



**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

**SLEDOVÁNÍ BUNĚK V OBRAZECH Z HOLOGRAFICKÉHO  
MIKROSKOPU**

CELL TRACKING IN IMAGES FROM HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Tomáš Vičar**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.**

**BRNO 2016**



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

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

**Student:** Bc. Tomáš Vičar

**ID:** 147472

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2015/2016

## NÁZEV TÉMATU:

**Sledování buněk v obrazech z holografického mikroskopu**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte princip snímání živých buněk na holografickém mikroskopu a seznamte se s vlastnostmi dodaných obrazových dat a s průběhem experimentů. 2) Proveďte rešerši z oblasti sledování buněk v obrazových sekvencích. 3) Pro účely testování metod si vytvořte vhodnou sadu dat. 4) Implementujte jednoduchý způsob pro ruční či poloautomatickou segmentaci buněk v dodaných sekvencích. 5) Navrhněte a implementujte metodu pro sledování označených buněk z předchozího bodu. 6) Výsledky vašeho přístupu vyhodnoťte a dostatečně diskutujte.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] MEIJERING, E. et al. Methods for Cell and Particle Tracking. Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells, 2012, vol. 504, s. 183-200.

[2] NIXON, M. a A. AGUADO. Feature Extraction and Image Processing, Elsevier, 2005.

**Termín zadání:** 8.2.2016

**Termín odevzdání:** 20.5.2016

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

**Konzultanti diplomové práce:**

**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**

Tato práce se věnuje sledování buněk v obrazových sekvencích pořízených pomocí multimodálního holografického mikroskopu (MHM). Princip holografického mikroskopu je zde popsán společně s jeho aplikací pro záznam buněk. Hlavní část práce popisuje společný přístup pro segmentaci a sledování jednotlivých buněk v dlouhodobých záznamech. Navržený přístup je založen na modelu parametrických aktivních kontur se specifickými modifikacemi pro dosažení přiměřené přesnosti a robustnosti. Implementovaná metoda je zde detailně popsána včetně vyhodnocení a ukázky výsledků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Holografie, multimodální holografický mikroskop, sledování buněk, aktivní kontury

## **ABSTRACT**

This thesis focuses on cell tracking in image sequences acquired using a multimodal holographic microscope (MHM). The principles of holographic microscopy are described together with the application in cells acquisition. The main part of the thesis describes a complete approach for segmentation and tracking of single cells in acquired in long-term sequences. The approach is designed based on parametric active contour models with specific modifications to achieve reasonable precision and robustness. The implemented method is described in detail, including the evaluation and demonstration of results.

## **KEYWORDS**

Holography, multimodal holographic microscope, cell tracking, active contours

VIČAR, Tomáš *Sledování buněk v obrazech z holografického mikroskopu*: diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústavu biomedicínského inženýrství, 2016. 74 s. Vedoucí práce byl doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Sledování buněk v obrazech z holografického mikroskopu“ jsem vypracoval 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 neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského 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.

Brno .....

.....

podpis autora

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Radimu Kolářovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Brno .....

.....

podpis autora

# OBSAH

Úvod	11
<b>1 Holografická mikroskopie</b>	<b>12</b>
1.1 Princip holografie . . . . .	12
1.1.1 Optická holografie . . . . .	12
1.1.2 Digitální holografie . . . . .	14
1.2 Digitální holografická mikroskopie . . . . .	14
1.2.1 In-line DHM . . . . .	14
1.2.2 Off-axis DHM . . . . .	15
1.3 Nekoherentní holografická mikroskopie . . . . .	16
1.3.1 Koherencí řízený holografický mikroskop . . . . .	16
1.3.2 Multimodální holografický mikroskop . . . . .	17
1.3.3 Řízení koherencí . . . . .	18
1.3.4 Rekonstrukce obrazu . . . . .	20
<b>2 Sledování buněk</b>	<b>22</b>
2.1 Segmentace . . . . .	22
2.2 Propojení buněk . . . . .	22
2.3 Kombinovaný přístup . . . . .	22
2.4 Parametry buněk . . . . .	23
2.4.1 Parametry polohy . . . . .	23
2.4.2 Parametry morfologie . . . . .	24
2.5 Větvení trajektorií . . . . .	24
2.6 Použitá metoda . . . . .	25
<b>3 Charakteristika použitých dat</b>	<b>26</b>
3.1 Typ buněk . . . . .	26
3.2 Podmínky záznamu . . . . .	26
3.3 Vlastnosti obrazových záznamů . . . . .	26
<b>4 Teoretický popis použitých metod</b>	<b>28</b>
4.1 Parametrické aktivní kontury . . . . .	28
4.1.1 Základní implementace aktivních kontur . . . . .	29
4.1.2 Vylepšení výpočtu aktivních kontur . . . . .	30
4.2 Watershed transformace . . . . .	36
4.3 Optický tok . . . . .	37
4.3.1 Metoda Lucas-Kanade . . . . .	37
4.3.2 Iterativní metoda Lucas-Kanade . . . . .	38

4.3.3	Pyramidová Lucas-Kanade . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Implementace metody</b>	<b>40</b>
5.1	Struktura algoritmu . . . . .	40
5.2	Výpočet pomocných obrazů . . . . .	41
5.2.1	Úprava základního obrazu . . . . .	41
5.2.2	Binární obraz jader . . . . .	41
5.2.3	Binární obraz pozadí . . . . .	43
5.3	Inicializace kontur . . . . .	44
5.4	Výřez okolí buňky . . . . .	44
5.5	Rozpínání kontur . . . . .	45
5.6	Diskriminace okolí kontury . . . . .	46
5.7	Deformace kontur . . . . .	48
5.7.1	Použitý parametrický obraz . . . . .	50
5.8	Odstranění přesmyček . . . . .	50
5.9	Změny topologie kontur . . . . .	52
5.9.1	Přiřazení jader konturám . . . . .	53
5.9.2	Rozdělení kontury . . . . .	53
5.9.3	Sloučení dvou kontur . . . . .	54
5.9.4	Vytvoření nové kontury . . . . .	55
5.9.5	Zánik kontury . . . . .	55
5.10	Úpravy pohybu kontury . . . . .	55
5.10.1	Omezení rozpínání . . . . .	55
5.10.2	Zabránění přechodu přes jádra . . . . .	56
5.11	Segmentace v následujících snímcích . . . . .	57
5.12	Vyplnění kontury . . . . .	57
5.13	Výpočet parametrů . . . . .	57
5.14	Využití optického toku pro deformaci kontur . . . . .	58
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>60</b>
6.1	Přesnost segmentace . . . . .	60
6.2	Spolehlivost sledování . . . . .	60
6.3	Ukázky výsledků sledování . . . . .	61
6.3.1	Dělení buněk . . . . .	61
6.3.2	Sloučení buněk . . . . .	63
6.3.3	Překrytí buněk . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>67</b>
	<b>Literatura</b>	<b>68</b>

Seznam zkratek	72
A Seznam skriptů a funkcí	73
B Obsah přiloženého CD	74

# SEZNAM OBRÁZKŮ

1.1	Ilustrace holografického záznamu planparalelní desky . . . . .	12
1.2	Princip holografického zobrazení . . . . .	13
1.3	Optické vyvolání obrazu . . . . .	14
1.4	Schéma in-axis DHM [3] . . . . .	15
1.5	Schéma off-axis DHM [3] . . . . .	15
1.6	Schéma CCHM [5] . . . . .	16
1.7	Schéma MHM [4] . . . . .	18
1.8	Pozice složek ve spektru hologramu DHM a CCHM [4] . . . . .	19
1.9	Původní hologram . . . . .	21
1.10	Ukázka rekonstrukce obrazu . . . . .	21
2.1	Trajektorie buňky [8] . . . . .	24
3.1	Ukázka dat . . . . .	27
4.1	Zlepšení vlivem GVF . . . . .	33
4.2	Dosah působení sil . . . . .	34
4.3	Ukázka interpolace . . . . .	35
4.4	Princip watershed transformace . . . . .	36
5.1	Vývojový diagram algoritmu . . . . .	40
5.2	Histogram snímku . . . . .	42
5.3	Ukázka segmentace jader prahováním . . . . .	43
5.4	Ukázka rozdělení jader watershed transformací . . . . .	44
5.5	Ukázka inicializace kontury . . . . .	45
5.6	Ukázka rozpínání kontury . . . . .	46
5.7	Ukázka výpočtu diskriminačního parametru $k(p)$ . . . . .	47
5.8	Vývojový diagram deformace kontury . . . . .	48
5.9	Ukázka přesmyčky . . . . .	51
5.10	Princip rozdělení kontury . . . . .	54
5.11	Ukázka normálové síly bránící přechodu přes jádra . . . . .	56
5.12	Ukázka optického toku pro body kontury . . . . .	59
5.13	Ukázka chyby optického toku . . . . .	59
6.1	Ukázka výsledné segmentace . . . . .	60
6.2	Ukázka interagujících buněk . . . . .	62
6.3	Graf trajektorií buněk . . . . .	62
6.4	Graf hmotností buněk . . . . .	63
6.5	Ukázka buněčného dělení . . . . .	64
6.6	Grafy parametrů při dělení . . . . .	64
6.7	Ukázka sloučení buněk . . . . .	65
6.8	Grafy parametrů při sloučení . . . . .	65

6.9 Ukázka překrytí buněk . . . . .	66
6.10 Grafy parametrů při překrytí . . . . .	66

# ÚVOD

Holografii objevil Denis Gabor v roce 1948, který za ni v roce 1971 obdržel Nobelovu cenu. Její širší uplatnění však bylo možné až po vzniku prvních laserů v roce 1960, neboť v základních aplikacích je potřebný koherentní zdroj světla. Později však byly vyvinuty metody schopné zobrazovat holografické obrazy v bílém světle - reflexní a duhová holografie. Jednou z prvních aplikací holografie bylo vytváření holografických optických prvků, které mohou nahradit klasické optické členy (např. čočky). Dále se začala využívat v optické interferometrii, což je jeden z nejcitlivějších nástrojů pro nedestruktivní testování.

Vývoj CCD snímačů s lepším rozlišením a větší výpočetní výkon počítačů umožnil vznik digitální holografie, kdy je hologram digitálně zaznamenán a jeho rekonstrukce je provedena v digitální podobě. Vývoj digitální holografie umožnil také ve spojení s mikroskopickými technikami vytvoření digitální holografické mikroskopie. [1]

Vysoké učení technické společně se společností TESCAN vyvinuly multimodální holografický mikroskop, jehož velkou výhodou je možnost využití nekoherentního osvětlení. Tento mikroskop je velmi vhodný pro biologické vzorky, neboť dokáže zobrazovat živé buňky bez nutnosti obarvení, které by mohlo ovlivnit některé fyziologické pochody. Jsou pomocí něho prováděny dlouhodobé experimenty na živých buňkách. Experiment trvá typicky několik desítek hodin a během něj se nasnímá několik stovek obrazů, kdy každý obsahuje až několik buněk. Dostáváme velké množství obrazových dat, proto je vhodné jejich automatické zpracování.

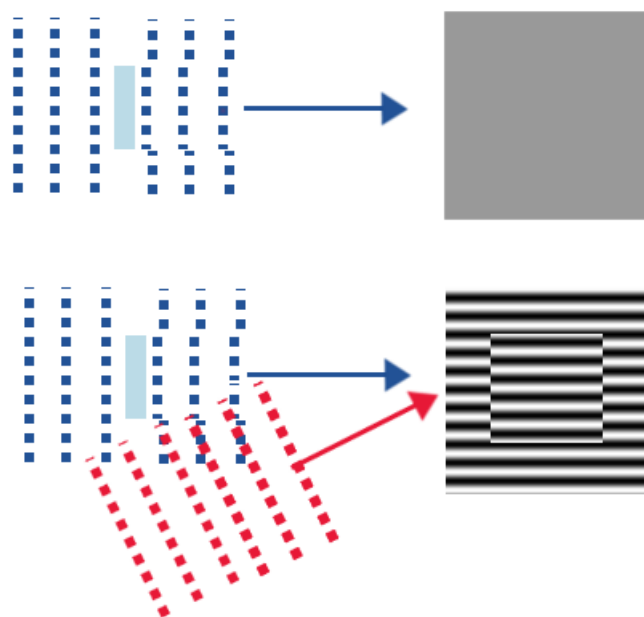
Právě automatickým zpracováním obrazových sekvencí buněk se zabývají metody buněčného sledování. Tyto metody se snaží převést původní obrazovou informaci na soubor parametrů, které chování těchto buněk popisují. Tyto parametry nám pak nesou potřebné informace, které jsme schopni využít pro další vyhodnocení.

Pro segmentaci byla zvolena metoda parametrických aktivních kontur, která je v této práci podrobně popsána. Kromě základního deformačního modelu je zde popsána řada úprav, aby bylo možné metodu použít i pro sledování těchto buněk. Je zde popsána také metoda automatické inicializace kontur.

# 1 HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE

## 1.1 Princip holografie

U běžné fotografie zaznamenáváme v každém bodě pouze intenzitu světla a ztrácíme informaci o směru dopadajícího světla. U holografického záznamu nezaznamenáváme signálovou vlnu světla jdoucí od pozorovaného objektu, ale interferenční proužky vzniklé interakcí signálové vlny s referenční vlnou. Zaznamenáváme opět intenzitu, ale v interferenčních proužcích se promítá i informace o fázi světelné vlny. Na obrázku 1.1 je zobrazen průchod světelné vlny planparalelní deskou. Vidíme, že fázový posun světelné vlny se na výsledném obraze intenzity nijak neprojeví. Pokud však signálová vlna interferuje s referenční, tak se přítomnost destičky projeví posunem interferenčních proužků. Výsledný záznam tedy obsahuje i informaci o fázi. Zároveň vidíme, že vzniklý obraz sice informaci nese, ale nezobrazuje ji přímo. Zaznamenaný obraz tedy musíme zpracovat. Z hlediska zpracování vzniklého záznamu (hologramu)



Obr. 1.1: Ilustrace holografického záznamu planparalelní desky

můžeme holografické techniky rozdělit na optickou holografii a digitální holografii.

### 1.1.1 Optická holografie

Při optické holografii probíhá záznam hologramu na fotografický materiál a jeho vyvolání provádíme osvětlením takto zaznamenaného hologramu referenční vlnou.

Pokud máme dvě koherentní vlny - signálovou a referenční, kde signálová vlna reaguje se zaznamenaným objektem, jako na obrázku 1.2, pak takto zaznamenaná intenzita bude odpovídat

$$I = |R + S|^2 = |R|^2 + |S|^2 + RS^* + R^*S. \quad (1.1)$$

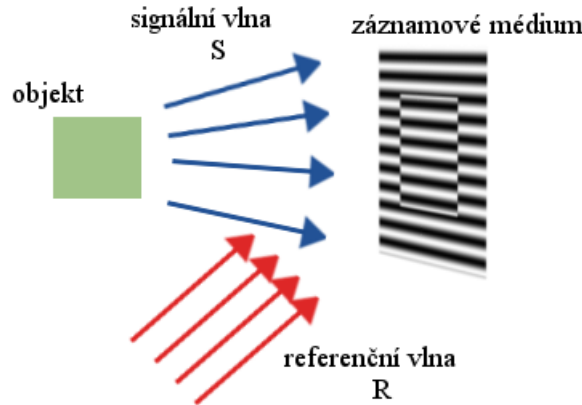
Komplexní amplituda referenčního svazku přitom odpovídá v každém bodě záznamového média  $(x, y)$  hodnotám

$$R(x, y) = R_0 e^{i2\pi\xi x}, \quad (1.2)$$

kde  $\xi = \frac{\sin(\alpha)}{\lambda}$ , kde  $\alpha$  je úhel mezi referenční a signálovou vlnou. Pro referenční vlnu tedy závisí na pozici pouze fázová složka. Pro signálovou vlnu je na pozici závislá jak amplituda, tak i fáze vlny

$$S = S_0(x, y) e^{-i\Phi(x, y)}. \quad (1.3)$$

Pro rekonstrukci necháme na hologram dopadat referenční vlnu, bude nám vznikat

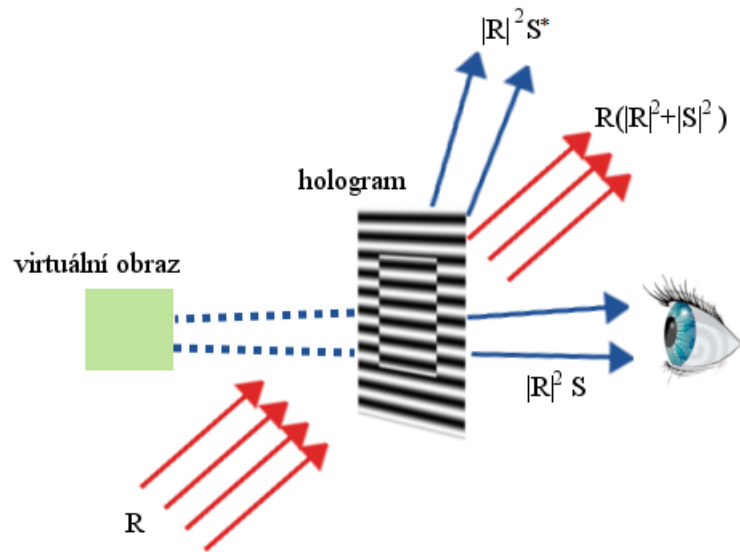


Obr. 1.2: Princip holografického zobrazení

rekonstruovaná vlna  $U$ . Budeme přitom předpokládat lineární závislost dopadající intenzity a výsledné odrazivosti hologramu  $t \sim I$ . Rekonstruovaná vlna pak bude odpovídat

$$U = tR \sim R|R|^2 + R|S|^2 + R^2S^* + |R|^2S. \quad (1.4)$$

Poslední člen odpovídá signálové vlně váhované intenzitou referenční vlny. Pokud je tedy referenční vlna prostorově invariantní, tak tato složka odpovídá vlně vycházející z původního objektu. Provedeme-li vyvolání hologramu referenční vlnou, jako na obrázku 1.3, tak jednotlivé složky rovnice 1.4 lze při správném nastavení, prostorově oddělit. Nastavení na obrázcích 1.2 a 1.3 přitom odpovídá off-axis holografii. Obdobným způsobem můžeme odvodit vyvolání při in-line holografii, tyto dva principy budou blíže popsány v 1.2.1 a 1.2.2. [2]



Obr. 1.3: Optické vyvolání obrazu

## 1.1.2 Digitální holografie

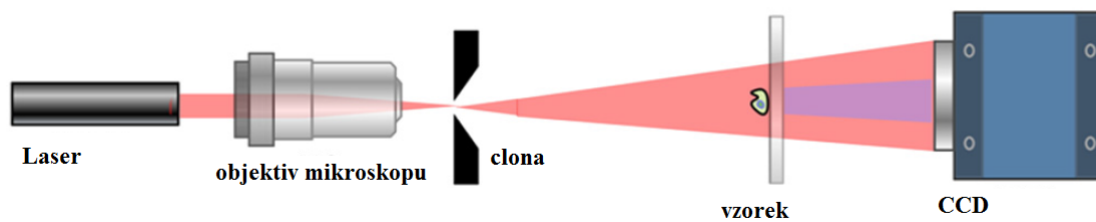
U digitální holografie (DH) je hologram digitálně zaznamenán pomocí optoelektronického prvku. Hologram je pak možné numericky rekonstruovat. Veškeré mikroskopické techniky pracují na principu DH. Numerickou rekonstrukci lze provést řadou výpočetních metod, jako je například úhlová spektrální metoda, Kirchhoff-Helmholtzova transformace, Fresnelova transformace a Huygensova konvoluce. [3]

## 1.2 Digitální holografická mikroskopie

Digitální holografická mikroskopie (DHM) je nově se rozvíjející způsob zobrazování často využívaný v biomedicínských aplikacích. [3]

### 1.2.1 In-line DHM

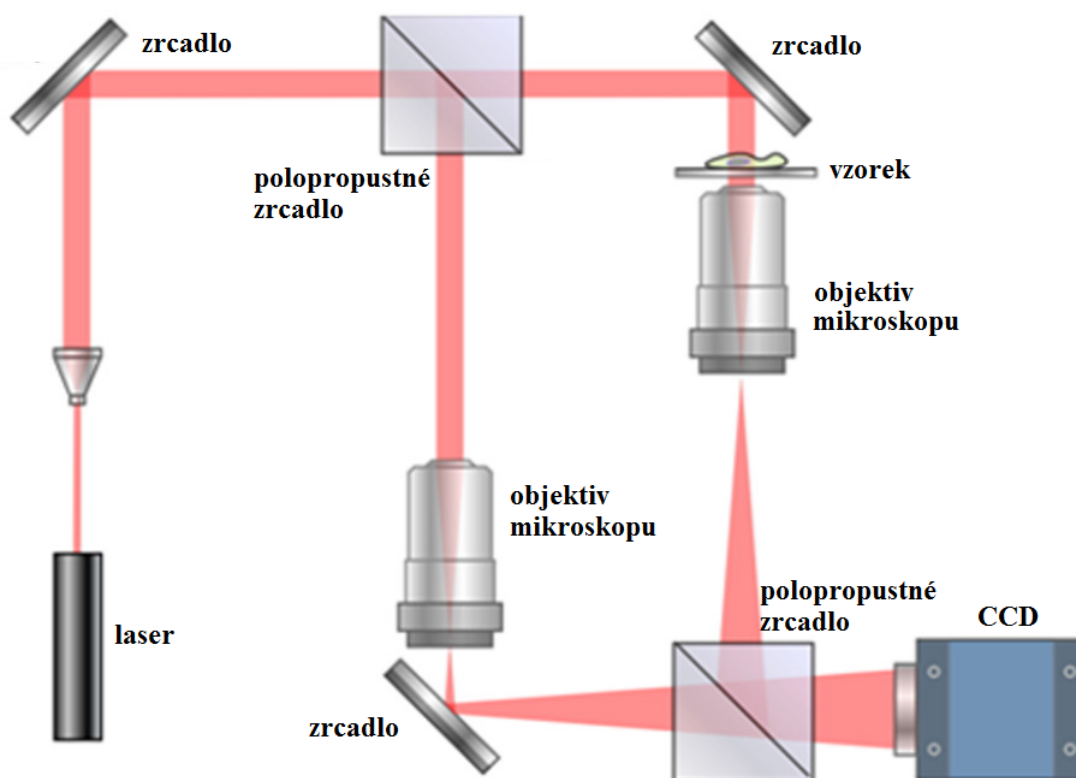
U In-line DHM je využit jeden světelný paprsek, který se nedělí a prochází skrz vzorek. Schéma této konfigurace můžeme vidět na obrázku 1.4. Jako referenční paprsek pro vytvoření interference je zde použito světlo procházející v okolí vzorku, které se vlivem této překážky se ohýbá. Paprsek je před vstupem do vzorku zaostřen do clony s otvorem o rozměrech v řádu vlnové délky použitého světla. Pokud je pro zobrazení použito koherentní osvětlení, tak tato clona není nutná. Důležité u této konfigurace je, že referenční paprsek dopadá na detektor pod stejným úhlem jako signální paprsek. Výsledný hologram se v takovém případě liší a je popsán jinou rovnicí. [3]



Obr. 1.4: Schéma in-axis DHM [3]

### 1.2.2 Off-axis DHM

U off-axis DHM je použita konfigurace jako na obrázku 1.5. Světelný paprsek je rozdělen na signální a referenční paprsek. Paprsky v obou větvích jsou pak fokusovány stejným objektivem, kde signální paprsek navíc prochází skrz vzorek. Paprsky pak vzájemně interferují na detektoru. [3]

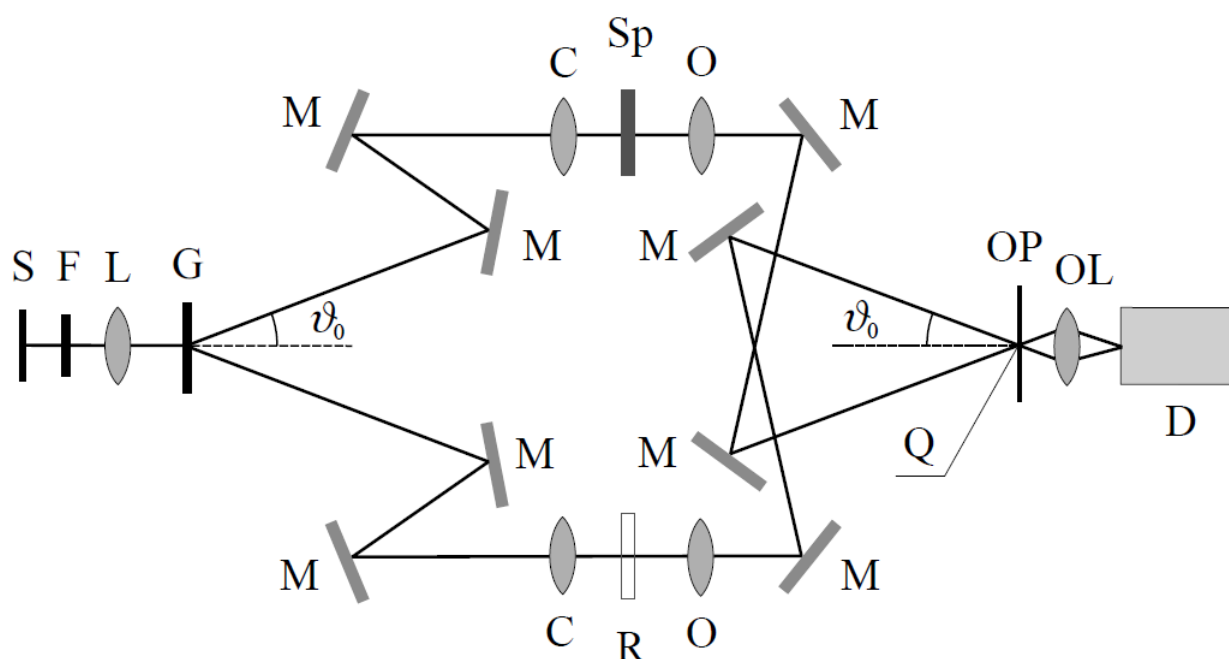


Obr. 1.5: Schéma off-axis DHM [3]

## 1.3 Nekoherentní holografická mikroskopie

Tato technika byla použita k záznamu dat zkoumaných v této práci. Metoda je založena na off-axis konfiguraci a používá nekoherentní osvětlení. Aby bylo možné použít nekoherentní osvětlení, musí být splněn předpoklad achromaticity, proto je použit tzv. achromatický interferometr. Použitý interferometr je Machova-Zehnderova typu. Achromatický hologram vznikne, pokud jsou interferenční proužky pro všechny vlnové délky stejné prostorové frekvence. [4]

### 1.3.1 Koherencí řízený holografický mikroskop



Obr. 1.6: Schéma CCHM [5]

S... zdroj světla, F... interferenční filtry, L... kolektor, M... zrcadla, G... difrakční mřížka, C... kondenzor, Sp... pozorovaný vzorek, R... referenční komůrka, O... objektiv, OP... výstupní rovina, Q... osový bod výstupní roviny OL... výstupní čočka, D... detektor.

