



การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการนับเซลล์ที่ตาย
Development of dead cells counting software

ฟาติม๊ะ รอหีม
Fatima Roheem

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biomedical Engineering
Prince of Songkla University

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการนับเซลล์ที่ตาย
ผู้เขียน นางผาติมา รอหิม
สาขาวิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.สุรพงษ์ ชาทิพันธุ์)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิมพันธุ์ เจริญพงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรชัย พงษ์ภัทรานนท์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรชัย พงษ์ภัทรานนท์)

.....กรรมการ
(ดร.สุรพงษ์ ชาทิพันธุ์)

.....กรรมการ
(ดร.กัญญ์ณัช กนกวิรุฬห์)

.....กรรมการ
(ดร.วฤทธิ์ วิชกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางผาติมะ รอหีม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางผาติมา รอหีม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการนับเซลล์ที่ตาย
ผู้เขียน	ผาติมีะ ร่อหีม
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวการแพทย์
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

การคิดค้นและการพัฒนารักษาโรคมะเร็งจะมีการศึกษาผลของยาหรือฤทธิ์ของยาด้วยการทดสอบกับเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง เทคนิคหรือวิธีการที่ยังคงนิยมใช้ในปัจจุบันในการศึกษาการตายของเซลล์จะใช้วิธีการย้อมสีทริปแทนบลู (Trypan blue dye) เพื่อดูการติดสีของเซลล์มะเร็งโดยนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญด้านนี้ด้วยการดูผลผ่านกล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ซึ่งการนับดังกล่าวจะต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญหรือมีประสบการณ์ในการนับและใช้เวลา และไม่สามารถนำผลการนับเซลล์กลับมาดูภายหลังได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อทำการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย โดยทำการพัฒนาและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อทำการวิเคราะห์ภาพถ่ายของเซลล์หลังจากการย้อมสีโดยอาศัยเทคนิคการประมวลผลภาพ การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 5 ขั้นตอนได้แก่ 1) การเตรียมภาพถ่ายของเซลล์ที่ทำกรย้อมสีแล้ว 2) การแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังของภาพ 3) การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ 4) การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย 5) การสร้างกราฟฟิคเพื่อการใช้งาน ซึ่งขั้นตอนการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังของภาพเพื่อทำการแยกข้อมูลออกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิคการจัดกลุ่มแบบ K-mean (K-mean clustering) ผลการนับจำนวนเซลล์จำนวน 20 รูปภาพ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนานี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการนับจำนวนเซลล์จากผู้เชี่ยวชาญพบว่าเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าความถูกต้องเฉลี่ย 86.94% และเซลล์ที่ตายมีค่าความถูกต้องเฉลี่ย 70.34% ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายยังมีความผิดพลาดในการนับ จึงได้เพิ่มความสามารถของโปรแกรมโดยสามารถระบุเซลล์จากผู้ใช้ได้เองหากโปรแกรมแสดงการนับที่ไม่ถูกต้อง แม้ผลการนับจำนวนเซลล์มีค่าความถูกต้องที่ไม่สูงมากนักแต่โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนานี้จะเพิ่มความสะดวกและความรวดเร็วในการนับเซลล์ให้กับผู้ทำการวินิจฉัย

คำสำคัญ: โปรแกรมคอมพิวเตอร์, การนับเซลล์, K-mean

Tsis Title	Development of dead cells counting software
Author	Miss Fatima Roheem
Major Program	Biomedical Engineering
Academic Year	2013

ABSTRACT

The discovery and the development of cancer treatment drugs normally focus on the effects of drugs on the cancer cells in vitro. The process or technique to identify the dead cells after using cancer treatment drug is Trypan blue dye exclusion. The conventional method used to evaluate the killing effect of drug is to count the number of living cells and dead cells by the experts. However, this conventional method is tedious and time-consuming. Therefore, this study aimed to develop a computer program that counts a number of living cells and dead cells by using image processing. There are five steps in this work to achieve the aim: 1) Image preprocessing, 2) Cell extraction from a background, 3) Noise reduction, 4) Cell counting and 5) Graphic user interface (GUI) implementation. K-Mean clustering was applied to distinguish the group of data of living cells and dead cells which is an important step in cell extraction. The results of cell counting from 20 image was then compared with the expert. It showed that the accuracies of counting were 86.94% and 70.34% for living cells and dead cells, respectively. This program has increased the ability of the program can be used to identify cells from the program count incorrect. Although this developed software did not provide a high accuracy for counting, it is still convenient and helpful for the researchers in a biomedical field.

Keywords-Computer-assisted program, Cell counting, K-mean

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 การตรวจสอบเอกสาร	2
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	11
1.6 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	11
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
2. ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โรคมะเร็งและเซลล์มะเร็ง	13
2.2 การตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)	15
2.3 การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็ง	16
2.4 การย้อมสีเซลล์ (Trypan blue dye exclusion stain)	17
2.5 การได้มาของภาพดิจิทัล	17
2.6 ระบบสี Color Model	18
2.7 การนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemocytometers	22
2.8 การประมวลผลภาพ (Image Processing) และ ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการประมวลผลภาพดิจิทัล	22
2.9 การแบ่งส่วนของภาพ(Image Segmentation)	25
2.10 การสร้างส่วนที่ติดต่อกับผู้ใช้งาน (Graphic User Interface : GUI)	30
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 การเตรียมความพร้อมของภาพที่ย้อมสีเซลล์แล้ว (Preprocessing)	32
3.2 การแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง (Segmentation)	33
3.3 การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ (Noise Reduction)	37
3.4 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย (Cell Count)	40
3.5 การสร้างกราฟฟิกเพื่อการใช้งาน (Graphic User Interface: GUI)	44
4. ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 ผลการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง โดยใช้ K-Mean	49
4.2 ผลของการกำจัดสิ่งรบกวน โดยใช้ Morphological	51

สารบัญ(ต่อ)	หน้า
4.3 ผลของการนับเซลล์โดยการใช้การระบุตัวตนของเซลล์ หรือ Hough Transform	52
4.4 ผลการเปรียบเทียบการนับเซลล์ระหว่างโปรแกรมกับผู้เชี่ยวชาญ	53
4.5 สรุปผลการทดลอง	56
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการพัฒนาและการทดสอบโปรแกรมช่วยนับเซลล์	59
5.2 ปัญหาและข้อจำกัดของโปรแกรมช่วยนับเซลล์	60
5.3 ข้อเสนอแนะในการพัฒนาโปรแกรมช่วยนับเซลล์	61
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก ก คู่มือการใช้งาน	67
ภาคผนวก ข ผลการแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง	72
ภาคผนวก ค ผลการกำจัดสัญญาณรบกวน	79
ภาคผนวก ง ผลการระบุตัวตนของเซลล์	86
ภาคผนวก จ คำสั่งที่ใช้ในการประมวลผลรูปภาพ	92
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลการเผยแพร่วิทยานิพนธ์	106
ประวัติผู้เขียน	111

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 ตัวอย่างผลการแยกเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตาย ออกจากพื้นหลังของภาพ	50
4.2 ตัวอย่างผลการกำจัดสัญญาณรบกวน	51
4.3 ตัวอย่างผลการระบุตัวตนของเซลล์	52
4.4 ผลการเปรียบเทียบจากผู้เชี่ยวชาญ	54
4.5 ค่าความถูกต้องในการนับเซลล์เพื่อเปรียบเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ	55

รายการประกอบภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 ภาพตัวอย่างจากการทดสอบ Trypan blue dye exclusion stain	3
1.2 ความแตกต่างของระดับความเข้มสี	4
1.3 ตัวอย่างของข้อมูลการแบ่งกลุ่มข้อมูลแบบ Hierarchical clustering	5
1.4 ภาพของการใช้ Opening	6
1.5 ภาพของการใช้ Closing	7
1.6 การทำ Average filter	8
1.7 ภาพของการกำจัดสัญญาณรบกวน	8
2.1 โรคมะเร็งบนร่างกายมนุษย์	13
2.2 เซลล์มะเร็งและการกำเนิดโรคของมะเร็ง	15
2.3 รูปร่างของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส	16
2.4 ขั้นตอนการได้มาของภาพดิจิทัล	18
2.5 ภาพดิจิทัลที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย	18
2.6 ภาพ model RGB	19
2.7 ภาพ model CMYK	20
2.8 สีในโหมด HSB	21
2.9 สีในโหมด LAB	21
2.10 Hemocytometer grid	22
2.11 การแปลงภาพอนาล็อกให้เป็นภาพดิจิทัล	23
2.12 ภาพแบบ Binary หรือภาพขาวดำ	24
2.13 ภาพแบบ Grayscale หรือ ภาพระดับเทา	24
2.14 ภาพแบบ RGB	25
2.15 ภาพแบบ Indexed	25
2.16 ความแตกต่างบริเวณรอยต่อและความเหมือนของพิกเซลของพื้นที่ภายใน	26
2.17 การแยกองค์ประกอบของสีตามพิกเซล	27
2.18 กระบวนการของ K-mean clustering	28
2.19 กลุ่มข้อมูลโดยใช้ K-mean clustering	28
2.20 ผลที่ได้จากการทำ Hough Transform	29
2.21 ตัวอย่างของหน้าจอ GUI	30
2.22 ตัวอย่าง dialog box ในลักษณะ GUI	30
3.1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	31
3.2 ภาพของเซลล์มะเร็งที่ผ่านการย้อมสีแล้ว	32
3.3 แสดงการปรับขนาดของรูปภาพ	33
3.4 ขั้นตอนกระบวนการ K-mean clustering	34
3.5 ผลการทำการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค K-mean clustering	35

ภาพประกอบ(ต่อ)	หน้า
3.6 ผลการทำการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค K-mean clustering	36
3.7 การจัดกลุ่มของข้อมูลทั้ง 4 กลุ่มข้อมูล	37
3.8 ขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน	38
3.9 ตัวอย่างการกำจัดสัญญาณรบกวนในรูปภาพ	40
3.10 ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย	39
3.11 กระบวนการในการแยกลักษณะเซลล์เพื่อการนับเซลล์	41
3.12 ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	42
3.13 ขั้นตอนการนับเซลล์ที่ตาย	43
3.14 แนวคิดโครงสร้างการทำงานของ GUI	44
3.15 หน้าต่างแสดงรูปภาพต้นฉบับที่เปิดมาจาก GUI ที่ได้ออกแบบไว้	45
3.16 หน้าต่างในการแสดงผลการนับ	46
3.17 หน้าต่างแก้ไขจำนวนเซลล์	46
4.1 รูปภาพที่บันทึกได้หลังจากการทำย้อมสีเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะเป็นวงกลมและสว่าง	47
4.2 ภาพแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมที่ใช้ในการนับเซลล์	48
4.3 รูปภาพที่นำเข้าสู่โปรแกรมก่อนการทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ออก	48
4.4 รูปภาพที่จะทำการวิเคราะห์หลังทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก	49
4.5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ตายระหว่างผู้เชี่ยวชาญกับโปรแกรม	55
4.6 ผลการเปรียบเทียบระหว่างโปรแกรมกับผู้เชี่ยวชาญของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคมะเร็งเป็นโรคที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในปัจจุบันทั้งประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งประชาชนขาดความเอาใจใส่ต่อสุขภาพตนเอง ขาดการออกกำลังกาย รับประทานอาหารไม่เลือก และมีสภาวะแวดล้อมที่มีมลภาวะ เหล่านี้เป็นสาเหตุให้มะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งถ้าผู้ป่วยมีการตรวจพบและรักษาได้ทันที่ก็มีโอกาสที่จะรักษาหาย ในทางการแพทย์เมื่อทำการรักษาโรคมะเร็งจะมีการศึกษาผลของยาที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมถึงการศึกษาผลของยีนก่อมะเร็ง (Oncogene) และยีนยับยั้งมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ที่มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยผ่านกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ซึ่งเป็นโปรแกรมการตายของเซลล์อย่างมีแบบแผน (Program cell death) หากกระบวนการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นน้อยเกินไป จะทำให้เกิดความผิดปกติที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งขึ้น [1-3] ในการศึกษาดังกล่าวนี้นิยมใช้เทคนิค Trypan blue dye exclusion stain โดยใช้หลักการย้อมสีเซลล์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิต (Living cells) และเซลล์ที่ตาย (Dead cell) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ทึบอยู่ทำให้สีไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ ส่วนเซลล์ที่ตายจะถูกย้อมติดสีน้ำเงินเนื่องจากสีสามารถผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ได้เนื่องจากผนังเซลล์มีการถูกทำลายจากยา แต่ทั้งนี้ในขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์แยกระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายจะต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทดลองทั้งเรื่องการย้อมสีเซลล์และการนับ โดยการนับจะดูด้วยตาเปล่าผ่านกล้องจุลทรรศน์จึงเป็นกระบวนการที่ขึ้นกับประสบการณ์ ต้องใช้เวลาในการนับและต้องทำทันทีที่ไม่สามารถนำกลับมาดูซ้ำได้อีก อีกทั้งผู้เชี่ยวชาญเองอาจเกิดอาการล้าได้ หากจำเป็นต้องวิเคราะห์ภาพเป็นเวลาดูติดต่อกันเป็นเวลานาน จึงไม่สะดวกในการทำงานและอาจเกิดการผิดพลาดเนื่องจากผู้นับได้อีกด้วย

ในปัจจุบัน เทคนิคทางการประมวลผลภาพ (Image processing) เป็นเทคนิคที่มีความก้าวหน้า สามารถประมวลผลได้เร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำที่สูงขึ้น การประมวลผลภาพเป็นการนำภาพมาประมวลผลหรือคิดคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เรากำลังต้องการทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ที่สำคัญ คือ การทำให้ภาพมีความคมชัดมากขึ้น การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ การแบ่งส่วนของวัตถุที่เราสนใจออกมาจากภาพ เพื่อนำภาพวัตถุที่ได้ไปวิเคราะห์หาข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น ขนาด รูปร่าง และทิศทางการเคลื่อนของวัตถุในภาพ นอกจากนี้ข้อมูลเชิงปริมาณเหล่านี้สามารถนำไปวิเคราะห์ และสร้างเป็นระบบ เพื่อใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่น ระบบคัดแยกเกรดหรือคุณภาพของพืชผลทางการเกษตร ระบบการอ่านป้ายทะเบียนรถ ระบบการจดจำใบหน้า การตรวจลายนิ้วมือโดยใช้ ระบบสแกนลายนิ้วมือ เป็นต้น จะเห็นได้ว่าระบบเหล่านี้จำเป็นต้องมีการประมวลผลภาพจำนวนมาก และเป็นกระบวนการที่ต้องทำซ้ำ ๆ กันในรูปแบบเดิมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งงานในลักษณะเหล่านี้ หากให้มนุษย์วิเคราะห์เองมักต้องใช้เวลาและใช้แรงงานสูง อีกทั้งหากจำเป็นต้องวิเคราะห์ภาพเป็นจำนวนมาก ผู้วิเคราะห์ภาพอาจเกิดอาการล้า ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดขึ้นได้ ดังนั้นคอมพิวเตอร์จึงมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เหล่านี้แทนมนุษย์ อีกทั้งเป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่าคอมพิวเตอร์มีความสามารถในการคำนวณและ

ประมวลผลข้อมูลจำนวนมหาศาลได้ในเวลาอันสั้น จึงมีประโยชน์อย่างมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการประมวลผลภาพและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากภาพในระบบต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น

ดังนั้นในการศึกษาประสิทธิภาพของยาที่มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งหากสามารถทำการถ่ายภาพของเซลล์หลังจากการย้อมสีแล้ว และนำภาพเหล่านี้มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการประมวลผลภาพร่วมกับการเขียนโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์จะทำให้ผู้ทดลองสะดวก สามารถเรียกดูภายหลังได้ และอีกทั้งสามารถทำงานอื่นได้ในขณะที่ให้โปรแกรมประมวลผล จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและเป็นที่มาของการวิจัยนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาเทคนิคการประมวลผลภาพร่วมกับการเขียนอัลกอริทึมทางคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการจำแนกเซลล์และนับจำนวนเซลล์

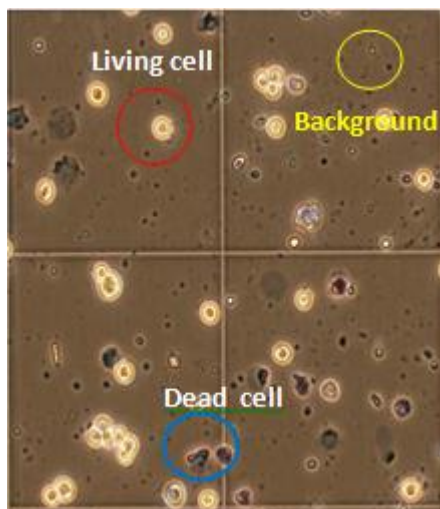
1.2.2 เพื่อพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับใช้ในการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

1.3 การตรวจสอบเอกสาร

การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการการศึกษาผลของยาที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง [2]จะมีสิ่งที่เกี่ยวข้องหลักคือ รูปภาพที่ใช้ในการประมวลผล เทคนิคที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มข้อมูลในรูปภาพ การกำจัดสิ่งรบกวนออกจากภาพ และการนับจำนวนเซลล์ ในแต่ละส่วนจะต้องมีความรู้และความเข้าใจในทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง สามารถอธิบายดังต่อไปนี้

1.3.1 รูปภาพ

ภาพที่ใช้ในการประมวลผลเป็นภาพที่ผ่านเทคนิค Trypan blue dye exclusion stain คือการย้อมสีเซลล์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย[2-5] เป็นภาพสีที่อยู่ในโหมด RGB หรือ additive color model [6, 7] เป็นรูปที่เก็บโดยใช้อาร์เรย์ 3 มิติ ขนาด $m \times n \times 3$ โดยที่ m คือความยาว และ n คือความกว้างของภาพในหน่วยจุดภาพ(pixel) ส่วนมิติสุดท้ายนั้น ในแต่ละมิติจะเก็บค่าสีแยกกัน คือสีแดง (Red) สีเขียว (Green) และสีน้ำเงิน (Blue) ประเภทของไฟล์รูปภาพที่สามารถนำมาประมวลผลได้แก่ TIFF JPG และ PNG



รูปที่ 1.1 ภาพตัวอย่างจากการทดสอบ Trypan blue dye exclusion stain

จากรูปที่ 1.1 แสดงภาพที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion stain โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ทึบอยู่ทำให้สีไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ ส่วนเซลล์ที่ตายจะถูกย้อมติดสีน้ำเงินเนื่องจากสีสามารถผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ ในภาพจะถูกวงกลมด้วยเส้นสีแดงและสีน้ำเงินตามลำดับ

รูปแบบไฟล์ของภาพ (Formats of image)

GIF (Graphics Interchange Format) เป็นไฟล์ที่รองรับสี 256 สี นิยมนำไปใช้กับการแสดงผลบนอินเทอร์เน็ต เหมาะกับงานที่มีรายละเอียดของสีน้อยๆ เช่น การ์ตูน หรือโลโก้ และยังสามารถสร้างภาพเคลื่อนไหว และภาพที่มีสีพื้นหลังโปร่งใสได้

JPG (Joint Photographics Experts Group) เป็นไฟล์ที่นิยมใช้กับการแสดงผลบนอินเทอร์เน็ต เนื่องจากเป็นไฟล์ที่สามารถบีบอัดให้เล็กลงได้มาก แสดงผลรวดเร็ว คุณภาพของรูปภาพต่ำ ความละเอียดของภาพน้อย ไม่เหมาะกับงานสื่อสิ่งพิมพ์

TIFF (Tagged Image File Format) เป็นไฟล์ที่นิยมใช้ในการโอนถ่ายข้อมูลข้ามโปรแกรม เป็นไฟล์ที่นิยมใช้สำหรับส่งงานเข้าโรงพิมพ์ เนื่องจากเป็นไฟล์ที่รองรับโหมดสี CMYK และเป็นไฟล์ที่สามารถเก็บคุณสมบัติต่างๆ ได้เหมือนต้นฉบับทุกประการ

BMP (Bitmap) เป็นไฟล์ภาพประเภทที่เก็บจุดของภาพแบบจุดต่อจุดจริงๆ ซึ่งจะมีขนาดใหญ่ แต่สามารถเก็บรายละเอียดของภาพได้อย่างสมบูรณ์

PNG (Portable Network Graphics) เป็นภาพที่เกิดจากการนำเอาคุณสมบัติของภาพ JPG และ GIF มาผสมผสานกันให้ได้ลักษณะเฉพาะสีมากกว่า 256 สีและโปร่งใสได้

1.3.2 เทคนิคที่ใช้ในการแบ่งส่วนรูปภาพ (Image Segmentation)[8]

ในกระบวนการนับเซลล์จะต้องมีการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังของรูปภาพ และแยกชนิดของเซลล์ระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย จึงต้องมีวิธีการในการแยกเซลล์ออกจากกัน

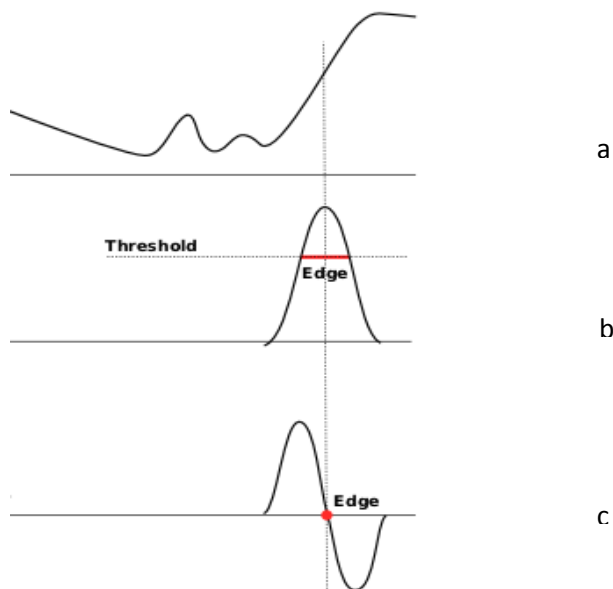
การทำ Segmentation จะทำให้สามารถแยกข้อมูลภาพของส่วนที่ต้องการออกมาได้ วิธีการพื้นฐานสำหรับการ Segmentation คือการพิจารณา Image amplitude ได้แก่การพิจารณาความสว่างของภาพสำหรับภาพแบบ Gray scale และความแตกต่างของสีสำหรับภาพสี นอกจากนี้ขอบของภาพและลักษณะของ Texture ก็เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่จะทำให้สามารถทำการ Segmentation ได้สะดวกยิ่งขึ้น

1.3.2.1 การแบ่งส่วนบนพื้นฐานของการตรวจจับขอบ

การ Segmentation ภาพออกไปเป็นกลุ่มต่าง ๆ (Region) สามารถทำได้โดยการค้นหาขอบของวัตถุของแต่ละกลุ่ม การหาขอบสามารถหาได้โดยการใช้คำสั่งหรืออัลกอริทึมที่เกี่ยวกับการตรวจจับขอบ (Edge detection) โดยการตรวจสอบว่าเส้นขอบลากผ่านหรือใกล้เคียงกับจุดใด โดยวัดจากการเปลี่ยนแปลงของความเข้มในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับจุดดังกล่าว ซึ่งวิธีการหาขอบนั้นมีด้วยกันหลายวิธี แต่อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ Gradient method และ Laplacian method

Gradient method เป็นวิธีหาขอบโดยการหาจุดต่ำสุดและจุดสูงสุดในรูปของอนุพันธ์อันดับหนึ่งของภาพ โดยจุดที่เป็นขอบจะอยู่ในส่วนที่เหนือค่า threshold ดังแสดงในรูปที่ 1.2b จึงอาจทำให้เส้นขอบที่ได้มีลักษณะหนา ตัวอย่างวิธีการหาขอบของกลุ่มนี้ เช่น Roberts, Prewitt, Sobel และ Canny เป็นต้น

Laplacian method เป็นวิธีหาขอบโดยใช้อนุพันธ์อันดับ 2 โดยใช้จุดที่ค่า y เป็น 0 (Zerocrossing) ดังแสดงในรูปที่ 1.2c ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการคำนวณมากกว่า Gradient method ตัวอย่างวิธีการหาขอบของกลุ่มนี้ เช่น Laplacian of Gaussian และ Marrs-Hildreth เป็นต้น



รูปที่ 1.2 a) ความแตกต่างของระดับความเข้มของสี และกราฟแสดงการหาขอบด้วยวิธี b) Gradient method และ c) Laplacian method

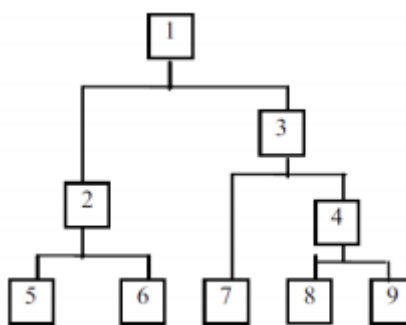
1.3.2.2 การแบ่งส่วนบนพื้นฐานของการจัดกลุ่มข้อมูล

เป็นวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยจะแบ่งชุดข้อมูล ออกเป็นกลุ่ม (Cluster) นำข้อมูลที่มีคุณลักษณะเหมือนกัน หรือคล้ายกันจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน ขั้นตอนวิธีที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มจะอาศัยความเหมือนที่สามารถแยกเซลล์ออกจากกัน การแบ่งกลุ่มข้อมูลจะแตกต่างจากการแบ่งประเภทข้อมูล (Classification) โดยจะแบ่งกลุ่มข้อมูลจากความคล้าย โดยไม่มีการกำหนดประเภทของข้อมูลไว้ก่อน จึงกล่าวได้ว่าการแบ่งกลุ่มข้อมูล เป็นการเรียนรู้แบบไม่มีผู้สอน วิธีการแบ่งกลุ่ม ได้แก่ K-mean clustering, Hierarchical clustering, Self organizing map (SOM)[9]

K-mean clustering [10]เป็นวิธีการจัดกลุ่มของข้อมูลออกเป็นกลุ่มย่อยๆ โดยการใช้ค่า pixel ของสีที่ตำแหน่งนั้น เทคนิค K-mean จะมีการทำงานหลายหลายรอบ (Iteration) โดยในแต่ละรอบจะมีการรวมข้อมูล ให้ไปอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง โดยเลือกกลุ่มที่ข้อมูลนั้นมีระยะห่างจากค่ากลางของกลุ่มน้อยที่สุด แล้วคำนวณค่ากลางของกลุ่มใหม่ จะทำเช่นนี้จนกระทั่งค่ากลางของกลุ่มไม่เปลี่ยนแปลง หรือครบจำนวนรอบที่กำหนดไว้ สามารถสรุปขั้นตอนของ K-mean ได้ดังนี้คือ

1. กำหนดค่าจำนวนกลุ่ม (k) ไว้ล่วงหน้า
2. สุ่มเลือกจุดกึ่งกลางของแต่ละกลุ่ม
3. คำนวณระยะห่างระหว่างข้อมูลหรือระยะห่างน้อยที่สุดในการแบ่งกลุ่มข้อมูล
4. คำนวณหาจุดกึ่งกลางใหม่ของแต่ละกลุ่ม
5. คำนวณระยะห่างของแต่ละข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบกับจุดกึ่งกลางใหม่ เพื่อกำหนดกลุ่มให้กับข้อมูล โดยจะทำแบบนี้ไปเรื่อย ๆ จนกว่าจะได้จุดกึ่งกลางที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่ม

Hierarchical clustering การจัดกลุ่มข้อมูลประเภทนี้จะอาศัยหลักการแบ่งข้อมูล ออกเป็นลำดับชั้นคล้ายกับต้นไม้ ซึ่งวิธีการแบ่งกลุ่มข้อมูลแบบนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 แนวทางตามลักษณะการสร้างลำดับชั้นคือ Agglomerative approach กับ Divisive approach ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างของการแบ่งกลุ่มข้อมูลแบบ Hierarchical clustering

Self-organizing map (SOM) เป็น high-dimensional ของการจัดกลุ่มและการมองเห็นอัลกอริทึมการเรียนรู้แบบไม่มีผู้สอน สามารถสรุปขั้นตอนของ SOM ได้ดังนี้คือ

1. การสุ่มค่าเริ่มต้น

2. การสุ่มเลือกโหนด Input และการคำนวณระยะห่าง Euclidean ของทุกหน่วย Input
3. เลือกโหนด (Node) ที่ชนะโหนดอื่น
4. ปรับโหนดที่ชนะเพื่อให้โหนดเข้าใกล้ Input มากขึ้น
5. ปรับโหนดใกล้เคียงเพื่อให้ Input ถัดไปที่มีค่าใกล้เคียงที่มีโหนดชนะใหม่อยู่ใกล้กัน
6. ทำซ้ำกระบวนการ 1-5 จนกว่าจะถึงจำนวนรอบหรือเงื่อนไขที่กำหนด

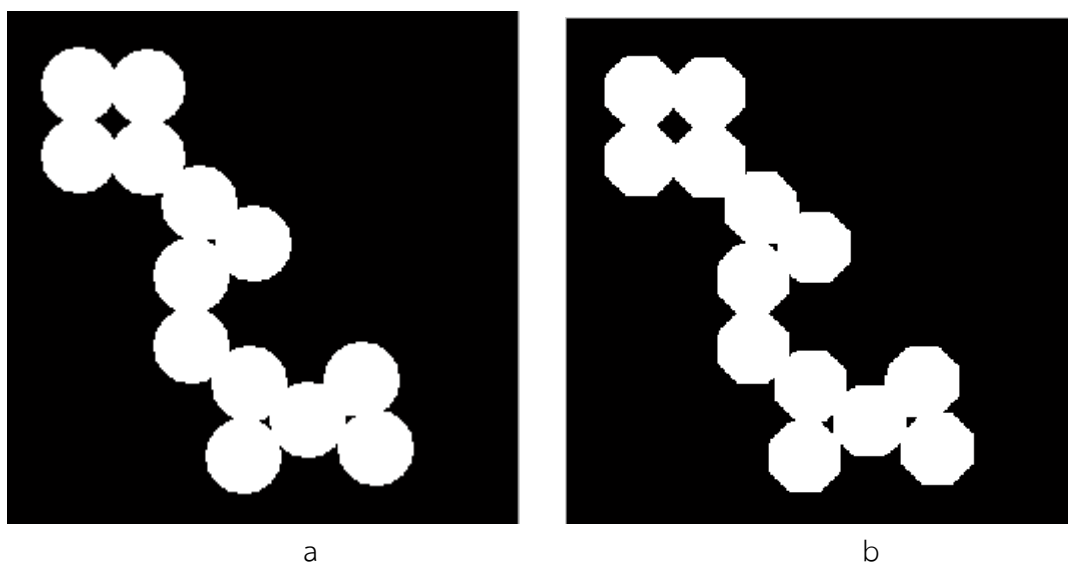
1.3.3 การกำจัดสิ่งรบกวนออกจากภาพ

เมื่อทำการแยกข้อมูลออกเป็นกลุ่มข้อมูลแล้ว แต่ละกลุ่มข้อมูลจะมีสิ่งที่เราไม่ต้องการอยู่ซึ่งเราเรียกว่าสิ่งรบกวน (Noise) ก่อนการนับเซลล์จะต้องมีการกำจัดสิ่งรบกวนออก เพื่อให้มีการนับที่ถูกต้องมากขึ้น ในการกำจัดสิ่งรบกวน สามารถใช้คำสั่ง Morphological [6, 11] สองแบบ คือ Opening และ Closing ร่วมกับวิธีการใช้ตัวกรองสิ่งรบกวน เช่น Average filter และ Median filter

Opening เป็นการทำให้เส้นรูปร่างหรือเส้นขอบของวัตถุมีความนุ่มนวลมากขึ้นทำลายเส้นที่เป็นเส้นคอคอดขนาดเล็ก ปรับโครงสร้างของวัตถุ ทำส่วนที่แคบให้แตกออก และกำจัดส่วนเกินที่ยื่นออกมาจากภาพ การทำ Opening ของ Set A ด้วย Structuring element B แทนด้วย

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B$$

ดังนั้น การทำ Opening A ด้วย B คือการทำการลบ (Erosion) A ด้วย B แล้วจึงนำผลที่ได้มาทำการขยายเพิ่ม (Dilation) ด้วย B อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 1.4

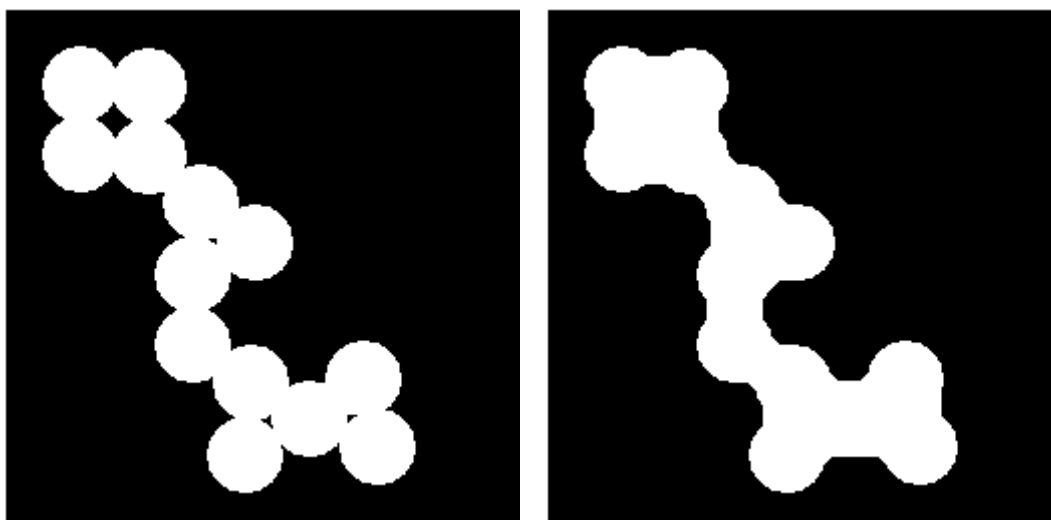


รูปที่ 1.4 ภาพของการใช้ Opening a) ภาพต้นฉบับ b) ภาพที่ได้จากวิธีการ Opening

Closing เป็นการทำให้เส้นของรูปร่างของภาพมีความนุ่มนวลมากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่จะตรงกันข้ามกับ Opening โดยจะเป็นการรวมกันระหว่างช่องแคบเล็กๆ หรือการเติมเต็มช่องว่าง เส้นบางที่มีขนาดเล็กให้มีความหนาขึ้น เป็นการทำให้หลุมหรือช่องว่างขนาดเล็กเติมเต็ม เป็นเนื้อเดียวกับรูป ดังแสดงในรูปที่ 1.5

เช่นเดียวกัน การทำ Closing ของ Set A ด้วย Structuring element B แทนด้วย

$$A \cdot B = (A \oplus B) \ominus B$$



รูปที่ 1.5 ภาพของการใช้ Closing a) ภาพต้นฉบับ b) ภาพที่ได้จากวิธีการ Closing

การกรองสัญญาณรบกวน (Filtering) ซึ่งเป็นการกำจัดสัญญาณที่ไม่ต้องการ หรือเป็นการกำจัดวัตถุที่ไม่ต้องการออกจากรูปภาพ โดยทั่วไปตัวกรองสัญญาณรบกวนมีหลายชนิดให้เลือกใช้ เช่น

Average filter เป็นการทำให้ภาพเบลอเพื่อลบสัญญาณรบกวนออก โดยผลลัพธ์ที่ได้จากการใช้ Average filter ในแต่ละจุดคือค่าเฉลี่ยของพิกเซลทุกพิกเซลที่อยู่ในหน้าต่างของตัวกรอง (Filter) นั้นๆ เช่น การใช้ Filter ขนาด 3x3 ดังรูปที่ 1.6 จะได้ค่าที่จุดกึ่งกลางเป็น $(4+7+2+9+5+3+8+12+46)/9 = 10.67$ ดังนั้นหากมีภาพต้นฉบับที่มีสัญญาณรบกวนดังรูปที่ 12a เมื่อใช้การกรองด้วย Average filter จะได้ผลลัพธ์ของภาพดังรูปที่ 12b

