Escalamiento en la Densidad de Imágenes para una Reconstrucción Tridimensional

Luis Gerardo de la Fraga

Sección de Computación
CINVESTAV-IPN. Departamento de Ingeniería Eléctrica
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. 07300 México, D.F.
E-mail: fraga@cs.cinvestav.mx

Resumen

En este trabajo se presenta la demostración de un procedimiento simplificado para el escalamiento de los valores de los pixels de imágenes de proyección bidimensionales provenientes del microscopio electrónico de transmisión. El escalamiento en la densidad es un paso previo para usar estas imágenes en una reconstrucción 3D de macromoléculas biológicas. El nuevo procedimiento simplificado está sintonizado para imágenes digitalizadas con una cámara CCD. Se presentan resultados de aplicación con volúmenes sintéticos.

Palabras clave: Ajuste de Datos, Procesamiento de Imagen, Reconstrucción 3D.

1 Introducción

Para la realización de una reconstrucción tridimensional de un cuerpo a partir de sus proyecciones bidimensionales, estas proyecciones deben cumplir: 1) Deben estar situadas en un mismo marco de referencia y cubrir lo mejor posible el espacio 3D. Con un "mismo marco de referencia" se quiere decir que los tres ángulos que describen la orientación de cada proyección están especificados en un mismo sistema de coordenadas. 2) Todas las proyecciones comparten un mismo origen de coordenadas, es decir, no existen desplazamientos en los ejes x y y de cada proyección. 3) Las proyecciones deben estar correctamente pesadas, es decir, todas las proyecciones son de un mismo cuerpo 3D. Si no se cumplen cualquiera de estos tres puntos, se causaría una representación distorsionada de la estructura 3D bajo estudio.

En la reconstrucción tridimensional de macromoléculas biológicas, se toman fotografías con el microscopio electrónico de transmisión (las llamadas micrografías) de una preparación de la macromolécula de la que se quiere conocer su estructura. En la micrografía se observan imágenes de proyección de muchas (decenas) macromoléculas, en donde, por principio, suponemos que las imágenes son proyecciones de macromoléculas idénticas. Para la reconstrucción 3D se toman varias micrografías para tener de cientos a miles de estas imágenes de proyección.

En este trabajo vamos a suponer que tenemos los puntos (1), la orientación, y (2), el origen de coordenadas, correctos para todas las proyecciones y nos enfocaremos al punto (3) de los pesos, o escalamiento, de los valores de los pixels de las distintas proyecciones.

Una demostración de los principios de la reconstrucción 3D puede verse en [1, cap. 27]. Un método para corregir desviaciones en la orientación puede verse en [2], y métodos para corregir el origen de coordenadas puede verse en [3].

2 Métodos para el Escalamiento

Una vez cortadas las imágenes individuales del espécimen en las micrografías, el procedimiento general para escalar los pixels es normalizar las proyecciones a una misma media, $\bar{x}$, y desviación estándar, σ, usando la ecuación:

$$D_i' = (D_i - \bar{x})/\sigma \tag{1}$$

donde D_i' son los valores de los pixels normalizados y D_i son los valores de los pixels de la imagen cortada.

Carazo *et al* [4] normalizan las proyecciones a una media de cero y desviación estándar de uno, lo que se consigue calculando $\bar{x}$ y σ de todos los pixels de la proyecciones originales. Schatz *et al* [5] normalizan las proyecciones de una manera semejante, a una densidad cero y una varianza arbitraria de valor 100. Roseman *et al* [6] simplemente mencionan que las proyecciones son normalizadas a una misma media y desviación estándar.

Boisset *et al* [7] realizan un procedimiento de escalamiento que hace uso explícito de la distribución estadística del ruido de fondo. El procedimiento es el siguiente: se asume que el ruido de fondo que rodea a cada partícula tiene la misma distribución estadística. (i) Se usa una porción grande de una de las micrografías para generar un histograma de referencia. (ii) Se realiza otro histograma de las densidades del área alrededor de la partícula, como puede verse en la Fig. 1. (iii) El histograma generado en (ii) es comparado con el de referencia en (i), y los parámetros a y b de una transformación lineal de densidades

$$D_i' = aD_i + b \tag{2}$$

"los parámetros a y b son estimados de tal forma que el histograma de los valores de los pixels transformados, que rodean la partícula, encajan óptimamente con el histograma del campo de referencia (usando una estadística chi-cuadrada como medida de discrepancia)".

