

Jarosław Gocławski\*, Joanna Sekulska-Nalewajko\*, Patryk Anioł\*\*

## **Metoda segmentacji obrazów mikroskopowych komórek roślinnych znakowanych radiograficznie do wyznaczenia poziomu syntezy DNA w jądrach komórkowych**

### **1. Wprowadzenie**

Autoradiografia śladowa stanowi istotną technikę badania zmian ilościowych DNA zachodzących podczas cyklu komórkowego roślin. Polega ona na lokalizacji związków promieniotwórczych w komórkach i tkankach. Tkankę poddaje się inkubacji w roztworach zawierających izotopy (np. tryt  $^3\text{H}$ ), które zostają wbudowane w struktury komórkowe ponieważ materiał żywy nie odróżnia znajdujących się w środowisku związków radioaktywnych i zużywa je w ten sam sposób jak analogiczne cząstki nieradioaktywne. Miejsca włączenia izotopu wykrywa się dzięki naświetlaniu emulsji fotograficznej, nałożonej na skrawkach sporządzonych z tej tkanki. Emulsja ta, wytwarza ziarna metalicznego srebra w miejscach naświetlania. Natomiast brak śladów radioaktywności w preparacie świadczy o tym, że w danym okresie badany związek ten nie był syntetyzowany. Metoda w pełni pozwala więc wskazać aktualny stan metaboliczny komórki. Badaniu poddawać można różnorodne tkanki zarówno zwierzęce jak i roślinne np. komórki merystematyczne systemu korzeniowego rośliny [2, 7–9].

Tradycyjna metoda wizualnego zliczania ziaren znacznika na obrazie preparatu jest niezwykle uciążliwa i nieefektywna [12]. Automatyzacja procesu zliczania poprzez digitalizację i odpowiednią obróbkę komputerową obrazu mikroskopowego ułatwia pomiary i poprawia ich dokładność. Warunkiem uzyskania wysokiej dokładności pomiaru jest zastosowanie właściwej segmentacji obrazu. Pierwsze metody automatyzacji w autoradiografii zaproponowano wraz z pojawieniem się komputerów osobistych [1, 12, 13]. Pomimo upływu czasu nie opracowano w tej dziedzinie jednolitej metody, powszechnie uznanej i stosowanej do wszystkich typów znakowanych preparatów tkankowych. Podstawowe ograniczenie stanowi etap segmentacji obrazu. Jej przebieg i zastosowane metody są bowiem uwarunkowane wieloma czynnikami, takimi jak struktura materiału biologicznego poddanego obserwacji, metody preparatyki czy technika obserwacji mikroskopowej.

---

\* Katedra Informatyki Stosowanej, Politechnika Łódzka w Łodzi

\*\* Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki w Łodzi

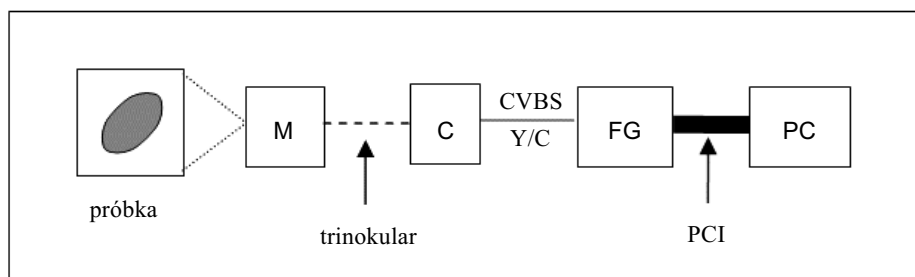
Zaproponowana segmentacja obrazów z autoradiogramów umożliwi lokalizację obszarów występowania komórek roślinnych, tła preparatu i znacznika w postaci ziaren srebra. Dotyczy preparatów komórek merystematycznych systemu korzeniowego rzodkiewki *Raphanus sativus*. Aby ją przeprowadzić, należy określić podstawowe cechy morfologiczne identyfikujące każdy z wymienionych obszarów w tej klasie preparatów.

## 2. Stanowisko badawcze

Do pobierania obrazów mikroskopowych wykorzystano stanowisko badawcze pierwotnie opracowane dla laboratorium Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ do pomiarów zawartości DNA w jądrach komórkowych [4]. 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 systemu akwizycji i obróbki obrazów przedstawiono na rysunku 1. Obraz mikroskopowy powstaje w wyniku tłumienia światła przechodzącego przez preparat zawierający badane jądra komórkowe wyznakowane radiograficznie trytem ( $^3\text{H}$ ) i wybarwione metodą Feulgena. Stopień tłumienia światła poza obszarem znaczników jest proporcjonalny do zawartości DNA w danym miejscu preparatu. Ziarna srebra występujące na powierzchni jąder po procesie znakowania powodują silniejsze tłumienie światła w porównaniu z ich otoczeniem. Kamera CCD podłączona jako trzeci okular mikroskopu zapisuje w matrycy obraz absorpcji światła, który następnie transmituje do komputera w standardzie PAL (768×576 pikseli) poprzez interfejs CVBS albo Y/C.



