

Západočeská univerzita v Plzni
Fakulta aplikovaných věd
Katedra kybernetiky

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PLZEŇ, 2015

Bc. MARTIN TOMAN

Zadání

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta aplikovaných věd
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin TOMAN**
Osobní číslo: **A13N0142P**
Studijní program: **N3902 Inženýrská informatika**
Studijní obor: **Řídicí a rozhodovací systémy**
Název tématu: **Automatická kvantifikace buněk použitím metod počítačového vidění**
Zadávací katedra: **Katedra kybernetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte možnosti metod počítačového vidění pro řešení úlohy určení počtu buněk z mikroskopického snímku buněčných kultur.
2. Navrhněte vhodnou metodu pro řešení úlohy. Metodu implementujte ve formě počítačového algoritmu.
3. Funkčnost algoritmu otestujte na reálných datech obdržných z pracovišť specializovaných na výzkum buněčných kultur LF UK v Plzni.



Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **40-50 stránek A4**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

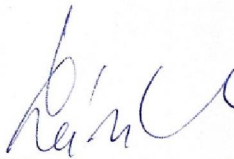
Sonka, M., Hlavac, V., Boyle, R.: Image processing, analysis, and machine vision, 3th edition, Thomson, 2008

Carneiro, J., Junqueira, C., L., a O Kelley, R.: Základy histologie, H&H, 2002

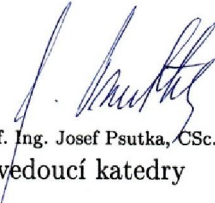
Konrádová, V., a spol.: Funkční histologie, H&H, 2000

Vedoucí diplomové práce: **Doc. Ing. Luděk Müller, Ph.D.**
Katedra kybernetiky

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**


Doc. RNDr. Miroslav Lávička, Ph.D.
děkan




Prof. Ing. Josef Psutka, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 1. října 2014

PROHLÁŠENÍ

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci zpracovanou na závěr studia na Fakultě aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím odborné literatury a pramenů, jejichž úplný seznam je její součástí.

V Plzni dne

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Lud'ku Müllerovi Ph.D. za jeho cenné rady, podporu, odborné vedení a čas, který mi věnoval.

Dále patří mé poděkování Ing. Marku Hruzovi Ph.D. za pomoc při hledání té správné cesty přes řadu překážek při návrhu algoritmu.

Své vřelé díky bych chtěl vyjádřit také Mgr. Janě Dvořákové z Ústavu hygieny a preventivní medicíny LF UK v Plzni za zodpovězení mnoha otázek z oblasti mikrobiologie, poskytnutí obrazových dat a anotací a také za její čas, který mi věnovala.

Abstrakt

Tato diplomová práce se věnuje tématu automatické kvantifikace buněk s použitím metod počítačového vidění. Počítání buněk v populacích je nedílnou součástí výzkumů, které se zaměřují na odhalení mechanismů působení perzistentních organických polutantů na náš organismus.

V úvodu je popsána hlavní motivace pro tuto práci, dále doplněná samotnými cíli práce. Následuje kapitola zprostředkovávající potřebný zevrubný úvod do problematiky buněk včetně jejich rozdělení, stavby a funkcí. Další část je věnována tkáním s hlavním zaměřením na tukovou tkáň. Popsány jsou zde typy a funkce tukové tkáně, stejně tak problematika ukládání perzistentních organických polutantů. Následující kapitola pak uvádí v dnešní době nejčastěji používané metody pro kvantifikaci buněk, speciální pozornost je věnována metodám počítačového vidění. Za pomoci teoretických podkladů popsaných v této části práce jsou v následující kapitole navrženy algoritmy pro automatickou kvantifikaci tukových buněk na mikroskopických snímcích. Zkoušené byly segmentační techniky Watershed a Floodfill, přičemž nad rámec zadání práce byla dále zkoušena metoda pro analýzu v adipocytech obsažených tukových kapének. Pro tento účel byl použit algoritmus Maximally stable extremal regions. Navržené postupy jsou následně testovány na reálných datech a jejich výsledky statisticky vyhodnoceny.

Klíčová slova: MSER, Watershed, Floodfill, prahování, segmentace, adipocyty, perzistentní organické polutanty, buňka

Abstract

This thesis is devoted to the issue of automatic cell quantification using computer vision methods. Cell counting is an important part of research focused on discovery of mechanisms of persistent organic pollutants effects on organism.

Main motivation and targets of this thesis are described in the introduction. The next chapter introduces briefly the issue of cells, including their types, structure and function. The next part is devoted to tissues with focus on the adipose tissue. It explains types and functions of the adipose tissue and gives attention to the accumulation of persistent organic pollutants in white adipose tissue. The next chapter then introduces commonly used methods for cell quantification with focus on the computer vision methods. On the basis of the theory described in this part the next chapter is devoted to design of the algorithms for cell counting in microscopic images. The tested segmentation techniques are Watershed and Floodfill, in addition there is method for analysis of lipid droplets in the adipose cells described. For this purpose is the Maximally stable extremal regions algorithm used. The suggested techniques are tested on real pictures and the results are then statistically interpreted.

Keywords: MSER, Watershed, Floodfill, thresholding, segmentation, adipocyte, persistent organic pollutants, cell

Obsah

Zadání.....	2
Poděkování.....	5
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	12
Seznam grafů.....	13
Nomenklatura.....	14
Seznam zkratk.....	14
Seznam symbolů.....	16
Seznam příloh.....	18
1 ÚVOD.....	19
2 CÍLE PRÁCE.....	21
3 BUŇKA.....	22
3.1 Prokaryotické buňky.....	22
3.2 Eukaryotické buňky.....	22
3.3 Buňky lidského těla.....	23
3.3.1 Stavba buňky.....	23
3.3.2 Buněčné organely.....	24
3.3.3 Buněčné membrány.....	26
3.4 Buněčné transportní systémy.....	28
3.5 Tkáně.....	29
4 TUKOVÁ TKÁŇ.....	30
4.1 Bílá tuková tkáň.....	31
4.2 Hnědá tuková tkáň.....	33
4.3 Tuková tkáň jako depozit polutantů.....	33
4.3.1 Funkce tukové tkáně.....	34
4.3.2 Klasifikace POPs a jejich účinky.....	35
4.3.3 Výzkum vlivu polutantů.....	36
5 SOUČASNÝ STAV.....	38
5.1 Počítací komůrka.....	38
5.2 Počítání jednotek tvořící kolonie.....	39
5.3 Spektrofotometrie.....	39
5.4 Coulterův čítač.....	40
5.5 Průtoková cytometrie.....	41
5.6 Metody zpracování obrazu.....	43

5.6.1	Maximally stable extremal regions.....	43
5.6.2	Watershed.....	46
5.6.3	Narůstání oblasti.....	48
5.6.4	Prahování.....	49
5.6.5	Barevný prostor HSV.....	51
5.7	Software.....	53
5.7.1	ImageJ.....	53
5.8	Barvení tukových buněk.....	54
6	NÁVRH A REALIZACE ŘEŠENÍ.....	56
6.1	Vstupní obraz.....	56
6.2	Rozpoznání vstupního obrazu.....	57
6.3	Otsuovo prahování.....	58
6.4	HSV prahování.....	59
6.5	Segmentace buněk.....	60
6.5.1	Maximally stable extremal regions.....	60
6.5.2	Watershed.....	61
6.5.3	Floodfill.....	62
6.6	Analýza tukových kapének.....	64
6.6.1	MSER.....	64
6.7	Výstup a vizualizace výsledků.....	65
6.8	Vytvořený skript.....	66
7	EXPERIMENTY.....	67
7.1	Snímky bez použití barviv.....	68
7.2	Snímky obarvené Oil Red O.....	69
8	VÝSLEDKY.....	71
8.1	Snímky bez použití barviv.....	72
8.1.1	Watershed.....	73
8.1.2	Floodfill.....	74
8.1.3	Detekce tukových kapének.....	76
8.2	Snímky obarvené pomocí Oil Red O.....	77
8.2.1	Watershed.....	78
8.2.2	Floodfill.....	80
8.2.3	Detekce tukových kapének.....	82
8.3	Shrnutí.....	83
9	ZÁVĚR.....	86
	Literatura.....	89
	Přílohy.....	95

Seznam obrázků

Obrázek 1	Schéma stavby buňky a jejích organel
Obrázek 2	Typy mezibuněčného spojení
Obrázek 3	Fáze vývoje tukových buněk
Obrázek 4	Stromová reprezentace obrazu algoritmem MSER
Obrázek 5	Segmentace Watershed bez markerů
Obrázek 6	Segmentace Watershed s markery
Obrázek 7	Porovnání modelů HSV a RGB
Obrázek 8	Ukázka vstupního obrazu (vlevo bez barviv, vpravo ORO)
Obrázek 9	Porovnání histogramů obou typů snímků (vlevo bez barviva, vpravo ORO)
Obrázek 10	Otsuovo prahování (vlevo bez barviva, vpravo ORO)
Obrázek 11	HSV prahování (vlevo bez barviva, vpravo ORO)
Obrázek 12	Watershed, bez barviva (vlevo markery, vpravo výsledek)
Obrázek 13	Watershed, barvivo ORO (vlevo markery, vpravo výsledek)
Obrázek 14	Floodfill, bez barviv (vlevo seed pointy, vpravo výsledek)
Obrázek 15	Floodfill, barvivo ORO (vlevo seed pointy, vpravo výsledek)
Obrázek 16	Detekce tukových kapének pomocí MSER (vlevo bez barviv, vpravo ORO, bíle tukové kapénky)
Obrázek 17	Příklad problémového místa s chybnou detekcí pomocí Watershed, ve snímku bez použití barviva (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)
Obrázek 18	Příklad problémového místa s chybnou detekcí pomocí Floodfill, ve snímku bez použití barviva (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)

Obrázek 19 Ukázka míst s chybnou detekcí buněk, algoritmus Watershed, snímky obarvené pomocí ORO (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)

Obrázek 20 Ukázka míst s chybnou detekcí buněk, algoritmus Floodfill, snímky obarvené pomocí ORO (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)

Seznam tabulek

Tabulka 1	Funkce některých specializovaných buněk v lidském těle
Tabulka 2	Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Watershed
Tabulka 3	Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Floodfill
Tabulka 4	Počty tukových kapének u nebarvených snímků, relativní chyba detekce, intervaly spolehlivosti
Tabulka 5	Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Watershed
Tabulka 6	Porovnání výsledků a chybovosti algoritmu Watershed s počty buněk zjištěnými dvěma různými osobami
Tabulka 7	Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Floodfill
Tabulka 8	Porovnání výsledků a chybovosti algoritmu Floodfill s počty buněk zjištěnými dvěma různými osobami
Tabulka 9	Počty tukových kapének u obarvených snímků s ORO, relativní chyba detekce, intervaly spolehlivosti

Seznam grafů

- Graf 1 Porovnání koeficientů korelace a determinace u jednotlivých metod, včetně p -hodnot při kvantifikaci buněk
- Graf 2 Porovnání koeficientů korelace a determinace u jednotlivých metod, včetně p -hodnot při kvantifikaci tukových kapének metodou MSER
- Graf 3 Porovnání průměrných relativních chyb algoritmů s rozptyly

Nomenklatura

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
ANOVA	Analysis of variance
Ahr	aryl uhlovodíkový receptor
ATP	adenosintrifosfát
BADGE	bisfenol A diglycidyl ether
CMY	barevný model (cyan, magenta, yellow)
CMYK	barevný model (cyan, magenta, yellow, key)
DDE	dichlordifenylchloroethylen
DDT	dichlordifenyltrichloretan
DEHP	bis(2-ethylhexyl) ftalát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
FACS	fluorescent activated cell sorting
GUI	graphic user interface
HADMSC	Human adipose derived mesenchymal cells
HE	hematoxylin - eosin
HSL	hormon-senzitivní lipáza
HSV	barevný model (hue, saturation, value)
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
MSER	maximally stable extremal regions
OCPs	organochlorové pesticidy
OpenCV	Open Source Computer Vision

ORO	Oil red O
PBFRs	polybromované zpomalovače hoření (polybrominated flame retardants)
PC	osobní počítač
PCBs	polychlorované bifenyly
POPs	perzistentní organické polutanty
PPAR	receptor aktivovaný proliferáty perixozomů (perixosom proliferator-activated receptor)
PVC	polyvinylchlorid
RGB	barevný model (red, green, blue)
RNA	ribonukleová kyselina
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)

Seznam symbolů

-	rozdíl
{ }	množina
U	sjednocení
	absolutní hodnota, kardinalita
Σ	suma
\hat{z}	odhad z
\bar{z}	výběrový průměr z
/	podíl
\	rozdíl množin
+	součet
\ominus	eroze
·	skalární součin
<	větší
$\langle a, b \rangle$	uzavřený interval od a do b
\neq	nerovná se
>	menší
\times	vektorový součin
\forall	pro všechny
\emptyset	prázdná množina
\in	je součástí
\cap	průnik
\subset	podmnožina
\oplus	dilatace
μ	střední hodnota
<i>grad</i>	gradient

Δ	Laplaceův operátor
σ^2	rozptyl
δ	parciální diferenciál
ω	pravděpodobnost třídy

Seznam příloh

Příloha 1	Příklad Neubauerovy počítací komůrky
Příloha 2	Ukázka jednotek tvořících kolonie
Příloha 3	Porovnání turbidimetrie a nefelometrie
Příloha 4	Coulterův čítač Z2 Coulter
Příloha 5	Průtokový cytometr
Příloha 6	Ukázka z programu ImageJ
Příloha 7	Ukázka textového výstupu algoritmu
Příloha 8	Ukázka segmentovaného snímku s adipocyty

1 ÚVOD

20. století se neslo pro celé lidstvo v duchu technického pokroku a sociálního rozvoje společnosti. Nespočet vynálezů nám otevřelo zcela nové možnosti a mnoho do té doby obtížných a komplikovaných úkonů zvládneme briskně pomocí stisku několika tlačítek. Cestování po celém světě není žádným problémem díky automobilům či letadlům, stejně tak komunikace s našimi blízkými na druhém konci světa může probíhat v reálném čase, a to i s přenosem obrazu. Dříve smrtelné dokážeme zažehnat několika pilulkami a je-li to potřeba, umíme vytvořit podrobný trojrozměrný model celého lidského těla. Pokrok medicíny v posledních desetiletích je kolosální. Nicméně ruku v ruce s vyspělými technologiemi rostou také požadavky na co nejvyšší výkony a kvalitu v co nejkratším čase a za co nejnižší náklady. Tento trend vedl k tomu, že principy, na nichž naše společnost stála po tisíce let, najednou přestaly dostačovat. Například pokud v zemědělství není nějaká rostlina dostatečně plodná, dokážeme ji geneticky modifikovat a pokud ji napadnou škůdci, zbavíme se jich snadno pomocí biocidů.

Používání celé řady synteticky vyrobených sloučenin způsobilo, že naše životní prostředí je zamořeno škodlivými chemikáliemi. Tyto látky pak kontaminují lidský organismus s celou řadou negativních důsledků. V tomto ohledu jsou nejnebezpečnější perzistentní organické polutanty (POPs), které se ukládají v lidském těle a jsou odolné vůči metabolickému odbourávání. Mezi ně například mnohé pesticidy a insekticidy, jejichž používání bylo sice již zakázáno, nicméně díky své odolnosti se stále vyskytují v životním prostředí. Další škodlivé polutanty představují změkčovadla a jiné látky používané při výrobě průmyslových plastů. S cílem snížit rozsah škod při požáru se často používají různé zpomalovače hoření, které jsou však také vysoce toxické.

V poslední době je směřována pozornost k ukládání lipofilních škodlivých polutantů v tukové tkáni. Vzhledem k tomu, že i u neobézních lidí může tato tkáň tvořit téměř jednu třetinu tělesné hmotnosti, představuje potenciálně významný depozit pro organismus toxických látek. Po dlouhou dobu byla tuková tkáň považována za pasivní zásobárnu energie a mechanickou ochranu orgánů proti vnějším vlivům. Nejnovější studie však ukazují, že vylučuje mnoho různých hormonů, čímž se účastní regulace celé řady metabolických procesů.

Zvýšená koncentrace POPs v tukové tkáni může vést k rozvoji obezity a s ní spojených onemocnění, jako je například cukrovka. Některé typy těchto polutantů také

negativně ovlivňují embryonální rozvoj a mohou poškodit reprodukční funkce u postižených jedinců. Mnoho těchto látek také vykazuje neurotoxické a karcinogenní účinky, narušuje imunitní systém a zabraňuje správné diferenciaci buněk.

Z důvodu hrozby, jakou tyto polutanty představují pro společnost, se provádějí výzkumy s cílem odhalit mechanismus působení těchto toxických látek na buňky lidského těla. V případě tukové tkáně se jedná o tukové buňky, čili adipocyty. Pokusy začínají nasazením zárodečných mezenchymálních buněk, z nichž se s postupem času diferencují dospělé adipocyty. Jednotlivé populace jsou vystaveny působení polutantů, přičemž je jejich vývoj následně porovnáván s kontrolní populací. K vyhodnocení rozdílů mezi populacemi patří potřeba znalosti počtu adipocytů, porovnání jejich velikostí a počtů tukových kapének, které jsou v nich obsaženy.

Ve většině případů probíhá kvantifikace buněk ručně, a to za pomoci tzv. počítací komůrky, kde je vzorek rozptýlen přes znázorněnou mřížku, a následně je počet buněk dopočítán se znalostí jejich koncentrace v určitém malém objemu roztoku. Tento přístup je časově poměrně náročný a vytěžuje výzkumné pracovníky. Z důvodu vysokých nákladů se však zřídka používají průtokové cytometry a Coulterovy čítače, které dokáží plně automaticky, přesně a velmi rychle vyhodnotit počet buněk ve zkoumaném vzorku. Pořízení takového přístroje je záležitostí několika set tisíc až milionů korun.

V posledních letech je také obracena pozornost k využívání metod zpracování digitálního obrazu. Přednosti tohoto přístupu jsou nasnadě, jedná se hlavně o nízké náklady, rychlost a jednoduché použití, pro které stačí vlastnit běžný počítač. Pořizování snímků během pokusu je možné díky digitálním zrcadlovkám, které lze jednoduše upevnit na mikroskop a všechny fotografie ukládat na paměťové karty. Pro zpracování těchto dat existuje také specializovaný software, který však stále vyžaduje asistenci člověka. Hlavním důvodem je fakt, že každý experiment je velmi specifický a různé typy buněk lidského těla se značně odlišují svojí velikostí, tvarem, uspořádáním apod. Tyto programy obsahují sadu nástrojů a algoritmů, které musí uživatel zkombinovat tak, aby získal co nejlepší výsledek.

Podobně vypadá situace na poli algoritmů schopných plně automaticky segmentovat a následně kvantifikovat buňky na snímku. Tyto metody fungují vždy pro konkrétní typ buněk a podmínky experimentu. V této práci jsou zkoumány možnosti použití metod počítačového vidění pro automatickou kvantifikaci buněk, konkrétně diferencovaných adipocytů. Funkční algoritmy zaměřené na kvantifikaci tohoto typu buněk nejsou dosud k dispozici.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je, jak již název napovídá, automatická kvantifikace buněk za použití metod počítačového vidění. V současnosti používané „ruční“ přístupy pro počítání buněk mimo oblast počítačového vidění nejsou zcela efektivní z hlediska časové náročnosti a zatěžování výzkumných pracovníků. Pořízení patřičných přístrojů pro automatickou kvantifikaci buněk je zase velmi nákladné, navíc samotné použití takových zařízení často vyžaduje odborně způsobilou obsluhu. V oblasti zpracování digitálního obrazu prozatím neexistují univerzální algoritmy či ucelená softwarová řešení schopná plně automatického počítání a segmentace buněk.

Prvním úkolem v rámci této práce je popsat různé metody počítačového vidění, které jsou používané pro automatickou segmentaci buněčných struktur. Následně s ohledem na popsané techniky navrhnout algoritmus, který dokáže plně automaticky detekovat vyvinuté tukové buňky v mikroskopických snímcích. Kromě samotné obrazové segmentace je úkolem ve výstupu algoritmu zapsat všechny zjištěné informace o adipocytech v konkrétním snímku. Kromě samotného počtu buněk se může jednat o jejich velikost či počet v nich obsažených tukových kapének.

Dalším dílčím cílem je implementovat navržený algoritmus a následně jej otestovat na reálných snímcích obsahujících diferencované dospělé tukové buňky. Testovací data byla pro tento účel poskytnuta Ústavem hygieny a preventivní medicíny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Společně s fotografiemi nám byly poskytnuty i anotace, na jejichž základě lze vyhodnotit úspěšnost navrženého postupu.

Hlavní smysl této práce spočívá v usnadnění kvantifikace buněk, které je prováděno při výzkumu s cílem vyhodnotit možné negativní účinky perzistentních organických polutantů uložených v tukové tkáni. Tyto toxické látky vyskytující se v našem životním prostředí mohou při kontaminaci organismu zapříčinit celou řadu závažných onemocnění a poruch metabolismu.

3 BUŇKA

Buňka je základním funkčním a stavebním prvkem všech živých organismů. Zároveň také představuje nejmenší živou jednotku, která je schopna nezávislé existence. V organismu plní celou řadu důležitých funkcí, jako je například látková výměna, obranné mechanismy, přeměna vnějších podnětů na nervový vzruch či udržování stálého vnitřního prostředí - homeostázy. Buňky se dokáží také pohybovat, množit, mají schopnost obnovy a mohou růst. Soubor buněk obdobného typu a tvaru tvoří tkáň. Soubor tkání ohraničený od okolí, který navíc vykonává určitou specifickou funkci, představuje orgán. Celluly, jak se buňky latinsky nazývají, se dělí do dvou základních skupin, a to na prokaryotické a eukaryotické. [HOU14a, KON00]

3.1 Prokaryotické buňky

S prokaryotickými buňkami se můžeme setkat nejčastěji u bakterií. Oproti eukaryotickým buňkám obsahují méně DNA, jsou menší, v průměru se jejich velikost pohybuje pouze kolem 1 - 5 μm a jejich genetický materiál není oddělen jaderným obalem od ostatních organel. Nemohou tvořit tkáně, neobsahují histony, nalezneme je pouze u jednobuněčných organismů a nejsou u nich vyvinuty organely ohraničené membránou. [KON00]

3.2 Eukaryotické buňky

Eukaryotické buňky jsou v průměru 10x větší a vyskytují se u všech organismů, jejichž těla jsou tvořena buňkami s diferencovaným jádrem, které je rovněž jasně odděleno jaderným obalem. Tyto buňky mají také navíc vyvinuty organely obklopené membránou. S eukaryotickými buňkami se můžeme setkat jak u jednobuněčných organismů (např. prvoci), tak i u mnohobuněčných, jako jsou houby, rostliny a živočichové. Během svého vývoje, který se nazývá buněčná diference, se postupně mění z primitivních buněk zastávajících několik omezených funkcí na buňky specializované. Ty jsou poté schopny díky vzájemné souhře vykonávat jako celek velmi specifické funkce s vysokou efektivitou. Během buněčné diference buňky postupně mění tvar, čemuž však ještě předchází změny chemické. Každý typ buňky provádí syntézu určitých proteinů, ať už se jedná například o syntézu aktinu či myosinu ve svazech nebo trávicích enzymů v pankreatu. [JUN97]

3.3 Buňky lidského těla

V lidském těle se můžeme setkat zhruba s 200 různými typy specializovaných buněk lišícími se již na první pohled tvarem, který závisí na vztahu buňky ke svému vnějšímu okolí. Mezi základní tvary buněk patří polyedrický (mnohostěnný), který mají především buňky tvořící buněčné vrstvy, dále pyramidový, cylindrický, kubický či plochý. Tabulka 1 zobrazuje přehled nejdůležitějších specializovaných buněk včetně jejich funkcí. Kromě tvaru se buňky liší také svojí velikostí. V lidském těle se můžeme setkat s poměrně širokou škálou průměrů buněk sahajících od 4 μm až k 150 μm . Nejmenšími z nich jsou drobné neurony, které se vyskytují v kůře mozečku. Naopak největším zástupcem je oocyt, přičemž průměrná velikost somatických buněk u člověka je 10 – 20 μm . Značně rozdílná je také délka života jednotlivých buněk. Například kardiomyocyty či neurony by měly fungovat po celou dobu našeho života, ale krevní buňky přežijí naopak jen několik dní. [JUN97, KON00]

Tabulka 1: Funkce některých specializovaných buněk v lidském těle

Funkce	Specializovaná buňka
Pohyb	Svalová buňka
Vedení vzruchu	Nervová buňka
Syntéza a sekrece enzymů	Acinární buňky pankreatu
Syntéza a sekrece steroidů	Buňky mucinózní žlázy
Syntéza a sekrece hlenových substancí	Některé z buněk nadledviny, varlete a ovária
Transport iontů	Buňky vývodů ledviny a slinných žláz
Intracelulární trávení	Makrofágy a některé leukocyty
Přeměna fyzikálních a chemických podnětů na nervové vzruchy	Senzorické buňky
Absorpce metabolitů	Buňky střev, ledvin, ...

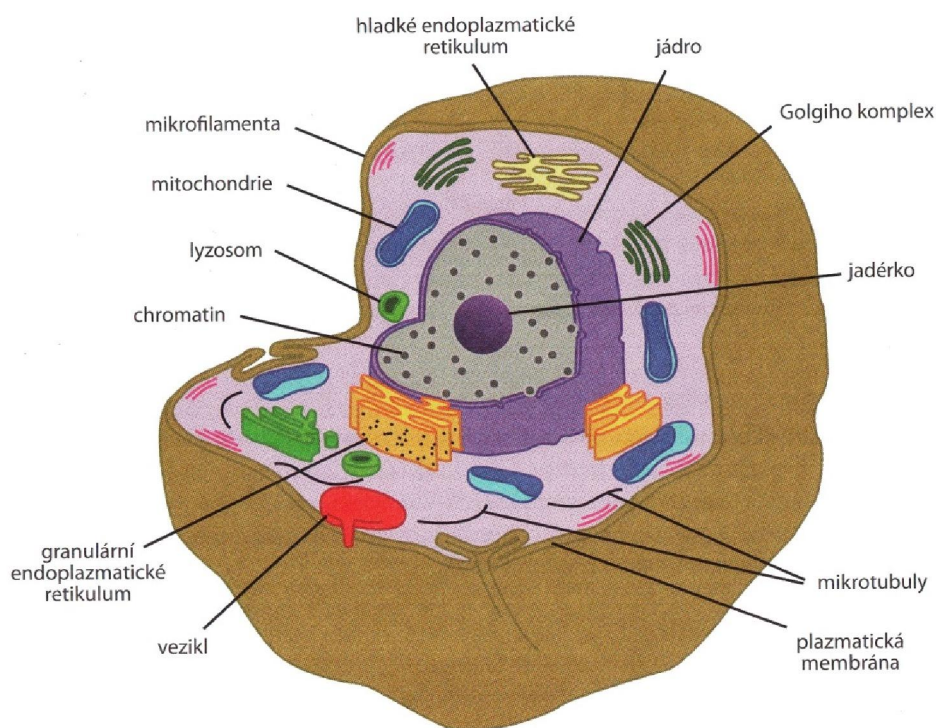
Zdroj: [JUN97], s. 25

3.3.1 Stavba buňky

Vnitřek eukaryotické buňky je vyplněn živou hmotou, která se nazývá protoplazma. Dělí se na cytoplazmu a karyoplazmu. Cytoplazma vyplňuje vnitřek buňky s výjimkou buněčného jádra a je ohraničena cytoplazmatickou membránou, zatímco karyoplazmu najdeme pouze v buněčném jádře, kde plní obdobnou funkci. Cytoplazmu tvoří matrix, což

je vlastní buněčné prostředí, které obsahuje orgány, elementy cytoskeletu a inkluzi. Buněčné orgány si můžeme představit jako „orgány“, z nichž každý hraje specifickou roli ve vlastním fungování buňky. Stavbu eukaryotické buňky názorně ukazuje obrázek 1. [KON00]

Obrázek 1: Schéma stavby buňky a jejích organel



Zdroj: [LAN09], s. 15

3.3.2 Buněčné orgány

Centrálním orgánem eukaryotických buněk je buněčné jádro neboli nucleus. Je zcela nezbytné pro život buňky, neboť bez něj může přežít pouze omezenou dobu. Slouží k uchování genetické informace, syntéze RNA a také řídí buněčnou diferenciaci. Jádro je ohraničeno jaderným obalem složeným ze dvou vrstev, přičemž jeho vnější vrstva se na několika místech prolíná s granulárním endoplazmatickým retikulem. Vnitřní vrstva obalu obsahuje tisíce tenkých jaderných pórů, které navíc překrývá velmi tenká membrána. V jádře se nachází jadérko (nucleolus), které se může vyskytovat volně v karyoplasmě, nebo přiléhá k vnitřní jaderné membráně. Není nijak ohraničeno od svého okolí. V samotném jádře nalezneme většinou jedno jadérko, v lidském organismu jich může být až 10. Jedná se o část chromatinu, který provádí syntézu ribosomálního RNA. Dále v jádře

najdeme i ribosomy, které jsou nejmenšími organelami v buňce vůbec. Vyskytovat se mohou jednotlivě, nebo tvoří shluky zvané polyribosomy. Vznikají v jádře z RNA a následně se přesunují póry v jaderné membráně do cytoplazmy, kde se podílejí na syntéze proteinů. Poslední komponentou buněčného jádra je chromatin, který je formován především DNA-proteinem. Pokud probíhá mitotické dělení, utvoří chromatiny specifické jaderné struktury zvané chromosomy, které jsou nositeli genetické informace. Kromě toho dále regulují metabolismus a diferenciaci buňky a replikují svůj genetický materiál jako přípravu na další mitózu. [LAN09, JUN97]

