

Patryk Orzechowski*, Marcin Waśko**

Metoda wyodrębniania frakcji na podstawie analizy obrazu białek osocza ludzkiej krwi

1. Wprowadzenie

Białka ludzkiego osocza spełniają ważne funkcje we wszelkich procesach zachodzących w organizmie [13]. Zmiany w ich ilości i jakości odzwierciedlają najprawdopodobniej każdy stan patologiczny, mający miejsce w żywym ustroju [5, 9]. Białka to makromolekuły zróżnicowane pod wieloma względami, m.in. strukturą przestrzenną, wielkością cząsteczek, ładunkiem elektrycznym. Stosując klasyczne metody rozdzielania według ładunku (elektroforeza), można wyróżnić wśród białek następujące podgrupy: albuminy oraz globuliny oznaczone pierwszymi kolejnymi literami alfabetu greckiego: alfa, beta i gamma [5].

Klasycznie analizę stężenia białka w osoczu krwi wykonuje się metodami chemicznymi. Wraz z rozwojem nowoczesnych metod diagnostycznych, w medycynie coraz powszechniej stosowane są systemy inteligentnej analizy obrazów, których celem jest ułatwienie lekarzowi postawienie właściwej diagnozy [23]. W systemach rozpoznawania obrazu, w pierwszej kolejności (w fazie przetwarzania wstępnego) dąży się do poprawy jakości zdjęcia poprzez eliminację zakłóceń oraz – poprzez segmentację – do wydzielenia i uwydatnienia regionów istotnych z medycznego punktu widzenia [1, 24]. Następnie dla przetworzonego obrazu redukuje się wymiarowość danych do dalszej analizy – z obrazu o rozmiarze w megabajtach (lub nawet gigabajtach) wyodrębnia się zestaw cech reprezentatywnych w postaci wektora zawierającego ok. kilkadziesiąt elementów [23]. Ostatni etap inteligentnej analizy obrazu polega na automatycznym identyfikowaniu oraz klasyfikowaniu wzorców, na podstawie ich kształtu, wymiarów czy tekstury [24]. W procesie tym wykorzystywane są różne techniki – m.in. wnioskowanie probabilistyczne, metody k-średnich, maszyny wektorowe (SVM), jak również sieci neuronowe czy zbiory rozmyte [14, 23].

Ważnym etapem w procesie przetwarzania i analizy obrazu jest jego segmentacja, polegająca na podziale obrazu na fragmenty odpowiadające uwidacznianym obiektom, oraz towarzysząca jej indeksacja, czyli etykietowanie poszczególnych pikseli, wskazujące na ich

* Katedra Automatyki, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

** Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

przynależność do danego obiektu [22]. Dotychczas opracowano wiele różnorodnych technik automatycznej segmentacji, których skuteczność w znacznym stopniu zależy od celu analizy, lecz także od postaci obrazu [1].

Najczęściej stosowane algorytmy przypisać można do jednej z dwóch kategorii [1]:

- 1) techniki bazujące na segmentacji obszarów (*region segmentation*), wyodrębniające regiony spełniające dane kryterium jednorodności;
- 2) techniki bazujące na segmentacji krawędzi (*edge-based segmentation*), poszukujące rozdziałów pomiędzy regionami o różnych charakterystykach.

Do najpopularniejszych technik segmentacji obszaru zaliczyć można lokalne lub globalne progowanie (*global thresholding*), algorytmy klasteryzacji (dzielące obrazy na zbiory mające wysoki stopień podobieństwa cech), algorytmy wykorzystujące rozrost obszaru [1, 22] lub też algorytmy detekcji działów wodnych (*watershed*) [1, 18]. Techniki wykorzystujące segmentację krawędzi polegają na znalezieniu pewnych granic dla obiektów oraz odseparowanie otoczonych nimi regionów. Granice wyodrębniane są poprzez zastosowanie algorytmów gradientowych, algorytmów przeszukiwania grafu (*graph searching*) lub śledzenie konturów (*contour following*) [1].

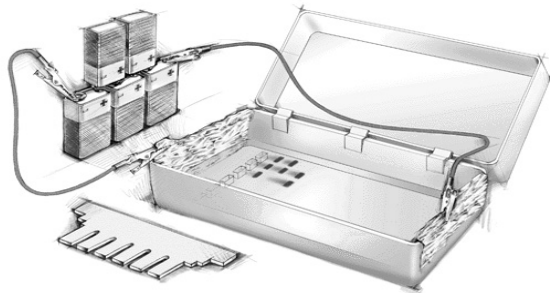
Technika diagnostyczna rozszerzonej elektroforezy jest na tyle nowatorska, że dotychczas nie podejmowano jakichkolwiek prób automatycznej analizy obrazów. Niniejszy artykuł jest więc pionierską próbą zastosowania metod automatycznej segmentacji dla tego badania. Dobrze udokumentowane są natomiast próby segmentacji obrazów o zbliżonym wyglądzie – pochodzących z dwuwymiarowej elektroforezy. Najczęściej bazują one na detekcji działów wodnych [3, 4, 18], z ewentualnym wykorzystaniem markerów (*marker controlled watershed*) [15, 18, 30], lub też polegają na analizie obrazów w różnych skalach z wykorzystaniem techniki *scale-space* i filtru gaussowskiego [16]. W najnowszych pracach stosuje się również metody konturowego filtrowania obszaru [8] lub algorytmy genetyczne [7]. Różne techniki segmentacji obrazów dwuwymiarowej elektroforezy zawarto w pracy [18].

