

## Development of a new filter for Protein Spot Segmentation in Two Dimensional Gel Electrophoresis Images

S. Shamekhi<sup>1</sup>, M. Miran Baygi<sup>1\*</sup>, A. Gooya<sup>1</sup>, B. Azarian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Electrical and Computer Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Protein-chemistry Lab., Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

---

### Abstract

Two-dimensional gel electrophoresis (2DGE) is a basic and widely used method in proteomics. In this method, mixtures of proteins are separated due to the differences in their molecular weight and isoelectric points and a final image obtained from the separated protein spots is created. Due to the large number of the protein spots in a 2DGE image and the importance of separation of overlapping proteins, the image processing of these images is a complex process. 2DGE images pose various noises and artifacts such as cracks, staining artifacts, and streaks that affect the reliability of the analysis. In this work, we have proposed a novel spots filter based on the scale-space second order structural Hessian and its eigenvalues for enhancing and separating the spots from the background. Furthermore, in this work, 2DGE images have been segmented and the locations of the spots have been detected. To evaluate and compare the proposed method, we have implemented three methods: Otsu thresholding, Watershed transform, and the method proposed by Mylona et al. Based on the regional spot volume evaluation, the TPR and FPR of the proposed method are 78.6 and 14.9, the TPR and FPR of the Otsu method are equal to 71.4 and 25.7 percent, and the TPR and FPR of the Watershed algorithm are 53.9 and 8.1 percent, respectively. Also, in the spot counts evaluation, the Precision and TPR of the proposed method are equal to 83.6 and 81.1 percent, and the Precision and TPR of Otsu method are 65.4 and 78.3, respectively. The Watershed transform has detected the spots with Precision and TPR equal to 27.7 and 68.2 percent, and the Precision and TPR of the method proposed by Mylona et al. are 74.0 and 72.7 percent, respectively. The results reveal the accuracy and superiority of the proposed method.

**Keywords:** Two-dimensional gel electrophoresis, Spot detection, Protein, Filter

---

\*Corresponding author

Address: Mohammad Hossein Miran Baygi, Faculty of Electrical and Computer Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Tel: +98 21 82883370

Fax: +98 21 82884325

E-mail: [miranbmh@modares.ac.ir](mailto:miranbmh@modares.ac.ir)

## توسعه‌ی فیلتری جدید برای استخراج لکه‌های پروتئینی در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی

سینا شامخی<sup>۱</sup>، محمدحسین میران بیگی<sup>۲\*</sup>، علی گویا<sup>۳</sup>، بهاره آذرین<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۴</sup> آزمایشگاه پروتئین/شیمی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

### چکیده

الکتروفورز ژل دو بعدی یکی از روش‌های پایه و پرکاربرد در علم پروتئومیک است. درین روش، پروتئین‌های موجود در نمونه‌ی اولیه براساس دو ویژگی وزن مولکولی و بار الکتریکی در دو بعد از هم جدا شده و تصویری از لکه‌های پروتئینی می‌دهد. به دلیل تعداد زیاد لکه‌های پروتئینی موجود در یک ژل نمونه که نزدیک به هم قرار دارند، پردازش تصاویر فرآیندی پیچیده است. وجود منابع نویز و آرتیفکت هم‌چون شکستگی‌ها، آرتیفکت‌های ناشی از رنگ‌آمیزی، رگه‌ها و موارد دیگر، جداسازی نواحی تصاویر با چالش‌های گوناگونی مواجه است. درین پژوهش، برپایه‌ی ویژگی‌های مکان/مقیاس، مشتقات مرتبه‌ی دوم و مقادیر ویژه‌ی هیشین تصویر، برای بهبود لکه‌های پروتئینی و جداسازی نواحی لکه از پس‌زمینه، فیلتری جدید ارائه شد. تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی ناحیه‌بندی شده و مکان و تعداد لکه‌های موجود در تصاویر، با این فیلتر بهتر تشخیص داده شد. الگوریتم پیشنهادی توانایی جداسازی نواحی لکه‌ی پروتئینی را با نرخ  $TPR$  برابر ۷۸٫۶ درصد و با نرخ  $FPR$  برابر ۱۴٫۹ درصد از نواحی پس‌زمینه دارد. درحالی که آستانه گذاری اوتسو و حوضچه‌ی آبریز به ترتیب: با نرخ‌های ۷۱٫۴ درصد و ۲۵٫۷ درصد، و با نرخ‌های ۵۳٫۹ درصد و ۸٫۱ درصد جداسازی می‌نمایند. بررسی تعداد لکه‌های صحیح استخراج شده در روش پیشنهادی، می‌تواند با دقت ۸۳٫۶ درصد و با نرخ  $TPR$  برابر ۸۱٫۱ درصد محل قرارگیری لکه‌ها را تشخیص دهد. در صورتی که روش‌های اوتسو، حوضچه‌ی آبریز و مایلون به ترتیب: با دقت ۶۵٫۴ درصد و با نرخ برابر ۷۸٫۳ درصد، دقت ۲۷٫۷ درصد و با نرخ ۶۸٫۲ درصد، دقت ۷۴٫۰ درصد و با نرخ ۷۲٫۷ درصد، مکان لکه‌ها را تشخیص می‌دهد. نتایج روش پیشنهادی، دقت و توانایی بالاتری را در ناحیه‌بندی تصویر، نسبت به روش‌های دیگر نشان داد.

کلیدواژه‌ها: الکتروفورز ژل دو بعدی، تشخیص لکه، پروتئین، فیلتر

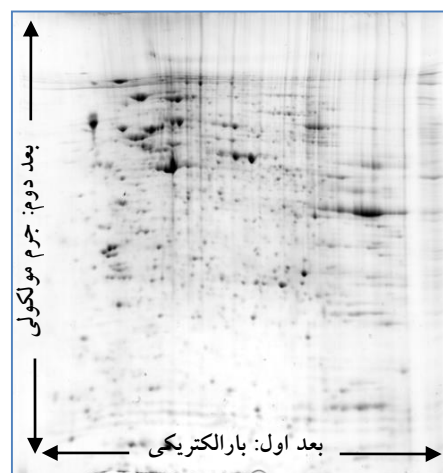
\*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۳۷۰، دورنگار: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۲۲۵، پیام نگار: miranbmh@modares.ac.ir

## ۱- مقدمه

به مطالعه پروتیین‌ها در مقیاس بزرگ که به طور ویژه بر ساختار و عملکرد آن‌ها متمرکز است، علم پروتئومیک گفته می‌شود [۲،۱]. این علم به همراه روش‌ها و ابزار مرتبط، در سال‌های اخیر توجه محققان علوم بیولوژیکی را به خود جلب نموده است. یکی از پرکاربردترین ابزار و روش‌های جداسازی پروتیین‌ها در علم پروتئومیک روش الکتروفورز ژل دو بعدی<sup>۱</sup> است. درین روش، پروتیین‌ها براساس دو ویژگی جرم و بار الکتریکی از یکدیگر جدا می‌شوند. الکتروفورز مدرن فعلی در اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی معرفی شد؛ سپس، به طور سریع رشد یافت [۳]. اولین گزارش رسمی از انجام ترکیب فوکوس ایزوالکتریک<sup>۲</sup> و الکتروفورز ژل پلی‌آکرلامید<sup>۳</sup> و نیز تشکیل ژل دو بعدی، در سال‌های ۱۹۷۴ و ۱۹۷۵ ارائه شده است [۴،۵]. جداسازی پروتیین‌ها درین روش، در یک فضای ژل دو بعدی و براساس بار الکتریکی در بعد اول و وزن پروتیین‌ها در بعد دوم انجام می‌شود. نمونه‌ای از تصویر نهایی حاصل از یک ژل واقعی الکتروفورز در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل (۱) - نمونه تصویر الکتروفورز دو بعدی (منبع: انستیتو پاستور)

درین تصویر، پروتیین‌ها به صورت لکه‌های<sup>۴</sup> متشکل از پروتیین‌های مشابه از نظر وزنی و بار الکتریکی، ظاهر می‌شوند.

تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی با چالش‌ها و مسایل

متعددی مواجه است. با توجه به انجام آزمون در شرایط متفاوت آزمایشگاهی، تجهیزاتی و اپراتوری، تصاویر حاصل خروجی، به طور مشهود با یکدیگر تفاوت دارند. ازسوی دیگر، وجود منابع خطاهای دستگاهی و انسانی و وقوع اتفاقاتی ناخواسته، موجب ایجاد نویز و آرتیفکت در تصاویر خروجی می‌شود. به عنوان مثال، می‌توان به ذرات گرد و غبار، اثرات انگشت، رگه‌های<sup>۵</sup> ناخواسته و لکه‌هایی که در موقعیتی بسیار نزدیک به هم قرار گرفته و هم‌پوشانی دارند، اشاره کرد [۶،۷]. وجود لکه‌هایی با شدت کم و ابعاد کوچک تا شدت بالا و ابعاد بزرگ، جداسازی لکه‌ها را دشوار می‌سازد [۸،۹].

از اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی روش‌هایی برای پردازش و تحلیل تصاویر الکتروفورز دو بعدی پیشنهاد شد. یکی از تحقیقات اولیه درین زمینه، توسط لمکین و هم‌کاران در سال ۱۹۷۹ انجام شد. درین تحقیق، ابزاری برای مقایسه و بررسی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی ارائه شد [۱۰].

در سال‌های بعد و با رشد ابزارهای محاسباتی، روش‌های گوناگونی مبتنی بر به کارگیری کامپیوتر برای تحلیل تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی و حل مسایل و مشکلات اشاره شده ارائه شد. در سال ۱۹۸۵ تحقیقاتی برپایه‌ی به کارگیری پردازنده‌های آرایه‌ای توسط پاتر صورت گرفت [۱۱]. در اواخر دهه ۱۹۹۰ تلاش‌هایی برای خودکار نمودن بخش‌هایی از فرآیند پردازش و تحلیل این تصاویر آغاز شد [۱۲،۱۳]. در اوایل قرن ۲۱ تحقیقاتی برای توسعه‌ی تطبیق در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی صورت گرفت [۱۴،۱۵].

تاکنون و با وجود پیشرفت‌هایی که در حوزه‌ی پردازش تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی صورت گرفته، تمام مراحل پیش‌پردازش و پردازش تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی به صورت تحت نظارت و غیرخودکار انجام می‌گیرد. وجود پارامترهای متعدد در تنظیمات اولیه‌ی الگوریتم‌های غیرخودکار، تفاوت در نتایج روش‌های مختلف را نشان می‌دهد. این نظارت و دخالت در روش‌ها، همراه با خطای انسانی است. ازین روی، در سال‌های اخیر تلاش‌های جدی برای خودکار نمودن فرآیندهای پردازشی تصاویر آغاز شده است [۱۶،۹،۸]. درین تحقیقات، پیش‌پردازش و ناحیه‌بندی تصاویر،

<sup>1</sup> Two-Dimensional Gel Electrophoresis

<sup>2</sup> Isoelectric Focusing

<sup>3</sup> Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

<sup>4</sup> Protein Spots

<sup>5</sup> Streaks

هم‌کاران [۲۵] و ناتال و هم‌کاران [۲۶]، لکه‌های اشباع شده مورد توجه قرار گرفته‌است. با این حال، پیچیدگی مدل‌ها و قابلیت جداسازی لکه‌های دارای هم‌پوشانی، از مشکلات موجود در روش‌های مبتنی بر مدل‌های پارامتری است.

یکی دیگر از مجموعه روش‌های ناحیه‌بندی تصاویر، آشکارسازهای مکان/مقیاس است. درین روش، اجزای تصویر با در نظر گرفتن معیارهای مکان/مقیاس پردازش می‌شوند [۲۷، ۲۸، ۲۹].

به دلیل تنوع ابعاد در لکه‌های پروتئینی، روش‌هایی که مبتنی بر مکان/مقیاس روش‌هایی مؤثر در جداسازی لکه‌های پروتئینی به شمار می‌روند. با این وجود، ازین روش‌ها بیش‌تر به عنوان ابزار کمکی جهت بهبود الگوریتم‌های ناحیه‌بندی استفاده شده و به صورت ابزار مستقل برای جداسازی لکه‌های نزدیک به هم به کار گرفته نشده‌است [۲۲].

با وجود گستردگی تحقیقات انجام شده، جداسازی و تشخیص لکه‌های نزدیک به هم و دارای هم‌پوشانی، چالشی اساسی در ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی است و تحقیقات بیش‌تر درین زمینه ضروری است.

درین تحقیق، فیلتری جدید و برپایه‌ی مکان/مقیاس برای تشخیص و جداسازی لکه‌های نزدیک به هم در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی پیشنهاد شد. فیلتر پیشنهادی گونه‌ی بهبود یافته‌ای از فیلتر ارائه شده توسط تیم تحقیقاتی این پژوهش در مطالعات پیشین است [۳۰]. فیلتر قبلی با بهره‌گیری از نظریه‌ی پایه‌ای مطرح شده توسط فرنگی و هم‌کاران که جهت تشخیص رگ در تصاویر پزشکی ارائه شد، طراحی شده‌است [۳۱].

روش ارائه شده توسط فرنگی در تحقیقات دیگر نیز به کار گرفته شده‌است [۳۲، ۳۳]. فیلتر قبلی با وجود توانایی بالا در جداسازی نواحی لکه از پس‌زمینه، ناحیه‌بندی لکه‌های نزدیک به هم را به صورت یک‌پارچه انجام می‌داد. بنابراین، درین تحقیق، جداسازی نواحی نزدیک به هم به عنوان هدف اصلی مطرح است.