**Rys. 1.** Schemat blokowy stanowiska badawczego: M – optyczny mikroskop absorpcyjny, C – kamera CCD z interfejsem Y/C lub CVBS, FG – karta akwizycji obrazu, PC – komputer z oprogramowaniem do obróbki obrazów

Karta akwizycji ponownie digitalizuje obraz w celu umożliwienia dalszej obróbki programowej. Badany preparat zawierający wybarwione jądra komórkowe rośliny i radioznaczniki ma postać cienkiego plastra tkanki roślinnej pomiędzy dwoma szkiełkami. Zosta-

je on umieszczony na stoliku mikroskopu przemieszczającym się w kierunkach  $x$ ,  $y$ ,  $z$  przestrzeni, aby wycentrować i zogniskować badaną grupę jąder w polu widzenia kamery.

Algorytm segmentacji autoradiogramów został przygotowany jako sekwencja określonych funkcji w środowisku MATLAB 7 z wykorzystaniem funkcji bibliotecznych wbudowanego pakietu przetwarzania obrazów (*Image Processing Toolbox*) [15]. Środowisko to stanowi część wyposażenia programowego komputera PC w ramach stanowiska badawczego (rys. 1). Program akwizycji obrazów mikroskopowych umożliwia ich zapis do plików bitmapy tworzących źródło danych do dalszego przetwarzania i analizy poprzez opracowany algorytm, realizujący metodę segmentacji zaproponowaną przez autorów.

### 3. Algorytm segmentacji

Segmentacji podlegają obrazy preparatów komórkowych wybarwionych metodą Feulgena i znakowanych radiograficznie [12]. Widoczne na nich jądra komórkowe charakteryzuje jednolity, purpurowy odcień i duży stopień nasycenia barwą związany z wysoką zawartością DNA (rys. 4a). Tło preparatów wypełnione balsamem kanadyjskim, zawiera oderwane fragmenty cytoplazmy i jąder oraz niespecyficznym powstałe ziarna srebra, które należy wyeliminować z rozważań [3, 7, 8]. Tło posiada słaby poziom nasycenia barwą przy zachowaniu stałego odcienia, identycznego jak w przypadku jąder komórkowych.

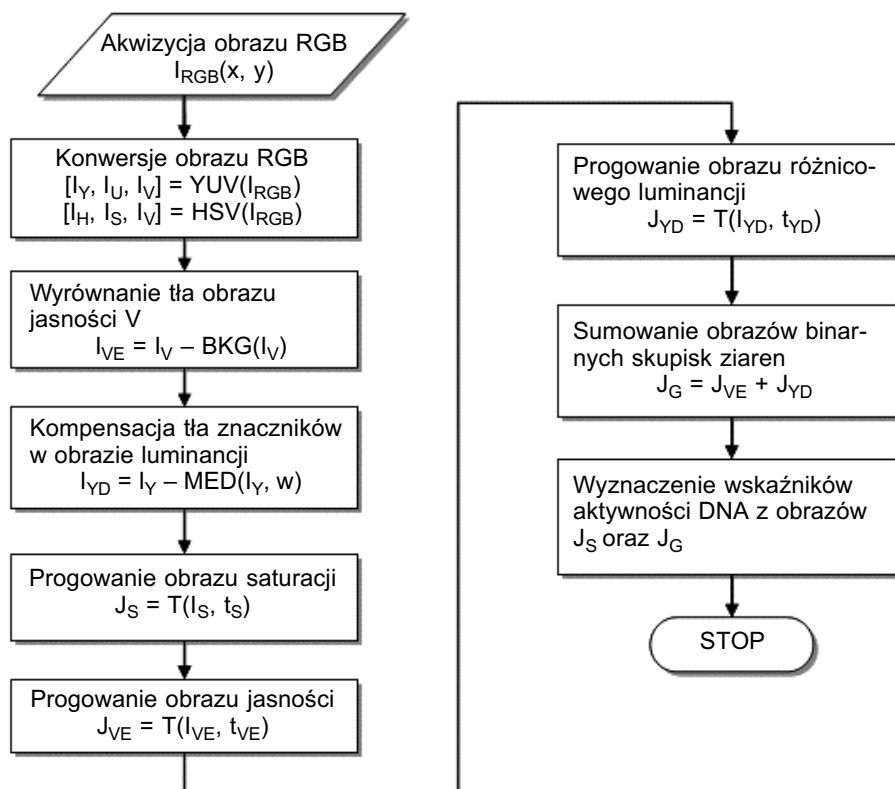
Ziarna srebra znakujące preparat nie przepuszczają światła mikroskopu, więc odpowiadające ich położeniu punkty obrazu mogą nie być w ogóle oświetlone lub oświetlone w jedynie niewielkim stopniu światłem rozpraszającym z najbliższego otoczenia. Obniżenie jasności pikseli stanowi wobec tego podstawowe kryterium wyróżniania skupień znaczników. Zaobserwowano, że pojedyncze obiekty znacznika lub ich małe skupienia są zawsze ciemniejsze od tła komórki, ale z przeciętną jasnością wyższą w porównaniu z dużymi polami skupień.

