

5.1. Egyéni hozzájárulás

A dolgozatom az informatika és a biológia egy eddig informatikai oldalról nem vizsgált specifikus határterületével foglalkozik. A kutatás informatikai oldalát teljes mértékben egyedül, témavezetői segítség nélkül végeztem; a témavezetőm — biológusként — elsődlegesen a feladat specifikálásában segített.

Újrafeltárom a *szekrétációs granulumok*kal kapcsolatos képfeldolgozási lehetőségeket, és bemutatok egy új *szakértői modellt* a *GlueFlux jelzőrendszer* használatával készült felvételek automatizált feldolgozására. A modellem a jelenleg ismert módszerekkel ellentétben újszerű elgondolást is figyelembe vesz: Ötvözöm az objektum-alapú kolokalizációt és a hagyományos kolokalizációt azáltal, hogy diszkretizáció előtt is keresek összefüggéseket egy felvétel több csatornája között.

A modell validációja mellett azt egy valós kísérletben is alkalmazom¹: részlegesen megismétlem Roederer, Bowser és Murphy kísérletét [40] a lizoszomális enzimek által okozott savasodás hőmérséklet-függésére vonatkozóan.

¹A kísérlet végrehajtását és az adatgyűjtést Dósa Anna végezte, azonban a kvantifikálás és az adatvizualizáció az én modellemmel történt, illetve az itt leírt statisztikai elemzést önállóan végeztem

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a dolgozat elkészüléséhez való hozzájárulását témavezetőmnek, dr. Csizmadia Tamásnak, aki a feladat részletes, jól illusztrált specifikálása után hasznos tanácsokkal látott el az első tudományos munkám megszületésére vonatkozóan, Dósa Annának a dolgozatban és a kutatás során használt fluoreszcens mikroszkópos felvételekért, Farkas Erikának a fénymikroszkópos felvételekért. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Bolyai Szakszeminárium vezetőjének, Porkoláb Zoltánnak, aki akár vasárnap este is válaszolt a levelemre, és az *ELTE Biológiai intézet Anatómiai Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszéknek (ELTE ASF)*, azon belül is főként a CsizmadiaLab labornak [5], aminek tagjai szabadidejünkben rengeteget segítettek a dolgozat biológiai háttérében amellet, hogy végig támogattak a dolgozat elkészítésében, és akiket kérdéseimmel folyton zaklathattam. Hozzájárultak a munkám színvonalához a Biológus TDK-n hallott értékes előadások és a Bolyai szakszemináriumok illetve az *ELTE ASF* tanszék inspiráló közege. Szeretném megköszönni a segítségét mindenkinek, aki félkész állapotban segített lektorálni a dolgozatomat: a családomnak, Tatai Áronnak, Dósa Annának, Kozák Balázsnak, Csizmadia Tamásnak és Hajder Leventének, akit a szakdolgozatommal kapcsolatos belső konzulensi közreműködése mellett a TDK-mmal kapcsolatos lektorálásra is megkérhettem. Továbbá mindenképpen szeretnék köszönetet mondani Csetverikov Dimitrijnek, aki a rövid találkozóink ellenére is hosszan tartó tanácsokkal látott el, és akinek közvetlenül köszönhetem, hogy a *DoG* alapú algoritmust használatba vettem.

A. függelék

Elméleti háttér

Alább részletezem azokat a fontosabb eljárásokat, algoritmusokat, amelyeket felhasználok a modellemben.

A.1. Aritmetikai műveletek képeken

Az egyik legegyszerűbb képfeldolgozási eljárás az, amikor a képen pixelenként a szín(ek)kel aritmetikai műveleteket végzünk.

Általában ezeknek csak szürkeárnyaltos (egyszínű) képek esetében van értelme.

A.1.1. Műveletek kép és skalár között

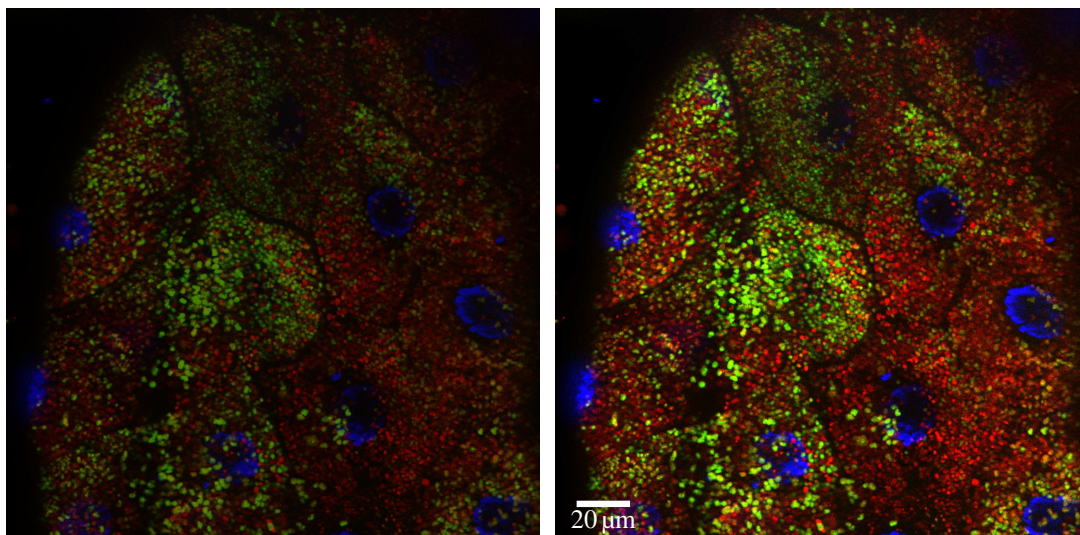
Szorzás skalárral

A legegyszerűbb ilyen művelet a skalárral való szorzás.

Ha például egy képen a legnagyobb intenzitású pixel is csak lehetséges legnagyobb intenzitás felét éri el, információvesztés nélkül felskálázható. (A.1 ábra)

Lebegőpontos formátum

Annak érdekében, hogy az információvesztést elkerüljem, olyan képformátumot használok, ami a pixelek értékét előjeles lebegőpontos számként tárolja. Mivel a lebegőpontos számábrázolás esetén a pontosság az elméleti maximumhoz közeledve csökken, a legpraktikusabb maximális intenzitásérték az 1, így könnyedén tudok az elméleti maximumnál kisebb és nagyobb fényességet is tárolni.



A.1. ábra. Kép szorzása skalárral. A jobb oldali képen színenként az intenzitás kétszer akkora, mint a bal oldalon.

Összeadás skalárral (eltolás)

Amennyiben szorzás helyett összeadást vagy kivonást alkalmazunk, az egymás melletti pixelek intenzitáskülönbsége megmarad.

Hatványozás

Ha a kép pixeleinek intenzitását négyzetre emeljük, az egymás melletti pixelek intenzitásának az aránya is változik, továbbá a nagy intenzitású pixelek esetében nagyobb az intenzitáskülönbség mint a kis intenzitású pixelek környezetében. Amennyiben az intenzitások a $[0, 1]$ tartományból származnak, ez fordítva van.

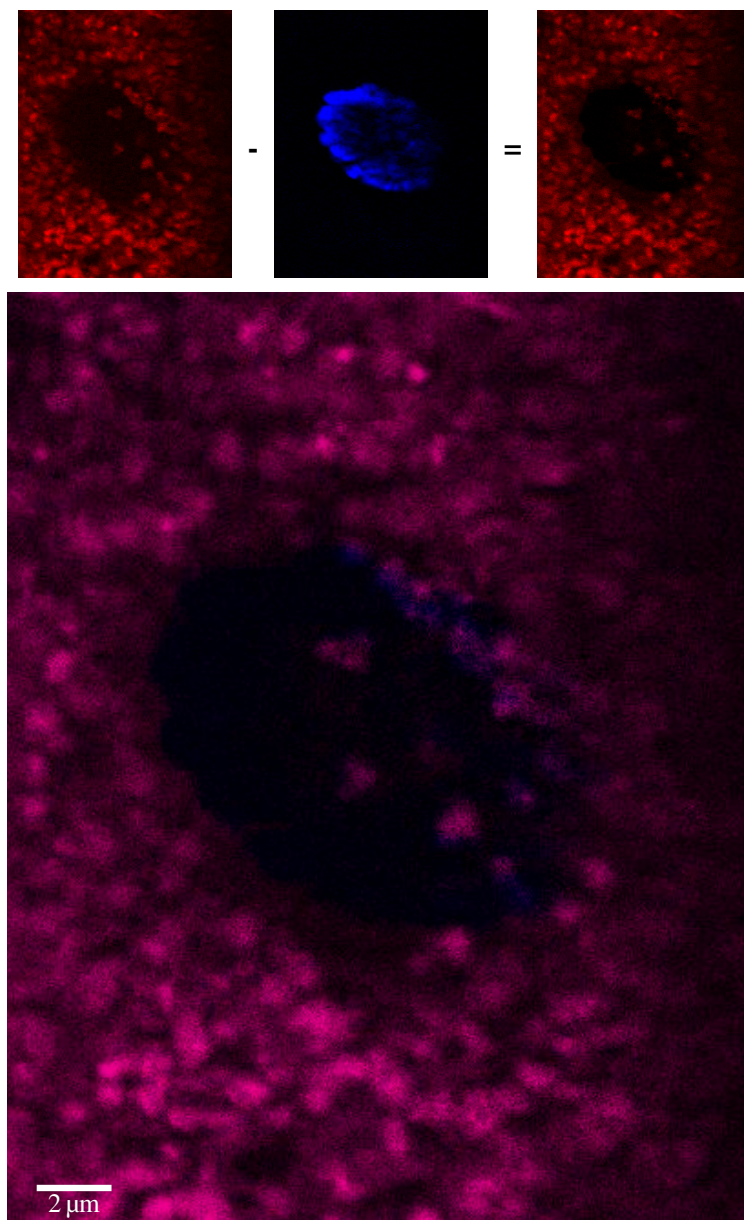
Összefoglaló az egyszerű műveletekről

Az intenzitáskülönbségek megtartása/elvesztése bizonyos esetekben kívánt tulajdonság, bizonyos esetekben pedig kerülendő.

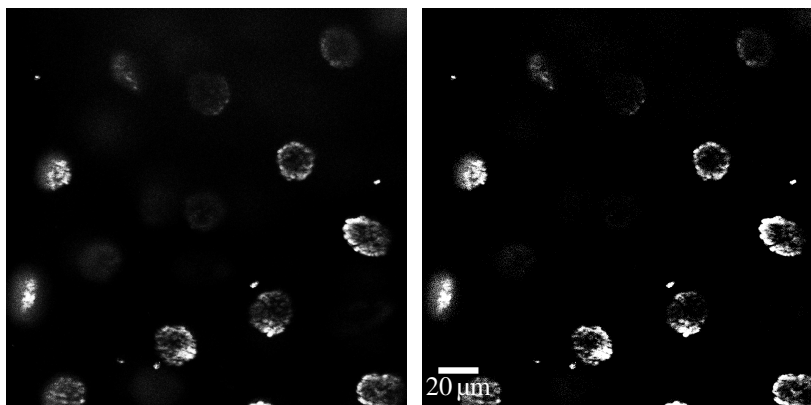
A.1.2. Műveletek képek között

Bináris aritmetikai műveletet nem csak egy adott kép pixeleivel és egy konstanssal lehet végezni, hanem két kép megfelelően párosított pixelei között is.

A képek közötti kivonás alkalmas a képek egyes részleteinek csökkentésére. [45] Például, ha egy adott képből kivonjuk ugyanarról a területről készített DAPI-szűrős változatát, eltűnnek a sejtmagok közelében lévő részletek, mivel a DAPI kizárólag a



A.2. ábra. Képek kivonása egymásból. A fenti három képen rendre ugyanannak a felvételnek a vörös (DsRed) és kék (DAPI) csatornája, illetve a kettő különbsége látható, alatta pedig a vörös csatornán a különbség, a kéken pedig az eredeti vörös csatorna. A sejtmaggal átfedésben lévő *sequestrációs granulumok* némileg kékesebbek, halványabbak.
A képek szélessége nagyjából 25μm



A.3. ábra. DAPI *fluoreszcens marker* intenzitása egy képen, limitálás előtt és után. A kör alakú formákból sejtmagok jelenlétére következtethetünk. A különbség nem szembetűnő, de ha keresünk a bal oldali képen nagyon halvány részeket, azok a jobb oldali képen hiányoznak, továbbá a világosabb részek a jobb oldalon sokkal világosabbak. A későbbiekben be fogok mutatni szembetűnőbb különbséget eredményező módszereket is.

sejtmagokban látszódik. (A.2 ábra) Azonban sajnos ez az eljárás még nem tökéletes, az ábrán az látható, hogy csak a sejtmag szélén lévő granulumok tűnnek el, és azok is csak kevésbé.

A.2. Limitálás (thresholding)

Sokkal jobb eredményt érhetünk el, ha nem-lineáris transzformációkat is alkalmazunk. Ilyen például a limitálás, amely az előjelfüggvényhez hasonlóan egy bizonyos limitáló érték alatti értékekhez 0-t, felette viszont a lehetséges legnagyobb értéket rendeli.

A A.3 ábrán az előző felvételek kék (DAPI) csatornáján egy ilyen átalakítás látható.

A 1.5 *Kapcsolódó munkák* alfejezetben említett munkák nagyrészt csak egy egyszerű limitálást végeznek a felismerendő objektumokon.

A.2.1. Otsu-féle hisztogram alapú threshold

A megfelelő limitáló érték kiválasztásához több algoritmus is létezik. Ezek közül talán a legegyszerűbb módszer, ha a limitáló értéknek a maximális és a minimális intenzitás számtani közepét vesszük, azonban ez az esetek kis részében vezet megfelelő eredményre. Az ennél jobbak közül az egyik legismertebb módszer Otsu nevéhez fűződik. Ennek lényege a határérték alatti és feletti intenzitások minimalizálása. [46]

Habár az ismertsége, könnyű implementálhatósága és átláthatósága miatt gyakran alkalmazzák például az Imaris [27] szoftverben, ez az eljárás nem feltétlenül a legjobb eredményeket hozza, helyette érdemes inkább a következő részben leírt lokális adaptív limitálást alkalmazni.

A.2.2. Lokális adaptív limitálás

Az előzőekben ismertetett ún. globális limitálási eljárásoknál általában jobb eredményeket érhetünk el, ha lokális limitálást alkalmazunk. Ennek lényege, hogy mindegyik pixel esetében más limitet alkalmazunk, ami az adott pixel egy környezetének értékeit veszi figyelembe. Ez lehetővé teszi a változó kontrasztú képek limitálását. [45]

A.3. Konvolúció

A képfeldolgozás egyik legsokoldalúbb alapvető művelete a *konvolúció*. Ez egy bináris képtranszformációs művelet képek és adatmátrixok (ún. *kernelek*) között, amely során az eredményül kapott kép összes pixelének intenzitása a környezetének és az adatmátrix között végzett skaláris szorzatnak¹ az eredménye. [48]

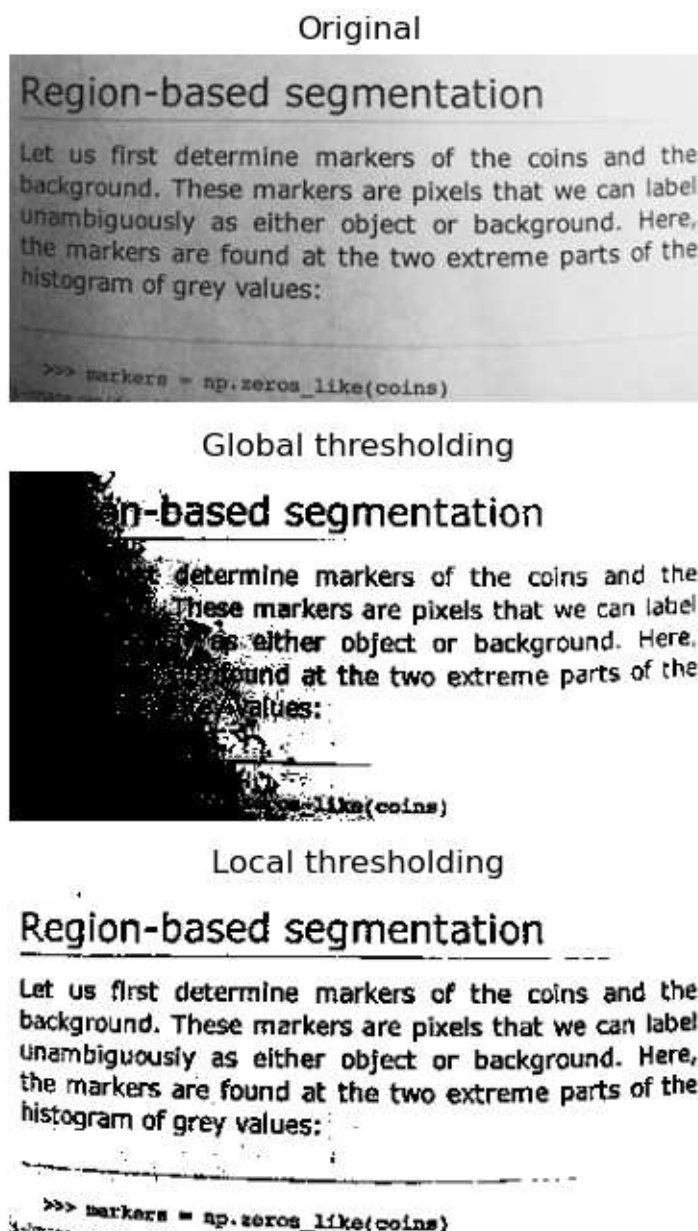
A.4. Gauss-elmosás

A *Gauss-elmosás* (*gaussian blur*) *Konvolúció* az ún. Gauss-kernellel. Az ilyen kernel vonalmenti metszetének az intenzitása a σ szórású normális eloszlás eloszlásfüggvényét követi (A.5 ábra). A kernel egy-egy eleme a A.1 képlettel írható le. [49]

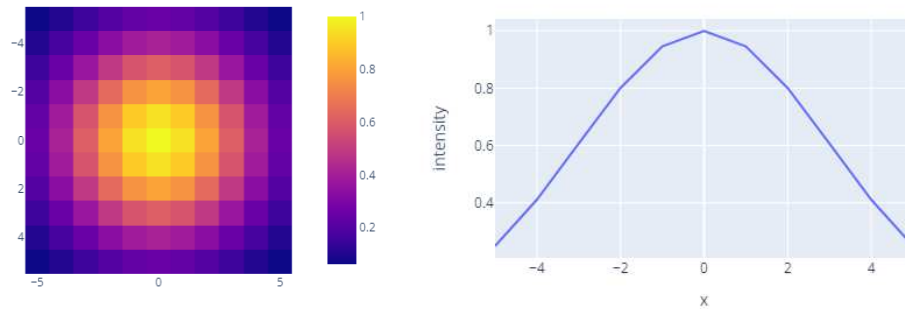
$$K[x,y] = e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{A.1})$$

Ilyen kernellel az adott pixel intenzitását egyenletesen befolyásolja a környezetének intenzitása, így a kép elmosódik, a lokális elváltozások eltűnnek, csak a nagyobb területeket érintő intenzitáskülönbségek maradnak meg.

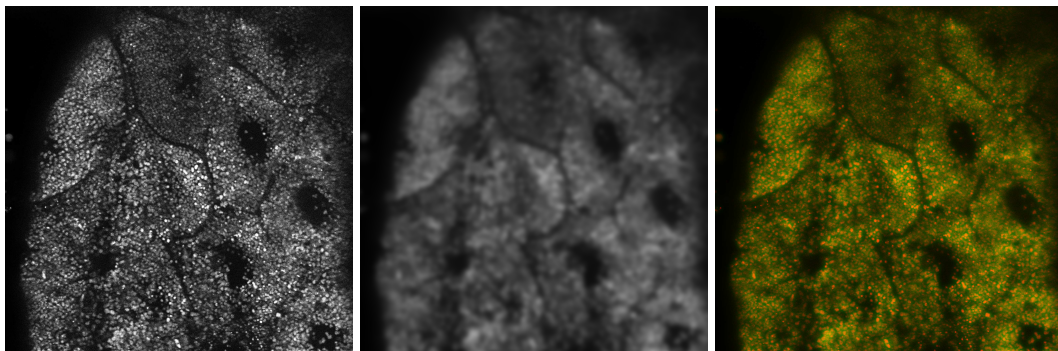
¹A skaláris szorzat elemenkénti szorzást majd a szorzatok összegzését jelenti



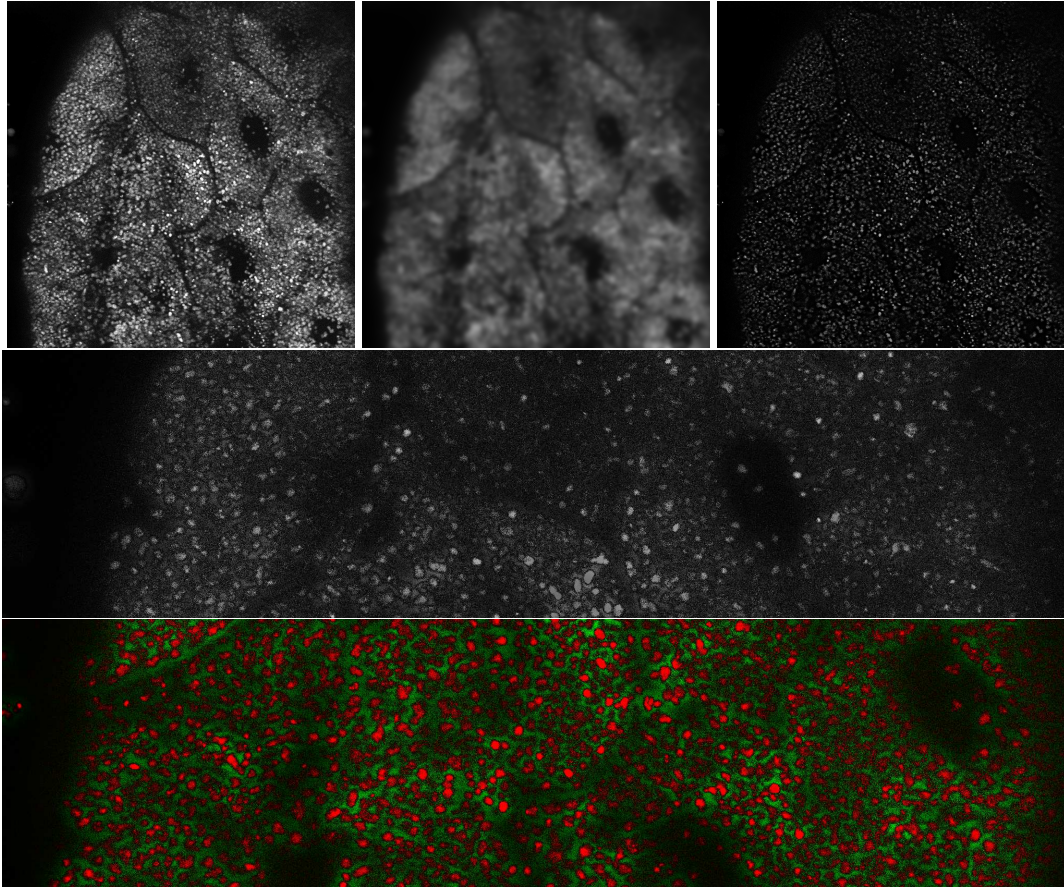
A.4. ábra. Lokális limitálás (thresholding) sokkal jobb eredményeket hoz változó kontrasztú kép esetén. A felső képen egy könyvről készült fotó látható, alatt a globális limitálás majd legalul lokális limitálás. A limitálás során a felbontás romlani látszik, de ez csak információvesztésre utal (dimenziócsökkenésre). Lokális limitálás esetén a legkevesebb a hiba. A kép forrása: skimage dokumentáció [47]



A.5. ábra. Egy 11x11-es méretű, $\sigma = 3$ paraméterű *Gauss-kernel* és annak $y = 0$ vonal menti metszete



A.6. ábra. Egy kép és annak *Gauss-elmosás* (*gaussian blur*) utáni változata. A harmadik képen a vörös csatornán az eredeti, a zöld csatornán pedig az elmosott változat látható, a képet jobban megfigyelve feltűnhet, hogy a granulumok nagy része sárga (piros + zöld), csak az átlagosnál nagyobb intenzitású granulumok kapnak pirosas árnyalatot.



A.7. ábra. A *Difference of Gaussians* (DoG) művelet szemléltetése. Egy kép eredeti, elmosott változata majd az eredeti és az elmosott különbsége. Alatta a különbség abszolút értéke látható, amelyen minden lokális elváltozás kirajzolódik. Legalul a vörös csatornán az eredetiből vonom ki az elmosottat, míg a zöld csatornán fordítva, így a vörös csatornán a lokális intenzitásnövekedések, míg a zöld csatornán a lokális intenzitáscsökkenések rajzolódnak ki.

A.4.1. *Difference of Gaussians* (DoG)

Két kép különbsége (A.1.2 rész) alkalmas lokális vonások kiemelésére vagy eltompítására. Egy elmosott képet kivonva az eredeti képből a részletek előtűnnek. (A.7 ábra)

DoG piramis

Az algoritmusom egyik központi eleme a *sarokdetektálás* (*blob detection*), amely során egy 2D-s képen gömbszerű struktúrákat azonosítok. Én David G. Lowe 2004-ben publikált algoritmusát alkalmazom. Ennek legnagyobb előnye a könnyű implementálhatóság és a méret- és körvonalinvariáns detektálás. [25]

A.5. Egyéb folt-detektálási algoritmusok

Az orvosi biológia területén a leggyakrabban a *DoG*, a *LoG* és a *DoH* algoritmusokat használják, így — habár ezek a modellemben nem szerepelnek — ez utóbbi kettőről is ejtek pár szót. [50]

A.5.1. *Laplace of Gaussians (LoG)*

„A *LoG* az egyik első és leggyakrabban használt folt-detektáló [algoritmus]. A folt jellemzőt csak fehér színű foltokon képes érzékelni, és mitöbb, nagyobb foltok detektálása kifejezetten lassú. Mindegyik közül a *LoG* a legpontosabb és leglassabb eljárás.” [50]

Szerencsére a fekete/fehér színeket egy egyszerű invertálással meg lehet cserélni, azonban tapasztalatom szerint nincs szükség ennek az alkalmazására, a gyorsabb módszerrel is megfelelően pontos eredmények érhetőek el.

A.5.2. *Difference of Hessians (DoH)*

„A *LoG*-hoz hasonlóan a *DoH* a *scale-space*t veszi figyelembe a cél-pontok detektálásához. A *DoH* esetében a lényeges képek gyorsan detektálják a cél-pontokat. A *DoH* előnye a számítási igény és így a felismerő az egyik leghasznosabb *folt-detektáló*. Ha a *scale-space* nem kifejezetten nagy, a *DoH* akár valós idejű *folt-detektáláshoz* is használható. Ezentúl a detektálási sebesség független a foltok méretétől és több szokványos geometriai struktúrát is tud detektálni, például tál formákat, foltokat és lapokat. Használható mind sötét háttéren világos, mind világos háttéren sötét foltok detektálására.” [50]

Sajnos a sebesség ennek az algoritmusnak az esetében enyhén a minőség rovására megy. Tapasztaltom szerint a különbség már nem elhanyagolható, azonban amennyiben a modellem alkalmazása megköveteli, a sebesség nyugodtan növelhető *DoG* helyett *DoH* alkalmazásával, mivel a hiba teljesíti a követelményeimet (1.4.1 Milyen a jó hiba?).

A.5.3. Mintafelismerés

Egy másik, kézenfekvő módszer *folt-detektálásra* speciális algoritmusok alkalmazása helyett mintafelismerés alkalmazása. Ennek kézenfekvő módja különböző méretű granulum alakú mintával való konvolúció alkalmazása. Ez a megközelítés (a minta

személyre szabhatóságának köszönhetően) kicsit nagyobb pontosságot de egyben jóval nagyobb futásidőket is eredményez.

Készítettem erre is egy implementációt, az elgondolás működőképes, de véleményem szerint lassúsága miatt nem érdemes alkalmazni, esetleg jövőbeni kutatások esetén kerülhet szóba alkalmazása.

A.6. Morfológiai módszerek

„A matematikai morfológia olyan kép-transzformációknak és kép-függvényeknek az elmélete, amelyek halmazelméleti, geometriai és topológiai koncepciókra vannak alapozva.” [51] Ennek a megközelítésnek az előnye az, hogy a feldolgozni kívánt képek tulajdonságainak ismeretében akár vakon is kidolgozhatunk jól működő eljárásokat, morfológiai építőkövek alkalmazása esetén meglehetősen egyszerű és szemléletes az algoritmus helyes működésének indoklása, ami kifejezetten előnyös interdiszciplináris területen [26].

A morfológiában leggyakrabban használt műveletek binárisak, melyek egyik operandusa egy szürkeárnyaltos kép, a másik pedig egy bizonyos szabályszerű *kernel* összes paramétere. A valódi művelet implementálható a *kernel* és a kép összes pixele között egy elemenkénti szorzattal, majd egy halmaz-redukciós művelet (pl. minimum, maximum, összeg) alkalmazásával. [52]

A Wolfram Mathematica [53] nyelv `ListConvolve` függvénye egy általánosított *konvolúciót* valósít meg, így ideális annak a jelöléseit alkalmazni. A A.2 képlet megfelel a hagyományos konvolúciónak.

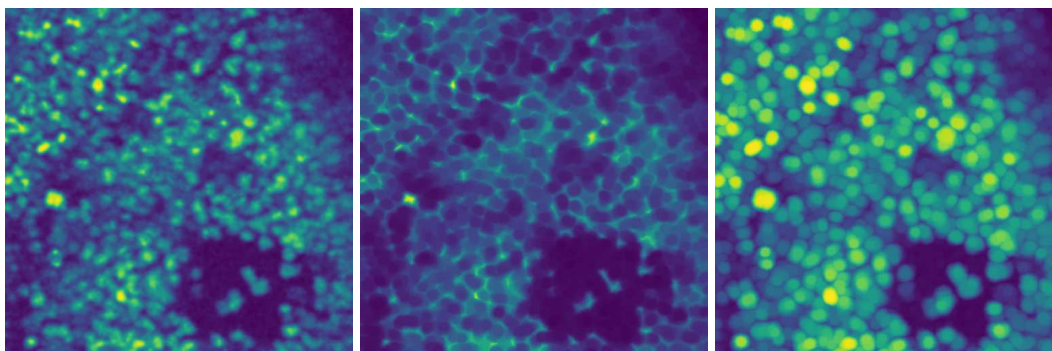
$$\text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{image}, \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Plus}]/\text{MatrixForm} \quad (\text{A.2})$$

Alább ismeretek pár fontosabb morfológiai műveletet.

A.6.1. Erózió, diláció

Diláció

A *diláció* a minkowski-összeg morfológiai megvalósítása. Informálisan megfogalmazva egy képre *dilációt* alkalmazva az objektumok mérete megnő.



A.8. ábra. Az *erózió* és a *diláció*. A második ábrán az első ábra erodált változata, míg a harmadik ábrán a dilatált változata látható, 5px sugarú kör alakú kernellel.

Minden pixelnek az adott *kernelre* vonatkozó környezetéből megkeressük a maximumot. Wolfram Mathematica [53] nyelvben a A.3 képlet szerint írható le.

$$\text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{image}, \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Max}] // \text{MatrixForm} \quad (\text{A.3})$$

Erózió

Az *erózió* a minkowski-különbség morfológiai megvalósítása. Informálisan megfogalmazva egy képre *eróziót* alkalmazva az objektumok mérete lecsökken.

Minden pixelnek az adott *kernelre* vonatkozó környezetéből megkeressük a minimumot. Wolfram Mathematica [53] nyelvben a A.4 képlet szerint írható le.

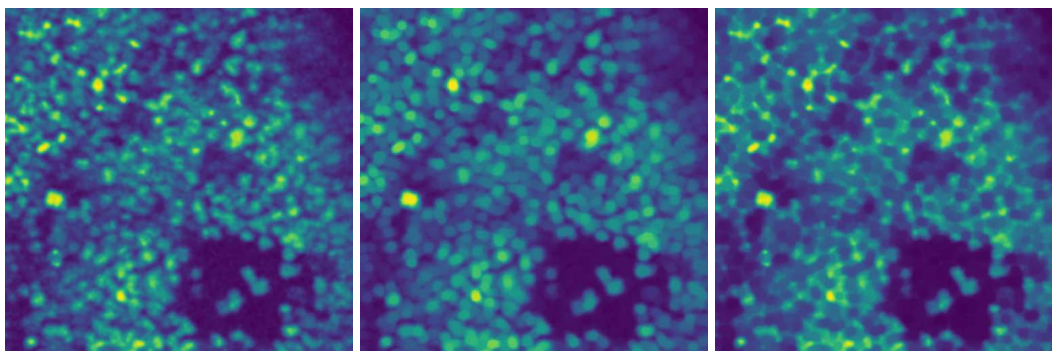
$$\text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{image}, \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Min}] // \text{MatrixForm} \quad (\text{A.4})$$

A.6.2. Opening, closing

Eróziót és *dilációt* egymás után alkalmazva a kis méretű objektumok eltűnnek, ezt opening-nek hívjuk. (A.5 képlet)

Fordított sorrendben alkalmazva a kis méretű lyukak tűnnek el. (A.6 képlet)

$$\text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{image}, \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Min}], \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Max}] // \text{MatrixForm} \quad (\text{A.5})$$



A.9. ábra. Az opening és a closing. A második ábrán az első ábra opening utáni változata, míg a harmadik ábrán a closing utáni változata látható, 5px sugarú kör alakú kernellel.

$$\text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{ListConvolve}[\text{kernel}, \text{image}, \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Max}], \text{Ceiling}[\text{Length}[\text{kernel}]/2], \{\}, \text{Times}, \text{Min}]/\text{MatrixForm} \quad (\text{A.6})$$

A módszer működésének informális indoklása:

- opening esetében:
 1. erózió: Az objektumok mérete lecsökken, olyannyira, hogy a nagyon kicsi objektumok nyomtalanul eltűnnek
 2. diláció: Az objektumok visszanyerik eredeti méretüket
- closing esetében:
 1. diláció: Az objektumok mérete megnő, olyannyira, a közel lévő objektumok közötti űr eltűnik
 2. erózió: Az objektumok visszanyerik eredeti méretüket

Ahogy a A.8 és a A.9 ábrán látható, a módszer hátránya, hogy a kép részletessége (információtartalma) minden egyes művelet során csökken. Így a morfológiai eljárások alkalmasak alacsony entrópiájú statisztikák készítésére, de óvatosan kell kezelni az érzékeny statisztikákat.

B. függelék

Felhasználói dokumentáció

A sok tesztelési kör miatt az implementáció felhasználói felülete a szokásosnál komolyabb.

A fentiekén kívül az implementáció kifejlesztése mellett elkészült egy olyan felhasználói felület is, amivel elkészíthetők közvetlenül azok a grafikonok, amelyek egy releváns biológiai kutatás során belekerülnének akár a végső publikációba (B.3.2 dashboard)

B.1. Szoftverkövetelmények, letöltés

B.1.1. Futtatás Windows alatt

A program Windows operációs rendszer alatt futtatható változata egy egyszerűen használható önkicsomagoló program formájában kerül terjesztésre.

A bináris változat letölthető itt: <https://github.com/lezsakdomi/gfp-ring-detector/releases>
(Forráskód: github.com/lezsakdomi/gfp-ring-detector)

A legutóbbi automatikus build letölthető a következő linkkel, amennyiben az elmúlt 90 napban volt frissítés: <https://bit.ly/gfp-ring-detector-downloader>

B.1.2. Futtatás Linux alatt (csak fejlesztőknek javasolt)

A forráskódból való futtatáshoz szükség van az Anaconda telepítésére illetve egy új környezet létrehozására az `environment.yml` alapján.

Ezután az adott környezet aktiválását követően indítsuk el választásunk szerint a `server.py` vagy `interactive-server.py` programot.

B.2. Fájlformátumok

A program az AxioImager M1 és M2 programokkal képes együttműködni. Az alábbiakban a felvétel szó olyan mappákat takar, amelyeket az AxioImager M1 vagy M2 program segítségével lehet létrehozni felvételek TIFF fájlként való elmentése funkció használatával. Ilyen mappaformátum az AxioVision program 4-es verziójával is produkálható, amely könnyebben beszerezhető mint az AxioImager M1 ill. M2.

A más módon létrehozott, hasonló szerkezetű mappák hivatalosan nem támogatottak, azonban jó eséllyel működnek, egyedül a mappák és a TIFF fájlok nevére érdemes odafigyelni, ha valaki ezzel próbálkozna.

A fő program ún. `stats.txt` és `stats.csv` fájlokat hoz létre, amelyek más módon is előállíthatók, ha valaki csak a *dashboard* komponenst szeretné használni.

B.3. A program használata

B.3.1. Fő program

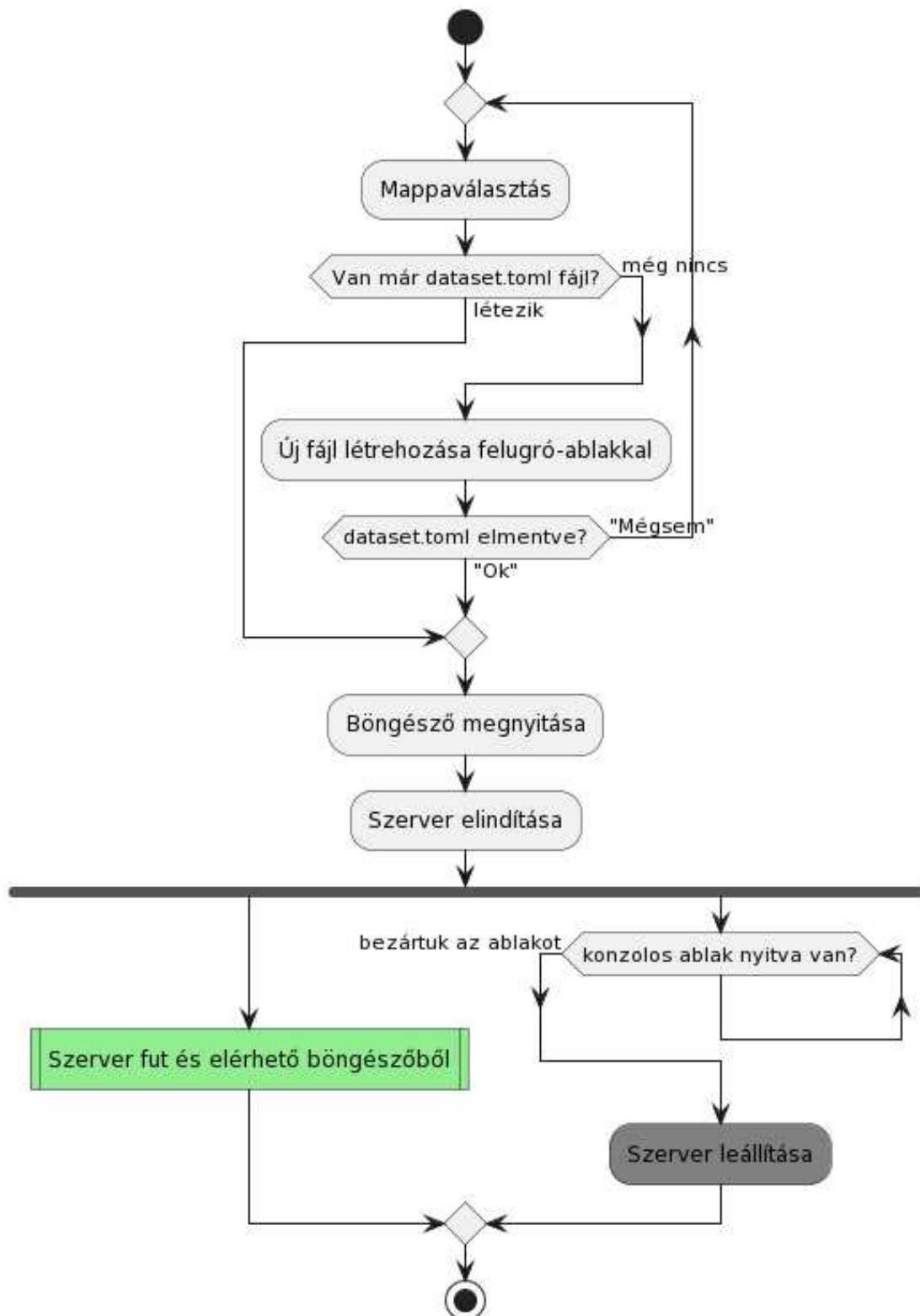
Áttekintés

A program webes felületről használható.

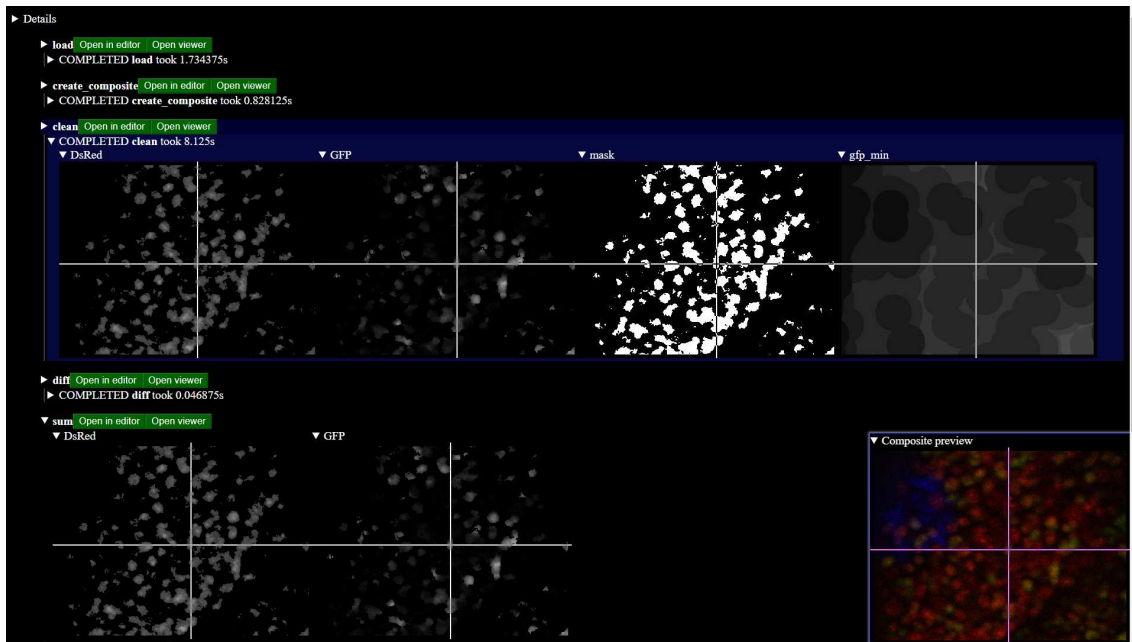
Indításkor pár felugró dialógus ablakban ki kell választanunk, hogy melyik mappában találhatóak az elemezni kívánt fájlok („dataset”), továbbá a a program megkérdez néhány, az adathalmazra vonatkozó információt, majd megnyílik egy böngészőablak, amelyben betöltődik a program webes felülete.

Ez alatt megnyílik egy konzolos ablak, amelyben a program az esetleges hibaüzeneteket élénk tárja. A program leállításához ezt az ablakot kell bezárni. Mindaddig, amíg a konzolablak nyitva van, akár több fájl is megnyithatunk különböző lapokon (B.1 ábra).

Mivel a program egy webszervert indít el, a Windows tűzfal indításkor megkérdezheti, hogy szeretnénk-e engedélyezni a más gépekkel való kommunikálást. Ha azt szeretnénk,



B.1. ábra. A letölthető program használata



B.2. ábra. Képernyőkép a fő program felhasználói felületéről

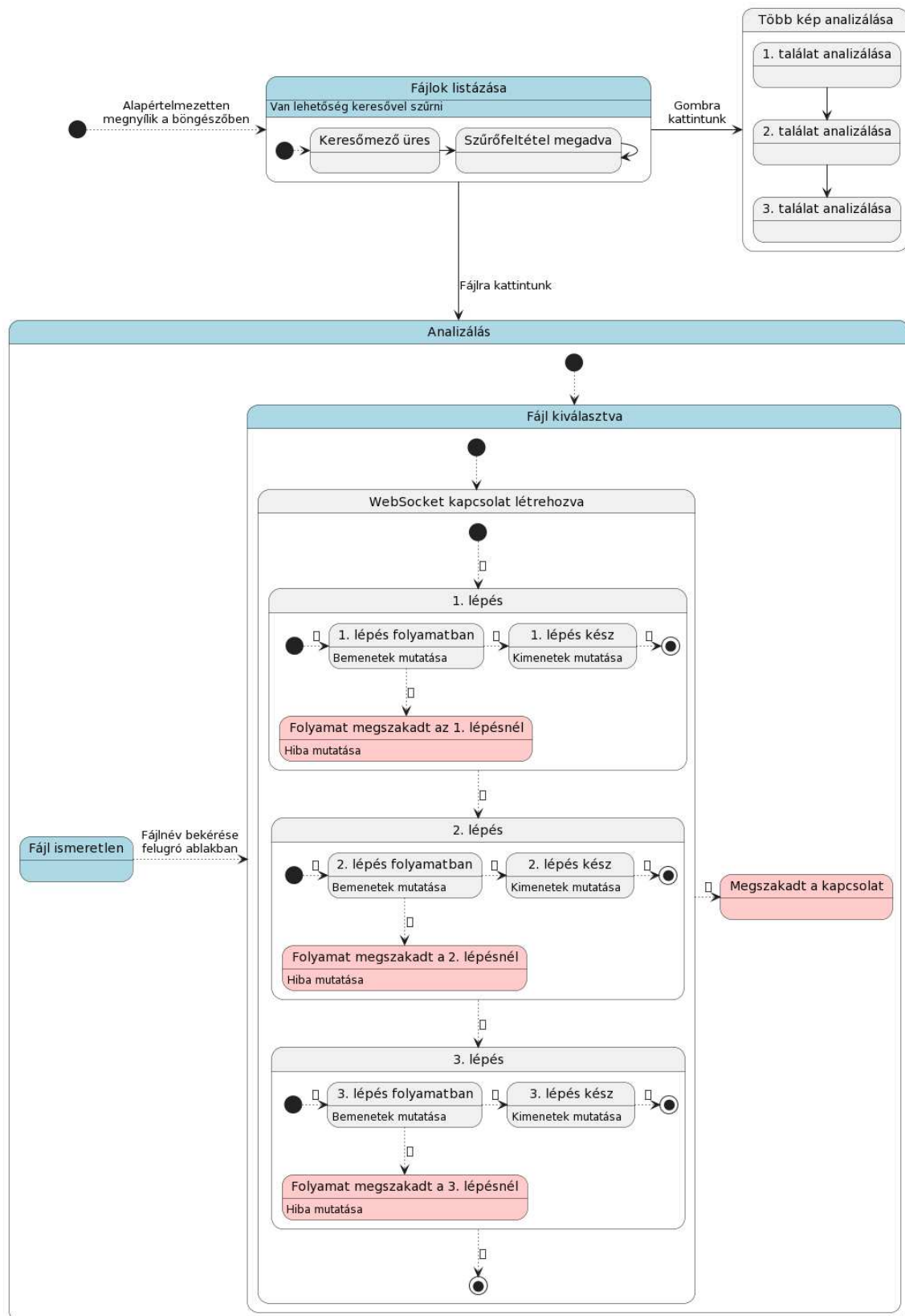
hogy a hálózatunkra kapcsolt más számítógépekről is vezérelni lehessen a programunkat, akkor engedjük át a programot a tűzfalon, ellenkező esetben ne. Sajnos a beállítás módosítása némileg körülményes, és legközelebbi indításkor nem fogja a Windows megkérdezni.

A webes felület használata

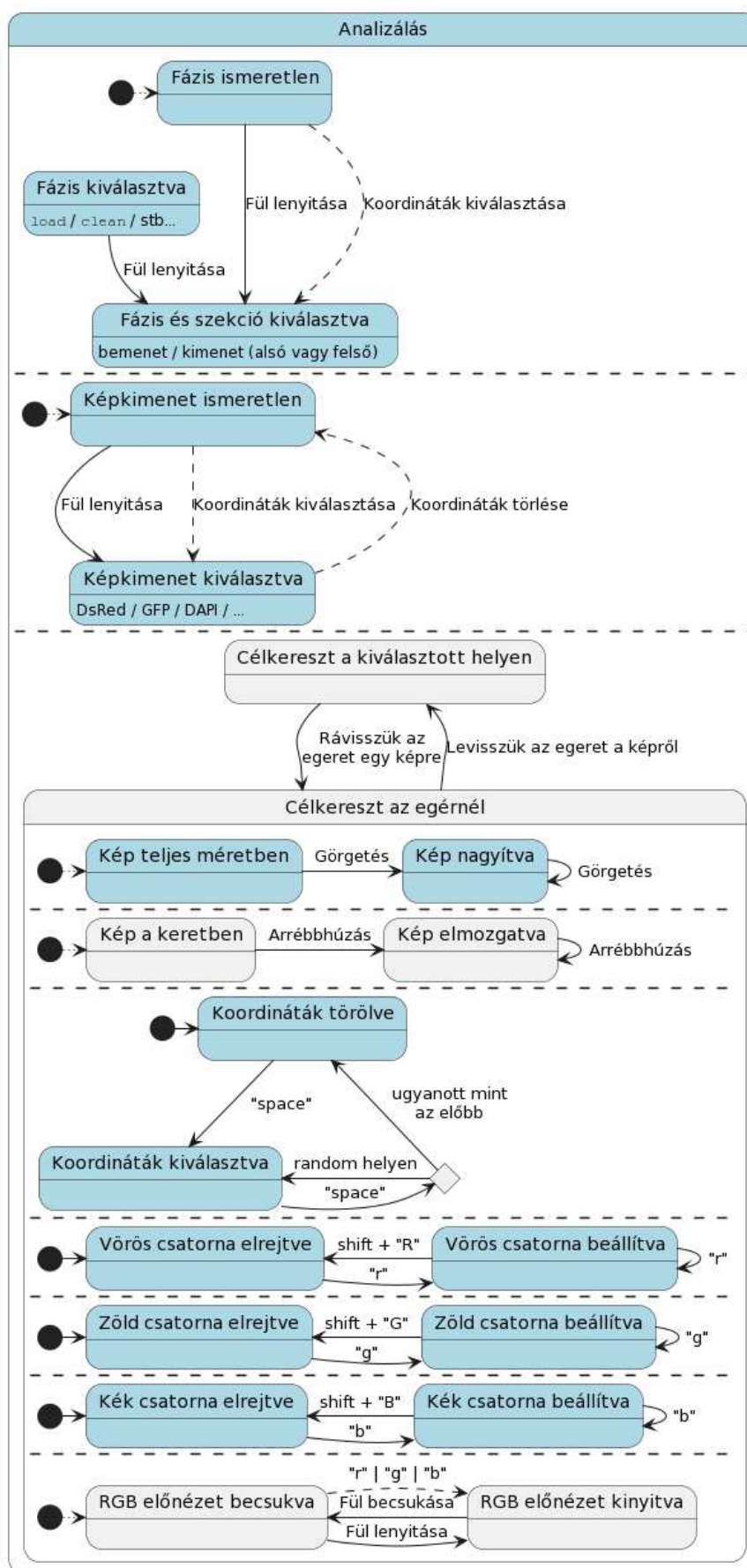
A program webes felületén lehetőség van az analizálandó felvételek listázására, egyedi képek analizálására. A fő felhasználói felület egy tipikus állapotáról készült képernyőkép látható a B.2 ábrán.

Ha kiválasztunk egy képet elemzésre, akkor egyrészt a webes felület WebSocket technológia használatával utasítja a konzolos alkalmazást analízis elkészítésére az adott képen, továbbá valós időben jeleníti meg számunkra a részeredményeket. *Mind az egyes lépések kimenetei és a bemenetei is láthatóak.*

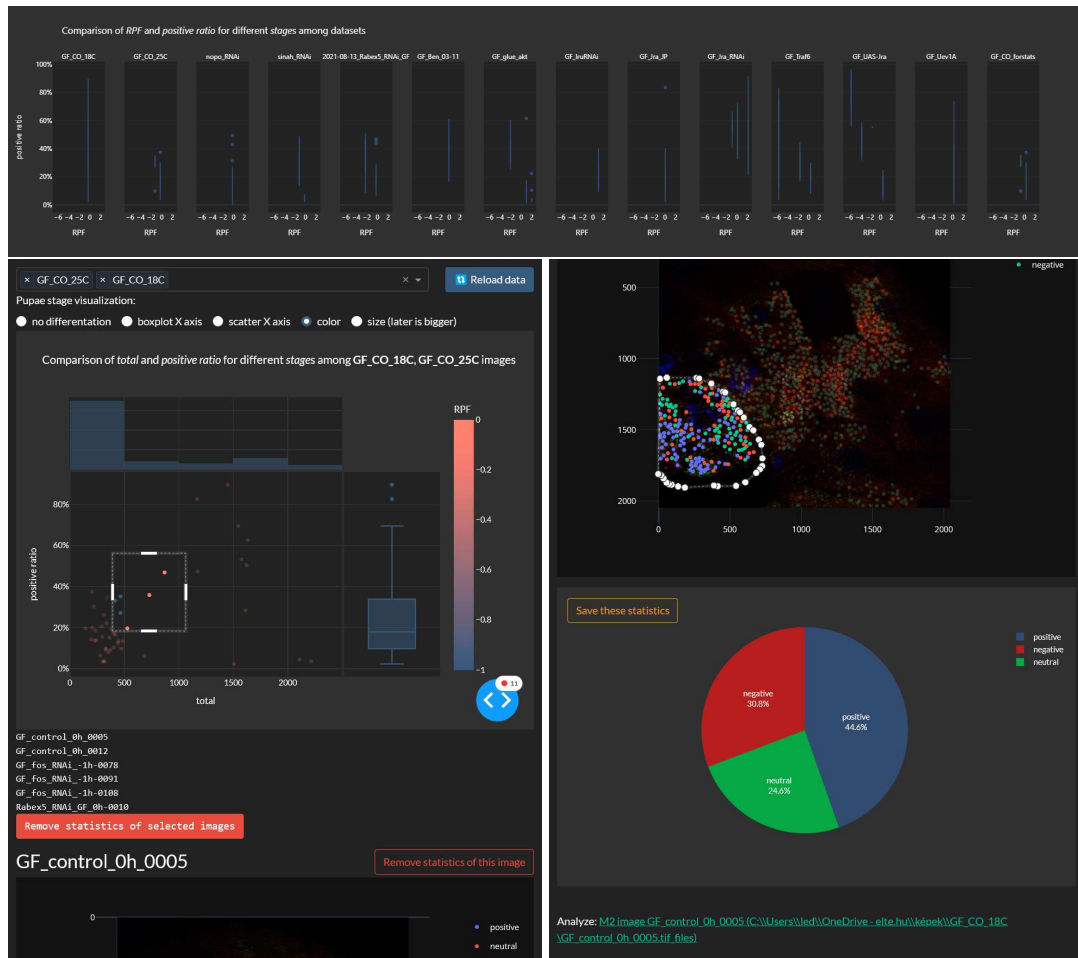
Ha rávisszük az egeret egy-egy képre, akkor van lehetőség nagyításra/kicsinyítésre (görgő), a kép arrébbhúzására, vagy akár színes kompozit létrehozására az r/g/b gombokkal, vagy a kompozit képen az egyes csatornák kikapcsolására ha ugyanezen gombok mellett nyomva tartjuk a shift gombot (B.3 ábra).



B.3. ábra. A felhasználói felület állapottai. A diagramon kékkel jelöltem azokat az állapotokat, amelyek megadhatóak akkor, ha a címsort átadjuk valakinek, esetleg elmentjük az oldalt könyvjelzőbe (1/2)



B.3. ábra. A felhasználói felület állapotai. A diagramon kékkel jelöltem azokat az állapotokat, amelyek megadhatóak akkor, ha a címsort átadjuk valakinek, esetleg elmentjük az oldalt könyvjelzőbe (2/2)



B.4. ábra. Néhány képernyőkép *dashboard* komponens felhasználói felületéről

Algoritmus A program korábbi verzióiról készült egy részletesebb leírás, ez elérhető a következő linken:

<https://bit.ly/gfp-ring-detector-v2-demo>

A program által végrehajtott algoritmust az 2.2 fejezetben ismertettem (2.1 ábra).

B.3.2. dashboard

A programnak egy olyan komponense, amely segítségével grafikonon tudjuk ábrázolni és vizsgálni az eredményeket. A B.4 ábrán látható néhány képernyőmentés a programkomponens tipikus diagramjairól.

Konfiguráció

A komponens több konfigurációs paraméterrel rendelkezik. Ezeket a `config.toml` fájlban adhatjuk meg.

A **datasets kulcs** vagy egy elérési utat, vagy pedig elérési utak listáját tartalmazhatja. Lista esetén a vizsgálandó adathalmazokat jelenti, közvetlenül megadott elérési út esetén olyan mappát, amely a vizsgálandó adathalmazokat tartalmazza. Egy adathalmaz egy mappát jelent, amelynek tartalma elkülönítve jelenik meg a grafikonokon (pl. külön boxplot, külön szín, stb.).

Alapértelmezett értéke a fő program elemzésre kiválasztott mappája, ami feltételezhetően adathalmazokat tartalmaz.

Az output **kulcs** egy opcionális mappa, ahova a kimeneti fájlok (grafikon, összesített CSV fájl) kerülhetnek. Alapértelmezetten a datasets kulcs értéke kerül ide, vagy ha az egy lista, akkor a fő programnál az elemzésre kiválasztott adathalmaz.

Megnyitás

A **dashboard megnyitása a fő programból** a fájllistázós nézetben az *Open dashboard* gombra kattintva lehetséges. A kezdeti betöltés lassú, mivel a program ilyenkor átnézi az összes almappát lehetséges felvételek után kutatva és megpróbálja beolvasni az összes felvétel `stats.txt` fájlját.

A **dashboard futtatása komponensként (fejlesztőknek)** megvalósítható a `plot.py` fájlból importált `get_app()` függvény meghívásával, ami egy Plotly Dash objektumot ad vissza. Ennek a server mezője egy Flask szerver, ami rendelkezik egy `wsgi_server` mezővel, ami egyszerűen használható webes lekérések kiszolgálásához [54].

A **dashboard önálló programként való futtatása** megtehető a `plot.py` szkript megfelelő környezetben (`environment.yml` fájlban rögzített csomagok feltelepítését követően) való megnyitásával, ez azonban nem javasolt, mert így nem lehet átkattintani egy-egy pont analízisének vizsgálatára. A fő program memória- és elindulási igénye eltörpül a *dashboard* mellett.

Amennyiben a `plot.py` szkriptet önálló programként futtatjuk, az eredmények elmentésre kerülnek a konfigurációban megadott kimeneti mappában, `stats.csv` néven (amely nem követi a szokásos formátumot), és egy összefoglaló interaktív grafikon `stats.html` néven. Más módon ezen fájlok létrehozására nincs lehetőség.

Használat

A komponensben lehetőség van megadni az összehasonlítani kívánt adathalmazokat (alapértelmezetten az összes látszik), felvétel készítésének az előbábáb-állapot elérésétől számított időpont vizualizációjának módjára (ha nem választottunk ki adathalmazokat, akkor erre kevesebb lehetőségünk van a grafikon átláthatatlanságának elkerülése érdekében, ha valaki mégis azt szeretné, akkor ki kell választania az összes adathalmazt).

A megjelenített grafikonok letölthetők képként a grafikonok jobb felső sarkában lévő kamera ikonra kattintva, amely (egyéb hasznos ikonok mellett) csak akkor látszik, ha fölé visszük az egerünket. A grafikonok interaktívak, az egeret az elemek fölé húzva részletes információkat látunk és a jelmagyarázatban kattintva egy-egy adatsort könnyedén lehet elrejteni és megmutatni. Az egyes adatpontok kattinthatóak és kijelölhetőek, kijelölés előtt a szaggatott négyzet vagy lasszó ikonra kattintva az adott grafikont kijelölés módba kell léptetni.

A felső (felvételeket összesítő) grafikonon

Adatpontok kijelölése esetén vágólapra másolható formában a grafikon alatt megjelenik a kijelölt adatpontokhoz tartalmazó felvétel neve és egy gomb, amellyel eltávolíthatjuk azokat a statisztikából. A statisztikából való eltávolítás az adott felvételekhez tartozó `stats.txt` fájl törlését jelenti. A program újraindítása vagy a jobb felső sarokban lévő *Reload data* gombra kattintásig az adatok a grafikonokon maradnak. A gomb használata közben egy felugró figyelmeztetés jelenik meg a művelet destruktív jellegéről, ami lehetőséget ad a felhasználónak arra, hogy még meggondolja magát.

Adatpontra kattintás esetén kis várakozás után (ami közben a felhasználói élmény javítása érdekében egy valós információkon alapuló folyamatjelző sáv jelenik meg ha a folyamat hosszabban tart) a grafikon alatt egy újabb grafikon jelenik meg, amin láthatjuk az adatponthoz tartozó felvétel RGB kompozit képét, amire (az adott felvételhez tartozó `stats.csv` fájl létezése esetén) felkerülnek adatpontként a program által felismert granulumok is. Továbbá az alsó grafikon jobb felső sarkában megjelenik egy gomb, amellyel a kijelöléshez hasonló módon ki lehet zárni az adott felvételt a statisztikából.

A felvételt ábrázoló grafikon sikeres betöltése esetén az alatt megjelenik egy kördiagram is, amelyen a granulumok osztályozását láthatjuk. Ennek elsősorban a

felvételt ábrázoló grafikonon adatpontok kijelölése esetén van szerepe.

Az oldal alján megjelenik egy link, amellyel a fő programban elindíthatjuk a felvétel megismételt analízisét, ezáltal a felvételhez tartozó `stats.txt` és `stats.csv` alaphelyzetbe állítását.

A középső (felvételt ábrázoló) grafikonon

Adatpontok kijelölése esetén az alatta lévő kördiagramon a `stats.csv` fájlból betöltött adatok helyett a kijelölt adatpontok eloszlása jelenik meg. A kördiagram bal felső sarkában lévő gombra kattintva felülbíráلhatjuk az adott felvételhez tartozó `stats.txt` fájl tartalmát olyanra, hogy a kördiagramon mutatott információkat reprezentálja. Azonban fontos megjegyezni, hogy a fő program és a *dashboard* független, így a gombra mentés merőben más jellegű adatokat ment el, mint amik abba automatikusan belekerülnek. A kép kizárásának esetéhez hasonlóan, a program a művelet végrehajtása közben figyelmeztet a művelet destruktív jellegére.

Grafikon területén való kattintás esetén a megfelelő koordinátákra fókuszálva megnyílik a fő programban az adott felvétel analízise, az esetleges hibák felderítésének az érdekében.

Az alsó (kördiagram) grafikon nem tartalmaz kattintható és/vagy kijelölhető adatpontokat.

Irodalomjegyzék

- [1] Attila Boda. “A *Drosophila* Arl8 kis GTPáz szerepe a lizoszomális fúziós folyamatokban”. Dissz. Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2020. URL: https://edit.elte.hu/xmlui/bitstream/handle/10831/57032/doktori_ertekezes_BodaAttila.pdf.
- [2] Brendan Reed és tsai. “Lysosomal cathepsin creates chimeric epitopes for diabetogenic CD4 T cells via transpeptidation”. *Journal of Experimental Medicine* 218.2 (2020). DOI: 10.1084/jem.20192135.
- [3] Kevin Vivot és tsai. “Breaking Bad and Breaking Good: -Cell Autophagy Pathways in Diabetes”. *Journal of Molecular Biology* 432.5 (2020), 1494–1513. old. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.07.030.
- [4] Walter Halangk és tsai. “Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis”. *Journal of Clinical Investigation* 106.6 (2000), 773–781. old. DOI: 10.1172/jci9411.
- [5] *Csizmadia Lab – Krinofágia kutatócsoport*. 2022. URL: <https://csizmadialab.hu/> (elérés dátuma 2022. 11. 17.).
- [6] Robert E. Smith és Marilyn G. Farquhar. “LYSOSOME FUNCTION IN THE REGULATION OF THE SECRETORY PROCESS IN CELLS OF THE ANTERIOR PITUITARY GLAND”. *Journal of Cell Biology* 31.2 (1966), 319–347. old. DOI: 10.1083/jcb.31.2.319.
- [7] G. FRAENKEL és VICTOR J. BROOKES. “THE PROCESS BY WHICH THE PUPARIA OF MANY SPECIES OF FLIES BECOME FIXED TO A SUBSTRATE”. *The Biological Bulletin* 105.3 (1953), 442–449. old. DOI: 10.2307/1538461.
- [8] Manon Monier és Virginie Courtier-Orgogozo. “*Drosophila* Glue: A Promising Model for Bioadhesion”. *Insects* 13.8 (2022), 734. old. DOI: 10.3390/insects13080734.

- [9] Anna Dósa. “A K63-kapcsolt poliubiquitin lehetséges szerepe a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióban”. *BTDK Konferencia*. ELTE Biológus TDK, 2022.
- [10] Andrea Weckman és tsai. “Autophagy in endocrine tumors”. *Endocrine-Related Cancer* 22.4 (2015), R205–R218. DOI: 10.1530/erc-15-0042.
- [11] Tal Rouso, Eyal D. Schejter és Ben-Zion Shilo. “Orchestrated content release from *Drosophila* glue-protein vesicles by a contractile actomyosin network”. *Nature Cell Biology* 18.2 (2015), 181–190. old. DOI: 10.1038/ncb3288.
- [12] Jason Burgess és tsai. “AP-1 and clathrin are essential for secretory granule biogenesis in *Drosophila*”. *Molecular Biology of the Cell* 22.12 (2011). Szerk. Anne Spang, 2094–2105. old. DOI: 10.1091/mbc.e11-01-0054.
- [13] Tamás Csizmadia és tsai. “Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*”. *Journal of Cell Biology* 217.1 (2017), 361–374. old. DOI: 10.1083/jcb.201702145.
- [14] Talley J. Lambert. “FPbase: a community-editable fluorescent protein database”. *Nature Methods* 16.4 (2019), 277–278. old. DOI: 10.1038/s41592-019-0352-8.
- [15] Arwed Weigel, Detlev Schild és Andre Zeug. “Resolution in the ApoTome and the confocal laser scanning microscope: comparison”. *Journal of Biomedical Optics* 14.1 (2009), 14022. old. DOI: 10.1117/1.3083439.
- [16] Tamás Csizmadia és tsai. “Developmental program-independent secretory granule degradation in larval salivary gland cells of *Drosophila*”. *Traffic* (2022). DOI: 10.1111/tra.12871.
- [17] *imagej count objects - Google Search*. 2022. dec. 1-én, ELTENET-ről, inkognitó módú böngészőből elvégzett keresés alapján. 2022. URL: <https://www.google.com/search?q=imagej+count+objects> (elérés dátuma 2022. 12. 01.).
- [18] *ImageJ dokumentáció - Particle Analysis*. 2022. URL: <https://imagej.net/imaging/particle-analysis> (elérés dátuma 2022. 12. 01.).
- [19] Bognár Gergő. *Modell-alapú neurális hálók*. 2022. URL: https://gsd.web.elte.hu/lectures/bolyai/2022/modell/BG_Bolyai_20221019.pdf (elérés dátuma 2022. 12. 01.).
- [20] Arató Miklós. *Matematikai Statisztika előadás*. <https://amiklos.web.elte.hu/Oktatas/Matstat2022osz/>. Hozzáférés dátuma: 2022-12-01. 2022.
- [21] Giulia De Luca és tsai. “Re-scan confocal microscopy (RCM) improves the resolution of confocal microscopy and increases the sensitivity”. *Methods and*

- Applications in Fluorescence* 5.1 (2017), 15002. old. DOI: 10.1088/2050-6120/5/1/015002.
- [22] Dmitry Chetverikov. “COMPUTER VISION: GOALS, MEANS, AND PROBLEMS”. *Computer Analysis of Images and Patterns*. Szerk. Klaus Voss, Dmitry Chetverikov és Gerald Sommer. Berlin, Boston: De Gruyter, 1989, 11–14. old. ISBN: 9783112576205. DOI: doi:10.1515/9783112576205-004.
- [23] Jesse S. Aaron, Aaron B. Taylor és Teng-Leong Chew. “Image co-localization – co-occurrence versus correlation”. *Journal of Cell Science* 131.3 (2018). DOI: 10.1242/jcs.211847.
- [24] S. Bradbury. “Microscopical Image Analysis: Problems And Approaches*”. *Journal of Microscopy* 115.2 (1979), 137–150. old. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1979.tb00163.x.
- [25] David G. Lowe. “Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints”. *International Journal of Computer Vision* 60.2 (2004), 91–110. old. DOI: 10.1023/b:visi.0000029664.99615.94.
- [26] Mahdi Khosravy és tsai. “Morphological Filters: An Inspiration from Natural Geometrical Erosion and Dilation”. *Nature-Inspired Computing and Optimization*. Springer International Publishing, 2017, 349–379. old. DOI: 10.1007/978-3-319-50920-4_14.
- [27] Oxford Instruments. *Imaris (RRID:SCR_007370)*. URL: <https://imaris.oxinst.com/> (elérés dátuma 2022. 11. 17.).
- [28] Cheng-I Ma és Julie Brill. “Quantitation of Secretory Granule Size in Drosophila Larval Salivary Glands”. *BIO-PROTOCOL* 11.11 (2021). DOI: 10.21769/bioprotoc.4039.
- [29] Quorum Technologies. *Volocity Software*. 2021. URL: <https://www.volocity4d.com/> (elérés dátuma 2022. 11. 17.).
- [30] Shirin Nasr-Isfahani, Atefeh Mirsafian és Ali Masoudi-Nejad. “A New Approach for Touching Cells Segmentation”. *2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics*. 1. köt. 2008, 816–820. old. DOI: 10.1109/BMEI.2008.262.
- [31] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband és Kevin W Eliceiri. “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”. *Nature Methods* 9.7 (2012), 671–675. old. DOI: 10.1038/nmeth.2089.

- [32] Travis E. Oliphant. “Python for Scientific Computing”. *Computing in Science & Engineering* 9.3 (2007), 10–20. old. ISSN: 1558-366X. DOI: 10 . 1109 / MCSE . 2007 . 58.
- [33] Stefan van der Walt, S. Chris Colbert és Gael Varoquaux. “The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation”. *Computing in Science and Engg.* 13.2 (2011), 22–30. ISSN: 1521-9615. DOI: 10 . 1109 / MCSE . 2011 . 37. URL: <https://doi.org/10.1109/MCSE.2011.37>.
- [34] Stefan Behnel és tsai. “Cython: The Best of Both Worlds”. *Computing in Science and Engg.* 13.2 (2011), 31–39. ISSN: 1521-9615. DOI: 10.1109/MCSE.2010.118.
- [35] Siu Kwan Lam, Antoine Pitrou és Stanley Seibert. “Numba: A LLVM-Based Python JIT Compiler”. *Proceedings of the Second Workshop on the LLVM Compiler Infrastructure in HPC*. LLVM '15. Austin, Texas: Association for Computing Machinery, 2015. ISBN: 9781450340052. DOI: 10 . 1145 / 2833157 . 2833162.
- [36] Áron Kozák. “Buborékdinamika a hidrogéngyártásban: energetikai hatékonyság numerikus optimalizációja”. *Gépészmérnöki Kar, Áramlástan szekció*. BME Tudományos Diákkör, 2022. URL: <https://tdk.bme.hu/GPK/AT11/Buborekdinamika-a-hidrogengyartasban1>.
- [37] Claire McQuin és tsai. “CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology”. *PLOS Biology* 16.7 (2018). Szerk. Tom Misteli, e2005970. DOI: 10 . 1371/journal.pbio.2005970.
- [38] Evan Czaplicki. “Elm: Concurrent frp for functional guis”. *Senior thesis, Harvard University* 30 (2012).
- [39] Evan Czaplicki. *An Introduction to Elm*. 2018.
- [40] Mario Roederer, Robert Bowser és Robert F. Murphy. “Kinetics and temperature dependence of exposure of endocytosed material to proteolytic enzymes and low pH: Evidence for a maturation model for the formation of lysosomes”. *Journal of Cellular Physiology* 131.2 (1987), 200–209. old. DOI: 10 . 1002 / jcp . 1041310209.
- [41] Kenneth W. Dunn, Malgorzata M. Kamocka és John H. McDonald. “A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy”. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300.4 (2011), C723–C742. old. DOI: 10 . 1152 / ajpcell.00462.2010.