نوآوری انجام شده درین تحقیق، ارائه‌ی معیاری جدید جهت تعیین و استخراج مرز بین دو لکه‌ی نزدیک به هم است.

مورد بررسی و توسعه قرار گرفته‌است تا بتوان دخالت کاربر را تا حد امکان کاهش داد. درین میان، می‌توان به روش آستانه-گذاری ارائه شده توسط زاچاری و هم‌کاران اشاره کرد [۱۷، ۱۸].

علی‌رغم گسترش روش‌های پردازشی در سال‌های اخیر، بهبود ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز یکی از اهداف اصلی در تحقیقات مربوط به پردازش این تصاویر است.

تحقیقاتی صورت گرفته در زمینه‌ی ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی را می‌توان در سه گروه اصلی ریخت‌شناسی ریاضی<sup>۶</sup>، مدل‌سازی پارامتری لکه<sup>۷</sup> و آشکارسازهای لکه براساس روش‌های گوسی مکان/مقیاس<sup>۸</sup> دسته‌بندی نمود [۱۹].

ریخت‌شناسی ریاضی یکی از زمینه‌های تحقیقاتی گسترده در تحلیل تصاویر محسوب می‌شود. یکی از اولین تحقیقات صورت گرفته در ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز توسط بوچر و هم‌کاران انجام شده‌است [۲۰، ۲۱]. درین تحقیقات، روشی مبتنی بر الگوریتم حوضچه‌ی آبریز برای جداسازی لکه‌های پروتئینی ارائه شد. علی‌رغم اینکه به کارگیری الگوریتم حوضچه‌ی آبریز در سال‌های بعد جهت جداسازی لکه‌های پروتئینی، توسعه‌ی چشم‌گیری یافت [۲۲، ۲۳]، از مشکل ناحیه‌بندی بیش‌از حد<sup>۹</sup>، رنج می‌برد [۱۹].

روش گنبد H نیز یکی دیگر از روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی است که در ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۲۴]. بزرگ‌ترین ضعف این روش در جداسازی لکه‌های نزدیک به هم است [۱۹].

مجموعه‌ی دیگری از روش‌های تشخیص لکه‌های پروتئینی با نام مدل‌های پارامتری شناخته می‌شوند. این روش‌ها براساس مشخصات مشترک لکه‌های پروتئینی که توسط یک مدل پارامتری قابل دریافت است، طراحی می‌شوند. به عنوان مثال، یک تابع دوبعدی گوسی می‌تواند به عنوان مدلی مناسب و عمومی برای یک لکه‌ی پروتئینی در نظر گرفته‌شود [۱۲].

مدل‌های پیچیده‌تری نیز برای شبیه‌سازی لکه‌های پروتئینی ارائه شده‌است. در تحقیق صورت گرفته توسط بتنز و

<sup>۶</sup> Mathematical morphology

<sup>۷</sup> Parametric spot modeling

<sup>۸</sup> Gaussian scale-space based blob detectors

<sup>۹</sup> Oversegmentation

در فیلتر پیشنهادی با به کار گیری مشتقات درجه‌ی دوم و مقادیر ویژه مرتب و تشخیص مقیاس ساختارهای هدف، محاسبات در مقیاس مناسب انجام شد و مورد بررسی قرار گرفت.

بسط تیلور تصویر  $I$  در همسایگی نقطه  $x_0$  به صورت ذیل است:

$$I(x_0 + \delta x_0)_s = I(x_0)_s + \delta x_0^T \nabla_{0,s} + \frac{1}{2} \delta x_0^T H_{0,s} \delta x_0 + O^3(\delta x_0) \quad (1)$$

در رابطه‌ی (1)،  $s$  مقیاس و  $\nabla_{0,s}$  و  $H_{0,s}$ ، به ترتیب گرادیان و هیشین<sup>12</sup> تصویر در نقطه  $x_0 = [x_0 \ y_0]^T$  در مقیاس  $s$  بوده و  $\delta x_0$  بردار تغییرات موقعیت در همسایگی نقطه‌ی  $x_0$  است.

برای محاسبه مشتقات اول و دوم از کانولوشن تصویر با مشتقات اول و دوم یک تابع گوسی استفاده شد.

$$\frac{\partial}{\partial x} I(x, s) = I(x) * \frac{\partial}{\partial x} G(x, s) \quad (2)$$

$$\frac{\partial}{\partial y} I(x, s) = I(x) * \frac{\partial}{\partial y} G(x, s) \quad (3)$$

تابع  $D$  - بعدی گوسی به صورت ذیل تعریف می‌شود:

$$G(x, s) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi s^2)^D}} \exp\left(-\frac{\|x\|^2}{2s^2}\right) \quad (4)$$

ماتریس هیشین نیز به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$H_{0,s} = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 I}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 I}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 I}{\partial y^2} \end{bmatrix} \quad (5)$$

به کار گیری کرنل گوسی در محاسبات، امکان تشخیص داخل و خارج یک ناحیه مفروض را فراهم می‌آورد. نحوه‌ی به کار گیری کرنل یک بعدی گوسی و جداسازی نواحی داخل و خارج لکه، در شکل (2) نشان داده شده‌است.

این معیار، به همراه معیار توان و معیار دایره‌ای که پیشنهاد شده، فیلتر توسعه یافته‌ی پیشنهادی را شکل می‌دهد.

فیلتر جدید پیشنهادی، با نام فیلتر بهبود لکه<sup>10</sup> یا SEF خوانده شده و فیلتر قبلی، به دلیل عدم وجود معیار تشخیص مرز بین دو لکه‌ی نزدیک به هم، فیلتر بهبود لکه بدون معیار مرز داخلی<sup>11</sup> یا SEFW نامیده می‌شود. هم‌چنین از آنجایی که فیلتر SEF با توجه به ساختار هندسی لکه‌های پروتیینی طراحی شده‌است، توانایی حذف رگه‌ها، شکستگی‌ها و نویزهای موجود در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی را دارد. ازین روی، تصاویر خروجی این فیلتر، لکه‌های پروتیینی با قابلیت تشخیص بالاتر را به ویژه در لکه‌های نزدیک به هم دارد. با استفاده از خروجی فیلترهای ارائه شده، تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی ناحیه‌بندی شده و نتایج آن ارزیابی شد.

درین مقاله، روش‌های محاسباتی به کار رفته مورد بررسی اجمالی قرار گرفته و فیلتر پیشنهادی ارائه شد. نتایج به دست آمده ارزیابی و مقایسه گردید و جمع‌بندی مطالب و نتیجه‌گیری انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- فیلتر بهبود لکه

در فیلتر بهبود لکه‌ی (SEF) ارائه شده درین پژوهش، معیارهای مکان/مقیاس برای سنجش ویژگی دایره‌ای ساختارها معرفی شد. این معیارها برپایه‌ی مشتقات درجه‌ی اول و دوم و مقادیر ویژه محلی طراحی و ارایه شد.

فیلتر جدید پیشنهادی معیارهایی برای تشخیص ساختارهای موجود در تصویر، حذف نویزها و آرتیفکت‌ها و هم‌چنین تفکیک لکه‌های نزدیک به هم را دارد. مبانی ریاضی فیلتر پیشنهادی نیز بررسی شد.

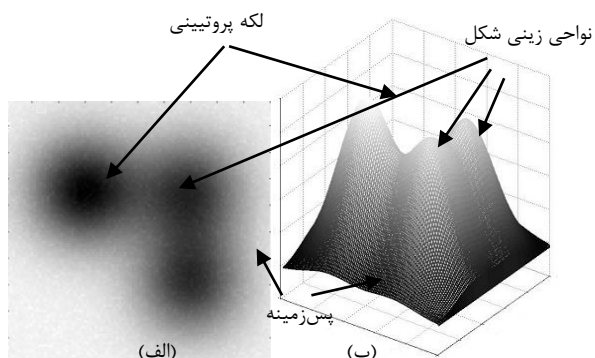
### ۲-۱-۱- روش کار

از آنجایی که لکه‌های پروتیینی موجود در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی ابعاد متنوعی دارد، توجه به مقیاس ساختارهای هندسی موجود، موجب بهبود نتایج جداسازی بخش‌های هدف از پس‌زمینه و حذف نویزهای موجود می‌شود.

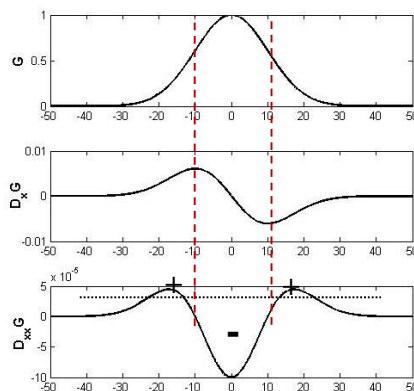
<sup>12</sup> Hessian

<sup>10</sup> Spot Enhancement Filter

<sup>11</sup> Spot Enhancement Filter without Internal border measure



شکل (۳) - (الف) سه لگه‌ی پروتیینی مصنوعی؛ (ب) نمایش سه بعدی لگه‌ها؛ نواحی لگه‌های پروتیینی، پس‌زمینه و نواحی زینی شکل به کمک پیکان‌هایی نشان داده



شکل (۲) - مشتقات اول و دوم از یک تابع گوسی یک بعدی، G تابع گوسی،  $D_x G$  مشتق اول و  $D_{xx} G$  مشتق دوم (داخل  $\equiv -$ ، خارج  $\equiv +$ )

از تصاویر معکوس شده‌ی الکتروفورز ژل دو بعدی استفاده شد، زیرا در تصاویر معکوس شده، قلّه‌ی لگه‌های پروتیینی شدت روشنایی بیش‌تر داشته و پس‌زمینه‌ی تصویر روشنایی کم‌تر دارد.

هم‌چنین این الگو، مشابه نحوه‌ی انباشته‌شدن پروتیین‌ها در هر لگه بوده و بر ساختار سه بعدی قلّه‌ها و پس‌زمینه‌ی واقعی موجود در ژل‌ها منطبق است. حالات موجود در تصاویر معکوس الکتروفورز ژل دو بعدی و وضعیت مقادیر ویژه مناظر در جدول (۱) نشان داده شده‌است.

جدول (۱) - حالات ممکن مقادیر ویژه در تصاویر معکوس الکتروفورز ژل دو بعدی

$\lambda_2$	$\lambda_1$	الگو
NL	NL	پس‌زمینه
H-	H-	ساختارهای شبه دایره
H-	L	ساختارهای خطی
H-/+	H+/-	نواحی زینی شکل
N $\equiv$ نویزی، +/- $\equiv$ مثبت/منفی، $\equiv$ کم و H $\equiv$ زیاد		

با توجه به آرتیفکت‌های موجود در تصاویر الکتروفورز دو بعدی، فیلتر بهبود لگه باید نویزهای پس‌زمینه و ساختارهای خطی را حذف نموده و ساختارهای دایره‌ای مربوط به لگه‌های پروتیینی را بهبود بخشیده و حفظ نماید. بنابراین، تابع فیلتر پیشنهادی، از سه بخش پایه‌ای، شامل معیار اندازه‌گیری ساختار، معیار دایره‌ای و یک معیار جداساز مرز، تشکیل شده است.

مزیت این روش هندسی، به کارگیری هیشین تصویر و مقادیر ویژه و بردارهای ویژه‌ی این ماتریس در استخراج پارامترهای هندسی و جهت‌ی است. رابطه‌ی مقادیر ویژه و بردارهای ویژه در ماتریس هیشین، براساس تعریف، به صورت ذیل است:

$$H_{0,s} \hat{u}_{s,k} = \lambda_{s,k} \hat{u}_{s,k} \quad (6)$$

در رابطه‌ی (۶)،  $H_{0,s}$  ماتریس هیشین در نقطه‌ی  $0$  در مقیاس  $s$  و  $\lambda_{s,k}$  مقدار ویژه  $k$ ام مرتبط با بردار ویژه نرمالیزه  $\hat{u}_{s,k}$  در مقیاس  $s$  است. مقادیر ویژه‌ی محاسبه شده در این مرحله در تولید معیارهای ساختاری و هندسی به کار گرفته شد. در ادامه، فیلتر بهبود لگه‌ی پروتیینی ارائه شد و مورد بررسی قرار گرفت.

### ۲-۱-۲- فیلتر بهبود لگه‌ی پیشنهادی

فیلتر پیشنهادی برای تشخیص و جداسازی لگه‌های پروتیینی و حذف نویزها و آرتیفکت‌های موجود در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی طراحی شد. با توجه به تعداد بعد تصاویر مطرح در این حوزه، دو مقدار ویژه در ماتریس هیشین قابل محاسبه است. هم‌چنین مقادیر ویژه با صدق در رابطه  $\lambda_2 \leq \lambda_1$  مرتب شد و محاسبات با این فرض انجام گرفت. در تصاویر الکتروفورز دو بعدی، لگه‌های پروتیینی به صورت نواحی تیره در پس‌زمینه‌ی روشن ظاهر می‌شوند (شکل‌های ۱ و ۳).

دایره‌ای به سمت یک میل می‌کند. بنابراین، با قرار دادن این رابطه در یک تابع نمایی، تابع نمایی اندازه‌گیری ساختار دایره‌ای تشکیل شد. این تابع در رابطه‌ی (۹) بیان شده‌است.

$$\text{Blobness measure} = \exp\left(-\frac{R_{BN}^2}{2A^2}\right) \quad (9)$$

در رابطه‌ی فوق،  $A$  آستانه‌ای برای کنترل اثر  $R_{BN}$  است.