W pierwszej części niniejszego artykułu opisano proces elektroforezy białek osocza ludzkiej krwi oraz możliwość wykorzystania badania w diagnostyce chorób. Omówiona została rozwijana w ostatnich latach technika rozszerzonej elektroforezy, która ma na celu poprawę efektywności rozpoznawania schorzeń. W dalszej części przedstawiony został opis automatycznej segmentacji i indeksacji frakcji białkowych osocza ludzkiej krwi dla badania rozszerzonej elektroforezy, bazujący na pracy [22], a będący odmianą metody detekcji działów wodnych.

Prowadzone prace badawcze posłużyć mogą do opracowania w przyszłości nowoczesnej metody diagnostycznej, bazującej na systemie ekspertowym oraz technikach analizy obrazu, która wskazywałaby na wysokie ryzyko występowania u pacjenta różnych chorób. Możliwe, że dzięki temu uda się uniknąć konieczności przepisywania pacjentowi „w ciemno” wysoce kosztownych badań diagnostycznych – pacjent kwalifikowany byłby do dalszej diagnostyki wyłącznie w przypadku negatywnego wyniku badania.

2. Elektroforeza

Elektroforeza jest popularną techniką analityczną, w której pod wpływem pola elektrycznego naładowane cząstki poruszają się w kierunku elektrody o przeciwnym znaku [25]. Większość białek osocza w pH stosowanym w elektroforezie ($\text{pH} = 8,76$) ma ładunek ujemny. Tak więc rozdział – po nałożeniu próbki przy elektrodzie ujemnej (katodzie) – następuje w kierunku elektrody dodatniej (anody) [21] (rys. 1).



Rys. 1. Schemat stanowiska do elektroforezy

Elektroforeza białek osocza przeprowadzana może być na różnych podłożach – dla celów klinicznych najczęściej na żelu agarozowym [13]. W elektroforezie na agarozie ruch cząstek jest spowalniany przez oddziaływanie żelowej matrycy, która pełni rolę sita molekularnego. Cząsteczki, których rozmiary są małe w porównaniu z porami żelu, łatwo w nim wędrują, natomiast cząsteczki znacznie większe od porów są prawie nieruchome [21]. Dzięki przeciwstawnemu oddziaływaniu pola elektrycznego i sita molekularnego uzyskuje się, zgodnie z różnicami w wielkości, kształcie i ładunku cząstek, różnice w szybkości ich migracji, co pozwala na ich rozdzielenie na poszczególne frakcje.

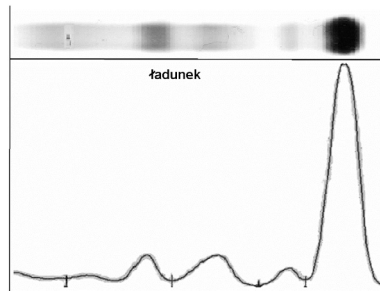
Najczęściej stosowana w praktyce klinicznej elektroforeza na żelu agarozowym umożliwia rozdział białek osocza na 5 frakcji (w kolejności rosnącej odległości od punktu nałożenia): albuminy, α_1 , α_2 , β i γ -globuliny [13]. Rozdzielone w żelu białka można wykryć, używając barwnika, który łączy się z nimi, zabarwia i w ten sposób uwidacznia prążki, ustawione osią długą poprzecznie do osi rozdziału. Każdy prążek odpowiada frakcji, a intensywność oraz wielkość prążka wskazują w przybliżeniu na stężenie (i pośrednio – ilość) zawartego we frakcji białka. Stężenie każdej spośród wymienionych frakcji określić można analizując wybarwiony rozdział densytometrem. Prawidłowe zakresy zawartości poszczególnych frakcji w osoczu przedstawia tabela 1. Należy przy tym zauważyć, że wyniki badań zdrowych osób mogą się od siebie w znaczący sposób różnić, nie przekraczając zakresu normy stężeń poszczególnych frakcji, tak więc nie istnieje jeden, „prawidłowy” wynik badania, który byłby wynikiem referencyjnym [9].

Tabela 1
Stężenia oraz udział procentowy poszczególnych białek w ludzkim osoczu

Fracja	Udział procentowy	Stężenie [g/dL]
albuminy	53÷66	3,5÷5,0
α 1-globuliny	2,0÷5,5	0,1÷0,3
α 2- globuliny	6÷12	0,6÷1,0
β -globuliny	8÷15	0,7÷1,2
γ -globuliny	11÷21	0,7÷1,6

2.1. Rezultat badania

Po skanowaniu densytometrem, wzór prążków może być przedstawiony w formie funkcji intensywności od odległości od miejsca nałożenia. Maksima i minima na wykresie odpowiadają większej i mniejszej intensywności oraz rozmiarowi prążków – czyli większym i mniejszym ilościom białka (por. rys. 2).



