



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

PŘEDZPRACOVÁNÍ OBRAZU 1D GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

PREPROCESSING OF 1D GEL ELECTROPHORESIS IMAGE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VERONIKA SVOZILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN VÍTEK, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Veronika Svozilová

ID: 136490

Ročník: 3

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Předzpracování obrazu 1D gelové elektroforézy

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Nastudujte a popište princip 1D gelové elektroforézy. Zaměřte se především na typy rušení a zkreslení, které mohou snížit kvalitu výsledného obrazu. Dále nastudujte a popište známé principy detekce jednotlivých vzorků v obrazu s ohledem na jejich výhody a nevýhody. 2) Realizujte vlastní metodu detekce vzorků vycházející z jednoduché horizontální segmentace obrazu gelové elektroforézy. Navrženou metodu otestujte na veřejně dostupných obrazech. Dosažené výsledky diskutujte. 3) Navrhněte algoritmus pro detekci hranic vzorků gelové elektroforézy, který se bude schopen vypořádat s běžnými typy rušení a zkreslení obrazu gelové elektroforézy. Navržený algoritmus realizujte v prostředí Matlab a otestujte na veřejně dostupných datech. 4) Veškeré dosažené výsledky diskutujte a srovnajte s výsledky dosaženými jinými autory.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] WONG, R. T. F., FLIBOTTE, S., CORBETT, R. et al. LaneRuler: Automated Lane Tracking for DNA Electrophoresis Gel Images. IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, Vol. 7, No. 3, pp. 706-708, 2010.

[2] PARK, S. C., NA, I. S., HAN, T. H. et al. Lane detection and tracking in PCR gel electrophoresis images. Computers and Electronics in Agriculture, Vol. 83, pp. 85-91, April 2012. ISSN 0168-1699.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Martin Vítek, Ph.D.

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

Cílem této bakalářské práce je navržení algoritmu v prostředí MATLAB, který by umožňoval zpracování a vyhodnocení obrazu z 1D gelové elektroforézy. Jako první je popsána detekce vzorků vycházející z horizontální segmentace obrazu gelové elektroforézy, následuje detekce minimálních hodnot intenzity obrazu, dále vertikální segmentace a stanovení hranic vzorku v obraze. Závěrečná fáze zahrnuje testování metody na veřejně dostupných obrazech a zhodnocení výsledků.

Klíčová slova

Elektroforéza, smilling efekt, gama korekce, ekvalizace histogramu; horizontální segmentace, směrodatná odchylka, vertikální segmentace.

Abstrakt

The aim of this work is to propose an algorithm in MATLAB, allowing image processing and evaluation of one-dimensional gel electrophoresis. At first describes the detection of samples based on the horizontal segmentation of electrophoresis gel image, followed by detection of the minimum intensity values of the image, a vertical segmentation and determination of the sample boundaries in the image. The final phase involves testing of the method on publicly available images and evaluation of the results.

Key words

Electrophoresis, smilling effect, gamma correction, histogram equalization, horizontal segmentation, standard deviation, vertical segmentation.

SVOZILOVÁ, V. *Předzpracování obrazu 1D gelové elektroforézy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Vítek, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Předzpracování obrazu 1D gelové elektroforézy 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 tohoto projektu 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 části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne 29. května 2013

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Vítkovi, PhD. za pomoc a vynaložené úsilí a snahu při konzultacích. Díky jeho pozitivnímu a spravedlivému přístupu jsem se snažila vytvořit bakalářskou práci dle nejlepšího vědomí a svědomí.

V Brně dne 29. května 2013

.....

podpis autora

OBSAH:

ÚVOD	9
1. ELEKTROFORÉZA	10
1.1. PRINCIP ELEKTROFORÉZY	10
<i>Volná elektroforéza</i>	10
<i>Elektroforéza na nosičích</i>	10
<i>Kapilární elektroforéza</i>	11
<i>Afinitní elektroforéza</i>	11
2. 1D GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	12
2.1. POŘÍZENÍ A ZPRACOVÁNÍ OBRAZU	13
2.2. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ELEKTROFORÉZY	13
3. TYPY ZKRESLENÍ OBRAZU	14
3.1. SMILING EFEKT	14
3.2. NEHOMOGENITA OSVĚTLENÍ	15
3.3. ZKRESLENÍ HRAN	15
4. ZNÁMÉ PRINCIPY DETEKCE HRANIC VZORKŮ V OBRAZE	16
4.1. ITERAČNÍ ALGORITMUS PRO SEGMENTACI LAN V OBRAZE	16
<i>Předzpracování</i>	17
<i>Zpracování obrazu, filtrace</i>	18
<i>Iterace</i>	19
<i>Souhrn metody</i>	20
4.2. DETEKCE LAN A STOPOVÁNÍ V OBRAZE PCR ELEKTROFORÉZY	20
<i>Stanovení šířky lan</i>	21
<i>Lokální obrazový processing</i>	21
<i>Souhrn metody</i>	24
5. REALIZACE VLASTNÍ METODY	24
5.1. PŘEDZPRACOVÁNÍ OBRAZU	25
<i>Gama korekce</i>	25
<i>Ekvalizace histogramu</i>	27
5.2. VLASTNÍ METODA DETEKCE	28
<i>Horizontální segmentace obrazu</i>	29
<i>Detektor minimálních hodnot</i>	31
<i>Vertikální segmentace obrazu</i>	32
<i>Detekce hranic vzorků v obraze</i>	34
6. VÝSLEDKY VLASTNÍ METODY DETEKCE HRANIC VZORKŮ	38
6.1. VYHODNOCENÍ VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ	38
6.2. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VLASTNÍ METODY DETEKCE S VEŘEJNĚ ZNÁMÝMI METODAMI	45
ZÁVĚR	46
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Plošné uspořádání gelu [4].	11
Obrázek 2: Schéma elektroforetické aparatury (agarosní gel) [19].	12
Obrázek 3 Elektroforetický aparát [21].	13
Obrázek 4: Výstupní obraz elektroforézy [16].	14
Obrázek 5: Ukázka smiling efektu [11].	15
Obrázek 6: Model skokové hrany a) a reálný model hrany b)[1].	16
Obrázek 7 Ukázka zkreslení hran v obraze [5].	16
Obrázek 8 Původní elektroforetický obraz [12].	17
Obrázek 9 Výsledek obrazu po filtraci minimum filtrem a maskou s rozměry 3x7 [12].	18
Obrázek 10 Výsledek detekce lokálních maxim (původní obraz byl filtrován průměrovacím filtrem.) [12].	19
Obrázek 11 Výsledný obraz iteračního algoritmu (v původním obraze zastoupen mírně smiling efekt) [12].	19
Obrázek 12: Obrázek elektroforézy a) a jeho vertikální projekce na ose x b) [14].	21
Obrázek 13 Vstupní obraz (a), horizontální projekční profil osy y (b) - osa y prezentuje řádky v původním obraze, osa x prezentuje intenzitu pixelů [14].	22
Obrázek 14 Vertikální projekční profily nasegmentovaných částí obrazu (3D) [14].	22
Obrázek 15 Výsledek metody stopování center lan a jejich následné detekce [14].	24
Obrázek 16 Obecné schéma programu.	25
Obrázek 17 Blokové schéma části předzpracování obrazu.	25
Obrázek 18 Blokové schéma gama korekce.	26
Obrázek 19 Přexponovaný (gama = 0.65) a podexponovaný obraz (gama = 1.65) s příslušnými transformačními funkcemi [13] [7].	26
Obrázek 20 Blokové schéma ekvalizace.	27
Obrázek 21 Ukázka obrazu s nehomogéním zastoupením intenzit v obraze (osa x – intenzita , y – četnost dané intezity) [13].	27
Obrázek 22 Ukázka rozdílu vstupního obrazu před ekvalizací a po ekvalizaci histogramu [13].	28
Obrázek 23 Blokové schéma horizontální segmentace.	29
Obrázek 24 Ukázka prvních tří segmentů obrazu a vektorů jejich směrodatných odchylek.	30
Obrázek 25 Původní obraz po gama korekci.	31
Obrázek 26 Blokové schéma detektoru.	31
Obrázek 27 Nadetekovaná minima prvních tří horizontálních úseků.	32
Obrázek 28 Blokové schéma vertikální segmentace.	33
Obrázek 29 Vertikální rozdělení obrazu.	34
Obrázek 30 Blokové schéma detekce hranic vzorků.	35
Obrázek 31 Zobrazení prostřední části lany.	35
Obrázek 32 Nadetekované hranice lan.	36
Obrázek 33 Původní hodnoty intenzit jedné lany (a), mediánové hodnoty jedné lany (b).	37
Obrázek 34 Výsledný obraz po mediánové filtraci i s detekovanými hranicemi lan.	38
Obrázek 35 Detekce hranic lan (gama = 1.65) [13].	39
Obrázek 36 Ekvalizace histogramu - ztráta signálu v určitých úsecích [13].	40
Obrázek 37 Obraz elektroforézy (gama = 1.9) - kompromis v prahování [16].	41
Obrázek 38 Smiling efekt v elfo obraze [18].	41

Obrázek 39 Ukázka ekvalizace histogramu - značné ztráty signálu [18].	42
Obrázek 40 Obraz elektroforézy - vynechání poslední mezery.	42
Obrázek 41 Elektroforetický obraz - vynechaná poslední lana [10].	43
Obrázek 42 Zkreslený obraz s nadetekovanými hranicemi [16].	44
Obrázek 43 Výsledný obraz detekce hran u asymetrických lan [22].	44
Obrázek 44 Výsledek dosažený metodou DTW [17].	45

Úvod

Elektroforéza je jednou z význačných separačních metod, která využívá rozdílné pohyblivosti částic v elektrickém poli. Využití této metody je velmi široké. Jedním z nejefektivnějších typů elektroforézy je elektroforéza proteinů. K separaci molekul se využívá rozdílných nábojů makromolekul bílkovin, což je zásadní zejména pro sekvenování DNA.

Předmětem této bakalářské práce není samotný proces této metody, ale zpracování jejího výstupu, tj. elektroforetického obrazu. Tento obraz se skládá ze dvou hlavních struktur, tj. mezer (světlé) a lan (tmavé) – pokud se nejedná o negativ, a je určený k vyhodnocení výsledků elektroforézy. Lany (tmavé proužky) reprezentují dráhu makromolekul migrujících v elektrickém poli a jsou tedy nejdůležitější složkou obrazové informace, kterou je třeba zpracovat. Vhodným zpracováním tohoto obrazu lze určit strukturu bílkovin.

Jako v každém obrazu, i v elektroforetickém, může být přítomno zkreslení, které by ztěžovalo zpracování a následné určení struktury dané bílkoviny. Hlavní cíl této práce je předzpracování obrazu, pokud je přítomno zkreslení, tak, aby se zvýšila kvalita obrazu a usnadnila se následná detekce hranic samotných lan.

Předzpracování elektroforetických obrazů je založeno na užití dvou metod, tj. gama korekce a ekvalizace histogramu, které by měly dostatečně zlepšit kvalitu obrazu. Pokud nebude v obraze přítomno žádné závažné zkreslení, není nutné těchto metod využít.

Samotná detekce lan v elektroforetickém obraze má svá specifika a není ještě zcela vyřešena. Hlavním problémem je nedostatek obrazové informace, tj. intenzity pixelů, ve světlých (nebo zcela bílých) částech obrazu. Tyto části obrazu reprezentují úseky gelu, kde nedošlo k zastavení žádné makromolekuly proteinu a pro efektivnější zpracování lze těmto místům gama korekcí zvýšit kontrast.

Algoritmus vlastní metody, která se tento problém snaží řešit, je založen na transformaci 2D obrazové informace do 1D signálu a skládá se z několika kroků. Za prvé se jedná o horizontální segmentaci obrazu, dále o stanovení vhodného prahu a následné detekce minimálních hodnot intenzit pixelů v horizontálních úsecích. Poté je na řadě vykreslení těchto minimálních hodnot do původního obrazu, stanovení prostředních částí lan a následné zobrazení hranic lan.

Vlastní metoda detekce lan v obraze je především založena na stanovení vhodného prahu pro minimální hodnoty intenzit. Práh nebude pro všechny testované obrazy stejný, ale bude se u každého obrazu lišit a samotná detekce lan bude tedy pracnější než u jiných známých metod detekce lan v elektroforetickém obraze.

Závěrem pak budou výsledky vlastní metody konfrontovány s výsledky jiných známých metod a popsány výhody a nevýhody vlastní metody, pro které obrazy je vlastní metoda vhodná a pro které méně, přičemž proč tomu tak je.

1. Elektroforéza

Elektroforéza je laboratorní metoda, jejíž využití spočívá v separaci látek pro analytické účely a v preparaci zkoumaných látek.

První elektroforetická aparatura byla sestrojena v roce 1937 Tiseliiem, který popsal metodu *pohyblivého rozhraní* dnes známou jako zónová elektroforéza. Tuto metodu použil k separaci sérových proteinů.

Sama elektroforéza se začala vyvíjet v 50. letech a aplikovat na analýzu aminokyselin a anorganických iontů. Rozvoj různých typů elektroforézy následoval a tyto druhy elektroforézy se začaly kategorizovat podle prostředí, ve kterém byly vykonávány (papír, polymerní gel, kapilára).

1.1. Princip elektroforézy

Elektroforéza je metoda, která pracuje se schopností částic se pohybovat v elektrickém poli. Rychlost částic pohybujících se v poli je dána jejich velikostí a velikostí náboje. Různě velké a různě nabitě částice se pohybují v elektrickém poli jinak, tzn. malá částice s velkým nábojem se pohybuje v elektrickém poli rychleji než velká částice s malým nábojem [4] [3] [21].

V dnešní době existuje mnoho druhů elektroforéz, v této bakalářské práci se zmíním alespoň o několika základních a nejužívanějších.

Volná elektroforéza

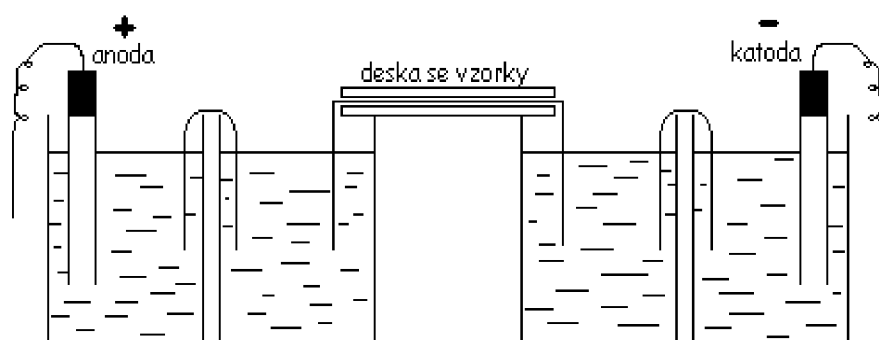
Tento typ elektroforézy je jedním ze základních a provádí se ve vodných roztocích (elektrolytů), kdy nabitá částice putuje k elektrodě, která má opačný náboj, rychlostí, která je úměrná její velikosti a velikosti náboje. Rychlost pohybu dané částice je ovlivněna i gradientem napětí, který používáme. U tohoto elektroforetického typu je zásadní problém v tom, že samotná separace je ovlivněna konvekčními proudy v kapalinách po průchodu elektrického proudu a tepla. Tato metoda se dnes již zřídka používá.

Elektroforéza na nosičích

Tato metoda se též nazývá *zonální elektroforéza* a začala se využívat, aby odstranila nedostatky elektroforézy volné, tedy problémy s konvekčními proudy v kapalinách. Nosiče používané v elektroforetických aparaturách musí mít určité vlastnosti, musí být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a mít co nejmenší možné adsorpční vlastnosti. Dříve se jako nosiče používali chromatografické papíry, acetát celulosy, škrob a celuloza. V současné době se jako nosič používá agarosový gel, škrobový či polyakrylamidový gel.

V současnosti je nejpopulárnější elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, tzv. *PAGE*. Tento typ metody se používá k analýze bílkovin, konkrétně ke stanovení homogenity

preparátu a k parciálnímu stanovení fyzikálně – chemických vlastností bílkovin. Úspěšnost této metody značně závisí na volbě použitého pH, které má vliv na stupeň disociace skupin separovaných látek a na velikost náboje částic. Dalším důležitým faktorem této metody je koncentrace gelu, tedy jeho *zesíťení*, jelikož póry gelu jsou mechanickou překážkou pro migrující částice, musí se koncentrace gelu vhodně zvolit, abychom dosáhly co nejlepších možných výsledků. Uspořádání gelu elektroforézy je dvojího typu. U obou typů se nosič se vzorkem umístí mezi dvě elektrody, kde prochází stejnosměrný proud. U prvního typu se nosič umísťuje vertikálně v trubičkách. U druhého typu je gel nanesen horizontálně na destičkách, též označováno jako *plošné* umístění gelu (Obrázek 1), která má několik výhod. Je citlivější, lze nanést více vzorků a lze jej snadněji pomocí denzitometrů kvantifikovat [4].



Obrázek 1: Plošné uspořádání gelu [4].

Kapilární elektroforéza

Tato metoda užívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek v křemenné kapiláře. Tato metoda je také známa jako *vysokoučinná kapilární elektroforéza*.

Kapilární gelová elektroforéza pracuje s kapilárou, která je naplněna různými typy materiálů vždy podle separované směsi. Separace vzorku závisí na elektroforetické pohybu nabitých částic matricí směrem k elektrodě. Důležitým faktor u této metody je poměr velikosti molekul a náboje. Pokud mají separované částice blízkou molekulovou hmotnost a rozlišitelnost na základě velikosti částic je chabá, můžeme použít organického rozpouštědla do elektrolytu, jelikož toto činidlo ovlivňuje tvar, velikost a náboj částic, takže může měnit schopnost samotné separace [15].