Na obrázku 1.6 je schéma původního, koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM – Coherence-Controlled Holographic Microscope), ze kterého vychází konstrukce multimodálního holografického mikroskopu (MHM – Multimodal Holographic Microscope). Konfigurace je obdobná jako u běžného optického mikroskopu, ale jsou zde použita dvě totožná ramena, která jsou zrcadlově symetrická. Objektiv O a kondenzor C jsou tvořeny totožnými objektivy s konečnou tubusovou délkou.

Zdrojem světla S může být nekoherentní plošný zdroj, kde je pomocí kolektoru L a děliče svazku G vytvořeno Köhlerovo osvětlení a navíc je zde soustava barevných filtrů F. Z difrakční mřížky G je použit 1. a -1. difrakční řád, každý pro jednu větev soustavy. Kondenzory jsou nastavené pod mez rozlišení proužků difrakční mřížky. Interferenční struktura tedy vzniká až ve výstupní rovině OP.

Díky překřížení větví pak může být dosaženo achromatičnosti. Pro difrakční řád  $n = 1, -1$  je světlo vychýleno na difrakční mřížce o úhel

$$\sin(\vartheta) = n\lambda f_G, \quad (1.5)$$

kde  $f_G$  je prostorová frekvence difrakční mřížky a  $\lambda$  je vlnová délka světla. Jednotlivé větve odkloníme o úhel  $\vartheta_0$ , který zjistíme dosazením střední vlnové délky  $\lambda_0$ , pro kterou je interferometr konstruován. Světlo s různými vlnovými délkami se rozptýlí pod úhlem dle 1.6. Jelikož dojde k převrácení obrazu, tak bude v ohniskových rovinách objektivu větší vlnová délka vychýlena o menší úhel, a tedy méně posunuta od osy. Aby v hologramu vznikly interferenční proužky jedné prostorové frekvence (achromatičnost), je nutné nastavit dopad na výstupní rovinu tak, aby se tam zdroj zobrazil stejně jako na difrakční mřížce. Toho je dosaženo převrácením barev pomocí překřížení větví a dopadem pod úhlem  $\vartheta_0$ . Frekvence interferenčních proužků výsledného obrazce pak bude

$$f_{OP} = \frac{2\sin(\vartheta)}{\lambda} = 2f_G, \quad (1.6)$$

protože interferujeme větve  $n = 1, -1$ . [5]

### 1.3.2 Multimodální holografický mikroskop

MHM vychází z původního CCHM, ale achromatičnosti interferometru je dosaženo jiným způsobem. Tento mikroskop byl vyvinut ve spolupráci výzkumníků Vysokého učení technického v Brně a společnosti TESCAN.[6] V původním návrhu byly potřeba 4 stejné objektivy pro každé zvětšení. Další velkou nevýhodou byl malý rozsah vlnových délek, které po difrakci kondenzor zvládl pojmout. U MHM dochází k difrakci pouze v referenční větvi. Schéma můžeme vidět na obrázku 1.7. Využíváme 1. difrakční řád, odražený od difrakční plochy, pro který vychází úhel odrazu

$$\sin(\alpha) = \lambda f_G. \quad (1.7)$$

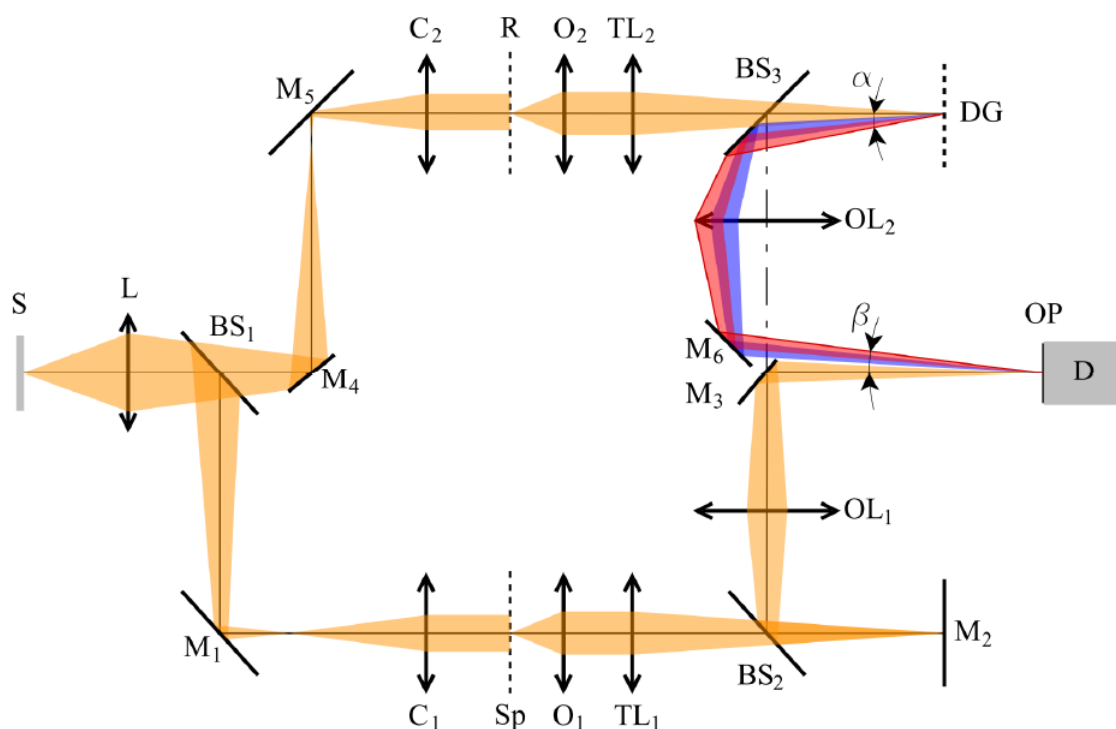
Spektrálně rozložené světlo ještě prochází výstupní čočkou OL<sub>2</sub>, výsledný úhel dopadu pak bude snížen vlivem této čočky na

$$\sin(\beta) = \frac{\sin(\alpha)}{m_{OL}}, \quad (1.8)$$

kde  $m_{OL}$  odpovídá zvětšení čočky. Jelikož v druhé větvi k difrakci nedochází, dopadají různé vlnové délky světla vyzařující z jednoho bodu zdroje pod jiným úhlem. Vznikají tak interferenční proužky paralelní s vrypy interferenční mřížky o prostoro-  
vé frekvenci

$$f_c = \frac{f_G}{m_{OL}}, \quad (1.9)$$

kteřá je konstantní pro všechny vlnové délky a interferometr je tedy achromatický. Pro achromaticnost a tím i kontrast výsledného hologramu je velmi důležité přesné nastavení dopadového úhlu  $\beta$ . To je zajištěno pomocí dvou piezoelektrických krystalů nastavujících posun zrcadla  $M_2$  podél optické osy a vyrovnání objektivu  $O_2$  kolmo k optické ose.



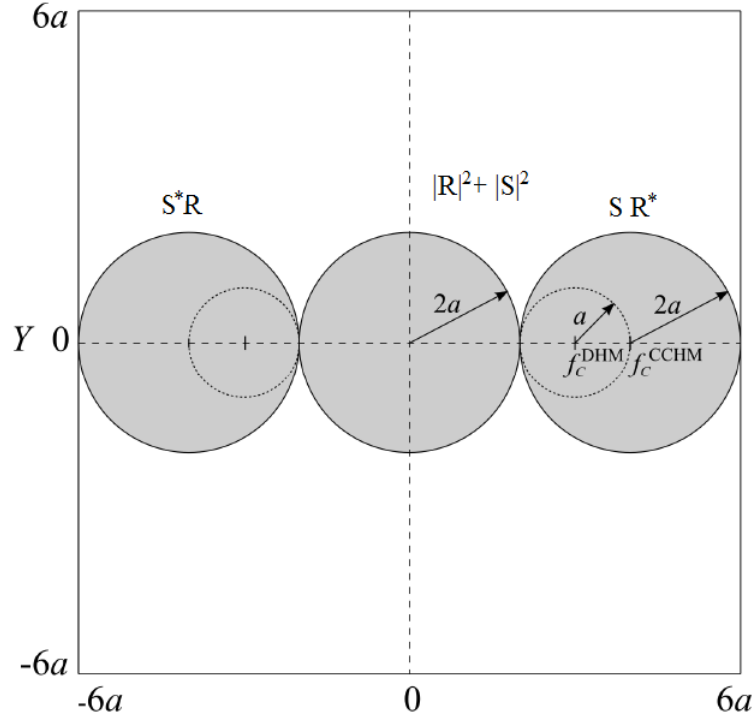
Obr. 1.7: Schéma MHM [4]

S...zdroj světla, L...kolektor, M...zrcadlo, BS...dělič svazku, C...kondenzor, Sp...pozorovaný vzorek, R...referenční komůrka, O...objektiv, TL...tubusová čočka OP...výstupní rovina, D...detektor, DG...difrakční mřížka, OL...výstupní čočka.

### 1.3.3 Řízení koherencí

Intenzita vzniklého hologramu lze popsat rovnicí

$$I = |R + S|^2 = |R|^2 + |S|^2 + RS^* + R^*S, \quad (1.10)$$



Obr. 1.8: Pozice složek ve spektru hologramu DHM a CCHM [4]

což lze rozepsat jako

$$I = |R|^2 + |S|^2 + SR_0^* e^{i2\pi f_c x} + S^* R_0 e^{i2\pi f_c x}. \quad (1.11)$$

Fourierovské spektrum intenzity vypadá jako na obrázku 1.8, na kterém je i porovnání s klasickou DHM. Z vlastností Fourierovi transformace vyplývá, že  $|R|^2$  a  $|S|^2$  odpovídá ve spektru autokorelacím spekter  $S$  a  $R$ . Transformací  $RS^*$  a  $R^*S$  vznikají členy tvořené konvolucí spekter  $R * S^*$  a  $R^* * S$ . To vysvětluje složení spektra na obrázku 1.8, neboť konvoluce způsobí namodulování signálu  $S$  na vlnu  $R$ , jejíž spektrum musí ležet na pozici nosné frekvence  $f_c$ . Obdobně spektrum  $R^*$  musí ležet na pozici  $-f_c$ .

Teoretická maximální frekvence signální vlny přenesená mikroskopem  $f_{max,s}$  je dána numerickou aperturou  $NA$ , vlnovou délkou  $\lambda$  a zvětšením  $m$  jako

$$f_{max,s} = \frac{NA}{m\lambda}. \quad (1.12)$$

Spektrální složka  $|S|^2$  pak ve spektru bude mít poloměr  $2a$ , kde  $a = f_{max,s}$ . Pro dokonale koherentní zdroj klasického off-axis DHM bude spektrum  $R$  odpovídat Diracovu impulsu. Spektrum  $R * S^*$  pak bude tvořeno pouze složkou  $S$  a bude mít poloměr  $a = f_{max,s}^{DHM} = f_{max,s}$ . Z toho je zřejmé, že takový DHM bude mít dvojnásobné rozlišení oproti běžnému optickému mikroskopu, pro který je rozlišení běžně počítáno jako  $f_{max,s}^{OM} = 2\frac{NA}{m\lambda}$ . Pro CCHM (i DHM) nepoužíváme koherentní zdroj.

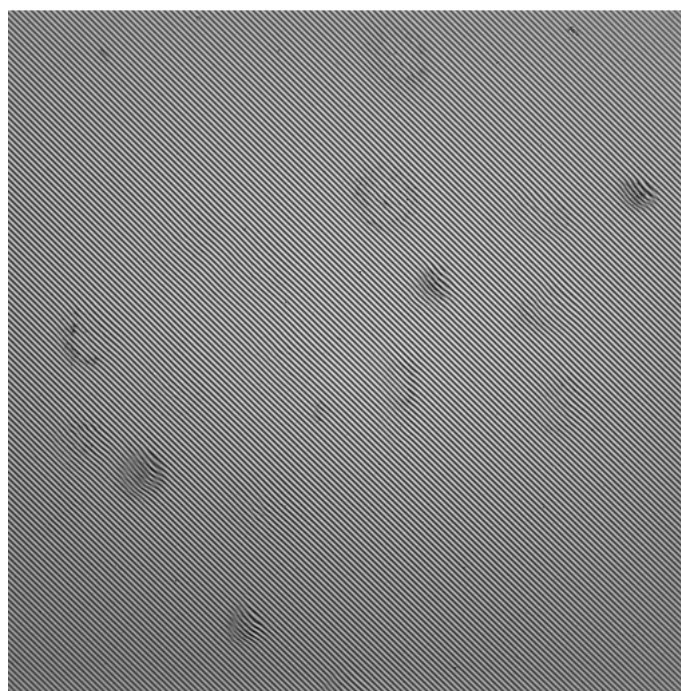
Velikost spektra  $R$  pro dokonale nekoherentní zdroj  $f_{max,r}^{CCHM}$  bude opět odpovídat maximální přenesené frekvenci mikroskopem  $f_{max,s}$ . Spojením  $R * S^*$  pak dostáváme dvojnásobný poloměr spektra  $f_{max,rs^*}^{CCHM} = 2f_{max,s} = 2a$ , dosahujeme tedy rozlišení běžného optického mikroskopu. Při nastavování koherence světla se pak můžeme pohybovat v rozsahu  $< a, 2a >$  a nastavovat tak maximální přenášenou frekvenci. Přenášení větší frekvence však nemusí zajistit lepší obraz. Na velkých frekvencích se snižuje kontrast. Snižováním přenášené frekvence můžeme tyto špatně kontrastní části odstranit. Nastavením koherence lze tedy vybrat maximální přenesenou frekvenci tak, aby bylo dosaženo nejvyšší kvality obrazu. [4]

### 1.3.4 Rekonstrukce obrazu

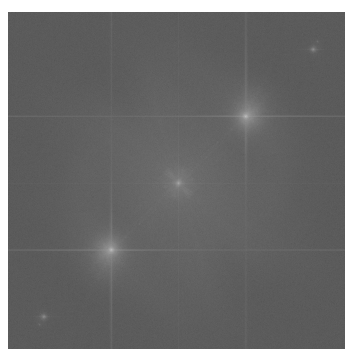
Pro zkoumaná data byl hologram rekonstruován na intenzitu a fázi pomocí odstranění nosné složky ve fourierovském prostoru. Vzniklý hologram lze popsat rovnicí 1.10. Jednotlivé složky jsou ve fourierovském spektru rozděleny jako na obrázku 1.8.

Ze spektra je pro rekonstrukci nutné vyjmout část odpovídající  $SR^*$  nebo  $S^*R$  (obě složky lze využít pro rekonstrukci obrazu) a přesunout tak, aby se frekvence  $f_c$  nacházela ve středu spektra. Spektrum je vhodné separovat pomocí Hammingova okna. Pokud upravené spektrum převedeme zpět do prostorové oblasti, dostáváme komplexní signál. Z tohoto signálu vypočítáme intenzitu obrazu jako kvadrát modulu tohoto signálu a fázi vypočítáme jako argument tohoto signálu. Pro obraz fáze je také nutné provést rozbalení fáze. [4]

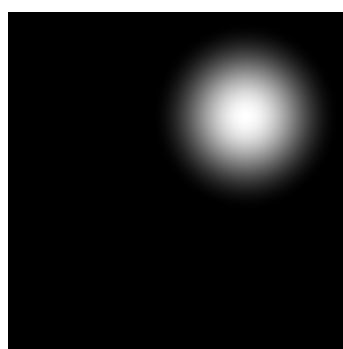
Proces rekonstrukce těchto obrazů provádí pro zkoumaná data obslužný program holografického mikroskopu, ale poskytuje i původní hologramy. Ukázku původního hologramu lze vidět na obrázku 1.9. Popsaná rekonstrukce obrazu byla testována a výsledek jednotlivých kroků je na obrázku 1.10. Pro zobrazení byl použit logaritmus amplitudových spekter. Logaritmus je zde použit, aby bylo možné zachytit celou dynamiku spektra. Je zde zobrazeno spektrum původního hologramu, použité Hammingovo okno v místě provedené separace a separovaná část spektra posunutá do středu spektra. Jsou zde také zobrazeny výsledné obrazy intenzity a fáze, včetně obrazu fáze před rozbalením.



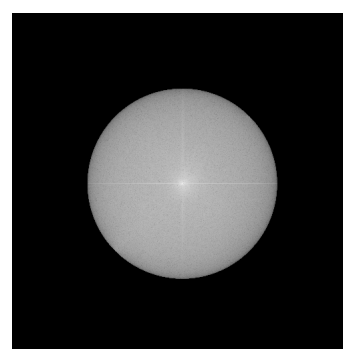
Obr. 1.9: Původní hologram



(a) Spektrum hologramu



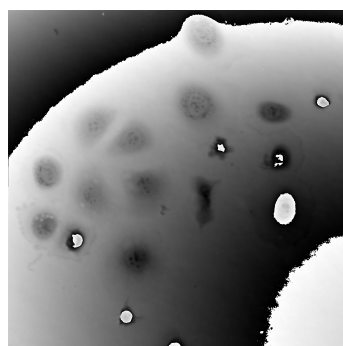
(b) Hammingovo okno



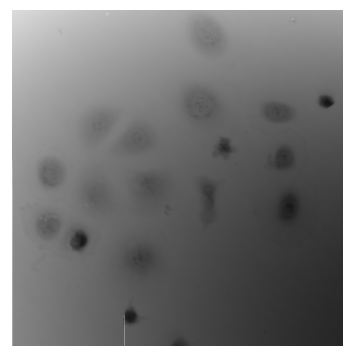
(c) Posunutý výřez spektra



(d) Obraz intenzity



(e) Obraz fáze



(f) Rozbalená fáze

Obr. 1.10: Ukázka rekonstrukce obrazu

## 2 SLEDOVÁNÍ BUNĚK

Vstupními daty pro sledování buněk je sekvence snímků v čase. Výsledkem sledování buněk je sekvence koordinátů pozice a dalších vlastností objektu v každém časovém okamžiku. Výsledek je pak možné použít pro další vyhodnocení biologicky důležitých parametrů. Případně můžeme dosáhnout výrazné redukce množství dat, pokud uchováme pouze informace o potřebných parametrech a již neukládáme obrazové sekvence.

Problém sledování buněk můžeme rozdělit na dva základní kroky:

1. rozpoznání hledaného objektu a jeho separace od pozadí v každém snímku - segmentační krok,
2. nalezení sobě odpovídajících objektů a jejich propojení segmentovaných objektů z jednoho snímku do druhého - propojující krok. [8]

### 2.1 Segmentace

K problému sledování buněk existuje řada přístupů. Vzhledem k segmentaci je tím nejjednodušším prahování, kdy oddělíme objekty od pozadí na základě prahové hodnoty intenzity pixelů, kde jsou následně oddělené oblasti považovány za jednotlivé buňky. Tuto metodu lze využít jen v případě nízké hladiny šumu a dobrého kontrastu, jinak je nutné použít sofistikovanější přístupy segmentace. Velmi populárními přístupy jsou metody tvarové shody - pokud jsou buňky velmi podobného tvaru, watershed transformace a deformovatelné modely. [8]

### 2.2 Propojení buněk

Vzhledem k propojování segmentovaných buněk je nejjednodušším přístupem propojení s nejbližší buňkou dalšího snímku. Dalšími přístupy pak mohou být například porovnávání buněk na základě podobnosti v intenzitě, objemu, tvaru a jiných vlastnostech. Volba vhodné metody závisí na použitých datech, ale také na snímkové frekvenci. Pokud je snímková frekvence dostatečně vysoká, pozice buňky se nestihne dostatečně změnit a propojení odpovídajících buněk je tak jednodušší. [8]

### 2.3 Kombinovaný přístup

Některé přístupy umožňují metodu kombinující segmentační a propojující krok. Tyto metody nazýváme online sledování buněk. Jedná se o metody využívající segmentace

tvarové shody nebo deformovatelných modelů, kdy výsledek segmentace z předcházejícího snímku použijeme pro iniciaci segmentace v dalším snímku. Tím řešíme i problém propojení buněk, kde je tímto do procesu vnesena informace o pozici i tvaru buňky. [8]

## 2.4 Parametry buněk

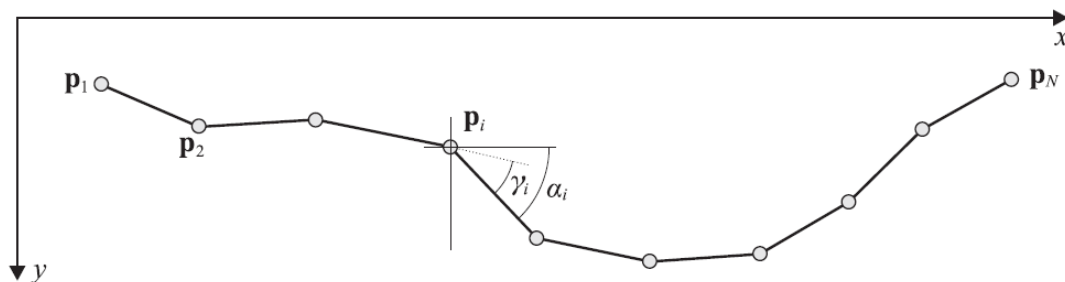
Měřené parametry můžeme rozdělit na parametry polohy buňky a morfologie buňky. Pro parametry vycházející z polohy buňky můžeme buňku považovat za nekonečně malý bod, který se pohybuje ve zkoumaném prostoru.