#### ۲-۱-۲-۳- فیلتر بهبود لگه‌ی بدون معیار مرز داخلی

با ترکیب دو عبارت بیان شده در روابط (۷) و (۹)، تابع نهایی فیلتر SEFW به صورت رابطه‌ی (۱۰) حاصل شد. این رابطه در تحقیق پیشین انجام شده توسط گروه تحقیقاتی این پژوهش ارائه شده‌است [۳۰].

$$B_o(s) = \begin{cases} e^{\left(\frac{-R_{BN}^2}{2A^2}\right)} \left(1 - e^{\left(\frac{-s^2}{2B^2}\right)}\right) & \lambda_1, \lambda_2 < 0 \\ 0 & \text{other wise} \end{cases} \quad (10)$$

براساس رابطه‌ی فوق، برای مقادیر ویژه‌ای که در شرط  $\lambda_1, \lambda_2 < 0$  صدق نمی‌کنند خروجی فیلتر برابر صفر قرار داده شده‌است که با توجه به حالت‌های اشاره شده در جدول (۱)، برای جداسازی نواحی با ساختارهای دایره‌ای تنظیم شده و مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۲-۱-۲-۴- جداسازی مرز

فیلتر بهبود لگه‌ی بدون معیار مرز داخلی (SEFW)، جهت جداسازی نواحی لگه از پس‌زمینه پیشنهاد شد. نتایج ارائه شده، توانایی بالای فیلتر در جداسازی نواحی لگه از پس‌زمینه را نشان می‌دهد. با این وجود ضروری است جهت استخراج مرز بین لگه‌های نزدیک به هم، معیاری جدید به رابطه‌ی (۱۰) اضافه شود تا لگه‌های نزدیک که به صورت نواحی یک‌پارچه ناحیه‌بندی شده‌اند، از یک‌دیگر تفکیک شوند.

در ادامه با بررسی رفتار مقادیر ویژه در مرز دو لگه‌ی مجاور نزدیک به هم، رابطه‌ی جدیدی برای جداسازی این نوع لگه‌ها ارائه شد. در شکل (۴) دو لگه‌ی گوسی مجاور هم نشان داده شده‌است.

#### ۲-۱-۲-۱- توان لگه

عبارت اندازه‌گیری ساختار برای حفظ ساختارهای معنی‌دار و حذف نویزهای موجود در تصویر طراحی شد. در نواحی، ساختارهای معنی‌دار هندسی، مقادیر ویژه ماتریس همیشین، اعدادی بزرگ دارند. بنابراین، می‌توان از ریشه‌ی دوم مجموع مربع مقادیر ویژه ماتریس  $(S = \sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2})H$  به عنوان پارامتر اندازه‌گیری نواحی ساختاری استفاده کرد [۳۱].

ازسوی دیگر، در نواحی پس‌زمینه به دلیل کوچک بودن مقادیر ویژه ماتریس  $S, H$  مقادیر ناچیزی دارد. لذا با قرار دادن  $S$  در یک رابطه‌ی نمایی، معیار توان لگه در تصویر به صورت ذیل به دست آمد:

$$\text{Strength measure} = 1 - \exp(-S^2/2B^2) \quad (7)$$

در رابطه‌ی فوق،  $S$  معیار توان و  $B$  آستانه‌ای برای کنترل حساسیت فیلتر به مقدار  $S$  است. مقادیر این معیار در نواحی دارای ساختار، به یک و در نواحی پس‌زمینه، به صفر میل می‌کند.

#### ۲-۱-۲-۲- معیار دایره‌ای

معیار دایره‌ای به منظور حفظ ساختارهای دایره‌ای و حذف ساختارهای خطی، براساس موارد مندرج در جدول (۱)، طراحی شد.

اساس معیار دایره‌ای بر این مطلب استوار است که در نواحی دایره‌ای، قدر مطلق هر دو مقدار ویژه ماتریس همیشین، بزرگ و نزدیک به هم است و در نواحی خطی، مقدار ویژه‌ی اول کوچک و مقدار ویژه‌ی دوم بزرگ است. درین پژوهش، نسبتی جدید برای اندازه‌گیری دایره‌ای بودن ساختارها پیشنهاد شد که به صورت ذیل است:

$$R_{BN} = (\lambda_1 - \lambda_2)/(\lambda_1 + \lambda_2) \quad (8)$$

با توجه به رابطه (۸)، با نزدیک شدن دو مقدار ویژه به یک‌دیگر که در نواحی دایره‌ای اتفاق می‌افتد، این نسبت به سمت صفر میل می‌کند و با دور شدن این دو مقدار، معیار

که این بررسی در بخش‌هایی از تصویر صورت می‌گیرد که هر دو مقدار ویژه کوچک‌تر از صفر هستند و نواحی دور از مرز، مورد نظر این بحث نیست. در نهایت، با به کار گیری مقدار ویژه‌ی دوم ماتریس هیشین در یک رابطه‌ی نمایی، تغییرات به اعدادی بین یک و صفر محدود شده و معیار تعیین مرز به دست آمد.

$$T(\lambda_2) = e^{-(\lambda_2/s)^2} \quad (14)$$

$$Internal\ border = e^{-(T(\lambda_2)/C)^2} \quad (15)$$

با ضرب این معیار در حاصل ضرب فیلتر SEFW (رابطه ۱۰)، فیلتر جدید بهبود لکه پیشنهادی (SEF) به دست آمد.

$$B_N(s) = \begin{cases} e^{\left(\frac{-R^2 B_N}{2A^2}\right)} \left(1 - e^{\left(\frac{-s^2}{2B^2}\right)}\right) e^{-\left(\frac{T}{C}\right)^2}, & \lambda_1, \lambda_2 < 0 \\ 0 & other\ wise \end{cases} \quad (16)$$

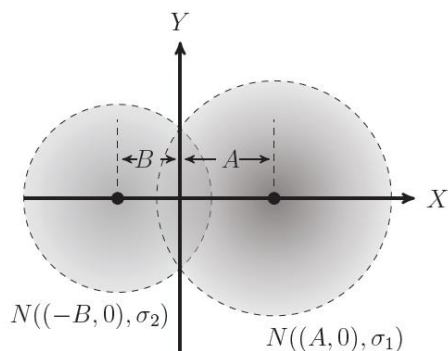
فیلتر بهبود لکه برای تمامی مقیاس‌هایی تعیین از سوی کاربر، محاسبه و ذخیره شد. در مرحله بعد، این مقادیر به ازای هر پیکسل مورد بررسی قرار گرفت و بیشینه مقادیر به عنوان خروجی نهایی فیلتر انتخاب شد. این فرآیند در رابطه‌ی (۱۷) بیان شده‌است.

$$B_o(\theta) = \max_{s_{min} \leq s \leq s_{max}} \{B_o(s)\} \quad (17)$$

در رابطه‌ی (۱۷)،  $s_{min}$  و  $s_{max}$  بیشینه و کمینه مقیاس‌های تعیین شده توسط کاربر است. این محدوده و گام تغییرات با توجه به ابعاد لکه‌های پروتئینی موجود در تصاویر انتخاب می‌شود. از سویی دیگر، می‌توان مقادیر مقیاس‌های مناسب را درون یک بردار در اختیار الگوریتم محاسباتی قرار داد. نتایج به کار گیری این فیلتر بررسی شد.

### ۳- نتایج

نتایج به کارگیری فیلتر پیشنهادی SEF و فیلتر بدون معیار مرز داخلی (SEFW) روی تصاویر مصنوعی و تصاویر واقعی الکتروفورز ژل دو بعدی ارائه شد و مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین روش پیشنهادی با روش‌های ناحیه‌بندی دیگر مقایسه و ارزیابی شد.



شکل (۴) - دو لکه‌ی مجاور هم با مقیاس‌های مکانی متفاوت و با مراکز قرار گرفته روی محور مختصات  $x$ ها

رابطه‌ی دو بعدی این تصویر به صورت ذیل است:

$$I(x, y) = \exp\left(-\frac{(x-A)^2 + y^2}{2\sigma_1^2}\right) + \exp\left(-\frac{(x+B)^2 + y^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad (11)$$

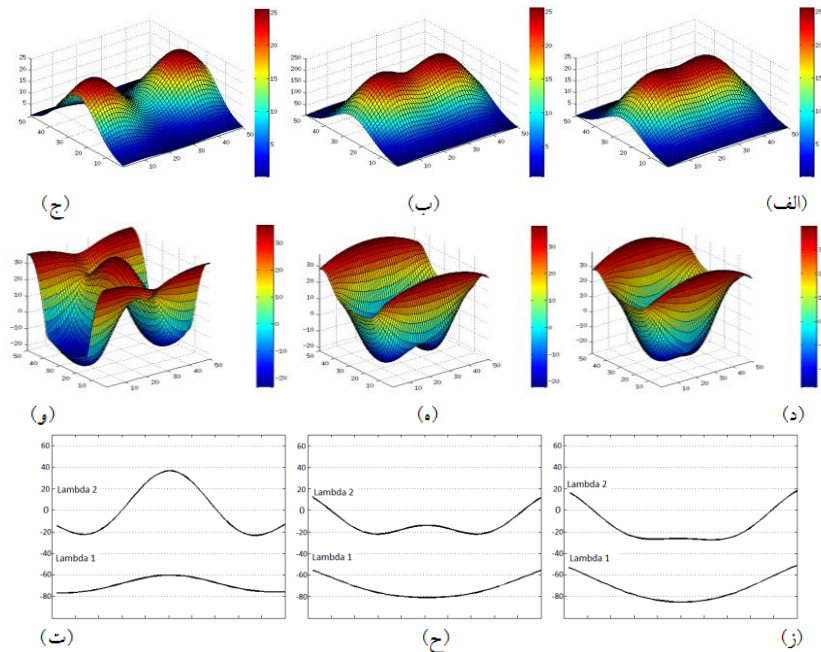
پس از گرفتن مشتقات جهتی مرتبه‌ی اول و دوم و محاسبه ماتریس هیشین در مکان  $r$  روی محور مختصات  $x$ ها، مقادیر ویژه‌ی ماتریس هیشین روی محور مختصات  $x$ ها به صورت ذیل به دست آمد:

$$\lambda_1 = -\frac{e^{\left(\frac{-(r-A)^2}{2\sigma_1^2}\right)}}{\sigma_1^2} - \frac{e^{\left(\frac{-(r+B)^2}{2\sigma_2^2}\right)}}{\sigma_2^2} \quad (12)$$

$$\lambda_2 = -\left(1 - \frac{(r-A)^2}{2\sigma_1^2}\right) \frac{e^{\left(\frac{-(r-A)^2}{2\sigma_1^2}\right)}}{\sigma_1^2} - \left(1 - \frac{(r+B)^2}{2\sigma_2^2}\right) \frac{e^{\left(\frac{-(r+B)^2}{2\sigma_2^2}\right)}}{\sigma_2^2} \quad (13)$$

با توجه به این مقادیر ویژه، مشخص است که مقدار اول به ازای همه مقادیر  $r$  منفی است، درحالی که مقدار دوم با توجه به مقدار  $r$  می‌تواند مثبت، صفر و یا منفی باشد. تأثیر فاصله‌ی بین لکه‌ها با مبدا مختصات  $(A$  و  $B)$  و در نتیجه‌ی تأثیر فاصله‌ی بین دو لکه  $(A + B)$  بر روی منحنی تغییرات  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$  در تصاویر شکل (۵) نشان داده شده‌است. مشاهده می‌شود، به ترتیب در تصاویر (۵ الف)، (۵ ب) و (۵ ج)، با افزایش فاصله دو لکه، مقدار  $\lambda_2$  در مبدا و اطراف مبدا که مرز بین دو لکه است، بیش‌تر شده و در نهایت مثبت می‌گردد. این تغییرات در تصاویر (۵ د)، (۵ ه) و (۵ و) مشخص است. اما مقدار  $\lambda_1$  در کلیه‌ی حالت‌ها منفی است (تصاویر ۵ ز، ۵ ح، ۵ ت). در حقیقت، تغییرات  $\lambda_2$  نسبت به  $\lambda_1$  قابل توجه بوده و می‌توان از تغییرات مقدار ویژه‌ی دوم به عنوان معیاری جدید برای تعیین مرز بین دو لکه استفاده کرد. لازم به یادآوری است



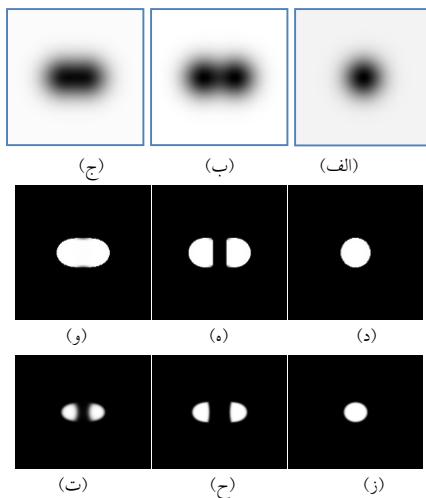


**شکل ۶-** مقایسه‌ی سه بعدی دو لگه‌ی گوسی در فواصل بسیار نزدیک (الف)، نزدیک (ب)، دور از هم (ج)؛ و نمایش سه بعدی مقدار ویژه دوم هر یک (ردیف دوم (د)، (ه)، (و))؛ و نمایش مقطعی مقدار ویژه دوم واقع بر محور مختصات Xها (ردیف سوم (ز)، (ح)، (ت))؛ در مرز بین دو لگه، مقدار ویژه دوم با افزایش فاصله بزرگ‌تر می‌شود.

