

الحمد لله الذي جعل



دانشکده: کامپیوتر و فناوری اطلاعات

گروه: هوش مصنوعی

تحلیل تصاویر الکتروفرورز با استفاده از تکنیک های پردازش تصویر

دانشجو: سمیرا خدا بخشی

استاد راهنما:

دکتر حمید حسن پور

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

ماه و سال انتشار:

دی ۱۳۹۱



دانشگاه گجرات

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۶)

بسمه تعالی

شماره :

تاریخ : ۹۱/۱۰/۱۱

ویرایش :

فرم صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سمیرا خدابخشی رشته کامپیوتر گرایش هوش مصنوعی تحت عنوان تحلیل تصاویر الکتروفرورز با استفاده از تکنیک های پردازش تصویر که در تاریخ ۹۱/۱۰/۱۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

☐ قبول (با درجه : ۱۹۵ امتیاز :)	☐ دفاع مجدد	☐ مردود
--	------------------------------------	--------------------------------

۱- عالی (۲۰ - ۱۹)

۲- بسیار خوب (۱۸/۹۹ - ۱۸)

۳- خوب (۱۶/۹۹ - ۱۶)

۴- قابل قبول (۱۵/۹۹ - ۱۴)

۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر حمید حسن پور	دانشیار	
۲- استاد مشاور	---		
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	مهندس علی بازقندی	مربی	
۴- استاد ممتحن	دکتر علی اکبر پویان	استادیار	
۵- استاد ممتحن	دکتر علیرضا احمدی فرد	استادیار	

رئیس دانشکده : دکتر حمید حسن پور

تقدیم بہ:

مادر مہربانم ، پدر دلسوزم

,

ہمسر فداکارم

تشکر و قدردانی

سپاس خاص بزرگی است و بزرگی از آن خدا، خدائی که به داد و دهش بزرگیش را به طبیعت ارزانی کرد و به انسان. به انسان کلمه را آموخت و نخست او بود که آموختن را نیز آموزاند. او که بخشش را مایه‌ی بزرگی آدمی قرار داد و همه تجلیات بزرگیش در انسان بهانه‌های بودن و بالیدنند.

سپاس معلم را که حروف و کلمات را می‌آموزاند و بزرگی را، بخشیدن بی مزد و منت را، از الفبا تا اینجا که حالا من هستم و تازه اول راه است. از ابتدا آموزگاران، معلمان، دبیران و استادانی داشته‌ام که به دعای خیری یادشان می‌کنم. اما در آموختن و بازگفتن آنچه در این پایان نامه آمده است بسیاری سهمیم بوده‌اند که باید اگر به کلمه‌ای حقشان را گذارد.

از جناب آقای دکتر حسن‌پور که با صبر و حوصله راهنمایی‌های بی‌دریغی در انجام این پایان نامه داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم و از خداوند منان توفیق روز افزونشان را خواستارم. از راهنمایی‌های جناب آقای مهندس بشکار در آزمایشگاه تشخیص طبی المهدی (عج) شهرکرد و جناب آقای مهندس حجتی فرد در آزمایشگاه بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان در زمینه علوم آزمایشگاهی سپاسگزارم. از زحمات اساتید گروه هوش مصنوعی جناب آقای دکتر پویان و جناب آقای دکتر زاهدی در دوران تحصیل کارشناسی ارشد کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر علیرضا احمدی فرد و جناب آقای دکتر پویان که زحمت داوری پایان نامه را بر عهده داشته‌اند و از جناب آقای مهندس علی بازقندی نماینده تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم. در پایان از زحمات همسر مهربانم دکتر صادق موسوی فرد که مشوق من در دوران تحصیل بودند و با صبر و از خودگذشتگی همراه لحظات من بودند سپاسگزارم و از خداوند بزرگ توفیق روز افزونشان را خواستارم. در پایان از همه کسانی که در انجام این پایان‌نامه سهمیم بوده‌اند تشکر می‌نمایم و آرزو دارم همواره بهترین مصلحت‌ها از جانب خداوند بلند مرتبه در مسیر راهشان قرار گیرد.

تعهد نامه

اینجانب سمیرا خدابخشی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته هوش مصنوعی دانشکده کامپیوتر و فناوری اطلاعات دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تحلیل تصاویر الکتروفرورز با استفاده از تکنیک های پردازش تصویر تحت راهنمایی جناب آقای دکتر حمید حسن پور متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

تحلیل تصویر یکی از تکنیک‌های پردازش تصویر می‌باشد که هدف آن استخراج ویژگی‌ها یا اطلاعات از تصویر می‌باشد. تحلیل تصاویر در علم پزشکی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است به این دلیل که مبنایی جهت تشخیص بیماری برای پزشک می‌باشد. علاوه بر روش‌های تصویربرداری که برای تشخیص بیماری از بخش‌های مختلف بدن بیمار تصاویری تهیه می‌شود، در برخی مواقع لازم است که جهت تشخیص بیماری از خون بیمار استفاده شود. به منظور تفکیک اجزای خون از دستگاهی به نام الکتروفورز استفاده می‌شود. الکتروفورز فرایند حرکت ذرات در داخل مایعی تحت تأثیر یک میدان الکتریکی یکنواخت است. الکتروفورز پروتئین سرم خون و الکتروفورز هموگلوبین خون جزء مهم‌ترین تست‌های آزمایشگاهی هستند که امروزه به طور وسیع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، به منظور تشخیص برخی بیماری‌های خونی استفاده می‌شوند.

تصاویر حاصل از الکتروفورز توسط نرم افزارهای تحلیل تصاویر الکتروفورز و با دخالت هماتولوژیست تحلیل می‌شوند. مهم‌ترین بخش تحلیل، تعیین نقاط جداکننده باندها می‌باشد که این کار به طور دستی انجام می‌شود. علاوه بر این موقعیت منحنی لین‌ها نیز توسط هماتولوژیست جابجا می‌شود. بنابراین نرم افزارهای الکتروفورز به طور اتوماتیک قادر به شناسایی نقاط جداکننده باندها نیستند. در این صورت احتمال بروز اشتباه به دلیل خطای انسانی وجود دارد.

در این پایان نامه به منظور شناسایی اتوماتیک موقعیت باندها در تصاویر الکتروفورز، الگوریتمی ارائه شده است که شامل مراحل پیش پردازش، استخراج لین و تحلیل لین می‌باشد. در مرحله پیش پردازش با محاسبه میزان تغییرات در پروفایل عمودی تصویر الکتروفورز، محدوده لین‌ها شناسایی و استخراج می‌-

شوند. در مرحله استخراج لین، با تعیین حد آستانه مناسب با استفاده از روش اتسو فرایند استخراج انجام می‌گیرد. در مرحله تحلیل لین پس از بهبود کنتراست با روش کشش هیستوگرام، موقعیت خطوط جداکننده تعیین می‌شود. سپس با در نظر گرفتن فاصله نسبی باندها نسبت به یکدیگر، موقعیت بهینه خطوط جداکننده محاسبه می‌شود. با تعیین موقعیت خطوط جداکننده محدوده باندها مشخص می‌شود و مقدار آن‌ها تعیین می‌گردد.

الگوریتم پیشنهادی بر روی تصاویر الکتروفورز جمع‌آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان‌های شهرکرد، اصفهان و شاهرود اعمال شد. با مقایسه نتایج الگوریتم و نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه نرخ تشخیصی در حدود ۷۵.۶٪ به دست آمده است.

کلمات کلیدی: پردازش تصویر، الکتروفورز، آستانه گذاری اتسو، هموارسازی سویزکی-گلی.

مقالات مستخرج از پایان نامه

Samira Khodabakhshi, Hamid Hassanpour, “Automatic Lane Extraction in Hemoglobin and Serum Protein Electrophoresis Using Image Processing”, Journal of Advances in Computer Research (JACR), Islamic Azad University, Sari Branch, Iran (Accepted).

فصل اول: مقدمه ۱۶

- ۱-۱- بیان موضوع و اهداف ۱۸
- ۲-۱- خون و اجزای آن ۲۰
- ۳-۱- الکتروفورز ۲۴
- ۴-۱- ساختار پایان نامه ۲۷

فصل دوم: الکتروفورز ۲۸

- ۱-۲- مقدمه ۲۹
- ۲-۲- انواع الکتروفورز ۲۹
- ۱-۲-۲- الکتروفورز با محیط کمی ۳۰
- ۲-۲-۲- الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید ۳۱
- ۳-۲-۲- الکتروفورز با ژل آگارز ۳۲
- ۲-۲-۲- الکتروفورز بدون محیط کمکی ۳۳
- ۱-۲-۲-۲- الکتروفورز موینه ای ۳۳
- ۳-۲- انواع تست الکتروفورز ۳۶
- ۱-۳-۲- تست الکتروفورز هموگلوبین ۳۷
- ۲-۳-۲- الکتروفورز پروتئین سرم ۴۱
- ۴-۲- برخی اقدامات انجام شده در زمینه الکتروفورز ۴۲
- ۱-۴-۲- تحلیل تصاویر DNA ۴۲
- ۵-۲- نتیجه گیری ۵۴

فصل سوم: تکنیک های استفاده شده در تحلیل تصاویر الکتروفورز ۵۵

- ۱-۳- مقدمه ۵۶
- ۲-۳- آستانه گذاری به روش اتسو ۵۶
- ۳-۳- هموارسازی داده ها ۵۹
- ۱-۳-۳- میانگین متحرک ۵۹
- ۲-۳-۳- هموارسازی سویزکی - گلی ۶۰
- ۴-۳- ارتقاء تصویر ۶۵
- ۱-۴-۳- پردازش بر اساس هیستوگرام تصویر ۶۶
- ۱-۴-۳-۱- کشش هیستوگرام ۶۷

۶۹	۳-۴-۱-۲- متعادل سازی هیستوگرام
۷۱	۳-۵- نتیجه گیری
۷۲	 فصل چهارم: الگوریتم پیشنهادی تحلیل تصاویر الکتروفورز
۷۳	۴-۱- مقدمه
۷۶	۴-۲- پایگاه داده
۷۷	۴-۳- الگوریتم پیشنهادی
۷۹	۴-۳-۱- پیش پردازش
۸۲	۴-۳-۲- استخراج لین ها
۸۶	۴-۳-۳- تحلیل لین ها و کنترل نتایج
۹۹	۴-۳-۴- مقایسه نتایج الگوریتم و نتایج نرم افزارهای آزمایشگاه
۱۰۳	۴-۴- نتیجه گیری
۱۰۴	 فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات
۱۰۵	۵-۱- نتیجه گیری
۱۰۷	۵-۲- پیشنهادات
۱۰۹	 منابع

شکل ۱-۱- تصویر الکتروفورز پروتئین سرم (آزمایشگاه سیدالشهدا اصفهان).....	۱۹
شکل ۲-۱- خون و اجزای آن [۵].....	۲۱
شکل ۳-۱- بزرگ‌نمایی از خلل و فرج های ژل استات سلولز [۹].....	۲۴
شکل ۴-۱- نمای شماتیکی از دستگاه الکتروفورز [۱۱].....	۲۵
شکل ۵-۱- دستگاه الکتروفورز [۱۲].....	۲۵
شکل ۶-۱- ژل استات سلولز الکتروفورز پروتئین سرم و مسیر حرکت	۲۶
شکل ۱-۲- الکتروفورز استات سلولز.....	۳۱
شکل ۲-۲- الکتروفورز پلی اکریل آمید DNA [۱۶].....	۳۲
شکل ۳-۲- الکتروفورز ژل آگارز DNA [۱۷]	۳۳
شکل ۴-۲- نمای شماتیکی از الکتروفورز موینه ای [۱۹]	۳۴
شکل ۵-۲- دستگاه الکتروفورز کاپیلاری [۲۰]	۳۵
شکل ۶-۲- نمونه هایی از نتیجه الکتروفورز موینه ای [۲۱].....	۳۶
شکل ۷-۲- ساختار گلبول قرمز [۲۲]	۳۷
شکل ۸-۲- نمونه ای از کاغذ استات سلولز نمونه گذاری شده.....	۳۸
شکل ۹-۲- مراحل الکتروفورز	۳۹
شکل ۱۰-۲- الکتروفورز هموگلوبین و موقعیت هموگلوبین های غیر نرمال مختلف [۲۴].....	۴۰
شکل ۱۱-۲- نتیجه الکتروفورز هموگلوبین فرد سالم و فرد مبتلا به آنمی داسی شکل	۴۱
شکل ۱۲-۲- الکتروفورز پروتئین سرم و باندهای آن (سیدالشهدا اصفهان).....	۴۲
شکل ۱۳-۲- مراحل الگوریتم مقایسه لین ها [۱۷]	۴۴
شکل ۱۴-۲- حذف پس زمینه [۱۷]	۴۵
شکل ۱۵-۲- تشخیص باندها [۱۷].....	۴۵
شکل ۱۶-۲- قطعه بندی لین ها [۱۷]	۴۵
شکل ۱۷-۲- مراحل الگوریتم [۲۵] در تحلیل DNA.....	۴۷
شکل ۱۸-۲- مراحل الگوریتم [۲۶].....	۴۹
شکل ۱۹-۲- نتیجه اجرای الگوریتم lane tracking [۲۷]	۵۰
شکل ۲۰-۲- مراحل الگوریتم [۲۸].....	۵۱
شکل ۲۱-۲- نتایج استخراج لین ها [۲۸].....	۵۲

شکل ۲-۲۲- مراحل الگوریتم استخراج لین ها [۲۹].....	۵۳
شکل ۳-۱- آستانه گذاری اتسو.....	۵۸
شکل ۳-۲- میانگین متحرک با اندازه پنجره ۵.....	۶۰
شکل ۳-۳- عملگر کانولوشن [۳۸].....	۶۱
شکل ۳-۴- اثر میانگین متحرک [۴۰].....	۶۲
شکل ۳-۵- اثر هموارسازی سویزکی-گلی [۴۰].....	۶۳
شکل ۳-۶- اثر سویزکی-گلی با درجات مختلف [۴۰].....	۶۴
شکل ۳-۷- اثر هموارسازی روی نمودار یک لین.....	۶۵
شکل ۳-۸- پردازش ارتقاء تصویر بر اساس فیدبک از تصویر خروجی [۴۵].....	۶۵
شکل ۳-۹- نگاشت خطی کشش هیستوگرام [۴۷].....	۶۸
شکل ۳-۱۰- مثالی از کشش هیستوگرام [۴۷].....	۶۹
شکل ۳-۱۱- نتیجه ارتقاء تصویر الکتروفورز پروتئین (کشش هیستوگرام).....	۶۸
شکل ۳-۱۲- مثالی از متعادل سازی هیستوگرام [۴۷].....	۷۰
شکل ۳-۱۳- نتیجه ارتقاء تصویر الکتروفورز پروتئین (متعادل سازی هیستوگرام).....	۷۱
شکل ۴-۱- تصاویر الکتروفورز اصفهان.....	۷۳
شکل ۴-۲- تصاویر الکتروفورز شهرکرد.....	۷۳
شکل ۴-۳- تصاویر الکتروفورز شاهرود.....	۷۴
شکل ۴-۴- نمونه هایی از تست الکتروفورز به همراه منحنی و خطوط جداکننده.....	۷۵
شکل ۴-۵- مراحل الگوریتم پیشنهادی ورودی و خروجی هر مرحله.....	۷۸
شکل ۴-۶- تصویر ژل الکتروفورز پروتئین و پروفایل آن.....	۸۰
شکل ۴-۷- تصویر ژل الکتروفورز هموگلوبین و پروفایل آن.....	۸۰
شکل ۴-۸- مراحل استخراج محدوده لین پروتئین.....	۸۱
شکل ۴-۹- مراحل استخراج محدوده لین هموگلوبین.....	۸۱
شکل ۴-۱۰- نتیجه حد آستانه ۰.۵.....	۸۳
شکل ۴-۱۱- نتیجه حد آستانه با روش اتسو.....	۸۳
شکل ۴-۱۲- آستانه گذاری در هموگلوبین.....	۸۴
شکل ۴-۱۳- پروفایل افقی تصویر باینری شده.....	۸۴
شکل ۴-۱۴- نتیجه استخراج لین ها برای الکتروفورز پروتئین سرم.....	۸۵
شکل ۴-۱۵- نتیجه استخراج لین ها برای الکتروفورز هموگلوبین.....	۸۵

شکل ۴-۱۶- مشکلات لین ها	۸۶
شکل ۴-۱۷- نتیجه بهبود کنتراست تصویر.....	۸۷
شکل ۴-۱۸- اثر تغییر خط زمینه با بهبود کنتراست.....	۸۸
شکل ۴-۱۹- مشکلات باندها در لین	۸۸
شکل ۴-۲۰- پروفایل عمودی یک سطر و هموارسازی آن (الکتروفورز پروتئین سرم).....	۸۹
شکل ۴-۲۱- پروفایل عمودی یک سطر و هموارسازی آن (الکتروفورز هموگلوبین).....	۹۰
شکل ۴-۲۲- مشتق یک سطر و هموارسازی آن.....	۹۰
شکل ۴-۲۳- نقاط مینیمم نسبی شناسایی شده در الکتروفورز پروتئین سرم	۹۱
شکل ۴-۲۴- نقاط مینیمم نسبی شناسایی شده در الکتروفورز هموگلوبین.....	۹۱
شکل ۴-۲۵- فاصله نقاط مینیمم نسبی نسبت به یکدیگر در الکتروفورز پروتئین سرم.....	۹۲
شکل ۴-۲۶- فاصله نقاط مینیمم نسبی نسبت به یکدیگر در الکتروفورز هموگلوبین.....	۹۲
شکل ۴-۲۷- نقاط مینیمم در پروتئین.....	۹۳
شکل ۴-۲۸- نقاط مینیمم در هموگلوبین	۹۳
شکل ۴-۲۹- پروفایل عمودی سطر با یک نقطه مینیمم شناسایی نشده.....	۹۴
شکل ۴-۳۰- عدم تفکیک باند آلفا و دو باند شدن باند بتا در الکتروفورز پروتئین شهرکرد	۹۵
شکل ۴-۳۱- عدم تفکیک باند دوم در الکتروفورز هموگلوبین شهرکرد.....	۹۷
شکل ۴-۳۲- نتایج تست الکتروفورز در نرم افزار Amirkabir	۱۰۰
شکل ۴-۳۳- نتایج تست الکتروفورز در نرم افزار Power Scan	۱۰۱
شکل ۴-۳۴- نتایج روش پیشنهادی.....	۱۰۲

فهرست جداول

صفحه

جدول ۱-۲- مقایسه عملکرد الگوریتم مرجع [۱۷] و روش های دیگر.....	۴۶
جدول ۱-۴- پایگاه داده.....	۷۷
جدول ۲-۴- نمونه‌هایی از موقعیت نقاط مینیمم نسبی بدست آمده از سطرهای ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰ بر حسب پیکسل و نقاط بهینه آن‌ها	۹۵
جدول ۳-۴- نمونه ایی از موقعیت نقاط مینیمم نسبی بدست آمده از سطرهای ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰ بر حسب پیکسل و نقاط بهینه آن‌ها با نقاط اصلاح شده.....	۹۶
جدول ۴-۴- نرخ تشخیص اتوماتیک موقعیت خطوط جدا کننده با استفاده از الگوریتم پیشنهادی.....	۹۸

فصل اول: مقدمه

امروزه پردازش تصویر در بسیاری از علوم در سطح وسیع به کار گرفته می‌شود. علم پزشکی نیز از این قاعده مستثنا نیست و با استفاده از پردازش تصویر در کنار دستگاه‌های آزمایشگاهی به بررسی و تشخیص بیماری‌ها می‌پردازد. در این فصل به معرفی و بیان مسئله، روش آزمایشگاهی الکتروفورز و اجزای خون می‌پردازیم.

اصطلاح پردازش تصویر دیجیتالی به فرایند پردازش تصاویر دوبعدی به کمک کامپیوتر اطلاق می‌شود. تصویر دیجیتالی یک آرایه‌ای از اعداد است که بوسیله تعداد متناهی از بیت‌ها نمایش داده می‌شود. در پردازش تصویر، تصویری به عنوان ورودی دریافت می‌شود و با توجه به هدف مورد نظر در خروجی تصویر جدیدی تولید می‌شود یا مجموعه‌ای از پارامترها و خصوصیات از تصویر ورودی به دست می‌آید. از تکنیک‌های پردازش تصویر می‌توان به مواردی از قبیل: نمایش تصاویر^۱، پیش پردازش تصاویر^۲، بهبود تصاویر^۳، بازیابی تصاویر^۴، تحلیل تصاویر^۵، بازسازی تصاویر^۶ و فشرده سازی تصاویر^۷ اشاره کرد [۱].

تحلیل تصویر به معنای استخراج ویژگی‌ها، داده یا اطلاعات از تصویر با روش‌های اتوماتیک یا نیمه اتوماتیک می‌باشد. در مقالات، تحلیل تصویر را استخراج داده، تجزیه تحلیل صحنه، تشریح تصویر، تفسیر اتوماتیک تصویر و یا درک تصویر می‌نامند. تحلیل تصویر از سایر تکنیک‌های پردازش تصویر مانند پیش پردازش، بازسازی یا بهبود تصویر متمایز است به این دلیل که هدف نهایی تحلیل تصویر یک خروجی عددی از تصویر است به جای این‌که تصویر جدیدی باشد [۲].

در پردازش تصویر، تصویر با یک سامانه تصویر برداری مانند دوربین تهیه می‌شود. امروزه پردازش تصویر در بسیاری از علوم از جمله صنعت، هواشناسی، شهرسازی، کشاورزی، علوم نظامی، نجوم، فضانوردی، پزشکی، باستان شناسی، اقتصاد، زمین شناسی و ... به کار گرفته می‌شود. به عنوان نمونه در علم پزشکی به کمک دستگاه‌هایی مانند رادیوگرافی^۸، سی تی اسکن^۹، ام آر آی^{۱۰} و ... از بخش‌های مختلف بدن بیمار تصاویری جهت بررسی بیماری، تشخیص بیماری یا مطالعات پزشکی تهیه می‌شود که تحلیل این تصاویر

¹ Image representation

² Image preprocessing

³ Image enhancement

⁴ Image restoration

⁵ Image analysis

⁶ Image reconstruction

⁷ Image data compression

⁸ Radiology

⁹ CT Scan

¹⁰ MRI

از حساسیت بالایی برخوردار است. چرا که تحلیل این تصاویر مبنای تصمیم‌گیری‌های بعدی پزشک جهت تجویز دارو یا در موارد حساس‌تر اعمال جراحی خواهد بود. در برخی موارد تشخیص اشتباه صدمات جبران ناپذیری برای بیمار بوجود خواهد آورد.

۱-۱- بیان موضوع و اهداف

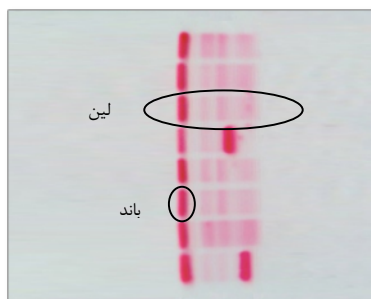
امروزه علم پزشکی با در دست داشتن دستگاه‌های مختلف از جمله دستگاه‌های تصویربرداری قادر به تشخیص برخی از انواع بیماری‌ها می‌باشد. در این میان رشته علوم آزمایشگاهی نیز به عنوان یکی از شاخه‌های علم پزشکی به کمک دستگاه‌ها و تجهیزات آزمایشگاهی، با بررسی و شناخت عوامل ایجادکننده بیماری‌ها به کمک علم پزشکی شتافته است.

علاوه بر روش‌های تصویربرداری که برای تشخیص بیماری از بخش‌های مختلف بدن بیمار تصاویری تهیه می‌شود، در برخی مواقع لازم است که جهت تشخیص بیماری از خون بیمار استفاده شود. علاوه بر امکان تصویربرداری از اجزای خون توسط میکروسکوپ و دوربین‌های مخصوص، امکان تفکیک اجزای خون توسط یکی از تجهیزات آزمایشگاهی به نام الکتروفورز بر روی صفحاتی از جنس استات سلولز^۱ وجود دارد. با استفاده از این روش پزشک قادر به تشخیص علایم بیماری در فرد مورد نظر خواهد بود.

الکتروفورز یکی از تکنیک‌های آزمایشگاهی است که به منظور جداسازی بیومولکول‌ها به کار می‌رود. الکتروفورز فرایند حرکت ذرات در داخل مایعی تحت تأثیر یک میدان الکتریکی یکنواخت است [۳]. از آنجایی که خون از پروتئین‌ها و بخش‌های مختلفی تشکیل شده است، برای تفکیک بخش‌های مختلف آن از روش الکتروفورز استفاده می‌شود. الکتروفورز پروتئین سرم خون و الکتروفورز هموگلوبین خون جزء مهم‌ترین تست‌های آزمایشگاهی هستند که امروزه به طور وسیع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، به

^۱ Acetate Cellulose

منظور تشخیص برخی بیماری‌های خونی استفاده می‌شوند. این تست روی صفحاتی از جنس استات سلولز تهیه می‌شود که به آن‌ها ژل^۱ گفته می‌شود. پس از انجام الکتروفورز ژل‌ها توسط اسکنر اسکن می‌شوند. تصاویر الکتروفورز، تصاویری هستند که طی این فرایند تهیه می‌شوند. سپس این تصاویر توسط نرم-افزارهای الکتروفورز و با کمک هماتولوژیست تحلیل می‌شوند در شکل زیر نمونه‌ای از نتیجه تست الکتروفورز پروتئین سرم خون نشان داده شده است.



شکل ۱-۱- تصویر الکتروفورز پروتئین سرم (آزمایشگاه سیدالشهدا اصفهان)

تصویر فوق شامل ۸ نمونه پروتئین سرم از بیماران مختلف می‌باشد. به هر نمونه لین^۲ و به هر یک از بخش‌های لین، باند^۳ گفته می‌شود. به کمک نرم افزارهای تحلیل تصاویر الکتروفورز مانند Power Scan، Amirkabir و Alan کارهایی از قبیل شناسایی موقعیت لین‌ها، رسم نمودار (منحنی) هر لین، تعیین نقاط جداکننده و در انتها محاسبه مقدار هر باند انجام می‌شود. مهم‌ترین بخش تحلیل، تعیین نقاط جداکننده می‌باشد که این کار به طور دستی توسط هماتولوژیست انجام می‌شود. نقاط جداکننده به صورت خطوطی هستند که با توجه به نمودار ایجاد شده از باندها توسط هماتولوژیست جابجا می‌شوند از

^۱ Gel

^۲ Lane

^۳ Band

این جهت نرم افزارها به طور اتوماتیک قادر به شناسایی نقاط جداکننده هر باند نیستند. در این صورت احتمال بروز اشتباه به دلیل خطای انسانی وجود دارد.

سعی ما در این پایان نامه بر این است که بتوانیم با توجه به اطلاعاتی که از تصاویر الکتروفورز بدست می آوریم بتوانیم این نقاط را تا حد امکان بدرستی و به طور اتوماتیک شناسایی کنیم و احتمال بروز خطا در تحلیل تست الکتروفورز را به حداقل برسانیم. البته در این مسیر با مسائل زیادی روبرو هستیم که حل آن ها در انتخاب درست نقاط جداکننده به ما کمک خواهد کرد. از جمله این مسائل می توان به مسئله بهبود تصاویر، حذف پس زمینه، انتخاب حد آستانه برای قطعه بندی تصویر، هموارسازی، نامتقارن بودن باندها، عدم تفکیک مناسب باندها و طول باندها اشاره نمود.

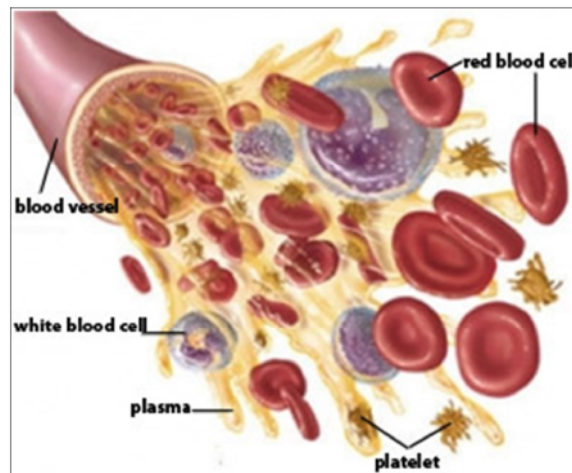
البته ذکر این نکته ضروری است که دقت در انجام صحیح مراحل آزمایشگاهی به منظور تهیه الکتروفورز هموگلوبین یا پروتئین سرم از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که عدم انجام صحیح تست در نتیجه آن نیز تاثیرگذار خواهد بود و در برخی مواقع باعث تشخیص اشتباه خواهد شد.

۱-۲- خون و اجزای آن

باتوجه به این که ما در این پایان نامه الکتروفورز هموگلوبین خون و پروتئین سرم خون را مورد مطالعه قرار داده ایم در ابتدا به معرفی مختصری از اجزای خون می پردازیم و پس از آن فرایند الکتروفورز را تشریح خواهیم نمود.

خون بافت مایعی است که عوامل شیمیایی گوناگون و فراوانی در آن به صورت محلول می باشد و میلیون ها سلول مختلف در آن وجود دارد. بخش مایع خون را پلاسما و بخش دیگر آن را عناصر سلولی خون

می نامند. عناصر سلولی خون از سه گروه اصلی تشکیل شده اند: گلبول های قرمز^۱، گلبول های سفید^۲ و پلاکت ها^۳ [۴].



