



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

HODNOCENÍ VIABILITY KARDIOMYOCYTŮ

EVALUATION OF VIABILITY OF CARDIOMYOCYTES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Kremličková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jan Odstrčilík, Ph.D.

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Lenka Kremličková

ID: 138942

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Hodnocení viability kardiomyocytů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s vlastnostmi obrazových dat kardiomyocytů a principem jejich snímání. 2) Provedte literární rešerši prací zabývajících se použitím metod segmentace obrazu a texturní analýzy v oblasti zpracování mikroskopických obrazů buněk. 3) Vybrané metody implementujte a aplikujte na zadaná data za účelem segmentace a klasifikace jednotlivých buněk. 4) Navrhněte a implementujte postup hodnocení viability kardiomyocytů ze zadaných dat. 5) Implementované algoritmy otestujte a vhodně vyhodnoťte na dostupných obrazových datech. 6) Provedte diskusi dosažených výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost aplikovaného řešení. 7) K vytvořeným programovým funkcím sepište přehledný návod k obsluze.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] SARVAZYAN, N., et al. A new approach to assess viability of adult cardiomyocytes: computer-assisted image analysis. J Mol Cell Cardiol 30. 2010.

[2] BAZAN, C., et al. Image processing techniques for assessing contractility in isolated adult cardiac myocytes. Int J Biomed Imaging. 2010, 352954.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. Jan Odstrčilík, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové 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 diplomové práce je seznámení se s vlastnostmi obrazových dat a principem jejich snímání. Dále literární rešerše metod zabývajících se segmentací obrazu v oblasti zpracování obrazů srdeční tkáně a v neposlední řadě snaha o nalezení metod pro klasifikaci mrtvých kardiomyocytů a analýzu jejich viability. Mrtvé kardiomyocyty byly analyzovány z hlediska jejich tvaru a podobnosti s šablónou vytvořeným jako průměr z mrtvých buněk. Dalším přístupem byla aplikace metody založená na lokálních binárních znacích a výpočet příznaků z jednoduchého a sdruženého histogramu.

Klíčová slova

Kardiomyocyt, segmentace dat, šablóna, LBP, klasifikace, SVM

Abstract

The aim of this diploma thesis is to get acquainted with the properties of image data and the principle of their capture. Literary research on methods of image segmentation in the area of cardiac tissue imaging and, last but not least, efforts to find methods for classification of dead cardiomyocytes and analysis of their viability. Dead cardiomyocytes were analyzed for their shape and similarity to the template created as a mean of dead cells. Another approach was the application of the method based on local binary characters and the computation of symptoms from a simple and associated histogram.

Keywords

Cardiomyocytes, data segmentation, template, local binary pattern (LBP), classification, support vector machine (SVM)

KREMLIČKOVÁ, L. *Hodnocení viability kardiomyocytů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 79 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jan Odstrčilík, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Hodnocení viability kardiomyocytů jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujícího zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

Lenka Kremličková

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Janu Odstrčilíkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne

.....

Lenka Kremličková

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Úvod | 11 |
| 1 Snímání buněk – kardiomyocytů..... | 12 |
| 1.1 Pozorování ve světlém poli..... | 12 |
| 1.2 Pozorování v temném poli..... | 13 |
| 1.3 Fázová kontrastní mikroskopie..... | 13 |
| 1.4 Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie..... | 14 |
| 1.5 Fluorescenční mikroskopie..... | 16 |
| 1.5.1 Epifluorescenční mikroskop | 16 |
| 1.6 Konfokální mikroskopie | 17 |
| 2 Základní metody segmentace obrazu | 19 |
| 2.1 Prahování | 19 |
| 2.2 Segmentace na základě hranové detekce | 20 |
| 2.2.1 Lokální operátory aproximující první derivaci | 20 |
| 2.2.2 Lokální operátory aproximující druhou derivaci | 21 |
| 2.2.3 Kombinace jednotlivých operátorů..... | 22 |
| 2.3 Segmentace na základě morfologických operací..... | 23 |
| 2.3.1 Eroze a dilatace | 23 |
| 2.3.2 Otevření a uzavření..... | 26 |
| 3 Texturní analýza | 27 |
| 3.1 Metody texturní analýzy | 27 |
| 3.2 Mikrostrukturní analýza | 28 |
| 4 Local Binary Pattern (LBP)..... | 30 |
| 4.1 Lokální binární operátor | 30 |
| 4.2 Základní LBP..... | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | Rotačně invariantní LBP (LBP^{ri}) | 33 |
| 4.4 | Rotačně invariantní uniformní LBP (LBP^{riu2}) | 33 |
| 4.5 | Rozšíření LBP | 34 |
| 5 | Popis příznaků zjišťovaných z histogramů z LBP | 35 |
| 5.1 | Histogramy a jejich výpočet z LBP | 35 |
| 5.1.1 | Jednoduchý 1D histogram | 35 |
| 5.1.2 | Sdružený 2D histogram | 36 |
| 5.2 | Příznaky textury | 36 |
| 6 | Klasifikace na základě získaných příznaků z LBP histogramů | 40 |
| 6.1 | Support vector machines (SVM) | 40 |
| 7 | Popis použitých dat | 42 |
| 8 | Popis použitých metod | 44 |
| 8.1 | Aplikace základních segmentačních metod | 44 |
| 8.1.1 | Vytvoření vzorové masky | 45 |
| 8.1.2 | Mikrostrukturní analýza | 46 |
| 8.1.3 | Procházení obrazu oknem 100 krát 100 px a 70 krát 70 px | 47 |
| 8.2 | Aplikace metody LBP | 50 |
| 8.2.1 | Výpočet LBP hodnot a lokálního kontrastu | 51 |
| 8.2.2 | Výpočet 1D a 2D histogramů a určení příznaků | 52 |
| 8.2.3 | Výpočet 1D a 2D příznaků z histogramů | 52 |
| 8.2.4 | Výběr příznaků pro klasifikaci | 52 |
| 8.2.5 | Trénování klasifikátoru SVM | 55 |
| 8.2.6 | Klasifikace celého obrazu | 56 |
| 9 | Zhodnocení dosažených výsledků | 58 |
| 9.1 | Hodnocení základních segmentačních metod | 58 |
| 9.2 | Hodnocení metody LBP | 61 |
| | Závěr | 64 |

| | |
|--|-----------|
| Seznam použité literatury | 66 |
| Seznam příloh | 69 |

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1.1 Schéma mikroskopu s fázovým kontrastem [4]..... | 14 |
| Obrázek 1.2 Schéma diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie [7]..... | 15 |
| Obrázek 1.3 Schéma fluorescenčního mikroskopu [5]..... | 17 |
| Obrázek 1.4 Schéma konfokálního mikroskopu [4]..... | 18 |
| Obrázek 2.1 Obraz a jeho řez zobrazující profily hran [9]..... | 20 |
| Obrázek 2.2 Schématické znázornění binární eroze [9]..... | 24 |
| Obrázek 2.3 Schématické znázornění binární dilatace [9]..... | 25 |
| Obrázek 4.1 Různé varianty rotačně symetrického okolí [18]..... | 31 |
| Obrázek 4.2 Submatice - centrální pixel a jeho okolí základní verze LBP [18]..... | 32 |
| Obrázek 4.3 Schématické znázornění výpočtu lokálních binárních znaků [9]..... | 32 |
| Obrázek 4.4 Uniformní vzory mající míru uniformnosti $U \leq 2$ [19]..... | 34 |
| Obrázek 6.1 Nelineární SVM - příklad jádrové transformace [24]..... | 41 |
| Obrázek 6.2 Optimálně rozdělující nadrovina a hraniční pásmo pro lineární SVM [24]..... | 41 |
| Obrázek 7.1 Ukázka 2 originálních obrázků..... | 43 |
| Obrázek 8.1 Vývojový diagram celého algoritmu..... | 44 |
| Obrázek 8.2 Vývojový diagram vytvoření vzorové masky..... | 45 |
| Obrázek 8.3 Vyplněná zprůměrovaná mrtvá buňka..... | 45 |
| Obrázek 8.4 Vývojový diagram mikrostrukturní analýzy..... | 46 |
| Obrázek 8.5 Výstup z mikrostrukturní analýzy..... | 46 |
| Obrázek 8.6 Výsledný erodovaný obraz..... | 47 |
| Obrázek 8.7 Vývojový diagram procházení obrazu oknem 100 krát 100px..... | 48 |
| Obrázek 8.8 Výsledný obraz po průchodu oknem 100 krát 100 px..... | 49 |
| Obrázek 8.9 Výsledný obraz s detekovanými mrtvými buňkami..... | 49 |
| Obrázek 8.10 Originální obraz 1..... | 50 |
| Obrázek 8.11 Originální obraz 2..... | 50 |
| Obrázek 8.12 Vývojový diagram LBP metody..... | 51 |
| Obrázek 8.13 Ukázka výřezů pozadí a buněk..... | 51 |
| Obrázek 8.14 Vybrané příznaky z 1D histogramu..... | 53 |
| Obrázek 8.15 Vybrané příznaky z 2D histogramu..... | 54 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 8.16 Vybrané příznaky z 2D histogramu - pokračování | 55 |
| Obrázek 8.17 Nasegmentovaný obraz | 56 |
| Obrázek 8.18 Výsledný obraz | 57 |
| Obrázek 9.1 Snímek číslo 9 | 60 |
| Obrázek 9.2 Snímek číslo 15 | 61 |
| Obrázek 9.3 Výsledný snímek číslo 1 | 63 |
| Obrázek 9.4 Výsledný snímek číslo 2 | 63 |

Úvod

Kardiomyocyty jsou základní stavební jednotkou srdečního svalu (myokardu). Jejich každodenní práce nám zajišťuje životaschopnost všech orgánů v těle, i srdce samotného. Díky nim totiž může neustále proudit tekutá tkáň, krev, do všech částí lidského těla. Živiny, teplo i důležité signální látky – za jejich dostatek ve všech orgánech jsou tyto buňky z velké části zodpovědné.

Živé buňky mají na rozdíl od těch v apoptóze nebo nekróze takové strukturní uspořádání, které jim umožňuje růst, vyvíjet se, plnit požadované funkce a dělit se v dceřiné buňky. Jejich tvar je tyčinkovitý na rozdíl od buněk mrtvých, které svůj tvar mění do kulata. Při umírání buňky tedy dochází ke strukturálním změnám uvnitř buňky i v membráně.

Cílem této diplomové práce je seznámení se s vlastnostmi obrazových mikroskopických dat kardiomyocytů a principem jejich snímání. Dále literární rešerše metod zabývajících se segmentací obrazu v oblasti zpracování obrazů srdeční tkáně a v neposlední řadě snaha o nalezení metod pro klasifikaci mrtvých kardiomyocytů a analýzu jejich viability.

V následujících kapitolách je shrnuto snímání obrazových dat různými typy mikroskopů, popsány základní segmentační metody, metody texturní analýzy a metody založené na lokálních binárních znacích. Následně popsána aplikace těchto metod na dostupná mikroskopická data kardiomyocytů a zhodnocení jejich úspěšnosti segmentace a detekce mrtvých buněk.

1 Snímání buněk – kardiomyocytů

Srdeční svalovina (myokard) je specializovaným typem svalové tkáně, která se skládá z buněk cylindrického tvaru (kardiomyocytů). Jádro kardiomyocytů je uloženo zpravidla uprostřed a až 25% jich může být dvoujaderných. Buňky jsou mezi sebou propojeny specializovanými mezibuněčnými kontakty, které se označují jako interkalární disky. Jeví se ve světelném mikroskopu jako příčně probíhající schodovité tmavší linie.

Srdeční buňky mají typicky délku 50-100 μm a šířku 10-20 μm . Každá buňka má několik krátkých bočních výběžků, odstupujících v ostrém úhlu, a konečné výběžky. Všechny výběžky se spojují s výběžky sousedních buněk. Kardiomyocyty jsou mezi sebou vázány řídký vazivem, v němž probíhají krevní a mízní cévy a nervy, a vytváří na povrchu buněk jemný obal (endomysium). [1] [2] [3]

1.1 Pozorování ve světlém poli

Zobrazení ve světlém poli patří mezi základní mikroskopické techniky. Světlo z kondenzoru prochází vzorkem a vstupuje do objektivu. Objekty vidíme díky tomu, že jsou schopny absorpcí zeslabovat intenzitu procházejícího záření. Proto je tato metoda vhodná jen pro objekty buď zcela nepropustné, nebo alespoň obarvené. Barvení objektů, které chceme pozorovat, patří jak mezi výhody tak i mezi nevýhody tohoto zobrazení. Výhodou barvení je to, že můžeme specificky obarvit různé biologické tkáně a získat tak informaci i o jejich chemickém složení. Hlavní nevýhodou barvení je toxicita použitých barev. Mezi další nevýhody této metody patří často nezbytná fixace a složitější příprava preparátů a nízký kontrast při pozorování většiny biologických vzorků. [4] [5]

1.2 Pozorování v temném poli

Zobrazení v temném poli umožňuje pozorovat detaily, které jsou při běžném pozorování (ve světlém poli) neviditelné. Podstatou je to, že do roviny objektu vstupují z kondenzoru temného pole pouze okrajové, velmi šikmé světelné paprsky, zatímco středové paprsky jsou pohlceny a při zobrazení se neuplatní. Objekt je tedy osvětlen jen ze stran, paprsky se od něj odrážejí a lámou. Do objektivu vstupují jen paprsky odražené od povrchu objektu a ten proto září v temném poli. Pro mikroskopii v temném poli se používají kondenzory opatřené centrální clonou. Účinnější jsou však speciální zrcadlové kondenzory, které mají lépe korigovanou otvorovou vadu a poskytují kvalitnější temné pole.

Mezi hlavní výhody patří to, že můžeme zobrazit živé buňky a není zapotřebí použití barviv. Mezi největší nevýhody patří to, že pro tvorbu obrazu je využita jen malá část světelné intenzity zdroje, který proto musí mít dostatečně vysoký výkon neboli silný světelný tok. [4] [6] [7]

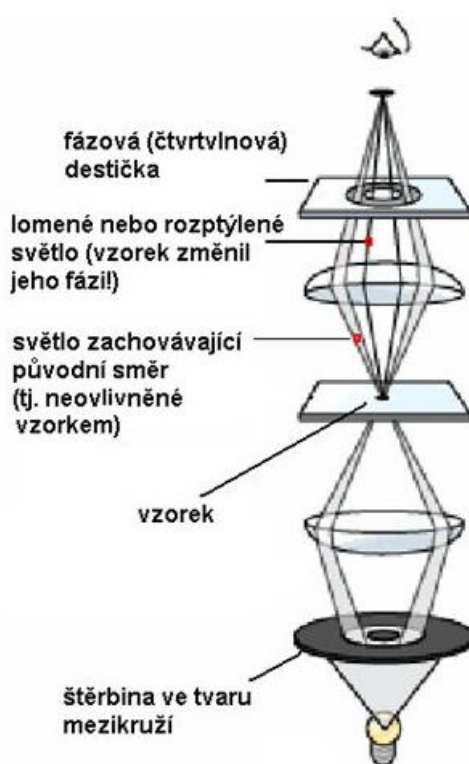
1.3 Fázová kontrastní mikroskopie

Mikroskopy využívající fázového kontrastu umožňují zviditelnit objekty, které se od svého okolí liší indexem lomu, jsou to tzv. fázové objekty. Při průchodu světelné vlny fázovým objektem nedochází ke změně její intenzity nýbrž k posunu její fáze, a to v závislosti na rozdílu indexu lomu dané struktury a jejího okolí, na délce optické dráhy i na vlnové délce světla.

Do optického systému kondenzoru je umístěna kruhová clona se zatemněným středem – světlo prochází jen úzkým mezikružím. Světelné paprsky dále projdou vzorkem, kde na fázových objektech dojde k odchýlení některých paprsků z původního směru. V zadní ohniskové rovině objektivu se nachází tzv. čtvrt vlnová destička (posunuje fázi o $+\pi/2$ nebo $-\pi/2$). Tato destička má opět tvar mezikruží, na které dopadnou především paprsky, které nezměnily svůj směr při interakci s fázovými objekty. Ostatní paprsky čtvrt vlnovou destičku minou, nejsou tedy fázově posunuty. [5]

Obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých. Jsou-li fázově posunuty paprsky se změněným směrem šíření, jeví se fázové objekty jako tmavší vůči svému pozadí, jedná se tedy o pozitivní fázový kontrast. Jsou-li posunuty paprsky nevychýlené ze svého směru, pak se fázové objekty jeví jako světlejší vůči svému okolí a jedná se o negativní fázový kontrast. [4]

Výhodou této metody je to, že fázově kontrastní mikroskopy umožňují pozorování živých objektů v nativním stavu bez jakéhokoliv barvení, z čehož vyplývá, že ani příprava preparátů není nijak výrazně časově náročná. Podmínkou však jsou tenké preparáty a malý útlum způsobený preparátem. [4] [7]



Obrázek 1.1 Schéma mikroskopu s fázovým kontrastem [4]

1.4 Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie

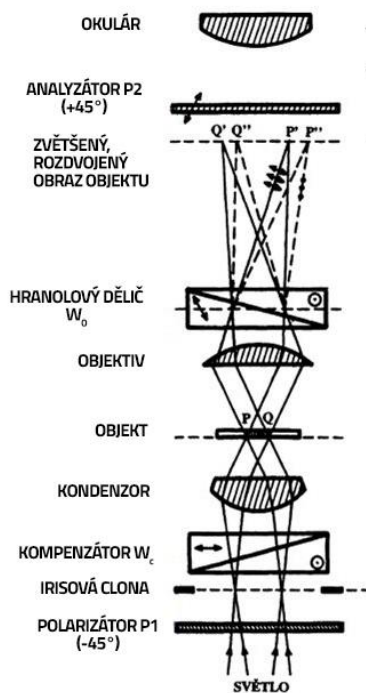
Interferenční mikroskopie je kontrastní metoda, která slouží, podobně jako mikroskopie s fázovým kontrastem, ke zvyšování kontrastu při pozorování průhledných

fázových objektů. Její aplikace je rozsáhlejší a účinnější, než fázový kontrast, je však mnohem složitější a náročnější a technické vybavení mikroskopu.

Světlo, vycházející z osvětlovací soustavy mikroskopu, je rozděleno do dvou koherentních svazků paprsků. Po průchodu preparátem a objektivem se oba svazky opět spojí do jediného. Projdou-li paprsky preparátem, vznikne mezi oběma svazky rozdíl fáze, způsobený strukturou fázového objektu. Následkem toho nastane ve spojeném svazku interference světelných vln, která obecně způsobí změny v amplitudě vlnění. Tak vzniknou kontrasty optické hustoty, což se projeví zviditelněním fázového objektu, který byl původně průhledný.

Rozdvojení paprsků na dva svazky a jejich opětovné spojení se provádí vložením Wollastonových a v pozdější modifikaci Nomarského hranolů. [4] [5] [6]

Tato metoda mikroskopie slouží stejně jako metoda fázového kontrastu ke zviditelnění živých buněk nebo jiných průhledných, nebarvených vzorků, které jsou při běžném použití světlého pole obtížně pozorovatelné. Oproti použití fázového kontrastu není tato metoda tolik zatížena tvorbou „halo“ jevu a může být použita k pozorování relativně tlustých preparátů. [4] [6]



Obrázek 1.2 Schéma diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie [7]

1.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopy jsou založeny na skutečnosti, že některé chemické látky (fluorochromy) po dopadu světla o kratší vlnové délce září světlem o delší vlnové délce – tedy světlem jiné barvy. Tento jev se nazývá fluorescence. Je projevem intramolekulové energetické změny vzbuzené v látce absorbovaným zářením. [5]

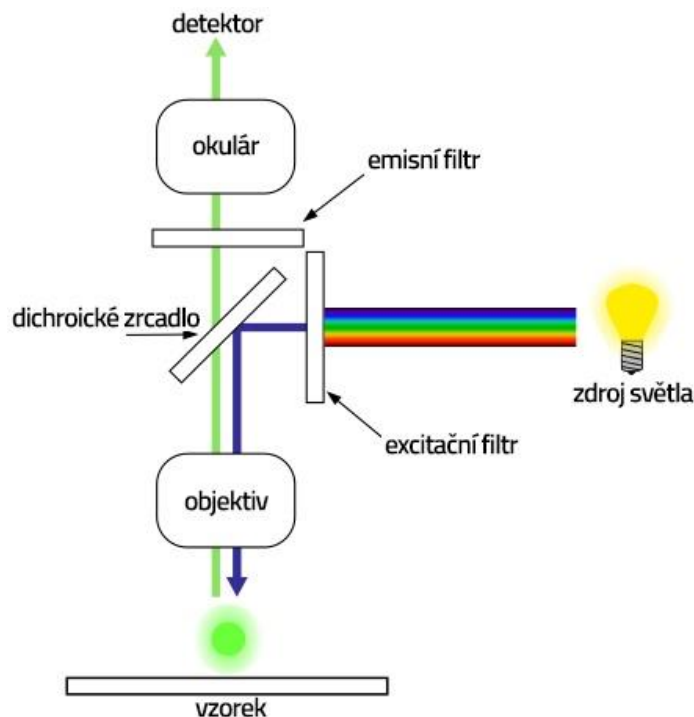
Mezi největší výhody fluorescenční mikroskopie patří vysoká citlivost, jelikož fluoreskující molekuly mohou být detekovány již při velmi malých koncentracích a mají vysoký kontrast vůči pozadí. Principiálně je fluorescenční mikroskop podobný klasickému světelnému, je ovšem doplněn o silný zdroj světla a dva typy filtrů – excitační a bariérový (emisní). Excitační filtr je umístěn mezi zdrojem světla a vzorkem a umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách. Naproti tomu bariérový (emisní) filtr je umístěn mezi vzorkem a okulárem a díky němu proniká do okuláru pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí. Excitující záření je odfiltrováno a tím je dosaženo vyšší citlivosti.

