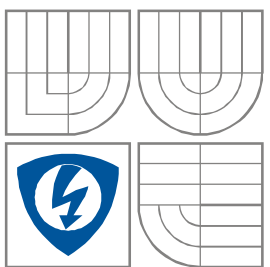


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

Analýza mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami v LabVIEW

Analysis of microscopic images with cell structures in LabVIEW

Bakalářská práce

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vojtěch Roček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmíel

BRNO, 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Vojtěch Roček

ID: 124851

Ročník: 3

Akademický rok: 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Analýza mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami v LabVIEW

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti akvizice, zpracování a analýzy obrazu z optického mikroskopu. Zabývejte se možnostmi využití LabVIEW a NI Vision k těmto účelům. 2) Zvolte vhodné metody pro práci s mikroskopickým obrazem a související funkce NI Vision, aby bylo možné provádět zejména úpravy snímaného obrazu a pracovat s objekty a strukturami v obraze, a to zejména provádět segmentaci obrazu, detekci a počítání objektů, rozměřování objektů a struktur. 3) Navrhněte hardwarové a softwarové řešení s využitím optického mikroskopu, kamery a LabVIEW s NI Vision. 4) Realizujte návrh z bodu 3) pro práci s objekty v mikroskopickém obraze. 5) Ověřte funkčnost řešení na ukázkových obrazech s odlišnými buňkami a buněčnými strukturami. 6) Proveďte diskusi nad získanými výsledky.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] RELF, G. CH. Image Acquisition and Processing with LabVIEW. CRC Press 2004.
[2] KLINGER, T. Image Processing with LabVIEW and IMAQ Vision. Prentice Hall 2003.

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 25.5.2012

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Tato práce se zabývá metodami akvizice, zpracování a analýzy obrazu z optického mikroskopu a jejich možným využitím. Kromě teoretického rozboru problému je zde navržen algoritmus, který realizuje segmentaci obrazu, detekci a počítání objektů a rozměrování objektů a struktur. Podle algoritmu je v prostředí LabVIEW vytvořen funkční software.

Klíčová slova

Analýza mikroskopického obrazu, LabVIEW, Struktury v mikroskopickém obraze, Operace s obrazem

Abstract

This work deals with the methods of acquisition, image processing and analysis of optical microscope and their potential use. Besides theoretical analysis of the problem is also designed an algorithm that implements image segmentation, detection and counting of objects and dimensioning of objects and structures. According to the algorithm is developed in LabVIEW functional software.

Key words

Analysis of microscopic images, LabVIEW, Structures in microscopic image, Image operations

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Analýza mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami v LabVIEW jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Vratislavu Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

ROČEK, V. Analýza mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami v LabVIEW. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Optický mikroskop	2
2.1 Historie optických mikroskopů	3
2.2 Stavba optického mikroskopu	3
2.3 Vznik obrazu v mikroskopu	3
3 Předzpracování obrazu	5
3.1 Obraz	5
3.2 Lokální operace	5
3.3 Aritmetické operace	6
3.4 Převodní charakteristika obrazu	7
3.5 Negativ	8
3.6 Histogramy	9
3.7 Barevné zvýraznění	10
3.8 Jas, kontrast a gamma korekce	10
4 Analýza obrazu	11
4.1 Prahová hodnota	11
4.2 Detekce hran	11
4.3 Matematická morfologie	12
4.4 Akvizice obrazu	13
5 Návrh řešení s využitím optického mikroskopu, kamery a NI Vision	15
6 Realizace programového vybavení LabVIEW 2011 Service pack 1	17
6.1 Akvizice obrazu	17
6.2 Předzpracování obrazu	17
6.3 Zpracování obrazu	19
6.4 Analýza obrazu	22
7 Závěr	25
8 Literatura a zdroje	26
<i>Tabulka použitých funkčních bloků</i>	<i>29</i>
<i>Seznam obrázků</i>	<i>32</i>
<i>Seznam symbolů</i>	<i>34</i>

1. Úvod

Nástupem techniky a nových metod se do popředí zájmu biologů, chemiků a dalších vědeckých pracovníků dostala mikroskopie a metody jejího využití v praxi. Jedná se totiž o způsob, jak lze zkoumané problémy lépe, poznat, analyzovat a vymyslet jejich řešení. Možnosti využití se ještě nadále prohloubily objevem elektronového mikroskopu, nebo připojením kamery na optickou soustavu a tudíž možnosti přenést obraz zkoumaného objektu na televizní obrazovku, dataprojektor, či monitor počítače.

Cílem této práce je návrh hardwarového a softwarového řešení akvizice, zpracování a analýzy mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami a jeho následná úprava a práce s objekty a strukturami v tomto obraze, například změna jasu obrazu, korekce špatné expozice, nebo rozměřování jednotlivých struktur ve zkoumaném obraze. Tyto metody by měly napomoci ke snadnějšímu zkoumání obrazu a přesnější analýze struktur v tomto obraze obsažených.

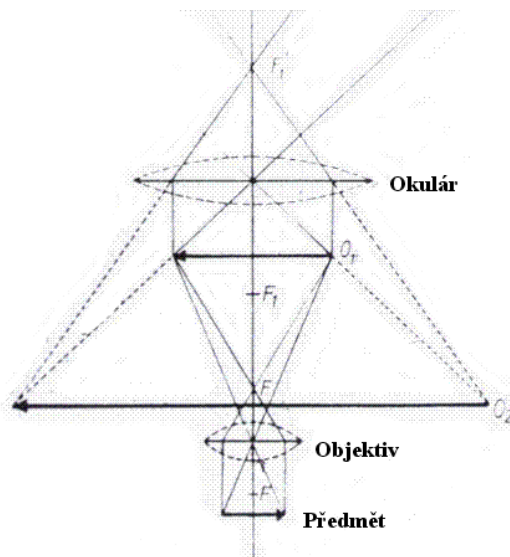
Tato práce se skládá z 8 hlavních kapitol, z nichž některé jsou rozděleny do podrobnějších podkapitol.

2. Optický mikroskop

Mikroskop je optický přístroj pro zobrazení malého sledovaného objektu ve větším zobrazení. Nejtypičtějším typem mikroskopu je mikroskop optický, který k zobrazení využívá světelných paprsků viditelného spektra. Jiným typem mikroskopu je např. mikroskop elektronový [1].

2.1. Historie optických mikroskopů

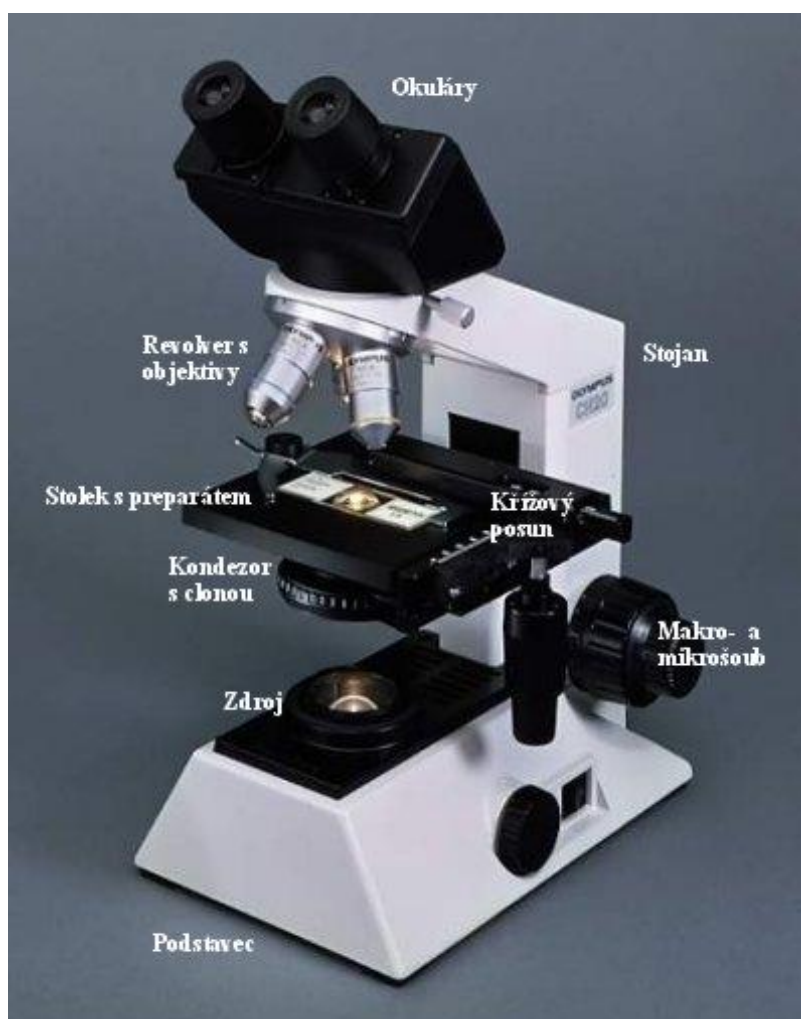
První přístroje, jež lze považovat za použitelné mikroskopy, vyrobili Hans a Zaccharias Janssenové z Middleburgu v Holandsku v letech 1590-1610. Na přelomu 17. a 18. století brousil Antoni van Leeuwenhoek čočky vynikající kvality, díky nimž bylo možné sestavit mikroskop, který zvětšoval až 270 krát. Roku 1874 zahajuje v Jeně firma Carl Zeiss výrobu mikroskopů. C. Richter přichází roku 1911 s fluorescenčním mikroskopem s UV excitací. Roku 1932 dochází F.Zernickem k objevu fázového rozhraní, za tento objev byl F.Zernick v roce 1953 oceněn Nobelovou cenou. Objevem, který dále velkou měrou pomohl k rozvoji mikroskopů, byl objev diferenciálního interferenčního kontrastu, jež učinil roku 1955 polský fyzik George Nomarski. Dalším mezníkem ve vývoji optického mikroskopu byl rok 1968, ve kterém byl představen rastrovací tandemový konfokální mikroskop, tento byl roku 1978 vylepšen v laserový konfokální rastrovací mikroskop [1].



Obrázek 1- Schéma průchodu paprsků optickým mikroskopem

2.2. Stavba optického mikroskopu

Základem mikroskopu jsou čočky, které tvoří objektiv a okulár. Objektivy i okuláry jsou povětšinou výměnné. Jednoduchý mikroskop je složen ze dvou spojitých soustav čoček, které mají společnou optickou osu. Objektiv má velmi malou ohniskovou vzdálenost (řádově v milimetrech). Pozorovaný objekt umístíme blízko k předmětovému ohnisku, čímž vzniká skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Tento obraz vzniká mezi okulárem a jeho předmětovým ohniskem. Vzniklý obraz pozorujeme okulárem, podobně jako lupou, čímž získáme další zvětšení. Ohnisková vzdálenost okuláru se pohybuje v řádech centimetrů. Obrazové ohnisko objektivu a předmětové ohnisko okuláru nesplývají, ale jsou od sebe vzdáleny o hodnotu optického intervalu, jehož hodnota se pohybuje mezi 15 a 20 cm (viz. Obrázek 1) [1.]



