



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

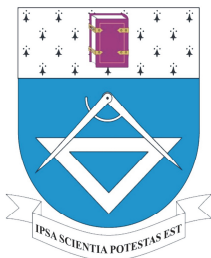


MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
Școala Doctorală a Facultății de
Automatică și Calculatoare



TEHNICI DE PROCESARE A IMAGINII ȘI DE EVALUARE A SEGMENTĂRII

- REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT -

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. ing. Vasile Manta

Doctorand:

Ing. Cristian Smochină

IAȘI - 2011

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de **17 Octombrie, 2011** la ora **14⁰⁰** în **Aula Universității Tehnice Gheorghe Asachi din Iași**, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**„TEHNICI DE PROCESARE A IMAGINII ȘI DE EVALUARE A SEGMENTĂRII”
(„IMAGE PROCESSING TECHNIQUES AND SEGMENTATION EVALUATION”)**

elaborată de domnul ing. **CRISTIAN-IONUT SMOCHINĂ** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof.Univ.Dr. Florina UNGUREANU
Universitatea Tehnică „Gh. Asachi”, Iași, Romania | președinte |
| 2. Prof.Univ.Dr. Vasile-Ion MANTA
Universitatea Tehnică „Gh. Asachi”, Iași, Romania | conducător de doctorat |
| 3. Prof.Univ.Dr. Florica MOLDOVEANU
Universitatea Politehnică București, Romania | referent oficial |
| 4. Prof.Univ.Dr. Walter G. KROPATSCH
Universitatea Tehnică din Viena, Austria | referent oficial |
| 5. Prof.Univ.Dr. Werner PURGATHOFER
Universitatea Tehnică din Viena, Austria | referent oficial |

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof.univ.dr.ing.**ION GIURMA**



Secretar universitate,

Handwritten signature
Ing. Cristina Nagiț

Rezumat

Această lucrare prezintă rezultatul cercetărilor în domeniul analizei de imagini microscopice, în particular segmentarea automată a imaginilor fluorescente ce conțin nucleeele celulelor și criptele din colon. Modalitatea de evaluare a rezultatelor segmentării este detaliată și un nou criteriu de evaluare este prezentat.

Metoda de discrepanță propusă se bazează pe comparația: segmentare automată vs. segmentare de referință. Această măsură de calcul a erorii elimină inconveniente ce apar în cazul obiectelor concave și permite un control mai ușor al sensibilității metodei față de asemănarea formelor obiectelor.

Cele mai folosite metode de procesare a imaginii sunt analizate și prezentate ținând cont de ambele domenii ale patologiei: citologie și histologie. Sunt propuse metode de segmentare pentru aceste două domenii: segmentarea nucleelor celulelor (folosită în citologie) și segmentarea criptelor (folosită în histologie).

Având în vedere problema critică în imaginile microscopice ale țesuturilor afectate de cancer de colon, sunt prezentate trei tehnici pentru detecția muchiilor nucleelor lipite/grupate. Sunt propuse două abordări pentru delimitarea cu o mare acuratețe a fundalului.

Nuceele înlănțuite sunt segmentate folosind punctele de concavitate și un set de șabloane și reguli pentru a valida și a conecta aceste puncte. Nucleele lipite/grupate în structuri complexe sunt separate folosind forma secțiunii regiunilor de separare dintre nuclee sau corelația cu un șablon creat special pentru aceste regiuni.

Pentru segmentarea structurilor histologice au fost propuse două tehnici stabile de segmentare care identifică stratul epitelial/cripte. Ambele metode propuse folosesc abordări ierarhice cum ar fi ierarhia morfologică sau piramida anizotropică. Considerând importanța acestor reprezentări ierarhice, este prezentat un studiu al eșantionării și o comparație între structura ierarhică (fără eșantionare) și piramidă (cu eșantionare). Calitatea acestor tehnici și importanța lor este o consecință a abordării diferitelor nivele de detalii (coarse-to-fine). Obiectele de interes sunt detectate în primă fază folosind informațiile globale, după care detaliile sunt accesate pentru o mai bună delimitare.

Evaluarea a fost realizată comparând segmentarea automată cu cea de referință sau prin analiza vizuală a unui expert. Rezultatele confirmă că metodele propuse reușesc să rezolve eficient problemele în segmentarea imaginilor microscopice.

Cuprins

Rezumat	1
Cuprins	2
I. Introducere	5
I.1. Procesarea de imagini în microscopie.....	5
I.1.1. Imaginile fluorescențe microscopice.....	5
I.2. Specificații citologice și histologice.....	6
I.3. Formularea problemei și motivare.....	6
I.4. Diseminarea rezultatelor.....	7
II. Tehnici folosite în segmentarea imaginilor microscopice	9
II.1. Tehnici de segmentare pentru citologie și histologie.....	9
II.2. Discuții.....	9
II.3. Metode de segmentare detaliate.....	11
II.3.1. Creșterea regiunilor și algoritmul de inundare.....	11
II.3.2. Filtrarea anizotropică.....	11
II.3.3. Corelația.....	12
II.3.4. Regiunile stabile maximale.....	12
II.4. Concluzii.....	13
III. Metode de evaluare a segmentării	14
III.1. Introducere.....	14
III.1.1. Criteriile de evaluare supervizate.....	14
III.1.2. Criterii din literatura de specialitate.....	15
III.2. Problemele criteriilor existente.....	15
III.3. Discrepanța bazată pe distanța geodezică și asemănarea obiectelor.....	15
III.3.1. Context.....	15
III.3.2. Distanța dintre curbe.....	16
III.3.3. Calculul erorii.....	16
III.3.3.1. Eroarea de la curba segmentată la cea de referință.....	16
III.3.3.2. Eroarea de la curba de referință la cea segmentată.....	17
III.3.4. Eroarea de segmentare.....	17
III.3.5. Exemplu.....	17
III.4. Rezultate.....	18
III.4.1. Test cu imagini sintetice.....	18

III.4.2. Teste cu imagini reale	19
III.5. Concluzii	19
IV. Tehnici de segmentare pentru citometrie	20
IV.1. Introducere.....	20
IV.2. Detecția fundalului.....	21
IV.2.1. Detecția folosind creșterea regiunilor	21
IV.2.2. Detecția folosind reconstrucția morfologică.....	22
IV.3. Segmentarea nucleelor înlănțuite	22
IV.3.1. Detecția punctelor de concavitate	22
IV.3.2. Validarea regiunilor de separare	23
IV.3.2.1. Șabloane geometrice și reguli de validare	23
IV.3.3. Rezultate	24
IV.3.3.1. Evaluare	24
IV.4. Detecția nucleelor lipite folosind profilul regiunii de separare	24
IV.4.1. Detecția V	25
IV.4.1.1. Validarea regiunilor de separare	25
IV.4.2. Detecția completă a conturilor nucleelor	25
IV.4.3. Rezultate	26
IV.5. Detecția nucleelor lipite folosind corelația.....	26
IV.5.1. Corelația folosind complementul unui filtru gaussian	26
IV.5.2. Detecția regiunilor de separare	27
IV.5.3. Rezultate	27
IV.6. Concluzii	27
V. Tehnici de segmentare pentru histometrie.....	29
V.1. Segmentarea stratului epitelial în imagini DAPI.....	29
V.1.1. Segmentarea lumenului folosind ierarhia morfologică	30
V.1.1.1. Construcția ierarhiei morfologice.....	30
V.1.1.2. Reconstrucția lumenului	30
V.1.2. Validarea lumenului și detecția conturului exterior al criptei	31
V.1.3. Rezultate	32
V.2. Eșantionarea în reprezentarea ierarhică	32
V.2.1. Motivație.....	32
V.2.2. Reconstrucția lumenului folosind piramida morfologică	33
V.2.2.1. Relația dintre domeniul eșantionat și cel neeșantionat	33
V.2.2.2. Detecția lumenului	34
V.2.3. Filtrare și eșantionare vs. eșantionare și filtrare	34
V.2.4. Rezultate	35
V.3. Segmentarea stratului epitelial în imagini cu cytokeratină	35

V.3.1. Îmbunătățirea imaginii	36
V.3.2. Detecția conturilor exterioare ale criptelor.....	36
V.3.2.1. Piramida anizotropică	37
V.3.3. Separarea criptelor și detecția lumenului	38
V.3.3.1. Separarea criptelor.....	38
V.3.3.2. Detecția lumenului	38
V.3.4. Rezultate	39
V.4. Concluzii	39
VI. Concluzii	40
VI.1. Contribuții.....	40
VI.1.1. Criterii de evaluare a segmentării	40
VI.1.2. Tehnici de procesare în analiza imaginilor microscopice	40
VI.1.3. Segmentarea nucleelor celulelor	40
VI.1.4. Segmentarea criptelor.....	41
VI.2. Direcții viitoare de cercetare.....	41
Referințe	42

I. Introducere

Segmentarea imaginilor este o etapă critică și un pas fundamental în analiza automată a imaginii. O mare varietate de algoritmi de segmentare a fost propusă în literatura de specialitate în ultimele decenii pentru o gamă largă de aplicații și domenii. Analiza imaginilor medicale a primit o atenție specială din partea cercetătorilor datorită aplicabilității practice în sănătatea omului. În această teză ne concentrăm asupra procesării de imagini microscopice și evaluarea algoritmilor propuși.

În patologie, patologistul oferă un diagnostic după ce analizează și verifică proprietățile unui set de mostre biologice (țesuturi tratate cu diferiți marcatori). Acest proces complex poate fi îmbunătățit prin furnizarea patologului/cercetătorului date concrete obținute prin analiza automată a imaginilor.

Tehnicile de procesare a imaginilor permit evaluarea/analiza unor seturi mari de imagini în comparație cu inspecția vizuală și sunt folosite în ambele domenii ale patologiei: citologie (studiul celulelor) și histologie (analiza structurilor microscopice din țesut) [Ta, *et al.*, 2009].

Performanța acestor algoritmi trebuie verificată folosind criterii de evaluare care caracterizează și evidențiază situațiile în care rezultatele obținute nu satisfac cerințele impuse de domeniul în care sunt folosite [Zhang, 1996].

Această lucrare prezintă contribuții și îmbunătățiri semnificative în segmentarea automată a imaginilor citologice și histologice dar și criterii de evaluare a segmentării.

I.1. Procesarea de imagini în microscopie

Tehnicile de procesare de imagini sunt folosite în patologie pentru a elimina posibila subiectivitate în analiza imaginilor cauzată de diferite interpretări ale patologilor dar și pentru posibilitatea de a analiza/evalua seturi mari de date/imagini.

I.1.1. Imaginile fluorescente microscopice

Microscopia fluorescentă folosește proprietățile fluorescente ale marcarilor aplicați pe țesut pentru a achiziționa imagini microscopice ale mostrelor biologice. În funcție de markerul folosit, diferite componente biologice (proteine) sunt evidențiate: acești marcatori fluorescenți “se leagă”/reacționează cu anumite proteine cu ar fi acidul deoxiribonucleic (ADN) sau cytokeratină.

În acest studiu suntem interesați de vizualizarea a două tipuri de obiecte (proteine): nucleul celulei (conține ADN) și cripte (structuri de celule epiteliale evidențiate datorită cytokeratinei).

În Fig.I.1a regiunile luminoase reprezintă nucleele și sunt rezultatul reacției dintre markerul Di Aminido Phenyl Indol (DAPI) [Morikawa and Morikawa, 1981] și ADNul din

nucleul celulei. Pentru a vizualiza criptele/stratul epitelial se folosește marcatorul anti-cytokeratina 8 (CK-8) [Moll, *et al.*, 2008] deoarece reacționează cu cytokeratina aflată doar în cytoskeletonul celulelor epiteliale. În Fig.I.1b regiunile luminoase reprezintă rezultatul reacției dintre CK-8 și componentele epiteliale.

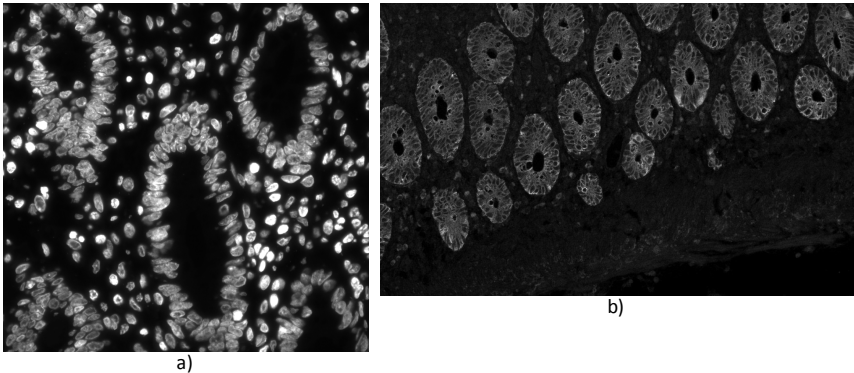


Fig.I.1 Imagini fluorescente din secțiuni de colon marcate cu DAPI a) și CK-8 b).

Această lucrare folosește imaginile cu nivele de gri (grey-scale) pe 8 biți achiziționate folosind TissueFAXSTM slide scanner (TissueGnostics GmbH, Austria).

I.2. Specificații citologice și histologice

Acest studiu analizează tehnicile de procesare automată a imaginilor obținute din secțiuni de țesut și evidențiază două tipuri de răspunsuri a proteinelor: ADN (imagini cu nucleele celulelor, Fig.I.1a) și cytokeratină (imagini cu cripte, Fig.I.1b).

Următoarele informații biologice trebuie evidențiate: nucleele din imaginile DAPI (e.g., Fig.I.1a, Fig.IV.1) și criptele din imaginile DAPI (Fig.V.1a) și CK-8 (Fig.I.1b, Fig.V.9).

I.3. Formularea problemei și motivare

Obiectivul segmentării în imaginile microscopice este de găsi pentru fiecare componentă curba care delimitează nucleul, celula sau structura histologică; dificultatea acestei segmentări este dată de variațiile puternice ale caracteristicilor obiectelor de interes.

- **Segmentarea nucleelor celulelor.** Principala motivare pentru segmentarea nucleelor este de a oferi patologilor/cercetătorilor informații cantitative despre aranjamentele și caracteristicile nucleelor celulelor. Analiza parametrilor citologici pentru fiecare celulă în ambientul lor natural oferă o mai bună viziune asupra dezvoltării și evoluției țesuturilor [Baggett, *et al.*, 2005];

- **Segmentarea criptelor.** Rezultatul aceste segmentări este important deoarece raportul arii epiteliale-stroma furnizează informații importante în evaluarea cancerului de colon dar și a altor organe [de Kruijff Esther, *et al.*, 2011];
- **Evaluarea segmnetării.** Segmentarea automată este mult mai rapidă decât analiza vizuală și nu este afectată de subiectivitatea umană. Cu toate acestea, o analiză riguroasă a acestor rezultate trebuie realizată folosind criteriile corespunzătoare.