2.1 Realización del Escalamiento

El escalamiento en la densidad de la Ec. (2) puede ser realizado de la forma siguiente: Ambos histogramas, el de referencia, $\tilde{h}_{REF}$, (del punto (i) en la sección anterior), y al a ajustar, $\tilde{h}$, (del punto(iii)), al hacerse funciones de frecuencias relativas, pueden considerase funciones de probabilidades de la variable aleatoria X y Y [8], respectivamente.

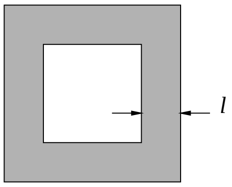


Figura 1: Zona de la proyección donde se considera solo hay ruido y donde se calculan la estadística del mismo (media y d.e.). l es especificado en pixels.

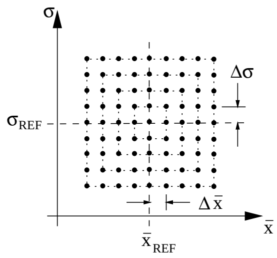


Figura 2: Esquema de la zona de búsqueda de c_1 y c_2 de la Ec. (3), marcados como puntos negros, en el entorno de los puntos iniciales $\bar{x}_{REF}$ y σ_{REF}.

Supongamos ahora que ambas funciones tienen una forma gausiana, por lo que X y Y son normales. La variable aleatoria Y se transformará linealmente a

$$Y' = c_1 Y + c_2 \tag{3}$$

de forma que se minimice

$$\sum_{x_i = y'_i} \left[f_{REF}(x_i) - f(y'_i) \right]^2 \tag{4}$$

En [8, cap. 8] viene demostrado que "bajo una transformación lineal, una variable aleatoria normal se transforma en una variable aleatoria normal" y, entonces, el mínimo de la Ec. (4) se obtiene cuando la media y d.e. de la función a ajustar, $f(y')$, son iguales a la media y d.e. de la función de referencia, $f_{REF}(x)$, lo que se logra haciendo

$$c_1 = \sigma_{REF}/\sigma, \qquad \text{y} \qquad c_2 = \bar{x}_{REF} - c_1 \bar{x} \tag{5}$$

en la Ec. (3). $\bar{x}_{REF}$ y σ_{REF} son respectivamente la media y d.e de la función de referencia y $\bar{x}$ y σ son, respectivamente, la media y d.e. de la función a ajustar. No cambian los valores de todos estos cuatro parámetros si se calculan sobre los histogramas.

Finalmente, comparando las ecuaciones (3) y (2), vemos que $a = c_1$ y $b = c_2$, por lo que no tenemos que hace un ajuste explícito de los histogramas, bajo la suposición que tienen una forma gausiana.

Ahora, si los histogramas no tienen una forma gausiana, podemos aún usar los valores $\bar{x}_{REF}$, σ_{REF}, como puntos iniciales y ajustar $\bar{x}$ y σ por medio de una búsqueda exhaustiva en un entorno alrededor de los puntos iniciales. Este proceso puede visualizarse en el diagrama de la Fig. 2 y se especificará con el pseudocódigo a continuación.

Primero, de forma general, se calcula un histograma con el procedimiento siguiente:

$dmin = \min(D_i)$;
for $0 \leq i < M$ **do**
  $k = \mathrm{int}\left[(D_i - dmin)/\Delta D + 0.5\right]$;
  $h[k]++$;
od

donde M es el número de pixels donde se realiza el histograma h. Para las imágenes a ajustar M tendrá el valor de $4l(N-l)$, donde l es el ancho de la zona de ruido (ver Fig. 1), para una imagen cuadrada de tamaño $N \times N$. El histograma se guarda en un nuevo tipo de dato que incluye el histograma en sí, el mínimo k en $h.\min$, y el máximo k en $h.\max$.

De entrada para el proceso de ajuste se tiene el histograma de referencia $\tilde{h}_{REF}$, se buscará en $2S$ puntos en la d.e. y en $2T$ puntos en la media. La búsqueda en la media de hará en pasos $\Delta\bar{x}$ igual a ΔD, esto es, la búsqueda de la media se realizará en un ancho de paso igual al ancho del paso con que se realizó el histograma. El proceso queda entonces como:

```
for 0 ≤ i < 2S do
    σ' = σ_REF + Δσ(i − S);
    if (σ' < 0.0)
        continue for ;
    fi
    Se calculan c1 y c2 de la Ec. (5)
          sustituyendo σ por σ';
    Se transforma cada pixel de la imagen
          a ajustar a D'_i = c1 D_i + c2;
    Se hace el histograma h'
          de los valores D'_i;
    Se calcula h̃'_i = h_i/[4l(N − l)];
    mintmp = h'.min;
    maxtmp = h'.max;
    for 0 ≤ j < 2T do
        h'.min = mintmp + (j − T);
        h'.max = maxtmp + (j − T);
        error[i, j] =
              calcular_error(h̃', h̃_REF);
    od
od
Se busca el mínimo de error[i, j];
x̄ = x̄_REF + ΔD(j − T);
σ = σ_REF + Δσ(i − S);
```

La función que calcula el error queda como:

```
funct calcular_error(h, h_R)
    tmin = min(h → min, h_R → min);
    tmax = max(h → max, h_R → max);
    error = 0.0;
    for tmin ≤ i ≤ tmax do
        k = i − h → min;
        l = i − h_R → min;
        if (k < 0 AND i > h → max)
            error + = h_R^2[l];
        elsif (l < 0 AND i > h_R → max)
            error + = h^2[k];
        else
            error + = (h[k] − h_R[l])^2 ;
        fi
    od
    return error;
```

3 Procedimiento Simplificado

El procedimiento de escalamiento de la Ec. (2) fue aplicado a micrografías digitalizadas en un microdensitómetro Perkin Elmer. Este aparato cuenta con una calibración absoluta de la densidad cero para cada micrografía, lo que justifica los pasos (i) e (iii) del procedimiento. Sin embargo, al digitalizar con una cámara CCD, no tenemos control sobre un valor de calibración absoluto entre las digitalizaciones de varias micrografías, i.e. el valor de densidad cero tiene distinto significado entre micrografías. Además, al aplicar el procedimiento de la sec. 2.1, a 220 imágenes provenientes de una misma micrografía, todas las soluciones a $\bar{x}$ y σ fueron iguales a los parámetros de referencia $\bar{x}_{REF}$ y σ_{REF}, lo que demuestra que los histogramas son gausianas. Entonces, lo que se puede hacer, es confiar en la estadística del ruido (ver Fig. 1) para cada proyección y normalizar todos sus pixels a una media cero y una desviación de 1. Esto se consigue simplemente haciendo $\bar{x}_{REF} = 0$ y $\sigma_{REF} = 1$ en la Ec. (5), y sustituyendo estos valores en la Ec. (2) (con $a = c_1$ y $b = c_2$), nos queda:

$$D'_i = (D_i - \bar{x})/\sigma \qquad (6)$$

que es la misma que la Ec. (1) pero $\bar{x}$ y σ son calculadas sólo con los pixels del borde de la imagen, que se considera la zona de ruido.

La aplicación del proceso se hizo sobre un micrografía preparada por crio-congelación. Esta fue digitalizada en una cámara CCD Eikonix modelo 1412, a un profundidad de 12 bits. Los pixels de las imágenes se transformaron a densidad con la relación $D_i = log(1+T_i)$, ya que la cámara CCD registra transmitancia y no densidad óptica, por lo que para el proceso de ajuste se usó $\Delta D = \Delta\bar{x} = \Delta\sigma = 0.005$, y $S = T = 10$. La imágenes fueron de tamaño 64×64 pixels y $l = 10$ pixels.

4 Experimento

Para demostrar la aplicación y resultados del proceso de normalización se realizó el siguiente experimento. Se realizó el fantasma, un volumen sintético, de un tamaño de $64 \times 64 \times 64$ voxels mostrado en la Fig. 3 a una densidad de 1. De este fantasma se realizaron 173 proyecciones de tamaño 64×64 pixels, equiespaciadas a 4° en el espacio 3D [9]. Se generó otro grupo de proyecciones adicionando a cada proyección un ruido gausiano son objeto de tener un nivel fraccional de ruido (nfr) de 0.20 [10]. El nivel de ruido adicionado a cada proyección está expresado como la razón entre la desviación estándar del ruido sumado y el promedio de las amplitudes en la intensidad para todas las imágenes simuladas. Una muestra de las proyecciones generadas a varios nfr se muestra en la Fig. 4.

A partir de las proyecciones con un nfr= 0.20 se generaron otros dos grupos de imágenes, el primero normalizado con el procedimiento antiguo de escalar cada proyección a una media de 0 y desviación estándar de 1, y el segundo grupo de proyecciones normalizado con el nuevo procedimiento presentado en este trabajo de normalizar con respecto a la estadística del ruido en el borde de cada imagen. Con estos tres grupos de proyecciones se realizaron tres reconstrucciones tridimensionales que pueden verse en la Fig. 5. Se usó para la realización de las reconstrucciones la Técnica Algebraica de Reconstrucción (ART, en inglés) [11].

A fin de comparar visualmente los resultados de las reconstrucciones se presenta en la Fig. 6 las imágenes de la rebanada 32 (correspondiente al plano en $z = 31$) de los cinco volúmenes que se han generado: el fantasma, las reconstrucciones a los nfr= 0.00 y nfr= 0.20, y las dos reconstrucciones con los procedimientos antiguo y nuevo de normalización.

Para comparar el efecto de las dos normalizaciones en los valores de la densidad, se presenta, en primera instancia en la Fig. 7, una comparación de los valores de la densidad en la fila 35 (correspondiente a los valores de todos los pixels a lo largo del eje horizontal x en las coordenada donde $y = 34$) de las rebanada 32 del fantasma y las rebanadas 32 de las reconstrucciones a un nfr de 0.00 y 0.20. Y en segunda instancia se presenta la comparación de los valores en las filas 26 y 35 (en las gráficas 8.(a) y 8.(b), respectivamente) de las dos rebanadas de las reconstrucciones realizadas con las proyecciones normalizadas con el procedimiento antiguo y el nuevo (estas se pueden ver en la Fig. 6(d,e)).

El fantasma, las proyecciones y las reconstrucciones fueron realizadas con el paquete Xmipp [12]. Las visualizaciones de superficie de los volúmenes (Figs. 3 y 5) fueron realizados con el programa WEB [13].

5 Resultados

La visualización de superficie de los volúmenes reconstruidos con el antiguo procedimiento, de normalizar las proyecciones a una media de 0 y d.e. de 1, y el nuevo procedimiento, normalizar con respecto al ruido de fondo de cada proyección, mostrada en las imágenes de las Fig. 5.(d-e), respectivamente, no muestra diferencias aparentes. Es posible que el usar la antigua normalización genere distorsiones en la reconstrucción 3D pero no fue apreciable este efecto con el volumen usado en el experimento. Se considera que es necesario investigar más al respecto.

El uso del nuevo procedimiento de normalización mejora la amplitud dinámica de los valores de densidad en un 40% con respecto a la normalización antigua, como puede verse en las gráficas de la Fig. 8. Este mejoramiento provoca que se puede generar más fácilmente una imagen de superficie del volumen.

6 Conclusiones

Se ha demostrado en este artículo que para realizar el escalamiento en densidad (o normalización de todas las imágenes) de imágenes digitalizadas con una cámara CCD basta con calcular las estadísticas del ruido, en una zona alrededor del borde de cada imagen, y utilizar esta estadística para normalizar todos los pixels de la

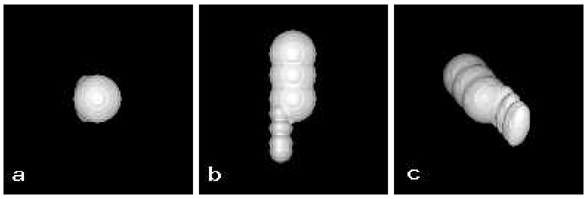


Figura 3: Tres imágenes de superficie del fantasma utilizado en el experimento

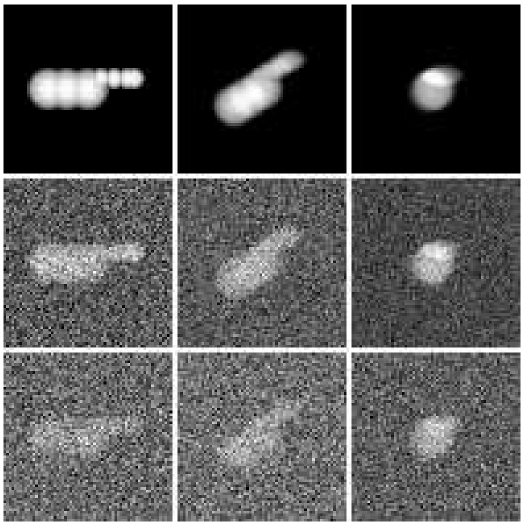


Figura 4: Ejemplos de imágenes de proyección del fantasma; la primera fila son proyecciones sin ruido; la segunda fila son las proyecciones anteriores más un ruido a un nfr de 0.20; la tercera fila son las mismas proyecciones pero ahora a un nfr de 0.40. Las usadas en el experimento son como las mostradas en la segunda fila a un nfr de 0.20

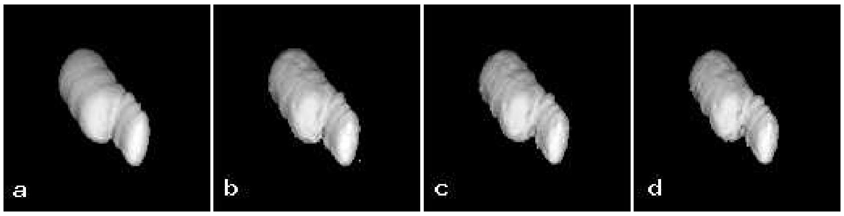


Figura 5: Visualización de superficie de las reconstrucciones tridimensionales. a) La reconstrucción a partir de las 173 proyecciones sin ruido. b) Reconstrucción con las proyecciones a un nfr=0.20. c) La reconstrucción con las proyecciones normalizadas con el procedimiento anterior, y c) la reconstrucción con las proyecciones normalizadas con el nuevo procedimiento propuesto en este trabajo.

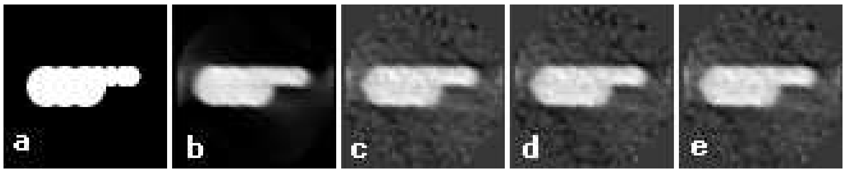


Figura 6: Imágenes de la rebanada 32 de varios volúmenes: a) del fantasma, b) de la reconstrucción sin ruido adicionado a las proyecciones, c) de la reconstrucción con las proyecciones a un nfr de 0.20, d) de la reconstrucción con las proyecciones normalizadas con el procedimiento anterior, y e) de la reconstrucción con las proyecciones normalizadas con el nuevo procedimiento propuesto.

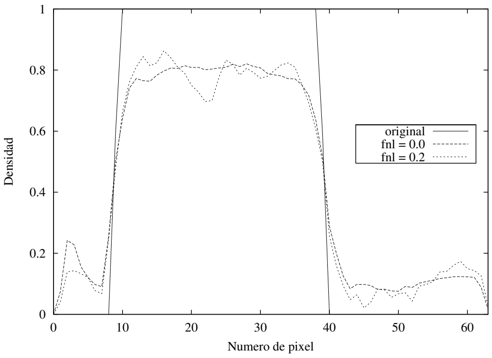
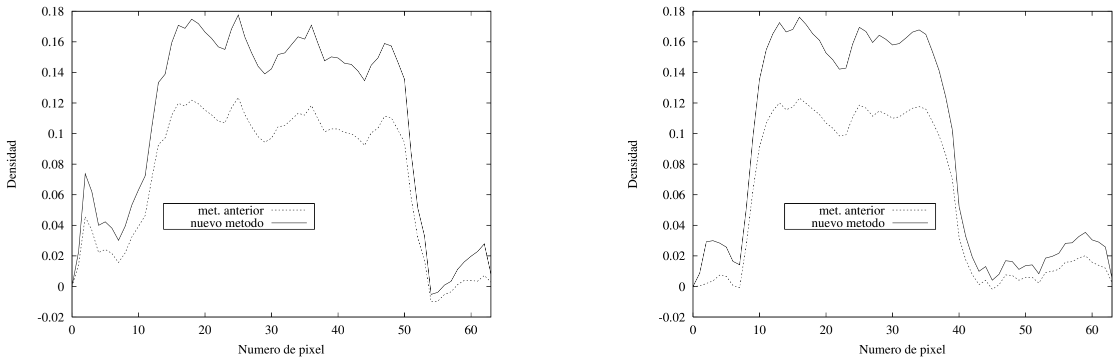


Figura 7: Comparación de los valores en densidad de las rebanadas (a), (b) y (c) de la Fig. 6. Se muestran los valores de densidad en la fila 35 de las distintas rebanadas.



(a) (b)

Figura 8: Comparación de las reconstrucciones con el antiguo y el nuevo procedimiento de normalización. En las gráficas se muestran los valores de densidad de las rebanadas (d) y (e) de la Fig. 6: En (a) se muestran los valores de densidad en la fila 26, en (b) los valores de las densidades en la fila 35.

imagen, como se presenta en la Ec. (6). De esta forma todas las imágenes tendrán los pesos correctos para poder usarse en un proceso de reconstrucción tridimensional. Este proceso ha sido incluido en el software público Xmipp [12]

El nuevo procedimiento de normalización aquí presentado mejora la amplitud dinámica en los valores de densidad de las reconstrucciones obtenidas en un 40% con respecto a la reconstrucción obtenida con el procedimiento antiguo de normalización.

El tema de las posibles distorsiones generadas en las reconstrucciones 3D al usar uno u otro procedimiento de normalización necesita ser más estudiado.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente apoyado por el proyecto 29944-E del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Referencias

[1] T.Y. Young and K-S. Fu, editors. *Handbook of Pattern Recognition and Image Processing.* Academic Press, 1986.

[2] Luis Gerardo de la Fraga. Estimación del ángulo de inclinación en imágenes de proyección con muy alto nivel de ruido. In *Simposium Internacional de Computación 1999. CIC, IPN*, pages 323–331, 1999.

[3] L.G. de la Fraga, J.M. Carazo, and G.T. Herman. A method for obtaining a low resolution 3d reconstruction from very noisy projections. In *Proc. VII National Symposium on Pattern Recognition and Image Analysis*, volume 1, pages 347–352, 1997.

[4] J.M. Carazo, S. Marco, G. Abella, J.L Carrascosa, J.P. Secilla, and M. Muyal. *J. Struct. Biol*, 106:211–215, 1991.

[5] M. Schatz, E.V. Orlova, P. Dube, K. Braig, and M. van Heel. Structure of *lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. *J. Struct. Biol.*, 114:28–40, 1995.

[6] A.M. Roseman, S. Chen, H. Write, K. Braig, and H.R. Saibil. The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell*, 87:241–251, 1996.

[7] N. Boisset, P. Penczeck, P. François, J. Frank, and J.N. Lamy. Three-dimensional architecture of human $\alpha 2$–macroglobulina transformed with methylamine. *J. Mol. Biol.*, 232:522–529, 1993.

[8] E. Kreyszing. *Introducción a la Estadística Matemática, Principios y Métodos.* Limusa, 1987.

[9] P. A. Penczek, R. A. Grassuni, and J. Frank. The ribosome at improved resolution: new techniques for for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles. *Ultramicroscopy*, 53:251–270, 1994.

[10] N. A. Farrow and F. P. Ottensmeyer. A posteriori determination of relative projection directions of arbitrarily oriented macromolecules. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(10):1749–1760, 1992.

[11] R. Marabini, G.T. Herman, and J.M. Carazo. 3D reconstruction in electron microscopy using ART with smooth spherically symmetric volume elements (blobs). *Biophys. J.*, 1997. In Press.

[12] R Marabini, I. M. Masegosa, M. C. San Martin, J.J. Fernández, S. Marco, L. G. de la Fraga, C. Vaquerizo, and J. M. Carazo. Xmipp: An image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 116:237–240, 1996.

[13] J. Frank, M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, and A. Leith. SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struct. Biol.*, 116:190–199, 1996.