شکل ۱-۲- خون و اجزای آن. [۵]

• گلبول های قرمز

گلبول های قرمز بالغ، سلول هایی هستند که از دو طرف مقعر بوده و در مرکز نازک و در کناره ها ضخیم تر هستند. کار اصلی آنها انتقال اکسیژن از شش ها به سلول های بدن برای استفاده سلول ها و برداشت دی-اکسید کربن از سلول ها و حمل آنها به شش ها برای دفع به محیط خارج از بدن می باشد. شکل بخصوص گلبول ها همراه با فراوانی تعداد آنها باعث افزایش سطح نقل و انتقال اکسیژن و دی اکسید کربن در بدن می شود. گلبول های قرمز حاوی ماده ای به نام هموگلوبین^۴ هستند که انتقال اکسیژن به سلول ها و برداشتن دی اکسید کربن از آنها را انجام می دهد. رنگ خون نیز بدلیل وجود هموگلوبین در گلبول قرمز است. وقتی میزان هموگلوبین در خون کاهش پیدا می کند عارضه کم خونی رخ می دهد [۴].

¹ Red blood cell

² White blood cell

³ Platelets

⁴ Hemoglobin

- گلبول‌های سفید

گلبول‌های سفید به دو گروه تقسیم می‌شوند؛ گلبول‌های سفید دانه‌دار شامل نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها و گلبول‌های سفید بدون دانه شامل لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها. اهمیت کار گلبول‌های سفید در بدن، کمتر از گلبول‌های قرمز نیست. آن‌ها به شیوه‌های گوناگونی در برابر حمله موجودات ذره‌بینی به بافت‌ها و یا به جریان خون، از بدن دفاع می‌کنند. برای نمونه نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها میکروب‌ها را بلعیده و سپس آن‌ها را هضم می‌کنند که به این عمل فاگوسیتوز یا ذره‌خواری می‌گویند و لنفوسیت‌ها هنگام ورود میکروب‌ها به بدن شروع به تولید فعال پادتن^۱ اختصاصی ضد آن میکروب‌ها می‌نمایند تا بدن را نسبت به بیماری‌های عفونی خاص ایمن سازند [۶].

- پلاکت‌ها

پلاکت‌ها که سومین گروه اصلی سلول‌های خونی را تشکیل می‌دهند در واقع سلول‌های کوچکی هستند که در عمل انعقاد خون شرکت می‌کنند. پس از ایجاد یک ضایعه خونریزی پیش از هر چیز پلاکت‌ها در نقطه آسیب دیده حالت چسبنده به خود گرفته و شروع به تجمع می‌کنند و یک صفحه پلاکتی نرم اما موقت برای مسدود کردن محل خونریزی درست می‌کنند. ولی برای پایا شدن انعقاد خون به چیز بیشتری نیاز است، همزمان با اتفاقات بالا، فاکتورهای انعقادی خاصی به درون پلاسما آزاد می‌گردند که در نهایت با فعال کردن فیبرینوژن و سایر فاکتورهای انعقادی غیر فعال و از قبل آماده موجود در درون پلاسما، ژل فیبروزی ویژه‌ای به نام فیبرین را شکل می‌دهند و به این ترتیب عمل انعقاد خون کامل می‌شود [۴].

¹ antibody

- پلاسما

پلاسما، مایعی است به رنگ زرد کهربایی که از آب و مواد گوناگون محلول در آن تشکیل یافته است. بیشتر مواد شیمیایی لازم برای زنده ماندن سلول‌ها در پلاسما حل شده اند؛ مانند غذا، اکسیژن و املاح که همگی آن‌ها باید از راه خون به سلول‌ها رسانده شوند. مواد زائد تولید شده در سلول‌ها نیز برای دفع از طریق پلاسما به اندام‌های دفعی منتقل می‌شوند. هورمون‌ها، عوامل شیمیایی تنظیم کننده و عوامل انعقادی نیز در پلاسما محلول می‌باشند [۴].

- سرم خون

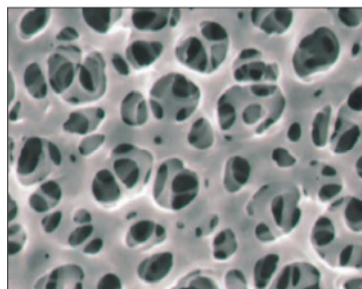
پس از عمل خون‌گیری خون را درون لوله آزمایش می‌ریزند و پس از چند دقیقه خون لخته می‌شود سپس با یک لوله هم‌زن شیشه‌ای آن را به هم می‌زنند و پس از سانتریفوژ مایع به دست آمده روئی سرم است بنابراین سرم فاقد فیبرینوژن است چون خون لخته شده است و فیبرینوژن به فیبرین تبدیل شده و فیبرین در داخل لخته خون باقی مانده و از مایع خون جدا شده است، بنابراین به مایع خون که فاقد فیبرینوژن باشد سرم گویند.

فراوان‌ترین ماده حل شده در پلاسما را گروهی از پروتئین‌های پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند. آلبومین‌ها به افزایش قوام خون کمک می‌کنند و گلوبولین‌ها باعث دفاع بدن در برابر عفونت‌ها می‌شوند [۶].

۳-۱- الکتروفورز

الکتروفورز یکی از شناخته شده ترین روش های آزمایشگاهی برای جداسازی بیومولکول ها است. این روش در سال ۱۸۰۷ توسط رویس^۱ کشف شد. او مشاهده کرد که ذرات خاک رس تحت تاثیر میدان الکتریکی در آب پراکنده می شوند. به طور کلی الکتروفورز حرکت ذرات پراکنده در داخل مایعی تحت تأثیر یک میدان الکتریکی یکنواخت است [۷].

در الکتروفورز نمونه هایی که بار الکتریکی دارند مانند هموگلوبین، پروتئین سرم خون یا DNA^۲ (عامل توارث) تحت تأثیر یک میدان الکتریکی از میان شبکه ای متخلخل (تصویر ۱-۳) مانند ژل پلی اکریل آمید^۳، ژل آگارز^۴ یا ژل استات سلولز حرکت می کنند. سرعت حرکت مولکول ها در این شرایط نه تنها تحت تأثیر بار الکتریکی مولکول ها است بلکه عوامل دیگری نظیر اندازه و شکل مولکول ها نیز در این امر دخیل هستند [۸].



شکل ۳-۱- بزرگ نمایی از خلل و فرج های ژل استات سلولز [۹]

برای الکتروفورز یک مخلوط مولکولی مانند پروتئین سرم یا هموگلوبین را به کمک دستگاه اپلیکاتور^۵، روی ژل نمونه گذاری می کنند. سپس ژل را درون دستگاه الکتروفورز (شکل ۱-۴ و شکل ۱-۵) قرار می دهند. پس از برقراری میدان الکتریکی و اعمال اختلاف پتانسیل مناسب، در مدت زمان مشخص مولکول -

^۱ Reuss

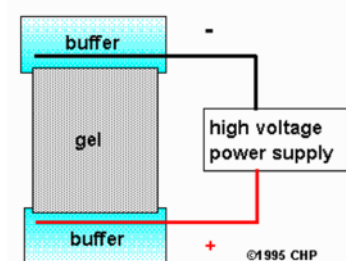
^۲ Deoxyribo Nucleic Acid

^۳ Polyacrylamide gel

^۴ Agaros gel

^۵ Applicator

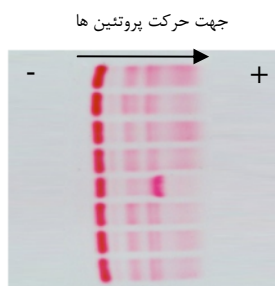
های موجود در نمونه بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی با سرعت‌های متفاوتی درون ژل از میان خلل و فرج‌ها شروع به حرکت می‌کنند. حرکت مولکول‌ها از قطب منفی به طرف قطب مثبت خواهد بود. بنابراین مولکول‌هایی که سنگین‌تر هستند به کندی حرکت می‌کنند و مولکول‌های سبک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند و از سایر مولکول‌ها جدا می‌شوند. این اختلاف سرعت مبنای جداسازی در الکتروفورز است. در پایان، مولکول‌های پروتئینی مختلف به صورت باندهایی مجزا در قسمت‌های مختلف ژل آشکار می‌شوند [۱۰]. شکل ۱-۶ نمونه‌ای از الکتروفورز ژل استات سلولز پروتئین سرم را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۴- نمای شماتیکی از دستگاه الکتروفورز [۱۱]



شکل ۱-۵- دستگاه الکتروفورز [۱۲]



شکل ۱-۶- ژل استات سلولز الکتروفورز پروتئین سرم و مسیر حرکت

همان‌طور که در شکل ۱-۶ نشان داده شده است جهت حرکت پروتئین‌ها از قطب منفی به سمت قطب مثبت می‌باشد. باندهای ایجاد شده نشان دهنده انواع پروتئین‌های مختلف در سرم خون می‌باشد. اولین باند، باند پروتئینی به نام آلبومین می‌باشد که دارای وزن بیشتری نسبت به سایر پروتئین‌هاست به این دلیل که حرکت کمتری نسبت به سایر پروتئین‌ها داشته است، سایر باندها به ترتیب آلفا ۱، آلفا ۲، بتا و گاما می‌باشند.

جداسازی توسط الکتروفورز تحت تأثیر عوامل متعددی می‌باشد، از جمله این عوامل می‌توان به بار الکتریکی و اندازه مولکول‌ها، شدت جریان الکتریکی، اثرات محیطی مانند نوع و نحوه‌ی استفاده از بافرها و حرارت ایجاد شده در زمان الکتروفورز اشاره کرد. در الکتروفورز سرعت حرکت مولکول‌ها تناسب مستقیم با شدت میدان الکتریکی اعمال شده دارد. بنابراین هر چه شدت میدان الکتریکی بیشتر شود مولکول‌ها سریع‌تر حرکت می‌کنند و فرایند الکتروفورز نیز سریع‌تر انجام می‌شود [۱۰].

۱-۴- ساختار پایان نامه

ادامه این پایان نامه در ۴ فصل گردآوری شده است. فصل دوم رویکرد الکتروفورزی دارد که به معرفی انواع روش های الکتروفورز، انواع تست الکتروفورز شامل الکتروفورز هموگلوبین، الکتروفورز پروتئین سرم و الکتروفورز DNA می پردازد و در ادامه برخی کارهای انجام شده در زمینه الکتروفورز DNA مطرح می شود. فصل سوم به معرفی تکنیک های استفاده شده در تحلیل تصاویر الکتروفورز می پردازد این موارد شامل آستانه گذاری، روش های هموار سازی و روش های بهسازی تصاویر می باشند. فصل چهارم به معرفی الگوریتم پیشنهادی و مراحل انجام کار پرداخته است و در فصل پنجم نتیجه گیری و پیشنهادات ارائه شده است.

فصل دوم: الکتروفورز

در این فصل الکتروفورز و روش‌های انجام آن مفصل‌تر مطرح شده است. دو تست تشخیص طبی الکتروفورز شامل تست الکتروفورز هموگلوبین و پروتئین سرم که محور اصلی این پایان نامه می باشند، معرفی شده اند. در انتهای این فصل مروری بر اقدامات انجام شده در زمینه الکتروفورز با رویکرد پردازش تصویر، شده است.

۲-۱- مقدمه

در این فصل به معرفی انواع روش‌های الکتروفورز با توجه به تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها می‌پردازیم. در ادامه برخی از تست‌های الکتروفورزی که به طور وسیع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار می‌گیرد مطرح می‌شود، در پایان برخی از اقدامات انجام شده در زمینه الکتروفورز از دیدگاه پردازش تصویر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

همان‌طور که در فصل قبل بیان شد، الکتروفورز یکی از روش‌های آزمایشگاهی برای جداسازی بیومولکول‌ها است. در این روش نمونه‌هایی که دارای بار الکتریکی هستند تحت تأثیر یک میدان الکتریکی یکنواخت از میان شبکه‌ای متخلخل شروع به حرکت می‌کنند. سرعت حرکت مولکول‌ها در این شرایط تحت تأثیر بار الکتریکی، وزن مولکولی و شکل مولکول‌ها می‌باشد. در این حرکت، فرایند جداسازی اتفاق می‌افتد و اجزای نمونه از یکدیگر جدا می‌شوند. پس از فرایند جداسازی مولکول‌های مختلف به صورت باندهایی مجزا در قسمت‌های مختلف شبکه ظاهر می‌شوند.

۲-۲- انواع الکتروفورز

امروزه روش الکتروفورز به عنوان روش جداسازی کارآمد در علوم پزشکی، ژنتیک و شیمی کاربرد وسیعی پیدا کرده است. با توجه به امکانات و تجهیزات به کار رفته برای انجام این روش در آزمایشگاه‌ها، می‌توان الکتروفورز را به دو روش تقسیم بندی کرد:

۲-۲-۱- الکتروفورز با محیط کمی^۱

از میان ژل های رایجی که در این روش به کار می روند می توان به استات سلولز، پلی اکریل آمید و آگارز اشاره کرد. این ژل ها به صورت صفحه ای (ورقه ای)، مایع غلیظ یا در لوله عرضه می شوند. این ژل ها را هم بصورت افقی و هم بصورت عمودی به کار می برند [۱۳].

در ادامه به معرفی مختصر هریک از موارد فوق می پردازیم:

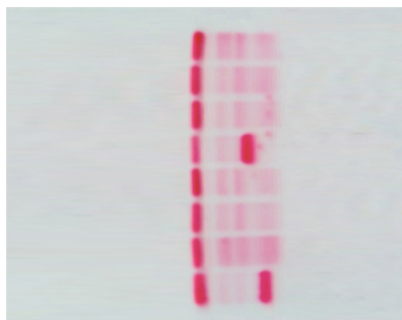
۲-۲-۱-۱- الکتروفورز با ژل استات سلولز

این یک روش کلاسیک است که برای جداسازی گونه های پیچیده با وزن مولکولی زیاد مورد استفاده قرار گرفته است. این جداسازی روی ژل استات سلولز متخلخل که منافذ آن دارای یک محلول بافر آبی می باشد، انجام می شود. استات سلولز برخلاف سایر ژل ها قبل از نمونه گذاری نیاز به خیساندن دارد و همچنین پس از جداسازی باندها نیاز به مرحله پاکسازی دارد.

این ورقه ابعادی در حدود ۱۰ سانتی متر دارد و می تواند چند نمونه را همزمان جدا کند. در این روش نمونه ها روی ورقه وارد می شوند، سپس اختلاف پتانسیل و جریان الکتریکی مناسب در طول ورقه برای مدت زمان مشخصی اعمال می شود. پس از اتمام جداسازی جریان قطع می شود و گونه های جدا شده به وسیله رنگ دار کردن شناسایی می شوند. اساس جداسازی در این روش بار الکتریکی و وزن مولکولی می باشد [۸].

این نوع روش جدا سازی کند و وقت گیر است، اما هزینه کمتری صرف تهیه تجهیزات این روش می شود. به علاوه ژل های استات سلولز به دلیل جنس مقاومی که دارند قابلیت نگهداری طولانی مدت را نیز دارند. تصویر زیر نمونه ای الکتروفورز روی ژل استات سلولز را نشان می دهد.

¹ Supporting medium electrophoresis



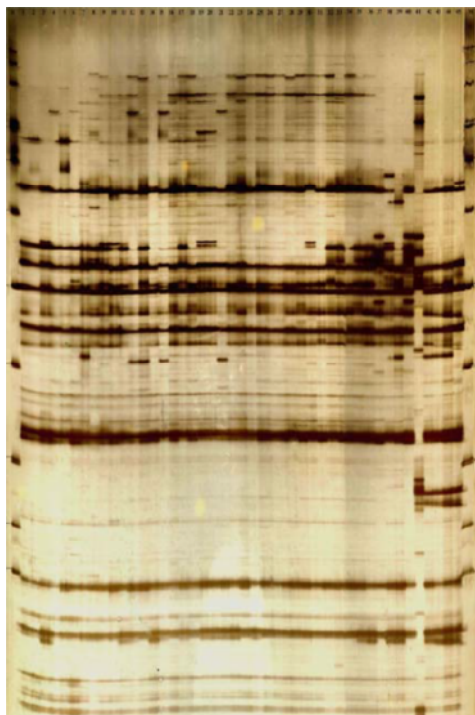
شکل ۲-۱- الکتروفورز اسنات سلولز

۲-۱-۲- الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید

اکثر روش‌های مربوط به تفکیک پروتئین‌ها که امروزه از آن‌ها استفاده می‌شود بر مبنای الکتروفورز منطقه‌ای یا ناپیوسته ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید است (الکتروفورز منطقه‌ای به این معناست که پتانسیل اعمال شده باعث می‌شود تا اجزای یونی متفاوت بر طبق ویژگی‌های خود مهاجرت کنند و به منطقه‌هایی تفکیک شوند). الکتروفورز منطقه‌ای روی ژل پلی‌اکریل‌آمید تحت عنوان PAGE شناخته می‌شود. از روش PAGE برای بررسی جهش‌ها و تعیین توالی DNA استفاده می‌شود [۱۴].

ژل اکریل‌آمید از پلیمرهای اکریل‌آمید ساخته شده است که دارای منافذ معینی است و اندازه این منافذ با توجه به نیاز باید تنظیم شوند. الکتروفورز در حقیقت عبور جریان الکتریکی از بستر ژل است که پروتئین‌ها را مجبور می‌کند بر اساس بار الکتریکی که دارند به سوی قطب مثبت حرکت کنند [۸].

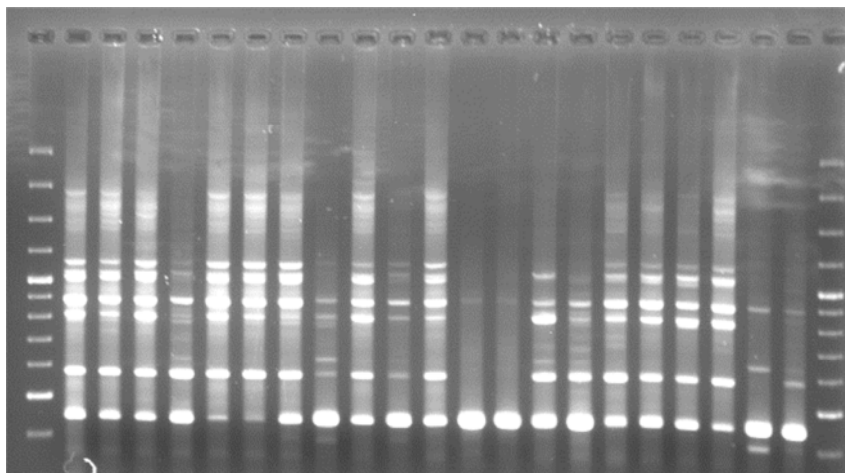
علاوه بر بار الکتریکی، وزن مولکولی پروتئین نیز به عنوان عامل تفکیک کننده عمل می‌کند، در این صورت پروتئین‌های با وزن مولکولی کم‌تر سریع‌تر از مولکول‌های درشت‌تر حرکت می‌کنند. در ضمن هر چه غلظت پلی‌اکریل‌آمید بیشتر باشد قدرت تفکیک ژل بیشتر خواهد بود و مولکول‌های دارای وزن مولکولی نزدیک به هم را بهتر تفکیک می‌نماید. بنابراین در این روش از تفاوت وزن مولکولی و بار الکتریکی پروتئین‌ها به طور همزمان برای تفکیک آن‌ها از یکدیگر استفاده می‌شود [۱۵]. در شکل ۲-۲ نمونه‌ای از الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید نشان داده شده است.



شکل ۲-۲- الکتروفورز پلی اکریل آمید DNA [۱۶].

۲-۲-۱-۳- الکتروفورز با ژل آگارز

برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک از ژل آگارز استفاده می شود. تهیه ژل مزبور به مراتب سریع تر و آسان تر از ژل پلی اکریل آمید بوده و هزینه کمتری را در بر می گیرد. آگارز، پلی ساکاریدی است که ژل حاصل از آن منافذی با ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر دارد. اندازه سوراخ ها به غلظت آگارز بستگی دارند؛ هر چه غلظت بیشتر باشد منافذ کوچک تر و هر چه غلظت کمتر باشد منافذ بزرگ تر هستند. قدرت تفکیک ژل آگارز ارتباط مستقیمی با غلظت آن دارد، بنابراین هر چه اندازه قطعات نمونه کوچک تر باشد از غلظت بیشتر و هر چه اندازه قطعات بزرگ تر باشد از غلظت کمتر استفاده می شود. برای تفکیک قطعات بزرگ DNA در صورتی- که هدف صرفاً بررسی کیفی و تفکیک باشد استفاده از ژل آگارز انتخاب مناسبی است. در این ژل مولکول های کوچکتر در مقایسه با مولکول های بزرگتر سریع تر حرکت کرده و مسافت بیشتری را طی می کنند [۸]. تصویر زیر نمونه ای از الکتروفورز ژل آگارز را نشان می دهد.



شکل ۲-۳- الکتروفورز ژل آگارز DNA [۱۷].

۲-۲-۲- الکتروفورز بدون محیط کمکی^۱

در این روش به جای استفاده از ژل به عنوان محیطی برای جداسازی، از دستگاهی به نام کاپیلاری الکتروفورز استفاده می شود. کاپیلاری (مویینه) لوله‌های بسیار باریکی با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر هستند که نمونه مورد نظر درون این لوله ها قرار می گیرد.

۲-۲-۲-۱- الکتروفورز مویینه‌ای^۲

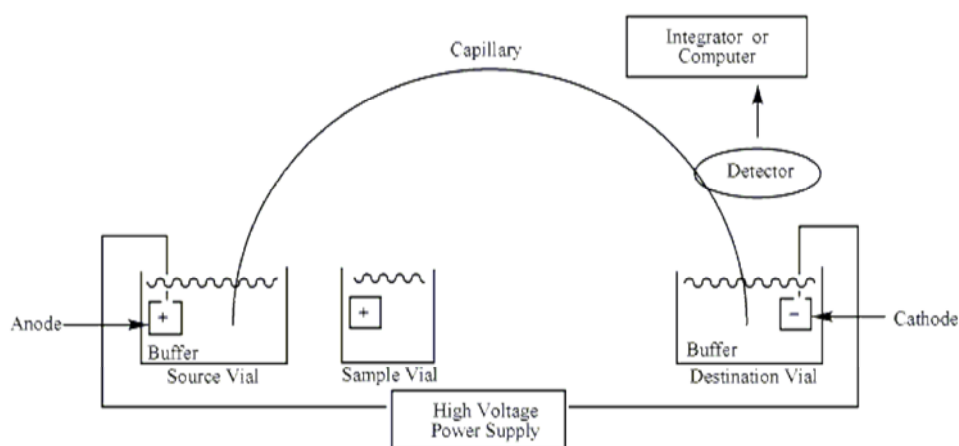
الکتروفورز مویینه‌ای یکی از تکنیک‌های جداسازی است که از لوله‌های باریک (کاپیلاری) پوشیده شده از جنس سیلیکا، برای جداسازی آرایش‌های پیچیده‌ی مولکول‌های کوچک و بزرگ استفاده می‌کند. اساس جداسازی در این روش بارالکتریکی و اندازه مولکول‌ها است [۱۸]. در این روش در هر بار اجرا برای جداسازی از حداقل مقدار نمونه در حدود ۰.۱ تا ۱۰ نانولیترا استفاده می‌شود. فرایند جداسازی با اعمال میدان الکتریکی بالا در حدود ۱۰ تا ۶۰ کیلوولت انجام می‌شود. در این شرایط اجزای نمونه بر اساس

^۱ Free solution electrophoresis

^۲ Capillary electrophoresis

اندازه و بار مولکولی‌شان با سرعت‌های متفاوت شروع به حرکت می‌کنند و فرایند جداسازی با سرعت بسیار بالایی انجام می‌شود.

تزریق نمونه درون کاپیلاری با قرار دادن یک انتهای آن درون بافر و انتهای دیگر درون شیشه نمونه و اعمال فشار بر روی شیشه نمونه یا با اعمال مکش در بافر انجام می‌شود. همان‌طور که در تصویر زیر نشان داده شده است یک دستگاه الکتروفورز موینه ای از ۲ مخزن بافر، منبع تغذیه با ولتاژ بالا، لوله های بسیار باریک (کاپیلاری) ، مخزن نمونه و یک سیستم آشکارساز^۱ تشکیل شده است [۸]. نمونه ای از دستگاه الکتروفورز در تصاویر ۲-۴ و ۲-۵ نشان داده شده است.



شکل ۲-۴- نمای شماتیکی از الکتروفورز موینه ای [۱۹]

¹ detector

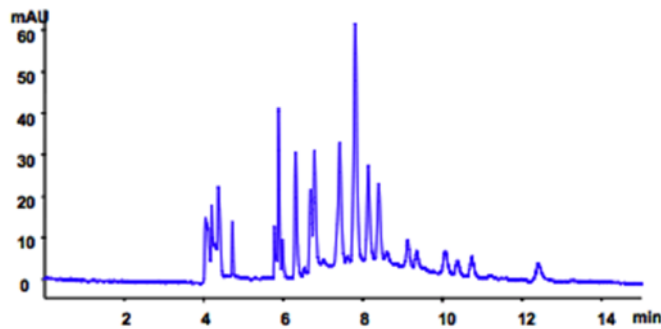


شکل ۲-۵- دستگاه الکتروفورز کاپیلاری [۲۰]

در جداسازی الکتروفورز موینه‌ای جهت حرکت مولکول‌ها از الکتروود مثبت به سمت الکتروود منفی می‌باشد. در این روش ابتدا سریع‌ترین کاتیون‌ها^۱ (یون مثبت) و متعاقب آن کاتیون‌های کندتر و سپس تمام مواد خنثی و در نهایت کندترین آنیون‌ها^۲ (یون منفی) و به دنبال آن آنیون‌های سریع‌تر به سمت الکتروود منفی حرکت می‌کنند [۸]. با گذشت زمان مولکول‌ها با سرعت‌های متفاوت از درون آشکار ساز عبور می‌کنند که نتیجه آن ایجاد پیک‌هایی خواهد بود که در قالب نموداری مانند تصویر زیر در سیستم کامپیوتری ثبت می‌شود. در این شرایط بدون داشتن لین‌ها مستقیماً نتیجه باندهای موجود در نمونه به دست خواهد آمد.

¹ Cation

² Anion



شکل ۲-۶- نمونه ایی از نتیجه الکتروفورز موینه‌ای [۲۱]

از مزایای این روش می‌توان به سرعت بالای جداسازی، تفکیک بهتر و نیاز به نمونه‌های با حجم کمتر اشاره نمود و عیب آن نسبت به سایر روش‌های الکتروفورز مطرح شده، بالا بودن هزینه دستگاه و تجهیزات آن می‌باشد.

۲-۳- انواع تست الکتروفورز

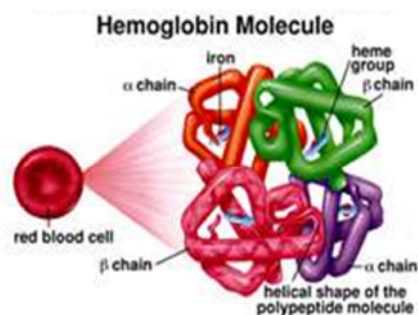
امروزه با پیشرفت علم و تکنولوژی در عرصه علم پزشکی تشخیص بسیاری از بیماری‌ها به کمک دستگاه‌های مختلف فراهم شده است. علوم آزمایشگاهی نیز با در دست داشتن تجهیزات متفاوت گام بزرگی در جهت تشخیص بیماری‌های مختلف برداشته است. یک آزمایشگاه تشخیص طبی از بخش‌های مختلفی از جمله خون شناسی، میکروب شناسی، بیوشیمی و ... تشکیل شده است. از تست‌های رایجی که در بخش خون شناسی (هماتولوژی) انجام می‌شود، می‌توان به تست الکتروفورز هموگلوبین و الکتروفورز پروتئین سرم اشاره کرد. در ادامه به معرفی این دو تست می‌پردازیم.

۲-۳-۱- تست الکتروفورز هموگلوبین

در این بخش ابتدا ساختمان هموگلوبین را به طور مختصر معرفی می‌کنیم و سپس مراحل انجام تست الکتروفورز هموگلوبین را شرح خواهیم داد.

• ساختمان هموگلوبین

گلبول‌های قرمز خون نقش انتقال گازهای خون (اکسیژن و دی‌اکسیدکربن) را به عهده دارد و این عمل توسط هموگلوبین به انجام می‌رسد. تمام انواع هموگلوبین‌ها ساختمان مشابهی دارند که شامل دو جفت زنجیر پروتئینی متفاوت بوده که هر کدام یک ملکول هم^۱ را به همراه دارند، این چهار زنجیره شامل دو زنجیره آلفا و دو زنجیره بتا می‌باشند. این ساختار به نام هموگلوبین A خوانده می‌شود و ساختار هموگلوبین افراد بالغ و سالم می‌باشد. در افراد سالم و بالغ جزء بسیار کوچکی هموگلوبین A_۲ وجود دارد که تفاوت آن در زنجیره بتا می‌باشد و زنجیره آلفا به همان شکل می‌باشد. در دوران جنینی هموگلوبین به شکل دیگری است و دارای دو زنجیره آلفا و دو زنجیره گاما می‌باشد که به نام هموگلوبین F خوانده می‌شود. پس از تولد کم‌کم هموگلوبین F به طرف هموگلوبین A و مقدار اندکی هموگلوبین A_۲ تغییر پیدا می‌کند به نحوی که در یک سالگی مقدار هموگلوبین F به کمتر از دو درصد می‌رسد [۶].



شکل ۲-۷- ساختار گلبول قرمز [۲۲]

^۱ Hem

علت کم خونی‌های^۱ مختلفی مانند ماژور و مینور می‌تواند ناشی از کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، یا کاهش سطح هموگلوبین در خون و یا بیماری هموگلوبین باشد.