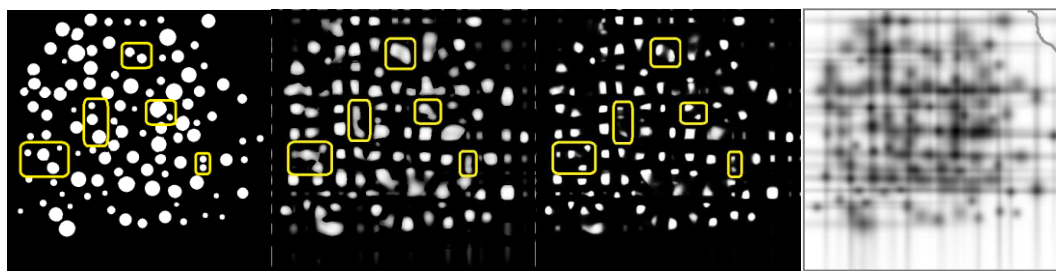
### ۳-۱- نتایج اعمال فیلترها بر تصاویر مصنوعی

در ابتدا، جهت بررسی عملکرد روش‌های پیشنهادی در جداسازی نواحی و ساختارهای دایره‌ای، در شکل (۶) نتیجه اعمال فیلتر SEFW (رابطه ۱۰) و فیلتر SEF (رابطه ۱۶) روی یک لگه‌ی مصنوعی گوسی (شکل ۶ الف) و دو لگه‌ی گوسی با دو وضعیت متفاوت فاصله نسبت به هم (شکل ۶ ب، ج) نشان داده شده‌است.

از آنجایی‌که مقدار خروجی فیلتر در نواحی لگه، بزرگ و نزدیک به یک بوده و در نواحی دیگر، کوچک و نزدیک به صفر است، تصاویر خروجی فیلتر شده به صورت معکوس تصاویر اصلی نمایش داده می‌شود. به بیانی دیگر، در تصویر خروجی فیلتر، لگه‌های تیره‌ی تصویر اصلی به صورت نواحی روشن و پس‌زمینه روشن تصاویر اصلی در قالب سطحی تیره نشان داده می‌شود. نتیجه‌ی اعمال فیلتر SEFW در تصاویر (۶ د، ه، و) نشان داده شده‌است. فیلتر SEFW قادر به تشخیص ناحیه‌های لگه‌های منفرد و دور از هم است؛ اما با نزدیک‌تر شدن لگه‌های گوسی به یک‌دیگر، فیلتر SEFW دیگر توانایی جداسازی دو ناحیه نزدیک به هم را ندارد و دو لگه به صورت یک ناحیه منفرد و یک‌پارچه تشخیص داده شده‌است.



**شکل ۵-** نتایج اعمال فیلترها بر تصاویر مصنوعی؛ ردیف اول: تصاویر مصنوعی گوسی شامل: الف) یک لگه؛ ب) دو لگه‌ی دور از هم؛ ج) دو لگه‌ی نزدیک به هم، ردیف دوم: نتایج اعمال SEFW به تصاویر ردیف اول؛ فیلتر SEFW در جداسازی یک لگه (د) و لگه‌های دور از هم (ه) موفق بوده اما در تفکیک لگه‌های نزدیک به هم (و) ناموفق است. ردیف سوم: نتایج اعمال فیلتر SEF به تصاویر ردیف اول؛ ناحیه‌ای که توسط فیلتر SEFW به یک ناحیه تقسیم شده بود (و)، در این فیلتر به دو ناحیه مجزا (ت) تفکیک شده است.



شکل (۷) - الف) نمونه‌ای از یک تصویر مصنوعی؛ ب) خروجی فیلتر SEF؛ ج) خروجی فیلتر SEFW؛ د) ناحیه‌بندی صحیح (GT)

### ۲-۳- نتایج اعمال فیلترها بر تصاویر واقعی

نتایج اعمال فیلتر پیشنهادی SEF و فیلتر SEFW روی تصاویر واقعی الکتروفورز ژل دو بعدی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر در آزمایشگاه پروتیین/شیمی در بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه و به صورت دستی ناحیه‌بندی شد. این تصاویر ناحیه‌بندی شده‌ی صحیح (GT)، جهت اعتبارسنجی فیلتر پیشنهادی استفاده شد. مجموعه‌ی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی به کار گرفته شده شامل ۸ عدد است که در فرمت TIFF، با عمق ۲۴ بیت سطح خاکستری و ابعاد  $1589 \times 1666$  اسکن شد. درین ۸ تصویر بالغ بر ۵۰۰۰ لکه‌ی پروتیینی وجود دارد. روابط و الگوریتم‌های بیان شده در فضای اینسایت تولکیت  $14^4$  تحت سیستم عامل لینوکس و با پردازنده اینتل پنتیوم ۳/۲ گیگاهرتز اجرا شد. در پیاده‌سازی‌ها، پارامترهای مورد نیاز با توجه به نتایج عملی، مقدار دهی شدند. این تنظیمات بدین شرح است. محدوده‌ی تغییرات مقیاس، ۲ تا ۱۵ و با گام ۱ انتخاب شد. مقادیر تجربی آستانه‌ها،  $A$  و  $B$ ، پس از آزمون‌های متعدد به ترتیب برابر ۵ و ۵ انتخاب شدند. افزایش  $A$  موجب افزایش مقدار تابع و روشنایی لکه‌های موجود در تصویر خروجی می‌شود. افزایش  $B$  نیز مقدار تابع را کاهش داده و تعداد نواحی جدا از هم تشخیص داده شده را افزایش می‌دهد. هم‌چنین پارامتر  $C$  برابر ۱ قرار داده شد.

در شکل (۸)، خروجی به دست آمده از فیلترهای SEFW و SEF پیشنهادی که روی تصویر شکل (۱) اعمال شدند، نشان داده شده‌است. مشاهده می‌شود خطوط عمودی و افقی نامطلوب حذف شده و لکه‌های پروتیینی پنهان درون این خطوط استخراج شدند. هم‌چنین بهبود لکه‌های پروتیینی و افزایش تفکیک‌پذیری لکه‌ها درین تصاویر قابل مشاهده است.

با ارائه و افزودن معیار تشخیص مرزهای داخلی (رابطه ۱۵) به رابطه‌ی فیلتر SEFW (رابطه ۱۰)، روشی برای رفع مشکل مطرح در جداسازی لکه‌های نزدیک به هم در قالب فیلتر SEF (رابطه ۱۶) پیشنهاد شد. با توجه به تصاویر فیلتر شده (شکل ۶ ز، ح، ت) مشاهده می‌شود که فیلتر جدید پیشنهادی (SEF) در تشخیص و تفکیک نواحی لکه‌ی پروتیینی از قابلیت بالایی برخوردار است. در این تحقیق، تصاویر مصنوعی الکتروفورز ژل دو بعدی جهت بررسی و ارزیابی روش پیشنهادی و مقایسه‌ی آن با روش‌های دیگر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تولید این تصاویر، لکه‌های پروتیینی به کمک هسته‌های گوسی مدل‌سازی شده و نویزهای رایج درین تصاویر هم‌چون رگه‌ها و شکستگی‌ها جهت ایجاد شرایط واقعی به تصویر افزوده شد. لازم به یادآوری است که در پژوهش‌های محققان دیگر نیز از هسته‌های گوسی جهت مدل‌سازی لکه‌های پروتیینی استفاده شده‌است [۳۶-۳۴].

مجموعه تصاویر مصنوعی به کار رفته درین تحقیق شامل ۸ تصویر با فرمت TIFF، با عمق ۲۴ بیت سطح خاکستری و ابعاد  $1000 \times 1000$  پیکسل است. درین مجموعه، بالغ بر ۲۰۰۰ لکه‌ی مصنوعی قرار داده شد.

در شکل (۷ الف) نمونه‌ای از تصاویر مصنوعی تولید شده به همراه خروجی فیلتر SEF (شکل ۷ ب)، فیلتر SEFW (شکل ۷ ج) و تصویر ناحیه‌بندی صحیح GT<sup>۱۴</sup> (شکل ۷ د) نشان داده شده‌است. لازم به یادآوری است که تصاویر مرجع GT، هم‌زمان با تولید تصویر مصنوعی ساخته شد. هم‌چنین، بهبود جداسازی لکه‌های پروتیینی توسط فیلتر SEF در مقایسه با فیلتر SEFW به کمک علائمی نشان داده شده است.

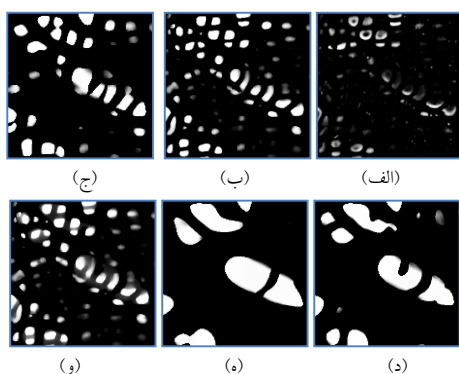
<sup>14</sup> InsightToolKit-4.0.0

<sup>13</sup> Ground truth

جهت بررسی جزئیات، در تصاویر شکل (۹)، خروجی بزرگ‌نمایی شده‌ی هر دو فیلتر پیشنهادی به همراه تصاویر اصلی نواحی انتخاب شده و تصاویر ناحیه‌بندی شده‌ی صحیح متناظر نشان داده شده‌است. با دقت در نواحی لکه و لکه‌های نزدیک به هم که توسط علامت‌های قرار گرفته روی تصویر مشخص شده‌اند، عملکرد مناسب فیلتر SEFW در تعیین نواحی لکه از پس‌زمینه و قابلیت فیلتر بهبودیافته SEF در جداسازی نواحی نزدیک به هم و دارای هم‌پوشانی، به وضوح قابل تشخیص است.

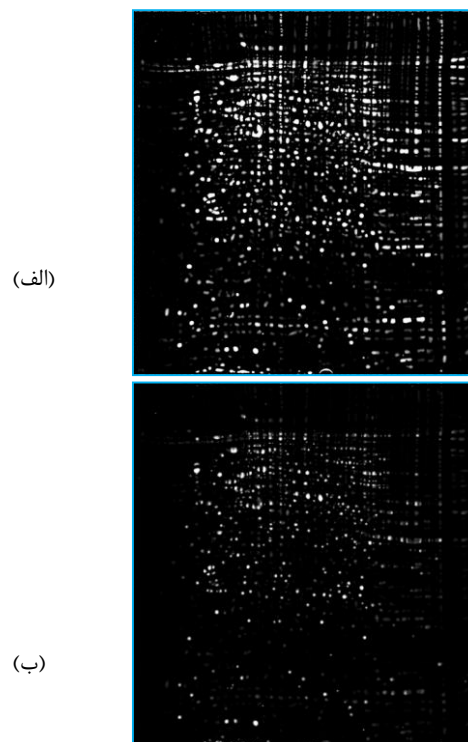
### ۳-۳- بررسی نقش مقیاس در جداسازی لکه‌ها

در شکل (۱۰)، تصاویر حاصل از اعمال فیلتر بهبود لکه در مقیاس‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و تصویر نهایی به دست آمده و به کارگیری رابطه‌ی (۱۷) را نشان می‌دهد.

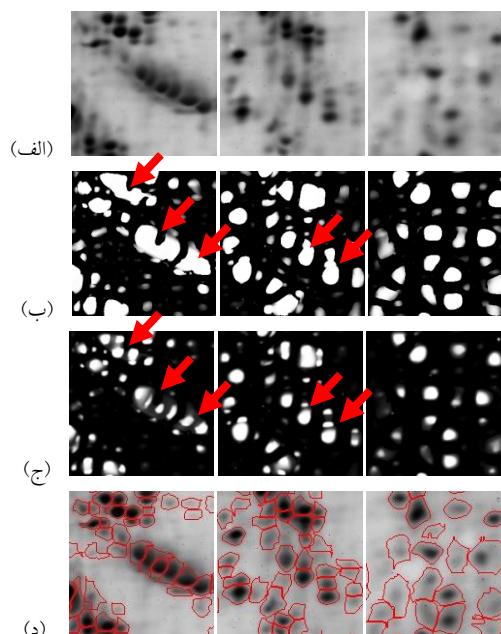


شکل (۱۰) - خروجی فیلتر SEFW در مقیاس‌های گوناگون؛ الف) مقیاس ۲؛ ب) مقیاس ۵؛ ج) مقیاس ۱۰؛ د) مقیاس ۱۵؛ ه) مقیاس ۲۰؛ و) بیشینه مقیاس‌های ۲ تا ۱۵ براساس رابطه‌ی (۱۷)؛ نقش مقیاس محاسبات در حذف و یا نمایش اجزا مشاهده می‌شود.

درین تصاویر، تأثیر افزایش مقیاس، در افزایش شعاع لکه‌ها به خوبی مشهود است. مقیاس کوچک موجب حذف ابعاد بزرگ و عدم حذف نوزهای موجود در پس‌زمینه می‌شود (شکل ۱۰ الف) و مقیاس بزرگ موجب حذف ساختارهایی با ابعاد کوچک شده و ساختارهای بزرگ‌تر را حفظ می‌نماید. در صورت افزایش بیش‌از اندازه‌ی مقیاس، نواحی بزرگ‌تر از اندازه واقعی تشکیل می‌گردد (شکل ۱۰ ه). بنابراین، انتخاب مقیاس نقش مهمی در ایجاد تصاویر و نتایج صحیح ایفا می‌نماید. با توجه به نتایج عملی و در شرایط آزمون، به کار



شکل (۸) - نتایج اعمال فیلترهای SEFW و SEF روی تصویر الکتروفورز در شکل (۱)؛ الف) خروجی فیلتر SEFW؛ ب) خروجی فیلتر SEF؛ حذف آرتیفکت‌ها و بهبود پس‌زمینه درین تصاویر به ویژه در شکل ب، در مقایسه با تصویر شکل (۱) قابل مشاهده است.



