

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki
Katedra Automatyki



Autoreferat rozprawy doktorskiej

Rekonstrukcja 3D komórek glejowych mózgu

mgr inż. Anna Romanowska-Pawliczek

Promotor:
Prof. dr hab. inż. Ryszard Tadeusiewicz

Kraków, 2010

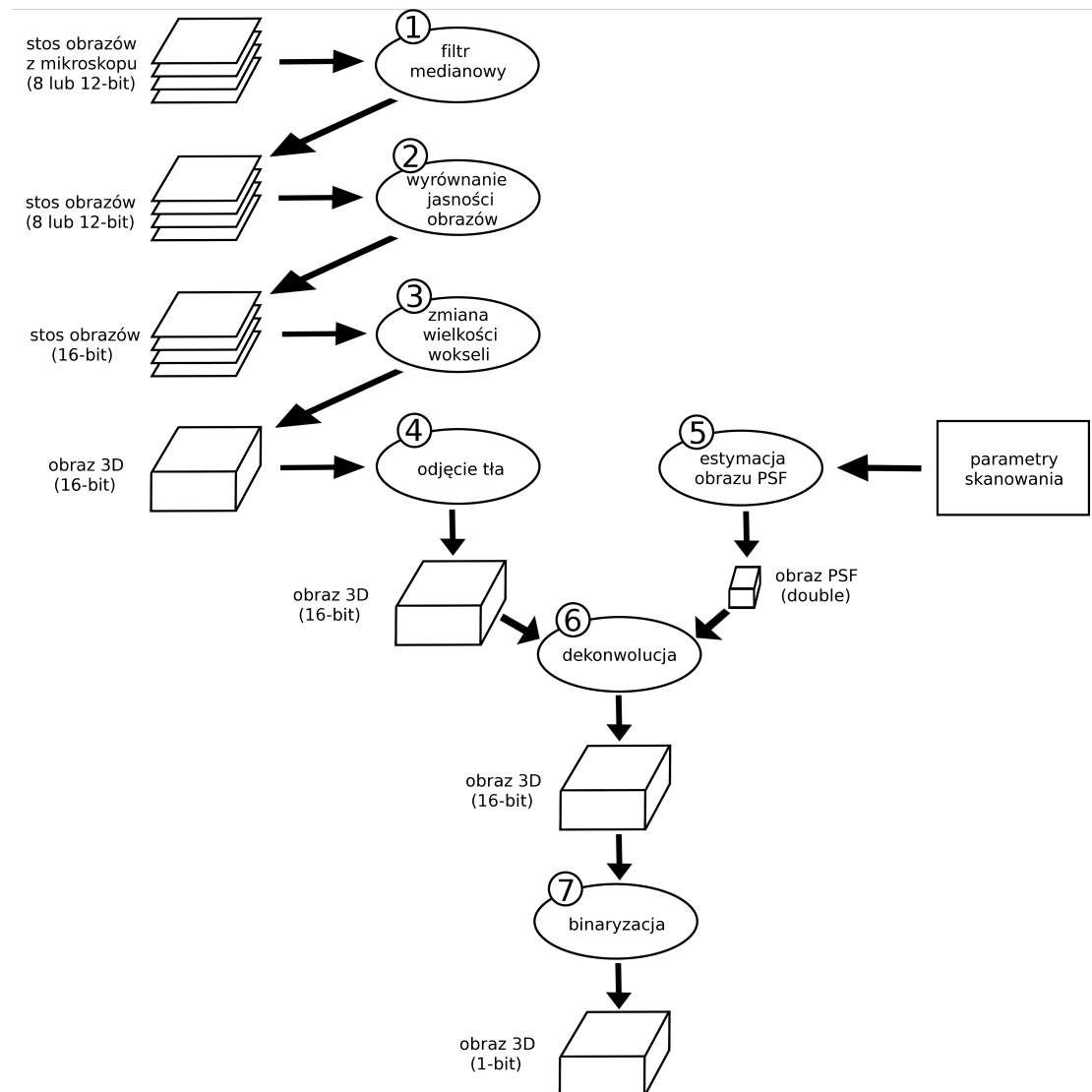
1 Wstęp

Przekonanie, że morfologia komórek tkanki nerwowej ma ścisły związek z pełnionymi przez nie funkcjami daje się zauważyć już w publikacjach pionierów neurobiologii z przełomu XIX i XX wieku. Jednak dopiero pod koniec XX wieku rozwój immunocytochemii, mikroskopii konfokalnej i komputerowych metod przetwarzania i analizy obrazu stworzył realne możliwości sprawdzenia tej tezy, dostarczając narzędzi do ilościowego opisu kształtu komórek. Większość badań skupia się jednak na komórkach nerwowych. Dotychczasowe zaangażowanie w badania nad morfologią komórek glejowych było znacznie mniejsze. Wykorzystywało głównie metody ilościowe w pracach nad rozwojem tych komórek oraz nad ich reakcją na różnego rodzaju czynniki patogenne, takie jak infekcje, urazy, czy choroby neurodegeneracyjne. Zmiany w morfologii komórek mogą być jednym z pierwszych objawów zmian patologicznych. Stąd też metody które pozwolą na precyzyjne badanie zmian kształtu mogą mieć fundamentalne znaczenie w diagnostyce. Najnowsze badania dowodzą, że komórki glejowe, w szczególności astrocyty, nie tylko wspomagają metabolicznie neurony i pełnią funkcje ochronne, ale są również aktywnym uczestnikiem procesu przetwarzania informacji. Poglądów na temat znaczenia gleju wciąż przybywa. Rozwój metod, które pozwolą na badanie istotnego aspektu reakcji komórek glejowych, czyli zmian ich kształtu, może mieć istotne znaczenie zarówno w badaniach dotyczących podstawowych mechanizmów funkcjonowania systemu nerwowego, jak i w poszukiwaniu przyczyn chorób