

Jarosław Gocławski*, Patryk Anioł**

Metoda segmentacji obrazów jąder komórkowych roślin w cytometrii DNA z heterogenicznym rozkładem wewnątrz jądra

1. Wprowadzenie

Pomiary DNA metodami cytometrycznymi mają duże znaczenie w medycynie i biologii przy diagnozowaniu złośliwych nowotworów, wykrywaniu patologii tkanek, obecności antygenów, a także różnego typu zakłóceń i anomalii w procesach wzrostu roślin [4, 15]. Pozwalają także różnicować plemniki na męskie i żeńskie ze względu na inną zawartość DNA w ich jądrach. Diagnostyka patologii opiera się o badanie odchyień od spodziewanego kształtu histogramu gęstości optycznej badanej populacji jąder komórkowych. Całkowa gęstość optyczna IOD (*Integrated Optical Density*) jądra komórki odniesiona do gęstości jądra wzorcowego o znanej masie DNA [1] stanowi miarę zawartości DNA.

Wielkość IOD_N dla danego jądra komórkowego N definiuje się jako

$$IOD_N = \sum_{p(x,y) \in N} \frac{I_{LUM}(x,y)}{I_{REF}(x,y)} \quad (1)$$

gdzie:

$I_{LUM}(x,y)$ – wartość luminancji w punkcie $p(x,y)$ barwnego obrazu jądra,
 $I_{REF}(x,y)$ – wartość luminancji tła w punkcie $p(x,y)$.

Dokładność wykonywanych pomiarów IOD determinuje przede wszystkim etap segmentacji obrazów jąder. Mianem segmentacji określa się proces podziału pola obrazu na podobszary jednolite ze względu na wybrane kryteria rozróżniające.

Rozważane obrazy jąder komórkowych składają się z jasnych obszarów tła i ciemniejszych obiektów jąder o znacznej dynamice zmian jasności. Metody segmentacji jąder komórkowych w celu pomiaru DNA znane z literatury [2, 15] dotyczą obrazów mikroskopowych zbieranych przy małych powiększeniach ($10\times$ lub $20\times$) i w związku z tym zawierających wiele jąder w ramach pojedynczego kadru. Preparaty przygotowywane są zazwyczaj

* Katedra Informatyki Stosowanej, Politechnika Łódzka

** Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

w taki sposób, że nie występują w nich jądra sklejone lub nakładające się na siebie. Nie zawierają również istotnych artefaktów tła, które mogłyby być mylnie zaliczone jako obiekty podlegające pomiarowi. Stosuje się wówczas segmentację bazującą na wykrywaniu krawędzi obiektów, progowaniu tych krawędzi i wypełnianiu wnętrza. Następnie dokonuje się dyskryminacji wydzielonych obszarów na podstawie ich kształtu i pola powierzchni. Przy dużych wymiarach fizycznych obserwowanego pola preparatu bierze się pod uwagę i koryguje nierównomierność oświetlenia tła. W naszych badaniach zastosowaliśmy obiektywy o dużych powiększeniach (40×, 100×) i lokalne progowanie, unikając wyrównywania nierównomierności oświetlenia. Wykorzystywaliśmy preparaty wykonane z międzywęzłowych komórek glonów i komórek merystemu korzeniowego cebuli, które zatopiono w balsamie kanadyjskim. Zawierają one wiele artefaktów w tle, takich jak ściany komórkowe lub, w przypadku glonów, pozostałości okrzemków. Powyższe zjawiska wynikają przede wszystkim ze specyfiki wykorzystywanego materiału roślinnego. Uwzględnienie ich w algorytmie segmentacji umożliwia badanie wszystkich próbek bez ich wstępnej selekcji, co podwyższa obiektywizm uzyskiwanych wyników pomiaru.

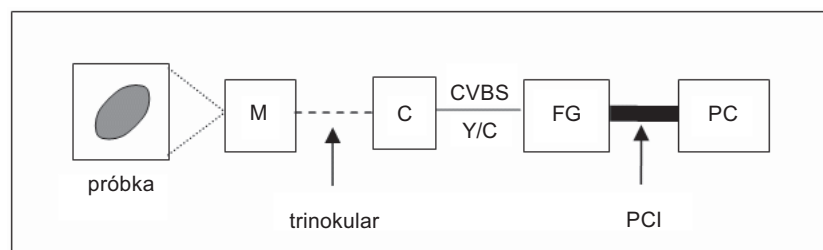
W ramach algorytmu segmentacji zaproponowaliśmy wstępną eliminację artefaktów poprzez manipulację w przestrzeni kolorów RGB analizowanego obrazu. Segmentację przeprowadza się w celu określenia profilu jądra, przed wyznaczeniem całkowitej gęstości optycznej IOD zgodnie z równaniem (1). Spośród znanych metod segmentacji wykorzystujących progowanie, detekcję krawędzi, klasteryzację, rozrost i podział obszarów wybrano metodę iteracyjnego progowania wielopoziomowego [3]. Jest ona najprostszą, najszybszą w realizacji programowej i wykorzystuje różne stopnie zaciemnienia profilu jądra, wynikające z nierównomiernej koncentracji DNA. Ponadto badane jądra nie posiadają żadnej widocznej jednolitej tekstury zachęcającej do próbowania innych metod. W przypadkach występowania grup jąder stykających się ze sobą krawędziami przeprowadza się ich separację z wykorzystaniem metody działów wodnych [13]. Jądra o nakładających się profilach nie są brane pod uwagę, bo nie nadają się do pomiaru zawartości DNA.

2. Akwizycja obrazu

Stanowisko badawcze cytofotometru do pomiaru całkowitej gęstości optycznych jąder komórkowych zostało opracowane dla laboratorium Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ. Składa się ono następujących modułów:

- mikroskopu optycznego OLYMPUS CH20 z halogenowym źródłem światła,
- kamery CCD SSC-DC50AP,
- karty akwizycji obrazu,
- komputera PC z systemem Windows.

Schemat blokowy cytofotometru przedstawiono na rysunku 1. Obraz mikroskopowy powstaje w wyniku tłumienia światła przechodzącego przez preparat zawierający badane jądra komórkowe wybarwione metodą Feulgena. Stopień tłumienia światła jest proporcjonalny do zawartości DNA w danym punkcie preparatu. Kamera CCD podłączona jako trzeci okular mikroskopu zapisuje w matrycy obraz absorpcji światła, który następnie transmittuje do komputera w standardzie PAL (768×576 pikseli) poprzez interfejs CVBS albo Y/C.



Rys. 1. Schemat blokowy cytofotometru obrazowego: M – optyczny mikroskop absorpcyjny, C – kamera CCD z interfejsem Y/C lub CVBS, FG – karta akwizycji obrazu, PC – komputer z oprogramowaniem cytofotometru

Karta akwizycji ponownie digitalizuje obraz w celu umożliwienia dalszej obróbki programowej. Badany preparat zawierający wybarwione jądra komórkowe rośliny ma postać cienkiego plastra tkanki roślinnej pomiędzy dwoma szkiełkami. Zostaje on umieszczony na stoliku mikroskopu przemieszczającym się w kierunkach x , y , z , przestrzeni, aby wycentrować i zogniskować badaną grupę jąder w polu widzenia kamery. Dla uzyskania poprawnych wyników pomiaru komponenty sprzętowe cytofotometru muszą spełniać następujące wymagania:

- Automatyczna regulacja wzmocnienia (AGC) kamery powinna być wyłączona, aby zapewnić jednakowe warunki ekspozycji niezależnie od średniej jasności obrazu. W ten sposób możliwe jest porównywanie wszystkich obrazów jąder z danej populacji ze sobą oraz odniesienie do obrazu jądra referencyjnego o znanej masie.
- Mikroskop musi mieć ustawiony stały poziom oświetlenia dla badanej serii preparatów.
- Karta akwizycji obrazu powinna być wyposażona w programowalne, wejściowe tablice konwersji (LUT) informujące za pośrednictwem odpowiednio zaprogramowanych kolorów o przekroczeniu zakresu sygnału obrazowego.

Wybarwione jądra są widoczne na obrazie cyfrowym jako spójne zbiory pikseli ciemniejszych na tle jaśniejszego tła, ze stopniem zaciemnienia proporcjonalnym do zawartości DNA. Występują w preparacie pojedynczo, oddzielone jasnym tłem lub formie grup obiektów związanych ze sobą brzegami. Nakładające się na siebie obiekty nie są brane pod uwagę.

3. Algorytm segmentacji

Na wyodrębnienie profilu jąder w obrazie składają się następujące etapy:

- konwersja w dziedzinie RGB prowadząca do obrazu z 256 odcieniami jasności,
- dobór prostokątnego obszaru ROI (*Region Of Interest*) obejmującego segmentowany obiekt lub grupę związanych obiektów,
- estymacja liczby wyróżniających się poziomów jasności obiektu jądra i jego tła jako podstawowego parametru progowania wielopoziomowego (wieloprogowania),
- wielopoziomowe progowanie obrazu jądra wydzielonego w obszarze ROI, zakończone wyborem progu binarnego,
- eliminacja artefaktów i obróbka morfologiczna binarnej maski jądra,
- separacja poszczególnych jąder związanych brzegami w obrębie wydzielonej grupy.

3.1. Konwersja w dziedzinie RGB

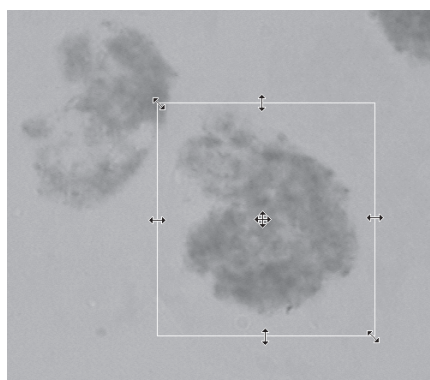
Pierwotny obraz mikroskopowy z kamery może zawierać wiele artefaktów wzmiankowanych we wprowadzeniu do niniejszego artykułu. Większość z nich nie podlega wybarwieniu charakterystycznemu dla DNA, nie ma więc typowej dla tego wybarwienia proporcji składowych R, G i B. W celu redukcji artefaktów autorzy zaproponowali odjęcie od siebie niebieskiej i zielonej składowej koloru pierwotnego obrazu barwnego I_C . Uzyskano w wyniku obraz różnicowy I_{B-G} odwzorowujący intensywności tłumienia światła przez DNA wyrażone przede wszystkim w składowej zielonej oryginalnego koloru. Można to opisać w formie zależności