• مراحل انجام تست الکتروفورز هموگلوبین

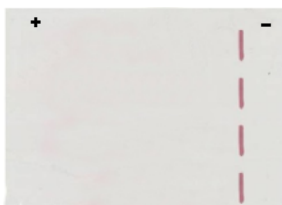
تست الکتروفورز هموگلوبین به متخصصین علوم آزمایشگاهی در تشخیص بیماری‌هایی مانند هموگلوبینوپاتی، آنمی داسی شکل و آلفا تالاسمی مینور و ماژور کمک می‌کند. جداسازی انواع هموگلوبین‌های غیر طبیعی از هموگلوبین A به دلیل ساختمان غیر طبیعی آن‌ها که معمولاً یک آمینواسید جایگزین آمینواسید دیگر شده است، بر اساس تغییر در بار الکتریکی‌شان صورت می‌گیرد. در فرایند جداسازی، هموگلوبین نرمال در بافر قلیایی دارای بار منفی است و به طرف الکتروود مثبت حرکت می‌کند [۲۳].

برای انجام این تست ابتدا نمونه مورد نظر را به دمای اتاق رسانده و سپس مراحل زیر انجام می‌شود:

۱- کاغذ استات سلولز که به صورت ژلهایی هستند که اغلب برای ۸ نمونه کاربرد دارند در بافر مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه خیسانده می‌شوند.

۲- سپس استات سلولز را بین ۲ کاغذ خشک‌کن قرار می‌دهند تا نم‌گیری مختصری انجام شود.

۳- در این مرحله نمونه را توسط اپلیکاتور بر روی کاغذ منتقل می‌کنند.



شکل ۲-۸- نمونه ای از کاغذ استات سلولز نمونه گذاری شده

^۱ Anemia

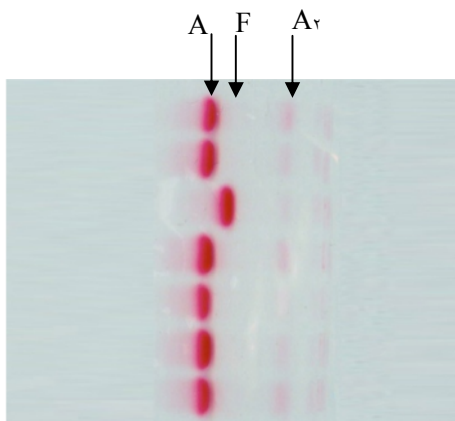
۴- سپس ژل را برگردانده و از پشت داخل تانک الکتروفورز که حاوی بافر مخصوص است قرار می‌دهند به طوری که نمونه در سمت الکتروود منفی باشد.

۵- به وسیله ۲ لام تمیز و کاغذ صافی پلی را برای ارتباط بهتر بافر با ژل ایجاد می‌کنند.

۶- تانک را به منبع تغذیه متصل نموده و با تنظیم دستگاه روی ولتاژ مناسب (۱۶۰ ولت) که شدت جریانی حدود ۴-۶ آمپر را فراهم کند جریان الکتریکی برقرار می‌شود.

۷- بعد از طی زمان حدود ۲۰ دقیقه دستگاه را خاموش کرده و مراحل رنگ آمیزی، رنگ بری، آب گیری و شفاف سازی را انجام می‌دهند.

۸- در نهایت باندها به وسیله اسکنر و برنامه مخصوص قرائت می‌شوند [۱۰].



(ب)



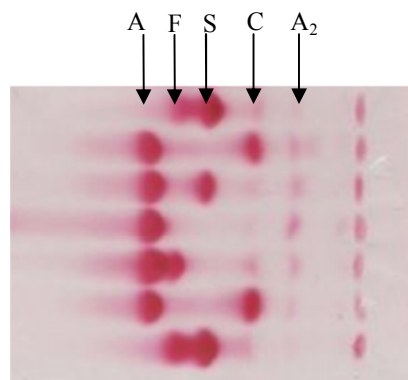
(الف)

شکل ۲-۹- مراحل الکتروفورز الف: اتصال تانک به منبع تغذیه، ب: نتیجه الکتروفورز هموگلوبین و باندهای آن (سیدالشهدا اصفهان)

در الکتروفورز هموگلوبین در صورت نرمال بودن ۳ باند شامل هموگلوبین A، F و A₂ تشکیل می‌شود. هر یک از این هموگلوبین‌ها دارای یک محدوده نرمالی هستند، که نشان می‌دهد فرد مورد آزمایش سالم است یا بیمار. محدوده نرمالی که در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود ممکن است اختلاف جزئی با هم داشته باشند، اما این اختلاف تاثیری در نتیجه نخواهد داشت. به عنوان نمونه محدوده نرمال در سیدالشهدا

اصفهان برای هموگلوبین A بین ۹۵٪ تا ۹۸٪، هموگلوبین F کمتر از ۲٪ و هموگلوبین A_۲ بین ۱.۵٪ تا ۳.۵٪ می باشد.

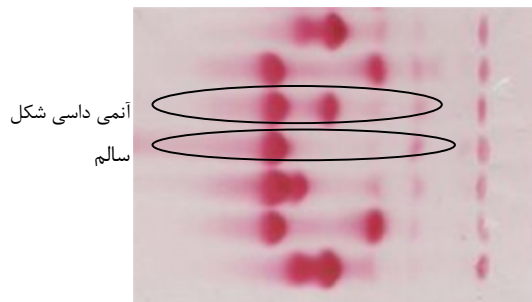
تصویر فوق (۲-۹) نتیجه الکتروفورز هموگلوبین ۷ فرد را نشان می دهد که فرد سوم در این تست دارای هموگلوبین F به مقدار زیاد می باشد و سایر افراد هموگلوبین نرمالی دارند. در صورت وجود بیماری باندهای مختلفی ایجاد می شود، که هر یک نشان دهنده یک هموگلوبین غیر نرمال در خون بیمار می باشد. در تصویر زیر نمونه ای از الکتروفورز هموگلوبین با باندهای غیر نرمال، که هر یک نشان دهنده نوعی بیماری در فرد می باشد، نشان داده شده است.



شکل ۲-۱۰- الکتروفورز هموگلوبین و موقعیت هموگلوبین های غیر نرمال مختلف [۲۴]

همانطور که گفته شد فرد سالم دارای هموگلوبین های A و A_۲ , F می باشد که بیشترین میزان هموگلوبین مربوط به هموگلوبین A می باشد.

کاهش هموگلوبین A و افزایش هموگلوبین A_۲ نشان دهنده تالاسمی مینور، کاهش هموگلوبین A و افزایش هموگلوبین F نشان دهنده تالاسمی ماژور و کاهش هموگلوبین A و افزایش هموگلوبین S نشان دهنده آنمی داسی شکل می باشد.



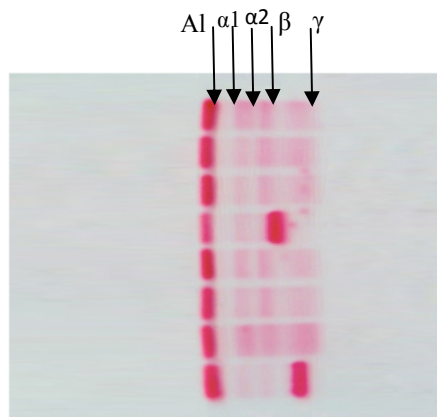
شکل ۱۱-۲- نتیجه الکتروفورز هموگلوبین فرد سالم و فرد مبتلا به آنمی داسی شکل

۲-۳-۲ الکتروفورز پروتئین سرم

الکتروفورز پروتئین سرم در موارد بیماری‌های اتوایمیون، بیماری‌های کبدی و کلیوی، التهابات حاد و مزمن در خواست می‌شود. روش انجام این تست مشابه روش الکتروفورز هموگلوبین است با این تفاوت که به جای هموگلوبین از پروتئین سرم استفاده می‌شود. در الکتروفورز پروتئین ۵ باند تشکیل می‌شود که شامل آلبومین (AL)، آلفا ۱ گلوبولین (α_1)، آلفا ۲ گلوبولین (α_2)، بتا گلوبولین (β) و گاما گلوبولین (γ) می‌باشد. پروتئین‌ها در طی الکتروفورز و در اثر قرار گرفتن در میدان الکتریکی بر اساس بار الکتریکی‌شان از الکتروود منفی به سمت الکتروود مثبت حرکت می‌کنند و از یکدیگر جدا می‌شوند [۱۰].

در این تست نیز هر یک از مقادیر پروتئین سرم دارای محدوده‌ی نرمالی می‌باشند. آلبومین ۵۲٪ تا ۶۲٪، آلفا ۱ گلوبولین ۱.۵٪ تا ۴.۵٪، آلفا ۲ گلوبولین ۶٪ تا ۱۳٪، بتا گلوبولین ۱۱٪ تا ۱۷٪ و گاما گلوبولین ۱۱٪ تا ۱۹٪ می‌باشد. افزایش یا کاهش هر یک از موارد فوق نشان‌دهنده وجود بیماری در فرد مورد نظر می‌باشد. به عنوان مثال افزایش گاما نشان‌دهنده سرطان خون، کاهش آلبومین نشان‌دهنده بیماری‌های کلیوی-کبدی و ... می‌باشد.

تصویر زیر نتیجه الکتروفورز پروتئین سرم را نشان می‌دهد. در این تصویر لین ۴ و ۸ غیر نرمال هستند و سطح گاما گلوبولین بالایی دارند که می‌تواند نشان‌دهنده وجود سرطان خون در فرد مورد آزمایش باشد.



شکل ۲-۱۲- الکتروفورز پروتئین سرم و باندهای آن (سیدالشهدا اصفهان)

۲-۴- برخی اقدامات انجام شده در زمینه الکتروفورز

امروزه پردازش تصویر با تکنیک‌های مختلف به یاری بسیاری از علوم شتافته است. الکتروفورز هم به عنوان یکی از تکنیک‌های آزمایشگاهی که با تصاویر سروکار دارد پردازش تصویر را به عنوان ابزاری در خدمت خود گرفته است و به کمک آن تحلیل و کنترل تصاویر را انجام می‌دهد. انجام این کار بدون استفاده از پردازش تصویر برای انسان وقت‌گیر است و همچنین احتمال وجود خطا در نتیجه کار انسان نیز غیر قابل اجتناب است. لذا در این بخش به مروری بر کارهای انجام شده با تکنیک‌های پردازش تصویر در زمینه الکتروفورز می‌پردازیم.

۲-۴-۱- تحلیل تصاویر DNA

همان‌طور که در مباحث گذشته مطرح شد، می‌توان اجزای مولکول DNA را در محیط الکتروفورز بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی از یکدیگر جدا نمود. نتیجه تصاویر الکتروفورز DNA به صورت لین-هایی می‌باشد که از باندهای زیادی تشکیل شده‌اند (شکل ۲-۳). کارهایی که روی این تصاویر انجام می‌شود را می‌توان به چند مرحله کلی تقسیم کرد. این مراحل شامل حذف نویز، آستانه گذاری، بهبود

تصاویر، تشخیص لین‌ها، استخراج باندها و در نهایت تحلیل باندها می‌باشند. در ادامه به مرور کارهای انجام شده و نتایج آن‌ها در چند سال اخیر می‌پردازیم.

در [۱۷] یک روش کامپیوتری برای مقایسه لین‌ها و شناسایی لین‌های مشابه ارائه شده است. یکی از مراحل که در تحلیل تصویر DNA وجود دارد شناسایی لین‌های مشابه است، دو لین مشابه هستند اگر موقعیت نسبی باندهایشان یکسان باشد. در این مقاله الگوریتمی ارائه شده است که در ادامه به توضیح مختصر آن می‌پردازیم:

۱- پیش پردازش تصویر: این مرحله شامل حذف بافت شبکه‌ای و پس‌زمینه می‌باشد. از آنجا که بافت شبکه‌ای فرکانس ثابتی در تصویر دارد می‌توان آن را در دامنه فرکانس حذف نمود. با توجه به هیستوگرام تصویر حدآستانه‌ای انتخاب شده و پس زمینه حذف شده است.

۲- بهبود باندها: در این مرحله از فیلتر تطبیق یافته^۱ استفاده شده است. این فیلتر بر اساس شکل و توزیع شدت رنگ باندها طراحی شده است. از آنجایی که باندها به صورت منحنی‌های مقعر روبه پایین هستند از فیلتر تطبیق یافته مستطیلی استفاده شده است.

۳- شناسایی باندها: از الگوریتم watershed برای محاسبه خط مرکزی باندها استفاده شده است. برای شناسایی موقعیت باندها لازم است که از مرکز باندها استفاده شود، برای این کار توسط الگوریتم watershed ساختار اسکلتی باندها بدست آمده است.

۴- بازسازی باندهای شکسته شده: این مرحله بر اساس میانگین شکل^۲ با استفاده از الگوریتم کوتاه‌ترین مسیر انجام می‌شود. در مرحله قبل پس از اعمال الگوریتم watershed ممکن است برخی از باندها به صورت شکسته شده یا به صورت دو مؤلفه جدا از هم باشند، در این مرحله این مؤلفه‌ها به یکدیگر وصل می‌شوند و یک باند را تشکیل می‌دهند. در این مرحله با میانگین شکل یک گراف وزنی جهت‌دار ایجاد

¹ Matched Filter

² Average Shape

می‌شود و با یافتن کوتاه‌ترین مسیر باندهای شکسته شده بازسازی می‌شوند. موقعیت خطوط افقی به

عنوان موقعیت باندها در نظر گرفته می‌شود و بردار موقعیت^۱ (PV) بدست می‌آید.

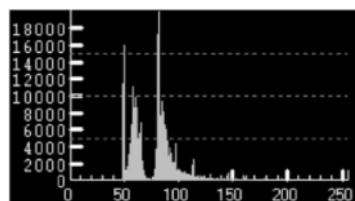
۵- نرمال سازی PV: این عمل بر اساس نشانگر (سمت چپ‌ترین لین) و بردار (سمت راست‌ترین لین)

انجام می‌شود. از آنجایی که در یک تصویر ممکن است لین‌های مشابه دارای PV متفاوتی باشند قبل از

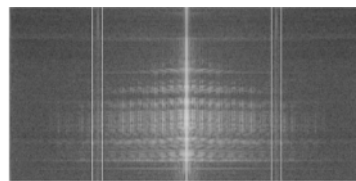
انجام مقایسه بین آن‌ها ابتدا PV ها نرمال می‌شوند.

۶- مقایسه لین‌ها.

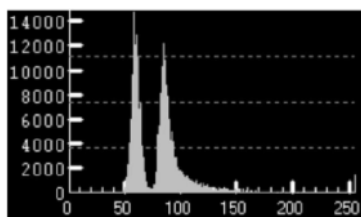
تصاویر زیر مراحل این الگوریتم را نشان می‌دهند.



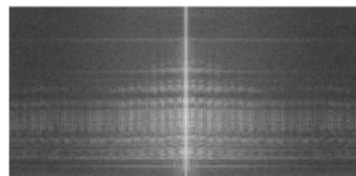
(ب)



(الف)



(ت)



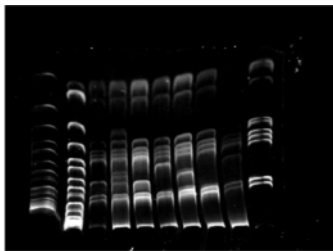
(پ)

شکل ۲-۱۳- مراحل الگوریتم مقایسه لین‌ها [۱۷] (الف) تصویر در دامنه فرکانس،

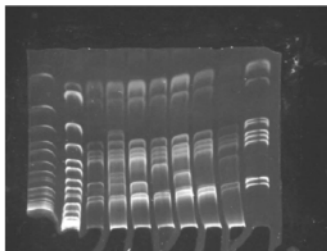
(ب) هیستوگرام تصویر، (پ) دامنه فرکانس با حذف بافت شبکه ای، (ت) هیستوگرام تصویر پس

از حذف بافت شبکه ای .

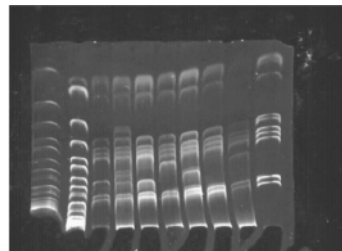
¹ Position Vector



(پ)



(ب)

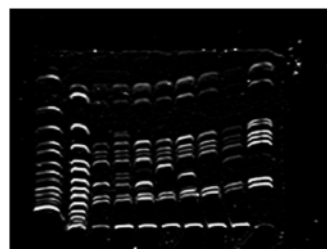


(الف)

شکل ۲-۱۴ - حذف پس زمینه [۱۷] (الف). تصویر ژل الکتروفورز، (ب). نتیجه حاصل از حذف بافت شبکه‌ای، (پ). نتیجه حذف پس زمینه.

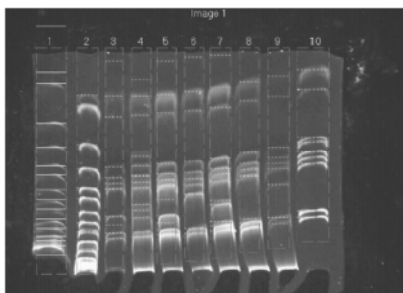


(ب)

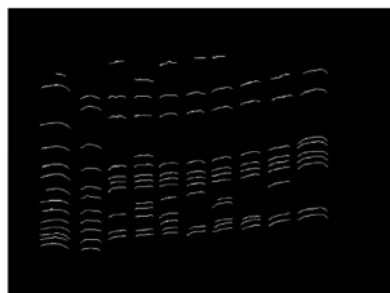


(الف)

شکل ۲-۱۵ - تشخیص باندها [۱۷] (الف). نتیجه اعمال فیلتر تطبیق یافته (ب). نتیجه اعمال فیلتر watershed و باندهای شکسته شده.



(ب)



(الف)

شکل ۲-۱۶ - قطعه بندی لین ها [۱۷] (الف). بازسازی باندهای شکسته شده (ب). نتیجه قطعه بندی لین ها.

جدول زیر نتایج مقایسه عملکرد روش پیشنهادی، نرم‌افزار مولکولی موجود و انسان متخصص را نشان می‌دهد.

جدول ۱-۲ مقایسه عملکرد الگوریتم مرجع [۱۷] و روش های دیگر

	# of Bands	False Positive	False Negative	Total Error	Error Rate
Proposed Method	774	10	10	20	2.6%
Experienced Human Expert	774	3	19	22	2.8%
Molecular Analyst Software	774	44	27	71	9.2%

در [۲۵] یک سیستم اتوماتیک برای تحلیل DNA و پروتئین ارائه شده است. آستانه گذاری برای یکسان سازی سطح خاکستری و بهبود تصاویر ضعیف از نکات برجسته این مقاله به شمار می روند. مراحل انجام شده در این مقاله به ۴ مرحله تقسیم می شود:

۱- آستانه گذاری: در این مرحله هدف یکسان سازی سطح خاکستری پس زمینه، بدون تغییر در اندازه باندها می باشد. حد آستانه تابعی از مینیمم و ماکزیمم شدت رنگ تصویر می باشد. این تابع در رابطه زیر نشان داده شده است:

$$T = \alpha[\max(i) - \min(i)] + \min(i) \quad (۱-۲)$$

مقدار α بر اساس انحراف معیار تصویر محاسبه می شود.

۲- تغییر مکان دهی^۱ و حذف نویز: هدف از این مرحله تغییر سطوح مینیمم پروفایل به صفر و حذف نویز می باشد. این مرحله از طریق تفریق حد آستانه از شدت رنگ هر پیکسل انجام می شود. در این صورت پس زمینه تیره تر خواهد شد. سپس برای حذف نویز نمک فلفلی موجود در تصویر از فیلتر top-hot و سپس فیلتر میانگین ۵*۵ استفاده شده است.

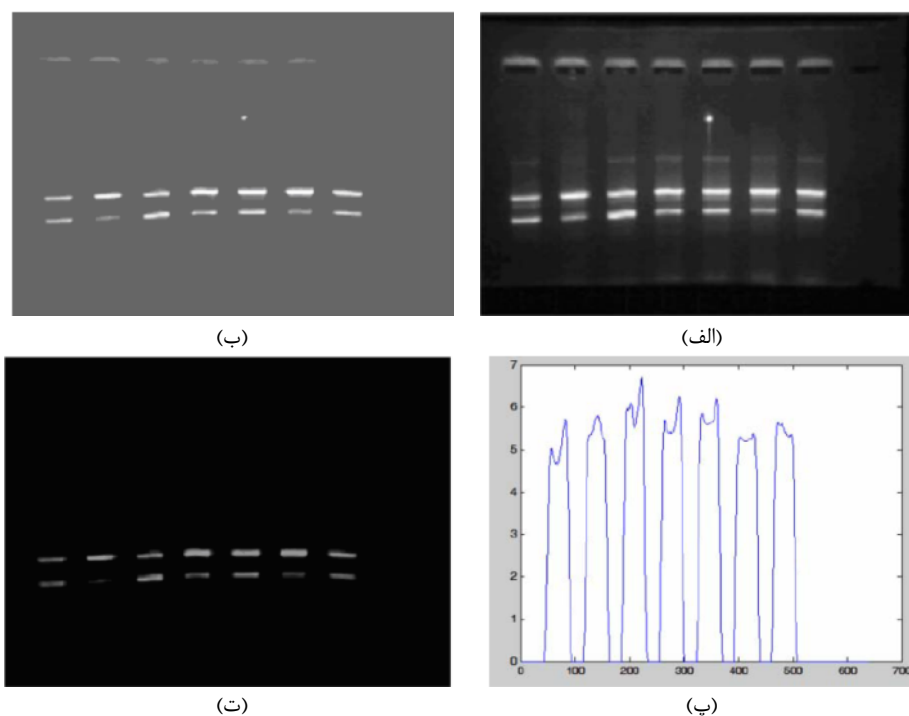
۳- بهبود: این مرحله برای تصاویر دارای کیفیت پایین، جهت افزایش دقت سیستم انجام می شود. هدف این مرحله مشخص کردن باندهای ضعیفی است که، ممکن است در فرایند آستانه گذاری بدلیل کم بودن

¹ shifting

سطح خاکستری‌شان از بین بروند. روش ارائه شده برای بهبود در این مقاله ترکیب فیلتر top-hot و فیلتر bottom-hot می باشد. نتیجه این ترکیب اختلاف بهتر بین باندهای تیره و روشن خواهد بود.

۴- پردازش داده: در این مرحله اطلاعات کمی مانند مقدار نمونه در هر باند و وزن مولکولی هر باند با محاسبه مساحت باند و موقعیت نسبی باند نسبت به باند مرجع بدست می‌آید.

تصاویر زیر مراحل انجام شده در این مقاله را نشان می دهند:



شکل ۲-۱۷- مراحل الگوریتم [۲۵] در تحلیل DNA (الف). تصویر ژل الکتروفورز، (ب). تصویر آستانه گذاری شده، (پ). پروفایل تصویر پس از مرحله shifting، (ت). تصویر خروجی

در [۲۶] یک سیستم اتوماتیک پردازش تصاویر دیجیتالی ژل الکتروفورز معرفی شده است. این سیستم به طور اتوماتیک تعداد، موقعیت لین‌ها و موقعیت باندهای هر لین را بدون دخالت کاربر شناسایی می‌کند، همچنین از یک لین مرجع برای محاسبه وزن مولکولی باندها استفاده کرده است.

مراحل انجام شده در این مقاله به شرح زیر می باشد:

۱-پیش پردازش: در این مرحله تصویر از حالت RGB به Gray تبدیل می شود سپس با استفاده از روش اتسو^۱ تصویر به باینری تبدیل می شود. نویز تصویر با استفاده از عملگر مورفولوژیکی open حذف می شود. سپس با توجه به هیستوگرام ستونی، تصویر به ۳ بخش تقسیم می شود که بخش وسط، لین های تصویر و بخش ۱ و ۳ کناره های تصویر را نشان می دهد که اطلاعاتی در آن ها وجود ندارد بنابراین حذف می شوند.

۲-شناسایی لین ها: در این مرحله تعداد و موقعیت لین ها شناسایی می شود. با محاسبه تعداد پیکسل های سیاه در هر سطر از تصویر باینری هیستوگرام تصویر تولید می شود و با توجه به توابع داده شده تعداد لین ها و موقعیت آن ها شناسایی می شود.

۳-استخراج باندها: در این مرحله هیستوگرام مربوط به هر لین ایجاد می شود، نقاط ماکزیمم محلی نشان -دهنده باندها می باشند. نقاط ماکزیمم محلی ضعیف و باندهای نادرست حذف می شوند. سایر نقاط ماکزیمم، مرکز باندهای لین را نمایش می دهد.

۴- تنظیم کردن با مرجع^۲

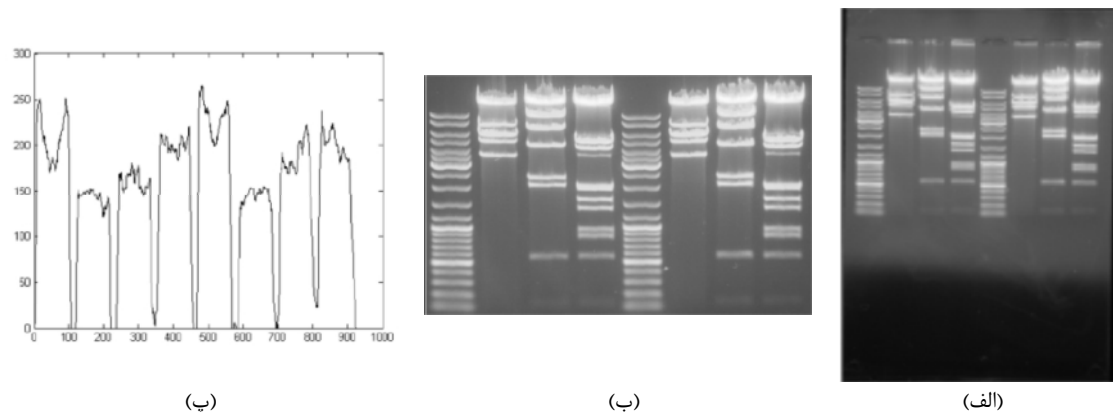
در این مرحله از ۵ نشانگر وزنی مولکول DNA جهت مقایسه با لین های تصویر استفاده شده است. هر یک از این نشانگرها دارای مشخصات منحصر به فردی هستند. به این معنا که تعداد باندهای ضعیف یا قوی و موقعیت نسبی باندها در این نشانگرها منحصر به فرد است. در مرحله تطبیق در ابتدا باندهای قوی تطبیق داده می شوند، اگر فاصله زیادی بین باند نشانگر و باند لین وجود داشته باشد باند در لین مورد بررسی حذف می شود. این فرایند برای ۵ نشانگر به همین ترتیب انجام می شود.

¹ Otsu

² Reference Calibration

۵- تحلیل لین: تطبیق بین نشانگرها و لین مورد نظر، تابعی را بین موقعیت باند و وزن مولکولی آن ایجاد می‌کند. سپس تخمین وزن مولکولی باند مشاهده شده بوسیله درونیابی خطی بین نزدیک‌ترین مقادیر در لین مرجع انجام می‌شود.

در این روش شناسایی موقعیت لین‌ها با کارایی بالا انجام می‌شود و محاسبه کمی وزن مولکولی بسته به شرایط آزمایشگاهی با متوسط خطای ۹.۲٪ انجام می‌شود.



شکل ۲-۱۸ - مراحل الگوریتم [۲۶] (الف). تصویر ژل (ب). بخش وسط تصویر ژل، (پ). مرحله شناسایی باندها

در [۲۷] روشی برای شناسایی لین‌ها در الکتروفورز آگارز ارائه شده است که بدون دخالت انسان دقیقی در حدود ۹۸٪ دارد. در تحلیل تصاویر ژل اولین کار شناسایی نواحی ژلی است که نمونه در آن حرکت کرده است به این فرایند دنبال کردن لین^۱ گفته می‌شود. در گذشته این کار به طور دستی و با صرف زمان زیادی، برای اطمینان از داده‌های استخراج شده انجام می‌شد. در روش ارائه شده در این مقاله این فرایند به طور اتوماتیک و در ۴ مرحله انجام شده است.

۱- پردازش تصویر: این مرحله شامل حذف نویز با روش فیلتر میانگین، بهبود لین‌ها با عملگر مورفولوژیکی close و بهبود شدت رنگ با انتقال نقطه ای می‌باشد.

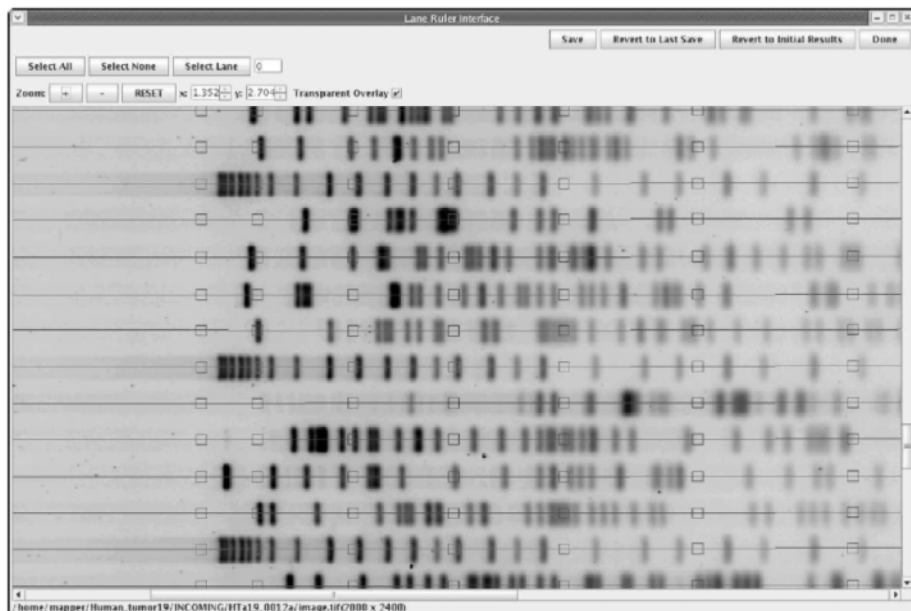
¹ lane tracking

۲-تحلیل پهنای ژل: در این مرحله تحلیل‌هایی روی پهنای ژل به منظور تعیین محدوده و شرایط کلی داده‌ها در تصویر ژل انجام شده است. در این مرحله داده‌ها به نواحی تقسیم می‌شوند و برای هر ناحیه متناسب با شدت رنگ آن، نودهایی تعیین می‌شود. سپس بر اساس تحلیل فوریه پهنای لین تعیین می‌شود.