Mezi nevýhody fluorescenčních mikroskopů patří to, že lze zkoumat pouze vzorky o tloušťce menší, než je hloubka ostrosti objektivu, která závisí na jeho numerické apertuře. Při zkoumání silných vzorků je kvalita zobrazení nepříznivě ovlivňována překrýváním obrazu roviny, do níž je mikroskop právě zaostřen (ohnisková rovina), neostrými obrazy rovin ležících nad ní a pod ní. [8]

1.5.1 Epifluorescenční mikroskop

Excitační světlo prochází objektivem, na preparátu vyvolá fluorescenci a emitované světlo se vrací zpět do objektivu. U tohoto mikroskopu se využívá speciální dichroické zrcadlo, které odráží maximum excitačního světla do objektivu a propouští maximum emisního světla podle vlastností daného fluoroforu do okuláru. Dichroické zrcadlo odráží světlo kratší než je určitá vlnová délka a propouští světlo delší než je tato vlnová délka. [7]

[8]



Obrázek 1.3 Schéma fluorescenčního mikroskopu [5]

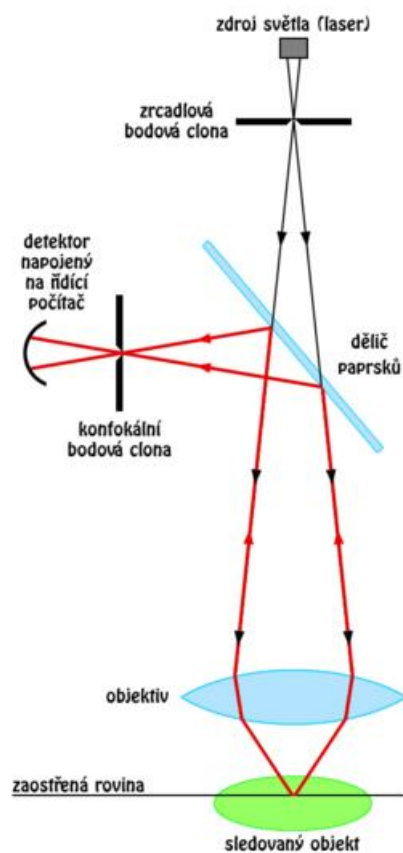
1.6 Konfokální mikroskopie

Světlo vychází z bodového zdroje – malého kruhového otvoru ve cloně osvětlované soustředěným laserovým světlem. Dále prochází polopropustným zrcadlem na čočku, která soustřeďuje paprsky do ohniska v preparátu. Paprsky odražené z tohoto ohniska procházejí touž čočkou zpět na polopropustné zrcadlo. Od polopropustného zrcadla se světlo nesoucí informaci o preparátu odráží na bodový otvor v další cloně, která je předsazena citlivému detektoru světla, obvykle fotonásobiči. Optický systém je seřízen tak, že otvorem v této cloně projdou pouze paprsky, které se odrazily od bodových struktur v zaostřené rovině. Všechny ostatní paprsky jsou clonou zachyceny. [5]

Největší výhodou konfokální mikroskopie je vyšší rozlišovací schopnost oproti fluorescenční mikroskopii daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Je to způsobeno přítomností bodové clony (pinhole), která eliminuje neostrý signál jak vertikálně tak i horizontálně z čehož vyplývá minimální hloubka ostrosti. Další výhodou je možnost

optické tomografie neboli 3D rekonstrukce obrazu, která není limitovaná Rayleighovým kritériem.

Mezi nevýhody patří to, že konfokální mikroskopie vyžaduje mimořádně silné zdroje světla typu laserů a speciální technologii detekce fotonů z horizontální roviny. Další nevýhodou je zatíženost statistickým šumem, jehož velikost je úměrná $\sqrt{N/N}$, kde N je počet detekovaných fotonů. Tuto nevýhodu nelze snadno řešit ani zvýšením intenzity záření. [8]



Obrázek 1.4 Schéma konfokálního mikroskopu [4]

2 Základní metody segmentace obrazu

Segmentace patří k základním krokům analýzy obrazu. Je to proces, ve kterém je obraz rozdělen na jednotlivé objekty nebo jejich části, a pozadí. Výsledkem je pak obraz stejných rozměrů jako originál, ve kterém jsou jednotlivé oblasti vyznačeny. Označovány mohou být jen hranice nebo celý obsah objektů, kde se tím pádem ztrácí obrazová informace z nitra oblastí. Segmentace je obvykle iterativní proces postupného zlepšování výsledné segmentace tak, aby postupně co nejlépe odpovídal apriorní interpretaci obrazu. [9]

2.1 Prahování

Prahováním segmentujeme obraz na základě jasů jednotlivých pixelů. Pro každou třídu parametru (jas) je nutné pomocí prahů stanovit jedinečný interval hodnot, který se nesmí překrývat s ostatními intervaly. Výsledkem prahování je nejčastěji binární obraz, kde pixely nabývají hodnot 0 pro pozadí a 1 pro popředí (objekty). Jestliže nastavíme práh T v obrazu $f(x, y)$, pak segmentovaný obraz $g(x, y)$ je dán rov. 2.1:

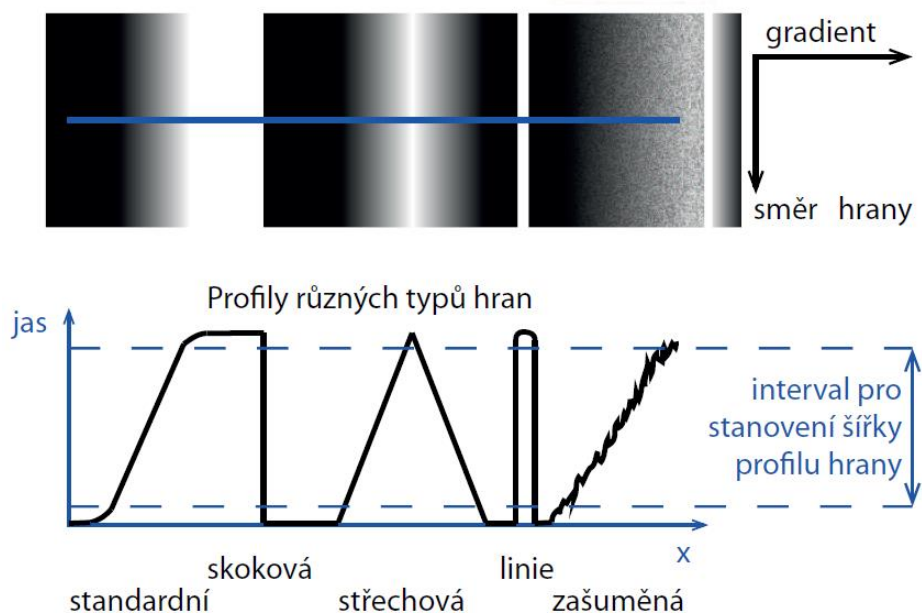
$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{jestliže } f(x, y) > T \\ 0 & \text{jestliže } f(x, y) \leq T \end{cases} \quad (2.1)$$

Jestliže je práh T konstanta použita pro celý obraz, operace se nazývá globální prahování. Jestliže se však hodnota prahu T mění v ploše obrazu, operace se nazývá lokální prahování. V posledním případě je práh T závislý na souřadnicích (x, y) , tím pádem není prostorově invariantní, a jedná se o dynamické neboli adaptivní prahování.

Nejjednodušší možností jak správně zvolit práh je pomocí histogramů. Obecně platí pomůcka, že pokud je to možné, tak se intervaly dělí v sedlech histogramů. Existují však i kvantitativní metody výpočtu optimálního prahu jako je např. metoda Otsu, Kapur, atd. K hlavním nevýhodám segmentace prahováním patří neschopnost správně segmentovat objekty, které jsou nasvětleny z jiné strany, než jsou pozorovány. V takovém případě se může stát, že vysegmentovaná část nebude odpovídat věcnému obsahu scény. Částečně lze tento nedostatek potlačit již dříve zmiňovaným adaptivním prahováním. [9] [10]

2.2 Segmentace na základě hranové detekce

Hranou je míněna dostatečně rychlá změna jasu v obraze. Čím je změna rychlejší (větší gradient hrany), tím je hrana v obraze zřetelnější a jednodušeji a přesněji detekovatelná. Na Obrázek 2.1 je vidět modelový obraz simulující různé typy hran (nahore) a jeho řez (dole) zobrazující profily jednotlivých hran (pozice řezu je naznačena modrou plnou čarou).



Obrázek 2.1 Obraz a jeho řez zobrazující profily hran [9]

Hranovou detekcí je v podstatě rozuměno transformování šedotónového obrazu na obraz binární, ve kterém bílé pixely reprezentují pozice hran a černé reprezentují pozice, na kterých hrana není. Většina hranových detektorů využívá dvou principů hranové detekce – metoda první a druhé derivace. V případě první derivace odpovídá největší změna lokálnímu extrému a v případě druhé derivace jde o průchod nulou. [9] [11]

2.2.1 Lokální operátory aproximující první derivaci

Existuje velké množství variant lokálních operátorů aproximujících první derivaci diferencemi např. Robertsův operátor (rov. 2.2, rov. 2.3), operátor Prewittové (rov. 2.4, rov. 2.5) a Sobelův operátor (rov. 2.6, rov. 2.7). Konvoluční masky operátorů jsou směrové, detekují tedy hrany pouze v určitém směru, a proto se označují jako „kompasové detektory“. V jiných směrech je odezva, buď velmi slabá, nebo žádná. Pro detekování hran

ve všech směrech se originál filtruje dvakrát, jednou maskou pro horizontální a druhou pro vertikální směr hrany. Výsledné obrazy se následně složí dohromady.

$$h_1 = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

$$h_2 = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

$$h_3 = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

$$h_4 = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

$$h_5 = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

$$h_6 = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

Výpočet výsledného obrazu $g_{i,k}$, který obsahuje aproximace gradientu pro všechny směry, je možné realizovat pomocí vzorce euklidovské vzdálenosti (rov. 2.8)

$$g_{i,k} = \sqrt{(\Delta_x f_{i,k})^2 + (\Delta_y f_{i,k})^2}, \quad (2.8)$$

kde $\Delta_x f_{i,k}$ odpovídá obrazu aproximujícímu gradient ve směru osy x a $\Delta_y f_{i,k}$ ve směru osy y. Alternativní možnosti výpočtu pak představují výrazy rov. 2.9 a rov. 2.10. [9] [10]

$$g_{i,k} \approx \max(\Delta_x f_{i,k}, \Delta_y f_{i,k}) \quad (2.9)$$

$$g_{i,k} \approx |\Delta_x f_{i,k}| + |\Delta_y f_{i,k}| \quad (2.10)$$

2.2.2 Lokální operátory aproximující druhou derivaci

Nejpoužívanějšími operátory, jejichž masky aproximují druhou derivaci, jsou Laplacián (rov. 2.11, rov. 2.12) a Laplacián Gaussianu (LoG) (rov. 2.13).

$$L_1 = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.11)$$

$$L_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.12)$$

$$LoG = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & -2 & -1 & 0 \\ -1 & -2 & 16 & -2 & -1 \\ 0 & -1 & -2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

Po konvoluci s vybranou maskou je nutné detekovat ve výsledném obrazu průchody nulou. K tomu lze využít opět maskový (lokální) operátor, tentokrát se však bude jednat o nelineární operaci. Masky o velikosti 3x3 má následující podobu (rov. 2.14)

Pracuje se tedy vždy se čtyřmi okolními sousedy každého analyzovaného pixelu. Aby do výstupního obrazu byla při dané pozici masky pod symbol x vložena jednička (označení, že se jedná o hranu), musí být splněny následující podmínky:

- nejméně jeden soused musí mít jiné znaménko než ostatní,
- rozdíl mezi značně odlišnými hodnotami různého znaménka je větší než definovaný práh,
- centrální hodnota musí ležet mezi těmito značně odlišnými hodnotami a na pozici symbolu x . [9] [10] [11]

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & x & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.14)$$

2.2.3 Kombinace jednotlivých operátorů

Mezi pokročilejší přístupy detekce hran je možné počítat například Cannyho detektor. Nejedná se o jeden konkrétní operátor, ale o posloupnost několika na sebe navazujících kroků. Zjednodušený postup lze popsat následujícími šesti kroky:

1. V originálním obrazu se filtruje šum pomocí Gaussianu (např. konvolucí v originální oblasti).
2. Detekují se hrany některým z kompasových detektorů ve všech směrech a vypočítá se absolutní hodnota gradientu v obrazu.
3. Vypočítá se směr gradientu podle následujícího vzorce (rov. 2.15):

$$\theta_{i,k} = \arctan \frac{\Delta_y f_{i,k}}{\Delta_x f_{i,k}}. \quad (2.15)$$

4. Určí se směr hrany v každém bodu a normalizuje se do jednoho ze čtyř směrů (horizontální, vertikální, jedna a druhá diagonála).

5. Sledování hrany (postup po hraně v jejím směru) se potlačí veškeré pixely, které nejsou vyhodnoceny jako hranové.
6. Prahování s hysterezi.[9]

2.3 Segmentace na základě morfologických operací

Morfologické operátory byly původně používány pro zpracování binárních obrazů jako například k analýzám tvarů binárních objektů, k dodatečnému zpracování hrubých hranových reprezentací, zjištění počtu objektů atd. Dnes jsou však tyto operátory zobecněny i pro práci s šedotónovými obrazy a našly své uplatnění v oblastech segmentace nebo zvýrazňování obrazů.

Morfologické operátory se do značné míry liší od všech ostatních operátorů. Obraz je chápán jako množina a v případě binárních obrazů se využívají množinové operace, jako jsou průnik, sjednocení, množinový doplněk, rozdíl, transpozice a inkluze. Všechny vyjmenované množinové operace tvoří základ morfologických operátorů, které jsou podobně jako konvoluční operátory lokální, a proto využívají masku, která se pohybuje po obrazu.

U morfologických operací spíše než o masce hovoříme o strukturním elementu, který má určitý referenční bod, pod jehož pozici se ukládá výsledek morfologické operace do výstupního obrazu. Strukturní element obsahuje pouze jedničky a nuly, jedničky tvoří aktivní prvky elementu a jejich rozmístění a počet musí být vždy volen s ohledem na konkrétní aplikaci. [9] [10]

2.3.1 Eroze a dilatace

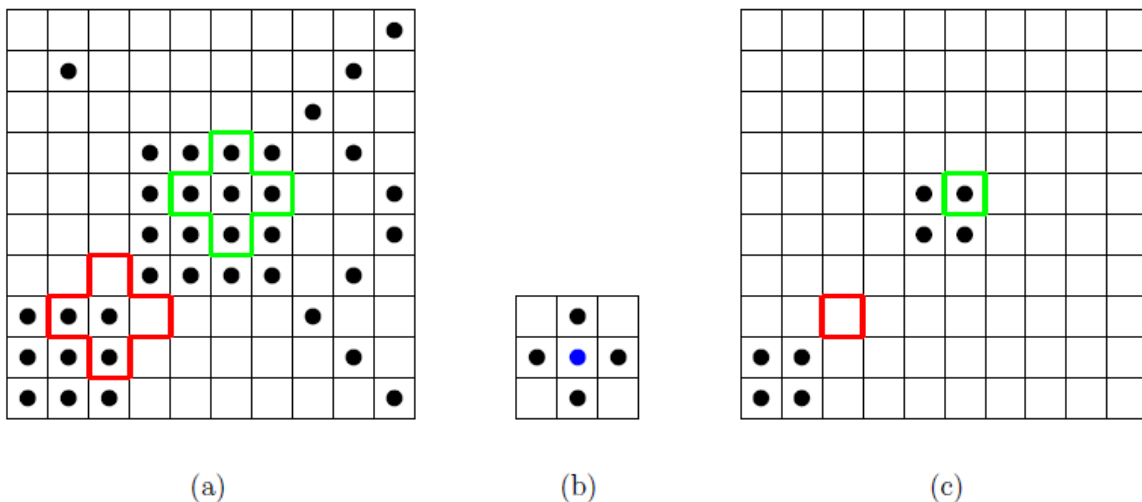
Operace eroze a dilatace jsou základními a také zásadními operacemi pro morfologické zpracování. Jejich vzájemné kombinace pak mohou tvořit morfologické otevírání nebo uzavírání obrazu. [15] [15] [15]

Eroze

Operátor binární eroze poskytuje pro každý pixel vstupního obrazu (i,k) odpověď na otázku: jsou pod všemi aktivními prvky strukturního elementu, který je položený na obraz, jedničky obrazu? Pokud ano, na pozici referenčního prvku strukturního elementu se do výstupního obrazu zapíše hodnota 1. Erozi můžeme popsat rovnicí (rov. 2.16), kde x představuje prostorové souřadnice obrazu, na kterých se vyskytuje referenční prvek strukturního elementu, H_x strukturní element posunutý na souřadnici x a X (Y) samotný vstupní (výstupní) obraz. [16][17]

$$Y = E_H(X) = \{x | H_x \subseteq X\} \quad (2.16)$$

Schématické znázornění binární eroze je na Obrázek 2.2. Aktivní prvky (jedničky) jsou znázorněny symbolem \bullet : (a) vstupní binární obraz se zvýrazněním aktivní \square a neaktivní \square polohy strukturního elementu, (b) strukturní element, jehož centrální prvek je označen symbolem \bullet , (c) výstupní erodovaný obraz s ukázkou bodu erozí odstraněného \square a neodstraněného \square . [9]



Obrázek 2.2 Schématické znázornění binární eroze [9]

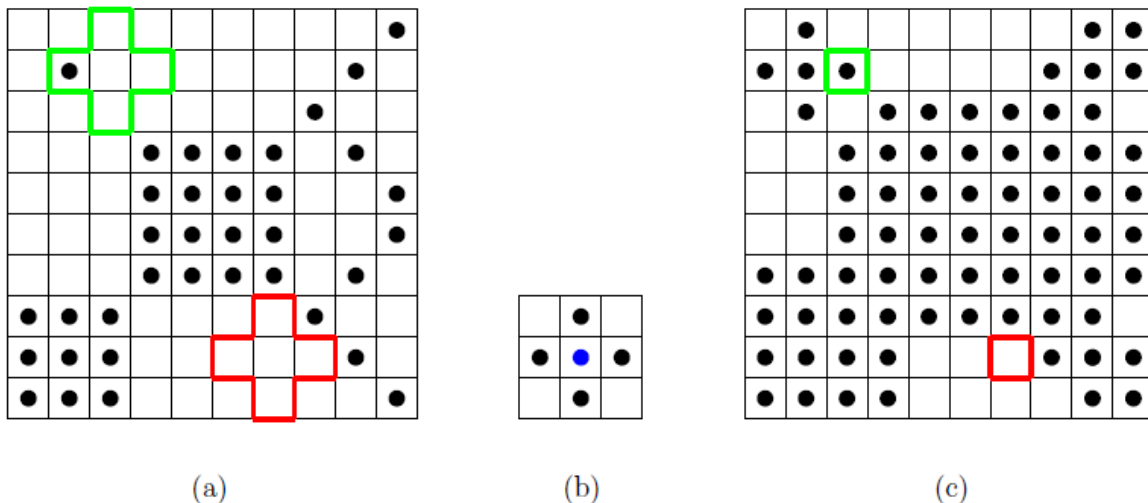
Z Obrázek 2.2 je patrné, že při erozi dochází k odstraňování, zmenšení a rozpojení objektů. Dále eroze zvýrazňuje tmavé detaily zvětšením jejich velikosti a má tendence zmenšovat a odstraňovat světlé detaily, obraz je tedy ve výsledku tmavší. [9] [17]

Dilatace

Operátor binární dilatace lze podobně jako erozi definovat otázkou: je aspoň pod jedním aktivním prvkem strukturního elementu, který je položen na vstupní obraz, jednička obrazu? Pokud ano, na pozici referenčního prvku strukturního elementu se do výstupního obrazu zapíše hodnota 1. Dilataci lze opět popsat rovnicí (rov. 2.17), která vyjadřuje vložení hodnoty jedna do výstupního obrazu na pozici centrálního prvku strukturního elementu x na pozicích, na kterých průnik aktivních prvků strukturního elementu a úseku obrazu, který je jím překrytý, není roven prázdné množně. [16][17]

$$Y = D_H(X) = \{x | H_x \cap X \neq \emptyset\} \quad (2.17)$$

Schématické znázornění binární dilatace je na Obrázek 2.3. Aktivní prvky (jedničky) jsou znázorněny symbolem \bullet : (a) vstupní binární obraz se zvýrazněním aktivních \square a neaktivní \square polohy strukturního elementu, (b) strukturní element, jehož centrální prvek je označen symbolem \bullet , (c) výstupní dilatovaný obraz s ukázkou bodu dilatací přidaných \square a neovlivněných \square . [9]



Obrázek 2.3 Schématické znázornění binární dilatace [9]

Z Obrázek 2.3 je patrné, že při dilataci dochází ke zvětšování objektů, vyplňování prázdných míst a propojování objektů. Dále při dilataci dochází k prostorovému rozšiřování světlých detailů, potlačení tmavých a výsledný obraz je tak světlejší. [9] [17]

2.3.2 Otevření a uzavření

Operace otevření a uzavření jsou operátory odvozené od již dříve zmíněné eroze a dilatace. Operace eroze a dilatace mění velikost objektů v obraze, což je v určitých případech jejich nevýhoda, a proto vznikly operace otevření a uzavření, které se snaží tuto nevýhodu eliminovat. Oba operátory jsou tvořeny zřetěžením operací eroze a dilatace za použití stejného strukturního elementu, přičemž pro výsledek je rozhodující pořadí provedení operací.

Účelem otevření a uzavření je ovlivnění malých objektů při současném přibližném zachování tvarů a velikostí velkých objektů. Operace otevření je kombinace eroze a následné dilatace, zatímco uzavření je tvořeno posloupností dilatace a následné eroze. Zásadní filtrační vliv má první operace a druhá slouží pouze k přibližné restauraci velkých objektů.

