

استخراج اتوماتیک هسته و سیتوپلاسم سلول‌های سفید خون در تصاویر لام محیطی

رامین سلطان زاده^۱، دکتر حسین ربانی^۲، دکتر اردشیر طالبی^۳

چکیده

مقدمه: یکی از پارامترهای اساسی در تشخیص سلول‌های بلاست، افزایش نسبت مساحت هسته به سیتوپلاسم آن‌ها است. علاوه بر این پارامتر، پارامترهایی از قبیل اندازه‌ی هسته، میزان گرد بودن هسته و نیز اندازه‌ی کل سلول در تعیین بلاست یا عدم بلاست بودن سلول‌ها مؤثر می‌باشند.

روش‌ها: در این مقاله با استفاده از خصوصیت متمایز هسته از سایر اجزاء یک لام خونی، آن‌ها را ابتدا با استفاده از الگوریتمی مبتنی بر روش خوشه‌بندی k-means تشخیص دادیم. سپس به جداسازی سیتوپلاسم از بقیه‌ی تصویر لام با تکیه بر حد آستانه بر مبنای هیستوگرام سطح خاکستری پرداختیم.

یافته‌ها: این مطالعه بر روی ۱۰۰ تصویر میکروسکوپی انجام شد که در تشخیص هسته دارای ویژگی ۸۲/۵ درصد و حساسیت ۸۴ درصد و در تشخیص سیتوپلاسم دارای ویژگی ۷۸/۰۲ درصد و حساسیت ۷۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: در این مقاله روشی اتوماتیک جهت تشخیص هسته و سیتوپلاسم ارائه شد. اگر چه نسبت مساحت هسته به سیتوپلاسم عامل مهمی در تعیین بلاست بودن سلول می‌باشد، اما نشانه‌های دیگر همچون تشخیص هستک نیز در تشخیص نهایی مؤثر می‌باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بلاست، حد آستانه، سطح خاکستری، نسبت هسته به سیتوپلاسم

مقدمه

است تا در دستگاه‌های هماتولوژی (Cell Counter)،

امکان جداسازی سلول‌های بلاست از لنفوسیت‌ها ایجاد شود. تشخیص‌هایی که امروزه توسط پزشکان داده می‌شود، بیشتر مبتنی بر میزان بزرگی هسته و افزایش نسبت هسته به سیتوپلاسم است (۲). این اندازه‌گیری کیفی است و برای تصمیم‌گیری بهتر، نیاز است تا پارامترهایی به صورت کمی برای آن‌ها تعریف شود. در این مطالعه ابتدا در بخش اول با استفاده از تکنیک‌های جداسازی رنگ‌ها، تصاویر را به زیرتصویر با رنگ‌های متفاوت تبدیل کرده، هسته را جداسازی کردیم و در بخش دوم و سوم، به ترتیب میزان گرد بودن هسته و نسبت هسته به

در حالت طبیعی خون محیطی (Peripheral blood smear) فاقد سلول‌های نوع بلاست می‌باشد. نفوذ سلول‌های بلاست از مغز استخوان به خون محیطی نشان دهنده‌ی بیماری سرطان خون یا لوسمی است. سرطان خون به انواع میلویدی و لنفوییدی تقسیم‌بندی می‌شود که هر کدام نوع حاد یا مزمن دارند (۱-۲). در برخی از حالات التهابی و عفونی سلول‌های لنفوسیت به صورت فعال در می‌آیند و بسیار شبیه سلول‌های بلاست می‌شوند که به آن‌ها لنفوسیت‌های آتیپیک گفته می‌شود. با توجه به اهمیت این مطلب تلاش‌های زیادی صورت گرفته

^۱ گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ دانشیار، گروه آسیب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین ربانی

سیتوپلاسم را اندازه‌گیری کردیم. اشکال ۱ و ۲ به ترتیب مراحل مطالعه را نمایش می‌دهند.