۳-قراردادن نودها: پس از تعیین محدود داده‌ها و نواحی، مجموعه ای از نودها برای تعیین مرکز لین‌ها روی تصویر قرار می‌گیرند. موقعیت هر نودی که تطبیق نداشته باشد بر اساس درون یابی خطی از موقعیت نزدیک‌ترین نودهای تطبیق یافته تعیین می‌شود.

۴- ضمانت و کنترل کیفیت: در این مرحله نتایج، بررسی و اصلاح می‌شود. در این مرحله نتایج توسط کاربر قابل تغییر هستند.

تصویر زیر نتیجه اجرای الگوریتم فوق را نمایش می‌دهد.

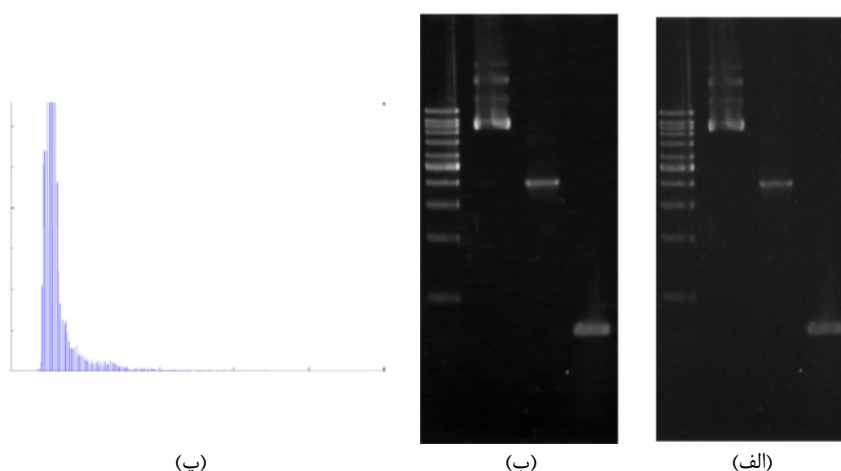


شکل ۲-۱۹- نتیجه اجرای الگوریتم lane tracking [۲۷]

در [۲۸] روشی جهت قطعه بندی باندها از پس زمینه برای تصاویر ژل الکتروفورز ارائه شده است. در این روش از آستانه گذاری چند سطحی با روش اتسو بر اساس PSO^۱ استفاده شده است. الگوریتم PSO نیز جهت یافتن تعداد سطوح آستانه گذاری بکار گرفته شده است. مراحل انجام این روش به شرح زیر می باشد:

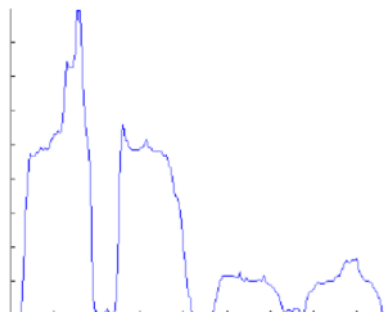
۱- پیش پردازش: این مرحله شامل حذف بافت شبکه ای توسط فیلتر گوسین پایین گذر و سپس استفاده از عملگر موفولوژیکی close می باشد .

۲- آستانه گذاری: با توجه به هیستوگرام ژل امکان انتخاب یک حد آستانه برای جداسازی باندها از پس زمینه وجود ندارد. بنابراین آستانه گذاری چند سطحی با روش اتسو اعمال می شود و الگوریتم PSO برای تعیین تعداد سطوح آستانه گذاری به کار می رود. در این روش ۳ سطح آستانه گذاری انتخاب شده است. در این روش پس از اعمال آستانه گذاری تصویری با پس زمینه یکنواخت بدست می آید. تصاویر زیر مراحل این روش را نشان می دهند.

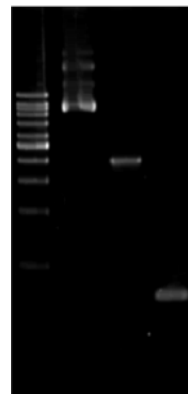


شکل ۲-۲۰- مراحل الگوریتم [۲۸] (الف). تصویر ژل (ب). تصویر ژل پس از پیش پردازش (پ). هیستوگرام تصویر

¹ Particle Swarm Optimization



(ب)



(الف)

شکل ۲-۲۱- نتایج استخراج لین ها [۲۸](الف). تصویر ژل پس از آستانه گذاری (ب). پروفایل تصویر

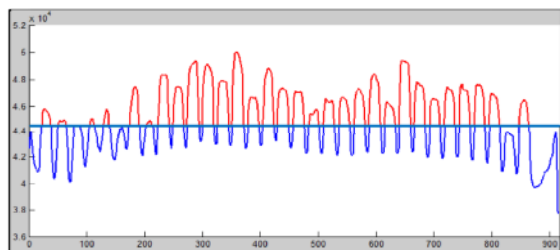
در [۲۹] روشی برای دنبال کردن مرکز و شناسایی لین ها به عنوان اولین مرحله در تحلیل تصاویر DNA ارائه شده است. در این روش تصویر به بخش های کوچک تری تقسیم شده و با استفاده از نقاط ماکزیمم محلی مرکز لین ها مشخص شده است. دقت این روش برای ۹۳۴ لین در حدود ۹۹٪ می باشد. این الگوریتم شامل ۵ مرحله به شرح زیر می باشد:

- ۱- حذف نویز: در این مرحله از فیلتر میانگین با اندازه ۵*۵ استفاده شده است.
- ۲- تخمین متوسط پهنای لین با استفاده از پروفایل عمودی: اعداد بدست آمده در پروفایل عمودی توسط الگوریتم k-means با $k=2$ به دو گروه تقسیم می شوند. سپس فاصله نقاط ابتدا و انتهای هر یک از پیک های که در گروه بالا قرار دارد محاسبه شده و میانگین (w) آن ها بدست می آید.
- ۳- تقسیم بندی تصویر بر اساس لین ها با استفاده از پروفایل افقی: میانگین (μ)، انحراف معیار (δ) و ماکزیمم سراسری (m) پروفایل افقی تصویر محاسبه می شود. محدوده $[\mu - \delta, \mu + \delta]$ به عنوان محدوده لین ها در تصویر ژل می باشد و سپس تصویر ژل به لین هایی تقسیم می شود.

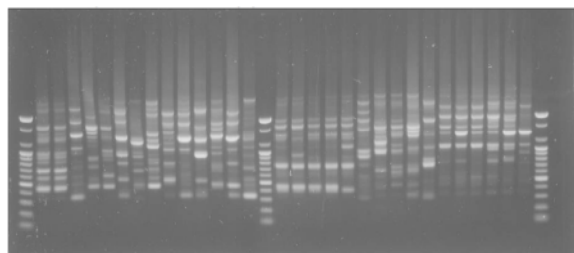
۴- یافتن نقاط ماکزیمم محلی در هر لین: در این مرحله برای پروفایل عمودی هر لین نقاط ماکزیمم محلی محاسبه می شود، این نقاط مرکز لین را نشان می دهند.

۵- حذف نقاط ماکزیمم محلی خارج از لین: این نقاط بر اساس توزیع شدت رنگ نقاط ماکزیمم محلی در تصویر حذف می شوند. توزیع شدت رنگ در هر نقطه ماکزیمم محلی (m) با میانگین پنجره $w*w$ به مرکز m در نظر گرفته می شود. اگر مقدار آن کمتر از شدت رنگ کل باشد حذف می شود.

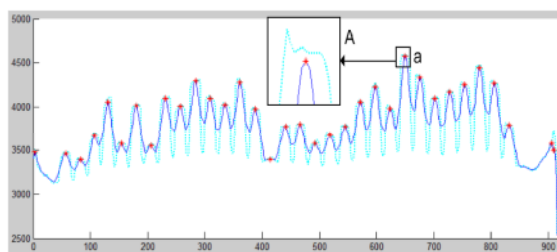
۶- تشکیل لین بوسیله اتصال نقاط ماکزیمم محلی: در انتها نقاط ماکزیمم محلی هر لین به یکدیگر متصل می شوند. تصاویر زیر مراحل الگوریتم فوق را نشان می دهند.



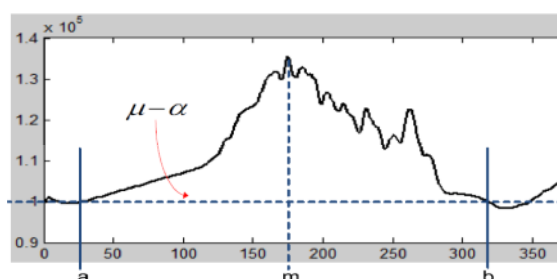
(ب)



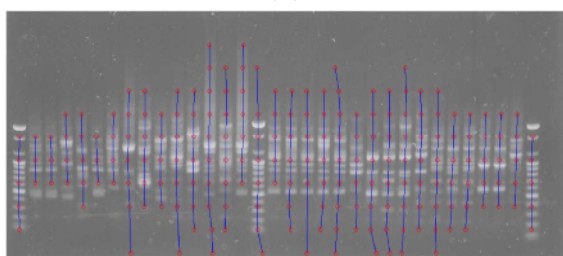
(الف)



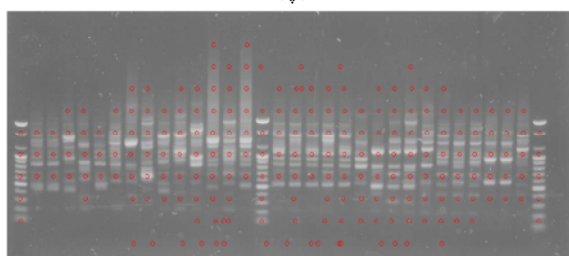
(ت)



(پ)



(ج)



(ث)

شکل ۲-۲۲- مراحل الگوریتم استخراج لین ها [۲۹] (الف). تصویر ژل، (ب). پروفایل عمودی ژل و گروه بندی آن، (پ). پروفایل افقی ژل و انتخاب محدوده لین ها، (ت). نقاط ماکزیمم محلی در یک لین، (ث). نقاط ماکزیمم محلی در تصویر ژل، (ج). اتصال نقاط ماکزیمم محلی

۲-۵- نتیجه گیری

در این فصل علاوه بر تشریح گسترده‌تر الکتروفورز و روش‌های آن به مروری بر اقدامات انجام شده در زمینه الکتروفورز پرداختیم. در تمامی مراحل ارائه شده در این مقالات تکنیک‌های پردازش تصویر از قبیل آستانه گذاری، حذف نویز، بهبود تصاویر و استخراج اشیاء از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند، چرا که با انجام درست این مراحل، تحلیل تصاویر با دقت بالاتری انجام خواهد شد.

از آنجا که هدف این پایان‌نامه کمک به تحلیل درست تصاویر الکتروفورز هموگلوبین خون و پروتئین سرم خون است، انجام مراحل فوق از اهمیت بالایی جهت تحلیل تصاویر برخوردار است. در فصل بعد تکنیک‌های پردازش تصویر استفاده شده در این پایان‌نامه معرفی شده اند و در فصل چهارم جایگاه استفاده از این تکنیک‌ها در قالب الگوریتم پیشنهادی معرفی خواهد شد.

فصل سوم: تکنیک های استفاده شده

در تحلیل تصاویر الکتروفورز

در این فصل ساختار تکنیک های پردازش تصویر مورد استفاده در تحلیل تصاویر الکتروفورز معرفی شده است. آستانه گذاری با روش اتسو، هموارسازی با روش سویزکی-گلی و ارتقاء تصویر با روش کشش هیستوگرام از تکنیک های مهمی هستند که در این پایان نامه به کار برده شده اند.

۳-۱- مقدمه

این فصل به معرفی ساختار تکنیک‌های استفاده شده در تحلیل تصاویر الکتروفورز پرداخته است. روش آستانه گذاری^۱ اتسو که در مقالات زیادی به عنوان تکنیکی کارآمد در آستانه‌گذاری به کار رفته است، حد آستانه را در تصویر به گونه‌ای انتخاب می‌کند که واریانس درون کلاسی را به حداقل برساند. در این پایان نامه جهت استخراج لین‌ها از ژل از روش آستانه گذاری اتسو استفاده شده است.

تکنیک هموارسازی^۲ که در این پایان‌نامه به کار گرفته شده است و نقش مهمی در تحلیل تصاویر الکتروفورز دارد تکنیک سویزکی-گلی^۳ می‌باشد. این تکنیک تعمیم یافته روش میانگین متحرک می‌باشد و بر اساس تقریب چندجمله‌ای حداقل مربعات، درون پنجره‌ای از داده‌ها اقدام به هموارسازی داده‌ها می‌کند.

تکنیک دیگری که در این پایان‌نامه به کار برده شده است، ارتقاء تصویر^۴ به روش کشش هیستوگرام است که به منظور بهبود جزئیات تصاویر الکتروفورز استفاده می‌شود.

هدف این فصل معرفی ساختار تکنیک‌های فوق و ارائه برخی نتایج اعمال این تکنیک‌ها روی تصاویر الکتروفورز می‌باشد. جایگاه استفاده از این تکنیک‌ها در فصل چهارم به تفصیل ارائه خواهد شد.

۳-۲- آستانه گذاری به روش اتسو

آستانه گذاری یکی از رایج ترین الگوریتم‌هایی است که به طور گسترده برای قطعه بندی تصاویر به کار می‌رود. ایده اصلی آستانه گذاری انتخاب یک حد آستانه‌ی بهینه‌ای است که بتوان از طریق آن اشیاء مورد نظر را از پس زمینه تصویر جدا کرد. در سال‌های اخیر روش‌های زیادی برای انتخاب حد آستانه در

¹ Thresholding

² Smoothing

³ Savitzky-Golay

⁴ Image enhancement

مقالات مختلف ارائه شده است [۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳]. یکی از تکنیک‌های آستانه گذاری که به عنوان تکنیکی

کارآمد در آستانه گذاری معرفی شده است، اتسو نام دارد [۳۴].

در روش اتسو فرض می‌شود که دو توزیع (پس زمینه و پیش زمینه) وجود دارد، حد آستانه به گونه‌ای انتخاب می‌شود که واریانس درون کلاسی دو توزیع را به حداقل برساند [۳۵، ۳۶]. این روش بر اساس تحلیل سطح خاکستری هیستوگرام کل تصویر، حد آستانه‌ی بهینه‌ای را انتخاب می‌کند. محاسبات این روش برای تصاویر بزرگ آسان و ساده است [۳۷].

این روش در سال ۱۹۷۹ توسط اتسو به عنوان روشی برای آستانه گذاری دو سطحی معرفی شد. در این روش $f(x, y)$ یک تصویر دو بعدی با L سطح خاکستری را نشان می‌دهد، که هر سطح خاکستری دارای محدوده $[0, 1, 2, \dots, (L - 1)]$ می‌باشد. تعداد پیکسل‌ها با سطح خاکستری i با n_i نشان داده می‌شود. بنابراین احتمال سطح خاکستری i در یک تصویر به صورت زیر نشان داده می‌شود:

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (1-3)$$

فرض کنید که تصویر با یک حد آستانه t به دو کلاس C_1 و C_2 (پس زمینه و پیش زمینه) تقسیم شود. کلاس C_1 پیکسل‌هایی با سطح $[0, 1, 2, \dots, (t - 1)]$ و C_2 پیکسل‌هایی با سطح $[t, \dots, (L - 1)]$ را نشان می‌دهند. میانگین دو کلاس C_1 و C_2 به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$\mu_1 = \sum_{i=0}^{t-1} \frac{ip_i}{q_1} \quad (2-3)$$

$$\mu_2 = \sum_{i=t}^{L-1} \frac{ip_i}{q_2} \quad (3-3)$$

بطوری که :

$$q_1 = \sum_{i=0}^{t-1} p_i \quad (4-3)$$

$$q_2 = \sum_{i=t}^{L-1} p_i \quad (5-3)$$

واریانس کلاس‌ها به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\sigma_1^2 = \sum_{i=0}^{t-1} \frac{(i-\mu_1)p_i}{q_1} \quad (۶-۳)$$

$$\sigma_2^2 = \sum_{i=t}^{L-1} \frac{(i-\mu_2)p_i}{q_2} \quad (۷-۳)$$

اتسو واریانس درون کلاسی را به صورت زیر معرفی می کند:

$$\sigma_w^2(t) = q_1\sigma_1^2 + q_2\sigma_2^2 \quad (۸-۳)$$

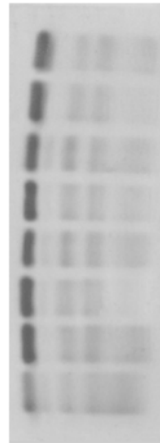
روش اتسو تضمین می کند که t حد آستانه بهینه ای است که واریانس درون کلاسی را به حداقل می رساند. همچنین از این روش می توان برای آستانه گذاری چند سطحی نیز استفاده کرد. فرض کنید که C حد آستانه، برای تصویر به صورت $[t_1, t_2, \dots, t_c]$ داده شده است، بنابراین تابع هدف جهت مینیمم سازی واریانس درون کلاسی به صورت زیر می باشد [۲۸]:

$$\sigma_w^2([t_1, t_2, \dots, t_c]) = q_1\sigma_1^2 + q_2\sigma_2^2 + \dots + q_c\sigma_c^2 \quad (۹-۳)$$

تصویر زیر اثر آستانه گذاری اتسو را در قطعه بندی ژل الکتروفورز نشان می دهد.



(ب)



(الف)

شکل ۳-۱- آستانه گذاری اتسو (الف) تصویر ژل، (ب) نتیجه آستانه گذاری ژل به روش اتسو

۳-۳- هموارسازی داده ها

هموارسازی داده‌ها یکی از تکنیک‌هایی است که برای کاهش اثر نویز و استخراج الگوی واقعی داده‌ها به کار می‌رود. اگر داده‌های ما به شکل سیگنال باشند، نویز می‌تواند ویژگی‌های اصلی سیگنال مانند پیک‌ها، دره‌ها^۱ و یا عرض پیک‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که این مسئله باعث می‌شود محاسبه سایر ویژگی‌های سیگنال نیز مانند شیب، نواحی و پهنای پیک‌ها با مشکلاتی مواجه شود. بنابراین با هموارسازی سیگنال نویزی ویژگی‌های مهم سیگنال قابل رؤیت خواهد بود. روش‌های مختلف با کارایی متفاوت برای این مسئله معرفی شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های میانگین متحرک^۲ و سویزکی - گلی اشاره کرد. در ادامه به توضیح مختصر هر یک روش‌های فوق می‌پردازیم.

۳-۳-۱- میانگین متحرک

روش میانگین متحرک یکی از ساده‌ترین روش‌های هموارسازی داده‌ها می‌باشد [۳۸]. در این روش فرض می‌کنیم دنباله‌ای از اعداد و یک مقدار ثابت m به عنوان اندازه زیر مجموعه (پنجره) داریم. اولین مقدار میانگین متحرک از طریق محاسبه میانگین m مقدار اول داده‌ها بدست می‌آید. سپس زیرمجموعه به سمت جلو جابجا می‌شود به این معنا که عدد اول زیر مجموعه حذف می‌شود و عدد بعد از زیر مجموعه در دنباله داده‌ها به زیر مجموعه اضافه می‌شود. این روند تا پایان دنباله‌ی داده‌ها تکرار می‌شود. در نتیجه یک مجموعه جدید از اعداد ایجاد می‌شود که میانگین‌ها هستند. بنابراین میانگین متحرک، مجموعه‌ای از اعداد است که هر یک از اعضای آن میانگین مربوط به زیر مجموعه‌ای از داده‌های مجموعه‌ی بزرگتر است [۳۹].

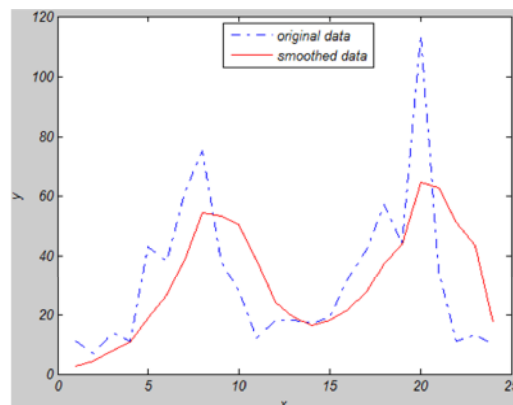
^۱ valleys

^۲ Moving Average

میانگین متحرک معمولاً با داده‌های سری زمانی و غیرسری زمانی بکار می‌رود. این روش در ریاضیات نوعی کانولوشن و در پردازش سیگنال نوعی فیلتر پایین‌گذر محسوب می‌شود [۳۹]. رابطه‌ای که برای محاسبه میانگین متحرک به کار می‌رود به صورت زیر می‌باشد:

$$y_s(i) = \sum_{n=-m}^{n=m} c_n y_{i+n} \quad (۱۰-۳)$$

که $y_s(i)$ مقدار هموار شده برای داده i ام، n تعداد نقاط همسایگی در سمت چپ و راست داده i ام و $c_n = \frac{1}{2n+1}$ است [۴۰]. بنابراین اندازه پنجره $2n + 1$ می‌باشد. شکل زیر مثالی از هموارسازی میانگین متحرک را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۲- میانگین متحرک با اندازه پنجره ۵

۳-۲-۳- هموارسازی سوزیکی - گلی

سوزیتزکی و گلی در سال ۱۹۶۴ [۳۸] روشی را برای هموارسازی داده‌ها بر اساس تقریب چند جمله‌ای حداقل مربعات معرفی کردند. آن‌ها نشان دادند که برازش کردن یک چند جمله‌ای به مجموعه‌ای از داده‌های ورودی و سپس ارزیابی نتیجه چند جمله‌ای در یک نقطه در محدوده تقریب، برابر با کانولوشن

گسسته با پاسخ ضربه‌ای^۱ ثابت است. هدف آن‌ها هموارسازی داده‌های نویزی بدست آمده از تحلیلگرهای طیفی شیمیایی بود، آن‌ها نشان دادند که هموارسازی حداقل مربعات، نویز را کاهش می‌دهد در حالی که شکل و ارتفاع پیک‌های شکل موج را حفظ می‌کند [۴۱].

روش سویزکی-گلی تعمیم یافته روش میانگین متحرک می باشد. این روش بر اساس مقادیر کانولوشن و تابع کانولوشن است. تصویر زیر فرایند کانولوشن می باشد که در روش سویزکی معرفی شده است .

1800.0			705
1799.8			712
1799.6			717
1799.4			718
1799.2			721
1799.0			722
1798.8	x_o-2	c_{-2}	725
1798.6	x_o-1	c_{-1}	730
1798.4	x_o	c_o	735
1798.2	x_o+1	c_1	736
1798.0	x_o+2	c_2	741
1797.8			746
1797.6			750

شکل ۳-۳- عملگر کانولوشن [۳۸].

مجموعه سمت راست داده ها (مقادیر عرض) و مجموعه سمت چپ اطلاعات طول می باشند. کادر وسط نشان دهنده تعدادی از اعداد طول، در محدوده (۲،...،۲-) و C ها مقادیر کانولوشن هستند. برای انجام عمل کانولوشن مقدار C_i در مقدار داده متناظر از سمت راست ضرب می شود نتایج ضرب‌ها جمع می شود و در انتها بر ۵ تقسیم می شود. در اینجا ۵ فاکتور نرمال سازی می باشد. برای محاسبه نقطه بعد در میانگین متحرک، کادر وسط یک ردیف پایین می آید و فرایند فوق تکرار می شود [۳۸].

مفهوم کانولوشن می‌تواند تحت میانگین متحرک تعمیم یابد. در حالت کلی C ها مجموعه مقادیر کانولوشن را نشان می دهند. یک فاکتور نرمال سازی هم وجود دارد. ابتدا C_2 در عدد روبروی اش ضرب می شود

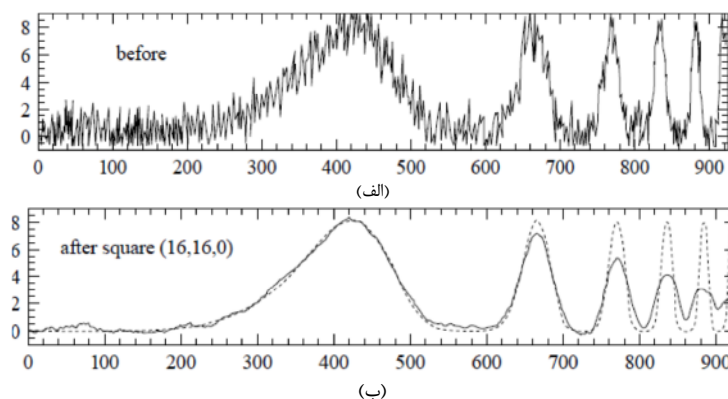
¹ impulse response

سپس C_{-1} و به همین ترتیب سایر C ها در مقدار روبری شان ضرب می شوند، در مرحله بعد نتایج ضرب با هم جمع می شوند و سپس بر فاکتور نرمال سازی تقسیم می شوند. نتیجه بدست آمده مقدار جدید برای مقدار داده متناظر با C_0 خواهد بود. برای نقطه بعد مجموعه نقاط کانولوشن به سمت پایین حرکت می کند و فرایند فوق تکرار می شود. رابطه زیر فرایند فوق را نشان می دهد [۳۸]:

$$y_i = \frac{\sum_{j=-m}^{i=m} C_j Y_{j+i}}{N} \quad (۱۱-۳)$$

که y_j مقدار داده عرض، N فاکتور نرمال سازی، m تعداد همسایگی از سمت چپ و راست داده مورد نظر و Y_i مقدار جدید متناظر با C_0 می باشد.

در میانگین متحرک $c_i = 1$ است و N تعداد اعداد کانولوشن است. هر چند برای بسیاری از انواع داده ها، یک بودن C_i مفید نخواهد بود. برای مثال در مواردی که پیک ها شارپ هستند روش میانگین متحرک باعث کاهش طول پیک ها می شود [۲۹]. تصویر زیر نتیجه هموار سازی به روش میانگین متحرک را نشان می دهد.



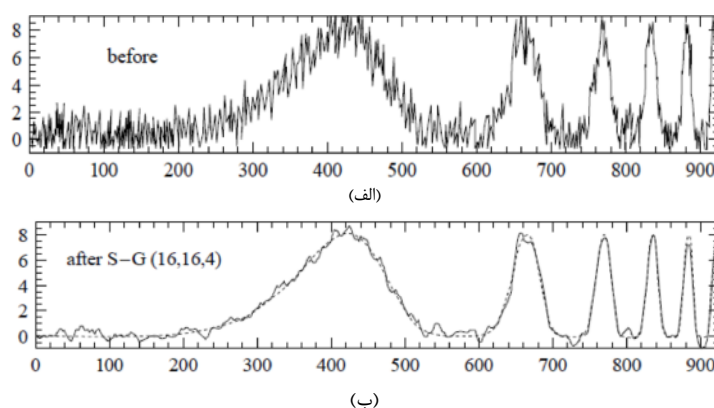
شکل ۳-۴ اثر میانگین متحرک، الف) سیگنال نویزی، ب) سیگنال هموار شده به روش میانگین متحرک با $M=16$ (خطوط نقطه چین سیگنال اصلی را نشان می دهند) [۴۰].

ایده فیلتر سویزکی یافتن ضرایب C_i است. در واقع ایده این فیلتر تخمین تابع اساسی درون پنجره متحرک با چند جمله ای درجه بالا می باشد. برای هر نقطه y_j یک چند جمله ای حداقل مربعات به $2N+1$

نقطه در پنجره متحرک برازش می‌شود و سپس با محاسبه y_i موقعیت جدید نقطه i (مرکز پنجره) بدست می‌آید. سپس پنجره به جلو جابجا می‌شود و مجدداً چند جمله‌ای حداقل مربعات برای موقعیت جدید مرکز پنجره متحرک محاسبه می‌شود. در این صورت برای هر پنجره با توجه به چند جمله‌ای آن ضرایب متفاوتی بدست می‌آید که انجام این کار دشوار و زمان بر خواهد بود [۴۲،۴۰].

از این جهت سویزکی و گلی در مقاله خود جداولی را بدست آورده‌اند که ضرایب C_i برای پنجره با اندازه-های ۵ تا ۲۵ نقطه، چند جمله‌ای با درجات ۲،۳،۴،۵، مشتق تا مرتبه ۵ به همراه فاکتور نرمال سازی را نشان می‌دهند [۳۸].

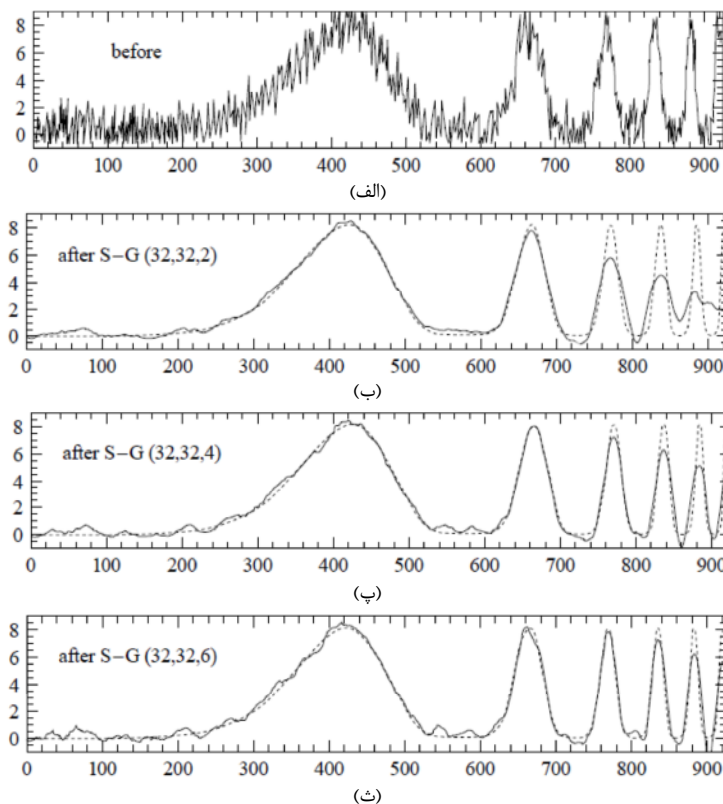
بنابراین زمانی که سیگنال ورودی در ضرایب C_i کانولوشن شود، برازش چند جمله‌ای حداقل مربعات به طور اتوماتیک انجام می‌شود، که این یکی از ویژگی‌های ذاتی روش سویزکی - گلی معرفی شده است [۴۳]. همان‌طور که گفته شد این روش هموارسازی نویز را در حالی کاهش می‌دهد که شکل و ارتفاع پیک‌های سیگنال نویزی را تا حد ممکن حفظ می‌کند. تصویر زیر نتیجه هموارسازی به این روش را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۵- اثر هموارسازی سویزکی-گلی. الف) سیگنال نویزی، ب) سیگنال هموار شده به روش S-G با $M=16$ (اندازه پنجره $2M+1=32$) (خطوط نقطه چین سیگنال اصلی را نشان می‌دهند) [۴۰].

