

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



Rozprawa doktorska

Rekonstrukcja 3D komórek glejowych mózgu

mgr inż. Anna Romanowska-Pawliczek

Promotor:
Prof. dr hab. inż. Ryszard Tadeusiewicz

Kraków, 2010

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu Profesorowi Ryszardowi Tadeusiewiczowi za cenne uwagi i pomoc w opracowaniu niniejszej pracy. Bardzo dziękuję również mojej rodzinie i przyjaciołom za cierpliwość i wsparcie.

Spis treści

Zestawienie używanych symboli	4
Zestawienie używanych skrótów	7
1 Wstęp	9
1.1 Teza pracy	10
1.2 Układ pracy	10
1.3 Wprowadzenie	11
1.3.1 Komórki glejowe	11
1.3.2 Mikroskopia konfokalna	13
1.3.3 Analiza trójwymiarowych obrazów	17
2 Metody rekonstrukcji morfologii komórek z obrazów 3D	20
2.1 Metody detekcji neuronów	20
2.2 Techniki przetwarzania rozpoznawczego	21
2.3 Automatyczna 3D segmentacja	23
2.4 3D spektralna konfokalna mikroskopia	23
2.5 Manualne metody rekonstrukcji struktur biologicznych	24
2.6 Automatyczne metody rekonstrukcji struktur biologicznych	25
3 Metody przetwarzania obrazów	30
3.0.1 Matematyczna definicja obrazu	31
3.1 Przekształcenia punktowe	31
3.1.1 Modulacja gamma	32
3.1.2 Wyrównanie histogramu	32
3.2 Binaryzacja	32
3.2.1 Algorytm SIS	33
3.2.2 Algorytm Bernsena	34
3.3 Transformacja Fouriera	35
3.3.1 Definicja transformacji Fouriera	35
3.3.2 Konwolucja obrazów	36
3.4 Filtracja obrazu	37
3.4.1 Filtry liniowe	37
3.4.2 Filtry nieliniowe	38
3.5 Przekształcenia morfologiczne	40
3.5.1 Erozja i dylatacja	41
3.5.2 Otwarcie i zamknięcie	41
3.5.3 Ścienianie	43

3.6	Transformata Hough'a	45
3.7	Dekonwolucja	47
4	Pozyskanie stosów obrazów do analizy	51
4.1	Budowa i działanie mikroskopu konfokalnego	51
4.2	Metodyka wykonywania zdjęć w mikroskopie konfokalnym	53
4.3	Barwienie komórek glejowych	55
4.4	Akwizycja stosów obrazów na potrzeby pracy	55
4.5	Stosy obrazów wykorzystane w pracy	57
5	Wstępne przetwarzanie stosów DAPI i GFAP	60
5.1	Schemat wstępnego przetwarzania obrazów	60
5.2	Wyrównywanie jasności obrazów 2D w obrębie stosu	63
5.2.1	Problem zmieniającej się jasności w obrębie stosu	63
5.2.2	Algorytm wyrównywania jasności obrazów 2D w obrębie stosu	65
5.3	Zmiana wielkości wokseli	69
5.4	Dekonwolucja	69
5.4.1	Odejście tła od obrazu	69
5.4.2	Estymacja obrazu PSF dla mikroskopu fluorescencyjnego	73
5.4.3	Implementacja algorytmu dekonwolucji Richardson-Lucy	74
5.5	Wyniki wstępnego przetwarzania obrazów	76
6	Wyodrębnienie komórek z obrazów 3D i rekonstrukcja ich struktury	83
6.1	Schemat procedury rekonstrukcji komórek	83
6.2	Wyznaczanie położenia jąder komórkowych	86
6.2.1	Przyjęte założenia	86
6.2.2	Algorytm wyszukiwania sfer w obrazie 3D	86
6.2.3	Wyniki	88
6.3	Obliczanie szkieletu	91
6.3.1	Szkieletyzacja	91
6.3.2	Redukcja szkieletu	92
6.4	Wyznaczenie struktur SWC	94
6.4.1	Konwersja szkieletu do grafu	94
6.4.2	Wyodrębnienie pojedynczych komórek	97
6.4.3	Zapisanie struktury komórek w formacie SWC	97
7	Wyniki rekonstrukcji struktury komórek	101
7.1	Obraz 2D zrekonstruowanych komórek	101
7.2	Porównanie z wynikiem ręcznej rekonstrukcji	105
8	Podsumowanie	113
8.1	Wnioski końcowe	113
8.2	Oryginalne elementy pracy	114
8.3	Sugerowane kierunki dalszych badań	115
	Bibliografia	116
	Spis tablic i rysunków	128

Zestawienie używanych symboli

a	Zmienna pomocnicza
a_j	Współczynnik przekształcenia L_j
B	Zmienna pomocnicza, oznacza obraz
b	Zmienna pomocnicza
b_j	Współczynnik przekształcenia L_j
$\mathbb{C}$	Zbiór liczb zespolonych
$\chi(F)$	Zbiór wektorów $\bar{x} \in \mathbb{Z}^N$, należących do obrazu F
$ \chi(F) $	Moc zbioru $\chi(F)$, czyli ilość wokseli w obrazie F
C_i	Zbiory wokseli, używane w algorytmie szkieletyzacji ($i = 0, 1, 2$)
d	Numer wymiaru, $d \in \mathbb{Z}$, $1 \leq d \leq N$
D_Z	Ilość obrazów 2D w stosie
E	Zbiór krawędzi grafu
F	Obraz
F_{BIN}	Obraz będący wynikiem wykonania binaryzacji
F_{DT}	Obraz zawierający wynik transformaty odległości (<i>distance transform</i>)
f_{Fr}	Transformacja Fouriera dla funkcji f
F_{GAMMA}	Obraz będący wynikiem wykonania modulacji gamma
F_{MAX}	Obraz będący wynikiem wykonania filtra maksymalnego
F_{MIN}	Obraz będący wynikiem wykonania filtra minimalnego
F_{NEG}	Obraz będący wynikiem wykonania negacji dla obrazu binarnego
F_{RSK}	Obraz binarny zawierający szkielek po redukcji

F_{SK}	Obraz binarny zawierający szkielet (wynik szkieletyzacji)
G	Graf nieskierowany
G_T	Graf nieskierowany będący drzewem
H_v	Zbiór wokseli obrazu skojarzonych z wierzchołkiem grafu
$H_j(p)$	Ilość pikseli o wartości mniejszej lub równej p w obrazie j (skumulowany histogram)
$h_j(p)$	Ilość pikseli o wartości p w obrazie j (histogram)
$H_j^{-1}(p)$	Funkcja odwrotna do H_j
H_v	Zbiór wokseli obrazu skojarzonych z krawędzią grafu
ι	Jednostka urojona ($\iota^2 = -1$)
I_j	Obraz 2D o indeksie j (ze stosu)
K	Zbiór wokseli, używany w algorytmie szkieletyzacji
l_{eu}	Liczba Euler'a
L_j	Przekształcenie liniowe, jakiemu podawany jest obraz o indeksie j podczas wyrównywania jasności w obrębie stosu
$m(\bar{v})$	Długość wektora $\bar{v}$
M_R	Obraz binarny zawierający maskę o promieniu R
M_S	Binarna maska zawierająca centralnie położoną sferę
$M_{\bar{x}}$	Zbiór współrzędnych wokseli mieszczących się w oknie wokół woksela $\bar{x}$
N	Ilość wymiarów
n	Zmienna pomocnicza
$ng(F, \bar{x})$	ilość niezerowych wokseli w obrazie F bezpośrednio stycznych z wokselem $\bar{x}$
P	Obraz PSF
p	Wartość piksela lub woksela
R	Promień koła lub kuli
$\mathbb{R}$	Zbiór liczb rzeczywistych
$r_d(F)$	Rozmiar obrazu F w wymiarze d w woksela
$r(F)$	Wektor $[r_1(F), r_2(F), \dots, r_N(F)]$, określający rozmiar obrazu F w woksela

S	Ciąg wektorów, reprezentujący kolejne woksele na obrazie tworzące ścieżkę (elementy tego ciągu nie mogą się powtarzać)
$\bar{t}$	Zmienna pomocnicza, wektor o N współrzędnych całkowitych ($\bar{t} \in \mathbb{Z}^N$)
T_{BIN}	Próg binaryzacji
T_h	Próg dopasowania używany w algorytmie wyszukiwania sfer na obrazie
$\bar{u}_i$	N -wymiarowy wektor jednostkowy o i -tej współrzędnej równej 1 i pozostałych współrzędnych równych 0
V	Zbiór wierzchołków grafu
v	Zmienna pomocnicza
w	Waga krawędzi, oznaczająca jej grubość w najcieńszym miejscu
$\bar{x}$	N -wymiarowy wektor $[x_1, x_2, \dots, x_N] \in \mathbb{Z}^N$, określa położenie woksela w obrazie
x_i	Współrzędna woksela względem osi i , $x_i \in \mathbb{Z}$, $1 \leq i \leq N$
$\mathbb{Z}$	Zbiór liczb całkowitych

Zestawienie używanych skrótów

2D	two-dimensional - dwuwymiarowy
3D	three-dimensional - trójwymiarowy
BFS	Breadth-First Search - algorytm przeszukiwania grafu wszerz
BTA	Branches Tracking Algorithm - algorytm śledzenia gałęzi
CCD	Charge Coupled Device - matryca CCD to układ wielu elementów światłoczułych, z których każdy rejestruje, a następnie pozwala odczytać sygnał elektryczny proporcjonalny do ilości padającego na niego światła
DAPI	4',6 - <i>diamidyno</i> - 2 - <i>fenyloindol</i> - aromatyczna, heterocykliczna amina stosowana jako barwnik fluorescencyjny silnie wiążący się do DNA na zasadzie interkalacji
DFT	Discrete Fourier Transform - dyskretna transformata Fouriera
DNA	Deoxyribonucleic acid - kwas dezoksyrybonukleinowy
DRG	Dorsal Root Ganglion - zwój korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych
FFT	Fast Fourier Transform - szybka transformata Fouriera
FISH	fluorescence in situ hybridization - fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
FLIC	Fluorescence Interference Contrast Microscopy - mikroskopia fluorescencyjna kontrastu interferencyjnego
FPS	Frames Per Second - klatki na sekundę
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor - glejopochodny czynnik wzrostowy
GFAP	glial fibrillary acidic protein - kwaśne włóknkowe białko glejowe
IDFT	Inverse Discrete Fourier Transform - odwrotna dyskretna transformata Fouriera

LDA	Linear Discriminant Analysis - liniowa analiza dyskryminacyjna
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscope - skanujący laserowy mikroskop konfokalny
LSM	Laser Scanning Microscope - skanujący laserowy mikroskop
ML	Maximum likelihood - metoda maksymalnego prawdopodobieństwa
PBS	phosphate buffered saline - bufor fosforanowy
PSF	Point Spread Function - funkcja reprezentująca zniekształcenie wprowadzane przez układ optyczny
QCA	Quantitative Coronary Angiography - angiografia ilościowa naczyń wieńcowych
RNA	Ribonucleic acid - kwas rybonukleinowy
SIS	Simple Image Statistic - metoda znajdowania globalnej wartości progowej
SWC	(nazwa formatu pliku) - pliki o tym typie przechowują strukturę drzewiastą reprezentującą zrekonstruowaną komórkę nerwową
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy - mikroskopia fluorescencyjna całkowitego wewnętrznego odbicia
UV	ultrafiolet - promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali krótszej niż światło widzialne i dłuższej niż promieniowanie rentgenowskie

Rozdział 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. Efektem tych działań jest powstanie międzynarodowej bazy “neuromorpho.org” gromadzącej zdigitalizowane obrazy neuronów powstałych w różnych laboratoriach ([12]). Uzyskano znaczące wyniki dotyczące związków między morfologią komórek nerwowych a przetwarzaniem przez nie informacji ([39], [87], [110]). Z powodzeniem przeprowadzono również prace badawcze, dotyczące mechanizmów homeostatycznej regulacji kształtu neuronów ([108]).

Dotychczasowe zaangażowanie w badania nad morfologią komórek glejowych było znacznie mniejsze. Wykorzystywało głównie metody ilościowe w pracach nad rozwojem tych komórek ([89]) oraz nad ich reakcją na różnego rodzaju czynniki patogenne, takie jak infekcje, urazy, czy choroby neurodegeneracyjne ([9], [125], [123], [124]). Skupienie się na aspektach neuropatologicznych wynika z faktu, że komórki glejowe bardzo silnie reagują na nieprawidłowości w funkcjonowaniu systemu nerwowego. Ich reakcja na wszelkie tego typu patologie jest bardzo różnorodna - komórki te namnażają się, zmieniają swój kształt, zaczynają wydzielać różnego rodzaju czynniki zarówno neuroprotektcyjne, jak i neurotoksyczne, nabywają też zdolność do fagocytozy. Efekty takiego zachowania również mogą być bardzo różne. Z jednej strony reakcja komórek glejowych może prowadzić do przywrócenia normalnego funkcjonowania systemu nerwowego. Z drugiej jednak strony nadmierna aktywacja komórek glejowych może uruchomić pętle dodatniego sprzężenia zwrotnego, której efektem może być degeneracja tkanki nerwowej.

Podaje się udział aktywowanych komórek glejowych w rozwoju tak poważnych schorzeń jak choroba Alzheimera czy Parkinsona ([68], [142]). Istotny jest także fakt, że większość nowotworów tkanki nerwowej ma pochodzenie glejowe ([22]). 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. Wreszcie, 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 ([121], [10]). 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.

1.1 Teza pracy

W rozprawie postawiono i wykazano następującą tezę:

Za pomocą opracowanych algorytmów przetwarzania obrazów, możliwa jest automatyczna, trójwymiarowa rekonstrukcja struktur komórek glejowych mózgu. Danymi wejściowymi, przyjmowanymi przy tym przetwarzaniu, są serie dwuwymiarowych obrazów, będących zdjęciami preparatu histologicznego tkanki mózgowej. Wykorzystane zdjęcia pochodzą z mikroskopu konfokalnego.

Teza zakłada, że skrawki histologiczne tkanki nerwowej mózgu są barwione w kierunku GFAP i DAPI, w celu wykrycia cytoszkieletu i jąder komórkowych. Zdjęcia tej tkanki będą analizowane przy użyciu opracowanych w tej pracy algorytmów wielokrotnie szybciej niż przez badacza wspomagane wyłącznie istniejącym oprogramowaniem wymagającym nieustannej interakcji i nadzoru.

W ramach współpracy Laboratorium Biocybernetyki Katedry Automatyki Akademii Górniczo-Hutniczej i Zakładu Neuroanatomii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego zaprojektowano i zaimplementowano system automatycznej trójwymiarowej rekonstrukcji komórek glejowych mózgu. Opracowany system został przedstawiony w ramach niniejszej pracy.

1.2 Układ pracy

W dalszej części rozdziału pierwszego zamieszczono krótkie wprowadzenie dotyczące tematów związanych z poruszaną problematyką. Krótko przedstawiono charakterystykę komórek glejowych oraz podstawowe informacje o mikroskopii fluorescencyjnej i obróbce otrzymywanych za jej pomocą obrazów. Przegląd prac związanych z samą rekonstrukcją struktury komórek nerwowych znajduje się w rozdziale drugim. Rozdział trzeci zawiera przegląd różnych metod przetwarzania obrazów wraz z przykładami ich działania, w tym opis niektórych algorytmów użytych w dalszej części pracy.

Głównym wątkiem pracy jest przedstawienie schematu systemu automatycznej, trójwymiarowej rekonstrukcji oraz algorytmów użytych do realizacji zadania. W rozdziale czwartym opisano sposób akwizycji trójwymiarowych obrazów za pomocą mikroskopu konfokalnego oraz scharakteryzowano obrazy mikroskopowe, które posłużyły do testowania projektowanego systemu. Schemat opracowanego w ramach pracy systemu opisano w rozdziałach piątym i szóstym. Opisany system został podzielony na dwie części. Pierwsza z nich, dotycząca wstępnego przetwarzania obrazów, została przedstawiona w rozdziale piątym.

Opis drugiej części systemu, dotyczącej ekstrakcji pojedynczych komórek z obrazu i rekonstrukcji ich struktury, zamieszczono w rozdziale szóstym.

Wyniki przeprowadzonych rekonstrukcji dla przykładowych obrazów zostały umieszczone w rozdziale siódmym. Podsumowanie osiągnięć pracy, wnioski z przeprowadzonych badań oraz propozycje kierunków dalszych badań znajdują się w rozdziale ósmym.

1.3 Wprowadzenie

1.3.1 Komórki glejowe

System nerwowy zbudowany jest nie tylko z komórek nerwowych, ale zawiera także szereg typów komórek glejowych ([44]). Komórki glejowe, według Virchowa (1958) *Nervenkitt* czyli „klej nerwowy”, znajduje się w ścisłym związku z komórkami nerwowymi. Tworzy ją zespół komórek, które z wyjątkiem mikrogliu, są podobnie jak komórki nerwowe, pochodzenia ektodermalnego. Pod względem stopnia złożoności morfologicznej komórki glejowe nie ustępują komórkom nerwowym, a pod względem różnorodności pełnionych funkcji nawet je przewyższają. Najnowsze badania szacunkowe wykazują, że w układzie nerwowym jest dwa razy więcej komórek glejowych niż komórek nerwowych ([55]).

Wśród komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego wyróżnia się ependymocyty (komórki wyściółki), astrocyty, oligodendrocyty oraz komórki mikrogliu. Neurony obwodowego układu nerwowego są otoczone przez komórki glejowe dwójakiego rodzaju: przez komórki glejowe zwojów, czyli komórki płaszczowe oraz komórki osłonkowe, czyli komórki Schwanna ([22]).

Komórki wyściółki wyściełają wszystkie ściany komór mózgowia z wyjątkiem zachyłku lejka komory trzeciej i części kanału rdzenia kręgowego. Zawierają one jądro, przeważnie owalne, z wyraźnym jąderkiem, a w cytoplazmie znajdują się stosunkowo drobne, zlokalizowane głównie wokół jądra, mitochondria. Ependymocyty są pokryte drobnymi rzęskami, witkami lub rąbkami szczoteczkowym. Strukturom tym przypisuje się pewną rolę w przepływie płynu mózgowo-rdzeniowego. Spełniają one funkcję podporową, niezmiernie istotną u zarodków, u których pozostałe komórki gleju nie osiągnęły jeszcze należytego stopnia dojrzałości czynnościowej. Komórki wyściółki wchodzą również w skład bariery płynu mózgowo-rdzeniowy - tkanka nerwowa ([52]).

Najliczniejszymi komórkami makrogliu (macroglia) są astrocyty, duże, gwiaździste komórki o bardzo licznych promienistych i rozgałęzionych wypustkach, zakończonych rozszerzeniem zwanym stopką końcową. Zawierają filamenty glejowe i ziarnistości glikogenu, stanowiące najbardziej charakterystyczne składniki ich cytoplazmy. Klasyczny podział, na podstawie kształtu wypustek, wyróżnia astrocyty protoplazmatyczne (*astrocytus protoplasmaticus*) i włókniste (*astrocytus fibrosus*) oraz formy pośrednie. Astrocyty protoplazmatyczne są przeważnie większe i zawierają większe jądro komórkowe. Rozgałęziają się one obficie już w pobliżu kadłuba komórki. Natomiast wypustki astrocytów włóknistych są znacznie smuklejsze, dłuższe, mniej rozgałęzione.

Obecnie oprócz tych dwóch rodzajów astrocytów wyróżnia się jeszcze kilka innych typów: między innymi astrocyty welonowate w hipokampie i mózdzku, astrocyty międzywarstwowe w korze mózgowej. Do astrocytów zalicza się również, głównie ze względu na obecność GFAP, glej Bergmanna w mózdzku, glej

Mullera, specyficzny dla siatkówki, występujące przede wszystkim w dnie komory III tanicyty, oraz glej radialny, odgrywający istotną rolę w migracji neuroblastów podczas wczesnego rozwoju embrionalnego ([135]).

Wypustki astrocytów izolują wszystkie synapsy i zapobiegają przeciekaniu transmitterów do synaps sąsiadujących. Synapsę formuje więc triada: zakończenie presynaptyczne, zakończenie postsynaptyczne i wypustka astrocytu. Astrocyty uczestniczą czynnie w procesach biochemicznych warunkujących transmisję sygnału przez połączenia synaptyczne. Glei gwiaździsty spełnia też funkcję tkanki podporowej ośrodkowego układu nerwowego. Astrocyty nie tylko oddzielają neurony od krwi przepływającej w naczyniach włosowatych ale jednocześnie pośredniczą w wymianie produktów przemiany materii między krwią a neuronami, czyli spełniają ważną funkcję odżywczą. Gromadzą również aminokwasy, glutaminian i asparaginian, które uwalniane z zakończeń nerwowych stanowią przekazywniki synaptyczne ([130]). Astrocyty wychwytyują glutaminian, przetwarzają na glutaminę i w tej postaci dostarczają neuronom. Posiadają zdolność syntetyzowania i uwalniania prekursorów niektórych neuromodulatorów, np. proenkefaliny. Inną funkcją makrogleju jest izolowanie od siebie synaps oraz poszczególnych włókien nerwowych bez osłonki mielinowej ([48]). Astrocyty wydzielają szereg przekazywników, neuromodulatorów i czynników wzrostowych. Są wśród nich takie same substancje jak te wytwarzane przez neurony, np. glutaminian i ATP, jak również czynniki specyficzne dla astrocytów, jak d-seryna, białko S100 czy glejopochodny czynnik wzrostowy GDNF (ang. glial-derived neurotrophic factor). W okresie płodowym astrocyty ułatwiają wędrówkę neuronów. Glei gwiaździsty bierze udział również w procesach patologicznych, odgrywając ważną rolę w czynnościach reperacyjnych ośrodkowego układu nerwowego. W uszkodzonych obszarach mózgu astrocyty tworzą blizny glejowe w procesie zwanym glejozą.

W skład tkanki nerwowej wchodzi również oligodendrocyty, które spotyka się między innymi w istocie białej wzdłuż włókien nerwowych, jako komórki wytwarzające wokół nich osłonkę. Aktywność enzymatyczna oligodendrocytów zmienia się zależnie od stanu czynnościowego komórek nerwowych, które otaczają. Oligodendrocyty to komórki małe o nielicznych i słabo rozgałęziających się wypustkach. Ich jądra są na przekroju okrągłe lub nieco owalne, ciemno barwiące się ze względu na znaczną ilość heterochromatyny szczególnie zagęszczonej pod otoczką jądra. Cytoplazma oligodendrocytów jest stosunkowo ciemna, w obrazie mikroskopowo-elektronowym zawiera liczne organelle. Oligodendrocyty w przeciwieństwie do astrocytów nie zawierają filamentów glejowych i ziarnistości glikogenu.

Komórki mikrogleju (microglia) zawierają wydłużone ciemne jądro, otoczone wąskim pasmem cytoplazmy perykarionu, od którego odchodzą drobne silnie rozgałęziające się wypustki. Cytoplazma jest elektronowo gęsta i zawiera liczne organelle. Mikroglej występuje w sąsiedztwie naczyń włosowatych krwionośnych i spełnia funkcję obronną. Pod wpływem czynników chorobotwórczych i czynników uszkodzających tkankę mózgową komórki te szybko się dzielą, ich liczba zwiększa się, kierują się ku chorobowo zmienionym ogniskom, gdzie wykazują właściwości żerne. Pochłaniają produkty rozpadu tkanki nerwowej.

Z gleju mogą rozwijać się nowotwory, zwane glejakami (glioma). Powstają one z trzech typów komórek glejowych: astrocytów, oligodendrocytów i ependymocytów. Stanowią 50% pierwotnych guzów wewnątrzczaszkowych ([44]).

Komórki Schwanna tworzą osłonkę wokół aksonów komórek nerwowych. Osłonka

powstaje przez owinięcie się cytoplazmy komórki wokół włókien nerwowych. Jedna osłonka pokrywa kilka aksonów. Cytoplazma komórki Schwanna wiąże aksony razem, ale nie pozwala im się dotykać. Osłonka ta spełnia funkcję ochronną dla aksonu, ale przede wszystkim zwiększa tempo przewodzenia impulsów nerwowych (dzięki przewężeniom Ranviera).

1.3.2 Mikroskopia konfokalna

Mikroskop fluorescencyjny

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). Związki chemiczne absorbują promieniowanie o określonej energii, a następnie wypromieniowują falę o zmienionej energii. Zjawisko to w optyce opisywane jest przez widma absorbancji i emisji. Widma te charakteryzują się różnymi wartościami energetycznymi i dlatego mogą być widoczne "gołym okiem" lub dzięki użyciu detektora. Związek chemiczny jest fluorochromem, czyli fluoryzuje, jeżeli posiada zdolność absorbowania fali o określonej długości w zakresie promieniowania ultrafioletowego (wzbudzenie, absorbancja) i emituje światło o mniejszej energii w zakresie widma widzialnego. Emisja ta jest widzialna i może być obserwowana pod mikroskopem. Energie emisji fluorochromów mają różną wartość i dlatego widoczne promieniowanie posiada barwy od niebieskiej i zielonej po ciemnoczerwoną. Technika badawcza, w której używa się związków fluorescencyjnych do zabarwiania struktur komórkowych w celu ich obserwacji w mikroskopie, nazywa się mikroskopią fluorescencyjną. Do wizualizacji używane jest tylko światło emisji. Światło wzbudzania (absorbancji) blokowane jest przez filtry znajdujące się w mikroskopie. Fluorescencja próbki może być pochodzenia naturalnego (np. fluorescencja chlorofilu) lub być wynikiem dołączenia (kowalencyjnie lub poprzez jakikolwiek inny typ oddziaływań fizyko-chemicznych między substancjami) do elementów obserwowanej próbki fluoroforów, czyli substancji chemicznych, które fluoryzują po wzbudzeniu światłem o określonej długości. Drugi sposób jest często wykorzystywanym w biologii, a w szczególności w biologii molekularnej, gdyż pozwala, poprzez znajomość oddziaływań, na wyznakowanie interesujących elementów komórki (np. białek, czy organelli) fluoroforami o zadanych właściwościach (np. barwie emisji) ([26], [101]).

Badanie w mikroskopie fluorescencyjnym polega na tym, iż wyłączone zostaje światło widzialne, a preparat jest oświetlany w ciemnym polu widzenia przez promienie UV. Jeżeli fluorochrom zwiąże się ze strukturą komórki, np. chromatyną jądrową, to zacznie po pewnym czasie emitować światło o kolorze dla niego charakterystycznym (np. jodek propidyny na czerwono) i stanie się możliwa obserwacja tylko jąder komórkowych świecących kolorem czerwonym, podczas gdy inne części komórek w ogóle nie będą widoczne ([37]).

Większość używanych mikroskopów fluorescencyjnych to mikroskopy epi-fluorescencyjne. Oznacza to, że wzbudzenie próbki falą świetlną, jak i jej obserwacja zachodzi znad niej (epi).

Mikroskopy fluorescencyjne stały się ważnym narzędziem w biologii, stając się podstawą do rozwoju bardziej zaawansowanych technik mikroskopii fluore-



Rysunek 1.1: Mikroskop konfokalny Zeiss 510 META

scencyjnej, takich jak:

- mikroskopia konfokalna LSCM (ang. Laser-Scanning Confocal Microscopy)
- mikroskopia dwufotonowa (ang. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy)
- mikroskopia fluorescencyjna kontrastu interferencyjnego FLIC (ang. Fluorescence Interference Contrast Microscopy)
- mikroskopia fluorescencyjna całkowitego wewnętrznego odbicia TIRFM (ang. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)

Mikroskop konfokalny

Mikroskop konfokalny jest nowoczesną odmianą mikroskopu fluorescencyjnego w którym źródłem światła jest laser. Do zalet użycia lasera jako źródła światła należy bardzo mała szerokość wiązki emisyjnej, ale jednocześnie duża moc wiązki w wybranym obszarze widma. Laser jest punktowym źródłem światła. 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. Różnica między zwykłymi mikroskopami (również fluorescencyjnymi) polega na tym, że dzięki mikroskopowi konfokalnemu (rysunek 1.1) otrzymujemy obraz o lepszej rozdzielczości i kontraście. Dzięki tej metodzie możliwa jest analiza przekrojów optycznych na różnej głębokości preparatu. Technika mikroskopii konfokalnej umożliwia więc uzyskiwanie wysokiej jakości obrazów oraz rekonstrukcji obrazów w trzech wymiarach. Znalazła przez to szerokie zastosowanie w naukach biologicznych.

Koncepcja mikroskopii konfokalnej w porównaniu z klasyczną świetlną szerokiego pola, opiera się na usunięciu, przy wejściu do detektora, światła, które wpadło do obiektywu spoza płaszczyzny ogniskowania. Usuwa się także wszelkie odbłyśki nie pochodzące bezpośrednio z miejsca ogniskowania. Używa się w tym celu dodatkowej przesłony z otworem, tzw. pinhole'a. Umieszcza się przed

wejściem do detektora. W tym mikroskopie źródło światła, oświetlony punkt preparatu oraz jego obraz leżą w ogniskowych soczewki, czyli w płaszczyznach konfokalnych i stąd też wywodzi się nazwa tej mikroskopii. Światło, które jest wzbudzane w punktach leżących poza ogniskiem jest eliminowane przez system specjalnych przesłon i nie bierze ono udziału w procesie tworzenia obrazu. Wynikiem tego jest obraz niezawierający składowych pochodzących z innych płaszczyzn niż ogniskowa. Dzięki temu rozdzielczość i kontrast są lepsze niż w zwykłym mikroskopie fluorescencyjnym.

Podstawy obrazowania konfokalnego zostały opatentowane przez Marviną Minsky'ego w 1961 roku. W zwykłej mikroskopii szerokiego pola próbka jest oświetlana przez źródło światła w całości. W odpowiedzi na to, albo odbija światło, albo fluoryzuje, przy czym sygnały te są zbierane przez obiektyw. Obiektyw zbiera sygnał nie tylko z miejsca ogniskowania, ale z całego przekroju próbki. Powoduje to, że tło wobec sygnału z miejsca ogniskowania jest dość wysokie, co zmniejsza kontrast. Zastosowanie przesłony z małym otworem przed detektorem (na przykład kamerą CCD), odcina sygnał dochodzący spoza płaszczyzny ogniskowania, co znacznie powiększa kontrast i jakość uzyskanego obrazu. Grubość takiej płaszczyzny ogniskowania, a zatem rozdzielczość pionowa mikroskopu, jest zwykle zależna od soczewek obiektywu, ale też od właściwości samej próbki. Najogólniej można powiedzieć, że mikroskopia konfokalna polega na detekcji wypromieniowanego światła po wcześniejszej absorpcji wiązki wzbudzającej o odpowiedniej długości fali. Światło emitowane charakteryzuje się zawsze większą długością fali niż światło absorbowane. Mikroskopia konfokalna opiera się zatem na pomiarze fluorescencji związków chemicznych, tzw. barwników fluorescencyjnych, wiążących się z pewnymi typami komórek, strukturami subkomórkowymi lub grupami chemicznymi. Do tego rodzaju zabiegów jest stosowanych wiele metod barwienia oraz jest wiele barwników fluorescencyjnych, tzw. fluorochromów. Największą jednakże zaletą tego rodzaju mikroskopu jest to, że pozwala on na rejestrowanie obrazów cienkich warstw preparatu, czyli przekrojów optycznych badanych obiektów. Z tego powodu jest on często stosowany do rejestracji serii przekrojów optycznych na różnych głębokościach preparatu i tworzenie dzięki tym obrazom trójwymiarowego obrazu badanego obiektu.

Obecnie używa się głównie trzech typów mikroskopów konfokalnych:

- skanujący laserowy mikroskop konfokalny (ang. Scanning Laser Confocal Microscope)
- mikroskop konfokalny z wirującym dyskiem (ang. Spinning-disk Confocal Microscope)
- PAM (ang. Programmable Array Microscope)

Pierwszy typ mikroskopu gwarantuje obrazy najlepszej jakości, ale charakteryzuje się długim czasem obrazowania (FPS niższa niż 3/sek.). Promień lasera pada na lustro dichroiczne o selektywnym odbiciu fal świetlnych. Wiązka przechodzi przez lustro skanujące, które dzięki minimalnym ruchom obrotowym mogą nią kierować. Wiązka skupiona przez obiektyw w jednym punkcie, wzbudza wyznakowany barwnikiem preparat, co powoduje emisję dłuższej fali świetlnej. Wiązka powraca tą samą drogą przez lustro skanujące i dichroiczne, po czym natrafia na przesłonę z niewielkim otworem pinhole'a. Wreszcie wiązka dociera do fotopowielacza, który wzmacnia padający sygnał. Taki sygnał zostaje

zamieniony przez przetworniki analogowo-cyfrowe na postać cyfrową i przeanalizowany przez komputer.

Mikroskopy konfokalne z wirującym dyskiem pozwalają z kolei na bardzo szybkie zbieranie obrazów, co pozwala na montowanie z nich sekwencji filmowych. Obrazy te cechuje jednak nieco gorsza jakość, jak również i inne ograniczenia. W detekcji emitowanego światła bardzo istotna jest rola fotopowielacza, który umożliwia wzmocnienie słabego sygnału emisji oraz ochronę preparatu przed wyświeceniem. Detektor wyposażony jest w płynną regulację zakresu odbieranych fal. Zapobiega on nakładaniu się na obrazie sygnałów z różnych barwników (ang. crosstalk).

Na rozwój instrumentów konfokalnych ma wpływ synteza nowych związków fluorescencyjnych. Związki chemiczne zdolne do fluorescencji, które zmieniają charakterystykę fluorescencji w zależności od środowiska, w którym się znajdują, to tzw. sondy. Wprowadzane sondy fluorescencyjne ulegają pobudzeniu oraz emisji w obrębie spektrum bardziej dopasowanym do długości fal produkowanych przez lasery mikroskopów konfokalnych. Ulepszone sondy mogą być sprzęgane z interesującymi nas przeciwciałami. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ FISH (ang. fluorescence in situ hybridization) jest techniką cytochemiczną polegającą na hybrydyzacji sekwencji DNA lub RNA ze specyficznymi sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. Dzięki reakcji sonda-niść DNA jesteśmy w stanie określić pozycję markera, czyli specyficznej, zazwyczaj oligonukleotydowej sekwencji, na badanej nici DNA. Stosując technikę FISH możemy również zidentyfikować interesujący nas chromosom. Określenie in situ wskazuje na miejsce przeprowadzania reakcji hybrydyzacji, którym jest naturalne środowisko występowania DNA (chromosomy, komórki).

Obserwacja zhybrydyzowanej sondy z komplementarną sekwencją DNA, jest możliwa dzięki wyznakowaniu sondy fluorochromem, który pod wpływem wzbudzenia światłem (UV-VIS) emituje promieniowanie (świeci). Do analizy badanego materiału wymagany jest mikroskop fluorescencyjny.

Każdy możliwy wybór mikroskopu świetlnego (fluorescencyjnego) ma zarówno wady jak i zalety. Najmniej kosztowne rozwiązanie to zastosowanie standardowego mikroskopu szerokiego pola. Dzięki wysokiej wydajności (przepustowości) możliwe jest szybkie uzyskanie danych obrazu i zastosowanie próbkowania wysokoczęstotliwościowego w domenie czasu, co może znaleźć zastosowanie w przypadku szybkich ruchów ([77]). Z drugiej strony jakość danych obrazu jest często zła z powodu zamazania pochodzącego z planów nie będących w obszarze ogniskowania, i w związku z tym proces analizy obrazu jest bardziej skomplikowany i czasochłonny zwłaszcza w przypadku stosowania technik dekonwolucji. Ponadto zwykle trudno jest sprawdzić obrazy po dekonwolucji i w związku z tym istnieje zawsze niebezpieczeństwo, że uzyskane obrazy nie odzwierciedlają rzeczywistości. W celu uzyskania lepszej jakości obrazu stosuje się różne typy technik konfokalnych. Prosty sposób uzyskania efektu konfokalnego jest zastosowanie oświetlania światłem strukturalnym (ang. structured light illumination) wprowadzone przez Juskaitis [66]. Celem jest sekwencyjna projekcja serii przestrzennych wzorów na próbkę, w związku z czym obraz konfokalny może być przetwarzany matematycznie z zebranej serii obrazów. Przykładem takiego wzoru jest siatka równomiernie rozmieszczonych linii tak jak w module Apotome firmy Zeiss. Każdy obraz serii jest zbierany z zastosowaniem tej samej siatki; jednakże położenie siatki zmienia się, w związku z tym za każdym razem inne linie są widoczne na obrazie. Niestety jakość obrazu jest gorsza niż

w przypadku zastosowania innych technik konfokalnych, z powodu konieczności rekonstrukcji końcowego konfokalnego obrazu.

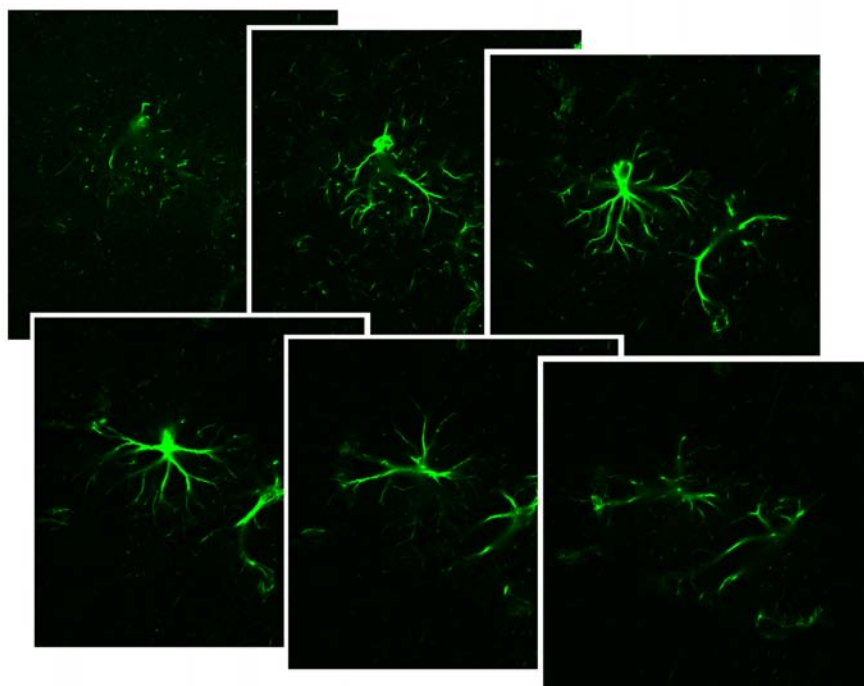
1.3.3 Analiza trójwymiarowych obrazów

Analiza obrazu jest procesem dokonywania ilościowych, strukturalnych i funkcjonalnych pomiarów na podstawie danych pozyskanych z obrazów. Wraz z rozpowszechnieniem dostępności mikroskopii 3D, w połączeniu z rosnącym trendem badań ilościowych, wzrasta zapotrzebowanie na analizę trójwymiarowych obrazów. Uzasadnieniem dla takiej analizy jest możliwość uzyskania właściwej morfometrii struktur biologicznych pozbawionej błędów towarzyszących dwuwymiarowej projekcji. Na przykład trudno jest rozróżnić obiekty nachodzące na siebie w dwuwymiarowym obrazowaniu, natomiast trójwymiarowe obrazowanie dostarcza więcej wskazówek wymaganych do segmentacji. Liczne struktury, takie jak neurony i unaczynienie, są zwykle grubsze niż głębia ostrości mikroskopu i wymagają analizy trójwymiarowych obrazów. Często interesują nas obszary które nie są płaskie. W takich przypadkach optyczne sekcjonowanie przez mikroskop konfokalny stanowi lepsze zabezpieczenie relacji trójwymiarowej w porównaniu do rzeczywistego cięcia i w związku z tym umożliwia bardziej dokładną morfometrię i analizę topologiczną. Na rysunku 1.2 przedstawiono kilka kolejnych zdjęć z przykładowego stosu (tj. serii obrazów 2D) otrzymanego za pomocą mikroskopu konfokalnego. Podsumowując, obrazowanie 3D często umożliwia szybsze, wygodniejsze i bardziej wiarygodne sondowanie tkanek w szeroko zakrojonych badaniach, niż tradycyjna technika sekwencji skrawków.

Przez automatyczną analizę trójwymiarowych obrazów rozumiemy, że manualny wkład jest minimalny (w zakresie od 0 do 10%). Te metody odróżniamy od metod manualnych, mówiąc o większym lub mniejszym stopniu automatyzacji w zależności od tego, czy konieczne jest zaangażowanie w pracę użytkownika czy nie. Pomimo, że metody manualnej analizy obrazu są w zasadzie daleko bardziej skuteczne niż metody automatyczne za sprawą przewagi ludzkiego systemu widzenia nad jakimkolwiek algorytmem, istnieją liczne przyczyny dla poszukiwania wysoko zautomatyzowanych metod. Podczas gdy obserwator jest lepszy w zadaniu klasyfikacji wzorca, często gorzej rozpoznaje szczegóły. Typowe dla człowieka jest pomijanie obiektów lub dwukrotne ich zliczanie, czy tworzenie niepewnych śladów ([64], [6]). W rzeczy samej typowym jest, że ten sam badacz w różny sposób ocenia te same obrazy przy powtórnej analizie. W porównaniu do metod manualnych metody automatyczne bezwzględnie eliminują wpływ oceny subiektywnej. Automatyzacja komputerowa jest uzasadniona w przypadku gdy duża liczba obrazów musi zostać poddana analizie w krótkim czasie. Może to eliminować monotonię i pracochłonność towarzyszące metodom manualnym. Szybsze komputery pozwalają na zwiększenie prędkości metod automatycznych a ponadto mogą one pracować przez cały czas.

Niezależnie od tego, że istnieje różnorodność kształtów obrazowanych obiektów można je zaklasyfikować do pewnych określonych typów. Obiekt jest w rzeczywistości zbiorem wokseli reprezentujących biologiczną strukturę obrazowaną przy pomocy mikroskopu. Trzy spośród najczęściej występujących w kontekście mikroskopii konfokalnej typów obiektów to obiekty plamiste (ang. blob-like objects), cylindryczne (ang. tube-like objects) i nieregularne kłębiaste (ang. irregular cloud-like distribution objects).

Przykładami trójwymiarowych obiektów plamistych są jądra komórkowe.



Rysunek 1.2: Seria obrazów ze stosu zdjęć z mikroskopu konfokalnego

Obiekty plamiste są najczęstszym typem poddawanych automatycznej analizie obrazu. W geometrycznym ujęciu są one postrzegane jako 3D elipsoidy nieregularnie zdeformowane. Jednakże te pozornie proste obiekty stanowią także duże wyzwanie za sprawą artefaktów preparatyki i obrazowania ([80]).

Przykładami obiektów cylindrycznych są naczynia krwionośne i neurony. Geometrycznie mogą być postrzegane jako niejednolicie zdeformowane 3D cylindry ([6], [1], [53]). Podobnie jak obiekty plamiste, obiekty cylindryczne również stanowią duże wyzwanie dla systemów automatycznej analizy obrazów. Obiekty cylindryczne mogą być lite lub puste w obrazowaniu.

Rozproszone sygnały FISH są dobrym przykładem klasy obiektów nieregularnych kłębiastych. Różnorodność i specyficzność fluoroforów w połączeniu z możliwościami nowoczesnych mikroskopów sprawia, że jest to istotna kategoria w analizie obrazu. Ponieważ te obiekty nie mają wyraźnej geometrii do ich oceny konieczne jest ustalenie ich relacji względem obiektów typów wyżej wymienionych (kłębiastych i cylindrycznych).

Preparacja skrawków i procedury mikroskopii stosowane w celu poprawnej analizy automatycznej obrazu są bardziej restrykcyjne niż w przypadku ręcznej analizy. W przeciwieństwie do ludzi komputery są bardziej podatne na błędy spowodowane zaburzeniami obrazu, artefaktami, różnorodnością i chaosem. W związku z tym istotnym jest włożenie dużego wysiłku, dla zapewnienia właściwej staranności, podczas preparowania skrawka i procedur obrazowania w celu uzyskania pewności, że interesujące nas obiekty są nakreślone z wysokim stopniem kontrastu w przeciwieństwie do struktur tkanki, które pozostają poza naszym zainteresowaniem.

Warunki próbkowania i cyfrowej rejestracji obrazów mogą być różne w zależności od celu analizy obrazu. Dla przykładu najlepiej jest unikać algorytmów kompresujących obraz, które powodują straty. Algorytmy analizy morfometrii są zaprojektowane tak by działać z największą dokładnością, natomiast procentowy wpływ na pojedynczy błąd (pojedynczą niedokładność) woksela istotnie zależy od ilości wokseli reprezentujących obiekt. Jeżeli tkanka jest całkowicie jednolita często możliwe jest próbkowanie tkanki w sposób losowy stosując standardowe techniki stereologicznego próbkowania ([58], [105], [85]). W obszarach granicznych trójwymiarowych obrazów i optycznych skrawków w pobliżu szczytu i u podstawy stosu często zawarte są części innych obiektów. Obiekty te powinny być systematycznie eliminowane ([60]).