روش‌ها

(۱) استخراج هسته

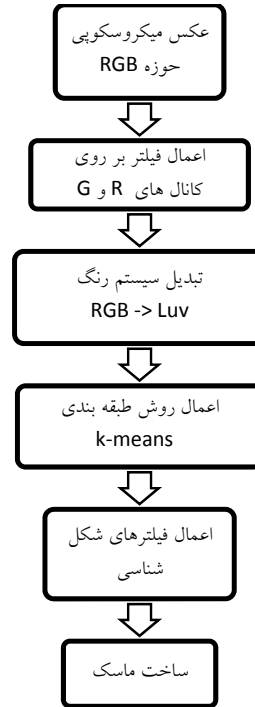
(۱-۱) پیش پردازش

به منظور کاهش نویز برق شهر موجود بر روی سیم حامل سیگنال، یک فیلتر میانه بر روی دو زیرباند قرمز و سبز تصویر اعمال گردید. علت استفاده از این دو زیرباند این بود که زیرباند آبی تصویر حاوی اطلاعات کمی از سلول و به خصوص هسته‌ی سلول است. در این جا به منظور جلوگیری از کاهش کیفیت لبه‌های تصویر از اعمال فیلتر پایین گذر صرف‌نظر شده است. پس از این اعمال فیلتر، سیستم رنگ تصویر به LUV تغییر داده می‌شود. علت انجام این کار این است که میزان همبستگی رنگ‌ها در این نوع سیستم رنگ به یکدیگر کمتر می‌باشد و این به تشخیص اجزاء سلول به صورت مستقل کمک می‌کند (۳-۴).

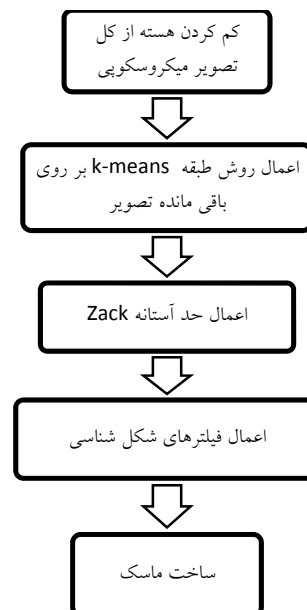
(۱-۲) جداسازی هسته از کل تصویر

برای جداسازی هسته از تصویر میکروسکوپی، از روش *k-means clustering* استفاده نمودیم و کل تصویر میکروسکوپی را به ۳ زیرتصویر تقسیم کردیم (۵-۷). از بین این تصاویر، زیرتصویری که حداقل میانگین رنگ قرمز داشت، حاوی هسته بود. این ضابطه به صورت سعی و خطا و از روی اعمال الگوریتم بر روی تصاویر نمونه‌ی مورد آزمایش به دست آمده است (۸-۱۴). شکل (۳) سه زیرتصویر حاصل از الگوریتم *k-means* را نمایش می‌دهد.

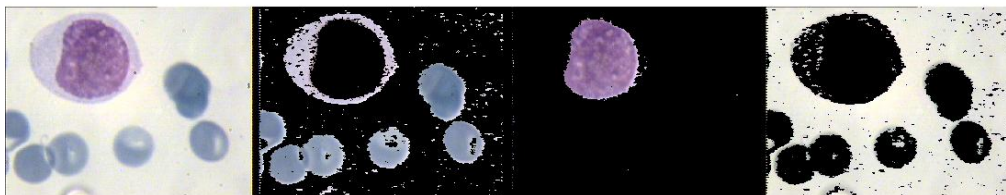
در گام بعدی به منظور کاهش نویزهای نقطه‌ای و خالص نمودن ماسک هسته، ابتدا تصویر را با استفاده از عملگرهای شکل شناسی یک بار با فیلتر به قطر ۲ پیکسل بستیم و سپس آن را با یک فیلتر به قطر ۸ پیکسل باز کردیم و در نهایت با اعمال حداکثر