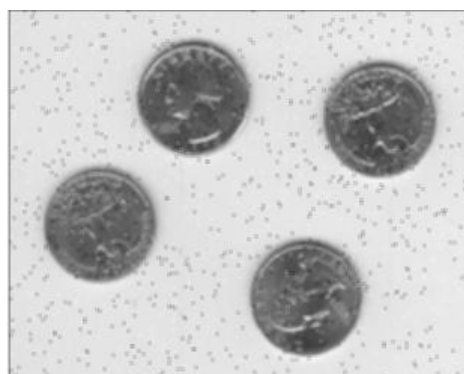
4	7	2		
9	5	3		
8	12	46		

รูปที่ 1.6 การทำ Average filter

Median filter เป็นการกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ ผลลัพธ์ที่ได้จากการทำ median filter คือ การแทนที่ค่าในพิกเซล ทั้งหมดที่หน้าต่างอยู่ด้วยค่ามัธยฐาน จากรูปที่ 1.6 หากทำการประมวลผลภาพด้วย median filter จะทำได้โดยเรียงค่าน้อยไปหามากนั้นคือ 2,3,4,5,7,8,9,12 และ 46 เพราะฉะนั้นค่ามัธยฐานก็คือ 7 ดังรูปที่ 1.7 เมื่อใช้การกรองด้วย median filter จะได้ผลลัพธ์ของภาพ ดังรูปที่ 1.7c



a



b



c

รูปที่ 1.7 แสดงภาพของการกำจัดสัญญาณรบกวน a) ภาพต้นฉบับ b) ด้วยวิธีการ averaging filter c) ด้วยวิธีการ median filter

1.3.4 การนับเซลล์

หลังจากที่มีการแยกเซลล์ออกจากกันและทำการกำจัดเศษที่ไม่ต้องการและสัญญาณรบกวนในภาพออกแล้ว จะต้องมีการระบุตัวตนและหาบริเวณที่ชัดเจนของเซลล์เพื่อใช้ในการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ในการระบุตัวตนและหาบริเวณของเซลล์นั้นจะใช้วิธีการที่เรียกว่า Hough transform[12] เพื่อใช้ในการหารูปร่างของเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการจดจำวัตถุในรูปแบบต่างๆ เช่น เส้นตรง วงกลม วงรี โดยสมการที่ใช้ในการหาเส้นตรง (Straight Line Hough Transform) และสมการที่ใช้ในการหาเส้นโค้ง (Circular Hough Transform) ดังสมการที่ (1.1) และ (1.2) ตามลำดับ

$$x \cos \theta + y \sin \theta = r \quad (1.1)$$

$$(x - c)^2 + (y - c)^2 = r^2 \quad (1.2)$$

เมื่อ r คือระยะจากจุดศูนย์กลางถึงเส้นตรง

θ คือมุมระหว่าง r กับแนวแกน x

c คือ จุดศูนย์กลาง

เมื่อกำหนดจุดของค่า r และ θ สำหรับทุกๆ ค่า x และ y ที่เป็นไปได้

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

H.Deng and D.A.Clausi (2004)[13] ได้นำเสนอการแบ่งแยกภาพโดยใช้ Markov Random Field (MRF) models ซึ่งเป็นวิธีใหม่ที่ใช้สำหรับ Unsupervised Image Segmentation ซึ่งวิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากและมีความซับซ้อนในการใช้งาน เนื่องจากจะต้องมีการกำหนดค่าตัวแปรต่างๆซึ่งไม่สามารถรู้ได้ว่าค่าไหนที่สมควรใช้และเหมาะสม ผลลัพธ์ของแต่ละส่วนของวิธีนี้ได้ผลที่ไม่เหมือนกัน จึงเป็นการยากที่จะเลือกใช้ให้เหมาะสม และวิธีการนี้ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้กับเซลล์มะเร็ง เนื่องจากวิธีนี้ใช้กับภาพที่เป็นสี HSV ซึ่งภาพมะเร็งที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้สามารถใช้ภาพที่อยู่ในโหมด RGB ก็สามารทำการทำงานได้

E.Gering and C.T.Atkinson(2004)[14] อธิบายโปรโตคอลสำหรับการสร้างการนับจำนวนนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงจาก digital micrographs ของ thin blood smears ที่สามารถใช้ในการประเมินความรุนแรงของการติดเชื้อใน hematozoan วิธีการนี้จะใช้ประโยชน์จากความแตกต่างความหนาและขนาดที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง และใช้ imageJ, JAVA เพื่อทำการวิเคราะห์ภาพ เทคนิคนี้จะทำให้การนับจำนวนมีความรวดเร็วและถูกต้อง

D.J.Withey and Z.J.Koles (2007)[15] อธิบายถึงความแตกต่างของในยุคสมัยก่อนหน้าเกี่ยวกับขั้นตอนวิธีการและการสร้างซอฟต์แวร์ในการแบ่งแยกวัตถุออกจากกันในแต่ละยุคจะมีความแตกต่างของขั้นตอนวิธีการในการแบ่งแยกวัตถุ และได้มีการพัฒนามาเรื่อยๆเพื่อให้เหมาะกับการใช้งาน และได้มีการออกแบบเครื่องมือที่ใช้ในการแบ่งแยกวัตถุออกเป็น 3 รุ่นในแต่ละรุ่นจะเพิ่มความซับซ้อนในการทำงานขึ้น ในรุ่นแรกจะมีลักษณะที่ง่ายที่สุดในการวิเคราะห์ภาพซึ่งจะ

เป็นการนำเอา intensity thresholds และ region growing มาใช้ ในรุ่นที่สองจะประยุกต์ใช้แบบจำลองความไม่แน่นอนและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน รุ่นสุดท้ายจะเป็นกระบวนการแบ่งส่วนรูปภาพ

P.Phukpattaranon and P.Boonyaphiphat (2007)[11] ได้นำเสนอเกี่ยวกับวิธีการแบ่งแยกเซลล์มะเร็งเต้านมออกจากพื้นหลังของภาพ โดยใช้โครงข่ายประสาทเทียม โดยวิธีจะเป็นแบบเรียนรู้โดยมีผู้สอน ซึ่งก็คือให้โปรแกรมเรียนรู้การแยกวัตถุออกจากพื้นหลังโดยให้โปรแกรมเรียนรู้พื้นหลังและเซลล์มะเร็งก่อน โดยจะหาเซลล์ที่ผิดปกติ โดยใช้สีในภาพเป็นตัวพิจารณา และได้มีการแยกเซลล์ที่ติดกันออกจากกัน เพื่อคุณลักษณะของเซลล์ที่ต้องให้ยาในการรักษา อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังต้องให้ระบบเรียนรู้บริเวณพื้น positive cell และ negative cell ก่อน เพื่อให้ระบบสามารถเลือกเซลล์ถัดไปได้ ซึ่งจะต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการในการเลือก

P.Phukpattaranont S.Limsiroratana and P.Boonyaphiphat(2009)[16] ได้ทำการพัฒนาระบบคอมพิวเตอร์ช่วยในการวิเคราะห์ภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่เรียกว่า การวิเคราะห์ภาพของเซลล์ (CIA) และแสดงถึงการประยุกต์ใช้กับการนับเซลล์มะเร็งเต้านม อัลกอริทึมสำหรับการวิเคราะห์ภาพจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน 1) เป็นการแยกเซลล์มะเร็งที่ได้จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้พื้นฐาน neural network และ mathematical morphology 2) คุณสมบัติของแต่ละเซลล์ที่ประกอบด้วยค่าเฉลี่ยของ $L^*;a^*;b^*$; ในพื้นที่ CIELab, circularity ratio และการแยกพื้นที่โดยโปรแกรม 3) แสดงถึงการประยุกต์ศักยภาพภาพของโปรแกรม การจำแนกนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นการดำเนินการโดยใช้คุณสมบัติ Euclidean distance ค่าเฉลี่ยของ $L^*;a^*;b^*$; ผลลัพธ์ที่ได้จากระบบการวิเคราะห์บนภาพเซลล์มะเร็งด้วยกล้องจุลทรรศน์จะถูกแบ่งได้อย่างเหมาะสม จำแนกเซลล์ได้ดี การประเมินผลเชิงปริมาณของการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เมื่อเทียบกับผู้เชี่ยวชาญมีความคล้ายกัน

N.H.Mahmood S.M.Mazalan and M.A.Razak(2013)[17] การแบ่งส่วนของเซลล์เม็ดเลือดและการระบุเม็ดเลือดเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับเลือด การนับเม็ดเลือดที่สมบูรณ์แบบถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบสุขภาพของผู้คน โดยเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เม็ดเลือดแดง ปัญหาหลักที่เกิดคือ เมื่อจำนวนของตัวอย่างเลือดที่มีจำนวนมากที่ถูกประมวลผลโดยนักวิทยาศาสตร์ด้านโลหิตวิทยาหรือช่างเทคนิคในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จะต้องใช้ทักษะและเวลาในการทำงานที่จำกัดเรื่องความเร็วและความถูกต้อง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาซอฟต์แวร์บนพื้นฐานของ MATLAB ในการแยกและระบุเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวจากรูปภาพ ในขั้นตอนการแยกส่วนในงานวิจัยได้ใช้ $L^*;a^*;b^*$; ในพื้นที่ CIELab ทำให้สามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวได้รวดเร็ว โดยมีความถูกต้องตั้งแต่ 64% ถึง 87% ขึ้นอยู่กับชนิดของการประมวลผลที่ใช้และชนิดของเซลล์ที่ถูกสกัด แต่ยังไม่สูงมากนักในการระบุเซลล์เม็ดเลือดที่มีการขีดกัน

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าการใช้เทคนิคประมวลผลภาพทำให้การคัดแยกเซลล์ที่มีความแตกต่างกันทำได้ง่ายขึ้นแต่อย่างไรก็ตามค่าความถูกต้องยังมีค่าที่ไม่สูงมากนักและยังมีปัญหาการคัดแยกหากเซลล์มีการติดกันหรือเซลล์มีหลากหลายรูปร่าง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ได้กำหนดขอบเขตการวิจัยไว้ ดังนี้

1.5.1 ทำการศึกษาและพัฒนาอัลกอริทึมสำหรับโปรแกรมคอมพิวเตอร์เกี่ยวกับการแยกเซลล์ที่มีชีวิตเซลล์และเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง โดยรูปร่างของเซลล์ที่มีชีวิตมีลักษณะค่อนข้างกลม

1.5.2 นับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายที่อยู่ในรูปด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้น และเปรียบเทียบผลการนับกับผลที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้

1.5.3 สร้างกราฟฟิกเพื่อการใช้งาน (Graphic User Interface: GUI) เพื่อให้ง่ายต่อการใช้งาน

1.6 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1.6.1 ด้านฮาร์ดแวร์ (Hardware) เป็นคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลที่ประกอบด้วย

- CPU Intel inside CORE™ i5-3210M
- RAM 4 GB
- การ์ดจอ nVIDIA GEFORCE® GT 630M
- Hard disk 750 GB

1.6.2 ด้านซอฟต์แวร์ (Software)

- ระบบปฏิบัติการ Microsoft Window 7
- โปรแกรม MATLAB R2008b
- โปรแกรม Photoscap

1.6.3 รูปภาพ (Image)

ภาพที่ใช้ในงานวิจัยเป็นภาพที่ถูกถ่ายด้วยกล้องถ่ายภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีคุณสมบัติดังนี้

- 1) กล้องจุลทรรศน์ OLYMPUS IX51/IX71
 - ความสว่าง IX2-ILL100
 - Condensers IX2-LWUCDA2
- 2) กล้องถ่ายภาพ DIGITAL CAMERA DP72
 - Single chip color CCD camera (Pixel shifting)
 - ขนาด 2/3-inch
 - ความละเอียดของภาพ 4140 x 3096 (pixel shifting)
 - ระบบสี RGB

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ได้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการประมวลผลภาพเพื่อการนับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

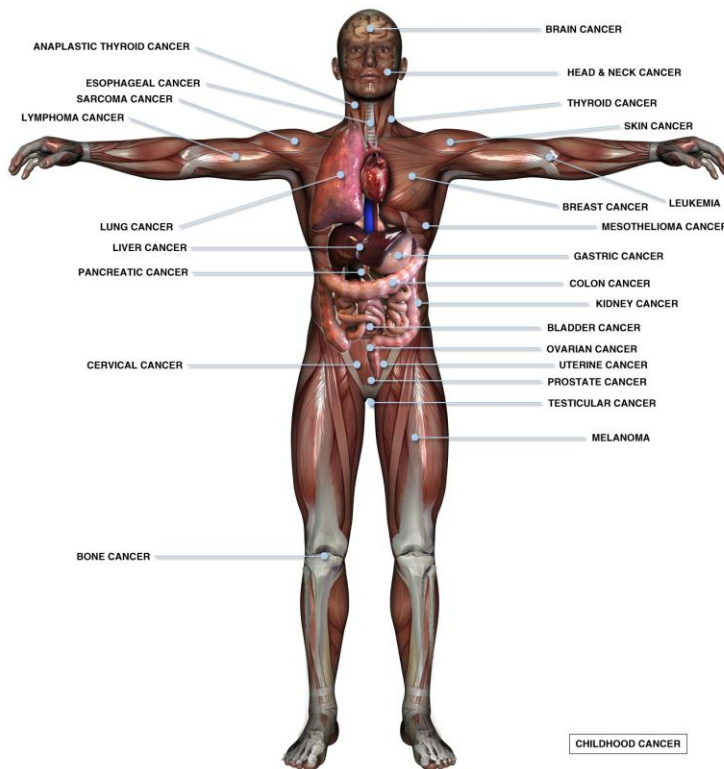
1.7.2 ได้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่มีราคาถูก ใช้งานง่าย

1.7.3 สะดวกในการทำงาน สามารถกลับมาเรียกดูภาพซ้ำเพื่อการนับได้ และสามารถทำงานอย่างอื่นพร้อมกันได้ในขณะที่ทำการวิเคราะห์ภาพ

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็งและเซลล์มะเร็ง

โรคมะเร็ง เป็นโรคซึ่งมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และเซลล์เหล่านี้ มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่งเช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ (Metastasis) การเจริญเติบโตแบบไม่เป็นระเบียบของเซลล์นี้ อาจมีสาเหตุที่เกิดขึ้นภายหลัง หรือเป็นกรรมพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ (DNA) ภายในเซลล์ มีการทำลายข้อมูลของยีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้าย และการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ นักวิทยาศาสตร์จะใช้ชื่อทางเทคนิคเพื่อแยกชนิดต่างๆ ของมะเร็งประเภท Carcinomas Sarcomas Lymphomas และ Leukemias โดยทั่วไปชื่อต่างๆ เหล่านี้ จะใช้คำนำหน้าตามชื่อของชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้อง เช่น นำหน้าด้วยคำว่า "Osteo" หมายถึง กระดูก ดังนั้นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่กระดูกจะเรียกว่า Osteosarcoma ในทำนองเดียวกัน นำหน้าด้วย "Adeno" หมายถึง ต่อม ดังนั้นมะเร็งของเซลล์ต่อม จึงเรียกว่า Adeno carcinoma เช่น Breast Adenocarcinoma มะเร็งมีมากมายกว่า 200 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 5 กลุ่ม[18] ดังนี้ Carcinoma Sarcoma Lymphoma Leukemias และ Melanoma ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โรคมะเร็งในร่างกายมนุษย์[19]

กลุ่ม Carcinoma หมายถึง มะเร็งซึ่งมาจากเซลล์เยื่อผิวของอวัยวะทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ซึ่งเซลล์เยื่อผิวของร่างกายมี 4 ชนิดใหญ่ได้แก่ เซลล์เยื่อผิวที่สร้างสารคัดหลั่ง เซลล์เยื่อผิวที่มีลักษณะแบนบางหลายเหลี่ยม เซลล์เยื่อผิวที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ตามการขยายและหดตัวของอวัยวะนั้นๆ และเซลล์เยื่อผิวที่เรียงตัวหลายชั้นเทียม

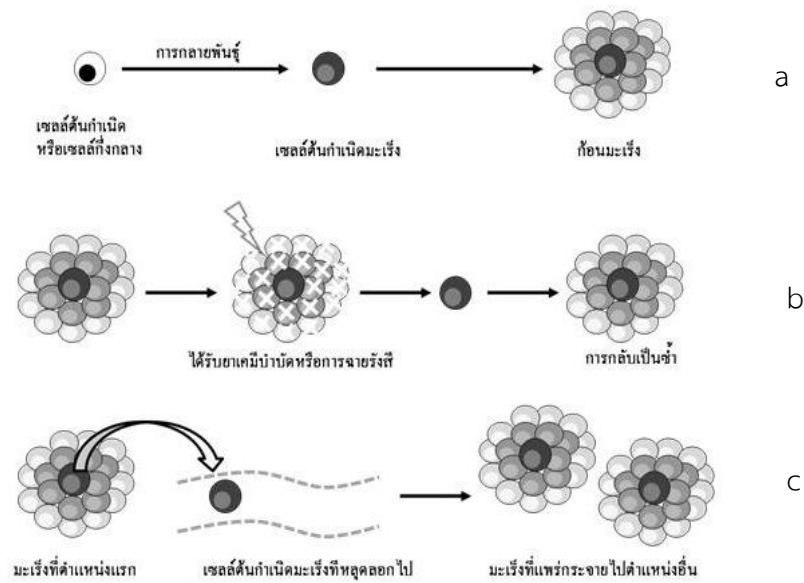
กลุ่ม Sarcoma หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่ออ่อน (Soft Tissue) ของร่างกาย หรือเนื้อเยื่อเสริม (Supportive Tissue) ซึ่งได้แก่ ไขมัน กล้ามเนื้อ เส้นประสาท และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนี้ ยังรวมถึงกระดูกและกระดูกอ่อนด้วย

กลุ่ม Lymphoma หมายถึง มะเร็งที่พัฒนามาจากต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อของระบบภูมิคุ้มกัน

กลุ่ม Leukemias หมายถึง มะเร็งของระบบโลหิต เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก (Bone Marrow)

กลุ่ม Melanoma หมายถึง มะเร็งที่มาจากเซลล์ผลิตเม็ดสี (Melanocytes) ซึ่งจะพบตามผิวหนัง ไฝ (Mole) คือการเจริญเติบโต ของเซลล์เม็ดสีประเภทไม่เป็นอันตราย

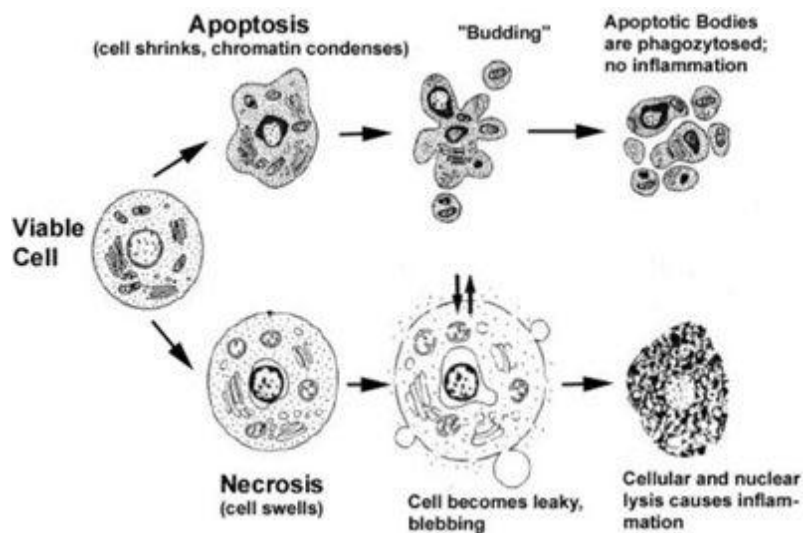
มะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้จากเซลล์เยื่ออวัยวะชนิดต่างๆ เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม (Breast Carcinoma) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เยื่อของต่อมสร้างน้ำนม นักวิทยาศาสตร์พบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์มะเร็งบางกลุ่มที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดหรือที่เรียกว่า เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells, CSC) [20] เซลล์กลุ่มนี้แม้จะมีอยู่จำนวนเล็กน้อยในเนื้อเยื่อมะเร็ง แต่ก็มีความสำคัญในการสนับสนุนการเจริญและขยายตัวของมะเร็ง การที่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเอง (Self-renewal) และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์จำเพาะได้หลายชนิด (Multilineage differentiation) เหมือนเซลล์ต้นกำเนิดทั่วไปนั้น ทำให้สันนิษฐานว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ต้นกำเนิดปกติหรือ Progenitor cells ที่ยังคงคุณสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง แนวคิดเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถอธิบายพฤติกรรมและการดำเนินโรคของมะเร็งได้หลายบริบท ดังตัวอย่างรูปที่ 2.2 ดังนั้นการพัฒนาเพื่อทำการรักษามะเร็งจึงมีความสำคัญ



รูปที่ 2.2 เซลล์มะเร็งและการดำเนินโรคของมะเร็ง a) การเป็นแหล่งให้กำเนิดเซลล์มะเร็งทั้งหมด b) การดื้อยาและไม่ตอบสนองต่อการรักษาของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งซึ่งนำไปสู่การกลับเป็นซ้ำ c) การแพร่กระจายของมะเร็ง[21]

2.2 การตายแบบอะพอพโทซิส(Apoptosis)

การตายของเซลล์มะเร็งที่ถูกยาฆ่ามะเร็งนั้นจะเป็นการตายที่เรียกว่า อะพอพโทซิส (Apoptosis) [3] ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบมีแบบแผน (Programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับชุดของปฏิกิริยาทางชีวเคมีซึ่งทำให้เซลล์ที่ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ หรือกล่าวอย่างจำเพาะคือเป็นชุดของปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การเปลี่ยนรูปของเซลล์คล้ายนิ้วมือ การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นการเหี่ยวของเซลล์ นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน โครมาตินหนาตัวขึ้น และดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน การตายลักษณะนี้จะมีรูปร่างเซลล์ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 รูปร่างของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส[22]

2.3 การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็ง

การที่จะค้นหามะเร็งได้ในขณะที่ยังไม่มีอาการหรือวินิจฉัยมะเร็งได้ในระยะที่เพิ่งเริ่มเป็นมีความสำคัญมาก และจะต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ป่วยเป็นอย่างมาก นอกเหนือไปจากความสามารถของแพทย์และการพัฒนาความก้าวหน้าในด้านเครื่องมือตรวจทางการแพทย์[23] ขั้นตอนต่างๆ ในการวินิจฉัยโรคนี้อาจคล้ายกับการวินิจฉัยโรคโดยทั่วไป คือจะต้องอาศัยจาก

1. ประวัติการเจ็บป่วยทั้งในปัจจุบันและอดีต รวมทั้งการรักษา ประวัติการเป็นมะเร็งของบุคคลในครอบครัว อาชีพ และประวัติการติดของเสพติดทั้งหลาย เช่น สุรา บุหรี่ เป็นต้น
2. การตรวจร่างกาย ทั้งเฉพาะตรงบริเวณที่เป็นมะเร็ง รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง และการตรวจร่างกายโดยทั่วไป เพื่อค้นหามะเร็งทุติยภูมิ โดยวิธีการตรวจธรรมดา การถ่ายภาพรังสี การใช้กล้องส่องตรวจ เป็นต้น
3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการตรวจโดยวิธีเซลล์วิทยา เพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งปฐมภูมิ และค้นหามะเร็งทุติยภูมิ
4. การตรวจด้วยวิธีพิเศษ เช่น การฉีดสารทึบแสงและถ่ายภาพรังสี การตรวจด้วยเอกซเรย์คอมพิวเตอร์
5. การตัดชิ้นเนื้อ รวมทั้งการทำผ่าตัดเพื่อเอาชิ้นเนื้อมาตรวจทางพยาธิวิทยา การที่แพทย์จะวินิจฉัยว่าผู้ใดเป็นมะเร็งนั้น จะต้องอาศัยพยาธิแพทย์เป็นผู้ตรวจและอ่านชิ้นเนื้อทาง

พยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งจริงก่อนเสมอ จึงนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งจำเป็นที่สุดในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง ในบางรายพยาธิแพทย์จะช่วยตัดชิ้นเนื้อไปตรวจโดยคร่าวๆ ก่อน (frozen section) ซึ่งวิธีนี้สามารถให้การวินิจฉัยได้ภายใน 10 – 20 นาที ช่วยให้ ศัลยแพทย์สามารถตัดสินใจผ่าตัดอวัยวะที่สำคัญออกได้อย่างมาก

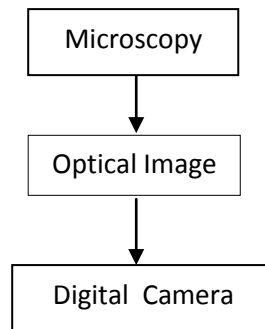
วิธีการรักษาโรคมะเร็งมีหลายวิธีด้วยกัน[23] เช่น การผ่าตัด เป็นวิธีการรักษาที่ได้ทั้งการมุ่งหวังให้โรคหายขาดในกรณีที่โรครังยังเป็นน้อย และเพื่อเป็นการบรรเทาอาการชั่วคราวในกรณีที่โรคเป็นมากแล้ว รังสีรักษา เป็นวิธีการรักษาที่ได้ทั้งการมุ่งหวังให้โรคหายขาดและเพื่อการบรรเทาอาการชั่วคราว การใช้สารเคมีบำบัด เป็นการรักษาในรูปของการใช้ยารักษาโรคมะเร็งกำลังเป็นที่สนใจ และมีบทบาทสำคัญ ในปัจจุบันนี้มีมะเร็งหลายชนิดที่อาจรักษาให้หายขาดด้วยยา เป็นต้น ในการใช้สารเคมีบำบัดรักษา การรักษาด้วยยาเพื่อควบคุมหรือทำลายเซลล์มะเร็ง โดยการออกฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรง จึงต้องมีการศึกษาผลของยาที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ในการศึกษาผลของยาที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง นิยมทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) และเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบผลของยาฆ่าเซลล์มะเร็งนั้นนิยมใช้เทคนิค Trypan blue dye exclusion stain โดยใช้หลักการย้อมสีเซลล์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ในการศึกษาประสิทธิภาพของยาในการฆ่าเซลล์มะเร็งกระทำโดยอาศัยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ในการทำการนับเซลล์

2.4 การย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue dye exclusion stain

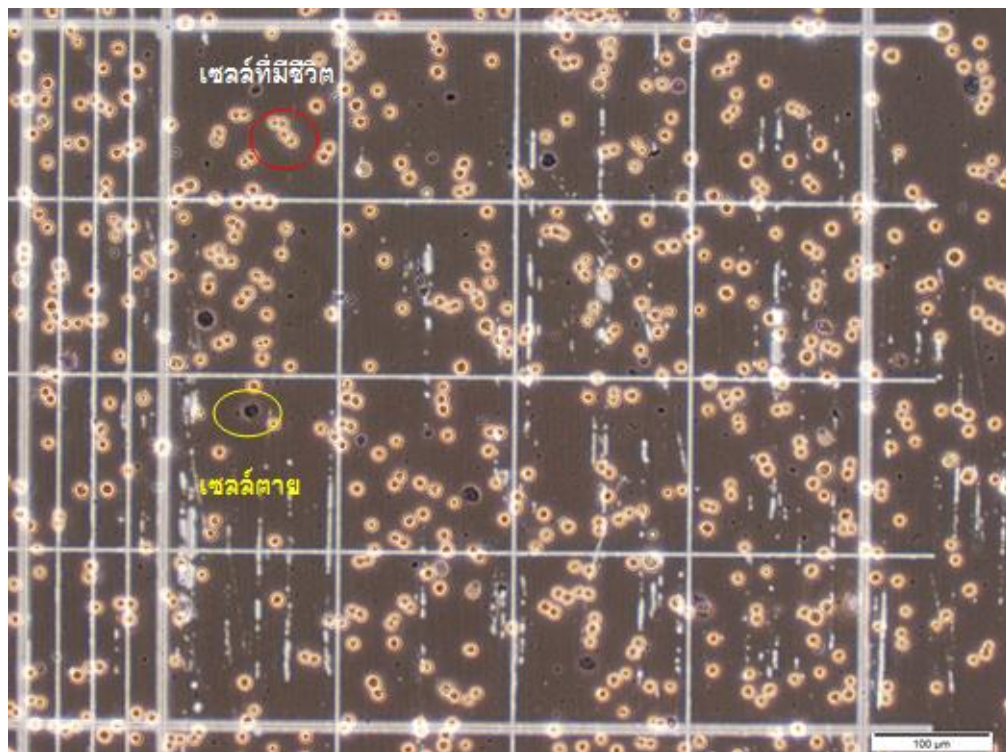
การย้อมสีเซลล์ เป็นวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ที่ตายแล้วหรือที่ยังมีชีวิตอยู่ออกจากกัน เซลล์ที่มีชีวิตจะยังคงเหมือนเดิมไม่มีการติดสีเนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตมีเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membranes) ทำให้สีไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ เซลล์ที่ตายจะมีลักษณะสีน้ำเงินเนื่องจากสีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกทำลายโดยยาที่ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ทำให้มองเห็นเป็นสีน้ำเงิน

2.5 การได้มาของภาพดิจิทัล

ภาพที่นำมาใช้ในการประมวลผลเป็นภาพของเซลล์มะเร็งที่ผ่านกระบวนการย้อมสีเซลล์แล้ว และผ่านการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopy) ภาพที่ได้จะถูกบันทึกให้เป็นภาพสี RGB เป็นไฟล์ประเภท JPEG ขั้นตอนการได้มาของภาพแสดงในรูปที่ 2.4 ภาพที่นำมาใช้จะประกอบด้วย เซลล์ที่มีชีวิตที่มีลักษณะสีสว่าง และเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะสีน้ำเงิน ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.5 ซึ่งในรูปจะแสดงตัวอย่างของภาพดิจิทัล วงกลมสีแดงแสดงเซลล์ที่มีชีวิต วงกลมสีเหลืองแสดงเซลล์ที่ตาย



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการได้มาของภาพดิจิทัล



รูปที่ 2.5 ภาพดิจิทัลที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

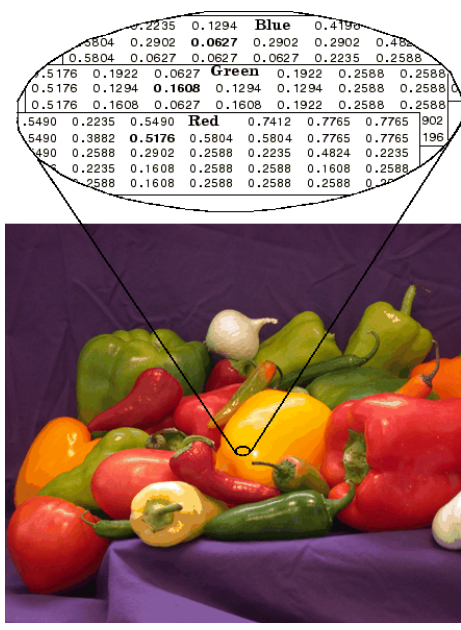
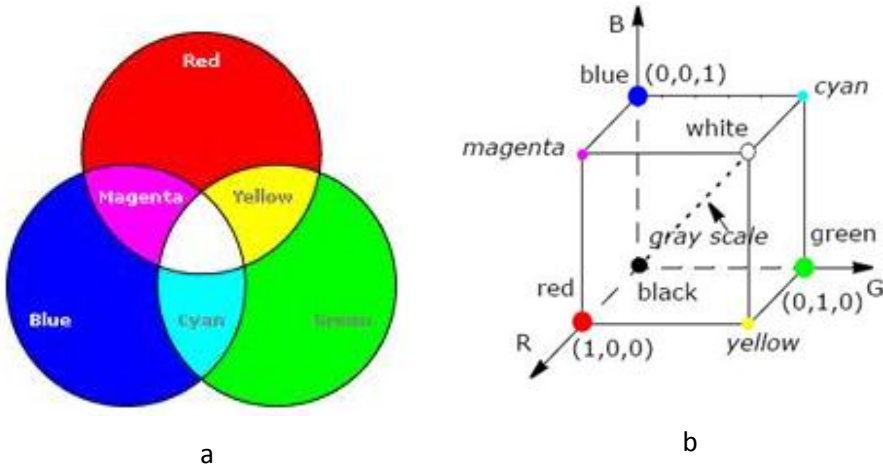
2.6 ระบบสี color model

การใช้สีกับงานกราฟิกในคอมพิวเตอร์ มีรายละเอียดหลายประการ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะระบบสีของคอมพิวเตอร์ จะเกี่ยวข้องกับการแสดงผลแสงที่แสดงบนจอคอมพิวเตอร์ โดยมีลักษณะการแสดงผล คือ ถ้าไม่มีแสดงผลสีใดเลย บนจอภาพจะแสดงเป็น "สีดำ" หากสีทุกสีแสดงผลพร้อมกัน จะเห็นสีบนจอภาพเป็น "สีขาว" ส่วนสีอื่นๆ เกิดจากการแสดงสีหลายๆ สี แต่มีค่าแตกต่างกัน การแสดงผลลักษณะนี้ เรียกว่า การแสดงสีระบบ Additive สีที่ใช้ในงานด้านกราฟิกทั่วไป มี 4 ระบบ คือ RGB CMYK HSB และ LAB

2.6.1 RGB

เป็นระบบสีที่ประกอบด้วยแม่สี 3 สี คือ แดง (Red) เขียว (Green) และน้ำเงิน (Blue) เมื่อนำมาผสมผสานกันทำให้เกิดสีต่างๆ บนจอคอมพิวเตอร์มากถึง 16.7 ล้านสี ซึ่งใกล้เคียงกับสีที่ตา

เรามองเห็นปกติ สีที่ได้จากการผสมสีขึ้นอยู่กับความเข้มของสี ในกรณีที่มีการผสมทุกสีเข้าด้วยกันสีที่เห็นจะเป็นสีขาว แต่ถ้าไม่ได้ผสมสีใดๆเลยสีที่เห็นจะเป็นสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.6a สำหรับ RGB ที่เก็บไว้จะมีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 1 ดังแสดงในรูปที่ 2.6b และ 2.6c

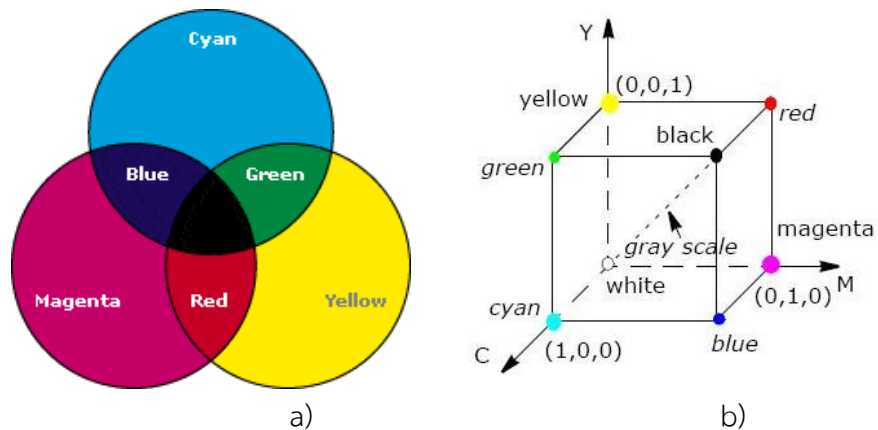


รูปที่ 2.6 ภาพ model RGB a) การผสมสีของ RGB color model b) ค่าการผสมสีของ RGB plane c) ค่าที่เก็บในพิกเซล ของ RGB แต่ละสี

2.6.2 CMYK

เป็นระบบสีที่ใช้กับเครื่องพิมพ์ที่พิมพ์ออกทางกระดาษหรือวัสดุผิวเรียบอื่น ๆ ซึ่งประกอบด้วย สีหลัก 4 สี คือ สีฟ้า (Cyan) สีม่วงแดง (Magenta) สีเหลือง (Yellow) และสีดำ (Black) เมื่อนำมาผสมกันจะเกิดสีเป็นสีดำ แต่จะไม่ดำสนิท เนื่องจากหมึกพิมพ์มีความไม่บริสุทธิ์ จึง