I.4. Diseminarea rezultatelor

Această teză se bazează aproape în totalitate pe 10 publicate în jurnale (3), conferințe indexate IEEE Xplore (2), Springer Lecture Notes in Computer Science-LNCS (1) și Bioinformatics-LNBI (1), ACM (1) și alte conferințe internaționale (2). O lista completă a publicațiilor este prezentată în continuare:

- Capitolul II se bazează pe:
 - ✓ **Cristian Smochină**, Vasile Manta, *Industrial inspection system using triangulation*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Tom LVI(LVIII), fasc. 3-4, Automatic Control and Computer Science, pp. 75-82, 2008 [**Smochina and Manta, 2008**].
 - ✓ **Cristian Smochină**, Paul Herghelegiu and Vasile Manta, *Image processing techniques used in microscopic image segmentation*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Automatic Control and Computer Science, Tom LVII(LXI), fasc. 2, 2011 (accepted for publications) [**Smochina, et al., 2011e**].
- Capitolul III conține rezulatele prezentate în:
 - ✓ **Cristian Smochină**, Vasile Manta and Radu Rogojanu, *New discrepancy measure for evaluation of segmentation quality*, In Proc. 11th IASTED International Conference on Computer Graphics and Imaging, Innsbruck, Austria, track 679-053, 2010 [**Smochina, et al., 2010a**].
- Rezultatele prezentate în Capitol IV sunt publicate în:
 - ✓ **Cristian Smochină**, Vasile Manta, Giovanna Bises and Radu Rogojanu, *Automatic cell nuclei detection in tissue sections from colorectal cancer*, In Proc. 14th International Conference on System Theory and Control, Sinaia, Romania, pp. 519-524, 2010 [**Smochina, et al., 2010b**].
 - ✓ Radu Rogojanu, Giovanna Bises, **Cristian Smochină** and Vasile Manta, *Segmentation of cell nuclei within complex configurations in images with colon sections*, In Proc. IEEE 6th International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, Cluj-Napoca, Romania, pp. 243-246, 2010 [**Rogojanu, et al., 2010**].
 - ✓ **Cristian Smochină**, Anca Serban and Vasile Manta, *Segmentation of cell nuclei within chained structures in microscopic images of colon sections*, In Proc. 27th

Spring conference on Computer Graphics, Viničné, Slovak Republic, pp. 146-154, 2011 [**Smochina, et al., 2011a**].

- ✓ Paul Herghelegiu, **Cristian Smochină** and Vasile Manta, *GPU method for registering multiple MRI sequences*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Automatic Control and Computer Science, Tom LVI(LX), fasc. 4, pp. 175-183, 2010 [**Herghelegiu, et al., 2010**].
- Capitolul V conține rezultate din:
 - ✓ **Cristian Smochină**, Vasile Manta and Walter Kropatsch, *Semantic segmentation of microscopic images using a morphological hierarchy*, In Proc. 14th International Conference on Computer Analysis of Images and Patterns, Seville, Spain, LNCS 6854, pp. 102-109, 2011 [**Smochina, et al., 2011b**].
 - ✓ **Cristian Smochină**, Radu Rogojanu, Vasile Manta and Walter Kropatsch, *Epithelial area detection in cytokeratin microscopic images using MSER segmentation in anisotropic pyramid*, In Proc. 6th IAPR International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics, Delft, The Netherlands, LNBI 7036, pp. 318, 2011 [**Smochina, et al., 2011c**].
 - ✓ **Cristian Smochină**, Vasile Manta and Walter Kropatsch, *Sampling step importance in hierarchical semantic segmentation of microscopic images*, In Proc. 15th International Conference on System Theory and Control, Sinaia, Romania, 2011 (accepted for publications) [**Smochina, et al., 2011d**].

Concluziile și direcțiile viitoare de cercetare pot fi găsite în Capitol VI.

II. Tehnici folosite în segmentarea imaginilor microscopice

În acest capitol este prezentat un studiu al celor mai folosite metode de segmentare propuse pentru imaginile microscopice. Acestea sunt grupate în funcție de aplicație: citologie sau histologie. Segmentarea imaginilor microscopice este considerată o sarcină dificilă [Nattkemper, 2005] iar publicațiile sunt răspândite în literatura de specialitate, i.e. microscopie, inginerie și imagistică biomedicală, bioinformatică și recunoaștere. Tehnicile de procesare a imaginii au fost des folosite în ultimele decenii iar imagistica medicală și microscopice au primit un efort considerabil din partea cercetătorilor.

II.1. Tehnici de segmentare pentru citologie și histologie

O clasificare a acestor metode bazată pe algoritmul de segmentare este dificil de realizat întrucât aproape toate tehnicile propuse combină cel puțin două metode de procesare. În schimb, tehnicile sunt grupate în funcție de metoda de procesare relevantă folosită și care face diferența față de celelalte metode [Smochina, *et al.*, 2011e].

II.2. Discuții

În urma analizei metodelor propuse [Smochina, *et al.*, 2011e], Tabel II.1 prezintă cele mai folosite metode în procesarea imaginilor microscopice și Tabel II.2 arată câteva criterii folosite pentru diferite faze în procesul de segmentare.

Metode de procesare	Articole
Threshold	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Zhou, <i>et al.</i> , 2009], [Naik, <i>et al.</i> , 2007], [Russell, <i>et al.</i> , 2009], [Madhloom, <i>et al.</i> , 2010], [Coelho, <i>et al.</i> , 2009], [Bai, <i>et al.</i> , 2009], [Wang, <i>et al.</i> , 2008], [Jeong, <i>et al.</i> , 2009], [Dalle, <i>et al.</i> , 2009], [Wei, <i>et al.</i> , 2011]
Watershed	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Zhou, <i>et al.</i> , 2009], [Roshni and Raju, 2011], [Lebrun, <i>et al.</i> , 2007], [Yang, <i>et al.</i> , 2006], [Angulo, 2008], [Coelho, <i>et al.</i> , 2009], [Jeong, <i>et al.</i> , 2009], [Cheng and Rajapakse, 2009], [Boucheron, <i>et al.</i> , 2010]
Gradient	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Roshni and Raju, 2011], [Dalle, <i>et al.</i> , 2009], [Angulo, 2008], [Coelho, <i>et al.</i> , 2009], [Danek, <i>et al.</i> , 2009], [Jeong, <i>et al.</i> , 2009], [Wang, <i>et al.</i> , 2008]
Active contours (level sets and snakes)	[Naik, <i>et al.</i> , 2007], [Naik, <i>et al.</i> , 2008], [Yang, <i>et al.</i> , 2005], [Cheng and Rajapakse, 2009], [Srinivasa, <i>et al.</i> , 2009], [Mosalinganti, <i>et al.</i> , 2009], [Dzyubachyk, <i>et al.</i> , 2008]
Morphological filtering	[Lebrun, <i>et al.</i> , 2007], [Dalle, <i>et al.</i> , 2009], [Bai, <i>et al.</i> , 2009]
Multiresolution approach	[Roshni and Raju, 2011], [Srinivasa, <i>et al.</i> , 2009]

Models (ellipsoidal, circle, hyperquadric, polynomial)	[Bai, <i>et al.</i> , 2009], [Gunduz-Demir, <i>et al.</i> , 2010], [Angulo, 2008]
Artificial neural network	[Colantonio, <i>et al.</i> , 2007], [Mefah, <i>et al.</i> , 2010]
Region growing	[Gunduz-Demir, <i>et al.</i> , 2010], [Roshni and Raju, 2011],
Bayesian classifier	[Naik, <i>et al.</i> , 2007], [Naik, <i>et al.</i> , 2008]
Gaussian filter	[Wahlby, <i>et al.</i> , 2004], [Lebrun, <i>et al.</i> , 2007]
Concavity points	[Wahlby, <i>et al.</i> , 2004], [Bai, <i>et al.</i> , 2009]
Markov model	[Zhou, <i>et al.</i> , 2009], [Yang and Choe, 2009]
Support vector machine	[Naik, <i>et al.</i> , 2007], [Lebrun, <i>et al.</i> , 2007], [Wang, <i>et al.</i> , 2008]
Image enhancement	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Dalle, <i>et al.</i> , 2009], [Madhloom, <i>et al.</i> , 2010]
K-means clustering	[Begelrnan, <i>et al.</i> , 2004], [Farjam, <i>et al.</i> , 2007]
Fuzzy c-means	[Colantonio, <i>et al.</i> , 2007]
Graph representation	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Gunduz-Demir, <i>et al.</i> , 2010]
Graph-cut	[Danek, <i>et al.</i> , 2009], [Yang and Choe, 2009]

Tabel II.1 Metode de procesare a imaginii folosite în segmentarea imaginilor microscopice [Smochina, *et al.*, 2011e].

Feature(s)	Paper(s)
area, perimeter, circularity	[Ta, <i>et al.</i> , 2009], [Naik, <i>et al.</i> , 2008], [Naik, <i>et al.</i> , 2007],
compactness	[Zhou, <i>et al.</i> , 2009], [Jeong, <i>et al.</i> , 2009]
shape, size and location	[Naik, <i>et al.</i> , 2008], [Danek, <i>et al.</i> , 2009]
convexity/convex hull	[Begelrnan, <i>et al.</i> , 2004], [Coelho, <i>et al.</i> , 2009]
concavity, zero crossing	[Wahlby, <i>et al.</i> , 2004], [Boucheron, <i>et al.</i> , 2010]
smoothness	[Jeong, <i>et al.</i> , 2009], [Naik, <i>et al.</i> , 2007]
variance	[Nilsson and Heyden, 2005], [Naik, <i>et al.</i> , 2007]
average	[Nedzved, <i>et al.</i> , 2000], [Colantonio, <i>et al.</i> , 2007]
gradient	[Colantonio, <i>et al.</i> , 2007], [Wahlby, <i>et al.</i> , 2004]
roundness	[Farjam, <i>et al.</i> , 2007], [Coelho, <i>et al.</i> , 2009]
standard deviation	[Naik, <i>et al.</i> , 2007]
eccentricity, semi-major and -minor axes	[Coelho, <i>et al.</i> , 2009]
probability distribution	[Zhou, <i>et al.</i> , 2009]
roughness	[Farjam, <i>et al.</i> , 2007]
moments	[Jeong, <i>et al.</i> , 2009]

Tabel II.2 Caracteristici/criterii utilizate [Smochina, *et al.*, 2011e].

Segmentarea cu prag (36% din articolele considerate) și metoda inundării (30% din articolele considerate) sunt cele mai folosite metode în procesarea de imagini microscopice în articolele considerate; acest lucru a fost evidențiat și în [Malpica and de Solorzano, 2002].

Pe lângă aceste metode simple, contururile active s-au dovedit a fi tehnici importante capabile să ofere rezultate satisfăcătoare [Malpica and de Solorzano, 2002]. Cea mai mare

problema în utilizarea acestora o reprezintă faza de inițializare. În [Dzyubachyk, *et al.*, 2008] sunt propuse noi abordări pentru această inițializare, dar aceasta rămâne totuși o problemă delicată.

În multe domenii rezultatele oferite de rețelele neuronale (ANN) sau sistemele de învățare automată (e.g., support vector machine SVM) depind în mare măsură de caracteristicile folosite. Informațiile geometrice *apriorice* (e.g., aproximare geometrică a elipsei, cercului) [Cloppet and Boucher, 2010], [Bai, *et al.*, 2009], [Jung and Kim, 2010] și punctele de concavitate sunt folosite pentru a ghida procesul de segmentare și a impune anumite restricții specifice domeniului.

O abordare interesantă o reprezintă reprezentarea pe mai multe nivele de informații a imaginii, urmând ca în primă fază doar informațiile globale să fie folosite (high-level knowledge) [Smochina, *et al.*, 2011e]. Multe abordări [Ta, *et al.*, 2009], [Gunduz-Demir, *et al.*, 2010] încearcă o abstractizare a imaginii folosind grafuri urmată de un set de operații aplicat pe aceste grafuri.

II.3. Metode de segmentare detaliate

Câteva metode sunt folosite în tehnicile propuse în capitolele IV și V și sunt descrise în continuare.

II.3.1. Creșterea regiunilor și algoritmul de inundare

Algoritmul de creștere a regiunilor (region growing) este unul dintre cele mai simple abordări în segmentarea imaginilor: pixelii vecini sunt grupați pentru a forma/indica regiunile de interes. Procesul iterativ începe cu un set de puncte predefinite (seeds), urmând ca vecinii acestora să fie atașați/marcați doar dacă satisfac anumite criterii. În general aceste criterii folosesc intensitățile/culoarea pixelilor și depind de domeniul în care sunt folosite.

În comparație cu algoritmul de creștere a regiunilor, algoritmul de inundare (watershed) accesează pixelii în funcție de intensitatea acestora. Ideea de bază este de a reprezenta imaginea ca o suprafață în care altitudinea este dată de intensitatea pixelilor [Pratt, 2001]. Prin inundarea acestor reprezentări “topografice” [Gonzalez and Woods, 1992], se obțin bazinele de acumulare (i.e., regiunile minime/“adânci” în care se acumulează apa) și barajele (i.e., crestele care onconjoară văile).

II.3.2. Filtrarea anizotropică

Ideea de bază a filtrării anizotropice este de a netezi imaginea intensitate considerând proprietățile locale ale imaginii. Difuzia anizotropica permite netezirea de-a lungul muchiilor, păstrând astfel informațiilor utile ale muchiilor [Weickert, 1998], [Schar and Weickert, 2000]. Acest proces este descris de o ecuație de tipul:

$$\frac{\partial I}{\partial t} = \nabla \cdot (D \cdot \nabla I), \quad D = \begin{pmatrix} a & b \\ c & d \end{pmatrix} \quad (\text{II.1})$$

unde I este imaginea originală, t denotă timpul de difuzie, ∇ denotă operatorul gradient și D este tensorul de difuzie. Fie Υ filtrarea anizotropică. Direcțiile de netezire sunt obținute folosind vectorii proprii (v_1 și v_2) ai tensorului ('second-moment matrix') J_ρ . Contrastul de-a lungul direcțiilor este dat de valorile proprii (μ_1 and μ_2). De exemplu, dacă $\mu_1 \gg \mu_2$ atunci vectorul v_1 indică orientarea cu cea mai mare fluctuație a intensităților iar v_2 este direcția indicată pentru netezire. Tensorul D al difuziei folosește aceeașii vectori ca și J_ρ dar valorile λ_1, λ_2 și elementele tensorului D sunt calculate folosind formulele descrise în [Scharr and Weickert, 2000].

Difuzia anizotropică neliniară este în general folosită pentru a îmbunătăți calitativ imaginile și chiar pentru a evidenția muchiile [Weickert, 1998].

II.3.3. Corelația

Corelația (cross-correlation) este o metodă standard de estimare a asemănării dintre două semnale și este deseori folosită în extragerea caracteristicilor [Gonzalez and Woods, 1992], [Brunelli and Poggio, 1993]. Corelația normalizată dintre imaginea I și șablonul t este definită astfel [Lewis, 1995]:

$$\gamma(u, v) = \frac{\sum_{x,y} [I(x, y) - \overline{I_{u,v}}] [t(x-u, y-v) - \overline{t}]}{\sqrt{\sum_{x,y} [I(x, y) - \overline{I_{u,v}}]^2 \sum_{x,y} [t(x-u, y-v) - \overline{t}]^2}} \quad (\text{II.2})$$

unde \overline{t} este valoarea medie a șablonului și $\overline{I_{u,v}}$ reprezintă media pixelilor de sub șablon.

Valoarea $\gamma(u, v)$ din Eq.II.2 reprezintă coeficientul de corelație în poziția (u, v) . Acesta ia valori mari pentru pixelii aflați într-o regiune asemănătoare cu șablonul folosit.

