



Politechnika Wroclawska

ROZPRAWA DOKTORSKA

Analiza obrazowa do wieloparametrycznej charakteryzacji komórek w układach mikrofluidycznych

Mgr inż. Danylo Lizanets

Promotor: prof. dr hab. inż. Rafał Walczak

Słowa kluczowe: obraz,
komórka,
mikrofluidyka

WROCŁAW 2022

Streszczenie

Badanie stanu fizjologicznego lub potencjału życiowego komórki jest podstawową procedurą w nowoczesnej diagnostyce medycznej i naukach o życiu. Badanie to może polegać na mikroskopowej obserwacji komórki i analizie jej obrazu. Wyznaczane najczęściej parametry komórek to ich liczba, kształt, wymiary, morfologia, deformacje oraz ruchliwość pod wpływem różnych czynników. Wraz z rozwojem technik mikroskopowych oraz informatycznych, analizę obrazu „ludzkim okiem” zastępowano układem optoelektronicznym (kamera) i przetwarzaniem obrazu z wykorzystaniem specjalistycznych algorytmów. W takim układzie w porównaniu do analizy „ludzkim okiem”, której dokonuje człowiek przez bezpośrednią obserwację, możliwa jest wyższa przepustowość, automatyzacja i przede wszystkim wieloparametryczna, obiektywna analiza obrazu komórki. W połączeniu z technikami mikrofluidycznymi, które umożliwiają „zarządzanie” komórką w bardzo małych objętościach oraz prowadzenie pomiarów w trybie stacjonarnym lub przepływowym analiza obrazowa staje się nowym narzędziem do wieloparametrycznej analizy komórek. Analiza ta jest rodzajem zaawansowanego przetwarzania sygnału (w tym wypadku obrazu) pozyskanego z wykorzystaniem układu optoelektronicznego (kamery). Analiza ta jest wieloetapowa i prowadzona automatycznie z wykorzystaniem dedykowanych algorytmów. Poruszane rozprawie zagadnienia mieszczą się zatem w ramach dyscypliny automatyka, elektronika i elektrotechnika.

Realizacja celu rozprawy wymagała przeprowadzenia zarówno badań literaturowych, teoretycznych jak i eksperymentalnych. Badania te wymagały wiedzy i umiejętności z zakresu niezbędnego aparatu matematycznego związanego z zastosowanymi algorytmami jak również narzędzi programistycznych do implementacji tych algorytmów. Niezbędna była również wiedza z zakresu konstrukcji i technologii układów mikrofluidycznych i optoelektronicznej rejestracji obrazów. Powstałe oprogramowanie jest elastycznym narzędziem badawczym, które użytkownik może dostosować do potrzeb analizy obrazów pozyskanych z dwóch różnych układów mikroskopowych – „tradycyjnego” i bezsoczewkowego w lab-chipach o różnej konstrukcji. Narzędzie to jest cały czas rozwijane i z powodzeniem wykorzystywane w kolejnych pracach badawczych prowadzonych w Katedrze Mikrosystemów.

Abstract

The study of the physiological state or vital potential of a cell is a fundamental procedure in modern medical diagnosis and life sciences. This examination may involve microscopic observation of the cell and analysis of its image. The most frequently determined parameters of cells are their number, shape, dimensions, morphology, deformation and mobility under the influence of various factors. With the development of microscopic and IT techniques, image analysis with the „human eye” was replaced by an optoelectronic system (camera) and image processing with the use of specialized algorithms. In such a system, compared to the „human eye” analysis performed by a human by direct observation, higher throughput, automation and, above all, multi-parameter, objective analysis of the cell image are possible. Combined with microfluidic techniques that allow cells to be „managed” in very small volumes and measured in stationary or flow-through modes, image analysis becomes a new tool for multi-parameter cell analysis. This analysis is a type of advanced signal processing (in this case an image) obtained with the use of an optoelectronic system (camera). This analysis is multi-stage and carried out automatically with the use of dedicated algorithms. Therefore, the issues discussed in the dissertation fall within the disciplines of automatics, electronics and electrical engineering.

Achieving the aim of the dissertation required both literature, theoretical and experimental research. These studies required knowledge and skills in the field of the necessary mathematical apparatus related to the algorithms used, as well as programming tools for the implementation of these algorithms. Knowledge of the design and technology of microfluidic systems and optoelectronic image recording was also necessary. The resulting software is a flexible research tool that the user can adapt to the needs of the analysis of images obtained from two different microscopic systems - „traditional” and lensless in lab-chips of various designs. This tool is constantly being developed and successfully used in subsequent research works carried out at the Department of Microsystems.

Spis treści

1	Wprowadzenie	8
2	Analiza obrazów w badaniach komórek w układach mikrofluidycznych	13
2.1	Analiza w układach mikrofluidycznych	19
2.1.1	Układ mikroskopowy „tradycyjny”	19
2.1.2	Układ bezsoczewkowy	27
2.2	Oprogramowanie do analizy obrazów komórek	32
2.3	Podsumowanie	37
3	Algorytmy analizy obrazu	39
3.1	Algorytmy detekcji	39
3.1.1	Progowanie	39
3.1.2	Filtrowanie	41
3.1.3	Poszukiwanie krawędzi	42
3.1.4	Entropia	46
3.1.5	Poszukiwanie konturów	47
3.1.6	Transformacja Hougha	49
3.1.7	Wyrównywanie jasności tła obrazu	50
3.1.8	Algorytm wododziału	50
3.1.9	Algorytm α -form	53
3.1.10	Algorytmy analizy obrazów z układów bezsoczewkowych	54
3.2	Algorytmy śledzenia	57
3.2.1	Dopasowywanie wzorców	58
3.2.2	Przepływ optyczny	59
3.2.3	Różnica klatek	60
3.2.4	Śledzenie wieloparametrowe	61
3.3	Algorytmy wspomagające	64
3.3.1	Wstępne przygotowanie obrazu	64
3.3.2	Maskowanie	66
3.4	Podsumowanie	67

4	Analiza obrazowa w lab-chipach	69
4.1	Oprogramowanie	69
4.2	Struktura oprogramowania	73
4.2.1	Algorytm działania oprogramowania	74
4.2.2	Podsumowanie	77
4.3	Analiza komórek	77
4.3.1	Drożdże	77
4.3.2	Eugleny	79
4.3.3	Oocyty	90
4.4	Analiza obrazów z układów bezsoczewkowych	101
4.4.1	Modelowanie	101
4.4.2	Układ pomiarowy	103
4.4.3	Analiza obrazów obiektów 2D	104
4.4.4	Analiza obrazów obiektów 3D	110
4.5	Podsumowanie	112
5	Podsumowanie i wnioski końcowe	114

Skróty i akronimy

AVI Audio Video Interleave, Kontener danych audiowizualnych.

BLAS Basic Linear Algebra Subprograms, Podstawowe procedury algebry liniowej.

BMP Bitmap, Mapa bitowa.

CCD Charge-coupled device, Ładunkowo połączone urządzenie, matryca elementów światłoczułych.

CGAL Computational Geometry Algorithms Library, Biblioteka algorytmów obliczeniowej geometrii.

CMOS Complementary Metal-Oxide-Semiconductor, Komplementarny półprzewodnik tlenkowy.

DoG Difference of Gaussians, Różnica gaussianów.

FBS Fetal Bovine Serum, Serum płodowe z cieląt.

FPGA Field Programmable Gate Array, Bezpośrednio programowalna macierz bramek.

GUI Graphical User Interface, Graficzny interfejs użytkownika.

HDR High Dynamic Range, Obraz z wysokim zakresem jasności.

HED Holistically-nested Edge Detection, Holistyczno-zagnieżdżona detekcja krawędzi.

JPG Joint Photographic Experts Group, Połączona grupa ekspertów fotograficznych.

JPIV Java Particle Image Velocimetry, Pomiar prędkości cząsteczek za pomocą Java.

LoC Lab-on-a-Chip, Laboratorium na chipie, lab-chip.

LoG Laplacian of Gaussian, Laplacjan gaussianów.

MP4 MPEG-4 część 14.

OpenCV Open Computer Vision, Otwarta wizja komputerowa.

PDMS Polydimethylsiloxane, Polidimetylosiloksan.

PNG Portable Network Graphics, Przenośna grafika sieciowa.

ROI Region Of Interest, Obszar zainteresowania.

VGG Visual Geometry Group, Wizualna grupa geometryczna.

Podziękowania

Dziękuję promotorowi Panu profesorowi Rafałowi Walczakowi oraz kolegom i koleżankom z Katedry Mikrosystemów za wsparcie przy prowadzeniu prac.

Dziękuję Pani dr inż. Agnieszce Podwin, Pani dr inż. Aleksandrze Pokrzywnickiej oraz Pani dr inż. Patrycji Śniadek za udostępnienie materiałów filmowych i zdjęć lab-chipów z rzeczywistym materiałem biologicznym.

Praca jest realizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki, numer projektu 2015/19/B/518/01110.

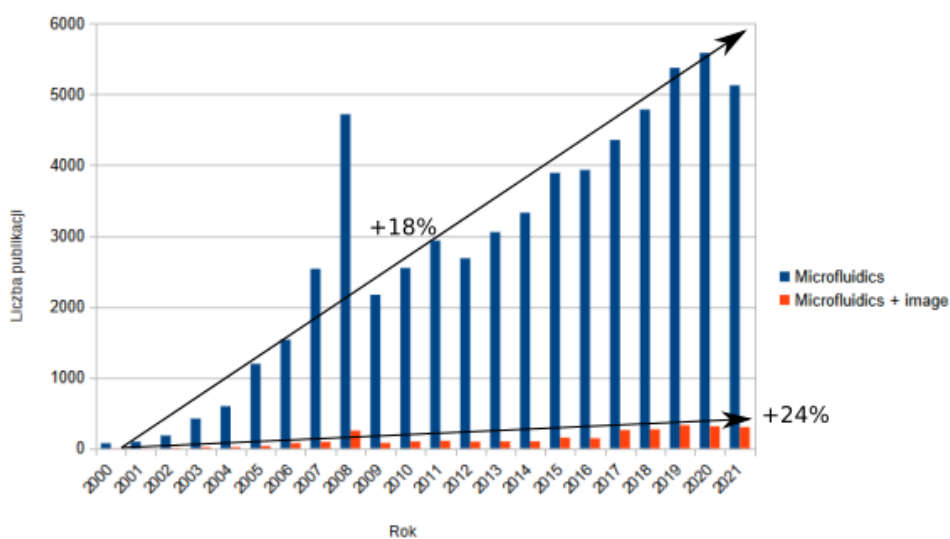
Rozdział 1

Wprowadzenie

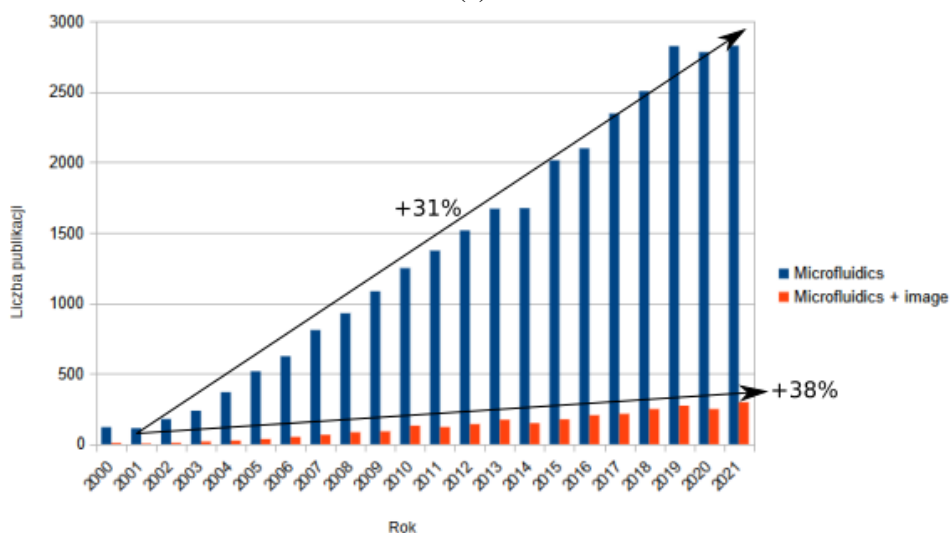
Badanie stanu fizjologicznego lub potencjału życiowego komórki jest podstawową procedurą w nowoczesnej diagnostyce medycznej i naukach o życiu. Badanie to może polegać na mikroskopowej obserwacji komórki i analizie jej obrazu. Wyznaczane najczęściej parametry komórek to ich liczba, kształt, wymiary, morfologia, deformacje oraz ruchliwość pod wpływem różnych czynników. Wraz z rozwojem technik mikroskopowych oraz informatycznych, analizę obrazu ludzkim okiem zastępowano układem optoelektronicznym (kamerą) i przetwarzaniem obrazu z wykorzystaniem specjalistycznych algorytmów. W takim układzie w porównaniu do analizy „ludzkim okiem”, której dokonuje człowiek przez bezpośrednią obserwację, możliwa jest wyższa przepustowość, automatyzacja i przede wszystkim wieloparametryczna, obiektywna analiza obrazu pojedynczej komórki lub/i populacji komórek. W połączeniu z technikami laboratoriów na chipie, które umożliwiają „zarządzanie” komórką (komórkami) oraz prowadzenie pomiarów w trybie stacjonarnym lub przepływowym analiza obrazowa staje się nowym narzędziem do wieloparametrycznej analizy komórek. Analiza ta jest rodzajem zaawansowanego przetwarzania sygnału (w tym wypadku obrazu) pozyskanego z wykorzystaniem układu optoelektronicznego (kamery, matrycy CCD lub CMOS). Analiza ta jest wieloetapowa i prowadzona automatycznie z wykorzystaniem dedykowanych algorytmów będących składowymi specjalistycznego oprogramowania. Poruszane w tej pracy zagadnienia mieszczą się zatem w ramach dyscypliny automatyka, elektronika i elektrotechnika.

W ostatnich latach (od 2000 roku) obserwowana jest stała tendencja do wzrostu liczby artykułów naukowych, w których występują słowa kluczowe „microfluidics” oraz „microfluidics + image” (Rysunek 1.1) w tytułach i abstraktach artykułów ujętych w bazach danych Scopus i Web of Science. Świadczy to o ciągłym rozwoju i zapotrzebowaniu na takie rozwiązania, a podjęta w rozprawie tematyka jest aktualna. Wynika to między innymi z zalet układów mikrofluidycznych to znaczy: małej objętość analitów, reagentów oraz odpadów po analizie, możliwości szybkiej zmiany temperatury i skrócenia czasu analizy, integracji i automatyzacji kilku kroków analitycznych w jednej strukturze, dobrej kontroli warunków analizy, możliwości zrównoleżonej prowadzonej analizy, zwiększonego bezpieczeństwa analiz oraz niższym kosztem

pojedynczej analizy w odniesieniu do tradycyjnych analiz laboratoryjnych [1].



(a)



(b)

Rysunek 1.1: Liczba artykułów naukowych zawierających słowa kluczowe „microfluidics” oraz „image” w bazie: (a) Scopus, (b) Web of Science

Jednym z obszarów zastosowania układów mikrofluidycznych jest badanie komórek biologicznych, ustalenie ich stanu fizjologicznego lub potencjału życiowego, co jak wspomniano wcześniej jest podstawą w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej.

Analiza komórek jest stosowana na przykład:

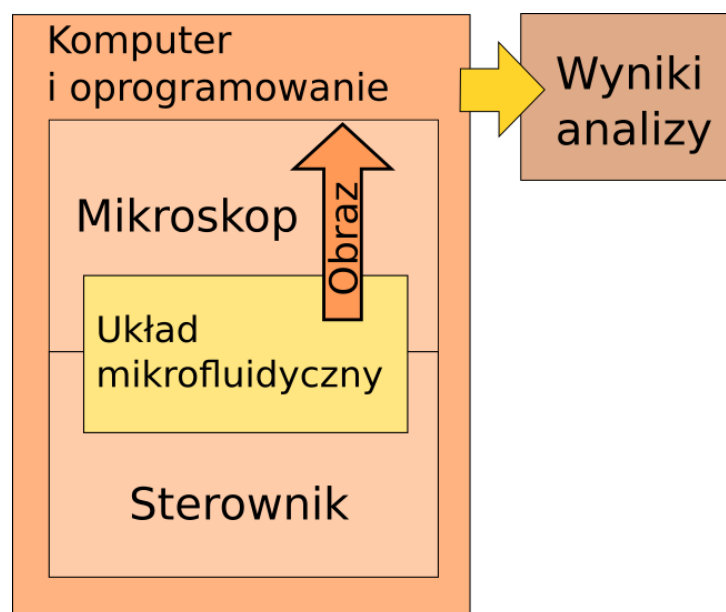
- w hodowli komórek do ustalenia stanu i oceny jakości komórek hodowanych w różnych warunkach,
- w farmacji do analizy efektywności działania i bezpieczeństwa leków,
- w medycynie do diagnostyki nowotworowej lub innych stanów patologicznych.

Najczęściej wyznaczane parametry komórek to między innymi:

- liczba komórek [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10],
- kształt [11, 5],
- wymiary [12, 13, 7, 14],
- morfologia [12, 15],
- kolor [16, 17, 18],
- deformacja [19],
- ruchliwość [20, 21, 22, 23].

W tradycyjnym układzie do analizy obrazowej komórek wykorzystuje się mikroskop optyczny i szkiełka mikroskopowe lub np. szalki Petriego, na których znajdują się badane komórki. Wraz z rozwojem układów mikrofluidycznych zwanych również laboratoriami na chipie (lab-chip) możliwym stało się sterowanie przepływem (kierunek i szybkość) komórek i ich hodowla wewnątrz tych układów. Układy mikrofluidyczne stały się alternatywą dla tradycyjnych „nośników” komórek.

Połączenie układów mikrofluidycznych i wspomaganą komputerowo analizy obrazów komórek jest coraz częściej stosowanym narzędziem we współczesnej analizie komórek. Typowy schemat blokowy systemu wykorzystującego układy mikrofluidyczne i komputerową analizę obrazu przedstawiono na rysunku 1.2.



Rysunek 1.2: Schemat systemu mikroskopowego do analizy komórek znajdujących się w układzie mikrofluidycznym

Systemy, w których wykorzystuje się układ mikrofluidyczny i analizę obrazu wymagają specjalistycznych algorytmów związanych z przygotowaniem obrazu do analizy oraz samą analizą. Brak standaryzacji konstrukcji lab-chipów i warunków analizy wymusza każdorazowo tworzenie nowych „elastycznych” narzędzi programowych. Dlatego też istnieje potrzeba opracowania uniwersalnego narzędzia programowego współpracującego z różnymi lab-chipami i mikroskopem optycznym umożliwiające wieloparametryczną charakteryzację pojedynczej komórki lub komórek. Nowe rozwiązanie powinno umożliwiać automatyczną detekcję komórki (komórek), wirtualne znakowanie komórek, analizować cechy morfologiczne (rozmiar, kształt, eliptyczność), śledzenie ruchu komórek lub komórki (w populacji) oraz określenie właściwości mechanicznych komórek przez analizę obrazu ich deformacji. Istotna jest również wysoka wydajność analizy obrazów wysokiej rozdzielczości oraz szybka adaptacja dla zmiennej konfiguracji układu detekcji.

Pozyskanie obrazu lab-chipa wraz z badanymi komórkami wymaga, aby układ mikrofluidyczny był przezroczysty dla światła widzialnego. Refleksyjność oraz chropowatość powierzchni lab-chipa mogą prowadzić do pojawienia się „zaburzeń” obrazu. Obraz może zawierać artefakty, odbicia od krawędzi, zniekształcenia, rozmycia itp. defekty. Są to problemy, których wpływ na wynik analizy można zminimalizować przez prawidłową analizę obrazu. Ponadto błędne wyniki analizy obrazu związane mogą być z: jakością obrazu (niska rozdzielczość, głębokość kolorów, itp), projekcją trójwymiarowej komórki na dwuwymiarowy obraz, ruchliwością komórek, trudnością ustawienia głębi ostrości, niską liczbą klatek na sekundę rejestrowanego ruchomego obrazu, niejednorodną jasnością obrazu, niskim kontrastem komórek w stosunku do tła i rozpraszaniem światła. Dlatego też dość istotny jest dobór odpowiednich algorytmów analizy obrazu.

Do analizy obrazów w istniejących systemach najczęściej używane są programy komercyjne lub oprogramowania rozwijane dla własnych potrzeb np. MATLAB – komercyjne interaktywne środowisko do wykonywania obliczeń naukowych i inżynierskich [24, 25, 26, 20, 27, 28, 29, 9, 30, 31, 16], ImageJ – środowisko programistyczne do analizy obrazów [21, 32, 33] oraz CellProfiler – programowe narzędzie do automatycznej analizy komórek [3, 12]. Przy implementacji własnych algorytmów używane są biblioteki programowe OpenCV w połączeniu z językami programowania C++ oraz Python [34].

Procedury wykonywane przy analizie obrazów komórek można podzielić na kilka grup. Pierwsza grupa to segmentacja obrazów komórek celem, której jest oddzielenie każdej pojedynczej komórki od tła oraz innych komórek. Istnieje wiele metod segmentacji, wśród których wymienić można metody punktowe (progowanie, klasteryzacja), krawędziowe, obszarowe (podział i łączenie, segmentacja wododziałowa) oraz hybrydowe.

Druga grupa to procedury, których celem jest określenie liczby oraz parametrów komórek, ich wymiarów, powierzchni całego lub wybranych obszarów kształtu. Do tego wykorzystuje się metody wyznaczania konturów i momentów każdej komórki wykrytej przy segmentacji.

Trzecia grupa algorytmów to śledzenia pojedynczych komórek, do pomiaru ich ruchliwości,

rodzaju ruchu oraz rozróżnienie komórek między sobą po ich przemieszczeniu się [24, 35, 36, 37, 26, 38, 39, 20, 40, 21, 22, 23, 30]. Śledzenie polega na wykrywaniu komórek na każdym pojedynczym obrazie i połączeniu znaczników odpowiednich komórek z kolejnych obrazów. Problematy, które występują w trakcie śledzenia komórek to między innymi: przemieszczenie się komórek poza granice obrazu, poruszanie się komórek w przestrzeni trójwymiarowej wynikiem czego jest wyjście ze strefy ostrości obrazu, dzielenie się komórek (mitoza) co powoduje pojawienie się dwóch komórek w miejscu jednej. Tak więc wieloparametryczna analiza obrazu komórek znajdujących się w układzie mikrofluidycznym nie jest zagadnieniem trywialnym. Opracowanie własnych narzędzi metodologicznych i programistycznych jest zatem uzasadnione i celowe.

Celem głównym prowadzonych prac badawczych było zatem oryginalne rozwiązanie problemu badawczego związanego z analizą obrazów komórek w układach mikrofluidycznych i wieloparametryczna charakteryzacja tych komórek.

Cele szczegółowe których osiągnięcie umożliwi realizację celu głównego, to:

- Analiza literaturowa wykorzystania różnych technik pozyskiwania oraz algorytmów analizy obrazu z punktu widzenia obrazowej charakteryzacji komórek (np. detekcja, śledzenie, deformacja).
- Opracowanie i badanie algorytmów analizy obraz z uwzględnieniem specyfiki rozwiązań mikrofluidycznych i z wykorzystaniem różnych rodzajów komórek.
- Badania właściwości opracowanej metodologii i oprogramowania jako narzędzia do badań komórek w lab-chipach.

W kolejnych rozdziałach tej pracy przedstawiono:

1. W rozdziale drugim przegląd literatury przedmiotu dotyczącej analizy mikroskopowych obrazów komórek w układach tradycyjnych jak i w lab-chipach.
2. W rozdziale trzecim algorytmy wykorzystywane typowo do obróbki obrazów oraz przykłady ich zastosowania do analizy mikroskopowych obrazów komórek.
3. W rozdziale czwartym opracowane autorskie oprogramowanie, łączące algorytmy, przedstawione w rozdziale trzecim w jeden system do analizy mikroskopowych obrazów komórek w układach mikrofluidycznych. Przedstawiono również przykłady wykorzystania opracowanego oprogramowania do wieloparametrycznej charakteryzacji komórek z wykorzystaniem laboratoriów na chipie.

Rozdział 2

Analiza obrazów w badaniach komórek w układach mikrofluidycznych

Jak wspomiano wcześniej analiza obrazów jest jedną z metod najczęściej wykorzystywanych do badania komórek zarówno w układach tradycyjnych „nośników” jak również w układach mikrofluidycznych. W tabeli 2.1 wymieniono przykłady prac, które nie dotyczą bezpośrednio układów mikrofluidycznych, ale zawierające opisy analizy mikroskopowych obrazów komórek. Natomiast w tabeli 2.2 zebrano przykłady, w których wykorzystywano różne układy mikrofluidyczne.

Tabela 2.1: Przykłady prac dotyczących analizy obrazów komórek w szalce Petriego lub na szkiełku mikroskopowym (tzw. nośniki tradycyjne)

#	Układ optyczny	Oprogramowanie	Wyniki analizy	Źródło obrazu	Lit.
1	Mikroskop	Własne oprogramowanie* (CellEvaluator)	Pozycja, prędkość komórek	Film	[35]
2	Mikroskop	BD Pathway Bioimager	Liczba komórek	Zdjęcie	[4]
3	Mikroskop szerokopolowy	ReViSP	Kształt komórek	Zdjęcie	[11]
4	Mikroskop	Własne oprogramowanie* (CellProfiler)	Fenotyp komórek	Zdjęcie	[12]
5	Mikroskop szerokopolowy fluorescencyjny	Własne oprogramowanie*	Pozycja, prędkość komórek	Film	[36]
6	Odwrócony mikroskop Nikon TE2000U	Własne oprogramowanie*	Pozycja, prędkość komórek	Film	[37]
7	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Liczba, kształt komórek	Zdjęcie	[5]

#	Układ optyczny	Oprogramowanie	Wyniki analizy	Źródło obrazu	Lit.
8	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Pozycja, prędkość komórek	Film	[38]
9	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Pozycja jądra komórkowego	Zdjęcie	[41]
10	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Liczba komórek	Zdjęcie	[6]
11	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Pozycja, liczba, wymiary komórek	Zdjęcie	[13]
12	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Pozycja, prędkość komórek	Film	[39]
13	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Ruchliwość komórek	Film	[20]
14	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Ruchliwość komórek	Film	[27]
15	Odwrócony fazowo-kontrastowy mikroskop (CK 40, Olympus)	Własne oprogramowanie*	Detekcja pojedynczych komórek w grupie	Zdjęcie	[42]
16	Mikroskop	CL-Quant,	Wzrost komórek, liczba komórek	Film	[43]
17	Mikroskop	AutoCellSeg	Liczba, wymiary komórek	Zdjęcie	[7]
18	Mikroskop FV1000-IX81 Olympus	Delta Vision OMX SR High Resolution Live Cell Imaging System	Jasność i kolor fluorescencji komórek	Zdjęcie	[44]
19	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Liczba, detekcja pojedynczych komórek w grupie	Zdjęcie	[8]
20	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Detekcja pojedynczych komórek	Zdjęcie	[28]
21	Mikroskop	Własne oprogramowanie*	Detekcja jąder komórek	Zdjęcie	[45]
22	Mikroskop	AxonDeepSeg	Pozycja, wymiary, kształt komórek	Zdjęcie	[46]
23	Mikroskop Nikon TE2000-E	Własne oprogramowanie*	Pozycja komórek, ich ruchliwość	Film	[30]
24	Mikroskop Olympus BX51	Własne oprogramowanie*	Liczba komórek	Zdjęcie	[10]

*opracowane przez zespół badawczy

Tabela 2.2: Przykłady prac dotyczących analizy obrazów komórek w układach mikrofluidycznych

#	Material lab-chipa	Układ optyczny	Oprogramowanie	Wyniki analizy	Źródło obrazu	Lit.
1	Szkło	Mikroskop epi-fluorescencyjny (Ti-Eclipse, Nikon)	Własne oprogramowanie *	Pozycja, prędkość komórek	Film	[24]
2	Szkło	Mikroskop (Leica DM2500)	Własne oprogramowanie *	Liczba komórek	Zdjęcie	[2]
3	PDMS	Mikroskop epi-fluorescencyjny (EVOS)	CellProfiler	Liczba, wymiary fluorescencji komórek	Zdjęcie	[3]
4	PDMS	Mikroskop konfokalny (DM6000 CS Leica SP5)	Własne oprogramowanie *	Liczba komórek	Zdjęcie	[25]
5	Krzem, szkło	Mikroskop odwrócony (Zeiss Axio Observer Z1)	Własne oprogramowanie *	Liczba komórek	Zdjęcie	[34]
6	PDMS	Brak danych	Własne oprogramowanie *	Pozycja, prędkość komórek	Film	[26]
7	Plastik	Brak danych	Własne oprogramowanie *	Pozycja, prędkość komórek	Film	[40]
8	PDMS	Mikroskop (BX51RT, Olympus)	Własne oprogramowanie *	Morfologia komórek	Zdjęcie	[15]
9	Szkło, krzem	Brak danych	Własne oprogramowanie *	Właściwości mechaniczne	Film	[47]
10	Szkło, PDMS	Mikroskop Nikon Ti-Eclipse	Własne oprogramowanie *	Sortowanie komórek	Film	[29]
11	Szkło	Mikroskop fazowo-kontrastowy	ImageJ	Ruchliwość komórek	Film	[21]
12	PDMS	Kamera CCD	Własne oprogramowanie *	Prędkość komórek	Film	[48]
13	Szkło	Mikroskop fluorescencyjny	Własne oprogramowanie *	Liczba komórek, ich pozycja	Zdjęcie	[9]

#	Material lab-chipa	Układ optyczny	Oprogramowanie	Wyniki analizy	Źródło obrazu	Lit.
14	PDMS	x20 SROFM (sub-pixel resolving optofluidic microscope)	Własne oprogramowanie *	Detekcja komórek, ich obracanie się	Film	[22]
15	PDMS	Mikroskop Ti-eclipse Nikon	Własne oprogramowanie *	Liczba komórek, czas ich życia	Film	[31]
16	Szkło, PDMS	Mikroskop odwrócony (Zeiss) + CCD kamera	Zen (Zeiss) + Własne dodatkowe oprogramowanie	Deformacja komórek	Film	[49]
17	Szkło, PDMS	Mikroskop fluorescencyjny	ImageJ	Monitoring dynamiki chromosomów	Film	[32]
18	Szkło, PDMS	Mikroskop IX81 Olympus	Własne oprogramowanie *	Kolor fluorescencji komórek	Zdjęcie	[16]
19	Szkło, PDMS	Mikroskop STEAM	Cytomics CXP Cytometer	Pozycja komórek, kolor fluorescencji	Film	[18]
20	Szkło, PDMS	40x mikroskop	Własne oprogramowanie *	Biofizyczne właściwości komórki	Zdjęcie	[50]
21	Krzem	Odwrócony mikroskop + CCD kamera	Własne oprogramowanie *	Deformacja komórek	Film	[51]
22	Brak danych	Mikroskop epi-fluorescencyjny	Własne oprogramowanie *	Pozycja komórek	Zdjęcie	[52]
23	Brak danych	Mikroskop jasno-polowy	Własne oprogramowanie *	Pozycja komórek	Film	[53]
24	Szkło, PDMS	Mikroskop STEAM	CellProfiler + Własne dodatkowe oprogramowanie *	Klasyfikacja komórek	Film	[54]
25	PDMS	Mikroskop Leica Dmi 6000B	Własne oprogramowanie *	Stan mikroorganizmu	Zdjęcie	[55]
26	PDMS	Mikroskop BX51 (Olympus)	JPIV (Java Particle Image Velocimetry)	Prędkość komórek	Film	[56]
27	Szkło	Mikroskop	Własne oprogramowanie *	Rozmiar, sortowanie komórek	Film	[14]
28	PDMS	Mikroskop odwrócony	Własne oprogramowanie *	Zmiana kształtu komórek	Film	[19]

#	Material lab-chipa	Układ optyczny	Oprogramowanie	Wyniki analizy	Źródło obrazu	Lit.
29	Szkło	Układ bezsoczewkowy, cyfrowa holograficzna mikroskopia (DHM)	Własne oprogramowanie do śledzenia w 3D	Pozycja, prędkość komórek	Film	[49]
30	PDMS	Układ bezsoczewkowy + SROFM (sub-pixel resolving optofluidic microscope)	Własne oprogramowanie*	Ruchliwość	Film	[23]
31	PDMS	Układ bezsoczewkowy	Własne oprogramowanie*	Liczba komórek, sortowanie komórek	Film	[57]
32	PDMS	Układ bezsoczewkowy	Własne oprogramowanie*	Liczba komórek	Zdjęcie	[58]
33	Szkło, PDMS	Układ bezsoczewkowy holograficzny	Brak danych	Kolor fluorescencji komórek	Zdjęcie	[17]
34	Szkło	Układ bezsoczewkowy	ImageJ, MTrackJ	Migracja komórek	Film	[33]
35	PDMS	Układ bezsoczewkowy	Własne oprogramowanie*	Powiększenie rozdzielczości obrazu komórek	Film	[59]

*opracowane przez zespół badawczy

Na podstawie danych zebranych w tabeli 2.1 i 2.2 można stwierdzać, że zarówno analiza z wykorzystaniem szalki Petriego lub szkiełka mikroskopowego (tzw. „tradycyjna”) jak i z wykorzystaniem układów mikrofluidycznych prowadzona jest zarówno z wykorzystaniem oprogramowania komercyjnego jak i własnego. Oprogramowanie komercyjne, ze względu na zamkniętą architekturę, w wielu przypadkach zastępowane jest własnym oprogramowaniem dającym możliwości dostosowania jego funkcjonalności do własnych potrzeb. Ponadto, zwykle wyznaczane są 1-2 parametry komórek co wynika z dostępnych opcji oprogramowania lub możliwości jego rozbudowy jeżeli konieczne jest wyznaczenie większej liczby parametrów (wieloparametryczność).

Oprogramowanie komercyjne do analizy komórek najczęściej jest oferowane przez producentów mikroskopów, które są wykorzystywane do pobierania obrazów przy badaniach komórek i jest sprzedawane w zestawie razem z mikroskopem. Przykładami takiego oprogramowania są:

1. CL-Quant (Nikon) – oprogramowanie automatycznie identyfikuje regiony komórek w obrazach kontrastowo-fazowych lub epifluorescencyjnych. Funkcja uczenia się pozwala użytkownikom poprawić dokładność analizy poprzez dostosowanie parametrów analizy.
2. BD bioimager (BD bioscience) – oprogramowanie pobiera obraz z kamery mikroskopu, realizuje przetwarzanie tego obrazu za pomocą specjalistycznych algorytmów segmentacji. Wyniki przetwarzania są analizowane i przechowywane w bazie danych.
3. Delta Vision OMX SR (Delta) – oprogramowanie do zwiększenia rozdzielczości obrazu komórki.

Wadami takiego oprogramowania jest to, że jest ono przystosowane do badania komórek znajdujących się na szalce Petriego, szkiełka mikroskopowym albo w jego odpowiedniku oferowanym przez producenta układu mikroskopowego i zwykle nie jest wykorzystywane z układami mikrofluidycznymi.

Druga grupa rozwiązań to oprogramowanie niekomercyjne opracowywane przez zespoły badawcze do analizy obrazów komórek. Są to na przykład:

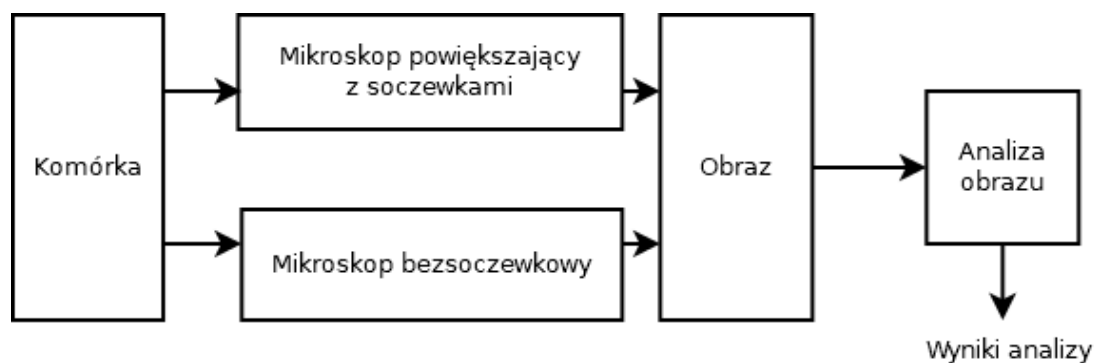
1. CellProfiler – oprogramowanie składające się z serii modułów do przetwarzania obrazu. W rozwiązaniu tym możliwa jest segmentacja obrazu, analiza fenotypu pojedynczych komórek oraz automatyczne przetwarzanie obrazów. Dane pomiarów są eksportowane do arkusza kalkulacyjnego lub bazy danych.
2. ImageJ – otwarte oprogramowanie przeznaczone do podstawowej obróbki pojedynczych obrazów lub ich zbiorów zaimplementowane w języku programowania Java. Używane jest przez grupy badawcze głównie przez implementację autorskich algorytmów w postaci tzw. „wtyczek” do oprogramowania „głównego”.
3. CellEvaluator – tzw. „wtyczka” programu ImageJ do ilościowej analizy wysokowydajnych pomiarów fluorescencji pojedynczych komórek.
4. AutoCellSeg – umożliwia automatyczną segmentację obrazu kontrolowaną przez użytkownika. Wykorzystano algorytm zaawansowanego progowania z sprzężeniem zwrotnym oraz algorytmem wododziału.
5. AxonDeepSeg – oprogramowanie przeznaczone do automatycznej segmentacji aksonów i otoczki mielinowej przy użyciu sieci neuronowych.

Szczegółową analizę instrumentalną rozwiązań mikrofluidycznych przedstawiono w kolejnym podrozdziale. Oparta jest ona na dwóch układach optoelektronicznych rejestrujących obraz:

1. Układ „tradycyjny” mikroskopowy z soczewkami ogniskującymi obraz obiektu w płaszczyźnie detektora (matryca CCD lub CMOS)

2. Układ bezsoczewkowy, nazywany w literaturze przedmiotu holograficznym, w którym obraz mikroobiekту powstaje bez użycia soczewek bezpośrednio na matrycy światłoczułej.

Bez względu na zastosowany układ optoelektroniczny powstały obraz poddawany jest analizie z wykorzystaniem algorytmów przetwarzania obrazów (Rysunek 2.1).

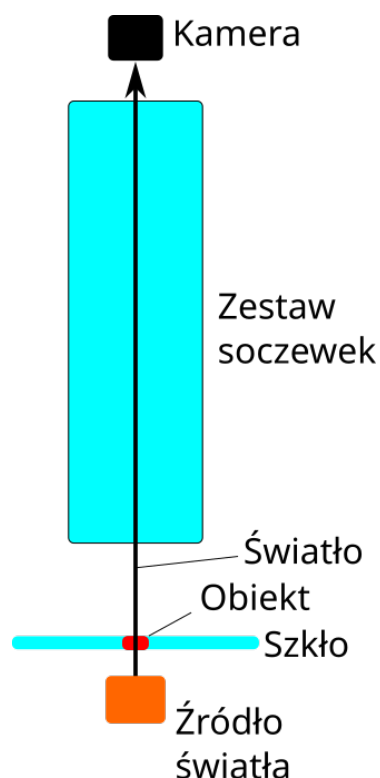


Rysunek 2.1: Analiza komórek w układach mikrofluidycznych

2.1 Analiza w układach mikrofluidycznych

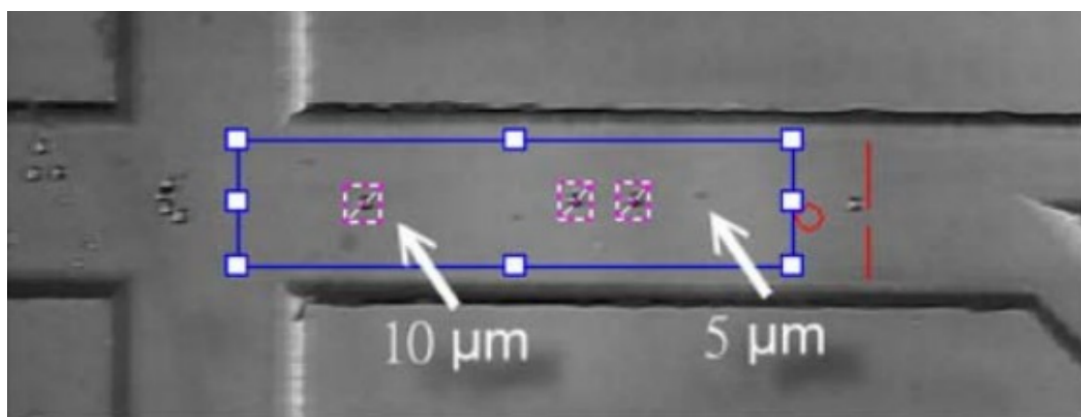
2.1.1 Układ mikroskopowy „tradycyjny”

Jak wspomiano wcześniej w układach tradycyjnych wykorzystywany jest zestaw soczewek ogniskujących na detektorze matrycowym powiększony obraz. Obraz ten jest rejestrowany przez matrycę obrazową typu CCD lub CMOS (Rysunek 2.2). Obrazy te są następnie analizowane. Poniżej opisano kilka przykładów wybranych układów mikrofluidycznych współpracujących z układem „tradycyjnym”.



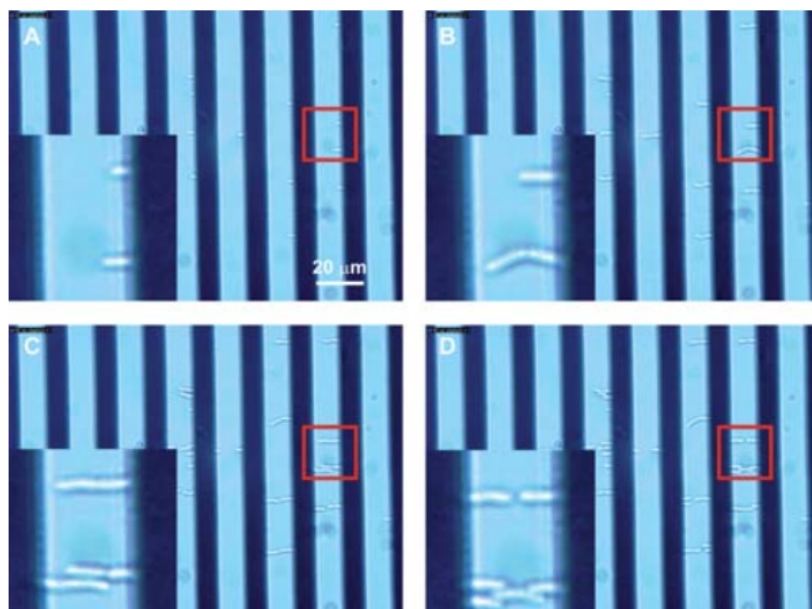
Rysunek 2.2: Schemat „tradycyjnego” układu optycznego

Chen-Chen Lin i wsp. [14] zaproponowali system, który składa się ze szklanego chipa, mikroskopu oraz tzw. pęsety optycznej. W opisywanym systemie komórki/mikrozasteczki elektrokinetycznie skupione są w wąskim strumieniu cieczy, a następnie przepływają przez obszar zainteresowania (ROI), gdzie są one rozpoznawane i śledzone w czasie rzeczywistym za pomocą własnego oprogramowania wykorzystującego dopasowywanie wzorca do wykrywania i liczenia komórek. Sortowanie komórek odbywa się za pomocą wspomnianej optycznej pęsety (Rysunek 2.3). System wykorzystuje dwa sposoby detekcji: dokładniejszy, ale wolniejszy do dopasowania wzorca komórki oraz szybki, ale mniej dokładny („EasyObject”) do wykrywania komórek, co nie jest wystarczającym dla niektórych przypadków.



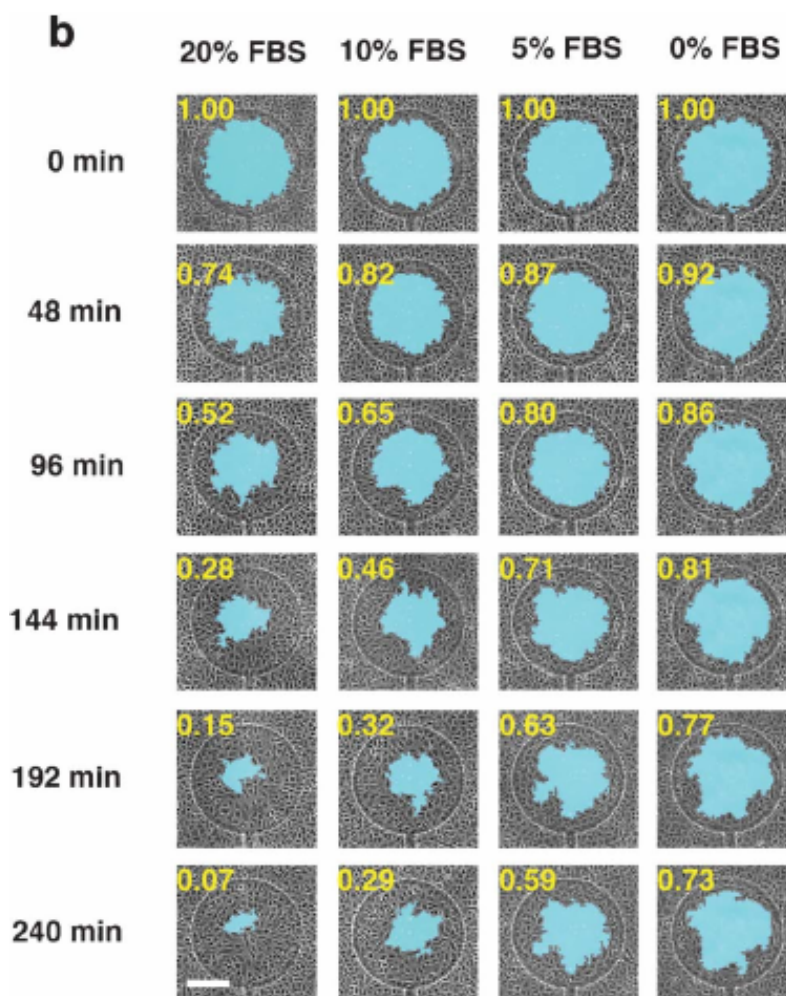
Rysunek 2.3: Widok układu mikrofluidycznego do śledzenia kulek w mikrokanałach wraz z ROI i wykrytymi komórkami [14]

Ingmar Peitz i Rien van Leeuwen [2] opracowali szklany chip z równoległymi mikrokanałami (Rysunek 2.4) i za pomocą mikroskopu Leica DM2500 oraz własnego oprogramowania opracowanego w środowisku Lab View zbadali wrażliwość *E. coli* na antybiotyki. Wynikiem analizy obrazowej była informacja na temat liczby komórek. Analiza obrazu była uproszczona – założono, że komórki są najbardziej jasnymi i kontrastowymi obiektami na obrazie.



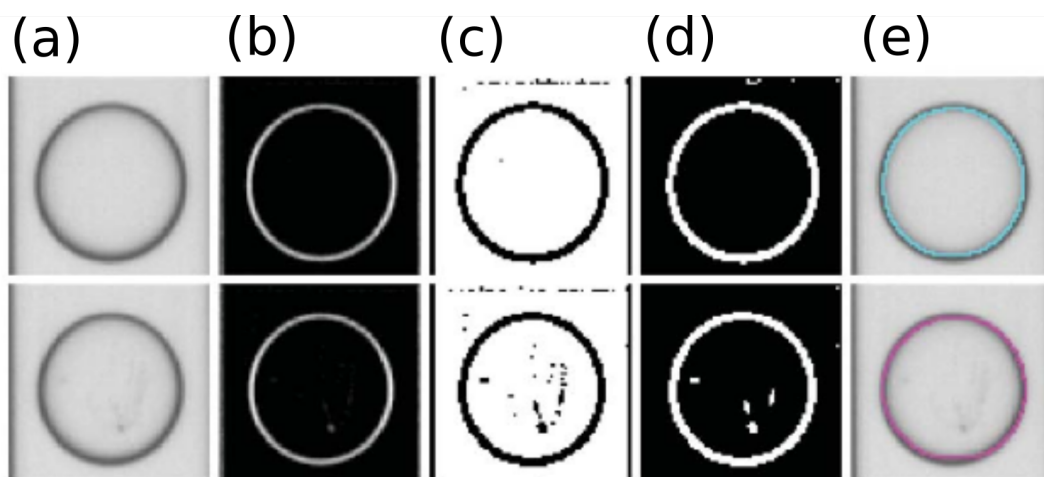
Rysunek 2.4: Komórki *E. coli* w mikrokanałach [2]

Chunhong Zheng i wsp. [48] zaproponowali chip z PDMS z komorami, których objętość jest precyzyjnie i powtarzalnie kontrolowana. Do obserwowania komórek wykorzystano monochromatyczną kamerę CCD 2000R (producent Qimaging) i odwrócony mikroskop z 10-krotnym obiektywem Nikon TE2000-E. Wynikiem analizy była informacja na temat szybkości wypełnienia się pustej przestrzeni komory komórkami śródbłonna żyły pępowinowej człowieka pod wpływem epigenetycznej regulacji (Rysunek 2.5). Analizując poklatkowo obrazy komórek migrujących w poszczególne puste obszary, określono szybkość migracji komórek w ciągu kilku godzin, eliminując efekt mieszania się komórek. Opracowana była także automatyczna analiza obrazów i dopasowanie danych na podstawie numerycznego modelu do tworzenia zintegrowanego systemu analizy migracji komórek.