Obrázek 2. – Stavba optického mikroskopu

2.3. Vznik obrazu v mikroskopu

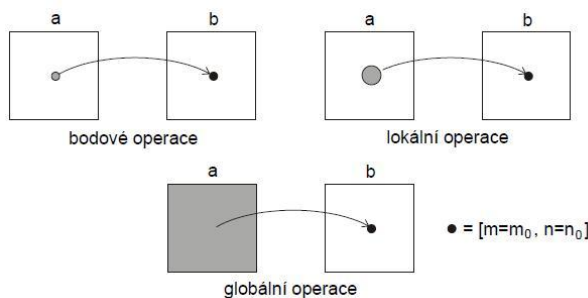
Mikroskop se skládá z mechanické části (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem), osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona) a optické části (objektivy a okuláry).

Objektiv je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný převrácený obraz objektu, jež se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem tento obraz pozorujeme jako pod lupou a vidíme zdánlivý zvětšený obraz.[1].

3. Předzpracování obrazu

Předzpracování obrazu je zcela nezbytnou operací, kterou je nutno provést u všech zpracovávaných obrazů. Je to dáno tím, že téměř nikdy se nám nepodaří pořídit kvalitní obraz bez šumu, bez jakéhokoliv rušení, za optimálních světelných podmínek a dalších možných vlivů. V rámci tohoto předzpracování se realizují takové operace, jako je úprava jasu a kontrastu, úprava histogramu, průměrování několika za sebou jdoucích snímků za účelem potlačení šumu, různé druhy filtrací pro zaostření obrazu, pro odstranění rušení, operace zmenšení, zvětšení, otočení a posunu. Souhrnně lze říct, že předzpracování obrazu je tvořeno souborem základních postupů, které je nezbytné provést, abychom mohli vyhodnocovat informaci, obsaženou v obraze, která má pro daný účel význam. Na digitální obraz lze aplikovat 3 druhy operací. Jsou to bodové operace, lokální operace a globální operace (viz. Obrázek 2). Vstupní obraz je označen $a[m,n]$. Výstupní obraz pak $b[m,n]$.

- Bodové operace – výstupní hodnota pixelu s definovanými souřadnicemi je závislá pouze na hodnotě výstupního pixelu v téže poloze, ale ve vstupním obraze
- Lokální operace – na rozdíl od bodové operace je zde výstupní hodnota pixelu s definovanými souřadnicemi závislá ne pouze na hodnotě vstupního pixelu v téže poloze, ale na hodnotách pixelů z definovaného okolí vstupního pixelu ve vstupním obraze
- Globální operace – na rozdíl od lokální operace je zde výstupní hodnota pixelu s definovanými souřadnicemi závislá na všech hodnotách pixelů ve vstupním obraze [2].



Obrázek 3.- Operace používané u předzpracování obrazu

3.1. Obraz

Máme-li pracovat s obrazem, je třeba si nejprve definovat, co rozumíme pod pojmem obraz. Podle fyzikální definice obrazu je obrazem každá vizuální scéna.

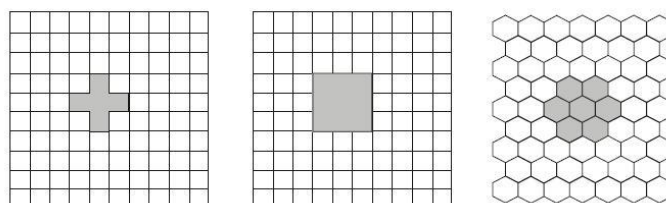
Vizuální obraz je psychosenzorický vjem. Samotný obraz je tvořen na sítnici zobrazením, tvořeným zrakovým orgánem (oko), senzory a signálem, který nese informaci o zobrazované

scéně. Signál, nesoucí obraz je ve formě elektromagnetického záření ve viditelné části spektra, na které jsou citlivé zrakové detektory. Signál je těmito detektory transformován na evokované potenciály, které se šíří po zrakovém nervu do mozku. Elektrický signál je mozkiem vyhodnocován a ukládán do paměti.

Digitální obraz při práci v počítači je reprezentován obrazovou funkcí $f(x,y)$. Ta je následně představována maticí hodnot. Obrazové elementy (pixely) jsou potom prvky této matice, jejichž hodnota je úměrná množství světelné energie. Pro jednodušší představu se v praxi užívá pojem bod, ačkoliv se jedná o pixel konečných rozměrů [4.].

3.2. Lokální operace

Velmi důležitou a nejčastěji používanou operací v číslicovém zpracování obrazu je operace lokální. Z tohoto důvodu je třeba si přesně vysvětlit, jak je obraz vzorkován, tj. z hlediska použitého rastru, který může být např. hexagonální nebo pravoúhlý (viz.Obrázek 3.), z hlediska vazeb, které mohou být v závislosti na použitých rastroch v okolí, či susedství, použity. Uvedené příklady lze použít např. při konveční, mediánové filtraci, nebo při morfologických operacích. Ideální rastr se jeví hexagonální, jak hlediska využití prostoru, tak z hlediska stejné vzdálenosti bodu od každého susedícího. Metody zpracování těchto struktur jsou však obtížné a přináší mnoho úskalí [2].



Obrázek 4.- Rastry používané při bodových operacích

3.3. Aritmetické operace

Jednou z největších výhod, oproti konvenční fotografii, je možnost užití aritmetických operací pro počítačové zpracování obrazu. Aritmetické operace jsou navíc výchozím bodem pro aplikaci dalších užitečných a pokročilých metod počítačového zpracování obrazu. Mezi základní aritmetické operace patří sčítání obrazů, odčítání obrazů, násobení obrazů a dělení obrazů.

- sčítání obrazů (4.1) – nejpoužívanější z výčtu aritmetických operací. Uvažujeme-li obraz jako matici dat, je sčítání dvou obrazů definováno tak, že prvek jednoho obrazu (matice) se sčítá s polohově odpovídajícím prvkem druhého obrazu (matice). Výsledkem této operace je

pak třetí obraz (matice), který je součtem předchozích dvou. Tuto metodu realizujeme za předpokladu, že jsou oba obrazy polohově souhlaseny, tzv. registrovány. Pokud k původnímu obrazu přičítáme pouze konstantu, situace je obdobná a výsledný obraz (matice) je pak vytvořen přičtením konstanty ke každému bodu matice. Ve výsledku pak přičtení konstanta odpovídá zvýšení hodnoty jasu.

- odčítání obrazů (4.2) - chceme-li naopak jas snížit, použijeme odčítání obrazu, přesněji pak odečtení konstanty od původního obrazu (matice). Tato operace je v praxi velice důležitá pro použití u DSA (Digitální substrakční angiografie), u níž odčítáme obrazy s použitou kontrastní látkou od tzv. pozadí, které bylo pořízeno bez kontrastní látky. Obdobně jako u sčítání tedy odčítáme prvek jednoho obrazu (matice) od prvku druhého obrazu (matice). Výsledný obraz je tedy rozdílem předchozích dvou.
- násobení obrazů (4.3) – Násobíme-li původní obraz (matici) konstantou, měníme kontrast obrazu. Speciálním případem je násobení obrazu sebou samým, tedy násobení prvku jedné matice a polohově odpovídajícího prvku druhé matice. Tento postup nám pomůže ke zvýraznění požadovaného rozsahu úrovní intenzit.
- dělení obrazů (4.4) – dělení obrazů mezi sebou je poměrně neobvyklá operace, ne už však dělení obrazu konstantou, což je podstatou jednak ovlivňování kontrastu obrazu, ale i při tzv. normování dynamického rozsahu.

Uvažujeme-li výstupní obrazovou funkci $g(x,y)$ a vstupní obrazové funkce $f_1(x,y)$ a $f_2(x,y)$, pak můžeme předešlé aritmetické operace vyjádřit pomocí následujících vztahů [2].:

$$g(x,y) = f_1(x,y) + f_2(x,y) \quad (4.1)$$

$$g(x,y) = f_1(x,y) - f_2(x,y) \quad (4.2)$$

$$g(x,y) = f_1(x,y) * f_2(x,y) \quad (4.3)$$

$$g(x,y) = f_1(x,y) / f_2(x,y) \quad (4.4)$$

3.4. Převodní charakteristika obrazu

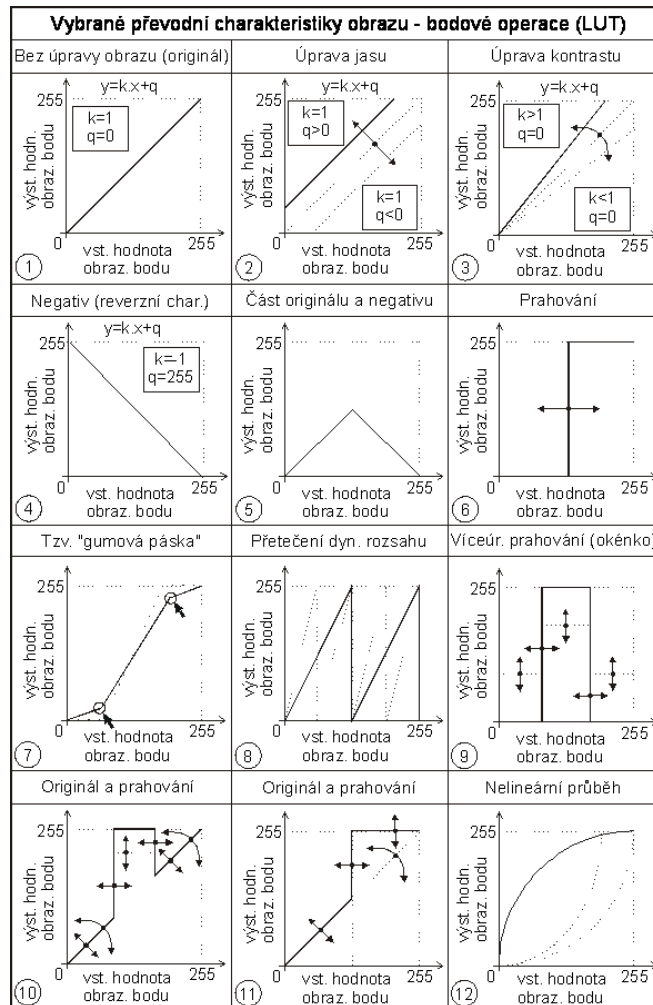
Tímto termínem označujeme závislost obrazového bodu výstupního obrazu na hodnotě obrazového bodu vstupního obrazu. Jedná se tedy o závislost, které je přímo ovlivněna operací, aplikovanou na vstupní obraz. Pokud bychom např. měli výstupní obraz tvořený vstupním obrazem, tedy při násobení vstupního obrazu konstantou „1“, pak převodní charakteristikou je přímka, procházející počátkem a se směrnici 1 ($y = x$) (viz. Obrázek 5(1)). Vyjádříme-li si základní rovnici přímky ve tvaru $y = kx + q$, je na první pohled zřejmé, že $k = 1$ a $q = 0$.