Afinitní elektroforéza

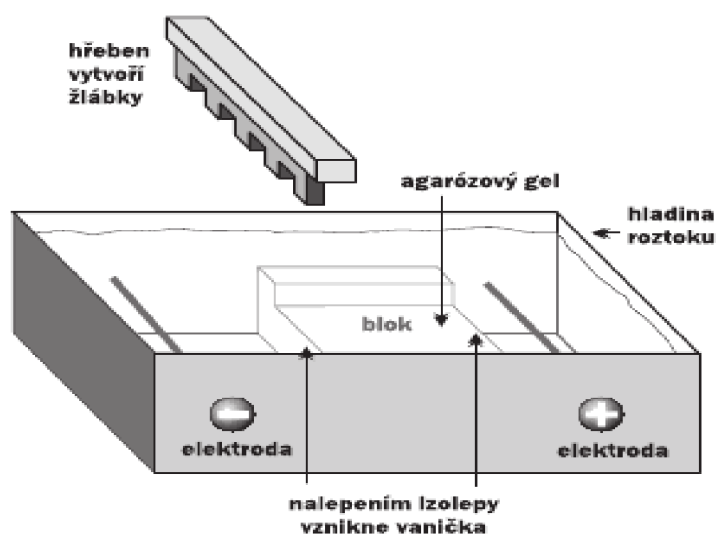
Látky určené k separaci migrují vlivem elektroforetické pohyblivosti gelu, kde je ustálen afinitní ligand, který je specifický alespoň pro jednu složku směsi. Složka směsi, která je pro daný ligand specifická, se na něj naváže a je zpožděna při průchodu gelem, zatímco složky směsi, které nejsou afinitní k danému ligandu putují gelem normální rychlostí. Porovnáním pohyblivosti složek směsi v gelu bez ligandu můžeme určit jaké složky směsi jsou afinitní k ligandu [4].

2. 1D gelová elektroforéza

V tomto oddílu se budu zabývat principem gelové elektroforézy nukleových kyselin. Nukleové kyseliny jsou negativně nabitě molekuly, které se pohybují ve stejnosměrném poli od katody k anodě.

Do formy nalijeme tekutý gel a vložíme hřeben, který v gelu vytvoří žlábký. Po zatuhnutí gelu dostaneme gelový obdélník s jamkami, vyndáme hřeben. Do jamek nanese roztok DNA označený modrou barvou, která má záporný náboj a ukazuje, jestli se záporně nabitě částice pohybují a jak. Musíme dbát na to, aby byl povrch gelu plně pod hladinou roztoku ve vaničce (Obrázek 2). Po nanesení vzorku na elektrody (platinové) přivedeme stejnosměrný proud. V následující fázi dochází k migraci částic, kdy v konečné fázi na gelu dostaneme oddělené molekuly.

V závěrečné části pak gel, který nyní už obsahuje oddělené molekuly, prosvítíme ultrafialovým světlem, nukleová kyselina pak bude oranžově svítit. Samotný výsledky obraz prozářeného gelu je následně zdokumentován digitálním fotoaparátem či CCD kamerou, čímž zajistíme možnost počítačového zpracování a vyhodnocení [20].



Obrázek 2: Schéma elektroforetické aparatury (agarosní gel) [20].

V reálu existuje samozřejmě mnoho podob elektroforetického aparátu, pro představu uvádím jednu z nejběžnějších forem (Obrázek 3).



Obrázek 3 Elektroforetický aparát [22].

2.1. Pořízení a zpracování obrazu

K tomu, aby počítačové zpracování a následně vyhodnocení proběhlo v pořádku, existují určitá pravidla optimalizace, jejichž dodržování usnadní práci a zvýší kvalitu výsledků.

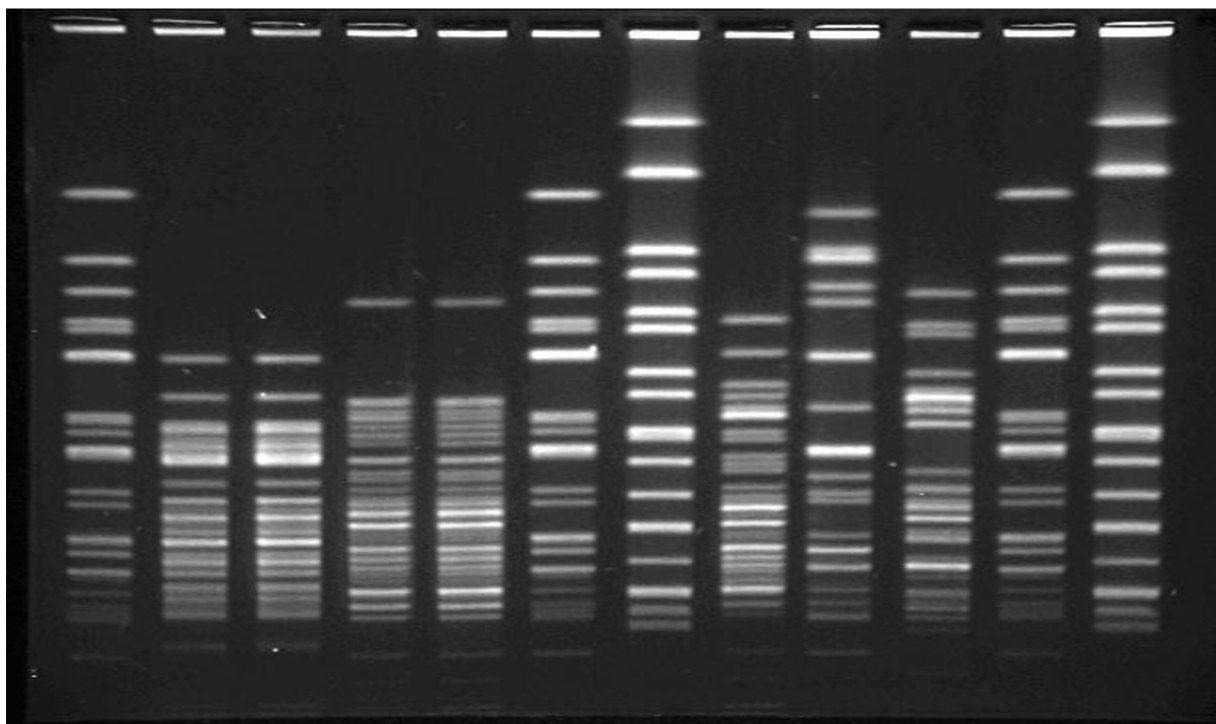
Dráhy pohybu částic v gelu by měly být vertikálně orientovány vzhledem k monitoru, aby se nemusel každý obraz zvlášť natáčet.

Dále bychom měli nastavit intenzitu bandů na menší než je maximálně možná, aby nedošlo k saturaci. Pozadí by mělo mít nenulovou hodnotu intenzity. Pokud je potřeba, obraz ořízneme, abychom opravdu zkoumali jen oblast zájmu.

Obraz poté uložíme. Na výběr máme několik formátů, rozdíl mezi nimi je ten, jestli je daný formát ztrátový (JPEG) nebo bezztrátový (TIFF). Uložení obrazu ve ztrátovém formátu JPEG je výhodná, pokud nám jde o úsporu paměti. Formát bychom tedy měli volit s ohledem na informace v obrazu, které nechceme ztratit .

2.2. Vyhodnocení výsledků elektroforézy

Jako výstup této metody je většinou černobílý obraz (pokud se jedná o obraz barevný, je vždy možnost jej konvertovat do černobílé škály), kde jsou znázorněny dráhy migrujících molekul (Obrázek 4).



Obrázek 4: Výstupní obraz elektroforézy [17].

Horizontální přímky v tomto obraze představují tzv. *bandy*, které jsou naskládány do vertikálních řad, tzv. *lan*. Při počítačovém zpracování nás budou tyto struktury zajímat nejvíce. Je zde vidět jak různé částice putovaly po různě dlouhých drahách. Tato různorodost je spojena s velikostí a tvarem molekuly a velikostí jejího náboje [20].

3. Typy zkreslení obrazu

Při pořizování obrazu může dojít, a většinou také dochází, k porušení linearitě přenosu, čímž vzniká ve výsledném obraze zkreslení. Nejčastějšími příčinami vzniku zkreslení obrazu je vzájemný pohyb snímače a předmětu, nevhodné zaostření, vada optické soustavy či nelinearita záznamového média (zrnitost materiálu).

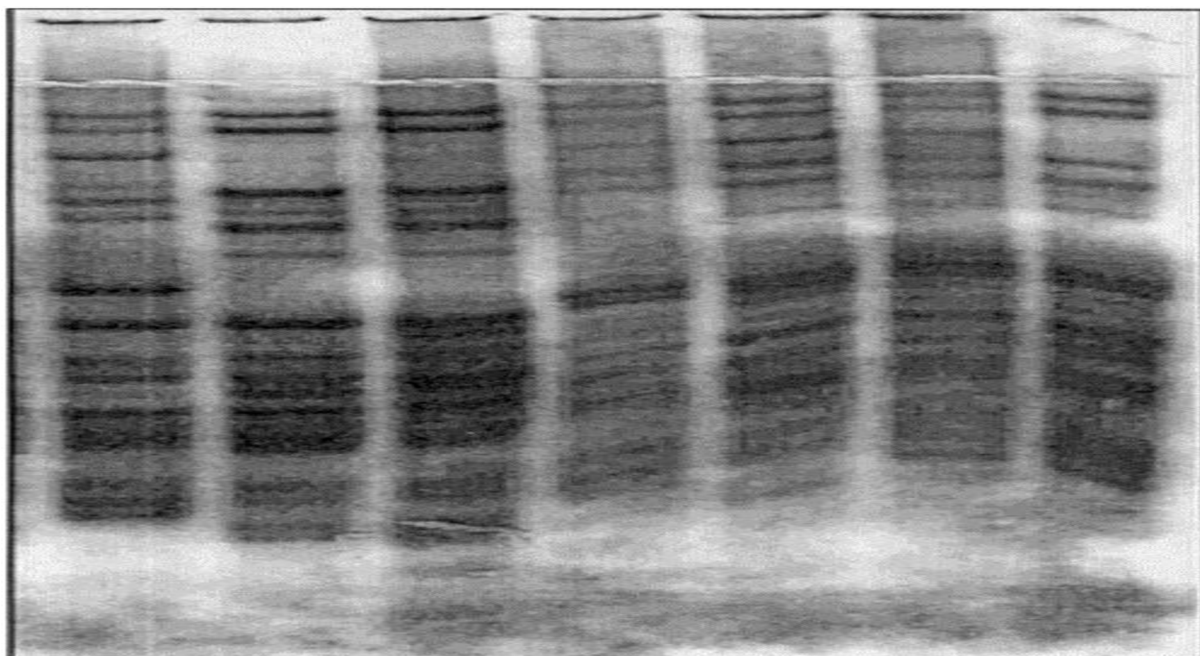
I v elektroforetických obrazech se vyskytuje několik typů zkreslení, které znehodnocují obraz, což ve výsledku znamená horší kvalitu obrazu a jeho počítačové zpracování.

3.1. Smiling efekt

Vzhledem k tomu, že u elektroforetických aparatur pracujeme se stejnosměrným proudem, vzniká v obvodu určité množství tepla, které má souvislost s Jouleho teplem, které je produktem elektrické energie. Vzniklé teplo může způsobit narušení či úplnou destrukci zkoumaných bílkovin. Při špatném odvodu tepla může vnikat tzv. *smiling efekt* (Obrázek 5), který způsobuje nerovnoměrnost okrajů lan elektroforegramu, tedy nežádoucí zakřivení.

Důležitou součástí elektroforetického obvodu je DC měnič, který může měnit velikost stejnosměrného napětí a tedy i množství vyprodukovaného tepla. Odpor v tomto obvodu

nezůstane konstantní. Pokud se při konstantním napětí snižuje proud, odpor se bude dále zvyšovat a s ním i množství vzniklého tepla. Separace látek tak probíhá delší dobu, čímž se zhoršuje rozlišení částic. Kvůli těmto faktům je velmi žádoucí celou elektroforetickou aparaturu chladit a tím tak snížit dobu separace látek a zabránit tak smiling efektu [11].



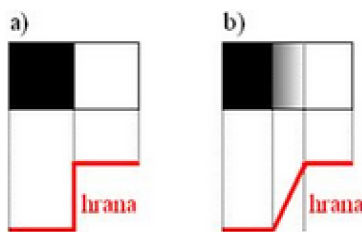
Obrázek 5: Ukázka smiling efektu [11].

3.2. Nehomogenita osvětlení

Nehomogenita osvětlení znamená ztrátu světelnosti snímaného obrazu mimo osu optické soustavy. Tento jev je způsoben především nedokonalostí objektivu a okuláru optické soustavy, tedy fotoaparátu [6].

3.3. Zkreslení hran

V samotném obrazu jsou jedním z nejdůležitějších prvků hrany. Hranou chápeme jako určitý bod v obraze, u kterého se prudce mění hodnota jasu. Změny v rozložení jasu v obraze naznačují fyzické rozmístění zkoumaných objektů. Za ideální model hrany považujeme tzv. *skokovou*, v reálných obrazech je však změna jasu postupná nikoli skoková, tudíž se zde používá tzv. *šikmá funkce* (Obrázek 6).



Obrázek 6: Model skokové hrany a) a reálný model hrany b)[1].

Ke zkrzení hran může dojít tehdy, pokud dojde k rozostření (Obrázek 7). Ostrost určuje rychlost změny jasu, tedy hranový kontrast. Rozostření hran je tedy jedno z nejčastějších zkrzení, které obraz postihuje. Samotná ostrost je dána objektivem fotoaparátu, kvalitou snímacího senzoru a způsobem zpracování obrazu [1] [9].



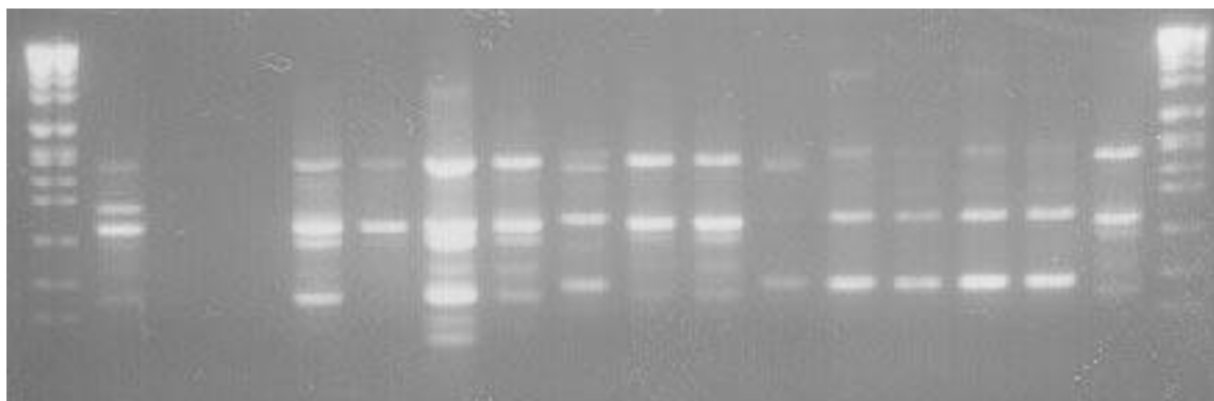
Obrázek 7 Ukázka zkrzení hran v obraze [5].

4. Známé principy detekce hranic vzorků v obraze

Pro předzpracování obrazu 1D elektroforézy existuje několik známých postupů, které mají poměrně dobrou přesnost a jsou i efektivní.

4.1. Iterační algoritmus pro segmentaci lan v obraze

Iterativní filtrovací algoritmy se zaměřují na určení počtu lan (Obrázek 8) a jejich umístění v obraze pomocí analýzy stupňů šedi. Nový iterační filtrační algoritmus je založen na projekci určitého vzorku v obraze. Tento algoritmus je srovnáván se shlukovou metodou filtrace ve smyslu účinnosti a efektivity.



Obrázek 8 Původní elektroforetický obraz [12].

Detekce lan může být brána jako problém seskupováním bandů v obraze gelové elektroforézy. Toto seskupování bandů je založené na umístění podle kartézské soustavy. Hlavní nevýhoda aplikace těchto shlukových algoritmů na tento problém se zdá být v nastavování prahových hodnot ve fázi obrazové segmentace.

Problém detekce lan je spojen s otázkou frekvenční analýzy jako rozmístění lan, které přibližně popisují určitý periodický vzor. Zde už kartézský souřadný systém nejenže nedostačuje, ale dokonce i překáží, takže se jako užitečné zjednodušení jeví postup, kterým přeneseme průměty (z osy y) na osu x . Průmět (projekce) vypovídá o celkovém rozmístění lan.

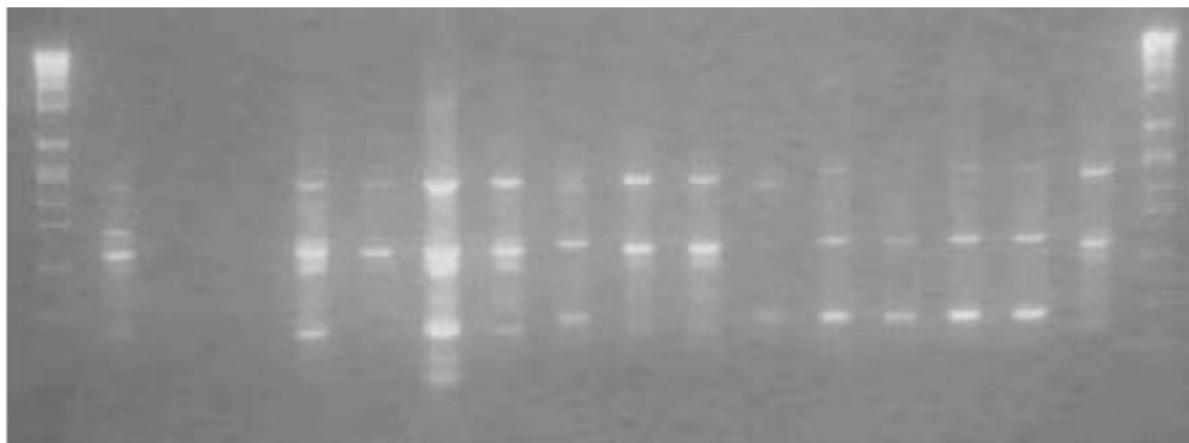
Aplikace frekvenčních filtrů přináší mnohem lepší výsledky než výsledky získané shlukováním (přesnost 85-96%). Avšak tyto výsledky jsou velmi citlivé k povaze obrazu. Základní frekvence spojená s periodicitou lan by mohla být vytlačena (nahrazena) s ohledem na začátek a konec obrazu (fázi) a interpretována jako chybějící lana. Chybějící lany se mohou objevit i uprostřed obrazu jako výsledek absence materiálu. Konečně, orientace lan může být zkreslena i elektrickým polem nebo díky nedbalé akvizici. Proto se v dnešní době uplatňuje metoda průmětu na osu x , jelikož chybějící lany nejsou v tomto případě problém, protože jejich absence je náležitě prezentována v projekci.

Předzpracování

Předtím, než si vybereme projekci, může být obraz filtrován, aby se snížilo rušení vzrůstu separace lan. Filtrování může být provedeno skenováním obrazu a vypočtením hodnoty každého pixelu, která je stanovena jako aritmetický průměr hodnot pixelů okolo. Dimenze prozkoumané oblasti bude ovlivňovat stupeň neostrosti (rozmazanosti), která se u této metody objevuje. Tento způsob filtrace je užitečný ve snížení vlivu vysokofrekvenčního rušení (sůl a pepř), ačkoli to může také snížit rozlišení sousedních lan.

