

Diplomová práce



České  
vysoké  
učení technické  
v Praze

**F3**

Fakulta elektrotechnická  
Katedra kybernetiky

# Detekcia a analýza častíc v mikroskopických snímkach

Bc. Eva Bartošová

Máj 2017

Vedúci práce: doc. RNDr. Ing. Marcel Jiřina, Ph.D.



České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta elektrotechnická

Katedra kybernetiky

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Student:** Bc. Eva Bartošová  
**Studijní program:** Biomedicínské inženýrství a informatika  
**Obor:** Biomedicínská informatika  
**Název tématu:** Detekce a analýza částic v mikroskopických snímcích

### Pokyny pro vypracování:

1. Seznamte se s principem měření tkáňových vzorků pomocí elektronového mikroskopu a principem vzniku mikroskopických snímků.
2. Analyzujte potřebné metody pro detekci a vyhodnocování částic v mikroskopických snímcích.
3. Navrhněte algoritmy pro analýzu obrazu a získání údajů pro následné vyhodnocení rozložení sledovaných částic v ploše i objemu, zejména jejich hustotu, statistické rozdělení, shlukovou analýzu, vzájemnou korelaci a statistické testy.
4. Navržené algoritmy implementujte ve vhodném softwarovém nástroji.
5. Vyhodnotte dosažené výsledky, analyzujte vzniklé problémy a nedostatky a navrhněte možná zlepšení.

### Seznam odborné literatury:

- [1] MELOUN, Milan; MILITKÝ, Jiří; KOČMÍDOVÁ, Helena. Statistické zpracování experimentálních dat. Plus, 1994.
- [2] MELOUN, Milan; MILITKÝ, Jiří; HILL, Martin. Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech. 2005.
- [3] RUSS, John C. The image processing handbook. CRC press, 2016.
- [4] BRADSKI, Gary; KAEHLER, Adrian. Learning OpenCV: Computer vision with the OpenCV library. " O'Reilly Media, Inc.", 2008.
- [5] SONKA, Milan; HLAVAC, Vaclav; BOYLE, Roger. Image processing, analysis, and machine vision. Cengage Learning, 2014.

**Vedoucí diplomové práce:** doc. RNDr. Ing. Marcel Jiřina, Ph.D.

**Platnost zadání:** do konce zimního semestru 2017/2018

L.S.

prof. Dr. Ing. Jan Kybic  
vedoucí katedry

prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.  
děkan

V Praze dne 13. 5. 2016



## PodĎakovanie / Prehlásenie

Chcela by som sa poĎakovať vedúcemu práce doc. RNDr. Ing. Marcelovi Jiřinovi, Ph.D. za odborné vedenie, hodnotné komentáre a námety. Tiež sa chcem poĎakovať konzultantovi Ing. Jakubovi Novákovi za venovaný čas, rady pri vývoji a poskytnuté zdroje. V neposlednom rade sa chcem poĎakovať svojej rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia.

Prehlasujem, že som predloženú prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje v súlade s Metodickým pokynom o dodržiavaní etických princípov pri príprave vysokoškolských záverečných prác.

V Prahe dňa .....

.....

## Abstrakt / Abstract

Táto diplomová práca sa zaoberá detekciou a analýzou častíc v mikroskopických snímkach. V úvode práca oboznamuje s procesom vzniku týchto snímok pomocou elektrónového mikroskopu. Ďalej sú uvedené metódy pre detekciu a klasifikáciu častíc. Cieľom je vybrať vhodné metódy detekcie častíc pre mikroskopické snímky a následné štatistické vyhodnotenie rozmiestnenia týchto častíc. Dôležitou súčasťou je preskúvanie možností štatistických metód analýzy rozmiestnenia častíc v ploche, implementácia algoritmov v softwarovom nástroji a ich rozšírenie do priestorovej analýzy.

**Kľúčové slová:** detekcia častíc; zhlu-kovanie častíc; kolokalizácia; K-funkcia; funkcia párovej korelácie; efekt rozhrania; geometrický kovariogram; distančná transformácia.

The diploma thesis deals with the detection and analysis of particles in the microscopic images. The introduction describes the process of developing these images using electron microscopy. The following are methods for the detection and classification of particles. The aim is to choose a proper method for the detection of particles in the microscopic images and subsequent statistical evaluation of the allocation of these particles. An important part is to explore the possibilities of statistical methods for analyzing particles in the deployment area, implementation of algorithms in software tools and their extension to spatial analysis.

**Keywords:** detection of particles; clustering of particles; colocalization; K-function; pair correlation function; boundary effect; geometric covarigram; distance transformation.

**Title translation:** The detection and analysis of particles in the microscopic images

# Obsah /

<b>1 Úvod</b> .....	1
<b>2 Detekcia častíc v mikroskopických snímkach</b> .....	2
2.1 Snímanie a digitalizácia mikroskopických snímkov .....	2
2.1.1 Meranie tkaninových vzoriek pomocou elektrónového mikroskopu a vznik mikroskopických snímkov .....	2
2.1.2 Značenie pomocou zlatých častíc .....	2
2.2 Metódy spracovania obrazu .....	3
2.2.1 Vyhladenie a zaostrenie obrazu .....	3
2.2.2 Morfológické transformácie .....	4
2.3 Segmentácia obrazu .....	4
2.3.1 Prahovanie obrazu .....	5
2.4 Detekcia obrysov .....	6
2.5 Popis a klasifikácia objektov .....	7
<b>3 Analýza rozloženia častíc</b> .....	8
3.1 Mapovanie častíc .....	8
3.2 Analýza plošného rozloženia častíc .....	8
3.2.1 Analýza rozloženia častíc viac typov .....	10
3.3 Rozšírenie do priestorovej analýzy .....	11
<b>4 Aplikácia metód spracovania obrazu na mikroskopické snímky častíc</b> .....	14
4.1 Popis datovej sady .....	14
4.2 Aplikácia metód spracovania na mikroskopické snímky častíc .....	16
4.2.1 Výber prahovacej metódy .....	18
<b>5 Návrh aplikácie pre detekciu a analýzu mikroskopických snímkov</b> .....	21
5.1 Štruktúra aplikácie .....	21
5.1.1 Modul detekcie .....	21
5.1.2 Modul analýzy rozloženia častíc .....	21
5.1.3 Modul simulácie .....	22
<b>6 Implementácia aplikácie pre detekciu a analýzu mikroskopických snímkov</b> .....	24
6.1 Realizácia a používané knižnice .....	24
6.2 Implementácia metód detekcie častíc .....	24
6.2.1 Klasifikácia a popis častíc .....	24
6.3 Uloženie dát .....	27
6.4 Implementácia mapovania častíc .....	27
6.4.1 Implementácia mapovania metódou distančnej transformácie .....	27
6.4.2 Implementácia mapovania metódou rozmazania konvolučným jadrom .....	29
6.5 Simulácia častíc v 2D a 3D .....	31
6.6 Implementácia metód analýzy rozloženia častíc v 2D a 3D priestore .....	33
6.7 Výpočet geometrického kovariogramu .....	33
6.8 Testovanie náhodného rozloženia pomocou intervalu spoľahlivosti .....	34
<b>7 Analýza rozloženia častíc na simulovaných dátach</b> .....	35
7.1 Výsledky plošnej analýzy rozloženia častíc na simulovaných dátach .....	35
7.2 Výsledky priestorovej analýzy rozloženia častíc na simulovaných dátach .....	37
<b>8 Výsledky analýzy rozloženia častíc na mikroskopických snímkach</b> .....	40
<b>9 Diskusia</b> .....	45
<b>10 Záver</b> .....	47
<b>Literatúra</b> .....	48
<b>A Kompletne výsledky analýzy mikroskopických snímkov</b> .....	51
<b>B Obsah priloženého CD</b> .....	66

## Tabuľky / Obrázky

<b>6.1.</b> Popis príznakov pre klasifikáciu objektov .....	25
<b>B.1.</b> Prehľad súborov a zložiek na priloženom CD .....	66
<b>2.1.</b> Ukážka mikroskopickej snímky so zlatými časticami .....	3
<b>2.2.</b> Ukážka histogramu jasovej intenzity pre šedotónový obrázok .....	5
<b>2.3.</b> Podmienky pre začiatkové body hrán pri detekcii obrysov. . .	6
<b>3.1.</b> Korekcia rozhrania .....	11
<b>3.2.</b> Korekcia efektu rozhrania v 3d .....	12
<b>4.1.</b> Mikroskopická snímka so zlatými časticami - jeden druh antigénu .....	15
<b>4.2.</b> Mikroskopická snímka so zlatými časticami - dva druhy antigénu .....	15
<b>4.3.</b> Vyhladenie snímok pomocou rôznych filtrov .....	16
<b>4.4.</b> Porovnanie metód ostrenia .....	17
<b>4.5.</b> Ostrenie mikroskopických snímok .....	17
<b>4.6.</b> Ukážka black top hat transformácie .....	18
<b>4.7.</b> Histogram jasových hodnôt po black top hat transformácií .	18
<b>4.8.</b> Otsu prahovanie .....	19
<b>4.9.</b> Adaptívne prahovanie .....	19
<b>5.1.</b> Doménový diagram aplikácie .	23
<b>6.1.</b> Detekcia častíc jedného druhu .	25
<b>6.2.</b> Detekcia častíc jedného druhu - priblíženie .....	26
<b>6.3.</b> Detekcia dvoch druhov častíc .	26
<b>6.4.</b> Detekcia dvoch druhov častíc - priblíženie .....	27
<b>6.5.</b> Ukážka distančnej transformácie .....	28
<b>6.6.</b> Ukážka distančnej transformácie s koeficientom saturácie .	28
<b>6.7.</b> Ukážka mapovania metódou distančnej transformácie .....	29
<b>6.8.</b> Rozmazanie Gaussovským filtrom .....	30
<b>6.9.</b> Mapovanie častíc rozmazaním Gaussovským filtrom .....	30



<b>6.10.</b>	Mapovanie častíc dvoch typov rozmazaním Gaussovským filtrom .....	31
<b>6.11.</b>	Simulácia dvoch tried náhodne rozmiestnených častíc v 2D priestore .....	32
<b>6.12.</b>	Simulácia dvoch tried zhlu- kovaných a kolokalizovaných častíc v 3D priestore .....	32
<b>6.13.</b>	Panely detekcie, mapovania a simulácie.....	33
<b>6.14.</b>	Graf funkcie párovej korelá- cie s 95% intervalom spoľah- livosti .....	34
<b>7.1.</b>	Analýza rozloženia na simu- lovaných bodoch s náhodným rozložením v 2D priestore.....	36
<b>7.2.</b>	Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných bo- doch s náhodným rozložením v 2D priestore .....	36
<b>7.3.</b>	Analýza rozloženia na simu- lovaných bodoch v zhlukoch v 2D priestore .....	37
<b>7.4.</b>	Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných ko- lokalizovaných bodoch v 2D priestore .....	37
<b>7.5.</b>	Analýza rozloženia na simu- lovaných bodoch s náhodným rozložením v 3D priestore.....	38
<b>7.6.</b>	Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných bo- doch s náhodným rozložením v 3D priestore .....	38
<b>7.7.</b>	Analýza rozloženia na simu- lovaných bodoch v zhlukoch v 3D priestore .....	39
<b>7.8.</b>	Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných kolo- kalizovaných bodoch v v 3D priestore .....	39
<b>8.1.</b>	Mikroskopické snímky s jed- ným typom častice .....	41

<b>8.2.</b>	Analýza rozloženia jedného druhu častice na mikroskopických snímkach .....	42
<b>8.3.</b>	Mikroskopické snímky s dvoma typmi častice .....	43
<b>8.4.</b>	Analýza rozloženia kolokalizácie častíc na mikroskopických snímkach.....	44

# Kapitola 1

## Úvod

Počítače poskytujú významnú pomoc pri biologickom výskume. Pri snímaní buniek je používaný elektrónový mikroskop, počítače následne pomáhajú a automatizujú radu činností nad týmito snímkami, od úpravy kontrastu a jasú, detekcie objektov až po zložitejšie klasifikácie a analýzy. V súčasnosti sa stále viac rozrastá 3D modelovanie bunky a jej štruktúry so snahou o odhalenie detailov funkčnosti živých systémov.

V elektrónovej mikroskopii sa pre zobrazenie molekúl bunky na snímkach používa značenie zlatými časticami. Cieľom tejto práce je uľahčiť prácu vedeckým výskumníkom pri spracovaní snímok, a to automatickou detekciou týchto častíc a následne ich štatistickou analýzou. Práca vznikla v spolupráci s Ústavom molekulárnej genetiky AV ČR, ktorý poskytol snímky s imunoznačením zlatými časticami antigénov v rastlinnej bunke. Hoci je detekovanie určené pre konkrétne snímky, štatistická analýza zameraná na testovanie rozloženia týchto častíc je aplikovateľná na akékoľvek dáta, ktoré majú bodové rozloženie. Okrem popisu a implementácie existujúcich metód pre toto testovanie v ploche, je v práci navrhnuté rozšírenie týchto metód v 3D priestore, ktoré umožňuje testovať, či sú častice v priestore rozmiestnené náhodne, tvoria zhluky alebo sa navzájom regulujú. Toto rozšírenie by mohlo byť využívané napríklad pri analýze 3D modelov buniek.

V prvej polovici práce je uvedený stručný prehľad metód predspracovania mikroskopických snímok a detekcie častíc. Ďalej sú zmienené možnosti štatistickej analýzy detekovaných častíc v ploche a v priestore. Z metód analýzy rozmiestnenia týchto častíc sú vybraté metódy analyzujúce distribúciu vzdialeností medzi časticami. Ďalej je v práci riešený problém efektu rozhrania, ktorý pri týchto metódach nastáva. Okrem štatistickej analýzy rozloženia častíc sú v práci uvedené dve metódy grafickej analýzy mapovaním častíc.

V druhej časti práce sú aplikované metódy predspracovania a detekcie častíc na snímky s imunoznačením. Po rozbere týchto metód sú vybrané tie, ktoré umožňujú najlepšie detekovať zlaté častice. Tieto metódy sú implementované v navrhutej aplikácii. Táto aplikácia obsahuje okrem modulu predspracovania a detekcie modul mapovania častíc, nástroj štatistickej analýzy detekovaných častíc a simulačný modul častíc v ploche a v priestore.

Dôležitou súčasťou je implementácia metód analýzy rozmiestnenia častíc v ploche a v priestore. Na simulovaných časticách sú prevedené analýzy rozloženia v ploche pomocou vybraných metód štatistickej analýzy distribúcie vzdialeností ako aj overenie správnosti navrhnutých metód pre priestorovú analýzu distribúcie vzdialeností trojrozmerných dát. Na overenie významnosti daných analýz sú v práci použité simulácie Monte Carlo. V závere práce sú zobrazené výsledky analýzy mikroskopických snímok s použitím dát získaných po detekcii a klasifikácii častíc na týchto snímkach.

## Kapitola 2

# Detekcia častíc v mikroskopických snímkach

Cielom detekcie mikroskopických častíc je nájsť v obraze jednotlivé častice a následne ich klasifikovať do dvoch tried. Detekciu častíc môžeme popísať postupnosťou základných krokov spracovania obrazu:

- Snímanie a digitalizácia obrazu
- Predspracovanie obrazu
- Segmentácia obrazu
- Popis objektov a klasifikácia

V nasledujúcej kapitole budú stručne popísané jednotlivé kroky detekcie častíc a uvedené rôzne metódy predspracovania a segmentácie častíc vhodné pri spracovaní mikroskopických snímkov. Z týchto metód budú následne vybrané metódy pre detekciu častíc na mikroskopických snímkach implementované v navrhnutej aplikácii.

## 2.1 Snímanie a digitalizácia mikroskopických snímkov

V tejto sekcii je vysvetlený proces vzniku mikroskopických snímkov a metóda značenia zlatými časticami, ktorá sa pri tomto procese využíva.

### 2.1.1 Meranie tkaninových vzoriek pomocou elektrónového mikroskopu a vznik mikroskopických snímkov

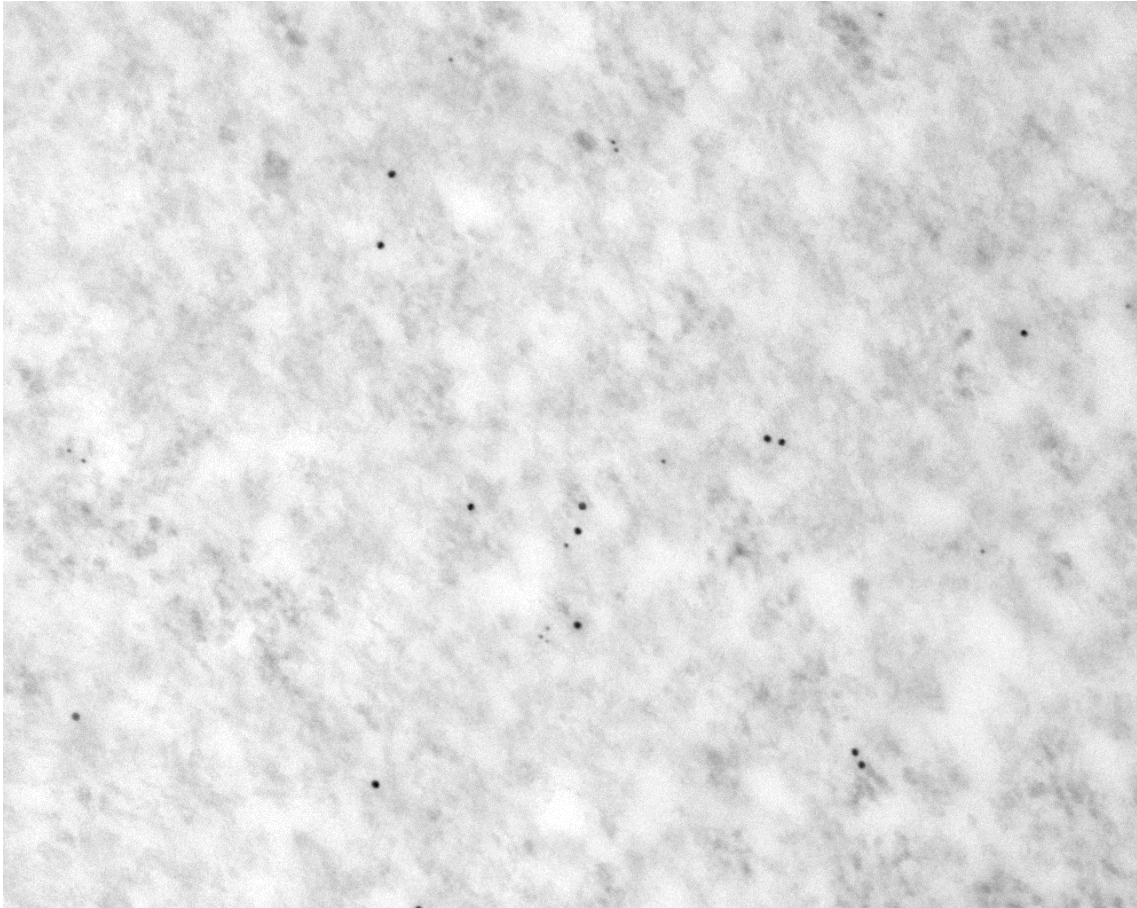
Zobrazenie mikroskopických častíc nám umožňujú elektrónové mikroskopy, ktoré zobrazujú povrch alebo vnútornú štruktúru tkanivovej vzorky pomocou prúdu elektrónov. Pre zobrazenie povrchu vzoriek sa využívajú skenovacie elektrónové mikroskopy, pre zobrazenie vnútornej štruktúry transmisné elektrónové mikroskopy. Pri zobrazovaní transmisným elektrónovým mikroskopom musí byť vzorka dostatočne tenká (10 - 500 nm) [1]. Vďaka vlnovej dĺžke elektrónov, ktorá je 2.5 pm (pri napätí 200 keV) majú elektróny rozlišovaciu schopnosť až 0.5 nm [2]. Pre záznam obrazu z elektrónového mikroskopu sú najčastejšie používané CCD (angl. Charge Coupled Devices) [3] a CMOS kamery [3].

### 2.1.2 Značenie pomocou zlatých častíc

Pri skúmaní buniek na mikroskopickej úrovni je obľúbeným nástrojom značenie zlatými časticami. Zlaté častice sa aplikujú na ultratenké rezy biologických vzoriek (obvykle menej ako 100 nm) [4]. Pomocou reakcie antigén - protilátka je možné detekovať prítomnosť špecifického antigénu v bunke. Na zlatú časticu je pritom naviazaná sekundárna protilátka, ktorá sa naviaže na komplex antigén - primárna protilátka. Rôzne veľkosti zlatých častíc umožňujú detekciu rôznych antigénov. Častice zlata sú používané vďaka veľkému mernému povrchu, dobrej biokompatibilite a vysokej elektrónovej hustote, ktorá umožňuje ľahkú detekciu a vynikajúcu elektrickú a tepelnú vodivosť v elektrónovom mikroskope [5]. Ďalšou výhodou zlatých častíc je ich vysoký kontrast na snímkach. Snímky

tak obsahujú kontrastné body (častice), ktoré identifikujú špecifické molekuly bunky, prípadne pomáhajú pri identifikácii celých kompartmentov.

Na obr. 2.1 je ukážka mikroskopickej snímky s rozmermi 1280 x 1024 a rozlíšením 200 dpi, ktorá obsahuje dva druhy zlatých častíc.



**Obrázok 2.1.** Ukážka mikroskopickej snímky so zlatými časticami.

## 2.2 Metódy predspracovania obrazu

Ďalším krokom spracovania obrazu je jeho predspracovanie. Cieľom predspracovania obrazových dát je zlepšenie ich kvality potlačením neželaných deformácií a odstránením šumu alebo zvýraznenie niektorých črt, ktoré sú dôležité z hľadiska ďalšieho spracovania (napríklad detekcia hrán). Medzi bežné metódy predspracovania obrazových snímok patrí

- Vyhľadanie a zaostrenie obrazu
- Morfologické transformácie

### 2.2.1 Vyhľadanie a zaostrenie obrazu

Cieľom vyhľadania obrazu je potlačenie náhodného šumu. Príkladom vyhladzovacích metód sú spriemerovanie, rozmazanie Gaussovským filtrom a mediánová filtrácia [3]. Metódy sú založené na konvolúcii obrazu s konvolučnou maskou. Za základnú metódu vyhľadania obrazu môžeme považovať spriemerovanie, kde ku každému bodu priradíme

nový jas, ktorý je aritmetickým priemerom vo zvolenom okolí. Príklady konvolučných másk v prípade spriemerovania a Gaussovského rozmazania [3]:

- Spriemerovanie

$$\begin{bmatrix} \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

- Gaussovské rozmazanie

$$\begin{bmatrix} \frac{1}{16} & \frac{2}{16} & \frac{1}{16} \\ \frac{2}{16} & \frac{4}{16} & \frac{2}{16} \\ \frac{1}{16} & \frac{2}{16} & \frac{1}{16} \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

Ďalšou možnosťou je mediánová filtrácia. Oproti obyčajnému spriemerovaniu má výhodu zachovania hrán, ktorá sa hodí najmä, ak je ďalším krokom ich detekcia. Metóda filtrácie mediánom stanoví jas výsledného bodu ako medián z hodnôt jasu stanoveného okolia.

Podstatou zaostrenia je zvýraznenie hrán v obraze. Pri hľadaní hrán objektov sa využíva náhla zmena jasu. Zmenu jasu je možné popísať gradientom jasových hodnôt. Výstupom gradientných operátorov udávajúcich veľkosť gradientu je tak obraz, kde sú hrany zvýraznené. Laplaceov operátor aproximuje druhú deriváciu. Pri aproximácií druhej derivácie diskretnou konvolúciou sa pritom používajú rôzne konvolučné masky. Príkladom používaného Laplaciána je konvolučná maska v tvare [3]:

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

Ďalšou metódou ostrenia je metóda Unsharp masking [6]. Pri tejto metóde sa najskôr obraz rozmazá napríklad Gaussovským filtrom. Následne sa k originálnemu obrazu pričíta rozdiel medzi originálnym obrazom a rozmazaným obrazom.

### ■ 2.2.2 Morfológické transformácie

Matematická morfológia sa zaoberá štúdiom objektov z pohľadu ich tvaru a využíva kombinácie metód z teórie množín. Matematické transformácie sú operácie založené na tvare objektov väčšinou binárneho obrazu. Zjednodušene ide o konvolúciu obrazu s jadrom nazývaným štruktúrny element [7]. Metódy matematických transformácií môžu byť uplatnené pri filtrácií, napríklad odstránenie malých objektov, odstránenie nerovnomerného osvetlenia, odstránenie šumu, detekcií hran alebo pri segmentácií založenej na tvare [7].

Medzi základné morfológické transformácie patrí erózia, dilatácia, otvorenie a uzavretie [3]. Príkladom šedotónovej transformácie je top hat [3] a black top hat transformácia [8]. Pri detekcií častíc môže byť užitočná práve black top hat transformácia, ktorej podstatou je získanie tmavých štruktúr potlačených uzavretím. Tieto štruktúry sú získané ako rozdiel uzavretia a originálneho obrazu.

## ■ 2.3 Segmentácia obrazu

Cielom segmentácie obrazu je rozdelenie obrazu na časti, ktoré súvisia s objektami reálneho sveta [3]. V najjednoduchšom prípade stačí ku segmentácií použitie prahovania,

inokedy sú potrebné zložitejšie metódy postavené na rôznych princípoch. V našom prípade je cieľom segmentácie oddelenie zlatých častíc od pozadia, aby sme následne boli schopní zistiť ich polohu a klasifikáciu do tried.

### ■ 2.3.1 Prahovanie obrazu

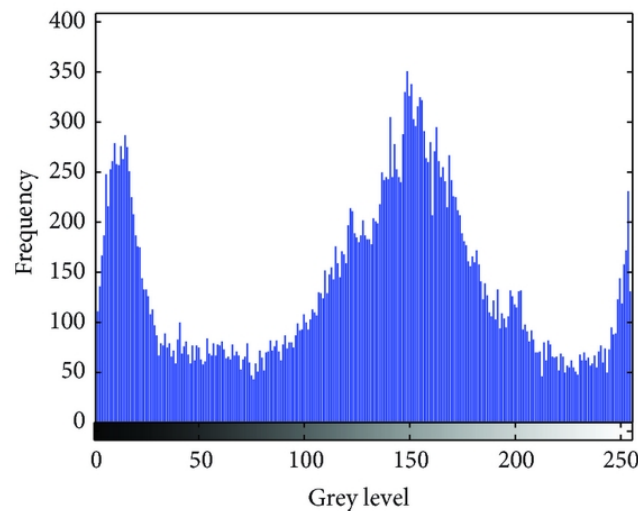
Prahovanie je metóda, pri ktorej sa stanoví prah rozhrania popredia a pozadia. Ak jasová hodnota daného obrazového bodu prekročí stanovený prah nahradí sa hodnota pixelu maximálnou hodnotou jasu, ak prah neprekročí, nahradí sa minimálnou hodnotou. Hodnota prahu môže byť určená manuálne, napríklad podľa histogramu alebo automaticky. Metódy môžeme ďalej rozdeliť na globálne a lokálne. Medzi globálne metódy patrí prahovanie podľa histogramu. Príkladom lokálneho prahovania je adaptívne prahovanie [3].

#### ■ Prahovanie podľa histogramu

V niektorých prípadoch môžeme prah určiť z histogramu intenzity. Histogram intenzity je graf zobrazujúci počet výskytov jednotlivých odtieňov šedi. Pre histogram hodnôt jasu šedotónového obrázka platí

$$N_p = \sum_{i=0}^n h_i, \quad (2.4)$$

kde  $N_p$  je celkový počet pixelov,  $i$  poradie odtieňa šedi,  $n$  rozsah jasovej stupnice a  $h_i$  počet výskytov odtieňa šedi s poradím  $i$ . Ukážku histogramu jasovej intenzity 8-bitového obrázka môžeme vidieť na obr. 2.2. Prahovanie podľa histogramu môžeme použiť v prípade, ak nie je pozadie a objekty tvorené spojitou oblasťou rovnakej (alebo veľmi podobnej) úrovne šedi.



**Obrázok 2.2.** Ukážka histogramu jasovej intenzity pre šedotónový obrázok [9].

#### ■ Optimálne prahovanie

Optimálne prahovanie [3] je variantou prahovania podľa histogramu, pri ktorej sa počíta optimálna hodnota prahu. Medzi najpoužívanejšie metódy automatickej voľby prahu patrí Otsu prahovanie [10]. Metóda je založená na základe rozdelenia rozloženia intenzít vstupného obrazu do dvoch tried, popredie a pozadie. Následne sa zisťuje maximálny medzitriedny rozptyl, podľa ktorého sa určí prahová hodnota.

- **Adaptívne prahovanie**

U obrazu, ktorý obsahuje nerovnomerné pozadie, napr. pri zlom osvetlení nejde použiť jednotný prah. Môžeme však použiť adaptívne prahovanie. Adaptívne prahovanie môžeme zaradiť medzi lokálne metódy prahovania. Pri adaptívnom prahovaní je hodnota prahu vypočítaná ako priemer jasových hodnôt z okolia aktuálneho pixelu, prípadne vypočítaná ako suma získaná z Gaussovského váženého okolia.

Ako príklady ďalších segmentačných metód môžeme uviesť:

- Regionálne metódy [3] - hľadajú spoločnú vlastnosť napr. jas, farba, textúra
  - spájanie oblastí
  - štiepenie oblastí
  - segmentácia rozvodím
- Metódy založené na hranici [3]

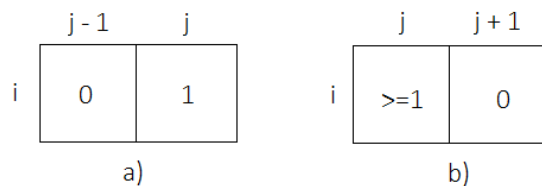
## 2.4 Detekcia obrysov

Po segmentácii častíc prahovaním je dôležitým krokom získanie ich obrysov. Obrys je definovaný ako súvislý segment široký jeden pixel a dlhý jeden alebo viac pixelov a pomedzie objektu potom ako jeho súvislý obrys [11]. Detekcia obrysov umožňuje získanie obrysov z binárneho obrazu. V prípade mikroskopických snímkov je detekcia obrysov vhodná k získaniu vektoru bodov, ktoré tvoria hranice zlatých častíc. Extrahované obrysy ďalej slúžia k získaniu charakteristík segmentovaných častíc.