Vlastností otevření je, že eliminuje malé výběžky objektu do pozadí obrazu a zanechává stejně velké výběžky pozadí do objektu a dále má tendence k rozpojování propojených objektů. Naproti tomu binární uzavření má tendence k eliminaci děr a výběžků pozadí do objektů, dále také propojuje objekty, které leží blízko sebe. [9] [16][17]

3 Texturní analýza

Textura tvoří důležitou součást většiny přirozených obrazů včetně medicínských a lidské oko je schopno textury velmi dobře rozeznávat. Definice textury jako takové není jasná, obecně je však textura definována jako soubor jednoho či více typů primitiv, jejichž rozdíly intenzit barvy či jasu mají určité charakteristické vlastnosti podávající informaci o struktuře či povrchu objektu vnímaného jako homogenní celek. Obrazová textura je tak definována počtem a typem oněch primitiv a jejich prostorovým uspořádáním. [9] [10]

Na základě velikosti primitiv lze textury rozdělit na hrubé, které mají velká primitiva, a jemné s malými primitivy. Podle prostorového uspořádání primitiv lze rozlišovat textury silné, jejichž primitiva jsou uspořádána striktně pravidelně a textury slabé, které se vyznačují nepravidelným, náhodným nebo chaotickým uspořádáním primitiv. Poslední kritérium rozlišuje, zda lze v uspořádání primitiv vyzorovat určitou směrovost, pokud ne textura se označuje za izotropní. Pokud ano, textura je označena jako směrová. [9]

Při texturní analýze je snaha o odvození obecného kvantitativního popisu textury, na který by bylo možné aplikovat matematické operace za účelem vymezení oblastí textur jako základ segmentace či za účelem klasifikovat texturní oblast obrazu do některé třídy. [10]

3.1 Metody texturní analýzy

Metody texturní analýzy lze rozdělit na příznakové a syntaktické. Příznakové metody fungují na principu nalezení statistického popisu intenzity a pozice pixelů, přičemž pixely jsou charakterizovány vektorem příznaků a textura je reprezentována oblastí v mnohazměrném příznakovém prostoru. Syntaktické metody spočívají v nalezení všech primitiv, ze kterých se textura skládá. Textura je pak definována výčtem typů primitiv a jejich geometrickým uspořádáním (strukturou). Účelem je popsat komplexní strukturu nějakým jednodušším způsobem – například pomocí grafu. [20]

Účelem metod texturní analýzy je buď vymežit oblasti textur jako základ segmentace nebo klasifikovat oblasti obrazu s texturou do určité třídy. Kvůli dobrému prostorovému rozlišení je při segmentaci vhodné vyhodnocovat co nejmenší oblasti textury, zatímco při klasifikaci je nutné (kvůli přesnosti klasifikace) brát v potaz co největší oblast homogenní textury. Vždy je nutné volit kompromis mezi dostatečným prostorovým rozlišením (čili vyhodnocením malých oblastí) a přesností klasifikace, který se zvyšuje s vyhodnocováním větších oblastí textury. [9] [10]

3.2 Mikrostrukturní analýza

Mikrostrukturní analýza je vhodná pro segmentaci velmi jemných struktur jak již název napovídá. Metoda spočívá v opakované filtraci původního obrazu souborem konvolučních masek, čímž pro každý pixel vznikne vektor parametrů, který popisuje texturu na dané pozici.

Mikrostrukturní analýza využívá souboru devíti nebo pětadvaceti standardizovaných konvolučních masek, přičemž každá zvýrazňuje určitý rys, který může být pro danou texturu charakteristický. Soubory masek vycházejí ze tří základních jednorozměrných filtrů, které představují výpočet lokálního průměru (L – local average, rov. 3.1), zvýraznění hran (E – edge detection, rov. 3.2) a detekci bodů (S – spot detection, rov. 3.3).

$$L = [1 \quad 2 \quad 1] \quad (3.1) \quad E = [-1 \quad 0 \quad 1] \quad (3.2)$$

$$S = [-1 \quad 2 \quad -1] \quad (3.3)$$

Z dvojice jednorozměrných filtrů lze vytvořit dvourozměrný filtr pomocí konvoluce prvního s transponovanou verzí druhého filtru. Kombinací všech základních jednorozměrných filtrů lze vytvořit soustavu devíti matic, viz rov. 3.4 až rov. 3.12, které představují soubor konvolučních masek.

$$L * L^T = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.4) \quad L * E^T = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (3.5)$$

$$L * S^T = \begin{bmatrix} -1 & 2 & -1 \\ -2 & 4 & -2 \\ -1 & 2 & -1 \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

$$E * L^T = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

$$E * E^T = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.8)$$

$$E * S^T = \begin{bmatrix} -1 & 2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & -2 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.9)$$

$$S * L^T = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 2 & 4 & 2 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \quad (3.10)$$

$$S * E^T = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ 2 & 0 & -2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.11)$$

$$S * S^T = \begin{bmatrix} 1 & -2 & 1 \\ -2 & 4 & -2 \\ 1 & -2 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

Provedením konvoluce obrazu se všemi devíti maskami je vytvořen devítirozměrný parametrický prostor a je vypočtena energie každého jednotlivého prvku v tomto prostoru. Takto vytvořený parametrický prostor, kde je jeden pixel textury reprezentován bodem v devítirozměrném prostoru, poté vstupuje do klasifikačního algoritmu – např. shlukovací metoda k-means. [9] [10] [21]

4 Local Binary Pattern (LBP)

Lokální binární vzor je jednoduchý, avšak velmi účinný texturní operátor, který sjednocuje odlišné přístupy statistických a strukturálních modelů texturní analýzy. Snad nejdůležitější vlastností LBP operátoru v reálných aplikacích je jeho invariantnost vůči monotónním změnám jasu v obraze. Neméně důležitá je jeho výpočetní jednoduchost a rychlost výpočtu, která umožňuje analyzovat obrazy v reálném čase, dále pak paměťová nenáročnost a dobrá rozlišovací schopnost.

Dosažené úspěchy metody dokazují, že LBP má obrovský potenciál pro řešení mnoha důležitých úkolů v počítačovém vidění a práci s obrazy, které dříve ani nebyly považovány za předmět texturní problematiky. Náležitá výtěžnost informací z popisu textury může výrazně zvýšit výkon a spolehlivost řady úloh a systémů počítačového vidění, a pomoci k robustnosti a jednoduchosti technologií pro použití v reálných aplikacích. [22]

Metoda umožňuje prostorově invariantní texturní analýzu, která nespécifikuje texturu na úrovni pixelů, ale vytváří lokální vzory. LBP operátor pracuje na principu, kdy je obraz skenován pixel po pixelu, přičemž LBP hodnota každého pixelu je stanovena z jeho okolí prostřednictvím prahování a váhování. Díky tomu je postupně každý pixel textury popsán pomocí specifického LBP kódu. [18]

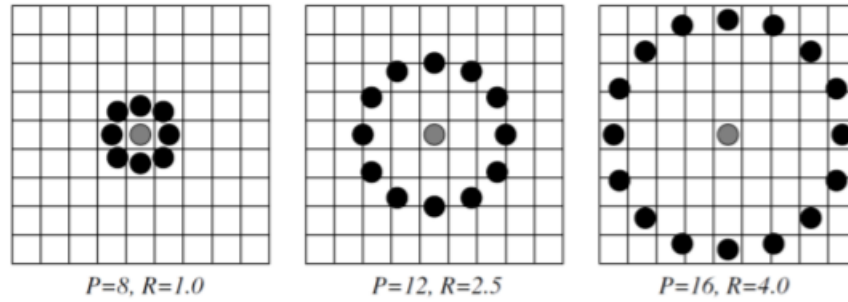
4.1 Lokální binární operátor

Texturu lokálního okolí šedotónového obrazu můžeme definovat jako sdruženou distribuci jasových hodnot $P+1$ obrazových pixelů:

$$T = t(g_C, g_0, \dots, g_{P-1}), \quad (4.1)$$

kde g_C je hodnota centrálního pixelu v lokálním okolí a g_0, g_1, \dots, g_{P-1} jsou hodnoty okolních pixelů, kterých je P . Počet okolních bodů a jejich vzdálenost od centrálního pixelu je dána hodnotami P a R , kdy uvažujeme g_C jako střed kružnice o poloměru R , na níž leží celkem P okolních pixelů. Parametr P tak předurčuje kvantování

v kruhovém prostoru a parametr R udává prostorové rozlišení. Různé varianty okolí centrálního pixelu jsou znázorněny na Obrázek 4.1 .



Obrázek 4.1 Různé varianty rotačně symetrického okolí [18]

Souřadnice jednotlivých pixelů jsou dány hodnotami:

$$x_p = x_c + R \cos \frac{2\pi p}{P}, y_p = y_c - R \sin \frac{2\pi p}{P}, p = 0, \dots, P - 1, \quad (4.2)$$

kde x a y jsou souřadnice centrálního pixelu. Pokud souřadnice vypočtené podle výše uvedeného vztahu neodpovídají přímo nějakému pixelu, je hodnota souřadnic získána pomocí interpolaci. Rovnici 4.1 tak můžeme upravit do následující podoby:

$$T = t(g_c) t(g_0 - g_c, \dots, g_{P-1} - g_c). \quad (4.3)$$

Jelikož člen g_c neobsahuje žádnou užitečnou informaci a texturu tedy charakterizuje jen druhý člen rovnice, můžeme upravit na:

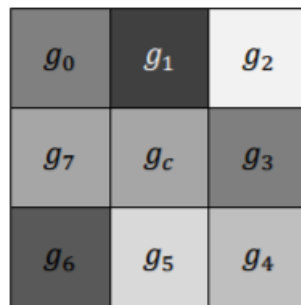
$$T = t(s(g_0 - g_c), \dots, s(g_{P-1} - g_c)), \text{ kde } s(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}. \quad (4.4)$$

Po aplikaci rovnice 4.3 (prahování) získáme binární kód, který je nutné převést na kód LBP. To provedeme váhování každého členu binárního kódu binomickou vahou 2^p . Výsledkem je unikátní LBP kód charakterizující obrazovou texturu v lokálním okolí viz rov. 4.5. [18]

$$LBP_{P,R}(x_c, y_c) = \sum_{p=0}^{P-1} s(g_p - g_c) 2^p \quad (4.5)$$

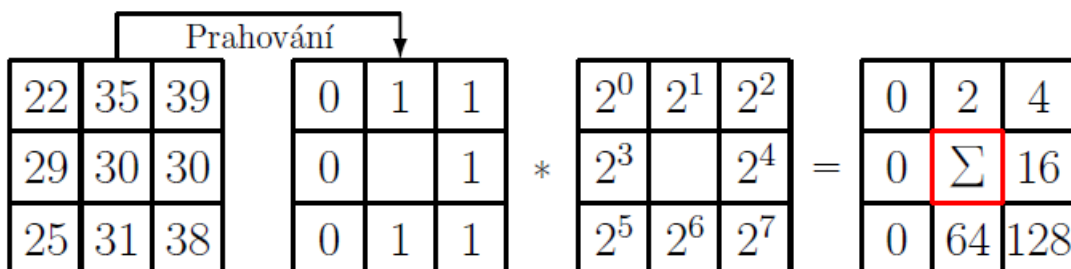
4.2 Základní LBP

Princip kódování, které slouží k výpočtu matice lokálních binárních znaků, je naznačen na Obrázek 4.3 . Obraz je procházen maskou o velikosti 3x3, která na každé pozici určuje aktuálně zpracovávanou submatici obrazu. Masky je schematicky znázorněna na Obrázek 4.2 .



Obrázek 4.2 Submatice - centrální pixel a jeho okolí základní verze LBP [18]

V rámci této submatice je provedeno prahování hodnot ležících mimo centrální prvek s hodnotou prahu rovnou jasnosti pixelu obrazu, který se nachází pod centrálním prvkem masky g_c . Je-li hodnota větší nebo rovna, vzhledem k hodnotě centrálního pixelu, na její místo připadne 1, je-li menší 0. Poté následuje váhování každého členu binárního kódu binomickou vahou 2^p . Lokální binární znak vznikne sumací prvků v kódované submatici a do parametrického prostoru se výsledek vloží pod centrální pixel masky.



Obrázek 4.3 Schématické znázornění výpočtu lokálních binárních znaků [9]

Pokud se okolí skládá z 8 pixelů, dostaneme celkem $2^8 = 256$ různých LBP hodnot reprezentujících rozložení textury v okolí centrálního pixelu. [9] [10] [18]

4.3 Rotačně invariantní LBP (LBP^{ri})

Základní algoritmus podle rov. 4.5 je rotačně variantní. To znamená, že výsledky pro pootočenou texturu jsou odlišné, neboť pootočená textura má odlišnou i šedotónovou distribuci hodnot. Je-li tedy obraz pootočen, jsou pootočeny i všechny prvky binární verze LBP kódu, a vznikají tak jiné LBP hodnoty. Nezávislost na rotaci je dosažena jednoduše tak, že ze všech možných natočení binárního vzoru textury vybírá takový, jenž je tvořen nejmenším binárním číslem:

$$LBP_{P,R}^{ri} = \min\{ROT(LBP_{P,R}i) \mid i = 0, 1, \dots, P - 1\}, \quad (4.6)$$

kde $ROT(x,i)$ značí i -tou iteraci bitového posunu binárního čísla x doprava. Aplikací této operace na lokální okolí zkoumaného bodu v obraze dochází k postupnému otáčení bodů po kružnici ve směru hodinových ručiček. Dochází ke značné redukci obrazovému prostoru (paměti), v případě $LBP_{8,R}$ získáme celkem 256 rotačně variantních LBP hodnot, ale jen 36 rotačně invariantních LBP hodnot.

V praxi se ukázalo, že tato metoda jako taková neposkytuje dobrou rozlišovací schopnost, a to ze dvou důvodů. Obrazy jsou zřídka otáčeny ve 45° intervalech, to vede k neefektivnosti $LBP_{8,R}$ operátoru při kvantování aktuálního úhlového prostoru. A navíc frekvence výskytu oněch 36 možných vzorů se hodně liší, některé se vyskytují jen zřídka, což má za následek statistickou nestabilitu metody. Aby se zabránilo těmto negativním vlastnostem, spíše než rotačně invariantní LBP je používána uniformní rotačně invariantní verze LBP. [18] [19] [22]

4.4 Rotačně invariantní uniformní LBP (LBP^{riu2})

Z důvodu zvýšení robustnosti LBP metody se výsledný deskriptor neskládá ze všech nalezených binárních vzorů v obraze. Množina vzorů je před dalším zpracováním zredukována pouze na vzory uniformní, které během testování prokázaly největší stabilitu. Uniformní vzory jsou zobrazeny na Obrázek 4.4 a ve své podstatě představují šablonu pro detekci světlých bodů (0), hran (1-7) a tmavých bodů či konstantních ploch v obraze (8).



Obrázek 4.4 Uniformní vzory mající míru uniformnosti $U \leq 2$ [19]

Uniformita binárního vzoru je určena tzv. mírou uniformnosti U , jejíž hodnota koresponduje s počtem přechodů 0/1 a 1/0 uvnitř binárního řetězce. Například, vzory 00000000_2 a 11111111_2 mají míru $U=0$, zatímco ostatní vzory na Obr. 4.4 mají míru $U=2$, jelikož obsahují právě dva přechody 0/1, resp. 1/0. Vzory s mírou uniformnosti o hodnotě maximálně dva jsou považovány za uniformní a $LBP_{P,R}^{ri}$ operátor popisující texturu v okolí zkoumaného bodu je nahrazen $LBP_{P,R}^{riu2}$ operátorem:

$$LBP_{P,R}^{riu2} = \begin{cases} LBP_{P,R}^{ri} & \text{pro } U(LBP_{P,R}) \leq 2, \\ P + 1 & \text{jinak,} \end{cases} \quad (4.7)$$

kde $U(LBP_{P,R})$ je definováno jako:

$$U(LBP_{P,R}) = |s(g_{P-1} - g_C) - s(g_0 - g_C)| + \sum_{p=1}^{P-1} |s(g_p - g_C) - s(g_{p-1} - g_C)|. \quad (4.8)$$

4.5 Rozšíření LBP

Samotný LBP operátor, ať už v jakékoliv verzi, často nezajistí dostatečné množství informace k přesnému určení textury. LBP operátor ve své podstatě zcela ignoruje velikosti jasových hodnot jednotlivých diferencí. V častých případech ale hraje kontrast důležitou roli. V takových případech je operátor doplněn o měření kontrastu a výsledkem je dvojrozměrná distribuce dvou vzájemně doplňujících se operátorů. Lokální kontrast $C_{P,R}$ je vypočten podle rov. 4.9. [20]

$$C_{P,R} = \frac{\sum_i^x g_i}{x} - \frac{\sum_j^y g_j}{y}, \quad (4.9)$$

kde

$$i = p \quad \forall (g_C - g_P) \leq 0 \quad a \quad j = p \quad \forall (g_C - g_P) > 0 \quad (4.10)$$

5 Popis příznaků zjišťovaných z histogramů z LBP

K popisu textury byl použit soubor příznaků. Samotná hodnota LBP a její okolí totiž ještě netvoří příznak textury, ten je určován histogramem všech LBP hodnot, z něhož jsou vypočteny konkrétní příznaky (vlastnosti) textury. Ke zjištění příznaků textury je využito výpočtu jak jednoduchého tak i sdruženého histogramu. Z jednoduchého šedotónového histogramu LBP distribuce je získáno celkem 6 příznaků popsaných blíže v podkapitole 5.2. Ze sdruženého histogramu je poté získáno dalších 14 příznaků dané textury blíže definovaných v podkapitole 5.2.

5.1 Histogramy a jejich výpočet z LBP

5.1.1 Jednoduchý 1D histogram

Jednoduchý histogram je sloupcový graf četností výskytu jednotlivých stupňů šedi v šedotónovém obrazu. Každý sloupec histogramu tedy vyjadřuje, kolikrát se daný stupeň šedi v obrazu vyskytuje a je zřejmé, že suma všech sloupců histogramu musí korespondovat s počtem pixelů v obrazu.

Dá-li se obraz považovat za realizaci náhodného pole a je-li jeho histogram normalizován tak, aby součet všech jeho sloupců byl roven jedné, představuje odhad funkce hustoty rozložení pravděpodobnosti stupňů šedi v daném obrazu. Každý sloupec pak vyjadřuje pravděpodobnost, že náhodně vybraný pixel bude nabývat daný stupeň šedi. Při vytváření histogramu dochází ke ztrátě poziční informace jednotlivých pixelů a z vytvořeného histogramu tedy nelze zpětně sestavit původní obraz.

Jednoduchý histogram počítaný z LBP distribuce je jednoznačně daný. Počet stupňů šedi je jednoznačně určen velikostí použitého rotačně invariantního uniformního LBP operátoru, přesněji (podle rov. 4.7) je počet úrovní n roven: [10] [20]

$$n = P + 2. \quad (5.1)$$

5.1.2 Sdružený 2D histogram

Sdružený histogram je definován pro dva obrazy A a B stejných rozměrů, s q resp. r stupni šedi. Je to matice četností současného výskytu různých kombinací jasů na odpovídajících si pozicích v obou obrazech. Sdružený histogram se vytváří prohledáním všech pozic v obrazech a zjištěním jednotlivých intenzit. Sdružený histogram je možné využít jak pro porovnání celých obrazů, tak i k porovnání jednotlivých malých oblastí v těchto obrazech.

V případě, že jsou si porovnávané obrazy zcela rovny, leží nenulové hodnoty na hlavní diagonále matice sdruženého histogramu. Pokud je jeden obraz odvozen od druhého, pomocí jasové transformační funkce, jsou nenulové hodnoty soustředěny do křivky, jejíž průběh odpovídá právě dané jasové funkci. [10] [20]

5.2 Příznaky textury

Jak již bylo zmíněno výše, pro popis textury bylo použito celkem 20 příznaků – 6 příznaků z jednorozměrného histogramu a 14 příznaků z dvojrozměrného histogramu.

Jednotlivé příznaky z jednorozměrného histogramu budou definovány následujícími rovnicemi (rov. 5.2 až rov. 5.7), kde N bude znázorňovat počet hodnot v histogramu, x_i je i-tá hodnota histogramu z celkových n hodnot.

Příznaky získané z jednorozměrného histogramu:

- střední hodnota (μ)

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} x_i i \quad (5.2)$$

- rozptyl (σ)

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} (x_i i)^2 - \mu^2} \quad (5.3)$$

- šikmost (g_1)

$$g_1 = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} x_i (i-\mu)^3}{\left[\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} (x_i i)^2 - \mu^2 \right]^{\frac{3}{2}}} \quad (5.4)$$

- křivost (g_2)

$$g_2 = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} x_i (i-\mu)^4}{\left[\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} (x_i i)^2 - \mu^2 \right]^2} - 3 \quad (5.5)$$

- energie (E)

$$E = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} x_i^2 \quad (5.6)$$

- entropie (S)

$$S = -\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} x_i \log(x_i) \quad (5.7)$$

Příznaky z dvojrozměrného histogramu budou definovány následujícími rovnicemi (rov. 5.8 až rov. 5.34), kde $M \times N$ jsou rozměry dvojrozměrného histogramu a $x_{i,j}$ je hodnota histogramu na pozici (i,j).

Příznaky získané z dvojrozměrného histogramu:

- energie (E_2)

$$E_2 = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j}^2 \quad (5.8)$$

- entropie (S_2)

$$S_2 = -\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j} \log(x_{i,j}) \quad (5.9)$$

- kontrast (K)

$$K = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (i-j)^2 x_{i,j} \quad (5.10)$$

- homogenita (H)

$$H = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \frac{x_{i,j}}{1+(i-j)^2} \quad (5.11)$$

- korelace (corr)

$$corr = \frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (i-j)x_{i,j} - \mu_r \mu_c}{\sigma_r \sigma_c} \quad (5.12)$$

$$\mu_r = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M p_{ri} \quad (5.13)$$

$$\mu_c = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N p_{cj} \quad (5.14)$$

$$\sigma_r = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (p_{ri} - \mu_r)^2} \quad (5.15)$$

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (p_{cj} - \mu_c)^2} \quad (5.16)$$

$$p_{ri} = \sum_{j=1}^N x_{i,j} \quad (5.17)$$

$$p_{cj} = \sum_{i=1}^M x_{i,j} \quad (5.18)$$

Předchozí dva výrazy jsou označovány jako suma řádků (rov. 5.17) a suma sloupců (rov. 5.18).