Rys. 2. Przykładowy wynik elektroforezy wraz z funkcją intensywności

Komputerowa analiza wyników elektroforezy bazuje na uśrednieniu intensywności pikseli w kierunku pionowym oraz separacji w poziomie obszarów poprzez znajdowanie ekstremum funkcji jednowymiarowej [32].

2.2. Anomalie w wynikach badania

Odchylenia od normy polegają na zmianach ilościowych (zanik lub pojawienie się nowej, patologicznej frakcji) oraz jakościowych (wzrost lub spadek udziału procentowego poszczególnych frakcji białek w obrazie densytometrycznym). Zmiany takie występują w wielu różnych chorobach, m.in. stanach zapalnych, chorobach układowych, nowotworach, schorzeniach wątroby i nerek oraz wielu innych, przyjmując niejednokrotnie obraz charakterystyczny dla danego schorzenia [5, 20]. Interpretację wyników badania, wykorzystywaną w diagnostyce chorób, zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2
Potencjalne przyczyny wystąpienia zmian w obrazie elektroforetycznym

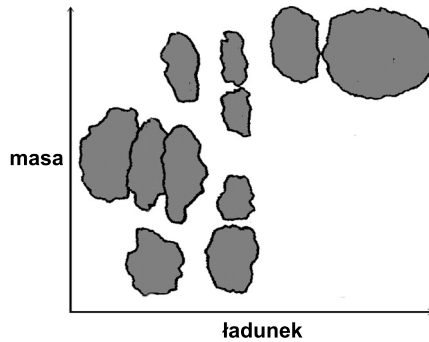
Obraz elektroforetyczny	Możliwe przyczyny
Obniżone białko całkowite	niedożywienie [12] syndrom nefrotyczny [28] enteropatia wysiękowa [9]
Podwyższenie α 1-globuliny	przewlekły stan zapalny [17] ostry stan zapalny [13] choroba nowotworowa [11, 19]
Obniżenie α 1-globuliny	niedobór α 1-antytrypsyny [6]
Podwyższenie α 2-globuliny	ostry stan zapalny [9] przewlekły stan zapalny [5]
Obniżenie α 2-globuliny	hemoliza [2, 27, 29]
Podwyższenie β -globuliny	hiperlipoproteinemia [10] terapia estrogenami [9]
Obniżenie β -globuliny	wrodzone zaburzenia krzepliwości [31] koagulopatia ze zużycia [20] DIC (zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego) [13]
Podwyższenie γ -globuliny	szpiczak mnogi [5] przewlekły stan zapalny [5] ostra infekcja bakteryjna [9] makroglobulinemia Waldenstroma [11] przewlekła choroba wątroby [13]
Obniżenie γ -globuliny	agammaglobulinemia Brutona [13]

3. Technika rozszerzonej elektroforezy

W ostatnim czasie opracowano techniki badawcze, będące rozwinięciem badania elektroforetycznego [25]. Sam sposób przeprowadzenia badania, jak również dobór podłoża jest w chwili obecnej przedmiotem eksperymentów, których celem jest poprawa jakości obrazu, otrzymywanego w wyniku rozszerzonej elektroforezy.

Rezultatem badania jest dwuwymiarowy obraz frakcji białek osocza, które rozlokowane są wzrastająco pod względem ładunku wzdłuż osi odciętych oraz względem masy wzdłuż osi rzędnych (rys. 3).

Klasyczny obraz powstały w wyniku rozszerzonej elektroforezy składa się z 11–15 barwnych plam. Każda plama jest częścią frakcji białek osocza znanych z elektroforezy klasycznej. Wydaje się, że taka metoda daje dokładniejsze wyniki, przy zachowanej swoistości i czułości badania [26].

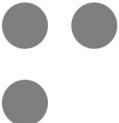
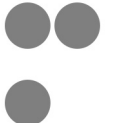
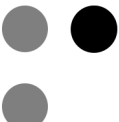

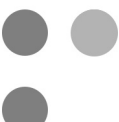
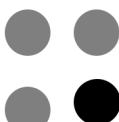


Rys. 3. Schemat obrazu frakcji białek osocza powstały w wyniku rozszerzonej elektroforezy

Teoretyczne analizy sposobu przeprowadzania badania wskazują na możliwość wystąpienia sześciu rodzajów odstępstw od wyniku uznawanego za prawidłowy (wykonanego dla pacjenta zdrowego). Możliwe odstępstwa dotyczą przesunięć poszczególnych najmocniejszych frakcji w pionie lub poziomie, wzmocnienia lub osłabienia ich intensywności oraz pojawienia się nowych frakcji. Poszczególne odstępstwa od badania referencyjnego przedstawia schematycznie tablica 1.