เป็นการผสมสีแบบลบ (Subtractive) หลักการเกิดสีของระบบนี้ คือ หมึกสีหนึ่งจะดูดกลืนแสงจากสีหนึ่งแล้วสะท้อนกลับออกมาเป็นสีต่าง ๆ เช่น สีฟ้าดูดกลืนแสงของสีม่วงแล้วสะท้อนออกมาเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งจะสังเกตได้ว่าสีที่สะท้อนออกมาจะเป็นสีหลักของระบบ RGB การเกิดสีในระบบนี้จึงตรงข้ามกับการเกิดสีในระบบ RGB ดังรูปที่ 2.7

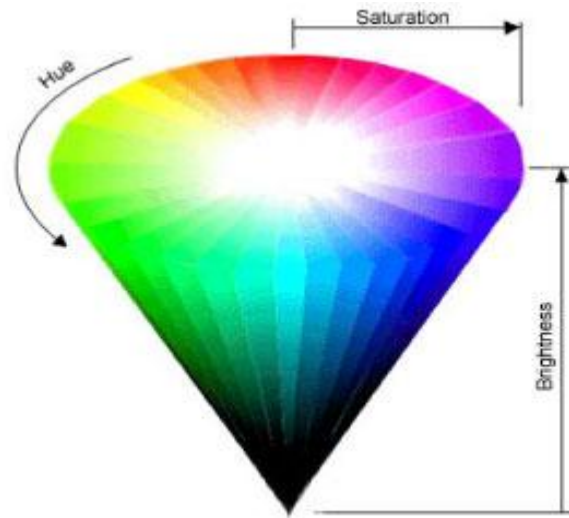


รูปที่ 2.7 แสดงภาพ model CMYK a) สีและการผสมสีของ CMYK color model
b) ค่าการผสมสีของ CMYK plane

2.6.3 HSB

เป็นระบบสีแบบการมองเห็นของสายตามนุษย์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

- Hue คือ สีต่าง ๆ ที่สะท้อนออกมาจากวัตถุแล้วเข้าสู่สายตาของเรา ซึ่งมักจะเรียกสีตามชื่อสี เช่น สีเขียว สีเหลือง สีแดง เป็นต้น
- Saturation คือ ความสดของสี โดยค่าความสดของสีจะเริ่มที่ 0 ถึง 100 ถ้ากำหนด Saturation ที่ 0 สีจะมีความสดน้อย แต่ถ้ากำหนดที่ 100 สีจะมีความสดมาก
- Brightness คือ ระดับความสว่างของสี โดยค่าความสว่างของสีจะเริ่มที่ 0 ถึง 100 ถ้ากำหนดที่ 0 ความสว่างจะน้อยซึ่งจะเป็นสีดำ แต่ถ้ากำหนดที่ 100 สีจะมีความสว่างมากที่สุด ดังรูปที่ 2.8



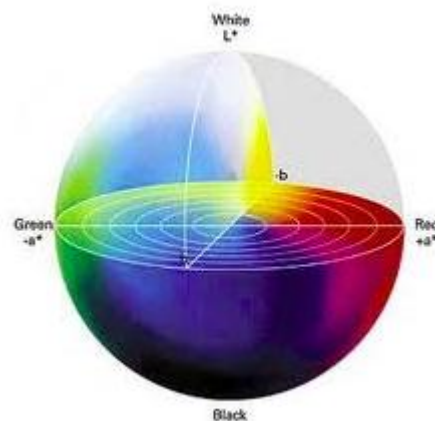
รูปที่ 2.8 สีในโหมด HSB

2.6.4 LAB

เป็นระบบสีที่ไม่ขึ้นกับอุปกรณ์ใด ๆ (Device Independent) โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

- L หรือ Luminance เป็นการกำหนดความสว่าง ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้ากำหนดที่ 0 จะกลายเป็นสีดำ แต่ถ้ากำหนดที่ 100 จะเป็นสีขาว
- A เป็นค่าของสีที่ไล่จากสีเขียวไปสีแดง
- B เป็นค่าของสีที่ไล่จากสีน้ำเงินไปสีเหลือง

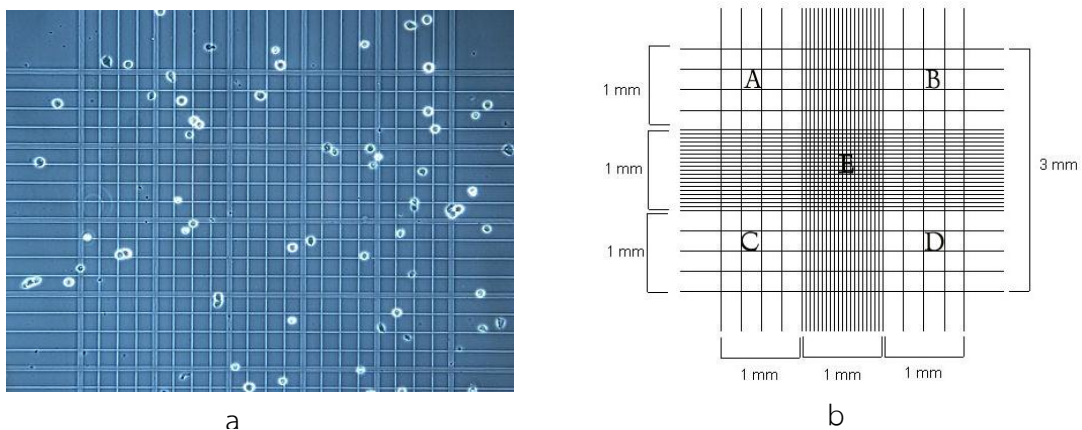
สีในระบบ LAB ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงสีในโหมด LAB

2.7 การนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemocytometers [24]

หลังจากที่ได้ภาพของเซลล์มะเร็ง จะมีการนำมาวิเคราะห์สัดส่วนการตายของเซลล์มะเร็ง (% Cell Death) หลังจากเซลล์ได้รับยา โดยการนับด้วยตาเปล่าผ่านกล้องจุลทรรศน์ การนับเซลล์จะมีความจำเป็นในการประเมินประสิทธิภาพของยาฆ่าเซลล์มะเร็ง hemocytometers มักถูกนำมาใช้ในการนับจำนวนเซลล์ที่ตายเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่ง hemocytometer คืออุปกรณ์สำหรับนับจำนวนเซลล์ เป็นสไลด์แก้วที่มีช่องนับเซลล์ (Counting chambers) รูปที่ 2.10a แสดงลักษณะของ hemocytometer grid ที่ใช้ในการนับเซลล์ hemocytometer มีความหนา 0.1 มิลลิเมตร พื้นที่สี่เหลี่ยมใหญ่ตรงกลางที่แสดงด้วยเส้นขอบหนา มีพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร ช่องใหญ่นี้จะถูกแบ่งเป็นช่องขอบเส้นคู่ 25 ช่อง ซึ่งแต่ละช่องขอบเส้นคู่ดังกล่าวแบ่งเป็นช่องเล็กๆอีก 16 ช่อง ดังนั้นพื้นที่สี่เหลี่ยมใหญ่ขอบหนานี้จึงมีช่องเล็กๆ จำนวน 400 ช่อง โดยจาก A B C และ D ที่ได้กำกับไว้ ดังแสดงในรูปที่ 2.10b



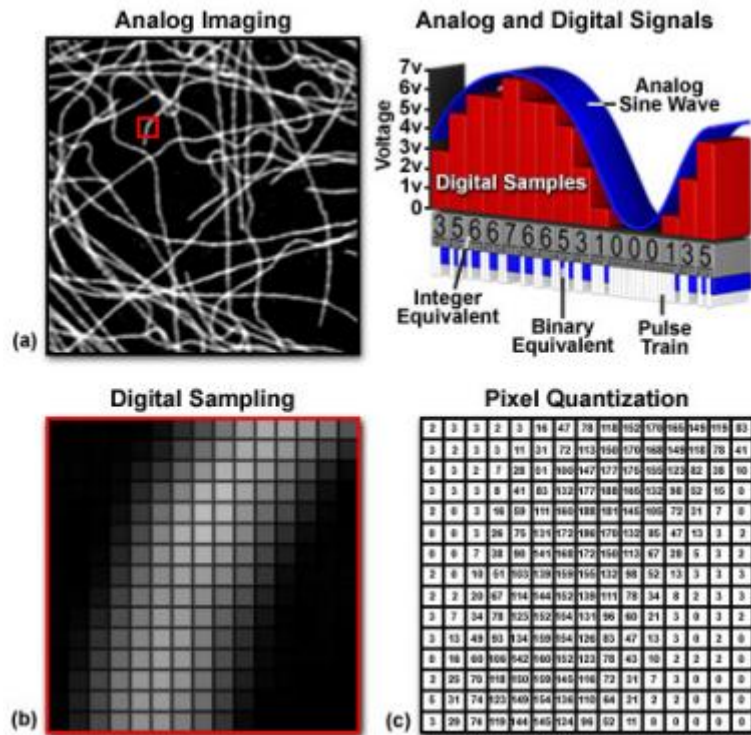
รูปที่ 2.10 Hemocytometer grid

2.8 การประมวลผลภาพ และ ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการประมวลผลภาพดิจิทัล

การประมวลผลภาพ (Image processing)[6, 25] คือการประยุกต์ใช้งานการประมวลผลสัญญาณบนสัญญาณ 2 มิติเช่น ภาพนิ่ง(ภาพถ่าย) หรือภาพวีดิทัศน์ (วิดีโอ) และยังรวมถึงสัญญาณ 2 มิติอื่นที่ไม่ใช่ภาพ เป็นการให้คอมพิวเตอร์ประมวลผลภาพ เพื่อให้ทราบว่าภาพนั้นคืออะไร หรือมีสิ่งที่น่าสนใจอยู่ในภาพหรือไม่ โดยที่ไม่ต้องใช้สายตาคอนมาตัดสิน การคิดคำนวณนั้นมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีประโยชน์แตกต่างกันไป ไม่ว่าจะเป็นการนำเอาสีแต่ละจุดพิกเซล (Pixel) มาคิด การคำนวณเป็นบริเวณหลายๆจุดรวมกัน เช่น การดูพื้นผิว (Texture) การดูรูปแบบ (Pattern) การวิเคราะห์รูปร่าง (Shape) หรือการวิเคราะห์แบบอื่น เป็นต้น

การประมวลผลภาพดิจิทัล เกี่ยวข้องกับการแปลงข้อมูลรูปที่เป็นสัญญาณอนาล็อก (Analogue signal) ให้อยู่ในรูปของสัญญาณดิจิทัล (Digital signal) เพื่อใช้ในการประมวลผลผ่านทางคอมพิวเตอร์ได้ ดังรูปที่ 2.11 และยังสามารถนำมาใช้ในการลดปัญหาของภาพเช่น ลดสัญญาณรบกวนภายในภาพ เป็นต้น

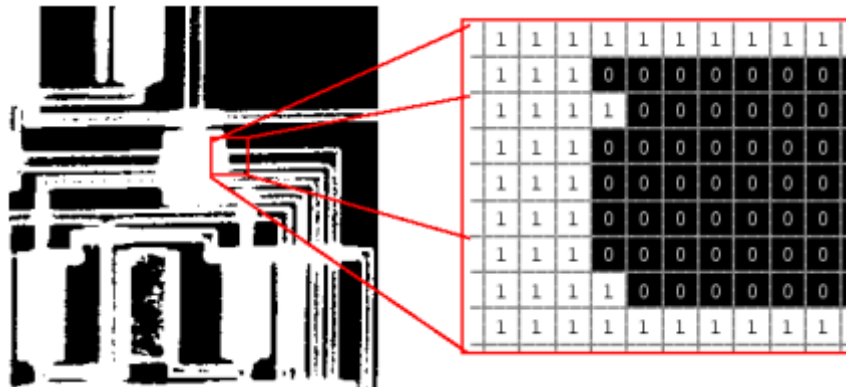
ในการแปลงภาพให้เป็นสัญญาณดิจิทัลนั้น ระบบจะนำรูปที่รับเข้ามาไปคำนวณโดยกระบวนการ Sampling และ Quantization และส่งข้อมูลออกมาในรูปแบบดิจิทัล จากนั้นคอมพิวเตอร์จะเก็บข้อมูลภาพลงหน่วยความจำ โดยการจองหน่วยความจำภายในเครื่องในรูปแบบของอาร์เรย์ (Array) โดยค่าในแต่ละช่องของอาร์เรย์ แสดงถึงคุณสมบัติต่างๆของรูปที่พิกเซลนั้นๆ และตำแหน่งของช่อง อาร์เรย์ก็เป็นตัวกำหนดตำแหน่งของพิกเซลภายในภาพด้วย



รูปที่ 2.11 การแปลงภาพอนาล็อกให้เป็นภาพดิจิทัล[26]

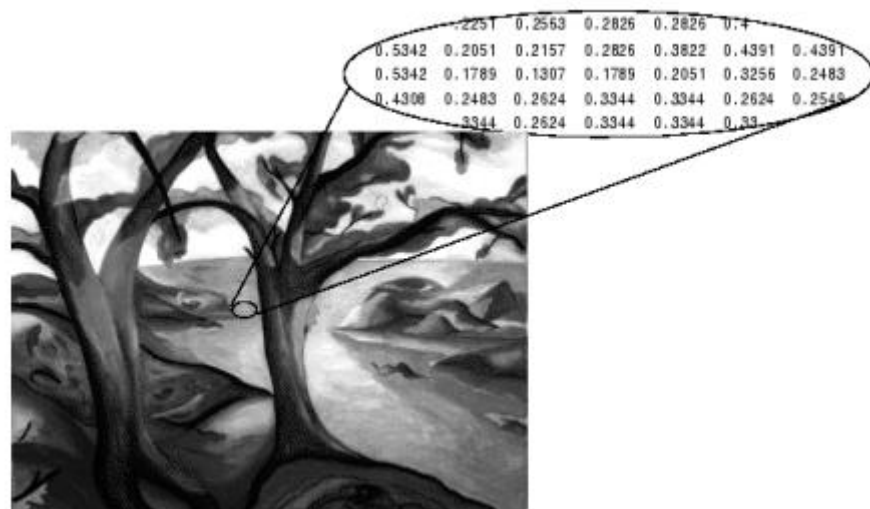
ภาพดิจิทัลที่ได้จะมีรูปแบบการเก็บเป็นเมทริกซ์ ซึ่งจะมีการจัดเก็บภาพแต่ละชนิดต่างกัน ขึ้นอยู่กับ ระบบสีของภาพดังกล่าว โดยแบ่งชนิดของภาพได้ดังนี้

- Binary image หรือ ภาพขาว-ดำ เป็นรูปที่ใช้เนื้อที่เพียง 1 บิต ต่อพิกเซล โดยค่าสีจะมีแค่สองค่าคือ 0 หรือสีดำ และ 1 หรือสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ภาพแบบ Binary หรือ ภาพขาว-ดำ[27]

- Grayscale Image หรือภาพระดับสีเทาเป็นรูปที่เก็บโดยใช้รูปแบบของอาร์เรย์ 2 มิติ โดยค่าที่เก็บจะมีค่าอยู่ในช่วงๆหนึ่ง ซึ่งระดับของสีขึ้นอยู่กับขนาดของบิตที่ใช้เก็บค่าสี ระดับความเข้มชั้นของสีจะอยู่ในช่วง 0 – 255 (8 bit) ดังรูปที่ 2.13



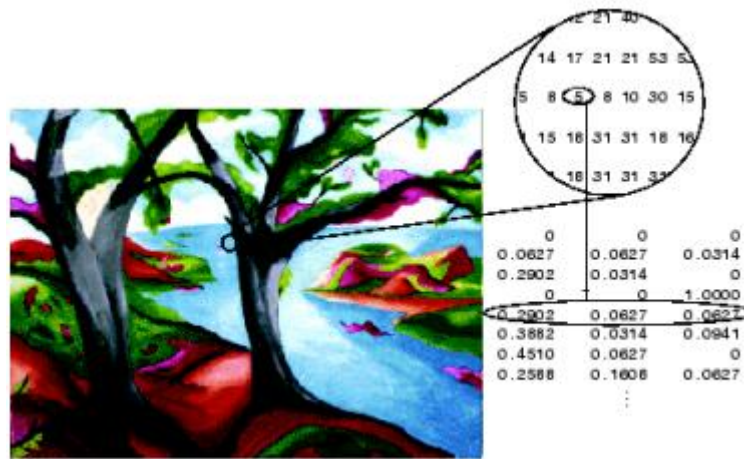
รูปที่ 2.13 ภาพแบบ Grayscale หรือ ภาพระดับสีเทา[27]

- RGB Image หรือ Truecolor Image เป็นรูปที่เก็บโดยใช้อาร์เรย์ 3 มิติ ขนาด $m \times n \times 3$ โดยที่ m คือความยาว และ n คือความกว้างของภาพในหน่วยจุดภาพ ส่วนมิติสุดท้ายนั้น ในแต่ละมิติจะเก็บค่าสีแยกกัน คือสีแดง(Red) สีเขียว(Green) และสีน้ำเงิน (Blue) ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ภาพแบบ RGB[27]

- Indexed Imageเป็นรูปที่มีรูปแบบการเก็บแบบค่าดัชนี (Indexed) คือ ภาพประเภทนี้จะเก็บค่าสีเป็นค่าดัชนีและในแต่ละช่องอาร์เรย์ จะเก็บตำแหน่งของสีค่าดัชนี นั้นๆไว้ ดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 ภาพแบบ Indexed[27]

2.9 การแบ่งส่วนของภาพ (Image Segmentation)

การแยกส่วนภาพ เป็นการแยกส่วนของข้อมูลภาพโดย แบ่งขอบเขต หรือส่วนของวัตถุในภาพออก เป็นส่วนๆมักทำหลังจากการปรับปรุงคุณภาพของภาพให้ดีขึ้นแล้วลักษณะการแยกจะ

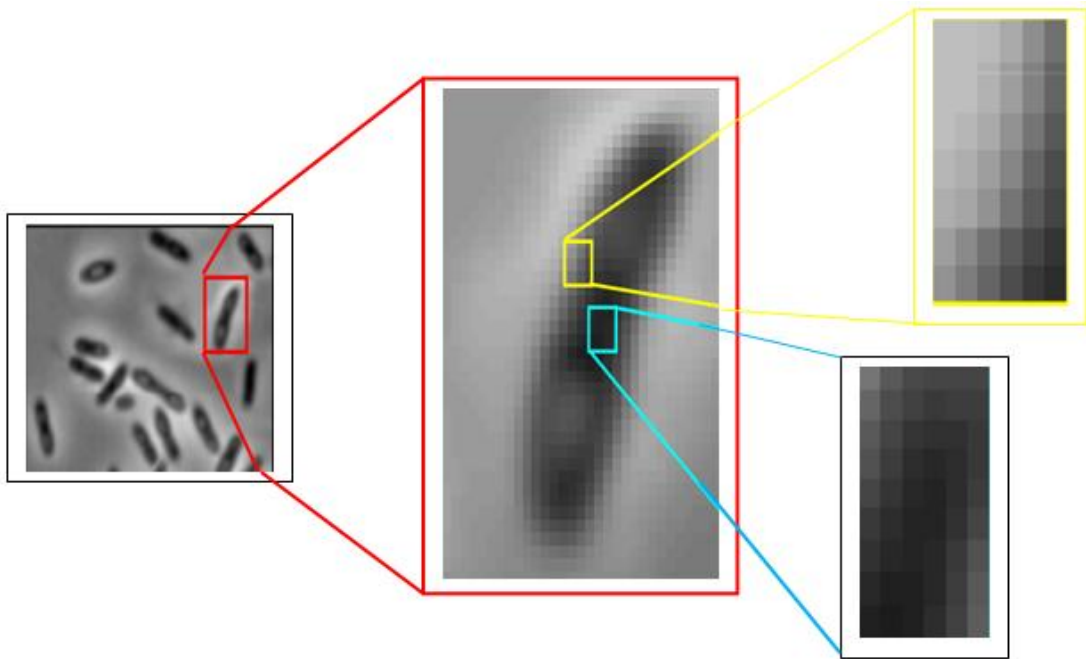
ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งานต่อ เช่น เพื่อวิเคราะห์รูปลักษณะของวัตถุ เพื่อคำนวณขนาดของวัตถุ เพื่อนับจำนวนวัตถุภายในภาพ ประโยชน์ของ Image Segmentation ได้แก่

- ลดจำนวนข้อมูลในรูปภาพที่ไม่จำเป็นในการวิเคราะห์หลัง
- จัดระเบียบข้อมูลในรูปภาพให้เป็นกลุ่มได้ดีขึ้น
- แสดงข้อมูลในรูปที่เข้าใจง่ายขึ้น

หลักการใหญ่ 2 หลักการในการแยกองค์ประกอบของภาพ

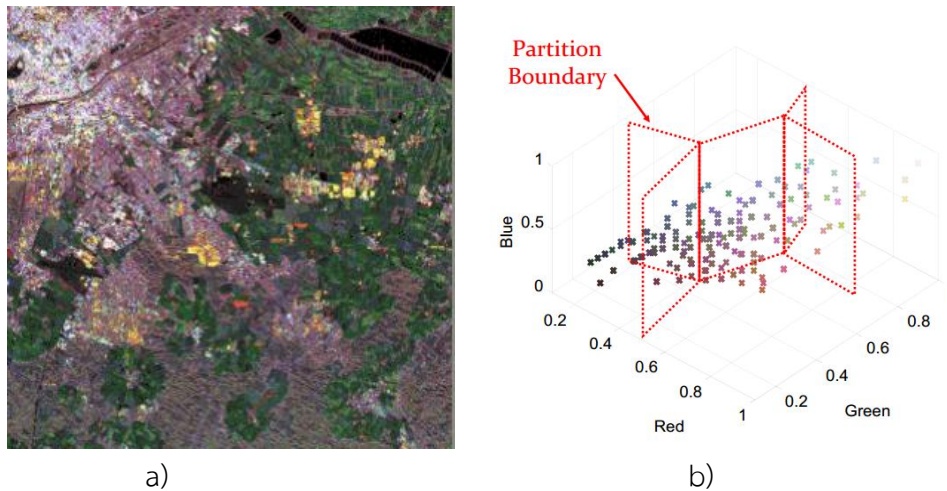
1. การแยกองค์ประกอบตามความเหมือน (Similarity) ของคุณสมบัติของพิกเซลของรูปภาพภายในพื้นที่เดียวกันดังแสดงในรูปที่ 2.16

2. การแยกองค์ประกอบโดยดูจากความไม่ต่อเนื่อง (Discontinuity) ของคุณสมบัติของพิกเซลบริเวณรอยต่อระหว่างวัตถุในภาพกับพื้นหลัง



รูปที่ 2.16 ความแตกต่างบริเวณรอยต่อและความเหมือนของพิกเซลของพื้นที่ภายใน[25]

การแยกส่วนภาพมี 2 แนวทางคือ Pixel Orientation และ Region Orientation แนวทางของ Pixel Orientation เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบของรูปภาพโดยดูจากความเหมือนกันของคุณสมบัติของพิกเซลภายในพื้นที่เพียงอย่างเดียว เช่นวิธีการ Intensity Thresholding สามารถใช้ได้กับภาพที่วัตถุกับพื้นหลังแยกกันอย่างชัดเจน แนวทาง Region Orientation สามารถนำไปใช้กับภาพสีได้โดยการแบ่ง partition ใน Feature space หรือเป็นการแยกองค์ประกอบตามสีพิกเซลนั่นเอง เช่น K-mean algorithm ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 การแยกองค์ประกอบของสีตามพิกเซล a) ภาพต้นฉบับ b) Feature space RGB[28]

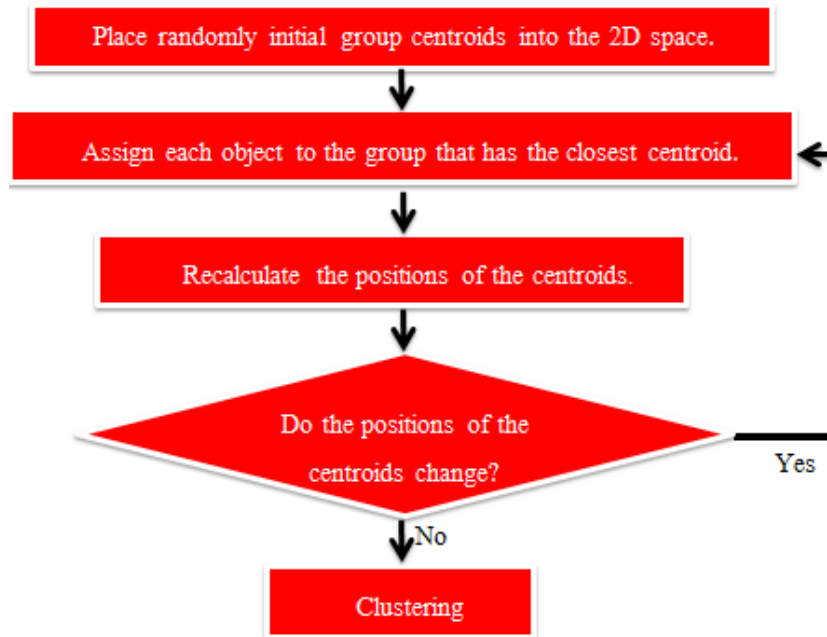
2.9.1 K-mean clustering

ขั้นตอนวิธี K-mean เป็นวิธีสำหรับการจัดกลุ่มของข้อมูล โดยชุดของข้อมูลจะจัดออกเป็น k กลุ่ม ในการจัดกลุ่มจะอาศัยการคำนวณระยะห่างเฉลี่ยของข้อมูลกับพิกัดของจุดศูนย์กลางของกลุ่ม (Centroids) ข้อมูลจะจัดอยู่ในกลุ่ม k ใดขึ้นอยู่กับระยะห่างที่สั้นที่สุดระหว่างพิกัดข้อมูลแต่ละตัวเทียบกับพิกัดของจุดศูนย์กลางของกลุ่มทุกกลุ่ม การจัดกลุ่มจะดำเนินไปเรื่อยๆ โดยจุดศูนย์กลางของกลุ่มจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับระยะห่างที่คำนวณได้ในแต่ละรอบ การจัดกลุ่มจะสิ้นสุดลงเมื่อจุดศูนย์กลางของกลุ่มทุกกลุ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ 2.1 และ 2.2 กระบวนการและตัวอย่างผลลัพธ์การจัดกลุ่มด้วยวิธี K-mean clustering ดังแสดงในรูปที่ 2.18 และรูปที่ 2.19 ตามลำดับ

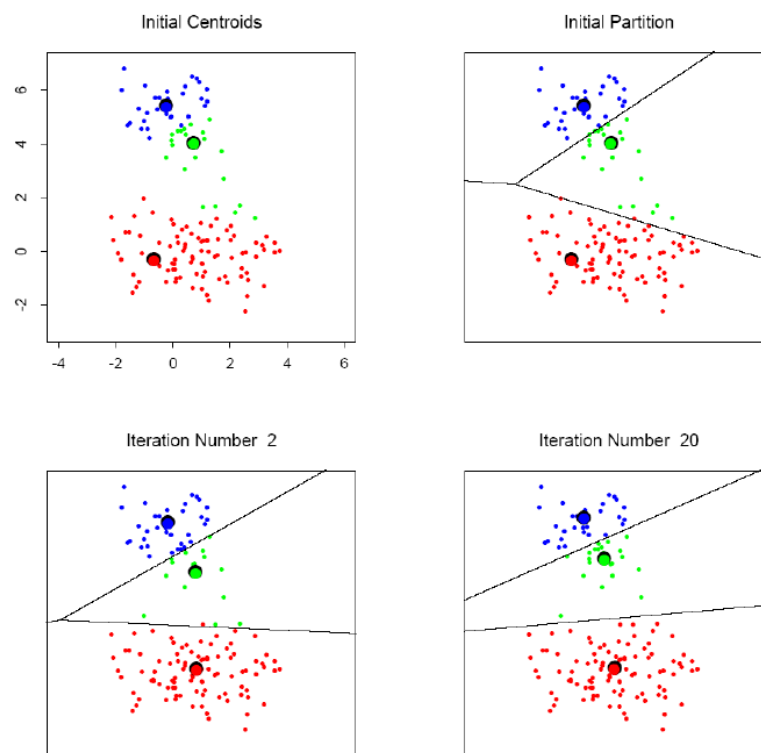
$$m_k = \frac{\sum_{i:C(i)=k} x_i}{N_k}, k = 1, \dots, K. \quad 2.1$$

$$C(i) = \operatorname{argmin}_{1 \leq k \leq K} \|x_i - m_k\|^2, i = 1, \dots, N \quad 2.2$$

โดย	x_1, \dots, x_N	หมายถึงจุดของข้อมูล
	$C(i)$	หมายถึงจำนวน cluster สำหรับ i^{th} observation
	m_k	หมายถึงค่าเฉลี่ยของ k^{th} cluster
	N_k	หมายถึงจำนวน observations ใน k^{th} cluster



รูปที่ 2.18 กระบวนการของ K-mean clustering



รูปที่ 2.19 กลุ่มข้อมูลโดยใช้ K-mean clustering[29]

2.9.2 Hough Transform

ซึ่งเป็นวิธีการใช้ในการจดจำวัตถุในรูปแบบต่างๆ โดยการตรวจหาเส้นตรง ส่วนโค้ง และวงกลมที่อยู่ในภาพ โดยสมการที่ใช้ในการหาเส้นตรง(Straight Line Hough Transform)และสมการที่ใช้ในการหาเส้นโค้ง(Circular Hough Transform) แสดงดังสมการที่ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ

$$x \cos \theta + y \sin \theta = r \quad 2.3$$

จากนั้นสร้าง accumulator cell สองมิติ $A(i,j)$ ซึ่งมีส่วนประกอบของ r_i และ θ_j กับทุกๆจุดภาพ พิกัด x,y ของจุดภาพใดๆที่อยู่บนเส้นตรงเส้นเดียวกันจะสะสมอยู่ใน accumulator cell ตัวเดียวกัน โดยมีค่า r_i และ θ_j เท่ากัน ดังนั้นถ้าจำนวนที่สะสมใน accumulator cell ตัวใดมีค่ามากกว่าค่า threshold ที่กำหนดไว้จะถูกแปลงกลับไปเป็นพิกัด x,y ซึ่งจะทำให้เราทราบว่าเส้นตรงดังกล่าวมีพิกัดที่จุดใดบ้างบนระนาบ x,y ในทำนองเดียวกันการหาส่วนโค้งและวงกลมด้วย จะใช้สมการ

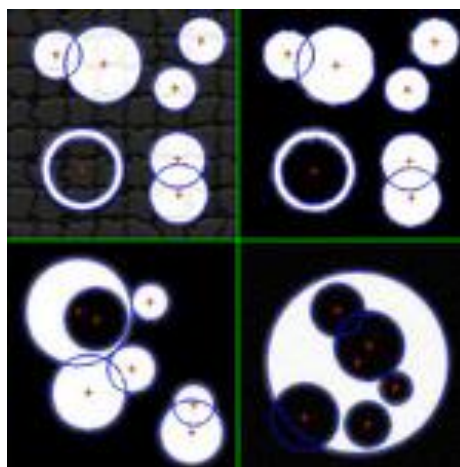
$$(x - a)^2 + (y - c)^2 = r^2 \quad 2.4$$

เมื่อ r คือระยะจากจุดศูนย์กลางถึงเส้นตรง

θ คือมุมระหว่าง r กับแนวแกน x

c คือ จุดศูนย์กลางของวงกลมในแนวแกน x และ y

การสร้าง accumulator cell ในกรณีวงกลมจะเป็น $A(i,j)$ 3 มิติซึ่งพารามิเตอร์จะประกอบด้วย C_x และ C_y และ r สำหรับวิธีการคำนวณหาพิกัด x,y ที่อยู่บนวงกลมหรือส่วนโค้งอันเดียวกันจะใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับกรณีของเส้นตรง ดังแสดงตัวอย่างผลลัพธ์ที่ได้จากการทำ Hough Transform ในรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 ผลที่ได้จากการทำ Hough Transform[30]

2.10 การสร้างส่วนที่ติดต่อกับผู้ใช้งาน (Graphic User Interface : GUI)

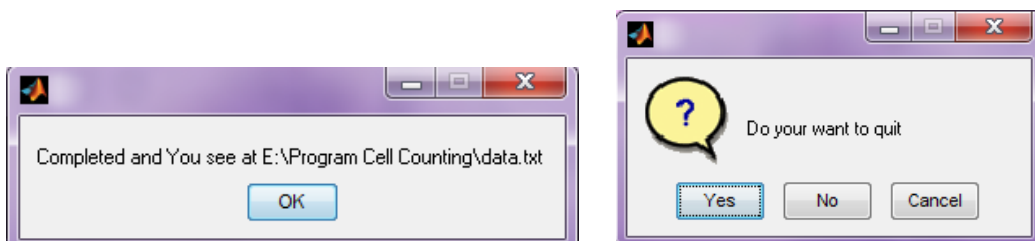
ส่วนที่ติดต่อกับผู้ใช้ เป็นสื่อกลางในการติดต่อและโต้ตอบระหว่างผู้ใช้ระบบกับคอมพิวเตอร์ ไม่ว่าจะเป็นการติดต่อทางด้ายฮาร์ดแวร์ หรือ ซอฟต์แวร์ หากเป็นสื่อทางด้าน ฮาร์ดแวร์จะประกอบไปด้วย อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ต่างๆ เช่น เม้าส์ คีย์บอร์ด ลำโพง เป็นต้น แต่หากเป็นสื่อทางด้านซอฟต์แวร์ จะหมายถึงลักษณะการแสดงผลทางจอภาพ ทำให้เกิดการปฏิสัมพันธ์กัน และทำให้ง่ายต่อการใช้งานสำหรับผู้ที่ไม่มีความรู้พื้นฐานในการเขียนโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

สื่อทางด้านซอฟต์แวร์จะใช้ภาษาทางคอมพิวเตอร์ในการสร้าง GUI ตัวอย่างภาษาที่นำมาใช้งานทางคอมพิวเตอร์เช่น ภาษาซี ภาษาจาวา เป็นต้น ปัจจุบันมีโปรแกรมที่สามารถสร้าง GUI หลายโปรแกรมตัวอย่างเช่น โปรแกรม Netbeans โปรแกรม MATLAB เป็นต้น ตัวอย่างการสร้าง GUI ในโปรแกรม MATLAB ดังรูปที่ 2.21 ในการสร้าง GUI จะประกอบด้วย การวางส่วนประกอบต่างลงใน GUI และ การเขียนคำสั่งเพื่อกำหนดการทำงานของส่วนต่างๆ



รูปที่ 2.21 ตัวอย่างของหน้าจอ GUI

จากรูปที่ 2.21 เป็นตัวอย่างหน้าจอ GUI ที่ใช้ในการคำนวณเลข จะมีช่องรับค่าและปุ่มที่ทำหน้าที่ในการบวกเลขและนำมาแสดงผล ใน GUI ซึ่งสามารถสร้าง dialog box เพื่อทำหน้าที่ในการเตือนความจำ หรือถามผู้ใช้งานได้ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 ตัวอย่าง dialog box ในลักษณะ GUI