- cluster shade (CS)

$$CS = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (i - \mu_r + j - \mu_c)^3 x_{i,j} \quad (5.19)$$

- cluster prominence (CP)

$$CP = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (i - \mu_r + j - \mu_c)^4 x_{i,j} \quad (5.20)$$

- souhrnný průměr (SA)

$$SA = \sum_{i=2}^{M+N} i p_{(r+c)_i} \quad (5.21)$$

$$p_{(r+c)_k} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j}; k = i + j = 2, 3, \dots, M + N \quad (5.22)$$

- souhrnná variance (SV)

$$SV = \sum_{i=2}^{M+N} (i - SA)^2 p_{(r+c)_i} \quad (5.23)$$

- souhrnná energie (SE)

$$SE = - \sum_{i=2}^{M+N} p_{(r+c)_i} \log(p_{(r+c)_i}) \quad (5.24)$$

- diferenční rozptyl (DV)

$$DV = \sum_{i=0}^{\max(M,N)-1} \left(i - \sum_{i=0}^{\max(M,N)-1} i p_{(r-c)_i} \right)^2 p_{(r-c)_i} \quad (5.25)$$

$$p_{(r-c)_k} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j}; k = |i - j| = 0, 1, \dots, \max(M, N) - 1 \quad (5.26)$$

- diferenční energie (DE)

$$DE = \sum_{i=2}^{M+N} p_{(r-c)_i} \log(p_{(r-c)_i}) \quad (5.27)$$

- informační měření korelace (IMC₁)

$$IMC_1 = \frac{HRC - HRC_1}{\max\{HR, HC\}} \quad (5.28)$$

- informační měření korelace (IMC₂)

$$IMC_2 = \left(1 - e^{-2(HRC_2 - HRC)} \right)^2 \quad (5.29)$$

$$HR = - \sum_{i=1}^N p_{r_i} \log(p_{r_i}) \quad (5.30)$$

$$HC = - \sum_{i=1}^M p_{c_i} \log(p_{c_i}) \quad (5.31)$$

$$HRC = - \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j} \log(x_{i,j}) \quad (5.32)$$

$$HRC_1 = - \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N x_{i,j} \log(p_{r_j} p_{c_i}) \quad (5.33)$$

$$HRC_2 = - \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N p_{r_j} p_{c_i} \log(p_{r_j} p_{c_i}) \quad (5.34)$$

6 Klasifikace na základě získaných příznaků z LBP histogramů

Klasifikační metody jsou metody na třídění vstupních dat do konečného počtu tříd pomocí určitých algoritmů. Tyto algoritmy mohou být jednoduché – třídit na základě jednoduchých třídících pravidel až po složité funkce, které využívají mechanismů strojového učení. V nejobecnější pohledu je možné klasifikátory roztrždit na pevné a učenlivé. [25]

6.1 Support vector machines (SVM)

Support vector machines (SVM) je metoda strojového učení s učitelem, sloužící zejména pro klasifikaci a také pro regresní analýzu. Cílem klasifikace je nalézt nadrovinu, která prostor příznaků optimálně rozděljuje tak, že trénovací data náležející odlišným třídám leží v opačných poloprostorech. Optimální nadrovina je taková, že hodnota minima vzdáleností bodů od roviny je co největší.

SVM podle názvu pracuje se sadou tzv. podpurných vektorů (support vector), což jsou vstupní vektory, jejichž funkcí je podpora oddělovací nadroviny, která na nich spočívá. SVM je možné rozdělit na lineární a nelineární. V lineárním případě jsou data vstupující do klasifikátoru lineárně separovatelná. V opačném případě je možnost převést vstupní data do vyšší dimenze a tím se stanou lineárně separabilní v naddimenzi. Do prostoru vyšší dimenze lze transformovat prostor příznaků na základě tzv. jádrové transformace (kernel transformation). K výběru vhodné jádrové transformace dochází intuitivně na základě podobnosti vstupních dat. Mezi často používané jádrové transformace patří (rov. 6.1 – rov. 6.3):

- polynomiální se stupněm polynomu p

$$K(x, y) = (x * y + 1)^p \quad (6.1)$$

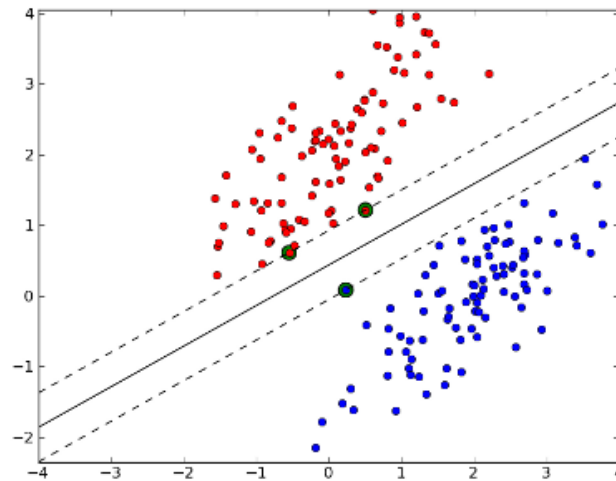
- radiální bázová funkce

$$K(x, y) = e^{-(x-y)^2/2\sigma^2} \quad (6.2)$$

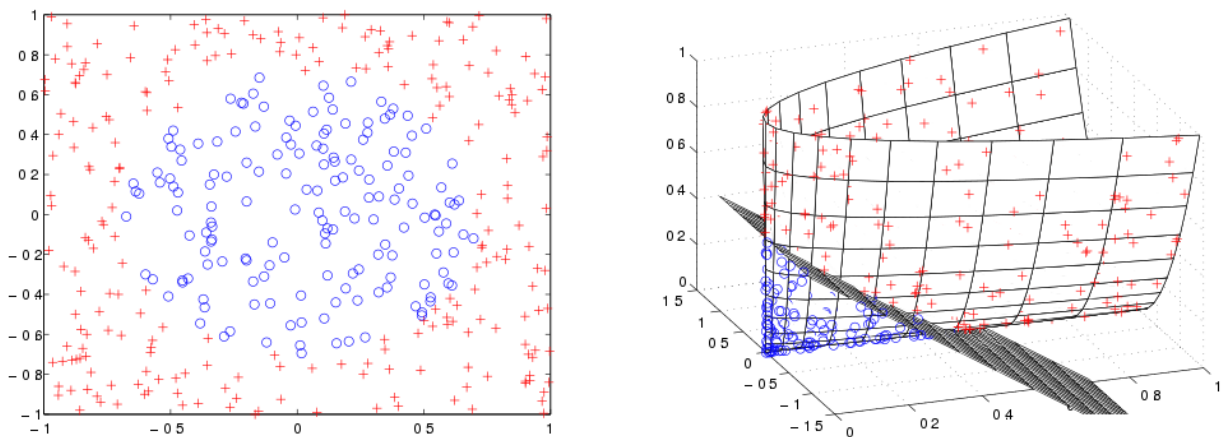
- sigmoidální

$$K(x, y) = \tanh(\gamma * x * y - \delta) \quad (6.3)$$

Na Obrázek 6.2 je znázorněna optimálně rozdělující nadrovina a hraniční pásmo pro lineární SVM. Body na okrajích pásma jsou podpurné vektory. Zatímco na Obrázek 6.1 je ilustrován příklad jádrové transformace, kdy jsou původní data ve 2D prostoru a je zcela zřejmé, že nejsou lineárně separabilní (vlevo). Po transformaci do 3D prostoru je lze rozdělit rovinou a již jsou lineárně separabilní v této vyšší dimenzi (vpravo). [23] [24]



Obrázek 6.2 Optimálně rozdělující nadrovina a hraniční pásmo pro lineární SVM [24]



Obrázek 6.1 Nelineární SVM - příklad jádrové transformace [24]

7 Popis použitých dat

Pro analýzu v programovém prostředí MATLAB bylo využito 27 dostupných snímků kardiomyocytů, na kterých jsou znázorněny dvě stádia těchto buněk – živé a mrtvé buňky. Ukázka dvou originálních obrázků a jejich převedení do šedotónového zobrazení, ve kterém probíhala další analýza je zobrazen na Obrázek 7.1. Jak již bylo popsáno výše, živé buňky mají tvar tyčinkovitý, zatímco mrtvé buňky mají tvar kulovitý.

Živé buňky mají na rozdíl od těch v apoptóze nebo nekróze takové strukturální uspořádání, které jim umožňuje růst, vyvíjet se, plnit požadované funkce a dělit se v dceřiné buňky. Při umírání buňky tedy dochází ke strukturálním změnám uvnitř buňky i v membráně. Například za normálního stavu polopropustná membrána se stává propustnou i pro makromolekuly a organely, bez kterých buňka není schopna dále přežít. K určení životnosti buněk se nejčastěji používají fluorescenční a kolorimetrické testy, ale lze využít i testy radionuklidové.

Mezi základní barviva, která se používají ke kolorimetrickým testům je trypanová modř. Základní princip této metody spočívá v tom, že živé buňky mají nepoškozené membrány a tudíž barvivo do cytoplazmy propouštějí jen velmi málo a buňka jej neustále aktivně transportuje přes membránu do extracelulárního okolí. Mrtvé buňky jsou touto modří naopak zviditelněny. K vyhodnocení viability pak stačí dát analyzovaný vzorek pod světelný mikroskop a určovat počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých čtverečcích komůrky. Po obarvení je potřeba buňky analyzovat během pěti minut. Později se některé živé buňky mohou stát propustné a také se zabarvit, což je problematické při stanovování viability buněk. Ukázka obarvení mrtvých kardiomyocytů na dostupných datech je znázorněno i na Obrázek 7.1. [14]

originál snímku číslo 13



originál snímku číslo 22



převod do šedotónového formátu



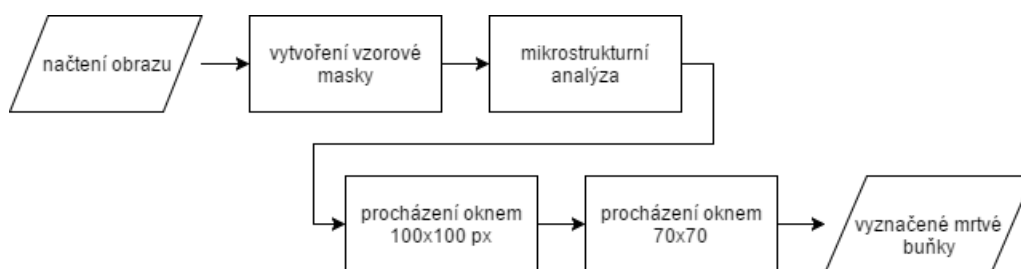
Obrázek 7.1 Ukázka 2 originálních obrázků

8 Popis použitých metod

Jak již bylo popsáno výše, k dispozici bylo 27 snímků kardiomyocytů. Na většinu z nich (25 snímků) byly pro segmentaci mrtvých buněk použity základní segmentační metody – prahování, morfologické operace, mikrostrukturní analýza atp. Tento postup byl aplikován proto, že u těchto snímků byla špatně patrná jejich vnitřní struktura (textura), a proto byly hodnoceny pouze z hlediska jejich tvaru a podobnosti se vzorovou maskou vytvořenou jako průměr z mrtvých buněk viz dále v podkapitole 8.1. Na zbývající dva snímky kardiomyocytů, kde byla dobře patrná jejich vnitřní struktura, byla aplikována metoda texturní analýzy založená na lokálních binárních znacích (LBP) – viz dále v podkapitole 8.2.

8.1 Aplikace základních segmentačních metod

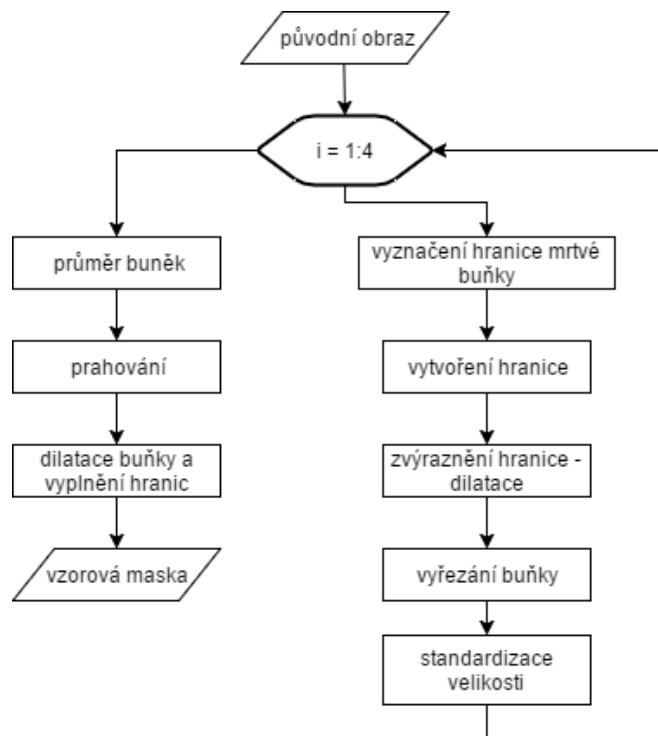
Na 25 snímků kardiomyocytů byly aplikovány základní segmentační metody. Vývojový diagram celého algoritmu je znázorněn na Obrázek 8.1. Vstupem do celého algoritmu byl originální obraz kardiomyocytů a výstupem obraz s červeně vyznačenými mrtvými buňkami. Prvním krokem algoritmu bylo vytvoření vzorové masky z mrtvých buněk, jejíž velikost a počet pixelů slouží pro další srovnávání a analýzu. Na původní obraz byla aplikována mikrostrukturní analýza pro segmentaci pozadí a buněk. Dále byl nasegmentovaný obraz procházen nejprve oknem 100 krát 100 px a poté 70 krát 70 px a pomocí podmínek a srovnání se vzorovou maskou vybrány mrtvé buňky, které byly obarveny na červeně pro lepší názornost.



Obrázek 8.1 Vývojový diagram celého algoritmu

8.1.1 Vytvoření vzorové masky

Vývojový diagram vytvoření vzorové masky je znázorněn na Obrázek 8.2, kdy je maska vytvořena z originálního obrazu. Jak je naznačeno ve vývojovém diagramu, ve for cyklu je vyznačena pomocí příkazu *roipoly* hranice mrtvé buňky, která je dále dilatována (zvýrazněna) a vyřezána. Všechny vyřezané hranice mrtvých buněk jsou standardizovány na velikost 100 krát 100 px. Nakonec jsou vyznačené hranice buněk zprůměrovány a naprahovány tak, že obrys buňky je tvořen jedničkami a okolí nulami. Takto naprahovaná mrtvá buňka je dilatována a vyplněna jedničkami viz Obrázek 8.3. Tato upravená mrtvá buňka slouží jako vzorová maska pro srovnání s buňkami v originálním obrazu z pohledu velikosti a počtu pixelů a je výstupem z této části algoritmu.



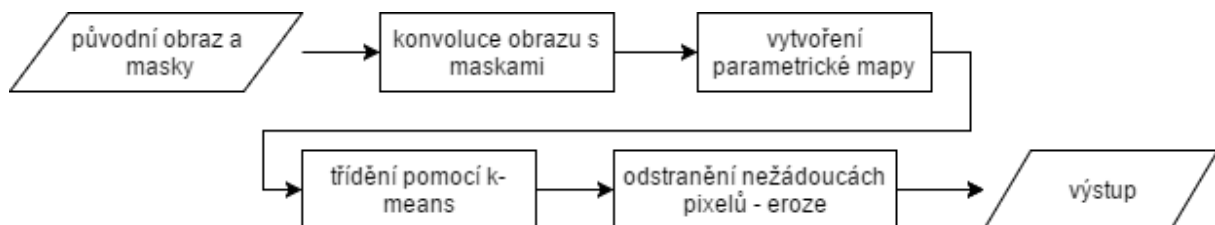
Obrázek 8.2 Vývojový diagram vytvoření vzorové masky



Obrázek 8.3 Vyplněná zprůměrovaná mrtvá buňka

8.1.2 Mikrostrukturní analýza

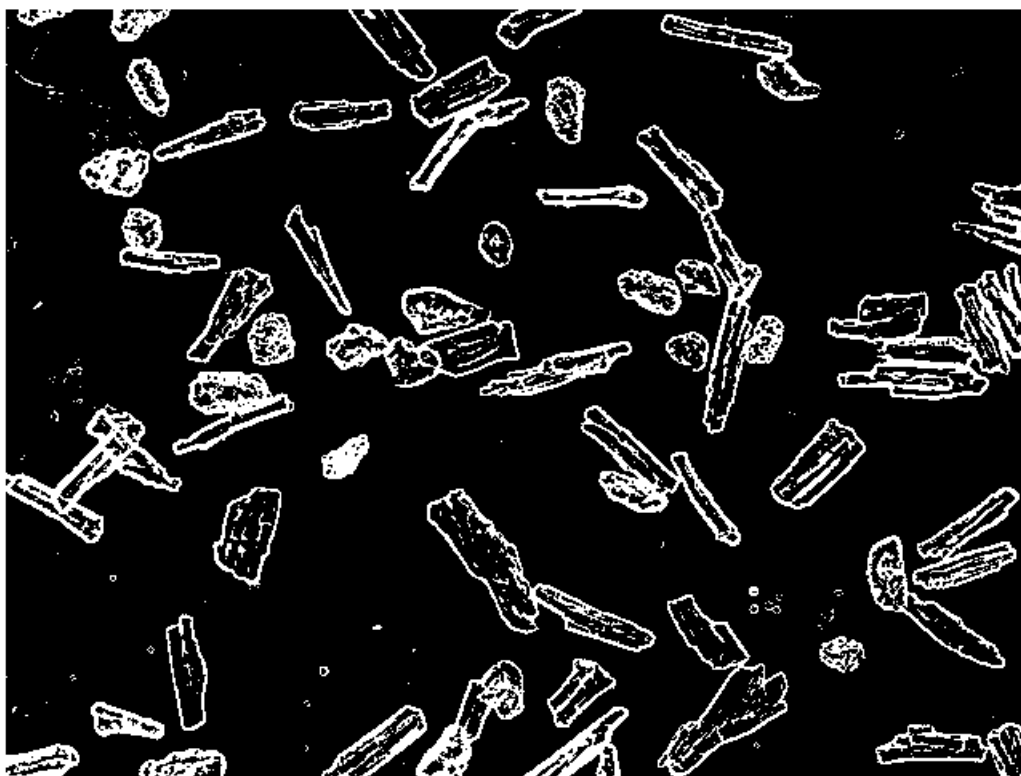
Dalším krokem je mikrostrukturní analýza založená na konvoluci obrazu s devíti maskami reprezentující základní jednorozměrné filtry viz podkapitola 3.2. Vývojový diagram mikrostrukturní analýzy je znázorněn na Obrázek 8.4. Do mikrostrukturní analýzy vstupuje originální obraz, který je konvolován s devíti maskami. Výstupem z této konvoluce je parametrická mapa, který je setříděna pomocí shlukovací metody k-means do 2 tříd (buňky a pozadí). Výstupem je tak binární obraz, kdy buňky jsou reprezentovány jedničkami, a pozadí nulami viz Obrázek 8.5. Z důvodu odstranění nežádoucích pixelů je na obraz aplikována morfologická operace eroze. Výstupem z této části algoritmu je tak erodovaný obraz znázorněný na Obrázek 8.6.



Obrázek 8.4 Vývojový diagram mikrostrukturní analýzy



Obrázek 8.5 Výstup z mikrostrukturní analýzy



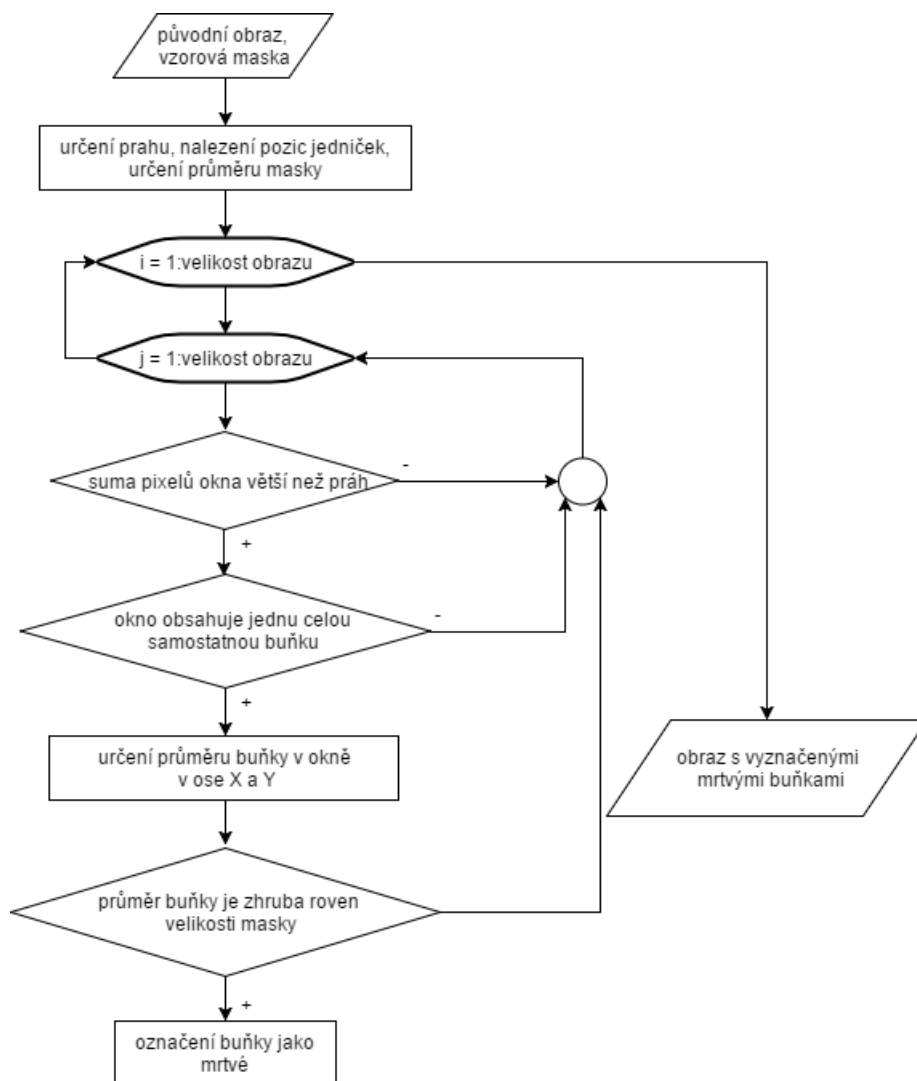
Obrázek 8.6 Výsledný erodovaný obraz

8.1.3 Procházení obrazu oknem 100 krát 100 px a 70 krát 70 px

Posledním krokem algoritmu je procházení obrazu oknem velikosti 100 krát 100 pixelů a poté oknem 70 krát 70 pixelů. Vývojový diagram této části algoritmu je znázorněn na Obrázek 8.7. Vstupem je obraz upravený pomocí mikrostrukturní analýzy a vzorová maska. Nejprve je zjištěna suma pixelů v masce (viz Obrázek 8.3) a na základě této sumy je zvolen práh jako 20% z této sumy. Následně jsou nalezeny první a poslední pozice jedniček v ose x a v ose y u masky a vypočtena průměrná velikost vzorové masky v ose x a v ose y.