Tablica 1

Anomalie zauważone w dotychczasowych wynikach badania rozszerzonej elektroforezy

Obraz	Opis	Obraz	Opis
	obraz prawidłowy (obraz referencyjny)		przesunięcie frakcji w osi odciętych
	wzmocnienie intensywności frakcji		przesunięcie frakcji w osi rzędnych
	osłabienie intensywności frakcji		pojawienie się dodatkowej frakcji

3.1. Automatyczna analiza obrazu – przetwarzanie wstępne

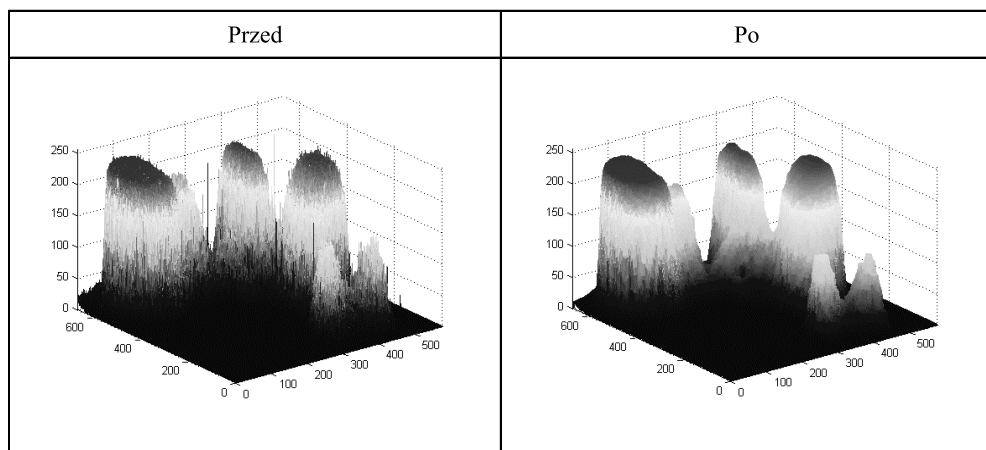
Przed przystąpieniem do analizy właściwej, mając na względzie znaczne zaszumienie danych wejściowych, zastosowano klasyczne metody przetwarzania wstępnego – wszystkie obrazy ze zbioru skalowano do rozmiaru 600×700 pikseli, a następnie stosowano sekwencję 30 operacji otwarcia (z maską kwadratową 6×6) oraz median (z maską identycznych rozmiarów).

Przeprowadzone operacje miały na celu eliminację zakłóceń powstałych podczas przeprowadzania samego badania (np. w wyniku osadzania się drobin kurzu na preparacie lub niejednorodności podłoża). Efektem zastosowanego przetwarzania wstępnego jest znaczna redukcja przypadkowych zakłóceń oraz „wygładzenie” obrazu, zwłaszcza w okolicach maksimów (por. tablicę 2).

Ze względów praktycznych, analizę przeprowadza się na negatywie obrazu – tzn. rozpatruje się białe frakcje na czarnym tle. W celu uniknięcia niejednoznaczności, w dalszym artykule (jak również w algorytmie) obrazy z rozszerzonej elektroforezy przedstawiane będą jako czarne frakcje na białym tle (wg oryginalnego obrazu), należy mieć jednak na uwadze, że pracuje się na obrazach odwrotnych.

Tablica 2

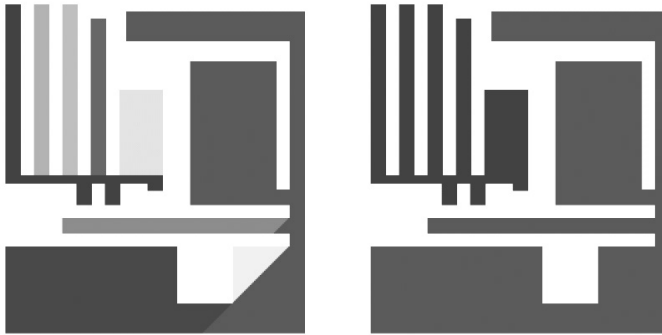
Obraz przed wykonaniem przetwarzania wstępnego oraz po jego wykonaniu



3.2. Koncepcja algorytmu

Zaprezentowany w niniejszym artykule algorytm jest wariantem metody detekcji działów wodnych. Koncepcja algorytmu bazuje na technice indeksacji zbinaryzowanego obrazu opisanej w [22]. Technika ta polega na przeglądaniu poszczególnych pikseli obrazu linia po linii, z wykorzystaniem informacji o indeksach pikseli należących do sąsiedztwa aktualnie rozpatrywanego. Dodatkowo, w celu zapewnienia spójności indeksacji w ramach danego obszaru, stosowany jest dodatkowy mechanizm etykietujący, zwany tablicą sklejeń.

Struktura ta, realizowana najczęściej za pomocą tzw. LUT (*Look Up Table*), aktualizowana jest każdorazowo gdy znaleziony zostanie piksel obszaru, który nie sąsiaduje z innymi znaczącymi pikselami lub gdy znaleziony zostanie piksel sąsiadujący z więcej niż jednym rodzajem znaczących pikseli. Po przeglądnięciu całego obrazu, informacja zapisana w LUT wykorzystywana jest do przenumerowania i ujednocnienia indeksacji obszarów, które mogły zostać pierwotnie potraktowane jako odseparowane (por. rys. 4).