### 2.4.1 Parametry polohy

Za polohu buňky v jednotlivých snímcích většinou považujeme souřadnice jejího centroidu, pro 2D sledování buněk tedy dostáváme vektor poloh v diskrétních časech  $p_i = (x_i, y_i)$ . Na spojitou trajektorii pak musíme polohu interpolovat, což nejčastěji provádíme pomocí lineárního splinu. Dostáváme tedy trajektorii buňky jako na obrázku 2.1. Tabulka 2.1 shrnuje výčet nejčastěji počítaných parametrů vycházejících z trajektorie buňky, kde vzdálenost  $d(p_i, p_{i+1})$  se pro trajektorii interpolovanou pomocí lineárních splinů vypočítá pomocí euklidovské vzdálenosti.

Parametr	Definice
Přímá uražená vzdálenost	$d_{net} = d(p_i, p_N)$
Celková uražená vzdálenost	$d_{tot} = \sum_{i=1}^{N-1} d(p_i, p_{i+1})$
Maximální dosažená vzdálenost	$d_{tot} = \max_i d(p_1, p_i)$
Celkový čas	$t_{tot} = \frac{N-1}{\Delta t}$
Poměr zachycení	$r_{con} = \frac{d_{net}}{d_{tot}}$
Aktuální úhel pohybu	$\alpha_i = \arctan\left(\frac{(y_{i+1}-y_i)}{(x_{i+1}-x_i)}\right)$
Změna směru pohybu	$\gamma_i = \alpha_i - \alpha_{i-1}$
Aktuální rychlost	$v_i = \frac{d(p_i, p_{i+1})}{\Delta t}$
Průměrná rychlost	$\bar{v} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} v_i$
Průměrná přímá rychlost	$v_{lin} = \frac{d_{net}}{t_{tot}}$
Linearita dopředného postupu	$r_{lin} = \frac{v_{lin}}{\bar{v}}$
Střední kvadratický posun	$MSD(n) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} d^2(p_i, p_{i+n})$

Tab. 2.1: Tabulka parametrů vycházejících z trajektorie buňky [8]



Obr. 2.1: Trajektorie buňky [8]

## 2.4.2 Parametry morfologie

V případě 2D sledování buněk patří mezi nejčastěji měřené morfologické parametry obvod, plocha, průměrná intenzita a cirkularita. Rozměry buňky přitom většinou počítáme v pixelech obrazu. Cirkularita se vypočítá jako

$$c = \frac{P^2}{4\pi A}, \quad (2.1)$$

kde  $P$  je obvod a  $A$  je plocha. Pro přesnější popis lze také využít Zernikeho koeficienty. [8]

## 2.5 Větvení trajektorií

Větvení trajektorií jsou problematické situace při sledování buněk. Pro korektní sledování buněk nestačí pouze vyhledat buňky v prvním snímku a následně vyhledávat tyto buňky v dalších snímcích, neboť se mohou objevit situace, kdy se v obrazové sekvenci objeví nová buňka, nebo existující buňka zmizí.

Jelikož máme jen omezené zorné pole, může nastat situace, kdy buňka z tohoto zorného pole vystoupí. V takovém případě musíme ukončit její sledovanou trajektorii. Buňky mohou také vstoupit do zorného pole. Takové buňky je nutné vyhledat a začít jejich trajektorii sledovat.

Další možností jsou samotné fyziologické procesy sledovaných buněk. Do této kategorie spadá hlavně buněčné dělení. Z původní buňky vznikají dvě buňky, musíme tedy sledovanou trajektorii rozdělit na dvě navazující trajektorie. Buněčné dělení přitom provází typické změny parametrů (zvětšení, zvýšené produkce látek), které je pak možné využít pro jeho detekci.

V některých případech může dojít také ke sloučení buněk, kdy se buňky spojí a vzniká jedna buňka více-jaderná, nebo kdy je jedna z buněk druhou buňkou pohlcena a zmetabolizována. V takových případech je nutné dvě trajektorie sloučit na jednu.

## 2.6 Použitá metoda

Pro implementaci byla vybrána metoda aktivních kontur, která spadá do metod deformovatelných modelů. Pro běžné prahovací metody mají snímky příliš nízký kontrast. Metody založené na tvarové shodě nelze také použít, neboť tvary sledovaných buněk jsou příliš variabilní. Metoda aktivních kontur spadá do online metod sledování buněk - lze jí tedy kombinovat jak pro segmentaci, tak i pro propojení odpovídajících buněk. V každém snímku je kolem buňky deformací vytvořena segmentační kontura, která je použita jako iniciační kontura pro další snímek. Výsledkem je pak pro každou buňku v každém snímku sada bodů tvořící její konturu, ze které lze pak snadno určit potřebné parametry. Metoda aktivních kontur je pro sledování buněk často využívána, jako například v [9] a [10].

## 3 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH DAT

### 3.1 Typ buněk

Sledování buněk je prováděno na buněčné linii PC-3, prostatických rakovinových buňkách. Tato buněčná linie byla vybrána laboratoří, od které byli poskytnuty záznamy, protože s jejím zkoumáním mají dlouhodobé zkušenosti. PC-3 je jedna z buněčných linií používaných pro zkoumání rakoviny prostaty. Je možné na ní zkoumat biochemické změny v pokročilém stádiu rakoviny prostaty, reakce na chemoterapeutika, nebo mohou být použity k vytvoření modelových nádorů u myši. Tato buněčná linie byla pořízena v roce 1979 z kostní metastázy čtvrtého stupně prostatických rakovinových buněk dvašedesátiletého bělocha. Z morfologického hlediska mají tyto buňky vlastnosti rakovinových buněk epidermálního původu, pro které je typické velké množství mikroklyků, abnormální jádra, jadérka a mitochondrie, junkční komplexy, kroužkové lamely a lipidová tělíška. [6] [7]

### 3.2 Podmínky záznamu

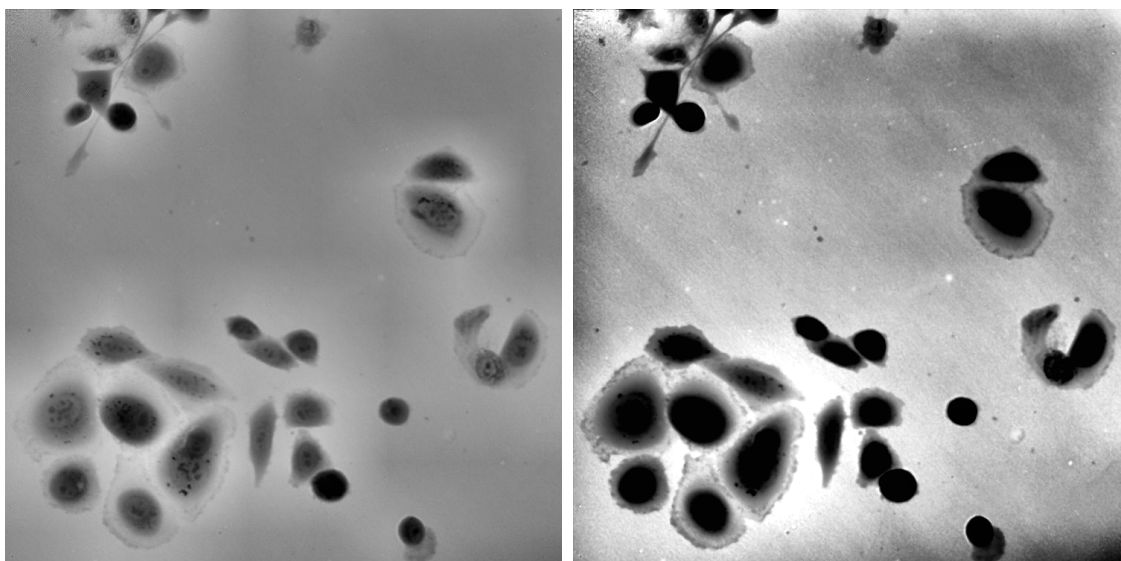
Záznamy buněčné linie PC-3 byly prováděny pomocí multimodálního holografického mikroskopu vyvinutého za spolupráce VUT v Brně a společnosti TESCAN. Pro záznam hologramu byl použit Nikon Plan 10×/0.3 objektiv s CCD kamerou XIMEA MR4021MC-VELETA. Záznam byl prováděn s rychlostí 1 snímek/2 minuty s rozlišením 1392×1040px. [7]

### 3.3 Vlastnosti obrazových záznamů

Ukázku použitých dat, můžeme vidět na obrázku 3.1. Pro zobrazování je v této práci používán druhý obraz, který je upraven pomocí lineární transformace jasu tak, aby se celý rozsah stupňů šedi soustředil na viditelnost hranice buňky. Nezobrazí se tak struktura uvnitř jader, která nás z hlediska segmentace nezajímá. Pro segmentaci je tedy toto zobrazení vhodnější.

Sledování buněk je prováděno na obrazových sekvencích fáze, vytvořených z původního hologramu metodou popsanou v kapitole 1.3.4. Pro buňky jsou typická výrazná jádra obklopená méně výraznou cytoplazmou. Některé buňky pak mohou vytvářet dlouhé mikroklyky. Typická je také výrazná vzájemná buněčná interakce.

Jelikož záznam má velkou vzorkovací frekvenci (1 snímek/2 minuty) není nutné používat techniky spojování buněk, neboť se buňka nepohybuje dostatečně rychle. V následujícím vzorku tedy můžeme za odpovídající buňku považovat buňku nejméně



(a) Původní obraz

(b) Obraz zvýrazňující hranice

Obr. 3.1: Ukázka dat

vzdálenou od předchozí, pokud se nejedná o problematické situace. Kromě jevů popsaných v 2.5 je nejčastějším pozorovaným problematickým jevem, jež je zásadní pro sledování těchto buněk, překrytí buněk bez interakce. Buňky se v tomto případě dostanou nad sebe, což výrazně zhorší možnosti jejich sledování, neboť tyto buňky často nelze vůbec rozlišit. Dalším problémem jsou dlouhé mikroklky, které se u některých buněk vyskytují. Ty však způsobují pouze chybu nepřesné segmentace.

## 4 TEORETICKÝ POPIS POUŽITÝCH METOD

### 4.1 Parametrické aktivní kontury

Metoda aktivních kontur je používána převážně tam, kde hledaný objekt nemá fixní tvar nebo změny tvaru tohoto objektu nejdou jednoduše popsat pomocí změny parametrů popisné funkce. V takovém případě nelze použít segmentační metody založené na tvarové shodě a metoda aktivních kontur je velmi vhodnou volbou.

Při segmentaci se snažíme nalézt hranici objektu. O hranici objektu předpokládáme, že se jedná o hladkou křivku, která se v obraze nachází v místě hran. Při hledání takové křivky můžeme vycházet z minimalizace energie dané výrazem

$$E_{kon} = \int E_{ext}(\mathbf{v}(s)) + E_{int}(\mathbf{v}(s)) ds, \quad (4.1)$$

při čemž v minimu bude

$$\frac{dE_{kon}}{d\mathbf{v}(s)} = 0. \quad (4.2)$$

Interní energie  $E_{int}(\mathbf{v}(s))$  bude dána tvarem (hladkostí) kontury a externí energie  $E_{ext}(\mathbf{v}(s))$  bude dána pozicí kontury v obraze.

Jelikož nalezení takové kontury je složitý optimalizační problém, je vhodným řešením postupná deformace do obrazu umístěné kontury. Do obrazu je nejprve umístěna iniciační kontura, která se v obraze pohybuje, dokud neodpovídá tvaru hledaného objektu. Tento proces simuluje pohyb struny, na kterou působí vnitřní síly - zabraňující ohybu a natahování/stlačování struny a vnější síly - vnášející do pohybu vliv obrazu. Struna se vlivem působení těchto sil zastaví ve stavu rovnováhy. Pokud tedy máme strunu popsanou funkcí  $\mathbf{v}(s) = (x(s), y(s))$ , pak se struna zastaví v rovnováze, čili bude pro ni platit

$$F_{int}(\mathbf{v}(s)) + F_{ext}(\mathbf{v}(s)) = 0, \forall s, \quad (4.3)$$

kde  $F_{int}$  značí vnitřní síly a  $F_{ext}$  značí vnější síly.

Samotná kontura může být otevřená nebo uzavřená křivka. Častěji se využívá uzavřená křivka (snažíme se vymezit hranice objektu). Pro tuto práci budeme uvažovat pouze uzavřenou křivku.

Pro metodu parametrických aktivních kontur je kontura  $\mathbf{v}(s)$  popsána pomocí sady svých bodů. [11][12]

### 4.1.1 Základní implementace aktivních kontur

Základní algoritmus, ze kterého většina výpočtů aktivních kontur vychází, je popsán v [12]. Z původních rovnic 4.1 a 4.2 dostaneme dvojici diferenciálních rovnic

$$-\frac{d}{ds} \left( \alpha(s) \frac{dx(s)}{ds} \right) + \frac{d^2}{ds^2} \left( \beta(s) \frac{d^2 x(s)}{ds^2} \right) = -\frac{1}{2} \frac{dE_{ext}}{dx} \Big|_{x,y} \quad (4.4)$$

$$-\frac{d}{ds} \left( \alpha(s) \frac{dy(s)}{ds} \right) + \frac{d^2}{ds^2} \left( \beta(s) \frac{d^2 y(s)}{ds^2} \right) = -\frac{1}{2} \frac{dE_{ext}}{dy} \Big|_{x,y}, \quad (4.5)$$

kde složky na levé straně odpovídají vnitřním vlastnostem kontury, přičemž první člen odpovídá deformační síle z protažení a druhý člen odpovídá tuhosti vůči pohybu. Parametry  $\alpha$  a  $\beta$  nastavují tyto vlastnosti kontur a mohou být obecně proměnné podél kontury, častěji se však nastavují jako konstantní - dosadíme tedy za  $\alpha(s) = \alpha$  a  $\beta(s) = \beta$ . Pravé strany rovnic odpovídají derivacím externí energie v bodě  $s$  (na pozici  $(x, y)$ ). Odvození těchto rovnic můžeme nalézt v [11].

Spojitou konturu pak následně diskretizujeme na sadu bodů s krokem  $h$  a derivace nahradíme pomocí konečných diferencí. Z rovnice 4.4 dostaneme rovnici

$$\begin{aligned} & -\frac{\alpha}{h} \left( \frac{x_{s+1} - x_s}{h} - \frac{x_s - x_{s-1}}{h} \right) + \\ & + \frac{\beta}{h^2} \left( \frac{x_{s+2} - 2x_{s+1} + x_s}{h^2} - 2 \frac{x_{s+2} - 2x_{s+1} + x_s}{h^2} + \frac{x_{s+2} - 2x_{s+1} + x_s}{h^2} \right) = \\ & = -\frac{1}{2} \frac{dE_{ext}}{dx} \Big|_{x,y}. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Jako  $E_{ext}$  použijeme parametrický obraz, který bude mít velké hodnoty v místech, kam má být kontura přitahována (např. amplituda gradientu). Člen  $-\frac{1}{2} \frac{dE_{ext}}{dx} \Big|_{x,y}$  označíme jako  $f_x(x, y)$  a odpovídá  $(x, y)$  vzorku z obrazu vytvořeného jako difference podél osy  $x$  parametrického obrazu  $E_{ext}$ . Předchozí rovnici lze upravit do tvaru

$$f_x(x, y) = ax_{s-2} + bx_{s+1} + cx_s + bx_{s+1} + ax_{s+1}, \forall s, \quad (4.7)$$

kde

$$a = \frac{\beta}{h^4} \quad b = -\frac{4\beta}{h^4} - \frac{\alpha}{h^2} \quad c = \frac{6\beta}{h^4} + \frac{2\alpha}{h^2}.$$

Soustavu můžeme přepsat do maticové formy jako

$$\mathbf{Ax} = f_x(\mathbf{x}, \mathbf{y}) \quad (4.8)$$

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} c & b & a & 0 & \cdots & 0 & a & b \\ b & c & b & a & 0 & \cdots & 0 & a \\ a & b & c & b & a & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & a & b & c & b & a & 0 & \cdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & & \\ 0 & \cdots & 0 & a & b & c & b & a \\ a & 0 & \cdots & 0 & a & b & c & b \\ b & a & 0 & \cdots & 0 & a & b & c \end{bmatrix}$$

Tuto soustavu je pak možné řešit iterativně

$$\frac{\mathbf{x}(i+1) - \mathbf{x}(i)}{\Delta} + \mathbf{A}\mathbf{x}(i+1) = f_x(\mathbf{x}(i), \mathbf{y}(i)), \quad (4.9)$$

kde  $\mathbf{x}(i)$  je vektor x-souřadnic v i-tém kroku a  $\Delta$  nastavuje rychlost pohybu kontury. Z rovnice si vyjádříme x-souřadnici v dalším kroku

$$\mathbf{x}(i+1) = \left( \mathbf{A} + \frac{1}{\Delta} \mathbf{I} \right)^{-1} \left( \frac{1}{\Delta} \mathbf{x}(i) + f_x(\mathbf{x}(i), \mathbf{y}(i)) \right) \quad (4.10)$$

a obdobně můžeme z rovnice 4.5 odvodit y-souřadnici v dalším kroku

$$\mathbf{y}(i+1) = \left( \mathbf{A} + \frac{1}{\Delta} \mathbf{I} \right)^{-1} \left( \frac{1}{\Delta} \mathbf{y}(i) + f_y(\mathbf{x}(i), \mathbf{y}(i)) \right). \quad (4.11)$$

Popsané rovnice jsou převzaty z [11].

## 4.1.2 Vylepšení výpočtu aktivních kontur

### Normálová síla

Model kontury vytvořený podle základní implementace je přitahován hranou pouze tehdy, pokud je kontura dostatečně blízko. To v praktických úlohách často nenastává, neboť by to vyžadovalo velmi přesnou inicializaci, která je zde velkým problémem. Krátký dosah síly částečně řeší fakt, že samotná kontura se vlivem působení vnitřních sil smršťuje. Pokud tedy konturu inicializujeme kolem objektu, kontura se začne smršťovat, přitom je přitahována hranami a zastaví se v prvním lokálním minimu. Aby kontura mírná lokální minima překonala a pohybovala se dál je možné přidat normálovou sílu, která bude působit ve všech místech kolmo na konturu

$$\mathbf{F}_{normal} = k\mathbf{n}(s). \quad (4.12)$$

Kde  $k$  je nastavovaná amplituda normálové síly a  $\mathbf{n}(s)$  je jednotkový normálový vektor. Normálový vektor určíme ze směrového vektoru, při čemž v diskrétním případě můžeme směrový vektor pro každý bod vypočítat jako rozdíl aktuálního a následujícího bodu. Normálovou sílu pak přidáme do původní rovnice tak, že ji rozdělíme na x a y složku a přidáme do iterativních řešení rovnic 4.10 a 4.11 jako

$$\mathbf{x}(i+1) = \left( \mathbf{A} + \frac{1}{\Delta} \mathbf{I} \right)^{-1} \left( \frac{1}{\Delta} \mathbf{x}(i) + f_x(\mathbf{x}(i), \mathbf{y}(i)) + k\mathbf{n}_x(i) \right). \quad (4.13)$$

Tuto normálovou sílu lze také využít jako "balónovou" sílu k rozpínání kontury v případech, kdy je vhodnější iniciovat konturu uvnitř segmentovaného objektu. [13]

## Prostorová interpolace

Externí síla je počítána z diskrétního parametrického obrazu. To nám umožňuje počítat body kontury pouze v této diskrétní mřížce. Větší přesnosti je možné dosáhnout interpolací hodnot v parametrickém obrazu. Pokud tedy máme body kontury s libovolnou prostorovou přesností můžeme hodnoty  $f_x(x, y)$  a  $f_y(x, y)$  v těchto bodech určit pomocí bilineární interpolace. [13]

## Normalizace pohybu

Další zlepšení popsané v [13] upravuje vektorové pole sil. Rychlost pohybu bodu kontury je dána velikostí síly  $f_x(x, y)$  a  $f_y(x, y)$ , vypočítané z parametrického obrazu, která může být různě velká pro jednotlivé body kontury. To může způsobovat nestabilitu kontury a oscilace kolem hledaných minim. Je možné zavést normalizaci, kdy zachováme pouze směr působení síly, ale její velikost upravíme na

$$f_{xnorm}(x, y) = \frac{f_x(x, y)}{\sqrt{f_x^2(x, y) + f_y^2(x, y)}}. \quad (4.14)$$

## Zastavení kontury

Jak již bylo uvedeno, samotná kontura se vlivem vnitřních sil smršťuje. To způsobuje velkou citlivost na nastavení parametrů  $\alpha$  a  $\beta$ . Pokud tyto parametry nastavíme příliš velké, kontura se bude smršťovat vlivem vnitřních sil tak silně, že se nezastaví na hranicích hledaného objektu. Pokud je nastavíme příliš malé, kontura se zastaví v prvním lokálním minimu. Velikost této smršťující síly je navíc závislá na velikosti kontury, neboť vychází pro jednotlivé body  $s_i$  jako

$$F_{kont}(s_i) = -\frac{\alpha}{r_i} + \frac{\beta}{r_i^3}, \quad (4.15)$$

kde  $r_i$  je poloměr zakřivení kontury v daném bodě. Tato síla přitom působí kolmo na konturu. Pokud tedy vypočítáme v každém bodě velikost této síly a použijeme ji jako konstantu  $k$  při výpočtu normálové síly z rovnice 4.12, můžeme vytvořit sílu přesně opačnou a zabránit tak smršťování. Smršťující pohyb kontury je však potřeba pro přiblížení kontury k objektu. Konturu tedy opět rozpohybujeme přidáním další normálové síly, kterou můžeme nastavit na vhodnou velikost. To nám zajistí menší citlivost na nastavení vlastností kontury.