Obraz je procházen ve dvou for cyklech, ve kterých jsou kontrolovány jednotlivé podmínky. Pokud jakákoliv z dále zmiňovaných podmínek neplatí, daný krok for cyklu se přeruší a přejde na další. První z podmínek je ověření, že suma pixelů okna je větší než již dříve zmiňovaný práh. Další z podmínek je pro ověření toho, že v okně se nachází celá buňka, která je ohraničená minimálně z každé strany jedním prázdným řádkem respektive sloupcem. Poslední podmínkou je srovnání průměrné hodnoty vzorové masky s průměrnou hodnotou buňky v ose x a v ose y. Pokud všechny tyto zmiňované podmínky platí je buňka v okně obarvena na červeno pro lepší názornost a zvýraznění. Výsledný obraz po průchodu oknem 100 krát 100 pixelů je znázorněn na Obrázek 8.8.

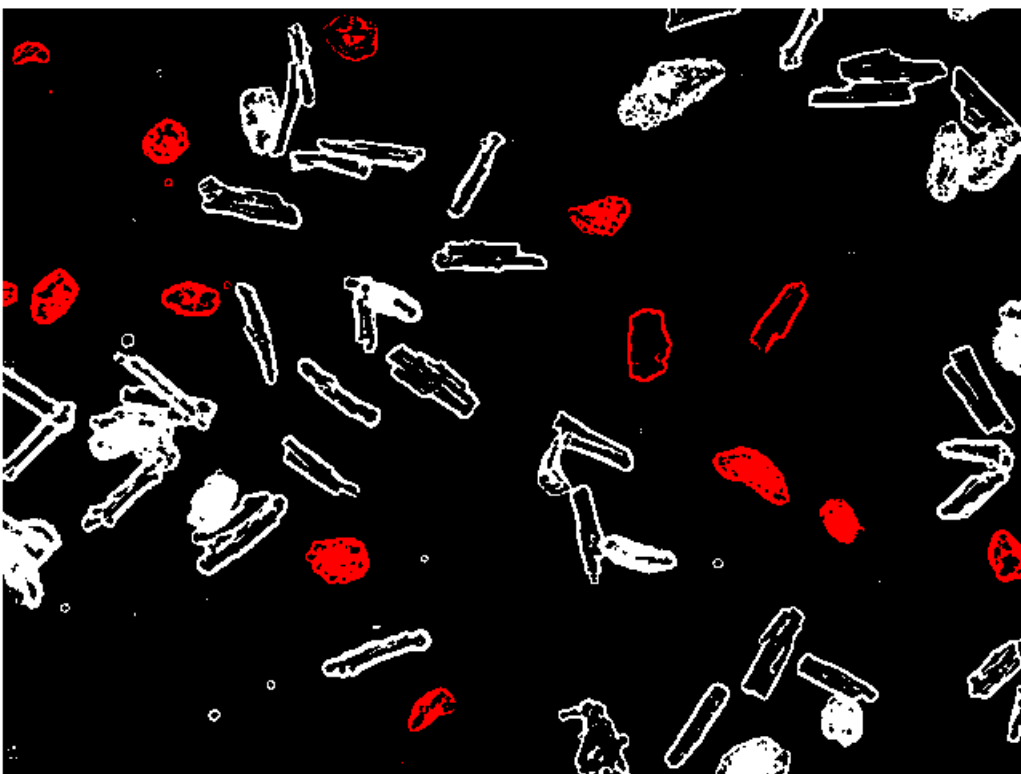
Po průchodu obrazu oknem 100 krát 100 pixelů je obraz procházen oknem 70 krát 70 pixelů. Pro tuto část algoritmu je nutné změnit velikost vzorové masky na velikost 70 krát 70 pixelů, aby byla jeho velikost přizpůsobena velikosti okna. Jednotlivé podmínky jsou kontrolovány stejně jak v předchozí části. Procházení oknem 70 krát 70 pixelů slouží pro detekci menších buněk, které v předchozím kroku nebyly detekovány. Výsledný obraz s detekovanými buňkami je znázorněn na Obrázek 8.9.



Obrázek 8.7 Vývojový diagram procházení obrazu oknem 100 krát 100px



Obrázek 8.8 Výsledný obraz po průchodu oknem 100 krát 100 px



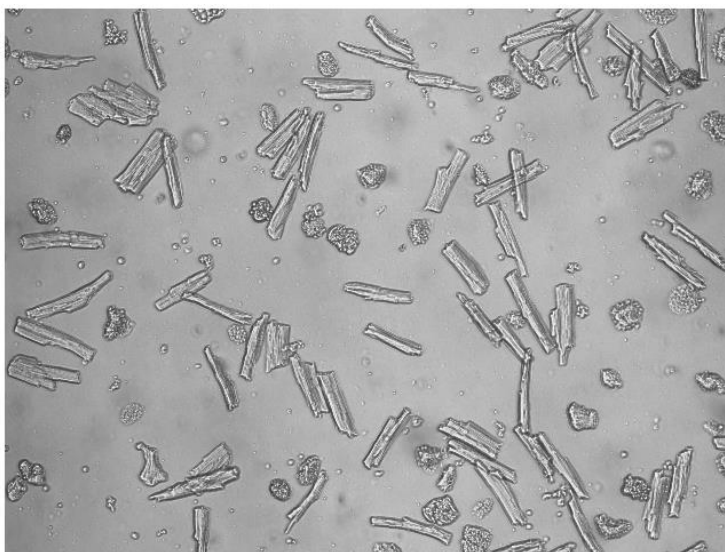
Obrázek 8.9 Výsledný obraz s detekovanými mrtvými buňkami

8.2 Aplikace metody LBP

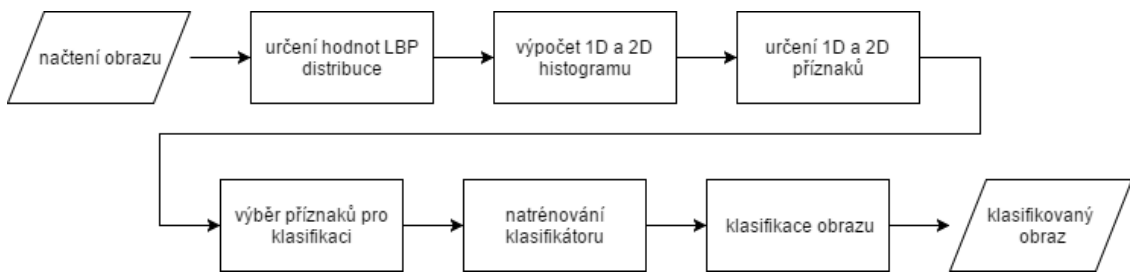
Jak již bylo řečeno výše metoda založená na lokálních binárních znacích (LBP) byla aplikována na 2 obrazy, na kterých byla dobře viditelná struktura jednotlivých buněk, na základě které byly klasifikovány a rozlišeny. Tyto obrazy jsou znázorněny na Obrázek 8.11 a Obrázek 8.10. Vývojový diagram celého algoritmu aplikovaného na obrazy je znázorněn na Obrázek 8.12.



Obrázek 8.11 Originální obraz 1



Obrázek 8.10 Originální obraz 2



Obrázek 8.12 Vývojový diagram LBP metody

8.2.1 Výpočet LBP hodnot a lokálního kontrastu

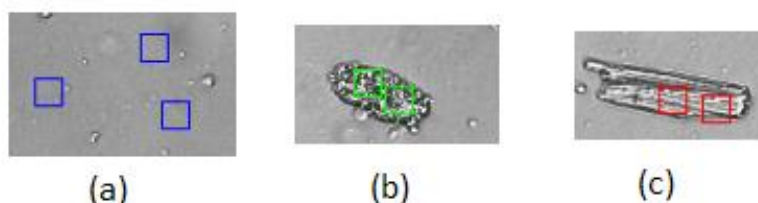
K výpočtu LBP hodnot byla použita funkce, která transformuje vstupní obraz (matici hodnot) na rotačně invariantní uniformní verzi LBP. Vstupem do této funkce je tedy vstupní obraz případně výřez obrazu, dále počet okolních pixelů kolem centrálního pixelu (P) a vzdálenost bodů od centrálního pixelu (R). Tato funkce je vytvořena na základě rov. 4.7.

$$\text{function } LBP = lbp_riu2(P, R, vstup)$$

Obdobnými funkcemi jsou funkce pro výpočet lokálního kontrastu podle rov. 4.9. Vstupní parametry jsou identické jako u funkce pro výpočet rotačně invariantní uniformní verze LBP.

$$\text{function } C = contrast(P, R, vstup)$$

LBP hodnoty byly spočítány na 70 vzorcích pozadí, mrtvých buněk a živých buněk na obou obrazech, takže ve výsledku je soubor výřezů tvořen 140 vzorky pozadí, mrtvých a živých buněk. Ukázka výřezů je na Obrázek 8.13, kde (a) znázorňuje pozadí, (b) mrtvou buňku a (c) buňku živou.



Obrázek 8.13 Ukázka výřezů pozadí a buněk

8.2.2 Výpočet 1D a 2D histogramů a určení příznaků

Pro výpočet jednoduchého a sdruženého histogramu jsou využity funkce hist1D a hist2D. Vstupem do těchto funkcí je parametrický obraz z LBP distribuce respektive více obrazů; například LBP distribuce, lokální kontrast apod. Dalším vstupním parametrem je nbins, který určuje rozsah hodnot vstupní matice, tj. rozměr výstupního histogramu. U sdruženého histogramu jsou to parametry nbins1 a nbins2 – pro první a druhou vstupní matici, rozměr výstupního sdruženého histogramu je pak nbins1 x nbins2. Výstupem funkcí je samotný histogram a počet pixelů vstupní matice.

$$\text{function [histogram,pocet] = hist1D(vstup, nbins)}$$
$$\text{function [histogram,pocet] = hist2D(vstup1,vstup2, nbins1,nbins2)}$$

8.2.3 Výpočet 1D a 2D příznaků z histogramů

Příznaky z jednoduchého histogramu a sdruženého histogramu jsou vypočteny na základě rov. 5.2 až rov. 5.34. Pro přehlednost je výpočet rozdělen do čtyř samostatných funkcí. Vstupem je vždy histogram a výstupem hodnoty příznaků. Pro jednoduchý histogram se jedná o funkci hist_params.

$$\text{function [mi,sigma,g1,g2,energy,entropy] = hist_params(vstup)}$$

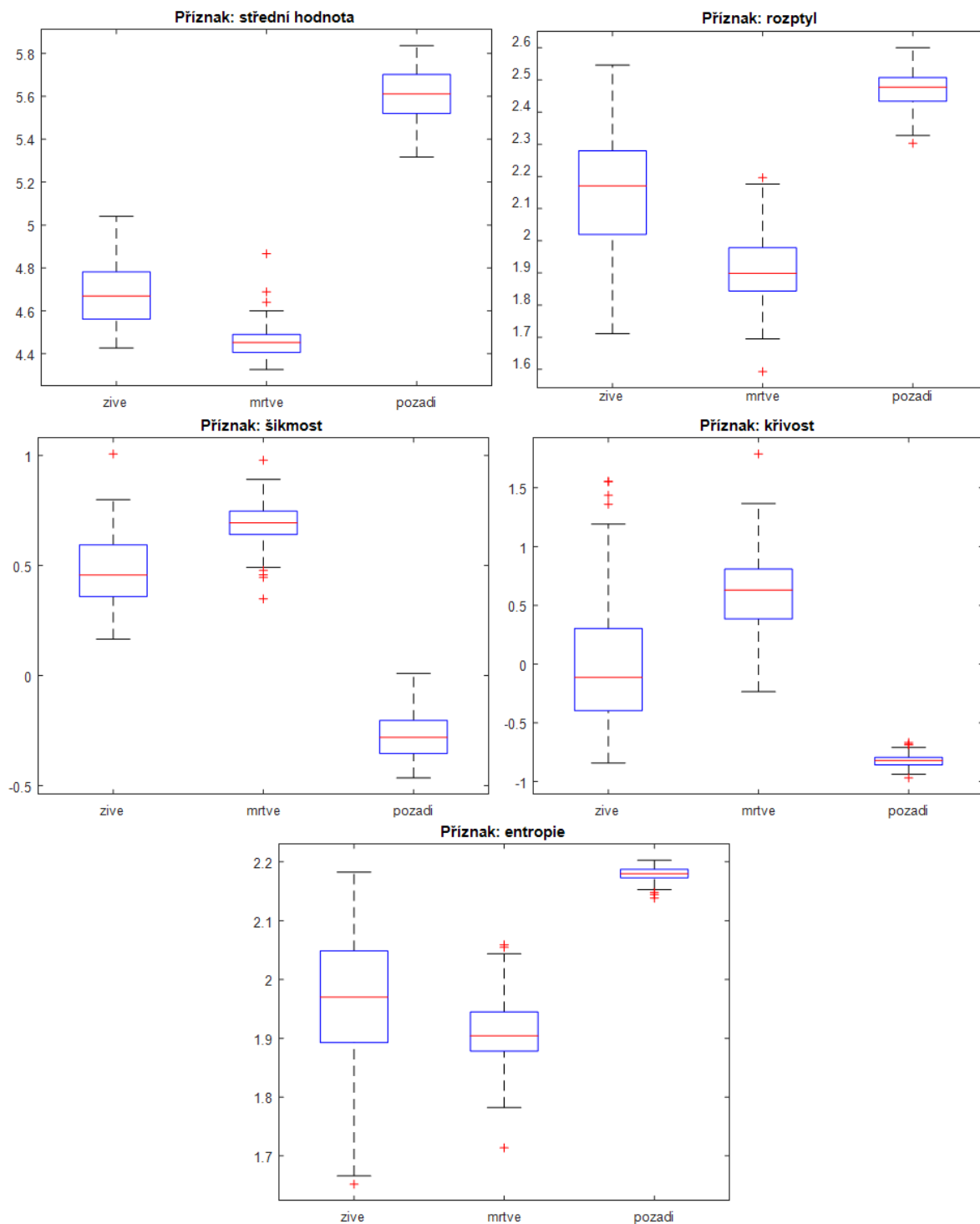
Pro histogram sdružený se jedná o zbylé tři funkce.

$$\text{function[energy,contras,homogeneity,entropy,korel,CS,CP]=hist2d_params(vstup)}$$
$$\text{function [SA,SV,SE,DV,DE] = hist2d_params2(vstup)}$$
$$\text{function [IMC1,IMC2] = hist2d_params3(vstup)}$$

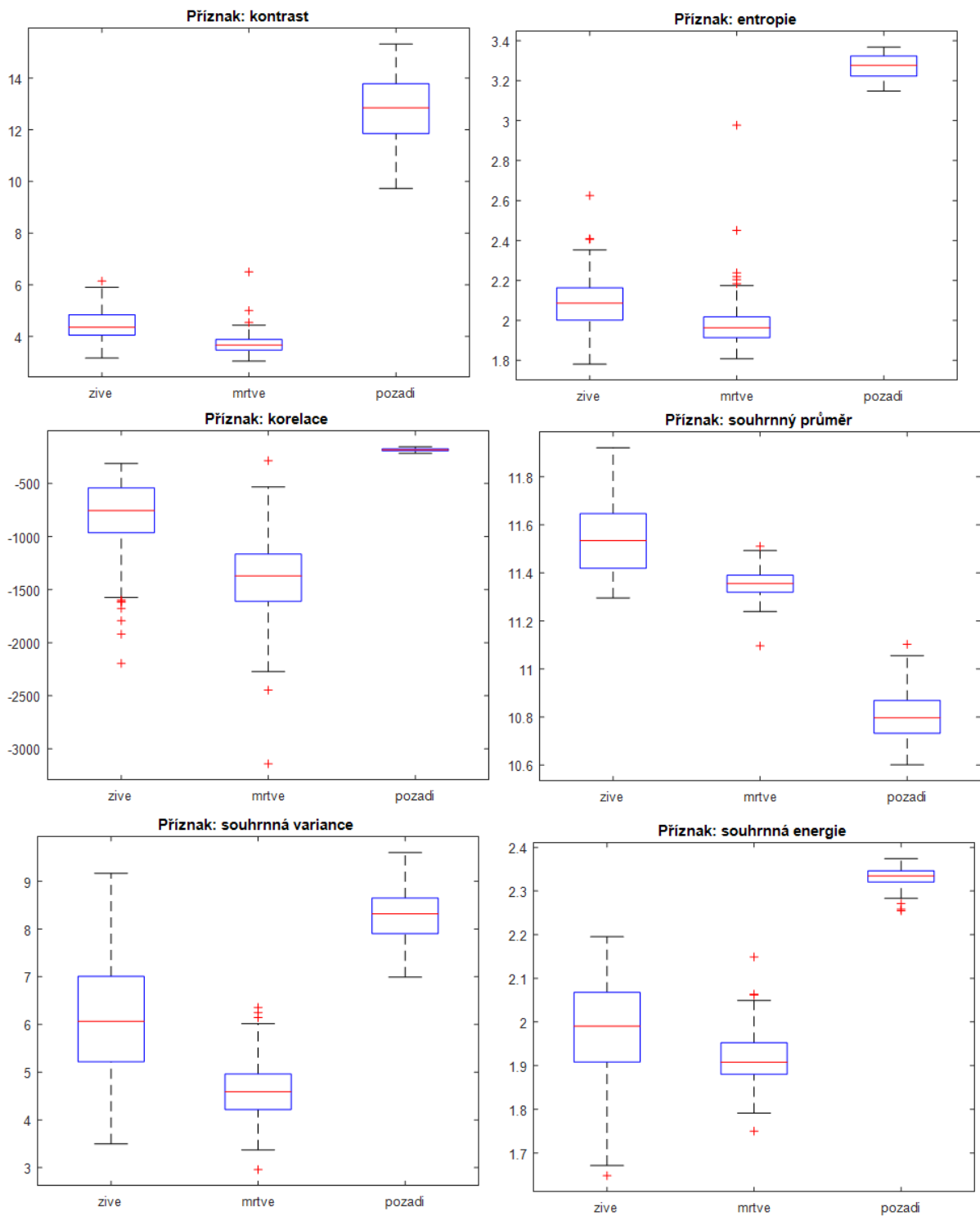
8.2.4 Výběr příznaků pro klasifikaci

Příznaky, které dobře oddělovaly pozadí, mrtvé a živé buňky, byly vybrány na základě boxplotů jednotlivých příznaků. Z celkových 20 příznaků tak bylo vybráno 15 a to konkrétně z 1D histogramu – střední hodnota, rozptyl, šikmost, křivost a entropie. Z 2D histogramu jsou to příznaky – kontrast, entropie, korelace, souhrnný průměr, souhrnná

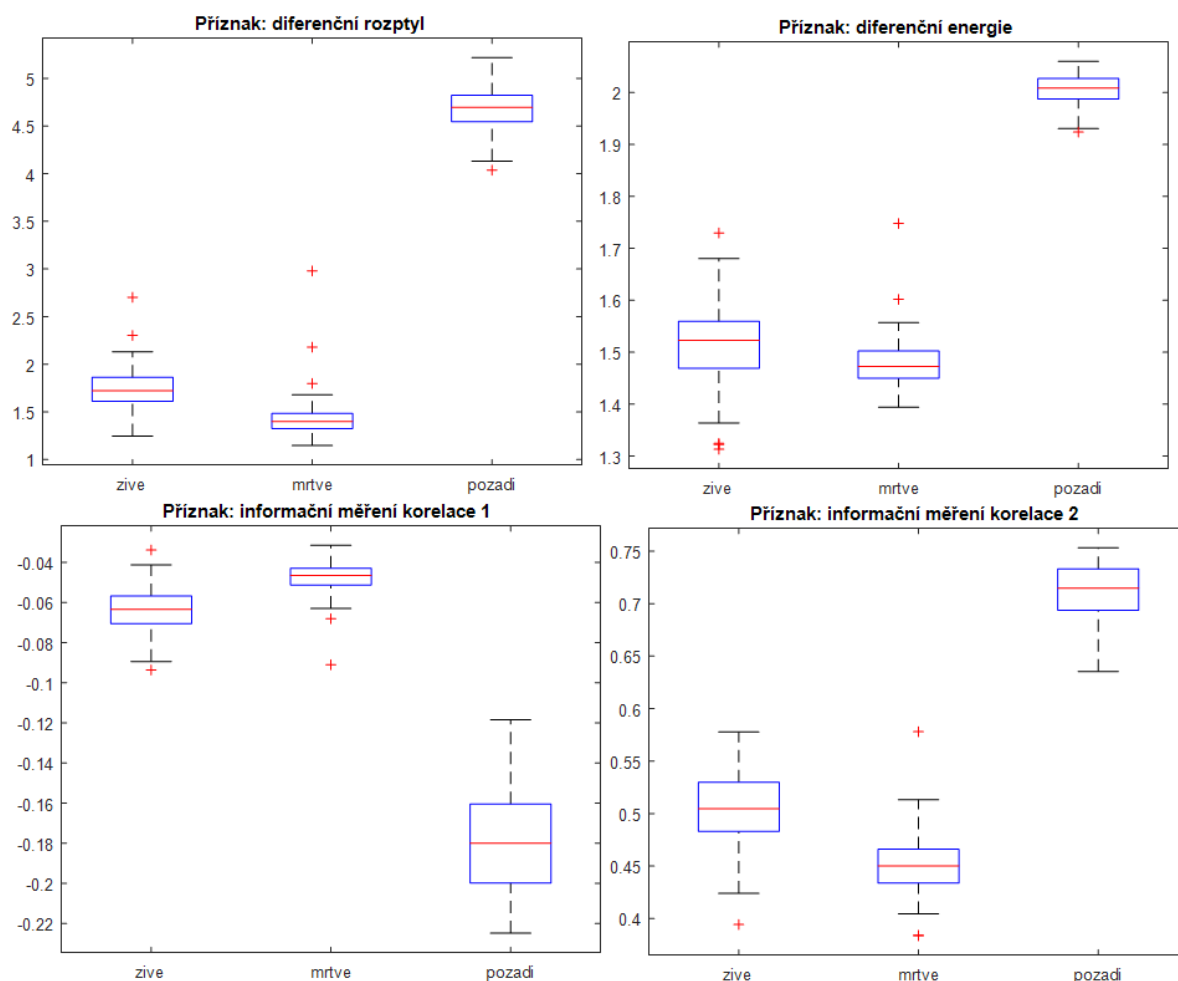
variance, souhrnná energie, diferenční rozptyl, diferenční energie a informační měření korelace (IMC1 a IMC2). Výsledné boxploty těchto příznaků jsou znázorněny na Obrázek 8.14, Obrázek 8.15 a Obrázek 8.16.