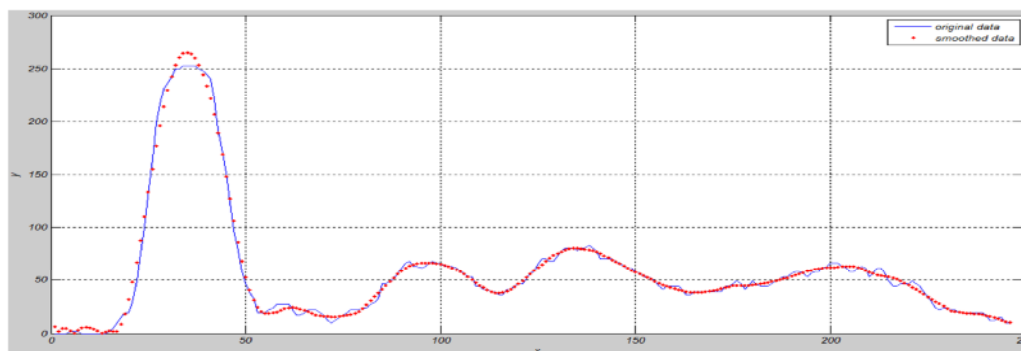
پارامترهای ورودی برای فیلتر سویزکی-گلی شامل درجه چندجمله‌ایی و تعداد نقاط هموارسازی است. انتخاب تعداد نقاط از اهمیت بالایی برخوردار است. اگر تعداد بسیار کم باشد خطای جدیدی را در داده‌ها ایجاد می‌کند و اگر تعداد بسیار زیاد باشد داده‌های طیفی شامل اطلاعات را از بین خواهد برد. بنابراین با توجه به کاربرد، پارامترهای هموارسازی متفاوت خواهند بود [۴۴].

انتخاب درجه چندجمله‌ایی هم در نتیجه بسیار تأثیر گذار خواهد بود، تصویر زیر نتیجه هموارسازی با ۳ درجه متفاوت را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۶- اثر سویزکی-گلی با درجات مختلف. نتیجه اعمال فیلتر S-G با $M=16$ (اندازه پنجره $2M+1=32$ و درجات مختلف. الف) سیگنال نویزی، ب) درجه ۲، پ) درجه ۴، ت) درجه ۶ [۴۰].

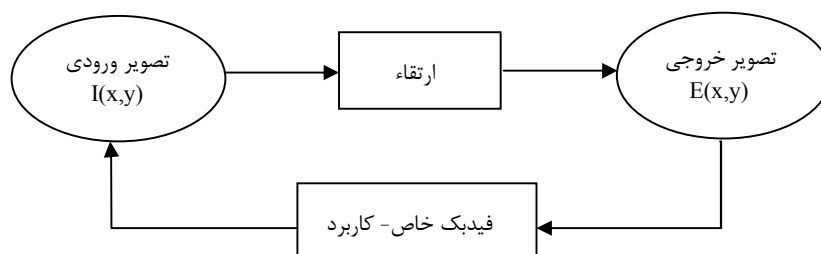
با توجه به تصاویر فوق این نتیجه برداشت می شود که درجات بالاتر ویژگی عرض و ارتفاع را بهتر حفظ می کنند درحالی که هموارسازی کمتری روی ویژگی های پهن تر انجام می دهند. تصویر زیر نمونه ای از اثر هموارسازی به روش سویزکی-گلی را روی نمودار یک لین نشان می دهد.



شکل ۳-۷- اثر هموارسازی روی نمودار یک لین

۳-۴- ارتقاء تصویر

ارتقای تصویر، پردازشی است که در آن تصویر تولید شده برای پردازش های بعدی یا برای دیدن مناسب تر از تصویر اصلی می باشد. روش های ارتقاء تصاویر وابستگی زیادی به کاربرد دارند، از این رو اغلب این روش ها به طور تجربی و آزمایشی توسعه داده می شوند. در شکل زیر فیدبکی از تصویر خروجی گرفته و به نقطه شروع پردازش اعمال شده است که بیانگر اهمیت نوع کاربرد می باشد. همچنین این شکل ماهیت تجربی بودن این نوع پردازش را نشان می دهد.



شکل ۳-۸- پردازش ارتقاء تصویر بر اساس فیدبک از تصویر خروجی [۴۵]

روش‌های ارتقاء تصویر می‌تواند در حوزه مکان یا حوزه فرکانس صورت پذیرد. درحوزه مکان پردازش مستقیماً روی پیکسل‌های تصویر انجام می‌شود. پردازش در حوزه فرکانس نیز به مفهوم اصلاح مولفه‌های فرکانسی تصویر است.

برخی از روش‌های ارتقاء تصویر مقدار سطح روشنایی پیکسل‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند بدون این که مقادیر سایر پیکسل‌ها در محاسبه تاثیری داشته باشند، این روش‌ها به پردازش نقطه‌ای معروف هستند. در برخی روش‌ها از نقاب^۱ استفاده می‌شود، به این صورت که مقدار جدید هر پیکسل بستگی به مقدار پیکسل‌های همسایه آن دارد که نقاب، تعیین کننده اندازه همسایگی است. در روش‌های دیگر که پردازش سراسری نام دارند مقادیر تمام پیکسل‌های تصویر برای محاسبه مقدار جدید هر پیکسل استفاده می‌شوند.

۳-۴-۱- پردازش بر اساس هیستوگرام تصویر

برخی از روش‌های ارتقاء تصویر بر اساس پردازش هیستوگرام عمل می‌کنند. بنابراین دراین بخش به معرفی هیستوگرام و پردازش‌های آن می‌پردازیم. هیستوگرام برای یک تصویر دیجیتال با سطوح روشنایی در محدوده $[0, L - 1]$ تابعی است گسسته که به صورت زیر تعریف می‌شود [۲]:

$$h(r_k) = n_k \quad (۱۲-۳)$$

که r_k یک سطح روشنایی موجود در تصویر و n_k تعداد پیکسل‌هایی است که دارای سطح روشنایی r_k هستند. اگر مقادیر سطوح روشنایی یک تصویر در محدوده $[0, L - 1]$ قرار داشته باشند، در آن صورت هیستوگرام به صورت یک تابع گسسته رسم می‌شود که محور افقی شامل سطوح خاکستری و محور عمودی نیز تعداد پیکسل‌ها به ازای هر سطح خاکستری می‌باشد.

^۱ mask

می‌توان تابع هیستوگرام را با تقسیم بر n (تعداد کل پیکسل‌های موجود در تصویر) نرمالیزه کرد:

$$p(r_k) = \frac{n_k}{n} \quad (۱۳-۳)$$

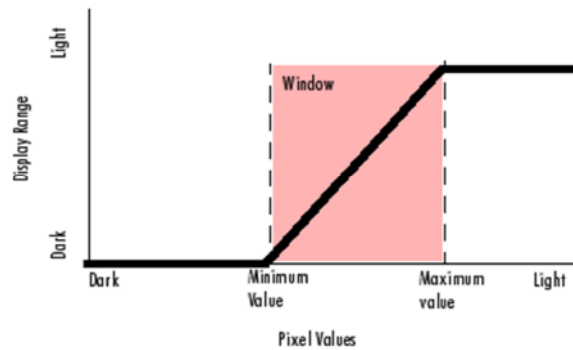
رابطه فوق تابع هیستوگرام نرمالیزه شده را نشان می‌دهد این تابع در حقیقت احتمال وقوع سطح r_k را در تصویر نشان می‌دهد.

کشش، فشردگی و جابجایی هیستوگرام از اصلاحاتی است که می‌توان به منظور ارتقاء تصویر روی هیستوگرام انجام داد. کشش هیستوگرام^۱، باعث کشش هیستوگرام یک تصویر در کل محدوده سطح خاکستری می‌شود که نتیجه آن افزایش کنتراست تصویر می‌باشد. فشردگی هیستوگرام، کنتراست تصویر را با فشردن سطوح خاکستری پایین می‌آورد. جابجایی هیستوگرام تصویر را تیره‌تر یا روشن‌تر می‌کند اما رابطه بین مقادیر سطح خاکستری را حفظ می‌کند. به عبارت دیگر مشتق بدون تغییر باقی می‌ماند به این دلیل که فقط یک سطح ثابت به تصویر اضافه شده است [۴۶].

۳-۴-۱-۱- کشش هیستوگرام

یک تصویر خاکستری فاقد کنتراست تصویری است، که تفاوت واضحی بین رنگ سیاه و سفید در آن وجود نداشته باشد. برای تغییر کنتراست تصویر می‌توان از روش کشش هیستوگرام استفاده کرد. در این فرایند مقادیر پیکسل‌های کمتر از یک مقدار مشخص شده (حد پایین) سیاه می‌شوند و مقادیر پیکسل‌های بالاتر از یک مقدار مشخص شده (حد بالا) سفید می‌شوند و پیکسل‌های بین دو مقدار مشخص شده به مقادیر خاکستری تغییر پیدا می‌کنند. نتیجه این فرایند، نگاشت خطی یک زیرمجموعه‌ای از مقادیر پیکسل‌ها به کل محدوده خاکستری خواهد بود که باعث افزایش کنتراست تصویر خواهد شد. تصویر زیر این نگاشت خطی را نشان می‌دهد. حد پایین و حد بالا به صورت نقطه چین نشان داده شده است.

¹ Histogram stretching

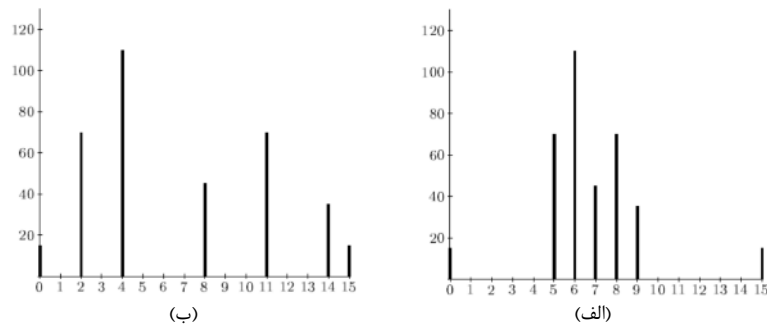


شکل ۳-۹- نگاشت خطی کشش هیستوگرام [۴۷]

تابع نگاشت مورد نیاز برای کشش هیستوگرام به صورت زیر بیان می‌شود:

$$g(x, y) = \left(\frac{f(x, y) - f(x, y)_{min}}{f(x, y)_{max} - f(x, y)_{min}} \right) [max - min] + min \quad (۱۴-۳)$$

که در رابطه فوق $f(x, y)_{max}$ و $f(x, y)_{min}$ به ترتیب بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین مقدار سطح خاکستری موجود در تصویر ورودی $f(x, y)$ می‌باشند. Min و Max حداکثر و حداقل مقدار ممکن برای سطوح، با توجه به تعداد بیت‌ها هستند، به عنوان مثال برای یک تصویر ۸ بیتی این مقادیر بین ۲۵۵ و ۰ می‌باشند. رابطه فوق منجر به کشش هیستوگرام یک تصویر در کل محدوده سطح خاکستری می‌شود و نتیجه آن افزایش کنتراست تصویر خواهد بود. تصویر زیر مثالی از کشش هیستوگرام را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۱۰- مثالی از کشش هیستوگرام. (الف) هیستوگرام تصویر با کنتراست پایین، (ب) نتیجه کشش هیستوگرام [۴۷].

تصویر زیر اثر کشش هیستوگرام به منظور ارتقاء تصویر در لین الکتروفورز پروتئین سرم را نشان می دهد.



شکل ۳-۱۱- نتیجه ارتقاء تصویر الکتروفورز پروتئین (کشش هیستوگرام). (الف) تصویر لین، (ب) نتیجه بهبود کنتراست به روش کشش هیستوگرام

۳-۴-۱-۲- متعادل سازی هیستوگرام^۱

متعادل سازی یکی از رایج ترین تکنیک های ارتقاء کنتراست تصویر می باشد [۴۹، ۴۸]. در این روش هیستوگرام تصویر تا حد امکان مسطح می شود. اساس متعادل سازی هیستوگرام مبتنی بر تئوری احتمالات است که در آن هیستوگرام به عنوان تابع توزیع احتمال سطوح روشنایی تصویر در نظر گرفته می شود. توصیف ریاضی تبدیلی که توسط آن متعادل سازی هیستوگرام صورت می گیرد به صورت زیر است:

$$s_k = T(r_k) = \sum_{j=0}^k \Pr(r_j) = \frac{1}{MN} \sum_{j=0}^k n_j \quad k = 0, 1, 2, \dots, L-1 \quad (۳-۱۴)$$

^۱ Histogram equalization

n_j تعداد پیکسل‌هایی است که سطح خاکستری آن‌ها برابر r_j می‌باشد، L تعداد کل سطوح روشنایی در تصویر و MN نیز تعداد کل پیکسل‌های تصویر است. تصویر خروجی با نگاشت به سطح خاکستری پیکسل k ام در تصویر ورودی (یعنی r_k) به مقدار متناظر آن یعنی S_k به دست خواهد آمد. به عبارت دیگر تصویر خروجی، تصویری خواهد بود که با جایگزینی سطح r_k در تصویر اصلی با سطح S_k بدست می‌آید. S_k مقدار نرمالیزه شده است بنابراین بایستی در بزرگ‌ترین سطح خاکستری موجود در تصویر اصلی (یعنی $L-1$) ضرب شود [۴۵].

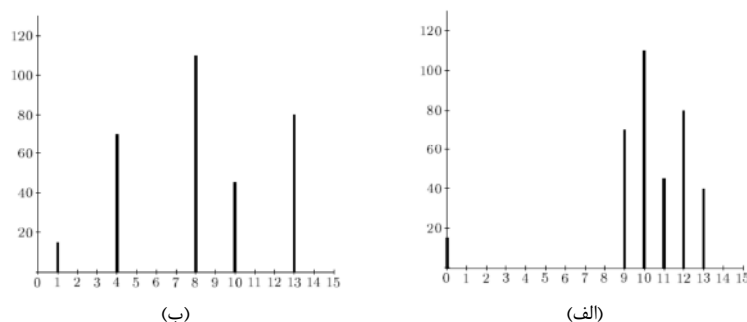
به طور خلاصه رویه‌ی پردازش متعادل سازی هیستوگرام شامل چهار مرحله است:

(۱) مقادیر $\sum_{j=0}^k n_j$ را محاسبه می‌کنیم.

(۲) مقادیر به دست آمده از مرحله اول را با تقسیم بر تعداد کل پیکسل‌ها (MN) نرمالیزه می‌کنیم.

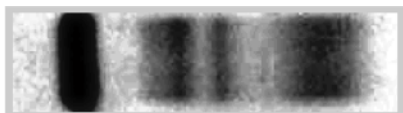
(۳) مقادیر به دست آمده از مرحله دوم را در حداکثر مقدار سطح خاکستری تصویر ضرب و نتایج را گرد می‌کنیم.

(۴) با استفاده از یک تناظر یک به یک مقادیر سطح خاکستری را به مقادیر به دست آمده از مرحله سوم نگاشت می‌کنیم.



شکل ۳-۱۲- مثالی از متعادل سازی هیستوگرام. (الف) هیستوگرام تصویر با کنتراست پایین، (ب) نتیجه متعادل سازی هیستوگرام [۴۷].

تصویر زیر اثر متعادل سازی هیستوگرام را در یک لین مربوط به الکتروفورز پروتئین نشان می دهد.



(ب)



(الف)

شکل ۳-۱۳- نتیجه ارتقاء تصویر الکتروفورز پروتئین (متعادل سازی هیستوگرام). (الف) تصویر لین، (ب) نتیجه بهبود کنتراست به روش متعادل سازی هیستوگرام

۳-۵- نتیجه گیری

در این فصل به معرفی ساختار تکنیک‌های استفاده شده در این پایان‌نامه پرداختیم. تکنیک‌ها شامل آستانه‌گذاری اتسو، هموارسازی به روش سویزکی-گلی و ارتقاء تصویر با روش کشش هیستوگرام و متعادل سازی هیستوگرام می‌باشد. جایگاه استفاده از این تکنیک‌ها و نتایج اعمال آن‌ها بر روی تصاویر الکتروفورز در فصل چهارم بیان خواهد شد.

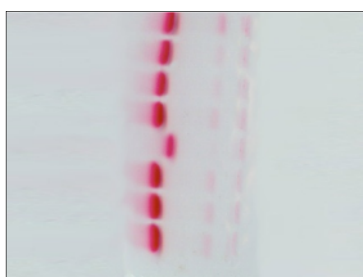
فصل چهارم: الگوریتم پیشنهادی

تحلیل تصاویر الکتروفورز

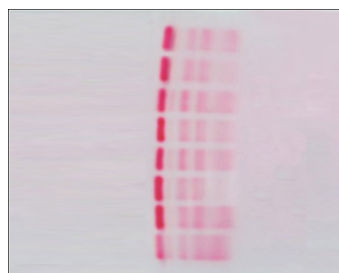
این فصل به معرفی و تشریح الگوریتم پیشنهادی می پردازد. الگوریتم پیشنهادی شامل مراحل پیش پردازش، استخراج و تحلیل لین‌ها می باشد. در تحلیل تصاویر الکتروفورز با مسایل و مشکلاتی روبه رو هستیم که در این فصل به ارائه راه حلی مناسب برای آن‌ها پرداخته ایم.

۴-۱- مقدمه

همان‌طور که در فصل‌های گذشته بیان شد الکتروفورز هموگلوبین و پروتئین سرم از رایج‌ترین تست‌های آزمایشگاهی جهت بررسی بیماری‌های مختلف می‌باشد. روش انجام تست الکتروفورز در آزمایشگاه‌های مختلف یکسان است، اما آن‌چه که موجب تغییر نتیجه می‌شود شرایط آزمایشگاهی، مواد مورد استفاده، تخصص و تجربه فردی است که ژل الکتروفورز را آماده می‌کند. در تصاویر زیر برخی از ژل‌های آماده شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف نشان داده شده است.



(ب)

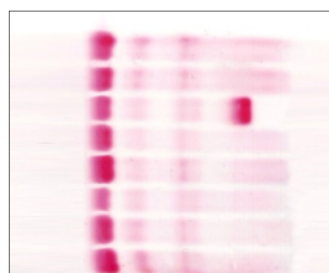


(الف)

شکل ۴-۱- تصاویر الکتروفورز اصفهان. (الف) الکتروفورز پروتئین سرم، (ب) الکتروفورز هموگلوبین (آزمایشگاه سیدالشهدا اصفهان)

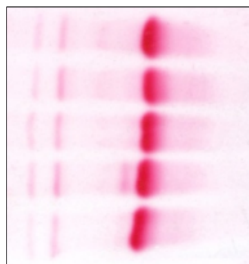


(ب)



(الف)

شکل ۴-۲- تصاویر الکتروفورز شهرکرد (الف) الکتروفورز پروتئین سرم، (ب) الکتروفورز هموگلوبین (آزمایشگاه المهدی شهرکرد)



(ب)



(الف)

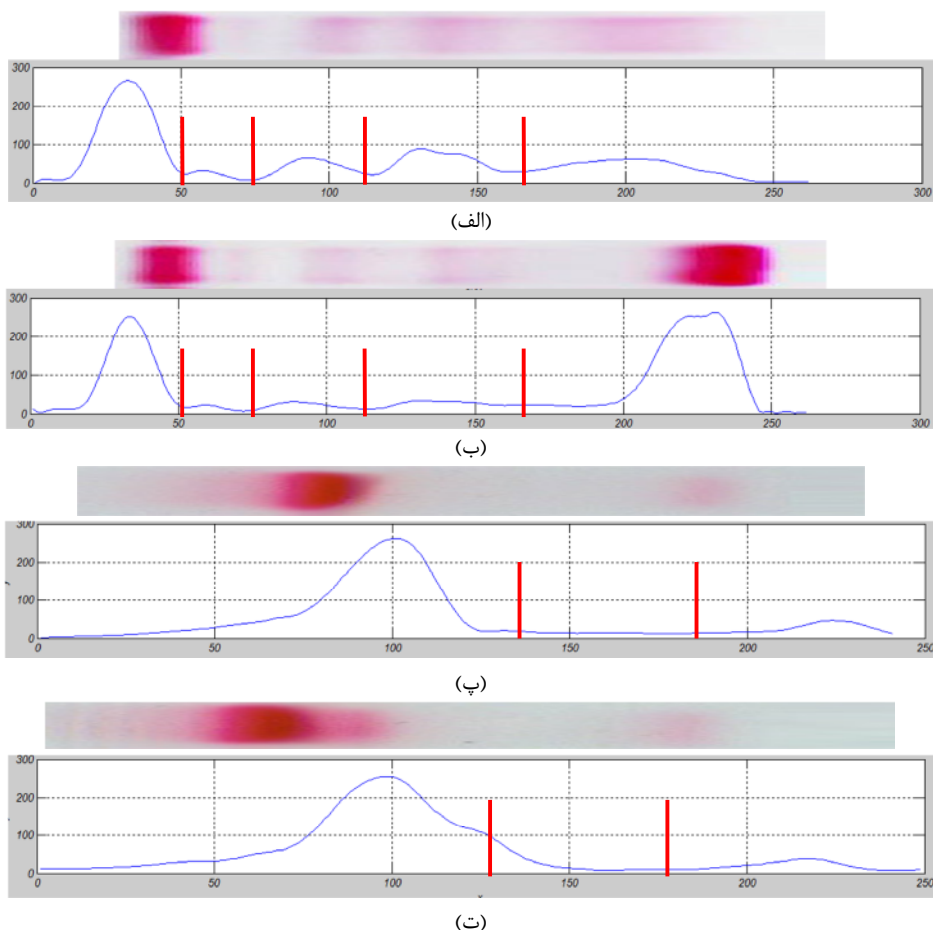
شکل ۳-۴- تصاویر الکتروفورز شاهرود (الف) الکتروفورز پروتئین سرم، (ب) الکتروفورز هموگلوبین (آزمایشگاه امام حسین (ع) شاهرود)

با توجه به تصاویر بالا تفاوت‌هایی بین ژل‌های آزمایشگاه‌های مختلف قابل مشاهده است. اولین مسئله طول لین‌ها می‌باشد. تغییر در میزان ولتاژ دستگاه الکتروفورز و مدت زمان تهیه ژل می‌تواند باعث تغییر طول باندها شود. هر چه مدت زمان روشن بودن دستگاه الکتروفورز بیشتر شود حرکت پروتئین‌ها نیز بیشتر می‌شود و طول لین‌ها افزایش می‌یابد. اگر فرایند الکتروفورز هم‌چنان ادامه یابد باعث خروج پروتئین‌ها یا هموگلوبین‌ها از ژل و خراب شدن ژل می‌شود.

تفاوت دیگری که بین ژل‌ها قابل مشاهده است پس زمینه ژل‌ها می‌باشد. نحوه رنگ آمیزی ژل و شفاف-سازی آن می‌تواند پس زمینه ژل را تحت تاثیر قرار دهد. به‌طوری‌که در برخی مواقع جداسازی پس زمینه از لین سخت می‌شود. حتی این مسئله می‌تواند باعث شود جداسازی باندها هم با مشکل مواجه شود. این مسایل می‌تواند، در تحلیل اتوماتیک تصاویر الکتروفورز تاثیر گذار باشد.

ژل الکتروفورز پس از آماده سازی، توسط اسکنر اسکن می‌شود سپس به کمک نرم‌افزارهایی مانند Power Scan، Amirkabir یا Alan برای تحلیل آماده می‌شود. در این نرم افزارها برای هر یک از لین‌ها با انتخاب اپراتور یک منحنی رسم می‌شود. در تست الکتروفورز هموگلوبین به طور پیش فرض به دلیل وجود ۳ باند، ۲ خط جداکننده و در تست الکتروفورز پروتئین سرم نیز به دلیل وجود ۵ باند، ۴ خط جداکننده وجود دارد. خطوط جداکننده به منظور جدا کردن باندها در منحنی مربوط به لین به کار می‌روند.

این خطوط با نظر متخصص علوم آزمایشگاهی جابجا می شوند و در جای مناسب قرار می گیرند. با توجه به محل قرارگیری خطوط جداکننده، سطح زیر منحنی هر قسمت توسط نرم افزار محاسبه می شود و نتیجه تست الکتروفورز بیان می گردد. هر باند دارای یک محدوده نرمال می باشد که توسط نرم افزار تعیین شده است. اگر مقدار تمامی باندها در محدوده نرمال باشد نتیجه تست الکتروفورز نرمال خواهد بود و فرد مورد نظر سالم است. در غیر این صورت، کاهش یا افزایش هر یک از باندها در نتیجه تست الکتروفورز نشان دهنده وجود بیماری در فرد مورد نظر می باشد. در تصاویر زیر یک لین نرمال و غیر نرمال پروتئین سرم به همراه منحنی و خطوط جداکننده آن ها نشان داده شده است.



شکل ۴-۴- نمونه هایی از تست الکتروفورز به همراه منحنی و خطوط جداکننده. (الف) الکتروفورز پروتئین سرم نرمال، (ب) الکتروفورز پروتئین سرم غیر نرمال، (پ) الکتروفورز هموگلوبین نرمال، (ت) الکتروفورز هموگلوبین غیر نرمال.

یکی دیگر از تغییراتی که در منحنی ایجاد می‌شود، تغییر خط زمینه^۱ منحنی است به این صورت که منحنی به طور دستی به سمت پایین کشیده می‌شود تا به خط زمینه نزدیک‌تر شود. از نظر متخصصان علوم آزمایشگاهی این کار به دلیل بهبود ظاهر نتیجه آزمایش انجام می‌شود.

هدف این پایان‌نامه تحلیل تصاویر الکتروفورز به طور اتوماتیک و با حداقل دخالت اپراتور می‌باشد. تغییر خط زمینه به طور اتوماتیک و تعیین موقعیت خطوط جداکننده باندها به طور اتوماتیک از اقدامات اساسی انجام شده در این پایان‌نامه خواهد بود.

مسائلی که ما در رسیدن به این اهداف با آن‌ها مواجه هستیم به طور خلاصه شامل موارد زیر خواهد بود:

- یکسان نبودن رنگ پس زمینه در ژل‌های مختلف.
- تفاوت طول لین‌ها در ژل‌های مختلف.
- تفاوت طول باندها در ژل‌های مختلف.
- تفکیک ضعیف باندها.
- عدم وجود برخی باندها.
- شکل نامتقارن باندها به‌خصوص باند آلبومین.

۴-۲- پایگاه داده

تصاویر الکتروفورز استفاده شده در این پایان‌نامه شامل تست الکتروفورز پروتئین سرم و الکتروفورز هموگلوبین با ژل استات سلولز می‌باشد که از آزمایشگاه‌های سیدالشهدا(ع)، اصفهان، امام حسین(ع) شاهرود و المهدی(عج) شهرکرد جمع‌آوری شده است. هر ژل دارای ۳ تا ۸، لین می‌باشد. تمامی ژل‌ها

¹ base line

با پانسو^۱ رنگ آمیزی شده‌اند، که به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند. مجموع لین های مورد استفاده ۲۰۵ عدد می باشد.