Další buněčnou organelou je endoplazmatické retikulum (ER), které zajišťuje syntézu lipidů a sacharidů a také přípravu proteinů pro plnění jejich specifických funkcí. Jeho tvar se průběžně mění během procesu diferenciaci, a to podle konkrétního typu buňky a její funkce. Povrch této organely je velmi nepravidelný, proto může jeho plocha 30krát – 40krát přesáhnout povrch samotné buňky. V diferencované eukaryotické buňce nalezneme granulární (drsné) a agranulární (hladké) endoplazmatické retikulum. Drsné má na svém vnějším povrchu připojené ribosomy a polyribosomy. Jeho hlavním úkolem je segregace proteinů pro jejich následný transport k jiným organelám v cytoplazmě či mimo buňku. Granulární ER je obvykle více vyvinuté u buněk, jejichž úkolem je syntetizovat proteiny pro export mimo buňku, což jsou například buňky pankreatu tvořící trávicí enzymy nebo fibroblasty, které produkují kolagen. Hladké ER je charakteristické tím, že na svém povrchu nemá vázány žádné ribosomy. Jeho hlavní funkcí je syntéza lipidů a steroidů, dále zajišťuje intracelulární transport látek a také neutralizuje a detoxikuje různé endogenní i exogenní toxické látky, jako například alkohol či léky. Děje se tak za pomoci kyseliny glukuronové, která rovněž hraje klíčovou roli při svalových kontrakcích. Agranulární je stejně tak jako v předchozím případě více rozvinuté u určitých typů buněk, kterými jsou například hepatocyty účastníci se již zmíněné detoxikace a neutralizace některých hormonů a toxických látek. [KON00, LAN09]

Na endoplazmatické retikulum je velmi úzce napojen Golgiho komplex, který z něj po tenkých vezikulách přijímá transportované látky a vytváří z nich vysoce koncentrované granuly. Tyto částice následně obalí membránou a označí místem, na které budou transportovány, a uvolní je. Přijímané látky jsou ukládány pro další zpracování do cisteren, jejichž počet se pohybuje od 3 do 10. Golgiho komplex představuje centrum zajišťující spojení mezi ER a zbytkem buňky. Je plně pod kontrolou buněčného jádra, se kterým komunikuje pomocí transportních vezikul. [JUN97, KON00]

Intracelulární trávení a obměnu buněčných komponent zajišťují lyzozomy, které jsou produktem Golgiho komplexu. Obsahují kyselé prostředí (pH 5 – 6), které je schopno štěpit prakticky všechny makromolekuly. Lyzozomy dělíme na primární a sekundární, přičemž první zmíněné jsou ty, které ještě nezačaly trávicí proces, a druhou skupinu tvoří lyzozomy, u nichž trávení začíná. Nalezneme je ve všech buňkách, nicméně nejhojněji se vyskytují u fagocytů, tedy např. u makrofágů a leukocytů. [JUN97, LAN09]

Neméně důležité organely jsou perioxozomy, které se tvoří nejčastěji v endoplazmatickém retikulu. Jejich úkolem je chránit buňku před peroxidem vodíku, který by mohl zapříčinit závažné poškození některých částí buňky. Peroxid vodíku je rozložen na vodu a kyslík, kromě něj však tyto organely také oxidují různé mastné kyseliny. [JUN97, LAN09]

Dostatek energie potřebné pro život buňky zajišťují mitochondrie. Tyto organely nalezneme ve všech eukaryotických buňkách, kde se jich může vyskytovat několik set až několik tisíc. Jejich počet závisí především na množství energie, které buňka potřebuje. Mitochondrie přeměňují chemickou energii z metabolitů, které se nacházejí v cytoplazmě uvnitř buňky, na adenzinotriřosfát (ATP), který představuje rychle dostupný a bohatý zdroj energie pro buňku. Tato přeměna začíná v Krebsově cyklu, kde je z organických látek uvolňován vodík, který poté dýchací řetězec oxiduje na vodu. Při této reakci se uvolňuje energie z přenosu elektronů, která je uložena do fosfátových vazeb. V tomto procesu, který se nazývá oxidativní fosforylace, dochází k přeměně adenzindifosfátu (ADP) na ATP, který je následně transportován do míst s potřebou energie. Po spotřebování energie se ATP mění zpět na ADP a vstupuje opět do procesu oxidativní fosforylace. ATP je v organismu nejvíce spotřebováván na transport látek přes buněčné membrány a dále slouží jako zdroj energie pro činnost veškerých svalů či pro syntézu různých makromolekul, které buňka potřebuje. [LAN09]

Struktura, která tvoří oporu buňky, napomáhá při buněčném dělení a účastní se transportu látek, se nazývá cytoskelet. Jedná se o síť mikrotubulů, mikrofilament a středních filament, která dává buňce tvar a také ovlivňuje její vnitřní uspořádání. [LAN09, JUN97]

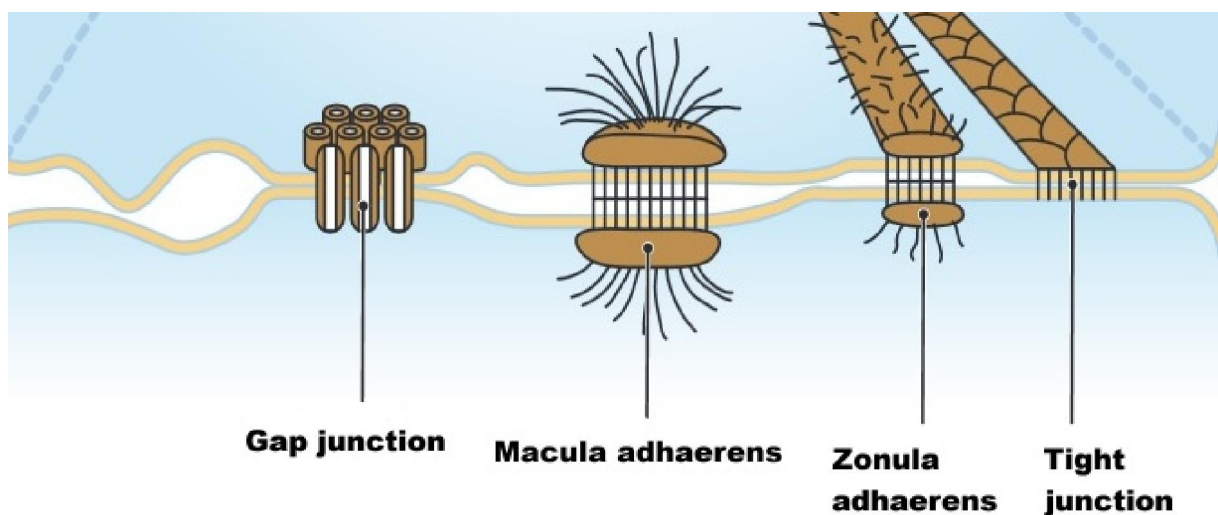
3.3.3 Buněčné membrány

Buňku jako celek ohraničuje plazmatická membrána, která zajišťuje její integritu a také ochranu před vnějšími vlivy. Hraje klíčovou roli v udržování homeostázy, čili stálosti vnitřního prostředí buňky. Skládá se ze dvojvrstvy lipidů, ve které se dále nacházejí

integrální membránové proteiny, které lze rozdělit do dvou kategorií. První skupinu tvoří nepenetrující integrální membránové proteiny, které zcela neprostupují membránou. Druhou skupinu tvoří naopak penetrující integrální membránové proteiny, které zcela pronikají lipidovou dvouvrstvou membrány. Druhá zmíněná kategorie slouží jako transportní kanály mezi buňkou a extracelulárním prostředím či jako adhezní místa, na která se mohou přichytit další buňky. Propojení mezi buňkami, které většinou realizují různé proteiny, lze klasifikovat do tří kategorií. První se nazývá *zonula occludens* a popisuje situaci, kdy dochází k těsnému přiblížení dvou buněčných membrán. V této skupině rozlišujeme dva hlavní typy propojení, a to „gap junctions“, kdy se dvě membrány těsně přiblíží, ale zcela neuzavřou štěrbinu mezi sebou, a „tight junctions“, kdy jsou dvě buňky soudržné. Druhou kategorií tvoří *zonula adhaerens*. V tomto případě o spojení, kdy jsou dvě buňky více vzdáleny. Posledním typem je *macula adhaerens*, kde se jedná o diskoidní útvar mezi buňkami, v němž se spojují proteiny z obou buněk. Všechny tyto typy spojení můžeme najít na jedné buňce. [LAN09]

Kromě „hlavní“ plazmatické membrány, která odděluje intracelulární a extracelulární prostředí, najdeme uvnitř buňky v cytoplasmě mnoho organel, které jsou každá rovněž ohraničeny membránou. Celková plocha membrán všech organel může být až 10x větší než plocha plazmatické membrány obklopující buňku. [LAN09]

Obrázek 2: Typy mezibuněčného spojení



Zdroj: MEDI-LEARN. Zell-Zell Kontakt. In: *Das Portal für Studienbewerber, Medizinstudenten und junge Ärzte* [online]. 2012 [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: www.medi-learn.de/seiten/suche/media/auflage_2013/pdf/Bio1-5-1.pdf

3.4 Buněčné transportní systémy

Transport látek přes membrány může probíhat celou řadou způsobů, záleží zejména na povaze a velikosti přenášené látky. Možnosti transportu mohou být rozděleny do skupin z různých hledisek. Například podle způsobu průchodu membránou rozlišujeme přenos s přestavbou a bez přestavby buněčné membrány, nebo podle náročnosti přenosu rozdělujeme transport se spotřebou energie a bez její spotřeby. [HOU14a]

Při prosté difuzi pronikají látky rozpustné v lipidech volně přes buněčnou membránu. Tímto způsobem mohou být přenášeny také molekuly kyslíku, oxidu uhličitého a vody. Pokud transport jinak neprostupnou membránou zajišťuje speciální přenašeč, jedná se o usnadněnou difúzi. Na podobném principu funguje i osmóza, kdy dochází k průchodu nějakého rozpouštědla (např. vody) buněčnou membránou. Všechny uvedené způsoby přenosu probíhají bez přestavby buněčné membrány, po koncentračním gradientu a patří mezi pasivní transporty, neboť zde nedochází ke spotřebě energie. [HOU14a, LAN09]

Při aktivním transportu se energie spotřebovává. Primární aktivní transport probíhá proti elektrochemickému gradientu, nejčastěji se s ním setkáme u tzv. Na-K pumpy. Jedná se o nejrozšířenější typ aktivního přenašeče, který nalezneme v membránách všech buněk lidského těla. Přečerpává kationty sodíku z intracelulárního do extracelulárního prostředí a kationty draslíku ve směru opačném. Tento typ transportu hraje klíčovou roli při vzniku a šíření elektrických signálů v nervových a svalových buňkách. Pokud při transportu nějaké látky proti elektrochemickému gradientu dochází k pasivnímu přenosu jiné látky v opačném směru, jedná se o sekundární aktivní transport. [HOU14a]

Nemohou-li některé látky pronikat membránou, musí při jejich přenosu dojít k přestavbě buněčné membrány. Při tomto ději je spotřebována energie, jedná se tedy o aktivní transport. Zde rozlišujeme endocytózu a exocytózu. U prvního zmíněného typu přenosu se látka z vnějšího prostředí vchlípí do membrány, která ji následně opepne, v místě semknutí sroste a propustí částici dovnitř buňky. Exocytóza probíhá na stejném principu, ale jedná se o transport v opačném směru, tedy z intracelulárního do extracelulárního prostředí. [HOU14a]

Voda a ionty mohou prostupovat membránou pomocí pórů, které tvoří proteinový kanál naplněný vodou. Prostupnost těmito kanály je řízena různými způsoby. Pokud jsou iontové kanály stále otevřené, pohybují se ionty po koncentračním gradientu a navíc také na základě membránového potenciálu, neboť nesou elektrický náboj. Tyto kanály mají často velmi specifickou permeabilitu, takže propustí pouze určité ionty. Napěťové řízení

iontových kanálů je realizováno pomocí změny struktury molekuly proteinu, který tvoří daný kanál. Je-li na vnitřní straně membrány negativní náboj, je kanál uzavřen. Pokud síla tohoto náboje klesá, začne se kanál otevírat. Další způsob řízení kanálů je chemický, kdy receptor pošle v případě potřeby povel iontovému kanálu. Receptor může být buď součástí daného kanálu, nebo vysílá instrukce pomocí tzv. G-proteinů. Chemické a napěťové řízení iontových kanálů se mohou kombinovat. Poslední možnost řízení těchto kanálů je mechanická, jejich propustnost závisí v tomto případě na napnutí cytoskeletu. [LAN09]

3.5 Tkáně

Tkáně představují soubory buněk podobného typu, které plní společně určitou funkci. Neexistují samostatně, vždy tvoří orgány či jiné funkční celky. V lidském těle najdeme 4 základní typy tkání – epitelovou, pojivou, nervovou a svalovou. [KON00]

V případě epitelové tkáně na sebe buňky velmi těsně naléhají a mezibuněčného prostoru je zde pouze minimum. Vzájemná adheze buněk je velmi silná, proto také tato tkáň pokrývá povrch těla, vystýlá tělní dutiny a tvoří celou řadu orgánů (střeva, žlázy). Setkat se s ní můžeme také u smyslových orgánů. [JUN97]

U tkáně pojivé převažuje mezibuněčná hmota nad samotnými buňkami. V organismu se vyskytuje jako chrupavka, kost nebo vazivo a její hlavní funkce je podpůrná. Udržuje a dokresluje tvar těla a utváří hmotu spojující jednotlivé buňky i orgány. Přestože se uvedené formy této tkáně na první pohled značně odlišují, mají stejný buněčný základ. Jejich odlišnost spočívá pouze v rozdílné mezibuněčné hmotě. [KON00]

Nervová tkáň tvoří v těle komunikační síť pomocí dvou typů buněk, a to buňky neuronové a gliové. Nejdůležitější schopností tohoto typu tkáně je možnost tvorby, přijímání a vedení nervových impulsů a také zpracování informací z vnějšího prostředí, které jsou zachyceny receptory. Jak je patrné již z názvu, nervové buňky tvoří neurony, které jsou základními funkčními a anatomickými jednotkami nervové soustavy. Starají se o šíření vzruchu a nemohou se regenerovat. Gliové buňky tvoří glie, které zajišťují výživu neuronů, homeostázu a plní některé imunitní funkce. [HOU14b, JUN97]

Svalová tkáň je základem všech svalů v těle, takže má na svědomí většinu pohybů, které vykonáme. Tvoří ji protáhlé buněčné struktury, které mají schopnost kontrakce. V lidském těle se můžeme setkat se svaly kosterními, které jsou příčně pruhované, a které můžeme libovolně ovládat. Dalším typem je hladká svalovina, která tvoří především výstelky dutin a vnitřní orgány. Tuto svalovinu nelze ovládat vůlí. Speciálním typem svaloviny je myokard, čili srdeční svalovina, která pracuje nepřetržitě bez únavy po celý

náš život a kterou i přesto, že je příčně pruhovaná, nemůžeme ovládat vůlí. Poslední typ svalové tkáně představuje myoepteliální tkáň, kterou nalezneme především u exokrinních žláz. [KON00]

Buňky tvořící tkáň jsou uspořádány podle přesně stanoveného schématu definujícího vlastnosti tkáně a také funkce orgánu, který je tkání tvořen. Mnoho buněk může provádět buněčné dělení po celý svůj život. Tato schopnost se nazývá proliferace a většinou umožňuje pouze průběžnou obnovu tkáně, nikoli její rozsáhlejší regeneraci. Řízené buněčné dělení může být narušeno mutacemi či působením nepříznivých faktorů. V takovém případě se jeho průběh vymkne kontrole a může vést například k nádorovým bujením. K řízené obnově tkání neodmyslitelně patří také zánik buněk, který by měl být s obnovou v rovnováze. Tento rovnovážný stav může narušit například zvýšená proliferace buněk, která může způsobit hypertrofii postiženého orgánu. Pokud dojde k nekontrolované proliferaci, hrozí vznik nádorového bujení. V důsledku různých degenerativních onemocnění může rovněž docházet ke zvýšenému zániku buněk a k atrofii tkáně. [JUN97, LAN09]

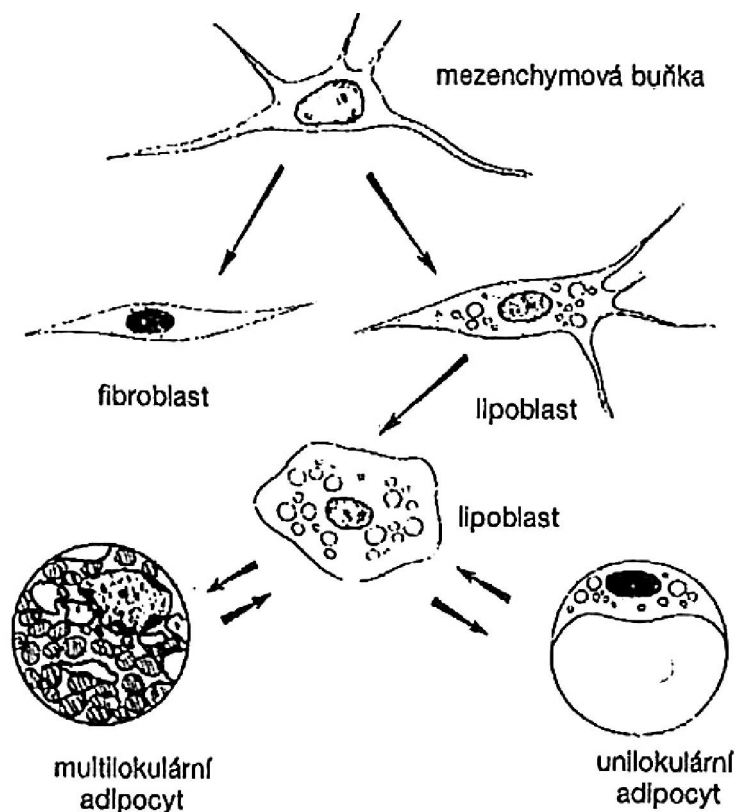
4 TUKOVÁ TKÁŇ

Tuková tkáň je speciálním druhem vazivové tkáně, který je tvořen tukovými buňkami – adipocyty. Představuje zásobárnu energie, slouží jako ochrana některých orgánů a rovněž tepelně izoluje naše tělo. Podle typu přítomných tukových buněk rozlišujeme dva typy této tkáně – bílou (unilokulární) a hnědou (multilokulární) tukovou tkáň. Tato tkáň je také velmi hojně zásobována krví. Buňky tukové tkáně se postupně vyvíjejí z nediferencovaných mezenchymálních buněk na lipoblasty, které shromažďují malé tukové kapénky. Následně dochází k plné diferenciaci na multilokulární či unilokulární tukové buňky, přičemž u buněk bílé tukové tkáně se kapénky tuku z lipoblastu spojí v jedinou. Fáze vývoje tukových buněk zobrazuje obrázek č. 3. Pokud je z důvodu potřeby energie mobilizováno velké množství tuku, mohou buňky přejít zpět do fáze lipoblastu. Ještě nediferencované mezenchymální buňky se mohou také přeměnit i na jiné typy buněk mimo tukových. Plně vyvinuté adipocyty patří mezi největší buňky lidského těla. [JUN97, LAN09]

Člověk se již narodí s tukovými zásobami, které jsou vytvářeny od 30. týdne těhotenství. Za normální je považován podíl tuku, který zaujímá u mužů 10 – 20 % celkové

tělesné hmotnosti, přičemž u žen se jedná o 20 – 30 %. U rizikově obézních jedinců může až 50 % tělesné hmotnosti tvořit tuk. [JUN97, SVA10]

Obrázek 3: Fáze vývoje tukových buněk



Zdroj: [JUN97], s. 120

4.1 Bílá tuková tkáň

Uniloculární tuková tkáň představuje pro organismus hlavní zásobárnu energie. Její buňky mají jen jednu velkou vakuolu a barva této tkáně může být od bílé až po tmavě žlutou, přičemž odstín závisí hlavně na stravovacích návycích daného jedince. U dospělých tvoří tato tkáň podstatnou většinu tukové hmoty, nenajdeme ji pouze u penisu, očních víček, skrota a ušního boltce. Množství bílé tukové tkáně v jednotlivých partiích těla se vyvíjí postupně s věkem. U novorozenců tvoří tato tkáň souvislou vrstvu, přičemž s postupem času v určitých místech ubývá a jinde se naopak hromadí. [JUN97, KON00]

U bílých adipocytů se můžeme setkat s kulovitým či polyedrickým tvarem, přičemž druhou jmenovanou podobu mají nahromaděné buňky, které společně tvoří tkáň. Jejich velikost se pohybuje zpravidla mezi 50 – 150 μm . Uvnitř těchto buněk najdeme jádro uložené v blízkosti buněčné membrány, v jehož okolí se dále nachází mitochondrie,

Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum a volné ribozomy. Zbylou část vyplňuje tuková kapénka, která není ohraničena membránou. Lipidy se do adipocytů dostávají z potravy, jedná se především o estery mastných kyselin a glycerolu, které jsou po syntéze v játrech přeneseny do tukové tkáně. Příjem a vstřebávání mastných kyselin buňkou probíhá za pomoci endoplazmatického retikula a mitochondrií. [JUN97]

V případě potřeby energie začne docházet ke štěpení tuků uskladněných v adipocytech na glycerol a mastné kyseliny, tyto látky jsou následně uvolňovány do krve. Jedná se především o případy dlouhodobé hladovění nebo působení krutého chladu. Tuto funkci zajišťuje enzym hormon-senzitivní lipáza (HSL), která spustí štěpení po stimulaci norepinefrinem, který je znám také pod názvem noradrenalin. Tento hormon je uvolňován ze zakončení postgangliových sympatických nervů, které se nacházejí v tukové tkáni. Nedochozí však k přímé inervaci samotných adipocytů, neboť nervová zakončení se nacházejí jen ve stěnách krevních cév. Štěpeny jsou především molekuly, nacházející se na povrchu tukových kapének uvnitř adipocytů. Rozpuštěný glycerol je dopravován do jater, zatímco méně rozpustné složky putují do jiných tkání. V některých částech těla jsou tuky štěpeny přednostně, jedná se o podkožní depozita či mezenterální nebo retroperitoneální oblasti. Jako poslední přicházejí na řadu tukové polštářky na končetinách, které začne organismus postupně spotřebovávat až při dlouhodobém hladovění. [JUN97, KON00]

Nadměrné hromadění tuku může vyvolat obezitu. Pokud dochází k nadměrnému hromadění tuku v adipocytech, dochází k jejich razantnímu zvětšování a jedná se o hypertrofickou obezitu. V případě nadměrného hromadění velkého počtu unilokulárních tukových buněk pak hovoříme o hyperplastické obezitě. [JUN97]

Buňky bílé tukové tkáně produkují mnoho hormonů, které se v organismu podílejí na regulaci celé řady funkcí a procesů. Jedním z těchto hormonů je leptin, který vyvolává pocit sytosti a reguluje tedy příjem potravy. Pokud je ho v těle nedostatek, můžeme se setkat s obezitou či hyperfágií. Někteří obézní lidé mívají trvale zvýšenou hladinu leptinu, díky čemuž se u nich může rozvíjet syndrom leptinové rezistence. Dalším neméně důležitým hormonem je adiponektin, který je odpovědný za potlačování usazování cholesterolu v cévách, působí protizánětlivě a funguje jako ochrana proti obezitě a jejímu negativnímu vlivu na organismus. V bílé tukové tkáni je produkován také faktor nádorové nekrózy alfa (TNF- α), který patří mezi cytokiny, což je řada signálních látek imunitního systému. Buňky začnou TNF- α produkovat v případě, že se do jejich okolí dostane nějaký patogen. TNF- α dokáže mimo jiné usmrtit některé buňky nádorového bujení či zvýšit tělesnou teplotu, pokud však dojde k rozšíření infekce do celého krevního oběhu, zvýší se

prudce produkce tohoto faktoru, což může vést k septickému šoku. Kromě výše uvedených je tukovými buňkami dále produkován rezistin, který podobně jako TNF- α patří mezi cytokiny, či estriadol. [JUN97, LAN09, LÜL12]

4.2 Hnědá tuková tkáň

Hnědá tuková tkáň se nachází u novorozenců, u nichž zaujímá přibližně 2 – 5 % tělesné hmotnosti. Po prvním roce života dochází k jejímu značnému úbytku, nicméně i u dospělých jedinců můžeme nalézt její zbytky, a to především v krční či supraklavikulární oblasti. U novorozenců ji nalezneme v oblasti páteře, ramen a při horní části míchy. Její hlavní funkcí je netřesová termogeneze, kdy buňky této tkáně přeměňují tukové zásoby na teplo. [JUN97, MÜL09, LÜL12]

Na rozdíl od buněk bílé tukové tkáně mají multilokulární buňky více tukových vakuol, nicméně jsou menší. Jejich charakteristická hnědá barva je způsobena bohatým krevním zásobením. Jádro je zde uloženo centrálně a je obklopeno velkým množstvím tukových kapének různých velikostí. Hnědé tukové buňky jsou přímo inervovány sympatikem, což zahájí proces štěpení tukových depozit pomocí HSL. Mitochondrie ale obsahují protein termogenin, díky kterému nedochází k uvolňování energie ve formě ATP, nýbrž ve formě tepla. Ohřátá tkáň přenáší tepelnou energii na proudící krev, která dále cirkuluje a ohřívá organismus. [JUN97]

4.3 Tuková tkáň jako depozit polutantů

Tuková tkáň byla po velmi dlouhou dobu považována především za zásobárnu energie, která hraje pouze marginální úlohu v metabolismu a regulačních procesech organismu. Přelom nastal na počátku devadesátých let minulého století, kdy byly objeveny první hormony vylučované tukovou tkání. Na jejich produkci se nepodílejí pouze samotné adipocyty, nýbrž také imunokompetentní buňky, preadipocyty či jiné buňky přítomné v tukové tkáni. V dnešní době již není pochyb o tom, že tuková tkáň hraje významnou roli v řízení příjmu potravy, při zánětu, v metabolických regulacích a v celé řadě dalších dějů. [HAL08]

Jak již bylo popsáno výše, zaujímá bílá tuková tkáň u neobézního dospělého jedince v průměru 15 – 25 % celkové tělesné hmotnosti. Toto číslo do značné míry závisí na pohlaví, ženy disponují o něco většími tukovými depozity než muži. 70 % celé hmoty této tkáně tvoří lipidy obsažené především v adipocytech. Vzhledem k takovému množství

buněk, podílejících se na významných metabolických procesech, se vědci začali zabývat také ukládáním lipofilních, tzn. v tučných rozpustných, toxických látek, které mohou negativně ovlivňovat endokrinní funkce tukové tkáně. Jedná se především o tzv. perzistentní organické polutanty (POPs), jejichž zvýšená hladina v tukové tkáni může souviset s celou řadou chorob či metabolických poruch. Největší podíl POPs přijímáme z potravy, tyto látky se mohou vyskytovat hlavně u mléčných výrobků, tučných ryb či v mase. Množství uložených polutantů závisí na stravovacích návycích jedince a jeho dispozicích pro ukládání těchto látek, které jsou určeny především velikostí tukového polštáře a změnami v jeho tloušťce. Redukce hmotnosti sice vede k úbytku tuku, ale také ke zvýšení koncentrace POPs, které se společně s ním neodbourají. [MÜL07, HAL08]

4.3.1 Funkce tukové tkáně

Tuková tkáň byla z fyziologického hlediska po dlouhou dobu považována za tepelný izolátor, mechanickou ochranu orgánů proti poranění a především za zásobárnu energie pro organismus. Jak již bylo popsáno výše, došlo počátkem devadesátých let minulého století k významnému zjištění, že tuková tkáň produkuje mnoho hormonů a cytokinů, čímž hraje významnou roli v regulaci příjmu potravy, řízení energetického výdeje či jiných metabolických dějů v organismu. [MÜL07, HAL08]

Z energetického hlediska funguje tuková tkáň jako zdroj mastných kyselin, které jsou uvolňovány především v době hladovění či postabsorbčních period. V případě potřeby dojde k nervové inervaci sympatikem a štěpení tukových zásob pomocí HSL, což zabraňuje vzniku metabolických poruch. Na druhou stranu však nadměrné hromadění tuku způsobuje obezitu, se kterou je spojena celá řada nebezpečných nemocí, jako například diabetes. [MÜL07, KON00]

Po objevení svých metabolických a regulačních funkcí se považuje tuková tkáň za největší endokrinní orgán v lidském těle. Její metabolismus je řízen sympatickou inervací a mnoha hormony, jako jsou například inzulin, katecholaminy, hormony štítné žlázy či steroidy. Produkuje celou řadu cytokinů, které hrají nepostradatelnou roli v sekreci hormonů jiných žláz a také v regulaci metabolismu jiných tkání. Látky produkované tukovou tkání ovlivňují tělesnou hmotnost, krevní tlak, senzitivitu a rezistenci na inzulin, zánětlivost, aterogenezi a mnoho dalších aspektů. Bílá tuková tkáň také reguluje proliferaci mateřských mezenchymálních buněk a jejich postupnou diferenciaci na dospělé adipocyty. Děje se tak pomocí transkripčních nukleárních faktorů s nitrojadernými receptory, které ovlivňují transkripci a expresi genů, nebo dokonce přímo metabolismus a vylučovací

funkce adipocytů. Jako zástupce těchto faktorů lze zmínit například receptory aktivované proliferátory perixosomů (PPAR). [MÜL07]

Poslední, nedávno objevenou funkcí tukové tkáně, je ukládání a kumulace léků či toxických lipofilních látek. Jedná se především o již zmíněné POPs, čili polutanty odolné vůči biologickému a organickému odbourávání. Tyto sloučeniny a jejich různé izomery vykazují celou řadu nepříznivých účinků na organismus. Mohou způsobit endokrinní disrupci, kdy dojde k narušení hormonálního řízení metabolismu, narušit homeostázu či správnou diferenciaci buněk a v neposlední řadě také zapříčinit rozvoj nemocí spojených s obezitou. Paradoxem navíc zůstává, že při úbytku tělesné váhy dojde ke zvýšení koncentrace POPs v tukové tkáni, což může vést k opakovanému kolísání hmotnosti, známé jako jo-jo efekt. Tento jev je zapříčiněn schopností POPs ovlivňovat diferenciaci a množení adipocytů. [HAL08, MÜL07]

4.3.2 Klasifikace POPs a jejich účinky

Perzistentní organické polutanty, které se mohou ukládat do tukové tkáně, lze rozdělit do pěti hlavních skupin:

1. Organochlorové pesticidy (OCP)
2. Polychlorované bifenyly (PCBs)
3. Dioxiny
4. Polybromovaný zpomalovač hoření (PBFRs)
5. Ostatní neklasifikovatelné polutanty (např. ftalátové estery)

První tři kategorie lze shrnout do velké skupiny organochlorových sloučenin, které byly po dlouhou dobu vypouštěny do životního prostředí jako biocidy. Přestože byly ve většině zemí koncem sedmdesátých let zakázány, jejich rezidua jsou stále hojně přítomna v životním prostředí. Patří sem například dichlordifenyiltrichloretan (DDT) či dichlordifenyldichlorethylen (DDE), které se dříve používaly především v zemědělství jako insekticidy. Tyto látky mohou poškodit normální embryonální rozvoj či narušit reprodukční funkce. [ČER12, MÜL07]

PCBs, byly používány v technice do sedmdesátých let, vykazují neurotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky. Mohou se také chovat jako antagonisté aryl uhlovodíkového receptoru (Ahr), což znamená, že se na receptor naváže polutant a zabrání jeho funkční odpovědi. Ahr hraje důležitou roli v diferenciaci buněk, imunitní odpovědi organismu a dalších fyziologických dějích. [MÜL07]

Dioxiny jsou hojně rozšířené, vysoce toxické látky, které se do životního prostředí dostávají jako produkt nedokonalého hoření. Patří mezi nejnebezpečnější polutanty, neboť jsou spojovány se vznikem cukrovky, negativními účinky na imunitní systém, rakovinou a rozvojem kardiovaskulárních nemocí. Mohou také ovlivnit genovou expresi, především v játrech. Otrava dioxiny se projevuje tzv. syndromem chřadnutí, který je charakteristický drastickým úbytkem na váze a lézemi na kůži, jako je například chlorakné či hyperpigmentace. [KUŽ12, MÜL07]

Další skupinou nebezpečných polutantů jsou PBFRs, které byly dříve přidávány do mnoha výrobků s cílem snížit riziko úrazu ohněm a škody při požárech. Během posledních 20 let byla zaznamenána zvyšující se kontaminace lidí touto chemikálií. [MÜL07]

Do skupiny ostatních neklasifikovatelných polutantů lze zařadit ftalátové estery, které jsou hojně využívány jako změkčovadla při výrobě produktů z polyvinylchloridu (PVC). Patří sem například bisfenol A diglycidyl ether (BADGE) používaný zejména při výrobě polykarbonátů a průmyslových plastů. Dalším zástupce této kategorie je bis(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP), který představuje nejčastěji používaný ftalátový ester v komerční praxi. Slouží jako změkčovadlo a jelikož není v plastu navázán kovalentně, snadno uniká do okolí. Vystavení DEHP, BADGE ale i ostatním ftalátovým esterům, může vést k poškození reprodukčních orgánů, ke zvýšené akumulaci lipidů v adipocytech a u žen navíc k rakovině prsu. DEHP mohou také podporovat rakovinné bujení v játrech a pomocí aktivace specifických genů v tukové tkáni také přispívají k obezitě. [HAL08, MÜL07, EFS15]

4.3.3 Výzkum vlivu polutantů

V Ústavu hygieny a preventivní medicíny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni jsou prováděny pokusy s cílem odhalit vliv POPs na diferenciaci adipocytů. Výzkum spočívá v pěstování adipocytů z kmenových mezenchymálních buněk v několika populacích, přičemž některé z nich jsou vystaveny polutantům v různých koncentracích. Cílem je odhalit mechanismy, kterými POPs ovlivňují vývoj těchto tukových buněk.