Další hojně užívaný filtr je mediánový filtr. Počítá hodnotu pixelu jako medián dané oblasti obrazu, což snižuje vysokofrekvenční šum bez prudkého snížení separace lan. Hlavní nevýhodou tohoto filtru je jeho cena.

Posledním používaným filtrem je minimum filtr, který vykazuje nejlepší výsledky pro gelovou elektroforézu zachycenou na obraze (Obrázek 9). Jak naznačuje název filtru, jako hodnota pixelu v obraze se určuje nejmenší hodnota pixelů okolo. Tento filtr snižuje vysokofrekvenční šum a zvyšuje rozlišení mezi dvěma lanami. Pokud je však použita maska s velkými rozměry, slabé a úzké bandy mohou z obrazu zmizet [12].



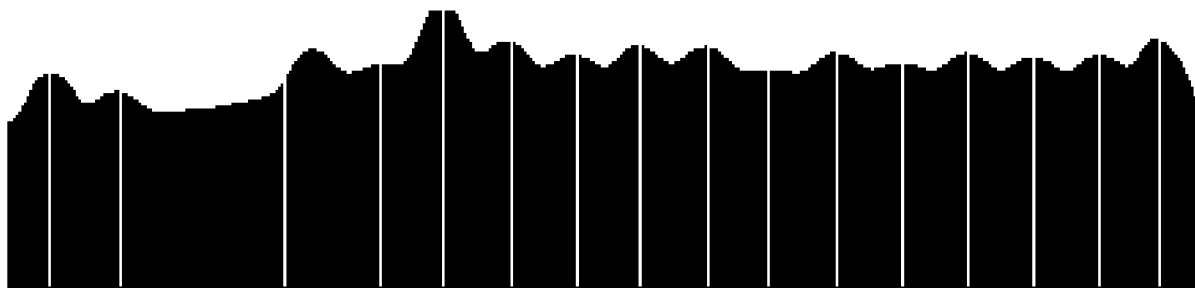
Obrázek 9 Výsledek obrazu po filtraci minimum filtrem a maskou s rozměry 3x7 [12].

Zpracování obrazu, filtrace

Výhoda toho, že obraz popíšeme jako projekci je v tom, že objekt není potřeba segmentovat a navíc není třeba stanovovat žádný práh. Existují dvě metody. První z nich a také používanější je suma všech stupňů šedi z každého sloupce. Výhoda této metody je v tom, že sníží efekt vysokofrekvenčního šumu. Na druhou stranu, lany vytvořené několika slabými bandy nebudou viditelné a tudíž budou vyřazeny ve fázi filtrování. Nízkofrekvenční šum (například velké rozmazané šmouhy) bude na projekci znatelný, jelikož každá hodnota pixelu tohoto šumu se bude podílet na konečné hodnotě pixelu. Tento druh nízkofrekvenčního šumu může být eventuálně mylně považován za lany. Jako alternativa k sumě stupňů šedi projekce je metoda, která naopak bere maximální hodnotu z každého sloupce.

Jelikož je filtrování celého obrazu před tím, než začneme pracovat jen s projekcí, drahé, tak se jako alternativa používá operace, kdy se projekce vypočte nejdřív (nejdřív si vybereme projekci) a teprve pak použijeme filtr. Výsledky jsou tak dobré jako je samotné filtrování obrazu, ale použitím této alternativy se výrazně zkracuje čas procesu. Nevýhodou této alternativy (filtrování pouze dané projekce) je to, že můžeme kombinovat více filtrů a každý tento filtr může pracovat na základě odlišných aspektů daného problému.

Po filtrování projekce obsahuje mnoho lokálních maxim, která mohou poukazovat na přítomnost lan (Obrázek 10). Tato maxima mohou být jednoduše určena druhou derivací funkce. Avšak v závislosti na obraze, není jediné filtrování projekce dostatečné ke správné detekci lan v obraze. Podrobíme tedy tyto lokální maxima iteraci.



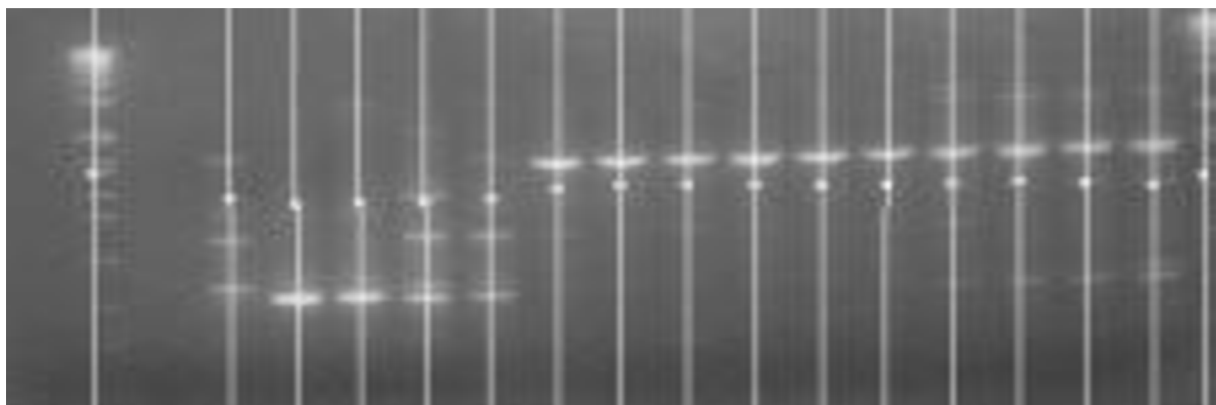
Obrázek 10 Výsledek detekce lokálních maxim (původní obraz byl filtrován průměrovacím filtrem.) [12]

Iterace

Cílem iterace je snížení počtu maxim, která jsou generovaná vysokými frekvencemi, vyhlazením funkce. Je zde ovšem další komplikace a to ta, že se zde předpokládá, že hřeben, který se používal k aplikování materiálu do agarového média, má stejné vzdálenosti kompartmentů - tedy vzdálenosti jednotlivých částí hřebenu by měly být stejné, ale skutečnost je trochu jiná. Pokud nějaká lana neobsahuje žádný materiál, šířka prázdného prostoru mezi dvěma lanami v obrázku bude dvakrát tak velká. Tento celkový poměr mezi vzdálenostmi a medián musí mít nějakou toleranci (Obrázek 11).

Výběr filtru (který použijeme hned po vyhlazení funkce) si zaslouží velkou pozornost. Průměrovací filtr je dobrá volba, pokud projekce poskytuje dobrou rozlišení lan, což může být zajištěno předzpracováním minimum filtrem. Minimum filtr může být v tomto iterativním procesu také použit, ale riskujeme tím zvýšenou ztrátu slabých lan. Poté, co je projekce dobře vymezena, proces rychle vede ke konvergenci, což je optimální výsledek. Výběr hodnoty šířky masky filtru je také důležitý. Na jedné straně, pokud je maska moc široká, jednotlivé iterace mohou eliminovat slabé lany. Na druhou stranu, úzká maska nemusí být schopná snížit šum, který pak můžeme mylně považovat za lany.

Dosud jsme se zabývali správným detekováním lan. Avšak někdy správná pozice se přesně neshoduje s příslušným maximem detekovaným ve filtraci. Je to díky filtrovacímu efektu nebo vzhledu gelu, který může obsahovat různé koncentrace materiálu, což vede ke vzniku projekce, která není symetrická s ohledem na svá centra (centra lan) [12].



Obrázek 11 Výsledný obraz iteračního algoritmu (v původním obraze zastoupen mírně smiling efekt) [12].

Souhrn metody

Tato metoda prezentovala problém detekce lan v obrazu gelové elektroforézy, která je založena na prostorové filtraci. Shlukování by bylo nejpřirozenější, co se týče postupu pro seskupování bandů v každé laně, ale to s sebou nese problém segmentace. Alternativní metoda k vyřešení problému se zabývá faktem, že gelová elektroforéza je charakterizována periodickým vzorem (schématem). Cílem frekvenčního filtrování je určení základní frekvence, která je spojena s rozmístěním lan. Výsledky, které obdržíme díky metodě frekvenční filtrace, jsou kvalitnější než ty, které dostaneme pomocí shlukování, ale jsou velmi citlivé na povahu obrazu.

Obrazové filtry jsou široce používány pro obrazový processing díky jednoduché realizaci těchto algoritmů. Hlavní výzvou tohoto přístupu je určení kombinace filtrů, které jsou efektivní pro řešení problémů v nejvíce možných případech. Hrubý obraz (surový) byl předzpracován průměrovacím, mediánovým a minimum filtrem. Projekce byly brány na základě sum a vypočtu maxima v každém sloupci a zpracovány mediánovým a minimum filtrem. Iterativní algoritmus navržený pro filtrování ve frekvenční oblasti byl přizpůsoben pro filtraci v obrazové oblasti s uspokojivými výsledky. Jako nejlepší kompromis se ukázalo být použití surového obrazu, projekce založené na sumování, předzpracování minimum filtrem a použitím průměrovacího iterativního filtru (96% detekovaných lan).

4.2. Detekce lan a stopování v obrazu PCR elektroforézy

Ačkoli výsledky výzkumu sledování center a detekce lan, který užívá profil projekce, bylo již dříve uveřejněno, díky zakřivením lan tato problematika nebyla dosud dokončena. K vyřešení tohoto problému se v této metodě užívá stanovení průměrné šířky lan užitím k-mean shlukovacího algoritmu a následujícího lokálního obrazového processingu.

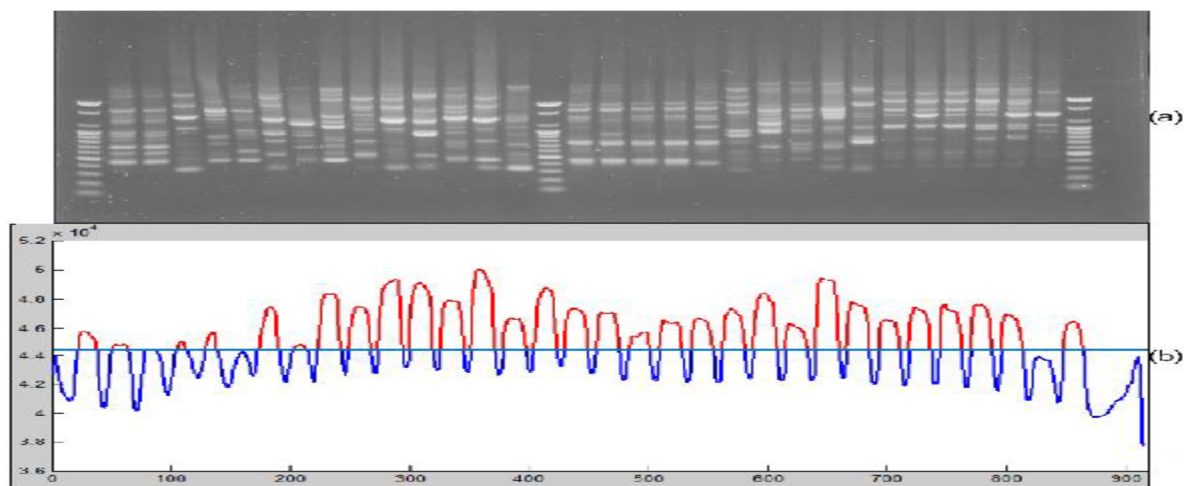
V lokálním obrazovém processingu se oddělil přepážkou vstupní obraz do malých obrazů a našla se lokální maxima (potencionální centra lan) na vertikální projekci každého rozděleného obrazu. Poté byly lany vyrovnány spojením lokálních maxim.

Nejdříve se vypočte vertikální projekční profil v celém obrazu a stanoví se průměrná šířka lan použitím k-mean shlukové analýzy. Stanovená šířka lan se používá jako hodnotná informace pro další analýzu. Průměrná šířka lan se tedy stanovuje užitím k-mean algoritmu, který je založený na vertikálním projekčním profilu analýzy v celém vstupním obraze.

Následně je celý obraz rozdělen do malých dílků pro lokální obrazový processing ke stopování center a detekci rozkouskovaných lan. Před vykonáním každé fáze je aplikován vysokorychlostní nelineární adaptivní filtr, aby se vyčistil obraz od šumu, který je generován během PCR gelové elektroforézy a obrazové akvizici [14].

Stanovení šířky lan

Vertikální projekční profil na x-ové ose je generován ke stanovení průměrné šířky lan a vyjadřuje transformaci informací z 2D do rozměru 1D, zatímco se hromadí intenzity všech pixelů ve všech sloupcích obrazu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Obrázek elektroforézy a) a jeho vertikální projekce na ose x b) [14].

V našem případě mohou být hodnoty vertikální projekce kategorizovány do dvou částí. Například hodnota projekce vypočtená podél lany je vyšší než hodnota vypočtená podél mezery mezi dvěma lany, protože lany jsou tvořeny řídce umístěnými horizontálními bandy, které jsou relativně jasnější než pozadí. Proto využíváme k-mean shlukovací algoritmus s hodnotou $k = 2$.

Po užití k-mean algoritmu jsou hodnoty projekčních profilů seskupeny buď do lan nebo do mezer mezi dvěma lany. Každý pík kopečků ve vyšší části separační linie je generován k-mean algoritmem a může být určen jako předpokládané centrum lany. Tudíž, vzdálenost mezi začátkem a koncem hrotu je pokládána za šířku lany. Celkově tedy pokládáme průměrnou vzdálenost všech lan detekovaných pomocí k-mean algoritmu za průměrnou šířku lany.

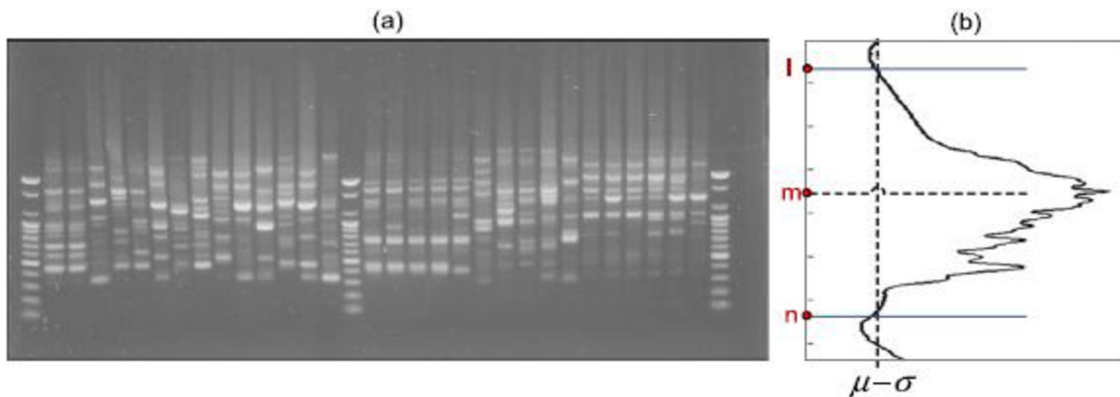
Lokální obrazový processing

Pokud je jednou průměrná šířka lan vypočtena, následuje lokální obrazový processing, který se skládá z několika kroků. Zaprvé, oblast, kde jsou koncentrovány bandy vstupního obrazu, je rozdělena do malých dílků na bázi horizontální projekce. Před provedením tohoto kroku by schéma mělo získat oblast, kde jsou koncentrovány bandy, pomocí horizontální projekce.

Zadruhé, algoritmus vyhledává lokální maxima na vertikální projekci, která je vypočtena na každém rozkouskovaném obrazu s využitím druhé derivace. Poté jsou falešná lokální maxima odstraněna díky stopovacím gradientu vertikální projekce. Nakonec algoritmus shromáždí každou lanu pomocí spojování pravých lokálních maxim, která jsou umístěna ve stejných vertikálních pozicích.

Rozkouskování vstupního obrazu:

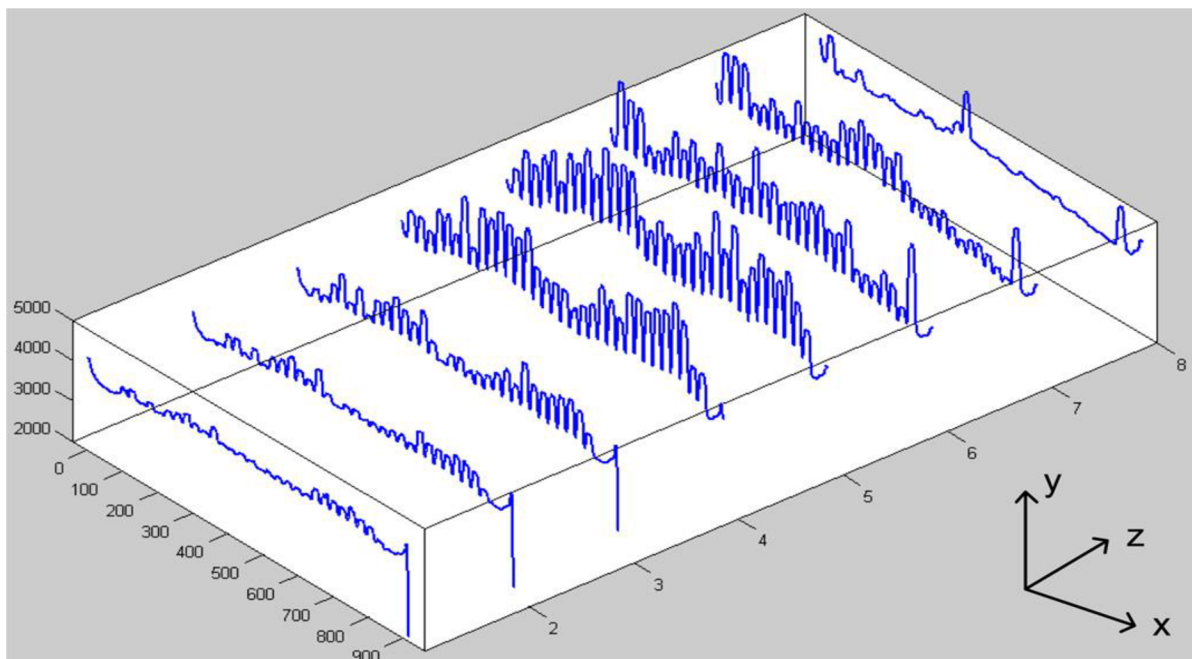
Tento krok je složen ze čtyř podkroků. Za prvé, algoritmus vypočte horizontální projekci na ose y v celém vstupním obraze. Za druhé je spočten průměr a standardní odchylka. Za třetí schéma vyhledává tzv. zásobník s globálním maximem profilu. Potom algoritmus prohledává profil kvůli špičkám (hrotům), jejichž profilová hodnota je nižší než hodnota rozdílu průměru a odchylky (Obrázek 13).