II.3.4. Regiunile stabile maximale

Algoritmul MSER (maximally stable extremal region) [Matas, *et al.*, 2002] verifică toate valorile posibile pentru pragul de segmentare iar componentele conectate sunt extrase analizând stabilitatea dată de schimbările de arie. Fiecare aplicare a pragului oferă imaginea binară B_t . Fie $\Psi(R_t^i)$ stabilitatea bazată pe schimbarea ariei regiunii R_t^i din imaginea B_t obținută cu pragul t :

$$\Psi(R_i^t) = \frac{|R_i^{t-\Delta}| - |R_i^{t+\Delta}|}{|R_i^t|} \quad (\text{II.3})$$

unde Δ este parametrul de stabilitate și $|\cdot|$ calculează aria regiunii. Proprietățile unei regiuni R_i^t de a fi MSER+ pot fi găsite în [Matas, *et al.*, 2002]. Avantajul acestei metode este dat de lipsa unui prag local sau global; toate pragurile sunt testate.

II.4. Concluzii

În acest capitol au fost prezentate cele mai importante metode de procesare folosite în analiza imaginilor microscopice. Pe lângă o statistică și discuții despre modul în care aceste metode sunt în general combinate, două direcții de dezvoltare a tehnicilor de segmentare sunt extrase [Smochina, *et al.*, 2011e]. O primă tendință presupune folosirea informațiilor geometrice *a priori* (e.g. diferite modele geometrice). În cazul în care acestea nu pot fi aplicate datorită contrastului sau muchiilor slabe, o a doua tendință presupune folosirea caracteristicilor obiectelor de interes în antrenarea ANN, SVM sau rețele bayesiene.

III. Metode de evaluare a segmentării

Acest capitol evidențiază importanța evaluării în procesul de segmentare și descrie conceptele și categoriile principale de criterii. După o analiză a problemelor existente (III.2), o nouă metodă de discrepanță este descrisă (III.3) [Smochina, *et al.*, 2010a].

III.1. Introducere

Existența unui mecanism de evaluare este necesară datorită numărului mare de algoritmi de segmentare propuși pentru diferite imagini din multiple domenii [Zhang, 1996]. Evaluarea calității rezultatelor segmentării este critică în toate aplicațiile de procesare a imaginii dar atenția cercetătorilor nu a fost la fel de accentuată ca în cazul algoritmilor de segmentare.

Primul studiu detaliat al acestor criterii a fost publicat de [Zhang, 1996]. Autorul analizează aplicabilitatea metodelor existente și le clasifică în metode analitice și empirice. [Zhang, 2001]. Cele empirice pot fi nesupervizate sau supervizate (de discrepanță). O schemă generală a procesului de segmentare și de evaluare este prezentată în Fig.III.1.

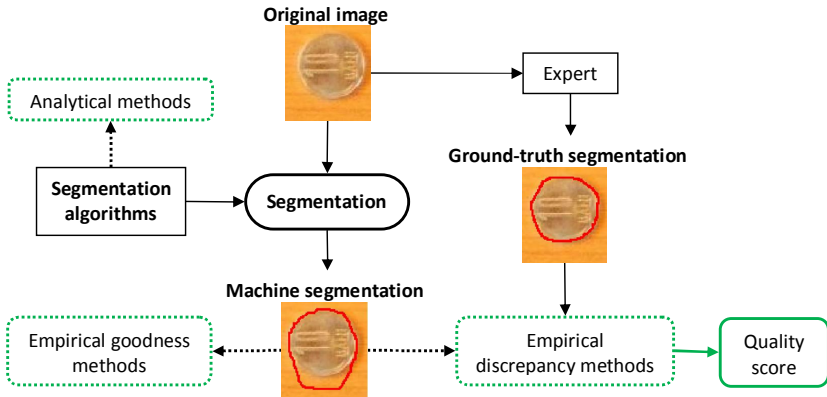


Fig.III.1. Procesul de segmentare și de evaluare.

III.1.1. Criteriile de evaluare supervizate

În [Zhang, 1996] metodele de discrepanță sunt grupate în funcție de criteriul folosit pentru a evidenția diferențele dintre segmentarea automată și cea de referință. În urma acestei comparații, patru tipuri de regiuni/pixeli apar [Bowyer, *et al.*, 2001], [Goumeidane, *et al.*, 2003]: True Positive (TP), False Positive (FP), False Negative (FN) și True Negative (TN). Aceste tipuri sunt exemplificate în Fig.III.2 folosind un obiect verde și o posibilă segmentare (roșu).

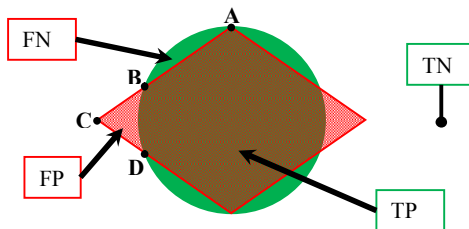


Fig.III.2 Obiectul rotund verde este greșit segmentat ca și un romb roșu.

III.1.2. Criterii din literatura de specialitate

Cele mai importante criteriile de evaluare propuse se bazează pe numărul și poziția pixelilor greșiți segmentați [Zhang, 1996]. Patru metode reprezentative au fost selectate (similar studiile din [Chabrier, *et al.*, 2008] și [Chabrier, *et al.*, 2004]): Pratt's Figure of Merit (FOM) [Goumeidane, *et al.*, 2003], distanța Hausdorff [Beauchemin, *et al.*, 1998] și criteriile Odet (*ODI* și *UDI*) [Odet, *et al.*, 2002] pentru pixeli supra- și sub-segmentați.

Pentru criteriul FOM valorile mari indică rezultate bune ale segmentării, iar pentru criteriile Hausdorff, *ODI* și *UDI* valorile mici indică rezultate bune.

III.2. Problemele criteriilor existente

Majoritatea metodelor de evaluare existente folosesc distanța euclidiană dintre cele două curbe pentru a calcula eroarea de segmentare. Această abordare oferă rezultate bune în cazul obiectelor convexe dar pentru formele concave rezultatele devin inconsistente.

O altă problemă o reprezintă și folosirea caracteristicilor obiectelor cum ar fi aria, perimetrul, excentricitatea care limitează aplicabilitatea metodei doar pentru obiecte simple. Pentru a rezolva aceste probleme, un nou criteriu de evaluare este propus în III.3.

III.3. Discrepanța bazată pe distanța geodezică și asemănarea obiectelor

Noua metodă de discrepanță propusă [Smochina, *et al.*, 2010a] se bazează pe comparația: segmentare automată vs. segmentare de referință. O primă îmbunătățire o reprezintă folosirea distanței geodezice în calculul erori eliminându-se astfel inconvenientele ce apar în cazul obiectelor concave. O a doua îmbunătățire este dată de un parametru ce controlează importanța asemănării obiectelor.

III.3.1. Context

Fie R curba de referință cu N_R pixeli și S curba segmentată cu N_S pixeli. Pentru fiecare regiune greșit segmentată (FP sau FN) eroarea este calculată în același mod iar

eroarea finală este dată de suma ponderată a fiecărei erori (Eq.III.4). O schemă a metodei propuse este prezentată în Fig.III.3.

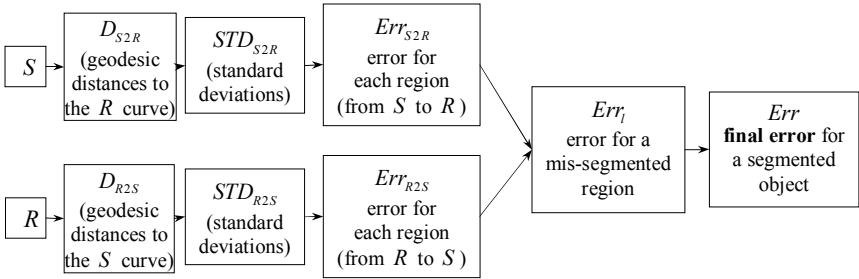


Fig.III.3. Schema tehnicii de evaluare propuse.

III.3.2. Distanța dintre curbe

În calculul distanței dintre curbe este considerat și interiorul obiectelor, nu numai perimetrul. Această abordare folosind regiuni “opace” (Opaque Object Approach OOA) nu măsoară distanțele prin regiunile corect segmentate, fiind considerate doar regiunile greșite (Fig.III.4). Calea cea mai scurtă dintre punctele celor două curbe nu trebuie să treacă prin regiunile opace; această condiție poate fi ușor satisfăcută folosind distanța geodezică. Distanță geodezică $d_G(x_a, x_b)$ dintre punctele x_a și x_b este denumită mai intuitiv și “distanță interioară” (“inner distance”) [Ling and Jacobs, 2007].

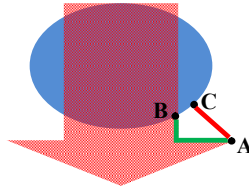


Fig.III.4 Obiectul rotund albastru greșit segmentat ca și săgeată roșie. Distanța euclidiană desenată cu roșu și cea geodezică cu verde.

III.3.3. Calculul erorii

III.3.3.1. Eroarea de la curba segmentată la cea de referință

Pentru fiecare punct al curbei segmentate $s_i \in S$ se determină cea mai scurtă distanță geodezică până la curba de referință R [Smochina, *et al.*, 2010a]. Se obține astfel vectorul de distanțe D_{S2R} cu lungimea N_S . În urma eliminării zgomotului, se calculează deviația standard pentru fiecare element într-o vecinătate de ε pixeli obținându-se vectorul STD_{S2R} .

Fiecare element al acestui vector indică gradul de asemănare dintre porțiuni ale celor două curbe. Eroarea fiecărei regiuni este calculată astfel [Smochina, *et al.*, 2010a]:

$$Err_{S2R} = \frac{1}{N_S} \sum_{i=1}^{N_S} D_{S2R}(i) \cdot [1 + \eta \cdot STD_{S2R}(i)] \quad (III.1)$$

Eroarea fiecărui pixel este dată de distanța geodezică $D_{S2R}(i)$ până la curba ideală ponderată de un factor $\varphi = 1 + \eta \cdot STD_{S2R}(i)$ ce indică gradul de asemănare dintre vecinătatea punctului i și porțiunea corespunzătoare din curba de referință. În funcție de domeniu, parametrul η poate fi schimbat atribuind diferite ponderi fidelității formelor.

III.3.3.2. Eroarea de la curba de referință la cea segmentată

Procesul anterior este repetat dar considerând distanțele de la curba de referință la cea segmentată. Se obține eroarea (similară cu Eq.III.1) [Smochina, *et al.*, 2010a]:

$$Err_{R2S} = \frac{1}{N_R} \sum_{j=1}^{N_R} D_{R2S}(j) \cdot [1 + \eta \cdot STD_{R2S}(j)] \quad (III.2)$$

III.3.4. Eroarea de segmentare

Eroarea unei regiuni folosește maximum celor două erori [Smochina, *et al.*, 2010a]:

$$Err_l = 1 - \frac{1}{1 + \kappa \cdot \max\{Err_{R2S}, Err_{S2R}\}} \quad (III.3)$$

Eroarea este 0 pentru o segmentare perfectă. Eroarea obiectului segmentat este dată de suma ponderată [Smochina, *et al.*, 2010a]:

$$Err = \frac{\sum_{l=1}^{n_c} Err_l \cdot A_l}{\sum_{l=1}^{n_c} A_l} \quad (III.4)$$

unde n_c este numărul de regiuni greșit segmentate și A_l este aria regiunii l .

III.3.5. Exemplu

Pentru a exemplifica criteriul propus este folosită situația din Fig.III.5. Vectorul distanțelor și al deviațiilor standard pentru regiunea *FPI* sunt prezentați în Fig.III.6.

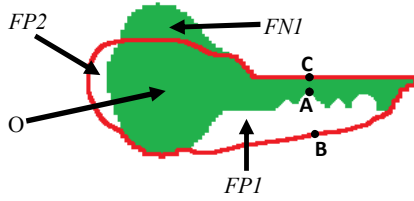


Fig.III.5 O posibilă segmentare S a obiectului O [Smochina, et al., 2010a].

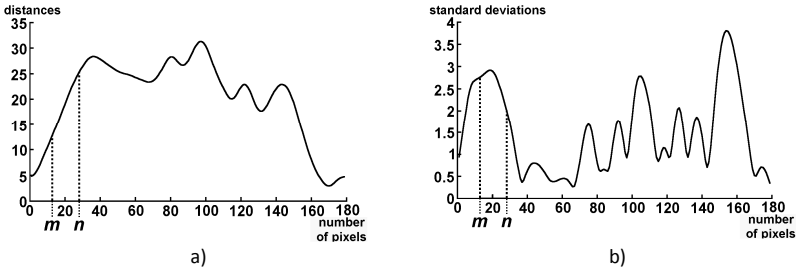


Fig.III.6 Vectorul distanțelor a) și deviațiilor standard b) pentru FP1 [Smochina, et al., 2010a]

Pixelii dintre indecșii m și n sunt într-o regiune unde cele două curbe au puține similarități iar eroarea lor va fi dată de distanța ponderată cu factorul $\varphi > 1$.

III.4. Rezultate

III.4.1. Test cu imagini sintetice

Fig.III.7 arată diferite segmentări (roșu) pentru obiectul concav. Rezultatele obținute cu metoda propusă OSFE sunt comparate cu ODI , UDI , FOM și Hausdorff în Tabel III. 1.



Fig.III.7 Diferite segmentări (roșu) pentru obiectul verde [Smochina, et al., 2010a].

Fig.III.7	OSFE* $\eta = 1$	ODI*	UDI*	FOM**	Hausdorff*
a	0.2310	0.3360	0.3605	21.778	12.2066
b	0.3958	0.4478	0.5778	24.1193	23.8537

c	0.6180	0.3875	0.5881	27.1516	24.0416
d	0.7131	0.1462	0.6160	34.675	20.2237
e	0.7666	0.3450	0.4578	41.2301	13.8924
f	0.8024	0.3955	0.6165	29.5016	18.0278

Tabel III.1 Evaluarea rezultatelor segmentărilor din Fig.III.7 [Smochina, et al., 2010a].

O segmentare bună este indicată de valorile mici „*” sau mari „**”.

III.4.2. Teste cu imagini reale

Un algoritm simplu bazat pe prag este folosit pentru a segmenta imaginile cu o monedă. Datorită pragului necorespunzător ales se obțin segmentările din Fig.III.8 ordonate descrescător din punct de vedere al calității. Evaluarea lor este prezentată în Tabel III.2.

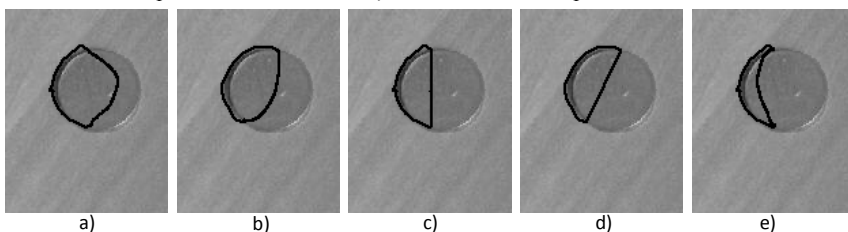


Fig.III.8 Diferite segmentări [Smochina, et al., 2010a].

Fig.III.8	OSFE * $\eta = 1$	ODIn*	UDIn*	FOM**	Hausdorff*
a	0.5830	0.7684	0.9173	97.0844	20.2485
b	0.6646	0.8638	1.2307	97.1112	28.6356
c	0.7129	0.7205	1.6318	97.2328	40
d	0.7427	0.6647	1.6205	97.2355	40.2492
e	0.78	0.4470	1.7861	97.17	48.2597

Tabel III.2 Evaluarea rezultatelor segmentărilor din Fig.III.8 [Smochina, et al., 2010a].

În Fig.III.8, cea mai bună segmentarea este a) iar metoda OSFE oferă rezultatele corecte.

III.5. Concluzii

În acest capitol au fost descrise criteriile de evaluare a segmentării și cele mai importante categorii. O nouă tehnică este propusă pentru evaluarea performanțelor algoritmilor prin comparația curbilor segmentate și de referință. Această tehnică folosește distanța geodezică dintre cele două curbe și introduce un factor de control al importanței asemănării formelor.

IV. Tehnici de segmentare pentru citometrie

Acest capitol abordează problema segmentării automate a nucleelor (Fig.IV.1).

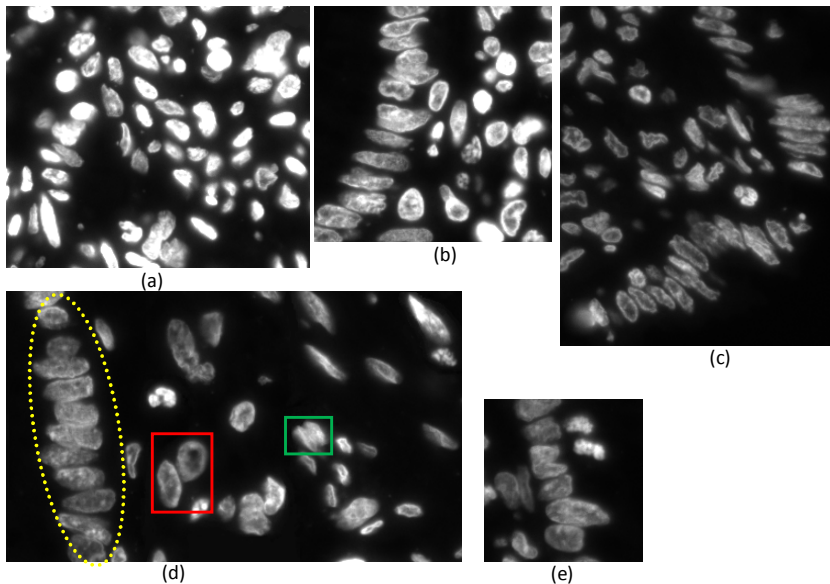


Fig.IV.1 Imagini fluorescente cu nucleee din secțiuni de țesut al colonului.

IV.1. Introducere

Problema critică în analiza imaginilor microscopice o reprezintă nucleeele care se ating (Fig.IV.1). Regiunile de separare dintre nucleee au o lățime de aproximativ 3-4 pixeli dar sunt situații în care pot fi chiar și de un pixel.

Au fost propuse trei tehnici de segmentare: una pentru structurile particulare de nucleee înlănțuite (IV.3) [Smochina, *et al.*, 2011a] și două pentru nucleeele grupate/lipite (IV.4 și IV.5) [Smochina, *et al.*, 2010b], [Rogojanu, *et al.*, 2010]. Fig.IV.2 prezintă o schemă a tehnicilor propuse.

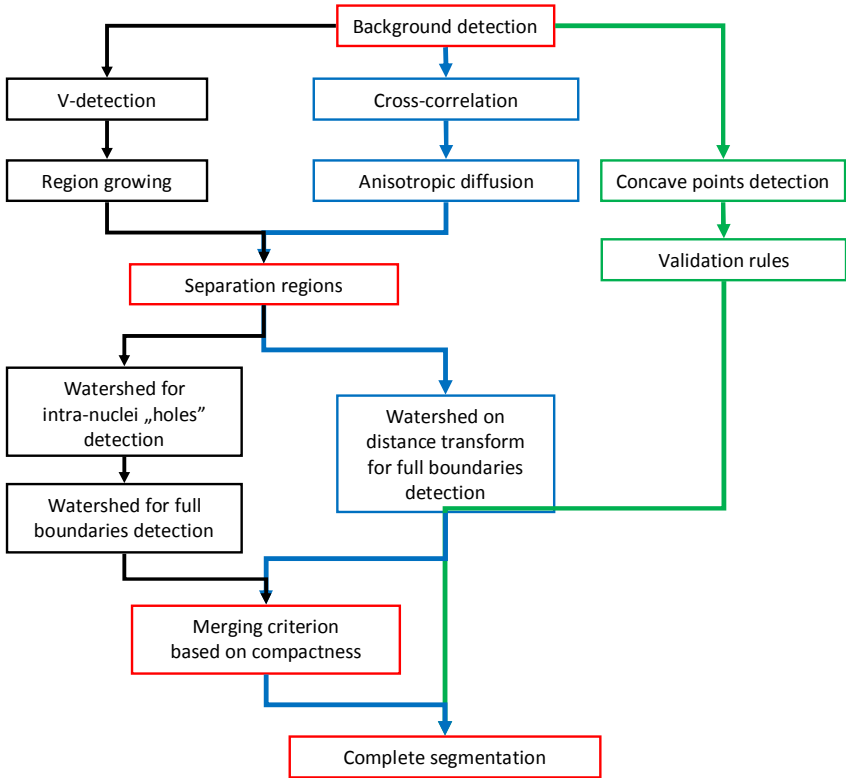


Fig.IV.2 Schema algoritmilor de segmentare: verde (IV.3), negru (IV.4) și albastru (IV.5).

IV.2. Detecția fundalului

Detecția fundalului este realizată folosind două abordări: una bazată pe creșterea regiunilor (IV.2.1) [Smochina, *et al.*, 2010b], [Rogojanu, *et al.*, 2010] și alta bazată pe reconstrucția morfologică (IV.2.2) [Smochina, *et al.*, 2011a].

IV.2.1. Detecția folosind creșterea regiunilor

Luminozitatea neuniformă determină diferite intensități pentru fundal și variații puternice apar lângă nuclee. Algoritmii de creștere a regiunilor sunt folosiți pentru că segmentarea printr-un singur prag nu va reuși să ofere rezultate acceptabile. Ideea de bază este de a lăsa regiunile predefinite să crească pe baza unui criteriu ce implică similitudinea intensităților. Regiunile inițiale sunt obținute printr-o segmentare cu un prag global mic [Rogojanu, *et al.*, 2010]. Acestea sunt desenate cu albastru în Fig.IV.3 iar creșterea lor cu verde.

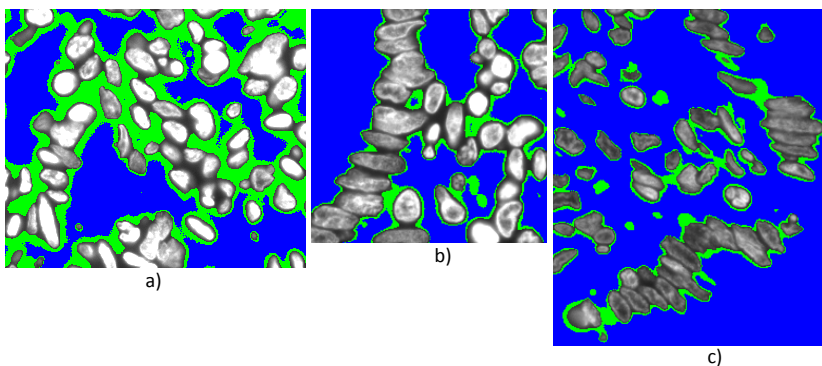


Fig.IV.3 Detectia fundalului [Smochina, *et al.*, 2010b].

IV.2.2. Detectia folosind reconstrucția morfologică

Această metodă [Smochina, *et al.*, 2011a] implică filtrarea anizotropică și reconstrucția morfologică urmată de o segmentare hysteresis [Canny, 1986]. Difuzia anizotropică este folosită pentru a reduce zgomotul și a accentua muchiile. Reconstrucția morfologică accentuează contrastul cu fundalul și elimină regiunile izolate și artefactele.

IV.3. Segmentarea nucleelor înlănțuite

Strucurile particulare cu nuclee înlănțuite (marcate cu galben în Fig.IV.1d) sunt segmentate folosind informații geometrice *a priori* despre modul de organizare și legăturile dintre nuclee [Smochina, *et al.*, 2011a]. După detectia fundalului, punctele de concavitate sunt folosite într-un set de reguli pentru a detecta liniile de separare.

IV.3.1. Detectia punctelor de concavitate

Nucleele înlănțuite au forme asemănătoare în regiunile în care se ating iar aceste regiuni sunt indicate de punctele de concavitate care indică “intrarea” în regiunile de separare. Punctele de concavitate detectate sunt evidențiate în Fig.IV.4.

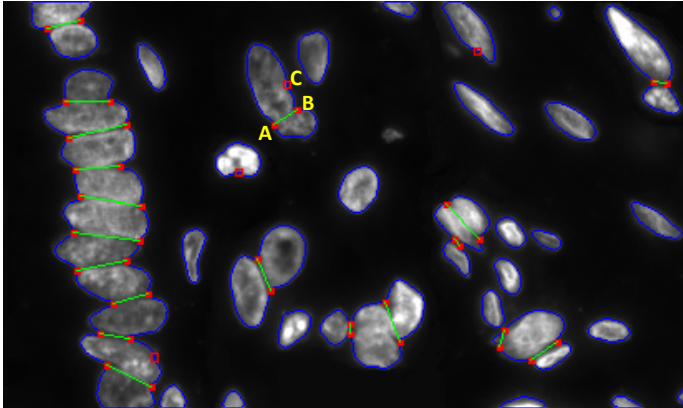


Fig.IV.4. Punctele de concavitate sunt marcate cu un pătrat plin roșu (TP) sau pătrat roșu gol (FP). Liniile de separare sunt desenate cu verde. [Smochina, *et al.*, 2011a]

IV.3.2. Validarea regiunilor de separare

Un set de șabloane este folosit pentru validarea punctelor de concavitate și detecția liniilor de separare [Smochina, *et al.*, 2011a].

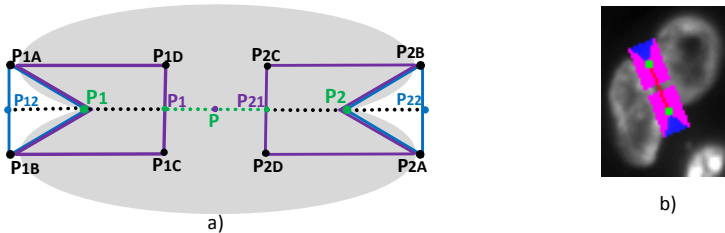


Fig.IV.5 a) Situația ideală a două nuclee care se ating. b) Cazul real (Fig.IV.1d) de plaiare a șablonelor. [Smochina, *et al.*, 2011a]

IV.3.2.1. Șabloane geometrice și reguli de validare

În Fig.IV.5a punctele P_1 și P_2 sunt puncte de concavitate. În această situație ideală, se observă două regiuni simetrice cu centrul de greutate în punctele de concavitate. Acestea pot fi approximate cu două dreptunghiuri, fiecare fiind format din două regiuni [Smochina, *et al.*, 2011a]. Dacă B reprezintă fundalul, N aria acoperită de nuclee și P_i și P_j punctele de concavitate cu șabloanele asociate T_i , K_i respectiv T_j , K_j , atunci următoarele reguli din Tabel IV.1 sunt folosite [Smochina, *et al.*, 2011a].

Overlapped areas	Rules
------------------	-------

$o_{T_i} = \text{card}(B \cap T_i)$	$r_1 = o_{T_i} > c_T \cdot \text{card}(T_i)$
$o_{T_j} = \text{card}(B \cap T_j)$	$r_2 = o_{T_j} > c_T \cdot \text{card}(T_j)$
$o_{K_i} = \text{card}(N \cap K_i)$	$r_3 = o_{K_i} > c_K \cdot \text{card}(K_i)$
$o_{K_j} = \text{card}(N \cap K_j)$	$r_4 = o_{K_j} > c_K \cdot \text{card}(K_j)$

Tabel IV.1 Reguli de validare [Smochina, *et al.*, 2011a].

Punctele P_i și P_j indică o linie de separare dacă ambele puncte sunt valide (i.e., verifică $r_{13} = r_1 \wedge r_3$ respectiv $r_{24} = r_2 \wedge r_4$) și ambele verifică $r = (r_1 \wedge r_3) \wedge (r_2 \wedge r_4)$. În cazul în care pentru un punct sunt validate mai multe puncte, legătura cu ponderea maximă este selectată

$$w_{ij} = \alpha(o_{T_i} + o_{T_j}) + \beta(o_{K_i} + o_{K_j}) \quad (\text{IV.1})$$

IV.3.3. Rezultate

Fig.IV.6 prezintă nuclee lipite cu puternice variații ale intensităților. Punctele de concavitate și regulile asociate reușesc detecția liniilor de separare.

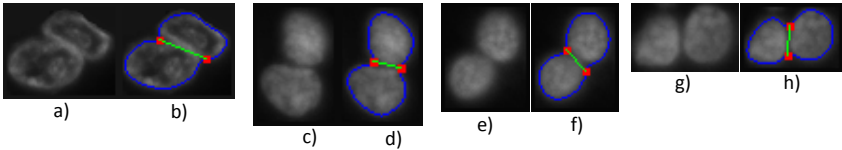


Fig.IV.6 a, b, c, d) Nuclee lipite și liniile de separare e, f, g, h) [Smochina, *et al.*, 2011a].

IV.3.3.1. Evaluare

Tehnica propusă a fost testată pe diferite tipuri de imagini cu nuclee marcate cu DAPI și comparate cu segmentările de referință. În urma evaluării, s-a obținut o acuratețe de $A=0.913$ observându-se o tendință de supra-segmentare. Folosirea setului de reguli garantează detecția situațiilor considerate și nu produce rezultate FP în celelalte cazuri.

IV.4. Detecția nucleelor lipite folosind profilul regiunii de separare

Cheia aceste tehnici este dată de succesiunea de filtre aplicate pentru a evidenția liniile de separare dintre nucleele lipite/grupate [Smochina, *et al.*, 2010b]. Aceste filtre au fost proiectate considerând profilul regiunii de separare (IV.4.1) iar algoritmul watershed a fost folosit pentru detecția completă a muchiiilor (IV.4.2).

IV.4.1. Detecția V

Pixelii din regiunile de separare au proprietatea că intensitățile lor sunt mai mici decât ai vecinilor aflați pe muchiile nucleelor. Această distribuție a intensităților în profilul secțiunii are forma literei V, de unde și numele metodei.

Pentru fiecare pixel candidat, sunt analizați pixelii dintr-un template 2D cu centrul în pixelul considerat. Acesta este marcat ca aparținând unei regiuni de separare dacă majoritatea vecinilor dintr-o anumită direcție pot fi considerați pe o linie de separare.

Dacă intensitatea unui pixel de pe coloana centrală este mai mică decât rezultatul convoluției dintre un filtru 1D Gaussian kernel și linia vecină stânga/dreapta, atunci acesta este marcat ca aparținând unei regiuni de separare. Dacă numărul pixelilor de pe coloana centrală este mai mare decât o valoare $nMinVpixels$, atunci centrul șablonului este marcat ca aparținând unei regiuni de separare [Smochina, *et al.*, 2010b]. Pentru a detecta toate regiunile, acest proces este repetat prin rotirea șablonului cu 45, 90 respectiv 135 grade.

IV.4.1.1. Validarea regiunilor de separare

Rezultate FP apar în cazul nucleelor cu intensități mici în interior. Acestea sunt eliminate prin validarea legăturii cu fundalul detectat. Regiunile FP nu pot atinge fundalul datorită intensităților mari de pe muchiile nucleului (regiunile cu roșu în Fig.IV.7a).

IV.4.2. Detecția completă a conturilor nucleelor

Algoritmul de creștere a regiunilor este aplicat folosind ca și seed-uri rezultatele TP detectate anterior. Algoritmul watershed este aplicat în două etape pentru a detecta conturul complet al nucleului. Într-o primă fază regiunile cu intensitate mică din interiorul nucleelor este detectată. Aceste regiuni sunt impuse ca și regiuni de creștere în cea de-a doua aplicare pe imaginea complementată. Regiunile găsite sunt prezentate în Fig.IV.7b. Un criteriu bazat pe compactitatea regiunilor este folosit pentru a unifica regiunile vecine aflate în același nucleu (e.g., R1, R2 și R3 din Fig.IV.7b).

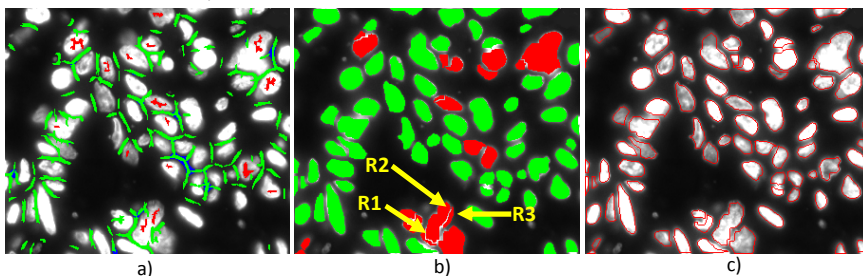


Fig.IV.7 Rezultate intermediare ale segmetării imaginii Fig.IV.1a cu rezultate FP (roșu) și TP (verde). b) Rezultatul algoritmului watershed. c) Conturile complete ale nucleelor. [Smochina, *et al.*, 2010b]

IV.4.3. Rezultate

Tehnica propusă a fost testată pe diferite seturi de imagini marcate cu DAPI iar rezultatele au fost comparate cu segmentările de referință.

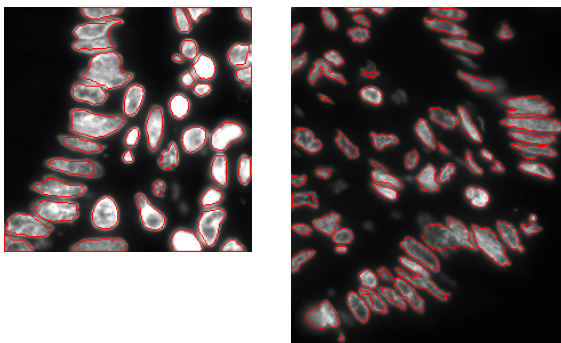


Fig.IV.8 Segmentarea imaginilor Fig.IV.1b, c [Smochina, *et al.*, 2010b].

IV.5. Detecția nucleelor lipite folosind corelația

A doua tehnică propusă pentru segmentarea nucleelor în configurații lipite/grupate folosește corelația pentru a evidenția regiunile de separare (IV.5.1) [Rogojanu, *et al.*, 2010]. Rezultatele sunt validate (IV.5.2) iar algoritmul watershed este folosit pentru detecția completă a conturilor.

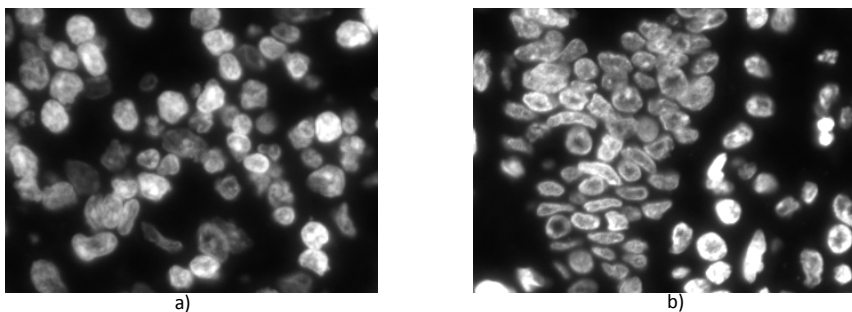


Fig.IV.9 Nuclee grupate [Rogojanu, *et al.*, 2010].

IV.5.1. Corelația folosind complementul unui filtru gaussian

Corelația poate fi folosită pentru detecția nucleelor prin definirea unor șabloane corespunzătoare tipurilor de nucleee. Acest lucru este greu de realizat datorită variației puternice a caracteristicilor (formă, dimensiune, orientare) dar mai ales distribuției neregulate a intensităților pixelilor în interiorul nucleului.

Având în vedere aceste dificultăți, corelația este folosită pentru a evidenția regiunile de separare dintre nuclee. Pentru că pixelii din aceste regiuni au intensități mai mici decât cei aflați pe muchiile nucleelor, complementul unui filtru gaussian 2D cu dimensiuni mici 3×3 a fost ales ca șablon. Astfel, pixelii aflați în regiunile considerate vor primi coeficienți de corelație mari. Rezultatele FP obținute în interiorul nucleelor sunt eliminate considerând conexiunea cu fundalul. Difuzia anizotropică este aplicată pentru a îmbunătăți contrastul dintre regiunile de separare cu coeficienți mari și restul pixelilor situați în nuclee.

IV.5.2. Detectia regiunilor de separare

Coeficienții mari ai pixelilor de pe regiunile de separare față de cei din nuclee face posibilă folosirea metodei de detecție V descrisă anterior în mod complementar; în acest caz, profilul secțiunii are forma Λ . Rezultatele FP sunt ignorate similar cu IV.4.1.1 (Fig.IV.10).

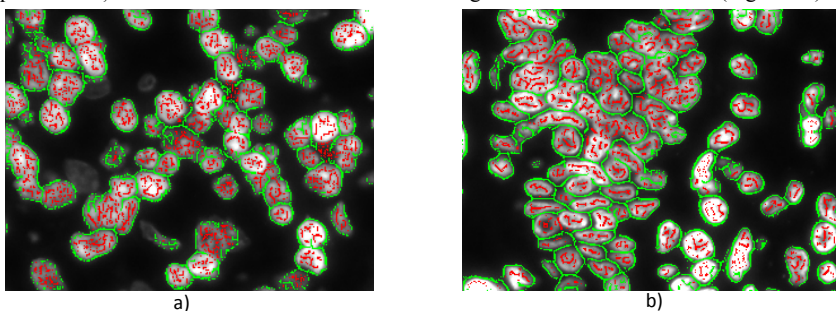


Fig.IV.10 Rezultatele TP sunt desenate cu verde iar cele FP cu roșu [Rogojanu, *et al.*, 2010].

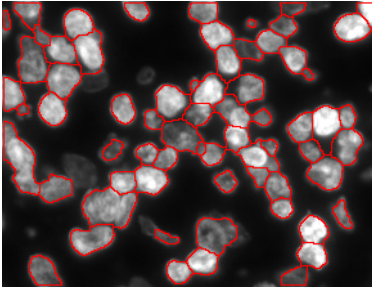
Regiunile inter-nuclee selectate anterior nu delimitează complet nucleul. Pentru a detecta conturul complet al unui nucleu, algoritmul watershed este aplicat pe rezultatul complementat al transformatei distanțe pentru imaginea binară ce conține regiunile de separare [Breu, *et al.*, 1995] (Fig.IV.11).

IV.5.3. Rezultate

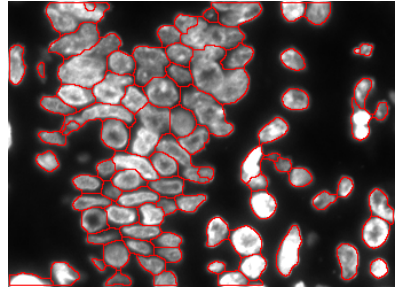
Liniile roșii reprezintă contururile obținute pentru fiecare nucleu (Fig.IV.11). Performanța aceste metode este măsurată folosind true positive ratio (TPR) 88.37% și mis-segmented ratio (MSR) 12.71% [Smochina, *et al.*, 2011a] fără a face diferența între nucleele supra- și sub- segmentate.

IV.6. Concluzii

În acest capitol sunt abordate problemele segmentării nucleelor în țesuturi tratate cu DAPI în configurații izolate, înlănțuite și grupate. Tehnicile automate propuse se bazează în



a)



b)

Fig.IV.11 Contururile nucleelor pentru imaginile din Fig.IV.9 [Rogojanu, *et al.*, 2010].

primul rând pe detecția fundalului urmată de metode care evidențiază regiunile de separare dintre nuclee.

Prima fază comună o reprezintă detecția fundalului. Două abordări au fost propuse (IV.2), una bazată pe segmentarea cu prag și creșterea regiunilor [Smochina, *et al.*, 2010b], [Rogojanu, *et al.*, 2010], respectiv filtrare anizotropică, reconstrucție morfologică și segmentare hysteresis [Smochina, *et al.*, 2011a].

Trei tehnici de segmentare au fost propuse în această secțiune: una pentru configurațiile înlănțuite (IV.3) și două pentru nucleele grupate/lipite (IV.4 și IV.5).

Informațiile geometrice sunt folosite pentru a defini un set de reguli capabile să valideze liniile de separare dintre punctele de concavitate (IV.3) [Smochina, *et al.*, 2011a]. Această metodă oferă rezultate bune chiar și în situațiile în care regiunile se separare dintre nuclee nu sunt vizibile.

Celelalte două metode (IV.4 și IV.5) folosesc diferite abordări bazate pe intensitatea pixelilor pentru a evidenția regiunile dintre nucleele lipite/grupate. Metoda din IV.4 [Smochina, *et al.*, 2010b] aplică o succesiune de filtre pentru a găsi regiunile a căror profil au forma literei V. Metoda din IV.5 [Rogojanu, *et al.*, 2010] definește un șablon ce caracterizează ariile mici din regiunile de separare; corelația este folosită pentru a verifica asemănarea dintre șablon și imagine.

Aceste metode produc rezultate FP care sunt validate pe baza conexiunii cu fundalul iar algoritmul watershed este aplicat pentru detecția completă a conturilor.

V. Tehnici de segmentare pentru histometrie

În acest capitol sunt propuse două tehnici automate pentru identificarea stratului epitelial/cripte față de nucleele interstițiale în imagini microscopice de la țesuturi de colon. Sunt considerate relațiile dintre componentele histologice (stratul epitelial, nucleu, lumen și stromă) și forma rotundă a criptei.

Aceleași date biologice (stratul epitelial) trebuie segmentat în două tipuri de imagini obținute din același țesut dar folosind marcatori diferiți. În V.1 și V.2 canalul DAPI este folosit pentru a detecta nucleele epiteliale iar în V.3 CK-8 evidențiază criptele. Ambele metode folosesc abordări ierarhice:

- Ierarhia morfologică (V.1) [Smochina, *et al.*, 2011b] și versiunea îmbunătățită pe baza piramidei morfologice (V.2) [Smochina, *et al.*, 2011d] și
- Piramida anizotropică (V.3) [Smochina, *et al.*, 2011c].

În V.2 este analizată importanța eșantionării și este prezentată o comparație între ierarhie (fără eșantionare) și piramidă (cu eșantionare).

V.1. Segmentarea stratului epitelial în imagini DAPI

Conturul interior al criptei (regiunea lumen) este detectat folosind ierarhia morfologică și ierarhia binară asociată (V.1.1). Conturul exterior este determinat de nucleele epiteliale marcate de curba de nivel maximală (V.1.2). O schemă a tehnicii propuse este prezentată în Fig.V.2 [Smochina, *et al.*, 2011b].

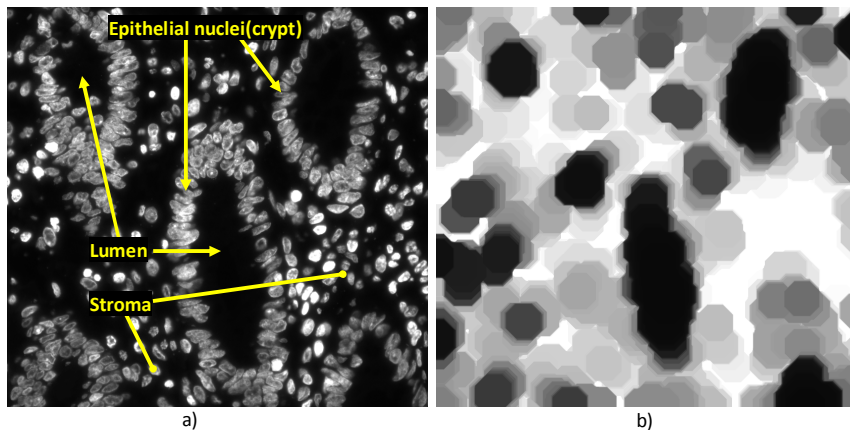


Fig.V.1. a) Imagini fluorescente. b) Imaginea din vârful ierarhiei morfologice [Smochina, *et al.*, 2011b]

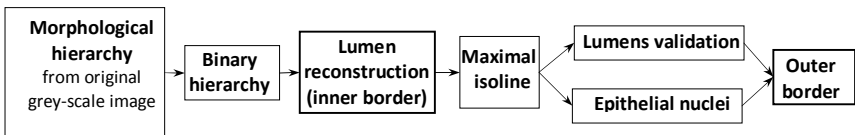


Fig.V.2. Schema tehnicii propuse [Smochina, *et al.*, 2011b].

V.1.1. Segmentarea lumenului folosind ierarhia morfologică

Detaliile locale nu oferă suficiente informații pentru separarea componentelor; trebuie considerate relațiile dintre stratul epitelial, lumen, stroma și fundal [Kropatsch, *et al.*, 2007]. De asemenea, trebuie analizată și distribuția nucleelor în regiunile de interes: lumenul nu conține nuclee și apare a o regiune neagră înconjurată de un ‘inel’ de grosime variabilă format dintr-o mare densitate de nuclee. Cazuri excepționale apar când nucleele lipsă ‘rup’ acest inel. Operatorului morfologic de închidere [Gonzalez and Woods, 1992] conectează/unește nucleele mai apropiate decât dimensiunea elementului structural (SE).

V.1.1.1. Construcția ierarhiei morfologice

Fie I imaginea originală și “ \bullet ” operatorul de închidere. SE ψ_k este un disk 2D de diametru $2k+1$. Reprezentarea ierarhică H_\bullet conține L nivele. Pe primul nivel este imaginea originală $H_\bullet^1 = I$ iar fiecare nivel $\ell > 0$ este dat de [Smochina, *et al.*, 2011b]

$$H_\bullet^\ell = H_\bullet^1 \bullet \psi_{2^\ell}, \quad \ell = \overline{1, L} \quad (V.1)$$

Pentru că dimensiunea SE crește de la baza spre vârf, în nivelele inferioare doar ‘găurile’ mici for fi umplute. Dimensiunea SE este limitată astfel încât să acopere maxim 2-3 nuclee (SE ψ_{50} oferă 25 nivele) (Fig. V.1b).

V.1.1.2. Reconstrucția lumenului

Reconstrucția lumenului pe baza regiunilor găsite în vârful ierarhiei este realizată prin analiza nivelelor inferioare. O ierarhie binară H_{bw} este construită pe baza H_\bullet . H_{bw} are același număr de nivele L și fiecare nivel este dat de [Smochina, *et al.*, 2011b]

$$H_{bw}^l = H_\bullet^l < c \cdot thr_{Otsu}(H_\bullet^l), \quad l = \overline{1, L} \quad (V.2)$$

unde $thr_{Otsu}(\cdot)$ calculează pragul de segmentare folosind metoda Otsu [Otsu, 1979]. Pentru fiecare regiune din vârful ierarhiei H_{bw} trebuie găsită partiția corespunzătoare din nivelele

inferioare care aproximează cel mai bine lumenul [Smochina, *et al.*, 2011b]. Regiunile lumen astfel gasite sunt prezentate în Fig.V.3a.

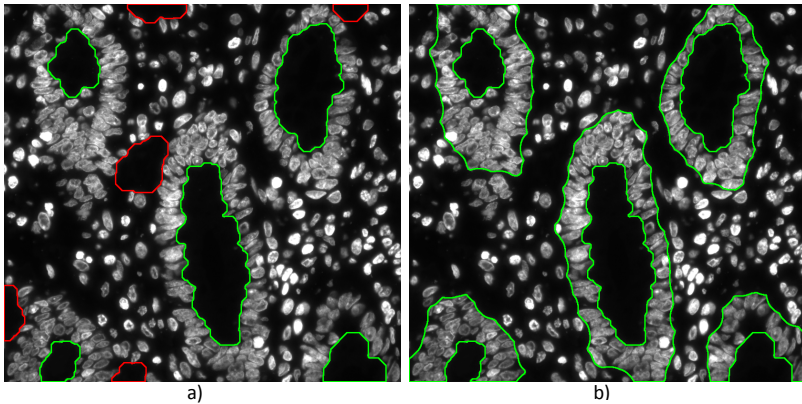


Fig.V.3. a) Rezultatele TP (verde) și FP (roșu). b) Curbele interioare și exterioare ale regiunilor lumen. [Smochina, *et al.*, 2011b]

V.1.2. Validarea lumenului și detecția conturului exterior al criptei

Stratul epitelial este diferențiat de stroma considerând distribuția nucleelor: nucleele epiteliale sunt grupate și lipite în criptă pe când în stromă acestea sunt răspândite. Curbele de nivel ale lumenului (conturul interior) sunt folosite pentru a elimina rezultatele FP și pentru a obține conturul exterior. Semnul din Fig.V.4b este format de media intensităților pentru fiecare curbă de nivel. Valoarea maximă este obținută în cazul curbei maximale (albastru în Fig.V.4a) care este utilizată pentru: a valida regiunile și a marca nucleele epiteliale.

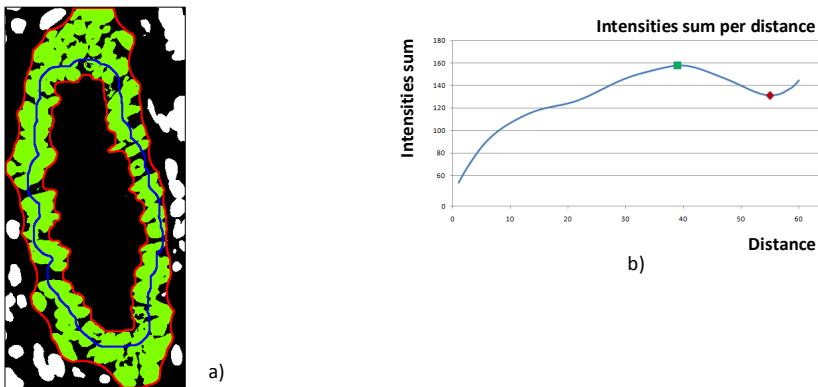


Fig.V.4. a) Contururile criptei (roșu) și curba de nivel maximală (albastră). b) Semnalul intensităților pentru fiecare curbă de nivel. [Smochina, *et al.*, 2011b]

V.1.3. Rezultate

Rezultatele aplicării tehnicii propuse sunt prezentate în Fig.V.3b și Fig.V.5.

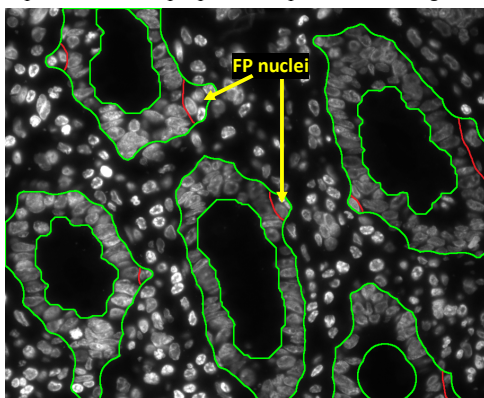


Fig.V.5. Curbele verzi indică conturul interior și exterior al criptei [Smochina, *et al.*, 2011b].

Evaluarea a fost realizată vizual de un specialist prin numărarea nucleelor greșit segmentate per criptă; s-a obținut o acuratețe de 94.07% per criptă.

V.2. Eșantionarea în reprezentarea ierarhică

În această secțiune tehnica propusă în V.1 este riguros analizată pentru a evidenția posibilele îmbunătățiri. Piramida morfologică este folosită în locul reprezentării ierarhice. Eșantionarea utilizată în construcția piramidei reduce cantitatea de date procesate, crește viteza de calcul și robustețea dar păstrează calitatea rezultatelor. Este prezentată o analiză și relațiile matematice dintre celor două structuri.

V.2.1. Motivație

În V.1.1.1 operatorul morfologic de închidere este aplicat succesiv prin creșterea elementului structural în funcție de nivelul ierarhiei. Metoda oferă rezultate stabile [Smochina, *et al.*, 2011b] dar prezintă câteva probleme rezolvabile. Cantitatea de date accesate pentru crearea fiecărui nivel crește considerabil pentru nivelele superioare. De asemenea, SE foarte mare determină un timp de execuție din ce în ce mai mare.

Structura piramidală este folosită pentru a reduce dimensiunea imaginii în crearea unui nou nivel. Piramida descrie conținutul unei imagini la rezoluții diferite [Kropatsch, *et al.*, 2007] iar tipul acesteia trebuie ales în funcție de domeniu.

V.2.2. Reconstrucția lumenului folosind piramida morfologică

Crearea fiecărui nivel al piramidei este realizată folosind operatorul închidere datorită avantajelor descrise în V.1.1. Un nivel al piramidei morfologice este obținut [Haralick, *et al.*, 1989] în doi pași: nivelul curent este filtrat morfologic cu SE ψ_{Π} iar apoi eșantionat pentru a obține nivelul următor. Piramida morfologică Π_{\bullet} are L_{Π} nivele iar fiecare nivel este dat de [Smochina, *et al.*, 2011d]:

$$\begin{aligned} \Pi_{\bullet}^1 &= I \\ \Pi_{\bullet}^{\ell} &= \left(\Pi_{\bullet}^{\ell-1} \bullet \psi_{\Pi} \right) \downarrow_4, \quad \ell = \overline{2, L_{\Pi}} \end{aligned} \quad (V.3)$$

\downarrow_4 denotă procesul de eșantionare care reduce dimensiunea imaginii de patru ori. Câteva nivele ale piramidei morfologice sunt prezentate în Fig.V.6.

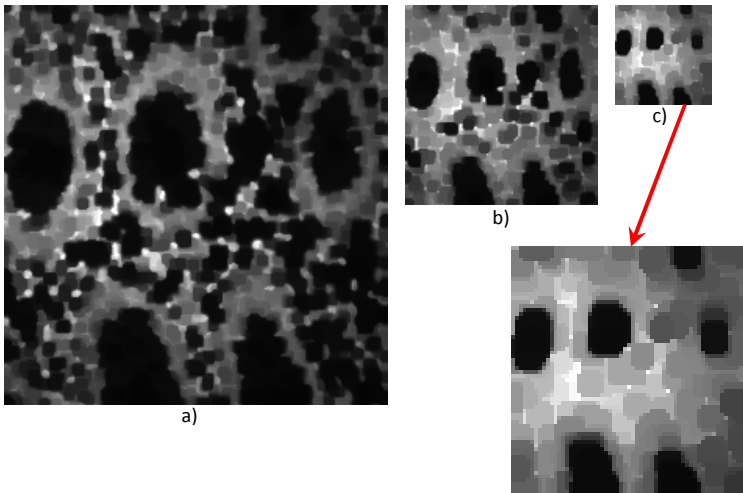


Fig.V.6. Nivelele trei a), patru b) și cinci c) din piramida morfologică pentru Fig.V.1a. [Smochina, *et al.*, 2011d]

V.2.2.1. Relația dintre domeniul eșantionat și cel neeșantionat

Fig.V.7. arată diferența dintre numărul de pixeli accesați pentru construcția celor două structuri ierarhice. Acest număr descreește exponențial în cazul piramidei și crește polinomial în cazul ierarhiei fără eșantionare. Pentru a obține relațiile dintre nivelele celor două reprezentări (Π_{\bullet} și H_{\bullet}), legatura dintre nivelul $H_{\bullet}^{2^5}$ (Fig.V.1b) și Π_{\bullet}^5 (Fig.V.6c) trebuie identificată [Smochina, *et al.*, 2011d]:

$$H_{\bullet}^{25} \downarrow_{4^4} \approx \Pi_{\bullet}^5 \rightarrow (H_{\bullet}^1 \bullet \psi_{50}) \downarrow_{4^4} \approx (\Pi_{\bullet}^4 \bullet \psi_{\Pi}) \downarrow_{4^4} \quad (V.4)$$

Astfel, relația dintre nivelul l_H al ierarhiei și nivelul $l+1$ al piramidei este [Smochina, *et al.*, 2011d]:

$$(H_{\bullet}^1 \bullet \psi_{l_H}) \downarrow_{4^l} \approx \left(\Pi_{\bullet}^l \bullet \psi_{\frac{l_H}{2^{l-1}}} \right) \downarrow_{4^l} \quad (V.5)$$

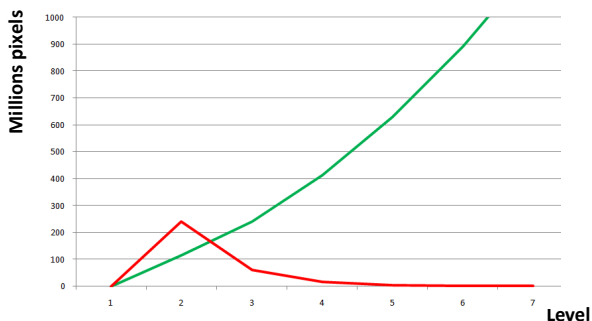


Fig.V.7. Numărul de pixeli accesați per nivel în cazul piramidei (roșu) și ierarhiei morfologice (verde). [Smochina, *et al.*, 2011d]

V.2.2.2. Detecția lumenului

Similar cu V.1.1.2, o piramidă binară Π_{bw} este construită [Smochina, *et al.*, 2011d]:

$$\Pi_{bw}^l = \Pi_{\bullet}^l < c \cdot thr_{Otsu}(\Pi_{\bullet}^l), \quad l = \overline{1, L_{\Pi}} \quad (V.6)$$

Avantajul față de V.1.1.2 este că partițiile descendente ale regiunilor găsite pe nivelul Π_{bw}^5 pot fi luate direct de pe nivelul Π_{bw}^3 pentru că acestea identifică corespunzător lumenul.

V.2.3. Filtrare și eșantionare vs. eșantionare și filtrare

Un nou nivel al piramidei poate fi obținut astfel [Smochina, *et al.*, 2011d]:

- În piramida Π_1 , imaginea curentă este filtrată cu SE ψ' și apoi eșantionată (Eq.V.3)

$$\Pi_1^{l+1} = (\Pi_1^l \bullet \psi') \downarrow_{4^l} \quad (V.7)$$

- În piramida Π_2 , imaginea curentă este eșantionată înainte de filtrarea cu SE ψ'' :

$$\Pi_2^{l+1} = (\Pi_2^l \downarrow_4) \bullet \psi'' \quad (\text{V.8})$$

Întrebarea este: cât de diferite sunt cele două piramide (Π_1 , Π_2) dacă $\psi' = \psi''$ și, dacă sunt diferite care este relația dintre ψ' și ψ'' astfel încât $\Pi_1^l \approx \Pi_2^l$, $\forall l$. Dacă $\psi' = \psi''$ atunci ψ'' este aplicat pe o imagine de patru ori mai mică rezultând în supra-umplere. Dacă se dorește ca $\Pi_1^l \approx \Pi_2^l$, atunci $\psi'' = \psi' \downarrow_4$ [Smochina, *et al.*, 2011d].

V.2.4. Rezultate

În Fig.V.8 sunt prezentate curbele interioare obținute cu ierarhia morfologică (verde) (V.1.1) și piramida morfologică (roșu) (V.2.2). Porțiunile galbene sunt cele comune.

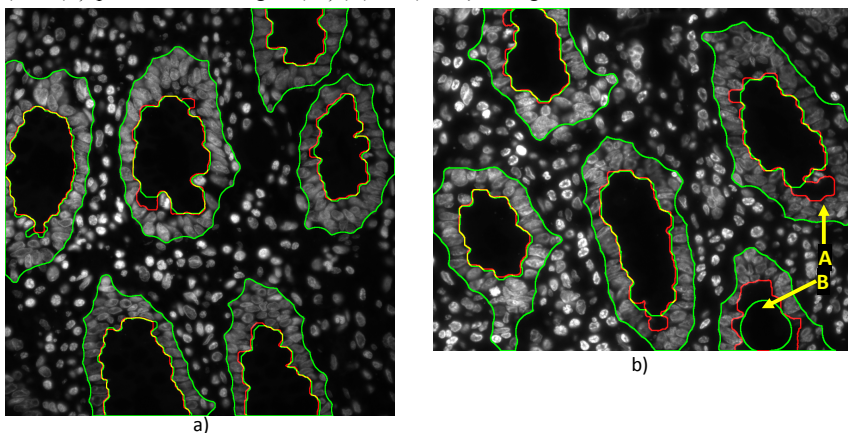


Fig.V.8. Contururile interioare obținute cu ierarhia morfologică (verde) și piramida morfologică (roșu) [Smochina, *et al.*, 2011d].

Chiar dacă timpul de execuție și memoria utilizată au fost reduce considerabil, calitatea rezultatelor a fost păstrată. Ele diferă doar prin câțiva pixeli ne semnificativi iar în unele cazuri oferă o delimitare chiar mai detaliată a lumenului (regiunile A și B, Fig.V.8b).

V.3. Segmentarea stratului epitelial în imagini cu cytokeratină

În acest capitol este prezentată o tehnică automată pentru delimitarea ariilor epiteliale (cripte) în imagini microscopice de la secțiuni de țesut marcate cu CK-8 (Fig.V.9). O schemă a acestei tehnici poate fi văzută în Fig.V.10. Stratul epitelial este evidențiat folosind piramida anizotropică (V.3.2.1) și segmentată cu MSER+. Separarea criptelor (V.3.3.1) și detecția lumenului (V.3.3.2) sunt realizate impunând constrângeri topologice legate de distribuția nucleelor epiteliale în țesut.

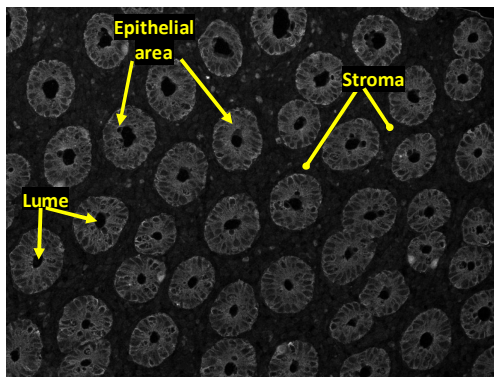


Fig.V.9. Imagini fluorescente cu secțiuni de țesut marcate cu CK-8.

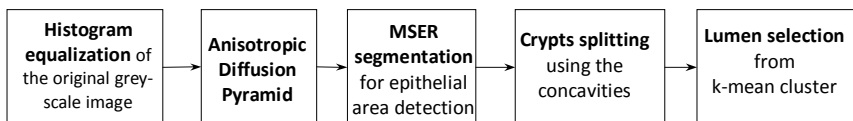


Fig.V.10. Schema tehnicii propuse [Smochina, *et al.*, 2011c].

V.3.1. Îmbunătățirea imaginii

Imaginile CK-8 sunt ușor sub-expuse datorită reacției slabe cu marcatorul fluorescent. Egalizarea histogramei [Gonzalez and Woods, 1992] este folosită deoarece accentuează contrastul; dar doar pixelii utili sunt folosiți în acest procedeu (Fig. V.11).

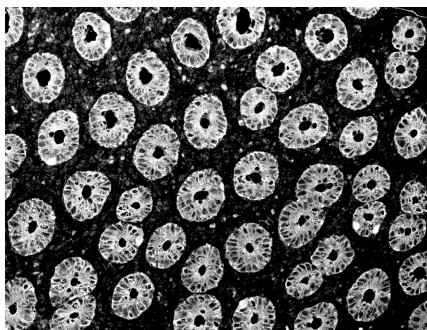


Fig.V.11. Varianta îmbunătățită a imaginii Fig.V.9 [Smochina, *et al.*, 2011c].

V.3.2. Detecția conturilor exterioare ale criptelor

Acest proces trebuie să ignore regiunile mici cu intensități mici din criptă. Detaliile locale nu oferă suficiente informații pentru separarea regiunilor de interes [Kropatsch, *et al.*,

2007]. În [Smochina, *et al.*, 2011b] operatorul închidere este folosit într-o reprezentare multi-rezoluție; “găurile” dintre nuclee sunt umplute controlând dimensiunea elementului structural. În acest caz, filtrarea anizotropică este aplicată pentru a omogeniza criptele, pentru a umple golurile și pentru a păstra informațiile utile ale muchiilor cu fundalul.

V.3.2.1. Piramida anizotropică

Piramida anizotropică (anisotropic diffusion pyramid ADP) [Acton, *et al.*, 1994] Π_Y conține L nivele. Primul nivel este imaginea îmbunătățită $\Pi_Y^1 = I_{enh}$ iar fiecare nivel $\ell > 1$ este dat de [Smochina, *et al.*, 2011c]

$$\Pi_Y^\ell = Y\left(\Pi_Y^{\ell-1}\right)\downarrow_4, \quad \ell = \overline{2, L} \quad (V.9)$$

Folosind ADP, proprietățile difuziei anizotropice de a accentua muchiile sunt exploatate împreună cu performanța de calcul a reprezentării ierarhice multirezoluție. În această reprezentare nivelul 4 este nivelul maxim al piramidei ce oferă detalii minime pentru extragerea informațiilor relevante (cripte) (Fig.V.14).

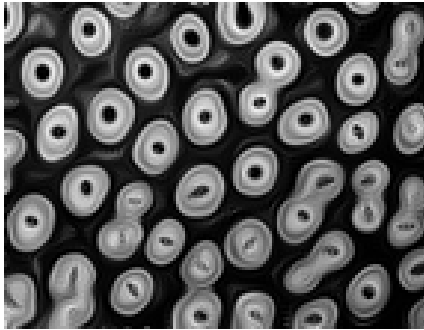


Fig.V.12. Imaginea de pe nivelul 4 al ADP mărită la dimensiunea imaginii originale (Fig.V.9) pentru o mai bună vizualizare [Smochina, *et al.*, 2011c].

Datorită filtrării anizotropice, criptele sunt evidențiate iar zgomotul eliminat. Algoritmul MSER este folosit (II.3.4) pentru a segmenta nivelul 4 al ADP. MSERul a fost folosit în locul segmentării cu prag pentru a crește stabilitatea dar și datorită „preferinței” pentru obiecte rotunde [Kimmel, *et al.*, 2010].

În cazul folosirii piramidei, reconstrucția corespunzătoare a regiunilor aflate la nivelul superior trebuie realizată accesând nivelele inferioare cu mai multe detalii. În cazul piramidei anizotropice acest lucru nu este necesar deoarece procesul de difuzie pastrează și chiar accentuează muchiile. Contururile exterioare sunt desenate cu verde în Fig.V.13.

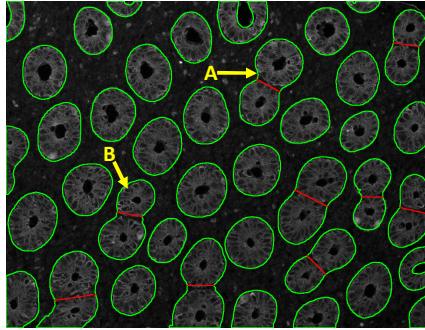


Fig.V.13. Curbele cu verde delimitează criptele iar liniile roșii separă criptele unite.
[Smochina, *et al.*, 2011c].

V.3.3. Separarea criptelor și detecția lumenului

Filtrarea anizotropică poate micșora și chiar umple total lumenul. Pentru detecția lumenului, criptele lipite sunt separate folosind informații geometrice.

V.3.3.1. Separarea criptelor

Separarea criptelor greșit delimitate (e.g., A și B în Fig.V.13) este realizată considerând forma rotundă, mărimea și concavitățile a două cripte unite. Pentru rezultatele FP, diferența dintre regiune și regiunea convexă oferă două zone (albastru în Fig.V.14a) care sunt folosite pentru a trasa linia ce separă criptele.

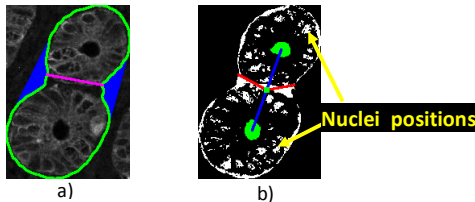


Fig.V.14. a) Linia roz separă criptele. b) Regiunile lumen (verde) sunt unite de linia albastră.
[Smochina, *et al.*, 2011c]

V.3.3.2. Detecția lumenului

Trei clase de pixeli pot fi evidențiate în cazul unei regiuni găsite anterior: una ce corespunde fundalului și lumenului (intensități mici), și altele două pentru reacția slabă cu marcatorul respectiv reacție puternică. Aceste clase sunt detectate folosind k-means clustering [Gonzalez and Woods, 1992]. Clusterul cu cele mai mici valori este prezentat în Fig.V.14b și este analizat pentru detecția lumenului [Smochina, *et al.*, 2011c]. Folosind linia

ce conectează regiunile lumen în cazul a două cripte lipite, poate fi realizată o mai bună aproximare a liniei de separare dintre doua cripte (Fig.V.14b, Fig.V.13, Fig.V.15).

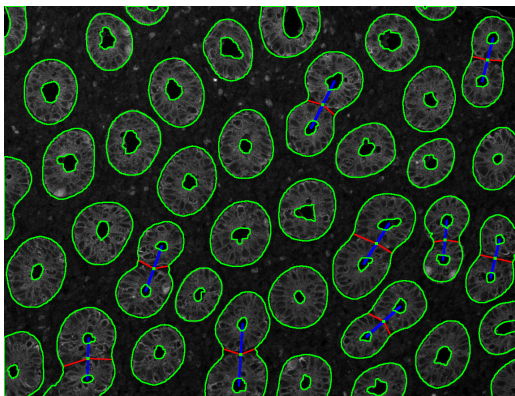


Fig.V.15. Contururile criptelor și a lumenului reprezentat cu verde. Linile albastre unesc regiunile lumen iar cele roșii separă criptele unite [Smochina, *et al.*, 2011c].

V.3.4. Rezultate

O condiție ce trebuie neaparat satisfăcută de algoritmul de segmentare este ca numărul de cripte sa fie corect stabilit iar regiunile epiteliale riguros delimitate. Evaluarea rezultatelor a fost realizată prin comparația cu segmentările de referință și a fost obținută o acuratețe de $A=0.947$ pentru cele 450 de cripte verificate. Rezultatele confirmă că metoda propusă reușește să segmenteze cu o bună acuratețe regiunile epiteliale.

V.4. Concluzii

În acest capitol au fost propuse două tehnici automate pentru segmentarea criptelor/stratului epitelial în două tipuri de imagini cu țesuturi marcate cu DAPI și CK-8. Ambele tehnici folosesc reprezentarea ierarhică, i.e., ierarhie morfologică (V.1) [Smochina, *et al.*, 2011b] și piramidă anizotropică (V.2) [Smochina, *et al.*, 2011c] având în comun abordarea coarse-to-fine. O analiză detaliată a acestor reprezentări ierarhice a fost prezentată cât și importanța eșantionării în construcția piramidei (V.3) [Smochina, *et al.*, 2011d].

Aceste tehnici folosesc o abordare coarse-to-fine și pot fi extinse cu ușurință pe orice imagine în care obiectele de interes au caracteristicile considerate în proiectarea acestor tehnici.

VI. Concluzii

Acest capitol evidențiază principalele contribuții prezentate în această teză precum și direcții posibile de cercetare.

VI.1. Contribuții

În această lucrare am prezentat contribuții în domeniul analizei imaginilor microscopice, în particular segmentarea automată a imaginilor fluorescente cu nucleii și cripte, și tehnici de evaluare a segmentării. Principalele contribuții sunt legate de:

- Criterii de evaluare a segmentării;
- Tehnici de procesare a imaginii în analiza imaginilor microscopice;
- Segmentarea nucleelor celulelor în aranjamente complexe;
- Segmentarea criptelor/stratului epitelial;
 - Stabilirea relației dintre domeniul eșantionat și cel neeșantionat.

Contribuțiile sunt detaliate în continuare.

VI.1.1. Criterii de evaluare a segmentării

Am propus un criteriu nou de evaluare a segmentării adaptat obiectelor concave și capabil să controleze importanța asemănării formelor obiectelor în calculul erori. Acest criteriu a fost comparat cu tehnicile existente iar rezultatele au arătat că este capabil să rezolve probleme considerate.

Criteriu propus oferă două avantaje principale: folosirea distanței geodezice în locul distanței euclidiene pentru calculul distanței dintre curbele segmentate și introducerea unui parametru ce indică asemănarea dintre formele obiectelor de referință și cele segmentate.

VI.1.2. Tehnici de procesare în analiza imaginilor microscopice

Studiul metodelor existente este util pentru o mai bună utilizare a acestor metode dar și pentru îmbunătățirea performanțelor. De asemenea, două direcții de dezvoltare a noilor metode sunt prezentate.

VI.1.3. Segmentarea nucleelor celulelor

Trei tehnici de segmentare au fost propuse pentru detecția nucleelor în imagini cu țesut marcat cu DAPI în structuri izolate, înlănțuite și lipite/grupate. Tehnicile se bazează pe metode care detectează în primă fază fundalul după care regiunile de separare sunt evidențiate.

Detecția fundalului este realizată folosind segmentarea cu prag și creșterea regiunilor respectiv difuzia anizotropică, reconstrucția morfologică și segmentarea hysteresis.

Prima tehnică folosește informații geometrice *apriorice* pentru a detecta punctele de concavitate și a defini un set de reguli care unesc aceste puncte astfel încât liniile să indice regiunile de separare dintre nuclee.

Celelalte două metode folosesc diferite abordări bazate pe intensitatea pixelilor pentru a evidenția regiunile dintre nucleele lipite/grupate. Prima metodă aplică o succesiune de filtre pentru ca găsi regiunile cu un profil similar literei V iar cea de-a doua definește un șablon ce caracterizează ariile mici din regiunile de separare; corelația este folosită pentru a verifica asemănarea dintre șablon și imagine.

Aceste metode produc rezultate FP care sunt validate pe baza conexiunii cu fundalul iar algoritmul watershed este aplicat pe diferite date pentru detecția completă a conturilor.

Stabilitatea acestor metode este dată de abordarea regiunilor de separare dintre nuclee și nu a caracteristicilor nucleelor. Această direcție a fost aleasă datorită variațiilor puternice în intensitate din interiorul nucleelor dar și a caracteristicilor dimensiune, arie sau orientare.

VI.1.4. Segmentarea criptelor

Două tehnici automate au fost propuse pentru segmentarea criptelor/stratului epitelial în două tipuri de imagini cu țesuturi marcate cu DAPI și CK-8. Ambele tehnici folosesc reprezentarea ierarhică, i.e., ierarhie morfologică și piramidă anizotropică având în comun abordarea coarse-to-fine. O analiză detaliată a acestor reprezentări ierarhice a fost prezentată dar și importanța eșantionării în construcția piramidei.

VI.2. Direcții viitoare de cercetare

Probleme întâlnite în aceste cercetări dar mai ales rezultatele obținute evidențiază câteva direcții interesante de cercetare ce pot fi urmate.

Configurarea parametrilor pentru algoritmi de segmentare poate fi realizată prin integrarea metodelor de evaluare a segmentării. Folosind segmentările de referință și metode de discrepanță poate fi creat un spațiu al “performanțelor” de segmentare (dimensiunea acestui spațiu este dat de numărul de parametri). Prin analiza acestui spațiu pot fi alese valorile corespunzătoare pentru algoritm. Metodele propuse evidențiază regiunile de separare dintre nuclee, dar cercetări pot fi desfășurate pentru a proiecta și antrena clasificatori specifici pentru detecția nucleelor.

Referințe

- [Acton, *et al.*, 1994] Acton S.T., Bovik A.C., Crawford M.M., *Anisotropic diffusion pyramids for image segmentation*, In Proc. of 1st IEEE International Conference on Image Processing, vol. 3, pp. 478-482, 1994.
- [Angulo, 2008] Angulo J., *Nucleus modelling and segmentation in cell clusters*, Progress in Industrial Mathematics at ECMI'2008, pp. 217-222, 2008.
- [Baggett, *et al.*, 2005] Baggett D., Nakaya M., McAuliffe M., Yamaguchi T.P., Lockett S., *Whole cell segmentation in solid tissue sections*, International Society for Advancement of Cytometry, vol. 67(2)-A, pp. 137-143, 2005.
- [Bai, *et al.*, 2009] Bai X., Sun C., Zhou F., *Splitting touching cells based on concave points and ellipse fitting*, Pattern Recognition, vol. 42(11), pp. 2434-2446, 2009.
- [Beauchemin, *et al.*, 1998] Beauchemin M., Thomson K., Edwards G., *On the Hausdorff distance used for the evaluation of segmentation results*, Canadian Journal of Remote Sensing, vol. 24(1), pp. 3-8, 1998.
- [Begelrnan, *et al.*, 2004] Begelrnan G., Gur E., Rivlin E., Rudzsky M., Zalevsky Z., *Cell nuclei segmentation using fuzzy logic engine*, International Conference on Image Processing, vol.5, pp. 2937-2940, 2004.
- [Boucheron, *et al.*, 2010] Boucheron L.E., Manjunath B.S., Harvey N.R., *Use of imperfectly segmented nuclei in the classification of histopathology images of breast cancer*, IEEE International Conference on Acoustics Speech and Signal Processing, vol. 1, pp. 666-669, 2010.
- [Bowyer, *et al.*, 2001] Bowyer K., Kranenburg C., Dougherty S., *Edge Detector Evaluation Using Empirical ROC Curves*, Computer Vision and Image Understanding, vol. 84(1), pp. 77-103, 2001.
- [Breu, *et al.*, 1995] Breu H., Gil J., Kirkpatrick D., Werman M., *Linear Time Euclidean Distance Transform Algorithms*, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 17(5), pp. 529-533, 1995.
- [Brunelli and Poggio, 1993] Brunelli R., Poggio T., *Face Recognition: Features versus Templates*, IEEE Transactions Pattern Analysis and Machine

Intelligence, vol. 15(10), pp. 1042-1052, 1993.