Obrázek 8.14 Vybrané příznaky z 1D histogramu



Obrázek 8.15 Vybrané příznaky z 2D histogramu



Obrázek 8.16 Vybrané příznaky z 2D histogramu - pokračování

8.2.5 Trénování klasifikátoru SVM

Pro trénování a následnou klasifikaci buněk bylo využito klasifikace do dvou tříd – mrtvé buňky a pozadí jelikož, jak vyplývá z předchozích boxplotů rozdíl v jednotlivých příznacích je u těchto dvou tříd největší. Příznaky získané z histogramů byly ještě pro následnou klasifikaci normalizovány pomocí minimální a maximální hodnoty jednotlivých příznaků.

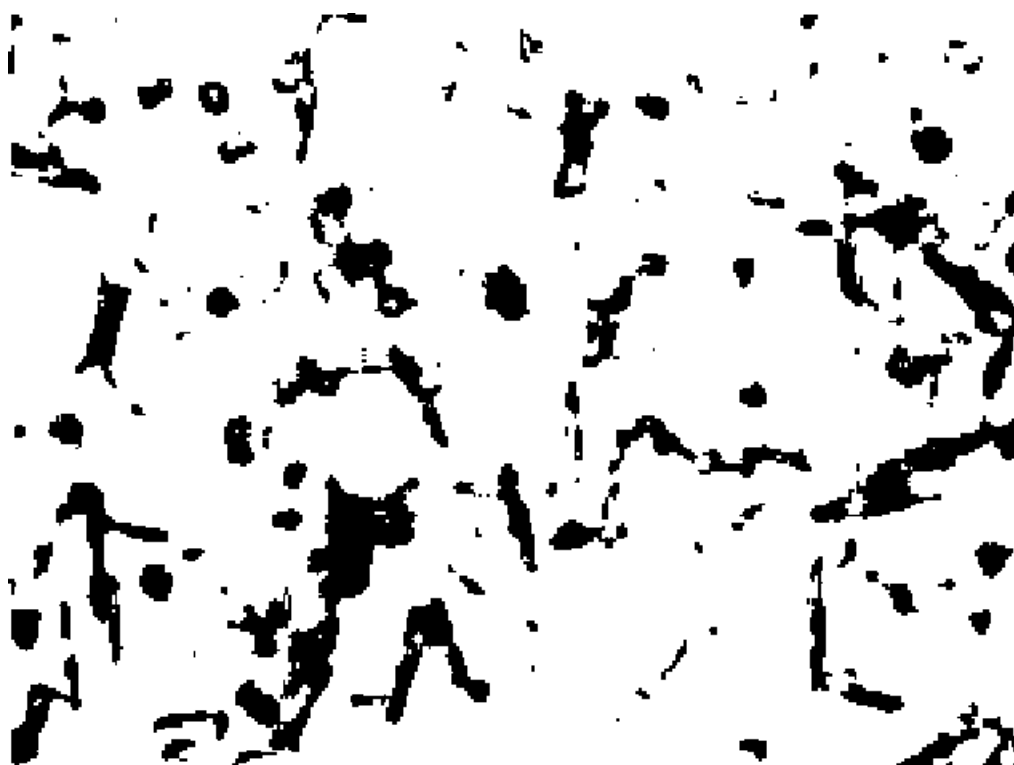
K natrénování klasifikátoru byla použita křížová validace dat, což je metoda zjišťování, jak moc bude model statistické analýzy ovlivňovat nezávislé vzorky dat. Tento postup je významný pro predikci neznámých vzorků po předchozí klasifikaci známých vzorků. K trénování a klasifikaci dat byly využity funkce *svmtrain* a *svmpredict* z knihovny LibSVM implementované do MATLABU viz [26].

Do funkce *svmtrain* vstupuje vektor tříd (vektor nul a jedniček) a matice příznaků pro mrtvé buňky a pozadí, dále parametr pro typ SVM – zvolena multi-class klasifikace (C-SVC), parametr pro typ jádrové funkce – zvolena základní radiální funkce a dále parametry pro nastavení tolerance ukončení apod.

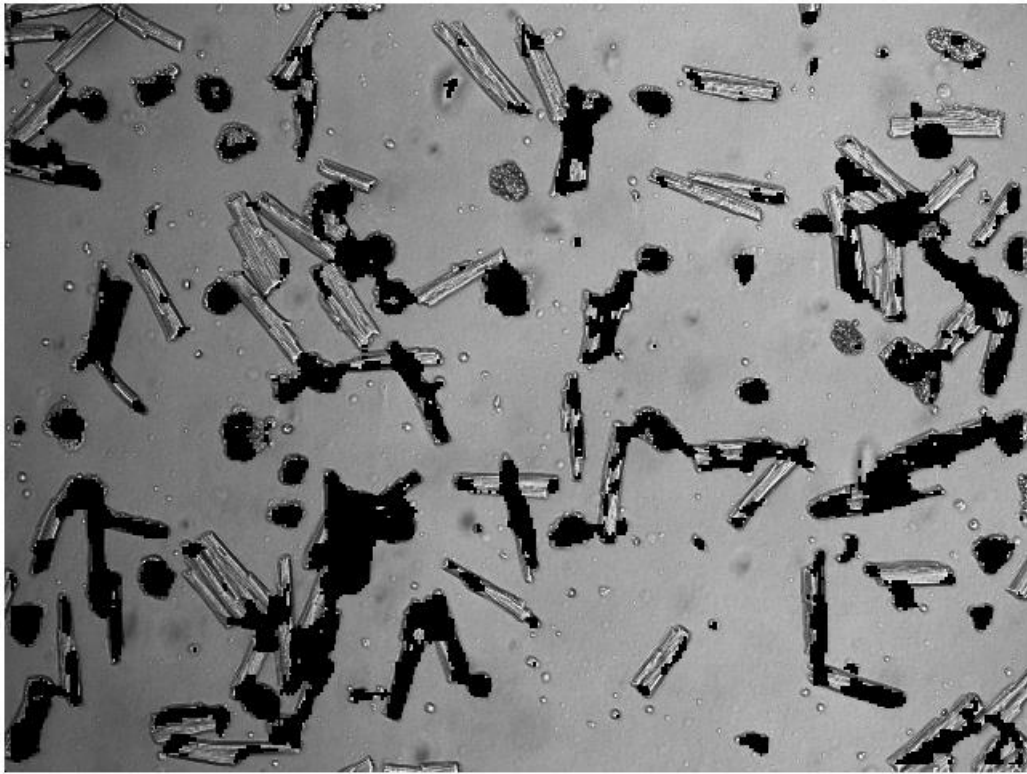
8.2.6 Klasifikace celého obrazu

Při klasifikaci celého obrazu byl obraz procházen ve dvou for cyklech a vyindexováno vždy okno, ve kterém probíhal výpočet LBP hodnot, histogramů a následně příznaků jak je popsáno výše. Jeden výřez obrazu byl tak ve výsledku reprezentován vektorem 15 příznaků, který pak vstupoval do následné klasifikace a určení zda se jedná o mrtvou buňku nebo pozadí.

Výsledkem byl vysegmentovaný obraz obsahující nuly a jedničky (nula – pozadí (bílá), jednička – buňka (černá)) viz Obrázek 8.17. Tento vysegmentovaný obraz byl poté vložen do originálního snímku pro snazší zhodnocení a lepší názornost viz Obrázek 8.18.



Obrázek 8.17 Nasegmentovaný obraz



Obrázek 8.18 Výsledný obraz

9 Zhodnocení dosažených výsledků

Oba dva zvolené přístupy jak aplikace základních segmentačních metod, tak i aplikace metody založené na lokálních binárních znacích (LBP) jsou hodnoceny z hlediska senzitivity S^+ , pozitivní prediktivní hodnoty P^+ a časové náročnosti.

Senzitivita udává pravděpodobnost pozitivní detekce, pokud je ve snímku přítomna mrtvá buňka. Výpočet senzitivity vychází z rov. 9.1, kde TP je skutečně pozitivní detekce a FN je falešně negativní detekce.

$$S^+ = \frac{TP}{TP+FN} \quad (9.1)$$

Pozitivní prediktivní hodnota P^+ udává pravděpodobnost přítomnosti mrtvé buňky, pokud je pozitivní detekce. Výpočet pozitivní prediktivní hodnoty vychází z rov. 9.2, kde TP je opět skutečně pozitivní detekce a FP je falešně pozitivní detekce.

$$P^+ = \frac{TP}{TP+FP} \quad (9.2)$$

9.1 Hodnocení základních segmentačních metod

Základní segmentační metody byly, jak již bylo popsáno výše, aplikovány na 25 snímků kardiomyocytů, na kterých se nachází jak mrtvé tak i živé buňky. Cílem tohoto přístupu byla detekce mrtvých buněk a jejich označení a vybarvení červenou barvou.

U každého snímku byl změřen čas potřebný pro analýzu a poté manuálně určeny hodnoty TP – skutečně pozitivní detekce, FP – falešně pozitivní detekce a FN – falešně negativní detekce. Všechny naměřené a spočítané výsledky jsou zapsány v Tabulka 9.1.

Tabulka 9.1 Výsledky metody založené na základních segmentačních metodách

| snímek | čas [s] | TP | FP | FN |
|---------------|---------|------------|-----------|------------|
| 1 | 64,34 | 12 | 1 | 6 |
| 2 | 69,56 | 9 | 0 | 12 |
| 3 | 63,1 | 13 | 3 | 6 |
| 4 | 72,18 | 5 | 2 | 6 |
| 5 | 64,13 | 2 | 1 | 4 |
| 6 | 66,03 | 6 | 3 | 13 |
| 7 | 65,91 | 13 | 4 | 17 |
| 8 | 64,33 | 22 | 0 | 49 |
| 9 | 65,43 | 22 | 0 | 20 |
| 10 | 63,4 | 16 | 3 | 28 |
| 11 | 64,77 | 19 | 4 | 11 |
| 12 | 62,52 | 9 | 5 | 6 |
| 13 | 62,85 | 12 | 2 | 8 |
| 14 | 65,84 | 12 | 2 | 9 |
| 15 | 61,19 | 8 | 1 | 1 |
| 16 | 62,66 | 8 | 3 | 1 |
| 17 | 66,83 | 8 | 6 | 10 |
| 18 | 58,99 | 4 | 1 | 3 |
| 19 | 66,58 | 6 | 2 | 6 |
| 20 | 62,04 | 5 | 0 | 3 |
| 21 | 69,96 | 9 | 0 | 4 |
| 22 | 63,89 | 8 | 1 | 3 |
| 23 | 63,93 | 3 | 1 | 2 |
| 24 | 65,19 | 3 | 5 | 2 |
| 25 | 63,85 | 10 | 4 | 3 |
| součet | | 244 | 54 | 233 |

Průměrný čas potřebný pro analýzu vyšel u této metody 64,78 sekund. Celkový počet skutečně pozitivně detekovaných mrtvých buněk byl 244 (TP), celkový počet falešně pozitivně detekovaných mrtvých buněk byl 54 (FP) a celkový počet falešně negativně detekovaných byl 232 (FN). Následně byla podle rov. 9.1 spočtena senzitivita, která vyšla 51,2% a podle rov. 9.2 vypočtena pozitivní prediktivní hodnota, který vyšla 81,88%. Všechny výsledky jsou shrnuty v Tabulka 9.2.

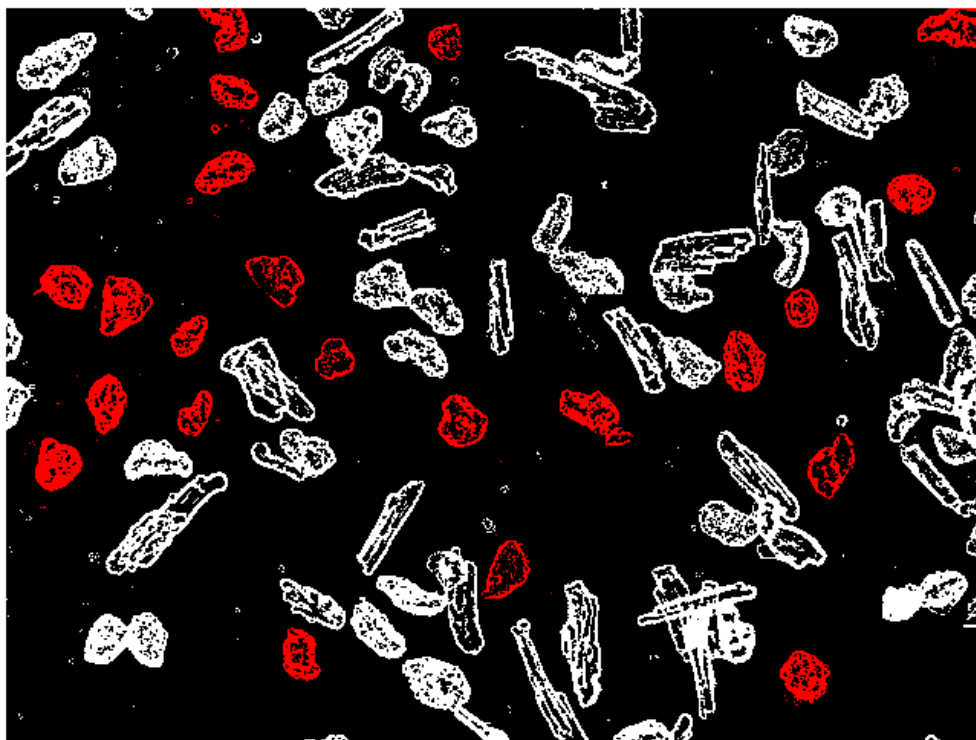
Tabulka 9.2 Souhrn výsledků základních segmentačních metod

| | |
|-----------------------------------|---------|
| průměrný čas | 64,78 s |
| senzitivita S⁺ | 51,15% |
| prediktivita P⁺ | 81,88% |

Mezi výhody tohoto přístupu využití základních segmentačních metod patří malá časová náročnost oproti použití metody založené na LBP, která činí v průměru zhruba jednu minutu na jeden obraz. Problémem u této metody je špatná detekce buněk, které se překrývají nebo jen dotýkají. Tohle omezení lze eliminovat například použitím morfologických operátorů eroze, což má poté však za následek rozpojování hranic buněk, což vede k jejich špatné detekci.

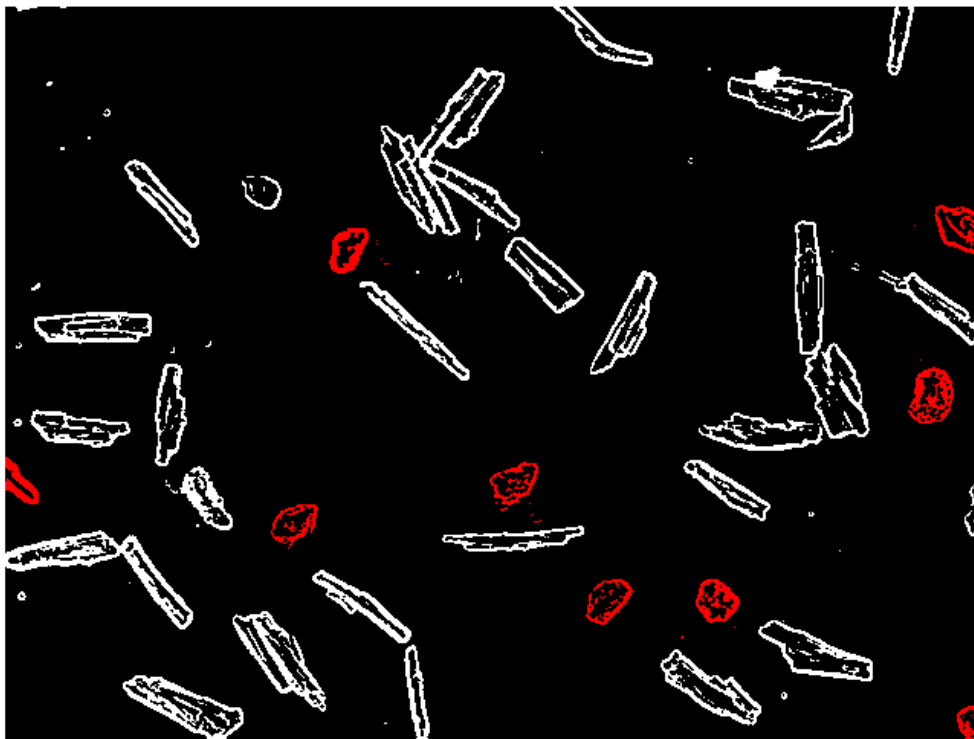
Senzitivita neboli pravděpodobnost pozitivní detekce pokud je v obraze přítomna mrtvá buňka je tedy 51,2%. Senzitivita vyšla tak malá právě proto, že nebyly detekovány buňky, které se překrývají nebo dotýkají, kterých je u některých snímků opravdu hodně. Prediktivita neboli pravděpodobnost přítomnosti mrtvé buňky pokud je pozitivní detekce vyšla docela velká a to konkrétně 81,88%. Z toho vyplývá, že ve snímcích nedocházelo k častým falešně pozitivním detekcím živých buněk.

Na ukázkou je vybrán snímek číslo 9 (Obrázek 9.1), kde je nulová falešně pozitivní detekce (FP), tedy žádná detekovaná živá buňka. Ale také se v tomto snímku nachází hodně falešně negativních detekcí (FN) a to z toho důvodu jak již bylo řečeno – dotýkání buněk a jejich překrývání.



Obrázek 9.1 Snímek číslo 9

Na ukázkou velmi malé falešně negativní detekce (FN) je zvolen snímek číslo 15 (Obrázek 9.2), kde pouze jediná mrtvá buňka není detekována a pouze jediná živá buňka je detekována jako mrtvá.



Obrázek 9.2 Snímek číslo 15

9.2 Hodnocení metody LBP

Metoda založená na lokálních binárních znacích (LBP) a určování příznaků textury byla aplikována na 2 obrázky s dobře patrnou vnitřní strukturou buněk. Cílem tohoto přístupu byla detekce mrtvých buněk na základě zjištěných příznaků (např. střední hodnota, šikmost, křivost, apod.).

Jak již bylo popsáno výše nejprve byl klasifikátor natrénován na základě křížové validace na příznacích vypočtených ze vzorků mrtvých buněk a pozadí. Výsledkem křížové validace je 100% přesnost a nulová celková chyba.

U obou snímků byl změřen čas potřebný pro klasifikaci a stejně jako v předchozím přístupu manuálně spočteny hodnoty skutečně pozitivně detekovaných (TP), hodnoty

falešně pozitivně detekovaných (FP) a hodnoty falešně negativně detekovaných (FN). Všechny hodnoty jsou shrnuty v Tabulka 9.3.

Tabulka 9.3 Výsledky metody založené na LBP

| snímek | čas [s] | TP | FP | FN |
|---------------|---------|-----------|-----------|----------|
| 1 | 1804,3 | 38 | 32 | 0 |
| 2 | 1735,3 | 29 | 27 | 1 |
| součet | | 67 | 59 | 1 |

Průměrný čas potřebný pro analýzu a klasifikaci touto metodou je 1769,8 sekund, což je zhruba 29 minut. Celkový počet skutečně pozitivně detekovaných buněk je 67 (TP), celkový počet falešně pozitivně detekovaných je 59 buněk (FP) a celkový počet falešně negativně detekovaných buněk je 1 (FN). Opět byla na základě rov. 9.1 vypočtena senzitivita, která vyšla 98,5% a pozitivní prediktivní hodnota podle rov. 9.2, která vyšla 53,2%. Všechny výsledky jsou shrnuty v Tabulka 9.4.

Tabulka 9.4 Souhrn výsledků metody založené na LBP

| | |
|---------------------|----------|
| průměrný čas | 1769,8 s |
| senzitivita | 98,53% |
| prediktivita | 53,17% |

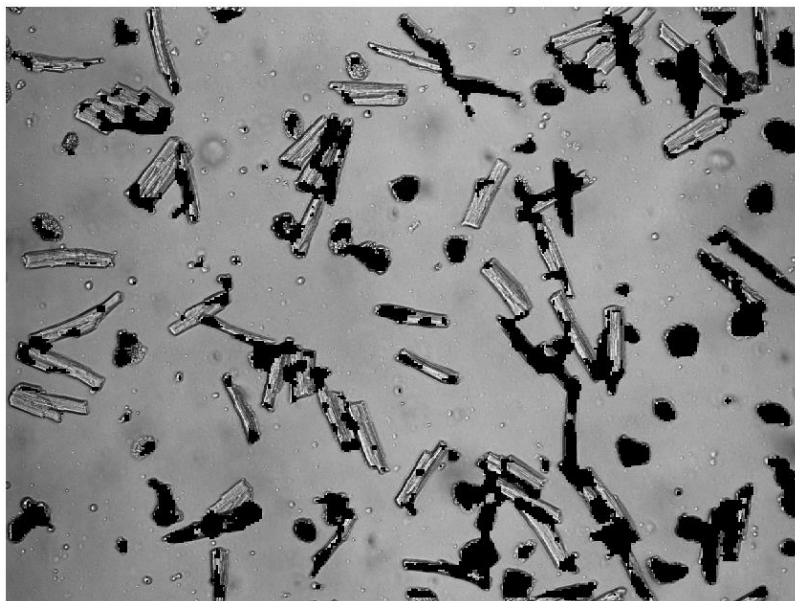
Nevýhodou této metody oproti aplikaci základních segmentačních metod je 30krát vyšší časová náročnost. Tato metoda nemohla být dokonale otestována a vyzkoušena protože byly k dispozici pouze 2 snímky kardiomyocytů, na kterých byla jasně patrná jejich vnitřní struktura, na jejíž rozpoznání je tato metoda založena. Metoda klade velké nároky na rozlišení snímků a proces nasnímání, kdy je třeba dobře zobrazit vnitřní strukturu buněk.

Přestože výsledky přesnosti detekce mrtvých buněk u křížové validace vychází 100%, tak u klasifikace celého obrazu vychází podstatně menší. To je způsobeno tím, že v celém klasifikovaném obrazu dochází k překrývání živých buněk, které v místech překrytí mají podobnou strukturu jako mrtvé buňky. Z toho vyplývá, že prediktivita u klasifikace na celém obrazu je malá neboli dochází k hodně falešně pozitivním detekcím.