Powszechnie występujące artefakty obrazowania charakteryzują się niejednorodnością i obecnością nieinteresujących niechcianych obiektów. Ich wpływ na wyniki analizy obrazu może być czasami zredukowany przez przeprowadzenie obróbki wstępnej obrazu. Filtry morfologiczne ([115], [24]), odjęcie tła ([104]) i korekcja tłumienia sygnału ([3], [28]) są przykładami powszechnie stosowanych metod wstępnej obróbki obrazu (ang. preprocessing) w obrazowaniu konfokalnym. Filtry morfologiczne oraz inne nieliniowe, takie jak medianowy i top-hat są zazwyczaj używane w celu redukcji szumu obrazu takiego jak plamy barwnika w tle lub wyrównania (złagodzenia) szumu Poisson'a ([109]) oraz niejednorodności intensywności tła. Generalnie rzecz biorąc, otrzymane z mikroskopu obrazy często muszą być poddawane wstępnej obróbce, która jest nieraz bardzo kosztowna obliczeniowo.

W segmentacji obiektów cylindrycznych (np. neurony, unaczynienie) są stosowane dwa ogólne typy algorytmów: szkieletyzacja i wektoryzacja. Metody szkieletyzacji działają przez systematyczną erozję w wersji zbinaryzowanej (rezultaty adaptatywnego progowania) obrazu aż do momentu, gdy pozostają tylko najbardziej wewnętrzne woksele (szkielet). Te metody są przydatne dla aplikacji, w których obiekty są nieregularne, jak na przykład przy detekcji kołców neuronów ([75]). Z drugiej strony metody bazujące na wektoryzacji są cenne dla obiektów o wyglądzie bardziej regularnym, które mogą być modelowane jako cylindry w przestrzeni trójwymiarowej ([6], [1], [2]).

W najprostszy sposób struktury tubularne mogą być zamodelowane jako segmenty przedziałowo liniowe, w których każdy segment jest uogólniony do postaci cylindra. W praktyce typowy model tubularny dopuszcza niewielkie nieregularności. Te nieregularności mogą być modelowane poprzez zastosowanie metod statystycznych, w których mediana zastępuje średnią arytmetyczną ([1]).

Rozdział 2

Metody rekonstrukcji morfologii komórek z obrazów 3D

Tkanka mózgu ma złożoną, trójwymiarową architekturę, zawierającą liczne neuronowe i glejowe typy komórek, uzupełnianych przez komórki systemu odpornościowego i elementy naczyniowe ([14]). Złożoność architektury mózgu uzasadnia celowość podjęcia badań, które wymagają pomiarów bazujących na obrazie w skali tkankowej. Przykłady takich badań to prace określające ilościowo lokalizację i rozmieszczenie komórek w miejscach neuralnych komórek macierzystych, mikrośrodowisko komórek macierzystych nowotworu ([27]), zależności komórek towarzyszących w tworzeniu bariery krew-mózg ([61]), i ocena zmian w komórkach spowodowanych urazami lub chorobą ([126]).

Liczba publikacji dotyczących trójwymiarowej rekonstrukcji komórek nerwowych jest znaczna. Wśród dostępnych materiałów w postaci publikacji naukowych i popularnonaukowych, dokumentacji technicznej programów komputerowych, dostępnych w Internecie programów darmowych oraz programów wykonanych w ramach prowadzonych przez jednostki badawcze działalności naukowej nie znaleziono pozycji bezpośrednio dotyczącej rekonstrukcji 3D komórek glejowych mózgu.

Charakterystyka struktur rozgałęzionych odgrywa główną rolę w licznych aspektach medycznych ([129], [153]) i biologicznych, zwłaszcza w neurobiologii. Lepsze zrozumienie dynamiki procesów fizjologicznych zachodzących w biologicznych sieciach neuronowych można osiągnąć poprzez właściwą charakteryzację kształtu komórek nerwowych, ponieważ zarówno objętość synapsy jak i sposób organizacji neuronów w sieciach neuronowych są ściśle związane z kształtem komórek.

2.1 Metody detekcji neuronów

Capowski przedstawił szczegółowe losy metod detekcji neuronów ([29]). Obecnie stosuje się półautomatyczne metody. Człowiek współpracuje z mikroskopem sprzężonym z komputerem wyposażonym w odpowiedni sprzęt i oprogramo-

wanie obrazujące. Użytkownik przeprowadza rozpoznawanie wzorca. System komputerowy archiwizuje dane i generuje analizę topologiczną i metryczną. W niektórych przypadkach komputer wspomaga badacza, umieszczając kursor na najbliższym obiekcie obrazu lub automatycznie ogniskuje mikroskop ([6]).

Stosowane metody digitalizacji neuronalnych struktur 3D opierają się na interaktywnym, manualnym śledzeniu komputerowym obrazów pochodzących z mikroskopii 2D. Metody te są czasochłonne, subiektywne i mało precyzyjne. W szczególności drobne szczegóły kształtu dendrytów, dendrytyczne zwężenia oraz kształt kolców dendrytycznych nie mogą być określone przez te systemy.

Wielu patologiom funkcji poznawczych (włączając ubytki związane z wiekiem lub krótkoterminową pamięć oraz zaburzenia uczenia i pamięci) towarzyszą subtelne zmiany w geometrii rozgałęzień dendrytów ([98]) oraz zaburzenia gęstości i rozmieszczenia kolców.

Aktualnie dostępne oprogramowanie służące do digitalizacji neuronów jest oparte na manualnym śledzeniu struktury komórki na monitorze komputera, na przykład: NeuroZoom ([146]) lub Neurolucida (MicroBrightField, Wiliston, VT, USA) ([29]). Metody manualnego śledzenia wprowadzają nieścisłości systematyczne, zależne od indywidualnego sposobu interpretacji obrazu przez użytkownika, co jest przyczyną błędów w określeniu prawidłowej struktury dendrytycznej.

Wyróżnia się trzy sposoby analizy struktur linearnie rozgałęzionych takich jak neurony czy naczynia krwionośne.

1. Pierwszy bazuje na szkieletyzacji i analizie punktów rozgałęzień.
2. Drugi bazuje na uwydatnieniu własności krawędzi a następnie identyfikacji konturów naczyń przez wspólne powiązanie krawędzi pikseli. Taki proces łączenia zazwyczaj pociąga za sobą dynamiczne programowanie w celu znalezienia ścieżki o najmniejszym koszcie.
3. W ramach trzeciego sposobu zmniejszane są wymagania względem mocy obliczeniowej poprzez przetwarzanie jedynie wybranych pierwszoplanowych pikseli stosując operację segmentacji. Niemniej jednak trójwymiarowa szkieletyzacja jest obliczeniowo kosztowna. Inne sposoby to wektoryzacja, wektorowe śledzenie lub kopiowanie.

Metody te najpierw lokalizują punkt początkowy i wykorzystują właściwości lokalne obrazu w celu rekurencyjnego tropienia struktury. Zazwyczaj przetwarzają one tylko piksele położone blisko struktur więc są określane jako algorytmy rozpoznawcze (ang. exploratory algorithms). Stosowanie ich jest szczególnie wskazane gdy prędkość przetwarzania jest krytyczna tak jak w przypadku przetwarzania obrazów w czasie rzeczywistym lub gdy rozmiar danych jest bardzo duży.

2.2 Techniki przetwarzania rozpoznawczego

W literaturze opisywane są trzy kategorie technik przetwarzania rozpoznawczego.

1. Pierwszą najczęściej stosowaną jest angiografia ilościowa naczyń wieńcowych QCA (ang. Quantitative Coronary Angiography), gdzie początkowe

i końcowe punkty naczyń (czasami również linie centralne) są wprowadzane manualnie. Choć bardzo dokładne, algorytmy te są przeznaczone do śledzenia segmentów naczyń z pominięciem rozgałęzień czy skrzyżowań.

2. W drugiej grupie algorytmy startują od ręcznego wprowadzania punktów początkowych i początkowego kierunku po czym rekurencyjnie śledzą całe drzewa tętnicze przeszukując je wszcz. Przeszukiwanie wszcz (ang. Breadth-First Search, w skrócie BFS) jest algorytmem przeszukiwania grafu. Algorytm zaczyna od korzenia i odwiedza wszystkie połączone z nim węzły. Następnie odwiedza węzły połączone z tymi węzłami i tak dalej, aż do odnalezienia celu. W odniesieniu do neuronów nawiązuje to do śledzenia pojedynczego neurytu wychodzącego z ciała pojedynczej komórki. Takie metody nie mogą być stosowane dla przetwarzania obrazów licznych neuronów, których neuryty nie zawierają się w badanym polu widzenia.
3. Trzecia kategoria zawiera w pełni zautomatyzowane metody, które przewycięzają ograniczenia poprzednich dwóch kategorii.

Liczne doniesienia w literaturze dotyczące wektoryzacji koncentrują się na obrazach dwuwymiarowych lub projekcji obrazów trójwymiarowych.

W literaturze opisywane są dwie podstawowe metody rekonstrukcji komórek nerwowych. Pierwsza bazuje na szkieletyzacji, druga na procesie sekwencyjnego śledzenia wzdłuż neuronów.

Al-Kofahi i współpracownicy ([8]) przeprowadzali badania mające na celu poprawę automatycznej analizy punktów rozgałęzienia w strukturach cytologicznych takich jak neuryty i histologicznych takich jak unaczynienie. Celem było zliczenie wyróżnionych lokalizacji w obrazie, z równoczesnym oszacowaniem umiejscowienia odgałęzień. Analiza punktów rozgałęzień stanowi cel działania wielu opracowań, takich jak badania neuroanatomiczne, badania rozwojowe, analiza wyników badań toksykologicznych i przesiewowych, jak również dających się oszacować punktów orientacyjnych rejestracji obrazu.

W literaturze prezentowane są różne algorytmy do segmentacji i analizy struktur tubularnych takich jak neuryty i unaczynienie ([1], [47], [138], [141], [143]). Generalnie funkcjonują dwa podejścia. Pierwsze opiera się na algorytmach szkieletyzacji, działających na dwuwymiarowych lub trójwymiarowych obrazach. W tej metodzie obraz jest najpierw segmentowany lub binaryzowany w celu wyodrębnienia interesujących struktur tła. Wynikowy obraz binarny jest systematycznie zawężany aż do uzyskania szkieletu neurytu który jest następnie przetwarzany. Drugie podejście odnosi się do wektoryzacji lub śledzenia. W tym postępowaniu zbiór początkowych punktów (ang. seed points) jest wyodrębniany z obrazu, neuryty są śledzone sekwencyjnie począwszy od punktów początkowych. Metoda ta jest zwykle całkowicie zautomatyzowana. Zarówno punkty początkowe jak i ich orientacja są selekcjonowane automatycznie. W niektórych przypadkach użytkownik określa punkty początkowe oraz kierunki, a następnie algorytm śledzi rozgałęzioną strukturę rekurencyjnie.

Algorytmy szkieletyzacji są w założeniach bardziej uogólnione. Niektórzy autorzy stosują je do analizy struktur drugorzędowych takich jak kolce dendrytyczne. W praktyce są one podatne na generowanie artefaktów powodowanych szumem nieregularności powierzchni w segmentacji obrazu.

Przyczyna dla której automatycznie śledzące algorytmy słabo się spisują w punktach rozgałęzień jest prosta – bazują one na modelu geometrycznym opartym na kształcie walca, który źle odwzorowuje punkty rozgałęzień, co może powodować miejscowe błędy. Powszechnie wiadomo, że małe błędy w zapisie generują znaczną ilość kolejnych błędów w dalszym przetwarzaniu. Właściwie określone miejsca rozgałęzień determinują poprawność określenia kątów rozgałęzień struktury.

Proponowane metody mogą być zaadaptowane do innych struktur tubularnych w obrazowaniu fluorescencyjnym, dotyczącym np. mikrokrażenia.

Opisane wyżej metody obliczeniowe są silnie zależne od związanego z głębokością osłabienia sygnału. Jednakże, jak w przypadku każdego algorytmu segmentacji, wyniki ograniczone są jakością obrazu. Jakiegokolwiek metody poprawiające głębię obrazowania i kontrolujące osłabienie sygnału mogą jedynie poprawić wyniki automatycznego przetwarzania.

Zespół Al-Kofahi ([6]) opracował oprogramowanie w ramach którego struktura neuronu jest śledzona rekurencyjnie poprzez oszacowanie kolejnych punktów wzdłuż linii centralnej. Proces ten wymaga:

1. zebrania punktów wzdłuż kierunków początkowych,
2. szablonów aplikacji rekursywnych mechanizmów,
3. kryterium stopu, gdy osiągnięty zostaje koniec struktury.

Detekcja ciała komórki osiągana jest poprzez połączenie domknięcia skali szarości, adaptacyjne progowanie, i operację łączenia komponentów.

Dla każdego drzewa program wyznacza korzenie, sumę długości wszystkich gałęzi, najdłuższą ścieżkę, jej długość, i zsumowaną długość segmentów gałęzi. Dodatkowo program określa punkty startowe i końcowe dla każdego segmentu drzewa, ich długość, i sumę wszystkich segmentów rozgałęziających się z każdego segmentu. Objętość ciała i długość segmentu są podane w woksela, bez odniesienia do rzeczywistego rozmiaru woksela.

2.3 Automatyczna 3D segmentacja

Automatyczną trójwymiarową segmentację i algorytmy śledzące stosowano do obrysowania jąder komórkowych, unaczynienia i komórek ([19]). Z tych segmentacji, dla każdej komórki oblicza się zbiór podstawowych oraz zbiór towarzyszących pomiarów bazujących na obrazie. Zależności między komórkami oraz pomiędzy unaczynieniem i komórkami przedstawia się w postaci sieci graficznej, w celu umożliwienia dalszej analizy. Pomiary mogą być zastosowane dla przeróżnych ilościowych hipotetycznych i poszukiwawczych badań dotyczących centralnego systemu nerwowego.

2.4 3D spektralna konfokalna mikroskopia

Metodologia w badaniach Bjornsson i współpracowników ([19]) opisująca organizację komórkową mózgu jest oparta na 3D spektralnej konfokalnej mikroskopii i komputerowej analizie obrazu. W badaniach tych analizowano trójwymiarowe obrazy z pięcioma kanałami które odpowiadały jądom komórkowym,

neuronom, komórkom mikrogleju, astrocytom i naczyniom krwionośnymi. Tradycyjnie przeprowadzane jest to poprzez zastosowanie komputerowej manualnej analizy bazującej na ludzkim rozpoznawaniu obrazów i komputerowej rejestracji danych z użyciem różnych typów oprogramowania, takich jak Metamorph (Molecular devices, Sunnyvale, CA), Velocity (Improvision Inc., Waltham, MA), ImageJ (NIH), oraz Neurolucida (MBF Biosciences).

Przez celowy wybór sond fluorescencyjnych możliwe jest obecnie równoczesne obrazowanie licznych rodzajów cząstek, przy jednoczesnym zachowaniu ich przestrzennych relacji. Wraz z pojawieniem się spektralnych konfokalnych mikroskopów, takich jak Zeiss LSM META, możliwa stała się rejestracja 32-punktowego spektrum emisji w każdym punkcie obrazu. Dane te mogą być przetwarzane z zastosowaniem oprogramowania dostarczanego wraz z mikroskopem przez producenta mikroskopu w celu przetwarzania niewielkiej liczby zasadniczo „czystych” kanałów zawierających nieistotne prześwity z innych fluoroforów ([35], [49], [152]). Ocena wystarczająco dużych trójwymiarowych obrazów umożliwia szeroko zakrojone pomiary zależności komórki względem innej komórki. Liczba kanałów obrazowania jest wystarczająco duża do przeprowadzenia niezależnego oznaczenia wszystkich składowych poddanych badaniom ([81], [116], [126]).

2.5 Manualne metody rekonstrukcji struktur biologicznych

Wśród metod manualnych funkcjonują dwa główne sposoby postępowania: bazujące na obiekcie i bazujące na intensywności fluorescencji. Przykładem metody bazującej na obiekcie jest stereologia wykorzystana np. w Stereo Investigator (MBF Biosciences, Williston, VT). W tej metodzie użytkownik liczy i/lub obrysowuje losowy podzbiór obiektów. Metody bazujące na intensywności fluorescencji stosują całkowitą intensywność sygnału dla określenia ilościowego sygnału bez wyraźnego obrysowania struktur (np. [18], [150]). Metody stereologiczne mają trzy główne ograniczenia. Po pierwsze ręczne próbkowanie obiektów jest konieczne do redukcji rozbieżności co ogranicza korzyści płynące z próbkowania podzbiorów. Po drugie zakładają, że tkanka jest homogenna, podczas gdy histologia mózgu nie jest homogenna. Po trzecie są ograniczone w możliwościach opracowywania danych wielowymiarowych. Metody bazujące na intensywności fluorescencji są niedoskonałe z powodu braku informacji strukturalnych i faktu, że sygnał fluorescencji jest niewiarygodnym wskaźnikiem stężenia molekularnego, ponieważ jest obciążony błędami przygotowania preparatu i obrazowania. Generalnie metody manualne są niedoskonałe z powodu powolności, kosztów, monotonii pracy, subiektywności, braku regularności śledzonych struktur, ograniczenia uwagi, zdolności percepcyjnych ludzkiego narządu wzroku, który jedynie umożliwia obuoczne widzenie stereoskopowe, nie pełnoobjętościowy ogląd. Metody oceny są ograniczone do dwuwymiarowego ekranu komputera. Największe ograniczenie metod manualnych stanowi ograniczenie możliwości analizy współzależności strukturalnych, wynikających z topologii.

2.6 Automatyczne metody rekonstrukcji struktur biologicznych

Algorytmy automatyczne stworzono do analizy indywidualnych elementów neuroanatomicznych w celu zliczania jąder komórkowych, śledzenia procesów neuronalnych, wzoru rozgałęzień dendrytów pojedynczego neuronu, czy śledzenia unaczynienia ([5], [8], [43], [81], [82], [131], [139], [149]). Narzędzia te umożliwiają obrysowywanie elementów specyficznych klas struktur obrazów jednobarwnych z błędem w zakresie 5-10%, co wiąże się ze znacznym postępowaniem w możliwościach radzenia sobie z różnorodnością morfologiczną. Ponieważ dotychczas nie uzyskano 100% automatyzacji narzędzia te akceptowane są jako automatyczne, z równoczesnym nadzorem i zastosowaniem metod edycji umożliwiających badaczowi w razie konieczności redukcję błędów. Biorąc pod uwagę, że tkanka mózgu ma różnorodną architekturę, ze skomplikowanymi sieciami połączeń i współzależnościami, istnieją dwie główne potrzeby. Pierwsza – konieczne jest równoczesne zastosowanie narzędzi wielokrotnej segmentacji w celu analizy wieloparametrowych zbiorów danych. Po drugie – istnieje potrzeba rozwoju wszechstronnych metod o możliwościach szerokiego zastosowania, w celu połączenia pomiarów uzyskanych z licznych segmentacji w znaczeniu biologicznym.

Jedną z proponowanych strategii zmagania się ze złożonością trójwymiarowych danych pochodzących z wielu wymiarów jest metoda, która bazuje na dostępnym na rynku oprogramowaniu rozdzielającym 32-kanalowy obraz spektralny na niewielką liczbę niezachodzących na siebie kanałów ([35], [49], [152]). Każdy kanał charakteryzuje się dużo mniejszą złożonością morfologiczną w porównaniu z kompletną tkanką. Umożliwia się zatem stworzenie obrysu struktur pochodzących z każdego z kanałów. Wykorzystywane są wówczas algorytmy dedykowane określonej kategorii morfologicznej analizowanych struktur. W ramach podstawowych pomiarów oceniane są: lokalizacja przestrzenna, wymiary i kształty przedziałów komórkowych, długości i wzory rozgałęzień, różnorodność unaczynienia i powierzchnie obszarów błon. Asocjacyjne pomiary służą do określenia ilościowych wzajemnych relacji pomiędzy dwoma lub większą ilością struktur uzyskanych przez segmentację. Rola tych pomiarów jest niezwykle istotna w systemie, który miałby posłużyć lepszemu zrozumieniu złożoności tkanki mózgu. Obiekty mogą pochodzić z pojedynczego kanału (np. dwa jądra komórki) lub różnych kanałów (np. jądra i naczynia krwionośne).

Pomiary można stosować w celu ilościowego określenia organizacji tkanki mózgu, zmian w organizacji zachodzących podczas rozwoju, lub w następstwie schorzeń, urazów, po podaniu środków farmakologicznych oraz procesów związanych ze starzeniem się.

Program analizy obrazu FARSIGHT ([19]) różni się od innych metod przez położenie nacisku na asocjacyjne pomiary podczas analizy każdego obiektu w polu. Kontekst obiektu, w sensie otaczającej tkanki, jest analizowany w pierwszej kolejności. Jest to alternatywne podejście w porównaniu do klasycznego w stereologii, bazującego na losowym próbkowaniu obszaru ([59]).

Złotym standardem dla oceny poprawności automatycznych analiz zawsze będzie człowiek, który jest ekspertem. Zrozumiałym podejściem jest aby ekspert z danej dziedziny analizował dane uzupełniając je komentarzem. W tym celu można się posłużyć takimi rozwiązaniami komercyjnymi jak MetaMorph (Mole-

cular Devices Corp., Sunnyvale, CA) lub Velocity (Improvision Inc., Waltham, MA). Niemniej jednak brakuje im następujących istotnych własności: możliwość nadawania priorytetu fragmentom analizowanej struktury w celu zmniejszenia wysiłku manualnej walidacji oraz fakt, że dane zawsze wymagają konwersji do formatów tych programów.

Analiza punktów przestrzennych jest postępowaniem analitycznym stosowanym w celu zrozumienia wzorów rozkładu pojedynczych punktów takich jak synapsy. W celu wsparcia analizy struktur neuronalnych stworzono narzędzie ([31]) freeware nazwane PAJ (Point Analysis in Java) bazujący na analizach statystycznych ([36]). Narzędzie to bazujące na Javie otrzymuje na wejściu 3D współrzędne kartezjańskie i przeprowadza zakres analiz do testowania wzorców. W dodatku na danych wejściowych przeprowadzana jest analiza Monte Carlo, w celu porównania eksperymentalnych danych z losowymi.

Często trójwymiarowe neurony są rzutowane na dwuwymiarową powierzchnię (np. camera lucida i różne typy mikroskopii 2D), w związku z tym obrys komórek może być w zasadzie przedstawiany jako jednowymiarowa krzywa parametryczna ([54]).

Możliwym zastosowaniem informacji o konturach jest automatyczne uzyskanie dendrogramów ([67]), jednakże ta metoda ulega często komplikacji za sprawą krzyżowania przebiegów neuronalnych na obrazach dwuwymiarowych, powodując, że niektóre obszary komórki stają się niedostępne dla algorytmów tradycyjnego konturowania. Algorytmy te wykrywają piksel początkowy konturu, szukają kolejnego piksela poprzez sondowanie najbliższego otoczenia piksela, następnie wędrują dookoła całego obiektu aż do momentu natrafienia na pierwszy początkowy piksel ([32]).

W algorytmach śledzących kontur zwykle nie jest możliwym przemierzanie obszarów najbardziej wewnętrznych z powodu rzutowania trzech wymiarów na dwa. W związku z tym tylko zewnętrzne kontury komórek są reprezentowane a utracone najbardziej wewnętrzne.

Z naturalnej przyczyny obrazowanie trójwymiarowe jest lepsze niż dwuwymiarowe ponieważ dostarcza więcej informacji o uzyskanej strukturze ([79]). Jednakże trójwymiarowe obrazowanie wymaga dodatkowej mocy komputerowej, zwłaszcza dla uwydatnienia i interpretacji struktury. W dodatku w przypadkach gdy oryginalne neurony są płaskie, jak komórki zwojowe siatkówki, to ich ujęcie trójwymiarowe umożliwia dokonanie rozdziału skrzyżowań cienkich segmentów, które zawierają się głównie w obrębie wymiaru Z. Inną przyczyną dla której obrazowanie dwuwymiarowe pozostaje cenne w neurobiologii jest fakt że nie wszystkie typy mikroskopii mogą być wykorzystane w aspekcie trójwymiarowym.

Rothaus i współpracownicy w swoich pracach ([103], [102]) przedstawili pół-automatyczną metodę rozdziału żył i tętnic drzewa naczyniowego dna oka. W celu rozwiązania tego problemu konieczne jest oznakowanie naczyń krwionośnych, które również są rozgałęzionymi strukturami. Na początku obraz szkieletyzacji jest uzyskiwany z drzew naczyniowych. Następnie ten szkielek jest przedstawiany jako graf naczyniowy, który zawiera wszystkie informacje włączając w to połączenia pomiędzy obszarami krytycznymi i segmentami gałęzi. Później odbywa się ręczne etykietowanie innych naczyń w obszarze naczyniowego grafu. W tym przypadku wiadomym jest, że skrzyżowanie występuje jedynie pomiędzy żyłą i tętnicą. Podstawowa wiedza dotycząca struktury naczyń stosowana jest do uproszczenia zagadnienia powodując że przeciwne segmenty

gałęzi w skrzyżowaniu powinny być jednolicie oznakowane. Takie założenie czyni to postępowanie specyficznym dla problemu śledzenia zależności żyła/tętnica. Alternatywnie segmenty gałęzi sąsiadujących w skrzyżowaniu powinny być oznakowane wyraźnym identyfikatorem.

Niektóre struktury takie jak skrzyżowania i nakładanie się, nie występują w rzeczywistym trójwymiarowym neuronie, a są jedynie następstwem projekcji z przestrzeni 3D na płaską.

Algorytm śledzenia gałęzi jest w literaturze określany jako BTA (ang. Branches Tracking Algorithm) ([11]). Proces śledzenia można podzielić na predykcję, pomiar i aktualizację. Podczas etapu predykcji algorytm estymuje następny etap systemu. Podczas etapu pomiaru algorytm sonduje system przez poszukiwanie bliskiego, możliwego do przyjęcia stanu. Podczas etapu aktualizacji algorytm łączy obydwie informacje uzyskane z poprzednich etapów i przedstawia wynik optymalnej estymacji dla następnego etapu.

Wszystkie metody opisane w pracy ([79]) zostały zaimplementowane w postaci skryptów napisanych w środowisku Matlab, z zastosowaniem SDC Morphology Toolbox for Matlab. Metody były ocenione na podstawie zbioru danych zawierających różne obrazy komórek zwojowych siatkówki kociej z zastosowaniem camera lucida.

NeuriteTracer ([95]) to biblioteka programu ImageJ. Analizuje on pochodzące z mikroskopu fluorescencyjnego obrazy neurytów i jąder neuronów wydzielonych z kultur hodowlanych. Zadane przez użytkownika progowanie umożliwia zliczanie przez plugin jąder neuronów oraz śledzenie i pomiary długości neurytów. NeuriteTracer właściwie mierzy wyrostki neurytów z mózdzku, DRG (ang. Dorsal Root Ganglion - zwój korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych) i neuronów hipokampa. Wartości uzyskane przez ten program silnie korelują z uzyskanymi przez śledzenie półręczne z zastosowaniem programu NeuronJ i jeśli użyć wysoce specjalistycznego pakietu analiz MetaXpress. NeuriteTracer automatycznie zapisuje tabele wyników do plików tekstowych, a stosy obrazów jąder neuronów oraz ich szkieletów zapisywane są w formacie TIFF do późniejszej wizualizacji.

NeuriteTracer dokładnie oznakowuje i mierzy neuryty zarówno pojedynczych jak i złożonych kultur neuronowych i w relatywnie czystych kulturach neuronowych identyfikuje oraz zlicza jądra komórkowe. Program jest również zdolny do uchwycenia mających znaczenie fizjologiczne różnic w rozroście neurytów. Przy założeniu, że parametry początkowe (progi i skala obrazu) zostały określone, śledzenie może się odbyć bez interakcji z użytkownikiem.

Najczęściej stosowaną miarą do oceny czynników mających wpływ na rozrost neurytów jest ilość rozgałęzień w strukturze komórki ([4], [63], [45], [71], [76], [107], [122], [147]).

Obecnie osiągnęte są zarówno komercyjne jak i ogólnie dostępne metody zautomatyzowanych pomiarów. Komercyjnie dostępne systemy zautomatyzowanych analiz takie jak IN Cell Analyzer (GE Healthcare) lub ImageXpress (Molecular Devices) są niesłychanie drogie i dostępne tylko dla pojedynczych bardzo zamożnych ośrodków naukowych. Algorytmy dedykowane śledzeniu opisywane były w literaturze ([7], [143], [148]) jednakże zastosowanie tych algorytmów w neurobiologii jest ograniczone z powodu złożoności zagadnienia. W związku z tym badania dotyczące rozrostu neurytów zwykle opierają się na pracochłonnych manualnych lub półmanualnych metodach. Aktualnie dostępne metody automatycznego śledzenia są albo niezwykle drogie, albo ogólnie dostępne, ale

trudne do wdrożenia.

Tradycyjne 3D metody bazujące na instrumentach manualnego śledzenia takich jak NeuroZoom lub Neurolucida wprowadzają błąd subiektywny a ich implementacja jest czasochłonna.

Algorytm sondujący Rayburst ([100]) generuje wielokierunkowy zbiór promieni zwany rdzeniem sondującym (ang. sampling core). W ramach tej metody wartości gęstości są interpolowane i uciągane pomiędzy woksłami, co umożliwia uzyskanie rozdzielczości poniżej jednego woksela dla powierzchni lokalnej oraz wygładza artefakty kwantyzacji obrazów cyfrowych. Jest to ogromna poprawa rozdzielczości małych struktur, takich jak kolce dendrytyczne neuronów, które mogą być reprezentowane przez zaledwie kilka wokseli zwłaszcza podczas obrazowania z zastosowaniem mikroskopu świetlnego o ograniczonej rozdzielczości. Pola powierzchni i objętości obiektów trójwymiarowych mogą być przetwarzane do poziomów arbitralnych dokładności poprzez integrację trójkątną powierzchniową siatką. W konsekwencji otrzymujemy określoną przez promienie dyskretyzację objętości. Liczba promieni może być różna w zależności od relacji dokładność a prędkość obliczeń. W wielu aplikacjach zastosowanie dwuwymiarowego zamiast trójwymiarowego rdzenia sondującego może poprawić zarówno prędkość jak i dokładność, poprzez uniknięcie rozmazania optycznego powodowanego poprzez PSF mikroskopu. W związku z tym można wyeliminować konieczność aplikacji procesu dekonwolucji.

Neurony zbudowane są z drzew aksonalnych i dendrytycznych, których podstawowym elementem jest fragment cylindrycznego odgałęzienia. Standardowe oprogramowanie dla morfometrii neuronów takie jak L-Measure ([112]), 3DMA ([139]) i NeuroLucida (MicroBrightField) oraz kompartmentowe programy modelujące takie jak NEURON ([56]) i GENESIS ([25]) prezentują rozgałęzienia neuronalne generalnie jako cylindry, które tworzą łańcuch węzłów o określonej średnicy. W celu otrzymania takiej reprezentacji na podstawie cyfrowych obrazów struktura musi być najpierw zredukowana do zbioru połączonych węzłów wzdłuż środka każdego segmentu rozgałęzienia. To powoduje że uzyskujemy środkową oś lub szkielet struktury, przy pomocy różnych metod ([6], [21], [23], [75], [111], [138]). W celu przedstawienia kształtu trójwymiarowego konieczna jest estymacja średnicy każdego węzła.

Dla danych uzyskanych za pomocą laserowej skanującej mikroskopii PSF mikroskopu może istotnie zmniejszać grubość gałęzi wzdłuż kierunku osi optycznej, co może być w znacznym stopniu wyrównane przez techniki dekonwolucji.

Półautomatyczne metody detekcji kształtu kolców dendrytycznych mogą być przeprowadzone z zastosowaniem programów NeuronStudio ([99]), AutoNeuron, MBF Bioscience, Williston, VT. NeuronStudio jest zintegrowanym systemem do półautomatycznej digitalizacji, morfometrii i analizy złożonej morfologii neuronów w wysokiej rozdzielczości.

W aplikacji NeuronStudio woksele kolców są pogrupowane i analizowane z precyzją poniżej jednego woksela przy pomocy programu Rayburst ([100]) oraz sklasyfikowane na trzy morfologiczne typy: grzybiasty, krępy i cienki. Program umożliwia również wizualną weryfikację klasyfikacji kolców i manualną ich edycję. Stosowana jest adaptacja metody ISODATA ([97]) w celu obliczenia lokalnego progu dla każdego węzła wzdłuż modelu dendrytycznego. Metoda ta jest właściwa dla zbioru danych wykazujących dwumodalny rozdział wartości intensywności.

Specjalista bada każdą stertę obrazów konfokalnych interaktywnie, używając

najpierw 2D przeglądarki skrawków i następnie 3D renderingu.

NeuronStudio jest narzędziem, które umożliwia rekonstrukcję, klasyfikację i określenie ilościowe kształtu kolców.

Tradycyjne metody manualne digitalizacji kolców są czasochłonne, niedokładne i subiektywne (NeuroZoom ([20]), NeuroLucida ([51]) (MBF Bioscience, Williston, VT)).

Do tej pory w literaturze opisano trzy metody automatycznej analizy kolców dendrytycznych w oparciu o obrazy z mikroskopii świetlnej i tylko jeden z nich opiera się o dane trójwymiarowe. Ta metoda 3D ([62]) bazuje na technice zwanej „grassfire” przypisującej każdemu wokselowi dendrytu odległość od osi środkowej struktury dendrytycznej ([75]). Kolce i wypukłości powierzchni dendrytów są identyfikowane jako miejscowe maksima tej miary.

Ostatnio Zhang Y. i wsp. ([148]) zastosowali detektor krzywoliniowych struktur do wykrywania kolców w dwuwymiarowych projekcjach stert obrazów LSM oraz LDA (ang. Linear Discriminant Analysis) w celu odróżnienia rzeczywistych kolców od pseudokolców. Metoda stanowi ulepszenie względem stosowanych wcześniej technik, przez zastosowanie adaptacyjnego miejscowego progowania do detekcji kolców i dendrytów, niestety jest stosowana jedynie dla dwóch wymiarów. W takich 2D metodach kolce powyżej i poniżej dendrytu wzdłuż osi optycznej nie mogą być wykryte, co więcej kształt kolców, długość oraz inne pomiary są zniekształcone przez brak informacji w osi Z.

System Neuroexplorer (Microbrightfield, Inc.) określa automatycznie generowane ślady, punkty rozgałęzień i pomiary morfologiczne.

L-Measure ([113]) jest ogólnie dostępnym oprogramowaniem stosowanym w ilościowej charakterystyce morfologii neuronów. L-Measure oblicza duże ilości parametrów neuroanatomicznych na podstawie plików rekonstrukcji trójwymiarowej.

Alternatywną wersją przeprowadzania analiz morfometrycznych jest program MicroBrightField NeuroExplorer (www.mbfbioscience.com). Programem umożliwiającym łączenie własności elektrofizjologicznych z morfologicznymi jest NEURON (<http://www.neuron.yale.edu>). PAJ (Java tool Point Analysis) ([114]) to ogólnodostępne oprogramowanie napisane w Javie w celu 3D analizy punktowej.

Rozdział 3

Metody przetwarzania obrazów

W celu efektywnego wykorzystania obrazu jako źródła informacji należy przetworzyć go na postać cyfrową, a następnie przeprowadzić jego szczegółowy proces analizy, w skład którego wchodzi: segmentacja, lokalizacja obiektów oraz wyznaczanie ich cech. Jednak przed rozpoczęciem tego procesu konieczna jest poprawa jakości obrazu, a w szczególności jego filtracja, w celu eliminacji zakłóceń oraz wyostanie. Te ostatnie operacje odwołują się do procesu przetwarzania obrazu.

Zadania realizowane przez komputerowe systemy przetwarzania obrazów są zaskakująco złożone i trudne ([127], [128]). Zaskoczenie wynika z tego, że każdy człowiek dokonuje przetwarzania i rozpoznawania obrazów przez praktycznie cały czas, przy czym czynności te nasz mózg wykonuje w sposób tak szybki i naturalny, że trudno jest nam zdać sobie sprawę z ogromnej złożoności tego procesu. Tymczasem próba stworzenia sztucznego odpowiednika tego procesu ujawnia całą złożoność tego, co po prostu nazywamy patrzeniem i postrzeganiem. Zautomatyzowanie tego procesu jest więc niesłychanie trudne, przynieść jednak może wielkie korzyści.

Na proces widzenia, zarówno naturalnego jak i sztucznego, składa się szereg operacji takich jak: recepcja (akwizycja) obrazu, przetwarzanie obrazu (filtracja wstępna, eliminacja zakłóceń, kompresja obrazu, eksponowanie ważnych cech, itp.), analiza obrazu (wydobycie cech opisujących obraz), rozpoznanie obrazu i jego semantyczna interpretacja. Najbardziej czasochłonnym i angażującym największe moce obliczeniowe jest etap filtracji obrazu, zaś najbardziej skomplikowaną i trudną w realizacji operacją jest analiza obrazu. Cechą charakterystyczną procesu przetwarzania obrazu jest fakt, że zarówno na wejściu algorytmu przetwarzającego informacje, jak i na wyjściu występują obrazy. Jest to spostrzeżenie bogate w konsekwencje. Główną z nich jest konstatacja faktu, że algorytm przetwarzający, który musi wytworzyć dziesiątki tysięcy lub nawet miliony punktów obrazu wynikowego, po prostu musi działać stosunkowo wolno na szeregowym (sekwencyjnym) komputerze. Jego pracę można znakomicie przyspieszyć przechodząc do komputerów o architekturze równoległej.

Po procesie przetwarzania obrazu następuje jego analiza. Wynikiem analizy obrazu mogą być dane jakościowe i ilościowe, opisujące określone cechy obrazu

lub całej grupy obrazów. Podczas analizy obrazu gubiona jest bezpowrotnie pewna część informacji, jednak rezultat analizy może zawierać wszystkie informacje użyteczne, a trudne do wyodrębnienia “na pierwszy rzut oka” w obrazie wyjściowym. Dlatego obraz po procesie analizy jest nieporównanie bardziej podatny na zastosowanie metod i algorytmów rozpoznawania czy też na inne metody oceny jego merytorycznej zawartości, niż obraz nie poddany analizie. Podstawowymi grupami przekształceń są: przekształcenia geometryczne, przekształcenia punktowe, przekształcenia kontekstowe, przekształcenia widmowe i przekształcenia morfologiczne.

3.0.1 Matematyczna definicja obrazu

Aby w formalny sposób zdefiniować operacje wykonywane na obrazie, musimy najpierw matematycznie określić pojęcie obrazu. Z matematycznej definicji obrazu przedstawionej w tym podrozdziale będziemy korzystać w dalszej części pracy. Zakładamy, że obraz składa się z pikseli (lub wokseli w przypadku obrazu trójwymiarowego), które mają wartości rzeczywiste lub całkowite i są indeksowane przez swoje współrzędne, będące liczbami całkowitymi. Dla przypadku dwuwymiarowego przyjmujemy, że piksel leżący w lewym górnym rogu obrazu ma indeks $[0, 0]$. Współrzędne pikseli rosną z lewej strony do prawej i z góry na dół. Obraz trójwymiarowy możemy sobie wyobrazić jako stos (ciąg) obrazów 2D umiejscowionych jeden na drugim. W obrazach 3D woksele mają 3 współrzędne. Indeksy wokseli z obrazu na górze stosu mają trzecią współrzędną równą 0. Jej wartość rośnie wraz z przechodzeniem w głąb stosu.

Przez obraz będziemy rozumieli pewną specyficzną funkcję, która dla podanych współrzędnych wokseli zwraca jego wartość (czyli jasność lub stopień szarości). Rozmiar obrazu F będziemy oznaczać poprzez $r_d(F)$, gdzie $d = 1, 2, 3, \dots$ to numer wymiaru (osi). I tak na przykład dla dwuwymiarowego obrazu F o szerokości 44 pikseli i wysokości 30 pikseli możemy zapisać $r_1(F) = 44$ i $r_2(F) = 30$. W definicjach matematycznych będziemy się często odwoływać do wartości wokseli leżących poza rzeczywistym obrazem, dlatego funkcja obrazu musi być również określona dla współrzędnych spoza jego granic. W niniejszej pracy przyjęto założenie, że wartości wokseli spoza obrazu są równe zero (chyba że, wyraźnie napisano, że jest inaczej). Reasumując, N -wymiarowy obraz F możemy zdefiniować jako następującą funkcję:

$$F: \mathbb{Z}^N \rightarrow \mathbb{R}$$

$$F([x_1, x_2, \dots, x_N]) = \begin{cases} \text{jasność wokseli} & \forall 1 \leq d \leq N \quad 0 \leq x_d < r_d(F) \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (3.1)$$

Dodatkowo wprowadzono definicję zbioru χ N -wymiarowych wektorów będących indeksami wokseli zawartych w obrazie:

$$\chi(F) = \{[x_1, x_2, \dots, x_N] \in \mathbb{Z}^N : \forall 1 \leq d \leq N \quad 0 \leq x_d < r_d(F)\} \quad (3.2)$$

3.1 Przekształcenia punktowe

Przekształcenia punktowe (anamorficzne) mają za zadanie jedynie lepsze uwidocznienie pewnych treści już zawartych w obrazie. Nie wprowadzają one żad-

nych nowych informacji do obrazu. Bezpośrednio widocznym efektem przekształceń punktowych jest zawsze zmiana skali jasności obrazu, bez zmiany geometrii widocznych na obrazie obiektów. Ich wadą jest to, że reguła przekształcenia musi być każdorazowo wymyślona przez osobę analizującą obraz.

3.1.1 Modulacja gamma

W celu ogólnej poprawy jakości obrazu i to bez określenia *ad hoc* czego się na obrazie szuka można użyć normalizacji czy modulacji gamma. Normalizacja polega na sprowadzeniu przedziału zmian wartości punktów wyjściowego obrazu do pewnego, ustalonego zakresu. Modulacja gamma ma natomiast za zadanie redukcję nadmiernego kontrastu obrazu wyjściowego. Przekształcenie to ma postać:

$$F_{GAMMA}(\bar{x}) = (F(\bar{x}))^\varphi \quad (3.3)$$

gdzie φ jest stałym wykładnikiem, zazwyczaj liczbą naturalną.

3.1.2 Wyrównanie histogramu

Często stosowanym przekształceniem jednopunktowym jest wyrównanie histogramu. Polega ono na takim przekształceniu jasności poszczególnych punktów obrazu, aby ilość punktów o jasności leżącej w każdym z równych przedziałów histogramu była w przybliżeniu taka sama. Transformacja ta ma duże znaczenie praktyczne. Idealny histogram powinien mieć w ogólnym zarysie kształt zbliżony do prostokąta, a więc żadne wydzielone obszary w dziedzinie szarości nie powinny mieć przewagi nad innymi. Wyrównanie histogramu można wykonać globalnie lub lokalnie. Lokalne wyrównanie histogramu na każdym z fragmentów obrazu niezależnie niweluje skutki nierównomiernego oświetlenia obiektu.

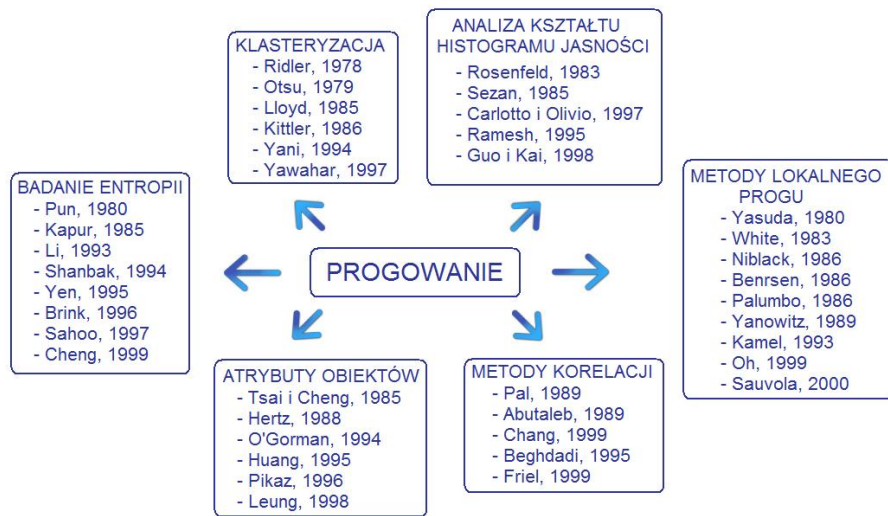
3.2 Binaryzacja

Celem binaryzacji jest radykalna redukcja ilości informacji zawartej w obrazie. Przeprowadzenie procesu binaryzacji polega na tym, aby obraz mający wiele poziomów szarości zamienić na obraz, którego piksele mają wyłącznie wartość 0 lub 1. Ogólną operację binaryzacji można zdefiniować w następujący sposób:

$$F_{BIN}(\bar{x}) = \begin{cases} 0 & \text{gdy } \bar{x} \in \chi(F) \wedge F(\bar{x}) < T_{BIN} \\ 1 & \text{gdy } \bar{x} \in \chi(F) \wedge F(\bar{x}) \geq T_{BIN} \end{cases} \quad (3.4)$$

gdzie $\delta_{BIN}(F)$ oznacza obraz F po binaryzacji, a T_{BIN} to przyjęty próg binaryzacji. Progowanie jest klasyczną metodą binaryzacji obrazu monochromatycznego. Dla większości aplikacji skuteczność segmentacji poprzez progowanie jest wystarczająca, a szybkość przetwarzania nieporównywalnie większa w stosunku do innych metod.

Przy wykonywaniu binaryzacji obrazu podstawowym problemem jest odpowiedni wybór progu binaryzacji. Algorytmy służące do automatycznego wyznaczania wartości progowej są tematem wielu prac naukowych. Na rysunku 3.1 zamieszczono krótki przegląd istniejących metod binaryzacji. Jako podstawę do przygotowania schematu przyjęto przeglądowy artykuł [117] oraz pracę [16]. Generalnie, algorytmy binaryzacji różnią się sposobem wyznaczania wartości progowej. Możemy tutaj wyodrębnić dwa główne podejścia:



Rysunek 3.1: Taksonomia metod wyznaczania progu przy binaryzacji obrazu wg. [16]

próg globalny - wartość progu T_{BIN} jest taka sama dla wszystkich wokseli. W tym podejściu wartość progu jest wyznaczana globalnie. Cały obraz jest binaryzowany z jedną, stałą wartością progu T_{BIN} . Przykładem algorytmu o globalnym progu może być opisany dalej algorytm SIS.

próg lokalny - wartość progu T_{BIN} jest wyznaczana dla każdego wokseli z osobna. Metody progu lokalnego są użyteczne w przypadku złego, a w szczególności nierównomiernego oświetlenia sceny. W metodach tych wartość progu obliczana jest osobno dla poszczególnych pikseli lub większych fragmentów obrazu, na podstawie informacji o wartościach pikseli w wybranym otoczeniu przetwarzanego wokseli. Jako przykład takiego podejścia zostanie dalej opisany algorytm Bernsena.

Oczywiście nie istnieją rozwiązania uniwersalne dla wszystkich obrazów. Dlatego dla konkretnych zagadnień metodę i jej parametry dobiera się doświadczalnie.

3.2.1 Algorytm SIS

Algorytm SIS (ang. Simple Image Statistic) jest metodą znajdowania globalnej wartości progowej na podstawie prostych statystyk obrazu i nie wymaga tworzenia histogramu wartości pikseli ([70], [106]). Zakładamy, że obraz rzeczywisty przedstawia obiekt o jasności a na tle o jasności b , jednak dla poszczególnych pikseli obrazu wartości te są w pewien sposób zaszumione. Wówczas odpowiednia dla takiego obrazu wartość progu T_{BIN} powinna być następująca:

$$T_{BIN} = \frac{a + b}{2} \quad (3.5)$$

W oryginalnej wersji algorytm SIS jest zdefiniowany dla dwuwymiarowego obrazu. Jeśli dla każdego punktu takiego obrazu $\bar{x} = [x_1, x_2]$ o jasności $F(\bar{x})$

zdefiniujemy jego numeryczny gradient:

$$|\nabla \bar{x}| = \max(|F(\bar{x} + \bar{u}_1) - F(\bar{x} - \bar{u}_1)|, |F(\bar{x} + \bar{u}_2) - F(\bar{x} - \bar{u}_2)|) \quad (3.6)$$

to wówczas otrzymujemy szukaną wartość progu.

$$T_{BIN} = \frac{\sum_{x_1=1}^{r_1(F)} \sum_{x_2=1}^{r_2(F)} |F([x_1, x_2])| \cdot |\nabla[x_1, x_2]|}{\sum_{x_1=1}^{r_1(F)} \sum_{x_2=1}^{r_2(F)} |\nabla[x_1, x_2]|} \quad (3.7)$$

Jak widać, algorytm ten można bardzo łatwo przystosować do binaryzacji obrazów trójwymiarowych - wystarczy rozszerzyć definicję 3.6 o element $|F(\bar{x} + \bar{u}_3) - F(\bar{x} - \bar{u}_3)|$ oraz definicję 3.7 o zmienną x_3 .

3.2.2 Algorytm Bernsena

W metodzie Bernsena wartość progu T_{BIN} dla danego woksela jest obliczana na podstawie wartości wokseli z jego sąsiedztwa. Dla dwuwymiarowych obrazów za sąsiedztwo przyjmuje się kwadratowe okna o zadanej wielkości. Jako wartość progową T_{BIN} przyjmuje się wartość uśrednioną z wartości minimalnej i maksymalnej w obrębie okna. (wzór 3.8).

$$T_{BIN}(\bar{x}) = 0,5 \cdot \left[\max_{\bar{t} \in M_{\bar{x}}} (F(\bar{t})) + \min_{\bar{t} \in M_{\bar{x}}} (F(\bar{t})) \right] \quad (3.8)$$

gdzie $M_{\bar{x}}$ jest oknem o rozmiarach b na b pikseli wokół piksela $\bar{x}$.

$$M_{\bar{x}} = \{\bar{t} = [t_1, t_2] \in \chi(F) : |x_1 - t_1| < b \wedge |x_2 - t_2| < b\} \quad (3.9)$$

Ponadto przyjmuje się, że jeśli kontrast w obrębie okna

$$C(\bar{x}) = \max_{\bar{t} \in M_{\bar{x}}} (F(\bar{t})) - \min_{\bar{t} \in M_{\bar{x}}} (F(\bar{t})) \quad (3.10)$$

jest zbyt mały, wówczas przyjmuje się, że wszystkie punkty należące do okna należą do tej samej klasy określonej przez wybrany eksperymentalnie próg globalny T_0 .

Wielkość okna M powinna być dobrana proporcjonalnie do wielkości obiektów, które algorytm wykrywa. Zastosowanie zbyt dużego okna powoduje, że algorytm segmentacji pomija małe obiekty o niewielkim kontraście, które znajdują się w sąsiedztwie obiektów o większym kontraście. Okno zbyt małe uniemożliwia prawidłowe wykrywanie krawędzi dużych obiektów oraz prawidłową identyfikację dużych obszarów obrazu o jednolitym tle. Wielkość okna przeszukiwania powinna być dobrana eksperymentalnie do wielkości obiektów widocznych na obrazie. Może to stanowić problem w przypadku, gdy nie znamy dokładnej skali obrazu lub obiekty, które poddajemy segmentacji charakteryzują się zróżnicowanym kontrastem i wielkością.

Możliwym rozwiązaniem tego problemu jest modyfikacja algorytmu opisana w pracy [17]. Przedstawiony tam algorytm dokonuje binaryzacji poprzez wykonywanie w kolejnych iteracjach algorytmu Bernsena z różną wielkością okna M . W każdym kroku iteracji podwaja się promień tego okna. Do następnego przebiegu wybiera się tylko te punkty, które zostały zaklasyfikowane jako tło. Algorytm kończy swoje działanie, gdy kolejny przebieg nie powoduje już zmiany przyporządkowania pikseli lub gdy osiągnięto ustalony maksymalny promień okna.

3.3 Transformacja Fouriera

Transformacja Fouriera jest przekształceniem widmowym umożliwiającym przedstawienie zadanej funkcji jednej zmiennej w dziedzinie częstotliwości. Może być ona wykorzystana w zaawansowanych technikach przetwarzania obrazów o charakterze specjalistycznym, na przykład obrazów medycznych, satelitarnych lub astronomicznych, do analizy tekstur czy do wyznaczania wymiaru fraktalnego. Dość znaczną analogię do transformacji Fouriera wykazuje szereg innych transformacji, powszechnie stosowanych na przykład do kompresji obrazów, takich jak transformacja kosinusowa czy falkowa (ang. Discrete Wavelet Transform).

3.3.1 Definicja transformacji Fouriera

Transformacja Fouriera wyznacza dla każdej funkcji postaci $f : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{C}$ dokładnie jedną odpowiadającą jej funkcję f_{Fr} zdefiniowaną w tzw. dziedzinie częstotliwości. Jest ona zdefiniowana następującym wzorem:

$$f_{Fr}(\xi) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\psi) \cdot e^{-i2\pi\psi\xi} d\psi \quad (3.11)$$

Istnieje również odwrotna transformacja Fouriera, pozwalająca na wyznaczenie pierwotnej funkcji f z zadanej funkcji f_{Fr} :

$$f(\psi) = \int_{-\infty}^{\infty} f_{Fr}(\xi) \cdot e^{i2\pi\psi\xi} d\xi \quad (3.12)$$

W praktyce operujemy na obiektach z przestrzeni dyskretniej (np.: piksele), dlatego też w miejsce transformacji Fouriera wykorzystywana jest dyskretna transformata Fouriera nazywana w skrócie DFT (ang. Discrete Fourier Transform). Jako dane wejściowe przyjmuje ona ciąg liczb zespolonych. Jej wynikiem jest inny ciąg liczb zespolonych, który ma taką samą ilość elementów, jak ciąg wejściowy. Jeżeli na wejściu mamy dany n -elementowy ciąg $(a_0, a_1, \dots, a_{n-1})$, $a_i \in \mathbb{C}$, to wynikiem DFT jest ciąg $(A_0, A_1, \dots, A_{n-1})$, $A_i \in \mathbb{C}$, którego elementy spełniają następującą zależność:

$$A_j = \sum_{k=0}^{n-1} a_k \cdot e^{-i2\pi \frac{1}{n} jk}, 0 \leq j \leq n-1 \quad (3.13)$$

Analogicznie jak dla opisanej powyżej transformacji Fouriera, istnieje również transformata odwrotna do DFT, dana wzorem:

$$a_j = \sum_{k=0}^{n-1} A_k \cdot e^{i2\pi \frac{1}{n} jk}, 0 \leq j \leq n-1 \quad (3.14)$$

Dwuwymiarowa transformata Fouriera jest operacją separowalną ze względu na wymiar. Może być użyteczna do wykrywania pewnych charakterystycznych wzorców w obrazie. Obrazy otrzymane poprzez odwrotną transformację Fouriera z F-obrazów są wprowadzane zawsze rzeczywiste, jednak ich wartości są zazwyczaj bardzo źle dopasowane do przedziału, z którego pochodziły początkowe wartości wokseli. W związku z tym należy dobrać, najlepiej metodą obserwacji i porównań, nowy zakres, tak by na odtworzonym obrazie zarysowały się kształty zawarte w obrazie oryginalnym.

Aby wykonać DFT dla dwuwymiarowych danych (np.: obrazu), trzeba je podzielić na jednowymiarowe ciągi liczb biegnące wzdłuż pierwszego wymiaru, obliczyć DFT dla każdego takiego ciągu, a następnie wykonać tę samą czynność dla drugiego wymiaru. Dla wielowymiarowych danych w analogiczny sposób należy wykonać te obliczenia kolejno dla wszystkich wymiarów.

3.3.2 Konwolucja obrazów

Transformacja Fouriera posiada pewną ważną własność powiązaną z operacją konwolucji (czyli splotu funkcji). Otóż konwolucja dwóch funkcji w przestrzeni rzeczywistej jest równoważna ich iloczynowi w przestrzeni Fouriera. Innymi słowy, dla dowolnych dwóch funkcji $f, g : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{C}$, które są ciągłe i całkowne na przedziale $(-\infty, \infty)$, zachodzi następująca własność:

$$(f * g)_{Fr} = f_{Fr} \cdot g_{Fr} \quad (3.15)$$

Własność tę można wykorzystać do efektywnego policzenia konwolucji dwóch obrazów za pomocą dyskretnej transformaty Fouriera. Konwolucję dwóch obrazów 2D można zapisać jako:

$$(F * P)([x_1, x_2]) = \sum_{k_1=0}^{r_1(P)-1} \sum_{k_2=0}^{r_2(P)-1} F([x_1 - k_1, x_2 - k_2]) \cdot P([k_1, k_2]) \quad (3.16)$$

Operację konwolucji możemy zinterpretować jako nakładanie na obraz tzw. maski. Obraz P jest w tym przypadku właśnie maską nakładaną na obraz F. Dla każdego piksela z obrazu F następuje przemnożenie jego wartości przez wartości pikseli z maski P. Tak przemnożona maska jest dodawana w odpowiednim miejscu do obrazu wynikowego. Obrazem wynikowym jest więc suma odpowiednio przesuniętych i przemnożonych masek P. Analogicznie konwolucję obrazów trójwymiarowych definiujemy jako:

$$(F * P)([x_1, x_2, x_3]) = \sum_{k_1=0}^{r_1(P)-1} \sum_{k_2=0}^{r_2(P)-1} \sum_{k_3=0}^{r_3(P)-1} F([x_1 - k_1, x_2 - k_2, x_3 - k_3]) \cdot P([k_1, k_2, k_3]) \quad (3.17)$$

Rozmiar obrazu będącego wynikiem konwolucji obrazów F i P można opisać zależnością:

$$r_d(F * P) = r_d(F) + r_d(P) - 1 \quad (3.18)$$

Korzystając z własności transformacji Fouriera przedstawionej w równaniu 3.15, wzory 3.16 i 3.17 możemy zastąpić wzorem korzystającym z dyskretnej transformaty Fouriera:

$$(F * P)(\vec{x}) = IDFT(DFT(F) \cdot DFT(P))(\vec{x}) \quad (3.19)$$

gdzie DFT oznacza dyskretną transformatę Fouriera, a IDFT transformatę odwrotną. Iloczyn obrazów interpretujemy jako obraz składający się z prostych iloczynów pomiędzy odpowiadającymi sobie wokseli. Sens stosowania dyskretnej transformaty Fouriera do wykonywania konwolucji widać po obliczeniu czasowej złożoności obliczeniowej dla wzorów 3.17 i 3.19. W klasycznym algorytmie konwolucji obrazów asymptotyczna czasowa złożoność obliczeniowa wynosi:

$$O\left(\prod_{d=1}^D r_d(F) \cdot \prod_{d=1}^D r_d(P)\right) \quad (3.20)$$

W przypadku korzystania z wzoru 3.19 trzeba policzyć dyskretne transformaty Fouriera dla obrazów wejściowych, przemnożyć je i dla otrzymanego obrazu policzyć transformatę odwrotną. Najbardziej kosztowne z tych operacji jest obliczenie DFT oraz IDFT. Złożoność czasowa tych operacji jest liniowo-logarytmiczna względem ilości wokseli na obrazie. Ponieważ operacje te muszą być wykonywane na obrazach o rozmiarach $r(F)+r(P)$, wypadkowa asymptotyczna czasowa złożoność obliczeniowa tej metody wynosi:

$$O\left(\prod_{d=1}^D (r_d(F) + r_d(P) - 1) \cdot \log\left(\prod_{d=1}^D (r_d(F) + r_d(P) - 1)\right)\right) \quad (3.21)$$

Po porównaniu wzorów 3.20 oraz 3.21 wyraźnie widać, że do konwolucji obrazów większych niż kilkanaście wokseli warto zastosować dyskretną transformatę Fouriera.

3.4 Filtracja obrazu

Zazwyczaj filtry używane do analizy obrazów zakładają, że wykonywane na obrazie operacje będą kontekstowe. Oznacza to, że dla wyznaczenia wartości jednego punktu obrazu wynikowego trzeba dokonać określonych obliczeń na wielu punktach obrazu źródłowego. Z powodu kontekstowości wykonywanych operacji filtracja z reguły nie może dotyczyć pikseli znajdujących się bezpośrednio na brzegu obrazu. Z matematycznego punktu widzenia filtr jest pewną funkcją (wieloargumentową) przekształcającą jeden obraz w drugi metodą “piksel po pikselu”. Właściwości filtru wynikają wprost z analitycznych własności realizującej go funkcji.

Kontekstowe operacje filtracji obrazu bardzo często wykorzystywane są w przetwarzaniu i analizie obrazu. Operacje te, w odróżnieniu od operacji punktowych, istotnie zmieniają zawartość obrazu, w tym także geometrię widocznych na obrazie obiektów. Najbardziej typowe zastosowanie filtracji polega na usuwaniu zakłóceń z obrazu. Za pomocą filtru uśredniającego można usunąć drobne zakłócenia z obrazu, takie jak np. drobne plamki. Wygładzane są również drobne zawirowania krawędzi obiektów, efekty falowania jasności zarówno w obszarze samych obiektów, jak i w obszarze tła.

3.4.1 Filtry liniowe

Wyróżnia się grupę filtrów liniowych, za pomocą których przeprowadzana jest operacja filtracji w oparciu o pewną liniową kombinację wybranych pikseli obrazu wejściowego. Filtry liniowe mogą być opisane za pomocą operacji konwolucji obrazu z odpowiednią maską. W przekształceniach obrazów dwuwymiarowych stosuje się zazwyczaj maski o wymiarach 3×3 . W literaturze opisano wiele różnych masek, których zastosowanie daje pewne określone efekty. Poniżej zostanie przedstawionych kilka z najbardziej znanych. Przy implementacji algorytmów korzystających z filtrów liniowych należy pamiętać o tym, że obraz otrzymany w drodze konwolucji z odpowiednią maską prawdopodobnie będzie musiał zostać przeskalowany, tak aby wartości pikseli mieściły się w dozwolonym przedziale (innym rozwiązaniem może być normalizacja maski przed konwolucją). Ponadto trzeba upewnić się, w jaki sposób dana maska ma zostać na obraz

nałożona - według matematycznej definicji (wzór 3.16) maska powinna być nałożona niejako “na odwrót”, tak aby lewy górny róg maski pokrywał się z prawym dolnym rogiem analizowanego obszaru. Tymczasem powszechnie przyjęło się, że maski są nakładane na analizowany obszar wprost, co jest bardziej intuicyjne, chociaż niezgodne z definicją konwolucji (oczywiście nie ma to znaczenia, gdy maska jest symetryczna w pionie i poziomie).

Filtry górnoprzepustowe mogą służyć do wydobywania z obrazu składników odpowiedzialnych za szybkie zmiany jasności - a więc konturów, krawędzi, drobnych elementów faktury, itp. Filtry górnoprzepustowe dokonują wyostrenia sygnału, co w praktyce polega na uwypukleniu krawędzi obiektów w obrazie. Filtry górnoprzepustowe realizują zawsze jakąś formę różniczkowania sygnału np. za pomocą gradientu Robertsa.

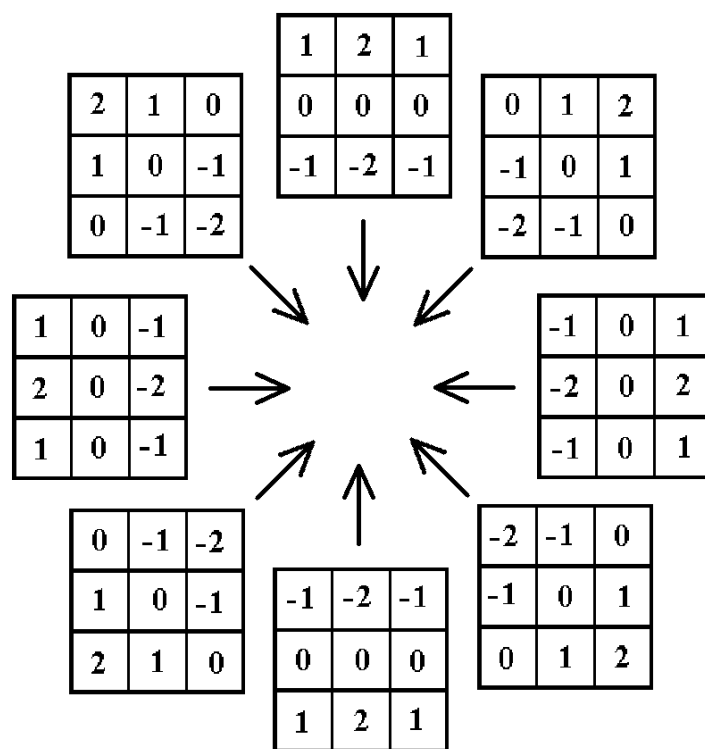
Istota filtracji górnoprzepustowej polega na podkreśleniu pewnych krawędzi. W macierzach konwolucji filtrów górnoprzepustowych występują zarówno dodatnie, jak i ujemne współczynniki, co oznacza, że po wykonaniu splotu w obrazie wynikowym będą występowały zarówno piksele o wartościach dodatnich, jak i piksele o wartościach ujemnych - zjawisko takie nie występuje podczas filtracji dolnoprzepustowych. Filtr dolnoprzepustowy powoduje niestety pewne rozmycie konturów obiektów i pogorszenie rozpoznawalności ich kształtów.

Przy filtracjach gradientowych można wzmacniać wpływ bezpośrednio najbliższego otoczenia piksela, dla którego wyznaczana jest wartość piksela obrazu wynikowego. Służą do tego tak zwane maski Sobela, które mając określoną orientację wydobywają z obrazu linie i struktury o tej właśnie orientacji.

Do wyznaczania gradientów kierunkowych służą maski Robertsa, Prewitta, Sobela i inne. Jako przykład na rysunku 3.4.1 przedstawiono maski Sobela. Istnieją też maski umożliwiające wykrywanie narożników. Główną cechą operatorów wykorzystywanych do wyznaczania gradientów obrazu lub do wykrywania narożników, jako specjalnych form górnoprzepustowej filtracji obrazu był fakt, że odpowiednie macierze konwolucji wykazywały określoną asymetrię. Następstwem tej asymetrii były kierunkowe własności realizowanych z użyciem tych macierzy transformacji obrazu - podkreślały one lub tłumiły pewne cechy obrazu - zależnie od tego, pod jakim kątem przebiegały określone krawędzie obiektów na obrazie w stosunku do kierunku asymetrii macierzy konwolucji. Gdy celem jest wykrywanie i podkreślanie w obrazie wszelkich krawędzi i konturów obiektów, niezależnie od tego, pod jakim kątem one przebiegają stosuje się najczęściej metody nieliniowe, ale w prostych zadaniach dobre efekty uzyskać można stosując tak zwane laplasjany. Operacja oparta na wykorzystaniu maski laplasjanu uwypukla i podkreśla wszelkie linie i krawędzie obrazu.

3.4.2 Filtry nieliniowe

Większość wspomnianych wyżej filtrów usuwa zakłócenia niszcząc także drobne szczegóły i krawędzie przetwarzanych obrazów. Lepsze efekty dają także i w tym zakresie filtry nieliniowe, wybierające zwykle dla przetwarzanego punktu obrazu wynikowego jedną z wartości z jego otoczenia na obrazie źródłowym. Najczęściej spotykanym przykładem filtra działającego na tej zasadzie jest filtr wykorzystujący medianę. Filtr medianowy jest filtrem mocnym, gdyż ekstremalne wartości przetwarzanego punktu nie mają wpływu na wartość, jaką filtr przekazuje na swoim wyjściu. Filtr medianowy bardzo skutecznie zwalcza wszelkie lokalne szumy, nie powodując ich rozmywania na większym obszarze, co



Rysunek 3.2: Maski Sobela, strzałki pokazują gradient “wykrywany” przez każdą z masek.

jest niestety przypadłością wszystkich filtrów konwolucyjnych. Filtracja medianowa nie wprowadza do obrazu nowych wartości. Obraz po wykonaniu filtracji nie wymaga więc żadnego dodatkowego skalowania. Wadą filtracji medianowej jest erozja drobnych szczegółów obrazu, a niewątpliwym mankamentem długi czas obliczeń. Do analizy stopni szarości wybranego otoczenia punktu można również stosować filtr maksymalny czy minimalny. Wybieramy wówczas wartość największą lub najmniejszą. Filtry te działają bardzo podobnie jak erozja i dylatacja opisane w podrozdziale 3.5.2

Rodzina filtrów nieliniowych jest bardzo liczna. Należą do niej również filtry adaptacyjne, które zmieniają charakterystykę działania w zależności od cech analizowanego obszaru. Do filtrów nieliniowych zaliczyć też można filtry kombinowane wykrywające krawędzie. Idea tych filtrów polega na kolejnym zastosowaniu dwóch gradientów w prostopadłych do siebie kierunkach, a następnie na dokonaniu nieliniowej kombinacji wyników tych gradientów. Dzięki nieliniowej kombinacji rezultatów liniowych transformacji obrazu tworzy się w ten sposób obraz wynikowy o wyjątkowo dobrze podkreślonych konturach, niezależnie od kierunku ich przebiegu. Kombinacja filtracji obrazu poprzez stosowanie dwóch prostopadłych masek Sobela i kombinacji Euklidesowej lub modułowej określana jest w literaturze mianem gradientu Sobela. Na analogicznej zasadzie, zmieniając tylko maski, otrzymuje się gradient Prewitta czy Kirscha.

Innym typem filtrów nieliniowych są operacje logiczne wykonywane na wartościach pikseli. Operacje logiczne najczęściej przeprowadzane są na obrazach binarnych. Najczęściej danymi wejściowymi są dwa obrazy, a rezultatem jeden obraz. Na poszczególnych punktach obrazu wykonywane są operacje logiczne: NOT (zaprzeczenie), AND (iloczyn logiczny), OR (suma logiczna), SUB (różnica logiczna), XOR (suma rozłączna), NXOR (równoważność logiczna). Dla obrazów o większej ilości stanów poszczególnego elementu (kolorów) tradycyjna logika Boole'a jest niewystarczająca. Należy wtedy stosować logikę wielowartościową lub rozmytą.

3.5 Przekształcenia morfologiczne

Przekształcenia morfologiczne są jednymi z najważniejszych operacji w komputerowej analizie obrazu, gdyż pozwalają na najbardziej złożone operacje, związane z analizą kształtu elementów obrazu, ich wzajemnego położenia oraz umożliwiają złożone procesy symulacji. Podstawowe przekształcenia morfologiczne są punktem wyjściowym do tworzenia bardziej złożonych operacji, związanych z analizą kształtu obiektów oraz ich wzajemnego rozmieszczenia. Niestety największą ich wadą jest wielka złożoność obliczeniowa, na skutek której rozpoznały się one w analizatorach obrazu dopiero w drugiej połowie lat 80-tych.

Przekształcenia punktowe transformują każdy punkt obrazu w taki sam sposób, bez względu na to, jakich ma on sąsiadów. Filtry konwolucyjne, medianowe, logiczne i inne uzależniają wynik od sąsiedztwa danego punktu, ale przekształcenie jest wykonywane zawsze, nawet jeżeli wartość obrazu w danym punkcie nie ulegnie zmianie. Przekształcenia morfologiczne natomiast przekształcają tylko tę część punktów obrazu, których otoczenie jest zgodne z wybranym elementem strukturalnym, co pozwala na szczególnie subtelne planowanie przekształceń.

3.5.1 Erozja i dylatacja

Do podstawowych przekształceń morfologicznych należy erozja. Polega ona na usunięciu wszystkich tych punktów obrazu o wartości jeden, które posiadają chociaż jednego sąsiada o wartości zero (dla obrazu binarnego). Eroziję można także interpretować matematycznie jako tzw. filtr minimalny, to znaczy taki operator, w którym każdemu punktowi przypisuje się minimum z wartości jego sąsiadów. Dzięki temu pojęcie erozji można rozszerzyć na obrazy posiadające wiele poziomów szarości, a nawet na obrazy kolorowe.

Dylatacja jest przekształceniem morfologicznym odwrotnym do erozji. Analogicznie do przypadku erozji, dylatację można zdefiniować jako filtr maksymalny. Za pomocą dylatacji można zamykać małe otwory i wąskie zatoki w konturach obiektów na obrazie, czy też łączyć obiekty, które położone są blisko siebie. Dylatacja dokonuje generalizacji obrazu. Drobne wklęsłości w wyróżnionych obszarach zostają usunięte, brzegi wyróżnionych obszarów zostają wygładzone, a ich długość zostaje zdecydowanie zmniejszona.

Operacje erozji i dylatacji są dość kosztowne obliczeniowo, zwłaszcza dla dużej maski o kolistym kształcie i trójwymiarowym obrazie. W niniejszej pracy erozja i dylatacja są używane tylko dla obrazów binarnych, co pozwoliło na pewną optymalizację ich działania. Jak wspomniano wcześniej, erozja odpowiada filtrowi minimalnemu, zaś dylatacja - filtrowi maksymalnemu. Rozpatrzmy najpierw przypadek filtra maksymalnego. Załóżmy, że $\delta_{MAX}(F, M)$ jest wynikiem zastosowania filtra maksymalnego do obrazu binarnego F z maską M (też binarną). Łatwo można zauważyć, że spełnione są następujące zależności:

$$\begin{aligned} F : \mathbb{Z}^N &\rightarrow \{0, 1\} \\ M : \mathbb{Z}^N &\rightarrow \{0, 1\} \\ \delta_{MAX}(F, M) : \mathbb{Z}^N &\rightarrow \{0, 1\} \\ (\delta_{MAX}(F, M))(\bar{x}) = 1 &\Leftrightarrow \exists \bar{t} \in \mathbb{Z}^N F(\bar{x} + \bar{t} - \frac{r(M)}{2}) = 1 \wedge M(\bar{t}) = 1 \Leftrightarrow (F * M)(\bar{x} + \frac{r(M)}{2}) > 0 \\ (\delta_{MAX}(F, M))(\bar{x}) = 0 &\Leftrightarrow \forall \bar{t} \in \mathbb{Z}^N F(\bar{x} + \bar{t} - \frac{r(M)}{2}) = 0 \vee M(\bar{t}) = 0 \Leftrightarrow (F * M)(\bar{x} + \frac{r(M)}{2}) = 0 \end{aligned} \quad (3.22)$$

Dwa ostatnie wzory z 3.22 pokazują, że do sprawdzenia, czy dany woksel w obrazie $\delta_{MAX}(F, M)$ przyjmuje wartość 1 czy 0, można wykorzystać operację konwolucji (opisaną wcześniej w rozdziale 3.3.2). Pozwala to na skonstruowanie algorytmu obliczającego filtr maksymalny o złożoności obliczeniowej rzędu $a \log_2 a$, gdzie $a = \prod_{d=1}^N r_d(F) + r_d(M) - 1$. Aby zastosować tę metodę do binarnego filtra minimalnego, wystarczy zastosować prostą negację do "przetłumaczenia" tego problemu na binarny filtr maksymalny. Można to zapisać w następujący sposób ($\delta_{NEG}(F)$ oznacza negatyw obrazu F).

$$\delta_{MIN}(F, M) = \delta_{NEG}(\delta_{MAX}(\delta_{NEG}(F), M)) \quad (3.23)$$

Na rysunku 3.3 przedstawiono efekt wykonania erozji i dylatacji na obrazie 2D. Jako przykładowy obraz wykorzystano czarno-białe zdjęcie fragmentu pióra. Obraz miał rozmiar 1100x550 pikseli, obie operacje wykonano przy pomocy maski w kształcie koła o promieniu 6 pikseli.

3.5.2 Otwarcie i zamknięcie

Konsekwencją zastosowania zarówno erozji jak i dylatacji jest wyraźna zmiana pola powierzchni przekształcanych obszarów. Erozja zmniejsza je, a dylatacja

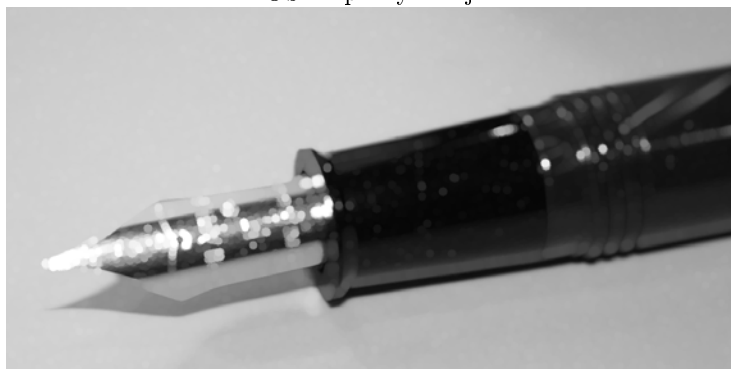
Obraz po erozji



Oryginalny obraz



Obraz po dylatacji



Rysunek 3.3: Przykład działania erozji i dylatacji na czarno-białym obrazie o 255 poziomach szarości.

zwiększa. Aby wyeliminować tę wadę stosuje się złożenie erozji z dylatacją, czyli tzw. otwarcie, oraz złożenie dylatacji z erozją, czyli zamknięcie. Otwarcie usuwa drobne obiekty i szczegóły, jak półwyspy i wypustki, nie zmieniając wielkości zasadniczej części figury, może też odseparować niektóre obiekty z przewężeniem. Zamknięcie wypełnia wąskie wcięcia i zatoki oraz drobne otwory wewnątrz obiektu, nie zmieniając wielkości jego zasadniczej części, może też połączyć leżące blisko siebie obiekty. Obydwie operacje nie zmieniają kształtu ani wymiarów dużych obiektów o wyrównanym, gładkim brzegu. Operacje otwarcia i domknięcia dają możliwość usuwania z obrazów pewnych szczególnie uciążliwych zakłóceń. Na rysunku 3.4 przedstawiono wynik wykonania operacji otwarcia i zamknięcia na przykładowym obrazie. Wykorzystano ten sam obraz i maskę co w poprzednim przykładzie przedstawionym na rysunku 3.3 (podrozdział).

Kolejne przekształcenia morfologiczne mogą być budowane jako coraz bardziej złożone transformacje obrazu. W oparciu o otwarcie i zamknięcie można realizować otwarcie właściwe, zamknięcie właściwe czy automedianę. Aby wyodrębnić z obrazu lokalne maksima należy od wyniku otwarcia danego obrazu odjąć obraz wyjściowy, a następnie dokonać binaryzacji z dolnym progiem otrzymanej różnicy. Analogicznie, aby wyodrębnić lokalne minima obrazu, należy dokonać podobnej operacji, z tym, że pierwszą operacją będzie zamknięcie. Efekt tych operacji zależy w dużym stopniu od wielkości otwarcia (zamknięcia) i progu binaryzacji.

3.5.3 Ścienianie

Ścienianie jest wspólną nazwą dla pewnego podzbioru przekształceń morfologicznych. W większości przypadków obrazem wejściowym dla ścieniania jest obraz binarny. Cechą charakterystyczną ścieniania jest to, że figura po ścienianiu zawiera się w figurze wyjściowej. Przykładem ścieniania jest szkieletyzacja, która jest operacją pozwalającą na wyodrębnienie osiowych punktów figur analizowanego obszaru. Szkielet figury jest zbiorem wszystkich punktów, które są równoległe do co najmniej dwóch punktów należących do brzegu. Szkielet figury jest znacznie mniejszy od niej samej, natomiast w pełni odzwierciedla jej podstawowe topologiczne własności. Szkieletyzacja może być realizowana jako ścienianie z odpowiednio dobranym elementem strukturalnym. Proces szkieletyzacji może wprowadzać do obrazu artefakty w postaci nadmiarowych gałęzi. W praktycznym zastosowaniu szkielet figury w dużym stopniu zależy od regularności brzegu figury. Każda, nawet niewielka, nieregularność powoduje powstanie dodatkowego, niepotrzebnego odgałęzienia wynikowego szkieletu. Takie zbyteczne odnogi mogą powstawać również w regularnych figurach, które nachylone są pod niewłaściwym kątem do siatki. Jeżeli będziemy stopniowo redukować odcinki posiadające wolne zakończenia, czyli stosować algorytm obcinania gałęzi, to w ostateczności pozostaną nam jedynie zamknięte pętle i odcinki przecinające brzeg obrazu. Zazwyczaj jednak obcinanie gałęzi przeprowadza się w ograniczonym stopniu, zależnym od ilości przeprowadzonych iteracji.

Za pomocą ścieniania można również wyznaczać centroidy, czyli szkielety figury z szczególnie mocno obciętymi gałęziami. Operacja wyznaczania centroidów sprowadza figurę do punktu, gdy ta figura nie posiada otworów lub do pętli, gdy takowe posiada.

Z kolei przekształceniem odwrotnym do ścieniania jest pogrubianie, którym można się posłużyć do konstrukcji specjalnego przekształcenia zwanego dylata-

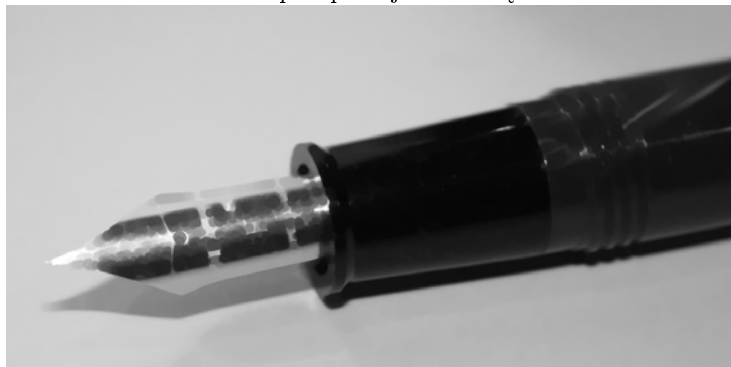
Obraz po operacji otwarcia



Oryginalny obraz



Obraz po operacji domknięcia



Rysunek 3.4: Przykład działania operacji otwarcia i domknięcia na czarno-białym obrazie o 255 poziomach szarości.

cją bez stykania obszarów. Umożliwia ono wydzielanie poszczególnych obiektów, które na obrazie wyjściowym stykały się lub nawet częściowo zachodziły na siebie. Przekształcenie to jest przydatne i pożyteczne, lecz niestety powstałe figury mają bardzo nieregularny brzeg z licznymi wąskimi i głębokimi wklęsłościami.

Aby w pewien sposób usystematyzować nieskończoną mnogość elementów strukturalnych wprowadzono tzw. alfabet Golay'a. Wiąże on litery alfabetu rzymskiego z pewnymi klasami elementów strukturalnych. Niektóre ze złożań przekształceń morfologicznych mają tak duże znaczenie w praktyce, że nadano im własne nazwy - takie jak rekonstrukcja, czyszczenie brzegu, zalewanie otworów czy funkcja odległości.

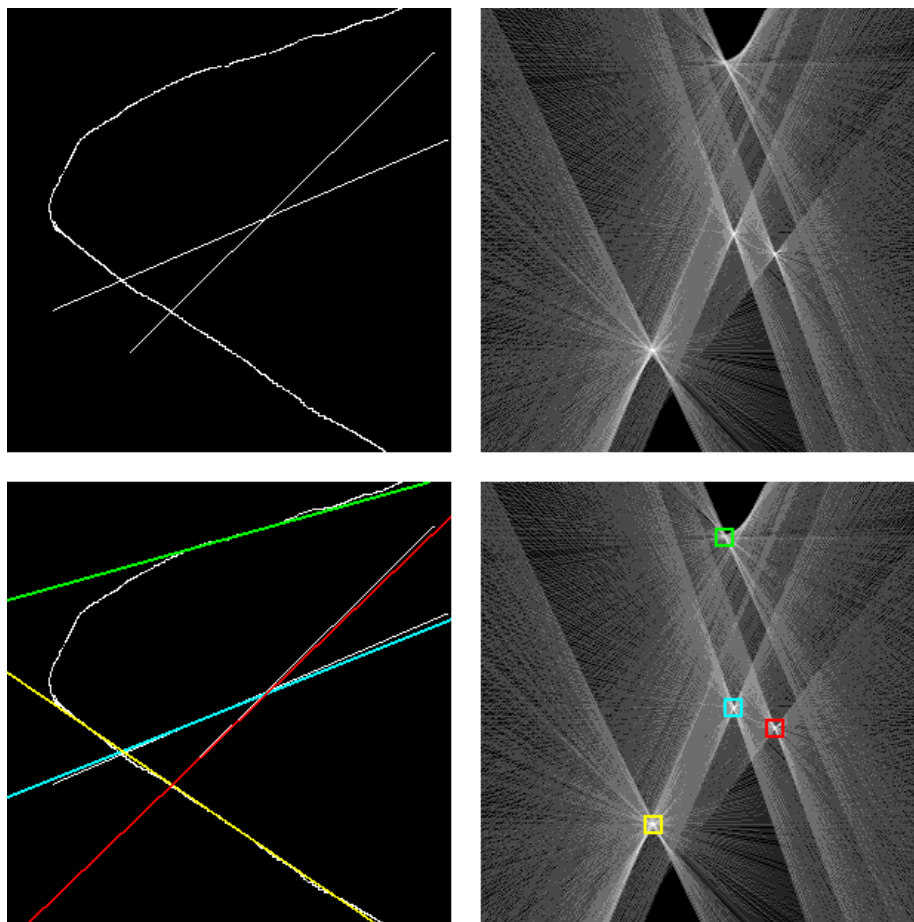
3.6 Transformata Hough'a

Transformata Hough'a nie da się przyporządkować do żadnej z pozostałych grup przekształceń. Służy ona do wykrywania na obrazie dowolnych figur, które da się opisać za pomocą kilku parametrów (np.: linie proste, okręgi, elipsy). W pierwotnej wersji algorytm ten służył do wykrywania linii prostych na dwuwymiarowym obrazie ([38]). Uogólniona postać tego algorytmu, pozwalająca na wykrywanie na obrazie również innych zadanych kształtów, została przedstawiona w [13]. Działanie transformaty Hough'a polega na przekształceniu obrazu wejściowego na kilku-wymiarowy obraz wyjściowy (ilość wymiarów zależy od ilości parametrów opisujących szukany kształt). Współrzędne wokseli w obrazie wyjściowym kodują wartości parametrów odpowiednich ewentualnych kształtów na obrazie wejściowym. Wartości wokseli są natomiast deskryptorem określającym, czy kształt o zadanych parametrach występuje na obrazie wejściowym, czy nie.

Na rysunku 3.6 przedstawiono wynik działania klasycznej transformaty Hough'a, służącej do wykrywania na obrazie linii prostych. Obrazy zamieszczone na tym rysunku zostały wygenerowane za pomocą apletu dostępnego na stronie <http://www.rob.cs.tu-bs.de/content/04-teaching/06-interactive/Hough.html> (autorzy: René Iser, Behrang Karimibabak, Simon Winkelbach). Po lewej stronie rysunku zamieszczono obraz dany na wejściu, po prawej obraz otrzymany po obliczeniu transformaty Hough'a. W dolnej części rysunku zamieszczono te same obrazy z naniesionymi czterema liniami prostymi, wykrytymi przez transformatę Hough'a. Na obrazie wyjściowym zaznaczono odpowiednimi kolorami cztery punkty odpowiadające wykrytym prostym. W tym prostym przykładzie przyjęto, że linie proste będą kodowane za pomocą równania:

$$Y = a \cdot X + b \quad (3.24)$$

Zmienne X i Y to współrzędne pikseli z obrazu wejściowego względem jego środka. Natomiast zmienne a i b określają położenie punktu na obrazie wyjściowym. Czyli pojedynczy punkt z obrazu wyjściowego odpowiada jednej prostej na obrazie wejściowym. Obliczenie transformaty Hough'a polega na przejściu przez wszystkie piksele obrazu wejściowego i dodanie ich wartości (oznaczającej poziom jasności) do odpowiednich pikseli na obrazie wyjściowym. Dla danego piksela (X, Y) dodajemy jego wartość (poziom jasności) do wszystkich pikseli na obrazie wyjściowym, które symbolizują proste, do których może należeć piksel (X, Y) . Można to sobie wyobrazić jako "głosowanie" - każdy z pikseli na obrazie wejściowym "głosuje" swoją wartością na wszystkie proste, do których



Rysunek 3.5: Przykład działania klasycznej transformaty Hough'a do wykrywania na obrazie linii prostych.

może należeć. Jeżeli na obrazie wejściowym rzeczywiście będzie fragment prostej, punkt na obrazie wyjściowym odpowiadający jej parametrom stanie się wyraźnym maksimum, ponieważ zbierze “głosy” od wielu jasnych pikseli. Sama procedura wyboru pikseli na obrazie wyjściowym nie jest trudna - dla każdego piksela (X, Y) z obrazu wejściowego dodajemy jego wartość do wszystkich pikseli (a, b) obrazu wyjściowego leżących na prostej:

$$b = -X \cdot a + Y \quad (3.25)$$

Przedstawiony tutaj przykład zastosowania transformaty Hough'a ma kilka istotnych niedoskonałości. Jak można łatwo zauważyć, nie wszystkie proste z obrazu wejściowego mają swoją reprezentację na obrazie wyjściowym - jest to spowodowane przez ograniczenie możliwych wartości współczynników a i b do pewnego, przyjętego z góry przedziału. Dlatego w praktyce do wykrywania linii prostych za pomocą transformaty Hough'a używa się współrzędnych biegunowych. Proste na obrazie wejściowym opisuje się równaniem:

$$\tau = X \cdot \cos \theta + Y \cdot \sin \theta \quad (3.26)$$

Zmienne τ i θ oznaczają odpowiednio długość i kierunek wektora łączącego środek układu współrzędnych z najbliższym punktem prostej. Jak łatwo zauważyć, wyznaczają one jednoznacznie położenie prostej na obrazie wyjściowym. Współrzędnymi pikseli na obrazie wyjściowym są odpowiednio przeskalowane wartości τ i θ .

Jak wspomniano wcześniej, transformatę Hough'a można również używać do wykrywania na obrazie innych kształtów, jak np.: okręgi. Kluczem do skutecznego zastosowania tego podejścia jest odpowiednie sparowanie parametrów kształtu. Ilość parametrów determinuje ilość wymiarów wyjściowego obrazu. Przy wyszukiwaniu na obrazie koła lub okręgu o zadanym promieniu potrzebne są dwa parametry określające położenie szukanej figury. Przy wyznaczaniu okręgów o dowolnym promieniu, obraz wyjściowy jest trójwymiarowy (promień staje się trzecim parametrem). Złożoność pamięciowa i obliczeniowa transformacji Hough'a drastycznie rośnie wraz z ilością parametrów opisujących położenie szukanego kształtu, co bardzo utrudnia jej zastosowanie do wyszukiwania bardziej skomplikowanych figur. Przykładem może być tutaj problem zlokalizowania na obrazie elips - w tym przypadku mamy aż pięć parametrów (współrzędne środka, długości obu promieni, kąt obrotu). Efektywne rozwiązanie tego problemu za pomocą transformaty Hough'a można znaleźć w pracy [144].

3.7 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 przemierzają 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). Zazwyczaj ma ona postać obrazu, jaki jest rejestrowany na wyjściu systemu optycznego, gdy na wejście zostanie podany pojedynczy punkt. 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). Operacja konwolucji obrazów została szczegółowo opisana w rozdziale 3.3.2.

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. Pomiaru PSF-a można dokonać poprzez podanie na wejście systemu optycznego obrazu z jednym lub kilkoma punktami i zapisanie wyjściowego obrazu, jaki dają te punkty. Obraz otrzymany dla takiego pojedynczego punktu odpowiada obrazowi PSF. Przy tego typu pomiarach należy również sprawdzić, jak bardzo obraz PSF-a zmienia się w zależności od położenia punktu na wejściu. Wszystkie metody bazujące na dekonwolucji zakładają, że PSF jest taki sam dla każdego punktu badanego obrazu. Pierwsze zastosowania dekonwolucji związane były z astronomią i tomografią. Obrazy były zniekształcone w sposób przewidywalny, dlatego też w tych przypadkach dekonwolucja dawała dobre wyniki.

Najprostszym i najbardziej oczywistym rozwiązaniem problemu dekonwolucji jest ułożenie odpowiedniego układu równań. Znając działanie operatora konwolucji, możemy wartość każdego punktu w obrazie wyjściowym G_{OUT} zapisać jako sumę iloczynów odpowiednich punktów z obrazu P i obrazu F . Ponieważ wartości pikseli z obrazów P i G_{OUT} są znane, dla każdego piksela z G_{OUT} otrzymujemy odpowiednie równanie liniowe, którego niewiadomymi są wartości odpowiednich pikseli z obrazu F . Po ułożeniu takich równań dla wszystkich pikseli z obrazu G_{OUT} otrzymujemy układ równań liniowych 3.27, którego rozwiązaniem są wartości wszystkich pikseli z obrazu F .

$$\begin{cases} G_{OUT}(x_1) = a_{1,1} \cdot F(x_1) + a_{1,2} \cdot F(x_2) + \dots + a_{1,n} \cdot F(x_n) \\ G_{OUT}(x_2) = a_{2,1} \cdot F(x_1) + a_{2,2} \cdot F(x_2) + \dots + a_{2,n} \cdot F(x_n) \\ \dots \\ G_{OUT}(x_n) = a_{n,1} \cdot F(x_1) + a_{n,2} \cdot F(x_2) + \dots + a_{n,n} \cdot F(x_n) \end{cases} \quad (3.27)$$

gdzie:

$$\begin{aligned} n &= \prod_{d=1}^N r_d(G_{OUT}) \\ x_1, x_2, \dots, x_n &\in \mathbb{Z}^N \\ a_{i,j} &\in \mathbb{R} \quad \text{dla } (1 \leq i \leq n) \wedge (1 \leq j \leq n) \end{aligned}$$

W powyższym układzie równań wektory $x_1, x_2, \dots, x_n$ są współrzędnymi kolejnych pikseli z obrazów F i G_{OUT} , a współczynniki $a_{i,j}$ odpowiadają wartościom odpowiednich pikseli z obrazu P (dobranych zgodnie z podanym wcześniej wzorem dyskretniej konwolucji 3.17). O ile takie rozwiązanie problemu dekonwolucji wydaje się być dość proste, w praktyce nie ma ono większego zastosowania. Musimy pamiętać, że wartości pikseli z obrazu G_{OUT} są wynikiem jakiegoś pomiaru, a więc są one obciążone pewnym błędem. Sam obraz PSF jest również z reguły wynikiem pomiarów albo obliczeń teoretycznych, więc na pewno odbiega nieco od rzeczywistości. Otrzymany układ równań będzie w większości przypadków sprzeczny lub nieoznaczony. Nawet jeżeli układ ten będzie posiadał jedno rozwiązanie, to otrzymany obraz F będzie najprawdopodobniej zupełnie inny od rzeczywistego obrazu wejściowego.

Innym, nieco bardziej wyrafinowanym podejściem do zagadnienia dekonwolucji jest użycie transformacji Fouriera. Jak już to było wspomniane wcześniej (podrozdział 3.3.2), mnożenie funkcji w przestrzeni Fourierowskiej (czyli w dziedzinie częstotliwości) odpowiada splotowi tych funkcji (czyli konwolucji) w przestrzeni rzeczywistej. Pozwala to na obliczenie konwolucji za pomocą szybkiej transformaty Fouriera (FFT) zgodnie ze wzorem 3.15. Ponieważ chcemy wykonać operację odwrotną do konwolucji, w przestrzeni Fouriera zamiast mnożenia obrazów $DFT(F)$ i $DFT(P)$ musi zostać wykonane dzielenie obrazów $DFT(G_{OUT})$ i $DFT(P)$. Otrzymany w wyniku dzielenia obraz po transformacji odwrotnej do DFT odpowiada obrazowi F . Przed wykonaniem transformacji DFT na obrazach G_{OUT} i P , zwiększamy rozmiar obrazu P (dokładając piksele o wartości zero), tak aby rozmiary obu obrazów przed transformatą DFT były takie same. Metody bazujące na tym podejściu dają czasami zadowalające wyniki, są one jednak dość wrażliwe na błędy w danych wejściowych.

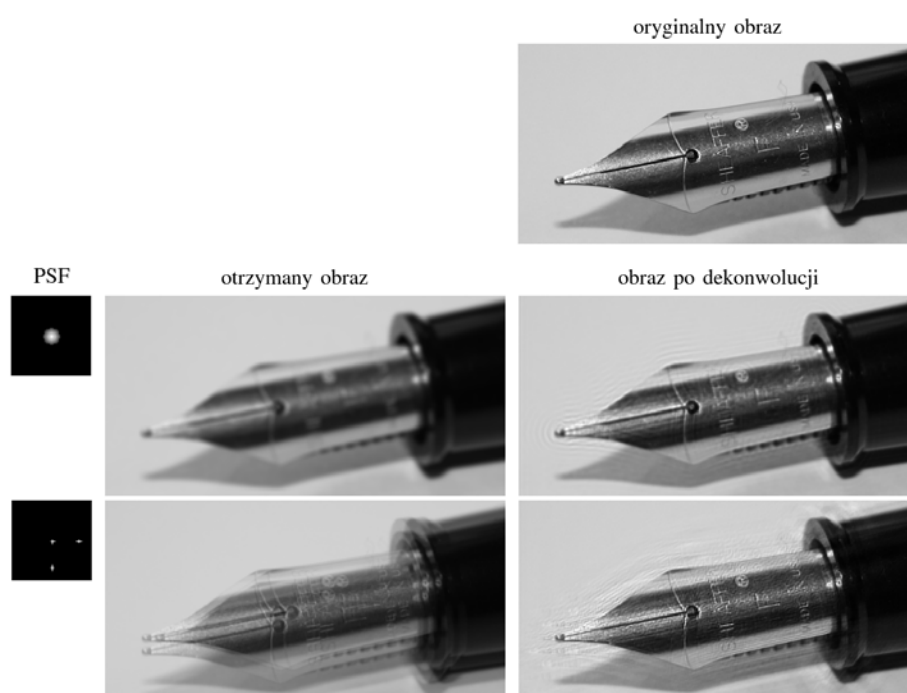
W ostatnich dwóch dekadach pojawiło się kilkanaście gotowych rozwiązań umożliwiających dekonwolucję obrazów 3D. Najbardziej przydatne do dekon-

Metoda	Model szumu	Referencje
Landweber	Gauss	[151]
Iterative Space Reconstruction Algorithm (ISRA)	Gauss	[33], [94]
Expectation-Maximization (EM), Richardson-Lucy (RL)	Poisson	[96], [83], [118], [78]
Maximum a Posteriori (MAP)	Gauss, Poisson	[136], [65]

Tablica 3.1: Zestawienie algorytmów do dekonwolucji bazujących na podejściu *Maximum Likelihood*

wolucji obrazów otrzymanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego okazały się algorytmy bazujące na podejściu statystycznym. Podejście to jest określane w literaturze fachowej mianem *Maximum Likelihood* (ML) ([15]). Wszystkie algorytmy należące do tej grupy opierają się na założeniu, że otrzymany obraz jest zakłócony przez szum zgodny z rozkładem Gauss’a lub Poisson’a i próbują wyznaczyć najbardziej prawdopodobny obraz źródłowy. W tabeli 3.1 zostały wymienione najbardziej znane algorytmy do dekonwolucji bazujące na podejściu ML.

W niniejszej pracy wszystkie przetwarzane obrazy zostały poddane trójwymiarowej dekonwolucji, co zostało dokładnie opisane w podrozdziale 5.4.3. Do tego celu wykorzystana została metoda Richardson-Lucy. Na rysunku 3.7 przedstawiono przykład konwolucji obrazu 2D z zadany obrazem PSF oraz wynik jego dekonwolucji otrzymany poprzez zastosowanie algorytmu Richardson-Lucy. Test został wykonany dla dwóch różnych postaci PSF. Należy tutaj zaznaczyć, że w przedstawionym przykładzie znany był dokładny obraz PSF, będącego przyczyną deformacji obrazu.



Rysunek 3.6: Fragment zdjęcia zakłóconego podanymi funkcjami PSF i wyniki jego dekonwolucji metodą Richardson-Lucy.

Rozdział 4

Pozyskanie stosów obrazów do analizy

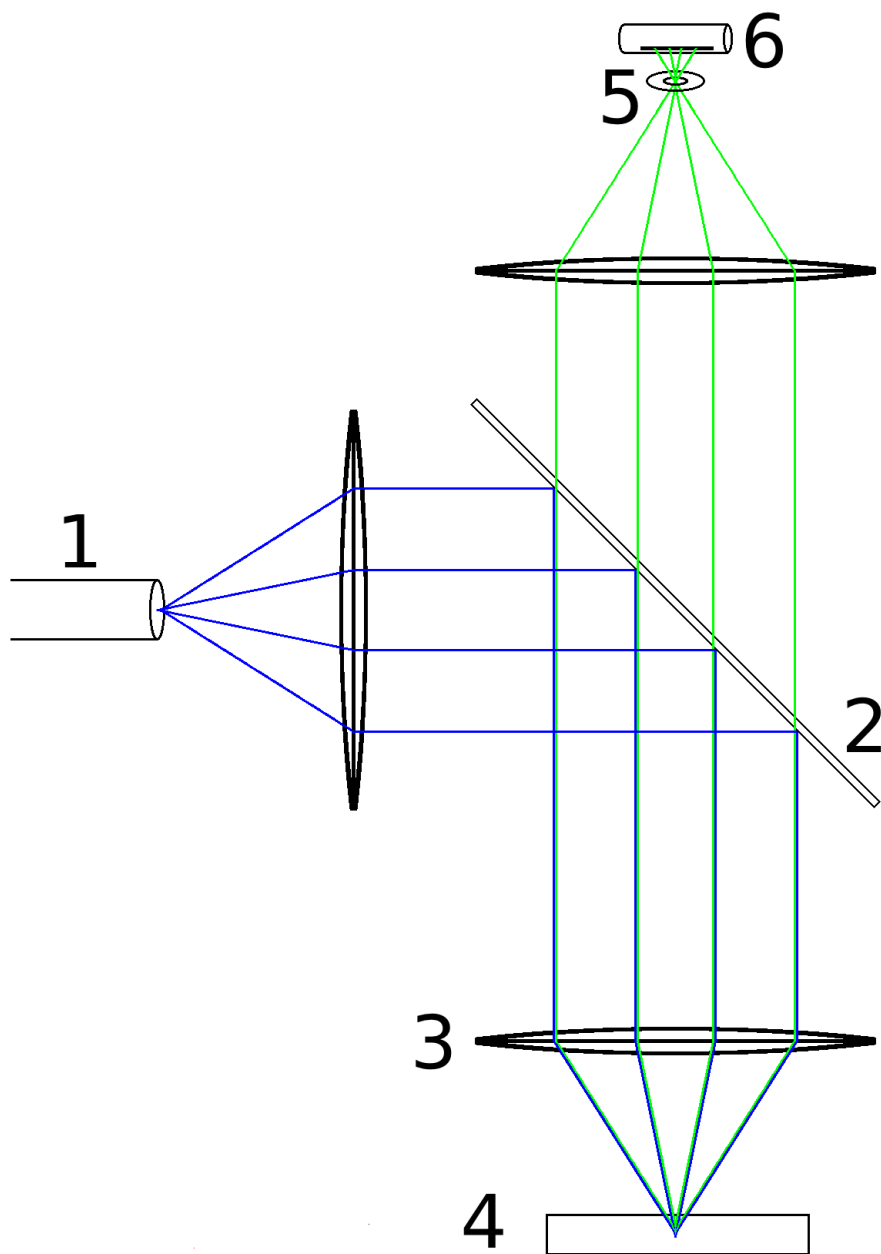
W ramach tego rozdziału opisano pokrótce proces pozyskiwania stosów obrazów 2D, na podstawie których dokonywana była rekonstrukcja struktury astrocytów. Zamieszczono w nim również opis działania mikroskopu konfokalnego oraz krótką charakterystykę wykorzystanych preparatów. Oprócz tego rozdział ten zawiera spis wszystkich stosów, jakie były przetwarzane w ramach tej pracy.

4.1 Budowa i działanie mikroskopu konfokalnego

Mikroskop konfokalny pozwala na rejestrowanie obrazów cienkich warstw preparatu, czyli przekrojów optycznych badanych obiektów. Z tego powodu jest on często stosowany do rejestracji serii przekrojów optycznych na różnych głębokościach preparatu. Otrzymana w wyniku pojedynczego skanowania seria takich dwuwymiarowych obrazów nazywana jest stosem. Podczas dalszego przetwarzania obrazy ze stosu mogą zostać nałożone na siebie w celu stworzenia obrazu trójwymiarowego. Trójwymiarowe obrazy komórek glejowych, których przetwarzanie jest tematem niniejszej pracy, są otrzymywane ze stosów dwuwymiarowych obrazów uzyskanych za pomocą laserowego skanującego mikroskopu konfokalnego LSCM (ang. Laser-Scanning Confocal Microscope).

Mikroskopia konfokalna opiera się na zjawisku fluorescencji, czyli powstawaniu światła widzialnego w wyniku naświetlenia obiektu promieniami ultrafioletowymi, niebieskimi lub zielonymi. Próbka może wykazywać zdolność do naturalnej fluorescencji (przykładowo chlorofil), bądź może być wyznakowana barwnikami fluorescencyjnymi. Barwniki fluorescencyjne używane są do znakowania interesujących nas molekuł (poprzez wiązanie się z nimi) w utrwalonych lub żywych komórkach. Kolor fluorescencji zależy od własności substancji fluoryzującej. Barwniki emitują głównie światło widzialne, choć niektóre mogą również emitować światło podczerwone. Właściwości fluorescencyjne wykazują również niektóre białka wyselekcjonowane w organellach komórkowych.

Na rysunku 4.1 przedstawiono uproszczony schemat działania laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego. Poniżej opisano pokrótce jego budowę i zasadę działania, numery punktów odpowiadają znacznikom na schemacie.



Rysunek 4.1: Schemat działania laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego

1. **Laser**

Jest źródłem wiązki światła wzbudzającego. Dobiera się go zależnie od typu fluorochromu, który ma być pobudzony do emisji.

2. **Zwierciadło dichroiczne**

Odbija światło o długości fali z pewnego wąskiego zakresu i swobodnie przepuszcza pozostałą część widma. Jest dobierane zależnie od użytego lasera, tak aby odbijać wiązkę światła wzbudzającego i przepuszczać wiązkę światła emitowanego przez wzbudzony w preparacie fluorochrom.

3. **Obiektyw**

Element optyczny dobierany przez operatora, wpływa na uzyskane powiększenie i rozdzielczość obrazu.

4. **Preparat**

Obraz preparatu budowany jest poprzez skanowanie, czy wykonanie serii pomiarów, punkt po punkcie, linia po linii. Każdy pomiar ustala wartość pojedynczego piksela obrazu wynikowego. Podczas skanowania położenie preparatu zmienia się o pewien zadany przez operatora krok, którego wielkość determinuje rozdzielczość otrzymanego obrazu (rozumianą jako wielkość pojedynczego piksela).

5. **Pinhole**

Przesłona z niewielkim otworem o średnicy rzędu kilkudziesięciu lub kilkuset μm . Przepuszcza tylko niewielką część emitowanego światła. Przepuszczane światło pochodzi bezpośrednio z aktualnie skanowanego punktu preparatu. Średnica pinhole'a może być ustawiana przez operatora.

6. **Detektor**

Jego zadaniem jest pomiar natężenia wiązki światła przepuszczonej przez pinhole. Wynik pomiaru jest zamieniany na wartość pojedynczego piksela. Odpowiada on aktualnie skanowanemu punktowi preparatu. Przed detektorem znajduje się fotopowielacz, za pomocą którego można odpowiednio wzmocnić siłę sygnału.

4.2 Metodyka wykonywania zdjęć w mikroskopie konfokalnym

Na podstawie standardów stosowanych od wielu lat w mikroskopii świetlnej opracowano procedury preparowania i obrazowania preparatów w mikroskopie konfokalnym. Główną zaletą uzasadniającą zastosowanie mikroskopii konfokalnej jest łatwość opracowania obrazu wraz z możliwością jednoczesnej analizy zbioru obrazów przeprowadzanej w formie cyfrowej. Im szybciej przebiega skanowanie tym czas naświetlenia preparatu jest krótszy. Podczas typowej prędkości skanowania pojedynczy punkt jest skanowany przez $1,6 \mu s$. Rzeczywiste naświetlenie pojedynczego punktu jest generalnie mniejsze niż w konwencjonalnej mikroskopii epi-fluorescencyjnej szerokiego pola. Z reguły w praktyce używa się możliwie najmniejszej mocy lasera w celu ochrony fluorochromu. W konsekwencji stosowania poszczególnych protokołów stosuje się czynniki ochraniające fluorochrom.

Główną zaletą stosowania mikroskopu konfokalnego jest poprawa możliwości obrazowania grubszych preparatów, co może być ograniczone poprzez charakterystyczne cechy preparatu. Aby preparat można było zobrazować konieczne jest spełnienie następujących wymagań: możliwość umiejscowienia preparatu w mikroskopie, badany obszar preparatu musi być tak zlokalizowany aby uzyskać odpowiednią odległość od soczewki obiektywu. Dla przykładu soczewka powiększająca 60x, której numeryczna apertura wynosi 1,4 należy uzyskać odległość $170\mu m$, podczas gdy 20x powiększenie (typowa apertura numeryczna 0,75) pozwala na pracę w odległości $660\mu m$.

Właściwości preparatu, które wpływają na transmisję światła, takie jak zmętnienie czy przymglenie, mogą w istotny sposób wpływać na głębokość penetracji wiązki lasera w preparacie a przez to na obrazowanie interesujących nas struktur. Na przykład nieutrwalony i niewybarwiony nabłonek rogówki oka jest przezroczysty i wiązka laserowa penetruje na głębokość $200\mu m$. Natomiast nieutrwalona skóra jest relatywnie nieprzezroczysta przez co rozprasza światło ograniczając penetrację lasera do około $10\mu m$. W ramach wielu protokołów przewiduje się zastosowanie czynników zwiększających przejrzystość tkanki.

Jeśli niemożliwe jest uzyskanie skutecznej penetracji wiązki lasera w obrębie całego preparatu, musi on być pocięty na cieńsze fragmenty. Do tego celu stosuje się wibrator. Jeżeli tkanka jest odpowiednio utrwalona do cięcia, zamiast wibratoru można zastosować mikrotom. Obrazy z głębszych warstw mogą być również uzyskane poprzez zastosowanie barwników wzbudzanych przez dłuższe fale (np. cyjanina 5). Jednak zastosowanie naświetlania dłuższymi falami nieznacznie zmniejsza możliwości uzyskania maksymalnej rozdzielczości. Wielofo-tonowa mikroskopia umożliwia uzyskanie obrazów z głębokich warstw preparatu poprzez pobudzenie światłem czerwonym.

Niezwykle istotny jest wybór soczewki obiektywu stosowanej w mikroskopie konfokalnym. Zdolność zbierania światła mierzona aperturą numeryczną determinuje zarówno rozdzielczość jak i grubość sekcji optycznych. Przy pozostałych zmiennych stałych wyższa apertura numeryczna obiektywu umożliwia uzyskanie cieńszych sekcji optycznych. I tak dla konkretnego urządzenia powiększenie 60x soczewką o aperturze numerycznej 1,4 i średnicy pinhole $1mm$ umożliwia uzyskanie grubości sekcji optycznej rzędu $0,4\mu m$, a w przypadku 16x powiększenia soczewką o aperturze numerycznej 0,5 przy średnicy Pinhole $1mm$, grubość sekcji optycznej wynosi $1,5mm$. Poprzez zwiększenie średnicy pinhole możemy uzyskać zwiększenie grubości sekcji optycznych. Soczewki obiektywu, które umożliwiają uzyskanie najlepszej rozdzielczości pozwalają na uzyskanie największych powiększeń oraz cechuje je najwyższa apertura numeryczna. Są one również najdroższe.

Jedną z istotnych i użytecznych cech mikroskopii konfokalnej jest zdolność do powiększania obrazu, przy zastosowaniu tej samej soczewki, bez utraty rozdzielczości. Uzyskuje się to poprzez zmniejszenie obszaru skanowanego przez laser preparatu za pomocą luster skanujących.

Liczne mikroskopy konfokalne mają możliwość zmiany średnicy pinhole'a w celu ograniczenia ilości światła spoza płaszczyzny ogniskowania docierającego do detektora. Zwiększenie średnicy pinhole'a powoduje pogrubienie sekcji optycznej i zmniejszenie rozdzielczości. Zmniejszenie średnicy pinhole'a powoduje redukcję grubości sekcji optycznej oraz jasności. Rozdzielczość rośnie wraz ze zmniejszaniem średnicy pinhole'a aż do uzyskania jej granicznej wartości, poniżej której rozdzielczość już nie rośnie, a jasność spada. Ta wartość graniczna

średnicy pinhole'a jest charakterystyczną miarą dla każdej soczewki obiektywu.

Zazwyczaj wstępne skanowanie odbywa się w trybie szybkim i charakteryzuje je niska rozdzielczość. Udań obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego zależy od właściwego doboru numerycznej apertury soczewki obiektywu, wielkości pinhole'a, jasności obrazowania, oraz zastosowania możliwie najniższej mocy lasera pozwalającej na uzyskanie najlepszego obrazu. Podczas skanowania preparatu stosuje się zwykle procedury uśredniające obraz w celu redukcji losowego szumu systemu detekcyjnego i uzyskania stałych (nielosowych) cech obrazu. Kolekcje obrazów zapisywane są na twardym dysku komputera mikroskopu konfokalnego. Podczas sesji mikroskopowej zachowuje się zazwyczaj możliwie wiele obrazów, które później poddaje się ocenie.

Typowe artefakty obrazowania obejmują różnorodne nasilenie szumu, rozsiianie punktów, osłabienie sygnału wraz z głębokością i niejednorodność w barwieniu powodującą brak ciągłości struktury.

4.3 Barwienie komórek glejowych

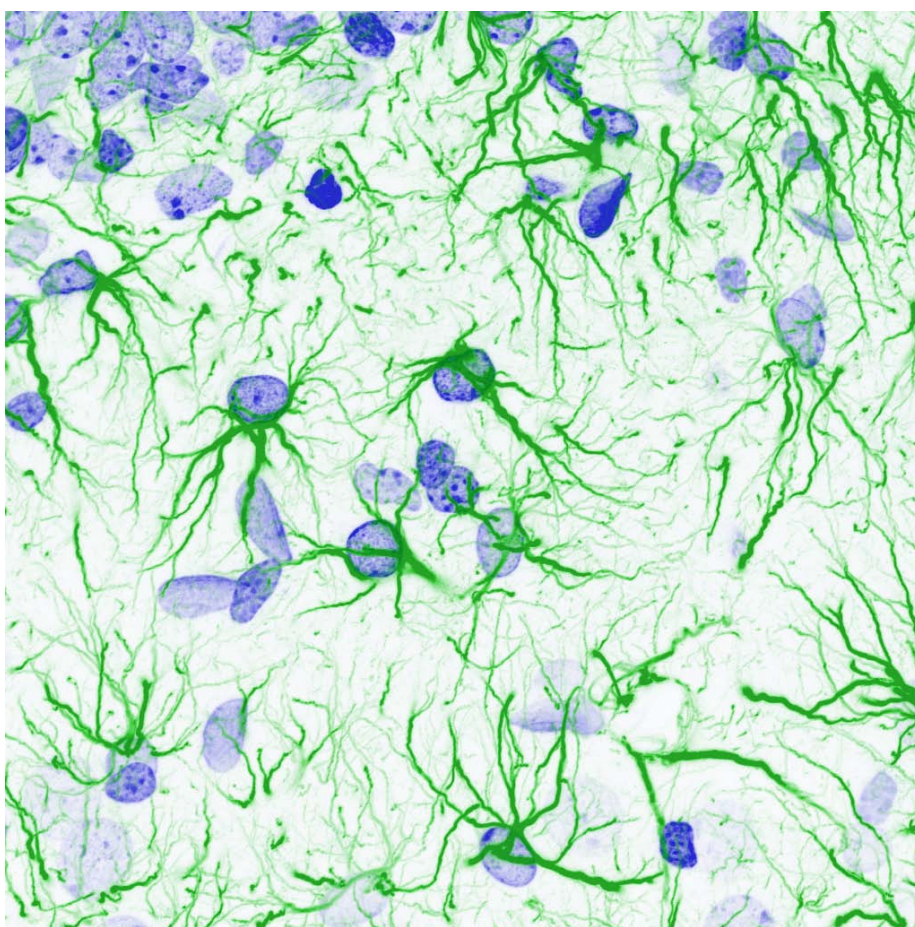
W niniejszej pracy ograniczono się do analizy jednego typu komórek glejowych - astrocytów. Astrocyty wypełniają niemal całą przestrzeń pomiędzy neuronami, pozostawiając niewielkie przestrzenie o rozmiarach nie większych niż $20nm$. Ich wypustki otaczają synapsy. Można je bardzo łatwo odróżnić od neuronów, ponieważ nie zawierają one ciałek Nissla. Ponadto możemy je zidentyfikować stosując barwienie immunocytochemiczne z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego kwaśne włóknienkowe białko glejowe GFAP (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein). Jest ono markerem astrocytów. GFAP wybarwia cytoszkielet astrocytów uwidaczniając ich lokalizację i kształt.

Nie wszystkie astrocyty wykazują możliwe do detekcji poziomy GFAP, jak również przeciwciała na GFAP nie znakują skrawków jednolicie ([69], [88]). Znaczna większość astrocytów hipokampa wykazuje jednak wystarczające dla ich immunohistologicznej identyfikacji ilości GFAP ([69], [88]). W związku z tym możliwa jest dokładna ocena i pomiary wszystkich tych komórek.

Bardziej uniwersalnym markerem astrocytów jest białko S100B. Wybarwia ono głównie kadłuby komórek należące do dojrzałych astrocytów. Bardzo przydatnym fluorochromem jest również DAPI. Jest to aromatyczna, heterocykliczna amina wiążąca się silnie do DNA. DAPI nie jest bezpośrednio związane z barwieniem komórek glejowych - służy ono wyłącznie do barwienia jąder komórkowych. Na rysunku 4.2 przedstawiono obraz preparatu barwionego w kierunku DAPI i GFAP. Wynik barwienia DAPI jest oznaczony kolorem niebieskim, a wynik barwienia GFAP kolorem zielonym.

4.4 Akwizycja stosów obrazów na potrzeby pracy

Stosy obrazów wykorzystane w pracy zostały uzyskane z próbek pobranych z mózgów szczura i myszy. Zwierzęta usypiano i perfundowano przez serce najpierw solą fizjologiczną (ok. 100 ml), następnie 4% paraformaldehydem w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4) i 0,9% NaCl (PBS). Po perfuzji mózgi zostały wyjęte i postfiksowane w tym samym utrwalaczu przez 4-6 godzin. Za pomocą wibratomu (Leica VT1000S) tkanę cięto na skrawki o grubości $50 - 150\mu m$.



Rysunek 4.2: Wynik barwienia preparatu w kierunku DAPI (kolor niebieski) i GFAP (kolor zielony).

Skrawki były barwione immunocytochemicznie, metodą free-float, na wytrząsarce, w temperaturze pokojowej. Przy barwieniu na S100B skrawki były dodatkowo inkubowane przez noc w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w PBS, a następnie przez 1,5 h w roztworze zawierającym surowicę kozią (Normal Goat Serum, 5%) i Tryton X100 (0,5%) w 0,1 M PBS. Następnie skrawki były inkubowane przez około 12 h w roztworze PBS z dodatkiem NGS i Tryton zawierającym pierwszorzędowe przeciwciała:

- króliczy anti-GFAP (Daco) w stężeniu 1:1000
- myszy anti-S100B (Sigma) w stężeniu 1:500

Następnie skrawki były płukane ($2 \times$ po 5 minut) i inkubowane w mieszaninie zawierającej następujące przeciwciała drugorzędowe:

- antykrólicza Alexa Fluor(R) 488 (Molecular Probes) w stężeniu 1:500
- antymysia Alexa Fluor(R) 568 (Molecular Probes) w stężeniu 1:250

Przeciwciała były rozpuszczone w 0,1 M PBS, z dodatkiem 0,5% Trytonu X100 (Sigma). Ten sam roztwór wykorzystany był do płukania skrawków przed, po i między barwieniami. Ostatnie płukanie wykonano w 0,00001% roztworze DAPI (Sigma). Na końcu skrawki zostały umieszczone na szkiełkach, zatopione Fluoromountem (Fluka) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

Przygotowane preparaty zostały zbadane przy użyciu skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego LSCM - model Zeiss LSM 510 Meta. Stosy obrazów 2D uzyskano poprzez skanowanie serii przekrojów co pewien stały krok. Do akwizycji obrazów wykorzystany został obiektyw olejowy Plan-Apochromat 63/1.4 DIC. Otrzymane stosy zdjęć składały się z kilkunastu lub kilkudziesięciu obrazów 2D. Niektóre fragmenty preparatów były dodatkowo skanowane pod kątem detekcji DAPI i S100B. Wynik skanowania jednego fragmentu preparatu składał się więc maksymalnie z trzech jednobarwnych obrazów, z których każdy był wynikiem jednego z przeprowadzonych barwień:

GFAP – barwienie cytoszkieletu astrocytów

DAPI – barwienie jąder komórkowych

S100B – barwienie kadłubów komórek

Niestety, z powodu bardzo nierównomiernego rozmieszczenia przeciwciała białka S100B (wybarwiona została tylko wierzchnia część preparatów), obrazy otrzymane za jego pomocą okazały się mało przydatne. Dlatego do procesu rekonstrukcji struktury komórek użyte zostały tylko obrazy DAPI i GFAP.

4.5 Stosy obrazów wykorzystane w pracy

Wykorzystane w niniejszej pracy stosy obrazów zostały zebrane w tabeli 4.1. Stosom nadano unikalne nazwy, które zostały wymienione w pierwszej kolumnie tej tabeli. Nazwy te będą używane w dalszej części pracy. Stosy o nazwie rozpoczynającej się literą A składają się z obrazów 12-bitowych, zaś stosy rozpoczynające się literą B z obrazów 8-bitowych. Cztery ostatnie znaki nazwy stosu oznaczają rodzaj barwienia - jest to DAPI lub GFAP. Stosy obrazów,

których dwie pierwsze litery w nazwach są takie same, zostały pobrane z tego samego skrawka preparatu i mają taki sam rozmiar oraz wielkość wokseli (np.: A3_dapi i A3_gfap).

Reasumując, na jeden zestaw danych wejściowych do opracowanego w ramach niniejszej pracy systemu do rekonstrukcji komórek glejowych, składają się dwa stosy (serie) jednobarwnych obrazów dwuwymiarowych. Stosy te mają identyczne rozmiary, wielkości wokseli i pokrywają ten sam fragment preparatu. Jeden z nich jest wynikiem skanowania preparatu w zakresie widma odpowiadającemu fluorochromowi DAPI, drugi w zakresie widma odpowiadającemu białku GFAP. Będą one dalej w skrócie nazywane stosami DAPI i GFAP. Każdy z tych stosów składa się z D_Z jednobarwnych obrazów 2D. Jak można zauważyć w tabeli 4.1, część stosów GFAP nie posiada odpowiadających im stosów DAPI. Dla tych przypadków pozycje jąder komórkowych zostały wyznaczone ręcznie, na podstawie obserwacji samych stosów GFAP.

Nazwa stosu	Rozmiar obrazów 2D	Ilość obrazów 2D	Rozmiar piksela w obrazach 2D w μm	Odległość pomiędzy obrazami 2D w μm	Opis
A1_gfap	1536x1536	90	0,067	0,100	szczur, hipokamp
A2_gfap	1024x1024	48	0,140	0,300	szczur, hipokamp
A3_gfap	1024x1024	67	0,140	0,280	szczur, hipokamp
A3_dapi	1024x1024	67	0,140	0,280	szczur, hipokamp
B1_gfap	2048x2048	18	0,070	1,300	szczur, zawój zębaty, hilus
B1_dapi	2048x2048	18	0,070	1,300	szczur, zawój zębaty, hilus
B2_gfap	2048x2048	100	0,070	0,294	szczur, zawój zębaty, hilus
B2_dapi	2048x2048	100	0,070	0,294	szczur, zawój zębaty, hilus
B3_gfap	2048x2048	46	0,070	1,300	szczur, stratum radiatum pola CA1 hipokampa
B3_dapi	2048x2048	46	0,070	1,300	szczur, stratum radiatum pola CA1 hipokampa
B4_gfap	1144x1144	44	0,105	0,441	mysz, kora czołowa, przysiódkowo
B5_gfap	1024x1024	49	0,089	0,391	mysz, pole CA1 hipokampa
B6_gfap	680x680	44	0,097	0,800	mysz, pole CA1 hipokampa

Tablica 4.1: Obrazy wykorzystane w pracy

Rozdział 5

Wstępne przetwarzanie stosów DAPI i GFAP

W niniejszym rozdziale zostało opisane wstępne przetwarzanie stosów obrazów 2D, będących wynikiem pojedynczego skanowania preparatu za pomocą mikroskopu konfokalnego. W ramach tego etapu oba stosy DAPI i GFAP były przetwarzane w ten sam sposób, ale niezależnie od siebie. Proces wstępnego przetwarzania polegał przede wszystkim na zamianie stosów dwuwymiarowych obrazów na obrazy trójwymiarowe, poprawie ich jakości za pomocą operacji dekonwolucji oraz na ich binaryzacji.

Ilość obrazów 2D w stosie oznaczano przez D_Z . Same obrazy ze stosu oznaczono jako I_j , gdzie j oznacza indeks obrazu ($j = 0, 1, \dots, D_Z - 1$). Wartość tego indeksu rośnie wraz z głębokością przekroju przedstawionego na obrazie. Definicja obrazu I_j (wzór 5.1) jest szczególnym przypadkiem bardziej ogólnego wzoru 3.1.

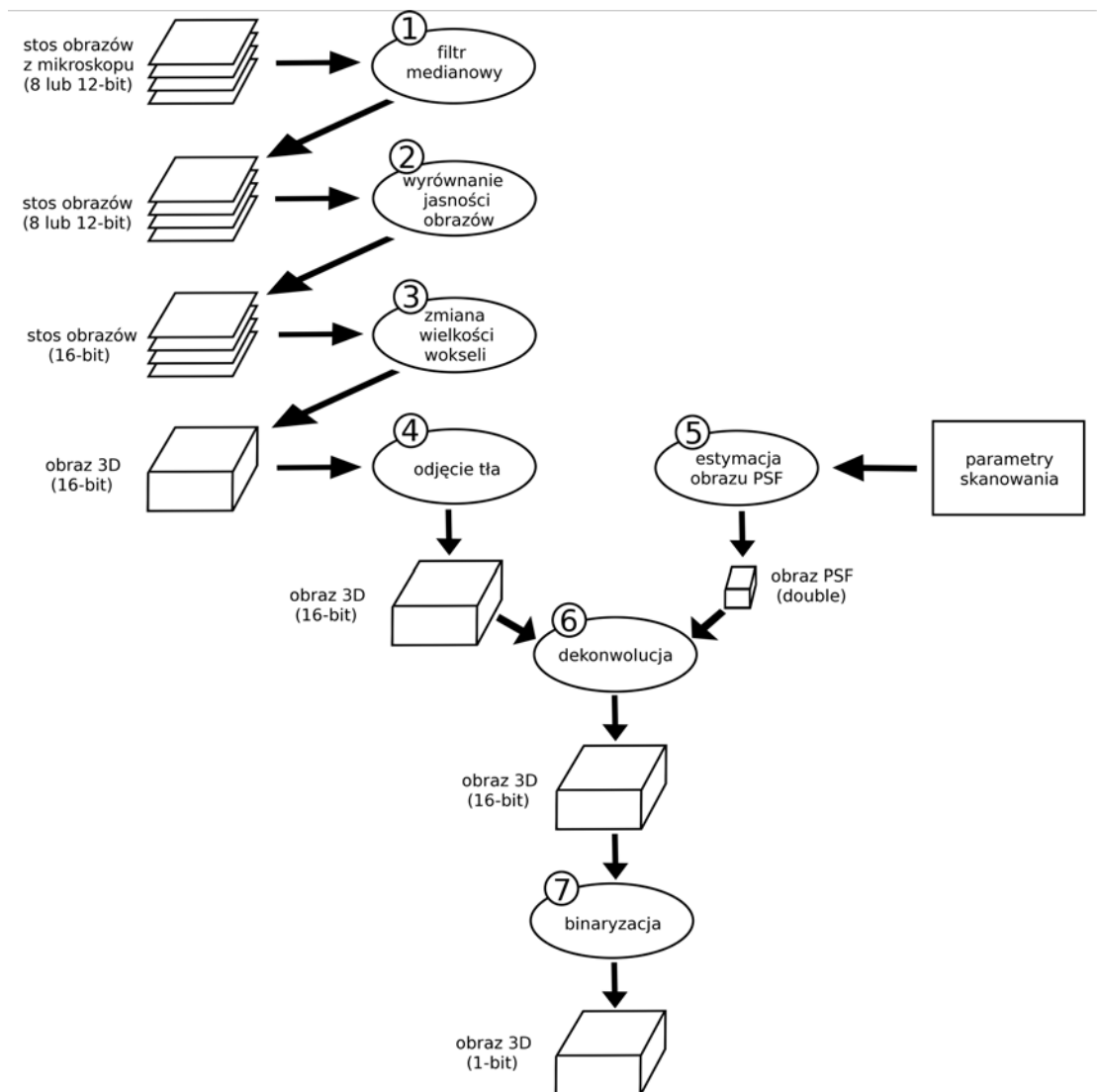
$$I_j: \mathbb{Z}^2 \rightarrow \mathbb{Z}$$
$$I_j([x_1, x_2]) = \begin{cases} \text{jasność woksela} & 0 \leq x_1 < r_1(I_j) \wedge 0 \leq x_2 < r_2(I_j) \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (5.1)$$

5.1 Schemat wstępnego przetwarzania obrazów

Wszystkie stosy obrazów użyte w tej pracy były wstępnie przetwarzane zgodnie z jedną, tą samą procedurą, której schemat został przedstawiony na rysunku 5.1. Dane wejściowe to:

- Stos dwuwymiarowych obrazów, będących wynikiem pojedynczego skanowania fragmentu preparatu (DAPI lub GFAP).
- Wartości parametrów z jakimi przebiegał proces skanowania.

Procedura wstępnego przetwarzania analizowanych stosów składa się z siedmiu głównych kroków, które zostały ponumerowane zgodnie ze schematem z rysunku 5.1. Kroki te są następujące:



Rysunek 5.1: Schemat wstępnego przetwarzania stosów obrazów

1. Filtr medianowy

Obrazy 2D należące do stosu są niezależnie do siebie przetwarzane za pomocą filtru medianowego o masce 3×3 . Operacja ta ma na celu usunięcie punktowego szumu wprowadzonego przez fotopowielacz.

2. Wyrównanie jasności obrazów

Obrazy w obrębie stosu mają różną jasność, co jest związane ze specyfiką procesu skanowania preparatu za pomocą mikroskopu konfokalnego. Dlatego przed dalszą obróbką stosu trzeba zrównoważyć jasność jego obrazów. Problem nierównomiernej jasności obrazów w obrębie stosu oraz proponowany sposób jego rozwiązania został przedstawiony w podrozdziale 5.2.

3. Zmiana wielkości wokseli

Krok ten ma na celu zamianę stosu obrazów 2D na jeden obraz 3D. Ponieważ odległości pomiędzy obrazami w stosie z reguły nie odpowiadają wielkości pikseli na tych obrazach, wynikowy obraz 3D musi być zbudowany za pomocą odpowiedniego próbkowania tego stosu. Operacja ta została opisana w podrozdziale 5.3.

4. Odjęcie tła

Operacja nazwana jako "odjęcie tła" polega wyznaczeniu wartości pewnej stałej i odjęciu jej od każdego woksela przetwarzanego obrazu 3D (woksele, których wartości stały się ujemne w wyniku tej operacji, są ustawiane na zero). Celem tego kroku jest zminimalizowanie artefaktów powstających na obrazie podczas przeprowadzanej później dekonwolucji. Zagadnienie to zostało przedstawione w podrozdziale 5.4.1.

5. Estymacja obrazu PSF

Obraz PSF opisuje zniekształcenia, jakimi uległ obraz podczas akwizycji (zostało to już opisane w podrozdziale 3.7). Obraz ten jest konieczny do przeprowadzenia opisanej w następnym punkcie operacji dekonwolucji. Dla danych przetwarzanych w ramach niniejszej pracy obraz PSF został obliczony analitycznie na podstawie wartości parametrów użytego mikroskopu, skanowanego preparatu oraz samego sposobu skanowania. Opis problematyki związanej z pozyskiwaniem obrazu PSF został opisany w podrozdziale 5.4.2

6. Dekonwolucja

Wykonanie operacji dekonwolucji ma na celu usunięcie deformacji obrazu powstałych podczas jego akwizycji. Zagadnienie dekonwolucji obrazu zostało już przedstawione w podrozdziale 3.7. Sposób wykonania dekonwolucji na przetwarzanych w ramach tej pracy obrazach został opisany w podrozdziale 5.4.3.

7. Binaryzacja

Ostatnim krokiem wstępnego przetwarzania obrazu 3D jest jego binaryzacja, czyli segmentacja polegająca na rozdzieleniu obrazu na dwa typy obszarów, czyli otoczenie (wartość 0) i ciała komórek (wartość 1). Do tego celu użyty został opisany już wcześniej w podrozdziale 3.2.1 algorytm SIS.

5.2 Wyrównywanie jasności obrazów 2D w obrębie stosu

5.2.1 Problem zmieniającej się jasności w obrębie stosu

Jak już wspomniano wcześniej, wynik skanowania preparatu ma postać serii dwuwymiarowych obrazów. Kolejne obrazy odzwierciedlają coraz głębsze przekroje preparatu (w coraz większej odległości od powierzchni szkiełka nakrywkowego). Obrazy te są jakby optycznymi wycinkami z preparatu i oddalone są od siebie o stałą wielkość. Wartości pikseli na każdym takim obrazie pokazują, gdzie w preparacie obecny był fluorochrom. Na skalę tych wartości ma również wpływ dostrojenie ustawień mikroskopu przed wykonaniem skanowania. Od decyzji operatora zależy, jaki przedział wartości rejestrowanego sygnału jest rzutowany na zakres możliwych wartości pikseli, czyli na wartości od 0 do 4095 dla obrazów 12-bitowych i od 0 do 255 dla obrazów 8-bitowych. Odpowiedni zakres mocy rejestrowanego sygnału jest dobierany przed skanowaniem dla jednego z obrazów (z reguły ze środka stosu) i obowiązuje dla wszystkich obrazów w stosie. Wszystkie sygnały o mocy spoza wybranego zakresu są rejestrowane jako piksele o skrajnej wartości (tak zwane skalowanie z nasyceniem).

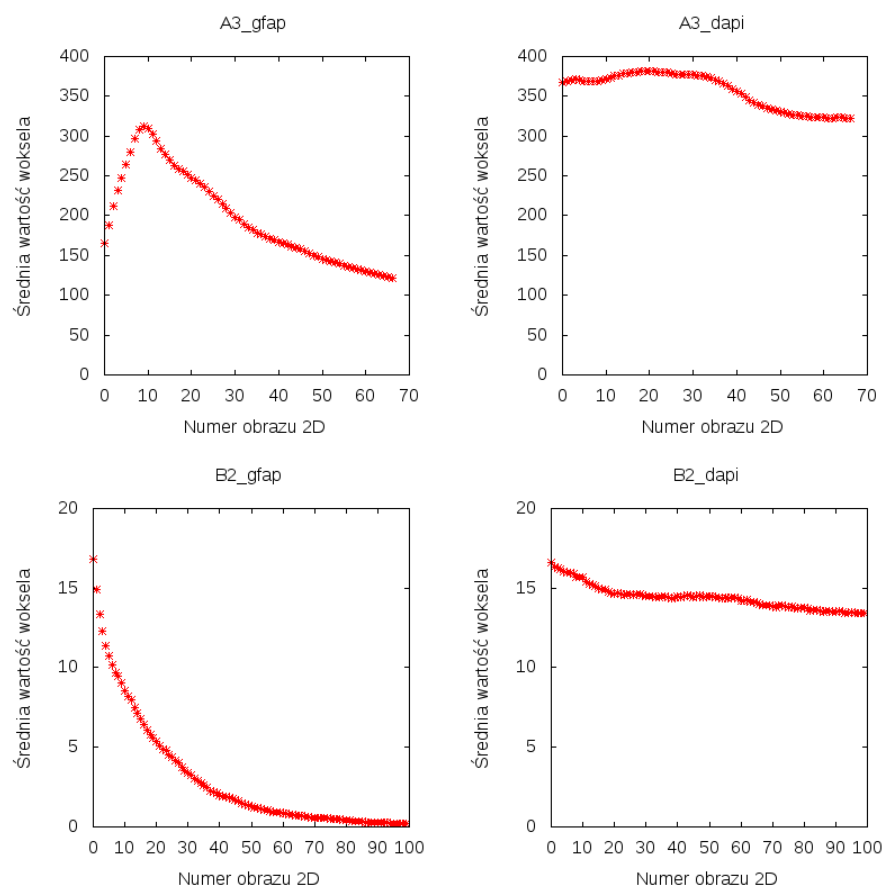
Niestety, otrzymane obrazy 2D w obrębie pojedynczego stosu mają różną jasność. Dla części obrazów GFAP początkowe przekroje są relatywnie ciemne, ale ich jasność wzrasta aż do osiągnięcia wartości najwyższej. Następnie jasność kolejnych obrazów jest coraz mniejsza, aż do zupełnie ciemnych i nieczytelnych obrazów na końcu stosu. Jasność obrazów w stosach DAPI jest bardziej stabilna, ale również zmienia się wraz z głębokością. Na rysunku 5.2 przedstawiono wykresy obrazujące zależność pomiędzy jasnością obrazu a głębokością skanowania dla dwóch par stosów GFAP i DAPI (jako przykład wybrano stosy A3 i B2). Za miarę jasności obrazu przyjęto średnią arytmetyczną jego pikseli.

Jak widać na przedstawionym przykładzie, problem nierównomiernej jasności dotyczy przede wszystkim stosów GFAP. Jasność obrazów w stosach DAPI zmienia się w niewielkim stopniu. Opisany dalej algorytm wyrównywania jasności został zastosowany do standaryzacji jasności wszystkich analizowanych stosów.

Nierównomierny rozkład jasności obrazów w stosie spowodowany jest następującymi czynnikami:

1. wraz ze wzrostem odległości od powierzchni skrawka (preparatu), zmniejsza się stężenie fluorochromu
2. energia lasera wzbudzającego fluorochrom zmniejsza się wraz z głębokością skanowania z powodu większego rozproszenia światła lasera
3. podczas procesu skanowania fluorochrom ulega wyświeceniu (tzw. *photo-bleaching*)
4. fluorochrom znajdujący się bliżej powierzchni preparatu ulega częściowemu wyświeceniu przed rozpoczęciem skanowania z powodu ekspozycji na światło

Trzy pierwsze czynniki powodują spadek jasności obrazu wraz ze wzrostem głębokości skanowania. Czwarty czynnik z kolei powoduje zmniejszenie jasności obrazów leżących blisko powierzchni preparatu.



Rysunek 5.2: Średnie arytmetyczne wartości pikseli dla kolejnych obrazów ze stosów A3 i B2.

5.2.2 Algorytm wyrównywania jasności obrazów 2D w obrębie stosu

W celu wyrównania jasności obrazów w obrębie stosu przetestowano dwa podejścia. W obu metodach przyjęto założenie, że rozkład wartości wokseli dla idealnych obrazów (tj. o tym samym stopniu jasności) jest bardzo podobny. Oznacza to, że w idealnym przypadku wszystkie obrazy 2D w obrębie jednego stosu powinny mieć podobny histogram. Większą część każdego z przekrojów stosu w płaszczyźnie XY stanowi tło mające ten sam rozkład niezależnie od głębokości przekroju, więc założenie to jest dość bliskie rzeczywistości. Poniżej opisano dwie proste metody, które zostały przetestowane w zakresie tej pracy. Ostatecznie do wyrównania jasności w obrębie stosów została wybrana metoda skalowania liniowego.

Metoda iloczynów

Celem tego podejścia jest wyrównanie średniej wartości wokseli obrazów 2D w obrębie stosu poprzez przemnożenie każdego obrazu przez pewną stałą a_j (j oznacza tu indeks obrazu). Stała ta jest wyznaczana dla każdego obrazu z osobna zgodnie ze wzorem 5.2.

$$a_j = \frac{S_w}{S_j}, \quad \text{gdzie } S_j = \frac{\sum_{x_1=0}^{r_1(I_j)-1} \sum_{x_2=0}^{r_2(I_j)-1} I_j([x_1, x_2])}{r_1(I_j) \cdot r_2(I_j)} \quad (5.2)$$

W powyższym wzorze S_w oznacza wzorcową (docelową) średnią wartość pikseli, a S_j aktualną średnią arytmetyczną wartości pikseli korygowanego obrazu I_j . Wzorcową wartość S_w była przyjmowana przez operatora lub ustawiana jako równa średniej arytmetycznej wartości pikseli najjaśniejszego obrazu 2D w obrębie stosu.

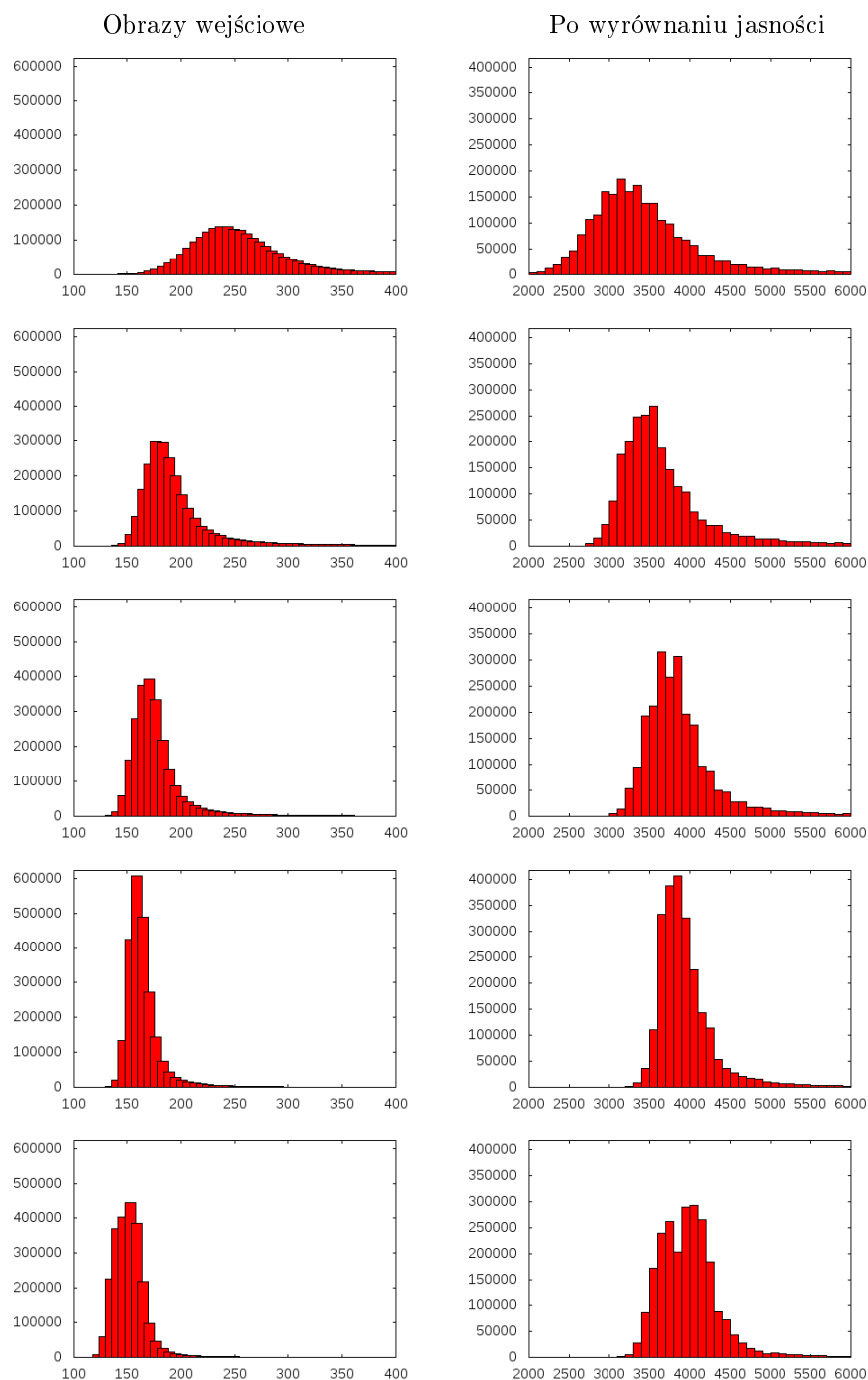
Metoda ta nie dała zadowalających rezultatów. Powodowała ona zbyt duże rozjaśnienie tła w obrazach 2D reprezentujących głębiej leżące obszary, co można zaobserwować na przykładzie histogramów przedstawionych na rysunku 5.3. Histogramy z lewej strony pochodzą z przekrojów stosu A1_gfap przed wyrównaniem jasności. Natomiast histogramy z prawej strony pochodzą z tych samych przekrojów stosu A1_gfap względem którego zastosowano opisaną metodę. Histogramy przedstawione na rysunku pochodzą od kolejnych obrazów 2D o indeksach $j = 2, 23, 44, 65, 87$ (patrzac od góry).

Metoda skalowania liniowego

W ramach tego podejścia skoncentrowano się na charakterystyce histogramów. Przedstawiona poniżej metoda bazuje na dwóch założeniach:

- Histogramy obrazów 2D leżących obok siebie powinny być bardzo podobne, gdyż przedstawiają one dwa, leżące blisko siebie, przekroje stosu.
- Wszystkie czynniki mające wpływ na końcową jasność obrazu mają charakter liniowy i działają na każdy z pikseli w ten sam sposób (niezależnie od wartości innych pikseli). Zależność pomiędzy wartościami pikseli na obrazie idealnym i obrazie otrzymanym w wyniku skanowania może więc zostać zapisana jako funkcja liniowa:

$$L_j(p) = a_j \cdot p + b_j \quad (5.3)$$



Rysunek 5.3: Porównanie histogramów kolejnych obrazów ze stosu A1_gfap przed i po wyrównaniu jasności metodą iloczynów.

Wartości współczynników a_j i b_j są inne dla każdego obrazu I_j . Zmienna p oznacza wartość punktu na otrzymanym obrazie I_j , któremu odpowiada punkt o wartości $L_j(p)$ na obrazie idealnym.

Na podstawie tych założeń możemy przyjąć, że różnice w histogramach dwóch sąsiadujących obrazów I_j oraz I_{j+1} są spowodowane przez fakt, że każdy z nich jest wynikiem przekształcenia rzeczywistego (idealnego) obrazu przez inną funkcję liniową L_j^{-1} , odwrotną do L_j (zakładamy, że idealne histogramy powinny być prawie identyczne). Opisywana metoda polega na wyznaczeniu dla każdego obrazu I_j przekształcenia L_j .

Ilość pikseli w obrazie I_j o wartości p będziemy oznaczać przez funkcję $h_j(p)$ zdefiniowaną następująco:

$$\begin{aligned} h_j: \mathbb{Z} &\rightarrow \mathbb{Z} \\ h_j(p) &= \sum_{x_1=0}^{r_1(I_j)-1} \sum_{x_2=0}^{r_2(I_j)-1} \begin{cases} 1 & \text{gdy } I_j([x_1, x_2]) = p \\ 0 & \text{gdy } I_j([x_1, x_2]) \neq p \end{cases} \end{aligned} \quad (5.4)$$

Jest to oczywiście ogólnie znana definicja histogramu. Wprowadźmy jeszcze definicję funkcji H_j , będącej odpowiednikiem histogramu skumulowanego:

$$\begin{aligned} H_j: \mathbb{R} &\rightarrow \mathbb{R} \\ H_j(p) &= \sum_{i=0}^{\lfloor p \rfloor} h_j(i) + (p - \lfloor p \rfloor) \cdot h_j(\lfloor p \rfloor + 1) \end{aligned} \quad (5.5)$$

Funkcja H_j jest oczywiście funkcją niemalejącą. Dzięki temu można zdefiniować funkcję odwrotną H_j^{-1} :

$$\begin{aligned} H_j^{-1}: \mathbb{R}_+ &\rightarrow \mathbb{R} \\ H_j^{-1}(v) &= \min_p (H_j(p) = v) \end{aligned} \quad (5.6)$$

Znając przekształcenie $L_w = a_w \cdot p + b_w$ dla obrazu I_w (jest ono przyjęte z góry lub obliczone wcześniej), chcemy dla sąsiadującego z nim obrazu I_j znaleźć analogiczne przekształcenie $L_j = a_j \cdot p + b_j$. Celem jest znalezienie takich wartości współczynników a_j i b_j , aby obraz I_j po przekształceniu za pomocą funkcji L_j miał histogram jak najbardziej podobny do histogramu wzorcowego obrazu I_w przekształconego za pomocą funkcji L_w . Problemem, jaki trzeba rozwiązać, jest sposób wyznaczenia wartości współczynników a_j i b_j . Zaproponowane 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:

$$\begin{aligned} \epsilon(a_j, b_j) &= \\ &\sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_j(p) > 0 \wedge H_j(p) \leq 0,7 \cdot |\chi(I_j)|} |L_j(p) - L_w(H_w^{-1}(H_j(p)))| + \\ &\sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_w(p) > 0 \wedge H_w(p) \leq 0,7 \cdot |\chi(I_w)|} |L_w(p) - L_j(H_j^{-1}(H_w(p)))| = \\ &\sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_j(p) > 0 \wedge H_j(p) \leq 0,7 \cdot |\chi(I_j)|} |a_j \cdot p + b_j - a_w \cdot H_w^{-1}(H_j(p)) - b_w| + \\ &\sum_{p \in \mathbb{Z}}^{h_w(p) > 0 \wedge H_w(p) \leq 0,7 \cdot |\chi(I_w)|} |a_w \cdot p + b_w - a_j \cdot H_j^{-1}(H_w(p)) - b_j| \end{aligned} \quad (5.7)$$

Szukanymi wartościami są tylko zmienne a_j i b_j . Wartości współczynników a_w i b_w dla wzorcowego obrazu I_w muszą być już znane. W powyższym wzorze

pod uwagę brane są tylko te wartości p , dla których wartość skumulowanego histogramu nie przekroczyła 70% ilości pikseli na obrazie. Dzięki temu pomijane są woksele o najwyższych wartościach, czyli te reprezentujące obiekty. Jeżeli dla analizowanego obrazu I_j więcej niż 70% ilości pikseli obrazu ma taką samą wartość ($\exists_p h_j(p) > |\chi(I_j)|$), to za wartości jego współczynników a_j i b_j przyjmowane są wartości odpowiednich współczynników a_w i b_w z obrazu wzorcowego.

Aby wyrównać jasność obrazów w stosie trzeba wybrać jeden z obrazów jako obraz wzorcowy, do którego będą dopasowywane pozostałe obrazy. Dla każdego przetwarzanego stosu jako obraz wzorcowy wybrany został obraz leżący w jego środku (w połowie stosu). Za wartości jego współczynników są przyjmowane $a_w = 1$ i $b_w = 0$. Dla obrazu leżącego bezpośrednio pod nim obliczane są współczynniki a_j i b_j . Po ich wyznaczeniu obraz ten staje się obrazem wzorcowym dla kolejnego obrazu poniżej, dla którego obliczane są nowe współczynniki a_j i b_j . Operacja ta jest powtarzana dla kolejnych obrazów, aż do osiągnięcia końca stosu. Analogiczna procedura stosowana jest dla obrazów leżących powyżej pierwotnego obrazu wzorcowego. Ogólny schemat działania algorytmu wyrównywania jasności jest następujący:

1. Obraz leżący w środku stosu jest przyjmowany jako pierwotny obraz wzorcowy I_w ($a_w = 1, b_w = 0$)
2. Obraz leżący pod obrazem I_w jest uznawany za obraz I_j
3. Następuje porównanie histogramów obrazów I_w i I_j oraz wyznaczenie współczynników a_j i b_j (jako minimum globalne funkcji ze wzoru 5.7)
4. Jeżeli obraz I_j nie jest ostatnim obrazem stosu, to uznajemy go za obraz I_w o współczynnikach $a_w = a_j$ oraz $b_w = b_j$ i wracamy do punktu 2
5. Obraz leżący w środku stosu jest przyjmowany jako pierwotny obraz wzorcowy I_w ($a_w = 1, b_w = 0$) - to samo co w punkcie 1
6. Obraz leżący nad obrazem I_w jest uznawany za obraz I_j
7. Następuje porównanie histogramów obrazów I_w i I_j oraz wyznaczenie współczynników a_j i b_j (jako minimum globalne funkcji ze wzoru 5.7)
8. Jeżeli obraz I_j nie jest pierwszym obrazem stosu ($j > 0$), to uznajemy go za obraz I_w o współczynnikach $a_w = a_j$ oraz $b_w = b_j$ i wracamy do punktu 6

W wyniku działania algorytmu dla każdego obrazu ze I_j stosu otrzymujemy współczynniki a_j i b_j , za pomocą których obraz ten powinien być przekształcony. Operacja wyznaczania nowych wartości pikseli jest wykonywana na liczbach zmiennoprzecinkowych. Otrzymany stos obrazów z rzeczywistymi pikselami jest przekształcany do stosu obrazów 16-bitowych, z pikselami o wartościach z przedziału 0 – 65535. Zmiennoprzecinkowe (rzeczywiste) wartości pikseli są liniowo rzutowane na docelowy przedział 0 – 65535, tak aby piksel o najmniejszej wartości w stosie został zapisany jako 0, a piksel o największej wartości jako 65535.

Opisany tutaj algorytm daje w praktyce dobre rezultaty zarówno dla stosów GFAP jak i DAPI. Na rysunku 5.4 zestawiono histogramy wybranych obrazów 2D ze stosu A1_gfap przed i po przeprowadzeniu wyrównania jasności opisaną

metodą (wyniki zaprezentowano analogicznie jak na rysunku 5.3). Jak można łatwo zauważyć, histogramy obrazów ze stosu po zastosowaniu metody skalowania liniowego są do siebie o wiele bardziej podobne, niż histogramy z tych samych przekrojów stosu podanego na wejściu lub przetworzonego metodą iloczynów.

5.3 Zmiana wielkości wokseli

Aby traktować stos obrazów 2D jako obraz trójwymiarowy, trzeba doprowadzić do sytuacji, w której odległość pomiędzy dwoma sąsiadującymi obrazami 2D będzie równa wielkości woksela. We wszystkich przetwarzanych w ramach niniejszej pracy obrazach (patrz tabela 4.1) wielkość woksela wzdłuż osi Z (czyli odległość pomiędzy dwoma obrazami stosu) jest większa od wielkości woksela w płaszczyźnie XY. Aby rozwiązać ten problem, wszystkie stosy zostały przeskalowane, tak aby uzyskać trójwymiarowe obrazy o sześciennych wokselaх. Ponadto dla niektórych stosów zmniejszono rozdzielczość obrazów w płaszczyźnie XY, aby uniknąć przetwarzania zbyt dużych obrazów 3D i przyspieszyć obliczenia. Redukcja ta została dokonana tylko w tych przypadkach, gdy wielkość woksela wzdłuż osi Z była dużo większa w stosunku do wielkości woksela w płaszczyźnie XY.

Operacja przeskalowania była wykonywana na każdym stosie z osobna i składała się z dwóch kroków:

1. Redukcja rozdzielczości w płaszczyźnie XY

Wielkość obrazu wzdłuż osi X oraz osi Y została podzielona przez pewien całkowity dzielnik. Nowe wartości pikseli zostały wyznaczone jako średnie arytmetyczne ze starych, zakrytych przez nie pikseli. Za dzielnik została przyjęta największa możliwa liczba całkowita, dla której wielkość nowego woksela w płaszczyźnie XY jest co najmniej dwa razy mniejsza od wielkości woksela wzdłuż osi Z i nie większa od $0,3\mu m$.

2. Zmniejszenie wielkości wokseli wzdłuż osi Z

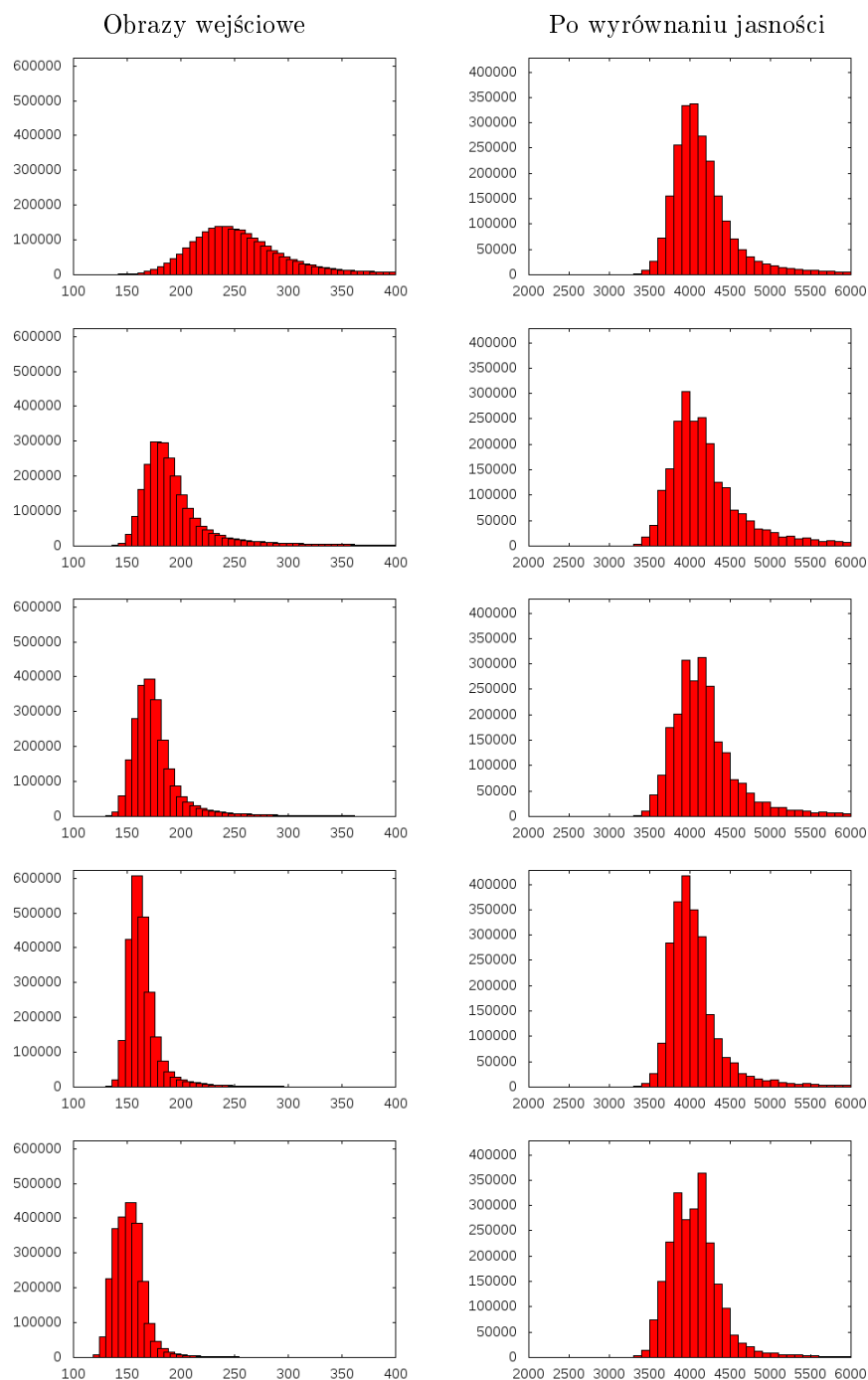
Nowe wartości wokseli zostały wyznaczone za pomocą liniowej interpolacji. Jeżeli nowy woksel całkowicie zawierał się w starym wokselu, to przyjmował jego wartość. Jeżeli zaś nakładał się na dwa stare woksele, to jego wartość była obliczana jako odpowiednia średnia ważona z wartości tych dwóch wokseli.

W tabeli 5.1 zestawiono parametry wszystkich przetwarzanych stosów przed i po przeskalowaniu.

5.4 Dekonwolucja

5.4.1 Odjęcie tła od obrazu

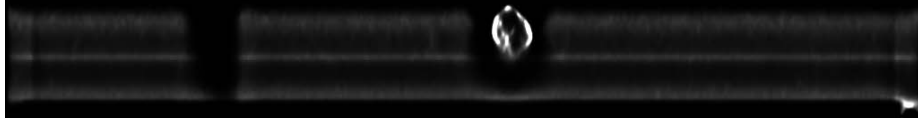
Jak możemy zaobserwować na przykładzie histogramów stosu A3_gfap przedstawionych na rysunku 5.4, niektóre obrazy mogą praktycznie nie posiadać wokseli o wartości równej zero. Na ich tło składają się woksele o dodatnich wartościach. Ponieważ przy obliczeniach związanych z dekonwolucją zakłada się, że woksele o współrzędnych spoza obszaru obrazu mają wartość równą zero, powoduje to powstawanie artefaktów przy brzegach przetwarzanego obrazu. Jest



Rysunek 5.4: Porównanie histogramów kolejnych obrazów ze stosu A1_gfap przed i po wyrównaniu jasności metodą skalowania liniowego.

Nazwa stosu	Oryginalny rozmiar stosu	Oryginalny rozmiar wokseła wzdłuż osi X i Y w μm	Oryginalny rozmiar wokseła wzdłuż osi Z w μm	Nowy rozmiar stosu	Nowa wielkość wokseła w μm
A1_gfap	1536x1536x90	0,067	0,100	1536x1536x129	0,067
A2_gfap	1024x1024x48	0,140	0,300	1024x1024x103	0,140
A3_gfap	1024x1024x67	0,140	0,280	1024x1024x134	0,140
A3_dapi	1024x1024x67	0,140	0,280	1024x1024x134	0,140
B1_gfap	2048x2048x18	0,070	1,300	512x512x83	0,279
B1_dapi	2048x2048x18	0,070	1,300	512x512x83	0,279
B2_gfap	2048x2048x100	0,070	0,294	1024x1024x210	0,140
B2_dapi	2048x2048x100	0,070	0,294	1024x1024x210	0,140
B3_gfap	2048x2048x46	0,070	1,300	512x512x214	0,279
B3_dapi	2048x2048x46	0,070	1,300	512x512x214	0,279
B4_gfap	1144x1144x44	0,105	0,441	572x572x92	0,209
B5_gfap	1024x1024x49	0,089	0,391	512x512x107	0,178
B6_gfap	680x680x44	0,097	0,800	226x226x120	0,291

Tablica 5.1: Parametry stosów po przeskalowaniu



Rysunek 5.5: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez wynik dekonwolucji obrazu DAPI stosu A3. W przedstawionym przykładzie przed dekonwolucją nie wykonano operacji odjęcia tła, co spowodowało powstanie wyraźnych artefaktów przy brzegach obrazu.

to spowodowane przez fakt, że tło obrazu będące wyraźnie większe od zera jest przez algorytm dekonwolucji “wykrywane” na granicy obrazu jako brzeg bryły. Na rysunku 5.5 przedstawiono przykład takiego zniekształcenia obrazu.

Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu jest dodanie przed dekonwolucją do każdego brzegu obrazu odpowiednio wielkiego marginesu symulującego tło i jego usunięcie po dekonwolucji. Zwiększa to jednak wielkość obrazu podczas dekonwolucji, wydłużając tym samym czas jej trwania oraz ilość wymaganej pamięci operacyjnej. Innym rozwiązaniem jest zmniejszenie poziomu tła, tak aby było ono stosunkowo niewielkie w porównaniu do jasności analizowanych obiektów. Można to osiągnąć poprzez odjęcie od każdego woksela obrazu odpowiedniej stałej t_b (spowoduje to przesunięcie histogramu obrazu w lewo). Podejście to zostało zastosowane w niniejszej pracy. Jediną trudnością, jaką tu trzeba rozwiązać, jest wyznaczenie w sposób automatyczny dla każdego obrazu wartości t_b . Do tego celu wykorzystano filtr maksymalny opisany już w podrozdziale 3.5.2. Zastosowany algorytm wyznaczania progu t_b dla obrazu F składa się z następujących kroków:

1. Obliczenie filtra maksymalnego dla obrazu F przy użyciu maski M_r (wzór 5.8) i zapisanie wyniku jako obraz F_{max}

$$M_R(x_1, x_2, x_3) = \begin{cases} 1 & \text{gdy } \sqrt{\left(\frac{r_1(M)}{2} - x_1\right)^2 + \left(\frac{r_2(M)}{2} - x_2\right)^2 + \left(\frac{r_3(M)}{2} - x_3\right)^2} \leq R \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (5.8)$$

2. Wybór z obrazu F_{max} woksela o najmniejszej wartości - jego wartość jest przyjmowana jako t_b

Obliczony w ten sposób próg t_b był odejmowany od każdego woksela obrazu. Jeżeli wartość przetwarzanego woksela była mniejsza od t_b , to ustawiano jego wartość na zero.

Jak można łatwo zauważyć, działanie powyższego algorytmu polega na znalezieniu na obrazie kuli o promieniu R zawierającej samo tło i wyborze z niej woksela o największej wartości. Metoda ta będzie działać dobrze tylko wtedy, gdy obraz będzie zawierał co najmniej jedną kulę o promieniu R wypełnioną w całości tłem. Przy przetwarzaniu obrazów w ramach niniejszej pracy przyjęto $R = 3$ (w woksela), co dla wszystkich testowanych obrazów dało zadowalające wyniki.

Metoda ta oczywiście nie usuwa całego tła z obrazu, tylko powoduje jego redukcję. Pozwala na względne powiększenie jasności obiektów na obrazie w stosunku do jasności tła, równocześnie nie wprowadzając nieliniowych zależności

między obrazem wejściowym a wyjściowym (poza wyzerowaniem wokseli o wartości mniejszej od t_b).

5.4.2 Estymacja obrazu PSF dla mikroskopu fluorescencyjnego

Pierwszym problemem, z jakim trzeba się zmierzyć przy dekonwolucji obrazów mikroskopowych, jest pozyskanie obrazu PSF. Przez ostatnie dwie dekady powstało wiele prac dotyczących tego zagadnienia. Wszystkie opisane do tej pory metody da się podzielić na trzy główne nurty:

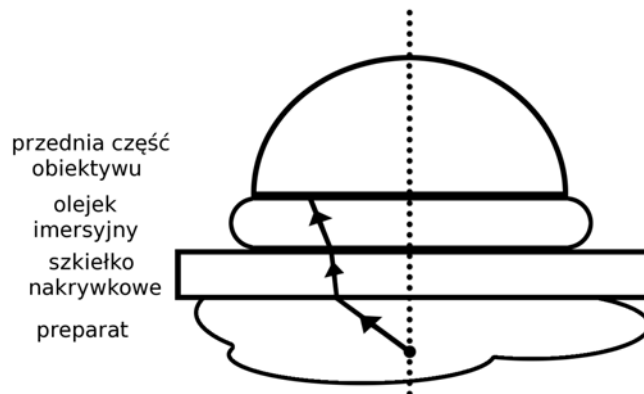
Estymacja PSF: analityczne obliczenie obrazu PSF na podstawie właściwości preparatu i parametrów skanowania. Metoda ta została użyta w niniejszej pracy i jest dokładniej opisana w dalszej części tego rozdziału.

Pomiar PSF: pozyskanie obrazu PSF poprzez skanowanie specjalnie przygotowanego preparatu zawierającego ziarna fluorescentu ([34], [145], [40]). Otrzymany obraz takiego punktowego źródła fluorescencji może być uważany za obraz PSF. Obrazy takich ziaren można też często znaleźć w zwykłych preparatach, w których samoistnie tworzą się niewielkie skupiska fluorochromu. Podejście to jest stosowane, gdy istnieje możliwość pobrania obrazu takiego punktowego obiektu. Niewątpliwą zaletą tej metody jest fakt, że w porównaniu z innymi metodami daje ona obraz PSF-a najbardziej podobny do rzeczywistej postaci PSF.

Dopasowanie PSF podczas dekonwolucji: podejście to jest określane w fachowej literaturze jako *blind deconvolution* ([84], [57], [92]). Polega ono na założeniu z góry ogólnego kształtu PSF-a i opisanu go przez pewną ilość parametrów. Wartości tych parametrów są dobierane podczas dekonwolucji tak, aby jak najlepiej pasowały do przetwarzanego obrazu. Wynikiem działania tej metody, oprócz obrazu po dekonwolucji, jest dopasowany obraz PSF. W praktyce podejście to daje jednoznaczne rozwiązanie, jednak znaleziony PSF często dość znacznie różni się od rzeczywistego, co rzutuje na jakość otrzymanych obrazów. Metoda ta jest bardzo wygodna i dość często stosowana, gdyż nie wymaga znajomości obrazu PSF.

Przy dekonwolucji obrazów przetwarzanych w ramach niniejszej pracy użyto obrazów PSF pozyskanych na podstawie teoretycznych obliczeń. Uproszczony, analityczny opis formowania się obrazu w mikroskopie fluorescencyjnym z olejnym obiektywem (tj. zaprojektowanym do pracy w olejku imersyjnym), pozwalający na numeryczne wyznaczenie przybliżonej postaci PSF, został przedstawiony w [50]. Model, jaki został przyjęty przez autorów został przedstawiony na rysunku 5.6. Zakłada on, że fale elektromagnetyczne tworzące obraz, na drodze pomiędzy obiektywem a ogniskiem, przechodzą przez dwie granice ośrodków o różnym współczynniku załamania światła. Pierwsza z nich to granica pomiędzy preparatem i szkiełkiem nakrywkowym, natomiast druga to granica pomiędzy szkiełkiem nakrywkowym a przestrzenią wypełnioną olejkim imersyjnym.

Bardziej dokładne matematyczne opisy procesu formowania się obrazu w mikroskopie konfokalnym można znaleźć w pracach [137] oraz [120], jednak żaden z nich nie uwzględnia efektu załamania światła na granicach ośrodków pomiędzy ogniskiem a obiektywem. Dopiero w pracach [132], [133], [134], [140], [41]



Rysunek 5.6: Załamanie wiązki światła na granicy preparat-szkiełko nakrywkowe oraz szkiełko nakrywkowe-olejek imersyjny

można znaleźć dokładne analityczne rozwiązania tego problemu, uwzględniające załamanie się fal elektromagnetycznych tworzących obraz na jednej granicy ośrodków pomiędzy ogniskiem a obiektywem. Nie istnieje dokładny analityczny opis modelu z dwoma granicami ośrodków o różnym współczynniku załamania światła, więc podczas obliczeń zakłada się, że współczynniki załamania światła dla szkiełka nakrywkowego oraz olejku imersyjnego są takie same (w rzeczywistości jest pomiędzy nimi nieznaczna różnica).

W pracy [86] porównano PSF wyznaczony na drodze analitycznych obliczeń z obrazem PSF, otrzymanym za pomocą skanowania preparatu z fluorescencyjnym ziarnem o wielkości $20nm$. Chociaż pomiędzy otrzymanymi w ten sposób wynikami były pewne różnice, kształt PSF wyznaczony analitycznie dość dobrze odpowiadał rezultatowi pomiarów dokonanych za pomocą ziarna.

Do estymacji obrazów PSF użytych przy dekonwolucji wykorzystano analityczny model przedstawiony w pracy [119]. W celu obliczenia obrazów PSF został zaimplementowany program w języku C++. W tabeli 5.2 zestawiono użyte wartości parametrów potrzebnych do obliczeń. Na rysunku 5.7 po lewej stronie przedstawiono przekrój w płaszczyźnie XZ obrazu PSF obliczonego dla stosu A1_gfap. Po prawej stronie zamieszczono ten sam obraz w skali logarytmicznej.

5.4.3 Implementacja algorytmu dekonwolucji Richardson-Lucy

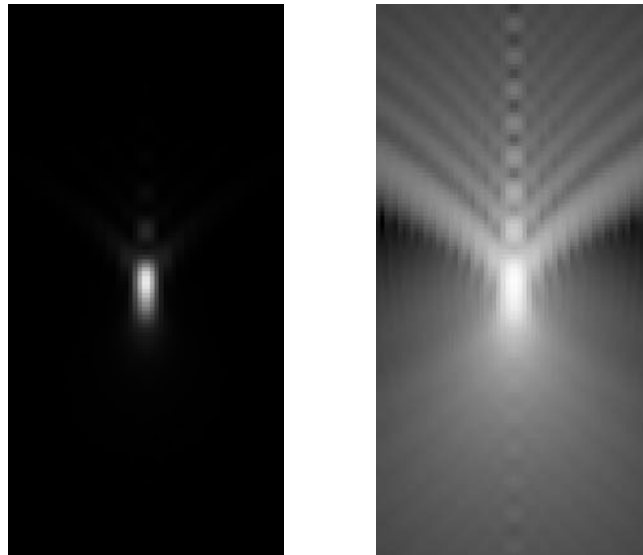
Wszystkie analizowane w tej pracy trójwymiarowe obrazy komórek były poddane procesowi dekonwolucji z wykorzystaniem algorytmu Richardson-Lucy ([96], [83]) rozszerzonego o regularyzację Conchello ([30]). Algorytm ten polega na poprawianiu jakości obrazu w kolejnych iteracjach zgodnie z następującym wzorem:

$$f^{(k+1)} = f^{(k)} A^T \left(\frac{g}{A f^{(k)}} \right) \quad (5.9)$$

We wzorze 5.9 funkcje f i g oznaczają odpowiedniki funkcji F i G_{OUT} w przestrzeni ciągłej (patrz rozdział 3.7), liczba k oznacza numer iteracji, natomiast

Parametr	Wartość	Geneza
Apertura numeryczna obiektywu	1,4	Parametr użytego obiektywu
Współczynnik załamania światła dla olejku imersyjnego i szkiełka nakrywkowego	1,518	Parametr użytego olejku imersyjnego
Współczynnik załamania światła dla preparatu	1,46	Wynik pomiaru współczynnika załamania światła dla medium, w którym umieszczony jest preparat
Długość fali światła emisji	DAPI: 449nm GFAP: 524nm	Parametry barwienia (są to średnie wartości z podanych zakresów)
Odległość ogniska od granicy ośrodków preparat-szkiełko nakrywkowe	8 μm	Przybliżone położenie środka skanowanych fragmentów preparatu

Tablica 5.2: Wartości parametrów użytych przy estymacji obrazów PSF



Rysunek 5.7: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez obraz PSF obliczony dla barwienia GFAP w wersji zwykłej (lewa strona) i w skali logarytmicznej (prawa strona)

A jest przekształceniem liniowym odpowiadającym konwolucji z zadaną funkcją PSF. Operacje dzielenia i mnożenia obrazów odpowiadają prostemu mnożeniu i dzieleniu wksel po wokselu (oczywiście obrazy F i G_{OUT} muszą mieć takie same rozmiary). Operator A w przypadku dyskretnym jest macierzą przekształcenia liniowego (elementy tej macierzy są równe wartościom odpowiednich wkseli z obrazu PSF). Wyrażenie A^T oznacza transpozycję tej macierzy. Można zauważyć, że przekształcenie liniowe $A^T f$ odpowiada konwolucji obrazu F z obrazem P' , gdzie P' oznacza wynik przekształcenia obrazu PSF P przez symetrię punktową względem wksela o współrzędnych $[0, 0]$. Spostrzeżenie to pozwala na opracowanie relatywnie szybkiej implementacji powyższych algorytmów za pomocą dyskretnej transformaty Fouriera (konwolucja z wykorzystaniem DFT została opisana w podrozdziale 3.3.2).

W tabeli 5.3 przedstawiono kolejne kroki wykonywane w pojedynczej iteracji programu przeprowadzającego dekonwolucję obrazu metodą Richardson-Lucy z regularyzacją Conchello. Jako początkowy obraz F przyjmuje się obraz G_{OUT} . Zarówno ilość iteracji jak i wartość współczynnika regularyzacji a określana jest przez operatora.

Program do dekonwolucji trójwymiarowych obrazów opisany w tabeli 5.3 został zaimplementowany w języku C++. Do obliczenia DFT użyto biblioteki FFTW ([46]) dostępnej na licencji GPL (<http://www.fftw.org/>). Ponieważ do obliczeń użyto zmiennych typu *double*, proces dekonwolucji większych obrazów wymagał dużej ilości pamięci operacyjnej. Pod względem potrzebnej mocy obliczeniowej i ilości pamięci operacyjnej dekonwolucja okazała się najbardziej wymagającym etapem w całym procesie przetwarzania obrazów komórek. Obliczenia związane z dekonwolucją analizowanych obrazów przeprowadzono na komputerze wyposażonym w dwa procesory AMD Opteron 270 oraz 17 GB pamięci RAM. W tabeli 5.4 zamieszczono średni czas trwania jednej iteracji algorytmu Richardson-Lucy dla wybranych obrazów. Podczas pomiarów użyto obrazu PSF o rozmiarze $61 \times 61 \times 131$. Do obliczania dyskretnej transformaty Fouriera zostały użyte dwa wątki.

Problem konieczności alokacji dużej ilości pamięci operacyjnej można rozwiązać poprzez rozdzielenie obliczeń pomiędzy kilka komputerów. Efektywność takiego rozwiązania zależy od wielkości obrazu PSF. Im większy obraz PSF, tym więcej danych w każdej iteracji musi być wymienianych pomiędzy komputerami. Równoległa wersja algorytmu Richardson-Lucy została opisana w pracy [93].

5.5 Wyniki wstępnego przetwarzania obrazów

Wynik działania procedury wstępnego przetwarzania stosów opisanej w podrozdziale 5.1 zaprezentowano poniżej na przykładzie stosów A3 i B3. Obrazami wejściowymi były surowe stosy otrzymane za pomocą mikroskopu konfokalnego, natomiast obrazami wyjściowymi obrazy binarne. Na rysunkach 5.8 i 5.9 przedstawiono przekroje przez obraz A3_gfap przed i po wykonaniu całej procedury. Analogiczne porównanie przekrojów dla obrazu B3_gfap zamieszczono na rysunkach 5.10 i 5.11. Na rysunkach 5.12, 5.13, 5.14 i 5.15 przedstawiono w podobnej formie wyniki otrzymane dla stosów A3_dapi oraz B3_dapi.

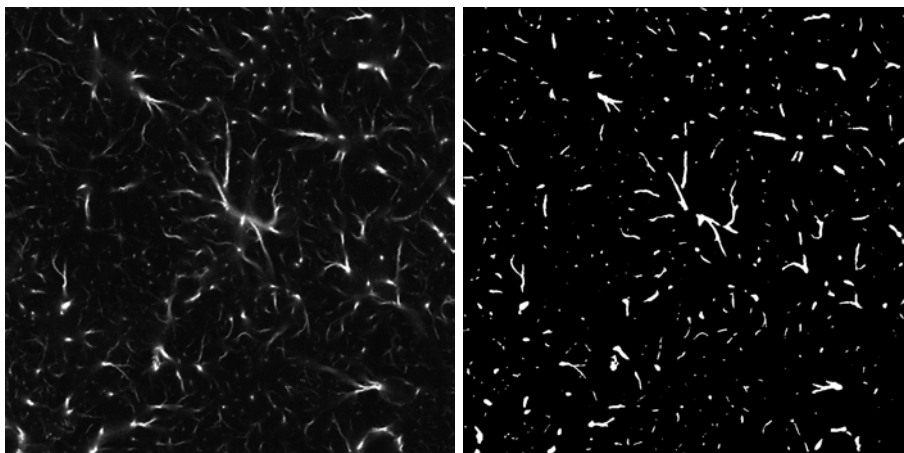
Porównując przekroje obu stosów w płaszczyźnie XZ (rysunki 5.9 i 5.11) można zauważyć większe "rozciągnięcie" w osi Z obrazu B3_gfap w porównaniu z obrazem A3_gfap. Deformację tę widać wyraźnie również dla stosu B3_dapi

Nr.	Operacja	Opis
1.	$B \leftarrow F$	Skopiowanie aktualnego obrazu F do bufora B
2.	$B \leftarrow B * P$	Konwolucja obrazu B z obrazem P (obrazem PSF)
3.	$B \leftarrow G_{OUT} \div B$	Podzielenie wartości każdego woksela z obrazu G_{OUT} przez odpowiedni wokslel z obrazu B i zapisanie wyniku do B (G_{OUT} nie ulega zmianie)
4.	$B \leftarrow B * P'$	Konwolucja obrazu B z obrazem P' , gdzie P' jest symetrią środkową obrazu P i spełnia warunek: $P'([x_1, \dots, x_N]) = P([r_1(P) - 1 - x_1, \dots, r_N(P) - 1 - x_N])$
5.	$F \leftarrow F \cdot B$	Przemnożenie każdego woksela z obrazu F przez wartość woksela o tych samych współrzędnych z obrazu B i zapisanie otrzymanego wyniku jako nowy obraz F
6.	$F \leftarrow \text{regularize}(F)$	Regularyzacja Conchello. Wartość każdego woksela z obrazu F jest zmieniana w następujący sposób: $v_{new} = \frac{-1 + \sqrt{1 + 2 \cdot a \cdot v_{old}}}{a}$ gdzie v_{new} oznacza nową wartość woksela, v_{old} jego starą wartość, a stała a jest współczynnikiem regularyzacji Conchello ustawianym przez operatora

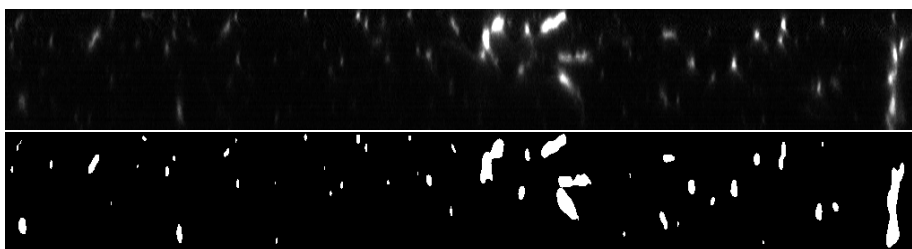
Tablica 5.3: Kroki wykonywane w pojedynczej iteracji algorytmu Richardson-Lucy z regularyzacją Conchello

Nazwa obrazu	Rozmiar obrazu	Średni czas jednej iteracji
B3_gfap	512x512x214	33,3 sekundy
A3_gfap	1024x1024x134	189,9 sekundy
B2_gfap	1024x1024x210	280,0 sekundy

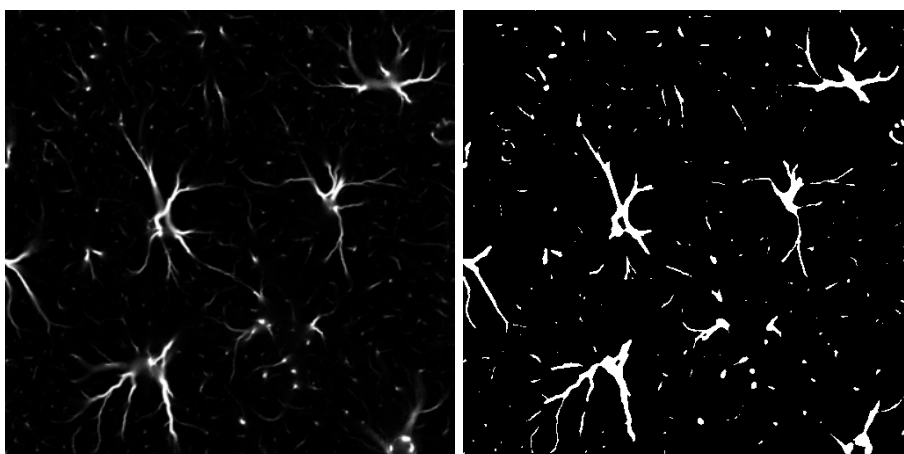
Tablica 5.4: Czas trwania dekonwolucji wybranych obrazów 3D z obrazem PSF o rozmiarze $61 \times 61 \times 131$.



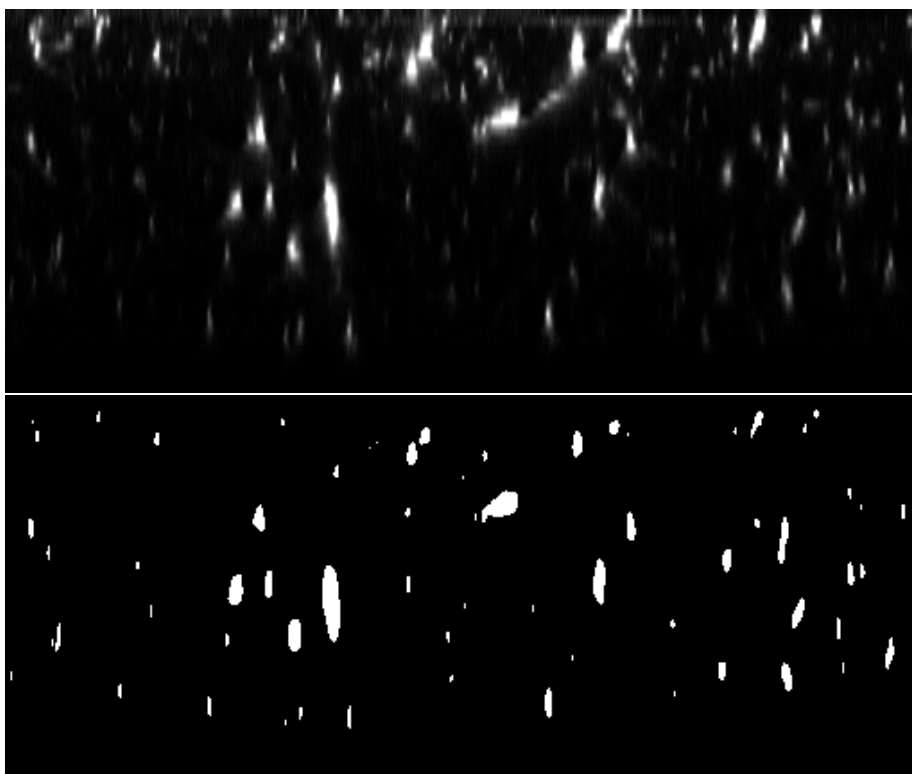
Rysunek 5.8: Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos A3_gfap przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania



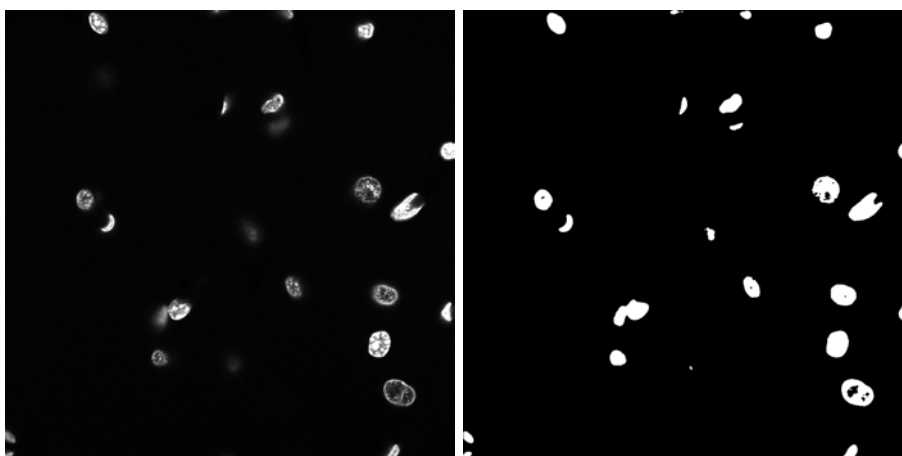
Rysunek 5.9: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos A3_gfap przed (górze) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania



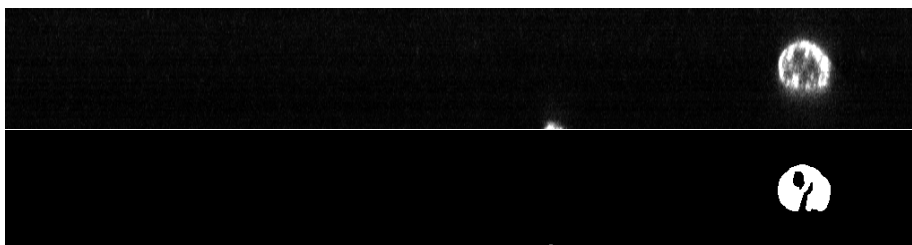
Rysunek 5.10: Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos B3_gfap przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania



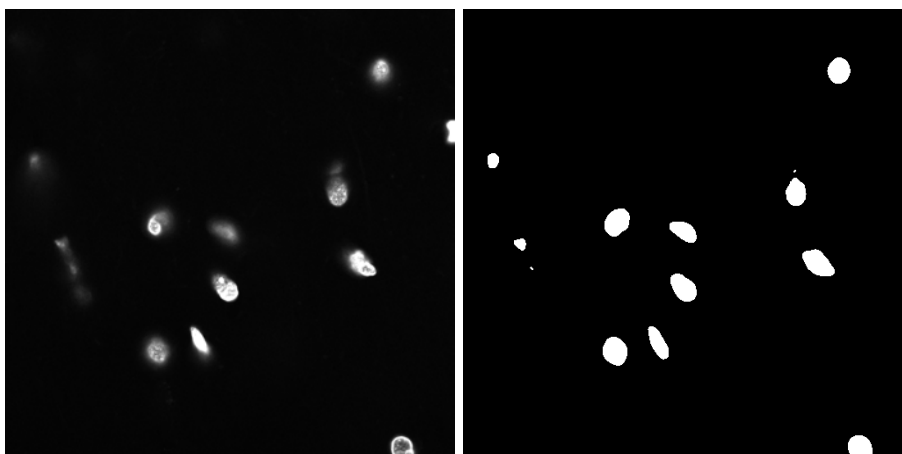
Rysunek 5.11: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos B3_gfap przed (góra) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania



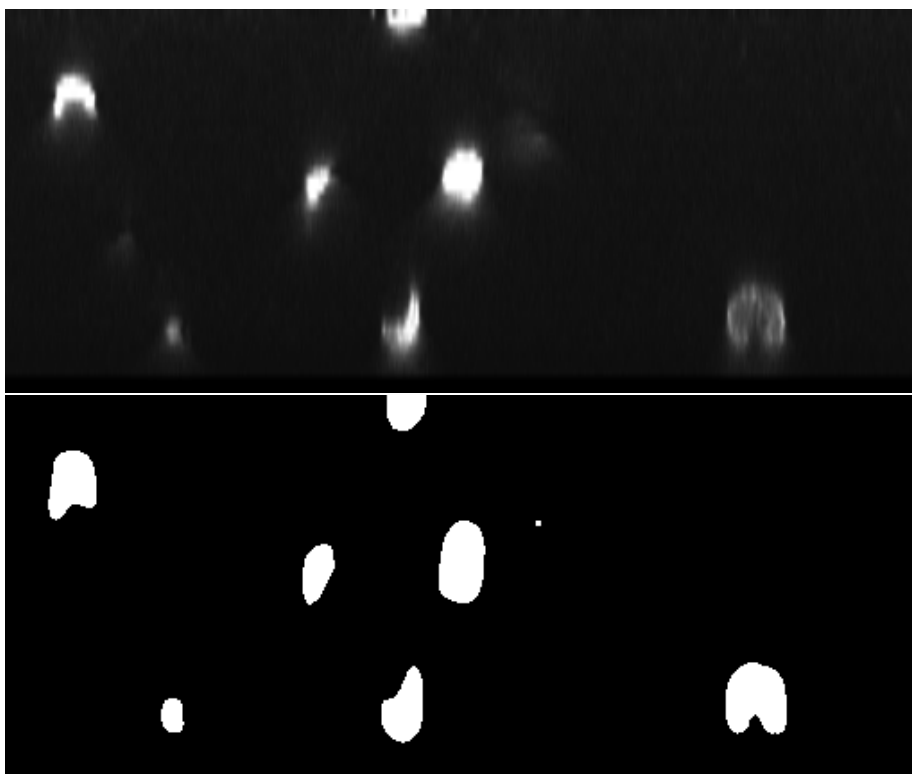
Rysunek 5.12: Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos A3_dapi przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania



Rysunek 5.13: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos A3_dapi przed (góra) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania



Rysunek 5.14: Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos B3_dapi przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania



Rysunek 5.15: Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos B3_dapi przed (góra) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania

na przekroju z rysunku 5.15. Jest to spowodowane zbyt rzadkim próbkowaniem preparatu w osi Z podczas akwizycji obrazu B3 (patrz tabela 4.1). Dla stosu A3 deformacja obrazu w osi Z jest mniejsza, jednak również występuje. W przypadku obrazu B3 zniekształcenie wzdłuż osi Z jest spowodowane zbyt małą rozdzielczością skanowania, natomiast w przypadku stosu A3 ograniczeniem jest maksymalna rozdzielczość układu optycznego mikroskopu (głównie obiektywu).

Rozdział 6

Wyodrębnienie komórek z obrazów 3D i rekonstrukcja ich struktury

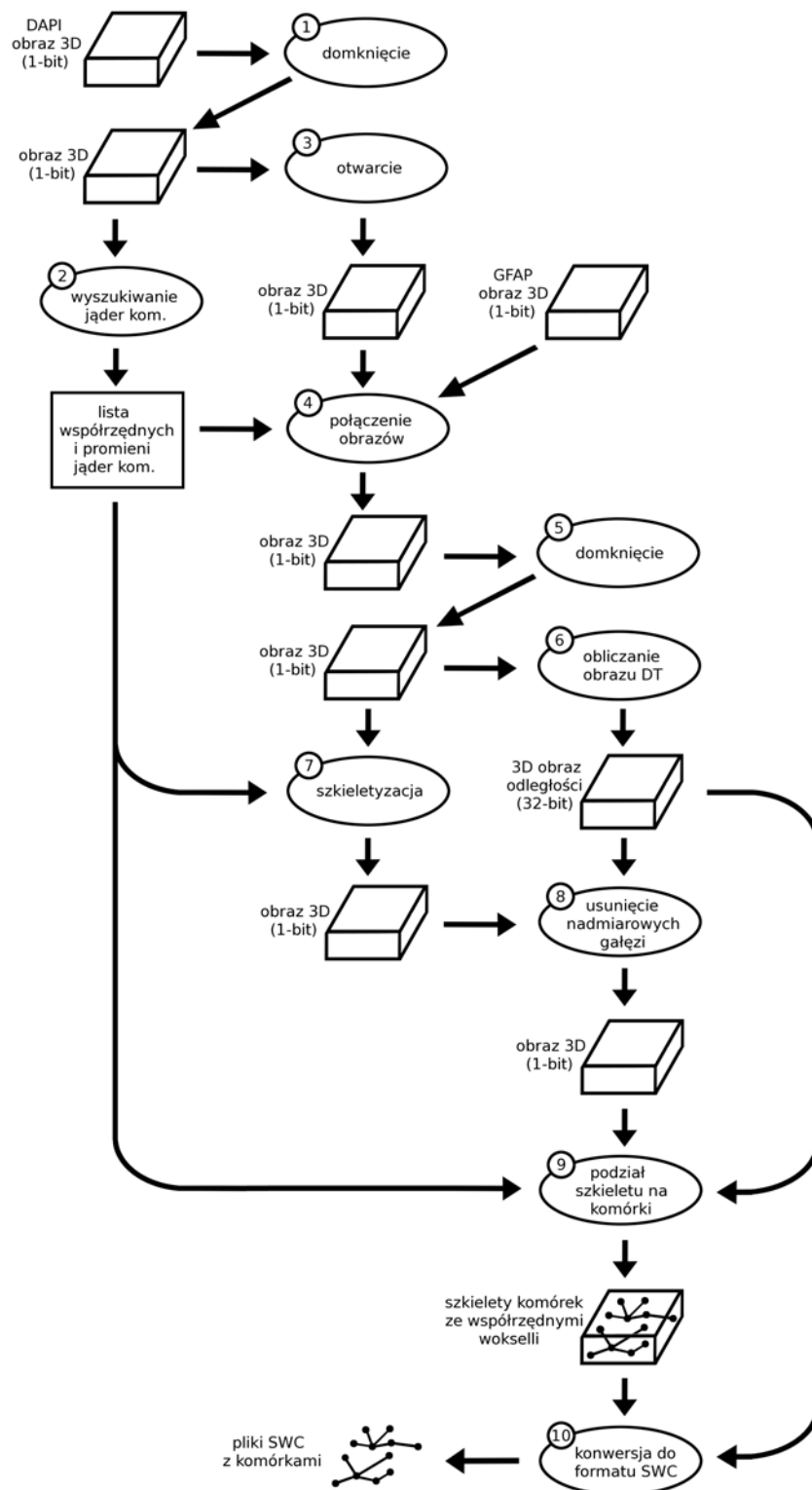
Opisane do tej pory przekształcenia miały na celu poprawę jakości analizowanych obrazów 3D oraz ich binaryzację. Następnym etapem jest wyodrębnienie z binarnych obrazów komórek glejowych i aproksymacja ich kształtu poprzez odpowiednią strukturę drzewiastą. W tym rozdziale zostały opisane najważniejsze operacje prowadzące od pary binarnych 3D obrazów (DAPI i GFAP) do zbioru trójwymiarowych, drzewiastych struktur reprezentujących astrocyty. Otrzymany wynik jest zapisywany w formacie SWC. Pliki zgodne z tym formatem są plikami tekstowymi, w których zapisany jest pojedynczy graf będący drzewem. Każdy z wierzchołków tego drzewa ma przypisaną pozycję w układzie XYZ oraz dwie dodatkowe liczby: jedna z nich oznacza wielkość wierzchołka, a druga jego typ. Dokładny opis tego formatu można znaleźć w internecie na stronach poświęconych rekonstrukcji komórek nerwowych (np.: <http://research.mssm.edu/cnic/swc.html>).

6.1 Schemat procedury rekonstrukcji komórek

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 6.1 przedstawiono schemat wykonywanych operacji. Poniżej znajduje się przeglądowy opis zaproponowanego systemu, numery punktów odpowiadają numerom operacji na rysunku.

1. Domknięcie

Operacja domknięcia mająca na celu wyeliminowanie niewielkich pustych przestrzeni wewnątrz obiektów. Pozwala to na usunięcie pewnych nieciągłości w obrazie, które pozostały po binaryzacji. Jest ona wykonywana na obrazie DAPI. Sama operacja domknięcia została opisana w podrozdziale



Rysunek 6.1: Schemat rekonstrukcji komórek

3.5.2. Jako elementu strukturalnego użyto kulistej maski o promieniu $0,5\mu m$.

2. Wyszukanie jąder komórkowych

Do wyznaczenia ilości oraz parametrów jąder komórkowych użyto obrazów DAPI. Jądra zostały zamodelowane jako kule i opisane poprzez cztery następujące parametry: współrzędne wzdłuż osi X , Y i Z oraz promień R . Ponieważ w praktyce DAPI wybarwia przede wszystkim zewnętrzną część jąder komórkowych, ich położenie jest ustalane poprzez wyszukiwanie w analizowanym obrazie sfer. Specjalnie zaprojektowany do tego celu algorytm został przedstawiony w podrozdziale 6.2. Dane A1, A2, B4, B5 i B6 nie posiadały obrazów DAPI. W ich przypadku parametry jąder komórkowych zostały ustalone ręcznie na podstawie obserwacji obrazów GFAP.

3. Otwarcie

Operacja otwarcia została opisana w podrozdziale 3.5.2. Jej celem jest usunięcie z obrazu niewielkich obiektów i wypustek. Jest ona wykonywana na obrazie DAPI. Jako elementu strukturalnego użyto kulistej maski o promieniu $0,5\mu m$.

4. Połączenie obrazów DAPI i GFAP w jeden obraz

W celu zapewnienia pustego obszaru wewnątrz wybarwionych jąder komórkowych, wyznaczone w punkcie 2 kule reprezentujące jądra zostały naniesione na obrazy DAPI. Tak przygotowane obrazy jąder komórkowych zostały skopiowane z obrazów DAPI do obrazów GFAP. Proces kopiowania pojedynczego jądra komórkowego polegał na przerysowaniu do obrazu GFAP kuli reprezentującej to jądro komórkowe wraz ze wszystkimi woskami bezpośrednio lub pośrednio z nią stykającymi. W przypadku braku obrazów DAPI (dla danych A1, A2, B4, B5 i B6) do obrazu GFAP zostały dodane same kule o parametrach podanych z zewnątrz. Wynikiem tego etapu jest obraz binarny zawierający zarówno jądra komórkowe jak i cytoszkielet.

5. Domknięcie

Operacja ta jest wykonywana na obrazie powstałym z połączenia w poprzednim kroku obrazów DAPI i GFAP. Krok ten jest analogiczny do tego opisanego w punkcie pierwszym. Jako elementu strukturalnego użyto kulistej maski o promieniu $0,5\mu m$.

6. Obliczenie obrazu DT

Dla otrzymanego obrazu obliczana jest transformata odległości (*ang. Distance Transform*). Polega ona na obliczeniu dla każdego woksela z obrazu jego Euklidesowej odległości do najbliższego woksela będącego tłem (czyli mającego wartość zero). Wynikiem jest obraz, którego wartości wokseli odpowiadają obliczonym odległościom. Będzie on dalej nazywany obrazem DT i oznaczany jako F_{DT} . W dalszej części pracy przyjęto, że obrazy F_{DT} zawierają odległości Euklidesowe, chociaż w rzeczywistości często przechowywane w nich kwadraty odległości, aby uniknąć konieczności używania liczb zmiennoprzecinkowych. Obrazy F_{DT} zostały wykorzystane przy redukcji szkieletu oraz w niektórych późniejszych operacjach. Więcej informacji o transformacie odległości można znaleźć w [42].

7. Szkieletyzacja

Binarny obraz 3D będący wynikiem kroku numer 5 został poddany procesowi szkieletyzacji. Wynikiem tej operacji jest binarny obraz zawierający sam szkielet, oznaczany dalej jako F_{SK} . Zagadnienie szkieletyzacji zostało poruszone w podrozdziale 3.5.3. Zastosowana implementacja szkieletyzacji została dokładnie opisana w podrozdziale 6.3.1.

8. Usunięcie nadmiarowych gałęzi

Otrzymany w poprzednim kroku szkielet został zredukowany poprzez usunięcie niektórych gałęzi. Cel tej operacji oraz sposób jej wykonania został szczegółowo opisany w podrozdziale 6.3.2. Będący wynikiem tej operacji obraz ze zredukowanym szkieletem będzie oznaczany przez F_{RSK} .

9. Podział szkieletu na komórki

Celem tego kroku jest wyodrębnienie z obliczonego w poprzednim punkcie szkieletu drzewiastych struktur odpowiadających poszczególnym komórkom. Aby to osiągnąć wyznaczono graf reprezentujący analizowany szkielet. Proces wyznaczania takiego grafu został opisany w podrozdziale 6.4.1. Sama operacja ekstrakcji drzewiastych struktur ze szkieletu została dokładnie omówiona w podrozdziale 6.4.2. Za korzenie drzew przyjęto wyznaczone wcześniej jądra komórkowe.

10. Konwersja otrzymanych struktur do formatu SWC

Na podstawie wyodrębnionych z obrazu struktur drzewiastych oraz obliczonego wcześniej obrazu DT zostały wyznaczone finalne struktury komórek w formacie SWC. Etap ten został opisany w podrozdziale 6.4.3.

6.2 Wyznaczanie położenia jąder komórkowych

6.2.1 Przyjęte założenia

Celem tego etapu jest wyznaczenie położenia oraz przybliżonej wielkości jąder komórkowych na podstawie binarnego obrazu DAPI. W zaproponowanym podejściu wykorzystano fakt, że jądra komórkowe astrocytów mają kształt zbliżony do kuli. 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.

6.2.2 Algorytm wyszukiwania sfer w obrazie 3D

Opracowany algorytm był zainspirowany działaniem transformaty Hough'a opisanej w rozdziale 3.6. Wyszukiwane na trójwymiarowym obrazie sfery są 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 współrzędnymi 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 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 woxel, 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:

$$M_S(\bar{x}) = \begin{cases} 1 & \text{gdyn } R - b \leq \sqrt{\left(\frac{r_0(M_S)}{2} - x_0\right)^2 + \left(\frac{r_1(M_S)}{2} - x_1\right)^2 + \left(\frac{r_2(M_S)}{2} - x_2\right)^2} \leq R \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (6.1)$$

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 woksele 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:

$$B(\bar{x}) = \sum_{\bar{t} \in \chi(M_S)} M_S(\bar{t}) \cdot F \left(x_0 - \frac{r_0(M_S)}{2} + t_0, x_1 - \frac{r_1(M_S)}{2} + t_1, x_2 - \frac{r_2(M_S)}{2} + t_2 \right) \quad (6.2)$$

Ponieważ jest to działanie liniowe, do efektywnego obliczenia obrazu B można użyć operatora konwolucji (patrz rozdział 3.3.2). Kompletny schemat algorytmu znajduje się w tabeli 6.1.

6.2.3 Wyniki

Opisaną powyżej metodę wykrywania jąder komórkowych przetestowano na posiadanych obrazach DAPI. Podczas testów przyjęto następujące wartości parametrów:

- $R_{min} = 3\mu m$
- $R_{max} = 5\mu m$
- $b = 0,5\mu m$
- $T_h = 60\%$

Na rysunku 6.2 zamieszczono obraz binarny otrzymany ze stosu A3_dapi, z naniesionymi czerwonymi kulami. Kule te reprezentują jądra komórkowe wyznaczone przez przedstawiony powyżej algorytm.

Wyniki uzyskane przez zaproponowany algorytm porównano z efektem ręcznej analizy obrazów wykonanej przez człowieka. Dla każdego z czterech obrazów wyznaczono ręcznie pozycje wszystkich widocznych na nich jąder komórkowych. Zostały one podzielone na trzy grupy:

1. Wewnątrz obrazu - do tej grupy zaklasyfikowano wszystkie elipsoidalne jądra komórkowe, leżące wewnątrz obrazu
2. Na krawędzi - prawidłowe jądra komórkowe, dla których więcej niż 10% ich objętości leży poza obrazem
3. Zdeformowane - obiekty o kształcie nie przypominającym elipsoidy, do tej grupy należą zapadnięte lub rozerwane jądra, jak również jądra o specyficznym kształcie należące do innych typów komórek

Dla każdej grupy z osobna zliczono ilość wykrytych i niewykrytych jąder komórkowych. Wyniki dla obrazów A3, B1, B2 i B3 zostały przedstawione kolejno w tabelach 6.2, 6.3, 6.4 oraz 6.5. Oprócz wyników dla trzech wyżej wymienionych grup, tabele te zawierają również czwartą grupę nazwaną "Nadmiarowe". Zawiera ona "urojone" jądra komórkowe wykryte przez algorytm, które nie pasują do żadnego z jąder komórkowych wyznaczonych ręcznie.

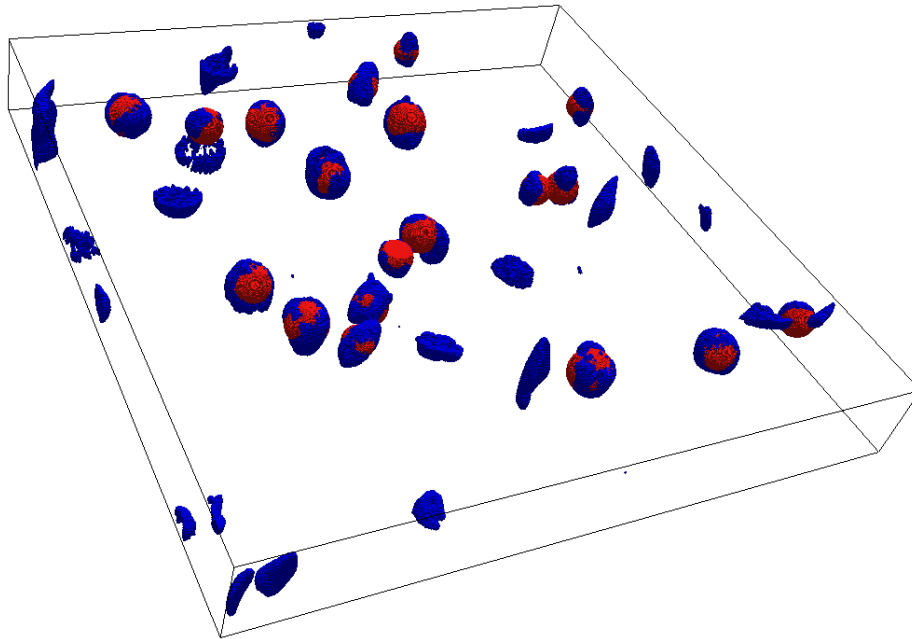
Testowany algorytm dał dobre wyniki dla obrazów A3 i B2 (tabele 6.2 oraz 6.4). W obrazie A3 wykryte zostały wszystkie jądra komórkowe z grupy pierwszej. Dla obrazu B2 z kolei w grupie pierwszej pominięte zostało jedno jądro komórkowe, które było bardzo słabo wybarwione. Zarówno w obrazie A3 jak i B2 wykryta została około $\frac{1}{3}$ jąder komórkowych przecinających krawędź obrazu.

Nr.	Operacja
1.	$R \leftarrow R_{max}$
2.	$M_S \leftarrow$ trójwymiarowa maska binarna, zawierająca wyśredkowany obraz sfery o grubości ściany b i zewnętrznym promieniu równym R
3.	$B \leftarrow F * M_S$ (konwolucja)
4.	$CandidatesChecked \leftarrow$ pusty zbiór współrzędnych wokseli
5.	$ConflictOccured \leftarrow FALSE$
6.	$\bar{x}_s \leftarrow$ współrzędne woksela z obrazu B o największej wartości $v \leftarrow$ wartość tego woksela
7.	Jeżeli $v < T_h$ to: • przejście do punktu 13
8.	Wyzerowanie w obrazie B woksela o współrzędnych $\bar{x}_s$
9.	Jeżeli $\exists_{t \in CandidatesChecked} (t - \bar{x}_s < 2 \cdot R)$ to: • $ConflictOccured \leftarrow TRUE$ w przeciwnym wypadku: • dodanie do wyników kuli o środku w punkcie $\bar{x}_s$ i promieniu R • wyzerowanie wszystkich wokseli z obrazu F należących do tej kuli
11.	Dodanie $\bar{x}_s$ do zbioru $CandidatesChecked$
12.	Przejdź do punktu 6
13.	Jeżeli $ConflictOccured = FALSE$ to: • $R \leftarrow R - 1$
14.	Jeżeli $R \geq R_{min}$ to: • przejście do punktu 2
15.	Koniec

Tablica 6.1: Schemat algorytmu wykrywającego sfery na obrazie 3D.

Rodzaj	Ilość w obrazie	Ilość wykrytych	Procent wykrytych
1. Wewnątrz obrazu	13	13	100%
2. Na krawędzi	11	4	36%
3. Zdeformowane	9	2	22%
4. Nadmiarowe	—	0	—

Tablica 6.2: Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie A3



Rysunek 6.2: Wynik działania proponowanej metody wykrywania jąder komórkowych dla stosu A3.

Rodzaj	Ilość w obrazie	Ilość wykrytych	Procent wykrytych
1. Wewnątrz obrazu	128	47	37%
2. Na krawędzi	113	16	14%
3. Zdeformowane	11	7	64%
5. Nadmiarowe	—	26	—

Tablica 6.3: Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B1

Rodzaj	Ilość w obrazie	Ilość wykrytych	Procent wykrytych
1. Wewnątrz obrazu	19	18	95%
2. Na krawędzi	20	7	35%
3. Zdeformowane	9	3	33%
4. Nadmiarowe	—	0	—

Tablica 6.4: Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B2

Rodzaj	Ilość w obrazie	Ilość wykrytych	Procent wykrytych
1. Wewnątrz obrazu	23	23	100%
2. Na krawędzi	8	7	88%
3. Zdeformowane	7	7	100%
4. Nadmiarowe	—	29	—

Tablica 6.5: Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B3

Z tej grupy wykryte zostały tylko te jądra, których więcej niż połowa znajdowała się na obrazie. Dla żadnego z tych dwóch obrazów proponowana metoda nie zwróciła nieprawidłowych (nieistniejących) jąder komórkowych.

Wyniki uzyskane dla dwóch pozostałych obrazów (B1 i B3, tabele 6.3 oraz 6.5) są dużo gorsze. W obu przypadkach wykrytych zostało ponad 20 nieistniejących jąder komórkowych. Znaczna większość tych nadmiarowych jąder komórkowych ma niewielki promień (około $3\mu m$) i leży bardzo blisko innych, prawidłowo wykrytych jąder komórkowych o większym promieniu. Zjawisko to jest spowodowane dużym rozmyciem i rozciągnięciem obrazów B1 oraz B3 w płaszczyznach XZ i YZ. Przyczyną tego jest bardzo mała rozdzielczość tych obrazów wzdłuż osi Z (odstęp co $1,3\mu m$, patrz tabela 4.1). Efektem ubocznym tego zjawiska jest duża skuteczność w wykrywaniu jąder komórkowych z grupy 3 (“Zdeformowane”), gdyż dzięki sporemu rozmyciu ich kształt zawiera w sobie szukane sfery.

Otrzymane dane o pozycjach i wielkościach jąder komórkowych, wykrytych przez opisywaną metodę dla obrazów A3 i B2, zostały wykorzystane w dalszym etapie rekonstrukcji. Dla stosów B1 i B3 do dalszych obliczeń przyjęto współrzędne jąder komórkowych wyznaczonych ręcznie. Rozdzielczość tych dwóch obrazów w osi Z jest zbyt niska, aby można było zastosować do nich przedstawiony tu algorytm. W kontekście celów niniejszej pracy nie ma to jednak większego znaczenia, ponieważ w praktyce do rekonstrukcji trójwymiarowych struktur powinno się stosować obrazy 3D o odpowiednio dużej rozdzielczości wzdłuż wszystkich trzech osi. Stosy B1 i B3 mają zdecydowanie zbyt niską rozdzielczość wzdłuż osi Z (patrz tabela 4.1), co tłumaczy niską jakość uzyskanych na ich podstawie wyników.

6.3 Obliczanie szkieletu

6.3.1 Szkieletyzacja

Do szkieletyzacji obrazu został użyty algorytm ścieniania zachowujący topologię obiektu zaproponowany w [90], a dokładniej jego poprawiona wersja przedstawiona w pracach [91] i [73]. Próby zastosowania tego algorytmu do analizy obrazów 3D otrzymanych za pomocą mikroskopu konfokalnego zostały opisane w [72] oraz [74]. Jego działanie polega na wynajdywaniu w kolejnych iteracjach tzw. “prostych” punktów (*simple points*) i usuwaniu ich z obrazu. Każda iteracja jest podzielona na sześć poditeracji, z których każda działa dla jednego z sześciu kierunków: $(-1, 0, 0)$, $(1, 0, 0)$, $(0, -1, 0)$, $(0, 1, 0)$, $(0, 0, -1)$ i $(0, 0, 1)$. Pojedyncza poditeracja składa się z następujących kroków (przez $\bar{t}$ oznaczono kierunek):

1. Wyznaczenie zbioru $K = \{\bar{x} : F(\bar{x}) = 1 \wedge F(\bar{x} + \bar{t}) = 0\}$
2. Dla każdego elementu ze zbioru K następuje ponowne sprawdzenie, czy jest on nadal punktem “prostym”. Jeżeli tak, to jest on usuwany (jego wartość jest ustawiana na 0)

Algorytm kończy działanie gdy osiągnie iterację, w której żadna z sześciu poditeracji nie usunie żadnego punktu.

Główna trudność w zdefiniowaniu powyższego algorytmu polega na sprawdzeniu warunku, czy dany punkt obrazu jest punktem “prostym”. Punkt “prosty” to taki, którego usunięcie nie zmienia topologii obiektu przedstawionego na obrazie. Przystępnie opracowany algorytm pozwalający na sprawdzenia tego warunku został opisany w pracy [91]. Składa się on z następujących kroków:

1. Wyznaczenie dla badanego woksela trzech następujących zbiorów:

C_0 - zbiór wierzchołków woksela, które są równocześnie wierzchołkami innego niezerowego woksela

C_1 - zbiór krawędzi woksela, które są równocześnie krawędziami innego niezerowego woksela

C_2 - zbiór ścian woksela, które są równocześnie ścianami innego niezerowego woksela

2. Obliczenie dla woksela liczby Eulera l_{eu} zgodnie ze wzorem:

$$l_{eu} = \overline{\overline{C_0}} - \overline{\overline{C_1}} + \overline{\overline{C_2}} \quad (6.3)$$

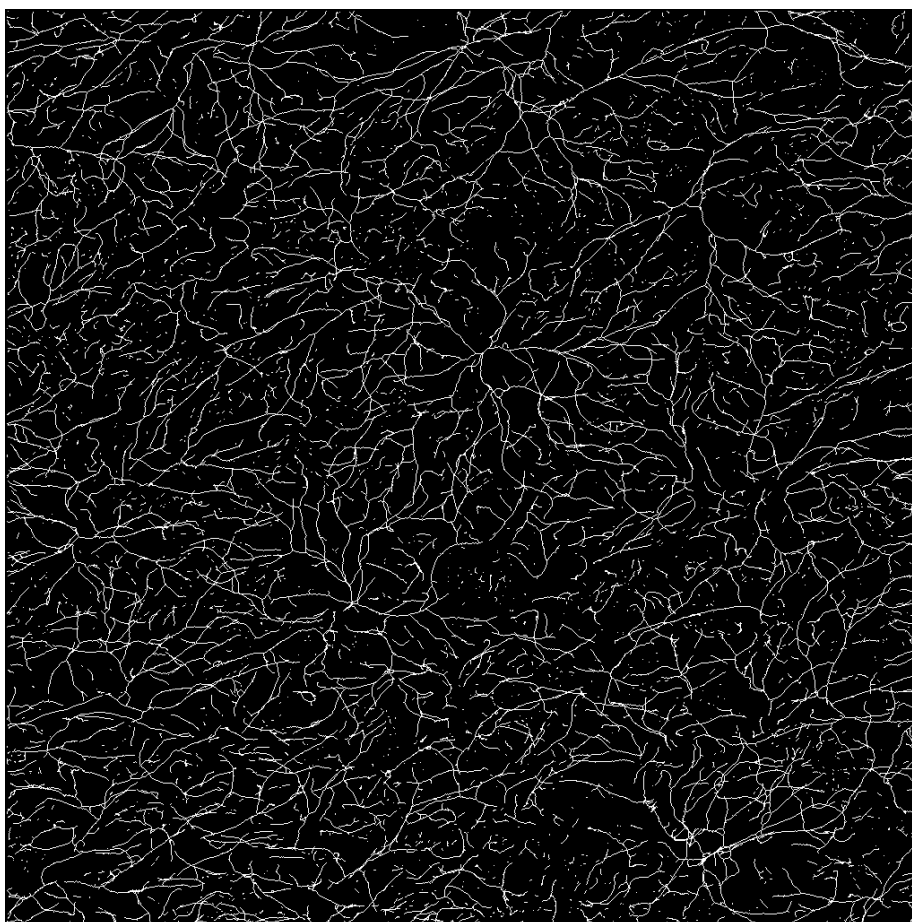
Jeżeli $l_{eu} \neq 1$ to badany woxsel nie jest punktem “prostym”. Gdy $l_{eu} = 1$ to wykonywane są następne kroki.

3. Sprawdzenie, czy istnieje wierzchołek należący do C_0 i jednocześnie nie należący do żadnej krawędzi ze zbioru C_1 . Jeżeli taki wierzchołek istnieje, to badany woxsel nie jest punktem “prostym”. W przeciwnym przypadku wykonywane są następne kroki.
4. Sprawdzenie, czy istnieje krawędź należąca do C_1 i jednocześnie nie mająca żadnych punktów wspólnych z innymi krawędziami ze zbioru C_1 . Jeżeli taka krawędź istnieje, to badany woxsel nie jest punktem “prostym”. W przeciwnym przypadku wykonywany jest następny krok.
5. Sprawdzenie, czy badany woxsel posiada ścianę, która nie należy do C_2 i której wszystkie cztery krawędzie należą do C_1 . Jeżeli taka ściana istnieje, to badany woxsel nie jest punktem “prostym”. W przeciwnym wypadku badany woxsel jest punktem “prostym”.

Przedstawiony powyżej algorytm dodatkowo pozwala na wymuszenie, aby pewne wybrane przed szkieletyzacją woksela zostały częścią szkieletu. W takim przypadku z góry przyjmuje się, że nie są one nigdy punktami “prostymi”, dzięki czemu nie zostają usunięte. W niniejszej pracy jako takie narzucone z góry, stałe punkty szkieletu przyjęto środki wykrytych wcześniej jąder komórkowych. Wynik działania algorytmu szkieletyzacji dla jednego z przetwarzanych obrazów został przedstawiony na rysunku 6.3.

6.3.2 Redukcja szkieletu

Już na pierwszy rzut oka można zauważyć, że otrzymany 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. Przykład takiej sytuacji został przedstawiony w górnej części rysunku 6.4. Problem ten został rozwiązany



Rysunek 6.3: Rzut szkieletu otrzymanego z obrazu A2 na płaszczyznę XY.

poprzez usunięcie niektórych końcowych gałęzi z otrzymanego szkieletu. Proces ten jest dalej nazywany redukcją szkieletu.

W celu opisanego zastosowanego algorytmu redukcji szkieletu musimy zdefiniować pomocniczą funkcję $ng(F, \bar{x})$, która zwraca ilość niezerowych wokseli z obrazu binarnego F bezpośrednio stycznych z wokselem $\bar{x}$. Jest ona formalnie zdefiniowana we wzorze 6.4.

$$ng(F, \bar{x}) = \left(\sum_{t_0=x_0-1}^{x_0+1} \sum_{t_1=x_1-1}^{x_1+1} \sum_{t_2=x_2-1}^{x_2+1} F([t_0, t_1, t_2]) \right) - F(\bar{x}) \quad (6.4)$$

Redukcja szkieletu rozpoczyna się od znalezienia na obrazie F_{SK} wszystkich niezerowych wokseli $\bar{x}_t$, dla których $ng(F_{SK}, \bar{x}_t) = 1$. Są one zapisywane do kolejki FIFO. Następnie kolejka jest opróżniana, dla każdego usuwanego z niej elementu $\bar{x}_t$ wykonywany jest następujący algorytm:

1. Znajdywany jest ścieżka wokseli $S = \bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_s$ spełniająca następujący warunek:

$$\forall_{1 \leq i \leq s} F_{SK}(\bar{x}_i) = 1 \wedge \forall_{1 < i < s} ng(F_{SK}, \bar{x}_i) = 2 \wedge \bar{x}_1 = \bar{x}_t \wedge ng(F_{SK}, \bar{x}_s) \neq 2 \quad (6.5)$$

Jak łatwo można zauważyć, zawsze istnieje dokładnie jedna taka ścieżka. Jeżeli $ng(F_{SK}, \bar{x}_s) = 1$ to mamy do czynienia z drzewem bez rozgałęzień. W takim przypadku reszta operacji jest pomijana i następuje przejście do następnej iteracji.

