

# Technická dokumentace pluginu GridRuler

Štěpán Helmer  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,  
Drnovská 507/73, Praha 6 - Ruzyně, 161 06



**Výzkumný ústav  
rostlinné výroby**

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod .....                            | 3  |
| 2. Instalace.....                        | 3  |
| 2.1 Stažení ImageJ nebo FIJI .....       | 3  |
| 2.2 Stažení pluginu .....                | 3  |
| 2.3 Instalace pluginu v ImageJ/FIJI..... | 3  |
| 3. Zpracování snímků .....               | 4  |
| 3.1 Příprava snímků .....                | 4  |
| 3.2 Možnosti Pluginu .....               | 4  |
| 3.3 Vyberte složku.....                  | 5  |
| 3.4 Výstupní soubory .....               | 5  |
| 4. Popis Algoritmu .....                 | 6  |
| 4.1 Nastavení vlastností obrázku.....    | 7  |
| 4.2 Převod na stupně šedi.....           | 8  |
| 4.3 Výpočet průměrných barev linek ..... | 9  |
| 4.4 Detekce čar mřížky .....             | 10 |
| 4.5 Detekce čtverců.....                 | 11 |
| 4.6 Rozpoznání mřížky .....              | 12 |
| 4.7 Maskování linek mřížky.....          | 13 |
| 4.8 Výběr mřížky .....                   | 13 |
| 4.9 Kalibrace rozměrů .....              | 14 |
| 4.10 Tresholding.....                    | 15 |
| 4.11 Předzpracování objektů .....        | 16 |
| 4.12 Analýza objektů .....               | 17 |

# 1. Úvod

GridRuler je plugin ve volně stažitelném programu pro obrazovou analýzu ImageJ či FIJI a byl vyvinut s cílem usnadnit a automatizovat analýzu mikroskopických snímků buněk uspořádaných na mřížce. Plugin je tedy vhodný pro analýzu snímků získaných z Neubauerovi komůrky (hemocytometru) či Burkerovi komůrky. Plugin po základním nastavení zpracuje všechny snímky ve zvolené složce. Plugin GridRuler vyhledává objekty na základě jejich velikosti v reálných jednotkách, kterou odvodí na základě velikosti mřížky.

## 2. Instalace

### 2.1 Stažení ImageJ nebo FIJI

Webová stránka pro stažení FIJI pro všechny operační systémy:

<https://imagej.net/software/fiji/downloads>

Webová stránka pro stažení ImageJ pro všechny operační systémy:

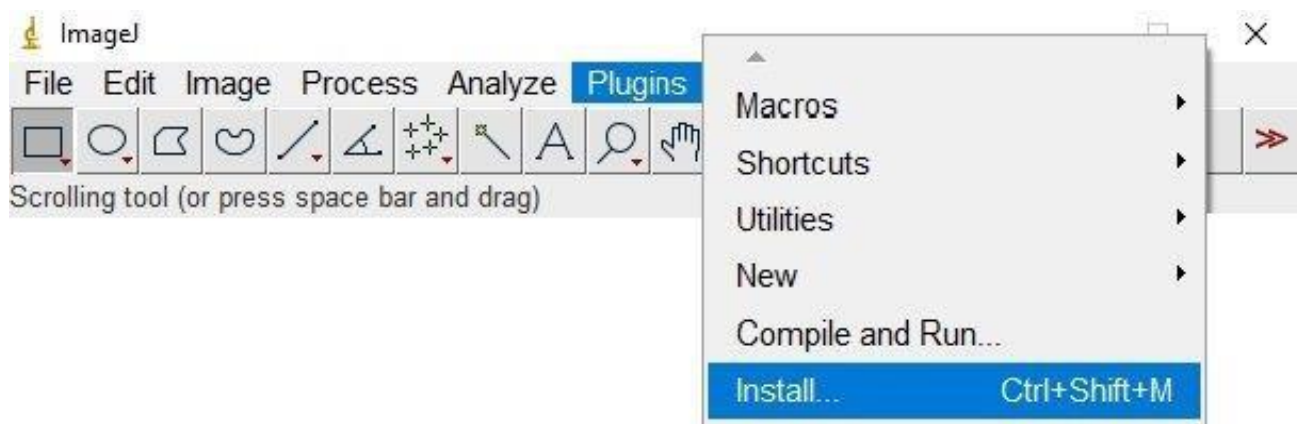
<https://imagej.net/ij/download.html>

### 2.2 Stažení pluginu

Plugin najdete na stránkách VURV u popisu pluginu ve formátu java:

<https://www.vurv.cz/vyzkum/software/>

### 2.3 Instalace pluginu v ImageJ/FIJI



Klikněte na záložku Plugins a na Install, najdete Vámi stažený plugin a nainstalujte jej. Plugin pak bude viditelný pod názvem Grid\_Ruler v záložce Plugins.