Základnou myšlienkou jednoduchých metód detekcie obrysov je prechádzanie obrysu objektu bod po bode v smere alebo proti smeru hodinových ručičiek podľa hodnoty aktuálneho bodu. Príkladom su metódy SBF (Simple Boundary Follower) [12], Moore - Neighborhood Tracing [13], Theo Pavlidis Algorithm (TPA) [14]. Nevýhodou týchto metód je, že detekujú iba vonkajšie obrysy objektov.

Príkladom metódy detekcie obrysov, ktorá okrem vonkajších obrysov detekuje aj obrysy vnútorné je algoritmus sledovania pomedzia podľa Suzukiho [15]. Princípom algoritmu je zaznamenávanie ľavého a pravého obrysu objektu, pričom sú dáta prechádzané po riadkoch. Algoritmus prechádza všetky body obrazu a podľa stanovených pravidiel na obr. 2.3 nachádza v obraze počiatočné body obrysu. Následne priraduje bodom unikátnu kladnú alebo zápornú hodnotu. Body obrazu sú pri prechádzaní označované nasledujúcim spôsobom:

- Body označené ako 0, tvoria pozadie
- Body označené ako 1, tvoria objekty, zatiaľ neoznačené ako obrys
- Body označené inou kladnou alebo zápornou hodnotou tvoria obrysy objektov



**Obrázok 2.3.** Podmienky pre začiatkový bod a) vonkajšej hrany a b) vnútornej hrany pri detekcii obrysov podľa [15].



Tento algoritmus je používaný na binárny obraz a rozlišuje ďalej obrisy na vnútorné a vonkajšie. V našom prípade, ak máme k dispozícii binárny obraz segmentovaných častíc, vedie použitie algoritmu k získaniu súvislých obrysov týchto častíc. Použitie algoritmu nám umožňuje reprezentovať detekované súvislé obrisy ako vektory bodov.

## 2.5 Popis a klasifikácia objektov

Po segmentácii obrazu na objekty a získaní ich obrysov nasleduje ďalší krok - popis objektov. U popisu častíc budeme využívať získané obrisy častíc, ktoré umožňujú výpočet charakteristík potrebných ku klasifikácii. Popis objektov je zvolený podľa ďalšieho spracovania objektov. V popise môžu byť údaje ako veľkosť objektov, priemer, obvod, súradnice stredu, kompaktnosť, predĺženie a pod. Celý zoznam príznakov používaných pri detekcii objektov spolu s uvedenými vzťahmi pre ich výpočet je možné dohľadať napr. v [16]. Informácie z popisu môžu byť ďalej použité ku klasifikácii objektu, ktorá je obvykle finálnym krokom spracovania obrazu. V prípade mikroskopických snímok bude tento popis slúžiť ku klasifikácii zlatých častíc a k zisteniu ich polohy. Tieto informácie budú ďalej slúžiť k analýze rozloženia týchto častíc.

# Kapitola 3

## Analýza rozloženia častíc

Nasledujúca kapitola je venovaná analýze rozloženia častíc na mikroskopických snímkach. Ako prvá je zmienená grafická metóda analýzy rozloženia častíc. Zvyšok kapitoly je venovaný analýze rozloženia častíc z pohľadu štatistickej distribúcie častíc. Táto časť obsahuje úvod do štatistickej analýzy rozloženia častíc, vybrané metódy plošnej analýzy a vlastné rozšírenie do priestorovej analýzy rozloženia častíc.

### 3.1 Mapovanie častíc

Mapovanie patrí medzi metódy využívané biológmi a je určené k vyznačeniu oblastí na snímke, ktorá obsahuje zhluky častíc viz obr. 6.7. Mapovanie ako označenie oblastí s vysokou hustotou častíc je možné previesť pomocou rozmazania napríklad Gaussovským filtrom a následným prahovaním jasovej intenzity. Rozmazanie obrázku je vo všeobecnosti prerozdelenie intenzity pixelu do jeho okolia. Intenzita rozmazaných častíc je nižšia ako mal pôvodný obrázok. V oblastiach s väčším výskytom častíc dochádza k sčítaniu intenzít a tak je možné detekovať práve viac frekventované oblasti. Ďalšou možnosťou mapovania je použitie distančnej transformácie [17]. Distančná transformácia je založená na výpočte vzdialenosti z každého obrazového bodu k najbližšiemu bodu objektu, v prípade mikroskopických snímkov k najbližšiemu bodu častice. Tieto vzdialenosti sú prevedené do jasovej intenzity, pričom jasová intenzita klesá od stredu častice. Následným prahovaním jasovej intenzity je možné mapovať zhluky zlatých častíc.

### 3.2 Analýza plošného rozloženia častíc

Distribúcia značkovaných častíc predstavuje priestorové rozloženie bodov (angl. spatial point pattern) [18]. Analýza priestorového rozloženia bodov má široké uplatnenie v biológii, ekológii, geografii a v mnohých ďalších oblastiach. V prípade mikroskopických častíc sa používa k overeniu, či sú častice v priestore rozmiestnené náhodne, tvoria zhluky alebo sa navzájom regulujú. Okrem analýzy bunkovej štruktúry sú v literatúre metódy analýzy priestorového rozloženia aplikované napríklad pri analýze rozmiestnenia stromov [19], analýze distribúcie vtáčích hniezd [20], analýze distribúcie miest [21] alebo pri analýze distribúcie galaxií [21].

Ako je uvedené v [19], prvým krokom analýzy priestorového rozloženia bodov je testovanie úplnej priestorovej náhodnosti (angl. Complete Spatial Randomness, CSR). Ako je ďalej uvedené dôvodom je, že pri nezamietnutí CSR ďalšie analýzy strácajú význam. Ďalším dôvodom je, že testovanie CSR umožňuje zároveň rozlíšiť náhodné rozloženie od rozloženia v zhlukoch. Existujú rôzne prístupy k testovaniu CSR. Jedným z nich je analýza kvadrátov [22–23]. Výstup CSR je možné popísať Poissonovým rozdelením. Pri tomto postupe je oblasť rozdelená do rovnako veľkých neprekrývajúcich sa oblastí - kvadrátov a očakávaný počet kvadrátov s  $x$  udalosťami sa riadi Poissonovým rozdelením  $p(x; \lambda)$  s parametrom intenzity  $\lambda$ . Tieto metódy teda porovnávajú pozorované

početnosti kvadrátov s očakávanými hodnotami pre Poissonov proces. Pri porovnávaní distribúcií je možné použiť Chí kvadrát test dobrej zhody, na rovnakom princípe založený index disperzity [22] alebo Kolmogorovov-Smirnovov test viz [24]. Kvadrátová analýza je jednoduchým nástrojom, avšak jej hlavný nedostatok je vo výbere veľkosti kvadrátov. Veľkosť kvadrátu je ľubovoľná a môže ovplyvniť výsledok testu [19].

Druhou vetvou analýzy náhodného rozmiestnenia častíc sú metódy založené na distribúcií vzdialeností. Základným nástrojom analýzy založených na distribúcií vzdialeností je Ripleyho  $K$  funkcia.  $\lambda K(t)$  je definovaná ako očakávaný počet bodov (častíc) do vzdialenosti  $t$  od náhodného bodu, kde  $\lambda$  je hustota častíc (počet častíc na jednotku plochy) [21]. Na rozdiel od metód založených na vzdialenosti k najbližšej častici - metódy najbližšieho suseda používaných napr. v [25],  $K$  funkcia popisuje rozloženie pre rôzne dĺžky. Graf  $K$  funkcie teda môže ukázať aj kombinácie ako napr. regulácie pri malých vzdialenostiach a zhlukovanie pri väčších [26].  $K$  funkciu je možné odhadnúť podľa vzťahu

$$\hat{K}(t) = \lambda^{-1} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{I(d_{ij} < t)}{N}, \quad (3.1)$$

kde  $d_{ij}$  je vzdialenosť medzi časticami,  $N$  je celkový počet častíc a  $I(d_{ij} < t)$  je funkcia indikácie s hodnotou 1, ak je splnená podmienka v zátvorkách a 0 inak. Takýto odhad je však skreslený tzv. efektom rozhrania [27], kedy s väčšou vzdialenosťou  $t$  rastie pravdepodobnosť, že sa častica nachádza mimo vzorkovaciu oblasť. Najpoužívanejšou korekciou tohto efektu je Ripleyho odhad [28]:

$$\hat{K}(t) = \lambda^{-1} \sum_i \sum_{j \neq i} w(l_i, l_j)^{-1} \frac{I(d_{ij} < t)}{N}, \quad (3.2)$$

kde  $w(l_i, l_j)$  je koeficient korektúry efektu rozhrania počítaný pre častice  $l_i$  a  $l_j$  ako podiel obvodu kružnice so stredom  $l_i$  a polomerom  $d_{ij}$  vo vnútri vzorkovacieho okna a celkového obvodu tejto kružnice. V článku [27] sú uvedené ďalšie možnosti korekcie efektu rozhrania.

$K$  funkcia môže byť normalizovaná podľa [29] a výsledná charakteristika je označená ako  $L$  funkcia, ktorej odhadom je

$$\hat{L}(t) = \sqrt{\frac{\hat{K}(t)}{\pi}}. \quad (3.3)$$

Dôvodom normalizácie  $K$  funkcie na  $L$  funkciu je konštantný rozptyl  $L$  funkcie pri CRS [30].

$K$  funkcia je kumulatívnou charakteristikou a preto môže byť vhodnejšie použitie funkcie párovej korelácie [26] definovanej ako

$$g(t) = \frac{1}{2\pi t} \frac{dK(t)}{dt}. \quad (3.4)$$

Pre homogénny Poissonov proces  $g(t) = 1$  pre všetky vzdialenosti, pri  $g(t) > 1$  proces vykazuje zhlukovanie a pri  $g(t) < 1$  inhibíciu [26]. Odhad funkcie párovej korelácie je náročnejšia úloha ako odhad  $K$  funkcie. Možnosťou je použitie neparametrických metód, príkladom ktorých je metóda histogramu.

### 3.2.1 Analýza rozloženia častíc viac typov

V prípade datovej sady mikroskopických snímok sú na niektorých snímkach prítomné dva druhy častíc. V prípade, ak nás zaujíma aj analýza medzi rôznymi typmi častíc si s vyššie uvedenými metódami nevystačíme. Vzťahy pre  $K$  funkciu a a funkciu párovej korelácie je potrebné upraviť do tvaru zohľadňujúceho typ častice. Estimátor  $K$  funkcie je v tomto prípade rozšírením Ripleyho pôvodného estimátora v [31] a má tvar:

$$\hat{K}_{ij}(t) = (\hat{\lambda}_i \hat{\lambda}_j A)^{-1} \sum_k \sum_l w(i_k, j_l) I(d_{i_k, j_l} < t), \quad (3.5)$$

kde  $\lambda_i$  je hustota častíc typu  $i$  a  $w(i_k, j_l)$  je pomer obvodu kružnice so stredom  $k$ -tej častice typu  $i$  s polomerom  $d_{i_k, j_l}$  vo vnútri vzorkovacieho okna a celkového obvodu tejto kružnice.

Metódy analýzy priestorového rozloženia bodov tejto práce budú ďalej vychádzať z článku [4], ktorý dokumentuje použitie  $K$  funkcie a funkcie párovej korelácie na experimentoch so značením zlatými časticami. Zlaté častice boli aplikované na vznikajúcu DNA v S fáze buniek HeLa a na známe proteíny v jadre týchto buniek. Pri značkovani zlatými časticami niekedy dochádza k označeniu jedného miesta viac ako jednou časticou, čo môže viesť k zvýšenému počtu krátkych vzdialeností a ovplyvneniu výsledkov analýzy. Na druhej strane malé rozmery molekúl antigénov a krátke vzdialenosti medzi molekulami môžu pri nesprávnej detekcii nesprávne indikovať reguláciu alebo inhibíciu [32]. Tieto špecifické okolnosti a problémy viedli v uvedenom článku k cenzúre krátkych vzdialeností a tým k modifikácii vyššie zmienenej  $K$  funkcie do tvaru:

$$\hat{K}_j(r', r'') = \frac{1}{N \hat{\lambda}^2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x, y \in X \\ x \neq y}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{\gamma(d(x, y))}. \quad (3.6)$$

Pre viacrozmernú analýzu rozloženia častíc DNA a proteínov je termín zhľukovania častíc nahradený termínom kolokalizácie častíc. Skúmajú sa teda vzdialenosti medzi rôznymi druhmi častíc a krížová  $K$  funkcia má tvar:

$$\hat{K}_{1,2}(r', r'') = \frac{1}{N \hat{\lambda}_1 \hat{\lambda}_2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x \in X_{1,i} \\ y \in X_{2,i}}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{\gamma(d(x, y))}. \quad (3.7)$$

Ďalej je odhadnutá  $K$  funkcia v tvare:

$$\hat{K}_j^{-1}(r', r'') = \frac{1}{2\pi N \hat{\lambda}^2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x, y \in X \\ x \neq y}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{d(x, y) \gamma(d(x, y))}. \quad (3.8)$$

Podobne krížová  $K$  funkcia v tvare:

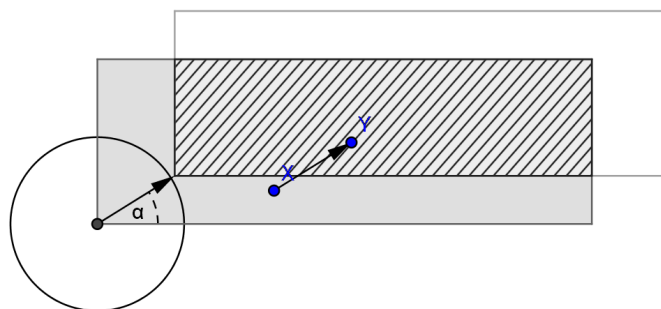
$$\hat{K}_{1,2}^{-1}(r', r'') = \frac{1}{2\pi N \hat{\lambda}_1 \hat{\lambda}_2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x \in X_{1,i} \\ y \in X_{2,i}}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{d(x, y) \gamma(d(x, y))}. \quad (3.9)$$

Histogram funkcie párovej korelácie (PCF) a krížovej funkcie párovej korelácie (PCCF) je následne zostrojený odhadnutím priemerov PCF a PCCF ako :

$$\frac{\hat{K}_j^{-1}(r_i, r_{i+1})}{(r_{i+1} - r_i)}, \quad (3.10)$$

$$\frac{\hat{K}_{1,2}^{-1}(r_i, r_{i+1})}{(r_{i+1} - r_i)}. \quad (3.11)$$

Efekt rozhrania je korigovaný použitím geometrického kovariogramu podľa [33]. Geometrický kovariogram sa rovná priemernému prieniku vzorkovacieho okna s rozmermi  $a$  a  $b$  posunutého o vzdialenosť  $r$  do všetkých smerov. Príklad posunutia obdĺžnikového okna o uhol  $\alpha$  je na obr. 3.1.



Obrázok 3.1. Korekcia efektu rozhrania.

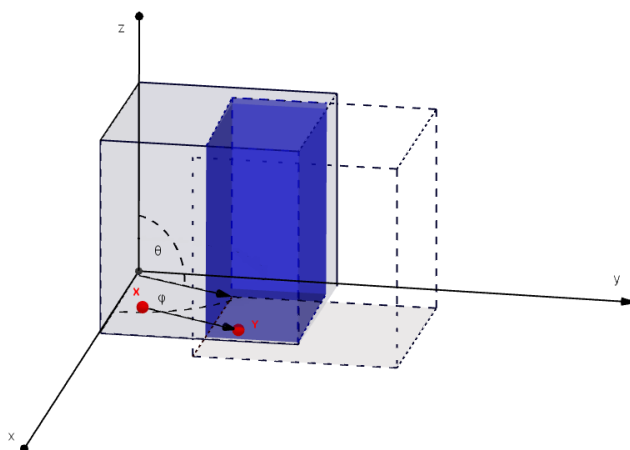
Pre  $r < \min(a, b)$  je tento kovariogram možné vypočítať ako:

$$\gamma(r) = ab - \frac{2}{\pi}(a + b)r + \frac{1}{\pi}r^2. \quad (3.12)$$

### 3.3 Rozšírenie do priestorovej analýzy

V tejto sekcii budú uvedené vzťahy pre estimátor  $K$  funkcie a párovej korelačnej funkcie v priestore (3D), ktoré sme odvodili na základe predošlých príkladov. Podobne ako v článku [4] budú vzťahy pre  $K$  funkciu a krížovú  $K$  funkciu v nekumulatívnej podobe, ktorá umožňuje cenzurovanie krátkych vzdialeností.

Z dôvodu efektu rozhrania v priestore bolo potrebné odvodiť výpočet priestorového geometrického kovariogramu. Za priestorový geometrický kovariogram považujeme priemerný prienik kvádra vzorky a identického kvádra posunutého o vzdialenosť medzi časticami do všetkých smerov. Príklad posunutia kvádrov o uhol  $\varphi$  a  $\theta$  je na obr. 3.2.



**Obrázok 3.2.** Korekcia efektu rozhrania v 3D priestore.

Pre  $r < \min(a, b, c)$  sme odvodili analytický vzorec pre výpočet priemerného prieniku. Prienik kvádrov s rozmermi  $a, b, c$  pri posunutí o  $\Delta x, \Delta y, \Delta z$  vypočítame ako

$$V = abc - ab\Delta z - ac\Delta y - bc\Delta x + \Delta x\Delta y c + \Delta y\Delta z a + \Delta z\Delta x b - \Delta x\Delta y z \quad (3.13)$$

Priemerovaním pre uhol vektoru posunutia od 0 po  $\pi/2$  od osi  $x$  a od 0 po  $\pi/2$  od osi  $z$  sme odvodili priemerný prienik rovnajúci sa priestorovému geometrickému kovariogramu:

$$\begin{aligned} \gamma(r) = & abc - \frac{2}{\pi} \int_0^{\pi/2} abr \cos \theta d\theta - \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} acr \sin \theta \sin \varphi d\theta d\varphi - \\ & - \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} bcr \sin \theta \cos \varphi d\theta d\varphi + \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} cr^2 \sin^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi d\theta d\varphi + \\ & + \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} ar^2 \sin \theta \cos \theta \sin \varphi d\theta d\varphi + \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} br^2 \sin \theta \cos \theta \cos \varphi - \\ & - \frac{4}{\pi^2} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} r^3 \sin \theta \cos \varphi \sin \theta \cos \theta d\theta d\varphi \end{aligned}$$

Po integrácii dostávame pre  $r < \min(a, b, c)$  analytický vzorec pre priestorový geometrický kovariogram v tvare:

$$\gamma(r) = abc - \frac{4}{\pi^2} r \left( \frac{\pi}{2} ab + ac + bc \right) + \frac{2}{\pi^2} r^2 \left( \frac{\pi}{4} c + a + b \right) - \frac{2r^3}{3\pi^2} \quad (3.14)$$

Vzťah pre  $K$  funkciu pre priestorovú analýzu sme odvodili analogicky k vzťahu (3.8).

$$\hat{K}_j^{-1}(r', r'') = \frac{1}{4\pi N \hat{\lambda}^2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x, y \in X \\ x \neq y}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{d(x, y)^2 \gamma(d(x, y))}, \quad (3.15)$$

kde  $\gamma(r)$  je priestorový geometrický kovariogram počítaný pre vzdialenosť  $r$ .

Podobne sme odvodili  $K$  funkciu pre priestorovú analýzu častíc viac druhov na základe analógií k vzťahu (3.9) v tvare:

$$\hat{K}_{1,2}^{-1}(r', r'') = \frac{1}{4\pi N \hat{\lambda}_1 \hat{\lambda}_2} \sum_{j=1}^N \sum_{\substack{x \in X_{1,i} \\ y \in X_{2,i}}} \frac{1[r' \leq d(x, y) < r'']}{d(x, y)^{2\gamma(d(x, y))}}. \quad (3.16)$$

Histogramy funkcie párovej korelácie (PCF) a krížovej funkcie párovej korelácie (PCCF) sme následne zostrojili odhadnutím priemerov PCF a PCCF ako :

$$\frac{\hat{K}_j^{-1}(r_i, r_{i+1})}{(r_{i+1} - r_i)}, \quad (3.17)$$

$$\frac{\hat{K}_{1,2}^{-1}(r_i, r_{i+1})}{(r_{i+1} - r_i)}. \quad (3.18)$$

## Kapitola 4

# Aplikácia metód spracovania obrazu na mikroskopické snímky častíc

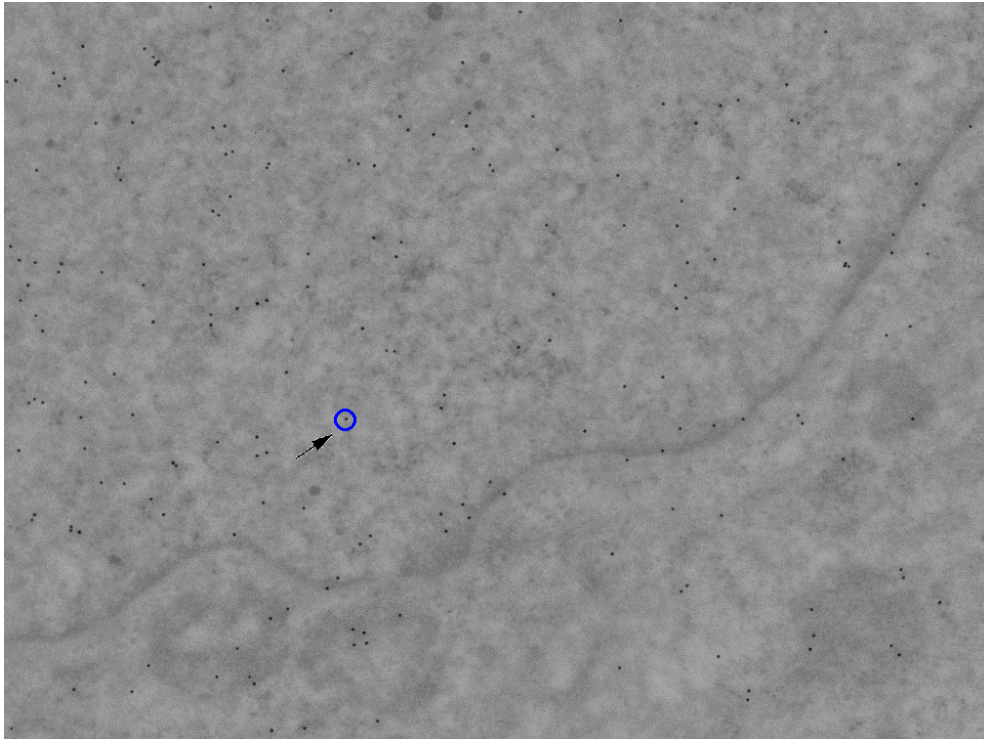
V nasledujúcej kapitole budú metódy predspracovania a detekcie z časti 2.2 aplikované na mikroskopické snímky. Cieľom kapitoly je vybrať najvhodnejšie metódy spracovania snímok a detekcie častíc na mikroskopické snímky datovej sady. Výber metód spracovania obrazu závisí od jeho vlastností. Z tohoto dôvodu musíme zvážiť, na aké snímky budeme metódy aplikovať. V našom prípade datová sada pozostáva z mikroskopických snímok so zlatými časticami, ďalej popísaná v časti 4.1.

Charakteristické vlastnosti snímok budú ovplyvňovať výsledky metód spracovania obrazu. Apriórne informácie o vlastnostiach snímok zohrali rolu vo výbere úvodného prehľadu metód spracovania obrazu. Ničmenej k optimálnemu výberu je nutná aplikácia viacerých metód a ich testovanie na datovej sade. V nasledujúcej časti preto aplikujeme na mikroskopické snímky datovej sady rôzne metódy filtrácie obrazu, za účelom jeho optimálneho vyhladenia a zostrenia pre nasledujúce prahovanie. V ďalšom kroku potom aplikujeme rôzne metódy prahovania s cieľom, čo najpresnejšej segmentácie zlatých častíc a ich následnej detekcie.

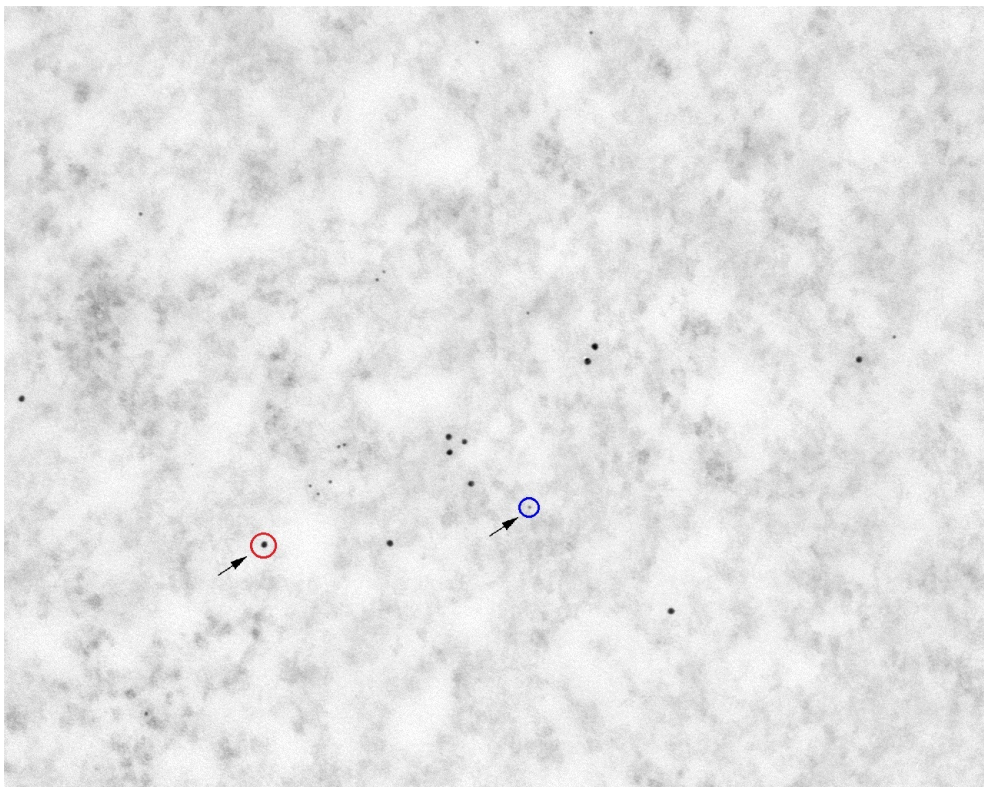
### 4.1 Popis datovej sady

Ako bolo v úvode spomenuté mikroskopické snímky sú prevzaté z Ústavu molekulárnej genetiky AV ČR. Snímky vznikli metódou imunoznačenia zlatými časticami popísanou v kap. 2.1.2 a zobrazujú skupinu antigénov v rastlinnej bunke. K dispozícii sú dve sady snímok. Prvú sadu tvorí štrnásť snímok zobrazujúcich jednu veľkosť zlatej častice a teda jeden druh antigénu. Druhú sadu tvorí osemnásť snímok zobrazujúcich dve veľkosti zlatých častíc, a teda dva rôzne antigény. Na obrázku 4.1 je ukážka mikroskopického snímky s rozmermi 1376 x 1032 pixelov a rozlíšením 200 dpi, ktorá obsahuje jeden druh častice. Na obrázku 4.2 je ukážka mikroskopického snímky s rozmermi 1280 x 1024 pixelov a rozlíšením 200 dpi, ktorá obsahuje dva druhy častíc. Mikroskopické snímky obsahujú 256 šedotónových jasových úrovní. Častice, ktoré sú objektom detekovania sú na všetkých snímkach v tvare kruhu s priemerom 6 px a 12 px.





**Obrázok 4.1.** Mikroskopická snímka so zlatými časticami s jedným typom antigénu.



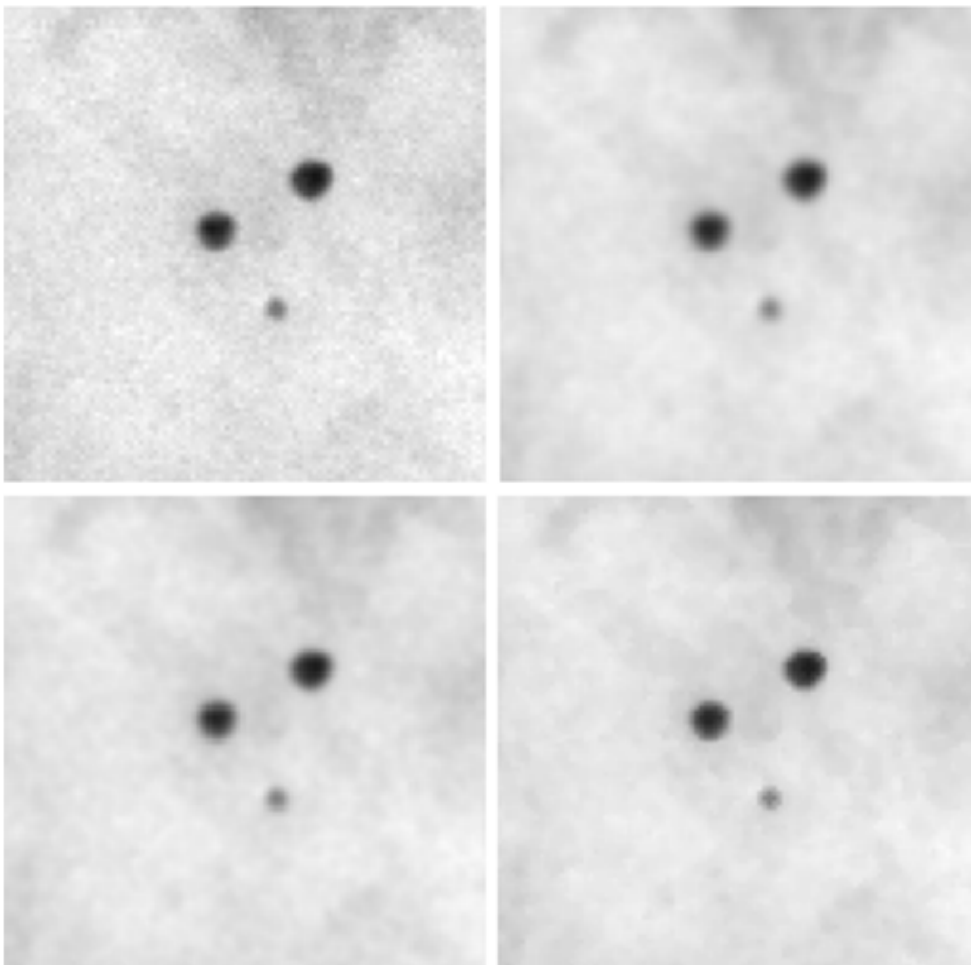
**Obrázok 4.2.** Mikroskopická snímka so zlatými časticami s dvoma typmi antigénov.