Použité mezenchymální kmenové buňky jsou tzv. Human adipose derived mesenchymal stem cells (HADMSC) od firmy Invitrogen (Carlsbad, USA). Z nich jsou pomocí diferenciačního roztoku pěstovány plně vyvinuté adipocyty. V rámci pokusu je pěstováno celkem 5 buněčných populací. První z nich jsou buňky v čistém diferenciačním roztoku, v dalších třech miskách je diferenciace ovlivněna přítomným polutantem v různých koncentracích. Nejvyšší testovaná koncentrace je 10 μ mol polutantu v jednom

litru roztoku, dále je obsah polutantu vždy 10x nižší, tedy 1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Přidané POPs je potřeba přimíchat již v tekuté podobě, pro tento účel se používá jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO). Kromě něj lze pro rozpuštění lipofilních polutantů použít také Nutriflex Lipid, který má uplatnění například k tvorbě roztoků pro parenterální výživu. Vzhledem k tomu, že by tato látka mohla také potenciálně ovlivnit diferenciaci adipocytů, je poslední z pěstovaných populací vystavena působení právě samotného DMSO. Zkoumanými polutanty jsou především DDE, DDT či zástupci ze skupiny PCBs, například PCB153.

Celý pokus trvá 28 dní a probíhající diferenciaci je u všech vzorků průběžně monitorována. Rozdíly mezi populacemi by měly být nejpatrnější mezi 21. a 28. dnem, kdy jsou adipocyty již vyvinuté a naplněné tukovými kapénkami. Také jejich počet se již v této době zpravidla nemění.

5 SOUČASNÝ STAV

V současnosti je používáno několik přístupů pro kvantifikaci buněčných kultur, které se odlišují rychlostí, finanční náročností, ale také přesností poskytovaných výsledků. Mezi méně nákladné metody patří ty, u nichž neprobíhá počítání automaticky a je zde nutná přímá interakce člověka. Jedná se například o počítání na komůrce či počítání buněk tvořících kolonie. Naopak finančně velmi náročná je proudová cytometrie, která kromě počtu buněk dokáže provádět také analýzu jejich tvaru, struktury apod. Velmi rozšířenou automatickou metodou pro kvantifikaci buněčných kultur je počítání na základě elektrické rezistence, kdy buňky procházejí úzkou štěrbinou mezi dvěma elektrodami, přičemž každý průchod buňky je charakterizován nárůstem elektrického odporu. V poslední době se však obrací pozornost také k metodám zpracování obrazu a počítačového vidění. Tento přístup vyniká nízkými náklady, nicméně neexistuje univerzální metoda, která by byla schopna kvantifikovat buňky všech druhů. Použité algoritmy vždy závisí na konkrétní situaci a požadovaných výsledcích. Počítání buněk na základě zpracování obrazové informace je z uživatelského hlediska snazší než například proudová cytometrie, neboť nevyžaduje odborně kvalifikovanou obsluhu.

5.1 Počítací komůrka

Počítací komůrku, nazývanou též hemocytometr, vynalezl v 19. století Louis-Charles Malassez za účelem počítání krevních buněk. Později však bylo zjištěno, že lze tuto metodu používat i pro jiné úlohy, například pro počítání kvasinek, spermií, mikroskopických neživých částic či ostatních buněk lidského těla. [HEM13]

Jedná se o speciální destičku určenou pro mikroskopii, která je rozdělena na dvě komůrky. Každá z nich zaujímá plochu 1 mm^2 a je také rozdělena mřížkou do několika různých polí. Přes tyto komůrky je umístěno krycí sklíčko, které zde utváří $0,1 \text{ mm}$ úzkou štěrbinu, do které je nanesen vzorek. Před nanesením samotných buněk je potřeba roztok silně naředit, neboť velké množství buněk by znemožnilo počítání. Princip je poměrně jednoduchý, neboť spočteme buňky pouze v určité oblasti komůrky, a jelikož známe objem naneseného roztoku a poměr jeho naředění, dokážeme dopočítat koncentraci buněk v potřebném vzorku. Výhodou tohoto přístupu je bezesporu nízká finanční náročnost, která je však vykoupena jistou nepřesností. Té se dopustíme logicky tím, že spočteme buňky pouze v části roztoku a odtud dopočítáme koncentraci pro celý roztok. Další nevýhodou je potřeba značně rozředěného roztoku. [HEM12, HEM13]

Pro různé účely existuje několik typů mřížek, které se liší velikostí jednotlivých dílčích políček. Nejčastěji používanými typy komůrek jsou Bürkerova a Neubauerova, jejich ceny začínají zhruba na 1500,- Kč (únor 2015). Počítací komůrka je zobrazena v příloze 1.

5.2 Počítání jednotek tvořící kolonie

Tato metoda se používá převážně pro zjištění počtu životaschopných buněk. Vychází z předpokladu, že buňky začnou po čase tvořit kolonie, které jsou následně spočteny, díky čemuž můžeme spolu se znalostí objemu použitého roztoku odhadnout počet buněk.

Nejprve je potřeba buněčný roztok silně naředit, aby rostoucí kolonie byly jednoznačně odlišitelné. Poté se buňky v růstovém prostředí nanesou na Petriho misku, přičemž se předpokládá, že každá živá buňka založí kolonii či jednotku tvořící kolonie. Počítání kolonií může být realizováno manuálně, nebo automaticky za použití speciálního softwaru, jako je například CellProfiler či OpenCFU. Tyto programy využívají metod počítačového vidění a jsou k dispozici zdarma ke stažení. Na základě počtu kolonií lze zjistit koncentraci buněk v celém roztoku, obdobně jako při počítání buněk v komůrce. Tato metoda je časově velmi náročná, neboť se musí vyčkat, dokud buňky nezačnou vytvářet kolonie, což se zpravidla děje nejméně po 12 hodinách. Navzdory této nevýhodě však poskytuje poměrně přesné výsledky pro počty živých buněk, neboť jen ty dokáží růst a množit se. Nevýhodou této metody je, stejně jako u počítání v komůrce, potřeba značného naředění roztoku. Ukázkou jednotek tvořících kolonie zobrazuje příloha 2. [SUT11, SUT06a]

5.3 Spektrofotometrie

Jak již sám název napovídá, jsou buňky touto metodou počítány za použití spektrofotometru. Protože buňky jsou částečně průhledné, absorbují a rozptylují část dopadajícího světla, zatímco zbytek jimi prochází. Pokud měříme intenzitu světla v přímém směru, jedná se o turbidimetrii. Čím vyšší je koncentrace buněk, tím vyšší je také turbidita, čili kalnost roztoku. Měříme-li vychýlené světlo, pak hovoříme o nefelometrii. [ŠTE09]

Spektrofotometr je nutné pro každý experiment kalibrovat, aby výsledky byly co nejpřesnější. Nejlepší hodnoty lze získat za použití úzké rovné štěrbinu, v níž jsou buňky

umístěny na kyvetě. V takovém případě dopadá na detektor pouze světlo, které prošlo zkoumaným vzorkem. V důsledku toho nedojde k ovlivnění výsledku odraženým světlem z okolí. Sledovaná vlnová délka dopadajícího světla se liší pro různé typy buněk, je důležité nastavit vždy standardizované hodnoty pro konkrétní vzorek. Pro bezbarvý roztok platí, že nejvyšší fotometrické citlivosti je dosaženo modrým světlem o vlnové délce 435 – 480 nm. [ŠTE09]

Tato metoda je velice rychlá, neboť ihned po vložení vzorku získáme hodnotu turbidity. Protože se však jedná pouze o odhad počtu buněk na základě měření jiné veličiny, je dobré provést měření na dvou na sobě nezávislých vzorcích stejného typu, čímž se sníží riziko chybného odhadu. Některé přístroje dokonce umožňují měřit i více vzorků najednou. Tento přístup je vhodný pro experimenty, kdy máme k dispozici jen malé množství buněčného roztoku, neboť u mnoha spektrofotometrů postačuje pro měření objem 1 mikrolitru. Ceny těchto přístrojů se velmi liší v závislosti na provedení a dostupných funkcích, začínají v řádech několika desítek tisíc Kč (únor 2015). Schéma porovnávací princip měření přímého a bočního rozptylu světla je zobrazen v příloze 3. [SUT06b, ŠTE09]

5.4 Coulterův čítač

V roce 1953 si nechal Wallace Coulter patentovat tzv. Coulterův impedanční princip, který představoval metodu pro určování velikosti a počtu částic obsažených ve zkoumaném roztoku. Analýza vzorku funguje na principu elektrické impedance, kdy je roztok se zkoumanými částicemi pouštěn do úzké kapiláry, na níž je elektrodami měřeno napětí. Částice suspendované v určitém roztoku fungují jako izolátor a tím zvyšují elektrický odpor. Projde-li taková částice měřeným úsekem, dojde ke změně napětí, přičemž je každá taková událost zaznamenávána. Tento objev znamenal převrat v lékařském výzkumu a diagnostice a Coulterův čítač se stal jedním z nejpoužívanějších nástrojů pro kvantifikaci částic v roztoku vůbec, a to jak v oblasti medicíny, tak i průmyslu. [KRU06]

Jak již bylo uvedeno, základem Coulterova čítače je úzká kapilára, na níž jsou připojeny dvě elektrody vytvářející tzv. měřící zónu. Do trubice je přiváděn elektrolyt, obsahující v nízké koncentraci buňky či jiné částice, jež chceme analyzovat. Proudí-li měřící zónou samotný elektrolyt, je naměřená impedance konstantní. Pokud však mezi tyto elektrody vpluje částice, bude se v měřící zóně po tuto dobu nacházet množství elektrolytu snížené o objem této částice. Tento jev se projeví pulsní změnou napětí, přičemž velikost

výkyvu přímo závisí na velikosti procházející částice. Získaný spojitý signál je následně digitalizován a softwarově vyhodnocován s cílem kvantifikovat procházející částice a analyzovat jejich objem. Obrovskou předností tohoto přístupu je jeho přesnost a rychlost, moderní Coulterovy čítače dokáží spočítat i několik tisíc částic za sekundu. [KRU06, COU12]

V současnosti se vývoji a distribuci těchto přístrojů věnuje firma Beckman Coulter, která nabízí komplexní řadu produktů pro použití v mnoha oborech. Z řady analyzátorů částic lze zmínit nejnovější Z2 Coulter, který je určen primárně pro použití v oblasti mikrobiologie. Je vhodný například pro analýzu buněk, řas, spermií či kvasinek a je schopen zaznamenat částice o velikosti 1 – 120 μm . Dokáže pracovat samostatně bez napojení na počítač, nicméně pomocí speciálního softwaru pro PC je možno automaticky statisticky vyhodnocovat výsledky experimentů. Dalším přístrojem je například Multisizer Coulter, který představuje nejflexibilnější řešení pro analýzu částic, které mohou mít velikost v rozsahu 0,4 – 1200 μm . Uvedený čítač Z2 Coulter vyjde v přepočtu na 450 tisíc Kč, ceny Multisizeru 4 Coulter pak začínají přibližně na 1,1 mil. Kč (únor 2015). Vyšší pořizovací cena přístroje tedy představuje největší slabinu této metody. Z2 Coulter je vyobrazen v příloze 4. [KRU06]

5.5 Průtoková cytometrie

Nejvíce sofistikovanou metodou pro analýzu buněčných kultur je bezesporu průtoková cytometrie. Buňky jsou v úzkém proudu posílány do laserového paprsku, který každou z nich osvítí, přičemž je následně odražené světlo zachycováno detektorem. Tento přístup není zdaleka předurčen pro „pouhé“ počítání buněk, dokáže je také třídít podle zvolených kritérií, kterými může být tvar, struktura či přítomnost různých proteinů. Klasifikace buněk podle jejich fluorescenčních vlastností a specifického rozptylu světla se nazývá Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS). [ŠIN08]

Průtokový cytometr sestává ze tří hlavních částí, a to z fluidního, optického a elektronického okruhu. Jak již název napovídá, přichází fluidní část do kontaktu se zkoumaným buněčným roztokem, který musí být ve formě suspenze, neboť je nutné, aby buňky procházely laserem jedna za druhou, a to konstantní rychlostí. Roztok by měl obsahovat ideálně $10^5 - 10^6$ částic v jednom mililitru. Suspenze je umístěna ve zkumavce, z jejíž dolní části vede tenká kapilára do nádobky, z níž odtéká kapalina laminárním prouděním a strhává s sebou částice ze zkumavky. Rychlost uvolňování částic ze zkumavky lze ovlivnit tlakem, který vyvíjí vzorek na kapiláru. Platí, že čím vyšší tento tlak

je, tím více částic se může najednou uvolnit. Postupného odplavování vzorků ze zkumavky bývá dosaženo při tlaku 1,3 kPa, což je hodnota vhodná i pro analýzu DNA. Také je potřeba zajistit, aby proudění v nádobce bylo laminární, nikoli turbulentní. [MAC07, ECK99]

Vzorek je přiváděn do optické soustavy, kde ho následně ozáří laser. U průtokových cytometrů se nejčastěji používají dva až tři lasery, přičemž každý z nich reprezentuje jinou část barevného spektra. Optickou soustavu tvoří kombinace čoček, filtrů a zrcadel. Pro odfiltrování určitých vlnových délek světla se používají filtry typu dolní, horní a pásmová propust, dále se zde můžeme setkat s tzv. diachronickým filtrem, který je umístěn ve sklonu 45°, čímž je část dopadajícího světla odražena. Z odfiltrovaného světla je následně pomocí detektorů snímána fluorescence, boční a přímý rozptyl. U bočního rozptylu a fluorescence se jedná o poměrně slabé signály, které je tak třeba před zpracováním zesílit fotonásobičem. [ECK99, MAC07]

Signál z optické soustavy je následně digitalizován a zpracován interním softwarem přístroje. Tento program například ošetřuje chybné či neočekávané hodnoty, detekci více částic najednou a také vytváří statistický přehled kvantitativních a kvalitativních znaků zkoumaného vzorku. [ECK99]

Průtokové cytometry mohou být doplněny tzv. sorterem, který dokáže částice třídit do dvou a více nádob podle určitého kritéria. Elektrostatický kapénkový sorter je používán pro extrakci buněk pomocí elektrostatické síly. Proud roztoku je vpraven mezi dvě nabitě desky, přičemž elektrizované kapičky s buňkami jsou přitáhnuty k těmto deskám a zbytek roztoku putuje do sběrné nádoby. Dalším typem je fluidní switch sorter. Pokud je detekována procházející částice, odkloní piezoelektrický ventil proud obsahující tento vzorek do určené nádoby. Další možností pro takovéto třídění je vsunutí sběrné trubice do roztoku ve chvíli, kdy se v něm nachází patřičná částice. Tyto sortery dokáží klasifikovat i 6000 částic za sekundu. [MAC07, ŠIN08]

Podobně jako Coulterův čítač byl i průtokový cytometr navržen primárně pro klinické nasazení, nicméně je dnes používán v celé řadě oborů. Jeho největší předností je vysoká rychlost, přesnost a také široká škála možností analýzy vzorku. Největší slabinou tohoto přístupu je pak cena takového přístroje, která činí zhruba 1,5 milionu Kč za základní verzi, přičemž náklady na pořízení lépe vybavené varianty se mohou vyšplhat až ke 12 milionům Kč (únor 2015). Příklad průtokového cytometru obsahuje příloha 5.

5.6 Metody zpracování obrazu

V poslední době je stále více cílena pozornost na metody počítačového vidění, které si kladou za cíl kvantifikovat buňky a získat o nich co možná nejvíce informací na základě obrazové informace. Výhody tohoto přístupu spočívají především v nižších nákladech a také přenositelnosti, kdy k provedení analýzy vzorku stačí pouze snímky buněk a počítač, na kterém bude program spuštěn. Předností těchto metod je také to, že není vyžadována odborně kvalifikovaná obsluha, jako je tomu například u průtokových cytometrů. Mezi nejčastěji používané metody patří algoritmus Watershed, metody narůstání oblasti, Maximally stable extremal regions (MSER) či kombinace těchto metod. Samozřejmostí je nutnost vhodného předzpracování vstupních snímků, kterým lze zvýšit úspěšnost segmentace obrazu. K tomuto účelu bývají použity různé techniky prahování, filtrace a také morfologické operace. [BEN04]

5.6.1 Maximally stable extremal regions

MSER je metoda používaná pro detekci tzv. blobů v obraze. Tento pojem představuje takové oblasti, které jsou z určitého hlediska homogenní nebo vykazují pouze malou variaci v daném rozmezí. Dalo by se tedy říci, že taková oblast sestává ze stejných či velmi podobných bodů. Původně byl tento algoritmus navržen pro hledání korespondence mezi oblastmi ze dvou obrazů pořízených z různých pozorovacích úhlů. Jeho princip spočívá v hledání takových regionů, které přežijí pokud možno co největší nebo předem definovaný počet prahování s postupně se měnící hodnotou prahu. Oblasti, které se v průběhu prahování nezmění, nebo se změní jen nepatrně, můžeme prohlásit za stabilní. [MAT02]

Prahování obrazu patří mezi nejzákladnější a nejstarší segmentační techniky. Máme-li obrazovou funkci I a hodnotu prahu t , pak bodu na souřadnicích x, y přiřadíme hodnotu 1 nebo 0 podle:

$$T(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{pro } I(x, y) > t \\ 0 & \text{jinak} \end{cases} \quad (1)$$

Výsledkem bude tzv. binární obraz rozdělený na popředí (bílá) a pozadí (černá barva). Pokud bychom vytvořili sekvenci obrazů vzniklých prahováním s postupně se měnícím prahem od 0 do 255, viděli bychom na počátku pouze bílý snímek, v němž by se postupně objevovaly černé oblasti, které by se postupně spojovaly a utvořily jednolitou černou plochu. Tyto postupně spojující se černé regiony jsou považovány za extrémní. Pro

všechny takové oblasti platí předpoklad, že všechny pixely uvnitř MSERů jsou buď světlejší, nebo tmavší ve srovnání se svým okolím. [MAT02, DEL11]

Pro výpočet extrémních oblastí jsou nejprve všechny pixely seřazeny podle hodnoty intenzity jasu. Následně jsou ke každé z oblastí průběžně přidávány nové body podle postupně se měnícího prahu, přičemž je sledována velikost těchto regionů. Oblasti, které při měnícím se prahu vykazují nejmenší změnu své velikosti, jsou označeny za maximálně stabilní.

Pro formální zápis uvažujme vstupní obraz I jako zobrazení

$$I : D \subset \mathbb{Z}^2 \leftarrow S \quad (2)$$

Extrémní oblasti jsou v takovém obraze definovány, pokud S je lineárně uspořádaná množina, tzn., že pro ni existuje reflexivní, tranzitivní a antisymetrická relace \leq . Množina S může obsahovat jasy v rozpětí $0 - 255$, obecně lze však algoritmus použít na jakékoli reálné hodnoty. Dále je potřeba definovat okolí, která je dáno relací $A \subset D \times D$. U tohoto algoritmu se pracuje se 4-okolím, tzn., že $p, q \in D$ jsou sousední (pAq), pokud pro ně platí

$$\sum_{i=1}^d |p_i - q_i| \leq 1 \quad (3)$$

Region Q je podmnožinou D , takže pro každé $p, q \in Q$ existuje posloupnost $p, a_1, a_2, \dots, a_n, q$ a $pAa_1, a_1Aa_{i+1}, a_nAq$. Hranici této oblasti pak můžeme definovat jako

$$\partial Q = \{q \in D \setminus Q : \exists p \in Q : qAp\} \quad (4)$$

Jinými slovy hranice ∂Q je množina bodů, která sousedí alespoň s jedním pixelem oblasti Q , ovšem není její součástí. Extrémní region $Q \subset D$ je taková oblast, u níž pro všechny body $p \in Q, q \in \partial Q : I(p) > I(q)$ v případě oblasti s maximální intenzitou a $I(p) < I(q)$ pro regiony s minimální intenzitou. Máme-li tedy posloupnost všech extrémních oblastí $Q_1, Q_2, \dots, Q_{i-1}, Q_i, \dots$ získanou prahováním s hodnotou prahu $1, 2, \dots, i-1, i, \dots$, prohlásíme extrémní region Q_{i^*} za maximálně stabilní, pokud má pro něj kritérium

$$q(i) = |Q_{i-\Delta} \setminus Q_{i+\Delta}| / |Q_i| \quad (5)$$

minimální hodnotu. Δ je volitelný parametr a značí počet cyklů prahování. [MAT02]

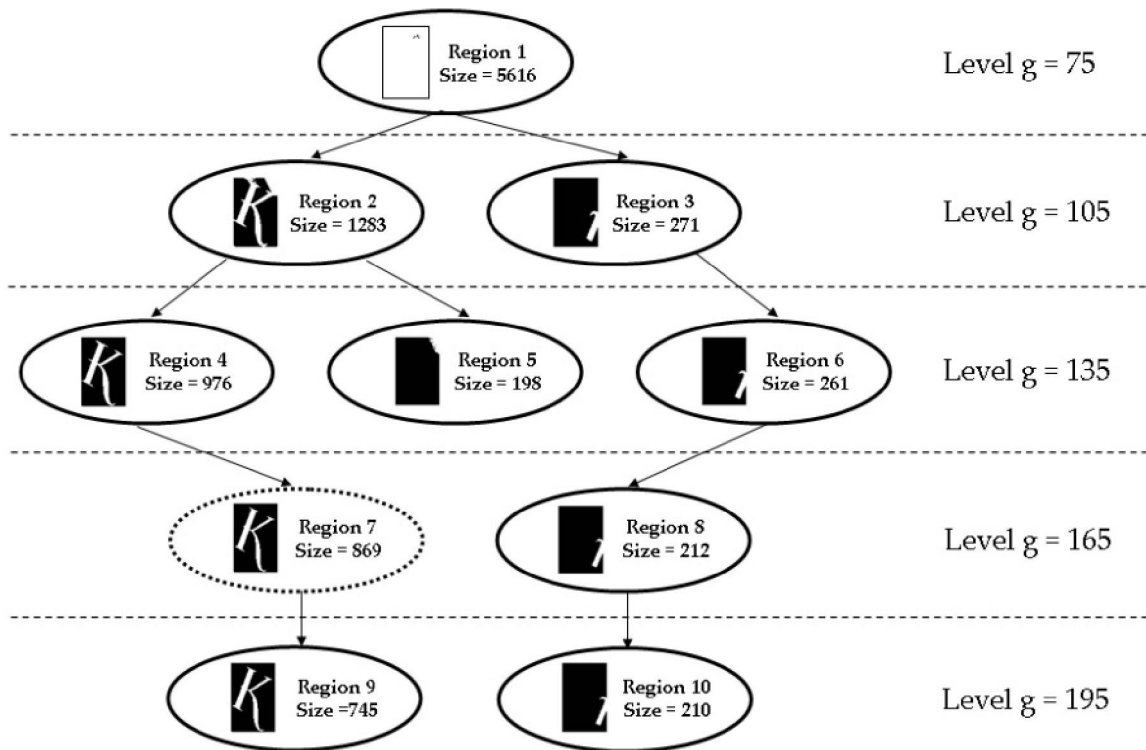
Vzhledem k vysoké výpočetní náročnosti výše popsaného postupu byla navržena technika, která reprezentuje celý obraz pomocí stromu. Detekce stabilních oblastí tak neprobíhá přímo ve snímku, nýbrž v tomto vytvořeném modelu. Každý z uzlů stromu reprezentuje jednu spojenou oblast binarizovaného obrazu. Pro MSERy jsou uvažovány pouze oblasti s maximální intenzitou definované $\forall p \in Q, \forall q \in \partial Q : I(p) > I(q)$. Ke každému uzlu je přiřazena hodnota prahu, při které byla oblast, kterou reprezentuje,

vytvořena. Kořen uzlu odpovídá nejnižší hodnotě prahu a obsahuje tedy všechny obrazové body, naopak čím níže se ve stromu pohybujeme, tím více menších oblastí se v něm vyskytuje. Maximálně stabilní extrémní oblasti jsou hledány analýzou tohoto stromu, přičemž je pro každý region Q_i s hodnotou prahu g vypočteno kritérium stability ψ_i^g definované jako

$$\psi(Q_i^g) = (|Q_j^{g-\Delta}| - |Q_k^{g+\Delta}|) / |Q_i^g| \quad (6)$$

R_i^g tedy představuje zkoumanou oblast získanou s hodnotou prahu g , Δ značí parametr stability podobně jako u (5) a $Q_j^{g-\Delta}$ s $Q_k^{g+\Delta}$ reprezentují oblasti pod, resp. nad aktuálním regionem. Za MSERy jsou následně prohlášeny takové uzly stromu (oblasti), pro které nabývá kritérium (6) lokálního minima. Příklad stromu vytvořeného touto metodou ukazuje obrázek 4, kde region 7 představuje MSER. [DON06]

Obrázek 4: Stromová reprezentace obrazu algoritmem MSER



Zdroj: [DON06], s. 2

Všechny extrémní regiony jsou definovány funkcí intenzity a hranicí. Díky svojí stabilitě při lokální binarizaci přes větší počet prahů mají také několik užitečných vlastností, jako je například nezávislost na afinity transformaci jasů, stabilita při prahování či nezávislost na zvětšení. [DEL11, MAT02]

Po nalezení všech MSERů mohou být ještě některé regiony vyřazeny ze seznamu maximálně stabilních extrémních oblastí. Tato situace může nastat, pokud je nalezený MSER příliš velký nebo malý, pokud se významně neodlišuje od jiného MSERu, do kterého patří, nebo pokud je příliš nestabilní, čili vykazuje variaci vyšší než je přípustné. Všechna tato kritéria lze ovlivnit volbou počátečních parametrů. [DEL11]

5.6.2 Watershed

Watershed je hojně používaný algoritmus pro segmentaci obrazu do homogenních oblastí. V principu této metody je obraz viděn topograficky jako reliéf, ve kterém se vyskytují tři základní prvky, a to minima, povodí a vodní hráze. Homogenní oblasti pak v takové transformaci vypadají jako relativně rovné plochy, ohraničené prudkými svahy. Tento algoritmus poprvé představili Luc Vincent a Pierre Soille. Segmentace probíhá postupným zapláváním údolí (lokálních minim gradientu), přičemž se stoupající úrovní vodní hladiny se může stát, že dvě či více takto vytvořených jezer splyne v jedno. Kde taková situace nastane, je postavena hráz, která reprezentuje hranici mezi segmentovanými oblastmi. [AMA14, ŠON08]