Dla oceny syntezy DNA bierze się pod uwagę jedynie ziarna występujące na tle jąder komórkowych, świadczące o wewnątrzkomórkowej lokalizacji izotopów promieniotwórczych wiązanych przez komórki w procesie syntezy DNA. Ilości znaczników i zajmowane przez nie pola można mierzyć poprzez analizę dwuwymiarowego obrazu preparatu obserwowanego w mikroskopie, ponieważ izotopowe znakowanie preparatu ma charakter procesu powierzchniowego. Słabiej wyróżnialne pod względem jasności, niewielkie ślady znakowania mogą znajdować się tuż pod powierzchnią jąder, nieco głębiej od pozostałych obiektów.

Aby przeprowadzić segmentację obrazu badanego autoradiogramu należy wyznaczyć:

- obszar skupień znaczników na podstawie ich obniżonej jasności,
- obszar występowania jąder komórkowych na podstawie podwyższonej saturacji względem tła preparatu.

Najmniejsze, znacznie rozjaśnione grupy ziaren powinny być dodatkowo rozpoznawane jako lokalne wahania poziomu jasności w ograniczonych polach powierzchni preparatu.



**Rys. 2.** Przebieg algorytmu segmentacji obrazu mikroskopowego preparatu komórkowego znakowanego radiograficznie.  $MED(I_Y, w)$  – filtr medianowy w oknie  $w \times w$  pikseli na obrazie  $I_Y$ ,  $BKG(I_V)$  – operacja wyrównywania tła obrazu jasności  $I_V$ ,  $T(I_S, t_S)$ ,  $T(I_{VE}, t_{VE})$ ,  $T(I_{YD}, t_{YD})$  – operacje wyznaczania progów i progowania argumentów obrazowych  $[I_Y, I_U, I_V]$  oraz  $[I_H, I_S, I_V]$  – obrazy składowe odpowiednio po transformacji YUV oraz HSV

Proponowana segmentacja obrazu dla określenia skupisk znaczników radiograficznych obejmuje następujące etapy (rys. 2):

1. Wyodrębnienie obrazów saturacji  $I_S$ , luminancji  $I_Y$  oraz jasności  $I_V$  z kolorowego obrazu RGB.
2. Detekcja i kompensacja zmian tła obrazów jasności  $I_V \rightarrow I_{EV}$  oraz luminancji  $I_Y \rightarrow I_{EY}$ , odpowiednio poprzez operacje morfologiczne i filtrację medianową.
3. Progowanie obrazu saturacji w celu określenia obszaru zawierającego komórki (jądra komórek) oraz ich tło  $I_S \rightarrow J_S$ .
4. Progowanie obrazu składowej jasności w przestrzeni HSV zawierającej większe obiekty skupień  $I_V \rightarrow J_V$ .
5. Progowanie obrazu luminancji ze skompensowanym tłem dla wykrycia małych, słabiej widocznych ziaren  $I_Y \rightarrow J_Y$ .

6. Sumowanie logiczne binarnych obrazów  $J_V + J_Y$ .
7. Eliminacja artefaktów obiektowych po rozpoznaniu i etykietowaniu wszystkich skupisk przy wykorzystaniu kryterium najmniejszej powierzchni lub rozpiętości w kierunkach poziomym i pionowym.
8. Zapamiętanie dla każdego obrazu binarnego z wykrytymi obiektami znaczników wymaganych parametrów do wyliczenia wskaźników aktywności DNA.

### 3.1. Konwersja obrazu RGB do przestrzeni HSV oraz YUV

Pierwotny obraz barwny  $I_{RGB}$ , uzyskany z kamery CCD, uwidacznia różne rodzaje substancji zarówno organicznych, jak i nieorganicznych obecnych w badanym preparacie roślinnym. Należą do nich: tło preparatu, wybarwione jądra komórkowe i skupienia znaczników – ziaren srebra. Tworzą one na obrazie łącznie trzy różne typy obszarów, przemieszane ze sobą, a nawet nakładające się wzajemnie.

Dla tych obszarów trzeba zdefiniować unikalne zestawy wspólnych cech morfologicznych umożliwiających ich klasyfikację. Dokładne określenie położenia i rozmiarów takich obszarów stanowi istotę prowadzonego procesu segmentacji.

W metodzie Feulgena wykorzystywanej do wybarwienia preparatu stężenie barwnika w danym punkcie obrazu jest proporcjonalne do zawartości DNA [4, 12], więc nasycenie barwy osiąga wysokie wartości na powierzchniach jąder komórkowych, co umożliwia ich odróżnienie od otaczającego tła. Obraz saturacji  $I_S$  w przestrzeni HSV [15, 16] na podstawie oryginału  $I_{RGB}$ , uzyskuje się poprzez zależność

$$\forall_{(x,y)} I_S(x,y) = \begin{cases} 0 & \max I_{RGB}(x,y) = 0 \\ 1 - \frac{\min I_{RGB}(x,y)}{\max I_{RGB}(x,y)} & \max I_{RGB}(x,y) \neq 0 \end{cases} \quad (1)$$

gdzie:

- $\min I_{RGB}(x,y)$  – minimalna wartość składowej RGB piksela  $(x,y)$ ,
- $\max I_{RGB}(x,y)$  – maksymalna wartość składowej RGB piksela  $(x,y)$ .

Skupienia znaczników rozróżniane są poprzez zmniejszoną jasność odpowiadających im pikseli (rys. 4a). Składnik jasności  $I_V$  przestrzeni HSV jest wyznaczany ze składowych  $I_{RGB}(x,y)$  jako

$$\forall_{(x,y)} I_V(x,y) = \max I_{RGB}(x,y) \quad (2)$$

Aby otrzymać obrazy  $I_S$  oraz  $I_V$ , zastosowano konwersję RGB  $\rightarrow$  HSV przy użyciu funkcji bibliotecznej programu MATLAB [15]

$$[I_H, I_S, I_V] = \text{rgb2hsv}(I_{RGB}) \quad (3)$$

Najmniejsze skupienia ziaren mogą posiadać maksymalną składową koloru  $I_{RGB}(x,y)$  porównywalną z otaczającym materiałem biologicznym jądra i nie będą wówczas wyróżniane w obrazie  $I_V$ . Usunięcie tego mankamentu jest możliwe poprzez wykrywanie lokal-

nych zmian luminancji obrazu na niewielkich obszarach odpowiadających najmniejszym skupieniom ziaren srebra. Przez takie obszary rozumie się kwadraty o wymiarach boków kilkanaście razy mniejszych od szacunkowych rozpiętości pionowych i poziomych obiektów jąder komórkowych (komórek).

Wyznaczenie obrazu luminancji  $I_Y$  w przestrzeni YUV [17] przeprowadzono za pomocą popularnego wzoru uwzględniającego czułość ludzkiego oka na zmiany składowych koloru

$$\forall_{(x,y)} I_Y(x,y) = 0,299 * I_R(x,y) + 0,587 * I_G(x,y) + 0,114 * I_B(x,y) \quad (4)$$

gdzie:  $I_R, I_G, I_B$  – wartości składowych RGB piksela  $(x, y)$ .

### 3.2. Detekcja i kompensacja nierówności tła

Składowa saturacji  $I_S$  w przestrzeni HSV może podlegać progowaniu globalnemu, ponieważ potencjalna nierównomierność oświetlenia tła nie ma wpływu na rozkład nasycenia barwy, co wynika z postaci równania (1).

Obraz luminancji  $I_Y$  poddaje się filtracji medianowej [5, 15, 14] w oknie  $11 \times 11$  pikseli z wykorzystaniem odpowiedniej funkcji bibliotecznej MATLAB [15]

$$\forall_{(x,y)} I_D(x,y) = medfilt2(I_Y(x,y), [w, w]) \quad (5)$$

gdzie  $[w, w]$  – rozmiar okna filtrującego wokół każdego piksela  $(x, y)$  obrazu  $I_Y$ .

Filtracja ta usuwa obiekty najmniejszych znaczników, traktując je jako typowe zakłócenia typu *salt and pepper noise* bez naruszania krawędzi obiektów jąder komórkowych. Odejmowanie obrazów luminancji przed i po filtracji eksponuje drobne skupienia, często niewykrywalne, lub zredukowane powierzchniowo w obrazie jasności  $I_V$ . Obraz różnicowy

$$\forall_{(x,y)} I_{YD}(x,y) = I_Y(x,y) - I_D(x,y) \quad (6)$$

równocześnie wyrównuje możliwe nierówności oświetlenia tła. Obraz jasności pikseli opisany równaniem (1) powinien podlegać wyrównywaniu wolnozmienniej składowej tła – np. poprzez morfologiczną operację domknięcia [10, 15, 14]. Realizuje się ją przy użyciu elementu strukturalnego  $s$  w postaci dysku o średnicy  $2 * R$ , przekraczającej maksymalne oczekiwane rozmiary największych skupień znaczników.

$$\forall_{(x,y)} I_{VE}(x,y) = imclose(I_V(x,y), s) \quad (7)$$

$$s = strel('disk', R)$$

W efekcie opisanych wyżej działań obrazy wynikowe  $I_{VE}$  oraz  $I_{YD}$  zawierają ciemne obszary odpowiednio większych i mniejszych skupisk znaczników na jasnym wyrównanym tle (rys. 4d, e) i mogą być poddane globalnemu progowaniu w celu wydzielenia tych obszarów z rozważanych obrazów.

### 3.3. Progowanie i łączenie binarnych obrazów skupień

Progowanie obrazu saturacji jest poprzedzone filtracją medianową w oknie  $3 \times 3$  piksele dla usunięcia drobnych artefaktów nasycenia niezwiązanych z fazą powierzchni jąder komórkowych.

Zastosowano algorytm Otsu [6, 15] (rys. 3) wyznaczania progu  $t_S$  oparty na poszukiwaniu maksimum wariancji pomiędzy dwoma zakładanymi klasami jasności – tła obrazu i obiektów jąder widocznych na tym tle. Wylizanie progu tą metodą i jego zastosowanie do obrazu saturacji opiera się na funkcjach bibliotecznych MATLAB-a [15]:

$$\begin{aligned} J_S(x, y) &= T(I_S(x, y), t_S) \\ t_S &= \text{graythresh}(I_S(x, y)) \end{aligned} \quad (8)$$

gdzie:

$\text{graythresh}()$  – wybór progu obrazu  $I_S$  metodą Otsu,  
 $T()$  – funkcja *im2bw* progowania obrazu.

Funkcja progowania  $T()$  w przypadku saturacji ma postać

$$\forall_{(x,y)} J_S(x, y) = \begin{cases} 1 & I_S(x, y) \geq t \\ 0 & I_S(x, y) < t \end{cases} \quad (9)$$

Obrazy  $I_{YD}$  oraz  $I_{VE}$  (podrozdz. 3.2) posiadają znormalizowane zakresy wartości pikseli w przedziale  $[0, 1]$ . Skupienia znaczników zajmują znikomą część całej powierzchni obrazów, zgodnie z wiedzą *a priori* o strukturze badanych preparatów [3, 7, 12]. Wobec tego dominujące ilościowo piksele tła, wyrównanego w poprzednim etapie algorytmu, implikują jednomodalne histogramy wartości  $I_{YD}$  oraz  $I_{VE}$  (rys. 3b, c). Wartość mody odpowiada ustalonemu poziomowi jasnego tła obrazów. Piksele występujące w obrębie skupień, z jasnościami poniżej tła (rys. 4c), mogą zmieniać wartości w szerokim zakresie poniżej tej mody. Stąd przyjmuje się zasadę wyznaczania globalnego progu poszukiwanych obiektów względem poziomu mody histogramu obrazu (rys. 3b, c). Autorzy niniejszej publikacji zaproponowali regułę

$$t = \text{mod}(h_N(z_i)) - k * \Delta z_i, \quad \Delta z_i = \frac{1}{N}, \quad i \in [0, 1] \quad (10)$$

gdzie:

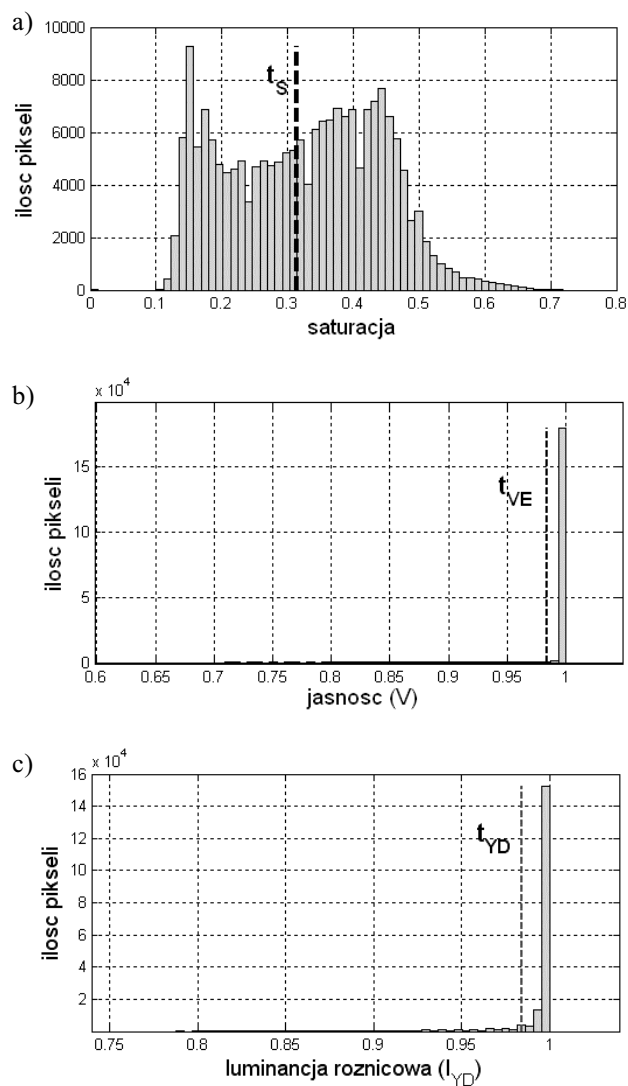
$N$  – liczba przedziałów histogramu w zakresie wartości  $[0, 1]$ ,  
 $k$  – wartość przesunięcia progu poniżej mody.

W wyniku doświadczenia przyjęto wartości  $N = 64$  oraz  $k = 2$ .

Funkcja progowania w przypadku jasności i luminancji ma postać odwróconą

$$\forall_{(x,y)} J(x, y) = \begin{cases} 1 & I(x, y) < t \\ 0 & I(x, y) \geq t \end{cases} \quad (11)$$

gdzie  $I$  – oznaczenie obrazów  $I_{YD}$  lub  $I_{VE}$ .