Pro výpočet velikosti smršťující síly 4.15 je potřeba znát poloměr křivosti v jednotlivých bodech. Odvození výpočtu tohoto poloměru vychází z [14]. Pokud počítáme poloměr křivosti v bodě  $s_i$ , tak pro výpočet potřebujeme navíc 4 okolní body  $s_{i-2}$  až  $s_{i+2}$ . Hledáme kružnici, která bude procházet všemi body, tedy pro všech 5

bodů musí platit

$$(x_i - x(s_k))^2 + (y_i - y(s_k))^2 = r_i^2 \quad (4.16)$$

pro  $k = \{i-2, i-1, i, i+1, i+2\}$  odpovídající jednotlivým bodům, kde  $[x_i, y_i]$  je střed této kružnice. Postupným dosazováním za  $k$  dostáváme soustavu pěti rovnic. Taková kružnice nemusí existovat, proto hledáme nejlepší aproximaci metodou nejmenších čtverců. Od ostatních rovnic 4.16 odečteme rovnici pro  $k = i$ , upravíme a dostáváme soustavu 4 rovnic

$$x_i(x(s_i) - x(s_k)) + y_i(y(s_i) - y(s_k)) = \frac{1}{2}(x(s_i)^2 - x(s_k)^2 + y(s_i)^2 - y(s_k)^2) \quad (4.17)$$

pro  $k = \{i-2, i-1, i+1, i+2\}$ . Řešení metodou nejmenších čtverců pak lze vypočítat jako

$$\begin{pmatrix} x_i \\ y_i \end{pmatrix} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{b} \quad (4.18)$$

kde

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} x(s_i) - x(s_{i-1}) & y(s_i) - y(s_{i-1}) \\ x(s_i) - x(s_{i-2}) & y(s_i) - y(s_{i-2}) \\ x(s_i) - x(s_{i+2}) & y(s_i) - y(s_{i+2}) \\ x(s_i) - x(s_{i+1}) & y(s_i) - y(s_{i+1}) \end{pmatrix} \quad (4.19)$$

$$\mathbf{b} = \begin{pmatrix} \frac{1}{2}(x(s_i)^2 - x(s_{i-1})^2 + y(s_i)^2 - y(s_{i-1})^2) \\ \frac{1}{2}(x(s_i)^2 - x(s_{i-2})^2 + y(s_i)^2 - y(s_{i-2})^2) \\ \frac{1}{2}(x(s_i)^2 - x(s_{i+2})^2 + y(s_i)^2 - y(s_{i+2})^2) \\ \frac{1}{2}(x(s_i)^2 - x(s_{i+1})^2 + y(s_i)^2 - y(s_{i+1})^2) \end{pmatrix}. \quad (4.20)$$

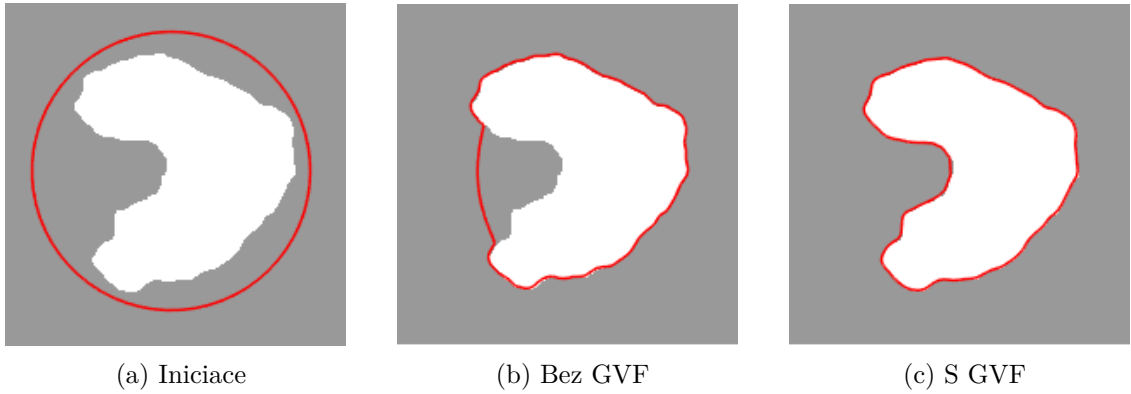
Se známým středem aproximační kružnice již můžeme poloměr křivosti vypočítat jako vzdálenost ke zkoumanému bodu, tedy

$$r_i = \sqrt{(x(s_i) - x_i)^2 + (y(s_i) - y_i)^2}. \quad (4.21)$$

Z poloměru křivosti pak pomocí rovnice 4.15 vypočteme velikost normálové síly, která vyváží smršťování způsobené vnitřními silami. [14]

## Tok gradientního vektoru

Metoda s využitím výpočtu toku gradientního vektoru (GVF – Gradient Vector Flow) řeší dva základní problémy klasické implementace - působení externích sil na krátkou vzdálenost a neschopnost kontury vniknout do konkavit objektu. Zlepšení konvergence do konkavit můžeme pozorovat na obrázku 4.1, kde je porovnán výsledek s použitím běžné externí síly (zde gradientu) a síly přepočítané na GVF. Nastavení kontury bylo použito totožné a segmentovaným objektem je binární obraz tvaru jedné buňky ze segmentovaných dat. U základní implementace máme paramete-



Obr. 4.1: Zlepšení vlivem GVF

trický obraz  $f(x, y)$ , který má maximální hodnoty v místech, kam má být kontura přitažena. Z tohoto parametrického obrazu pak počítáme směr gradientu  $\nabla f$ , který odpovídá vektorům směřujícím kolmo na hledanou oblast. Tyto vektory pak mají velké hodnoty poblíž hledaných oblastí a v homogenních oblastech jsou blízké nule. Výpočet GVF pak zajišťuje difuzi větších hodnot do těchto homogenních regionů.

Pole GVF je definováno v [15] jako vektorové pole  $\mathbf{v}(x, y) = [u(x, y), v(x, y)]$ , které minimalizuje hodnotu výrazu

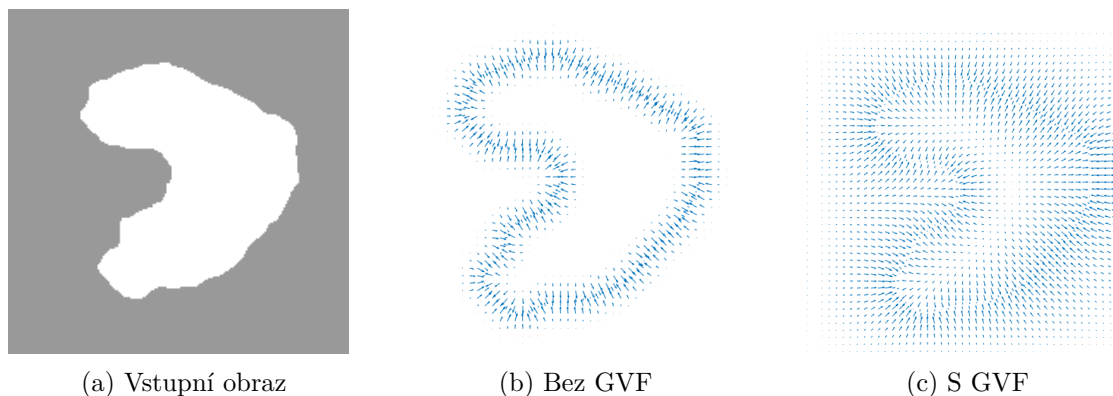
$$E = \int \int \mu(u_x^2 + u_y^2 + v_x^2 + v_y^2) + |\nabla f|^2 |\mathbf{v} - \nabla f|^2 dx dy, \quad (4.22)$$

kde  $\nabla f$  je gradient původního obrazu,  $\mu$  je parametr zvětšující difuzi.  $u_x$  je parciální derivace složky  $u$  podle  $x$ ,  $u_y$  je parciální derivace složky  $u$  podle  $y$ ,  $v_x$  je parciální derivace složky  $v$  podle  $x$  a  $v_y$  je parciální derivace složky  $v$  podle  $y$ . Vstupem je tedy gradient původního obrazu a snažíme se nalézt vhodné  $\mathbf{v}(x, y) = [u(x, y), v(x, y)]$ , pro které bude hodnota výrazu  $E$  minimální. Takové  $\mathbf{v}(x, y)$  pak budeme považovat za hledaný GVF. Tento výraz má zajistit změnu pouze tam, kde jsou nízké hodnoty. V místech s malými hodnotami gradientu  $|\nabla f|$  dominuje ve výrazu suma čtverců parciálních derivací  $u_x^2 + u_y^2 + v_x^2 + v_y^2$  a největší minimalizace tedy dosáhneme upravením pole  $\mathbf{v}(x, y)$ , kde výsledkem bude difuze vysokých hodnot do těchto oblastí. Pokud je v některém místě hodnota  $|\nabla f|$  velká, tak dominuje druhá polovina výrazu a minimalizace je dosaženo vyrovnaním  $\mathbf{v} = |\nabla f|$ , proto zde bude GVF přibližně odpovídat gradientu, který zde odpovídá vstupnímu obrazu a tedy nedochází ke změně. Velikost difuze do homogenních regionů je pak regulována parametrem  $\mu$ , jehož velikost zvětšuje difuzi a jeho hodnota by měla růst s hladinou šumu.

Minimalizace výrazu 4.22 lze dosáhnout iterativním dosazováním do rovnic:

$$\begin{aligned} u(i+1) &= u(i) + 4\mu \nabla^2 u(i) - |\nabla f|^2 (u(i) - f_x) \\ v(i+1) &= v(i) + 4\mu \nabla^2 v(i) - |\nabla f|^2 (v(i) - f_y), \end{aligned} \quad (4.23)$$

kde  $u(i)$  je x složka gradientního vektorového pole v  $i$ -tém kroku,  $\nabla^2$  je Laplasián původního obrazu a  $f_x$  je složka gradientu ve směru osy x původního obrazu. Zde  $\mu$  nastavuje rychlost difuze a jeho menší hodnoty zajistí konvergenci výpočtu, ale zvětšují nutný počet iterací. Iniciační hodnoty  $u$  a  $v$  nastavujeme na hodnoty  $f_x$  a  $f_y$ . Odvození iterativního řešení lze nalézt v [15]. Porovnání původního gradientního pole a GVF můžeme vidět na obrázku 4.2, kde jsou zobrazeny vektorová pole opět pro binární obraz tvaru jedné z buněk v sekvenci. Externí síla přepočítaná na GVF



Obr. 4.2: Dosah působení sil

působí na větší vzdálenost, a proto je kontura méně citlivá na iniciační pozici. Zároveň mnohem lépe konverguje do konkavit objektu. Nevýhodou je pak delší výpočetní čas způsobený iterativním způsobem výpočtu GVF. [15]

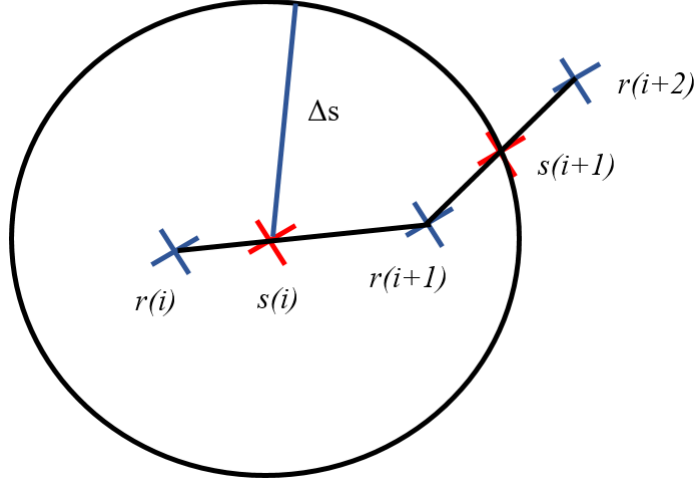
### Převzorkování bodů kontury

Při postupném rozpínání nebo smršťování kontury se body vzájemně přibližují nebo oddalují. To může způsobit překrytí některých bodů, vytvoření smyček nebo příliš velký vzorkovací krok kontury. Tento problém bývá řešen pomocí odstraňování blízkých bodů a přidávání nových bodů mezi příliš vzdálené body, ale toto řešení není dostatečné pro opakované využívání kontury při sledování buněk. Dalším možným řešením je přidání nové síly, která zajistí stabilitu kontury jako v [24], tato síla však zhorší výsledek segmentace. Proto byla vytvořena metoda pro kompletní převzorkování kontury.

Pro lineární převzorkování musíme vytvořit novou sadu bodů, která bude ležet na úsečkách spojujících sousední body předešlé sady bodů. Nové sousední body přitom musí ležet stejně daleko od sebe.

Problém lze zjednodušit na situaci hledání následujícího bodu  $\mathbf{s}(i+1) = [x_s(i+1), y_s(i+1)]$ . Vzorkovací krok (vzdálenost hledaných bodů) označíme  $\Delta s$ . Následující bod  $\mathbf{s}(i+1)$  musí tedy ležet na kružnici se středem v bodě  $\mathbf{s}(i)$  a poloměrem  $\Delta s$ .

Zároveň musí ležet na některé z úseček spojujících sousední body původní kontury. Víme přitom, že poslední nalezený bod  $s(i)$  leží na úsečce mezi bodem  $r(j)$  a  $r(j+1)$  původní kontury. Situaci ukazuje obrázek 4.3, kde  $\Delta s$  je vzorkovací krok,  $r$  jsou staré body kontury a  $s$  jsou nové body kontury. Průsečík přitom budeme postupně hledat s úsečkami  $r(j+k)$  a  $r(j+k+1)$  pro  $k = 0, 1, 2, \dots$ . Pokud budeme hledat průsečík



Obr. 4.3: Ukázka interpolace

pro  $k = 0$  můžeme úsečku popsat analyticky pomocí přímky ve tvaru

$$y = \frac{ax - c}{b}, \quad (4.24)$$

kde

$$a = x_r(j+1) - x_r(j)$$

$$b = y_r(j+1) - y_r(j)$$

$$c = x_r(j+1) + y_r(j+1) - x_r^2(j) - y_r^2(j).$$

Kružnici lze také popsat analyticky jako

$$(x - x_s(i))^2 + (y - y_s(i))^2 = \Delta s^2, \quad (4.25)$$

kde po dosazení rovnice 4.24 za  $y$  a vyjádření hledané souřadnice průsečíků dostáváme

$$x_{1,2} = \pm \frac{1}{2(a^2 + b^2)} (-2aby_s - 2ac + 2b^2x_s + \quad (4.26)$$

$$+ \sqrt{(2aby_s + 2ac - 2b^2x_s)^2 - 4(a^2 + b^2)(b^2x_s^2 + b^2y_s^2 - \Delta s^2b^2 + 2bcy_s + c^2)}).$$

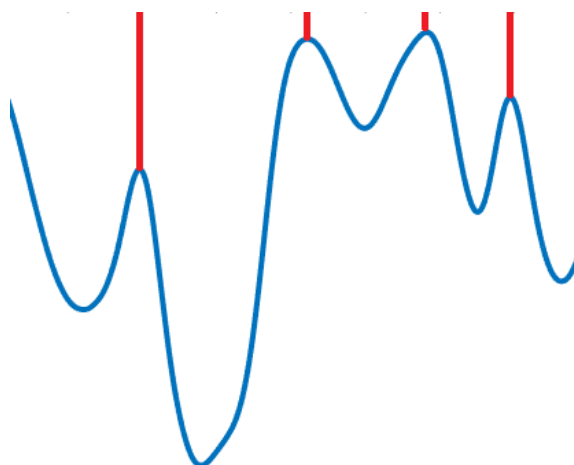
Pomocí rovnice 4.24 pak můžeme dopočítat souřadnici  $y_{1,2}$  průsečíků. Výsledkem jsou dva průsečíky, kde za hledaný bod můžeme považovat vždy bod ležící blíže k druhému  $r(j+1)$  bodu úsečky. Jelikož jsme počítali s rovnicí přímky, je nutné zkontrolovat, zda bod leží na úsečce nebo mimo ni. Pokud bod na úsečce neleží, navýšíme  $k$  a hledáme průsečík s další úsečkou.

## 4.2 Watershed transformace

Watershed transformace (česky nazývaná jako rozvodí nebo povodí), je metoda vycházející z topografie.

Pro zpracování obrazu může šedotónový obraz představovat topografický reliéf, kde nadmořská výška odpovídá intenzitě daného pixelu. Takový obraz lze pak rozdělit na regiony odpovídající jeho povodím. Povodí zde odpovídá oblasti, pro kterou simulovaná kapka vody stéká do stejného lokálního minima.

Z hlediska výpočtu je vhodnější jiný přístup, jak výsledné segmentace dosáhnout. Ten vychází z představy postupného zaplavování – hladina vody postupně stoupá s nadmořskou výškou. Pokud by se měly zaplavované oblasti spojit, je zde vytvořena hráz, která má splnutí těchto dvou vodních ploch zabránit. Na obrázku 4.4 je modře zobrazen profil řezu obrázkem a červeně jsou zde vyznačeny hráze, které by vznikly při postupném zaplavování. Po dosažení nejvyššího bodu v obraze odpovídají vzniklé hráze hranicím regionů watershed transformace.



Obr. 4.4: Princip watershed transformace

Pro výpočet watershed transformace existuje řada algoritmů. Popis těchto algoritmů není součástí této práce, jelikož je zde tato metoda využita jen okrajově. Pro její výpočet byla použita implementace v programovacím prostředí MATLAB.

Pro lepší výsledek segmentace watershed transformací lze využít nejrůznějších úprav segmentovaného obrazu. Často bývá využit například gradient segmentovaného obrazu. Velkým problémem bývá přesegmentování, kterému lze zabránit vyhlazením obrazu filtrací, nebo snížením počtu stupňů šedi obrazu. [16] [17]

## 4.3 Optický tok

Optický tok je metoda, kdy se každému pixelu v obraze snažíme přiřadit vektor rychlosti pohybu tohoto pixelu mezi snímky v sekvenci. Výsledkem je tedy vektorové pole určující směr pohybu objektů v obraze. Optický tok může obecně vzniknout relativním pohybem mezi objektem ve scéně a kamerou. Optický tok pak může poskytnout důležité informace o změně prostorového uspořádání scény. Může také pomoci při segmentaci těchto objektů, čehož je využito v této práci.

Jelikož jediná informace, ze které vycházíme, je posun intenzity v obraze, lze optický tok vypočítat pouze v oblastech nesoucí informaci, tedy v oblastech s vysokým gradientem. Z toho důvodu bývá optický tok často počítán pouze ve významných bodech obrazu. Pro výpočet optického toku existuje celá řada metod. Popis používaných metod lze nalézt v [18] a [20].

### 4.3.1 Metoda Lucas-Kanade

Tato metoda byla zvolena, protože se jedná o nepoužívanější metodu výpočtu, neboť je rychlá a poskytuje dostatečně přesný odhad optického toku. Jedná se o lokální metodu výpočtu. Okolí bodu (pro který počítáme optický tok) v 1. obraze bereme jako vzor (například okno  $5 \times 5$  px). V následujícím obraze se snažíme najít takový posun, pro který bude lokální okolí mít minimální součet čtverců rozdílů se vzorem.

Pro lokální okolí (okno) předpokládáme konstantní posuv  $\mathbf{v} = [u \ v]^T$ . První obraz označíme  $J(x, y)$ , druhý  $I(x, y)$ , středový pixel okna  $\mathbf{p} = [p_x \ p_y]$  a okno bude velikosti  $2\omega + 1$ . Pro daný pixel pak problém odpovídá minimalizaci chybového výrazu

$$e(\mathbf{v}) = \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} (J(x, y) - I(x + u, y + v))^2. \quad (4.27)$$

Zde odvodíme řešení metodou nejmenších čtverců podle [19]. Taylorovým rozvojem dostáváme

$$e(\mathbf{v}) \approx \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} (J(x, y) - I(x, y) + \frac{dI}{dx}u + \frac{dI}{dy}v.)^2, \quad (4.28)$$

kde  $J(x, y) - I(x, y)$  můžeme označit jako  $I_t$ ,  $\frac{dI}{dx}$  jako  $I_x$  a  $\frac{dI}{dy}$  jako  $I_y$ . Tyto derivace můžeme aproximovat pomocí diferencí v jednotlivých bodech  $x$  a  $y$  daného okna. V minimu bude

$$\frac{de(\mathbf{v})}{d\mathbf{v}} = [0 \ 0]. \quad (4.29)$$

Derivací a úpravou výrazu 4.28 dostáváme

$$e(\mathbf{v}) \approx -2 \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} (I_t + [I_x \ I_y]\mathbf{v})[I_x \ I_y]. \quad (4.30)$$

což lze upravit na maticový tvar

$$-\frac{1}{2} \frac{de(\mathbf{v})}{d\mathbf{v}} \approx \mathbf{A}\mathbf{v} - \mathbf{b},$$

$$\mathbf{A} = \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} \begin{bmatrix} I_x^2 & I_{xy} \\ I_{yx} & I_y^2 \end{bmatrix}, \mathbf{b} = \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} \begin{bmatrix} I_t I_x \\ I_t I_y \end{bmatrix}. \quad (4.31)$$

Pro optimální posun  $\mathbf{v}_{\text{opt}}$ , což odpovídá výslednému optickému toku, bude

$$\mathbf{v}_{\text{opt}} = \mathbf{A}^{-1} - \mathbf{b}. \quad (4.32)$$

Tato základní implementace lze využít k velmi rychlému výpočtu optického toku. Pro zlepšení výsledku se využívají nejrůznější zlepšení jako iterativní metoda výpočtu, která výsledek zpřesní a pyramidová implementace, která je schopna vypočítat optický tok pro větší pohyb. [21] [19] [20]

### 4.3.2 Iterativní metoda Lucas-Kanade

Při iterativním řešení postupně zpřesňujeme výsledek řešení metody. Odvození vzorců lze nalézt v [19]. Číslo iterace označíme dolním indexem. Pro výpočet  $k$ -té iterace použijeme výsledek předchozího kroku, který definujeme jako

$$I_k = I(x + u_{k-1}, x + v_{k-1}), \quad (4.33)$$

kde vektor posunu v dalším kroku určíme z dosavadního posunu a aktuálního posunu, tedy

$$\mathbf{v}_k = \mathbf{v}_{k-1} + \mathbf{n}_k. \quad (4.34)$$

Aktuální posun  $\mathbf{n}_k$  přitom určíme minimalizací chybového signálu obdobně jako v rovnici 4.32

$$\mathbf{n}_k = \mathbf{A}^{-1} - \mathbf{b}_k, \quad (4.35)$$

kde  $\mathbf{b}_k$  je zde upraveno na výsledek předchozího kroku jako

$$\mathbf{b}_k = \sum_{x=p_x-\omega}^{p_x+\omega} \sum_{y=p_y-\omega}^{p_y+\omega} \begin{bmatrix} I_{tk} I_x \\ I_{tk} I_y \end{bmatrix}. \quad (4.36)$$

Zde vystupuje upravená časová derivace vůči výsledku předchozí iterace

$$I_{tk} = J - I_k. \quad (4.37)$$

Prostorové diference pro dané okno lze vypočítat i v původním obrazu  $J(x, y)$  (okno a posunuté okno v dalším obraze předpokládáme totožné), což se zde hodí, protože tak lze prostorové diference vypočítat pouze jednou pro všechny iterace (matice  $\mathbf{A}$  zůstává stejná). V každé iteraci však musíme počítat reziduální chyby  $I_{tk}$  a upravit vektor  $\mathbf{b}_k$ . Vhodný iniciační odhad je  $\mathbf{v} = [0 \ 0]^T$  a vhodný maximální počet iterací je 20. [19]

### 4.3.3 Pyramidová Lucas-Kanade

Pyramidová metoda využívá podvzorkování obrazu pro větší dosah výsledného optického toku. Výsledek je pak upraven na méně podvzorkovaném obrazu, až se dostaneme k původnímu obrazu. Při pyramidové reprezentaci obrazu označíme původní obraz  $I$  (velikosti  $m \times n$ ) jako nultou úroveň  $I^0$ . Každá další úroveň má oproti předchozí úrovni poloviční rozměry  $n^L = \frac{n^{L-1}}{2}$  a  $m^L = \frac{m^{L-1}}{2}$ . Pro výpočet další úrovně s anti-aliasingovým filtrem lze odvodit vzorec převzatý z [19]:

$$I^{L+1}(x, y) = \frac{1}{4}I^L(2x, 2y) + \quad (4.38)$$

$$\frac{1}{8} \left( I^L(2x-1, 2y) + I^L(2x+1, 2y) + I^L(2x, 2y-1) + I^L(2x, 2y+1) \right) +$$

$$\frac{1}{16} \left( I^L(2x-1, 2y-1) + I^L(2x+1, 2y+1) + I^L(2x-1, 2y+1) + I^L(2x+1, 2y-1) \right).$$

Začínáme od nejvyšší úrovně pyramidy a výsledný vektor posuvu do nižší úrovně označíme  $g^{L-1}$  a vypočítáme ho jako

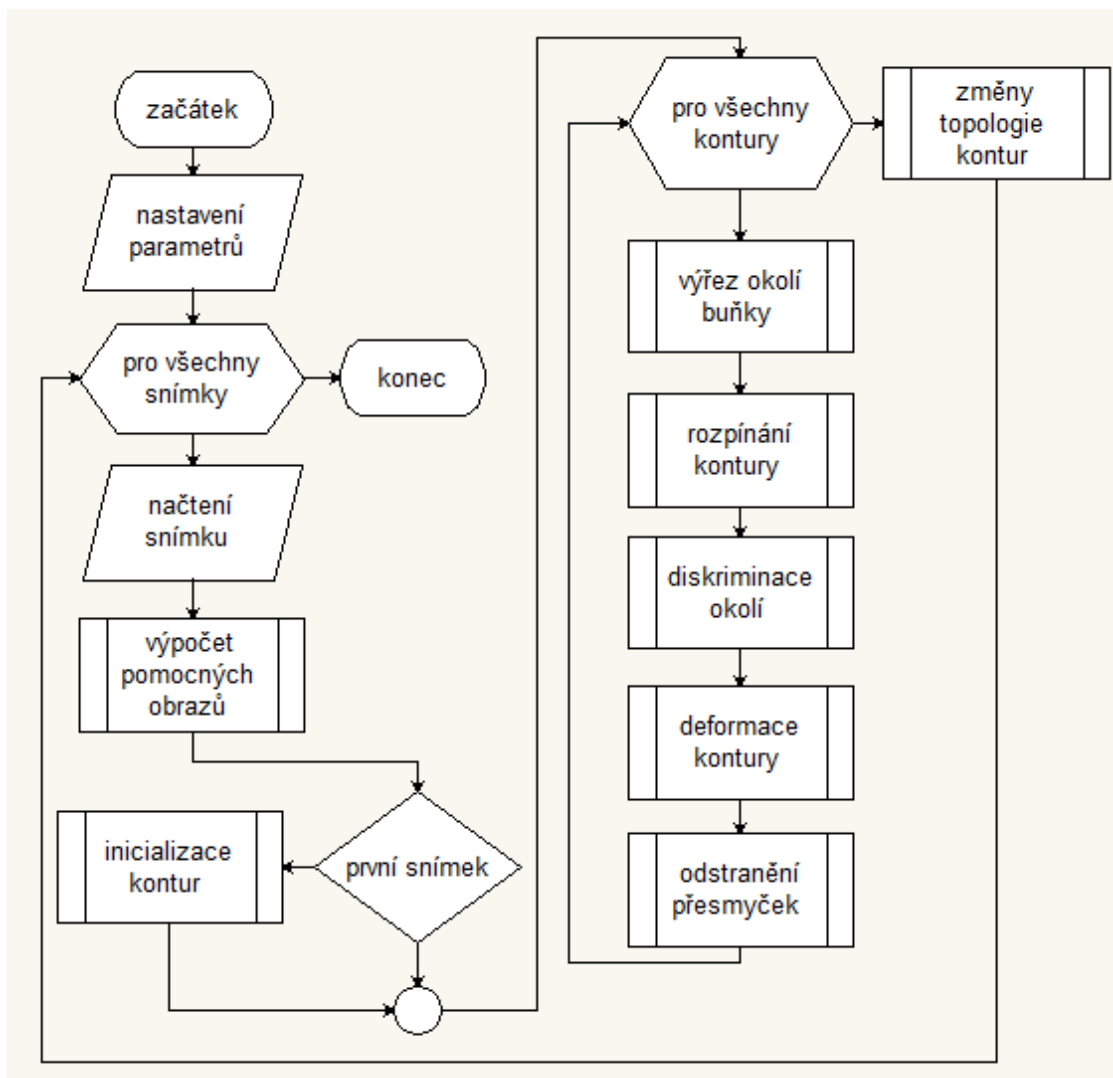
$$\mathbf{g}^{L-1} = 2(\mathbf{g}^L + \mathbf{d}^L), \quad (4.39)$$

kde  $\mathbf{d}^L$  je reziduální vektor posuvu v této úrovni a  $\mathbf{g}^L$  je vektor posuvu z nižších úrovní. Výpočet je obdobný s iterativní metodou a obě metody je možné zkombinovat a počítat tak více iterací pro každou úroveň. [19]

## 5 IMPLEMENTACE METODY

Byla provedena implementace metody pro sledování buněk využívající metodu aktivních kontur v programovacím prostředí MATLAB. Metoda zahrnuje automatické vytvoření iniciační kontury v prvním snímku sekvence, segmentaci buněk v daném snímku a přechod kontury na další snímek. Metoda dále ošetřuje případné změny topologie kontury v případech větvení trajektorií popsaných v 2.5. Dále byla provedena extrakce základních parametrů buněk.