Původní verze tohoto algoritmu aplikovala Watershed transformaci na gradientní obraz, který reprezentoval již zmiňovaný reliéf. Morfologický gradient (také nazývaný Beucherův gradient) obrazu I je definován jako rozdíl dilatovaného a erodovaného obrazu strukturním elementem B :

$$\text{grad}(I) = (I \oplus B) - (I \ominus B) \quad (7)$$

Dilatace skládá body dvou množin pomocí vektorového součtu. Touto operací dojde k zaplnění malých děr a úzkých „zálivů“, zároveň se všechny objekty rozrostou na úkor pozadí. Eroze je duální transformací k dilataci, ovšem není vůči ní inverzní. Skládá dvě množiny s využitím rozdílu vektorů. Její aplikací dojde k odstranění osamocených bodů, tenkých čar a zároveň ke zmenšení všech objektů ve prospěch pozadí. Morfologický gradient představuje aproximaci gradientu obrazové funkce, který je definován za použití parciálních derivací jako:

$$|\text{grad } I(x, y)| = \sqrt{\left(\frac{\delta I}{\delta x}\right)^2 + \left(\frac{\delta I}{\delta y}\right)^2} \quad (8)$$

Gradient udává velikost jasových změn v obraze, maximálních hodnot tedy dosahuje v oblastech hran. Následným krokem je „zaplavení“ údolí, reprezentujících jednotlivé objekty, a stanovení hranic tam, kde regiony splynou v jeden. Princip této segmentace je znázorněn na obrázku 5. Tento přístup však trpěl problémy s přesegmentováním, kdy byl

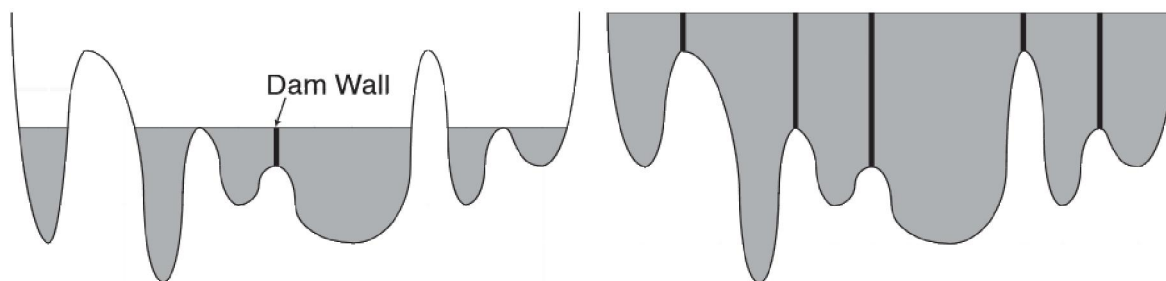
obraz rozdělen na velké množství malých oblastí, které často nekořespondovaly s objekty v obraze, nýbrž pouze se šumem. Z uvedeného obrázku je jasně patrné, že pomyslné hráze reprezentující hranice oblastí byly vystavěny všude, kde se libovolná dvě jezera spojila v jedno. Tento problém lze vyřešit použitím tzv. markerů, kterými je segmentace řízena. [AMA14, BEL09, LAG11, ŠON08]

Markery představují označení takových lokálních minim gradientu, která skutečně reprezentují hledaný objekt, pozadí nebo místo očekávaného rozdělení oblastí. Hranice mezi objekty pak bude stanovena pouze tehdy, spojí-li se jezera založená na odlišných markerech. Označení takových míst v obraze může být prováděno buď přímo uživatelem, nebo v některých případech i automaticky za využití kombinace nějaké apriorní znalosti o hledaných objektech, způsob závisí vždy na povaze řešené úlohy. Markery jsou obvykle umísťovány na prostředek segmentovaných oblastí. Každé z označených minim pak má jakousi „sféru vlivu“, kterou si lze představit jako povodí jezera. To znamená, že voda i v okolních údolích patří do jednoho obrazového segmentu, pokud nemají svůj vlastní marker. Velikost každého povodí je vypočítávána pomocí Laplaciánu morfologického gradientu obrazu I , který je definován ve tvaru:

$$\Delta_I = (I \oplus B) - 2I + (I \ominus B) \quad (9)$$

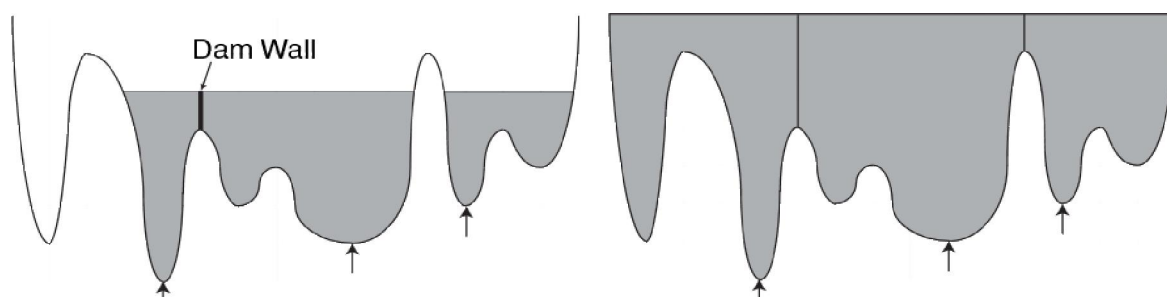
Průběh této segmentace zobrazuje obrázek 6. Markery jsou zde reprezentovány šipkami, které označují pouze ta minima morfologického gradientu, která patří do hledaných oblastí. [BEL09, LAG11, ŠON08]

Obrázek 5: Segmentace watershed bez markerů



Zdroj: WAH, Benjamin W. *Wiley encyclopedia of computer science and engineering*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, 5 v. (xviii, 3223 p.). ISBN 04700501605. S. 1546.

Obrázek 6: Segmentace watershed s markery



Zdroj: WAH, Benjamin W. *Wiley encyclopedia of computer science and engineering*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, 5 v. (xviii, 3223 p.). ISBN 04700501605. S. 1548.

5.6.3 Narůstání oblasti

Narůstání oblasti je poměrně jednoduchá segmentační technika. Je hojně používána pro detekci hranic homogenních oblastí či pro nalezení určité části snímku, která bude dále podrobněji analyzována. Spočívá v porovnávání okolních pixelů s body patřícími do určité oblasti. Pokud je zkoumaný bod prohlášen za podobný těmto pixelům, je připojen k danému regionu. Podobnost, kterou reprezentuje tzv. agregační kritérium, může být vyhodnocována například z hlediska jasu či barvy, a to jak v RGB prostoru, tak i v HSV. Volba tohoto kritéria vždy silně závisí na konkrétní úloze. Algoritmus narůstání je spouštěn na základě jednoho či více počátečních bodů, tzv. seed pointů. Výsledek segmentace zde silně závisí na volbě těchto bodů, lepších výsledků je zpravidla dosahováno, pokud je seed point uprostřed segmentované oblasti. [BRA08]

Segmentace každé oblasti tedy začíná volbou prvního pixelu patřícího do daného regionu. Volba tohoto bodu může být provedena manuálně pomocí grafického uživatelského rozhraní (GUI), náhodně nebo za využití nějaké apriorní informace o řešené úloze. Následně jsou prohledány všechny sousedící body, které má každý pixel 4, bereme-li v úvahu jen 4-okolí, nebo analogicky 8 pro 8-okolí. Druhá zmiňovaná možnost logicky zajišťuje přesnější nalezení hranice oblasti, je však také výpočetně náročnější. Pokud vyhodnocovaný pixel splní agregační kritérium, je označen jako element patřící oblasti. Algoritmus narůstání oblasti je ukončen, pokud již nejsou k dispozici žádné body k otestování podobnosti. [BRA13]

Agregační kritérium může být zvoleno například jako odchylka od střední hodnoty dosud vytvořené oblasti. Pokud je takový region se tvořen n elementy, můžeme vypočítat jejich střední hodnotu μ_n a rozptyl σ_n . Obrazový bod $I_{n+1}(x, y)$ pak bude přiřazen k dané oblasti, pokud bude splňovat kritérium:

$$\mu_n - \alpha\sigma_n < I_{n+1}(x, y) < \mu_n + \alpha\sigma_n \quad (10)$$

α je parametr, kterým lze upravovat pásmo tolerance. Čím nižší tato hodnota je, tím nižší počet bodů bude k oblasti připojen. Další možností je přímo stanovit práh maximální přípustné odlišnosti nového elementu od stávající oblasti. Bod $I_{n+1}(x, y)$ pak bude patřit k danému regionu, pokud bude splňovat:

$$\mu_n - \alpha < I_{n+1}(x, y) < \mu_n + \alpha \quad (11)$$

Zde α představuje maximální možnou odchylku nového bodu $I_{n+1}(x, y)$ od střední hodnoty dosud vytvořeného regionu μ_n . Pokud jsou tato agregační kritéria použita u barevných snímků, je nutné otestovat samostatně jednotlivé barevné kanály, přičemž připojen bude pouze ten bod, jehož všechny kanály tuto podmínku splní. Pro barevné obrázky lze také jako kritérium použít Eukleidovskou vzdálenost pixelu a střední hodnoty oblasti. Vyhodnocovaný bod $I_{n+1}(x, y)$ pak musí splnit podmínku:

$$\sqrt{(I_R - \mu_R)^2 + (I_G - \mu_G)^2 + (I_B - \mu_B)^2} < \alpha \quad (12)$$

α v tomto případě znamená mezní eukleidovskou vzdálenost mezi střední hodnotou oblasti a novým pixelem. Všechna uvedená kritéria lze také modifikovat a místo střední hodnoty regionu μ_n můžeme použít pro porovnání pouze hodnotu startovacího bodu či jen sousedního pixelu. [RAM10]

Nespornou výhodou algoritmu narůstání oblasti je jeho jednoduchá implementace a schopnost přesné segmentace. Mezi nevýhody pak patří závislost výsledku segmentace na volbě seed pointu a také citlivost na přítomný šum v obraze. U zašuměných snímků se může stát, že segmentovaný region tzv. „přeteče“ a bude spojen s velkou částí pozadí. [BRA08, RAM10]

5.6.4 Prahování

Jedná se o nejjednodušší a velmi starou segmentační techniku, jejímž výsledkem může být binární obraz, či snímek s ponechanými objekty (popředím) a pozadím obarveným na černo. Prahování je založeno na myšlence, že mnoho segmentovaných objektů vykazuje téměř konstantní hodnoty jasu, díky čemuž lze takové oblasti oddělit od pozadí pouhou volbou hodnoty prahu a následnou binarizací snímku. Tento přístup má jednoduchou implementaci, je rychlý, výpočetně nenáročný a tím pádem vhodný k provádění v reálném čase. Na druhou stranu jsou však získané výsledky málokdy uspokojivé, proto je prahování používáno spíše jako předzpracování obrazu pro následnou aplikaci pokročilejších segmentačních technik. [ŠON08, ROS14]

Základní prahování spočívá ve stanovení hodnoty prahu T a následné binarizaci obrazu podle (1). Po segmentaci získáme reprezentaci vstupního obrazu I pomocí množiny regionů $Q = \{Q_1, Q_2, \dots, Q_S\}$, pro které platí, že:

$$I = \bigcup_{i=1}^S Q_i, \text{ a } Q_i \cap Q_j = \emptyset, \text{ kde } i \neq j \quad (13)$$

Binarizace rozdělí obraz na dvě třídy C_0 a C_1 , přičemž první z nich bude obsahovat úrovně jasů $\{0, 1, \dots, T\}$ a druhá $\{T+1, T+2, \dots, \max\}$. Otázkou zůstává, jak nejlépe zvolit hodnotu prahu T . Pokud je histogram obrázku bimodální, nachází se optimální hodnota někde mezi jeho dvěma vrcholy. [ŠON08]

Kritérium, které umožňuje vyhodnocovat „optimálnost“ zvoleného prahu, představil v roce 1979 Nobuyuki Otsu. Jedná se o iterativní metodu, která pro každou hodnotu prahu vyhodnotí rozptyl mezi vytvořenými třídami v obraze. Je-li obraz složený z N pixelů rozdělen prahováním na dvě třídy obsahující body p s hodnotou jasu i , pak můžeme každé z nich vyčíslit pravděpodobnost:

$$\omega_0 = (\sum_{i=1}^T p_i) / N \quad (14)$$

$$\text{a } \omega_1 = (\sum_{i=T+1}^{\max} p_i) / N \quad (15)$$

Následně lze vyjádřit střední hodnoty obou tříd jako:

$$\mu_0 = \sum_{i=1}^T i(p_i / \omega_0) \quad (16)$$

$$\text{a } \mu_1 = \sum_{i=T+1}^{\max} i(p_i / \omega_1) \quad (17)$$

Rozptyly obou tříd jsou definovány:

$$\sigma_0^2 = \sum_{i=1}^T (i - \mu_0)^2 p_i / \omega_0 \quad (18)$$

$$\text{a } \sigma_1^2 = \sum_{i=T+1}^{\max} (i - \mu_1)^2 p_i / \omega_1 \quad (19)$$

Optimálnost testovaného prahu je hodnocena pomocí vnitřního rozptylu obou tříd:

$$\sigma_w^2 = \omega_0 \sigma_0^2 + \omega_1 \sigma_1^2 \quad (20)$$

Práh, pro který je tato variance nejnižší, je považován za optimální. Bimodální histogram není u Otsuovy metody podmínkou, zajišťuje však dosažení uspokojivějších výsledků segmentace. [GRE10, HRÚ14, ROS14]

Prahování je silným nástrojem, pokud segmentované objekty mají stejný či velmi podobný jas a také jsou od sebe vzájemně odděleny. Pokud se hledané oblasti dotýkají, nedokážeme z binarizovaného obrázku přesně určit hranice objektů. V takovém případě se tato segmentační technika dá použít například pro vytvoření markerů pro algoritmus Watershed, který se s tímto problémem vypořádá lépe. [ŠON08, ROS14]

5.6.5 Barevný prostor HSV

Barevný model hue – saturation – value (HSV) oproti red – green – blue (RGB) více odpovídá přirozenému vnímání barev člověkem. V roce 1978 jej představil Alvy Ray Smith jako vhodnou alternativu k do té doby používaným reprezentacím barev. Stejně jako v RGB je i v HSV reprezentována barva pomocí tří složek. Hue představuje základní barevný tón, může nabývat hodnot od 0° do 360° . Tento úhel udává pozici na kruhu, který obsahuje všechny odstíny barev. Saturation uvádí sytost barvy v procentech. Dalo by se také říci, že reprezentuje příměs šedé do základního barevného tónu, takže například červená barva s 50% saturací pak bude ve skutečnosti růžová. Value pak vyjadřuje také pomocí procent hodnotu jasu, čili světlost barvy. Oproti prostoru RGB, který je nejčastěji zobrazován ve formě kostky, je HSV nejčastěji znázorňován v cylindrické podobě. Porovnání RGB a HSV lze vidět na obrázku 7. [ŠON08, CAR01]

Pro převod z prostoru RGB do HSV přepočítáme hodnoty jasu jednotlivých barevných kanálů tak, aby byly v intervalu $\langle 0; 1 \rangle$. Toho dosáhneme vydělením hodnoty jasu červeného kanálu (R), zeleného (G) a nakonec modrého (B) číslem 255, které představuje maximální možnou hodnotu jasu. Díky tomu lze nyní definovat

$$R' = R/255 \quad (21)$$

$$G' = G/255 \quad (22)$$

$$B' = B/255 \quad (23)$$

$$C_{max} = \max(R', G', B') \quad (24)$$

$$\text{a } C_{min} = \min(R', G', B') \quad (25)$$

Nyní již můžeme přistoupit k výpočtu samotných hodnot hue, saturation a value pro zvolenou barvu. [CAR01]

$$H = \begin{cases} 0^\circ, & \text{pokud } C_{max} - C_{min} = 0 \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{G' - B'}{C_{max} - C_{min}} \right) \text{ mod } 6, & \text{pokud } C_{max} = R' \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{B' - R'}{C_{max} - C_{min}} \right) + 2, & \text{pokud } C_{max} = G' \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{R' - G'}{C_{max} - C_{min}} \right) + 4, & \text{pokud } C_{max} = B' \end{cases} \quad (26)$$

$$S = \begin{cases} 0, & \text{pokud } C_{max} = 0 \\ \frac{C_{max} - C_{min}}{C_{max}}, & \text{pokud } C_{max} \neq 0 \end{cases} \quad (27)$$

$$V = C_{max} \quad (28)$$

Po zpracování obrazových dat v prostoru HSV můžeme z nějakého důvodu požadovat jejich zpětný převod do souřadnic modelu RGB. Pro tento účel je potřeba definovat pomocné proměnné:

$$C = S \cdot V \quad (29)$$

$$\tau = C \cdot (1 - |(H/60^\circ) \bmod 2 - 1|) \quad (30)$$

$$m = V - C \quad (31)$$

Nyní dopočteme hledané hodnoty R,G a B podle

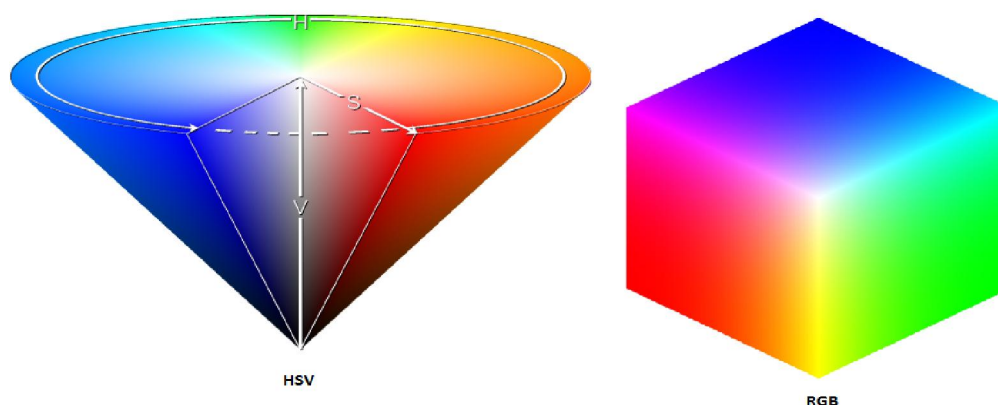
$$(R', G', B') = \begin{cases} (C, \tau, 0), & \text{pokud } 0^\circ \leq H < 60^\circ \\ (\tau, C, 0), & \text{pokud } 60^\circ \leq H < 120^\circ \\ (0, C, \tau), & \text{pokud } 120^\circ \leq H < 180^\circ \\ (0, \tau, C), & \text{pokud } 180^\circ \leq H < 240^\circ \\ (\tau, 0, C), & \text{pokud } 240^\circ \leq H < 300^\circ \\ (C, 0, \tau), & \text{pokud } 300^\circ \leq H < 360^\circ \end{cases} \quad (32)$$

$$(R, G, B) = (R' + m, G' + m, B' + m) \quad (33)$$

[CAR01, HUG13]

Barevný prostor HSV je silným nástrojem, pokud potřebujeme v obraze nalézt objekty určité barvy či například chceme porovnat barvy segmentovaných objektů. Tento barevný model je také hojně používán v interních algoritmech softwaru pro editaci fotografií či tvorbu počítačové grafiky (např. GIMP, Adobe Photoshop). Za zmínku stojí například nástroj často nazývaný jako „kouzelná hůlka“. S jeho pomocí lze ve snímku vybrat oblast, která má podobnou barvu jako počáteční bod zvolený uživatelem. Na druhou stranu existují situace, kde je vhodnější preferovat RGB model před HSV. Jednat se může například o potřebu přesného nastavení barvy osvětlení. HSV také není vhodný pro nasazení v tiskových úlohách, pro tyto účely je hojně používána reprezentace Cyan, Magenta, Yellow (CMY), případně CMYK, kde K reprezentuje samostatnou černou složku barvy (key). [CAR01, HUG13]

Obrázek 7: Porovnání modelů HSV a RGB



Zdroj: HSV. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2014 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/HSV>

5.7 Software

Pro analýzu mikroskopických snímků buněčných kultur existuje několik softwarových řešení, a to jak komerčních, tak i s licencí freeware. Mezi zástupce první skupiny lze zařadit SigmaScan od Scystat Software, DuxoCell dodávaný firmou Cellix nebo Image-Pro Plus od MediaCybernetics. Naopak programy jako CellProfiler nebo ImageJ jsou k dispozici zdarma. Jedná se o rozsáhlé softwarové balíky pro analýzu obrazu z mnoha oborů, obsahují celou řadu možností předzpracování snímků a jejich následného vyhodnocení. Vzhledem ke komplexitě těchto programů vyjde licence placených verzí zhruba na 40 tisíc Kč (únor 2015). [KIN12]

5.7.1 ImageJ

Tento volně dostupný program byl vyvinut Národním ústavem zdraví (NIH) ve Spojených státech za účelem analýzy medicínských obrazových dat. Je naprogramován v jazyce Java, lze jej používat jako webovou aplikaci nebo nainstalovat na pracovní stanici a funguje pod Windows, Linuxem i Mac OS X. Podporovány jsou všechny standardní obrazové formáty včetně surových obrazových dat RAW. Základní program lze rozšířit množstvím pluginů, které obsahují specializované funkce pro konkrétní úlohy. [NAT13]

Uživatelské rozhraní je poměrně jednoduché, zahrnuje standardní nástroje pro práci s obrázky, jako jsou geometrické transformace, filtrace, doostření, práce s histogramy, prahování a mnoho dalších. K dispozici jsou také výběry různých tvarů pro provádění lokálních úprav. Základní vzhled programu ImageJ zobrazuje příloha 6. [NAT13]

Pro počítání buněk je zapotřebí, aby uživatel binarizoval obraz tak, aby jednotlivé buňky tvořily bílé popředí a pozadí zůstalo černé. K tomuto účelu lze použít různé techniky prahování, například Otsuovu metodu či nastavení pevné uživatelem definované hodnoty prahu. Pro odstranění šumu a redukci přesegmentování jsou určeny různé filtry, zde lze například uvést mediánovou či Gaussovu filtraci. Jakmile je toto předzpracování dokončeno, použije se nástroj „Analyze particles“, který pro daný binární obraz vypočte množství buněk a sestaví statistiku jejich velikostí. Tento částečně automatizovaný přístup je však stále ve velké míře závislý na asistenci uživatele. [KIN12, NAT13]

Z dostupných pluginů je vhodné uvést „Cell Counter“, který usnadňuje ruční kvantifikaci buněk. Je užitečný především tehdy, kdy zkoumaný vzorek obsahuje více druhů buněk, přičemž chceme znát zastoupení každého z nich. Tento nástroj umožňuje definování několika čítačů, každý pro jeden buněčný typ. Uživatel poté pouze pomocí ukazatele myši označuje klepnutím buňky, které jsou kvantifikovány aktivovaným čítačem. Po dokončení této operace lze vypočítat základní statistické ukazatele a graficky interpretovat zjištěné informace. [NAT13]

Jelikož se jedná o software s otevřeným kódem, může se kdokoli zapojit do vývoje pluginů specializovaných pro konkrétní úlohy. V tomto ohledu skrývá ImageJ opravdu velký potenciál, tvorba pluginu pro automatickou kvantifikaci buněk by mohla být námětem pro další práci v této oblasti. Navíc v kombinaci s nulovými pořizovacími náklady si tento program jistě zaslouží pozornost.

5.8 Barvení tukových buněk

Za účelem snazšího počítání a analýzy tvaru buněk byly vyvinuty způsoby, jak buňky barevně odlišit od pozadí. Pro kvantifikaci adipocytů se používá v tučích rozpustné barvivo Oil Red O (ORO). Jeho aplikace byla poprvé demonstrována již v roce 1926 ve Francii, přičemž bylo klasifikováno jako jedno z průmyslových barviv typu Sudan. ORO nelze považovat za speciální buněčné barvivo, neboť se nemůže přímo navázat na adipocyty. Jedná se ve skutečnosti o kolorant, kterým lze fyzickou cestou díky jeho rozpustnosti v lipidech obarvit tukové molekuly, které tukové buňky obsahují. [PAR13]

Většina běžných barviv pro analýzu buněčných vzorků funguje na principu ředění roztoku. ORO oproti nim využívá své vysoké rozpustnosti v tukových sloučeninách, díky které dokáže indikovat přítomnost neutrálních triglyceridů a některých lipoproteinů. Pro pohlcení přebytečného barviva se používají speciální šetrná rozpouštědla, která ponechají obarvené tukové kapénky neporušené. Za tímto účelem je nejčastěji používán propylen

glykol. Výsledkem jsou červeně obarvené tukové kapénky v adipocytech a modré okolí. Buněčné jádro zůstane rovněž neobarveno. [PAR13]

Barvení tukových buněk lze realizovat různými barvivy, nicméně ORO je velice oblíbené díky své sytě červené barvě, která značně usnadňuje analýzu zkoumaného vzorku. Používá se například k indikaci přítomnosti tuku při lokalizaci tumorů, jako jsou liposarkomy a lipomy. Užitečné je také při kontrole na vnitřní poranění při úrazech, kdy dochází v postiženém místě k vyplavování tuku do krve. Zajímavé je také použití při hledání otisků prstů na porézních površích, kde barvivo reaguje s aminokyselinami zanechanými kontaktem s kůží. [PAR13]

6 NÁVRH A REALIZACE ŘEŠENÍ

Na základě dostupných metod počítačového vidění popsaných v předchozí části je v této kapitole navržen algoritmus pro automatickou kvantifikaci buněk ve vstupním obraze. Jako vhodná se pro tuto úlohu jeví metoda MSER, která je rychlá a při vhodné volbě parametrů by mohla být schopna nalézt tukové buňky. Dále je zkoušen algoritmus Watershed s použitím markerů, který je hojně využíván právě v úlohách tohoto typu. Jeho velkou předností je, že si při vhodném sestavení markerů dokáže poradit i s případy, kdy se hledané objekty v obraze navzájem dotýkají. Poslední testovanou segmentační technikou je Floodfill, který funguje na principu narůstání oblasti. Ještě před použitím těchto metod je nutné provést potřebné předzpracování vstupního snímku. Zde připadá v úvahu automatické prahování pomocí Otsuovy metody či HSV prahování, kde lze využít apriorní informaci o barvě tukových buněk.

Pro implementaci je použito knihovny Open Source Computer Vision (OpenCV), neboť obsahuje bohatý soubor užitečných metod pro zpracování digitálního obrazu. Například popisovaný nástroj ImageJ je sice uživatelsky přívětivější a nevyžaduje programování skriptů, na druhou stranu ale nabízí pouze zlomek možností oproti OpenCV. Navíc ImageJ vyžaduje, aby uživatel sám „ručně“ kombinoval nástroje pro zpracování obrazu, nedokáže tedy kvantifikaci provádět plně automaticky.

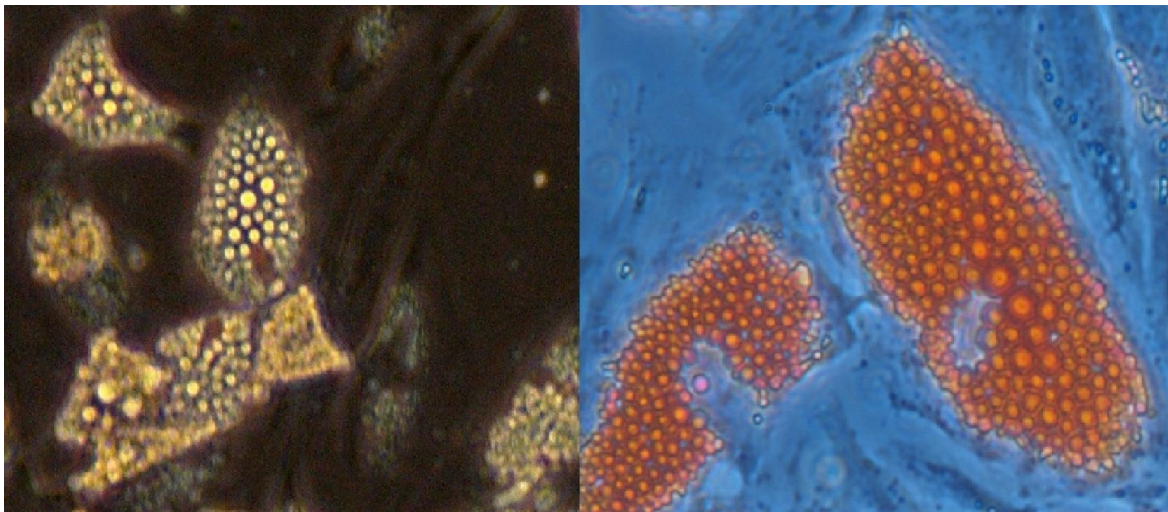
Výstupem algoritmu je pak snímek s ohraničenými nalezenými buňkami a textový soubor obsahující informace o počtu buněk a další zjištěné údaje. Samotná realizace je rozdělena do několika dílčích částí, přičemž je vždy popsán způsob, jakým byl konkrétní krok proveden.

6.1 Vstupní obraz

Snímky buněk byly pořízeny digitální jednookou zrcadlovkou Olympus E-600, která disponuje 12,2 megapixelovým Live MOS snímačem. Fotoaparát se upevňuje přímo na mikroskop pomocí speciálního adaptéru s bajonetem „Four Thirds“, který používají zrcadlovky této japonské značky pro nasazení objektivů. Vstupní snímek pro náš algoritmus je barevný tříkanálový RGB obraz ve formátu JPEG, který byl vyvolán pomocí programu Adobe Photoshop ze surových obrazových dat RAW. 12 megapixelový snímač produkuje fotografie o rozlišení 4032 x 3024 pixelů, velikost vyvolaných JPEG snímků se pohybuje v rozmezí 5 – 6 MB.