Realizujeme však sčítání obrazů, uskutečněnou změnou konstanty a tedy změnou jasu, budeme měnit hodnotu q (viz. Obrázek 5(2)). Druhou, velmi důležitou operací, je změna kontrastu obrazu. Při zpracování obrazu je kontrast vyjádřením vztahů mezi dvěma úrovněmi obrazových bodů, či jejich přírůstky. Základním vztahem pro definici tzv. relativního kontrastu, je vyjádřen jako $K = (L_{max} - L_{min} / L_{max} + L_{min}) * 100$ [%]. Jmenovatel v tomto vztahu zavádí tzv. normování, což zajišťuje obdržení stejných hodnot relativního kontrastu pro různé dvojice hodnot L_{max} a L_{min} . V převodní charakteristice se změna kontrastu projeví jako změna k . Původní, šedotónový, obraz má $k = 1$. Zvýšení kontrastu obrazu bude tedy odpovídat nárůstu k ($k > 1$), snížení kontrastu naopak jeho pokles ($k < 1$)(viz. Obrázek 5(3)). Vhodnou kombinací aritmetických operací můžeme dosáhnout změny jasu i kontrastu. Různou kombinací výše zmíněných základních typů vznikají další typy převodních charakteristik. Výsledkem těchto kombinací je pak převodní charakteristika složená z konečného počtu lineárních úseků. Existují však i nelineární převodní charakteristiky [2].

3.5. Negativ

Další velice častou převodní charakteristikou je převodní charakteristika negativního obrazu, tzv. reverzní funkce. V praxi tato charakteristika znamená, že hodnota nejnižší vstupního obrazu (0) odpovídá nejvyšší hodnotě výstupního obrazu (255) a naopak. Matematické vyjádření této reverzní funkce je tedy $y = -x + 255$ (viz obrázek 5(4)). Další častou převodní charakteristikou je převodní charakteristika dvouúrovňového obrazu, kde $k = \infty$. Jistou možností této charakteristiky je tzv. úrovňový řez (viz. Obrázek 5(9 A 10)). První z charakteristik tohoto řezu je v podstatě charakteristikou dvouúrovňového obrazu, s tím rozdílem, že zde není pouze jedna prahová hodnota, ale interval. Druhý typ úrovňového řezu pak zvýrazňuje určitou oblast úrovní a zachovává podložený původní obraz.

Další velkou skupinu tvoří převodní charakteristiky nelineární (mocninné, exponenciální, uživatelem definované)(viz. Obrázek 5(12)) [2].



Obrázek 5.- Převodní charakteristiky obrazu

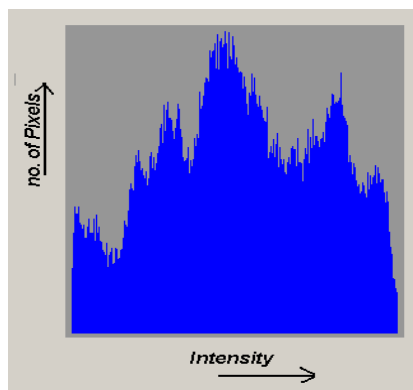
3.6. Histogramy

Histogramem rozumíme graf, který dává přehled o zastoupení jednotlivých pixelů ve škále od nejmenšího, po největší jas. Jedná se tedy o graf, na jehož ose x je vyneseno 256 bodů, zastupujících 256 odstínů. Vzhledem k tomu, že digitální obraz má 3 barevné kanály (červený, zelený a modrý), z nichž každý má 256 odstínů ($256 = 2^8$, tedy 8 bitů). V součtu to tedy dělá 16 milionů barev true color barevného podání.

Na svislé ose y je znázorněn počet pixelů v dané úrovni jasu.

Každý obraz může mít pouze jeden histogram, avšak jeden histogram může odpovídat více obrazů. Optimálně by měl histogram obsahovat skoro všechny stupně šedi. Pokud tomu tak není, může mít obraz vysoký, nebo nízký kontrast. Chceme-li optimálně zvýšit kontrast, používáme ekvalizaci, neboli vyrovnání kontrastu. Při tomto procesu dochází ke stejnému zastoupení jednotlivých jasových úrovní. Výsledkem je zvýšení kontrastu v oblastech blízko

maximálních hodnot histogramu a naopak pokles kontrastu v oblastech minimálních hodnot. Modelový histogram je zobrazen na Obrázku 6. [2].



Obrázek 6.- Příklad histogramu

3.7. Barevné zvýraznění

Lidské oko rozezná asi 10 krát více barevných odstínů než stupňů šedi, z tohoto důvodu převádíme černobílý obraz na obraz barevný. Při prohlížení černobílého obrazu totiž oko reaguje pouze na změny jasu, takže funkce oka je omezena pouze na vertikální osu barevného vnímání. Při umělém obarvení černobílého obrazu používáme tzv. pseudobarvy. Každé úrovni šedi je zde přiřazena určitá barva, což ve výsledném obraze je provedeno spojitou, nebo skokovou funkcí[2].

3.8. Jas, kontrast a gamma korekce

Jas je dán intenzitou světla, odebíraného lidským okem a vyzařovaná zdrojem nebo odrážejícího se od okolních povrchů. Proto také může být popsán jako intenzita jiskřivosti připisovaná na dané ploše. Jeho jednotkou je kandela na metr čtvereční (cd/m^2) [4].

Kontrast vyjadřuje rozdíl mezi nejtmašími a nejsvětějšími místy oblastmi na fotografii. Čím je větší rozdíl mezi těmito oblastmi, tím větší je kontrast[5].

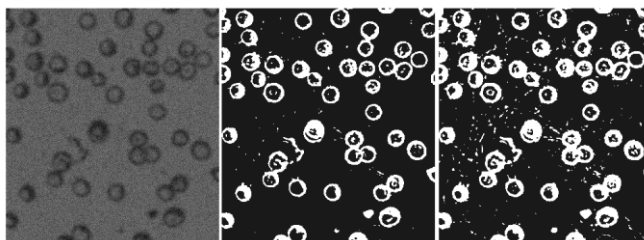
Gamma korekce slouží ke zesvětlení, či ztmavení obrazu, Na rozdíl od změny jasu však nemění nejtmaší a nejsvětější bod. Při zesvětlování obrazu připočítává k pixelům bílou bravu, při ztmavení naopak bílou barvu odečítá.

4. Analýza obrazu

Obrazová analýza je nástrojem, jeho pomocí převádíme informace, obsažené v obraze do numerické formy, se kterou lze dále pracovat. Pro zjednodušení si lze obrazovou analýzu představit jako soubor po sobě následujících kroků, na jejich konci dojde k přeměně obrazových dat do formy číselných dat. Prvním krokem obrazové analýzy je samotné získání digitálního obrazu. Tento získaný digitální obraz je poté vhodné převést do formy, která nejlépe vyhovuje našim potřebám. Dalším možným krokem je diskriminace, jejím účelem je převést obraz do tzv. binárního obrazu, tedy obrazu, skládajícího se pouze z bílé a černé barvy. Takovýto binární obraz, po úpravách metodami matematické morfologie, je nejvhodnějším pro měření, na jejich základě lze provádět základní výpočty. Při těchto krocích se digitální obraz mění a zjednodušuje [6.]

4.1. Prahová hodnota

Prahovou hodnotu získáváme operací prahováním. Prahování spočívá na hodnocení jasu každého pixelu. Jejím principem je nalezení takové hodnoty (prahu) v histogramu, pro kterou bude platit, že všechny hodnoty nižší než práh budou v obraze odpovídat pozadí, kdežto všechny hodnoty vyšší než práh, budou odpovídat popředí. Nehomogenní obraz, obvykle obraz obsahující různé úseky, neumožňuje určit přímo globální práh, je však možné využít metod adaptivního prahování. V případě, že se rozložení jasu pixelů v pozadí a popředí výrazně překrývá, např. z důvodu vysoké hodnoty šumu v obraze, může být přímé prahování prakticky nemožné. Vliv prahování na výsledný počet bílých objektů ve zpracovávaném obraze je znázorněn na obrázku 7 [7].



Obrázek 7.- Vliv prahování na obraz

4.2. Detekce hran

K detekci hran používáme gradientní operátory, např. Cannyho hranový detektor, nebo Sobelův filtr. Protože výstupem gradientního operátoru je obraz, kde hrany sice jsou zvýrazněny, ale může obsahovat další artefakty, odpovídající lokálním nehomogenitám v obraze,

je třeba obraz dále upravit. K odstranění artefaktů, vzniklých lokálními malými rozdíly obvykle postačuje prahování. Vzhledem ke svým vlastnostem mohou detektory hran vytvářet přerušované i falešné hranice. Obraz hranic je tedy nutné dále zpracovat [7].

4.3. Matematická morfologie

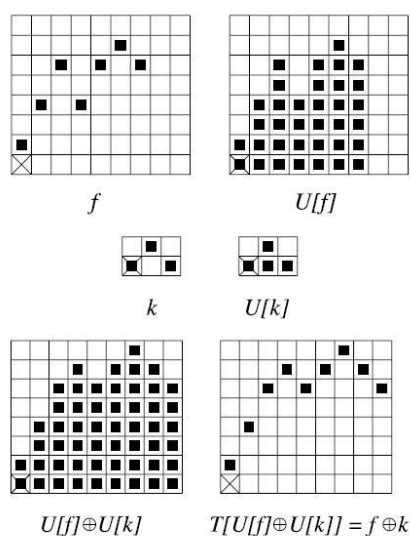
Základním předpokladem matematické morfologie je možnost modelace obrazů v bodových množin. V počítačovém zpracování se používá protějšek euklidovského prostoru, tedy prostoru splňujícího Euklidovy axiomy. V binární matematické morfologii se používá množina dvojic celých čísel a při šedotónové morfologii pak trojice celých čísel [8].

Binární obrazy jsou podmnožinou 2D obrazu a jejich pixely jsou reprezentovány dvojicí celých čísel, vzhledem ke dvěma osám diskrétní mřížky. Body obrazu, které reprezentují množinu X , odpovídají pixelům s hodnotou 1. Body doplňku množiny jsou pixely rovny nule. Počátek má souřadnice (0,0), souřadnice ostatních bodů jsou (x,y). Morfologická transformace je dána relací mezi obrazem a jinou menší bodovou množinou, strukturním elementem. Základní transformace jsou dilatace, eroze, otevření a uzavření [8].

Dilatace skládá body dvou množin pomocí vektorového součinu (5.1)

$$X \oplus B = \{p \in \varepsilon^2 : p = x + b, x \in X, b \in B\} \quad (5.1)$$

kde X a B , jsou množiny, x a b jsou pixely z množin X a B , p je součet pixelů a ε^2 je euklidovský prostor.(viz.Obrázek 7.)