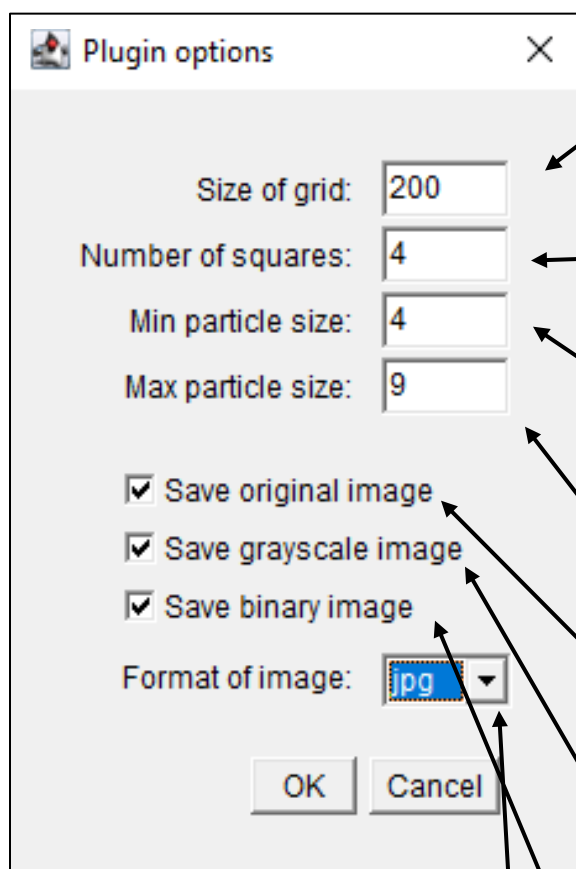
# 3. Zpracování snímků

## 3.1 Příprava snímků

- Snímky by ideálně neměly být nijak natočené, aby vodorovné a svislé linky mřížky nevybočovaly. Linky by měli začínat kus od kraje. Snímky mohou být ve formátech PNG, JPG, TIFF či GIF. Snímky mohou být v odstínech šedi i barevné.

## 3.2 Možnosti Pluginu

Po instalaci se otevře dialogové okno pro specifikaci mřížky, sledovaných částic a výstupních souborů



Size of grid: reálná velikost mřížky

Number of square: Počet čtverců uvnitř mřížky v jednom směru. Naříklad když zvolíte 4, bude mřížka analyzována jako 4\*4 čverce

Min particle size: minimální velikost detekovaných částic

Max particle size: maximální velikost detekovaných částic

Save original image: Uloží původní snímek s nastavenými velikostmi

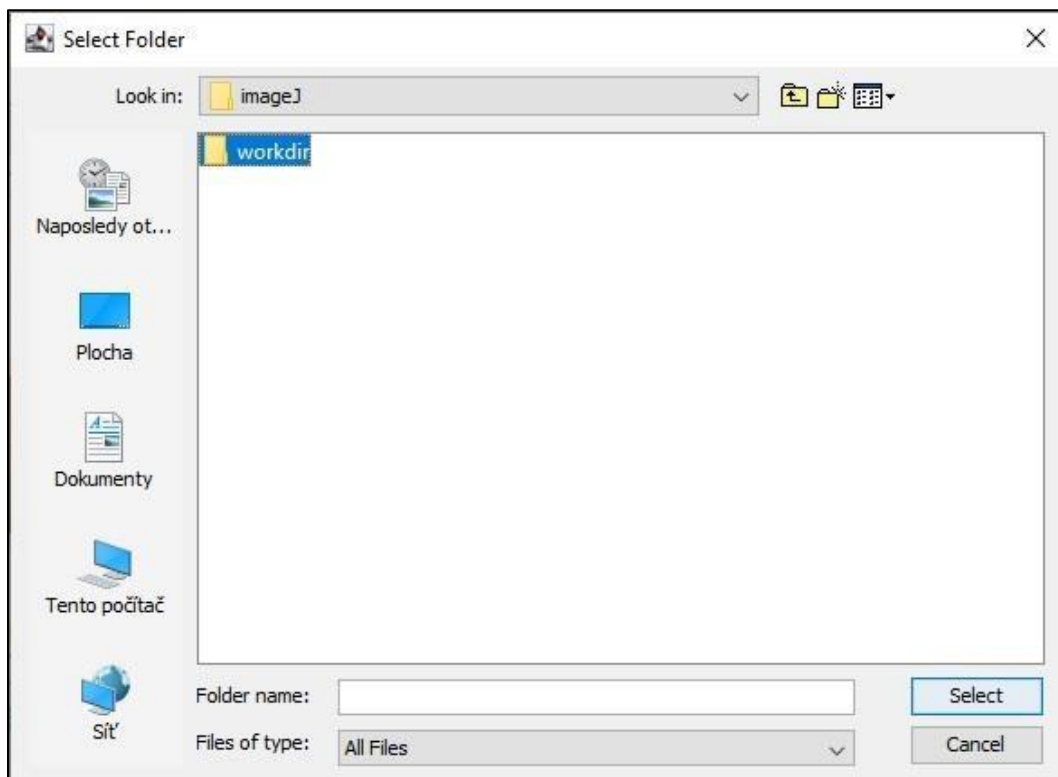
Save grayscale image: Snímek vnitřní části mřížky bude uložen ve formátu odstínů šedi

Save binary image: oříznutý snímek v binární formě bude uložen ve Vaší složce

Format of image: formát analyzovaných snímků

### 3.3 Vyberte složku

Po vybrání složky s vašimi obrázky klikněte na select (vybrat)



### 3.4 Výstupní soubory

- Všechny výstupní soubory budou uloženy ve složce Results, jež bude vytvořena ve složce s Vašimi obrázky.
- **Tabulky-výsledkem** vašich analýz budou dvě tabulky v .csv formátu: Particles.csv s parametry of všech částic ze všech snímků. Druhá je Count.csv s počtem objektů na jednotlivých snímcích.
- **Snímky**-Dalším výstupem mohou upravené snímky-originální snímek s kalibrovanými jednotkami, ořízlý original snímek v odstínech šedi a v binární formě. Všechny snímky jsou kalibrovány na reálné jednotky podle mřížky.