První sada získaných fotografií je bez barviva, buňky zde představují shluky tukových kapének zbarvených do oranžova. Druhou skupinu tvoří snímky buněk obarvených na červeno pomocí barviva ORO. V OpenCV provedeme načtení obrázku příkazem `cv2.imread`.

Obrázek 8: Ukázka vstupního obrazu (vlevo bez barviv, vpravo ORO)



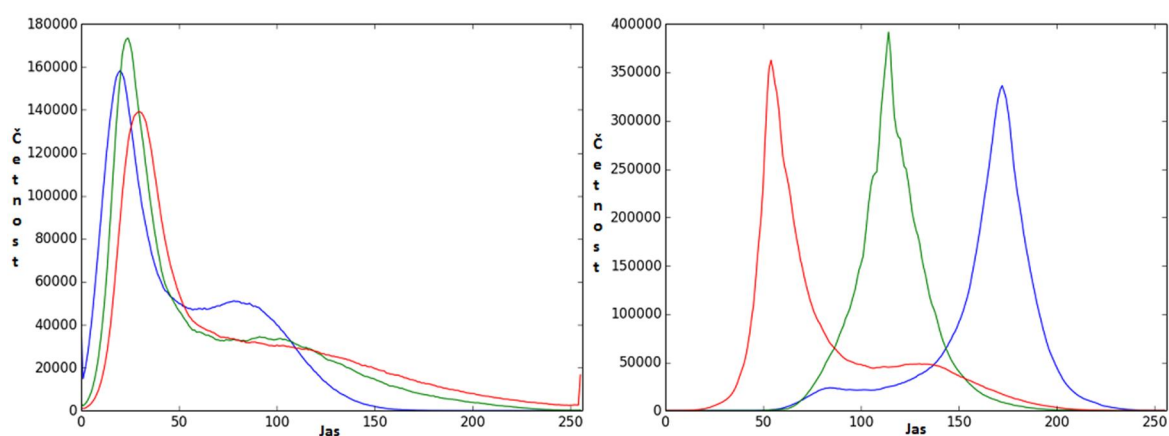
6.2 Rozpoznání vstupního obrazu

Protože se na vstupu navrhovaného algoritmu můžeme setkat se dvěma druhy snímků, je nutné každý z nich správně identifikovat. Tento krok je důležitý, neboť některé parametry používaných metod se odlišují v závislosti na typu vstupního obrazu. Například snímky s obarvenými buňkami obsahují diametrálně odlišné barvy, proto je u nich nutné nastavit jiný rozsah barev pro HSV prahování.

Jednou z možností, jak od sebe tyto dvě třídy snímků odlišit, je porovnání jejich histogramů. Histogram poskytuje informaci o rozložení jednotlivých jasů v obraze. Lze z něj snadno vyčíst, které barvy a v jaké míře se ve snímku vyskytují. Porovnáním několika fotek z obou skupin bylo zjištěno, že u neobarvených snímků se histogramy jednotlivých barevných kanálů takřka překrývají. U fotografií obarvených buněk je situace zcela odlišná. I zde mají křivky histogramů velmi podobný tvar, jejich vrcholy jsou však od sebe vzdáleny a vždy ve stejném pořadí. Nejnižší hodnotu jasu má vrchol červeného kanálu, následuje zelený a nakonec nalezneme nejvíce vpravo modrý kanál. U neobarvených snímků jsou křivky v opačném pořadí, tedy B, G a R. Rozdíly v histogramech snímků ukazuje obrázek 9.

Této znalosti lze využít při rozhodování, do jaké třídy snímek patří. Histogram lze pro každý barevný kanál efektivně vypočítat pomocí vestavěné funkce *cv2.calcHist*. Poté stačí jen nalézt indexy, na kterých se nachází jednotlivá maxima, a porovnat jejich pořadí. Vzhledem k tomu, že u neobarvených snímků se všechny křivky téměř překrývají, lze kromě pořadí vrcholů sledovat i jejich vzdálenost. Snížíme tím riziko chybného rozhodnutí v případě, že by u některého neobarveného snímku bylo pořadí křivek stejné jako u druhé skupiny.

Obrázek 9: Porovnání histogramů obou typů snímků (vlevo bez barviva, vpravo ORO)



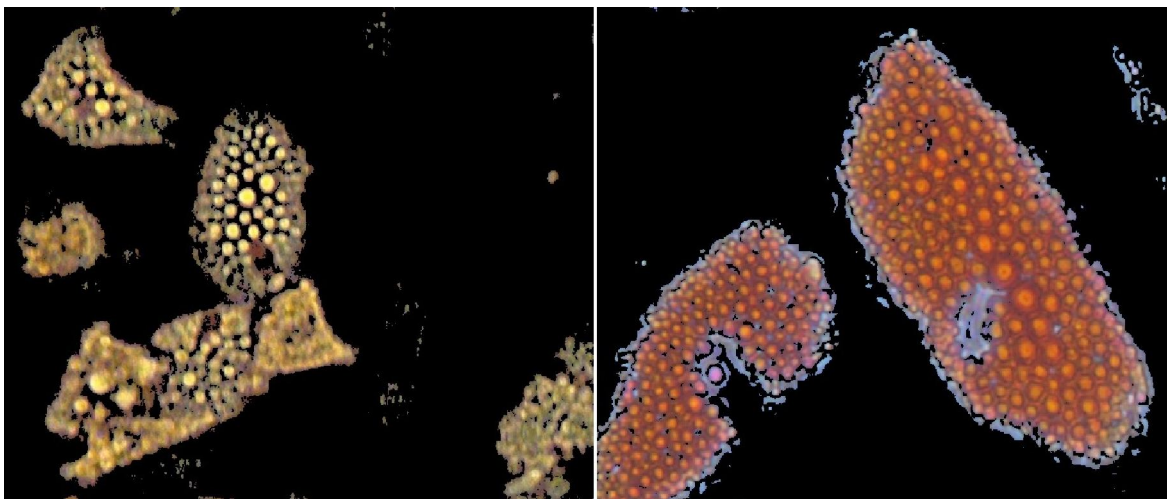
6.3 Otsuovo prahování

Na vstupní obraz je následně použito Otsuovo prahování. Pro tento krok je zapotřebí převést snímek do šedotónové reprezentace, čehož dosáhneme pomocí funkce *cv2.cvtColor*. Její druhý argument specifikuje, o jaký převod se jedná, konkrétně v našem případě použijeme pro RGB obraz (v Pythonu BGR) volbu *cv2.COLOR_BGR2GRAY*. Pokud je na vstupu snímek obarvený pomocí ORO, použijeme pouze jeho červený kanál, neboť červené buňky mají v tomto kanálu značně vyšší intenzitu než modré pozadí. Navíc je histogram červeného kanálu ve většině případů bimodální, což umožňuje přesnější nalezení optimálního prahu.

Pomocí Otsuovy metody lze odstranit většinu pozadí, které je tvořeno převážně nediferencovanými mezenchymálními buňkami. Výsledkem prahování je binární obraz, v němž mají všechny pixely patřící objektům (popředí) hodnotu 1 a ostatní 0. Tímto binárním obrazem vynásobíme všechny 3 kanály původního obrazu, čímž dojde k obarvení pozadí na černo, přičemž oblast buněk zůstane zachována v původní podobě. Standardní

prahování je v OpenCV realizováno funkcí *cv2.threshold*, v níž poslední argument specifikuje požadovaný typ prahu. V tomto případě se jedná o *cv2.THRESH_OTSU*.

Obrázek 10: Otsuovo prahování (vlevo bez barviva, vpravo ORO)



6.4 HSV prahování

V dalším kroku zpracování využijeme znalost o barvě segmentovaných buněk. Jak již bylo uvedeno výše, jsou na standardních snímcích tukové buňky reprezentovány shluky tukových kapének oranžové barvy, při použití barviva ORO je tuk v diferencovaných adipocytech obarvený na červeno. Díky těmto apriorním znalostem po vynásobení výstupní masky z Otsuovy metody s původním snímkem aplikovat HSV prahování, které je silným nástrojem při segmentaci objektů určité barvy. Tento krok precizněji oddělí oblasti s barvou buněk od pozadí.

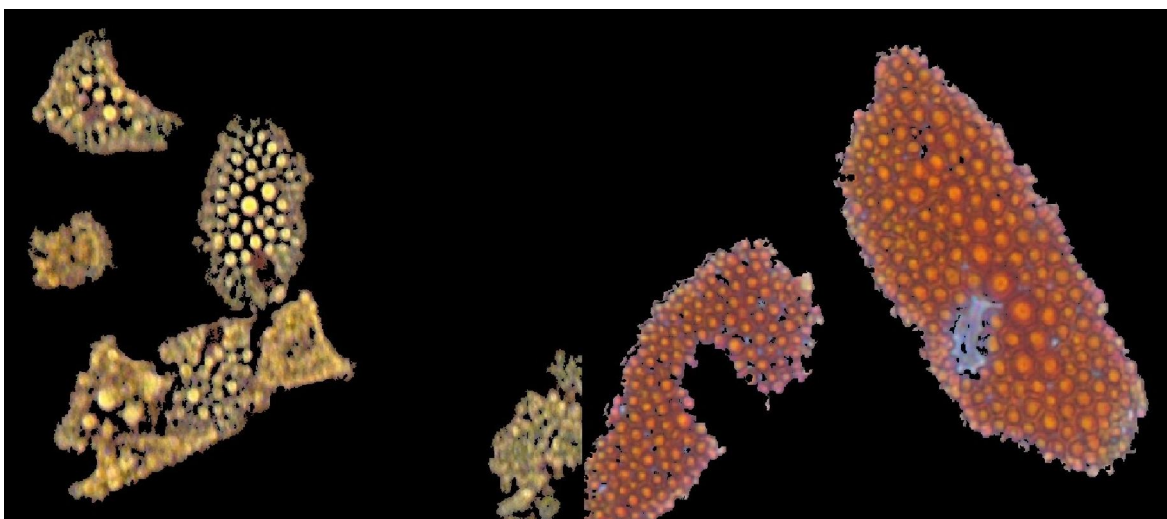
Nejprve je potřeba převést obraz z barevného prostoru RGB do HSV, což lze provést již použitou funkcí *cv2.cvtColor*, nyní ovšem s argumentem *cv2.COLOR_BGR2HSV*. Pro prahování v prostoru HSV je nutné stanovit interval barev definovaný maximální a minimální hodnotou. Všechny pixely spadající do tohoto rozmezí budou označeny jako popředí (bílá) a ostatní jako pozadí (černá).

Prahové hodnoty byly v této práci stanoveny za použití programu GIMP 2, který jednoduše umožňuje práci s obrazovými daty v HSV. Je však nutné mít na paměti, že různá softwarová řešení mohou používat odlišnou reprezentaci HSV modelu. V OpenCV může „hue“ nabývat hodnot od 0° do 180°, „saturation“ a „value“ je pak v rozmezí 0 – 255. V GIMPu je situace odlišná, odstín barvy se pohybuje v intervalu 0° - 360°,

zatímco sytost a světlost je určena procentuálně od 0 % do 100 %. Prahové hodnoty získané pomocí zmiňovaného programu je tedy nutné patřičně přepočítat.

Po stanovení maximální a minimální hodnoty hledané barvy můžeme přistoupit k samotnému HSV prahování. V OpenCV tento krok provedeme pomocí funkce *cv2.inRange*, do které vkládáme jako argumenty segmentovaný obraz společně s prahovými hodnotami. Podíváme-li se pozorně na cylindrický HSV model, zjistíme, že červená barva se vyskytuje kolem hranice 0°. Z tohoto důvodu je pro obarvené snímky prováděno dvojité HSV prahování, nejprve pro odstíny nad 0° a poté pro barevné tóny pod 180°.

Obrázek 11: HSV prahování (vlevo bez barviva, vpravo ORO)



6.5 Segmentace buněk

HSV prahováním získáme pouze takové oblasti, které mají barvu odpovídající naší apriorní znalosti, nicméně adipocyty se v obraze nejeví jako homogenní oblasti. Z tohoto důvodu se může stát, že z jedné buňky „projdou“ prahováním jen určité části, čímž dojde k jejímu rozdělení. Binární obraz získaný tímto krokem však může dobře posloužit jako východisko pro segmentaci pomocí narůstání oblasti či algoritmu Watershed. Pomocí těchto algoritmů lze problém s přesegmentováním do jisté míry eliminovat. Oba uvedené přístupy jsou v této práci implementovány a následně otestovány.

6.5.1 Maximally stable extremal regions

První z uvažovaných možností pro segmentaci tukových buněk byla metoda MSER. Jejími přednostmi jsou vysoká rychlost a přesná detekce blobů v obraze. Problém

zde však představují oblasti adipocytů, které jsou značně nehomogenní, což způsobuje jejich nestabilitu při prahování s měnící se hodnotou prahu. I pro velmi „tolerantní“ nastavení MSER detektoru (např. vysoká přípustná variabilita) se nepodařilo adipocyty segmentovat. Naopak jako poměrně stabilní se jeví tukové kapénky, které jsou v buňkách obsaženy. MSER vždy detekuje právě je namísto celé buňky. Možným řešením je spojit tyto podoblasti v jednu pomocí morfologických operací, ovšem v mnoha případech tím dojde ke spojení sousedících buněk. Nicméně tuto metodu lze využít právě pro analýzu tukových kapének, které je MSER schopen nalézt.

6.5.2 Watershed

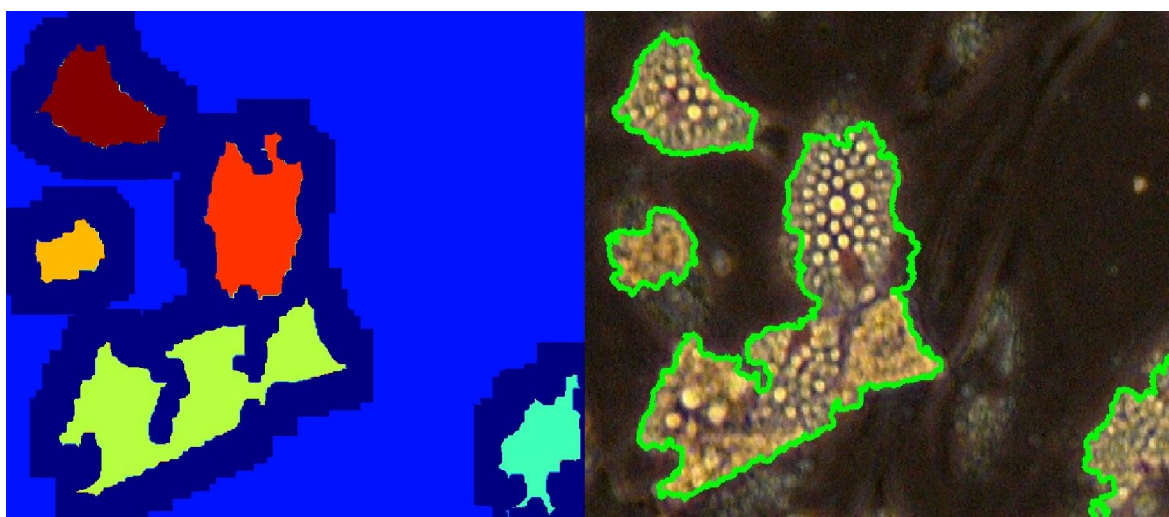
Při segmentaci pomocí tohoto algoritmu uvažujeme obrázek jako topografický reliéf, který je rovnoměrně zaplavován vodou. Změny jasu se v této představě projeví jako „stěny hor“ oddělující různá údolí. Jakmile se při zaplavování spojí dvě „jezera“ v jedno, je v tomto místě vystavěna „hráz“, čili hranice objektu. S cílem omezit přesegmentování obrazu je v této práci použito markerů, které označují pixely náležící objektům či pozadí.

Markery definujeme za použití binárního výstupu z HSV prahování, kde jsou bíle označeny objekty a černě pozadí. Oblasti, které s jistotou náleží pozadí, určíme pomocí dilatace. Zjednodušeně řečeno tím dosáhneme zvětšení bílých objektů na úkor pozadí. Dilataci lze provést pomocí funkce *cv2.dilate*, předtím je však zapotřebí ještě vytvořit strukturní element a určit počet požadovaných iterací. Následně sestrojíme markery pro hledané buňky. Potřebujeme zredukovat bílé oblasti náležící objektům, což lze jednoduše provést pomocí vzdálenostní transformace. Princip spočívá v tom, že pro každý pixel patřící nějakému objektu vypočteme Eukleidovskou vzdálenost k nejbližšímu nulovému pixelu. Tímto krokem získáme obraz, ve kterém mají body uprostřed buněk nejvyšší hodnotu, neboť jsou nejvíce vzdáleny nulovým pixelům pozadí. Vzdálenostní transformaci lze vypočítat pomocí *cv2.distanceTransform*. Pro Eukleidovskou vzdálenost použijeme argument *cv2.CV_DIST_L2*. Na výsledek této transformace aplikujeme standardní prahování podle (1), čímž odfiltrujeme části objektů poblíž nulových pixelů pozadí. Jako poslední musíme označit taková místa, u nichž nevíme, zda se jedná o pozadí či hledanou buňku. Obecně lze za „neznámé“ považovat pixely, kde se objekty překrývají či kde se nachází jejich hranice. Všechny takové body získáme například použitím funkce *cv2.subtract*, která vypočte rozdíl dvou matic (pozadí a popředí) po jednotlivých prvcích.

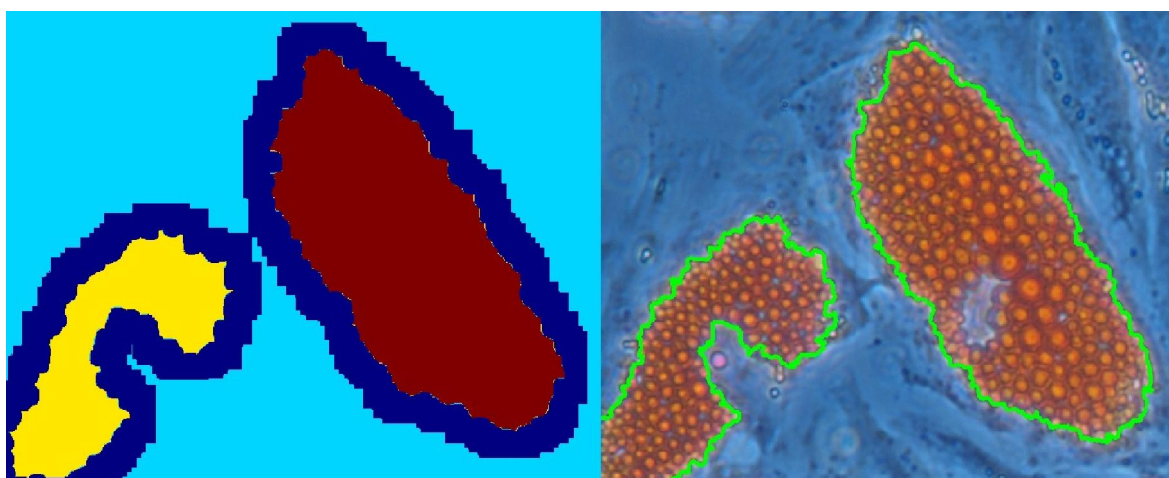
Ještě před aplikací samotného Watershed algoritmu je nutné všechny získané markery poskládat do jednoho obrazu o velikosti vstupního snímku. Veškeré pixely patřící

pozadí ponesou hodnotu 1, neznámé body pak budou označeny číslem 0. Jednotlivé regiony, které s jistotou patří hledaným objektům, postupně „olabelujeme“ různými kladnými čísly začínajícími od hodnoty 2. Segmentaci následně realizujeme zavoláním funkce *cv2.watershed*. Pokud se nějaký adipocyt „dotýká“ hranice snímku, neoznačí Watershed v tomto místě jeho obrys, což znemožní následné zpracování pomocí metody *cv2.findContours*. Jedním z možných řešení je přidat kolem vstupního snímku tenký rámeček odlišné barvy (např. černá), čímž dojde k „uzavření“ oblastí problémových buněk. Snímek lze jednoduše ohraničit pomocí funkce *cv2.copyMakeBorder*.

Obrázek 12: Watershed, bez barviva (vlevo markery, vpravo výsledek)



Obrázek 13: Watershed, barvivo ORO (vlevo markery, vpravo výsledek)



6.5.3 Floodfill

Druhou možností segmentace, která byla v rámci této práce také testována, je metoda Floodfill fungující na principu narůstání oblasti z určeného počátečního bodu.

Algoritmus startuje v tzv. seed pointu, prohledává okolní pixely a není-li u nich nalezena výrazná odlišnost, připojí je k dosud vytvořené oblasti. I zde využijeme binární obraz, který je výstupem HSV prahování.

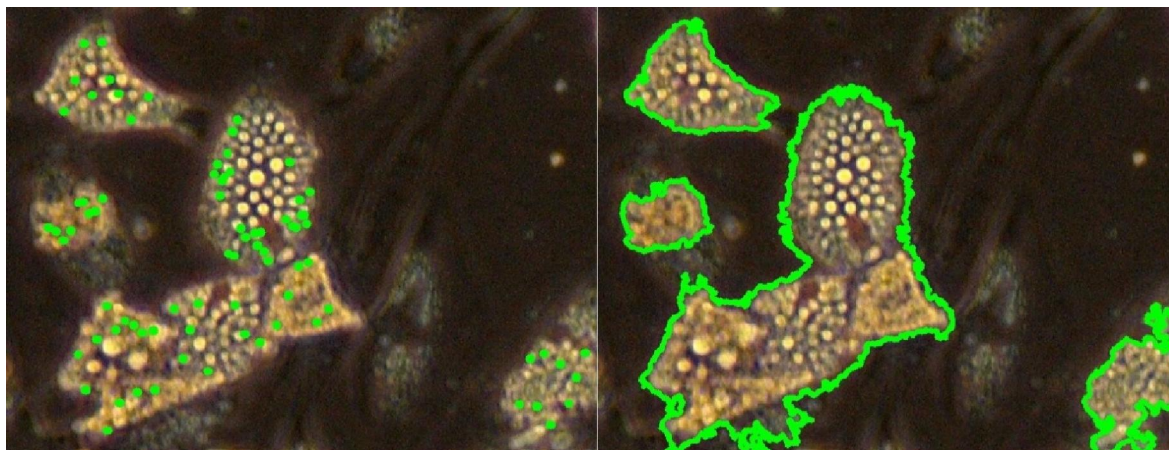
Jak již bylo uvedeno, je základním východiskem pro Floodfill startovací bod, z něž začne procházení okolních pixelů. V našem případě máme k dispozici binarizovaný obraz, jehož bílé oblasti reprezentují části buněk. Úkolem je extrahovat z něj souřadnice seed pointů. V úvahu zde připadá například použití algoritmu MSER, který vrací seznam extrémních regionů v podobě sady souřadnic jejich bodů. Problémem je, že MSER implementovaný v OpenCV se na binárních snímcích chová nestandardně, neboť některé z bílých oblastí nejsou vůbec detekovány. Tato chyba je reportována jako bug #756 a dle uvedeného statusu není zatím (04/2015) opravena. [LYS10]

Další možností je procházení jednotlivých obrazových bodů a ukládání jejich souřadnic, pokud budou mít požadovanou hodnotu. Protože toto řešení není zcela efektivní, je potřeba co nejvíce omezit procházenou část snímku. Pomocí funkce *cv2.findContours* detekujeme hranice bílých oblastí, přičemž pro každou z nich vypočteme za použití *cv2.boundingRect* vzpřímený ohraničující obdélník o nejmenší možné velikosti. Následně jsou prohledávány pouze body uvnitř tohoto obdélníku, přičemž souřadnice bodů uvnitř kontur jsou ukládány do seznamu.

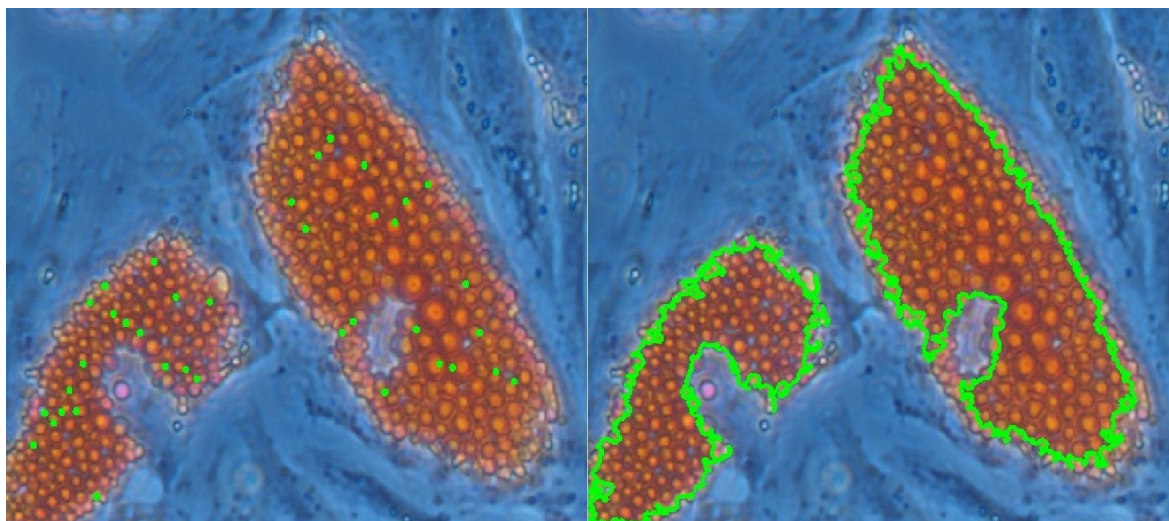
Pro každou konturu pak spustíme algoritmus Floodfill pomocí *cv2.floodfill*. Vzhledem k tomu, že oblasti buněk mohou obsahovat poměrně široké rozpětí barev, je tato funkce volána pro několik seed pointů z každé kontury. Ty jsou vybírány rovnoměrně z celého seznamu uložených souřadnic. Tímto opatřením je zajištěno, že budou označeny pixely o širším barevném rozpětí, nicméně stále odlišné od pozadí. Všechny pixely patřící do dané oblasti jsou označeny bílou barvou. Bude-li tedy některý bod označen vícekrát, dojde ke spojení těchto dílčích podoblastí. Počet seed pointů pro každou oblast je volitelný, dá se říci, že vyšším počtem dosáhneme lepších výsledků segmentace, ale také vyšších výpočetních nároků algoritmu. Kromě počátečního bodu lze zvolit také velikost prohledávaného okolí, na výběr je zde ze 4- nebo 8-okolí.

Implementace algoritmu Floodfill v OpenCV označuje body oblasti přímo do vstupního snímku. Z tohoto důvodu je nutné pro každou iteraci této metody použít vždy „čistou“ kopii vstupního obrazu, neboť již přítomná bílá barva v buňce by v některých případech omezovala narůstání oblasti.

Obrázek 14: Floodfill, bez barviv (vlevo zeleně seed pointy, vpravo ohraničený výsledek)



Obrázek 15: Floodfill, barvivo ORO (vlevo zeleně seed pointy, vpravo ohraničený výsledek)



6.6 Analýza tukových kapének

Jakmile jsou jednotlivé buňky segmentovány, nabízí se také možnost analýzy tukových kapének, které jsou v adipocytech obsaženy. V obraze představují malé kruhové útvary, na jejichž okraji dochází ke změně jasu. Vzhledem k tomu, že jsou uvnitř homogenní, lze pro jejich detekci použít metodu MSER.

6.6.1 MSER

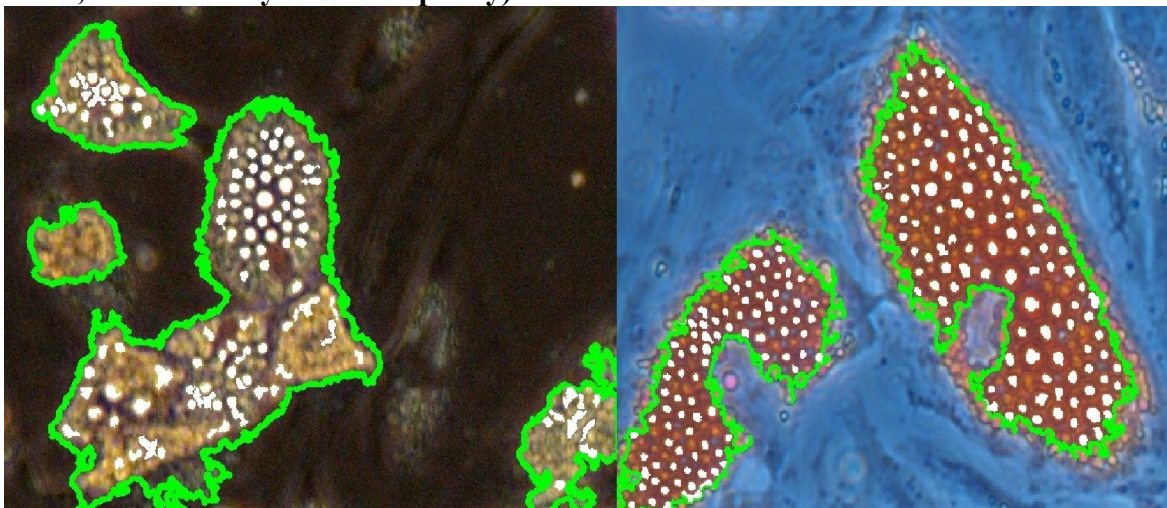
Princip této metody spočívá v postupném prahování obrazu s průběžně měnícím se prahem. Oblasti, které zůstávají neměnné přes určitý počet prahů, jsou pak prohlášeny za

maximálně stabilní. Tato metoda je také v některých úlohách používána pro segmentaci buněk v mikroskopických snímcích.