### 5.1 Struktura algoritmu



Obr. 5.1: Vývojový diagram algoritmu

Obrázek 5.1 ukazuje strukturu algoritmu. Princip výpočtu jednotlivých částí je v této kapitole dále rozepsán.

Na začátku jsou nastaveny všechny potřebné parametry. Výpočet probíhá postupně pro všechny snímky. Pro aktuální snímek jsou vypočítány všechny upravené obrazy potřebné pro výpočet pohybu kontur. V případě, že se jedná o první snímek sekvence, je provedena inicializace kontur pomocí segmentace jader buněk.

Výpočet pohybu kontury je prováděn pro každou konturu zvlášť. Pro urychlení výpočtu jsou vypočítány výřezy všech potřebných obrazů, v okolí aktuální kontury a výpočty probíhají pro tento výřez. Kontura je nejprve rozpínána, z výsledku rozpínání pak můžeme diskriminovat okolí kontury. Následně je vypočítána výsledná deformace a jsou odstraněny případné přesmyčky na konturách.

Po zdeformování všech kontur jsou na základě obrazu jader dalšího snímku upraveny topologie kontur – kontury jsou rozděleny, sloučeny, přidány nové, nebo jsou odstraněny.

## 5.2 Výpočet pomocných obrazů

Pro výpočet pohybu jednotlivých kontur jsou používány různě upravené obrazy, ze kterých je brán výřez pro aktuální konturu. Pro zjednodušení algoritmu a urychlení výpočtu je vhodné pro aktuální snímek tyto úpravy provést dopředu a pro každou konturu použít odpovídající výřez obrazu.

### 5.2.1 Úprava základního obrazu

Zpracovávaná data jsou uložena ve formátu tif o 32-bitové hloubce. Do tohoto formátu data ukládá obslužný program holografického mikroskopu. Pro zaznamenané buňky zabírá dynamika obrazu jen malou část z celé bitové hloubky (vyskytuje se zde i malé množství chybových pixelů v celém bitovém rozsahu). Pro veškerou analýzu těchto dat je tedy nutné celý rozsah vhodně omezit. Pro jednodušší zpracování byl obraz s upraveným rozsahem hodnot převeden do intervalu  $\langle 0,1 \rangle$ .

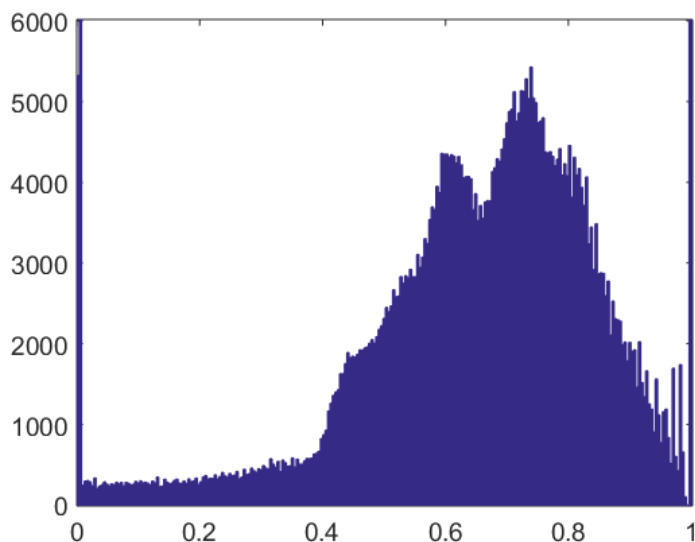
Na obraz byla dále aplikována mediánová filtrace, která zajistí odstranění vadných pixelů, které se v obraze vyskytují. Pro mediánový filtr bylo zvoleno okno 3x3 pixely. Pro další zpracování i zobrazování je použit tento upravený obraz.

### 5.2.2 Binární obraz jader

Binární obraz jader je využit pro inicializaci kontur v prvním snímku sekvence a pro zabránění konturám přechodu přes jádra, čímž je výrazně zlepšena spolehlivost sledování buněk. Je také použit pro identifikaci nutnosti změn topologie při větvení

trajektorií.

Cílem je získat pro každou buňku jeden binární objekt. K vytvoření tohoto obrazu je použito prahování. Intenzita buněčných jader je však velmi rozdílná, a proto nedosáhneme přesné segmentace jader. Není zde ale důležitá přesnost této segmentace, ale pouze spolehlivost vytvoření oddělených binárních objektů.



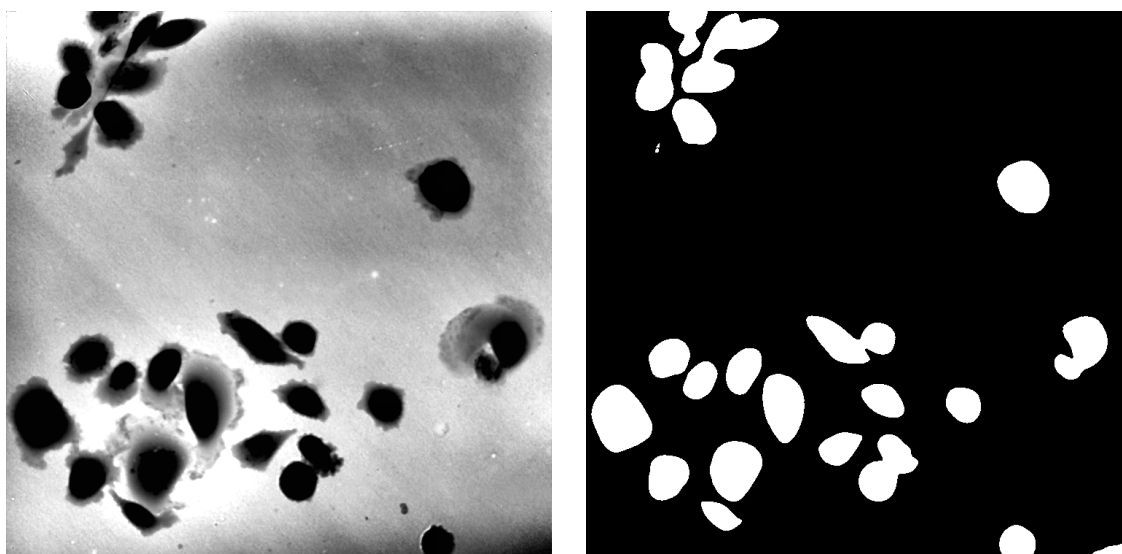
Obr. 5.2: Histogram snímku

Metoda vytvoření binárního obrazu jader vychází z vlastností segmentovaných buněčných záznamů. Buňky mají velmi výrazná jádra, která lze segmentovat pomocí prahování. Pro prahování jader byla zvolena univerzální hodnota prahu fungující pro všechny zkoumané sekvence. Na obrázku 5.2 je zobrazen histogram snímku z obrázku 5.3, kde je použita hodnota prahu 0.2 (rozsah pro který dostaneme správný výsledek je 0.1 až 0.3).

Pro dosažení lepšího výsledku byl obraz použitý pro prahování rozmazán pomocí Gaussova filtru. Pro odstranění malých objektů odpovídajících nečistotám byl výsledný binární obraz vyčištěn pomocí morfologických operací.

Obrázek 5.3 ukazuje výsledek segmentace jader prahováním. Pomocí morfologických operací se podařilo odstranit malé objekty, které by způsobily falešnou detekci jádra. Problémem jsou výrazné buňky nacházející se blízko u sebe. Tyto buňky segmentace prahováním nedokáže oddělit. Pro oddělení těchto buněk byl použit výsledek watershed transformace.

Watershed transformace je zde využita pro oddělení buněčných jader, která se nepodařilo oddělit pomocí prahování. Intenzita obrazu mezi takovými buňkami neklesne pod prahovou hodnotu a buňky proto nejsou rozděleny na jednotlivé objekty.



(a) Původní obraz

(b) Výsledek segmentace jader

Obr. 5.3: Ukázka segmentace jader prahováním

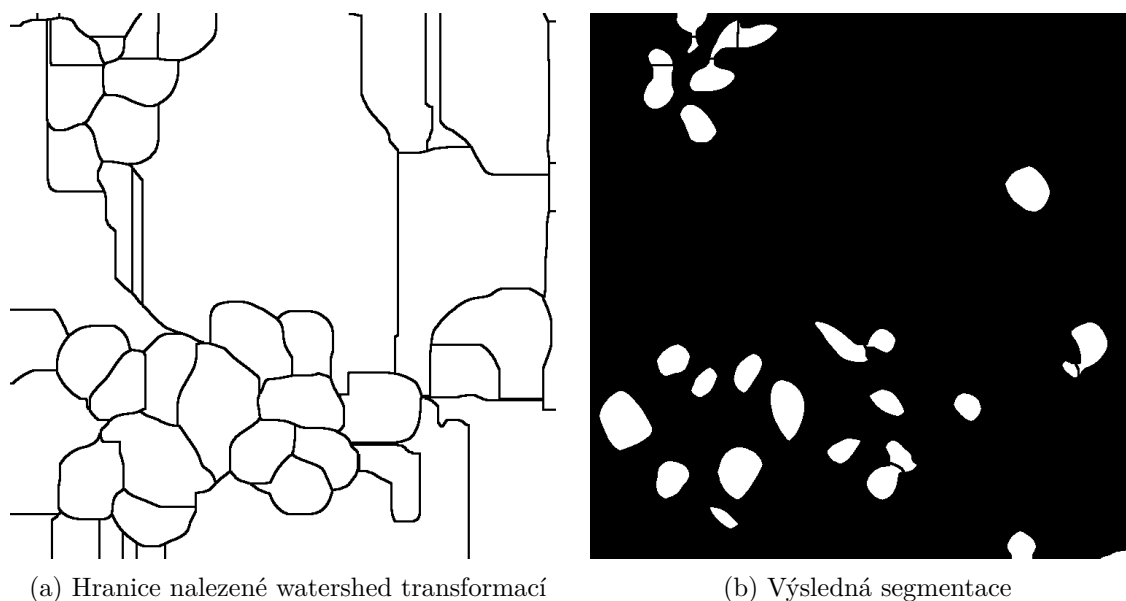
Každé buněčné jádro odpovídá lokálnímu minimu v obraze, a je tedy segmentováno pomocí watershed transformace jako jeden objekt. Aby nebylo jádro segmentováno na více částí (může obsahovat více lokálních minim), je obraz rozmazán pomocí Gaussova filtru. Výsledek takové segmentace je velmi nepřesný, většinou není schopna oddělit buňku od pozadí, ale mezi sousedními buňkami vznikne hranice, která tyto buňky oddělí.

Rozdělení jader pomocí hranic vytvořených watershed transformací lze provést vynulováním pixelů obrazu jader, které odpovídají hranicím nalezeným watershed transformací. Toho lze dosáhnout vynásobením binárního obrazu jader s binárním obrazem hranic vzniklých watershed transformací. Obrázek 5.4 ukazuje hranice vzniklé watershed transformací a výsledná jádra rozdělená za pomoci těchto hranic.

### 5.2.3 Binární obraz pozadí

Binární obraz pozadí je použit pro omezení rozpínání kontury. Výsledek této segmentace opět nemusí být přesný, neboť se používá pouze pro zpřesnění výsledků segmentace. Nevadí zde pokud není některá část pozadí rozpoznána, ale nesmí dojít k falešné detekci buňky jako pozadí.

Pro segmentaci pozadí bylo využito prahování obrazu absolutní hodnoty gradientu, jelikož předpokládáme malou hodnotu gradientu v oblastech pozadí. Tato segmentace však není dostatečně přesná a může docházet k velkým chybám. Proto byl použit součet gradientů z předchozího, aktuálního a následujícího snímku. To



Obr. 5.4: Ukázka rozdělení jader watershed transformací

lze provést, neboť zde nevyžadujeme přesnost.

Obraz sečtených gradientů byl stejně jako obraz jader vyhlazen Gaussovským filtrem a naprahovaný binární obraz upraven pomocí morfologických operací.

### 5.3 Inicializace kontur

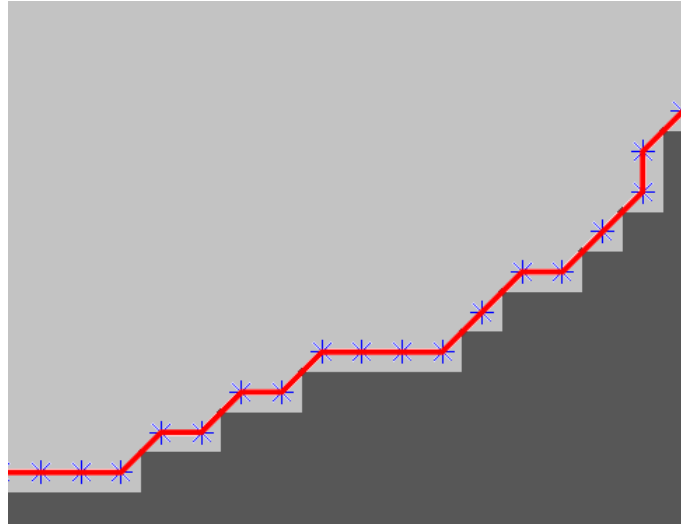
Byla vytvořena metoda pro automatickou inicializaci kontur v prvním snímku sekvence. Metoda se skládá ze segmentace jader popsané v kapitole 5.2.1, čímž je vytvořen binární obraz jader. Z buněčných jader je následně vytvořena iniciační kontura.

Jako iniciační body kontury jsou použity pozice hraničních pixelů jader, jak ukazuje obrázek 5.5. Je zapotřebí zajistit správné pořadí takto vzniklých bodů kontury tak, aby sousedním bodům kontury odpovídaly vždy sousední pixely. Nemusíme se zde starat o vzdálenost vzniklých bodů, neboť ji lze upravit převzorkováním popsaným v kapitole 4.1.2.

### 5.4 Výřez okolí buňky

Pohyb kontury je nutné počítat pro každou konturu zvlášť. Velikost obrazu, ve kterém se kontura pohybuje, výrazně ovlivňuje výpočetní čas. Proto je vhodné pro výpočet pohybu kontury použít jen výřez z původního obrazu.

Velikost výřezu pro výpočet aktuální buňky byla zvolena na velikost 201 pixelů, podle maximální velikosti buněk vyskytujících se v sekvencích. Pozice výřezu je



Obr. 5.5: Ukázka inicializace kontury

volena podle pozice těžiště kontury z předcházejícího snímku. Těžiště lze vypočítat po převedení kontury na binární obraz vnitřních pixelů a zprůměrování jejich pozic. Výřez pak odpovídá  $\pm 100$  pixelovému okolí v ose  $x$  i  $y$ . V případě okrajů obrazu je zvolen stejně velký výřez, ale jeho pozici je nutné posunout do obrazu, čili pokud je poloha těžiště v některé ose menší než 101 pixelů, je těžiště uměle přesunuto na pozici 101. pixelu. Obdobně je nutné omezit maximální hodnotu pozice těžiště. Tento výřez je nutné vypočítat pro všechny použité obrazy, tedy kromě původního obrazu i pro obraz jader a obraz pozadí.

Při výpočtu je nutné dočasně upravit polohu kontury podle daného výřezu. Od pozice bodů kontury je tedy nutné odečíst polohu výřezu v původním obraze. Po dokončení pohybu kontury je nutné převést polohu kontury zpět do původního obrazu zpětným přičtením této hodnoty.

## 5.5 Rozpínání kontur

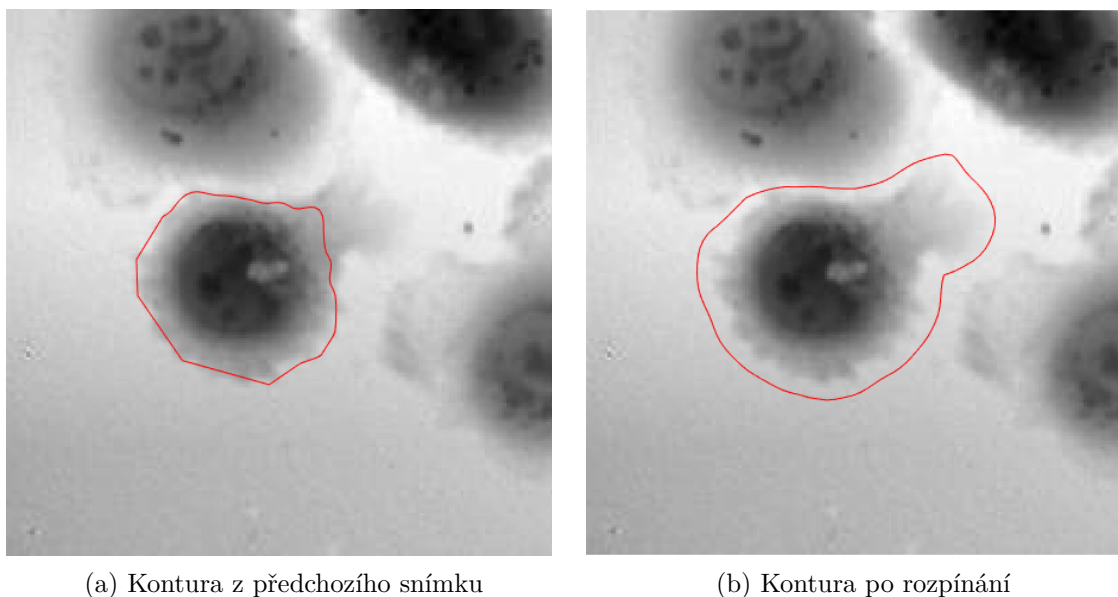
Segmentace je spolehlivější, pokud je deformace kontury zahájena v okolí buňky. K tomu je možné využít přímo modelu aktivních kontur s použitím vhodného parametrického obrazu. Vyjdeme-li z předpokladu, že pozadí má nejvyšší intenzitu, tak je vhodným parametrickým obrazem pro rozpínání přímo obraz intenzity vyhlazený Gaussovským filtrem, tedy

$$E_{ext}(x, y) = G_{\sigma} * I(x, y), \quad (5.1)$$

kde  $E_{ext}(x, y)$  je výsledný parametrický obraz (energie externí síly) a  $G_{\sigma} * I(x, y)$  je obraz intenzity vyhlazený Gaussovým filtrem. Výsledek rozpínání kontury touto

metodou můžeme vidět na obrázku 5.6. Rozpínání kontury je velmi důležité hlavně při první segmentaci konturou po její inicializaci, kdy je takto kontura zvětšena z velikosti jádra na velikost buňky. Vytvoření kontury obklopující buňku je také využito pro diskriminaci okolí kontury, a proto je rozpínání kontury počítáno ve všech snímcích.

Samotný průběh výpočtu rozpínání je stejný jako u deformace kontury, kde je výpočet podrobně popsán (5.7).



Obr. 5.6: Ukázka rozpínání kontury

## 5.6 Diskriminace okolí kontury

V použitých datech spolu buňky velmi často interagují a dotýkají se. To může způsobit velkou chybovost pokud má sousední buňka výraznější okraj. Kontura pak může konvergovat k okraji vedlejší buňky. Pro řešení tohoto problému byla vyvinuta nová metoda. Pomocí rozpínání kontur vznikla kontura, která obklopuje segmentovanou buňku. Taková kontura velmi dobře vymezuje oblast, ve které se buňka nachází. Parametrický obraz mimo vymezenou oblast pak můžeme diskriminovat vynásobením hodnotou  $k$ , tedy výsledná externí energie bude pro každý pixel  $p$

$$E'_{ext}(p) = k(p)E_{ext}(p). \quad (5.2)$$

Pro příliš velkou diskriminaci by byla kontura odpuzována vlivem difuze externí síly výpočtem GVF. S větší vzdáleností od kontury je vhodné obraz diskriminovat více.

Ideální se ukázala být skoková změna (z  $k = 1$  na  $k = 0,8$ ) následovaná lineárním poklesem hodnoty  $k$  se vzdáleností od kontury.

Pro výpočet lze použít distanční transformaci obrazu. Pokud konturu převedeme na binární vyjádření vnitřní plochy kontury (postupem popsáním v 5.12), dostáváme binární obraz  $I : \Omega \subset Z^2 \rightarrow \{0, 1\}$ , kde vnitřní plocha kontury reprezentuje objekt  $O$  tvořený bílými pixely

$$O = \{p \in \Omega | I(p) = 1\}. \quad (5.3)$$

Komplementární množinu tvořenou tmavými pixely nazveme  $O^C$ . Distanční transformaci pak definujeme jako

$$D(p) = \min\{d(p, q) | q \in O\} = \min\{d(p, q) | I(q) = 1\}, \quad (5.4)$$

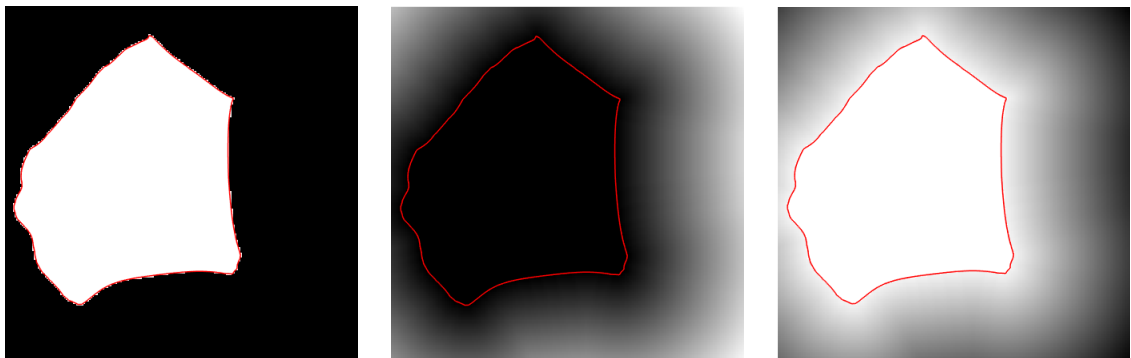
kde  $d(p, q)$  odpovídá euklidovské vzdálenosti

$$d(p, q) = \sqrt{(p_x - q_x)^2 + (p_y - q_y)^2}. \quad (5.5)$$

Výsledkem je obraz, jehož hodnoty vyjadřují vzdálenost od bílého pixelu. Parametr  $k$  lze pak vyjádřit jako

$$k(p) = \begin{cases} 1, & p \in O \\ 0,8 - a D(p), & p \in O^C \end{cases}, \quad (5.6)$$

kde  $a$  nastavuje rychlost poklesu  $k$  se vzdáleností. Ukázkou výsledku jednotlivých kroků můžeme vidět na obrázku 5.7. Výpočet distanční transformace je převzat z [22].