systemu nerwowego i metod ich leczenia. Układ nerwowy zbudowany jest nie tylko z komórek nerwowych, ale zawiera także szereg typów komórek glejowych. Pod względem stopnia złożoności morfologicznej komórki glejowe nie ustępują komórkom nerwowym, a pod względem różnorodności pełnionych funkcji nawet je przewyższają. Badania szacunkowe wykazują, że w układzie nerwowym jest znacznie więcej komórek glejowych niż komórek nerwowych.

Narzędziem badawczym używanym w tej pracy jest mikroskop fluorescencyjny. Jest to mikroskop świetlny używany w badaniach substancji organicznych i nieorganicznych, którego działanie oparte jest na zjawisku fluorescencji i fosforescencji, zamiast, lub wraz ze zjawiskami odbicia i absorpcji światła (co jest wykorzystane w klasycznym mikroskopie optycznym). Mikroskop konfokalny umożliwia dokonywanie tzw. przekrojów optycznych preparatu, analizuje bowiem światło pochodzące z jednej jego płaszczyzny, eliminując światło docierające z warstw położonych wyżej lub niżej. Możliwa jest analiza przekrojów optycznych na różnej głębokości preparatu. Technika mikroskopii konfokalnej umożliwia uzyskiwanie wysokiej jakości obrazów oraz rekonstrukcji obrazów w trzech wymiarach. W niniejszej pracy poddano analizie i trójwymiarowej rekonstrukcji jeden typ komórek glejowych - astrocyty. W celu ich identyfikacji poddano je barwieniu immunocytochemicznemu z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego kwaśne włókninkowe białko glejowe GFAP (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein). Jest ono markerem astrocytów, który wybarwia ich cytoszkielet. Dodatkowo użyto fluorochromu DAPI, czyli aromatycznej heterocyklicznej aminy, która wiąże się silnie do DNA. Barwienie w kierunku DAPI umożliwiło określenie lokalizacji jąder komórkowych w analizowanych skrawkach tkanki mózgowej.