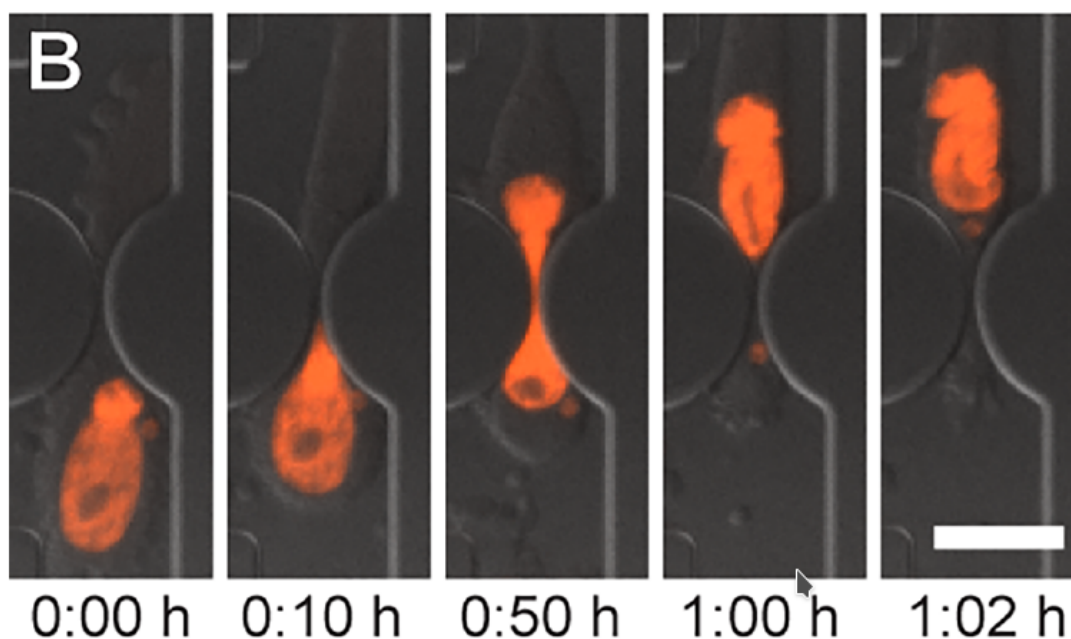
Rysunek 2.5: Zmiana „pustego” obszaru w czasie. Pionowo wskazano czas, poziomo – koncentrację czynnika stymulującego wzrost (FBS) [48]

Emerson Zang i wsp. [34] wytworzyli krzemowo-szklany chip z mikrokanalem, który obserwowano za pomocą odwróconego mikroskopu (Zeiss Axio Observer Z1). Własne oprogramowanie napisane w języku C++ z użyciem biblioteki OpenCV wykorzystano do klasyfikacji pustych i wypełnionych kropli o objętości pikolitów zawierających kulturę aktynobakterii. System wysokiej wydajności do hodowli aktynobakterii generował ponad 600000 kultur na godzinę, które następnie były hodowane w ciągu kilku dni. Chociaż krople z komórkami poruszały się w mikrokanale, to analiza obrazu odbywa się tylko w jednym obszarze za pomocą prostego algorytmu progowania (Rysunek 2.6). Metodę tę wykorzystano tylko do rozwiązywania konkretnego problemu badawczego i metoda ta nie była stosowana w innych badaniach tej grupy.



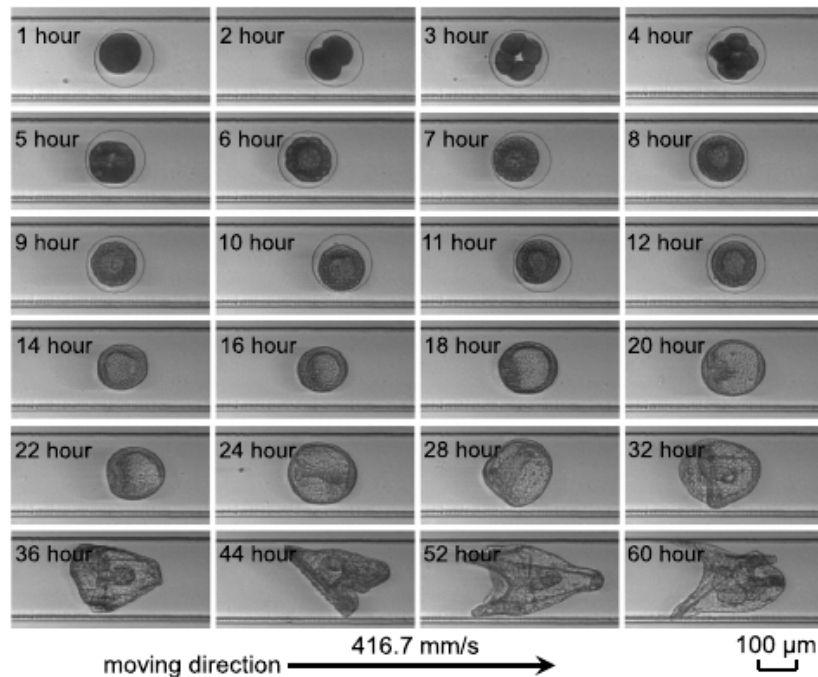
Rysunek 2.6: Detekcja komórek w pikokroplach: (a) oryginalne obrazy, (b) zastosowanie różnicy gaussianów, (c) binaryzacja progowaniem, (d) odejmowanie tła, (e) klasyfikacja kropli [34]

Joshua J. Elacqua i wsp. [51] wykorzystali krzem i szkło do opracowanego lab-chipa, w którym zostały wytrawione konstrukcje geometryczne do deformowania komórek (Rysunek 2.7). W badaniach wykorzystano odwrócony mikroskop Zeiss Observer Z1 oraz kamerę CCD CoolSNAP EZ (producent Photometrics). Stosowano oprogramowanie Zen (producent Zeiss), które umożliwiło zautomatyzowanie procesu przechwytywania obrazu komórek. Własne oprogramowanie opracowane w środowisku MATLAB śledziło migrację komórek w czasie i rejestrowało przejście komórki przez zężenia, czas przejścia i rozerwanie błony komórki. Taka automatyzacja skróciła czas potrzebny do analizy eksperymentów migracji z kilku tygodni do kilku godzin.



Rysunek 2.7: Obrazy przemieszczającej się przez zężenie mikrokanalu komórki [51]

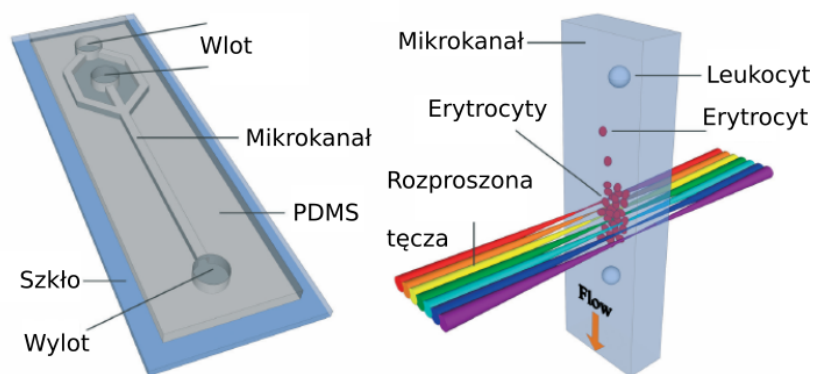
Qingyi Gu i wsp. [15] przedstawili system, który składa się z lab-chipa, mikroskopu (BX51RT, Olympus) i źródła światła PCS-MH375RC (producent Optical Garden Company). Wykorzystali oni własny algorytm do analizy obrazu, który został zaimplementowany w logice sprzętowej (FPGA). Wynikiem analizy była informacja dotycząca morfologii (charakterystyki momentu obrazu ¹ komórki oraz kształt jej otoczki) pojedynczych komórek. System miał przepustowość do 500 komórek na sekundę (około 2000 klatek na sekundę). Ponadto, zdjęcia wszystkich opracowanych komórek były przechowywane i analizowane w trybie „offline” (Rysunek 2.8).



Rysunek 2.8: Przykład obrazów komórek w mikrokanale dla różnych czasów hodowli [15]

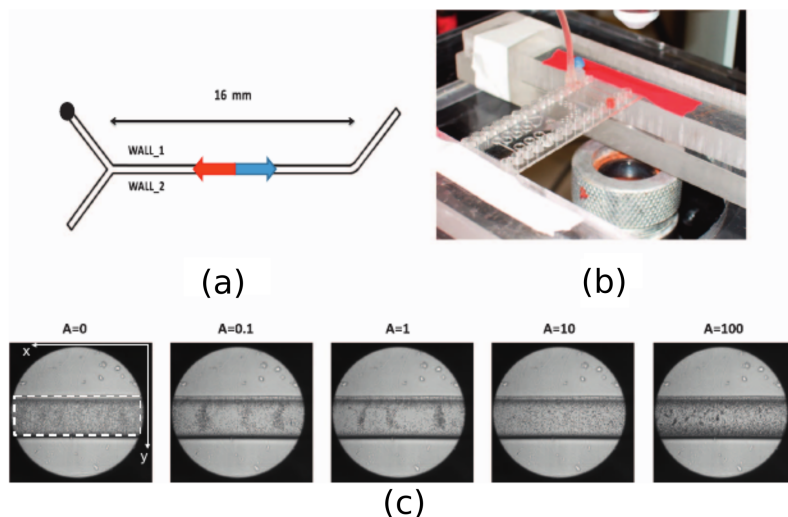
Yiyue Jiang i wsp. [18] przedstawili chip ze szkła i PDMS (Rysunek 2.9) współpracujący z szerokopasmowym laserowym układem optycznym do mikroskopii typu „time-stretch”. Do analizy obrazów wykorzystano oprogramowanie CellProfiler służące do segmentacji obrazów [12], a także własny algorytm uczenia się maszynowego na podstawie biblioteki obrazów komórek. Wynikiem analizy była możliwość morfologicznej klasyfikacji komórek.

¹W przetwarzaniu obrazu, wizji komputerowej i obszarach pokrewnych moment obrazu jest pewną szczególną średnią ważoną (momentem) jasności pikseli obrazu, albo funkcją takich momentów



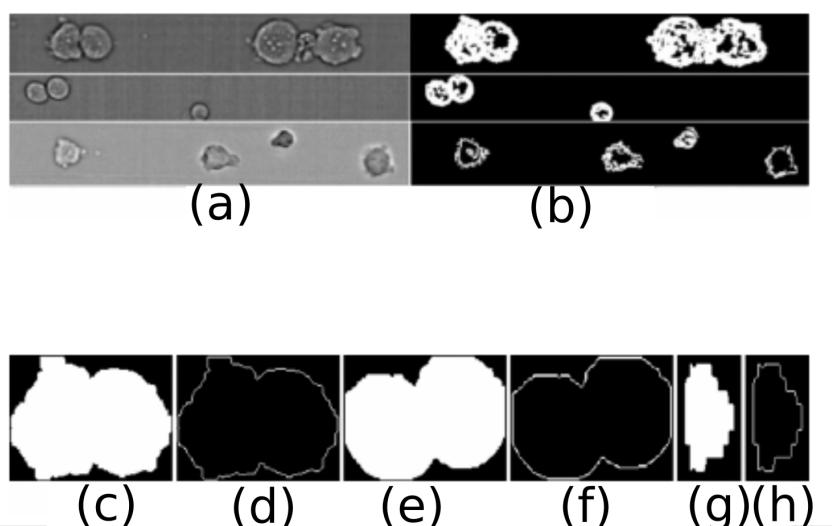
Rysunek 2.9: Chip z PDMSu (po lewej) i schemat działania układu detekcji (po prawej) [18]

F. Caironea i wsp. [56] opisali chip z PDMS z kanałem typu Y (Rysunek 2.10), który współpracuje z układem optycznym z mikroskopu BX51 (producent Olympus) i kamerą CCD. Oprogramowanie JPIV (Java Particle Image Velocimetry) wykorzystujące własne algorytmy przetwarzania obrazu umożliwiło określenie wektorowej mapy prędkości komórek w obserwowanej części kanału.



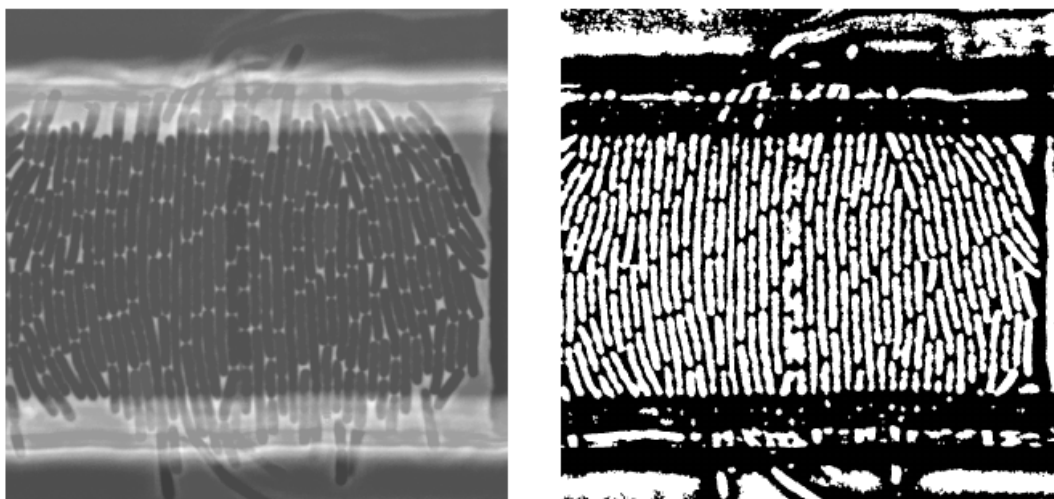
Rysunek 2.10: System do określenia szybkości komórek: (a) schemat mikrofluidycznego kanału typu Y, (c) ogólny widok systemu, (c) obrazy kanału z komórkami [56]

G. Gopakumar i wsp. [53] proponują metodę klasyfikacji komórek za pomocą cytometru przepływowego. Każda komórka jest lokalizowana poprzez znalezienie dokładnego jej obwodu (Rysunek 2.11). Następnie pozyskiwane są parametry tej komórki. Proponowane podejście zostało użyte do klasyfikacji niezabarwionych komórek rakowych w cytometrze mikrofluidycznym. Jak i w poprzednich przypadkach algorytm jest przystosowany tylko do analizy nieporuszających się komórek.



Rysunek 2.11: Komórki w kanale mikrofluidycznym na wejściowym obrazie (a), obraz w trakcie przetwarzania (b, c, e, g) i ich kontury (d, f, h) [53]

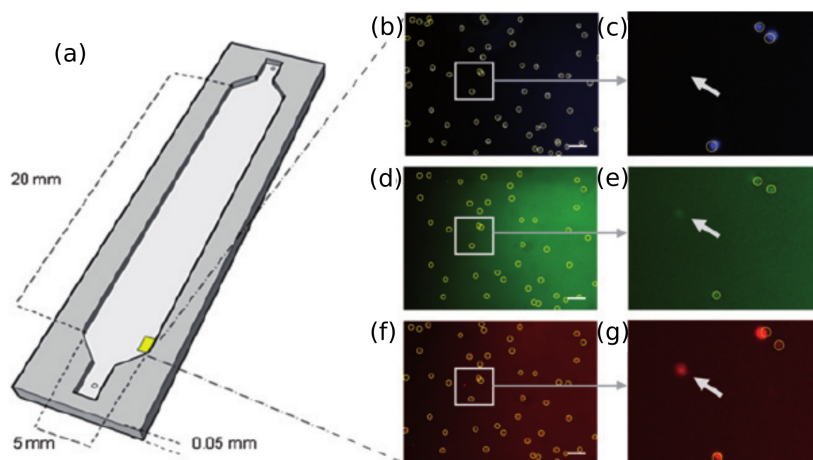
Catalin Fetita i wsp. [52] zaprojektowali i zbudowali system, w którym charakteryzowana była zmiana genów komórek. Bakterie *E. coli*, hodowane w mikrofluidycznym chipie, obserwowane były za pomocą epifluorescencyjnej mikroskopii. Autorzy opracowali zautomatyzowaną metodę śledzenia pojedynczych komórek, która składa się z dwuwymiarowej segmentacji komórek na obrazach i graficznej rekonstrukcji ich zmian w czasie (Rysunek 2.12). Algorytm przystosowany był tylko do analizy nieporuszających się komórek.



Rysunek 2.12: Komórki *E. coli* w kanale mikrofluidycznym przed i po analizie obrazu [52]

Mohamad A. Alyassin i wsp. [9] zaprezentowali zautomatyzowaną metodę liczenia komórek w chipach mikrofluidycznych za pomocą segmentacji obrazu (Rysunek 2.13). W tej metodzie komórki są oznaczone jedną lub kilkoma barwami z wykorzystaniem wbudowanych algorytmów oprogramowania MATLAB. Zaproponowana metoda miała wydajność podobną do ręcznego liczenia dla „małej” liczby komórek. Jednak, automatyczne liczenie było szybsze i

dokładniejsze dla dużej liczby komórek (>500 komórek). Wykorzystany algorytm nie był uniwersalny i został dostosowany tylko do liczenia zabarwionych komórek.

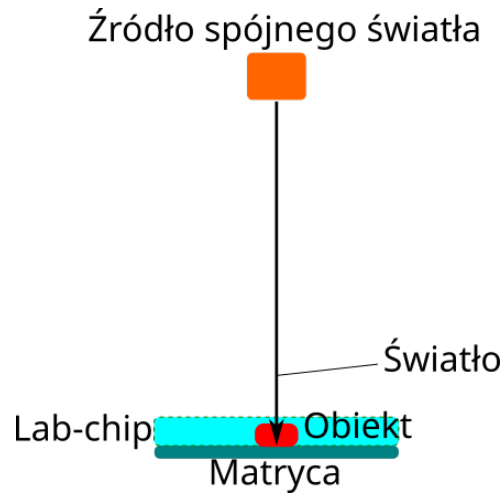


Rysunek 2.13: Chip do automatycznego liczenia komórek: (a) schemat chipa, (b-g) obrazy kanału mikroskopowego i wyniki ich analizy [9]

Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że do obserwacji komórek w układach mikrofluidycznych wykorzystywane są z powodzeniem tradycyjne mikroskopy optyczne. W układach „tradycyjnych” obraz najczęściej jest pobierany za pomocą oprogramowania udostępnianego przez producenta konkretnego mikroskopu, a przetwarzany jest własnym oprogramowaniem lub/oraz algorytmami, dostępnymi w bezpłatnych systemach programowych. Szczegółowe zadania badawcze związane z analizą obrazów komórek rozwiązywane są zatem z wykorzystaniem własnego oprogramowania.

2.1.2 Układ bezsoczewkowy

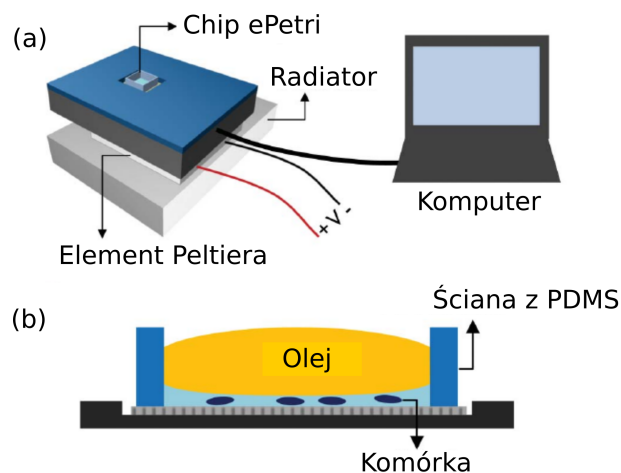
W układach bezsoczewkowych obserwowany obiekt znajduje się jak najbliżej matrycy czujników optoelektronicznych, a analizowany obraz powstaje bez udziału soczewek. Jest to stosunkowo nowa metoda otrzymywania obrazów mikroobiektów, której zasadę działania w najprostszym przypadku schematycznie przedstawiono na rysunku 2.14.



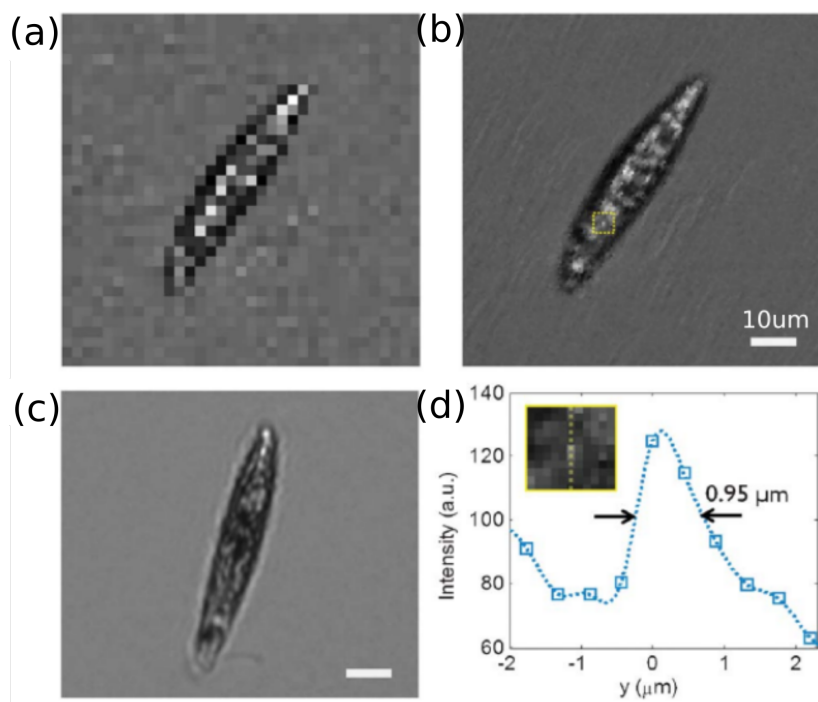
Rysunek 2.14: Schemat działania typowego układu bezsoczewkowego

Wybrane przykłady zastosowania układu bezsoczewkowego w technice laboratoriów na chipie i specjalistycznego oprogramowania do obróbki i analizy zebranych obrazów przedstawiono poniżej.

Seung Ah Lee i wsp. [23] opracowali zminiaturyzowaną szalkę Petriego (ePetri), która składa się z matrycy CMOS niskiej rozdzielczości (400 x 200 pikseli), otwartego mikropojemnika z PDMS oraz warstwy oleju, która „przyciska” komórki do matrycy CMOS (Rysunek 2.15). Zastosowano własny algorytm zwiększenia rozdzielczości obrazu na podstawie zestawu obrazów mikroorganizmów (Rysunek 2.16). Przeprowadzono długotrwałe badania mikroorganizmów (*Euglena gracilis*) hodowanych na platformie ePetri i analizę ruchu oraz morfologii komórek w oparciu o zarejestrowane obrazy.

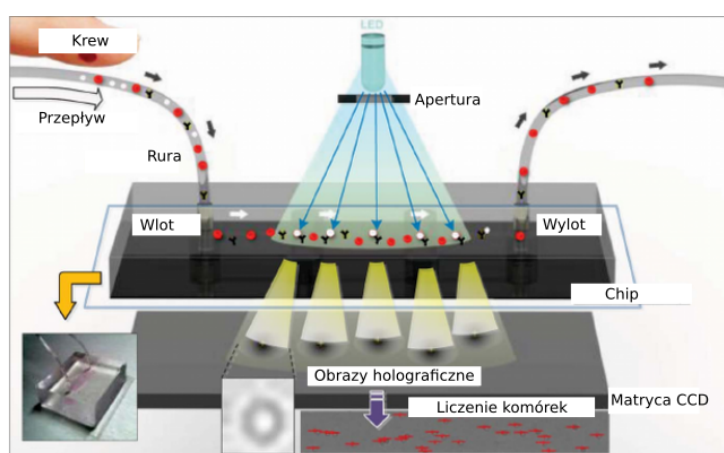


Rysunek 2.15: Technologia ePetri: (a) schemat działania (b), pojedynczy chip ePetri [23]



Rysunek 2.16: Zwiększenie jakości obrazu komórki: (a) początkowy obraz, (b) ulepszony obraz, (c) mikroskopowy obraz, (d) detekcja komórki z rekonstruowanego obrazu [23]

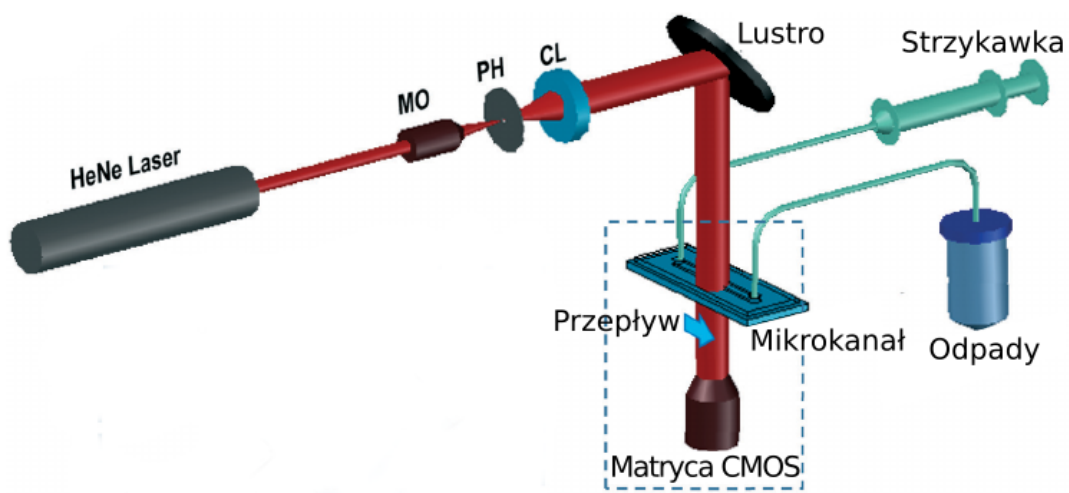
Ho-Kyeong Ra i wsp. [57] zaprezentowali układ opto-mikrofluidyczny, który składa się z chipa z PDMS i matrycy CCD (Rysunek 2.17). Opracowano własny algorytm analizy holograficznego obrazu z matrycy CCD, który wyznacza liczbę komórek za pomocą znormalizowanej dwuwymiarowej korelacji. Każda komórka jest porównywana i dopasowywana do wzorców między zestawem obrazów biblioteki komórek. System umożliwia liczenie komórek tysiące razy szybciej i dokładniej od ludzkich możliwości.



Rysunek 2.17: Schemat mikrofluidycznego urządzenia do badania komórek krwi metodą mikroskopii holograficznej [57]

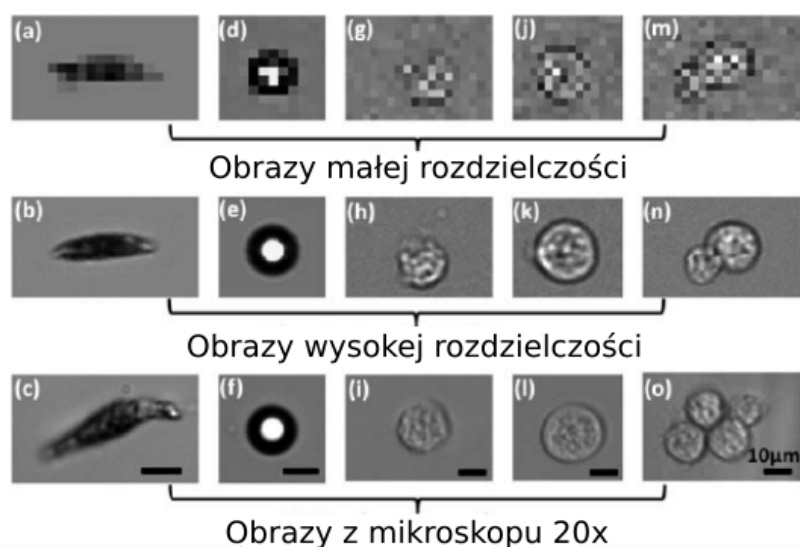
Dhananjay Kumar Singh i wsp. [49] zaprezentowali chip mikrofluidyczny wykonany ze szkła i PDMS. Schemat układu przedstawiony jest na Rysunku 2.18. W układzie za pomocą

światła lasera oświetlającego obiekt tworzony jest holograficzny obraz na powierzchni matrycy CMOS. Własny algorytm analizy obrazu został zaimplementowany w środowisku MATLAB. Algorytm ten bazuje na metodzie uczenia się maszynowego. Wykorzystywany jest klasyfikator, utworzony na podstawie 100000 obrazów różnych komórek: czerwonych krwinek, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i komórek nowotworowych. Wynikiem analizy jest klasyfikacja komórek na zdrowe i onkologiczne na podstawie ich wymiarów i jasności. Zaletą opisanego rozwiązania jest to, że możliwe jest wykrywanie 10 chorych komórek w 1 ml krwi bez znakowania komórek. Wadą jest stosunkowo niska szybkość obróbki obrazów holograficznych (1000 obrazów w około 2 godziny).



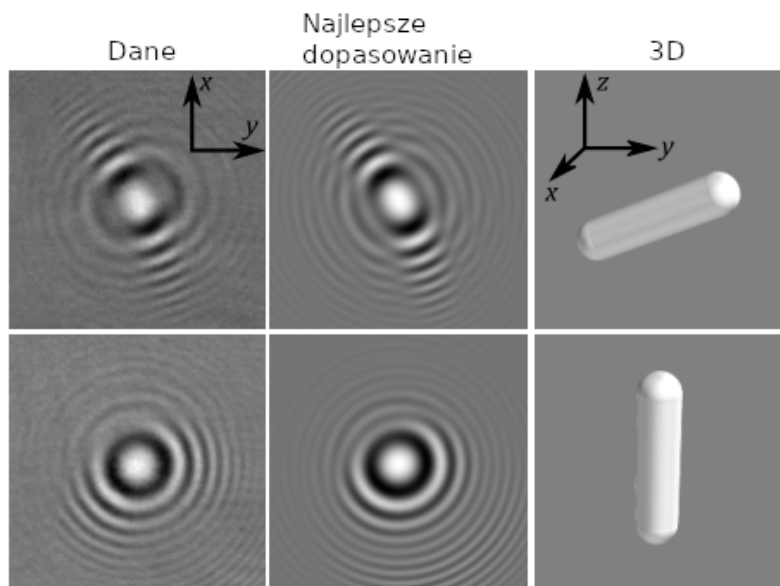
Rysunek 2.18: Schemat mikrofluidycznego urządzenia do laserowego badania komórek [49]

Guoan Zheng i wsp. [22] opracowali chip z PDMS z mikrokanalem, który jest umieszczony bezpośrednio na matrycy CMOS rejestrującej obraz niskiej rozdzielczości. Za pomocą własnego algorytmu, tworzony jest obraz wysokiej rozdzielczości z wielu obrazów niskiej rozdzielczości. Estymowane jest położenie komórki w przestrzeni co umożliwia zwiększenia rozdzielczości obrazu (Rysunek 2.19). Złożenie obrazów obracającej się komórki pozwoliło na zobrazowanie wewnętrznej struktury komórki.



Rysunek 2.19: Obrazy przed i po zwiększeniu rozdzielczości [22]

Anna Wang i wsp. [60] wykorzystali cyfrową mikroskopię holograficzną do obrazowania swobodnie pływającej *E. coli* i wykazali oni, że dopasowanie modelu rozpraszania światła do hologramów *E. coli* może dostarczyć ilościową informację o obrocie organizmu, oferując możliwość precyzyjnego śledzenia drobnych szczegółów ruchliwości bakterii bez wykorzystania barwienia komórek (Rysunek 2.20).



Rysunek 2.20: Przechwytywane hologramy swobodnie pływającej *E. coli*. Asymetria jest zauważalna w obrazach w lewej kolumnie. Najlepiej dopasowane hologramy są wyświetlane po środku, a trójwymiarowe modele z najlepiej dopasowanych hologramów są wyświetlane po prawej stronie [60]

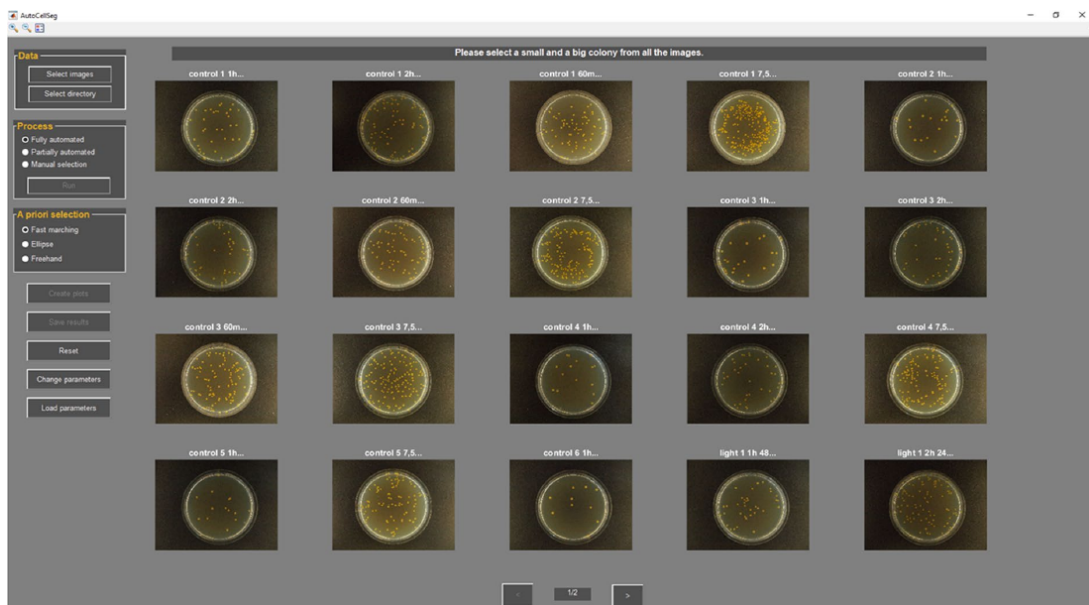
Podsumowując przedstawiony przegląd literatury można stwierdzić, że w układach bezsoczkowych obserwowany obiekt jest umieszczony bezpośrednio pomiędzy źródłem światła

oraz matrycą CMOS jak najbliższej matrycy. Z tego powodu nie jest potrzebny skomplikowany zestaw soczewek co pozwala na zmniejszenie wymiarów układu. Obraz otrzymany w takim układzie w większości przypadków wymaga przetwarzania i rekonstrukcji (holograficzny obraz na „zwykły” obraz) za pomocą specjalistycznego oprogramowania. Zwykle jest to autorskie oprogramowanie, które powstaje na potrzeby konkretnego problemu badawczego.

2.2 Oprogramowanie do analizy obrazów komórek

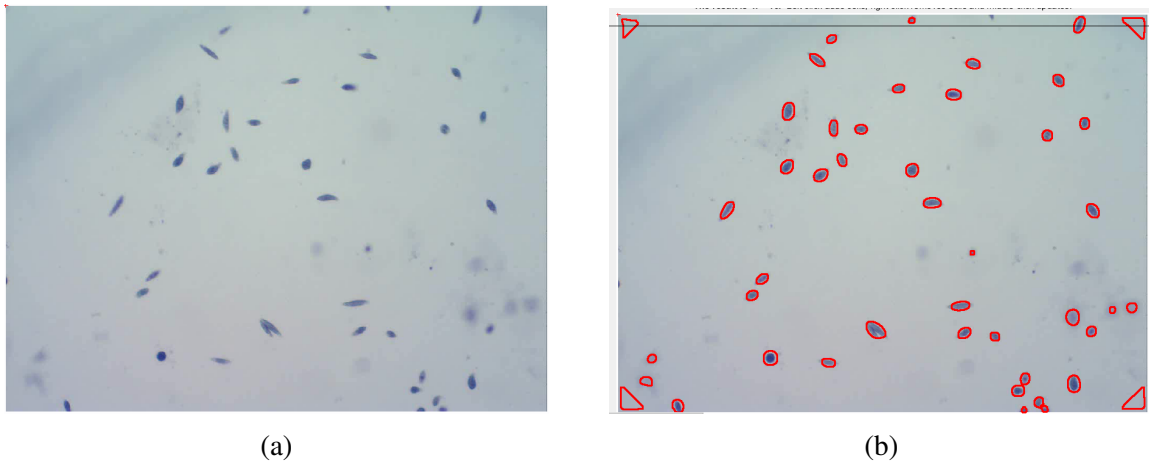
Jak wykazano wcześniej poza częścią instrumentalną układu detekcji obrazowej, ważnym elementem jest również oprogramowanie do analizy zebranych obrazów. Poniżej krótko przedstawiono główne możliwości autorskiego oprogramowania opracowanego przez różne grupy badawcze.

Arif ul Maula Khan i wsp. [7] opracowali program AutoCellSeg (działający w oparciu o MATLAB), który realizuje kontrolowaną automatyczną segmentację obrazów. AutoCellSeg używa wielokrotnego progowania razem z algorytmem „wododziału” biorąc pod uwagę kryteria wiarygodności segmentacji. Program może być używany w różnych trybach pracy i pozwala użytkownikowi wybierać obiekty metodą segmentacji obrazu. To pozwala użytkownikowi dostosować wyniki za pomocą graficznego interfejsu. Program AutoCellSeg (Rysunek 2.21) jest także przystosowany tylko do analizy statycznych obrazów komórek w szalkach Petriego.



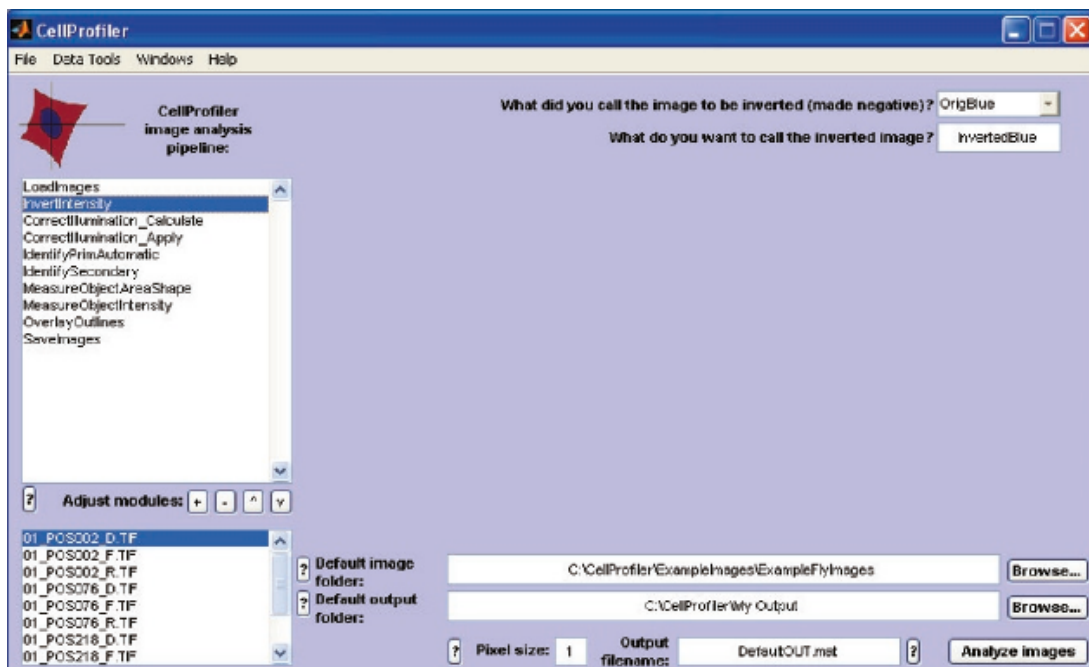
Rysunek 2.21: Widok okna programu AutoCellSeg [7]

Przykładowy wynik analizy obrazu komórek w lab-chipie uzyskany za pomocą AutoCellSeg (Rysunek 2.22) wskazuje, że program ten nie wykrył poprawnie komórek.

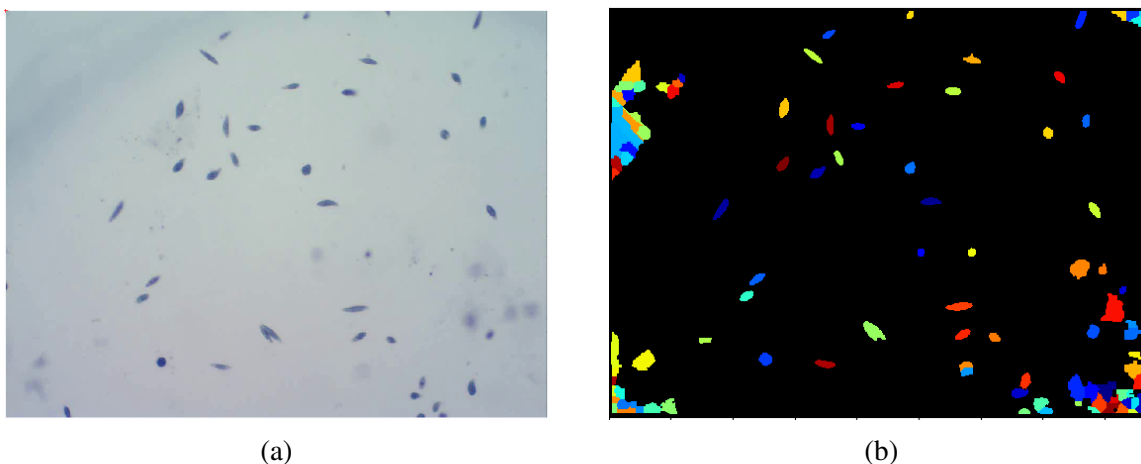


Rysunek 2.22: Przykład działania programu AutoCellSeg: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz z wykrytymi komórkami po półautomatycznej analizie. Wykryte zostały ciemne rogi obrazu nie będące komórkami (obraz źródłowy z prac własnych)

Anne E Carpenter i wsp. [12] opisali pierwszy darmowy system „open source”, przeznaczony do analizy obrazów o wysokiej przepustowości, CellProfiler (Rysunek 2.23). CellProfiler obejmuje dość szeroki zakres ilościowych badań biologicznych, w tym standardowe analizy (np. liczenie komórek, wyznaczenie rozmiaru, poziomu protein w komórce) i złożone morfologiczne analizy. Wadą CellProfiler jest to, że program nie wspiera obróbki filmów wideo i jest przystosowany do obróbki obrazów nie poruszających się albo wolnych komórek (Rysunek 2.24).



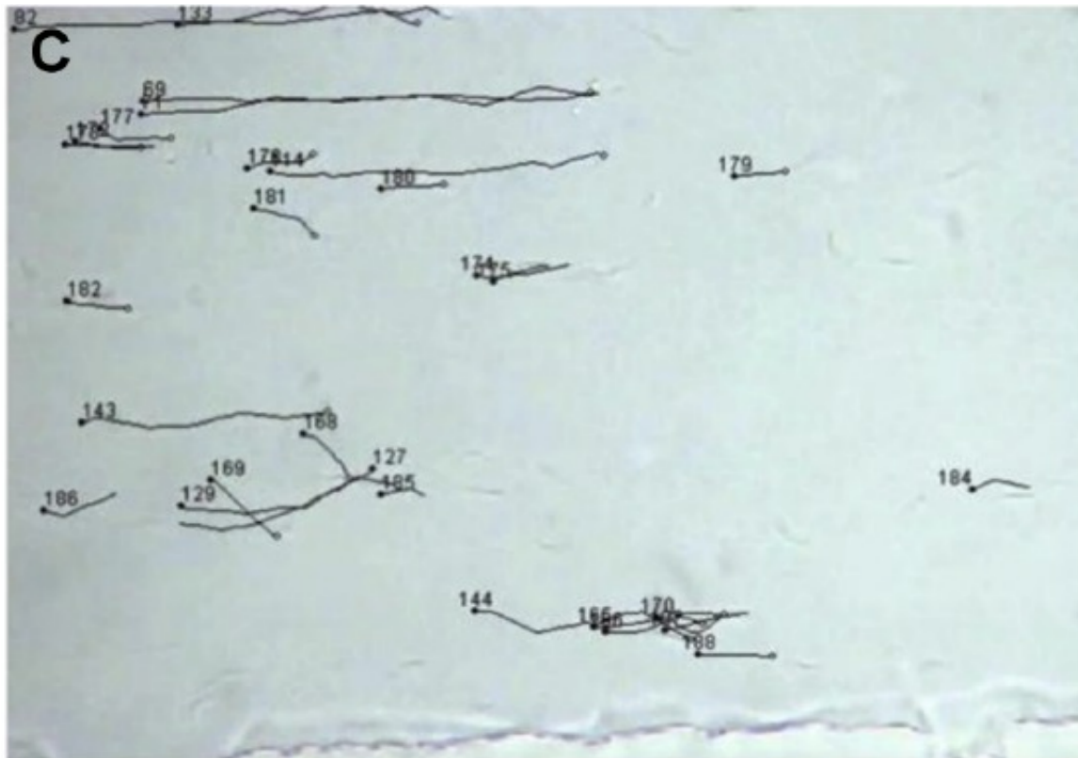
Rysunek 2.23: Widok okna programu CellProfiler [12]



Rysunek 2.24: Przykład działania programu CellProfiler: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz z wykrytymi komórkami po automatycznym progowaniu. Wykryte zostały obiekty nie będące komórkami (obraz źródłowy z prac własnych)

Wstępna analiza możliwości tych programów (AutoCellSeg, CellProfiler) w pracach badawczych prowadzonych w zespole wykazała brak możliwości ich wykorzystania. Obserwowano nieprawidłowe wykrywanie komórek co dyskwalifikowało te programy (Rysunki 2.22, 2.24)

Mohamed Elsayed i wsp. [21] zaprezentowali zmodyfikowaną „wtyczkę” do komputerowej analizy plemników (CASA) do oprogramowania ImageJ, która umożliwia analizę ruchu plemników w środowisku mikrofluidycznym, gdzie plemniki i ciecz są stale w ruchu (Rysunek 2.25). Śledzenie obiektu zostało ulepszone i zmodyfikowane tak, aby uwzględniać plemniki, które znikają z płaszczyzny ogniskowej na krótkie okresy czasu. „Wtyczka” przeznaczona jest wyłącznie do analizy ruchliwości plemników i wymaga modyfikacji, aby wykonywać bardziej uniwersalne zadania.

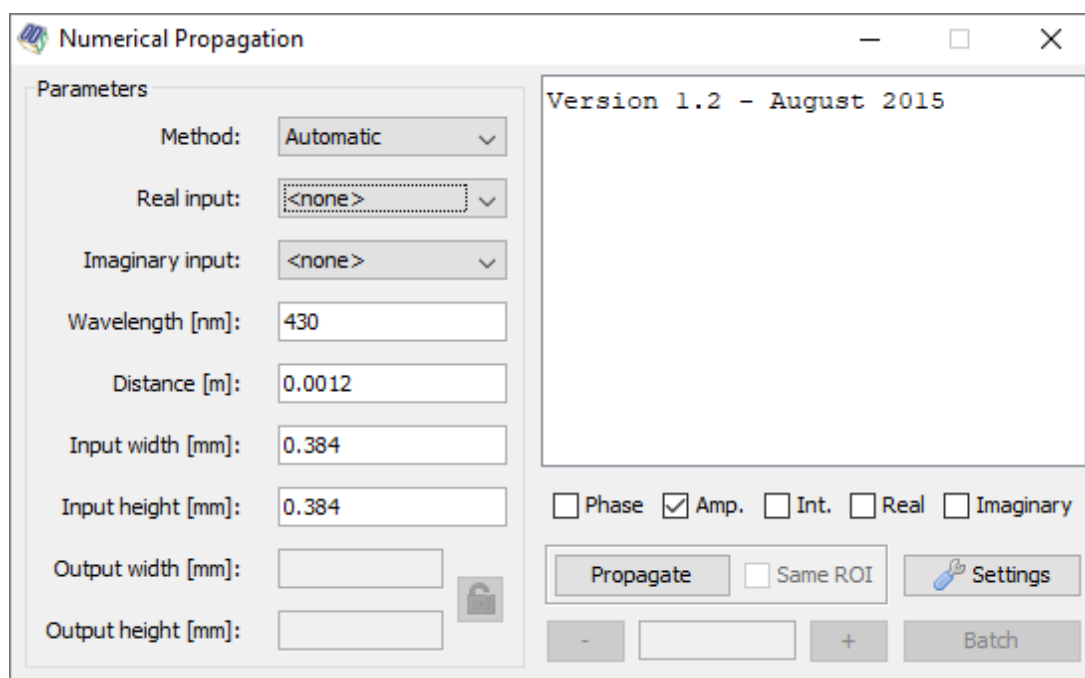


Rysunek 2.25: Wyniki działania algorytmu śledzenia plemników programem CASA [21]

Analiza obrazów z układów bezsoczewkowych przeprowadzana jest najczęściej za pomocą własnego oprogramowania.

Solomon Barkley i wsp. [61] opracowali bibliotekę programową HoloPy w języku Python, która zawiera w sobie programistyczny interfejs do niskopoziomowego kodu analizy hologramów.

Pablo Piedrahita-Quintero i wsp. [62] przedstawili „wtyczkę” Numerical Propagation do ImageJ do numerycznej propagacji fal (Rysunek 2.26). Zapewnia ona możliwość obliczania propagacji fal numerycznych za pomocą metod widma kąтового, Fresnela i Fresnela-Bluesteina.



Rysunek 2.26: Widok okna „wtyczki” Numerical Propagation

Tabela 2.3: Przykłady oprogramowania do analizy obrazów komórek

#	Nazwa	Wejściowe dane	Wyjściowe dane
1	AutoCellSeg	Statyczne obrazy	Segmentowany obraz
2	CellProfiler	Statyczne obrazy	Liczba komórek, ich wymiary
3	CAS („wtyczka” ImageJ)	Filmy	Ścieżki komórek
4	TrackMate („wtyczka” ImageJ)	Filmy	Ścieżki komórek
5	Numerical Propagation („wtyczka” ImageJ)	Statyczne obrazy (holo-gramy)	Pozycja komórek w przestrzeni trójwymiarowej
6	HoloPy (biblioteka Python)	Statyczne obrazy (holo-gramy)	Pozycja komórek w przestrzeni trójwymiarowej

Na podstawie przeprowadzonej analizy dostępnego oprogramowania, podsumowanej w tabeli 2.3, można stwierdzić, że oprogramowanie do analizy komórek w większości zawiera proste metody segmentacji i liczenia komórek (AutoCellSeg, CellProfiler) lub jest „wtyczką” do systemu obróbki obrazów (ImageJ, MATLAB) ze specjalistycznym zestawem możliwości. Próby wykorzystania dostępnego oprogramowania (CellProfiler, ImageJ) do analizy obrazów (zasoby zespołu) komórek w lab-chipach zakończyły się niepowodzeniem. Żaden z programów nie wykrył wszystkich komórek, a tym samym niemożliwa była ich parametryzacja.

2.3 Podsumowanie

Analiza obrazowa jest powszechnie wykorzystywana w układach typu lab-on-a-chip do analizy komórek. Możliwe jest między innymi liczenie komórek, określenie wymiarów komórek, ich wewnętrznej struktury. Analiza ta możliwa jest jeżeli spełniane są pewne wymagania zarówno w odniesieniu do lab-chipa jak i rejestrowanych obrazów. Są to przede wszystkim:

- Przezroczystość materiałów lab-chipa – elementy lab-chipa, przez które „przechodzi” światło powinni być wykonane z takich materiałów, co też nakłada ograniczenia jeżeli chodzi o możliwe do wykorzystania materiały.
- Kontrast obrazu – powinna istnieć możliwość odróżnienia komórki od jej tła. W przypadku krzemowych chipów kontrast komórki względem tła jest często niski co powoduje konieczność użycia barwników i detekcji fluorescencji [51], w przypadku obrazów rejestrowanych z szklanych lab-chipów komórka może zlewać się z tłem.
- Ograniczenie prędkości i jakości nagrywania – do analizy obrazowej najlepiej nadają się ostre obrazy. W przypadku poruszających się komórek liczba klatek na sekundę powinna być taka żeby obraz komórki nie był rozmazany. Ograniczenie liczby klatek na sekundę związane jest również z ograniczeniem wymiarów obrazu i odpowiednią ilością informacji, którą ten obraz zawiera.

Przeprowadzona analiza możliwości wykorzystania dwóch mikroskopowych technik pozyskiwania obrazów wskazuje, że zarówno układ „tradycyjny” jaki i bezsoczewkowy z powodzeniem może być stosowany z układami typu lab-chip. Istotne są zarówno rozwiązania techniczne tych mikroskopów jak również programowa analiza rejestrowanych obrazów.

Istniejące rozwiązania programowe do analizy obrazów komórek, takie jak: CellProfiler, CellEvaluator, AutoCellSeg przeznaczone są tylko do analizy obrazów komórek np. w szalce Petriego. Można również zauważyć, że pojawiają się różne metody analizy obrazów komórek, które skupiają się na automatyzacji (przetwarzanie wielu obrazów bez udziału człowieka) oraz poprawieniu dokładności (obiektywności analizy) za pomocą wieloparametrycznej analizy. W wielu wypadkach są to autorskie oprogramowania, rozwijane przez grupy badawcze na potrzeby prac naukowych.

Istnieje zatem potrzeba opracowania uniwersalnego narzędzia programowego współpracującego z lab-chipem i typowym mikroskopem optycznym lub układem holograficznym umożliwiające wieloparametrową charakteryzację komórki (komórek).

Celem pracy jest zatem:

1. Analiza możliwości wykorzystania różnych technik pozyskiwania oraz algorytmów analizy obrazu (programowych) z punktu widzenia obrazowej charakteryzacji komórek (detekcja, parametryzacja, śledzenie, deformacja).

2. Opracowanie i badanie wieloetapowego algorytmu analizy obrazu z uwzględnieniem specyfiki rozwiązań mikrofluidycznych i z wykorzystaniem różnych komórek oraz układów do pozyskiwania obrazów.
3. Badania właściwości opracowanego oprogramowania jako narzędzia do badania komórek w lab-chipie.

Rozdział 3

Algorytmy analizy obrazu

W rozdziale tym przedstawiono algorytmy przetwarzania obrazów ważne z punktu widzenia analizy obrazów oraz filmów wideo żywych komórek, które zostały zastosowane w opracowanym oprogramowaniu.

Algorytmy te można podzielić na trzy grupy:

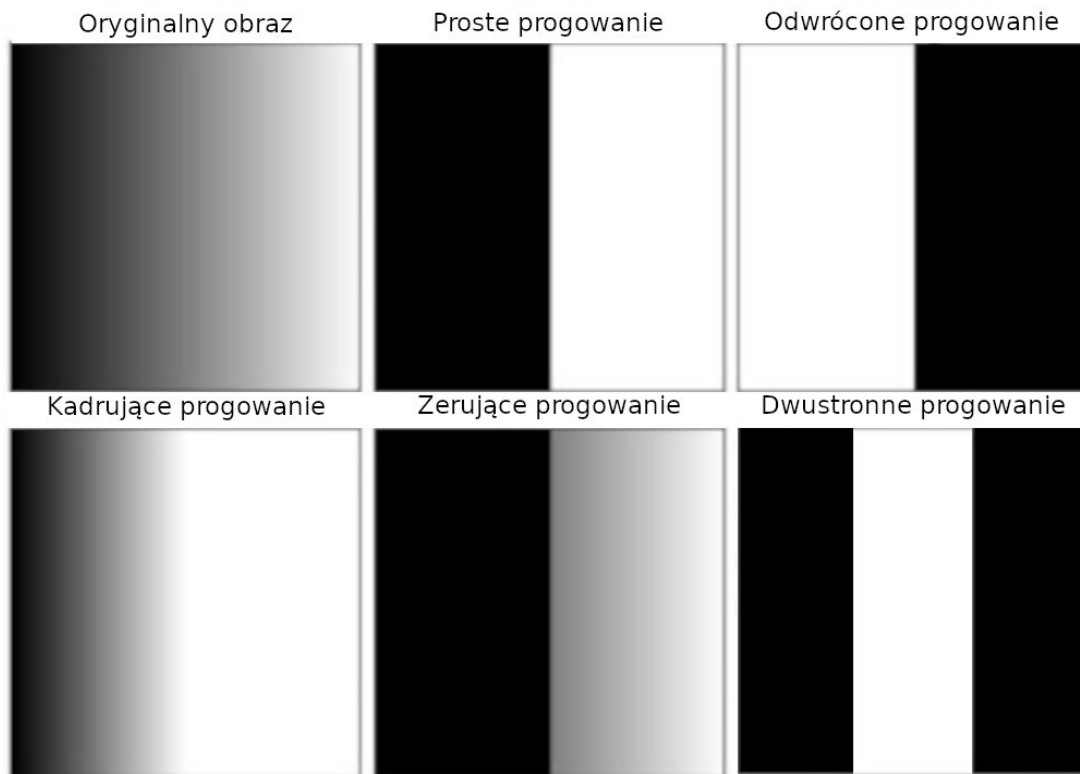
1. algorytmy do detekcji komórek,
2. algorytmy do śledzenia komórek,
3. algorytmy wspomagające analizę.

3.1 Algorytmy detekcji

Algorytmy detekcji to algorytmy, które używane są do odnalezienia komórek na obrazie. Algorytmy te to: progowanie, filtrowanie, poszukiwanie krawędzi, poszukiwanie konturów, odejmowanie tła, obliczanie entropii, algorytm α -form, transformacja Hougha i algorytm wodorozdziału. Algorytmy te będą opisane w następnych podrozdziałach.

3.1.1 Progowanie

Progowanie polega na binaryzacji obrazu I albo jego fragmentu zgodnie z zadanym warunkiem. Na wyjściu otrzymujemy obraz R , który składa się z „czarnych” wartości (0) oraz „białych” wartości (255) pikseli. Przy detekcji komórek stosuje się wiele różnych algorytmów progowania i ich modyfikacje, tzn. proste progowanie, z kadrowaniem i zerowaniem, dwustronne, adaptatywne i wielokrotne (Rysunek 3.1).



Rysunek 3.1: Wizualizacja wyniku działania różnych metod progowania obrazu

W algorytmie prostego progowania wszystkie piksele o jasności powyżej (poniżej w odwróconym progowaniu) wartości progu t są zaznaczane białym kolorem (255), a pozostałe piksele są zaznaczane na czarno (0) (wzór 3.1).

$$R(x,y) = \begin{cases} 255, & \text{jeśli } I(x,y) > t \\ 0, & \text{inne} \end{cases} \quad (3.1)$$

W progowaniu z kadrowaniem i zerowaniem wypełniane są czarnym albo białym kolorem tylko te piksele, które spełniają zadany warunek poziomu jasności (wzór 3.2).

$$R(x,y) = \begin{cases} 255, & \text{jeśli } I(x,y) > t \\ I(x,y), & \text{inne} \end{cases} \quad (3.2)$$

Dwustronne progowanie polega na tym, że białym kolorem są zaznaczone tylko piksele, których jasność znajduje się pomiędzy dolną t_1 , a górną t_2 wartością progów.

$$R(x,y) = \begin{cases} 255, & \text{jeśli } I(x,y) > t_1 \text{ i } I(x,y) < t_2 \\ 0, & \text{inne} \end{cases} \quad (3.3)$$

Adaptatywne progowanie zmienia wartość progową podczas progowania w zależności od jasności pikseli w konkretnym zakresie na obrazie. Wartość progowa może być obliczana jako

średnia jasność albo średnia ważona jasność zakresu. W taki sposób możliwe jest uzyskanie lepszych wyników progowania obrazów ze zmienną jasnością. W wielokrotnym progowaniu obraz jest progowany wielokrotnie z różnymi progowymi wartościami, po czym wyniki są dodawane za pomocą koniunkcji albo sumy logicznej.

3.1.2 Filtrowanie

Filtrowanie służy do zmniejszenia poziomu szumu, czyli usunięcia składowej obrazu z wysoką częstotliwością. Z tego powodu także usuwane są takie szczegóły obrazu jak krawędzie. Żeby zachować krawędzie oraz usunąć szum używane są następujące rodzaje filtrów.

Dwustronny filtr (ang. *bilateral filter*) jest nieliniowym filtrem wygładzającym obrazy, zachowującym krawędzie i redukującym szumy. Zastępuje on intensywność każdego piksela średnią ważoną wartości natężenia z pobliskich pikseli. Wagi te są oparte na rozkładzie Gaussa. Co istotne, wagi zależą nie tylko od euklidesowej odległości pikseli, ale także od różnic radiometrycznych (np. różnic zakresu, takich jak intensywność koloru, odległość głębi itp.), co zachowuje ostre krawędzie.

Filtr Kuwahara jest filtrem wygładzającym nieliniowym stosowanym w przetwarzaniu obrazu do adaptacyjnej redukcji szumów (Rysunek 3.2) [63]. Filtr Kuwahara wygładza obraz, zachowując jednocześnie krawędzie. Załóżmy, że $I(x, y)$ jest obrazem w skali szarości i , że do analizy wybrano kwadratowe okno o wymiarach $2a + 1$ wyśrodkowane wokół punktu (x, y) na obrazie. Kwadrat ten można podzielić na cztery mniejsze obszary kwadratowe $Q_{i=1...4}$ (Równanie 3.4)

$$Q_i(x, y) = \begin{cases} [x, x + a] \times [y, y + a] & \text{dla } i = 1 \\ [x - a, x] \times [y, y + a] & \text{dla } i = 2 \\ [x - a, x] \times [y - a, y] & \text{dla } i = 3 \\ [x, x + a] \times [y - a, y] & \text{dla } i = 4, \end{cases} \quad (3.4)$$

gdzie \times jest iloczynem kartezjańskim. Należy zauważyć, że piksele znajdujące się na granicy między dwoma regionami należą do obu regionów, więc między podregionami występuje niewielkie nakładanie się.

Średnia arytmetyczna $M_i(x, y)$ oraz odchylenie standardowe $\sigma_i(x, y)$ czterech regionów wyśrodkowanych wokół piksela (x, y) są obliczane i używane do określenia wartości centralnego piksela. Wyjście filtra Kuwahara $\Phi(x, y)$ dla dowolnego punktu (x, y) jest wtedy podane przez $\Phi(x, y) = M_i(x, y)$ gdzie $i = \arg \min_j \sigma_j(x, x)$. Oznacza to, że centralny piksel przyjmie średnią wartość obszaru, który jest najbardziej jednorodny. Położenie piksela względem krawędzi odgrywa dużą rolę w określeniu, który region będzie miał większe odchylenie standardowe. Jeśli na przykład piksel znajduje się po ciemnej stronie krawędzi, najprawdopodobniej przyjmie on średnią wartość obszaru ciemnego. Z drugiej strony, jeśli piksel będzie po jasnej stronie krawędzi, najprawdopodobniej przyjmie wartość jasnego obszaru. W przypadku, gdy piksel znajduje

się na krawędzi, przyjmuje wartość bardziej gładkiego, najmniej teksturowanego obszaru. Fakt, że w filtrze brana jest pod uwagę jednorodność regionów, gwarantuje, że zachowane zostaną krawędzie przy użyciu średniej wartości, ale także spowoduje to efekt rozmycia.

a	a	a/b	b	b
a	a	a/b	b	b
a/c	a/c	a/b/ c/d	b/d	b/d
c	c	c/d	d	d
c	c	c/d	d	d

Rysunek 3.2: Schemat działania filtra Kuwahara

Naprowadzany filtr (ang. *guided filter*) bazuje na lokalnym modelu liniowym. W filtrze tym obliczany jest wynik filtrowania, biorąc pod uwagę zawartość obrazu naprowadzającego, który może być samym obrazem wejściowym lub innym obrazem. Naprowadzany filtr może być używany jako operator wygładzania zachowujący krawędzie, jak filtr dwustronny, ale ma lepsze wyniki działania w pobliżu krawędzi. Naprowadzany filtr jest również bardziej ogólnym pojęciem wykraczającym poza wygładzanie. Może on przenosić struktury obrazu naprowadzania na wyjście filtrujące, umożliwiając kolejne zastosowania filtrowania. Co więcej, naprowadzany filtr naturalnie posiada szybki i nieliniowy algorytm czasu liniowego, niezależnie od wielkości jądra i zakresu intensywności. Obecnie jest to jeden z najszybszych filtrów zachowujących krawędzie. Eksperymentalnie wykazano, że naprowadzany filtr jest zarówno efektywny, jak i wydajny w wielu różnych aplikacjach związanych z wizją komputerową i grafiką komputerową, takich jak: wygładzanie krawędzi, ulepszanie szczegółów, kompresja HDR, matowienie/pierzenie obrazu, usuwanie zamglenia, podniesienie częstotliwości próbkowania itp. [64].

3.1.3 Poszukiwanie krawędzi

W komputerowej analizie obrazów krawędź to punkt, w którym gwałtownie zmienia się jasność pomiędzy pikselami obrazu. Algorytmy do detekcji krawędzi wykrywają je na podstawie

poszukiwania punktów obrazu, w których gwałtownie zmienia się jasność. Większość takich algorytmów wykorzystuje różnego rodzaju filtry i ich kombinacje. Poniżej przedstawiono niektóre z tych algorytmów.

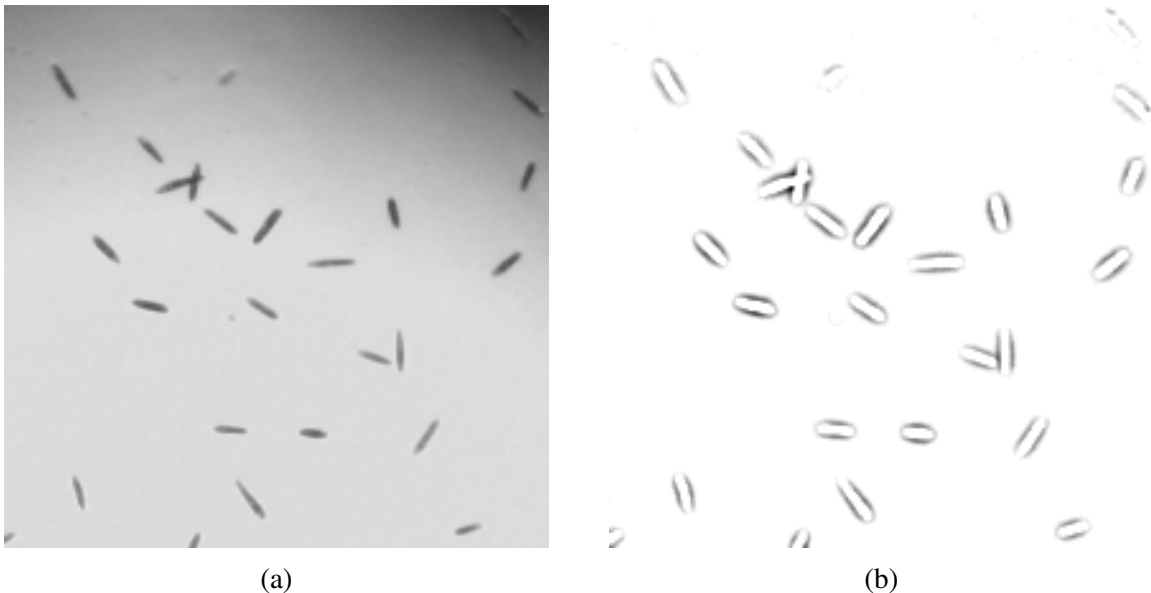
Laplacjan rozkładu Gaussa (Laplacian of Gaussian, Laplacjan gaussianów (LoG)) to zastosowanie operatora Laplace'a do obrazu wygładzonego funkcją Gaussa. LoG jest falką opisaną następująco:

$$\psi(x,y) = \frac{1}{\pi\sigma^2} \left(1 - \frac{1}{2} \left(\frac{x^2+y^2}{\sigma^2} \right) \right) e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (3.5)$$

gdzie ψ – funkcja falkowa, x,y – współrzędne, σ – parametr nazywany różnicą rozkładów Gaussa (DoG) będąca różnicą wyników dwóch filtrów Gaussa z różnymi maskami (jądrami) przekształcenia. Przy odejmowaniu jednego obrazu od innego otrzymywana jest informacja przestrzenna, która zapisywana jest w formie dwóch wygładzonych obrazów. W ten sposób, różnica Gaussjanów staje się pasmowym filtrem, który odrzuca wszystko, oprócz kilku częstotliwości przestrzennych, obecnych w oryginalnym obrazie. DoG (równanie 3.6) jest często używany jako przybliżenie LoG (Rysunek 3.3).

$$\Gamma_{\sigma,K\sigma}(x,y) = I * \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-(x^2+y^2)/(2\sigma^2)} - I * \frac{1}{2\pi K^2\sigma^2} e^{-(x^2+y^2)/(2K^2\sigma^2)} \quad (3.6)$$

gdzie Γ – końcowy obraz, $\sigma, K\sigma$ – parametry rozkładów Gaussa, I – początkowy obraz, x,y – współrzędne



Rysunek 3.3: Przykład działania różnicy rozkładów Gaussa: (a) oryginalny obraz euglen, (b) różnica rozkładów Gaussa dla obrazu. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Detektor Canny to złożony algorytm, który wykorzystuje cztery operatory Sobela do detekcji poziomych, pionowych oraz przekątnych krawędzi na wygładzonym obrazie.

Operator Sobela to operator dyskretnego różniczkowania umożliwiający aproksymację po-

chodnych kierunkowych intensywności obrazu w ośmiu kierunkach po 45° każdy. Ponieważ funkcja natężenia obrazu cyfrowego jest znana tylko w punktach dyskretnych, pochodne tej funkcji nie mogą być zdefiniowane, chyba że założymy, że istnieje podstawowa różniczkowalna funkcja natężenia, która została pobrana w punktach obrazu. Przy pewnych dodatkowych założeniach pochodną funkcji ciągłego natężenia można obliczyć jako funkcję na próbkowanej funkcji natężenia, tj. obraz cyfrowy. Okazuje się, że pochodne w dowolnym punkcie są funkcjami wartości natężenia w praktycznie wszystkich punktach obrazu. Przybliżenia tych funkcji pochodnych można jednak definiować z mniejszą lub większą dokładnością.

Operator Sobela reprezentuje przybliżenie gradientu obrazu, ale nadal jest wystarczająco wysokiej jakości, aby mógł być praktycznie wykorzystany w wielu zastosowaniach. Dokładniej, używa wartości intensywności tylko w obszarze 3x3 wokół każdego punktu obrazu w celu przybliżenia odpowiedniego gradientu obrazu, i używa tylko wartości całkowitych dla współczynników, które ważą intensywność obrazu w celu uzyskania przybliżenia gradientu.

Przy poszukiwaniu krawędzi ważnym problemem jest wyodrębnienie krawędzi tylko samej komórki, odrzucając krawędzie tła oraz krawędzie wewnętrznych struktur komórki. Do rozwiązania tego problemu używana jest filtracja krawędzi.

W algorytmie prostej filtracji krawędzie, które są dalej od centroidy wszystkich krawędzi są odrzucane (Równanie 3.7). Można odrzucać krawędzie, które są dalej albo bliżej n odchyłeń standardowych względem średniej, gdzie $n = 1, 2, \dots$

$$R(x, y) = \begin{cases} K(x, y), & \text{jeśli } d(K(x, y), C) > T \\ 0, & \text{inne} \end{cases} \quad (3.7)$$

gdzie $R(x, y)$ – wartość intensywności piksela na obrazie wyjściowym ze współrzędnymi x, y , $K(x, y)$ – wartość odpowiedniego piksela na obrazie z krawędziami, d – funkcja odległości, T – wartość progowa. Przy transformacji odległości dla każdego piksela wykrytych krawędzi obliczana jest wartość, która jest średnią odległością od tego piksela do każdego innego piksela krawędzi.

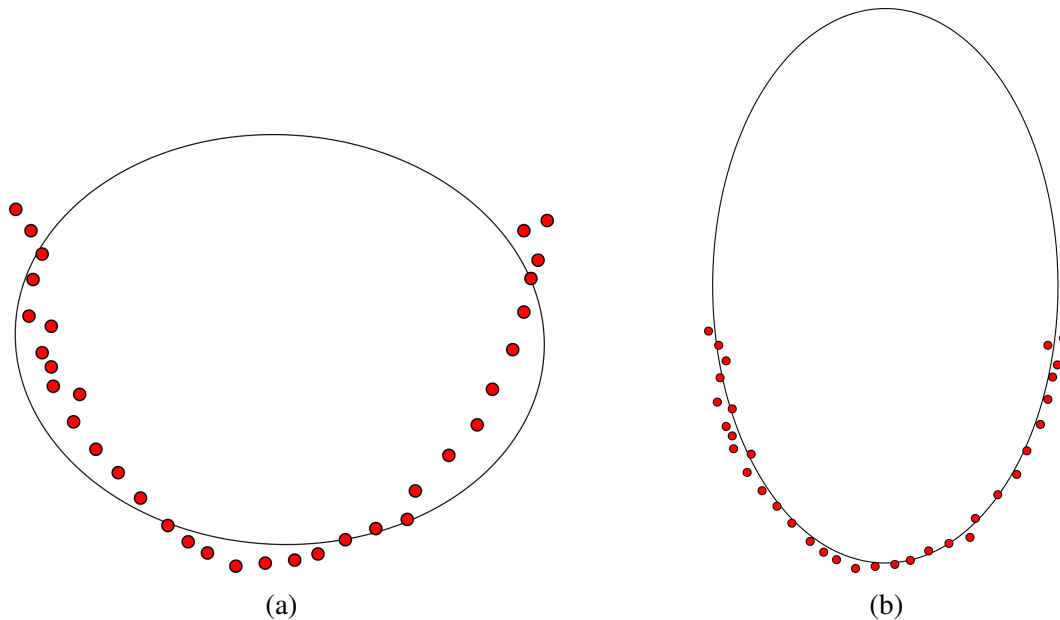
$$D_i = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1 \dots N, j \neq i} d(K_i, K_j) \quad (3.8)$$

gdzie D_i – wartość intensywności piksela na obrazie wyjściowym, N – liczba pikseli krawędzi na obrazie, K_i – współrzędne piksela krawędzi na obrazie wejściowym, d – funkcja odległości $d(a, b) = \sqrt{(a_x - b_x)^2 + (a_y - b_y)^2}$

Końcowa wartość tego przetwarzania jest liczbą zmiennoprzecinkową (32 bity dokładności). Wartość ta jest następnie odwzorowywana w zakresie 0...255. Piksele z jasnością poniżej oraz powyżej wskazanych progów są odrzucane progowaniem.

W przypadku gdy krawędź komórki nie jest wykrywana na całej długości, rekonstrukcja elipsy pozwala na przybliżenie prawdziwego kształtu komórki. Zwykle dopasowywanie tworzy elipsę metodą najmniejszych kwadratów w taki sposób, że punkty są jak najbliżej elipsy. Jeśli

punkty nie tworzą całej elipsy takie dopasowywanie nie jest użyteczne. W takim przypadku docelową metodą będzie optymalizacja, przy której funkcją celową jest średnie odchylenie sumy odległości punktów od ognisk elipsy. Porównanie metod odtwarzania elipsy na podstawie zestawu punktów zaprezentowane jest na rysunku 3.4.



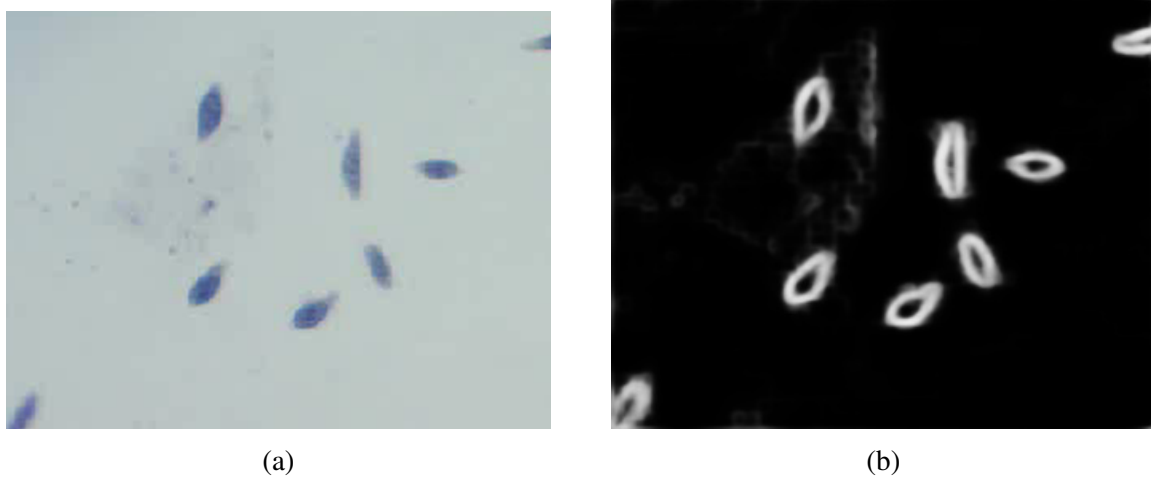
Rysunek 3.4: Porównanie metod wytwarzania elipsy na podstawie zestawu punktów: (a) dopasowywanie elipsy metodą najmniejszych kwadratów, (b) dopasowywanie elipsy metodą optymalizacji odległości

Użytecznym jest połączenie rekonstrukcji elipsy z filtracją krawędzi transformacją odległości, która odrzuca osobne krawędzie znajdujące się na tle obrazu. Transformacja odległości i jej progowanie daje w wyniku tylko piksele największego zbioru krawędzi czyli właśnie krawędzie komórki, odrzucając inne. Możliwe jest także adaptatywne odrzucanie krawędzi, które znajdują się blisko samej elipsy, przy której każda krawędź jest najpierw odrzucana, po czym wykonuje się obliczenie jakości dopasowywania się elipsy bez tej krawędzi i porównuje się z jakością dopasowywania elipsy z tą krawędzią. Wynikiem tego działania jest wybór najlepszej metody z punktu widzenia najlepszego dopasowywania.

Sieci neuronowe mają szerokie zastosowanie w wizji komputerowej i analizie obrazów. Wykrywanie krawędzi może być bardziej efektywne z wykorzystaniem sieci neuronowych. Zalety wykorzystania sieci neuronowych to możliwość dopasowywania sieci do danych wejściowych oraz szybkie działanie dzięki temu, że długi proces uczenia się sieci odbywa się osobno od pomiaru/analizy.

Do wykrywania krawędzi używane są sieci neuronowe głębokiego uczenia się. Metoda ta, zwana jako całościowe wbudowane wykrywanie krawędzi lub HED (*Holistically-nested Edge Detection*), oparta jest na systemie wykrywania, który korzysta z VGG-podobnej konwolucyjnej sieć neuronowej do prognozowania obrazów.

Sieć wykorzystuje boczne wyjścia (obrazy, które są wynikiem z pośrednich warstw) sieci neuronowej. Boczne wyjścia wszystkich warstw są dodawane dla generowania ostatecznego obrazu, ponieważ obrazy, utworzone na każdej warstwie, mają inny rozmiar i dlatego nadają się skutecznie do badania obrazu w różnych skalach (Rysunek 3.5).



Rysunek 3.5: Krawędzie komórek wykryte z wykorzystaniem algorytmu z siecią neuronową: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.

3.1.4 Entropia

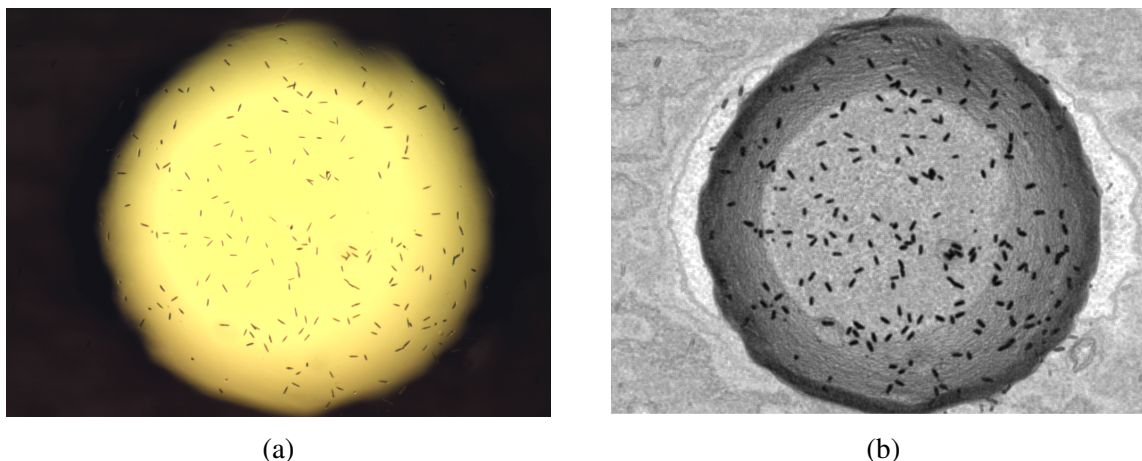
Entropia w teorii informacji to średnia ilość informacji, przypadająca na pojedynczą wiadomość z jej źródła. Innymi słowy jest to średnia ważona ilości informacji niesionej przez pojedynczą wiadomość, gdzie wagami są prawdopodobieństwa nadania poszczególnych wiadomości. Obliczenie entropii daje możliwość wykrywania struktury obrazu nawet jeśli nie ma znacznej różnicy w jasności obrazu (Rysunek 3.6).

W przypadku obrazu I entropia to:

$$H(I) = - \sum_{i=1..N} h(I, i) \log_2 h(I, i), \quad (3.9)$$

gdzie $h(I, i)$ – i -ty element histogramu obrazu I .

Entropia obrazu jest zwykle jedną liczbą dla całego obrazu co nie jest skutecznym do analizy obiektów na tym obrazie. Dla takiego przypadku istnieje możliwość obliczenia entropii dla pojedynczego piksela jako dla niewielkiego (kwadrat z bokiem o wymiarach pojedynczych pikseli) otoczenia tego piksela. Z tych wartości można określić obraz entropii o wymiarach $(N - k + 1) \times (M - k + 1)$, gdzie N, M – wymiary wejściowego obrazu, k – wymiar otoczenia piksela.

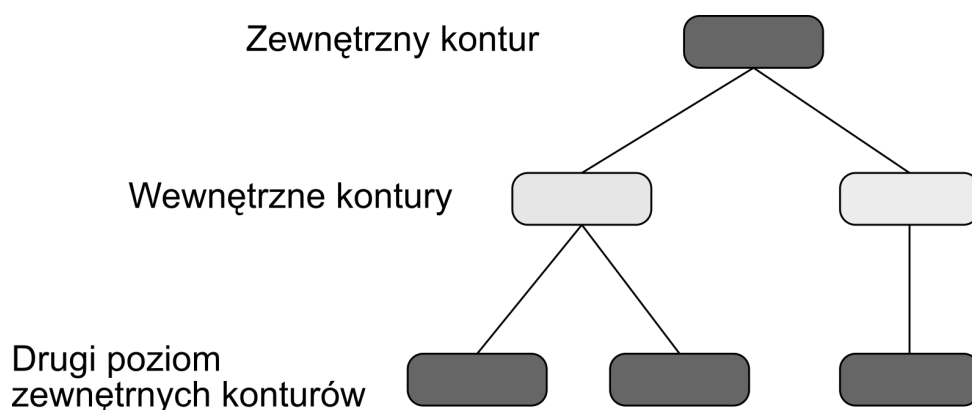


Rysunek 3.6: Przykład obrazu przetworzonego przez algorytm obliczenia entropii: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz. Poziom jasności piksela w skali szarości odpowiada wartości entropii. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

3.1.5 Poszukiwanie konturów

W komputerowej analizie obrazów kontur to zamknięta krzywa przybliżona za pomocą zestawu punktów i łączących te punkty prostych krawędzi.

Po progowaniu/poszukiwaniu krawędzi monochromatyczny obraz jest przetwarzany algorytmami detekcji konturów. Wykorzystywany algorytm tworzy hierarchiczną drzewopodobną strukturę gdzie najbardziej zewnętrzne kontury są na górze, a najbardziej wewnętrzne na dole drzewa (Rysunek 3.7). W taki sposób uzyskujemy możliwość odróżnienia konturu samej komórki od konturów jej wewnętrznych części.



Rysunek 3.7: Hierarchiczna struktura konturów

Odnalezione kontury są przetwarzane algorytmami obróbki konturów. W algorytmie uproszczenia każdy kontur jest podmieniony na uproszczoną jego wersję z zadaną dokładnością. To pomaga przyspieszyć obróbkę konturu w następnych krokach.

W algorytmie filtracji obliczany jest obszar powierzchni każdego konturu. Kontury z obszarem mniejszym od minimalnego albo większym od maksymalnego są odrzucane.

Momenty obrazu oraz centroid obrazu obiektu ograniczonego konturem dają możliwość śledzenia przemieszczania oraz obracania się tego obiektu na większym obrazie.

Obliczenie momentów¹ obrazu to średnia ważona intensywności pikseli obrazu (Równanie 3.10)

$$M_{ij} = \sum_x \sum_y x^i y^j I(x, y) \quad (3.10)$$

gdzie $i, j = 0, 1, 2, \dots, x, y$ – współrzędne, I – wejściowy obraz

Wyznaczenie centroida jest zdefiniowane jako (Równanie 3.11)

$$\mu_{pq} = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})^p (y - \bar{y})^q f(x, y) \quad (3.11)$$

gdzie $\bar{x} = \frac{M_{10}}{M_{00}}, \bar{y} = \frac{M_{01}}{M_{00}}$

Obliczenie dopasowywanej elipsy, w przeciwieństwie do rekonstrukcji elipsy krawędzi (Podrozdział 3.1.3), polega na określeniu matematycznego wzoru elipsy na podstawie punktów, które znajdują się jak najbliżej punktów konturu bez rekonstrukcji brakujących danych. Dopasowywana elipsa jest obliczana w przypadku kiedy kontur ma więcej niż cztery punkty. W innych przypadkach obliczany jest najmniejszy obrócony prostokąt, który mieści w sobie cały kontur. Dopasowywaną elipsę „buduje” się za pomocą metody najmniejszych kwadratów. Metoda ta polega na przybliżaniu rozwiązań nadokreślonych zestawów równań tak, żeby końcowe rozwiązanie minimalizowały sumę kwadratów błędów przy rozwiązywaniu każdego z równań. Obliczane parametry dopasowanej elipsy to:

- Mimośród – miara „odchylenia” danej elipsy od okręgu:

$$E = \sqrt{\frac{h^2 - w^2}{h^2}} \quad (3.12)$$

gdzie E – mimośród, h – szerokość / 2, w – długość / 2

- Iloraz długości i szerokości

$$I = \frac{h}{w} \quad (3.13)$$

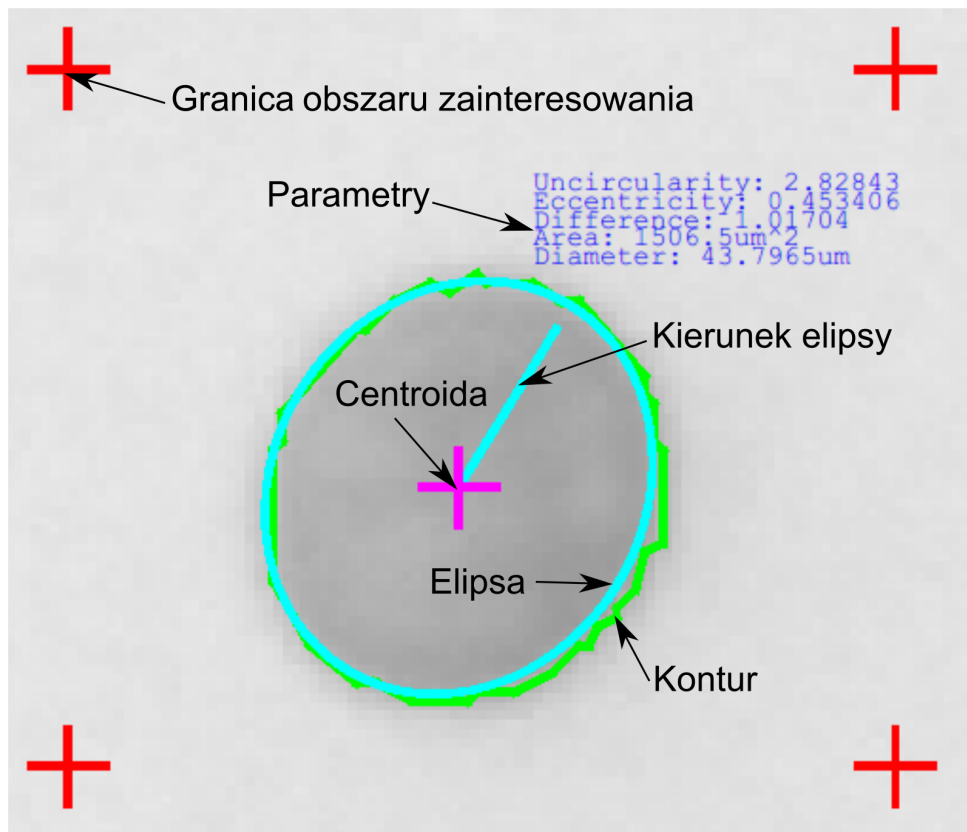
- Średnia różnica odległości konturu od elipsy:

$$S = \frac{1}{N} \sum_{i=0 \dots N} d(f_1, c_i) + d(f_2, c_i) \quad (3.14)$$

gdzie $d(a, b) = \sqrt{(a_x - b_x)^2 + (a_y - b_y)^2}$ – odległość, S – średnia, f_1, f_2 – ogniska elipsy, N – liczba punktów konturu, c_i – i -ty punkt konturu.

Przykład zastosowania opisanych wyżej algorytmów przedstawiono na rysunku 3.8.

¹W przetwarzaniu obrazu, wizji komputerowej i obszarach pokrewnych moment obrazu jest pewną szczególną średnią ważoną (momentem) jasności pikseli obrazu, albo funkcją takich momentów



Rysunek 3.8: Parametry konturów dla pojedynczej komórki drożdży. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

3.1.6 Transformacja Hougha

Transformacja Hougha jest metodą wykrywania regularnych kształtów. Uogólniona metoda pozwala na wykrywanie kształtów dających się opisać analitycznie, w tym np. okręgów.

W dwuwymiarowej przestrzeni okrąg może być opisany wzorem 3.15:

$$(x - a)^2 + (y - b)^2 = r^2 \quad (3.15)$$

gdzie (a, b) – środek okręgu, a r – promień.

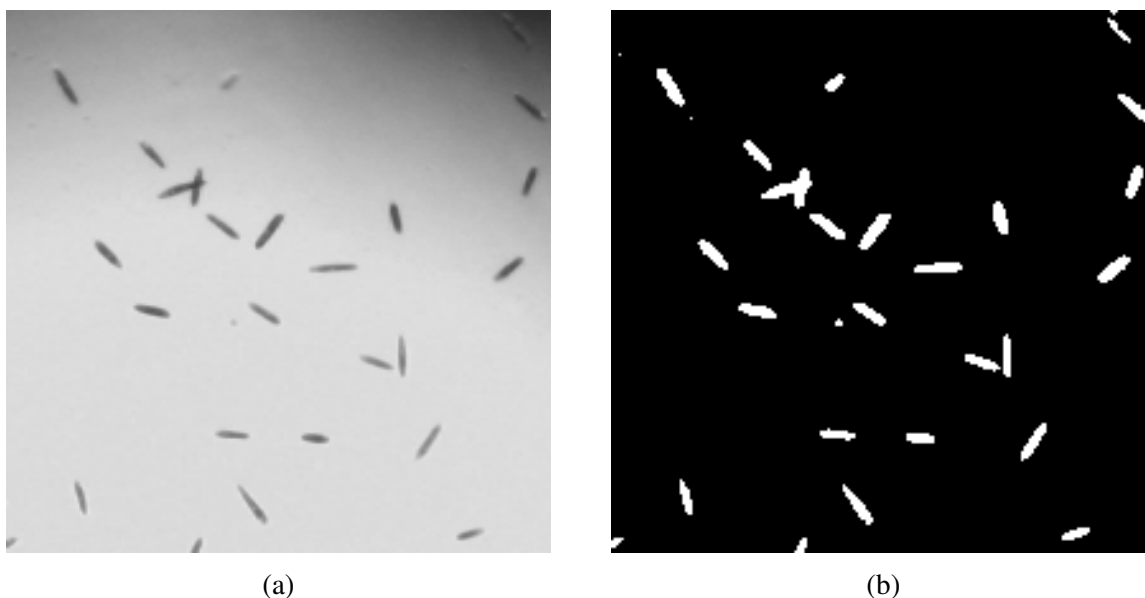
Jeśli położenie punktu (x, y) jest stałe, to parametry mogą być uznane zgodnie z (3.15). Wówczas przestrzeń parametrów będzie trójwymiarową (a, b, r) , a wszystkie parametry, które spełniają (x, y) , będą leżeć na powierzchni odwróconego prostokątnego stożka, którego wierzchołek znajduje się w $(x, y, 0)$. Proces ten można podzielić na dwa etapy. Pierwszy etap to ustalenie promienia, a następnie znalezienie optymalnego środka okręgów w przestrzeni parametrów 2D. Drugi etap to poszukiwanie optymalnego promienia w jednowymiarowej przestrzeni parametrów.

3.1.7 Wyrównywanie jasności tła obrazu

W przypadku nierównomiernej jasności obrazu istnieje możliwość usunięcia niskich częstotliwości obrazu (w tym przypadku obraz jest traktowany jako dwuwymiarowy sygnał) przez filtr dolnoprzepustowy. Jeśli nierównomierność jest jednym gradientem na całej powierzchni obrazu wykorzystuje się dwuwymiarową regresję liniową, która pozwala na generację obrazu gradientu i jego odejmowanie od początkowego obrazu.

W celu optymalizacji i zwiększenia wydajności analizy możliwe jest wykorzystywanie w regresji liniowej nie wszystkich pikseli, a tylko każdego n -tego piksela.

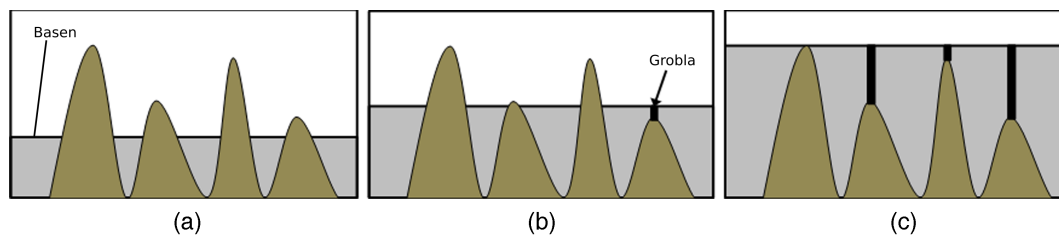
Przykład działania algorytmu wyrównywania jasności tła przedstawiony na rysunku 3.9.



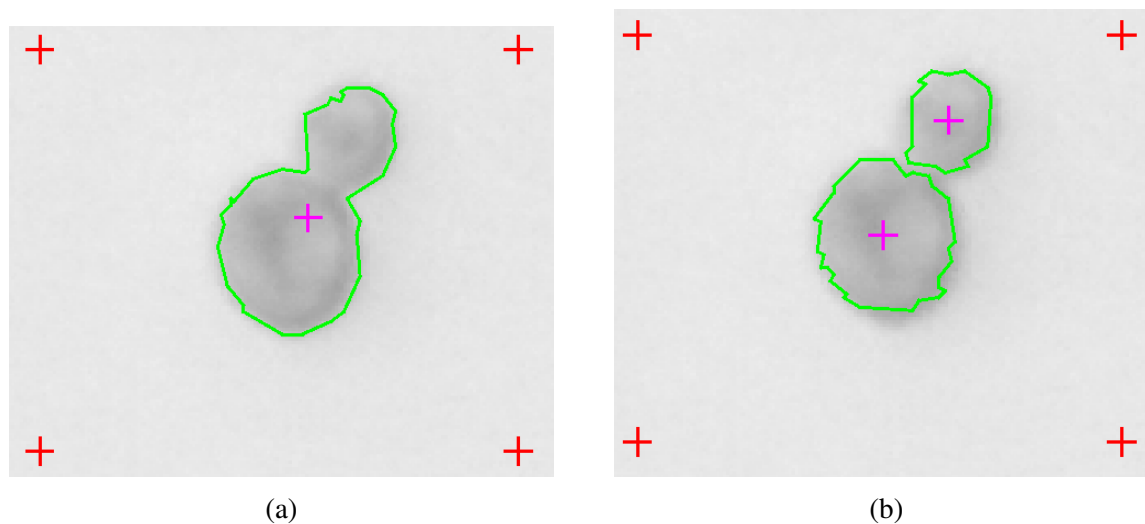
Rysunek 3.9: Przykład działania operacji wyrównywania jasności tła obrazu: (a) wejściowy obraz, (b) odwrócony obraz z usuniętym tłem. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.

3.1.8 Algorytm wododziału

Algorytm wododziału stosowany jest w przypadkach gdy komórki są blisko siebie w grupach, do rozdzielania takich grup. Algorytm bazuje na tym, że każda komórka jest zaznaczona jako dno nowego „basenu”. Kolejny krok to podwyższenie poziomu każdego z „basenów” z tworzeniem „grobli” w miejscach gdzie dwa „baseny” dotykają się (Rysunek 3.10). W taki sposób komórki w grupach są rozdzielone na pojedyncze (Rysunek 3.11).

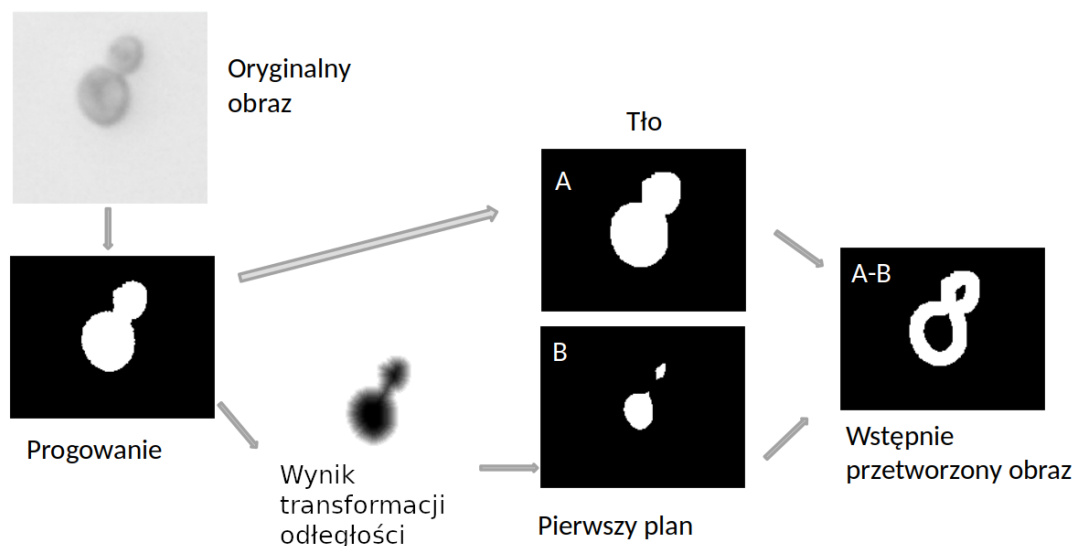


Rysunek 3.10: Zasada działania algorytmu wododziału, przykład jednowymiarowy: (a) początkowy wybór „basenów”, (b) pojawienie się „grobli”, (c) końcowy wynik analizy



Rysunek 3.11: Przykład działania algorytmu wododziału: (a) oryginalny obraz, (b) obraz przetworzony algorytmem wododziału. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

Przed stosowaniem algorytmu wododziału potrzebne jest zaznaczenie każdej pojedynczej komórki. Żeby zautomatyzować takie zaznaczanie stworzony został algorytm wstępnej obróbki obrazu (Rysunek 3.12).



Rysunek 3.12: Schemat działania algorytmu wstępnej obróbki obrazu przed działaniem algorytmu wododziału.

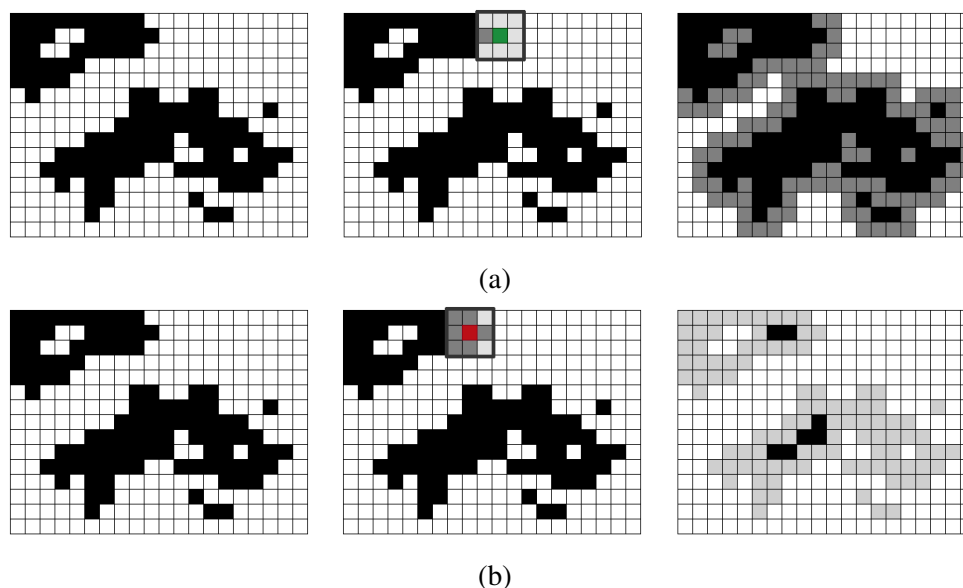
Etapy tego algorytmu są następujące:

1. Progowanie oryginalnego obrazu z wykryciem maksymalnej powierzchni komórek.
 - (a) Za pomocą morfologicznej operacji otwarcia otrzymujemy obszar, który zdecydowanie jest tłem,
 - (b) Za pomocą transformaty odległości otrzymujemy obraz, na którym białe piksele są zabarwione w skali szarości w zależności od tego jak daleko znajdował się najbliższy czarny piksel.
2. Obraz po transformacji odległości jest adaptatywnie progowany dzięki czemu uzyskujemy obszary, które zdecydowanie są komórkami.
3. Odejmując obszar komórek od obszaru tła otrzymujemy białą otoczkę, która będzie podzielona pomiędzy komórkami podczas działania algorytmu wododziału.

Algorytm korzysta z operacji morfologicznych (Rysunek 3.13). Operacje morfologiczne pozwalają przeprowadzić zaawansowaną analizę kształtów poszczególnych obiektów oraz odległości między nimi. Podstawowe operacje morfologiczne to:

- Dylatacja – zastosowanie sumy Minkowskiego do obrazu. Dylatacja przykładu obrócony element strukturalny do każdego piksela na obrazie. Jeżeli choć jeden piksel z sąsiedztwa objętego przez element strukturalny ma wartość równą jeden, punkt centralny również otrzymuje wartość jeden.
- Erozja – zastosowanie różnicy Minkowskiego do obrazu. Erozja jest odwróconą dylatacją.

Otwarcie morfologiczne jest równoważne nałożeniu operacji dylatacji na wynik erozji obrazu pierwotnego [65].

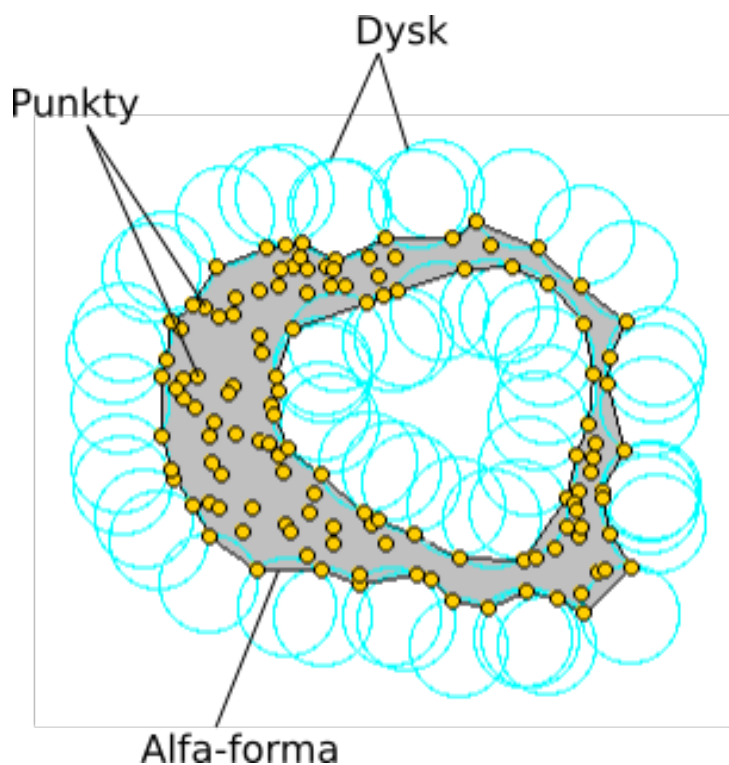


Rysunek 3.13: Przykład działania operacji morfologicznych: (a) dylatacja, (b) erozja. Czarne piksele mają wartość „1”, białe – „0”. Lewa kolumna – wejściowy obraz, środkowa kolumna – obraz z nałożonym elementem strukturalnym (piksel zaznaczony na zielono otrzymuje wartość „1”, na czerwono – odpowiednio „0”), prawa kolumna – wyjściowy obraz (zaznaczone zmienione piksele) Obraz należy do domeny publicznej https://pl.wikipedia.org/wiki/Cyfrowe_przetwarzanie_obraz%C3%B3w_binarnych

3.1.9 Algorytm α -form

Alfa-forma lub α -forma to otoczka obiektu związana z wieloma punktami. Alfa-forma jest streszczeniem pojęcia wypukłości, czyli każda wypukła otoczka jest alfa formą, ale nie każda alfa-forma jest wypukłą otoczką.

Przy analizie obrazów komórek, otoczka komórki może różnić się od tła nie na całym swoim obwodzie. W takim przypadku po poszukiwaniu krawędzi na obrazie powstaje zbiór punktów. Dla odzyskania pełnego kształtu otoczki komórki krawędź α -formy jest rysowana między dwoma punktami zbioru, gdy istnieje dysk o promieniu $1/\alpha$, który nie mieści innych punktów i na granicy którego leżą te dwa punkty (Rysunek 3.14).



Rysunek 3.14: Przykład działania algorytmu α -form

3.1.10 Algorytmy analizy obrazów z układów bezsoczewkowych

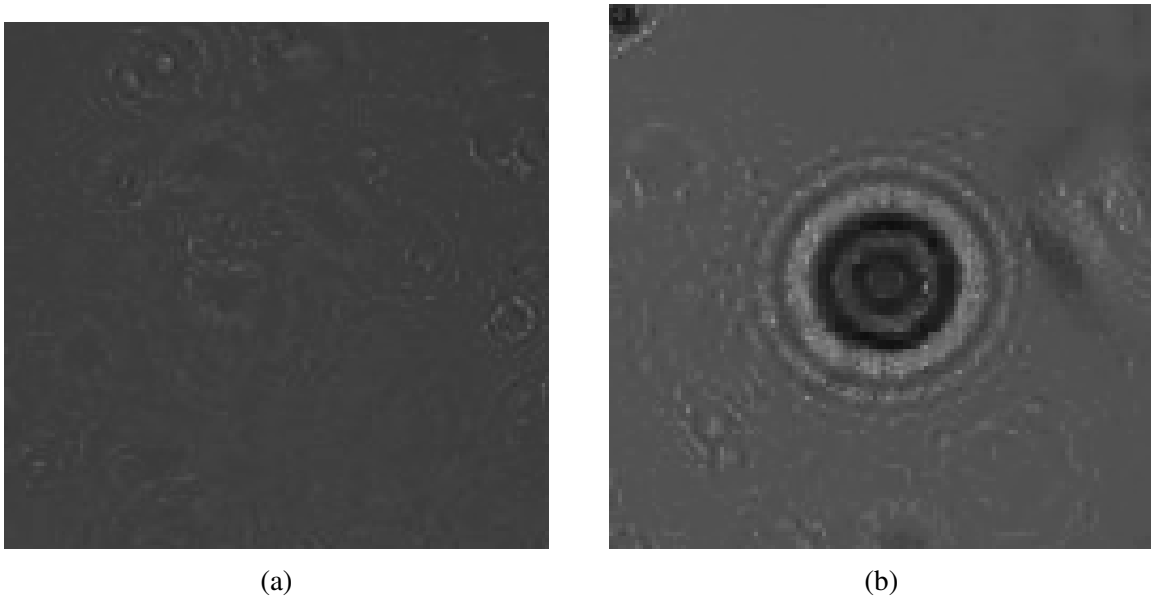
W przypadku badań właściwości komórek w układach bezsoczewkowych obraz komórek, który jest pobierany z matrycy (np. CMOS) jest rodzajem hologramu. Cechą tego hologramu jest to, że przedstawia on trójwymiarową przestrzeń na dwuwymiarowym obrazie. Wadą hologramu jest natomiast to, że dla wykonania analizy obraz z hologramem powinien być przetworzony często w nietrywialny sposób.

Parametry użyteczne do analizy komórek, które można obliczyć bez nietrywialnego przetwarzania holograficznego obrazu to:

1. Stosunek sygnału do szumu (SNR)

$$SNR = |[\max(I) - \mu_b] / \sigma_b| \quad (3.16)$$

gdzie I – intensywność światła na matrycy, μ_b , σ_b – średnia i wariancja zewnętrznego szumowego obszaru.



Rysunek 3.15: Przykładowe obrazy holograficzne: (a) tło, (b) obiekt (SNR dla danego obiektu wynosi 10.38).

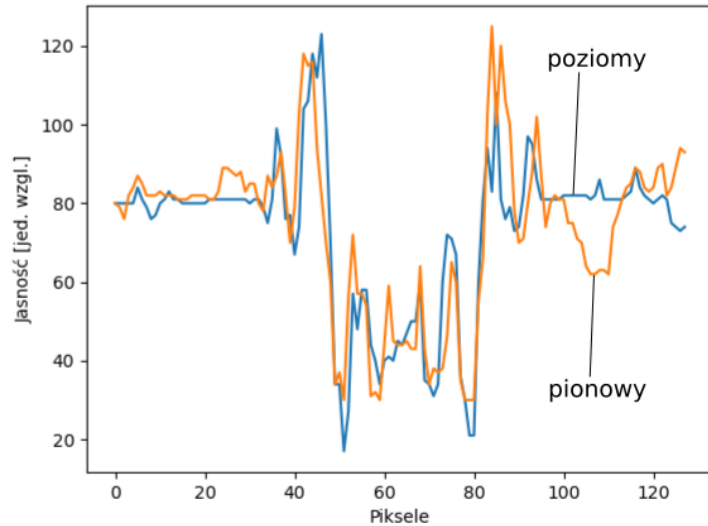
2. Średnica cienia (wstępna wartość średnicy obiektu/komórki)

$$R_{rms} = \left[\sum_{x=1}^w (x - \bar{x})^2 |f(x, y = y_0)|^2 / \sum_{x=1}^w |f(x, y = y_0)|^2 \right]^{1/2} \quad (3.17)$$

gdzie w – maksymalna liczba pikseli w regionie zainteresowania i

$$\bar{x} = \sum_{x=1}^w x |f(x, y = y_0)|^2 / \sum_{x=1}^w |f(x, y = y_0)|^2.$$

Tutaj (x, y) to indeks piksela obrazu, $f(x, y = y_0)$ – wyznaczony profil jasności na linii $y = y_0$ (Rysunek 3.16).



Rysunek 3.16: Poziomy i pionowy przekrój środka hologramu dla obrazu z rysunku 3.15 (b)

3. Współczynnik korelacji (daje możliwość porównywania obiektów komórek na hologramie ze znanymi wartościami z poprzednio badanych komórek)

$$Dev = \sum_{(x,y) \in ROI} |f(x,y) - L(x,y)| \quad (3.18)$$

gdzie $L(x,y)$ – średnia więcej jak 20 przykładowych obrazów. Stąd

$$Corr = 1 - \frac{Dev - Dev_{min}}{Dev_{max} - Dev_{min}} \quad (3.19)$$

gdzie Dev_{max}, Dev_{min} – maksimum i minimum odchylenia $f(x,y)$ obliczonej z obrazów wykorzystanych do obliczenia $L(x,y)$.

Jeśli rekonstrukcja hologramu jest niezbędna do dalszej analizy, to może ona być wykonywana metodą propagacji Kirchhoffa-Fresnela [69] w następujący sposób:

1. wyznaczenie uśrednionego obrazu tła z kilku obrazów tła bez obiektu,

$$B_A = \frac{1}{N} \sum_1^N B_i$$

gdzie B_i – pojedynczy obraz tła, B_A – uśredniony obraz tła

2. odjęcie obrazu tła od wejściowego obrazu,

$$I_s = I - B_A$$

gdzie I – wejściowy obraz (Rysunek 3.17 (a)), I_s – obraz bez tła.

3. transformata Fourie'go

$$T = fft(I_s)$$

gdzie T – wynik transformaty Fourie'go.

4. odwrócona transformata Fourie'go

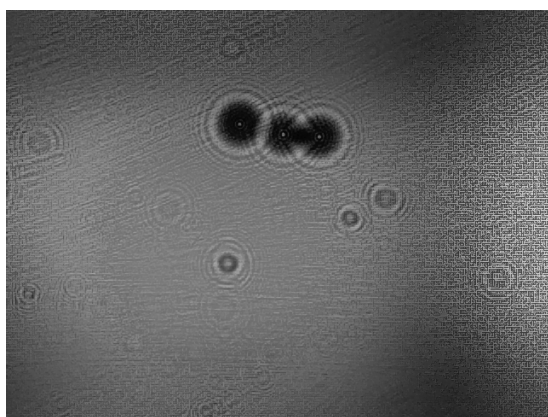
$$R = ifft(T * G)$$

gdzie R – wyjściowy obraz, G – funkcja przejściowa. Funkcja przejściowa jest obliczana zgodnie z wyrazem:

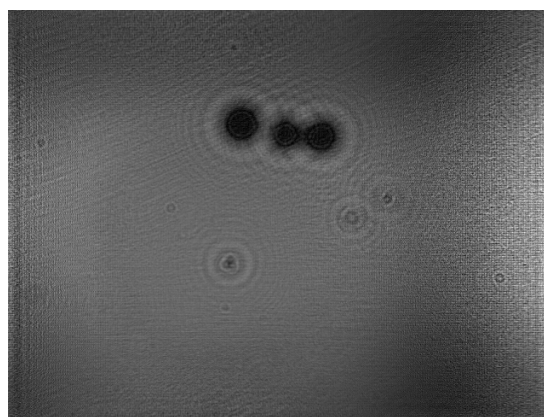
$$G(n, m) = e^{\frac{2\pi id}{\lambda}} \sqrt{1 - \left(\frac{\lambda(n-1)}{N\Delta\xi}\right)^2 - \left(\frac{\lambda(m-1)}{M\Delta\eta}\right)^2}, \quad n = 1..N, m = 1..M$$

gdzie N, M – liczby pikseli obrazu poziomo oraz pionowo, λ – długość fali światła, d – odległość od matrycy do obiektu, $\Delta\xi, \Delta\eta$ – pozioma i pionowa odległości pomiędzy pikselami matrycy.

W rezultacie zastosowanie tej metody otrzymujemy obraz, który jest wynikiem dekonwolucji hologramu wejściowego (Rysunek 3.17 (b)).



(a)



(b)

Rysunek 3.17: Przykład rekonstrukcji obrazu z hologramu: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz po analizie.

3.2 Algorytmy śledzenia

Algorytmy śledzenia przeznaczone są do określenia parametrów przemieszczania się obiektów w odniesieniu do tła na filmach wideo lub zbiorach obrazów. Najczęściej wykorzystywane algorytmy opisano w dalszej części podrozdziału.

3.2.1 Dopasowywanie wzorców

Dopasowywanie wzorców polega na odnalezieniu wybranego mniejszego obrazu (wzorca) na wejściowym większym obrazie. Wybierany jest obszar obrazu z największym podobieństwem do wzorca. Realizacja tego algorytmu wymaga dwóch głównych elementów:

- Oryginalnego obrazu (I): obraz, w którym spodziewamy się znaleźć przypadek z obrazu-wzorca,
- Obrazu wzorca (T): obraz który będzie porównywany z obrazem oryginalnym lub jego częścią.

Celem działania algorytmu jest znalezienie obszaru z najwyższą (minimalną albo maksymalną w zależności od wybranego algorytmu) zgodnością. Wyjściowy obraz R wyznaczany jest jednym z następujących sposobów:

1. Suma różnic kwadratów:

$$R(x, y) = \sum_{x', y'} (T(x', y') - I(x + x', y + y'))^2 \quad (3.20)$$

2. Normowana suma różnic kwadratów:

$$R(x, y) = \frac{\sum_{x', y'} (T(x', y') - I(x + x', y + y'))^2}{\sqrt{\sum_{x', y'} T(x', y')^2 \cdot \sum_{x', y'} I(x + x', y + y')^2}} \quad (3.21)$$

3. Współczynnik korelacji:

$$R(x, y) = \sum_{x', y'} (T(x', y') \cdot I(x + x', y + y')) \quad (3.22)$$

4. Współczynnik kros-korelacji:

$$R(x, y) = \frac{\sum_{x', y'} (T(x', y') \cdot I(x + x', y + y'))}{\sqrt{\sum_{x', y'} T(x', y')^2 \cdot \sum_{x', y'} I(x + x', y + y')^2}} \quad (3.23)$$

$$R(x, y) = \sum_{x', y'} (T'(x', y') \cdot I'(x + x', y + y')) \quad (3.24)$$

gdzie

$$T'(x', y') = T(x', y') - 1/(w \cdot h) \cdot \sum_{x'', y''} T(x'', y'')$$

$$I'(x + x', y + y') = I(x + x', y + y') - 1/(w \cdot h) \cdot \sum_{x'', y''} I(x + x'', y + y'')$$

5. Współczynnik kros-korelacji normowany

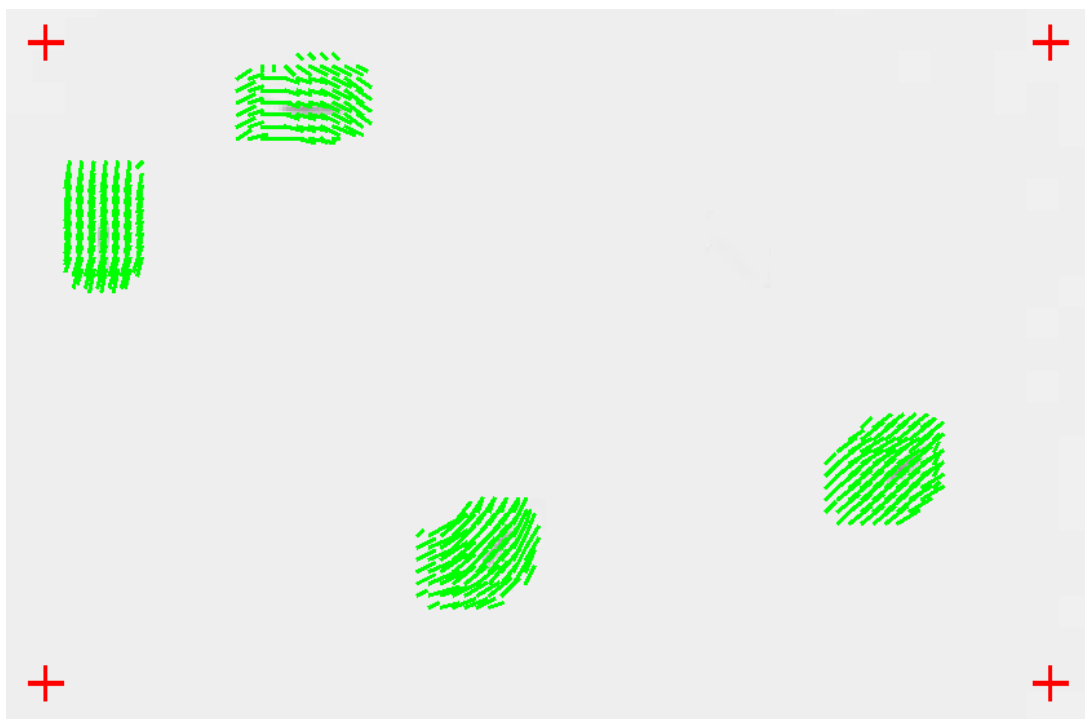
$$R(x,y) = \frac{\sum_{x',y'} (T'(x',y') \cdot I'(x+x',y+y'))}{\sqrt{\sum_{x',y'} T'(x',y')^2 \cdot \sum_{x',y'} I'(x+x',y+y')^2}}, \quad (3.25)$$

gdzie x, y – współrzędne obrazu I , x', y' – współrzędne obrazu T . Punkt, w którym obraz R ma ekstremum i jest tym punktem, w którym znaleziono wzorec.

Dopasowywanie wzorców może być wykorzystane do śledzenia komórek jak i do stabilizacji obrazu z filmów wideo. Przy obserwacji mikroskopowej najmniejszy ruch układu może spowodować znaczne zmiany rejestrowanego obrazu. W takim przypadku wybierana jest pewna część obrazu, która się nie porusza w rzeczywistości. Przemieszczenia tej części na filmie wykorzystywane są jak wyznaczniki odległości, na które trzeba przesunąć obraz w przeciwnym kierunku żeby skompensować drganie kamery albo samego układu mikrofluidycznego.

3.2.2 Przepływ optyczny

Przepływ optyczny to obraz widocznego ruchu obiektów na filmie wideo między dwiema kolejnymi klatkami, spowodowany ruchem obiektu lub kamery (Rysunek 3.18). Jest to dwuwymiarowy wektor pola, gdzie każdy wektor jest wektorem przemieszczenia, pokazujący ruch punktów od pierwszego ujęcia filmu do drugiego i tak dalej.



Rysunek 3.18: Wizualizacja przepływu optycznego dookoła poruszających się komórek. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.

Przepływ optyczny służy do wykrywania i liczenia obiektów, które poruszają z taką prędko-

ścią, że przy danej liczbie klatek na sekundę nie można jednoznacznie wykryć ich obrysu, ale można wykryć ich obecność za pomocą obliczenia zmiany przepływu optycznego. Przykładem takich obiektów są komórki w szybkim przepływie cieczy.

3.2.3 Różnica klatek

Jednym z najprostszych sposobów detekcji ruchu na filmach wideo jest obliczenie różnicy jasności dwóch sąsiednich klatek. W takim przypadku nieruchome tło zostaje takie same i dlatego różnica będzie równa zero. Ruchome obiekty znajdują się w różnych położeniach na różnych klatkach i dlatego na obrazie różnicowym będą „podświetlone” (Rysunek 3.19).

Problemy, które związane są z zastosowaniem metody różnicy klatek mogą wystąpić jeśli:

- obiekt się nie porusza jakiś czas, wówczas znika on z różnicowego obrazu,
- obiekt porusza się wolno to na jego miejscu wynika jego różnica z samym sobą po czym wykrycie poprawnego kształtu obiektu nie jest możliwe.

Również w zależności od kontrastu obiektów i tła różnica będzie mieć dodatnie lub ujemne wartości, co utrudnia proces analizy obrazu różnicowego.



Rysunek 3.19: Obraz różnicowy, widoczne są artefakty (szare obszary) dookoła „wolno” poruszających się obiektów (czarne obszary w czerwonych kołach) oraz artefakty tła (szare prostokąty). Film wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.

3.2.4 Śledzenie wieloparametrowe

Śledzenie wieloparametrowe oprócz położenia komórki uwzględnia także inne parametry, takie jak wymiary komórki, kąt obrotu, wewnętrzna struktura.

Śledzenie komórek polega na wykrywaniu przemieszczenia się komórek pomiędzy klatkami filmów wideo z łączeniem wszystkich punktów, w których była dana pojedyncza komórka w ciągłą ścieżkę ruchu tej komórki.

Głównym problemem śledzenia jest odróżnienie każdej pojedynczej komórki od innych komórek. Problem ten występuje najczęściej w przypadku kiedy liczba komórek jest duża, poruszają się one szybko i znajdują się blisko jedna obok drugiej. Także utrudnieniem analizy może być mała liczba klatek na sekundę co powoduje duże przerwy pomiędzy nawet „wolnymi”² komórkami.

Najprostszy algorytm śledzenia to:

Krok 1. Wykrycie wszystkich komórek w danej klatce,

Krok 2. Dla każdej komórki z poprzedniej klatki wybierana jest najbliższa z komórek na danej klatce razem z tym usuwając ją z listy komórek,

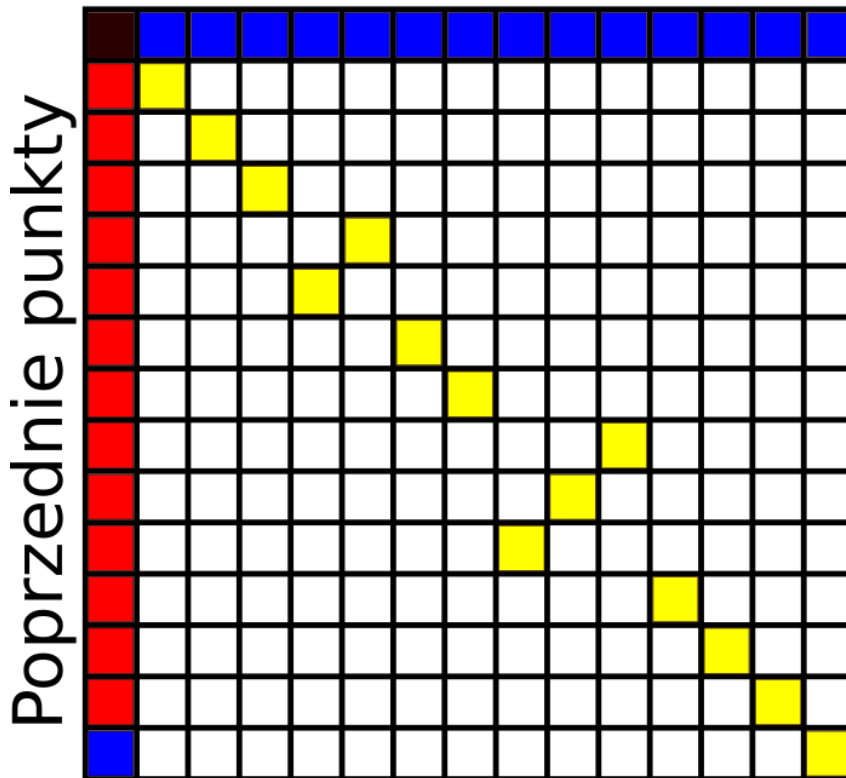
Krok 3. Przejście do kroku 1.

Algorytm ten nie bierze pod uwagę takich zjawisk jak zniknięcie komórki albo pojawienie się nowej komórki. Komórki w urządzeniach LoC mogą „znikać” z obrazu wypływając z pola obiektywu kamery lub poruszając się do i od kamery w przestrzeni trójwymiarowej. Algorytm ten nie uwzględnia przypadku, w którym komórka jest widoczna, ale nie jest wykrywana na 1-2 klatkach filmu.

Żeby uwzględnić wyżej wymienione problemy opracowany został zaawansowany algorytm śledzenia, który bazuje na rozwiązaniu liniowego problemu optymalnego przydziału [20, 35, 37]. Każda komórka z pierwszej klatki filmu jest uznawana jako początkowy punkt ścieżki. Dla każdej klatki oprócz pierwszej jest budowana macierz F (Rysunek 3.20), w której każdej kolumnie odpowiada nowy punkt (wykryta komórka), a każdemu rzędowni już istniejący z poprzednich klatek punkt końcowy każdej ścieżki.

²„wolne” komórki – komórki, które przy poruszaniu się pomiędzy sąsiednimi klatkami filmu nie wychodzą całkowicie za granicę swojego zarysu z poprzedniej klatki

Nowe punkty



Rysunek 3.20: Macierz przetwarzania punktów. Na niebiesko są zaznaczone nowe punkty, na czerwono – poprzednie punkty, na żółto – skrzyżowania kolumny i wiersza, punkty z których powinni być ma jednej ścieżce.

Najpierw pierwsze kolumna i wiersz macierzy wypełniane są maksymalną wartością funkcji odległości. Dla każdego elementu macierzy obliczana jest i zapisywana wartość funkcji odległości pomiędzy punktem z poprzednich klatek, a nowym punktem. Funkcja odległości w ogólnej formie ma postać:

$$f(x,y) = \sqrt{a_1(x_1 - y_1)^2 + a_2(x_2 - y_2)^2 + \dots + a_n(x_n - y_n)^2} \quad (3.26)$$

gdzie x, y – punkty, n – liczba wymiarów przestrzeni parametrów, $a_1 \dots a_n$ – wagi każdego wymiaru.

Jeśli wartość funkcji przekracza maksymalną wartość to do elementu macierzy jest wpisywana liczba 2^{32} .

Kolejny krok to wypełnienie macierzy połączeń G , która będzie wskazywać który punkt jest połączony z którym. Macierz ta ma taki sam rozmiar jak F . Dla każdego i -tego wiersza F oblicza się indeks j , taki że $F(i, j)$ jest najmniejszym elementem wiersza F_i , a elementowi $G(i, j)$ przypisywana jest wartość 1. Jeśli jakiś inny wiersz ma j -ty element jako najmniejszy, to wybiera się następnym najmniejszy element.

Trzeci krok to optymalizacja macierzy G . Dla każdego zerowego elementu $G(i, j)$ dla takich

i, j że $F(i, j) < 2^{32}$ szukane są l, k , dla których $G(i, l) = 1$ i $G(k, j) = 1$. Oblicza się wartość Z z wyrazu:

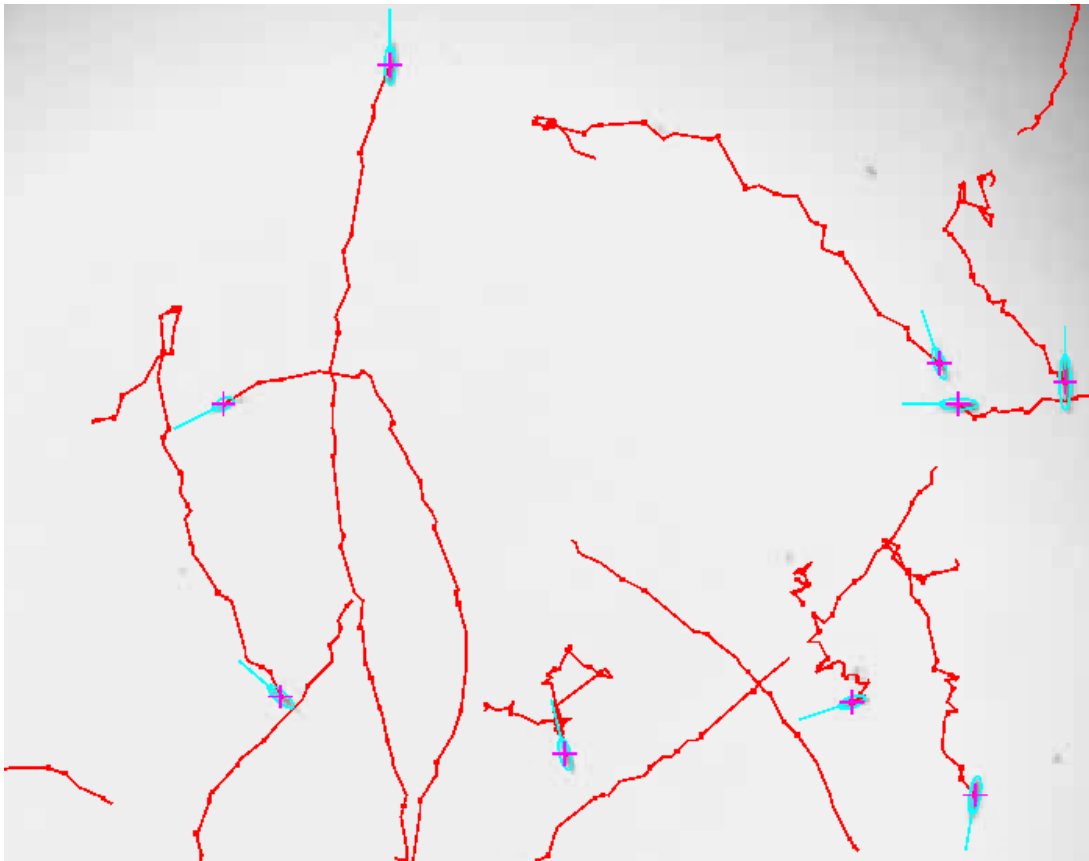
$$Z = F(i, j) - F(i, l) - F(k, j) + F(k, l) \quad (3.27)$$

Jeśli minimalna wartość Z jest mniejsza od zera to wykonywana jest transformata macierzy:

$$G(i, j) = 1, G(i, j) = 0, G(i, j) = 0, G(k, l) = 1 \quad (3.28)$$

Proces optymalizacji jest powtarzany dopóki minimalna wartość Z nie będzie bliska do zera z dokładnością 10^{-15} .

Następny krok to łączenie segmentów ścieżek na podstawie wartości macierzy G . Nowe punkty, które nie trafiły do ścieżek tworzą nowe ścieżki (Rysunek 3.21).

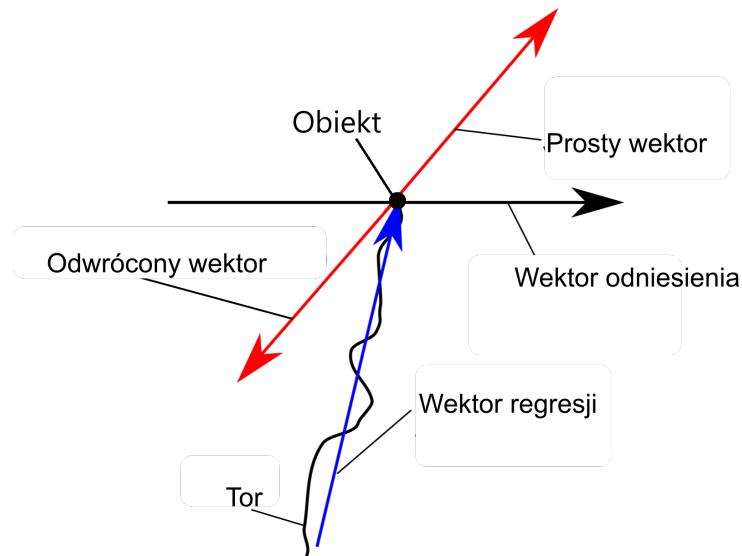


Rysunek 3.21: Przykład działania algorytmu śledzenia, zaznaczone ścieżki komórek, a także centroidy i otaczające elipsy komórek. Film wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Przy poruszaniu się obiektów, szczególnie żywych komórek, ich tory ruchu nie są prostymi i w każdym momencie czasu mogą zmieniać swój kierunek. Aby móc porównywać między sobą kierunki ruchu pojedynczych komórek uzasadnione jest obliczenie uśrednionego kierunku ruchu.

Do obliczenia uśrednionego kierunku ruchu używana jest regresja liniowa metodą najmniejszych kwadratów. Żeby odróżnić prosty wektor od odwróconego wykorzystywany jest wektor

odniesienia $(1, 0)$, który zawsze jest równoległy do osi x i jest skierowany w dodatnim kierunku tej osi. W zależności od kąta między wektorem regresji oraz wektorem odniesienia obliczany jest uśredniony kierunek poruszania się obiektu przybliżony do rzeczywistego (Rysunek 3.22).



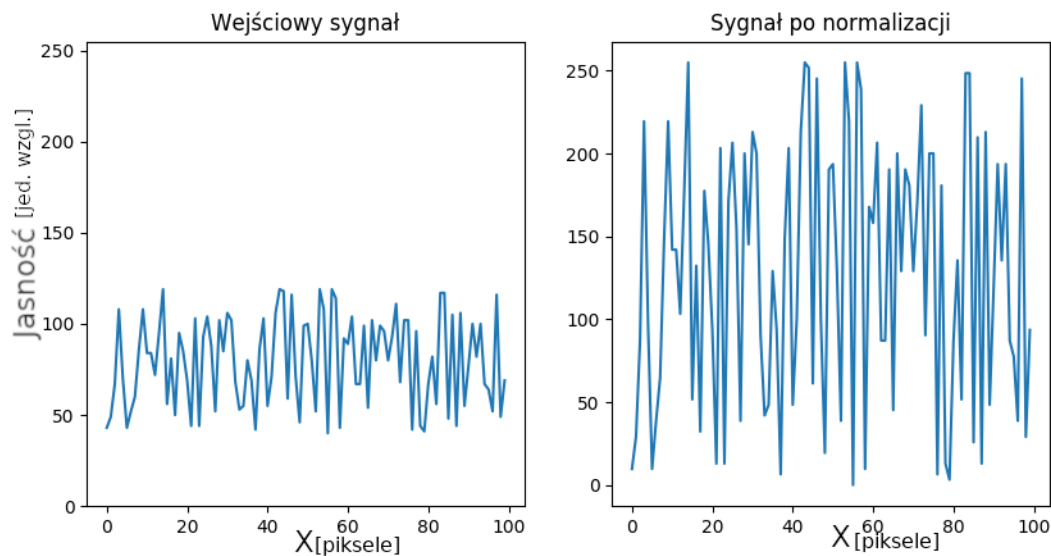
Rysunek 3.22: Schemat wektorów przy wykrywaniu uśrednionego kierunku poruszania się komórki. Wektor regresji (uśredniony) wybudowany na kilku ostatnich punktach ścieżki komórki pomaga wyznaczyć kierunek poruszania się komórki pomiędzy wektorem prostym, a odwróconym.

3.3 Algorytmy wspomagające

3.3.1 Wstępne przygotowanie obrazu

Pierwszy algorytm stosowany do przygotowania obrazów to normalizacja jasności czyli wyrównywanie histogramu obrazu. Normalizacja ta może być używana na całej powierzchni obrazu jak i na jego fragmentach.

Przy normalizacji cały przedział wartości jasności jest mapowany do wartości od 0 do 255 dla 8-bitowych obrazów. Normalizacja zwiększa kontrast obrazu co powoduje polepszenie detekcji zmian jasności (Rysunek 3.23).



Rysunek 3.23: Przykład normalizacji po osi X

Jasność i kontrast są dostrajane za pomocą prostego liniowego filtra. Jeśli obraz jest kolorowy, to najpierw należy przetworzyć go do skali szarości. Istnieje wiele sposobów takiego przetwarzania. Najprostszy z nich to średnia ważona wszystkich kanałów obliczono według wzoru:

$$Y = 0.299 * R + 0.587 * G + 0.114 * B \quad (3.29)$$

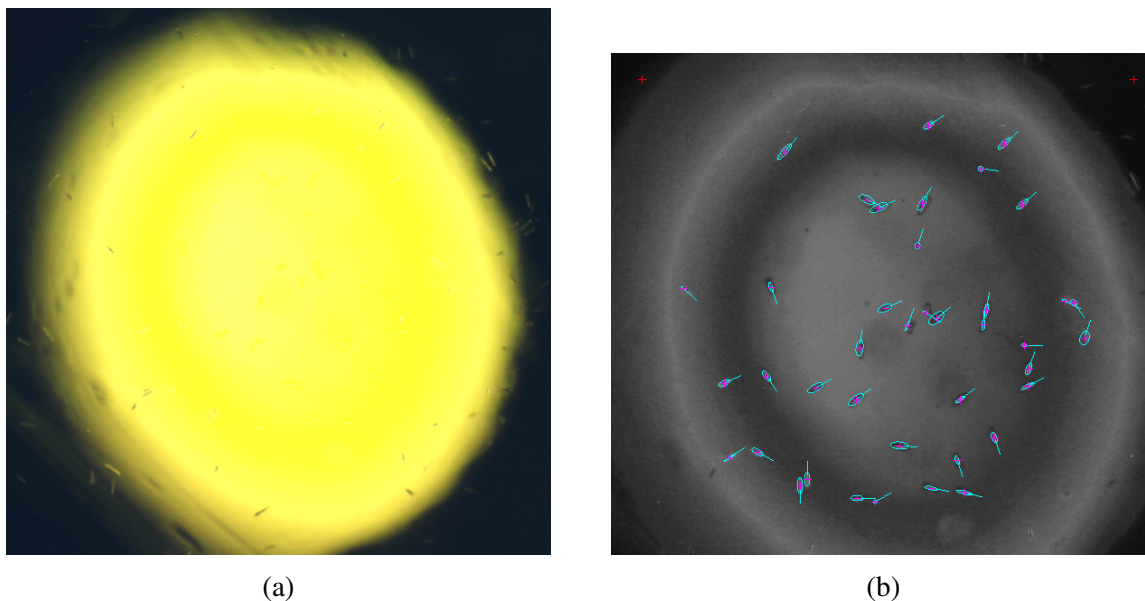
gdzie Y – jasność wyjściowego obrazu w skali szarości, R, G, B – czerwony, zielony i niebieski kanał.

W przypadku nadmiernie jasnego obrazu (Rysunek 3.24a) stosowany jest algorytm minimalnego wyszarzenia (Rysunek 3.24b):

$$Y = \min(R, B, G) \quad (3.30)$$

gdzie \min – operator minimum (3.31), R, G, B – czerwony, zielony i niebieski kanał.

$$\min(R, G, B) = \begin{cases} R & \text{jeśli } R \leq G, R \leq B \\ G & \text{jeśli } G \leq R, G \leq B \\ B & \text{jeśli } B \leq R, B \leq G \end{cases} \quad (3.31)$$



Rysunek 3.24: Przykład działania algorytmu minimalnego wyszarzenia: (a) oryginalny obraz, (b) obraz w skali szarości przetworzony algorytmem minimalnego wyszarzenia [72]

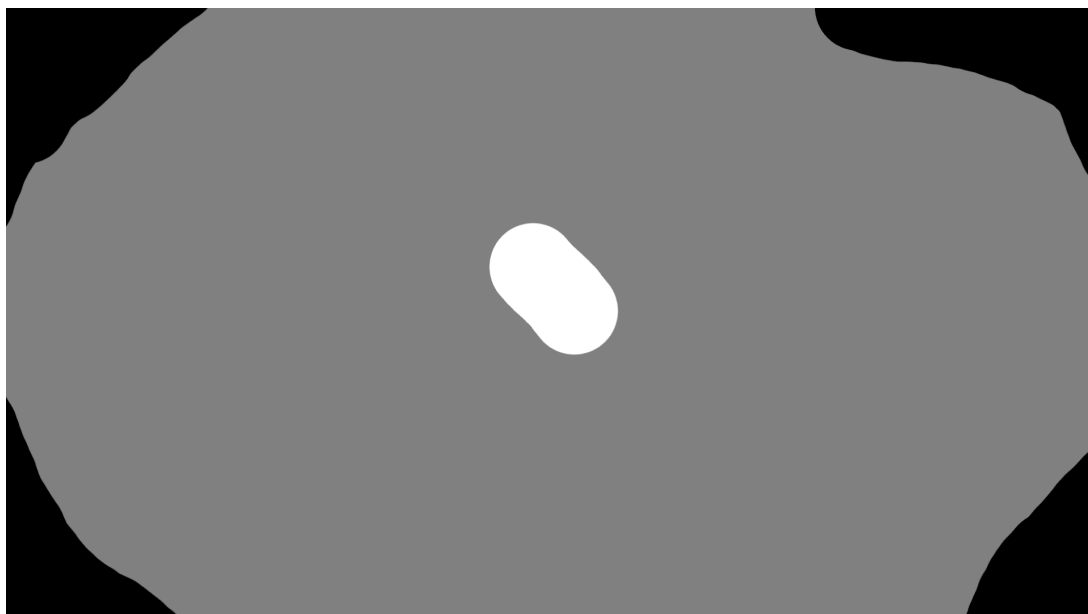
3.3.2 Maskowanie

Przy analizie obrazów z urządzeń LoC na obrazie mogą być obecne różne artefakty, takie jak części samego urządzenia, krawędzie chipa, martwe komórki itp. Żeby uniknąć analizy takich artefaktów wykorzystywane jest maskowanie. Część obrazu, która może zaburzać analizę nie jest przetwarzana niektórymi algorytmami, zaczynając od obróbki konturów. Maskowanie jest realizowane nałożeniem na obraz odpowiedniej maski obrazu, gdzie na czarno są zaznaczone obszary, których nie powinna dotyczyć analiza.

Istnieje również możliwość odwrotnego maskowania. Jeśli z jakichś powodów algorytm nie wykrył komórki, to jest możliwość zaznaczenia tej komórki „ręcznie” za pomocą odwróconej maski, gdzie białe piksele odpowiadają obszarom, które powinny być zaznaczone jako wykryte.

Tworzenie obrazu maski jest możliwe na kilka sposobów. Jeden z nich to stworzenie wypełnionego kolorem wielokąta, który ogranicza analizowany obszar. Innym sposobem jest łączenie okręgów z różnymi średnicami za pomocą ręcznego „pędzla”, którym użytkownik generuje kształt docelowego obszaru. Okręgi składają się w listę i są po kolei rysowane na obrazie wypełnionym wartością 128 w skali szarości. W taki sposób można rozróżnić białe i czarne obszary od neutralnego szarego tła. Obraz maski jest dalej stosowany do celowego obrazu zgodnie z równaniem (3.32) (Rysunek 3.25).

$$R(x,y) = \begin{cases} 255, & \text{jeśli } M(x,y) = 255 \\ 0, & \text{jeśli } M(x,y) = 0 \\ I(x,y), & \text{inaczej} \end{cases} \quad (3.32)$$



Rysunek 3.25: Przykład obrazu maski. Na czarno zaznaczono piksele, które nie będą brać udział w wykrywaniu konturów, na biało zaznaczono te piksele, które na pewno będą częścią konturu, szare piksele to te, które zostają niezaznaczone i będą analizowane algorytmem wykrywania konturów.

3.4 Podsumowanie

W niniejszym rozdziale skrótowo przedstawiono wybrane przez autora algorytmy przetwarzania obrazów, które mogą być użyte do analizy obrazów żywych komórek w lab-chipach i wyznaczenia wybranych wartości parametrów tych komórek. Algorytmy te i ich funkcje zebrano w tabeli 3.1.

Wszystkie te algorytmy połączone w różnych kombinacjach będą elementami opracowanego przez autora narzędziem do przetwarzania i analizy obrazów komórek.

Tabela 3.1: Zestawienie algorytmów stosowanych do analizy obrazów w lab-chipach

Nazwa algorytmu	Funkcja algorytmu
<i>Algorytmy detekcji</i>	
Progowanie	Poszukiwanie pikseli o jasności z danego zakresu wartości
Filtrowanie	Przepuszczanie obrazu przez filtr przestrzenny, tak aby wzmocnić lub osłabić niektóre elementy tego obrazu
Poszukiwanie konturów	Odnalezienie zamkniętych obszarów na obrazie
Detekcja krawędzi	Odnalezienie krawędzi na obrazie
Filtracja krawędzi	Odzyskanie tylko krawędzi z pewnymi właściwościami
Obliczenie entropii	Wykrywanie na obrazie obszarów z różną entropią
Transformacja Hougha	Wykrywanie okrągłych obiektów na obrazach
Odejmovanie tła	Rozdzielenie obrazu na tło i przedni plan z obiektami
Algorytm wododiała	Rozdzielenie połączonych obiektów
Sieci neuronowe	Odnalezienie krawędzi na obrazie
Algorytm alfa-form	Odnalezienie konturów w zbiorach punktów
<i>Algorytmy śledzenia</i>	
Przepływ optyczny	Odnalezienie poruszających się obiektów pomiędzy klatkami
Dopasowywanie wzorców	Poszukiwanie wzorców na obrazach
Różnicowanie klatek	Obliczenie różnicy pomiędzy klatkami
Śledzenie wieloparametryczne	Śledzenie obiektów poruszających się
<i>Algorytmy wspomagające</i>	
Wstępne przygotowanie	Ustawienie jasności oraz kontrastu, normalizacja, wyszarzenie
Maskowanie	Wykluczenie albo domyślnie wkluczenie części obrazu do wykrytych obiektów

W programowej realizacji opisanych powyżej algorytmów obraz jest przedstawiony jednolitą tablicą w pamięci komputera, co zwiększa prędkość przetwarzania obrazu na nowoczesnych procesorach oraz kartach graficznych. Dostęp do pojedynczych pikseli odbywa się przez offset w tej tablicy. Operację nad obrazem są wykonywane najczęściej za pomocą bibliotek algebry liniowej zgodnych z interfejsem BLAS, które mogą być wykorzystane w wielu językach programowania.

Rozdział 4

Analiza obrazowa w lab-chipach

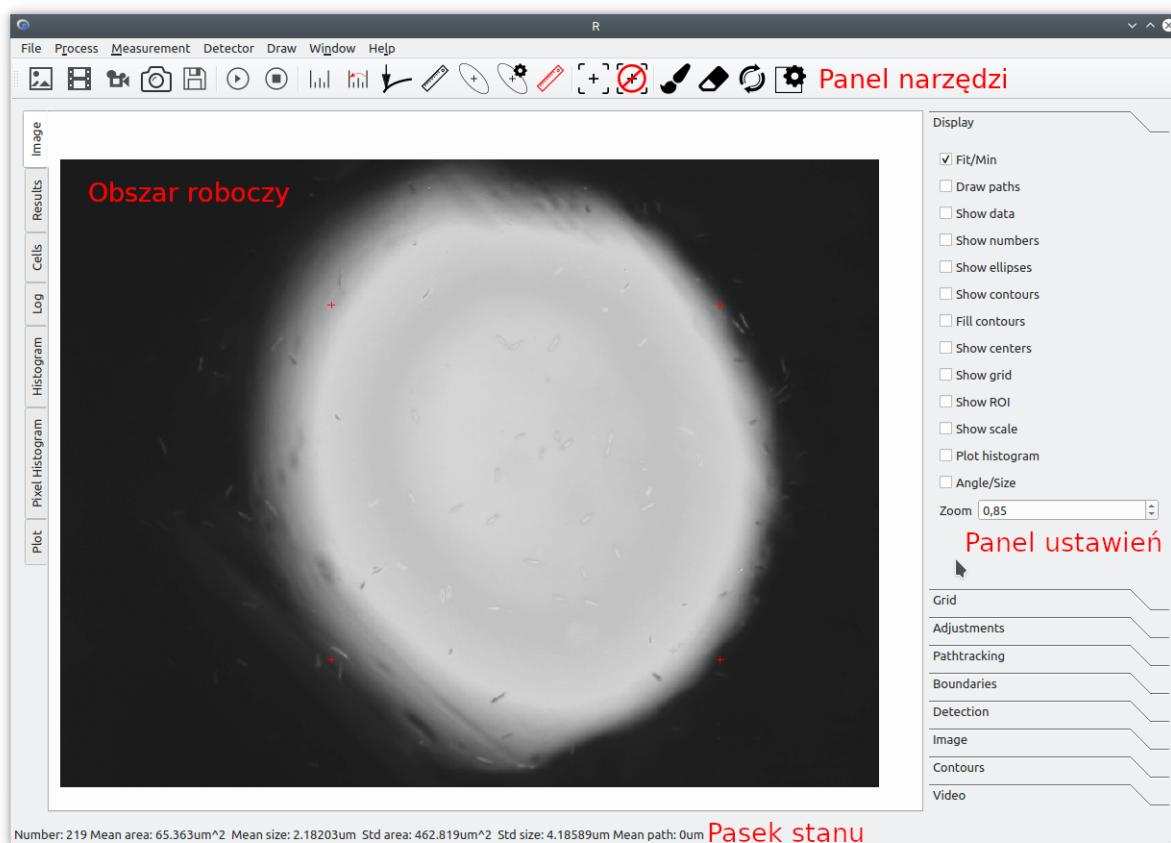
W rozdziale tym opisano wyniki prac własnych związanych z opracowanym autorskim oprogramowaniem oraz analizą obrazów komórek, znajdujących się w LOC, za pomocą tego oprogramowania.

4.1 Oprogramowanie

W ramach prac własnych opracowane autorskie oprogramowanie użytkowe do analizy obrazowej komórek wykorzystujące opisane wcześniej algorytmy. Oprogramowanie wykonano z wykorzystaniem języka programowania C++ oraz bibliotek programowych Qt (interfejs użytkownika), OpenCV (podstawowa obróbka obrazów), CGAL (przekształcenie geometrii) oraz Eigen (algorytmy algebry liniowej). Oprogramowanie posiada graficzny interfejs użytkownika i może być uruchamiane w systemach operacyjnych Windows oraz Linux.

Oprogramowanie wspiera formaty obrazów JPG, PNG, BMP oraz formaty filmów AVI i MP4. Możliwe jest również nagrywanie filmów wideo w formacie AVI ze standardowych kamer wspieranych przez systemy operacyjne Windows oraz Linux. Dla badania wolnych procesów możliwe jest nagrywanie filmu poklatkowego z ustawieniem interwału czasu pomiędzy pojedynczymi klatkami.

Przykładowy wygląd graficznego interfejsu użytkownika (GUI) jest zaprezentowany na rysunku 4.1.



Rysunek 4.1: Graficzny interfejs użytkownika

GUI składa się z:

- Obszaru roboczego – pole, w którym pokazywany jest obraz i wyniki działania algorytmów detekcji i śledzenia, w tym:
 - Karta „Image” – podgląd obrazu, dane o komórkach na obrazie, kontury komórek, ich centroidy, dopasowywane elipsy oraz pomiarowe kształty,
 - Karta „Results” – informacje o wykrytych komórkach w postaci tabeli,
 - Karta „Cells” – informacje o wymiarach komórek w trybie manualnym,
 - Karta „Log” – rejestr zdarzeń programu oraz wyniki obliczeń,
 - Karty „Histogram” oraz „Pixel Histogram” – graficznie statystyki wykrytych komórek,
 - Karta „Plot” – wykresy.
- Dolnego paska stanu – statystyki analizowanych komórek (liczba, średni obszar powierzchni, średnia średnica, odchylenie standardowe),
- Panelu narzędzi – panel z zestawem narzędzi (Rysunek 4.2) dla użytkownika (od lewej do prawej): otwieranie obrazu, otwieranie wideo, nagrywanie wideo z kamery, zapisywanie obrazu z filmu wideo, zapisywanie wyników, uruchomienie obróbki albo nagrywania

filmu, zatrzymywanie obróbki albo nagrywania filmu, ustawienie skali obrazu, resetowanie skali obrazu do 1, ustawienie parametrów, linijka pomiarowa, elipsa pomiarowa, dostrojenie elipsy pomiarowej, dostrojenie skali obrazu, zaznaczenie obrazu szablonu, resetowanie wszystkich obrazów szablonu, rysowanie maski, usuwanie maski, resetowanie maski, dostrojenie prostokąta ROI.

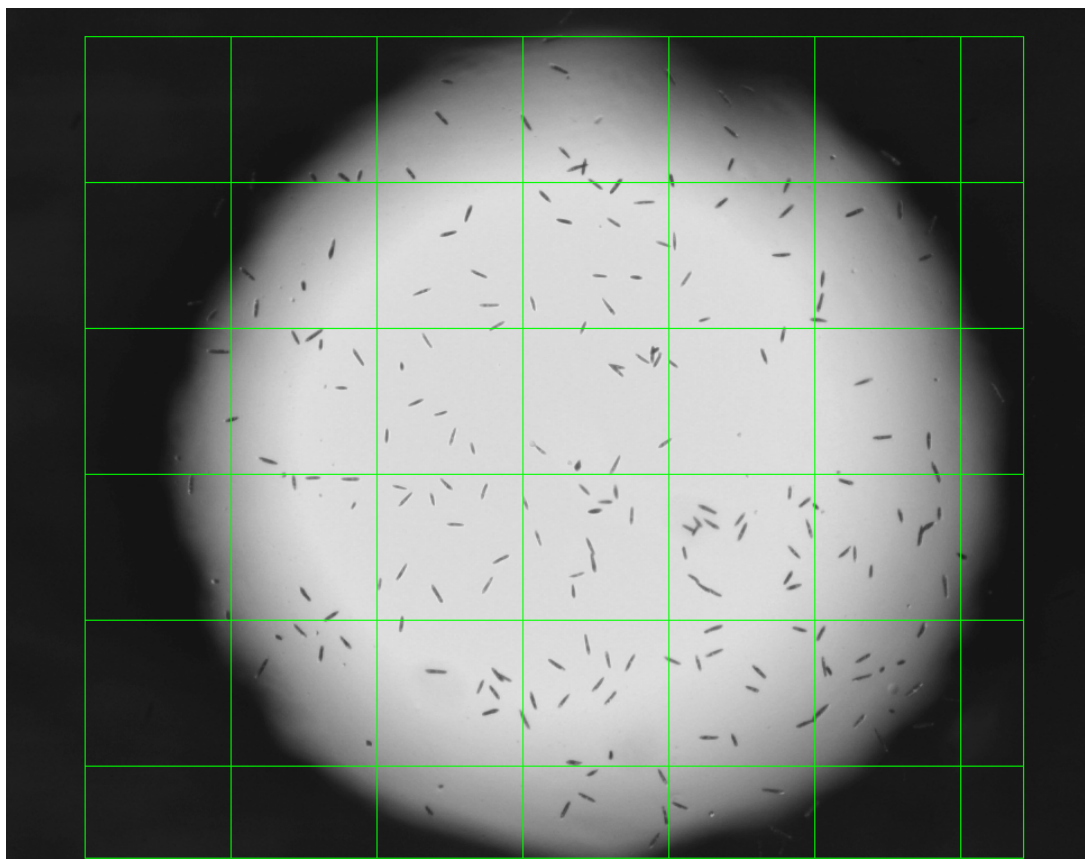


Rysunek 4.2: Widok panelu narzędzi

- Panel ustawień – panel, składający się z kart z ustawieniami podzielonymi po tematach których dotyczą, w tym:
 - Display – ustawienia wyświetlania karty „image”. Dotyczy to wyświetlania konturów, elips, centroid, ścieżek, informacji o komórkach, współczynnika skali, przepływu optycznego oraz parametrów histogramu.
 - Grid – ustawienia wymiarów siatki, liczby rzędów oraz kolumn w siatce.
 - Adjustments – ustawienia dostosowywania obrazu (jasność, kontrast, sposoby przetwarzania do skali szarości, liniowego wyrównywania jasności tła)
 - Pathtracking – ustawienia parametrów algorytmu wieloparametrycznego śledzenia komórek.
 - Boundaries – ustawienia pozycji oraz wymiarów ROI w pikselach oraz mikrometrach. Ustawienie parametru minimalnej odległości od granicy ROI.
 - Detection – ustawienia algorytmu wykrywania oraz wielokrotnego wykrywania. Możliwy jest wybór trzech różnych poziomów wykrywania. Na każdym poziomie jest możliwość całkowitego wyłączenia wykrywania (np. w przypadku pomiaru manualnego). Kontrolka bieżącego poziomu wykrywania ustawia dla którego poziomu są podłączone ustawienia z karty „Image”.
 - Image – ustawienia parametrów konkretnego algorytmu wykrywania. Ustawienia normalizacji, inwersji, progowania, algorytmu α -form.
 - Contours – ustawienia filtracji i uproszczenia konturów, wymiarów „pędzla” do maskowania.
 - Video – ustawienia obróbki filmów wideo, przepływu optycznego i dopasowywania wzorców.

Użytkownik programu może zaznaczyć region zainteresowania (ROI) za pomocą myszy albo ustawień w odpowiedniej karcie. Obszar ten można zmienić w każdym momencie działania programu. ROI może być przemieszczane bez zmiany jego wymiarów jeśli jest potrzebna

analiza obszarów o jednakowych wymiarach. Istnieje możliwość zaznaczenia parametru minimalnej odległości. Jeśli wykryta komórka znajduje się na granicy ROI albo umieszczona jest od granicy ROI w odległości mniejszej od parametru progowego odległości, ustawionego przez użytkownika, to taka komórka zostanie odrzucona. ROI także może być zaznaczony jako siatka (Rysunek 4.3) n na m elementów z możliwością obliczenia liczby komórek w każdym elemencie siatki. Wymiary każdego elementu siatki są wprowadzane w mikrometrach.



Rysunek 4.3: ROI w formie siatki 7 na 6 elementów. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Typowy proces obsługi programu składa się z następujących kroków:

1. Otwieranie pliku obrazu, filmu albo urządzenia nagrywania wideo. Program pamięta nazwy plików otwieranych poprzednio.
2. Ustawienie skali obrazu. Skala nie zmienia się przy otwieraniu następnego obrazu, jest możliwe użycie obrazu szablonu z linijką o znanych wymiarach.
3. Zaznaczenie regionu zainteresowania, początkowe ustawienie parametrów obróbki obrazu. Program zapisuje ustawione parametry pomiędzy uruchomieniami. Także ustawienia parametrów pomiarów mogą być zapisane i odczytane przez użytkownika do/z pliku w tekstowym formacie INI.

4. Dopasowywanie parametrów obróbki obrazu, maskowanie. Program posiada możliwość dodawania, odejmowania oraz resetowania maski.
5. Pomiar i zapisywanie parametrów wykrytych komórek. Wykryte komórki oraz obliczone parametry tych komórek zestawione są w formie tabeli (Rysunek 4.4).

ID	Center x	Center y	Contour area	Diameter	Width	Length	Ellipse area	Eccentricity
0	489	638	56.5	7.74597	3	20	47.1239	0.988686
1	458	631	45	8	4	16	50.2655	0.968246
2	523	621	47	8	4	16	50.2655	0.968246
3	497	621	40	6.9282	3	16	37.6991	0.982265
4	565	618	46	8	4	16	50.2655	0.968246
5	462	614	43.5	6.7082	3	15	35.3429	0.979796
6	449	609	32	6.48074	3	14	32.9867	0.976771
7	554	606	50.5	8	4	16	50.2655	0.968246
8	410	595	51.5	8.7178	4	19	59.6903	0.977588
9	467	599	79.5	11.8322	7	20	109.956	0.93675
10	517	589	50.5	8	4	16	50.2655	0.968246
11	620	585	42	6.9282	3	16	37.6991	0.982265
12	582	587	47	7.14143	3	17	40.0553	0.984306
13	563	584	33.5	6.7082	3	15	35.3429	0.979796
14	308	579	35.5	6.48074	3	14	32.9867	0.976771
15	330	570	44.5	7.48331	4	14	43.9823	0.958315
16	545	571	43.5	7.93725	3	21	49.4801	0.989743
17	379	553	37.5	7.48331	4	14	43.9823	0.958315

Rysunek 4.4: Przykładowy rezultat wykrywania komórek w formie tabeli

Program umożliwia „ręczny” pomiar parametrów komórki jeśli automatyczny pomiar z jakiegoś powodu nie jest możliwy. Są dwa rodzaje „ręcznego” pomiaru: liniowy i pomiar za pomocą elipsy. Wynikiem liniowego pomiaru jest odległość pomiędzy dwoma punktami w ustawionej przez użytkownika skali. W przypadku pomiaru elipsą wyznaczana jest szerokość i wysokość elipsy, a także jej pole powierzchni. Elipsa pomiarowa może być skalowana w dwóch kierunkach, przemieszczana oraz obracana. Pomiar elipsą umożliwia także półautomatyczne zapisywanie wyników pomiaru do tabeli, która później może być wyeksportowana do pliku w formacie CSV.

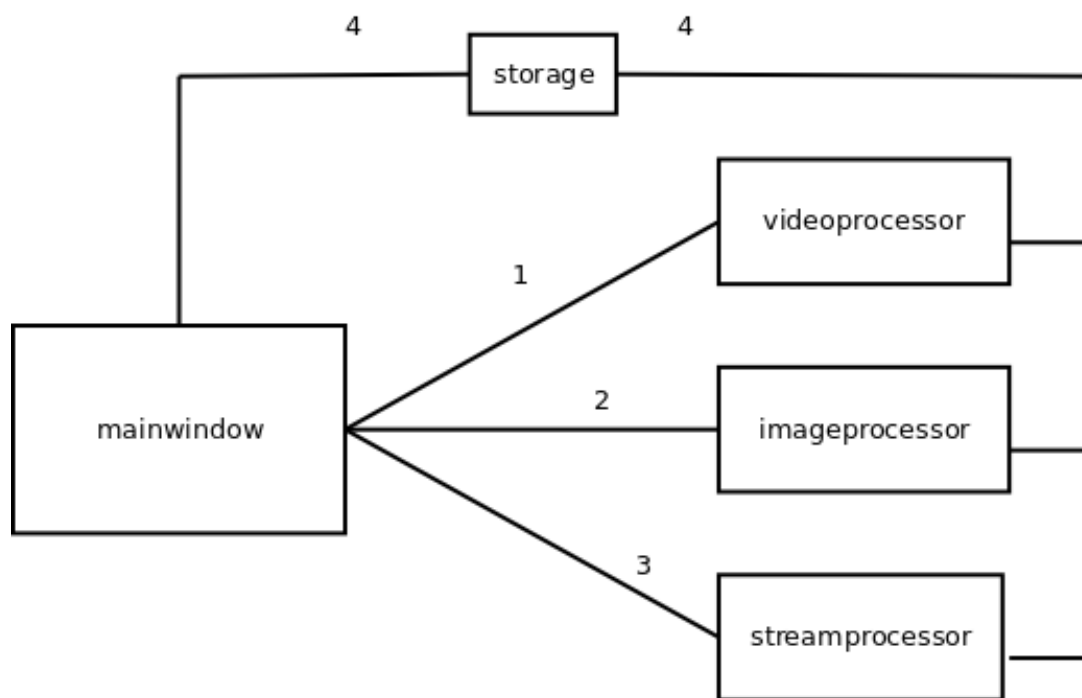
Śledzenie wzorców jest przystosowane do jednoczesnego śledzenia nieograniczonej liczby tych wzorców, które mogą być pobrane jak bezpośrednio z obrazu tak i z poprzednio przygotowanych próbek. Wyniki śledzenia są eksportowane do pliku w formacie CSV.

4.2 Struktura oprogramowania

Na rysunku 4.5 przedstawiono wewnętrzną strukturę oprogramowania. Moduł mainwindow jest odpowiedzialny za rysowanie graficznego interfejsu, a także sterowanie innych modułów odpowiednio do ustawień użytkownika. Łączy wszystkie inne moduły za pomocą systemu

„signal-slot” biblioteki Qt. Moduł `imagearea` odpowiedzialny jest za wyświetlenie obrazu. Moduł `imageprocessor` przetwarza obrazy i rozpoznaje komórki. Moduł `streamprocessor` przetwarza strumień klatek z kamery korzystając z modułu `imageprocessor`. Moduł `videoprocessor` przetwarza filmy wideo korzystając z modułu `imageprocessor`. Zawiera w sobie algorytmy, które potrzebują wiele klatek do obliczeń. Moduł `storage` zawiera wszystkie zmienne dane i zabezpiecza synchronizację tych danych podczas wielowątkowego działania programu.

Moduły `streamprocessor` oraz `videoprocessor` realizowane się w osobnych wątkach i wysyłają dane dotyczące analizy każdej pojedynczej klatki do modułów `storage` oraz `mainwindow`.



Rysunek 4.5: Wewnętrzna struktura oprogramowania: 1 – wywoływanie przetwarzania wideo, 2 – wywoływanie przetwarzania obrazów, 3 – wywoływanie przetwarzania strumienia klatek, 4 – zapisywanie i odczytywanie danych.

4.2.1 Algorytm działania oprogramowania

Do przetwarzania pojedynczych obrazów oraz filmów wideo stosowano różne zestawy algorytmów opisanych wcześniej i zestawionych w strukturze opracowanego programu.

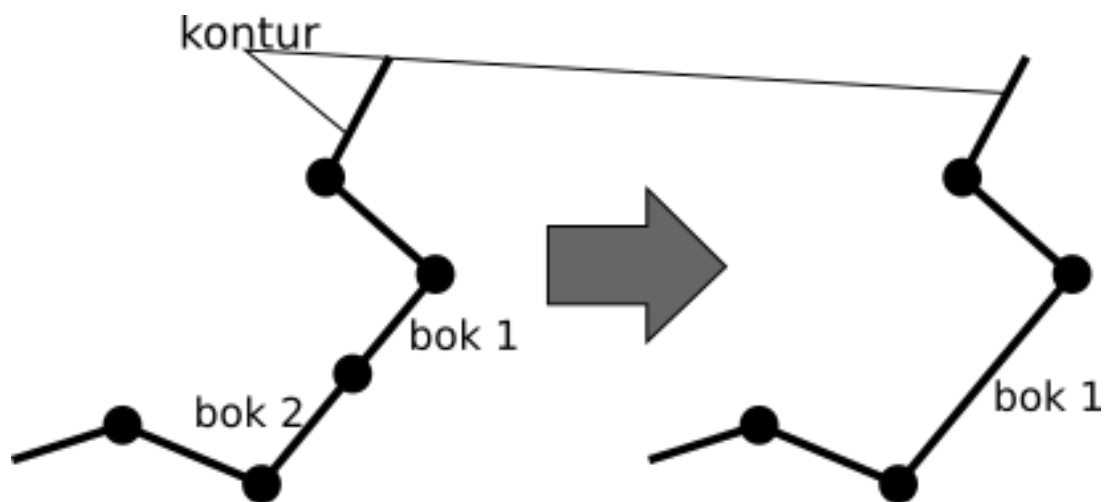
Przetwarzanie pojedynczego obrazu

Pierwszy krok analizy obrazu to przetwarzanie wstępne. Obraz jest konwertowany do skali szarości w jeden z dostępnych sposobów, normalizowany, oraz ustawiane są kontrast i jasność obrazu. Na tym etapie obraz jest kadrowany do wymiarów regionu zainteresowania. Możliwe jest również zastosowanie algorytmów filtracji (naprowadzany filtr, dwustronne filtrowanie, filtr Kuwahara).

Następny etap to oddzielenie komórek na obrazie od reszty obrazu. Program wykorzystuje 11 algorytmów wykrywania komórek: pojedyncze progowanie, wielokrotne progowanie, adaptatywne progowanie, odejmowanie tła, LoG, DoG, detekcja krawędzi filtrami przestrzennymi, detekcja krawędzi sieciami neuronowymi. Algorytmy mogą być zmodyfikowane dodaniem dodatkowych kroków, takich jak α -formy czy algorytm wododziału. Sieć neuronowa, która jest wykorzystywana do wykrywania krawędzi składa się z 5 konwolucyjnych warstw i korzysta z poprzednio wytrenowanego zbioru danych w formacie „Caffe”¹.

Po działaniu tych algorytmów wyjściowy obraz może nie składać się wyłącznie z wartości pikseli 0 (czarny) lub 255 (biały). W takim przypadku stosowane jest dodatkowe progowanie. Po tym etapie odbywa się proces maskowania.

Kolejny etap to poszukiwanie konturów komórek. Następnie kontury są filtrowane oraz upraszczane są boki konturu. Boki, które są pod małym kątem jeden względem drugiego są łączone co zwiększa szybkość obliczeń (Rysunek 4.6).

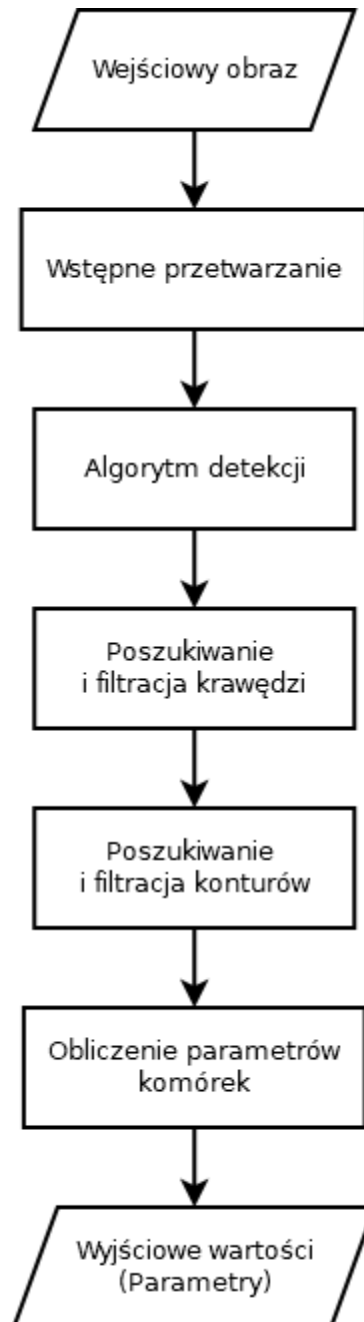


Rysunek 4.6: Eliminacja nadmiarowych boków konturu

Wykryte kontury podawane są na wejście algorytmu przetwarzania konturów. Obliczane są: obszar powierzchni konturu, jego wymiary, momenty, centroida. Wyznaczone parametry są eksportowane do GUI.

Schemat kolejności sterowania algorytmów przedstawiono na rysunku 4.7.

¹Caffe to biblioteka do deep learning, rozwijana przez Berkeley AI Research (BAIR) i przez współpracowników społeczności. Caffe jest wydawany na licencji BSD 2.



Rysunek 4.7: Schemat blokowy działania oprogramowania w przypadku pojedynczego obrazu

Przetwarzanie filmu wideo

Przy przetwarzaniu filmu wideo lub sekwencji obrazów z kamery każda osobna klatka jest przetwarzana zgodnie z algorytmem przetwarzania pojedynczego obrazu.

Niektóre algorytmy stosowane są do kilku klatek jednocześnie lub do wyników przetwarzania tych klatek. Takie algorytmy to: śledzenie wieloparametryczne, różnicowanie klatek, wykrywanie wzorców oraz pomiar przepływu optycznego.

Dane pozyskane z przetwarzania klatek, takie jak ścieżki komórek, są zbierane razem do następnej analizy i przygotowane do eksportowania.

4.2.2 Podsumowanie

W ramach pracy własnej zaprojektowano i wykonano oprogramowanie autorskie przeznaczone do wieloparametrycznej charakteryzacji komórek w układach mikrofluidycznych. Oprogramowanie posiada graficzny interfejs użytkownika i zawiera w sobie realizacje algorytmów opisanych w rozdziale trzecim. Weryfikacja działania oprogramowania nastąpiła w wyniku przeprowadzenia szeregu analiz obrazów pozyskanych podczas eksperymentów wykorzystujących lab-chipy i układy mikroskopowe „tradycyjne” i bezsoczewkowe.

4.3 Analiza komórek

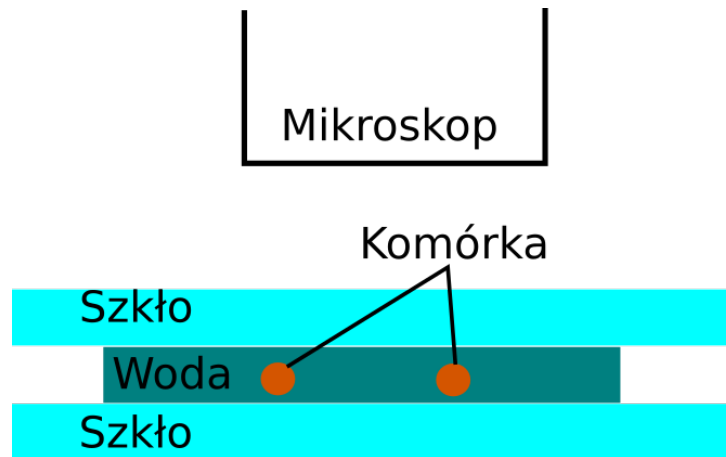
W podrozdziale tym przedstawiono przykłady wykorzystania opracowanego oprogramowania do analizy komórek znajdujących się w lab-chipach o różnej konstrukcji.

Analizowano komórki drożdży, euglen i oocyty świńskie. Lab-chipy wykorzystywane w badaniach to konstrukcje opracowane w Katedrze Mikrosystemów (dawniej Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki). Są to:

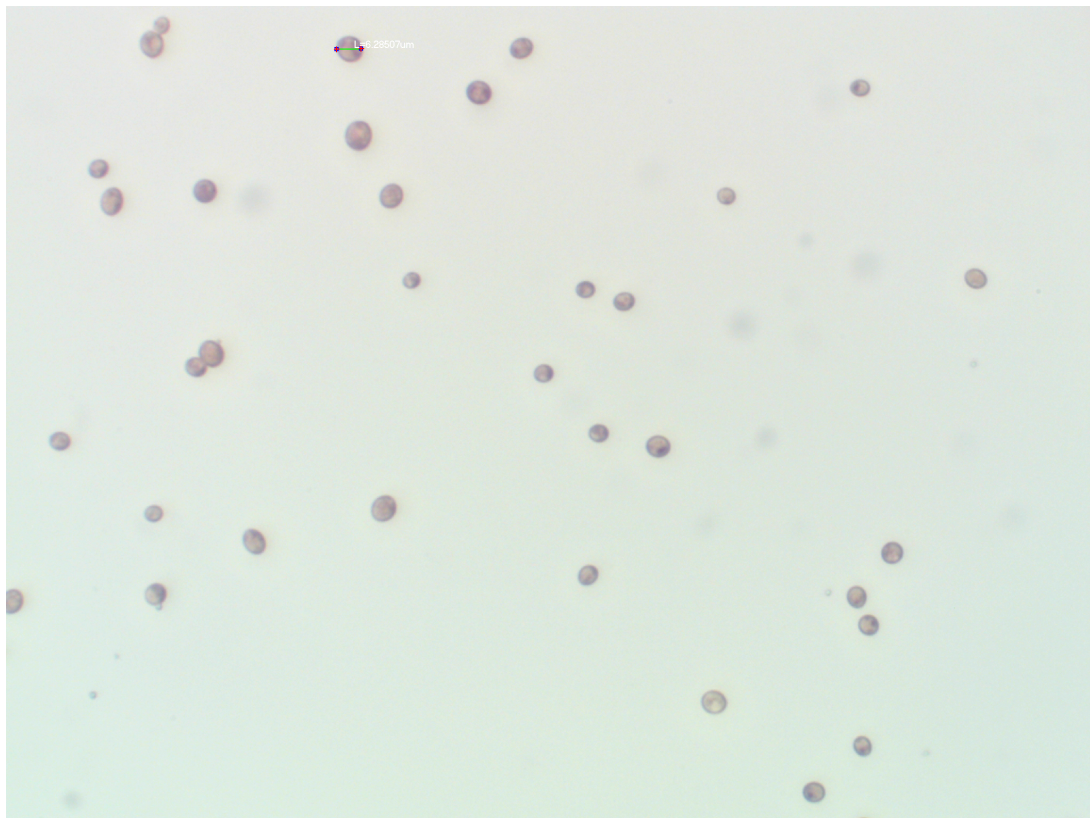
1. szklany lab-chip współpracujący z wyświetlaczem OLED do badania nadwrażliwości glonów na światło [66]. Mikroorganizmy hodowane były w szklanym laboratorium na chipie i poddawane czerwonemu (615 nm) i niebieskiemu (470 nm) światłu w mikrokomorze.
2. mikroakwarium, wykonane w postaci w pełni szklanego laboratorium na chipie do badania mikroorganizmów [67]. Po raz pierwszy do hodowli wybranych mikroorganizmów został zastosowany w pełni szklany chip ze szkła borokrzemowego.
3. krzemowo-szklany mikrocytometr MEMS. Mikrocytometr ten umożliwia w czasie rzeczywistym obserwowanie deformacji komórek występujących podczas ich ściskania mechanicznego w mikrokomorze za pomocą membrany krzemowej [68, 69, 70].

4.3.1 Drożdże

Pierwszymi badaniami weryfikującymi przydatność opracowanego oprogramowania były badania z unieruchomionymi w znacznej odległości komórkami drożdży. Mikroorganizmy zostały umieszczone na szkłe, które było kontrastowym tłem (Rysunek 4.8). W takich warunkach prosty algorytm progowania był wystarczający do wykrywania komórek (Rysunek 4.9).

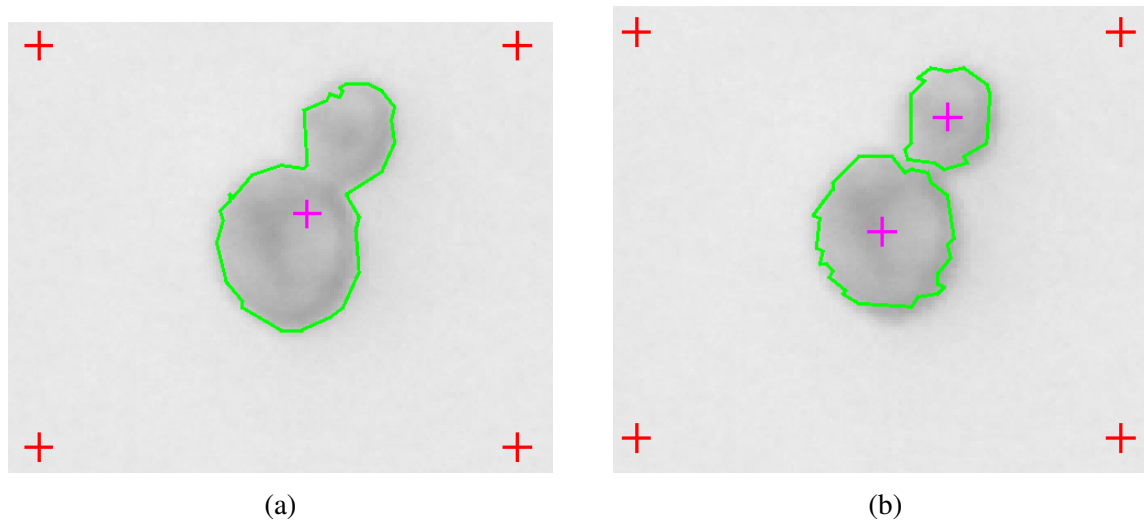


Rysunek 4.8: Schemat układu do analizy obrazów drożdzy



Rysunek 4.9: Przykładowy obraz z wykrytymi komórkami drożdzy. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

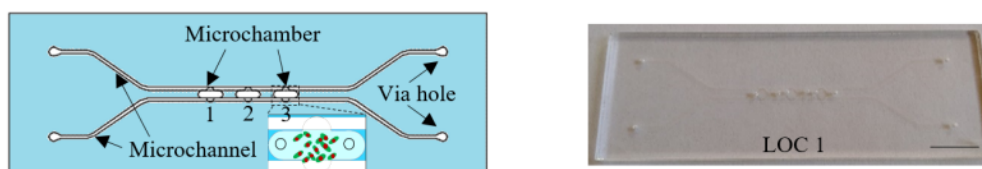
Stwierdzono również, że niektóre komórki łączyły się w grupy po dwie. Do rozdzielenia ich został użyty algorytm wododziału (Rysunek 4.10). Drugi problem, który zaobserwowano to nierównomierność tła obrazu, która ma wpływ na rozmiar konturów wykrytych komórek. Przy takich samych parametrach progowania kontury komórek na ciemniejszym i jaśniejszym tle różnią się. Za pomocą algorytmu odejmowania tła udało się zminimalizować nierównomierność jasności tła co spowodowało poprawne wyznaczenie wymiarów konturów.



Rysunek 4.10: Przykład działania algorytmu wododziału: (a) oryginalny obraz, (b) obraz przetworzony algorytmem wododziału. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

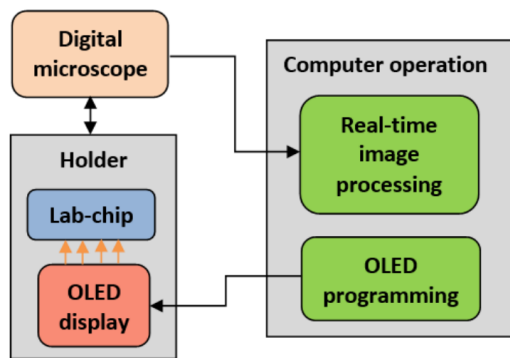
4.3.2 Eugleny

Badane komórki *E. gracilis* hodowane były z wykorzystaniem regulatora mikroprzepływu oraz szklanego „mikroakwarium” (Rysunek 4.11) [71, 72].

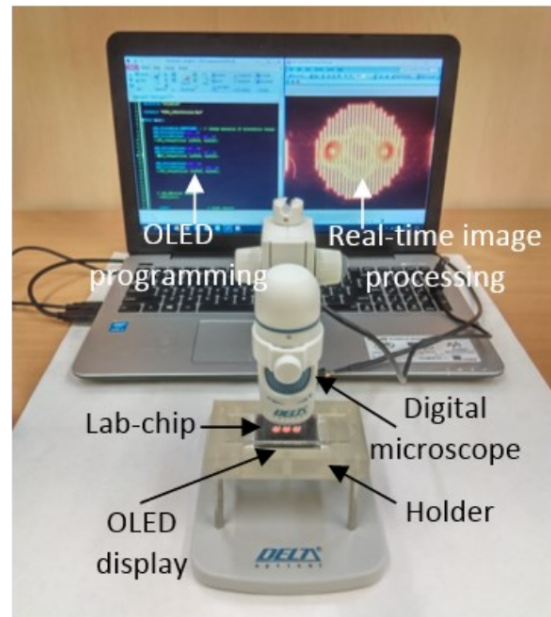


Rysunek 4.11: Szklany lab-chip do hodowli *Euglena gracilis* [72].

Schemat oraz widok układu pomiarowego, w tym z wykorzystaniem miniaturowego mikroskopu, przedstawiono na rysunku 4.12.



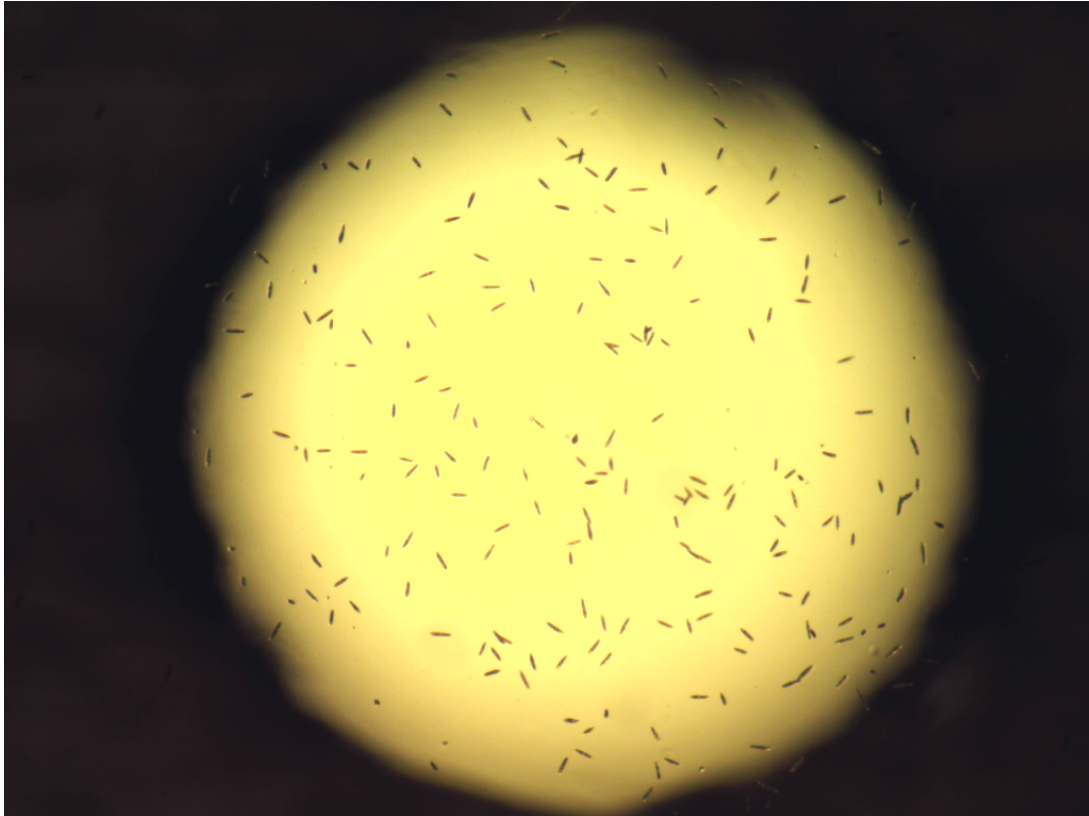
(a)



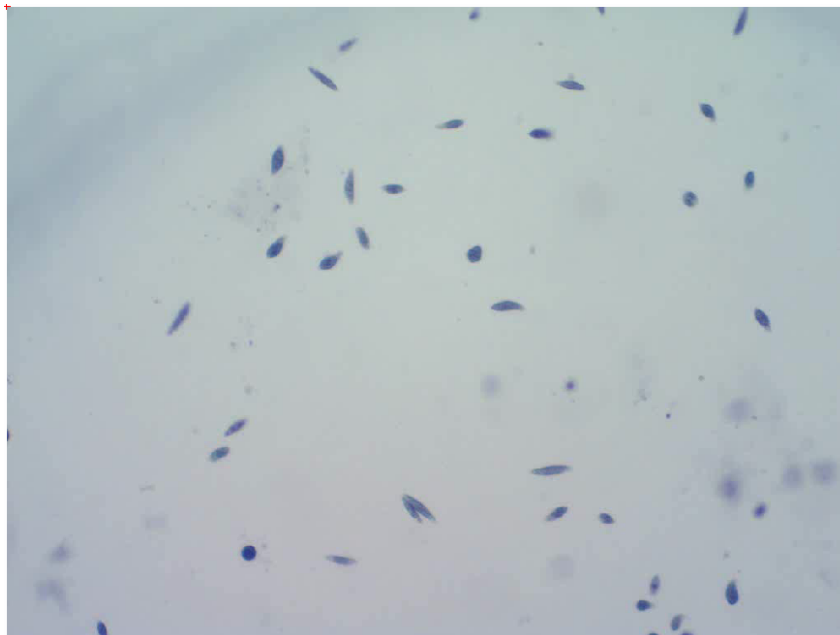
(b)

Rysunek 4.12: Układ pomiarowy: (a) schemat, (b) widok [66].

Opracowane oprogramowanie wykorzystywano do analizy filmów wideo z poruszającymi się euglenami w różnych warunkach oświetlenia (Rysunek 4.13). Przy analizie euglen ważnym było wyznaczenie ich liczby i ruchliwości. Przeprowadzono badania dla dwóch typów filmów: z powiększeniem $\times 4$ oraz z powiększeniem $\times 10$. Na filmach z powiększeniem $\times 4$ pojedyncza euglena ma wymiary około 15 na 5 pikseli (Rysunek 4.13), a na filmach z powiększeniem $\times 10$ (Rysunek 4.14) wymiary komórki wynosiły około 35 na 13 pikseli. W pierwszym przypadku euglena nie jest wystarczająco „dużym” obiektem żeby wyznaczyć jej parametry oprócz położenia w przestrzeni 2D oraz kąta obrotu. W drugim przypadku możliwe było rozpoznawanie także kształtu komórki oraz jej wewnętrznej struktury co pozwala na lepsze odróżnienie jednej komórki od drugiej.



Rysunek 4.13: Obraz z komórkami euglen w komórce lab-chip przy powiększeniu x4. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

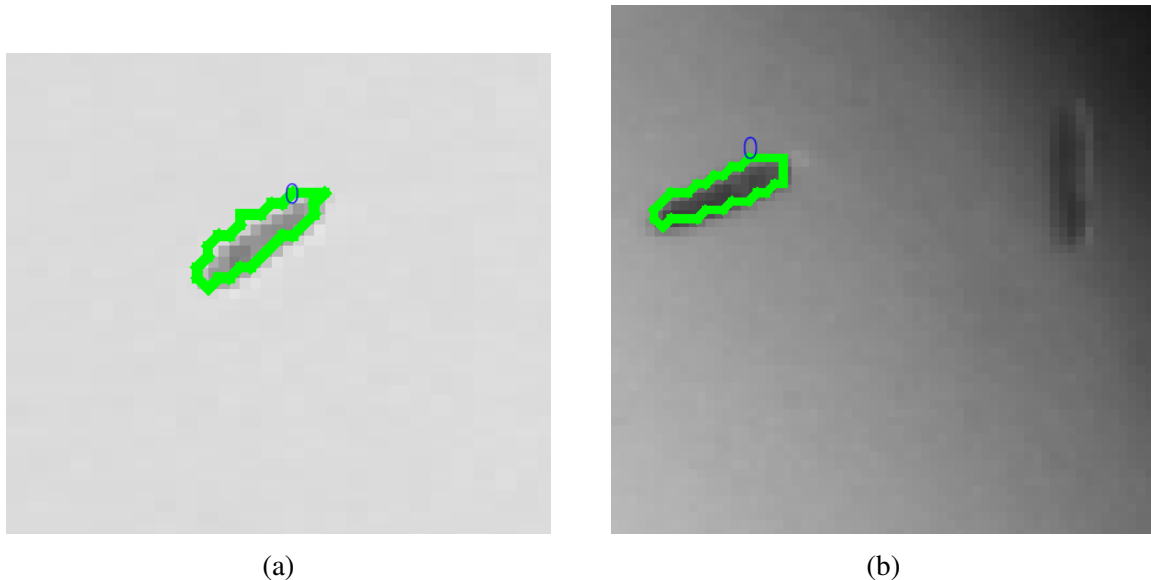


Rysunek 4.14: Obraz z komórkami euglen w komórce lab-chip przy powiększeniu x10. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

W celu doboru optymalnego algorytmu wyszukiwania komórek (w tym przypadku euglen) przeprowadzono porównanie wybranych algorytmów do liczenia komórek przez oprogramo-

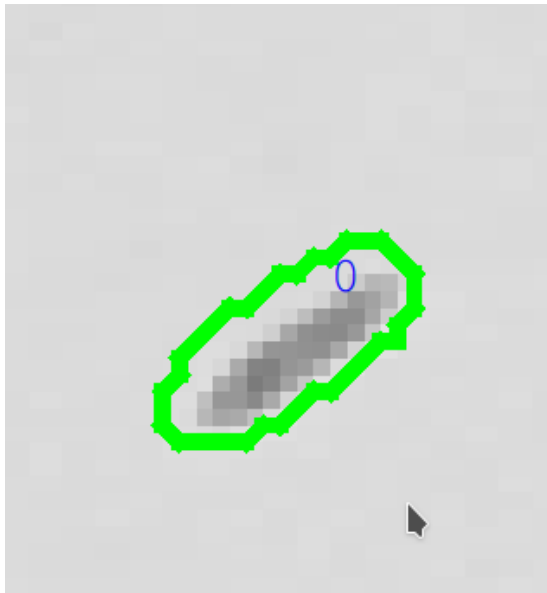
wanie na podstawie zarejestrowanego obrazu.

Algorytm progowania w przypadku małych euglen okazał się najmniej przydatny. Główne problemy to mała dokładność wykrywania konturu komórki, który składa się z pojedynczych pikseli (Rysunek 4.15a) oraz niemożliwość wykrywania komórek w „cieniu” z powodu nierównomierności tła (Rysunek 4.15b).

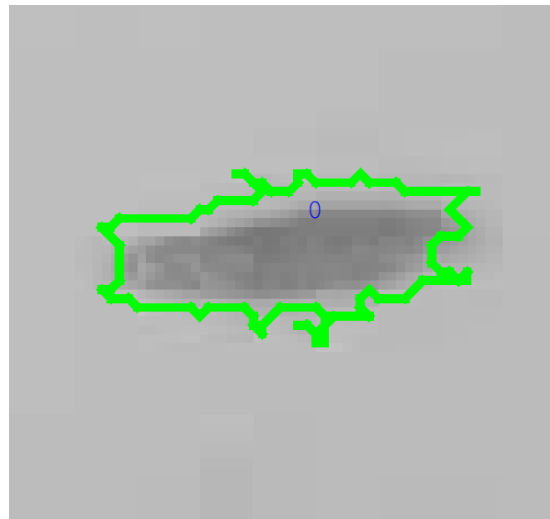


Rysunek 4.15: Przykład działania algorytmu progowania: (a) przesunięty kontur, (b) komórka w „cieniu” nie została wykryta. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Algorytm LoG wykrywa nie tylko komórkę, ale także przestrzeń dookoła komórki, która różni się od pozostałego tła z powodu artefaktów skompresowanego rastrowego obrazu (Rysunek 4.16). W wyniku działania tego algorytmu nieprecyzyjnie wyznaczane są kontury komórek, a także stwierdzono, że niektóre grupy komórek są rozpoznawane jako jedna komórka. W przypadku powiększenia x10 wykryty kontur komórki miał nieprawidłowy kształt, który nie dało się wygładzić dopasowaniem parametrów algorytmu wykrywania konturów.



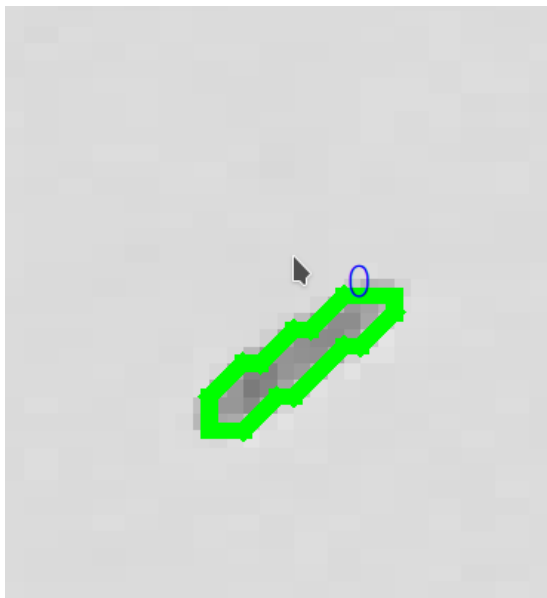
(a)



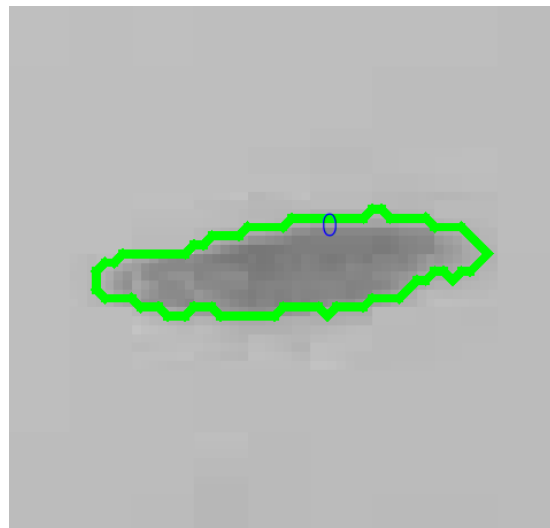
(b)

Rysunek 4.16: Przykład działania algorytmu LoG – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem LoG. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Algorytm odejmowania tła wykorzystuje filtrację obrazu filtrem Gaussa, co powoduje rozmycie granic małej komórki na obrazie. Wynikiem działania algorytmu jest wykryty kontur, ale mniejszy od komórki (Rysunek 4.17).



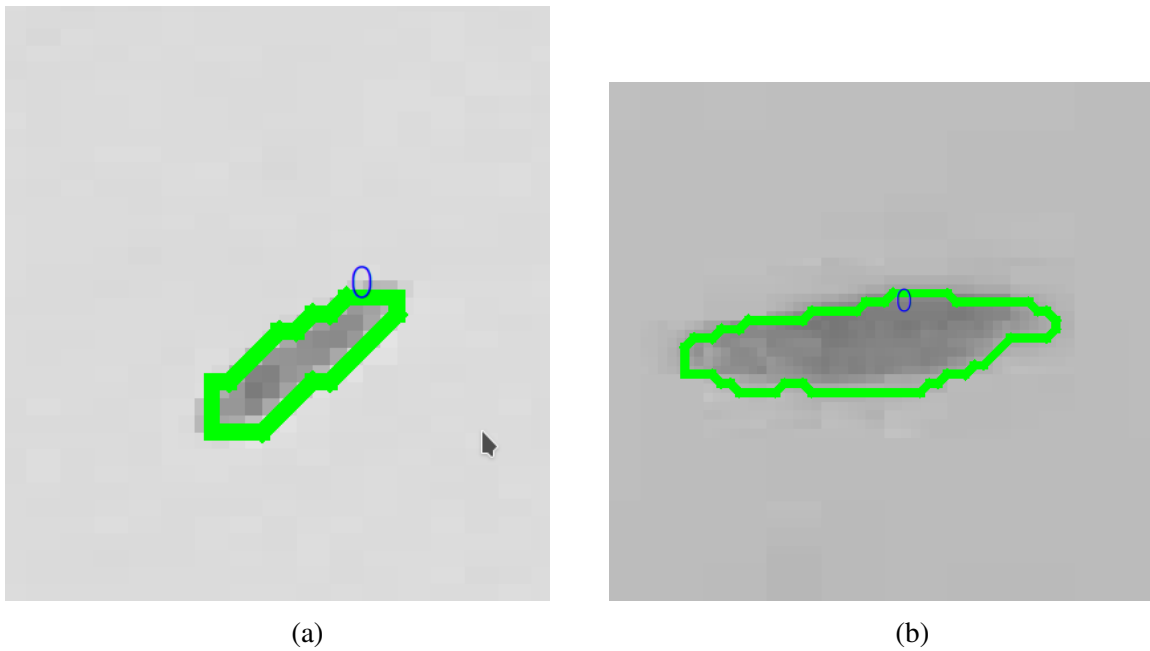
(a)



(b)

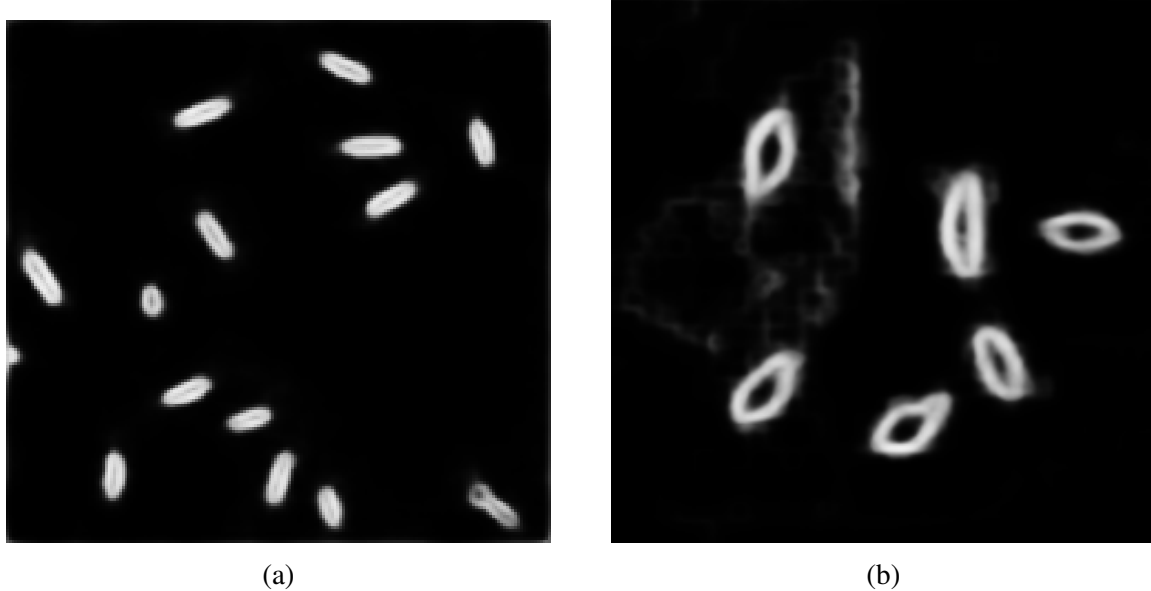
Rysunek 4.17: Przykład działania algorytmu odejmowania tła – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem odejmowania tła. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Algorytm detekcji krawędzi najlepiej zidentyfikował komórki. Kontury komórki były prawidłowo zlokalizowane i odzwierciedlały rzeczywisty kształt komórki.



Rysunek 4.18: Przykład działania algorytmu detekcji krawędzi – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem detekcji krawędzi. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

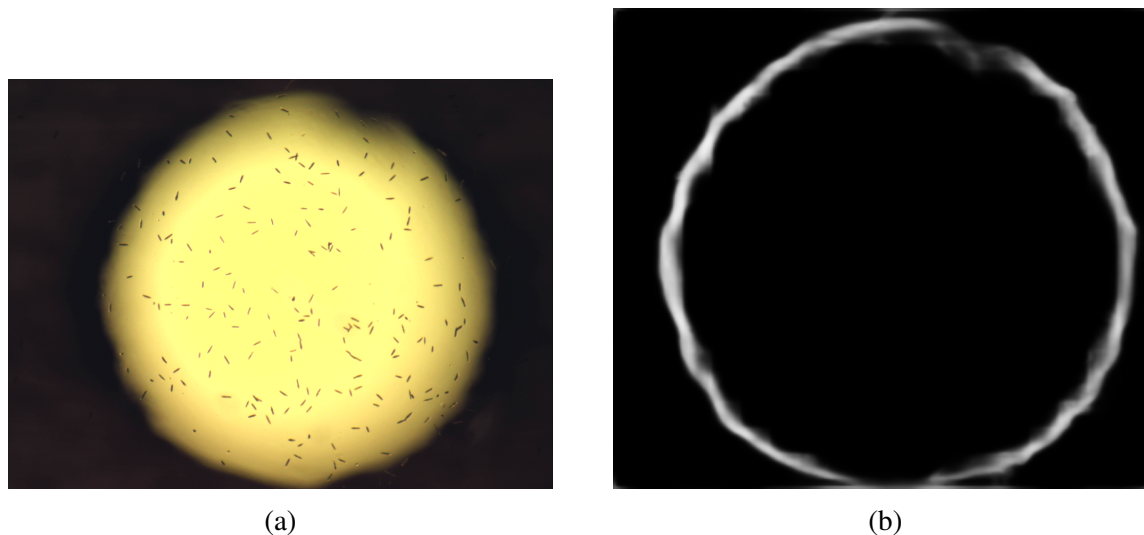
Wykrywanie krawędzi sieciami neuronowymi, dla obu obrazów o powiększeniu x4 i x10, zakończył się również pozytywnym wynikiem. Prawdłowo wykryte zostały osobne komórki (Rysunek 4.19).



Rysunek 4.19: Przykład działania algorytmu wykrywania krawędzi sieciami neuronowymi. Wykryte krawędzie (a) powiększenie x4, (b) powiększenie x10. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Przy analizie obrazu euglen z powiększeniem x4 pojawiły się trudności ze skalą krawędzi. Duża różnica pomiędzy krawędziami całego obszaru komórki, a krawędziami pojedynczych ko-

mórek spowodowała rozszerzenie zakresu „rozmiarów”² krawędzi. Wynikiem tego efektu było to, że mniejszych krawędzi komórek nie można było przedstawić na 8-bitowym obrazie (Rysunek 4.20). Dlatego ta metoda nadaje się tylko do wykrywania euglen w lokalnych częściach obrazu (Rysunek 4.19).



Rysunek 4.20: Wynik algorytmu wykrywania krawędzi: (a) obraz wejściowy, (b) po skalowaniu obrazu do 8-bit pozostała tylko krawędź komory. Krawędzi komórek nie są widoczne. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin

Badano również wykorzystanie wyżej przedstawionych algorytmów do liczenia komórek. Stwierdzono, że najbliższej wartości referencyjnej (liczenie przez operatora) był wynik działania algorytmu detekcji krawędzi i odejmowanie tła (Tabela 4.1, Rysunek 4.21).

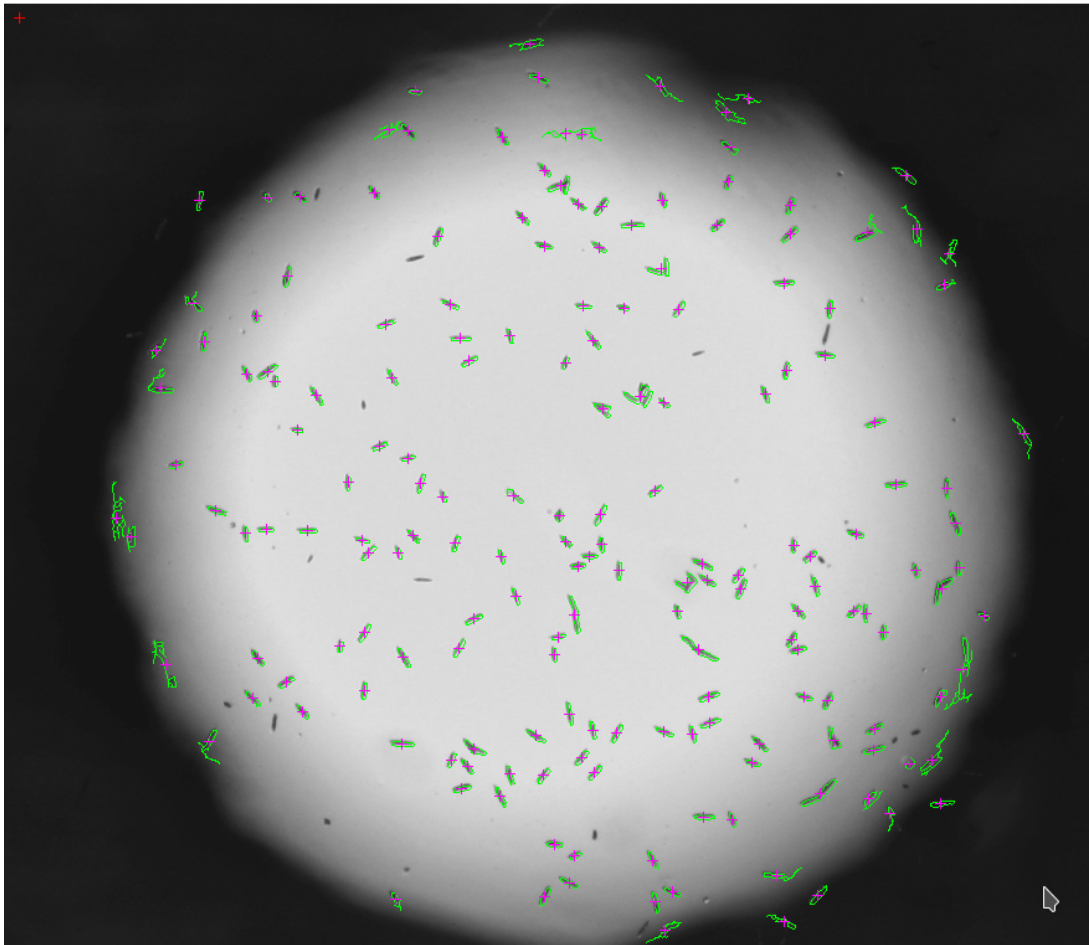
Tabela 4.1: Porównanie algorytmów wykrywania przy przetwarzaniu obrazu euglen.

Algorytm	Liczba wykrytych komórek	Procent poprawnie wykrytych komórek
Progowanie	149	73%
Detekcja krawędzi	197	96%
LoG	189	92%
Odejmowanie tła	207	101%
Wartość referencyjna	205	100%

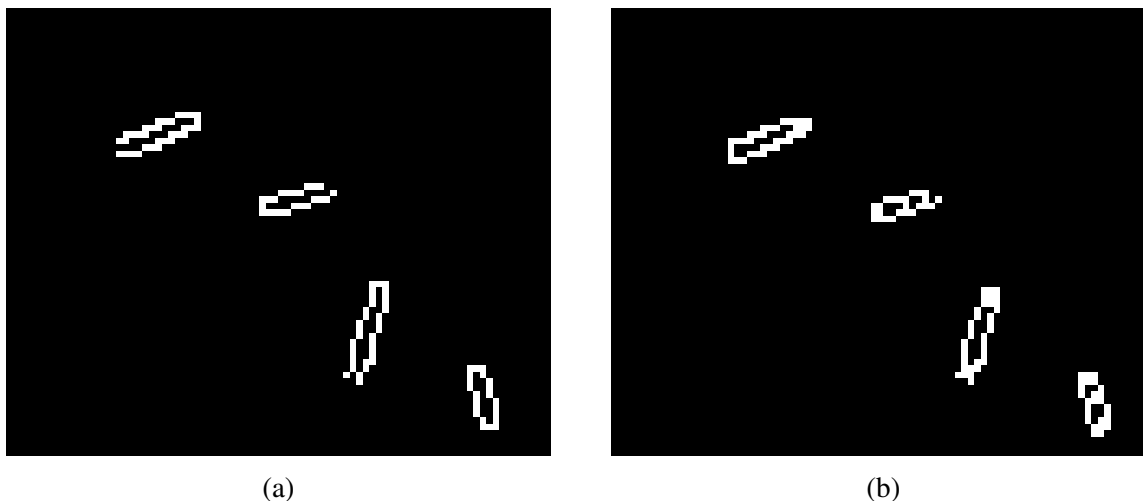
Do usunięcia nierównomierności tła obrazów (np. rysunek 4.21) wykorzystany algorytm odejmowania tła. Przy detekcji małych obiektów (jak np. eugleny w obszarze wielokrotnie większym od powierzchni komórek) stosując metodę detekcji krawędzi stwierdzono problem z

²„Rozmiar” krawędzi w tym przypadku – różnica jasności pomiędzy pikselami obrazu po obu stronach krawędzi.

nieciągłością przestrzeni w krawędziach, co powoduje błędy w algorytmie poszukiwania konturów. Morfologiczna operacja zamykania umożliwiła zamknięcie otwartych krawędzi (Rysunek 4.22a) i lepszą detekcyjność komórek.



Rysunek 4.21: Obraz z wykrytymi komórkami euglen za pomocą algorytmu detekcji krawędzi. Zaznaczone są kontury komórek oraz ich centroidy. Zauważalne jest, że wykryte zostały komórki na jaśniejszych oraz bardziej ciemnych częściach obrazu. Kilka komórek (szczególnie mniejsze) nie zostały wykryte. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin



Rysunek 4.22: Wyniki analizy obrazu z komórkami euglen : (a) obraz bez zamykania, (b) obraz z zamykaniem krawędzi

Przy wyznaczeniu liczby komórek stwierdzono, że przy wysokiej gęstości komórek nakładają się one na siebie, a przy ich małych wymiarach, algorytm wododziału nie może być wykorzystany do rozpoznawania pojedynczych komórek.

Jeśli zbiorów takich komórek nie jest dużo w odniesieniu do ogólnej liczby komórek, to obliczenie przybliżonej liczby komórek może być wykonane za pomocą wyrażenia (4.1)

$$N = \frac{1}{\bar{A}'} \sum_{i=1 \dots n} A_i \quad (4.1)$$

gdzie N – przybliżona liczba komórek, n – liczba wykrytych „komórek”, A_i – obszar powierzchni jednej wykrytej „komórki”, \bar{A}' – poprawiony średni obszar powierzchni komórek w granicach jednego odchylenia standardowego.

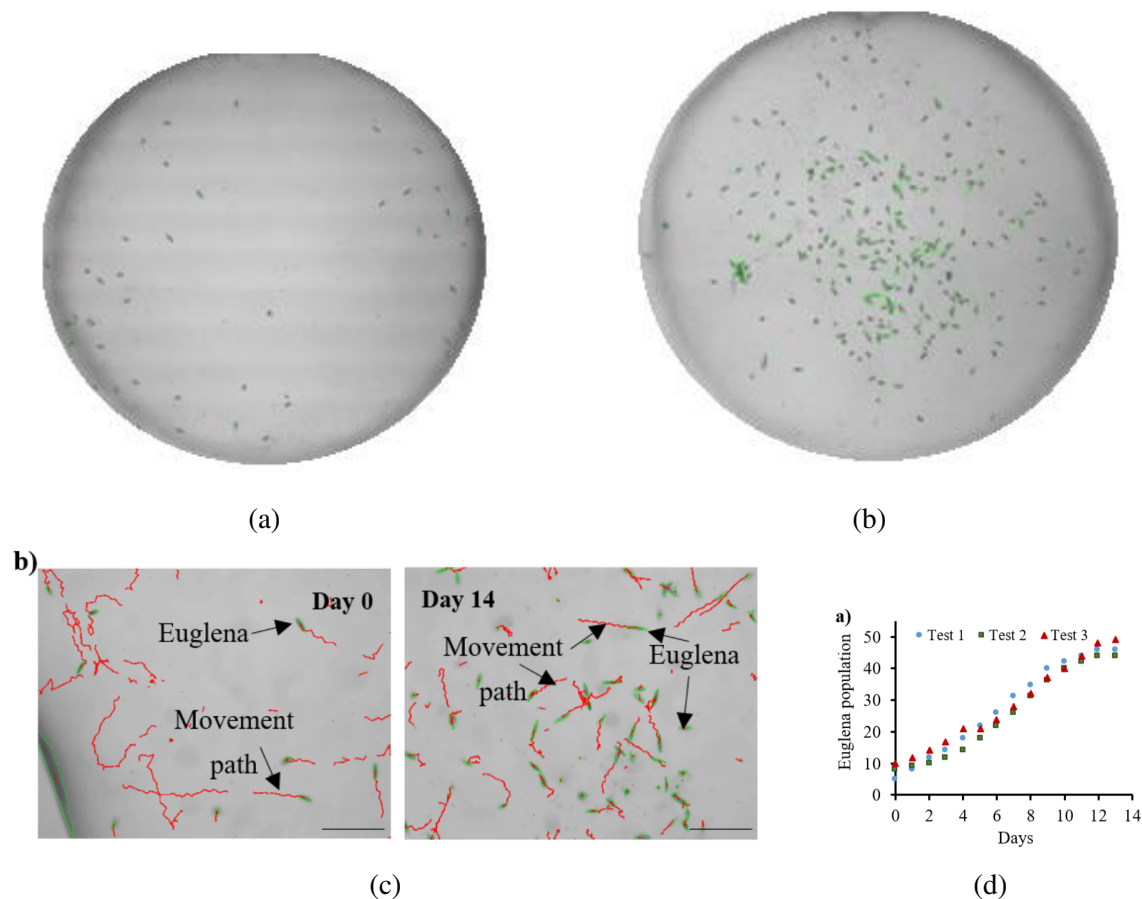
W przypadku wydłużonych komórek (np. eugleny) „średnica” to średnia wartość ich długości i szerokości.

Kolejnym badanym parametrem była ruchliwość. Ruchliwość euglen została określona na podstawie wyników działania algorytmu śledzenia. Ruchliwość M jest obliczana wzorem:

$$M = \frac{L}{\bar{N} \cdot f} \quad (4.2)$$

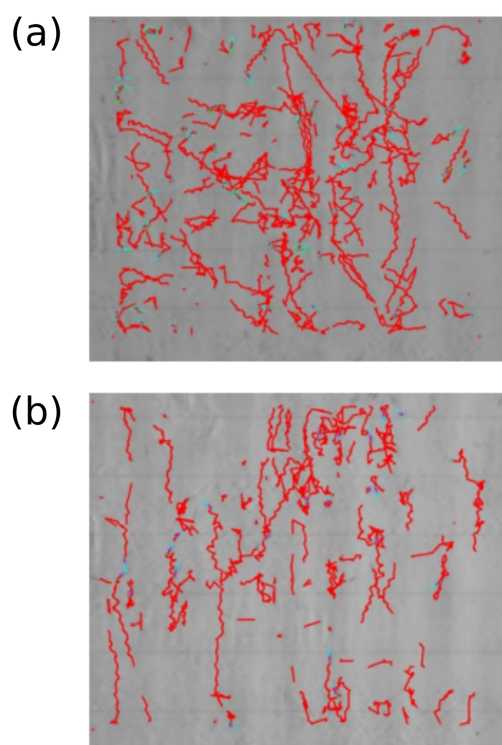
gdzie L – długość wszystkich ścieżek, \bar{N} – średnia liczba komórek na klatce filmu, f – liczba klatek filmu.

Opracowane oprogramowanie zostało użyte do analizy liczebności i ruchliwości komórek w mikrokomorze chipa (Rysunek 4.23) [73].



Rysunek 4.23: Obraz z wykrytymi komórkami euglen w mikrokomorze: (a) pierwszy dzień hodowli, b) piąty dzień hodowli, c) obrazy poddane analizie w 1 i 14 dzień hodowli, (d) wynik analizy liczebności euglen w trakcie hodowli [74, 72].

Oprogramowanie wykorzystano do analizy zmiany ruchliwości euglen w wyniku odpowiedzi komórek na niebieskie i czerwone światło (Rysunek 4.24). Do analizy obrazu zastosowano metodę odejmowania tła z powodu pasów zmiennej jasności wynikających z nierównomierności natężenia światła wyświetlacza OLED oraz braku synchronizacji wyświetlacza i kamery



Rysunek 4.24: Obraz z wykrytymi ścieżkami euglen. Zaznaczone są ścieżki komórek: (a) przy niebieskim świetle (większa ruchliwość), (b) przy czerwonym świetle (mniejsza ruchliwość) [66].

Otrzymane wyniki analizy obrazów posłużyły do sformułowania stwierdzenia, że eugleny są czułe na światło niebieskie (470 nm) w przeciwieństwie do światła czerwonego (615 nm), co powoduje większą ich ruchliwość przy napromieniowaniu światłem niebieskim [66].

Opracowane oprogramowanie wykonywało automatyczną analizę obrazu komórek, znajdujących się w komorze szklanego chipa (Rysunek 4.23) [67] oraz umożliwiło badania mobilności komórek w zależności od rodzaju oświetlenia (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Porównanie ruchliwości *E. gracilis* w zależności od typu oświetlenia

		<i>Mikrokomora 1</i>		<i>Mikrokomora 2</i>	
Czas [min]	Światło [nm]	Ruchliwość	Światło [nm]	Ruchliwość	
0	Otoczenia	2,17	Otoczenia	2,17	
5	615	2,23	470	1,54	
10	615	2,33	615	2,07	
15	615	2,22	470	1,65	

Oprogramowanie badano również pod kątem wydajności obróbki filmów wideo w porównaniu do dostępnego oprogramowania oraz w kierunku analizy obrazów w czasie rzeczywistym. Film wideo, który był wykorzystany do testowania zawiera poruszające się eugleny. Testowanie polegało na wykrywaniu i śledzeniu komórek na całym obszarze klatek filmu. W każdym z

przypadków stosowano algorytm śledzenia, do wykrywania komórek na pojedynczych klatkach – jeden z algorytmów wymienionych w tabeli 4.3 oraz wspólne dodatkowe algorytmy poszukiwania konturów. Otrzymane wyniki porównano z wynikami działania „wtyczki” TrackMate programu ImageJ, który też wykonuje wykrywanie i śledzenie komórek. Parametry testowanego filmu to czas trwania 36 sekund, rozdzielczość 1024 x 768, liczba klatek na sekundę 8. Parametry komputera, na którym było przeprowadzone testowanie to procesor Core i7-6700HQ CPU @ 2.60 GHz, pamięć 12 GB RAM DDR4. Wyniki testowania przedstawiono w tabeli 4.3.

Tabela 4.3: Porównanie czasów analizy (oprogramowanie własne vs dostępne rozwiązanie detekcji i śledzenia komórek, ImageJ, <https://fiji.sc/>).

Algorytm detekcji	Czas [s]
Pojedyncze progowanie	2,89
Kilka progowań	7,5
Detekcja krawędzi	3,33
Watershed	10,48
Odejmowanie tła	5,11
TrackMate (ImageJ)	16,24

Do przetwarzania strumienia obrazu z kamery w czasie rzeczywistym ważna jest minimalizacja czasu, który algorytmy wykorzystują do obróbki pojedynczej klatki. Główne sposoby minimalizacji tego czasu to: zmniejszenie rozdzielczości obrazu, zwiększenie interwału pomiędzy akwizycją pojedynczych klatek, lub wykorzystywanie szybszych algorytmów.

Zmniejszenie rozdzielczości obrazu może być wykonywane zarówno na poziomie obrazu z kamery jak i programowo za pomocą wyboru mniejszego ROI w oprogramowaniu. Zmniejszenie liniowych wymiarów obrazu o n pikseli zmniejsza pole powierzchni obrazu w przybliżeniu na n^2 pikseli i odpowiednio przyspiesza przetwarzanie.

Opracowane oprogramowanie analizuje klatki z największą możliwą szybkością bez oczekiwania. Obliczenia odbywają się w osobnym wątku co uniemożliwia „zawieszanie” się interfejsu użytkownika. Dla „szybko” poruszających się komórek (np. eugleny przy dużym powiększeniu) potrzebnym jest około 25-30 klatek na sekundę. Dla komórek, poruszających się ze „średnią” szybkością (np. eugleny przy małym powiększeniu) niezbędnym jest około 10-15 klatek na sekundę.

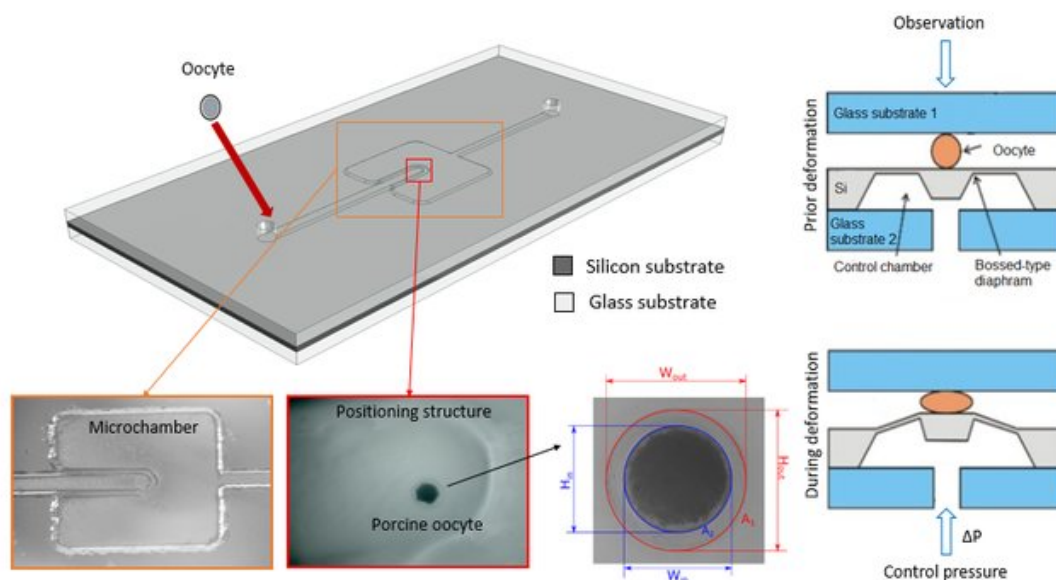
Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że opracowane oprogramowanie może być potencjalnie wykorzystywane do analizy filmów również w czasie rzeczywistym.

4.3.3 Oocyty

W ramach projektu NCN OPUS pt. „Mikrocytometria odkształceniowa komórek w zintegrowanym systemie mikro-elektromechanicznym z aktywizacją pneumatyczną i wieloparamet-

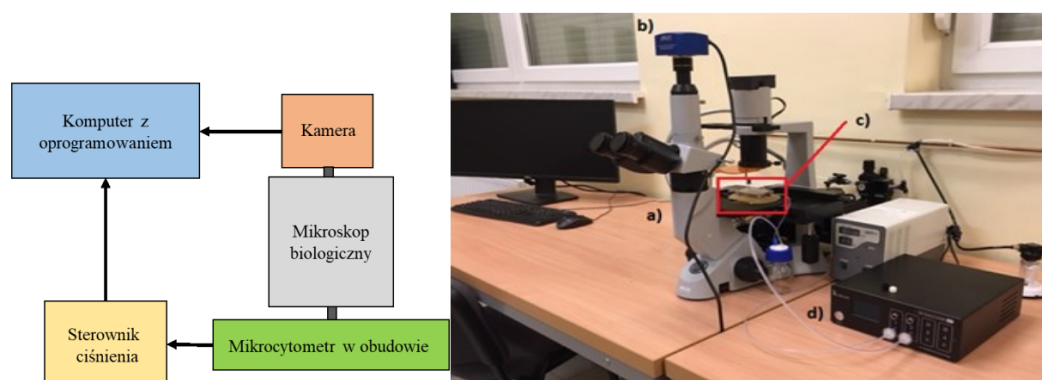
tryczną detekcją obrazową” badano między innymi mechaniczne właściwości oocytów przez ich kontrolowane ściskanie i analizę obrazów ściskanej komórki.

Badane oocyty świńskie umieszczone były w mikrofluidycznym cytometrze (Rysunek 4.25). Szczegóły technologiczno-metodologiczne tego rozwiązania zostały opisane w pracy [69] i rozprawie doktorskiej dr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej.



Rysunek 4.25: Cytometr mikrofluidyczny do ściskania oocytów [69].

Schemat oraz widok układu pomiarowego, w tym z wykorzystaniem mikroskopu odwróconego, przedstawiono na rysunku 4.26. W układzie pomiarowym użyto mikroskop biologiczny do określania prawidłowej pozycji badanej komórki w czasie pomiarów w chipie oraz kamerę mikroskopową (DLT–CamPRO 6.3 MP USB 3.0, Delta Optical) do rejestrowania zmian zachodzących w oocytach podczas deformacji [75].



Rysunek 4.26: Stacja pomiarowa: schemat (po lewej), widok stanowiska (po prawej): a) mikroskop biologiczny, b) kamera, c) mikrocytometr w obudowie, d) sterownik ciśnienia [75].

Parametry oocytów świńskich wyznaczone przez opracowane oprogramowanie to wymiary komórki (średnica, pole powierzchni), wymiary jądra komórki (średnica, pole powierzchni),

a także ich zmiany podczas i po ściskaniu. Źródłowe obrazy miały rozdzielczość 3072 x 2048 pikseli, ale sam oocyt zajmował tylko około 2% obszaru obrazu (średnica 300 pikseli) (Rysunek 4.27), co powodowało dodatkowe utrudnienia w analizie obrazu.

Na podstawie propagacji błędów numerycznych można określać błędy pomiaru jako:

1. Błędu pomiaru współrzędnej piksela wynoszącego połowę jednostki – 0,5 piksela.
2. Minimalna rozróżnialna odległości dwóch niezależnych punktów $p_1 = (x_1, y_1), p_2 = (x_2, y_2)$ na obrazie

$$d(p_1, p_2) = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2} \quad (4.3)$$

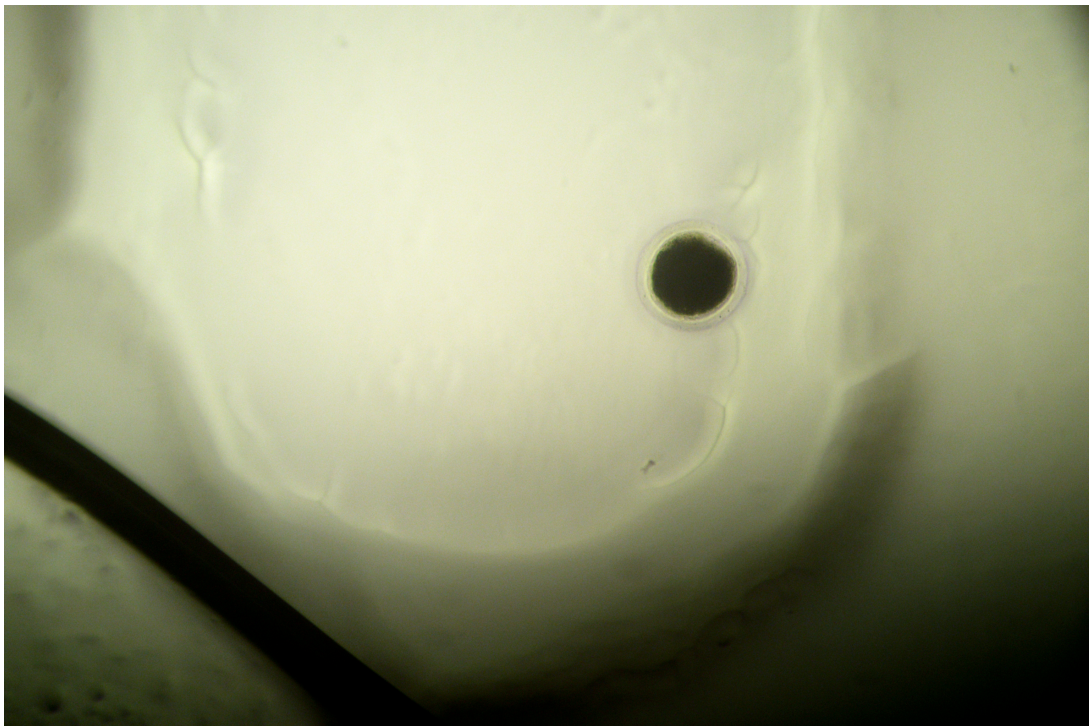
gdzie d – odległość, x_1, x_2, y_1, y_2 – współrzędne, błąd numeryczny jest równy

$$\Delta d = \frac{1}{2} \sqrt{(2 * \sqrt{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2})^2 + (2 * \sqrt{\Delta y_1^2 + \Delta y_2^2})^2} \quad (4.4)$$

gdzie Δd – błąd odległości, $\Delta x_1, \Delta x_2, \Delta y_1, \Delta y_2$ – błędy współrzędnych

Dla wartości błędu pomiaru współrzędnych 0,5 pikseli błąd odległości wynosi:

$$\Delta d = \frac{1}{2} \sqrt{(2 * \sqrt{0,5^2 + 0,5^2})^2 + (2 * \sqrt{0,5^2 + 0,5^2})^2} = 0,707106 \text{ pikseli} \quad (4.5)$$



Rysunek 4.27: Wejściowy obraz mikroskopu pomiarowej cytometru z oocytem. Obraz dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

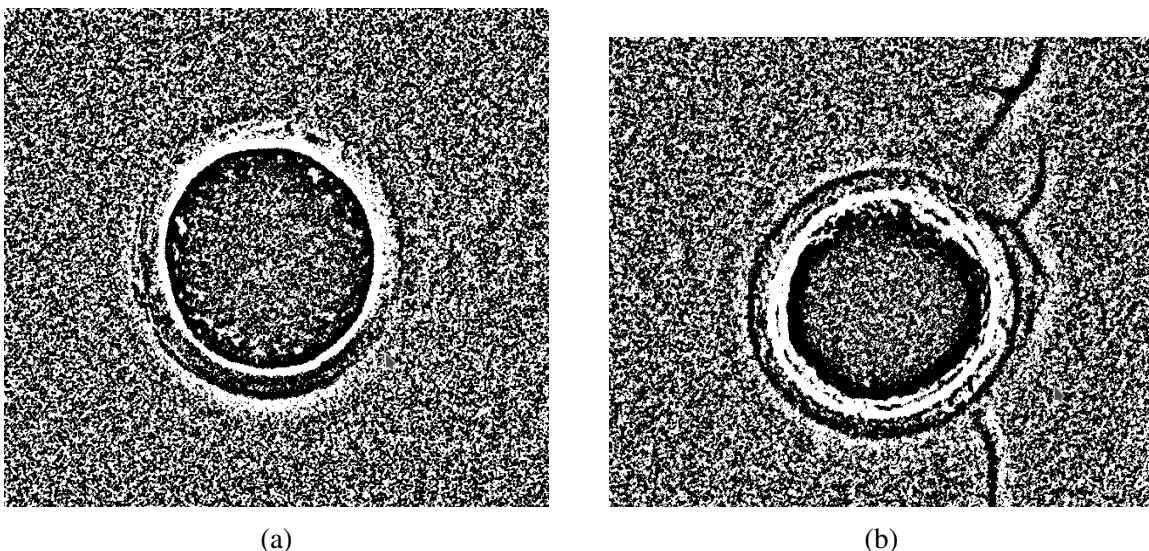
Na podstawie już wstępnych analiz obrazów stwierdzono, że największym wyzwaniem przy detekcji oocytów jest detekcja zewnętrznej otoczki oocytu. Otoczka ta jest przezroczysta i ma

bardzo niski kontrast w odniesieniu do tła. W niektórych przypadkach otoczka jest podświetlona w taki sposób, że jest ona dostatecznie kontrastowa w jednym miejscu i całkowicie przezroczysta w innym.

W ramach rozprawy badano możliwość zastosowania do detekcji otoczki kilku metod:

- progowanie adaptatywne,
- wykrywanie krawędzi,
- wykrywanie krawędzi sieciami neuronowymi,
- algorytm lokalnej entropii,
- algorytm α -form.

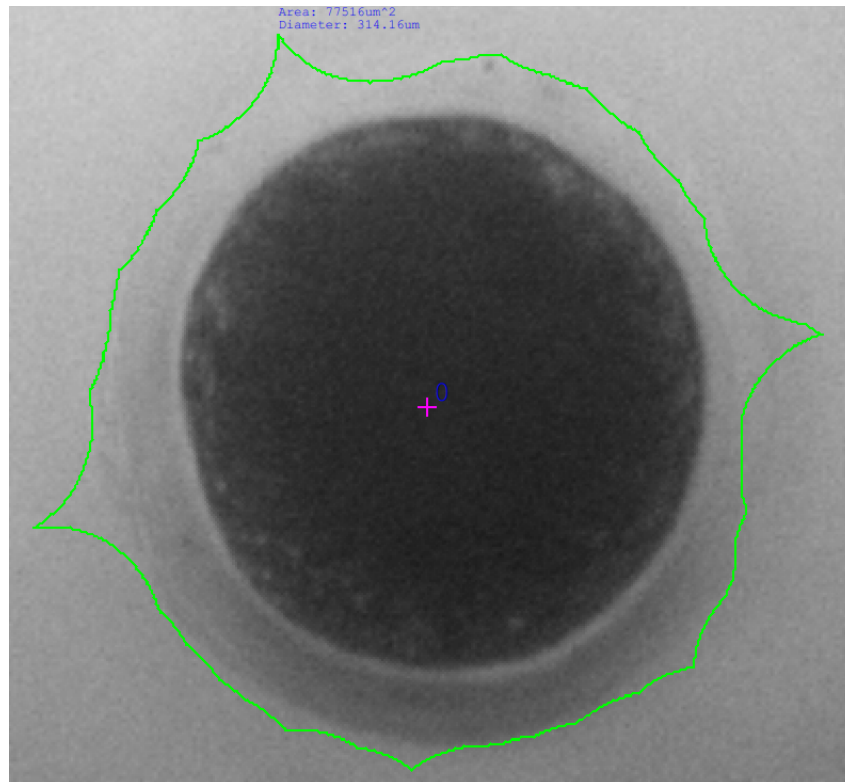
Wynik działania algorytmu adaptatywnego progowania zależy od małego obszaru obrazu dookoła opracowywanego piksela (podrozdział 3.1.1). Za pomocą tego algorytmu możliwe jest wykrycie niskokontrastowej otoczki komórki. Niestety to podejście nie sprawdza się we wszystkich przypadkach (Rysunek 4.28).



Rysunek 4.28: Przykłady obrazów po zastosowaniu progowania adaptatywnego: (a) obraz, na którym adaptatywne progowanie nie dało zadowalającego wyniku (górną część otoczki komórki), (b) obraz, na którym adaptatywne progowanie uzyskało dobry wynik. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

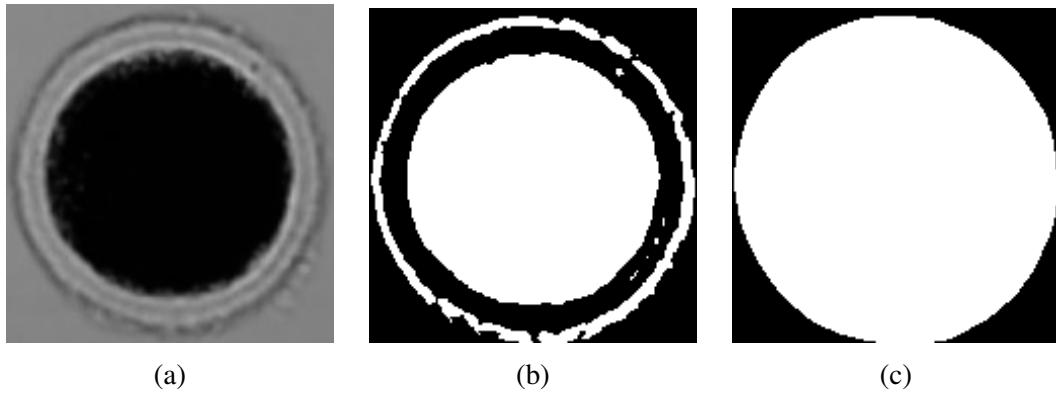
Drugi z badanych algorytmów to detekcja krawędzi połączona z operacjami morfologicznymi. Przy detekcji krawędzi obiektów z niskim kontrastem tła obserwowano problem z uzyskaniem ciągłości wykrytych krawędzi. Krawędź może być rozerwana w miejscach nieodróżnianych od tła. W takim przypadku nie jest możliwe zdefiniowania konturu do pomiaru wymiarów komórki. Podobnie jak w wypadku detekcji euglen wykorzystany może być algorytm morfologicznego domknięcia do zamknięcia konturów. W przypadku dużych komórek takie

podejście, jak i poprzednie, może nie doprowadzić do detekcji krawędzi jeśli otoczka komórki jest podświetlona nierównomiernie (Rysunek 4.29).

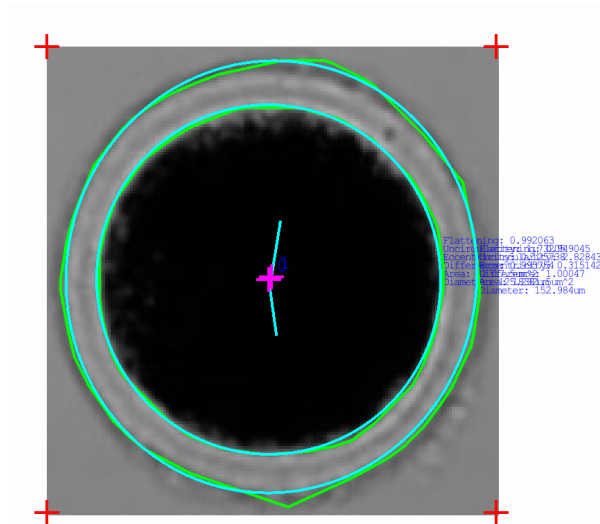


Rysunek 4.29: Obraz z niepoprawnie wykrytą otoczką oocyty

Detekcja krawędzi algorytmem α -form powoduje zamknięcie przerwy konturów bez potrzeby użycia operacji morfologicznych. Przy odpowiednich wartościach parametrów algorytmu wypełnia on długie nieciągłości. W przypadku obrazów oocytów algorytm α -form jest przydatny do wykrywania zewnętrznej otoczki komórek tam gdzie inne algorytmy nie dają akceptowalnych wyników (Rysunki 4.30, 4.31).



Rysunek 4.30: Etapy przetwarzania obrazu oocytu: (a) wstępny obraz po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (b) obraz po zastosowaniu algorytmu detekcji, widoczne są przerwy w konturach (c) obraz po zastosowaniu algorytmu α -form, przerwy w konturach są wyeliminowane. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej



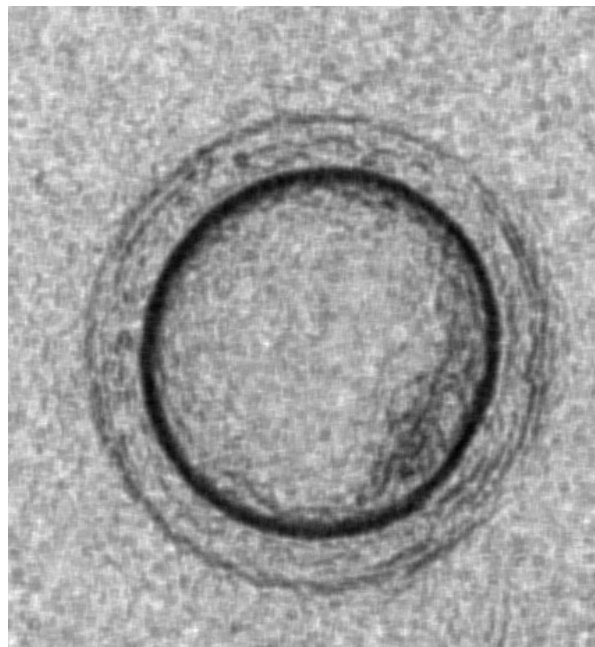
Rysunek 4.31: Oocyt wykryty za pomocą α -form. Wartość parametru $\alpha = 100000$. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

Sieć neuronowa wykorzystywana poprzednio do wykrywania euglen w przypadku oocytów nie dała akceptowalnego wyniku (Rysunek 4.32). Kontrastowe wnętrze komórki zostało wykryte poprawnie, ale zewnętrzna otoczka była wykryta tylko częściowo.



Rysunek 4.32: Wynik zastosowania sieci neuronowych do obrazu oocyty. Nie została wykryta znaczna część zewnętrznej otoczki komórki. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

Algorytm obliczenia lokalnej entropii wykrywa różnicę struktury obrazu oocyty i otaczającej przestrzeni (Rysunek 4.33). Algorytm ten nadaje się do wykrywania wnętrza komórki jak i do poprawnego wykrywania zewnętrznej otoczki.



Rysunek 4.33: Lokalna entropia obrazu oocyty. Wymiary lokalnego obszaru: 6 x 6 pikseli, wartość progowa: 107. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej

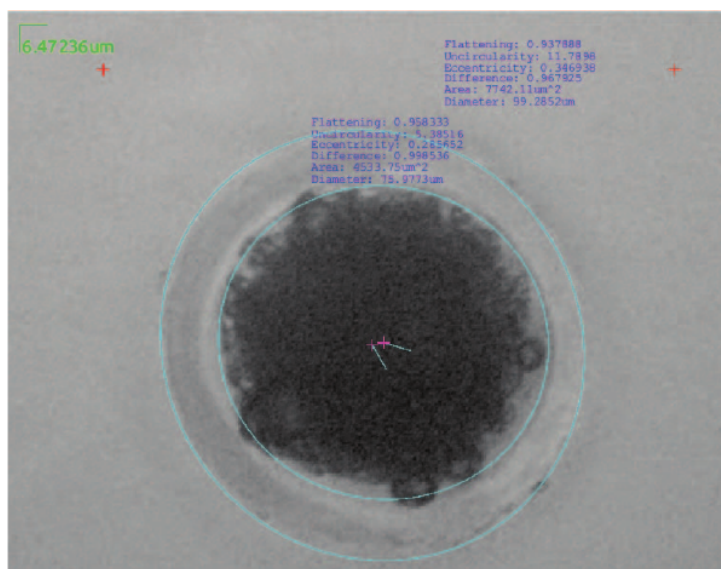
Zestawienie wyniku badania wykorzystania wyżej przedstawionych algorytmów do detekcji oocytów przedstawiono w tabeli 4.4. Stwierdzono, że najlepszym był wynik działania algo-

rytmu detekcji krawędzi połączony z algorytmem α -form.

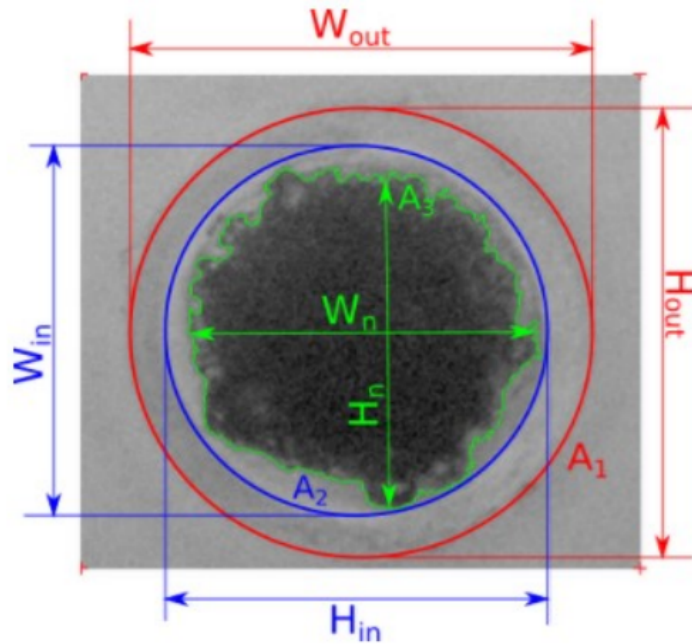
Tabela 4.4: Porównanie algorytmów wykrywania przy przetwarzaniu obrazu oocytów.

Algorytm	Zalety	Wady
Progowanie adaptatywne	szybkie działanie	dokładność wykrywania
Detekcja krawędzi	szybkie działanie	mała odporność na nierównomierne podświetlenia tła
Sieć neuronowa	dokładność wykrywania	wrażliwość na skalę krawędzi
Obliczenie entropii	wykrywanie struktury wewnętrznej	niska dokładność wykrywania (entropia mierzona dla kilku pikseli)
α -form	zamykanie przerw w konturach	wolne działanie

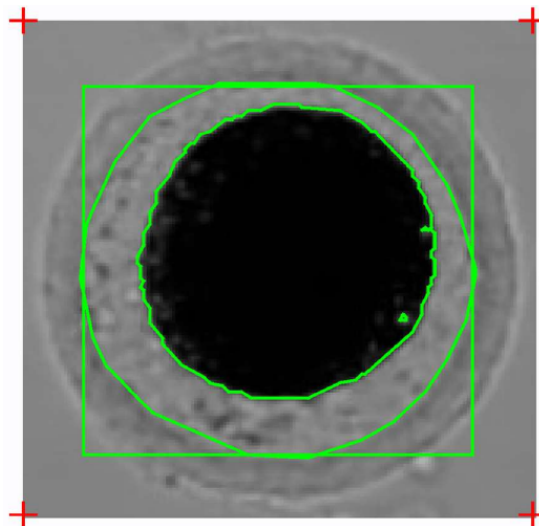
Opracowane oprogramowanie do analizy mikroskopowych obrazów wykorzystane zostało do wieloparametrycznej charakteryzacji oocytów świńskich (Rysunki 4.34, 4.35, 4.36).



Rysunek 4.34: Obraz z wykrytymi otoczką i wnętrzem komórki oraz z dodatkowymi parametrami: pole powierzchni, średnica, mimośród przybliżonej elipsy [68].

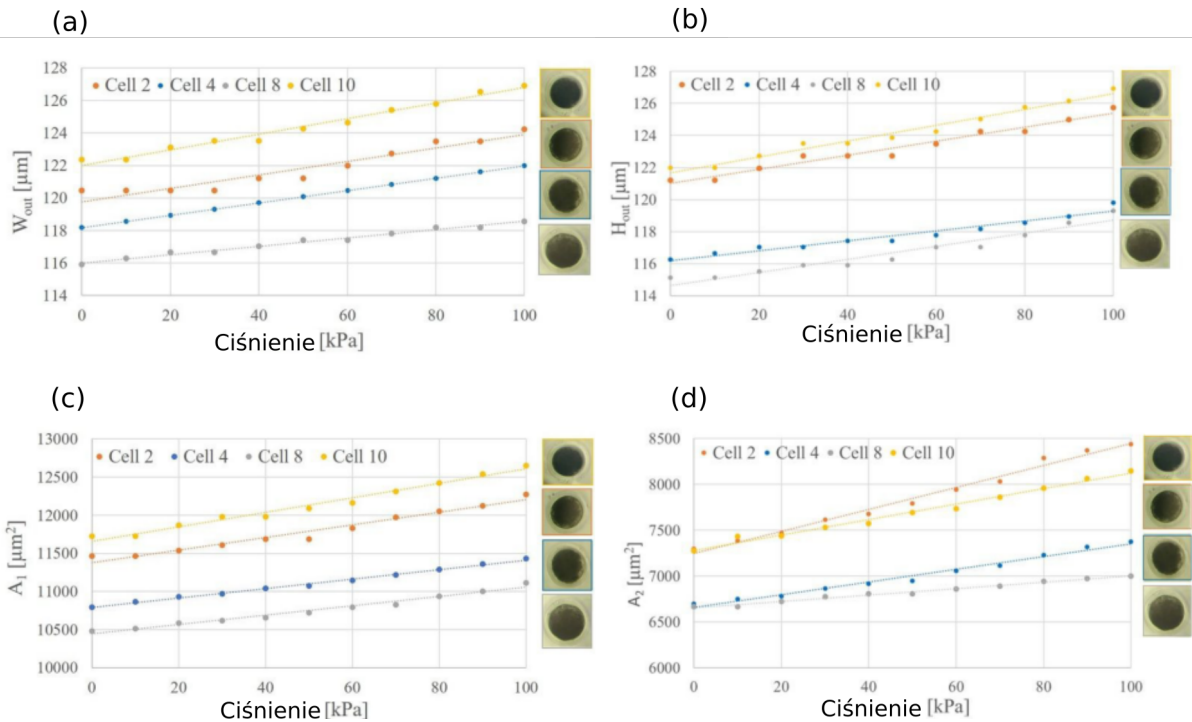


Rysunek 4.35: Obraz oocyty z schematycznie zaznaczonymi przykładowymi wykrywanymi wymiarami (W_{out}, H_{out} – wysokość i szerokość zewnętrznej otoczki oocyty, W_{in}, H_{in} – wysokość i szerokość wnętrza oocyty, W_n, H_n – wysokość i szerokość jądra oocyty, A_1, A_2, A_3 – pole powierzchni: całej komórki, wnętrza komórki, jądra komórki [69].

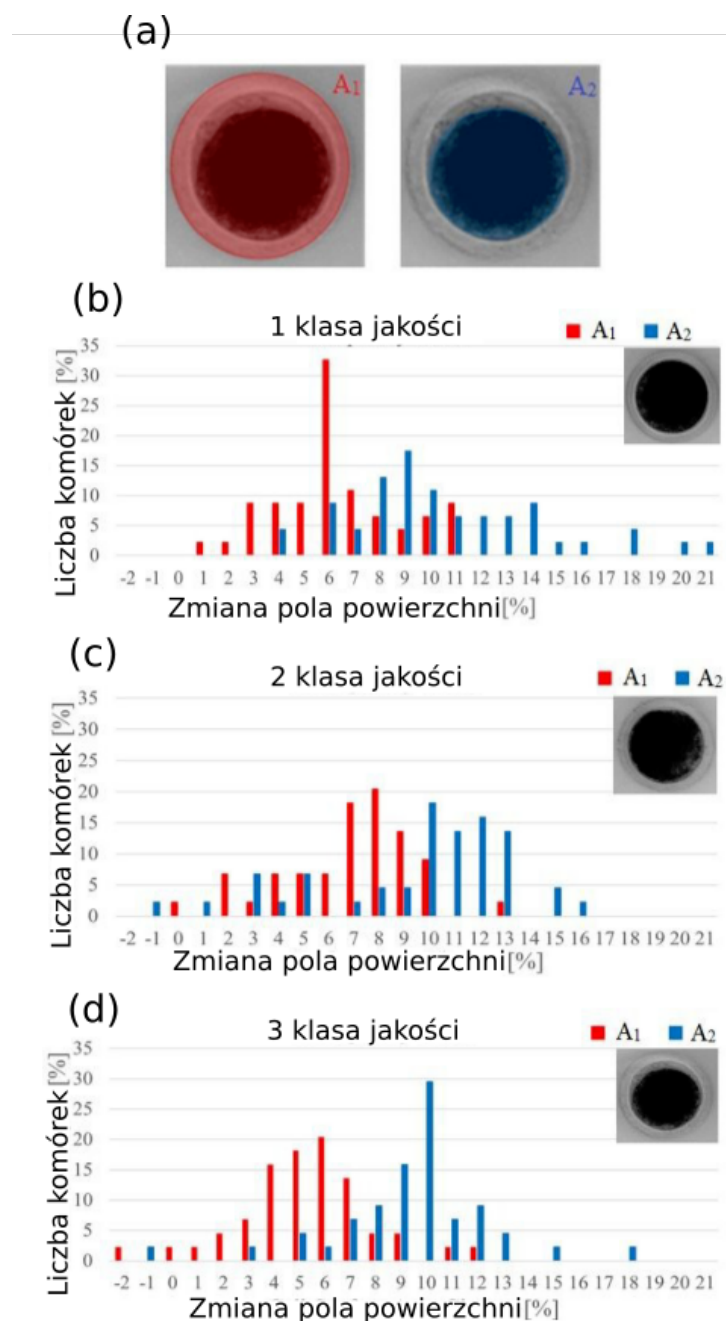


Rysunek 4.36: Obraz oocyty z wykrytymi wnętrzem i jądrem komórkowym [76].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że możliwe było wyznaczenie zmian wykrytych parametrów podczas ściskania komórki, a tym samym określenie deformowalności komórek (Rysunek 4.37) w zależności od klasyfikacji tych komórek (Rysunek 4.38). Wynikiem pomiaru zmiany wymiarów komórki podczas ściskania jest zbiór obrazów dla każdego 10 kPa ciśnienia sterującego ugięciem membrany. Maksymalne zmiany średnicy w jednym takim zbiorze z 10 obrazów stanowiły około 10 pikseli.



Rysunek 4.37: Przykładowe zależności zewnętrznej wysokości (a) i szerokości (b), powierzchni całej komórki (c) i ooplazmy (d) oocytów świni po dojrzewaniu *in vitro* w funkcji ciśnienia sterującego ugięciem membrany [77].



Rysunek 4.38: Powierzchnia całego oocytu i odpowiadająca jej powierzchnia ooplazmy oocytów świń po dojrzwaniu *in vitro* dla trzech klas jakości: a) schematyczny widok oocytów z zaznaczonymi obszarami oraz histogramy zależności od zmiany powierzchni oocytu i zmiany powierzchni ooplazmy podczas deformacji oocytu dla $P = 100$ kPa dla (b) pierwszej klasy jakości, (c) drugiej klasy jakości i (d) trzeciej klasy jakości. [77]

Wyniki analiz rejestrowanych obrazów szczegółowo opisano w rozprawie doktorskiej dr inż. A. Pokrzywnickiej [75]. Opracowane autorskie oprogramowanie stało się w ramach tej rozprawy głównym narzędziem do analizy obrazów deformowanego oocytu.

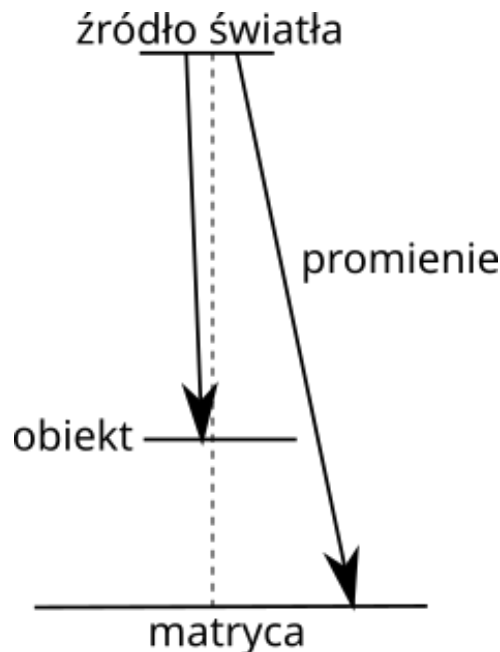
4.4 Analiza obrazów z układów bezsoczewkowych

Poza „tradycyjnym” układem mikroskopowym z lab-chipami mogą współpracować układy obrazowej detekcji optycznej bezsoczewkowe. Jak wspomniano wcześniej pozyskane w takim układzie obrazy mogą wymagać obróbki przed ich właściwą analizą. W tym podrozdziale przedstawiono wyniki kompleksowych prac nad analizą obrazów z układów bezsoczewkowych tzn. podjęto próbę opracowania uproszczonego modelu powstawania obrazu. Zweryfikowano go w rzeczywistym układzie pomiarowym badając obrazy obiektów dwuwymiarowych oraz zarejestrowano i poddano analizie opracowanym oprogramowaniem komórki (oocyty) i kulki szklane.

4.4.1 Modelowanie

W ramach prac własnych opracowano autorski uproszczony model do symulacji obrazu z układu bezsoczewkowego bazujący na zasadach optyki geometrycznej i śledzenia promieni [78]. Do implementacji użyto język C++ i umieszczono w opracowanym oprogramowaniu jako narzędzie dodatkowe.

W opracowanym modelu w trakcie symulacji promienie są emitowane ze „źródła światła” w kierunku „matrycy” (Rysunek 4.39). Na każdym etapie symulacji promień pokonuje niewielką odległość w przestrzeni po czym sprawdzane jest otoczenie, w którym się on znajduje i podejmowana jest decyzja o pochłanianiu promienia przez obiekt, lub jego dalszą propagację w kolejnych krokach.



Rysunek 4.39: Schemat modelu śledzenia promieni.

Parametry wejściowe modelu to:

- odległość pomiędzy źródłem światła, a matrycą,
- odległość pomiędzy obiektem, a matrycą,
- kształt i właściwości optyczne obiektu,
- maksymalny kąt odchylenia promieni od pionu,
- liczba promieni,
- rozmiar i intensywność punktów pozostawianych przez promień na „matrycy”.

Decyzja o wygaszeniu lub nie promienia podejmowana jest na podstawie następującego algorytmu:

1. Jeśli promień wyszedł za boczną lub górną granicę symulowanego obszaru to symulacja tego promienia kończy się.
2. Jeśli promień przechodzi przez granice obiektu, który nie jest płaskim (maska) lub nieprzeźroczystym promień zmienia swój kierunek zgodnie z zasadą refrakcji

$$\beta = \arcsin \frac{\sin \alpha * n_2}{n_1} \quad (4.6)$$

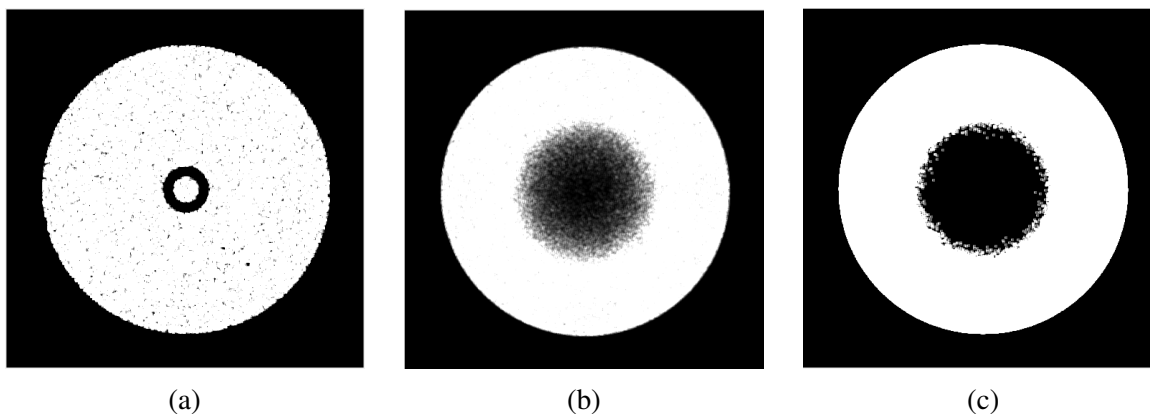
gdzie α – kąt padania, β – kąt załamania, n_1 – współczynnik załamania światła w obiekcie, n_2 – współczynnik załamania światła poza obiektem.

3. Jeśli promień porusza się w obiekcie na każdym etapie może on:
 - Zmienić kierunek z prawdopodobieństwem p_1
 - Być pochłoniętym przez materiał obiektu z prawdopodobieństwem p_2
 - Przejść dalej z prawdopodobieństwem $1 - (p_1 + p_2)$
4. Jeśli promień przechodzi przez płaszczyznę „matrycy” to jego symulacja się kończy.
5. W innym przypadku promień porusza się dalej

$$x = x + v \quad (4.7)$$

gdzie x – pozycja promienia, v – krok promienia.

Każdy promień, który nie jest „pochłaniany” przez obiekt oraz nie jest odbity w „pustą przestrzeń” zostawia jasny punkt na matrycy. Wynikiem symulacji jest obraz, który zawiera symulowane cienie będące wynikiem oddziaływania światła z obiektem (wzory 2D (tzw. maski) lub kulka o stałej/zmiennej przeźroczystości, Rysunek 4.40).

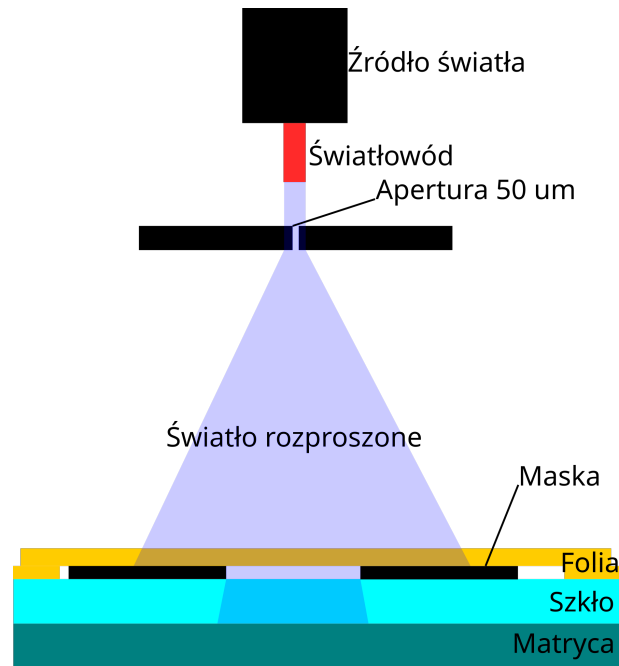


Rysunek 4.40: Przykładowe wyniki symulacji. Biały obszar to promienie padające na matrycę bez interakcji z obiektem, ciemny obszar w środku – cień obiektu: (a) maska „pączek” o średnicy $100\ \mu\text{m}$, (b) modelowana kulka ze zmienną przezroczystością (współczynnik pochłaniania $0,5-0,99$) o średnicy $300\ \mu\text{m}$, (c) kulka o stałej przezroczystości (współczynnik pochłaniania $0,99$) o średnicy $300\ \mu\text{m}$. Dla wszystkich obiektów: odległość pomiędzy źródłem światła a matrycą – $5\ \text{cm}$, odległość pomiędzy obiektem, a matrycą – $1\ \text{mm}$

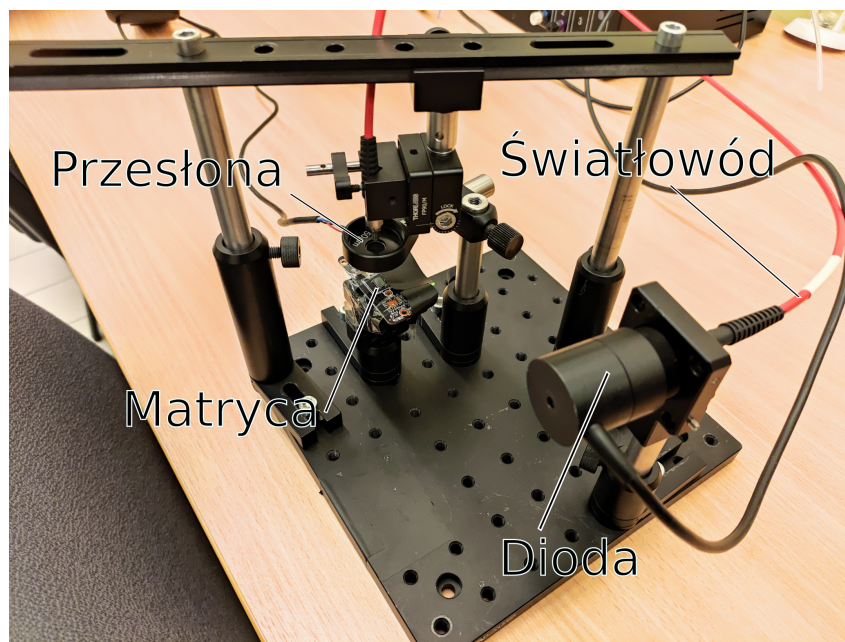
4.4.2 Układ pomiarowy

Weryfikacja opracowanego modelu nastąpiła eksperymentalnie w zestawionym układzie pomiarowym. Układ pomiarowy (Rysunki 4.41, 4.42) składa się z następujących komponentów:

- matrycy CMOS o wymiarach $5,5 \times 3,3\ \text{mm}^2$ i rozdzielczości 1920×1080 pikseli,
- szkła o grubości $1,1\ \text{mm}$, które znajduje się na matrycy,
- folii z wydrukowanymi maskami, przymocowanej do szkła,
- źródła światła (dioda) o długości fali $430\ \text{nm}$ ze światłowodem, umieszczonym prostopadle do matrycy w odległości $5\ \text{cm}$,
- przesłony (apertury) z otworem o średnicy $50\ \mu\text{m}$, umieszczonej tuż za końcówką światłowodu,
- komputera z oprogramowaniem do akwizycji i analizy obrazów.



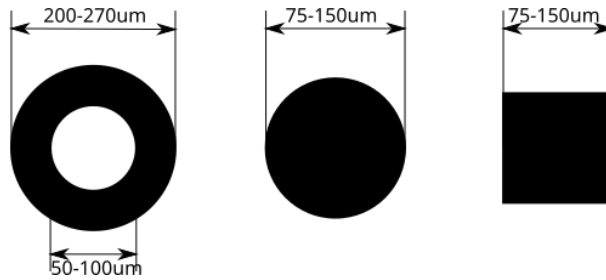
Rysunek 4.41: Schemat układu pomiarowego.



Rysunek 4.42: Widok układu pomiarowego.

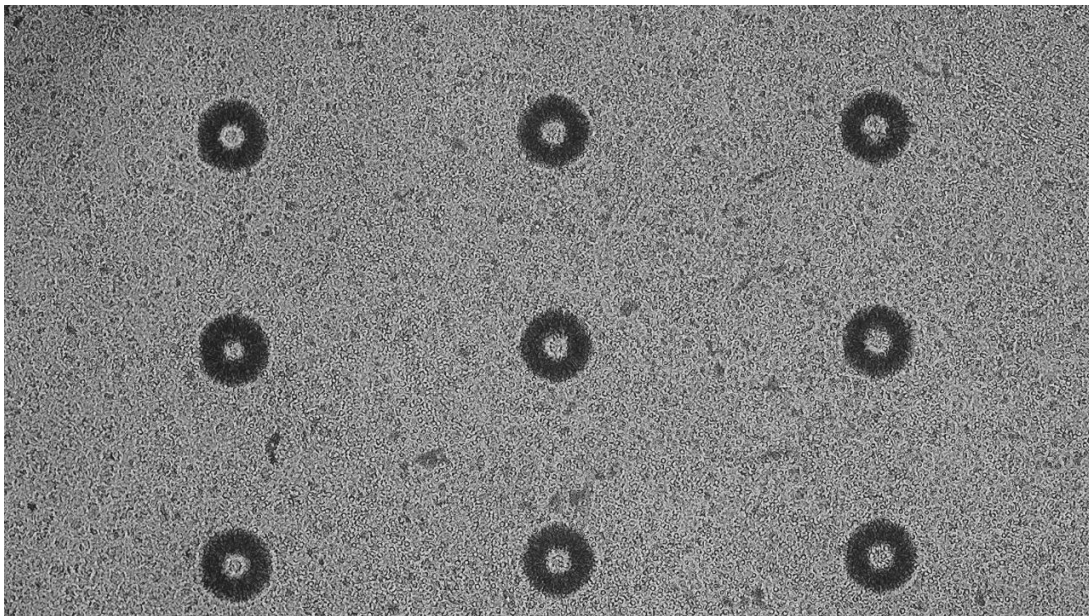
4.4.3 Analiza obrazów obiektów 2D

Do analizy obrazów holograficznych ważnym jest pozyskanie odniesienia obrazu holograficznego do rzeczywistych obiektów, które są obrazowane. W tym przypadku obiektami były maski (obiekty 2D) trzech typów: „pączek”, kropka oraz kwadrat (Rysunek 4.43) w zestawach po 9 sztuk w konfiguracji 3 na 3 (Rysunek 4.44).



Rysunek 4.43: Obrazowane maski: „pączek” (po lewej), kropka (środek), kwadrat (po prawej)

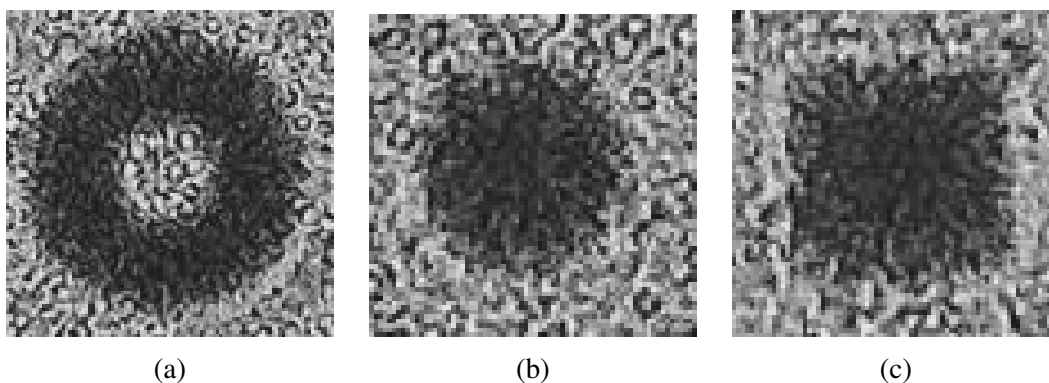
W przypadku obiektów o wymiarach około 50-150 mikrometrów średnicy (typowe wymiary euglen/oocytów, wymiary używanych masek) obraz holograficzny otrzymany przy długości fali światła 430 nm oraz odległości pomiędzy matrycą, a obiektem 1,1 mm (grubość szkła) pozwala na detekcję tych obiektów bez dekonwolucji hologramu (Rysunek 4.44).



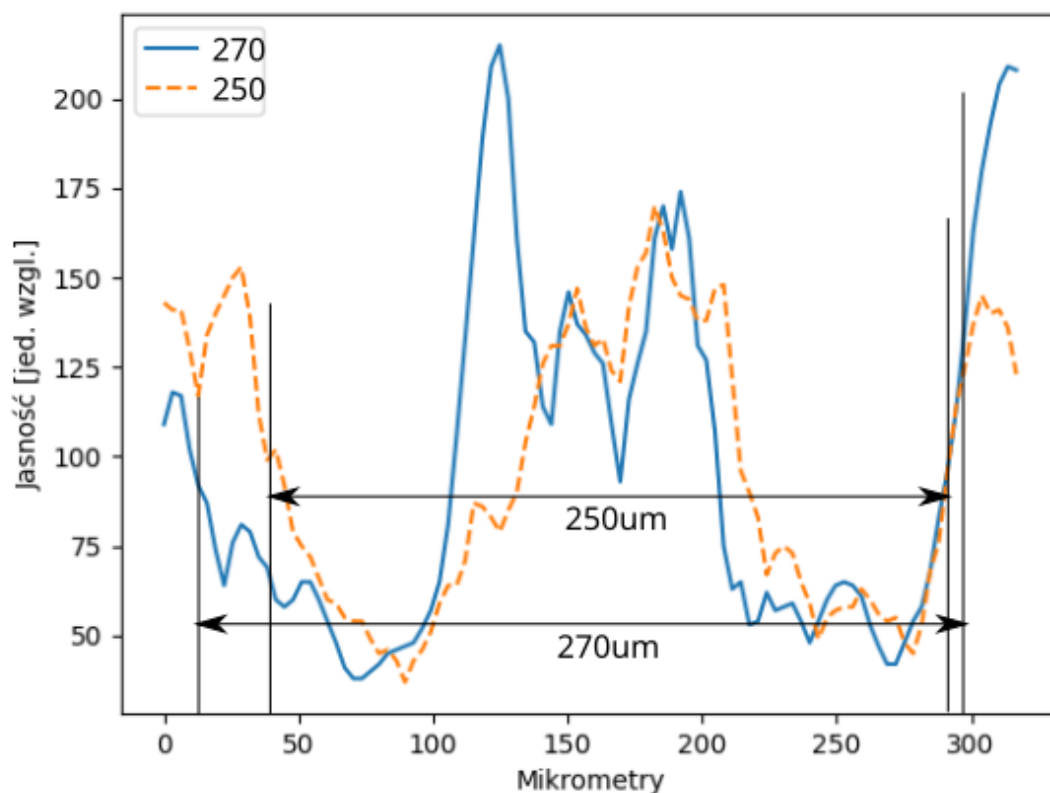
Rysunek 4.44: Obraz holograficzny masek okrągłych typu „pączek” (średnica maski – 270 μm , średnica otworu – 100 μm). Charakterystyczny wzór tła jest wynikiem rozpraszania się światła na folii, na której umieszczone były maski.

Do detekcji wymiarów obiektów o różnych wymiarach (Rysunek 4.45) na obrazie holograficznym użyto porównania wartości jasności pikseli przekroju obiektu (Rysunek 4.46) lub algorytmu progowania. (Rysunek 4.47).

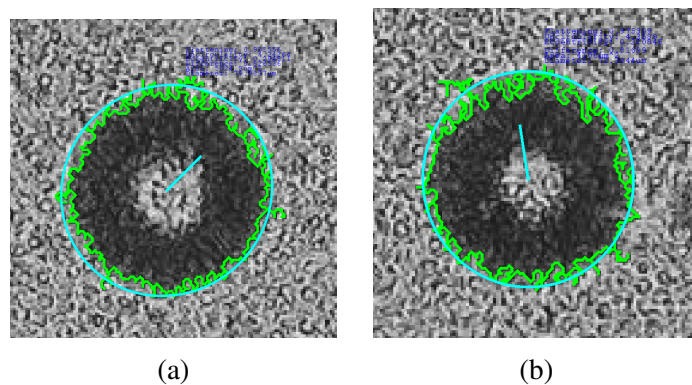
W przypadku wykorzystania przekroju jasności obiektu, jego średnicę wyznaczano na podstawie odległości między połowami wysokości zboczy związanych z zewnętrznym obrysem obrazu.



Rysunek 4.45: Obrazy holograficzne masek: (a) „paczek” o średnicy 270 μm , (b) kropka o średnicy 150 μm , (c) kwadrat zo boku 150 μm



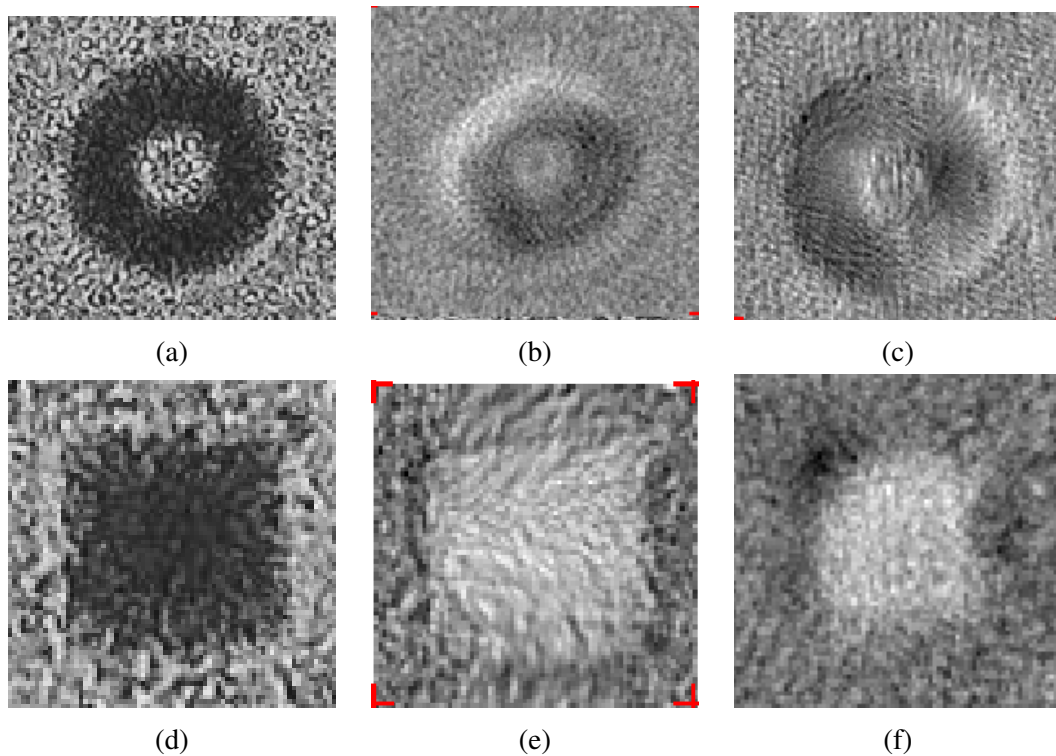
Rysunek 4.46: Porównanie przekrojów obrazów holograficznych masek z różnymi średnicami. Aby zmniejszyć wpływ szumu tła na pomiar, przekrój przetwarzany jest metodą średniej ruchomej z rozmiarem okna $n = 5$. Mniejszy obiekt posiada mniejszą odległość pomiędzy szczytami bocznymi. Pomiar średnicy odbywa się pomiędzy punktami na środkach zbocz. Linia ciągła – dla średnicy wyznaczonej 270 μm , linia przerywana – dla średnicy wyznaczonej 250 μm



Rysunek 4.47: Porównanie wyników działania algorytmu progowania przy detekcji obiektów na obrazach holograficznych masek. Zauważalne są zniekształcenia hologramu na krawędziach obiektów. Średnicy wyznaczone to: (a) $270 \mu\text{m}$, (b) $250 \mu\text{m}$

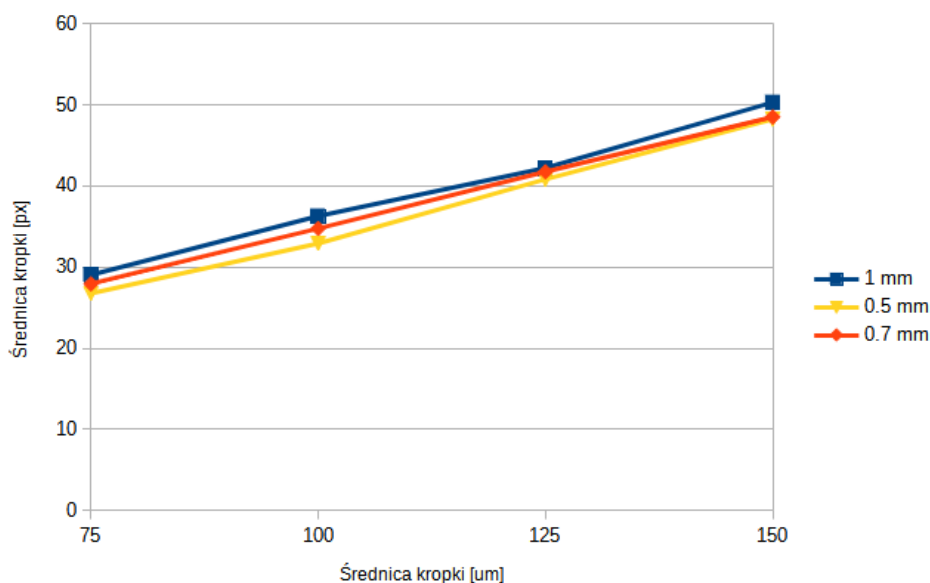
Obydwa zastosowane sposoby wyznaczania wymiarów obiektów były poprawne, a wyznaczone wymiary były zbliżone do rzeczywistości.

W przypadku dekonwolucji obrazu holograficznego zanieczyszczenie tła wewnętrzną strukturą folii, na której znajdowały się maski nie pozwoliło na poprawne przetwarzanie obrazu (Rysunek 4.48). W wypadku zastosowania metod Fresnela-Fourie'go i Kirchhoffa-Fresnela efektem „ubocznym” jest wrażenie trójwymiarowości przetwarzanego obrazu.



Rysunek 4.48: Dekonwolucja holograficznego obrazu maski: (a) wstępny obraz „pączka” po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (b) obraz „pączka” po zastosowaniu metody Fresnela-Fourie’go (c) obraz „pączka” po zastosowaniu metody propagacji Kirchhoffa-Fresnela (d) wstępny obraz kwadratu po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (e) obraz kwadratu po zastosowaniu metody Fresnela-Fourie’go (f) obraz kwadratu po zastosowaniu metody propagacji Kirchhoffa-Fresnela.

Przeprowadzono również badanie zależności pomiędzy odległością maski od matrycy, a wymiarami cienia tej maski na obrazie. Do porównania wykorzystano trzy grubości szkła: 0,5, 0,7 oraz 1 mm (typowe grubości podłoży szklanych stosowanych w technologii lab-chipów) oraz cztery zestawy okrągłych masek ze średnicami: 75, 100, 125 oraz 150 μm . Stwierdzono, że zmiana grubości szkła o 0,2-0,3 mm powoduje zmianę średnicy cienia o 2-3 pikseli (4-5%).



Rysunek 4.49: Zależność pomiędzy średnicami masek, a średnicami ich cieniów na obrazie dla masek typu kropka dla trzech odległości maska-matryca.

Analizę obrazów obiektów 2D z układu bezsoczewkowego podsumowano w tabeli 4.5.

Tabela 4.5: Symulowane, źródłowe i przetworzone obrazy dla różnych wzorów masek.

Wzór maski	„pączek”	kropka	kwadrat
Obraz symulowany			
Obraz źródłowy			
Wynik dekonwolucji			

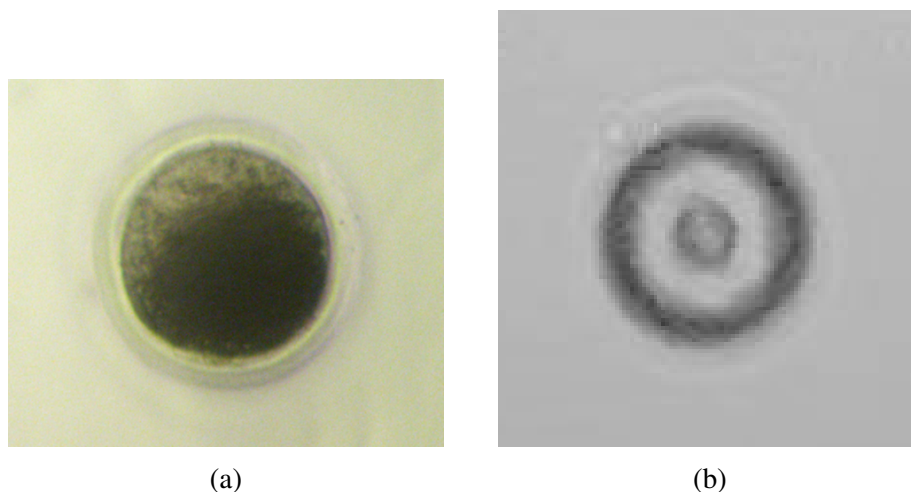
Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że opracowany uproszczony model służący do symulacji obrazów obiektów 2D może być wykorzystany jako pierwsze przybliżenie obrazu rzeczywistego. Zestawiony układ pomiarowy jak również wykorzystane algorytmy mogą służyć do pozyskania obrazów obiektów 2D i ich analizy oraz kalibracji układu z późniejszą możliwością wyznaczania wymiarów obiektu. W dalszej kolejności analizowano obrazy obiektów trójwymiarowych.

4.4.4 Analiza obrazów obiektów 3D

Przy obrazowaniu bezsoczewkowym złożonych, częściowo przezroczystych, trójwymiarowych obiektów (np. oocyty) otrzymywany obraz jest skomplikowany i jego modelowanie jest poważnym wyzwaniem. Powszechnie stosowane modele rozpraszania się światła (rozwiązanie Mie, osiowo-symetryczne rozwiązanie T-matrycy, przybliżenie dyskretnych dipoli) przystosowane są do modelowania obrazów „małych” obiektów (rzędu pojedynczych mikrometrów).

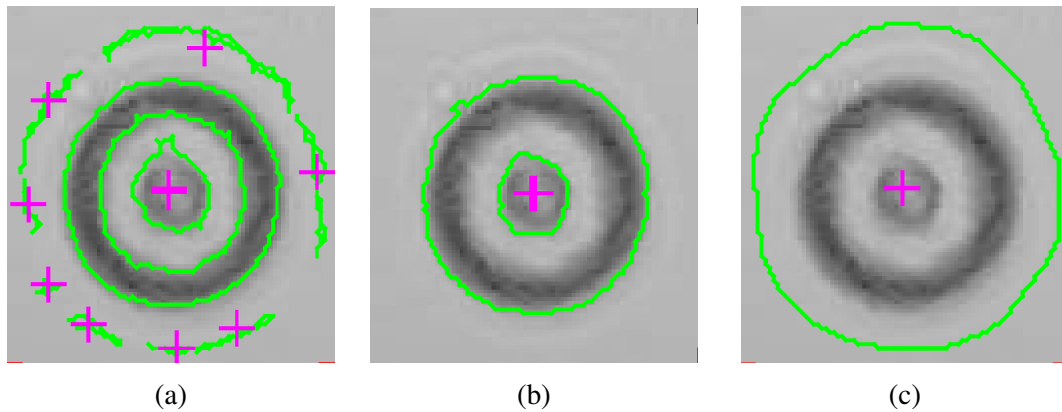
Opracowany uproszczony model dawał akceptowalne wyniki dla obiektów 2D natomiast dla „dużych” obiektów 3D nie mógł być zastosowany.

W ramach niniejszej pracy zobrazowane zostały komórka (oocyt świni o średnicy około 150 mikrometrów) oraz kulki agarozowe (o średnicach od 50 μm do 150 μm) (Rysunki 4.50, 4.53).

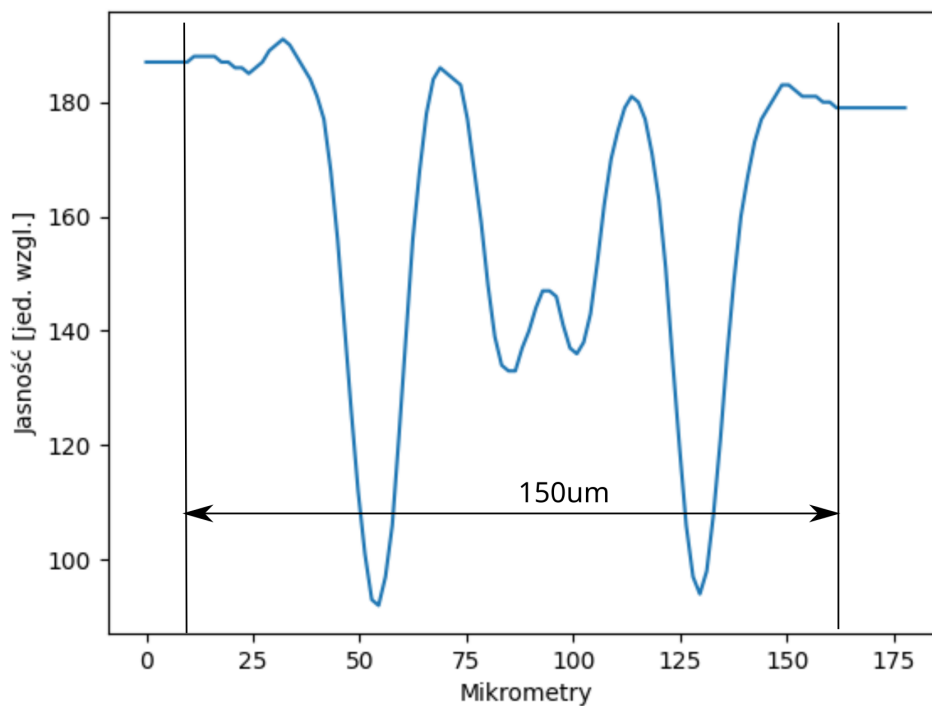


Rysunek 4.50: Obrazy oocyty: (a) przykładowy obraz z układu „tradycyjnego” mikroskopowego, (b) obraz z układu bezsoczewkowego.

Obraz oocyty z układu bezsoczewkowego znacznie się różni od typowych obrazów z „tradycyjnych” mikroskopów. Otoczka komórki zlewa się z tłem (Rysunek 4.51), ale analiza jest dalej możliwa za pomocą np. analizy przekroju obrazu (Rysunek 4.52).



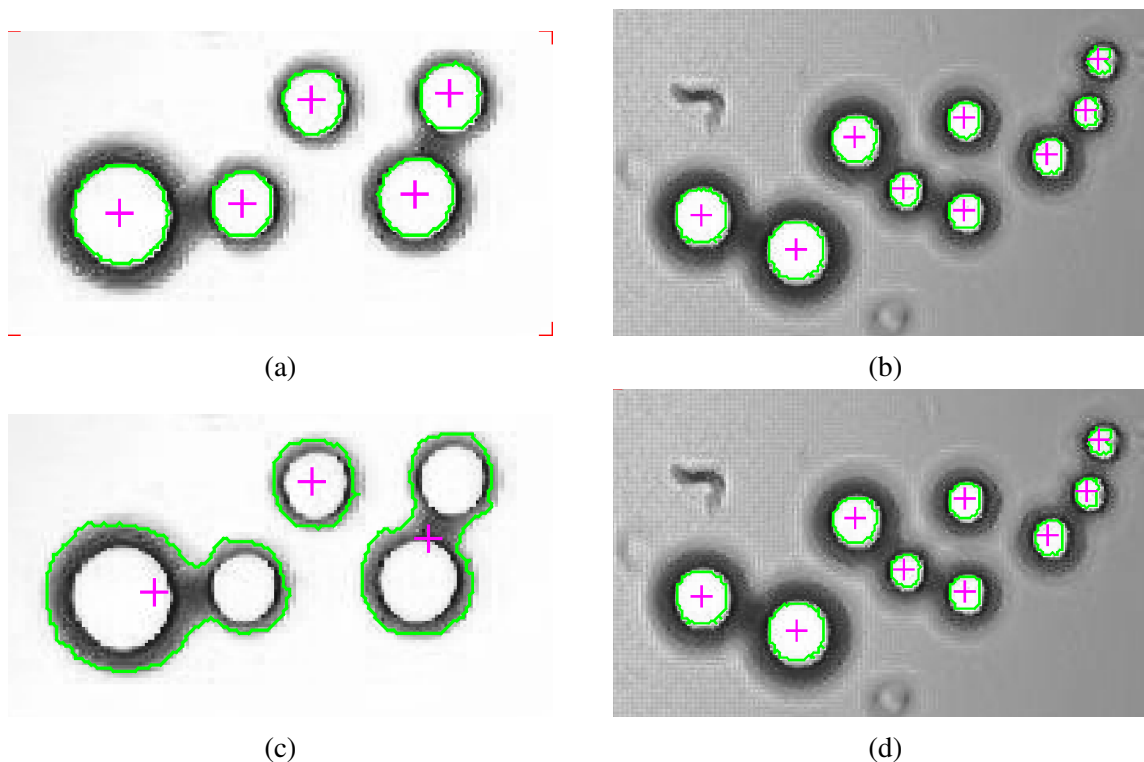
Rysunek 4.51: Wykrywanie oocytu: (a) prosty algorytm wykrywania krawędzi wykrywa osobne części otoczki, (b) algorytm progowania wykrywa wewnętrzne elementy komórki, ale nie otoczkę, (c) algorytm α -form wykrył oocyt razem z otoczką, ale granica konturu wychodzi poza granice otoczki (górną część obrazu) co jest spowodowane małym kontrastem otoczki i tła oraz stosunkowo małą rozdzielczością obrazu (2 megapiksele).



Rysunek 4.52: Przekrój obrazu komórki. Pomiar średnicy zewnętrznej otoczki oocytu odbywa się pomiędzy punktami gdzie jasność obrazu zaczyna się zmieniać względem jasności tła. Spowodowane to jest tym, że otoczka komórki nie różni się znacznie od tła i dlatego nie powstaje wyraźne zbocze na wykresie przekroju. Średnicę wnętrza komórki bez otoczki można wyznaczyć na podstawie już stosowanego wcześniej pomiaru odległości pomiędzy połowami zboczy. Zgodnie z wymiarami kalibracyjnymi na podstawie obrazów masek, średnica komórki była wyznaczona jako $150 \mu\text{m}$

Obrazy kulek agarozowych (Rysunek 4.53), mimo zbliżonych do oocytu wymiarów mają zupełnie inny kształt. Ze względu na jednorodność wewnętrznej struktury kulek, wewnętrzna

część obrazu jest jednolicie jasna. Widoczna jest natomiast zewnętrzna otoczka wynikająca z oddziaływania promieni świetlnych z obiektem. Grubość tej otoczki jest uzależniona od średnicy kulki - im większa średnica tym grubsza otoczka. Przykłady zastosowania wybranych algorytmów wykrywających kulki przedstawiono na rysunku 4.53.



Rysunek 4.53: Obrazy kulek agarozowych: (a) obraz z jasnym tłem, przeanalizowany algorytmem progowania, kulki wykryto poprawnie, (b) obraz z ciemnym tłem, przeanalizowany algorytmem progowania, kulki wykryto poprawnie, (c) obraz z jasnym tłem, przeanalizowany algorytmem wykrywania krawędzi, kulki wykryto niepoprawnie, zaznaczono krawędzie cienia, (d) obraz z ciemnym tłem, przeanalizowany algorytmem odejmowania tła, kulki wykryto poprawnie.

4.5 Podsumowanie

W rozdziale tym przedstawiono własne autorskie oprogramowanie służące do analizy obrazów komórek znajdujących się w lab-chipach. Oprogramowanie wykorzystuje przedstawione wcześniej algorytmy analizy obrazu, które zestawione w ciąg funkcjonalny umożliwiają zaawansowaną i efektywną analizę obrazów komórek. Wynikiem tej analizy jest zestaw parametrów opisujących komórkę. Zestaw ten może być dobierany przez użytkownika (badacza) w zależności od potrzeb badawczych, co jest jedną z jego unikatowych właściwości.

Oprogramowanie wykonano z wykorzystaniem języka programowania C++ oraz niezbędnych bibliotek programowych. Jego powstanie wymagało zarówno opanowania niezbędnego, często nietrywialnego, aparatu matematycznego związanego z wykorzystywanymi algorytmami, jak również biegłości programowania.

Weryfikacja działania programu nastąpiła w wyniku współdziałania autora rozprawy z zespołem badawczym Katedry Mikrosystemów i włączeniem opracowanego programu w cykl badań związanych z hodowlą i analizą wpływu oświetlenia na ruchliwość euglen w szklanym lab-chipie oraz badaniem właściwości mechanicznych oocytów świńskich z wykorzystaniem krzemowo-szklanego cytometru typu MEMS. Istotny jest tutaj materiał lab-chipa, który w pierwszym wypadku był całkowicie przezroczysty (szkło), w drugim natomiast „tłem” dla badanej komórki było podłoże nieprzezroczyste (krzem). W badaniach wykorzystano „tradycyjny” układ mikroskopu optycznego, ale o różnych parametrach. Był to miniaturowy mikroskop ręczny z kamerą o stosunkowo niskiej rozdzielczości i typowy odwrócony mikroskop biologiczny z kamerą o wysokiej rozdzielczości. Wykazano, że bez względu na źródło obrazu, zarejestrowane obrazy komórek (eugleny i oocyty) mogły z powodzeniem zostać poddane analizie wieloparametrycznej. Ponadto, przeprowadzono cykl badań z wykorzystaniem układu bezsoczewkowego. Zaproponowano model uproszczony powstawania obrazów oraz zweryfikowano jego działanie w zestawionym przez autora rzeczywistym układzie pomiarowych. Uzyskano i analizowano obrazy zarówno wzorcowych struktur dwuwymiarowych jak również kulek agarozowych i oocytu świńskiego. Wykazano zatem, że bez względu na źródło obrazu (tzn. układ mikroskopowy „tradycyjny” lub bezsoczewkowy) opracowane oprogramowanie jest elastycznym i efektywnym narzędziem badawczym umożliwiającym analizę komórek znajdujących się w lab-chipie szklanym lub krzemowo-szklanym.

Rozdział 5

Podsumowanie i wnioski końcowe

Analiza obrazu komórek jest jedną z najczęściej stosowanych technik badawczych w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej. Rozwój technik rejestracji obrazu za pomocą urządzeń optoelektronicznych w połączeniu z przetwarzaniem i analizą obrazu umożliwił określania parametrów komórek, które do tej pory opisywane były subiektywnie na podstawie obserwacji mikroskopowej przez operatora. Automatyzacja i parametryzacja procesu analizy obrazu komórki oparta jest na zastosowaniu specjalizowanych algorytmów i narzędzi informatycznych zwykle dostępnych jako oprogramowanie komercyjne o zamkniętej architekturze. W parach badawczych związanych z analizą komórek, jak wykazano w rozdziale drugim, często wykorzystuje się autorskie oprogramowanie do analizy, które powstaje w grupach badawczych w wyniku zapotrzebowania tych grup na rozwiązanie konkretnego problemu badawczego. Jednocześnie, coraz powszechniejsze wykorzystanie układów mikrofluidycznych (lab-chipów) do prowadzenia zarówno badań naukowych jak i sroko pojętej laboratoryjnej diagnostyki stanów patologicznych komórek, spowodowało konieczność dalszego rozwoju technik analizy obrazowej ze względu na szereg trudności wynikających ze specyfiki badania komórek w układzie mikrofluidycznym. Ciągły rozwój i zapotrzebowanie na takie rozwiązania widoczne są zarówno w liczbie publikacji naukowych związanych z tą tematyką jak również z rosnącym zainteresowaniem i nowymi możliwościami diagnostycznymi wynikającymi z wykorzystania detekcji obrazowej i lab-chipów. Celem niniejszej rozprawy było zatem opracowanie oryginalnego rozwiązania problemu badawczego związanego z analizą obrazów komórek w układach mikrofluidycznych i wieloparametryczną charakteryzacją tych komórek.

W ramach rozprawy doktorskiej:

1. Przeprowadzono analizę literatury związanej z analizą obrazów komórek znajdujących się w lab-chipach wykonanych z przezroczystych materiałów, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystywanego układu optycznego (mikroskopy „tradycyjny” lub układ bezsoczewkowy), oprogramowania zastosowanego do analizy obrazów, źródła obrazów i wyniku analizy,
2. Przeprowadzono analizę możliwości wykorzystania wybranych algorytmów analizy ob-

razu w trzech grupach funkcjonalnych (algorytmy detekcji, śledzenia i wspomagające) z uwzględnieniem specyfiki techniki lab-chipów,

3. Opracowano autorskie oprogramowanie wykorzystujące wybrane algorytmy do zaawansowanej analizy obrazów komórek znajdujących się w lab-chipach, współpracujące z układem mikroskopowym „tradycyjnym” lub bezsoczewkowym jako źródłami obrazów,
4. Eksperymentalnie zweryfikowano działanie oprogramowania wykorzystując je z powodzeniem do wieloparametrycznej analizy komórek drożdży, euglen i oocytów świńskich w układach mikrofluidycznych wykonanych ze szkła oraz krzemu i szkła opracowanych w ramach prac badawczych zespołu Katedry Mikrosystemów,
5. Wykazano, że opracowane rozwiązanie jest użytecznym narzędziem badawczym umożliwiającym wieloparametryczną analizę komórek znajdujących się w układach mikrofluidycznych [79, 80].

Realizacja celu rozprawy wymagała przeprowadzenia zarówno badań literaturowych, teoretycznych jak i eksperymentalnych. Badania te wymagały wiedzy i umiejętności z zakresy niezbędnego aparatu matematycznego związanego z zastosowanymi algorytmami analizy obrazu jak również narzędzi programistycznych do implementacji tych algorytmów. Niezbędna była również wiedza z zakresu techniki mikrosystemów (konstrukcji i technologii układów mikrofluidycznych) i optoelektronicznej rejestracji obrazów. Powstałe oprogramowanie jest elastycznym narzędziem, które może dostosować użytkownik do potrzeb analizy obrazów pozyskanych z dwóch różnych układów mikroskopowych – „tradycyjnego” i bezsoczewkowego. Cel pracy został zatem w pełni osiągnięty. Wyniki prac przedstawiono w 3 artykułach z tzw. listy filadelfijskiej oraz 14 materiałach konferencji krajowych i międzynarodowych [81, 82, 83, 84]. Dalsze prace związane z rozwojem oprogramowania skupione będą wokół dwóch zagadnień: (1) możliwość analizy rejestrowanych obrazów w czasie rzeczywistym oraz (2) metodologia modelowania obrazów holograficznych skomplikowanych struktur komórkowych (np. oocyty). Prace te będą kontynuowane w Katedrze Mikrosystemów Wydziału Elektroniki, Fotoniki i Mikrosystemów Politechniki Wrocławskiej.