## 4.2 Aplikácia metód predspracovania na mikroskopické snímky častíc

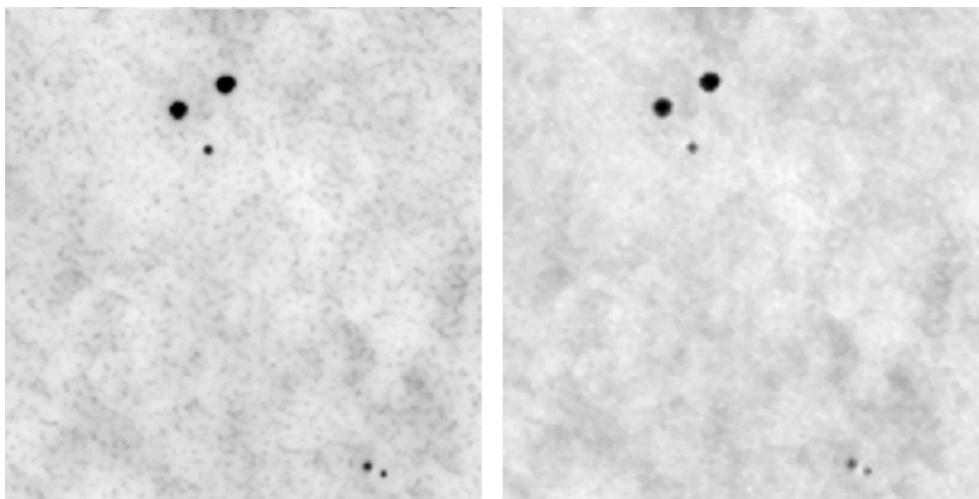
Účelom vyhladenia snímok je odstránenie šumu a zabránenie tak chybnjej detekcii hrán na pozadí. Na druhej strane chceme zachovať hrany objektov.

V prvom kroku boli aplikované filtre vyhladenia opísane v kap. 2.2.1. Na obr. 4.3 je zobrazený výsledok vyhladenia pomocou spriemerovania, použitím Gaussovského a mediánového filtra. Pre požadované zachovanie hrán je vhodné použitie mediánového filtra, ktorý zároveň znižuje jemný šum na pozadí.

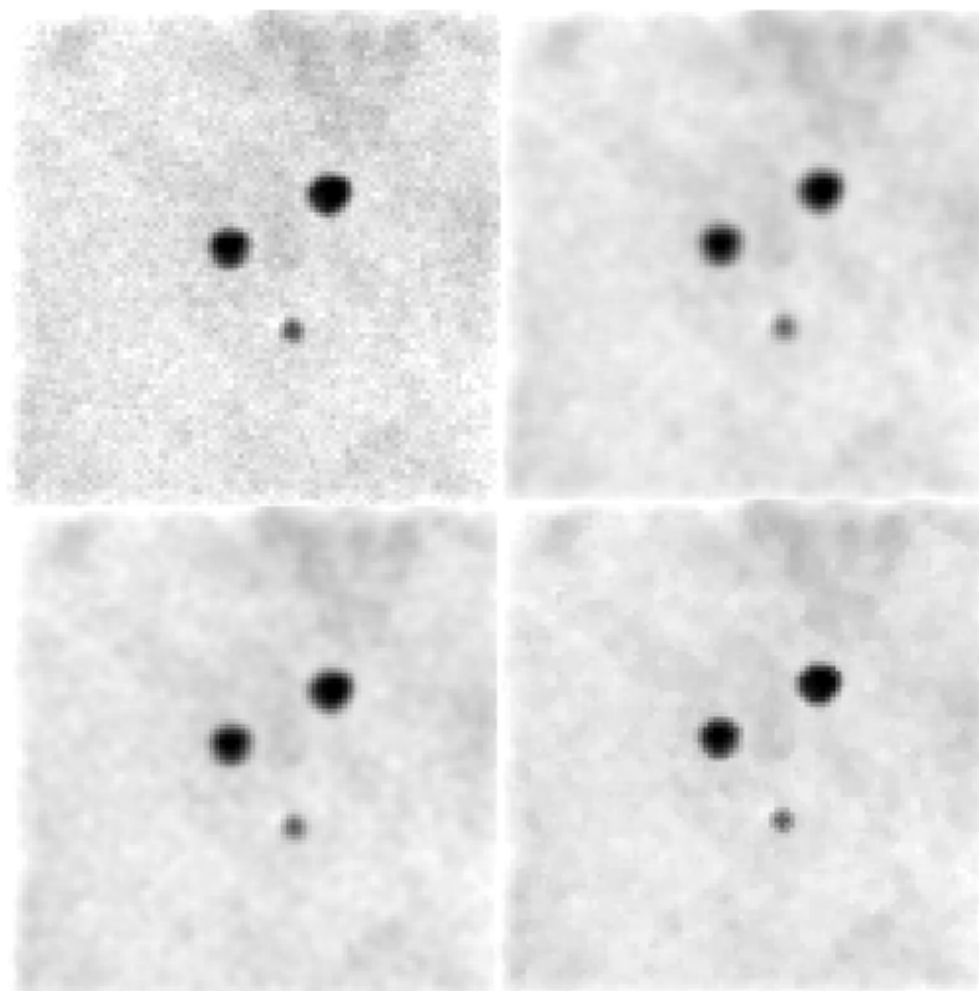
V ďalšom kroku boli porovnávané metódy ostrenia pomocou Laplaceovho operátora a metódou Unsharp Masking. Výsledky aplikácie metód su zobrazené na obr. 4.4. Na obrázku 4.5 je zobrazená ukážka rôznych filtrov a následného ostrenia. Výsledok ostrenia Laplaceovým operátom na obr. 4.4 naľavo je v porovnaní s ostrením metódou Unsharp Masking o niečo ostrejší. Na druhej strane zvýraznené pozadie je spôsobené citlivosťou Laplaceovho operátora na šum.



**Obrázok 4.3.** Hore zľava pôvodný obrazok, vyhladenie spriemerovaním, dole zľava vyhladenie Gausiánom a mediánový filter.



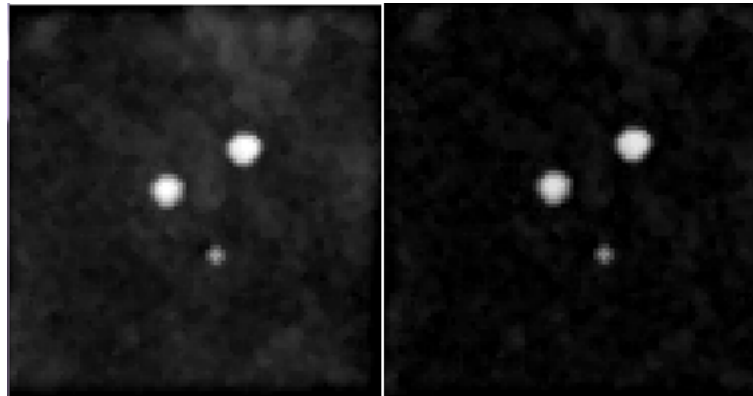
**Obrázok 4.4.** Porovnanie metód ostrenia na mikroskopických snímkach, naľavo Laplaceovým operátorom, vpravo metódou Unsharp Masking.



**Obrázok 4.5.** Hore zľava ostrenie pôvodného obrázku, obrázku vyhladeného pomocou priemerovania, Gaussovským a mediánovým filtrom.

Na obr. 4.5 je ukážka vyhladenia pomocou mediánového filtru s veľkosťou 3x3 a následné ostrenie implementované metódou Unsharp masking. Keďže častice tvoria tmavé štruktúry a pozadie má rôznu intenzitu jasu môžeme použiť black top hat transformá-

ciu na zvýraznenie častíc oproti pozadiu. Efekt použitia black top hat transformácie môžeme vidieť na obrázku 4.6.

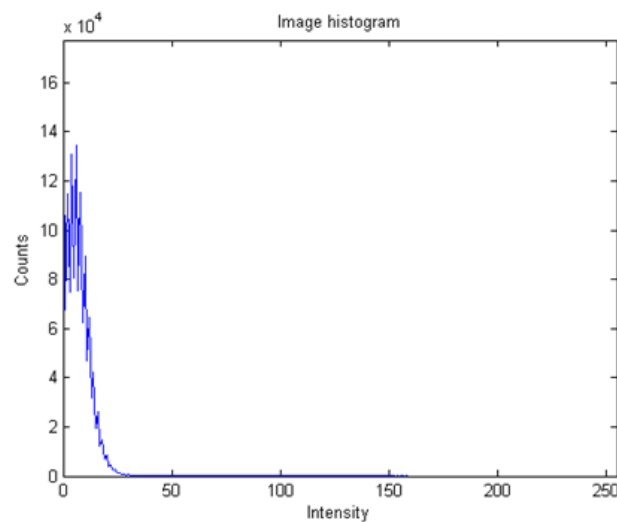


**Obrázok 4.6.** Použitie black top hat transformácie, zľava obraz bez transformácie a obraz s transformáciou.

#### 4.2.1 Výber prahovacej metódy

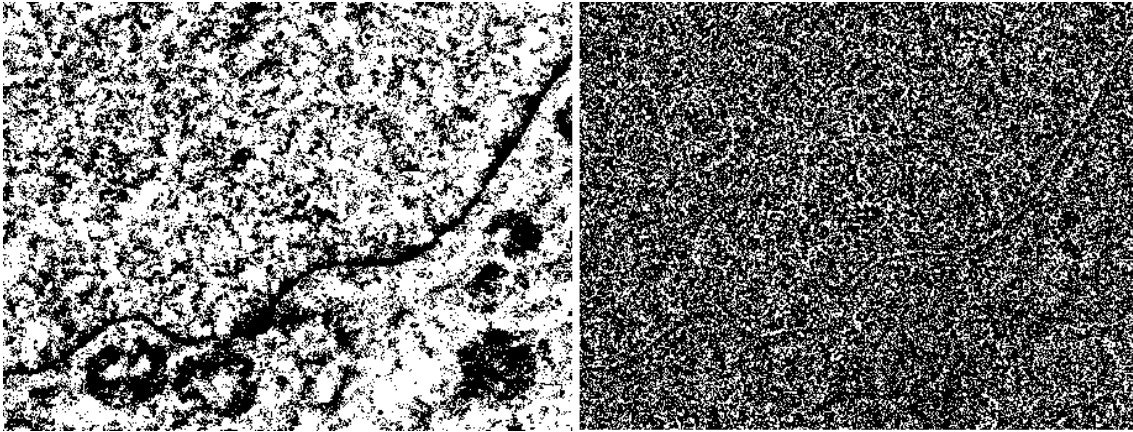
Na mikroskopické snímky boli ďalej aplikované prahovacie metódy uvedené v kapitole 2.3.1 za účelom ich segmentácie. Použitím prahovacej metódy sa snažíme o binárny obraz, v ktorom budú segmentované všetky častice od pozadia.

Ako prvé bolo realizované prahovanie podľa histogramu. Ukážka histogramu jasových hodnôt mikroskopickej snímky po black top hat transformácií je na obr. 4.7. Z histogramu je možné odhadnúť hodnotu prahu a použiť globálne prahovanie, ktoré dosahuje uspokojivú segmentáciu častíc.



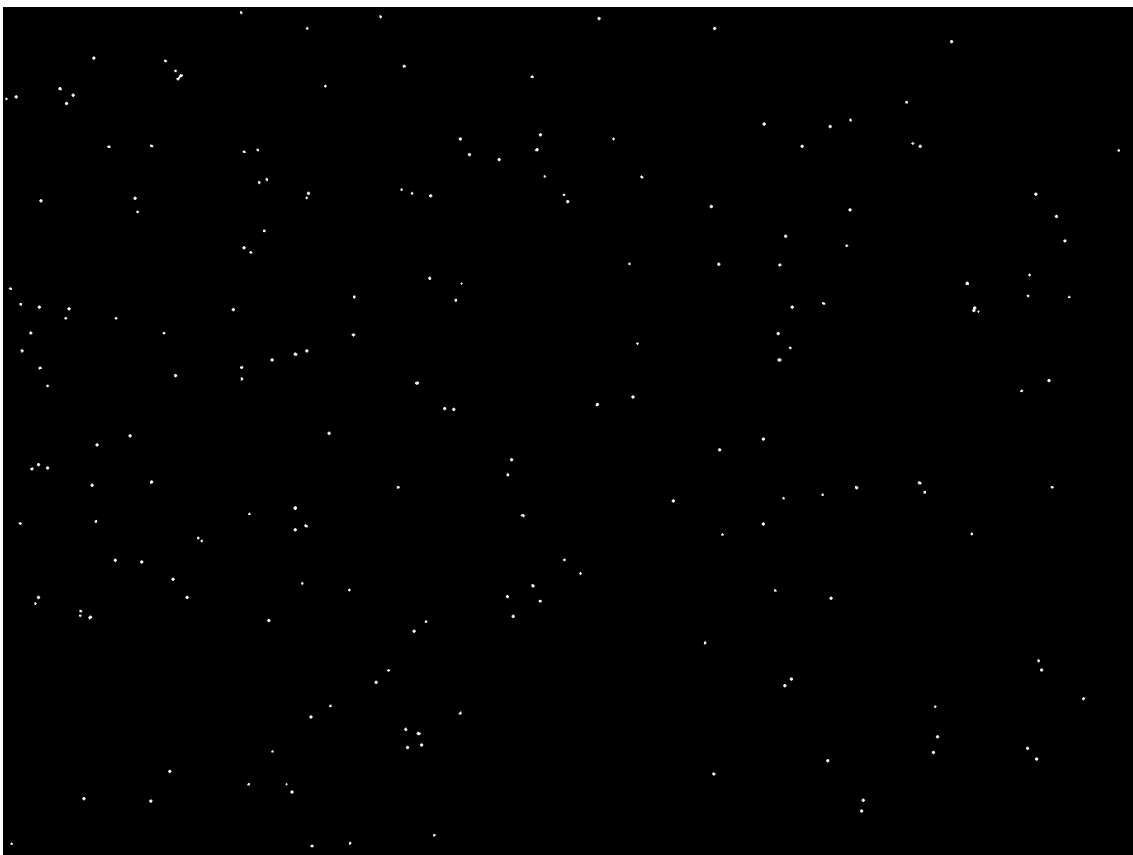
**Obrázok 4.7.** Histogram jasových hodnôt po black top hat transformácií.

Druhou možnosťou je Otsu prahovanie. Algoritmus hľadania maximálneho medzi-triedneho rozptylu je implementovaný v knižnici OpenCV. Na obr. 4.8 je implementovaná funkcia Otsu prahovania aplikovaná na vyhladené a zaostrené mikroskopické snímky. Ako je z obrázkov vidieť automatická voľba prahu podľa Otsu metódy nie je pre tento typ snímok vhodná, pretože zvolená hodnota prahu nesegmentuje správne častice.



**Obrázok 4.8.** Výsledný binárny obraz s Otsu prahovaním bez a s použitím black top hat transformácie.

Ako tretiu variantu na snímky aplikujeme metódu adaptívneho prahovania. Na obrázku 4.9 je výsledok adaptívneho prahovania, ktoré správne segmentovalo častice. Výhodou adaptívneho prahovania oproti voľbe prahu podľa histogramu je, že pri jeho použití nie je potrebné stanovenie prahu pre každú snímku zvlášť.



**Obrázok 4.9.** Binárny obraz po adaptívnom prahovaní.

Po otestovaní rôznych možností metód predspracovania na trénovacej množine snímok, bola vybraná kombinácia metód s čo najväčšou presnosťou segmentácie na testovacích snímkach. Kritériom pri tom bola čo najmenšia relatívna chyba detekovaných častíc. Z vyhladzovacích metód bol pre jeho spomenuté vlastnosti zachovania hrán vybraný mediánový filter. Následne aj keď mal Laplaceov operátor lepšie výsledky v zaostrení

snímok, bola vybraná metóda Unsharp masking v kombinácii s transformáciou black top hat s následným adaptívnym prahovaním. Použitie týchto metód viedlo vo výsledku k úspešnej detekcii všetkých častíc na mikroskopických snímkach. Výber adaptívneho prahovania prispieva k automatizácii prahovania častíc a k automatizácii detekovania mikroskopických snímkov.

# Kapitola 5

## Návrh aplikácie pre detekciu a analýzu mikroskopických snímok

Súčasťou práce je aplikácia, ktorej úlohou je prezentovať vybrané metódy detekcie a analýzy mikroskopických snímok. Táto aplikácia umožňuje aplikáciu metód predspracovania, detekcie a mapovania častíc. Súčasťou aplikácie je ďalej nástroj štatistickej analýzy rozloženia častíc a nástroj simulácie bodov v ploche a priestore.

### 5.1 Štruktúra aplikácie

Aplikácia sa skladá z troch modulov, modul detekcie častíc, modul analýzy rozloženia častíc a modul simulácie. Tieto moduly navzájom komunikujú prostredníctvom súboru dát.

#### 5.1.1 Modul detekcie

Modul detekcie slúži k detekovaniu, klasifikácii a uloženiu dát s časticami mikroskopických snímok. Obsahuje metódy predspracovania a segmentácie obrazu vybrané v kapitole 4 pre mikroskopické snímky častíc popísané v časti 4.1.

Základné funkcie modulu detekcie:

- zobrazenie snímok
- aplikácia metód predspracovania
- segmentácia a klasifikácia častíc
- uloženie dát do súboru

#### 5.1.2 Modul analýzy rozloženia častíc

Modul analýzy rozloženia častíc obsahuje modul mapovania častíc a nástroj štatistickej analýzy rozloženia častíc v ploche a v priestore. Nástroj mapovania obsahuje metódy predspracovania a segmentácie vybrané v kapitole 4. Ďalej modul obsahuje metódy mapovania uvedené v kapitole 3.1, ktoré sa aplikujú na binárne snímky po segmentácii častíc. Nástroj štatistickej analýzy umožňuje načítanie súboru dát a aplikáciu metód distribúcie vzdialeností v ploche a v priestore na dáta zo súboru.

Základné funkcie modulu analýzy rozloženia častíc:

- Funkcia mapovania
  - zobrazenie snímok
  - aplikácia metód predspracovania
  - aplikácia metód mapovania častíc
- Štatistická analýza rozloženia častíc
  - načítanie častíc zo súboru
  - zobrazenie grafického výstupu analýzy rozloženia bodov v 2D a 3D

### ■ 5.1.3 Modul simulácie

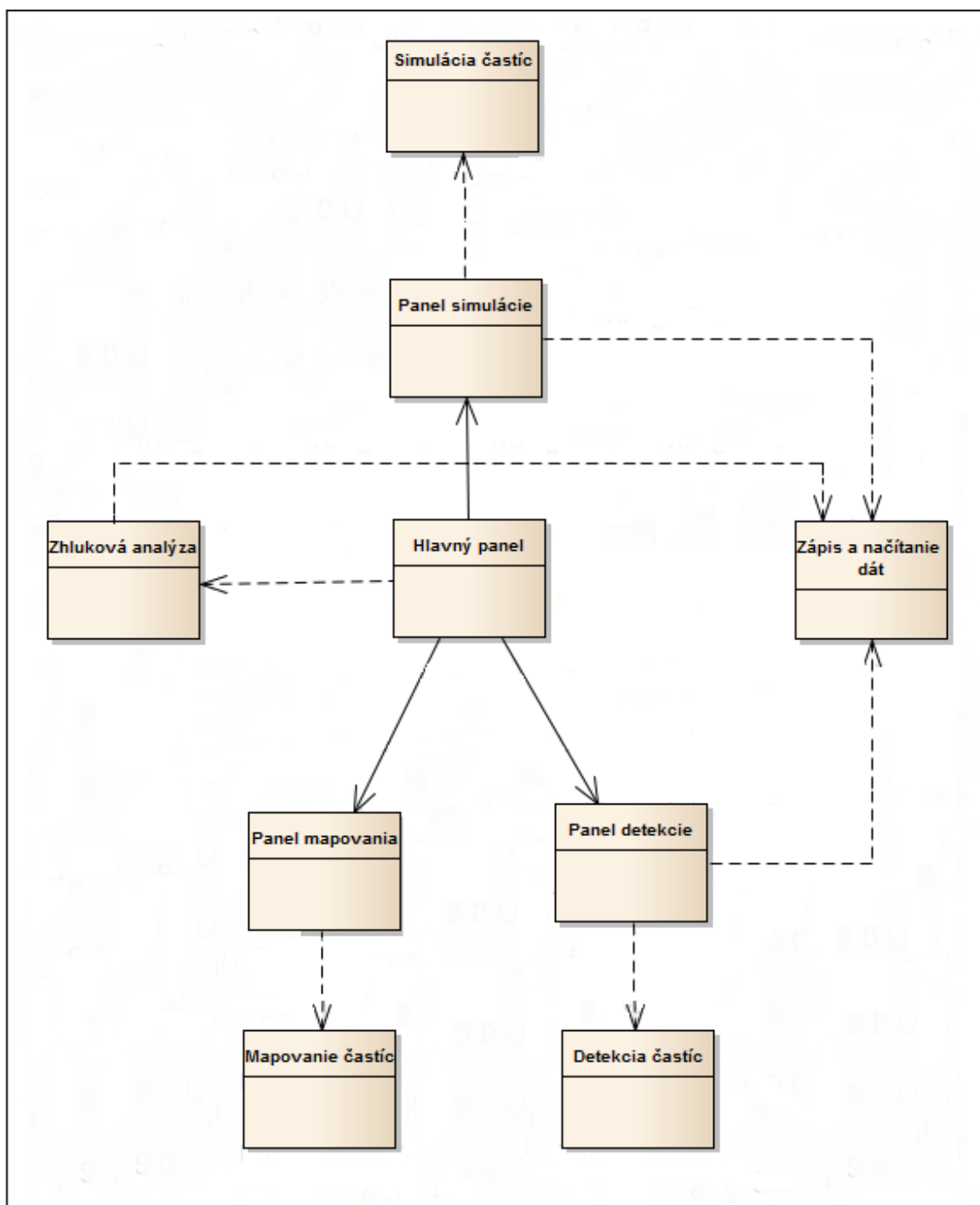
Modul simulácie umožňuje simuláciu a zobrazenie bodov v ploche a v priestore. Simulované body sú jedného alebo dvoch typov a sú rozložené náhodne alebo v zhlukoch. Ďalej je možná simulácia kolokalizácie bodov dvoch typov. Popis simulovaných dát pozostáva z popisu ich polohy a príznaku či ide o typ častice 1 alebo typ častice 2, pričom nám nezáleží na tom, aký je rozdiel medzi jednotlivými typmi častíc.

Základné funkcie modulu simulácie:

- simulácia a zobrazenie náhodného rozloženia bodov v 2D a 3D
- simulácia a zobrazenie zhlukovaných bodov v 2D a 3D
- simulácia a zobrazenie kolokalizovaných bodov v 2D a 3D
- uloženie dát do súboru

Na obr. 5.1 je návrh aplikácie detekcie a analýzy častíc pomocou doménového diagramu štruktúry.





Obrázok 5.1. Doménový model aplikácie detekcie a analýzy častíc.

# Kapitola 6

## Implementácia aplikácie pre detekciu a analýzu mikroskopických snímok

V nasledujúcej kapitole je popísaná implementácia jednotlivých modulov podľa návrhu v kap. 5. Budú tu popísané realizácie metód detekcie častíc, realizácia metód analýzy rozloženia častíc spolu s realizáciou intervalov spoľahlivosti, ako aj popis realizácie simulácie častíc.

### 6.1 Realizácia a používané knižnice

Jednotlivé metódy sú implementované v aplikácii v programovacom jazyku Java. Grafické rozhranie využíva Java knižnicu Swing [34]. Ďalej sú v aplikácii používané knižnice určené k spracovaniu a zobrazeniu obrazových dát:

- OpenCV [35] - knižnica s funkciami spracovania obrazu, počítačového videnia a strojového učenia
- Java FX [36] - platforma s balíkom grafických funkcií
- Jzy3D [37] - Open Source knižnica pre modelovanie priestorových dát

Hlavné menu aplikácie je rozdelené do troch častí: detekcia častíc, analýza častíc a simulácia častíc viz obr. 6.13. Výber detekcie častíc vytvorí nový panel detekcie, v analýze častíc sú na výber mapovanie alebo štatistická analýza rozloženia častíc a simulácia častíc vytvorí panel simulácie.

### 6.2 Implementácia metód detekcie častíc

V aplikácii sú implementované metódy mediánovej filtrácie, metóda ostrenia Unsharp masking a black top hat transformácia s využitím knižnice OpenCV. Veľkosť konvolučnej masky je užívateľsky voliteľná a závisí od veľkosti detekovaných častíc. V prípade detekovania častíc dvoch typov je zvolená veľkosť masky nastavená na priemer veľkosti väčšej častice, ktorá je 12 px. V prípade detekovania častíc s priemerom 6 px je možné nastaviť veľkosť na polovičnú. Z prahovacích metód je implementované adaptívne prahovanie. Pri implementácii je použitá funkcia `adaptiveThreshold` z knižnice OpenCV. Prah je počítaný vážením Gaussovským jadrom zvolenej veľkosti a odpočítaním konštanty. Vstupné parametre, ktoré sú veľkosť Gaussovského okna a konštanta boli zvolené iteráciou parametrov s podmienkou minimálnej chyby segmentácie častíc na testovacích dátach. Ako alternatíva k nemu je implementovaná aj možnosť globálneho prahovania, pri ktorej je hodnota prahu zvolená užívateľom.

#### 6.2.1 Klasifikácia a popis častíc

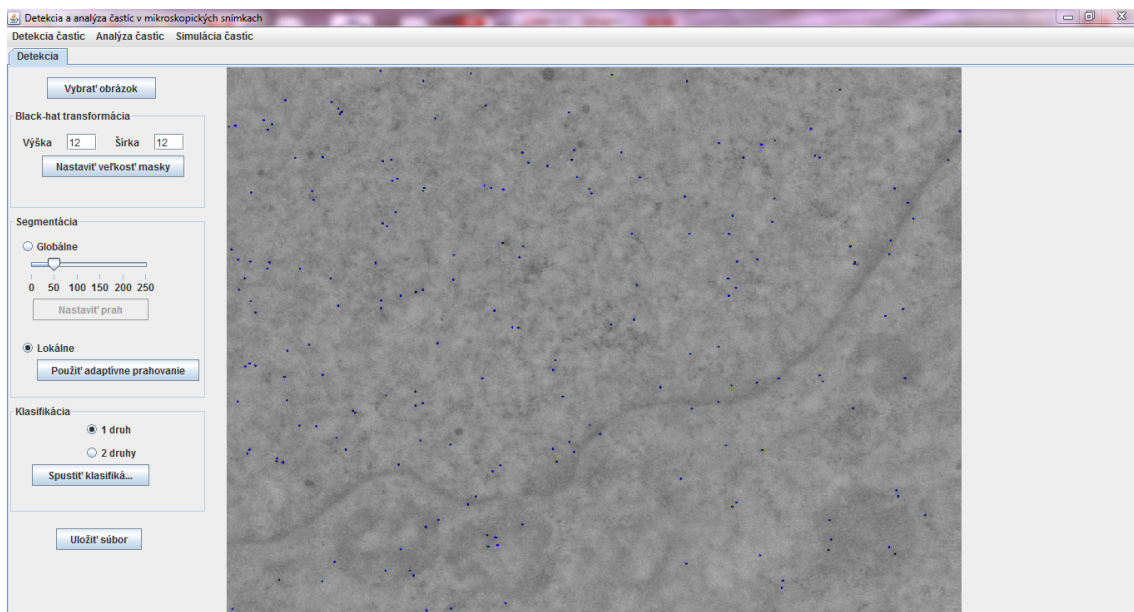
K detekcii obrysov segmentovaných častíc je následne použitý algoritmus podľa [15] viz 2.4 a implementovaný použitím funkcie `findContours` z knižnice OpenCV. Po detekovaní môžeme objekty klasifikovať do tried podľa špecifických atribútov (príznakov)

príznak	popis výpočtu alebo funkcie
obvod (perimeter)	arcLength
obsah (area)	contourArea
rozmery opísaného obdĺžnika častici a,b zaoblenie	minAreaRect $\frac{4area}{\pi d^2}$
priemer (diameter)	$\sqrt{\frac{4area}{\pi}}$
pomery strán (aspect ratio)	$\frac{max(a,b)}{min(a,b)}$
stred častice	stred opísaného obdĺžnika častici

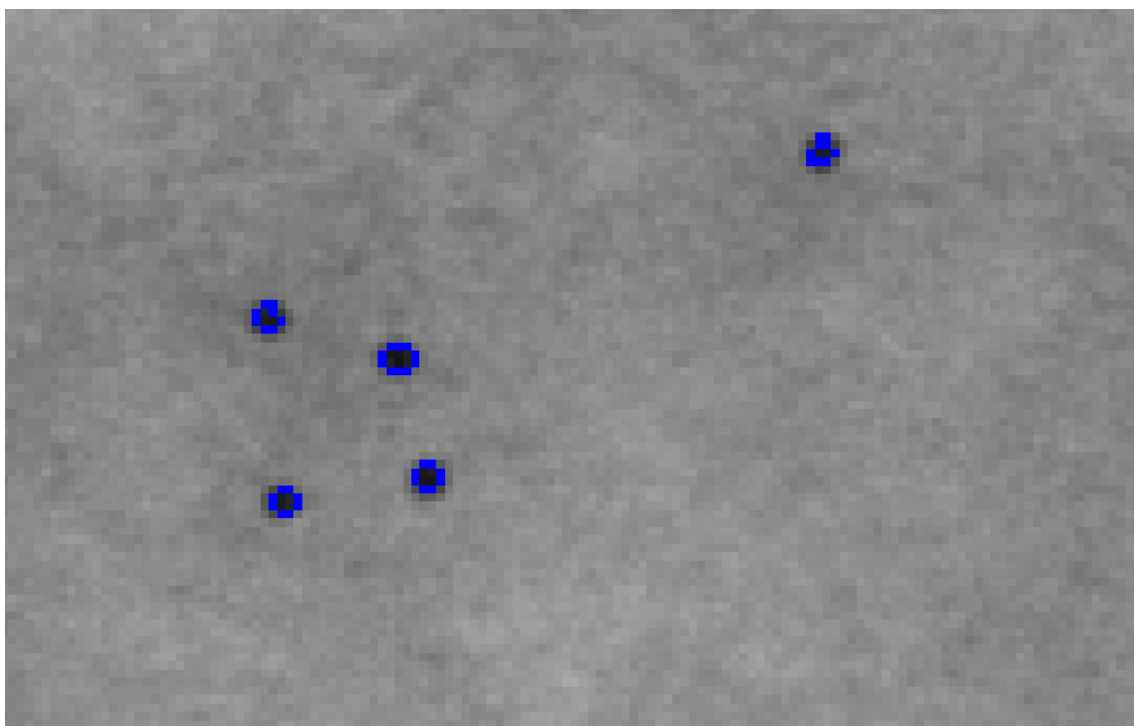
**Tabuľka 6.1.** Popis príznakov pre klasifikáciu objektov

jednotlivých kontúr, ktoré sú uvedené v tab. 6.1 a implementované v aplikácii v triede ShapeDescriptors. Prvé tri príznaky obvod, obsah a rozmery opísaného obdĺžnika častici sú implementované pomocou funkcií dostupných z knižnice OpenCV, pre ďalšie sú v tab.6.1 uvedené vzorce pre výpočet.

