

AUTOMATYCZNE  
METODY ANALIZY  
ORIENTACJI MIKROTUBUL



NR 2574



40 LAT  
UNIwersytetu  
Śląskiego

Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

AUTOMATYCZNE  
METODY ANALIZY  
ORIENTACJI MIKROTUBUL

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Katowice 2007

Redaktor serii: Informacja Naukowo-Techniczna  
Andrzej Szewc

Recenzent  
Juliusz L. Kulikowski

Tytuł dofinansowany przez Komitet Badań Naukowych  
w ramach grantu nr N518 005 31/0336  
*Metody analizy i przetwarzania obrazów w zastosowaniu do wyznaczania kąta  
nachylenia mikrotubul*

Redaktor: Grażyna Wojdała

Redaktor techniczny: Barbara Arenhövel

Korektor: Lidia Szumigała

Copyright © 2007  
by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego  
Wszelkie prawa zastrzeżone

**ISSN 0208-6336**  
**ISBN 978-83-226-1719-9**

Wydawca  
**Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**  
**ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice**  
www.wydawnictwo.us.edu.pl  
e-mail: wydawus@us.edu.pl

---

Wydanie I. Nakład: 100 + 50 egz. Ark. druk. 7,5. Ark. wyd. 8,0.  
Przekazano do składu we wrześniu 2007 r. Podpisano do druku  
w listopadzie 2007 r. Papier offset. kl. III, 80 g

Cena 14 zł

---

Lamanie: Pracownia Składu Komputerowego  
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego  
Druk i oprawa: Czerny Marian. Firma Prywatna GREG  
Zakład Poligraficzny, ul. Wrocławska 10, 44-100 Gliwice

## SPIS TREŚCI

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ . . . . .	7
1. WPROWADZENIE. . . . .	9
2. OBRAZY MIKROTUBUL . . . . .	12
2.1. Mikrotubula – podstawowe dane biologiczne . . . . .	12
2.2. Algorytmy analizy obiektów wydłużonych . . . . .	14
3. ALGORYTMY DO POMIARU KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL . . . . .	17
3.1. Mikrotubule i ich geometryczne przybliżenie . . . . .	17
3.2. Wstępne przetwarzanie obrazu . . . . .	21
3.3. Idea oraz algorytm pomiaru stopnia nachylenia mikrotubul . . . . .	22
3.4. Optymalizacja algorytmu . . . . .	32
3.5. Zastosowanie operacji szkieletyzacji dla mikrotubul . . . . .	37
3.6. Analiza kąta nachylenia komórek . . . . .	39
4. WŁASNOŚCI OPRACOWANEGO ALGORYTMU . . . . .	45
4.1. Przybliżenie mikrotubuli prostą . . . . .	45
4.2. Metodyka pomiaru własności algorytmów. . . . .	50
4.2.1. Generator losowy obiektów wydłużonych . . . . .	51
4.2.2. Analiza histogramów . . . . .	53
4.3. Parametry opracowanych algorytmów . . . . .	54
4.3.1. Wpływ zmian rozmiaru maski $h$ . . . . .	54
4.3.2. Wpływ zmian progu $p_r$ . . . . .	56
4.3.3. Wpływ liczby obiektów na scenie . . . . .	58
4.3.4. Wpływ kąta nachylenia obiektów na scenie . . . . .	59
4.3.5. Wpływ doboru kroku działania algorytmu . . . . .	60
4.4. Podsumowanie . . . . .	61
5. ANALIZA ZMIENNOŚCI KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL . . . . .	62
5.1. Obszarowa analiza kąta nachylenia mikrotubul . . . . .	62

---

5.2. Typy histogramów mikrotubul . . . . .	67
5.3. Podsumowanie . . . . .	72
6. REKONSTRUKCJA MIKROTUBUL NA PODSTAWIE SEKWENCJI ICH OBRAZÓW . . . . .	76
6.1. Wprowadzenie . . . . .	76
6.2. Nakładanie sekwencji obrazów . . . . .	77
7. POLE KIERUNKU W ANALIZIE OBIEKTÓW CYLINDRYCZNYCH . . . . .	82
7.1. Wprowadzenie . . . . .	82
7.2. Analiza konturów obiektów cylindrycznych . . . . .	83
7.3. Analiza obiektów cylindrycznych . . . . .	88
7.3.1. Wyznaczenie obszaru poddawanego analizie . . . . .	88
7.3.2. Rekonstrukcja konturu obiektu cylindrycznego . . . . .	93
7.4. Przykładowe zastosowanie . . . . .	97
8. ANALIZA OKRESOWOŚCI PROTOFILAMENTÓW W POPRZECZNYM OBRAZIE MIKROTUBULI . . . . .	99
8.1. Wprowadzenie . . . . .	99
8.2. Liczba protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli . . . . .	100
8.3. Okresowości protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli . . . . .	105
8.3.1. Szybka transformata Fouriera . . . . .	105
8.3.2. Optymalizacja simpleksowa . . . . .	107
8.3.3. Filtracja filtrem Butterwortha . . . . .	110
8.3.4. Inne możliwe podejścia . . . . .	114
8.4. Podsumowanie . . . . .	115
9. LITERATURA . . . . .	116
Summary . . . . .	119
Резюме . . . . .	120