**Rys. 3.** Przykładowe histogramy obrazów składowych z przestrzeni HSV i YUV przetwarzanych podczas segmentacji (rys. 4): a) obrazu saturacji z progiem  $t_S$  wyliczonym metodą Otsu; b) składowej jasności V z wyrównanym tłem i progiem  $t_{VE}$ ; c) różnicowej luminancji z progiem  $t_{YD}$  po odjęciu obrazu jej mediany i ograniczeniu do wartości mody

Otrzymane obrazy binarne znaczników podlegają logicznemu sumowaniu a następnie maskowaniu poprzez binarny obraz saturacji  $J_S$  w celu uzyskania ostatecznego wyniku – pełnego obrazu skupisk ziaren na tle jąder komórkowych.

$$\forall_{(x,y)} J_G(x,y) = (J_{VE}(x,y) \cup J_{YD}(x,y)) \cap J_S(x,y) \quad (12)$$



### 3.4. Usuwanie artefaktów ze zbioru obiektów

Binarne obiekty znaczników uważane są za artefakty, jeżeli posiadają pola powierzchni poniżej określonego minimum ustalonego dla pojedynczego ziarna lub ich wymiary w pewnych kierunkach są mniejsze niż dopuszczalne. Wszystkie obiekty ziaren w obrazie binarnym  $J_G$  podlegają etykietowaniu (funkcja  $bwlabel()$  w równaniach (13)) przy założeniu 8-punktowego sąsiedztwa w ramach każdego z nich.

Następnie obiekty te są testowane pod względem wartości pola oraz rozpiętości w poziomie i pionie (funkcja  $regionprops()$  w równaniach (13)). Zastosowano następujące funkcje z pakietu obrazowego MATLAB [15]:

$$\forall_{(x,y)} J_L(x,y) = bwlabel(J_G(x,y), 8) \quad (13)$$

$$p = regionprops(J_L, 'Area', 'BoundingBox')$$

Sprawdzono, że należy usuwać obiekty o polu pojedynczego piksela lub o wymiarze pojedynczego piksela w pionie lub poziomie ( $p.Area$  lub  $p.BoundingBox(3)$  i  $p.BoundingBox(4)$ ). Pikselom takich obiektów identyfikowanym określoną etykietą w obrazie  $J_L$  przypisuje się wartość  $tla$  na obrazie wynikowym  $J_G$ .

## 4. Określenie poziomu syntezy DNA

Poziom syntezy DNA definiuje się, zliczając standardowe ziarna radioznacznika osadzone na określonej powierzchni badanych jąder komórkowych. Ziarna mogą być uważane za pojedyncze w pewnych, określonych doświadczalnie granicach wahań pola powierzchni względem pola ziarna referencyjnego [12]. Wszystkie większe obszary traktowane są jako skupienia znacznika. Umowna liczba ziaren w skupieniu wynika z podziału jego pola powierzchni przez pole ziarna referencyjnego.

Powierzchnia ziarna referencyjnego jest przyjmowana arbitralnie lub stanowi średnią powierzchnię obliczoną dla wybranego pola ziaren znacznika uważanych za pojedyncze.

Poziom aktywności DNA komórek merystematycznych definiuje się jako [11, 12]:

- średnią liczbę referencyjnych ziaren znacznika na powierzchni jednej komórki w badanej populacji,
- całkowitą, wyliczoną liczbę ziaren referencyjnych znacznika odniesioną do całkowitej powierzchni wszystkich komórek (jąder) wyrażonej w jednostkach powierzchni tych ziaren (lub w jednostkach fizycznych).

Liczba ziaren referencyjnych  $N_G$  jest zazwyczaj wyznaczana na jeden z poniższych sposobów [11, 12]:

1)

$$N_G = (C_G) \quad a \leq a_L + \left( \frac{A_G}{a_{REF}} \right) \quad a > a_L \quad (14)$$

gdzie:

- $A_G$  – całkowite pole powierzchni ziaren znacznika,
- $a_{REF}$  – pole powierzchni ziarna referencyjnego,
- $a, a_L$  – zmierzona i graniczna wartość pola dla pojedynczych ziaren,
- $C_G$  – liczba pojedynczych ziaren znacznika.

2)

$$N_G = \frac{\log\left(1 - \frac{A_G}{A_N}\right)}{\log\left(1 - \frac{a_{REF}}{A_G}\right)} \quad (15)$$

przy czym:

- $A_N$  – całkowite pole powierzchni badanych komórek,
- $A_G, a_{REF}$  – jak w równaniu (14).

Sposób 2) zawiera statystyczną korektę uwzględniającą nakładanie się ziaren.

Rozważana metoda segmentacji zapewnia wyznaczenie zarówno liczby, powierzchni poszczególnych ziaren (skupień ziaren), jak i całkowitego pola powierzchni wszystkich badanych komórek. Stanowi więc podstawę do określenia stopnia aktywności DNA w badanej serii autoradiogramów.

