

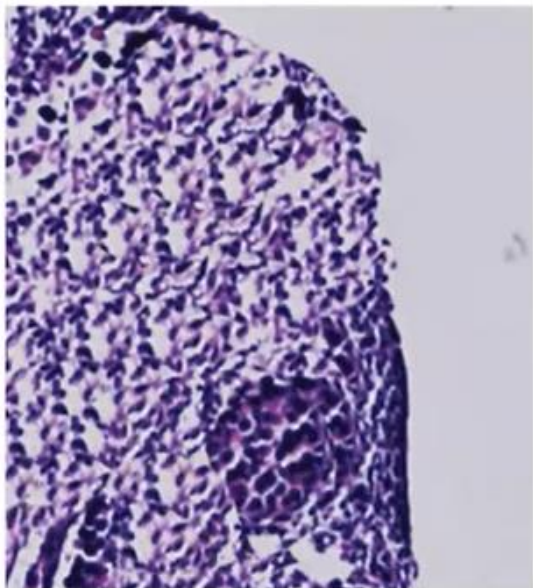
Analýza obrazu

Zuzana Sumbalová Koledová

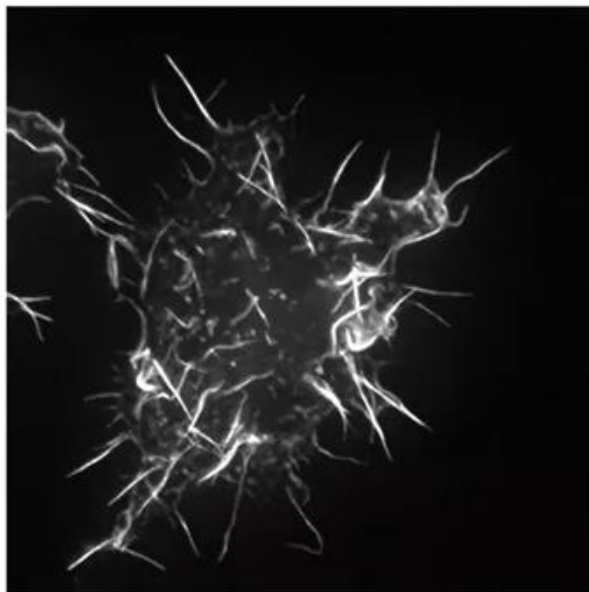
Analýza obrazu – načo?

- Mikroskopovacie experimenty poskytujú:
 - Kvalitatívne data
 - Kvantitatívne data (zmysluplné čísla a štatistiky)

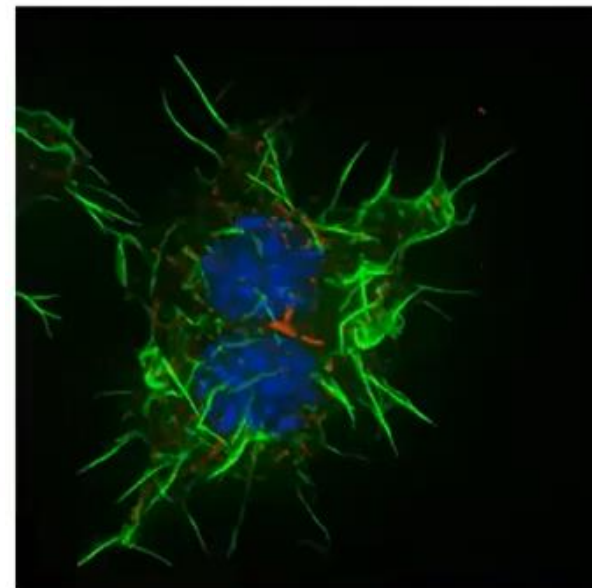
Typy obrázkov



Farebné RGB obrázky
(brightfield/histológia)



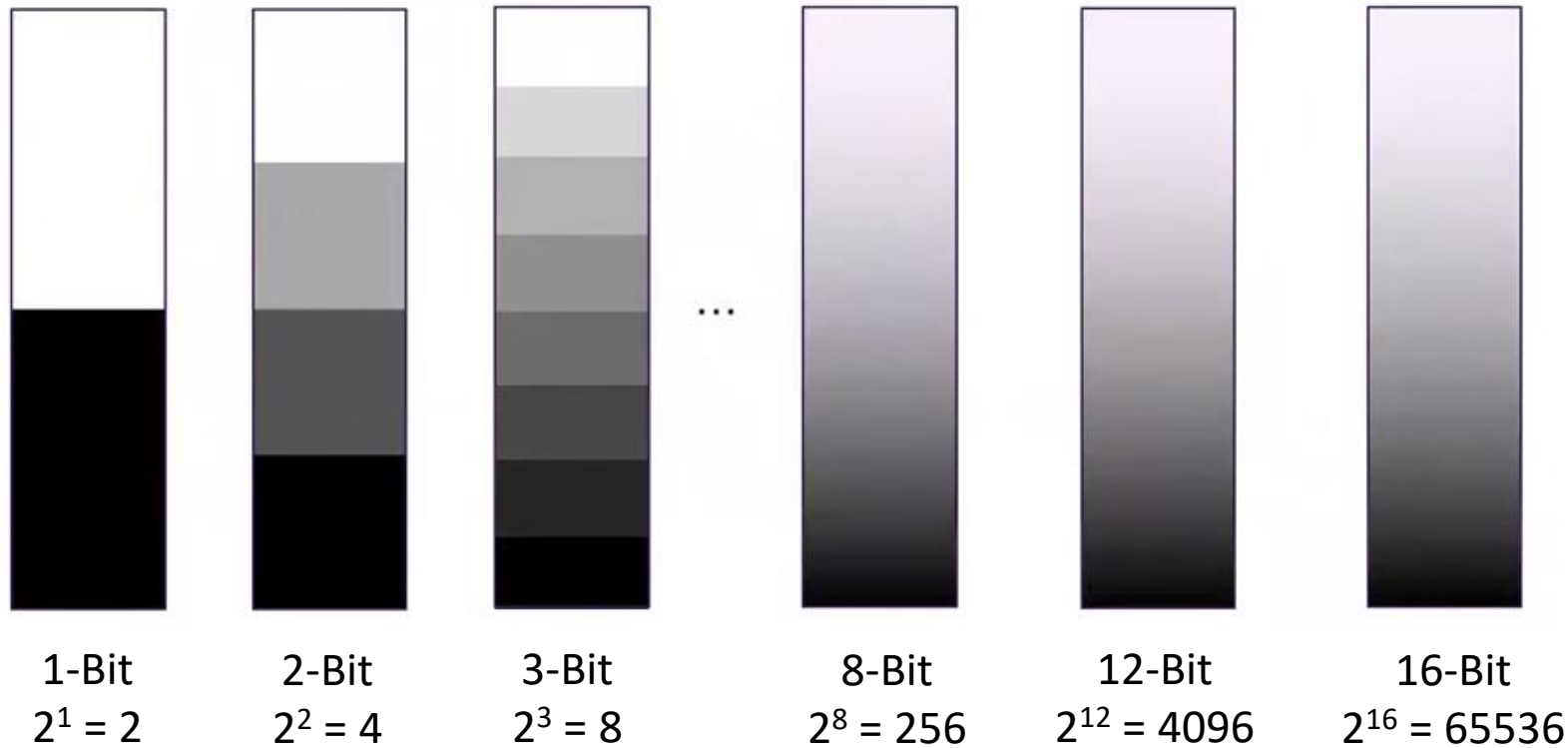
Obrázky v odtieňoch šedej
(fluorescencia)



Obrázky zložené z viac
kanálov

Bity – hĺbka farieb

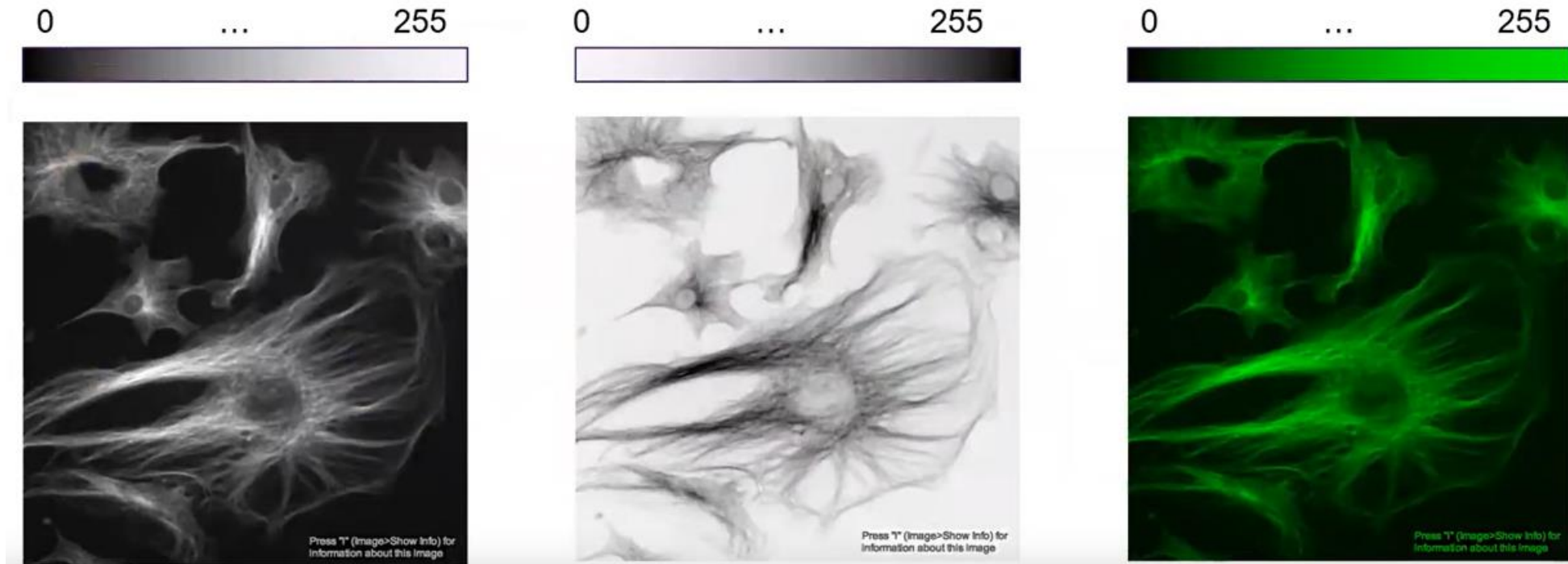
Farebné rozlíšenie/hladiny šedej



- Väčšina mikroskopov: 8-bit
- 12-bit a 16-bit hĺbky sú lepšie na kvantifikáciu
- Hĺbky farieb v bit (hodnoty šedej) sú absolútne (nie negatívne čísla)

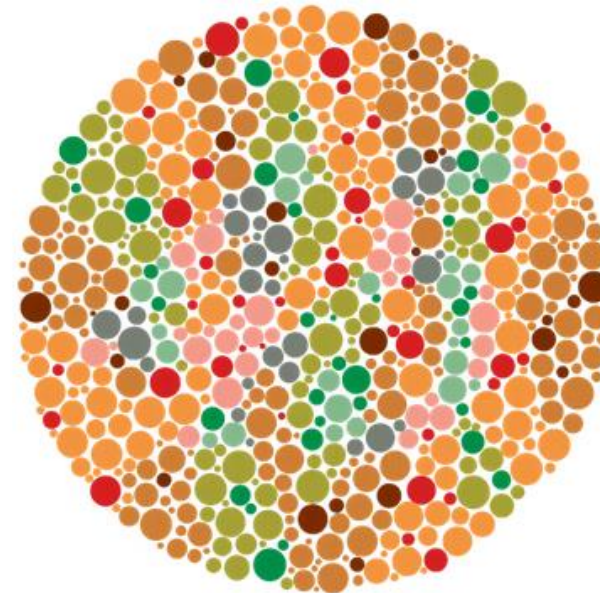
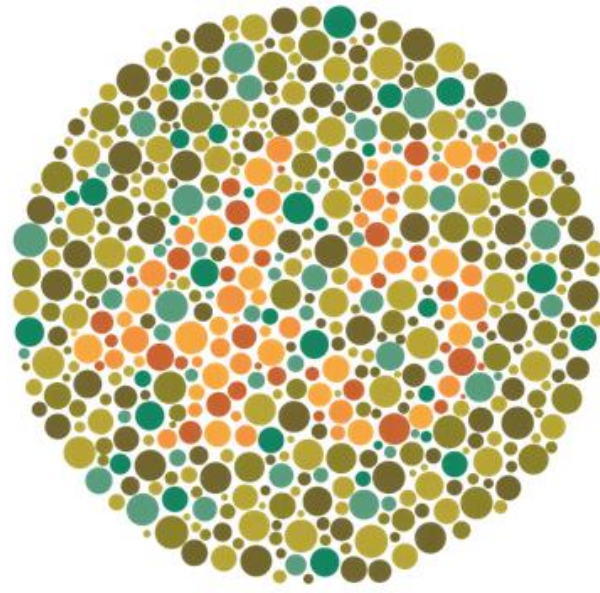
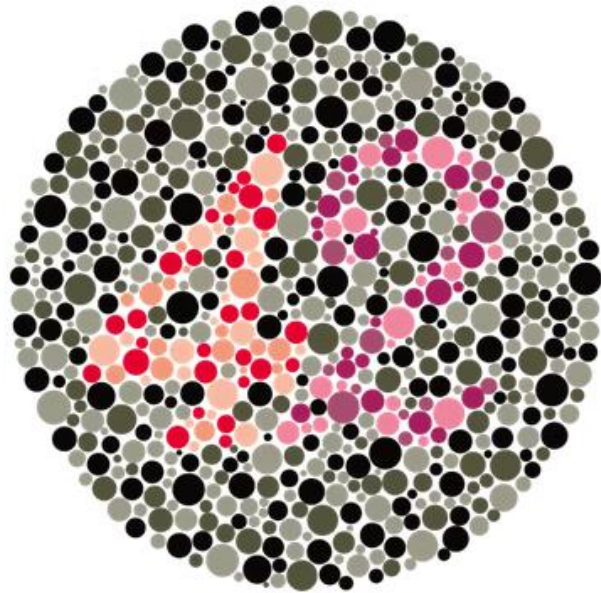
LUTs (Look Up Tables)

- Spôsob mapovania farieb na definované hodnoty šedej
- Nemenia intenzitu, len spôsob zobrazenia



Farbosleposť a LUTs

- Pri zobrazovaní obrázkov myslite na to, ako ich vnímajú iní – predovšetkým farboslepi ľudia

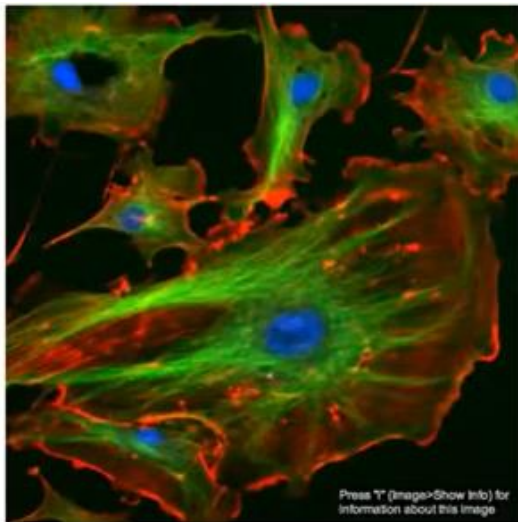


Farbosleposť a LUTs

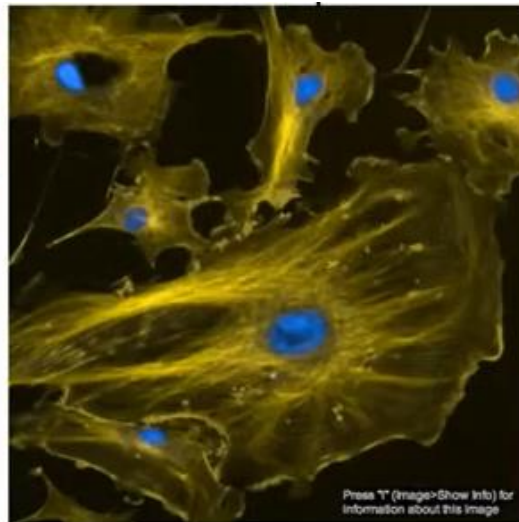
- Pri zobrazovaní obrázkov myslite na to, ako ich vnímajú iní – predovšetkým farboslepí ľudia

Red / Green / Blue

Normálne videnie

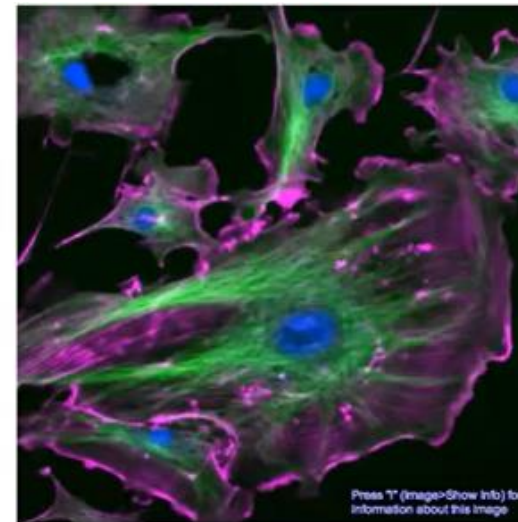


Červeno-zelená
farbosleposť

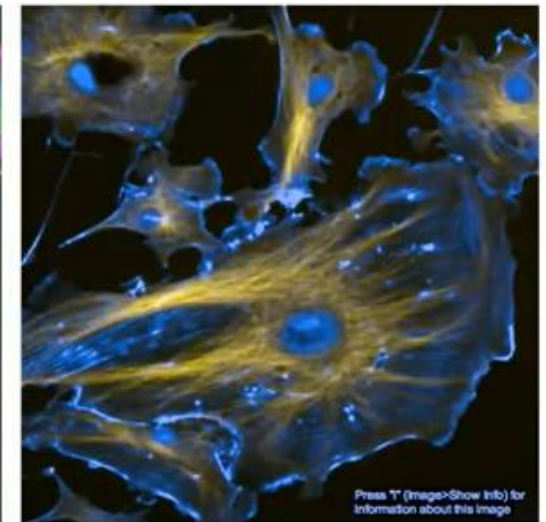


Magenta / Green / Blue

Normálne videnie



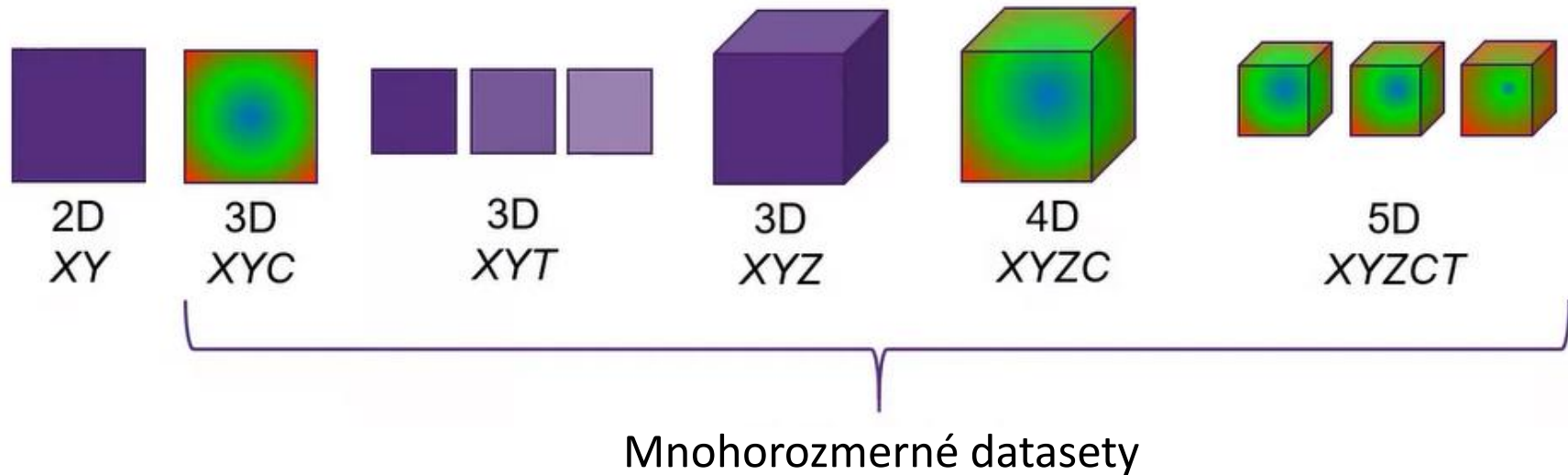
Červeno-zelená
farbosleposť



Fiji: Image > Colour > Simulate colour blindness

Dimenzie/rozmery mikroskopických obrázkov

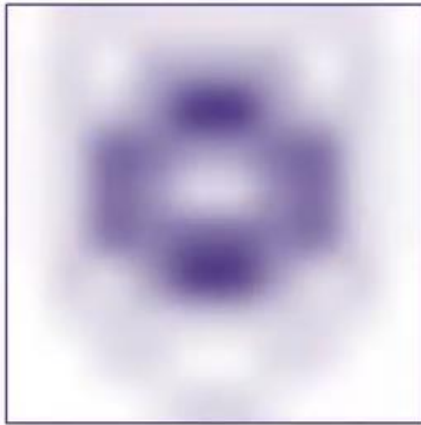
Šírka = X
Výška = Y
Hĺbka = Z
Kanál = C
Čas = T



*Poradie ukladania dát sa môže líšiť medzi rôznymi systémami

Veľkosť pixelu

- Vlastnosť, ktorú definujete pri získavaní dát
- Viac pixelov na plochu – lepšie rozlíšenie objektu v obrázku



Príklad veľkosti
pixelu = 2 μm



Príklad veľkosti
pixelu = 1 μm



Príklad veľkosti
pixelu = 0,2 μm

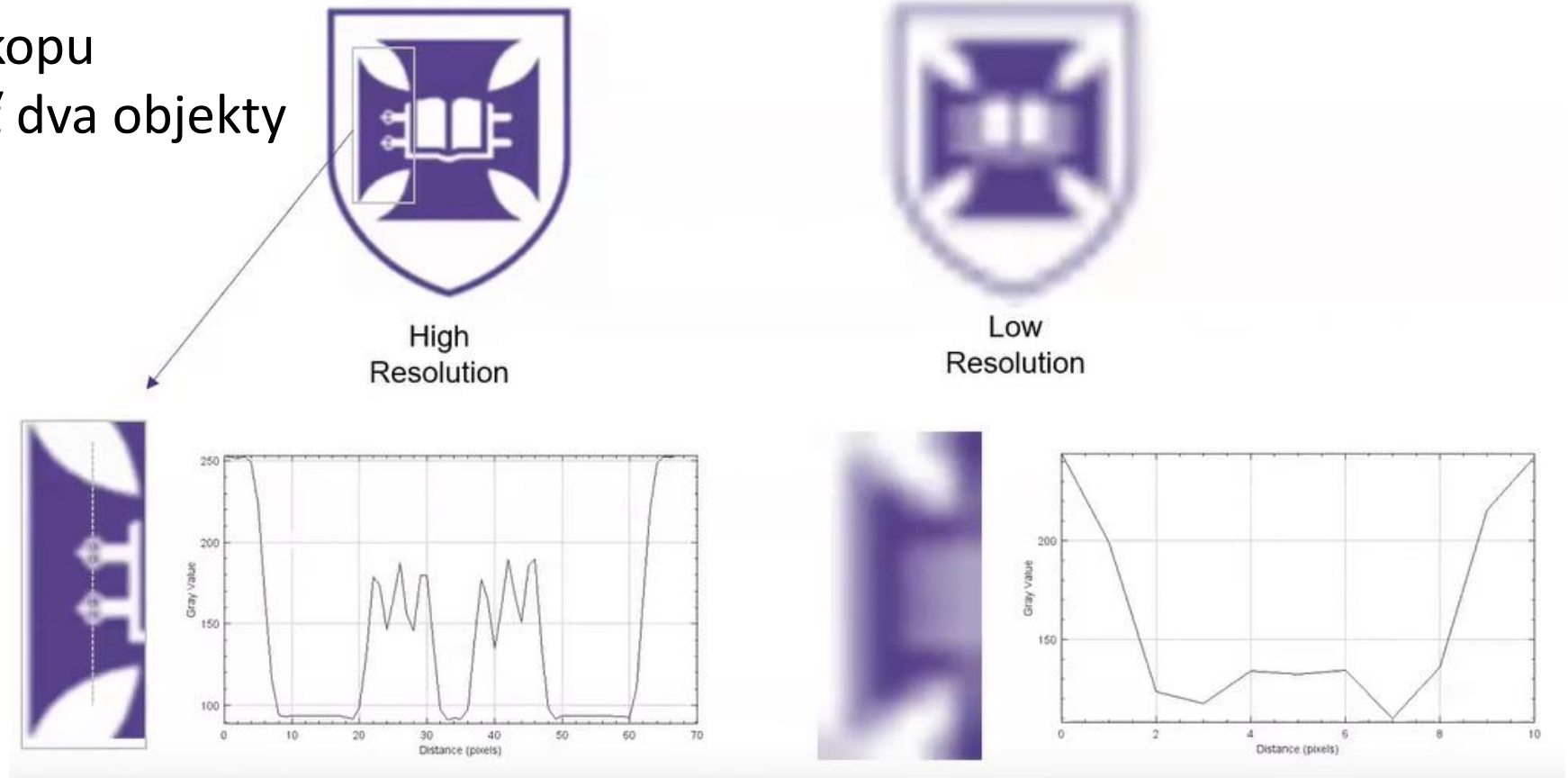


Príklad veľkosti
pixelu = 0,1 μm

- Menšie pixely či viac pixelov nie vždy znamenajú väčšie rozlíšenie

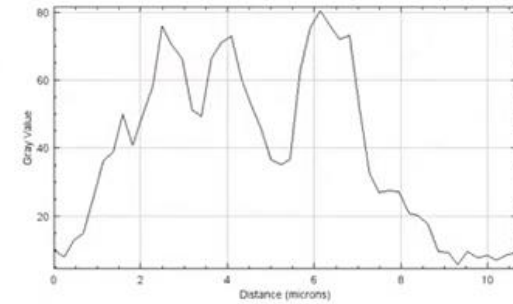
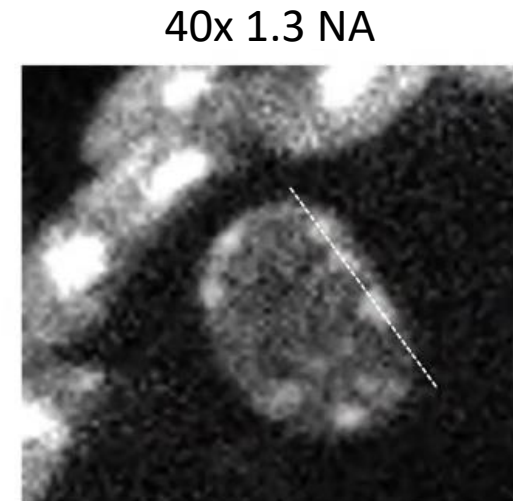
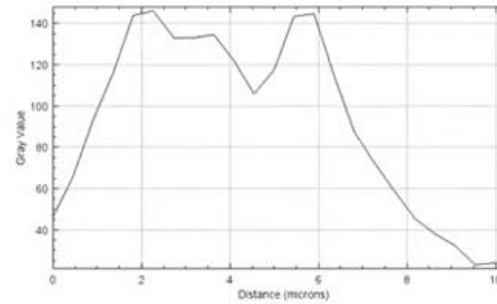
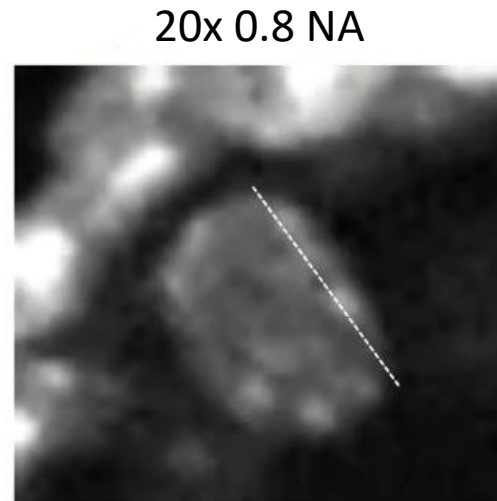
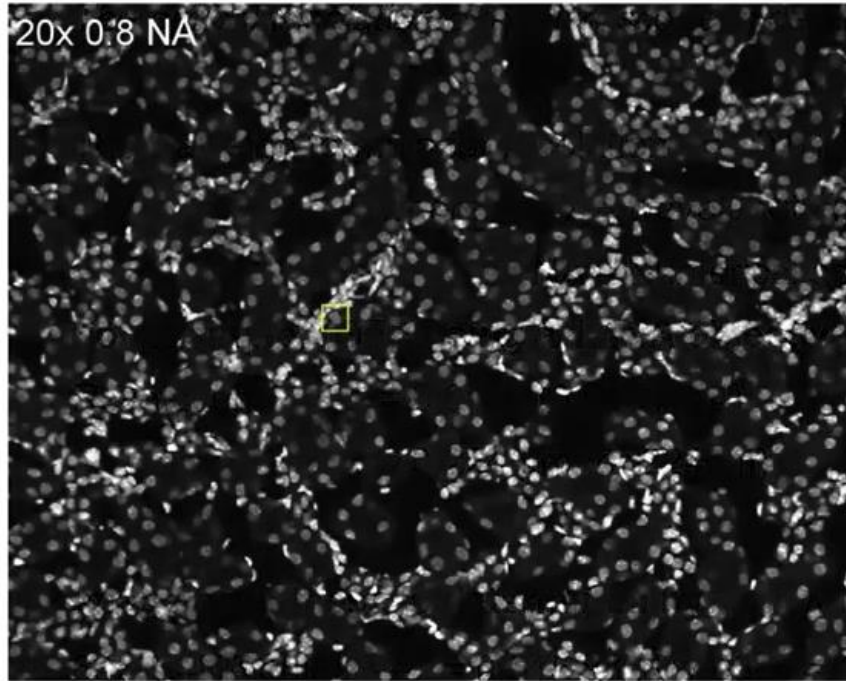
Rozlíšenie

- Vlastnosť mikroskopu
- Schopnosť rozlíšiť dva objekty



- Väčšie zväčšenie neznamená vždy väčšie rozlíšenie

Rozlíšenie v biologickom kontexte



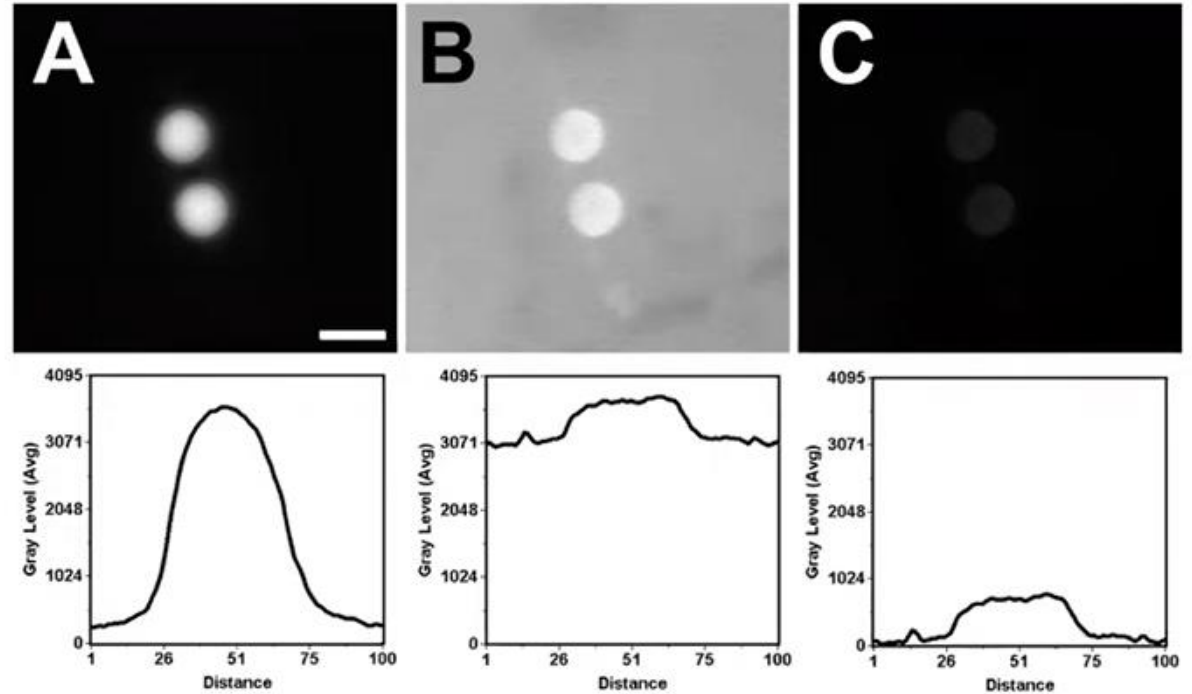
Pomer signálu k šumu (Signal to Noise Ratio, SNR)

Signál = objekt, ktorý nás zaujíma

Šum = pozadie

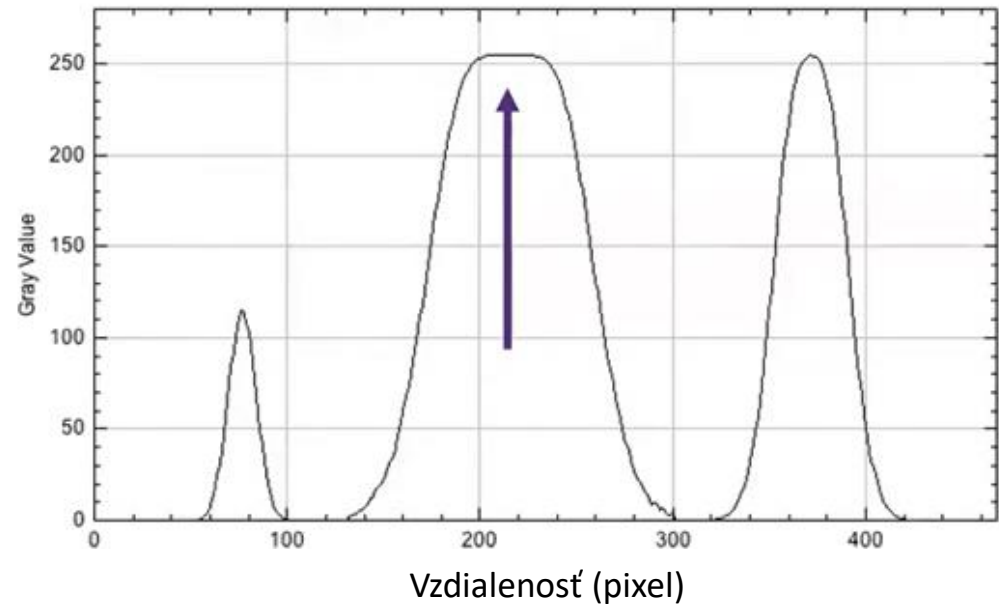
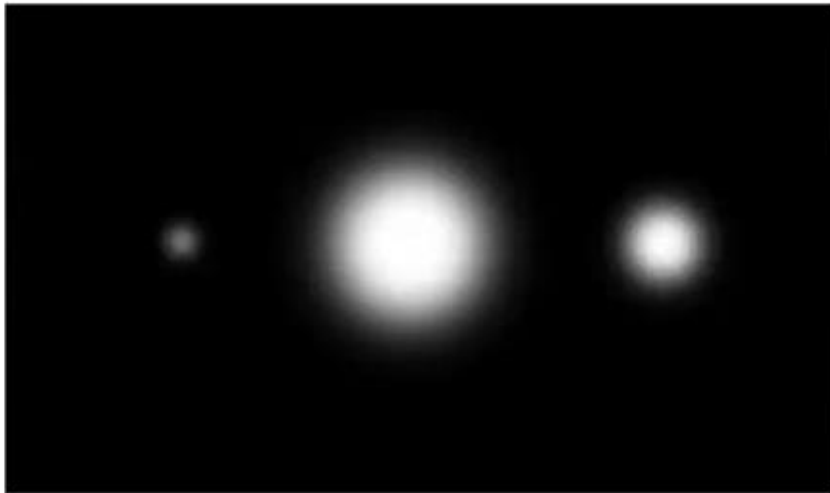
Čím vyššie SNR, tým lepšie

- Uľahčuje segmentáciu
- Pomáha rozlíšiť objekty od pozadia



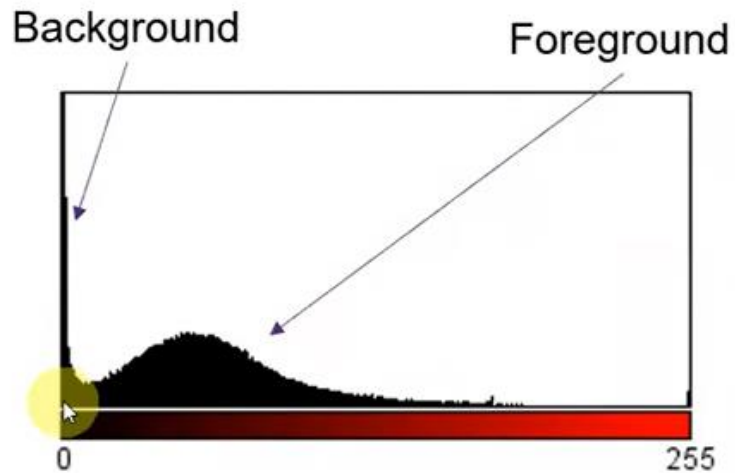
Nesaturujte obrázky!

- Dôležité – nepreexponovávať obrázky
 - Strata dát saturáciou
 - Neschopnosť rozlíšiť objekty v saturovanej oblasti
 - Plánujte do budúcnosti – môže sa hodiť neskôr na kvantifikáciu



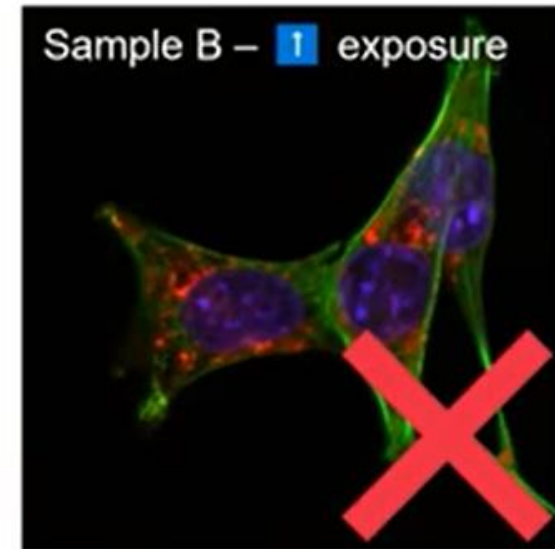
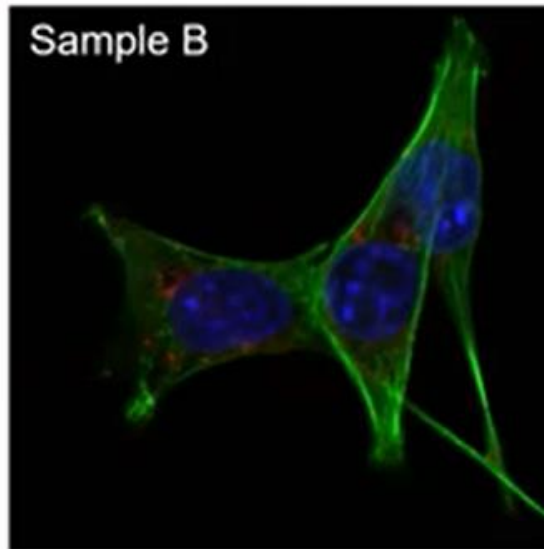
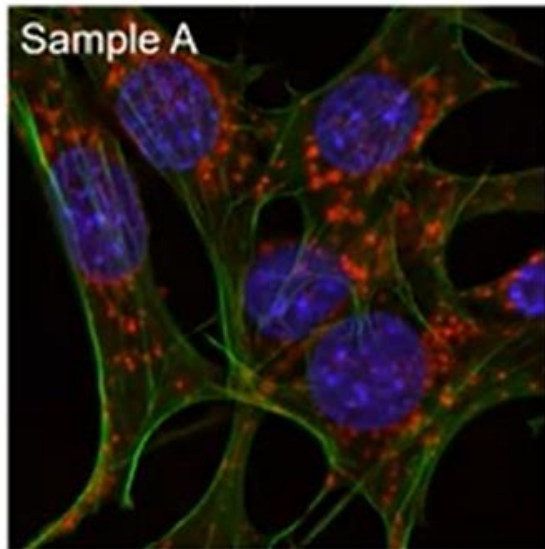
Histogram obrázku

- Reprezentácia intenzity pixelov
 - Distribúcie frekvencií intenzity jednotlivých pixelov pre každý pixel obrázku



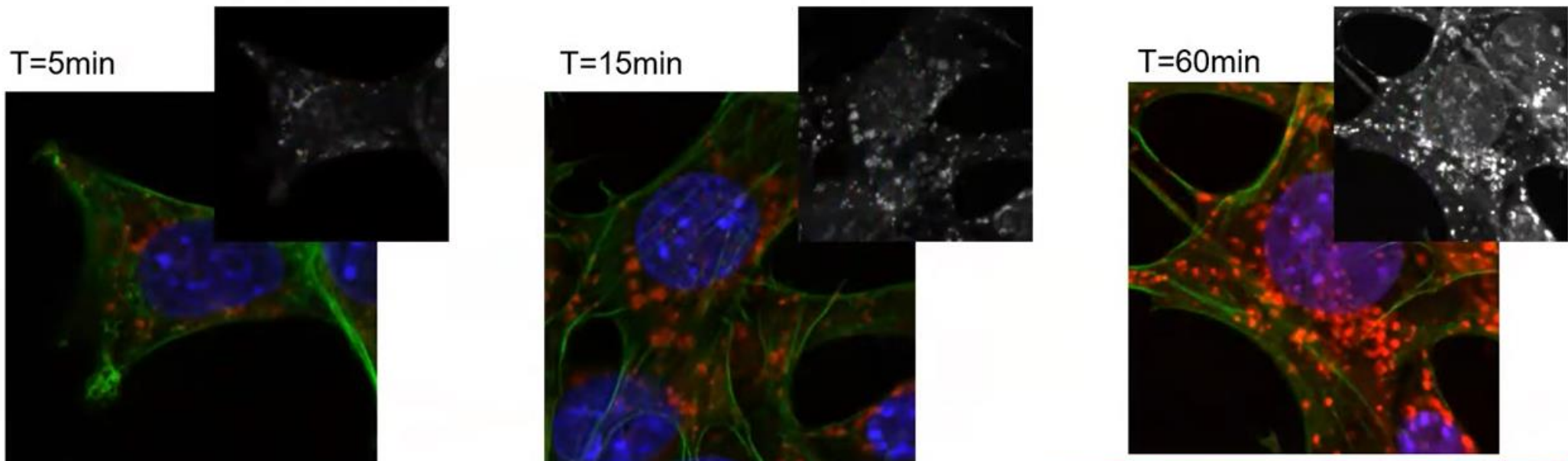
Dôležitá konzistencia snímania

- Čas expozície (kamera) a prídavok fotomultiplikátora musia zostať rovnaké naprieč všetkými vzorkami experimentu
- Platí i pre intenzitu lampy, silu lasera, veľkosť pinhole atď.



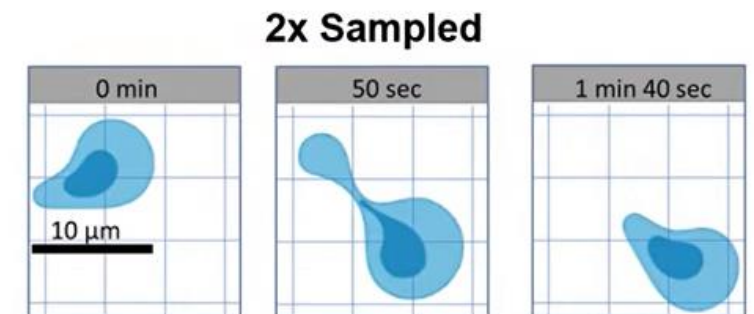
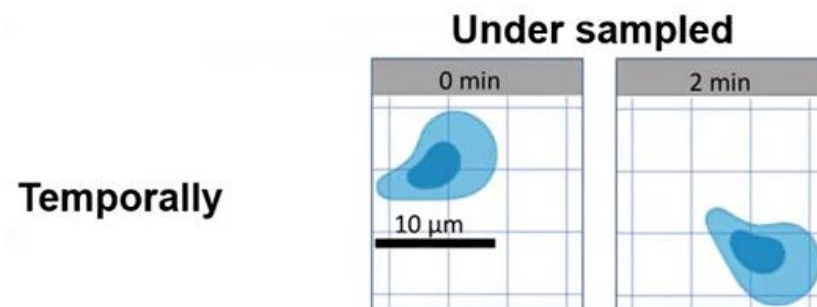
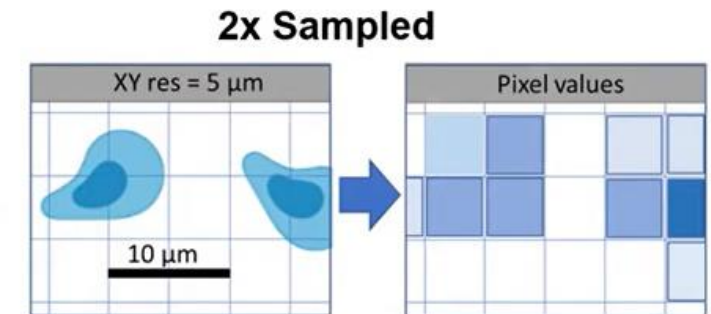
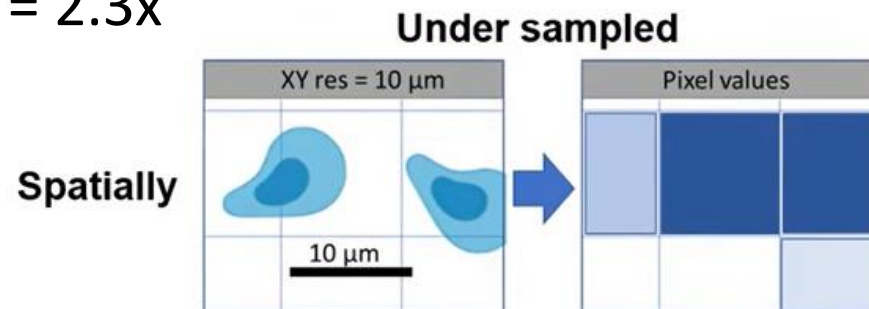
Premyslite výsledok experimentu

- Pri nastavovaní snímania treba myslieť na najjasnejšie aj najtmavšie vzorky – zmenia sa intenzity počas experimentu?



Frekvencia vzorkovania

- Mikroskopické obrázky sú digitálnou reprezentáciou prírodných udalostí (analógové). Preto ich musíme vzorkovať frekvenciou, ktorá reprezentuje to, čo snímame
- Nyquist = 2.3x



Ako získať dobrý obrázok

- Použite indikátory rozsahu

- ukážu overexpozíciu

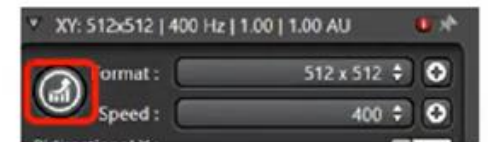
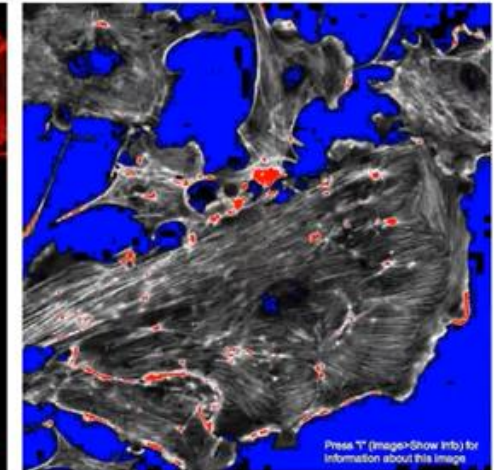
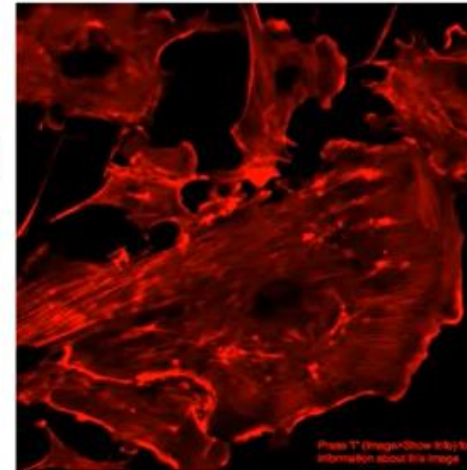


- Použite optimálne nastavenie

- správny počet a veľkosť pixelov

- Dobre naplánujte experiment

- Objektív, počet Z krokov, počet časových bodov
 - Zmena jasnosti objektov
 - Kontroly



Formáty obrázkov

- JPEG – stratový, nepoužívať!
- TIFF – bezstratový a dobrý klasický formát obrázku
- Špecifické formáty pre daného producenta zariadenia – najlepšie pre skladovanie relevantných metadát
 - .dzi, .oir, .sld, .nd2, .lsm
 - Najlepšie kompatibilné s „Bio-Formats“ vo FIJI/ImageJ

Základné pravidlá pre prácu s obrázkami z mikroskopov

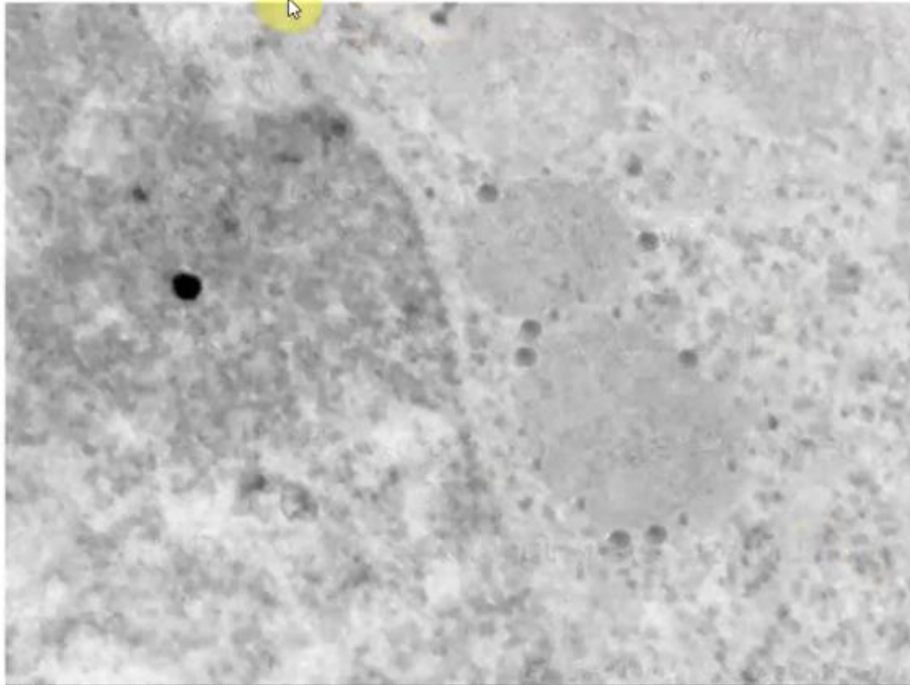
- Vedecké digitálne obrázky sú data, ktoré môžu byť kompromitované nesprávnou manipuláciou
- Manipuláciu digitálnych obrázkov vždy robíme na kópii originálu – vždy zachovajte originálny súbor nezmenený!
- Jednoduché úpravy celých obrázkov sú väčšinou akceptovateľné
- Orezanie/zmenšenie obrázku je väčšinou akceptovateľné
- Digitálne obrázky, ktoré budeme navzájom porovnávať, musia byť vyfotené za rovnakých podmienok a aj po-akvizičné procesovanie musí byť identické
- Manipulácie, ktoré sú robené len na časti obrázku ale nie na iných častiach obrázku, sú spochybniteľné

Základné pravidlá pre prácu s obrázkami z mikroskopov

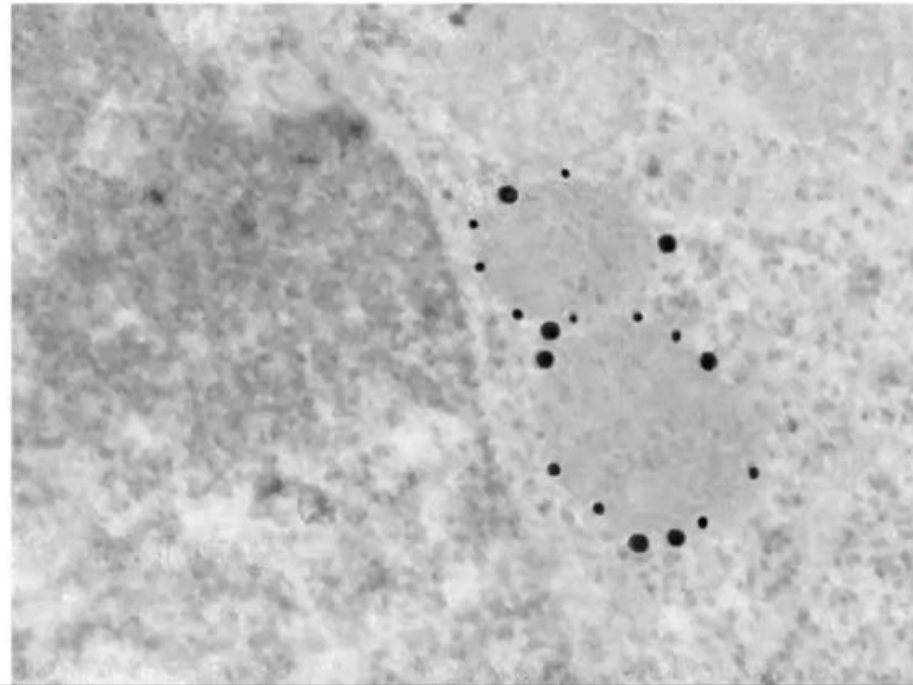
- Používanie softvérových filtrov na zlepšenie kvality obrázkov nie je odporúčané
- Klonovanie či kopírovanie objektov do digitálneho obrázka z iných častí obrázku alebo z iného obrázku je veľmi pofidérne
- Merania intenzity by mali byť robené na uniformne spracovaných dátach, ktoré by mali byť kalibrované k známemu štandardu
- Vyhýbajte sa stratovej kompresii
- Veľkosť a rozlíšenie sú dôležité
- Pozor na zmenu veľkosti obrázku (v pixeloch)

Manipulácie obrázkov – selektívne zvýraznenie

Original image



Manipulated image

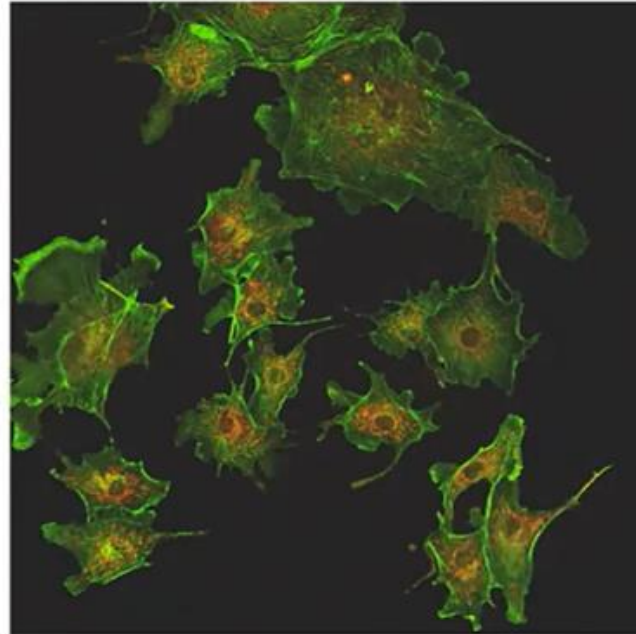


Misrepresentation of immunogold data. The gold particles, which were actually present in the original (left), have been enhanced in the manipulated image (right). Note also that the background dot in the original data has been removed in the manipulated image.

Image from Mike Rossner, and Kenneth M. Yamada J Cell Biol 2004;166:11-15

Manipulácie obrázkov - orezávanie

Manipulated
image



Manipulation
revealed
by contrast
adjustment

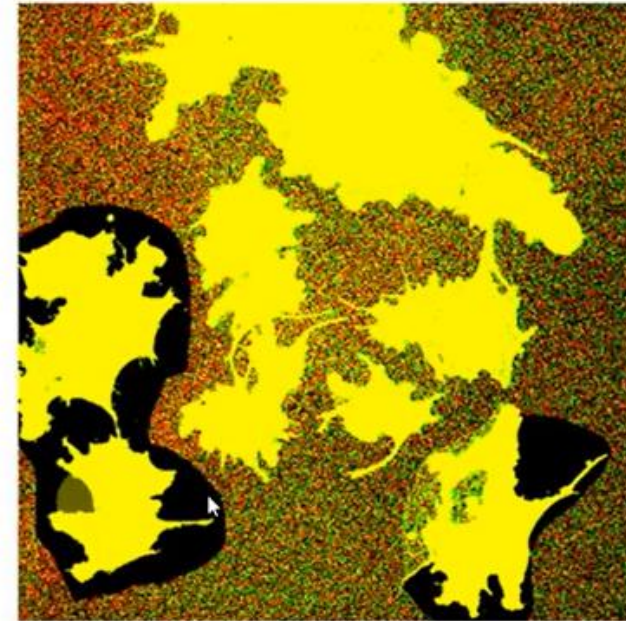
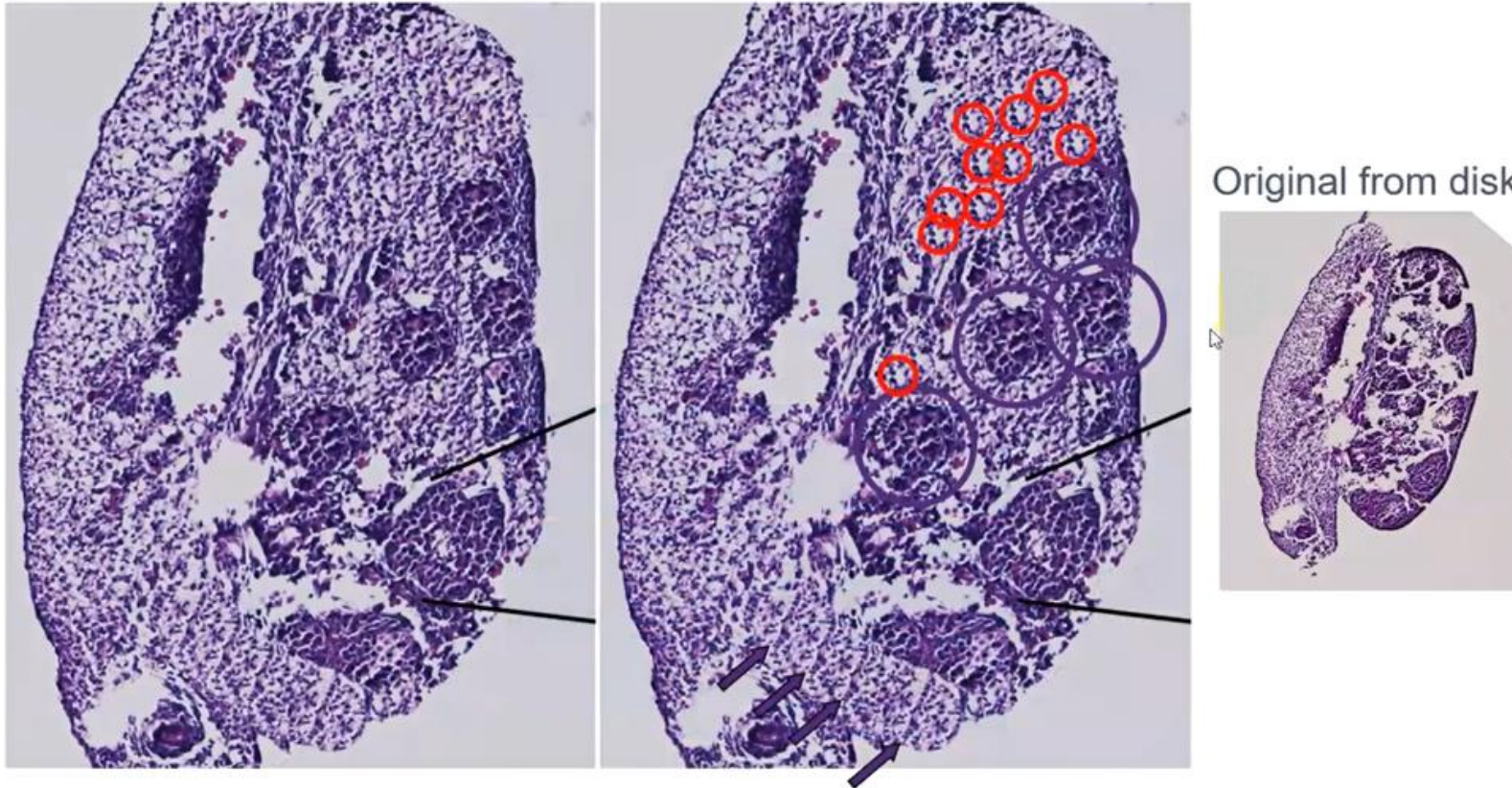


Image from Mike Rossner, and Kenneth M. Yamada J Cell Biol 2004;166:11-15

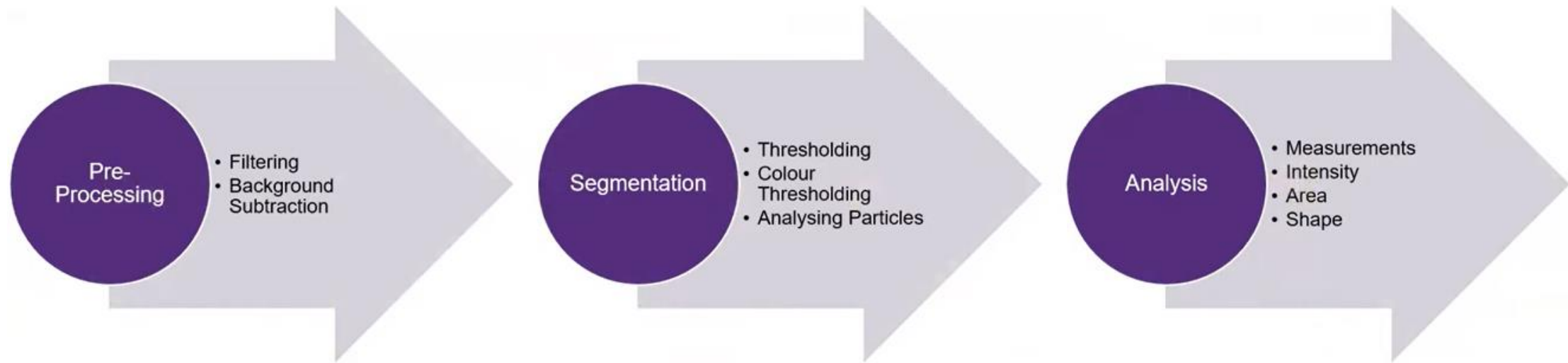
Manipulácie obrázkov - klonovanie



Originálny ilustratívny snímok: Peter Koopman

Analýza obrazu

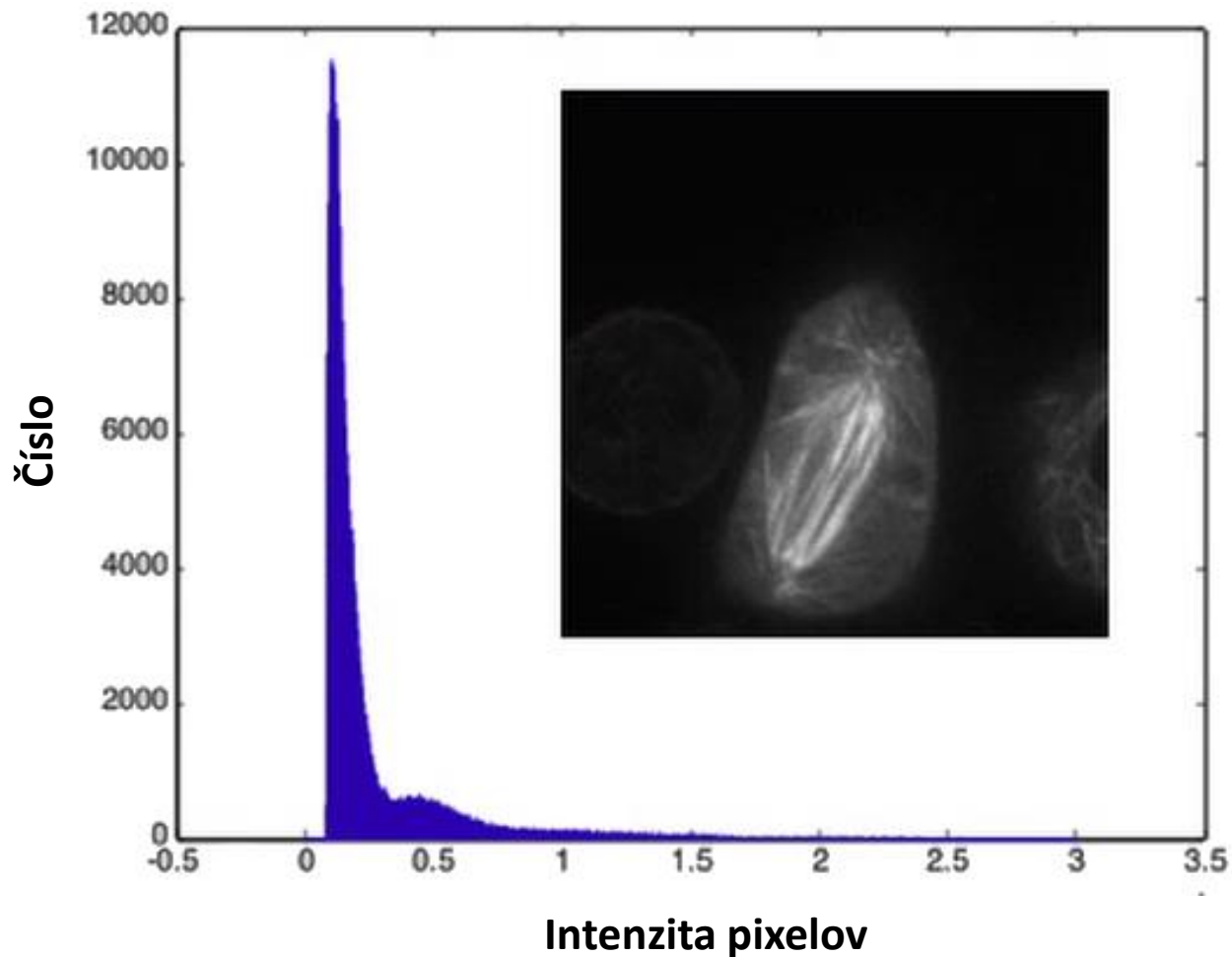
Image Analysis Pipeline



Korekcia obrazu od klasických artefaktov

- Korekcia pozadia
 - čisto matematické – kamera má nenulový offset
 - Reálne pozadie – autofluoescencia média, fluorescencia pozadia, svetlo miestnosti...
- Snaha o korekciu odčítaním tohoto pozadia
- Zmeranie/odhad pozadia, potom odčítanie
 - Tmavý snímok z kamery alebo nenafarbená vzorka, ktorá nemá mať signál

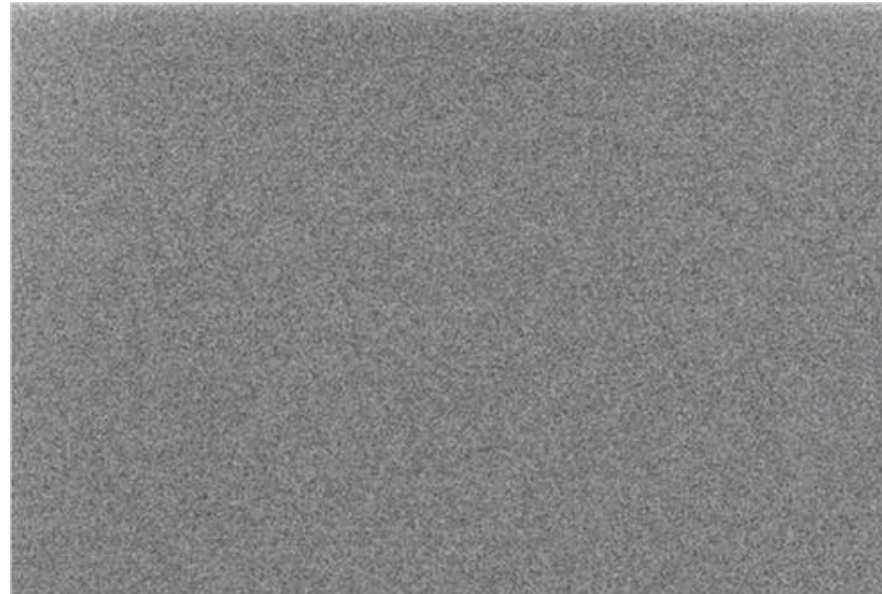
Odhad pozadia z obrázku



V prípade nerovnomerného pozadia možno odčítať rôzne pozadie pre rôzne časti obrázku

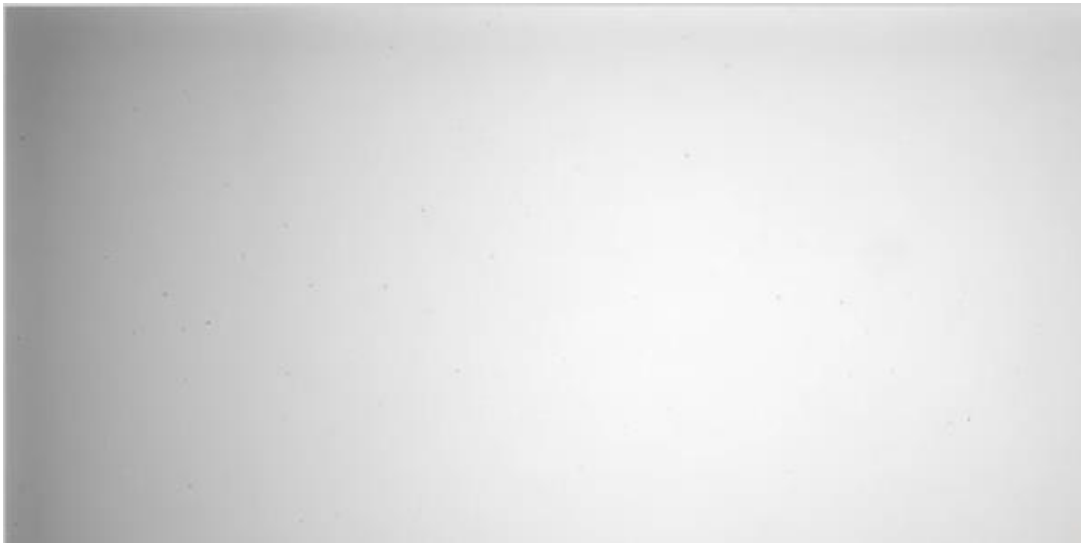
Tmavý obrázok

- Získaný kamerou, ktorou neprechádza svetlo
- Umožňuje zmerať pozadie prístroja
- Pomáha detekovať reálnu autofluorescenciu pozadia od offsetu kamery



Korekcia tieňovania

- Meranie a korekcia nerovnomernosti v osvetlení a detekcii
(pixely v strede sú svetlejšie ako na krajoch obrázku)
- zosnímanie rovnomernej fluorescenčnej vzorky



$$I_{\text{zmerany}} = I_{\text{reálny}} * \text{Tieňovanie} + \text{Tmavý obraz}$$

$$I_{\text{reálny}} = (I_{\text{zmerany}} - \text{Tmavý obraz}) / \text{Tieňovanie}$$

Digitálne filtre

- Priemerovanie – vyhladzovanie

1	1	1
1	1	1
1	1	1

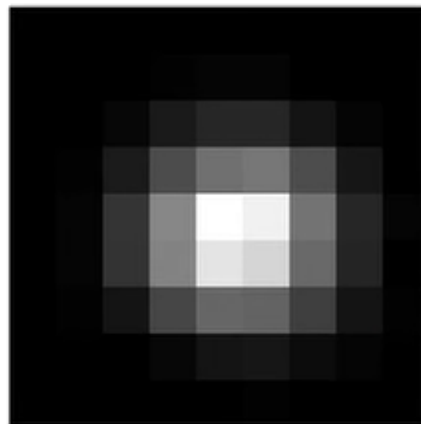


- Gausovské vyhladzovanie

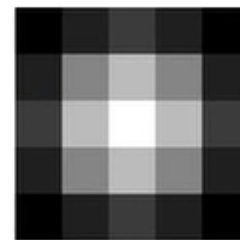
0	1	2	1	0
1	6	10	6	1
2	10	16	10	2
1	6	10	6	1
0	1	2	1	0

Prečo vyhladzovať?

- Vyhladenie malých artefaktov
- Ak je váš obrázok správne zosnímaný, funkcia rozptylu bodu bude rozptýlená naprieč mnohými pixelmi
- Správne využitie tejto redundancie vyžaduje dekonvolúciu
- Vyhladenie pomáha redukovať artefakty šumu jednotlivých pixelov, ktoré nie sú reálne

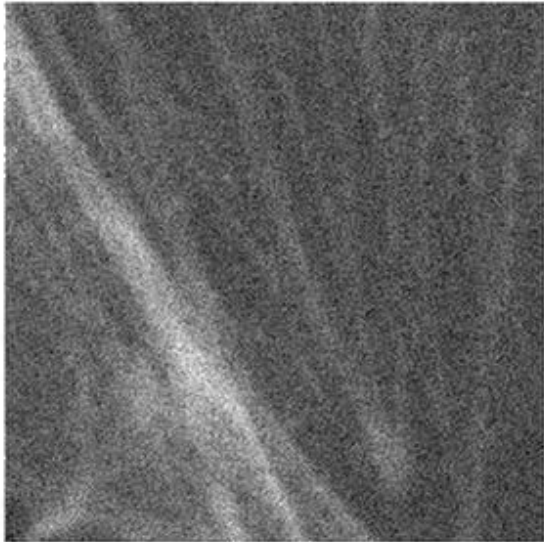


PSF

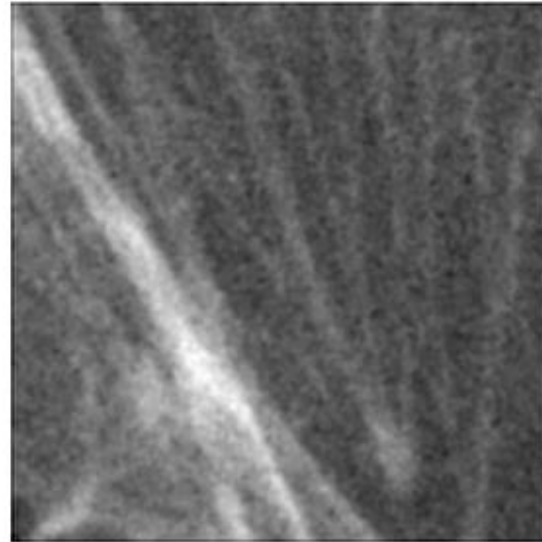


Gaussian

Priemerovanie/vyhladzovanie: spriemerovanie redundancie, potlačenie šumu

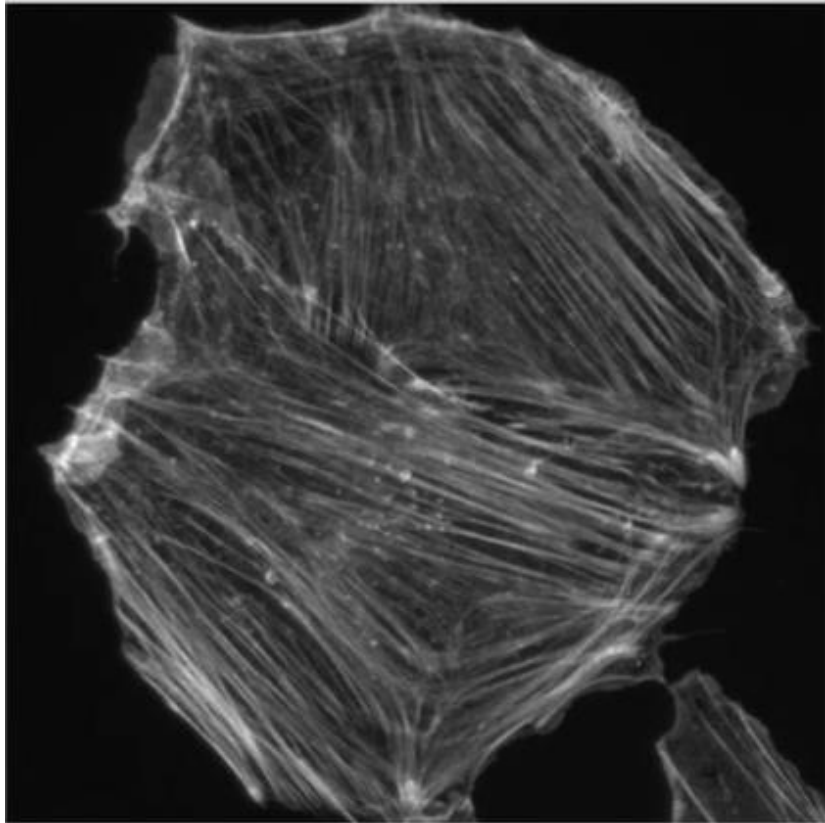


Obrázok so šumom



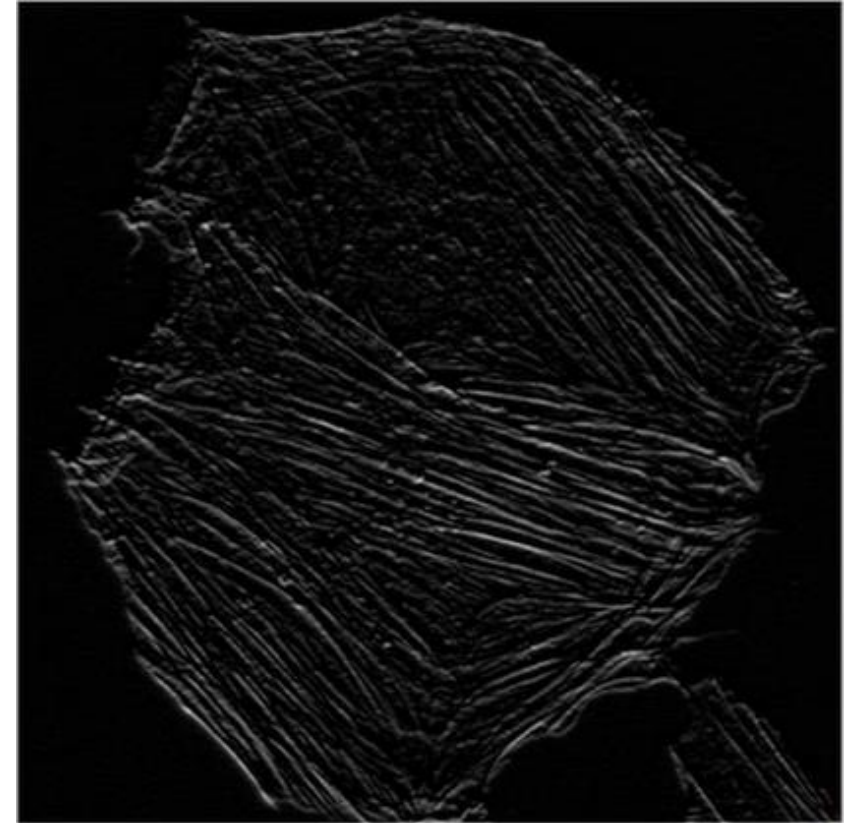
Filter s Gausovským
vyhladením, $\sigma = 1$ pixel