Obrázek 13 Vstupní obraz (a), horizontální projekční profil osy y (b) - osa y prezentuje řádky v původním obraze, osa x prezentuje intenzitu pixelů [14].

Lokální maxima na vertikální projekci každého rozkouskovaného dílku:

V této fázi algoritmus stopuje centra lan v každém dílu. Ke stopování center lan se vypočte vertikální projekční profil v každém dílčím obraze (Obrázek 14), a poté pomocí druhé derivace projekčního profilu najdeme lokální maxima.



Obrázek 14 Vertikální projekční profily nasegmentovaných částí obrazu (3D) [14].

Test druhé derivace je často užitečné kritérium k určení, zda daný pevný bod funkce je lokální maximum nebo lokální minimum (jako stacionární bod užíjeme hodnotu druhé derivace). V našem případě, je vertikální projekční profil označen za funkci $f(x)$. Pokud má funkce kritický bod, kde se první derivace rovná nule a druhá derivace je negativní, pak má tato funkce $f(x)$ lokální maximum v tomto bodě.

Pozor, někdy je možné, že se lokální maxima objeví několikrát na jedné laně díky obrazovému šumu, který je generován během elektroforézy, a/nebo díky akvizici. Tudiž použijeme pohyblivý průměrovací filtr k vyhlazení profilu s tím, že nám zůstane jen jedno maximum na lanu. Pohyblivý průměrovací filtr je konvoluční operátor sloužící k tvorbě průměrné hodnoty pixelů na výstupu.

Pixel odpovídající centru okna je zaktualizován průměrem. V našich experimentech byla velikost okna nastavena na odhadovanou průměrnou šířku lany. Tento proces byl pak proveden ve všech dílčích obrazech.

Odstranění falešně pozitivních lokálních maxim na pozadí:

Detekovaná lokální maxima, která dostaneme použitím druhé derivace, mohou být též nalezena v údolí na vertikálním projekčním profilu, které prezentuje mezery mezi dvěma lanami v PCR obraze. Tato detekovaná maxima jsou pro nás falešně pozitivní maxima. Tato falešně pozitivní maxima musíme odstranit užitím změn sklonu ve vertikálním projekčním profilu, který už je vyhlazený.

Obecně je pravé lokální maximum lokalizováno na vršku kopce tak, aby se sklon tečny v projekci změnil na lokální maximum s negativní hodnotou. Nejdříve musíme spočítat pozitivní sklony tečen (gradient) v projekci v C_1 jako v počátečním bodu lany k lokálnímu maximumu a také spočítat negativní sklon C_r od lokálního minima do konečného bodu lany. Stacionární bod a koncový bod jsou ve vzdálenosti půlky průměrné šířky lany od lokálního maxima jak na levou tak i na pravou stranu. Potom je falešně pozitivní lokální maximum odstraněno, když platí:

$$C_1 \cdot \alpha < \frac{W}{2} \tag{1}$$

nebo pokud platí:

$$C_r \cdot \alpha < \frac{W}{2} \tag{2}$$

kde je α experimentálně vybraná konstanta a W je průměrná šířka lan.

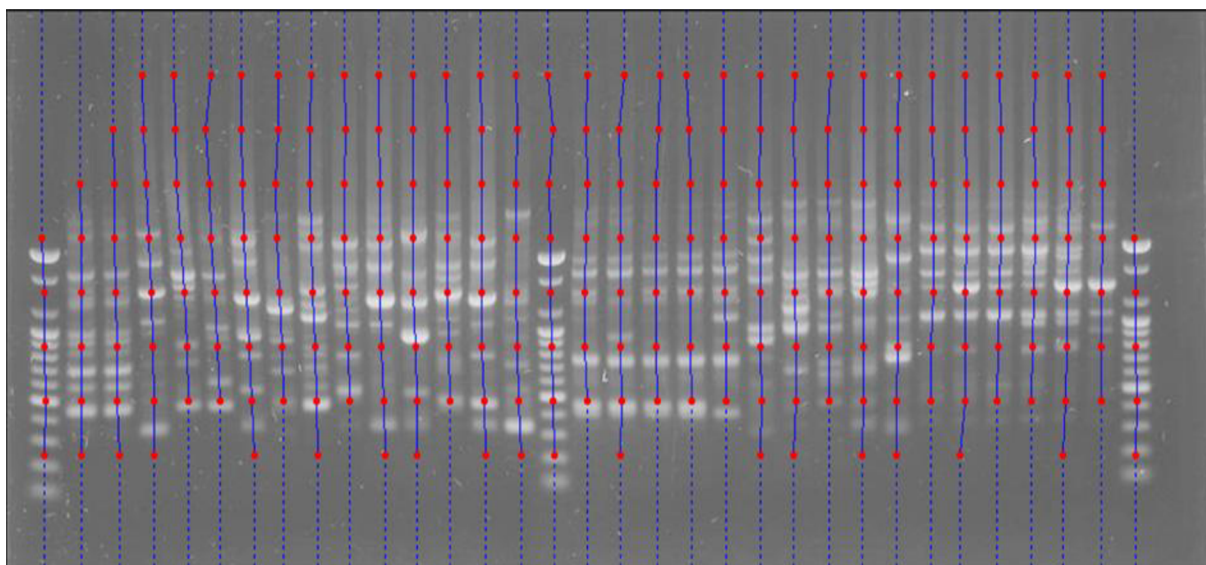
Skladba lan, která vznikla spojením lokálních maxim:

Ke spojení lokálních maxim podél lany algoritmus nejdříve vybírá rozkouskovaný obraz, kde jsou koncentrovány bandy, jako základní obraz. Zkoumáním každého rozkouskovaného

obrazu ze základního obrazu směrem nahoru až k poslednímu ve vyšším směru schéma určuje, jestli jsou dvě odpovídající lokální maxima v sousedních dvou rozkouskovaných obrazech lokalizovaná na stejné laně. Kritérium k tomuto určení je ověření si, jestli jsou dvě lokální maxima v rozsahu (horizontální okno), který koordinuje osa x vstupního obrazu.

Pokud nezbyvá více rozkouskovaných obrazů k prozkoumání ve vyšších etážích, algoritmus se vrátí k základnímu obrazu, kde prozkoumá obrázky pod základním obrazem v nižších etážích, aby sesbíral lokální maxima. Po těchto procesech, které jsou aplikovány i na další lany, je každé lokální maximum spojeno a bude patřit jedné z lan.

Detekované lany, které vzniknou spojením lokálních maxim (Obrázek 15), zahrnují jak falešná tak pravá lokální maxima, takže pomocí algoritmu bychom se měli zbavit těch falešných. Typický příklad falešné lany je krátká lana s malým počtem lokálních maxim špatně detekovaných na místě mezery mezi dvěma lanami. Proto algoritmus automaticky maže falešné lany, které se skládají z dvou či méně lokálních maxim [14].



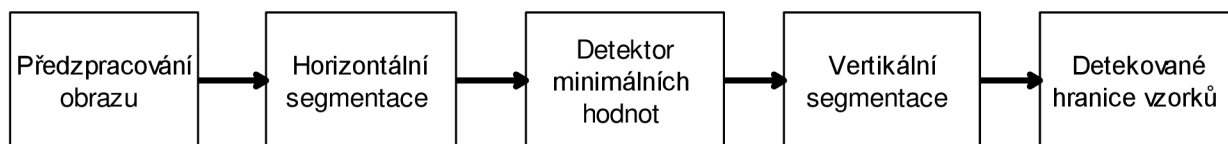
Obrázek 15 Výsledek metody stopování center lan a jejich následné detekce [14].

Souhrn metody

Výsledky experimentů ukazují, že navržené schéma je schopno sledovat (stopovat) centra a detekovat lany bez lidského zásahu a může tedy být užít jako automatizovaný nástroj na pomoc výzkumníkům analyzovat PCR gelového obrazu elektroforézy.

5. Realizace vlastní metody

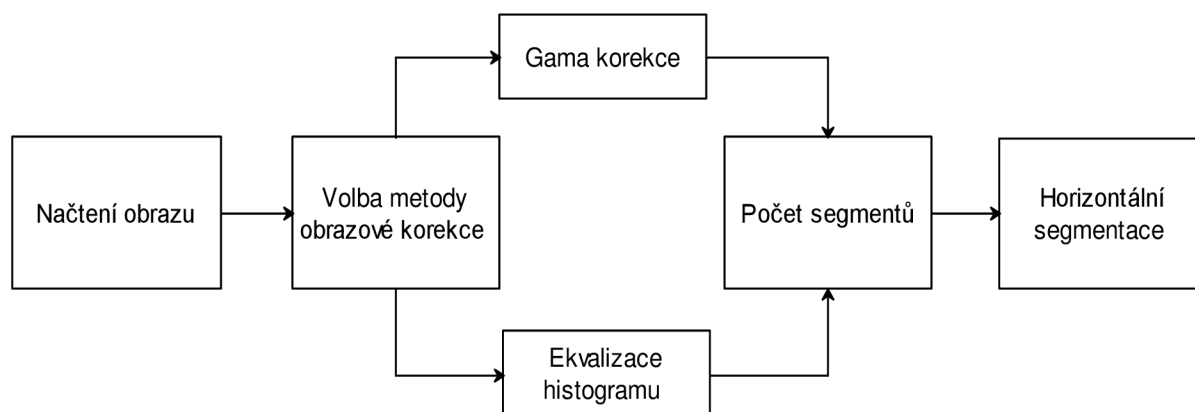
Realizace vlastní metody byla provedena v prostředí programu Matlab a program byl otestován na několika obrazech gelové elektroforézy včetně obrazů se zkreslením (smiling efekt). Obecné schéma programu:



Obrázek 16 Obecné schéma programu.

5.1. Předzpracování obrazu

Dříve než se přikročí k samotné detekci lan obrazu, je potřeba provést předzpracování daného obrazu, abychom se vyrovnali s běžným rušením, např. smiling efekt, pokud je v obraze přítomno (schéma Obrázek 17).



Obrázek 17 Blokové schéma části předzpracování obrazu.

Do prostředí programu MATLAB se obraz vkládá jako trojrozměrná matice, kterou bude třeba převést do 2D, tedy do šedotónové stupnice, takže každá hodnota pixelu obrazu bude v intervalu od 0 do 1 (pixel s větší hodnotou intenzity bude blíže k 1 a pixel s malou hodnotou intenzity pak bude blíže k 0). Tuto obrazovou matici, tedy matici s hodnotami intenzity pro každý pixel obrazu, budeme v tomto kroku upravovat tak, abychom obraz zbavili případného zkreslení a detekce samotných vzorků byla provedena co nejpřesněji.

Gama korekce

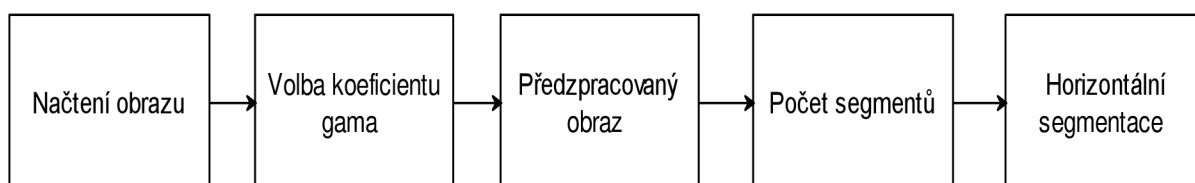
Tato metoda korekce je užitečná, pokud se v obraze projeví nehomogenita osvětlení. Gama korekce je prezentována číslem, tj. *gama*, které nám udává vztah mezi hodnotami signálu na vstupu a výstupu optické soustavy. Pokud je výstup gama korekce roven jedné, tak se systém chová lineárně (intenzita vstupního signálu je rovna intenzitě výstupního). Digitální fotoaparáty mají gamu nižší kvůli tomu, že jsou určeny pro zobrazení na monitoru, kde je gama naopak vyšší.

Abychom mohli obrazy objektivně hodnotit musí tedy proběhnout gama korekce, což znamená snížení intenzity výstupního signálu podle vztahu:

$$I' = 255 \cdot \left(\left(\frac{Y_0 - Y}{k} \right)^{\frac{1}{\gamma}} \right) \quad (3)$$

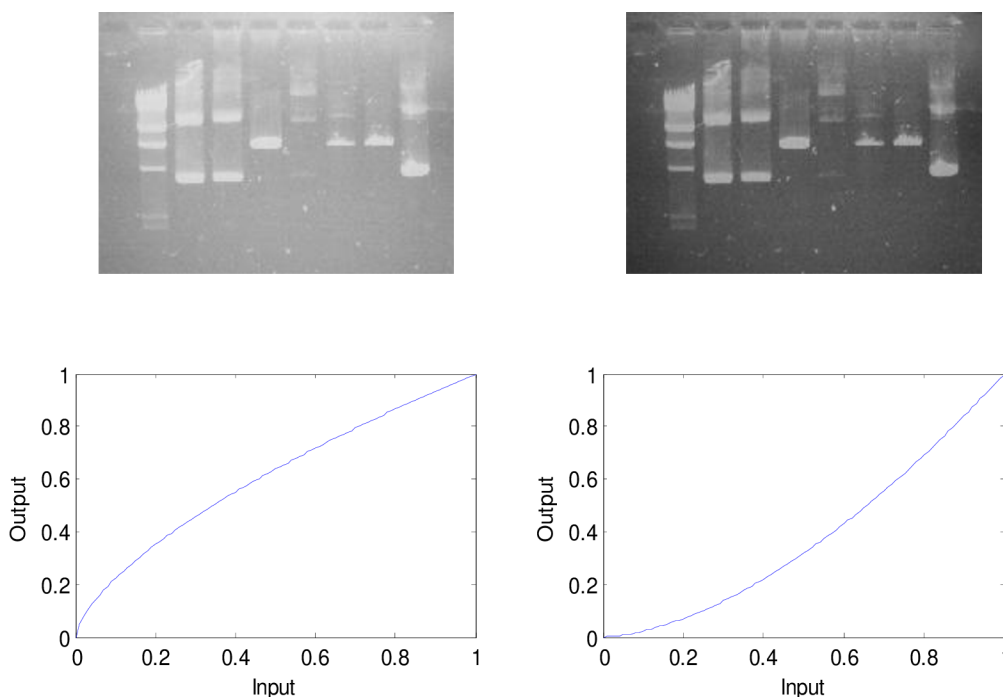
kde Y_0 je nenulový výstupní signál při nulové vstupní intenzitě osvětlení, Y je intenzita výstupního signálu, k je normalizační konstanta, exponent γ je gama hodnota [24][8].

Princip této korekce je naznačen na Obrázek 18.



Obrázek 18 Blokové schéma gama korekce.

U každého ze zpracovaných obrazů, u kterého se projeví nehomogenita osvětlení, lze nastavit parametr gama tak, aby to vyhovovalo požadavku na zlepšení kvality obrazu. Jako optimální se jeví hodnota gamy 0,65. Pokud zvolíme gamu menší než 1, obraz přeeexponujeme a obraz se bude jevit světlejší, naopak u hodnot nad 1 obraz podexponujeme a daný obraz se bude jevit tmavší (ukázka Obrázek 19).

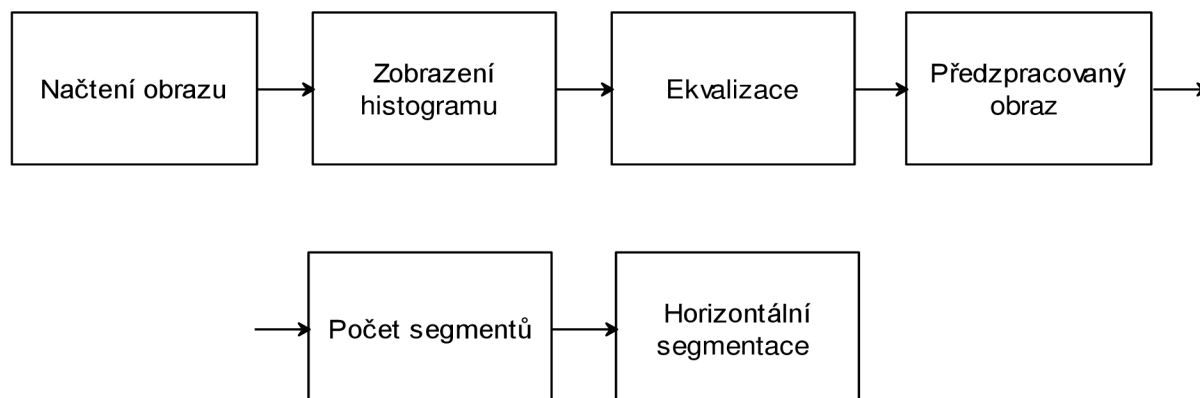


Obrázek 19 Přeeexponovaný (gama = 0.65) a podexponovaný obraz (gama = 1.65) s příslušnými transformačními funkcemi [13] [7].

Pokud se v obraze, který je určený pro zpracování, nehomogenita neobjevuje, není třeba této korekce použít [7].

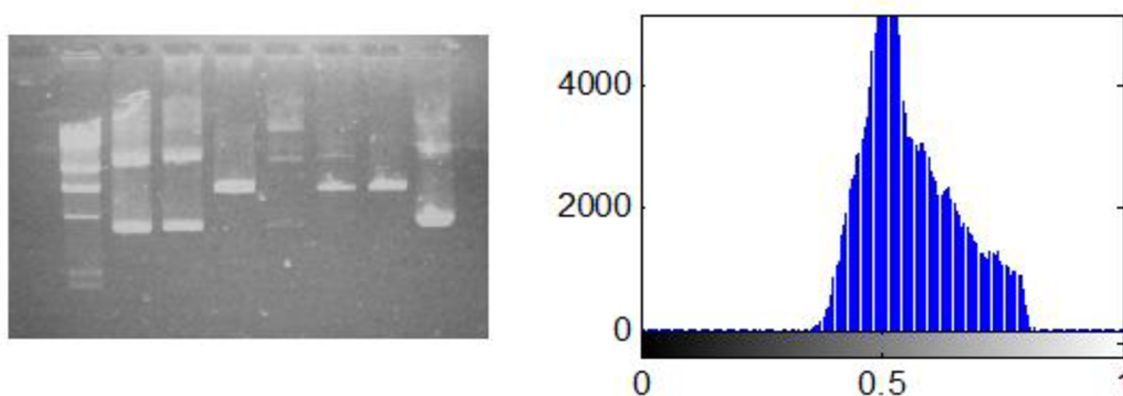
Ekvalizace histogramu

Další metodou korekce obrazu je ekvalizace histogramu, jejíž schématické zobrazení je následující:



Obrázek 20 Blokové schéma ekvalizace.