2 Wstępne przetwarzanie stosów DAPI i GFAP

Schemat procedury wstępnego przetwarzania analizowanych stosów został przedstawiony na rysunku 1. Głównymi elementami opracowanej procedury są trzy następujące etapy:



Rysunek 1: Schemat wstępnego przetwarzania stosów obrazów

wyrównanie jasności obrazów w obrębie stosu, dekonwolucja trójwymiarowych obrazów oraz binaryzacja. Pierwsze dwa etapy zostały krótko opisane poniżej. Do binaryzacji został wykorzystany algorytm SIS (ang. Simple Image Statistic), opisany w [2]. Polega on na wyznaczeniu globalnej wartości progowej na podstawie prostych statystyk obrazu.

2.1 Wyrównanie jasności obrazów

Obrazy 2D w obrębie pojedynczego stosu mają różną jasność. Dla części obrazów GFAP początkowe przekroje są relatywnie ciemne, ale ich jasność wzrasta aż do osiągnięcia wartości najwyższej. Następnie jasność kolejnych obrazów jest coraz mniejsza, aż do zupełnie ciemnych i nieczytelnych obrazów na końcu stosu. Jasność obrazów w stosach DAPI jest bardziej stabilna, ale również zmienia się wraz z głębokością.

Aby wyrównać jasność obrazów w stosie trzeba wybrać jeden z obrazów jako obraz wzorcowy, do którego będą dopasowywane pozostałe obrazy. Dla każdego przetwarza-

nego stosu jako obraz wzorcowy wybrany został obraz leżący w jego środku (w połowie stosu). Pozostałe obrazy są korygowane poprzez wykonanie na wartościach ich wokseli prostego przekształcenia liniowego postaci:

$$p_{new} = a_j \cdot p_{old} + b_j \quad (1)$$

Współczynniki a_j i b_j są osobno wyznaczane dla każdego z obrazów stosu. Są one wyznaczane na podstawie porównania obrazu z jednym z sąsiadujących z nim obrazów, który został już skorygowany. W pierwszym kroku korygowane są dwa obrazy sąsiadujące bezpośrednio z obrazem wzorcowym, potem kolejne dwa, sąsiadujące bezpośrednio ze skorygowanymi obrazami. W ten sposób, obraz po obrazie, zostaje skorygowany cały stos.

Problemem, jaki trzeba rozwiązać, jest sposób wyznaczenia wartości współczynników a_j i b_j dla obrazu I_j , zakładając, że znamy już wartości analogicznych współczynników a_w i b_w dla sąsiadującego z nim obrazu wzorcowego I_w . Zaproponowane w pracy rozwiązanie bazuje na porównywaniu skumulowanych histogramów H_j i H_w . Dla wartości pikseli p , dla których histogram ma niezerową wartość, próbujemy dopasować odpowiadającą mu wartość piksela z drugiego obrazu. Następnie dla wyznaczonych w ten sposób par wartości pikseli szukamy najlepiej pasujących wartości a_j i b_j . Za rozwiązanie tego problemu przyjęto minimum globalne następującej funkcji:

$$\epsilon(a_j, b_j) = \sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_j(p) > 0 \wedge H_j(p) \leq 0,7 \cdot |X(I_j)|} |a_j \cdot p + b_j - a_w \cdot H_w^{-1}(H_j(p)) - b_w| + \sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_w(p) > 0 \wedge H_w(p) \leq 0,7 \cdot |X(I_w)|} |a_w \cdot p + b_w - a_j \cdot H_j^{-1}(H_w(p)) - b_j| \quad (2)$$

2.2 Dekonwolucja

Każdy obraz otrzymywany za pomocą jakiegokolwiek systemu optycznego takiego jak mikroskop, kamera albo luneta jest obrazem zniekształconym. Zniekształcenia te spowodowane są przez różnego rodzaju aberracje, jak również poprzez własności ośrodków, przez które przemieszczają się promienie świetlne tworzące obraz. Powstałe w ten sposób deformacje rzeczywistego obrazu mogą być opisane za pomocą tak zwanej funkcji PSF (ang. Point Spread Function). Jeżeli założymy, że dla każdego punktu leżącego w obszarze obrazu funkcja PSF jest taka sama, to wyjściowy (zarejestrowany) obraz może być zamodelowany jako wynik konwolucji (splotu) obrazu PSF-a z obrazem wejściowym (tj. rzeczywistym, bez zniekształceń).