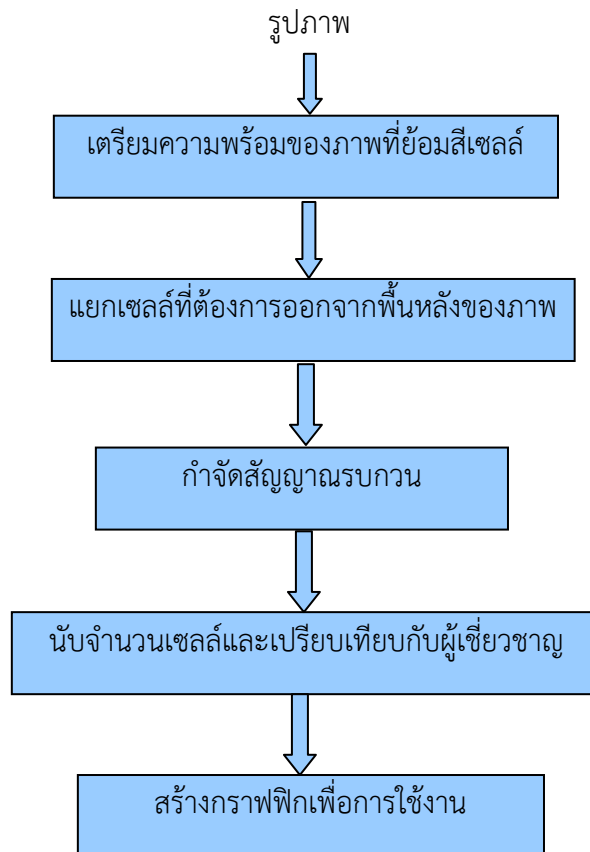
บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานในวิทยานิพนธ์นี้มุ่งเน้นการสร้างและพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการนับเซลล์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการประมวลผลภาพพร้อมกับการเขียนอัลกอริทึมทางคอมพิวเตอร์ และประดิษฐ์โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการนับเซลล์โดยสามารถจำแนกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการนับเซลล์แทนวิธีการนับด้วยตาผ่านกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป ในการวิจัยจะแบ่งออกเป็น 5 ส่วน คือ

1. การเตรียมความพร้อมของภาพเซลล์ที่ย้อมสีแล้ว (Preprocessing)
2. การแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง (Segmentation)
3. การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ (Noise Reduction)
4. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย (Cell Counting)
5. การสร้างกราฟฟิกเพื่อการใช้งาน (Graphic User Interface: GUI)

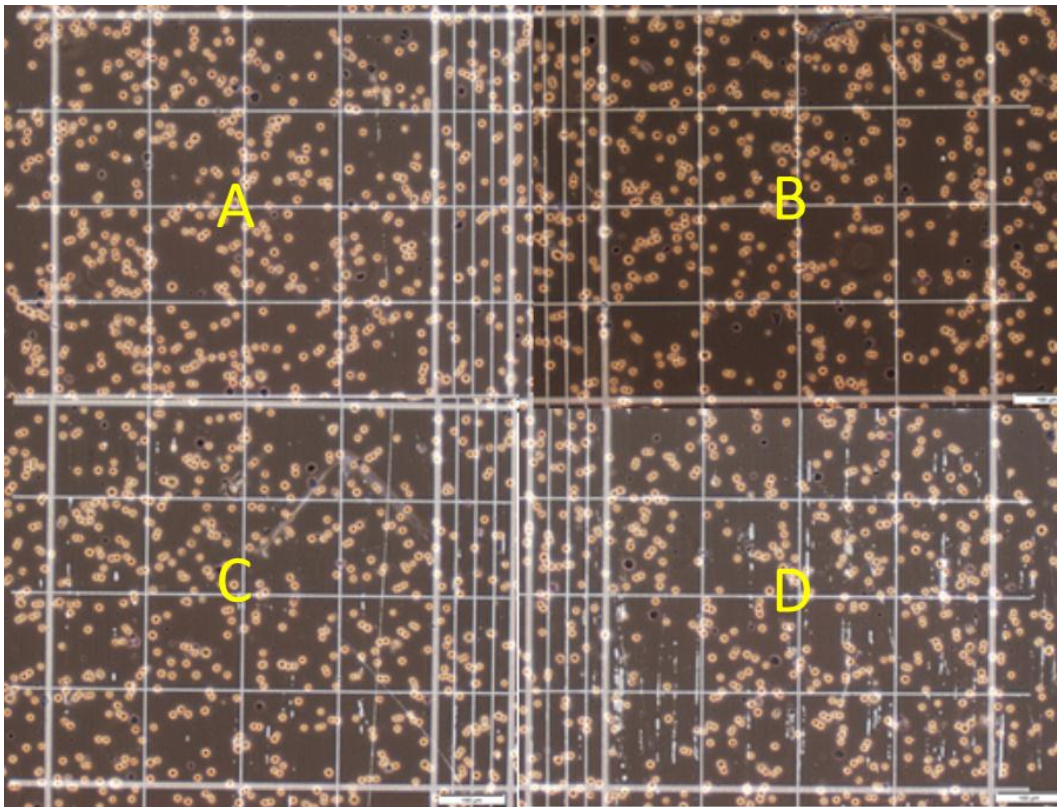
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้ แสดงในรูปที่ 3.1



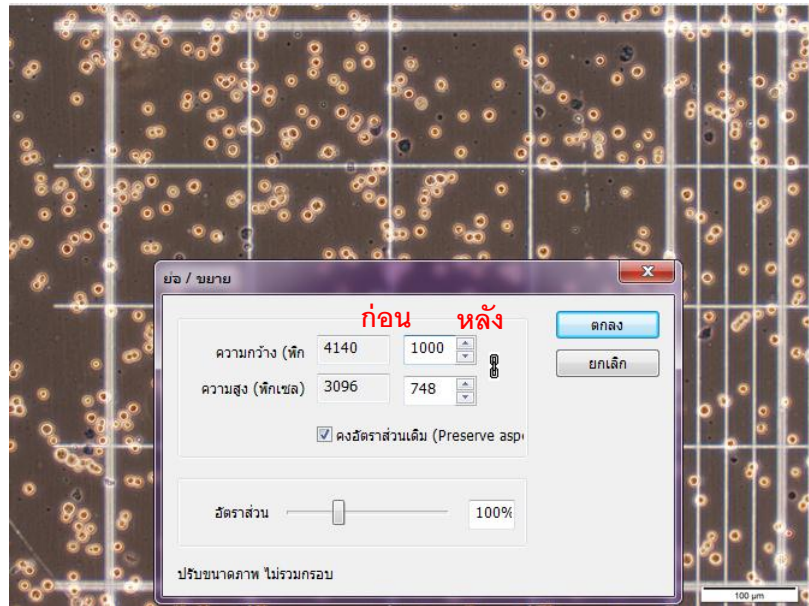
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมความพร้อมของภาพที่ย้อมสีเซลล์แล้ว (Preprocessing)

เป็นขั้นตอนของการเตรียมความพร้อมของภาพหลังจากที่ได้ภาพมาจากผู้เชี่ยวชาญ โดยจะนำไปใช้ในการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง ภาพที่ใช้อยู่ในโหมด RGB ในภาพหนึ่งภาพจะประกอบด้วยรูปภาพย่อยๆ อีก 4 รูปภาพ แต่ละรูปภาพย่อยจะประกอบด้วย 16 เฟรมย่อย ตาม hemocytometers ดังที่กล่าวในบทที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 3.2 และมีการปรับขนาดของรูปให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้มีความเหมาะสมกับงานและหน่วยความจำสำรองของคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการประมวลผล ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ภาพของเซลล์มะเร็งที่ผ่านการย้อมสีแล้ว

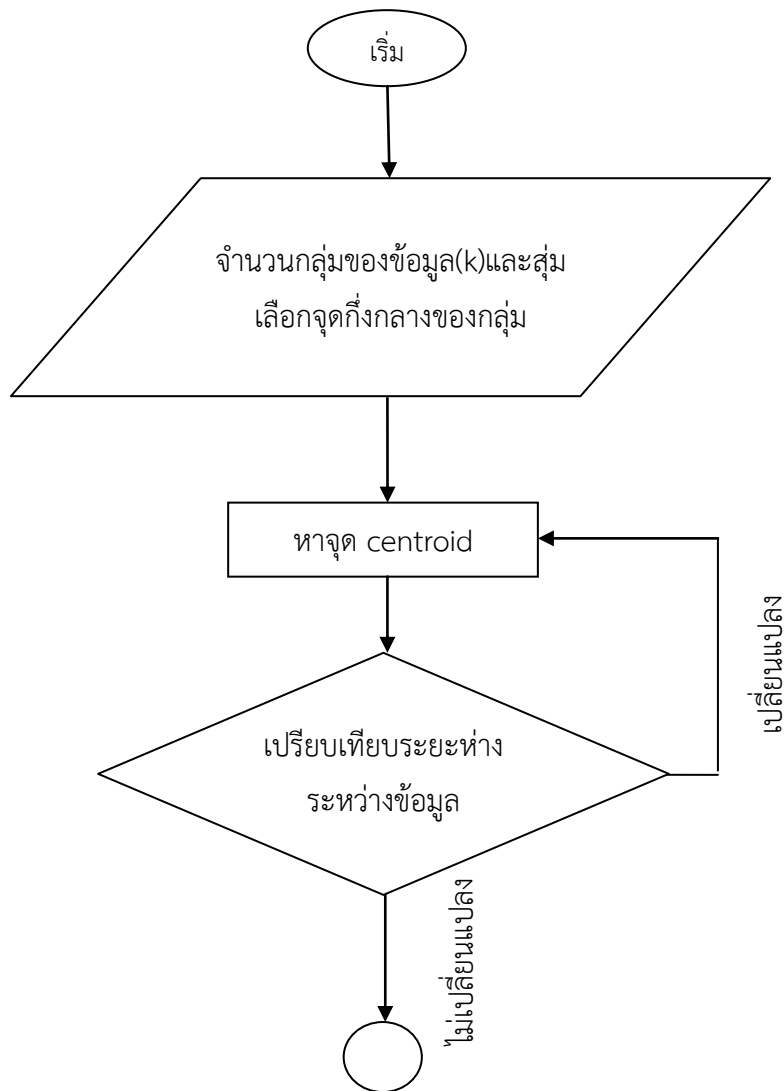


รูปที่ 3.3 การปรับขนาดของรูปภาพโดยใช้โปรแกรม PhotoScape

3.2 การแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง (Segmentation)

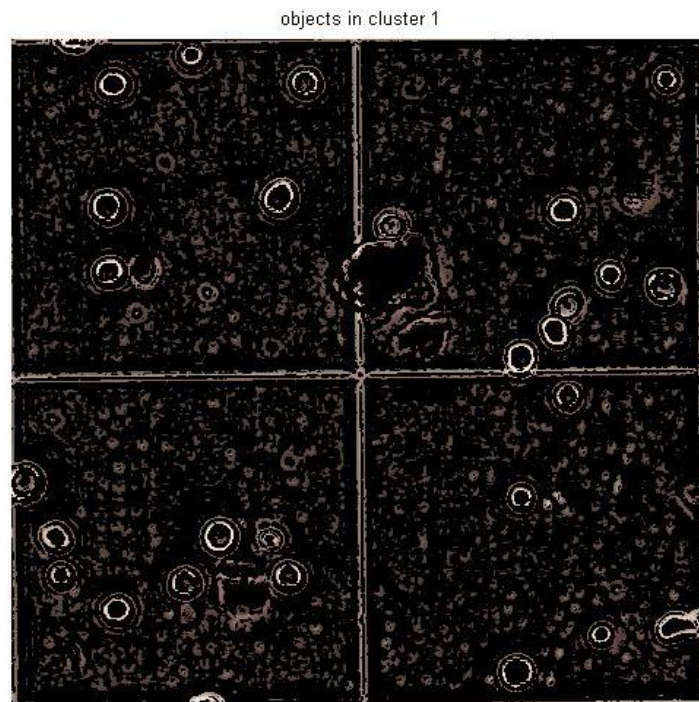
เป็นขั้นตอนการแยกส่วนที่เป็นเซลล์ออกจากพื้นหลังของภาพ เพื่อที่จะนำผลของการแยกเซลล์ไปทำการนับเซลล์ การแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังของภาพจะใช้วิธีการจัดกลุ่มข้อมูลโดยวิธี K-mean Clustering ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยขั้นตอนวิธีการของ K-mean Clustering ประกอบด้วย

1. กำหนดค่าจำนวนกลุ่ม (k) ไว้ล่วงหน้า
2. สุ่มเลือกจุดกึ่งกลางของแต่ละกลุ่ม
3. วัดระยะห่างระหว่างข้อมูลหรือระยะห่างน้อยที่สุดในการแบ่งกลุ่มข้อมูล
4. คำนวณหาจุดกึ่งกลางใหม่ของแต่ละกลุ่ม
5. วัดระยะห่างของแต่ละข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบกับจุดกึ่งกลางใหม่ เพื่อกำหนดกลุ่มให้กับข้อมูล
6. กระทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 - 5 จนกว่าจะได้จุดกึ่งกลางที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่ม

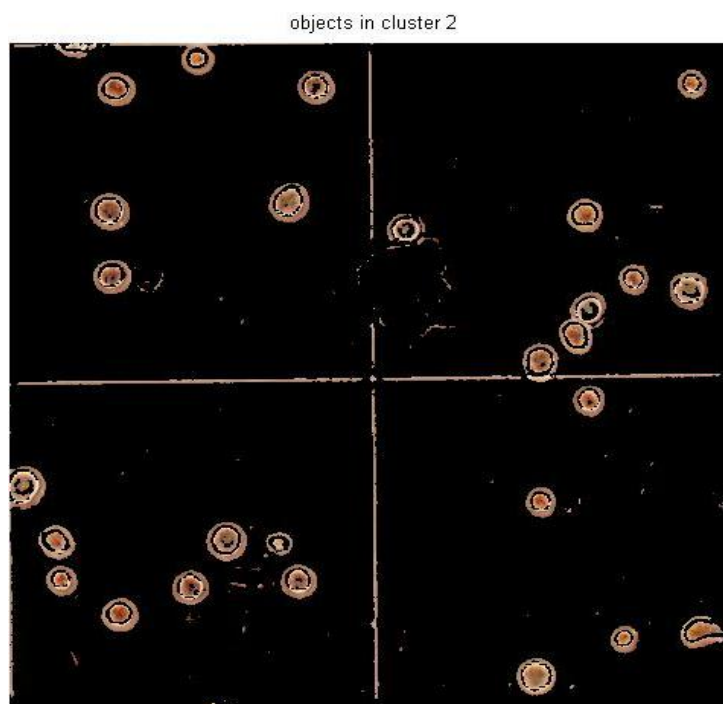


รูปที่ 3.4 ขั้นตอนของกระบวนการ K-mean Clustering

โดยในงานวิจัยได้กำหนดกลุ่มข้อมูลเป็น 4 กลุ่มข้อมูล ($k = 4$) โดยใช้ข้อมูลจากคุณสมบัติระบบสี RGB ข้อมูลที่นำมาทำการจัดกลุ่มข้อมูลด้วยวิธีการของ K-mean clustering คือ ข้อมูลของค่าที่จุดพิกเซลแต่ละพิกเซล ผลจากการทำการจัดกลุ่มข้อมูลแสดงได้ดังรูปที่ 3.5 และรูปที่ 3.6 โดยข้อมูลกลุ่มที่ 1 เป็นลักษณะขอบของเซลล์ ข้อมูลกลุ่มที่ 2 เป็นข้อมูลเซลล์ที่มีชีวิต ข้อมูลกลุ่มที่ 3 เป็นข้อมูลพื้นหลัง ข้อมูลกลุ่มที่ 4 เป็นข้อมูลเซลล์ที่ตาย โดยรูปที่ 3.7 แสดงผลการจัดกลุ่มข้อมูลทั้ง 4 กลุ่มข้อมูล ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไปจะใช้ข้อมูลเฉพาะกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4

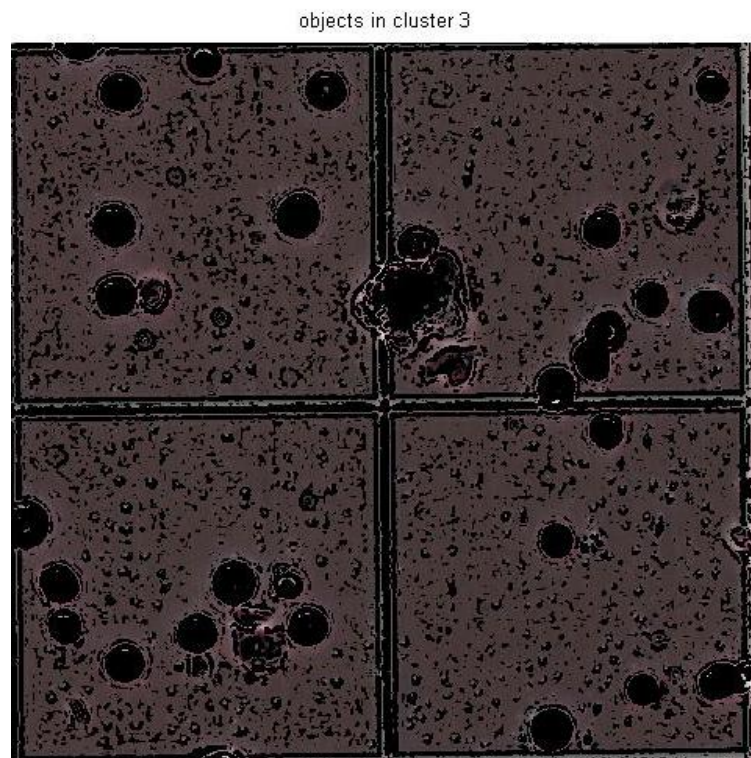


a)

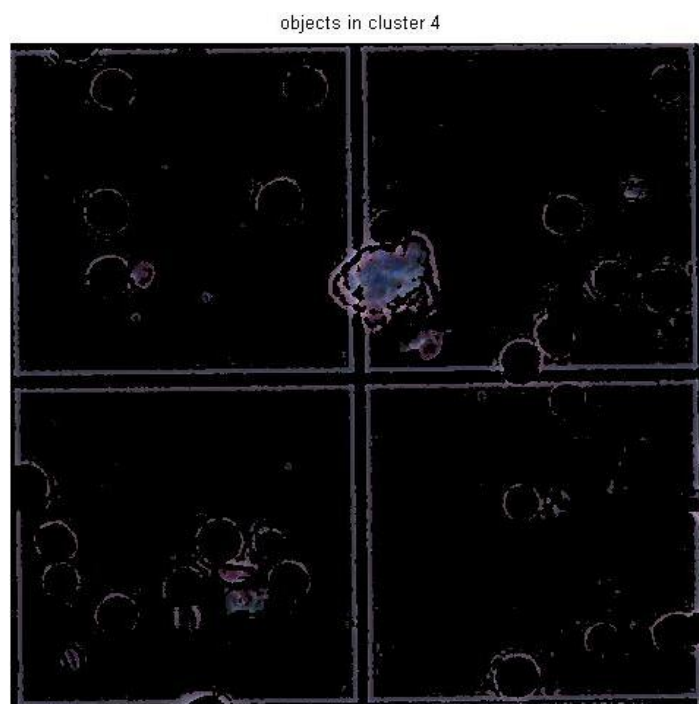


b)

รูปที่ 3.5 ผลการทำการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค K-mean Clustering a) กลุ่มข้อมูลที่เป็นลักษณะขอบของเซลล์ที่มีชีวิต b) กลุ่มข้อมูลของเซลล์ที่มีชีวิต

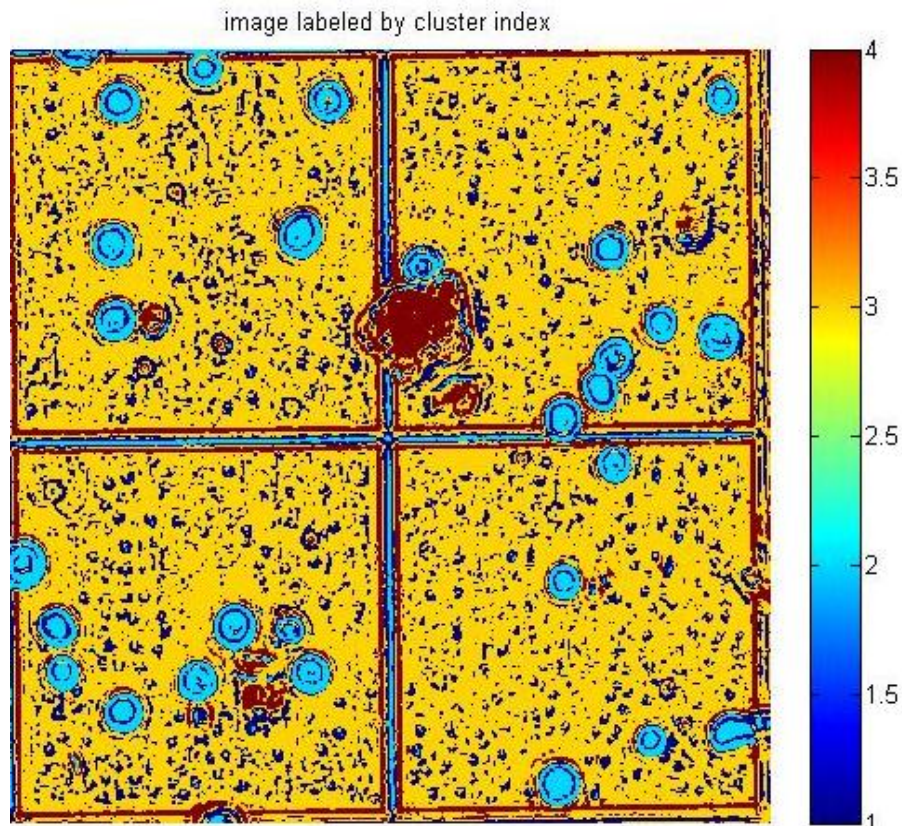


a)



b)

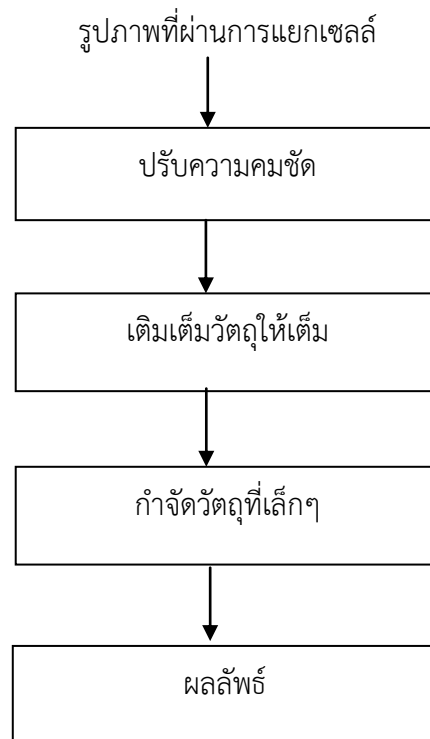
รูปที่ 3.6 ผลการทำการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค K-mean Clustering a) กลุ่มข้อมูลที่เป็นพื้นหลัง
b) กลุ่มข้อมูลของเซลล์ที่ตาย



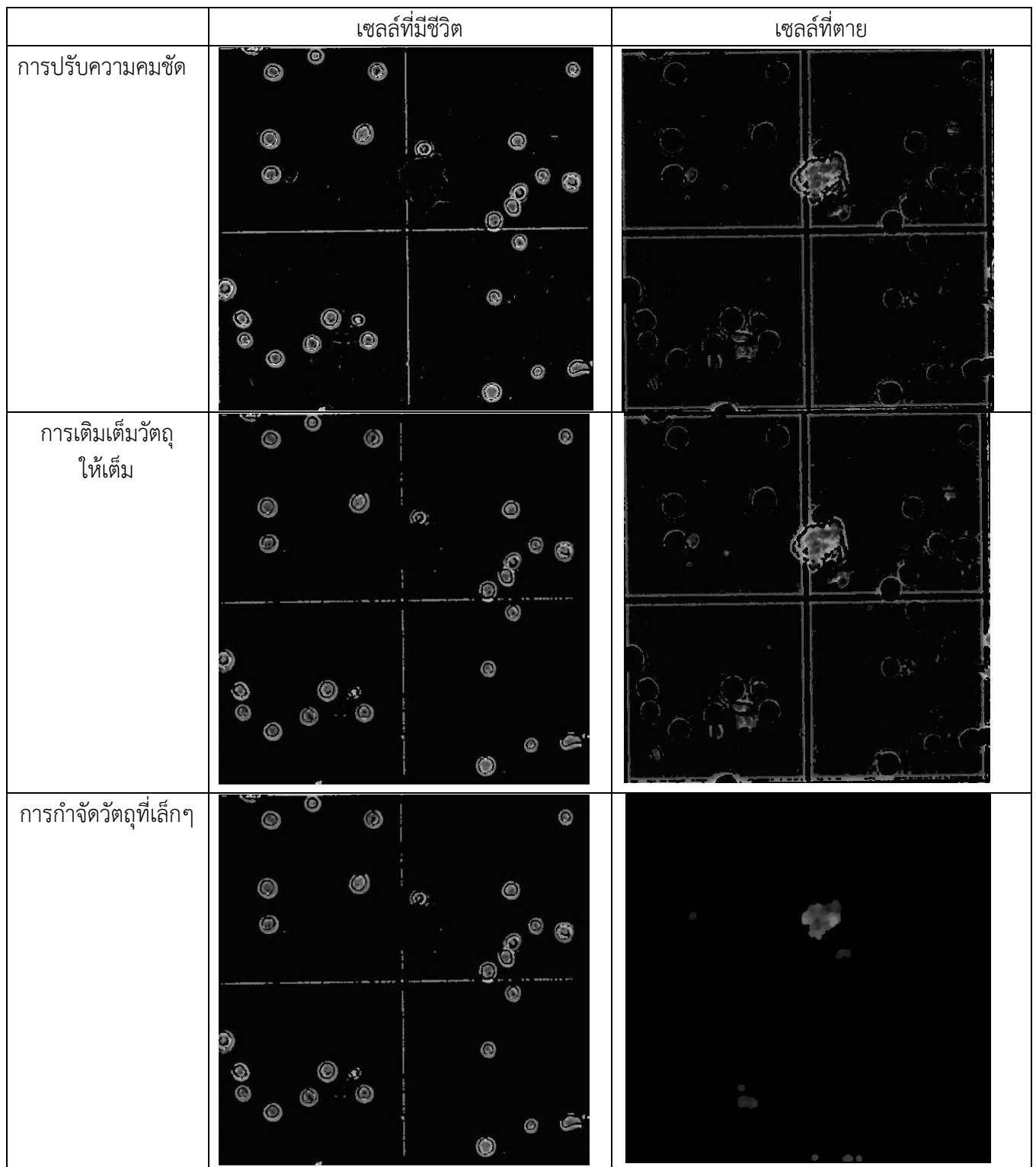
รูปที่ 3.7 การจัดกลุ่มของข้อมูลทั้ง 4 กลุ่มข้อมูล

3.3 การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ (Noise Reduction)

เป็นขั้นตอนการกำจัดสิ่งที่ไม่จำเป็นในรูปภาพออกจากรูปภาพ เนื่องจากรูปภาพที่ผ่านกระบวนการจัดกลุ่มข้อมูลจะมีสิ่งที่ไม่จำเป็นอยู่ในรูปภาพ หากนำไปใช้จะเกิดความผิดพลาดเกิดขึ้น โดยนำรูปภาพเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายมาทำการกำจัดสิ่งที่ไม่จำเป็นออกจากรูปภาพ ดังรูปที่ 3.8 โดยแบ่งออกเป็นภาพเซลล์มีชีวิต และภาพเซลล์ที่ตาย การกำจัดสิ่งรบกวนในภาพเซลล์ได้แก่ ปรับความคมชัดของวัตถุ และเติมเต็มส่วนที่เป็นช่องว่าง และกำจัดส่วนที่กระจัดกระจายในรูปภาพที่เป็นสิ่งเล็กๆ ผลลัพธ์ที่ได้เมื่อได้กำจัดสัญญาณรบกวนออกจากรูปภาพดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน



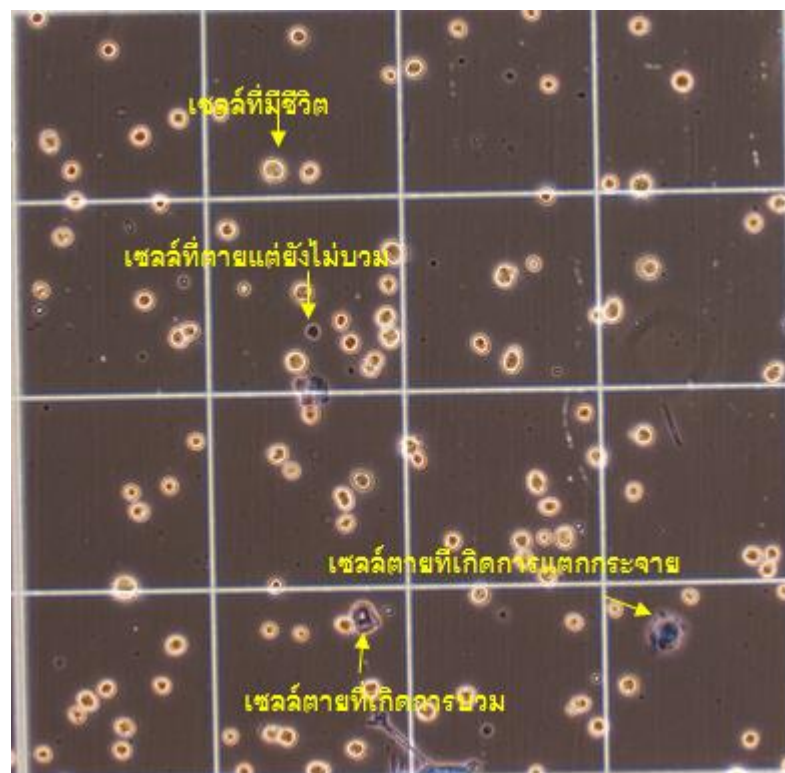
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างการกำจัดสัญญาณรบกวนในรูปภาพ

3.4 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

เป็นการนับเซลล์ที่อยู่ในภาพซึ่งมีทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ผลของการนับเซลล์สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หัตถ์ของการให้ยาแก่เซลล์มะเร็ง โดยจะแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากกันเพื่อทำการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งสามารถแยกลักษณะของเซลล์ได้เป็น 2 ลักษณะคือ

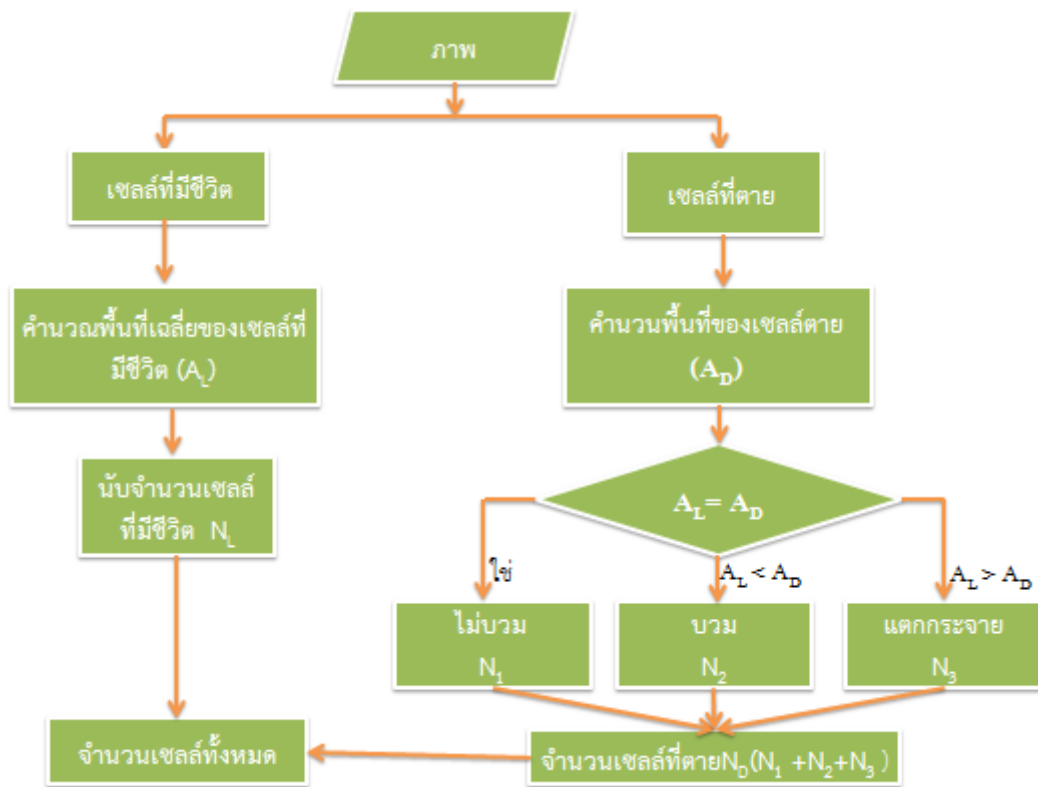
1. เซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะสว่าง
2. เซลล์ที่ตายจะมีลักษณะแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ
 - 2.1 เริ่มตาย เซลล์จะมีสีดำ รอบนอกจะเป็นวงสีขาวแต่เซลล์ยังไม่บวมโต
 - 2.2 เซลล์เริ่มมีการบวมโต มีขนาดใหญ่ขึ้น
 - 2.3 เซลล์ที่บวมจะแตกออก กระจายอยู่บริเวณรอบ

ลักษณะของเซลล์แต่ละลักษณะแสดงได้ดังรูปที่ 3.10 และกระบวนการแยกลักษณะของเซลล์เพื่อการนับเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ในภาพโดยแยกเป็นจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต และจำนวนของเซลล์ที่ตาย ได้ดังรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.10 ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

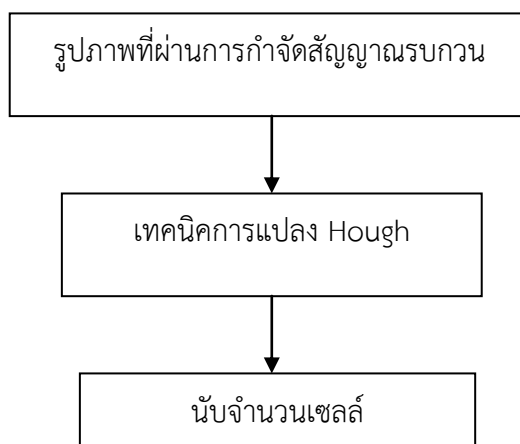
กระบวนการคัดแยกเซลล์ออกจากกัน



รูปที่ 3.11 กระบวนการในการแยกลักษณะเซลล์เพื่อการนับเซลล์

3.4.1 การนับเซลล์ที่มีชีวิต

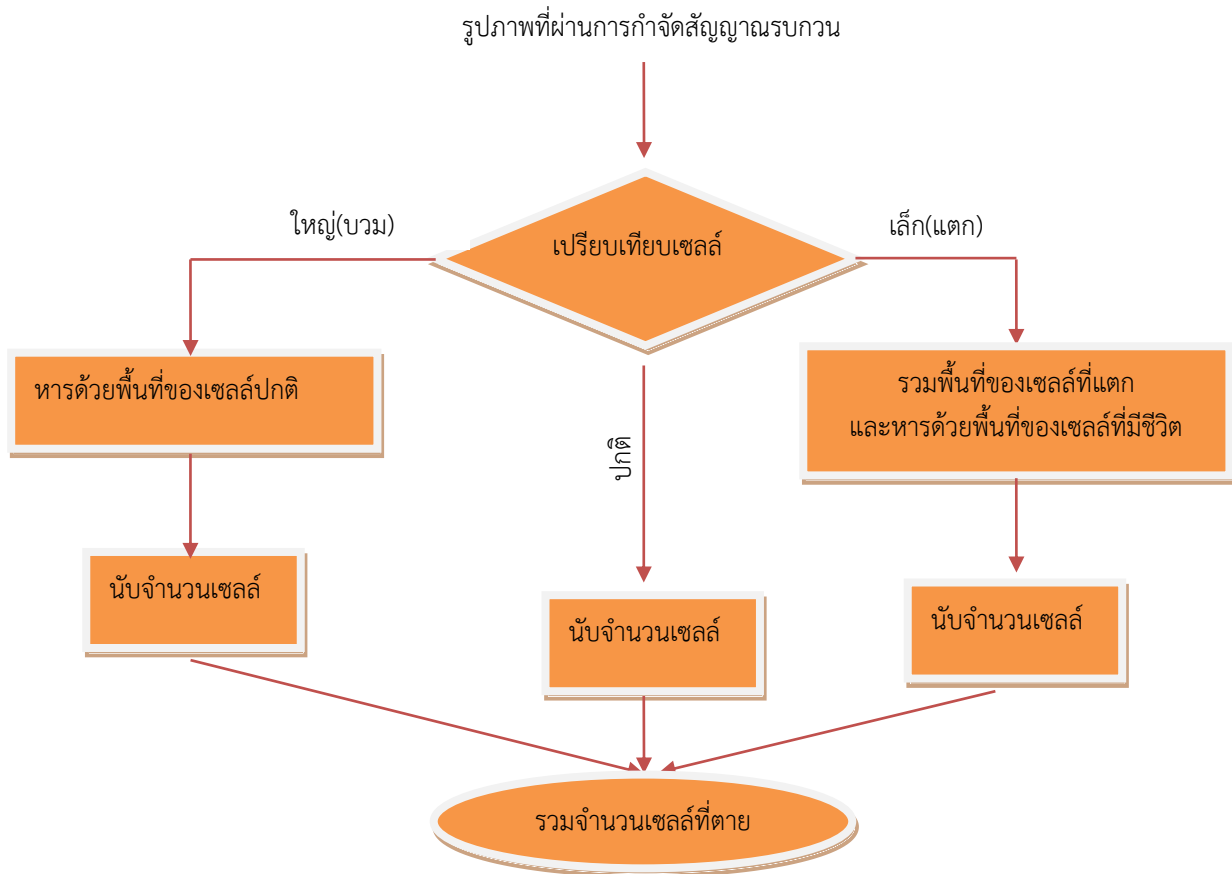
ในการนับเซลล์ที่มีชีวิตจะประกอบไปด้วยขั้นตอนของการใช้เทคนิคของ Hough Transform ซึ่งก็คือการระบุตัวตนของวัตถุ และการล้อมรอบเป็นวงกลม โดยใช้ภาพที่ผ่านการกำจัดสัญญาณรบกวนแล้ว เป็นข้อมูลนำเข้า (Input) ดังรูปที่ 3.12 ที่แสดงขั้นตอนการนับเซลล์ที่มีชีวิต



รูปที่ 3.12 ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์เซลล์ที่มีชีวิต

3.4.2 การนับเซลล์ที่ตาย

เซลล์ที่ตายสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ เซลล์ที่ตายปกติ เซลล์ตายที่บวม และ เซลล์ตายที่แตกเป็นเศษเซลล์ ดังนั้นการนับเซลล์จะต้องมีการนับจำนวนของเซลล์ที่แตกและเกิดการกระจาย ซึ่งการนับเซลล์ที่ตายจะมีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.13 โดยทำการเปรียบเทียบกับขนาดพื้นที่ของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้ามีขนาดใหญ่กว่าพื้นที่เซลล์ที่มีชีวิต จะจัดกลุ่มอยู่ในประเภทเซลล์บวมและทำการหารด้วยพื้นที่เซลล์ที่มีชีวิต ถ้ามีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่มีชีวิต ให้จัดอยู่ในกลุ่มเซลล์แตก จากนั้นจะทำการรวมพื้นที่ของเซลล์แตกทั้งหมดแล้วหารด้วยพื้นที่ของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าขนาดพื้นที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่มีชีวิตให้จัดกลุ่มอยู่ในเซลล์ตายปกติ แล้วนับเซลล์ทั้ง 3 ประเภทรวมกัน



รูปที่ 3.13 ขั้นตอนการนับเซลล์ที่ตาย

เซลล์ที่ได้จากการนับด้วยโปรแกรมจะต้องนำมาเปรียบเทียบความถูกต้องกับผู้เชี่ยวชาญทางด้านการนับเซลล์ ซึ่งประสิทธิภาพของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อการนับเซลล์จะพิจารณาจากความถูกต้องของการนับเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้โดยค่าความถูกต้องคำนวณได้จากสมการที่ 3.1

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = 100 - \frac{|A - B|}{B} \times 100 \quad 3.1$$

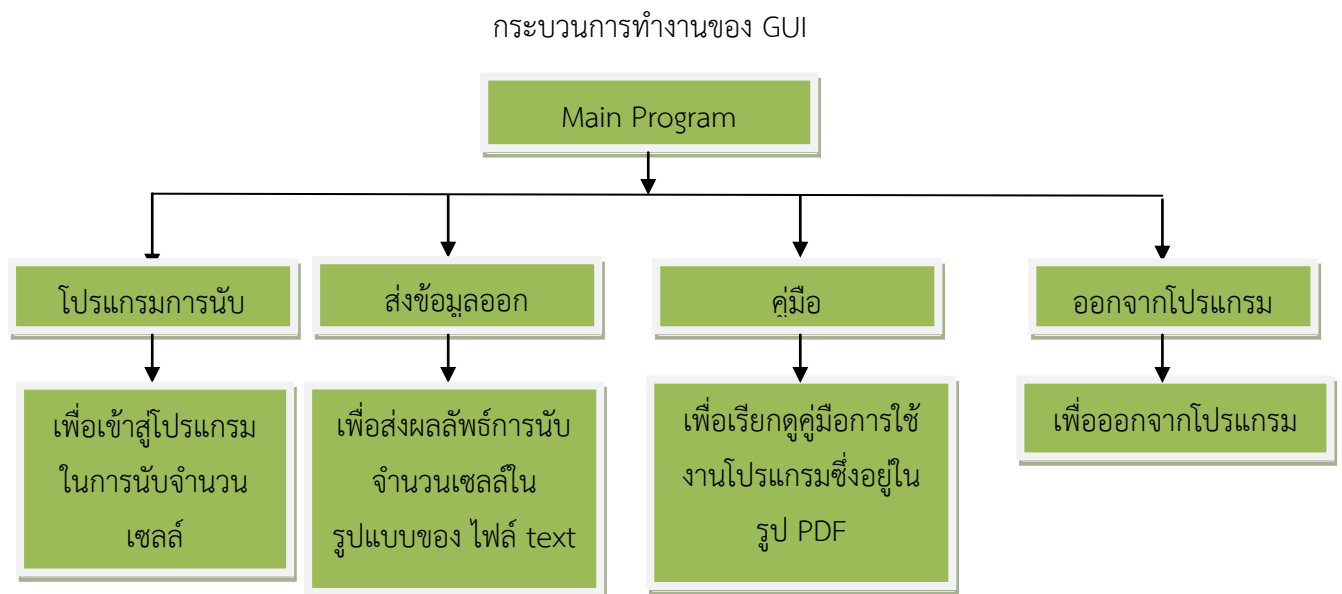
เมื่อ A คือ จำนวนที่โปรแกรมนับได้

B คือ จำนวนที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้

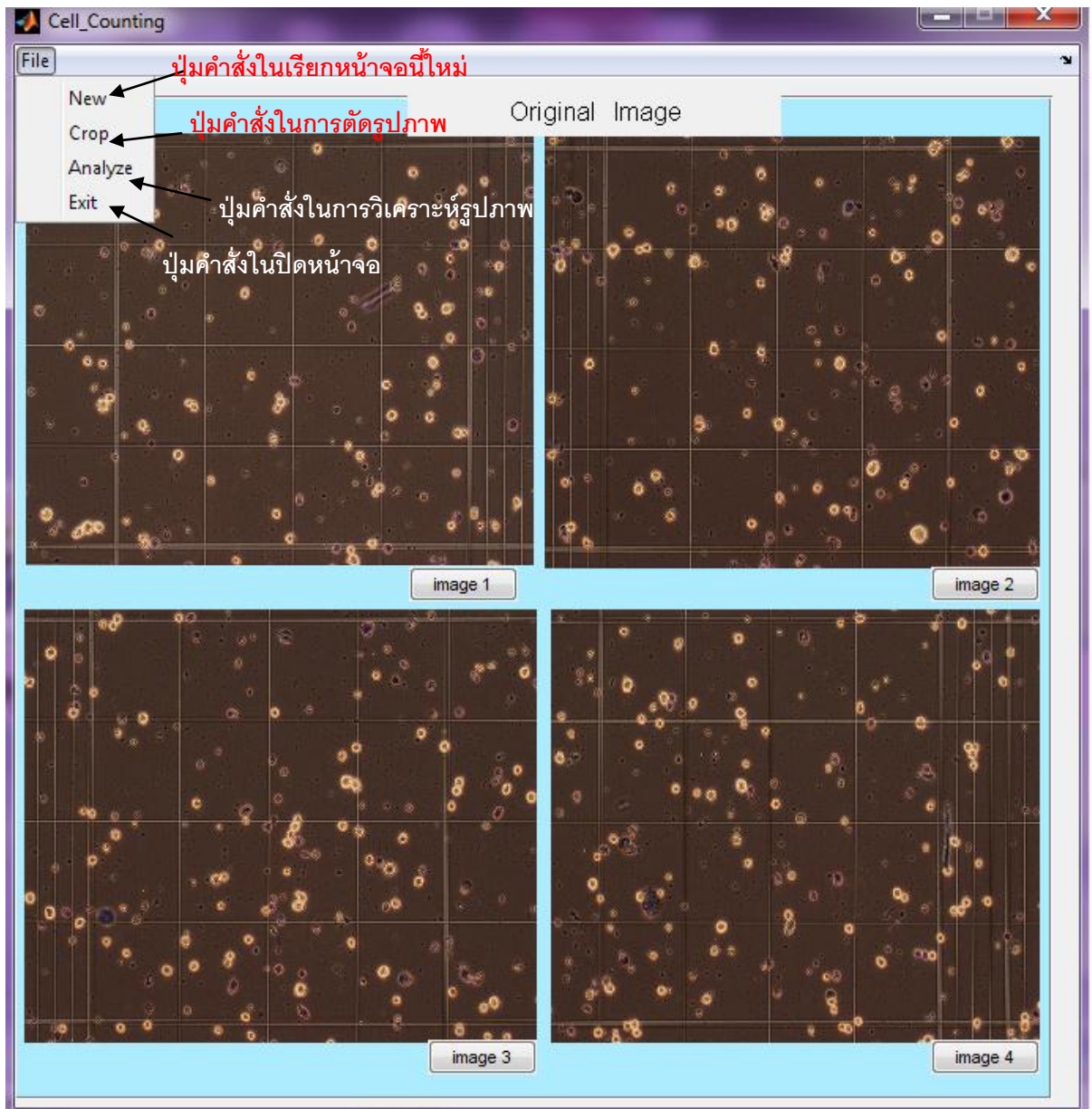
3.5 การสร้างกราฟฟิกเพื่อการใช้งาน (Graphic User Interface: GUI)

ในการสร้าง GUI เพื่อให้ง่ายและสะดวกต่อการใช้งาน โดยเลือกใช้โปรแกรม MATLAB ในการสร้าง GUI ซึ่งมีแนวคิดที่จะให้มีหน้าแรกของ GUI ประกอบไปด้วยปุ่มคำสั่งต่างๆที่ใช้ในการทำงาน และปุ่มที่สามารถเรียกดูคู่มือการใช้งานโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3.14 โดย GUI ที่สร้างขึ้นจะประกอบไปด้วยหน้าต่างหลักจำนวน 3 หน้าต่างคือ

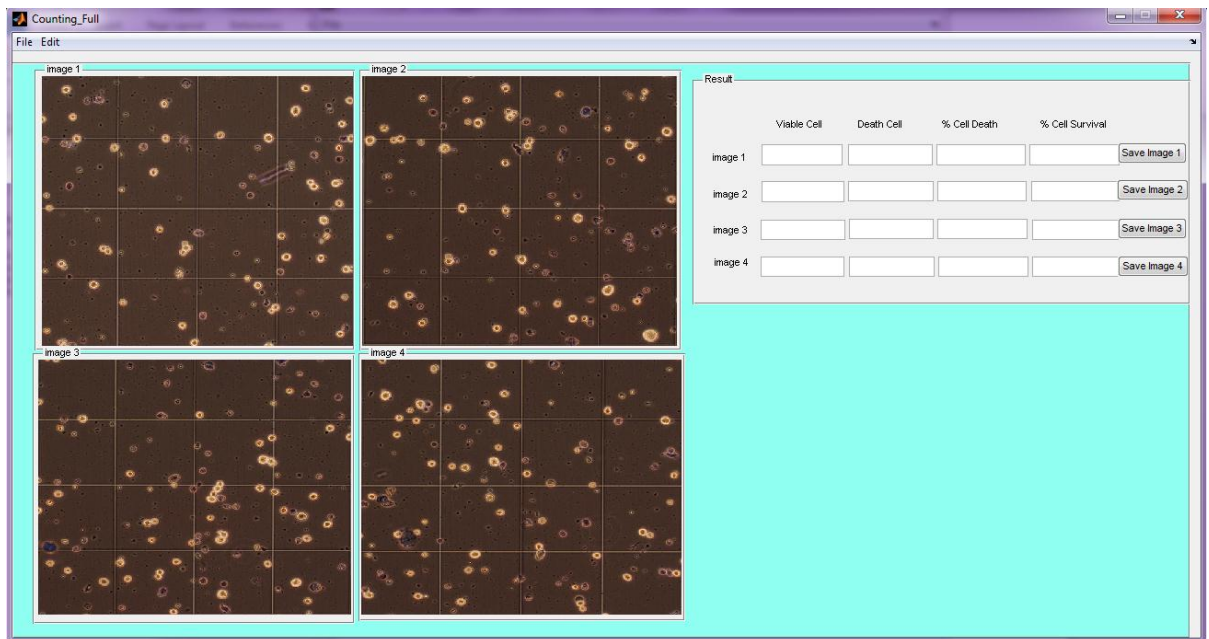
- 3.5.1 หน้าต่างแสดงรูปภาพต้นฉบับ ดังแสดงในรูปที่ 3.15
- 3.5.2 หน้าต่างแสดงผลการนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.16
- 3.5.3 หน้าต่างในการแก้ไขการนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.17



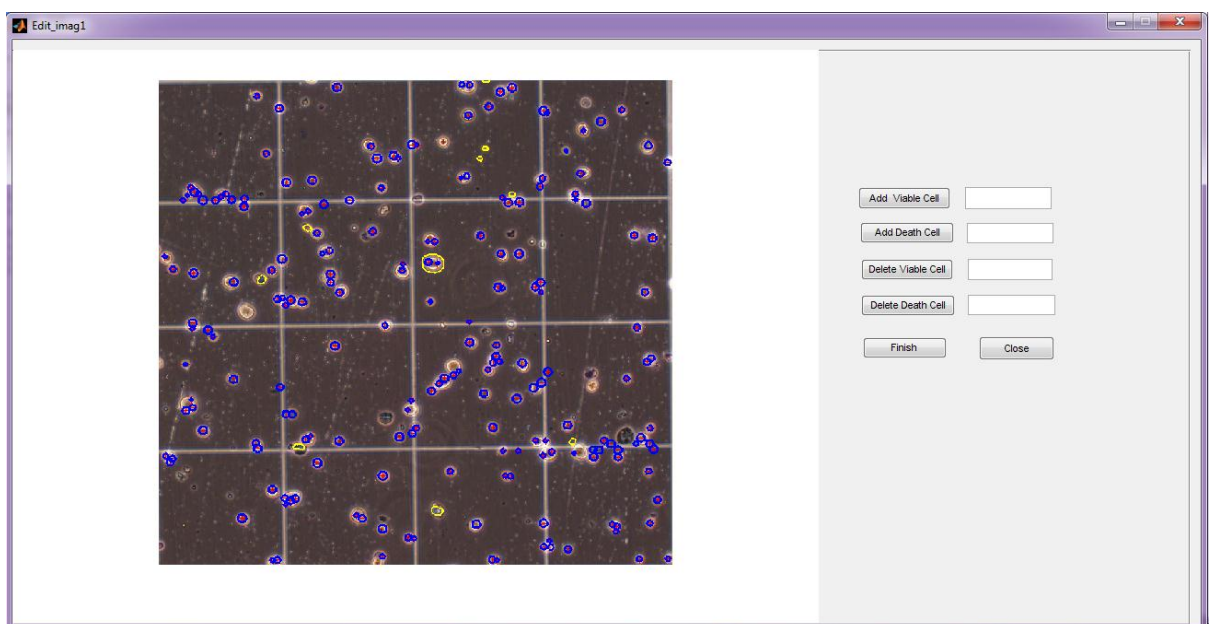
รูปที่ 3.14 แนวคิดโครงสร้างการทำงานของ GUI



รูปที่ 3.15 หน้าต่างแสดงรูปภาพต้นฉบับที่เปิดมาจาก GUI ที่ได้ออกแบบไว้



รูปที่ 3.16 หน้าต่างในการแสดงผลการนับ



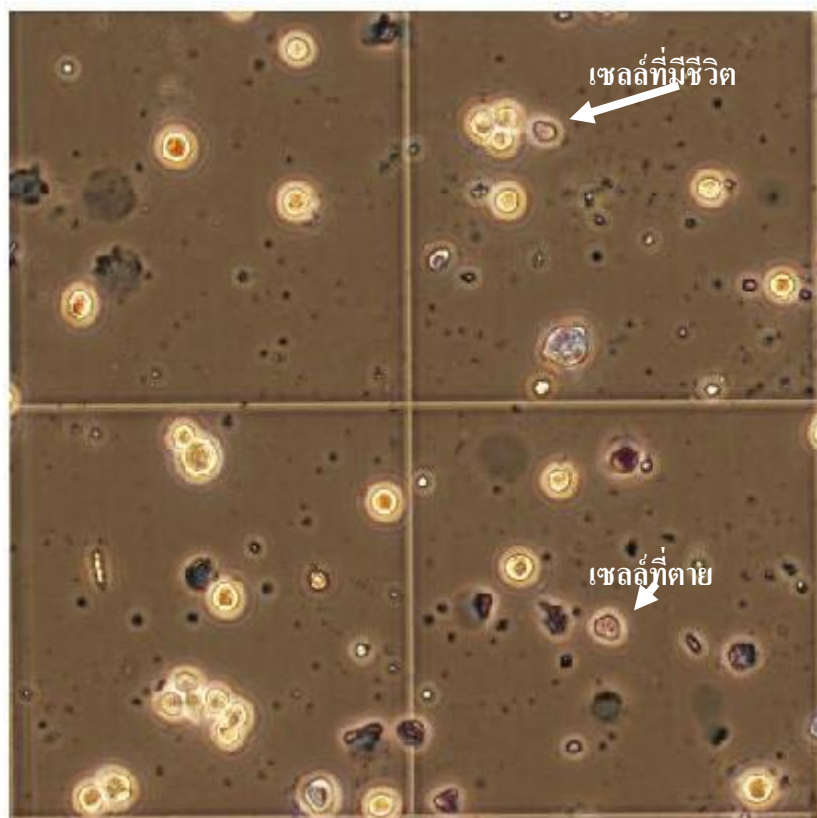
รูปที่ 3.17 หน้าต่างแก้ไขจำนวนเซลล์

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ผลลัพธ์จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการนับเซลล์ จะถูกนำเสนอในบทนี้ ในการทดสอบจะใช้ภาพที่ผ่านเทคนิค Trypan blue dye exclusion stain ซึ่งเป็นภาพที่ได้มาจากผู้เชี่ยวชาญที่ทำการทดลองให้ยาแก่เซลล์มะเร็งและดูผลของยาที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งและได้ทำการย้อมสีและถ่ายเป็นภาพเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์จำนวน 20 ภาพ ซึ่งจัดเก็บในรูปแบบของไฟล์ TIFF ในภาพจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะมีลักษณะเป็นวงกลมที่สว่างและเซลล์ที่ตายซึ่งติดสีที่ได้ย้อมดังแสดงในรูปที่ 4.1

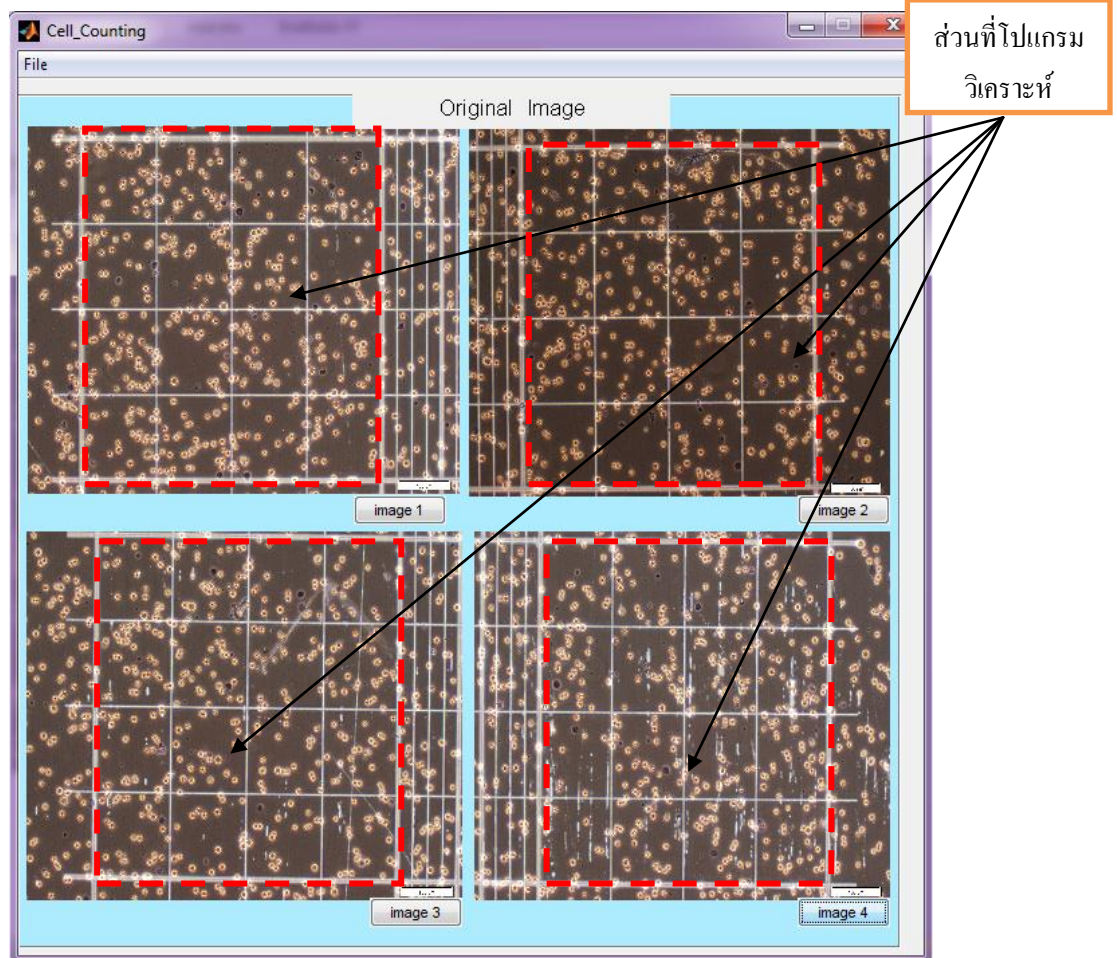
ภาพที่ใช้ในการทดลองก่อนที่จะทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง กำจัดสิ่งรบกวน และนับเซลล์จะต้องผ่านการตัดส่วนที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ออกก่อน โดยการนำรูปภาพเข้าสู่โปรแกรมนับเซลล์ที่อยู่ในรูปแบบ GUI ที่ได้ออกแบบดังแสดงในรูป 4.2 และทำการตัดรูป (Crop Image) โดยคำสั่งที่อยู่ในโปรแกรมดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.1 รูปภาพที่บันทึกได้หลังจากการทำย้อมสีเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะเป็นวงกลมและสว่าง

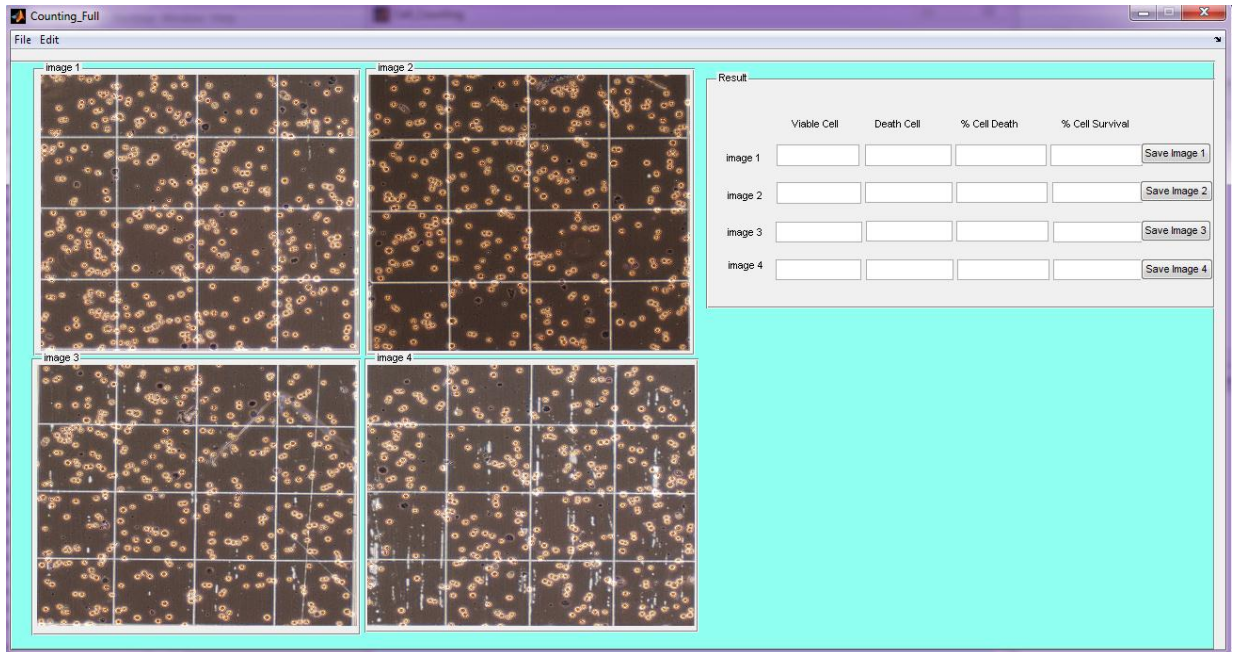


รูปที่ 4.2 ภาพแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมที่ใช้ในการนับเซลล์



รูปที่ 4.3 รูปภาพที่นำเข้าสู่โปรแกรมก่อนทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ออก

ภาพที่ได้จากการบันทึกจากแผ่นสไลด์ที่ใช้นับเซลล์นั้นมักจะมีเส้นขอบที่แบ่งแยกขอบเขตหรือพื้นที่ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ ดังนั้นในการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจึงมีการตัดรูปเพื่อพิจารณาเฉพาะภายในเส้นขอบดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยเมื่อรูปที่ตัดเอาเฉพาะพื้นที่ที่สนใจจะถูกแสดงบนหน้าจอเพื่อพร้อมในการทำขั้นตอนต่อไปดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งสามารถทำพร้อมกันได้จำนวน 4 รูปภาพ

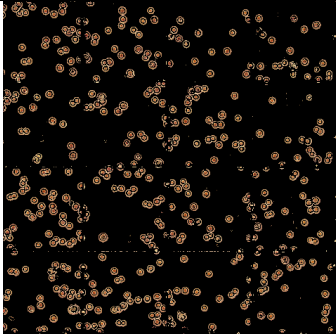
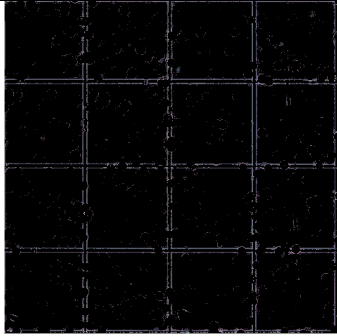
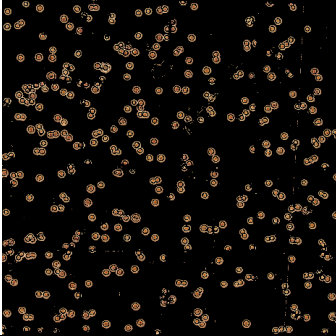
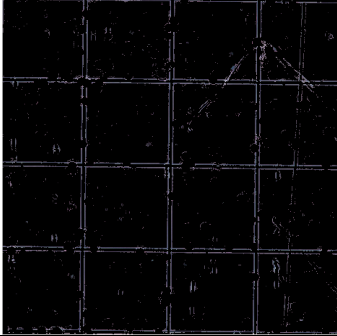
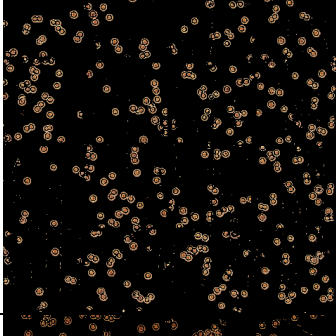
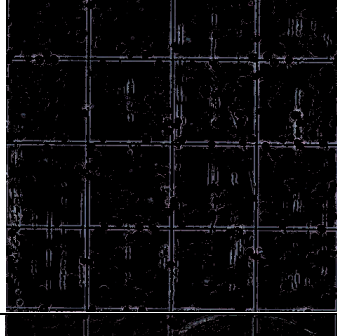
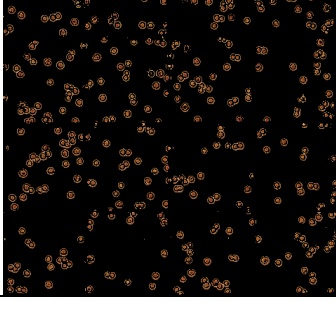
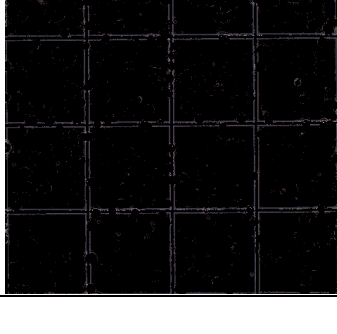


รูปที่ 4.4 รูปภาพที่จะทำการวิเคราะห์หลังทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก

4.1 ผลการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง โดยใช้ K-mean

เมื่อรูปภาพที่ถูกตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ถูกนำเข้าสู่โปรแกรมที่พัฒนาขึ้น จะถูกประมวลผลโดยผ่านกระบวนการ K-mean clustering แบ่งกลุ่มข้อมูลออกเป็น 4 กลุ่มข้อมูล คือ กลุ่มข้อมูลที่เป็นพื้นหลังของภาพ กลุ่มข้อมูลเซลล์ที่มีชีวิต กลุ่มข้อมูลที่เป็นขอบของเซลล์ที่มีชีวิต และกลุ่มข้อมูลเซลล์ที่ตาย ดังนั้นด้วยกระบวนการ K-mean ซึ่งกำหนดให้เป็น 4 กลุ่มทำให้สามารถแยกเซลล์ที่สนใจ คือ เซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลังของภาพได้ดีกว่าการกำหนดให้เป็น 3 กลุ่ม เนื่องจากในกรณีการกำหนด 3 กลุ่ม กลุ่มข้อมูลของขอบเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งมีลักษณะที่ต่างจากตัวเซลล์ซึ่งก็คือนิวเคลียสของเซลล์จะเข้าไปอยู่ในกลุ่มของเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตจำนวนหลายเซลล์ติดกันเมื่อทำการนับเซลล์ เซลล์ที่ติดกันหลายเซลล์จะนับจำนวนเป็น 1 เซลล์ทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับขึ้น แต่เมื่อกำหนดกลุ่มข้อมูลเป็น 4 กลุ่มข้อมูลขอบของเซลล์ที่มีชีวิตจะถูกแยกออกจากเซลล์ที่มีชีวิตอย่างชัดเจน ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตไม่มีส่วนที่ติดกัน เมื่อทำการนับเซลล์ก็จะมีค่าถูกต้องมากขึ้น ดังแสดงรูปการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังโดยกำหนด $k = 4$ ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างผลการแยกเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตาย ออกจากพื้นหลังของภาพ

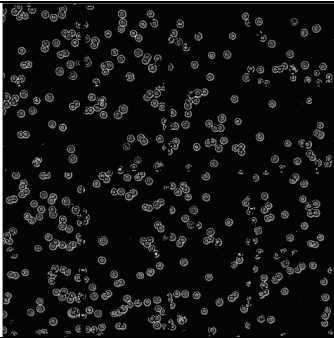
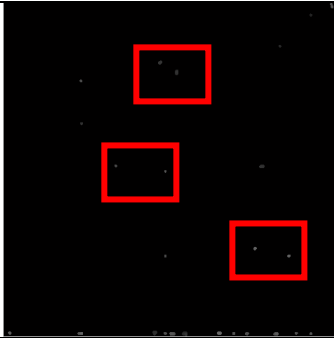
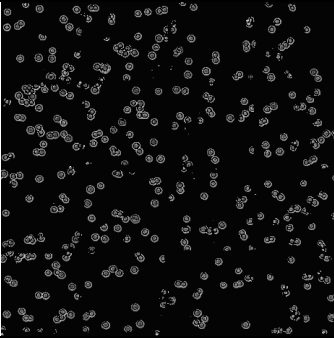
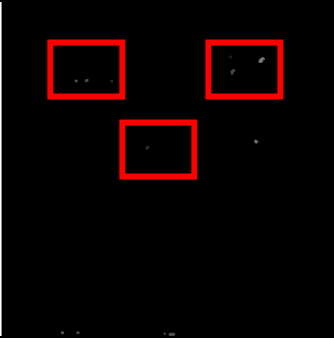
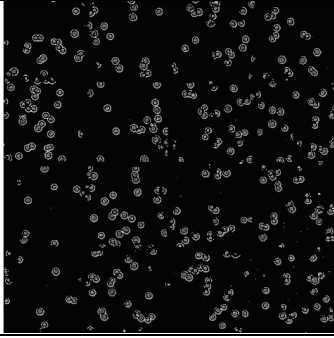
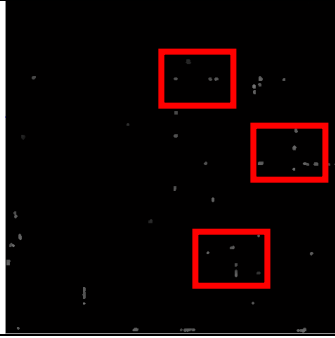
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1		
2		
3		
4		

ผลจากการแยกเซลล์โดยใช้ K-mean จะสังเกตได้ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นเด่นชัดจากพื้นหลังมีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งจะเป็นรูปภาพในกลุ่มข้อมูลที่ 2 สำหรับเซลล์ที่ตายจะเห็นได้ว่าเป็นรูปร่างสีดำที่แตกต่างจากพื้นหลัง ซึ่งจะเป็นรูปภาพในกลุ่มข้อมูลที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

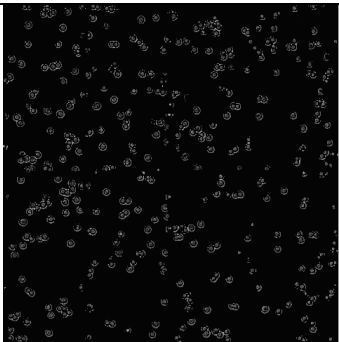
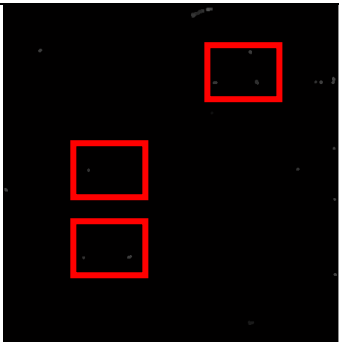
4.2 ผลของการกำจัดสิ่งรบกวน โดยใช้ Morphological

เมื่อรูปภาพที่ถูกตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ผ่านกระบวนการแบ่งกลุ่มข้อมูลซึ่งได้กำหนดให้มีจำนวน 4 กลุ่มข้อมูล ผลที่ต้องการคือข้อมูลกลุ่มของเซลล์ที่มีชีวิตและกลุ่มของเซลล์ที่ตาย เพื่อนำมาทำการกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกและเติมช่องว่างให้เต็มโดยใช้กระบวนการ Morphological ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตสามารถกำจัดสัญญาณรบกวนได้ง่ายเนื่องจากขนาดของเซลล์มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน แต่ในกรณีของเซลล์ที่ตายยังคงกำจัดสัญญาณรบกวนได้ไม่ดีโดยเฉพาะเซลล์เล็กๆที่เป็นเศษของเซลล์ที่ตายจะหายไปจากรูปภาพ เนื่องจากเซลล์ที่ตายมีขนาดที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมากคือ เซลล์ที่ตายปกติ เซลล์ที่บวมแต่ยังไม่แตก และเซลล์ที่เกิดการแตกกระจาย ดังนั้นเมื่อนำรูปภาพของเซลล์ที่ตายไปนับจำนวน ยังคงมีความผิดพลาดเกิดขึ้น ผลการกำจัดสัญญาณรบกวนโดยใช้ Morphological ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างผลการกำจัดสัญญาณรบกวน

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1		
2		
3		

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างผลการกำจัดสัญญาณรบกวน(ต่อ)

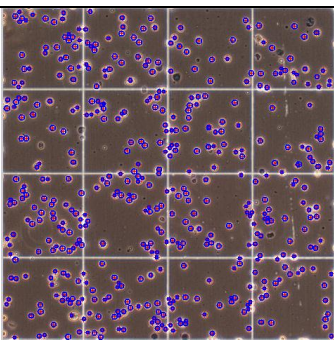
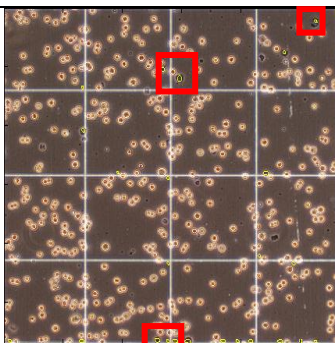
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
4		

ผลจากการกำจัดสัญญาณรบกวนโดยใช้ Morphological จะสังเกตได้ว่าภาพของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายมีวัตถุเล็กๆที่อยู่ในภาพหายไป โดยเฉพาะภาพของเซลล์ที่ตายจะเห็นการกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกจากภาพได้อย่างชัดเจน ในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงจะแสดงตัวอย่างของเซลล์ที่ตายที่อยู่ในภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

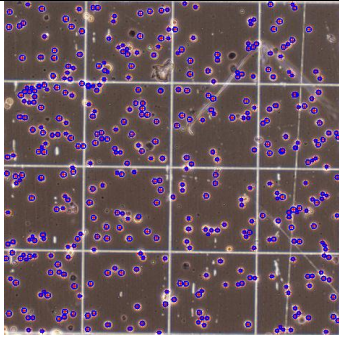
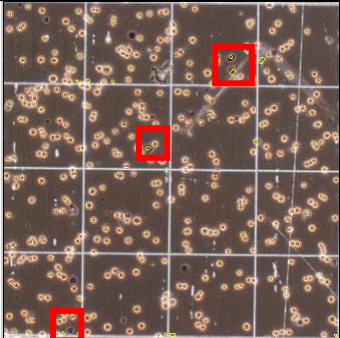
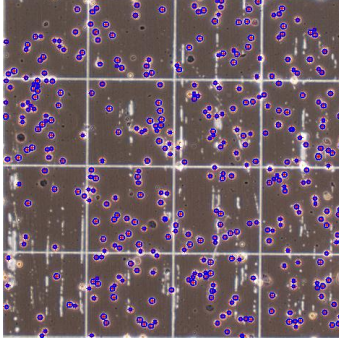
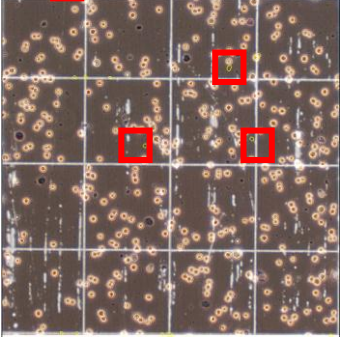
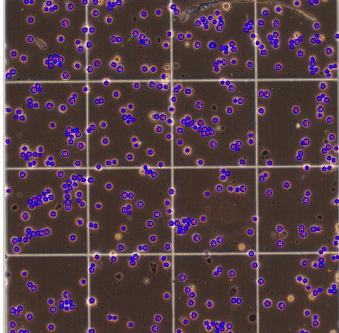
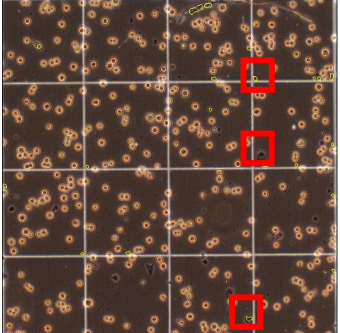
4.3 ผลของการนับเซลล์โดยการใช้การระบุตัวตนของเซลล์ หรือ Hough Transform

ในการนับเซลล์จะใช้วิธีการระบุตัวตนของเซลล์ด้วย Hough Transform เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตมีรูปร่างลักษณะเป็นวงกลมและสามารถกำจัดสัญญาณรบกวนได้ดีตั้งที่ได้กล่าวก่อนแล้วข้างต้น ทำให้เซลล์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และเซลล์ที่มีชีวิตไม่ได้ถูกกำจัดออกในขั้นตอนการกำจัดสัญญาณรบกวนทำให้สามารถนับเซลล์ที่มีชีวิตได้ถูกต้อง และเซลล์ที่ตายบางเซลล์ได้ถูกกำจัดออกในขั้นตอนการกำจัดสัญญาณรบกวน ทำให้การนับเซลล์มีความถูกต้องน้อยลง ดังแสดงผลการระบุตัวตนของเซลล์ในตารางที่ 4.3 และเวลาในการประมวลผลรูปภาพจะขึ้นอยู่กับ ความละเอียด (Resolution) ของภาพ ถ้ารูปภาพยังมีความละเอียดที่สูงจะใช้เวลาในการประมวลผลนานขึ้น

ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างผลการระบุตัวตนของเซลล์

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1		

ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างผลการระบุตัวตนของเซลล์ (ต่อ)

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
2		
3		
4		

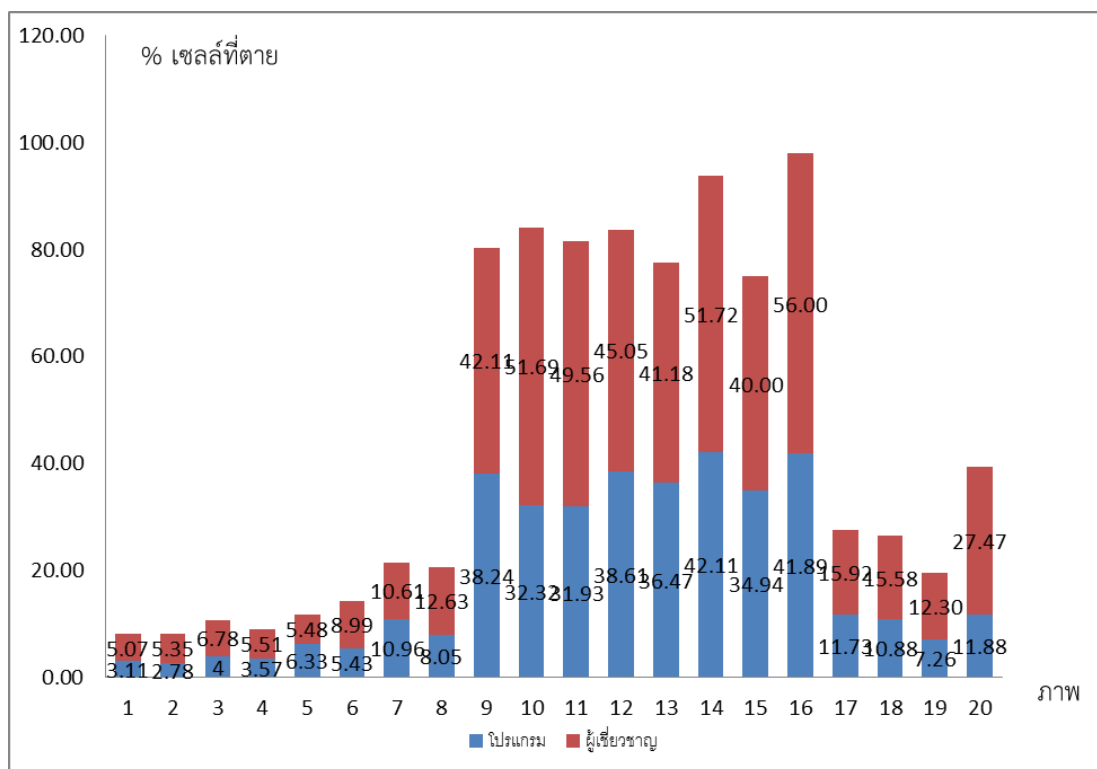
ผลจากการระบุตัวตนของเซลล์ จะสังเกตได้ว่าเซลล์ที่มีชีวิตที่มีลักษณะเป็นวงกลมสีเหลืองจะถูกระบุตัวตนด้วยวงกลมสีน้ำเงิน และเซลล์ที่ตายที่มีลักษณะสีดำจะถูกระบุตัวตนด้วยวงกลมสีเหลือง ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.4 ผลการเปรียบเทียบการนับเซลล์ระหว่างโปรแกรมกับผู้เชี่ยวชาญ

การเปรียบเทียบเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายกับผู้เชี่ยวชาญเพื่อหาค่าความถูกต้องของโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโปรแกรมมีค่าใกล้เคียงกับผู้เชี่ยวชาญ แต่การนับจำนวนเซลล์ที่ตายของโปรแกรมจะมีค่าที่ไม่แตกต่างกับผู้เชี่ยวชาญ

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบจากผู้เชี่ยวชาญ

รูปภาพ	โปรแกรม		ผู้เชี่ยวชาญ		% เซลล์ที่ตาย จากโปรแกรม	% เซลล์ที่ตาย จากผู้เชี่ยวชาญ
	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ตาย	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ตาย		
1	468	15	468	25	3.11	5.07
2	420	12	407	23	2.78	5.35
3	384	16	385	28	4.00	6.78
4	432	16	429	25	3.57	5.51
5	74	5	69	4	6.33	5.48
6	87	5	81	8	5.43	8.99
7	65	8	59	7	10.96	10.61
8	80	7	83	12	8.05	12.63
9	63	39	55	40	38.24	42.11
10	67	32	43	46	32.32	51.69
11	81	38	57	56	31.93	49.56
12	62	39	61	50	38.61	45.05
13	54	31	50	35	36.47	41.18
14	55	40	42	45	42.11	51.72
15	54	29	54	36	34.94	40.00
16	43	31	33	42	41.89	56.00
17	143	19	132	25	11.73	15.92
18	131	16	130	24	10.88	15.58
19	166	13	164	23	7.26	12.30
20	89	12	66	25	11.88	27.47



รูปที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ตายระหว่างผู้เชี่ยวชาญกับโปรแกรม

ผลการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่นับได้ด้วยการใช้โปรแกรมและผู้เชี่ยวชาญนั้น พบว่ามีค่าที่แตกต่างกัน โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโปรแกรมจะมีค่ามากกว่าที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้ และการนับจำนวนเซลล์ตายของโปรแกรมจะมีค่าน้อยกว่าที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้ เมื่อเปรียบเทียบทิศทางของกราฟจะเห็นว่ากราฟมีความสอดคล้องและไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าความถูกต้องในการนับเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ

รูปภาพ	ความถูกต้องของการนับเซลล์ที่มีชีวิต (%)	ความถูกต้องของการนับเซลล์ที่ตาย (%)
1	100.00	60.00
2	96.81	52.17
3	99.74	57.14
4	99.30	64.00
5	92.75	75.00

ตารางที่ 4.5 ค่าความถูกต้องในการนับเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ(ต่อ)

รูปภาพ	ความถูกต้องของการนับเซลล์ที่มีชีวิต (%)	ความถูกต้องของการนับเซลล์ที่ตาย (%)
6	92.59	62.50
7	89.83	85.71
8	96.39	58.33
9	85.45	97.50
10	44.19	69.57
11	57.89	67.86
12	98.36	78.00
13	92.00	88.57
14	69.05	88.89
15	100.00	80.56
16	69.70	73.81
17	91.67	76.00
18	99.23	66.67
19	98.78	56.52
20	65.15	48.00

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความถูกต้องในการนับเซลล์ที่ตายและเซลล์ที่มีชีวิตของโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเมื่อเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งพบว่าค่าความถูกต้องในการนับเซลล์ที่ตายมีค่า 48.00% - 97.50% และค่าความถูกต้องในการนับเซลล์ที่มีชีวิต 44.19% - 100% เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของค่าความถูกต้องจะได้ว่าค่าเฉลี่ยของค่าความถูกต้องของการนับเซลล์ที่ตายมีค่า 70.34% และ 86.94% สำหรับการนับเซลล์ที่มีชีวิต

4.5 สรุปผลการทดลอง

4.5.1 การเตรียมความพร้อมของภาพที่ย้อมสีเซลล์แล้ว

ในขั้นตอนเตรียมความพร้อมของภาพนี้ ได้จัดกลุ่มของภาพให้อยู่ในชุดเดียวกันคือ ภาพจะเป็นข้อมูลชุดเดียวกันต่างกันตรงที่มีการถ่ายภาพในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้ผู้ใช้งานสามารถเลือกรูปภาพที่อยู่ในชุดเดียวกันมาทดสอบและดูความแตกต่างของข้อมูลที่ได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการให้ยาแก่เซลล์มะเร็งต่อไป

4.5.2 การแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง

ในขั้นตอนนี้เป็นการแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลังของภาพ ด้วยการใช้เทคนิคของ K-mean ซึ่งกำหนดให้มี 4 กลุ่มข้อมูลคือ ข้อมูลของพื้นหลัง ข้อมูลของเซลล์ที่มีชีวิต ข้อมูลของขอบของเซลล์ที่มีชีวิต และข้อมูลของเซลล์ที่ตาย สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตาย และพื้นหลังออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถนำผลที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการกำจัดสัญญาณที่รบกวนออกได้

4.5.3 การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากภาพ

ในขั้นตอนนี้ได้นำผลจากการแยกเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายมากำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออก โดยการใช้เทคนิค Morphological Operation โดยสามารถกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกจากภาพได้เป็นอย่างดี และสามารถเติมในส่วนที่ขาดหายไปให้เต็ม ทำให้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตถูกต้องมากขึ้น แต่เซลล์ที่ตายยังคงมีความผิดพลาดในการนับดังที่ได้กล่าวข้างต้น

4.5.4 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

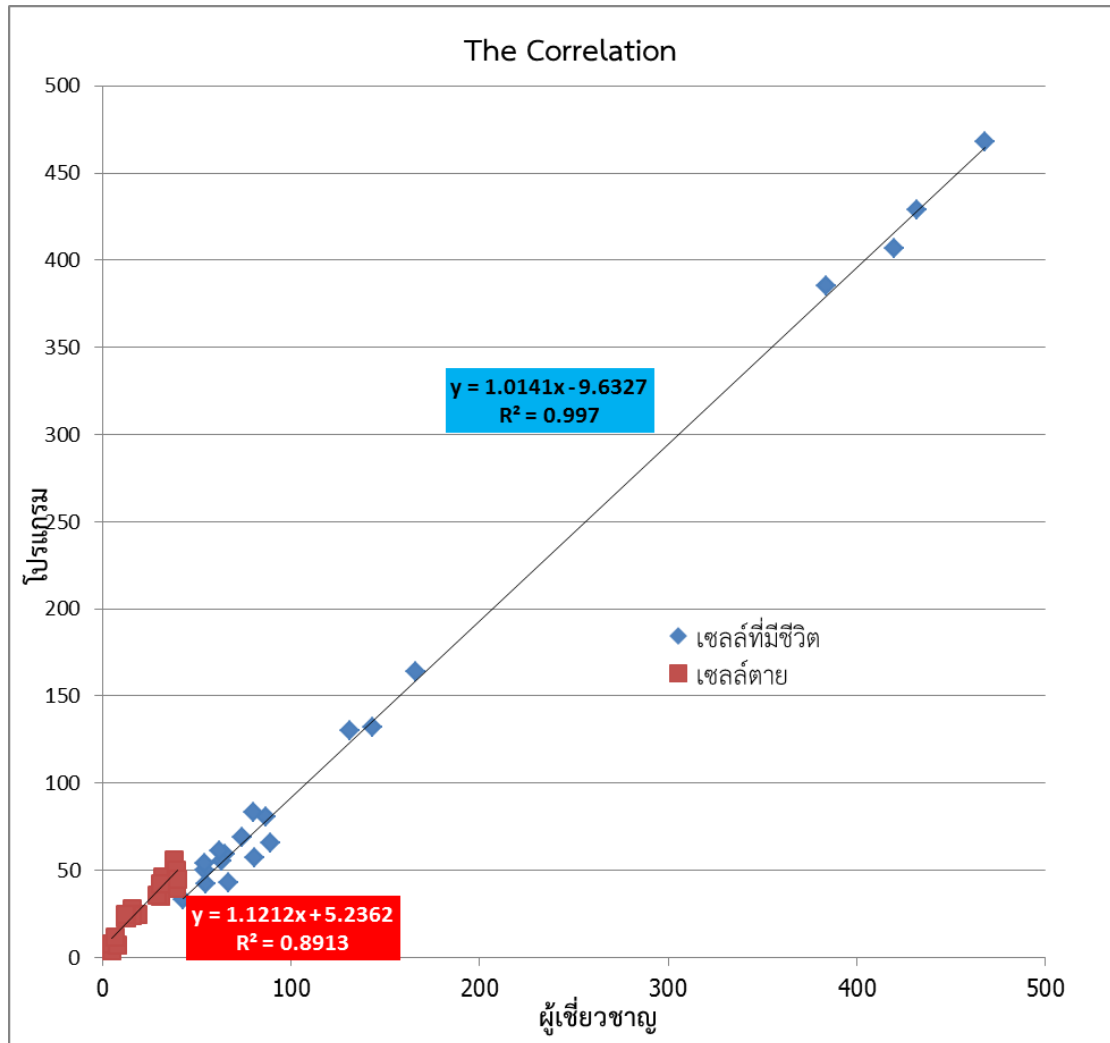
ในขั้นตอนนี้ได้นำผลในการกำจัดสัญญาณรบกวนออก ทั้งภาพของเซลล์ที่มีชีวิตและภาพเซลล์ที่ตาย โดยการระบุตำแหน่งของเซลล์และนับจำนวนเซลล์ ในส่วนของการนับเซลล์ที่มีชีวิตสามารถระบุตำแหน่งและนับจำนวนเซลล์ได้เป็นอย่างดี แต่ในส่วนของเซลล์ที่ตายยังไม่สามารถนับเซลล์ได้ดีมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับผลของผู้เชี่ยวชาญ เปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการนับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายเมื่อเปรียบเทียบกับผู้เชี่ยวชาญจะเห็นว่ามีค่าความถูกต้องเฉลี่ย 86.94% และ 70.34% ตามลำดับ จะเห็นว่าการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีค่าความถูกต้องที่ดีกว่าการนับจำนวนเซลล์ที่ตาย

4.5.5 การสร้างกราฟฟิกเพื่อการใช้งาน

ในขั้นตอนนี้สุดท้ายเป็นการสร้าง GUI เพื่อให้ผู้ใช้งานที่ไม่มีพื้นฐานในการเขียนโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ และไม่มีพื้นฐานในการนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สามารถทำการนับเซลล์ได้ง่าย และสามารถบันทึกข้อมูลการทำงานเพื่อนำกลับมาดูซ้ำภายหลังได้

จากผลลัพธ์ในแต่ละขั้นตอนสามารถสรุปได้ว่า เทคนิคของ K-mean สามารถแยกภาพของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลังของภาพได้ดีเมื่อเทียบกับวิธีอื่นเช่น การแยกโดยใช้ขอบของวัตถุ ซึ่งการแยกโดยใช้ขอบจะไม่สามารถแยกเซลล์ที่ติดกันได้ เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนการกำจัดสัญญาณรบกวนสามารถทำได้ง่ายขึ้น แต่ในส่วนของเซลล์ที่ตาย มีความผิดพลาดเกิดขึ้นในบางรูปภาพเพราะในขั้นตอนของการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังจะใช้ค่าสีของภาพ RGB มาจัดกลุ่มของข้อมูล เซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีลักษณะที่เด่นชัดจนทำให้สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่ในส่วนของเซลล์ที่ตายถ้าหากเซลล์มีลักษณะสีใกล้เคียงกับพื้นหลังจะทำให้มีการแยกเซลล์ออกมาเกิดความผิดพลาดและประกอบกับเซลล์ที่ตายมีขนาดของเซลล์หลายขนาด เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนกำจัดสัญญาณรบกวน เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะถูกกำจัดออก หรือเซลล์ไม่ได้ถูกกำจัดออกอย่างถูกต้อง ทำให้การกำจัดสัญญาณทำได้ไม่ดี เป็นผลทำให้มีการนับเซลล์ที่ตายน้อยกว่าหรือมากกว่าที่ผู้เชี่ยวชาญนับได้

จากข้อมูลการนับเซลล์เทียบกับผู้เชี่ยวชาญจะเห็นว่าการนับเซลล์ที่มีชีวิตมีความแตกต่างกันไม่มาก แต่เซลล์ที่ตายยังมีค่าความแตกต่างที่มากอยู่ อย่างไรก็ตามการนับจำนวนเซลล์ของโปรแกรมและผู้เชี่ยวชาญมีความสอดคล้องกันโดยการพิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linear Correlation) พบว่าค่า R^2 ของผลการนับเซลล์ที่มีชีวิตและผลการนับเซลล์ที่ตายมีค่าสูง คือ 0.997 และ 0.8913 ตามลำดับ ดังแสดงกราฟการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบระหว่างโปรแกรมกับผู้เชี่ยวชาญของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานในวิทยานิพนธ์นี้ได้พัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการนับเซลล์ เพื่อช่วยให้นักวิจัยด้านยาหรือสารฆ่าเซลล์มะเร็งและนักวิจัยทางชีวเวชศาสตร์สามารถวิเคราะห์เกี่ยวกับประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็ง ด้วยการดูผลการนับจำนวนเซลล์ที่ตายเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยไม่จำเป็นต้องทำการนับด้วยการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ทันที ทำให้นักวิจัยมีความสะดวกขึ้น เพิ่มความสามารถในการทำงานอื่น และสามารถนำผลการนับกลับมาดูย้อนหลังได้

แนวคิดที่ได้นำมาใช้ในการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการนับเซลล์นั้นอาศัยหลักการที่นักวิจัยทางชีวเวชศาสตร์ใช้ในการนับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายนำมาประยุกต์เขียนเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่ต้องมีการจัดการกับรูปภาพที่จะนำมาใช้กับโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเนื่องจากรูปภาพที่บันทึกนั้นมีสิ่งรบกวนหรือมีความแปรปรวนของการถ่ายภาพในแต่ละครั้งที่ต่างกัน ดังนั้นการนำเทคนิคทางภาพถ่าย (Image Processing) เช่น การกำจัดสิ่งรบกวน การเพิ่มความคมชัด จึงมีความจำเป็นในการใช้พัฒนาโปรแกรมเพื่อการนับเซลล์นี้

เมื่อพิจารณาแนวคิดที่ต้องการนับเซลล์ด้วยการนำเทคนิคทางภาพถ่ายมาใช้นั้นจะพบว่ามีความวิจัยหลายงานวิจัยที่คล้ายคลึงกันที่นำเทคนิคทางภาพถ่ายมาช่วยให้การนับหรือแยกแยะความแตกต่างของวัตถุที่สนใจเพื่อทำให้การทำงานสะดวก รวดเร็วและตรวจสอบย้อนหลังได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์ห้มีความผิดพลาดในผลลัพธ์เกิดขึ้นเสมอ ซึ่งเป็นสิ่งที่นักวิจัยจำเป็นต้องพัฒนาปรับปรุงให้มีความถูกต้องที่สูงขึ้น

5.1 สรุปผลการพัฒนาและการทดสอบโปรแกรมช่วยนับเซลล์

การออกแบบโปรแกรมช่วยนับเซลล์จะประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 5 ขั้นตอนคือ 1) การเตรียมความพร้อมของรูปภาพ 2) การแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังของรูปภาพ 3) การกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากรูปภาพ 4) การนับเซลล์ และ 5) การออกแบบกราฟฟิกการใช้งานสำหรับผู้ใช้งาน (GUI) โดยในการนับเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตาย จะมีการคำนวณร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ต้องการต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้และแสดงผลเก็บไว้ในรูปของไฟล์ตัวอักษร (Text file)

การเตรียมความพร้อมของภาพนั้นจะต้องมีการพิจารณาถึงชนิดของไฟล์เนื่องจากความละเอียดของรูปภาพแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อขนาดของไฟล์และระยะเวลาที่ใช้ในการประมวลผลของคอมพิวเตอร์ เช่น ขนาดของไฟล์ที่มีขนาด 4000x3000 พิกเซล จะใช้เวลาในการประมวลผลนานกว่าขนาดรูปภาพ 1000x900 พิกเซลเนื่องจากจำนวนพิกเซลที่มากกว่า

อัลกอริทึม K-mean clustering ซึ่งมักจะถูกนำมาใช้ในการจำแนก แยกแยะข้อมูลออกเป็นกลุ่มๆ นั้นพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการคัดแยกรูปภาพเซลล์ที่มี โดยสามารถแยกแยะหรือจัดกลุ่มของเซลล์ที่ต้องการออกมาได้อย่างชัดเจน แต่ประสิทธิภาพในการแยกแยะกลุ่มนั้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนกลุ่มและค่าเริ่มต้นศูนย์กลางของกลุ่มที่ต้องป้อนหรือกำหนดให้แก่อัลกอริทึม นอกจากนี้พบว่าหากกลุ่มข้อมูลมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันหรือคล้ายคลึงกันจะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกแยะลดลง

ตลอดจนการเพิ่มค่าจำนวนกลุ่มในอัลกอริทึมจะทำให้ประสิทธิภาพของการแยกแยะเพิ่มขึ้นแต่ระยะเวลาในการประมวลผลภาพเพิ่มตามไปด้วย

การกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยคำสั่ง Morphological เป็นอีกวิธีที่ได้ถูกนำมาใช้ในการกำจัดสัญญาณรบกวนเนื่องจากสามารถทำการเติมเต็มส่วนที่ยังขาดอยู่เข้าไปได้ และสามารถเลือกขนาดวัตถุที่ไม่ต้องการออกจากรูปภาพได้ แต่ยังไม่สามารถที่จะเลือกวัตถุและกำจัดวัตถุได้หลากหลายในเวลาเดียวกันได้

การนับจำนวนเซลล์โดยใช้วิธีการระบุตัวตนด้วยเทคนิค Hough Transform กระทำโดยการหาจุดตัดบนเส้นของวัตถุซึ่งทำให้รู้ตำแหน่งของวัตถุและขนาดของวัตถุ สามารถระบุวัตถุได้หลากหลายทั้งที่เป็นวงกลม สี่เหลี่ยม เป็นต้น และสามารถแยกเซลล์ที่ติดกันออกจากกันได้ ทำให้การนับเซลล์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและมีความถูกต้องมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ

การสร้าง GUI เพื่อนำมาใช้งาน เป็นการทำให้การใช้งานของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความสะดวกและนำใช้งานมากขึ้น เนื่องจากในบางครั้งผู้ใช้งานไม่มีความรู้เกี่ยวกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในระดับสูง จึงมีข้อจำกัดในการใช้งานโปรแกรมที่ต้องเขียนอัลกอริทึมเพื่อทำการประมวลผล ดังนั้นการออกแบบให้โปรแกรมอยู่ในรูป GUI จึงมีประโยชน์และมีความจำเป็น

ผลการทดสอบการนับด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาเพื่อใช้ในการนับเซลล์แบบอัตโนมัติพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีความถูกต้องเฉลี่ย 86.94% เมื่อเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ และเซลล์ที่ตายมีความถูกต้องเฉลี่ย 70.34% เมื่อเทียบกับผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายยังมีความผิดพลาดในการนับเนื่องจากค่าพิกเซลของเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับพื้นหลัง เมื่อทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง เซลล์แยกได้ไม่ชัดเจนโดยยังมีค่าพิกเซลของพื้นหลังรวมอยู่ด้วย รวมทั้งเซลล์ที่ตายมีขนาดรูปร่างที่หลากหลายลักษณะ จึงมีความยากในการนับเซลล์ ดังนั้นจึงได้มีการเพิ่มเติมความสามารถในการนับเซลล์โดยสามารถระบุจากผู้ใช้งานได้เองหากเซลล์ที่โปรแกรมแสดงผลนั้นไม่ถูกต้อง โดยโปรแกรมสามารถเพิ่มและหักลบจำนวนเซลล์ได้เพื่อให้ผลลัพธ์ที่ได้จากโปรแกรมมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ตามที่ตั้งวัตถุประสงค์ในการทำงานวิจัยนี้ คือ เพื่อนำเทคนิคการประมวลผลภาพและการเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์มาช่วยในการนับเซลล์ที่นักชีวเวชศาสตร์ต้องนับให้สามารถทำงานได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น พบว่าโปรแกรมการนับเซลล์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถช่วยให้การนับเซลล์มีความสะดวกขึ้น ไม่ก่อให้เกิดความอ่อนล้าแก่ผู้นับเซลล์ และอีกทั้งสามารถนำผลการนับกลับมาดูได้ในภายหลัง และสามารถส่งออกข้อมูลการนับเซลล์เป็นไฟล์เพื่อนำไปใช้ต่อได้

นอกจากนี้ในส่วนของผู้พัฒนางานวิจัยนี้ได้เรียนรู้เทคนิคการประมวลผลภาพและพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ในการนับเซลล์ ตลอดจนประสบการณ์ในการทำงานร่วมกับนักวิจัยทางด้านการประมวลผลภาพและนักชีวเวชศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญ

5.2 ปัญหาและข้อจำกัดของโปรแกรมช่วยนับเซลล์

ในการดำเนินงานเพื่อพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการนับเซลล์ ผู้พัฒนางานวิจัยพบว่ามีปัญหาและข้อจำกัดอยู่หลายประเด็น ดังต่อไปนี้

5.2.1 ภาพที่ใช้ในงานวิจัยเป็นภาพจริงที่ถ่ายมาจากกล้องจุลทรรศน์โดยผู้เชี่ยวชาญ ทำให้ไฟล์ภาพจะมีขนาดรูปภาพที่ใหญ่ทำให้เกิดความล่าช้าในการประมวลผลของคอมพิวเตอร์และต้องใช้คอมพิวเตอร์ที่มีคุณสมบัติที่สูง เช่น มีหน่วยความจำและพื้นที่ในการเก็บข้อมูลรูปภาพในฮาร์ดดิสก์ที่สูงซึ่งพบว่าขนาดของหน่วยความจำ (RAM) ที่ 2 GB เหมาะกับรูปภาพที่มีขนาดเล็กกว่า 748x1000 พิกเซล และอีกทั้งรูปภาพที่ได้มีส่วนที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ในภาพทำให้ต้องนำภาพที่ได้มาตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกก่อนทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ จึงใช้เวลาเพิ่มเติมในขั้นตอนของการเตรียมความพร้อมของรูปภาพ นอกจากนี้คุณภาพของรูปภาพ เช่น เรื่องแสง ความคมชัด ของรูปก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมนี้ เนื่องจากจะมีผลต่อความสามารถในการแยกแยะเซลล์ออกจากพื้นหลังของรูปภาพ

5.2.2 วิธีการที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลัง ซึ่งมีการใช้เวลาในการศึกษาถึงวิธีการที่ใช้ในการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังนานพอสมควรเพราะต้องศึกษาและอ้างอิงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานประมวลผลภาพที่ได้มีการตีพิมพ์หรือเผยแพร่ เพื่อนำมาเป็นแนวคิดและประยุกต์ใช้กับงานนับเซลล์ รวมทั้งการพัฒนาอัลกอริทึม และต้องวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของขั้นตอนวิธี ซึ่งบางครั้งผลที่ได้ยังไม่ให้ผลตามที่คาดหวัง และประกอบกับรูปภาพที่นำมาวิเคราะห์ผลมีลักษณะที่แตกต่างกัน เมื่อทำการแยกกลุ่มข้อมูลทำให้กลุ่มข้อมูลมีการเปลี่ยนแปลง ไม่อยู่ในกลุ่มเดิม เมื่อนำไปวิเคราะห์ต่อจึงมีความผิดพลาดขึ้นในการวิเคราะห์เนื่องจากอาจจะไม่ใช้กลุ่มข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงต้องมีการกำหนดค่าเริ่มต้นของสีแต่ละกลุ่ม เพื่อให้สีที่ใกล้เคียงกันเข้ากลุ่มที่ได้ตั้งไว้ เพื่อที่จะได้กลุ่มข้อมูลอยู่ในกลุ่มเดิม

5.2.3 ผลที่คลาดเคลื่อนเนื่องจากการนับเซลล์ที่ตายเพราะเซลล์ที่ตายมีความหลากหลายดังที่ได้กล่าวข้างต้น โดยเฉพาะเซลล์ๆ ซึ่งอาจโดนกำจัดเมื่อทำการ preprocessing จึงต้องมีการแยกเซลล์ที่ตายแต่ละชนิดออกจากกัน โดยอาศัยหลักเกณฑ์ที่นักชีวเวชศาสตร์ใช้ในการนับเซลล์มาพัฒนาเป็นอัลกอริทึม ซึ่งอาจจะมีผลคลาดเคลื่อนในการตรวจหาและนับเซลล์ที่ตาย

5.2.4 รูปแบบ GUI ที่ค่อนข้างมีหลายหน้าต่าง อาจจะทำให้การใช้งานไม่ค่อยสะดวกนัก และการทำงานผ่าน platform ของโปรแกรม MATLAB ยังไม่สามารถทำเป็นตัวติดตั้งได้ทำให้การนำไปใช้งานยังมีข้อจำกัดเพราะจะต้องมีการลงโปรแกรม MATLAB ก่อนการใช้งาน GUI ซึ่งถ้าหากผู้ใช้ไม่มีโปรแกรม MATLAB ในเครื่องคอมพิวเตอร์ก็จะไม่สามารถใช้งานโปรแกรมการนับเซลล์นี้ได้

5.3 ข้อเสนอแนะในการพัฒนาโปรแกรมช่วยนับเซลล์

สำหรับประเด็นในงานวิจัยที่สามารถศึกษาและนำไปพัฒนาต่อได้มีดังนี้

5.3.1 ควรมีการทดสอบกับรูปภาพที่มีความหลากหลายของสี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ของโปรแกรม

5.3.2 ด้านการประมวลผล เช่น การพัฒนาอัลกอริทึมเพื่อการแยกเซลล์ออกจากพื้นหลังภาพ การกำจัดสัญญาณหรือสิ่งรบกวนในรูปภาพ และการนับเซลล์ สามารถปรับปรุงให้มีการทำงานที่เร็วขึ้นและมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการใช้วิธีการแบบขนานที่ช่วยให้การประมวลผลมีความเร็วขึ้น

5.3.3 โปรแกรมสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อหาเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างที่ไม่ใช่วงกลม หรือมีลักษณะอื่นๆ ซึ่งจะช่วยให้การนำไปใช้ในการนับเซลล์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

5.3.4 ส่วนที่ติดต่อกับผู้ใช้งาน (GUI) สามารถพัฒนาโปรแกรมให้มีความสวยงามและง่ายต่อการใช้งาน สามารถเพิ่มให้คุณสมบัติการทำงานที่มากยิ่งขึ้น และสามารถปรับเปลี่ยนค่าต่างๆที่ผู้ใช้งานต้องการปรับเปลี่ยนได้

5.3.5 ควรทำเป็นไฟล์ติดตั้งหรือมีนามสกุลไฟล์เป็น .exe เพื่อที่จะสามารถนำไปติดตั้งเครื่องอื่นได้โดยสามารถใช้งานได้โดยไม่มีโปรแกรม MATLAB เพื่อช่วยให้ผู้ใช้งานสะดวกในการติดตั้งและใช้โปรแกรมการนับเซลล์

บรรณานุกรม

- [1] S. W. Lowe and A. W. Lin, "Apoptosis in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 21, pp. 485-495, 2000.
- [2] D. W. Knowles, D. Sudar, C. Bator-Kelly, M. J. Bissell, and S. A. Lelievre, "Automated local bright feature image analysis of nuclear protein distribution identifies changes in tissue phenotype," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 4445-50, Mar 21 2006.
- [3] S.Y.Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.pp. 1-14, 2011.
- [4] E. Gering and C. T. Atkinson, "A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis," *J Parasitol*, pp.879-881, 2004.
- [5] J. P. Hofgaard, S. Mollerup, N. H. Holstein-Rathlou, and M. S. Nielsen, "Quantification of gap junctional intercellular communication based on digital image analysis," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 297, pp. R243-7, Aug 2009.
- [6] W. Yuedong and X. Heru, "The color image processing technology of the milk somatic cells," in *Computer Engineering and Technology (ICCET), 2nd International Conference on*, vol. 2010, pp.280-283, 2010.
- [7] L. Huey Nee, M. Y. Mashor, and R. Hassan, "White blood cell segmentation for acute leukemia bone marrow images," in *Biomedical Engineering (ICoBE), International Conference*, pp. 357-361, 2012.
- [8] P. Rajeshwar Dass, Swapna Devi, "Image Segmentation Techniques," 2012.
- [9] L. Hubert, H. F. Kohn, and D. Steinley, "Cluster Analysis: A Toolbox for MATLAB," *Millsap: The SAGE Handbook of Quantitative Methods in Psychology*, vol. 2009, pp. 444-513, 2009.
- [10] S. Ray and R. H. Turi, "Determination of number of clusters in K-means clustering and application in colour image segmentation," in *the 4th International Conference on Advances in Pattern Recognition and Digital Techniques Calcutta, India: Narosa Publishing House, New Delhi, India*, pp.137-143, 1999.
- [11] P.Phukpattaranont. and P.Boonyaphiphat, "Color base segmentation of nuclear stained breast cancer cell image," *ECTI Transaction on Electronic and Communications*, vol. 5, pp.158-164, 2007.

- [12] H. Liew, and M. Chan., "Cell detection for bee comb images using Circular Hough Transformation," in *Science and Social Research (CSSR), 2010 International Conference*, pp.191-195, 2010.
- [13] H. Deng and D. A. Clausi, "Unsupervised image segmentation using a simple MRF model with a new implementation scheme," *Pattern Recognition* vol. 37, pp. 2323 - 2335, 2004. 63
- [14] E. Gering, and C.T. Atkinson, "A Rapid Method for Counting Nucleated Erythrocytes on Stained Blood Smears by Digital Image Analysis," *Journal of Parasitology* 90, pp. 879-881, 2004.
- [15] D.J. Withey and Z.J. Koles, "Medical Image Segmentation: Methods and Software," *Proceedings of NFSI & ICFBI, Hangzhou, China*, pp. 1-4, 2007.
- [16] P.Phukpattaranont S.Limsiroratana and P.Boonyaphiphat, "Computer-Aided System for Microscopic Images: Application to Breast Cancer Nuclei Counting," *INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING*, vol. 2, pp. 69 - 74, 2009.
- [17] N.H.Mahmood S.M.Mazalan and M.A.Razak, "BLOOD CELLS EXTRACTION USING COLOR BASED SEGMENTATION TECHNIQUE," *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, vol. 2, pp. 1-10, 2013.
- [18] ม.ป.ป. การบำบัดและรักษาโรคมะเร็งทางเลือกรังสีวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์. <http://pineapple-eyes.snru.ac.th/alo/index.php?q=node/12>. (สืบค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2556)
- [19] n.d. *Cancer and The Human Body. An Inside Look*. National Foundation For Cancer Research. <http://www.nfcr.org/cancer-and-human-body-inside-look> (accessed October 7, 2013).
- [20] T. Reya, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *insight review articles, Macmillan Magazines Ltd*, vol. 414, pp. 104-111, 2001.
- [21] Kunlathida Kunlabut. n.d. *Cancer Stem Cell*. Srinagarind Medical Journal, Faculty of Medicine, Khon Kaen University http://www.smj.ejnal.com/ejournal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1627 (accessed October 7, 2013)
- [22] ม.ป.ป. รูปแบบการตายของเซลล์มะเร็ง. คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยี <http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/1517>. (สืบค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2556)

- [23] ม . ป . ป . ความรู้เกี่ยวกับมะเร็ง . แบ็กซ์เตอร์ เฮลธ์ แครร์ . http://www.baxter.co.th/th/patients_and_caregivers/cancer_knowledge/ (สืบค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2556)
- [24] L. S. ReseaRch and G. DeliveReD, *ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines*.2011
- [25] G. Manuel. Forero and A. Hidalgo, "Image Processing Methods for Automatic Cell Counting In Vivo or In Situ Using 3D Confocal Microscopy," *Advanced Biomedical Engineering*, pp. 183-204, 2011.
- [26] ม . ป . ป . การแปลงภาพแอนะล็อกให้เป็นภาพดิจิทัล . <http://learn.hamamatsu.com/articles/microscopyimaging.html>. (สืบค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2556)
- [27] Image Processing Toolbox .Search R2013 Documentation. <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/toolbox/images/> (accessed October 7,2013)
- [28] *A Brief Tutorial on Supervised Image Classification*. Available: <http://www.lac.inpe.br/JIPCookbook/7020-tutorial-supervisedclassification.jsp>
- [29] *Clustering words by tags in the SwDA*. Available: <http://compprag.christopherpotts.net/swdaclustering.html>
- [30] Detect circles with various radii in grayscale image via Hough Transform <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/9168-detect-circles-with-various-radii-in-grayscale-image-via-hough-transform>. (accessed October 7,2013).

ภาคผนวก

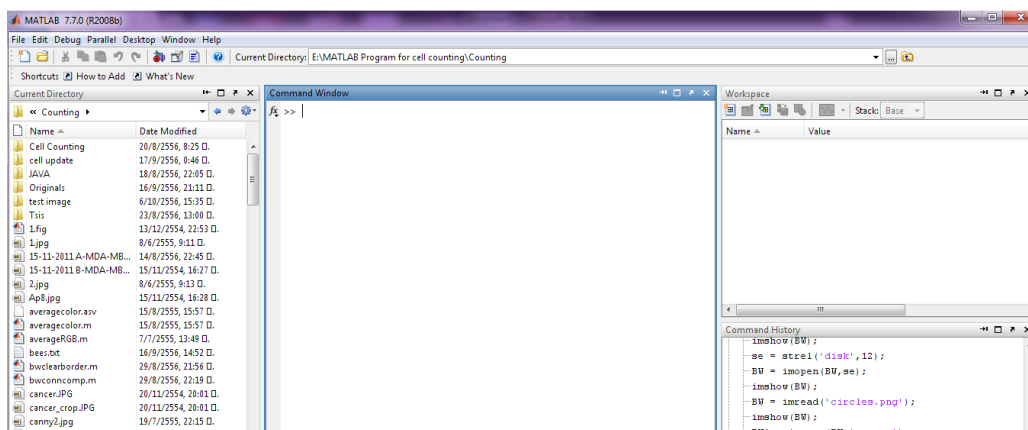
ภาคผนวก ก
คู่มือการใช้งานโปรแกรม

คู่มือการใช้งาน

1. เปิดโปรแกรม MATLAB R2008b ดังรูป



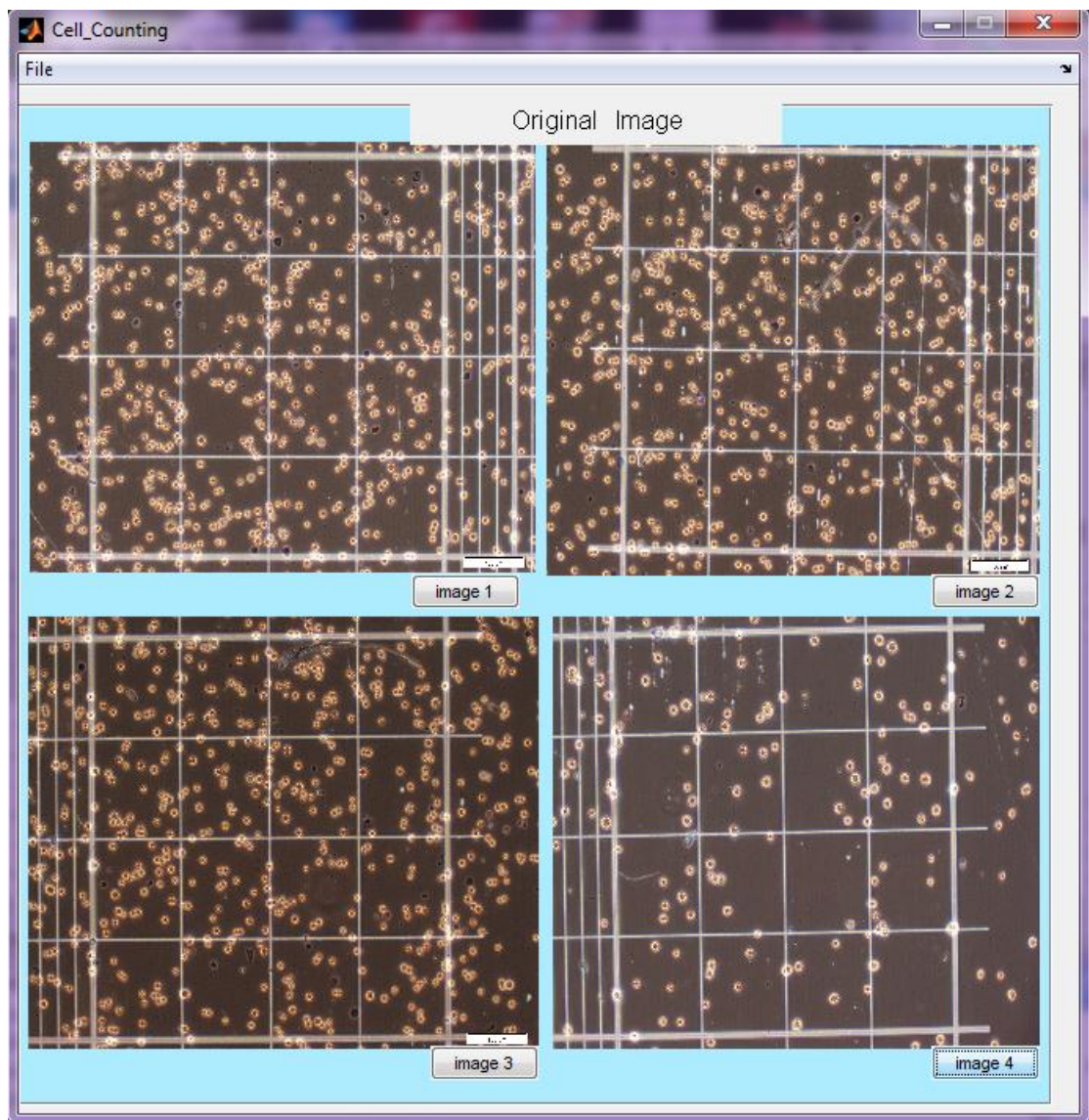
2. เปลี่ยน Directory ในหน้าต่างของโปรแกรม MATLAB ไปยัง E:\MATLAB Program for cell counting\Counting ดังรูป



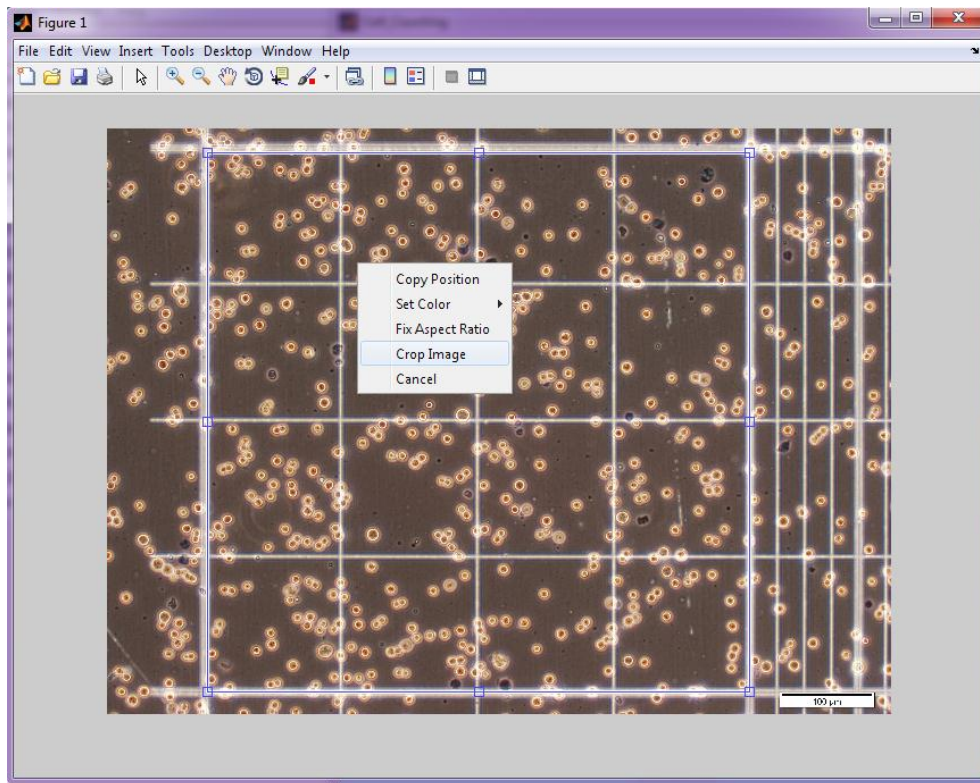
3. พิมพ์คำสั่ง main ใน Command Window จะได้โปรแกรมดังรูป



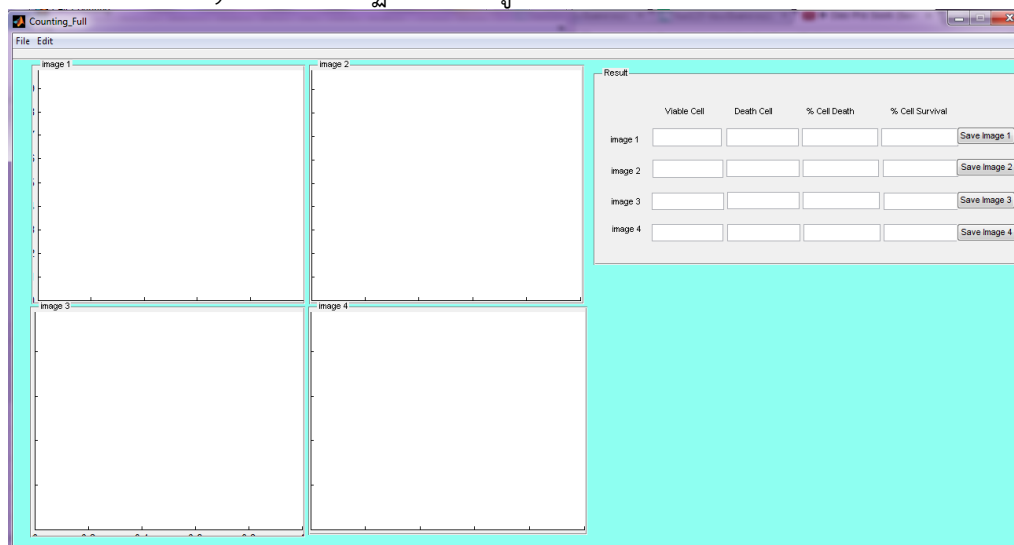
4. คลิกที่ Program
5. โหลดรูปภาพที่ต้องการนับจำนวนเซลล์เข้ามายังโปรแกรม



6. คลิก File -> Crop และเลือกส่วนที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ทั้ง 4 รูป



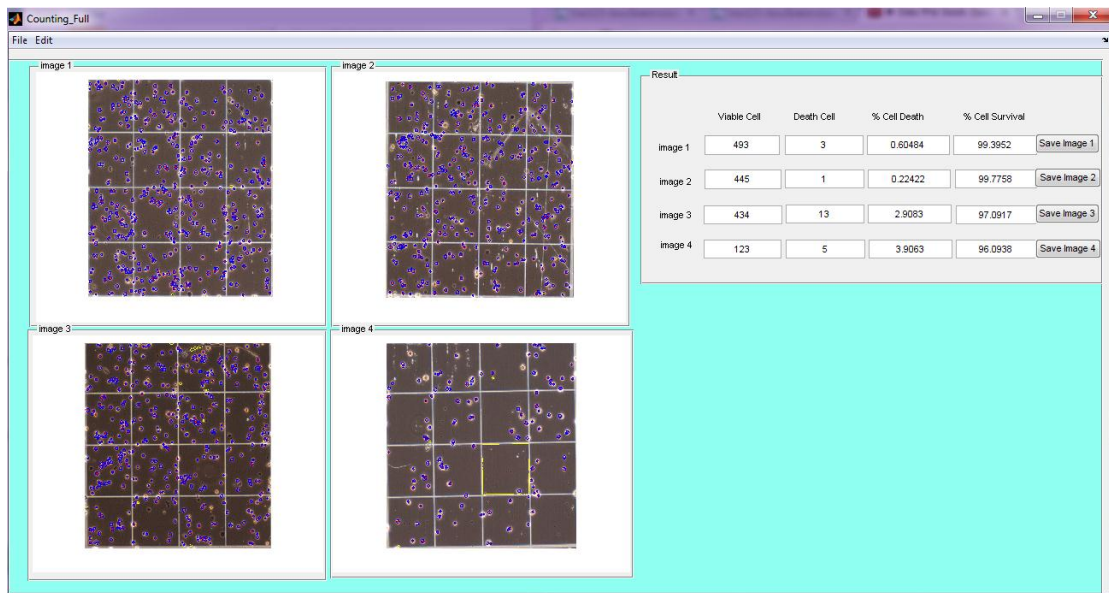
7. คลิก File -> Analyze จะปรากฏหน้าต่างดังรูป



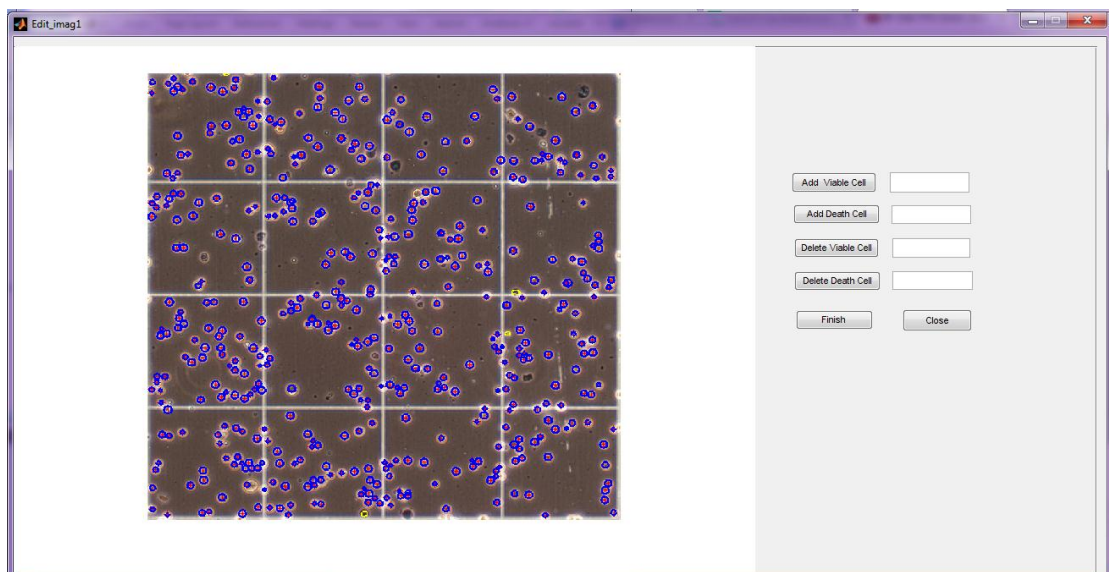
8. คลิก File -> Load Image

9. คลิก File -> Analyze

10. รอให้โปรแกรมทำการประมวลผลเสร็จและแสดงผลการนับในตาราง ดังแสดงในรูป



11. กรณีที่ต้องการแก้ไขการนับเซลล์ คลิก Edit_image 1 (Edit_image 1 สำหรับรูปที่ 1 Edit_image 2 สำหรับรูปที่ 2 Edit_image 3 สำหรับรูปที่ 3 Edit_image 4 สำหรับรูปที่ 4) ดังแสดงในรูป

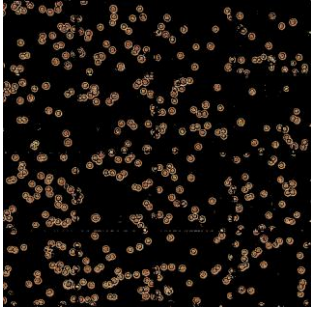
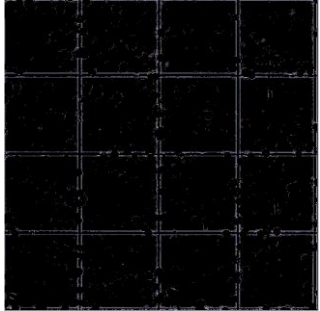
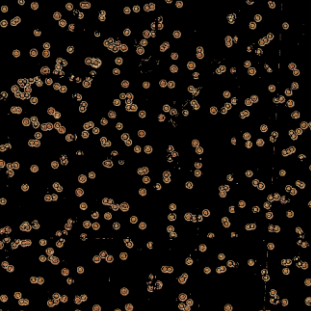

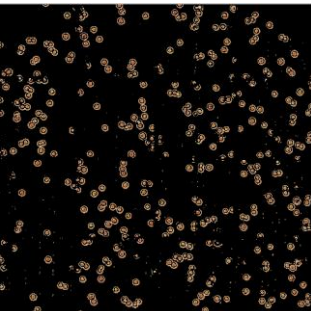
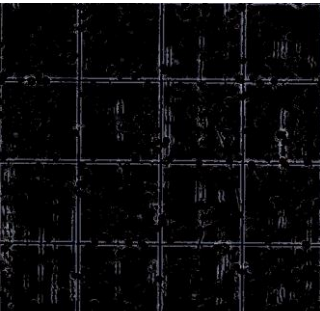
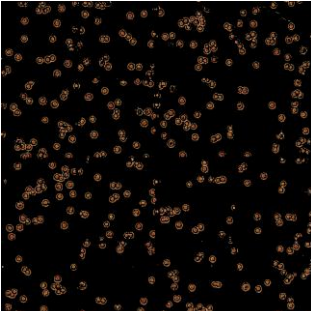
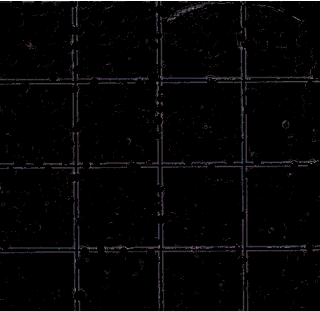


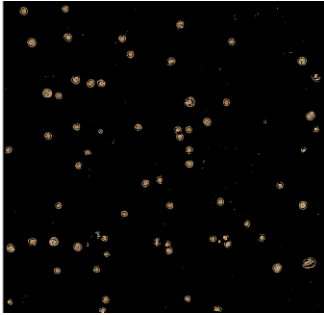
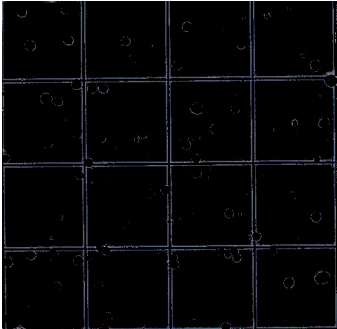
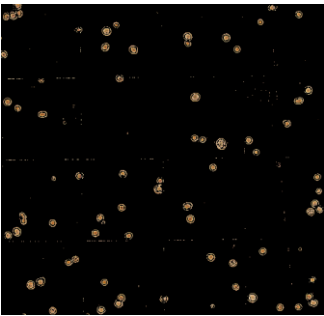
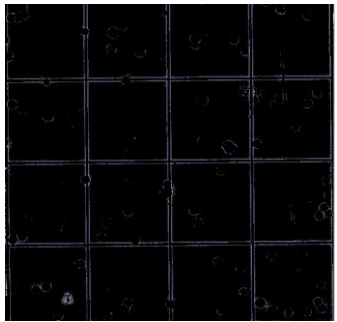
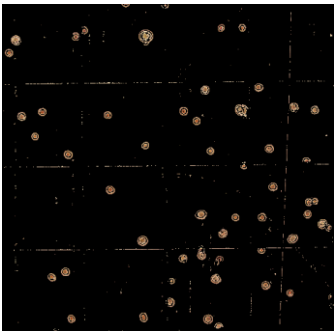
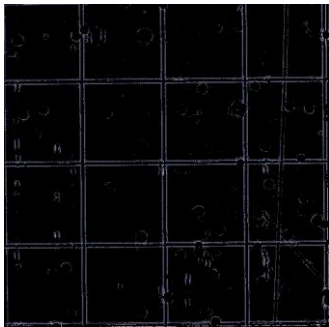
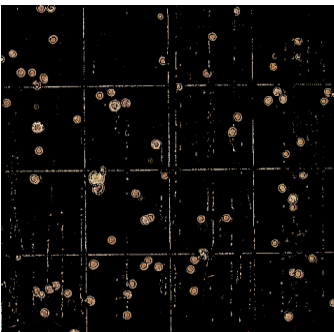
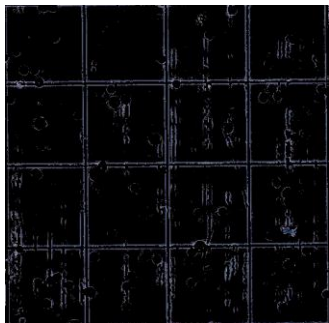
12. หากต้องการเพิ่มจำนวนเซลล์ คลิก Add Viable Cell หรือ Add Death Cell คลิกที่เซลล์ที่มีชีวิตที่ต้องการเพิ่ม หากต้องการลบจำนวนเซลล์ คลิก Delete Viable Cell หรือ Delete Death Cell คลิกที่เซลล์ที่มีชีวิตที่ต้องการลบ

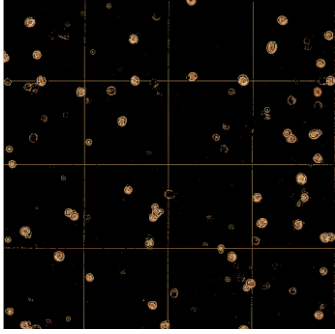
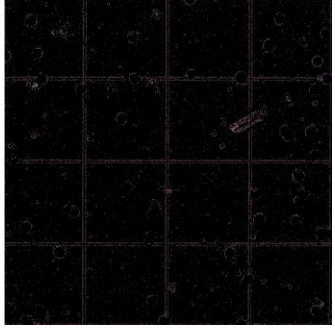
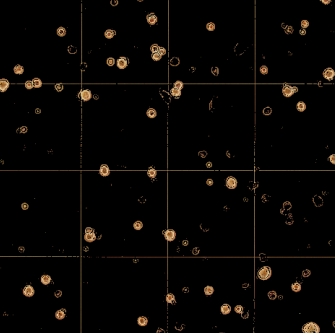
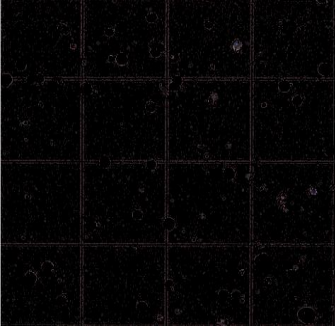
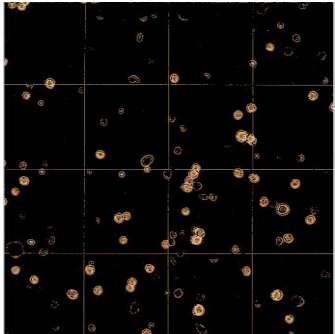
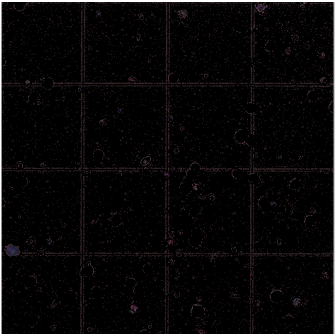
13. เมื่อเพิ่มหรือลบจำนวนเซลล์แล้ว คลิก close เพื่อปิดหน้าต่าง

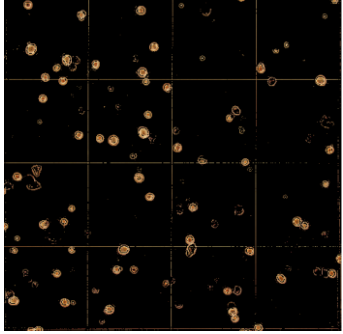
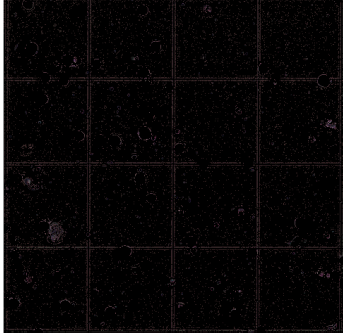
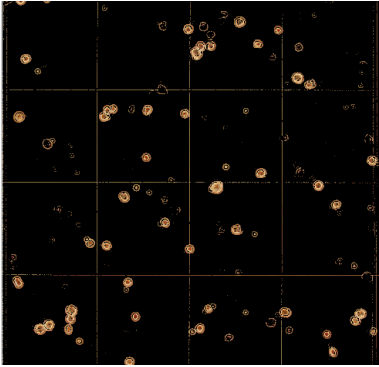
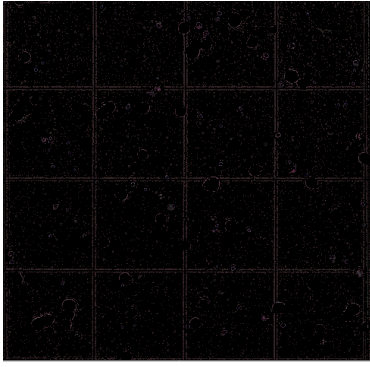
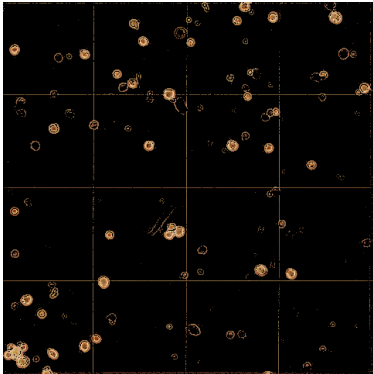
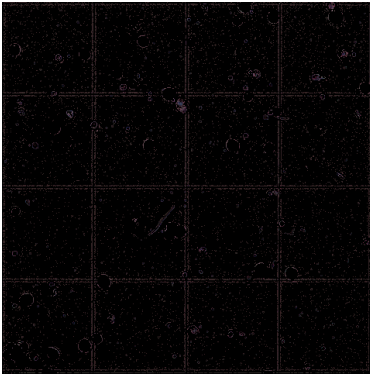
14. คลิก File -> Update

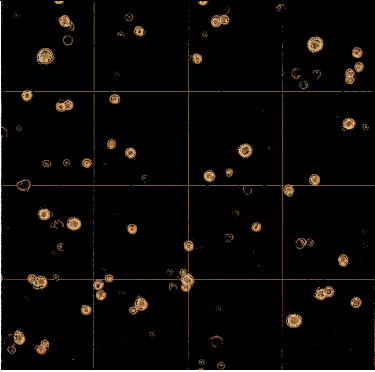
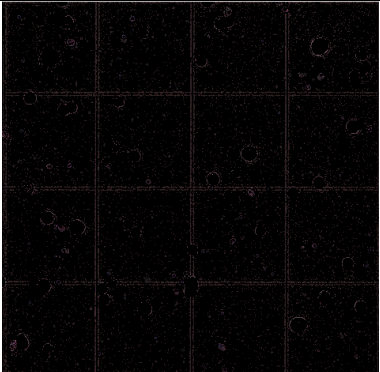
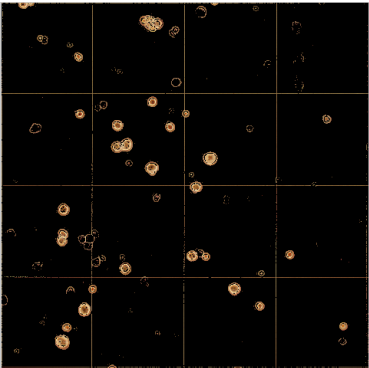
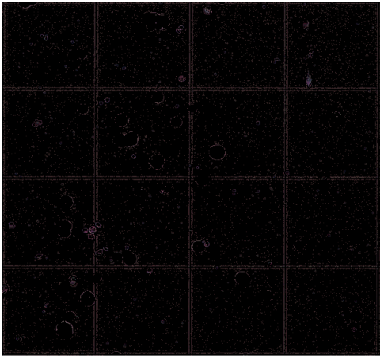
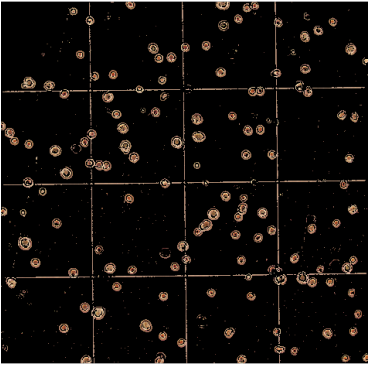
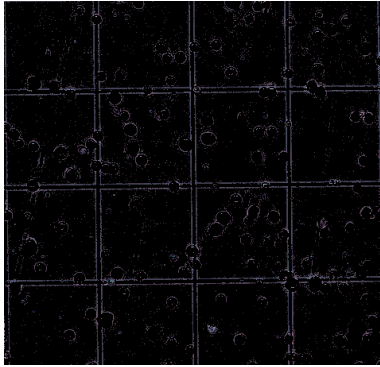
ภาคผนวก ข
ผลการแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายออกจากพื้นหลัง

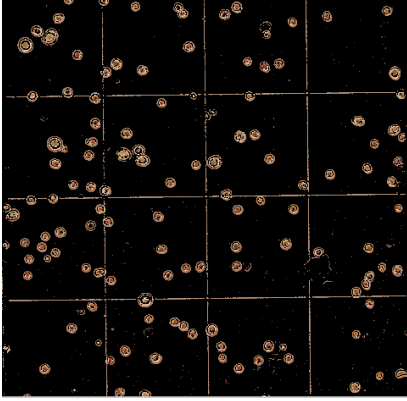
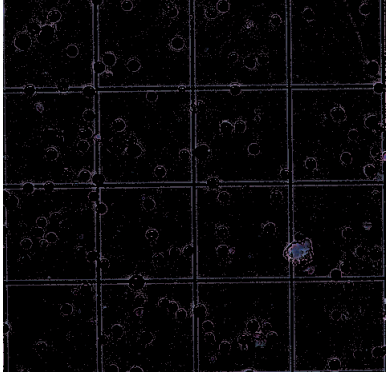
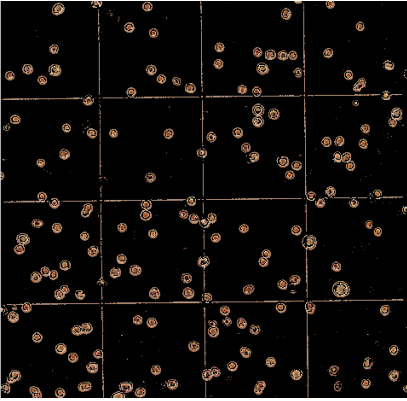
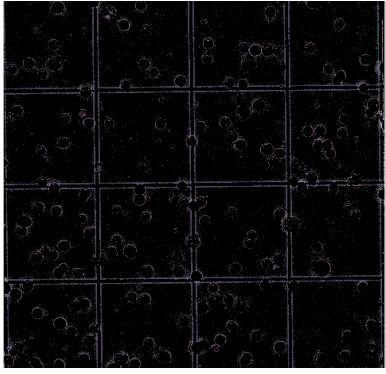
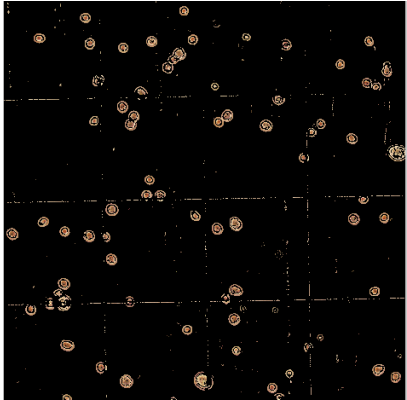
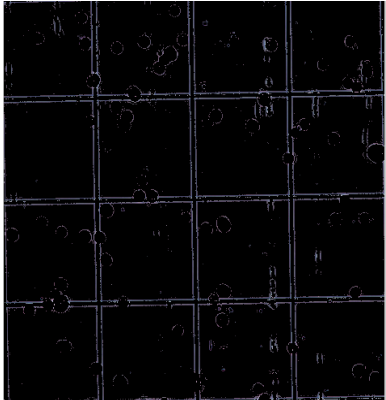
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1		
2		
3		
4		