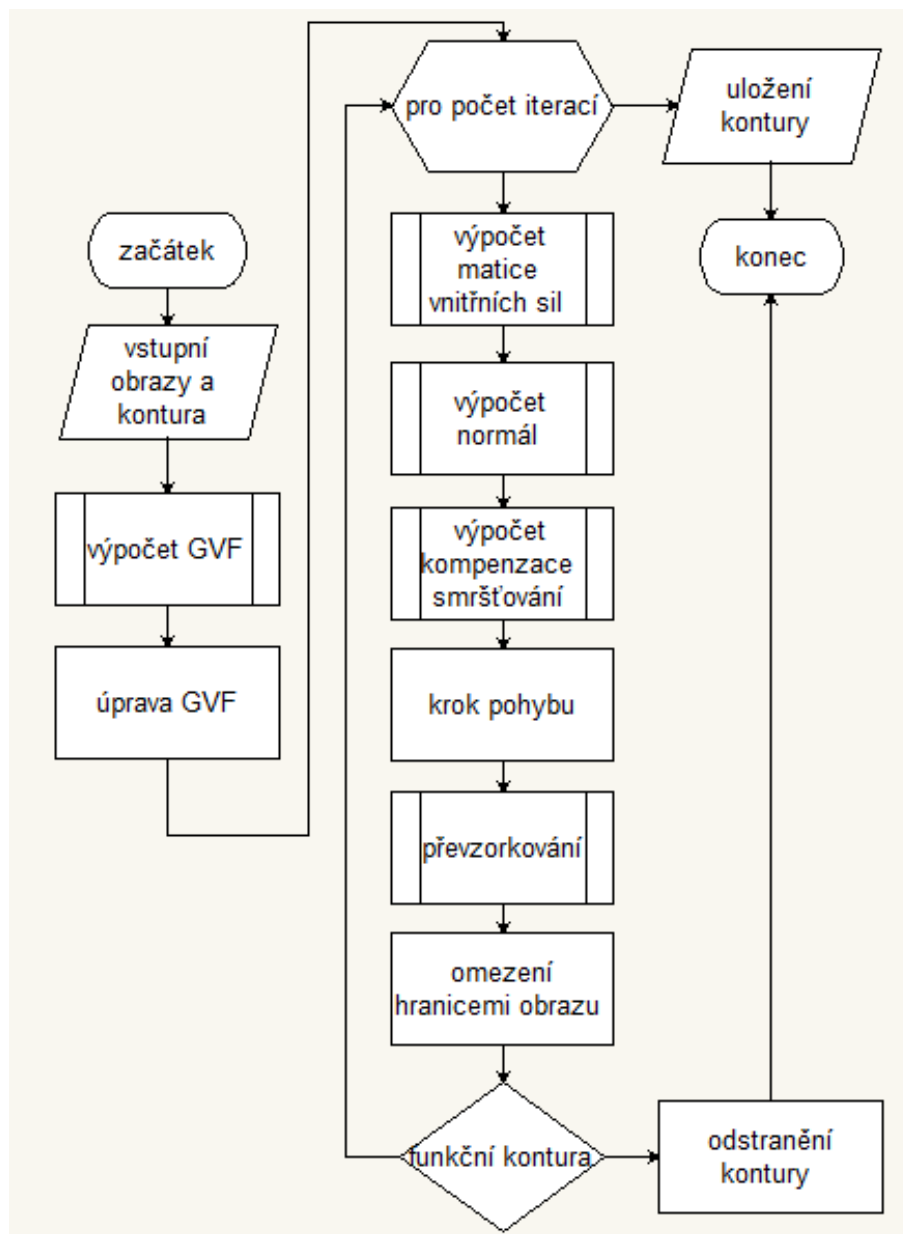


(a) Binární vyjádření vnitřní plochy  $I(p)$  (b) Distanční transformace  $D(p)$  (c) Diskriminační parametr  $k(p)$

Obr. 5.7: Ukázka výpočtu diskriminačního parametru  $k(p)$

## 5.7 Deformace kontur

Pro výslednou segmentaci byla použita metoda parametrických aktivních kontur. Při výpočtu aktivních kontur byly využity všechny možnosti zlepšení popsané v kapitole 4.1.2. Vývojový diagram popisující výpočet deformace kontury je vidět na obrázku 5.8.



Obr. 5.8: Vývojový diagram deformace kontury

## Výpočet GVF

Vstupní parametrický obraz, podle kterého je počítána deformace kontury, je nejdříve přepočítán na vektorové pole sil – GVF. Nejprve je vypočítán gradient, který je podle vzorce 4.1.2 iterativně přepočítán na GVF.

## Úprava GVF

GVF je vhodné normalizovat, jak je popsáno 4.1.2. Zachováváme tedy směr síly, ale její velikost je ve všech místech stejná. To lze provést vydělením obou složek všech vektorů délkou vektorů. Výsledné vektorové pole sil je také upraveno vynulováním v místech, kde je nežádoucí, aby se kontura pohybovala, jak je popsáno v 5.10.1.

## Výpočet vnitřních sil

V každém kroku pohybu je nutné vytvořit matici parametrů pro výpočet vnitřních sil podle vzorce 4.1.1. Velikost matice se mění s počtem bodů kontury. Pokud by nebylo prováděno převzorkování v každé iteraci, bylo by možné používat stále stejnou matici.

## Výpočet normál

Dále je nutné vypočítat jednotkové normálové vektory, aby bylo možné použít pomocné normálové síly, zabráňující přechodu přes jádra, jak je popsáno v kapitole 5.10.2. Slouží také pro určení směru síly kompenzující smršťování vlivem interních sil. Popis normálové síly lze nalézt v kapitole 4.1.2. Normálové vektory v jednotlivých bodech lze určit z tečných vektorů kontury. Pro aproximaci tečných vektorů můžeme použít vektor vypočítaný jako rozdíl následujícího a aktuálního bodu kontury.

## Výpočet kompenzace smršťování

Dále potřebujeme vypočítat velikost síly kompenzující smršťování podle rovnic uvedených v kapitole 4.1.2. Síla kompenzující smršťování působí ve směru normálové síly.

## Pohyb kontury

Samotný pohyb lze vypočítat podle vzorce 4.13, kde normálová síla bude mít dvě složky – sílu zabráňující přechod přes jádra a sílu kompenzující smršťování. Pohyb je počítán zvlášť pro  $x$  a  $y$  složku. GVF má hodnoty pouze na diskrétní mřížce. Hodnoty síly proto interpolujeme, jak je popsáno v 4.1.2.

## Převzorkování

Po každém kroku pohybu je provedeno převzorkování kontury, jak je popsáno v 4.1.2.

## Omezení hranicemi obrazu

Je také zapotřebí zajistit navrácení bodů do obrazu, v případě, že se některému z bodů podařilo vlivem pohybu dostat mimo obraz. To lze provést omezením  $x$  a  $y$  složky na interval  $\langle 1, \text{velikost obrazu} \rangle$ . Pokud se některá složka dostane mimo tento rozsah, je jí přidělena krajní hodnota rozsahu.

## Kontrola funkčnosti kontury

Pokud se kontura příliš zmenší, nebo dojde k jinému problému při výpočtu, je nutné ukončit deformaci, jinak dojde k chybě programu. Pokud je kontura identifikována jako chybná, je ukončeno celé sledování prováděné touto konturou.

### 5.7.1 Použitý parametrický obraz

Pro použitá data (ukázka na obrázku 3.1) se jako nejvhodnější parametrický obraz pro výpočet externí síly ukázala kombinace absolutní hodnoty gradientu a obrazu intenzity ve formě

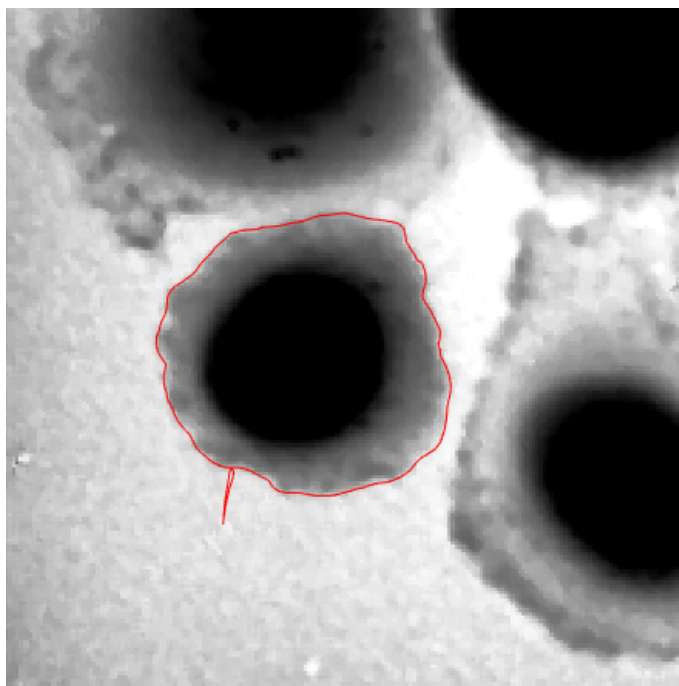
$$E_{ext}(x, y) = \omega_i I(x, y) + \omega_g |\nabla I(x, y)| + \omega_{ig} I(x, y) |\nabla I(x, y)|, \quad (5.7)$$

kde  $E_{ext}(x, y)$  je výsledný parametrický obraz (energie externí síly ze které je počítán GVF),  $G_\sigma * I(x, y)$  je obraz intenzity,  $\nabla I(x, y)$  je gradient obrazu,  $w_i$ ,  $w_g$  a  $w_{ig}$  jsou váhy nastavující vliv jednotlivých složek. Gradient do výpočtu vnáší informaci o hranách, obraz intenzity zajistí preferenci hran ve světlejších oblastech obrazu. Přidáním obrazu intenzity zajistíme preferenci světlejších hranic buňky před tmavšími hranicemi jádra. Nově byla do výrazu přidána složka  $I(x, y) |\nabla I(x, y)|$ , která má zajistit preferenci míst, kde je obraz současně světlý a jsou zde i hrany a ne pouze jedna ze složek ve větší míře. Ostatní složky jsou zde pro nastavitelnost metody.

## 5.8 Odstranění přesmyček

Přesmyčky, jako na obrázku 5.9, jsou častou chybou segmentace. Použitím převzorkování popsaného v kapitole 4.1.2 se jejich vznik značně omezí. Stále ale jejich vznik může nastat a je potřeba zajistit jejich odstranění. Proto byla vyvinuta metoda pro jejich vyhledávání a odstraňování. Vznikají v případě, že dojde k příliš velkému rozpínání kontury, nebo pokud se v některém místě buňka výrazně zmenší a dojde

tak ke vzniku kontury, která obklopuje velký prostor s pozadím. V nejbližším místě pak kontura není přitahována hranou buňky, ale bližší části kontury jsou postupně přitahovány hranami buňky a vytvoří se přesmyčka. Samotná přesmyčka většinou nesegmentuje žádnou plochu a způsobuje tak pouze chybu v parametru obvodu buňky. Problém nastává až v následujícím snímku, kdy je přesmyčka vlivem rozpínání zvětšena a může způsobit velké chyby v segmentaci. Přesmyčky je tedy vhodné po dokončení deformace kontury nalézt a odstranit.



Obr. 5.9: Ukázka přesmyčky

Vytvořená metoda hledání přesmyček vychází z hledání bodů kontury, které jsou blízko sebe, ale neodpovídají sousedním bodům na kontuře. Pokud pro konturu složenou z bodů  $[s_1, s_2, \dots, s_n]$  nalezneme dvojici bodů  $s_i$  a  $s_j$  pro kterou platí

$$d(s_i, s_j) > a \wedge \min\{j - i, i + n - j\} > b, \text{ pro } j > i, \quad (5.8)$$

je tato dvojice identifikována jako místo přesmyčky.  $d(s_i, s_j)$  je euklidovská vzdálenost bodů jako 5.5,  $a$  je parametr nastavující minimální vzdálenost bodů identifikovaných jako přesmyčka a  $b$  je parametr nastavující, kolik bodů od sebe musí body ležet, aby mohly tvořit přesmyčku. Pokud je taková dvojice bodů nalezena, tak je jako přesmyčka identifikována menší část kontury, vzniklá rozdělením kontury v místě blízkých bodů. Konturu tedy rozdělíme na dvě části:  $[s_i, s_{i+1}, \dots, s_j]$  a  $[s_1, s_2, \dots, s_{i-1}, s_{j+1}, s_{j+2} \dots s_n]$ . Část obsahující méně bodů odstraníme jako přesmyčku. Princip výpočtu přesmyček je dobře patrný z pseudokódu:

```

1: function ODSTRANENIPRESMYCEK( $s, a, b$ )
2:    $n \leftarrow \text{délka}(s)$ 
3:    $i \leftarrow 1$ 
4:    $j \leftarrow i + b$ 
5:   while  $i < n - b$  do
6:     while  $j < n - b$  do
7:        $d \leftarrow \text{vzdálenost}(s_i, s_j)$ 
8:       if  $d < a$  then
9:          $sa \leftarrow [s_i, s_{i+1}, \dots, s_j]$ 
10:         $sb \leftarrow [s_1, s_2, \dots, s_{i-1}, s_j, s_{j+1}, \dots, s_n]$ 
11:        if  $j - i > n - j + i$  then
12:           $s = sa$ 
13:        else
14:           $s = sb$ 
15:           $n \leftarrow \text{délka}(s)$ 
16:           $j \leftarrow n$ 
17:           $j \leftarrow j + 1$ 
18:         $i \leftarrow i + 1$ 
19:         $j \leftarrow i + b$ 
20:   return  $s$ 

```

Hledání přesmyček je výpočetně náročné, neboť je nutné zkontrolovat všechny dvojice bodů, stačí ho ale použít vždy jen jednou, pro každou konturu v daném snímku, po dokončení deformace kontury.

## 5.9 Změny topologie kontur

Za velkou nevýhodu parametrických aktivních kontur (oproti geometrickým) je považována neschopnost samostatné změny topologie – kontura se není schopna sama rozdělit na více kontur. To je však pro sledování buněk výhodné, protože počet buněk se v obrazu jen velmi málo mění. Jsou však situace, kdy dojde k překrytí buněk, sloučení buněk, dělení buněk nebo může do zorného pole vstoupit nová buňka. V takovém případě je nutné zajistit patřičnou úpravu kontur. Pro změny topologie byla vytvořena vlastní metoda vycházející ze segmentace jader.

Spolehlivým ukazatelem aktuálního počtu buněk je obraz jader použitý při inicializaci. Pokud obraz jader vypočítáme v každém snímku, tak počet kontur by měl vždy odpovídat počtu jader. Po přiřazení jader konturám mohou nastat tyto situace:

1. 1 kontuře jsou přiřazeny 2 jádra  $\rightarrow$  rozdělení kontury,
2. 1 jádro je přiřazeno 2 konturám  $\rightarrow$  sloučení kontur,

3. jádro není přiřazeno žádné kontuře  $\rightarrow$  vytvoření nové kontury,
4. kontura nemá přiřazeno žádné jádro  $\rightarrow$  zánik kontury.

Při změně topologie je důležité zaznamenat původ vzniku nové kontury, nebo důvod zániku kontury, protože tato informace může být potřebná pro další analýzu.

### 5.9.1 Přiřazení jader konturám

Pro identifikaci nutnosti změn topologie a pro zabránění přechodu přes jádra (5.10.2), je nutné konturám přiřadit jejich jádro (případně jádra). Pro změny topologie je důležité umožnit, aby kontuře mohlo být přiřazeno více jader a jádru přiřazeno více kontur.

Přiřazení lze provést pomocí binárního obrazu zobrazujícího vnitřní plochu jádra, který lze získat výpočtem popsáním v 5.12. Jádro přiřadíme kontuře, pokud se uvnitř kontury nalézá alespoň pětina jeho plochy. Pro binární obraz jádra  $J(p)$  patřícího kontuře a binární obraz vnitřní plochy kontury  $K(p)$  musí platit

$$\sum_p J(p)K(p) > \frac{1}{5} \sum_p J(p). \quad (5.9)$$

Překryv jen  $\frac{1}{5}$  byl zvolen kvůli slučování kontur. Když se dvě jádra spojí, každá z kontur překrývá jen část vzniklého jádra, ale toto jádro musí být přiřazeno oběma konturám.

### 5.9.2 Rozdělení kontury

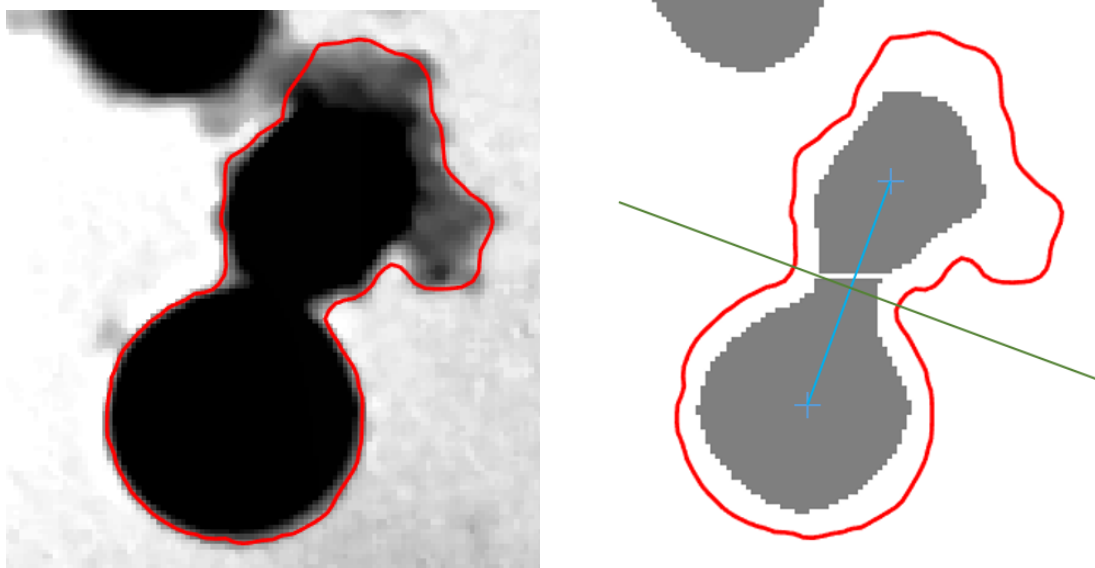
Rozdělení kontury je třeba zajistit v případech, kdy dojde k dělení buněk, nebo když se vzdálí dvě buňky, které se překrývaly. Oba případy se projeví tím, že uvnitř kontury vzniknou dvě jádra. Konturu je tedy nutné rozdělit na dvě kontury.

Jako nevhodnější metoda se ukázalo být rozdělení kontury pomocí přímky, která je osou úsečky spojující těžiště jader těchto dvou buněk. Bylo by možné provést novou inicializaci kontur, na základě jejich jader, ale metoda rozdělení přímkou zachová pozici bodů a nemůže tak dojít ke skokovým změnám parametrů. Ukázku takového rozdělení můžeme vidět na obrázku 5.10

Polohu těžiště jádra lze určit jako průměrnou hodnotu polohy pixelů jádra. Osu úsečky pak lze určit z analytického vyjádření. Pro těžiště  $A = [a_x, a_y]$  a  $B = [b_x, b_y]$  lze odvodit rovnici dělicí přímky

$$(b_x - a_x)x + (b_y - a_y)y - \frac{1}{2}(b_x^2 - a_x^2 + b_y^2 - a_y^2) = 0. \quad (5.10)$$

Pokud si levou stranu rovnice označíme jako funkci  $p(x, y)$ , tak můžeme body kontury rozdělit na body, pro které je  $p(x, y) > 0$ , a pro které  $p(x, y) < 0$ . To odpovídá rozdělení kontury podle popsané přímky.



(a) Kontura v původním obrazu

(b) Ukázka principu rozdělení kontury

Obr. 5.10: Princip rozdělení kontury

U obou kontur vytvořených rozdělením vznikne v místě rozdělení mezera, kterou lze vyplnit převzorkováním kontury popsáným v kapitole 4.1.2.

Z důvodu častého výskytu falešných rozdělení vlivem špatné segmentace jader, je vhodnější kontury rozdělovat, až pokud jsou dvě jádra v buňce identifikována ve dvou snímcích po sobě. Při prvním nalezení dvou jader je uložena informace o možném rozdělení v dalším snímku a obě jádra jsou považována za jádro této buňky. Pokud jsou i v dalším snímku v buňce nasegmentována dvě jádra, tak je provedeno rozdělení.

### 5.9.3 Sloučení dvou kontur

Sloučení kontur může nastat v případech, kdy dojde k překrytí buněk, nebo když jedna buňka pohltí druhou. Pokud se buňky příliš přiblíží, tak segmentace jader tyto dvě jádra identifikuje jako jedno jádro.

Pokud je jedno jádro identifikováno jako jádro u dvou různých kontur je zapotřebí provést jejich sloučení. To lze provést pouhým odstraněním jedné kontury, kde je vhodnější odstranit menší konturu. Nasegmentování celého sloučeného objektu druhou z kontur nastane automaticky díky vlivu zabránění přechodu přes jádra popsaného v kapitole 5.10.2. Vznikne tak normálová síla, která konturu roztáhne kolem celé buňky.

Stejně jako u rozdělení kontur, je vhodné buňky sloučit až pokud je společné jádro nasegmentováno ve dvou snímcích po sobě, aby se zabránilo falešným sloučením při

jednom chybně segmentovaném snímku. Sloučení kontur však nastává automaticky vlivem působení normálových sil jader. Proto pokud je jedno jádro přiřazeno dvěma konturám poprvé, tak je nutné normálové síly tohoto jádra vypnout.

#### **5.9.4 Vytvoření nové kontury**

V obrazu se může objevit nová buňka, kdy je nutné pro tuto buňku vytvořit novou konturu. To může nastat v případě vstupu této buňky do zorného pole, nebo při chybách segmentace, kdy se pomocí stávající kontury buňku nepodaří segmentovat. Nová kontura by měla vzniknout, pokud některé jádro není přiřazeno žádné kontuře. Vznik nové kontury lze provést stejně, jak probíhá inicializace kontur v prvním snímku.

#### **5.9.5 Zánik kontury**

K zániku kontury může dojít pokud se buňka dostane mimo zorné pole, nebo v případě výrazných chyb segmentace. V takovém případě není kontuře přiřazeno žádné jádro a provedeme její odstranění.

### **5.10 Úpravy pohybu kontury**

Pro správnou funkci sledování bylo vytvořeno několik heuristických postupů pro úpravu pohybu kontury. Popsané postupy využívají změn parametrického obrazu, ze kterého je počítána externí síla, nebo změn výsledné externí síly. Rozdíl je zde ten, že úprava parametrického obrazu ovlivní okolí vlivem difuze při výpočtu GVF. Úprava výsledného GVF ovlivní jen skutečně změněnou hodnotu. Parametrický obraz je změněn například při diskriminaci okolí kontury a výsledná síla je změněna například při omezení rozpínání. Další možnou úpravou je přidání normálové síly v určitých částech obrazu.