Celem zastosowania dekonwolucji jest odtworzenie obrazu rzeczywistego na podstawie obrazu wyjściowego oraz zmierzonej (lub oszacowanej) funkcji PSF. Określenia obrazu PSF dokonuje się na drodze teoretycznych obliczeń lub za pomocą pomiarów. Przy dekonwolucji obrazów przetwarzanych w ramach niniejszej pracy użyto obrazów PSF uzyskanych na podstawie teoretycznych obliczeń, bazujących na modelu przedstawionym w [8].

Wszystkie analizowane w tej pracy trójwymiarowe obrazy komórek były poddane procesowi dekonwolucji z wykorzystaniem algorytmu Richardson-Lucy ([7], [4]) rozszerzonego o regularyzację Conchello ([1]). Algorytm ten polega na poprawianiu jakości obrazu w kolejnych iteracjach zgodnie z następującym wzorem:

$$f^{(k+1)} = f^{(k)} A^T \left(\frac{g}{A f^{(k)}} \right) \quad (3)$$

We wzorze 3 funkcje f i g oznaczają odpowiedniki funkcji F i G_{OUT} w przestrzeni ciągłej, liczba k oznacza numer iteracji, natomiast A jest przekształceniem liniowym odpowiadającym konwolucji z zadaną funkcją PSF.

3 Wyodrębnienie komórek z obrazów 3D i rekonstrukcja ich struktury

Danymi wejściowymi do zaproponowanej w tej pracy procedury rekonstrukcji komórek są dwa binarne 3D obrazy przedstawiające ten sam skrawek preparatu, z których jeden jest obrazem DAPI, a drugi obrazem GFAP. Obrazy te muszą się dokładnie pokrywać, mieć identyczny rozmiar i taką samą wielkość woksela. Na rysunku 2 przedstawiono schemat zaprojektowanej procedury do wyznaczania struktur komórek. Najważniejsze etapy zostały opisane poniżej.

3.1 Wyznaczanie położenia jąder komórkowych

Opracowana metoda wyszukiwania na obrazie 3D jąder komórkowych polega na wyznaczaniu zawartych w podanym obrazie kulistych kształtów o promieniu z zadanego przedziału. Ponieważ DAPI w praktyce wybarwia jądra komórkowe w okolicy błony jądrowej, są one widoczne na analizowanych obrazach jako sfery - kuliste kształty puste w środku. Dlatego do wyszukiwania na obrazie jąder komórkowych użyto specjalnie zaprojektowanego algorytmu wyznaczającego na obrazie sfery o zadanym promieniu i grubości.

