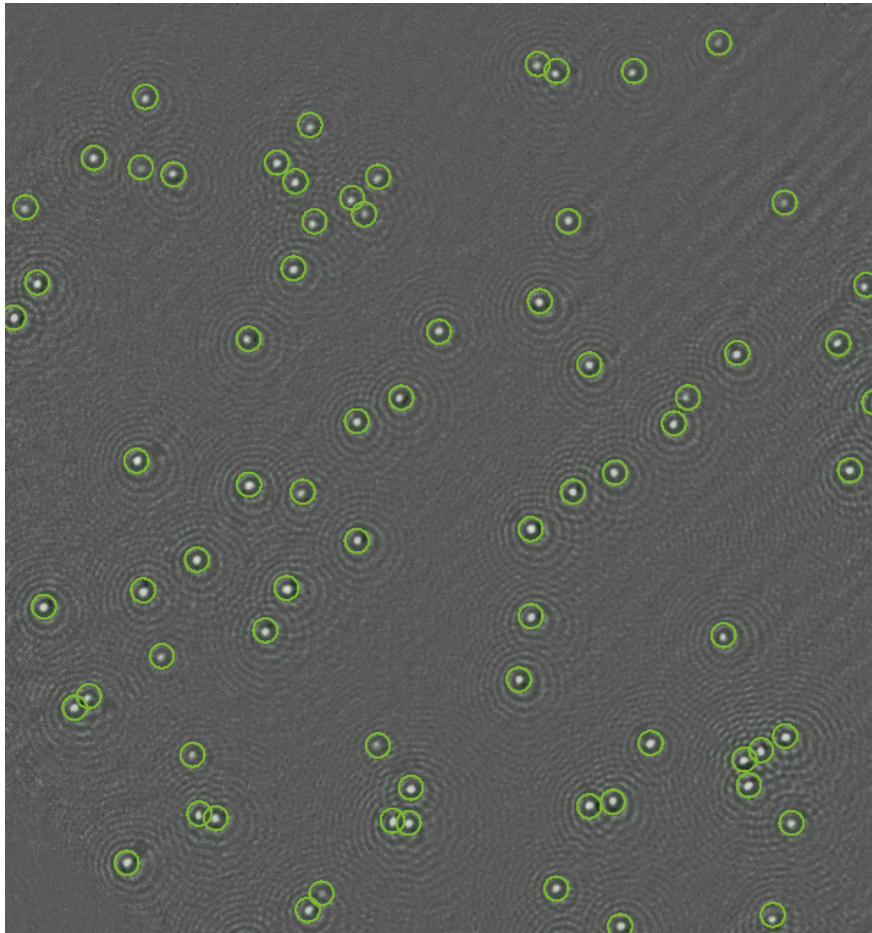




CHALMERS



GÖTEBORGS UNIVERSITET



Spårning av nanopartiklar med iSCAT och maskininlärning

MALTE AHLKOG, OSKAR ALBERS, KARL JUNIOR ANDERSSON
ADAM BERGER, ARAM JAMAL, KERMEND MURIQI

INSTITUTIONEN FÖR FYSIK

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg 2024
www.chalmers.se

KANDIDATARBETE 2024

Spårning av nanopartiklar med iSCAT och maskininlärning

Nanoparticle tracking with iSCAT and machine learning

MALTE AHLKOG, OSKAR ALBERS, KARL JUNIOR ANDERSSON
ADAM BERGER, ARAM JAMAL, KERMEND MURIQI



GÖTEBORGS
UNIVERSITET



CHALMERS

Institutionen för Fysik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
GÖTEBORGS UNIVERSITET
Göteborg 2024

SPÅRNING AV NANOPARTIKLAR MED iSCAT OCH MASKININLÄRNING
Malte Ahlskog, Oskar Albers, Karl Junior Andersson
Adam Berger, Aram Jamal, Kelmend Muriqi

© MALTE AHLKOG, OSKAR ALBERS, KARL JUNIOR ANDERSSON
ADAM BERGER, ARAM JAMAL, KELMEND MURIQI, 2024.

Handledare: Daniel Midtvedt, Institutionen för fysik
Examinator: Magnus Hörnqvist Colliander, Institutionen för fysik

Kandidatarbete 2024
Institutionen för fysik
Chalmers Tekniska Högskola
SE-412 96 Göteborg
Telefon +46 31 772 1000

Omslagsbild: Partikeldetektioner utförda med LodeSTAR-metoden på experimentell data.

Skriven i L^AT_EX
Göteborg 2024

Sammanfattning

Denna studie undersöker spårning av partiklar i storlek 100 nm från iSCAT-mikroskopi i två och tre dimensioner med maskininlärnings- och algoritm-baserade spårningsmetoder. Arbetet jämför noggrannheten av förutsägelser av partikelpositioner i två dimensioner mellan LodeSTAR-metoden och Radial Variance Transform algoritmen (RVT), hur dessa förutsägelser påverkar skapandet av partikelbanor med MAGIK och hur partiklarnas diffusivitet beror på den valda detektionsmetoden. För att möjliggöra förutsägelser i djupled anpassades den tredimensionella LodeSTAR-modellen för att tränas på syntetiserade bilder av partiklar på olika djup. Noggrannheten av LodeSTAR-metoden i tre dimensioner utvärderades genom att jämföra diffusivitet hos förutsagda partikelbanor från experimentell data med deras teoretiska värden, samt genom analys av banor och deras kovarianser i djupled. Resultaten för den tvådimensionella LodeSTAR-modellen visar att RVT, utifrån kovariansanalys, ger fler detektioner som resulterar i Brownsk rörelse för partiklarna, men att LodeSTAR presterar bättre i antal korrekt förutsagda partiklar och spårning över längre tidsförlopp. Däremot ger båda detektionsformer sämre resultat när partiklarna varierar avsevärt i form och storlek. Vidare tyder jämförelser av diffusivitet, kovarians och partikelbanor för tredimensionell detektion på att LodeSTAR-metoden extraherar information om partikeldjup, men att detektionerna saknar noggrannhet. Det föreslås att förbättring av den syntetiserade datan för att närmare efterlikna partiklar i djupare brunnar skulle ge mer precisa resultat. Sammanfattningsvis visar LodeSTAR-metoden lovande framtida potential för att spåra partiklar i tre dimensioner från iSCAT-bilder.

Abstract

This study explores the tracking of particles of size 100 nm from iSCAT microscopy in two and three dimensions with machine learning and algorithm-based tracking methods. The study compares the accuracy of particle position predictions in two dimensions between the LodeSTAR method and the Radial Variance Transform algorithm (RVT), how these predictions influence the creation of particle trajectories with MAGIK, and how the diffusivities of particles depend on the chosen detection method. Furthermore, the three-dimensional LodeSTAR method is modified to train on synthesized images of particles in varying depths in order to gain vertical prediction capabilities. The accuracy of the LodeSTAR method in three dimensions is evaluated by comparing the diffusivity of predicted particle trajectories from experimental data with their theoretical values, as well as through the analysis of trajectories and their covariances in the vertical dimension. The results for the two-dimensional LodeSTAR model indicate that RVT – based on covariance analysis – yields detections that indicate Brownian motion of the particles, but LodeSTAR performs better in terms of the number of correctly predicted particles and tracking trajectories over longer time periods. Furthermore, comparisons of diffusivity, covariance and particle tracings for three-dimensional detections suggest that the LodeSTAR method extracts information about particle depth, but that the detections lack accuracy. It is suggested that improving the synthesized data to better capture the particle shape in a greater depth range would yield more accurate results. In summary, the LodeSTAR method shows promising future potential for tracking particles in three dimensions from iSCAT microscopy footage.

Nyckelord: iSCAT, LodeSTAR, MAGIK, djupinläring, partikelspårning.

Beteckningar

Tabell 0.1: Lista av beteckningar med tillhörande förklaring och översättning

Beteckning	Förklaring	Översättning
CNN	Convolutional Neural Network	Fältningsnätverk
GNN	Graph Neural Network	Grafneurala nätverk
LodeSTAR	Localization and detection from Symmetries, Translations and Rotations	Lokalisering och detektion från symmetrier, translationer och rotationer
MAGIK	Motion Analysis through GNN Inductive Knowledge	Rörelseanalys genom induktiv kunskap från grafneurala nätverk
MLP	Multilayer Perceptron	Flerlayersperceptron
MoV	Mean of Variances	Medelvärde av varianser
NA	Numerical Aperture	Numerisk apertur
RVT	Radial Variance Transform	Radiell varians transform
ReLU	Rectified Linear Unit	Rektifierad linjär enhet
iSCAT	Interferometric scattering microscopy	Interferometrisk spridningsmikroskopi
TAMSD	Time-Averaged Mean Squared Displacement	Tidsmedelvärdat genomsnittlig kvadratförskjutning
VoM	Variance of means	Varians av medelvärden

Innehåll

Beteckningar	viii
1 Inledning	1
1.1 Syfte	2
1.2 Avgränsningar	2
2 Teknisk Bakgrund	3
2.1 Maskininlärning och neurala nätverk	3
2.2 Faltningsnätverk (CNN)	4
2.3 LodeSTAR	5
2.4 MAGIK	7
2.5 iSCAT	8
2.6 Bildgenerering med DeepTrack	8
2.7 Diffusivitet	9
2.8 Radial Variance Transform	10
3 Metod	13
3.1 Experimentell datainsamling	13
3.2 Bearbetning av experimentell data	14
3.3 Partikeldetektion i två dimensioner	14
3.3.1 Träning av LodeSTAR-nätverk	14
3.3.2 Radial Variance Transform	15
3.4 Partikelspårning med MAGIK	15
3.5 Träning och syntetisering för detektioner i tre dimensioner	16
4 Resultat	19
4.1 Partikelspårning i två dimensioner	19
4.1.1 Detektioner	19
4.1.2 Spårning	19
4.1.3 Diffusion	21
4.2 Partikeldetektioner i tre dimensioner	22
4.2.1 Träning med DeepTrack	23
4.2.2 Detektioner	23
4.2.3 Diffusion i z- och xy-led	24
5 Diskussion	27
5.1 Jämförelse av partikeldetektion och diffusivitetsmätningar mellan LodeSTAR och RVT	27
5.2 Analys av tredimensionell noggrannhet i partikelspårning med LodeSTAR	28
5.3 Förslag på metodförbättringar	29

5.3.1	Tvådimensionell spårning	29
5.3.2	Tredimensionell spårning	29
5.4	Från övervakad till övervakad inläring	30
5.5	Slutsatser	30
	Data- och kodtillgänglighet	31
	Litteraturförteckning	36

1

Inledning

Kvantitativ analys¹ genom digital mikroskopi har spelat en betydande roll för forskningen inom ett brett spektrum av naturvetenskapliga områden såsom biologi, kemi och fysik. Mikroskopi på nanonivå har möjliggjort spårning av organismer som virus [1], bakterier [2] och även cellstrukturer i levande celler [3] och därmed gett insikter i biologiska funktioner på nanonivå.

För observationer på nanonivå har fluorescensmikroskopi varit en av de vanligaste metoderna sedan 90-talet [4], [5], men den har svagheter. Metoden bygger på att en laborant märker objekt med fluorescens och därmed skapar en ljuskälla att studera i mikroskop, vilket medför en del begränsningar vid spårning av partiklar. Fotoblekning, att fluorescensen lyser svagare med tiden, och fluorescenssaturation, att antalet fotoner som sänds ut begränsas av objektets storlek, är två stora problem som resulterar i att observationstiderna och lokaliseringsprecisionen för fluorescensmikroskopi begränsas [6], [7]. Ytterligare kan fluorescensen skada partiklarna som studeras, framförallt inom biologiska sammanhang [8]. Denna sorts mikroskopi är alltså inte tillämpbar i vissa fall.

En lösning till dessa begränsningar presenteras med interferometrisk spridningsmikroskopi (iSCAT) som introducerades 2004 [9]. Den huvudsakliga princip som iSCAT nyttjar är att brytningsindex för ett studieobjekt skiljer sig från lösningen objektet befinner sig i. Förutom att det då inte förekommer fotoblekning eller fluorescenssaturation erbjuder iSCAT lika högupplösta bilder som fluorescensmikroskopi, kvantitativ karakterisering² av enskilda molekyler och en mikroskopi där laboranten inte behöver märka partiklar [10]. Med iSCAT har exempelvis högupplösta spårningar av virus (Simian virus 40) gjorts [6], utveckling av supramolekylära självreplikerande modeller av livsformer [11] och spårning av proteiner utsöndrade av levande celler [12].

Tekniken som möjliggör analys av partiklar på nanonivå är fortfarande relativt ny och därmed är många tillämpningsområden ännu inte utforskade. Hittills har studier av biologiska processer på nanonivå gett vetenskapliga framsteg inom nanotransporter [13] vilket ger nya möjligheter inom cancerforskning [14], diabetesforskning [15] och utvecklingen av vaccin, exempelvis mot COVID-19 [16], [17]. Tekniken ger även nya möjligheter för stamcells-nanoteknologi [18] samt för att utforska egenskaper hos nano-organismer så som virus och bakterier [6], [12]. Det finns många nanotillämpningar inom medicin och en bra metod att spåra partiklar är därmed av stor betydelse inom detta forskningsfält.

Inom analys av mikroskopisk data har maskininlärning visat sig vara särskilt effektivt [19]–[22]. Localization and detection from Symmetries, Translations and Rotations (LodeSTAR) är en djupinlärningsmetod som har använts för att träna neurala nätverk för partikeldetektion med högre precision än klassiska algoritmer [23]. Det är även visat att maskininlärning kan uppnå en bättre precision

¹Kvantitativ analys är en metod för att utvärdera situationer, fenomen eller data genom kvantitativa, det vill säga mätbara och numeriska, metoder.

²Här: Att använda mätbara numeriska data för att definiera egenskaper hos en molekyl såsom molekylär struktur eller dynamiska egenskaper.

än klassiska algoritmer för partikelspårning [24], [25]. Partikelspårning av fluorescensmikroskopi med hjälp av maskininlärning har gjorts bland annat av Pineda et al. [26] där Motion Analysis through GNN Inductive Knowledge (MAGIK) tillämpades, ett maskininlärningsramverk som kan skapa partikelbanor över flera bildrutor och därmed ge information om partiklars dynamiska egenskaper.

Att använda iSCAT-teknik för att samla mikroskopibilder av biologiska material för att sedan analysera dessa bilder med maskininlärning kan ge en förbättrad förståelse för nanotransport och nanomedicin vilket i sin tur gynnar forskning inom vaccnutveckling, cancer och diabetes.

1.1 Syfte

Syftet med arbetet är att undersöka hur maskininlärningsmetoden LodeSTAR kan tillämpas för att detektera och spåra partiklar i två och tre dimensioner med diametrar ner till 100 nm i bilder tagna med iSCAT-mikroskopi.

1.2 Avgränsningar

För att härleda egenskaper hos partiklar, såsom diffusivitet, genomförs separata numeriska beräkningar åtskilt från maskininlärningsmetoderna. Härledning av partikelegenskaper skulle kunna göras via MAGIK, om modellen tränats för detta ändamål. Träningen kräver dock mycket tid och arbete som med fördel läggs på andra problem, exempelvis partikeldetektion.

En tydlig avgränsning görs vid utvärdering av partikeldetektioner i två dimensioner med hjälp av LodeSTAR, i det avseendet att detektionerna jämförs med den klassiska algoritmen Radial Variance Transform (RVT). Utvärdering av dessa två metoder begränsas till uträkning av diffusivitet baserat på detektionerna och jämförelse med de teoretiska värdena för partiklarna. Manuell märkning utesluts som metod för jämförelse då antalet partiklar och bilder är överväldigande, men även eftersom detta i vissa fall inte är välmotiverat utifrån brusförhållanden, där manuell märkning är svår och opålitlig.