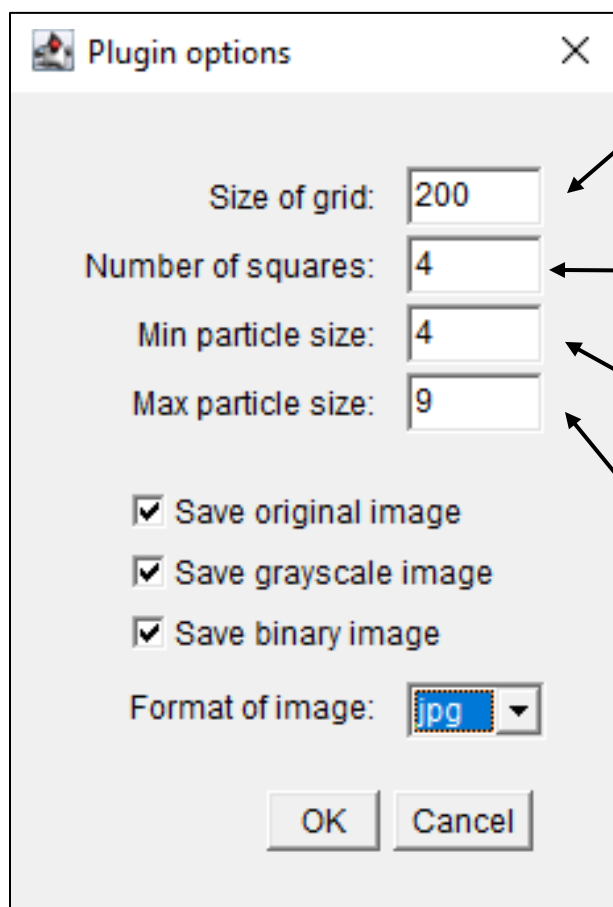
## 4. Popis Algoritmu

Plugin Grid\_Ruler pro ImageJ se skládá ze série kroků analýzy obrazu s mřížkovou strukturou a identifikuje částice uvnitř mřížky. Zde jsou konkrétní kroky algoritmu:

- Nastavení vlastností obrázků
- Konverze do odstínů šedé
- Výpočet průměrných hodnot barev svislých a vodorovných linek
- Detekce linek mřížky
- Detekce čtverců
- Rozpoznání mřížky
- Maskování čar mřížky
- Kalibrace rozměrů
- Tresholding-binarizace
- Předzpracování obrázků
- Analýza objektů

## 4.1 Nastavení vlastností obrázku

- V dialogovém okně se nastavuje počet čtverců v mřížce pro oba směry a velikost mřížky v reálných jednotkách. Také je nastavený minimální a maximální průměr hledaných částic.



Velikost mřížky v reálných jednotkách

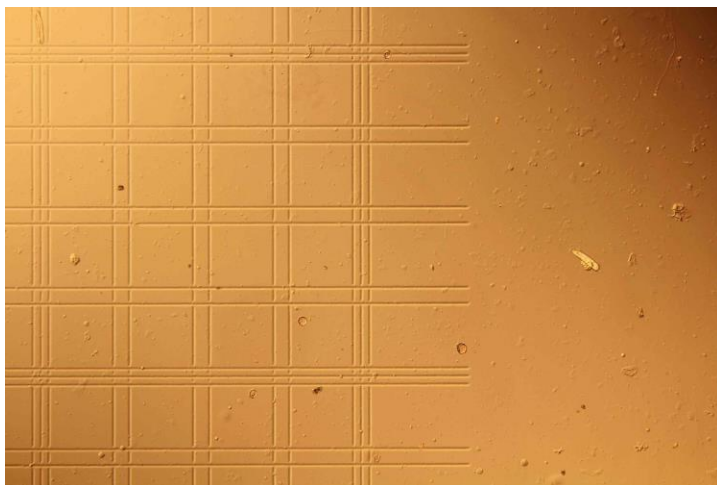
Počet čtverců v jednom směru mřížky. 4 čtverce znamenají mřížku 4x4 čtverce.

Minimální velikost detekovaných částic v reálných jednotkách

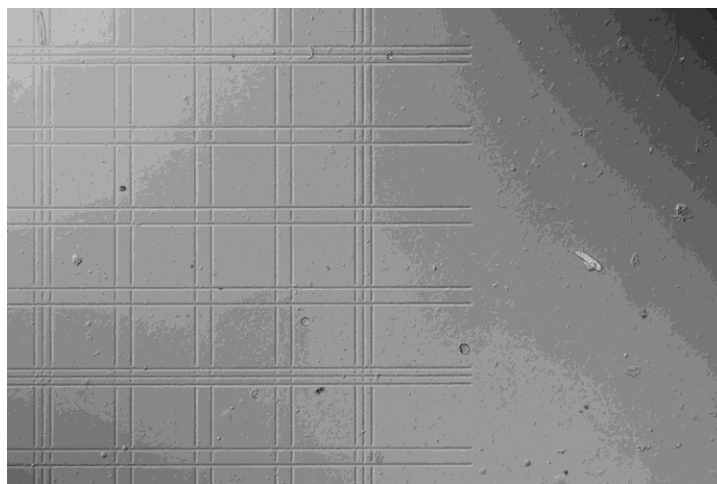
Maximální velikost částic v reálných jednotkách

## 4.2 Převod na stupně šedi

- Snímek je konvertován do 8-bitového formátu (formátu v odstínech šedi).
- 8-bitový formát má 256 hodnot, každý pixel má hodnotu od 0 (černá) do 255 (bílá).