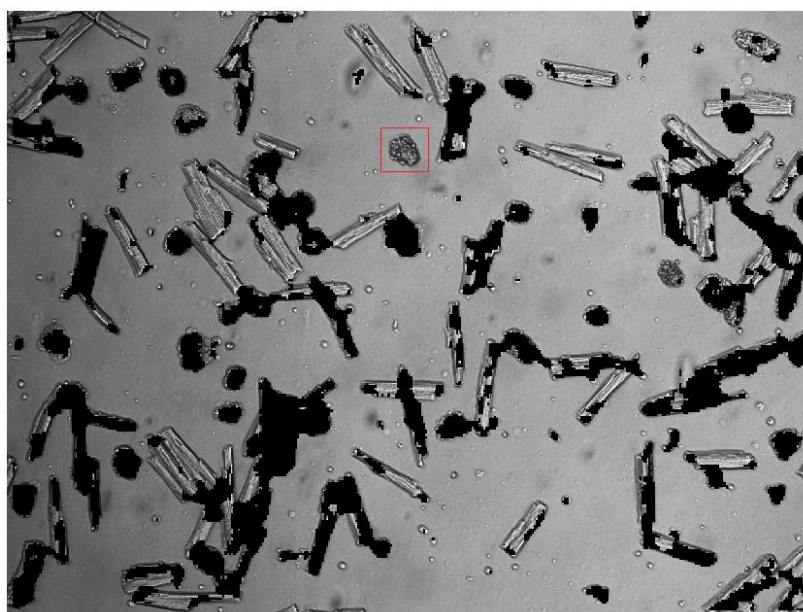
Senzitivita neboli pravděpodobnost pozitivní detekce pokud je v obraze přítomna mrtvá buňka je tedy u této metody 98,5%. Z toho vyplývá, že u této metody docházelo

k téměř stoprocentní detekci mrtvé buňky avšak za cenu toho, že prediktivita je pouze 53,2%, což znamená, že docházelo k častým falešně pozitivním detekcím živých buněk.

Oba dva výsledné snímky jsou znázorněny na Obrázek 9.3 respektive na Obrázek 9.4. Na Obrázek 9.3 je nulová falešně negativní detekce, což znamená, že došlo k detekci všech mrtvých buněk na základě jejich vnitřní struktury. Na Obrázek 9.4 je jedna falešně negativně detekovaná buňka, která je vyznačena červeným výřezem.



Obrázek 9.3 Výsledný snímek číslo 1



Obrázek 9.4 Výsledný snímek číslo 2

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo seznámení se s vlastnostmi obrazových dat a principem jejich snímání, snaha o nalezení metod pro klasifikaci mrtvých kardiomyocytů a analýzu jejich viability. V práci byly popsány základní segmentační metody, jako je prahování, hranová detekce a morfologické operace, dále metody texturní analýzy – mikrostrukturní analýza a různé modifikace metody založené na lokálních binárních znacích.

Aplikovány byly dva přístupy detekce mrtvých kardiomyocytů. Prvním přístupem bylo aplikování základních segmentačních metod u snímků kardiomyocytů, kde není jasně patrná jejich vnitřní struktura, a proto byly hodnoceny z hlediska jejich tvaru a podobnosti s templátem vytvořeným jako průměr z mrtvých buněk. Velikost templátu a počet jeho pixelů v binárním zobrazení slouží pro další srovnávání a segmentaci mrtvých buněk. Druhým přístupem byla aplikace metody založená na lokálních binárních znacích a výpočet příznaků z jednoduchého a sdruženého histogramu. Tento přístup byl aplikován na snímky kardiomyocytů, na kterých je dobře patrná vnitřní struktura lišící se u živých a mrtvých buněk.

Oba dva aplikované algoritmy byly hodnoceny na základě specifity, pozitivní prediktivní hodnoty a časové náročnosti. Senzitivita udává pravděpodobnost pozitivní detekce, pokud je ve snímku přítomna mrtvá buňka. Pozitivní prediktivní hodnota udává pravděpodobnost přítomnosti mrtvé buňky, pokud je pozitivní detekce.

Z hlediska časové náročnosti je první přístup aplikace základních segmentačních metod 30krát rychlejší než algoritmus založený na lokálních binárních znacích. Z hlediska senzitivity vychází úspěšněji metoda založená na lokálních binárních znacích se senzitivitou 98,5%. Naopak prediktivita vychází lépe u základních segmentačních metod konkrétně 81,88%.

Hlavní nevýhodou metody založené na základních segmentačních metodách a srovnávání buněk s templátem je to, že tento algoritmus není schopen detekovat buňky, které se překrývají nebo dotýkají. Naopak výhodou je to, že u této metody dochází k malému výskytu falešně pozitivních detekcí živých buněk.

Metoda založená na lokálních binárních znacích nemohla být dokonale otestována a vyzkoušena, protože byly k dispozici pouze 2 snímky kardiomyocytů, na kterých byla jasně

patrná jejich vnitřní struktura, na jejíž rozpoznání je tato metoda založena. Metoda klade velké nároky na rozlišení snímků a proces nasnímání, kdy je třeba dobře zobrazit vnitřní strukturu buněk. Výhodou této metody je ovšem to, že docházelo k téměř stoprocentní detekci mrtvé buňky avšak za cenu toho, že prediktivita je pouze 53%, což znamená, že docházelo k častým falešně pozitivním detekcím živých buněk, které se překrývají a tím dochází k napodobení struktury, kterou mají mrtvé buňky.

V případné další studii by bylo vhodné mít dobře nasnímané snímky s velkým rozlišením, kde by byla dobře viditelná vnitřní struktura buněk rozdílná pro mrtvé a živé buňky. Díky tomu by mohl přístup založený na lokálních binárních znacích podávat dobré výsledky klasifikace a hodnocení viability,

Seznam použité literatury

- [1] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [2] MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [3] ŠTEJFA, Miloš. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1385-4.
- [4] CHANDLER, Douglas E. a Robert W. ROBERSON. *Bioimaging: current concepts in light and electron microscopy*. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publishers, c2009. ISBN 07-637-3874-3.
- [5] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902-8961-4.
- [6] NIKON. Základní metody světelné mikroskopie [online]. B.m.: Nikon. [vid. 8.11.2016]. Dostupné z: http://www.are.cz/data/file/zakladni_metody_svetelne_mikroskopie.pdf
- [7] Kolář R.: Mikroskopická zobrazovací technika. Přednášky. Brno: FEKT VUT v Brně, 2015
- [8] SEHADOVÁ, Hana. Fluorescenční a konfokální mikroskopie. In: *Biologické centrum Akademie věd České republiky, v. v. i.* [online]. Biologické centrum AVČR, České Budějovice, 2011 [cit. 2016-11-10]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [9] WALEK, Petr, LAMOŠ Martin, JAN, Jiří. Analýza biomedicínských obrazů. Vysoké učení technické v Brně, 2013. ISBN 978-80-214-4792-9.
- [10] JAN, Jiří. Medical image processing, reconstruction and restoration: concepts and methods. Boca Raton: Taylor, 2006. Signal processing and communications, 24. ISBN 08-247-5849-8.
- [11] SEMMLOW, John L. Biosignal and medical image processing. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2009. ISBN 14-200-6230-1.
- [12] AL-KOFAHI, Y., W. LASSOUED, W. LEE a B. ROYSAM. Improved Automatic Detection and Segmentation of Cell Nuclei in Histopathology Images. IEEE Transactions on

Biomedical Engineering. 2010, 57(4), 841-852. DOI: 10.1109/TBME.2009.2035102. ISSN 0018-9294. Dostupné také z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5306149/>

[13] WANG, Quanli. A Novel Immersion Simulation Based Self-Organizing Transform with Application to Single-Cell Segmentation from Microscopy Images. Institute for Genome Sciences & Policy, & Department of Statistical Science: Duke University, 2009.

[14] BRANSKÁ, Barbora, LINHOVÁ, Michaela, PATÁKOVÁ, Petra, PAULOVÁ, Leona, MELZOCH, Karel. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. Chemické listy [online]. [cit. 2017-01-03]. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf

[15] GONZALEZ, Rafael C., Richard E. WOODS a Steven L. EDDINS. *Digital Image processing using MATLAB*. 2nd ed. S.I.: Gatesmark Pub., c2009. ISBN 978-0982085400.

[16] GONZALEZ, Rafael C. a Richard E. WOODS. *Digital image processing*. 3rd ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, c2008. ISBN 978-0-13-168728-8.

[17] SOILLE, Pierre. *Morphological image analysis: principles and applications*. 2nd ed. New York: Springer, c2003. ISBN 35-404-2988-3.

[18] PIETIKÄINEN, Matti, Abdenour HADID, Guoying ZHAO a Timo AHONEN. *Computer Vision Using Local Binary Patterns*. London: Springer-Verlag, 2011. ISBN 978-0-85729-747-1.

[19] BRAHNAM, Sheryl, Lakhmi C. JAIN, Loris NANNI and Alessandra LUMINI. *Local binary patterns: new variants and applications*. Berlin: Springer-Verlag, 2014. ISBN 978-3-642-39288-7.

[20] NOVOTNÝ, A. *Texturní analýza vrstvy nervových vláken na snímcích sítnice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství, 2010. 54 s., 8 s. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Jan Odstrčilík.

[21] MIRMEHDI, Majid, Xianghua XIE, Jasjit SURI: *Handbook of texture analysis*. London: Imperial College Press, 2008, 413 s.

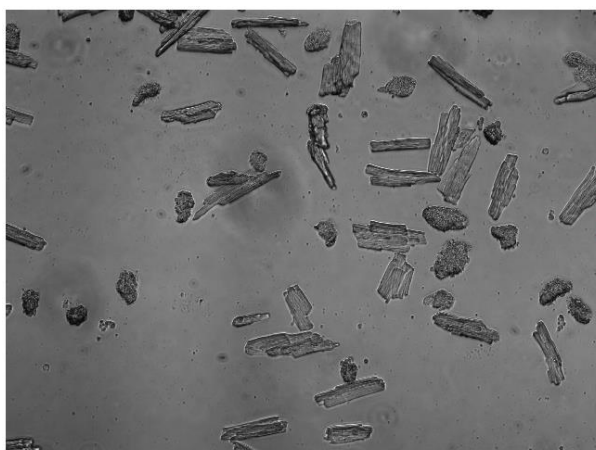
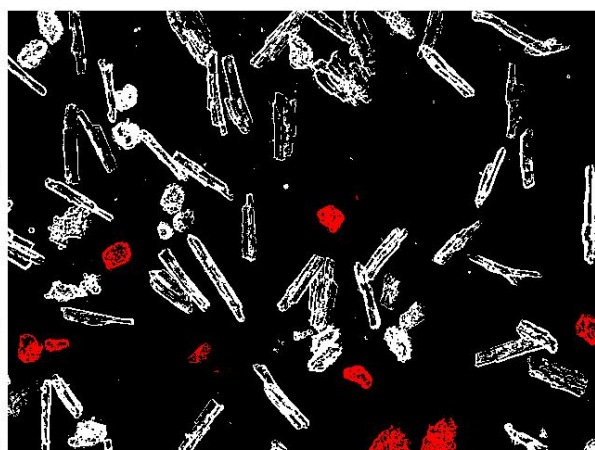
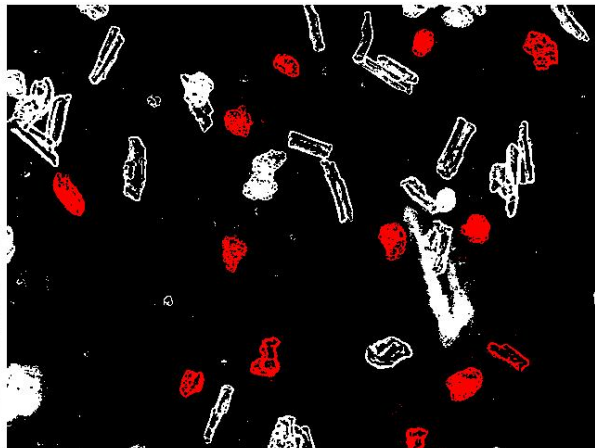
[22] HRŮZ, Marek. LBP, HoG [online]. Katedra kybernetiky, Plzeň, 2015 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <http://www.kky.zcu.cz/uploads/courses/mpv/05/materialy05.pdf>

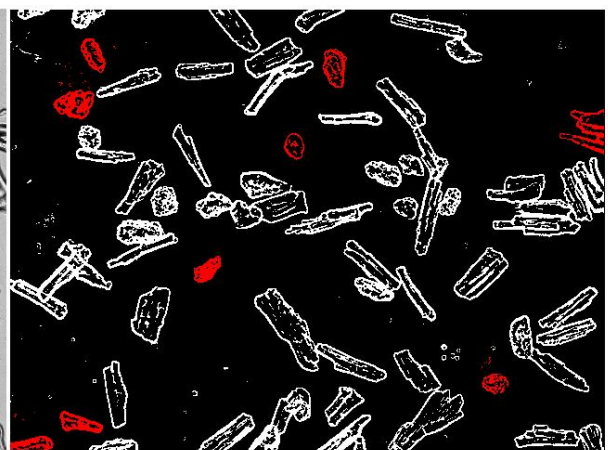
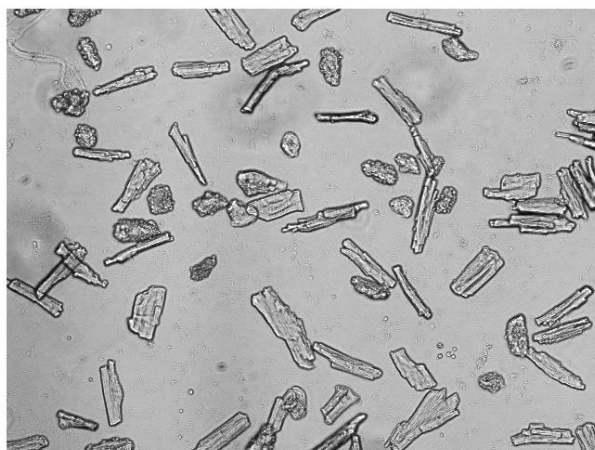
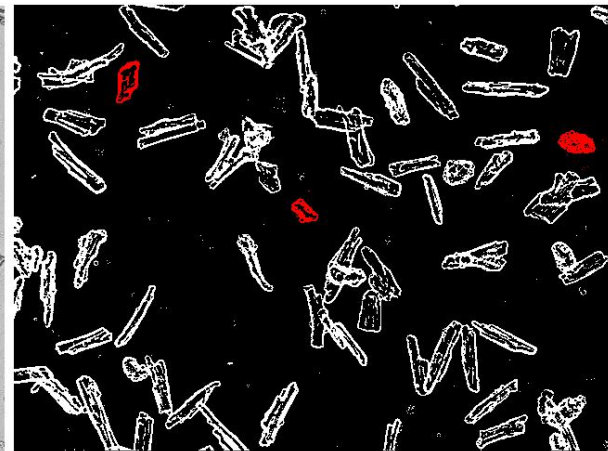
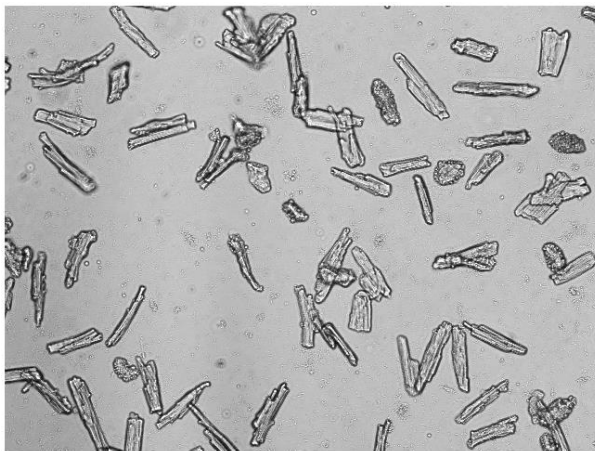
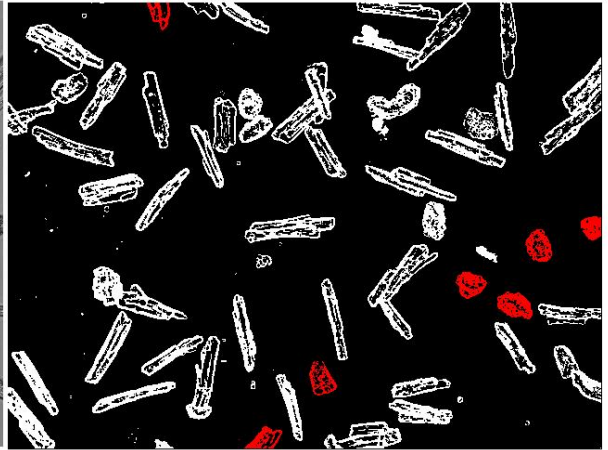
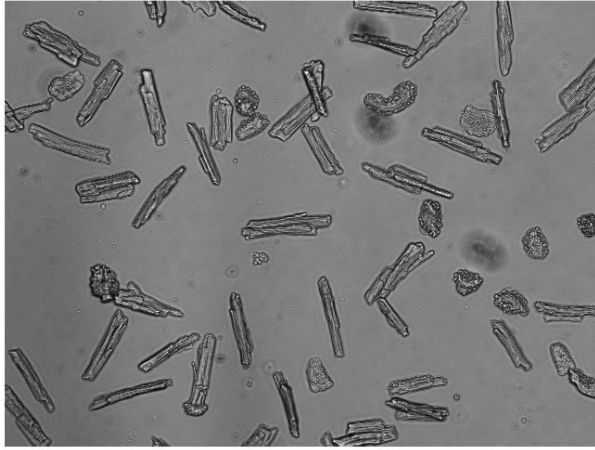
- [23] KECCMAN, V. Learning and soft computing: support vector machines, neural networks, and fuzzy logic models. Cambridge, Mass.: MIT Press, c2001. ISBN 02-621-1255-8.
- [24] SCHÖLKOPF, Bernhard. a Alexander J. SMOLA. Learning with kernels: support vector machines, regularization, optimization, and beyond. Cambridge, Mass.: MIT Press, c2002. ISBN 02-621-9475-9.
- [25] MAHDAL, Jakub. Srovnání klasifikátorů [online]. Brno, 2006 [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: http://www.fit.vutbr.cz/study/courses/SRE/public/2007-08/projekty/mahdal_sre.pdf. Fakulta informačních technologií VUT Brno.
- [26] Chang Ch., Lin Ch. LIBSVM: a library for support vector machines. ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology, 2011, vol. 27, no. 2, pp. 1-27

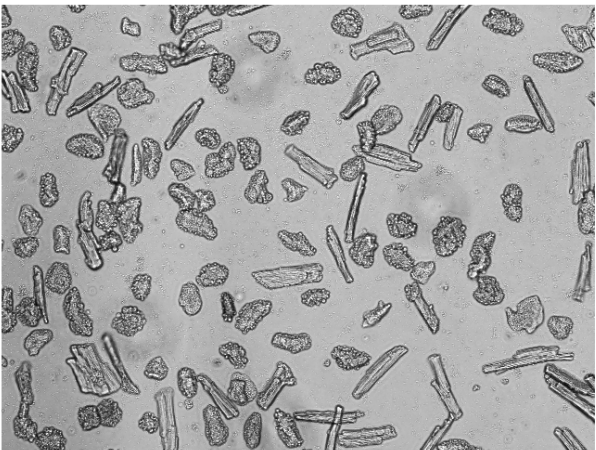
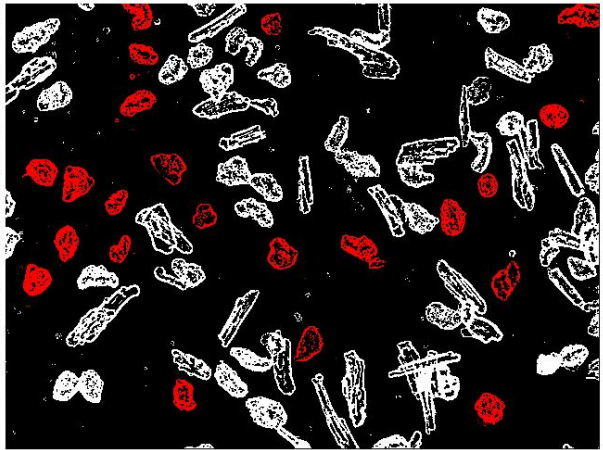
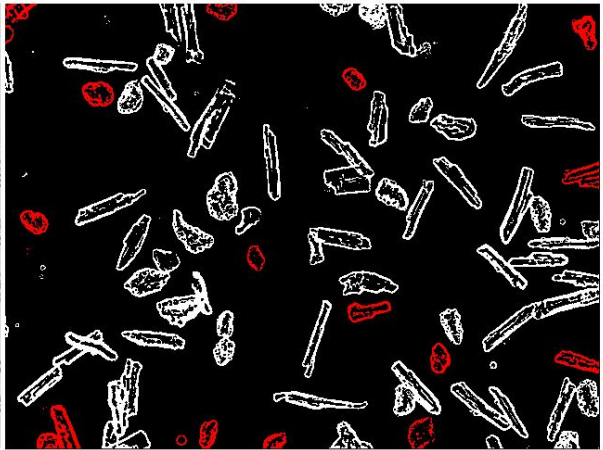
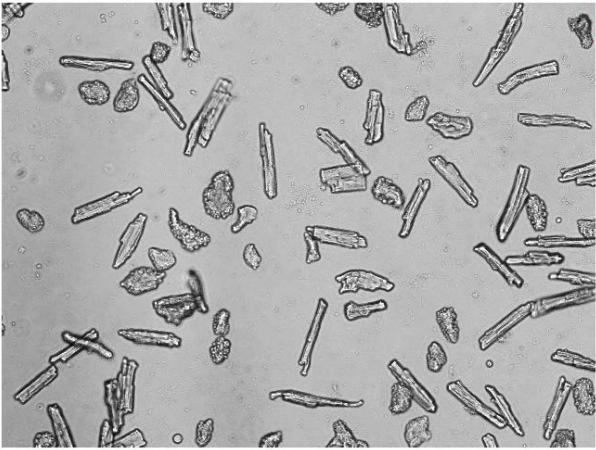
Seznam příloh