Pro použití této segmentační techniky v OpenCV je potřeba nejprve vytvořit MSER detektor pomocí *cv2.MSER*, přičemž lze nastavit maximální a minimální velikost detekovaných oblastí, jejich největší přípustnou variabilitu a minimální odlišnost, při které je daná oblast prohlášena za novou. Zásadní je také volba počtu cyklů prahování, po které musí stabilní oblast zůstat nezměněna. Samotná detekce je následně provedena příkazem *mser.detect*. Výstupem této funkce je pak seznam vektorů, z nichž každý reprezentuje jednu maximálně stabilní oblast.

Aby detekce probíhala vždy pouze v rámci jedné buňky, je pro každou nalezenou konturu vytvořena maska, v níž jsou body buňky označeny hodnotou 1 a pozadí číslem 0. Vynásobením tohoto binárního obrazu a vstupního snímku získáme vždy samostatně jednu buňku. Ne u všech adipocytů jsou tukové kapénky dobře rozpoznatelné. Není-li například obraz dostatečně ostrý a kapénky nejsou jasně ohraničeny, MSER je ignoruje. Nastavením „tolerantnějších“ parametrů detektoru sice lze počet detekovaných kapének zvýšit, čímž se však také zvýší riziko „falešné“ detekce oblastí mimo obsažený tuk. Naším cílem je detekovat významné tukové kapénky,

Obrázek 16: Detekce tukových kapének pomocí MSER (vlevo bez barviv, vpravo ORO, bíle označeny tukové kapénky)



6.7 Výstup a vizualizace výsledků

Pro zakreslení výsledků segmentace do vstupního snímku je využíváno funkce *cv2.findContours*. Pomocí ní lze z výsledků použitých segmentačních technik získat hranice nalezených buněk. Tyto kontury je možné zakreslit libovolnou barvou pomocí

funkce `cv2.drawContours`, u níž lze zvolit i požadovanou tloušťku a také metodu vizualizace kontur. Je-li potřeba obarvit celé plochy nalezených buněk, použijeme pro argument tloušťky hodnotu `cv2.cv.CV_FILLED`.

Souhrn získaných informací o snímku je zapisován do textového souboru `výsledky_<jméno snímku>.txt`. Pro každý vstupní obraz je uveden jeho název a typ. Kromě toho je zde pro každou segmentovanou tukovou buňku uveden počet tukových kapének, jejich velikosti včetně maximální, minimální a průměrné hodnoty. Dále zde najdeme celkový počet buněk, stejně jako maximální, minimální a průměrnou velikost obsažených tukových kapének v rámci celého snímku. Ukázka výstupu algoritmu je k nahlédnutí v příloze 7. Velikosti adipocytů jsou počítány funkcí `cv2.contourArea`, zatímco pro tukové kapénky stačí zjistit délku patřičného seznamu pixelů, který vrací metoda `MSER`.

6.8 Vytvořený skript

Výše popsáný postup byl naprogramován do dvou skriptů, první používá pro kvantifikaci buněk metodu `Watershed` a druhý `Floodfill`. V obou z nich je také metoda `MSER` použita pro analýzu tukových kapének, které jsou v adipocytech obsaženy. Algoritmy jsou implementovány v jazyce `Python 2.7` za použití knihovny `Open Source Computer Vision (OpenCV)` ve verzi `2.4.10`. Oba skripty je možné stáhnout z úložiště Katedry kybernetiky na `FAV` pomocí odkazu:

http://konos-pole2-kky.fav.zcu.cz/martintoman/adipose_cells_quantification.zip

Pro jejich použití je zapotřebí mít nainstalovanou zmiňovanou knihovnu `OpenCV`, která obsahuje celou řadu použitých funkcí. V souboru dostupné z uvedeného odkazu jsou přiloženy také snímky s buňkami, výstupní textový soubor s výsledky segmentace se ukládá do stejného adresáře, ve kterém jsou uloženy skripty. Pokud je použit algoritmus `Floodfill`, bude mít výstupní soubor na začátku svého jména „`FL`“, bude-li se jednat o `Watershed`, ponese soubor označení znaky „`WA`“. Podrobnější popis pro použití je přiložen v `readme` textovém souboru.

7 EXPERIMENTY

Experimenty byly nejprve prováděny na několika snímcích, u nichž nebylo použito žádného barviva, a dále na fotografiích obarvených pomocí kolorantu ORO. Pro každou skupinu dat byly testovány oba výše popsané přístupy, Watershed i Floodfill. Úspěšnost detekce je u obou technik následně porovnávána, z čehož lze také následně vyhodnotit vliv použití červeného barviva. Pro následné zpracování výsledků je pro každý experiment uchován výstupní textový soubor. Z Ústavu hygieny a preventivní medicíny LF UK v Plzni byly získány kopie snímků s anotacemi, v nichž jsou ručně označené přítomné adipocyty a zapsán jejich počet. Tato data slouží jako referenční při vyhodnocení kvality segmentace.

Všechny fotografie byly pořízeny 21. a 28. den od začátku pěstování. Pro získání co možná nejkonzistentnějších dat bylo zapotřebí upravit nastavení používané digitální zrcadlovky. Aby bylo možné ovlivnit co nejvíce parametrů expozice, byl fotoaparát přepnut do plně manuálního režimu. S cílem minimalizovat šum v obraze pak byla nastavena světelná citlivost čipu na nejnižší možnou hodnotu, tedy ISO100. Tato volba však logicky vede k delším expozičním časům, v našem případě se jedná o 1 sekundu. Takto dlouhé spuštění závěrky značně zvyšuje riziko neostrosti snímku vlivem pohybu fotoaparátu, proto byla nastavena samospoušť se zpožděním dvou sekund. Při pořizování snímků pak bylo nutné zabránit otřesům pultu, na němž je mikroskop s fotoaparátem umístěn. Velikost clonového čísla nelze ovlivnit, je pevně dáno použitou optickou soustavou. Ostření je realizováno ovládacími prvky mikroskopu, ostrost obrazu je kontrolována pomocí živého náhledu na displeji fotoaparátu. Pro tento účel bohužel nelze použít náhledu přímo přes okulár, neboť je-li v něm obraz dobře zaostřený, jsou vyfocené snímky neostré. Fotografie jsou pořizovány v maximálním možném rozlišení 4032 x 3024 pixelů do formátu RAW, odkud jsou následně vyvolány jako JPEGy.

Bohužel, první sada snímků adipocytů byla pořízena ještě před výše popsaným nastavením fotoaparátu, proto se některé snímky na první pohled odlišují například vyvážením bílé barvy. Automatický režim také nastavoval citlivost čipu, zpravidla bylo použito ISO800, díky čemuž je v obraze patrný barevný šum. Dále zde nebylo zcela využito potenciálu obrazového snímače, neboť byl na fotoaparátu nastaven pouze 8 megapixelový režim. Fotografie v této sadě tak mají rozlišení 2400 x 3200 pixelů.

Vzhledem časové náročnosti pěstování populací adipocytů nám bylo dáno k dispozici prozatím 14 testovacích snímků s anotacemi. V následujícím měsíci (červen 2015) bude probíhat další pokus, odkud budou získány další obsáhlejší sady fotografií, a to

jak obarvených pomocí ORO, tak bez použití kolorantů. Jejich použití v této práci tak není možné z časového hlediska.

7.1 Snímky bez použití barviv

Bez použití speciálního kolorantu lze adipocyty ve vstupním snímku spatřit jako různě členité oranžovohnědé útvary obklopené hnědým pozadím. Právě podobnost barevného tónu buněk se zbytkem snímku představuje významný problém při segmentaci. Jsou-li adipocyty v těsné blízkosti, je hranice mezi nimi špatně patrná a může dojít k tomu, že algoritmus tyto buňky označí jako jednu.

Pro prahování vstupního snímku z hlediska barvy byl nastaven HSV interval s dolní hranicí $HSV_MIN = (5, 5, 5)$ a horní pak $HSV_MAX = (60, 250, 250)$. Toto rozmezí obsahuje oranžovohnědé barvy, které se mohou v adipocytech vyskytovat. Uvedené hodnoty byly získány experimentálně odečtením z vybraných pixelů uvnitř buněk. Po prahování mohou v obraze zůstat malé nevýznamné segmenty, z tohoto důvodu jsou pro následné zpracování použity pouze bloby, jejichž velikost přesahuje 500 pixelů. V případě použití algoritmu Watershed představuje další krok vytvoření markerů. Pozadí je získáno dilatací, která proběhne opakovaně v 5 iteracích za použití strukturního elementu o velikosti 3x3. Vyšší míra dilatace sice zajistí vyšší jistotu při labelování pozadí, nicméně také odstraní tenké hranice mezi adipocyty v těsné blízkosti. Oblasti s jistotou korespondující s buňkami jsou získány prahováním obrazu vzdálenostní transformace $distTrans$. Hodnota prahu je zvolena jako

$$threshold = 0,04 \cdot \max(distTrans) \quad (34)$$

Čím vyšší je hodnota prahu, tím menší markery buněk získáme. Obraz vzdálenostní transformace má totiž nejvyšší hodnoty v místech, která jsou nejvíce vzdálena od nejbližších nulových pixelů. V našem případě bylo nutné zvolit takto nízký práh z důvodu značně rozdílných velikostí adipocytů ve snímcích. Pokud byla nastavena příliš vysoká hodnota, mohlo by dojít k zanedbání menších buněk, čímž by pro ně nebyly vytvořeny markery. Po aplikaci algoritmu Watershed následuje analýza tukových kapének pomocí metody MSER. Zde byl počet změn prahu, při kterých musí oblast zůstat stabilní, stanoven na 5. Tento parametr je označován jako $delta$ a platí, že čím je vyšší, tím méně oblastí je detekováno. Nižší hodnota pak logicky znamená „mírnější“ kritérium a také více segmentovaných oblastí. Vzhledem k velikosti tukových kapének ve snímcích byl zvolen interval přípustné rozlohy oblastí od 100 do 500 pixelů. Aby bylo zabráněno opakované

detekci již nalezených oblastí, byl zvolen parametr minimální diverzity o hodnotě 0,9. Toto číslo udává, jak moc se musí jedna oblast odlišovat od druhé, aby byla prohlášena za novou. Volí se v intervalu od 0 do 1 a platí, že vyšší hodnota způsobí detekci méně oblastí. Vysokou stabilitu segmentovaných kapének pak zajišťuje maximální přípustná variabilita, která se stejně jako minimální diverzita volí v rozsahu od 0 do 1. V našem případě je nastavena na hodnotu 0,15.

U metody Floodfill je používáno stejného předzpracování vstupního snímku jako u algoritmu Watershed. Pro použití této implementace narůstání oblasti je nutné stanovit interval, v němž se mohou pohybovat odchylky prohledávaných pixelů od startovacího bodu. Volí se dvě prahové hodnoty, první určuje maximální přípustnou odlišnost pro pixely s nižší hodnotou a druhá naopak s vyšší hodnotou. Oba tyto parametry byly nastaveny shodně na 30. Je nasnadě, že s vyššími přípustnými rozdíly získáme nižší počet oblastí, které budou ovšem rozlehlejší než při zvolení „přísnějších“ hodnot. Kvalita a rychlost segmentace závisí mimo jiné na počtu použitých seed pointů. Čím více jich je, tolikrát bude muset být Floodfill u každé buňky spuštěn. Vyšším počtem tedy docílíme přesnější segmentace, ale také vysoké výpočetní náročnosti algoritmu. Při prováděných experimentech bylo narůstání oblasti spuštěno vždy z 20 různých bodů. Dále je zapotřebí rozhodnout, jak velké okolí pixelů bude prohledáváno. Na výběr je mezi 4- a 8-okolím, přičemž obecně lze říci, že větší okolí poskytuje zpravidla lepší výsledky segmentace. Hodnoty prohledávaných pixelů jsou pokaždé porovnávány se seed pointem, další možností je zjišťovat odchylku od průměrné hodnoty dosud vytvořené oblasti.

Na základě výsledků segmentace adipocytů lze obecně říci, že u snímků bez použití barviva se často objevuje problém spojení několika buněk do jedné oblasti. Nastaví-li se naopak přísnější limity u algoritmu narůstání oblasti, narazíme na problém velkých rozdílů jasů uvnitř buňky. Z jednoho adipocytu jsou pak segmentovány jen určité části.

7.2 Snímky obarvené Oil Red O

Použitím lipofilního kolorantu ORO dojde k obarvení tuku obsaženého v adipocytech na červenou. Pozadí snímku pak zůstává v modré barvě. Toto odlišení již na první pohled usnadňuje nalezení tukové buňky, navíc jsou zde o poznání snáze detekovatelné tukové kapénky. U těchto snímků jsou testovány stejné metody jako u neobarvené sady, odlišnosti jsou zde pouze v nastavení některých parametrů.

Barevné prahování je zapotřebí provést ve dvou krocích, neboť červená barva se nachází v cylindrickém HSV modelu kolem úhlu 0°. V první části je tedy segmentována

barva v rozsahu $HSV_MIN = (0, 15, 20)$ až $HSV_MAX = (12, 200, 240)$, druhé prahování následně ponechá v obraze pixely s barvou v intervalu od $HSV_MIN = (150, 20, 20)$ do $HSV_MAX = (180, 240, 240)$. V dalším kroku je sestavován obraz s markery pro segmentaci pomocí algoritmu Watershed. Labely pozadí jsou i zde získány dilatací binarizovaného obrazu, rozdíl je ovšem v jejím rozsahu. Zde je opakována ve 20 iteracích, na rozdíl od 10 v případě neobarvených snímků. Další odlišnost se týká již algoritmu Floodfill, kde jsou maximální přípustné odchylky nového bodu od seed pointu nastaveny na 27, opět shodně pro pixely s vyšší i nižší hodnotou. Parametry MSER detektoru zůstaly nezměněny.

Podle výsledků lze na první pohled říci, že obarvení adipocytů pomocí ORO značně zvýšilo kvalitu segmentace. K jevu, kdy jsou natěsnané buňky označeny jako jedna, dochází v méně případech. Kromě jasné barevné odlišitelnosti buněk od pozadí je zde velkou výhodou také to, že uvnitř adipocytů nenarazíme na tak výrazné změny jasu a barev jako u neobarvených snímků. Podrobné analýze výsledků získaných při experimentech je věnována následující kapitola.

8 VÝSLEDKY

Navržené techniky pro kvantifikaci buněk byly otestovány na sadě 14 fotografií, polovinu z toho tvořily snímky s obarvenými buňkami pomocí kolorantu ORO. Pro všechny použité fotografie nám byly poskytnuty anotace, díky kterým lze vyhodnotit úspěšnost navržených postupů. Zkoušené byly dvě techniky, algoritmy Watershed a Floodfill. Nad rámec zadání této práce byla dále použita metoda MSER pro detekci výrazných tukových kapének uvnitř buněk.

Pro počty buněk získané navrženým algoritmem a pro hodnoty získané z anotací byla provedena korelační analýza, která slouží ke zjištění závislosti/nezávislosti dvou proměnných. Mezi anotacemi a hodnotami získanými algoritmem lze očekávat lineární závislost, jejíž míru vyjadřuje korelační koeficient. V této práci je pro určení závislosti Pearsonův korelační koeficient. Označíme-li počty buněk podle anotací jako y a hodnoty získané algoritmem jako x , lze koeficient korelace R vypočítat pomocí vztahu

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (35)$$

Čím vyšší hodnota vyjde, tím vyšší je korelace mezi zkoumanými proměnnými. V rámci korelační analýzy lze také vypočítat p -hodnotu, která popisuje významnost korelace. Zde platí nepřímá úměra, nízké hodnoty (např. pod 0,05) znamenají významnou korelaci. Následně je pro naměřená a získaná data provedena lineární regrese, jejíž princip spočívá v aproximaci hodnot nějaké proměnné přímkou. Tato přímka představuje model jednoduché lineární regrese a je definována jako

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x + \varepsilon \quad (36)$$

kde y představuje závislou proměnnou a x nezávislou proměnnou. Prostý člen, neboli intercept, je reprezentován pomocí β_0 , β_1 značí regresní koeficient udávající sklon přímky a člen ε značí náhodnou variabilitu. Rovnice nejvhodnějšího modelu je hledána pomocí kritéria nejmenších čtverců. Řešením je tedy přímka, která má nejmenší součet kvadrátů svislých vzdáleností proložených hodnot od přímky. Tyto vzdálenosti se nazývají rezidua a jejich součet je vyjádřen vztahem

$$RMS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (37)$$

Pomocí vytvořeného lineárního modelu lze provádět korekci naměřených hodnot, aby bylo dosaženo co nejnižší chyby kvantifikace buněk. Přesnost vypočteného modelu popisuje koeficient determinace, jehož hodnota se pohybuje v intervalu od 0 do 1. Udává, jaká část

rozptylu dané proměnné je popsána modelem, vyšší číslo tedy znamená vyšší dosahovanou přesnost. Determinační koeficient lze vypočítat jako druhou mocninu korelačního koeficientu R nebo podle vztahu

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (38)$$

Koeficient korelace a regresní analýza předpokládají normální rozdělení analyzovaných proměnných. Bohužel soubor dat, který nám byl dosud poskytnut, je příliš malý pro ověření tohoto předpokladu. Pokud by se na větším množství dat ukázala tato podmínka jako nesplněná, bylo by nutné použít některou z neparametrických metod analýzy, například Kendallův korelační koeficient. [ŠED11]

Vzhledem k rozdílnému počtu buněk ve snímcích je nutné vyjádřit chybu relativně pomocí procent. Označíme-li počet buněk podle anotací jako a a hodnotu získanou algoritmem jako b , lze relativní chybu v procentech vyjádřit pomocí

$$E = |a - b|/a \quad (39)$$

U každé metody je pak z těchto hodnot vypočítán průměr chyby \bar{E} a rozptyl σ^2 . Pro každý odhad počtu buněk pomocí lineární regrese je také vždy stanoven 95% a 99% interval spolehlivosti. Šířky těchto intervalů jsou vypočteny pomocí tzv. pravidla tří sigma. Jak již název evokuje, jsou intervaly stanoveny pomocí rozptylu relativních chyb podle vztahu

$$in_{0,95} = 2 \cdot \sigma, \text{ resp. } in_{0,99} = 3 \cdot \sigma \quad (40)$$

Pro vyšší hodnoty rozptylů tak budou logicky intervaly širší. [ŠED11]

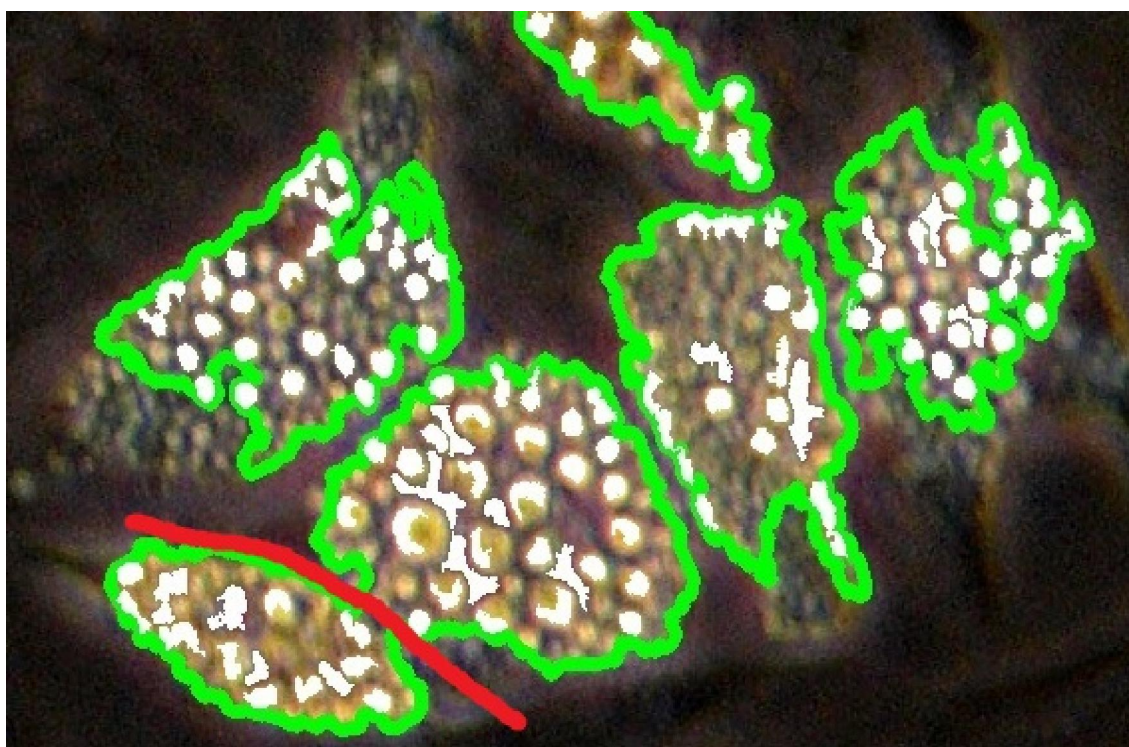
8.1 Snímky bez použití barviv

Dle očekávání byla segmentace tukových buněk v této sadě snímků obtížná. Adipocyty zde nemají jednotnou podobu, liší se nejen svým tvarem a velikostí, ale také barvou. V některých případech dokonce nalezneme výrazné rozdíly v barvě uvnitř jediné buňky. Další již avizovanou překážku v segmentaci představují adipocyty natěsnané na sebe navzájem. Hranice mezi nimi je velmi obtížně rozpoznatelná i pouhým okem, což představuje problém pro automatickou segmentaci. Některé tukové buňky jsou také o poznání tmavší než ostatní, což zhoršuje jejich odlišitelnost od pozadí. Ztížená detekce adipocytů je navíc u této skupiny snímků umocněna ne zcela vhodným nastavením fotoaparátu. Díky němu mají fotografie nižší rozlišení, obsahují více barevného šumu a rovněž nebyly pořízeny při konzistentním nastavení parametrů expozice. Typ vstupního snímku se u této skupiny podařilo vždy automaticky rozpoznat.

8.1.1 Watershed

Jako první byl pro kvantifikaci tukových buněk nasazen segmentační algoritmus Watershed. Na základě provedených experimentů lze říci, že tato metoda v drtivé většině případů detekovala nižší počet buněk, než byl jejich skutečný stav. Tento jev je způsoben již popsaným problémem dotýkajících se adipocytů. V několika případech se však objevil opačný problém, kdy byla například segmentována oblast, která ovšem podle anotací tvoří dvě separátní buňky. Příklad těchto problémových míst ukazuje obrázek 17, kde jsou červeně odděleny buňky dle anotací. Oproti metodě Floodfill je Watershed několikanásobně rychlejší, detekce trvá v řádech několika sekund. Časově náročnější je až finální vyhodnocování obsažených tukových kapének pomocí MSER.

Obrázek 17: Příklad problémového místa s chybnou detekcí pomocí Watershed, ve snímku bez použití barviva (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)



Pro počty adipocytů získané ve formě anotací a pro hodnoty zjištěné algoritmem byl vypočítán korelační koeficient $R = 0,816$. Významnost této korelace také podtrhuje dosažená p -hodnota $p = 0,0251$. Provedením jednoduché lineární regrese byl vypočítán lineární model, který lze psát ve tvaru

$$\hat{y} = -3,220 + 1,259 \cdot x \quad (41)$$

Determinační koeficient udávající přesnost tohoto modelu je $R^2 = 0,6666$. Na základě této hodnoty lze říci, že vytvořený lineární model není příliš přesný, pokryje totiž přibližně 66,66 % zkoumané proměnné. Tento fakt je zapříčiněn nekonzistentností počtu detekovaných adipocytů napříč snímky, neboť horší vyrovnanost dosahovaných výsledků logicky vede k potřebě širšího pásma spolehlivosti. Rovnice (40) byla použita pro korekci výsledků získaných algoritmem. Získané hodnoty včetně intervalů spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 2. Rozsahy obou intervalů spolehlivosti zde vyšly široké, což spolu s koeficientem determinace podtrhuje nízkou přesnost tohoto lineárního modelu. Průměrná hodnota relativní chyby po provedené korekci činí $\bar{E} = 17,52$ %, její rozptyl je pak $\sigma^2 = 128,35$ %.

Tabulka 2: Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Watershed

Snímek	Anotace	Watershed	Po korekci	Relativní chyba %	95% od	95% do	99% od	99% do
DDE2, D21, 40x	92	52	62	32,33	41	83	48	76
DDE1, D21, 40x	89	65	79	11,66	52	105	61	96
DDE2, D21, 40x (2)	74	64	77	4,55	51	104	60	95
DDE2, D28, 40x	46	50	60	29,86	39	80	46	73
DDE3, D21, 40x	108	93	114	5,44	75	153	88	140
DDE3, D28, 40x	40	42	50	24,16	33	67	38	61
DMSO, D28, 40x	51	49	58	14,66	39	78	45	72

8.1.2 Floodfill

Tato metoda se rovněž potýkala se všemi výše popsanými kritickými jevy ve snímcích. Z tohoto důvodu se zde rovněž vyskytují všechny problémy, které se objevily u algoritmu Watershed. Zde je potřeba říci, že Floodfillem byl vždy detekován ještě nižší počet buněk, než tomu bylo předchozí testované techniky. Tato metoda je tedy více citlivá na špatně separovatelné bloby v obraze, což lze do jisté míry korigovat nastavením nižších přípustných rozdílů nových pixelů od seed pointu. V takovém případě pak zase algoritmus v rámci jednoho adipocytu detekuje několik buněk, což je způsobeno značnou nehomogenitou hledaných oblastí. Narazí-li tato metoda na výraznější změnu barvy, vytvoří v takovém místě hranici. Pro možné porovnání s Watershedem zachycuje obrázek 18 stejnou oblast, která byla vyobrazena na předchozí ukázce. Je zde jasně patrné zhoršení oproti Watershedu, neboť Floodfill zde spojil 5 adipocytů do jedné oblasti. Tato metoda je

také o poznání pomalejší, neboť vlastní metoda narůstání oblasti je volána pro každou potenciální buňku několikrát. Samotná iterovaná segmentace buněk došla k výsledku v čase kolem dvou minut.

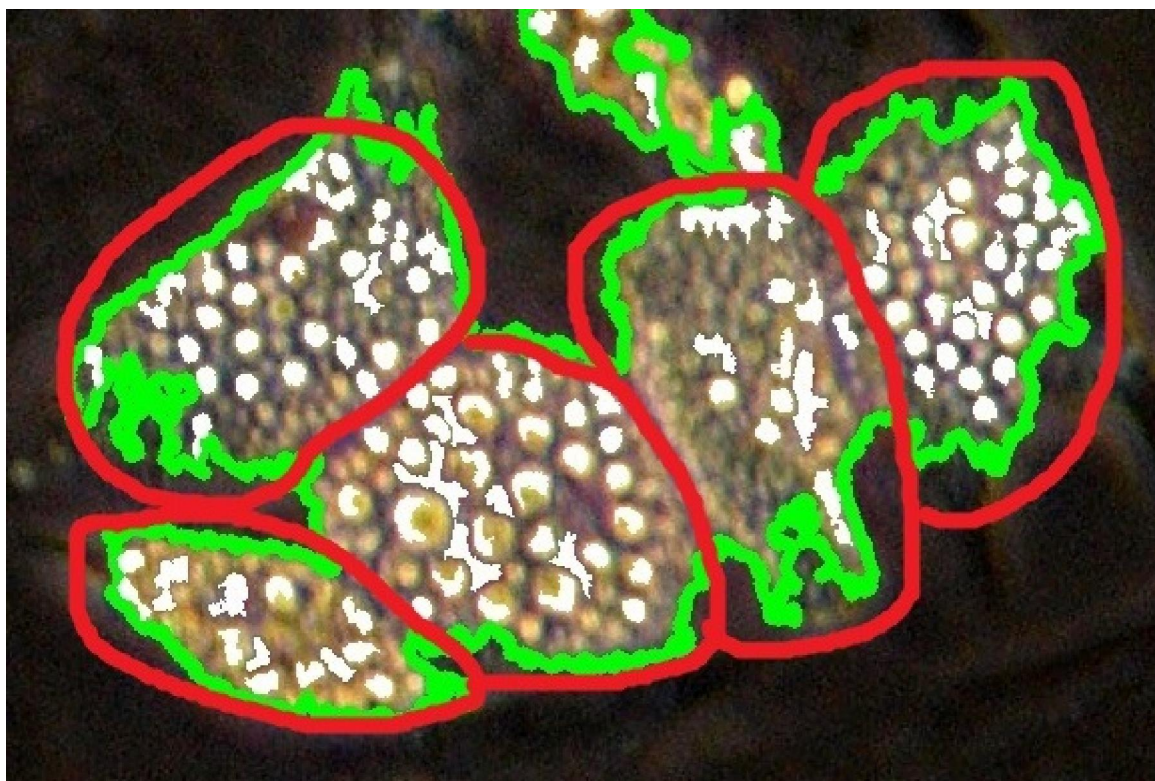
Při porovnání výsledků metody Floodfill s hodnotami získanými z odborného pracoviště LF UK v Plzni byl vypočten korelační koeficient $R = 0,5288$. Nižší hodnota zde značí menší míru korelace mezi těmito dvěma proměnnými u výsledku Watershedu. Stejně tak i vyšší dosažená p -hodnota $p = 0,2223$ v tomto případě nasvědčuje méně významné korelaci. Jednoduchou lineární regresí byly zjištěny koeficienty lineárního modelu, který lze následně zapsat ve tvaru

$$\hat{y} = -13,131 + 2,020 \cdot x \quad (42)$$

Pomocí něj můžeme následně provést korekci počtů adipocytů získaných metodou Floodfill. Determinační koeficient tohoto modelu je $R^2 = 0,2797$, takže lze říci, že přesnost aproximace proměnné je v tomto případě jen 27,97 %. Při porovnání s koeficientem získaným u algoritmu Watershed je tato hodnota méně než poloviční. Takto nízká přesnost je zapříčiněna jednak nevyrovnaností výsledků metody Floodfill a do jisté míry také nízkým počtem dat. U každé hodnoty s korekcí byly i zde vyčísleny 95% a 99% intervaly spolehlivosti, které vyšly ještě širší, než u předchozí metody. Toto je způsobeno vysokou nepřesností vytvořeného lineárního modelu. Průměrná hodnota relativní chyby je zde $\bar{E} = 28,78$ %, přičemž její rozptyl činí $\sigma^2 = 132,06$ %.