Histogram je graf, na jehož první ose najdeme informaci o intenzitách pixelů I , které jsou v daném obraze zastoupeny, a na druhé ose vektor H , jehož hodnoty odpovídají četnosti bodů příslušné intenzity v obraze. Hodnoty intenzit v každém obraze se nachází v intervalu $\langle 0;1 \rangle$. Homogenita rozložení intenzit pixelů v obraze má přímý vliv na kvalitu obrazu. Pokud nejsou v obraze hodnoty intenzit v intervalu $\langle 0;1 \rangle$ rovnoměrně rozloženy, obraz je nekvalitní a tudíž je na místě provést korekci tohoto obrazu, což je vidět na obrázku (Obrázek 21).



Obrázek 21 Ukázka obrazu s nehomogénním zastoupením intenzit v obraze (osa x – intenzita , y – četnost dané intezity) [13].

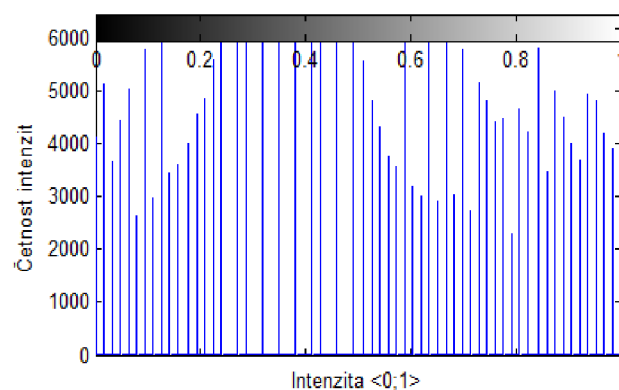
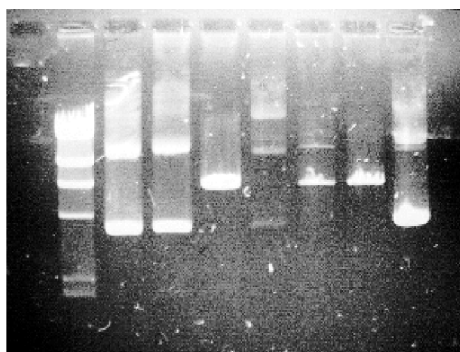
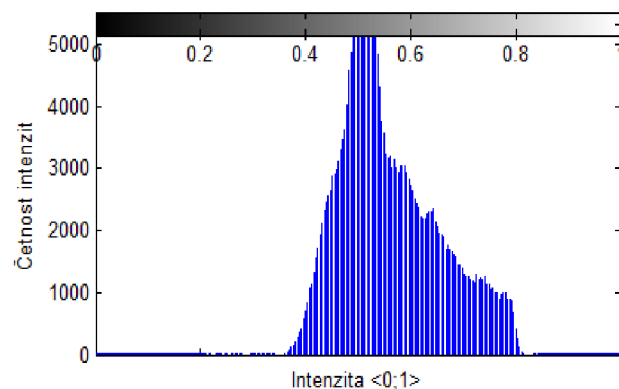
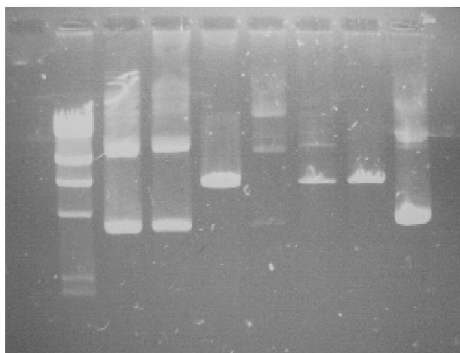
Na Obrázek 21 je jasně vidět, že v obraze zcela chybí intenzity pixelů ze začátku a z konce intervalu $\langle 0;1 \rangle$, vstupní obraz je tedy málo kvalitní.

Korekce takového obrazu je založena na roztažení histogramu, tj. *ekvalizaci histogramu* tak, aby hodnoty intenzit pixelů byly rovnoměrně rozloženy po celém intervalu $\langle 0;1 \rangle$, pokud možno se stejnou četností. Tímto způsobem lze v obraze zvýraznit špatně rozpoznatelné oblasti s nízkým kontrastem. Výsledný histogram se vypočítá následovně:

$$H_e(j) = \frac{q_k - q_0}{M \cdot N} \cdot \sum_{i=0}^j H_p(i) + q_0 \quad (4)$$

$H_e(j)$ je výsledný histogram, $q_0 - q_k$ je interval požadovaných šedotónových úrovní ve výsledném obraze a M, N jsou rozměry obrazu [2].

Tato metoda předzpracování obrazu zahrnuje následující postup: vytvoříme histogram původního obrazu, který nám zobrazí úroveň homogenity reprezentace jednotlivých intenzit. Pokud se v tomto histogramu projeví nehomogenita intenzit, přikročíme k samotné ekvalizaci histogramu (ukázka Obrázek 22).



Obrázek 22 Ukázka rozdílu vstupního obrazu před ekvalizací a po ekvalizaci histogramu [13].

5.2. Vlastní metoda detekce

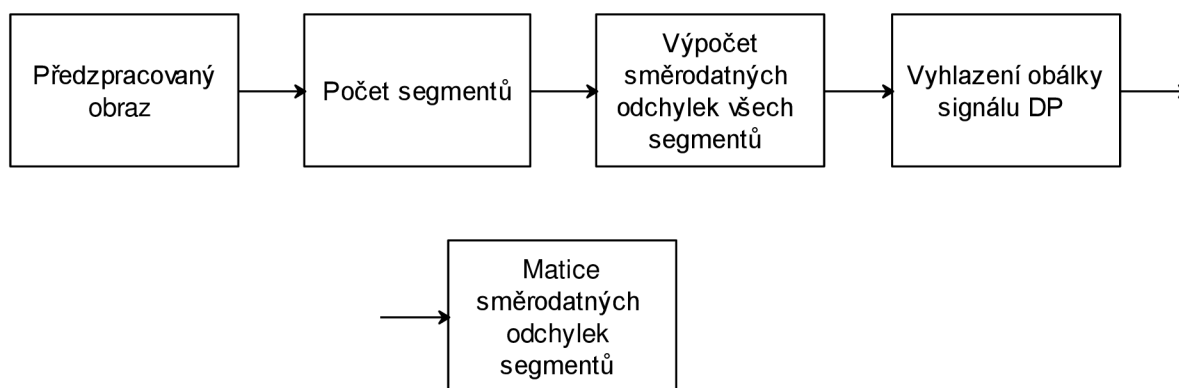
Po předzpracování obrazů následuje samotná detekce vzorků v obraze. Návrh vlastní metody vycházel s kombinace metod popsanych v kap. 4 a skládá se z několika kroků.

Vzhledem k tomu, že vlastní metoda detekce je převážně založena na detekci minimálních hodnot intenzit pixelů, které reprezentují bílá místa, tj. mezery mezi lanami, je třeba, aby vstupní obraz tuto podmínku respektoval. Pokud v původním obraze jsou mezery mezi lanami tmavé, převedeme vstupní obraz na negativ a tím zajistíme splnění této podmínky.

Pro názornost vysvětlení principu vlastní metody detekce byl vybrán jen jeden ukázkový obraz, který je originální (vlastní výroba), v kap. 6 pak budou ukázány a diskutovány výsledky několika dalších obrazů gelové elektroforézy.

Horizontální segmentace obrazu

Po předzpracování vstupního obrazu některou z výše uvedených metod dostaneme obrazovou matici s vhodně upravenými hodnotami jednotlivých pixelů. Následný postup bude korespondovat s tímto schématem:



Obrázek 23 Blokové schéma horizontální segmentace.

Tuto obrazovou matici si horizontálně rozdělíme do dvaceti segmentů (počet těchto segmentů je volitelný, můžeme si zvolit i jiný počet horizontálních segmentů podle velikosti vstupního obrazu).

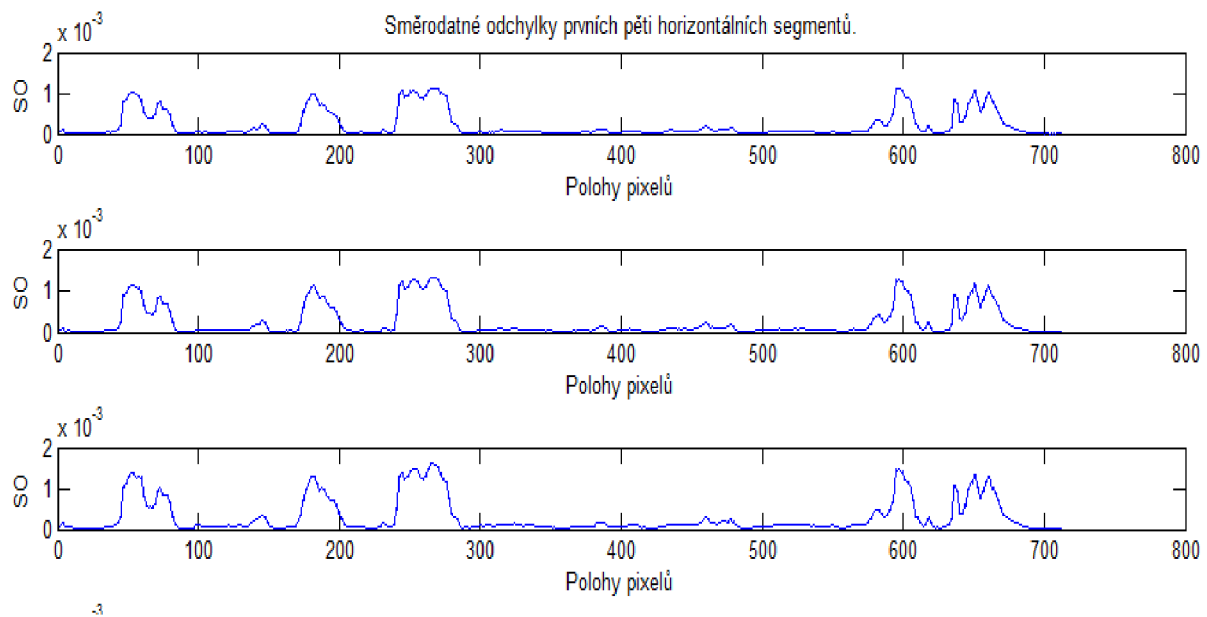
V každém horizontálním segmentu spočítáme směrodatnou odchylku v každém sloupci, takže ve výsledku dostaneme dvacet vektorů s hodnotami směrodatných odchylek, které vypočteme ze vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \tag{5}$$

Pokud se rozhodneme pro větší počet horizontálních segmentů, signál reprezentovaný směrodatnými odchylkami bude méně kvalitní. Tudíž na vektory těchto směrodatných odchylek aplikuji FIR filtr typu dolní propust' a vyhledám takto obálku signálů pro další

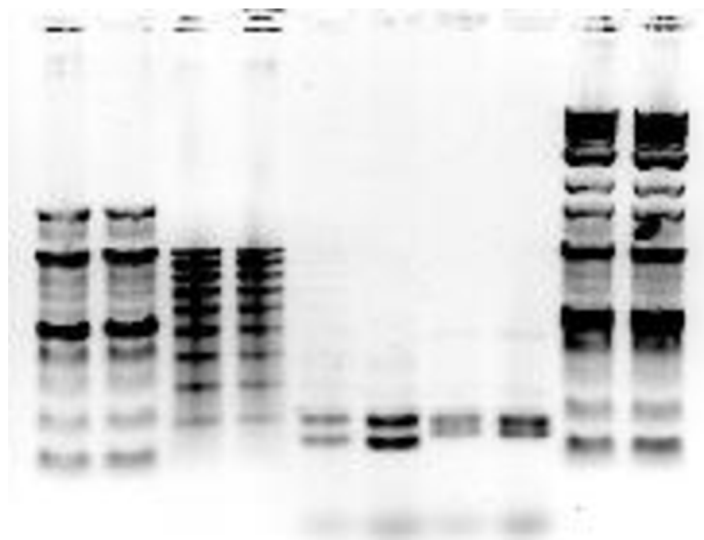
úpravy. Takto upravené vektory směrodatných odchylek vyneseme do grafů (ukázka Obrázek 24).



Obrázek 24 Ukázka prvních tří segmentů obrazu a vektorů jejich směrodatných odchylek.

V grafu (Obrázek 24) jsou na ose x vyneseny polohy jednotlivých pixelů a na ose y pak hodnoty směrodatných odchylek. Výsledný signál v každém horizontálním úseku kopíruje strukturu objektů v obraze a jejich hranice. Místa s nejmenší hodnotou směrodatné odchylky jsou zároveň i místy, která mají nejmenší intenzitu pixelu, tedy jakási minima v obraze. Díky těmto místům s minimální hodnotou směrodatné odchylky jsme schopni v originálním šedotónovém obraze určit rozhraní, kde lana končí a začíná mezera. Tedy díky těmto minimálním hodnotám jsme schopni určit šířku lany.

Dále lze v tomto obrázku (Obrázek 24) pozorovat určité úseky, zhruba v intervalu poloh pixelů $\langle 300;550 \rangle$, kde jsou odchylky v hodnotách směrodatných odchylek jen minimální. Jsou to místa v původním obraze, která jsou čistě bílá, tedy nenesou žádný signál (žádnou obrazovou informaci), což je další důkaz toho, že tato metoda horizontální segmentace respektuje strukturu původního obrazu.

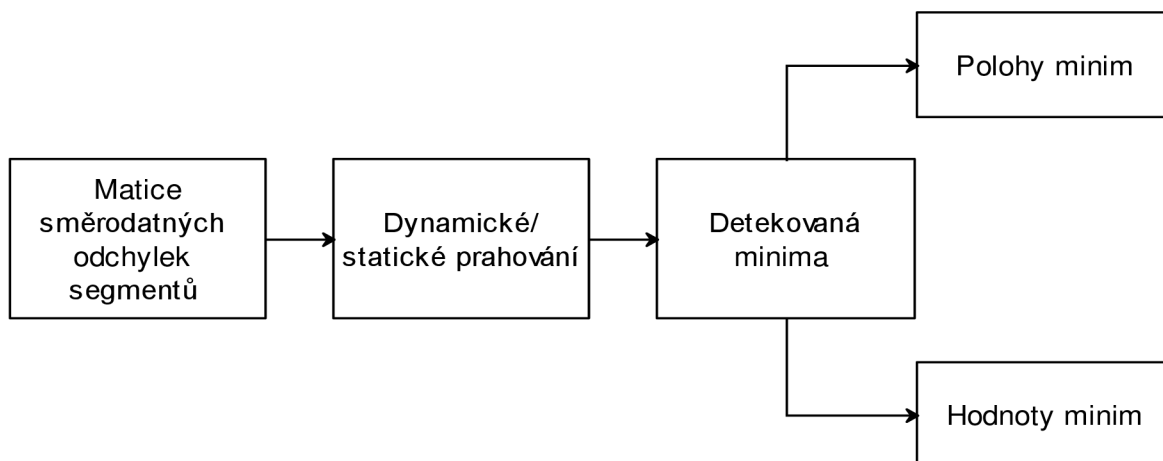


Obrázek 25 Původní obraz po gama korekci.

Pro ilustraci uvádím původní obraz po gama korekci (Obrázek 25), je patrná nepřítomnost signálu, kterou kopírují vektory směrodatných odchylek.

Detektor minimálních hodnot

Detektor minimálních hodnot pracuje na podobném principu jako například detektor R vln. Funguje následovně:



Obrázek 26 Blokové schéma detektoru.

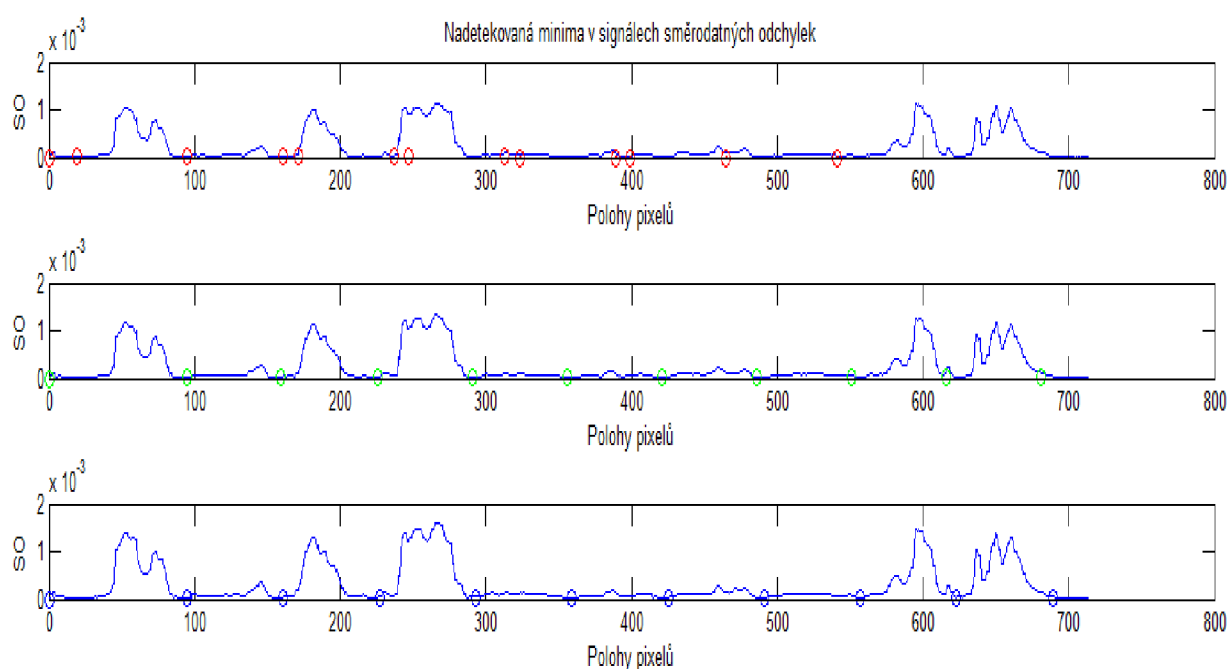
Nejdříve se výsledné vektory směrodatných odchylek pro každý horizontální segment obrazu spojily v matici, která byla doplněna v každém řádku o délku okna, v tomto případě šlo o padesát nul.