2

Teknisk Bakgrund

I detta avsnitt förklaras teorin bakom de viktigaste koncepten som används i arbetet. Först introduceras grundläggande begrepp och principer inom maskininlärning och neurala nätverk. Därefter förklaras LodeSTAR-metoden ingående och hur den kan användas för att förutsäga både två- och tredimensionella partikelpositioner. Vi beskriver sedan kortfattat principerna bakom hur MAGIK och iSCAT-mikroskopi fungerar. Vidare förklaras bildgenereringen samt hur de tränade neurala nätverken, som även kallas modeller, utvärderas med hjälp av diffusivitet och algoritmen Radial Variance Transform (RVT).

2.1 Maskininlärning och neurala nätverk

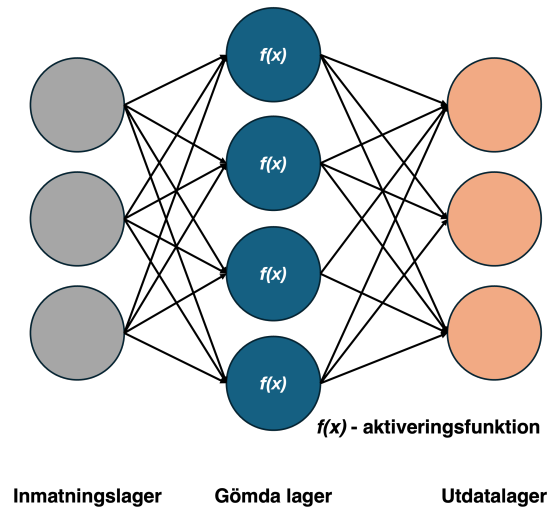
Maskininlärning är en gren av artificiell intelligens som fokuserar på att bygga system som kan lära sig från data för att göra förutsägelser på annan liknande data. Denna studie kommer använda sig av maskininlärning i form av neurala nätverk, som flerlayersperceptroner (MLP), neurala faltningsnätverk (CNN) och neurala grafnätverk (GNN).

Neurala nätverk utgörs vanligtvis av ett indatalager, ett antal gömda lager och ett utdatalager. De gömda lagren innehåller vikter och aktiveringsfunktioner [27]. Vikterna justeras under nätverkets träning för att uppnå en viss funktionalitet och aktiveringsfunktionens syfte är ofta att introducera icke-linjäritet i träningen, vilket gör det möjligt för nätverket att lära sig och utföra mer komplexa uppgifter än vad som skulle vara möjligt med enbart linjära operationer [28]. Antalet gömda lager varierar beroende på komplexiteten av uppgiften som nätverket ska kunna utföra; fler gömda lager tillåter ett nätverk att lära sig mer komplexa samband, men medför också större krav på beräkningskraft och minne samt ökar risken för överträning [27]. Ett neuralt nätverk med fler än ett gömt lager klassificeras som ett djupt neuralt nätverk [29], [30], vilket är den typ av nätverk som används i både MAGIK och LodeSTAR. Ett exempel på ett neuralt nätverk med ett indatalager, ett gömt lager och ett utdatalager, i det här fallet i form av en MLP, ges i Figur 2.1.

Vid träning av neurala nätverk är det felet i nätverkets förutsägelser, förlusten, som avgör hur mycket vikterna ska justeras. Ett av de vanligare sätten att beräkna förlusten på är att beräkna den absoluta skillnaden i värde $|y_{\text{pred}} - y_{\text{true}}|$ mellan förutspått värde y_{pred} och önskat värdet y_{true} [31]. Hur y_{true} tas fram beror på om maskininlärningsmetoden är övervakad eller självövervakad [32]. Övervakad inlärning innebär att nätverket jämför sin förutsägelse med ett facit givet från laboranten, en metod som tillämpas i MAGIK. I självövervakad inlärning däremot, skapar nätverket ett facit att jämföra med baserat på indatan, vilket är fallet för den självövervakade inlärningsmetoden LodeSTAR.

Aktiveringsfunktionen som används i detta arbetes nätverk är Rectified Linear Unit (ReLU)-funktionen, se funktionens formulering i ekvation 2.1. ReLU-funktionen väljs över andra aktiveringsfunktioner då den har visat sig vara väl lämpad för träning av djupa neurala nätverk [33].

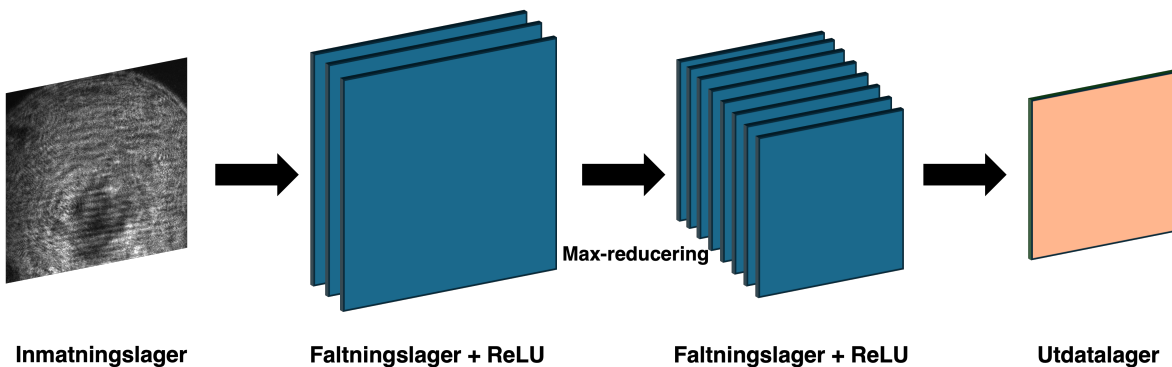
$$f(x) = \max(0, x). \quad (2.1)$$



Figur 2.1: Exempel på en flerlayersperceptron (MLP) med ett gömt lager. Inmatningslagret består av ett antal noder som tar emot datapunkter som sedan sänds vidare till det gömda lagret. I det gömda lagret används en aktiveringsfunktion för att behandla datan innan den skickas vidare. Slutligen levereras den processade datan till utdatalagret.

2.2 Faltningsnätverk (CNN)

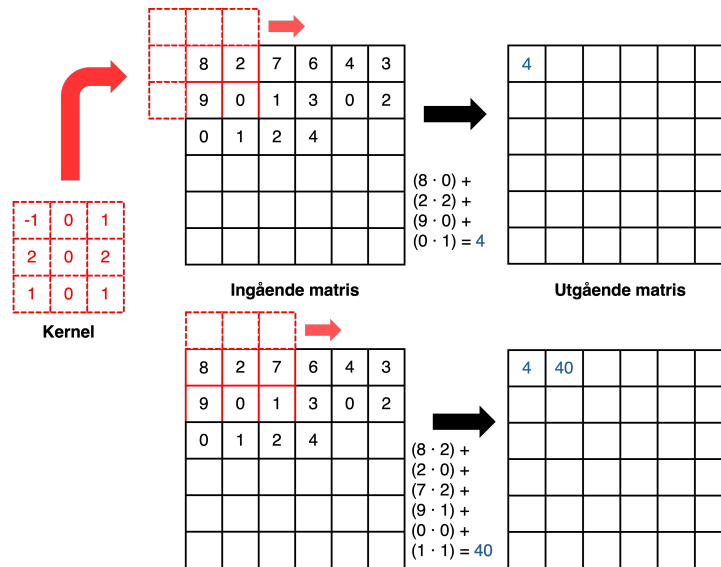
Faltningsnätverk är en typ av neuralt nätverk som är väl lämpat för mönsterigenkänning i bilder [34], [35]. I detta arbete kommer ett neuralt faltningsnätverk (CNN) tränas för att extrahera partikelkoordinater från mikroskopibilder i gråskala. Det CNN som används i detta arbete består av faltningslager, ReLU-aktiveringslager och reduceringslager i en konfiguration som kan ses i Figur 2.2. De olika lagrens respektive funktion beskrivs nedan.



Figur 2.2: En illustration över den CNN-arkitektur som används i detta arbete. Tre på varandra följande faltningslager med varsitt ReLU-aktiveringslager. Därefter följer ett reduceringslager, ytterligare åtta faltningslager med varsitt ReLU-aktiveringslager och slutligen ett sista faltningslager utan ReLU-aktivering som utlager.

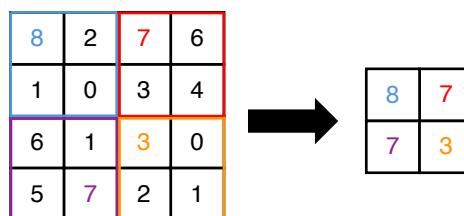
Ett CNN anpassat för bildbehandling i gråskala tar in en bild i form av en tvådimensionell tensor, där varje värde representerar en pixels intensitet. Mönster extraheras genom elementvis multiplikation och sedan summering mellan bildtensorn och en viktensor i en process som kallas för faltning. Faltningen sker svepande över bildtensorn tills en egenskapstensor har bildats vilken representerar de specifika egenskaper som viktensorn har detekterat, se Figur 2.3. Nätverket lär sig urskilja egenskaper genom att viktensorns element justeras via bakåtpropagation, en metod där nätverket iterativt justerar sina vikter baserat på hur varje vikt i nätverket har bidragit till förlusten [32], [36].

Reduceringslagret, som följer efter de tre första faltningslagren i Figur 2.2, minskar antalet parametrar



Figur 2.3: Exempel på operationen ett faltningsslag utför på en bildtensor. Varje element i viktensorn multipliceras med motsvarande i bildensorn. Dessa värden adderas sedan för att bilda det första elementet i egenskapstensorn. Sedan flyttas viktensorn ett steg och upprepar processen. De element som inte hamnar inom ramen för viktensorn ignoreras i beräkningen.

och beräkningar som krävs i nätverket. Reduceringen hjälper till att effektivisera nätverket och minska risken för överanpassning¹. Den typ av reduktion som används i detta arbete, max-reducering, tar maxvärdet av en viss region av den ingående tensor och placerar värdet i en ny tensor som har mindre dimensioner [32]. Processen liknar faltning, men operationen som utförs är en annan, se Figur 2.4. I detta arbete begränsas nätverket till att innehålla endast ett reduceringslager i syfte att bibehålla tillräcklig spatial information för lokalisering av partiklar med hög precision.



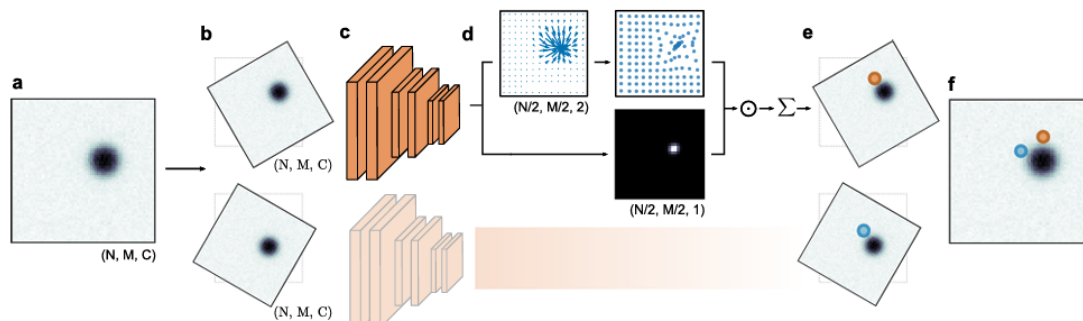
Figur 2.4: Exempel på max-reducering. Likt faltning skannas tensorn ett steg i taget, här med steglängd två, för att plocka ut det största värdet inom en given region. På så sätt bevaras informationen men antalet parametrar minskar, vilket effektiviserar nätverket.

2.3 LodeSTAR

Localization and Detection from Symmetries, Translations and Rotations (LodeSTAR) är en självövervakad maskininlärningsmetod som används för att detektera partiklar, genom att träna ett CNN att bli ekvivariant till vissa transformationer, vanligtvis translationer och rotationer i bildplanet. Ekvivarians i detta sammanhang innebär att ett neuralt nätverk ska ge samma partikelposition i en transformerad bild som en transformerad partikelposition från den ursprungliga bilden, givet att transformerna är

¹Överanpassning inträffar när en modell lär sig både den underliggande strukturen och slumpmässiga variationer (brus) i träningsdata, vilket gör att den presterar sämre på ny data.

lika. Principen är att om ekvarians ska uppnås behöver nätverket hitta något i bilden att detektera, och eftersom nätverket kan tränas att bli ekvariant kan det tränas att detektera partiklar. Ett träningssteg illustreras i Figur 2.5.



Figur 2.5: a) Exempel på en bild som ska användas för att träna nätverket. b) Två kopior skapas och roteras samt translateras på olika sätt. c) Bilderna propagerar genom två identiska CNN. d) Ett nätverk ger ut två egenskapstensorer. e) De två egenskapstensorerna slås samman för att inferera positionen hos partikeln. f) Bilderna roteras och translateras tillbaka till initiala positionen och prediktionerna kan jämföras. Nätverket tränas för att minimera avståndet mellan dessa. Bild tagen från [23] och beskuren så att bilden endast visar funktionaliteten av LodeSTAR.

Det neurala nätverk som tränas med LodeSTAR kan se ut på olika sätt; i detta arbete används det som föreslagits av skaparna till metoden [23]. Nätverket är ett CNN med tre $3 \times 3 \times 32$ faltningsslager med ReLU-aktivering, följt av ett 2×2 max-reduceringslager, sedan åtta $3 \times 3 \times 32$ faltningsslager med ReLU-aktivering och slutligen ett faltningsslager utan ReLU-aktivering. Det sista lagrets dimensioner är $1 \times 1 \times 4$ för detektioner i tre dimensioner och $1 \times 1 \times 3$ för detektioner i två dimensioner. Indatan är en bild i form av en $M \times N$ tensor medan utdatan består av mängden $\{\chi^c\}_{c=0}^n$. I fallet då $n = 2$ (som för tvådimensionell partikeldetektion) är $\rho := \chi_0$ en vikttensor och χ_1 samt χ_2 kan tolkas som två avståndstensorer Δx och Δy . Avståndstensorernas element representerar avståndet till partikeln position i respektive led, givet att elementet är tillräckligt nära för att detektera partikeln, annars sätts värdet slumpmässigt. Vikttensorn ρ innehåller information om hur varje element i avståndstensorerna bidrar till den slutgiltiga prediktionen.

Nätverket tränas genom att transformera träningsbilderna och sedan jämföra de inverstransformerade partikelpositionerna med varandra. För varje epok² skapas bildsamlingar med slumpmässiga transformationer τ_θ av varje träningsbild, så att en bildsamling endast består av en träningsbild. Varje transformerad bild k i en sådan bildsamling propagerar sedan genom nätverket och tensorerna χ^1 och χ^2 från utdatan definieras om enligt

$$\chi_{kij}^1 + il - N/2 \rightarrow \chi_{kij}^1 \quad (2.2)$$

$$\chi_{kij}^2 + jl - M/2 \rightarrow \chi_{kij}^2, \quad (2.3)$$

där $l = 2$ är en faktor som skalar upp positionerna i χ_k^1 och χ_k^2 från att det reducerats av max-reduceringen, och i samt j är elementindex i tensorerna. För varje utdatakanal $c \neq 0$ beräknas härnäst den normerade viktade summan enligt

$$\bar{\chi}_k^c = \frac{\sum_{i,j} \chi_{kij}^c w_{ij}}{\sum_{i,j} w_{ij}}, \quad (2.4)$$

²En epok är en fullständig genomgång av alla träningsbilder genom nätverket.

med de normaliserade vikterna definierade som

$$w_{ij} = \frac{\rho_{ij} + \epsilon}{\sum_{i,j} [\rho_{ij} + \epsilon]} : \epsilon = 10^{-5}. \quad (2.5)$$

Slutligen bakåtpropageras en total förlust bestående av förlusten mellan bilderna \mathcal{L}_a^c och den inre förlusten \mathcal{L}_b^c som en viktad summa $\mathcal{L}_a^c + 10\mathcal{L}_b^c$. Dessa förluster beräknas enligt

$$\mathcal{L}_a^c = \sum_{k=1}^K \left[\tau_{\theta_k}^{-1}(\bar{\chi}_k^c) - \frac{\sum_{i=1}^K \tau_{\theta_k}^{-1}(\bar{\chi}_i^c)}{K} \right] \quad (2.6)$$

$$\mathcal{L}_b^c = \sum_{k,i,j}^{K,N,M} |\chi_{kij}^c - \bar{\chi}_k|^2 w_{kij}, \quad (2.7)$$

där K är antalet transformationer i en bildsamling för en träningsbild.