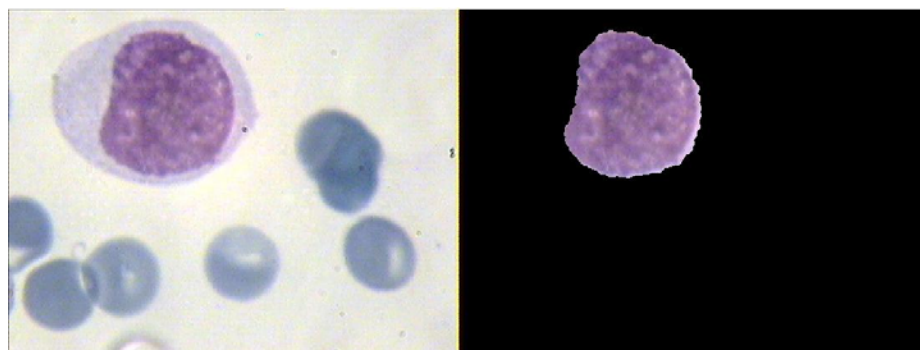
شکل ۱. روند استخراج الگوهای هسته از سلول



شکل ۲. روند استخراج الگوهای سیتوپلاسم سلول



شکل ۳. سه زیرباند خروجی روش k-means



شکل ۴. نتیجه‌ی اعمال ماسک هسته بر روی تصویر

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i ; \quad x_i \in \text{boundary of cell}$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i ; \quad y_i \in \text{boundary of cell}$$

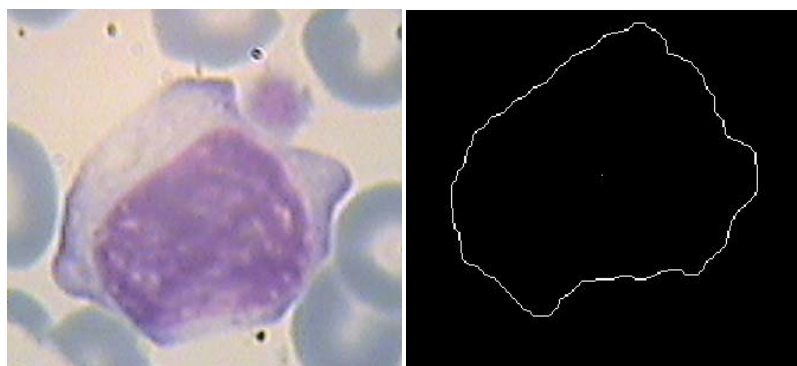
سپس فاصله‌ی تک تک پیکسل‌های موجود در لبه‌ی هسته را از طریق رابطه‌ی ۲ محاسبه کردیم. واضح است که هر چقدر هسته به دایره نزدیک‌تر باشد، میزان پراکندگی این فواصل کمتر خواهد بود (۱۵).

$$d = \sqrt{(x_i - \bar{x})^2 + (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{رابطه‌ی ۲:}$$

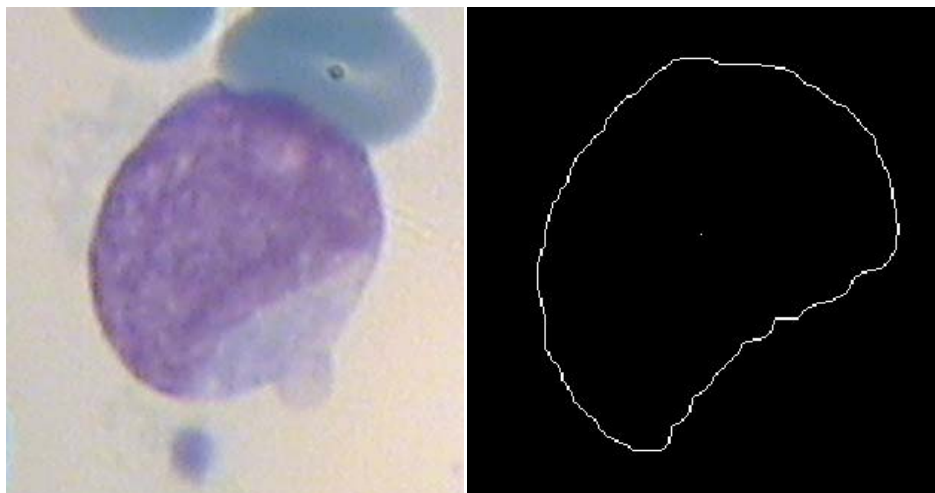
میزان این پراکندگی برای دو سلول آتیپیک و بلاست به ترتیب در اشکال ۵ و ۶ نمایش داده شده است.