Další postup algoritmu je takový, že právě vytvořenou matici detektor projíždí po řádcích a hledá minimální hodnotu směrodatné odchylky podle daného prahu. Signál každého horizontálního úseku původního obrazu má poněkud odlišnou dynamiku, kterou je potřeba

sledovat. Proto, pokud selže statické prahování, které je vymezeno číselným intervalem a nesleduje dynamiku signálu, zvolíme prahování dynamické, které s touto skutečností počítá.

Jakmile tedy tyto minimální hodnoty program najde, uloží je do vektoru a nadetekovaný vektor minimálních hodnot každého horizontálního úseku uloží do buňkového pole. Celkově tedy budeme mít jedno buňkové pole o dvaceti vektorech nadetekovaných minimálních hodnot směrodatných odchylek a jedno buňkové pole o dvaceti vektorech, ve kterých budou uloženy přímo polohy těchto minim (respektive x-ové souřadnice těchto minim).

Do jednoho grafu poté vyneseme vektory směrodatných odchylek prvních tří horizontálních segmentů a vektory nadetekovaných minim, abychom se přesvědčili, jak detektor funguje (Obrázek 27).



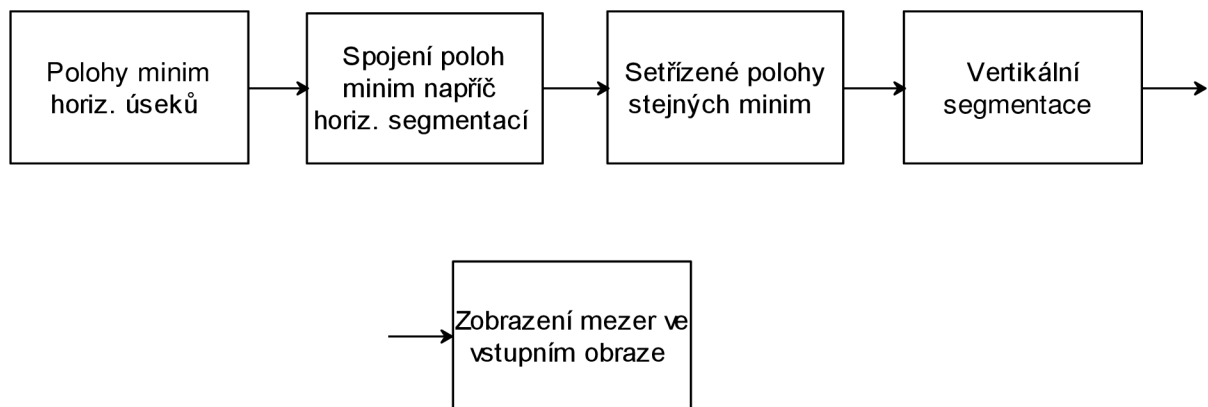
Obrázek 27 Nadetekovaná minima prvních tří horizontálních úseků.

Z Obrázek 27 je patrné, že některá minima byla nadetkována velmi blízko sebe, což znamená, že v některé mezeře mezi lanami budou blízko sebe dvě lokální minima, což může vést k nepřesnostem a způsobit tak potíže při stanovování hranic mezi lanami. Ideální by bylo, kdyby v každé mezeře bylo nalezeno jen jedno minimum.

Tuto komplikaci se mi podařilo vyřešit v následujícím kroku.

Vertikální segmentace obrazu

Dosavadní postup přinesl informace o minimálních hodnotách v horizontální rovině napříč celou šířkou obrazové matice. Pro další postup je třeba nadetkovat mezery v obraze, které jsou ovšem orientovány vertikálně (Obrázek 28).



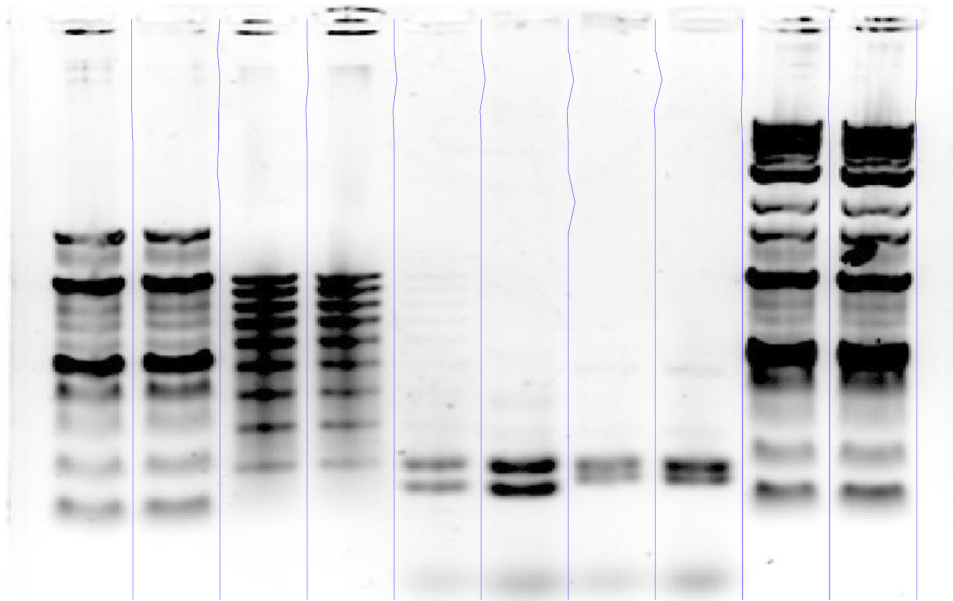
Obrázek 28 Blokové schéma vertikální segmentace.

Z buňkového pole, které obsahuje dvacet vektorů poloh minim v horizontálním směru, se vytvoří nové buňkové pole, které tentokrát bude obsahovat polohy nadetekovaných minim ve vertikálním směru.

Princip, jen pro ilustraci, je následující: detektor minimálních hodnot našel v každém horizontálním úseku např. deset minimálních směrodatných odchylek, které byly nalezeny ve stejných či velmi podobných pozicích v každém horizontálním úseku. Minimální směrodatné odchylky, které byly nadetekovány ve stejných či velmi podobných pozicích, jsem spojila do nových vektorů, které již reprezentovaly délku mezery, nikoli její šířku. Tímto způsobem se vstupní obraz opět nasegmentoval, ale tentokrát ve vertikálním směru. Počet vertikálních úseků, které nesou nějaký signál, se rovná počtu mezer přítomných ve vstupním obraze.

Pro každý takto vzniklý vektor jsem stanovila mediánovou hodnotu. Pokud by se ve vektoru objevila poloha, která by se od ostatních lišila o více než 10 pixelů, bude nahrazena právě touto mediánovou hodnotou. Tento způsob úpravy vektorů jsem zvolila proto, abych se zbavila minim, která byla v horizontálních úsecích nadetekována natolik blízko sebe, že by mohla způsobit falešně pozitivní výsledky a natolik daleko od sebe, aby jejich odstranění nemělo velký vliv na pravdivost výsledků.

Tyto nově vzniklé vektory jsem propojila a následně zobrazila v původním obraze (Obrázek 29).



Obrázek 29 Vertikální rozdělení obrazu.

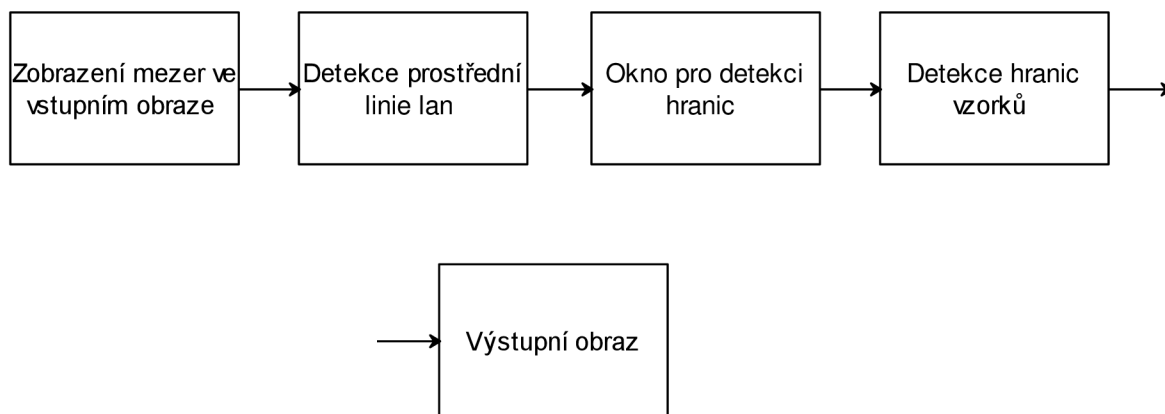
V tomto obrázku (Obrázek 29) je prezentována vertikální segmentace obrazu. Tento obraz byl předzpracován metodou gama korekce (byl lehce přeexponován) a je na první pohled vidět, že v něm není zastoupeno nějaké závažnější rušení či zkreslení, takže nadetekovaná minima v horizontálních úsecích byla nadetekována téměř ve stejných polohách (odchylka jen několik málo pixelů a to jen v těch částech obrazu, kde nebyl signál moc patrný).

Detektor minimálních hodnot projíždí matici směrodatných odchylek všech horizontálních segmentů s posuvným oknem, jehož velikost jsem zvolila 50 vzorků (tato délka okna vykazuje nejlepší výsledky). Toto posuvné okno je ovšem příčina toho, že v obraze není nedetekován začátek první lany a že tedy nepůjde stanovit hranici první lany. Tento problém je dále popsán a řešen v poslední části vlastní metody detekce.

Vertikální rozdělení obrazu a následná detekce mezer mezi lanami je stěžejní pro stanovení hranic vzorků v obraze, tedy poslední část vlastní metody.

Detekce hranic vzorků v obraze

Poslední část vlastní metody zahrnuje stanovení hranic vzorku na základě detekce mezer mezi lanami podle následujícího postupu:

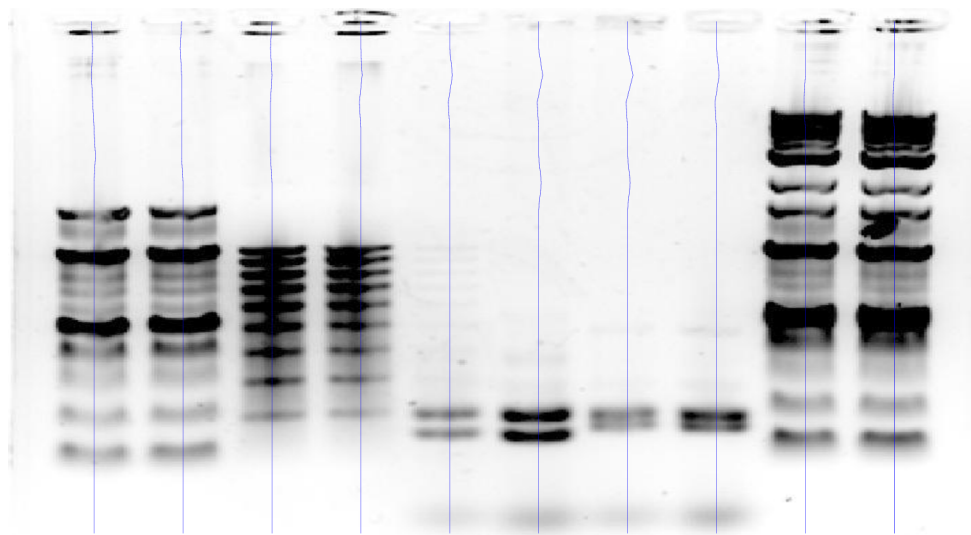


Obrázek 30 Blokové schéma detekce hranic vzorků.

V tomto posledním kroku vlastní metody detekce se zabývám detekováním hranic vzorků pomocí dříve detekovaných mezer mezi lanami. Detekovaná mezera je v půli vzdálenosti jedné lany od druhé a této skutečnosti zde využívám.

Prakticky to znamená následující: nejdříve si zjistím vzdálenosti mezi nadetekovanými prostředky mezer a tyto vzdálenosti uložím do vektorů (vzdálenost mezer je číslo, které udává počet pixelů, o které je jedna přímka, která odpovídá prostředku mezery mezi lanami, vzdálena od druhé).

Následovně tyto vypočtené vzdálenosti rozpůlím a stanovím tak přesně prostřední část lany. Tyto prostřední části pak lineárně propojím a zobrazím v originálním obraze (Obrázek 31).



Obrázek 31 Zobrazení prostřední části lany.

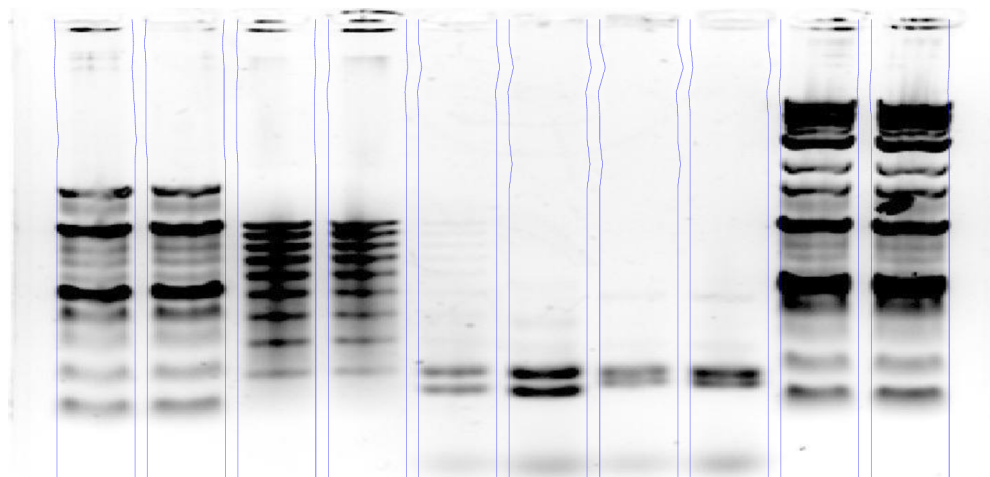
Z obrázku (Obrázek 31) je patrné, že propojení bodů reprezentujících prostřední části lany není přesně lineární, ale naopak kopíruje strukturu nedetekovaných mezer z předchozího

kroku. Je to dáno tím, že jsem se v tomto kroku opět zčásti vrátila k horizontální segmentaci. V horizontální segmentaci byl vždy jeden bod reprezentující jednu mezeru. V Obrázek 31 je přítomno deset mezer, což znamená deset bodů v každé horizontální segmentaci a mezi těmito body proběhl výpočet vzdálenosti.

V této fázi postupu bylo také třeba vyřešit problém, že díky velikosti okna v detektoru nebyla nadetekována hned první mezeru (tedy část před začátkem první lany). Vzdálenost mezer se tedy začala počítat až od druhé nadetekované mezery. K vyřešení tohoto problému jsem využila skutečnosti, že šířky lan a šířky mezer mezi nimi jsou stejné (což je dáno strukturou elektroforetického gelu hned při přípravě elektroforézy). Takže jsem vzala hned tu první zjištěnou vzdálenost mezi druhou a třetí mezerou, vypočetla její poloviční hodnotu a místo abych tuto poloviční hodnotu přičetla každé přímce zobrazující mezeru, jako jsem to udělala pro ty ostatní přímky zobrazující mezery, jsem ji od první přímky zobrazující druhou mezeru odečetla a dostala tak prostřední část první lany. Tato skutečnost je zachycena na Obrázek 31.

V poslední části vlastního programu se zabývám detekcí samotných hranic vzorků. Vycházím zde z nadetekovaných prostředních částí lan.

Nejedná se již o nic jiného než o vytvoření vhodného okna, díky kterému lze následně stanovit hranice vzorku. V tuto chvíli je pro další postup stěžejní vzdálenost nadetekované mezery a nadetekované prostřední části lany. Pokud zvolíme dostatečný rozměr okna a posuneme křivku, která zobrazuje nadetekovanou střední část lany o tento rozměr doprava i doleva, vzniklé křivky budou kopírovat hranice lan zprava i zleva.



Obrázek 32 Nadetekované hranice lan.

Stanovení tohoto okna bylo trochu obtížnější, ale nakonec se ukázalo, že nejlepší výsledky dosahuje rozměr okna, který se rovná 75 - 85% vzdálenosti mezi křivkou, která reprezentuje mezeru, a křivkou reprezentující prostřední část lany (Obrázek 32).

Poslední krok v realizaci vlastní metody je věnován mediánové filtraci obrazu, ve kterém byly úspěšně nadetekovány hranice lan.

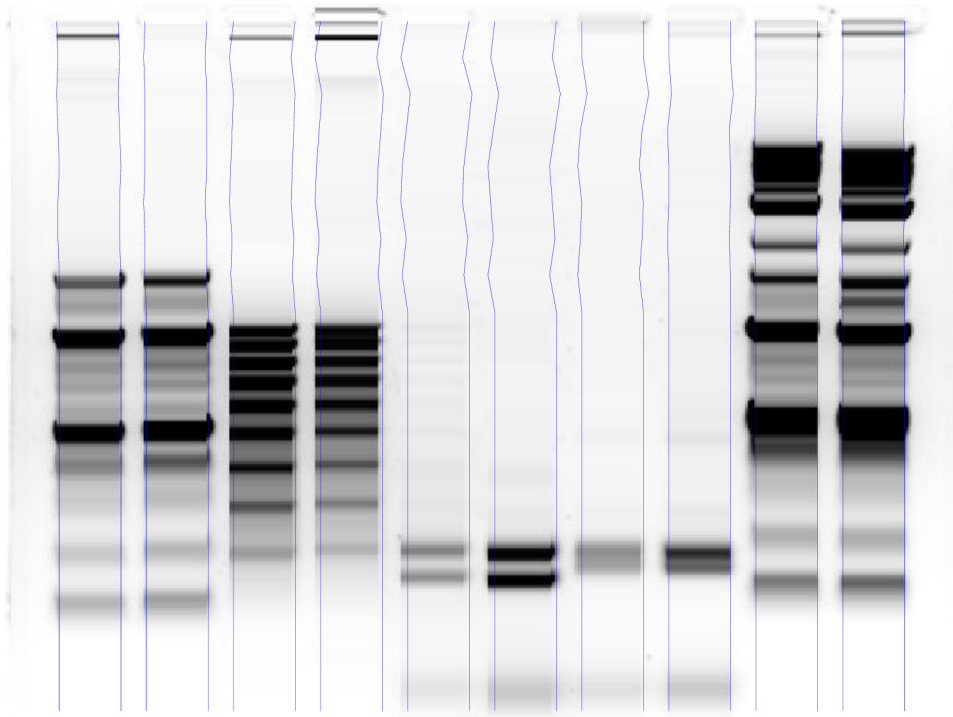
V každé nadetekované laně vypočítáme pro každý řádek obrazové matice mediánovou hodnotu intenzity, kterou budou poté nahrazeny všechny hodnoty intenzity v příslušném řádku lany.