Ett tränat nätverk detekterar partiklar i bilder genom att beräkna en slags poängtensor från bilden och hitta lokala maxima. Denna poängtensor beräknas som $w^\alpha b^{\beta 3}$ genom den normerade viktensorn w och klustertensorn b vars element definieras enligt

$$b_{ij}^{-1} = \sum_{c=1}^n \left[\left(\sum_{j'=j-1}^{j+1} \sum_{i'=i-1}^{i+1} \frac{\chi_{i'j'}^c}{9^2} \right) - \left(\sum_{j'=j-1}^{j+1} \sum_{i'=i-1}^{i+1} \frac{\chi_{i'j'}^c}{9} \right)^2 \right]. \quad (2.8)$$

Oftast sätts $\alpha = 1 - \beta$ och i denna studie har både α och β satts till 0,5 för att ge lika mycket vikt till båda. Alla lokala maxima antas inte vara partiklar, utan vanligtvis specificeras ett tröskelvärde som de måste vara större än.

2.4 MAGIK

Motion Analysis through GNN⁴ Inductive Knowledge (MAGIK) är ett ramverk som via grafer modellerar dynamiska egenskaper i ett system, mer specifikt rörelser och interaktioner [26]. MAGIK är uppbyggt av flera olika nätverk, encodernätverken ϕ_ν och ϕ_e , följt av ett mellansteg med uppdatering av noder och kanter och slutligen decodernätverken φ_ν , φ_e och φ_g . Inmatningen i nätverken ϕ_ν och ϕ_e består dels av noderna ν , som innehåller information om position i tid och rum samt andra karakteriserande egenskaper, och kanterna ε , som kopplar ihop noderna samt innehåller information om avståndet och tiden mellan dem. Kanterna ε skapas genom att koppla ihop en viss nod till andra noder inom ett visst avstånd i rum och tid.

Först konverteras noderna och kanterna via encodernätverken ϕ_ν och ϕ_e till vektorer av högre dimensioner. Kanterna uppdateras sedan genom att propagera genom en MLP med deras två kopplade noder och därefter viktas kanterna med funktionen:

$$f_w(d_{ij}) = \exp \left(- \left(\frac{d_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)^\beta \right), \quad (2.9)$$

där d_{ij} är en kantegenskap som representerar avståndet mellan två noders positionsegenskaper och σ samt β är parametrar som lärs via träning. Vidare uppdateras noderna med hjälp av de nya viktade

³Element i den nya tensorn blir $b_{ij}^\alpha \cdot b_{ij}^\beta$.

⁴Graph Neural Network; ett nätverk som processerar och matar ut grafnätverk såsom noder och kanter.

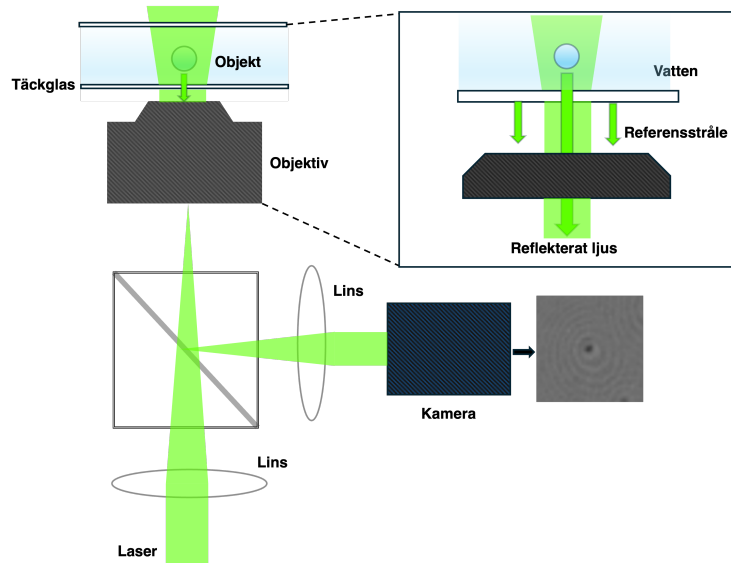
kanterna och Attention. Attention är en nätverksstruktur som ger ett mått på vilken indata som korrelerar till varandra för att producera utdata, som i det här fallet är vilka noder som korrelerar.

Till sist extraheras en förutsägelse för noderna och kanterna via decodernätverken φ_v och φ_e , samt för en global representation via decodernätverket φ_g . Även dessa nätverk är MLPs, där φ_v och φ_e är reflektioner av encodernätverken med en tillagd aktiveringsfunktion som avslut. Utifrån de förutsedda noderna och kanterna, går det att extrahera partikelbanor i ett tidsförlopp [26].

2.5 iSCAT

Interferometisk spridningsmikroskopi (iSCAT) är en optisk mikroskopi som utnyttjar fasskillnader mellan det spridda ljuset från ett objekt och en referensstråle. En exempeluppställning visas i Figur 2.6. Där belyses ett prov underifrån med en laser genom ett objektiv. Det reflekterade ljuset från täckglaset används som referensstråle för att skapa interferens med det reflekterade ljuset från provet [37].

För att generera en bild med iSCAT leds referensstrålen och den bakåtspridda strålen från provet till en kamera. När den bakåtspridda strålen möter referensstrålen uppstår destruktiv och konstruktiv interferens mellan strålarna. Variationer i intensitet från interferensen skapar en bild där objekt representeras av pixlar med avvikande värden jämfört med bakgrundsstrålningen. Objekt visualiseras därmed som interferensringar, se nere till höger i Figur 2.6.



Figur 2.6: Typisk uppställning för iSCAT-mikroskopi. En laser propagerar genom en stråldelare, så att en del av ljuset reflekteras åt vänster medan resten transmitteras till objektivet och objektet. Delar av ljuset reflekteras vid täckglaset och bildar en referensstråle och en liten del av ljuset sprids mot objektet i brunnen så att ljuset reflekteras tillbaka mot kameran (höger uppe). Laserljuset spritt från objektet och referensstrålen superpositioneras sedan så att totala intensiteten tas upp av kameran och producerar en bild av objektet. Inspiration hämtad från [37].

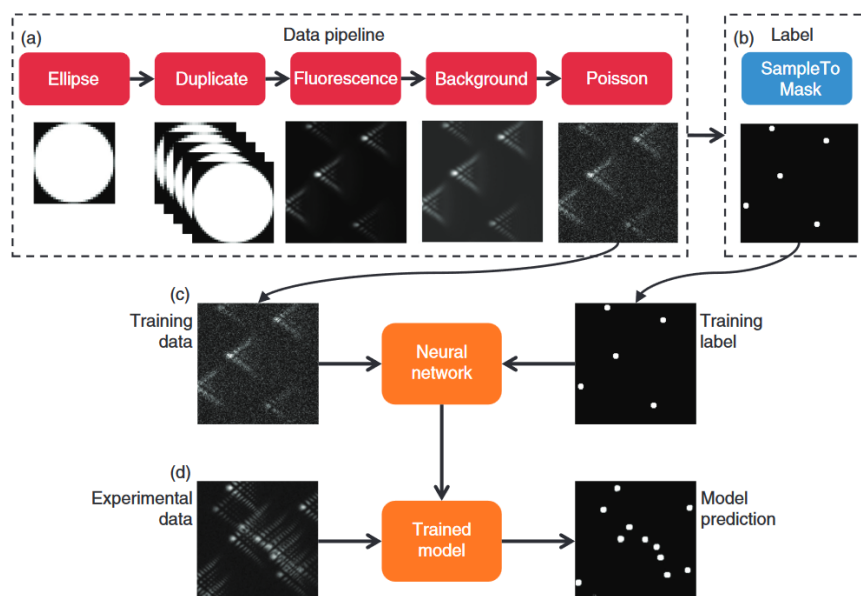
2.6 Bildgenerering med DeepTrack

För bildgenerering används python-biblioteket DeepTrack [24], ett mjukvaruprogram som skapar artificiella mikroskopibilder för att träna neurala nätverk för partikeldetektion. DeepTrack har kapaciteten

att producera en stor mängd bilder av partiklar som kan anpassas för att efterlikna experimentell data producerat med olika mikroskopimetoder. Tillsammans med bilderna kan även tillhörande partikelpositioner fås ut, vilka kan användas vid övervakad träning av nätverk.

DeepTrack genererar bilder genom att först skapa en form för varje partikel, som sedan dupliceras för att kunna modifieras var för sig. Parametrar kan väljas så att partiklarna har olika storlek, form och position. De framställda partiklarna skickas till en simulator som återskapar de optiska effekterna av ett förvalt typ av mikroskop. Brus läggs sedan till i bilden för att den ska efterlikna experimentell data. De duplicerade bilderna av partiklarna kan sedan användas för att skapa den förväntade utdatan som behövs för träningsprocessen [24], se Figur 2.7.

I detta arbete används DeepTrack för att skapa bilder som liknar den experimentella datan tagna med iSCAT-mikroskopi. LodeSTAR-nätverket tränas med transformationer av de genererade bilderna, vilket begränsar behovet att generera en stor mängd bilder under träningsprocessen.



Figur 2.7: Ett visuellt exempel på hur DeepTrack genererar bilder. a) En partikel genereras och dupliceras. Partiklarna genomgår en simulation för en given mikroskopimetod för att sedan läggas på en bakgrund där ett bakgrundsbrus appliceras. b) En märkning av datan extraheras för att användas i träningsprocessen. c) Här visas hur den genererade bilden samt märkningen används i träningsprocessen av nätverket. d) Den experimentella datan skickas in i den tränade modellen och den ger en förutsägelse för partiklarna. Bild tagen från [24].

2.7 Diffusivitet

Små partiklar rör sig slumpmässigt enligt Brownsk rörelse och drivs i huvudsak av termisk energi. Ett mått på dessa rörelser är diffusion, som teoretiskt kan uppskattas med ekvation (2.10), och anger hur mycket en partikel rör sig.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r}. \quad (2.10)$$

Här betecknar k_b Boltzmanns konstant, T rumtemperaturen, η den dynamiska viskositeten för vatten och r partiklarnas radie. Ekvation (2.10) är den så kallade Stokes-Einstein-Rutherford ekvationen. I detta arbete är partiklarnas radie $r = 50$ nm, temperatur $T = 21$ °C och $\eta = 0,9764$ mPas, vilket ger

ett värde för diffusiviteten som $D = 4,41 \mu\text{m}^2/s$.

Ett sätt att mäta diffusivitet från digitalt spårade partiklar är genom den tidsmedelvärdesbildade genomsnittliga kvadratförskjutningen (TAMSD), vilket tillåter beräkning av diffusion från en ensam partikel. Givet att partikelns bana består av N positioner i följd, $\mathbf{X}_1, \mathbf{X}_2, \dots, \mathbf{X}_N$, där varje position är separerad med ett tidsintervall Δt , är TAMSD [38], [39] definierad som:

$$\text{TAMSD}(\Delta t) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} (\mathbf{X}_{i+1} - \mathbf{X}_i)^2. \quad (2.11)$$

För partiklar som uppvisar Brownsk rörelse kan förhållandet mellan partikelns TAMSD och diffusionskonstant D visas vara

$$\text{TAMSD}(\Delta t) = 2dD\Delta t, \quad (2.12)$$

där d är antalet rumsdimensioner [40].

Efter att ha förutspått en samling partikelbanor från mikroskopivideo kan en genomsnittlig diffusionskonstant D bestämmas genom partiklarnas TAMSD, givet att de uppvisar Brownsk rörelse. Jämförelse av parametern D med det uträknade teoretiska värdet möjliggör utvärdering av spårningens noggrannhet.

En annan egenskap som utvärderar noggrannhet av partikelbanor är kovariansen mellan förflyttningar $\overline{\Delta x_n \Delta x_m}$ [41]. Kovariansens karakteristiska egenskap vid fri diffusion är att $\overline{\Delta x_n \Delta x_m} \approx 0$, där Δx_n är en viss förflyttning $x_n - x_{n-1}$ längs en axel x och index n, m indikerar två skilda bildrutor i en sekvens. Att det nämnda väntevärdet blir lika med noll beror på att Brownsk rörelse är spontan, vilket innebär att en förflyttning i ett visst tidssteg är oberoende av en förflyttning i ett annat tidssteg. Skulle $m = n$, erhålls istället:

$$\overline{\Delta x_n \Delta x_n} = \overline{(\Delta x_n)^2} \approx 2D\Delta t, \quad (2.13)$$

Kovariansen $\overline{\Delta x_n \Delta x_{n+1}}$ blir svagt negativ vid experiment på grund av lokaliseringsfel [41]. Utseendet av kovariansen kan därmed, likt diffusionskonstanten D , visa på kvalitén av partikelspårningen.

2.8 Radial Variance Transform

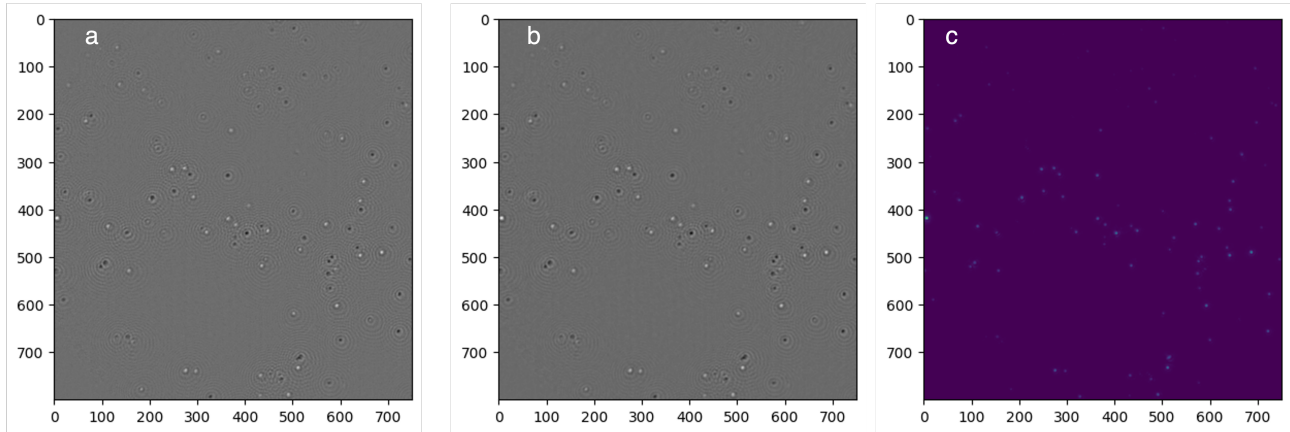
För att utvärdera resultat från LodeSTAR-nätverket kommer det jämföras med en klassisk algoritm för partikelspårning, Radial Variance Transform (RVT) [42]. RVT bygger på att hitta radiella symmetrier i en bild och eftersom partikeldetektioner i iSCAT-data karakteriseras av ringmönster, se figur 2.6, är RVT en väl lämpad algoritm för att lokalisera partiklar i sådan data.

Vid en viss radie kring centrum av en partikel är pixelvärden snarlika och medelvärdet av pixelvärden vid olika radier kring centrum varierar mycket, vilket utnyttjas av RVT för att detektera partiklar. Partikelcentrum karakteriseras alltså av en hög varians av medelvärden (VoM) för pixelvärden vid olika radier och ett lågt medelvärde av varianser (MoV) vid en viss radie. Brus har å andra sidan en låg VoM och högt MoV och detekteras därmed inte av RVT.

Algoritmen applicerar först ett gaussiskt filter på bilden som minskar högfrekvent brus [43] och sedan appliceras RVT på hela bilden enligt

$$\text{RVT}_n(i, j) = \frac{\text{VoM}(i, j)}{\text{MoV}(i, j)}, \quad (2.14)$$

där n betecknar att funktionen är normaliserad genom att dividera med MoV. Med ekvation 2.14 kommer centrum av radiella symmetrier få ett högt RVT-värde och positioner utan radiell symmetri, såsom brus, lågt RVT-värde. Resultatet blir då en bild där centrum av radiella symmetrier visas med högre pixelvärden. Processen för en experimentell bild visas i Figur 2.8.



Figur 2.8: En bildruta från den experimentella datan som undergår stegen i Radial Variance Transform. Alla axlar i enheten pixlar. a) Tidsmedelvärdesbildad iSCAT-bild. b) Resulterande bild efter gaussfilter applicerats i syfte att eliminera högfrekvent brus. c) Resulterande bild efter RVT där partiklar visas som lysande, små punkter. Positioner extraheras genom att ta lokala maxima över ett visst tröskelvärde.

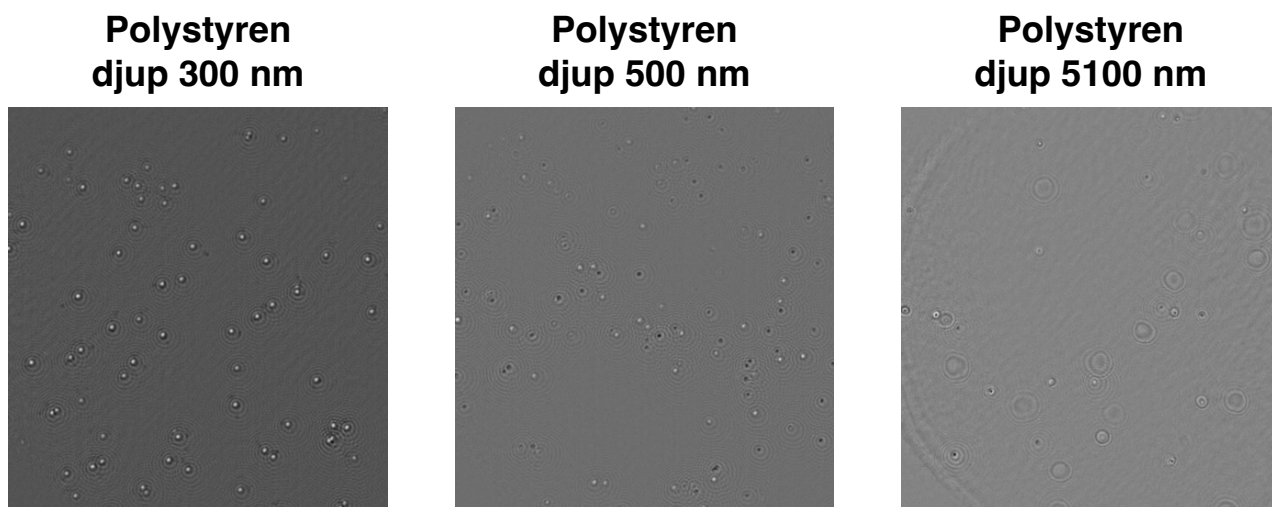
3

Metod

Arbetet inleddes med att ta fram bilder för träningen av ett LodeSTAR-nätverk avsett att förutsäga partikelkoordinater i två dimensioner, vilket använde experimentell data som träningsunderlag. Ett separat LodeSTAR-nätverk tränades för att förutsäga partikelkoordinater i tre dimensioner där träningsdata genererat med DeepTrack nyttjades för att justera partiklarnas avstånd från fokus. Efter förutsägning av partikelpositioner på experimentell data sammankopplades partiklarnas koordinater över tid till banor med hjälp av MAGIK. Med syfte att utvärdera riktigheten i de spårade banorna analyserades diffusivitet och kovarians mellan förflyttningar. För detektioner i två dimensioner gjordes även jämförelser mellan detektioner utförda av RVT och LodeSTAR-modellen. En mer ingående beskrivning av delmomenten presenteras i kommande avsnitt.

3.1 Experimentell datainsamling

Datan som använts i arbetet är bilder från iSCAT-mikroskopi framtagna av Erik Olsén vid the University of British Columbia och bearbetade för att reducera brus. iSCAT-mikroskopin är utförd på polystyrenpartiklar med diametrar på 100 nm som placerats i brunnar tillsammans med vatten. Polystyrenen är en slags plast som i detta fall har formats till kulor och ska representera biologiska partiklar [44]. Brunnarna är omslutna av täckglas undertill och ovanför, där avståndet mellan den övre och undre kan justeras med piezoelektriska kristaller, vilka deformeras när de utsätts för en elektrisk spänning [45]. Bilderna har tagits då djupet varit 300 nm och 500 nm, där partikelrörelserna var begränsade, samt 5100 nm så att partiklarna kunde röra sig mestadels fritt. Se exempel på erhållna bilder i Figur 3.1.



Figur 3.1: Bearbetade mikroskopibilder på polystyrenkulor erhållna från Erik Olsén vid The University of British Columbia. Bilderna är tagna på partiklar som befinner sig i olika brunndjup, indikerade över varje bild.

3.2 Bearbetning av experimentell data

Bilderna tagna med iSCAT-mikroskopi var bearbetade enligt metoden som beskrivs i artikeln ”Dual-Angle Interferometric Scattering Microscopy for Optical Multiparametric Particle Characterization”, i delen *supporting information*, skriven av Erik Olsén m.fl [46]. Kortfattat har datan bearbetats genom att en bakgrundsbuffert subtraherats från varje bild varefter bilden normaliserats med bakgrundssignalen så att medianvärdet är ett. I de resulterande bilderna har statistiskt brus och tidslokala förändringar eliminerats. Figur 3.1 visar en bild från varje mätning som bearbetats enligt de nämnda metoderna.

3.3 Partikeldetektion i två dimensioner

3.3.1 Träning av LodeSTAR-nätverk

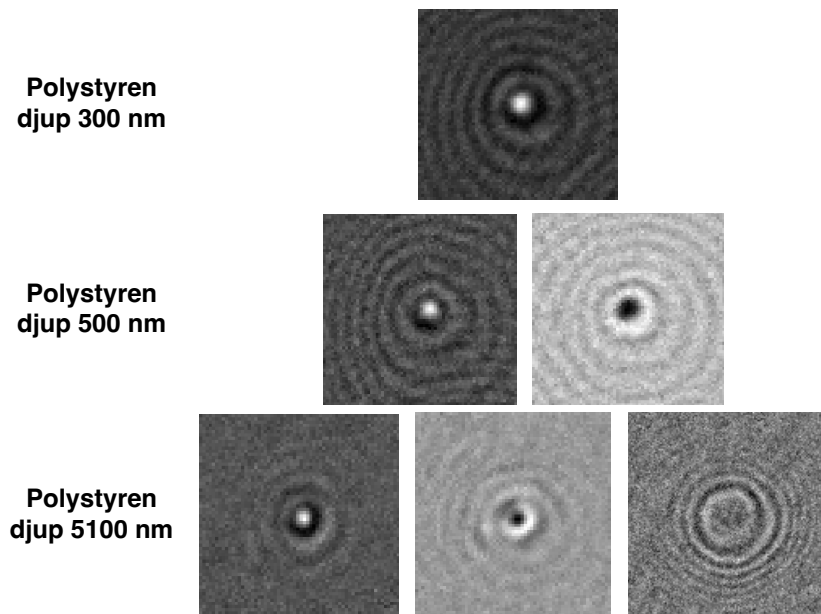
De bearbetade bilderna i Figur 3.1 visar att partikelutseenden varierar både inom och mellan mätningarna, vilket motiverade olika typer av träningsformer. För att detektera partiklar i varje mätning tränades tre nätverk på olika bilder och med olika metoder. Gemensamt för alla mätningar var att träningsbilderna bestod av utvalda delar av en hel bild, att partiklarna var centrerade i träningsbilderna samt att nätverket tränades att bli translations- och rotationsekvivariant. Vid urval av träningsbilder var principen att välja ut bilder av storlekar mellan 64x64 och 128x128 pixlar, där mindre bilder valdes för att effektivisera träning. Större bilder reserverades för större partiklar i de fall det var nödvändigt.

För att nätverket sedan skulle lyckas ge rimliga detektioner krävdes det att partiklarna i träningsbilderna var lik majoriteten av partiklarna i detektionsbilderna. Eftersom partiklarnas avstånd till fokus påverkar hur de ser ut användes fler träningsbilder för mätningar där brunnen, som partiklarna befann sig i, var djupare. Bortsett från avstånd till fokus varierar intensiteten hos partiklarna, och ibland även den omgivande brusnivån, vilket motiverade införande av en slumpmässig skalningsfaktor och pålagt normalfördelat brus centrerat runt noll för vissa av mätningarna.

Bilderna från den första mätningen, som består av polystyrenpartiklar i en 300 nm djup brunn (se Figur 3.1), visade låg variation i partiklarnas utseende. Denna likhet mellan partiklar motiverade användningen av endast en träningsbild utan införandet av slumpmässiga omskalningar och brusnivåer. I den andra mätningen, med en 500 nm djup brunn (se Figur 3.1), är det större skillnader mellan partiklarnas utseenden. Nyansen i mitten av partiklarna varierar här för det mesta mellan vit och svart¹, samt att intensiteten är olika för vissa partiklar. På grund av denna kontrast användes en svart och en vit genererad partikel som träningsdata, där intensiteten slumpmässigt varierades mellan 10^{-1} och 2. Normalfördelat brus med en varierande standardavvikelse mellan 0 och 10^{-3} infördes även.

I den mätning då brunnen var 5100 nm djup fluktuerar partikelutseendet som mest. Förutom att nyansen i mitten av partiklarna varierar mellan vit och svart skiljer sig utseendet på partiklar från varandra avsevärt beroende på deras avstånd från fokus. Eftersom det inte finns en tydlig markör i mitten av partiklar långt från fokus behövde större bilder användas för att träna nätverket. För brunnen med 500 nm respektive 300 nm djup har bara bilder av ungefärlig storlek 70x70 pixlar använts, men för brunnen med djupet 5100 nm användes även en bild på en av de större interferensmönsterna med en bildstorlek på 128x128 pixlar. Bilderna hade även här en slumpmässigt införd skalningsfaktor mellan 10^{-1} och 2 samt normalfördelat brus, för att få med så många partiklar som möjligt. Bilder för alla träningspartiklar visas i Figur 3.2.

¹Den fysikaliska anledningen till varför detta sker är att när partiklarna passerar fokus får elektriska fältet i ljuset som sprids från partiklarna en $\pm\pi/2$ fasskillnad, även kallat Gouyfas.



Figur 3.2: Visar bilderna som användes för att träna nätverket med LodeSTAR-metoden för de olika djupen i den experimentiella datan. Bakgrundsbruset har ungefär samma pixelvärden i träningsbilderna, vilket inte framgår här med hjälp av gråskalan. Bilden längst ner till höger är 128×128 pixlar, medan resten av bilderna är ungefär 70×70 pixlar.

3.3.2 Radial Variance Transform

När partiklar detekterades med Radial Variance Transform (RVT) applicerades först ett gaussfilter med variansen $\sigma^2 = 1$, vilket finns implementerat i pythonpaketet scikit-image [47] och tillämpades på alla processerade mikroskopibilder. Bilderna transformerades sedan genom en pythonimplementering av RVT med parametrar $r_{min} = 1$ och $r_{max} = 10$, vilket gav en tensor där lokala maxima utgjorde detektioner av partiklar, se Figur 2.8c för exempel [42]. Parametrarna r_{min} och r_{max} betecknar hur stora radiella mönster algoritmen ska söka efter och valdes här genom en iterativ process till små värden för att kunna detektera partiklarna som är små relativt hela bilden.

För att undvika att transformerna för pixlar nära bildkanterna får för lite data används en utfyllnadsfunktion, *padding*, som lägger till pixlar runt kanterna med medelvärdet i bilden som pixelvärde. Utfyllnadsfunktionen användes här i läget *constant*. För att få ut koordinater valdes de pixlar i den RVT-transformerade bilden som överskred tröskelvärdet som detektioner. I detta arbete användes tröskelvärdet 99 %, beräknat för varje bildruta, för alla bilder.

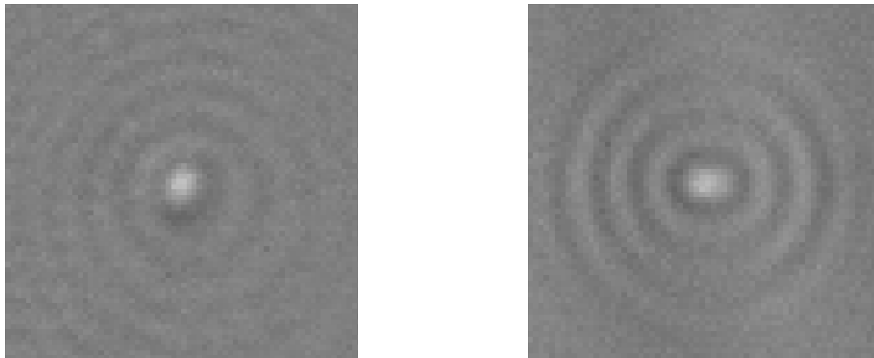
3.4 Partikelspårning med MAGIK

Vid bildandet av partikelbanor användes en färdigtränad MAGIK-modell tränad på märkta muskelstamceller från möss med tre nodegenskaper; x-position, y-position och bildnummer i bildserien (tidpunkt) [26]. För att MAGIK-modellen ska vara oberoende av bildens storlek har modellen tränats på positioner normaliserade mellan noll och ett. Trots att modellen är tränad på stamceller och tar hänsyn till celldivision och migration fungerar den väl för att skapa partikelbanor i detta arbete, då partiklarnas rörelsemönster är relativt enkla vid jämförelse med cellmigrationen. Hur korrekta partikelbanorna blir är därför främst beroende av hur väl positionerna detekteras med LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen.

Efter att indata sammanställts från detektioner med LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen matas dessa in i MAGIK som genererar noder och banor för att representera de partiklar som i slutändan detekterats och deras banor. I det första steget, det vill säga skapandet av kanter och noder, tog modellen hänsyn till tre bildrutor och en radie på 3 % av bildstorleken för att associera noder inom. För att en partikelbana sedan skulle skapas sattes det inget krav på hur många bilder i rad en partikel ska ha detekterats i. Valet av lågt tröskelvärde grundas i det höga signalbrusförhållandet som råder i bilderna och att vissa partiklar är svaga och svåra att detektera med LodeSTAR. Det låga tröskelvärdet innebär dock en risk för detektion av brus med LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen men innebär också att partikelbanor lättare kan skapas med MAGIK.

