

Wybrane metody detekcji i segmentacji obiektów
stosowane do barwnych obrazów mikroskopowych
neuralnych komórek macierzystych i preparatów tkankowych
barwionych immunohistochemicznie

dr Anna Korzyńska

Cykl publikacji stanowiących wkład i wykazujących aktywność naukową
w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna
po otrzymaniu stopnia doktora

Dane publikacji opatrzone: impakt faktorem – współczynnikiem wpływu (ang. Impact Factor, IF), procentowy udział autorki w publikacji (ujęty w nawias) i ilość punktów na rok wydania zgodnie z wykazem MNiSW

- I. **Anna Korzyńska**, Marcin Iwanowski, 2012, "Multistage morphological segmentation of bright-field and fluorescent microscopy images" **Opt-Electronics Review** **20(2)**: 87-99, DOI **10.2478/s11772-012-0026-x**; IF=0.923, (55%); MNiSW lista A 25 pkt.;
- II. Urszula Neuman, **Anna Korzyńska**, Carlos Lopez, Marylene Lejeune, 2010, "Segmentation of stained lymphoma tissue section images", Ed.: Pietka E, Kawa J, **Information Technology in Biomedicine 2, Advances in Intelligent and Soft Computing** 69: 101-113, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, DOI: **10.1007/978-3-642-13105-9_11**; materiały konferencyjne indeksowane przez WoS, (45%); MNiSW lista B 10 pkt.;
- III. Łukasz Roszkowiak, **Anna Korzyńska**, Marylène Lejeune, Ramon Bosch and Carlos López, 2016, "Improvements to segmentation method of stained lymphoma tissue section images", Ed.: Burduk Robert, Jackowski Konrad, Kurzynski Marek, Woźniak Michał, Żołnierek Andrzej Proceedings of the 9th International Conference on Computer Recognition Systems CORES 2015, **Advances in Intelligent Systems and Computing** 403: 609-617 Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-26225-3 (Print) 978-3-319-26227-7 (Online), DOI: **10.1007/978-3-319-26227-7_57**; materiały konferencyjne według zapewnień redakcji (dr. T Ditzingera oraz H Schaepe odpowiedzialnych za serie, w której ukazały się proceedings CORES) zostały one wysłane do indeksowania przez WoS, (45%); MNiSW lista B 10 pkt.;
- IV. **Anna Korzyńska**, Łukasz Roszkowiak, Carlos Lopez, Ramon Bosch, Marylene Lejeune, 2013, "Validation of various adaptive threshold methods of segmentation applied to follicular lymphoma digital images stained with 3,3'-Diaminobenzidine&Haematoxylin", **Diagnostic Pathology**, 8:48, DOI: **10.1186/1746-1596-8-48**; IF=2.411, (60%); MNiSW lista A 25 pkt.;
- V. Łukasz Roszkowiak, **Anna Korzyńska**, Dorota Pijanowska, 2015, "Short survey: adaptive threshold methods used to segment immunonegative cells from simulated images of follicular lymphoma stained with 3,3'-Diaminobenzidine&Haematoxylin", Ed.: M. Ganzha, L. Maciaszek, M. Paprzycki, Proceedings of the 2015 Federated Conference on Computer Science and Information Systems; **Annals of Computer Science and Information Systems**,

5:291-295; DOI: **10.15439/2015F263**; materiały konferencyjne indeksowane przez WoS, (45%); MNiSW lista B 10 pkt.;

- VI. Anna Korzyńska**, Marcin Iwanowski, 2012, "Artificial images for evaluation of segmentation results; bright field images of living cells", *Information Technology in Biomedicine*, Ed.: Pitka E , Kawa J, **Lecture Notes in Bioinformatics**: 7339:445-455, DOI **10.1007/978-3-642-31196-3_45**; materiały konferencyjne indeksowane przez WoS, (90%); MNiSW lista B 10 pkt.;
- VII. Urszula Neuman, Anna Korzyńska**, Carlos Lopez, Marylene Lejeune, Łukasz Roszkowiak, Ramon Bosch, 2013, "Equalisation of Archival Microscopic Images from Immunohistochemically Stained Tissue Sections", *Biocybernetics & Biomedical Engineering* 33(1): 63-76, DOI **10.1016/S0208-5216(13)70056-1**; IF=0.157, (45%); MNiSW lista A 15 pkt.;
- VIII. Anna Korzyńska**, Lukasz Roszkowiak, Dorota Pijanowska, Wojciech Kozłowski, Tomasz Markiewicz, 2014, "The influence of the microscope lamp filament colour temperature on the process of digital images of histological slides acquisition standardization" *Diagnostic Pathology*, 9(S1): S13, DOI: **10.1186/1746-1596-9-S1-S13**; IF=2.594, (75%); MNiSW lista A 30 pkt.;
- IX. Tomasz Markiewicz, Anna Korzyńska**, Andrzej Kowalski, Zaneta Swiderska-Chadaj, Piotr Murawski, Bartłomiej Grala, Malgorzata Lorent, Marek Wdowiak, Jakub Zak, Lukasz Roszkowiak, Wojciech Kozłowski, Dorota Pijanowska, 2016, "MIAP - web-based platform for the computer analysis of microscopic images to support the pathological diagnosis", *Biocybernetics & Biomedical Engineering* 36(4): 597-609, DOI **10.1016/S0208-5216**; IF=0.808, (13%); MNiSW lista A 15 pkt.

W wybranych publikacjach dr Anna Korzyńska jest pierwszą lub drugą autorką, a udział w ich powstaniu ocenia na:

- cztery publikacje z udziałem 60 - 90 % [IV, V, VII, VIII],
- cztery publikacje z udziałem 45 lub 55 % [I, II, III, VI], oraz
- jedna publikacja z udziałem 13% [IX](pełna lista autorów z trzech instytucji wykonujących projekt liczy 12 osób).

Przedstawione publikacje mają sumaryczny impakt faktor równy **4.299** (według wartości w roku wydania publikacji i bez wliczania publikacji będącej suplementem w czasopiśmie *Diagnostic Pathology*), a suma punktów MNiSW wynosi **120**.

1. Wstęp

Autorka obroniła pracę doktorską pt.: „Komputerowa ocena ruchu i kształtu granulocytów obojętnochłonnych”, napisaną pod kierunkiem prof. Juliusza Kulikowskiego w 2000 roku [1]. Recenzentami pracy byli prof. Jan Doroszewski i prof. Zdzisław Pawłowski. Stopień doktora nauk technicznych w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna został nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczza Polskiej Akademii Nauk (IBIB PAN) z dnia 4 lipca 2000 roku.

Praca doktorska dotyczyła analizy sekwencji obrazowych dokumentujących ruchy pojedynczych komórek układu odpornościowego. Były to wyizolowane z krwi neutrocyty, czyli neutrofile, zwane również granulocytami obojętnochłonnymi, obserwowane w mikroskopie w świetle przechodzącym. Zdefiniowane w pracy współczynniki, opisujące ruchy i kształty pojedynczej komórki, pozwoliły ocenić i porównać ruchliwość neutrofilii pacjenta z zespołem Chediaka – Higashiego z neutrofilami dzieci zdrowych.

W pracy doktorskiej wykorzystywano metody analizy obrazów monochromatycznych z pojedynczym obiektem w polu widzenia, w których - ze względu na dobór szybkości zbierania klatek - nowe położenie komórki w znacznej części pokrywało się z poprzednim. Zaproponowana w pracy metoda segmentacji opierała się na dopasowaniu obrysu komórki, zidentyfikowanego na poprzedniej klatce, do nowego jej położenia. Na pierwszej klatce operator ręcznie wskazywał przybliżone położenie komórki, a na następnych - procedura działała automatycznie.

Opracowanie w postaci monotematycznego cyklu publikacji I – IX, będącego podstawą do habilitacji zgodnie z przepisami określonymi w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.), nosi tytuł **„Wybrane metody detekcji i segmentacji obiektów stosowane do barwnych obrazów mikroskopowych neuralnych komórek macierzystych i preparatów tkankowych”**. Cykl dotyczy analizy obrazów barwionych immunohistochemicznie skrawków tkanek i zmodyfikowanych genetycznie neuralnych komórek macierzystych produkujących białka fluorescencyjne EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescence Protein*). Obrazy komórek macierzystych są rejestrowane w świetle białym oraz w świetle wzbudzającym fluorescencję, czyli ultrafioletowym. Światło przechodzące lub światło emitowane jest rejestrowane za pomocą kamery. Obrazy tkanek i komórek rejestrowanych w mikroskopach i skanerach jako obrazy barwne lub jako obrazy złożone z trzech obrazów monochromatycznych, powstają z wykorzystaniem filtrów czerwonego, zielonego i niebieskiego koloru (RGB).

Osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego, jest zawarte w cyklu publikacji I – IX z lat 2010-2016 i przedstawia wyniki prac badawczych autorki uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora, co stanowi wkład autorki w dyscyplinę Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna.

W przeciwieństwie do zagadnień przedstawionych w rozprawie doktorskiej, które dotyczyły analizy morfologii i zachowania pojedynczych komórek – neutrofilii, na podstawie obrazów monochromatycznych, w prezentowanym cyklu, stanowiącym podstawę postępowania habilitacyjnego, przedstawiono opracowane metody detekcji i segmentacji stosowane do obrazów barwnych, w których w polu widzenia występuje wiele obiektów podlegających analizie, rozproszonych wśród innych obiektów. Jako

analizowane obiekty przyjmuje się zarówno komórki w całości, jak i ich jądra, występujące w tkankach lub hodowli linii macierzystych komórek neuralnych (w dalszej części autoreferatu autorka bliżej zidentyfikuje i opíše tak nazywaną przez biologów badaną linię komórkową).

W publikacjach wchodzących w skład powyższego monotematycznego cyklu, do segmentacji i detekcji są wykorzystywane metody morfologii matematycznej i morfologii geodezyjnej oraz metody dekonwolucji sygnału kolorowego na wybrane kolory bazowe. Natomiast w metodzie segmentacji zaproponowanej w pracy doktorskiej, autorka korzystała ze zmodyfikowanych dopasowanych do rozpatrywanego problemu znanych narzędzi przetwarzania obrazów. Na przykład – z krawędziowania i modelowania obrysu na półprostych promieniście rozchodzących się ze środka obiektu, wyznaczonego z użyciem momentów matematycznych. W badaniach po zakończeniu pracy doktorskiej metoda ta została rozwinięta przez zastosowanie specjalnie skonstruowanej tzw. skumulowanej funkcji znormalizowanej, opartej na gradiencie Prewitta [2].

Rodzaj tekstury jest opisywany jako cecha wskazująca poszukiwane obiekty. W metodzie zaproponowanej w pracy doktorskiej tekstura została oceniana z wykorzystaniem siatki o zadanej wielkości oczka (w pikselach) i była ograniczona do analizy wartości średniej oraz odchylenia standardowego jasności w danym obszarze. W metodach prezentowanych poniżej w cyklu publikacji ocena tekstury jest wykonywana przez okienkowanie z przesunięciem i , oprócz poprzednio wykorzystywanych wielkości dotyczy również wariancji jasności i natężenia składowych koloru w różnych modelach kolorów [II, III].

Metody zastosowane w przedstawionym cyklu publikacji dotyczą selekcji analizowanych obiektów, ich segmentacji, klasyfikacji i określenia ich liczebności. W rozprawie doktorskiej wyznaczano obszar komórki, na podstawie którego uzyskiwano współrzędne punktu reprezentującego pozycję komórki, aby następnie – w oparciu o jej kolejne pozycje - otrzymać trajektorię ruchu.

Ponadto w monotematycznym cyklu są również prezentowane metody walidacji rezultatów segmentacji i detekcji przy użyciu obrazów symulowanych [VI], wykorzystane w publikacjach [I, IV i V] oraz wybrane metody wstępnego przetwarzania obrazów [VII - IX], które nie były przedmiotem badania w rozprawie doktorskiej.

Badania, przedstawione w niniejszym cyklu prac autorki, są interdyscyplinarne. Dotyczą wiedzy z dziedziny informatyki, biologii, medycyny oraz szeroko pojętej inżynierii biomedycznej. Zakres badań po doktoracie, których wyniki opisano w publikacjach z cyklu stanowiącego podstawę habilitacji, został znacząco rozszerzony. Prowadzenie badań wymagało znajomości metod przetwarzania obrazów, warsztatu programistycznego i matematycznego, podstaw biologii ruchu komórki, a także bardzo ścisłej współpracy z lekarzami patologami i biologami. Ponadto - zapoznania się z powstawaniem, znaczeniem i interpretacją obrazów immunohistochemicznych i cytologicznych, ich znaczeniem w diagnostyce, prognostyce i z umiejętnością oceny stopnia zaawansowania różnych procesów chorobowych.

Podsumowując - zaprezentowany monotematyczny cykl publikacji przedstawia opracowane przez autorkę metody detekcji i segmentacji barwnych obrazów tkanek i komórek [I - V]. Segmentacja obiektów jest stosowana w tych problemach badawczych, gdzie wstępna detekcja obiektu nie wystarcza, np. gdy w celu klasyfikacji obiektu jest potrzebna ocena jego tekstury lub pomiar pola jego powierzchni i ocena

jego kształtu [I - III]. Ponadto - przedstawiono problem walidacji używanych metod [I - V], który stanowi osobne i trudne zagadnienie przetwarzania obrazów. W ostatnich trzech publikacjach cyklu, stanowiącego podstawę ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, autorka zaproponowała metody wstępnej poprawy pewnych aspektów jakości analizowanych obrazów tkanek [VI - IX], które ułatwiły dalsze rozwijanie metod detekcji i segmentacji.

2. Stan obecny i tło badań nad metodami segmentacji obrazów i detekcji obiektów w obrazach tkanek i komórek

Przetwarzanie obrazów mikroskopowych komórek i tkanek jest ważnym problemem badawczym. Wspomaga ono badania biologiczne i medyczne nad morfologią komórek i strukturą tkanek. Wyniki analizy opisowej i ilościowej preparatów cytologicznych lub histologicznych są podstawą:

- diagnostyki dużej liczby chorób,
- podejmowania decyzji dotyczącej dalszego leczenia,
- prognozowania wyleczenia choroby lub prawdopodobieństwa jej remisji,
- wspomagania oceny stopnia zaawansowania choroby,
- przeprowadzania badań klinicznych i naukowych.

Analiza ilościowa polega zwykle na ocenie liczebności pewnych subpopulacji obiektów widocznych na obrazie. Dotyczy zarówno całych komórek (ich cytoplazmy), jak i ich części - np. jąder czy błon komórkowych. Wymaga ona wstępnej selekcji obiektów widocznych na obrazie, następnie badania cech charakterystycznych tych obiektów i ich zaklasyfikowania do poszczególnych subpopulacji. Analiza ilościowa obejmuje: (1) wyodrębnienie subpopulacji komórek, np. o cechach morfologicznych innych, niż uznane za normę, albo (2) podział na subpopulacje wykazujące pewne cechy, np. podział na podstawie obecności lub braku wybranego antygeny.

W szpitalach i klinikach lekarze-patolodzy wciąż jeszcze dokonują rutynowej oceny preparatów histologicznych i cytologicznych pod mikroskopem. Wyszukują - według wytycznych WHO [3, 4] - obszarów odpowiednich do skwantyfikowania i zliczają obiekty. W lepiej wyposażonych placówkach, gdzie są dostępne skanery wirtualnych slajdów, lekarze (szczególnie ci przyzwyczajeni do percepcji obrazów z urządzeń elektronicznych) mogą oceniać preparaty cyfrowe, wykorzystując wysokiej jakości monitory ekranowe. Jednak w takich przypadkach wciąż samodzielnie wybierają obszary do skwantyfikowania i bez wspomagania zliczają obiekty lub ze wspomaganie w postaci siatki i markera pozycji. Podczas wykonywania tej czasochłonnej pracy wprowadzanie błędów oceny, zwanych błędami wewnątrz- i międzygrupowymi, jest nieuniknione. Duży na to wpływ mają: stan psychofizyczny lekarza (zmęczenie), warunki oświetlenia w pracowni, czy dobór parametrów monitora. Błędy oceny wynikają z braku powtarzalności pomiarów.

Dostępność pamięci o dużej pojemności, szybkich wielordzeniowych komputerów, umożliwiających zachodzenie procesów równoległych, przyspiesza obliczenia na dużych obrazach. Zastosowanie klastrów lub gridów komputerowych

oraz szybkich wysokiej jakości skanerów, przetwarzających tradycyjne preparaty na szkiełkach do postaci złożonych wielkoobszarowych obrazów cyfrowych, umożliwia jednocześnie pracę z wykorzystaniem cyfrowych preparatów cytologicznych i tkankowych. Pierwsze metody komputerowej analizy ilościowej cyfrowych preparatów cytologicznych zostały już zaakceptowane przez WHO do diagnostyki klinicznej i przesiewowej (ThinPrep POP Test [5, 6], firmy HOLOGIC do badania cytologii u kobiet). Zostały również zaakceptowane przez Unię Europejską i inne regionalne organizacje kontrolujące procedury i urzędnicy medyczne, przez co stają się powszechne w użyciu od 10 lat.

Do komputerowej analizy ilościowej WHO w następnej kolejności dopuściła niektóre preparaty mikroskopowe zawierające skrawki histologiczne z wyznakowanymi markerami chorób nowotworowych układu rozrodczego, takimi jak: progesteron (PR), estrogen (ER) i ludzki czynnik wzrostu typu 2 (HER-2/neu). Dotyczy to jedynie oprogramowania niektórych firm (np.: Automated Cellular Imaging System skrót ACIS III, współpracująca z producentami skanerów Daco i Zeiss, Genetix Applied Imaging ARIOL, Aperio) [7], pod warunkiem użycia odpowiednich przeciwciał i barwników określonych firm. Natomiast w przypadku badań naukowych, do znanych systemów komputerowych analizy obrazów skrawków tkanek należy oprogramowanie takich firm, jak 3DHistec MIRAX HistoQuant, Pathimam, TissueMine, Dedinines TisseMap, SlidePath, HistoRx AQUA i Cambridge Research & Instruments Software [7]. Proponują one dedykowane rozwiązania głównie dotyczące podstawowego barwienia histologicznego z użyciem hematoksyliny i eozyny (H&E).

W Polsce, podobnie jak w Europie, została dopuszczona analiza ilościowa w przypadku niektórych wymienionych enumeratywnie chorób. Analiza musi być przeprowadzana na atestowanych urządzeniach i za pomocą certyfikowanego oprogramowania [8].

Podsumowując można zauważyć, że na całym świecie obserwuje się intensyfikację prac nad rozwojem i weryfikacją metod oceny ilościowej w diagnostyce, prognostyce i ocenie zaawansowania kolejnych chorób, zwłaszcza nowotworowych. Wyraża się to znacznym wzrostem liczby publikacji dotyczących metod analizy i przetwarzania obrazów mikroskopowych oraz metod diagnostycznych wspomaganych komputerowo (Computer Aided Diagnosis; CAD), opartych na analizie obrazów. W latach dziewięćdziesiątych XX wieku powstały pierwsze znaczące publikacje dotyczące ilościowej oceny preparatów histopatologicznych [9 - 12], natomiast w pierwszej dekadzie XXI wieku powstały ich już setki. Dlatego ujmuje się je w grupy powiązane z poszczególnymi narządami i ich schorzeniami, np. rak sutka [13 - 16], rak prostaty [16 - 21], rak wątroby [22, 23], rak trzustki [24, 25], guzy mózgu i obwodowego układu nerwowego [26 - 31], nowotwory węzłów chłonnych [32, 33], nowotwory w obrębie ust, nosa i płuc [34, 35], raki przewodu pokarmowego [36]. W tym czasie powstały również ciekawe publikacje przeglądowe, które do 2014 roku pełniły rolę zestawienia wiedzy w tej dziedzinie, np.: kompendium Gurnana i współpracowników z 2009 roku [37], dotyczące przeglądu systemów typu CAD dla histopatologii, czy kompendium Demira i Yenera z 2006 roku [38], dotyczące automatycznej diagnostyki raka na podstawie obrazów histopatologicznych. Prace z tamtych lat dotyczą głównie analizy obrazów barwionych hematoksylina i eozyną (H&E), czyli znaną od ponad 100 lat i uznawaną przez część środowiska patologów za podstawową metodę barwienia, niosącą najwięcej informacji diagnostycznej.

W związku z koniecznością uzyskiwania wysokiej precyzji i dokładności istnieją metody, w których wykorzystuje się dodatkowe informacje pochodzące z innych metod obrazowania tego samego lub sąsiedniego skrawka tkanki. Informacja jest wzbogacana przez użycie barwników (chromogenicznych, takich, jak DAB, czy fluorescencyjnych, takich jak Cy lub Alexa fluor) lub przez zastosowanie zobrazowań spektroskopowych [37]. Są to obrazy uzyskiwane dzięki eksperymentalnym systemom zbierania obrazów, zaproponowanym przez autorów publikacji [38], które nie doczekały się komercjalizacji. Warto wspomnieć, że w tym okresie zbierane fragmenty obrazów preparatów były ograniczone do typowego rozmiaru 2000×2000 pikseli.

W pierwszej dekadzie XXI wieku została wydana pierwsza książka, która omawia problemy analizy obrazów mikroskopowych komórek [39]. W jej pierwszej edycji z 2008 roku wprowadzono metody morfologii matematycznej do kanonu analizy obrazów mikroskopowych.

W latach 2010-2015 publikacji dotyczących analizy obrazów histopatologicznych ukazało się znacznie więcej, niż w poprzednim dziesięcioleciu. Opisują one głównie analizę tzw. złożonych wielkoobszarowych obrazów cyfrowych, powstałych w wyniku digitalizacji fizycznych preparatów mikroskopowych. Urządzenia poprzedzające skanery, tzw. zmotoryzowane mikroskopy, powstały w późnych latach 90-tych XX wieku, ale dopiero w tym okresie rozwinęły się na tyle, aby skanować pojedyncze slajdy z akceptowalną szybkością (poniżej 1 minuty) i z dużą efektywnością [40]. Przetworzone do wersji cyfrowej obrazy preparatów przygotowanych na szkiełku mikroskopowym są zapisywane w plikach nazywanych wirtualnymi preparatami lub WSI (ang. *Whole Slide Images*). Jeśli takie pliki są pokazywane przy pomocy specjalnego oprogramowania, imitującego typowe możliwości mikroskopu, zainstalowanego na komputerze lub specjalnych urządzeniach przeglądających, to wraz z nim stanowi to tzw. wirtualny mikroskop (ang. *virtual microscope*). Komputerowa analiza takich wielkoobszarowych obrazów wymaga rozwiązania nie tylko problemów przetwarzania informacji obrazowej, ale również problemów efektywnego zarządzania pamięcią i zbudowania algorytmów równoległego przetwarzania fragmentów obrazów i łączenia częściowych wyników w całość [41, 42].

W związku z powyższym motywacją autorki było rozwinięcie metod analizy. Wcześniej tworzone metody są dostosowane do obrazów o maksymalnym rozmiarze 2000×2000 pikseli, czyli do fragmentów slajdów fotografowanych kamerą połączoną z mikroskopem. Autorka rozwija metody w sposób umożliwiający analizę równoległą wirtualnych slajdów, tzn. selekcję odpowiednich (niemałych i podzielonych na fragmenty) obszarów do analizy i organizację przetwarzania, jako procesy równoległe.