Tímto způsobem dostaneme obraz, který bude vykazovat homogennější zastoupení intenzit v každé nadetekované laně, jinými slovy, lany i samotné bandy, které lany tvoří, jsou zřetelnější (Obrázek 33) a jsou tedy vhodnější pro další analýzu..



Obrázek 33 Původní hodnoty intenzit jedné lany (a), mediánové hodnoty jedné lany (b).

Celkový obraz s mediánovou hodnotou intenzity v každém řádku detekované lany pak vypadá ucelenější a ostřejší (Obrázek 34).



Obrázek 34 Výsledný obraz po mediánové filtraci i s detekovanými hranicemi lan.

6. Výsledky vlastní metody detekce hranic vzorků

V této poslední kapitole budou uvedeny výsledky dosavadní práce. Výsledky budou vyhodnoceny a postoupeny srovnání s výsledky jiných známých metod. V případě nedostačujících výsledků v některých obrazech bude vysvětlena příčina problému.

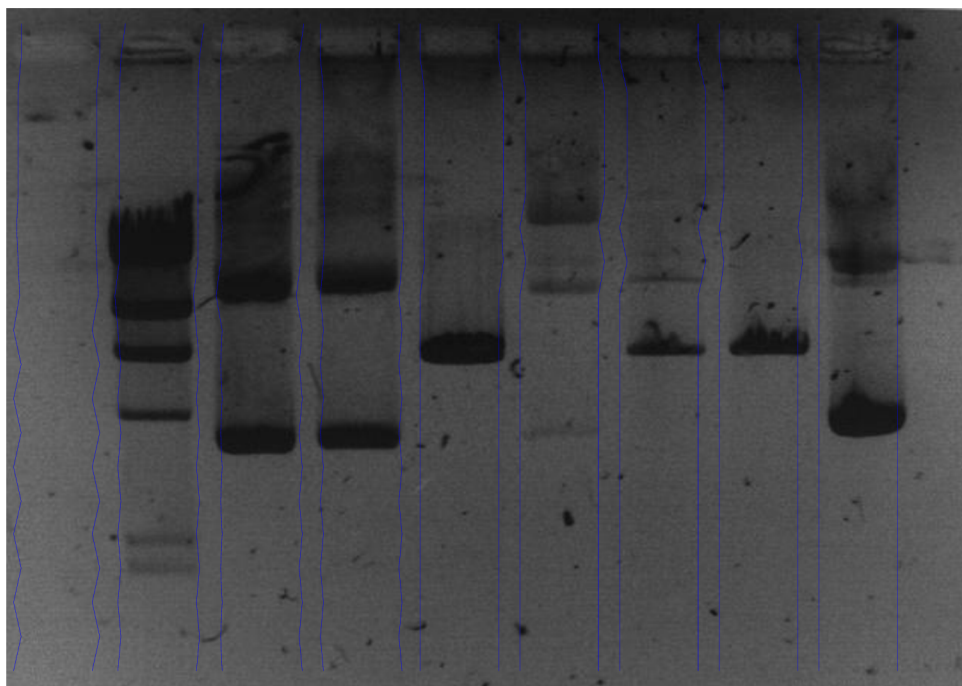
6.1. Vyhodnocení vlastních výsledků

Metoda vlastní detekce hranic vzorků zahrnuje několik proměnných, které jsou flexibilní, tj. pro každý obraz se mohou měnit. Tyto proměnné jsou následující: počet horizontálních segmentů, práh (buď zvolíme statický, či dynamický, podle toho, který umožní lepší výsledky), délka okna v detektoru minimálních hodnot (je nastavena na hodnotu 50 vzorků, avšak u obrazů, které mají malé rozměry, je možné hodnotu tohoto okna zmenšit). Podle toho, jak je obraz kvalitní, se také můžeme rozhodnout, zda bude potřeba filtrace signálu, který je reprezentován maticí směrodatných odchylek. Pokud bude obraz dostatečně kvalitní, není třeba užít dolní propusti, aby byla obálka signálu vyhlazena.

Na prvním obraze, kde jsou detekovány hranice Obrázek 32, je vidět, že detekce proběhla poměrně úspěšně. Je to dáno tím, že obraz nebyl zatížen žádným závažnějším rušením, takže stačila jen gama korekce a detekci hran lze považovat za úspěšnou. Počet horizontálních segmentů zde byl zvolen vysoký, tj. 40, filtrace směrodatných odchylek byla zachována, což odstranilo zbývající drobné nepřesnosti v signálu.

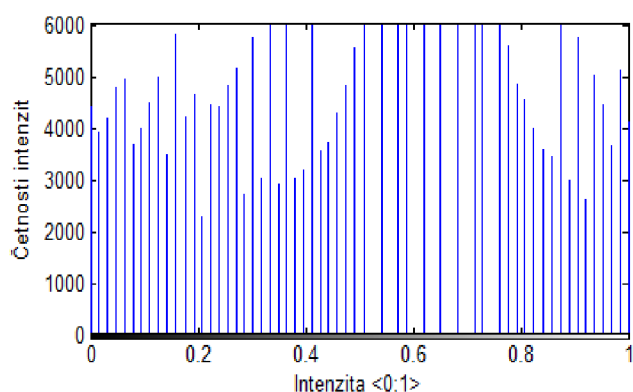
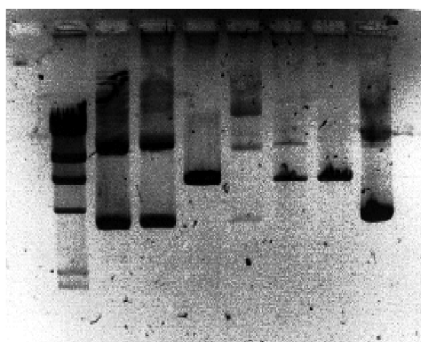
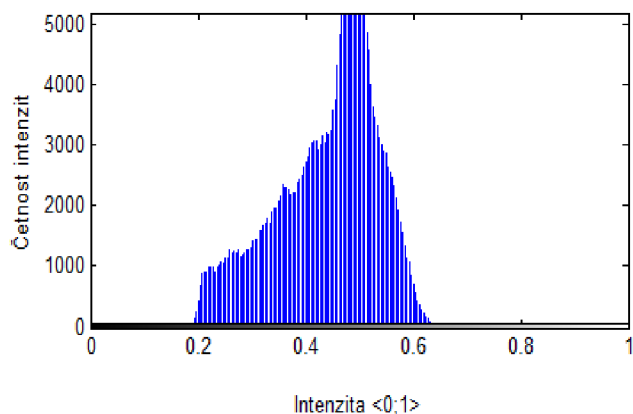
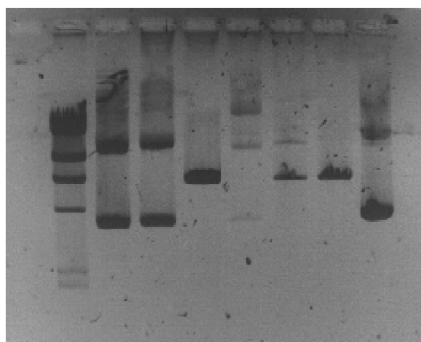
Na dalším obraze, na který byla aplikována metoda vlastní detekce, bylo již zkusení patrnější. Opět byla použita gama korekce i filtrace signálu byla zachována (Obrázek 35).

I když byla aplikována gama korekce, hranice lan, přechody mezer a samotných lan jsou těžko rozeznatelné. Tam, kde v obraze byl signál, jsou hranice detekovány tak, že respektují strukturu linie hran, tam kde rozdíl signálů mezi lanou a mezerou chybí, je křivka lineární, nekopíruje tedy přesně skutečnou linii hrany lany, ale pouze předpokládanou.



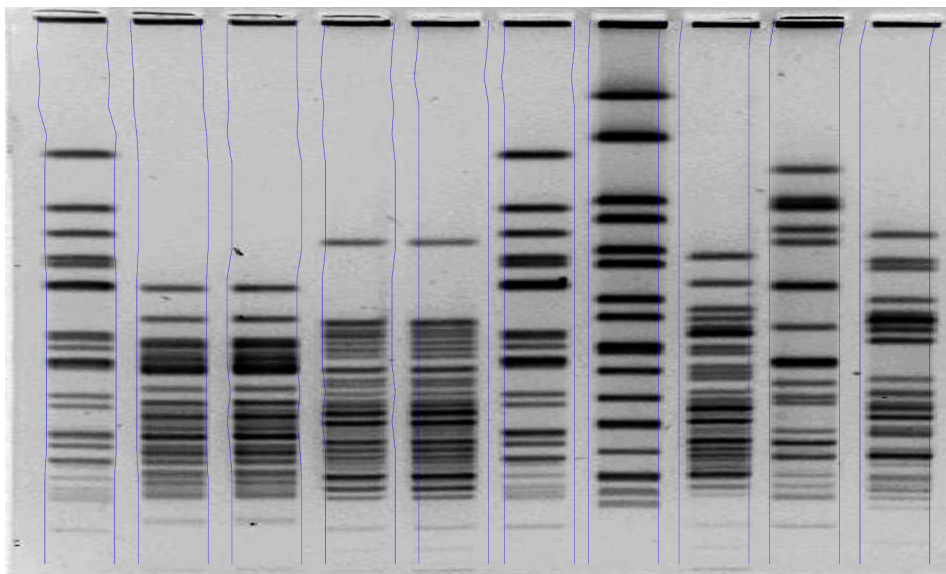
Obrázek 35 Detekce hranic lan (gama = 1.65) [13].

Metoda ekvalizace histogramu u toho obrazu neměla smysl, obraz ještě více rozostřila. Jak je vidět na obrázku (Obrázek 36), ekvalizace histogramu původního obrazu vyvolala v některých úsecích i ztrátu jakéhokoli signálu (bílá místa), ve kterých by detektor nenadetekoval žádná minima, vzhledem k tomu, že by byl signál nulový.



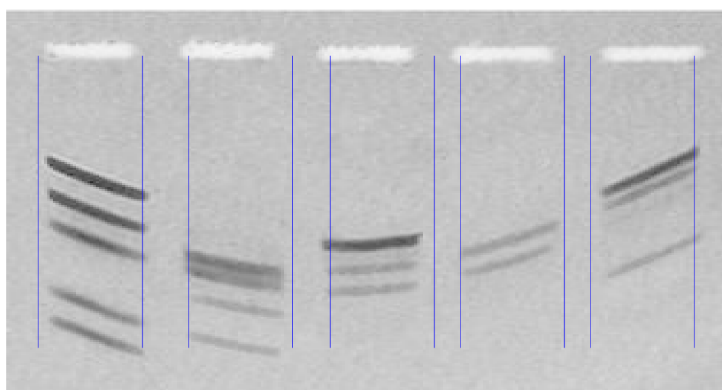
Obrázek 36 Ekvalizace histogramu - ztráta signálu v určitých úsecích [13].

Další obraz (Obrázek 37) byl upraven gama korekcí s koeficientem $\gamma = 1,9$. Na obrázku je vidět, že lany už na začátku trošku uhýbají ze své dráhy, ale jinak je obraz bez většího zkreslení. Jak je z obrázku vidět, většinu hranic lan detektor nadetekoval poměrně přesně. Jsou zde však i lany, které přesně kopírovány nejsou. Problém může být ve stanovení prahu v detektoru. Všechny mezery, resp. prostřední část mezer, totiž nemají stejné hodnoty intenzit, ale liší se od sebe a to i v některých případech o jeden řád. Pokud zvolíme malý práh, nadetkuje to prvních pár mezer, ale pro ostatní mezery je to práh velmi malý. Když naopak bude práh vysoký, v prvních mezerách bude nedetekováno více linií. Takže musíme zvolit určitý kompromis.

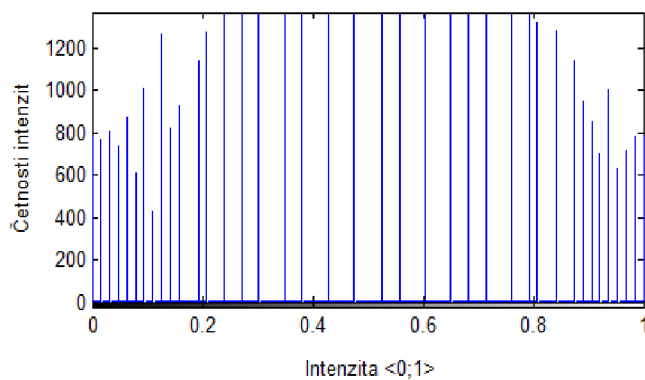
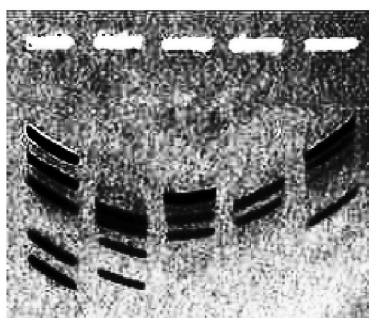
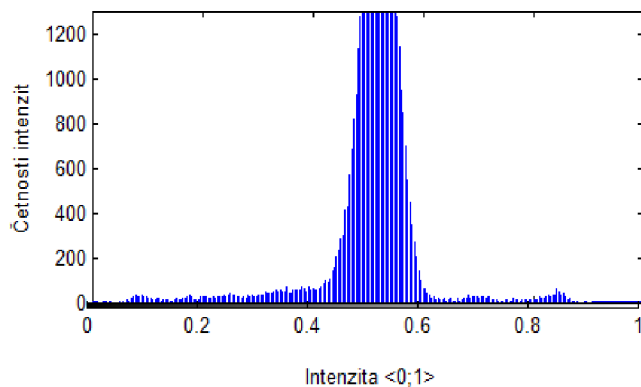
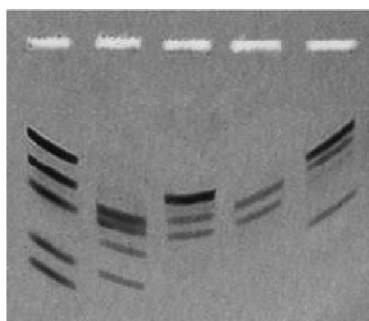


Obrázek 37 Obraz elektroforézy (gama = 1.9) - kompromis v prahování [17].

Další obraz elektroforézy je zkreslený. Je tam patrný smiling efekt, se kterým se měl detektor vyrovnat (Obrázek 38). Jak je vidět na obraze, detekované linie kopírují hrany lan s mírnou odchylkou. Původní obraz byl velmi malých rozměrů oproti ostatním, takže se okno detektoru zmenšilo pouze na 10 vzorků a práh intenzity detekovaných minim se pohyboval kolem hodnoty 0,0003. Původní obraz byl opět vystaven jen gama korekci, ekvalizace histogramu zde nepomohla, došlo ke ztrátě signálu ve značné části obrazu (Obrázek 39). Gama koeficient byl zde velmi malý, tj. 0,4, došlo tedy celkově k zesvětlení původního obrazu.

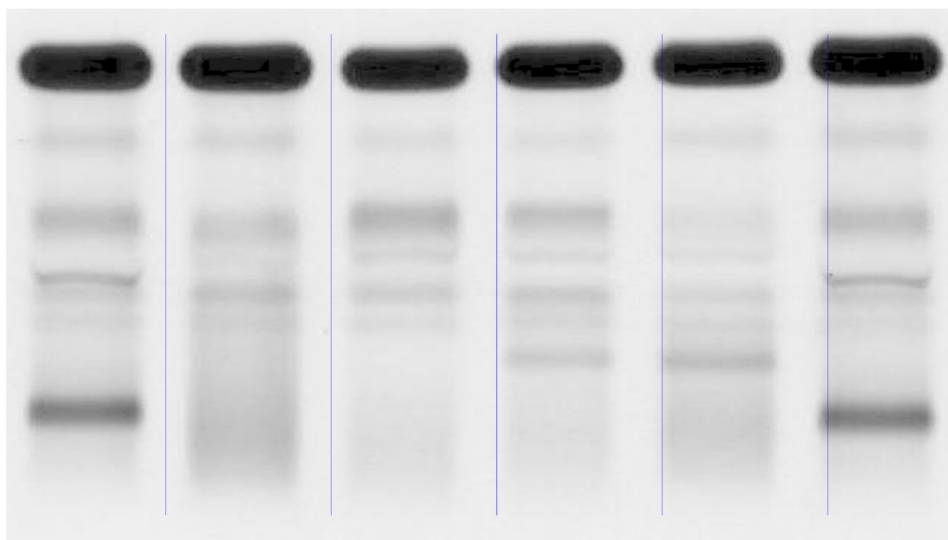


Obrázek 38 Smiling efekt v elfo obraze 0.



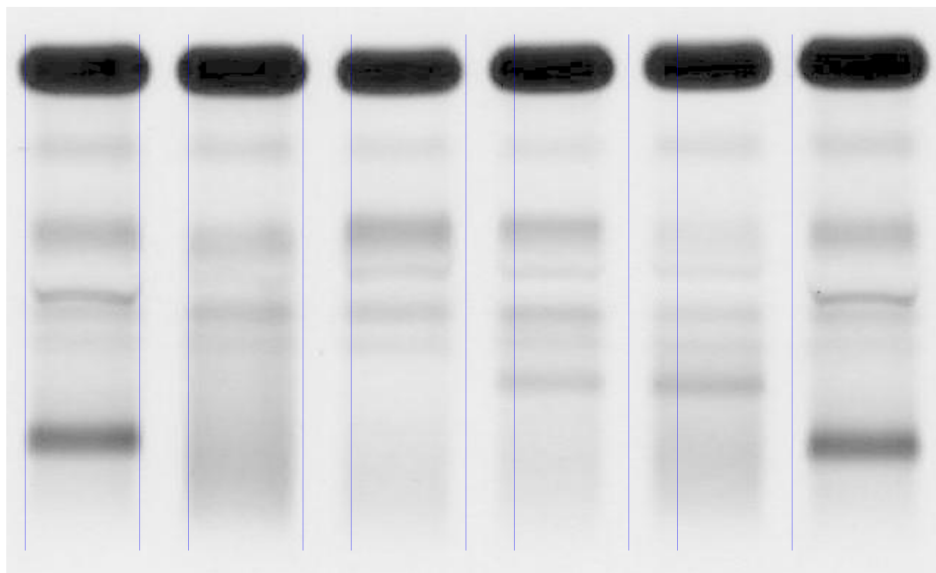
Obrázek 39 Ukázka ekvalizace histogramu - značné ztráty signálu 0.