Na základě výše popsanych výpočtů lze říci, že Floodfill dosahuje na snímcích bez barviva horších výsledků než Watershed, jeho odchylka je v průměru o cca 9 % vyšší. Nízká přesnost lineárního modelu může být do jisté míry způsobena nízkým počtem aproximovaných hodnot, které byly méně konzistentní než u algoritmu Watershed. Počty buněk, provedenou korekcí, relativní chybu a stanovené intervaly spolehlivosti jsou přehledně zobrazeny v tabulce 3.

Obrázek 18: Příklad problémového místa s chybnou detekcí pomocí Floodfill, ve snímku bez použití barviva (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)



Tabulka 3: Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Floodfill

Snímek	Anotace	Floodfill	Po korekci	Relativní chyba %	95% od	95% do	99% od	99% do
DDE2, D21, 40x	92	45	78	15,46	51	105	60	96
DDE1, D21, 40x	89	40	68	23,96	44	91	52	83
DDE2, D21, 40x (2)	74	55	98	32,41	64	132	75	120
DDE2, D28, 40x	46	37	62	33,95	40	83	47	76
DDE3, D21, 40x	108	44	76	29,85	50	102	58	93
DDE3, D28, 40x	40	36	60	48,99	39	80	46	73
DMSO, D28, 40x	51	36	60	16,85	39	80	46	73

8.1.3 Detekce tukových kapének

Všechny zmíněné nedostatky týkající se této sady snímků negativně ovlivnily i počítání tukových kapének uvnitř buněk. U některých adipocytů není bez použití barvení zřetelný obsažený tuk. Jelikož se jedná o poměrně jemné detaily, je zde znát každá byť sebemenší neostrost snímku. Možnosti detekce zde negativně ovlivňuje i přítomný barevný šum, který je důsledkem nastavené vysoké citlivosti snímače fotoaparátu.

Na sadě 7 buněk byl vypočten koeficient korelace $R = 0,3285$. Tato hodnota svědčí o nízké míře korelace mezi získanými výsledky a ručně spočítanými kapénkami, kterou dokazuje i p -hodnota $p = 0,4719$. Provedením regresní analýzy byl vytvořen lineární model

$$\hat{y} = 58,9563 + 0,5396 \cdot x \quad (43)$$

Za použití tohoto modelu byla prováděna korekce zjištěného počtu tukových kapének, pro testování byla použita sada dalších sedmi obrázků. Nízkou přesnost aproximace dokládá determinační koeficient modelu, který s hodnotou $R^2 = 0,1079$ nasvědčuje pouze 10,79% přesnosti. Pro každý zjištěný počet kapének byly stanoveny opět 95% a 99% intervaly spolehlivosti, které vyšly dle očekávání velmi široké. Tento fakt dokazuje nižší přesnost detekce u neobarvených snímků. Dosažena byla průměrná hodnota relativní chyby $\bar{E} = 43,60 \%$, její rozptyl činí $\sigma^2 = 861,65 \%$. Metoda MSER tedy u této skupiny snímků detekovala po korekci většinou vyšší počet kapének, než jsou hodnoty uvedené v anotacích. Získané výsledky včetně intervalů spolehlivosti a chyb obsahuje tabulka 4.

Tabulka 4: Počty tukových kapének u neobarvených snímků, relativní chyba detekce, intervaly spolehlivosti

Snímek	Anotace	MSER	Po korekci	Relativní chyba v %	95% od	95% do	99% od	99% do
orig	62	42	82	31,65	10	153	34	130
orig 2	82	35	78	5,07	9	146	32	124
orig 3	43	32	76	77,27	9	143	31	121
orig 4	58	14	67	14,67	8	125	27	106
orig 5	139	58	90	35,07	11	170	37	143
orig 6	43	24	72	67,23	9	135	30	114
orig 7	49	49	85	74,28	10	161	35	136

8.2 Snímky obarvené pomocí Oil Red O

Barviva se v mikrobiologii používají pro usnadnění kvantifikace buněčných populací. Kolorant ORO obarví tuk obsažený v adipocytech na červenou, přičemž okolí buněk obsahující diferenciační roztok a zárodečné mezenchymální buňky zůstane modré. Výsledky naplnily očekávání, barevné odlišení tukových buněk výrazně zlepšilo kvalitu detekce. Nicméně i přesto se také u těchto snímků objevil problém dotýkajících se buněk, kdy algoritmus například spojil dvě natěsnané buňky v jednu. Tento jev se zde však vyskytoval v několikanásobně nižší míře, než tomu bylo u fotografií bez použití barviva. Zajímavostí je, že se zde v několika případech objevil problém zcela opačný, kdy dvě evidentně oddělené červené oblasti tvořily podle anotací jednu buňku. Algoritmus v takové

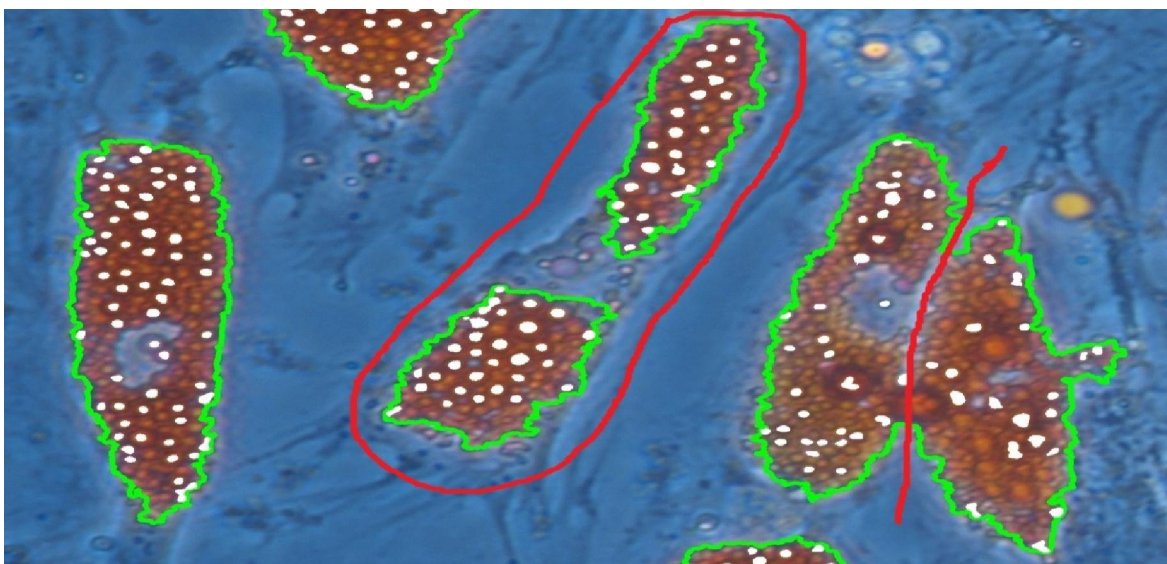
situaci logicky napočte dva adipocyty. Typ vstupního snímku byl i zde pokaždé správně rozpoznán na základě analýzy histogramu.

Pro tuto sadu testovacích snímků se podařilo získat počty buněk, které byly ve snímcích označeny jinou osobou, než která vytvořila anotace. Díky tomu lze provést zajímavé srovnání, a to jaké jsou odlišnosti mezi lidmi při ručním počítání. Pro tento účel je použita metoda Analysis of variance (ANOVA), která provede porovnání experimentů na základě rozptylů získaných hodnot. Výsledkem této analýzy je p -hodnota, která udává, míru odlišnosti mezi testovanými sadami dat. Vyjde-li p -hodnota velmi nízká (např. nižší než 0,05), dalo by se říci, že výsledky experimentů se významně liší.

8.2.1 Watershed

Jako první byl opět testován algoritmus Watershed. Barevná odlišnost buněk umožnila kvalitnější vytvoření markerů, díky čemuž zde dochází k nižší chybovosti než u neobarvených snímků. Odchyly oproti výsledkům ručního počítání se pohybují v řádech jednotek buněk. Ke spojení více buněk v jednu dochází jen v takových případech, kdy jsou tyto oblasti skutečně vzájemně propojeny. Pokud náleží dvě jasně separované obarvené oblasti jedné buňce, detekuje algoritmus chybně dvě buňky, nicméně laickým okem není možné tento problém odhalit. Ukázkou těchto problémových jevů znázorňuje obrázek 19. Co se rychlosti algoritmu týče, trvá i zde segmentace pomocí Watershedu několik sekund. V porovnání s dosahovanými časy u nebarvených snímků je zde patrné zpoždění v řádech jednotek sekund, které je způsobeno o 4 megapixely vyšším rozlišením fotografií.

Obrázek 19: Ukázka míst s chybnou detekcí buněk, algoritmus Watershed, snímky obarvené pomocí ORO (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)



Lepší dosahované výsledky podtrhuje i vyšší korelační koeficient $R = 0,9879$, který byl vypočítán při porovnání detekovaných počtů a dat získaných ve formě anotací. Oproti předchozím dvěma případům je zde jasně vidět vyšší míra korelace, i vypočtená p -hodnota $p = 0,0000304$ je několikanásobně nižší než v předchozích případech. Jednoduchou lineární regresí byly vypočteny koeficienty lineárního modelu, který má po dosazení tvar

$$\hat{y} = -3,3185 + 1,0923 \cdot x \quad (44)$$

Pomocí této rovnice byla následně provedena korekce odhadovaných počtů buněk v jednotlivých snímcích. Přesnost vytvořeného modelu hodnotí koeficient determinace $R^2 = 0,9760$. Lze tedy říci, že dosažená přesnost aproximace počtů buněk je 97,6 %, což je oproti snímkům bez použití barviva výrazně lepší výsledek. Ke každému počtu buněk s provedenou korekcí byly také vyčísleny 95% a 99% intervaly spolehlivosti, které mají vzhledem k vyšší přesnosti lineárního modelu užší rozsah. Průměrná relativní chyba odhadu byla zjištěna $\bar{E} = 5,03$ %, její rozptyl pak činí $\sigma^2 = 20,76$ %. Počty buněk před a po korekci, relativní velikost chyby a intervaly spolehlivosti jsou zobrazeny v tabulce 5.

U této metody bylo dále provedeno porovnání s druhou sadou „ručně“ zjištěných počtů buněk. Následně byly vyčísleny relativní chyby mezi výsledky algoritmu a oběma sadami hodnot napočítaných člověkem, stejně tak mezi dvěma různými osobami navzájem. Metodou ANOVA bylo provedeno porovnání výsledků, přičemž byla vypočtena p -hodnota $p = 0,59$. Vzhledem k její poměrně vysoké hodnotě nelze říci, že mezi počty buněk zjištěnými člověkem a výsledky algoritmu existuje statisticky významná odlišnost. Analyzované počty buněk jsou zobrazeny v tabulce 6.

Tabulka 5: Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Watershed

Snímek	Anotace	Watershed	Po korekci	Relativní chyba %	95% od	95% do	99% od	99% do
D28, 40x (2)	33	37	37	12,41	32	42	34	40
D28, 40x (3)	35	36	36	2,87	31	36	36	39
D21, 20x (2)	80	76	80	0,38	69	80	80	87
D28, 40x (1)	39	40	40	3,52	35	40	40	44
D21, 40x (1)	37	34	34	8,60	29	34	34	37
D21, 20x (1)	47	46	47	0,15	41	47	47	51
D21, 40x (2)	40	37	37	7,26	32	37	37	40

Tabulka 6: Porovnání výsledků a chybovosti algoritmu Watershed s počty buněk zjištěnými dvěma různými osobami

Anotace 1	Po korekci	Anotace 2	Anotace 1 / Po korekci %	Anotace 2 / Po korekci %	Anotace 1 / Anotace 2 %
33	37	35	12,41	5,99	6,06
35	36	38	2,87	5,25	8,57
80	80	82	0,38	2,81	2,50
39	40	37	3,52	9,12	5,13
37	34	36	8,60	6,06	2,70
47	47	44	0,15	6,65	6,38
40	37	41	7,26	9,52	2,50
Průměr			5,03	6,49	4,84
Rozptyl			20,76	5,27	5,57

8.2.2 Floodfill

I u této metody došlo použitím barviva ORO k rapidnímu zlepšení dosahovaných výsledků, odchylky od anotací jsou opět v řádech jednotek buněk. Ve většině případů měla metoda Floodfill tendence detekovat mírně nižší počet adipocytů, než kolik se jich ve snímku opravdu vyskytovalo. Kritické byly opět situace s dotýkajícími se buňkami, stejně tak byly chybně napočteny dvě obarvené oblasti, které však dohromady náleží jedné buňce. Tyto jevy jsou patrné na obrázku 20, který nabízí pohled na stejnou část snímku jako obrázek 19 u algoritmu Watershed. Z hlediska rychlosti se zde více prohlubuje rozdíl oproti algoritmu Watershed, což je způsobeno opakovaným „voláním“ funkce Floodfill a také vyšším rozlišením těchto snímků.

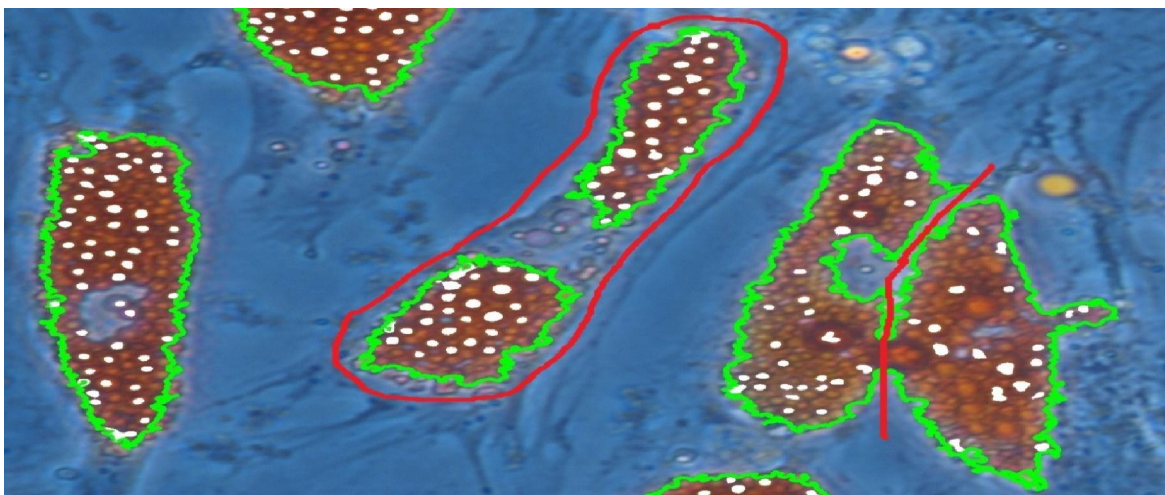
Mezi hodnotami anotací a počty získanými touto metodou byl vypočten korelační koeficient $R = 0,9681$. Oproti nebarveným snímkům je korelace výrazně vyšší, což potvrzuje i p -hodnota $p = 0,000343$. Nicméně algoritmus Watershed dosahuje o něco lepších hodnot. Po provedení jednoduché lineární regrese byla s pomocí vypočtených koeficientů sestavena rovnice modelu, která má po dosazení podobu

$$\hat{y} = -3,2766 + 1,1475 \cdot x \quad (45)$$

Na základě tohoto modelu byla provedena korekce počtu detekovaných buněk. Koeficient determinace tohoto modelu je $R^2 = 0,9372$, tudíž lze říci, že přesnost aproximace činí 93,72 %. V porovnání s algoritmem Watershed je však mírně nižší, což je zapříčiněno méně vyrovnanými výsledky testované metody. Průměrná velikost relativní chyby je $\bar{E} = 7,87 \%$, její rozptyl byl vyčíslen na hodnotu $\sigma^2 = 48,56 \%$. Šířky obou intervalů spolehlivosti zde vyšly podobné jako u metody Watershed. Počty buněk před a po korekci,

včetně relativních chyb a intervalů spolehlivosti jsou obsaženy v tabulce 6. Průměrná hodnota chyby je u této metody mírně vyšší než u Watershedu (cca o 2 %), má zároveň vyšší rozptyl.

Obrázek 20: Ukázka míst s chybnou detekcí buněk, algoritmus Floodfill, snímky obarvené pomocí ORO (zeleně výsledek, červeně chyba, bíle tukové kapénky)



I zde bylo provedeno porovnání s výsledky ručního počítání provedeného další osobou. Na vyčíslené relativní chyby mezi všemi sadami počtů buněk navzájem byla poté provedena ANOVA, jejímž výsledkem je p -hodnota $p = 0,40$. U metody Floodfill tedy nelze říci, že existuje významná odlišnost mezi výsledky algoritmu a ručně zjištěnými počty adipocytů. Vzhledem k tomu, že počty získané člověkem zůstaly neměnné, nasvědčuje p -hodnota nižší dosažené přesnosti detekce než u předchozího algoritmu. Porovnání všech relativních chyb je zobrazeno v tabulce 8.

Tabulka 7: Počty buněk, 95% a 99% intervaly spolehlivosti a relativní velikost chyby, metoda Floodfill

Snímek	Anotace	Floodfill	Po korekci	Relativní chyba v %	95% od	95% do	99% od	99% do
D28, 40x (2)	33	37	39	18,73	31	47	34	45
D28, 40x (3)	35	35	37	5,39	29	45	32	42
D21, 20x (2)	80	71	78	2,26	62	95	67	89
D28, 40x (1)	39	37	39	0,00	31	47	34	45
D21, 40x (1)	37	33	35	6,51	27	42	30	39
D21, 20x (1)	47	46	50	5,34	39	60	43	56
D21, 40x (2)	40	32	33	16,39	26	40	29	38

Tabulka 8: Porovnání výsledků a chybovosti algoritmu Floodfill s počty buněk zjištěnými dvěma různými osobami

Anotace 1	Po korekci	Anotace 2	Anotace 1 / Po korekci %	Anotace 2 / Po korekci %	Anotace 1 / Anotace 2 %
33	37	35	18,73	11,95	6,06
35	36	38	5,39	2,93	8,57
80	80	82	2,26	4,64	2,50
39	40	37	0,46	5,89	5,13
37	34	36	6,51	3,91	2,70
47	47	44	5,34	12,52	6,38
40	37	41	16,39	18,43	2,50
Průměr			7,87	8,61	4,84
Rozptyl			48,56	33,38	5,57

8.2.3 Detekce tukových kapének

Podobně jako u samotné kvantifikace buněk, i zde bylo u snímků s použitím barviva ORO dosaženo přesnějších výsledků. Vyšší úspěšnost lze přičíst jak vhodnějšímu nastavení fotoaparátu, které vede ke kvalitnějším snímkům, tak i použitému kolorantu. Ten totiž obarví přímo tuk obsažený v adipocytech, takže přítomné kapénky jsou snáze detekovatelné. Nedochozí tak k vysoké variaci barev uvnitř buňky.

Při porovnání referenčních hodnot se získanými počty kapének byl vypočten korelační koeficient $R = 0,9218$, což značí vyšší závislost mezi těmito dvěma proměnnými než u první sady snímků. Tomuto tvrzení nasvědčuje i vypočtená p -hodnota $p = 0,0032$. Provedením regresní analýzy byly vypočteny koeficienty lineárního modelu, který má podobu

$$\hat{y} = 28,2782 + 0,7318 \cdot x \quad (46)$$

Hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,8498$ znamená několikanásobně vyšší přesnost vytvořeného modelu, než tomu bylo u nebarvených snímků. Rovnice (45) byla použita pro korekci získaných výsledků, přičemž průměrná velikost dosažené relativní chyby činí $\bar{E} = 26,77\%$ s rozptylem $\sigma^2 = 515,60\%$. V tomto případě tedy MSER většinou detekuje o cca 17% přesnější počet tukových kapének než u neobarvených snímků. Přehled všech hodnot obsahuje tabulka 9, u každého počtu jsou uvedeny 99% a 95% intervaly spolehlivosti, které jsou díky přesnějšímu lineárnímu modelu užší než u snímků bez použití barviva.

Tabulka 9: Počty tukových kapének u obarvených snímků s ORO, relativní chyba detekce, intervaly spolehlivosti

Snímek	Anotace	MSER	Po korekci	Relativní chyba v %	95% od	95% do	99% od	99% do
oro	84	57	70	16,68	22	118	38	102
oro 2	72	14	39	46,50	12	65	21	56
oro 3	95	32	52	45,58	16	87	28	75
oro 4	57	38	56	1,60	18	94	31	82
oro 5	54	31	51	5,62	16	86	28	74
oro 6	35	37	55	58,15	18	93	30	80
oro 7	95	74	82	13,23	26	139	45	120

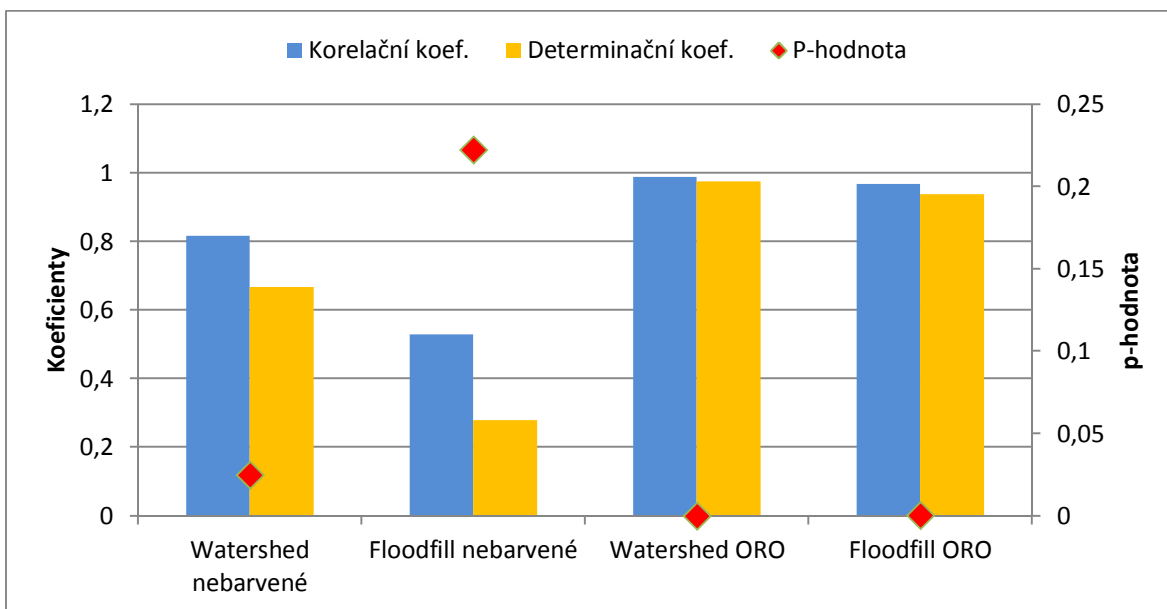
8.3 Shrnutí

Ze získaných výsledků je evidentní, že použití barviva ORO značně zvyšuje úspěšnost kvantifikace adipocytů a obsažených tukových kapének. U této sady snímků bylo díky obarvení dosaženo téměř 4x nižší chybovosti. Tuto skutečnost dokazují vypočtené korelační koeficienty a koeficienty determinace lineárních modelů, které jsou u sady s obarvenými snímky vyšší (viz graf 1). Pokud se zaměříme na úspěšnost obou použitých algoritmů, vychází lépe ze srovnání Watershed. Jeho výsledky mají nižší odchylku od referenčních hodnot, navíc jsou více vyrovnané. U obou skupin snímků má také tato metoda vyšší koeficienty determinace a korelace, což je patrné z grafu 1. Nejnižší dosažená chybovost u neobarvených snímků je 17,52 %, při použití barviva ORO pak činí 5,03 %.

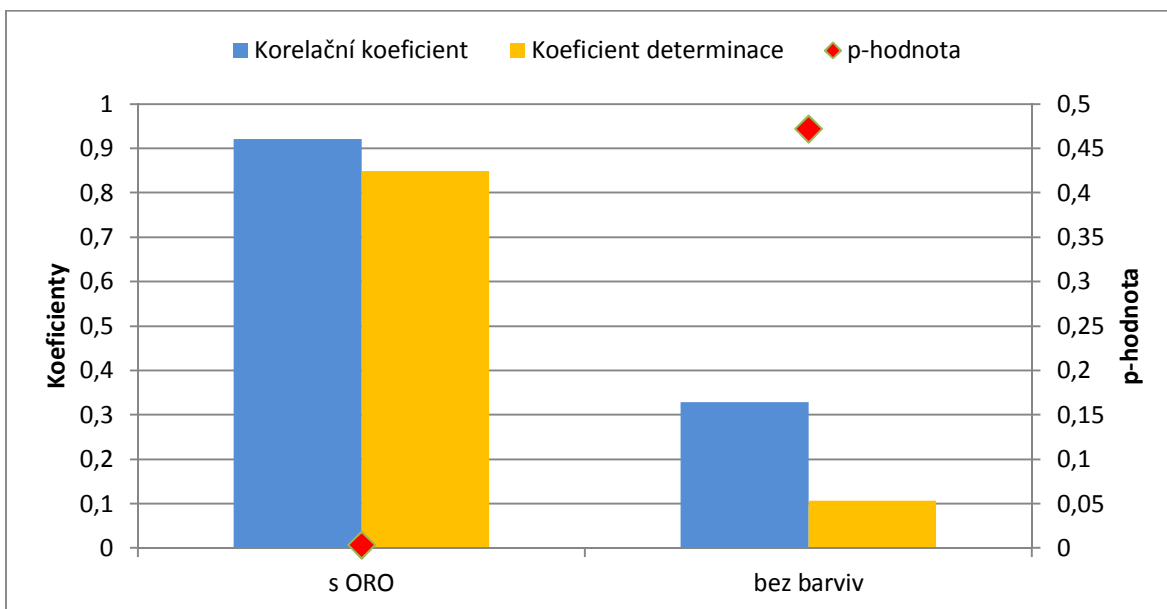
Kromě počtu buněk jsou kvantifikovány i obsažené tukové kapénky, pro tento účel je použita metoda MSER. I v tomto případě platí, že získané výsledky jsou přesnější u skupiny s obarvenými adipocyty. U neobarvených snímků bylo touto metodou dosaženo velmi nízké přesnosti, čemuž nasvědčují i vypočtené koeficienty korelace a determinace (viz graf 3). Chybovost u neobarvených snímků činí 43,60 %, při použití barviva ORO pak 26,77 %. Ukázky segmentovaných obrazů lze vidět v příloze 8.

Bohužel, jak již bylo uvedeno, výsledky jsou do jisté míry zkresleny malým počtem testovacích dat. Vytvořené lineární modely byly testovány na stejných snímcích, které byly použity pro samotnou lineární regresi. Otázkou tedy zůstává, jak moc se budou výsledky odlišovat na nových fotografiích.

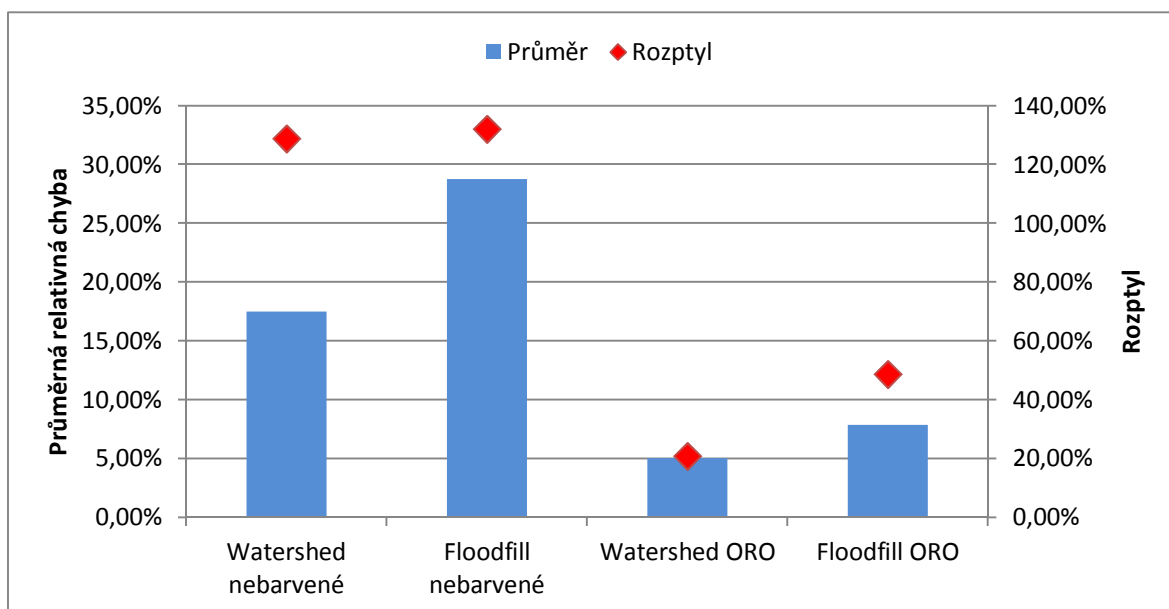
Graf 1: Porovnání koeficientů korelace a determinace jednotlivých metod, včetně p-hodnot při kvantifikaci buněk



Graf 2: Porovnání koeficientů korelace a determinace jednotlivých metod, včetně p-hodnot při kvantifikaci tukových kapének metodou MSER



Graf 3: Porovnání průměrných relativních chyb algoritmů a jejich rozptylů



9 ZÁVĚR

Tato práce je věnována kvantifikaci buněk v mikroskopických snímcích za použití metod počítačového vidění. Konkrétně je úkolem navrhnout algoritmus schopný spočítat diferencované tukové buňky, čili adipocyty. Počet buněk je jednou z charakteristik, které jsou sledovány v rámci výzkumu působení toxických polutantů na organismus. Poslední výzkumy ukazují, že tuková tkáň je největším endokrinním orgánem lidského těla, a protože u dospělého jedince může tvořit až 30 % tělesné hmotnosti, může fungovat jako významný depozit pro POPs. Tyto toxické látky mohou negativně ovlivňovat genovou expresi a diferenciaci adipocytů, což může vést k celé řadě vážných onemocnění. Nekontrolovaná diferenciacie tukových buněk může způsobit obezitu a zapříčinit vznik onemocnění s ní spojených, například cukrovky. Ovlivněná genová exprese zase může podporovat nádorová bujení. Automatická kvantifikace buněk by mohla napomoci při výzkumu účinků POPs na organismus.