Najnowsze publikacje w omawianej dziedzinie to wymienione poniżej artykuły przeglądowe oraz te, które opisują najnowsze podejścia do problemu analizy obrazów cytologicznych i histologicznych. Należą do nich metody oparte na: (1) uczeniu wielowarstwowej sieci neuronowej (ang. *Deep CNN*) [43, 44], (2) algorytmach *level set*, pracujących równoległe na wielu procesorach [45], (3) algorytmach grafowych [46], oraz (4) dopasowywaniu fragmentów obrazu do modeli obiektów [47 - 49].

Ponadto, w latach 2010-2015 powstały nowe systemy komercyjne (HALO platform firmy Indica – USA, Nowy Meksyk [50], komercyjne oprogramowanie OUTSPACE, SLIDEMACHER, VOLOOM firmy MicrDimensions – Niemcy, Monachium [51, 52]) i oprogramowanie ogólnodostępne (typu *open source*) CYTOMINE [53] (Belgia, Liege) do wspomagania eksploracji złożonych wielkoobszarowych obrazów cyfrowych.

Powstały również niekomercyjne systemy analizy i przetwarzania obrazów, głównie stworzone przez naukowców dla naukowców, lekarzy i studentów. Należą do nich: platforma EAMUS [54, 55] i telepatologiczny system INTERREG [56].

Platforma EAMUS powstała w Niemczech w 2005 roku, ale po paru latach stała się dostępna tylko komercyjnie (użytkownicy zostali zobowiązani do wnoszenia opłat) i niedługo po tym przestała funkcjonować. Natomiast system INTERREG powstał we Włoszech i wciąż pełni rolę narzędzia do konsultacji między dwiema instytucjami: Institute of Pathology, University of Udine, Włochy i Institute of Pathology at the Hospital of Izola, Słowenia [56]. Ostatnią niekomercyjną inicjatywą w Europie jest tworzenie bazy wirtualnych slajdów wraz z informacjami o pacjentach [57, 58] przez prof. K. Kaysera na potrzeby czasopisma *Diagnostic Pathology*.

Największy sukces odnosi platforma ImageMiner [59], którą Foran i jego współpracownicy udostępnił środowisku naukowemu do analizy porównawczej preparatów tworzonych jako tzw. mikromacierze tkankowe (ang. *Tissue Microarray*, TMA). Platforma zbudowana w USA obsługuje zarówno projekty amerykańskie, jak i projekty naukowców współpracujących z Amerykanami [<http://www.definiens.com/research/tissue-studio/image-miner>].

Podsumowując - rozwój metod analizy obrazów, w tym analizy obrazów komórek i tkanek, w połączeniu z rozwojem technologii sprzętowej i programistycznej, daje szansę na utworzenie komputerowego wspomaganie dla patomorfologii. Podobnie jak radiologia w końcu XX. wieku, tak patomorfologia w XXI. wieku powinna uzyskać charakter cyfrowy. Cyfryzacja patomorfologii pozwoli na zaangażowanie sieci przesyłowych do dystrybucji informacji (cyfrowych obrazów tkanek i komórek oraz informacji o pacjentach) między szpitalami, klinikami i centrami diagnostycznymi, czyli tzw. sieci telepatologicznych [56 - 61]. Telepatologia daje szansę nawet najmniejszym szpitalom na dostęp do ekspertów, konsultacji, procesu wymiany wiedzy i umiejętności. Oprócz tego otwiera drogę do tzw. medycyny spersonalizowanej, w której jest możliwe dobranie algorytmu leczenia dla subpopulacji pacjentów wyselekcjonowanych na podstawie identyfikacji specyficznego profilu molekularnego, ujawnionego nie tylko w testach genetycznych, ale również w skrawkach tkanek barwionych specyficznymi [62, 63].

Szczególnie trudnym problemem, stanowiącym hamulec w rozwoju patologii cyfrowej, telepatologii i systemów CAD, opartych na informacji pozyskiwanej z obrazów tkanek i komórek [64, 65], jest detekcja i segmentacja obiektów zainteresowania w obrazach.

W ramach przetwarzania i analizy obrazów, a w szczególności w ramach widzenia komputerowego (ang. *computer vision*), zaproponowano ogromną liczbę metod automatycznej detekcji i segmentacji obiektów. Większość działa efektywnie w konkretnych zastosowaniach, do których zostały utworzone. Najbardziej skutecznie działają tam, gdzie obraz do analizy może być uproszczony już na etapie jego akwizycji, jak to ma miejsce w robotyce, na taśmach produkcyjnych [66]. W tych zastosowaniach, przez kontrolę warunków akwizycji, niekiedy przez kadrowanie, unifikację warunków oraz przez przystosowanie obiektów i scen przy pomocy wskaźników i etykiet, uzyskuje się obrazy, w których obiekty łatwo zlokalizować i segmentować.

Efektywność i dokładność metod detekcji i segmentacji znacznie spada, gdy są zastosowane do analizy obrazów naturalnych, np. obrazów drogi, parkingu, tłumy, obrazów lotniczych i satelitarnych, itp. Obrazy naturalne zawierają zwykle fragmenty

istotne i nieistotne ze względu na cel analizy. Te istotne trzeba odnaleźć mimo ich zmiennej lokalizacji i zmieniających się warunków akwizycji obrazów (zmiany oświetlenia, zmiany sceny, itp.). Natomiast nieistotne obiekty należy odrzucić. Niepoprawny podział obrazu prowadzi do błędów lub wręcz do braku możliwości uzyskania wyników. W systemach o akceptowalnym stosunkowo wysokim poziomie nierozstrzygniętych wyników analizy, przypadki, z którymi nie poradzi sobie system komputerowej wizji, zostają pominięte lub rozwiązane przez człowieka. Tak jest w przypadkach systemów komputerowej wizji, stosowanych do wspomagania radarów mierzących prędkość pojazdów i fotografujących te z nich, które przekraczają przepisy drogowe oraz oceny jakości lub identyfikacji produktów, których obraz jest pozyskiwany podczas przemieszczania ich na taśmie produkcyjnej [66].

Inaczej jest w przypadku obrazów komórek i tkanek stosowanych do diagnostyki i prognostyki. Poziom akceptowanego braku rozstrzygnięć, a tym bardziej poziom występowania błędnej oceny, musi być jak najniższy ze względu na etykę lekarską. Rozwijane metody analizy obrazów tkanek i komórek muszą się charakteryzować odpowiednią czułością i specyficznością. Nie jest to łatwe do osiągnięcia, choćby ze względu na ogromną zmienność i różnorodność obrazów naturalnych tkanek i komórek. Wszystko to powoduje, że analiza takich obrazów jest nie lada wyzwaniem dla twórców metod komputerowej analizy. Praktycznie w przypadku większości chorób nowotworowych wciąż jest jeszcze nierozwiązanym problemem na przykład komputerowa analiza obrazów barwionych DAB&H (3,3'-diaminobenzodyną i hematoksyliną).

Autorka rozwija metody i oprogramowanie do analizy obrazów tkanek barwionych specyficznymi barwnikami DAB&H, ponieważ są one wykorzystywane w diagnostyce chorób nowotworowych (np. do oceny indeksu proliferacji – opisanego poniżej – w raku sutka **III** i w opaniakach [67]), ponadto są wykorzystywane w badaniach naukowych współpracujących z jej pracownią biologów i patologów z oddziału patologii szpitala WIM (chłoniaki typu LBCD **IX**) oraz z Molecular Biology and Research Section, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta (chłoniaki grudkowate i rak sutka z i bez przerzutów do węzłów chłonnych [**II**, 68, 69]). Manualna ocena takich obrazów wymaga czasochłonnej procedury wykonywanej przez specjalistów, a dotychczasowe próby jej automatyzacji nie dają rezultatów na zadawalającym poziomie czułości i specyficzności.

3. Trudności w detekcji i segmentacji mikroskopowych obrazów komórek i tkanek

Problemy w przeprowadzaniu automatycznej detekcji mikroskopowych obrazów komórek i tkanek można podzielić na dwa obszary:

- cechy wspólne, wynikające z użycia mikroskopu i kamer cyfrowych, np. winietowanie, czy dystorsje geometryczne lub chromatyczne,
- konieczność indywidualnego dostosowania algorytmu do danego problemu badawczego.

Najważniejsze przyczyny zróżnicowania wyglądu tkanek i komórek na poziomie preparatów na szkiełkach mikroskopowych, to:

1. różnorodność tkanek i komórek - występuje na poziomie osobniczym oraz na poziomie populacji,
2. zróżnicowanie wynikające z procesów chorobowych - tak na poziomie różnych jednostek chorobowych u jednego człowieka, jak i na poziomie tej samej choroby u różnych ludzi,
3. znaczna liczba sposobów i protokołów barwienia oraz rodzajów używanych barwników.

Różnorodność wynikająca z natury i z barwienia preparatów jest amplifikowana ze względu na sposoby i narzędzia formowania obrazów cyfrowych z preparatów na szkiełkach. Skanery wirtualnych slajdów pracują z wykorzystaniem światła różnego typu (np. światło LED lub halogenowe, czasem filtrowane lub modulowane), różnych typów matryc, algorytmów doboru intensywności światła, płaszczyzny ostrości, modyfikują zbierany sygnał, itd. W następstwie tej różnorodności obrazy wirtualne tego samego preparatu, poddane obróbce cyfrowej za pomocą różnych urządzeń, w wersji cyfrowej różnią się między sobą wartością jasności występujących kolorów, ich odcieniem, kontrastem, rozdzielczością, a także dystorsjami geometrycznymi i chromatycznymi, wynikającymi z charakterystyki zastosowanej optyki i kamery [70-74]. Obowiązujące sposoby standaryzacji procedury tworzenia preparatów i wirtualnych slajdów próbują tę różnorodność utrzymać w założonych zakresach [71, IX].

Jednak obrazy różnych tkanek, uzyskane w tych samych warunkach barwienia i przygotowania preparatu, czyli obrazy pojedynczych próbek (ang. *punch* lub *core*) mikromacierzy tkankowej, mają znaczny zakres zmienności barw, tonacji i kolorów, oraz kontrastu i ostrości. W tym wypadku różnorodność obrazów wynika z heterogenności tkanek umieszczonych w poszczególnych próbkach mikromacierzy [75].

Preparaty histopatologiczne cechuje duża zmienność wyglądu. Obrazy tkanek zmienionych w przebiegu procesów nowotworowych pokazują rozpad ich typowej architektury oraz wynikające z niego przypadkowe bezładne i ciasne upakowanie komórek i ich jąder, podczas gdy ta sama tkanka nieobjęta chorobą ma pewien charakterystyczny wzór (ang. *pattern*). W tkankach zmienionych chorobowo, znacznie częściej niż w tkankach nieobjętych chorobą, obserwuje się połączenia jąder komórkowych i komórek w skupiska, tzw. klastry [publikacja II rysunek 4, publikacja III rysunek 2]. Do tego w tkankach objętych nowotworzeniem zmienność obiektów (w szczególności zmienność kształtu jąder komórkowych oraz niehomogeniczność ich zabarwienia) nastręcza wiele trudności na etapie ich detekcji i segmentacji. Jądra komórkowe i komórki naturalnie różnią się wyglądem w poszczególnych fazach cyklu komórkowego i fizjologicznej aktywności (np. podczas sekrecji i w fazie spoczynku). Jeśli do tego dodamy zmienność utkania, wynikającą z zastosowania leczenia przeciwnowotworowego (występowanie zmian nekrotycznych, zastępowanych z czasem przez tkankę łączną włóknistą – ang. *fibrous connective tissue*) oraz fizjologiczną zmienność, np. z przerastającą tkanką tłuszczową, to zakres zmienności obrazów obserwowanych w preparatach jest bardzo duży. Prowadzi to do

skomplikowanych metod wyszukiwania nie tylko jąder i komórek, ale całych obszarów do kwantyfikacji.

Duża zmienność wyglądu jąder komórkowych i komórek prowadzi także do trudności w znalezieniu kryteriów wyróżniania obiektów [publikacja III tabela 1]. W konsekwencji - metody klasyfikacji obiektów odnalezionych na etapie detekcji lub segmentacji, stają się skomplikowane i wieloetapowe. Dodatkowo procesy te utrudnia obecność artefaktów (w postaci zagięć, dziur, depozytów barwnika i komórek krwi [67]) oraz stosunkowo słaby kontrast obiektów w stosunku do tła w obrazach komórek i tkanek.

Reasumując, wszystkie wymienione powyżej cechy cyfrowych obrazów skrawków tkanek i komórek wpływają bezpośrednio na etapy przetwarzania obrazów, zwane detekcją obiektów (tzn. lokalizacją jednego lub spójnej grupy pikseli należących do jednego obiektu) i ich segmentacją (tzn. znalezieniem dokładnych granic obiektów). Etapem pośrednim jest klasyfikacja: morfologii komórki lub jądra komórkowego, tekstury ich wnętrza oraz intensywności i rozmieszczenia barwnika. Niektóre klasyfikujące cechy, np. kształt i wielkość, wymagają segmentacji obrazu. Na podstawie oceny klasyfikujących cech patomorfolog decyduje, czy znaleziony obiekt należy do danej subpopulacji obiektów, której liczebność jest cechą diagnostyczną choroby. Niezależnie od tego, czy zliczamy wyniki detekcji czy segmentacji komórek lub jąder komórkowych, to ich rezultaty bezpośrednio wpływają na diagnostykę lub prognostykę.

Kształty, jakie przyjmują żywe komórki, a więc obiekty przezroczyste z ziarnistościami (drobnymi nieprzezroczystymi strukturami, np.: retikulum endoplazmatycznym, aparatem Golgiego, lizosomami) rozproszonymi w cytoplazmie często naokoło jądra komórkowego, są bardzo zróżnicowane i zmienne w czasie [publikacja I rysunek 1, 2, 8]. Komórki obserwowane w świetle przechodzącym są obiektami słabo skontrastowanymi z tłem, o niejednoznacznej linii brzegowej. W procesie analizy obrazów dopiero wykorzystanie informacji uzupełniającej, pochodzącej z innego obrazu tego samego obiektu, z innej modalności w postaci obserwacji np. we fluorescencji, pozwala zaproponować efektywną metodę ich segmentacji. Pary obrazów żywych komórek, zbierane w jasnym polu i z wykorzystaniem fluorescencji wynikającej z transdukcji genu *gfp*, zawierają informacje komplementarne (są - odpowiednio w pierwszym przypadku - bardzo słabo skontrastowane z tłem, ale mają zauważalną teksturę, albo - w drugim przypadku - zauważalnie skontrastowane z tłem), pozwalające na wyznaczenie obiektów.

4. Przegląd metod detekcji i segmentacji stosowanych do przetwarzania obrazów komórek i tkanek

Jak wynika z analizy przedstawionej w poprzednim rozdziale, opracowywanie metod analizy obrazów skrawków tkanek i komórek dla rozwoju cyfrowej patologii jest trudne. Prezentowany cykl publikacji autorki przedstawia jej osiągnięcia w pracach nad metodami detekcji i segmentacji obrazów mikroskopowych fragmentów tkanek i komórek oraz pokazuje, w jaki sposób autorka radziła sobie z wymienionymi wyżej wyzwaniami.

Aby umiejscowić osiągnięcia autorki w spektrum metod detekcji i segmentacji obiektów w obrazach mikroskopowych tkanek i komórek stosowanych przez innych autorów, w Tabeli 1. jest prezentowane zestawienie metod sporządzone na podstawie poniższych trzech artykułów:

- (1) przeglądu Funonga Xinga i Lina Yanga [76] z 2016 roku pt.: „Robust Nuclei/Cell Detection and Segmentation for Digital Pathology and Microscopic Images: A Comprehensive Review” opublikowanego w IEEE Review in Biomedical Engineering (w którym są również cytowane prace, w których uczestniczyła autorka);
- (2) przeglądu Jisha Johna i współpracowników [77] z 2016 roku pt.: „A Novel Approach for Detection and Delineation of Cell Nuclei Using Feature Similarity Index Measure”, opublikowanego w Biocybernetics and Biomedical Engineering (również zawierającego cytowania prac autorki), prezentującym ich nowe podejście do detekcji obiektów na podstawie specjalnie zdefiniowanego podobieństwa;
- (3) przeglądu H. Irshada, A. Veillarda, L. Rouxa i D. Racoceanua [78] 2014 roku pt.: „Methods for Nuclei Detection, Segmentation, and Classification in Digital Histopathology: A Review -Current Status and Future Potential” opublikowanego w IEEE Reviews in Biomedical Engineering.

Detekcja - to wskazanie obiektu przez ustalenie lokalizacji jego spójnego fragmentu, bez dokładnego ustalania jego granic. Najważniejszą cechą detekcji jest jej jednoznaczność, zgodnie z zasadą, że jeden obiekt – to jeden wskazany fragment obrazu [39, 79]. Natomiast segmentacja obiektu - to wskazanie jego granic, a więc wszystkich punktów należących do obiektu. Najważniejszą cechą segmentacji jest jej pełność, tzn. każdy piksel obiektu należy do obszaru wskazanego przez wynik segmentacji [39, 79]. Wynikiem detekcji jest spójny wewnętrzny obszar obiektu, zwykle ulokowany w pobliżu jego centroidu, a wynikiem segmentacji jest wyznaczenie mapy całego obiektu. Zwykle detekcja, zwana również selekcją obiektów, jest jedynie etapem (choć niekoniecznym) w segmentacji. Natomiast nadrzędny cel analizy, czyli analiza ilościowa obiektów znajdujących się na obrazie, może wymagać wyłącznie detekcji obiektów, albo ich pełnej segmentacji.

Zarówno metody segmentacji, jak i metody detekcji obiektów, bazują albo na pewnej apriorycznej wiedzy o cechach poszukiwanych obiektów, albo na algorytmach, które na podstawie zbiorów uczących same wybierają cechy istotne z punktu widzenia rozpoznawania obiektów. Biorąc pod uwagę ten generalny podział oraz wyróżniając osobno detekcję i segmentację, metody znane w przetwarzaniu obrazów autorka proponuje zestawić w sposób przedstawiony w poniższej Tabeli 1. Warto wspomnieć, że podział ten sztucznie rozdziela wszelkie metody, w których detekcja i segmentacja są nierozłączne. Co więcej - w Tabeli 1 metody oparte na wiedzy są całkowicie oddzielone od tych opartych na algorytmach uczenia, podczas gdy argumentem wejściowym SVM może być encyklopedyczna wiedza, a metody grafowe mogą wykorzystywać wiedzę opisową. W tym wypadku, jak i w każdym innym, wymuszona systematyzacja skutkuje uproszczeniami rzeczywistości.

Tabela 1. Metody stosowane w detekcji i segmentacji obiektów w mikroskopowych obrazach komórek i tkanek.

Metody detekcji obiektów oparte na:	Detekcja	Segmentacja
opisowej wiedzy encyklopedycznej – zewnętrznej [76–78]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Transformata odległościowa; 2. Operacje morfologiczne bez wododziała; 3. Transformata H-min/max; 4. Filtracja LoG; 5. Transformata Hougha; 6. Symetria radialna; 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Progowanie; 2. Rozrost regionów; 3. Operacje morfologiczne, w tym wododziała; 4. Klasteryzacja i pokrewne modele probabilistyczne; 5. Modele deformowalne (level set, aktywny kontur); 6. Metody grafowe;
wiedzy wyekstrahowanej automatycznie z obrazów – wewnętrznej [76–78, 80–82]	<ol style="list-style-type: none"> 7. SVM (pokrewna do klasteryzacji); 8. Detekcja MSER; 9. Drzewa decyzyjne (Random Forests); 10. Konwolucyjne SSN. 	<ol style="list-style-type: none"> 7. Klasyfikacja pod nadzorem.

W Tabeli 1. **pogrubionym** drukiem zaznaczono metody, które są rozwijane przez autorkę, natomiast niektóre z pozostałych były wykorzystywane do porównań opisanych w publikacjach. Poniżej zostaną omówione metody wykorzystywane w publikacjach z niniejszego cyklu. Przedstawione zostaną ich typowe zastosowania do analizy obrazów komórek i fragmentów tkanek oraz ich wady i zalety, aby wskazać specyfikę ich wykorzystania/rozszerzenia w pracach autorki.

W ramach zamieszczonych w cyklu publikacji zostały przedstawione metody analizy obrazów:

1. transdukowanych genem *gfp* neuralnych komórek macierzystych linii HUCB-NSC [I oraz 83] oraz
2. barwionych immunohistochemicznie skrawków tkanek:
 - 2.1. węzłów limfatycznych barwionych przeciw FOXP3 [publikacje II, III, IV, V] w chorobie nowotworowej chłoniaku grudkowego,
 - 2.2. centralnego układu nerwowego (mózgu) barwione przeciwko Ki-67 [publikacja VIII oraz 67] w oponiakach mózgu,
 - 2.3. sutka barwionych przeciw Ki67 [publikacja VI] w chorobie nowotworowej,

oraz sutka i węzłów pachowych barwione przeciw FOXP3 [68, 69] w publikacjach nie włączonych do cyklu.

Skrawki tkanek są poddawane immunohistochemicznemu barwieniu z użyciem markerów jądrowych, zwanemu w medycynie odczynem immunohistochemicznym. Jest to tzw. barwienie pośrednie, w którym element pośredni (organiczna molekula) wiąże się z przeciwciałem specyficznym dla pewnego typu jąder komórkowych, a barwnik wiąże się z elementem pośrednim [84, 85]. W publikacjach z cyklu preparaty są barwione 3,3'-diaminobenzydyną, w skrócie DAB (barwiącą na kolor brązowy).

Reakcja wiązania nie jest stechiometryczna, co oznacza, że z elementem pośrednim może się związać więcej lub mniej cząsteczek barwnika. Preparaty immunohistochemiczne są dodatkowo kontrbarwione, w celu łatwiejszego zróżnicowania wybarwionych struktur, z użyciem hematoksyliny (H), która barwi chromatynę zawartą w jądrach. Chromatyna jądrowa jest barwiona na kolor niebieski [publikacje II – V, IX] i to zarówno w jądrach zabarwionych już przez DAB, jak i we wszystkich pozostałych. Obrazy skrawków tkanek poddane takiemu barwieniu można zobaczyć w publikacji II (rysunek 1 i 2), w publikacji III (rysunek 2) oraz w publikacji IX (rysunek 8).

Barwienie immunohistochemiczne jest techniką barwienia, która przedstawia molekularną informację o ekspresji białek w kontekście informacji o morfologii tkanki (*in situ*) [84, 85]. Jest to technika wykorzystywana przez patologów do dokonania wyboru terapii, a potem do oceny odpowiedzi organizmu, do stwierdzenia czy nowotwór jest łagodny czy złośliwy oraz do ustalenia stopnia jego zaawansowania. Jest więc dopełnieniem standardowego i najstarszego badania histologicznego z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny (H&E).

Poza cyfrowymi obrazami preparatów tkankowych, w wybranym do habilitacji cyklu publikacji są analizowane obrazy neuralnych komórek macierzystych w hodowli komórkowej. Macierzyste komórki neuralne - to pluripotencjne komórki, które mogą się zróżnicować zarówno w neurony (neurocyty), jak i w komórki glejowe. W pracach autorki była wykorzystywana ich linia komórkowa HUCB-NSC powstała w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, w pracowni Neurobiologii Naprawczej kierowanej przez prof. Krystynę Domańską-Janik. Również tam została transdukowana, tak aby świecić białkiem fluorescencyjnym EGFP. Autorka niniejszej publikacji otrzymała komórki tej linii w ramach współpracy, z przeznaczeniem do realizacji projektu MNiSW w latach 2008-2011.