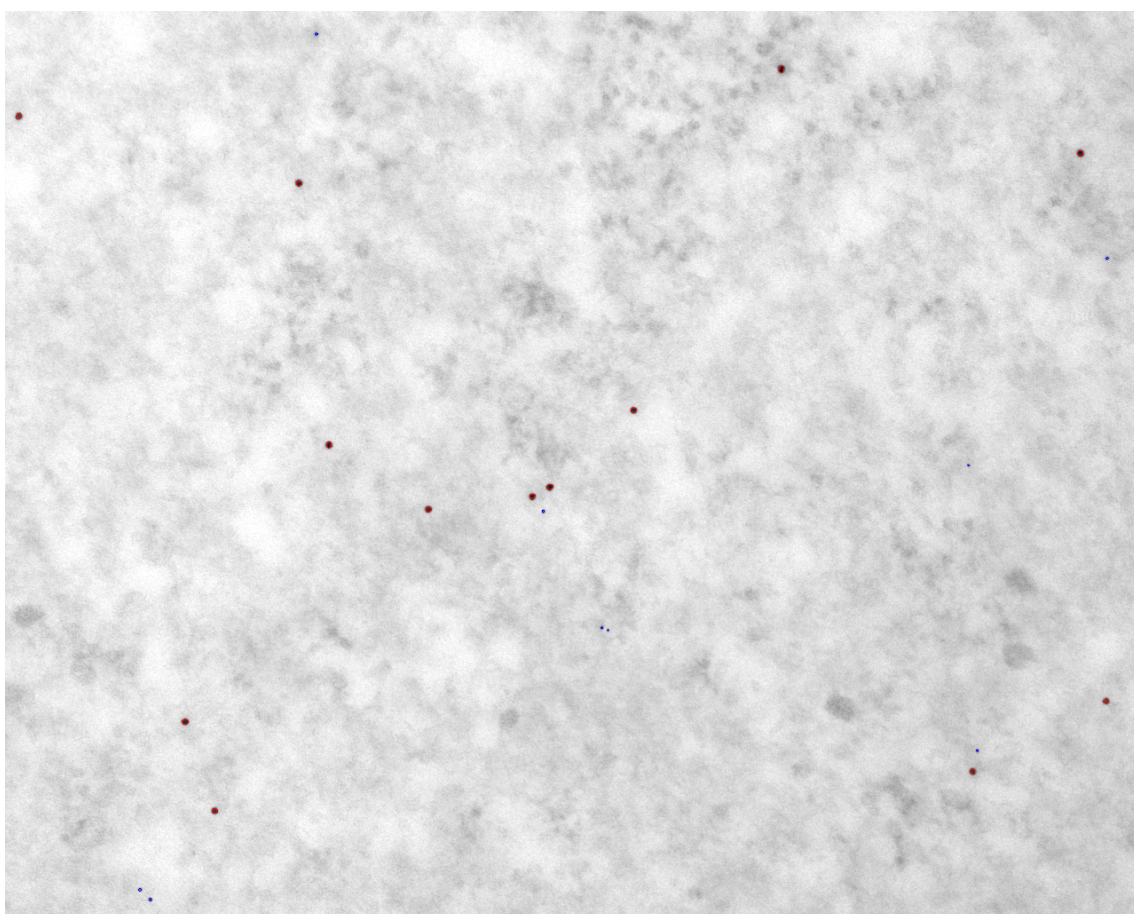
V prípade mikroskopických snímok je ku klasifikácii do dvoch tried ako postačujúci príznak použitý obvod kontúry, keďže zlaté častice sú pevne daných veľkostí. Klasifikáciu je možné prepínať z módu klasifikácie jednej triedy a klasifikácie do dvoch tried. Toto nastavenie umožňuje zabrániť chybným klasifikáciám častíc jedného typu v prípade, ak sú dve častice blízko seba. Výsledky detekcie častíc a následnej klasifikácie sú na obrázku 6.1 pre jeden typ častice a na obrázku 6.3 pre dva typy častíc.



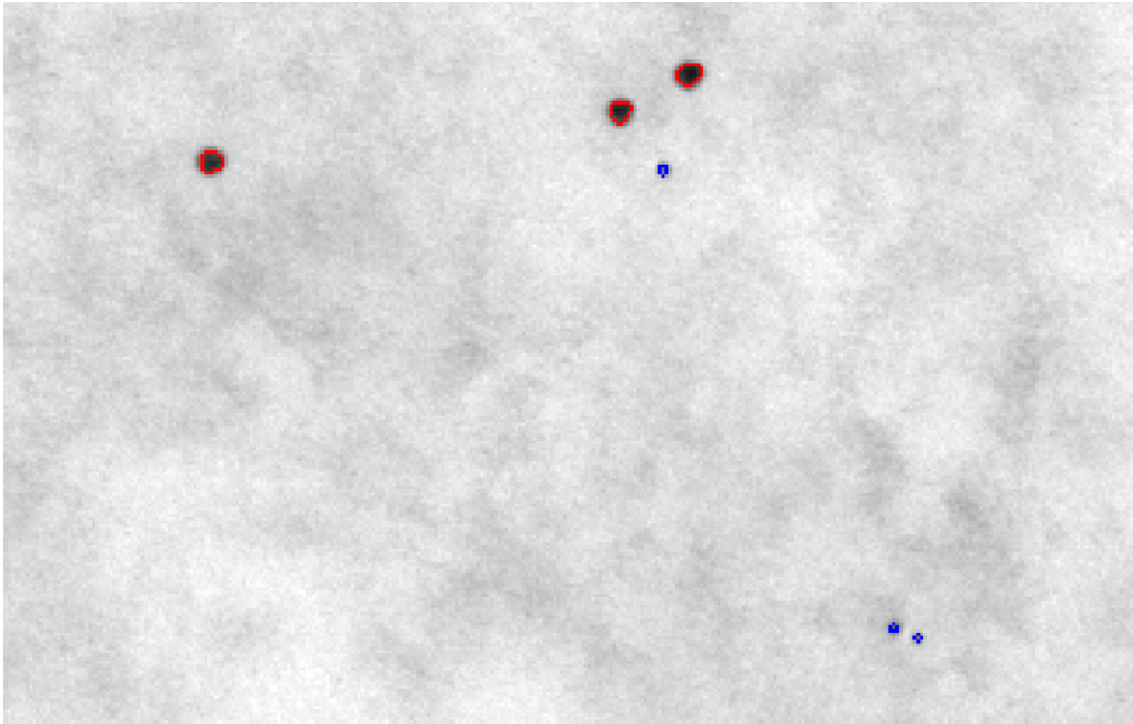
**Obrázok 6.1.** Detekcia a klasifikácia jedného druhu častice.



**Obrázok 6.2.** Detekcia a klasifikácia jedného druhu častice pri zväčšení.



**Obrázok 6.3.** Detekcia a klasifikácia dvoch druhov častíc.



Obrázok 6.4. Detekcia a klasifikácia dvoch druhov častíc - priblíženie.

## 6.3 Uloženie dát

Častica je implementovaná ako trieda `Particle` s vlastnosťami `id` častice, `stred` častice a `typ` častice. Súbor týchto častíc je uchovávaný prostredníctvom triedy `ParticleSet`, ktorý navyše obsahuje údaje o rozmeroch vzorky daných častíc. Súradnice stredov detekovaných častíc, ich klasifikácia a rozmery vzorky sú následne uložené do súboru s formátom CSV. Uloženie a načítanie častíc je implementované prostredníctvom samostatnej triedy v balíčku `Utils`.

## 6.4 Implementácia mapovania častíc

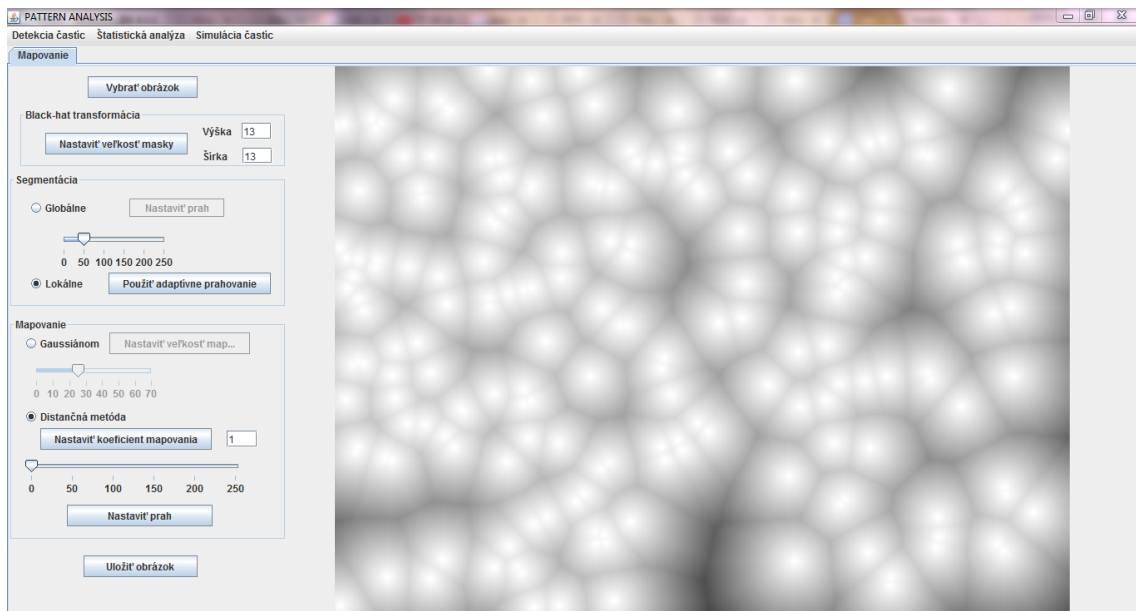
Mapovanie častíc je implementované v aplikácii dvoma spôsobmi uvedenými v kap. 3.1. Obidve metódy je možné aplikovať na binárny obraz získaný prahovaním.

### 6.4.1 Implementácia mapovania metódou distančnej transformácie

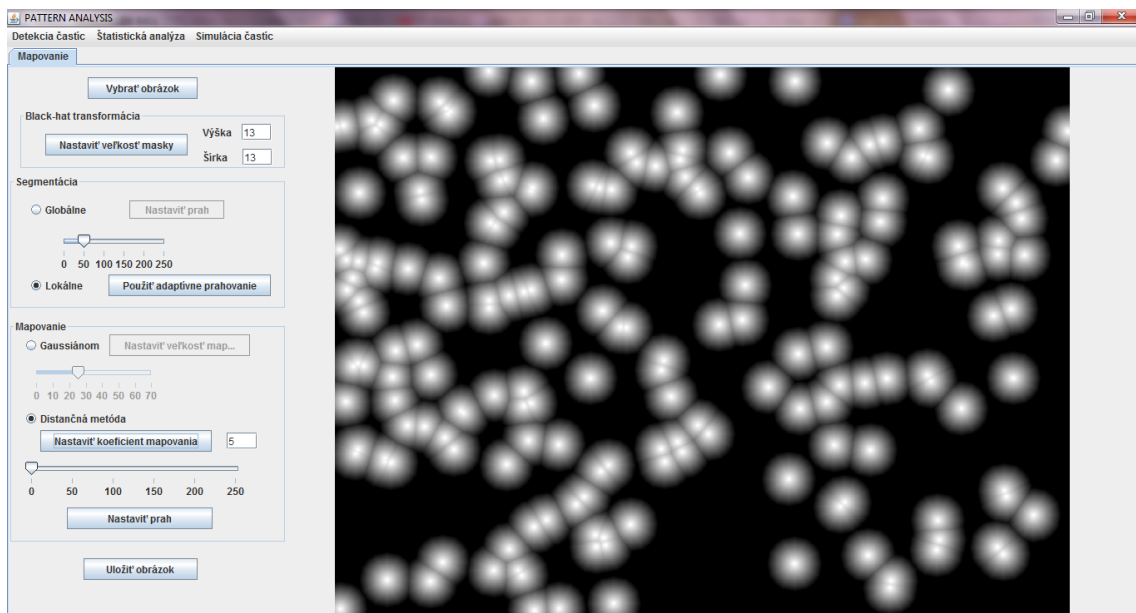
Prvou metódou mapovania je použitie distančnej transformácie. V prípade binárnych obrázkov, kde hodnota pixelu rovná nule predstavuje časticu a pixel s hodnotou jedna pozadie, je možné metódu distančnej transformácie previesť pomocou algoritmu hľadania najkratšej cesty [38]. Algoritmus pre každý pixel hľadá najkratšiu cestu k nulovému pixelu, pričom cesta pozostáva z vertikálnych, horizontálnych a diagonálnych posunov. Tento algoritmus je implementovaný pomocou funkcie `distanceTransform` z knižnice `OpenCV` s použitím euklidovskej vzdialenosti.

Po prevedení distančnej transformácie je možné upraviť veľkosť oblastí mapovania pomocou koeficientu saturácie. Prenásobením vzdialeností týmto koeficientom získame menšie oblasti, vďaka saturácii jasovej stupnice. Na obrázku 6.5 je výsledok distančnej

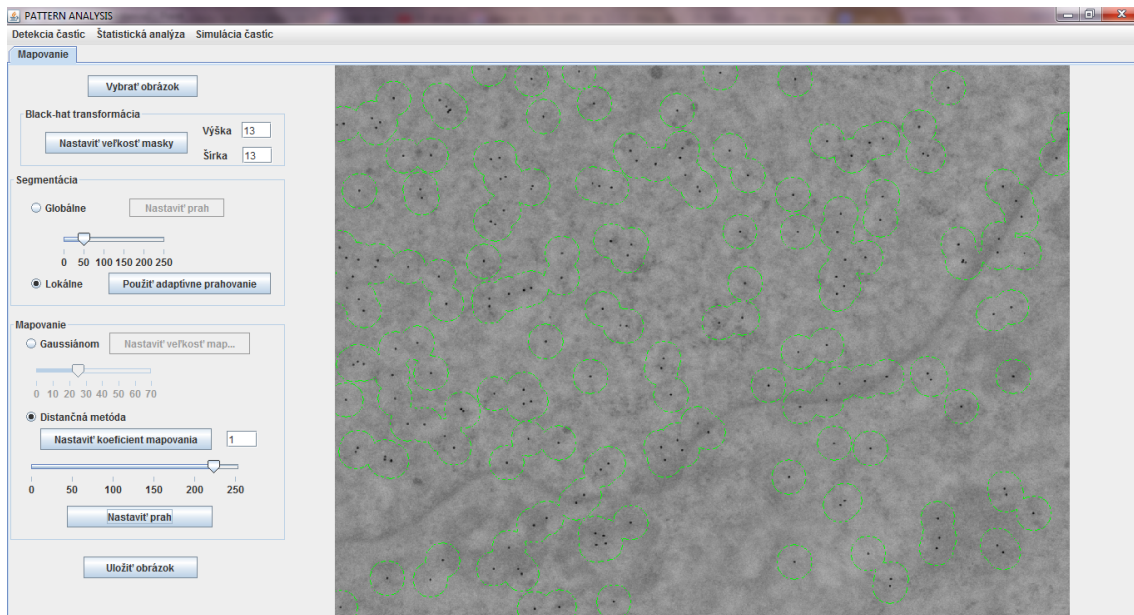
transformácie, na obrázku 6.6 je príklad výsledného prahovania pri nastavení koeficientu na hodnotu 5. Na obrázku 6.7 je výsledné mapovanie častíc po prahovaní.



Obrázok 6.5. Ukážka distančnej transformácie.



Obrázok 6.6. Ukážka distančnej transformácie s koeficientom saturácie jasovej stupnice.



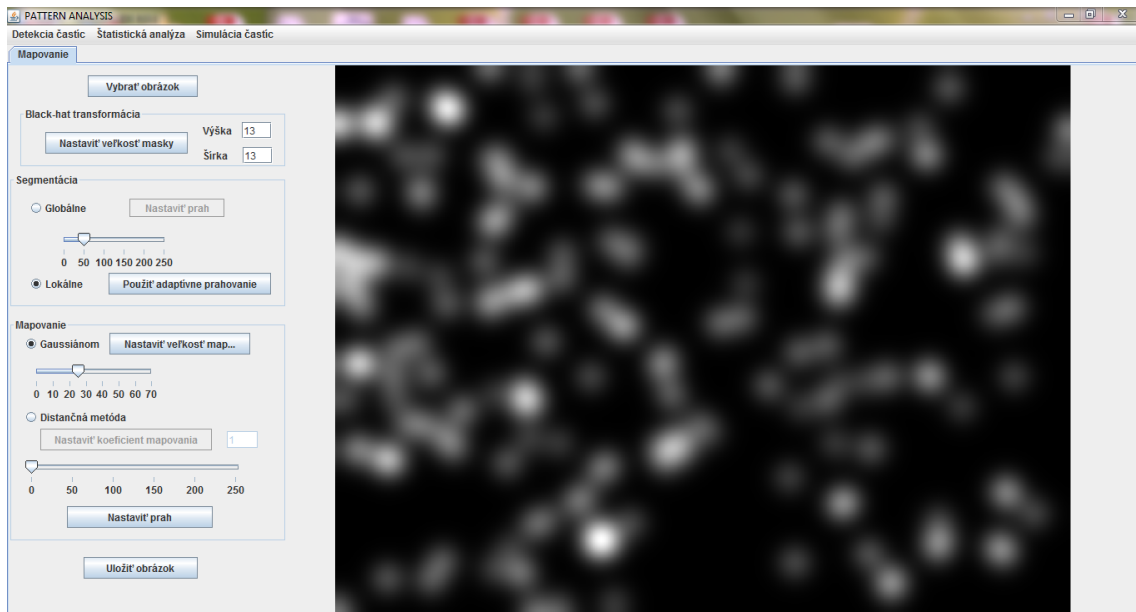
Obrázok 6.7. Mapovanie metódou distančnej transformácie.

### 6.4.2 Implementácia mapovania metódou rozmazania konvulčným jadrom

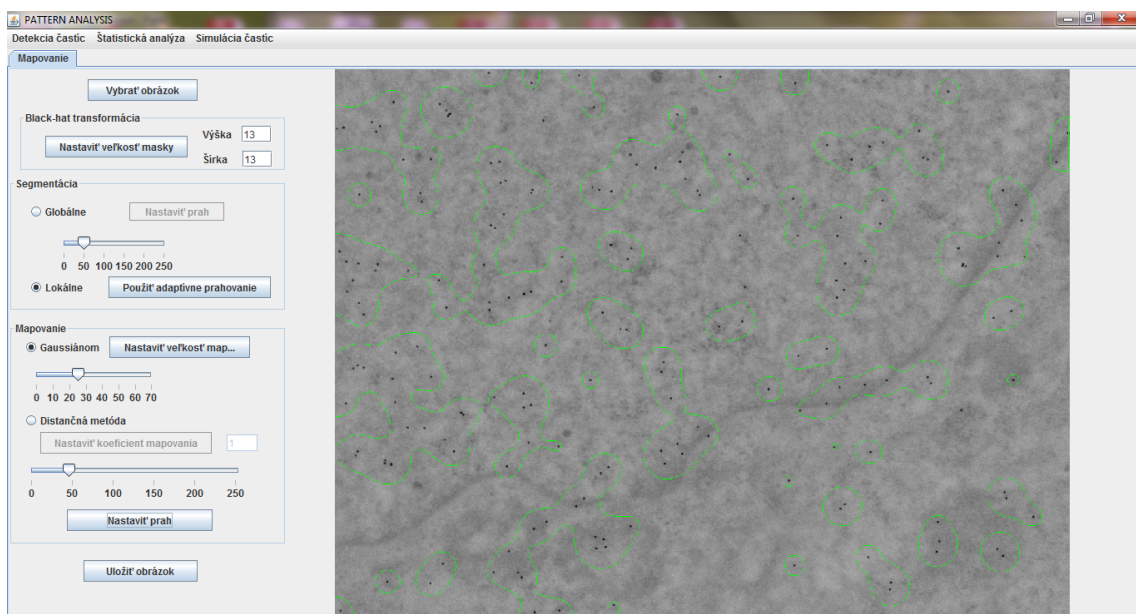
V prípade mapovania metódou rozmazania Gaussovským filtrom, veľkosť mapovania závisí od zvolenej hodnoty rozptylu. Keďže po rozmazaní sú hodnoty intenzít jednotlivých bodov veľmi malé, prevádzame normalizáciu na maximálnu hodnotu rozsahu jasovej intenzity, ktorá je v prípade mikroskopických snímok 255.

Mapovanie je realizované ako konvolúcia s Gaussovským jadrom s danou zvolenou hodnotou rozptylu, ktorú aplikujeme na binárny obraz častíc. Čím väčšiu hodnotu rozptylu zvolíme, tým je oblasť, do ktorej sa prerozdelená jasová intenzita väčšia. V aplikácii je konvolúcia s Gaussovským jadrom implementovaná použitím funkcie GaussianBlur z knižnice OpenCV, kde vstupom je binárny obraz, veľkosť a rozptyl Gaussovského jadra. Rozptyl jadra je nastaviteľný na požadovanú hodnotu.

Po konvolúcii následne môžeme stanoviť prahovú hodnotu intenzity, do hodnoty ktorej sa majú vyznačiť oblasti s viac či menej frekventovanými časticami. Na obrázku 6.8 je rozmazanie binárneho obrazu Gausiánom a na obrázku 6.9 a 6.10 je výsledná mapa po prahovaní.

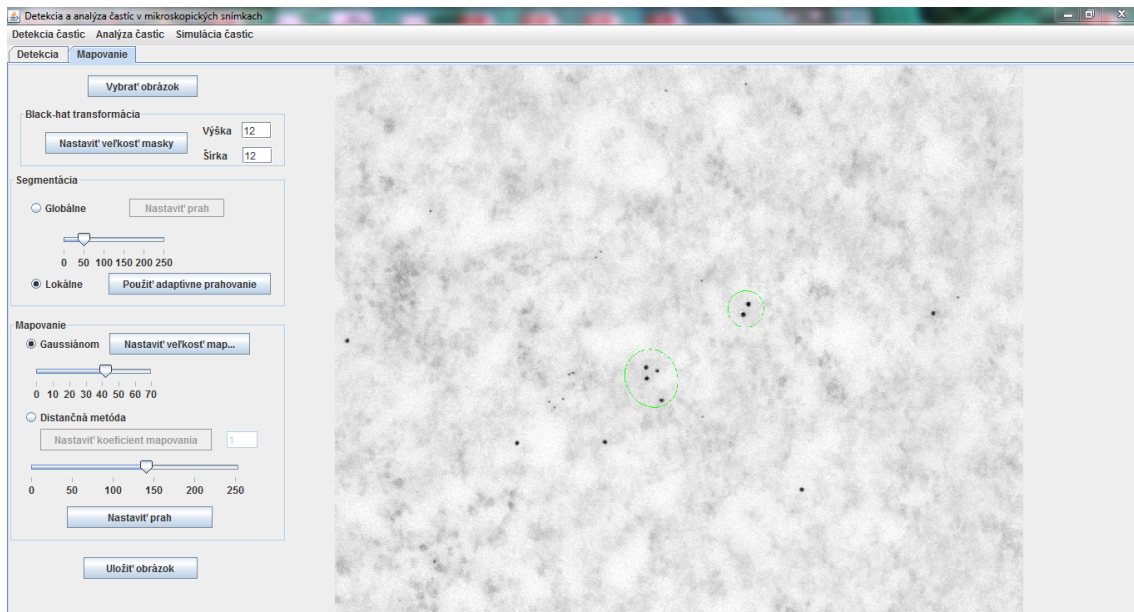


Obrázok 6.8. Rozmazanie Gaussovským filtrom.



Obrázok 6.9. Mapovanie častíc rozmazaním Gaussovským filtrom.





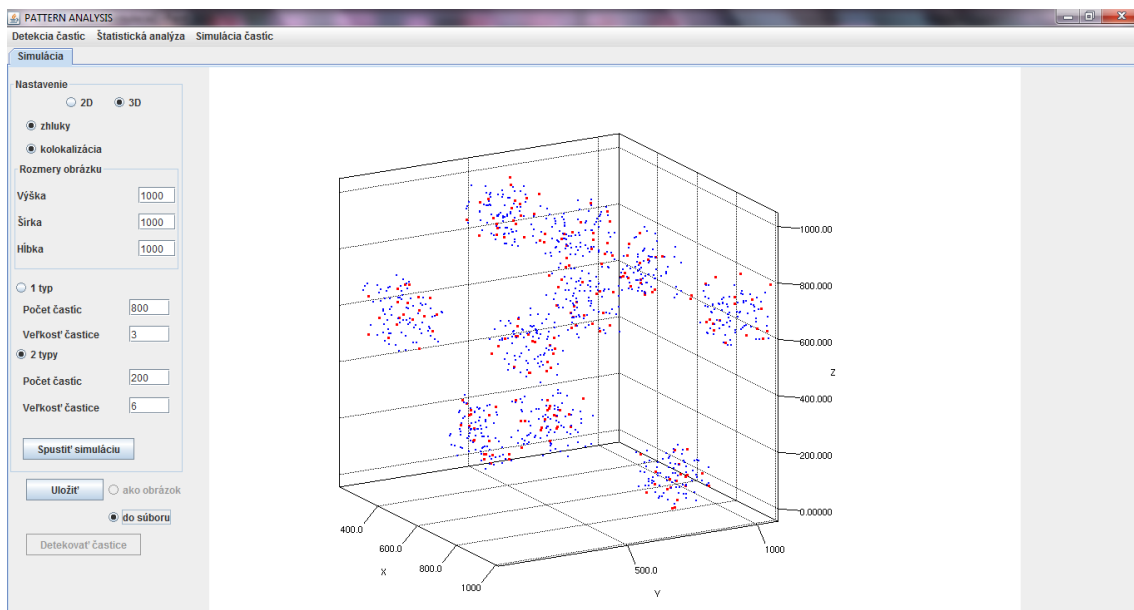
Obrázok 6.10. Mapovanie častíc dvoch typov rozmazaním Gaussovským filtrom.

## 6.5 Simulácia častíc v 2D a 3D

Aplikácia obsahuje panel simulácie častíc v 2D a 3D priestore. Generátor bodov generuje náhodne rozmiestnenie podľa rovnomerného rozdelenia vo zvolenom rozsahu, pričom je možný výber jednej a dvoch tried generovaných bodov. Takto simulované častice nám slúžia na overenie metód analýzy rozloženia častíc v ploche a priestore. Počet generovaných bodov je voliteľný. Rovnako je možné generovať body v zhlukoch a dve triedy bodov navzájom kolokalizovaných. Generovanie v zhlukoch je implementované na princípe náhodnej generácie rodičovských bodov, okolo ktorých sú následne generované ďalšie body. Ukážka náhodnej generácie dvoch tried v 2D je na obrázku 6.11. Ukážka simulácie zhlukovania a kolokalizácie častíc je na obrázku 6.12. Pre zobrazenie 3D priestoru aplikácia využíva knižnicu Jzy3d.