# 1. WPROWADZENIE

Przeważająca część informacji o otaczającym świecie dociera do nas za pośrednictwem wzroku. Nic więc dziwnego, że w dobie szybkiego rozwoju informatyki podejmuje się intensywne próby automatyzacji analizy i przetwarzania obrazów, używając do tego celu komputerów. Nasz zmysł wzroku z pewnością przewyższa komputer w interpretacji obrazu, komputer natomiast jest jednoznaczny w swych decyzjach. Poza tym komputer może powtarzać te same czynności setki lub tysiące razy, nie odczuwając przy tym zmęczenia monotonną pracą.

Proces uczenia komputera analizy i przetwarzania obrazów stał się dopiero wtedy możliwy, kiedy wprowadzono cyfrowy zapis obrazu, a także kiedy pojawiły się wystarczająco wydajne procesory oraz duże pamięci mogące zapisywać i analizować wprowadzone obrazy. Analiza i przetwarzanie obrazów obecnie znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach życia [39]. Są to między innymi: automatyka, kryminalistyka, geodezja i kartografia, medycyna, komunikacja, wojskowość, astronomia i astrofizyka, metrologia. W związku z tym zapotrzebowaniem na polskim rynku pojawiło się kilka znakomitych pozycji książkowych poświęconych podstawom teoretycznym komputerowej analizy przetwarzania oraz rozpoznawaniu obrazów mogących mieć zastosowanie we wspomnianych dziedzinach (np.: [20], [26], [29], [39], [46], [47], [48], [49]). Z kolei analizę i przetwarzanie obrazów biomedycznych, ściśle związane z niniejszą pracą, przedstawiono obszernie w [56].

Autorzy mają nadzieję, że niniejsza monografia będzie szczególnie pomocna biologom, utwierdzając ich w przekonaniu, że wiele pracochłonnych pomiarów może za nich wykonać profilowany program komputerowej analizy obrazu, pozostawiając im tylko interpretację uzyskanych wyników. Algorytmy analizy i przetwarzania obrazów wykorzystane w tej grupie badań owocują nie tylko ilościowymi wynikami, lecz także pełną automatyką pomiarów, co znacznie przyspiesza proces badań, jak też czyni je powtarzalnymi.

Celem niniejszej monografii są:

- opracowanie metody automatycznego wyznaczania kąta nachylenia mikrotubul,
- opracowanie metody przestrzennej rekonstrukcji mikrotubul,
- opracowanie metody wyznaczania przestrzennego rozłożenia protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli.

W rozdziale drugim omówiono podstawowe własności mikrotubul jako obiektów wydłużonych, przedstawiono też literaturę dotyczącą analizy i przetwarzania obiektów wydłużonych. W trzecim rozdziale monografii zaprezentowano akwizycję i wstępne przetwarzanie obrazów mikrotubul. Pokazano różne typy mikrotubul (obiektów wydłużonych) oraz zaproponowano ich geometryczne przybliżenie w postaci 1-globalnego i 2-globalnego przybliżenia oraz przybliżenia lokalnego. Zaproponowano trzy autorskie algorytmy do pomiaru kąta nachylenia mikrotubul jako obiektów wydłużonych, omawiając ich zasadę działania i ukazując podstawowe matematyczne zależności. Tematem czwartego rozdziału jest metodyka pomiaru własności metrologicznych opracowanych algorytmów. Zbadano, jak na dokładność pomiaru kąta nachylenia mikrotubul, z uwzględnieniem ich pól powierzchni, wpływa wybór odpowiedniej implementacji algorytmu, a w szczególności: rozmiar stosowanej maski, zmiana progu, wpływ liczby obiektów na obrazie, wpływ nachylenia obiektów na obrazie, wpływ wielkości kroku działania algorytmu. W rozdziale piątym omówiono automatyczną metodę pomiaru kąta nachylenia mikrotubul. Uzyskane wyniki umożliwiły wyznaczenie histogramu kąta nachylenia mikrotubul, z uwzględnieniem ich pól powierzchni. Dodatkowo omówiono użycie zaproponowanego algorytmu w analizie zmienności kąta nachylenia mikrotubul jako pewnego rodzaju trendu w komórce. Analiza tego typu będzie przeprowadzana w zadeklarowanym obszarze, pozwalając na uzyskanie wskaźników globalnych kąta nachylenia. W rozdziale szóstym pokazano możliwość przestrzennej trójwymiarowej rekonstrukcji mikrotubul na podstawie sekwencji obrazów uzyskiwanych z mikroskopu fluoroscencyjnego, z wykorzystaniem możliwości zmiany głębi ostrości. W rozdziale siódmym przedstawiono nowe podejście do zagadnienia pola kierunku. Podano nowe możliwości zastosowania teorii pola kierunku do analizy obiektów cylindrycznych. W ostatnim, ósmym rozdziale dokonano analizy okresowości protofilamentów występujących w poprzecznym obrazie mikrotubul. Pokazano różne możliwe podejścia do tego zagadnienia. Zaprezentowano otrzymane wyniki, które pozwoliły na obliczenie liczby protofilamentów w mikrotubuli.