Barevný snímek



8-bitový snímek



### 4.3 Výpočet průměrných barev linek

- Snímek je analyzován řádek po řádku a sloupec po sloupci pro výpočet průměrné barevné hodnoty každého řádku a každého sloupce
- Tyto průměrné hodnoty řádků a sloupců jsou uloženy v datovém typu arraylist
- Vzorec pro výpočet průměrné hodnoty řádku a sloupce je následující

- Pro řádek:

$$XY_1 = (x_1y + x_2y + \dots + x_ny) / n$$

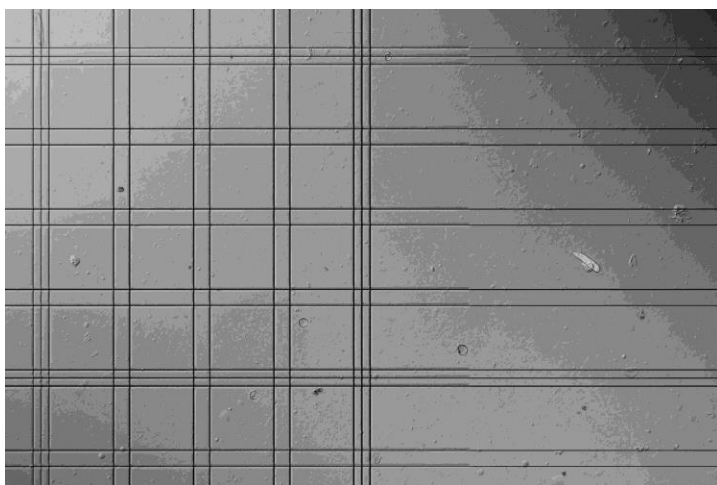
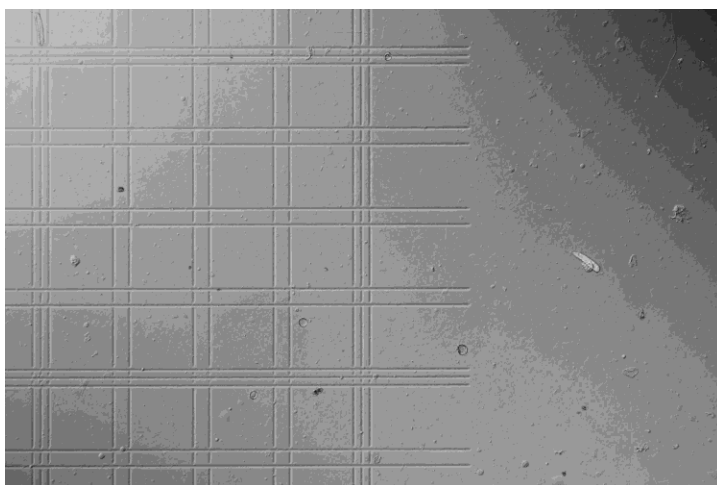
- Pro sloupec:

- $X_1Y = (xy_1 + xy_2 + \dots + xy_m) / m$

|          |          |  |  |  |  |  |          |
|----------|----------|--|--|--|--|--|----------|
| $x_1y_1$ | $x_2y_1$ |  |  |  |  |  | $x_ny_1$ |
| $x_1y_2$ |          |  |  |  |  |  |          |
|          |          |  |  |  |  |  |          |
|          |          |  |  |  |  |  |          |
|          |          |  |  |  |  |  |          |
|          |          |  |  |  |  |  |          |
| $x_1y_m$ |          |  |  |  |  |  |          |

## 4.4 Detekce čar mřížky

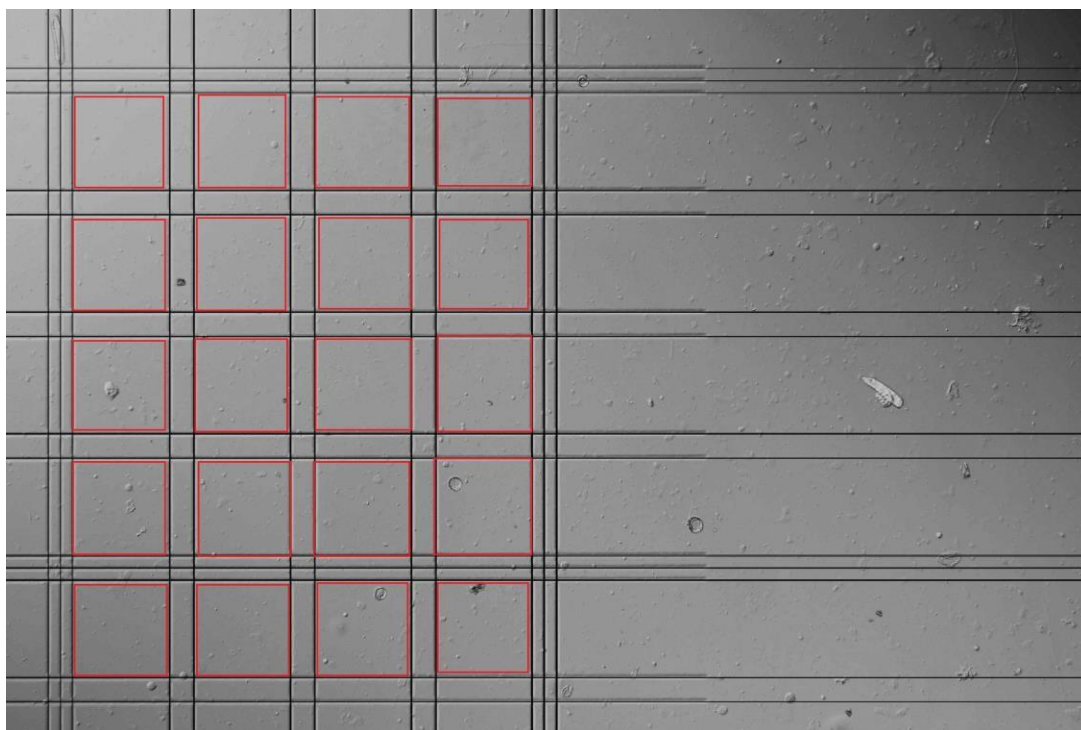
- Jsou analyzovány listy průměrných hodnot barev řádků a sloupců
- Pokud se průměrná hodnota barvy dvou po sobě jdoucích řádků nebo sloupců liší o určitou hodnotu, jsou souřadnice těchto řádků respektive sloupců zapsány do listu linek mřížky.