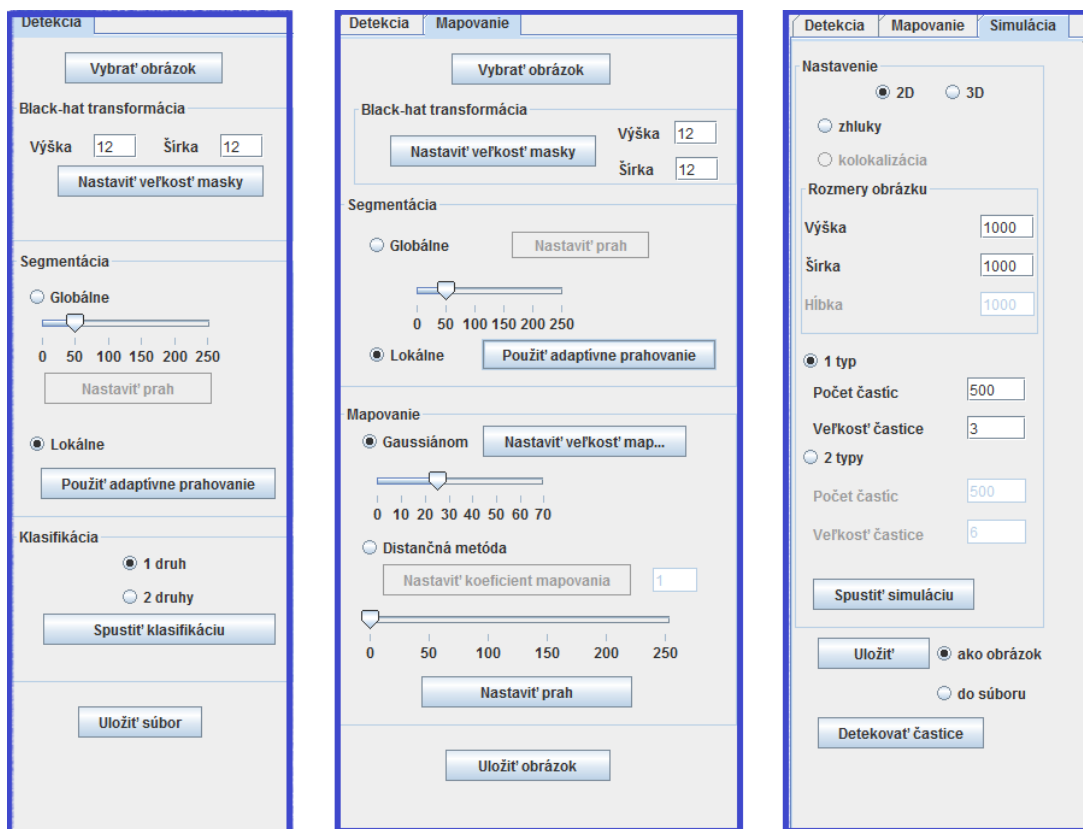


Obrázok 6.11. Simulácia dvoch tried náhodne rozmiestnených častíc v 2D priestore.



Obrázok 6.12. Simulácia dvoch tried zhlukovaných a kolokalizovaných častíc v 3D priestore.

Aplikácia je realizovaná formou panelov, medzi ktorými sa dá jednoducho prepínať. Implementácia jednotlivých panelov je zobrazená na obr. 6.13.



Obrázok 6.13. Panely detekcie, mapovania a simulácie.

## 6.6 Implementácia metód analýzy rozloženia častíc v 2D a 3D priestore

Do aplikácie boli implementované metódy analýzy rozloženia častíc v 2D a 3D priestore. Po načítaní súboru častíc vo formáte CSV sa spustí metóda pre 2D alebo 3D analýzu podľa dimenzie vstupných dát. Výsledok analýzy je párová korelačná funkcia definovaná v kap. 3, ktorá je vhodným diskriminantom náhodného rozloženia častíc. Pre plošnú analýzu je počítaná použitím vzťahu (3.8) a (3.9) a následne vzťahom (3.10) a (3.11). Pre priestorovú analýzu sú implementované vzorce uvedené v kap. 3.3. V aplikácii je možné zvoliť analýzu rozloženia pre jeden druh častíc a analýzu rozloženia medzi dvoma druhmi častíc. V prvom prípade sa spustí metóda na výpočet párovej korelačnej funkcie, v druhom prípade sa vypočíta krížová párová korelačná funkcia pre analýzu interdistribúcie vzdialeností medzi triedami. Výstup analýzy je realizovaný grafom párovej korelačnej funkcie a krížovej párovej korelačnej funkcie s využitím knižnice JavaFX.

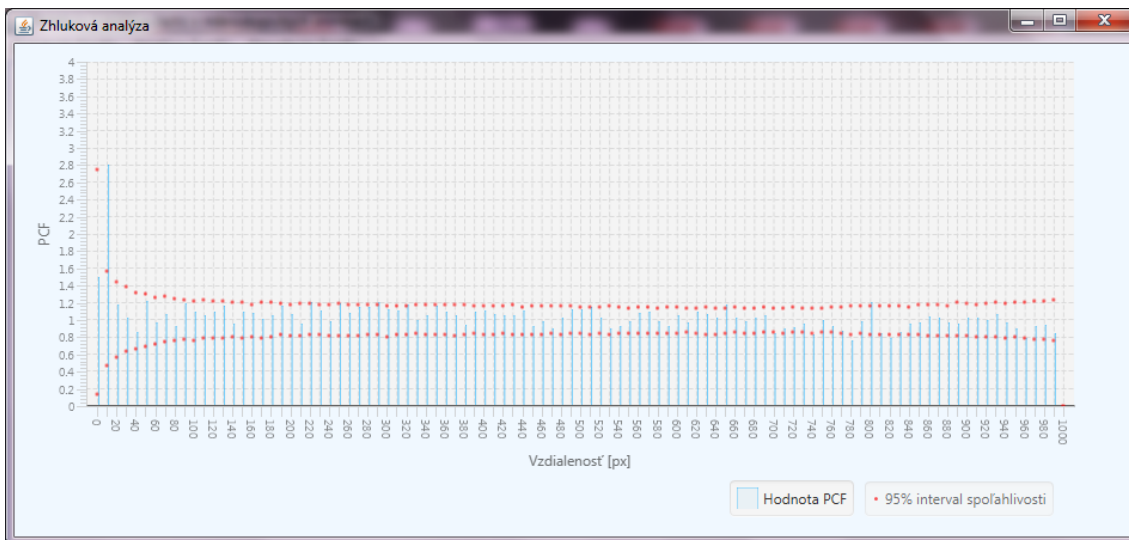
## 6.7 Výpočet geometrického kovariogramu

Výpočet párovej korelačnej funkcie (3.8) a (3.10) a krížovej párovej korelačnej funkcie (3.8) a (3.11) zahŕňa výpočet geometrického kovariogramu. Výpočet geometrického

kovariogramu je implementovaný dvoma spôsobmi. Analyticky je ho možné vypočítať podľa vzťahu (3.12) pre plošnú analýzu a vzťahu (3.14) pre priestorovú analýzu. Druhý spôsob implementácie spočíva v numerickom výpočte geometrického kovariogramu, kedy sa v priebehu jedného cyklu od 0 po  $2\pi$  a v prípade 3D analýzy v priebehu dvoch cyklov od 0 po  $2\pi$  spočítava priemerný prienik cez všetky uhly. Pre zjednodušenie a zrýchlenie výpočtu je cyklus implementovaný od 0 po  $\pi/2$ , čo na výsledok priemerného prieniku nemá vplyv. Diskretizácia v numerickom výpočte je príčinou menej presného výpočtu kovariogramu. Analytický výpočet je teda z hľadiska presnosti a rýchlosti lepší, ale ako bolo uvedené v kap. 3, jeho použitie je obmedzené len do určitých vzdialeností. Pre väčšie vzdialenosti je nutný numerický výpočet.

## 6.8 Testovanie náhodného rozloženia pomocou intervalu spoľahlivosti

Ako bolo uvedené v kap. 3 pre náhodne rozložené častice má párová korelačná funkcia a krížová párová korelačná funkcia približne hodnotu rovnú jedna. Aby sme vedeli zamietnuť hypotézu náhodného rozloženia častíc a videli významnosť výsledku analýzy obsahuje analýza výpočet 95% intervalov spoľahlivosti metódou Monte Carlo. Pri testovaní je zostrojených 1000 opakovaní náhodného rozloženia častíc. Ako minimálna hodnota intervalu je vzatá dvadsiatapiata hodnota a ako maximálna hodnota intervalu deväťstosedemdesiatapiata hodnota. Intervaly spoľahlivosti na obr. 6.14 sú znázornené červenými bodmi, pričom spodný z dvojice vertikálne položených bodov odpovedá spodnej hranici 95% intervalu spoľahlivosti a horný bod odpovedá hornej hranici 95% intervalu spoľahlivosti.



Obrázok 6.14. Graf funkcie párovej korelácie s 95% intervalom spoľahlivosti.

## Kapitola 7

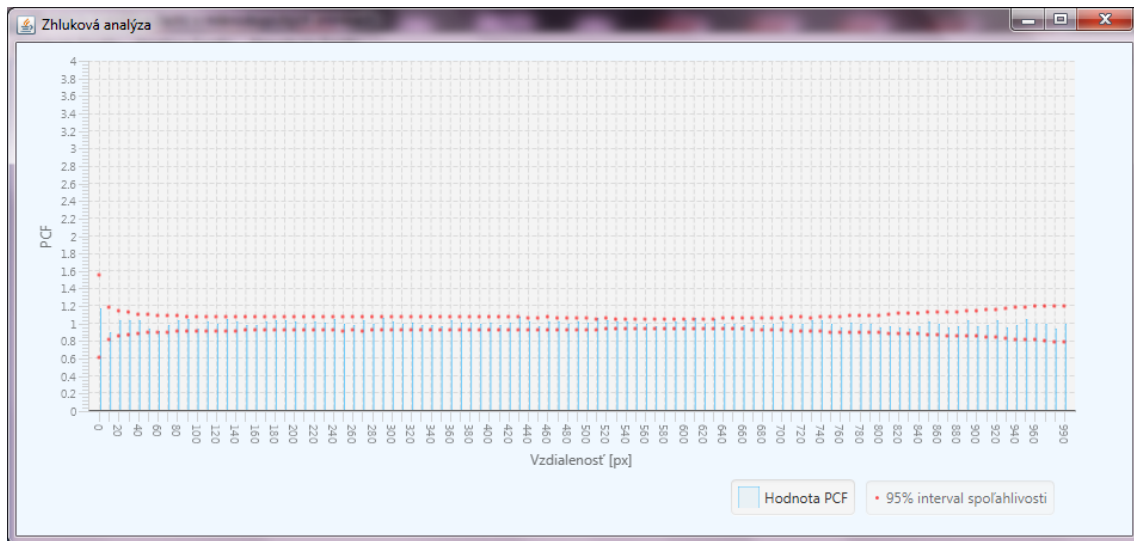
# Analýza rozloženia častíc na simulovaných dátach

V nasledujúcej časti sú zobrazené výsledky analýz na simulovaných dátach. Účelom je ukázať ako implementované metódy plošného a priestorového rozloženia častíc vyhodnocujú dané rozloženie. Pre zhlukovú analýzu bolo vygenerovaných 500 častíc s náhodným rozložením a 500 častíc rozmiestnených v desiatich zhlukoch. Pre analýzu kolokalizácie bolo vygenerovaných 500 častíc prvej triedy a 500 častíc druhej triedy. Rozmery okna simulovaných častíc je 1000 x 1000 pixelov. Rovnaký postup je použitý následne aj pre analýzu v priestore, kedy sú simulované body v priestore s rozmermi 1000 x 1000 x 1000 bodov.

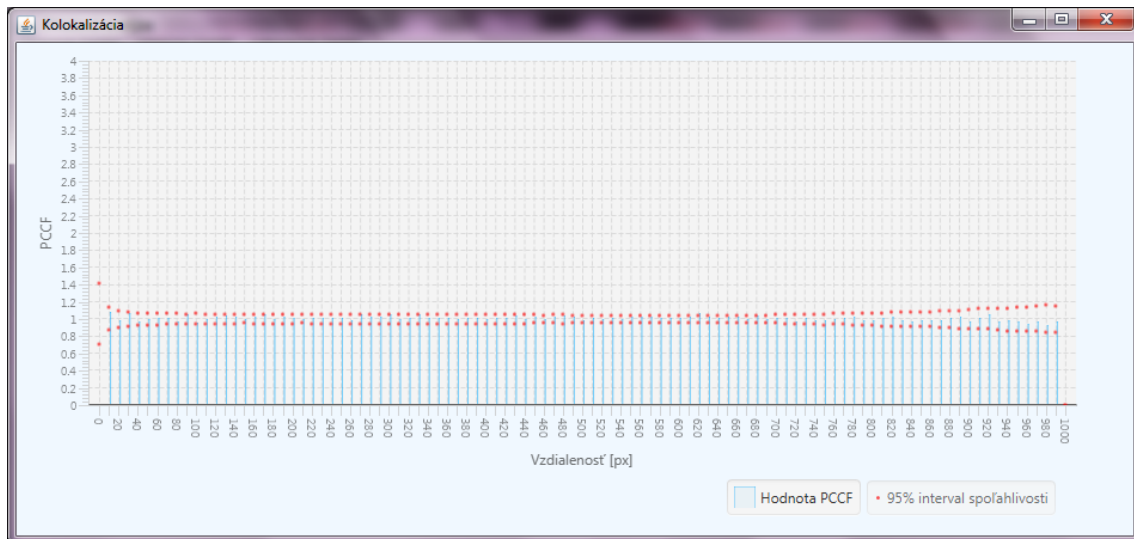
### 7.1 Výsledky plošnej analýzy rozloženia častíc na simulovaných dátach

Pri náhodnom rozložení simulovaných bodov môžeme na obrázku 7.1 pre plošnú analýzu vidieť výsledné hodnoty párovej korelačnej funkcie, ktoré sú rovné približne jednej, čo odpovedá ich náhodnému rozloženiu. Ďalej môžeme vidieť, že hodnoty sú v rozmedzí 95% intervalov spoľahlivosti náhodného rozmiestnenia dát. Rovnako na obrázku 7.2 môžeme vidieť hodnoty krížovej párovej korelačnej funkcie rovnajúce sa približne hodnote jedna v rozmedzí 95% intervalu spoľahlivosti. Naopak na obrázku 7.3, kedy sú body simulované v zhlukoch, hodnoty kolísajú vo väčšom rozmedzí a pre niektoré vzdialenosti sú mimo intervalu kritických hodnôt. Je teda možné hypotézu o náhodnom rozložení zamietnuť. Ďalej je na grafe možné vidieť, že vo vzdialenostiach 180 - 500 px sú hodnoty PCF nižšie ako jedna, čo odpovedá medzizhlukovým vzdialenostiam. Pre vzdialenosti mimo toto rozmedzie sú hodnoty PCF väčšie ako jedna, čo odpovedá vzdialenostiam medzi časticami v spoločnom zhluku a nárast pre väčšie vzdialenosti odpovedá vzdialenostiam medzi časticami z rôznych zhlukov. Rovnako pre kolokalizované častice môžeme podľa obrázku 7.4 zamietnuť hypotézu o ich vzájomnom náhodnom rozložení. Na obrázkoch je ďalej vidieť, že pri simulácií 500 častíc a 5 % významnosti sú intervaly spoľahlivosti v pomerne úzkom rozpätí hodnôt.

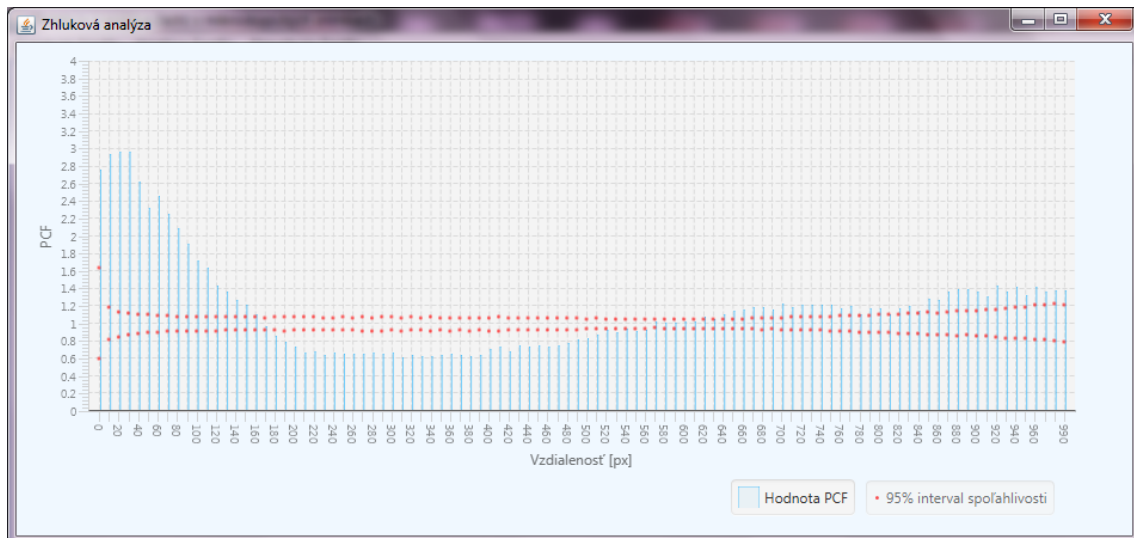
## 7. Analýza rozloženia častíc na simulovaných dátach



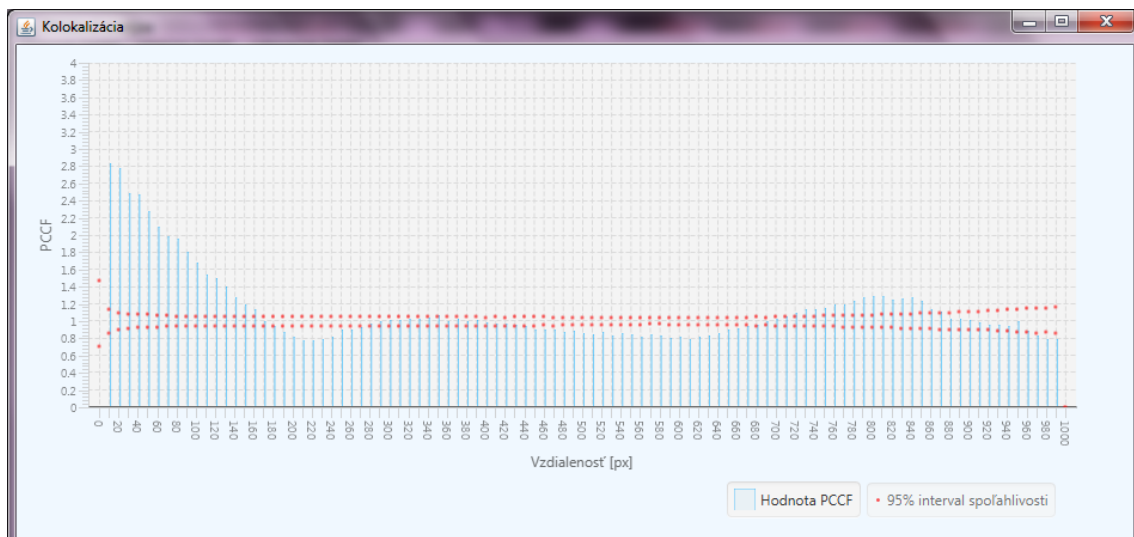
**Obrázok 7.1.** Analýza rozloženia na simulovaných bodoch s náhodným rozložením v 2D priestore.



**Obrázok 7.2.** Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných bodoch s náhodným rozložením v 2D priestore.



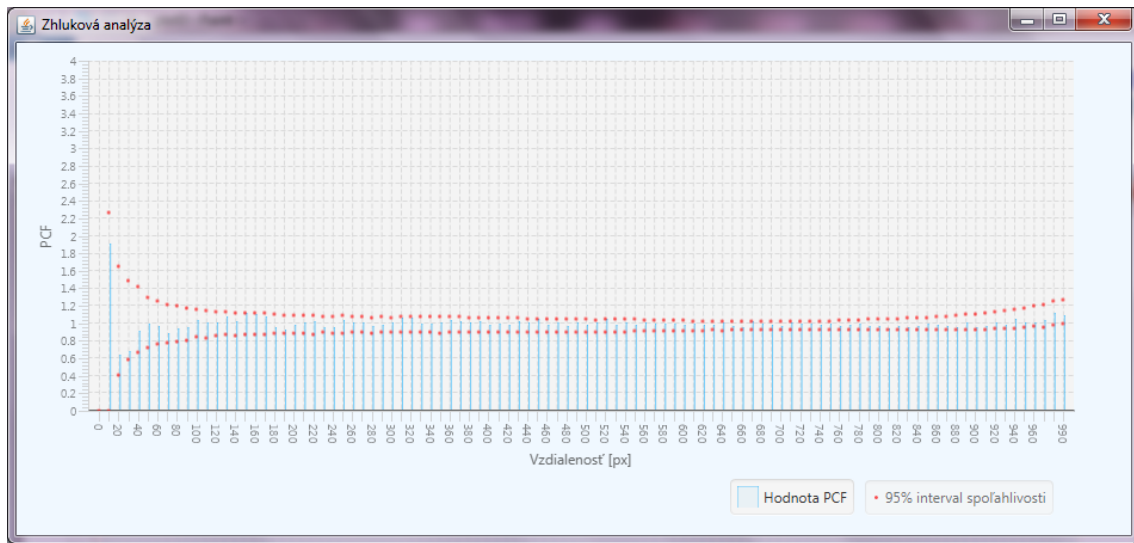
Obrázok 7.3. Analýza rozloženia na simulovaných bodoch v zhlukoch v 2D priestore.



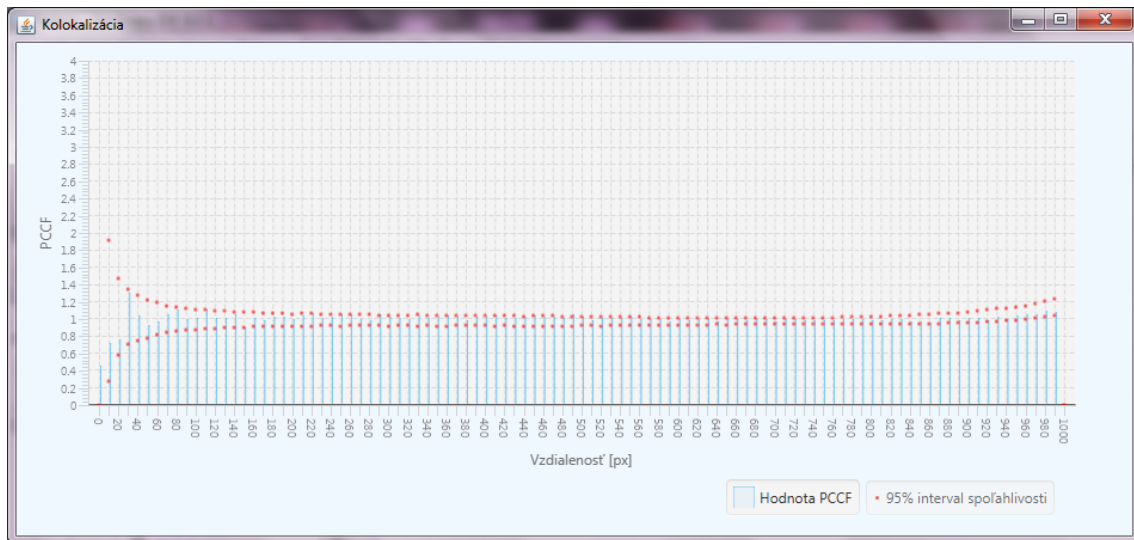
Obrázok 7.4. Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných kolokalizovaných bodoch v 2D priestore.

## 7.2 Výsledky priestorovej analýzy rozloženia častíc na simulovaných dátach

Pri náhodnom rozložení simulovaných bodov môžeme na obrázku 7.5 pre priestorovú analýzu vidieť výsledné hodnoty párovej korelačnej funkcie, ktoré sú rovnako ako v prípade plošnej analýzy rovné približne jednej a sú v rozmedzí 95% intervalov spoľahlivosti náhodného rozmiestnenia dát. Rovnako na obrázku 7.6 môžeme vidieť hodnoty krížovej párovej korelačnej funkcie rovnajúce sa približne hodnote jedna v rozmedzí 95% intervalu spoľahlivosti. Na obrázku 7.7 pre body simulované v zhlukoch, hodnoty kolísajú ešte vo väčšom rozmedzí ako v prípade plošnej analýzy a je možné hypotézu o náhodnom rozložení častíc zamietnuť. Rovnako pre kolokalizované častice môžeme podľa obrázku 7.8 zamietnuť hypotézu o ich vzájomnom náhodnom rozložení v priestore.

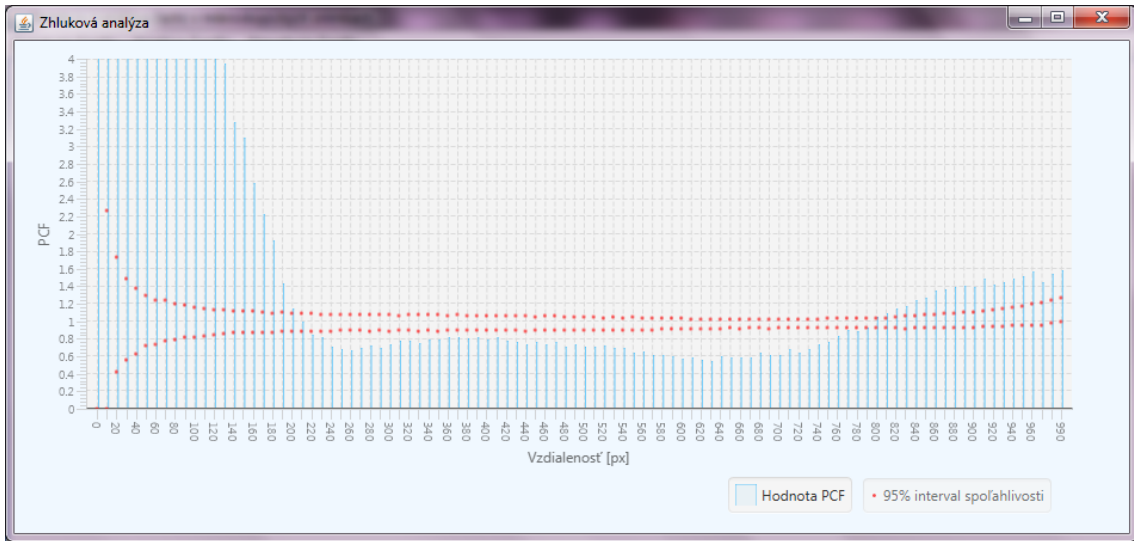


**Obrázok 7.5.** Analýza rozloženia na simulovaných bodoch s náhodným rozložením v 3D priestore.

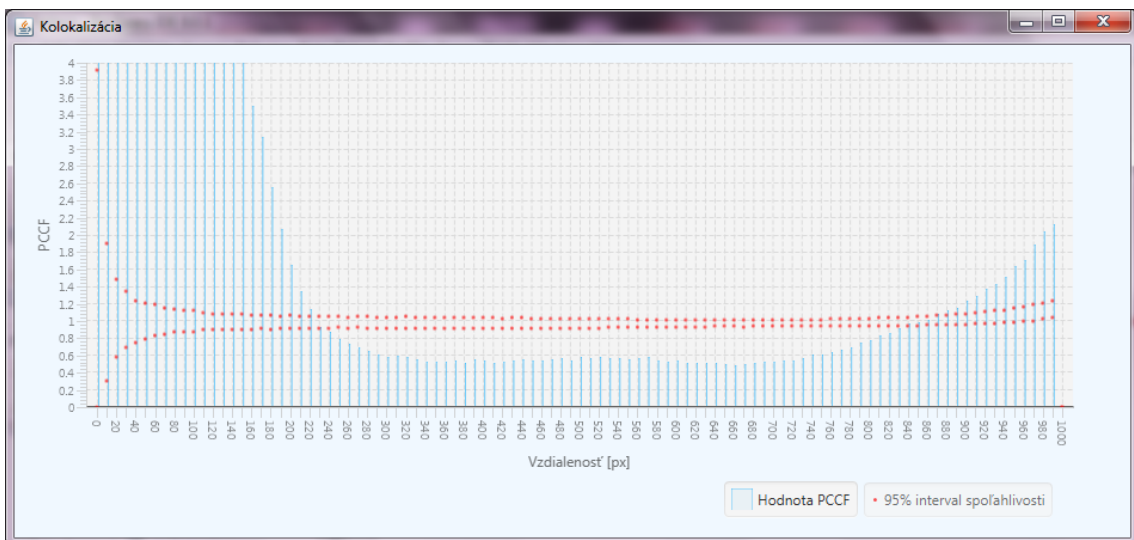


**Obrázok 7.6.** Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných bodoch s náhodným rozložením v 3D priestore.





Obrázok 7.7. Analýza rozloženia na simulovaných bodoch v zhlukoch v 3D priestore.



Obrázok 7.8. Analýza rozloženia dvoch tried na simulovaných kolokalizovaných bodoch v 3D priestore.

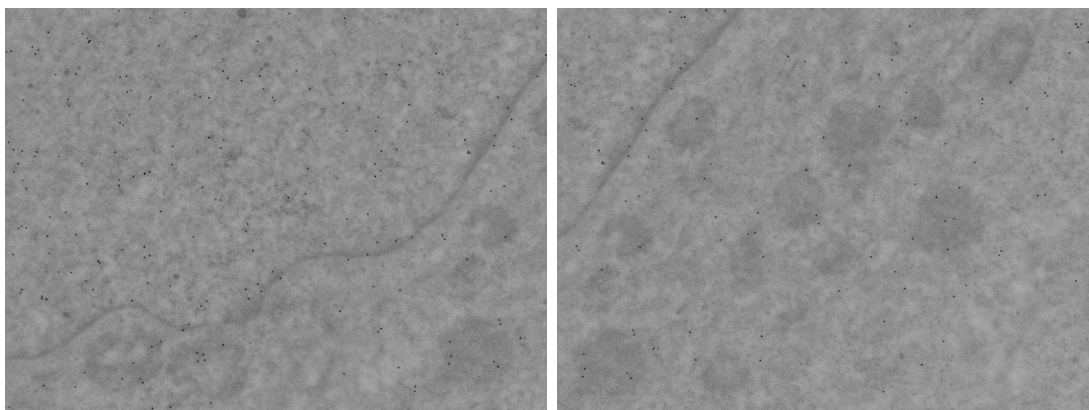
## Kapitola 8

### Výsledky analýzy rozloženia častíc na mikroskopických snímkach

V tejto kapitole sú zobrazené výsledky analýzy rozloženia častíc na reálnych dátach 4.1 po ich úspešnom detekovaní. Pre analýzu rozloženia častíc budú vybrané snímky, pre ktoré budú následne ukázané výsledky analýzy. Kompletne výsledky analýzy mikroskopických snímkov je potom možné nájsť v prílohe tejto práce.