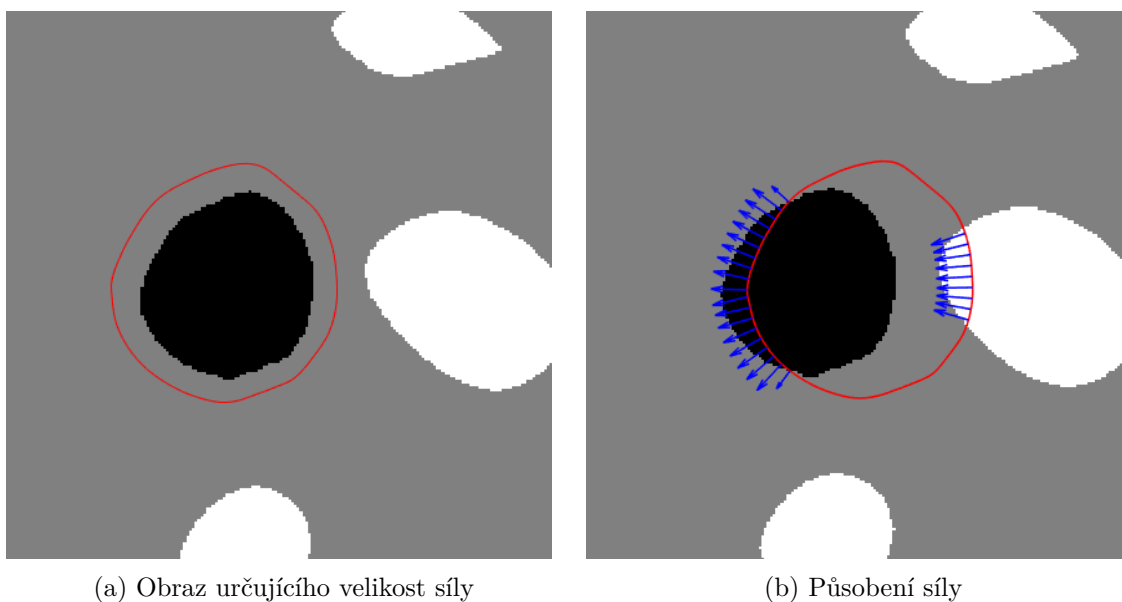
#### **5.10.1 Omezení rozpínání**

Velké roztažení kontury při rozpínání může způsobovat chyby segmentace. Pokud se kontura příliš vzdálí od okraje segmentované buňky, tak tato hranice již na konturu nepůsobí dostatečně silně a kontura k ní nekonverguje. Byla proto vytvořena metoda pro zastavení kontury v oblastech pozadí. Zastavení kontury je zajištěno vynulováním GVF v oblastech pozadí.

### 5.10.2 Zabránění přechodu přes jádra

Pro správný výsledek sledování nesmí kontura nikdy překročit jádro aktuální segmentované buňky. Konturu inicializujeme v okolí jádra a v případě přechodu kontury do dalšího snímku nepředpokládáme tak velký pohyb buňky, že by se její jádro dostalo mimo konturu. Je tedy zřejmé, že přechod kontury přes jádro by způsobil zhroucení kontury a sledování buňky by bylo přerušeno. Obdobně nesmí kontura přejít přes jádra sousedních buněk, neboť by pak tyto dvě buňky byly segmentovány jako jedna.

Přechodu přes jádra lze zabránit vynulováním externí síly v oblasti jader. Kontura se však může přes jádro dostat i postupným působením interních sil. Pro zajištění spolehlivosti byla tedy přidána nová externí síla, která působí ve směru kolmém na konturu, pokud se bod kontury nachází v oblasti jádra.



Obr. 5.11: Ukázka normálové síly bránící přechodu přes jádra

Tuto sílu lze vypočítat jako normálovou sílu popsanou v kapitole 4.1.2. Velikost normálové síly (hodnota  $k$  z rovnice 4.12) musí být nulová mimo oblasti jader, kladná v oblasti jádra aktuální buňky a záporná v oblasti ostatních jader. Pro její výpočet byl vytvořen obraz s těmito hodnotami a velikost normálové síly je pak určena pozicí daného bodu kontury v obraze. Na obrázku 5.11 můžeme vidět ukázkou takového obrazu a ukázkou působení výsledné síly.

## 5.11 Segmentace v následujících snímcích

Pro inicializaci kontury v následujících snímcích je použita kontura z předcházejícího snímku. Postup segmentace je totožný jako v prvním snímku. Můžeme zde však použít menší počet iterací pro rozpínání, než u inicializačního prvního snímku.

Využíváme opět i rozpínání kontury, neboť je tak zajištěna konvergence kontury do okolí buňky a lze tedy využít metody preferující pro segmentaci oblast uvnitř kontury popsané v kapitole 5.6.

## 5.12 Vyplnění kontury

Pro řadu výpočtů (např. pro výpočet parametrů buněk nebo pro určení, zda se dané jádro nalézá uvnitř kontury) je zapotřebí převést konturu reprezentovanou sadou bodů, na binární obraz vnitřní plochy kontury. Pro tento úkol existuje řada algoritmů, zde lze však použít jednoduchou metodu využívající převzorkování kontury (4.1.2).

Pokud konturu převzorkujeme na vzdálenost sousedních bodů jeden pixel, tyto pozice bodů zaokrouhlíme a vykreslíme pixely nacházející se na těchto bodech, získáme osmi-spojitou hranici oblastí. Oblast lze pak vyplnit například pomocí inverzního vyplňování bez nutnosti rasterizace úseček. Pro implementaci vyplnění oblastí v MATLABU byla použita funkce *imfill*.

## 5.13 Výpočet parametrů

Hlavním výsledkem sledování buněk jsou parametry jednotlivých buněk v sekvenci, kde pro výpočet byly zvoleny základní parametry: obvod, plocha, cirkularita, poloha těžiště a hmotnost.

Pro výpočet plochy je nutný převod kontury na binární obraz vnitřní plochy kontury pomocí metody popsané v 5.12. Plocha pak odpovídá počtu pixelů tvořících buňku.

Hmotnost je počítána jako součet intenzity všech pixelů buňky. Pro tento výpočet lze opět použít binárního zobrazení buňky, které se používá pro výpočet plochy. Pro záznamy z holografického mikroskopu je lineární závislost mezi intenzitou a hmotností buňky:  $1 \text{ rad/px} = 0,238 \text{ pg/px}$ . Jelikož však pozadí nemá nulovou intenzitu je potřeba jeho hodnotu odečíst. Hodnota pozadí byla vypočítána jako průměrná intenzita pozadí v prvním snímku. Jako obraz pozadí zde byl použit výsledek segmentace popisovanou metodou v prvním snímku sekvence.

Pro výpočet obvodu je důležitá hustota vzorkování kontury, která by měla být vždy stejná. Pro výpočet obvodu byla použita kontura s body vzdálenými 1 pixel. Obvod pak přímo odpovídá počtu bodů kontury.

Cirkularitu lze vypočítat na základě obvodu a plochy buňky podle vzorce 2.1.

## 5.14 Využití optického toku pro deformaci kontur

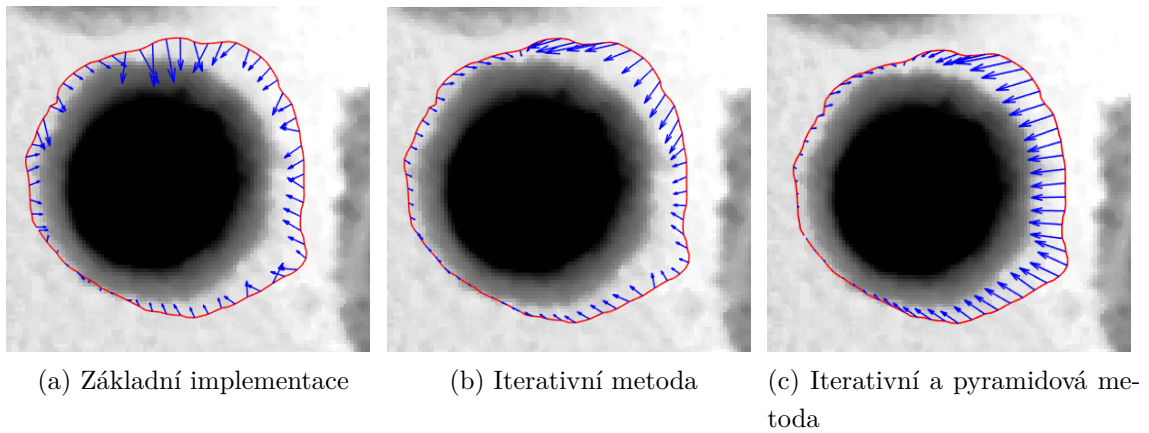
Základní implementace aktivních kontur je vytvořena pro segmentaci objektů v jediném snímku a využívá tedy pouze informaci obsaženou v tomto snímku. V rozdílu (pohybu) mezi snímky se nachází velké množství informace, která by se dala využít pro zlepšení výsledků segmentace a sledování. Velmi vhodným vyjádřením této informace změny mezi snímky je právě optický tok. Úspěšná implementace použití optického toku jako externí síly pro deformaci kontury je popsána v [23] a [24]. Tyto metody optický tok kombinují s klasickými externími silami působícími na konturu.

Pro využití optického toku, jako další složky externí síly pro deformaci, je nutné vypočítat optický tok ve všech bodech obrazu a jako externí sílu působící na bod kontury brát hodnotu tohoto vektorového pole v místě bodu kontury (případně tuto sílu zkombinovat s jinou externí silou působící na konturu). Při pokusu o implementaci tato metoda pro testovaná data poskytovala velmi špatné výsledky, a proto byl testován jiný nový přístup.

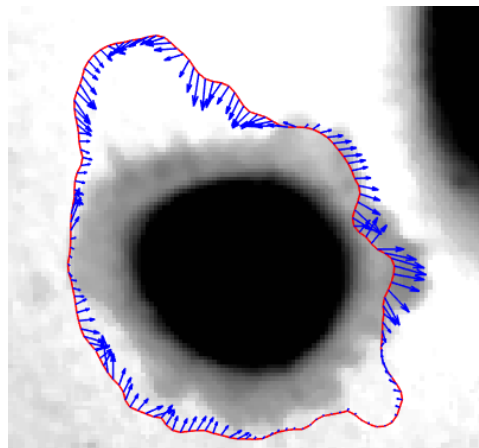
Jak je uvedeno v teoretickém popisu optického toku (kapitola 4.3), nejpřesnější výpočet optického toku lze provést ve významných bodech obrazu (v místech s velkou hodnotou gradientu). Velmi vhodnými významnými body jsou body kontury z předchozího snímku, které by měly ležet na hranici buňky (v předchozím snímku). Pokud pro každý bod kontury vypočítáme optický tok, což je vektor pohybu daného bodu do dalšího snímku, můžeme tento vektor použít pro skokovou deformaci kontury a výslednou konturu pak upravit pomocí běžné deformace.

Na obrázku 5.12 je zobrazen výsledek optického toku v bodech pro základní implementaci Lucas-Kanade i pro její zlepšení. Pro základní implementaci obsahoval výsledek velké množství chybných vektorů, proto byla implementace rozšířena o iterativní způsob výpočtu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo pomocí kombinace iterativní a pyramidové metody, která je schopna optický tok vypočítat i v místech, kde dochází k velkému pohybu buňky.

Výsledek je velmi citlivý na tvarové změny buněk. Typicky nepřesný výsledek ukazuje obrázek 5.13. Další nepřesnosti jsou způsobeny vlivem dotyku buněk. V místě, kde se buňky dotýkají, neexistuje hrana. Pokud se buňky v následujícím snímku přestanou dotýkat, hrana vznikne a tato metoda nerozpozná podobnost. Dalším velkým problémem je chybná segmentace v přecházejícím snímku, taková



Obr. 5.12: Ukázka optického toku pro body kontury



Obr. 5.13: Ukázka chyby optického toku

chyba se přenáší do následujícího snímku.

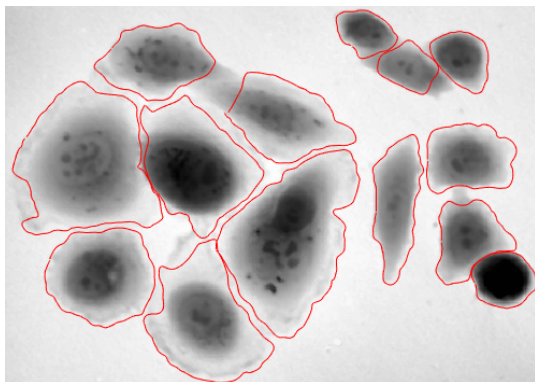
Úprava výsledku po pohybu klasickou deformací některé chyby eliminuje, metoda však poskytovala horší výsledky, než metoda bez použití optického toku, proto tato metoda nebyla použita pro výslednou implementaci. Důvodem nevhodnosti této metody jsou změny tvaru buněk ve zkoumaných datech – buňky se málo pohybují a pouze mění svůj tvar. Využití metody s optickým tokem by bylo velmi vhodné pro sledování buněk, které se více pohybují, ale zachovávají si svůj tvar jako v [24].

## 6 VÝSLEDKY

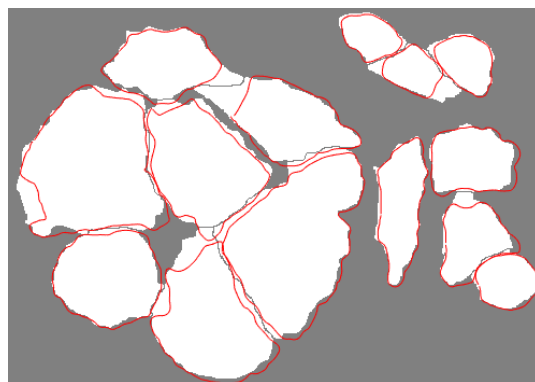
### 6.1 Přesnost segmentace

Důležitá je přesnost výsledné segmentace. Ukázkou takové segmentace ukazuje obrázek 6.1, kde můžeme vidět kontury zobrazené v původním obraze a také porovnání s ručně segmentovanými daty. Tabulka 6.1 vyhodnocuje přesnost segmentace v porovnání s ručně segmentovanými daty. Hodnoty jsou vyjádřeny v poměru se segmentovanou plochou. Metoda dosahuje větší nepřesnosti u falešně negativních pixelů, což je dáno především malým kontrastem buněk a nutností včas zastavit narůstání kontury.

Jelikož segmentované buňky jsou zaznamenány relativně novou modalitou a zaznamenané snímky jsou velmi specifické, je obtížné nalézt jinou metodu pro srovnání přesnosti výsledků. Pro srovnání byla vybrána segmentace snímků z fázově-contrastního mikroskopu popsána v [25], kde autoři uvádějí přesnost segmentace 81,05%. Snímky zde mají velmi podobné vlastnosti, ale srovnání je nutné brát pouze jako orientační.



(a) Výsledek segmentace



(b) Porovnání s ruční segmentací (bílé objekty jsou ruční segmentace)

Obr. 6.1: Ukázka výsledné segmentace

### 6.2 Spolehlivost sledování

Z hlediska sledování buněk může docházet k chybám. Implementované slučování a rozdělování kontur není úspěšné v případech, kdy spolu buňky dlouhodobě interagují. Takové buňky se k sobě opakovaně přibližují a oddalují. Kontura se tak mnohokrát opakovaně rozdělí a opět sloučí. Ukázkou takových interagujících buněk

Číslo sekvence	Počet buněk	Průměrná velikost	Falešně pozitivní	Falešně negativní	Celková přesnost
1	25	4629 px	5,90 %	10,77 %	83,33 %
2	10	4831 px	6,82 %	8,33 %	84,85 %

Tab. 6.1: Přesnost segmentace jako poměr segmentované plochy

lze vidět na obrázku 6.2, kde na některých snímcích jsou buňky identifikovány odděleně a na některých jako jeden celek. Problémem zde je, že při takovéto interakci dojde často k chybě a sledované buňky pak nejsou propojeny. To lze pozorovat na grafu trajektorií 6.3, kde tyto buňky odpovídají shluku krátkých trajektorií v pravé části grafu. Naopak ukázky úspěšně identifikovaných změn topologie jsou uvedeny v kapitole 6.3.

Metoda je velmi spolehlivá z hlediska segmentace všech buněk ve všech snímcích, neboť i při chybách sledování je pouze špatně identifikovaná návaznost buněk v sekvenci, ale buňka je dále segmentována novou konturou. Výsledek sledování touto metodou by tedy bylo vhodné dále zpracovat – nalézt korespondující buňky v místech přerušení a identifikovat jejich návaznost. Toto zpracování však již není součástí této práce.

## 6.3 Ukázky výsledků sledování

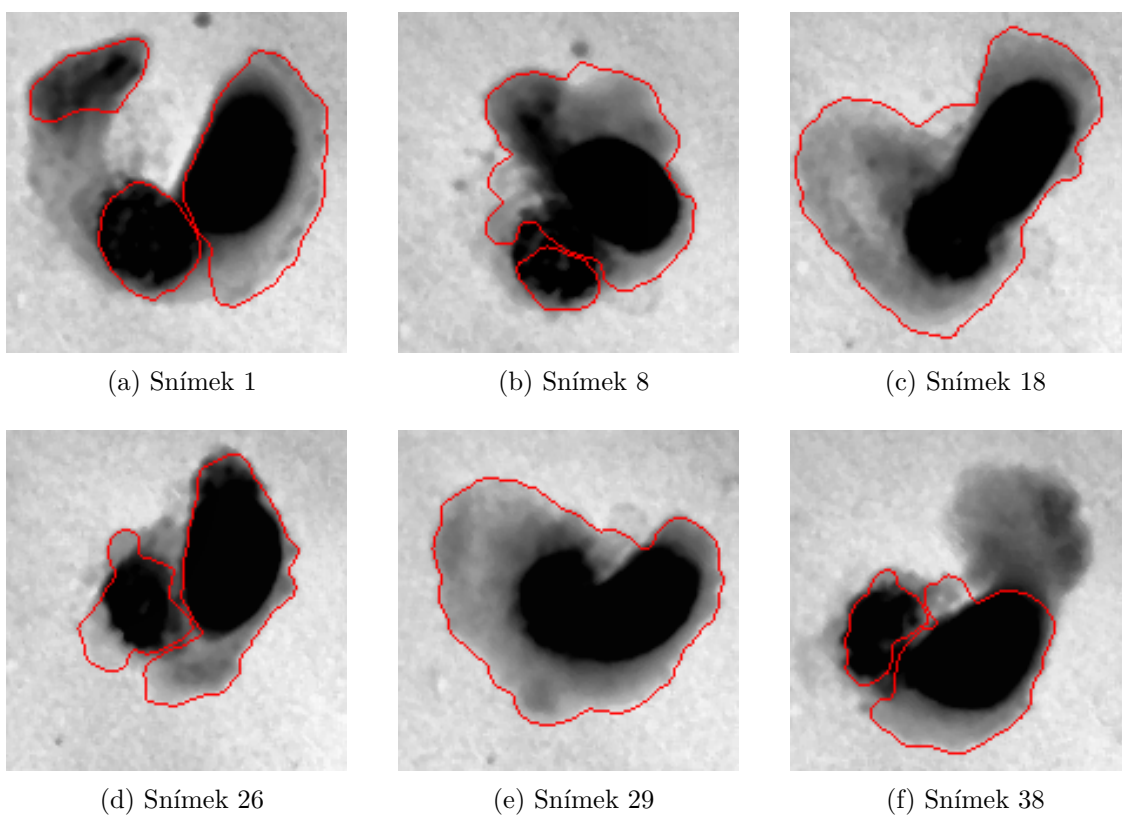
Typickým výsledkem sledování buněk je zobrazení jejich trajektorie v průběhu sekvence, jako na obrázku 6.3. Z grafu trajektorií všech buněk v průběhu 100 snímků sekvence je patrné, že buňky se v těchto datech příliš nepohybují. Buňky, které v sekvenci nevykonávají žádný pohyb lze většinou také identifikovat jako mrtvé buňky.

Na obrázku 6.4 jsou zobrazeny hmotnosti těchto buněk. Lze zde pozorovat skokové nárůsty a poklesy hmotnosti, což odpovídá sloučení a rozdělení kontur.

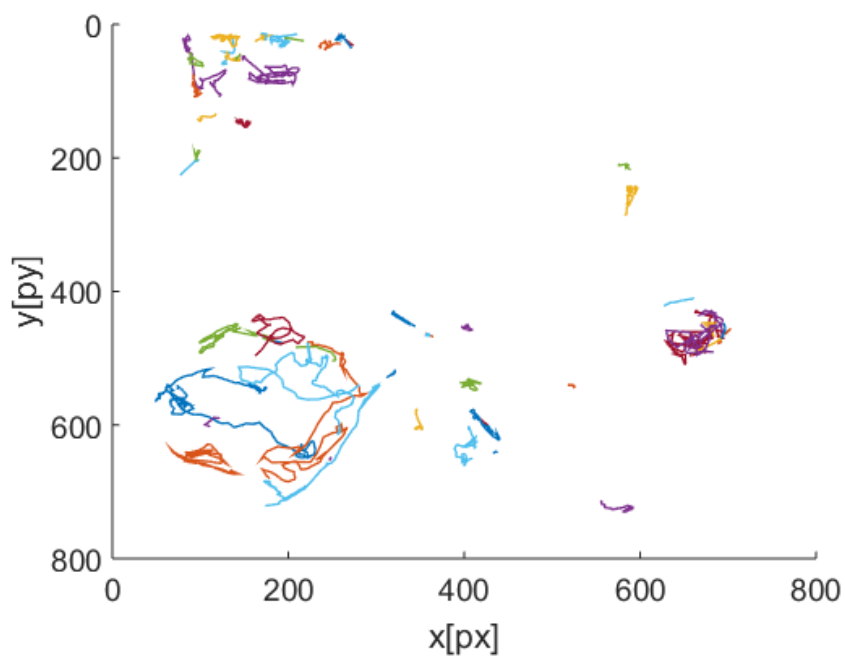
Nejzajímavějšími situacemi pro analýzu jsou dělení a slučování buněk. Zajímá nás především vývoj parametrů v časovém okolí těchto jevů. Zobrazené výsledky jsou výsledkem automatického sledování. Ručně byly z výsledků vybrány zajímavé buňky a vhodné časové okolí těchto jevů pro zobrazení. Jedná se pouze o ukázky výsledků, které by mohly být vhodné pro interpretaci.

### 6.3.1 Dělení buněk

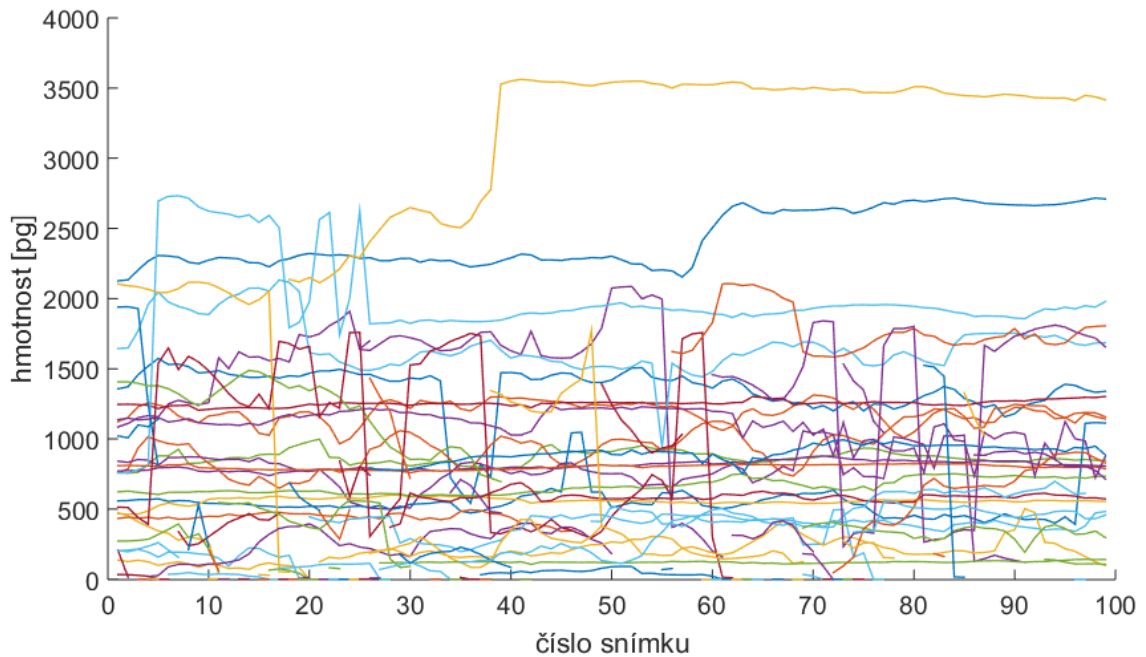
Na obrázku 6.5 jsou ukázány výřezy z vybraných snímků výsledků segmentace, kde je zachycen vývoj dělení buněk. Došlo zde k úspěšnému rozdělení kontury a vzniklá



Obr. 6.2: Ukázka interagujících buněk



Obr. 6.3: Graf trajektorií buněk



Obr. 6.4: Graf hmotností buněk

dvojice buněk je dále úspěšně sledována. Na obrázku 6.6 je vývoj hmotnosti a circularity těchto dvou buněk. Lze zde pozorovat, že hmotnost původní buňky se rozdělila mezi dvě nově vzniklé buňky.

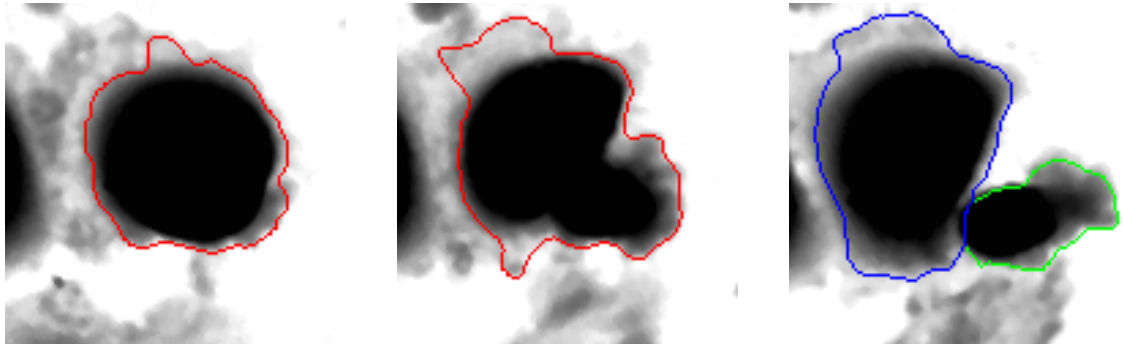
### 6.3.2 Sloučení buněk

Na obrázku 6.7 je vidět ukázka sloučení dvou buněk. Buňky zde byly opět správně sledovány a jejich kontury byly úspěšně sloučeny. Vývoj hmotnosti a obvodu těchto buněk je vidět na obrázku 6.8.

### 6.3.3 Překrytí buněk

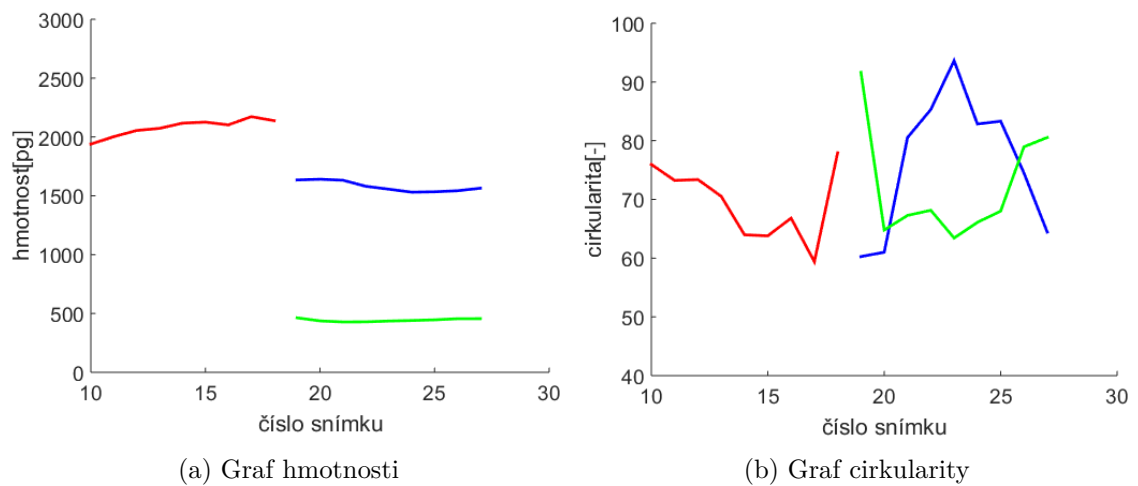
Velmi problematickou situací je překrytí dvou buněk. Typický vývoj takového překrytí ukazuje obrázek 6.9. Došlo zde k úspěšnému sloučení a opětovnému rozdělení kontur. Překrytí lze od sloučení buněk identifikovat podle opětovného rozdělení těchto buněk. Lze předpokládat, že nejde o sloučení a následné dělení buněk, neboť tyto jevy jsou v analyzovaných sekvencích velmi vzácné.

Pro korektní sledování těchto buněk je zapotřebí identifikovat, o kterou z původních buněk se jedná. Zde lze vycházet z parametrů zobrazených na obrázku 6.10. Původní buňky si zachovaly svou hmotnost a lze je tedy snadno identifikovat. V grafu plochy lze pozorovat velký nárůst na začátku a konci překrytí, který je způsobený postupným vzdalováním těchto buněk.

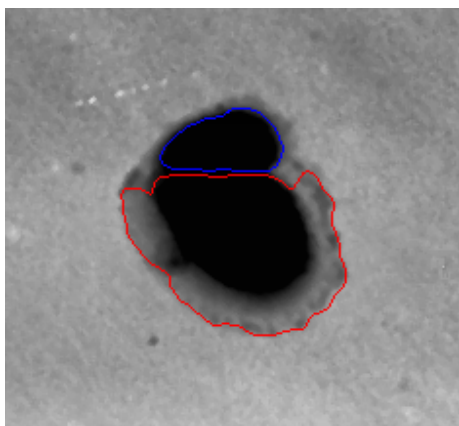


(a) Buňka před dělením (snímek 17)      (b) Buňka v průběhu dělení (snímek 18)      (c) Buňka po dělení (snímek 21)

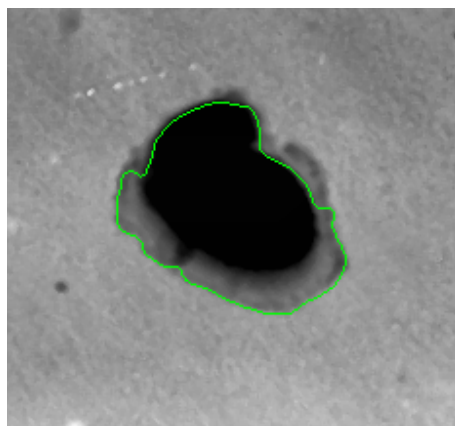
Obr. 6.5: Ukázka buněčného dělení



Obr. 6.6: Grafy parametrů při dělení

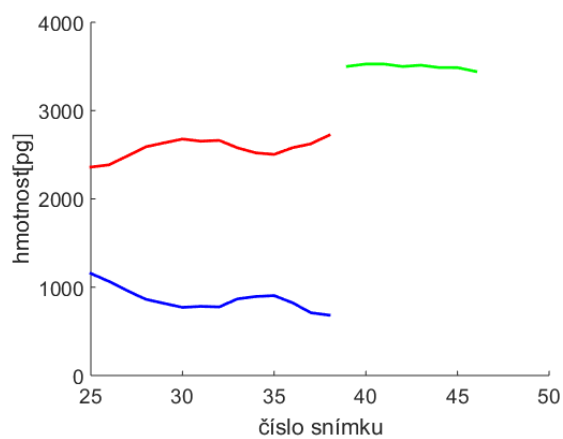


(a) Buňky před sloučením (snímek 32)

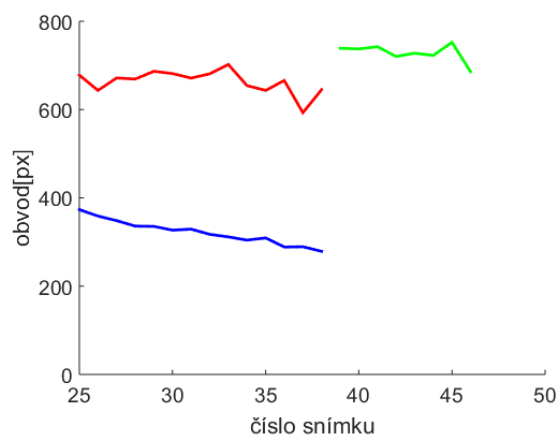


(b) Buňky po sloučení (snímek 40)

Obr. 6.7: Ukázka sloučení buněk

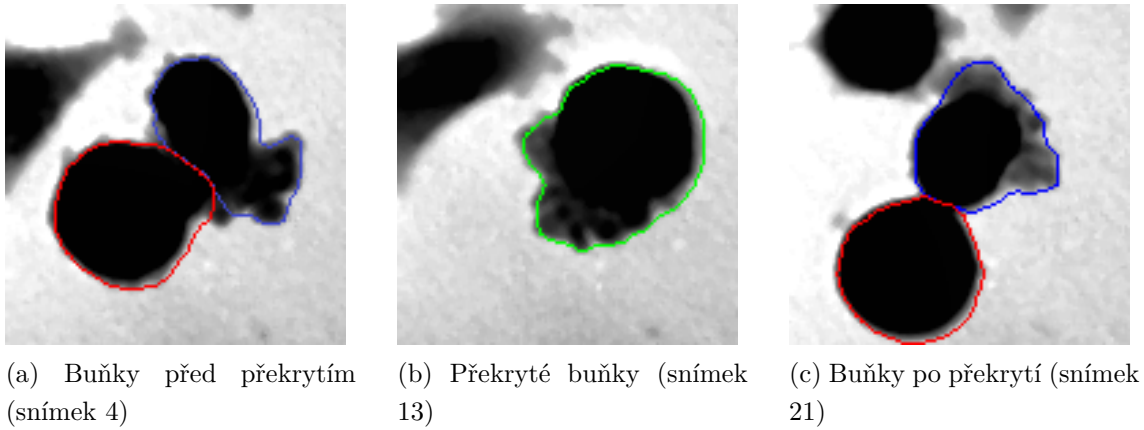


(a) Graf hmotnosti

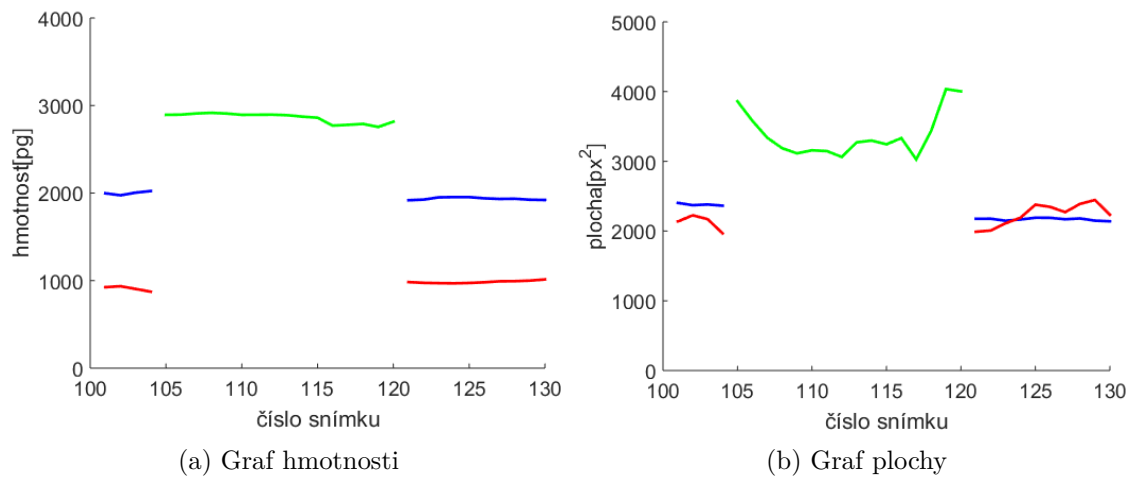


(b) Graf obvodu

Obr. 6.8: Grafy parametrů při sloučení



Obr. 6.9: Ukázka překrytí buněk



Obr. 6.10: Grafy parametrů při překrytí

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo popsat sledování buněk a navrhnout vhodnou metodu sledování v záznamech pořízených novou modalitou - multimodálním holografickým mikroskopem.

Práce se nejprve zaměřuje na vysvětlení základních principů holografie a probírá obecné konstrukce holografických mikroskopů. Podrobněji je pak rozebrán multimodální holografický mikroskop, pomocí kterého byly pořízeny obrazové sekvence buněk. Dále jsou zde tyto buňky přesně specifikovány a jsou popsány základní vlastnosti těchto obrazových dat.

V další části se práce zaměřuje na základní metody sledování buněk a popisuje nejrůznější zkoumané parametry. Byla vybrána metoda parametrických aktivních kontur, kterou lze využít pro kombinaci segmentace i hledání korespondujících buněk. Model parametrických aktivních kontur je podrobně popsán s několika možnostmi zlepšení.

Práce popisuje implementaci metody sledování buněk, jejíž základem je model parametrických aktivních kontur. Metoda obsahuje automatický způsob inicializace kontur, který vychází z kombinace prahování jader buněk a watershed transformace. Metoda obsahuje řadu postupů pro zlepšení výsledků segmentace. Metoda ošetřuje také způsob rozdělování a slučování kontur při větvení trajektorií, kde jsou tyto situace vyhledávány opět pomocí obrazu jader. Byla testována metoda deformace kontur s využitím optického toku, která však byla identifikována jako nevhodná pro použitá data.

Z hlediska segmentace lze metodu považovat za přesnou a spolehlivou vzhledem k obtížnosti segmentace těchto dat. Z hlediska sledování buněk při konfliktních situacích (větvení trajektorií) si metoda neporadí s buňkami, které spolu dlouho a intenzivně interagují. Problémem metody je její velká výpočetní náročnost. V práci je přesnost segmentace vyhodnocena porovnáním s ruční segmentací. Je zde uvedeno několik ukázek, při kterých byla metoda sledování úspěšná, a při kterých metoda selhala.

## LITERATURA

- [1] TOAL, Vincent. *Intrudiction to holography*. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-1869-5.
- [2] HARIHARAN, P. *Basics of holography*. New York, NY: Cambridge University Press, 2002, xii, 161 p. ISBN 05-210-0200-1.
- [3] YU, Xiao, Jisoo HONG, Changgeng LIU a Myung K. KIM. Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking. *Optical Engineering*. 2014-11-01, vol. 53, issue 11, s. 112306-. DOI: 10.1117/1.OE.53.11.112306. Dostupné z: <http://opticalengineering.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.OE.53.11.112306>
- [4] SLABÝ, Tomáš, Pavel KOLMAN, Zbyněk DOSTÁL, Martin ANTOŠ, Martin LOŠŤÁK a Radim CHMELÍK. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21, issue 12, s. 14747-. DOI: 10.1364/OE.21.014747. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-12-14747>
- [5] KOLMAN, Pavel a Radim CHMELÍK. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, vol. 18, issue 21, s. 21990-. DOI: 10.1364/OE.18.021990. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-21-21990>
- [6] GUMULEC, Jaromir, Jan BALVAN, Marketa SZTALMACHOVA, et al. Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. *International Journal of Oncology* [online]. 2013, **44**(3), - [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.3892/ijo.2013.2223. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.2223>
- [7] BALVAN, Jan, Aneta KRIZOVA, Jaromir GUMULEC, et al. Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLOS ONE* [online]. 2015-3-24, **10**(3), e0121674- [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0121674. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0121674>
- [8] MEIJERING, E. et al. *Methods for Cell and Particle Tracking. Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells*, 2012, vol. 504, s. 183-200.
- [9] RAY, N. a S.T. ACTON. Active contours for cell tracking. *Proceedings Fifth IEEE Southwest Symposium on Image Analysis and Interpretation* [online]. IEEE Comput. Soc, 2002, , 274-278 [cit. 2016-05-13].

- DOI: 10.1109/IAI.2002.999932. ISBN 0-7695-1537-1. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=999932>
- [10] ZIMMER, C., E. LABRUYERE, V. MEAS-YEDID, N. GUILLEN a J. OLIVOMARIN. Segmentation and tracking of migrating cells in videomicroscopy with parametric active contours: a tool for cell-based drug testing. *IEEE Transactions on Medical Imaging* [online]. 2002, **21**(10), 1212-1221 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1109/TMI.2002.806292. ISSN 0278-0062. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1174099>
- [11] NIXON, Mark S a Alberto S AGUADO. *Feature extraction and image processing*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2008, xv, 406 s. ISBN 978-0-12-372538-7.
- [12] KASS, Michael, Andrew WITKIN a Demetri TERZOPOULOS. Snakes: Active contour models. *International Journal of Computer Vision* [online]. 1988, vol. 1, issue 4, s. 321-331 [cit. 2015-11-30]. DOI: 10.1007/BF00133570. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00133570>
- [13] COHEN, L.D. a I. COHEN. Finite-element methods for active contour models and balloons for 2-D and 3-D images. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* [online]. vol. 15, issue 11, s. 1131-1147 [cit. 2015-12-01]. DOI: 10.1109/34.244675. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=244675>
- [14] XU, G., E. SEGAWA a S. TSUJI. A robust active contour model with insensitive parameters. *1993 (4th) International Conference on Computer Vision*. IEEE Computer Society Press, 1993, s. 562-566. DOI: 10.1109/ICCV.1993.378161. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=378161>
- [15] CHENYANG XU a J.L. PRINCE. Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Transactions on Image Processing* [online]. vol. 7, issue 3, s. 359-369 [cit. 2015-12-06]. DOI: 10.1109/83.661186. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=661186>
- [16] VINCENT, L. a P. SOILLE. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* [online]. **13**(6), 583-598 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1109/34.87344. ISSN 01628828. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=87344>
- [17] ROERDINK, Jos a Arnold MEIJSTER. The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies. *Fundamenta Informaticae* [online].

- 2000, **41**, 187-228 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.3233/FI-2000-411207. ISSN 0169-2968. Dostupné z: <http://doi:10.3233/FI-2000-411207>
- [18] BARRON, J.L., D.J. FLEET, S.S. BEAUCHEMIN a T.A. BURKITT. Performance of optical flow techniques. *Proceedings 1992 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* [online]. IEEE Comput. Soc. Press, 1992, , 236-242 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1109/CVPR.1992.223269. ISBN 0-8186-2855-3. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=223269>
- [19] BOUGUET, Jean-Yves. Pyramidal implementation of the affine lucas kanade feature tracker—description of the algorithm. *Pages.Slc.Edu* [online]. 2001 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1.1.185.585. Dostupné z: [http://robots.stanford.edu/cs223b04/algo\\_affine\\_tracking.pdf](http://robots.stanford.edu/cs223b04/algo_affine_tracking.pdf)
- [20] PATEL, Dhara a Saurabh UPADHYAY. Optical Flow Measurement using Lucas Kanade Method. *International Journal of Computer Applications* [online]. 2013, **61**(10), 6-10 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.5120/9962-4611. ISSN 09758887. Dostupné z: <http://research.ijcaonline.org/volume61/number10/pxc3884611.pdf>
- [21] BAKER, Simon a Iain MATTHEWS. Lucas-Kanade 20 Years On: A Unifying Framework. *International Journal of Computer Vision* [online]. 2004, **56**(3), 221-255 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1023/B:VISI.0000011205.11775.fd. ISSN 0920-5691. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:VISI.0000011205.11775.fd>
- [22] FABBRI, Ricardo, Luciano Da F. COSTA, Julio C. TORELLI a Ode-mir M. BRUNO. 2D Euclidean distance transform algorithms. *ACM Computing Surveys* [online]. 2008, **40**(1), 1-44 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1145/1322432.1322434. ISSN 03600300. Dostupné z: <http://portal.acm.org/citation.cfm?doid=1322432.1322434>
- [23] YU, Sha a Derek MOLLOY. Optic Flow Providing External Force for Active Contours in Visually Tracking Dense Cell Population. *2011 Irish Machine Vision and Image Processing Conference* [online]. IEEE, 2011, , 84-87 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1109/IMVIP.2011.24. ISBN 978-0-7695-4629-2. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6167845>
- [24] RAY, N. a S.T. ACTON. Motion Gradient Vector Flow: An External Force for Tracking Rolling Leukocytes With Shape and Size Constrained Active

Contours. *IEEE Transactions on Medical Imaging* [online]. 2004, **23**(12), 1466-1478 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1109/TMI.2004.835603. ISSN 0278-0062. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1362749>

- [25] BENSCH, Robert a Olaf RONNEBERGER. Cell segmentation and tracking in phase contrast images using graph cut with asymmetric boundary costs. *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)* [online]. IEEE, 2015, , 1220-1223 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1109/ISBI.2015.7164093. ISBN 978-1-4799-2374-8. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=7164093>

## SEZNAM ZKRATEK

DH	digitální holografie
DHM	digitální holografická mikroskopie
CCHM	koherencí řízený holografický mikroskop – Coherence-Controlled Holographic Microscope
MHM	multimodální holografický mikroskop – Multimodal Holographic Microscope
GVF	tok gradientního vektoru – Gradient Vektor Flow

## A SEZNAM SKRIPTŮ A FUNKCÍ

- sledovani1* – základní skript počítající sledování sekvence 1
- sledovani2* – základní skript počítající sledování sekvence 2
- vypocet\_parametru* – skript, pro výpočet parametrů z bodů kontury
- zakladni\_uprava* – funkce provádějící základní úpravu vstupního obrazu
- vypocet\_pozadi* – funkce pro výpočet binárního obrazu pozadí
- vypocet\_jader* – funkce pro výpočet binárního obrazu jader
- inicializace* – funkce pro převod binárního obrazu jader na kontury
- zmena\_topologie* – funkce pro úpravu topologie kontur
- prirazeni\_jader* – funkce pro přiřazení jader konturám
- rozdeleni* – funkce pro rozdělení kontury
- sloucení* – funkce pro sloučení kontur
- odstraneni* – funkce pro odstranění kontur
- pridani* – funkce pro inicializaci nových kontur
- vypocet\_vyrezu* – funkce pro výpočet výřezů z obrazů v okolí kontury
- pohyb\_kontury* – funkce pro výpočet deformace (nebo rozpínání) kontury
- vypocitat\_gvf* – funkce pro přepočítání energie na GVF
- vypocitat\_matici\_A* – funkce pro vytvoření matice vnitřních sil
- normaly* – funkce pro výpočet normálových vektorů pro body kontury
- kompenzace\_sil* – funkce pro výpočet velikosti sil kompenzujících smršťování
- interpolace* – funkce pro převzorkování kontury na stejně vzdálené body
- odstran\_presmycky* – funkce pro odstranění přesmyček z kontury
- vyplnovani* – funkce přepočítávající konturu na binární obraz vnitřní plochy
- ulozeni* – funkce pro převod kontur na pixely a uložení

## B OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

**tomas\_vicar\_DP.pdf** – elektronická verze diplomové práce

**ukazka\_vysledku** – složka obsahující ukázky výsledků sledování

*data1* – složka se 100 segmentovanými snímky 1. sekvence

*data2* – složka se 100 segmentovanými snímky 2. sekvence

**skripty\_a\_funkce** – složka obsahující skripty a funkce pro výpočet sledování

*funkce* – složka s funkcemi pro výpočet sledování

*data* – složka s daty pro ukázkové spuštění

*vysledky* – složka pro ukládání výsledků spuštění

*vypocet\_parametru.m* – skript pro výpočet a vykreslení parametrů

*sledovani1.m* – skript pro ukázkou výpočtu sledování na 1. sekvenci

*sledovani2.m* – skript pro ukázkou výpočtu sledování na 2. sekvenci