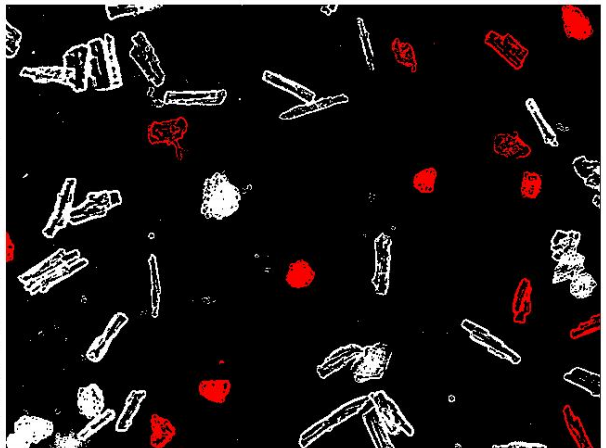
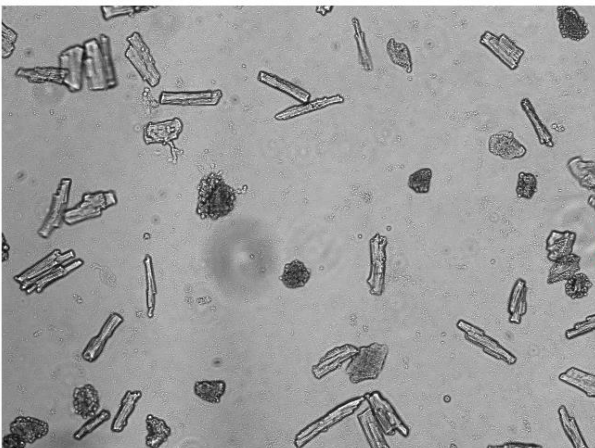
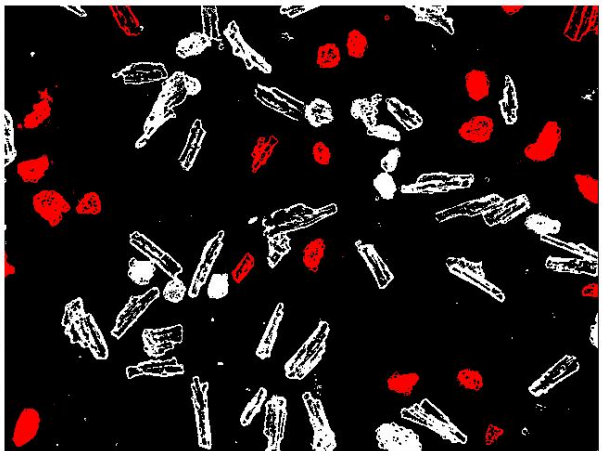
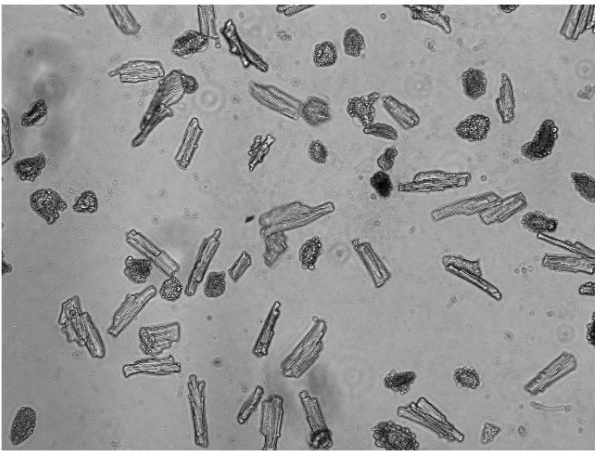
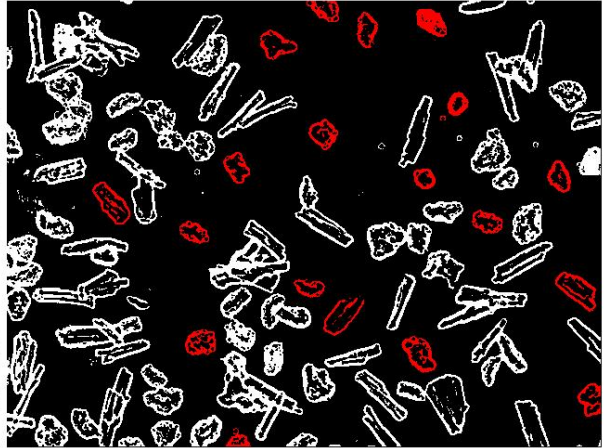
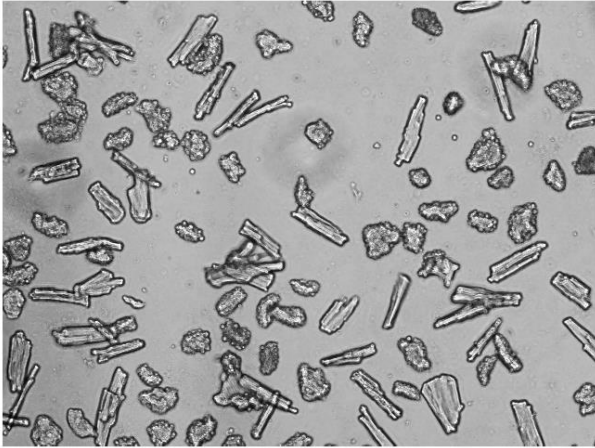
| | |
|---|---|
| A. Výsledné obrázky ze základních segmentačních metod | I |
| B. Výsledné obrázky z metody založené na LBP | X |

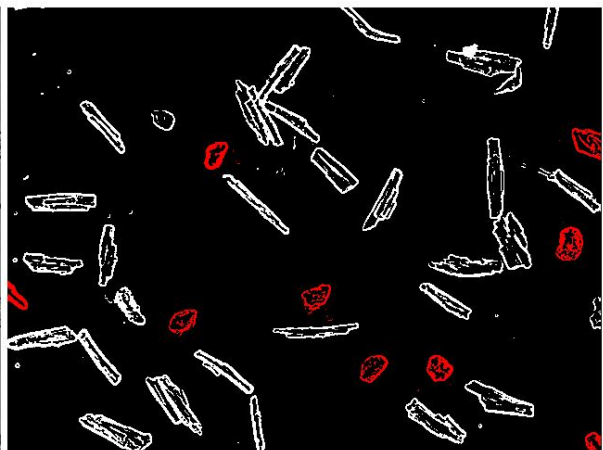
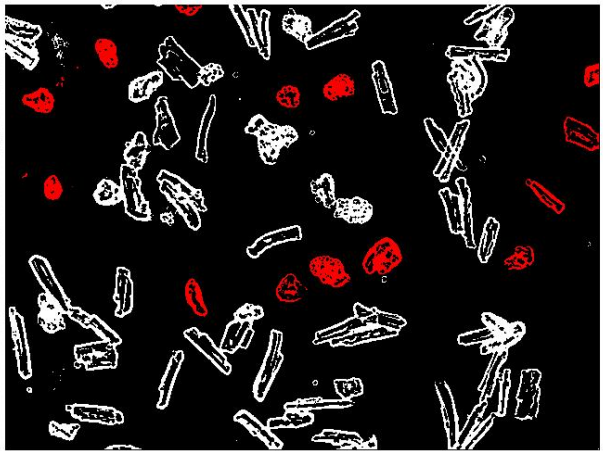
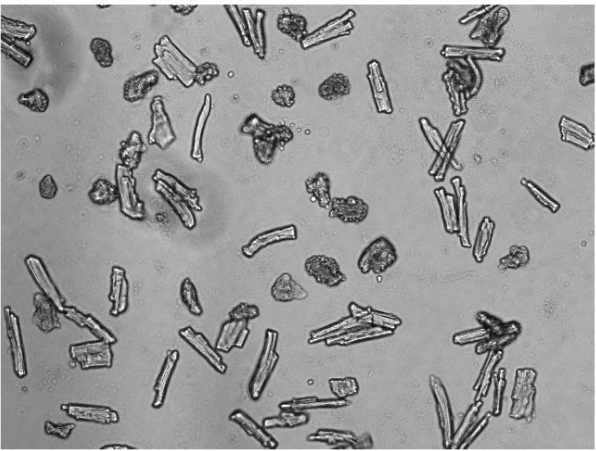
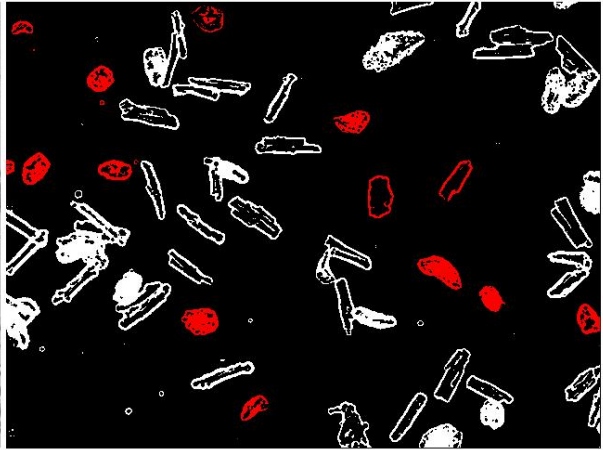
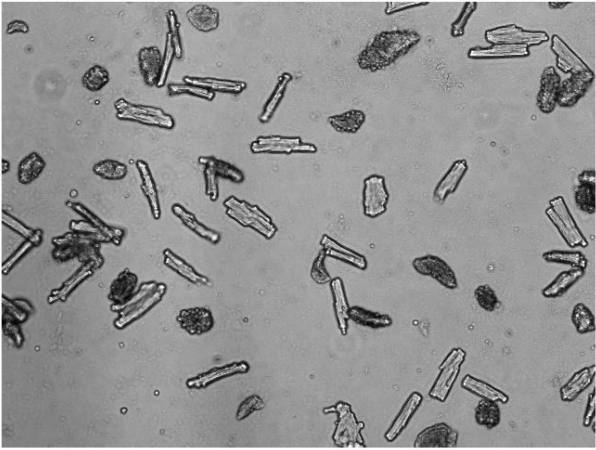
A. Výsledné obrázky ze základních segmentačních metod

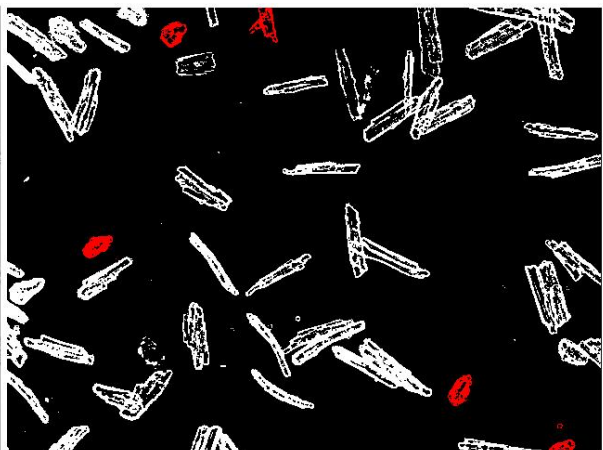
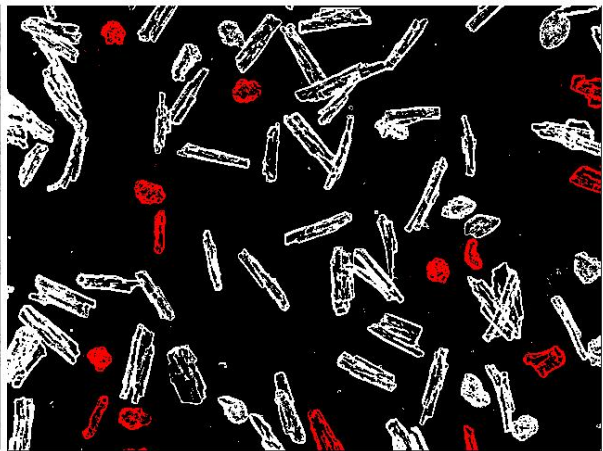
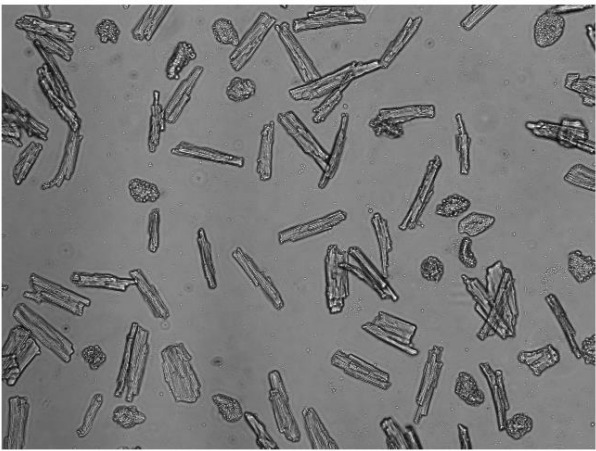


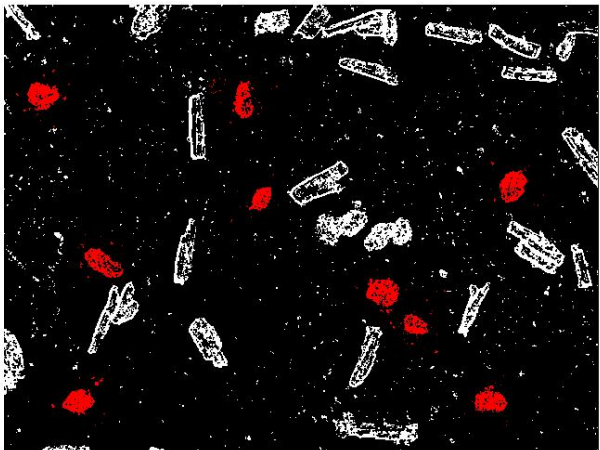
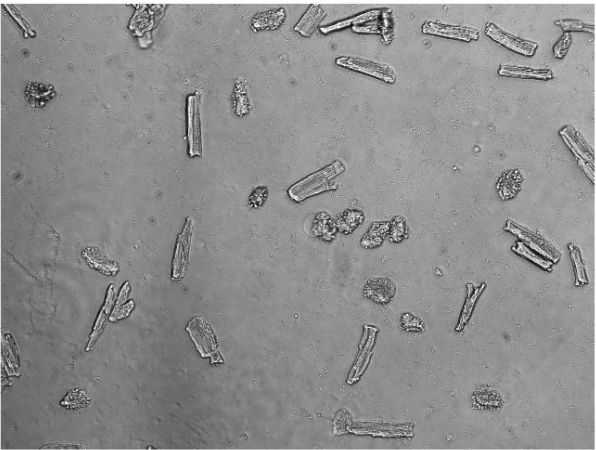
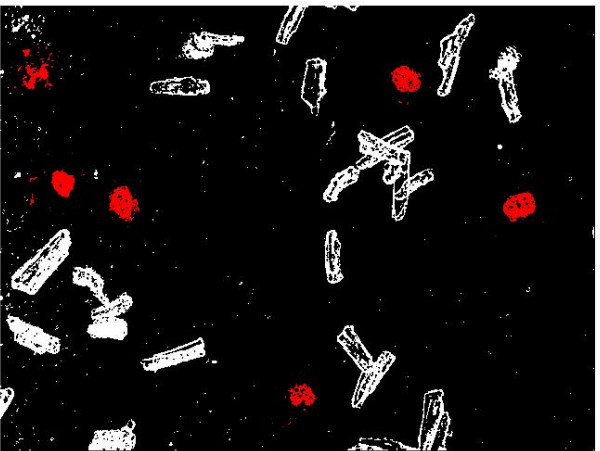
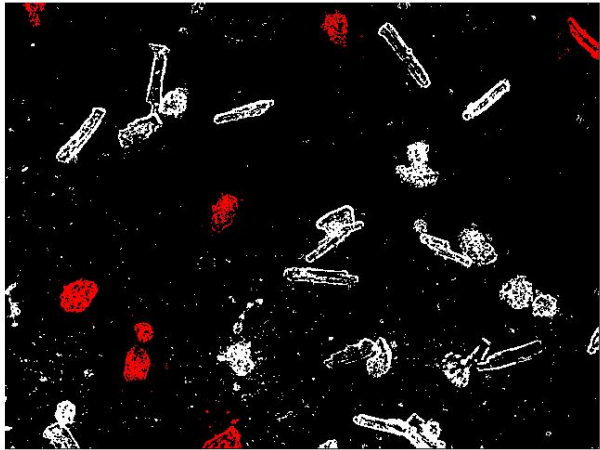
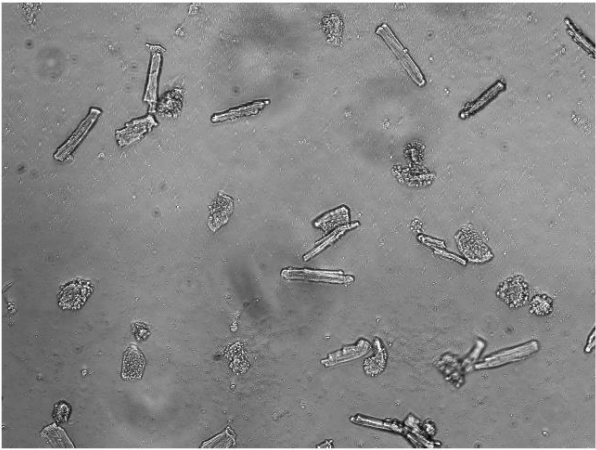


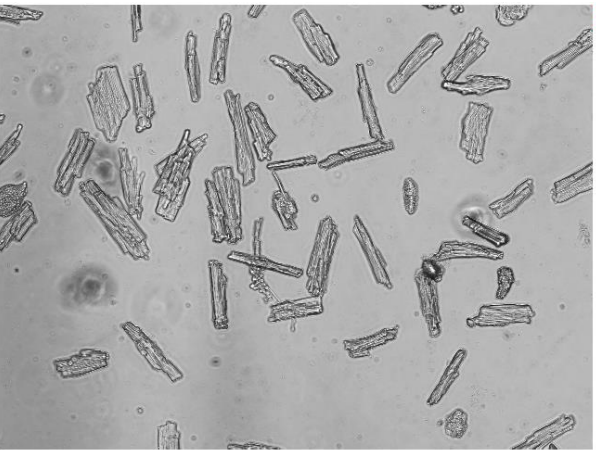
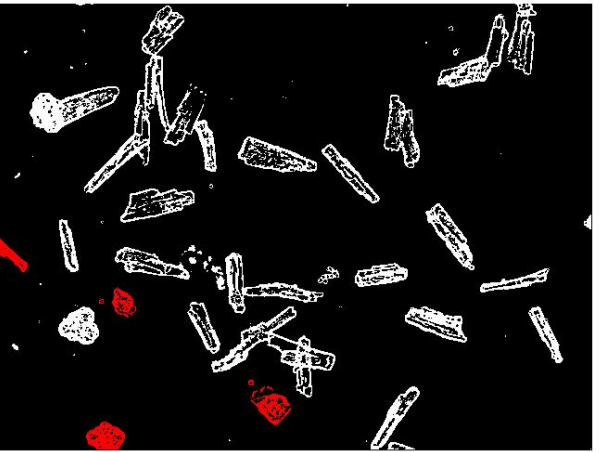
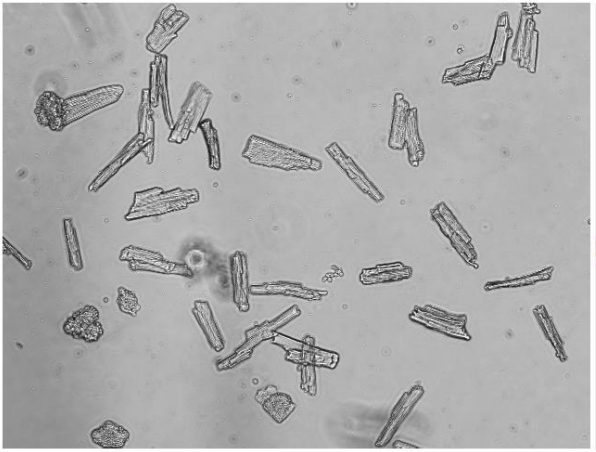
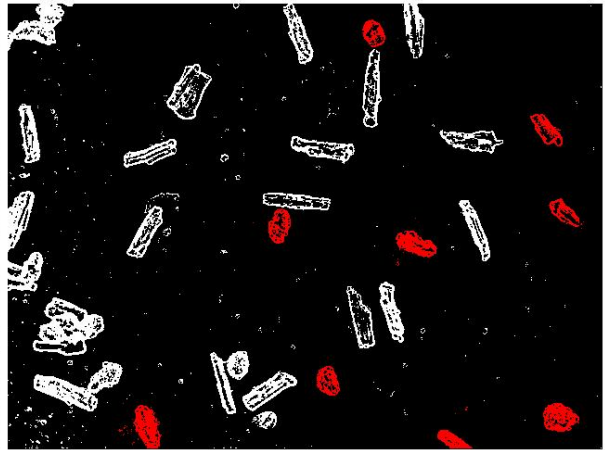
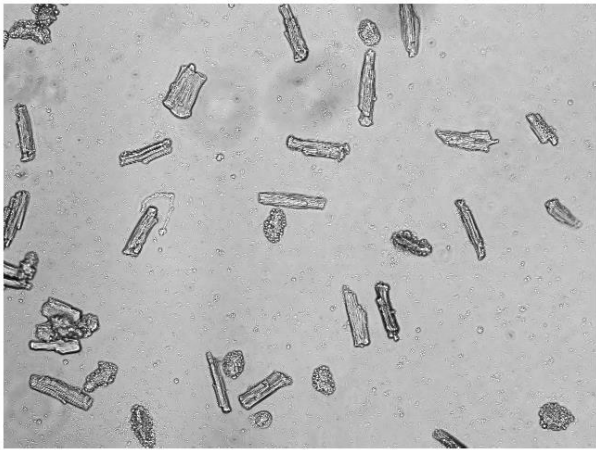


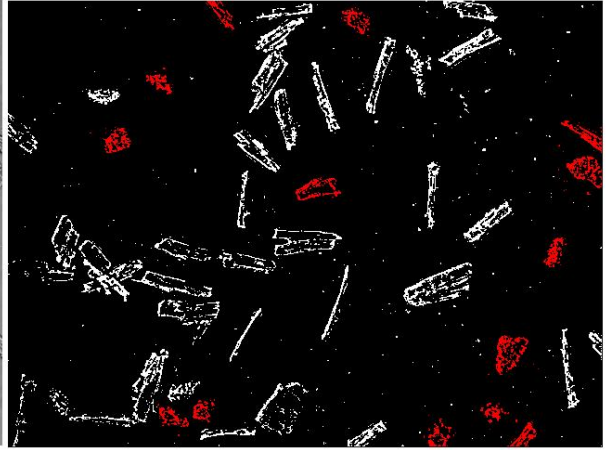












B. Výsledné obrázky z metody založené na LBP