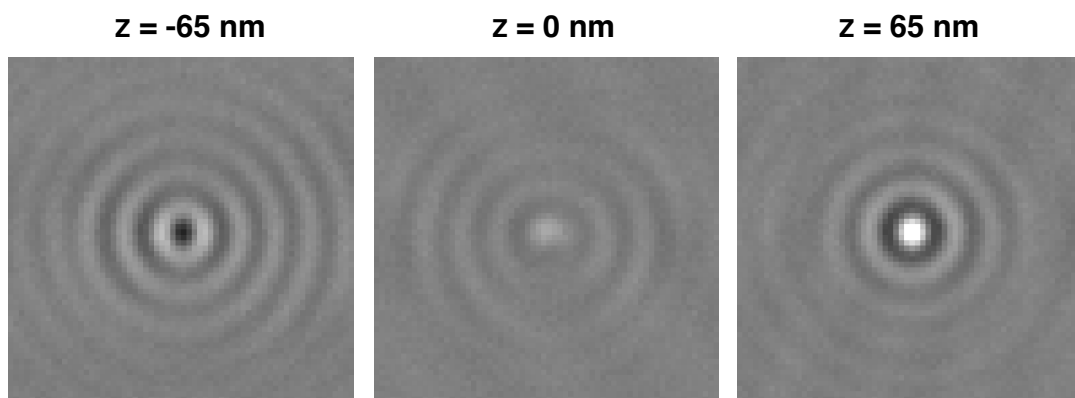
3.5 Träning och syntetisering för detektioner i tre dimensioner

För att träna LodeSTAR-nätverket att upptäcka partiklar i tre dimensioner återskapades först partiklar i DeepTrack baserat på den experimentella datan med ett djup på 300 nm. Dessa partiklar är redan kända att vara begränsade till fokusplanet i djupled (z-led) på iSCAT-mikroskopet och därför antogs partiklarna ha positionen $z = 0$. För att träna LodeSTAR-nätverket att ge en koordinat för den tredje dimensionen modifierades sista utmatningslagret i dess CNN till att producera fyra tensorer istället för tre, som i fallet för tvådimensionell detektion. Förutom translation och rotation i bildplanet introducerades ytterligare en transformation som genererar en ny bild av partikeln med DeepTrack, men med en förskjutning i z-led, se Figur 3.4. Den genererade bilden har parametrar som baseras på den tidigare nämnda DeepTrack-återskapningen, jämförelse mellan genererad och experimentell data visas i Figur 3.3. Den inversa koordinatstransformationen av denna bildtransform innebär en återställning av den erhållna koordinaten med motsvarande z-förskjutning.



Figur 3.3: Bilden till vänster visar en experimentell avbildning av en partikel vid $z \approx 0$. Bilden till höger representerar en simulerad avbildning av samma partikel vid $z = 0$, skapad med DeepTrack.

Efter träning applicerades nätverket på den experimentella datan med 300 och 500 nm djup för att förutsäga partikelkoordinater. Utvärderingen av dessa z-koordinater baserades på diffusionsberäkningar efter att partikelbanor identifierats med MAGIK. Eftersom partiklarna har stor variation i intensitet och färg beroende på deras position i z-led, applicerades en till typ av modifiering av bilderna för träning av nätverket. I transformationssteget multiplicerades de transformerade bilderna med en slumpmässig faktor från 0,8 till 1,2. Skalningen görs för att LodeSTAR-nätverket lättare ska kunna detektera partiklar med olika utseende.



Figur 3.4: Exempel på bilder genererade i DeepTrack för partiklar som befinner sig vid tre olika z -värden, nämligen -65 nm, 0 nm och 65 nm.

4

Resultat

Här redovisas resultaten från detektioner med LodeSTAR-metoden och RVT-algoritmen. Vidare presenteras partikelbanor extraherade med MAGIK och motsvarande beräknade diffusiviteter. Avsnittet delas upp i vilken form av partikelspårning som behandlas och där i görs en löpande jämförelse mellan resultaten från LodeSTAR-metoden och RVT-algoritmen. Slutligen presenteras resultat från träning, detektion och spårning av partikeldetektioner i tre dimensioner, där även diffusivitet och kovarians av respektive dimensioner redovisas.

4.1 Partikelspårning i två dimensioner

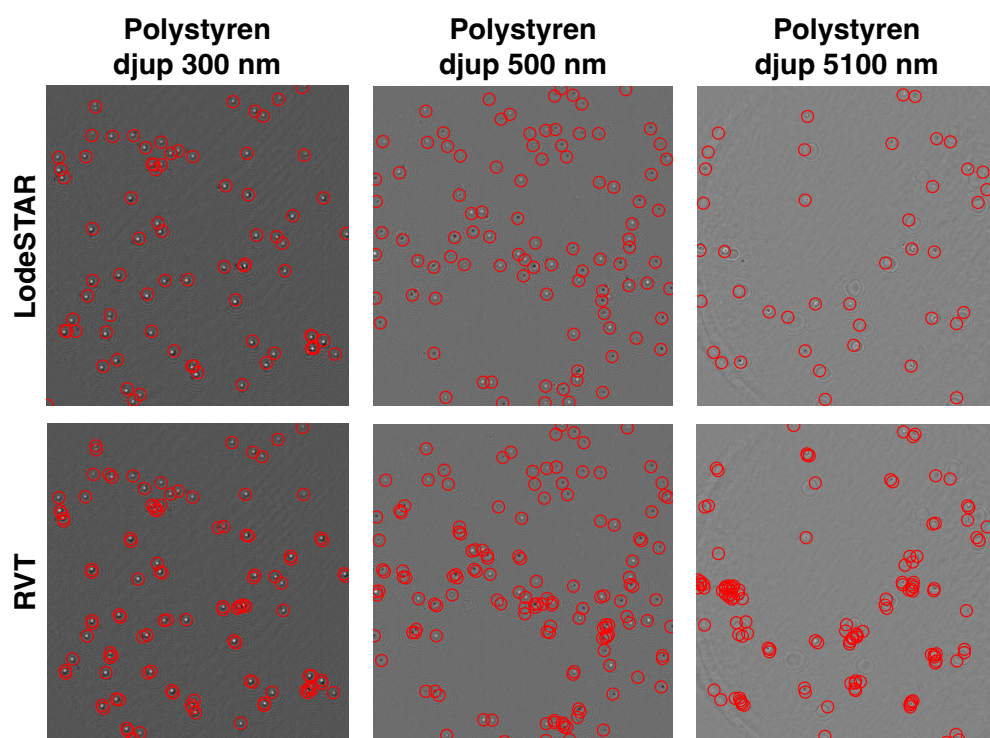
Resultaten då partiklarna befinner sig nära fokus visar att både LodeSTAR-modellen och RVT ger partikelbanor som liknar Brownsk rörelse, där tillhörande diffusiviteter inte skiljer sig avsevärt från de teoretiskt beräknade värdena. Däremot är partikelbanorna längre om detektionerna utförts via LodeSTAR-modellen. När partiklarna kan röra sig längre från fokus ger varken LodeSTAR-modellen eller RVT-algoritmen partikelrörelser som följer Brownsk rörelse, däremot ger RVT-algoritmen diffusiviteter som är inom rimligt avstånd till det teoretiskt uppskattade värdet.

4.1.1 Detektioner

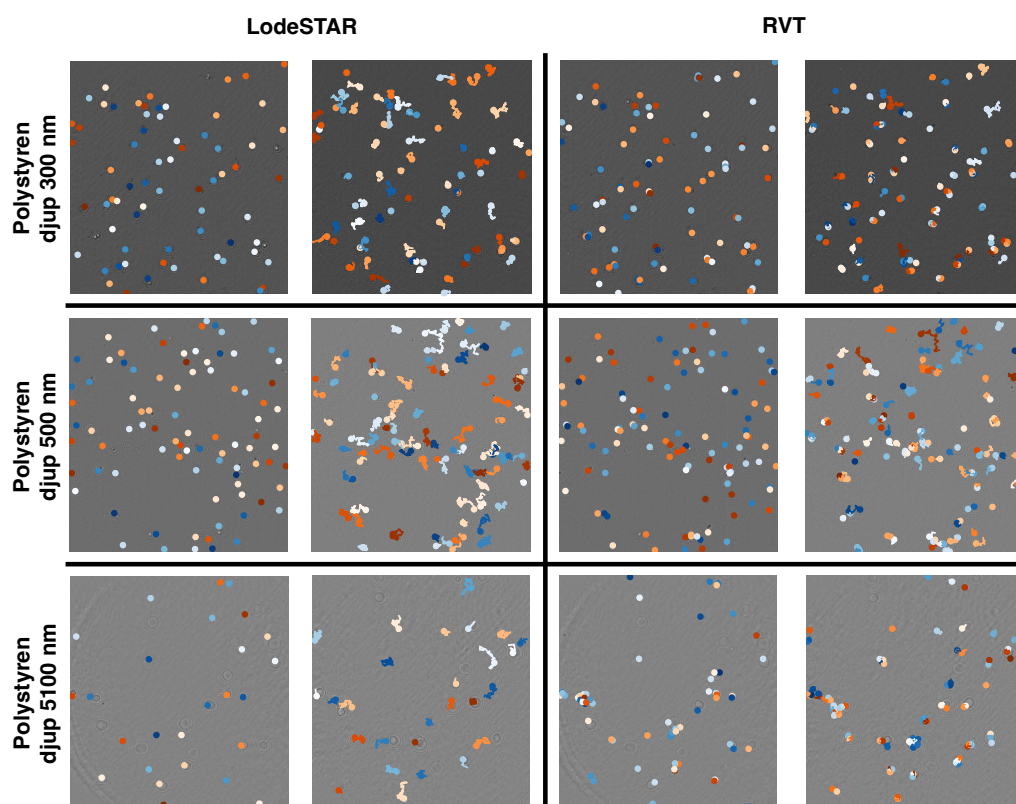
I Figur 4.1, som innehåller exempel på detektioner från varje mätning, visas det att noggrannheten för detektionerna från både LodeSTAR-modellen och RVT minskar när djupet i brunnen ökar. Dessutom detekteras fler objekt i bilderna som inte nödvändigtvis är partiklar, så kallade falska positiva detektioner, eller delar av partiklar som inte tillhör centrum. Gemensamt för alla mätningar är att RVT ger fler detektioner än LodeSTAR-modellen, där den övervägande majoriteten av överskottet beror på att flera detektioner gjorts på samma partikel.

4.1.2 Spårning

Efter att partikelpositioner har extraherats, sammanlänkas positionerna i MAGIK för att skapa banor, vilket visas i Figur 4.2. För att illustrera de partiklar MAGIK har lyckats koppla samman för spårning visas här en bild med partiklarnas ursprungsposition och en bild 50 bildsteg senare, där partikelbanorna framgår. Även här ser vi att antalet detekterade partiklar för RVT är högre än för LodeSTAR-modellen. Ur partikelbanorna kan rimligheten i detektionerna uppskattas. Vad som kännetecknar en rimlig bana är små, slumpmässiga rörelser för varje tidssteg, vilket kan observeras i banorna hos detekterade partiklar på de 300 nm och 500 nm djupa brunnarna. Undersöks partikelbanor för den 5100 nm djupa brunnen, visas istället rörelse som inte går att beskriva som Brownsk, exempelvis flera sickmönster, vilket indikerar fel i detektioner. Dessutom är vissa rörelser större än vad de förväntas vara.



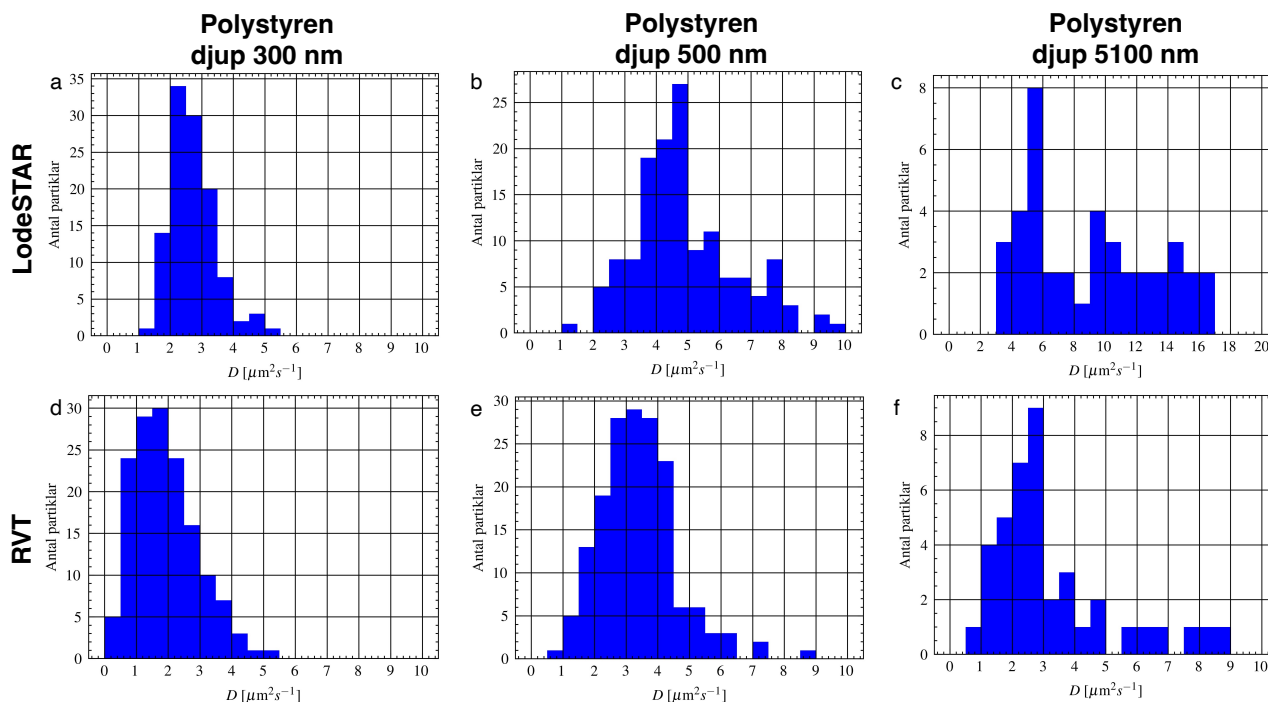
Figur 4.1: Visar exempel på partikeldetektioner från LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen i bilder från mätningar där djupet på brunnen är 300 nm, 500 nm, och 5100 nm.



Figur 4.2: Banor extraherade från LodeSTAR-modellen samt RVT med hjälp av MAGIK. De tre raderna representerar de tre olika brunndjupen. Två bildrutor från olika tidpunkter visas per metod och per mätning. Bilderna är tagna 50 tidssteg från varandra vilket motsvarar 0,45 s.

4.1.3 Diffusion

Efter att partikelbanorna upprättats i MAGIK beräknades diffusiviteterna för varje partikel med en partikelbana längre än tio tidssteg. Resultaten visas i Figur 4.3. När djupet ökar i brunnen syns det att variansen i diffusivitetsfördelningarna ökar. De principiella utseendena hos fördelningarna är också lika för LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen, förutom i den sista mätningen där RVT-algoritmen inte detekterat partiklar med diffusiviteter över $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Vidare visar fördelningarna att LodeSTAR-modellen har en tendens att detektera partiklar på ett sådant sätt att MAGIK sedan upprättar partikelbanor med högre diffusivitet än vad som ges av RVT.



Figur 4.3: Fördelningar av diffusiviteter för partikelspårning av polystyren i brunnar med djup 300 nm, 500 nm och 5100 nm. Övre raden, **a – c**, visar resultat av LodeSTAR-modellen och nedre raden, **d – f**, visar resultat av RVT. Observera olika storlekar på x -axlar.