نمونه ها بر اساس تعداد لین شامل موارد زیر می‌باشد:

جدول ۴-۱- پایگاه داده

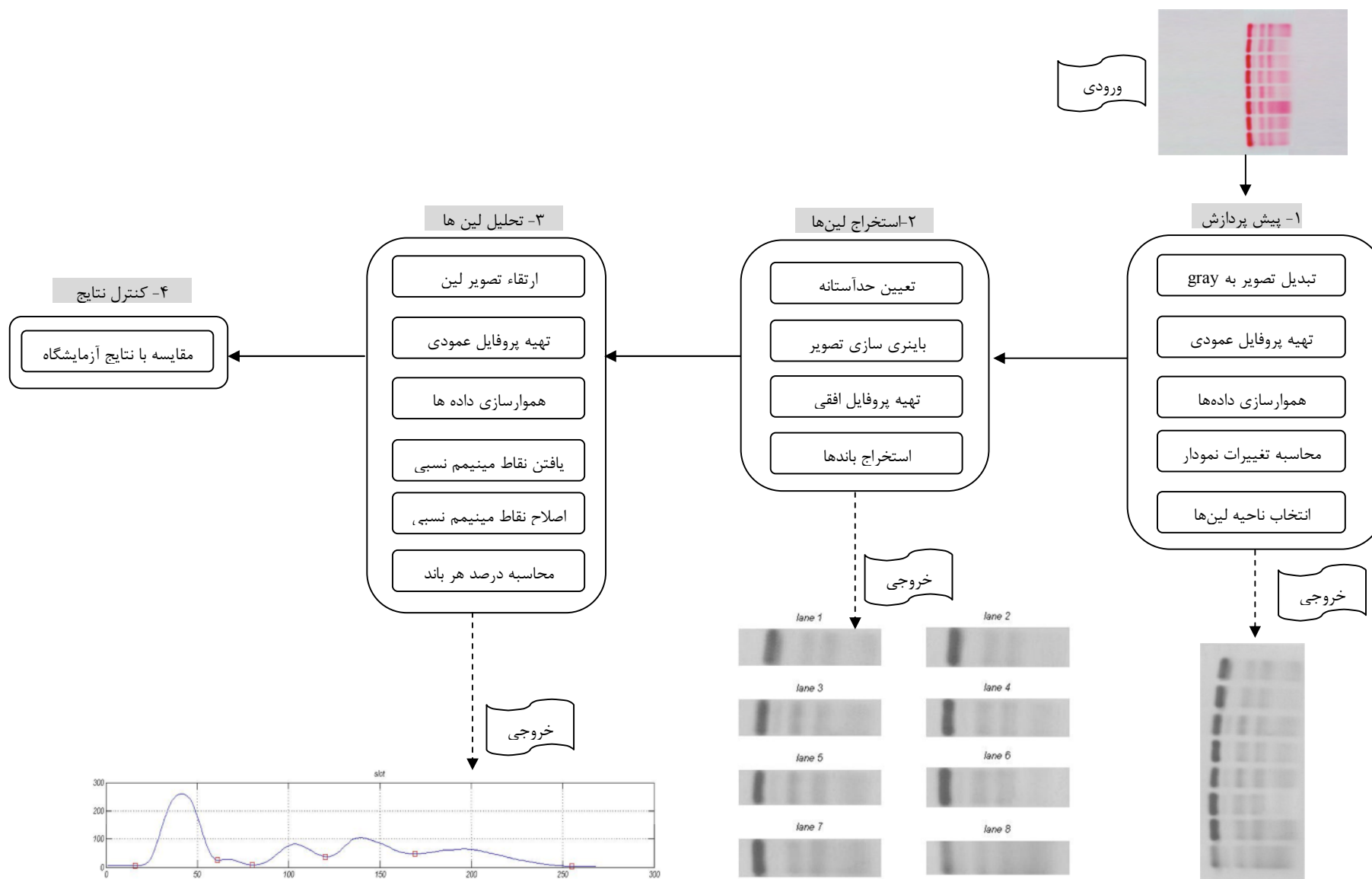
نام آزمایشگاه	تعداد لین الکتروفورز پروتئین سرم	تعداد لین الکتروفورز هموگلوبین
المهدی (عج) شهرکرد	۳۰	۴۰
امام حسین(ع) شاهرود	۱۰	۱۵
سیدالشهدا(ع) اصفهان	۸۰	۳۰
مجموع	۲۰۵	

برخی از ژل های مورد استفاده در تصویر ۴-۱ تا ۴-۳ نشان داده شده است.

۴-۳- الگوریتم پیشنهادی

همان طور که در فصل های قبل نیز اشاره کردیم، هدف این پایان نامه تحلیل تصاویر الکتروفورز با حداقل دخالت اپراتور می‌باشد. انتخاب موقعیت خطوط جداکننده و تنظیم خط زمینه از اهداف اساسی این پایان نامه می‌باشد. الگوریتم ارائه شده در این پایان نامه دارای چهار مرحله کلی پیش پردازش، استخراج لین ها، تحلیل لینها و کنترل نتیجه تحلیل با نتایج آزمایشگاه می‌باشد. هر یک از این مراحل نیز شامل بخش هایی می‌باشد. مراحل جزئی الگوریتم پیشنهادی و خروجی هر مرحله در تصویر زیر نشان داده شده است.

¹ Panceau S

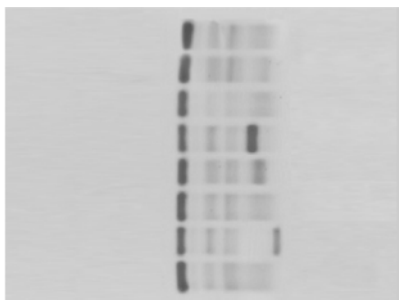


شکل ۴-۵- مراحل الگوریتم پیشنهادی ورودی و خروجی هر مرحله

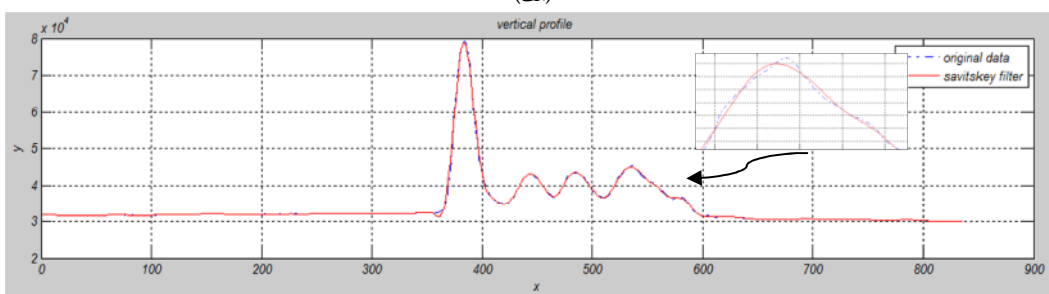
۴-۳-۱- پیش پردازش

تصاویر رنگی در مدل RGB هستند و در قالب یک آرایه سه بعدی تعریف می‌شوند. به منظور تسریع و کاهش پیچیدگی در امر محاسبات تصویر را به مدل gray تغییر می‌دهیم. در این حالت تصویر به صورت آرایه‌ای دو بعدی خواهد بود که انجام محاسبات را ساده‌تر خواهد کرد.

با توجه به این که لین‌ها در وسط ژل ایجاد می‌شوند لازم است که در ابتدا محدوده لین‌ها را در ژل مشخص کنیم و بخش‌های اضافه ژل را کنار بگذاریم. در ابتدا پروفایل عمودی مربوط به ژل ترسیم می‌شود. پروفایل عمودی از جمع کردن مقادیر gray هر ستون آرایه بدست می‌آید. پروفایل عمودی تصویر مانند یک سیگنال می‌باشد که در آن ناهمواری‌هایی به چشم می‌خورد. بنابراین از فیلتر سویزکی - گلی برای هموار کردن پروفایل عمودی تصویر استفاده می‌کنیم. برای این فیلتر درجه را ۴ و اندازه پنجره را ۴۱ انتخاب می‌کنیم. تصاویر زیر، پروفایل عمودی و هموارسازی آن را برای الکتروفورز پروتئین و هموگلوبین نشان می‌دهند. در بخش (ب) این تصاویر کادر وسط، بزرگ‌نمایی بخشی از پروفایل را نشان می‌دهد که در آن اثر فیلتر هموار کننده مشاهده می‌شود.

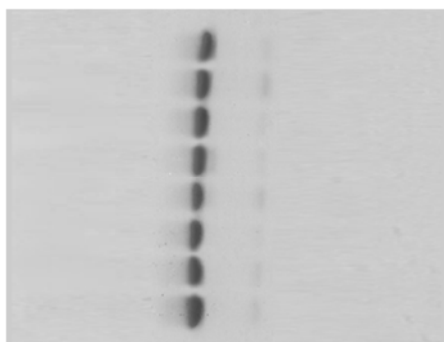


(الف)

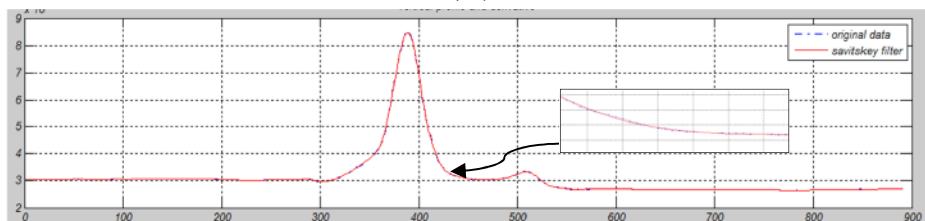


(ب)

شکل ۴-۶- تصویر ژل الکتروفورز پروتئین و پروفایل آن. (الف) تصویر ژل الکتروفورز پروتئین سرم در مدل gray، (ب) پروفایل عمودی ژل و هموارسازی آن (X نشان دهنده شماره ستون، Y نشان دهنده جمع مقادیر هر ستون)



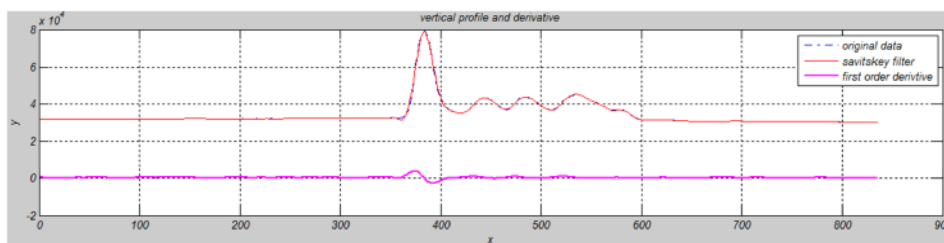
(الف)



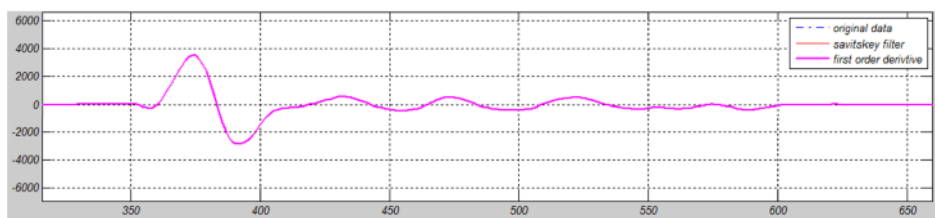
(ب)

شکل ۴-۷- تصویر ژل الکتروفورز هموگلوبین و پروفایل آن (الف) تصویر ژل الکتروفورز هموگلوبین در مدل gray، (ب) پروفایل عمودی ژل و هموارسازی آن (X نشان دهنده شماره ستون، Y نشان دهنده جمع مقادیر هر ستون)

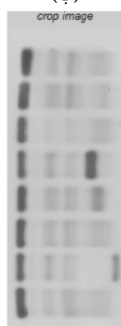
همان‌طور که محور عمودی نمودار نشان می‌دهد، اعداد مربوط به پروفایل اعداد بسیار بزرگی هستند که برای انتخاب محدوده لین‌ها مناسب نیستند. بنابراین برای انتخاب ناحیه لین‌ها، تغییرات موجود در منحنی را از طریق مشتق بدست می‌آوریم. در بخشی از تصویر که شروع لین‌ها می‌باشد تغییرات نمودار به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد و در بخش‌هایی که لین وجود ندارد تغییرات نمودار بسیار ناچیز و نزدیک به صفر است. با توجه به این تغییرات محدوده لین‌ها در تصویر قابل شناسایی است. در تصویر ۸-۴ مشتق پروفایل و تصویر ژل استخراج شده از نتیجه مشتق نشان داده شده است.



(الف)

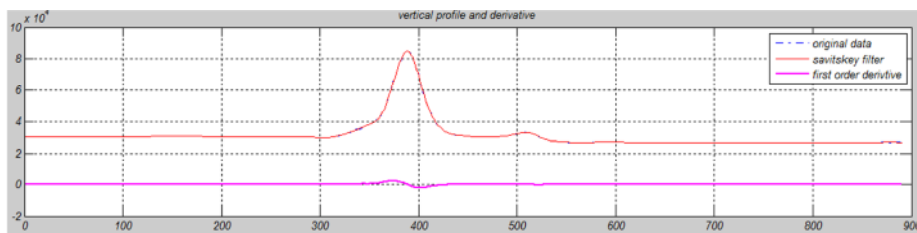


(ب)

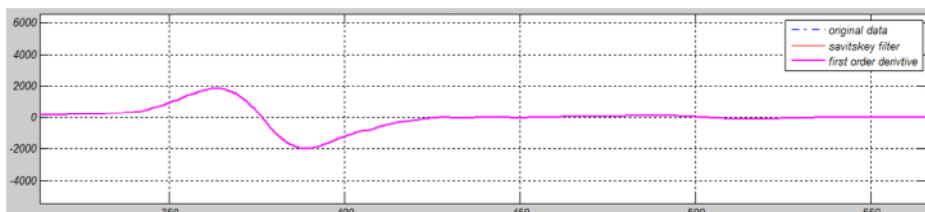


(ج)

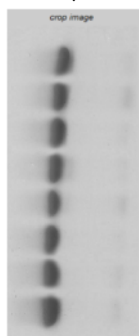
شکل ۸-۴- مراحل استخراج محدوده لین پروتئین (الف) پروفایل عمودی ژل الکتروفورز پروتئین سرم، نمودار هموار شده و نمودار مشتق، (ب) بزرگ‌نمایی نمودار مشتق تصویر الف، (ج) ناحیه لین استخراج شده از تصویر ژل.



(الف)



(ب)

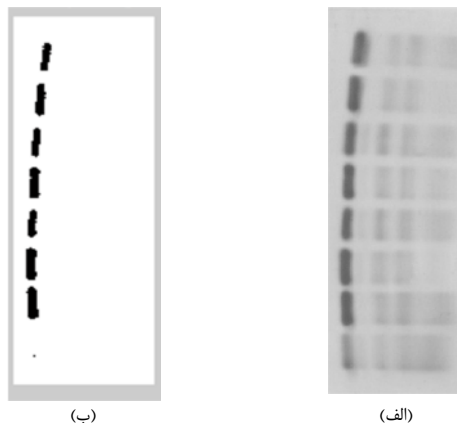


(ج)

شکل ۴-۹- مراحل استخراج محدوده لین هموگلوبین (الف) پروفایل عمودی ژل الکتروفورز هموگلوبین، نمودار هموار شده و نمودار مشتق، (ب) بزرگ نمایی نمودار مشتق تصویر الف، (ج) ناحیه لین استخراج شده از تصویر ژل.

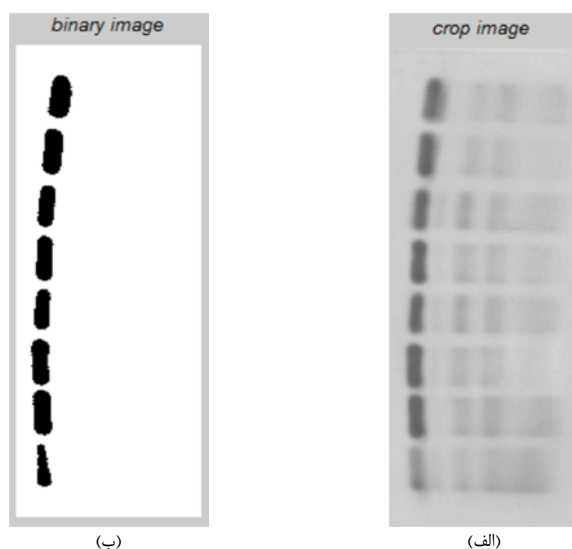
۴-۳-۲- استخراج لین ها

در این مرحله هدف استخراج لین ها از تصویر می باشد. برای انجام این کار ابتدا تصویر را به باینری تبدیل می کنیم. لذا نیاز به انتخاب یک حد آستانه مناسب برای تصویر داریم. اگر حد آستانه به درستی انتخاب نشود ممکن است باندهایی که دارای رنگ کمتری هستند در فرایند باینری شدن حذف شوند که نتیجه آن، عدم استخراج آن لین خواهد بود. در شکل زیر این مسئله نشان داده شده است.

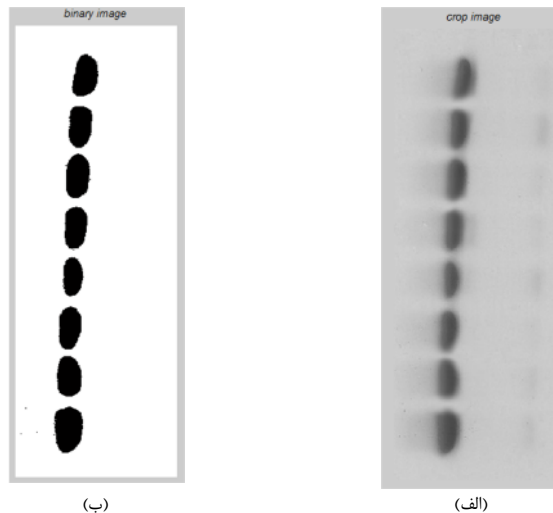


شکل ۴-۱۰- نتیجه حد آستانه ۰.۵ (الف) تصویر لین استخراج شده، (ب) آستانه گذاری تصویر با حد آستانه ۰.۵

بنابراین برای رفع این مشکل حد آستانه را به روش اتسو انتخاب می‌کنیم که روش اتسو حد آستانه را ۰.۶ تعیین می‌کند. در نتیجه با انتخاب این حد آستانه همه باندها حتی در شرایطی که رنگ آن‌ها کمتر باشد، در فرایند باینری شدن حفظ خواهند شد. حد آستانه برای تصاویر الکتروفورز هموگلوبین نیز به روش اتسو مقدار ۰.۶ می‌باشد. در تصاویر زیر نتیجه آستانه گذاری تصویر بالا و همچنین الکتروفورز هموگلوبین نشان داده شده است.

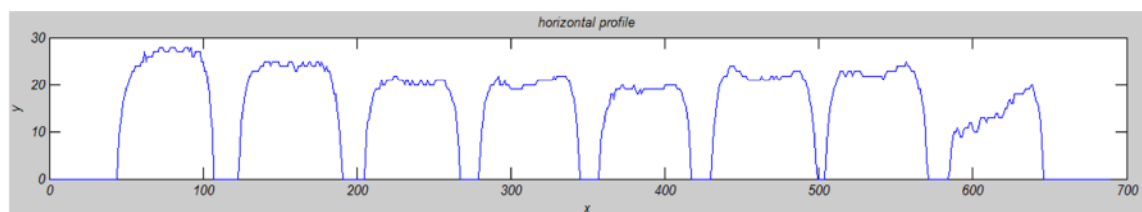


شکل ۴-۱۱- نتیجه حد آستانه با روش اتسو (الف) تصویر لین استخراج شده پروتئین سرم، (ب) آستانه گذاری تصویر به روش اتسو با حد آستانه ۰.۶



شکل ۴-۱۲- آستانه گذاری در هموگلوبین (الف) تصویر لین استخراج شده هموگلوبین، (ب) آستانه گذاری تصویر به روش اتسو باحد آستانه ۰.۶

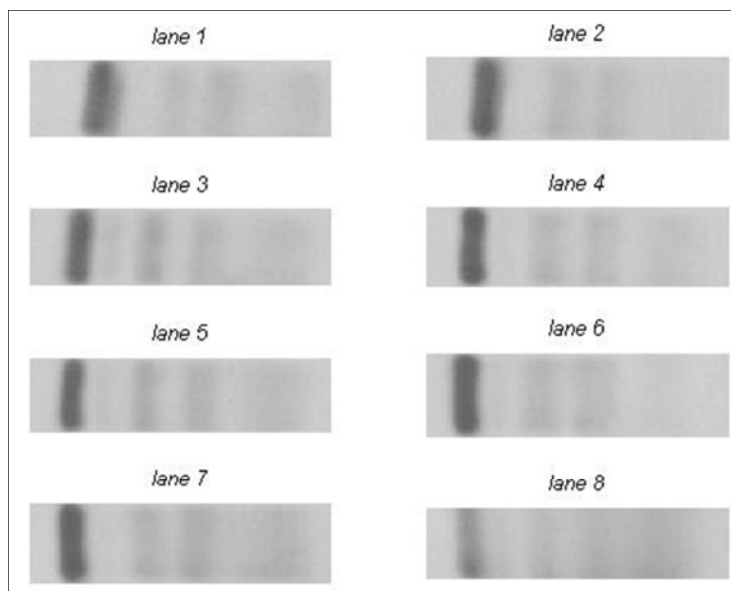
پس از باینری سازی تصویر، پروفایل افقی آن را به دست می آوریم. برای این کار مجموع مقادیر هر سطر آرایه ی تصویر را محاسبه می کنیم و آن را در قالب نموداری ترسیم می کنیم. از آنجایی که مقادیر آرایه باینری دارای دو مقدار صفر و یک می باشد، لذا موقعیت قرارگیری باندها بر اساس پروفایل به راحتی قابل شناسایی خواهد بود. تصویر زیر پروفایل افقی تصویر را نشان می دهد.



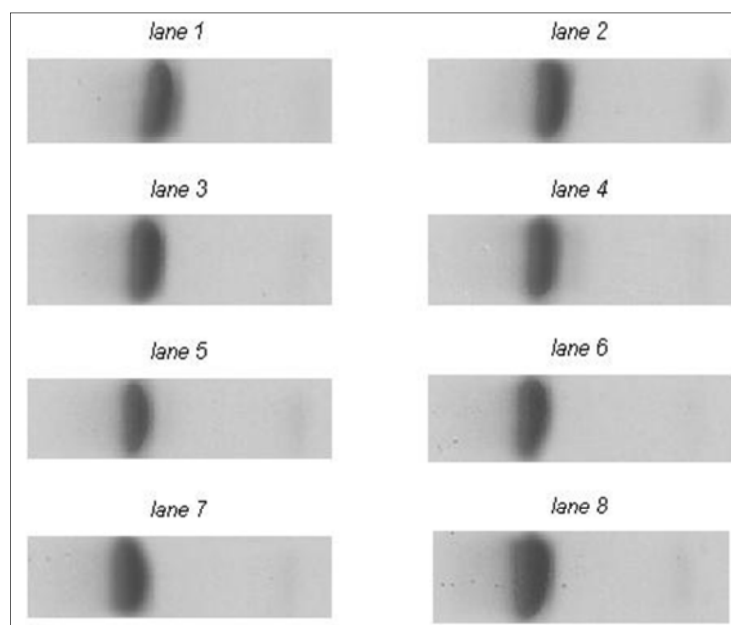
شکل ۴-۱۳- پروفایل افقی تصویر باینری شده

همان طور که در پروفایل مشاهده می شود، قسمتی که نمودار مقدار صفر دارد نشان دهنده پس زمینه است و سایر قسمت ها، لین های موجود در تصویر را نشان می دهند. پس در این شرایط می توان لین ها را از

تصویر استخراج کرد. تصاویر زیر لین‌های استخراج شده از تصاویر ژل الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۴- نتیجه استخراج لین‌ها برای الکتروفورز پروتئین سرم



شکل ۴-۱۵- نتیجه استخراج لین‌ها برای الکتروفورز هموگلوبین

۴-۳-۳- تحلیل لین ها

این مرحله روی هر یک از لین ها انجام می شود. در این مرحله با مسایلی از قبیل تاثیر پس زمینه بر باندها، کج بودن باندها، عدم وجود برخی باندها و تفکیک نامناسب روبرو هستیم. این مسایل پیدا کردن نقاط جداکننده را تحت تاثیر قرار می دهد.

اولین و مهم ترین مسئله حذف پس زمینه می باشد همان طور که در تصویر زیر مشاهده می شود، تفکیک باندها از یکدیگر (الف) و همچنین تفکیک باندها از پس زمینه (ب) دشوار است.

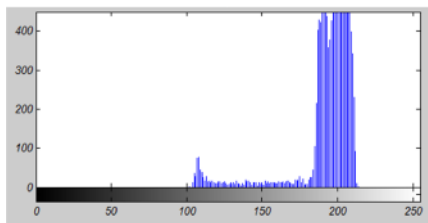


شکل ۴-۱۶- مشکلات لین ها (الف) تفکیک نامناسب باندها از یکدیگر، (ب) مشکل تفکیک باندها از پس زمینه

همان طور که در تصاویر فوق مشاهده می شود این تصاویر دارای کنتراست پایینی هستند به این دلیل که اختلاف واضحی بین رنگ سیاه و سفید دیده نمی شود، هیستوگرام (شکل ۴-۱۷ (ب)) هم این مسئله را تایید می کند.

برای رفع این مشکل از دو روش کشش هیستوگرام و یکسان سازی هیستوگرام به منظور افزایش کنتراست تصویر استفاده می کنیم. نتایج بدست آمده از دو روش این مسئله را نشان می دهد که یکسان سازی هیستوگرام در این مورد به خوبی عمل نمی کند، به این دلیل که رنگ و پهنای باندها بیش تر از اندازه واقعی شان شده است و این مسئله باعث تحلیل نادرست نتایج لین خواهد شد. اما نتیجه کشش هیستوگرام رضایت بخش تر است، چرا که وضوح باندها افزایش پیدا کرده است که این باعث تفکیک

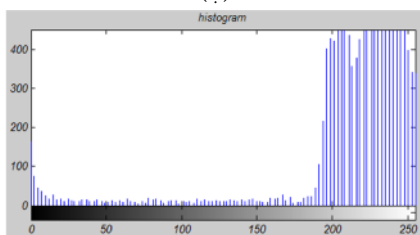
مناسب باندها خواهد شد علاوه بر آن پس زمینه باندها نیز حذف شده است. تصویر زیر نتیجه افزایش کنتراست تصویر به دو روش یکسان سازی هیستوگرام و کشش هیستوگرام را نشان می دهد.



(ب)



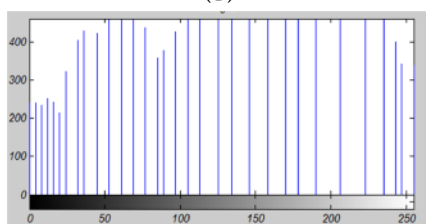
(الف)



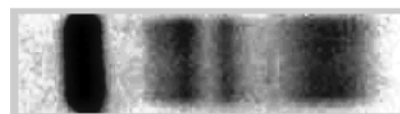
(ت)



(پ)



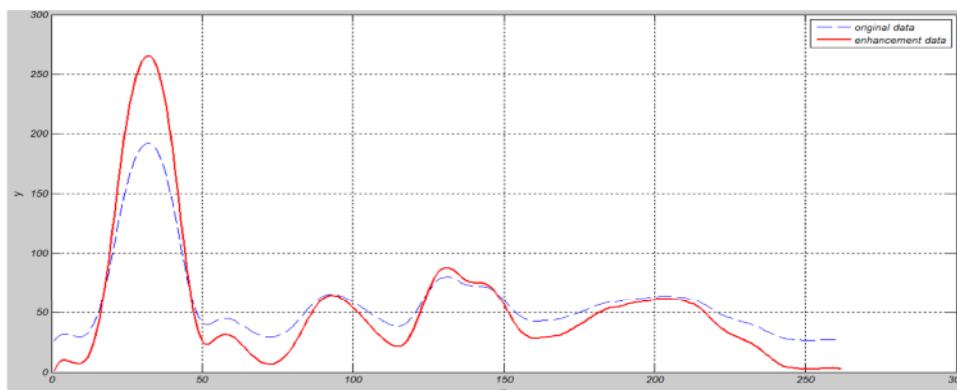
(ج)



(ث)

شکل ۴-۱۷- نتیجه بهبود کنتراست تصویر. (الف) تصویر لین، (ب) هیستوگرام تصویر، (پ) نتیجه بهبود کنتراست به روش کشش هیستوگرام، (ت) هیستوگرام حاصل از بهبود کنتراست به روش کشش هیستوگرام، (ث) نتیجه بهبود کنتراست به روش متعادل سازی هیستوگرام، (ج) هیستوگرام حاصل از بهبود کنتراست به روش متعادل سازی هیستوگرام.

یکی دیگر از نتایجی که با بهبود کنتراست بدست می آید حذف پس زمینه است که نتیجه آن پایین آمدن خط زمینه در تصاویر الکتروفورز است، بنابراین با بهبود کنتراست تغییر خط زمینه به طور اتوماتیک اتفاق می افتد. تصویر زیر این مسئله را نشان می دهد.



شکل ۴-۱۸- اثر تغییر خط زمینه با بهبود کنتراست

یکی دیگر از مسایلی که ما با آن روبرو هستیم کج بودن باندها می‌باشد، که این به دلیل خطای نمونه گذاری هنگام تهیه ژل می‌باشد. علاوه بر کج بودن موقعیت باند، شکل نامتقارن آن هم یکی دیگر از مسایل است، منظور ما از نامتقارن بودن نداشتن شکل هندسی منظم در باندها به خصوص باند آلبومین در الکتروفورز پروتئین سرم می‌باشد، شکل زیر این مسایل را نشان می‌دهد. این مسایل باعث می‌شود پیدا کردن نقاط جداکننده با مشکل مواجه شود.



شکل ۴-۱۹- مشکلات باندها در لین ها. (الف) مشکل کج بودن باند، (ب) مشکل نامتقارن بودن باند

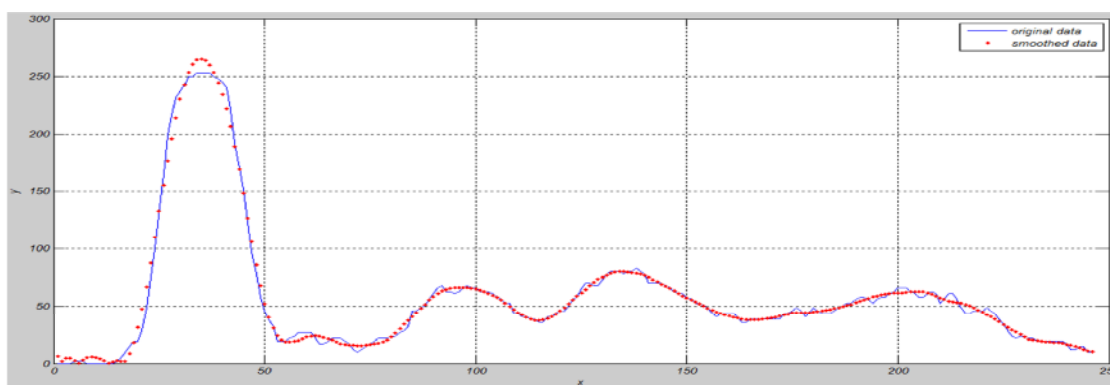
راه حل پیشنهاد شده برای این مسایل این است که به جای در نظر گرفتن کل لین تنها چند سطر از آن را انتخاب کنیم. با توجه به پایگاه داده استفاده شده در این پایان نامه طول لین ها به طور متوسط ۶۰ سطر می‌باشد. بنابراین برای این که همه بخش‌های لین را در نظر بگیریم ۵ سطر از لین را با فاصله ۱۰ از سطر ۱۰ انتخاب می‌کنیم. بنابراین سطرهای انتخابی ما ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ می‌باشد. سپس برای هر کدام از این سطرها به طور جداگانه مراحل زیر انجام می‌شود:

- محاسبه پروفایل عمودی

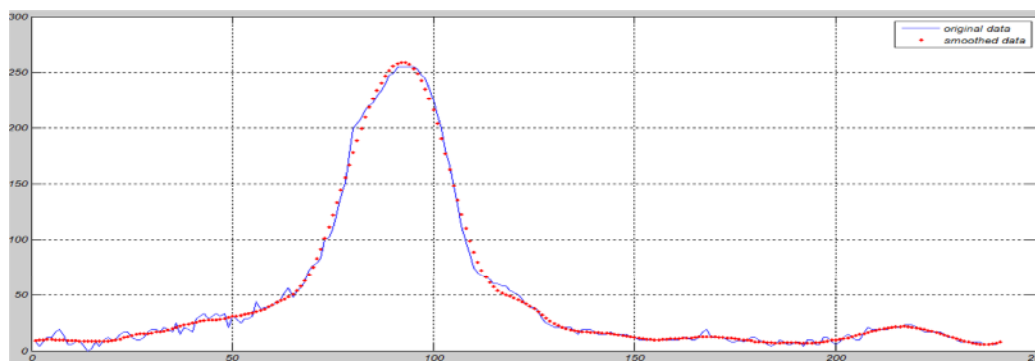
برای هریک از سطرهای بدست آمده پروفایل عمودی را بدست می‌آوریم.