2. Z wyznaczonej ścieżki S wybierany jest element $\bar{x}_j$ o największym możliwym indeksie j spełniający warunek:

$$m(\bar{x}_s - \bar{x}_j) \geq F_{DT}(\bar{x}_s) \quad (6.6)$$

Z części ścieżki S tworzona jest ścieżka $S_g = \bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_j$ reprezentująca widoczną część gałęzi.

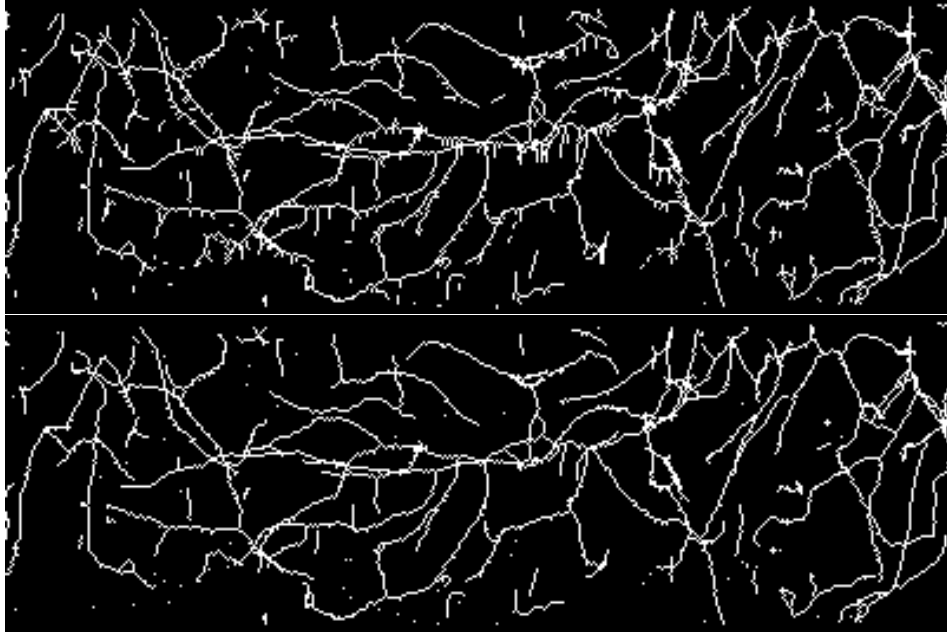
3. Jeżeli długość ścieżki S_g jest mniejsza od $1\mu m$, to cała ścieżka S , za wyjątkiem ostatniego woksela x_s , jest usuwana z obrazu F_{SK} .

Wynik działania powyższego algorytmu dla obrazu A2 został przedstawiony na rysunku 6.4. Rysunek ten przedstawia złożenie kolejnych fragmentów przekrojów w płaszczyźnie YZ z zakresu 409-512 (względem osi X) przed i po redukcji szkieletu.

6.4 Wyznaczenie struktur SWC

6.4.1 Konwersja szkieletu do grafu

Aby umożliwić analizę struktury, którą tworzą wybarwione komórki, trzeba go zapisać w postaci grafu. Graf ten będzie dalej nazywany grafem G , zbiór jego wierzchołków będzie oznaczany przez V , a zbiór krawędzi przez E . 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



Rysunek 6.4: Bezpośredni wynik działania algorytmu szkieletyzacji dla obrazu A2 (na górze) oraz jego poprawiona wersja otrzymana poprzez zastosowanie opisanego algorytmu redukcji szkieletu (na dole).

i wierzchołków. Najprostszym rozwiązaniem byłoby zaklasyfikowanie niezerowych wokseli posiadających dwóch sąsiadów jako fragmentów krawędzi i potraktowanie pozostałych wokseli szkieletu jako wierzchołków. Podejście to daje jednak nieprawidłowe rozwiązania. Przykładowy fragment szkieletu został przedstawiony na rysunku 6.5. Woksele zaznaczone na szaro mają więcej niż dwóch sąsiadów, jednak nie powinny być zakwalifikowane jako osobne wierzchołki.

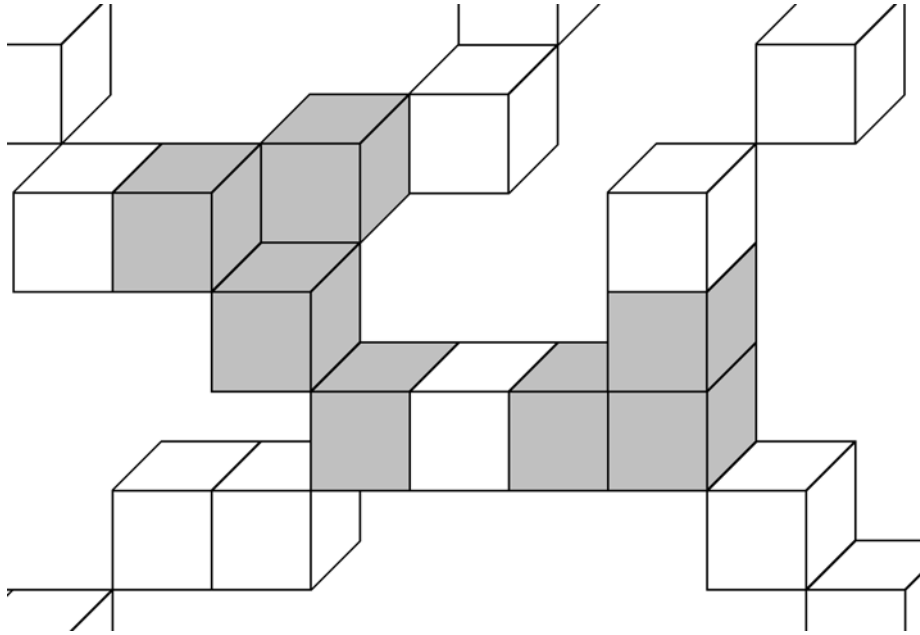
W niniejszej pracy przyjęto założenie, że takie grupy sąsiadujących ze sobą wokseli posiadających więcej niż dwóch sąsiadów reprezentują jeden wierzchołek grafu. Podobne podejście do tego problemu zostało przedstawione w pracy [72]. Zastosowany algorytm wyznaczania grafu G na podstawie obrazu szkieletu F_{RSK} można opisać w następujących punktach:

1. Z obrazu szkieletu F_{RSK} wybierane są wszystkie woksele $\bar{x}$ spełniające warunek:

$$F_{RSK}(\bar{x}) = 1 \wedge ng(F_{RSK}, \bar{x}) = 2 \quad (6.7)$$

Łatwo można zauważyć, że zbiór takich wokseli tworzy na obrazie rozłączne ścieżki i cykle. Ścieżki są zapisywane w pomocniczym zbiorze - będą one krawędziami grafu. Dla każdej ze ścieżek wyznaczane są i zapamiętywane następujące wartości:

- H_v - zbiór współrzędnych wokseli obrazu F_{RSK} należących do ścieżki
- $\bar{x}_B$ - współrzędna woksela nie należąca do ścieżki i granicząca z pierwszym jej wokselem



Rysunek 6.5: Przykładowy fragment szkieletu. Na szaro zaznaczono woksele posiadające więcej niż dwóch sąsiadów.

- $\bar{x}_E$ - współrzędna woksela nie należąca do ścieżki i granicząca z ostatnim jej wokslem

Wszystkie woksele spełniające warunek 6.7 są następnie usuwane ze szkieletu (tj. ich wartość na obrazie F_{RSK} jest ustawiana na zero). Po wykonaniu tej operacji cykle utworzone przez takie woksele są bezpowrotnie traczone, jednak w praktyce nie mają one wpływu na końcowy wynik. Zdarzają się one bardzo rzadko i składają się zaledwie z kilku wokseli, poza tym nie są one połączone z żadną inną częścią szkieletu (w przeciwnym razie nie byłyby na tym etapie widoczne jako cykle).

2. Pozostałe na obrazie woksele definiują wierzchołki grafu. Zakładamy, że każde dwa woksele pośrednio lub bezpośrednio ze sobą styczne należą do jednego wierzchołka. Zbiory wokseli odpowiadające wierzchołkom grafu można wyznaczyć poprzez np.: "zalewanie" nieprzydzielonych jeszcze niezerowych wokseli. W wyniku tej operacji otrzymujemy zbiór wierzchołków V , w którym każdy wierzchołek jest skojarzony z pewnym niepustym zbiorem H_v wokseli obrazu. Wyznaczone w ten sposób zbiory wokseli H_v przyporządkowane do wierzchołków są rozłączne, a ich suma zawiera wszystkie niezerowe woksele pozostałe na obrazie F_{RSK} .
3. Na podstawie zapisanych wcześniej ścieżek tworzone są krawędzie grafu. Każdy z wokseli $\bar{x}_B$ i $\bar{x}_E$, wyznaczonych wcześniej dla każdej ścieżki, należy dokładnie do jednego ze zbiorów wokseli skojarzonych z wierzchołkami grafu. Na podstawie tego określone są wierzchołki grafu, które łączy dana ścieżka, co pozwala na dodanie jej do tworzonego grafu G jako nowej krawędzi.

Wynikiem powyższego algorytmu jest nieskierowany (i być może niespójny) graf G składający się ze zbioru wierzchołków V i zbioru krawędzi E . Każdy wierzchołek ma przypisany niepusty zbiór wokseli H_v , będących jego obrazem w szkielecie F_{RSK} . Analogicznie każda krawędź ma przypisany zbiór wokseli H_e , przez które była reprezentowana w szkielecie F_{RSK} .

6.4.2 Wyodrębnienie pojedynczych komórek

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. Anomalie te spowodowane są następującymi przyczynami:

- obraz zawiera fragmenty komórek, których jądra leżą poza skanowanym obszarem
- wypustki komórek leżące blisko siebie są na obrazie sklejone
- część widocznych jąder komórkowych nie należy do komórek glejowych

Aby wyodrębnić z otrzymanego grafu G pojedyncze komórki, trzeba usunąć niektóre z krawędzi ze zbioru E . W tym celu dla każdej z krawędzi wyznaczana jest waga w , reprezentująca jej minimalną grubość. Jest ona obliczana na podstawie obrazu F_{DT} , zgodnie z następującym wzorem:

$$w = \inf\{F_{DT}(\bar{x}) : \bar{x} \in H_e\} \quad (6.8)$$

Algorytm ekstrakcji z grafu G struktury poszczególnych komórek został przedstawiony w tabeli 6.6. Jego działanie polega na zaznaczeniu każdego z wierzchołków oraz części krawędzi odpowiednimi kolorami, oznaczającymi przynależność do konkretnych komórek. Krawędzie grafu, które w wyniku działania algorytmu nie zostały pokolorowane, są usuwane.

6.4.3 Zapisanie struktury komórek w formacie SWC

Ostatnim etapem opisanego w niniejszej pracy systemu jest konwersja pojedynczych drzew reprezentujących komórki do formatu SWC. Komórka w formacie SWC jest zapisana jako drzewo, w którym każdy z wierzchołków jest opisany przez następujące parametry:

- położenie, zapisane jako współrzędne w przestrzeni XYZ
- promień, określający wielkość wierzchołka

Krawędzie drzewa w strukturze SWC nie mają żadnych dodatkowych parametrów.

Otrzymany w wyniku wcześniejszych przekształceń graf G jest lasem (tj. wszystkie jego spójne składowe są drzewami). Zaprojektowany algorytm do przekształcenia tego grafu w zbiór struktur SWC składa się z następujących kroków:

Nr.	Operacja
1.	Zaznaczenie każdego z wierzchołków grafu G reprezentującego jądro komórkowe innym kolorem
2.	$EdgesToCheck \leftarrow$ zbiór wszystkich krawędzi grafu połączonych z pokolorowanymi wierzchołkami
3.	Jeżeli zbiór $EdgesToCheck$ jest pusty to: • przejście do punktu 12
4.	$e_g \leftarrow$ krawędź ze zbioru $EdgesToCheck$ o największej wartości w (wzór 6.8), w przypadku remisu wybierana jest krawędź, która została wcześniej dodana do zbioru
5.	Usunięcie krawędzi e_g ze zbioru $EdgesToCheck$
6.	Jeżeli oba wierzchołki, z którymi łączy się krawędź e_g , są pokolorowane, to: • przejście do punktu 3
7.	$v_n \leftarrow$ niepokolorowany wierzchołek, z którym łączy się krawędź e_g $v_k \leftarrow$ pokolorowany wierzchołek, z którym łączy się krawędź e_g
8.	Zaznaczenie wierzchołka v_n kolorem wierzchołka v_k
9.	Zaznaczenie krawędzi e_g kolorem wierzchołka v_k
10.	Dodanie wszystkich niepokolorowanych krawędzi połączonych z wierzchołkiem v_n do zbioru $EdgesToCheck$
11.	Przejdź do punktu 3
12.	Koniec - wierzchołki i krawędzie należące do tej samej komórki są zaznaczone tym samym kolorem (innym dla każdej z komórek)

Tablica 6.6: Schemat algorytmu wyodrębniającego z grafu G poszczególne komórki.

1. Zamiana krawędzi na ciąg wierzchołków
Zbiory wokseli H_e skojarzonych z poszczególnymi krawędziami zamieniane są na ścieżki wierzchołków. Każdy z wokseli należący do któregoś ze zbiorów H_e staje się osobnym wierzchołkiem, połączonym z dokładnie dwoma innymi wierzchołkami. Zbiory H_v skojarzone z utworzonymi w ten sposób wierzchołkami składają się z dokładnie jednego woksela. Krawędzie w nowo powstałym grafie nie mają przyporządkowanych żadnych wokseli.
2. Wyznaczenie pozycji wierzchołków
Pozycja każdego wierzchołka jest wyznaczana jako średnia arytmetyczna współrzędnych wokseli z jego zbioru H_v .
3. Usunięcie nadmiarowych wierzchołków
Powstały graf G posiada dużo wierzchołków połączonych bardzo krótkimi krawędziami. W celu poprawy wizualnej jakości otrzymanych wyników przeprowadzana jest redukcja ilości wierzchołków w otrzymanym grafie G . Usunięte mogą zostać tylko te wierzchołki, które nie są korzeniami i mają dokładnie jednego potomka. Po usunięciu wierzchołka i dwóch połączonych z nim krawędzi, jego rodzic i potomek są bezpośrednio łączone ze sobą nową krawędzią. Algorytm służący do wyznaczania w poszczególnych drzewach nadmiarowych wierzchołków i ich usuwania został przedstawiony w tabeli 6.7.
4. Wyznaczenie wielkości wierzchołków
Jak już wspomniano, każdy wierzchołek w strukturze SWC ma przypisany promień, opisujący grubość gałęzi. Dla każdego z wierzchołków grafu G wyznaczono promień R zgodnie z następującym wzorem:

$$R = \sup\{F_{DT}(\bar{x}) : \bar{x} \in H_v\} \quad (6.9)$$

Po wykonaniu powyższych kroków każde drzewo w grafie G reprezentuje jedną strukturę SWC, opisującą pojedynczą komórkę. Wierzchołki i krawędzie drzewa są bezpośrednio mapowane na wierzchołki i krawędzie tworzonej struktury SWC. W ten sposób graf G zostaje zamieniony na wynikowy zbiór struktur SWC, reprezentujących znalezione w przetwarzanym stosie astrocyty.

Nr.	Operacja
1.	Graf G_T jest drzewem reprezentującym pojedynczą komórkę, z wyznaczonym wierzchołkiem v_r będącym korzeniem.
2.	$LockedNodes \leftarrow$ pusty zbiór wierzchołków $NodesToDelete \leftarrow$ pusty zbiór wierzchołków $MinError \leftarrow 2$ $NodesToCheck \leftarrow$ zbiór wszystkich wierzchołków drzewa G_T różnych od v_r o stopniu równym 2.
3.	Jeżeli zbiór $NodesToCheck$ jest pusty, to: • przejście do punktu 13
4.	$v_c \leftarrow$ wierzchołek ze zbioru $NodesToCheck$ $v_1, v_2 \leftarrow$ wierzchołki będące sąsiadami wierzchołka v_c w grafie G_T
5.	Usunięcie wierzchołka v_c ze zbioru $NodesToCheck$
6.	$\bar{x}_c \leftarrow$ pozycja wierzchołka v_c $\bar{x}_1 \leftarrow$ pozycja wierzchołka v_1 $\bar{x}_2 \leftarrow$ pozycja wierzchołka v_2
7.	$\bar{t} \leftarrow$ najkrótszy wektor od punktu $\bar{x}_c$ do odcinka $\ \bar{x}_1, \bar{x}_2\ $
8.	Jeżeli $(m(\bar{t}) > MinError) \vee (m(\bar{t}) = MinError \wedge v_c \in LockedNodes)$ to: • przejście do punktu 3
9.	Jeżeli $m(\bar{t}) < MinError$ to: • $LockedNodes \leftarrow$ pusty zbiór wierzchołków $NodesToDelete \leftarrow$ pusty zbiór wierzchołków $MinError \leftarrow m(\bar{t})$
10.	Dodanie do zbioru $LockedNodes$ wierzchołków v_1 i v_2
11.	Dodanie do zbioru $NodesToDelete$ wierzchołka v_c
12.	Przejdź do punktu 3
13.	Jeżeli zbiór $NodesToDelete$ jest pusty to: • przejście do punktu 20
14.	$v_d \leftarrow$ wierzchołek ze zbioru $NodesToDelete$ $v_1, v_2 \leftarrow$ wierzchołki będące sąsiadami wierzchołka v_d w grafie G_T
15.	Usunięcie wierzchołka v_d ze zbioru $NodesToDelete$
16.	Usunięcie wierzchołka v_d z grafu G_T wraz z dwoma połączonymi z nim krawędziami
17.	Dodanie do grafu G_T krawędzi łączącej wierzchołki v_1 i v_2
18.	Jeżeli zbiór $NodesToDelete$ nie jest pusty, to: • przejście do punktu 14
19.	Przejdź do punktu 2
20.	Koniec - graf G_T jest drzewem reprezentującym pojedynczą komórkę po usunięciu nadmiarowych wierzchołków

Tablica 6.7: Schemat algorytmu usuwającego nadmiarowe wierzchołki z drzewa reprezentującego pojedynczą komórkę.

Rozdział 7

Wyniki rekonstrukcji struktury komórek

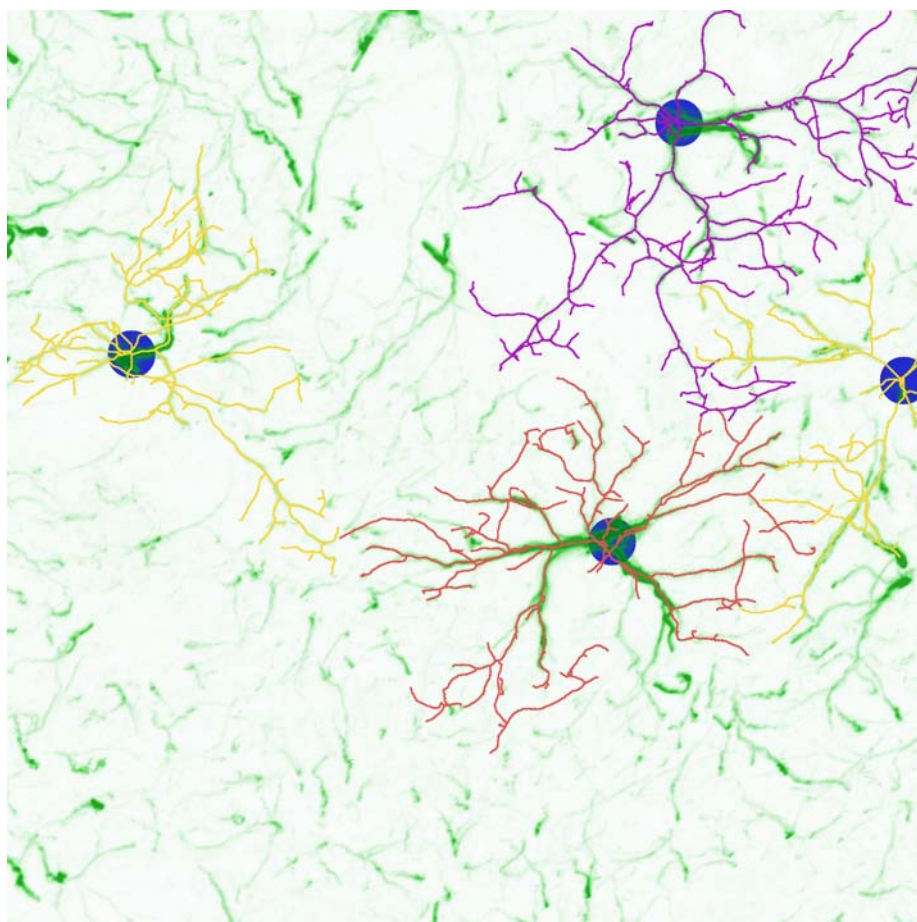
7.1 Obraz 2D zrekonstruowanych komórek

W celu zobrazowania otrzymanych wyników, szkielety największych zrekonstruowanych komórek zostały nałożone na podane na wejściu stosy. Otrzymane w ten sposób obrazy 3D zostały zrzutowane na płaszczyznę XY. Powstałe w wyniku tej operacji dwuwymiarowe obrazy zostały przedstawione na rysunkach 7.1-7.9. Kolorem niebieskim oznaczono obraz powstały ze stosu DAPI, kolorem zielonym obraz powstały ze stosu GFAP. Dla zestawów danych A1, A2, B4, B5 i B6, dla których nie było stosów DAPI, niebieskim kolorem zaznaczono jądra komórek wyznaczone ręcznie na podstawie obserwacji. Naniesione na stosy szkielety zrekonstruowanych komórek zostały oznaczone kolorem żółtym, czerwonym i fioletowym. Aby zachować przejrzystość zamieszczonych rysunków, naniesiono tylko największe z wyznaczonych szkieletów komórek.

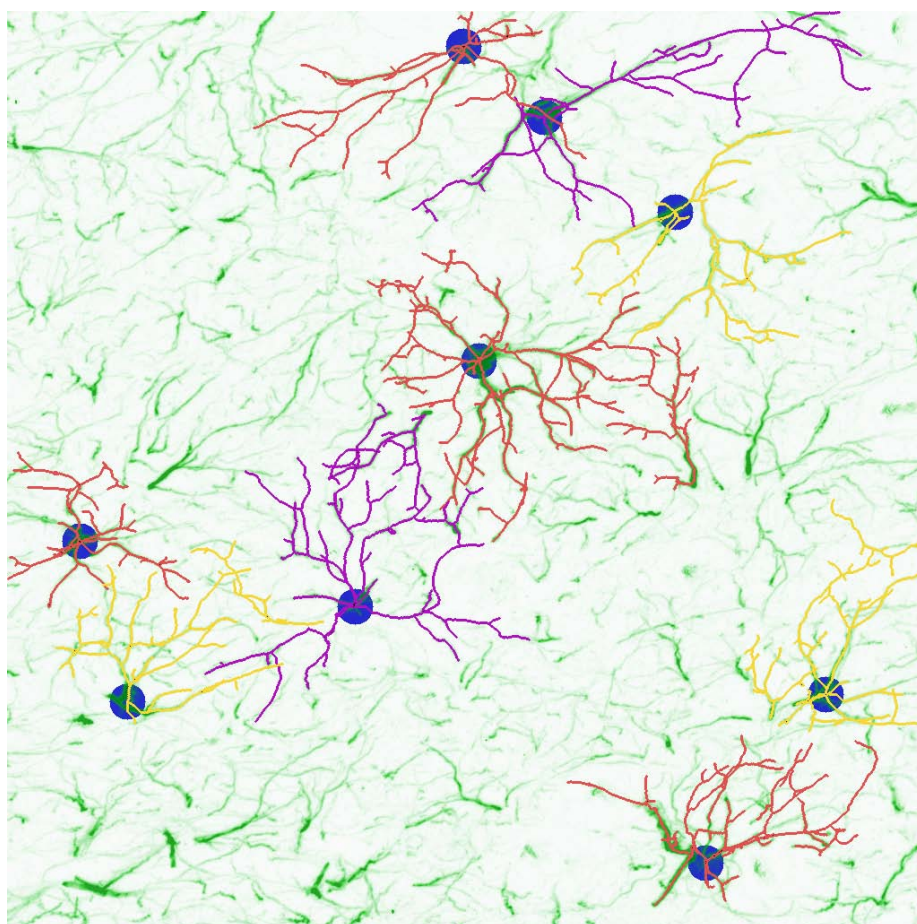
Na podstawie tak przygotowanych obrazów 2D nie można oczywiście dokonać weryfikacji otrzymanych wyników. Do tego niezbędne jest porównanie otrzymanych struktur w trójwymiarowej przestrzeni z wynikami ręcznej rekonstrukcji (patrz podrozdział 7.2). Rzut na płaszczyznę XY pozwala jednak na wychwycenie niektórych błędów wykonanej rekonstrukcji oraz pobieżną ocenę jej dokładności.

Obrazy stosów A3, B1, B2, i B3 zawierają wynik barwienia DAPI, więc widać na nich jądra komórkowe. Należy pamiętać, że część widocznych na obrazach jąder komórkowych należy do komórek nie będących astrocytami. Na obrazie stosu B1 (rysunek 7.4) widać duże skupisko komórek, które jest najprawdopodobniej warstwą neuronów. Na tym rysunku można również zauważyć, że fragmenty cytoszkieletu wykrytego przez barwienie GFAP i leżące w obrębie tej warstwy, zostały błędnie przyporządkowane do jąder komórkowych. Jest to spowodowane niską rozdzielczością stosu B1 w osi Z (patrz tabela 4.1) oraz działaniem samego algorytmu rekonstrukcji, który interpretuje wykryte jądra komórkowe jako kule. Obydwa te czynniki powodują “zlewanie się” leżących blisko siebie jąder komórkowych ze sobą i ze znajdującymi się w ich pobliżu fragmentami cytoszkieletu.

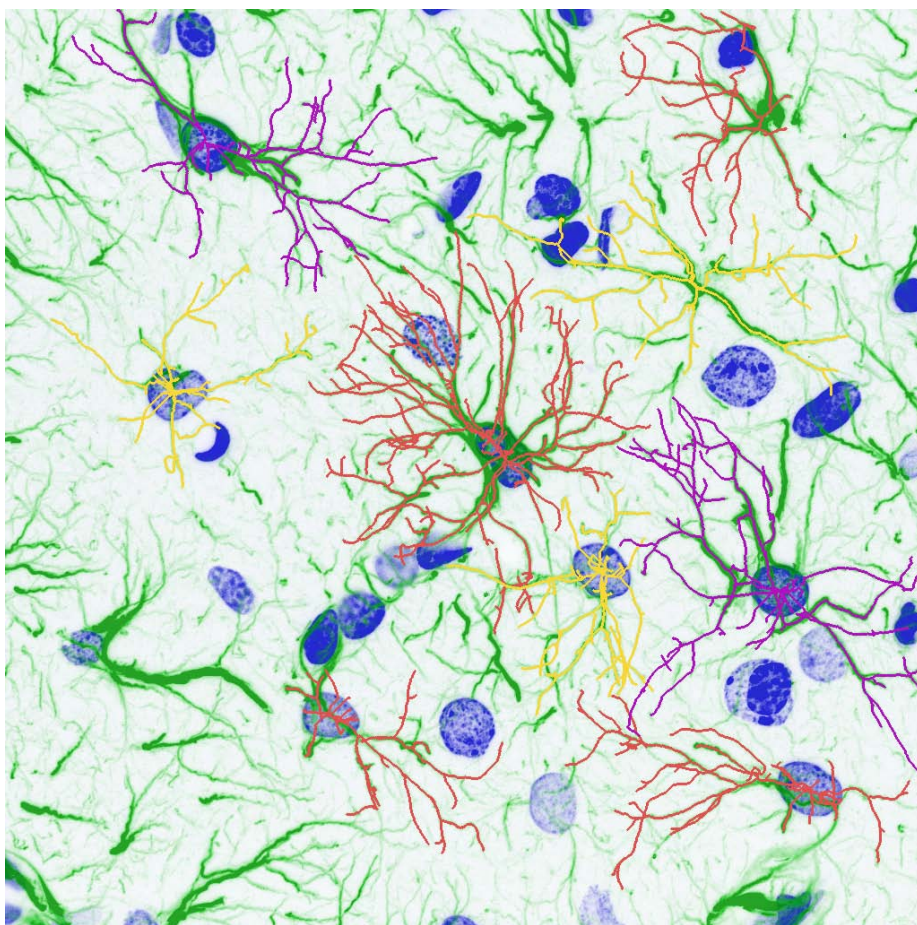
Prawie we wszystkich obrazach można zauważyć błędy rekonstrukcji polega-



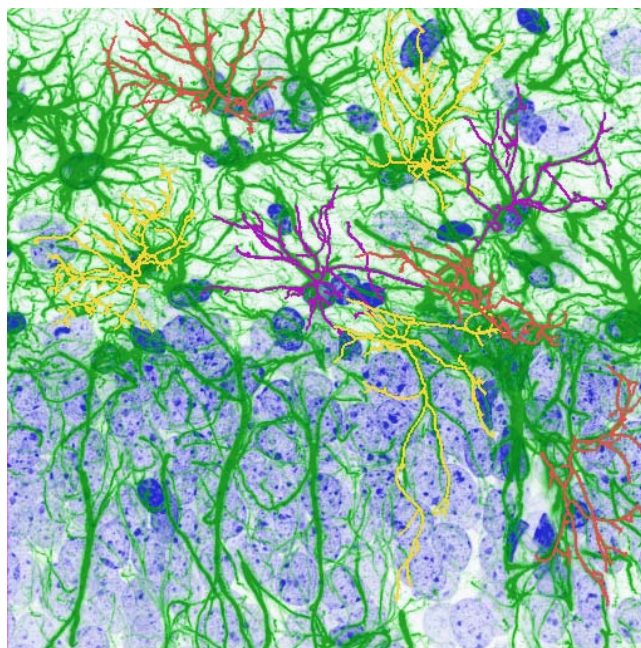
Rysunek 7.1: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A1.



Rysunek 7.2: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A2.



Rysunek 7.3: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A3.

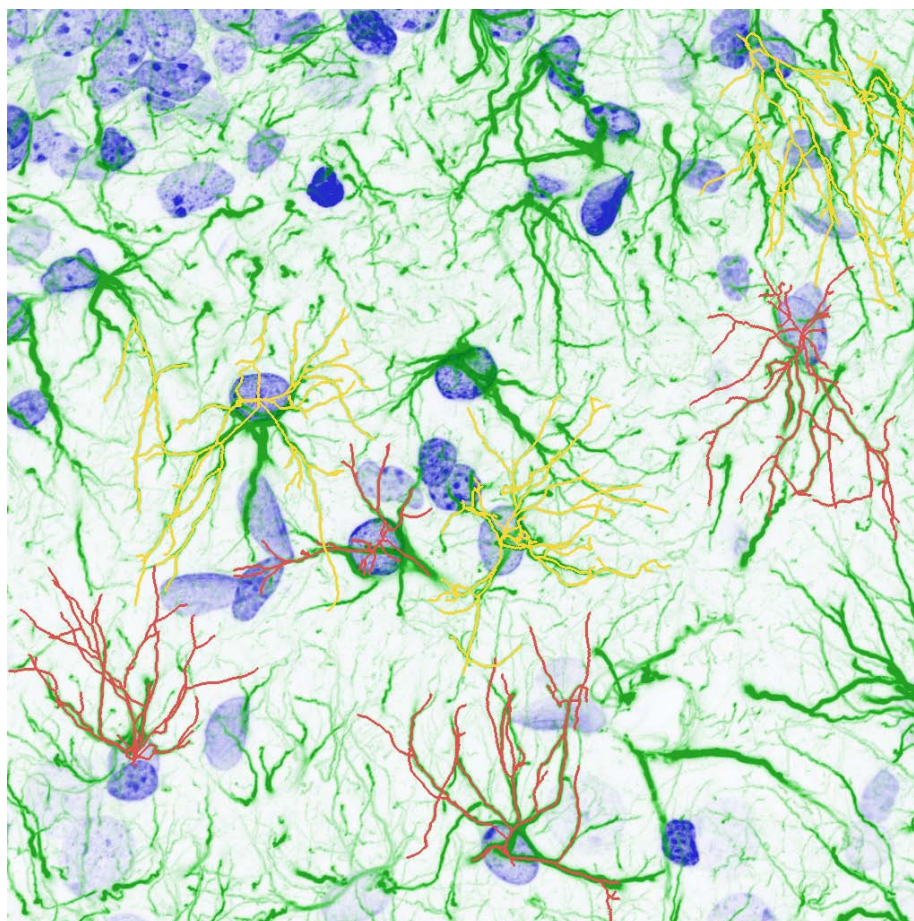


Rysunek 7.4: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B1.

jące na dołączaniu do szkieletu rekonstruowanej komórki fragmentów szkieletu należących do innych komórek. Najłatwiej to zaobserwować na obrazie stosu B2 (rysunek 7.5). Innym zauważalnym błędem jest “ucinanie” w rekonstruowanej komórce cieńszych gałęzi szkieletu, co można łatwo zauważyć na obrazach stosów B5 (rysunek 7.8) oraz B6 (rysunek 7.9). Głównym powodem tego zjawiska jest nierównomierne wybarwienie cytoszkieletu. Prawdopodobnie występowanie obu tych błędów można by znacznie ograniczyć poprzez zastosowanie bardziej zaawansowanego algorytmu segmentacji.

7.2 Porównanie z wynikiem ręcznej rekonstrukcji

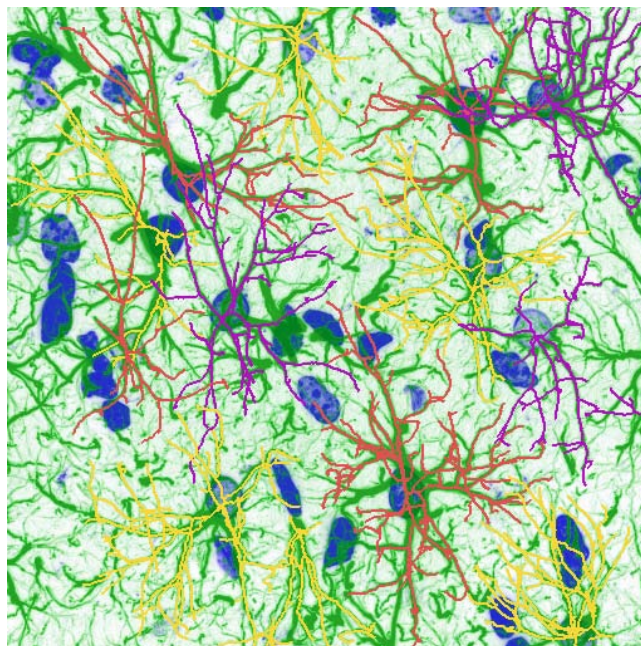
Z przetwarzanych w ramach niniejszej pracy stosów obrazów wybrano pięć komórek i dokonano ich ręcznej rekonstrukcji. Rekonstrukcja została wykonana z wykorzystaniem programu Neuromorpho.org. Otrzymane w ten sposób szkielety komórek zostały porównane ze szkieletami uzyskanymi w drodze automatycznej rekonstrukcji. 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. Wyniki takiego porównania zostały przedstawione na rysunkach 7.10-7.15. 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. Analogicznie podzielono szkielet wyznaczony ręcznie. Część szkieletu, pokrywająca się ze szkieletem wyznaczonym automatycznie, została zaznaczona kolorem zielonym. Pozostałą część szkieletu zaznaczono kolorem pomarańczowym.



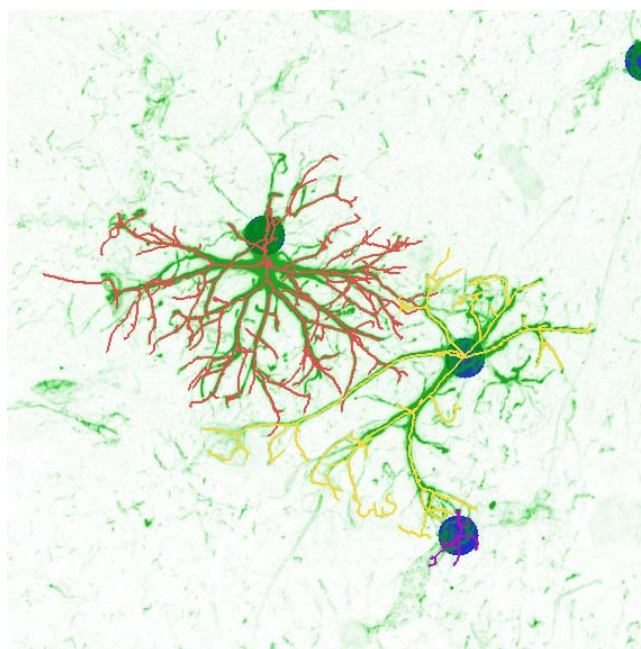
Rysunek 7.5: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B2.

Źródłowy stos	Część dopasowanego szkieletu względem ręcznej rekonstrukcji
A3 (1)	89,9%
A3 (2)	75,5%
B1	37,6%
B2	83,4%
B3	34,9%
B4	61,8%

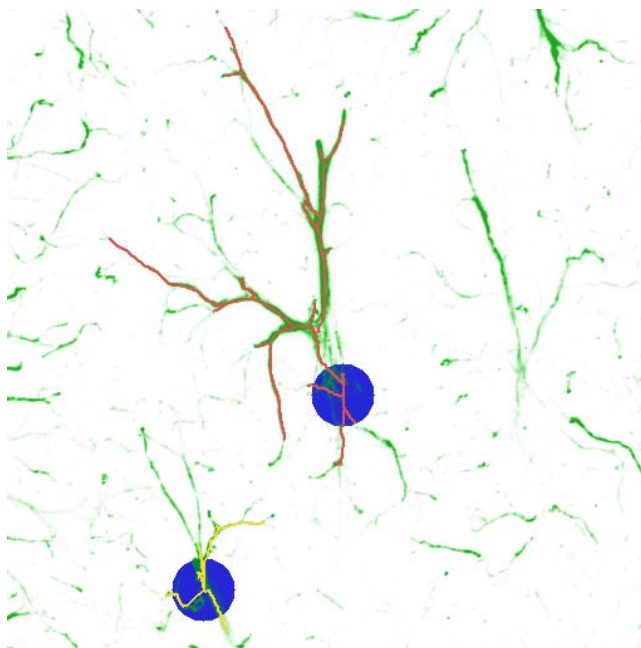
Tablica 7.1: Zgodność szkieletu komórek zrekonstruowanych ręcznie i automatycznie



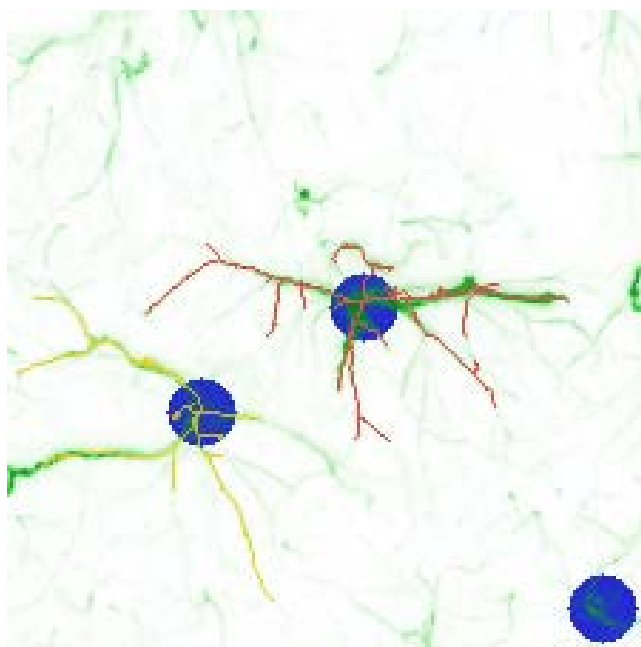
Rysunek 7.6: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B3.



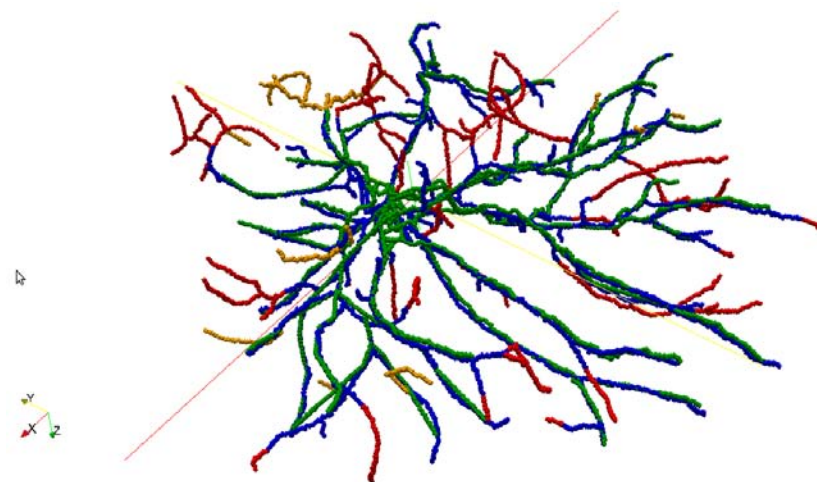
Rysunek 7.7: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B4.



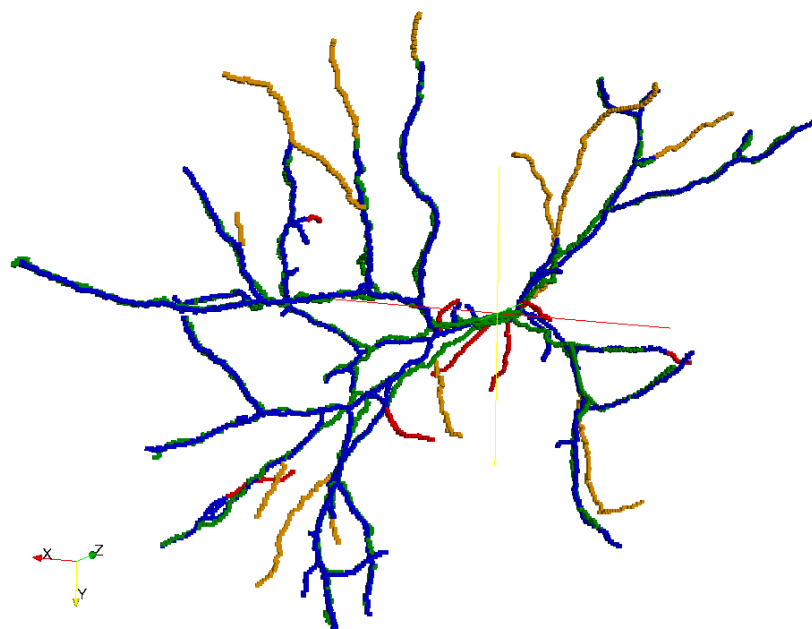
Rysunek 7.8: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B5.



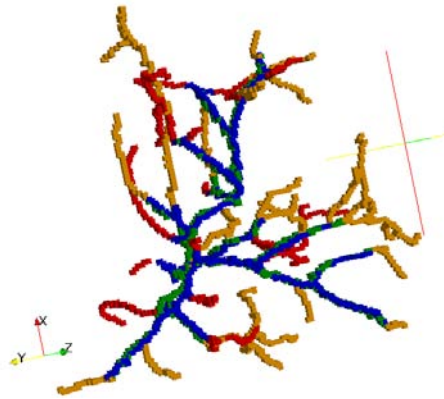
Rysunek 7.9: Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B6.