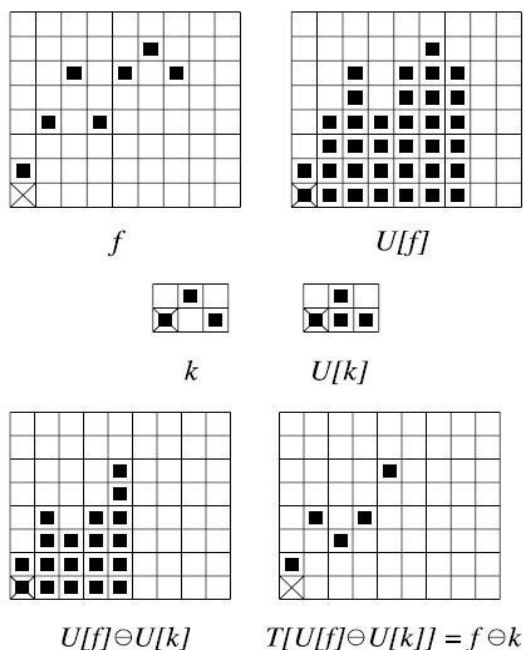


Obrázek 8- Matematická morfologie-dilatace

Eroze je duální operací k dilataci a je dána vztahem (5.2)

$$X \ominus B = \{p \in \varepsilon^2 : p + b \in X, b \in B\} \quad (5.2)$$

kde X a B , jsou množiny, b je pixel z množiny B , p je pixel obrazu a ε^2 je euklidovský prostor.(viz.Obrázek 8.)



Obrázek 9 - Matematická operace eroze

Kombinace eroze a dilatace jsou operace otevření a uzavření. Výsledkem je zjednodušený obraz s velmi malým množstvím detailů. Eroze, následovaná dilatací způsobí otevření, opačný postup pak uzavření [8].

4.4. Akvizice obrazu

Převod snímku do digitální je základním předpokladu pro aplikaci obrazové analýzy. Tento krok označujeme jako akvizici obrazu. Základním cílem tohoto kroku je zachytit analogový obraz, jehož jas je spojitou funkcí pozice a jeho následný převod do digitální formy [2].

Na počátku celého procesu stojí objektiv. Je to soustava několika druhů čoček, jež mají za úkol přenést snímanou scénu na snímač a eliminovat případné optické vady na co nejmenší

možnou úroveň. Objektiv hraje zřejmě nejdůležitější roli v kvalitě pořízeného obrazu a je charakterizován ohniskovou vzdáleností, světelností a schopností transfokace.

Pro zachycení světelné informace je dnes nejpoužívanějším systémem CCD detektor. Charged Coupled Device v sobě ukrývá čip, který je díky fyzikálně- chemické reakci schopen přeměnit světelnou informaci na elektrický signál.

Pro přenos obrazu do počítače používáme digitální nebo analogové rozhraní. Příkladem digitálního rozhraní je FireWire, nebo HDMI, příkladem analogového rozhraní je kompozitní video nebo komponentní video[3].

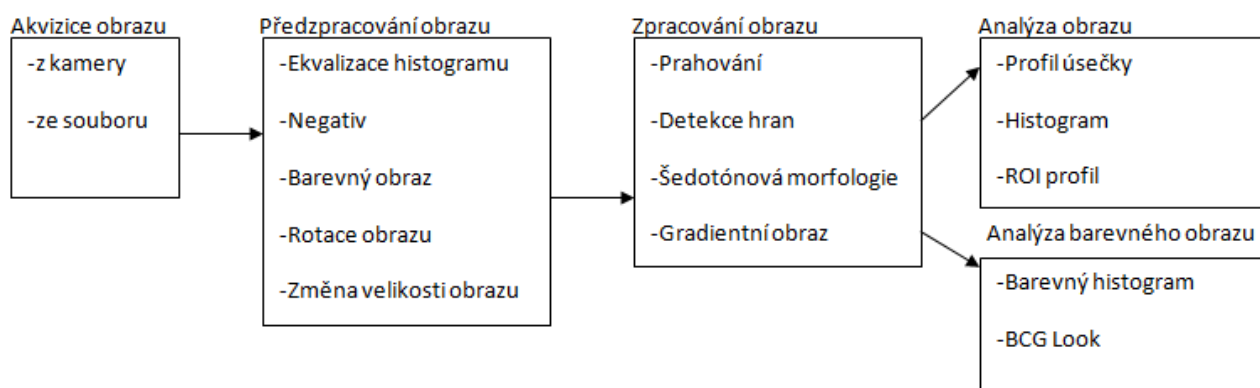
5. Návrh řešení s využitím optického mikroskopu, kamery a NI Vision

Při návrhu a následné tvorbě programu se budeme držet základních částí, a to akvizicí obrazu, v našem případě z kamery. Dále bude obraz předzpracován, zpracován, analyzován a v podobě takto zpracovaného obrazu odeslán na výstup. Máme tedy 5 základních částí, které bude algoritmus obsahovat. Podoperace, ze kterých budou tyto části složené, byly rozebrány v předešlých kapitolách.

Pro návrh algoritmu v prostředí LabVIEW využijeme jeho následující funkce:

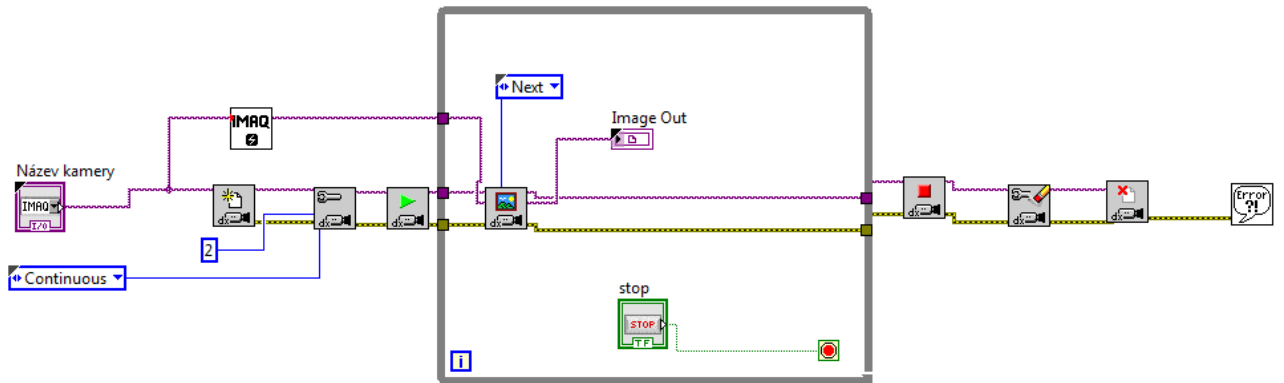
- IMAQ Create – tato funkce vytvoří plochu pro uložení obrazu
- IMAQdx Open Camera VI – touto funkcí spustíme kameru
- IMAQdx Configure Acquisition – nastaví parametry pro snímání
- IMAQdx Start Acquisition - funkce na spuštění kamery
- IMAQdx Get Image VI – funkce pro získání obrazu
- IMAQdx Stop Acquisition VI – funkce pro zastavení snímání obrazu
- IMAQdx Unconfigure Acquisition VI – funkce pro zrušení parametrů. Nastavených funkcí *IMAQdx Configure Acquisition*
- IMAQdx Close Camera VI – funkce pro vypnutí kamery

Návrh blokového schématu programu lze vidět na Obrázku 9. Z kamery, připojené a optickou soustavou mikroskopu, dostaneme zkoumaný obraz. Tento pak metodami, uvedenými v této práci, bude předzpracován, zpracován, analyzován a následně odeslán na výstup. Tento proces by měl usnadnit uživateli zkoumání tohoto obrazu a napomoci tak k řešení problémů, které jsou s obrazovou analýzou neodmyslitelně spojeny.





Obrázek 11. – Blokové schéma akvizice obrazu z kamery mikroskopu



Obrázek 12. – Blokový diagram akvizice obrazu z kamery

6. Realizace programového vybavení LabVIEW 2011 Service pack 1

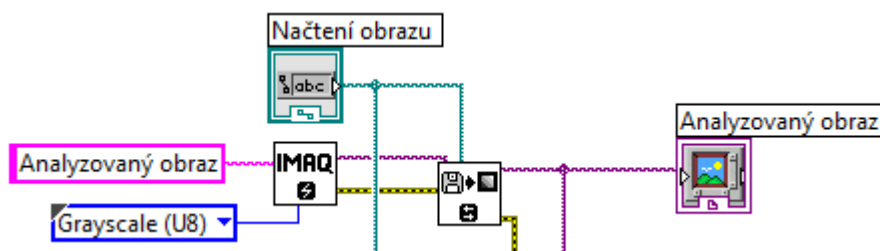
LabVIEW 2011 Service pack 1 je vývojové grafické programátorské prostředí, sloužící k vytvoření a ovládání systému určených k měření. Programy, vytvořené v tomto prostředí, se nazývají virtuální instrumenty (VI). Každý program se skládá ze 2 částí, a to blokového diagramu a čelního panelu. Čelní panel obsahuje ovládací a zobrazovací prvky pro uživatele, v blokovém diagramu jsou umístěny funkční bloky, nutné ke správnému chodu vytvořeného programu [9].

6.1. Akvizice obrazu ze souboru

Před spuštěním programu, sloužícího k analýze obrazu, vybereme na čelním panelu pomocí oddílu *Načtení obrazu* obraz, který chceme analyzovat. V blokovém diagramu je tato možnost zastoupena funkcí *IMAQ ReadFile*, umístění souboru na disku a tedy cesta k němu, se na čelním panelu též zobrazí, a to díky prvku *Image Display* na čelním panelu a proměnné *Načtení obrazu*, připojené na funkční blok *IMAQ ReadFile*. Funkční blok *IMAQ Create* jsme nastavili na zobrazení obrazu černobílého, obraz na čelním panelu tedy není barevný. K zobrazení barevného obrazu jsou třeba další operace.