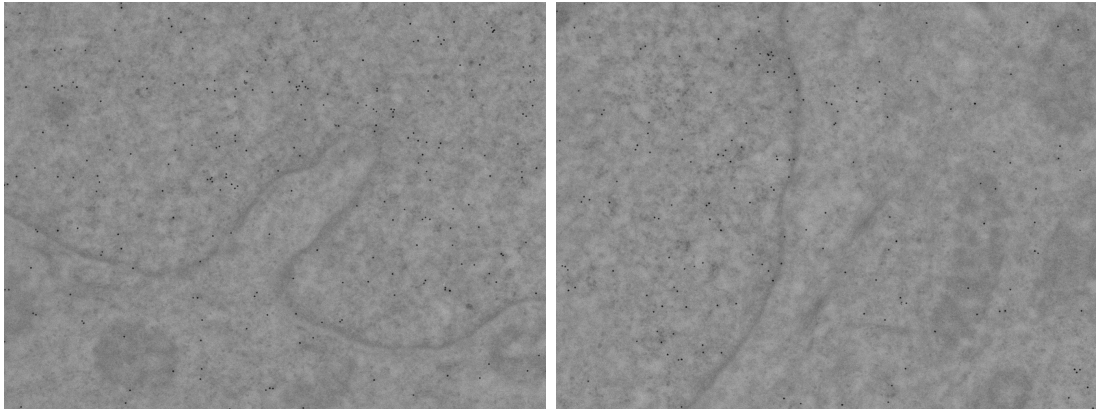
Mikroskopické snímky s jedným druhom častice sú zobrazené na obr. 8.1, na obr. 8.2 sú zobrazené výsledky analýzy rozloženia týchto snímkov. Na týchto obrázkoch sú zobrazené histogramy párovej korelačnej funkcie spolu s 95 % intervalmi spoľahlivosti. Vzdialenosť na ose  $x$  je zobrazená v milimetroch. Na grafoch môžeme vidieť, že hodnoty sú blízke hodnote jedna, čo odpovedá náhodnému rozloženiu. Z prípadov, kedy je hodnota párovej korelačnej funkcie mimo interval spoľahlivosti, je možné v danom rozsahu vzdialenosti usudzovať odchýlenie od náhodného rozloženia. Na obrázkoch 8.2 sú odchýlenia od normálneho rozloženia vo vzdialenosti 1-2 mm.

Mikroskopické snímky s dvoma druhmi častíc sú zobrazené na obr. 8.3, na obr. 8.4 sú zobrazené výsledky kolokalizácie častíc na týchto snímkach. Grafy zobrazujú histogram krížovej párovej korelačnej funkcie spolu s 95 % intervalmi spoľahlivosti. Vzdialenosť na ose  $x$  je rovnako zobrazená v milimetroch. Šírka intervalou na týchto snímkach je výrazne väčšia ako v predchádzajúcej analýze s jedným typom častice, čo je spôsobené veľmi malou veľkosťou datovej sady. Vzhľadom na veľmi malú vzorku dát na týchto snímkach môžeme vidieť, že minimálna hodnota intervalu spoľahlivosti leží vo všetkých prípadoch na nule. Pri takomto počte častíc nie sú teda závery plynúce z analýzy kolokalizácie častíc jednoznačné.



a)

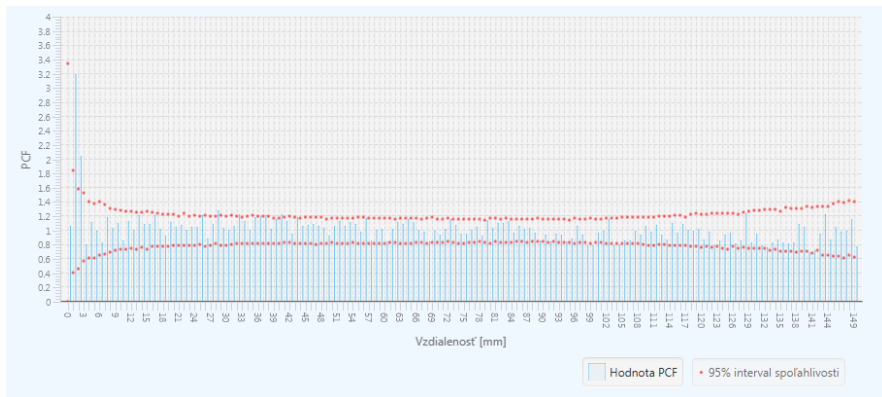
b)



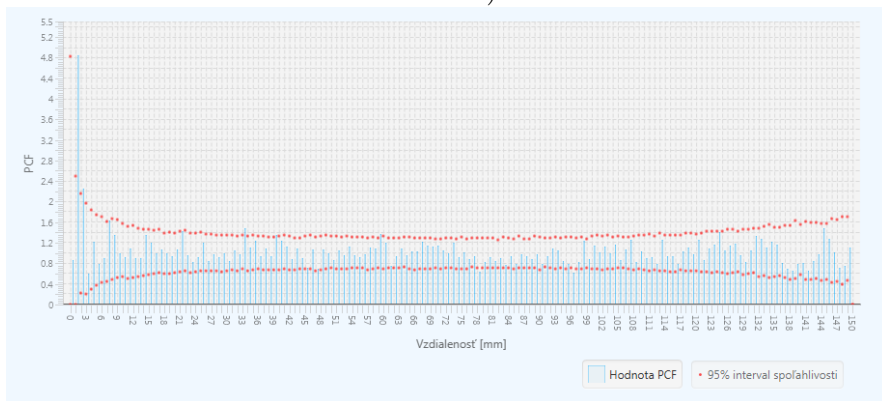
c)

d)

**Obrázok 8.1.** Mikroskopické snímky s jedným typom častice.

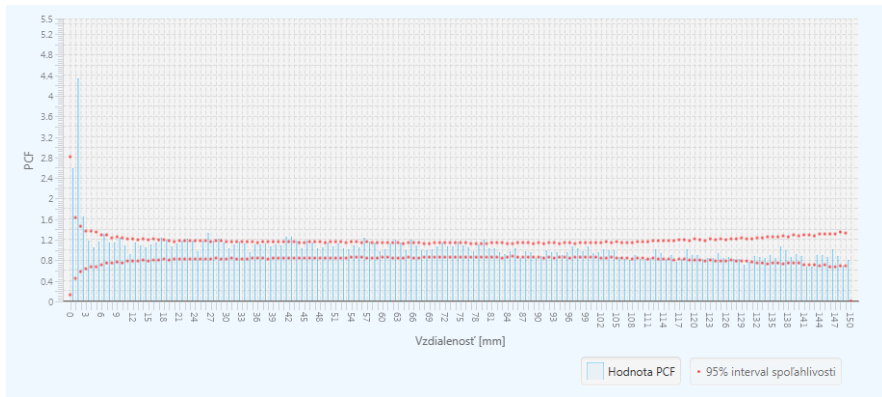


a)

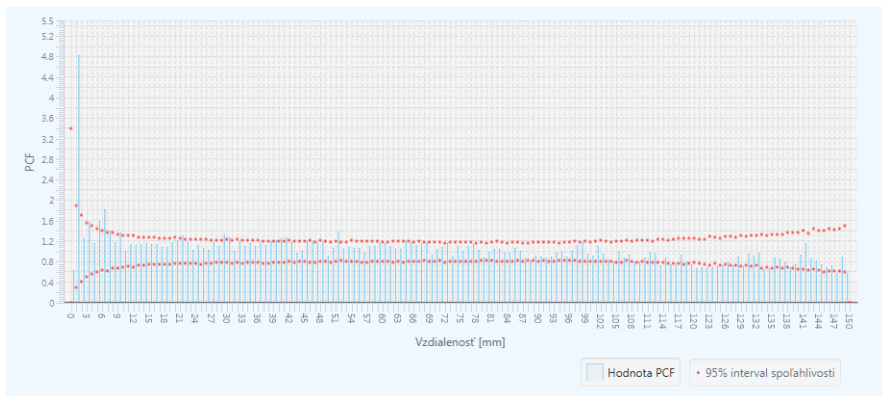


b)

8. Výsledky analýzy rozloženia častíc na mikroskopických snímkach

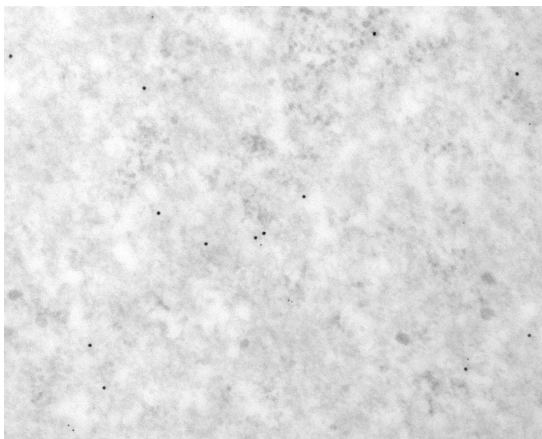


c)

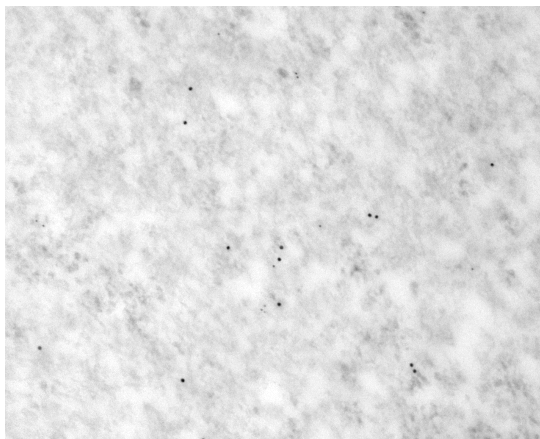


d)

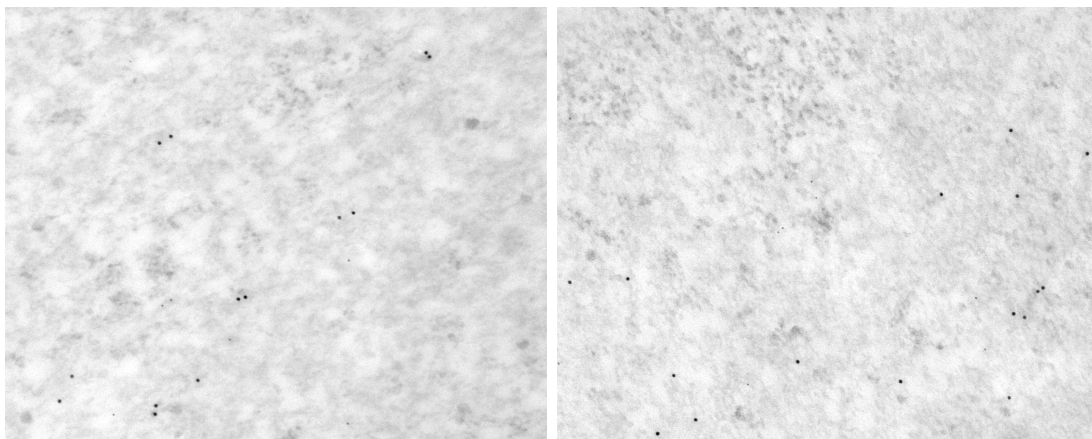
**Obrázok 8.2.** Analýza rozloženia jedného druhu častice na mikroskopických snímkach.



a)



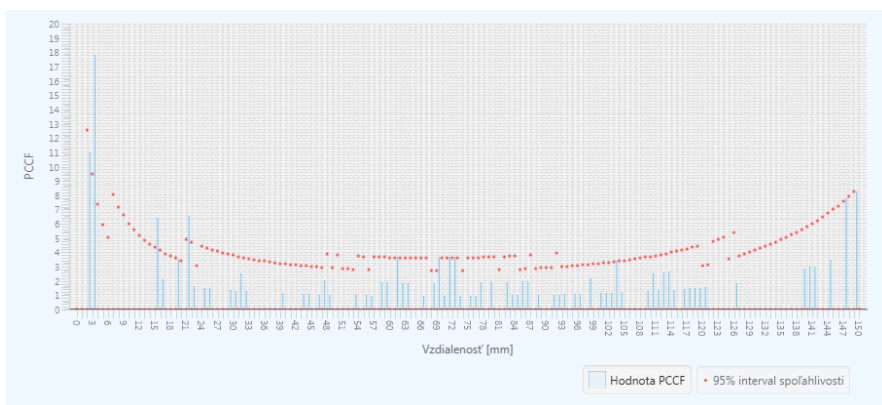
b)



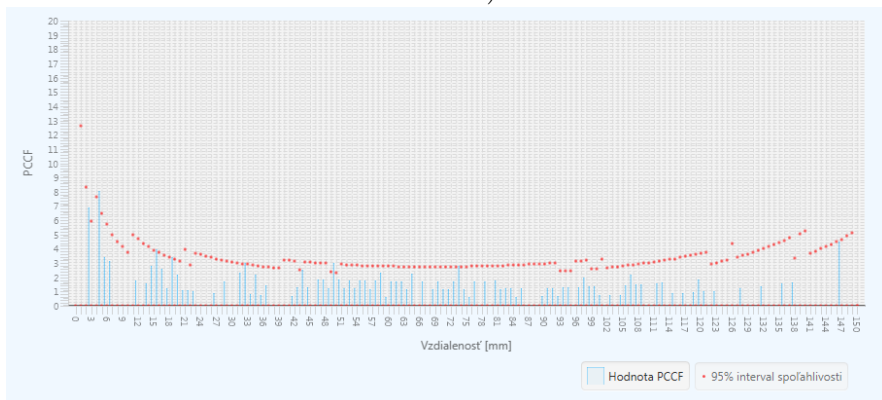
c)

d)

**Obrázok 8.3.** Mikroskopických snímok s dvoma druhmi častíc.

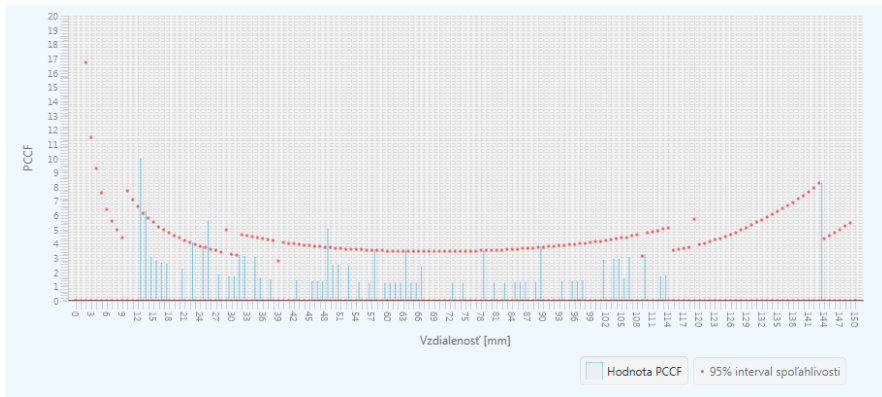


a)

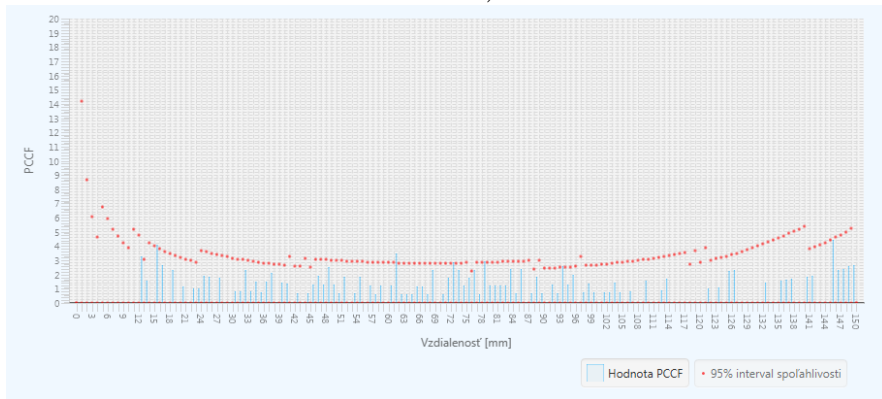


b)

8. Výsledky analýzy rozloženia častíc na mikroskopických snímkach



c)



d)

**Obrázok 8.4.** Analýza kolokalizácie častíc na mikroskopických snímkach.

## Kapitola 9

### Diskusia

Táto práca je zložená z dvoch hlavných dielčích celkov, ktoré na seba naväzujú. Prvou úlohou bola detekcia častíc na mikroskopických snímkach. Jej hlavná časť je zameraná na nájdenie najvhodnejších postupov detekcie konkrétnych mikroskopických snímkov, na základe ktorej je možné ďalej tieto častice analyzovať.

Na mikroskopické snímky boli aplikované metódy filtrácie obrazu, metódy ostrenia a metóda morfolologickej transformácie. Z nich bola vybraná kombinácia metód, ktorá na základe chyby detekcie na testovacej množine mikroskopických snímkov najlepšie detekovala zlaté častice. Použitá bola metóda mediánovej filtrácie, ostrenie metódou Unsharp masking a black top hat transformácia. Z možností prahovania bola vybraná metóda adaptívneho prahovania, ktorého použitie vedie k želanému prahovaniu, a nie je nutná voľba prahovej hodnoty pre každú snímku zvlášť. V aplikácii je ako varianta k adaptívnemu prahovaniu implementované aj globálne prahovanie s nastaviteľnou hodnotou prahu.

Detekcia častíc implementovaná v aplikácii umožňuje úspešne detekovať a klasifikovať dva druhy častíc, ktoré sú prítomné na daných mikroskopických snímkach. Problémom sú však častice, ktoré sú blízko pri sebe a pri segmentácii tvoria jeden neoddeliteľný objekt. Takéto častice použitou metódou segmentácie nie je možné správne klasifikovať. Vzhľadom na minimálny počet takýchto chýb a hlavne z dôvodu, že ďalší krok, ktorým je analýza rozloženia týchto častíc je schopná tento problém elegantne obísť, je ponechaná segmentácia prahovaním.

Naväzujúcou úlohou je zhluková analýza častíc na mikroskopických snímkach. Grafickým nástrojom označenia zhlukov na snímke je mapovanie častíc. Implementované boli dve metódy mapovania, metóda distančnej transformácie a metóda rozmazania Gaussovským filtrom.

Výsledné mapovanie distančnou metódou umožňuje označenie zhlukov častíc rôznych veľkostí. Nevýhodou tejto metódy je, že vždy označuje ako zhluk aj jednu časticu. Zhlukovanie častíc metódou rozmazaním Gaussovským jadrom závisí od veľkosti zvoleného Gaussovského konvolučného jadra a zvoleného prahu. Problématické pri tejto metóde ostáva mapovanie častíc dvoch tried, kedy sú častice jednej triedy výrazne menšie. V tomto prípade môže zhluk menších častíc a jedna väčšia častica mať po aplikovaní rozmazania rovnakú intenzitu a nie je tak možné zvolenie prahu pre správne mapovanie.

Zhlukovanie častíc bolo ďalej analyzované z pohľadu štatistickej distribúcie častíc. Práca sa zamiera na analýzu distribúcie vzdialeností medzi časticami. Vhodné metódy analýzy plošného rozmiestnenia v ploche boli implementované v aplikácii. Ďalej je v práci navrhnuté rozšírenie metód k analýze zhlukov častíc v 3D priestore, ktoré je rovnako implementované v aplikácii.

Za účelom overenia implementovaných metód bola realizovaná simulácia častíc v ploche a v priestore. Implementovaný nástroj analýzy častíc v ploche dokázal úspešne analyzovať nasimulované dáta s náhodným rozložením a s rozložením dát v zhlukoch. Rovnako úspešne sa v analýze dát v 3D priestore ukázali navrhnuté metódy.

Na záver boli metódy analýzy použité na reálne mikroskopické snímky. Pri týchto snímkach a výsledkoch analýzy je potrebný ďalší rozbor analýzy. Výsledky testovania náhodného rozloženia prebiehajú na intervaloch vzdialenosti, preto je potrebné skúmať v akých vzdialenostiach dochádza k prípadnému zamietnutiu hypotézy o náhodnosti rozloženia a v akej miere. V prípade častíc jedného druhu vykazovala analýza rozloženia na malé odchyľky ich náhodnosť. Ako bolo ukázané na príkladoch analýzy častíc dvoch typov je dôležité vo výsledkoch analýzy zväžiť aj veľkosť datovej sady. Vывodzovanie záverov na základe výsledkov analýzy rozloženia malej datovej sady je tak ako pri iných štatistických testoch problematické.



# Kapitola 10

## Záver

Elektrónová mikroskopia nám dnes prináša množstvo cenných obrazových informácií o mikroštruktúre buniek. Aby sme vedeli z týchto obrazových dát získať komplexné informácie o zložení a chovaní mikrosveta vo vnútri buniek, je potrebné vyvíjať ďalšie nástroje spracovávajúce obrazové dáta.

Ďielčou časťou tejto práce je detekcia častíc na mikroskopických snímkach. V práci sa podarilo vybrať metódy spracovania obrazu umožňujúce úspešnú detekciu týchto častíc. Naväzujúcou úlohou na detekciu častíc je ich ďalšia analýza. Táto práca je zameraná na analýzu rozloženia týchto častíc. Výsledky implementovaných metód pre plošnú analýzu na simulovaných dátach ukázali, že sú schopné správne analyzovať náhodné rozloženie a rozloženie v zhlukoch. Ďalej práca obsahuje časť rozširujúcu tieto analýzy o metódy pre analýzu rozloženia častíc v 3D priestore. Výsledky na simulovaných dátach ukazujú, že sú tieto metódy schopné analyzovať náhodnosť rozloženia častíc v priestore. Implementovaný nástroj tak obsahuje metódy analýzy pre mikroskopické snímky a rovnako metódy analýzy priestorových dát, ktoré môžu byť v budúcnosti využívané na dáta získané z priestorovej detekcie častíc.

Hlavným prínosom práce sú implementované metódy štatistického spracovania v ploche a priestore, ktoré môžu byť ďalej využívané, ako aj komplexný pohľad na spracovanie snímkov s časticami.

## Literatúra

- [1] A. Jäger a V Gärtnerová. *Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura* [online]. Fyzikální ústav AV ČR [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>.
- [2] *Electron Microscopy Tutorial*. Introduction to Electron Microscopy - Advanced Microscopy - Imaging Facilities - The University of Utah [online]. [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://advanced-microscopy.utah.edu/education/electron-micro/>.
- [3] Milan Sonka, Vaclav Hlavac a Roger Boyle. *Image processing, analysis, and machine vision*. Cengage Learning, 2014.
- [4] Anatoly A. Philimonenko, Jiří Janáček a Pavel Hozák. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of structural biology*. 2000, 132 (3), 201–210.
- [5] Mogana Murtey. *Immunogold Techniques in Electron Microscopy*. [online]. [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/immunogold-techniques-in-electron-microscopy>.
- [6] Anil K. Jain. *Fundamentals of digital image processing*. Prentice-Hall, Inc., 1989.
- [7] Pierre Soille. *Morphological image analysis: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [8] *Mathematical Morphology*. Image Processing - Utrecht University [online]. [vid. 2017-04-21]. Dostupné z:  
<http://www.cs.uu.nl/docs/vakken/ibv/reader/chapter6.pdf>.
- [9] Jin Liu, Jianhong Zheng, Quanhua Tang a Weidong Jin. *Minimum Error Thresholding Segmentation Algorithm Based on 3D Grayscale Histogram*. Hindawi Publishing Corporation, 2014.
- [10] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica*. 1975, 11 (285-296), 23–27.
- [11] Ward A. McQueen. *Contour tracing and boundary detection for object identification in a digital image*. 2004. US Patent 6,674,904.
- [12] Jonghoon Seo, Seungho Chae, Jinwook Shim, Dongchul Kim, Cheolho Cheong a Tack-Don Han. Fast Contour-Tracing Algorithm Based on a Pixel-Following Method for Image Sensors. *Sensors*. 2016, 16 (3),
- [13] Godfried Toussaint. *Grids, connectivity, and contour-tracing*. [online]. [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://cgm.cs.mcgill.ca/~godfried/teaching/pr-web.html>.
- [14] Theodosios Pavlidis. *Algorithms for graphics and image processing*. Springer Science & Business Media, 2012.

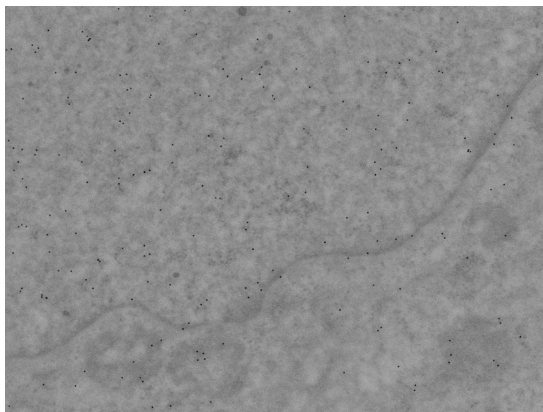
- [15] Satoshi Suzuki et al. Topological structural analysis of digitized binary images by border following. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*. 1985, 30 (1), 32–46.
- [16] John C. Russ. *The image processing handbook*. CRC press, 2016.
- [17] Pedro Felzenszwalb a Daniel Huttenlocher. *Distance transforms of sampled functions*. Cornell University, 2004.
- [18] Maria A. Kiskowski, John F. Hancock a Anne K. Kenworthy. On the use of Ripley’s K-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophysical journal*. 2009, 97 (4), 1095–1103.
- [19] Peter J. Diggle. *Statistical analysis of spatial and spatio-temporal point patterns*. CRC Press, 2013.
- [20] Brian D. Ripley. *Spatial statistics*. John Wiley & Sons, 2005.
- [21] Brian D. Ripley. Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1977, 172–212.
- [22] D. Stoyan a H. Stoyan. *Methods of geometrical statistics*. 1994.
- [23] Barry N. Boots a Arthur Getis. *Point pattern analysis*. Regional Research Institute, West Virginia University, 1985.
- [24] Jay Lee a David W. S. Wong. *Statistical analysis with ArcView GIS*. John Wiley & Sons, 2001.
- [25] Peter Greig-Smith. *Quantitative plant ecology*. University of California Press, 1983.
- [26] Philip M. Dixon. Ripley’s K function. *Encyclopedia of Environmetrics, 2nd edn.* [online]. John Wiley & Sons, 2012 [vid. 2017-01-29]. Dostupné z: <http://www.public.iastate.edu/~pdixon/stat406/RipleyK.pdf>.
- [27] Peter Haase. Spatial pattern analysis in ecology based on Ripley’s K-function: Introduction and methods of edge correction. *Journal of vegetation science*. 1995, 6 (4), 575–582.
- [28] Brian D. Ripley. The second-order analysis of stationary point processes. *Journal of applied probability*. 1976, 255–266.
- [29] J. E. Besag. Comments on Ripley’s paper. *Journal of the Royal Statistical Society B*. 1977, 39 (2), 193–195.
- [30] Chris J. Peterson a Edwin R. Squiers. An unexpected change in spatial pattern across 10 years in an aspen-white pine forest. *Journal of Ecology*. 1995, 847–855.
- [31] K. H. Hanisch a D. Stoyan. Formulas for the second-order analysis of marked point processes. *Statistics: A Journal of Theoretical and Applied Statistics*. 1979, 10 (4), 555–560.
- [32] C. A. Glasbey a I. M. Roberts. Statistical analysis of the distribution of gold particles over antigen sites after immunogold labelling. *Journal of Microscopy*. 1997, 186 (3), 258–262.
- [33] Brian D. Ripley. *Statistical inference for spatial processes*. Cambridge university press, 1991.
- [34] Marc Loy, Robert Eckstein, Dave Wood, James Elliott a Brian Cole. *Java swing*. ” O’Reilly Media, Inc.”, 2002.
- [35] Gary Bradski et al. The opencv library. *Doctor Dobbs Journal*. 2000, 25 (11), 120–126.

- [36] Mark Heckler, Gerrit Grunwald, José Pereda, Sean Phillips a Carl Dea. *JavaFX 8: Introduction by Example*. Apress, 2014.
- [37] Martin Pernellet. *Jzy3d - Scientific 3d plotting*. [online]. [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://www.jzy3d.org>.
- [38] Gunilla Borgefors. Distance transformations in digital images [online]. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 1986, 344 - 371, [vid. 2017-01-29]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734189X86800470>.