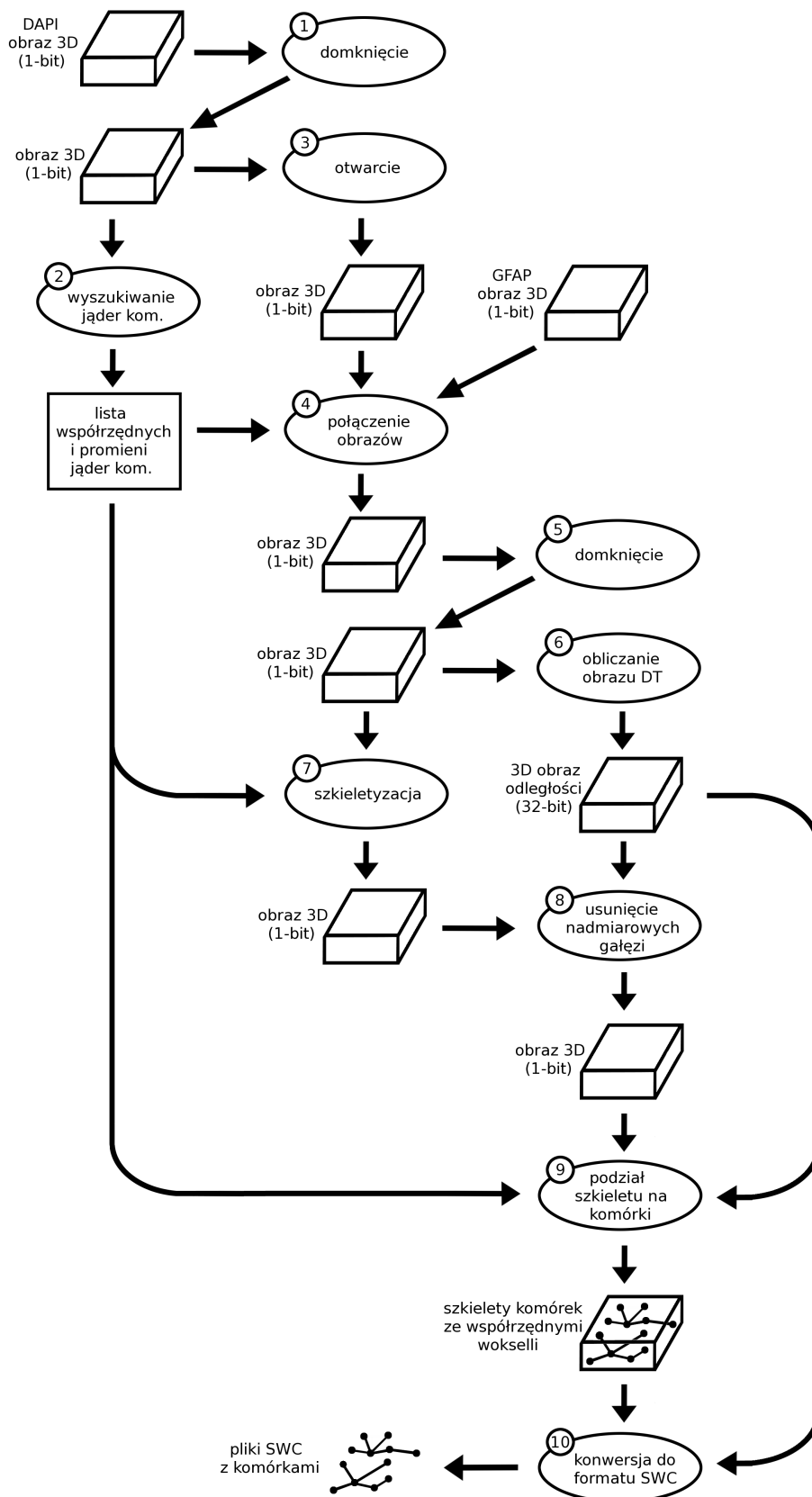
Opracowany algorytm był zainspirowany działaniem transformaty Hough'a. Wyszukiwane na trójwymiarowym obrazie sfery są jednoznacznie określone przez następujące parametry:

- położenie środka $\bar{x}_s = [x_{s0}, x_{s1}, x_{s2}]$ (trzy współrzędne)
- promień R

Wszystkie te wartości podane są jako liczby całkowite, z czego pierwsze trzy są tożsame ze współzrędnymi wokseli. Jako dane wejściowe algorytmu podawane są następujące parametry:

- obraz binarny F w którym wyszukiwane są sfery
- minimalny promień szukanych sfer R_{min} – liczba całkowita
- maksymalny promień szukanych sfer R_{max} – liczba całkowita
- grubość sfery b – liczba wokseli stanowiąca “grubość” ściany sfery
- próg dopasowania T_h – minimalny procent pokrycia sfery przez woksele obrazu

W klasycznym podejściu, bazującym na transformacie Hough'a, należałoby zbudować czterowymiarowy obraz (czwartym wymiarem jest promień), w którym należałoby wyszukać maksima. Ponieważ operujemy na dość dużych obrazach, podejście to miałoby zbyt dużą złożoność pamięciową. Dlatego zaprojektowano specjalny algorytm, działający w podobny sposób i mający dużo mniejszą złożoność pamięciową. Polega on na



Rysunek 2: Schemat rekonstrukcji komórek

wielokrotnym wykonywaniu prostszego algorytmu wyszukiwania sfer o ustalonym promieniu.