Obrazy komórek w hodowli były zbierane przez kamerę cyfrową połączoną z mikroskopem, jako sekwencje dokumentujące ich zachowanie. Dwie naprzemiennie ułożone sekwencje – pierwsza powstała jako obrazy w białym świetle przechodzącym i – druga, powstała jako obraz we wzbudzonym zielonym świetle fluorescencyjnym [publikacja I]. Każda taka para zdjęć była zbierana z minimalnym odstępem czasowym, wynikającym z szybkości akwizycji, natomiast między parami występuje różnica czasowa rzędu kilkudziesięciu sekund. Sekwencję obrazów można zobaczyć w publikacji I, rysunek 1.

Obrazy komórek w hodowli, które analizuje autorka, były w większości zbierane w powiększeniu 400× (z użyciem obiektywu powiększającego 40 razy) i zapisywane w bezstratnym formacie TIF.

W przypadku neuralnych komórek macierzystych obiektami detekcji i segmentacji są komórki w całości oraz ich jądra komórkowe, a w przypadku obrazów tkankowych - jądra komórek występujących w skrawkach tkanek, np. komórek nabłonkowych, limfocytów, komórek nowotworowych, itp.

Specyfika wyżej opisanych obrazów powoduje, że - jak sprawdziła to autorka - korzystanie z poniżej opisanych metod detekcji jąder komórkowych i ich segmentacji jest efektywne.

Transformata odległościowa (ang. *distance transform* – *DT*) – przy pomocy której każdemu pikselowi przyporządkowuje się jego odległość (np. euklidesową) od wybranych punktów [86, 87]. Najczęściej wyznacza się odległość punktów należących do obiektu od brzegu obiektów w obrazie binarnym. Dzięki temu lokalne maksimum (najjaśniejszy punkt) – to centroid obiektu.

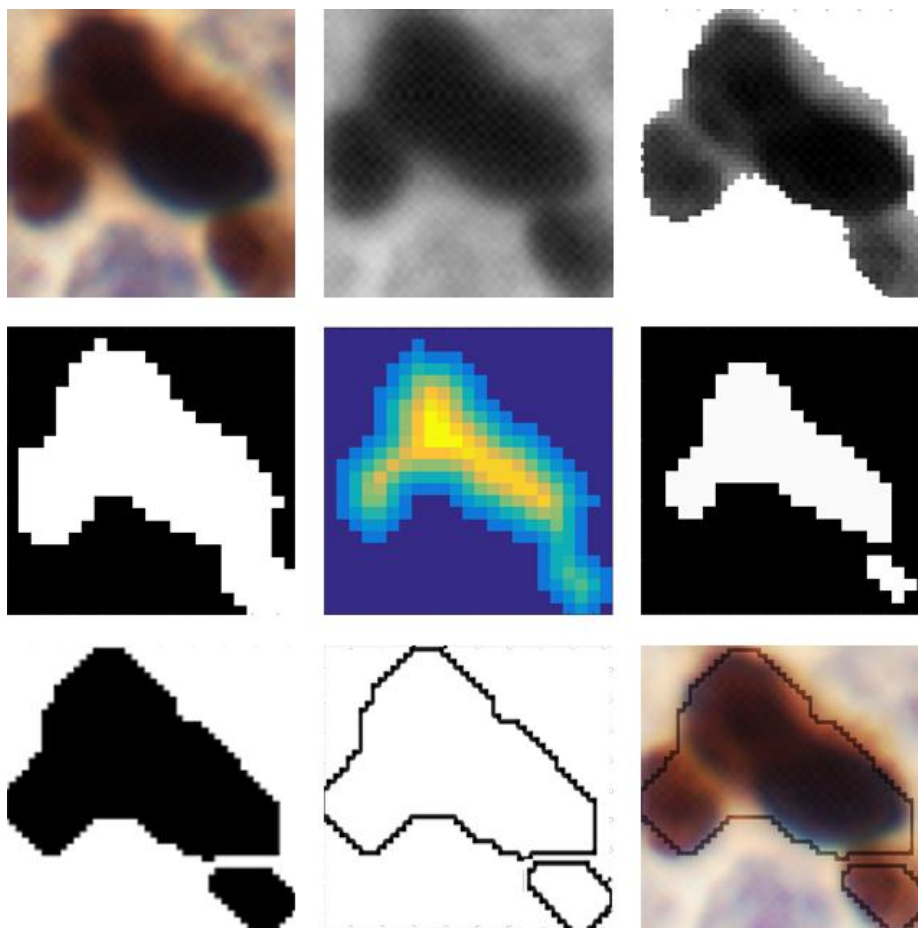
Wielu autorów używa transformaty odległościowej do detekcji obiektów, np. Adiga et al. [88] wykorzystali ją do wykrywania centroidu jąder komórkowych w histopatologicznych obrazach skrawków od pacjentów z rakiem piersi, a Yan et al. [89] oraz [90, 91] do zlokalizowania środków jądra, jako markerów do przeprowadzenia wododziału we fluorescencyjnych obrazach komórek.

Transformata odległościowa jest efektywna jedynie, jeśli obiekty mają regularne kształty. Dlatego wielu autorów proponuje jej modyfikację w postaci:

- (1) transformaty obrazu dodanej do obrazu [92, 93];
- (2) przemnożenia obrazu z wagami przez obraz gradientu, tzn. gradientowo - wagowej transformaty odległościowej [94].

W publikacji II niniejszego cyklu autorka wykorzystuje transformatę odległościową mapy obiektów, po progowaniu adaptacyjnym opisanym poniżej, w celu przygotowania obrazu pośredniego do wykonania operacji wododziału.

Otrzymana transformata odległościowa jest modyfikowana przed przeprowadzeniem na niej wododziału. Modyfikacja polega na wykorzystaniu mapy markerów do morfologicznej rekonstrukcji jedynie istotnych, wskazanych przez markery obiektów. Mapa markerów do rekonstrukcji powstaje przez odjęcie stałej (o wartości 0,3) od oryginalnej transformaty odległościowej (co prowadzi do odcięcia niskich lokalnych minimów) i wyrzucenia wybranego zakresu wartości z transformaty odległościowej, stającej się podstawą operacji wododziału. Rekonstrukcja upraszcza oryginalną mapę odległościową i prowadzi nie tylko do pozbycia się nieodpowiednich lokalnych minimów, ale również do wycięcia pewnego zakresu poziomów szarości, odpowiadających brzegowym nieregularnościom kształtów. Metoda jest opisana w publikacji II niniejszego cyklu, a jej wyniki pokazuje rysunek 3e. Dodatkowo - proces przedstawia również poniższy Rysunek 1. Pokazuje on wynik i fazy pośrednie podziału klastrów jąder komórkowych na tym samym fragmencie obrazu, który został wykorzystany do demonstracji dalej opisaney metody Metinus, w celu pokazania różnic w ich działaniu.



Rysunek. 1. Wykorzystanie transformaty odległościowej do separacji klastrów jąder komórkowych w metodzie zaproponowanej w publikacji II. Lewy górny obrazek przedstawia fragment obrazu oryginalnego, a prawy dolny - ten sam obrazek z nałożonym obrysem podzielonych komórek. Kolejne obrazy pomiędzy nimi (uszeregowane po wierszach) pokazują: kanał niebieski po modyfikacji kolorów i piramidzie, wynik progowania adaptacyjnego na tym obrazie, mapę obiektu zakwalifikowanego do klastrów ze względu na rozmiar, jego mapę odległościową, wynik wododziału na mapie odległościowej, mapę obiektów po piramidzie odwrotnej i ich obrysy.

Połączenie zmniejszenia obrazu (16 razy) przy pomocy piramidy gaussowskiej i transformaty odległościowej daje metodzie zaproponowanej w publikacji II nie tylko przyśpieszenie obliczeń, ale również wygładzenie i uproszczenie kształtów brzegów wysegmentowanych obiektów.

Opisana metoda detekcji jąder komórkowych jest używana do oceny liczby limfocytów typu T regulatorowych (ang. *T regulatory cells*) na obrazach preparatów pochodzących od pacjentów z chłoniakiem grudkowym (*Lymphoma follicularis*). Na obrazach preparatów pacjentów z chłoniakami, limfocyty regulatorowe T są w znacznej większości rozproszone, a jeśli tworzą klastry - to zawierają stosunkowo małą liczbą jąder i mają wydłużony kształt. W takich klastrach jądra układają się jedno za drugim. Wyniki podziału klastra składającego się z trzech jąder, z których dwa tworzą szereg, a trzeci jest połączony, przylegając do ściany innego jądra, można zobaczyć na Rysunku 1. Połączenia szeregowo ustawionych jąder są wykrywane i dzielone, a jąder przylegających - nie. Błędem metody jest więc brak rozdzielania pewnych jąder.

Ponieważ metoda detekcji jest częścią procedury analizy ilościowej, jej błąd został oceniony w sposób pośredni. Ocena odbyła się na podstawie porównania ilości

obiektów immunopozytywnych wskazanych przez eksperta, co zostało dokładnie opisane w podsumowaniu tego rozdziału.

Operacje morfologiczne - to operacje przetwarzania obrazów binarnych i monochromatycznych, które zdążyły wejść do kanonu przetwarzania obrazów [95, 86, 87].

Najwięcej prac [88 – 91, 94 – 96] opisujących użycie operacji morfologicznych do detekcji komórek lub jąder komórkowych wykorzystuje erozję lub erozję warunkową z warunkiem zapobiegającym znikaniu obiektów, przy pomocy której dokonuje się zmniejszenia i wyrównania kształtu obiektu. Operacje erozji są więc najczęściej wykorzystywane podczas konstrukcji maski, która pozwala na operację modyfikacji obrazu lub obrazu gradientowego przez nakładanie/wskazywanie minimów (ang. *minima imposition*), jako przygotowania do operacji wododziału. W takim kontekście jest ona również wykorzystana przez autorkę w publikacji I, co jest opisane przy pomocy wzorów (14) i (15).

Operacje morfologiczne są efektywne, jeśli obrazy są pozbawione szumu i jeśli obiekty w nich zawarte są od siebie oddalone. Dlatego autorzy niektórych prac donoszą o modyfikacjach operacji erozji. Park i współpracownicy [95] zdefiniowali operację erozji zależną od miary wypukłości figury po erozji. Taka erozja zatrzymuje się wcześniej, niż typowa erozja warunkowa. Niestety, działa ona tylko na obrazach binarnych.

Yang i współpracownicy [96] zaproponowali erozję z dwoma progami T1 i T2 oraz z dwoma elementami strukturalnymi. Erozję wykonuje się najpierw z wykorzystaniem elementu strukturalnego 7×7 pikseli sprawdzając, czy obiekt wciąż jest większy, niż próg T1, a potem z elementem strukturalnym 3×3 pikseli, dopóki rozmiar obiektu nie jest mniejszy niż T2. Przy odpowiedniej konstrukcji elementu strukturalnego 7×7 pikseli otrzymuje się efekt zaokrąglenia elipsoidalnych jąder komórkowych, a ostatni etap z elementem strukturalnym 3×3 pikseli zmniejsza ich rozmiar, prowadząc do pojedynczego punktu wskazującego obiekt.

Zastosowanie operacji erozji wraz z następującą po niej dylatacją o tym samym elemencie strukturalnym, stanowi operację otwarcia, natomiast otwarcie przez rekonstrukcję jest operacją złożoną z erozji i dylatacji przez rekonstrukcję.

W publikacji I z omawianego cyklu publikacji są używane operacje otwarcia i otwarcia przez rekonstrukcję, aby odfiltrować szum i artefakty występujące w obrazach neuralnych komórek macierzystych. Filtrowanie obrazu przy użyciu otwarcia przez rekonstrukcję oraz typowego otwarcia jest opisane w postaci wzorów matematycznych (4) i (6) w publikacji I oraz dotyczy odpowiednio obrazu w jasnym polu po detekcji tekstury, jaki i obrazu fluorescencyjnego. Filtr usuwa obiekty drobne oraz słabo skonstrastowane z tłem, pozostawiając inne większe i mocno skonstrastowane, czyli komórki. Autorka stosuje to standardowe narzędzie morfologii geodezyjnej, czyli otwarcie przez rekonstrukcję, z maską/markerem rekonstrukcji w postaci tego samego obrazu.

Do rozwiązania problemu segmentacji w tej samej publikacji jest również używany gradient morfologiczny, ale w zmodyfikowanej wersji. Stosując nietypowy, bo stosunkowo duży element strukturalny, otrzymuje się nietypowy „gruby” gradient morfologiczny. Ten niweluje podwójny gradient, wynikający z obecności halo (rozjaśnienia naokoło komórki wynikającego z odbicia światła od błon komórkowych),

powstający przy zastosowaniu typowych metod liczenia gradientu (np.: Sobela, Prewitta, czy gradientu morfologicznego na typowym elemencie strukturalnym). Jego opis zamieszczono w publikacji I na stronie 93 rozdział 2.4.1. Taki gradient nie jest rozwiązaniem typowym, ale okazuje się w tym wypadku bardzo efektywny.

W publikacji I autorka wykorzystuje operacje morfologiczne do pomiaru intensywności tekstury, licząc jej lokalne średnie odchylenie standardowe i wariancję dla każdego punktu obrazu. Wzór tej operacji jest przedstawiony w publikacji I na stronie 90 jako równanie (3), a wyniki jego działania można zobaczyć na rysunku 3a w kontekście obrazu pierwotnego, przedstawionego na rysunku 2a (oba rysunki w publikacji I).

Wkładem autorki do rozwiązania problemu segmentacji żywych komórek jest zaproponowanie w publikacji I sposobu łączenia markerów, wynikających z oddzielnej analizy obrazu komórki w jasnym polu i obrazu tej samej komórki we fluorescencji. Formuła łącząca ma postać wzoru (10) i zawiera otwarcie przez rekonstrukcję i rekonstrukcję przez dylatację. Dzięki opracowanej metodzie łączenia informacji z dwóch komplementarnych źródeł, otrzymujemy skuteczne i proste rozwiązanie problemu dobrania wewnętrznych i zewnętrznych markerów do operacji wododziału, która poniżej będzie przedstawiona dokładnie.

Transformata h-min/max z transformaty odległościowej lub odwróconej transformaty odległościowej usuwa regiony, których lokalne minima/maksima są mniejsze/większe, niż parametr h [86, 87]. Jest to sposób na detekcję obiektów w obrazach komórek - Plissiti i Nikou [97] wykorzystują tę transformatę do dzielenia jąder komórkowych w rozmazach komórek barwionych PAP, Masmoudi i współpracownicy [98] stosują ją do preparatów tkanek barwionych immunohistochemicznie, pochodzących od chorych z rakiem sutka, a Wahlby i współpracownicy [99] oraz Bengtsson i współpracownicy [100] stosują do fluorescencyjnych obrazów komórek.

Powyższa technika wymaga poprawnego doboru parametru h , co nie jest proste w przypadku występowania niejednorodności oświetlenia lub intensywnego szumu w obrazach. Najczęstsze modyfikacje selekcji obiektów na podstawie transformaty h-min/max, to interaktywne [101, 102] lub optymalizowane doboru wartości parametru h . Optymalizacja może iść w różnych kierunkach, ale najlepsze efekty dawały:

- (1) optymalizacja oparta na wynikach śledzenia dopasowania do eliptycznego modelu komórki w obrazie wynikowym, wartościowanym tak, aby minimalizować zniekształcenia segmentacji, zaproponowane w [97], lub
- (2) optymalizacja ze względu na wariancję rozmiaru pól wysegmentowanych komórek/jąder komórkowych, zaproponowana przez [103].

Jak to było opisane powyżej, w publikacji II niniejszego cyklu autorka wykorzystuje transformatę odległościową do przygotowania mapy dla operacji wododziału. Mapa ta jest modyfikowana przez rekonstrukcję na podstawie markera, który stanowi obraz transformaty odległościowej zmodyfikowanej przez transformatę h-min. Modyfikacja polega na odjęciu stałej (równej 0,3 dla obrazu w zakresie 0-1).

Progowanie – to najprostsza oraz najszybsza technika segmentacji, w związku z tym jest często wykorzystywana, a w literaturze opisano wiele jej modyfikacji [39, 72]. Jest ona dobrą podstawą do zastosowania segmentacji opartej na zewnętrznej wiedzy o charakterystycznych cechach obiektów.

Typowe progowanie dotyczy wartości intensywności poszczególnych pikseli w obrazie (zarówno jasności, jak i intensywności cech wyliczonych dla każdego piksela, np. wyrażonej ilościowo tekstury, itp.). Każde progowanie wymaga określenia progu, który może być stały lub zmienny (zależny od położenia na obrazie). Na to, aby progowanie z progiem stałym dało dobre efekty, intensywności występujące w obiektach i w tle powinny być wyraźnie rozdzielone. Takie cechy obserwuje się jedynie w dobrze zbieranych obrazach fluorescencyjnych. Obrazy mikroskopowe skrawków tkanek, zarówno o rozmiarach typowych, jak i wielkoobszarowych pochodzących ze skanerów, mają zwykle zróżnicowane jasności (winietowanie kamery lub toru świetlnego mikroskopu) na powierzchni obrazu. W takim przypadku jedynie progowanie adaptacyjne, z progiem wyznaczanym zgodnie z lokalną charakterystyką obrazu, jest efektywne. W progowaniu adaptacyjnym jest potrzebny dodatkowy parametr, określający rozmiar lokalnego rejonu.

Autorka zaproponowała własną metodę progowania adaptacyjnego, dostosowaną do analizowanych zmodyfikowanych obrazów barwionych fragmentów tkanek, której działanie opisuje następujący wzór:

$$B(x, y) = \begin{cases} \text{obiekt} & \text{jeśli } (I(x, y) \leq T_w \text{ i } C_w > F) \text{ lub } (I(x, y) \leq T_s \text{ i } C_w \leq F) \\ \text{tło} & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases}$$

gdzie T_w - oznacza średnią wartość (w oknie o rozmiarach 30×30), C_w - oznacza rozpiętość jasności w tym samym oknie, F - próg intensywności odpowiadający szumowi i wynoszący dla typowego obrazu 15 poziomów szarości, a T_s - to stały próg wskazujący na obiekt lub tło, ustawiony na poziomie 205. Zaproponowana metoda progowania jest używana do wstępnej selekcji obiektów z wykorzystaniem kanału niebieskiego zmodyfikowanych obrazów skrawków tkanek, barwionych z użyciem DAB&H.

Modyfikacja obrazów polega na nakładaniu białej maski na kolory inne, niż występujące w poszukiwanych obiektach. Oprogramowanie rozróżnia dwa typy obrazów - jasne i ciemne, dla których zostają dobrane właściwe progi, od których następuje wysycenie. Są to R=28, G=53, B=200 dla jasnych obrazów, oraz R=28, G=53 B=139 dla ciemnych. Takie wstępne przygotowanie obrazu jest wykorzystywane w metodach:

- (1) opisanych w publikacjach II i III oraz wspomnianych w publikacji IX z cyklu, oraz
- (2) w publikacji spoza cyklu [104].

Reasumując, poddając zmodyfikowany obraz zdefiniowanemu progowaniu adaptacyjnemu, dokonuje się preselekcji obiektów immunoreaktywnych w obrazach barwionych preparatów tkankowych, oznaczając następujące komórki:

- (i) limfocyty typu T regulatorowe (wskazane przez FOXP3) w chłoniakach grudkowych (publikacja II i III),

- (ii) komórki proliferujące (wskazane przez Ki67) w raku sutka (publikacja spoza cyklu [104]),
- (iii) limfocyty typu T regulatorowe (wskazane przez FOXP3) w raku sutka - w tkance sutka i w tkance węzłów pachowych (publikacje spoza cyklu [68, 69]),

a także komórki proliferujące (wskazane przez Ki67) w chłoniakach rozlanych z dużych komórek B DLBCL (jeszcze nieopublikowane, opracowywane w ramach projektu PIKAOM/MIAP), o czym wspomniano w publikacji **IX**.

Wyniki wstępnej detekcji obiektów, opartej na powyższym progowaniu adaptacyjnym, wymagają podziału obiektów połączonych w klastry, a także klasyfikacji pozwalającej wykluczyć obiekty fałszywe (za małe, bardzo ciemnoniebieskie i o kształtach innych, niż charakterystyczne dla komórek i klastrów – śmieci i artefakty). Algorytm podziału klastrów na podstawie mapy bitowej zweryfikowanych obiektów opisano powyżej w ramach opisu transformaty odległościowej. Natomiast algorytm podziału klastrów na podstawie zmodyfikowanego wododziału zostanie zaprezentowany w dalszej części.

Ponieważ operacje progowania adaptacyjnego pełnią ważną rolę we wstępnej detekcji obiektów, autorka przeprowadziła porównanie efektywności znanych metod progowania adaptacyjnego na monochromatycznych obrazach, powstałych z ekstrakcji informacji o kolorze z oryginalnych 24-bitowych obrazów RGB. W artykułach stanowiących publikacje **IV** i **V** niniejszego cyklu porównano metody progowania adaptacyjnego (określane dalej nazwiskiem głównego autora): Niblack [105], Sauvola [106], White [107], Bernsen [108], Yasuda [109] i Palumbo [110], analizując ich czułość i specyficzność w znajdowaniu obiektów odpowiednio immunopozytywnych i immunonegatywnych. Ocena została wykonana na specjalnie symulowanych obrazach, odpowiadających niektórym z obrazów eksperymentalnych, wykorzystywanych w publikacji **II** niniejszego cyklu publikacji, czyli obrazów z barwionymi limfocytami T regulatorowymi i pochodzącymi od pacjentów z chłoniakiem grudkowym. W tym miejscu autoreferatu autorka przedstawi jedynie wyniki porównania, natomiast o sztucznych obrazach i o problemach weryfikacji wyników segmentacji będzie jeszcze mowa dalej.

Porównanie metod adaptacyjnego progowania dla brązowych obiektów immunopozytywnych (publikacja **IV**) zostało wykonane na obrazach monochromatycznych, stanowiących: - kanał niebieski modelu RGB, - kanał DAB po dekonwolucji kolorów [111 – 113], - mapę brązu wyliczoną z modelu RGB. Porównanie wykazało, że metody White'a, Bernsena, Sauvoli są bardziej dokładne od pozostałych, niezależnie, czy segmentacja dotyczy kanału niebieskiego w RGB, czy brązu ekstrahowanego z kolorowych obrazów przez dekonwolucję kolorów, czy też brązu wyliczanego z modelu RGB. Jednak najlepsze wyniki otrzymano dla mapy DAB otrzymanej z dekonwolucji koloru, wówczas powyższe metody wykazały się czułością odpowiednio na poziomie: 1; 1; 0,74 i specyficznością na poziomie: 0,74; 0,91; 0,99. Najważniejszym osiągnięciem porównań jest dostrzeżenie komplementarności wyników metod Sauvola i Bernsena, wynikające z tego, że:

- (1) pierwsza z nich segmentuje całe obiekty, bez żadnego niedomiaru typowego dla pozostałych metod, ale do wyników nadmiarowo dokłada obiekty tzw. fałszywie dodatnie, natomiast
- (2) druga skutecznie wykrywa obiekty, ale zmniejsza ich powierzchnie.