Rys. 4. Korekta indeksacji za pomocą tablicy sklejeń
(na podstawie [22])

Podstawową różnicą pomiędzy klasyczną metodą indeksacji a algorytmem separacji frakcji jest sposób przeglądania obrazu. Podejście literaturowe analizuje obraz linia po linii, piksel po pikselu [22]. Zaproponowane rozwiązanie dokonuje iteracji według stopnia szarości poszczególnych pikseli. Podczas pierwszego przeglądania obrazu, piksele zostają podzielone na grupy o jednakowym poziomie szarości. Następnie – obraz jest przeglądany, począwszy od pikseli najbardziej znaczących (najciemniejszych) przez wartości pośrednie aż do pikseli mających stopień szarości równy wartości poziomu odcięcia (tzw. *threshold*), który rozgranicza obraz frakcji od pikseli tła.

Analiza według poziomów szarości wprowadza konieczność dokonania zmian w algorytmie [22], w fazie analizowania sąsiedztwa (konieczne jest wzięcie pod uwagę wszystkich 8 pikseli sąsiadujących z rozpatrywanym). W tym celu definiuje się funkcję przynależności piksela p do zbioru A . Jeśli wśród pikseli sąsiadujących z p nie występuje żaden piksel należący do zbioru A , funkcja zwraca pojedynczy piksel – p . W przeciwnym wypadku, gdy przynajmniej jeden z pikseli q należących do sąsiedztwa N analizowanego piksela p należy do niepustego zbioru A , funkcja dołącza piksel p do zbioru A , wg wzoru (1):

$$f(A, p) = \begin{cases} A \cup p; & \exists q: q \in A \wedge q \in N(p) \\ p; & A = \phi \end{cases} \quad (1)$$

Kolejną różnicą w podejściach jest dokonanie rozróżnienia podczas pracy algorytmu pomiędzy grupą, frakcją a regionem. Poprzez **grupę** rozumie się zbiór sąsiadujących ze

sobą znaczących pikseli obrazu, który nie spełnia wystarczających wymagań, aby mógł zostać uznany za **frakcję**. Na obecnym etapie prac, wymagania dotyczą przede wszystkim rozmiaru grupy (tzn. grupa pikseli może zostać nazwana frakcją, gdy zawiera więcej elementów niż z góry założone minimum). **Regionem** – uznaje się natomiast zbiór pikseli, stanowiących obszar wspólny kilku wcześniej wyodrębnionych frakcji.

3.3. Algorytm separacji frakcji na podstawie analizy obrazu

Algorytm wykorzystuje oryginalną tabelę A z poziomem szarości oraz tabelę V – zawierającą informację o indeksacji danego piksela (konwencja: wartość piksela w tabeli V jest równa zero, jeśli piksel należy do tła, większa od zera dla oznaczenia przynależności do grupy, oraz mniejsza od zera, dla oznaczenia przynależności do regionu), listę G – zawierającą listę pikseli należących do poszczególnych grup, F – przechowującą indeksy grup, które zostały uznane za frakcje oraz listę R – ze zdefiniowanymi regionami, przechowującą identyfikatory frakcji, które wchodzą w ich skład.

Szkielet opracowanego algorytmu przedstawić można następująco:

1. Posortuj piksele obrazu według stopnia szarości – od zawierających najwięcej białka (najciemniejszych) do najjaśniejszych (tj. pikseli tła).
2. Ustaw aktualny poziom szarości na maksymalny znaleziony na obrazie ($level = MAX$)
3. Dla każdego piksela p o poziomie szarości równym $level$: $A(p) = level$, przeanalizuj sąsiedztwo $N(p) = \{q_i\}, i = 1 \dots 8$:

q_1	q_2	q_3
q_4	p	q_5
q_6	q_7	q_8

- a. Sprawdź, czy piksel p sąsiaduje z daną frakcją lub regionem, do których powinien zostać dołączony, tzn. czy $V(q_i), i = 1 \dots 8$.

Niech (F_1, F_2, F_3, \dots) będzie zbiorem indeksów frakcji, zaś (R_1, R_2, R_3, \dots) zbiorem indeksów regionów, znajdujących się w sąsiedztwie piksela q_i .

Wyznacz wszystkie indeksy frakcji (te należące do regionów), z którymi sąsiaduje piksel p : $R_p = \bigcup_{i,j} F_i \cup R_j$.

- Sprawdź, czy w tabeli regionów R istnieje już region zawierający wyszczególnione frakcje. Jeśli nie – stwórz nowy region z połączenia wszystkich indeksów frakcji będących w sąsiedztwie p : $R \leftarrow R \cup R_p$.
- Dołącz piksel p do wszystkich frakcji F_i oraz nadaj pikselowi indeks istniejącego regionu $V(p) = -R_p$.