- [Canny, 1986] Canny J., *A computational approach to edge detection*, IEEE Transactions on PAMI, vol. 8(6), pp. 679–698, 1986.
- [Chabrier, *et al.*, 2004] Chabrier S., Laurent H., Emile B., Rosenberger C., Marche P., *A comparative study of supervised evaluation criteria for image segmentation*, In Proc. of the 12th European Signal Processing Conference, Vienna, Austria, pp. 1143-1146, 2004.
- [Chabrier, *et al.*, 2008] Chabrier S., Laurent H., Rosenberger C., Emile B., *Comparative study of contour detection evaluation criteria based on dissimilarity measures*, EURASIP Journal on Image and Video Processing, 13 pages, 2008.
- [Cheng and Rajapakse, 2009] Cheng J., Rajapakse J.C., *Segmentation of Clustered Nuclei With Shape Markers and Marking Function*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 56(3), pp. 741-748, 2009.
- [Cloppet and Boucher, 2010] Cloppet F., Boucher A., *Segmentation of complex nucleus configurations in biological images*, Pattern Recognition Letters, vol. 31(8), pp. 755–761, 2010.
- [Coelho, *et al.*, 2009] Coelho L.P., Shariff A., Murphy, R.F., *Nuclear Segmentation in Microscope Cell Images: A Hand-Segmented Dataset and Comparison of Algorithms*, IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, pp. 518-521, 2009.
- [Colantonio, *et al.*, 2007] Colantonio S., Salvetti O., Gurevich I.B., *A two-step approach for automatic microscopic image segmentation using fuzzy clustering and neural discrimination*, Pattern Recognition and Image Analysis, vol. 17(3), pp. 428-437, 2007.
- [Dalle, *et al.*, 2009] Dalle J.R., Huang C.H., Leow W.K., Racoceanu D., Putti T.C., *Nuclear pleomorphism scoring by selective cell nuclei detection*, In Proc. IEEE Workshop on Applications of Computer Vision, 2009.
- [Danek, *et al.*, 2009] Danek O., Matula P., Ortiz-de-Solórzano C., Muñoz-Barrutia A., Maška M., Kozubek, M., *Segmentation of touching cell nuclei using a two-stage graph cut model*, Lecture Notes in Computer Science, vol. 5575, pp. 410-419, 2009.
- [de Kruijf Esther, *et al.*, 2011] de Kruijf Esther M., van Nes Johanna G.H., van de Velde Cornelis J.H., Putter H., Smit Vincent T.H.B.M., Liefers Gerrit J., Kuppen P.J.K., Tollenaar Rob A.E.M., Mesker Wilma E., *Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast*

- cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients*, Breast cancer research and treatment, vol. 125(3), pp. 687-696, 2011.
- [Dzyubachyk, *et al.*, 2008] Dzyubachyk O., Niessen W., Meijering E., *Advanced level-set based multiple-cell segmentation and tracking in time-lapse fluorescence microscopy images*, 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, pp. 185-188, 2008.
- [Farjam, *et al.*, 2007] Farjam R., Soltanian-Zadeh H., Jafari-Khouzani K., Zoroofi R.A., *An image analysis approach for automatic malignancy determination of prostate pathological images*, Clinical Cytometry, vol. 72B(4), pp. 227–240, 2007.
- [Gonzalez and Woods, 1992] Gonzalez R.C., Woods R.E., *Digital Image Processing*, Reading, Massachusetts: Addison-Wesley 2nd ed., 1992.
- [Goumeidane, *et al.*, 2003] Goumeidane A.B., Khamadja M., Belaroussi B., Benoit-Cattin H., Odet C., *New discrepancy measures for segmentation evaluation*, In Proc. of the IEEE International Conference on Image Processing, vol. 3, pp. II-411-14, 2003.
- [Gunduz-Demir, *et al.*, 2010] Gunduz-Demir C., Kandemir M., Tosun A.B., Sokmensuer C., *Automatic segmentation of colon glands using object-graphs*, Medical Image Analysis, vol. 14(1), pp. 1-12, 2010.
- [Haralick, *et al.*, 1989] Haralick R.M., Zhuang X., Lin C., Lee J.S.J., *The digital morphological sampling theorem*, IEEE Trans. Acoust., Speech, Signal Processing, vol. 37, pp. 2067-2090, 1989.
- [Herghelegiu, *et al.*, 2010] Herghelegiu P., **Smochina C.**, Manta V., *GPU method for registering multiple MRI sequences*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Automatic Control and Computer Science, Tom LVI(LX), fasc. 4, pp. 175-183, 2010.
- [Jeong, *et al.*, 2009] Jeong M.R., Ko B.C., Nam J.Y., *Overlapping nuclei segmentation based on Bayesian networks and stepwise merging strategy*, Journal of Microscopy, vol. 235(2), pp. 188–198, 2009.
- [Jung and Kim, 2010] Jung C., Kim C., *Segmenting Clustered Nuclei Using H-minima Transform-Based Marker Extraction and Contour Parameterization*, In IEEE Trans Biomed Eng., vol. 57(10), pp. 2600-2604, 2010.
- [Kimmel, *et al.*, 2010] Kimmel R., Zhang C., Bronstein A.M., Bronstein M.M., *Are*

- MSER features really interesting?*, IEEE Trans. PAMI in press 2010.
- [Kropatsch, *et al.*, 2007] Kropatsch W.G., Haxhimusa Y., Ion A., *Multiresolution Image Segmentations in Graph Pyramid*, Applied Graph Theory in Computer Vision and Pattern Recognition, vol. 52, pp. 3-41, 2007.
- [Lebrun, *et al.*, 2007] Lebrun G., Charrier C., Lezoray O., Meurie C., Cardot H., *A fast and efficient segmentation scheme for cell microscopic image*, Cellular and molecular biology, vol. 53(2), pp. 51-61, 2007.
- [Lewis, 1995] Lewis J.P., *Fast template matching*, in Proc. Vision Interface, pp. 120-123, 1995.
- [Ling and Jacobs, 2007] Ling H., Jacobs D.W., *Shape Classification Using the Inner-Distance*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 29(2), pp. 286-299, 2007.
- [Madhloom, *et al.*, 2010] Madhloom H.T., Kareem S.A., Ariffin H., Zaidan A.A., Alanazi H.O., Zaidan B.B., *An automated white blood cell nucleus localization and segmentation using image arithmetic and automatic threshold*, Journal of Applied Sciences, vol. 10(11), pp. 959-966, 2010.
- [Malpica and de Solorzano, 2002] Malpica N., de Solorzano C.O., *Automated nuclear segmentation in fluorescence microscopy*, Science, Technology and Education of Microscopy: an Overview, vol. 2, pp. 614-621, 2002.
- [Matas, *et al.*, 2002] Matas J., Chum O., Urban M., Pajdla T., *Robust wide baseline stereo from maximally stable extremal regions*, In Proc. BMVC, pp. 384-393, 2002.
- [Meftah, *et al.*, 2010] Meftah B., Lezoray O., Lecluse M., Benyettou A., *Cell microscopic segmentation with spiking neuron networks*, International Conference on Artificial neural networks, vol. 6352, pp. 117-126, 2010.
- [Moll, *et al.*, 2008] Moll R., Divo M., Langbein L., *The human keratins: biology and pathology*, Histochemistry and Cell Biology, Springer-Verlag, vol. 129(6), pp. 705-733, 2008.
- [Morikawa and Morikawa, 1981] Morikawa K., Yanagida J., *Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method*, Japanese Biochemical Society, vol. 89(2), pp. 693-696, 1981.
- [Mosaliganti, *et al.*, 2009] Mosaliganti K., Gelas A., Gouaillard A., Megason S.G., *Tissue*

level segmentation and tracking of biological structures in microscopic images based on density maps, Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging, pp.1354-1357, 2009.

[Naik, *et al.*, 2007]

Naik S., Doyle S., Feldman M., Tomaszewski J., Madabhushi A., *Gland segmentation and computerized Gleason grading of prostate histology by integrating low-, high-level and domain specific information*, In 2nd MICCAI Workshop Microscopic Image Analysis with Appl. in Biology, Piscataway, 2007.

[Naik, *et al.*, 2008]

Naik S., Doyle S., Agner S., Madabhushi A., Feldman M.D., Tomaszewski J., *Automated gland and nuclei segmentation for grading of prostate and breast cancer histopathology*, In Proceedings of 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, pp. 284-287, 2008.

[Nattkemper, 2005]

Nattkemper T.W., *Automatic segmentation of digital micrographs: A survey*, Journal Studies in health technology and informatics, vol. 107(2), pp. 847-852, 2005.

[Nedzved, *et al.*, 2000]

Nedzved A., Ablameyko S., Pitas I., *Morphological segmentation of histology cell images*, 15th International Conference on Pattern Recognition, pp. 1500, 2000.

[Nilsson and Heyden, 2005]

Nilsson B., Heyden A., *Segmentation of complex cell clusters in microscopic images: application to bone marrow samples*, Cytometry, vol. 66(1), pp. 24-31, 2005.

[Odet, *et al.*, 2002]

Odet C., Belaroussi B., Benoit-Cattin H., *Scalable discrepancy measures for segmentation evaluation*, In Proc. of the IEEE International Conference on Image Processing, Rochester, pp. 785-788, 2002.

[Otsu, 1979]

Otsu N., *A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*, In IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, vol. 9(1), pp. 62-66, 1979.

[Pratt, 2001]

Pratt W.K., *Digital Image Processing*, 3rd ed., Wiley Interscience, NY, 2001.

[Rogojanu, *et al.*, 2010]

Rogojanu R., Bises G., **Smochina C.**, Manta V., *Segmentation of cell nuclei within complex configurations in images with colon sections*, In Proc. IEEE 6th International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, pp. 243-246, 2010.

[Roshni and Raju, 2011]

Roshni V.S., Raju G., *Image segmentation using multiresolution*

- texture gradient and watershed algorithm*, International Journal of Computer Applications, vol. 22(5), pp. 21-28, 2011.
- [Russell, *et al.*, 2009] Russell R.A., Adams N.M., Stephens D.A., Batty E., Jensen K., Freemont P.S., *Segmentation of Fluorescence Microscopy Images for Quantitative Analysis of Cell Nuclear Architecture*, Biophysical Journal, vol. 96(8), pp. 3379-3389, 2009.
- [Scharr and Weickert, 2000] Scharr H., Weickert J., *An anisotropic diffusion algorithm with optimized rotation invariance*, German Association for Pattern Recognition, pp. 460-467, 2000.
- [Smochina and Manta, 2008] **Smochina C.**, Manta V., *Industrial inspection system using triangulation*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Tom LVI(LVIII), fasc. 3-4, Automatic Control and Computer Science, pp. 75-82, 2008.
- [Smochina, *et al.*, 2010a] **Smochina C.**, Manta V., Rogojanu R., *New discrepancy measure for evaluation of segmentation quality*, In Proc. 11th IASTED International Conference on Computer Graphics and Imaging, track 679-053, 2010.
- [Smochina, *et al.*, 2010b] **Smochina C.**, Manta V., Bises G., Rogojanu R., *Automatic cell nuclei detection in tissue sections from colorectal cancer*, In Proc. 14th International Conference on System Theory and Control, pp. 519-524, 2010.
- [Smochina, *et al.*, 2011a] **Smochina C.**, Serban A., Manta V., *Segmentation of cell nuclei within chained structures in microscopic images of colon sections*, In Proc. 27th Spring conference on Computer Graphics, pp. 146-154, 2011.
- [Smochina, *et al.*, 2011b] **Smochina C.**, Manta V., Kropatsch W.G., *Semantic segmentation of microscopic images using a morphological hierarchy*, In Proc. 14th International Conference on Computer Analysis of Images and Patterns, LNCS 6854, pp. 102-109, 2011.
- [Smochina, *et al.*, 2011c] **Smochina C.**, Rogojanu R., Manta V., Kropatsch W.G., *Epithelial area detection in cytokeratin microscopic images using MSER segmentation in anisotropic pyramid*, In Proc. 6th IAPR International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics, LNBI 7036, pp. 318, 2011.
- [Smochina, *et al.*, 2011d] **Smochina C.**, Manta V., Kropatsch W.G., *Sampling step importance in hierarchical semantic segmentation of microscopic*

images, In Proc. 15th International Conference on System Theory and Control, 2011 (accepted for publications).

- [Smochina, *et al.*, 2011e] **Smochina C.**, Herghelegiu P., Manta V., *Image processing techniques used in microscopic image segmentation*, In Journal Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Automatic Control and Computer Science, Tom LVII(LXI), fasc. 2, 2011 (accepted for publications).
- [Srinivasa, *et al.*, 2009] Srinivasa G., Fickus M.C., Guo Y., Linstedt A.D., Kovacević J., *Active mask segmentation of fluorescence microscope images*, IEEE Transactions on Image Processing Volume, vol. 18(8), pp. 1817-1829, 2009.
- [Ta, *et al.*, 2009] Ta V.T., Lezoray O., El Moataz A., Schupp S., *Graph-based tools for microscopic cellular image segmentation*, Pattern Recognition, vol. 42(6), pp. 1113-1125, 2009.
- [Wahlby, *et al.*, 2004] Wahlby C., Sintorn I.M., Erlandsson F., Borgefors G., Bengtsson E., *Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections*, Journal of Microscopy, vol. 215(1), pp. 67–76, 2004.
- [Wang, *et al.*, 2008] Wang M., Zhou X., Li F., Huckins J., King R.W., Wong S.T., *Novel cell segmentation and online SVM for cell cycle phase identification in automated microscopy*, Bioinformatics, vol. 24(1), pp. 94-101, 2008.
- [Wei, *et al.*, 2011] Wei W.Y., Li Z.M., Zhang G.Q., *Novel Color Microscopic Image Segmentation with Simultaneous Uneven Illumination Estimation based on PCA*, Information Technology Journal, vol. 9(8), pp. 1682-1685, 2011.
- [Weickert, 1998] Weickert J., *Anisotropic Diffusion in Image Processing*, Teubner, Stuttgart, 1998.
- [Yang and Choe, 2009] Yang H.F., Choe Y., *Cell tracking and segmentation in electron microscopy images using graph cuts*, IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, pp. 306-309, 2009.
- [Yang, *et al.*, 2005] Yang L., Meer P., Foran D.J., *Unsupervised segmentation based on robust estimation and color active contour models*, IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed., vol. 9(3), pp. 475–486, 2005.
- [Yang, *et al.*, 2006] Yang X., Li H., Zhou X., *Nuclei segmentation using marker-*

controlled watershed, tracking using mean-shift and Kalman filter in time-lapse microscopy, IEEE Trans on Circuits and Systems, vol. 53(11), pp. 2405-2414, 2006.

[Zhang, 1996]

Zhang Y.J., *A survey on evaluation methods for image segmentation*, Pattern Recognition, vol. 28(8), pp. 1335-1346, 1996.

[Zhang, 2001]

Zhang Y.J., *A review of recent evaluation methods for image segmentation*, Sixth International Symposium on Signal Processing and its Applications, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 148-151, 2001.

[Zhou, *et al.*, 2009]

Zhou, X., Li, F., Yan, J., Wong, S.T., *A novel cell segmentation method and cell phase identification using Markov model*, IEEE Trans. Info. Tech. Biomed., vol. 13(2), pp. 152–157, 2009.