شکل (۹) - تصاویر بزرگ‌نمایی شده از خروجی فیلترهای پیشنهادی؛ الف) نواحی اصلی؛ ب) خروجی فیلتر SEFW؛ ج) خروجی‌های فیلتر SEF؛ د) ناحیه‌بندی توسط کارشناسان خبره؛ توانایی فیلترها در جداسازی نواحی نزدیک به هم و با فراوانی کم به کمک پیکان‌هایی نشان داده شده‌است.

جهت بررسی عملکرد روش پیشنهادی از بررسی دقت<sup>۱۸</sup> ( $PR$ ) و بهره‌وری<sup>۱۹</sup> ( $Eff$ ) استفاده شد. نحوه‌ی محاسبه این پارامترها در روابط (۱۸)، (۱۹)، (۲۰) و (۲۱) بیان شده‌است.

$$TPR = TP / (TP + FN) \quad (18)$$

$$FPR = FP / (FP + TN) \quad (19)$$

$$PR = TP / (TP + FP) \quad (20)$$

$$Eff = (TP - FP) / (TP + FN) \quad (21)$$

درین روابط،  $TP$  نواحی شناخته شده‌ی صحیح به صورت لکه‌های پروتیینی،  $FN$  نواحی شناخته نشده‌ی نادرست،  $FP$  نواحی شناخته شده به صورت نادرست و  $TN$  نواحی شناخته نشده‌ی صحیح است. جهت استخراج این اعداد از یک آستانه گذاری روی تصاویر خروجی فیلتر برای ایجاد تصاویر ناحیه بندی شده استفاده شد. در محاسبات مربوط به حجم محصور در لکه، مقادیر  $TP$ ،  $FP$ ،  $FN$ ،  $TN$  به صورت مجموع شدت نقاط محصور در ناحیه‌ی لکه محاسبه شدند. به عنوان مثال، برای محاسبه‌ی  $TP$  داریم:

$$TP_{\Omega} = \sum_{p_{\Omega}(x,y) \in C} I_p \quad (22)$$

در رابطه‌ی (۲۲)،  $\Omega$  ناحیه تحت بررسی و  $C$  نواحی تعیین شده به عنوان لکه از تصویر  $GTS$  و  $I_p$  شدت تصویر در پیکسل  $p$  است.

جهت تعیین نقطه‌ی بهینه در منحنی  $ROC$  از دو معیار کمینه‌ی فاصله با نقطه‌ی بهینه و بیشینه‌ی معیار یودن<sup>۲۰</sup> استفاده شد. این معیارها به صورت ذیل تعریف می‌شوند [۳۸،۳۷].

$$Min. Dist. (MI) = \min\{\sqrt{(TPR - 1)^2 + FPR^2}\} \quad (23)$$

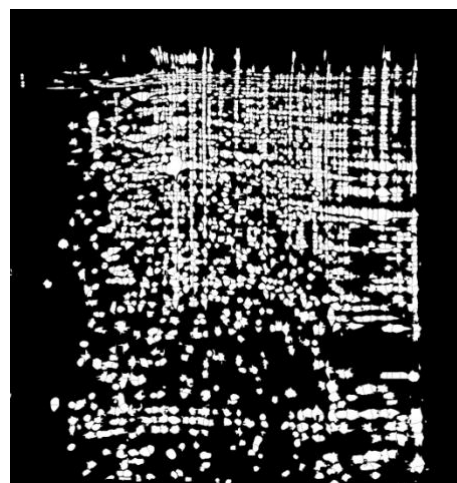
$$Yuden Index (J) = \max\{TPR - FPR\} \quad (24)$$

این معیارها در منحنی شکل (۱۲) نشان داده شده‌است.

گیری مقیاس‌های ۲ تا ۱۵ با گام ۱ مناسب تشخیص داده شد. نتیجه‌ی انتخاب مقیاس مناسب که براساس بیشینه‌ی مقدار تابع لکه به دست آمده است، در شکل (۱۰) و نشان داده شده‌است. این تصویر شامل بیش‌ترین اطلاعات صحیح از مجموع داده‌های مقیاس‌های مختلف است. محدود نمودن مقیاس‌های به کار رفته در محاسبات، به منظور کاهش حجم محاسبات است.

### ۳-۴- ارزیابی نتایج

فیلتر پیشنهاد شده ( $SEF$ ) به منظور ناحیه‌بندی لکه‌های پروتیینی در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی ارائه شد. بنابراین، جهت ارزیابی عملکرد این فیلتر، از تصاویر ناحیه‌بندی شده توسط انستیتو پاستور ایران استفاده شد. نمونه‌ای ازین تصاویر در شکل (۱۱) نشان داده شده‌است.



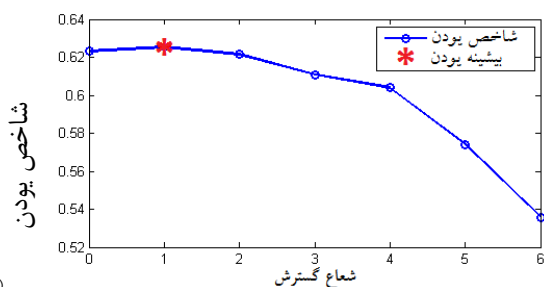
شکل (۱۱) - نمونه‌ای از تصاویر ناحیه‌بندی شده توسط متخصصان خبره در انستیتو پاستور ایران و آماده‌سازی شده توسط گروه تحقیقاتی این پژوهش (از تصویر شکل ۱). نواحی سفید نشانگر محل لکه‌های پروتیینی و نواحی سیاه نشان‌دهنده بخش پس زمینه تصویر الکتروفورز است.

براساس تصاویر  $GT$  تهیه شده، از ترسیم و بررسی منحنی عملکرد سیستم<sup>۱۵</sup> ( $ROC$ ) جهت ارزیابی عملکرد روش‌ها استفاده شد. در منحنی  $ROC$  نرخ نواحی تشخیص داده شده مثبت صحیح<sup>۱۶</sup> ( $TPR$ ) نسبت به نرخ نواحی تشخیص داده شده مثبت به صورت اشتباه<sup>۱۷</sup> ( $FPR$ ) ترسیم شد.

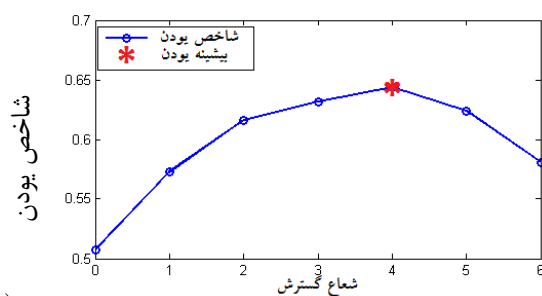
<sup>18</sup> Precision  
<sup>19</sup> Efficiency  
<sup>20</sup> Yuden Index

<sup>15</sup> Receiver operating characteristic  
<sup>16</sup> True Positive Rate  
<sup>17</sup> False Positive Rate

شکل (۱۳) (بیشینه‌ی مقدار شاخص یودن) این مطلب را تأیید می‌کند.



(الف)

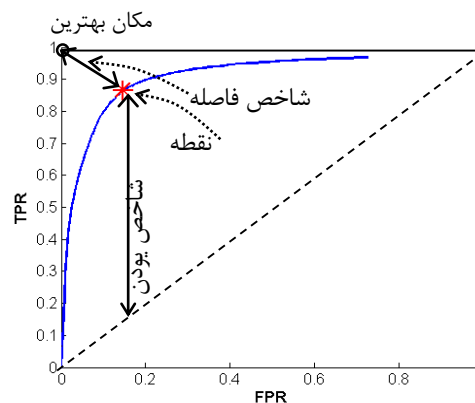


(ب)

شکل (۱۳) - تغییرات معیار یودن نسبت به مقدار گسترش اعمال شده در تصاویر خروجی فیلترها؛ الف) فیلتر SEFW؛ ب) فیلتر پیشنهادی (SEF) به همراه مقادیر بیشینه‌ی هر یک (ستاره قرمز)

پس از اعمال فیلترها بر تصاویر آموزشی (تصاویر ۱ تا ۴) و جداسازی نواحی لکه از پس‌زمینه و نیز به کارگیری الگوریتم اشاره شده، جهت تعیین مقدار بهینه‌ی گسترش، تصاویر جدید به عنوان داده‌های تست، ناحیه‌بندی می‌گردند. نمونه‌ی ناحیه‌بندی شده‌ی تصاویر در شکل (۱۴) نشان داده شده‌است. درین شکل، ناحیه‌ی اصلی به همراه تصویر GT و خروجی فیلترهای SEF، SEFW و گسترش یافته‌ی هر یک آورده شد. گسترش یافته‌ی هر دو فیلتر دارای نتایج شهودی قابل قبولی هستند. در ادامه، مقادیر TPR و FPR هر یک از روش‌ها به صورت عددی بررسی شد.

جهت ارزیابی نتایج، شرایط بهینه‌ی محاسبه شده در فاز آموزشی (تصاویر ۱-۴) بر تصاویر جدید اعمال شد و نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت. با پیاده‌سازی روش آستانه گذاری اوتسو<sup>۲۲</sup> [۳۹] که توسط زاچاری و همکاران [۱۷، ۱۸] جهت ناحیه‌بندی این تصاویر به کار گرفته شد و الگوریتم ناحیه‌بندی حوضچه‌ی آبریز که جزو روش‌های مورد استفاده



شکل (۱۴) - منحنی ROC حاصل از تصویر گسترش یافته با مقیاس ۵ از تصویر خروجی فیلتر SEFW و نقطه‌ی بهینه‌ی محاسبه شده بر مبنای بیشینه‌ی معیار یودن و معیار کمینه‌ی فاصله با (\*) نشان داده شده

در کلیه‌ی تصاویر به دست آمده از فیلترها، نواحی جداسازی شده در شرط  $\lambda_1, \lambda_2 < 0$  صدق می‌نماید که این نواحی تمام حجم لکه را دربر نمی‌گیرند. ازین روی، به منظور بهبود نتایج، به ویژه جهت مقایسه‌ی حجم لکه‌ها و پس‌از بررسی نتایج، یک مرحله گسترش<sup>۲۱</sup> روی تصاویر فیلتر شده اعمال می‌گردد.

جهت تعیین مقدار گسترش مورد نیاز، با بررسی منحنی‌های ROC حاصل از مقادیر مختلف، بهترین مقدار گسترش براساس بیشینه‌ی معیار یودن و معیار کمینه‌ی فاصله انتخاب و به کار گرفته شد. مقدار گسترش انتخاب شده با معیارهای یودن و کمینه‌ی فاصله در حالت بهینه، یکسان است.

نمودار تغییرات معیار یودن نسبت به مقدار گسترش اعمال شده در خروجی فیلترهای SEF و SEFW پیشنهادی در شکل (۱۳) نشان داده شده‌است.

با توجه به تغییرات این معیار، بیشینه‌ی معیار یودن در مقدار گسترش برای خروجی فیلتر SEFW، ۱ و برای خروجی فیلتر پیشنهادی، ۴ به دست آمد. معیار مرز داخلی (رابطه ۱۵) موجب کوچک‌تر شدن نواحی تفکیک شده در مقایسه با خروجی فیلتر SEFW می‌شود. بنابراین، انتظار می‌رود که گسترش مورد نیاز در فیلتر SEF بیش‌تر از مقدار مورد نیاز در خروجی فیلتر SEFW باشد. مقادیر به دست آمده از تصاویر

<sup>22</sup> Otsu Thresholding

<sup>21</sup> Dilation



نظر تشخیص تعداد و مکان لکه با روش پیشنهادی مقایسه شد. تصاویر به کار گرفته شده در آزمون‌های مورد بررسی با الگوریتمی یک‌سان پیش‌پردازش شد.

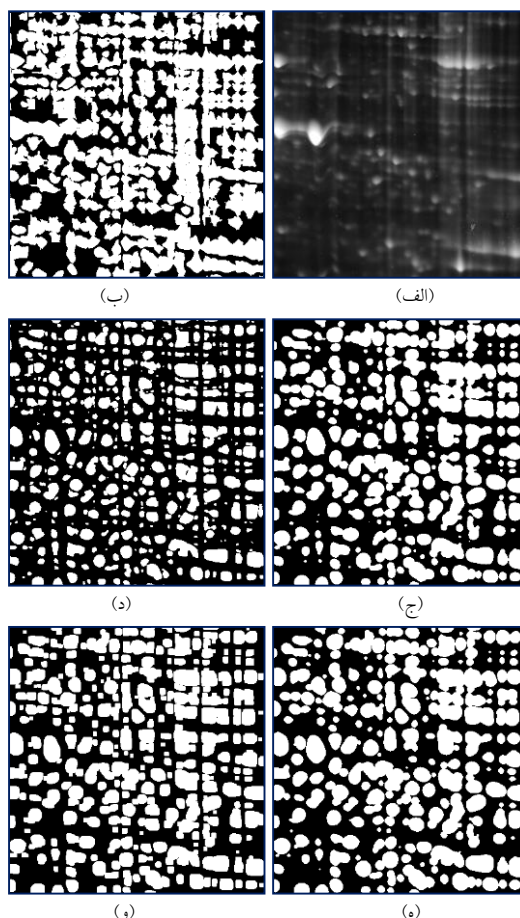
### ۳-۴-۱- بررسی حجم کل نواحی لکه

عملکرد فیلتر پیشنهادی (SEF) براساس مقایسه‌ی حجم محصور در نواحی لکه مورد ارزیابی قرار گرفت. محاسبات حجم محصور به کمک روابطی مشابه رابطه‌ی (۲۲) انجام شد. پس از اعمال روش‌های پیشنهادی و مورد بحث، نتایج آماری حاصل از اعمال آزمون‌ها روی ۸ تصویر واقعی و ۸ تصویر مصنوعی به ترتیب در جداول (۲) و (۳) ارائه شده‌است. درین جداول مقادیر TPR و FPR آزمون‌ها به صورت درصد و معیارهای کمینه‌ی فاصله (MI) و یودن (J) به صورت اعدادی بین صفر و یک ارائه شده‌اند.