Krok powyższy ma na celu określenie, czy możliwe jest zaindeksowanie piksela *a priori*. Jeśli tak – określany jest indeks frakcji lub regionu wspólnego, do którego piksel ma zostać przypisany.

b. Sprawdź wszystkie grupy, które znalazły się w sąsiedztwie p .

Niech G_1, G_2, G_3, \dots oznacza indeksy grup znalezionych w sąsiedztwie p , niech $G_p = \bigcup_i G_i$.

- Jeśli w sąsiedztwie p znaleziono frakcję lub region, przypisz $G_p \leftarrow R_p$.
- Połącz wszystkie grupy G_i , w jedną grupę G_p . Uaktualnij tablicę sklejeń, wpisując pod indeksem i -tym wartość p (identyfikator najmniejszej spośród sklejaných grup).
- Dołącz piksel p do grupy G_p .
- Jeśli możliwe jest uznanie grupy za frakcję, oznacz grupę G_p jako nową frakcję, dodaj jej indeks do listy frakcji.

Efektom powyższego kroku jest rzeczywiste połączenie zbiorów, których sąsiedztwo zostaje ujawnione w wyniku analizy piksela p . Po określeniu docelowej indeksacji piksela p , aktualizowana jest w tablicy sklejeń indeksacja sąsiadujących z nim regionów, frakcji oraz grup.

c. jeśli w sąsiedztwie p nie znaleziono żadnej grupy, stwórz nową i dołącz do niej piksel p .

Po zakończeniu trzeciego kroku, uzyskuje się wyniki indeksacji wszystkich pikseli, których poziom szarości jest większy lub równy aktualnej wartości *level*.

4. Zmniejsz *level* o 1. Jeśli $level < MIN$ przerwij obliczenia, w przeciwnym razie wróć do kroku 3.
5. Przeglądając tablicę sklejeń, przenumeruj indeksy poszczególnych grup. Pozostać powinny wyłącznie te indeksy, których wartość jest równa pozycji w tablicy. Dokonaj ponownej numeracji indeksów frakcji tak, aby indeksacja frakcji obrazu zaczynała się od cyfry '1'. W rezultacie, wyznaczona zostaje ostateczna liczba klastrów.
6. Przeindeksuj wszystkie piksele obrazu na ostateczne wartości na podstawie tablicy sklejeń.

Przedstawiony schemat w dość prosty sposób można modyfikować, w zależności od tego, jak precyzyjnie pragnie się zaindeksować regiony wspólne. Jeśli wymagane byłoby rozróżnienie poszczególnych regionów wspólnych (tzn. odróżniałoby się regiony utworzone przez odmienny zestaw frakcji), pesymistyczna złożoność obliczeniowa algorytmu dla indeksacji obrazu o rozmiarze $n \times n$ wyniosłaby $O(n^4)$. Wspólnych regionów może być co najwyżej tyle, ile pól na obrazie pozostało wolnych po wyodrębnieniu frakcji (których może być co najwyżej n^2), zaś każdy z nich zawierać może co najwyżej n^2 indeksów.

Złożoność algorytmu wyniesie $O(n^2)$, jeśli zrezygnuje się z odróżniania regionów wspólnych (tzn. zostanie wprowadzony pojedynczy region wspólny zawierający wszystkie piksele graniczne pomiędzy frakcjami).

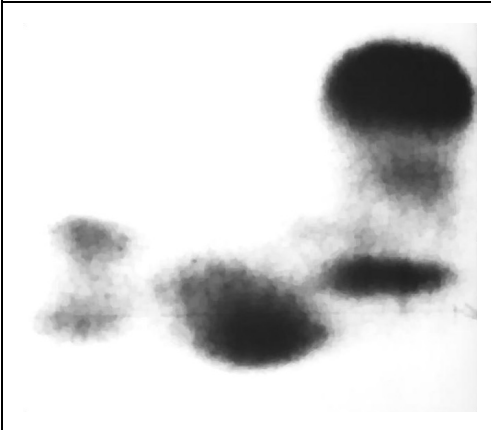
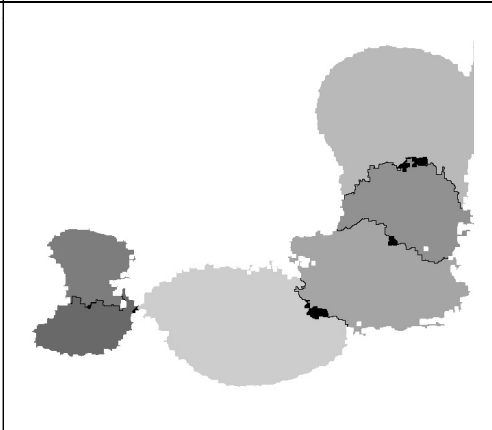
3.4. Wstępne wyniki działania algorytmu

Działanie algorytmu przetestowano na bazie badań rozszerzonej elektroforezy dostępnej w Katedrze Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, która w chwili obecnej liczy 10 obrazów.