Linky mřížky jsou detekovány

## 4.5 Detekce čtverců

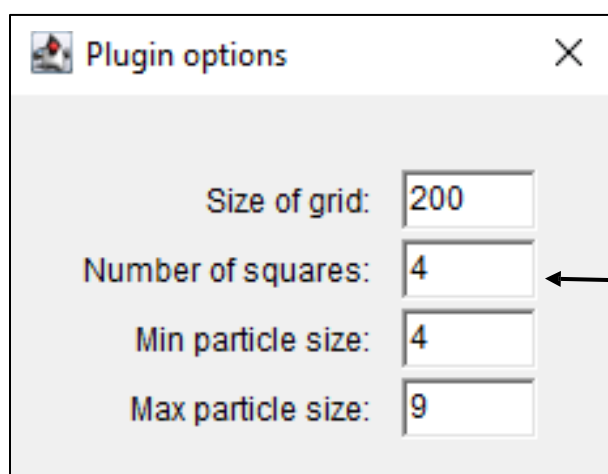
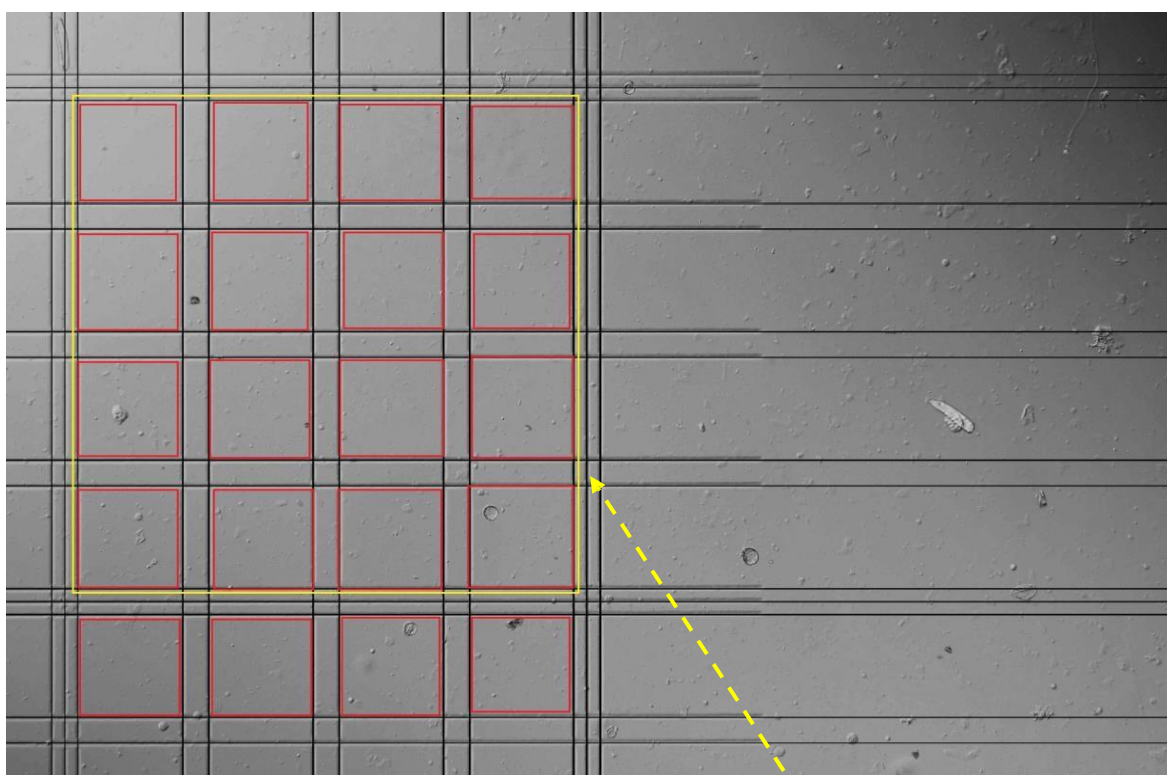
- Linky čtverců jsou selektovány z detekovaných linek mřížky.
- Linky tvořící největší čtverec jsou identifikovány.
- Vzdálenosti linek největšího čtverce jsou použity k hledání párů vertikálních a horizontálních linek.
- Detekované páry linek jsou zapsány do dalších listů.