Bibliografia

- [1] Rafał Walczak. *Laboratoria chipowe z detekcją optyczną: konstrukcja, technologia i przykłady wykorzystania*. Wrocław: Oficyna wydawnicza politechniki wrocławskiej, 2014.
- [2] Ingmar Peitz i Rien van Leeuwen. „Single-cell bacteria growth monitoring by automated DEP-facilitated image analysis”. eng. W: *Lab on a Chip* 10.21 (list. 2010), s. 2944–2951. DOI: 10.1039/c004691d.
- [3] Jing Zhou, Yu Wu, Sang-Kwon Lee i Rong Fan. „High-content single-cell analysis on-chip using a laser microarray scanner”. en. W: *Lab on a Chip* 12.23 (paź. 2012), s. 5025–5033. DOI: 10.1039/C2LC40309A. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/lc/c2lc40309a> (term. wiz. 05.07.2021).
- [4] Obdulia Rabal, Wolfgang Link, Beatriz G. Serelde, James R. Bischoff i Julen Oyarzabal. „An integrated one-step system to extract, analyze and annotate all relevant information from image-based cell screening of chemical libraries”. en. W: *Molecular BioSystems* 6.4 (mar. 2010), s. 711–720. DOI: 10.1039/B919830J. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/mb/b919830j> (term. wiz. 05.07.2021).
- [5] Ilker Ersoy i Kannappan Palaniappan. „Multi-feature contour evolution for automatic live cell segmentation in time lapse imagery”. W: *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. ISSN: 1558-4615. Sierp. 2008, s. 371–374. DOI: 10.1109/IEMBS.2008.4649167.
- [6] Diana Delibaltov, S. Karthikeyan, Vignesh Jagadeesh i B.S. Manjunath. „Robust biological image sequence analysis using graph based approaches”. W: *2012 Conference Record of the Forty Sixth Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers (ASILOMAR)*. ISSN: 1058-6393. List. 2012, s. 1588–1592. DOI: 10.1109/ACSSC.2012.6489297.
- [7] Arif ul Maula Khan, Angelo Torelli, Ivo Wolf i Norbert Gretz. „AutoCellSeg: robust automatic colony forming unit (CFU)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques”. en. W: *Scientific Reports* 8.1 (maj 2018), s. 7302. DOI: 10.1038/s41598-018-24916-9. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24916-9> (term. wiz. 05.07.2021).

- [8] Siqi Li, Huiyan Jiang, Yu-dong Yao, Wenbo Pang, Qingjiao Sun i Li Kuang. „Structure convolutional extreme learning machine and case-based shape template for HCC nucleus segmentation”. en. W: *Neurocomputing* 312 (paź. 2018), s. 9–26. DOI: 10.1016/j.neucom.2018.05.013. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925231218305447> (term. wiz. 05.07.2021).
- [9] Mohamad A. Alyassin, SangJun Moon, Hasan O. Keles, Fahim Manzur, Richard L. Lin, Edward Hægstrom, Daniel R. Kuritzkes i Utkan Demirci. „Rapid automated cell quantification on HIV microfluidic devices”. eng. W: *Lab on a Chip* 9.23 (grud. 2009), s. 3364–3369. DOI: 10.1039/b911882a.
- [10] Aymen Mouelhi, Hana Rmili, Jaouher Ben Ali, Mounir Sayadi, Raoudha Doghri i Karima Mrad. „Fast unsupervised nuclear segmentation and classification scheme for automatic allred cancer scoring in immunohistochemical breast tissue images”. en. W: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 165 (paź. 2018), s. 37–51. DOI: 10.1016/j.cmpb.2018.08.005. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169260718301950> (term. wiz. 05.07.2021).
- [11] Filippo Piccinini, Anna Tesei i Alessandro Bevilacqua. „Single-image based methods used for non-invasive volume estimation of cancer spheroids: a practical assessing approach based on entry-level equipment”. eng. W: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 135 (paź. 2016), s. 51–60. DOI: 10.1016/j.cmpb.2016.07.024.
- [12] Anne E. Carpenter, Thouis R. Jones, Michael R. Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A. Guertin, Joo Han Chang, Robert A. Lindquist, Jason Moffat, Polina Golland i David M. Sabatini. „CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes”. W: *Genome Biology* 7.10 (paź. 2006), R100. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r100. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100> (term. wiz. 05.07.2021).
- [13] Wojciech Tarnawski, Vartan Kurtcuoglu, Paweł Lorek, Marcin Bodych, Jan Rotter, Monika Muszkietka, Łukasz Piwowar, Dimos Poulikakos, Michał Majkowski i Aldo Ferrari. „A robust algorithm for segmenting and tracking clustered cells in time-lapse fluorescent microscopy”. eng. W: *IEEE journal of biomedical and health informatics* 17.4 (lip. 2013), s. 862–869. DOI: 10.1109/JBHI.2013.2262233.
- [14] Chen-Chen Lin, Angela Chen i Che-Hsin Lin. „Microfluidic cell counter/sorter utilizing multiple particle tracing technique and optically switching approach”. eng. W: *Biomedical Microdevices* 10.1 (lut. 2008), s. 55–63. DOI: 10.1007/s10544-007-9109-8.
- [15] Qingyi Gu, Tomohiro Kawahara, Tadayoshi Aoyama, Takeshi Takaki, Idaku Ishii, Ayumi Takemoto i Naoaki Sakamoto. „LOC-Based High-Throughput Cell Morphology Analysis System”. W: *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering* 12.4 (paź. 2015), s. 1346–1356. DOI: 10.1109/TASE.2015.2462118.

- [16] E. Afrimzon, G. Botchkina, N. Zurgil, Y. Shafran, M. Sobolev, S. Moshkov, O. Ravid-Hermesh, I. Ojima i M. Deutsch. „Hydrogel microstructure live-cell array for multiplexed analyses of cancer stem cells, tumor heterogeneity and differential drug response at single-element resolution”. en. W: *Lab on a Chip* 16.6 (mar. 2016), s. 1047–1062. DOI: 10.1039/C6LC00014B. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/1c/c61c00014b> (term. wiz. 05.07.2021).
- [17] Ophélie I. Berthuy, Sinan K. Muldur, François Rossi, Pascal Colpo, Loïc J. Blum i Christophe A. Marquette. „Multiplex cell microarrays for high-throughput screening”. en. W: *Lab on a Chip* 16.22 (list. 2016). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 4248–4262. DOI: 10.1039/C6LC00831C. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/1c/c61c00831c> (term. wiz. 05.07.2021).
- [18] Yiyue Jiang, Cheng Lei, Atsushi Yasumoto, Hirofumi Kobayashi, Yuri Aisaka, Takuro Ito, Baoshan Guo, Nao Nitta, Natsumaro Kutsuna, Yasuyuki Ozeki, Atsuhiko Nakagawa, Yutaka Yatomi i Keisuke Goda. „Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy”. eng. W: *Lab on a Chip* 17.14 (lip. 2017), s. 2426–2434. DOI: 10.1039/c71c00396j.
- [19] Daphne Weihs, Dror Gilad, Moti Seon i Itai Cohen. „Image-based algorithm for analysis of transient trapping in single-particle trajectories”. en. W: *Microfluidics and Nanofluidics* 12.1 (sty. 2012), s. 337–344. DOI: 10.1007/s10404-011-0877-3. URL: <https://doi.org/10.1007/s10404-011-0877-3> (term. wiz. 05.07.2021).
- [20] Leonardo F. Urbano, Puneet Masson, Matthew VerMilyea i Moshe Kam. „Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images”. eng. W: *IEEE transactions on medical imaging* 36.3 (mar. 2017), s. 792–801. DOI: 10.1109/TMI.2016.2630720.
- [21] Mohamed Elsayed, Taymour M. El-Sherry i Mohamed Abdelgawad. „Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J”. eng. W: *Theriogenology* 84.8 (list. 2015), s. 1367–1377. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.021.
- [22] Guoan Zheng, Seung Ah Lee, Samuel Yang i Changhuei Yang. „Sub-pixel resolving optofluidic microscope for on-chip cell imaging”. eng. W: *Lab on a Chip* 10.22 (list. 2010), s. 3125–3129. DOI: 10.1039/c01c00213e.
- [23] Seung Ah Lee, Guoan Zheng, Nandini Mukherjee i Changhuei Yang. „On-chip continuous monitoring of motile microorganisms on an ePetri platform”. W: *Lab on a chip* 12.13 (lip. 2012), s. 2385–2390. DOI: 10.1039/c21c40090a. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371133/> (term. wiz. 05.07.2021).

- [24] Serge Pelet, Reinhard Dechant, Sung Sik Lee, Frank van Drogen i Matthias Peter. „An integrated image analysis platform to quantify signal transduction in single cells”. eng. W: *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 4.10 (paź. 2012), s. 1274–1282. DOI: 10.1039/c2ib20139a.
- [25] Mohammad Ali Khorshidi, Prem Kumar Periyannan Rajeswari, Carolina Wählby, Hakan N. Joensson i Helene Andersson Svahn. „Automated analysis of dynamic behavior of single cells in picoliter droplets”. en. W: *Lab on a Chip* 14.5 (lut. 2014). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 931–937. DOI: 10.1039/C3LC51136G. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/1c/c31c51136g> (term. wiz. 05.07.2021).
- [26] D. Falconnet, A. Niemistö, R. J. Taylor, M. Ricicova, T. Galitski, I. Shmulevich i C. L. Hansen. „High-throughput tracking of single yeast cells in a microfluidic imaging matrix”. eng. W: *Lab on a Chip* 11.3 (lut. 2011), s. 466–473. DOI: 10.1039/c01c00228c.
- [27] Alex Eli Pottash, Ryan McKay, Chelsea R. Virgile, Hana Ueda i William E. Bentley. „TumbleScore: Run and tumble analysis for low frame-rate motility videos”. W: *Bio-Techniques* 62.1 (sty. 2017). Publisher: Future Science, s. 31–36. DOI: 10.2144/000114493. URL: <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/000114493> (term. wiz. 05.07.2021).
- [28] Jean-Baptiste Lugagne, Srajan Jain, Pierre Ivanovitch, Zacchary Ben Meriem, Clément Vulin, Chiara Fracassi, Gregory Batt i Pascal Hersen. „Identification of individual cells from z-stacks of bright-field microscopy images”. en. W: *Scientific Reports* 8.1 (lip. 2018), s. 11455. DOI: 10.1038/s41598-018-29647-5. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29647-5> (term. wiz. 05.07.2021).
- [29] Bo Yang Yu, Caglar Elbuken, Chong Shen, Jan Paul Huissoon i Carolyn L. Ren. „An integrated microfluidic device for the sorting of yeast cells using image processing”. en. W: *Scientific Reports* 8.1 (lut. 2018), s. 3550. DOI: 10.1038/s41598-018-21833-9. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-21833-9> (term. wiz. 05.07.2021).
- [30] Chunhong Zheng, Zhilong Yu, Ying Zhou, Louis Tao, Yuhong Pang, Tao Chen, Xiannian Zhang, Haiwei Qiu, Hongwei Zhou, Zitian Chen i Yanyi Huang. „Live cell imaging analysis of the epigenetic regulation of the human endothelial cell migration at single-cell resolution”. W: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 17 (2012), s. 3063–3072. DOI: 10.1039/c21c40192d.
- [31] Irina Zaretsky, Michal Polonsky, Eric Shifrut, Shlomit Reich-Zeliger, Yaron Antebi, Guy Aidelberg, Nir Waysbort i Nir Friedman. „Monitoring the dynamics of primary T cell activation and differentiation using long term live cell imaging in microwell arrays”. eng. W: *Lab on a Chip* 12.23 (grud. 2012), s. 5007–5015. DOI: 10.1039/c21c40808b.

- [32] Si Hyung Jin, Sung-Chan Jang, Byungjin Lee, Heon-Ho Jeong, Seong-Geun Jeong, Sung Sik Lee, Keun Pil Kim i Chang-Soo Lee. „Monitoring of chromosome dynamics of single yeast cells in a microfluidic platform with aperture cell traps”. en. W: *Lab on a Chip* 16.8 (kw. 2016). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 1358–1365. DOI: 10.1039/C5LC01422K. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/1c/c51c01422k> (term. wiz. 05.07.2021).
- [33] Evelien Mathieu, Colin D. Paul, Richard Stahl, Geert Vanmeerbeeck, Veerle Reumers, Chengxun Liu, Konstantinos Konstantopoulos i Liesbet Lagae. „Time-lapse lens-free imaging of cell migration in diverse physical microenvironments”. W: *Lab on a chip* 16.17 (sierp. 2016), s. 3304–3316. DOI: 10.1039/c61c00860g. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987231/> (term. wiz. 05.07.2021).
- [34] Emerson Zang, Susanne Brandes, Miguel Tovar, Karin Martin, Franziska Mech, Peter Horbert, Thomas Henkel, Marc Thilo Figge i Martin Roth. „Real-time image processing for label-free enrichment of Actinobacteria cultivated in picolitre droplets”. eng. W: *Lab on a Chip* 13.18 (wrz. 2013), s. 3707–3713. DOI: 10.1039/c31c50572c.
- [35] Simon Youssef, Sebastian Gude i Joachim O. Rädler. „Automated tracking in live-cell time-lapse movies”. eng. W: *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 3.11 (list. 2011), s. 1095–1101. DOI: 10.1039/c1ib00035g.
- [36] I. F. Sbalzarini i P. Koumoutsakos. „Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology”. en. W: *Journal of Structural Biology* 151.2 (sierp. 2005), s. 182–195. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.002. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847705001267> (term. wiz. 05.07.2021).
- [37] Khuloud Jaqaman, Dinah Loerke, Marcel Mettlen, Hirotaka Kuwata, Sergio Grinstein, Sandra L. Schmid i Gaudenz Danuser. „Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences”. en. W: *Nature Methods* 5.8 (sierp. 2008), s. 695–702. DOI: 10.1038/nmeth.1237. URL: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1237> (term. wiz. 05.07.2021).
- [38] Ketheesan Thirusittampalam, M. Julius Hossain, Ovidiu Ghita i Paul F. Whelan. „A novel framework for cellular tracking and mitosis detection in dense phase contrast microscopy images”. eng. W: *IEEE journal of biomedical and health informatics* 17.3 (maj 2013), s. 642–653. DOI: 10.1109/titb.2012.2228663.
- [39] Pedro D. Kostelec, Leo M. Carlin i Ben Glocker. „Learning to detect and track cells for quantitative analysis of time-lapse microscopic image sequences”. W: *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. ISSN: 1945-8452. Kw. 2015, s. 1544–1547. DOI: 10.1109/ISBI.2015.7164172.

- [40] L. Miccio, P. Memmolo, F. Merola, S. Fusco, V. Embrione, A. Paciello, M. Ventre, P. A. Netti i P. Ferraro. „Particle tracking by full-field complex wavefront subtraction in digital holography microscopy”. en. W: *Lab on a Chip* 14.6 (lut. 2014). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 1129–1134. DOI: 10.1039/C3LC51104A. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/lc/c3lc51104a> (term. wiz. 05.07.2021).
- [41] Dibet Garcia-Gonzalez, Miguel Garcia-Silvente i Eugenio Aguirre. „A multiscale algorithm for nuclei extraction in pap smear images”. en. W: *Expert Systems with Applications* 64 (grud. 2016), s. 512–522. DOI: 10.1016/j.eswa.2016.08.015. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957417416304055> (term. wiz. 05.07.2021).
- [42] Anna Fabijańska. „Automatic segmentation of corneal endothelial cells from microscopy images”. en. W: *Biomedical Signal Processing and Control* 47 (sty. 2019), s. 145–158. DOI: 10.1016/j.bspc.2018.08.018. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1746809418302088> (term. wiz. 05.07.2021).
- [43] Yuta Imai, Kei Yoshida, Megumi Matsumoto, Mai Okada, Kei Kanie, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda i Ryuji Kato. „In-process evaluation of culture errors using morphology-based image analysis”. en. W: *Regenerative Therapy* 9 (grud. 2018), s. 15–23. DOI: 10.1016/j.reth.2018.06.001. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320418300117> (term. wiz. 05.07.2021).
- [44] Changjian Li, Yueqi Wang, Saipeng Huang, Xiaojie Zhang, Xiaoxuan Kang, Yanchi Sun, Ziyuan Hu, Lu Han, Libo Du i Yang Liu. „A photostable fluorescent probe for long-time imaging of lysosome in cell and nematode”. en. W: *Talanta* 188 (paź. 2018), s. 316–324. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.06.001. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914018306076> (term. wiz. 05.07.2021).
- [45] Khin Yadanar Win, Somsak Choomchuay, Kazuhiko Hamamoto i Manasanan Raveesunthornkiat. „Detection and Classification of Overlapping Cell Nuclei in Cytology Effusion Images Using a Double-Strategy Random Forest”. en. W: *Applied Sciences* 8.9 (wrz. 2018), s. 1608. DOI: 10.3390/app8091608. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3417/8/9/1608> (term. wiz. 05.07.2021).
- [46] Aldo Zaimi, Maxime Wabartha, Victor Herman, Pierre-Louis Antonsanti, Christian S. Perone i Julien Cohen-Adad. „AxonDeepSeg: automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using convolutional neural networks”. en. W: *Scientific Reports* 8.1 (lut. 2018), s. 3816. DOI: 10.1038/s41598-018-22181-4. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22181-4> (term. wiz. 05.07.2021).

- [47] Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Takeshi Hayakawa i Fumihito Arai. „On-Chip Transportation and Measurement of Mechanical Characteristics of Oocytes in an Open Environment”. en. W: *Micromachines* 6.5 (maj 2015). Number: 5 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, s. 648–659. DOI: 10.3390/mi6050648. URL: <https://www.mdpi.com/2072-666X/6/5/648> (term. wiz. 05.07.2021).
- [48] Chunhong Zheng, Zhilong Yu, Ying Zhou, Louis Tao, Yuhong Pang, Tao Chen, Xian-nian Zhang, Haiwei Qiu, Hongwei Zhou, Zitian Chen i Yanyi Huang. „Live cell imaging analysis of the epigenetic regulation of the human endothelial cell migration at single-cell resolution”. eng. W: *Lab on a Chip* 12.17 (wrz. 2012), s. 3063–3072. DOI: 10.1039/c2lc40192d.
- [49] Dhananjay Kumar Singh, Caroline C. Ahrens, Wei Li i Siva A. Vanapalli. „Label-free, high-throughput holographic screening and enumeration of tumor cells in blood”. en. W: *Lab on a Chip* 17.17 (sierp. 2017), s. 2920–2932. DOI: 10.1039/C7LC00149E. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/lc/c7lc00149e> (term. wiz. 05.07.2021).
- [50] Liang Huang, Peng Zhao i Wenhui Wang. „3D cell electrorotation and imaging for measuring multiple cellular biophysical properties”. en. W: *Lab on a Chip* 18.16 (sierp. 2018), s. 2359–2368. DOI: 10.1039/C8LC00407B. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/lc/c8lc00407b> (term. wiz. 05.07.2021).
- [51] Joshua J. Elacqua, Alexandra L. McGregor i Jan Lammerding. „Automated analysis of cell migration and nuclear envelope rupture in confined environments”. eng. W: *PLoS One* 13.4 (2018), e0195664. DOI: 10.1371/journal.pone.0195664.
- [52] Catalin Fetita, Boris Kirov, Alfonso Jaramillo i Christophe Lefevre. „An automated approach for single-cell tracking in epifluorescence microscopy applied to E. coli growth analysis on microfluidics biochips”. W: *Medical Imaging 2012: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging*. T. 8317. International Society for Optics i Photonics, kw. 2012, 83170Z. DOI: 10.1117/12.911371. URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/8317/83170Z/An-automated-approach-for-single-cell-tracking-in-epifluorescence-microscopy/10.1117/12.911371.short> (term. wiz. 05.07.2021).
- [53] G. Gopakumar, Veerendra Kalyan Jagannadh, Sai Siva Gorthi i Gorthi R. K. Sai Subrahmanyam. „Framework for morphometric classification of cells in imaging flow cytometry”. eng. W: *Journal of Microscopy* 261.3 (mar. 2016), s. 307–319. DOI: 10.1111/jmi.12335.
- [54] Yiyue Jiang, Cheng Lei, Atsushi Yasumoto, Hirofumi Kobayashi, Yuri Aisaka, Takuro Ito, Baoshan Guo, Nao Nitta, Natsumaro Kutsuna, Yasuyuki Ozeki, Atsuhiko Nakagawa, Yutaka Yatomi i Keisuke Goda. „Label-free detection of aggregated platelets in blood

- by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy”. eng. W: *Lab on a chip* 17.14 (lip. 2017), s. 2426–2434. DOI: 10.1039/c7lc00396j. URL: <https://doi.org/10.1039/c7lc00396j> (term. wiz. 05.07.2021).
- [55] Mei Zhan, Matthew M. Crane, Eugeni V. Entchev, Antonio Caballero, Diana Andrea Fernandes de Abreu, QueeLim Ch’ng i Hang Lu. „Automated Processing of Imaging Data through Multi-tiered Classification of Biological Structures Illustrated Using *Caenorhabditis elegans*”. en. W: *PLOS Computational Biology* 11.4 (kw. 2015). Publisher: Public Library of Science, e1004194. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004194. URL: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004194> (term. wiz. 05.07.2021).
- [56] F. Cairone, D. Ortiz, P. J. Cabrales, M. Intaglietta i M. Bucolo. „Emergent behaviors in RBCs flows in micro-channels using digital particle image velocimetry”. eng. W: *Microvascular Research* 116 (mar. 2018), s. 77–86. DOI: 10.1016/j.mvr.2017.09.003.
- [57] Ho-Kyeong Ra, Hyungseok Kim, Hee Jung Yoon, Sang Hyuk Son, Taejoon Park i SangJun Moon. „A robust cell counting approach based on a normalized 2D cross-correlation scheme for in-line holographic images”. en. W: *Lab on a Chip* 13.17 (lip. 2013). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 3398–3409. DOI: 10.1039/C3LC50535A. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/lc/c3lc50535a> (term. wiz. 05.07.2021).
- [58] Ho-Kyeong Ra, Hyungseok Kim, Hee Jung Yoon, Sang Hyuk Son, Taejoon Park i SangJun Moon. „A robust cell counting approach based on a normalized 2D cross-correlation scheme for in-line holographic images”. en. W: *Lab on a Chip* 13.17 (lip. 2013). Publisher: The Royal Society of Chemistry, s. 3398–3409. DOI: 10.1039/C3LC50535A. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/lc/c3lc50535a> (term. wiz. 05.07.2021).
- [59] Guoan Zheng, Seung Ah Lee, Samuel Yang i Changhuei Yang. „Sub-pixel resolving optofluidic microscope for on-chip cell imaging”. eng. W: *Lab on a Chip* 10.22 (list. 2010), s. 3125–3129. DOI: 10.1039/c0lc00213e.
- [60] Anna Wang, Rees F. Garmann i Vinothan N. Manoharan. „Tracking *E. coli* runs and tumbles with scattering solutions and digital holographic microscopy”. EN. W: *Optics Express* 24.21 (paź. 2016), s. 23719–23725. DOI: 10.1364/OE.24.023719. URL: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-24-21-23719> (term. wiz. 06.07.2021).
- [61] Solomon Barkley, Thomas G. Dimiduk, Jerome Fung, David M. Kaz, Vinothan N. Manoharan, Ryan McGorty, Rebecca W. Perry i Anna Wang. „Holographic Microscopy with Python and HoloPy”. W: *arXiv:1806.00058 [physics]* (maj 2018). URL: <http://arxiv.org/abs/1806.00058> (term. wiz. 06.07.2021).

- [62] Pablo Piedrahita-Quintero, Raul Castañeda i Jorge Garcia-Sucerquia. „Numerical wave propagation in ImageJ”. EN. W: *Applied Optics* 54.21 (lip. 2015). Publisher: Optical Society of America, s. 6410–6415. DOI: 10.1364/AO.54.006410. URL: <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-54-21-6410> (term. wiz. 06.07.2021).
- [63] M. Kuwahara, K. Hachimura, S. Eiho i M. Kinoshita. „Processing of RI-Angiocardigraphic Images”. en. W: *Digital Processing of Biomedical Images*. Red. K. Preston i M. Onoe. Boston, MA: Springer US, 1976, s. 187–202. DOI: 10.1007/978-1-4684-0769-3_13. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0769-3_13 (term. wiz. 05.07.2021).
- [64] Kaiming He, Jian Sun i Xiaoou Tang. „Guided Image Filtering”. W: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 35.6 (czer. 2013). Conference Name: IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, s. 1397–1409. DOI: 10.1109/TPAMI.2012.213.
- [65] Robert M. Haralick, Stanley R. Sternberg i Xinhua Zhuang. „Image Analysis Using Mathematical Morphology”. W: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* PAMI-9.4 (lip. 1987). Conference Name: IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, s. 532–550. DOI: 10.1109/TPAMI.1987.4767941.
- [66] Agnieszka Podwin i **Danylo Lizanets**. „OLED Display as a Useful Tool Towards Real-Time On-Chip Photosensitivity Investigation of Microorganisms”. W: *2018 XV International Scientific Conference on Optoelectronic and Electronic Sensors (COE)*. Czer. 2018, s. 1–4. DOI: 10.1109/COE.2018.8435177.
- [67] Agnieszka Podwin, Wojciech Kubicki i Jan A. Dziuban. „Study of the behavior of *Euglena viridis*, *Euglena gracilis* and *Lepadella patella* cultured in all-glass microaquarium”. eng. W: *Biomedical Microdevices* 19.3 (wrz. 2017), s. 63. DOI: 10.1007/s10544-017-0205-0.
- [68] Aleksandra Pokrzywnicka, **Danylo Lizanets**, Rafal Walczak i Patrycja Sniadek. „Lab-on-chip for Mechanical Characterization of Oocyte”. W: *2018 25th International Conference "Mixed Design of Integrated Circuits and System"(MIXDES)*. Czer. 2018, s. 441–444. DOI: 10.23919/MIXDES.2018.8436939.
- [69] Aleksandra Pokrzywnicka, **Danylo Lizanets**, Patrycja Sniadek, Natalia Małyszka i Rafał Walczak. „Multiparametric Porcine Oocyte Deformation Characterization by Novel MEMS-Type Cytometer”. en. W: *Proceedings* 2.13 (2018). Number: 13 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, s. 1015. DOI: 10.3390/proceedings2131015. URL: <https://www.mdpi.com/2504-3900/2/13/1015> (term. wiz. 05.07.2021).

- [70] Aleksandra Pokrzywnicka, **Danylo Lizanets** i Rafał Walczak. „Towards MEMS-based mechanical microbiology — How parametrize mechanically a single cell”. W: *2018 Baltic URSI Symposium (URSI)*. Maj 2018, s. 225–227. DOI: 10.23919/URSI.2018.8406752.
- [71] Agnieszka Podwin, **Danylo Lizanets**, Wojciech Kubicki, Patrycja Śniadek, Rafał Walczak i Jan Dziuban. „Lab-on-chip platform for culturing and investigation of cells behaviour”. W: *Proceedings of 2018 International Students and Young Scientists Workshop*. 2019, s. 78–83.
- [72] Agnieszka Podwin, **Danylo Lizanets**, Dawid Przystupski, Wojciech Kubicki, Patrycja Śniadek, Julita Kulbacka, Artur Wymysłowski, Rafał Walczak i Jan A. Dziuban. „Lab-on-Chip Platform for Culturing and Dynamic Evaluation of Cells Development”. W: *Micromachines* 11.2 (lut. 2020), s. 196. DOI: 10.3390/mi11020196. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074672/> (term. wiz. 05.07.2021).
- [73] Agnieszka Podwin, Rafał Walczak i Jan Dziuban. „A 3D Printed Membrane-Based Gas Microflow Regulator for On-Chip Cell Culture”. en. W: *Applied Sciences* 8.4 (kw. 2018). Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, s. 579. DOI: 10.3390/app8040579. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3417/8/4/579> (term. wiz. 05.07.2021).
- [74] Agnieszka Podwin i Jan A. Dziuban. „Modular 3D printed lab-on-a-chip bio-reactor for the biochemical energy cascade of microorganisms”. en. W: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 27.10 (wrz. 2017). Publisher: IOP Publishing, s. 104004. DOI: 10.1088/1361-6439/aa7a72. URL: <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aa7a72> (term. wiz. 05.07.2021).
- [75] Aleksandra Pokrzywnicka. „Cytometr odkształceniowy typu MEMS do badania deformowalności oocytów zwierzęcych”. Prac. dokt. Wrocław: Politechnika Wroclawska, 2021.
- [76] Aleksandra Pokrzywnicka, **Danylo Lizanets**, Rafał Walczak i Patrycja Śniadek. „Microsystems for Cell Deformability Measurements”. W: *2018 XV International Scientific Conference on Optoelectronic and Electronic Sensors (COE)*. Czer. 2018, s. 1–4. DOI: 10.1109/COE.2018.8435155.
- [77] Aleksandra Pokrzywnicka, Patrycja Śniadek, Natalia Małyszka, **Danylo Lizanets**, Wojciech Kubicki, Piotr Pawlak i Rafał Walczak. „MEMS cytometer for porcine oocyte deformation measurement”. en. W: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 29.9 (lip. 2019). Publisher: IOP Publishing, s. 095004. DOI: 10.1088/1361-6439/ab27f1. URL: <https://doi.org/10.1088/1361-6439/ab27f1> (term. wiz. 13.07.2021).

- [78] **Danylo Lizanets**, Oleh Matviykyiv i Rafał Walczak. „The model of a light transmittance through translucent objects in lens-free imaging setups”. W: *2017 XIIIth International Conference on Perspective Technologies and Methods in MEMS Design (MEMSTECH)*. Kw. 2017, s. 78–80. DOI: 10.1109/MEMSTECH.2017.7937538.
- [79] A. Podwin, A. Graja, **D. Lizanets**, J. A. Dziuban, R. Walczak i D. Przystupski. „The universal lab-on-chip platform for bio-nanosatellite”. en. W: Basel, Switzerland, 2019, s. 1492–1493. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=45178052> (term. wiz. 14.03.2022).
- [80] A. Podwin, A. Graja, D. Przystupski, **D. Lizanets**, P. Śniadek, R. Walczak i J. A. Dziuban. „Lab-on-chip platform as a nanosatellite payload solution for biomedical experiments in outer space”. W: *2019 19th International Conference on Micro and Nanotechnology for Power Generation and Energy Conversion Applications (PowerMEMS)*. Grud. 2019, s. 1–3. DOI: 10.1109/PowerMEMS49317.2019.82063206124.
- [81] Rafał Walczak i **Danylo Lizanets**. „Cell detection and tracking in lab-on-a-chip devices by image processing”. eng. W: <http://opticaapplicata.pwr.edu.pl/> (2018). Publisher: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej. DOI: 10.5277/oa180102. URL: <https://www.dbc.wroc.pl/dlibra/publication/151271/edition/109348> (term. wiz. 14.03.2022).
- [82] **Danylo Lizanets** i Rafal Walczak. „Processing and Simulation of Output from Lab-on-a-Chip Devices in Cell Mechanical Analysis”. W: *2018 25th International Conference "Mixed Design of Integrated Circuits and System"(MIXDES)*. Czer. 2018, s. 390–393. DOI: 10.23919/MIXDES.2018.8436919.
- [83] **Danylo Lizanets**, Jan A. Dziuban i Rafał Walczak. „Comparison of algorithms for detection and real-time tracking of living microorganisms in lab-on-a-chip devices”. W: *2017 MIXDES - 24th International Conference "Mixed Design of Integrated Circuits and Systems*. Czer. 2017, s. 581–584. DOI: 10.23919/MIXDES.2017.8005280.
- [84] **Danylo Lizanets** i Rafal Walczak. „Algorithms and approaches for processing an output signal from lab-on-a-chip devices in bioanalysis”. W: *2016 XII International Conference on Perspective Technologies and Methods in MEMS Design (MEMSTECH)*. Kw. 2016, s. 6–8. DOI: 10.1109/MEMSTECH.2016.7507507.

Spis rysunków

1.1	Liczba artykułów naukowych zawierających słowa kluczowe „microfluidics” oraz „image” w bazie: (a) Scopus, (b) Web of Science	9
1.2	Schemat systemu mikroskopowego do analizy komórek znajdujących się w układzie mikrofluidycznym	10
2.1	Analiza komórek w układach mikrofluidycznych	19
2.2	Schemat „tradycyjnego” układu optycznego	20
2.3	Widok układu mikrofluidycznego do śledzenia kulek w mikrokanałach wraz z ROI i wykrytymi komórkami [14]	20
2.4	Komórki E. coli w mikrokanałach [2]	21
2.5	Zmiana „pustego” obszaru w czasie. Pionowo wskazano czas, poziomo – koncentrację czynnika stymulującego wzrost (FBS) [48]	22
2.6	Detekcja komórek w pikokroplach: (a) oryginalne obrazy, (b) zastosowanie różnicy gaussianów, (c) binaryzacja progowaniem, (d) odejmowanie tła, (e) klasyfikacja kropli [34]	23
2.7	Obrazy przemieszczającej się przez zwężenie mikrokanalu komórki [51]	23
2.8	Przykład obrazów komórek w mikrokanale dla różnych czasów hodowli [15]	24
2.9	Chip z PDMSu (po lewej) i schemat działania układu detekcji (po prawej) [18]	25
2.10	System do określenia szybkości komórek: (a) schemat mikrofluidycznego kanału typu Y, (c) ogólny widok systemu, (c) obrazy kanału z komórkami [56]	25
2.11	Komórki w kanale mikrofluidycznym na wejściowym obrazie (a), obraz w trakcie przetwarzania (b, c, e, g) i ich kontury (d, f, h) [53]	26
2.12	Komórki E. coli w kanale mikrofluidycznym przed i po analizie obrazu [52]	26
2.13	Chip do automatycznego liczenia komórek: (a) schemat chipa, (b-g) obrazy kanału mikroskopowego i wyniki ich analizy [9]	27
2.14	Schemat działania typowego układu bezsoczewkowego	28
2.15	Technologia ePetri: (a) schemat działania (b), pojedynczy chip ePetri [23]	28
2.16	Zwiększenie jakości obrazu komórki: (a) początkowy obraz, (b) ulepszony obraz, (c) mikroskopowy obraz, (d) detekcja komórki z rekonstruowanego obrazu [23]	29

2.17	Schemat mikrofluidycznego urządzenia do badania komórek krwi metodą mikroskopii holograficznej [57]	29
2.18	Schemat mikrofluidycznego urządzenia do laserowego badania komórek [49] .	30
2.19	Obrazy przed i po zwiększeniu rozdzielczości [22]	31
2.20	Przechwytywane hologramy swobodnie pływającej <i>E. coli</i> . Asymetria jest zauważalna w obrazach w lewej kolumnie. Najlepiej dopasowane hologramy są wyświetlane po środku, a trójwymiarowe modele z najlepiej dopasowanych hologramów są wyświetlane po prawej stronie [60]	31
2.21	Widok okna programu AutoCellSeg [7]	32
2.22	Przykład działania programu AutoCellSeg: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz z wykrytymi komórkami po półautomatycznej analizie. Wykryte zostały ciemne rogi obrazu nie będące komórkami (obraz źródłowy z prac własnych) .	33
2.23	Widok okna programu CellProfiler [12]	33
2.24	Przykład działania programu CellProfiler: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz z wykrytymi komórkami po automatycznym progowaniu. Wykryte zostały obiekty nie będące komórkami (obraz źródłowy z prac własnych)	34
2.25	Wyniki działania algorytmu śledzenia plemników programem CASA [21]	35
2.26	Widok okna „wtyczki” Numerical Propagation	36
3.1	Wizualizacja wyniku działania różnych metod progowania obrazu	40
3.2	Schemat działania filtra Kuwahara	42
3.3	Przykład działania różnicy rozkładów Gaussa: (a) oryginalny obraz euglen, (b) różnica rozkładów Gaussa dla obrazu. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	43
3.4	Porównanie metod wytwarzania elipsy na podstawie zestawu punktów: (a) dopasowywanie elipsy metodą najmniejszych kwadratów, (b) dopasowywanie elipsy metodą optyimizacji odległości	45
3.5	Krawędzie komórek wykryte z wykorzystanie algorytmu z siecią neuronową: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.	46
3.6	Przykład obrazu przetworzonego przez algorytm obliczenia entropii: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz. Poziom jasności piksela w skali szarości odpowiada wartości entropii. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	47
3.7	Hierarchiczna struktura konturów	47
3.8	Parametry konturów dla pojedynczej komórki drożdży. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	49

3.9	Przykład działania operacji wyrównywania jasności tła obrazu: (a) wejściowy obraz, (b) odwrócony obraz z usuniętym tłem. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.	50
3.10	Zasada działania algorytmu wododziała, przykład jednowymiarowy: (a) początkowy wybór „basenów”, (b) pojawienie się „grobli”, (c) końcowy wynik analizy	51
3.11	Przykład działania algorytmu wododziała: (a) oryginalny obraz, (b) obraz przetworzony algorytmem wododziała. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	51
3.12	Schemat działania algorytmu wstępnej obróbki obrazu przed działaniem algorytmu wododziała.	52
3.13	Przykład działania operacji morfologicznych: (a) dylatacja, (b) erozja. Czarne piksele mają wartość „1”, białe – „0”. Lewa kolumna – wejściowy obraz, średnia kolumna – obraz z nałożonym elementem strukturalnym (piksel zaznaczony na zielono otrzymuje wartość „1”, na czerwono – odpowiednio „0”), prawa kolumna – wyjściowy obraz (zaznaczone zmienione piksele) Obraz należy do domeny publicznej https://pl.wikipedia.org/wiki/Cyfrowe_przetwarzanie_obraz%C3%B3w_binarnych	53
3.14	Przykład działania algorytmu α -form	54
3.15	Przykładowe obrazy holograficzne: (a) tło, (b) obiekt (SNR dla danego obiektu wynosi 10.38).	55
3.16	Poziomy i pionowy przekrój środka hologramu dla obrazu z rysunku 3.15 (b) .	56
3.17	Przykład rekonstrukcji obrazu z hologramu: (a) wejściowy obraz, (b) wyjściowy obraz po analizie.	57
3.18	Wizualizacja przepływu optycznego dookoła poruszających się komórek. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.	59
3.19	Obraz różnicowy, widoczne są artefakty (szare obszary) dookoła „wolno” poruszających się obiektów (czarne obszary w czerwonych kołach) oraz artefakty tła (szare prostokąty). Film wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin.	60
3.20	Macierz przetwarzania punktów. Na niebiesko są zaznaczone nowe punkty, na czerwono – poprzednie punkty, na żółto – skrzyżowania kolumny i wiersza, punkty z których powinni być ma jednej ścieżce.	62
3.21	Przykład działania algorytmu śledzenia, zaznaczone ścieżki komórek, a także centroidy i otaczające elipsy komórek. Film wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	63
3.22	Schemat wektorów przy wykrywaniu uśrednionego kierunku poruszania się komórki. Wektor regresji (uśredniony) wybudowany na kilku ostatnich punktach ścieżki komórki pomaga wyznaczyć kierunek poruszania się komórki pomiędzy wektorem prostym, a odwróconym.	64
3.23	Przykład normalizacji po osi X	65

3.24	Przykład działania algorytmu minimalnego wyszarzenia: (a) oryginalny obraz, (b) obraz w skali szarości przetworzony algorytmem minimalnego wyszarzenia [72]	66
3.25	Przykład obrazu maski. Na czarno zaznaczono piksele, które nie będą brać udział w wykrywaniu konturów, na biało zaznaczono te piksele, które na pewno będą częścią konturu, szare piksele to te, które zostają niezaznaczone i będą analizowane algorytmem wykrywania konturów.	67
4.1	Graficzny interfejs użytkownika	70
4.2	Widok panelu narzędzi	71
4.3	ROI w formie siatki 7 na 6 elementów. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	72
4.4	Przykładowy rezultat wykrywania komórek w formie tabeli	73
4.5	Wewnętrzna struktura oprogramowania: 1 – wywoływanie przetwarzania wideo, 2 – wywoływanie przetwarzania obrazów, 3 – wywoływanie przetwarzania strumienia klatek, 4 – zapisywanie i odczytywanie danych.	74
4.6	Eliminacja nadmiarowych boków konturu	75
4.7	Schemat blokowy działania oprogramowania w przypadku pojedynczego obrazu	76
4.8	Schemat układu do analizy obrazów drożdży	78
4.9	Przykładowy obraz z wykrytymi komórkami drożdży. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	78
4.10	Przykład działania algorytmu wododziała: (a) oryginalny obraz, (b) obraz przetworzony algorytmem wododziała. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	79
4.11	Szklany lab-chip do hodowli <i>Euglena gracilis</i> [72].	79
4.12	Układ pomiarowy: (a) schemat, (b) widok [66].	80
4.13	Obraz z komórkami euglen w komorze lab-chip przy powiększeniu x4. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	81
4.14	Obraz z komórkami euglen w komorze lab-chip przy powiększeniu x10. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	81
4.15	Przykład działania algorytmu progowania: (a) przesunięty kontur, (b) komórka w „cieniu” nie została wykryta. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	82
4.16	Przykład działania algorytmu LoG – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem LoG. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	83
4.17	Przykład działania algorytmu odejmowania tła – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem odejmowania tła. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	83

4.18	Przykład działania algorytmu detekcji krawędzi – eugleny (a – x4, b – x10) wykryte algorytmem detekcji krawędzi. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	84
4.19	Przykład działania algorytmu wykrywania krawędzi sieciami neuronowymi. Wykryte krawędzie (a) powiększenie x4, (b) powiększenie x10. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	84
4.20	Wynik algorytmu wykrywania krawędzi: (a) obraz wejściowy, (b) po skalowaniu obrazu do 8-bit pozostała tylko krawędź komory. Krawędzi komórek nie są widoczne. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	85
4.21	Obraz z wykrytymi komórkami euglen za pomocą algorytmu detekcji krawędzi. Zaznaczone są kontury komórek oraz ich centroidy. Zauważalne jest, że wykryte zostały komórki na jaśniejszych oraz bardziej ciemnych częściach obrazu. Kilka komórek (szczególnie mniejsze) nie zostały wykryte. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Podwin	86
4.22	Wyniki analizy obrazu z komórkami euglen :(a) obraz bez zamykania, (b) obraz z zamykaniem krawędzi	87
4.23	Obraz z wykrytymi komórkami euglen w mikrokomorze: (a) pierwszy dzień hodowli, b) piąty dzień hodowli, c) obrazy poddane analizie w 1 i 14 dzień hodowli, (d) wynik analizy liczebności euglen w trakcie hodowli [74, 72].	88
4.24	Obraz z wykrytymi ścieżkami euglen. Zaznaczone są ścieżki komórek: (a) przy niebieskim świetle (większa ruchliwość), (b) przy czerwonym świetle (mniejsza ruchliwość) [66].	89
4.25	Cytometr mikrofluidyczny do ściskania oocytów [69].	91
4.26	Stacja pomiarowa: schemat (po lewej), widok stanowiska (po prawej): a) mikroskop biologiczny, b) kamera, c) mikrocytometr w obudowie, d) sterownik ciśnienia [75].	91
4.27	Wejściowy obraz mikrokomorzy pomiarowej cytometru z oocytem. Obraz dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	92
4.28	Przykłady obrazów po zastosowaniu pogowania adaptatywnego: (a) obraz, na którym adaptatywne progowanie nie dało zadowalającego wyniku (górną część otoczki komórki), (b) obraz, na którym adaptatywne progowanie uzyskało dobry wynik. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	93
4.29	Obraz z niepoprawnie wykrytą otoczką oocytu	94
4.30	Etapy przetwarzania obrazu oocytu: (a) wstępny obraz po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (b) obraz po zastosowaniu algorytmu detekcji, widoczne są przerwy w konturach (c) obraz po zastosowaniu algorytmu α -form, przerwy w konturach są wyeliminowane. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	95

4.31	Oocyt wykryty za pomocą α -form. Wartość parametru $\alpha = 100000$. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	95
4.32	Wynik zastosowania sieci neuronowych do obrazu oocytu. Nie została wykryta znaczna część zewnętrznej otoczki komórki. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	96
4.33	Lokalna entropia obrazu oocytu. Wymiary lokalnego obszaru: 6 x 6 pikseli, wartość progowa: 107. Obraz wejściowy dzięki uprzejmości dr inż. A. Pokrzywnickiej	96
4.34	Obraz z wykrytymi otoczką i wnętrzem komórki oraz z dodatkowymi parametrami: pole powierzchni, średnica, mimośród przybliżonej elipsy [68].	97
4.35	Obraz oocytu z schematycznie zaznaczonymi przykładowymi wykrywanymi wymiarami (W_{out}, H_{out} – wysokość i szerokość zewnętrznej otoczki oocytu, W_{in}, H_{in} – – wysokość i szerokość wnętrza oocytu, W_n, H_n – – wysokość i szerokość jądra oocytu, A_1, A_2, A_3 – pole powierzchni: całej komórki, wnętrza komórki, jądra komórki [69].	98
4.36	Obraz oocytu z wykrytymi wnętrzem i jądrem komórkowym [76].	98
4.37	Przykładowe zależności zewnętrznej wysokości (a) i szerokości (b), powierzchni całej komórki (c) i ooplazmy (d) oocytów świń po dojrzewaniu <i>in vitro</i> w funkcji ciśnienia sterującego ugięciem membrany [77].	99
4.38	Powierzchnia całego oocytu i odpowiadająca jej powierzchnia ooplazmy oocytów świń po dojrzewaniu <i>in vitro</i> dla trzech klas jakości: a) schematyczny widok oocytów z zaznaczonymi obszarami oraz histogramy zależności od zmiany powierzchni oocytu i zmiany powierzchni ooplazmy podczas deformacji oocytu dla $P = 100$ kPa dla (b) pierwszej klasy jakości, (c) drugiej klasy jakości i (d) trzeciej klasy jakości. [77]	100
4.39	Schemat modelu śledzenia promieni.	101
4.40	Przykładowe wyniki symulacji. Biały obszar to promienie padające na matrycę bez interakcji z obiektem, ciemny obszar w środku – cień obiektu: (a) maska „pączek” o średnicy $100 \mu\text{m}$, (b) modelowana kulka ze zmienną przezroczystością (współczynnik pochłaniania 0,5-0,99) o średnicy $300 \mu\text{m}$, (c) kulka o stałej przezroczystości (współczynnik pochłaniania 0,99) o średnicy $300 \mu\text{m}$. Dla wszystkich obiektów: odległość pomiędzy źródłem światła a matrycą – 5 cm, odległość pomiędzy obiektem, a matrycą – 1 mm	103
4.41	Schemat układu pomiarowego.	104
4.42	Widok układu pomiarowego.	104
4.43	Obrazowane maski: „pączek” (po lewej), kropka (środek), kwadrat (po prawej)	105
4.44	Obraz holograficzny masek okrągłych typu „pączek” (średnica maski – $270 \mu\text{m}$, średnica otworu – $100 \mu\text{m}$). Charakterystyczny wzór tła jest wynikiem rozpraszania się światła na folii, na której umieszczone były maski.	105

4.45	Obrazy holograficzne masek: (a) „pączek” o średnicy 270 μm , (b) kropka o średnicy 150 μm , (c) kwadrat zo boku 150 μm	106
4.46	Porównanie przekrojów obrazów holograficznych masek z różnymi średnicami. Aby zmniejszyć wpływ szumu tła na pomiar, przekrój przetwarzany jest metodą średniej ruchomej z rozmiarem okna $n = 5$. Mniejszy obiekt posiada mniejszą odległość pomiędzy szczytami bocznymi. Pomiar średnicy odbywa się pomiędzy punktami na środkach zbocz. Linia ciągła – dla średnicy wyznaczonej 270 μm , linia przerywana – dla średnicy wyznaczonej 250 μm	106
4.47	Porównanie wyników działania algorytmu progowania przy detekcji obiektów na obrazach holograficznych masek. Zauważalne są zniekształcenia hologramu na krawędziach obiektów. Średniczy wyznaczone to: (a) 270 μm , (b) 250 μm	107
4.48	Dekonwolucja holograficznego obrazu maski: (a) wstępny obraz „pączka” po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (b) obraz „pączka” po zastosowaniu metody Fresnela-Fourie’go (c) obraz „pączka” po zastosowaniu metody propagacji Kirchhoffa-Fresnela (d) wstępny obraz kwadratu po normalizacji, kadrowaniu do wymiarów ROI oraz ustawieniu jasności i kontrastu (e) obraz kwadratu po zastosowaniu metody Fresnela-Fourie’go (f) obraz kwadratu po zastosowaniu metody propagacji Kirchhoffa-Fresnela.	108
4.49	Zależność pomiędzy średnicami masek, a średnicami ich cieniów na obrazie dla masek typu kropka dla trzech odległości maska-matryca.	109
4.50	Obrazy oocytu: (a) przykładowy obraz z układu „tradycyjnego” mikroskopowego, (b) obraz z układu bezsoczewkowego.	110
4.51	Wykrywanie oocytu: (a) prosty algorytm wykrywania krawędzi wykrywa osobne części otoczki, (b) algorytm progowania wykrywa wewnętrzne elementy komórki, ale nie otoczkę, (c) algorytm α -form wykrył oocyt razem z otoczką, ale granica konturu wychodzi poza granice otoczki (górną część obrazu) co jest spowodowane małym kontrastem otoczki i tła oraz stosunkowo małą rozdzielczością obrazu (2 megapiksele).	111
4.52	Przekrój obrazu komórki. Pomiar średnicy zewnętrznej otoczki oocytu odbywa się pomiędzy punktami gdzie jasność obrazu zaczyna się zmieniać względem jasności tła. Spowodowane to jest tym, że otoczka komórki nie różni się znacznie od tła i dlatego nie powstaje wyraźne zbocze na wykresie przekroju. Średnicę wnętrza komórki bez otoczki można wyznaczyć na podstawie już stosowanego wcześniej pomiaru odległości pomiędzy połowami zboczy. Zgodnie z wymiarami kalibracyjnymi na podstawie obrazów masek, średnica komórki była wyznaczona jako 150 μm	111

4.53 Obrazy kulek agarozowych: (a) obraz z jasnym tłem, przeanalizowany algorytmem progowania, kulki wykryto poprawnie, (b) obraz z ciemnym tłem, przeanalizowany algorytmem progowania, kulki wykryto poprawnie, (c) obraz z jasnym tłem, przeanalizowany algorytmem wykrywania krawędzi, kulki wykryto niepoprawnie, zaznaczono krawędzie cienia, (d) obraz z ciemnym tłem, przeanalizowany algorytmem odejmowania tła, kulki wykryto poprawnie. 112

Spis tabel

2.1	Przykłady prac dotyczących analizy obrazów komórek w szalce Petriego lub na szkiełku mikroskopowym (tzw. nośniki tradycyjne)	13
2.2	Przykłady prac dotyczących analizy obrazów komórek w układach mikroflu-idycznych	15
2.3	Przykłady oprogramowania do analizy obrazów komórek	36
3.1	Zestawienie algorytmów stosowanych do analizy obrazów w lab-chipach . . .	68
4.1	Porównanie algorytmów wykrywania przy przetwarzaniu obrazu euglen. . . .	85
4.2	Porównanie ruchliwości <i>E. gracilis</i> w zależności od typu oświetlenia	89
4.3	Porównanie czasów analizy (oprogramowanie własne vs dostępne rozwiązanie detekcji i śledzenia komórek, ImageJ, https://fiji.sc/).	90
4.4	Porównanie algorytmów wykrywania przy przetwarzaniu obrazu oocytów. . . .	97
4.5	Symulowane, źródłowe i przetworzone obrazy dla różnych wzorów masek. . .	109