Wyniki przykładowej analizy obrazu przedstawiono w tabelicy 3. Algorytm poprawnie separuje podstawowe frakcje białkowe na obrazach dostępnych badań, konieczne jest jednak dostarczenie większej liczby danych eksperymentalnych, które zweryfikowałyby skuteczność zastosowanego podejścia.

Tablica 3

Wynik działania algorytmu. Kolorem czarnym zaznaczono regiony – miejsca styku frakcji

Zdjęcie oryginalne	Wyodrębnione frakcje
	

Podstawowym problemem, na jaki napotkano podczas prac, jest konieczność zdefiniowania zestawu warunków, w przypadku spełnienia których grupa sąsiadujących pikseli może zostać określona mianem frakcji. W przypadku „złośliwych” danych (np. bardzo intensywnej małej frakcji sąsiadującej z rozległą frakcją o niskiej intensywności), prowadzić to może do błędnej detekcji frakcji. W celu eliminacji tego zjawiska, należałoby wprowadzić do algorytmu dodatkowe warunki, biorące pod uwagę m.in. informacje o kontekście lokalnym piksela (czyli tzw. lokalne progowanie – *local thresholding*), bądź też stosować różne techniki hybrydowe [1].

Możliwe, że należy również sprawdzać, czy sąsiadujące ze sobą grupy powinny się ze sobą łączyć – okazać się może bowiem, że dołączanie grupy pikseli o niskim poziomie szarości do grupy o wysokim poziomie szarości jest niepożądane.

4. Podsumowanie

W pracy przedstawiono zasadę działania podstawowego badania elektroforetycznego. Zaprezentowano zastosowanie badania w rozpoznawaniu chorób. Opisano stan prac nad rozszerzoną elektroforezą – intensywnie rozwijaną techniką badawczą, która poza informacją uzyskiwaną z klasycznego badania elektroforetycznego, może dostarczać dodatkowych informacji, przyczyniając się do poprawiania diagnostyki wymienionych patologii.

Naszkicowana została wstępna wersja algorytmu służącego do automatycznego wyodrębniania frakcji białkowych na podstawie analizy obrazu osocza ludzkiej krwi. Szkielet algorytmu w bardzo prosty sposób można modyfikować. W wersji umożliwiającej przypisanie pojedynczego piksela do wielu frakcji uzyskano złożoność pamięciową $O(n^4)$, złożoność obliczeniową rzędu $O(n^2)$ można osiągnąć, gdy nie rozróżnia się regionów wspólnych. Przy dobrze dobranych parametrach (tzn. adaptacyjnie wyznaczanym końcowym progu obliczeń, wielkość minimalna frakcji) algorytm jest skuteczny w oddzielaniu minimów o różnej intensywności dla rozpatrywanego problemu.

Prowadzone obecnie badania dotyczą zarówno prac nad poprawą jakości zdjęć wejściowych, jak również weryfikacji poprawności i zwiększenia skuteczności działania algorytmu. Rozważane są także alternatywne podejścia – zakładające wyodrębnienie środków frakcji oddzielnymi metodami oraz wykorzystujące niniejszy algorytm jedynie do rozbudowywania poszczególnych frakcji. Pod uwagę brane są również podejścia stopniowo rozbudowujące frakcje, bazujące na funkcji kary lub wykorzystujące systemy agentowe.

W przyszłości, po wykonaniu kolejnych badań, planuje się opracować system ekspertowy, który na podstawie istniejącej bazy wiedzy z badaniami rozszerzonej elektroforezy przeanalizowanymi przez specjalistów, szacował będzie prawdopodobieństwo wystąpienia u badanego pacjenta określonego schorzenia oraz sugerował diagnostykowi skierowanie pacjenta na dodatkowe badania.

Literatura

- [1] Bankman I. (ed.), *Handbook of Medical Imaging: Processing and Analysis*. Academic Press, 2000.
- [2] Benlakehal M., Le Bricon T., Feugeas J.P., Bousquet B., *Effect of hemolysis on determination and electrophoresis of serum proteins*. Annales de Biologie Clinique (Paris), May–Jun. 2000, 58(3), 367–71.
- [3] Beucher S., Lantuejoul C., *Use of watersheds in contour detection*. International Workshop on Image processing, Real Time Edge and Motion Detection/Estimation, Rennes, France, 1979, 2.1–2.12.
- [4] Beucher S., *Extrema of grey-tone functions and mathematical morphology*. Proc. of the Colloquium on Math. Morph., Stereol. and Image Analysis, Prague, Czechoslovakia, Sept. 1982, 59–70.
- [5] Bogdanikowa B., *Klinika białek osocza*. Polski Związek Wydawnictw Lekarskich, 1963, 32–36.
- [6] González-Sagrado M., López-Hernández S. et al., *Alpha1-antitrypsin deficiencies masked by a clinical capillary electrophoresis system (CZE 2000)*. Clinical Biochemistry, 2000 Feb.; 33(1), 79–80.
- [7] Iakovidis D.K., Maroulis D. et al., *A Genetic Approach to Spot Detection in Two-Dimensional Gel Electrophoresis Images*. Proc. of International Conference on Information Technology in Biomedicine (ITAB), Ioannina, Greece, Oct. 2006.
- [8] Kazhiyur-Mannar R., Smiraglia D.J., Plass Ch., Wenger R., *Contour Area Filtering of 2-Dimensional Electrophoresis Images*. Medical Image Analysis, 10, 2006, 353–365.
- [9] Killingsworth L.M., *CRC critical reviews in clinical laboratory science*. Aug. 1979, 11(1), 1–30.