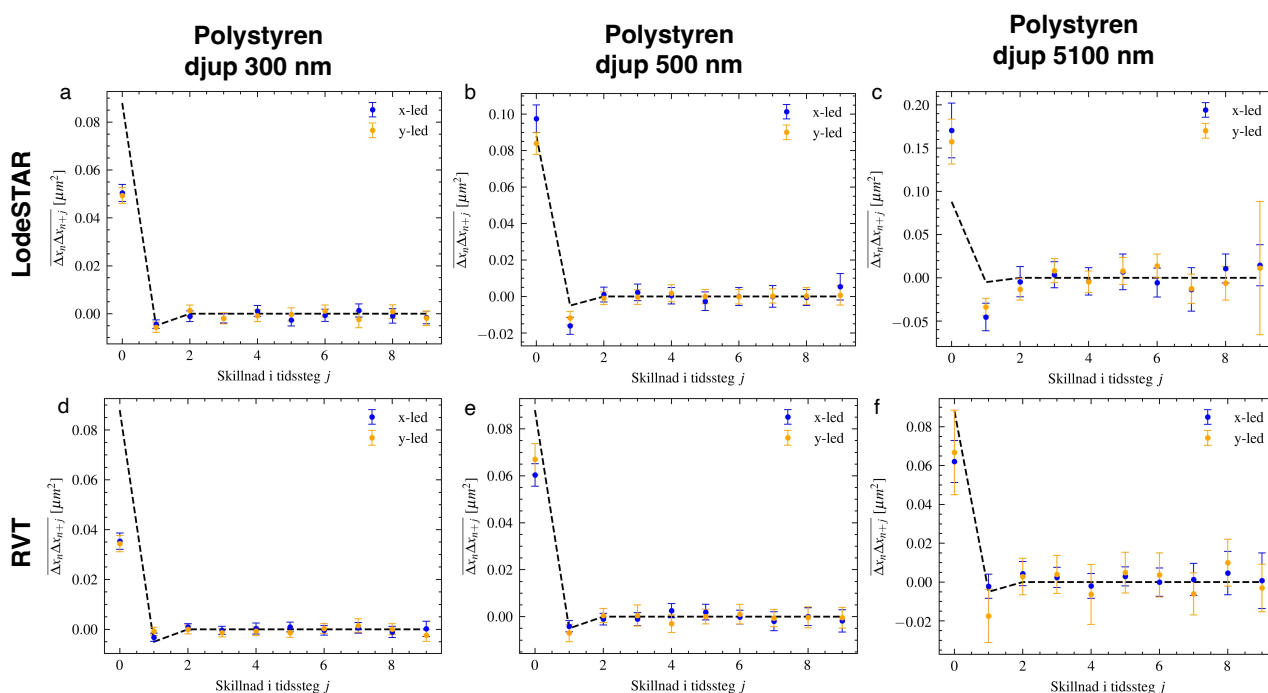
I Tabell 4.1 visas det att LodeSTAR-modellen förutspår högre diffusiviteter i alla mätningar, oavsett om medelvärdet eller medianen är av intresse. Det teoretiskt beräknade värdet för diffusiviteten som förväntas råda för partiklarna i brunnarna är $4,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$. I Tabell 4.1 visas det att andra mätningen med LodeSTAR-modellen ger diffusiviteter som liknar det teoretiska värdet. Gällande sista mätningen är diffusiviteterna från LodeSTAR-modellen noterbart stora i jämförelse med det teoretiskt beräknade värdet, diffusiviteterna från RVT-algoritmen och de andra värdena från LodeSTAR-modellen. Det kommenteras även att typvärdena för LodeSTAR-modellen visas befinna sig närmare det teoretiska värdet från Figur 4.3.

Från partikelbanorna kan kovarianserna mellan en partikels position och dess framtida positioner beräknas, vilka visas i Figur 4.4. Det förväntade utseendet av kovariansen är att värdet för den första mätpunkten blir $2D\Delta t$, där Δt motsvarar tiden mellan varje bild och D sätts till det teoretiskt beräknade värdet av diffusiviteten. Vidare förväntas det att värdet för andra mätpunkten blir svagt negativt och slutligen att resterande värden stabiliseras nära noll. Kovarianserna ska idealt vara nära noll efter första mätpunkten om detektionerna helt stämmer överens med de verkliga partiklarnas positioner, men på grund av icke-ideala förhållanden i kameran förväntas kovarianserna vara svagt

Tabell 4.1: Medelvärden och medianer med standardfel för de beräknade diffusiviteter hos polystyrenkulorna för LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen.

Metod	Djup [nm]	Medelvärde [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Median [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
LodeSTAR	300	$2,74 \pm 0,068$	$2,64 \pm 0,090$
	500	$5,00 \pm 0,15$	$4,57 \pm 0,092$
	5100	$9,02 \pm 0,65$	$9,00 \pm 1,27$
RVT	300	$1,92 \pm 0,079$	$1,76 \pm 0,091$
	500	$3,51 \pm 0,12$	$3,32 \pm 0,12$
	5100	$3,54 \pm 0,41$	$2,61 \pm 0,18$

negativa vid andra datapunkten i varje mätning.



Figur 4.4: Medelvärdet av kovarianser och tillhörande standardfel för partikelbanor från detektioner av polystyren i brunnar med djup 300 nm, 500 nm och 5100 nm. Övre raden, **a – c**, visar resultat av LodeSTAR-modellen och nedre raden, **d – f**, visar resultat av RVT. Felstaplarna här har dubbel storlek mot standardfelet för bättre visualisering. Observera olika storlekar på *y*-axlar.

I Figur 4.4 visas det att kovarianserna tyder på Brownsk process hos de detekterade partiklarna, förutom i den sista mätningen där kovariansen inte med säkerhet kan sägas vara nära noll. Figur 4.4 visar även att kovarianserna är konsekvent lite närmare noll då partikeldetektionerna gjorts med RVT istället för med LodeSTAR.

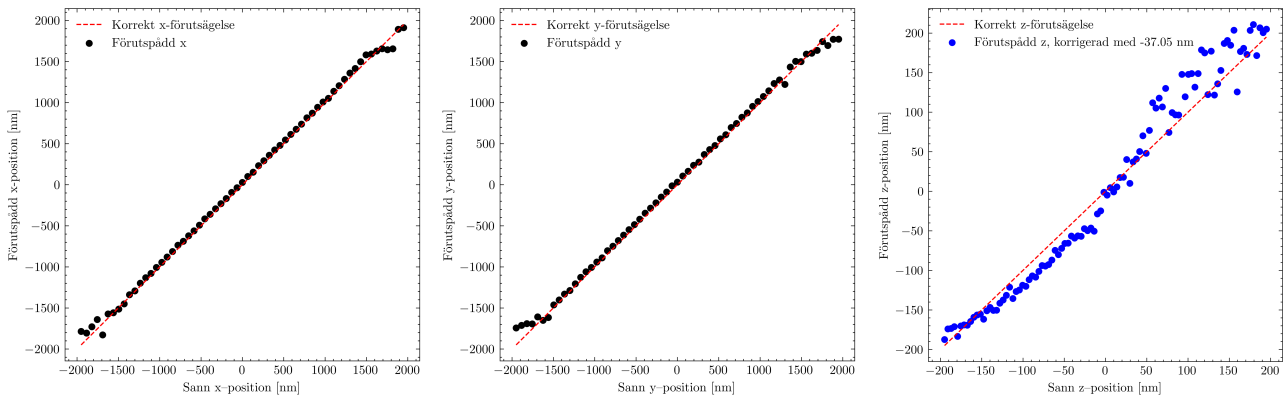
4.2 Partikeldetektioner i tre dimensioner

I detta avsnitt presenteras resultaten från LodeSTAR-modellens tredimensionella behandling av både syntetisk och experimentell data. Först presenteras jämförelse mellan LodeSTAR-modellens detektioner och de korrekta partikelpositionerna på syntetiserad data. Därefter visas LodeSTAR-modellens detektioner i *xy*-planet på experimentell data och slutligen utvärderas modellens förmåga att detektera

partiklar i z-led genom att observera variationer över tid i z-led samt kovarians- och diffusivitetsberäkningar.

4.2.1 Träning med DeepTrack

Efter träning av LodeSTAR-nätverket med DeepTrack-genererad data fås resultat enligt Figur 4.5 där det visas hur väl LodeSTAR-modellen lyckas förutspå partikelpositioner i DeepTrack-genererad data i x-, y- och z-led. Träningen avslutades efter cirka 4 timmar¹ med ett förlustvärde på 0,096. LodeSTAR-modellen lyckas i allmänhet göra korrekta förutsägelser på positioner i xy-planet. Modellen ger även en indikation om partiklarnas positioner i z-riktningen, dock med bristande noggrannhet, särskilt för partiklar över fokus.



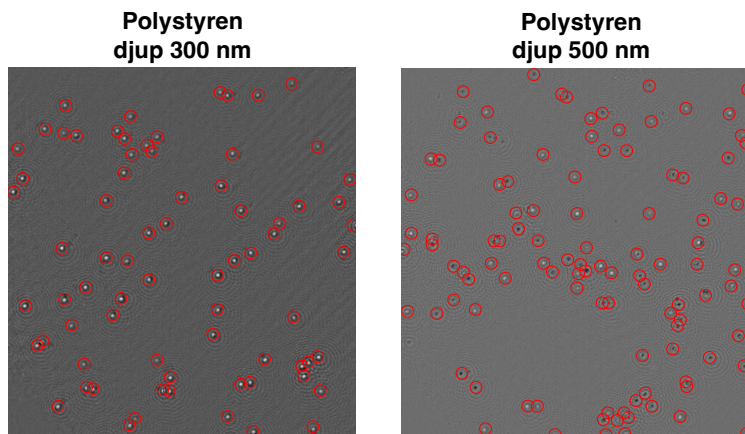
Figur 4.5: Förutspådda x -, y - och z -positioner som funktion av korrekta positioner på simulerade bilder med DeepTrack. Här visas korrekt förutsägelse av en röd streckad linje.

4.2.2 Detektioner

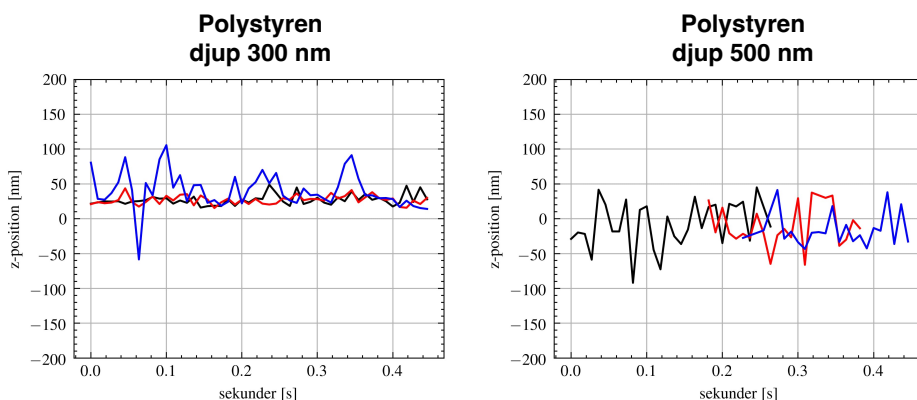
Inmatning av experimentell data med en 300 nm och 500 nm djup brunn ger tvådimensionella förutsägelser på en överväldigande majoritet av partiklarna enligt Figur 4.6. Förutsägelserna är lika de som gjorts då LodeSTAR endast tränats på experimentell data, men färre positiva och fler falska negativa detektioner har gjorts. Experimentell data med ett brunndjup på 5100 nm testades inte på grund av att nätverket inte tränades i dess z-spänn.

I Figur 4.7 visas förutsägelserna för z-positionen av polystyrenpartiklar på 300 nm samt 500 nm djup. I brunnen som är 300 nm djup visas banor med liten variation i z-led, däremot uppvisar partiklar i den 500 nm djupa brunnen oftare större variationer i z-led, vilket indikerar mindre noggrannhet i detektioner.

¹4 timmar motsvarar 1400 epoker i detta fall.



Figur 4.6: Visar förutsägelser, röda ringar, i xy -planet gjorda av LodeSTAR-modellen tränad för tre dimensioner på polystyren-data i en 500 nm djup brunn.



Figur 4.7: Visar z -positionen av förutsagda partikelbanor under ett tidsintervall på cirka 0,4 sekunder för tre slumpmässigt valda partiklar i brunn med djup 300 nm respektive 500 nm. De olika färgerna på linjerna representerar de tre partiklarna.

4.2.3 Diffusion i z - och xy -led

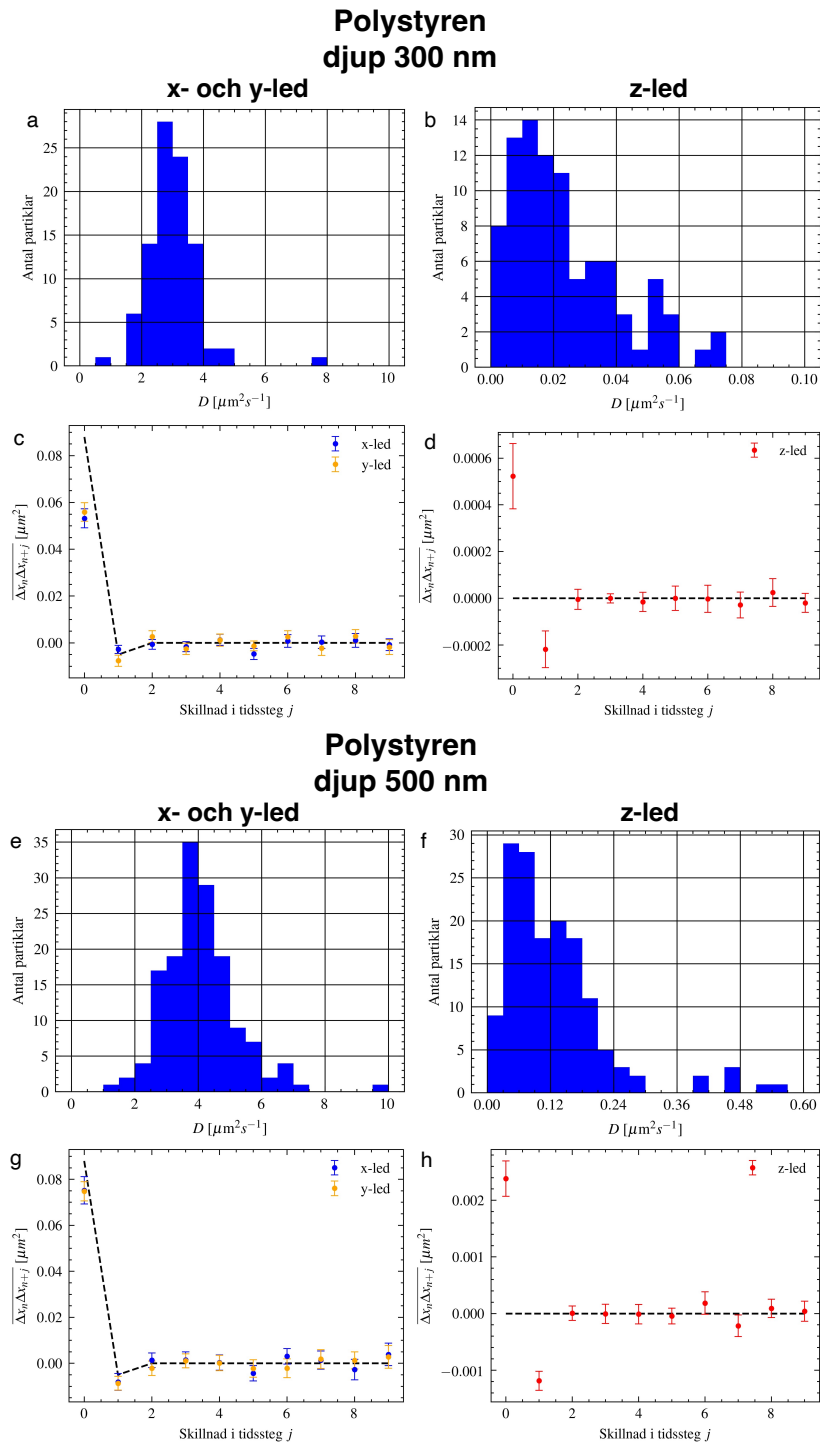
Beräkning av diffusivitet och kovarians från partikelbanorna ger resultat enligt Figur 4.8 för de båda brunn djupen. Tabell 4.2 redovisar median och medelvärde av beräknad diffusion i xy - och z -led. I xy -led stämmer medelvärdena och medianerna någorlunda överens med LodeSTAR-modellens resultat i Tabell 4.1. Medelvärdena och medianerna för diffusiviteten i z -led är mellan en och tre storleksordningar mindre än det teoretiskt uppskattade värdet, där diffusiviteten i andra mätningen är nästan en storleksordning större än diffusiviteten i första mätningen.