V kapitole 5 jsou popsány používané techniky pro počítání buněk, a to včetně metod založených na zpracování obrazu. Po provedení této analýzy je zde navržen algoritmus pro automatickou kvantifikaci buněk s použitím metod počítačového vidění. Jeho implementace je provedena v jazyce Python za použití knihovny OpenCV. Tento program vytvoří pro každý vstupní obraz textový soubor, obsahující informace o počtu přítomných tukových buněk a jejich velikostí. Dále je u každého adipocytu popsán počet obsažených tukových kapének včetně velikostí. Algoritmus je následně otestován na dvou sadách testovacích dat, první je tvořena fotografiemi bez použití barviva a druhá obsahuje buňky obarvené pomocí ORO. Výsledky jsou poté statisticky vyhodnoceny. Na základě výše uvedeného lze říci, že stanovené cíle diplomové práce byly splněny.

Pro účely segmentace mikroskopických snímků jsou v této práci použity algoritmy Watershed a Floodfill. U první skupiny získaných dat nebylo použito žádného kolorantu pro usnadnění segmentace adipocytů, proto zde byla detekce poměrně problematická. Docházelo ke spojování více buněk vlivem těžko detekovatelných hranic hledaných oblastí, nebo naopak k rozdělení buňky kvůli přílišné rozdílnosti obsažených barev. Druhá část obdržených testovacích fotografií obsahuje buňky obarvené na červeně pomocí ORO, což významně zvýšilo přesnost detekce buněk (viz graf 3). Tento fakt dokazuje i porovnání korelačních koeficientů a koeficientů determinace vytvořených lineárních modelů. Pokud se zaměříme na jednotlivé metody, vychází ze srovnání nejlépe Watershed (viz grafy 1,3). Přestože u obarvených snímků není mezi uvedenými technikami markantní rozdíl, jeví se

zmíněná metoda jako o poznání rychlejší. Podává také nejvyrovnanější výsledky a dosahuje nižší chybovosti. Bohužel výsledky jsou do jisté míry zkresleny nedostatkem testovacích dat, kvůli kterému bylo možné po provedení lineární regrese testovat metody jen na datech, které byly použity k výpočtu lineárních modelů. Je možné, že na dalších datech by se rozdíl mezi algoritmy prohloubily. Další snímky budou k dispozici v průběhu června 2015.

Nad rámec zadání této práce byla dále navržena metoda pro detekci tukových kapének obsažených v adipocytech. Jejich počet a velikost jsou také jednou ze sledovaných charakteristik při porovnávání jednotlivých populací adipocytů. K tomuto účelu je použita metoda MSER, která byla původně testována pro segmentaci celých buněk, ale detekovala právě obsažené tukové kapénky. Jak nasvědčují vypočtené statistické ukazatele, i zde je diametrální rozdíl mezi fotografiemi s barvivem ORO a bez něj. Úspěšnost detekce byla u obarvených snímků několikanásobně vyšší (viz graf 2), v kombinaci s použitím kolorantu lze uvedené metody použít pro automatickou kvantifikaci buněk. Hlavní přínos této práce spočívá v návrhu algoritmu schopného automatické kvantifikace tukových buněk. Tato činnost je prozatím prováděna ručně, nejčastěji za použití některého typu počítačích komůrek. Tento způsob počítání je však časově poměrně náročný a zatěžuje výzkumné pracovníky. Použití metod počítačového vidění je rychlé a v porovnání s ostatními způsoby kvantifikace také méně nákladné.

Jako námět pro další práci do budoucna může být otestování navržených metod na větším počtu snímků a případné poupravení modelů pro přesnější aproximaci. Protože další sady snímků budou k dispozici z několika populací s působícími polutanty, bude možné provést experimenty s cílem nalézt automaticky odlišnosti mezi těmito skupinami buněk. Stejně tak by bylo zajímavé porovnat výsledky algoritmu s počty buněk od více osob, neboť i člověk se při počítání dopouští určité chybovosti. V tomto ohledu stojí výhoda na straně počítače, který poskytuje konzistentní výsledky. Za zvážení by také stálo vyzkoušení jiného typu barviva, například hematoxylin – eosin (HE). Hematoxylin je bazická složka, která obarví buněčná jádra na modrofialový odstín, zatímco eosin je kyselé barvivo, které dodá okolní cytoplazmě růžovou barvu. Obarvení jader by umožnilo analyzovat počet diferencovaných adipocytů oproti celkovému množství původních mezenchymálních buněk. Další možností je vytvoření rozhraní GUI pro intuitivní používání programu. Jistý potenciál spočívá také v naprogramování pluginu pro program ImageJ, který je v současnosti hojně používán pro analýzu mikrobiologických obrazových dat, ovšem neumožňuje plně automatickou kvantifikaci adipocytů.

Používání celé řady perzistentních organických polutantů již sice bylo na základě několika mezinárodních úmluv zakázáno, jejich koncentrace v životním prostředí je však stále vysoká. Pokud se podaří co nejpřesněji odhalit mechanismy, kterými tyto látky negativně ovlivňují organismus, bude možné snáze předcházet mnoha onemocněním jako důsledku působení těchto látek. V tomto ohledu je podle mě vhodné uvést tento citát:

„Zdraví není vším, ale bez zdraví je všechno ničím.“

Arthur Schopenhauer

Literatura

- [AMA14] AMANDEEP KAUR, Aayushi. Image Segmentation Using Watershed Transform. *International Journal of Soft Computing*. 2014, roč. 4, č. 1. Dostupné z: <http://www.ijscce.org/attachments/File/v4i1/A2060034114.pdf>
- [BEL09] BELAID, Lamia Jaafar a Walid MOUROU. IMAGE SEGMENTATION: A WATERSHED TRANSFORMATION ALGORITHM. *Image Analysis*. 2009, roč. 28, č. 2, s. 93-102. DOI: 10.5566/ias.v28.p93-102. Dostupné z: <http://www.ias-iss.org/ojs/IAS/article/view/852>
- [BEN04] BENGSSON, Ewert, Carolina WÄHLBY a LINDBLAD. Robust Cell Segmentation Methods. *Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications*. 2004, roč. 14, č. 2, s. 157-167. Dostupné z: http://www.cb.uu.se/~carolina/web_ims/Bengtsson_PRIA_2004.pdf
- [BRA08] BRADSKI, Gary R a Adrian KAEHLER. *Learning OpenCV*. Sebastopol: O'Reilly, 2008, xvii, 555 s. ISBN 978-0-596-51613-0.
- [BRA13] BRAHMBHATT, Samarth. *Practical opencv*. New York, NY: Apress, 2013. ISBN 978-143-0260-790.
- [CAR01] CARDANI, Darrin. Adventures in HSV Space. *The advanced Developers Hands on Conference July 2001* [online]. 2001, č. 1 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://132.68.58.138/labs/anat/hsvspace.pdf>
- [COU12] Coulter Counter. BECKMAN COULTER, Inc. *Beckman Coulter* [online]. 2012 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <https://www.beckmancoulter.com/>
- [ČER12] ČERNÁ, Milena. Zátěž české populace POPs. In: *GENASIS* [online]. Státní zdravotní ústav, 2012 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.genasis.cz/index.php?pg=publikace--narodni-inventura-pops--narodni-inventura-pops-2007--zatez-ceske-populace-pops>
- [DEL11] DEL BIMBO, Alberto. Region detectors. In: *Media Integration and Communication Center* [online]. University of Florence, 2011 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: http://www.micc.unifi.it/delbimbo/wp-content/uploads/2011/03/slide_corso/A34%20MSER.pdf

- [DON06] DONOSER, Michael a BISCHOF. 2006. *Efficient Maximally Stable Extremal Regions (MSER) Tracking* [online]. (1) [cit. 2015-05-13]. Dostupné z: http://www.icg.tu-graz.ac.at/publications/pdf/docvpr2006.pdf/at%20_download/file
- [ECK99] ECKSCHLAGER, Tomáš. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada-Avicenum, 1999, 169 s. ISBN 80-716-9279-4.
- [EFS15] EFSA Topic: Bisphenol A. EFSA. *European Food Safety Authority* [online]. 2015 [cit. 2015-03-29]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm>
- [GRE10] GREENSTED, Andrew. Otsu Thresholding - The Lab Book Pages. *The Lab Book Pages: An online collection of electronics information* [online]. 2010 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://www.labbookpages.co.uk/software/imgProc/otsuThreshold.html>
- [HAL08] HALUZÍK, Martin. Hormony tukové tkáně. *Postgraduální medicína*. Brno: Státní archiv v Brně, 2008, roč. 10, č. 6, 625 - 630. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/hormony-tukove-tkane-369037>
- [HEM12] Hemocytometer (Counting of Cells). AMRITA VISHWA VIDYAPEETHAM UNIVERSITY. *Amrita Vishwa Vidyapeetham Virtual Lab* [online]. 2012 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=188&sim=336&cnt=1>
- [HEM13] Hemocytometer square size. *Hemocytometer* [online]. 2013 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://www.hemocytometer.org/2013/04/11/hemocytometer-square-size/>
- [HOU14a] HOUDOVÁ, Lucie. Buňka a membránový potenciál: BIO/ZS [online]. ZČU v Plzni: Katedra kybernetiky, 2014, 18 s. [cit. 25.2.2015]. Dostupné z: [http://www.kky.zcu.cz/uploads/courses/bio/3.Bunecne signaly a MP.zip](http://www.kky.zcu.cz/uploads/courses/bio/3.Bunecne%20signaly%20a%20MP.zip)
- [HOU14b] HOUDOVÁ, Lucie. Základy neurofyziologie: BIO/ZS [online]. ZČU v Plzni: Katedra kybernetiky, 2014, 18 s. [cit. 28.2.2015]. Dostupné z: <http://www.kky.zcu.cz/uploads/courses/bio/2.Neurofyziologie.zip>

- [HRÚ14] HRÚZ, Marek. Adaptive Histogram Equalization, Histogram processing and Convolution. In: *Metody Počítačového Vidění (MPV)* [online]. ZČU Plzeň, 2004 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: http://www.kky.zcu.cz/uploads/courses/mpv/01/lesson01_materials.pdf
- [HUG13] HUGHES, John F. *Computer graphics: principles and practice*. 3rd ed. Upper Saddle River: Addison-Wesley, 2013, xlvii, 1209 s. ISBN 978-0-321-39952-6.
- [JUN97] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O KELLEY. *Základy histologie*. 1. vyd. v ČR. Jinočany: H & H, 1997, 502 s. ISBN 8085787377.
- [KIN12] KIND, Tobias. Automatic cell counting: Image Processing Software. PLONE FOUNDATION. *Metabolomics Fiehn Lab* [online]. 2012, 2015 [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Collector/Cell_Counting
- [KON00] KONRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 291 s. ISBN 8086022803.
- [KRU06] KRUŽÍK, Pavel. Analyzátoř buněk a částic. *In vitro diagnostika: Informační magazín*. 2006, č. 3, s. 4-6. Dostupné z: <http://www.beckman.cz/Media/Default/IVD/IVD%202006-03.pdf>
- [KUŽ12] KUŽÍLEK, Vladimír. Výskyt POPs v hydrosféře. In: *GENASIS* [online]. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, 2012 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.genasis.cz/index.php?pg=publikace--narodni-inventura-pops--narodni-inventura-pops-2007--vyskyt-pops-v-hydrosfere>
- [LAG11] LAGANIÉRE, Robert. *OpenCV 2 computer vision application programming cookbook: over 50 recipes to master this library of programming functions for real-time computer vision*. 1st ed. Brimingham: Packt Publishing, 2011, iii, 287 s. Quick Answers to Common Problems. ISBN 978-1-84951-324-1.
- [LAN09] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 320 s. ISBN 9788024725260.

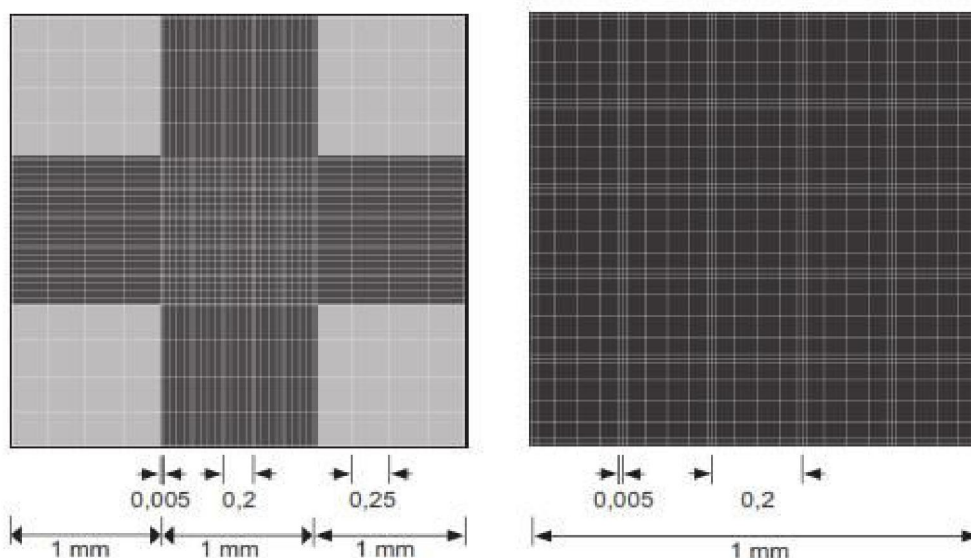
- [LÜL12] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vyd. Překlad Radomír Čihák. Praha: Grada, 2012, xx, 556 s. ISBN 978-802-4737-294.
- [LYS10] LYSENKOV, Ilya. MSER detector is missing keypoints on binary images (Bug #756). In: *OpenCV - WikiStart - OpenCV DevZone* [online]. 2010, 2012 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://code.opencv.org/issues/756>
- [MAC07] MACEY, Marion G. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007, s. 257-276. ISBN 1597454516.
- [MAT02] MATAS, J., O. CHUM, M. URBAN a T. PAJDLA. Robust Wide Baseline Stereo from Maximally Stable Extremal Regions. *Proceedings of the British Machine Vision Conference 2002: Advances in Mathematical Theory and Applications*. British Machine Vision Association, 2002, roč. 14, č. 2, 36.1-36.10. DOI: 10.5244/C.16.36. Dostupné z: <http://www.bmva.org/bmvc/2002/papers/113/index.html>
- [MÜL07] MÜLLEROVÁ, Dana a Jan KOPECKÝ. White Adipose Tissue: Storage and Effector Site for Enviromental Pollutants. In: *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. Praha: Institut fyziologie, Akademie věd České republiky, 2007, s. 375-381. ISSN 0862-8408. Dostupné z: http://biomed.cas.cz/physiolres/pdf/56/56_375.pdf
- [MÜL09] MÜLLEROVÁ, Dana. *Obezita - prevence a léčba*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2009, 261 s. ISBN 978-802-0421-463.
- [NAT13] NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *ImageJ* [online]. Maryland: NIH, 2013 [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>
- [PAR13] PARRY, Nicola. Don't See Red! Use Oil Red O: A Histological Stain For Fats And Lipids. In: *Bitesize Bio: Brain Food for Biologists* [online]. 2013 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://bitesizebio.com/13443/dont-see-red-use-oil-red-o-a-histological-stain-for-fats-and-lipids/>

- [RAM10] RAMOS, Oscar E a Babak REZAEI. Scene Segmentation and Interpretation: Image Segmentation using Region Growing. In: *Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes* [online]. Girona, 2010 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://homepages.laas.fr/oramos/files/UdG/Image Segmentation_RegionGrowing.pdf
- [ROS14] ROSENBROCK, Adrian. *Practical Python and OpenCV: An Introductory, Example Driven Guide to Image Processing and Computer Vision*. Baltimore, Maryland area: PyImageSearch, 2014. ISBN neuvedeno.
- [SUT06a] SUTTON, Scott. Counting colonies. *PMF Newsletter*. 2006, roč. 12, č. 1. Dostupné z: <http://www.microbiol.org/resources/monographwhitepapers/counting-colonies/>
- [SUT06b] SUTTON, Scott. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. *PMF Newsletter*. 2006, roč. 12, č. 8, s. 3-6. Dostupné z: <http://www.microbiologyforum.org/content/file/PMFNews.12.08.0608.pdf>
- [SUT11] SUTTON, Scott. Accuracy of Plate Counts. *Journal of Validation Technology*. 2011, roč. 17, č. 3. Dostupné z: http://www.microbiol.org/wp-content/uploads/2010/07/Sutton.jvt_.2011.17_3.pdf
- [SVA10] SVAČINA, Štěpán. *Poruchy metabolismu a výživy*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010, xxii, 505 s. ISBN 978-807-2626-762.
- [ŠED11] ŠEDIVÁ, Blanka, PATRICE, Tomáš ŤOUPAL a Eva WAGNEROVÁ. 2011. Pravděpodobnost a statistika pro FEL. *Osobní stránky Blanka Šedivá* [online]. Plzeň: ZČU [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: http://home.zcu.cz/~sediva/pse/hlavni_text_PSE.pdf
- [ŠIN08] ŠINKOROVÁ, Zuzana a Lenka ZÁRYBNICKÁ. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda 1. část. *Vojenské zdravotnické listy*. 2008, LXXVII, č. 3, s. 98-103. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/vzl3_2008/05-%C5%A1inkorov%C3%A1.pdf

- [ŠON08] ŠONKA, Milan, Václav HLAVÁČ a Roger BOYLE. *Image processing, analysis, and machine vision*. 3rd ed. Toronto: Thomson, 2008, xxv, 829 s. ISBN 978-0-495-08252-1.
- [ŠTE09] ŠTERN, Pavel. Základové metody, turbidimetrie, nefelometrie. In: *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2009 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/AJDPD.htm>

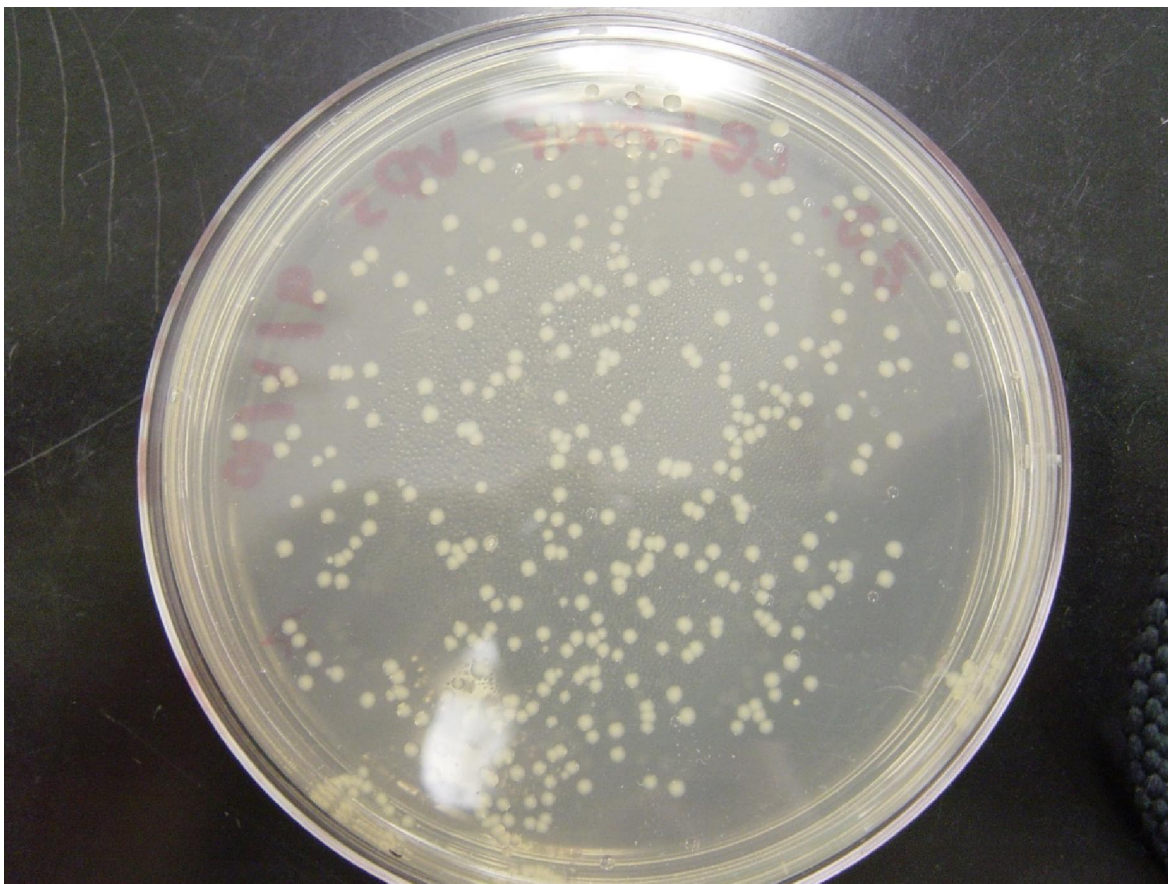
Přílohy

Příloha 1: Příklad Neubauerovy počítací komůrky



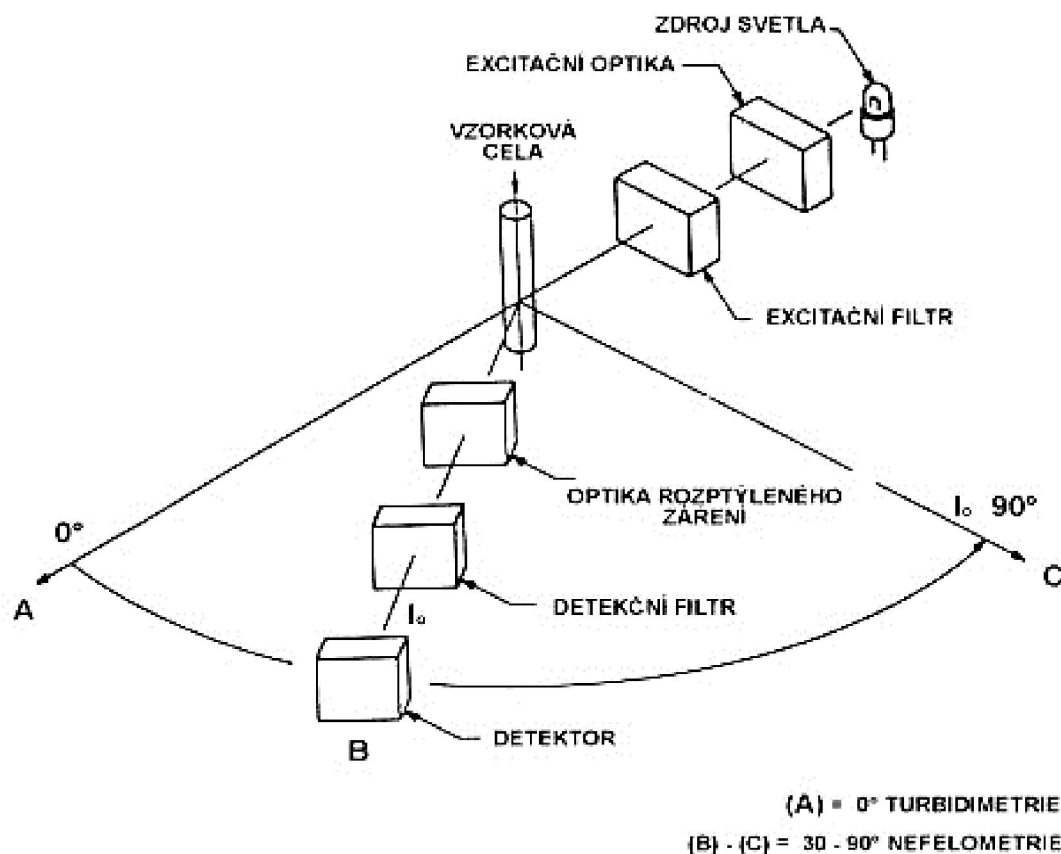
Zdroj: Neubauer Sperm counting chamber and coverslips. 2014. , Tek-Event Pty Ltd. Tekevent [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.tekevent.com/counting-chambers/neubauer-sperm-counting-chamber/>

Příloha 2: Ukázka jednotek tvořících kolonie



Zdroj: KUMAR M, Ajith. 2014. CFU: Colony Forming Unit & Calculation. *Bio-Resource* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://technologyinscience.blogspot.cz/2011/11/cfu-colony-forming-unit-calculation.html#.VU8CnFJcNKO>

Příloha 3: Porovnání turbidimetrie a nefelometrie



Zdroj: VÁVROVÁ, Jaroslava. 2015. Turbidimetrie. *Datový standard MZ ČR - verze 4* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVABV.htm>

Příloha 4: Coulterův čítač Z2 Coulter



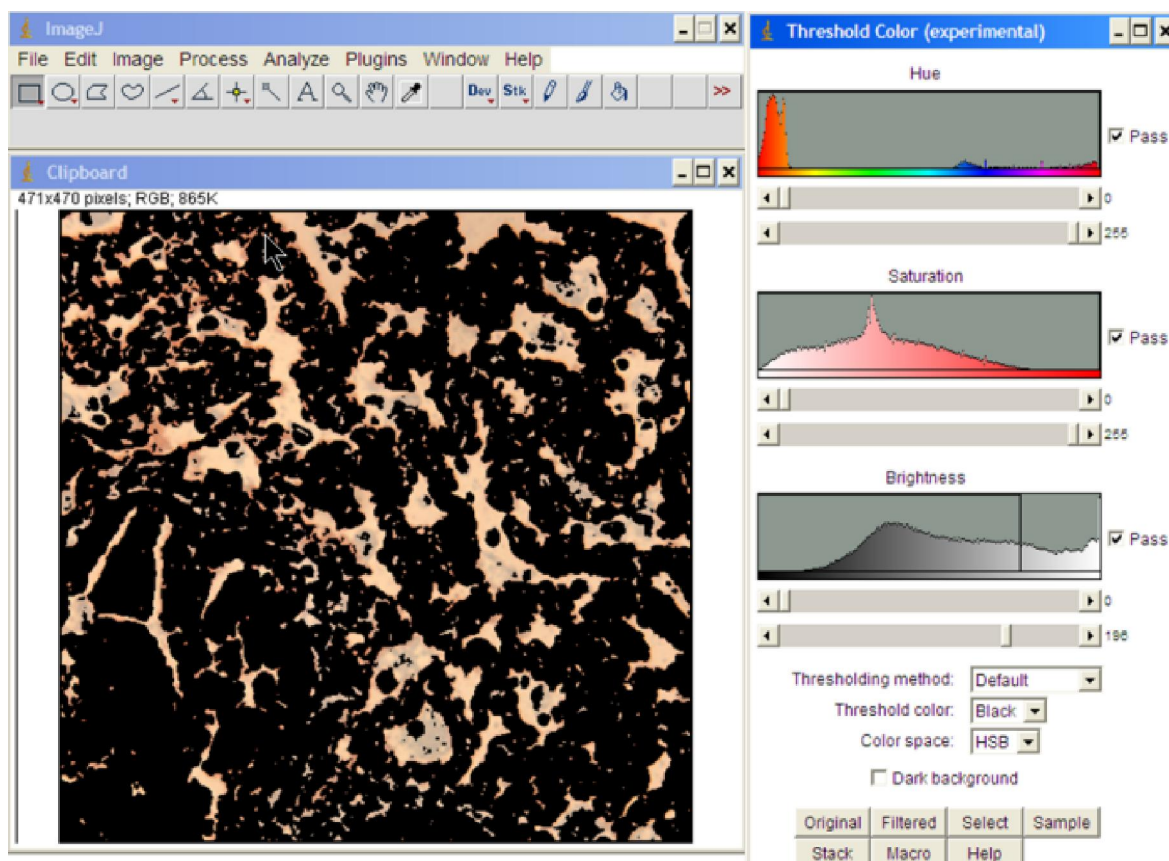
Zdroj: Beckman Coulter Z2 Particle Counter & Size Analyzer. 2015. *J&M Scientific LLC* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.j-mscientific.com/Details.asp?EquipmentID=13>

Příloha 5: Průtokový cytometr



Zdroj: Flow cytometry. 2001-. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry

Příloha 6: Ukázka z programu ImageJ



Zdroj: Nuclei Watershed Separation. 2014. *ImageJ* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: http://imagej.net/Nuclei_Watershed_Separation

Příloha 7: Ukázka textového výstupu algoritmu

XX

Nazev testovaneho snimku: zkusebni.jpg

Snimek obarveny pomoci ORO

Adipocyt c. 1:

Velikost: 37977.5

Pocet tukovych kapenek: 21

Velikosti tukovych kapenek:

Cislo 1: 111

Cislo 2: 113

Cislo 3: 474

Cislo 4: 113

Cislo 5: 120

Cislo 6: 117

Cislo 7: 106

Cislo 8: 133

Cislo 9: 204

Cislo 10: 114

Cislo 11: 110

Cislo 12: 146

Cislo 13: 110

Cislo 14: 113

Cislo 15: 143

Cislo 16: 110

Cislo 17: 115

Cislo 18: 145

Cislo 19: 123

Cislo 20: 174

Cislo 21: 114

Prumerna velikost tukovych kapenek: 123

Maximalni velikost tukovych kapenek: 474

Minimalni velikost tukovych kapenek: 106

.....

Celkem pocet adipocytu ve snimku: 1

Prumerna velikost vseh tukovych kapenek 123

Maximalni velikost ze vseh tukovych kapenek: 474

Minimalni velikost ze vseh tukovych kapenek: 106

Příloha 8: Ukázka segmentovaného snímku s adipocyty