- هموارسازی

در این مرحله هموارسازی روی نمودار به دست آمده به روش سویزکی - گلی با درجه چند جمله ای ۴ و اندازه پنجره ۳۱ انجام می‌شود. همان طور که در فصل قبل گفتیم درجات بالاتر برای این فیلتر، ویژگی عرض و ارتفاع سیگنال را بهتر حفظ می‌کند. بنابراین اگر درجه کمتری انتخاب شود برخی از باندها شناسایی نمی‌شوند. همچنین اگر اندازه کمتری برای پنجره انتخاب شود به دلیل کاهش اثر هموارسازی اشتباهات زیادی در نقاط مینیمم بوجود خواهد آمد. لذا در این پایان‌نامه این پارامترها با سعی و خطا و بررسی اثر آن‌ها در پیدا کردن نقاط مینیمم انتخاب شده‌اند. بنابراین نتیجه هموارسازی این است که یافتن نقاط مینیمم نسبی در مرحله بعد با دقت بیشتری انجام شود. تصاویر زیر هموارسازی پروفایل عمودی سطر را در الکتروفورز هموگلوبین و پروتئین سرم نشان می‌دهند.



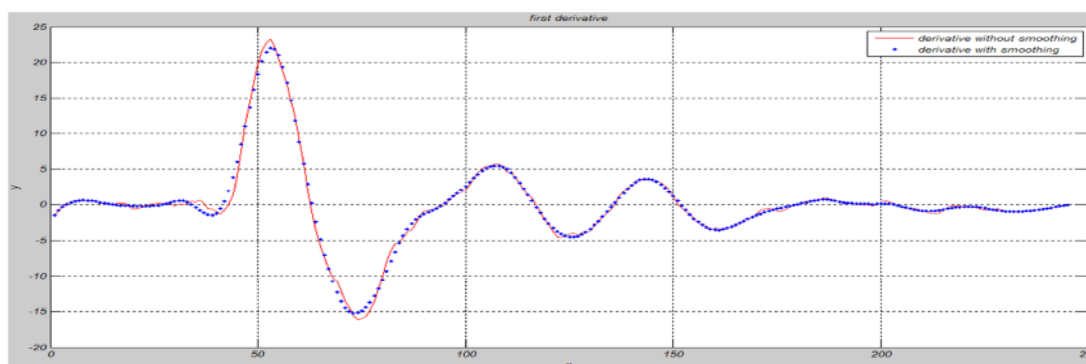
شکل ۴-۲۰- پروفایل عمودی یک سطر و هموارسازی آن (الکتروفورز پروتئین سرم)



شکل ۴-۲۱- پروفایل عمودی یک سطر و هموارسازی آن (الکتروفورز هموگلوبین)

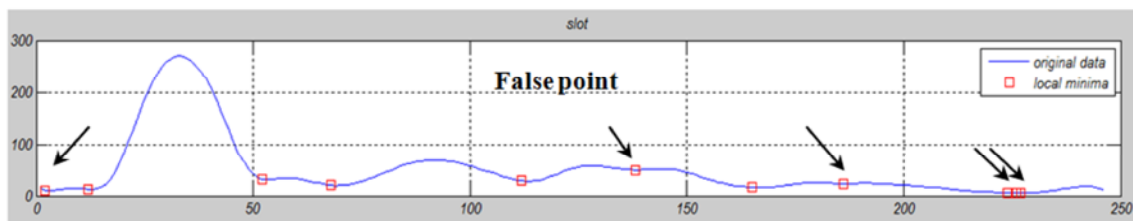
• یافتن نقاط مینیمم

این مرحله که جز مهم‌ترین مراحل الگوریتم پیشنهادی است، یافتن نقاط مینیمم یا همان نقاط جداکننده در نمودار مربوط به لین‌ها می‌باشد. برای این کار ابتدا مشتق نمودار را بدست می‌آوریم، پس از آن نقاط بحرانی را محاسبه می‌کنیم. نقاط بحرانی نقاطی هستند که مشتق تابع در این نقاط تعریف نشده یا برابر صفر باشد. مجدداً پروفایل افقی را رسم می‌کنیم که این پروفایل دارای ناهمواری‌هایی می‌باشد، مانند مرحله قبل از فیلتر سویزکی - گلی با درجه ۴ و اندازه پنجره ۳۱ برای هموارسازی نمودار مشتق استفاده می‌کنیم. تصویر زیر مشتق و هموار سازی یک سطر را نشان می‌دهد.

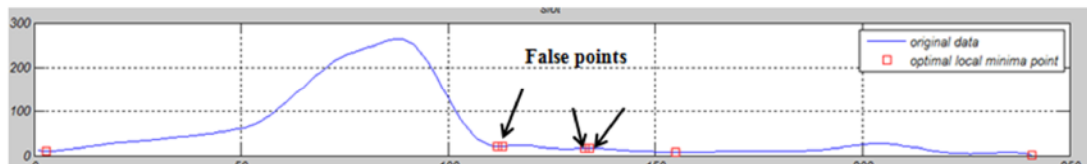


شکل ۴-۲۲- مشتق یک سطر و هموارسازی آن

پس از آن مشتق دوم نمودار را به دست می‌آوریم. سپس مشتق دوم را در نقاط بحرانی بررسی می‌کنیم. اگر مشتق دوم در یک نقطه بحرانی مثبت باشد، آن نقطه مینیمم نسبی و اگر منفی باشد ماکزیمم نسبی است. ممکن است در بین نقاط مینیمم نسبی به دست آمده نقاط اضافی نیز وجود داشته باشد که باید اصلاح شوند. تصاویر زیر نتیجه شناسایی نقاط مینیمم نسبی در الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۲۳- نقاط مینیمم نسبی شناسایی شده در الکتروفورز پروتئین سرم



شکل ۴-۲۴- نقاط مینیمم نسبی شناسایی شده در الکتروفورز هموگلوبین

• اصلاح نقاط مینیمم نسبی

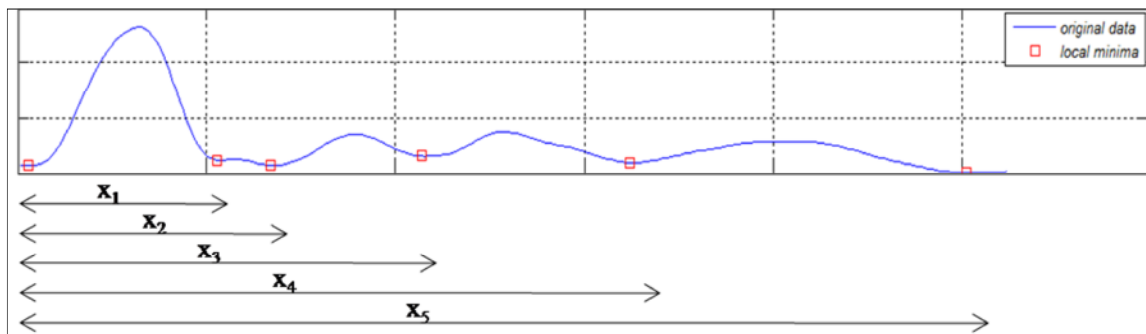
در این مرحله نقاط مینیمم نسبی که در مرحله قبل محاسبه شدند باید اصلاح شوند. منظور از اصلاح، حذف نقاط اضافه یا اضافه کردن نقاط شناسایی نشده در نمودار است.

۱- حذف نقاط اضافه

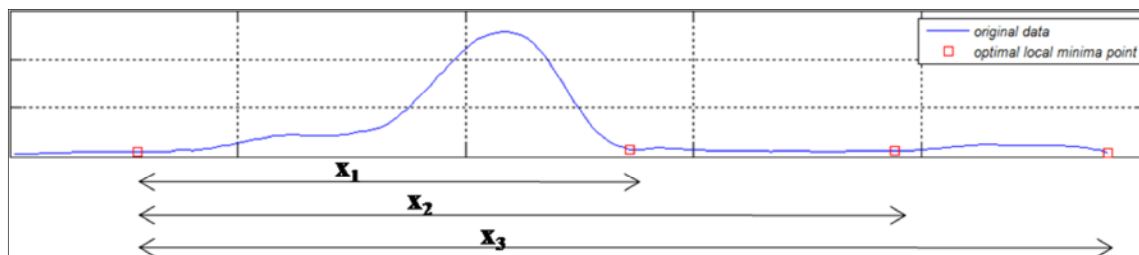
همان‌طور که در تصاویر فوق مشاهده می‌شود، نقاط اضافه معمولاً در نزدیکی یکدیگر ایجاد می‌شوند. دلیل

آن ناهموازی‌های نمودار است که به طور کامل با فیلتر سویزکی - گلی قابل حذف نیستند. افزایش اندازه پنجره هم تاثیری در حذف این ناهموازی‌ها ندارد. لذا برای حذف این نقاط راه حل دیگری پیشنهاد کرده- ایم.

با بررسی طول باندها بر حسب پیکسل در لین‌های مختلف پایگاه داده به این نتیجه رسیدیم که نسبت فاصله بین هر دو نقطه مینیمم تا اولین نقطه مینیمم در نمونه های مختلف متفاوت است. تصویر زیر این مفهوم را نشان می دهد.



شکل ۴-۲۵- فاصله نقاط مینیمم نسبی نسبت به یکدیگر در الکتروفورز پروتئین سرم



شکل ۴-۲۶- فاصله نقاط مینیمم نسبی نسبت به یکدیگر در الکتروفورز هموگلوبین

با توجه به شکل فوق رابطه زیر را تعریف می کنیم:

$$k = \frac{x_{i+1}}{x_i} \quad i = 1, 2, 3, 4, 5 \quad (4-1)$$

(الکتروفورز پروتئین سرم)

$$(2-4) \quad k = \frac{x_{i+1}}{x_i} \quad i = 1, 2, 3 \quad (\text{الکتروفورز هموگلوبین})$$

برای حذف نقاط اضافه باید رابطه زیر برقرار باشد:

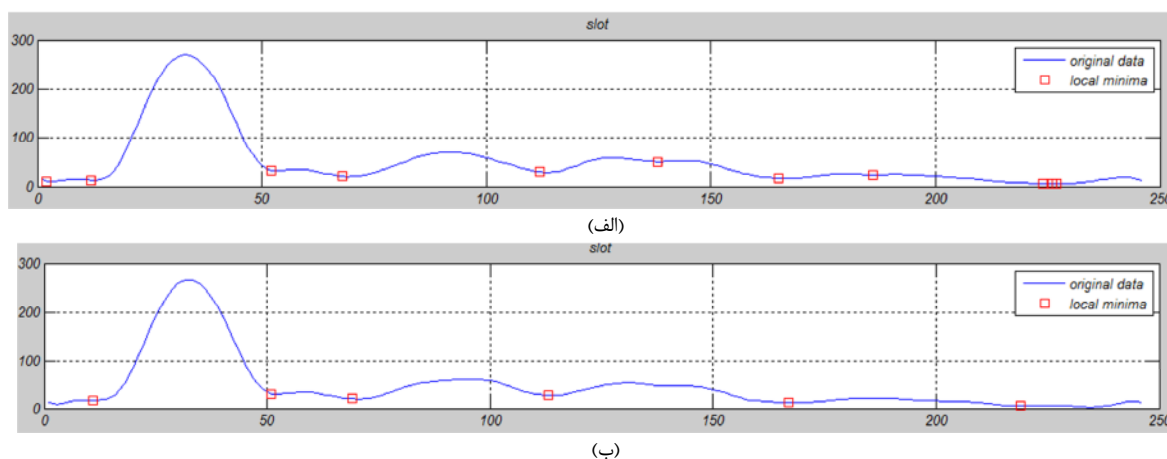
$$(3-4) \quad k \geq 1.25 \quad (\text{برای نمونه های الکتروفورز پروتئین اصفهان و شاهرود})$$

$$(4-4) \quad k \geq 1.6 \quad (\text{برای نمونه های الکتروفورز پروتئین شهرکرد})$$

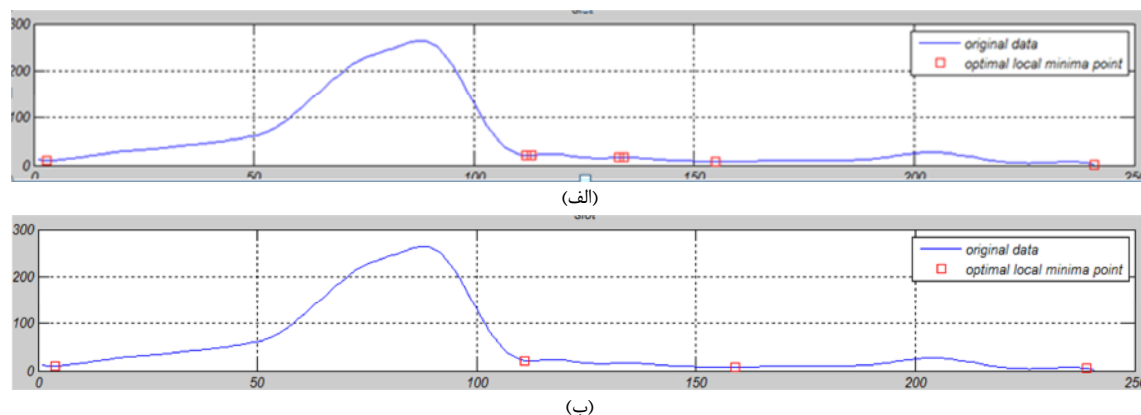
$$(5-4) \quad k \geq 1.4 \quad (\text{برای نمونه های الکتروفورز هموگلوبین اصفهان و شاهرود})$$

$$(6-4) \quad k \geq 1.3 \quad (\text{برای نمونه های الکتروفورز هموگلوبین شهرکرد})$$

با استفاده از رابطه فوق می‌توانیم نقاط مینیمم اضافه که در نزدیکی یکدیگر هستند را حذف کنیم. تصاویر زیر نتیجه حذف نقاط مینیمم نسبی اضافه را نشان می‌دهند.



شکل ۴-۲۷- نقاط مینیمم در پروتئین (الف) نمودار الکتروفورز پروتئین سرم و تمام نقاط مینیمم نسبی آن، (ب) نمودار تصویر (الف) با نقاط مینیمم نسبی اصلاح شده



شکل ۴-۲۸- نقاط مینیمم در هموگلوبین (الف) نمودار الکتروفورز هموگلوبین و تمام نقاط مینیمم نسبی آن، (ب) نمودار تصویر (الف) با نقاط مینیمم نسبی اصلاح شده

همان طور که گفته شد چهار مرحله فوق باید برای ۵ سطر انتخابی از لین انجام شوند. پس از اعمال مراحل فوق بر روی هر سطر، در الکتروفورز پروتئین ۶ نقطه و در الکتروفورز هموگلوبین ۴ نقطه بدست می‌آید. در مرحله بعد باید با استفاده از مینیمم های بدست آمده از هر سطر نقاط بهینه را برای لین بدست آوریم.

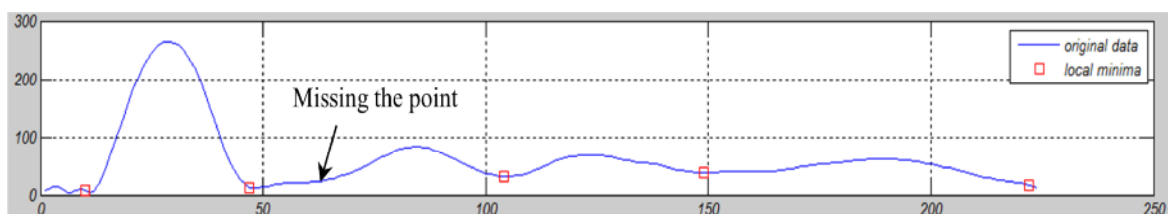
برای بدست آوردن نقاط بهینه ابتدا از عناصر اول بدست آمده از هر سطر، آرایه‌ای پنج عضوی ایجاد می‌کنیم. سپس پراکندگی آن‌ها را توسط واریانس بدست می‌آوریم. اگر واریانس از ۱۰ کوچک‌تر باشد، به این معناست که نقاط در یک محدوده هستند، بنابراین میانگین آن‌ها را محاسبه می‌کنیم. اگر واریانس عدد بزرگ‌تری را نشان دهد، به این معناست که نقاط پراکنده‌تر هستند، پس تا زمانی که واریانس از ۱۰ بزرگ‌تر باشد نقاط پرت (نقاطی که از سایرین فاصله بیش‌تری دارد) را از بین نقاط حذف می‌کنیم. زمانی که واریانس به کم‌تر از ۱۰ رسید میانگین نقاط را محاسبه می‌کنیم.

برای سایر نقاط هم به همین ترتیب عمل می‌کنیم. تصویر زیر نمونه‌ای از نقاط بدست آمده از هر سطر و نقاط بهینه آن‌ها را در الکتروفورز پروتئین سرم نشان می‌دهد.

جدول ۴-۲- نمونه‌هایی از موقعیت نقاط مینیمم نسبی بدست آمده از سطرهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ بر حسب پیکسل و نقاط بهینه آن‌ها

نقطه اول	نقطه دوم	نقطه سوم	نقطه چهارم	نقطه پنجم	نقطه ششم	
۱۱	۵۳	۷۱	۱۱۳	۱۶۵	۲۱۶	سطر اول
۱۱	۵۲	۶۹	۱۱۳	۱۶۲	۲۲۰	سطر دوم
۱۱	۵۱	۶۹	۱۱۲	۱۵۹	۱۹۹	سطر سوم
۱۱	۵۱	۶۹	۱۱۳	۱۶۷	۲۱۹	سطر چهارم
۱۲	۵۲	۶۸	۱۱۲	۱۶۵	۲۲۴	سطر پنجم
۰.۲	۰.۷	۱.۲	۰.۳	۹.۸	۹۴.۳	واریانس
۱۱	۵۲	۶۹	۱۱۳	۱۶۶	۲۲۰	مقدار بهینه

در برخی مواقع ممکن است برای یک سطر ۶ نقطه بدست نیاید به این معنا که نقاط مینیمم نسبی به دلیل کم رنگ بودن باندها مشخص نشود. در این صورت در انتهای آرایه صفر اضافه می‌کنیم تا طول آرایه به ۶ برسد. سپس نقاط مینیمم بهینه را محاسبه می‌کنیم. تصویر زیر سطری را نشان می‌دهد که برخی نقاط مینیمم آن شناسایی نشده است.



شکل ۴-۲۹- پروفایل عمودی سطر با یک نقطه مینیمم شناسایی نشده

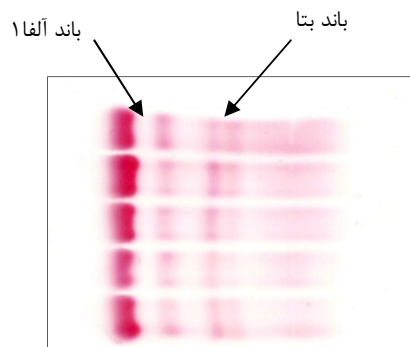
جدول زیر نمونه ایی از سطرهایی را نشان می‌دهد که برخی نقاط در آن‌ها شناسایی نشده است. همان طور که گفته شد در انتهای آرایه صفر اضافه می‌کنیم تا طول آن به ۶ برسد. با استفاده از پراکندگی داده ها مقدار بهینه‌ای را انتخاب می‌کنیم. مزیت داشتن ۵ سطر این است که اگر در برخی سطرها نقاط مینیمم شناسایی نشده باشد، می‌توان با استفاده از سایر سطرها این نقاط را تخمین زد. موقعیت نقاط

مینیمم به دست آمده همان خطوط جداکننده هستند که برای اندازه‌گیری مقادیر مختلف باندها به کار می‌روند.

جدول ۳-۴- نمونه ایی از موقعیت نقاط مینیمم نسبی بدست آمده از سطرهای ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰ بر حسب پیکسل و نقاط بهینه آن‌ها با نقاط اصلاح شده

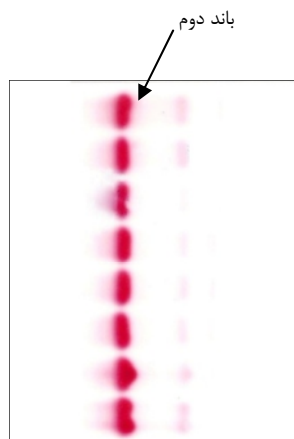
نقطه اول	نقطه دوم	نقطه سوم	نقطه چهارم	نقطه پنجم	نقطه ششم
۸	۵۷	۱۰۵	۱۴۹	۰	۰
۸	۴۷	۵۹	۱۰۴	۱۵۲	۲۲۲
۱۰	۴۷	۱۰۴	۱۴۹	۰	۰
۱۱	۴۸	۶۳	۱۰۳	۱۴۹	۲۲۰
۱۱	۴۸	۶۳	۱۰۳	۱۴۹	۲۲۱
۲.۳	۱۸.۳	۵۵۳.۲	۶۲۵.۸	۶۷۵۱.۵	۱۴۶۵۲.۸
۱۰	۴۸	۶۳	۱۰۳	۱۵۰	۲۲۱

با توجه به نتایج به دست آمده از شناسایی موقعیت خطوط جداکننده در نمونه‌های الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین به این نتیجه رسیدیم که، باندهای الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین در نمونه‌های اصفهان و شاهرود از تفکیک مناسب‌تری نسبت به نمونه‌های شهرکرد برخوردار هستند. این مسئله نتیجه تفاوت در مراحل آزمایشگاهی تهیه ژل الکتروفورز می‌باشد. همان‌طور که در تصویر زیر مشاهده می‌شود باند دوم (آلفا) در نمونه‌های الکتروفورز پروتئین شهرکرد به خوبی جدا نشده است، علاوه بر آن باند چهارم (بتا) به صورت دو باند مجزا ایجاد شده است که این مسایل باعث کاهش دقت در تشخیص اتوماتیک موقعیت خطوط جداکننده در نمونه‌های الکتروفورز پروتئین شهرکرد می‌شود.



شکل ۴-۳۰- عدم تفکیک باند آلفا و دو باند شدن باند بتا در الکتروفورز پروتئین شهرکرد

همچنین در الکتروفورز هموگلوبین شهرکرد نیز تفکیک باند دوم (هموگلوبین F) از باند اول (هموگلوبین A) بخوبی انجام نشده است که این مسئله نیز باعث کاهش دقت در الکتروفورز هموگلوبین شهرکرد می شود.



شکل ۴-۳۱- عدم تفکیک باند دوم در الکتروفورز هموگلوبین شهرکرد

پس از تعیین موقعیت خطوط جداکننده در الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین، مساحت سطح زیر منحنی هر یک از باندها محاسبه می شود. با توجه به مقادیر به دست آمده برای هر باند در لین فرد مورد آزمایش، سالم یا بیمار بودن او مشخص می شود. نتایج به دست آمده از الگوریتم پیشنهادی با نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه مقایسه شدند. جدول زیر نتایج تشخیص اتوماتیک موقعیت خطوط جداکننده را در نمونه های مختلف پایگاه داده، با استفاده از الگوریتم پیشنهادی نشان می دهد.

جدول ۴-۴- نرخ تشخیص اتوماتیک موقعیت خطوط جدا کننده با استفاده از الگوریتم پیشنهادی

نمونه	نرخ تشخیص در الکتروفورز پروتئین سرم	نرخ تشخیص در الکتروفورز هموگلوبین	مجموع
اصفهان	۹۰٪	۸۶.۶٪	۸۸.۳٪
شاهرود	۷۰٪	۸۴.۴٪	۷۷.۲٪
شهرکرد	۵۶.۶٪	۶۵.۸٪	۶۱.۲٪
مجموع	۷۲.۲٪	۷۸.۹٪	۷۵.۶٪
کل	۷۵.۶٪		

همان‌طور که گفته شد، تفاوت در ژل‌های آزمایشگاه‌های مختلف، به دلیل تفاوت در مراحل آزمایشگاهی تهیه ژل از جمله میزان ولتاژ و مدت زمان انجام الکتروفورز می‌باشد. این عوامل موجب اختلاف در طول لین‌ها، طول باندها و تفکیک باندها در ژل‌های آزمایشگاه‌های مختلف شده است. نتایج به دست آمده در جدول فوق مؤید این مسئله می‌باشد که نمونه‌های اصفهان به دلیل شرایط مناسب‌تر آزمایشگاهی از تفکیک مناسب‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها برخوردار هستند، لذا این ویژگی باعث افزایش نرخ تشخیص اتوماتیک موقعیت خطوط جداکننده در آن‌ها شده است. پس از اصفهان، در نمونه‌های شاهرود نرخ تشخیص بالاتری نسبت به نمونه‌های شهرکرد مشاهده می‌شود.

البته ذکر این نکته ضروری است که نتایج آزمایشگاه با دخالت کاربر به دست آمده اند ممکن است که در آزمایشگاه‌های مختلف یک آزمایش نتایج مختلفی داشته باشد به این دلیل که متخصصان مختلف نظرات مختلفی برای نتایج آزمایش داشته باشند. بنابراین تفاوت داشتن نتایج الگوریتم معرفی شده در این پایان

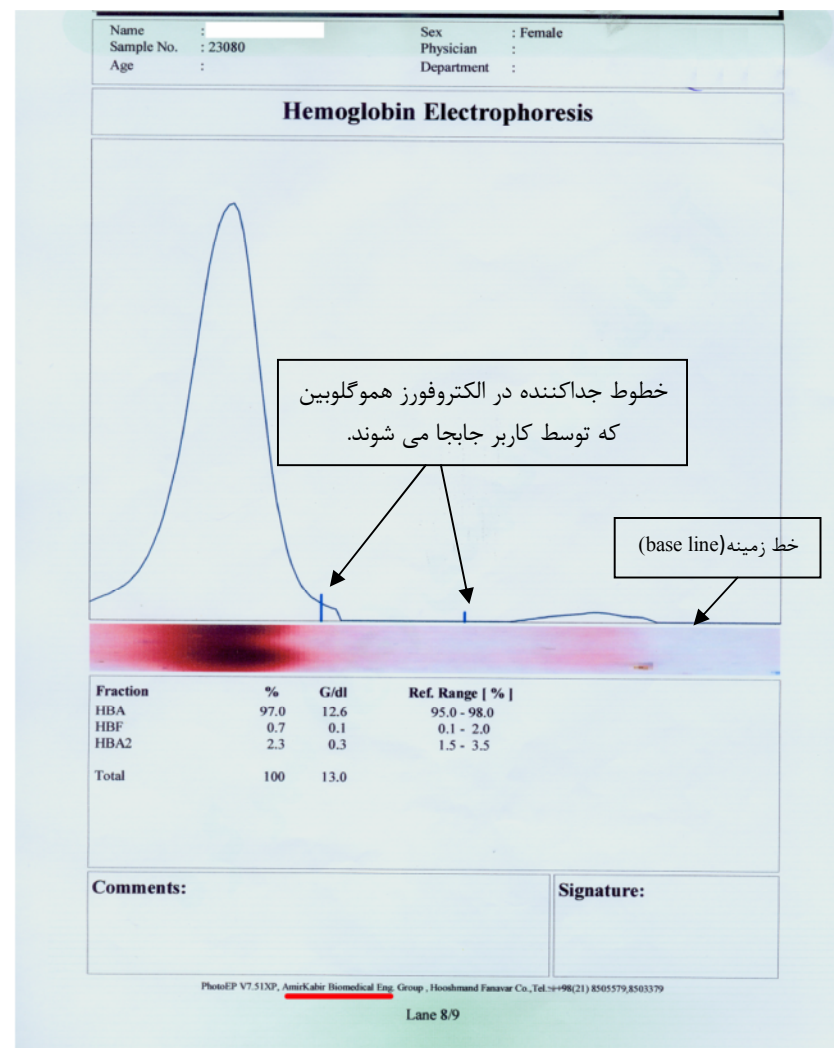
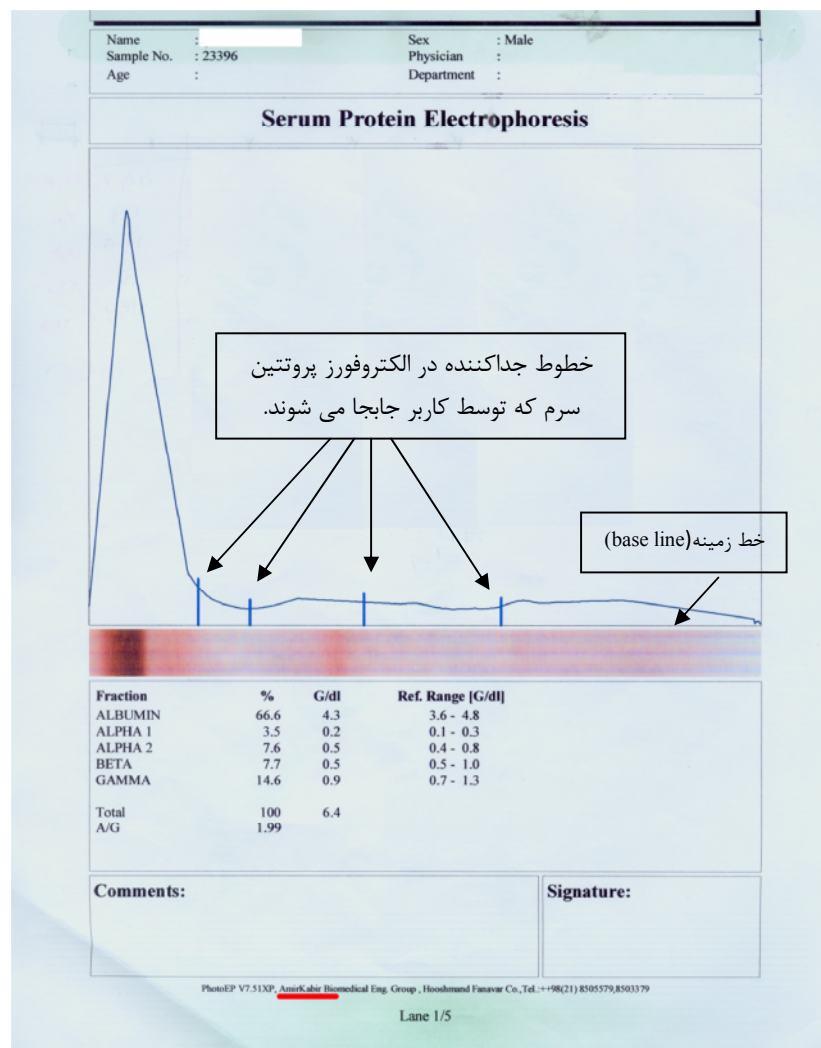
نامه و نتایج آزمایشگاه نمی تواند به دلیل ضعف الگوریتم باشد چرا که نتایج صرفاً با نتایج تهیه شده در یک آزمایشگاه مقایسه شده است.