## 5. Wyniki

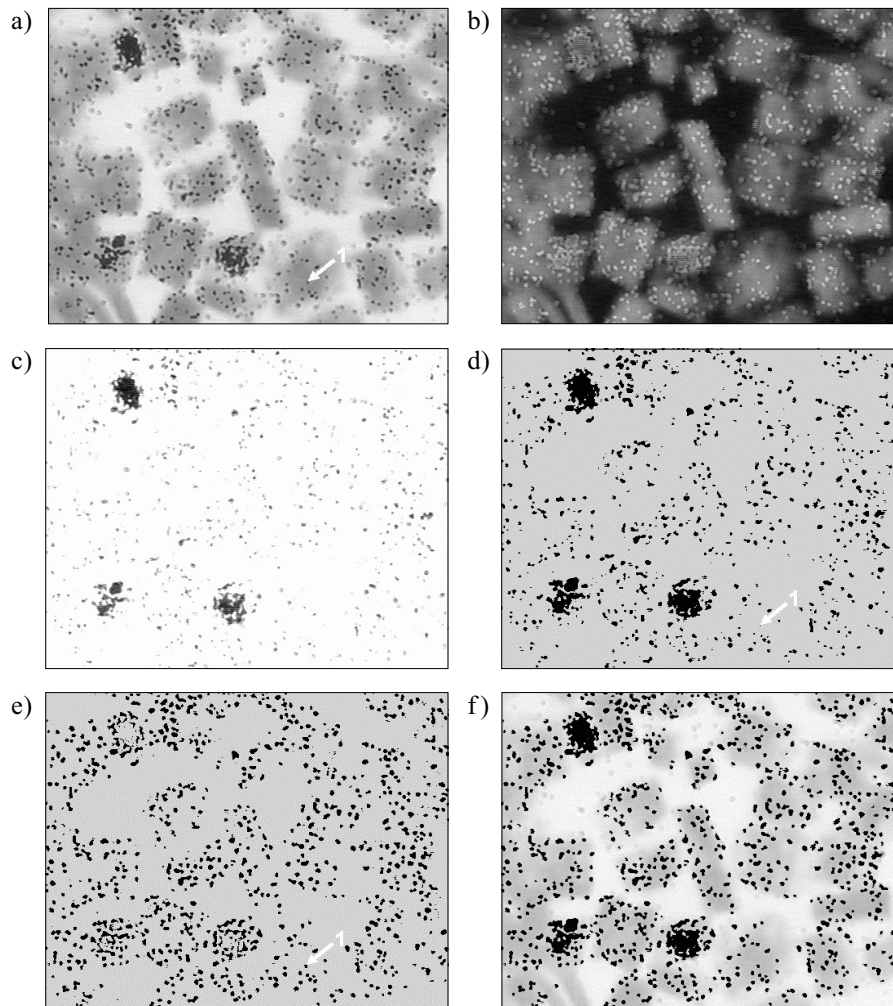
Na rysunkach 4a–f przedstawiono obrazy wynikowe na wybranych etapach działania algorytmu segmentacji wg proponowanej wyżej metody. Można łatwo zaobserwować (rys. 4b), że wyliczona saturacja dużych skupień znaczników nie ulega zmniejszeniu, a powiększa się wyraźnie wewnątrz mniejszych skupień. Jej obserwowalne wahania na samych brzegach skupień można łatwo wyeliminować poprzez dwuwymiarową filtrację medianową obrazu  $I_S$  w oknie  $3 \times 3$  piksele.

Sklejenia znaczników o większych powierzchniach są łatwe do identyfikacji przez progowanie obrazu jasności  $I_V$  (rys. 4c, d). Niewielkie obiekty ziaren, rozjaśnione w porównaniu z pozostałymi mogą być jednak pomijane (detal 1 na rys 4d). Zostaną one dodatkowo wychwycone na różnicowym obrazie luminancji  $I_{YD}$  (rys. 4e).

Przy wyliczaniu progu z równania (10) liczba słupków histogramu  $N$  oraz wartość  $k$  przesunięcia klasyfikujących progów względem mody histogramu może wymagać indywidualnego doboru dla danej serii preparatów komórkowych.

Dokonano przeliczenia powierzchni zajętej przez znaczniki na tle powierzchni zajętej przez jądra komórkowe dla serii 10 obrazów ( $728 \times 576$  pikseli) z autoradiogramów komórek roślinnych. Badaniu poddano próbki komórek merystematycznych pobranych ze szczytu korzenia rzodkiewki. Oznakowano je poprzez inkubację w tymidynie  $^3\text{HTdR}$ . Powoduje to redukcję  $\text{AgBr}$  w emulsji fotograficznej rozproszonyj na powierzchni preparatu w trakcie jego przygotowywania. Próbki zostały później wybarwione metodą Feulgena

i utrwalone w balsamie kanadyjskim. W badaniach zastosowano obiektyw o powiększeniu 40×, ponieważ z uwagi na grubość preparatów przy większych powiększeniach obiektywu następuje widoczne naruszenie głębi ostrości obrazu w polu widzenia. Po ustawieniu ostrości mikroskopu na głębokości jąder komórkowych, obiekty znacznika w tle preparatu i na granicy jąder komórkowych mogą ulegać rozmyciu i posiadać zafałszowane rozmiary.