Natomiast porównanie metod adaptacyjnego progowania dla obiektów niebieskich (publikacja **V**) zostało również wykonane na symulowanych obrazach monochromatycznych, wygenerowanych z obrazów 24-bitowych RGB, tzn. na kanałach czerwonym, zielonym i niebieskim w modelu RGB, na kanałach intensywności L i b, w modelu Lab oraz na kanale hematoksyliny (niebieskim) po dekonwolucji kolorów. Porównanie wykazało, że:

- (1) najlepszym kanałem informacyjnym o immunonegatywnych jądrach komórkowych jest kanał hematoksyliny,
- (2) zastosowanie metody White'a daje czułość i specyficzność odpowiednio na poziomie 0,93 i 0,96 oraz
- (3) stosowanie komplementarnych metod Sauvola i Bernsena na kanale b modelu koloru Lab również prowadzi do zadowalających wyników.

Powyższe badania pozwoliły sformułować założenia nowej metody detekcji obiektów (immunonegatywnych i immunopozytywnych jąder komórkowych), polegającej na selekcji obiektów wykrytych przez progowanie adaptacyjne Sauvola na kanale DAB po dekonwolucji lub na kanale b modelu Lab przez rekonstrukcję, opartą na znacznikach pochodzących z obrazu stanowiącego wynik progowania adaptacyjnego metodą Bernsena. Ta metoda jest implementowana na potrzeby projektu platformy PIKAOM/MIAP, finansowanego przy pomocy grantu NCBiR, o czym wspomniano w publikacji **IX**.

Poza tym, w publikacjach zawartych w niniejszym cyklu, jest wykorzystywane typowe progowanie:

- (1) progowanie z progiem zależnym od określonej procentowo maksymalnej jasności obserwowanej w obrazie (publikacja **I**, wzory (5) i (7));
- (2) progowanie z progiem wyznaczanym automatycznie metodą Otsu (publikacja **I**).

Operacje morfologiczne, w tym wododział wykorzystywany do segmentacji [86, 87] - to grupa operacji działających według schematu uwzględniającego wiedzę zewnętrzną. W intuicyjnym przedstawianiu transformaty wododziałowej porównuje się ją do procedury wypełniania wodą terenu, ukształtowanego analogicznie do obrazu, rozumianego jako funkcja określona na przestrzeni XY z wartościami w osi Z. Wypełnianie odbywa się począwszy od lokalnych minimów, a kończy się, gdy wypełni się cały obraz, pozostawiając granice zlewisk:

- w postaci odpowiednich tam, zapobiegających mieszanii się wody, oraz
- w postaci najwyższych grzbietów, stanowiących dla wody nieprzebyte bariery.

Tak można ją zrozumieć, gdy podstawą liczenia wododziału jest obraz lub obraz gradientowy wynikający z przekształcenia różniczkującego. Natomiast gdy podstawą operacji wododziału jest transformata odległościowa binarnego obrazu, zastosowanie operacji wododziału prowadzi do podziału obiektów ze względu na ich kształt (obiekt z przewężeniem jest dzielony w miejscu przewężenia – opis powyżej w sekcji **Transformata odległościowa**).

Główną wadą wododziału jest jego tendencja do podziału na zbyt małe obszary. Autorzy metod segmentacji opartych na wododziale proponują jego modyfikacje, np.:

- (a) łączące obraz i jego transformatę odległościową [92, 93],
- (b) stosujące wagowo zmodyfikowaną mapę gradientową [94],
- (c) wykonujące transformatę bezpośrednio na monochromatycznym obrazie komórek [112], albo, jeśli występuje nadmierne rozdrobnienie,
- (d) dokonują łączenia obszarów, zlepiając sąsiednie rejony według specjalnie zaprojektowanych reguł:
 - (i) według słabości granicy między fragmentami [100], albo
 - (ii) spełniające/niespełniające odpowiednio zdefiniowanych kryteriów [94].

Transformata wododziałowa, stosowana w segmentacji komórek i jąder komórkowych, to najczęściej tzw. wododział sterowany znacznikami [86]. Operacja dzielenia obszaru obrazu startuje wówczas od podanych znaczników wewnętrznych obiektów oraz znacznika tła (znacznika zewnętrznego) i dołącza do nich kolejne przyległe piksele, aż podzieli cały obszar, zatrzymując się na najwyższych gradientach i tamach.

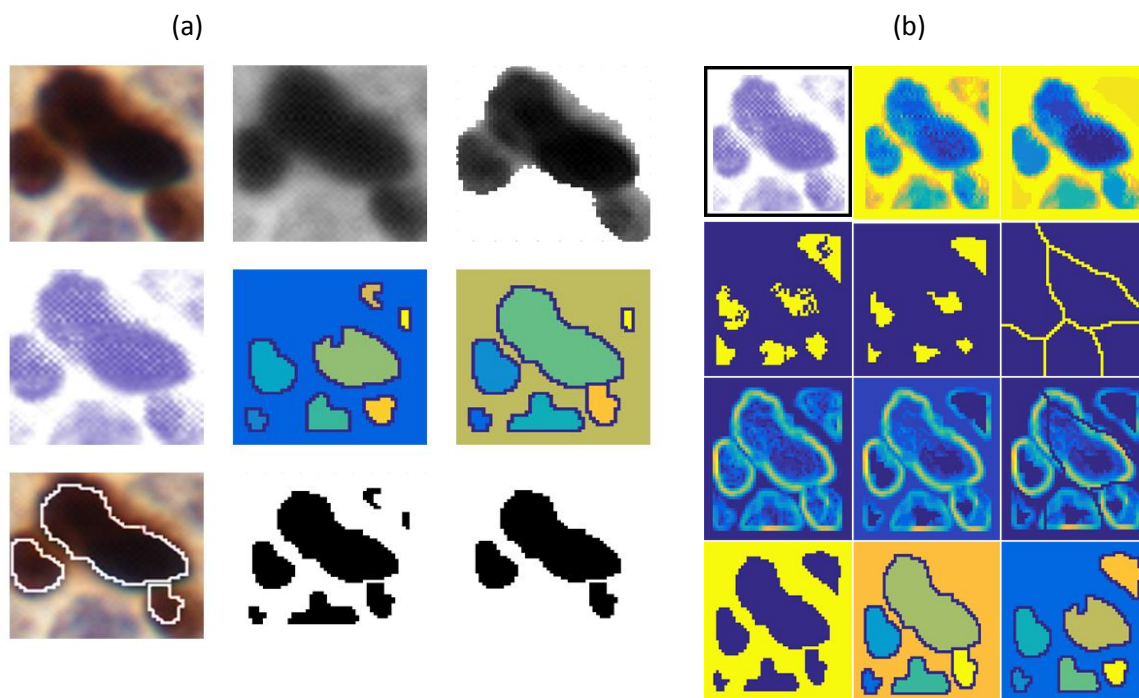
Zaproponowana przez autorkę metoda segmentacji obrazów neuralnych komórek macierzystych w hodowli, opisana w publikacji I omawianego cyklu publikacji, wykorzystuje markery. Markery są skonstruowane na podstawie omówionej powyżej specjalnie zaproponowanej formuły, łączącej wyniki oddzielnej analizy obrazu komórki w jasnym polu i obrazu tej samej komórki we fluorescencji. Wyliczony marker zewnętrzny i markery wewnętrzne obiektów pozwalają na zmodyfikowanie obrazu gradientowego tak, że obraz poddawany segmentacji wododziałowej jest spłaszczony, co można zobaczyć na rysunku 7b w publikacji I. Wyniki tej segmentacji zaprezentowano na rysunku 8.

Natomiast w publikacji III niniejszego cyklu operacja wododziału jest wykorzystywana do podziału wyselekcjonowanych obiektów (według kryteriów opartych na współczynnikach kształtu i polu powierzchni) przez wykonanie lokalnego wododziału na powiększonym o niewielki margines prostokącie, opisanym na obiekcie. Wododział jest wykonywany na prostokątnym fragmencie monochromatycznego obrazu zawierającego informację o intensywności hematoksyliny (tzw. kanał hematoksyliny po dekonwolucji kolorów [113]). W tym przypadku gradient Sobela, liczony na obrazie intensywności hematoksyliny, jest podstawą do liczenia dwóch typów wododziałów:

- (1) klasycznego wododziału opartego na znacznikach obiektów i tła, oraz
- (2) wododziału zaproponowanego w publikacji III, wykorzystującego jedynie znaczniki obiektów.

Informacje zawarte w obu obrazach wynikowych integruje specjalna procedura konstruuująca obraz wynikowy. To rozwiązanie wykorzystuje fakt, że hematoksylina znacznie precyzyjniej wskazuje granice jądra komórkowego, niż „rozlewający się” poza jądro barwnik DAB. Dzięki temu uzyskano skuteczne narzędzie dzielące klastry jąder komórkowych. Ponieważ publikacja III nie zawiera rysunku pokazującego jednocześnie obraz, jego modyfikacje i obraz warstwy hematoksyliny po dekonwolucji, autorka

przygotowała Rysunek 2. pokazujący w części (a) ogólny przebieg segmentacji, a w części (b) - jak liczone są oba lokalne wododziały. Pozwalają on porównać rezultaty działania wcześniej przedstawionej metody segmentacji z aktualnie prezentowaną.



Rysunek 2. Wykorzystanie specjalnego lokalnego podwójnego wododziału do separacji klastrow jader komorkowych w metodzie Metinus, zaproponowanej w publikacji III.

- (a) lewy górny obrazek przedstawia fragment obrazu oryginalnego, a lewy dolny - ten sam obrazek z nałożonym obrysem podzielonych komórek. Obraz pomiędzy nimi (lewy w drugim wierszu)- to monochromatyczny obraz warstwy hematoksyliny. Kolejne dwa obrazy w pierwszym wierszu to kanał niebieski (RGB) oraz wynik progowania adaptacyjnego na tym obrazie – kroki analogiczne do metody z publikacji II pokazanej na Rysunku 1. Obrazy w środkowym wierszu pokazują wyniki dwóch oddzielnych przebiegów wododziału, przedstawionych dokładnie w części b tego rysunku: prawy - typowego wododziału na gradiencie obrazu intensywności hematoksyliny z markerami tła i obiektów, a środkowy – wododziału wyłącznie z markerami obiektów. Dwa obrazy w ostatniej linii przedstawiają mapy obiektów: uzgodnioną na podstawie wyników obu lokalnych wododziałów (środkowy) i mapę ostateczną, powstałą przez odrzucenie obiektów fałszywych na podstawie analizy rozkładu intensywności barwnika DAB w wyznaczonym rejonie.
- (b) w pierwszym wierszu są kolejno:
- lewy – (1L) obraz monochromatyczny warstwy hematoksyliny z poszerzeniem na ramę,
 - środkowy – (1Ś) obraz hematoksyliny z włączoną ramką pokazany w pseudokolorze, ze sztuczną barwą według skali mapy geograficznej,
 - prawy – (1P) poprzedni obraz po operacjach morfologicznych wyrównania poziomów - erozja i erozja przez rekonstrukcję;
- w drugim wierszu są przedstawione lokalne minima odnalezione w obrazie 1P:
- 2L -- bez wygładzenia kształtu,
 - 2Ś – minima z 2L z wygładzeniem kształtu,
 - 2P – podział obszaru tła wyliczony przy pomocy wododziału na transformacie odległościowej mapy minimów 1P;
- w trzecim wierszu znajdują się kolejno:
- 3L - gradient Sobela wyliczony z obrazu hematoksyliny 1Ś,
 - 3Ś - gradient Sobela z nałożonymi lokalnymi minimami,
 - 3P - gradient Sobela z nałożonymi zarówno minimami, jak i znacznikiem tła;
- w czwartym wierszu znajdują się mapy obiektów:
- 4L – ostateczna mapa uzgodniona na podstawie dwóch następnycy obrazów (P),
 - 4Ś – wyniki wododziału liczonego na gradiencie Sobela z oznaczonymi minimami lokalnymi 3Ś,
 - 4P -- wyniki wododziału liczonego na gradiencie Sobela z oznaczonymi minimami lokalnymi i znacznikiem podziału tła 3P.

Jak już to było wspomniane powyżej w publikacji II, zastosowanie transformaty odległościowej na mapie obiektów wyselekcjonowanych przy pomocy progowania adaptacyjnego i zweryfikowanych ze względu na wielkość obiektów, pozwala na wykonanie wododziału na całym obrazie jednocześnie. Wyniki tej operacji można zobaczyć w publikacji II na rysunku 3e.

Natomiast, w publikacji III - operacja wododziałowa jest wykorzystywana do podziału pojedynczych obiektów, jedynie tych, które wykazują cechy klastrów, a nie pojedynczych jąder komórkowych. Każdy obiekt, który przekracza rozmiar dużego klastra (ma więcej niż 2000 pikseli – Tabela 1) jest eliminowany z rozważań. Natomiast spośród obiektów średniego i dużego rozmiaru wybiera się te, których kształt wskazuje na to, że mogą być obiektem złożonym (powyżej 400 pikseli pola powierzchni i współczynnika kształtu powyżej 0,7 lub między 100 a 400 pikseli i współczynnika kształtu powyżej 0,4) i każdy po kolei poddawany jest procedurze podziału.

Podział klastra jąder komórkowych następuje na podstawie fragmentu obrazu warstwy hematoksyliny, odpowiadającej zidentyfikowanemu klastrowi (Rysunek 2a, lewy obraz w środkowym wierszu), zostaje wydzielony obszar odpowiadający prostokątowi, opisanemu na dzielonym obiekcie. Dodatkowo jest on otoczony ramką o rozmiarze 5 pikseli w kolorze tła (Rysunek 2(b) 1L i 1Ś), aby obiekt nie przylegał bezpośrednio do brzegu obszaru poddanego wododziałowi. Na tak przygotowanym fragmencie monochromatycznego obrazu są wykonywane operacje: wyliczenia gradientu Sobela (Rysunek 2(b) 3L) oraz wyszukiwania lokalnych minimów (Rysunek 2(b) 2L i 2Ś) i markerów dzielących tło (Rysunek 2(b) 3P). Następnie są nakładane minima (Rysunek 2(b) 3Ś) oraz, w jednym przypadku, dodatkowo marker tła (Rysunek 2(b) 3P). Tak przygotowane podwójne obrazy są poddane wododziałowi. Rezultaty (Rysunek 2(b) 4Ś i 4P) wododziałów są łączone w jedną pośrednią mapę obiektów po podzieleniu (Rysunek 2(b) 4L), która następnie jest weryfikowana ze względu na intensywność DAB w obszarze poszczególnych obiektów.

Oddzielna analiza każdego klastra daje możliwość wysterowania operacji wododziału zgodnie z jego lokalną charakterystyką i dlatego rezultaty podziału są lepsze, niż w przypadku metody opisanej w publikacji II. Dodatkowo - każdy wydzielony fragment klastra jest ponownie weryfikowany, czy spełnia warunki pojedynczego jądra komórkowego. Jeśli ich nie spełnia - zostaje odrzucony, Rysunek 2(a) prawy obrazek w ostatnim wierszu.

Klasteryzacja - to grupowanie pikseli do pewnej liczby klas, wewnątrz których piksele są mocniej „związane”, niż piksele grupowane w innych klasach [112, 114]. Klasteryzacja ocenia „powiązanie” jako podobieństwo, odległość lub korelację pomiędzy obiektami. Miary oparte na tych wielkościach mogą być różne: odległość euklidesowa lub nieeuklidesowa, podobieństwo cech lub kolorów, itp. Do najbardziej znanych algorytmów klasteryzacji należą:

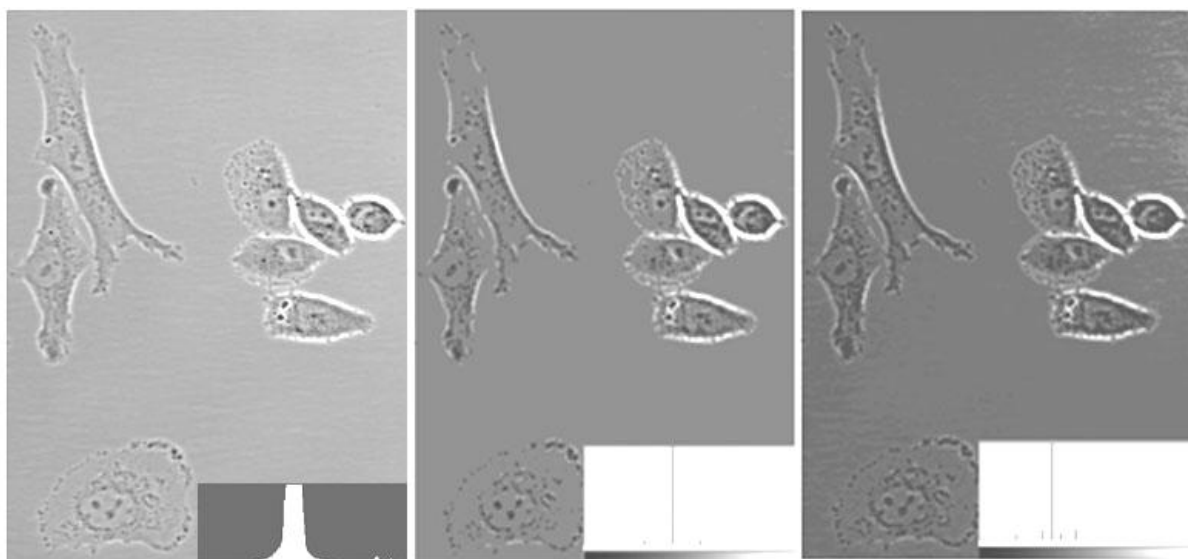
- (1) metoda średnich wewnętrznych (ang. *k-means*);
- (2) metoda rozmytych średnich wewnętrznych (ang. *fuzzy – c-means*)
- (3) metoda maksymalizacji oczekiwania (ang. *expectation maximization*).

W przypadku obrazów komórek lub skrawków tkanek, klasteryzacja stanowi:

1. albo etap wstępny, wykorzystywany do np. ujednolicenia tła, po którym należy jeszcze znaleźć krawędzie obiektów i rozdzielić obiekty posklejane,
2. albo etap końcowy, kiedy po uwypukleniu/skontrastowaniu obiektów dokonujemy klasteryzacji ujednolicającej obiekty i oddzielającej je od ujednoliconego tła [86].

Autorka stosowała klasteryzację metodą średnich wewnętrznych w publikacji z 2008 pod tytułem "Clustering as a method of image simplification" spoza cyklu [114] oraz w metodzie oceny balansu bieli w kolorowych obrazach skrawków tkanek [IX].

W pierwszej publikacji zastosowała klasteryzację odcieni szarości w obrazach neuralnych komórek macierzystych, obserwowanych w hodowli w mikroskopie. Prowadziło to do uproszczenia obrazu - wyrównania i wydzielenia obszarów tła [114].



Rys. 3. Klasteryzacja obrazów neuralnych komórek macierzystych. Lewy obraz - to obraz oryginalny, zbierany jako 12-bitowy (4048 poziomów szarości). Pozostałe obrazy - to jego uproszczone wersje: środkowy - powstały metodą arbitralnie wybranych punktów, zwanych generatorami i z połączeniem klas odpowiadających tłu (98, 119 i 108), z nierównymi współczynnikami klas [0,1; 0,1; 0,1; 0,1; 0,1; 0,1; 0,1; 1; 1], prawy - to obraz powstały metodą doboru współczynników klas w zależności od liczebności klas. (Rysunek powstał na podstawie zapożyczonych z publikacji [114] fragmentów rysunków 2 i 4).

Autorka zastosowała klasteryzację kolorów do obrazów skrawków tkanek w publikacji IX. Klasteryzacja pozwoliła zlokalizować obszar poza preparatem i wszelkie wewnętrzne przerwy w preparacie, albo stwierdzić, że takiego obszaru w obrazie nie ma. Identyfikacja pustych fragmentów obrazu pozwala sprawdzić i skorygować balans bieli obrazu, o czym jeszcze będzie mowa dalej.

Reasumując – niniejszy cykl powiązanych tematycznie publikacji przedstawia metody segmentacji, zaproponowane przez autorkę, z których każda spełnia warunki jednego z trzech typowych schematów segmentacji [39, 76 – 78].

1. Metoda MSMA, przedstawiona w publikacji I, odpowiada **identyfikacji markerów na etapie detekcji i rozszerzenia ich granic aż do brzegu obiektu przez wododział sterowany znacznikami**; markery wewnętrzne są poszukiwane przez uzgodnienie, według oryginalnej zaproponowanej przez autorkę funkcji (publikacja I, wzór (10)), łączącej wyniki detekcji dwóch typów obszarów –

identyfikowanego przez teksturę i identyfikowanego przez intensywność światła fluorescencyjnego. Natomiast marker zewnętrzny - to pomniejszony przez erozję obszar poza wyselekcjonowanymi obiektami.

Metodę MSMA oceniono korzystając z syntetycznych obrazów przez porównanie rezultatów segmentacji do założonych brzegów komórek (metoda oceny z użyciem obrazów syntetycznych jest opisana poniżej), obliczając błąd pola powierzchni i błąd lokalizacji. Błąd pola powierzchni obliczono według wzoru (17) w publikacji I, a błąd lokalizacji wyznaczano jako odległość środka ciężkości obiektu po segmentacji w stosunku do założonego środka ciężkości. Tabela 2 w publikacji I przedstawia błędy pola powierzchni i lokalizacji w trzech grupach komórek: (1) małych i upakowanych – do 15000 pikseli – odpowiednio $6\% \pm 4\%$, 5 ± 3 pikseli; (2) dużych i rozplaszczonych – powyżej 55000 pikseli – odpowiednio $17\% \pm 12\%$, 28 ± 20 pikseli i (3) pośrednich – odpowiednio $43\% \pm 21\%$, 133 ± 71 .

2. Metoda przedstawiona w publikacji II odpowiada **separacji koloru białego (stanowiącego zmodyfikowane tło) od obiektów. Po wstępnej detekcji obiektów przez progowanie adaptacyjne, następuje klasyfikacja obiektów stanowiących spójne fragmenty, nie będące tłem, do klasy obiektów lub fragmentów obrazu nie będących pojedynczymi jądrami, które następnie dzielimy wododziałem opartym o transformatę odległościową.**

Separacja tła odbywa się przez modyfikację obrazu kolorowego. Według algorytmu gaussowskiej piramidy dokonuje się 16-krotnego zmniejszenia obrazu, który poddaje się omówionej powyżej operacji progowania. Następnie są odrzucane obiekty o powierzchni poniżej progu, wynikającego z typowych rozmiarów jądra i powyżej progu wielkości klastrów. Na podstawie mapy zaklasyfikowanych obiektów następuje podział klastrów jąder przy użyciu operacji wododziału, liczonej na obrazie transformaty odległościowej. Następnie mapa wynikowa jest przeskalowywana do poprzedniego rozmiaru.

Metodę oceniono na podstawie liczby znalezionych obiektów korzystając z obrazów, na których patomorfolog zaznaczył immunopoztywne jądra komórkowe. Średni błąd w ilości odnalezionych obiektów w stosunku do eksperta wynosił 11% (tabela 1 w publikacji II). Zaproponowana metoda znajdowała na poszczególnych testowych obrazach taką samą lub mniejszą liczbę obiektów w porównaniu z ekspertem (100% - 83%, tabela 2 w publikacji II). Dla obrazów z rozproszonymi immunopoztywnymi jądrami obiekty pominięte - to pojedyncze słabo zabarwione jądra. Natomiast w obrazach z gęsto upakowanymi obiektami oraz o liczbie obiektów powyżej 100 występują zarówno obiekty nadmiernie podzielone, jaki i niepodzielone. Metoda przyniosła duże oszczędności czasowe w ocenie ilościowej, z rzędu minut dla eksperta do średnio 18 sekund na obraz (tabela 1 w publikacji II).

3. Metoda Metinus, przedstawiona w publikacji III, odpowiada **detekcji obiektów, a następnie przeprowadzeniu ich klasyfikacji na podstawie koloru, kształtu i pola powierzchni.** Rezultatami klasyfikacji są dwie mapy: pojedynczych jąder komórkowych i klastrów obiektów. **Jedynie obiekty z mapy klastrów zostają poddane operacji lokalnych podwójnych wododziałów. Ostateczny podział**

jest wynikiem uzgodnienia rezultatu obu wododziałów – klasycznego i zmodyfikowanego.

Metoda Metinus częściowo korzysta z takiego samego mechanizmu, jak metoda poprzednia (separacji pożądanej barwy przez wysycanie innych barw, zastosowania gaussowskiej piramidy zmniejszającej i dopasowanej do obrazów operacji progowania adaptacyjnego). Następnie każdy wyselekcjonowany obiekt jest oceniany oddzielnie pod względem wielkości, kształtu, mediany, średniej i odchylenia standardowego intensywności trzech kanałów po dekonwolucji kolorów (publikacja III tabela 1 i opis na stronie 612). Na podstawie powyższych cech każdy dostatecznie duży obiekt jest klasyfikowany - albo do zliczenia, albo do podziału. Jeśli obiekt jest zakwalifikowany do podziału, operacje podwójnego wododziału działają lokalnie, na fragmencie obrazu pojedynczego kanału hematoksyliny, powstałemu dzięki dekonwolucji kolorów. Kolory bazowe dekonwolucji zostały tak dobrane, aby odseparować kolory barwników: brązowy i niebieski. Wszystkie obszary wynikające z podziału klastrów są nowymi obiektami i podlegają weryfikacji.

Metoda została oceniona na podstawie ilości wysegmentowanych immunopozytywnych obiektów przez porównanie jej rezultatów z rezultatami dwóch innych metod: metody opisanej w poprzednim punkcie i półautomatycznej, kontrolowanej przez patologa, metody zaimplementowanej w komercyjnym oprogramowaniu Image-Pro Plus firmy MediaCybernetics (surowe dane dla każdego porównywalnego obrazka są prezentowane w tabeli 2 w publikacji III). Dla porównania rezultatów został policzony współczynnik korelacji Kendalla tau-b, który wykazał zgodność wyników metody Metinus i metody półautomatycznej na poziomie 0,91, a zgodność metody opisanej w poprzednim punkcie i metody półautomatycznej na poziomie 0,71 (tabela 3 w publikacji III). Metoda Metinus pomija mniej słabo zabarwionych jąder dla obrazów z rozproszonymi immunopozytywnymi jądrami, a dla obrazów z klastrami jąder - liczba obiektów nadmiernie podzielonych, jak i niepodzielonych, poprawiła się o połowę.

Jak widać z powyższego przeglądu, autorka zaproponowała różne metody segmentacji, opartej na wcześniejszej detekcji, które stały się podstawą analizy ilościowej. Metody dotyczące analizy skrawków tkanek (z publikacji II i III) zostały wykorzystane w badaniach naukowych przez współpracujących z nią patologów i biologów z Molecular Biology and Research Section szpitala w Tortozie, Hiszpania. Oprogramowanie realizujące zaproponowane i powyżej opisane metody ilościowej oceny preparatów z barwionych tkanek zostało im przekazane i wdrożone (stosowne oświadczenia zostały dołączone – załącznik 9). Współpracująca grupa wykonała badania przy użyciu tego oprogramowania, a ich wyniki są opublikowane we wspólnych publikacjach [115-117] (publikacje spoza cyklu).

Oprogramowanie wynikające z implementacji metody MSMA (publikacja I), które powstało w ramach projektu pt.: „Opracowanie metody segmentacji obrazów komórkowych na podstawie sekwencji obrazów mikroskopowych” zostało umieszczone na stronie internetowej prezentującej wyniki projektu (<http://www.ibib.waw.pl/grants/Korzynska>) i jest w ten sposób dostępne dla osób

zainteresowanych wraz z kodem w środowisku MATLAB. Pozostałe metody są dostępne do użycia na platformie PIKAOM/MIAP, po uprzednim zarejestrowaniu.

5. Przegląd metod walidacji wyników detekcji i segmentacji stosowanych do obrazów komórek i tkanek

Zastosowania biomedyczne wymagają skrupulatnej weryfikacji i oceny metod analizy obrazów wykorzystywanych w diagnostyce.

W dziedzinie detekcji i segmentacji obrazów komórek i tkanek (podobnie jak w przypadku innych typów obrazów) nie ma obiektywnie najlepszej metody oceny rezultatów niezależnej od implementacji [118, 119]. Analizując literaturę można stwierdzić, że zwykle ocenę zaproponowanej metody wykonuje jej autor, na podstawie zaimplementowanych algorytmów i na podstawie własnych obrazów, wybierając taki sposób oceny, jaki wydaje mu się najlepszy. Same metody, a także ich implementacje i rezultaty otrzymywane na podstawie różnych wartości parametrów metody, są trudne do porównania. Trudności te wynikają z następujących dwóch problemów:

Pierwszy – to brak dobrej miary poprawności i oceny jakości segmentacji. Niektórzy twierdzą [118], że ocena rezultatów segmentacji jest zbyt złożona i intuicyjna, aby można było znaleźć jedną uniwersalną miarę jakości segmentacji. Miara taka jest zależna od oceniającego i od celu, więc można próbować ją tworzyć jedynie do pewnego typu zadań segmentacji.

Drugi - to niepełność lub wręcz brak ogólnie dostępnych baz obrazów, na których można byłoby przeprowadzić niezależne porównawcze testy metod detekcji i segmentacji. Istnieją merytorycznie odmienne bazy, zawierające ogólnodostępny materiał w postaci zdjęć cyfrowych do porównywania metod i implementacji segmentacji, takie, jak album Brodatza [120], czy Berkeley Segmentation Dataset [121]. Mają one, przynajmniej do części obrazów, wyniki segmentacji manualnej do porównań rezultatów konkretnych metod w stosunku do segmentacji manualnej. Istnieją również bazy obrazów z obiektami z pewnych konkretnych dziedzin, jak np.: Military Graphics Collection [122], z obrazami obiektów wojskowych i broni, czy baza obrazów syntetycznych [123]. Baz zawierających obrazy komórek i skrawków tkanek jest niewiele, np.: ICPR 2012 – baza obrazów do detekcji komórek mitotycznych, ang. *mitotic cells* [124], ISBI 2013 – baza do weryfikacji metod śledzenia komórek, (ang. *cell tracking*) [125] czy baza AMIDA13 [126, 127], UCSB Bio-segmentation benchmark [128]. Niestety, żadna z nich nie zawiera choćby w części obrazów histologicznych barwionych immunohistochemicznie od pacjentów z chorobami, jakimi zajmowała się lub zajmuje autorka. Jeśli baza obrazów zawiera obrazy fragmentów tkanek, to są to obrazy barwione z użyciem hematoksyliny i eozyny. Lepiej przedstawia się sytuacja z obrazami żywych komórek, ponieważ baza CMU [129, 130] zawiera obrazy komórek z mikroskopu fluorescencyjnego wraz z manualnie wysegmentowanymi komórkami i ich jądrami. Została ona wykorzystana przez autorkę w pracach nad metodą MSMA, opisaną w [publikacji I], a jej wyniki są przedstawione w doniesieniu konferencyjnym spoza cyklu [131].

Systematyczne podejście do walidacji metod segmentacji przedstawił w 2008 roku Zhang i współpracownicy w publikacji „Image Segmentation Evaluation: A Survey of Unsupervised Method” [118], proponując hierarchiczny podział metod walidacji. Na początku dzieli on metody oceny na dwie kategorie: (1) na metody subiektywne,

wykonywane przez ludzi, oraz (2) metody obiektywne, wykonywane przez oprogramowanie. Ta ostatnia kategoria znów dzieli się na: ocenę systemową (ang. *system-level*) [130] i ocenę bezpośrednią (ang. *direct*). Ocena bezpośrednia znów dzieli się na: ocenę metodami analitycznymi (ang. *analytical*) [130, 132] i ocenę metodami empirycznymi (ang. *empirical*), a ta ostatnia ostatecznie została podzielona na dwie grupy: metody nadzorowane (ang. *supervised*) [133 – 140] i metody nienadzorowane (ang. *unsupervised*) [141 – 146]. Wymienione metody walidacji segmentacji są opisane poniżej w Tabeli 2., wraz z krótkim opisem i zestawieniem wad i zalet.

Tabela 2. Zestawienie metod walidacji wyników i procesu segmentacji i detekcji obiektów wraz z ich opisem, wadami i zaletami.

Metody	Opis	Zalety	Wady
Ocena subiektywna – oceniająca wyniki	Ocena dokonywana przez ludzi, którzy ze względu na rozumienie i wiedzę o świecie segmentują/separują obiekty na obrazach według własnych kryteriów	Jest zrozumiała i naturalna	Typowe zróżnicowanie wyników oceny zależne od osoby oceniającej (różnice osobnicze percepcji obrazów) i od czynników zewnętrznych; aby była wiarygodna, jest wymagane zaangażowanie dużej grupy ludzi, którzy oceniają dużą liczbę obrazów, co czyni ją kosztowną i czasochłonną
Ocena systemowa – oceniająca wpływ procesu na inne wyniki	Ocena przez analizę wpływu na inne metody, korzystające z wyników działania segmentacji i detekcji obiektów na obrazie	Jest łatwa w ocenie rezultatu segmentacji/detekcji	Jest to metoda pośrednia i nie można rozstrzygnąć, czy pozytywny rezultat sytemu jako całości wynika z pozytywnego wpływu wyników segmentacji/detekcji, albo czy negatywny rezultat systemu wynika z jakości segmentacji/detekcji
Analityczne metody oceny – oceniająca proces	Ocena metody w kategoriach: sekwencyjna/równoległa, interaktywna/automatyczna, oparta o matematyczne podstawy/heurystyczna, korzystające z jednego typu/z mieszanych kryteriów, kosztów obliczeniowych (czasu, złożoności obliczeniowej)	Jest potrzebna do decyzji o implementacji metody, ale nie do walidacji rezultatów metody	Wymienione cechy nie wpływają na ocenę rezultatów pracy metody
Nadzorowane	Potrzebują obrazów	zapewniają stosunkowo	Wymagają obrazów

<p>metody oceny – zwane również oceną względną (ang. <i>relative evaluation</i>) lub empiryczną zgodnością (ang. <i>empirical discrepancy method</i>)</p>	<p>referencyjnych i oceniają: podobieństwo/stopień korelacji/różnice w wartości analizowanych cech lub liczbę źle zaklasyfikowanych pikseli/suma odległości między źle sklasyfikowanym pikselem a najbliższym należącym do rejonu w obrazie wynikowym w porównaniu z „prawdziwymi” segmentami. Najnowsze osiągnięcie, to użycie wielowymiarowej przestrzeni z wieloma różnymi odległościami do globalnej oceny dopasowania i kosztów [35]</p>	<p>wysoką dokładność/rozdzielczość oceny metody segmentacji/detekcji</p>	<p>referencyjnych naturalnych, z manualnie wygenerowanymi segmentami lub oznakowanymi obiektami (ponieważ adnotacje robi człowiek, co wprowadza do nich subiektywność) lub sztucznych, w których w znanych miejscach znajdują się obiekty o znanych granicach (trudności w odtworzeniu cech charakterystycznych dla obrazów naturalnych)</p>
<p>Nienadzorowane metody oceny, znane również jako inne metody oceny (ang. <i>stand-alone</i>) lub empiryczne metody oceny (ang. <i>empirical goodness method</i>)</p>	<p>Działanie metod jest sprawdzane na dużym zbiorze bardzo różnych obrazów: (1) obrazów uproszczonych, w których koncentrowano się na cechach obrazów naturalnych, inkorporowanych do obrazów w różnym zakresie (2) obrazów naturalnych prostych scen bez semantycznego znaczenia segmentów</p>	<p>Jest to metoda obiektywna i ilościowa; umożliwia zarówno porównywanie metod między sobą, jak również tej samej metody przy zmianie jej parametrów, jako jedyna umożliwia: (a) automatyczny proces dopasowania parametrów metody do zbioru obrazów; (b) automatyczną kontrolę jakości segmentacji/detekcji, nawet w systemach czasu rzeczywistego</p>	<p>Nie nadają się do porównywania wyników segmentacji/detekcji dokonanej przez człowieka i automatycznej, bo analizuje tylko cechy niskiego poziomu bez brania pod uwagę semantycznego znaczenia segmentów; słabo nadaje się do porównywania różnych metod</p>

Metody walidacji, wykorzystane w publikacjach z niniejszego cyklu, są zaznaczone w Tabeli 2. pogrubioną czcionką. Poniżej znajduje się ich krótki opis wraz z przedstawieniem specyfiki ich wykorzystania lub rozszerzenia w pracach autorki.

Ocena subiektywna – to ocena wykonana przez grupę oceniających ludzi. Jest poprawna, gdy zapewnia w pewnym sensie „uśrednienie” wyników dużej (>10) grupy osób oceniających dużą (>10) liczbę obrazów. Ponadto należy zadbać, aby ocena była sformalizowana według przyjętej skali i odpowiednich wskazówek dla oceniających oraz aby prezentacja odbywała się w warunkach pozwalających wyeliminować wpływ kolejności, w jakiej zaangażowane osoby wydają ocenę [118, 130].

W przypadku publikacji zawartych w niniejszym cyklu, ocena subiektywna była wykonywana w formie uproszczonej, bez zachowania założeń przedstawionych w [147], czyli przez osoby zajmujące się metodą lub ją wykorzystujące. Jej wynik jest więc obciążony stosunkiem emocjonalnym osób biorących w niej udział. Jednak

w przypadku obrazów tak szczególnych i tak skomplikowanych, jak obrazy cytologiczne lub histologiczne, trudno sobie wyobrazić wiarygodną ocenę osób nie mających podstaw biologicznych, medycznych czy pozbawionych doświadczenia w pracy z obrazami mikroskopowymi. Jedynie w publikacji I niniejszego cyklu autorka prezentuje wyniki subiektywnej oceny wykonanej przez autorów publikacji, stwierdzając, że pole powierzchni komórek jest wysegmentowane zgodnie z oczekiwaniami (str. 96 w publikacji I). Jest to jednak wyłącznie ocena wspomagająca, ponieważ główny sposób oceny tej metody segmentacji, to zastosowanie opisanej poniżej metody nadzorowanej z użyciem obrazów symulowanych.

Ocena systemowa - to ocena stosowana tam, gdzie segmentację obiektów wykonuje się w celu późniejszej analizy, rozpoznawania [148] lub rozumienia. Zakłada się w niej, że segmentacja jest o tyle dobra, o ile prowadzi do dobrych wyników całego procesu, w którym jest jedynie etapem.

Stosowanie oceny systemowej do wyników segmentacji i detekcji obiektów w mikroskopowych obrazach fragmentów tkanek i komórek jest częste, ponieważ przeważnie są one wczesnym etapem wielu analiz [67 – 69, 147, 149, 150]. Wszystkie publikacje, zamieszczone w niniejszym cyklu, opisują metody selekcji i segmentacji obiektów wykonywane w celu analizy ilościowej. W dwóch z nich zastosowano ocenę pośrednią przez ocenę wyników analizy, polegającą na zliczaniu obiektów immunoreaktywnych w odpowiednio dobranym polu widzenia.

- W publikacji II – błąd metody detekcji obiektów immunopozytywnych, zdefiniowano jako różnicę liczby znalezionych obiektów w stosunku do liczby obiektów wyznaczonej przez eksperta; wzór (1); wyniki oceny w tabeli 1;
- W publikacji III – błąd metody segmentacji oceniono przez współczynnik korelacji Kendalla *tau-b*, liczony na podstawie liczby obiektów znalezionych przez segmentację względem liczby wyznaczonej inną metodą (w tym wypadku było to komputerowo wspomagane zliczanie obiektów przez eksperta, z wykorzystaniem oprogramowania Image-Pro Plus – firmy Media Cybernetics); wyniki oceny w tabeli 3.

Analityczne metody oceny segmentacji opisują implementację i oceniają koszty implementacyjne lub czasowe, wynikające ze złożoności obliczeniowej metody i strategii implementacji [151]. Prezentowane w niniejszym cyklu publikacje zawierają jedynie informacje dotyczące analitycznych cech prezentowanych metod, takie, jak język implementacji, schemat przetwarzania oraz eksperymentalnie wyznaczone czasy analizy.

Nadzorowane metody oceny wyników segmentacji wymagają obrazów referencyjnych o znanej liczbie i znanej lokalizacji obiektów [136 – 142]. Obrazy referencyjne powstają najczęściej przez ręczne wskazanie przez człowieka (lub grupę osób) pełnych obrysów lub tylko lokalizacji obiektów, a rzadziej - przez tworzenie obrazów symulowanych, w których położenie każdego obiektu jest znane.

Ręcznie wykonane obrysy obiektów są obarczone typowymi błędami (błędy wewnątrz- i międzygrupowe), dlatego są wyznaczane przez kilka osób, a następnie na ich podstawie konstruuje się obraz referencyjny (ang. *ground truth*). Taki obraz jest

w pewnym sensie „uśrednieniem” wyników zaangażowanych ekspertów. Zhang i współpracownicy [119] zaproponowali metodę STAPLE, w której na podstawie zbioru rezultatów manualnej segmentacji ekspertów tworzy się obraz referencyjny i przygotowuje narzędzia do porównania wyników segmentacji, ocenianej w stosunku do tak powstałej referencji.

Druga rzadziej używana metoda – to tworzenie syntetycznych obrazów referencyjnych o wiadomym położeniu i liczbie obiektów [152]. Najtrudniejszym elementem tworzenia jest uzyskanie takiej samej charakterystyki na obrazach symulowanych, jak na obrazach eksperymentalnych. Wiąże się to z dokładną oceną charakterystyki obrazów eksperymentalnych i symulacją zniekształceń tworzonych przez konkretne urządzenia akwizycji obrazów [152, 153].

Nienadzorowane metody walidacji oceniają ilościowo, na wiele sposobów, rozbieżności/zbieżności lub dopasowanie/niedopasowanie wyników segmentacji w stosunku do obrazu testowego, np. przez porównanie liczby źle i poprawnie sklasyfikowanych pikseli w wersjach z lub bez uwzględnienia funkcji kary, wagowo proporcjonalnej do odległości od najbliższych dobrze sklasyfikowanych pikseli [151] lub różnice wybranych cech obiektów wysegmentowanych i testowych [130], liczonych populacyjnie (stosowana najczęściej, gdy liczba wysegmentowanych obiektów jest różna od liczby obiektów w obrazie testowym) [154].

Najnowsze podejście - to zastosowanie frontu Pareta, zwanego także zbiorem Pareta, wywodzącego się z ekonomii. W tej metodzie są oceniane wyniki segmentacji w wielowymiarowej przestrzeni dopasowania i kosztów, tak jak się ocenia przedsięwzięcia gospodarcze, inwestycje i produkcję [155].

W niniejszym cyklu publikacji dotyczącym detekcji i segmentacji obiektów na obrazach mikroskopowych tkanek i komórek jest dokonywana ocena proponowanych metod oparta na obrazach referencyjnych. Są nimi:

- (1) obrazy syntetyczne, wygenerowane na podstawie map obiektów (o położeniu wyznaczonym metodami losowymi i o założonej, wzorowanej na obrazach eksperymentalnych, liczbie i wielkości obiektów), lub
- (2) obrazy, w których eksperci zaznaczyli obiekty immunopoztywne bez wyznaczenia ich granic.

Oba typy obrazów referencyjnych są odpowiednie do weryfikacji selekcji, ale nie segmentacji. Zastosowane miary dopasowania są oparte na współczynnikach wyznaczonych na podstawie liczby pikseli w czterech kategoriach: prawdziwie dodatnie, prawdziwie ujemne, fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie oraz na porównywaniu wybranych cech obiektów wysegmentowanych i referencyjnych.

Metody generowania obrazów symulujących charakterystyczne cechy obrazów mikroskopowych są wykorzystywane w publikacjach **IV**, **V** (symulowane obrazy barwionych skrawków tkanek) oraz publikacji **I** (symulowane obrazy neuralnych komórek macierzystych). Powstały one przez rozwinięcie i dostosowanie metody i oprogramowania SIMCEP, autorstwa Lehmusoli i współpracowników [152, 157] (oprogramowanie jest dostępne w Internecie), a przeznaczonych do tworzenia symulowanych obrazów fluorescencyjnych. Są to obrazy, w których tło jest czarne,

a obiekty świecą światłem wzbudzonym – są jasne, o wysokiej jasności w środku komórki, a małej w zewnętrznych fragmentach cytoplazmy.

Celem dostosowania metody i oprogramowania było tworzenie obrazów żywych niebarwionych komórek na szarym tle i skrawków tkanek barwionych immunohistochemicznie. Modyfikacje polegały na:

- (1) rozbudowie sposobu tworzenia obrazu o symulację obrazu żywej niebarwionej komórki i tkanki barwionej DAB&H w świetle przechodzącym, rejestrowanego odpowiednio przez kamerę monochromatyczną i kolorową;
- (2) dodaniu pochodzących z obrazów eksperymentalnych obiektów o różnej charakterystyce do systemu bazy, z której losujemy obiekty, których kształtów i tekstur nie da się wygenerować narzędziami SIMCEP, generującymi obiekty o kształtach elipsoidalnych.

Obrazy symulujące obrazy mikroskopowe żywych neuralnych komórek macierzystych obserwowanych w hodowlach są przedstawione w publikacji **VI**, a wykorzystywane do oceny - w publikacji **I**. Natomiast metoda tworzenia symulowanych obrazów barwionych tkanek jest wykorzystana do oceny metod progowania adaptacyjnego w publikacjach **IV** i **V** niniejszego cyklu publikacji, a jej opis znajduje się w publikacji **IV**.

Metoda MSMA do segmentacji żywych neuralnych komórek macierzystych produkujących białko EGFP na podstawie pary zdjęć – w jasnym polu i we fluorescencji, przedstawiona w publikacji **I** niniejszego cyklu, została oceniona przy wykorzystaniu zbioru par obrazów symulowanych, o skali szarości uproszczonej względem obrazów zbieranych eksperymentalnie. Obrazy fluorescencyjne są symulowane w oprogramowaniu SIMCEP zgodnie z jego funkcjonalnościami, natomiast w obrazach w jasnym polu mają teksturę (w rejonie jądra komórkowego i otaczającego go retikulum endoplazmatycznego), której nie da się wygenerować w generatorze obrazów komórek i jąder komórkowych w oprogramowaniu SIMCEP. Dlatego pochodzą one z bazy obiektów wyekstrahowanych z obrazów eksperymentalnych i podzielonych w bazie na trzy kategorie: komórki skupione, komórki rozplaszczone i komórki w stadium pośrednim. Są one zaprezentowane w publikacji **VI** na rysunku 1. oraz w publikacji **I** na rysunku 9. Wygenerowane obrazy pozwoliły ocenić dwa rodzaje błędów segmentacji: błędu pola powierzchni (zdefiniowanego przy pomocy wzoru (17) w publikacji **I**) oraz błędu lokalizacji obiektu (opisanego na tej samej stronie publikacji **I**).

Natomiast ocena i porównanie metod progowania adaptacyjnego (publikacje **IV** i **V**) zostały wykonane na podstawie symulowanych obrazów barwionych skrawków tkanek. Na obrazach tych znajdują się, naniesione zgodnie z mapą, wygenerowane losowo jądra komórkowe (obiekty o kształcie elipsoidalnym) o zadanych parametrycznie zakresach wielkości i kształtu, z podziałem na immunopoztywne i immunonegatywne. Losowość zapewnia oprogramowanie SIMCEP. Jądra i powierzchnie między nimi są wypełnione teksturami wygenerowanymi za pomocą SIMCEP. Natomiast kolory jąder komórkowych, cytoplazmy i przestrzeni międzykomórkowych dobrano na podstawie konkretnych obrazów eksperymentalnych, „zapożyczając” z nich próbki kolorów w oprogramowaniu CameraRaw 4.1 firmy Adobe. Zsyntetyzowane kolorowe obrazy poddano degradacji w sposób typowy dla sygnału występującego w mikroskopach (winietowanie, rozmycie punktu) i kamerach cyfrowych (szum i rozmycie krawędzi), korzystając

z oprogramowania SIMCEP. Jedynie aberracja chromatyczna, występująca na peryferyjnych częściach obrazów, została dołożona w CameraRaw 4.1.

Wyniki segmentacji każdej z badanych metod (tzn. Niblacka, Sauvola, White'a, Bernsena, Yasudy, Palumba i własnej) na każdym badanym kanale informacyjnym (tzn. dla niebieskiego kanału z RGB, kanału DAB po dekonwolucji kolorów, brązowego kanału wyliczonego z RGB) były porównywane z odpowiednią mapą obrazu symulowanego. Do porównania i ewaluacji wykorzystano specjalnie przygotowane oprogramowanie VoS (*Validation of Segmentation*), zliczające liczbę pikseli w kategoriach: (a) prawdziwie dodatnie, (b) prawdziwie ujemne, (c) fałszywie dodatnie i (d) fałszywie ujemne oraz wyliczającego czułość i specyficzność, współczynnik Dice'a, współczynnik Jaccarda, współczynnik Sokala i Sneatha oraz współczynnik Rogersa i Tanimota, zdefiniowane przy pomocy wzorów (12)-(17) w publikacji IV. Wyniki tych obliczeń są prezentowane w tabelach 4, 5, 6 w publikacji IV.

W przypadku tego porównania zastosowano również ocenę systemową przez sprawdzenie zgodności wyników poszczególnych porównywanych metod, zobrazowanych zmiennością istotnych cech, takich, jak kształt i wielkości obiektów. Zastosowano analizę wykresów Blenda-Altmana w stosunku do pola powierzchni, stosunku obu osi eliptycznego modelu obiektu, współczynnika kształtu uwypuklającego podobieństwo do koła (ang. *roundness*), współczynnika skupienia (ang. *solidity*) oraz współczynnika odchylenia od cyrkularności, opartego na stosunku ogniskowej do osi długiej (ang. *eccentricity*). Wyniki tej analizy można zobaczyć na rysunkach 5, 6, 7 w publikacji IV.

Ponadto na potrzeby porównania metod progowania adaptacyjnego prezentowanych w publikacji IV autorka zaproponowała nową własną statystykę, nazwaną *quasi Blend-Altman plot*. Statystyka ta pokazuje, czy istnieje jakiś stały lub okazjonalny trend w ułożeniu fałszywie znalezionych obszarów. Jej opis znajduje się na stronie 7, a jej wykresy są prezentowane na rysunku 7.

6. Korekcja obrazów

Autorka, projektując metody analizy obrazów cytologicznych i histologicznych, napotkała problemy wynikające z pewnych cech obrazów, które utrudniają lub wręcz uniemożliwiają segmentację lub detekcję obiektów na obrazach. Należą do nich: rozmycie obiektów, nierównomierność oświetlenia, szum, słaby kontrast czy zabarwienie obrazu, zwane w fotografii zafarbem, wynikające z procesu akwizycji. Możliwe jest wprowadzenie korekcji przy przetwarzaniu obrazów tylko w takim stopniu, w jakim ich informacja obrazowa, istotna ze względu na segmentację czy detekcję, nie zostanie zniszczona. Operacje korygujące, prowadzące do wyrównania niektórych istotnych charakterystyk obrazu, np. zakresu jasności, tonów kolorów występujących w obrazach, są nazywane standaryzacją obrazów. W ramach niniejszego cyklu publikacji zastosowano poprawę jakości analizowanych obrazów przez usunięcie ewidentnych błędów ich akwizycji (publikacja VII i IX niniejszego cyklu) lub inherentnych cech obrazów, wynikających z działania konkretnego urządzenia do akwizycji (publikacja VIII niniejszego cyklu). Największym problemem jest

zróźnicowanie kolorów i ich odcieni wynikające ze zjawiska metameryzmu oraz z innych przyczyn.

Metameryzm (metameria) prowadzi do tego, że dwa fragmenty obrazu w jednych warunkach wydają się identyczne, a w innych zupełnie różne. Można to zaobserwować w przypadku zastosowania światła o różnej charakterystyce lub identycznego światła padającego pod różnymi kątami.

Inne przyczyny zróźnicowania kolorów – to różnice intensywności oświetlenia, różnice zastosowanego powiększenia, niejednakowa optyka toru świetlnego, różnice czułości światłoczułych przetworników kamery i różnice wynikające z działania oprogramowania przetwarzającego sygnał na kod koloru. Takie zróźnicowanie, znane jako *batch effect*, jest najlepiej widoczne w badaniach, w których preparaty pochodzą z różnych szpitali. Problem zróźnicowania koloru w obrazach tych samych mikroskopowych preparatów, wczytanych przez różne skanery i mikroskopy, doczekał się opracowania wskazówek ze strony International Color Consortium Medical Imaging Working Group [156]. Ich autorzy zalecają używanie urządzeń kalibrujących i wspomagającego oprogramowania do przygotowania każdego urządzenia do użytku. Jednak takich urządzeń (analogicznych do urządzeń do kalibracji monitorów) nie ma na rynku. W literaturze można znaleźć publikacje [70 – 75, 158 – 162], w których wspomina się o metodach kalibracji koloru przygotowywanych na użytek poszczególnych laboratoriów. Niektóre z nich są oparte na statystyce tonów i kolorów, a inne - na przygotowaniu szkiełek kalibracyjnych do kalibracji koloru.

Praca urządzeń skanujących mikroskopowe slajdy zaczyna się od wstępnego procesu automatycznego doboru płaszczyzny ostrości w kilkunastu lub kilkudziesięciu równomiernie rozrzuconych punktach preparatu, na dobór których nie ma zewnętrznego wpływu [7]. Proces ten nie zawsze prowadzi do powstania ostrego obrazu całego preparatu. Wszelkie fałdy, zmarszczki i zawinięcia, zbyt gruby preparat oraz obecność pęcherzyków powietrza lub kleju mogą wprowadzać błędy w pomiarze optymalnej głębi ostrości i prowadzić do uzyskania rozmytych fragmentów w pobliżu tych usterek na obrazie. Tak jak fragmenty preparatów, które nie są strukturami przeznaczonymi do badania (np. obecność komórek tłuszczowych, dużych naczyń, fragmentów martwiczko zmienionych z/bez wylewu krwi, czy fragmentów zwłóknień) są z obszaru do analizy wykluczane, tak również powinny zostać zidentyfikowane i odrzucone fragmenty uszkodzone i nieostre. Stąd konieczność oceny jakości preparatu i wyznaczania obszarów do analizy [67].

W niniejszym cyklu zamieszczono trzy publikacje dotyczące:

- (1) analizy balansu bieli (publikacja **VII** niniejszego cyklu),
- (2) metody wyrównania nierównomierności oświetlenia w obrazach mikroskopowych (publikacja **VI**) oraz
- (3) metody standaryzacji i oceny obrazów (publikacja **IX**), zaproponowane przez autorkę.

Wyrównanie nierównomierności oświetlenia jest szczególnie istotne dla obrazów mikroskopowych, ponieważ bardzo trudno uniknąć na nich niedoświetlenia zewnętrznych fragmentów obrazu w stosunku do jego centrum, czyli tzw. winietowania. Niedoświetlenie jest konsekwencją rozpraszania światła na zewnętrznych krzywiznach soczewek, natomiast obecność soczewek korygujących nie

likwiduje w pełni efekt przyciemnienia, a jedynie efekt ten zmniejsza. Znane metody ujednolicenia jasności obrazu pozyskanego z mikroskopu wymagają:

- (1) zebrania dodatkowego obrazu/obrazów, pozwalających ustalić charakterystykę niedoświetlenia w celu zaproponowania funkcji korygującej [30-34, w publikacji VI], lub
- (2) oceny charakterystyki na podstawie korygowanego obrazu [39 w publikacji VI], w którym obiekty są stosunkowo rzadko ułożone i stosunkowo jednorodne ze względu na rozmiar i kształt.

Takie postępowanie okazało się jednak nieodpowiednie aby pozbyć się nierównomierności oświetlenia obrazów archiwalnych, otrzymanych w ramach współpracy z Oncological Pathology & Bioinformatics (OP&B) Research Group i z Department of Pathology ze szpitala Verge de la Cinta w Tortozie. Na znacznej ich liczbie znajdowały się gęsto upakowane obiekty i struktury tkankowe, bez lub z niewielką ilością tła.

Ponieważ zostały zmodernizowane mikroskop i kamera, przy pomocy których dokonano akwizycji tych obrazów, zebranie obrazu charakterystyki stało się niemożliwe. W związku z tym w publikacji VI autorka zaproponowała własną metodę, wykorzystującą wyniki analizy charakterystyki dużego zbioru obrazów (ponad 100) do konstrukcji obrazu korekcyjnego. Ten obraz następnie wykorzystuje się do korekcji każdego z obrazów. W metodzie wyszukuje się fragmenty tła w obrazach i na ich podstawie interpoluje mapą nierównomierności oświetlenia. Mapa staje się podstawą funkcji korygującej. Dzięki temu duże repozytorium zostało wykorzystane do analiz w publikacjach spoza monotematycznego cyklu, których autorka jest współautorką [68, 69].

Zjawisko występowania różnic w tonacji i w kolorystyce obiektów na obrazach tych samych preparatów, wczytywanych przez różne urządzenia do akwizycji obrazów, jak również przez te same urządzenia, ale przy różnych parametrach wczytywania, jak to ma miejsce w przypadku mikroskopu, przeszkadza zarówno wtedy, gdy oceny preparatów wirtualnych dokonują lekarze, jak i w przypadku, gdy do oceny używane są metody automatyczne, których podstawą działania są różnice w kolorze. Jedną z przyczyn może być niedopasowanie założonego udziału kanałów czerwonego, zielonego i niebieskiego w formowaniu kolorowego sygnału. Może to mieć miejsce, gdy procedura formowania sygnału nie zna temperatury barwowej światła, którym został oświetlony preparat. Jeśli obrazy są wczytywane za pomocą mikroskopu, to balans bieli jest dobierany przez osobę obsługującą wczytywanie i wówczas takie niedopasowanie jest prawdopodobne (np. przez obecność pasożytniczego światła w pomieszczeniach, gdzie pracuje mikroskop). W automatycznych skanerach wirtualnych slajdów nie ma możliwości manipulowania temperaturą barwową światła i w związku z tym algorytmy rekonstrukcji są dopasowywane do światła zastosowanego w skanerze na poziomie konstrukcji urządzenia i oprogramowania.

Niepoprawny balans bieli na obrazie manifestuje się zafarbem pewnego koloru (niebieskiego, żółtego, czerwonego), najlepiej widocznym w miejscach, które powinny być białe lub szare. Jest to przedstawione na rysunku 1. publikacji VIII. Istnienie charakterystycznego zafarbu wynika głównie z braku zgodności faktycznej temperatury

barwowej światła, użytego do powstania obrazu, w stosunku do założeń oprogramowania rekonstruującego kolor w obrazie. Powstaje on również w związku ze zróżnicowaniem czułości mozaiki światłoczułej kamery dla różnych długości fali, a czasami z powodu braku odcięcia fali spoza widma widzialnego, która jest w granicach czułości detektorów światła. Autorka zbadała wpływ manualnej korekcji balansu bieli na degradację cech, istotnych z punktu widzenia procedur selekcji i segmentacji, korzystając z oprogramowania Camera Raw 4.2 (firmy Adobe). Przeprowadziła eksperymentalne kontrolowane zaburzenie balansu bieli i jego korektę. Porównała obrazy po korekcji z obrazami wczytanymi poprawnie i wyniki zaprezentowała w tabeli 1. w publikacji VIII. Ustaliła, że poszukiwane obiekty (brązowe barwione DAB-em jądra komórkowe) po korekcji balansu bieli zajmują w przestrzeni Lab inne miejsca, niż obiekty z obrazów wczytanych poprawnie. Ich kolorystyka (w podprzestrzeni ab z modelu Lab), określona współrzędnymi chromatycznymi przestrzeni, jest zbliżona do obrazów wczytanych poprawnie, natomiast ich luminancja, współrzędna L, jest zaniżona, co oznacza degradację tekstury widoczną na rysunku 4. w publikacji VIII. Ustalono, że duże niedopasowanie temperatury barwowej światła, demonstrujące silny zafarb (np. dla wartości kanału b w obszarach pustych, gdzie wartości pikseli wykraczają poza przedział (-15,20)) powoduje, że korekcja jest bezużyteczna ze względu na degradację tekstury wewnątrz obiektu.

Autorka zaproponowała własną metodę automatycznej korekty balansu bieli w zakresie uznanym za odpowiedni i przedstawiła ją w publikacji IX. W metodzie korzysta się z klasteryzacji *k-means* na bazie koloru. Dzięki specjalnie dopasowanej procedurze wyszukiwania 4 klastrów koloru, są znajdowane obszary bez preparatu. W tych obszarach następuje analiza stosunku i rozpiętości kanałów R, G, B. Jeśli występuje dysproporcja w udziale poszczególnych kanałów w bieli czystego tła, to odpowiednie rozjaśnienie lub przyciemnienie zidentyfikowanego kanału pozwala wyrównać balans bieli.

Niepoprawna ostrość fragmentów obrazu zostaje zidentyfikowana przez uśrednioną ocenę wielkości rozmycia brzegu komórki dla fragmentów obrazu 1000×1000 pikseli. Obszar graniczny obiektów i tła identyfikuje się na podstawie wcześniej wspomnianej zmodyfikowanej klasteryzacji *k-means*, krótko przedstawionej w publikacji IX. W każdym punkcie brzegu każdego obiektu, wyznaczonym na podstawie operatora Canny'ego, mierzy się rozpiętość brzegu (czyli długość przejścia od koloru wewnątrz obiektu, przy krawędzi, do lokalnego koloru tła) [163]. Pomierzone wartości dodaje się i standaryzuje. Wartość graniczna, poniżej której ostrość obrazu jest uznawana za poprawną, a fragment obrazu zostaje zaakceptowany do analizy, wynosi 3,5 (w pikselach).

Nadmierny szum można zaobserwować w obrazach pochodzących z mikroskopów i dlatego autorka zaproponowała metodę jego eliminacji, zwaną *Noise Decrease using 2 images (ND2I)*. Metoda ta została przedstawiona w publikacji IX. Wykorzystuje się w niej współczynnik podobieństwa (*similarity index*), zdefiniowany w [164 – 166], który porównuje odpowiadające sobie okna w dwóch obrazach w celu zidentyfikowania i eliminacji szumu. Obniżenie szumu następuje przez: (1) zastąpienie zaszumionej wartości wartością z drugiego obrazu, jeśli jest ona wartością o dużym współczynniku

podobieństwa do otoczenia, lub (2) uśrednienie, jeśli w obu obrazach analogiczne wartości mają mały współczynnik podobieństwa do otoczenia.

Korekcja koloru, zaproponowana przez autorkę w publikacji **IX**, obejmuje przygotowanie szkiełek kalibrujących i współpracującego oprogramowania. Korzystając z folii poliestrowej typu Deep-Dyed firmy ROSCO LTD o znanej transmitancji, został ułożony zestaw 8 kolorów odpowiadający kolorom naturalnym i podstawowym (przezroczysty, 50% szarości, czerwony, zielony i niebieski) oraz kolorom typowym dla obrazów skrawków tkanek barwionych immunohistochemicznie (bursztynowy, żółty i brąz) w sposób przedstawiony na rysunku 2. publikacji **IX**. Oprogramowanie, rozpoznaje 8 kolorów w oparciu o sieć neuronową, a następnie liczy macierz korygującą kolor niezależnie od rozmieszczenia i kształtu fragmentów kolorowej folii. Dlatego może być użytkowane ze szkiełkami, na których znajdują się inne kolory folii i są na nich dowolnie rozmieszczone. Przykładową macierz korekcji wyliczoną dla mikroskopu dostępnego w pracowni (pod powiększeniem $\times 100$ z obiektywem powiększającym 10 razy) i efekty jej działania można zobaczyć na rysunku 3. z tej samej publikacji. Oprogramowanie korygujące kolor w obrazie pochodzącym z konkretnego skanera, działającego przy określonych parametrach wejściowych, wykorzystuje informacje zawarte w odpowiedniej macierzy korekcyjnej tego urządzenia i zmienia wartości pikseli w kanałach RGB, tworząc obraz po korekcji.

Metody oceny jakości cyfrowych obrazów, powstałych przez digitalizację mikroskopowych preparatów i ich standaryzacji, opracowane w ramach projektu PIKAOM/MIAP realizowanego przez konsorcjum, którego konsorcjantami są: Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im Macieja Nałęcz Polskiej Akademii Nauk, Wojskowy Instytut Medyczny i Politechnika Warszawska, zostały opisane w publikacji **IX**. Autorka i jej współpracownicy mają świadomość istniejących problemów natury prawnej i etycznej, jakie zazwyczaj pojawiają się na styku praw chorego człowieka do ochrony swoich danych osobowych z prawem lekarzy i biologów do dostępności do wyników jego badań nie tylko w telepatologii czy patologii. Dlatego platforma powstała w ramach projektu jest dostępna dla użytkowników po ich uprzednim zarejestrowaniu.

7. Podsumowanie

Reasumując - poniżej przedstawiono osiągnięcia autorki zawarte w publikacjach z niniejszego monotematycznego cyklu stanowiącego podstawę do habilitacji, które wiążą się z dyscypliną naukową Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna.

1. Opracowanie metody detekcji i segmentacji obrazów żywych transdukowanych (produkujących EGFP) neuralnych komórek macierzystych, z wykorzystaniem własnych rozwiązań dotyczących:

- łączenia wyników detekcji pochodzących z różnych kanałów informacyjnych,
- tworzenia markerów na potrzeby operacji wododziału tak, aby nie doprowadzić do nadmiernej segmentacji.

Metoda nazwana MSMA (w publikacji **I**) powstała w ramach projektu finansowanego przez MNiSW pt.: „Opracowanie metody segmentacji obrazów

komórkowych na podstawie sekwencji obrazów mikroskopowych”. Na stronie internetowej (<http://www.ibib.waw.pl/grants/Korzynska>) opisującej rezultaty jest dostępny kod źródłowy, napisany w środowisku MATLAB. W latach 2008 – 2011 autorka wykonywała wspomniany projekt i kierowała zespołem realizującym. Zgodnie z jego założeniami autorskie oprogramowanie wraz z kodem źródłowym jest ogólnodostępne i może być rozwijane dalej.

2. Opracowanie metod detekcji i segmentacji obrazów tkanek barwionych immunohistochemicznie (z użyciem barwników DAB&H), opartych na:

- własnym algorytmie progowania adaptacyjnego, dostosowanego do obrazów ze zmodyfikowanymi kolorami (innymi niż brąz),
- dobranych przez autorkę kryteriach identyfikacji odpowiedniej subpopulacji jąder komórkowych,
- dwóch metodach podziału klastrów jąder na podstawie operacji wododziału z wykorzystaniem transformaty odległościowej i piramidy gaussowskiej oraz na specjalnie zmodyfikowanej nietypowej metodzie łączenia wyników dwóch wododziałów działających lokalnie.

Nowe metody, to:

- (1) metoda opublikowana w roku 2010, powstała w ramach COST Action jako Polish-Spanish Cooperative Project on “Development of a Novel Technique for Quantitative Immunochemistry”, realizowany we współpracy z Molecular Biology and Research Section, ze szpitala Verge de la Cinta w Tortozie, Hiszpania [publikacja II], oraz
- (2) metoda Metinus, prezentowana w 2015 i opublikowana w 2016 roku [publikacja III], powstała w ramach realizacji dalszej współpracy ze szpitalem w Tortozie.

Oprogramowanie obu metod zostało przekazane i wdrożone w szpitalu w Tortozie, a odpowiednie oświadczenia zostały załączone w załączniku nr 9. Obie metody segmentacji, połączone z analizą ilościową, zostały również przekazane i udostępnione do wykorzystania przez zainteresowane osoby. Wykorzystanie tego oprogramowania, dostępnego na platformie PIKAOM /MIAP, jest możliwe po wcześniejszym zarejestrowaniu.

3. Opracowanie metody tworzenia symulowanych obrazów tkanek i komórek [publikacja V] przez rozwój oprogramowania SIMCEP (autorstwa Lehmuoli i współpracowników [157]). Utworzone przez autorkę symulowane obrazy tkanek i odpowiadające im obrazy eksperymentalne są dostępne na platformie PIKAOM/MIAP do wykorzystania przez osoby zainteresowane i zarejestrowane na platformie.

4. Przeprowadzenie analizy porównawczej efektywności różnych znanych z literatury metod progowania adaptacyjnego do segmentacji jąder komórkowych na obrazach pochodnych/składowych obrazów tkanek barwionych immunohistochemicznie z wykorzystaniem DAB&H. Porównania te dotyczą oddzielnie jąder immunopozytywnych [publikacja IV] i immunonegatywnych [publikacja V]. Wyniki analizy porównawczej pozwoliły

zapropnować nową metodę segmentacji, która jest aktualnie implementowana w projekcie PIKAOM/MIAP.

5. **Przeprowadzenie analizy wpływu użycia niepoprawnego balansu bieli na zawartość informacyjną obrazów tkanek barwionych immunohistochemicznie z wykorzystaniem DAB&H podczas akwizycji obrazów oraz ocena zakresu możliwej w takim przypadku korekty balansu bieli.** Opracowane oprogramowanie do korekty balansu bieli wdrożono na platformie PIKAOM/MIAP do wykorzystania przez zarejestrowane na niej zainteresowane osoby.
6. **Opracowanie metody i implementacja oprogramowania do korekcji winietowania w archiwalnych testowych obrazach mikroskopowych,** otrzymanych od współpracujących lekarzy i biologów, które były wykorzystywane w latach wcześniejszych, przed analizą złożonych wielkoobszarowych cyfrowych obrazów całych preparatów.
7. **Opracowanie metody i oprogramowania wspomagającego korekcję koloru obrazów skrawków tkanek barwionych immunohistochemicznie, z wykorzystaniem przygotowanych szkiełek/preparatów kalibracyjnych.**
8. **Opracowanie metody i oprogramowania do oceny i korekcji jakości** złożonych, wielkoobszarowych obrazów całych preparatów pod względem poziomu szumu, balansu bieli i występowania obszarów rozmytych do wykluczenia z analizy.