$$\forall p(x, y) \in I_C \quad I_{B-G}(p) = 255 - k \cdot \max(0, I_B(p) - I_G(p)) \quad (2)$$

gdzie $I_B(p)$ oraz $I_G(p)$ oznaczają składową niebieską i zieloną obrazu barwnego. Parametr k jest dodatnim współczynnikiem wzmocnienia dynamiki sygnału obrazowego, o wartości nie powodującej przekroczenia zakresu $[0, 255]$ w równaniu (2). Przykładowy obraz różnicowy dla jądra z rysunku 4a pokazano na rysunku 4b.

3.2. Selekcja obszaru ROI

Odbywa się ona w trakcie akwizycji poprzez regulację stolika mikroskopowego w płaszczyźnie XY, w celu wprowadzenia pożądanego obiektu w pole obszaru prostokątnego ograniczonego ramką (rys. 2). Ponadto za pomocą myszki manipuluje się rozmiarami i położeniem ramki ROI. Pozwala to na wybór obszaru zainteresowania także w przypadku obrazów wcześniej przechwyconych kartą akwizycji i zapisanych w plikach.



Rys. 2. Wybór obiektu jądra w prostokątnej ramce ROI. Kursory pokazują możliwości manipulacji ramką ROI

Zastosowanie obszaru ROI „lokalizuje” problem segmentacji w obszarze wokół badanego jądra.

3.3. Wielopoziomowe progowanie obiektu

Potrzeba progowania wielopoziomowego wynika z faktu, że w obrębie jąder komórkowych, w pewnych stadiach rozwoju obserwuje się dużą nierównomierność koncentracji DNA. Można dostrzec co najmniej kilka różnych poziomów jasności obrazu skoncentrowanych w wielu podobszarach (patrz rys. 4a). Zastosowanie progowania binarnego w takich przypadkach skutkuje pozostawieniem wielu obszarów jaśniejszych, o mniejszej zawartości DNA poza wyznaczonym przez algorytm profilem jądra (patrz rys. 4e).

Popularne metody progowania binarnego bazujące na zachowaniu momentów [12] lub znajdowaniu maksimum entropii histogramu [8], w odniesieniu do wielu progów wymagają znacznych nakładów obliczeniowych, takich jak rozwiązywanie układów równań lub wielu operacji zmiennoprzecinkowych. W rozważanym przypadku zastosowano prostą metodę progowania iteracyjnego ISODATA [3]. Zapewnia ona stabilizację rozwiązania już po wykonaniu kilku do kilkunastu iteracji zależnie od zadanej liczby progów. Dla prostokątnego obszaru ROI wyznaczamy histogram jasności h obiektu jądra i otaczającego go tła preparatu. Metoda jest zbieżna niezależnie od wyboru punktu startowego.

Algorytm składa się z czterech następujących kroków:

1. Przyjęcia startowych wartości progów histogramu h w przedziale $[LO, UP]$

$$LO = T_0 < T_1 < T_2 < \dots < T_{n-1} < T_n = UP + 1 \quad (3)$$

– największym zawierającym na końcach niezerowe zliczenia h .

2. Wyznaczenia wartości średnich μ_i histogramu w przedziałach $I_i = [T_{i-1}, T_i)$ pomiędzy kolejnymi progami jako

$$\mu_i^{(k)} = \frac{\sum_{j \in I_i} j \times h(j)}{\sum_{j \in I_i} h(j)}, \quad 1 \leq i \leq n \quad (4)$$

gdzie $k > 0$ oznacza numer kolejnej iteracji.

3. Wyliczenia nowych wartości progów T_1, T_2, \dots, T_{n-1} przy użyciu wzoru

$$T_i^{(k)} = \left\lfloor \frac{\mu_i + \mu_{i+1}}{2} \right\rfloor, \quad 1 \leq i < n \quad (5)$$

4. Powrotu do pętli wyznaczania μ_i (punkt 2) w przypadku wykrycia zmian progach $T_i^{(k)} \neq T_i^{(k-1)}$ dwóch ostatnich iteracji lub zakończenia algorytmu w przeciwnym wypadku.

Jako ostateczny próg binarny oddzielający profil jądra od tła przyjmuje się najwyższy z progów uzyskanych z użyciem przedstawionej metody. W wyniku progowania binarnego otrzymuje się wysegmentowany obraz w obszarze ROI:

$$\forall_{p \in ROI} I_{BW}^{ROI}(p) = \begin{cases} 255 & I_{B-G}(p) \geq T_{n-1} \\ 0 & I_{B-G}(p) < T_{n-1} \end{cases} \quad (6)$$

gdzie:

- p – piksel obrazu $p(x, y)$ w obszarze ROI,
- T_{n-1} – ostatni wewnętrzny próg w równaniu (5).

Autorzy zaproponowali określenie liczby i położeń progów na podstawie wykrytej liczby maksimów lokalnych histogramu jasności jądra $h(i)$ w obszarze ROI. W tym celu zastosowano metodę rekonstrukcji jednowymiarowej funkcji histogramu jądra (rys. 3). Histogram obrazu wzmocnionego przez współczynnik k w równaniu (2) należy skumulować w przedziałach odpowiedniej szerokości tak, aby nie pojawiły się w nim brakujące poziomy jasności.

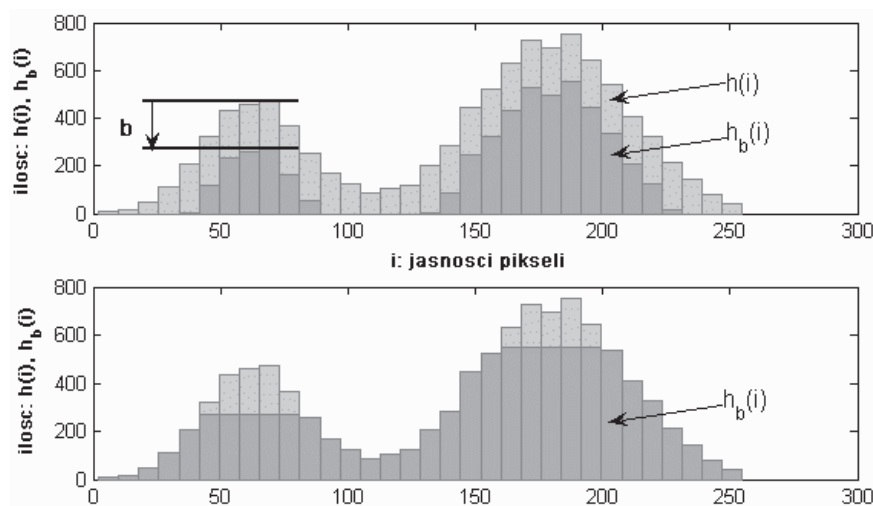
Algorytm tej metody jest następujący:

- h : histogram jasności obiektu jądra,
- $h_b = h - b$: marker histogramu h ,
- h_R = histogram maksimów h ,
- w : szerokość filtru maksymalnego,
- $i \in [LO, UP]$: poziom jasności,
- k : numer iteracji,
- pętla k ,
- dla każdego i : ($h_b^{k+1}(i) = h_b^k(i)$) \rightarrow przerwij k ,
- dla każdego i : $h_b^{k+1}(i) \leftarrow \min(h(j), \max\{h_b^k(j) : j \in w\})$,
- nowe k ,
- dla każdego i : $h_R(i) \leftarrow h(i) - h_b^k(i)$.

Uzyskany histogram wierzchołków $h_R(i)$ zależy od parametru przesunięcia b , który dobiera się dla danej klasy obrazów jąder. Duże wartości b skutkują pominięciem maksimów o niewielkim wypiętrzeniu względem swego otoczenia. Przesunięcie b uzależniono od średniej wartości histogramu:

$$b = k_b \cdot \bar{h}, \quad \bar{h} = \frac{1}{UP - LO + 1} \sum_{i \in [LO, UP]} h(i), \quad k_b \in (0, 1] \quad (7)$$

Dla badanych obiektów liczba zadanych poziomów progowania powinna odpowiadać ilości wykrytych maksimów histogramu lub być od niej nieznacznie większa – nie bardziej niż o jeden lub dwa dodatkowe progi. Zbyt duża liczba progów w stosunku do obserwowanych poziomów jasności może spowodować nadmierne przesunięcie ostatniego progu (binarnego) w kierunku tła.



Rys. 3. Ilustracja zasady wyznaczania maksimów histogramu:
 $h(i)$ – histogram badany, $h_b(i)$ – marker histogramu h

3.4. Obróbka binarnej maski jądra

Zawiera ona następujące procedury:

- usunięcie obiektów binarnych o powierzchniach mniejszych niż największy badany obiekt jądra (grupy jąder),
- usunięcie wchodzących w obszar ROI obiektów zewnętrznych,
- wypełnienie wewnętrznych obszarów otoczonych maską jądra („dziury”) w celu uzyskania binarnego obiektu jednospójnego,
- morfologiczna operacja otwarcia [11] z użyciem kołowego elementu strukturalnego, w celu wygładzenia krawędzi jądra po progowaniu.

3.5. Separacja jąder komórkowych złączonych w grupę

Decyzja o rozdzieleniu grupy złączonych jąder komórkowych jest podejmowana interaktywnie przez użytkownika programu realizującego proces segmentacji po wykonaniu progowania wielopoziomowego (podrozdz. 3.3). Rozdzielanie wymaga bowiem znacznych nakładów programowych.

Algorytm separacji składa się z następujących pięciu etapów postępowania:

1. Transformacja binarnego obrazu grupy, uzyskanego w wyniku progowania, do przestrzeni odległości wyrażonej za pomocą 256 poziomów jasności obrazu wynikowego [15].
2. Erozja obrazu odległości (z gradacją jasności) za pomocą kołowego elementu strukturalnego.

3. Rekonstrukcja [13] i dylatacja obrazu odległości grupy jąder z użyciem tego samego typu elementu strukturalnego.
4. Wyznaczenie działów wodnych [14] w obrębie wejściowej maski binarnej grupy jąder.
5. Wybór, zależnie od znanej liczby złączonych obiektów, jednej lub więcej linii działów wodnych na podstawie najwyższej średniej jasności wyliczonej wzdłuż tych linii.

Transformata odległości oznacza, że każdy piksel obrazu transformaty opisuje za pomocą stopnia jasności swoją odległość od najbliższego punktu tła oryginału. Autorzy zastosowali odwzorowanie odwrócone, w którym punkty największej odległości są najciemniejsze (rys. 6b). Przyjęto także euklidesową miarę odległości – indeks E w równaniu (8). Operację tę można zapisać jako:

$$I_{DST}(p) = k_E \cdot \rho_E(p, q_C), \quad p \in N, \quad q_C \in C_N \quad (8)$$

gdzie:

- k_E – współczynnik normalizacji odległości ρ_E do zakresu $[0, 255]$,
- C_N – zewnętrzny kontur binarnej maski obiektu N ,
- I_{DST} – obraz transformaty odległości.

Erozja i dylatacja w przestrzeni odległości są realizowane odpowiednio poprzez filtry maksymalny i minimalny [10] z użyciem kołowego elementu strukturalnego $C(R_1)$ o promieniu R_1 . Erozja wytwarza obraz markera I_{ERD} dla procesu rekonstrukcji. Dylatacja elementem strukturalnym o niezależnie dobranym promieniu R_2 powiększa baseny obiektów po rekonstrukcji w celu podkreślenia linii podziału (rys. 6c). Operacja rekonstrukcji wykonywana jest w otoczeniu ośmiu sąsiadów z użyciem obrazu odległości I_{DST} jako maski i obrazu I_{ERD} jako markera.

$$\begin{aligned} \forall_{p \in ROI} I_{ERD}(p) &= \max_q \{I_{DST}(q) : q \in C(p, R_1) \cap ROI\} \\ \forall_{p \in ROI} I_{DIL}(p) &= \min_q \{I_{REC}(q) : q \in C(p, R_2) \cap ROI\} \end{aligned} \quad (9)$$

gdzie:

- $C(p, R_1)$ – kołowy wzorzec erozji,
- $C(p, R_2)$ – kołowy wzorzec dylatacji,
- I_{DST} – obraz transformaty odległości.

Rekonstrukcja [13] obiektów odległości umożliwia wychwycenie i poszerzenie obszarów maksimum odległości wraz z równoczesnym wytłumieniem fluktuacji jasności obrazu. W ten sposób badane obiekty jąder w obrazie transformaty przyjmują postać głębokich basenów o gładkich ścianach, wyraźnie oddzielonych od siebie jasnymi liniami podziałów. Pozwala to na skuteczne działanie metodzie działów wodnych (*watershed method*), zmniejszając zagrożenie nadmierną liczbą uzyskanych linii podziału. Wynik metody działów wodnych stanowi obraz binarny

$$\forall_{p \in ROI} I_{WSH}(p) = \begin{cases} 255 & p(x, y) \in \{L_i\} \\ 0 & p(x, y) \notin \{L_i\} \end{cases}, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (10)$$

gdzie:

$p(x, y)$ – punkt obrazu o współrzędnych (x, y) ,
 L_i – linia i -tego działu wodnego.

Wynik segmentacji:

$$I_{SEG}(p) = I_{WSH}(p) \mid I_{BW}^{ROI}(p), \quad (11)$$

$$I_{WSH} = WSHEd(I_{DIL})$$

gdzie:

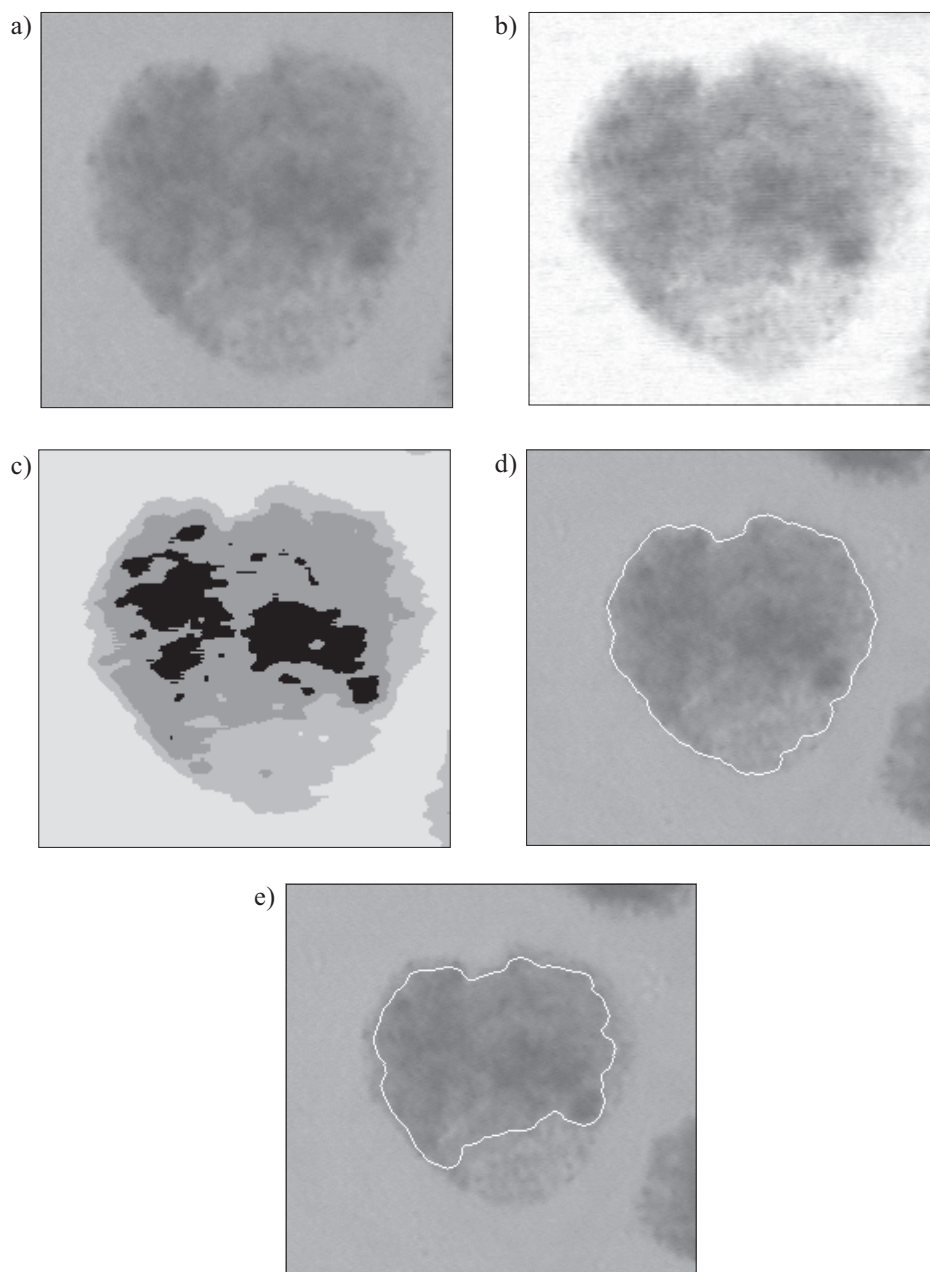
$WSHEd$ – procedura wyszukiwania działów wodnych,
 p – punkt obrazu o współrzędnych (x, y) ,
 I_{WSH} – obraz binarny działów wodnych.

Obraz binarny I_{WSH} po transformacji $WSHEd$ tworzą białe linie działów wodnych na czarnym tle. Końcowy wynik segmentacji I_{SEG} jest sumą logiczną obrazu linii działów i binarnego obrazu jąder I_{BW}^{ROI} z równania (5). Zawiera on czarne obiekty grup jąder na białym tle. W przypadku powstania nadmiarowych linii podziałów, te niepożądane eliminuje się interaktywnie wskazując je kursorem myszki. Stosowana jest także eliminacja automatyczna przy założeniu wypukłości stykających się obiektów. Dla n połączonych jąder komórkowych pozostawia się $n-1$ linii zawierających największe jasności średnie w obrazie różnicowym I_{B-G} z równania (2).

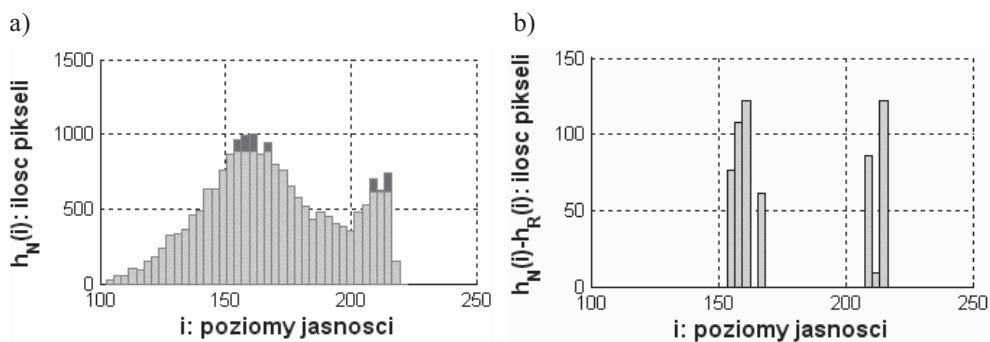
4. Wyniki

Test proponowanego algorytmu przeprowadzono dla 25 jąder merystematycznych komórek cebuli w stadium profazy i kilku wybranych jąder glonów, charakteryzujących się w większości obłymi kształtami i dużą zmiennością koncentracji DNA w ich wnętrzu. Badania prowadzono na prezentowanym stanowisku w laboratorium Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ. Wyniki segmentacji zostały zweryfikowane wizualnie i zaakceptowane przez specjalistów z zakresu biologii roślin. Stosowano obiektyw o powiększeniu $100\times$, aby dokładnie określić profile jąder i zmiany stopnia zaciemnienia.