Detekcia okraja



1	1	1
0	0	0
-1	-1	-1

1	2	1
0	0	0
-1	-2	-1

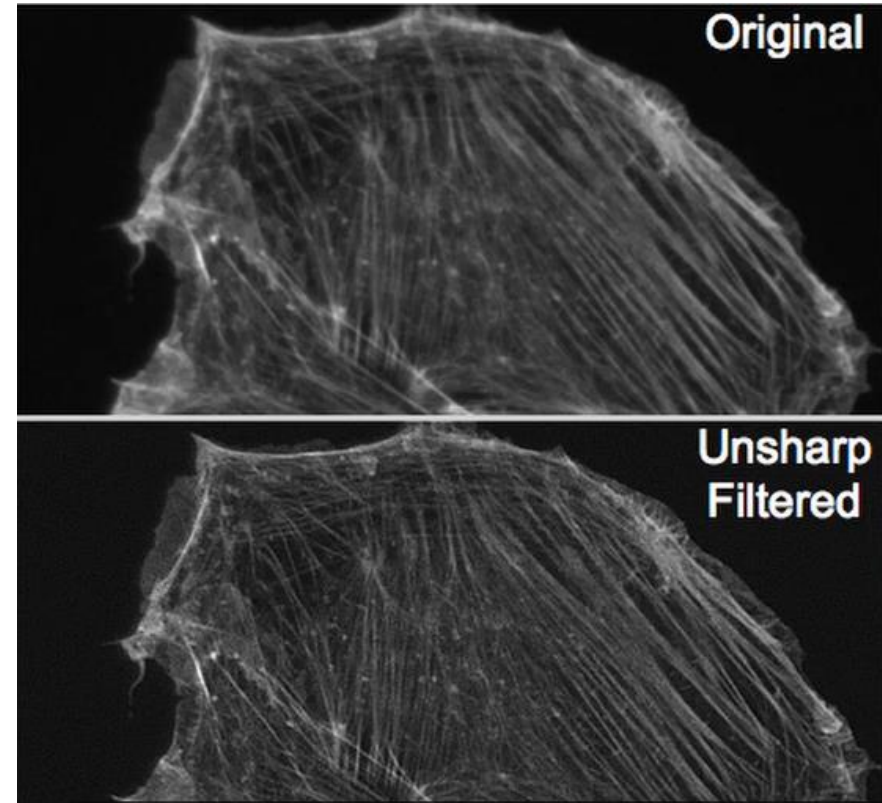


Užitočné pre hľadanie okrajov, zvýraznenie prechodov

Filtre zvýrazňujúce kontrast

- Zvýraznenie výrazných pixelov obklopených slabými pixelmi
 - Rozostrenie (unsharp)
 - Laplacovský
 - Laplacovský na Gausovskom

-1	-4	-1
-4	26	-4
-1	-4	-1

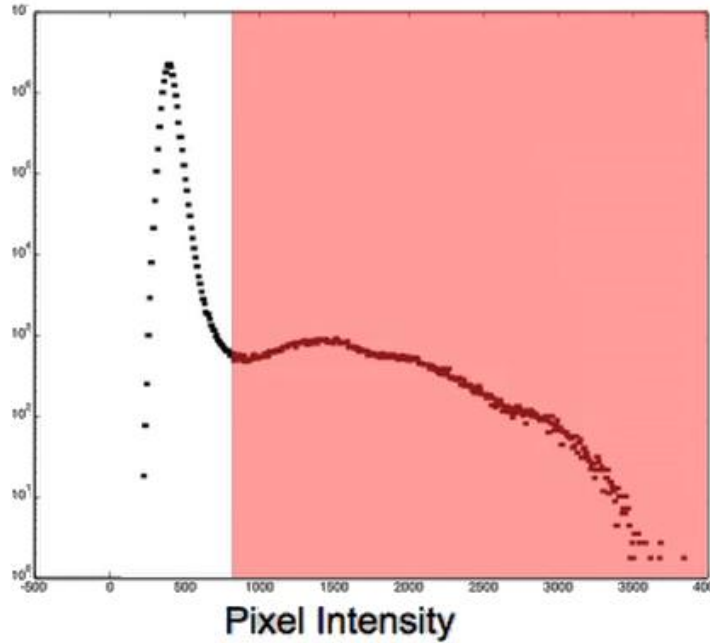


Nelineárne filtre

- Mediánové filtrovanie – nahradenie centrálního pixelu hodnotou mediánu v štvorci
- Užitočné na vyhladenie za zachovania okrajov

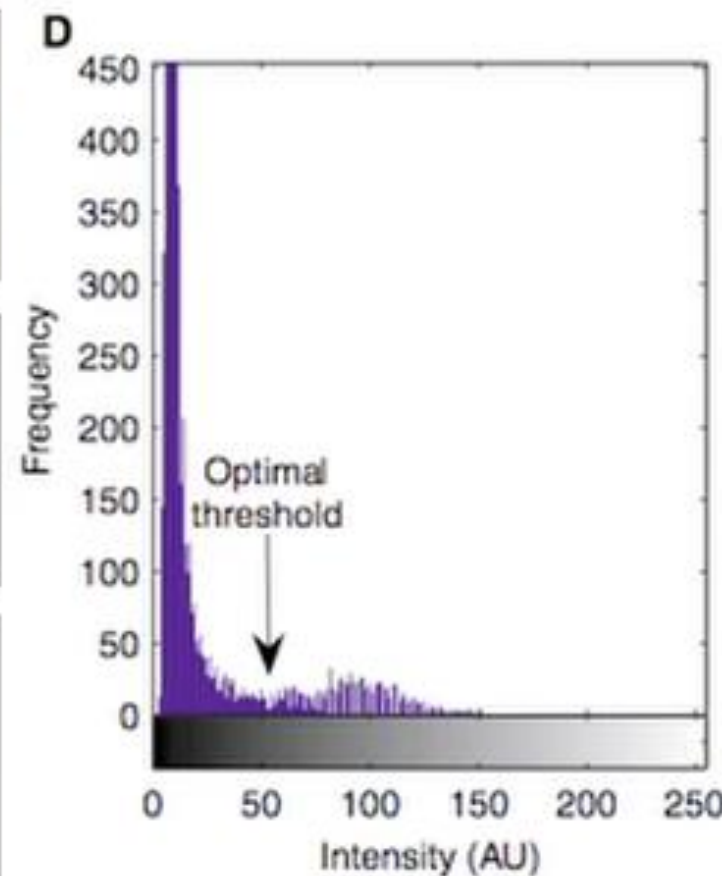
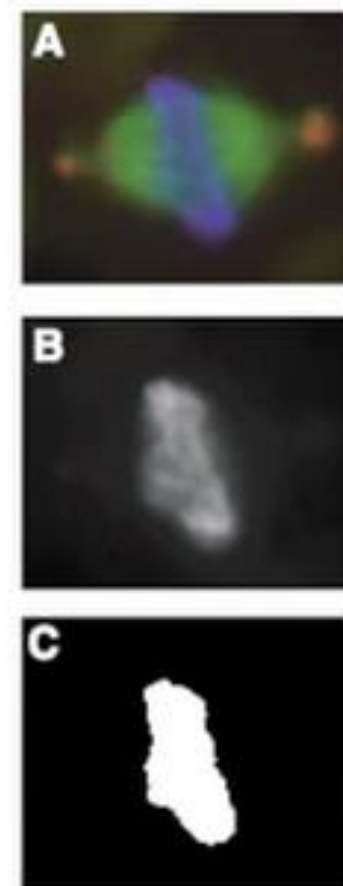
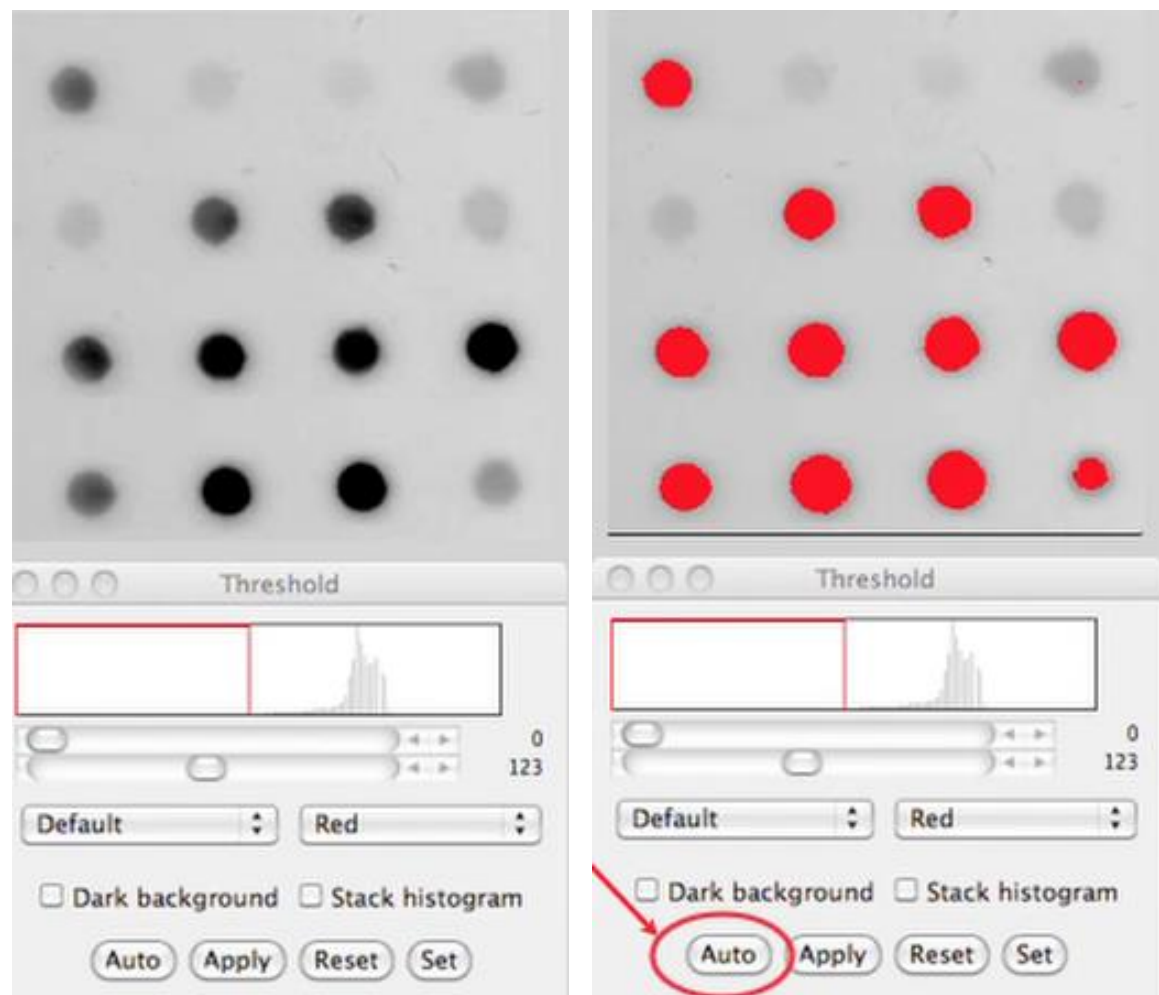
Thresholding

- Bežná technika na identifikáciu objektov v obrázku



Separovanie na popredie a pozadie

Thresholding – nastavenie hraničnej hodnoty



Problém tohoto prístupu

- Naklonený jasnejším objektom
- Ideálne je použiť druhý kanál na nezávislé definovanie veľkosti objektov merania

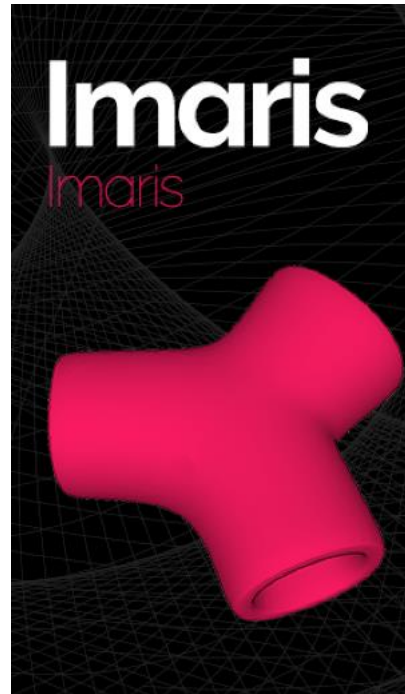
Binárny obraz

- Výsledok thresholdingu; 1 je v objekte, 0 všade inde
- Dá sa použiť na identifikáciu objektov
- Možno ďalej manipulovať

Ďalšie binárne operácie

- Sekvenčná erózia a rozšírenie – vyhladenie objektov
- Vyplnenie dier
- Odstránenie objektov na hraniciach

Programy na analýzu obrazu: příklady



CellProfiler™
cell image analysis software

Zdroje

- iBiology.org: <https://www.youtube.com/watch?v=jaY6S1p4i3A>
- <https://www.youtube.com/watch?v=qkgADgd7xu0>