مقادیر میانگین و انحراف معیار برای هریک از پارامترها در انتهای جدول‌ها درج شده‌است. با توجه به حجم بالای اعداد مندرج در جدول‌ها و جهت مقایسه‌ی بهتر، مقادیر میانگین مربوط به معیارهای کمینه‌ی فاصله و یودن در قالب تصاویر شکل (۱۵) نشان داده شد.

انحراف معیار هریک از بررسی‌ها روی هریک از نمودارها ترسیم شده‌است. با توجه به نتایج مندرج در جداول (۲) و (۳)، مشخص است که روش پیشنهادی در مقایسه با دیگر روش‌های بررسی شده کم‌ترین معیار فاصله و بیش‌ترین معیار یودن را دارد. روش پیشنهادی در تشخیص صحیح نواحی در هردو مجموعه‌ی تصاویر واقعی و مصنوعی از توانایی مناسبی برخوردار است و در مجموع نواحی کم‌تری را به اشتباه به صورت لکه‌ی پروتئینی تشخیص داده‌است. مقادیر TPR در روش آستانه گذاری اوتسو (زاچاری ۲۰۱۴) قابل قبول است، اما ضعف این روش، مقادیر بالای FPR است. مقادیر بالای FPR درین روش، موجب افزایش معیار کمینه‌ی فاصله و کاهش معیار یودن و در مجموع تضعیف عملکرد روش آستانه گذاری اوتسو (تحقیق ارائه شده توسط زاچاری و همکاران) شد. در روش حوضچه‌ی آبریز، با توجه به استخراج نواحی در ابعادی بسیار کوچک‌تر از ابعاد واقعی، مقادیر TPR بسیار پایین‌تر از روش‌های دیگر است.

در ناحیه‌بندی تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی است، با آن نتایج مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.



شکل (۱۴) - الف) تصویر معکوس شده از یک تصویر الکتروفورز ژل دو بعدی؛ ب) GT متناظر؛ ج) خروجی آستانه گذاری شده با فیلتر SEFW؛ د) خروجی آستانه گذاری شده‌ی فیلتر پیشنهادی SEF؛ ه) گسترش یافته‌ی تصویر ج؛ و) گسترش یافته‌ی تصویر د؛ هدف در این تصاویر بررسی توان جداسازی لکه‌ها از پس‌زمینه است. به صورت شهودی، گسترش یافته‌ی هردو فیلتر از توانایی بالایی در جداسازی لکه‌ها از پس‌زمینه برخوردار هستند.

تاکنون، الگوریتم‌های متعددی با مبنای الگوریتم حوضچه‌ی آبریز ارائه شده‌است. درین تحقیق و جهت مقایسه عملکرد روش‌های پیشنهادی از الگوریتم حوضچه‌ی آبریز ارائه شده توسط بیر و همکاران استفاده شد [۲۲]. هم‌چنین، روش پیشنهادی با روش ارائه شده توسط مایلونا و همکاران به منظور تشخیص مکان و تعداد لکه‌های پروتئینی مقایسه شد [۸]. با توجه به اینکه مایلونا و همکاران در زمینه‌ی حجم محصور در زیر لکه گزارشی ارائه نداده‌اند، روش آن‌ها فقط از

جدول (۲) - پارامترهای مقایسه‌ای حجم زیر لگه‌ی ناحیه‌بندی در تصاویر واقعی مورد بررسی

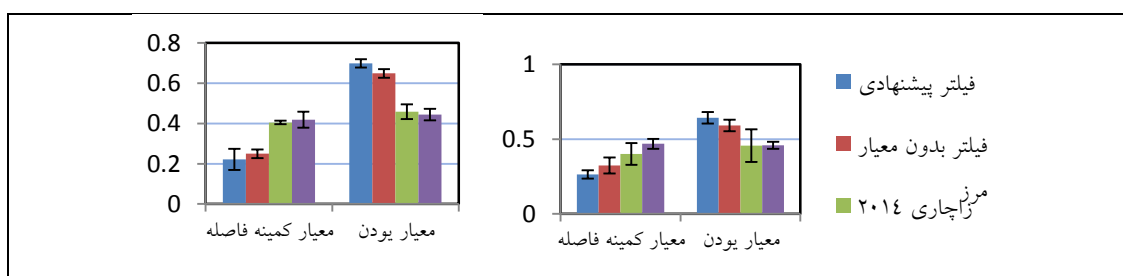
روش تصویر	فیلتر پیشنهادی SEF				فیلتر بدون جداساز مرز SEFW				زاچاری (۲۰۱۴) [۱۸،۱۷]				حوضچه آبریز (۲۰۰۶) [۲۲]			
	TPR*	FPR*	MI	J	TPR	FPR	MI	J	TPR	FPR	MI	J	TPR	FPR	MI	J
۱	۸۳/۱	۱۴/۹	۰/۲۳	۰/۶۸	۶۵/۶	۷/۲	۰/۳۵	۰/۵۸	۷۶/۷	۲۹/۴	۰/۳۷	۰/۴۷	۵۶/۱	۶/۳	۰/۴۴	۰/۵
۲	۸۱/۷	۱۹/۰	۰/۲۶	۰/۶۳	۶۵/۲	۸/۸	۰/۳۶	۰/۵۶	۷۰/۴	۲۴/۳	۰/۳۸	۰/۴۶	۵۱/۷	۶/۴	۰/۴۹	۰/۴۵
۳	۷۷/۶	۱۱/۶	۰/۲۵	۰/۶۶	۶۴/۶	۸/۲	۰/۳۷	۰/۵۶	۸۰/۷	۴۴/۷	۰/۴۹	۰/۳۶	۵۴/۳	۸/۰	۰/۴۶	۰/۴۶
۴	۷۸/۷	۱۰/۰	۰/۲۴	۰/۶۹	۶۴/۹	۷/۶	۰/۳۶	۰/۵۷	۶۱/۹	۱۵/۹	۰/۴۱	۰/۴۶	۵۴/۲	۸/۰	۰/۴۶	۰/۴۶
۵	۷۸/۸	۱۹/۴	۰/۲۹	۰/۵۹	۷۶/۳	۱۶/۷	۰/۲۹	۰/۵۹	۷۶/۷	۳۲/۸	۰/۴	۰/۴۴	۴۹/۲	۶/۱	۰/۵۱	۰/۴۳
۶	۷۴/۲	۱۲/۱	۰/۲۸	۰/۶۲	۷۲/۱	۱۰/۴	۰/۳	۰/۶۲	۷۱/۵	۱۴/۳	۰/۳۲	۰/۵۷	۵۹/۸	۱۱/۹	۰/۴۲	۰/۴۸
۷	۷۷/۸	۱۹/۷	۰/۳	۰/۵۸	۶۵/۵	۶/۷	۰/۳	۰/۵۹	۷۳/۹	۳۱/۳	۰/۴	۰/۴۳	۵۰/۵	۶/۵	۰/۵	۰/۴۴
۸	۷۶/۸	۱۲/۸	۰/۲۸	۰/۶۴	۶۹/۰	۱۰/۹	۰/۲۷	۰/۶۴	۵۹/۸	۱۳/۴	۰/۴۲	۰/۴۶	۵۵/۸	۱۱/۳	۰/۴۶	۰/۴۴
میانگین ± Std.	۷۸/۶ ± ۲/۷	۱۴/۹ ± ۳/۹	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۰/۶۴ ± ۰/۰۳	۶۹/۸ ± ۵/۳	۱۰/۸ ± ۳/۸	۰/۳۲ ± ۰/۰۳	۰/۵۹ ± ۰/۰۲	۷۱/۴ ± ۷/۲	۲۵/۷ ± ۱۰/۹	۰/۴ ± ۰/۰۵	۰/۴۶ ± ۰/۰۶	۵۳/۹ ± ۳/۴	۸/۱ ± ۲/۳	۰/۴۶ ± ۰/۰۳	۰/۴۶ ± ۰/۰۲

\* برحسب درصد، MI معیار کمینه فاصله، J معیار بودن و Std. انحراف معیار

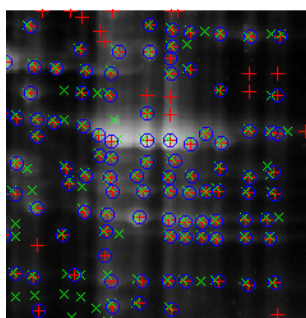
جدول (۳) - پارامترهای مقایسه‌ای حجم زیر لگه‌ی ناحیه‌بندی در تصاویر مصنوعی مورد بررسی

روش تصویر	فیلتر پیشنهادی SEF				فیلتر بدون جداساز مرز SEFW				زاچاری (۲۰۱۴) [۱۸،۱۷]				حوضچه آبریز (۲۰۰۶) [۲۲]			
	TPR*	FPR*	MI	J	TPR	FPR	MI	J	TPR	FPR	MI	J	TPR	FPR	MI	J
۱	۸۶/۷	۱۴/۰	۰/۱۹	۰/۷۳	۸۲/۹	۱۶/۸	۰/۲۴	۰/۶۶	۸۲/۴	۳۰/۹	۰/۳۶	۰/۵۲	۶۳/۳	۲۰/۱	۰/۴۰	۰/۴۶
۲	۸۹/۳	۱۷/۲	۰/۲۰	۰/۷۲	۸۱/۹	۱۴/۴	۰/۲۳	۰/۶۷	۸۲/۵	۳۸/۵	۰/۴۲	۰/۴۴	۶۹/۵	۲۲/۷	۰/۳۶	۰/۴۹
۳	۸۷/۸	۱۵/۳	۰/۱۹	۰/۷۳	۷۹/۶	۱۴/۳	۰/۲۵	۰/۶۵	۸۳/۱	۳۸/۹	۰/۴۲	۰/۴۴	۶۳/۳	۱۸/۸	۰/۴۰	۰/۴۷
۴	۸۷/۰	۱۴/۳	۰/۳۱	۰/۵۷	۸۰/۲	۱۳/۸	۰/۲۴	۰/۶۶	۸۱/۴	۳۶/۰	۰/۴۰	۰/۴۵	۶۲/۴	۱۶/۱	۰/۴۱	۰/۴۶
۵	۷۲/۶	۱۵/۵	۰/۳۲	۰/۵۷	۷۸/۹	۱۴/۶	۰/۲۶	۰/۶۴	۸۱/۲	۳۵/۹	۰/۴۱	۰/۴۵	۵۹/۶	۱۸/۵	۰/۴۴	۰/۴۱
۶	۸۵/۹	۲۰/۳	۰/۲۵	۰/۶۶	۷۹/۰	۱۹/۸	۰/۲۹	۰/۵۹	۸۱/۰	۳۱/۳	۰/۳۶	۰/۴۹	۵۵/۹	۱۶/۳	۰/۴۷	۰/۳۹
۷	۸۶/۹	۱۴/۲	۰/۲۰	۰/۷۲	۸۵/۰	۱۷/۲	۰/۲۳	۰/۶۷	۸۱/۸	۳۶/۲	۰/۴۱	۰/۴۶	۶۴/۱	۱۵/۶	۰/۴۰	۰/۴۸
۸	۸۳/۵	۱۵/۱	۰/۲۲	۰/۶۸	۸۰/۱	۱۷/۶	۰/۲۷	۰/۶۲	۸۳/۳	۴۱/۸	۰/۴۵	۰/۴۱	۵۹/۴	۱۳/۷	۰/۴۲	۰/۴۹
میانگین ± Std.	۸۴/۹ ± ۵/۲	۱۵/۷ ± ۲/۰	۰/۲۲ ± ۰/۰۴	۰/۷۰ ± ۰/۰۶	۸۰/۹ ± ۲/۱	۱۶/۱ ± ۲/۱	۰/۲۵ ± ۰/۰۲	۰/۶۵ ± ۰/۰۳	۸۲/۱ ± ۰/۸	۳۶/۲ ± ۳/۶	۰/۴۰ ± ۰/۰۳	۰/۴۶ ± ۰/۰۳	۶۲/۲ ± ۴/۱	۱۷/۷ ± ۲/۶	۰/۴۱ ± ۰/۰۳	۰/۴۶ ± ۰/۰۳

\* برحسب درصد، MI معیار کمینه فاصله، J معیار بودن و Std. انحراف معیار



شکل (۱۵) - معیارهای مقایسه‌ای حجم زیر لگه‌ی ناحیه‌بندی؛ (الف) تصاویر واقعی؛ (ب) تصاویر مصنوعی



شکل (۱۶) - وضعیت تشخیص لگه‌ها در تصویر؛ (+) لگه‌های تشخیص داده شده؛ (x) لگه‌های صحیح؛ (o) لگه‌هایی که به درستی تشخیص داده شده

جدول (۴) - پارامترهای مقایسه‌ای تعداد لگه‌های تشخیص داده شده به صورت صحیح در تصاویر واقعی مورد بررسی