**Rys. 4.** Wybrane etapy przetwarzania obrazu mikroskopowego komórek merystematycznych korzenia rzodkiewki: a) obraz źródłowy RGB; b) obraz saturacji  $I_S$  z przestrzeni HSV; c) obraz jasności  $I_{VE}$  z przestrzeni HSV po wyrównaniu tła; d) obraz jasności  $I_{VE}$  po progowaniu; e) różnicowy obraz luminancji  $I_{YD}$  po progowaniu; f) obraz RGB po segmentacji z zaznaczonymi na czarno skupieniami znaczników; 1 – przykładowy, niewielki obiekt znacznika „zgubiony” na obrazie  $I_{VE}$  i „wykryty” na obrazie  $I_{YD}$

## 6. Podsumowanie i wnioski

Po zastosowaniu proponowanej metody segmentacji do opisanej wyżej serii 10 obrazów, przeliczenie liczby ziaren znacznika zgodnie z równaniem (14) daje błąd względny ok. 8% przy porównaniu z obliczeniami wykonanymi przez operatora. Na obrazach badanych autoradiogramów powinny być widoczne zarówno ciemne obiekty komórek, jak i jasno oświetlone tło. Zasadnicze zmiany sposobu wybarwienia, oświetlenia preparatu itp. mogą powodować konieczność doświadczalnego doboru przesunięć progów w równaniu (10).

Dla dużych, zwartych skupień znaczników bardzo trudno przeliczać ich pola powierzchni w odniesieniu do pola pojedynczego znacznika – wymaga to nakładania precyzyjnych siatek pomiarowych na powierzchni obrazu. Problem ten stanowi potencjalne źródło błędów przy wyznaczaniu poziomu syntezy DNA w jądrach komórkowych. Wyniki uzyskane w zliczaniu automatycznym, dla serii preparatów określonej w rozdziale 5, zostały zweryfikowane pozytywnie przez specjalistów z zakresu cytologii roślin. Przedstawiony algorytm zrealizowany w środowisku MATLAB 7 jest wykonywany na komputerze PC z procesorem Celeron 2000 i pamięcią RAM 512 MB, w czasie pojedynczych sekund dla każdego z badanej serii 10 obrazów PAL, a więc nieporównanie szybciej niż zliczanie znaczników przez operatora. Wykorzystanie tego algorytmu w laboratoryjnym układzie pomiarowym, pokazanym na rysunku 1, umożliwi eliminację błędów ludzkich zarówno na etapie identyfikacji jak i zliczania poszczególnych skupień znaczników. W przypadku preparatów z mniej zagęszczonymi komórkami niż na rysunku 4, możliwe jest także badanie aktywności DNA preparatów odniesieniu do pojedynczych komórek (jąder komórkowych).

## Literatura

- [1] Brunn P.A., Ford S.S., Shackney S.E.: *Semi-Automated Grain and Cell Counting*. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland
- [2] Caro L.G.: *High-resolution autoradiography*. [w:] *Methods in Cell Physiology*, New York and London, Academic Press 1964
- [3] Ficq A.: *Autoradiography*. [w:] *The Cell*, vol. 1, ed. J. Brachet and A. E. Mirsky, New York and London, Academic Press 1959
- [4] Gocławski J., Anioł P.: *Metoda segmentacji obrazów jąder komórkowych roślin w cytometrii DNA z heterogenicznym rozkładem wewnątrz jądra*. Półrocznik AGH AUTOMATYKA, t. 10, z. 3, 2006
- [5] Malina W., Smiatacz M.: *Metody cyfrowego przetwarzania obrazów*. Warszawa, EXIT 2005
- [6] Otsu N.: *A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, No. 1, 1979, 62–66.
- [7] Prescott D.M.: *Autoradiography with liquid emulsion*. [w:] *Methods in Cell Physiology*, New York and London, Academic Press 1964
- [8] Sawicki W.: *Autoradiografia w badaniach cytochemicznych i histochemicznych*. *Post. Bioch.*, 257, 1963
- [9] Sawicki W.: *Autoradiografia pod mikroskopem elektronowym*. *Post. Bioch.*, 10/503, 1964
- [10] Serra J.: *Introduction to Mathematical Morphology*. *Computer Vision Graphics Image Processing*, vol. 35, 1986, 283–305
- [11] Shuette W.H., Chen S.S., Occhipinti S.J., Mujagic H.S., Shackney S.E.: *Automated Radiographic Grain Counting: Correction for Grain Overlap*. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland

- 
- [12] Sklarew R.J.: *Simultaneous Feulgen Densitometry and Autoradiographic Grain Counting with the Quantimet 720D Image-Analysis System*. The Journal of Histo-chemistry and Cytochemistry, vol. 30, No. 1, 1982, 49–57
- [13] Stark M.H., Tucker J.H., Thomson E.J., Perry P.E.: *An automated image analysis system for the detection of rare autoradiographically labelled cells in the human lymphocyte HGPRT variant assay*. Vol. 5, No. 3, 1984, 250–257
- [14] Tadeusiewicz R.: *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Kraków, Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji 1997
- [15] The Mathworks: *Image Processing Toolbox User's Guide*. <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/toolbox/images/>
- [16] *HSV color space*. [http://en.wikipedia.org/wiki/HSV\\_color\\_space](http://en.wikipedia.org/wiki/HSV_color_space)
- [17] *YUV*. <http://en.wikipedia.org/wiki/YUV>