- [10] Kuchinskene Z.Z., *Composition, level and ratio of low density protein fraction and very low density lipoprotein subfraction in the serum of patients with chronic kidney insufficiency*. *Voprosy meditsinskoi khimii*, Sep.–Oct. 1985, 31(5), 91–5.
- [11] McMaster M.L., Csako G., *Protein electrophoresis, immunoelectrophoresis and immunofixation electrophoresis as predictors for high-risk phenotype in familial Waldenström macroglobulinemia*. *International Journal of Cancer*, Mar. 2008, 1, 122 (5), 1183–8.
- [12] Lonberg-Holm K., Sandberg L.B., Doleman M.S., Owens A.J., *Classification of malnutrition by statistical analysis of quantitative two-dimensional gel electrophoresis of plasma proteins*. *Computers and Biomedical Research, an International Journal*, Aug. 1986, 19 (4), 340–60.
- [13] Lutz W., *Perspectives in the study of plasma proteins and their value in clinical diagnosis*. *Polski Tygodnik Lekarski*, Oct. 1980, 35(43), 1667–70.
- [14] Meyer-Baeae A., *Pattern Recognition in Medical Imaging*. Elsevier-Academic Press, 2004.
- [15] Nugues P.M., *Two Dimensional Electrophoresis Image Interpretation*. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 40, No. 8, 1993.
- [16] Olsen O.F., Nielsen M., *Multi-scale gradient magnitude watershed segmentation*. Springer-Verlag, 1997, vol. 1, 6–13.
- [17] Pearce C.B., Zinkevich V. et al., *Using the polymerase chain reaction coupled with denaturing gradient gel electrophoresis to investigate the association between bacterial translocation and systemic inflammatory response syndrome in predicted acute severe pancreatitis*. *World Journal of Gastroenterology*, Dec. 2005, 7, 11(45), 7142–7.
- [18] Pedersen L., *Analysis of two-dimensional electrophoresis gel images*. Informatics and Mathematical Modelling Ph.D. Thesis No. 96 Kgs. Lyngby 2002.
- [19] Pushkarev I.A., Borisov L.L. et al., *Use of agarose gel and cellulose acetate electrophoresis for detecting and identifying monoclonal immunoglobulin*. *Laboratornoe delo*. (10), 1979, 606–9.
- [20] Rasouli M., Okhovatian A., Enderami A., *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 43(9), 2005, 913–8.
- [21] Righetti P.G., *Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes*. *Journal of Chromatography A*, 1079 (2005), 24–40.
- [22] Tadeusiewicz R., Korohoda P., *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Kraków, Wydawnictwo Postępu Telekomunikacji 1997.
- [23] Tadeusiewicz R., Ogiela M.R., *Automatic image understanding a new paradigm for intelligent medical image analysis*. *Bio-Algorithms and Med-Systems*, vol. 2, no. 3, 2006, 3–9.
- [24] Tadeusiewicz R., Ogiela M.R., *Structural approach to medical image understanding*. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Technical Sciences*, vol. 52, no. 2, 2004, 131–139.
- [25] Walkowiak B., Kochmańska V. et al., *Elektroforeza – przykłady zastosowań*. Łódź, Warszawa, Amersham Biosciences 2002.
- [26] Waško M. et al., *Chromatoelectrophoresis. A method disclosing molecular weight and charge of serum proteins*. *Eur J Med Res* 11 (Supplement II) I–XVIII, 7, 2006.
- [27] Steiman I., Norwood C., Charache S., *Quantitative analysis of abnormal hemoglobins by agar gel electrophoresis*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Mar. 1985, 105(3), 328–30.
- [28] Sun T., Lien Y.Y., Gross S., *Clinical application of a high-resolution electrophoresis system: a review of electrophoretic patterns in disease*. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, May–Jun. 1978, 8 (3), 219–27.
- [29] Van Lente F., Marchand A., Galen R.S., *Diagnosis of hemolytic disease by electrophoresis of erythrocyte lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate or Agarose*. *Clinical Chemistry*, Aug. 1981, 27(8), 1453–5.

-
- [30] Vincent L., *Morphological Grayscale Reconstruction: Definition, Efficient Algorithm and Applications in Image Analysis*. Proc. of IEEE Conference on Comp. Vision and Pattern Recog., Champaign IL, June 1992, 633–635.
 - [31] Weinstein M.J., Deykin D., Davie E.W., *Quantitative determination of factor-VIII protein by two-stage gel electrophoresis*. British Journal of Haematology, Jul. 1976, 33(3), 343–55.
 - [32] Ye X., Ching Y. *et al.*, *A Recent Development in Image Analysis of Electrophoresis Gels*. Vision Interface, 1999.