Wymienione osiągnięcia wymagały od autorki ścisłej współpracy z lekarzami patologami i biologami. Opracowane metody są obecnie wykorzystywane w pracach naukowych, co umożliwi ich wszechstronne sprawdzenie. Można mieć nadzieję, że doświadczenia zebrane podczas pracy nad tymi metodami pozwolą je jeszcze rozwinąć tak, aby weszły do praktyki szpitalnej.

Wyniki niektórych z opracowanych przez autorkę zagadnień mają charakter ogólny, dlatego mogą być wykorzystane przez osoby zajmujące się szeroko rozumianą tematyką przetwarzania obrazów.

Przykłady takich osiągnięć przedstawiono poniżej.

1. Opracowanie metody walidacji wyników segmentacji w stosunku do zadanego obrazu referencyjnego VoS (**V**alidation **o**f **S**egmentation), z wykorzystaniem perceptualnej miary podobieństwa SSIM (autorstwa Wang [166]) obrazów oraz realizującego ją oprogramowania, które było wykorzystane w publikacjach **IV** oraz **V** i które może być wykorzystywane w kolejnych pracach badawczych nad rozwojem metod segmentacji, prezentowane na seminarium MCB [167].
2. Do ważnych innych osiągnięć autorka zalicza wyniki pracy zamieszczone w publikacji [168], która nie należy do monotematycznego cyklu publikacji wybranych jako podstawa habilitacji, ale stanowi przejaw jej aktywności naukowej w dziedzinie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej. Opracowana

przez autorkę metoda oceny tzw. czasu podwojenia się liczby komórek w hodowlach komórkowych (ang. *cells doubling time*) cieszy się zainteresowaniem biologów. Pomiar odbywa się na podstawie obserwacji ze stałym przyrostem czasowym Δt liczby komórek w hodowli (lub w zdefiniowanym oknie obserwacji).

Podsumowując, wkładem autorki w rozwój dyscypliny Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna są nowe metody analizy, które powstały na podstawie własnych badań.

Dorobek autorki według bazy Web of Science (na dzień 21.08.2016) to 27 publikacji, cytowanych 98 razy (63 razy bez autocytowań), Indeks Hirscha (h-index) = 6. Cytowania publikacji autorki można podzielić na dwie grupy:

- (1) cytowania dotyczące omówienia metodyki podejścia do problemu segmentacji i detekcji [49, 169] lub analizy ilościowej [170, 171], oraz
- (2) cytowania wskazujące prace nad określonym typem komórek [172] lub tkanek [75, 173].

Ponadto niektóre cytowania odnoszą się do stosowanej przez autorkę metodyki oceny wyników segmentacji i selekcji [174, 175], analizy ilościowej [77, 176, 177, 178] oraz są związane z komentowaniem trendów dotyczących analizy obrazów tkanek omawianych w publikacjach przeglądowych [76, 175]. Spośród publikacji nienależących do przedstawianego monotematycznego cyklu oraz nie dotyczących wyników prac związanych z doktoratem, jest cytowana publikacja [168] dotycząca obliczania czasu podwojenia liczby komórek w hodowlach komórkowych [179]. Największą liczbę cytowań mają publikacje związane z doktoratem (najwięcej 23 cytowania).

Kierunki aktualnych i przyszłych prac autorki

Autorka nadal prowadzi prace związane z analizą obrazów cytologicznych i histologicznych oraz w dalszym ciągu rozwija nowe i modyfikuje już działające metody opisane w niniejszym autoreferacie. Ulepszenia i rozwiązywanie problemów analizy ilościowej innych preparatów tkankowych są konsekwencją warunków realizacji projektu PIKAOM/MIAP, który autorka aktualnie wykonuje i który zakłada pięcioletni okres eksploatacyjno-weryfikacyjny platformy MIAP, powstającej w ramach projektu. Plany projektu przewidują implementację nowych metod analizy, opartych na rezultatach własnych porównań efektywności progowania adaptacyjnego i na metodyce zwanej konwolucyjnymi sieciami neuronowymi (ang. *Deep CNN*), która powoli staje się najnowocześniejszą metodą rozpoznawania obiektów na złożonych obrazach. Można zatem stwierdzić, że prace badawcze autorki prowadzone obecnie i w najbliższej przyszłości wpisują się w kierunki „*state of the art*” badań związanych z analizą obrazów barwionych tkanek i komórek.

Literatura:

1. A Korzyńska, 2001, „Komputerowa ocena ruchu i kształtu granulocytów obojętnochłonnych. 2001, supervisor: prof. J.L Kulikowski, PAN Instytut Biocybernetyki i Inżynierii, Prace Warszawa 2001, 57, ISSN 0239–7455.
2. A Korzynska, W Strojny, A Hoppe, D Wertheim, P Hoser; 2007 “*Segmentation of Microscopic Images of Living Cells*” Pattern Analysis and Application, 2007, 10: 301–319, doi: 10.1007/s10044–007–0069–7
3. Swedlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, “WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues”, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2008.
4. AF Tavassoli P Devilee, “WHO classification of Tumors; Pathology and Genetics; Tumours of the Breast and Female Genital Organs”, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2003.
5. MD Rockville, "Screening for Cervical Cancer: Recommendations and Rationale". AHRQ 03–515A". Agency for Healthcare Research and Quality, U.S. Preventive Services Task Force, 2010.
6. M Arbyn, A Anttila, J Jordan, G Ronco, U Schenck, N Segnan, H Wiener, A Herbert, L von Karsa, 2010, "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition Summary Document". Annals of Oncology 21(3): 448–458. doi: 10.1093/annonc/mdp471. PMC 2826099.
7. M Rojo, G Bueno, J Słodkowska, 2009, “Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemicastry in the Pathology daily practice”, Folia Histochemica et cytobiologica, 47(3): 349–354, 2009.
8. KS Suvarna, C Layton, JD Bancroft, “Bancroft’s Theory and Practice of Histology Techniques”, 7th edition, London, UK, 2012.
9. H Ancin, B Roysam, TE Dufresne, MM Chestnut, GM Ridder, DH Szarowski, JN Turner, “Advances in automated 3–D image analysis of cell populations imaged by confocal microscopy” *Cytometry*, 25(3): 221–234, 1996.
10. N Malpica, CO de Solorzano, JJ Vaquero, A Santos, I Vallcorba, JM Garcia–Sagredo, F del Pozo, “Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei”, 1997.
11. A Fitzgibbon, M Pilu, R Fisher, “Direct least square fitting of ellipses,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. (TPAMI)*, 21(5): 476–480, 1999.
12. PW Hamilton, N Anderson, PH Bartels, D Thompson, “Expert system support using Bayesian belief networks in the diagnosis of fine needle aspiration biopsy specimens of the breast” *J Clin Pathol*; 47:329–36, 1994.
13. G Alexe, GS Dalgin, D Scandfeld, P Tamayo, JP Mesirov, C DeLisi, L Harris, N Barnard, M Martel, AJ Levine, S Ganesan, G Bhanot, “High expression of lymphocyte–associated genes in nodenegative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates”, *Cancer Res* 15; 2007.
14. S Petushi, FU Garcia, MM Haber, C Katsinis, A Tozeren “Large - scale computations on histology images reveal grade–differentiating parameters for breast cancer” *BMC Med Imaging* (6):S14, 2006.
15. DL Weaver, DN Krag, EA Manna, T Ashikaga, SP Harlow, KD Bauer, “Comparison of pathologist detected and automated computer–assisted image analysis detected sentinel lymph node micrometastases in breast cancer”, *Mod Pathol* Nov 16:1159–63, 2003. *BMC Med Imaging* 2006 (6):S14.
16. S Naik, S Doyle, S Agner, A Madabhushi, J Tomaszewski, M Feldman, “Automated gland and nuclei segmentation for grading of prostate and breast cancer histopathology” *ISBI Special Workshop on Computational Histopathology (CHIP)*. IEEE; Paris, France: 284–287, 2008.
17. SS Singh, B Qaqish, JL Johnson OH Ford, JF Foley, SJ Maygarden, JL Mohler, “Sampling strategy for prostate tissue microarrays for Ki–67 and androgen receptor biomarkers” *Anal Quant Cytol Histol*; 26:194–200, 2004.
18. S Doyle, M Hwang, K Shah A Madabhushi, M Feldman, J Tomaszewski, “Automated grading of prostate cancer using architectural and textural image features” *ISBI Special Workshop*:1284–1287, 2007.

19. S Doyle, M Hwang, K Shah, A Madabhushi, J Tomaszewski, M Feldman, "Automated Grading of Prostate Cancer using Architectural and Textural Image Features", International Symposium on Biomedical Imaging: 1284–87, 2007.
20. K Jafari-Khouzani, H Soltanian-Zadeh, "Multiwavelet grading of pathological images of prostate". IEEE Trans Biomed Eng 50:697–704, 2003.
21. A Tabesh, M Teverovskiy, HY Pang, VP Kumar, D Verbel, A Kotsianti, O Saidi, "Multifeature prostate cancer diagnosis and Gleason grading of histological images" IEEE Trans Med Imaging 26:1366–78, 2007.
22. M Elizabeth, MD Brunt, "Histopathologic features of hepatocellular carcinoma", Clinical LiverDisease 1, (6): 194–199, 2012, doi: 10.1002/cld.98.
23. C Pilette, MC Rousselet, P Bedossa, D Chappard, F Oberti, H Rifflet, MY Maïga, Y Gallois, P Calès, „Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi - quantitative scores: Comparison with serum markers", Journal of Hepatology, 28,(3): 439–446, 1998, doi: 10.1016/S0168–8278(98)80318–8.
24. AJ Sims, MK Bennett, A Murray, "Image analysis can be used to detect spatial changes in the histopathology of pancreatic tumours", Physics in Medicine and Biology; 48: 183–191, 2003.
25. B Sitek, B Sipos, I Alkatout, G Poschmann, C Stephan, T Schulenburg, K Marcus, J Lüttges, DD Dittert, G Baretton, W Schmiegel, SA Hahn, G Klöppel, HE Meyer, K Stühler, "Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation." J Proteome Res, 8(4):1647–56, 2009, doi: 10.1021/pr800890j.
26. M Gurcan, T Pan, H Shimada, JH Saltz, "Image analysis for neuroblastoma classification: Hysteresis thresholding for cell segmentation", APiII Vancouver, 2006.
27. MN Gurcan, T Pan, H Shimada, J Saltz, "Image analysis for neuroblastoma classification: segmentation of cell nuclei", Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 1:4844–7, 2006.
28. O Sertel, J Kong, H Shimada, U Catalyurek, J Saltz, MN Gurcan, "Computer-aided prognosis of neuroblastoma on whole-slide images: Classification of stromal development", Pattern Recognition 42:1093–1103, 2009.
29. H Qureshi, O Sertel, N Rajpoot, R Wilson, M. Gurcan, "Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention", MICCAI 2008. Adaptive Discriminant Wavelet Packet Transform and Local Binary Patterns for Meningioma Subtype Classification: 196–204, 2008.
30. B Cambazoglu, O Sertel, J Kong, JH Saltz, MN Gurcan, UV Catalyurek, "Efficient processing of pathological images using the grid: Computer - aided prognosis of neuroblastoma", Proceedings of Fifth International Workshop on Challenges of Large Applications in Distributed Environments; Monterey Bay: 35–41, 2007.
31. A Ruiz, O Sertel, M Ujaldon, UV Catalyurek, J Saltz, MN Gurcan, "Pathological Image Analysis Using the GPU: Stroma Classification for Neuroblastoma" IEEE BIBM'07. 2007.
32. O Sertel, J Kong, U Catalyurek, G Lozanski, J Saltz, M Gurcan, "Histopathological Image Analysis using Model-based Intermediate Representations and Color Texture: Follicular Lymphoma Grading." Journal of Signal Processing Systems. 2009.
33. S Samsi, G Lozanski, A Shana'ah, AK Krishanmurthy, MN Gurcan, "Detection of Follicles from IHC Stained Slides of Follicular Lymphoma Using Iterative Watershed", IEEE transactions on bio-medical engineering 57(10):2609–2612, 2010, doi:10.1109/TBME.2010.2058111.
34. Z Huang, A McWilliams, H Lui, D McLean, S Lam, H Zeng, "Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer", Int. J. Cancer 107:1047–1052 2003.
35. S Keenan, J Diamond, W Glenn McCluggage, H Bharucha, D Thompson, P Bartels, P Hamilton, "An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)", J Pathol:192, 2000.
36. F Ginty, S Adak, A Can, M Gerdes, M Larsen, H Cline, R Filkins, Z Pang, Q Li, M Montalto, "The Relative Distribution of Membranous and Cytoplasmic Met Is a Prognostic Indicator in Stage I and II Colon Cancer", Clinical Cancer Research 14:3814, 2008.
37. MN Gurcan, LE Boucheron, A Can, A Madabhushi, "Histopathological Image Analysis: A Review", IEEE Rev Biomed Eng. 2: 147–171, 2009, doi: 10.1109/RBME.2009.2034865.
38. Demir C, Yener B. "Automated Cancer Diagnosis Based on histopathological images: a systematic survey", Rensselaer Polytechnic Institute, Troy :NY2006.
39. Q Wu, FA Merchant, KR Castleman, Microscope Image Processing. Burlington, MA: Academic Press, Inc., 2008.

40. NFarahani, AParwani, L Pantanowitz, „Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives”, *Pathology and Laboratory Medicine International* 7: 23–33, 2015.
41. G Bueno, M Garcia–Rojo, O Deniz, J Garcia–Gonzalez, , “Grid Architecture and Components in Diagnostic Pathology”, “Grid Technology for E - Health: Applications for Telemedicine Service and Delivery”, *IGC Global*:105–116, 2011.
42. G Bueno, R Gonzalez, O Deniz, M Garcia - Rojo, J Garcia - Gonzalez, MM Fernandez - Carrobles, N Vallez, Salido, “A parallel solution for high resolution histological image analysis, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2012, doi: 10.1016/j.cmpb.2012.03.007.
43. Y LeCun, Y Bengio, G Hinton, “Deep learning,” *Nature* 521(28): 436–444, 2015.
44. L Deng, D Yu, “Deep learning: Methods and applications,” *Foundations and Trends in Signal Processing* 3,(3–4): 197–387, 2013.
45. X Qi, F Xing, DJ Foran, L Yang, “Robust segmentation of overlapping cells in histopathology specimens using parallel seed detection and repulsive level set” *Biomed. Eng. IEEE Trans. On* 59(3): 754–765, 2012.
46. GM Faustino, M Gattass, CJP de Lucena, PB Campos, SK Rehen, “A graph–mining algorithm for automatic detection and counting of embryonic stem cells in fluorescence microscopy images“, *Integrated Computer Aided Engineering* 18: 91–106, 2011 DOI: 10.3233/ICA20110359.
47. S Wienert, D Heim, K Saeger, A Stenzinger, M Beil, P Hufnagl, M Dietel, C Denkert, F Klauschen, “Detection and Segmentation of Cell Nuclei in Virtual Microscopy Images: A Minimum–Model Approach”, *Sci. Rep.*, vol. 2, 2012.
48. MT McCanna, JA Ozoleka, CA Castro, B Parvina, J Kovacevic: „Automated Histology Analysis” *IEEE Signal Processing Magazine* 78, 2015, DOI: 10.1109/MSP.2014.2346443.
49. JL Mueller, ZT Harmany, JK Mito, SA Kennedy, Y Kim, L Dodd, J Geradts, DG Kirsch, RM Willett, JQ Brown, N Ramanujam, “Application to the Detection of Residual Disease in Tumor Margins” *PLOS ONE* 8(6): e66198, 2013, 10.1371/journal.pone.0066198.
50. J Pundavela, S Roselli, S Faulkner, J Attia, RJ Scott, RF Thorne, JF Forbes, RA Bradshaw, MM Walker, P Jobling, H Hondermarck, “Nerve Fibers Infiltrate The Tumor Microenvironment and Are Associated With Nerve Growth Factor Production And Lymph Node Invasion In Breast Cancer“, *Mol Oncol.* 14, 2015, doi: S1574–7891(15)00115–5.
51. L Huang, D Wohlleber, F Reisinger, CN Jenne, R Cheng, Z Abdullah, FA Schildberg, M Odenthal, HP Dienes, N van Rooijen, E Schmitt, N Garbi, M Croft, Ch Kurts, P Kubes, U Protzer, M Heikenwalder, PA Knolle, “Intrahepatic myeloid–cell aggregates enable local proliferation of CD8+ T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection”, *Nature Immunology* 14:574–583, 2013.
52. Y Yagi, M Groher, M Feuerstein, ML Onozato, H Heibel, and N Navab, “Overcoming Challenges in Histology 3D Imaging” , 11th European Congress on Telepathology and 5th International Congress on Virtual Microscopy, 2011.
53. R Maree, B Stevens, L Rollus, N Rocks, X Moles - Lopez, I Salmon, D Cataldo, L Wehenkel "A rich internet application for remote visualization and collaborative annotation of digital slide images in histology and cytology", *Diagnostic Pathology*, 8 (Suppl 1): S26 (Proceedings 12th European Congress on Telepathology and 5th International Congress on Virtual Microscopy), 2013.
54. G Kayser, D Radziszowski, P Bzdyl, R Sommer, K Kayser, “Theory and implementation of an electronic, automated measurement system for images obtained from immunohistochemically stained slides” *Anal Quant Cytol* 28:27–38, 2006.
55. G Kayser, D Radziszowski, P Bzdyl, M Werner, K Kayser, “Eamus – internet based platform for automated quantitative measurements in immunohistochemistry”, *Conf. International Society for Cellular Oncology (ISCO)*, 2005.
56. Intersimone D, Snoj V, Riosa F, Bortolotti N, Sverko S, Beltrami CA, Della Mea V. “Transnational telepathology consultations using a basic digital microscope: experience in the Italy–Slovenia INTERREG project "Patient without borders". *BMC Diagnostic Pathology* 2011; 6(Suppl 1):S25.
57. Yagi Y, Kayser K. Whole slide images–Application in education, research and routine. 24th Congress of Pathology, 2012.
58. Kayser K, Borkenfeld S, Kayser G. Virtual slides in Open Access Publication and Medical Forum. 24th Congress of Pathology, 2012.
59. DJ Foran, L Yang, W Chen, J Hu, LA Goodell, M Reiss, F Wang, T Kurc, T Pan, A Sharma, JH Saltz, “ImageMiner: a software system for comparative analysis of tissue microarrays using content–based image retrieval, high–performance computing, and grid technology”, *Journal of the*

- American Medical Informatics - Association (JAMIA) 18(4): 403–415, 2011, <http://doi.org/10.1136/amiajn-2011-000170>.
60. M Garcia - Rojo, B Blobel, A Laurinavicius, "Perspectives on Digital Pathology. Results of the COST Action IC0604 EURO-TELEPATH", *Studies in Health Technology and Informatics* 179, 2012 IOS Press, Amsterdam.
 61. BL Braunhut, AR Graham, LC Richter, PD Webster, EA Krupinski, AK Bhattacharyya, RS Weinstein, "Fifth generation telepathology systems. Workflow analysis of the robotic dynamic telepathology Component", *Diagnostic Pathology* 2013, 8(Suppl 1):S3, www.diagnosticpathology.org/content/8/S1/S3.
 62. G Lexe, J Monaco, S Doyle, Basavanhally, A Reddy, M Seiler, S Ganesan, G Bhanot, A Madabhushi, "Towards Improved Cancer A Diagnosis and Prognosis Using Analysis of GeneExpression Data and Computer Aided Imaging", *Experimental Biology and Medicine* 234:860–879. 2009.
 63. J Kononen, L Bubendorf, A Kallionimeni, M Bärnlund, P Schraml, S Leighton, J Torhorst, MJ Mihatsch, G Sauter, OP Kallionimeni, „Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens", *Nat Med*;4:844–8477, 1998, doi:10.1038/nm0798-844.
 64. G Bueno, MM Fernández - Carrobes, O Deniz, M Garcia - Rojo. "New Trends of Emerging Technologies in Digital Pathology", *Pathobiology* 83(2–3):61–69, 2016.
 65. R Koprowski, T Bocklitz, "Image Processing in Biomedical Diagnosis"; *Journal of Biophotonics* 9(5): 434–435, 2016, DOI: 10.1002/jbio.20167005.
 66. GB Batchelor, "Machine Vision for Industrial Applications Machine Vision for Industrial Applications", 2012, isbn 978–1–84996–169–1, doi 10.1007/978–1–84996–169–1_1.
 67. Z Swiderska, A Korzynska, T Markiewicz, M Lorent, J Zak, A Wesolowska, L Roszkowiak, J Slodkowska, B Grala, „Comparison of the manual, semiautomatic, and automatic selection and leveling of hot spots in whole slide images for Ki67 quantification in meningiomas." *Analytical cellular pathology* 2015: 1–15: UNSP 498746, DOI:10.1155/2015/498746, 2015.
 68. C López, C Callau, R Bosch, A Korzynska, J Jaén, M García - Rojo, G Bueno, MT Salvadó, T Alvaro, M Onos, MM Fernández–Carrobes, M Llobera, J Baucells, G Orero, MT Lejeune, 2014, "Development of automated quantification methodologies of immunohistochemical markers to determine patterns of immune response in breast cancer: a retrospective cohort study" *BMJ Open* 01/2014; e005643 DOI:10.1136/bmjopen-2014-005643
 69. C Callau, M Lejeune, A Korzynska, M García, G Bueno, RBosch, J Jaén, G Orero, T Salvadó, C López, "Evaluation of cytokeratin–19 in breast cancer tissue samples: a comparison of automatic and manual evaluations of scanned tissue microarray cylinder", *BioMedical Engineering OnLine*, **14** (Suppl 2):S2: 1–15, 2015, doi:10.1186/1475–925X–14–S2–S2.
 70. C Revie, "Color management in Digital Pathology", *Analytical Cellular Pathology*1–2, 2014.
 71. Y Yagi, "Color standardization and optimization in Whole Slide Imaging" *Diagnostic Pathology*, 6(Sup 1): S15, 2011, <http://www.diagnosticpathology.org/content/6/S1/S15>.
 72. PA Bautista, N. Hashimoto, Y Yagi, "Color standardization in whole slide imaging using a color calibration slide", *Pathol Inform* 5(4): 2014.
 73. Y. Murakami, T. Abe, A. Hashiguchi, M. Yamaguchi, A. Saito, M. Sakamoto, "Color correction for automatic fibrosis quantification in liver biopsy specimens", *J Pathol Inform* 4(36): 1–10, 2013.
 74. P. A. Bautista, N. Hashimoto, Y. Yagi, "Color standardization in whole slide imaging using a color calibration slide", *Pathol Inform*;vol 5(4): 2014, DOI: 10.4103/2153–3539.126153.
 75. MM Fernández - Carrobes, G Bueno, O Deniz, "Influence of Texture and Colour in Breast TMA Classification", *PLoS ONE* 10(10):e0141556, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0141556.
 76. F Xinga, L Yanga: „Robust nuclei/cell detection and segmentation for digital Pathology and Microscopic Images: A comprehensive Review" *Review in Biomedical Engineering IEEE*, 2016, ISSN 1937–3333, DOI: 10.1109/RBME.2016.2515127.
 77. J John, MS Nair, PRA Kumar, M. Wilscy, „A novel approach for detection and delineation of cell nuclei using feature similarity index measure", *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 36(1): 76–88, 2015, ISSN 0208–5216, DOI: 10.1016/j.bbe.2015.11.002.
 78. H Irshad, A Veillard, L Roux, D Racoceanu: „Methods for Nuclei Detection, Segmentation, and Classification in Digital Histopathology: A Review - Current Status and Future Potential", *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 7: 97–114, 2014, ISSN 1937–3333, doi: 10.1109/RBME.2013.2295804.