Tabell 4.2: Medelvärden och medianer med standardfel längs olika led för diffusiviteterna med LodeSTAR-modell tränad för tre dimensioner.

Led	Djup [nm]	Medelvärde [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Median [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
xy-led	300	$3,00 \pm 0,085$	$2,96 \pm 0,097$
	500	$4,12 \pm 0,10$	$3,96 \pm 0,091$
z-led	300	$0,029 \pm 0,0038$	$0,019 \pm 0,0021$
	500	$0,13 \pm 0,0086$	$0,11 \pm 0,010$

Kovarianserna och fördelningarna i xy -led behåller sitt principiella utseende i jämförelse med LodeSTAR-

modellens resultat i Figur 4.3. För z-led visar fördelningarna väldigt låga diffusiviteter, och kovarianserna visar hög negativ korrelation.



Figur 4.8: Visar diffusiviteter och kovarianser beräknade på datan med 300 nm djup brunn, **a** — **d** och 500 nm djup brunn, **e** — **h**, för *xy*- och *z*-led. I kovariansgraferna **c**, **d**, **g** och **h** visar förväntat utseende med svart streckad linje. Felstaplarna har här dubbel storlek mot standardfelet för bättre visualisering. Observera olika storlekar på *x*-axlar på histogrammen och olika storlekar på *y*-axlar på kovariansgraferna.

5

Diskussion

5.1 Jämförelse av partikeldetektion och diffusivitetmätningar mellan LodeSTAR och RVT

Skapandet av partikelbanor med MAGIK visar att den tränade LodeSTAR-modellen överlag ger rimliga och konsekventa detektioner till skillnad från RVT-algoritmen, förutom då partiklar tillåts vandra fritt i den djupare brunnen. Banorna är längre då partikelpositioner förutsagts med LodeSTAR-modellen, vilket gör det möjligt att spåra partiklarna över längre tidsperioder och på så sätt mer pålitligt kunna härleda individuella partiklars diffusiviteter. RVT-algoritmen, å andra sidan, förutsäger partikelpositioner på ett sätt som leder till att MAGIK detekterar fler partiklar än vad som faktiskt är närvarande i brunnarna, vilket gör det svårt, om inte omöjligt i vissa fall, att följa individuella partiklar. Dessa överflödiga partiklar är tätt klustrade, vilket gjort att MAGIK har upprättat korta banor mellan dessa detektioner och har ansett partiklarna vara kortlivade. Diffusiviteten är låg för sådana partiklar och rörelserna mellan dessa är spontana, vilket ger en missvisande bild över diffusivitetsfördelningar och kovarianser mellan rörelser i flera tidssteg, varför dessa inte har tagits hänsyn till i beräkningarna.

Vid jämförelse av de härledda diffusiviteterna syns det att banor upprättade från partikeldetektioner av både LodeSTAR-modellen och RVT-algoritmen ger rimliga resultat både då brunnen är 300 nm och 500 nm djup, medan resultaten avviker från förväntningarna då brunnen är 5100 nm. Då brunnen är 300 nm djup ger båda detektionsmetoder låga diffusiviteter, vilket kan förklaras med att partiklarna är nära täckglasen i brunnen. Vattnet har då inte lika många möjligheter att ta sig runt en partikel när den rör på sig, vilket hindrar partikelns rörelser. För 500 nm är partiklarna mindre begränsade i sina rörelser och ger därför en högre diffusivitet som överensstämmer bättre med det teoretiskt uppskattade värdet $4,84 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Formen och storleken varierar på partiklarna i iSCAT-bilderna när de tillåts vandra fritt, vilket gör att LodeSTAR-modellen inte lyckas detektera alla partiklar i den 5100 nm djupa brunnen. Problemet med RVT i detta fall är främst att algoritmen använder en bestämd radie för att söka efter radiella symmetrier, vilket inte är lämpligt då partikelradierna varierar.

En kovariansanalys för de detekterade partiklarna över flera tidssteg visar att Brownsk rörelse råder för partiklarna i den 300 nm och 500 nm djupa brunnen, men att avvikelser sker för detektionerna av partiklarna som rör sig i den 5100 nm djupa brunnen. Detta tyder på att detektionerna bakom de långlivade partiklarna i den 300 nm och 500 nm djupa brunnen är både noggranna och precisa, men att varken LodeSTAR-modellen eller RVT-algoritmen lyckats väl med detektionerna i den 5100 nm djupa brunnen. För LodeSTAR-modellen uttrycks den låga noggrannheten även i diffusivitetsfördelningen i Figur 4.3, i form av en större varians och en komplex fördelning, samt i medelvärdet och medianen i Tabell 4.1, vilka avsevärt avviker från de förväntade resultaten.

5.2 Analys av tredimensionell noggrannhet i partikelspårning med LodeSTAR

Resultaten indikerar att den tredimensionella LodeSTAR-modellen framgångsrikt förutser tvådimensionella positioner för experimentell data med god noggrannhet (se Figur 4.6), vilket även framgår av diffusivitetsdata från Tabell 4.2. Dessutom är de tvådimensionella spårningarna jämförbara med dem gjorda av LodeSTAR-modellen som tränats på experimentell data, vilket indikerar att en grundläggande efterliknelse av de experimentella partiklarna har uppnåtts. För experimentell data med 300 och 500 nm djup brunn ligger medianvärdet och medelvärdet av diffusiviteten inom god marginal för det teoretiskt uppskattade värdet $4,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ enligt tabell 4.2 och visar på tillförlitliga förutsägelser i två dimensioner för båda brunn djupen. Även kovarianserna i två dimensioner är inom god marginal för de förväntade värden vid korrekta detektioner enligt Figur 4.8.

I djupled ger nätverket rimliga förutsägelser på syntetisk data som den det tränats på (se Figur 4.5), vilket är väntat. Nätverket uppvisar dock svårigheter att identifiera syntetiserade partiklar långt över fokusplanet, men presterar bättre för syntetiserade partiklar under fokus. Förslagsvis kan nätverket tränas längre för att ge bättre z-förutsägelser, men då löper det risk att överanpassas.

När nätverket förutsäger avvikelser från fokus på verkliga partiklar i brunnen med ett djup på 500 nm erhålls en diffusivitet i djupled på $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ i medelvärde och $0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ i median, vilket är en till två storleksordningar mindre än de i bildplanet. Det är däremot känt att partiklarnas rörelser i djupled är begränsade i brunnen på 500 nm, vilket förväntas resultera i jämförelsevis mindre diffusion i djupled. Vidare visas oregelbundenheter och bristande precision på förutspådda banor i z-led över tid, vilket framgår i Figur 4.7. Nätverket förutspår att partiklar typiskt rör sig upp till 100 nm i z-led per tidssteg, med ett kaotiskt mönster kring ett fast djup. Samtliga kovarianser i Figur 4.8g,h avviker betydande från noll, vilket tyder på detektionsfel. Å andra sidan indikerar figuren stor negativ korrelation i z-led, vilket är rimligt då partiklarnas rörelser är begränsade i den riktningen. Sammanfattningsvis kan resultaten indikera en mindre tillförlitlig z-förutsägelse för brunn djup på 500 nm.

När nätverket istället förutsäger z-koordinat på partiklar från experimentell data med ett brunn djup på 300 nm erhålls en diffusivitet i z-led på 0,03 i medelvärde och 0,02 i median. Det är känt att partiklar i denna brunn har ännu mer begränsad rörelse i z-led, och ska befinna sig kring ett plan strax ovanför fokus. Det kan anses att denna begränsade rörlighet reflekteras i det ännu lägre diffusionsvärdet för z-led, och pekar på att nätverket gjort rimliga förutsägelser. Vidare visar majoriteten av förutspådda banor i den 300 nm djupa brunnen stabila utvecklingar av z-position över tid (se figur 4.7) och kan anses indikera få falska variationer i förutsagd z-position i detta djupintervall. Även i detta fall erhålls nollskilda kovarianser och hög negativ korrelation, se Figur 4.8c,d.

Sammanställning av partikelspårning i z-led för de 300 nm och 500 nm djupa brunnarna visar att den angivna metoden kan förutspå z-positioner när partiklarnas rörelser är små. Dock försämras metodens tillförlitlighet avsevärt när partikelrörelserna i z-led ökar. Noterbart är att diffusionen i z-riktningen för den 300 nm djupa brunnen är lägre jämfört med den för 500 nm, vilket överensstämmer med teoretiska modeller och kan innebära bättre noggrannhet i z-spårning. Vidare förutsäger nätverket korrekt att ljusare partiklar befinner sig ovanför fokusplanet och att mörkare partiklar är placerade under det, där de mörkare partiklarna tilldelas större negativa z-värden. Även om den aktuella tekniken för tredimensionell förutsägelse erbjuder vissa fördelar för spårning längs z-axeln, när den inte samma nivå av precision som observeras i spårningen av partiklars positioner i xy-planet.

Avslutningsvis prövades inte nätverket utförligt på experimentell data med ett brunn djup på 5100 nm,

eftersom de partiklar som återskapades i DeepTrack inte producerade trovärdiga och jämförbara bilder över detta z-spann, till skillnad från syntetiska bilder över spannet på 500 nm. Följaktligen tränades inte nätverket att hantera z-positioner på spannet 5100 nm och en utvärdering av z-förutsägelser skulle därmed inte vara av betydelse. Detta påvisar en brist i skapandet av träningsdatan och är ett potentiellt förbättringsområde för tekniken.

5.3 Förslag på metodförbättringar

5.3.1 Tvådimensionell spårning

Eftersom partiklarna såg väldigt lika ut i datan från den 300 nm djupa brunnen ansågs LodeSTAR inte behövas tränas på partiklar som slumpmässigt skalats om. I efterhand föreslås det som en metodförbättring att ändå införa slumpmässiga skalningsfaktorer inom ett intervall på 10^{-1} och 2 exempelvis, eftersom det eventuellt ändå hade lett till bättre resultat. Det finns även en risk att partiklar med låga intensiteter i förhållande till bakgrunden inte har tagits hänsyn till i träningen för 500 nm så bra som de kunde ha gjorts. Att lägga till en partikel med lägre intensitet i förhållande till omgivningen hade därför kunnat förbättra detektionerna.

LodeSTAR-modellen lyckades inte detektera partiklarna tillförlitligt i den 5100 nm djupa brunnen, vilket beror på att partiklarna varierar mycket i form och storlek. Det finns mer självklara åtgärder som hade kunnat prövats, nämligen att öka antalet epoker för träningen och att lägga till fler träningsbilder. Ytterligare ett förslag är att maxreducera detektionsbilderna för att minska storleken på de större interferensmönsterna. LodeSTAR-modellen hade då kunnat tränas på antingen en blandning av maxreducerade större interferensmönster och vanliga mindre partiklar, eller endast maxreducerade bilder på alla partiklar. Sedan hade detektioner kunnat köras på detektionsbilderna i två steg, nämligen ett där detektionsbilderna är maxreducerade och ett där de är som vanligt. Det är även möjligt att om LodeSTAR-modellen tränats att förutsäga tredimensionella positioner i ett större z-spann hade LodeSTAR-modellen blivit bättre på att detektera tvådimensionella positioner i den 5100 nm djupa brunnen.

För att validera om resultatet av ett rimligt medelvärde för diffusiviteten beror på RVT-algoritmens noggrannhet eller att RVT detekterat för många partiklar, föreslås att göra mätningar med samma algoritm på ny data. För att uppnå en alternativ teoretisk diffusivitet krävs att denna datamängd inkluderar partiklar med varierande diameter mer än 100 nm eller användning av en annan typ av vätska. Detta är nödvändigt för att ta reda på om en teoretisk uppmätt större diffusivitet fortfarande leder till fler detektioner av partiklar med låg diffusivitet, eller om RVT presterar som den ska. Ett annat alternativ till den metod som använts i detta arbete är att applicera RVT-algoritmen på bilden upprepade gånger med r_{min} och r_{max} inställda för att detektera en viss storlek av partikel. Detta bör göra en mer korrekt detektion och minska falska positiva detektioner.

5.3.2 Tredimensionell spårning

Osäkerheten i z-led på tredimensionell detektion av experimentell data antas bero på att den syntetiska träningsdatan inte tillräckligt efterliknar verkliga förhållanden, speciellt då partiklar med stora z-förskjutningar från fokusplanet ger upphov till mindre korrekta avbildningar. Ett förbättringsområde som bör undersökas ytterligare är därför efterliknelse av partiklar för ett större z-spann. Det är även svårt att uppskatta hur rimliga partiklarnas rörelser är i Figur 4.7, eftersom tidsupplösningen är låg. För att utvärdera metoden ytterligare hade analys på experimentell data med högre tidsupplösning varit fördelaktigt, förslagsvis med en tiofaldig ökning av bildfrekvensen.

Träningen av LodeSTAR-modellen i tre dimensioner kräver många epoker. Orsaken kan vara att CNN-arkitekturen som använts inte är lämplig för mer än två dimensionella detektioner. Ett mer komplext nätverk hade kunnat lära sig att hitta partiklarna i alla tre dimensioner lättare, vilket hade fått träningen att konvergera fortare och därmed kortat ner träningstiden. Tyvärr fanns tiden inte till för att modifiera LodeSTAR-modellen för att vara mer anpassad till tredimensionell detektion, vilket är olyckligt, men något att ha i åtanke vid framtida implementeringar.

En nackdel med metoden är också att nya bilder måste genereras för varje z-transform under varje epok, vilket är tid- och resurskrävande. Det återstår att undersöka om denna nackdel väger upp de potentiella fördelarna med metoden.

Den presenterade metoden för träning av tredimensionell positionförutsägelse saknar realtidsvalidering. Istället utförs validering först i efterhand när diffusion och kovarians erhålls från experimentell data. Denna valideringsförsening medför en risk att nätverket överanpassas till den syntetiska datan och förlänger tiden att finjustera antalet träningsepoker, speciellt när träning redan tar så lång tid. Eventuellt hade diffusion- och kovariansberäkning på experimentell data kunnat automatiseras direkt i träningscykeln med möjlighet att detta tidskrävande tillägg minskar den totala tiden att bestämma optimala träningsparametrar.

5.4 Från oövervakad till övervakad inlärning

Tidigare implementeringar av LodeSTAR i tre dimensioner har använts för att analysera partiklar från holografisk mikroskopi. I dessa fall användes optisk propagering för att skapa bilder av partiklar med en förskjuten z-koordinat direkt från experimentell data [23]. Optisk propagering förutsätter dock att ett elektromagnetiskt fält kan extraheras från bilden, vilket är möjligt med holografisk mikroskopi, men inte med iSCAT där endast intensitetsfält kan erhållas. Inom ramen för detta projekt var därför denna metod inte genomförbar och alternativet var att antingen utföra optisk propagering på syntetiskt genererad data, eller att direkt generera ny syntetisk data med en förskjuten z-position. Det senare alternativet bedömdes vara enklare att implementera och valdes därför. Detta skifte mot att generera och använda syntetisk data innebar en förändring i träningsparadigmet från självövervakat till övervakat. Specifikt manipulerar vi z-transformen för att generera nya bilder genom att ändra z-positionen, och därigenom har vi indirekt märkt träningsdatan med information. Trots att vi inte direkt använder dessa märkningar för att beräkna förlusten, förankrar själva handlingen av att ändra och utnyttja en absolut z-position övervakning i inlärningen.

5.5 Slutsatser

Vad gäller partikeldetektioner i två dimensioner tycks LodeSTAR-modellen prestera tillfredställande för partiklar som har samma form på bilden, vilket är fallet för de flesta partiklarna i de 300 nm och 500 nm djupa brunnarna. Motiveringen är att partikelbanorna är rimliga och visar på Brownsk rörelse, samt att de uppmätta diffusiviteterna kan förklaras utifrån teori och det experimentella metoderna som använts vid insamlingen av data. Däremot presterar LodeSTAR-modellen inte lika tillfredsställande på partiklar med stor variation i utseende, såsom i den 5100 nm djupa brunnen, vilket förklaras med att formen och storleken på partiklarna varierar mer än i den 300 nm och 500 nm djupa brunnen .