Obrázek 13.-Oddíl *Načtení obrazu* z čelního panelu



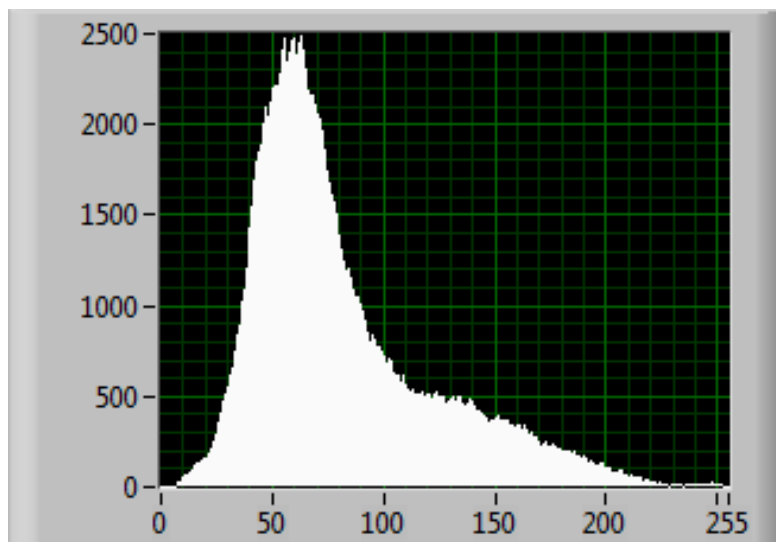
Obrázek 14.-Realizace načtení obrazu v blokovém diagramu

6.2. Předzpracování obrazu

Na čelním panelu máme operace rozděleny do 3 skupin. Jedná se o Předzpracování obrazu, Zpracování obrazu a Analýzu obrazu. Každá z těchto skupin pod sebe zaštiťuje dílčí operace s obrazem. Jednotlivé operace spouštíme kliknutím na příslušné tlačítko s názvem operace. Pod skupinu operací, reprezentovanou názvem Předzpracování obrazu, se v programu řadí:

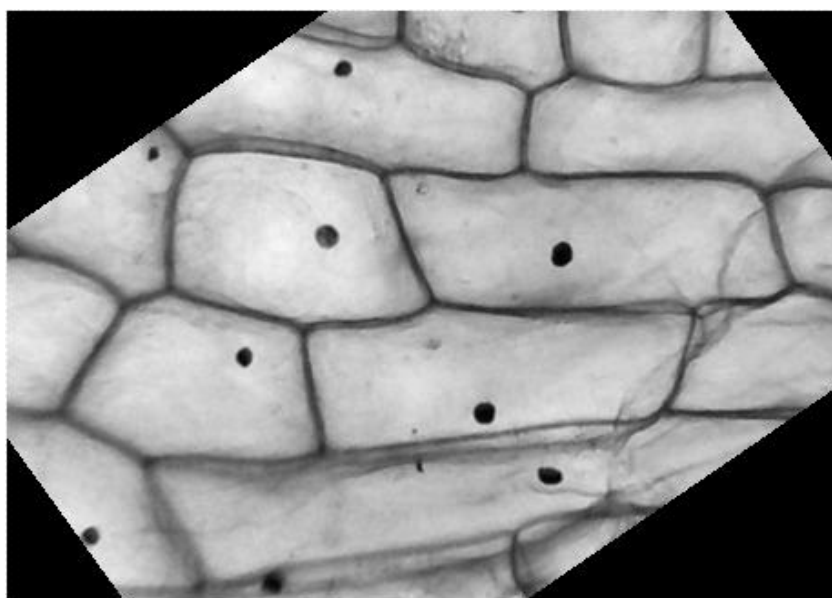
Negativ (viz.3.5., Obrázek 15.), Rotace obrazu (viz. Obrázek 16.), Změna velikosti obrazu (viz Obrázek 17.) a Ekvalizace histogramu (viz. Obrázek 18.)

- Negativ – inverzní funkcí je vytvořen negativ. Výstupem funkce je negativ a inverzní obraz. Negativ je zobrazen pomocí kontrolního panelu Waveform Graph



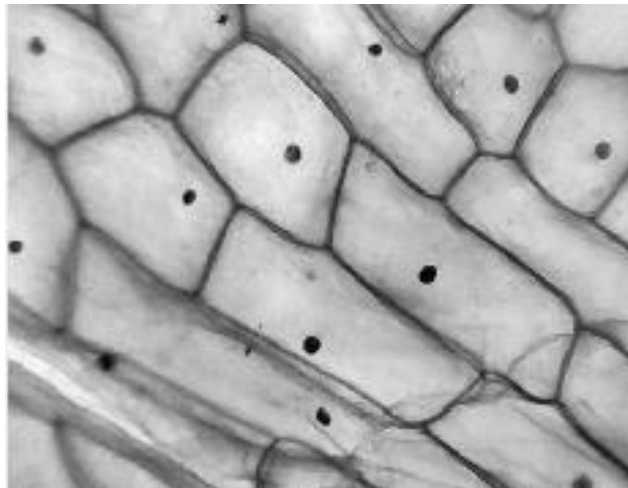
Obrázek 15.- Negativ analyzovaného obrazu

- Rotace obrazu – po nastavení úhlu rotace ve stupních obraz otočí.



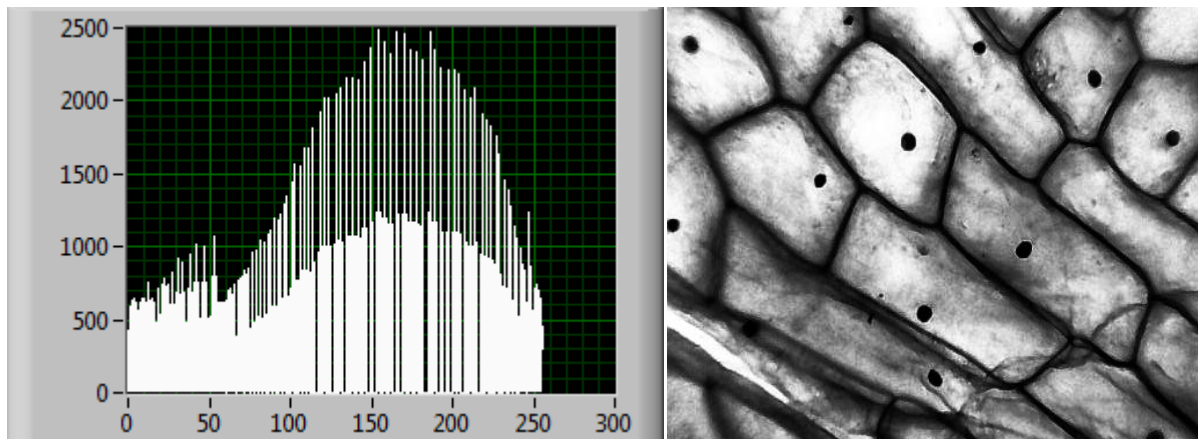
Obrázek 16. - Obraz po rotaci o 35°

- Změna velikosti obrazu – převede obraz na jinou velikost dle nastavitelných parametrů X a Y



Obrázek 17. - Obraz, jehož velikost byla změněna podle parametrů $X=230$, $Y=178$

- Ekvalizace histogramu – provede ekvalizaci analyzovaného obrazu. Jako výstup zobrazí egalizovaný histogram a obraz, který mu odpovídá

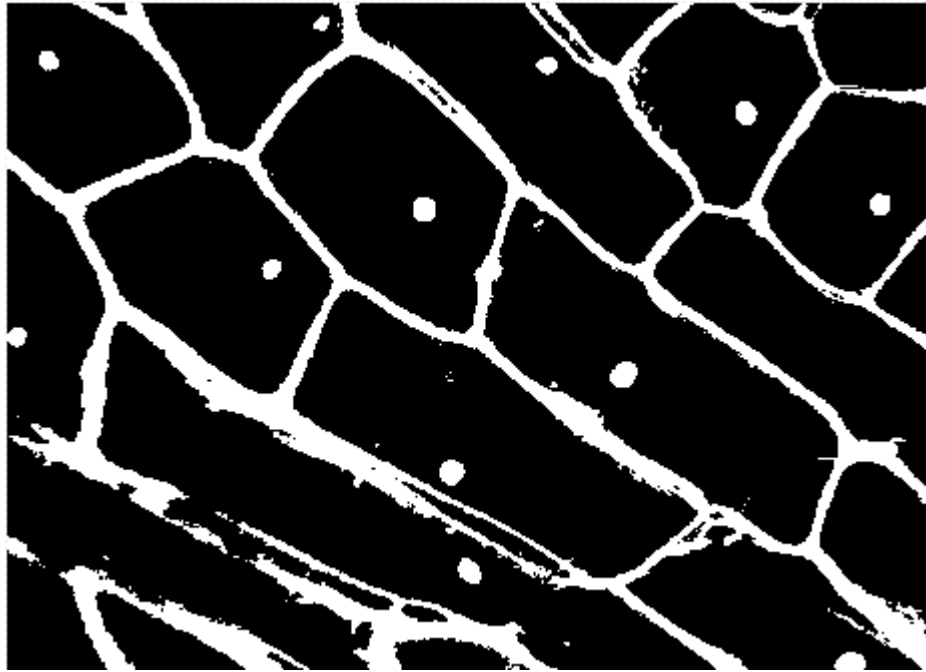


Obrázek 18. – Ekvalizovaný histogram a jemu odpovídající obraz

6.3. Zpracování obrazu

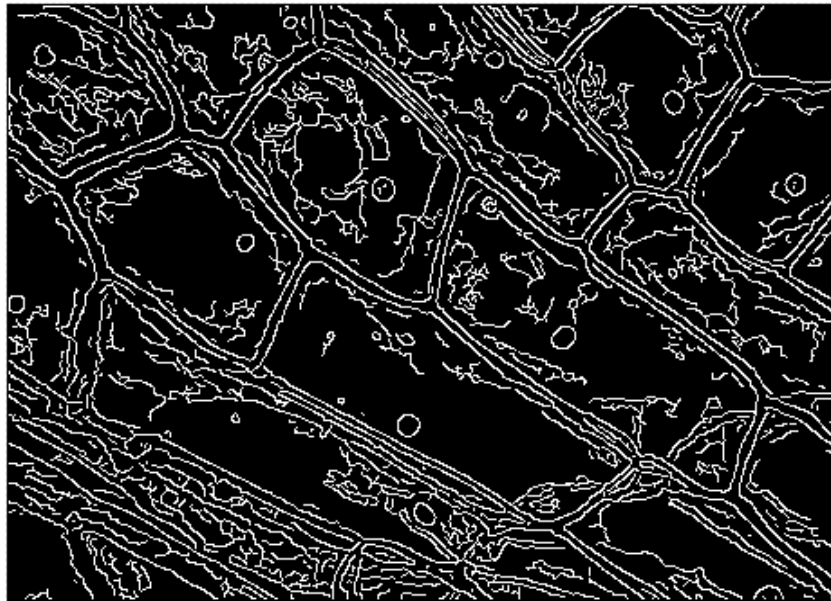
Ke zpracování obrazu jsou v programu použity metody prahování, detekce hran a šedotónové morfologie

- Prahování – po nastavení horního a spodního prahu provede prahování analyzovaného obrazu a na výstupu zobrazí výsledný obraz.