۴-۳-۴- مقایسه نتایج الگوریتم و نتایج نرم افزارهای آزمایشگاه

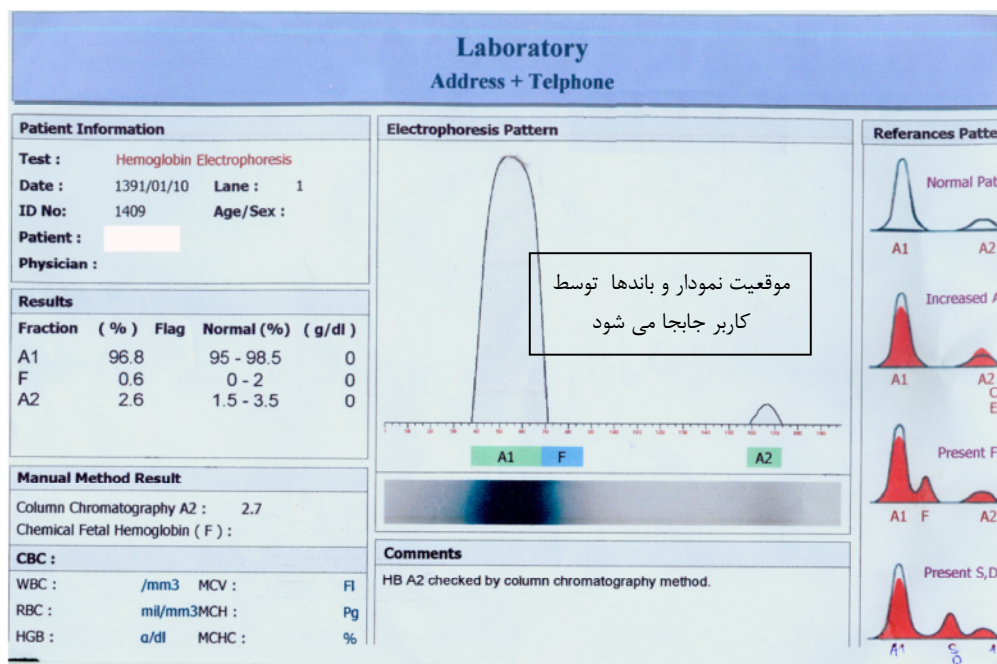
در حاضر تحلیل تصاویر الکتروفورز در آزمایشگاه های تشخیص طبی با استفاده از نرم افزارهای مختلف مانند Power Scan ، Amirkabir و Alan انجام می شود. همان طور که قبلاً اشاره شد این نرم افزارها به تنهایی قادر به تحلیل تصاویر الکتروفورز نیستند. هماتولوژیست در انجام تحلیل تصاویر الکتروفورز پروتئین و هموگلوبین نقش بسزایی دارد. چرا که نرم افزار در اکثر مواقع قادر به تفکیک باندها از یکدیگر نمی باشد.

مراحل کار این نرم افزار ها به این گونه است که پس از اسکن ژل الکتروفورز، موقعیت هر یک از لین ها با انتخاب کاربر در ژل مشخص می شود، سپس نمودار منحنی مربوط به لین مورد نظر توسط نرم افزار ترسیم می شود. پس از رسم منحنی، موقعیت منحنی توسط کاربر جابجا می شود و به خط زمینه چسبانده می شود. سپس نرم افزار با توجه به نوع ژل که هموگلوبین می باشد یا پروتئین، خطوطی را در اختیار کاربر قرار می دهد. کاربر با جابجایی این خطوط موقعیت باندها را برای نرم افزار مشخص می کند و در انتها نرم افزار با توجه به نقاط تعیین شده، سطح زیر منحنی هر باند را محاسبه می کند و به کاربر نمایش می دهد.

تصاویر زیر نمونه هایی از نتیجه تست الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین را در نرم افزارهای Amirkabir و Scan Power نشان می دهند. در تصویر اول خطوط جداکننده و خط زمینه نیز نشان داده شده است.



شکل ۴-۳۲- نتایج تست الکتروفورز در نرم افزار Amirkabir. (الف) نتیجه الکتروفورز هموگلوبین، (ب) نتیجه الکتروفورز پروتئین سرم.



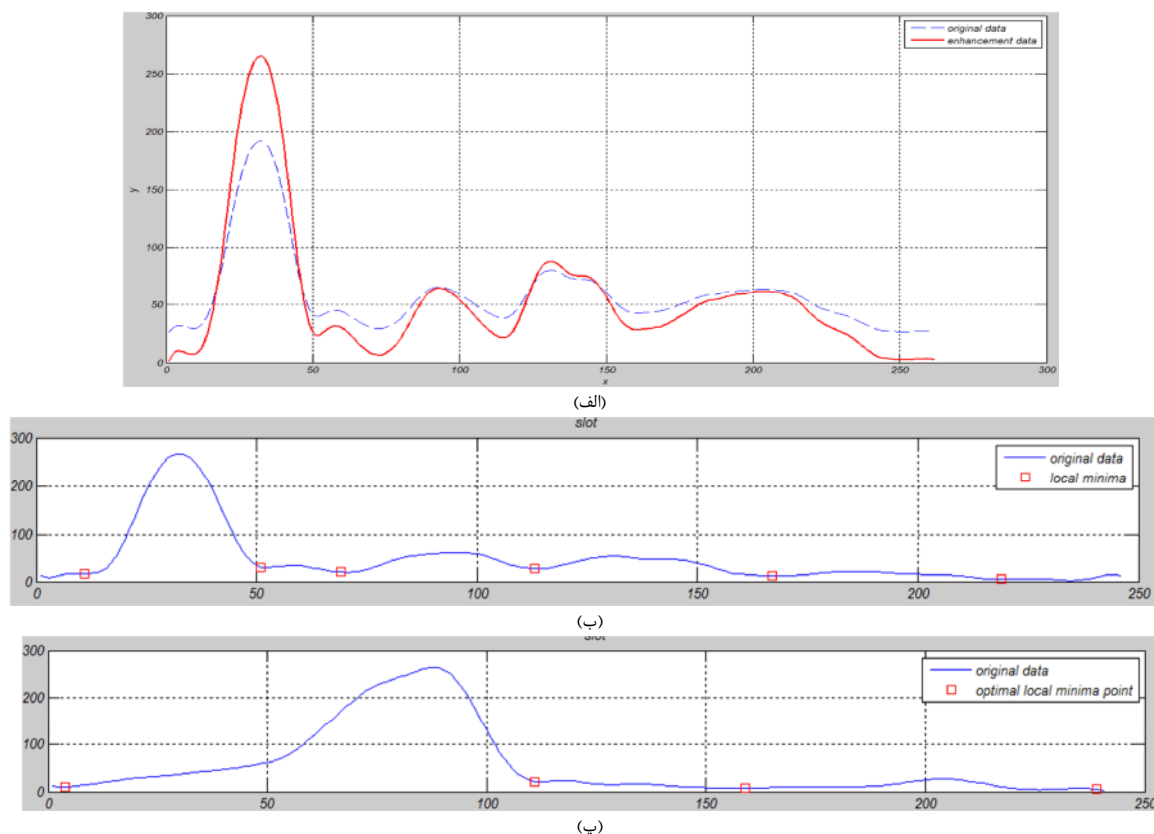
(الف)



(ب)

شکل ۴-۳۳- نتایج تست الکتروفورز در نرم افزار power scan. الف) نتیجه الکتروفورز هموگلوبین، ب) نتیجه الکتروفورز هموگلوبین.

همان‌طور که در تصاویر بالا نشان داده شده است، دو مسئله ایی که در نرم افزارهای تحلیل تصاویر الکتروفورز وجود دارد شامل تغییر موقعیت منحنی (قرار دادن آن روی خط زمینه) و تغییر موقعیت خطوط جداکننده جهت مشخص کردن موقعیت باندها می باشد که با دخالت مستقیم کاربر انجام می-شوند. در روشی که در این پایان نامه ارائه دادیم توانستیم با استفاده از تکنیک های پردازش تصویر این دو مسئله را به طور خودکار انجام دهیم. با استفاده از تکنیک‌های بهبود تصاویر (کشش هیستوگرام) توانستیم تغییر موقعیت منحنی را به طور خودکار انجام دهیم و با استفاده از مراحل که برای تحلیل لین مطرح شد توانستیم موقعیت باندها را به طور اتوماتیک تعیین کنیم. تصاویر زیر نتایج این مراحل را نشان می دهند.



شکل ۴-۳۴- نتایج روش پیشنهادی . الف) جابجایی منحنی به روش کشش هیستوگرام، ب) تعیین موقعیت خطوط جداکننده باندها در الکتروفورز پروتئین سرم، پ) تعیین موقعیت خطوط جداکننده باندها در الکتروفورز هموگلوبین

همان طور که پیش‌تر اشاره کردیم، دقت روش پیشنهادی 75.6% می‌باشد که با تغییراتی در روش پیشنهادی می‌توان دقت روش را بهبود بخشید. یکی از این تغییرات فراهم شدن امکانی برای اعمال نظر کاربر می‌باشد. در این صورت اگر در نتیجه، خطای تعیین موقعیتی وجود داشته باشد توسط کاربر اصلاح شود.

۴-۴ نتیجه‌گیری

در این فصل به معرفی و تشریح الگوریتم پیشنهادی جهت تحلیل تصاویر الکتروفورز پرداخته شد. الگوریتم پیشنهادی شامل مراحل پیش پردازش، استخراج و تحلیل لین می‌باشد. پایگاه داده مورد استفاده، مجموعه‌ای از تصاویر الکتروفورز پروتئین سرم و الکتروفورز هموگلوبین می‌باشد که از آزمایشگاه-های شهرستان‌های شهرکرد، اصفهان و شاهرود جمع آوری شده است. از اقدامات اساسی انجام شده در این الگوریتم می‌توان به استخراج اتوماتیک لین‌ها از تصاویر الکتروفورز، کاهش اثر پس زمینه به منظور تغییر خط زمینه، حل مسئله نامتقارن بودن باندها و در نهایت یافتن اتوماتیک موقعیت خطوط جداکننده باندها بر اساس فاصله نسبی باندها نسبت به یکدیگر اشاره نمود. پس از اعمال الگوریتم و مقایسه نتایج با نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه به نرخ تشخیص 75.6% دست یافتیم.

فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات

این فصل در ابتدا به مرور اجمالی آن چه در این پایان نامه مطرح شد می پردازد و در ادامه به طرح نتایج به دست آمده و همچنین پیشنهاداتی جهت ادامه کار می پردازد.

۵-۱- نتیجه گیری

الکتروفورز به عنوان یکی از تکنیک‌های رایج در علوم آزمایشگاهی می‌باشد که به منظور جداسازی بیومولکول‌ها استفاده می‌شود. الکتروفورز هموگلوبین و الکتروفورز پروتئین سرم از جمله رایج‌ترین تست‌های آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جهت تشخیص برخی بیماری‌ها استفاده می‌شود. نتایج حاصل از فرایند الکتروفورز هموگلوبین و الکتروفورز پروتئین سرم بر روی ژل استات سلولز، توسط اسکنر اسکن می‌شوند و با استفاده از نرم افزارهای خاص تهیه شده در این زمینه تحلیل می‌شوند. تمامی این نرم افزارها بدون دخالت کاربر قادر به تحلیل تصاویر نیستند. مهم‌ترین بخش تحلیل، تعیین موقعیت خطوط جداکننده باندها می‌باشد که این مرحله به طور کاملاً دستی توسط کاربر انجام می‌شود و نرم افزار به تنهایی قادر به تعیین درست این موقعیت‌ها نمی‌باشد. هدف این پایان نامه ارائه روشی به منظور تحلیل اتوماتیک تصاویر الکتروفورز با حداقل دخالت کاربر می‌باشد.

این پایان نامه در قالب ۵ فصل با هدف تحلیل تصاویر الکتروفورز هموگلوبین و پروتئین سرم تدوین شده است. در فصل اول به معرفی مقدمه ای از مسائل و اهداف مورد نظر، اجزای خون و فرایند الکتروفورز به عنوان یکی از تکنیک‌های کارآمد جداسازی در علم پزشکی و شیمیایی پرداخته شده است.

در فصل دوم مفهوم الکتروفورز و انواع الکتروفورز کامل‌تر تشریح شده است. با پیشرفت علم و تکنولوژی امکانات و تجهیزات متفاوتی در زمینه الکتروفورز ارائه شده است، بر این اساس الکتروفورز به دو روش کلی الکتروفورز با محیط کمکی و الکتروفورز بدون محیط کمکی انجام می‌شود. کاربرد هر یک از این روش‌ها به اهداف آزمایش بستگی دارد. الکتروفورز هموگلوبین و پروتئین سرم به هر دو روش فوق قابل انجام است. انتخاب هر یک از این روش‌ها به شرایط و امکانات آزمایشگاهی موجود بستگی دارد. همچنین در فصل دوم مراحل انجام الکتروفورز پروتئین سرم و هموگلوبین نیز مطرح شده است. از آن‌جا که این پایان

نامه با رویکرد پردازش تصویری انجام شده، در انتهای فصل دوم به مرور مقالاتی در این زمینه پرداخته شده است.

فصل سوم با رویکرد پردازش تصویری، به معرفی تکنیک‌های پردازش تصویر مورد استفاده در پایان نامه پرداخته است. این تکنیک‌ها شامل آستانه گذاری به روش اتسو، هموارسازی به روش سویزکی-گلی و بهبود کنتراست تصاویر به روش کشش هیستوگرام می باشد.

فصل چهارم به معرفی الگوریتم ارائه شده در این پایان نامه، پایگاه داده، مراحل انجام کار و نتایج حاصل از هر مرحله در تحلیل تصاویر الکتروفورز می‌پردازد. الگوریتم پیشنهادی شامل مراحل پیش پردازش، استخراج لین و تحلیل لین می‌باشد، هر یک از این مراحل نیز شامل زیر مراحل می‌باشند. در مرحله پیش پردازش با محاسبه میزان تغییرات در پروفایل عمودی تصویر الکتروفورز، محدوده لین‌ها شناسایی و استخراج می شوند. در مرحله استخراج لین، با تعیین حد آستانه مناسب با استفاده از روش اتسو فرایند استخراج لین انجام می‌گیرد. در مرحله تحلیل لین پس از انجام بهبود کنتراست تصویر با استفاده از روش کشش هیستوگرام، موقعیت خطوط جداکننده تعیین می‌شود و با در نظر گرفتن فاصله نسبی باندها نسبت به یکدیگر، موقعیت بهینه خطوط جداکننده به دست می‌آید. با تعیین موقعیت خطوط جداکننده محدوده باندها مشخص و مقدار آن‌ها تعیین می‌شود. در فصل پنجم نتایج و پیشنهادات مطرح شده است.

الگوریتم پیشنهادی بر روی تصاویر الکتروفورز جمع آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان‌های شهرکرد، اصفهان و شاهرود اعمال شد و با مقایسه نتایج به دست آمده از الگوریتم و نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه به نرخ تشخیصی در حدود ۷۵.۶٪ دست یافتیم.

۵-۲- پیشنهادات

با توجه به اقدامات انجام شده در این پایان نامه پیشنهاداتی جهت کارهای آینده در این زمینه قابل ارائه می باشد.

۱. تهیه پایگاه داده جامع از تصاویر الکتروفورز و بررسی الگوریتم ارائه شده: تصاویر پایگاه داده مورد استفاده در این پایان نامه از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرهای شهرکرد، اصفهان و شاهرود جمع آوری شده است. از آنجا که در این زمینه پایگاه داده جامعی وجود ندارد می توان تصاویر الکتروفورز را از سایر شهرستان ها جمع آوری کرد و نتیجه اجرای الگوریتم را بر روی داده های بیشتری بررسی کرد.

۲. امکان اعمال نظر متخصصین علوم آزمایشگاهی: از آنجا که الگوریتم ارائه شده در این پایان نامه مراحل تشخیص موقعیت خطوط جداکننده را به طور اتوماتیک و بر اساس تحلیل تصویر انجام می دهد مسلماً نتیجه به دست آمده عاری از خطا نخواهد بود. بنابراین می توان به عنوان کاری در آینده امکان اصلاح نتایج به دست آمده توسط الگوریتم را در اختیار کاربر قرار داد.

۳. اضافه کردن الگوریتم پیشنهادی به نرم افزارهای الکتروفورز موجود: با توجه به این که در حال حاضر نرم افزارهای موجود در زمینه الکتروفورز در حال رقابت با یکدیگر بوده و هر کدام با امکانات جدیدتری وارد بازار می شوند می توان الگوریتم پیشنهادی را به عنوان یکی از امکانات جدید به نرم افزارهای موجود اضافه کرد.

۴. استفاده از این الگوریتم جهت استخراج لین های DNA: همان طور که در فصل دوم نمونه های از تصاویر الکتروفورز DNA مشاهده می شود، در تحلیل تصاویر DNA نیز به دلیل وجود لین های مختلف مرحله استخراج لین ها از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا می توان از روش ارائه شده در این پایان نامه به عنوان مراحل استخراج لین ها در تصاویر DNA نیز استفاده کرد.

۵. استفاده از این الگوریتم جهت تحلیل باندهای DNA: تحلیل باندها در تصاویر الکتروفورز DNA از بخش‌های مهم تحلیل DNA می‌باشد. البته هدف از تحلیل باندها در تحلیل تصاویر DNA کمی متفاوت از تحلیل تصاویر الکتروفورز پروتئین و سرم خون می‌باشد. لذا به عنوان کاری در آینده می‌توان با کمی اصلاح در مراحل الگوریتم پیشنهادی، امکان تحلیل تصاویر الکتروفورز DNA را نیز فراهم کرد.

منابع

- [1] Jain A.K., (2008), "*Fundamentals of Digital Image Processing*", University of California, Davis, Prentice Hall, New Delhi.
- [2] Gonzalez R.C. and woods R.E. (2008), "*digital image processing*", prentice Hall.
- [3] Anderson S. C. and Cockayne S.(2003), "*Clinical Chemistry Concepts and Applications*", Waveland Press, Inc., Long Grove, Illinois.
- [۴] کوئیرا ج (۱۳۸۹)، "بافت شناسی پایه"، مترجم دکتر مهدی منتظری، چاپ دهم، انتشارات ارجمند، تهران، ص ۲۷۹.
- [5] <http://fa.parsiteb.com/news.php?nid=10474>
- [۶] نصیری ن و شریفی م (۱۳۹۱)، "خون شناسی و بانک خون"، چاپ اول، انتشارات ارجمند، تهران، ص ۱۲۰.
- [7] Ward K. M., Lehmann C. A. and Leiken A. M. (1994), "*Clinical Laboratory Instrumentation and Automation Principles, Applications, and Selection*", Saunders, Philadelphia.
- [۸] سقاء ح و سروش نیا م (۱۳۸۲)، "کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده‌های تشخیصی"، جلد دوم، چاپ اول، انتشارات کتاب میر، تهران.
- [9] http://www.advantecmfs.com/filtration/membranes/mb_ca.shtml
- [۱۰] مهدی الف (۱۳۷۹)، "اصول، کاربرد و تفسیر آزمایش‌ها در هماتولوژی عملی"، چاپ اول، انتشارات اشراقیه، تهران، ص ۲۶۳.
- [11] <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/electrop/electrop.htm>
- [12] <http://www.ngdir.ir/geolab/PGeoLabExp.asp?PID=3280>
- [13] Buckingham L. and Flaws M. L.(2007), "*Molecular Diagnostics Fundamentals, Methods, and Clinical Applications*", FA Davis, Philadelphia.
- [14] Cheng W. Z., Yen K. S., Lin C.Y., Ching Y. T. and Yang Y. L.(2001), "Comparing lanes in the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) images", in *Proc. 23rd Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 3, pp. 2911–2913.
- [15] Akhter N., Khan A. R., Talib Y. and Shadab S. (2008) " Analysis of Gel Electrophoresis Images", *ICETET- 08*, p106-109, Australia.

- [16] Sorkheh K., Shiran B., Gradziel T. M., Epperson B. K. and Asadi E. (2007) "Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm" *Euphytica springer*, pp327-344.
- [17] Lin C.Y., Ching Y.T. and Yang Y.L. (2007) "Automatic Method to Compare the Lanes in Gel Electrophoresis Images", *IEEE TITB*, 11, 2, pp. 179-189.
- [18] Vander Schans M. J, Kuypers A. W. H. M. , Kloosterman A. D., Janssen H. J. T. and Everaerts F. M. (1997), " Comparison of resolution of double-stranded and single-stranded DNA in capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, V772, pp 255-264.
- [19] http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis
- [20] <http://uhaweb.hartford.edu/chemistry/facilities1.html>
- [21] http://www.aesociety.org/areas/capillary_electrophoresis.php
- [22] <http://medicallabtechnology.blogfa.com/post-7.aspx>
- [۲۳] ذاکر ف ، شریفی م (۱۳۹۰)، "مروری بر هماتولوژی و بیماریها"، چاپ اول، انتشارات برای فردا، تهران.
- [24] <http://www.zenlabmedicine.com/>
- [25] Kaabouch N., Schultz R. R., Milavetz B. and Balakrishnan L.(2007)" An Analysis System for DNA Gel Electrophoresis Images Based on Automatic Thresholding an Enhancement" *IEEE EIT*, pp.26-31.
- [26] Caridade C.M.R., Marcal A.R.S, Mendonca T., Pessoa A.M. and Pereira S.(2009)" An automatic Method to identify and extract information of DNA bands in Gel Electrophoresis Images", *IEEE EMBS*, p1024-1027, *Minnesota*, USA.
- [27] Wong R.T. F., Flibotte S., Corbett R., Saeedi P., Jones S. J. M., Marra M.A., Schein J. E., and Birol I.(2010) "LaneRuler: Automated Lane Tracking for DNA Electrophoresis Gel Images", *IEEE T-ASE*, 7, 3, pp706-708.
- [28] Mohd Noor M. H., Hussain Z., Ahmad K. A. and Ainihayati A. R.(2011)" Gel Electrophoresis Image Segmentation with otsu Method Based on Particle Swarm Optimization", *CSPA 2011*, pp426-429.
- [29] Park S.C., Na I. S., Kim S. H., Lee G. S., Oh K. H., Kim J. H. and Han T.H. (2011) " Lanes Detection in PCR Gel Electrophoresis Images", *CIT2011*, pp306-313, Cyprus.
- [30] Li Z. and Liu C., (2009) "An Image Thresholding Method Based on Standard Deviation", *CSO' 09*, pp835-838, Washington, USA.

- [31] Sthitpattanapongsa P. and Srinark T. (2011), “A Two-stage otsu’s Thresholding Based Method on a 2D Histogram”, *IEEE*, pp345-348.
- [32] Zhang J. and Hu J., (2008) “Curvilinear Thresholding Method for Noisy Images based on 2D Histogram”, *IEEE ROBIO*, pp1014-1019, Bangkok.
- [33] Moghaddam R. F., Cheriet M. (2012) , “Adotsu: An adaptive and parameterless generalization of otsu’s method for document image binarization “, *Pattern Recognition Elsevier*, 45, pp 2419–2431.
- [34] Trier O.D. and Jain A.K., (1995) “Goal-Directed Evaluation of Binarization Methods”, *IEEE TPAMI*, 17, 12, pp 1191-1201.
- [35] Otsu N., (1979), “A threshold selection method from graylevel histograms”, *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 9, 1, pp 62–66.
- [36] Ye X., Cheriet M., Suen C.Y., (2001) “Stroke-model-based character extraction from gray-level document images”, *IEEE TIP*, 10, 8, pp1152–1161.
- [37] Zhao M., Yang Y., Yan H., (2000) “ An adaptive thresholding method for binarization of blueprint Images”, *Pattern Recognition Letters Elsevier Science*, 21, pp927-943.
- [38] Savitzky A. and Golay M. J. E., (1964) “Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures”, *Anal. Chem*, 36, 8, pp1627–1637.
- [39] Chou Y.L., (1975) “*Statistical analysis, with business and economic applications*”, 2nd, Holt, Rinehart and Winston, New York.
- [40] Press W. H., Teukolsky S. A., Vetterling W. T. and Flannery B. P., (1992) “*Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing*” 2nd, 1, University of Cambridge, pp.644-649.
- [41] Schafer R.W., (2011) “On the Frequency-Domain Properties of Savitzky-Golay Filters” *DSP/SPE 2011 IEEE*, pp54-59.
- [42] Ruffin C. and King R. L., (1999) “ The Analysis of Hyper spectral Data Using Savitzky-Golay Filtering - Theoretical Basis (Part 1),” *IEEE IGARSS’99 Proceedings* ,pp756-758.
- [43] Luo J., Ying K., He P. and Bai J., (2005) “Properties of Savitzky–Golay digital differentiators”, *Digital Signal Processing Elsevier*, 15, pp.122–136.
- [44] Chen J., Wu L., Pan T., Xie J. and Chen H., (2010), “ Quantification Method of Glucose in Aqueous Solution by FTIR/ATR Spectroscopy”, *FSKD 2010 IEEE*, pp2159-2163, Yantai, China.

[۴۵] شمس اسفند آبادی م و احمدی الف، (۱۳۸۷) " اصول پردازش تصویر دیجیتال". چاپ اول، انتشارات دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ص ۴۰-۸۰.

[46] Umbaugh S. E., (2005) "*Digital image analysis and processing*", CRC Press, 1 edition.

[47] McAndrew A., (2004) "*An Introduction to Digital Image Processing with Matlab*", Victoria University of Technology, pp.61.

[48] Zuo C., Chen Q. and Sui X., (2012) "Range Limited Bi-Histogram Equalization for image contrast enhancement", *Optik - Int. J. Light Electron Opt*, pp.1-7.

[49] Al-amri S. S., (2011) "Contrast Stretching Enhancement in Remote Sensing Image", *BIOINFO Sensor Networks*, 1, 1, pp.06-09.

Abstract

Image analysis is an Image processing technique that aims to extract features or information from images. Image analysis in medicine has a special place because is a basis for disease diagnosis for physicians. In addition to diagnostic imaging technique that different parts of the body are covered, sometimes it is necessary for the diagnosis is used of the patient's blood. In order to separate blood components using a machine called Electrophoresis. Electrophoresis is mobility of the particles in a liquid under the influence of an electric field uniform. Serum protein electrophoresis and hemoglobin electrophoresis test are the most important laboratory tests that used now widely in the medical diagnostic laboratories in order to diagnose certain diseases of the blood.

Images obtained from electrophoresis are analyzed by hematologists and electrophoresis image analysis software. The important part of the analysis is separation of the bands that this can be done manually. Also, lane curve position moved by a hematologist. Thus electrophoresis software can't automatically identify band's separators. In this case there is the risk of mistakes due to human error.

In this dissertation introduced technique that identifies automatically location of the bands on electrophoresis images that includes pre-processing, lane extraction and lane analysis. Preprocessing stage to calculate the rate of change in the vertical profile picture electrophoresis of lane for identify and extraction area of the lanes. In lane extraction stage, the determination of appropriate threshold is done using Otsu method then extracted all of lanes. In lane analysis stage, histogram stretching method used to improve the contrast of the lane then the position of the separators can be determined. Then consider the relative distance between the bands, optimized position of the separators is calculated. After specify bands locations, values of the bands are determine.

Proposed algorithm done on images obtained from Labs medical diagnostics Shahrekord, Isfahan and shahrood cites. By comparing the results of the algorithm and the results provided by the laboratory diagnostic rate of 75.6% is obtained for proposed algorithm.

Key words: Image Processing, Electrophoresis, Otsu Thresholding, Savitzky-Golay smoothing.