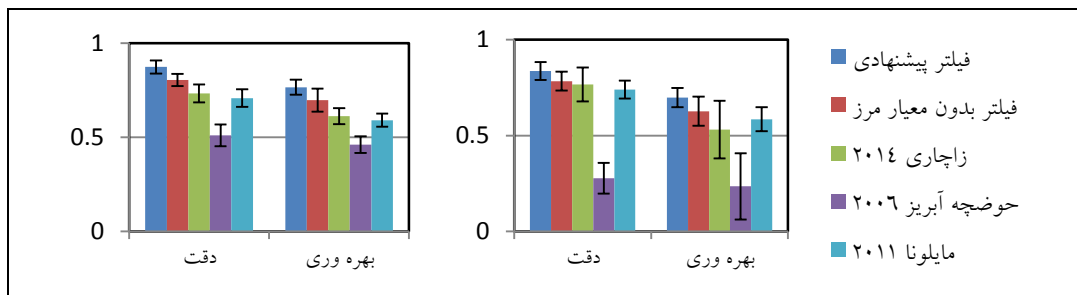
روش تصویر	فیلتر پیشنهادی SEF			فیلتر بدون معیار مرز SEFW			زاچاری (۲۰۱۴) [۱۸،۱۷]			مایلونا (۲۰۱۱) [۸]			حوضچه آبریز (۲۰۰۶) [۲۲]		
	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.
۱	۸۸/۰	۸۱/۶	۰/۷۳	۷۷/۶	۸۲/۱	۰/۶۶	۶۰/۲	۹۱/۵	۰/۵۷	۷۱/۸	۷۹/۱	۰/۶۰	۶۲/۸	۴۹/۸	۰/۲۴
۲	۸۳/۸	۸۴/۳	۰/۷۲	۷۱/۹	۸۰/۱	۰/۶۱	۶۲/۷	۵۳/۸	۰/۴۱	۷۴/۷	۸۰/۴	۰/۶۳	۶۸/۱	۳۹/۹	۰/۳۳
۳	۷۶/۲	۷۴/۹	۰/۶۱	۷۶/۳	۷۰/۷	۰/۵۷	۷۸/۵	۵۶/۹	۰/۴۹	۶۵/۲	۶۸/۱	۰/۵۱	۵۴/۴	۸/۰	۰/۲
۴	۸۱/۴	۸۳/۲	۰/۷۰	۷۴/۴	۷۱/۹	۰/۵۸	۷۹/۵	۷۳/۵	۰/۶۲	۶۹/۴	۷۸/۸	۰/۵۸	۷۱/۰	۱۷/۰	۰/۱۵
۵	۷۶/۱	۹۰/۶	۰/۷۱	۷۱/۱	۸۷/۶	۰/۶۴	۶۲/۵	۸۹/۳	۰/۵۸	۷۸/۳	۷۵/۶	۰/۶۸	۶۷/۱	۴۳/۸	۰/۳۶
۶	۸۱/۳	۸۲/۴	۰/۶۹	۸۳/۳	۷۲/۷	۰/۶۳	۶۱/۷	۷۳/۱	۰/۵	۷۰/۲	۶۶/۹	۰/۵۲	۷۲/۸	۱۵/۴	۰/۱۴
۷	۷۶/۱	۸۹/۹	۰/۷۰	۷۲/۹	۸۹/۶	۰/۶۷	۵۴/۶	۹۰/۳	۰/۵۱	۷۲/۶	۷۷/۹	۰/۶۱	۶۵/۶	۴۰/۵	۰/۳۳
۸	۸۵/۹	۸۱/۹	۰/۷۲	۸۳/۸	۷۲/۱	۰/۶۳	۶۲/۷	۸۴/۷	۰/۵۶	۷۹/۳	۶۵/۳	۰/۵۶	۸۱/۶	۱۰/۹	۰/۱۱
میانگین ± Std.	۸۱/۱ ±۴/۶	۸۳/۶ ±۵/۰	۰/۷۰ ±۰/۰۳	۷۶/۴ ±۴/۹	۷۸/۳ ±۷/۶	۰/۶۲ ±۳/۴	۶۵/۴ ±۸/۸	۷۶/۷ ±۱۴/۹	۰/۵۳ ±۰/۰۶	۷۲/۷ ±۴/۶	۷۴/۰ ±۷/۲	۰/۵۸ ±۰/۰۶	۶۸/۲ ±۸/۱	۲۷/۷ ±۱۷/۳	۰/۲۳ ±۰/۰۹

\* برحسب درصد، Eff. = بهره‌وری و Std. = انحراف معیار

جدول (۵) - پارامترهای مقایسه‌ای تعداد لگه‌های تشخیص داده شده به صورت صحیح در تصاویر مصنوعی مورد بررسی

روش تصویر	فیلتر پیشنهادی SEF			فیلتر بدون معیار مرز SEFW			زاچاری (۲۰۱۴) [۱۸،۱۷]			مایلونا (۲۰۱۱) [۸]			حوضچه آبریز (۲۰۰۶) [۲۲]		
	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.	TPR*	PR*	Eff.
۱	۸۴/۹	۸۱/۸	۰/۷۱	۷۹/۲	۷۱/۱	۰/۶۰	۷۹/۶	۷۰/۴	۰/۶۲	۸۱/۴	۷۰/۹	۰/۶۱	۸۴/۰	۴۷/۲	۰/۴۳
۲	۸۴/۵	۸۴/۵	۰/۷۳	۸۲/۵	۸۱/۰	۰/۶۹	۷۴/۶	۷۳/۳	۰/۶۱	۷۲/۸	۷۷/۱	۰/۵۶	۷۶/۴	۴۵/۶	۰/۴۰
۳	۹۰/۴	۸۹/۰	۰/۸۱	۸۵/۹	۷۸/۶	۰/۶۹	۷۴/۵	۶۷/۷	۰/۵۶	۷۵/۰	۷۱/۶	۰/۵۸	۷۹/۷	۴۷/۹	۰/۴۳
۴	۸۲/۱	۸۴/۶	۰/۷۱	۸۳/۶	۸۴/۸	۰/۷۲	۷۲/۴	۷۶/۹	۰/۶۲	۷۳/۹	۶۹/۸	۰/۵۶	۸۰/۰	۵۰/۰	۰/۴۴
۵	۸۷/۶	۸۶/۵	۰/۷۷	۸۶/۳	۷۳/۲	۰/۶۵	۸۲/۱	۷۱/۴	۰/۶۴	۸۲/۴	۷۷/۲	۰/۶۶	۸۷/۱	۵۱/۳	۰/۴۷
۶	۸۳/۳	۸۶/۶	۰/۷۴	۸۳/۳	۷۹/۳	۰/۶۸	۸۱/۲	۷۰/۶	۰/۶۳	۷۹/۷	۶۶/۳	۰/۵۶	۸۵/۳	۵۱/۶	۰/۴۷
۷	۹۱/۵	۹۲/۷	۰/۸۵	۸۹/۳	۸۷/۲	۰/۷۸	۸۶/۹	۷۹/۳	۰/۷۳	۸۵/۶	۶۶/۷	۰/۶۰	۹۲/۵	۵۹/۲	۰/۵۶
۸	۸۴/۰	۹۲/۹	۰/۷۹	۸۱/۱	۸۷/۹	۰/۷۳	۷۸/۴	۷۷/۵	۰/۶۵	۷۵/۳	۷۲/۰	۰/۵۸	۷۵/۳	۵۵/۸	۰/۴۷
میانگین ± Std.	۸۶/۰ ±۳/۴	۸۷/۳ ±۳/۹	۰/۷۷ ±۰/۰۵	۸۳/۹ ±۳/۱	۸۰/۴ ±۶/۱	۰/۶۹ ±۵/۵	۷۸/۷ ±۴/۷	۷۳/۳ ±۴/۲	۰/۶۳ ±۰/۰۴	۷۸/۳ ±۴/۶	۷۰/۸ ±۳/۴	۰/۵۹ ±۰/۰۳	۸۲/۵ ±۵/۸	۵۱/۰ ±۴/۴	۰/۴۶ ±۰/۰۵

\* برحسب درصد، Eff. = بهره‌وری و Std. = انحراف معیار



شکل (۱۷) - معیارهای مقایسه‌ای تعداد لگه‌های تشخیص داده شده صحیح؛ الف) در تصاویر واقعی؛ ب) در تصاویر مصنوعی

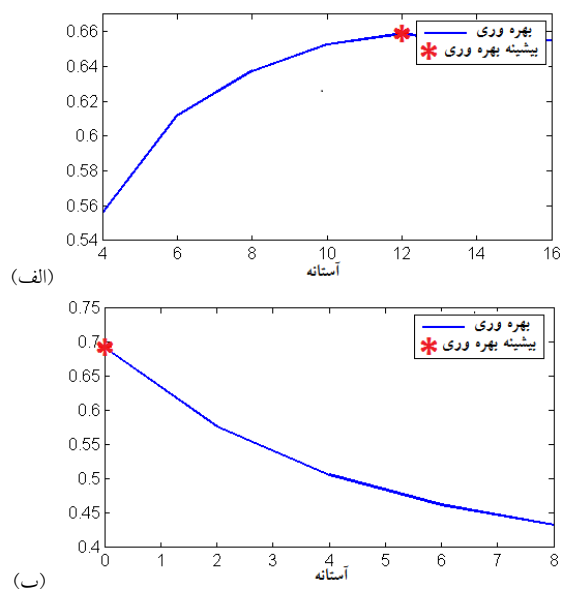
### ۳-۲-۴- بررسی آماری مکان‌ها و تعداد لگه‌ها

نشان داده شده‌است. درین تصویر، لگه‌های تشخیص داده شده با الگوریتم پیشنهادی در این تحقیق با علامت (+)، لگه‌های صحیح با علامت (x) و لگه‌هایی که به درستی تشخیص داده شده‌اند با علامت (o) نشان داده شده‌اند. در حقیقت، لگه‌هایی که به درستی تشخیص داده شده به صورت نقاطی با علامت‌های (+) و (o) مشخص شده‌اند.

علاوه‌بر بررسی توانایی روش‌های مورد بررسی در ناحیه-بندی، ضروری است توانایی روش‌ها در جداسازی نواحی و استخراج مکان‌ها و تعداد صحیح لگه‌های پروتیینی مورد ارزیابی قرار گیرد. در شکل (۱۶) نمونه‌ای از بررسی‌های مکانی انجام یافته روی نتایج حاصل از خروجی فیلتر SEF



شرایط بهینه حذف شدند. درحالی که خروجی فیلتر SEF نیازی به اعمال آستانه نداشته و می‌تواند با بهره‌وری بالاتر نسبت به فیلتر SEFW و به صورت مستقیم جهت تعیین مکان لکه‌های پروتئینی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل (۱۸) - الف) منحنی تغییرات بهره‌وری برحسب آستانه‌های به کار رفته در خروجی فیلتر SEF؛ ب) منحنی تغییرات بهره‌وری برحسب آستانه‌های به کار رفته در خروجی فیلتر SEFW؛ نقطه‌ی بهینه (\*) برحسب بیش‌ترین مقدار بهره‌وری انتخاب شده

با توجه به شکل (۱۸ ب)، خروجی فیلتر SEF با اعمال آستانه گذاری صفر روی مجموعه‌ی داده‌های ورودی به کار گرفته شده، بهترین عملکرد را از خود نشان داد. در حقیقت، نواحی غیر صفر خروجی فیلتر SEF را می‌توان به طور مستقیم برای تعیین نواحی لکه‌ی پروتئینی در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی استفاده نمود. هم‌چنین، درین حالت با افزایش مقدار آستانه، از بهره‌وری سیستم کاسته می‌شود.

مقایسه‌ی عملکرد فیلترهای SEF و SEFW نشان‌گر توانایی بالاتر فیلتر SEF در تشخیص صحیح و دقت بهتر آن در جداسازی لکه‌ها است. این تفاوت در نتایج، به دلیل جداسازی لکه‌های نزدیک به هم در فیلتر SEF است که در فیلتر SEFW به صورت نواحی یک‌پارچه تشخیص داده‌شد. به هرحال، به کار گیری معیار جداساز لکه در فیلتر پیشنهادی (SEF) موجب بهبود تعداد لکه‌هایی است که به صورت

درین کار، از یک الگوریتم استخراج بیشینه‌های محلی جهت تعیین مکان لکه‌ها استفاده شده‌است. پیش‌از اجرای این الگوریتم، با استفاده از آستانه گذاری روی تصویر خروجی فیلتر تشخیص لکه، یک تصویر سیاه و سفید (صفر و یک) تهیه شده و جستجوی بیشینه‌های محلی در تصویر خروجی فیلتر درین نواحی صورت گرفت. جهت انتخاب بهترین آستانه، از معیار بهره‌وری (رابطه ۲۱) استفاده شد.

استخراج مقدار بهینه در مرحله‌ی آموزش (تصاویر ۱-۴) انجام شد و نتایج بعدی مربوط به تست الگوریتم و تصاویر مصنوعی براساس آستانه‌ی محاسبه شده در مرحله‌ی آموزش به دست آمد. با توجه به تعداد زیاد مقادیر مندرج در جدول‌ها و جهت مقایسه‌ی بهتر، معیارهای دقت و بهره‌وری مربوط به بررسی مکان و تعداد لکه‌ها در قالب نمودارهایی در شکل (۱۷) نشان داده شده‌است.

بررسی نتایج مندرج در جدول‌های (۴) و (۵) نشان دهنده‌ی قابلیت بالای فیلتر SEF در استخراج صحیح مکان لکه‌های پروتئینی در هر دو مجموعه‌ی تصاویر واقعی و مصنوعی، در مقایسه با دیگر روش‌های مورد بررسی درین تحقیق است. در جدول‌های (۴) و (۵) به ترتیب نتایج ارزیابی روش‌ها براساس تعداد لکه‌های استخراجی در تصاویر واقعی و تصاویر مصنوعی نشان داده شده‌است. مقادیر TPR و دقت (PR) آزمون‌ها به صورت درصد و معیار بهره‌وری (Eff) به صورت اعدادی بین صفر و یک ارائه شده‌است. مقادیر میانگین و انحراف معیار مربوط به پارامترهای هر یک از روش‌ها در انتهای جدول‌ها درج شده‌است.