Linky ohraničující čtverce jsou vybrány z linek mřížky

## 4.6 Rozpoznání mřížky

Struktura mřížky je rozeznána na základě detekovaných dvojicích linek vnitřních čtverců. Z nich jsou vybrány čtverce v obou směrech na základě zadaného počtu čtverců v dialogovém okně.



Počet čtverců v jednom směru mřížky. 4 znamená mřížka 4x4 čtverce.

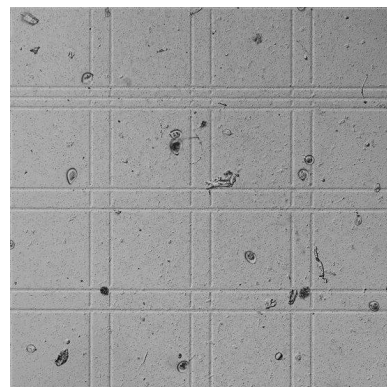
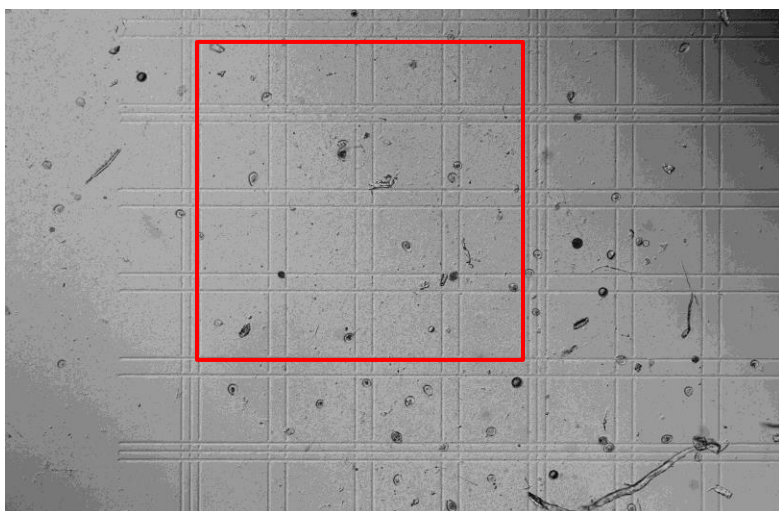
Čtverce jsou vybrány ze všech čtverců na základě počtu čtverců, jež jsou vybrány v dialogovém okně.

## 4.7 Maskování linek mřížky

- Hodnota barvy pixelů linek mřížky je nastavena na hodnotu 255, tento krok je důležitý pro proces binarizace.

## 4.8 Výběr mřížky

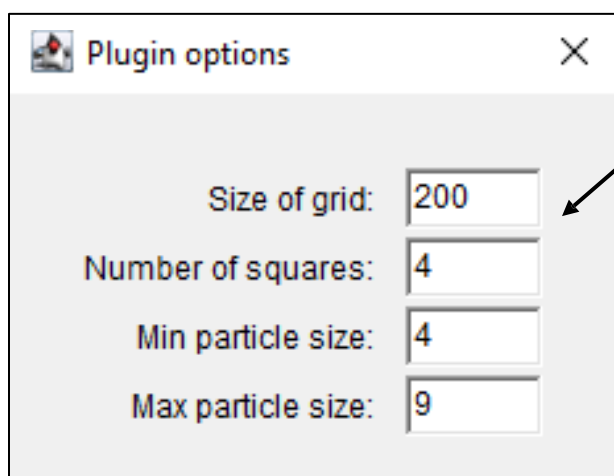
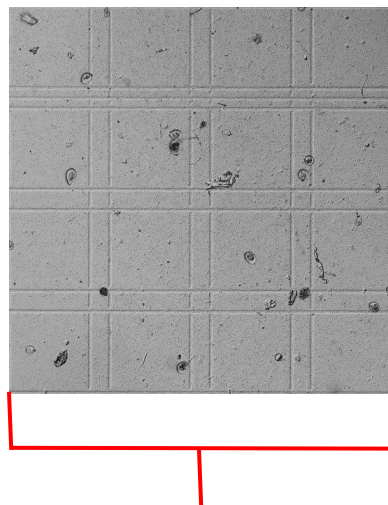
- Rozpoznaný čtverec mřížky je oříznut



## 4.9 Kalibrace rozměrů

- Na základě informací o reálné velikosti částic a mřížky jsou nastaveny rozměry obrázku