79. RC Gonzalez, RE Woods, "Digital image processing". Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Education, Inc., 2008.
80. C Arteta , V Lempitsky , JA Noble, A Zisserman "Learning to Detect Cells Using Non - overlapping Extremal Regions" Medical Image Computing and Computer - Assisted Intervention MICCAI 2012, Lecture Notes in Computer Science7510: 348–356.
81. J Shu, GE Dolman, J Duan, G Qiu, M Ilyas, "Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers" BioMed Eng OnLine 15:462016 DOI: 10.1186/s12938-016-0161-6.
82. Y Al - Kofahi, W Lassoued, W Lee, B Roysam, "Improved Automatic Detection and Segmentation of Cell Nuclei in Histopathology Images," IEEE Transactions on Biomedical Engineering 57(4): 841–852, 2010, doi:10.1109/TBME.2009.2035102.
83. M Iwanowski, A Korzyńska, "Detection of the area covered by neural stem cells in cultures using textural segmentation and morphological watershed", Computer Recognition Systems 3: 543–557, Advances in intelligent and Soft Computing 57, 2009, DOI: 10.1007/978-3-540-93905-4_64.
84. AE Rizzardi, AT Johnson, RI Vogel, SE Pambuccian, J Henriksen, APN Skubitz, GJ Metzger, SC Schmechel, "Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring"; Diagnostic Pathology 7(42): 2–10 2012, www.diagnosticpathology.org/content/7/1/42.
85. L Pantanowitz; JH Sinar, MD; WH Henricks; LA Fatheree; AB Carter; L Contis; BA Beckwith; AJ Evans; CN Otis; A Lal; AV. Parwani, „Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center”, Arch Pathol Lab Med. 137:1710–1722, 2013; doi:10.5858/arpa.2013-0093-CP.
86. M Iwanowski, "Metody morfologiczne w przetwarzaniu obrazów cyfrowych", AOW EXIT, Warszawa, 2009.
87. M Nieniewski, "Segmentacja obrazów cyfrowych. Metody segmentacji wododziałowej, EXIT, Warszaw, 2005.
88. U Adiga, R Malladi, R Fernandez - Gonzalez, CO de Solorzano, "High-throughput analysis of multispectral images of breast cancer tissue," IEEE Trans. Image Process. (TIP) 15(8): 2259–2268, 2006.
89. P Yan, X Zhou, M Shah, STC. Wong, "Automatic segmentation of high - throughput RNAi fluorescent cellular images," IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed. (TITB) 12(1): 109–117, 2008.
90. U Adiga, B Bell, L Ponomareva, D Taylor, R Saldanha, S Nelson T Lamkin, "Mapping infected cell phenotype," IEEE Trans. Biomed. Eng. (TBME), 59(8): 2362–2371, 2012.
91. N Harder, M Bodnar, R Eils, D Spector, K Rohr, "3d segmentation and quantification of mouse embryonic stem cells in fluorescence microscopy images," IEEE Int. Symp. Biomed. Imag. (ISBI) : 216–219, 2011.
92. M Wang, X Zhou, F Li, J Huckins, RW King, STC Wong, "Novel cell segmentation and online SVM for cell cycle phase identification in automated microscopy," Bioinformatics 24 (1): 94–101, 2008.
93. F Li, X Zhou, J Ma, STC Wong, "Multiple nuclei tracking using integer programming for quantitative cancer cell cycle analysis" IEEE Trans. Med. Imaging (TMI) 2(1): 96–105, 2010.
94. G Lin, U Adiga, K Olson, JF Guzowski, CA Barnes, B Roysam, "A hybrid 3d watershed algorithm incorporating gradientcues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks," Cytometry Part A, 56A(1): 23–36, 2003.
95. C Park, JZ Huang, JX Ji, Y Ding, "Segmentation, inference and classification of partially overlapping nanoparticles," IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. (TPAMI) 35(3): 669–681, 2013.
96. X Yang, H Li, and X Zhou, "Nuclei segmentation using marker-controlled watershed, tracking using mean-shift, and Kalman filter in time - lapse microscopy," IEEE Trans. Circuits Syst. (TCS) 53(11):2405–2414, 2006.
97. M Plissiti and C Nikou, "Overlapping cell nuclei segmentation using a spatially adaptive active physical model," IEEE Trans. ImageProcess. (TIP) 21(11): 4568–4580, 2012.
98. H Masmoudi, SM Hewitt, N Petrick, KJ Myers, MA Gavrielides, "Automated quantitative assessment of her - 2/neu immunohistochemical expression in breast cancer," IEEE Trans. Med. Imaging (TMI) 28(6): 916–925, 2009.

99. C Wahlby, IM Sintorn, F Erlandsson, G Borgefors, E Bengtsson, "Combining intensity, edge and shape information for 2d and 3d segmentation of cell nuclei in tissue sections," *J. Microscopy* 215(1): 67–76, 2004.
100. E Bengtsson, C Wahlby, J Lindblad, "Robust cell image segmentation methods," *Pattern Recog. Image Anal.* 14(2): 157–167, 2004.
101. J Cheng, JC Rajapakse, "Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function," *IEEE Trans. Biomed. Eng. (TBME)* 56(3): 741–748, 2009.
102. C Jung, C Kim, "Segmenting clustered nuclei using h-minima transform-based marker extraction and contour parameterization," *IEEE Trans. Biomed. Eng. (TBME)* 57(10): 2600–2604, 2010.
103. K Mkrtchyan, D Singh, M Liu, V Reddy, A Roy–Chowdhury, M Gopi, "Efficient cell segmentation and tracking of developing plant meristem," *IEEE Int. Conf. Image Process. (ICIP)*: 2165–2168, 2011.
104. A Korzyńska, U Neuman, C Lopez, M Lejeune, R Bosch, "The Method of Immunohistochemical Images Standardization" 2nd Image Processing and Communication, IP&C2010: R.S. Choras (ed.): Image processing & Communications Challenges 2, AISC 84, 2010.
105. W Niblack: "An Introduction to Image Processing". Englewood Cliffs: Prentice–Hall International; 1986. [<http://books.google.pl/books?id=XOxRAAAAMAAJ>].
106. Sauvola J, Pietikainen M, "Adaptive document image binarization", *Pattern Recognit.* 33(2):225–236, 2000. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031320399000552>].
107. White JM, Rohrer GD: Image thresholding for optical character recognition and other applications requiring character image extraction. *IBM J Res.* 27(4):400–411, 1983.
108. J Bernsen, "Dynamic thresholding of gray-level images", *ICPR'86: International Conference on Pattern Recognition*; 1986. [<http://libra.msra.cn/Publication/2042781/dynamic-thresholding-of-gray-level-images>].
109. Y Yasuda, M Dubois, T Huang, "Data compression for check processing machines", *Proc IEEE*, 68(7):874–885, 1980.
110. PW Palumbo, P Swaminathan, SN Srihari, "Document image binarization: evaluation of algorithms". *Proc SPIE Appl Digit Image Process IX*, 697(278):278–285, 1986, doi: 10.1117/12.976229.
111. E Hodneland, N Bukoreshtliev, T Eichler, XC Tai, S Gurke, A Lundervold, H Gerdes, "A unified framework for automated 3-d segmentation of surface-stained living cells and a comprehensive segmentation evaluation," *IEEE Trans. Med. Imaging (TMI)* 28(5): 720–738, 2009.
112. J Quintanilla - Dominguez, B Ojeda - Magaña, MG Cortinav - Januchs, R Ruelas, A Vegav - Corona, D Andina, "Image segmentation by fuzzy and possibilistic clustering algorithms for the identification of microcalcifications", *Scientia Iranica* 18(3): 580–589 2011, ISSN 1026–3098, doi: 10.1016/j.scient.2011.04.009.
113. AC Ruifrok, DA Johnston, "Quantification of histochemical staining by color deconvolution" *Analytical and Quantitative Cytology and Histopathology* 23(4): 291–299, 2001.
114. A Korzynska, M Zdunczuk, "Clustering as a method of image simplification" Pietka, Kawa (Eds): *Inform Tech in Biomed*, ASC 47:365–376, 2008, DOI: 10.1007/978-3-540-68168-7_41.
115. C Lopez, B Tomas, A Korzynska, R Bosch, MT Salvado, M Llobera, M Gracia Rojo, T Alvaro, C Callau, J Jaen, M Lejeune, "Is it necessary to evaluate nuclei in HER2 FISH evaluation?" *American Journal of Clinical Pathology* 139:47–54, 2013, DOI:10.1309/AJCZPPXLYJVG0V8I.
116. M Lejeune, C López, A Korzynska, J Jaén, U Neuman, T Salvadó, L Pons, T Álvaro, X Cugat, J Baucells, R Bosch, "New automated approach for FISH analysis of HER-2 amplification in invasive breast carcinomas", *Virchows Archiv* 457(2): 77, 2010, DOI: 10.1007/s00428-010-0947-z.
117. C López, M Lejeune, A Korzyńska, R Bosch, U Neuman, T Salvadó, N Subirats, E Munoz, LI Pons, T Álvaro, J Jaén, "New methodology to evaluate HER-2 FISH in invasive breast cancer" *Virchows Archiv* 457(2): 177–178, 2010, DOI: 10.1007/s00428-010-0947-z.
118. H Zhang, JE Fritts, SA. Goldman, "Image Segmentation Evaluation: A Survey of Unsupervised Methods" *Computer Vision And Image Understanding*, doi: 10.1016/j.cviu.2007.08.003.
119. H Zhang, J Fritts, S Goldman, "A co-evaluation framework for improving segmentation evaluation," *Proc. SPIE– Defense and Security, Signal Processing, Sensor Fusion, Target Recognition XIV*, 2005.
120. P Brodatz, "Textures, a photographic album for artistes and designers" Dover, New York, 1966.

121. D Martin, C Fowlkes, D Tal, J Malik, "A database of human segmented natural images and its application to evaluating segmentation algorithms and measuring ecological statistics," Proc. 8th Intl Conf. Computer Vision 2: 416C423, 2001.
122. Military Graphics Collection, <http://www.locked.de/en/index.html>.
123. Base of 300 synthetic images, <http://www.ensibourges.fr/LVR/SIV/interpretation/evaluation/>.
124. L Roux, D Racoceanu, N Lomenie, M Kulikova, H Irshad, J Klossa, F Capron, C Genestie, GL Naour, MN Gurcan, "Mitosis detection in breast cancer histological images an icpr 2012 contest," J. Pathol. Inform. (JPI) 4(1): 1–8, 2013.
125. M Maška, V Ulman, D Svoboda, P Matula, P Matula, C Ederra, A Urbiola, T España, S Venkatesan, DM Balak, P Karas, T Bolcková, M Streitová, C Carthel, S Coraluppi, N Harder, K Rohr, KE Magnusson, J Jaldén, HM Blau, O Dzyubachyk, P Křížek, GM Hagen, D Pastor-Escuredo, D Jimenez-Carretero, MJ Ledesma-Carbayo, A Muñoz-Barrutia, E Meijering, M Kozubek, C, Ortiz-de-Solorzano "A benchmark for comparison of cell tracking algorithms," Bioinformatics 30(11): 1609 – 1617, 2014.
126. M Veta et al., "Assessment of algorithms for mitosis detection in breast cancer histopathology images," Med. Image Anal. (MedIA) 20(1): 237–248, 2015.
127. AMIDA, MICCAI 2013 Grand Challenge, 2013, <http://amida13.isi.uu.nl/>.
128. ED Gelasca, B Obara, D Fedorov, K Kvilekval, B Manjunath, "A biosegmentation benchmark for evaluation of bioimage analysis methods," BMC Bioinformatics 10(368): 1–12, 2009.
129. LP Coelho, A Shariff, RF Murphy, "Nuclear segmentation in microscope cell images: A hand-segmented dataset and comparison of algorithms," IEEE Int. Symp. Biomed. Imag. (ISBI): 518–521, 2009.
130. MC Shin, DB Goldgof, KW Bowyer, "Comparison of Edge Detector Performance Through Use in an Object Recognition Task" Computer Vision and Image Understanding 84(1), 2001.
131. A Korzyńska, "Image Processing Analysis as a Support Tool for the Living Cell Investigation" 104th ICB Seminar; 10th Polish – Japanese Seminar on New Trends in Biomedical and Clinical Engineering, 2009, Lecture Notes of the ICB Seminar: 31 -.Lecture Notes of the ICB Seminar 84.
132. Y Zhang, "A survey on evaluation methods for image segmentation," Pattern Recognition 29(8): 1335–1346, 1996.
133. JS Cardoso, L Corte-Real, "Toward a Generic Evaluation of Image Segmentation", IEEE Trans. on Image Processing 14(11), 2005.
134. L Yang, F Albrechtsen, T Lonnestad, P Grottum, "A supervised approach to the evaluation of image segmentation methods," Computer Analysis of Images and Patterns: 759–765, 1995.
135. S Chabrier, H Laurent, B Emile, C Rosenburger, P Marche, "A comparative study of supervised evaluation criteria for image segmentation," EUSIPCO: 1143C1146, 2004.
136. P Correia, F Pereira, "Objective evaluation of relative segmentation quality," ICIP00, I: 308–311, 2000.
137. Y Lim, S Lee, "On the color image segmentation algorithms based on the thresholding and fuzzy c-means techniques," Pattern Recognition 23: 935–952, 1990.
138. M Van Droogenbroeck, O Barnich, "Design of Statistical Measures for the Assessment of Image Segmentation Schemes", Proc. of International Conference on Computer Analysis of Images and Patterns, 2005(280).
139. M Everingham, H Muller, B Thomas, "Evaluating image segmentation algorithms using the pareto front, medical images," International Journal of Signal Processing 1(2), 2004.
140. R Unnikrishnan, C Pantofaru, M Hebert, "A Measure for Objective Evaluation of Image Segmentation Algorithms", Empirical Evaluation Methods in Computer Vision: 34–34, 2005.
141. CE Erdem, B Sanker, AM Tekalp, "Performance measures for video object segmentation and tracking" IEEE Trans. on Image Processing 13: 937–951, 2004.
142. J. Liu and Y.-H. Yang, "Multi-resolution color image segmentation," IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 16, no. 7, pp. 689C700, July 1994.
143. C. Rosenberger and K. Chehdi, "Genetic fusion: Application to multicomponents image segmentation," in Proc. ICASSP-4, 2000.
144. S. Chabrier, B. Emile, H. Laurent, C. Rosenberger, and P. Marche, "Unsupervised evaluation of image segmentation application to multispectral images," Proc. of the 17th international conference on pattern recognition, 2004.
145. H-C Chen, S-J Wang, "The use of visible color difference in the quantitative evaluation of color image segmentation," Proc. ICASSP, 2004.

- 146.H Zhang, J Fritts, S Goldman, "An entropy-based objective evaluation method for image segmentation" Proc. SPIE - Storage and Retrieval Methods and Applications for Multimedia, 2004.
- 147.ED Gelasca, T Ebrahimi, M Farias, M Carli, S Mitra, "Towards perceptually driven segmentation evaluation metrics" Proc. of Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshop (CVPRW04) 4, 2004.
- 148.MC Shin, DB Goldgof, KW Bowyer, "Comparison of Edge Detector Performance Through Use in an Object Recognition Task", Computer Vision and Image Understanding 84(1), 2001.
- 149.AA Dima, JT Elliott, JJ Filliben, M Halter, A Peskin, J Bernal, M Kociolek, MC Brady, HC Tang, AL Plant, "Comparision of segmentation algorithms for Fluorescence Microscopy Images of cells" Citometry Part A 79A:545–559, 2011.
- 150.A Zaritsky, S Natan, J Horev, I Hecht, L Wolf, E Ben-Jacob, I Tsarfaty, "Cell Motility Dynamics: A Novel Segmentation Algorithm to Quantify Multi-Cellular Bright Field Microscopy Images", PLOS ONE 6(11): e 27593, 2011, doi 10.1371/journal.pone.0027593.
- 151.J Weszka, A Rosenfeld, "Threshold evaluation techniques," IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics 8(8): 622–629, 1978.
- 152.A Lehmussola, P Ruusuvoori, J Selinummi, H Huttunen, O Yli-Harja, "Computational framework for simulating fluorescence microscope images with cell populations", Med Imaging, IEEE Trans 26(7): 1010–1016, 2007.
- 153.M Van Droogenbroeck, O Barnich, "Design of Statistical Measures for the Assessment of Image Segmentation Schemes", Proc. of International Conference on Computer Analysis of Images and Patterns, 2005(280).
- 154.R Unnikrishnan, C Pantofaru, M Hebert, "A Measure for Objective Evaluation of Image Segmentation Algorithms", Empirical Evaluation Methods in Computer Vision: 34–34, 2005.
- 155.M Everingham, H Muller, B Thomas, "Evaluating image segmentation algorithms using the pareto front", Proceedings of the 7th European Conference on Computer Vision: 34–48, 2002.
- 156.http://www.color.org/groups/medical/medical_imaging_wg.xalter (1/08/2016).
- 157.A Lehmussola, P Ruusuvoori, J Selinummi, T Rajala, O Yli-Harja, "Synthetic images of high-throughput microscopy for validation of image analysis methods", *Proc IEEE* 2008, 96(8):1348–1360.
- 158.WC Revie, M Shires, P Jackson, D Brettle R Cochrane, D Treanor, "Color management in digital pathology" Analytical Cellular Pathology 2014, ID 652757.
- 159.Y Yagi, "Color Standarization and optimization in Whole Slide Imaging", Diagnostic Pathology, 6(suppl1):s15: 1–12, 2011.
- 160.Y Murakami, T Abe, A Hashiguchi, M Yamaguchi, A Saito, MSakamoto, " Color correction for automatic fibrosis quantification in liver biopsy specimens", *J Pathol Inform* 2013, 4(36): 1–10
- 161.WC Revie, "Color management in Digital Pathology", Analytical Cellular Pathology, 652757:1–2, 2014.
- 162.PA Bautista, N Hashimoto, Y Yagi, "Color standardization in whole slide imaging using a color calibration slide", *Pathol Inform* 5(4): 201.
- 163.EePing Ong, Weisi Lin, Zhongkang Lu, Xiaokang Yang, Susu Yao, Feng Pan, Lijun Jiang and Fulvio Moschetti,"A No-Reference Quality Metric For Measuring Image Blur" Signal Processing and Its Applications. Proceedings. Seventh International Symposium; (1): 469–472, 2003 ISBN: 0–7803–7946, DOI: 10.1109/ISSPA.2003.1224741.
- 164.K Malik, B Smolka, "Modified Bilateral Filter for the Restoration of Noisy Color Images", Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems; 2012.
- 165.B Smolka, D Kusnik, "Robust local similarity filter for the reduction of mixed Gaussian and impulsive noise in color digital images", *Signal Image and Video Processing* 9(1):49–56, 2015.
- 166.Z Wang, AC Bovik, HR Sheikh, EP Simoncelli, "Image Qualifty Assessment: From Error Visibility to Structural Similarity", *IEEE Transactions on Image Processing* 13(4): 600–612.
- 167.A. Korzynska, L. Roszkowiak, J. Zak, D. Pijanowska "Software framework for validation of segmentation results (VoS)", 147 ICB Seminar 10–th Statistics And Clinical Practice, 2016.
- 168.A Korzyńska, M Zychowicz, "A method of estimation of the Cell Doubling time on Basis of the Cell culture Monitoring Data", *Biocybernetics & Biomedical Engineering* 28(4):75–82, 2008.
- 169.S Kiranyaz, T Ince, J Pulkkinen, M Gabbouj, J Ärje, S Kärkkäinen, V Tirronen, M Juhola, T Turpeinen, K Meissner, „Classification and retrieval on macroinvertebrate image databases" *Comput Biol Med.* 41(7):463–72, 2011, doi: 10.1016/j.compbimed.2011.04.008.

170. GM Faustino, M Gattass, CJP de Lucena, PB Campos, SK Rehen, "A graph-mining algorithm for automatic detection and counting of embryonic stem cells in fluorescence microscopy images", *Integrated Computer Aided Engineering* 18: 91–106, 2011, DOI: 10.3233/ICA20110359.
171. G Faustino, M Gattass, PCP Carvalho, S Rehen CJP de Lucena; "Automatic Embryonic Stem Cells Detection and Counting in Fluorescence Microscopy Images"; *Monografias em Ciência da Computação* 04/09.
172. KA Selz "A Third Measure–Metastable State in the Dynamics of Spontaneous Shape Change in Healthy Human's White Cells", *PLoS Comput Biol* 7(4): e1001117, 2011, doi: 10.1371/journal.pcbi.1001117.
173. D Daunoravicius, J Besusparis, E Zurauskas, A Laurinaviciene, D Bironaite, S Pankuweit, B Plancoulaine, P Herlin, J Bogomolovas, V Grabauskiene, A Laurinavicius; „Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology”; *Diagnostic Pathology* 9:114, 2014.
174. AA Dima, JT Elliott, JJ Filliben, M Halter, A Peskin, J Bernal, M Kociolek, MC Brady, HC Tang AL Plant; "Comparison of segmentation algorithms for fluorescence microscopy images of cells" *Cytometry Part A* 79A(7): 545–559, 2011; DOI: 10.1002/cyto.a.21079.
175. J Stegmaier, JC Otte, A Kobitski, A Bartschat, A Garcia, GU Nienhaus, U Strahle, R Mikut, "Fast Segmentation of Stained Nuclei in Terabyte–Scale, Time Resolved 3D Microscopy Image Stacks" *PLoS ONE* 9(2): e90036, 2014, doi:10.1371/journal.pone.0090036.
176. T Zhang, W Jia, Y Zhu, J Yang, "Automatic tracking of neural stem cells in sequential digital images", *Biocybernetics And Biomedical Engineering* 36(1): 66–75, 2016.
177. Z Vojdani, A Babaei, A Vasaghi, M Habibagahi, T Talaei–Khozani, "The effect of amniotic membrane extract on umbilical cord blood mesenchymal stem cell expansion: is there any need to save the amniotic membrane besides the umbilical cord blood?" *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1): 89–96.
178. U Adiga, L Ponomareva, B Bell, S Nelson, S Kanzleman, D Taylor, HM Jackson, Ryan Kramer "Automated Analysis and Classification of Infected Macrophages Using Bright–Field Amplitude Contrast Data", *Air Force Research Laboratory Raport AFRL–RH–WP–TR–2012–0170*.
179. A Rogalska, A Marczak, A Gajek, M Szwed, A Śliwińska, J Drzewoski, Z Józwiak, „Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B", *Toxicol In Vitro* 27(1):239–49, 2012/2013, doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.006.