مساحت ۵۰۰۰ پیکسل، تمامی اشیایی را که در تصویر مساحتی کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل داشتند، از تصویر حذف کردیم. شکل ۴ نتیجه‌ی خروجی این مرحله را نمایش می‌دهد.

(۲) تعیین میزان گرد بودن هسته: در تشخیص بلاست بودن یک هسته و یا آتیپیک بودن آن، میزان گرد بودن هسته بسیار مؤثر است. بدین منظور ابتدا مرکز جرم هسته از طریق رابطه‌ی ۱ به دست آمد. رابطه‌ی ۱:



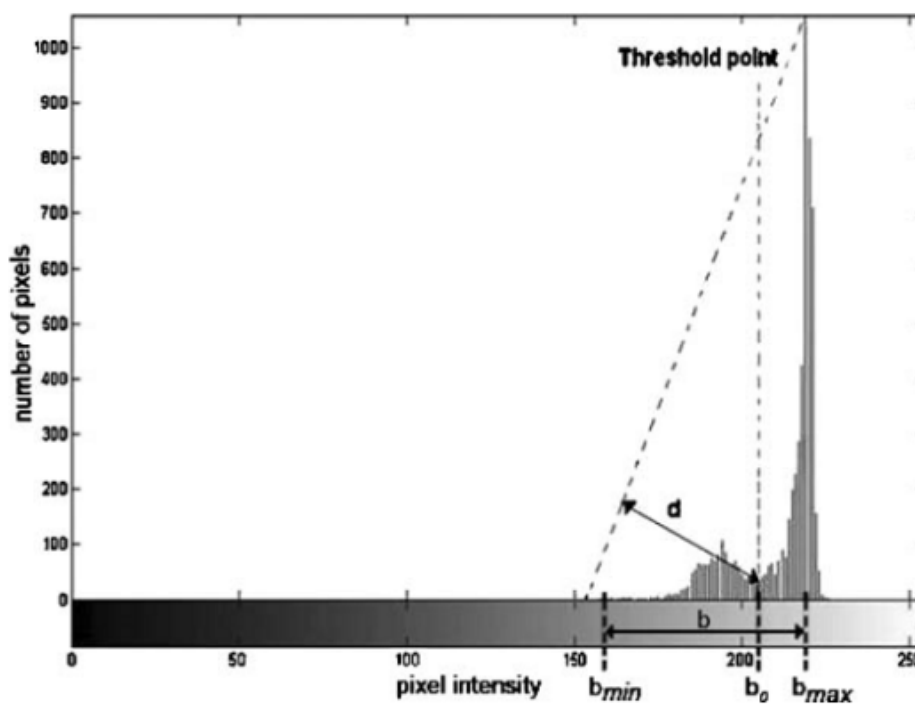
شکل ۵. مشخص شدن مرکز و لبه‌ی هسته (سمت راست)، تصویر اصلی سلول (سمت چپ) میزان پراکندگی: ۲۰۷/۱۰۶۱



شکل ۶: مشخص شدن مرکز و لبه‌ی هسته (سمت راست)، تصویر اصلی سلول (سمت چپ) میزان پراکندگی: ۱۰۲/۵۱۶۵

صورت که ابتدا هسته را از کل تصویر تفریق نموده، سپس با استفاده از حد آستانه‌ی مذکور، ناحیه‌ای را که حاوی کل سلول است، تشخیص دادیم. در شکل ۷ و رابطه‌ی ۳ نحوه‌ی محاسبه‌ی این حد آستانه مشخص شده است (۳).