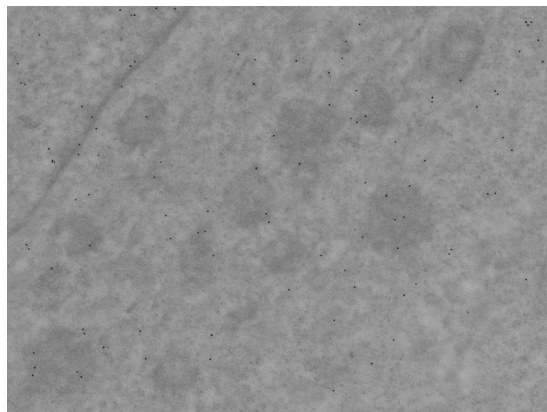
## Príloha A

### Kompletné výsledky analýzy mikroskopických snímok

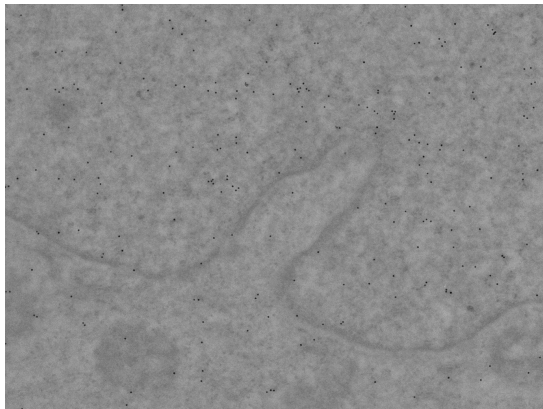
V tejto prílohe sú priložené mikroskopické snímky datovej sady s jedným druhom častice a ich výsledky analýzy rozloženia, následne mikroskopické snímky s dvoma druhmi častíc s výsledkami analýzy kolokalizácie častíc.



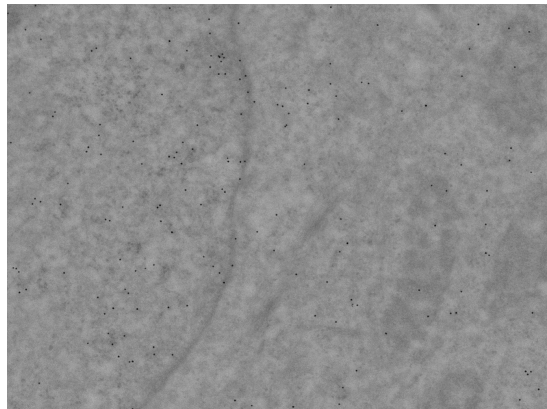
a)



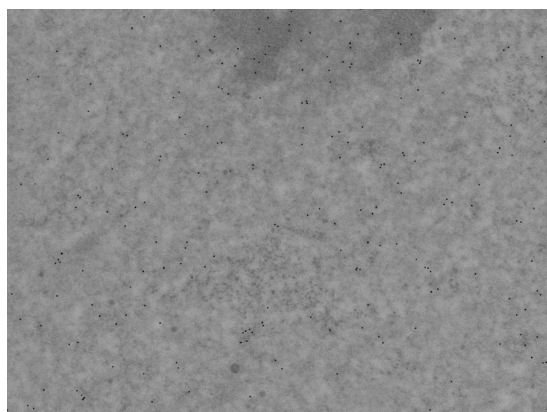
b)



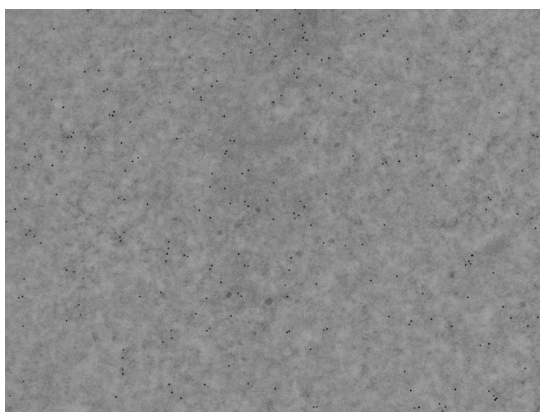
c)



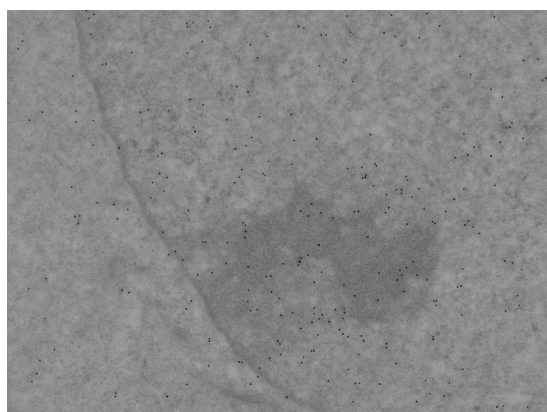
d)



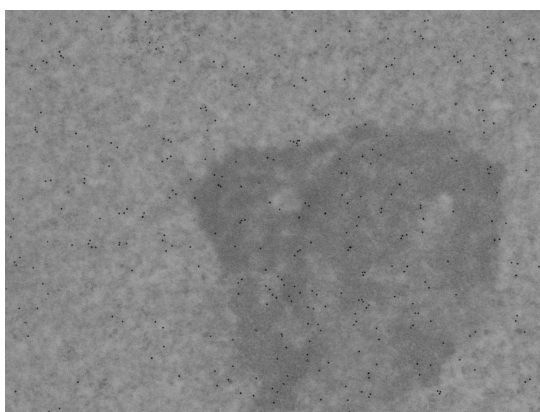
e)



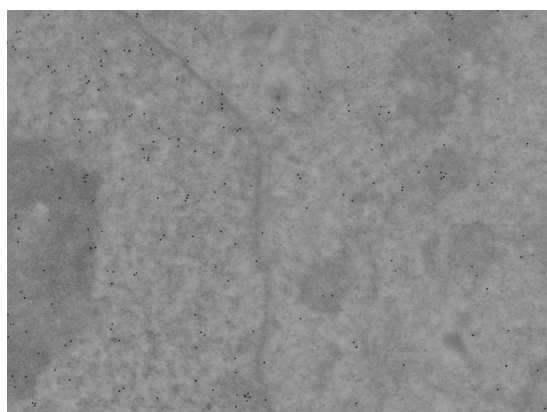
f)



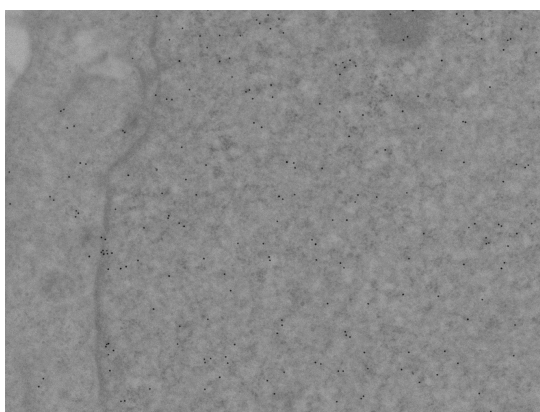
g)



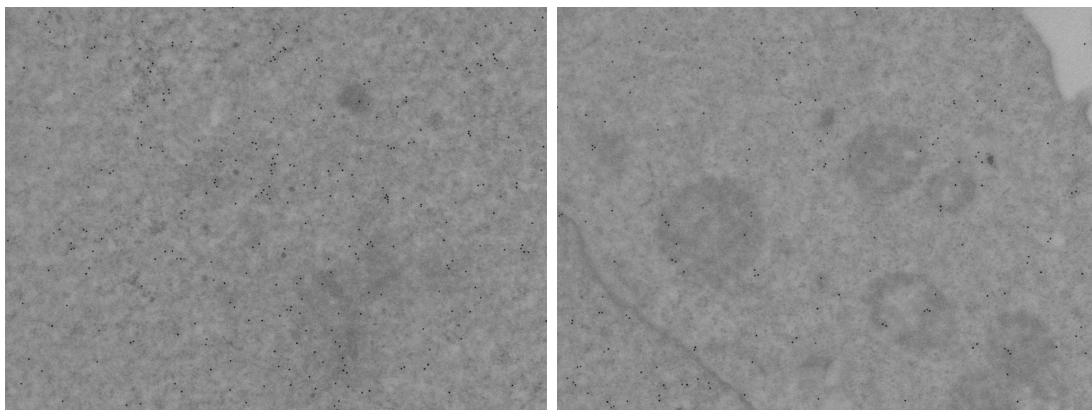
h)



i)

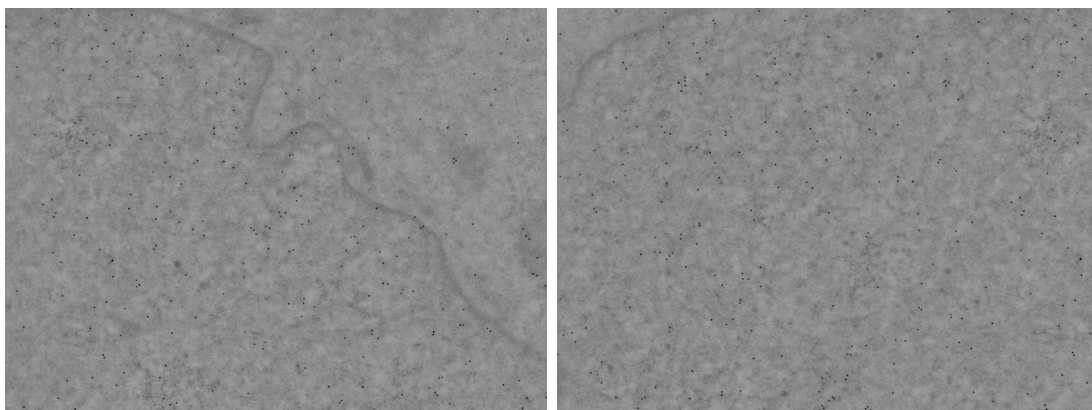


j)



k)

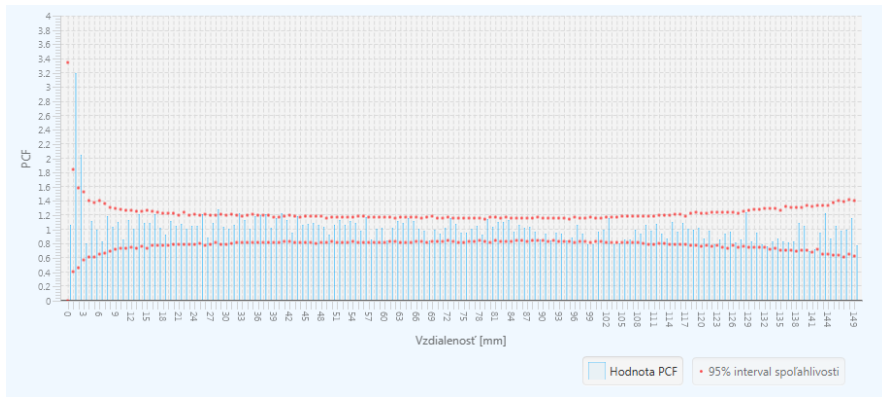
l)



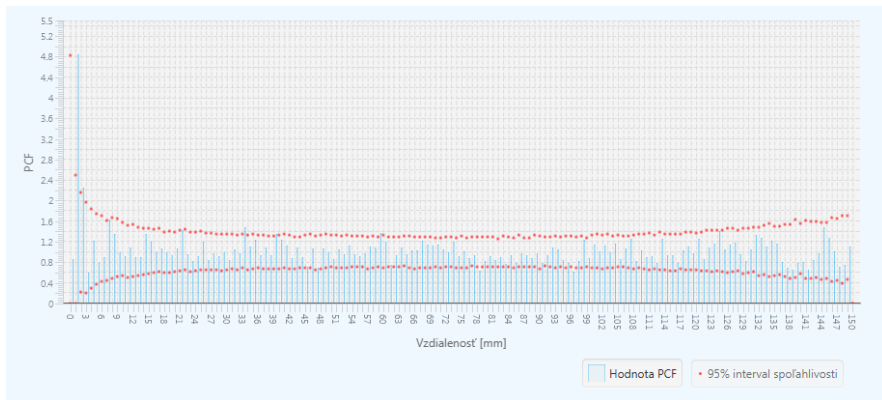
m)

n)

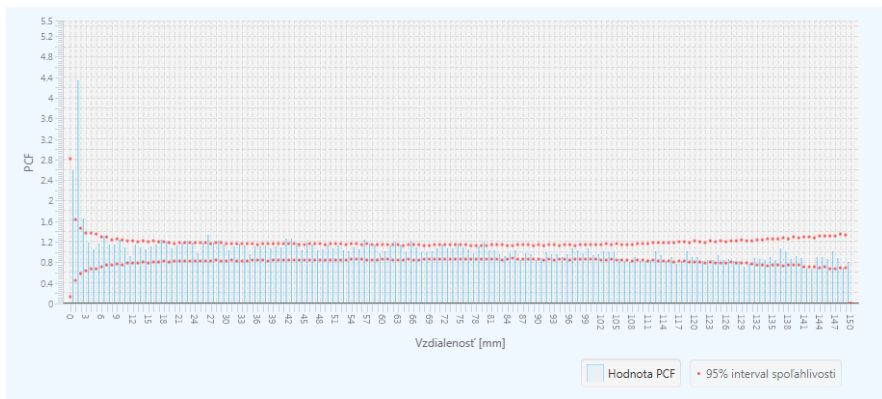
**Obrázok A.1.** Datová sada mikroskopických snímok s jedným typom častice.



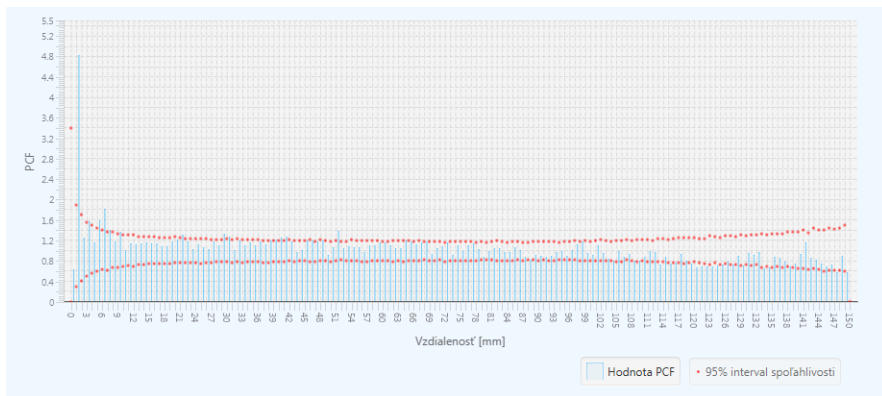
a)



b)

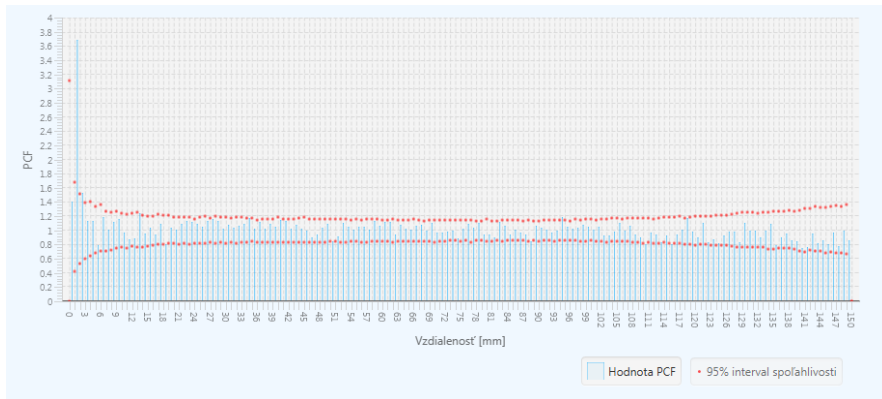


c)

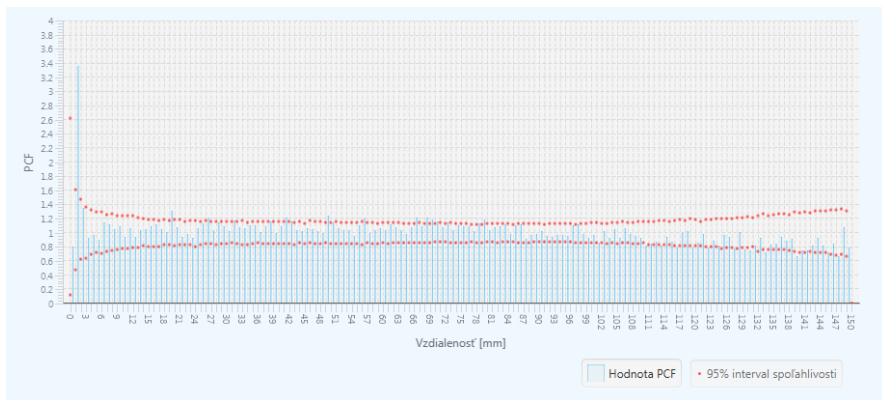


d)

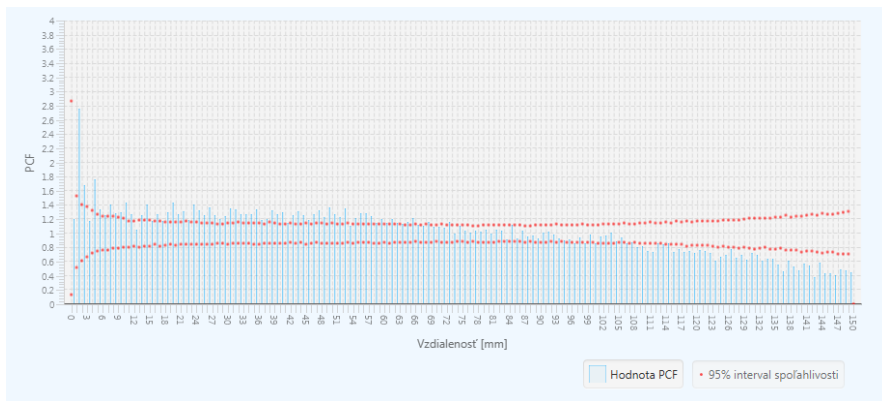




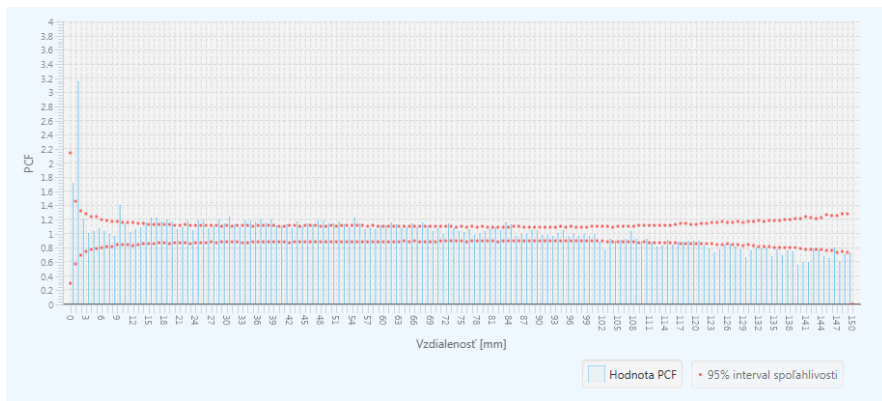
e)



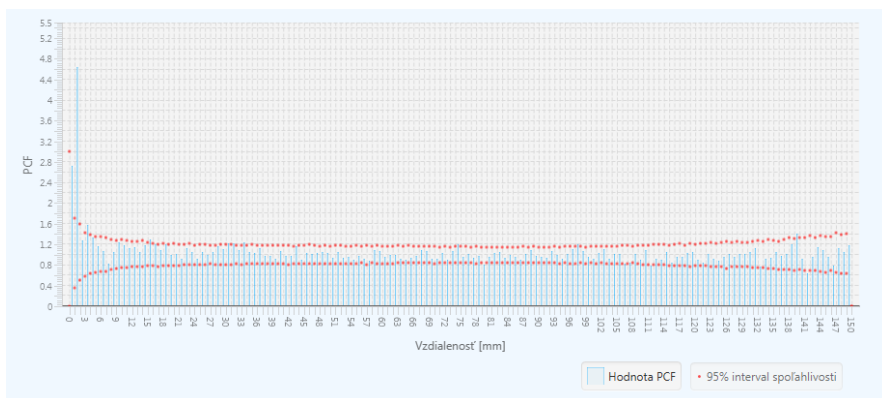
f)



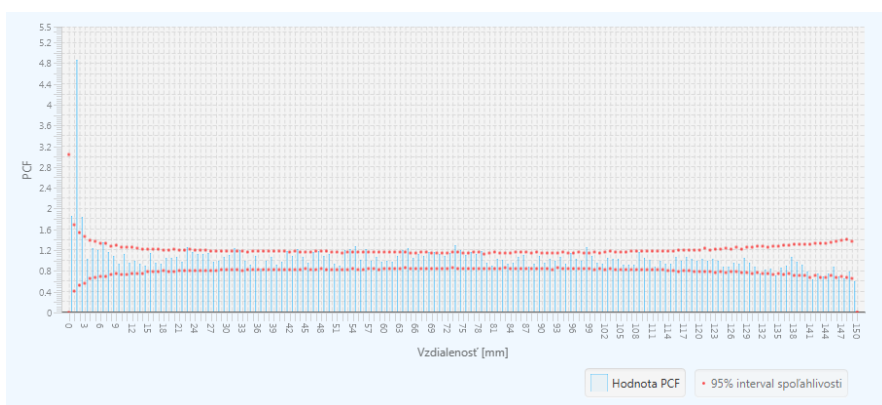
g)



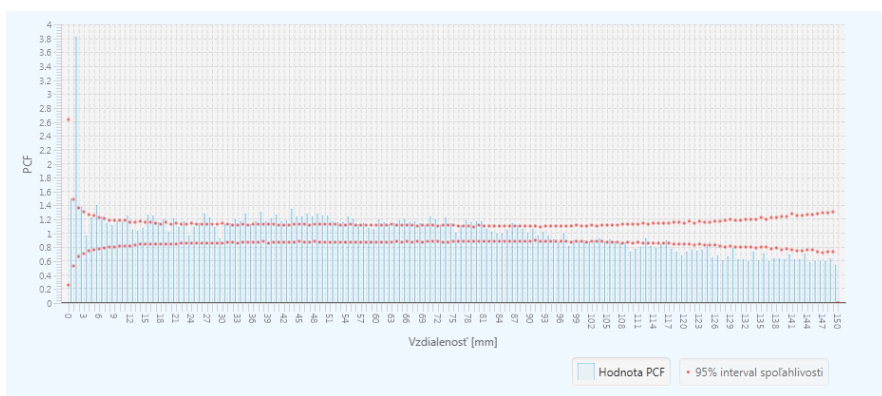
h)



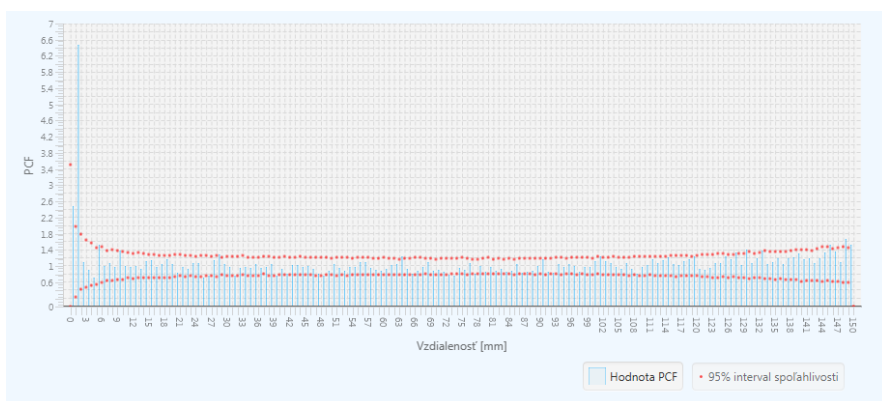
i)



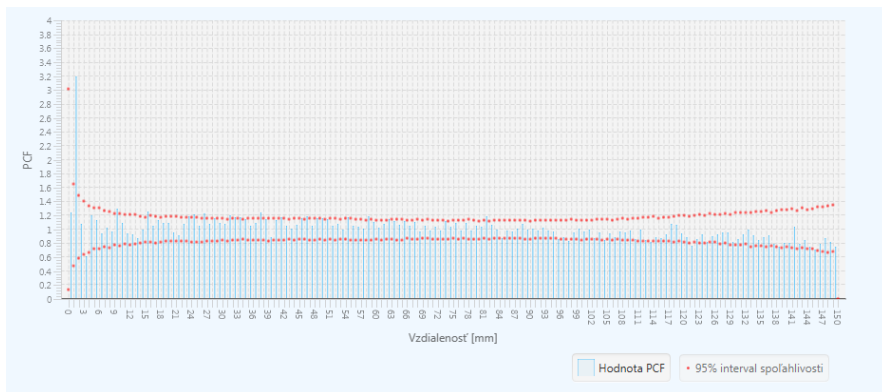
j)



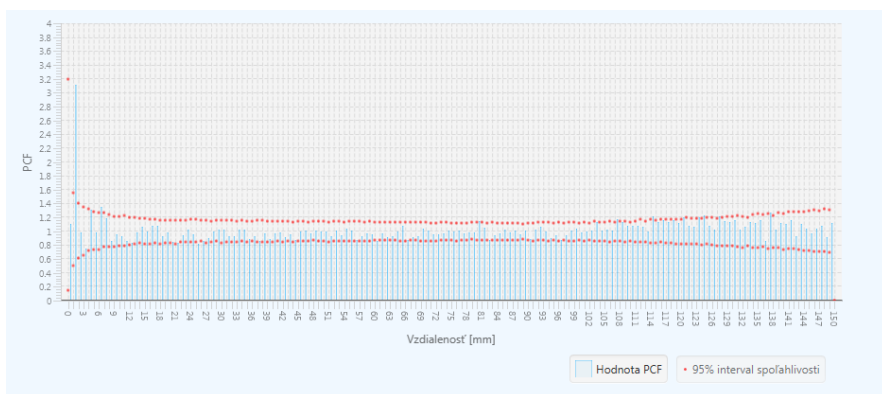
k)



l)

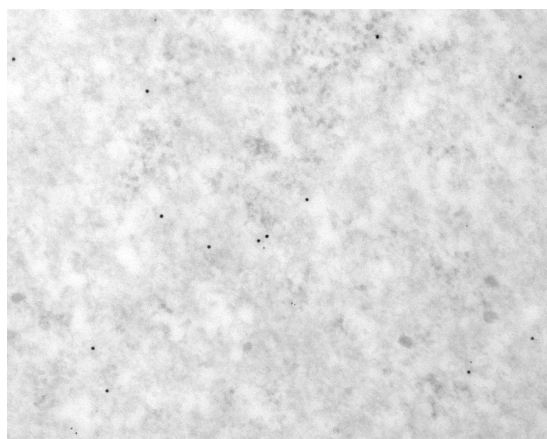


m)

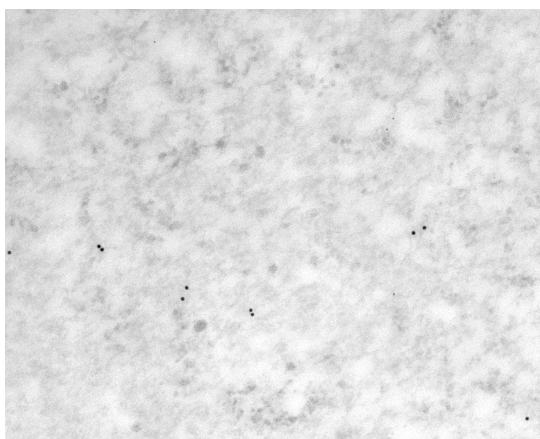


n)

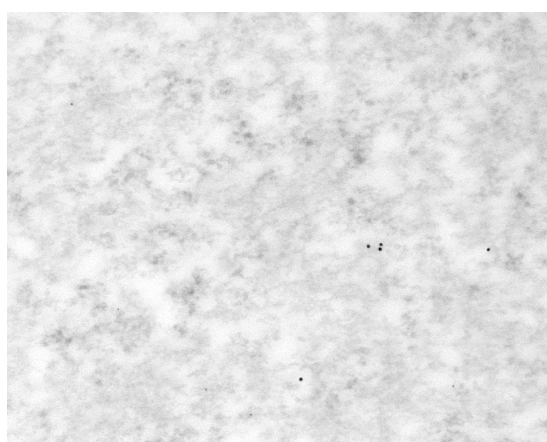
**Obrázok A.2.** Analýza rozloženia jedného druhu častice na mikroskopických snímkach.



a)



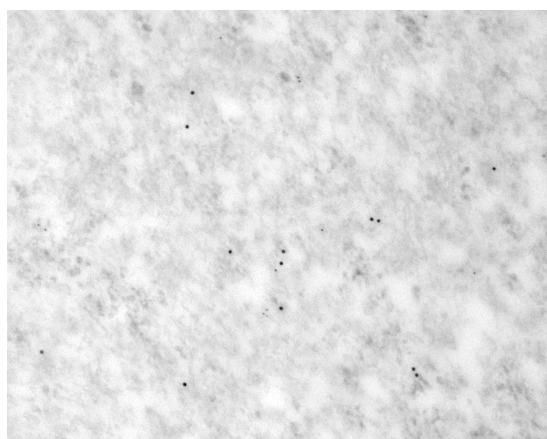
b)



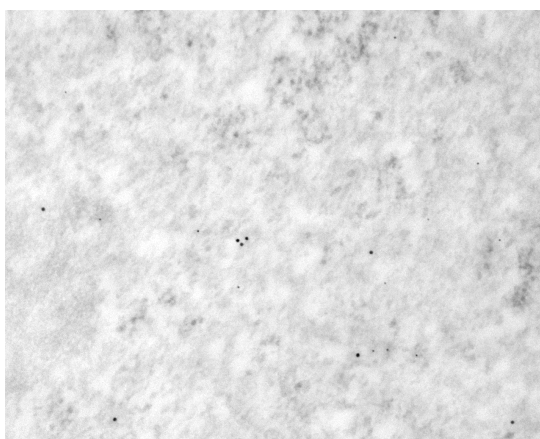
c)



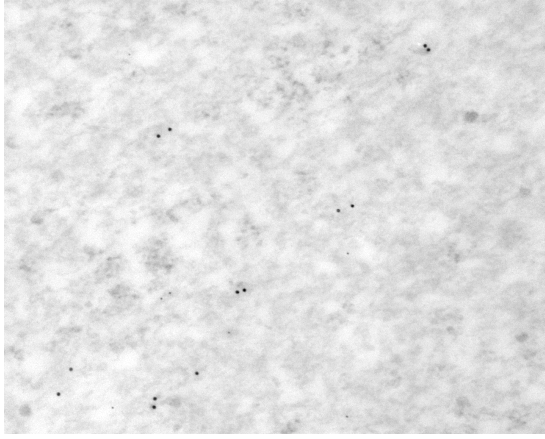
d)