W pierwszej kolejności wyszukiwane są sfery o największym zadanym promieniu R_{max} . Znalezione sfery wraz z wnętrzem usuwane są z obrazu wejściowego. W kolejnych iteracjach algorytmu promień wyszukiwanych sfer R jest zmniejszany o jeden woxsel, aż do osiągnięcia minimalnej interesującej nas wartości R_{min} .

W efekcie działania algorytmu otrzymujemy współrzędne środków znalezionych sfer oraz ich promienie (są to zawsze wartości całkowite). Przy wyszukiwaniu sfer korzystamy z binarnej, trójwymiarowej maski M_S określonej wzorem:

$$M_S(\bar{x}) = \begin{cases} 1 & \text{gdy } R - b \leq \sqrt{\left(\frac{r_0(M_S)}{2} - x_0\right)^2 + \left(\frac{r_1(M_S)}{2} - x_1\right)^2 + \left(\frac{r_2(M_S)}{2} - x_2\right)^2} \leq R \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (4)$$

gdzie $r_0(M_S)$, $r_1(M_S)$, $r_2(M_S)$ to rozmiary maski względem osi X, Y oraz Z, b to grubość ściany sfery, natomiast R to promień aktualnie szukanej sfery. W każdym wokselu obrazu F umieszczana jest potencjalna sfera o zadanym promieniu R . Jeżeli niezerowe wokselse obrazu F pokrywają tę sferę w stopniu nie mniejszym niż próg dopasowania T_h , to uznajemy, że w tym miejscu na obrazie F znajduje się sfera.

Podczas tego procesu należy zwrócić uwagę na to, że jeden kulisty kształt na obrazie z reguły dopasowuje kilka podobnych sfer o leżących blisko siebie środkach. Aby rozwiązać ten problem, w każdej iteracji wybierana jest jedna, najlepiej dopasowana sfera. Jest ona dodawana do wyniku i usuwana wraz z wnętrzem z analizowanego obrazu. Dzięki temu w następnej iteracji nie zostaną wykryte sfery o podobnej wielkości i położeniu.

W celu wyznaczenia pozycji na obrazie F , w których najlepiej jest dopasowany kształt sfery przedstawiony na masce M_S , obliczany jest obraz B . Wartość każdego z jego wokseli jest równa liczbie dopasowanych wokseli z maski sfery, której środek znajduje się w tym wokselu. Obraz B można zdefiniować następująco:

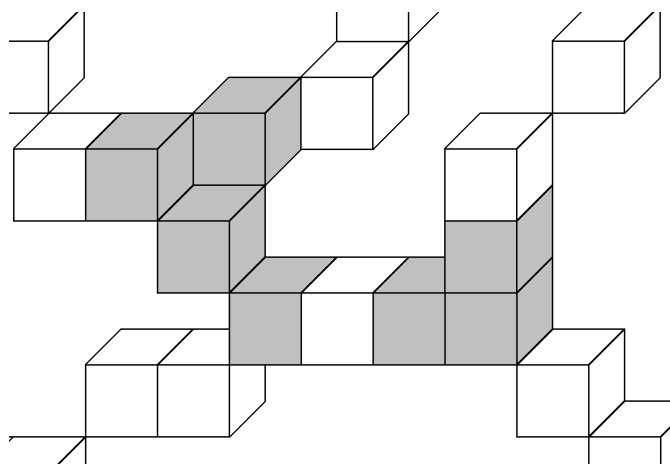
$$B(\bar{x}) = \sum_{\bar{t} \in \chi(M_S)} M_S(\bar{t}) \cdot F \left(x_0 - \frac{r_0(M_S)}{2} + t_0, x_1 - \frac{r_1(M_S)}{2} + t_1, x_2 - \frac{r_2(M_S)}{2} + t_2 \right) \quad (5)$$

Ponieważ jest to działanie liniowe, do efektywnego obliczenia obrazu B można użyć operatora konwolucji, co pozwala na szybkie wykonanie obliczeń za pomocą szybkiej transformaty Fourier'a.

3.2 Szkieletyzacja

Na podstawie zbinaryzowanych obrazów GFAP oraz wyznaczonych z obrazów DAPI parametrów jąder komórkowych obliczany jest szkielet. Do szkieletyzacji obrazu został użyty algorytm ścieniania zachowujący topologię obiektu zaproponowany w [5], a dokładniej jego poprawiona wersja przedstawiona w pracach [6] i [3].

Otrzymany w ten sposób szkielet zawiera sporo nadmiarowych gałęzi o niewielkich rozmiarach. Jest to spowodowane przez to, że podczas procesu szkieletyzacji nawet niewielkie nierówności na powierzchni komórki są traktowane jako osobne gałęzie. Problem ten został rozwiązany poprzez usunięcie niektórych końcowych gałęzi z otrzymanego szkieletu.



Rysunek 3: Przykładowy fragment szkieletu. Na szaro zaznaczono woksele posiadające więcej niż dwóch sąsiadów.

3.3 Podział szkieletu na komórki oraz zapisanie ich w formacie SWC

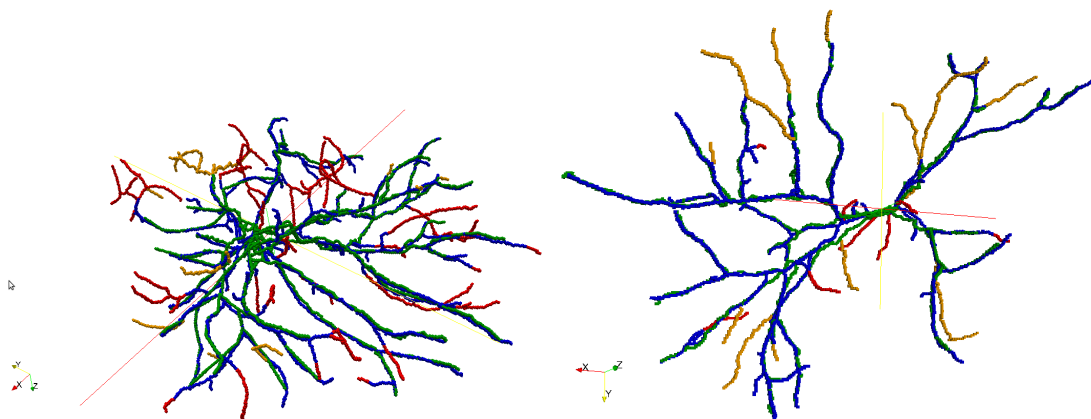
Aby umożliwić analizę struktury, którą tworzą wybarwione komórki, trzeba go zapisać w postaci grafu. Na pierwszy rzut oka otrzymany wskutek wcześniejszych przekształceń szkielet dobrze przedstawia strukturę wybarwionych komórek. Jednak po dokładniejszej analizie można zauważyć, że nie wyznacza on w jednoznaczny sposób krawędzi i wierzchołków. Przykładowy fragment szkieletu został przedstawiony na rysunku 3. Woksele zaznaczone na szaro mają więcej niż dwóch sąsiadów, jednak nie powinny być zakwalifikowane jako osobne wierzchołki. W pracy przyjęto założenie, że takie grupy wokseli definiują pojedynczy wierzchołek grafu.

Kolejnym problemem jest wyodrębnienie z powstałego grafu drzew reprezentujących poszczególne komórki. W idealnym przypadku otrzymany graf powinien się składać z drzew, przy czym każde drzewo powinno zawierać po jednym jądrze komórkowym. W rzeczywistości jednak wynikiem powyższych operacji jest jeden lub kilka grafów zawierających cykle, przy czym niektóre nie są połączone z żadnym jądrem, a niektóre są połączone z kilkoma jądrami. Zaproponowany w pracy algorytm podziału grafu polegał na usuwaniu najcieńszych krawędzi.

4 Wyniki rekonstrukcji

Z przetwarzanych w ramach niniejszej pracy stosów obrazów wybrano pięć komórek i dokonano ich ręcznej rekonstrukcji. Rekonstrukcja została wykonana z wykorzystaniem programu Neuromorpho.org. Otrzymane w ten sposób szkielety komórek zostały porównane ze szkieletami uzyskanymi w drodze automatycznej rekonstrukcji. W tym celu każdą parę szkieletów naniesiono na jeden obraz 3D. Osobnymi kolorami zaznaczono pokrywające się części szkieletu, a innymi te, które nie mają odpowiadającego fragmentu w drugim szkielecie. Przykładowy wyniki takiego porównania został przedstawiony na rysunku 4.

Kolorem niebieskim zaznaczono te części szkieletu otrzymanego w wyniku automatycznej rekonstrukcji, które pokrywały się ze szkieletem wyznaczonym ręcznie. Pozostałą część wyznaczonego automatycznie szkieletu oznaczono kolorem czerwonym. Analogicz-



Rysunek 4: Porównanie szkieletów komórek otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.

nie podzielono szkielet wyznaczony ręcznie. Część szkieletu, pokrywająca się ze szkieletem wyznaczonym automatycznie, została zaznaczona kolorem zielonym. Pozostałą część szkieletu zaznaczono kolorem pomarańczowym.

Pomijając wyniki otrzymane dla obrazów o bardzo małej rozdzielczości, system był w stanie automatycznie rozpoznać struktury analizowanych komórek. Uzyskiwano wyniki na poziomie 75% zgodności (w porównaniu do wyników ręcznej rekonstrukcji), co można uznać za dobry wynik. Automat zdecydowanie odtwarzał generalną strukturę badanej komórki i prawidłowo ją lokalizował i orientował przestrzennie. Rozbieżności pojawiały się na etapie odtwarzania drobnych szczegółów struktury, na przykład takich, które zostały źle odwzorowane w procesie barwienia.

5 Oryginalne elementy pracy

Najistotniejszym rezultatem niniejszej pracy jest opracowanie, zaimplementowanie i przetestowanie systemu, pozwalającego na automatyczną rekonstrukcję struktur astrocytów na podstawie stosów obrazów 2D otrzymanych za pomocą mikroskopu konfokalnego. Schemat działania opracowanego systemu został w skrócie przedstawiony na rysunkach 1 oraz 2. Schemat ten zarówno w całości jak i w drobnych szczegółach jest oryginalnym rozwiązaniem będącym własnym osiągnięciem autorki rozprawy.

W ramach niniejszej pracy zostały również zaprojektowane i przetestowane własne algorytmy, stanowiące część systemu rekonstrukcji. Są to:

- Algorytm do wyrównywania jasności obrazów 2D w obrębie stosu
- Algorytm służący do wyznaczania położenia i wielkości jąder komórkowych na obrazie 3D, otrzymanym z preparatu wybarwionego przez DAPI
- Algorytm ekstrakcji drzew (tj. grafów acyklicznych) reprezentujących struktury poszczególnych komórek glejowych z binarnego obrazu 3D, otrzymanego z preparatu wybarwionego przez GFAP

Całkowicie własnym opracowaniem jest też całe stworzone oprogramowanie oraz wszystkie wyniki jego badań.

Literatura

- [1] Conchello J., McNally J.G. Fast regularization technique for expectation maximization algorithm for optical sectioning microscopy. *Digital Image Processing, Analysis, and Visualization*, tom 2655, 199–208. 1996.
- [2] Kittler J., Illingworth J., Föglein J. Threshold selection based on a simple image statistic. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 30, 125–147, 1985.
- [3] Klette G., Pan M. 3D Topological Thinning by Identifying Non-simple Voxels. *Combinatorial Image Analysis, Lecture Notes in Computer Science*, tom 3322/2005, 164–175. Springer Berlin / Heidelberg, 2005.
- [4] Lucy L.B. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal*, 79, 745, 1974.
- [5] Palágyi K., Kuba A. A 3D 6-subiteration thinning algorithm for extracting medial lines. *Pattern Recognition Letters*, 19, 613–627, 1998.
- [6] Pan M., Klette G. A Revision of a 3D Skeletonization Algorithm. Technical Report 143, CITR, The University of Auckland, New Zealand, 2004.
- [7] Richardson W.H. Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration. *Journal of the Optical Society of America*, 62, 55–59, 1972.
- [8] Sheppard C.J.R., Török P. Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *Journal of Microscopy*, 185, 366–374, 1997.