Problém nastal u tohoto obrazu (Obrázek 40). Detektor totiž vůbec nenadetekoval prostor za hranicí poslední lano. Důvodem opět může být prahování a v tomto případě zde nepomohla ani gama korekce či ekvalizace histogramu.



Obrázek 40 Obraz elektroforézy - vynechání poslední mezery.

Výsledný obraz (Obrázek 41) pak díky tomuto faktu nemá ohraničenou poslední lanu. Už na té předposlední je vidět, že nekopíruje přesně danou lanu. Opět je to zaviněno prahováním.

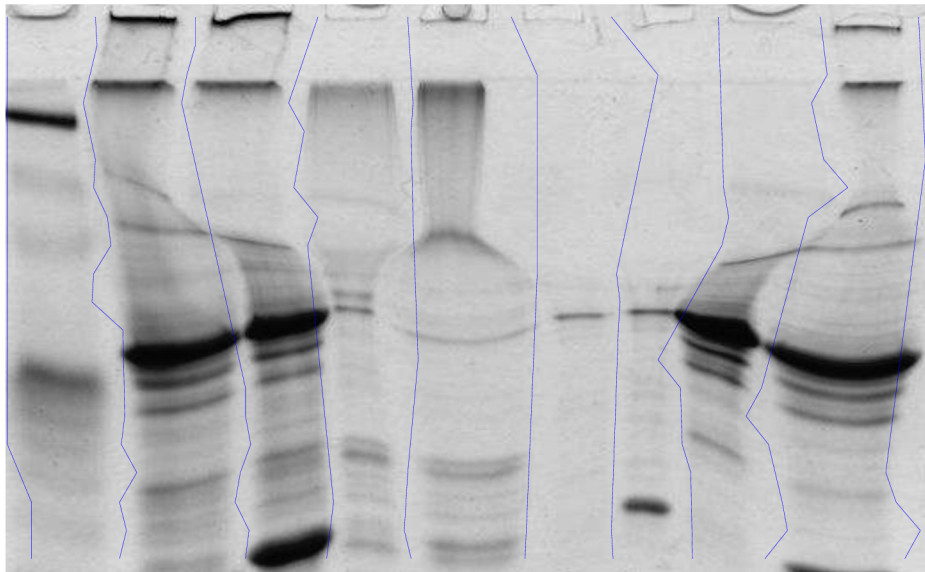


Obrázek 41 Elektroforetický obraz - vynechaná poslední lana [10].

Další obraz (Obrázek 42) elektroforézy je silně zkreslený. Hrany lan jsou asymetrické. Toto zkreslení mohlo být způsobeno zvýšenou teplotou v elektrickém poli. Jako první jsem u tohoto obrazu použila gama korekci, konkrétně byl koeficient gama 1,65 (tedy obraz byl podexponován), obraz celkově ztmavnul a došlo ke zvýšení kontrastu i minimálních hodnot intenzity.

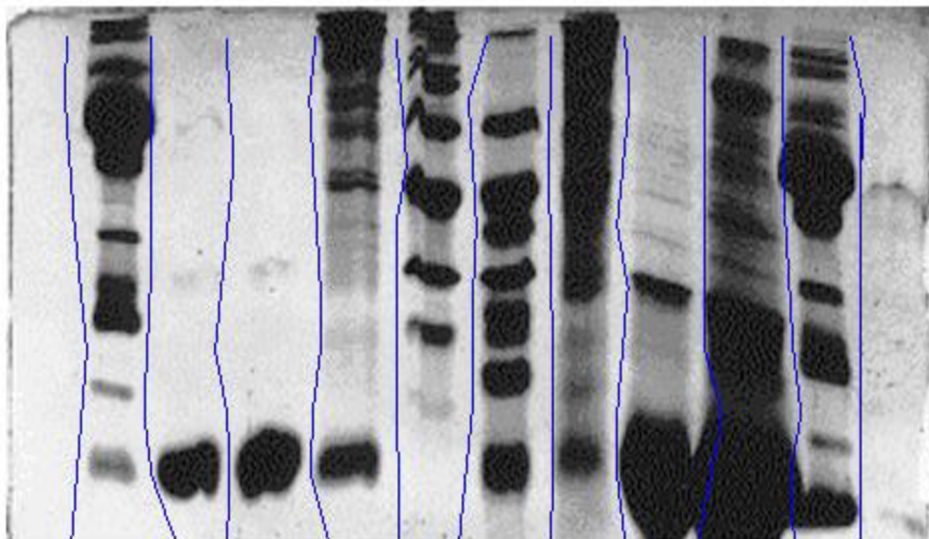
Obraz byl dále rozdělen na 20 horizontálních segmentů, opět byly spočítány směrodatné odchylky. Z obrázku je patrné, že detekované křivky zhruba kopírují hranice lan. Odchylky nadetekovaných hodnot, které jsou z obrazu patrné, byly způsobeny opět prahováním. V každém horizontálním úseku se nenadetekoval stejný počet minimálních hodnot, jelikož ne v každé mezeře mezi lanami odpovídaly zvolenému prahu.

Ekvalizace histogramu zde nemá moc smysl, jelikož v určitých úsecích dochází ke ztrátě signálu už tak nekvalitního obrazu.



Obrázek 42 Zkreslený obraz s nadetekovanými hranicemi [16].

Další obraz (Obrázek 43) má opět asymetrické hranice, ale ne tolik jako na Obrázek 42. Detekce mi v tomto případě připadá přesnější, ale i tak je to stále ten samý problém s prahováním. V některých horizontálních úsecích nebylo nalezeno minimum, takže v některé úseky jsou opět spojeny přímkou.



Obrázek 43 Výsledný obraz detekce hran u asymetrických lan [23].

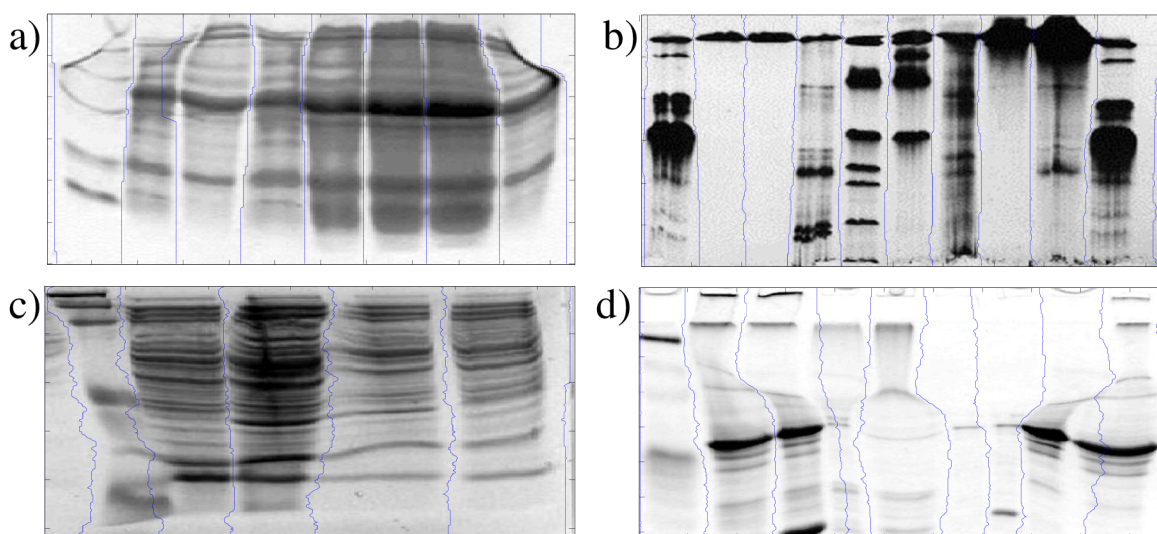
6.2. Porovnání výsledků vlastní metody detekce s veřejně známými metodami

Oproti jiným známým metodám má vlastní metoda realizace jednu nevýhodu, která limituje detekci minimálních hodnot a tou je prahování. V metodě vlastní realizace se musí vybrat takový práh, který pojme hodnoty minim ve všech mezerách, což není vždy možné splnit vzhledem k tomu, že ne ve všech obrazech elektroforézy se v mezerách mezi lanami vyskytují minimální hodnoty intenzity ve stejném rozmezí.

Například u metody detekce hranic vzorků, která užívá metody DTW (Dynamic time warping), tento problém není. Tato metoda sleduje podobnosti různých sekvencí, jejichž prvky se v čase mění a umožňuje stanovení optimální shody mezi dvěma sekvencemi.

Pro představu zde uvádím výsledky dosažené touto metodou (Obrázek 44). Je zřejmé, že tyto výsledky vykazují kvalitní výsledky i u obrazů, kde je přítomno velmi silně zřetelné zkreslení (smiling efekt).

Metody uvedené v kap. 4 jsou založeny na iteračních operacích, na shlukových analýzách a stopování a nemají tedy žádný problém s prahováním. Ovšem jejich detekce se ve směs omezuje jen na stanovení prostředních částí lan, kdežto metoda vlastní detekce se snaží tento postup rozšířit o detekování hranic jednotlivých lan (Obrázek 11).



Obrázek 44 Výsledek dosažený metodou DTW [18].

Obraz (Obrázek 44 – d), který je zpracován metodou DTW, jsem podrobila také vlastnímu detektoru, abych tyto dvě metody porovнала a výsledek vlastní metody jsem uvedla výše (Obrázek 42). Je jasné, že metoda založená na DTW vykazuje o něco lepší výsledky než vlastní detektor. Není to způsobeno ani chybným předzpracováním či segmentací obrazu, ale již zmíněným prahováním. U metody DTW se práh, který by byl jednotný pro minimální hodnoty všech přítomných mezer, nepoužívá.

Závěr

Cílem této práce bylo předzpracování obrazu, pokud je přítomno zkreslení, tak, aby se zvýšila kvalita obrazu a tím se usnadnila detekce hranic lan.

Abych tento cíl splnila, testované elektroforetické obrazy jsem nejdříve upravila pomocí gama korekce či ekvalizace histogramu, pokud se v obrazech vyskytovalo zkreslení či bylo potřeba zvýšit kontrast obrazu. Gama koeficient byl použit podle potřeby (obraz se tedy následně podexponoval či přeexponoval).

Takto upravený obraz jsem horizontálně rozdělila a v každém úseku jsem detekovala minimální hodnoty intenzity pixelů, které měly reprezentovat mezery mezi lanami. Tuto detekci jsem založila na prahování, tj. stanovení hodnoty intenzity, pod kterou by se nacházely minimální hodnoty, které by reprezentovaly mezery mezi lanami.

Takto nadetekované hodnoty intenzit byly spojeny v křivky, které procházely prostředními částmi mezer. Z těchto křivek byly poté stanoveny prostřední úseky lan a následně pak vykresleny křivky, které kopírovaly přímo hranice každé lany.

Tento postup se osvědčil u elektroforetických obrazů, které potřebovaly zvýšit kontrast a které měly hranice lan poměrně symetrické. U těchto obrazů byl detektor schopen v každém horizontálním úseku obrazu detekovat stejný počet minimálních hodnot intenzit a tento počet také korespondoval s počtem mezer mezi lanami. Dále už bylo snadné určit prostřední části samotných lan a podle těchto křivek dále stanovit hranice lan.

Problém nastal u elektroforetických obrazů, kde byly hranice lan velmi asymetrické. Detektor sice fungovala a detekoval minimální hodnoty intenzit v každém horizontálním úseku, avšak jejich počet nebyl stejný, takže počet nadetekovaných minim v horizontálních úsecích ne vždy odpovídal skutečnému počtu mezer.

Když se poté přikročilo ke spojení minimálních hodnot do křivek, které by měly kopírovat mezery, došlo k tomu, že v některých místech nebylo co spojit, takže tato místa byla proložena přímkou, která se napojila na další detekované minimum. Tímto způsobem mohly vzniknout nepřesnosti ve stanovení mezer a v navazující detekci hranic.

Důvod, proč detektor v horizontálních úsecích nenadetekoval všechna minima, je ve stanovení prahu. Pro část v horizontálním úseku, která reprezentovala některou z mezer, mohl být nastavený práh moc malý, takže detektor v tomto horizontálním úseku neurčil žádné lokální minimum.

Tato slabost vlastní metody detekce hranic vzorků v obraze se určitě dá eliminovat, což dokazují jiné známé metody detekce hranic, které jsou v této práci zmíněné. Tyto metody stanovení jakéhosi globálního prahu vůbec nepotřebují, pracují na jiných principech (viz kap. 4). Co se týče eliminace vlivu prahování na výslednou detekci hranic, mohlo by pomoci vypočítat diferenci signálu směrodatných odchylek, aby byl lépe patrný rozdíl mezi

intenzitami v úsecích reprezentujících mezery a lany, což by mohlo vést k přesnějšímu stanovení prahu a lepší detekci mezer.

Cílem bakalářské práce bylo navrhnout vlastní algoritmus detekce a tento bod byl splněn. Rozhodla jsem se pro určitý postup a tohoto postupu jsem se celou prací držela, i když se nakonec ukázalo, že existují metody, které vykazují lepší výsledky než vlastní realizovaný algoritmus. I přes nedostatek ve vlastní realizaci metody detekce hranic vzorku v obraze si myslím, že vlastní metoda není zbytečná a že cíl bakalářské práce byl i tak splněn a důvody limitace vlastního programu byly uvedeny a vysvětleny jejich příčiny.

7. Seznam použité literatury

- [1] Artefakty obrazu. *Artefakty obrazu* [online]. 2011 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1532-artefakty-obrazu>
- [2] BRAVA, M. Ekvalizace histogramu. In: *Ekvalizace histogramu* [online]. 2005 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: http://cmp.felk.cvut.cz/~perdom1/vyuka/dzo/cv2/cv2_histeq/cv2_histeq.html
- [3] Elektroforéza proteinů. In: *Elektroforéza proteinů* [online]. [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~muncling/ELFO.DOC>.
- [4] Elektroforéza. In: *Elektroforéza* [online]. 2010 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>
- [5] Fourierova transformace ve 2D. In: *Fourierova transformace ve 2D* [online]. 2009 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: http://www.uamt.feec.vutbr.cz/~richter/vyuka/0910_mpov/tmp/integral_tr_2DFT.html. en
- [6] Fyzikální webové stránky - webFyzika. *Fyzikální webové stránky - webFyzika* [online]. [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://webfyzika.fsv.cvut.cz/1optika.htm>
- [7] Gamma korekce. In: *Gamma korekce* [online]. 2011 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: http://www.fotoroman.cz/glossary2/3_gamma.htm
- [8] GIORGIANY E. J., MADDEN T. E. Digital Color Managment. *Digital Color Managment*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, USA, 1997
- [9] HOZMAN, J. Základní metody předzpracování obrazu. *Základní metody předzpracování obrazu* [online]. [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: http://webzam.fbmi.cvut.cz/hozman/Zprac_obr_prisp_kurz_UEM_3_2003.pdf
- [10] Imunoglobuliny a detekce paraproteinu. *Imunoglobuliny a detekce paraproteinu* [online]. 2012 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: <http://www.interimun.cz/prehled-vysetreni-17-imunoglobuliny-a-detekce-paraproteinu.htm>
- [11] JEDRA, M., EL KHATTABI, LIMOURI a ESSAID. Recognition of seed varieties using a time-delay neural network: analysis of electrophoretic images. *Recognition of seed varieties using a time-delay neural network: analysis of electrophoretic images* [online]. 1999, č. 22 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169998000349>
- [12] MACHADO, Alexei M. C., CAMPOS, SIQUIERA a DE CARVALHO. An iterative algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images. *An iterative algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images*. 1997.
- [13] Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Optical tracking of organically*

- modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery* [online]. 2005, vol. 102 no.2 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/102/2/279/F3.expansion.html>
- [14] PARK, Sang Cheol, IN SEOP NA, TAE HO HAN, SOO HYUNG KIM a GUEE SANG LEE. Lane detection and tracking in PCR gel electrophoresis images. *Lane detection and tracking in PCR gel electrophoresis images*. 2012.
- [15] PREISLER, J. Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí. In: *Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí* [online]. 2012 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kapilarni-elektroforeza-s-laserem-indukovanou-fluorescenci-detekci>
- [16] PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS TIPS AND TROUBLESHOOTING GUIDE. *PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS TIPS AND TROUBLESHOOTING GUIDE* [online]. 2008 [cit. 2013-05-28]. Dostupné z: <http://en.dogeno.us/2005/03/protein-gel-electrophoresis-tips-and-troubleshooting-guide-zz/>
- [17] Pulsed-field gel electrophoresis. In: *Pulsed-field gel electrophoresis* [online]. 2012 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: http://www.lifesciencesfoundation.org/events-Pulsedfield_gel_electrophoresis.html
- [18] SKUTKOVA, H., M. VITEK, R. KIZEK a I. PROVAZNIK. Preprocessing and classification of electrophoresis gel images using dynamic time warping. *Preprocessing and classification of electrophoresis gel images using dynamic time warping*[online]. 2013, č. 8 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://www.electrochemsci.org/list13.htm#current>
- [19] Smiley Gels - The effect of excess heat causes problems of distortion in gel electrophoresis. In: *Smiley Gels - The effect of excess heat causes problems of distortion in gel electrophoresis* [online]. 2007 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: http://learning.covcollege.ac.uk/content/Jorum/GMB_DNA-electrophoresis_LM-1.2-29Jan08/page27.htm
- [20] STORCHOVÁ, Zuzana. Jak to udělat, aby molekula byla dobře viditelná. *Jak to udělat, aby molekula byla dobře viditelná*[online]. 1998, č. 7 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/molekuly-na-povel-iii>
- [21] ŠIMAN, P. Elektroforéza. In: *Elektroforéza* [online]. 2013 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/siman/Prednasky/Elfo.pdf>
- [22] World - Global Electrophoresis Equipment and Supplies Market to Reach US\$1.7 Billion by 2017. In: *World - Global Electrophoresis Equipment and Supplies Market to Reach US\$1.7 Billion by 2017* [online]. 2012 [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: <http://yourviet.blogspot.cz/2012/03/world-global-electrophoresis-equipment.html>
- [23] ZHANG-SDS-PAGE. *ZHANG-SDS-PAGE* [online]. 2010 [cit. 2013-05-28]. Dostupné z: <http://bbs.biogo.net/simple/?t166936.html>

[24] ZMEŠKAL, O. a M. NEŽÁDAL. Harmonic and Fractal Image Analyser. *Harmonic and Fractal Image Analyser* [online]. 2001 [cit. 2012-12-13]. Dostupné z: www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci ©