Estimación del Ángulo de Inclinación en Imágenes de Proyección con Muy Alto Nivel de Ruido

Luis Gerardo de la Fraga

§ Centro de Investigaciones en Ingeniería y Ciencias Aplicadas,

Universidad Autónoma de Morelos. Ave. Universidad 1001, 62210 Cuernavaca Mor.

E-mail: fraga@ciicap.uaem.mx

Resumen

En este artículo se desarrolla un método para estimar el ángulo de inclinación de un conjunto de imágenes de proyección con niveles muy altos de ruido y que cumplen con la geometría cónica aleatoria. El método está basado en líneas comunes y es aplicable a un grupo de imágenes tanto de un volumen sin simetría como a volúmenes con simetría cilíndrica. El procedimiento es robusto, trabaja bajo condiciones de muy fuerte ruido. Se presentan resultados de simulación con un volumen de simetría cilíndrica tres.

Palabra clave: Procesado de imagen, Líneas Comunes, Refinamiento de la geometría, Procesado de Señal, Estimación de Parámetros.

1 Introducción

Para realizar una reconstrucción tridimensional de un volumen a partir de sus imágenes bidimensionales de proyección es necesario primero situar en un mismo marco de referencia todas las proyecciones.

Una proyección de un *volumen* (un objeto tridimensional) es una colección de las estimaciones de las integrales de línea a través del volumen, realizándose la integración en la dirección del grupo de líneas que son perpendiculares a un plano en particular.

La reconstrucción tridimensional (3D) es el proceso de estimar el volumen a partir del grupo de proyecciones. La localización de las líneas perpendiculares al plano de proyección, que forman los pixels individuales de la imagen de proyección, queda expresada por lo que se conoce como los tres ángulos de Euler y por la localización en el plano de las dos coordenadas de la proyección del origen del sistema de coordenadas del volumen. Este problema es solucionado automáticamente en las reconstrucciones 3D médicas [1], como es la tomografía. En las aplicaciones médicas todas las proyecciones con tomadas de un mismo volumen (el paciente) y el sistema de coordenadas del volumen puede asumirse que está fijo al instrumento que colecta los datos.

En las reconstrucciones 3D de macromoléculas biológicas a partir de imágenes del microscopio electrónico de transmisión, el método de recolección de los datos, nuestras imágenes bidimensionales de proyección, va degradando al espécimen. Cuando se tiene un espécimen que muestre lo que se conoce como "vistas preferentes", esto es, su orientación con respecto a la rejilla soporte del microscopio electrónico no es arbitraria, sino que interaccionan de una (o de unas pocas) formas determinadas, que dan lugar a una (o a unas pocas) "vistas preferentes", se puede aprovechar esta característica para resolver su estructura 3D por medio de la técnica de reconstrucción basada en una geometría de inclinación cónica [2].

La estrategia se basa en tomar dos micrografías (fotografías provenientes del microscopio electrónico), primero una inclinada un ángulo φ y la segunda sin inclinar ($\varphi = 0°$). La primera micrografía proporciona las distintas vistas de proyección del espécimen que serán utilizadas en la reconstrucción 3D, La segunda micrografía, sin inclinar, proporciona los ángulos "rotacionales" mediante técnicas de alineamiento por correlación cruzada [3]. Los ángulos rotacionales forman el primer ángulo de Euler mientras φ es el segundo ángulo de Euler, *común* a todas las proyecciones. Las coordenadas del desplazamiento de las proyecciones inclinadas se puede obtener por un método como el explicado en la Ref. [4] que estima el centro de las proyecciones identificando en la misma proyección la localización sobre la que se proyecta el centroide del volumen. El tercer ángulo de Euler se hace cero y corresponde a la dirección del eje de inclinación de la micrografía.

En este trabajo suponemos que los ángulos de rotación y los desplazamientos de cada proyección son correctos. El tercer ángulo de Euler se supone igual a cero. El método nos permite estimar el ángulo de inclinación para tantas imágenes como de pueda de todo el grupo de proyecciones. El método está basado en las líneas comunes.

Las líneas comunes son una consecuencia directa del teorema de la sección central: dos proyecciones cualesquiera de un objeto representadas en el espacio de Fourier 3D se intersectan sobre una línea a través del origen, en el espacio recíproco, su *línea común*.

2 Descripción del Método

Entre dos proyecciones cualesquiera (siempre que no sean una en sí misma) siempre existe una línea común. Puede demostrarse que entre dos proyecciones cualquiera, que cumplan la geometría cónica aleatoria, la línea común se localiza en el ángulo ρ, sobre la primera imagen, y a $-\rho$ sobre la segunda imagen, de acuerdo a la relación expresada en la Ec. (1).

$$\tan \rho = \frac{\cos \varphi (1 - \cos \theta)}{\operatorname{sen} \theta} \tag{1}$$

donde $\theta = \theta_2 - \theta_1$, θ_2 y θ_1 con los ángulos de rotación sobre la segunda y primera proyección, respectivamente; y φ es el ángulo de inclinación común.

Para el caso de tener dos proyecciones de un volumen que presenta una simetría cilíndrica s, se tienen s líneas comunes entre el par de proyecciones situadas a ρ_i, para la misma Ec. (1) a $(\theta + i\kappa)$, $\kappa = 2\pi/s$, e $i = 0, 1, \ldots, s-1$.

Entonces para cada par de imágenes definimos la función $\rho_i(\varphi)$, esto es, la situación entre las líneas comunes depende del ángulo de inclinación φ, considerando que los ángulos θ_1 y θ_2 son los correctos. Definimos

$$D(\rho, j, k) = \sum_{r \text{ rayos}} \big[\mathrm{p}_j(\rho + \pi/2, r) - \mathrm{p}_k(-\rho + \pi/2, r) \big]^2 \tag{2}$$

como la distancia cuadrática entre las proyecciones de las imágenes j y k. El mínimo de la función D de la Ec. (2) corresponde al lugar donde se halla la línea común entre las imágenes j y k. Y definimos

$$d(\varphi, j, k) = \sum_{i=0}^{s-1} D(\rho_i, j, k) \qquad (3)$$

como la suma de las distancias cuadráticas sobre cada línea común i. Con $s = 1$ las ecuaciones (3) y (2) son equivalentes. El mínimo de la Ec. (3) nos da el valor estimado, en el caso de que las imágenes contengan ruido, del ángulo de inclinación para el par de imágenes (j, k). La sumatoria en la Ec. (3) nos debe mejorar la relación señal a ruido, tanto mejor cuanto más grande ser el orden de simetría en nuestro espécimen.

El método para estimar el ángulo de inclinación para un conjunto de M imágenes consiste en lo siguiente:

Paso 1.- Cada imagen es transladada medio pixel en los dos ejes. Esto es debido a que para el cálculo de las proyecciones unidimensionales, p_j o p_k en la Ec. (2), se usan algunas subrutinas del paquete SNARK93 [5]. SNARK93 sólo trabaja con imágenes digitalizadas de tamaño $n \times n$, donde n es un número impar, de esta forma el centro de la imagen yace sobre el centro del pixel central. Nuestra proyecciones son de tamaño par y centradas en el vértice de los cuatro pieles centrales. Posteriormente, en la discusión, regresaremos a este punto.

Paso 2.- Cada imagen es cortada a un tamaño cuadrado impar, menor que la imagen transladada en el paso anterior, de manera que encierre el espécimen completamente. Luego es multiplicada por una máscara binaria circular, con el valor de cero los pixels de la zona alrededor del espécimen.

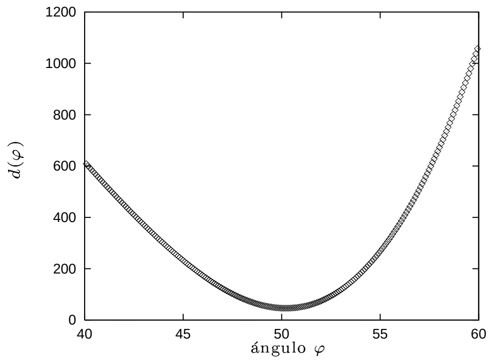

Figura 1: Gráfica típica de la función $d(\varphi)$

Paso 3.- Se calcula la Ec. (3) en un intervalo alrededor de un valor inicial de φ, consideramos que un intervalo de $\pm 10°$ es suficiente. Para el cálculo de las proyecciones unidimensionales se discretizan los ángulos a un paso $\delta = \pi/2048$. Así, 114δ es igual aproximadamente a $10°$. El mínimo de d, Ec. (3), nos proporciona el lugar donde se encuentra la línea común. La forma típica de la función d puede verse en la Fig. 1. Aquí tenemos el problema de que el ruido superimpuesto es tan grande que no podemos identificar la localización del mínimo en el caso sin ruido, con la localización del mínimo en el caso con ruido. En particular, ya que el valor esperado del ruido es positivo, el valor esperado de su mínimo en el caso con ruido es también positivo (más que cero, al igual que el caso sin ruido). Para superar esta dificultad se considera la siguiente aproximación para identificar la localización del punto mínimo por ajuste a una curva: asumimos que la forma de la curva que define la Ec. (3) será aproximada por un polinomio de cuarto orden:

$$\mathrm{d}(x) = \sum_{n=0}^{4} a_n x^n \qquad (4)$$

Se escogió un polinomio de cuarto orden en base a las las características de la función $d(\varphi)$ (ver también la Fig. 1): todos sus valores son positivos y su forma es asimétrica alrededor del mínimo. Un polinomio de segundo orden, una parábola, serviría como primera aproximación, pero su forma no es asimétrica alrededor de su mínimo. Un polinomio de tercer grado nos daría valores positivos y negativos. El polinomio de menor grado que se ajusta a nuestro datos experimentales es el de cuarto orden, donde el coeficiente a_4 debe ser mayor que cero y el valor del coeficiente a_0 (debe ser casi cero en caso de no tener ruido) nos permitiría ajustar el valor esperado positivo del ruido.

Para cada valor posible de φ en la amplitud sobre la cual estamos buscando, se consideran $2R+1$ valores contiguos e incrementales valores de φ (inicialmente podría ponerse a $R = 16$). Se estiman los coeficientes de la Ec. (4) de manera que el valor de la función de error descrita en la Ec. (5) sea tan pequeño como sea posible.

$$E(\varphi) = \sum_{r=1}^{2R+1} \left[d(\varphi + r\delta) - \mathrm{d}(\varphi + r\delta)\right]^2 \tag{5}$$

La ecuación (5) es justamente el error chi-cuadrado, entre los valores experimentales y nuestro modelo, el cual debe ser minimizado.

En la amplitud de nuestra búsqueda, en los puntos donde la Ec. (5) es minimizada, también se encuentra la raíz de la derivada de la Ec. (4), si el valor de su raíz, c, tiene la propiedad que

$$\varphi - \frac{R}{3}\delta \leq c \leq \varphi + \frac{R}{3}\delta \tag{6}$$

y la Ec. (5) tiene el valor más pequeño que todos los demás, c será nuestro estimador del ángulo de inclinación φ.

Ahora, supongamos que los datos experimentales (los valores de d) nos son disponibles en M puntos, los cuales denotaremos por $\varphi_0 + s, \ldots, \varphi_0 + Ms$. Supóngase también que tenemos una R fija (mucho más pequeña que M) y definimos T como el más grande entero menor que $R/3$. La realización del algoritmo quedaría como en el siguiente pseudocódigo.

Algoritmo para estimar el ángulo de inclinación

1. **Inicializar** $C = \varphi_0$, $\quad$ Error $= \infty$;
2. **For** $1 \leq m \leq M - 2R$ **do**
   (a) **set**
   $y(r) = \mathrm{d}\left(\varphi_0 + ms + (r-1)s\right)$; $1 \leq r \leq 2R+1$

   $l = \sum_{r=R-3T}^{R-T} y(r)$

   $k = \sum_{r=R-T+1}^{R+T+1} y(r)$

   $h = \sum_{r=R+T+2}^{R+3T+2} y(r)$

   (b) **if** $k \geq \min(l, h)$ **then continue with for**

   (c) **find** los valores de los coeficientes en la Ec. (4) de manera que

   $e = \sum_{r=1}^{2R+1}[y(r) - \mathrm{y}(r)]^2$

   sea tan pequeño como sea posible.

   (d) **find** la raíz real de la derivada de la Ec. (4)

   (e) **if** no es posible **then continue with for**

   (f) **if** $e < E$ y $R - T \leq c - 1 \leq R + T$ **then set** Error=e, $C = \varphi_0 + ms + (c-1)s$
3. **enddo**

4. **if** $C = \varphi_0$, entonces la búsqueda a fallado y **stop**

5. **Output C** (como nuestro estimador del ángulo de inclinación)

6. **End**

Paso 4.- Se repite el algoritmo del paso anterior (Paso 3) para cada par de proyecciones, del total de N imágenes, para l valores iniciales de φ.

El estimador del ángulo de inclinación, $\hat{\varphi}$ será

$$\hat{\varphi}_l = \mathrm{ave}(\hat{\varphi}^l_{jk}) \tag{7}$$

para el φ_l que tenga el mayor número de pares de imágenes al que se pudo calcular $\hat{\varphi}_{jk}$ (por el procedimiento del paso 2). $\hat{\varphi}_l$ es el promedio de los valores estimados del ángulo de inclinación para cada par de imágenes (j,k) al mismo valor inicial φ_l. $\hat{\varphi}$ expresará el ángulo de inclinación para todas las imágenes involucradas en el cálculo de la Ec. (7).

3 Experimento

Se construyó un fantasma, esto es, un volumen sintético de tamaño $64 \times 64 \times 64$ voxels que se visualiza en la Fig. 2. Este fantasma presenta una simetría cilíndrica de orden 3. Se realizaron 60 proyecciones: a un ángulo de inclinación $\phi = 50°$ y ángulos de rotación $0 \leq \theta < 120°$ a un $\Delta\theta = 2°$.

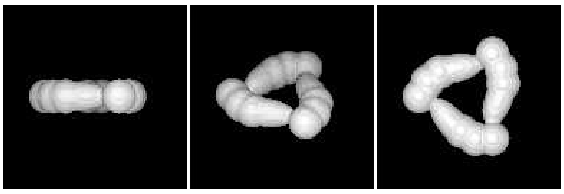

Figura 2: El fantasma usado en el experimento.

Se generaron cuatro grupos de proyecciones a distintos niveles fraccionales de ruido (nfr) de 0.10, 0.20, 0.40 y 0.80. El ruido se considera aditivo y gaussiano. 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. El nfr=0.80 corresponde aproximadamente a una relación señal-ruido de 0.30. Un ejemplo de las distintas imágenes a cada nfr puede verse en la Fig. 3.

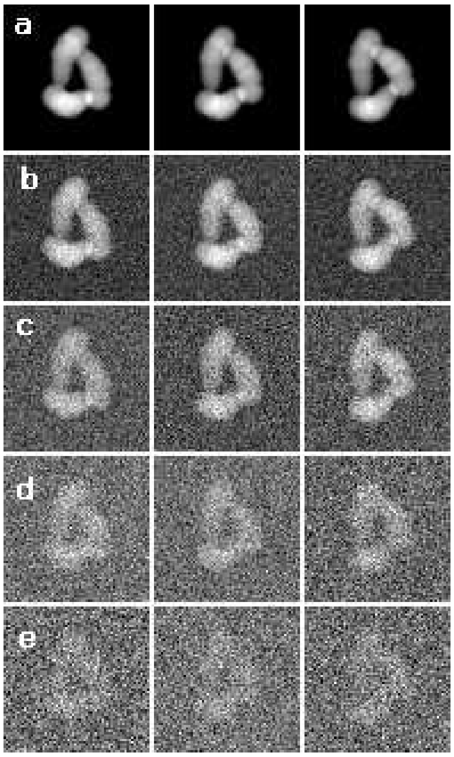

Figura 3: Ejemplos de imágenes de proyección usadas en el experimento. Las imágenes en la columna (a) están sin ruido (nfr= 0.00). (b)-(e) a un nivel fraccional de ruido de 0.10, 0.20, 0.40 y 0.80, respectivamente.

Se sintonizó T en la Ec. (5) igual a 32. Para cada grupo de realizarn los pasos del método a los valores iniciales del ángulo de inclinación, φ_l, de 30°, 40°, 50° y 60°.

El método aquí propuesto fue programado usando el lenguaje de programación C-ANSI. El paquete de software XMIPP [6] fue usado para realizar el fantasma y las proyecciones. El paquete WEB [7] fue usado para hacer las visualizaciones de superficie en la Fig. 2.

4 Resultados

En la Fig. 4 se visualiza las gráficas, a distintos niveles fraccionales de ruido, de los valores iniciales del ángulo de inclinación versus el número de pares de imágenes a los que el método presentado aquí fue capaz de hallar el estimador de ángulo de inclinación. El número máximo de pares de imágenes es $N(N-1)$, $N=60$, esto es, 1770 pares. El error al encontrar los valores de φ_{jk} se visualiza en la gráfica de la Fig. 5.

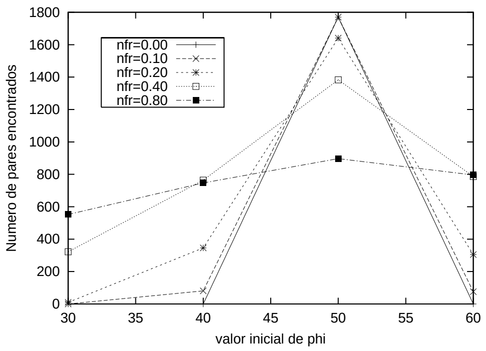

Figura 4: Número de pares imágenes a las que fue posible estimar el ángulo de inclinación versus el valor inicial de φ, a varios niveles fraccionales de ruido (nfr)

Para una condición sin ruido el método halla los valores del ángulo de inclinación para todos los pares de imágenes, el error en los valores de φ_{jk} es de $\sigma = 0.68$ y el ángulo de inclinación para todo el grupo es de 50.068°, esto es, un error de 0.068° que es despreciable, o en otras palabras: el valor del ángulo de inclinación encontrado con el método presentado aquí es el correcto para nfr = 0.00 (esta muy por debajo de la resolución angular de un pixel en una imagen de tamaño 64×64).

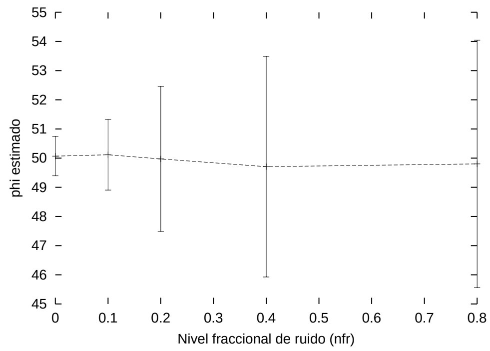

Figura 5: El valor estimado del ángulo de inclinación, $\hat{\varphi}$, para un grupo de imágenes versus el nivel fraccional de ruido (nfr) presente en las imágenes. Los valores de $\hat{\varphi}$ están unidos por una linea recta. Para cada nfr se presentan además los puntos $\pm\sigma$ de los valores estimados del ángulo de inclinación para cada par de imágenes

Para un nfr de 0.10, el método no halla valores estimados del ángulo de inclinación para cada par de imágenes, $\hat{\varphi}_{jk}$, para un valor de φ inicial de 30° y algunos, pero despreciables ($< 5\%$ del total de pares), para φ igual a 40° y 60°. Al aumentar el nfr aparecen más valores de "falsos" de los valores estimados de $\hat{\varphi}_{jk}$. Hasta un nfr de 0.40 el número de falsos $\hat{\varphi}_{jk}$ para un valor inicial de $|\varphi - 50°| \geq 10°$ es menor del 50% del total de pares. Para un nfr igual a 0.80 el número de falsos $\hat{\varphi}_{jk}$ es significativo pero es el *mayor* número de "buenos" $\hat{\varphi}_{jk}$, el punto a $\varphi = 50°$ en la Fig. 4, los que caen dentro de la búsqueda hecha con el valor inicial correcto de φ.

La variabilidad de los $\hat{\varphi}_{jk}$ es baja, el valor de sigma es menor que 1° (ver la Fig. 5), para un nfr ≤ 0.10, admisible para un nfr $= 0.20$ y ya muy grande para un nfr ≥ 0.40. Tomando el estimador del ángulo de inclinación, para el grupo de imágenes al que se les pudo encontrar $\hat{\varphi}_{jk}$, como el promedio de todos estos $\hat{\varphi}_{jk}$, el ángulo estimado de inclinación es correcto (con una diferencia menor a 1° entre el valor estimado y el real).

5 Discusión

El valor mínimo de los valores calculados de la Ec. (3), cuya gráfica típica puede verse en la Fig. 1 cabría esperar que fuese cero: representa la diferencia cuadrática entre las proyecciones unidimensionales situadas en las líneas comunes. Este valor no es cero debido a la translación de las imágenes realizada en el paso 1 del método. Esta translación afecta a la estructura de la proyección y produce una correlación del ruido de fondo de forma que la media del mismo deja de ser igual a cero. Para la translación, y también para las rotaciones si se usasen, se utiliza la aproximación bicuadrática en la que cada nuevo pixel procede de los cuatro pixels más cercanos. Se ha estudiado otra aproximación exacta, usando una máscara circular de radio $\sqrt{1.25}$ pixels, para expandir la imagen a un tamaño impar; con esto nos resulta un mínimo igual a cero, pero tiene el incoveniente de aumentar la cantidad de memoria usada para almacenar cada imagen y aumenta también el tiempo de cómputo para al cálculo de las proyecciones unidimensionales. Ahora, en alguna aplicación con imágenes reales de microscopía, es necesario situarlas en su centro, y tal vez corregir el tercer ángulo de Euler con una rotación. Por esto último se decidió usar la aproximación de transladar medio pixel, que afecta tanto a que el mínimo de la función d no sea cero, como a la variabilidad de los resultados: $\sigma = 0.68^\circ$ para un nfr $= 0.0$ en la gráfica de la Fig. 5; esta variabilidad es menor en el caso de expadir la imagen a un tamaño impar ($< 0.1^\circ$) [8].

En el esquema cónico aleatorio, el método usado para alinear las imágenes a cero grados llamado *alineamiento usando una referencia dinámica* ha sido demostrado en la práctica que trabaja para valores muy bajos en el nivel señal a ruido de las imágenes (ver la Ref. [9], p.e.), que no es sorprendente dado que trabaja con máscaras de correlación cruzada que es el procedimiento que mejor trabaja para hallar correspondencia de patrones en condiciones de alto ruido [3]. El método de la *estimación del centroide mediante segmentación de la masa* [4] se ha demostrado, en simulaciones, que trabaja también en condiciones de ruido muy alto. El método presentado en este artículo llena el hueco para estimar los parámetros completos usados en una reconstrucción tridimensional.

El método explicado en este artículo está basado en líneas comunes. Por líneas comunes es conocido el método de *reconstitución angular* [10] que es elegante en su planteamiento conceptual pero que no puede usarse para alinear imágenes con baja razón señal a ruido. La reconstitución angular, en la práctica, se aplica a imágenes promediadas que presentan un mejor nivel señal a ruido [11]. De hecho, el mismo efecto puede notarse en los resultados de nuestra simulación: a medida que el ruido aumenta, crece el variabilidad de los resultados y aún nos dan resultados falsos. Este método funciona debido a que solo se busca un sólo parámetro, el ángulo de inclinación, compartido por todo el grupo de imágenes. Es fascinante que estos niveles de ruido, a un nfr $= 0.80$, aún existan métodos que nos puedan dar el registro de señal.

El número de imágenes a los que es posible asignar el parámetro estimado debe decrecer proporcionalmente al aumento del nivel de ruido en las imágenes. A las demás imágenes pueden resolverse sus parámetros de orientación con el uso de un *método de refinamiento* como [12]. La esencia de tal método es el siguiente: tener el primer volumen estimado a partir del grupo de imágenes con los parámetros estimados, calcular los parámetros geométricos necesarios de las demás por la consistencia de estas imágenes con las proyecciones estimadas a partir del volumen, reconstruir con los nuevos parámetros y repetir hasta la convergencia.

6 Conclusiones

Se ha desarrollo un nuevo método para estimar el ángulo de inclinación para tantas imágenes como se pueda de un grupo de imágenes de proyección que cumplen la geometría cónica aleatoria. Se ha demostrado por simulaciones que el método trabaja aún en condiciones de ruido muy alto, con un nivel señal a ruido menor a 1.

Agradecimientos

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

Referencias

[1] G. T. Herman. *Image Reconstruction from Projections: The Fundamentals of Computerized Tomography.* Academic Press, 1980.

[2] M. Radermacher. The three-dimensional reconstruction of single particles from random and non-random tilt series. *J. Electron Microsc. Tech.*, 9:359–394, 1988.

[3] W. O. Saxton. *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy.* Academic Press, 1978.

[4] 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.

[5] J. A. Browne, G. T. Herman, and D. Odhner. SNARK93: A programming system for image reconstruction from projections. Technical Report MIPG198, Medical Image Processing Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, P.A. U.S.A., aug 1993.

[6] 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.

[7] 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.

[8] L.G. de la Fraga. *Refinamiento de la Estructura Tridimensional*

de Macromoléculas Biológicas Aisladas: Principios y Realización en Multiprocesadores. PhD thesis, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Informática, 1998.

[9] Felix de Hass, J.-C. Taveau, N. Boisset, O. Lambert, S.N. Vinogradov, and J. Lamy. Three-dimensional recontruction of the chlorocruorin of the polychaete annelid *eudistylia vancouverii*. *J. Mol. Biol.*, 225:140–153, 1996.

[10] M. van Heel. In A. Csanády, P. Röhlich, and D. Szabó, editors, *Proc. 8th Eur. Congr. on Electron Microscopy, Budapest*, volume 2, pages 1347–1348, 1984.

[11] P.D. Dube, E.V. Orlova, F. Zemlin, M. van Heel, J.R. Harris, and J. Markl. Three-dimensional structure of keyhole limpet hemocyanin by cryoelectron microscopy and angular reconstitution. *J. Struc. Biol*, 115:226–232, 1995.

[12] 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.