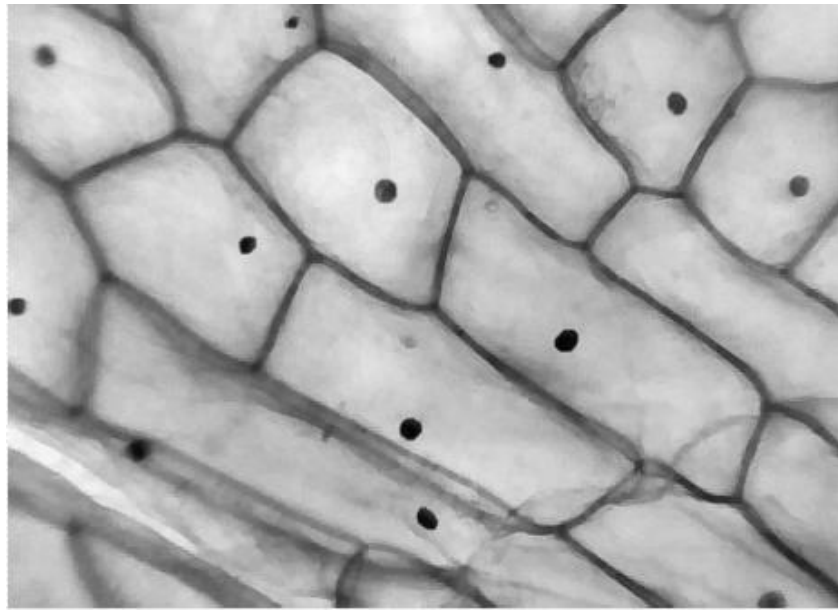
Obrázek 19. – Analyzovaný obraz po prahování

- Detekce hran – pomocí speciální metody detekce hran odhadne jejich umístění a zobrazí analyzovaný obraz s detekovanými hranami

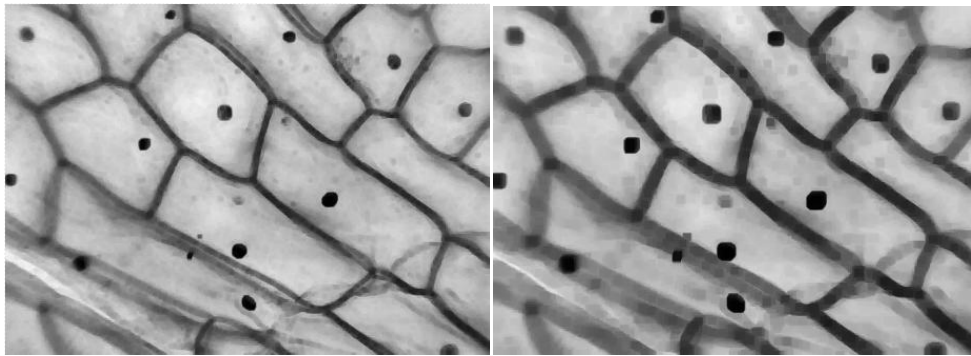


Obrázek 20. – Analyzovaný obraz s detekovanými hranami

- Segmentace obrazu – počítá zóny vlivu mezi částicemi v analyzovaném obraze. Každá částice v tomto obraze roste, dokud nedosáhne sousední částice. V takovém okamžiku svůj růst zastaví. Zdrojový obraz musí mít hranici větší, nebo rovnu 1.
- Šedotónová morfologie – provede transformaci analyzovaného obrazu na šedotónový obraz

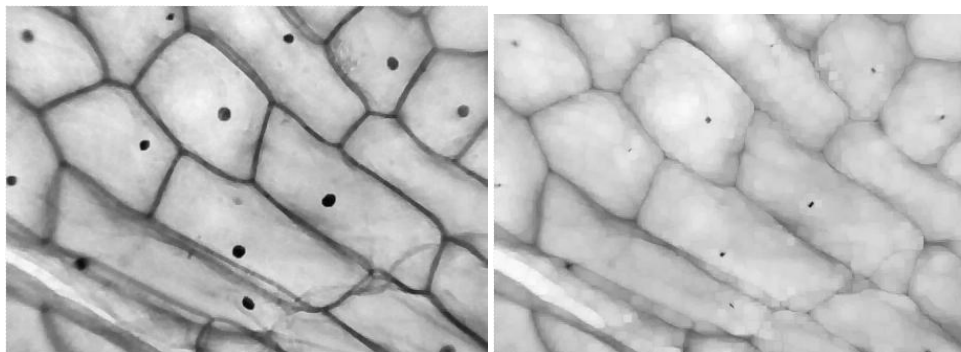


Obrázek 21. – Šedotónový obraz



Eroze s počtem opakování 1

Eroze s počtem opakování 3

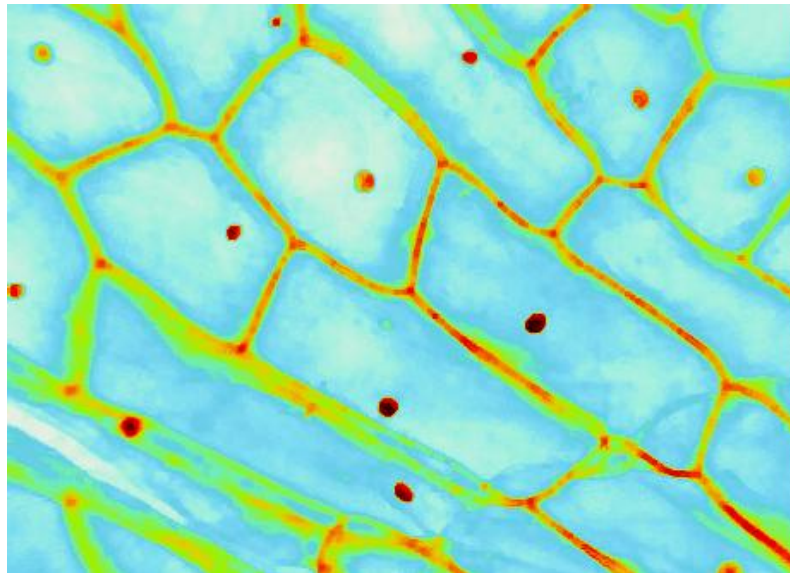


Dilace s počtem opakování 1

Dilatace s počtem opakování 3

Obrázek 22. – Operace eroze a dilatace

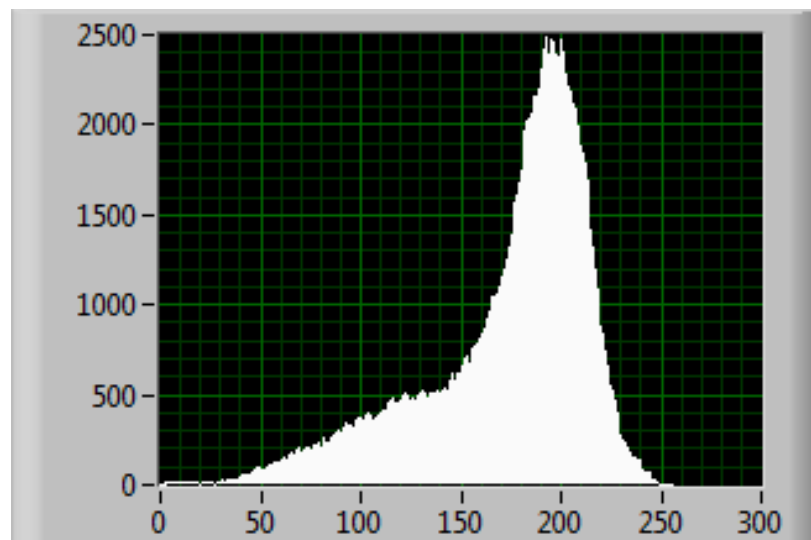
- Gradientní obraz – převede analyzovaný obraz na gradientní obraz, obsahující spektrum od červené barvy na začátku, po modrou na konci spektra. Červená barva odpovídá zastoupení černé v analyzovaném obraze, modrá reprezentuje zastoupení bílé



Obrázek 23. – Pseudobarevný gradientní obraz

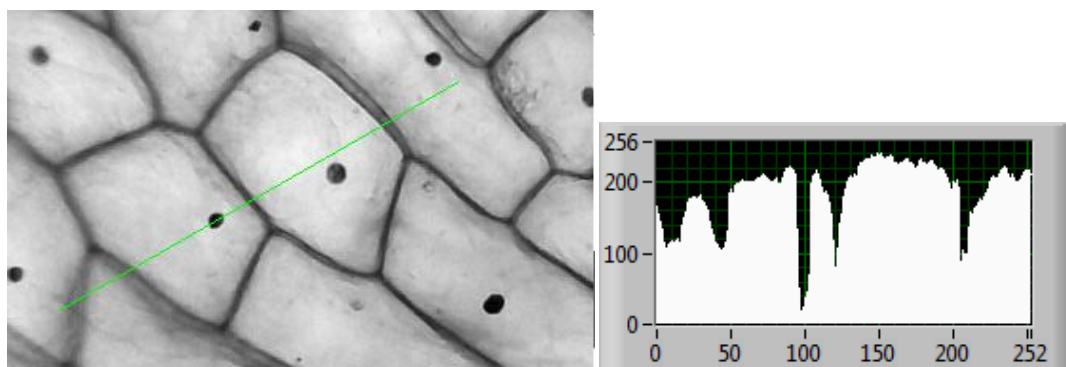
6.4. Analýza obrazu

- Histogram – vytvoří a zobrazí histogram analyzovaného obrazu. Histogram je zobrazen pomocí Waveform graph.



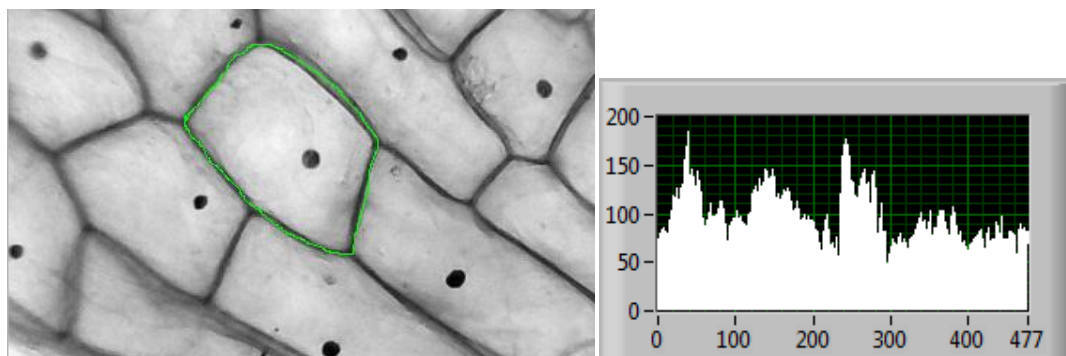
Obrázek 24. – Histogram analyzovaného obrazu

- Profil úsečky – zobrazí profil úsečky a vytvoří graf, reprezentující pixely na úsečce. Po kliknutí na tlačítko *Profil úsečky* se v pracovním okně zobrazí analyzovaný obraz. Poté uživatel pomocí myši definuje úsečku v obraze a opětovným stisknutím tlačítka spustí výpočet a zobrazení grafu.



Obrázek 25. – Úsečka v analyzovaném obraze a její graf

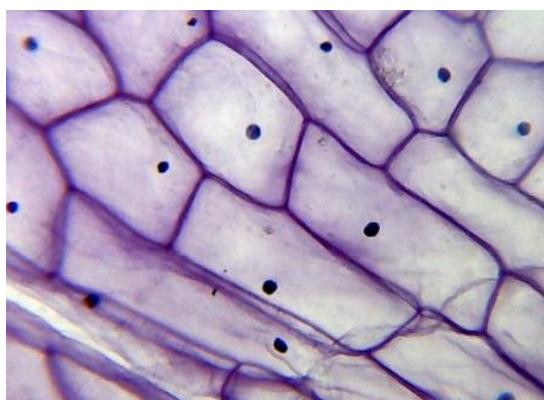
- ROI profil – počítání profil pixelů podél hranice vybraného tvaru profilu. Lze si vybrat mezi základními tvary, jako jsou obdélník, čtverec, mnohoúhelník, kruh, elipsa, kruhová výseč, nebo lze zájmovou oblast definovat uživatelem.



Obrázek 26. – Analyzovaný obraz s definovaným ROI profilem a jeho graf

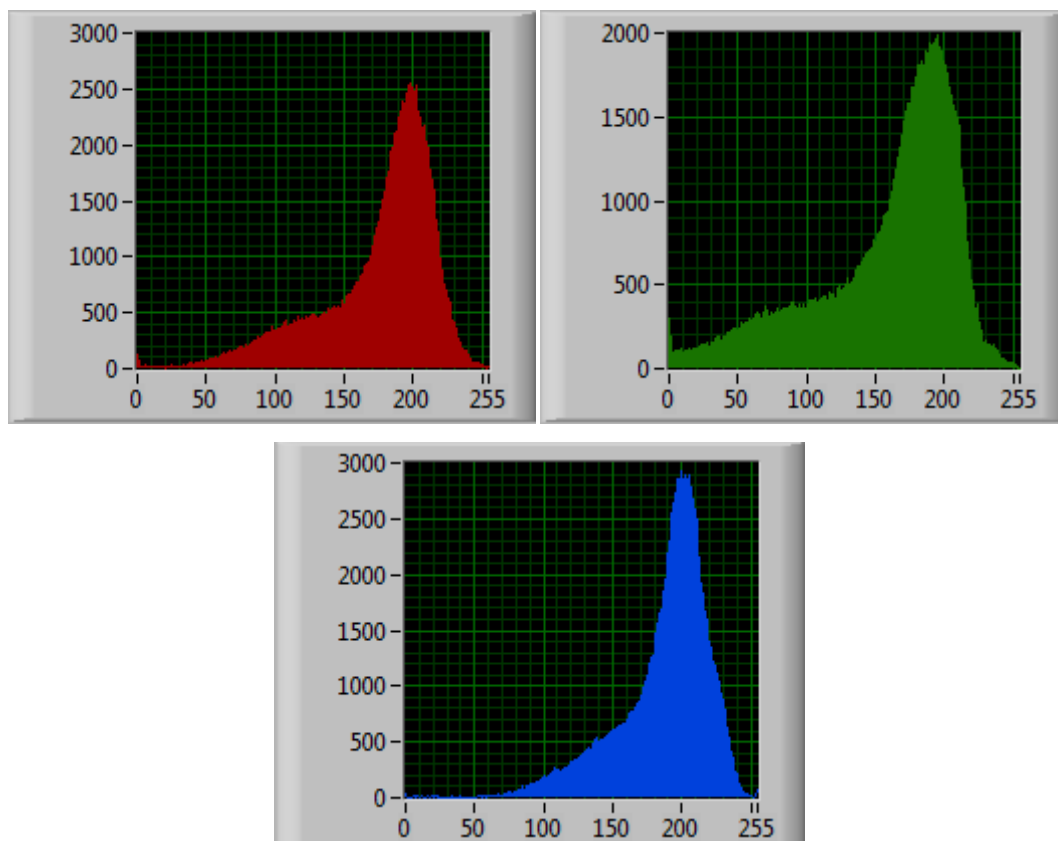
6.5. Zpracování barevného obrazu

- Barevný obraz – zobrazení původního, barevného, obrazu.



Obrázek 27. – Analyzovaný barevný obraz

- Barevné histogramy – zobrazení zastoupení pixelů tří základních barev v analyzovaném obraze. Základní barvy jsou červená, zelená a modrá. Barva histogramu odpovídá analyzované barvě v obraze.



Obrázek 28. – Histogramy barevného obrazu

7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabýval analýzou mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami v prostředí LabVIEW.

Teoretická část bakalářské práce zahrnuje odborné informace, které by měly posloužit k úvodu do problematiky analýzy mikroskopického obrazu. Dále obsahuje seznámení se základními postupy, užívanými při předzpracování, zpracování a analýze obrazu. Posledním oddílem teoretické části je návrh hardwarového a softwarového řešení zkoumaného problému. Úkolem navrženého programu je provádět úpravy snímaného objektu a práce s objekty a strukturami v obraze, a to zejména provádět segmentaci obrazu, detekci a počítání objektů a struktur.

Součástí této bakalářské práce je mimo teoretické části i část praktická. V praktické části je realizováno hardwarové a softwarové řešení z teoretické části. Softwarové řešení je navrženo v programovacím prostředí LabView SP 2011. Realizovaný program umožňuje předzpracování, zpracování a analýzu mikroskopického obrazu s buněčnými strukturami. Výstupem tohoto programu je obraz po analýze a matematická data, charakterizující tento obraz.

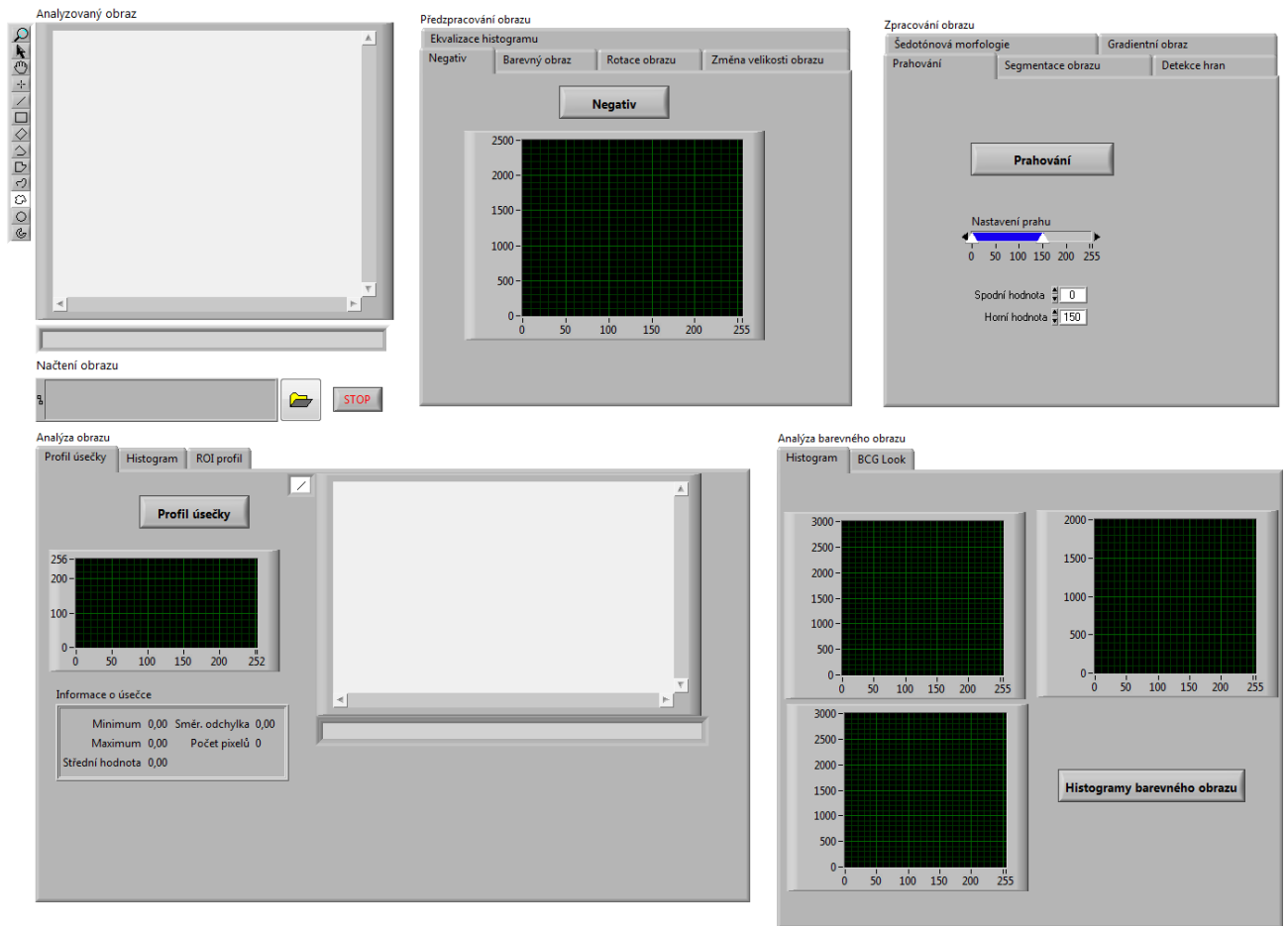
Výsledkem této bakalářské práce je tedy program, a jeho jednotlivé výstupy po aplikaci různých operací, sloužících k analýze obrazu. Výstupy programu jsou obrazová data a matematické hodnoty, charakterizující obraz.

Funkčnost softwaru, sloužícího pro akvizici obrazu z kamery, byla v laboratorních podmínkách úspěšně ozkoušena.