در شکل (۱۸) منحنی تغییرات معیار بهره‌وری نسبت به آستانه‌ی به کار رفته نشان داده شده‌است. با این وجود، به دلیل تعدد لکه‌های تشخیص داده شده به صورت اشتباه، دقت و بهره‌وری این روش در مقایسه با روش پیشنهادی پایین‌تر است.

با به کار گیری فیلتر SEFW آستانه‌ی بهینه برابر ۱۲ به دست آمد. به بیانی دیگر، در فیلتر SEFW بخش‌هایی از نواحی که به عنوان لکه تشخیص داده شده موجب کاهش بهره‌وری فیلتر شده‌اند که با اعمال آستانه گذاری جهت ایجاد

خروجی فیلتر پیشنهادی درین پژوهش با نتایج روش‌های ناحیه‌بندی دیگر مقایسه و ارزیابی شد. هم‌چنین نقش مقیاس‌های به کار گرفته شده بررسی شد و محدوده‌ی مناسب، با توجه به نتایج عملی، استخراج شد.

براساس نتایج به دست آمده در بخش ارزیابی، فیلتر پیشنهادی SEF توانایی بیش‌تر در تشخیص و جداسازی نواحی نزدیک به هم را دارد. با توجه به نتایج آزمایشات انجام شده، یک مرحله گسترش، جهت گرفتن نتایج بهتر در تصاویر اعمال شده‌است. کلیدی پارامترهای موجود در طی انجام آزمایشات روی تصاویر مختلف، ثابت بوده‌اند. با توجه به نتایج مندرج در جدول‌های (۲) تا (۵)، فیلتر SEF عملکردی مناسب‌تر در جداسازی نواحی لکه از پس‌زمینه در هردو گروه تصاویر واقعی و مصنوعی دارد. هم‌چنین در جداسازی لکه‌های مجاور و استخراج قله‌ها به ویژه قله‌های نزدیک به هم از عملکرد بهتری برخوردار است. بنابراین، فیلتر جداساز لکه‌ی بهبود یافته‌ی SEF به منظور استخراج مکان بیشینه‌های محلی و درنهایت تعداد لکه‌ها و نیز محاسبه‌ی حجم محصور در لکه‌ها استفاده شد. با بررسی انجام شده در تصویر (۱۸ ب)، عدم نیاز به کارگیری آستانه گذاری در خروجی فیلتر SEF را نشان می‌دهد. بدین صورت، نواحی دارای مقادیر غیر صفر در فیلتر SEF به طور مستقیم در جداسازی و استخراج لکه‌های پروتئینی قابل استفاده است. در مجموع، نتایج به دست آمده از این پژوهش، توانایی بالای فیلتر پیشنهادی در بهبود و فیلتر تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی و استخراج صحیح نواحی و مکان لکه‌های پروتئینی را نشان می‌دهد.

با توجه به مقادیر دقت مربوط به فیلتر SEF، مندرج در جدول (۴)، پیشنهاد می‌شود جهت بهبود بیش‌تر نتایج، خروجی فیلتر جداساز لکه با اعمال الگوریتم‌هایی هم‌چون دیفیوژن بر تصویر اصلی، نرم‌تر گردد تا از تشخیص نقاط نادرست جلوگیری به عمل آید. بدین منوال، الگوریتم پیشنهادی درین پژوهش جهت به کارگیری به عنوان یک مرحله تشخیص اولیه در فرآیند پردازش تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی مناسب است.

صحیح استخراج شده‌اند. هم‌چنین، تعداد پایین نقاط تشخیص داده شده به صورت اشتباه به همراه تعداد بالای نقاط تشخیص داده شده به صورت صحیح در فیلتر پیشنهادی در مقایسه با روش‌های دیگر موجب افزایش دقت در استخراج نقاط لکه شده‌است.

روش آستانه گذاری اوتسو (زاچاری ۲۰۱۴) نیز قادر است تعداد زیادی از لکه‌های موجود را به درستی جداسازی نماید. با این وجود، با توجه به نتایج به دست آمده درین تحقیق، نتایج روش اوتسو (زاچاری ۲۰۱۴) در مقایسه با نتایج فیلتر بهبود یافته‌ی پیشنهادی (SEF)، از دقت کم‌تری برخوردار است. از سوی دیگر، نتایج الگوریتم اوتسو (زاچاری ۲۰۱۴) در تصاویر مختلف به کار گرفته شده، دچار نوسانات شدید شده و بهره‌وری یک‌سانی در تشخیص لکه‌های پروتئینی از خود نشان نمی‌دهد. در بررسی روش حوضچه‌ی آبریز، ناحیه‌بندی بیش‌از حد که مشکل اصلی این روش است، موجب کاهش شدید دقت استخراج لکه‌ها و عدم بهره‌وری بالای این روش می‌شود.

با توجه به نتایج حاصل از به کارگیری روش ارائه شده توسط مایلونا و همکاران، این روش توانایی جداسازی صحیح تعداد بالایی از لکه‌ها را دارد.

#### ۴- جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

با ارائه معیارهای جدید برای سنجش ساختارهای دایره‌ای، فیلتری ویژه جهت بهبود نواحی لکه‌های پروتئینی، جداسازی لکه‌های نزدیک به هم و حذف آرتیفکت‌ها و نویزهای موجود در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی پیشنهاد شد. به منظور استخراج ویژگی‌های مکان/مقیاس مطلوب از ساختارهای هندسی در نقاط مختلف تصویر، پایه‌ی محاسباتی مشتق دوم تصویر و مقادیر ویژه‌ی این ماتریس به کار گرفته‌شد. با به کارگیری این اطلاعات و به همراه ارائه معیارهایی جدید برای سنجش و تشخیص ساختارهای موجود در تصویر، فیلتری توانمند در تشخیص لکه‌های پروتئینی و حذف عوامل نامطلوب به دست آمد.

- [12] E. Bettens, P. Scheunders, J. Sijbers, D. Van Dyck, L. Moens, "Automatic segmentation and modelling of two-dimensional electrophoresis gels, In Image Processing" *Proceedings International Conference on IEEE* 1: 665-668, 1996.
- [13] Y. Watanabe, K. Takahashi, M. Nakazawa, "Automated detection and matching of spots in autoradiogram images of two-dimensional electrophoresis for high-speed genome scanning, Image Processing, Proceedings" *International Conference on IEEE Vol 3*, 1997.
- [14] Z. Smilansky, "Automatic registration for images of two-dimensional protein gels" *Electrophoresis* 22 (9): 1616-1626, 2001.
- [15] K. Rohr, P. Cathier, S. Wörz, "Elastic registration of electrophoresis images using intensity information and point landmarks" *Pattern recognition* 37 (5): 1035-1048, 2004.
- [16] M. Daszykowski, M. S. Wróbel, A. Bierzynska-Krzysik, J. Silberring, G. Lubec, B. Walczak, "Automatic preprocessing of electrophoretic images" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 97 (2): 132-140, 2009.
- [17] E. Zacharia, E. Kostopoulou, D. Maroulis, S. Kossida, "A spot segmentation approach for 2D gel electrophoresis images based on 2D histograms, In Pattern Recognition (ICPR)" *20th International Conference on IEEE* 2540-2543, 2010.
- [18] E. Kostopoulou, E. Zacharia, D. Maroulis, "An Effective Approach for Detection and Segmentation of Protein Spots on 2D-Gel Images" *Biomedical and Health Informatics, Journal of IEEE* 18 (1): 67-76, 2014.
- [19] L. Pedersen, "Analysis of two-dimensional electrophoresis gel images" Ph.D. thesis, Informatics and Mathematical Modelling, *Technical University of Denmark*, 2002.
- [20] S. Beucher, "Extrema of grey-tone functions and mathematical morphology" *Rapport du CGMM, Ecole des Mines, Fontainebleau* 1 (793): 1-12, 1983.
- [21] S. Beucher, C. Lantuejoul, "Use of watersheds in contour detection" In: *International Workshop on Image Processing: Real-time Edge and Motion Detection/Estimation*, Rennes, France, pp 1-12, 1979.
- [22] R. Beare, G. Lehmann, "The watershed transform in ITK-discussion and new developments" *The Insight Journal online available: <http://www.insight-journal.org/browse/journal/4>*, 2006.
- [23] M. M. Skolnick, "Application of morphological transformations to the analysis of two-dimensional electrophoretic gels of biological materials" *Computer vision, graphics, and image processing* 35 (3): 306-332, 1986.

## ۵- سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر بهروز وزیر ریاست محترم آزمایشگاه پروتئین/شیمی، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران قدردانی و تشکر می‌شود.

## ۶- مراجع‌ها

- [1] N. Anderson, N. Anderson, "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words" *Electrophoresis* 19 (11): 1853-61, 1998.
- [2] W. Blackstock, M. Weir, "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins" *Trends Biotechnol* 17 (3): 121-7, 1999.
- [3] U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*; 227: 680-5, 1970.
- [4] A. MacGillivray, D. Rickwood, "The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography" *Eur. J. Biochem* 41: 181-90, 1974.
- [5] P. O'Farrell, "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins" *J. Biol. Chem* 250: 4007-21, 1975.
- [6] M. Rye, E. M. Fargestad, "Preprocessing of electrophoretic images in 2-DE analysis" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 117: 70-79, 2012.
- [7] S. Nhek, B. Tessema, U. Indahl, H. Martens, E. Mosleth, "2d electrophoresis image segmentation within a pixel-based framework" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 14: 33-46, 2015.
- [8] E. A. Mylona, M. A. Savelonas, D. Maroulis, S. Kossida, "A Computer-Based Technique for Automated Spot Detection in Proteomics Images" *IEEE Trans. Information Technology in Biomedicine Jul.* 15 (4): 661-667, 2011.
- [9] Savelonas M. A., Mylona E. A., Maroulis D., "Unsupervised 2D gel electrophoresis image segmentation based on active contours, *Pattern Recognition*, 2012; 45: 720-731.
- [10] P. Lemkin, C. Merril, L. Lipkin, M. VAN Keuren, W. Oertel, B. Shapiro, M. Wade, M. Schultz, E. Smith, "Software Aids for the Analysis of 2D Gel Electrophoresis Images" *Computers and Biomedical Research* 12: 517-544, 1979.
- [11] D. J. Potter, "Computer-Assisted Analysis of Two Dimensional Electrophoresis Images Using an Array Processor" *Computers and Biomedical Research* 18: 347-362, 1985.

- Lecture Notes in Computer Science” Springer Verlag, Berlin, Germany 1496: 130-137, 1998.
- [32] R. Manniesing, W. Niessen, "Multiscale vessel enhancing diffusion in CT angiography noise filtering" In *Information Processing in Medical Imaging, Springer Berlin Heidelberg* 138-149, 2005.
- [33] R. Manniesing, M. A. Viergever, W. J. Niessen, "Vessel enhancing diffusion: A scale space representation of vessel structures" *Medical Image Analysis* 10 (6): 815-825, 2006.
- [34] C. T. Ekstrøm, S. Bak, C. Kristensen, M. Rudemo, "Spot shape modelling and data transformations for microarrays" *Bioinformatics* 20: 2270-2278, 2004.
- [35] D. Matuzevicius, A. Serackis, D. Navakauskas, "Mathematical models of oversaturated protein spots, Electronics and Electrical Engineering" *Kaunas: Technologija* 1 (73): 63-68, 2007.
- [36] J. I. Garrels, "The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels" *Journal of Biological Chemistry* 264: 5269-5282, 1989.
- [37] R. Kumar and A. Indrayan, "Receiver operating characteristic (roc) curve for medical researchers" *Indian pediatrics* 48 (4): 277-287, 2011.
- [38] E. F. Schisterman, N. J. Perkins, A. Liu, H. Bondell, "Optimal cut-point and its corresponding youden index to discriminate individuals using pooled blood samples" *Epidemiology* 16 (1): 73-81, 2005.
- [39] O. Nobuyuki, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms" *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 9 (1): 62-66, 1979.
- [24] L. Vincent, "Morphological grayscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms, Image Processing" *Transactions on IEEE* 2 (2): 176-201, 1993.
- [25] E. Bettens, P. Scheunders, D. Van Dyck, L. Moens, P. Van Osta, "Computer analysis of two-dimensional electrophoresis gels: A new segmentation and modeling algorithm" *Electrophoresis* 18: 792-798, 1997.
- [26] M. Natale, A. Caiazzo, E. M. Bucci, E. A. Ficarra, "Novel Gaussian extrapolation approach for 2d gel electrophoresis saturated protein spots" *Genomics, proteomics & bioinformatics* 10 (6): 336-344, 2012.
- [27] T. Lindeberg, "Scale-space theory in computer vision, Springer 1993.
- [28] T. Lindeberg, "Feature detection with automatic scale selection, *International journal of computer vision* 30 (2): 79-116, 1998.
- [29] J. Sporring, M. Nielsen, L. Florack, P. Johansen, "Gaussian scale-space theory" Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [۳۰] س. شامخی، م. ح. میران‌بیگی، ع. گویا، "ارایه‌ی فیلتر جدید بهبود لکه‌های پروتئینی در تصاویر الکتروفورز ژل دو بعدی" مجموعه مقالات بیست و یکمین کنفرانس مهندسی برق ایران، اردیبهشت ۱۳۹۲.
- [31] A. F. Frangi, W. J. Niessen, K. L. Vincken, M. A. Viergever, "Multiscale vessel enhancement filtering, Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI'98, Wells W.M., A. Colchester and S.L. Delp (Eds.),