- [42] HK Yuen és tsai. “Comparative study of Hough Transform methods for circle finding”. *Image and Vision Computing* 8.1 (1990), 71–77. old. DOI: 10.1016/0262-8856(90)90059-e.
- [43] T.J. Atherton és D.J. Kerbyson. “Size invariant circle detection”. *Image and Vision Computing* 17.11 (1999), 795–803. old. ISSN: 0262-8856. DOI: 10.1016/S0262-8856(98)00160-7.
- [44] Daniel Kondermann. “Ground Truth Design Principles: An Overview”. *Proceedings of the International Workshop on Video and Image Ground Truth in Computer Vision Applications*. VIGTA '13. St. Petersburg, Russia: Association for Computing Machinery, 2013. ISBN: 9781450321693. DOI: 10.1145/2501105.2501114.
- [45] Stan Z. Li. *Encyclopedia of Biometrics*. en. Springer US, 2009. ISBN: 978-0-387-73002-8.
- [46] Nobuyuki Otsu. “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms”. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9.1 (1979), 62–66. old. DOI: 10.1109/TSMC.1979.4310076.
- [47] *Thresholding – skimage v0.19.2 docs*. Felhasználási feltételek: <https://scikit-image.org/docs/0.19.x/license.html>. 2022. URL: https://scikit-image.org/docs/stable/auto_examples/applications/plot_thresholding.html (elérés dátuma 2022. 11. 23.).
- [48] Vincent Dumoulin és Francesco Visin. *A guide to convolution arithmetic for deep learning*. 2016. DOI: 10.48550/ARXIV.1603.07285.
- [49] Moo K. Chung. *Gaussian kernel smoothing*. 2020. DOI: 10.48550/ARXIV.2007.09539.
- [50] Kay Thwe Min Han és Bunyarit Uyyanonvara. *A Survey of Blob Detection Algorithms for Biomedical Images*. 2016. DOI: 10.1109/ictemsys.2016.7467122.
- [51] Henk J. A. M. Heijmans. “Mathematical Morphology: A Modern Approach in Image Processing Based on Algebra and Geometry”. *SIAM Review* 37.1 (1995), 1–36. old. DOI: 10.1137/1037001.
- [52] Mariusz Jankowski. “Erosion, dilation and related operators”. *8th International Mathematica Symposium*. 2006, 1–10. old. URL: http://www.internationalmathematicasymposium.org/IMS2006/IMS2006_CD/articles/Jankowski.pdf (elérés dátuma 2022. 11. 24.).

- [53] Wolfram Research, Inc. *Mathematica, Version 13.1*. Champaign, IL, 2022. URL: <https://www.wolfram.com/mathematica>.
- [54] P.J. Eby. *Python Web Server Gateway Interface*. Techn. jel. 3333. 2010. URL: <https://peps.python.org/pep-3333/>.
- [55] J.K. Ousterhout. “Scripting: higher level programming for the 21st Century”. *Computer* 31.3 (1998), 23–30. old. ISSN: 1558-0814. DOI: 10.1109/2.660187.
- [56] A. Kaspers. “Blob Detection”. Dipl. Utrecht University, 2011. DOI: 20.500.12932/6944.
- [57] Tom M. Apostol. *Calculus*. en. John Wiley & Sons, 1967. ISBN: 0471000051.

Ábrák jegyzéke

- 1.1. A kvantifikációs probléma, a különböző színű foltok számolása. Oszloponként ugyanannak a háromszínű felvételnek három különböző projekciója látható: A felső képen az összes szín látható, amit kettébontottam: A második sorban csak a magenta (*szekrétációs granulumokat* jelölő) és a kék (sejtmagokat jelölő) színt komponens, az alsó sorban azonban csak a zöld (*pozitív szekrétációs granulumokat* jelölő) színt komponens szerepel. Az ábráról szemrevételezéssel is leolvasható, hogy a bal oldalhoz képest a jobb oldalon több magenta színben látható folt zöld színben is látszik. A kutatásom fő kérdése: Pontosan hány darab folt (*szekrétációs granulum*) látható, és ezek közül mennyi zöld (kísérlet szempontjából *pozitív* minta) is és mennyi csak magenta színű (kísérlet szempontjából *negatív* minta)? (A felvételek fluoreszcens mikroszkóppal készültek kontroll (bal oldal) és géncsökkentett ($Vps41^{RNAi}$ -kezelt) (jobb oldal) fiatal *Drosophila melanogaster* bábok nyálmirigy-sejtjeiről. A magenta szín DsRed, a zöld szín GFP és a kék szín DAPI jelét mutatja [5]). 5

- 1.2. A kísérleti modellállat bemutatása. Balról jobbra sorban először egy muslicák fenntartására szolgáló üvegcsövet, majd abban pár kifejlődés előtt álló lárvát, utána lárvák nyálmirigyeit láthatjuk különböző nagyításokban. A képeken lévő állatok transzgénikusak, nyálmirigyeik magenta színűnek látszanak, ami a középső képen szabad szemmel is kivehető. A jobb szélső, nagyobb nagyítású képek hasonlóak, de azokon csak a *szekrétációs granulumok* beltartalma került géntechnológiával megjelölésre, így a granulumok elkülöníthetőek, cserébe a magenta szín csak speciális mikroszkópon keresztül látható. Néhány granulum zöld színben is feltűnik egy másik, mesterséges jelölésnek köszönhetően. (A kék vonalak tájékoztató jellegűek, mindegyik képen másik egyedről készült felvétel. A fekete méretvonallal jelölt képeken +;fkh-Gal4,UAS-6XmCherry transzgénikus *Drosophila melanogaster* lárvák láthatóak (háttérben sötét színnel két fiatal, kifejllett példány), ennek köszönhetően a nyálmirigyeikben lévő granulumok magenta színben világítanak már látható fényben is. A fehér méretvonallal jelölt képeken hasonló (*GlueFlux* jelzőrendszerrel ellátott) lárvák kiboncolt nyálmirigye látható fluoreszcens mikroszkóp alatt, aminek az esetében a kibocsájtott fény valójában 575 nm-es hullámhosszon a legerősebb, a magenta színt csak a kontrasztarány növelése érdekében végzett szoftveres utószínezésnek köszönhetően kapjuk.) 7
- 1.3. A *krinofágia* folyamata leegyszerűsítve. A szekrétációs granulumok a szekrétó (normális folyamat) helyett a *krinofágia* útjára is léphetnek [9] . 8
- 1.4. Az általam megfigyelt kísérletek során leggyakrabban használt *fluoreszcens markerrendszer*. Kék, zöld és narancssárga színnel rendre a DAPI, GFP és DsRed jelölőanyagok fénykibocsájtási spektruma látható egy diagramon ábrázolva. Az én képeimen csak ez a rendszer van használatban, más kísérletek esetén más *fluoreszcens markerrendszer* is előfordulhat. A grafikon az FPbase Spectra Viewer segítségével készült [14]. (A vízszintes tengelyen a fény hullámhossza szerepel 375-től 750 nm-ig, a függőleges tengelyen pedig az egyes anyagok fluoroflórjai által az adott hullámhosszon kibocsájtott fény (normalizált) intenzitása látható) 10

1.5. <i>Fluoreszcens</i> markerek egyesítése. <i>Drosophila melanogaster</i> nyálmirigypár, az 1.4 ábra szerinti <i>fluoreszcens</i> markerrendszerben: DsRed magenta, GFP zöld és DAPI kék színnel ábrázolva, először színenként, majd egyesítve. A háttér fekete marad, mivel a minta megvilágítása mindig más hullámhosszon történik mint amilyen színben a jelölőanyagok fluoreszkálnak	11
1.6. A <i>GlueFlux</i> jelzőrendszer működése. Az idő előrehaladtával a fehér színű granulumok száma csökken, és egyre több magentává válik, ezt a jelenséget a granulumok beltartalmának elsavasodása okozza. A középső sorban sematikus ábrák, az alsó sorban pedig valódi mikroszkópos felvételek láthatóak. A kép forrása Dósa Anna 2022-es biológia TDK előadása [9], némi átalakítással	12
1.7. Magenta-zöld-kék és vörös-zöld-kék színezés összehasonlítása. Bal és jobb oldalon ugyanaz az információ látható, azonban jobb oldalt könnyebb összehasonlítani az első két csatornát.	12
1.8. Apotome és szeletelés nélküli (Widefield) képkészítési technológiák összehasonlítása. A bal oldalon a nyíllal jelölt objektumok jobban kivehetőek annak köszönhetően, hogy nincsenek egyéb rétegből származó zavaró jelek. („Egy 70µm vastag szelet <i>X. laevis</i> ebihalról. Kék: sejtmag (DAPI [DP]), zöld: idegek (Alexa Fluor 488 lekövetés (tracing [TR])), sárga: dendritek (Alexa Fluor 546 biocytin visszakövetés (backtracing [BT])), vörös: aktin-szálak (Alexa Fluor 647 phalloidin immunfestés [PH]). (a) ApoTome képkészítéssel és (b) szokásos epifluoreszcens kép.” Az ábra forrása Weigel, Schild és Zeug munkája [15])	13
2.1. Összefoglaló folyamatábra a modellemet megvalósító algoritmusról (1/2)	25
2.1. Összefoglaló folyamatábra a modellemet megvalósító algoritmusról (2/2)	26
2.2. DAPI <i>fluoreszcens</i> marker intenzitása egy képen, eredeti változatban (bal felső), közvetlenül limitálva (jobb felső) és <i>Gauss-elmosás</i> (<i>gaussian blur</i>) ($\sigma = 5$) után (bal alsó) illetve azután limitálva (jobb alsó). A maszkolás során a jobb alsóhoz változatot használok fel ebből a csatornából	28

2.3. Maszkolás. Az első a beolvasott (load) felvétel, második képen a maszkolás előtti DsRed (vörös), GFP (zöld) síkok és a generált mask sík (kék), a harmadik képen pedig maszkolás utáni DsRed (vörös) és GFP (zöld) látható. A felvétel tetején lévő sejt granulumjainak nagy része nincsen benne a fókuszsíkban, így a lépés után az eltűnik.	29
2.4. Felismert granulumok vizualizációja. Az első képen a vörös illetve zöld csatornán a betöltött nyers adatok láthatóak, kék színnel pedig a felismert granulumok vannak jelölve (all sík); a második képen a vörös csatornát emelem ki; az alsó sorban a felső képek tetejének (cián keret) kinagyított változata látható. Ideális esetben kék jelölő éppen kvantifikálásra alkalmas granulumokra van elhelyezve. A második képről leolvasható, hogy a felső-középső részen sok <i>szekeciós granulum</i> nincsen fókuszban, így csak 1-2 kék jelölőt látunk azon a régióban, azonban közelről megnézve az elhelyezett jelölők éppen értékelhető granulumokat takarnak.	33
3.1. Kontroll és megismételt géncsendesítés (Iru^{RNAi}) összehasonlítása, y tengelyen a <i>pozitív</i> granulumok arányával az összeshez viszonyítva. Amennyiben az elképzelések helyesek, mind a két minta pozitivitása alacsony.	37
3.2. Megismételt kísérlet kontroll (kék) és géncsendesített (Iru^{RNAi}) (piros) felvételeinek összehasonlítása, y tengelyen a <i>pozitív</i> granulumok aránya, x tengelyen az összes granulum száma az adott felvételen.	38
3.3. Géncsendesített (Iru^{RNAi}) és különböző kontrollfelvételek összehasonlítása, y tengelyen a <i>pozitív</i> granulumok arányával az összeshez (x tengely) viszonyítva. Kék színnel a 18°C-os környezetben végrehajtott kontrollkísérlet, piros színnel a 25°C-os környezetben végrehajtott összes korábbi kontrollkísérlet közül a közeli felvételek, zöld színnel pedig a géncsendesített törzs felvételei. Az új felvételeken (kék és zöld) a granulumok magas számának a magyarázata az, hogy a gyors közbelépésemnek köszönhetően nagyobb területet felölelő felvételek kerültek mentésre.	38