(۳) جداسازی سیتوپلاسم از کل تصویر یکی از مهم‌ترین پارامترهای تشخیص سلول‌های بلاست، تعیین نسبتی موسوم به نسبت هسته به سیتوپلاسم می‌باشد. بدین منظور از یک حد آستانه‌ی موسوم به حد آستانه‌ی Zack استفاده شده است؛ بدین



شکل ۷: نحوه‌ی محاسبه حد آستانه‌ی تصویر سطح خاکستری از طریق هیستوگرام تصویر

رابطه‌ی ۳:

$$\text{hist} + \frac{\text{hist}_{\max} - \text{hist}_{\min}}{\text{graylevel}_{\max} - \text{graylevel}_{\min}} (\text{graylevel}) + \frac{\text{hist}_{\max} - \text{hist}_{\min}}{\text{graylevel}_{\max} - \text{graylevel}_{\min}} \text{graylevel}_{\min} = 0$$

$$d = \frac{\left| \text{hist} + \frac{\text{hist}_{\max} - \text{hist}_{\min}}{\text{graylevel}_{\max} - \text{graylevel}_{\min}} (\text{graylevel}) + \frac{\text{hist}_{\max} - \text{hist}_{\min}}{\text{graylevel}_{\max} - \text{graylevel}_{\min}} \text{graylevel}_{\min} \right|}{\sqrt{\frac{\text{hist}_{\max} - \text{hist}_{\min}}{\text{graylevel}_{\max} - \text{graylevel}_{\min}}^2 + 1}}$$

$$\text{zack threshold} = \max_{\text{graylevel}} d$$

<http://misp.mui.ac.ir/data/microscopic-image-data.html> تصاویر دارای رزولوشن 576×768 می‌باشند که توسط یک میکروسکوپ نوری معمولی با سه لنز چشمی اخذ شده و توسط یک کارت Pinnacle به منظور دیجیتال سازی به یک CCD متصل شده است. با توجه به اثربخشی نتایج استخراج هسته و سیتوپلاسم (شکل ۱۰) در تشخیص نهایی، نتایج حاصل از این دو الگو به صورت جداگانه به دست آمده است.

نتایج استخراج الگوها بر اساس دو معیار حساسیت و ویژگی بیان شده‌اند. نسبت میزان پیکسل‌هایی که به صورت صحیح (به عنوان هسته یا به عنوان سیتوپلاسم) تشخیص داده شده‌اند، به تعداد کل پیکسل‌ها (به عنوان هسته یا به عنوان سیتوپلاسم) حساسیت و نسبت تعداد پیکسل‌هایی که به صورت صحیح (به عنوان هسته یا به عنوان سیتوپلاسم) تشخیص داده نشده‌اند به تعداد کل پیکسل (به عنوان هسته یا به عنوان سیتوپلاسم) ویژگی تعریف می‌شود.

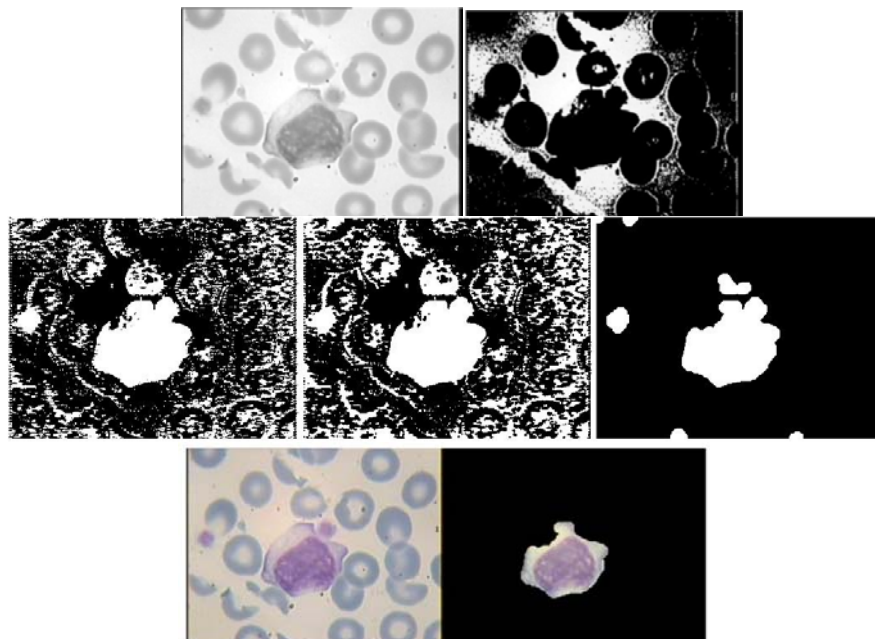
بالا بودن این دو معیار، نشانه‌ی عملکرد بهتر روش‌ها خواهد بود. این دو معیار با استفاده از فرمول‌های زیر قابل محاسبه می‌باشند.