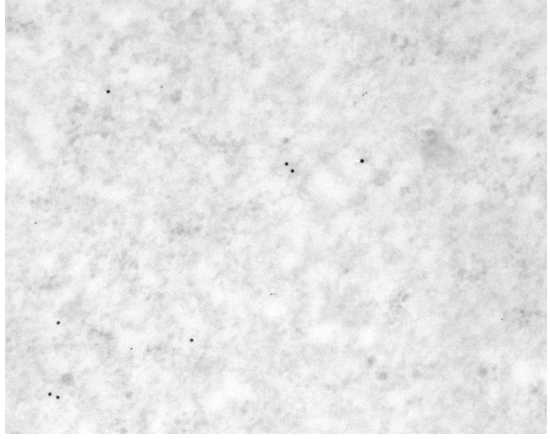
e)



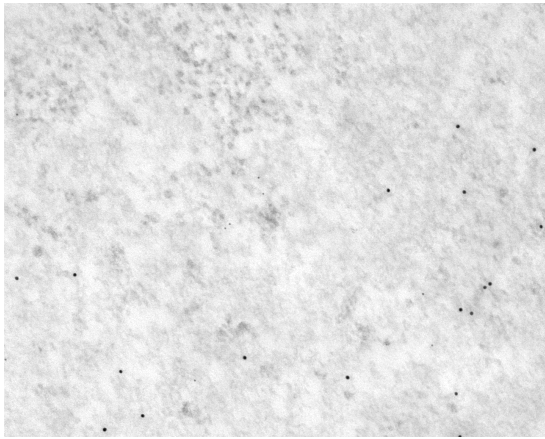
f)



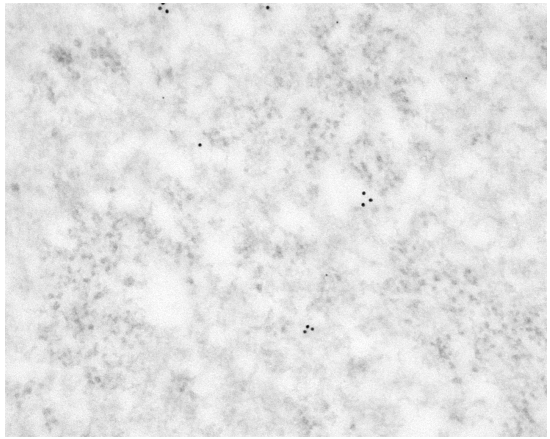
g)



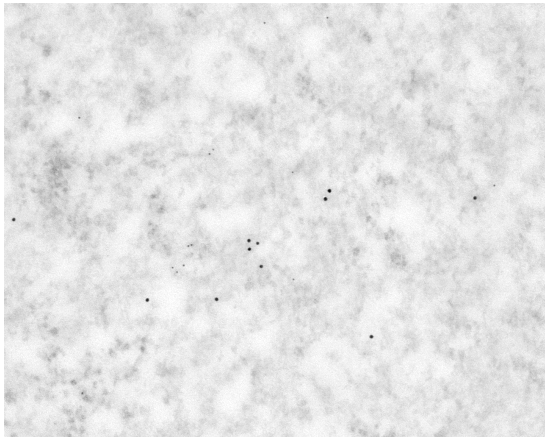
h)



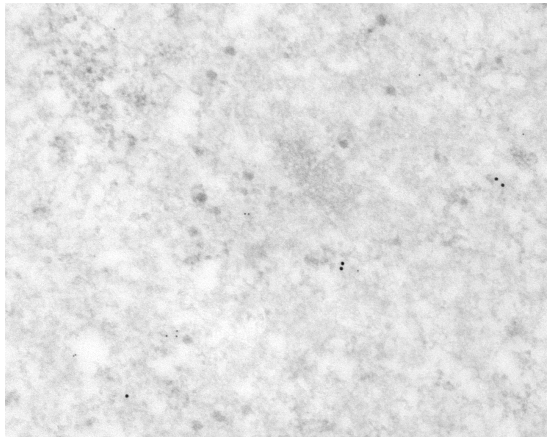
i)



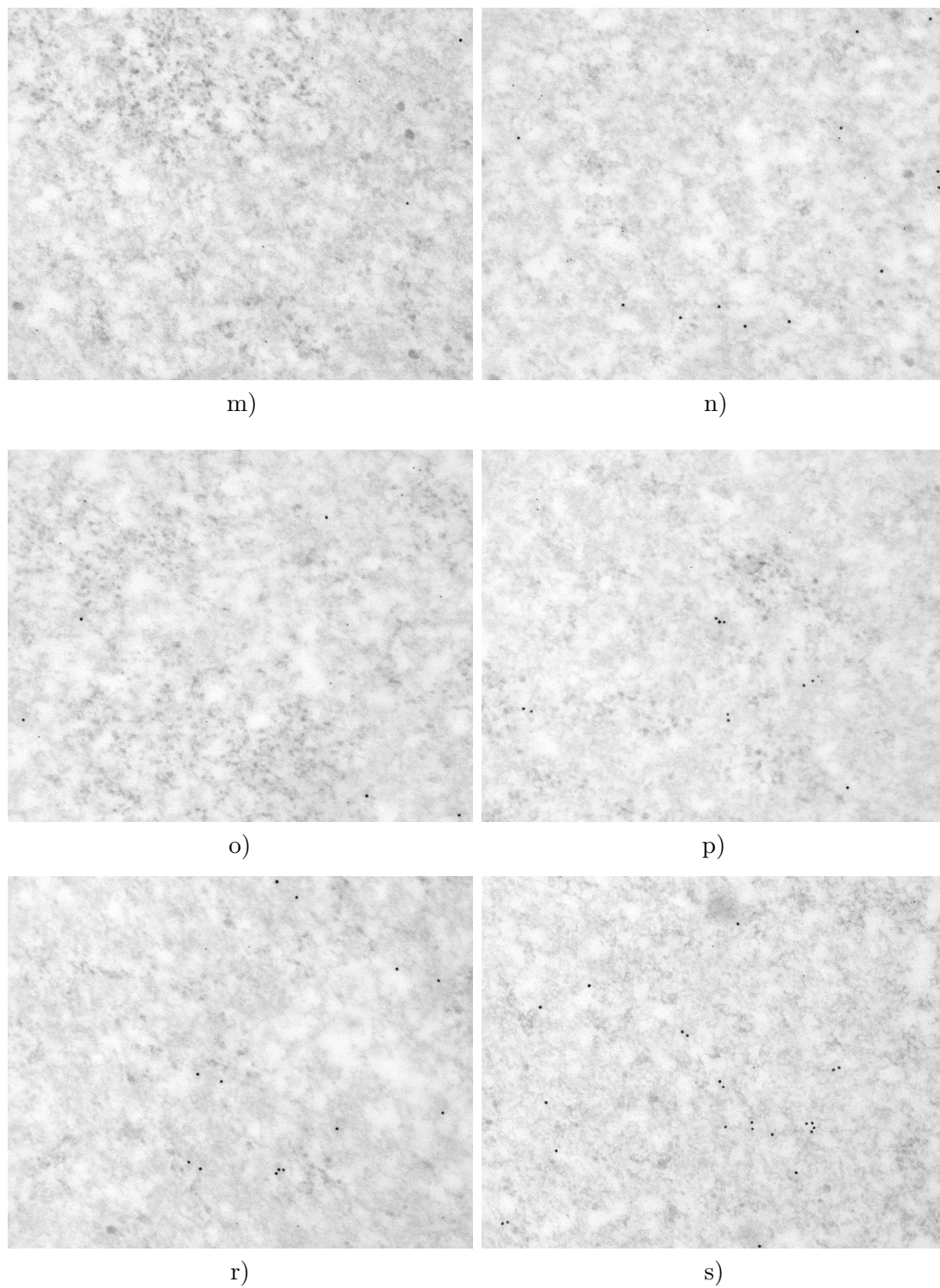
j)



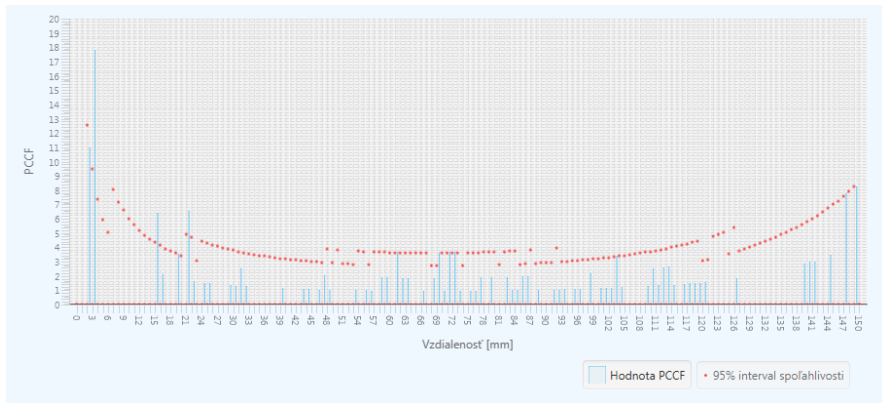
k)



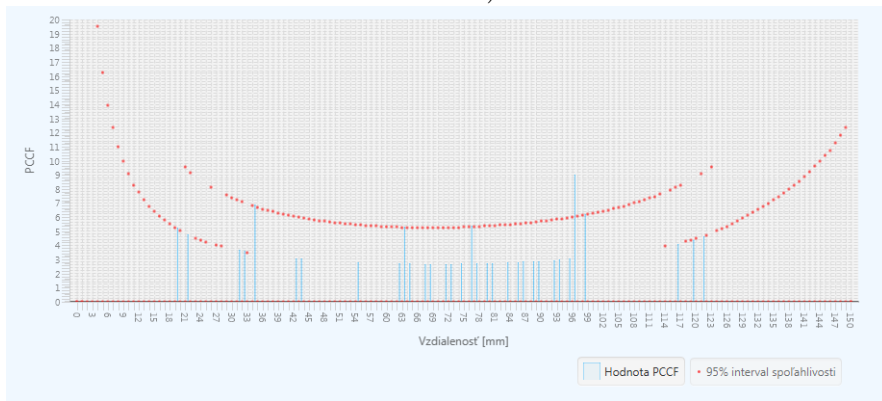
l)



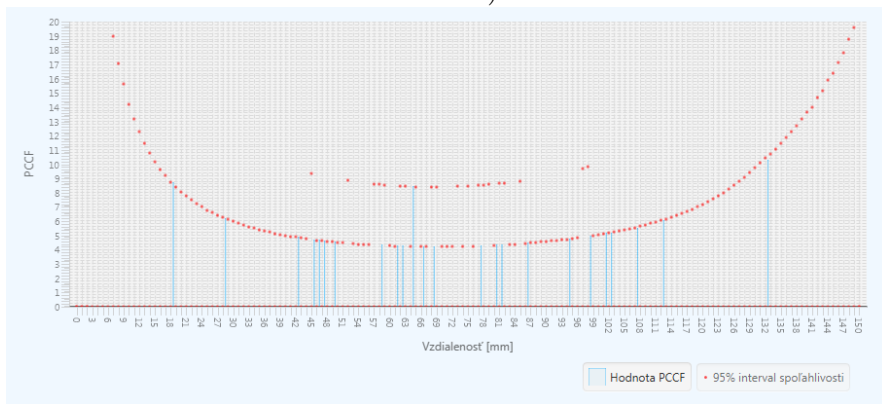
**Obrázok A.3.** Datová sada mikroskopických snímok s dvoma typmi častíc.



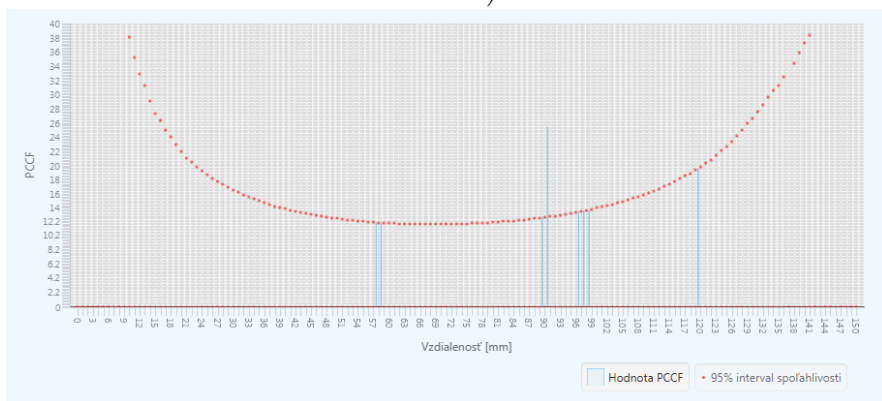
a)



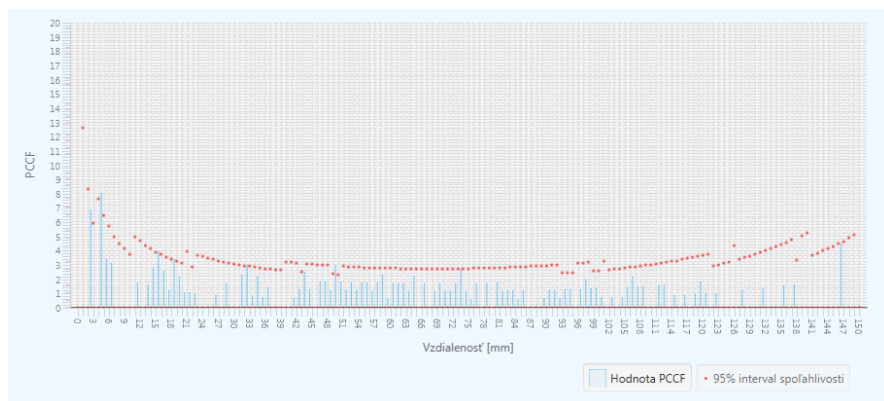
b)



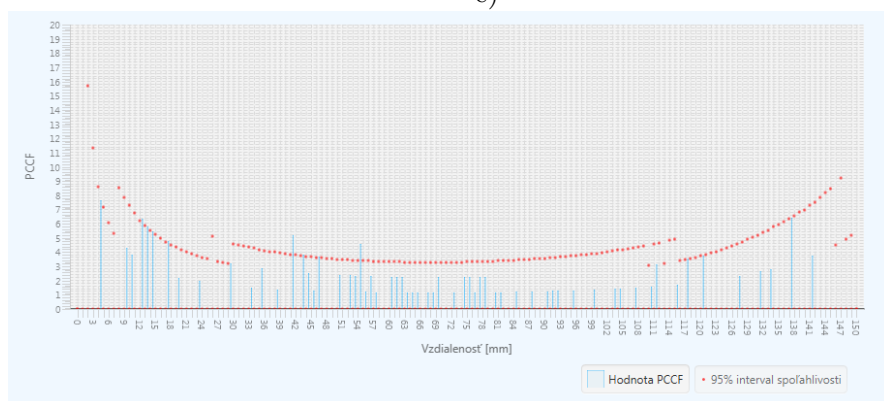
c)



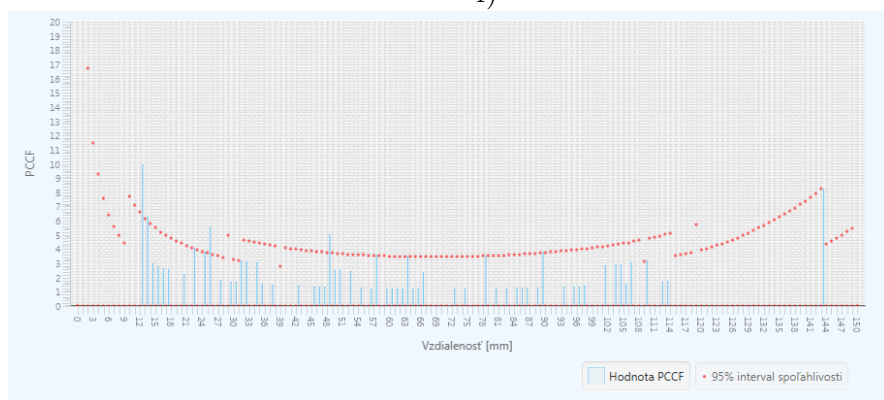
d)



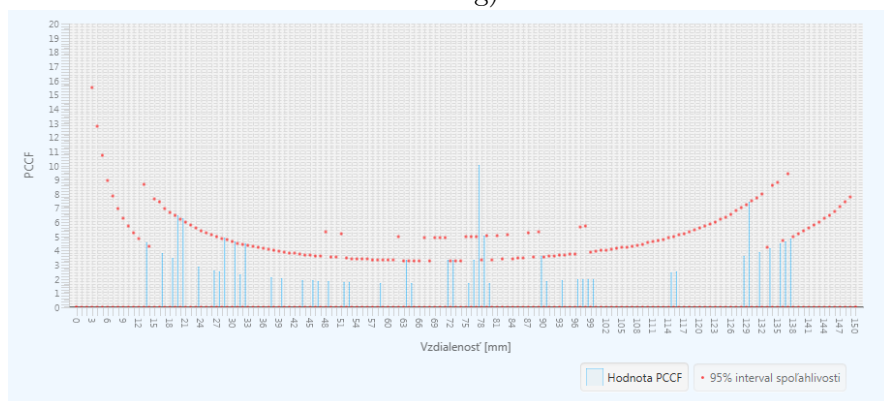
e)



f)

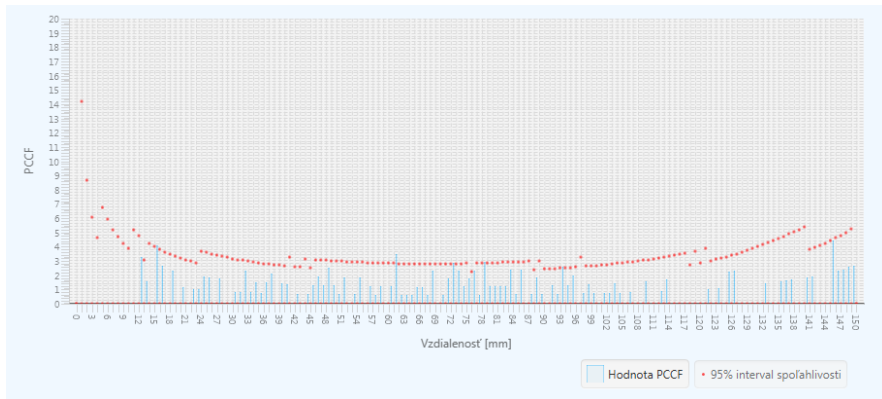


g)

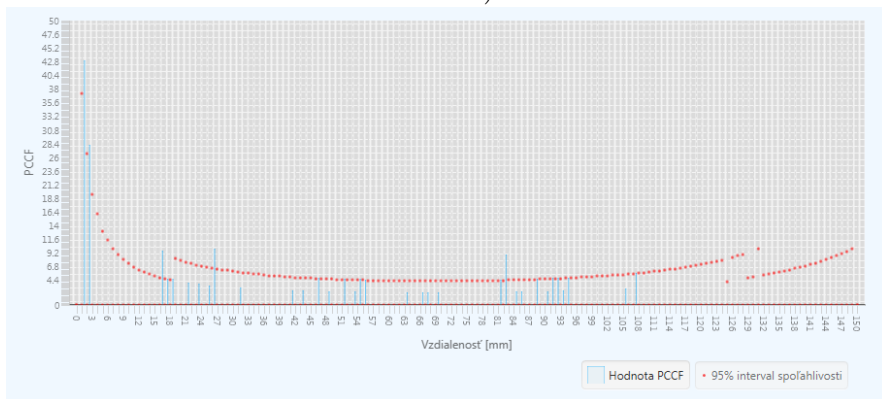


h)

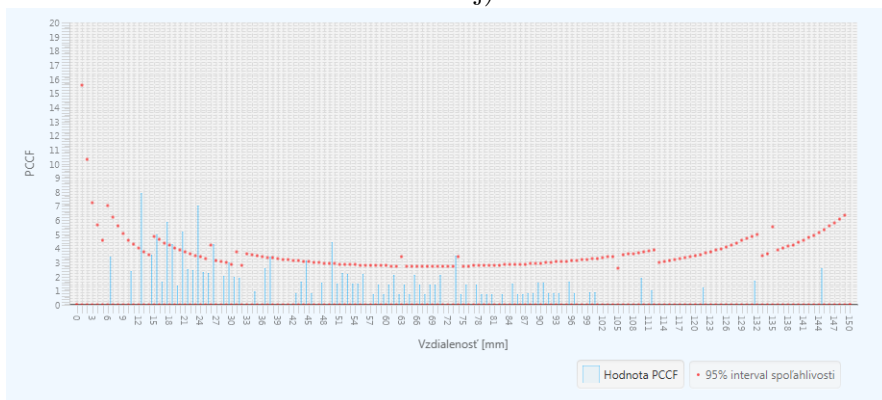




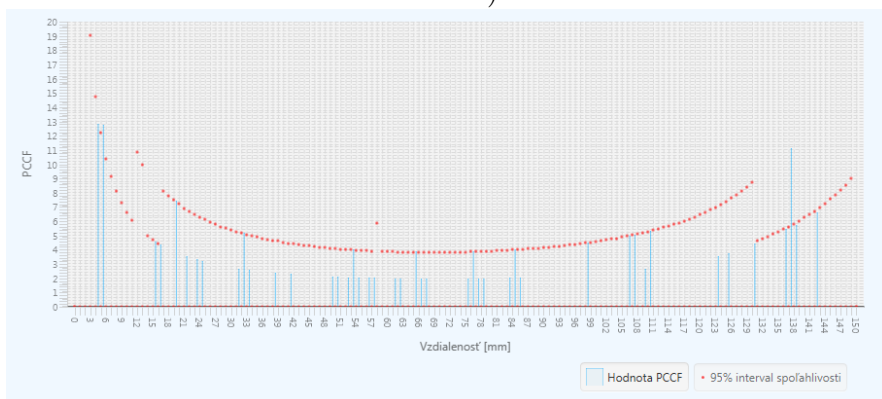
i)



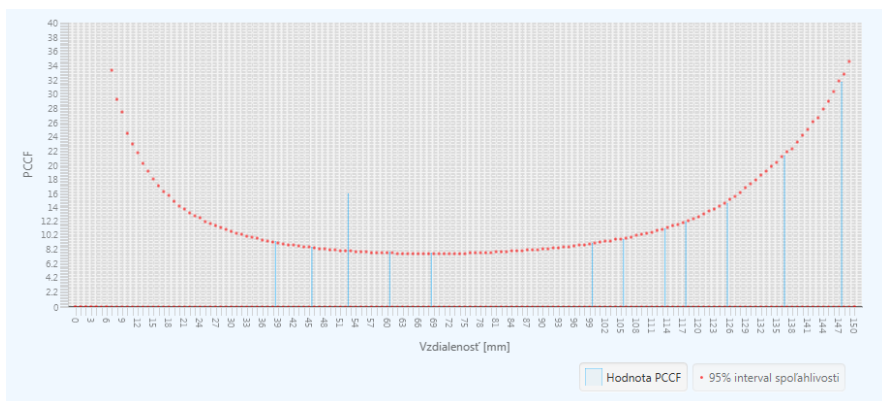
j)



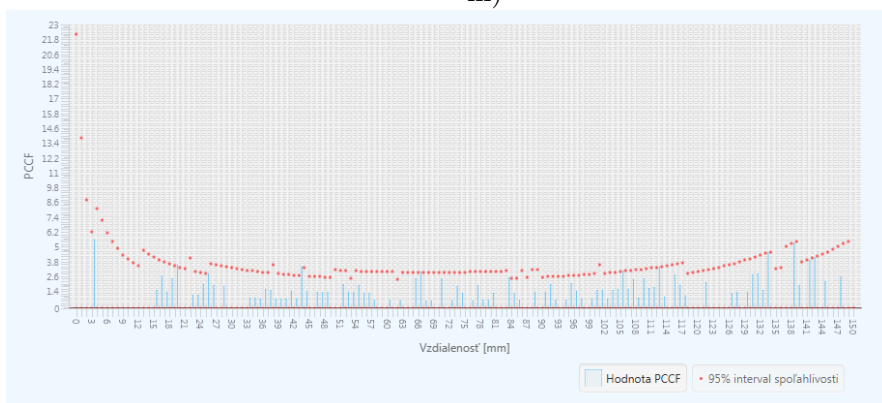
k)



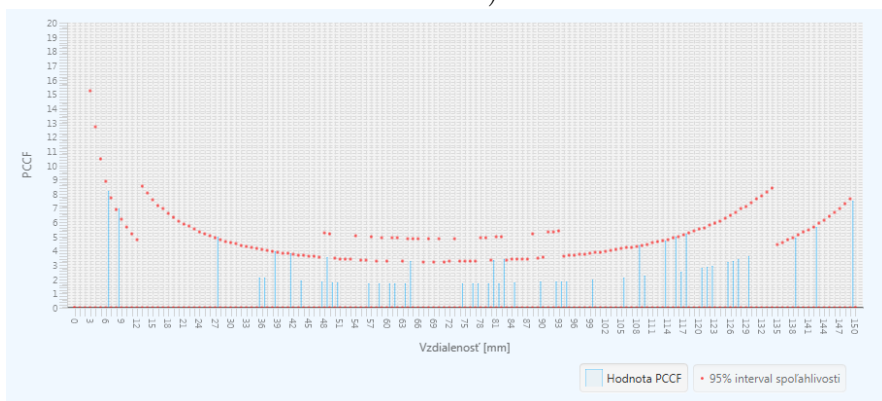
l)



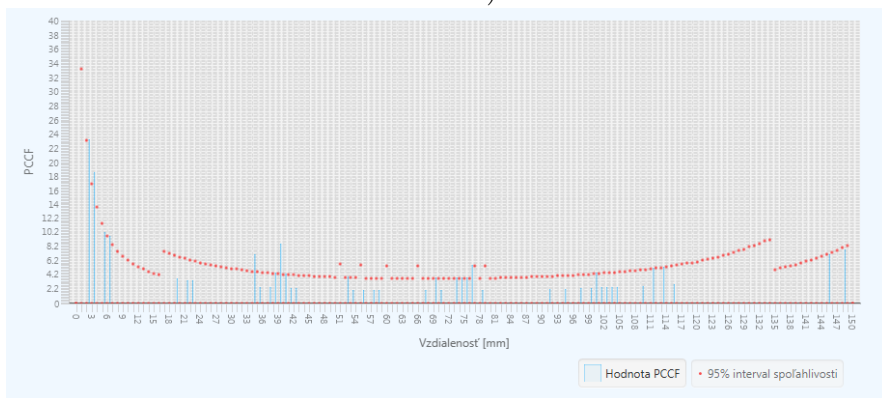
m)



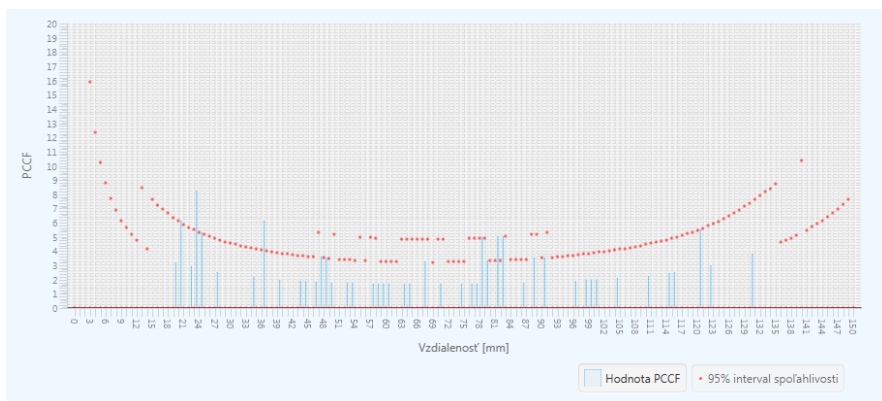
n)



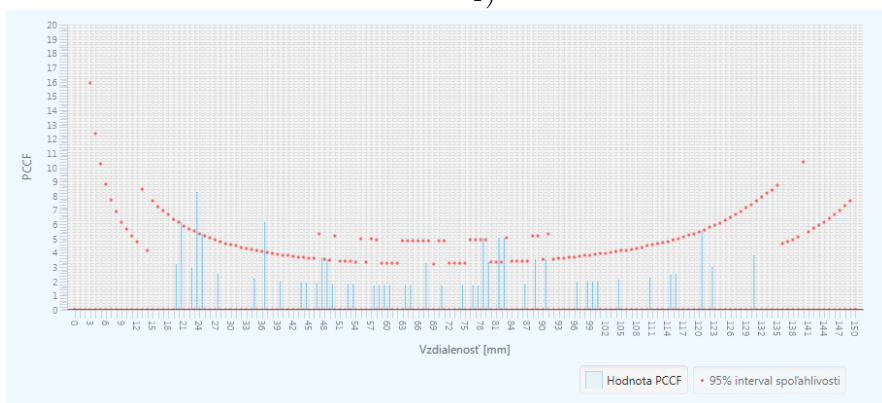
o)



p)



r)



s)

**Obrázok A.4.** Analýza kolokalizácie častíc na mikroskopických snímkach.

# Príloha B

## Obsah priloženého CD

Súbor / Zložka	Popis
scripts/	zložka obsahujúca naprogramované skripty
data/	zložka obsahujúca datovú sadu mikroskopických snímok
dll/	zložka s dynamicky pripájanými knižnicami
lib/	zložka s knižnicami
Pattern.jar	súbor s aplikáciou
run.bat	spustiteľný súbor naprogramovanej aplikácie
manual.pdf	manúal k aplikácií
DP-2017-bartosova-eva.pdf	diplomová práca vo formáte PDF

**Tabuľka B.1.** Prehľad súborov a zložiek na priloženom CD