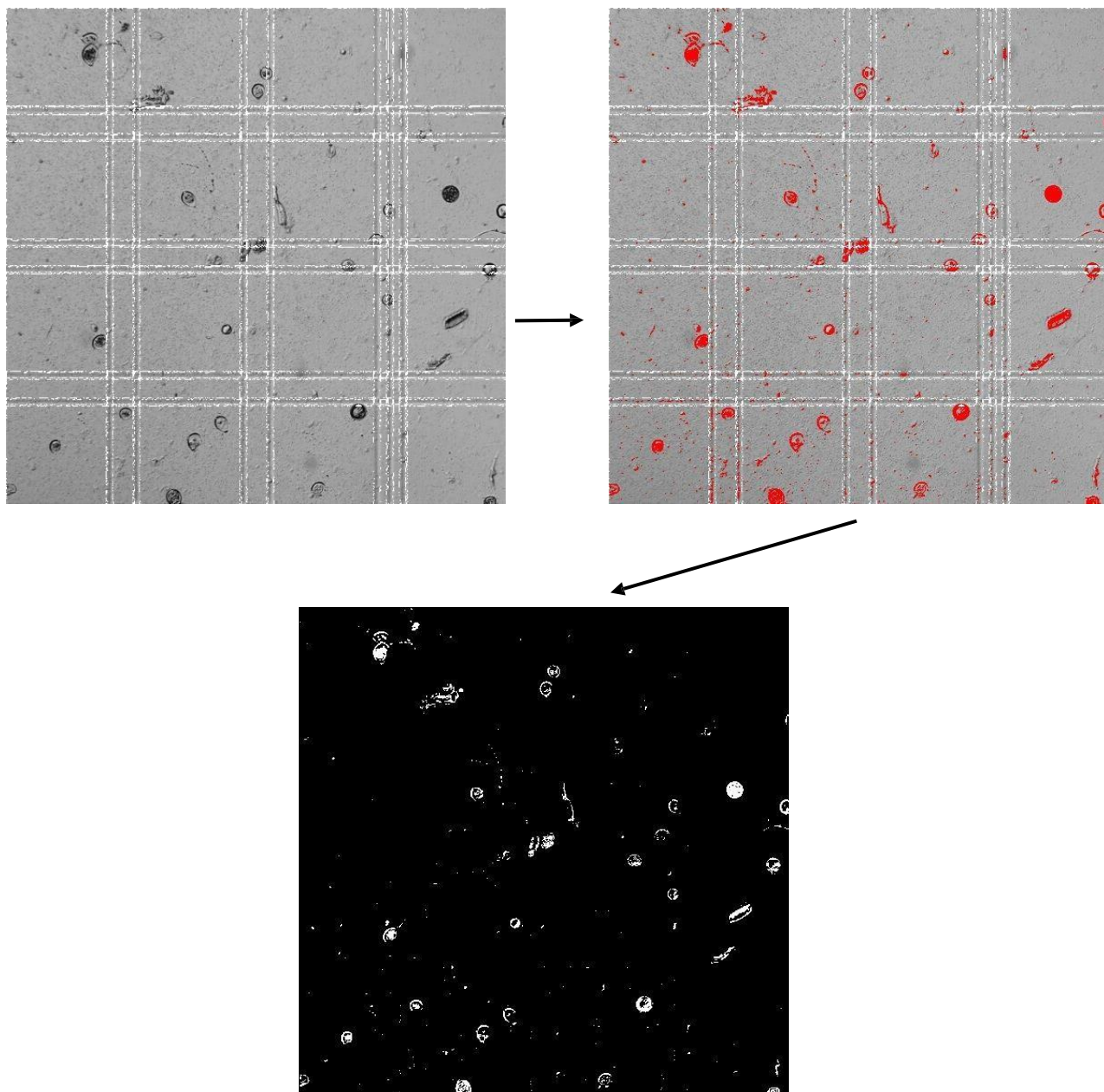
200 um



Velikost mřížky v reálných jednotkách

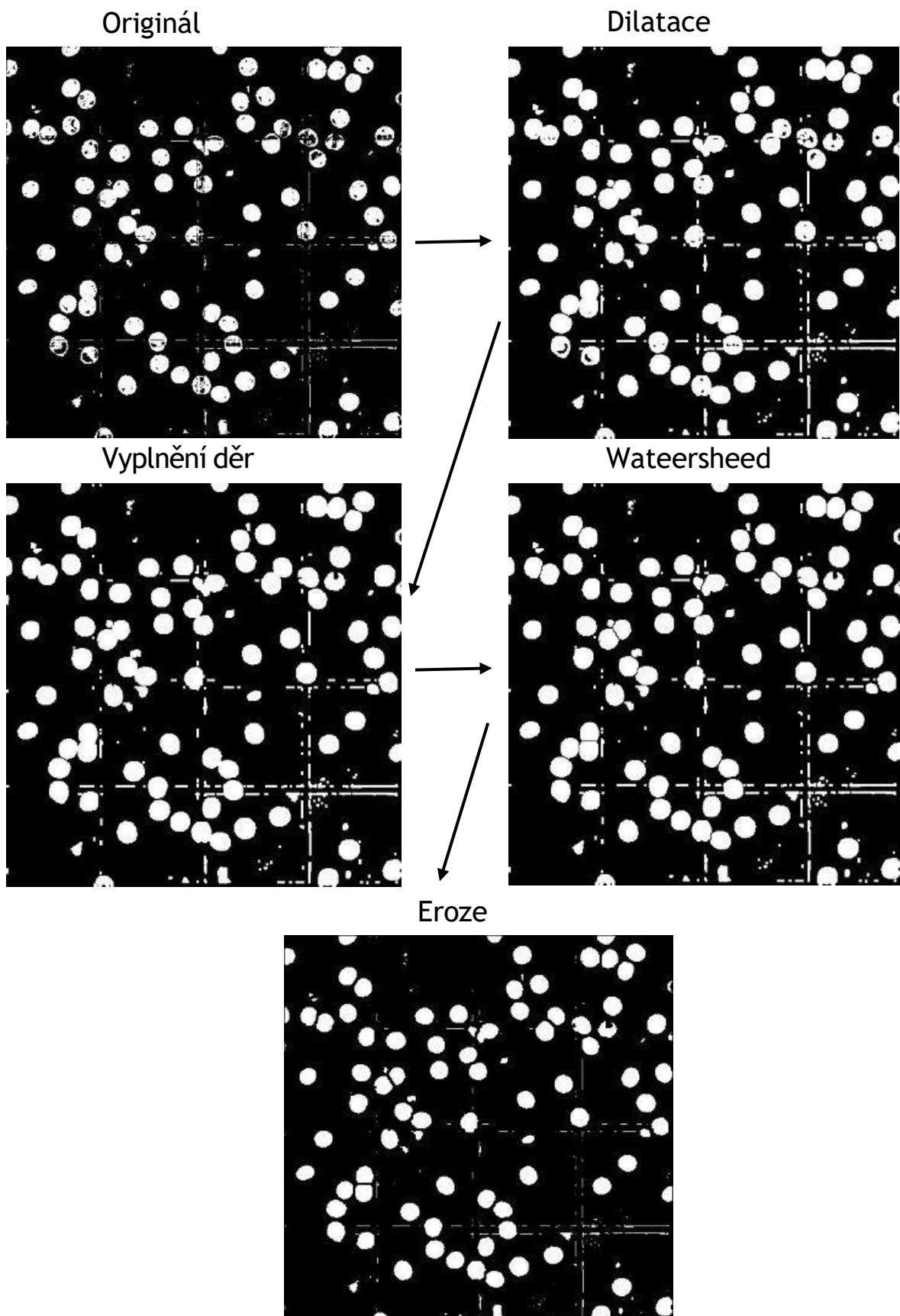
## 4.10 Tresholding

- Tento krok konvertuje snímek v odstínech šedé na binární formát kde jsou pixely rozděleny na dvě kategorie – černé pozadí a bílé objects of interest.
- Thresholding je proces nastavení práhu, který rozdělí pixely that reprezentující objects of interest od pozadí.
- Metoda maxEntropy je použita pro thresholding.



## 4.11 Předzpracování objektů

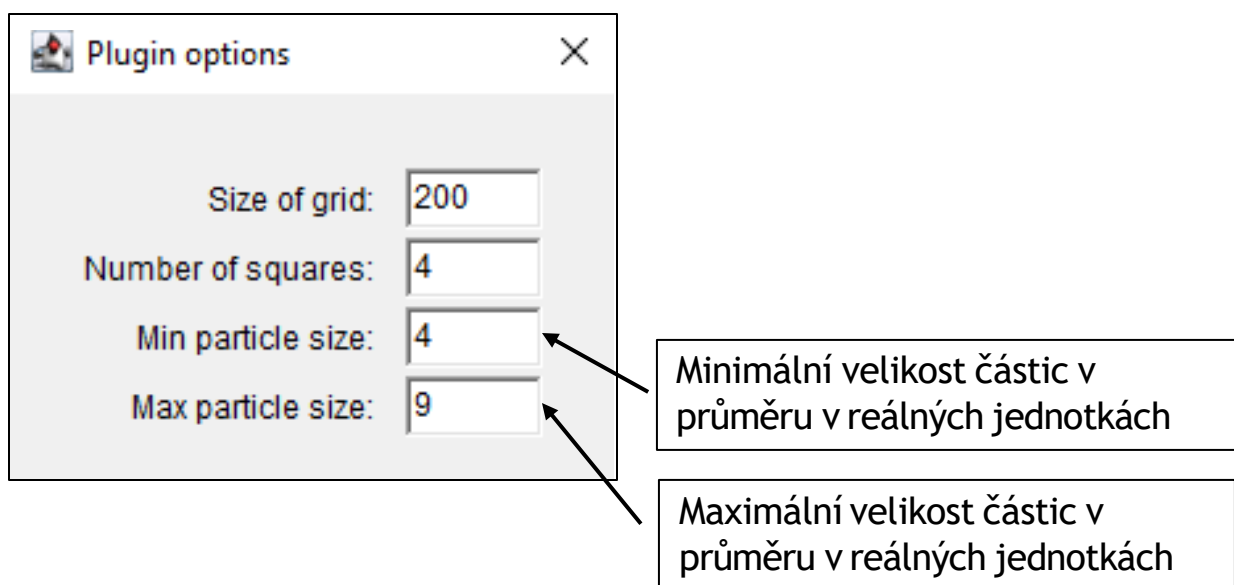
- Objekty jsou předzpracovány pro počítání částic na základě velikosti.
- **Dilatace:** Zvětšení objektů ke spojení blízkých objektů v jeden a uhlazení malých nerovnoměrností
- **Vyplnění děr:** Vyplnění malých děr či mezer uvnitř objektů.
- **Watershed:** Segmentace překrývajících se objektů.
- **Eroze:** Redukce nebo zúžení objektů na snímcích opačný děj než dilatace.





## 4.12 Analýza objektů

- Jsou identifikovány souvislé plochy bílých pixelů na černém pozadí na základě jejich velikosti. Parametr velikosti částic je vybrán na zátku v dialogovém okně.
- Objekty jsou hledány jak objekty rovné  $(\pi * (\text{průměr}/2))^2$
- Každá charakteristika částice jako je velikost, shape a pozice jsou analyzovány
- Získaná data jsou zpracována a exportována jako tabulky.



Průměry částic v reálných jednotkách jsou použity k hledání částic na základě jejich velikosti.