پس از به دست آوردن این ناحیه و اعمال برخی تبدیلات شکل شناسی می‌توان آن را بر روی تصویر اعمال کرد و حدود سیتوپلاسم را در یک تصویر میکروسکوپی به دست آورد. بدین منظور ابتدا Zach threshold بر روی باندهای U و V اعمال شدند و سپس عملگرهای مورفولوژیکی بستن به اندازه‌ی ۲ پیکسل و باز کردن به اندازه‌ی ۱۵ پیکسل بر روی تفاضل دو زیرباند حاصل شده اعمال گردید. در نهایت به منظور حذف بخش‌های زاید یک فیلتر با اندازه‌ی ۱۰۰۰۰ پیکسل به تصویر اعمال گردید. شکل ۸ نمونه‌ای از این عملیات را نشان می‌دهد.

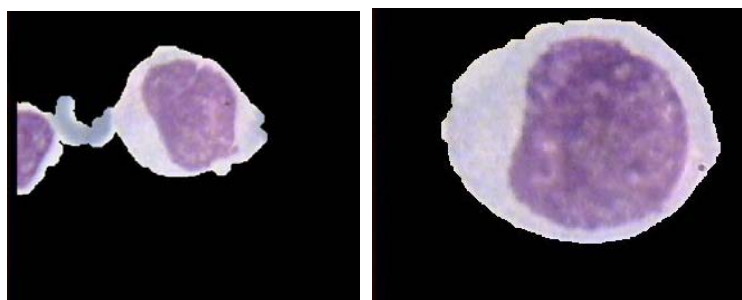
لازم به ذکر است که حد آستانه‌ی محاسبه شده در بالا، از آن جا که بر روی سطح روشنایی تصویر عمل می‌کند، بسیار به نحوه‌ی به دست آوردن تصویر بستگی دارد. بنابراین نمی‌توان از آن با عنوان یک روش مقاوم و قابل استفاده در تمام شرایط تصویرگیری یاد کرد. در شکل ۹ می‌توان نمونه‌های موفق و ناموفق این روش را مشاهده نمود (۲۱-۱۶).

یافته‌ها

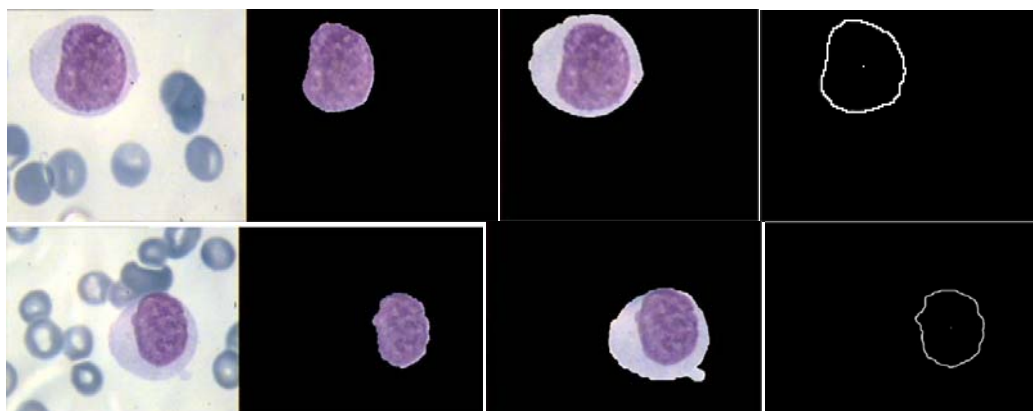
الگوریتم مذکور جهت استخراج هسته و سیتوپلاسم بر روی ۱۰۰ داده‌ی میکروسکوپی موجود در آدرس



شکل ۸. ردیف اول: اعمال **Zack thresholding** (سمت راست)، بر روی زیرباند **U** (سمت چپ)
 ردیف دوم: تصویر حاصل از تفاضل زیرباندهای **U** و **V** پس از اعمال **Zack thresholding** (سمت چپ)، تصویر حاصل از اعمال عملگر مورفولوژیکی بستن به اندازه‌ی ۲ پیکسل (وسط) و باز کردن به اندازه‌ی ۱۵ پیکسل (سمت راست)
 ردیف سوم: تصویر اصلی (سمت چپ) و مرز نهایی استخراج شده به عنوان سیتوپلاسم (سمت راست)



شکل ۹. نمونه‌ی موفق از حد آستانه‌ی **Zack** (سمت راست)، نمونه‌ی ناموفق حد آستانه‌ی **Zack** (سمت چپ)



شکل ۱۰. نمونه‌هایی از استخراج هسته و سیتوپلاسم

بحث

در این مقاله روشی اتوماتیک جهت تشخیص هسته و سیتوپلاسم ارائه گردید. در این روش با استفاده از روشی مبتنی بر خوشه‌بندی k-means، هسته سلول استخراج شد و با استفاده از روشی مبتنی بر Zach thresholding سیتوپلاسم به دست آمد. بر این اساس می‌توان به طور اتوماتیک نسبت هسته به سیتوپلاسم را که عاملی تعیین کننده در تعیین بلاست بودن سلول می‌باشد، محاسبه نمود. اگر چه این نسبت عامل مهمی در تعیین بلاست بودن سلول می‌باشد، اما نشانه‌های دیگر همچون تشخیص هسته نیز در تشخیص نهایی مؤثر می‌باشند. با استفاده از ویژگی‌های مختلف همچون اندازه‌ی هسته، میزان گرد بودن آن، نسبت هسته به سیتوپلاسم و ویژگی‌های استخراجی از هسته می‌توان در نهایت با استفاده از یک طبقه‌بندی کننده به تشخیص سلول بلاست و تمایز آن با سلول‌های آتیپیک پرداخت.

$$(1-4) \quad Sensitivity = \frac{T_p}{T_p + F_n}$$

$$(2-4) \quad Specificity = \frac{Tn}{T_n + F_n}$$

T_p : تعداد پیکسل‌های غیر مشکوک به هسته که غیر مشکوک به هسته شناسایی می‌شوند.

Tn : تعداد پیکسل‌های مشکوک به هسته که مشکوک به هسته تشخیص داده می‌شوند.

F_p : تعداد پیکسل‌های مشکوک به هسته که غیر مشکوک به هسته شناسایی می‌شوند.

F_n : تعداد پیکسل‌های غیر مشکوک به هسته که به صورت مشکوک به هسته شناسایی می‌شوند.

با بررسی نتایج استفاده از الگوریتم پیشنهادی مشخص شد که تشخیص نواحی مشکوک به وجود هسته دارای ویژگی ۷۸/۰۲ درصد و حساسیت ۷۹ درصد بود. تشخیص نسبت هسته به سیتوپلاسم سیتوپلاسم توسط الگوریتم نیز دارای ویژگی ۸۲/۵۰ درصد و حساسیت ۸۴ درصد بود.

References

- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 419-28.
- Maslak P. Blast Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia. ASH Image Bank [online] 2001. [cited 2001 May 12]; Available from: URL: <http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1458&AssetType=Asset>.
- Sadeghian F, Seman Z, Ramli AR, Abdul Kahar BH, Saripan MI. A framework for white blood cell segmentation in microscopic blood images using digital image processing. Biol Proced Online 2009; 11: 196-206.
- Ritter N, Cooper J. Segmentation and border identification of cells in images of peripheral blood smear slides. Proceedings of the 13th Australasian Conference, ACISP; 2008 Jul 7-9; Wollongong, Australia. 2008. p. 161-9.
- Ongun G, Halici U, Leblebicioglu K, Atalay V, Beksac M, Beksac S. Feature extraction and classification of blood cells for an automated differential blood count system. Proceedings of the International Joint Conference on Neural Networks; 2001 Jul 15-19; Washington, DC, USA. 2001. p. 2461-6.
- Jiang K, Liao QM, Dai SY. A novel white blood cell segmentation scheme using scale-space filtering and watershed clustering. Proceedings of the International Conference on Machine Learning and Cybernetics; 2003 Nov 2-3; Xian, China. 2003. p. 2820-5.
- Dorini LB, Minetto R, Leite NJ. White blood cell segmentation using morphological operators and scale-space analysis. Proceedings of the Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image; 2007 Oct 7-10; Minas Gerais, Brazil. 2007. p. 294-304.
- Scotti F. Automatic morphological analysis for acute leukemia identification in peripheral blood microscope images. Proceedings of the IEEE International Conference on Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications; 2005 Jul 20-22; Giardini Naxos, Italy. 2005. p. 96-101.

9. Kumar BD, Joseph DK, Sreenivasc TV. Teager energy based blood cell segmentation. Proceedings of the 14th International Conf. on Digital Signal; 2002 Jul 1-3; Santorini, Greece. 2002. p. 619-22.
10. Cseke I. A fast segmentation scheme for white blood cell images. Proceedings of the 11th International Conference on Pattern Recognition, Image, Speech and Signal Analysis; 1992 Aug-Sep 30-3; The Hague, Netherlands. 1992. p. 530-3.
11. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics 1979; 9(1): 62-6.
12. Tuzel O, Yang L, Meer P, Foran DJ. Classification of hematologic malignancies using texton signatures. Pattern Anal Appl 2007; 10(4): 277-90.
13. Sebesr JA. Multivariate Observations. 1st ed. London: Wiley; 1984.
14. Self-organizing map-based color image segmentation with k-means clustering and saliency map. ISRN Signal Processing [Online] 2011. Available from: URL: <http://www.isrn.com/isrn/sp/2011/393891/abs/>.
15. Soltanzadeh R, Rabbani H. Classification of three types of red blood cells in peripheral blood smear based on morphology. Proceedings of the 10th International Conference on Signal Processing; 2010 Oct 24-28; Beijing, China. 2010. p. 707-10.
16. Konoplev S, Bueso-Ramos CE. Advances in the pathologic diagnosis and biology of acute myeloid leukemia. Ann Diagn Pathol 2006; 10(1): 39-65.
17. Lezoray O, Cardot H. Cooperation of color pixel classification schemes and color watershed: a study for microscopic images. IEEE Trans Image Process 2002; 11(7): 783-9.
18. Meyer F, Beucher S. Morphological segmentation. Journal of Visual Communication and Image Representation 1990; 1(1): 21-46.
19. Lewandowski K, Hellmann A. Atlas of Hematology. Gdansk: Multimedia Medical Publisher; 2001.
20. Walter T, Klein J, Massin P, Erginay A. A contribution of image proceedings to the diagnosis of diabetic retinopathy-detection of exudates in color fundus images of the human retina. IEEE Transactions on Medical Imaging 2002; 21(10): 1236-43.
21. Osowski S, Markiewicz T. Feature Generation Forte Cell Image Recognition of Myelogenous Leukemia. Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks; 2005 Jul-Aug 31-4; Vienna, Austria. 2005. p. 2496-501.

An Automated Framework for Extraction of Nuclei and Cytoplasm of White Blood Cells from Peripheral Blood Smear Images

Ramin Soltanzadeh¹, Hossein Rabbani PhD², Ardeshir Talebi PhD³

Abstract

Background: One of the most remarkable factors in blast cells diagnosis is the increment of nucleus-cytoplasm ratio. Some other parameters like size of the nucleus and the whole, and how round the nucleus is also affect the diagnosis.

Methods: In this study, the explicit characters of nucleus were used to identify it from the other parts of blood smear. The nuclei were thus extracted by k-means clustering. The cytoplasm was then extracted based on gray level histogram.

Findings: This study was conducted on 100 microscopic images. The method had a specificity of 82.5% and a sensitivity of 84% in the extraction of nuclei. The corresponding values for cytoplasm detection were 75.02% and 79%.

Conclusion: In this Study present an automatic method to determine the nucleus and cytoplasm. Although the ratio of the cell nucleus to the cytoplasm is an important factor in determining the blast, but other signs such as detecting nucleolus are also effective in the final diagnosis.

Keywords: Blast cells, Threshold, Gray-level, Nucleus-cytoplasm ratio

¹ Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hossein Rabbani PhD, Email: h_rabbani@med.mui.ac.ir