Na rysunkach 4a–4d zilustrowano działanie przedstawionej metody wieloprogowania na przykładzie wybranego jądra komórkowego cebuli. Posiada ono nierównomierną koncentrację DNA na powierzchni i w nawet w wyniku obserwacji wizualnej można wyodrębnić kilka wyraźnie różnych poziomów jasności. Progowanie binarne z użyciem pojedynczego progu uzyskane za pomocą tej samej metody iteracyjnej daje efekt „gubienia” dużej części profilu jądra (rys. 4e).

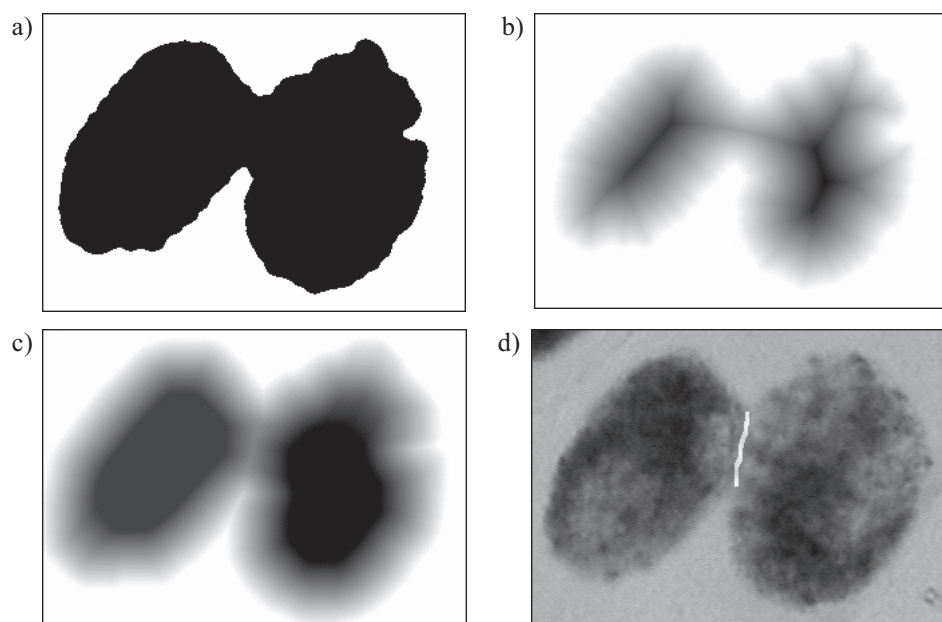


Rys. 4. Etapy segmentacji jądra komórkowego: a) obraz luminancji badanego jądra; b) obraz różnicowy składowej niebieskiej i zielonej w przestrzeni RGB; c) progowanie z użyciem trzech progów (cztery poziomy jasności); d) wynik segmentacji po zastosowaniu trzech progów; e) wynik progowania binarnego z jednym progiem



Rys. 5. Etapy separacji pary zgrupowanych jąder komórkowych

Wykresy na rysunkach 5a i 5b obrazują działanie metody wykrywania maksimum lokalnych na histogramie jasności jądra komórkowego z rysunku 4. Obraz różnicowy składowych koloru (rys. 4b) uwypukla zakłócenia występujące w systemie podczas akwizycji obrazu. Nie wpływają one jednak w sposób znaczący na działanie omawianej metody.



Rys. 6. Etapy separacji pary zgrupowanych jąder komórkowych: a) obraz binarny dwóch złączonych jąder komórkowych; b) odwrócony obraz transformaty odległości; c) transformata odległości po rekonstrukcji i dylatacji; d) uzyskana linia działu wodnego na tle obrazu rozdzielanych jąder

Na rysunku 6 zobrazowano wybrane stadia rozdzielania pary jąder stycznych ze sobą, które tworzą wspólną maskę w wyniku progowania (rys. 6a). Odwrócona transformata od-

ległości ich obrazu (rys. 6b) wykazuje dużą nierównomierność zagłębień związaną z brakiem gładkości linii brzegowych. Na tym etapie użycie metody działów wodnych mogłoby prowadzić do powstania wielu nadmiarowych linii podziałów. Problem ten znika w wyniku zastosowania proponowanej obróbki transformaty za pomocą rekonstrukcji i dodatkowej dyatacji (rys. 6c). Ostateczną linię podziału pokazano na rysunku 6d, w tle oryginalnego obrazu.

5. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej pracy przedstawiono metodę segmentacji obrazów komórek wypreparowanych z tkanki roślinnej w celu pomiaru zawartości DNA. Opiera się ona na wielopoziomym, lokalnym progowaniu obiektów jąder występujących pojedynczo lub połączonych w grupach. Rozważane są tylko grupy powstałe wskutek brzegowego zetknięcia obiektów, bez ich wzajemnego nakładania.

Proponowana metoda została zweryfikowana pozytywnie dla klasy jąder merystematycznych komórek cebuli w stadium profazy. Ich obraz w powiększeniu $100\times$ i $40\times$ charakteryzuje się losowym występowaniem obszarów wyraźnie różniących się stopniem tłumienia przechodzącego światła. Wynika to ze specyfiki koncentracji DNA w obrębie jądra na badanym etapie rozwoju komórki. Pokazano, że zastosowanie progowania wielopoziomowego daje w takim wypadku lepsze rezultaty segmentacji niż progowanie binarne. Otrzymane wyniki segmentacji uzyskały akceptację biologów. Zastosowana metoda progowania iteracyjnego ISODATA charakteryzuje się bardzo prostym i szybko działającym algorytmem. W perspektywie należałoby porównać doświadczalnie efekty tej metody z innymi algorytmami wieloprogramowymi bazującymi na zmodyfikowanej metodzie Otsu [9] lub metodzie zachowania momentów histogramu [12].

Decyzja o rozdzieleniu grupy jąder jest podejmowana interaktywnie, co eliminuje trudności związane z automatycznym rozpoznaniem typu analizowanego obiektu jako pojedynczego albo złączonego. Przy zastosowanej metodzie rozdziału takie rozpoznanie wydaje się możliwe pod warunkiem ograniczenia klasy badanych jąder, np. do obiektów wypukłych.

Przedstawiona metoda segmentacji jako całość jest wolniejsza niż inne proponowane w cytometrii obrazowej [4, 1, 15]. Wynika to ze stosowania dużych powiększeń mikroskopu i interaktywnego doboru obszarów ROI. Umożliwia ona algorytmom pomiarowym uzyskanie dużych dokładności wyznaczania IOD poszczególnych jąder komórkowych, a także ich powierzchni i obwodów wykorzystywanych jako ważne dane przy badaniach cytometrycznych.

Literatura

- [1] Claeyns A., Cornelis A., Kreckaert I., Coen H., Zukowski F., Smets G., Roels F.: *Fully Automated Measurements by Light Microscopy of Tissue Sections Using a Cellular Array Computer*. Gegenbaurs morphol. Jahrbuch, 135, 1989, 83–90
- [2] Claeyns A., Van Den Branden Ch., Roels F.: *Automated Measurements on Cell Nuclei in Tissue Sections*. Analytical and Quantitative Cytology and Histology, t. 10, nr 4, 1988, 276–284

- [3] Dias Velasco F.R.: *Thresholding using ISODATA Clustering Algorithm*. IEEE Trans. On Systems, Man and Cybernetics, t. SMC-10, nr 11, 1980, 771–774
- [4] Eudey T. L.: *Statistical Considerations in DNA Flow Cytometry*. Statistical Science, t. 11, nr 4, 1996, 320–334
- [5] Haralick R.M., Shapiro L.G.: *Survey: Image segmentation Techniques*. Computer Vision Graphics Image Processing, t. 29, 1985, 100–132
- [6] Husain O. A.N., Watts K.C.: *Preparatory Methods for DNA Hydrolysis, Cytochemistry, Immunocytochemistry and Ploidy Analysis. Their Application to Automated and Routine Diagnostic Cytopathology*. Analytical and Quantitative Cytology and Histology, t. 9, nr 3, 1987, 218–224
- [7] *Interpretation assistance in diagnostic DNA image cytometry*. <http://euroquant.med.tu.dresden.de/intassi.htm>
- [8] Kapur J.N., Sahoo P.K., Wong A.K.C.: *A New Method for Gray-Level Picture Thresholding Using Entropy of the Histogram*. Computer Vision, Graphics, and Image Processing, t. 29, 1985, 273–285
- [9] Liao P.S., Chen T.S., Chung P.C.: *A Fast Algorithm For Multilevel Thresholding*. Journal of Information Science And Engineering, t. 17, 2001, 713–727
- [10] Malina W., Smiatcz M.: *Metody cyfrowego przetwarzania obrazów*. EXIT, Warszawa 2005
- [11] Serra J. 1986: *Introduction to Mathematical Morphology*. Computer Vision Graphics Image Processing, t. 35, 2005, 283–305
- [12] Tsai W.H.: *Moment Preserving Thresholding*. Computer Vision, Graphics, and Image Processing, t. 29, 1985, 377–393
- [13] Vincent L.: *Morphological Grayscale Reconstruction in Image Analysis: Applications and Efficient Algorithms*. IEEE Transactions on Image Processing, t. 2, nr 2, 1993, 176–201
- [14] Vincent L., Soille P.: *Watersheds in Digital Spaces: An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, t. 13, nr 6, 1991, 583–598
- [15] Wahlby C.: *Algorithms for Applied Digital Image Cytometry*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 896, 2003, 1–75