3.4. Különböző hőmérsékleten végzett géncsendesített (<i>Iru^{RNAi}</i>) és kontroll felvételek összehasonlítása, y tengelyen a <i>pozitív</i> granulumok arányával az összeshez (x tengely) viszonyítva. Piros és zöld színnel a 25°C-on végzett kontroll és kísérleti csoport eredményei, míg kék és sárga színnel a 18°C-on végzett kontroll és kísérleti csoport eredményei.	38
3.5. A LampRing rendszer működése. A középső sorban sematikus ábrákkal, az alsó sorban pedig mikroszkópos felvételeken követhető nyomon a gyűrűk kialakulásának folyamata LampRing rendszer esetén [9]. A magenta szín DsRed jelre, a zöld pedig GFP jelre utal.	40
3.6. Az eredeti implementáció működése. A konklúziót az utolsó panelről lehet levonni, amelyen vörös színnel a membránok, zöld színnel pedig a gyűrűk láthatóak, a két szín keverékéből a színárnyalat alapján meg lehet mondani, hogy a narancssárga az pozitív, GFP gyűrűs granulumot, míg a vörös az negatív, GFP gyűrű nélküli granulumot jelöl.	41
3.7. A vörös és a zöld csatornán a szokásos GFP és DsRed látható, a kék csatornán azonban <i>MI</i> segítségével mesterségesen előállított gyűrűk . . .	44
A.1. Kép szorzása skalárral. A jobb oldali képen színenként az intenzitás kétszer akkora, mint a bal oldalon.	51
A.2. Képek kivonása egymásból. A fenti három képen rendre ugyanannak a felvételnek a vörös (DsRed) és kék (DAPI) csatornája, illetve a kettő különbsége látható, alatta pedig a vörös csatornán a különbség, a kéken pedig az eredeti vörös csatorna. A sejtmaggal átfedésben lévő <i>szelekciós granulumok</i> némileg kékesebbek, halványabbak. A képek szélessége nagyjából 25µm	52
A.3. DAPI <i>fluoreszcens marker</i> intenzitása egy képen, limitálás előtt és után. A kör alakú formákból sejtmagok jelenlétére következtethetünk. A különbség nem szembetűnő, de ha keresünk a bal oldali képen nagyon halvány részeket, azok a jobb oldali képen hiányoznak, továbbá a világosabb részek a jobb oldalon sokkal világosabbak. A későbbiekben be fogok mutatni szembetűnőbb különbséget eredményező módszereket is.	53

A.4. Lokális limitálás (thresholding) sokkal jobb eredményeket hoz változó kontrasztú kép esetén. A felső képen egy könyvről készült fotó látható, alatt a globális limitálás majd legalul lokális limitálás. A limitálás során a felbontás romlani látszik, de ez csak információvesztésre utal (dimenziócsökkenésre). Lokális limitálás esetén a legkevesebb a hiba. A kép forrása: skimage dokumentáció [47]	55
A.5. Egy 11x11-es méretű, $\sigma = 3$ paraméterű <i>Gauss-kernel</i> és annak $y = 0$ vonal menti metszete	56
A.6. Egy kép és annak <i>Gauss-elmosás (gaussian blur)</i> utáni változata. A harmadik képen a vörös csatornán az eredeti, a zöld csatornán pedig az elmosott változat látható, a képet jobban megfigyelve feltűnhet, hogy a granulumok nagy része sárga (piros + zöld), csak az átlagosnál nagyobb intenzitású granulumok kapnak pirosas árnyalatot.	56
A.7. A <i>Difference of Gaussians (DoG)</i> művelet szemléltetése. Egy kép eredeti, elmosott változata majd az eredeti és az elmosott különbsége. Alatta a különbség abszolút értéke látható, amelyen minden lokális elváltozás kirajzolódik. Legalul a vörös csatornán az eredetiből vonom ki az elmosottat, míg a zöld csatornán fordítva, így a vörös csatornán a <u>lokális intenzitásnövekedések</u> , míg a zöld csatornán a <u>lokális intenzitáscsökkenések</u> rajzolódnak ki.	57
A.8. Az <i>erózió</i> és a <i>diláció</i> . A második ábrán az első ábra erodált változata, míg a harmadik ábrán a dilált változata látható, 5px sugarú kör alakú kernellel.	60
A.9. Az opening és a closing. A második ábrán az első ábra opening utáni változata, míg a harmadik ábrán a closing utáni változata látható, 5px sugarú kör alakú kernellel.	61
B.1. A letölthető program használata	64
B.2. Képernyőkép a fő program felhasználói felületéről	65
B.3. A felhasználói felület állapotai. A diagramon kékkel jelöltem azokat az állapotokat, amelyek megadhatóak akkor, ha a címsort átadjuk valakinek, esetleg elmentjük az oldalt könyvjelzőbe (1/2)	66

B.3. A felhasználói felület állapotai. A diagramon kékkel jelöltem azokat az állapotokat, amelyek megadhatóak akkor, ha a címsort átadjuk valakinek, esetleg elmentjük az oldalt könyvjelzőbe (2/2)	67
B.4. Néhány képernyőkép <i>dashboard</i> komponens felhasználói felületéről . .	68

Szójegyzék

Drosophila melanogaster Közismert nevén ecetmuslica, előszeretettel használt modellállat biológiai kutatásokban a gyors reprodukciós rátájának és alacsony fenntartási költségeinek köszönhetően. 5, 7, 11, 78–80, 86

dashboard A program egy elkülönülő komponense, amely alkalmas nagy mennyiségű kvantifikációs adat vizualizálására, esetleg a fő programmal való kommunikációra. 24, 31, 32, 46, 63, 68, 69, 71, 84

dekonvolúció A mikroszkópos képek zajának és torzításának csökkentése. Minden lencsének van egy torzítása és zaja. A leggyakrabban használt fluoreszcens mikroszkópok képesek nem csak felülnézeti vetületről, hanem akár mélyebb rétegekből való képalkotásra is. Szerencsére a mikroszkóp torzítása invertálható, a zajszűrésre azonban bonyolultabb heurisztikák szükségesek, amelyek nem képzik tárgyát ennek a dolgozatnak. 19

diláció Morfológiai művelet. Teljes *kernel* mentén végzett minimum-keresés. Megfelel a minkowski-különbségnek [51]. 59, 60, 83

DoG Difference of Gaussians. 31, 45, 49, 57, 58, 83

DoH Difference of Hessians. 31, 58

ELTE ASF ELTE Biológiai intézet Anatómiai Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék. 17, 36, 49

erózió Morfológiai művelet. Teljes *kernel* mentén végzett maximum-keresés. Megfelel a minkowski-összegnek [51]. 60, 83

flood-fill algoritmus Tükörfordításban elárasztó-kitöltő algoritmus. Egyszerű algoritmus a kontúrral körbezárt terület kijelölésére. Iteratív eljárás, amelynek

kiindulópontja egy olyan pontnak az egyelemű halmaz, amely benne van a kitöltendő területben, és amelyben minden iteráció során hozzávesszük a halmaz elemeinek nem-kontúr szomszédait. 42

fluoreszcens marker Olyan mesterséges jelölőanyag, ami adott hullámhosszú fénnel való megvilágítás hatására más hullámhosszú fényt bocsájt ki. A vizsgált képeken (jó esetben) csak ilyenek látszanak. 9–11, 14, 27, 28, 30, 31, 53, 79, 80, 82, 86

Gauss-elmosás (gaussian blur) *Gauss-kernelel történő konvolúció.* 27–29, 54, 56, 80, 83

Gauss-kernel Olyan *kernel*, aminek a vonalmenti metszetének az intenzitása a σ szórású normális eloszlás eloszlásfüggvényét követi. Egy-egy elemét a következő képlet írja le: $K[x, y] = e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$. 56, 83, 86

Glue Olyan ragasztószerű, cukoroldalláncokat tartalmazó anyag összessége, amelyet a *Drosophila melanogaster* lárva a bábozódás során önmagának környezethez való rögzítéséhez használ [8] [7]. A tárgyalt biológiai kísérletben [13] a szekréció folyamán ilyen anyag kerül kiürítésre. 8–10, 86

GlueFlux jelzőrendszer Olyan *fluoreszcens markerrendszer*, amely magéntában fluoreszkáló DsRed fehérjét és a zöldben fluoreszkáló GFP fehérjét is hozzáköti a *szekréciós granulumok*ban fellelhető *Glue*hoz, így az a *Glue*, amely savas, fehér (magenta+zöld, DsRed+GFP) színben látszik, amely azonban savas, csak magéntában [13]. 7, 10, 12, 29–32, 37, 39, 46–48, 79, 80

ground truth Magyarra alapigazsággként fordítható. Statisztikai és gépi tanulási szakkifejezés, olyan információ, amiről axiómaként feltehető, hogy igaz. A képfeldolgozásban olyan felvételeket jelent, amelyek a feldolgozandó képeknél nagyságrendekkel pontosabbak. [44] Én a kifejezést a hagyományos értelemben használom, tehát olyan információkra, amelyekről egy szakértő kijelentette, hogy igazak. 35, 36

hiperparaméter Mesterséges intelligencia szakkifejezés. Olyan paraméter, amelynek értékét csak kísérletezéssel lehet meghatározni, nem számítható ki más paraméterek függvényében. 32

- kernel** Egy kisebb adatmátrix amely rávetíthető egy kép összes pixelének egy környezetére. Általában a kép széleihez közel levő pixelek speciális kezelést igényelnek, mert azok környezete nem feltétlenül része a képnek. 54, 59, 60, 85, 86
- konvolúció** A képfeldolgozás egyik legsokoldalúbb alapvető művelete. Ez egy bináris képtranszformációs művelet képek és adatmátrixok (ún. kernelek) között, amely során az összes pixelre a környezetük és az adatmátrix között skaláris szorzatot képzünk [48]. 54, 59, 86
- krinofágia** A sejtekben természetes körülmények között lezajló folyamat, amely során *lizoszómák* közvetlenül egyesülnek a kiürülésre váró *szekrétációs granulumokkal*. 7–10, 14, 46, 79
- lizoszóma** Egy membránnal határolt sejtservecske, amiben emésztőenzimek vannak. 8, 87
- LoG** Laplace of Gaussians. 31, 58
- magas szintű** Azokat a programozási nyelveket nevezzük $\sim$ nek, amelyekben egy-egy utasítás több száz-ezer gépi utasítást takar [55]. A doglozatomban a kifejezést átvitt értelemben alkalmazom, $\sim$ modell alatt olyan modellt értek, aminek egyes részlépései hasonlóak egy magas szintű programozási nyelv egyes utasításaihoz. 21
- MI** mesterséges intelligencia. 44, 46, 82
- negatív** (a dolgozatomban) olyan *szekrétációs granulumok*, amelyek elsavasodtak, így nem tartalmazzak GFP jelet, csak DsRed-et. 5, 14, 16, 32, 34–36, 47, 78
- pipeline** Jól elkülöníthetően lépcsőzetesen egymásra épülő blokkokból álló algoritmus. 22, 87
- pipeline_lib.py** Egy önálló keretrendszer mely a munka melléktermékeként készült. Alkalmas *pipeline* algoritmusok implementálására. 22, 23, 46
- plane** Sík. Az implementációmban használt angol szó egyes eltárolt képváltozatok jelölésére. 27

pozitív (a dolgozatomban) olyan *szekeációs granulumok*, amelyek nem savasodtak el, így tartalmaznak GFP és DsRed jelet is. 5, 14, 16, 32, 34–39, 47, 78, 81, 82

RPF time Relative to Puparium Formation. 39

sarokdetektálás (blob detection) Alacsony szintű 2D-s vagy 3D-s struktúrák felismerése képeken [56]. Ez a gyakorlatban éppen átvilágított gömbök elmosott vetületére illik legjobban, amely pontosan megfelel a *szekeációs granulumok* fluoreszcens mikroszkópon keresztül látott változatának. 31, 57, 58

scale-space A kép paraméteres transzformáltjainak összessége, ahol a paraméter megfeleltethető a kép méretezésének [25]. Egy képfeldolgozási megközelítésként is értelmezhető. 31, 58

szakértői modell Olyan modell (bizonyos adatok alapján bizonyos predikcióra alkalmas komplex (bonyolult) függvény / algoritmus), amelynek az előállítása szakértőktől származó információk alapján történt. 6, 9, 15, 17, 24, 32, 46–48

szekeációs granulum Membránnal határolt váladékszemcse. 4–8, 10, 14, 16, 18, 29, 30, 33, 47, 48, 52, 78, 79, 81, 82, 86–88

trichotóm összehasonlítás Két valós szám között a $<$, $>$, $=$ relációk közül pontosan egy áll fenn, a $\sim$ ezek közül a megfelelő kiválasztása [57]. 30

unió Két halmaz egyesítése. Például az $\{1,2\}$ és $\{2,3\}$ halmazok $\sim$ ja $\{1,2,3\}$. Matematikai jelekkel: $\{1,2\} \cup \{2,3\} = \{1,2,3\}$. 16, 31