Implementację opisywanych w pracy algorytmów prowadzono w programie Matlab w pakiecie Image Processing. Informacje o programie Matlab można znaleźć między innymi w pracach [13], [44], [45], [48], [49].

*Autorzy bardzo dziękują Panom prof. dr. hab. Zbigniewowi Hejnowiczowi oraz dr. hab. Jerzemu Nakielskiemu z Katedry Biofizyki i Biologii Wydziału*



---

*Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za udostępnienie obrazów mikrotubul oraz cenną dyskusję w czasie powstawania niniejszej monografii.*

*Autorzy pragną też podziękować Pani prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej z Katedry Cytofizjologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za udostępnienie obrazów protofilamentów wykorzystanych w rozdziale ósmym książki.*

Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

## AUTOMATIC METHODS FOR MICROTUBULE ORIENTATION ANALYSIS

### S u m m a r y

A microtubule is a fibrous structure of 25 nm diameter and 10—25  $\mu\text{m}$  length, which is created as a result of the polymerization of the tubulin protein. The orientation of microtubules in relation to the cell axis changes due to both internal factors (associated with intracellular processes) and external ones (the gravitational field, light intensity, mechanical stresses, an electric field, etc.). In order to evaluate these changes, the inclination angle to the cell axis is usually measured.

In this monograph three developed algorithms for measuring the inclination angle to the cell axis are presented. The algorithms allowed determining a histogram of microtubule inclination angles which takes into consideration the area of microtubules. Additionally, the work covers the employment of the developed algorithms to the analysis of inclination angle variability as a kind of a trend in a cell.

The authors present a spatial, three-dimensional reconstruction of microtubules based on a sequence of images obtained with a fluorescence microscope, using the depth-of-focus change feature.

The monograph also contains an analysis of the protofilaments present in cross-sectional images of microtubules. Various possible approaches to this issue are shown.

The authors hope that their monograph will be particularly useful for biologists and confirm them in the belief that many laborious measurements can be performed with a profiled image analysis application, leaving to them the analysis of the obtained results only.

Зигмунт Врубель, Роберт Копровский

## АВТОМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОРИЕНТАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК

### Резюме

Микротрубочка это волокнистая структура диаметром ок. 25 nm и длиной до 10–25  $\mu\text{m}$  которая образуется в результате полимеризации белка тубулина в клетке. Ориентация микротрубочек относительно оси клетки изменяется как под влиянием внутренних факторов (связанных с внутриклеточными процессами) так и внешних факторов (поля тяготения, интенсивности освещения, механических напряжений, электрического поля и т.д.). Для оценки этих изменений обычно проводятся измерения угла наклона микротрубочек по отношению к оси клетки.

В монографии разработано три алгоритма для измерения угла наклона микротрубочек по отношению к оси клетки. Разработанные алгоритмы позволили определить гистограмму угла наклона микротрубочек с учетом полей их поверхностей. Дополнительно оговорено использование разработанных алгоритмов для анализа изменения угла наклона микротрубочек как определенного тренда в клетке.

Разработано также пространственную трехмерную модель реконструкции микротрубочек на основе секвенции изображений получаемых при помощи флуоресцентного микроскопа, используя возможности изменения резкости.

Представлено анализ периодичности протофиламентов существующих в поперечном разрезе микротрубочек. Показаны различные способы решения этого вопроса.

Авторы надеются, что разработанная монография в особенности позволит помочь биологам, давая им возможность осуществления множества трудоемких измерений при помощи разработанной профильной компьютерной программы анализа изображений, оставляя биологам только интерпретацию результатов.