LodeSTAR-modellen som använts för detektering av partiklar i tre dimensioner visar potential i att kunna spåra partiklar tillförlitligt, men noggrannare analys av partiklarnas rörelser med högre tidsupplösning hade behövts. Metoden ger rimliga resultat för partiklar nära fokusplanet, men presterar betydligt sämre när partiklarna är placerade längre bort. För ökad noggrannhet föreslås förbättrad

syntetisk partikelefterliknelse som mer exakt återspeglar partiklarnas verkliga förhållanden på olika djup.

Data- och kodtillgänglighet

Kod för detta arbete finns tillgänglig på https://github.com/aramyamal/iSCAT_PartikelSp-rning. Datan som användes för den tränade MAGIK-modellen finns på <http://celltrackingchallenge.net/2d-datasets/>. Mikroskopibilderna från The University of British Columbia finns ej att tillhandahålla.

Litteratur

- [1] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endreß, H. Büning, M. Hallek och C. Bräuchle, "Real-Time Single-Molecule Imaging of the Infection Pathway of an Adeno-Associated Virus," *Science*, årg. 294, nr 5548, s. 1929–1932, 2001. DOI: [10.1126/science.1064103](https://doi.org/10.1126/science.1064103). eprint: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.1064103>. URL: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1064103>.
- [2] Z. Gitai, "New fluorescence microscopy methods for microbiology: sharper, faster, and quantitative," *Current Opinion in Microbiology*, årg. 12, nr 3, s. 341–346, 2009, Ecology and Industrial Microbiology • Techniques, ISSN: 1369-5274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.03.001>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527409000290>.
- [3] J. Helmuth, C. Burckhardt, U. Greber och I. Sbalzarini, "Shape reconstruction of subcellular structures from live cell fluorescence microscopy images," *Journal of Structural Biology*, årg. 167, nr 1, s. 1–10, 2009, ISSN: 1047-8477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.017>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847709000987>.
- [4] E. Betzig, "Proposed method for molecular optical imaging," *Opt. Lett.*, årg. 20, nr 3, s. 237–239, febr. 1995. DOI: [10.1364/OL.20.000237](https://doi.org/10.1364/OL.20.000237). URL: <https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?URI=ol-20-3-237>.
- [5] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber och H. Schindler, "Imaging of single molecule diffusion," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, årg. 93, nr 7, s. 2926–2929, 1996. DOI: [10.1073/pnas.93.7.2926](https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2926). eprint: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.93.7.2926>. URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.93.7.2926>.
- [6] P. Kukura, H. Ewers, C. Müller, A. Renn, A. Helenius och V. Sandoghdar, "High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus," *Nature Methods*, årg. 6, nr 12, s. 923–927, nov. 2009, ISSN: 1548-7105. DOI: [10.1038/nmeth.1395](https://doi.org/10.1038/nmeth.1395). URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1395>.
- [7] C.-Y. Cheng, Y.-H. Liao och C.-L. Hsieh, "Dynamic signal of live biological cells under interferometric scattering (iSCAT) microscopy and its impacts on single-particle tracking," *Journal of Physics D: Applied Physics*, årg. 54, nr 36, s. 364001, juni 2021, ISSN: 1361-6463. DOI: [10.1088/1361-6463/ac083e](https://doi.org/10.1088/1361-6463/ac083e). URL: <http://dx.doi.org/10.1088/1361-6463/ac083e>.
- [8] J. Icha, M. Weber, J. C. Waters och C. Norden, "Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it," *BioEssays*, årg. 39, nr 8, juli 2017, ISSN: 1521-1878. DOI: [10.1002/bies.201700003](https://doi.org/10.1002/bies.201700003). URL: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201700003>.
- [9] K. Lindfors, T. Kalkbrenner, P. Stoller och V. Sandoghdar, "Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy," *Physical Review Letters*, årg. 93, nr 3, juli 2004, ISSN: 1079-7114. DOI: [10.1103/physrevlett.93.037401](https://doi.org/10.1103/physrevlett.93.037401). URL: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.037401>.
- [10] G. Young och P. Kukura, "Interferometric Scattering Microscopy," *Annual Review of Physical Chemistry*, årg. 70, nr 1, s. 301–322, 2019, PMID: 30978297. DOI: [10.1146/annurev-physchem-050317-021247](https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-050317-021247). eprint: <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-050317-021247>. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-050317-021247>.

- [11] M. G. Howlett, A. H. J. Engwerda, R. J. H. Scanes och S. P. Fletcher, "An autonomously oscillating supramolecular self-replicator," *Nature Chemistry*, årg. 14, nr 7, s. 805–810, maj 2022, ISSN: 1755-4349. DOI: 10.1038/s41557-022-00949-6. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41557-022-00949-6>.
- [12] A. Gemeinhardt, M. P. McDonald, K. König, M. Aigner, A. Mackensen och V. Sandoghdar, "Label-Free Imaging of Single Proteins Secreted from Living Cells via iSCAT Microscopy," *Journal of Visualized Experiments*, nr 141, nov. 2018, ISSN: 1940-087X. DOI: 10.3791/58486. URL: <http://dx.doi.org/10.3791/58486>.
- [13] G. Chen, I. Roy, C. Yang och P. N. Prasad, "Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy," *Chemical Reviews*, årg. 116, nr 5, s. 2826–2885, jan. 2016, ISSN: 1520-6890. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00148. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>.
- [14] D. Fan, Y. Cao, M. Cao, Y. Wang, Y. Cao och T. Gong, "Nanomedicine in cancer therapy," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, årg. 8, nr 1, aug. 2023, ISSN: 2059-3635. DOI: 10.1038/s41392-023-01536-y. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>.
- [15] Y. Wang, C. Wang, K. Li m. fl., "Recent advances of nanomedicine-based strategies in diabetes and complications management: Diagnostics, monitoring, and therapeutics," *Journal of Controlled Release*, årg. 330, s. 618–640, febr. 2021, ISSN: 0168-3659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.01.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.002>.
- [16] D. Diaz-Arévalo och M. Zeng, "Nanoparticle-based vaccines," i *Nanopharmaceuticals*. Elsevier, 2020, s. 135–150. DOI: 10.1016/b978-0-12-817778-5.00007-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817778-5.00007-5>.
- [17] A. Sharma, K. Kontodimas och M. Bosmann, "Nanomedicine: A Diagnostic and Therapeutic Approach to COVID-19," *Frontiers in Medicine*, årg. 8, juni 2021, ISSN: 2296-858X. DOI: 10.3389/fmed.2021.648005. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.648005>.
- [18] Y. Dong, X. Wu, X. Chen, P. Zhou, F. Xu och W. Liang, "Nanotechnology shaping stem cell therapy: Recent advances, application, challenges, and future outlook," *Biomedicine amp; Pharmacotherapy*, årg. 137, s. 111236, maj 2021, ISSN: 0753-3322. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111236. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111236>.
- [19] L. von Chamier, R. F. Laine, J. Jukkala m. fl., "Democratising deep learning for microscopy with ZeroCostDL4Mic," *Nature Communications*, årg. 12, nr 1, april 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-021-22518-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22518-0>.
- [20] Z. Liu, L. Jin, J. Chen m. fl., "A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis," *Computers in Biology and Medicine*, årg. 134, s. 104523, juli 2021, ISSN: 0010-4825. DOI: 10.1016/j.combiomed.2021.104523. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104523>.
- [21] F. Xing, Y. Xie, H. Su, F. Liu och L. Yang, "Deep Learning in Microscopy Image Analysis: A Survey," *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems*, årg. 29, nr 10, s. 4550–4568, okt. 2018, ISSN: 2162-2388. DOI: 10.1109/tnnls.2017.2766168. URL: <http://dx.doi.org/10.1109/TNNLS.2017.2766168>.
- [22] J. M. Newby, A. M. Schaefer, P. T. Lee, M. G. Forest och S. K. Lai, "Convolutional neural networks automate detection for tracking of submicron-scale particles in 2D and 3D," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, årg. 115, nr 36, s. 9026–9031, aug. 2018, ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1804420115. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1804420115>.
- [23] B. Midtvedt, J. Pineda, F. Skärberg m. fl., "Single-shot self-supervised object detection in microscopy," *Nature Communications*, årg. 13, nr 1, dec. 2022, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-022-35004-y. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-35004-y>.

- [24] B. Midtvedt, S. Helgadottir, A. Argun, J. Pineda, D. Midtvedt och G. Volpe, "Quantitative digital microscopy with deep learning," *Applied Physics Reviews*, årg. 8, nr 1, febr. 2021, ISSN: 1931-9401. DOI: 10.1063/5.0034891. URL: <http://dx.doi.org/10.1063/5.0034891>.
- [25] X. Ju, D. Murnane, P. Calafiura m. fl., "Performance of a geometric deep learning pipeline for HL-LHC particle tracking," *The European Physical Journal C*, årg. 81, nr 10, okt. 2021, ISSN: 1434-6052. DOI: 10.1140/epjc/s10052-021-09675-8. URL: <http://dx.doi.org/10.1140/epjc/s10052-021-09675-8>.
- [26] J. Pineda, B. Midtvedt, H. Bachimanchi m. fl., "Geometric deep learning reveals the spatiotemporal features of microscopic motion," *Nature Machine Intelligence*, årg. 5, nr 1, s. 71–82, jan. 2023, ISSN: 2522-5839. DOI: 10.1038/s42256-022-00595-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s42256-022-00595-0>.
- [27] B. Mehlig, *Machine Learning with Neural Networks: An Introduction for Scientists and Engineers*. Cambridge University Press, okt. 2021, ISBN: 9781108494939. DOI: 10.1017/9781108860604. URL: <http://dx.doi.org/10.1017/9781108860604>.
- [28] S. R. Dubey, S. K. Singh och B. B. Chaudhuri, *Activation Functions in Deep Learning: A Comprehensive Survey and Benchmark*, 2021. DOI: 10.48550/ARXIV.2109.14545. URL: <https://arxiv.org/abs/2109.14545>.
- [29] Springer New York, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-45528-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-45528-0>.
- [30] Y. LeCun, Y. Bengio och G. Hinton, "Deep learning," *Nature*, årg. 521, nr 7553, s. 436–444, maj 2015, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature14539. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14539>.
- [31] J. Heaton, "Ian Goodfellow, Yoshua Bengio, and Aaron Courville: Deep learning: The MIT Press, 2016, 800 pp, ISBN: 0262035618," *Genetic Programming and Evolvable Machines*, årg. 19, nr 1–2, s. 305–307, okt. 2017, ISSN: 1573-7632. DOI: 10.1007/s10710-017-9314-z. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10710-017-9314-z>.
- [32] R. Yamashita, M. Nishio, R. K. G. Do och K. Togashi, "Convolutional neural networks: an overview and application in radiology," *Insights into Imaging*, årg. 9, nr 4, s. 611–629, juni 2018, ISSN: 1869-4101. DOI: 10.1007/s13244-018-0639-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s13244-018-0639-9>.
- [33] X. Glorot, A. Bordes och Y. Bengio, "Deep Sparse Rectifier Neural Networks," i *Proceedings of the Fourteenth International Conference on Artificial Intelligence and Statistics*, G. Gordon, D. Dunson och M. Dudík, utg., ser. Proceedings of Machine Learning Research, vol. 15, Fort Lauderdale, FL, USA: PMLR, nov. 2011, s. 315–323. URL: <https://proceedings.mlr.press/v15/glorot11a.html>.
- [34] M. Valueva, N. Nagornov, P. Lyakhov, G. Valuev och N. Chervyakov, "Application of the residue number system to reduce hardware costs of the convolutional neural network implementation," *Mathematics and Computers in Simulation*, årg. 177, s. 232–243, 2020, ISSN: 0378-4754. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matcom.2020.04.031>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378475420301580>.
- [35] Y. Lecun, L. Bottou, Y. Bengio och P. Haffner, "Gradient-based learning applied to document recognition," *Proceedings of the IEEE*, årg. 86, nr 11, s. 2278–2324, 1998, ISSN: 0018-9219. DOI: 10.1109/5.726791. URL: <http://dx.doi.org/10.1109/5.726791>.
- [36] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton och R. J. Williams, "Learning representations by back-propagating errors," *Nature*, årg. 323, nr 6088, s. 533–536, okt. 1986, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/323533a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/323533a0>.
- [37] C.-L. Hsieh, "Ultrahigh-speed imaging reveals nanoscopic single-molecule dynamics," *SPIE Newsroom*, jan. 2017, ISSN: 1818-2259. DOI: 10.1117/2.1201611.006731. URL: <http://dx.doi.org/10.1117/2.1201611.006731>.

- [38] P. Kowalek, H. Loch-Olszewska och J. Szwabiński, "Classification of diffusion modes in single-particle tracking data: Feature-based versus deep-learning approach," *Physical Review E*, årg. 100, nr 3, sept. 2019, ISSN: 2470-0053. DOI: 10.1103/physreve.100.032410. URL: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.100.032410>.
- [39] H. Qian, M. Sheetz och E. Elson, "Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems," *Biophysical Journal*, årg. 60, nr 4, s. 910–921, 1991, ISSN: 0006-3495. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82125-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82125-7). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349591821257>.
- [40] A. Einstein, "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen," *Annalen der Physik*, årg. 322, nr 8, s. 549–560, jan. 1905, ISSN: 1521-3889. DOI: 10.1002/andp.19053220806. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/andp.19053220806>.
- [41] C. L. Vestergaard, P. C. Blainey och H. Flyvbjerg, "Optimal estimation of diffusion coefficients from single-particle trajectories," *Phys. Rev. E*, årg. 89, s. 022726, 2 febr. 2014. DOI: 10.1103/PhysRevE.89.022726. URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.89.022726>.
- [42] A. D. Kashkanova, A. B. Shkarin, R. G. Mahmoodabadi m. fl., "Precision single-particle localization using radial variance transform," *Optics Express*, årg. 29, nr 7, s. 11070, mars 2021, ISSN: 1094-4087. DOI: 10.1364/oe.420670. URL: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.420670>.
- [43] G. Deng och L. Cahill, "An adaptive Gaussian filter for noise reduction and edge detection," i *1993 IEEE Conference Record Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference*, ser. NSSMIC-93, IEEE. DOI: 10.1109/nssmic.1993.373563. URL: <http://dx.doi.org/10.1109/NSSMIC.1993.373563>.
- [44] M. C. Beckerle, "Microinjected fluorescent polystyrene beads exhibit saltatory motion in tissue culture cells," *The Journal of cell biology*, årg. 98, nr 6, s. 2126–2132, juni 1984, ISSN: 1540-8140. DOI: 10.1083/jcb.98.6.2126. URL: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.98.6.2126>.
- [45] X. Yuan, J. Shi, Y. Kang, J. Dong, Z. Pei och X. Ji, "Piezoelectricity, Pyroelectricity, and Ferroelectricity in Biomaterials and Biomedical Applications," *Advanced Materials*, årg. 36, nr 3, nov. 2023, ISSN: 1521-4095. DOI: 10.1002/adma.202308726. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/adma.202308726>.
- [46] E. Olsén, B. García Rodríguez, F. Skärberg m. fl., "Dual-Angle Interferometric Scattering Microscopy for Optical Multiparametric Particle Characterization," *Nano Letters*, årg. 24, nr 6, s. 1874–1881, jan. 2024, ISSN: 1530-6992. DOI: 10.1021/acs.nanolett.3c03539. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c03539>.
- [47] S. van der Walt, J. L. Schönberger, J. Nunez-Iglesias m. fl., "scikit-image: image processing in Python," *PeerJ*, årg. 2, e453, juni 2014, ISSN: 2167-8359. DOI: 10.7717/peerj.453. URL: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.453>.



GÖTEBORGS
UNIVERSITET



CHALMERS