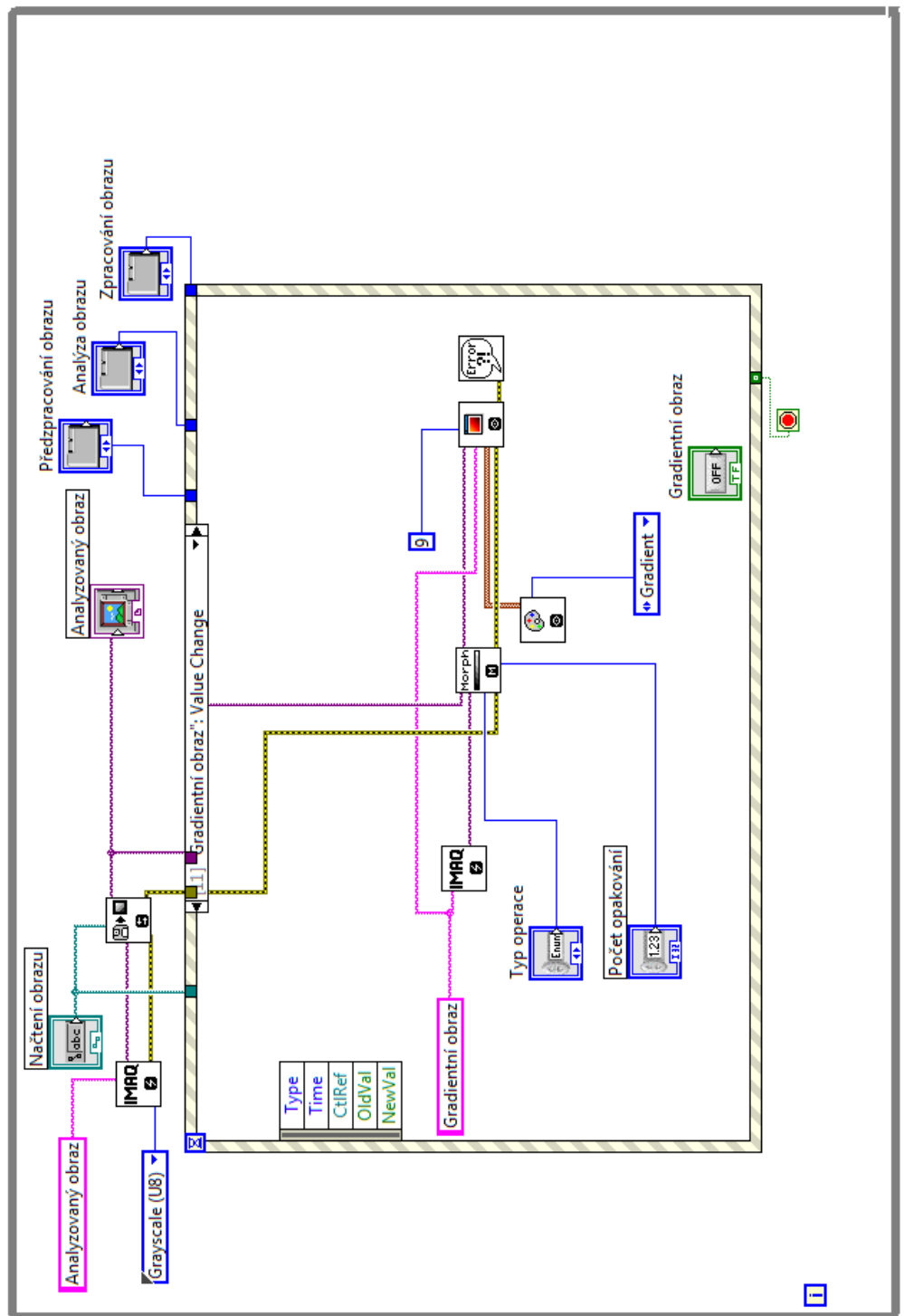
Program má praktické využití pro analýzu obrazu v laboratorních podmínkách, nebo jako pomoc při laboratorní výuce.

8. Literatura a zdroje

- [1]. Dušan Matis a kolektiv: Mikroskopická technika. Skriptum PřF Univerzity Komenského, 1993
- [2]. Drastich, A.:Zobrazovací systémy v lékařství. (Skriptum). Vysoké učení technické v Brně. Vydavatelství VUT: Brno, 1990. 512s.
- [3].Úvod do multimediálních technologií, , Weinlich P., 7. přednáška,dostupná na: http://ilex.kin.tul.cz/~petr.weinlich/multiedu/UMM/07_prednes_UMM.pdf
- [4]. Webová stránka, Svítidla-elektro.cz, Slovník, dostupná z <http://www.svitidla-elektro.cz/new/index.php?pg=slovník>, [cit.2011-05-22]
- [5]. Webová stránka, Osobní stránky Martina Bažanta, Bažant M., Pojmy digitální fotografie, dostupná na : <http://old.bazantik.net/digifoto/pojmy-digitalni-fotografie.php#k>, [cit.2012-5-22]
- [6]. Robards A.W., Wilson A.J. 1993: Procedures in Electron Microscopy, Willey and Sons,Ltd.
- [7]. DOUGHERY, Geoff. Digital Image Processing for Medical Applications. [s. l.] : Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-86085-7. (en)
- [8]. HLAVÁČ, V., SEDLÁČEK, M. *Zpracování signálů a obrazů*. Praha : ČVUT, 2007. 255 s. ISBN 978-80-01-03110-0.
- [9]. Webová stránka, NI LabVIEW[online]. Austin, Texas:National Instrument Corporation, 2003, dostupná z WWW: <http://www.ni.com/labview/whatis/>, [cit.2011-05-16]




























Ukázka čelního panelu programu











Ukázka blokového diagramu pro zobrazení gradientního obrazu

Tabulka použitých funkčních bloků

Název funkčního bloku	Popis funkčního bloku
 - IMAQ Create	Vytváří dočasné paměťové místo pro obraz.
 - IMAQ ReadFile	Čte soubor s obrázkem. Formát souboru může být standardní formát (BMP, TIFF, JPEG, JPEG2000, PNG a AIPD) nebo nestandardní formát, známý pro uživatele. Ve všech případech se přečtené pixely automaticky převádí na typ obrazu, který lze zobrazit funkčním blokem <i>Image</i> .
 - File Path	Vypíše umístění analyzovaného obrazu na pevném disku počítače.
 - Image Out	Zobrazí analyzovaný obraz, jehož pixely byly převedeny funkčním blokem <i>IMAQ ReadFile</i> .
 - Waveform Graph	Vykreslí graf pro požadovanou operaci.
 - Tab Control	Pomocí tohoto funkčního bloku se přepínáme mezi jednotlivými funkcemi, potřebnými k provedení operace s obrazem.
 - Boolean	Slouží ke spuštění dané funkce, potřebné k provedení operace s obrazem.
 - IMAQ Histogram	Vypočítá histogram obrazu.
 - Simple Error Handler	Indikuje vzniklou chybu. Zobrazí popis chyby a dialogové okno.
 - IMAQ Inverse	Invertuje pixely v obraze pro výpočet negativního obrazu.
 - IMAQ WindDraw	Zobrazí obraz v okně obrazu. Okno otevře automaticky při spuštění připojené funkce.
 - Slide	Slouží k nastavení dvou hodnot, nutných pro správný chod některých funkcí.

 - IMAQ Threshold	Aplikuje na analyzovaný obraz práh.
 - IMAQ Cast Image	Převede aktuální typ obrazu na typ obrazu, určený pomocí <i>Image type</i> .
 - IMAQ GetPalette	Vybere paletu barev, ve které bude analyzovaný obraz zobrazen. K dispozici je 5 barevných palet, přičemž každá má svůj číselný kód.
 - IMAQ Rotate	Otočí analyzovaný obraz.
 - Numeric	Udává číselnou hodnotu, nutnou ke správnému chodu některých funkcí.
 - IMAQ GrayMorphology	Provádí transformaci analyzovaného obrazu na šedotónový.
 - Enum	Nabízí na výběr typy operací, užitých při průběhu některých funkcí.
 - Numeric	Udává číselnou hodnotu, potřebnou pro správný průběh některých funkcí.
 - IMAQ CannyEdgeDetection	Za použití speciální metody detekce hran přesně odhaduje umístění hran i za podmínek vysokého poměru signál – šum.
 - IMAQ Equalize	Vytváří ekvalizovaný histogram analyzovaného obrazu.
 - IMAQ LineProfile	Vypočítá profil řady pixelů. Příslušné obrazové informace jsou získány ze specifikovaného vektoru.
 - Cluster	Zobrazí informace, analyzované funkčními bloky.
 - IMAQ Resample	Změní velikost analyzovaného obrazu na základě uživatelem definovaných parametrů. Tímto funkčním blokem lze analyzovaný obraz zvětšit, nebo naopak zmenšit.

 - IMAQ ColorHistogram	Vypočítá histogramy tří barevných rovin obrazu.
 - IMAQ ColorBCGLookup	Aplikuje nastavené hodnoty jasu, kontrastu a gama korekce pro každou ze tří barevných rovin odděleně.
 - IMAQ ROIProfile	Počítá profil pixelů podél hranice ROI profilu. Dále vypočítá obrazové informace, jako statistiku pixelů, nebo souřadnice bodů podél ROI hranice.
 - IMAQ Label	Označí částice v binárním obraze, což je důležité pro další práci s nimi.
 - IMAQ Segmentation	Vypočítá zóny vlivu mezi částicemi.
 - Stop Button	Ukončí strukturu <i>While loop</i> , čímž zastaví program.
 - Case Structure	Slouží k oddělení jednotlivých funkcí. Každá funkce má vlastní <i>Event case</i> , v němž se nacházejí pouze funkční bloky k této funkci nezbytné.
 - While Loop	Zajišťuje samotný chod programu. Dokud není její chod přerušen tlačítkem <i>Stop button</i> , nebo uživatelem, probíhá program.

Seznam obrázků

Obrázek 1- Schéma průchodu paprsků optickým mikroskopem.....	2
Obrázek 2. – Stavba optického mikroskopu	3
Obrázek 3.- Operace používané u předzpracování obrazu	5
Obrázek 4.- Rastry používané při bodových operacích.....	6
Obrázek 5.- Převodní charakteristiky obrazu	9
Obrázek 6.- Příklad histogramu	10
Obrázek 7.- Vliv prahování na obraz.....	11
Obrázek 8- Matematická morfologie-dilatace	12
Obrázek 9 - Matematická operace eroze	13
Obrázek 10.-Blokové schéma uvažovaného programu	15
Obrázek 11. – Blokové schéma akvizice obrazu z kamery mikroskopu	16
Obrázek 12. – Blokový diagram akvizice obrazu z kamery	16
Obrázek 13.-Oddíl <i>Načtení obrazu</i> z čelního panelu	17
Obrázek 14.-Realizace načtení obrazu v blokovém diagramu	17
Obrázek 15.- Negativ analyzovaného obrazu.....	18
Obrázek 16. - Obraz po rotaci o 35°	18
Obrázek 17. - Obraz, jehož velikost byla změněna podle parametrů X=230, Y=178.....	19
Obrázek 18. – Ekvalizovaný histogram a jemu odpovídající obraz	19
Obrázek 19. – Analyzovaný obraz po prahování	20
Obrázek 20. – Analyzovaný obraz s detekovanými hranami	20
Obrázek 21. – Šedotónový obraz.....	21
Obrázek 22. – Operace eroze a dilatace	21
Obrázek 23. – Pseudobarevný gradientní obraz	22
Obrázek 24. – Histogram analyzovaného	22
Obrázek 25. – Úsečka v analyzovaném obraze a její graf.....	23
Obrázek 26. – Analyzovaný obraz s definovaným ROI profilem a jeho graf.....	23

Obrázek 27. – Analyzovaný barevný obraz.....	23
Obrázek 28. – Histogramy barevného obrazu	24

Seznam symbolů

$a[m,n]$	vstupní obraz
$b[m,n]$	výstupní obraz
$f(x,y)$	vstupní obrazová funkce
$g(x,y)$	výstupní obrazová funkce
k	konstanta převodní charakteristiky obrazu
y,x	souřadnice pixelu
q	hodnota jasu
K	relativní kontrast
L_{max}	minimální kontrast v obraze
L_{min}	maximální kontrast v obraze
X,B	množiny
x,b	pixely z množin X,B
p	součet pixelů
ε^2	Euklidovská vzdálenost