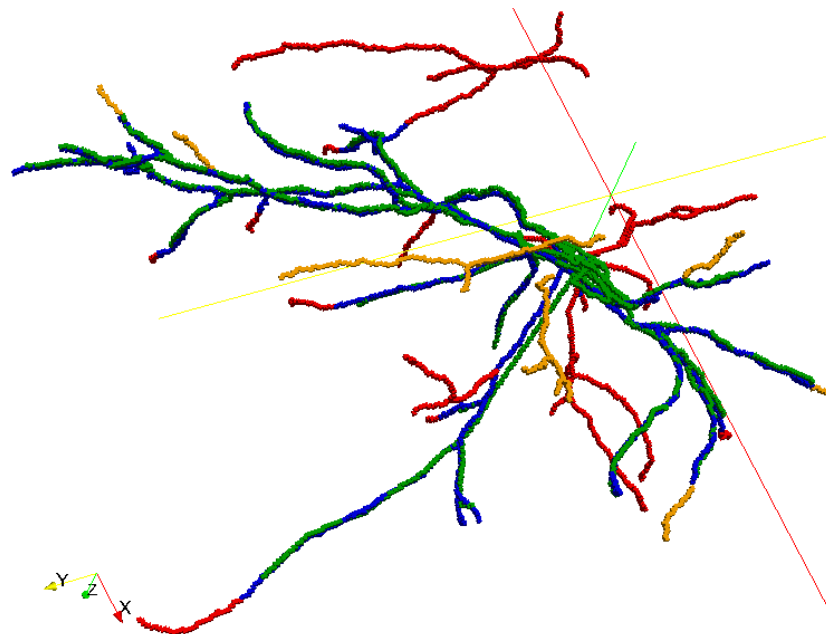
Rysunek 7.10: Porównanie szkieletów komórki ze stosu A3 (komórka 1) otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.



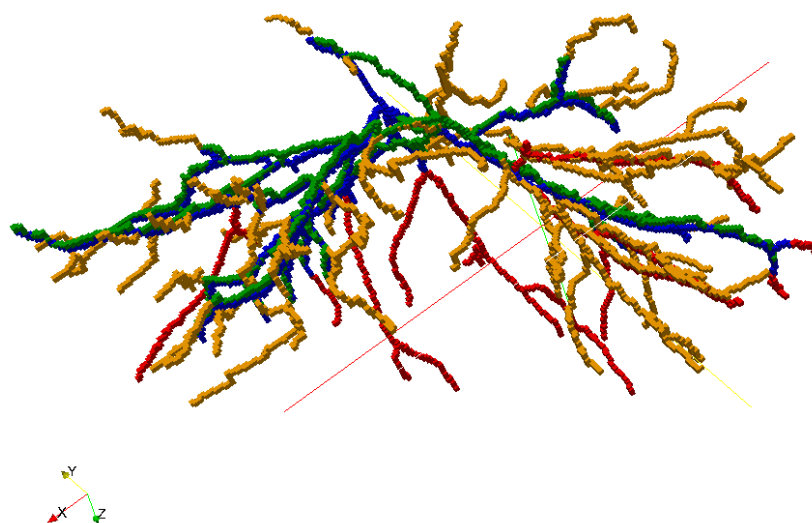
Rysunek 7.11: Porównanie szkieletów komórki ze stosu A3 (komórka 2) otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.



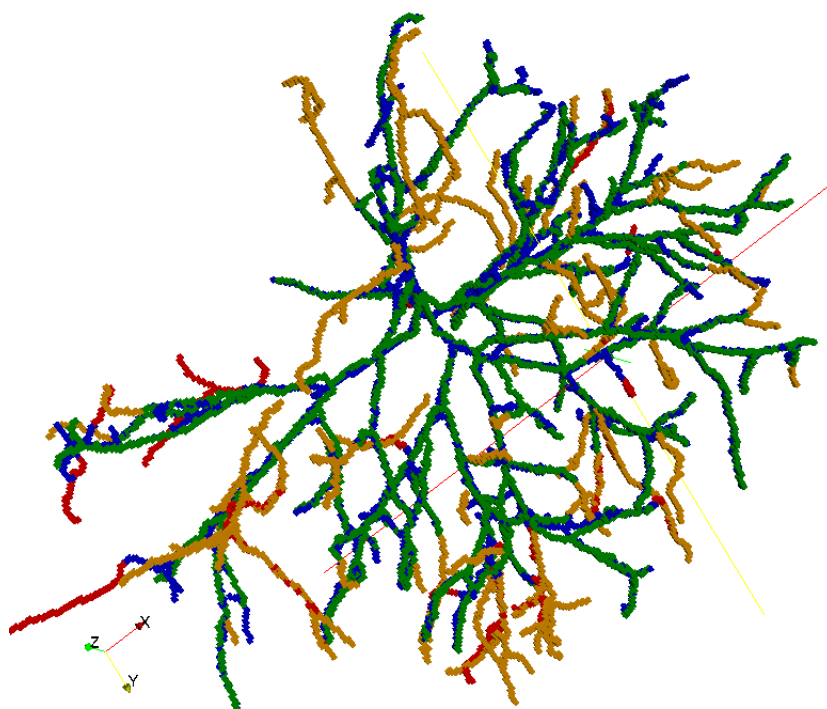
Rysunek 7.12: Porównanie szkieletów komórki ze stosu B1 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.



Rysunek 7.13: Porównanie szkieletów komórki ze stosu B2 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.



Rysunek 7.14: Porównanie szkieletów komórki ze stosu B3 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.



Rysunek 7.15: Porównanie szkieletów komórki ze stosu B4 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.

wym.

Aby sprawdzić stopień pokrycia się porównywanych szkieletów, obliczono ich długości oraz długości ich pokrywających się fragmentów. Za długość szkieletu przyjęto tutaj sumaryczną długość jego krawędzi w reprezentującej go strukturze SWC. W tabeli 7.1 zostały zebrane wyniki porównania długości dopasowanego fragmentu szkieletu do jego całkowitej długości. Wyniki otrzymane dla obrazów B1 i B3 są wyraźnie gorsze niż dla pozostałych danych. Jest to spowodowane bardzo małą rozdzielczością tych obrazów w osi Z. Podobna sytuacja ma miejsce dla stosu B4. Jego rozdzielczość wzdłuż osi Z jest wyraźnie lepsza niż stosów B1 i B3, lecz nadal jest ona zbyt niska. W pozostałych przypadkach, tj. dla komórek ze zbiorów A3 i B2, automatyczna rekonstrukcja była w stanie prawidłowo wykryć co najmniej 75% struktury komórki.

Braki w automatycznie otrzymanych szkieletach są głównie spowodowane poprzez nierównomierne wybarwienie cytoszkieletu komórek. Dotyczy to w szczególności cieńszych wypustek cytoszkieletu, gdzie niewielki brak w wybarwieniu powoduje "ucięcie" gałęzi w otrzymanym w wyniku automatycznej rekonstrukcji szkielecie. Fragmenty automatycznie zrekonstruowanego szkieletu, których nie ma w ręcznie wyznaczonym szkielecie, są w rzeczywistości fragmentami szkieletu innych komórek, lub prawidłowymi gałęziami szkieletu, które nie zostały wykryte przez operatora.

Rozdział 8

Podsumowanie

8.1 Wnioski końcowe

W całej niniejszej pracy konsekwentnie zmierzano do udowodnienia tezy przedstawionej w podrozdziale 1.1, która brzmiała:

Za pomocą opracowanych algorytmów przetwarzania obrazów, możliwa jest automatyczna, trójwymiarowa rekonstrukcja struktur komórek glejowych mózgu. Danymi wejściowymi, przyjmowanymi przy tym przetwarzaniu, są serie dwuwymiarowych obrazów, będących zdjęciami preparatu histologicznego tkanki mózgowej. Wykorzystane zdjęcia pochodzą z mikroskopu konfokalnego.

Tezę tę dowodzono w sposób konstruktywny, to znaczy w ramach pracy zaprojektowano, zaimplementowano i przetestowano system do automatycznej, trójwymiarowej rekonstrukcji struktury komórek glejowych mózgu. Rekonstrukcji dokonywano na podstawie stosów obrazów, otrzymanych za pomocą mikroskopu konfokalnego. Stworzony system, będący najważniejszym praktycznym osiągnięciem pracy został zaprojektowany pod kątem automatycznej rekonstrukcji struktury pewnej klasy komórek glejowych mózgu, a konkretnie tak zwanych astrocytów. Rekonstrukcji dokonywano na podstawie dwóch stosów obrazów, będących wynikiem barwienia preparatu w kierunku GFAP i DAPI. Opracowany i zaimplementowany system jest odpowiedzialny za następujące etapy procesu rekonstrukcji struktury komórek glejowych mózgu:

- wstępne przetwarzanie stosów obrazów otrzymanych za pomocą mikroskopu konfokalnego
- ekstrakcja z otrzymanego obrazu 3D pojedynczych astrocytów
- rekonstrukcja struktury 3D znalezionych komórek

Wszystkie te etapy są wykonywane w pełni automatycznie. Wyznaczone struktury wyekstrahowanych komórek mogą być zapisane w postaci plików SWC.

W podrozdziale 7.2 porównano struktury komórek otrzymane za pomocą zaprojektowanego systemu z wynikami ręcznej rekonstrukcji. 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. Jeśli na przykład na długości którejś wypustki znajdował się nie wybarwiony fragment, to doświadczony człowiek, wykonujący rekonstrukcję 3D ręcznie, widząc dalej dalszy ciąg wypustki potrafił zaznaczyć i włączyć do trójwymiarowej rekonstrukcji także tę jej część, która w istocie była całkowicie niewidoczna. Zbudowany w tej pracy system takiej umiejętności nie posiada, więc pojawia się rozbieżność między rekonstrukcją automatyczną i rekonstrukcją ręczną obejmująca nie tylko ten drobny nie wybarwiony poprawnie fragment komórki, ale odcinająca cały dalszy fragment już prawidłowo wybarwionej wypustki, które jednak nie jest dołączona do budowanej rekonstrukcji i daje (między innymi) ten pozornie wysoki poziom rozbieżności między rekonstrukcją ręczną i automatyczną.

W istocie jednak porównanie wyników działania opiniowanego systemu oraz wyników pracy eksperta, możliwe do przeprowadzenia na podstawie przykładowych wyników pokazanych w rozdziale 7, dowodzi użyteczności stworzonego systemu. W przypadku korzystania z oprogramowania stworzonego w ramach tej pracy wynik (w postaci potrzebnego cytoszkieletu komórki) uzyskuje się całkowicie automatycznie, podczas gdy uzyskanie tego samego rezultatu za pomocą pracy ręcznej wymaga od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin bardzo uciążliwej pracy człowieka.

Co więcej, wynik automatycznej rekonstrukcji często pozwalał na znalezienie fragmentów struktury pominiętych podczas ręcznej rekonstrukcji. Otrzymane rezultaty pozwalają stwierdzić, że na podstawie odpowiednio wykonanych stosów zdjęć preparatu histologicznego tkanki mózgowej, możliwa jest automatyczna, trójwymiarowa rekonstrukcja struktur astrocytów. W związku z powyższym można stwierdzić, że teza pracy przedstawiona w podrozdziale 1.1 została udowodniona.

8.2 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 w podrozdziałach 5.1 oraz 6.1. Przykładowe wyniki zostały przedstawione w rozdziale 7. 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 - podrozdział 5.2

- Algorytm służący do wyznaczania położenia i wielkości jąder komórkowych na obrazie 3D, otrzymanym z preparatu wybarwionego przez DAPI - podrozdział 6.2
- Algorytm ekstrakcji drzew (tj. grafów acyklicznych) reprezentujących struktury poszczególnych komórek glejowych z binarnego obrazu 3D, otrzymanego z preparatu wybarwionego przez GFAP - podrozdział 6.4

Całkowicie własnym opracowaniem jest też całe stworzone oprogramowanie oraz wszystkie wyniki jego badań, opisanych w rozdziale 7.

Na marginesie tego ostatniego osiągnięcia podkreślić należy, że tworzona przez system rekonstrukcja komórki glejowej jest trójwymiarowa. Jest to najważniejsza cecha tego systemu. Ale porównywanie ze sobą tworów trójwymiarowych nie jest łatwe. W celu zobrazowania otrzymanych wyników, szkielety największych zrekonstruowanych komórek zostały nałożone na podane na wejściu stosy. Otrzymane w ten sposób obrazy 3D zostały zrzutowane na płaszczyznę XY. Odzwierciedla to wynik pracy, ale trzeba pamiętać, że jest to tylko efekt rzutowania na płaszczyznę, a prawdziwy wynik jest znacznie bardziej wyrafinowany. Na podstawie tak przygotowanych obrazów 2D nie można było dokonać pełnej weryfikacji otrzymanych wyników, dlatego były one oceniane obliczeniowo metodą opisaną w podrozdziale 7.2. Metoda ta nie ocenia jednak ogólnej zgodności kształtów (co jak się wydaje zostało osiągnięte), lecz wymaga ich literalnej identyczności. Ułatwiło to ilościowe wyrażanie wyników ewaluacji (patrz tabela 7.1), jednak prowadziło do ocen numerycznych gorszych, niż ogólne wrażenie wzrokowe.

8.3 Sugerowane kierunki dalszych badań

Jak przedstawiono wyżej, aktualna zgodność wyników segmentacji ręcznej i automatycznej jest na poziomie 75%. Uzasadniano, że wynik ten na obecnym etapie można uznać za zadowalający, ale pożądane są dalsze badania, mające na celu jego dalsze polepszenie. W zaproponowanym systemie do wykonania automatycznej rekonstrukcji struktury komórek glejowych potrzebne są dwa stosy obrazów, wykonane dla tego samego skrawka preparatu. Jeden z nich musi być wynikiem barwienia preparatu przez fluorochrom DAPI, a drugi z wynikami barwienia preparatu w kierunku GFAP. Akwizycja obrazów, będących danymi wejściowymi do systemu, musi być wykonana z odpowiednią rozdzielczością, zarówno w płaszczyźnie XY jak i wzdłuż osi Z. Dalsze prace mogą zmierzać do złagodzenia stopnia rygorystyczności przedstawionych warunków.

Bibliografia

- [1] Abdul-Karim M., Al-Kofahi K., Brown E.B., Jain R.K., Roysam B. Automated tracing and change analysis of angiogenic vasculature from in vivo multiphoton confocal image time series. *Microvascular Research*, 66, 113–125, 2003.
- [2] Abdul-Karim M., Roysam B., Dowell-Mesfin N., Jeromin A., Yuksel M., Kalyanaraman S. Automatic selection of parameters for vessel/neurite segmentation algorithms. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14, 1338–1350, 2005.
- [3] Adiga P.S.U., Chaudhuri B.B. Some efficient methods to correct confocal images for easy interpretation. *Micron*, 32, 363–370, 2000.
- [4] Ahmed Z., Mazibrada G., Seabright R.J., Dent R.G., Berry M., Logan A. TACE-induced cleavage of NgR and p75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *The FASEB Journal*, 20, 1939–1941, 2006.
- [5] Al-Kofahi K., Can A., Lasek S., Szarowski D., Dowell-Mesfin N., Shain W., Turner J., Roysam B. Median-based robust algorithms for tracing neurons from noisy confocal microscope images. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 7, 302–317, 2003.
- [6] Al-Kofahi K., Lasek S., Szarowski D., Pace C., Nagy G., Turner J., Roysam B. Rapid automated three-dimensional tracing of neurons from confocal image stacks. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 6, 171–187, 2002.
- [7] Al-Kofahi O., Radke R., Roysam B., Banker G. Automated semantic analysis of changes in image sequences of neurons in culture. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 53, 1109–1123, 2006.
- [8] Al-Kofahi Y., Dowell-Mesfin N., Pace C., Shain W., Turner J.N., Roysam B. Improved detection of branching points in algorithms for automated neuron tracing from 3D confocal images. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73, 36–43, 2008.
- [9] Andersson P.B., Perry V.H., Gordon S. The kinetics and morphological characteristics of the macrophage-microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience*, 42, 201–214, 1991.

- [10] Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22, 208–215, 1999.
- [11] Arulampalam S., Maskell S., Gordon N., Clapp T. A Tutorial on Particle Filters for On-line Non-linear/Non-Gaussian Bayesian Tracking. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 50, 188–174, 2002.
- [12] Ascoli G.A., Donohue D.E., Halavi M. NeuroMorpho.Org: a central resource for neuronal morphologies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27, 9247–9251, 2007.
- [13] Ballard D. Generalizing the Hough transform to detect arbitrary shapes. *Pattern Recognition*, 13, 111–122, 1981.
- [14] Bear M.F. Therapeutic implications of the mGluR theory of fragile X mental retardation. *Genes, Brain, and Behavior*, 4, 393–398, 2005.
- [15] Bertero M., Boccacci P. Image deconvolution. *From Cells to Proteins: Imaging Nature across Dimensions, NATO Security Through Science Series. Subseries B: Physics and Biophysics*, tom 3, 349–370. Springer, 2005.
- [16] Bieniecki W. Nowe algorytmy przetwarzania obrazów w wizyjnych systemach komputerowych wspomagających diagnostykę patomorfologiczną, 2005.
- [17] Bieniecki W., Grabowski S. Multi-pass approach to adaptive thresholding based image segmentation. *Proceedings of the 8th. International IEEE Conference CADSM 2005*, 418–423. Lviv-Slavske, Ukraina, 2005.
- [18] Biran R., Martin D.C., Tresco P.A. The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 82, 169–178, 2007.
- [19] Bjornsson C.S., Lin G., Al-Kofahi Y., Narayanaswamy A., Smith K.L., Shain W., Roysam B. Associative image analysis: a method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 170, 165–178, 2008.
- [20] Bloom F.E., Young W., Nimchinsky E., Hof P., Morrison J. Neuronal vulnerability and informatics in human disease. *Neuroinformatics*, 83–123. Routledge, 1997.
- [21] Blum H., Dunn W. A Transformation for Extracting New Descriptors of Shape. *Models for the Perception of Speech and Visual Form*, 362–380. MIT Press, 1967.
- [22] Bochenek A., Reicher M. *Anatomia człowieka*, tom 4. Warszawa Wydawnictwo Lekarskie PZWL, piąte wydanie, 2007.
- [23] Borgefors G., Nyström I., Baja G.S.D. Computing skeletons in three dimensions. *Pattern Recognition*, 32, 1225–1236, 1999.

- [24] Bovic A., Aggarwal S., Merchant F., Kim N., Diller K. Automatic area and volume measurements from digital biomedical images. *Image Analysis*, 23–64. CRC Press, 2001.
- [25] Bower J. *The book of GENESIS : exploring realistic neural models with the GEneral NEural Simulation System*. TELOS, Santa Clara Calif., drugie wydanie, 1998.
- [26] Bradbury S., Evenett P. *Contrast techniques in light microscopy*. Garland Publishing, (Oxford, UK), pierwsze wydanie, 1996.
- [27] Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Stella A.M.G. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8, 766–775, 2007.
- [28] Can A., Al-Kofahi O., Lasek S., Szarowski D.H., Turner J.N., Roysam B. Attenuation correction in confocal laser microscopes: a novel two-view approach. *Journal of Microscopy*, 211, 67–79, 2003.
- [29] Capowski J.J., Johnson E.M. A simple hidden line removal algorithm for serial section reconstruction. *Journal of Neuroscience Methods*, 13, 145–152, 1985.
- [30] 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.
- [31] Condron B. A Freeware Java Tool for Spatial Point Analysis of Neuronal Structures. *Neuroinformatics*, 6, 57–61, 2008.
- [32] da Fontoura Costa L., Cesar R.M. *Shape analysis and classification*. CRC Press, 2001.
- [33] Daube-Witherspoon M.E., Muehllehner G. An Iterative Image Space Reconstruction Algorithm Suitable for Volume ECT. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 5, 61–66, 1986.
- [34] de Monvel J.B., Scarfone E., Calvez S.L., Ulfendahl M. Image-Adaptive Deconvolution for Three-Dimensional Deep Biological Imaging. *Biophysical Journal*, 85, 3991–4001, 2003.
- [35] Dickinson M.E., Bearman G., Tille S., Lansford R., Fraser S.E. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques*, 31, 1272, 1274–1276, 1278, 2001.
- [36] Diggle P. Statistical Analysis of Spatial Point Patterns. *International Journal of Geographical Information Science*, 18, 105, 2004.
- [37] Drewa T., Wolski Z., Łysik J. Diagnostyka chorób układu moczowego przy użyciu sond fluorescencyjnych oraz metody hybrydyzacji in situ. *Urologia Polska*, 2007.
- [38] Duda R.O., Hart P.E. Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures. 15, 11–15, 1972.

- [39] Duijnhouwer J., Remme M., van Ooyen A., van Pelt J. Influence of dendritic topology on firing patterns in model neurons. *Neurocomputing*, 183–189, 2001.
- [40] Dusch E., Vincent N., Genovesio A. 3D Fluorescent Spots Detection in Line-Scanning Confocal Microscopy. *Proceedings of the International Conference on Image Processing, ICIP 2007*, tom 6, VI-241 – VI-244. IEEE, San Antonio, Texas, USA, 2007.
- [41] Egner A., Hell S.W. Equivalence of the HuygensFresnel and Debye approach for the calculation of high aperture point-spread functions in the presence of refractive index mismatch. *Journal of Microscopy*, 193, 244–249, 1999.
- [42] Fabbri R., da Costa L.F., Torelli J.C., Bruno O.M. 2D Euclidean Distance Transform Algorithms: A Comparative Survey. *ACM Computing Surveys*, 1, 2:1–2:44, 2008.
- [43] Fernandez-Gonzalez R., Jones A., Garcia-Rodriguez E., Chen P.Y., Idica A., Lockett S.J., Barcellos-Hoff M.H., Ortiz-De-Solorzano C. System for combined three-dimensional morphological and molecular analysis of thick tissue specimens. *Microscopy Research and Technique*, 59, 522–530, 2002.
- [44] Fix J.D. *Neuroanatomia*. Urban & Partner Wydawnictwo Medyczne, 2002.
- [45] Fournier A.E., Gould G.C., Liu B.P., Strittmatter S.M. Truncated Soluble Nogo Receptor Binds Nogo-66 and Blocks Inhibition of Axon Growth by Myelin. *Journal of Neuroscience*, 22, 8876–8883, 2002.
- [46] Frigo M., Johnson S. The Design and Implementation of FFTW3. *Proceedings of the IEEE*, 93, 216–231, 2005.
- [47] Gang L., Chutatape O., Krishnan S.M. Detection and measurement of retinal vessels in fundus images using amplitude modified second-order Gaussian filter. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 49, 168–172, 2002.
- [48] Ganong W. *Fizjologia lekarska*. Warszawa Wydawnictwo Lekarskie PZWL, pierwsze wydanie, 2007.
- [49] Garini Y., Young I.T., McNamara G. Spectral imaging: principles and applications. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69, 735–747, 2006.
- [50] Gibson S.F., Lanni F. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 8, 1601–1613, 1991.
- [51] Glaser J.R., Glaser E.M. Neuron imaging with Neurolucida—a PC-based system for image combining microscopy. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 14, 307–317, 1990.

- [52] Gołąb B. *Anatomia czynnościowa ośrodkowego układu nerwowego*. Wydawnictwo Lekarskie, piąte wydanie, 2004.
- [53] He W., Hamilton T.A., Cohen A.R., Holmes T.J., Pace C., Szarowski D.H., Turner J.N., Roysam B. Automated three-dimensional tracing of neurons in confocal and brightfield images. *Microscopy and Microanalysis*, 9, 296–310, 2003.
- [54] Herman G.T. *Geometry of digital spaces*. Springer, 1998.
- [55] Hilgetag C., Barbas H. Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Structure and Function*, 213, 365–366, 2009.
- [56] Hines M. The NEURON simulation program. *Neural Network Simulation Environments*, 147–163. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, 1994.
- [57] Holmes T.J., O’connor N.J. Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs. *Journal of Microscopy*, 200, 114–127, 2000.
- [58] Howard C., Reed M. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. *Trends in Neurosciences*, 22, 94–95, 1999.
- [59] Howard M.A., Roberts N., García-Fiñana M., Cowell P.E. Volume estimation of prefrontal cortical subfields using MRI and stereology. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 10, 125–138, 2003.
- [60] Howard V., Reid S., Baddeley A., Boyde A. Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *Journal of Microscopy*, 138, 203–212, 1985.
- [61] Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer’s disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5, 347–360, 2004.
- [62] Jackins C., Tanimoto S. Oct-trees and their use in representing three-dimensional objects. *Computer Graphics and Image Processing*, 14, 249–270, 1980.
- [63] Jaco A.D., Augusti-Tocco G., Biagioni S. Alternative acetylcholinesterase molecular forms exhibit similar ability to induce neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Research*, 70, 756–765, 2002.
- [64] Jaeger D. Accurate reconstruction of neuronal morphology. *Computational neuroscience*, 159–177. CRC Press, 2001.
- [65] Joshi S., Miller M.I. Maximum a posteriori estimation with Good’s roughness for three-dimensional optical-sectioning microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 10, 1078–1085, 1993.
- [66] Juskaitis R., Wilson T., Neil M.A., Kozubek M. Efficient real-time confocal microscopy with white light sources. *Nature*, 383, 804–806, 1996.
- [67] Júnior R.M.C., da F Costa L. Neural cell classification by wavelets and multiscale curvature. *Biological Cybernetics*, 79, 347–360, 1998.

- [68] Kim Y.S., Joh T.H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 38, 333–347, 2006.
- [69] Kimelberg H.K. The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45, 191–202, 2004.
- [70] Kittler J., Illingworth J., Föglein J. Threshold selection based on a simple image statistic. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 30, 125–147, 1985.
- [71] Kleene R., Yang H., Kutsche M., Schachner M. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 21656–21663, 2001.
- [72] Klette G. Branch Voxels and Junctions in 3D Skeletons. *Combinatorial Image Analysis, Lecture Notes in Computer Science*, tom 4040/2006, 34–44. Springer Berlin / Heidelberg, 2006.
- [73] 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.
- [74] Klette G., Pan M. Characterization of Curve-Like Structures in 3D Medical Images. Technical Report 172, CITR, The University of Auckland, New Zealand, 2005.
- [75] Koh I.Y.Y., Lindquist W.B., Zito K., Nimchinsky E.A., Svoboda K. An Image Analysis Algorithm for Dendritic Spines. *Neural Computation*, 14, 1283–1310, 2002.
- [76] Koprivica V., Cho K., Park J.B., Yiu G., Atwal J., Gore B., Kim J.A., Lin E., Tessier-Lavigne M., Chen D.F., He Z. EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science (New York, N.Y.)*, 310, 106–110, 2005.
- [77] Kozubek M., Matula P., Matula P., Kozubek S. Automated acquisition and processing of multidimensional image data in confocal in vivo microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 64, 164–175, 2004.
- [78] Lange K., Carson R. EM reconstruction algorithms for emission and transmission tomography. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 8, 306–316, 1984.
- [79] Leandro J., Cesar-Jr R., Costa L.F. Automatic contour extraction from 2D neuron images. *Journal of Neuroscience Methods*, 177, 497–509, 2009.
- [80] Lin G., Adiga U., Olson K., Guzowski J.F., Barnes C.A., Roysam B. A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 56, 23–36, 2003.

- [81] Lin G., Bjornsson C.S., Smith K.L., Abdul-Karim M., Turner J.N., Shain W., Roysam B. Automated image analysis methods for 3-D quantification of the neurovascular unit from multichannel confocal microscope images. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 66, 9–23, 2005.
- [82] Lin G., Chawla M.K., Olson K., Barnes C.A., Guzowski J.F., Bjornsson C., Shain W., Roysam B. A multi-model approach to simultaneous segmentation and classification of heterogeneous populations of cell nuclei in 3D confocal microscope images. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71, 724–736, 2007.
- [83] Lucy L.B. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal*, 79, 745, 1974.
- [84] Markham J., Conchello J. Parametric blind deconvolution: a robust method for the simultaneous estimation of image and blur. *Journal of the Optical Society of America A*, 16, 2377–2391, 1999.
- [85] Mouton P.R. *Principles and practices of unbiased stereology*. JHU Press, 2002.
- [86] Nasse M.J., Woehl J.C., Huant S. High-resolution mapping of the three-dimensional point spread function in the near-focus region of a confocal microscope. *Applied Physics Letters*, 90, 031106, 2007.
- [87] Nasuto S., Knappe R., Krichmar J., Ascoli G. Relation between neuronal morphology and electrophysiology in the kainate lesion model of Alzheimer’s disease. *Neurocomputing*, 1477–1487, 2001.
- [88] Nixdorf-Bergweiler B.E., Albrecht D., Heinemann U. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, 12, 180–195, 1994.
- [89] Orłowski D., Soltys Z., Janeczko K. Morphological development of microglia in the postnatal rat brain. A quantitative study. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 21, 445–450, 2003.
- [90] Palágyi K., Kuba A. A 3D 6-subiteration thinning algorithm for extracting medial lines. *Pattern Recognition Letters*, 19, 613–627, 1998.
- [91] Pan M., Klette G. A Revision of a 3D Skeletonization Algorithm. Technical Report 143, CITR, The University of Auckland, New Zealand, 2004.
- [92] Pankajakshan P., Zhang B., Blanc-Feraud L., Kam Z., Olivo-Marin J., Zerubia J. Parametric Blind Deconvolution for Confocal Laser Scanning Microscopy. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE*, 6531–6534, 2007.
- [93] Pawliczek P., Romanowska-Pawliczek A., Soltys Z. Parallel deconvolution of large 3D images obtained by confocal laser scanning microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 73, 187–194, 2010.

- [94] Pierro A.R.D. On the Convergence of the Iterative Image Space Reconstruction Algorithm for Volume ECT. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 6, 174–175, 1987.
- [95] Pool M., Thiemann J., Bar-Or A., Fournier A.E. NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Methods*, 168, 134–139, 2008.
- [96] Richardson W.H. Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration. *Journal of the Optical Society of America*, 62, 55–59, 1972.
- [97] Ridler T., Calvard S. Picture thresholding using an interactive selection method. *IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics*, 1065. Institute of Electrical and Electronic[s] Engineers, 1989.
- [98] Rodriguez A., Ehlenberger D., Kelliher K., Einstein M., Henderson S.C., Morrison J.H., Hof P.R., Wearne S.L. Automated reconstruction of three-dimensional neuronal morphology from laser scanning microscopy images. *Methods (San Diego, Calif.)*, 30, 94–105, 2003.
- [99] Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dickstein D.L., Hof P.R., Wearne S.L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PloS One*, 3, e1997, 2008.
- [100] Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Hof P.R., Wearne S.L. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nature Protocols*, 1, 2152–2161, 2006.
- [101] Rost F.W.D., Oldfield R.J. *Photography with a Microscope*. Cambridge University Press, 2000.
- [102] Rothaus K., Jiang X., Rhiem P. Separation of the retinal vascular graph in arteries and veins based upon structural knowledge. *Image and Vision Computing*, 27, 864–875, 2009.
- [103] Rothaus K., Rhiem P., Jiang X. Separation of the Retinal Vascular Graph in Arteries and Veins. *Graph-Based Representations in Pattern Recognition, Lecture Notes in Computer Science*, tom 4538/2007, 251–262. Springer, 2007.
- [104] Russ J.C. *The image processing handbook*. CRC Press, 2007.
- [105] Russ J.C., DeHoff R.T. *Practical stereology*. Springer, 2000.
- [106] Sahoo P., Soltani S., Wong A., Chen Y. A survey of thresholding techniques. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 41, 233–260, 1988.
- [107] Sakurai T., Lustig M., Nativ M., Hemperly J.J., Schlessinger J., Peles E., Grumet M. Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *The Journal of Cell Biology*, 136, 907–918, 1997.

- [108] Samsonovich A.V., Ascoli G.A. Morphological homeostasis in cortical dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1569–1574, 2006.
- [109] Sarti A., de Solórzano C.O., Lockett S., Malladi R. A geometric model for 3-D confocal image analysis. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 47, 1600–1609, 2000.
- [110] Schaefer A.T., Larkum M.E., Sakmann B., Roth A. Coincidence detection in pyramidal neurons is tuned by their dendritic branching pattern. *Journal of Neurophysiology*, 89, 3143–3154, 2003.
- [111] Schmitt S., Evers J.F., Duch C., Scholz M., Obermayer K. New methods for the computer-assisted 3-D reconstruction of neurons from confocal image stacks. *NeuroImage*, 23, 1283–1298, 2004.
- [112] Scorcioni R., Ascoli G. Algorithmic Extraction of Morphological Statistics from Electronic Archives of Neuroanatomy. *Connectionist Models of Neurons, Learning Processes, and Artificial Intelligence*, 30–37. 2001.
- [113] Scorcioni R., Polavaram S., Ascoli G.A. L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nature Protocols*, 3, 866–876, 2008.
- [114] Scorcioni R., Wright S.N., Card J.P., Ascoli G.A., Barrionuevo G. Point Analysis in Java applied to histological images of the perforant pathway: a user’s account. *Neuroinformatics*, 6, 63–67, 2008.
- [115] Serra J.P., Soille P. *Mathematical morphology and its applications to image processing*. Kluwer Academic Publishers, 1994.
- [116] Seymour J.P., Kipke D.R. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials*, 28, 3594–3607, 2007.
- [117] Sezgin M., Sankur B. A Survey Over Image Thresholding Techniques And Quantitative Performance Evaluation. *Journal of Electronic Imaging*, 13, 146–165, 2004.
- [118] Shepp L.A., Vardi Y. Maximum Likelihood Reconstruction for Emission Tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 1, 113–122, 1982.
- [119] Sheppard C.J.R., Török P. Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *Journal of Microscopy*, 185, 366–374, 1997.
- [120] Sheppard C.J.R., Török P. An electromagnetic theory of imaging in fluorescence microscopy, and imaging in polarization fluorescence microscopy. *Bioimaging*, 5, 205–218, 1997.
- [121] Slezak M., Pfrieder F.W., Soltys Z. Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *Journal of Physiology, Paris*, 99, 84–91, 2006.
- [122] Smirnova I.V., Citron B.A., Arnold P.M., Festoff B.W. Neuroprotective signal transduction in model motor neurons exposed to thrombin: G-protein modulation effects on neurite outgrowth, Ca(2+) mobilization, and apoptosis. *Journal of Neurobiology*, 48, 87–100, 2001.

- [123] Soltys Z., Janeczko K., Orzyłowska-Sliwińska O., Zaremba M., Januszewski S., Oderfeld-Nowak B. Morphological transformations of cells immunopositive for GFAP, TrkA or p75 in the CA1 hippocampal area following transient global ischemia in the rat. A quantitative study. *Brain Research*, 987, 186–193, 2003.
- [124] Soltys Z., Orzyłowska-Sliwinska O., Zaremba M., Orlowski D., Piechota M., Fiedorowicz A., Janeczko K., Oderfeld-Nowak B. Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 146, 50–60, 2005.
- [125] Soltys Z., Ziaja M., Pawliński R., Setkowicz Z., Janeczko K. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *Journal of Neuroscience Research*, 63, 90–97, 2001.
- [126] Spataro L., Dilgen J., Retterer S., Spence A.J., Isaacson M., Turner J.N., Shain W. Dexamethasone treatment reduces astroglia responses to inserted neuroprosthetic devices in rat neocortex. *Experimental Neurology*, 194, 289–300, 2005.
- [127] Tadeusiewicz R., Flasiński M. *Rozpoznawanie obrazów*. Problemy Współczesnej Nauki i Techniki. Informatyka. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1991.
- [128] Tadeusiewicz R., Korohoda P. *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji, 1997.
- [129] Tadeusiewicz R., Ogiela M., Szczepaniak P. Notes on a Linguistic Description as the Basis for Automatic Image Understanding. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 19, 143–150, 2009.
- [130] Traczyk W.Z., Trzebski A. *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. PZWŁ, trzecie wydanie, 2007.
- [131] Tyrrell J.A., di Tomaso E., Fuja D., Tong R., Kozak K., Jain R.K., Roy-sam B. Robust 3-D modeling of vasculature imagery using superellipsoids. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 26, 223–237, 2007.
- [132] Török P., Varga P., Booker G.R. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. I. *Journal of the Optical Society of America A*, 12, 2136–2144, 1995.
- [133] Török P., Varga P., Laczik Z., Booker G.R. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation. *Journal of the Optical Society of America A*, 12, 325–332, 1995.
- [134] Török P., Varga P., Németh G. Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices. *Journal of the Optical Society of America A*, 12, 2660–2671, 1995.

- [135] Verkhatsky A., Butt A. *Glial Neurobiology: A Textbook*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [136] Verveer P.J., Jovin T.M. Efficient superresolution restoration algorithms using maximum a posteriori estimations with application to fluorescence microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 14, 1696, 1997.
- [137] Visser T.D., Wiersma S.H. Electromagnetic description of image formation in confocal fluorescence microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 11, 599–608, 1994.
- [138] Wearne S.L., Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Rocher A.B., Henderson S.C., Hof P.R. New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience*, 136, 661–680, 2005.
- [139] Weaver C.M., Hof P.R., Wearne S.L., Lindquist W.B. Automated algorithms for multiscale morphometry of neuronal dendrites. *Neural Computation*, 16, 1353–1383, 2004.
- [140] Wiersma S.H., Visser T.D. Defocusing of a converging electromagnetic wave by a plane dielectric interface. *Journal of the Optical Society of America A*, 13, 320, 1996.
- [141] Wink O., Niessen W.J., Viergever M.A. Multiscale vessel tracking. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 23, 130–133, 2004.
- [142] Wojtera M., Sikorska B., Sobow T., Liberski P.P. Microglial cells in neurodegenerative disorders. *Folia Neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*, 43, 311–321, 2005.
- [143] Xiong G., Zhou X., Degterev A., Ji L., Wong S.T.C. Automated neurite labeling and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69, 494–505, 2006.
- [144] Yonghong X., Qiang J. A New Efficient Ellipse Detection Method. *Proceedings. 16th International Conference on Pattern Recognition, 2002.*, 2, 957–960, 2002.
- [145] Yoo H., Song I., Gweon D. Measurement and restoration of the point spread function of fluorescence confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 221, 172–176, 2006.
- [146] Young W., Nimchinsky E., Hof P., Morrison J., Bloom F. *NeuroZoom Software User Guide and Reference Books*. NeuroZoom Software User Guide and Reference Books. YBM Inc., San Diego, 1997.
- [147] Zhang W., Duan W., Cheung N.S., Huang Z., Shao K., Li Q. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces translocation of its G-protein-coupled receptor into caveolin-enriched membrane microdomains, leading to enhanced cyclic AMP generation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 103, 1157–1167, 2007.

- [148] Zhang Y., Zhou X., Degterev A., Lipinski M., Adjeroh D., Yuan J., Wong S.T.C. A novel tracing algorithm for high throughput imaging Screening of neuron-based assays. *Journal of Neuroscience Methods*, 160, 149–162, 2007.
- [149] Zhang Y., Zhou X., Witt R.M., Sabatini B.L., Adjeroh D., Wong S.T.C. Dendritic spine detection using curvilinear structure detector and LDA classifier. *NeuroImage*, 36, 346–360, 2007.
- [150] Zhong Y., Bellamkonda R.V. Dexamethasone-coated neural probes elicit attenuated inflammatory response and neuronal loss compared to uncoated neural probes. *Brain Research*, 1148, 15–27, 2007.
- [151] Zhu D., Razaz M., Lee R. A Landweber algorithm for 3D confocal microscopy restoration. *Proceedings of the 17th International Conference on Pattern Recognition, 2004. ICPR 2004.*, tom 1, 552–555. 2004.
- [152] Zimmermann T. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 95, 245–265, 2005.
- [153] Śmietański J., Tadeusiewicz R., Łuczyńska E. Texture analysis in perfusion images of prostate cancer—A case study. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 20, 149–156, 2010.

Spis tablic

3.1	Zestawienie algorytmów do dekonwolucji bazujących na podejściu <i>Maximum Likelihood</i>	49
4.1	Obrazy wykorzystane w pracy	59
5.1	Parametry stosów po przeskalowaniu	71
5.2	Wartości parametrów użytych przy estymacji obrazów PSF	75
5.3	Kroki wykonywane w pojedynczej iteracji algorytmu Richardson-Lucy z regularyzacją Conchello	77
5.4	Czas trwania dekonwolucji wybranych obrazów 3D z obrazem PSF o rozmiarze $61 \times 61 \times 131$	77
6.1	Schemat algorytmu wykrywającego sfery na obrazie 3D.	89
6.2	Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie A3	89
6.3	Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B1	90
6.4	Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B2	90
6.5	Skuteczność wyszukiwania jąder komórkowych w obrazie B3	90
6.6	Schemat algorytmu wyodrębniającego z grafu G poszczególne komórki.	98
6.7	Schemat algorytmu usuwającego nadmiarowe wierzchołki z drzewa reprezentującego pojedynczą komórkę.	100
7.1	Zgodność szkieletu komórek zrekonstruowanych ręcznie i automatycznie	106

Spis rysunków

1.1	Mikroskop konfokalny Zeiss 510 META	14
1.2	Seria obrazów ze stosu zdjęć z mikroskopu konfokalnego	18
3.1	Taksonomia metod wyznaczania progu przy binaryzacji obrazu wg. [16]	33
3.2	Maski Sobela, strzałki pokazują gradient “wykrywany” przez każdą z masek.	39
3.3	Przykład działania erozji i dylatacji na czarno-białym obrazie o 255 poziomach szarości.	42
3.4	Przykład działania operacji otwarcia i domknięcia na czarno-białym obrazie o 255 poziomach szarości.	44
3.5	Przykład działania klasycznej transformaty Hough’a do wykrywania na obrazie linii prostych.	46
3.6	Fragment zdjęcia zakłóconego podanymi funkcjami PSF i wyniki jego dekonwolucji metodą Richardson-Lucy.	50
4.1	Schemat działania laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego	52
4.2	Wynik barwienia preparatu w kierunku DAPI (kolor niebieski) i GFAP (kolor zielony).	56
5.1	Schemat wstępnego przetwarzania stosów obrazów	61
5.2	Średnie arytmetyczne wartości pikseli dla kolejnych obrazów ze stosów A3 i B2.	64
5.3	Porównanie histogramów kolejnych obrazów ze stosu A1_gfap przed i po wyrównaniu jasności metodą iloczynów.	66
5.4	Porównanie histogramów kolejnych obrazów ze stosu A1_gfap przed i po wyrównaniu jasności metodą skalowania liniowego.	70
5.5	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez wynik dekonwolucji obrazu DAPI stosu A3. W przedstawionym przykładzie przed dekonwolucją nie wykonano operacji odjęcia tła, co spowodowało powstanie wyraźnych artefaktów przy brzegach obrazu.	72
5.6	Załamanie wiązki światła na granicy preparat-szkło nakrywkowe oraz szkło nakrywkowe-olejek imersyjny	74
5.7	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez obraz PSF obliczony dla barwienia GFAP w wersji zwykłej (lewa strona) i w skali logarytmicznej (prawa strona)	75
5.8	Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos A3_gfap przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania	78

5.9	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos A3_gfap przed (górze) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania	78
5.10	Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos B3_gfap przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania . .	78
5.11	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos B3_gfap przed (górze) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania	79
5.12	Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos A3_dapi przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania . .	79
5.13	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos A3_dapi przed (górze) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania	80
5.14	Przekrój w płaszczyźnie XY przez stos B3_dapi przed (lewa strona) i po (prawa strona) procesie wstępnego przetwarzania . .	80
5.15	Przekrój w płaszczyźnie XZ przez stos B3_dapi przed (górze) i po (dół) procesie wstępnego przetwarzania	81
6.1	Schemat rekonstrukcji komórek	84
6.2	Wynik działania proponowanej metody wykrywania jąder komórkowych dla stosu A3.	90
6.3	Rzut szkieletu otrzymanego z obrazu A2 na płaszczyznę XY. . .	93
6.4	Bezpośredni wynik działania algorytmu szkieletyzacji dla obrazu A2 (na górze) oraz jego poprawiona wersja otrzymana poprzez zastosowanie opisanego algorytmu redukcji szkieletu (na dole). .	95
6.5	Przykładowy fragment szkieletu. Na szaro zaznaczono woksele posiadające więcej niż dwóch sąsiadów.	96
7.1	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A1.	102
7.2	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A2.	103
7.3	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu A3.	104
7.4	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B1.	105
7.5	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B2.	106
7.6	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B3.	107
7.7	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B4.	107
7.8	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B5.	108
7.9	Szkielety zrekonstruowanych komórek ze stosu B6.	108
7.10	Porównanie szkieletów komórki ze stosu A3 (komórka 1) otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	109
7.11	Porównanie szkieletów komórki ze stosu A3 (komórka 2) otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	109
7.12	Porównanie szkieletów komórki ze stosu B1 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	110
7.13	Porównanie szkieletów komórki ze stosu B2 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	110
7.14	Porównanie szkieletów komórki ze stosu B3 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	111
7.15	Porównanie szkieletów komórki ze stosu B4 otrzymanych w drodze ręcznej i automatycznej rekonstrukcji.	111