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
5		
6		
7		
8		

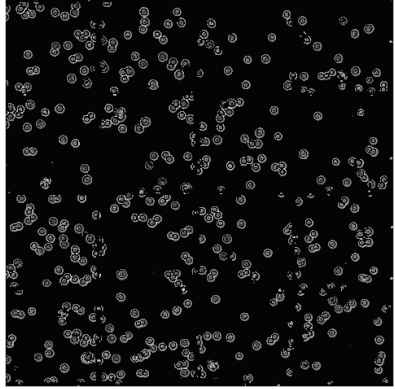

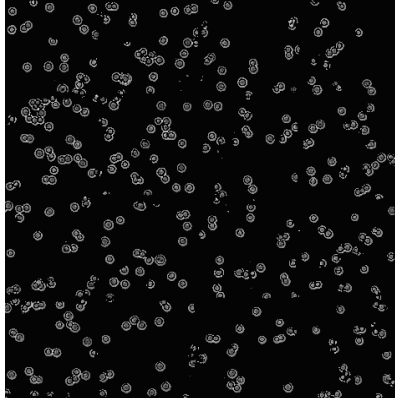

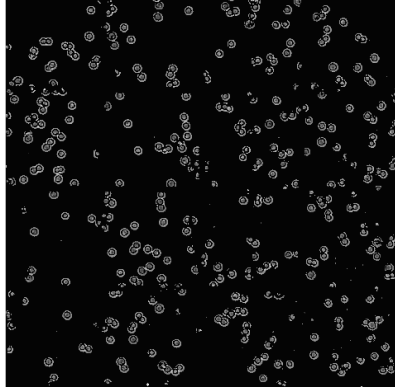
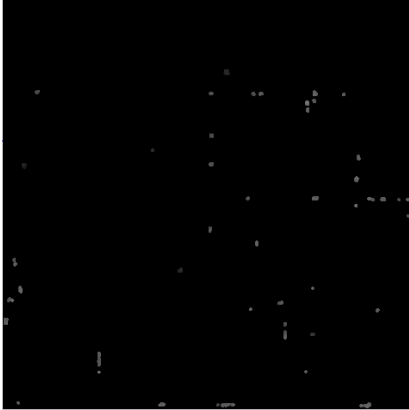
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
9		
10		
11		

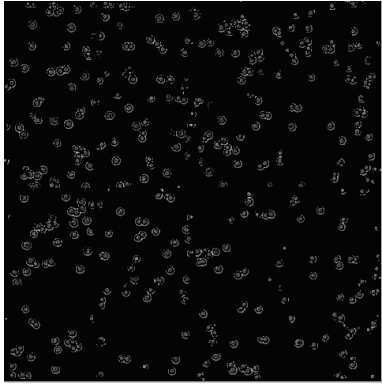

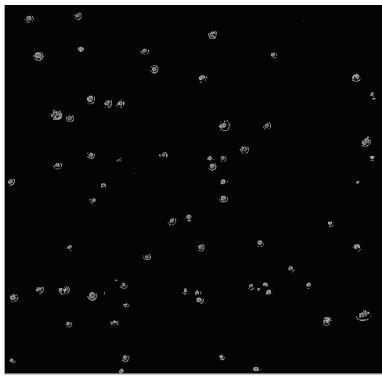

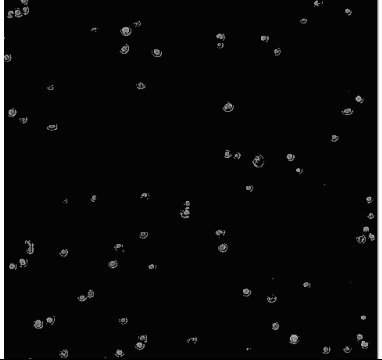
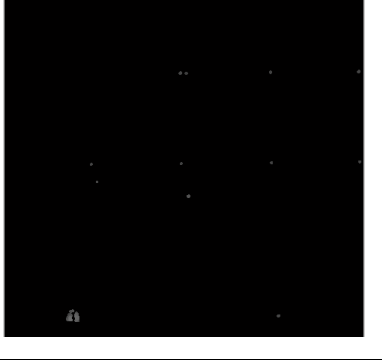
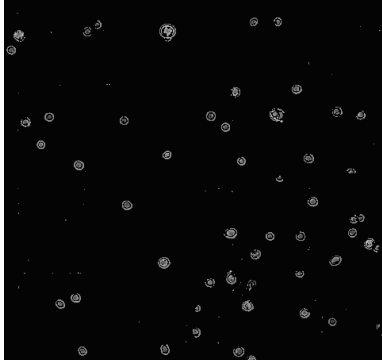
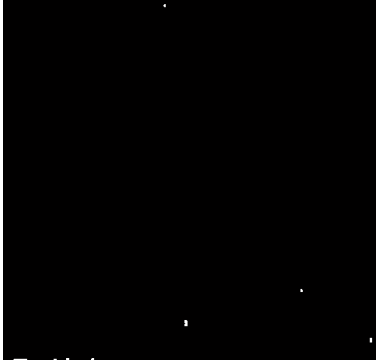
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
12		
13		
14		

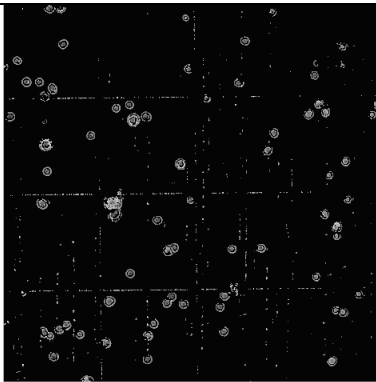

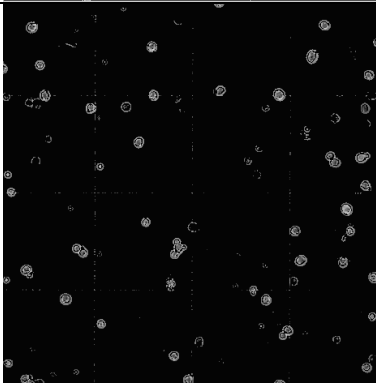
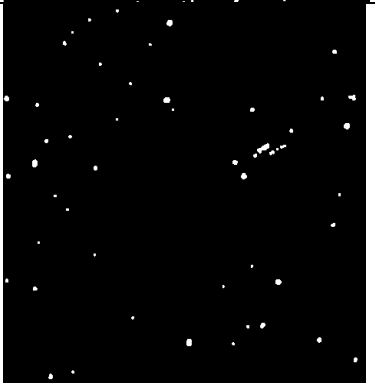
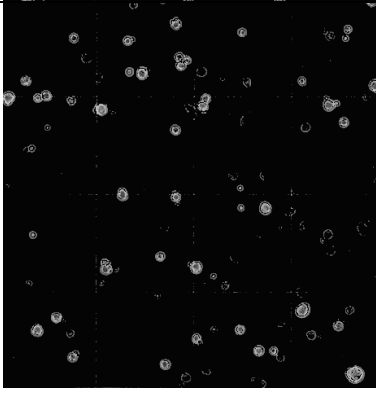
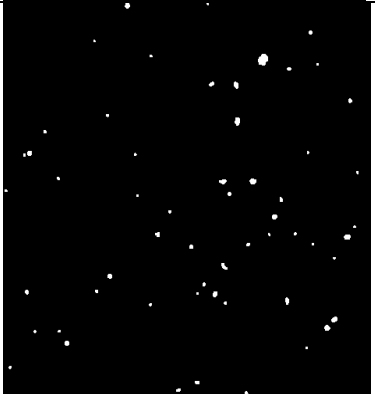
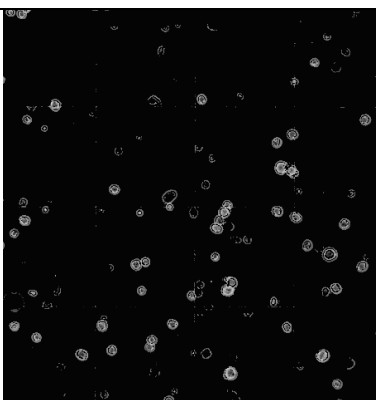

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
15		
16		
17		

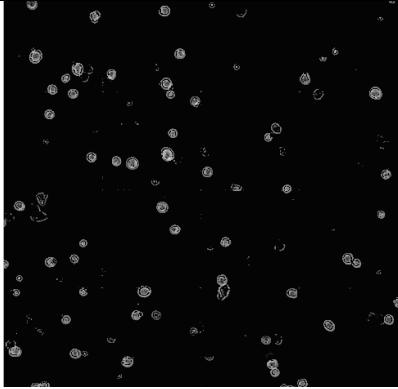

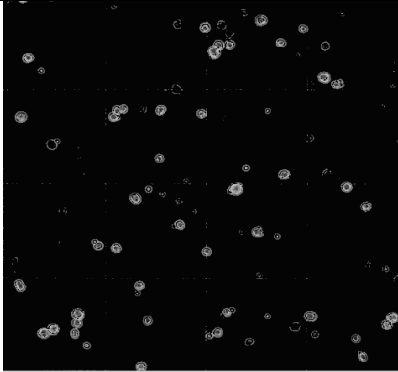
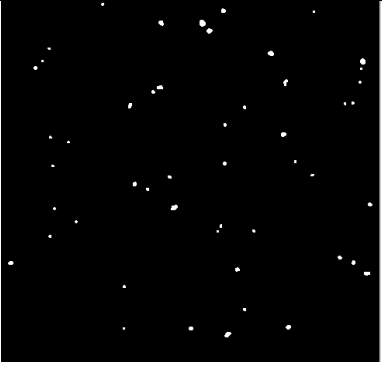
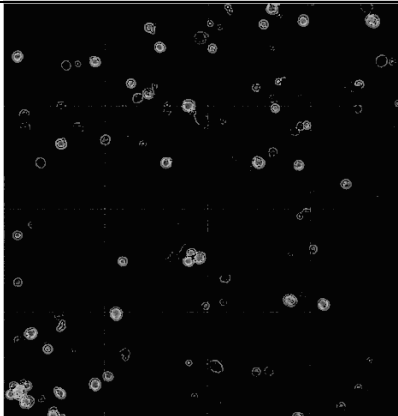

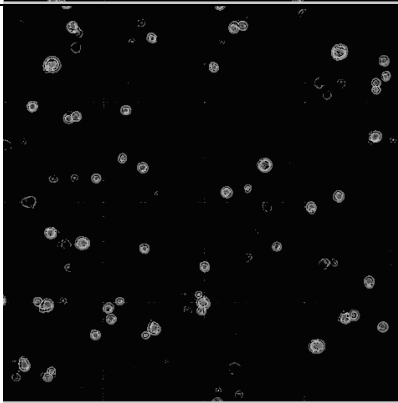
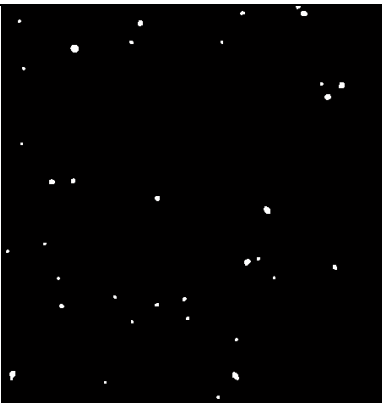
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
18		
19		
20		

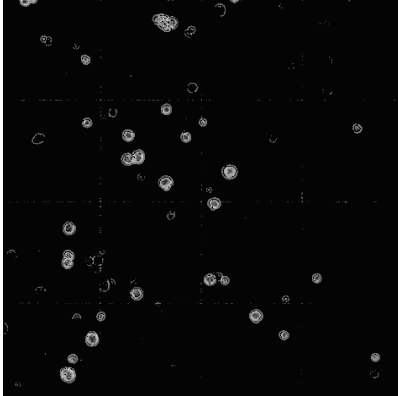
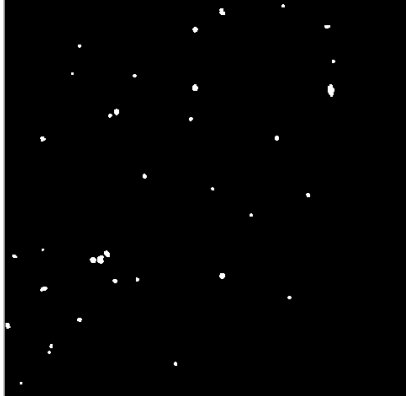
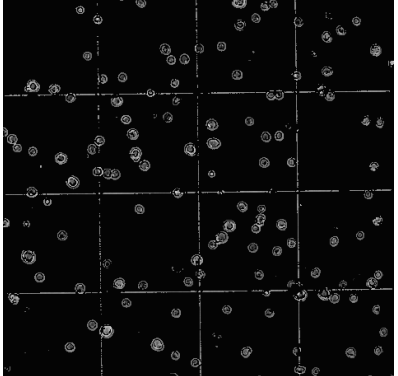
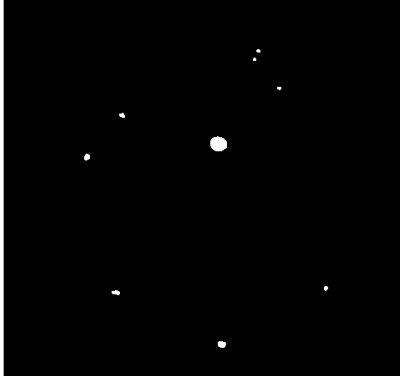
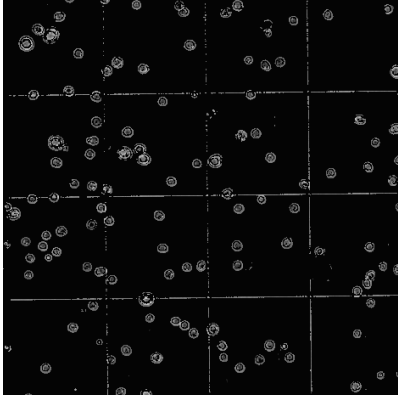

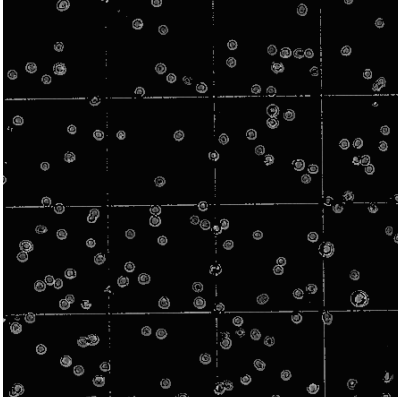
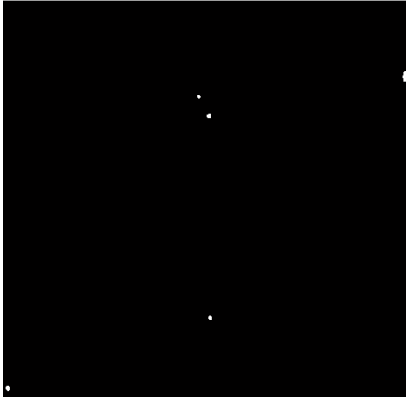
ภาคผนวก ค
ผลการกำจัดสัญญาณรบกวน

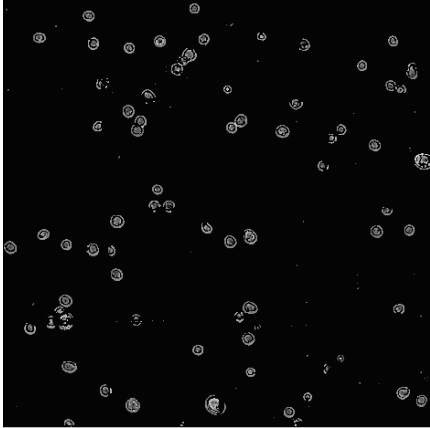
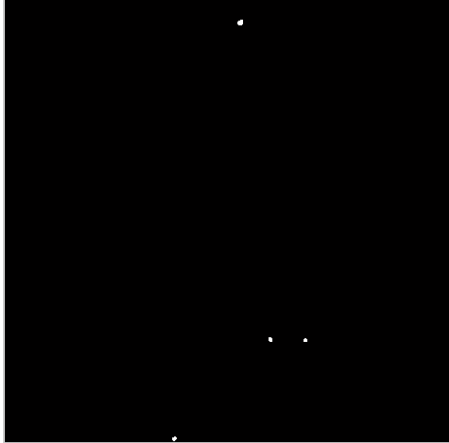
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1	 Micrograph showing a dense population of live cells, appearing as bright, circular structures against a dark background.	 Micrograph showing dead cells, appearing as dark, irregular structures against a dark background.
2	 Micrograph showing a dense population of live cells, appearing as bright, circular structures against a dark background.	 Micrograph showing dead cells, appearing as dark, irregular structures against a dark background.
3	 Micrograph showing a dense population of live cells, appearing as bright, circular structures against a dark background.	 Micrograph showing dead cells, appearing as dark, irregular structures against a dark background.

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
4		
5		
6		
7		

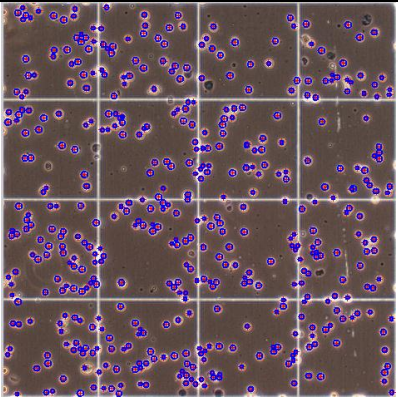
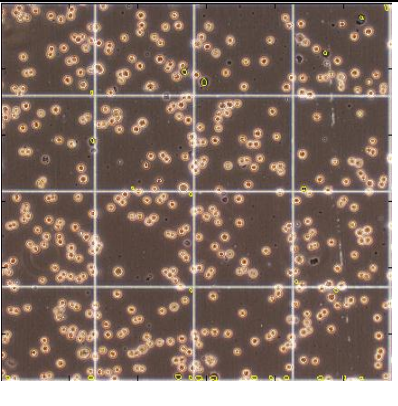
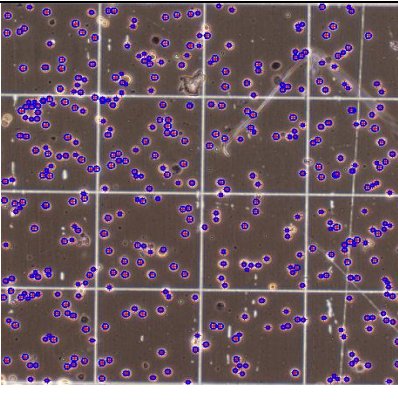
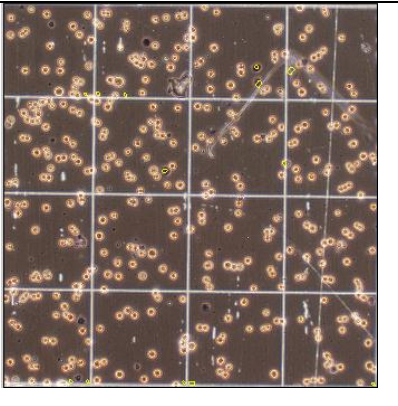
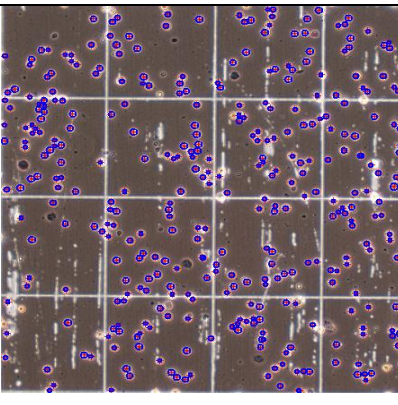
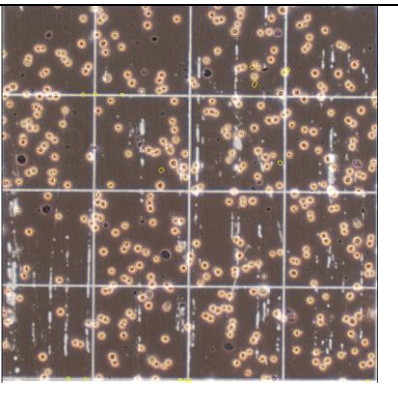
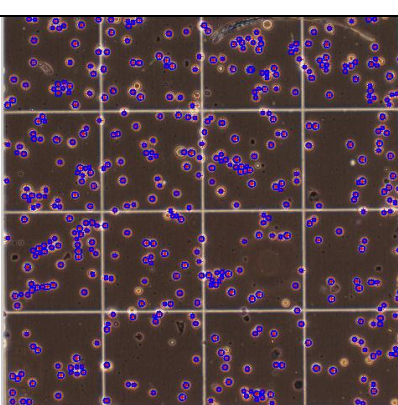
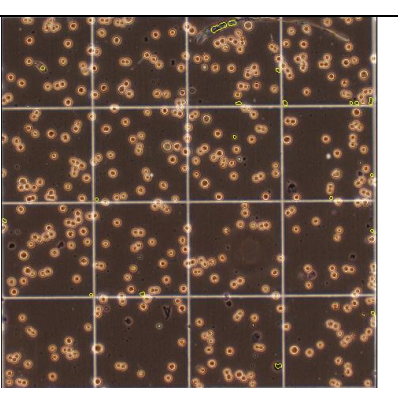
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
8		
9		
10		
11		

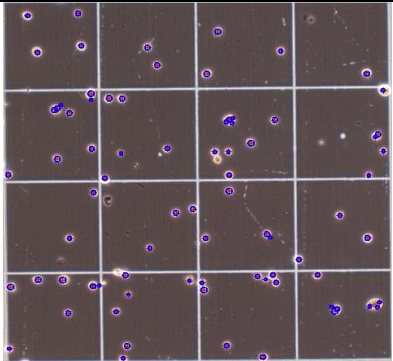
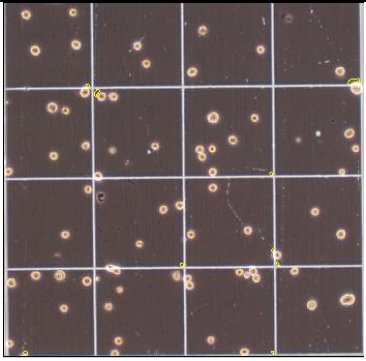
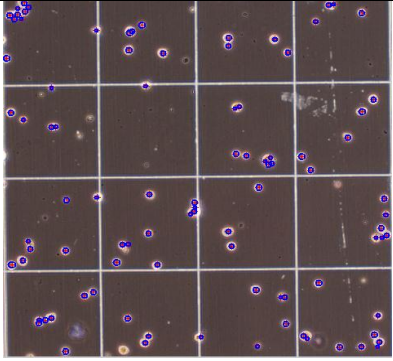
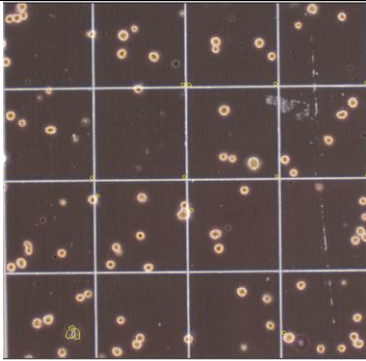
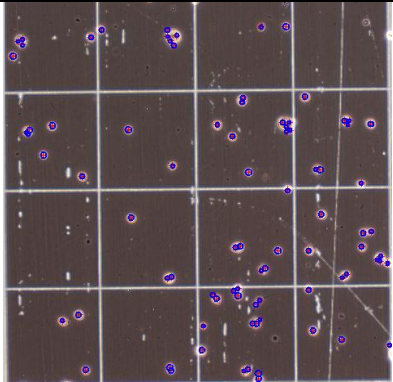
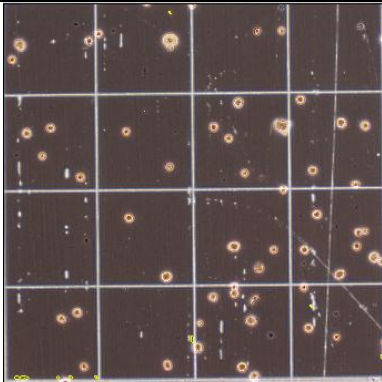
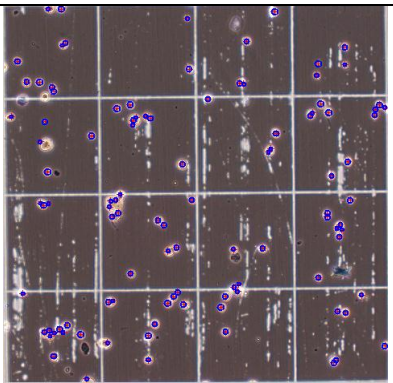
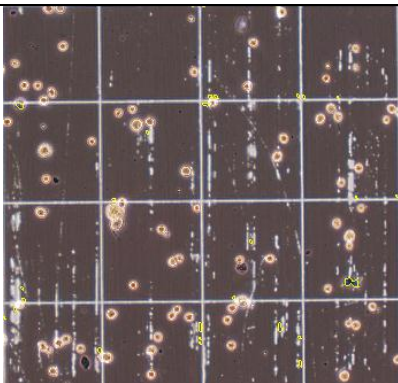
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
12		
13		
14		
15		

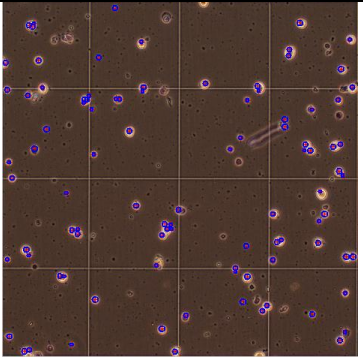
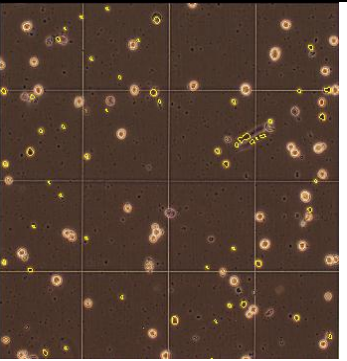
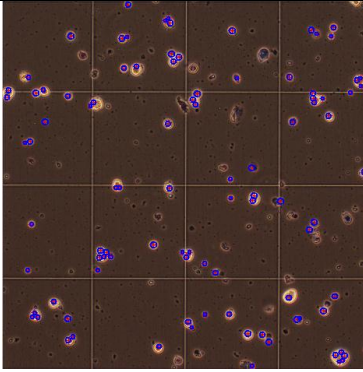
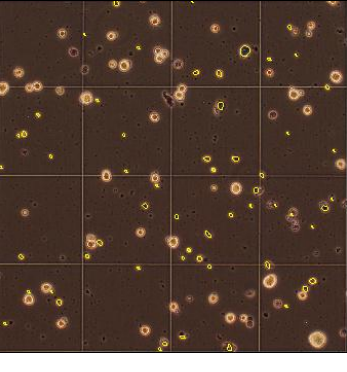
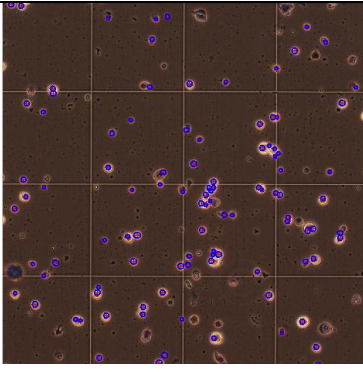
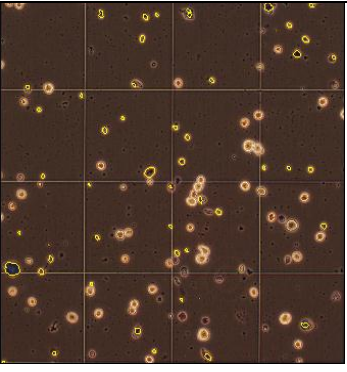
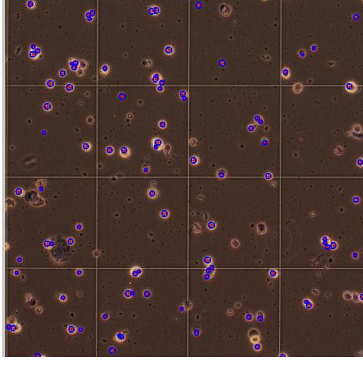
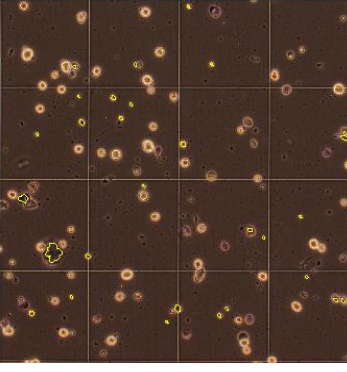
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
16		
17		
18		
19		

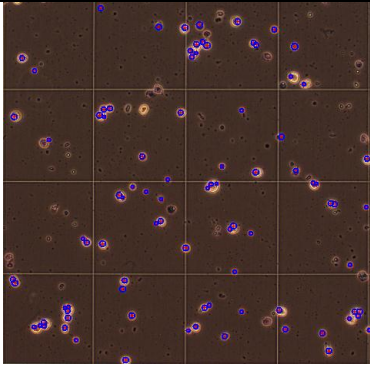
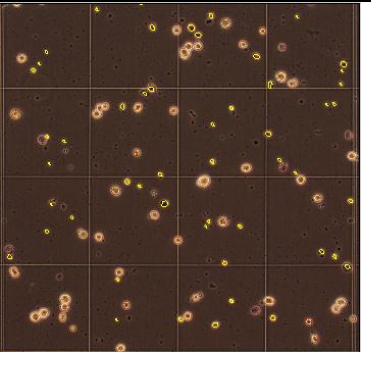
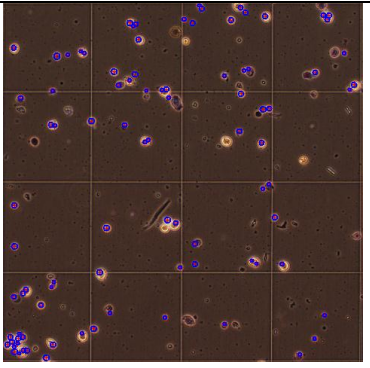
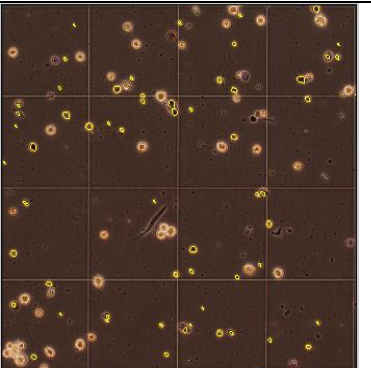
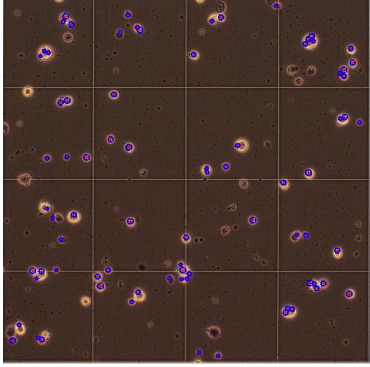
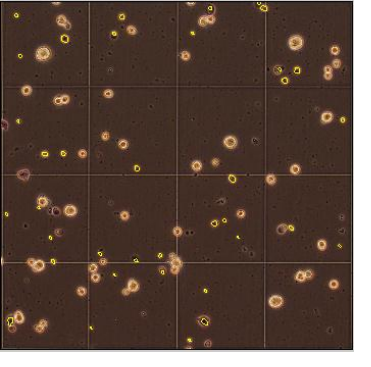
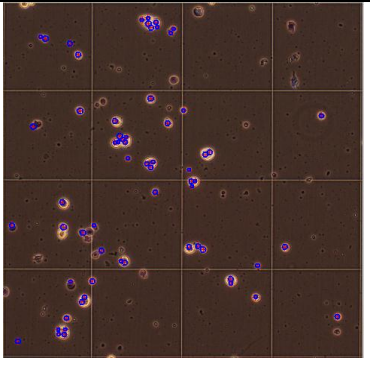
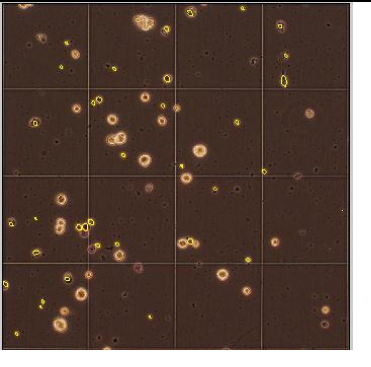
รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
20	 A black and white micrograph showing numerous small, bright, circular cells scattered across a dark background. The cells appear to be in various stages of division or movement, with some showing distinct internal structures.	 A black and white micrograph showing a dark field with only a few very small, faint white spots, indicating that most of the cells have died and are no longer visible or are too faint to be seen.

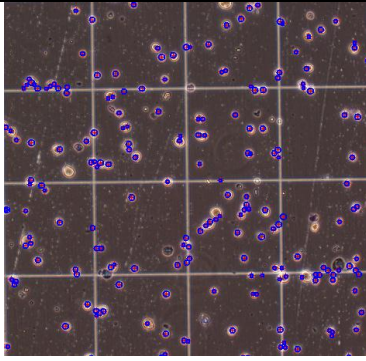
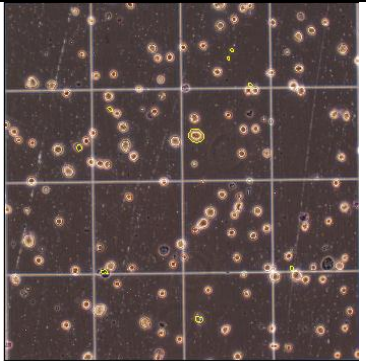
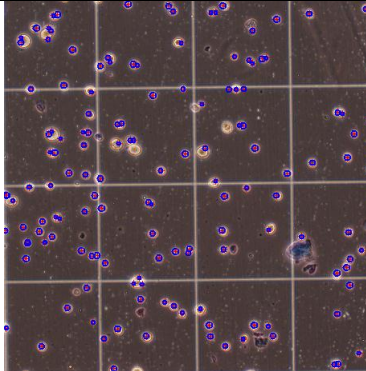
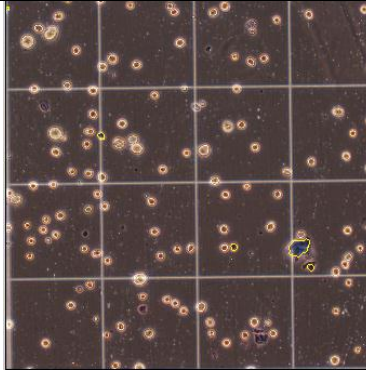
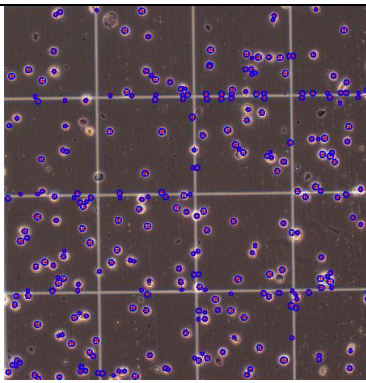
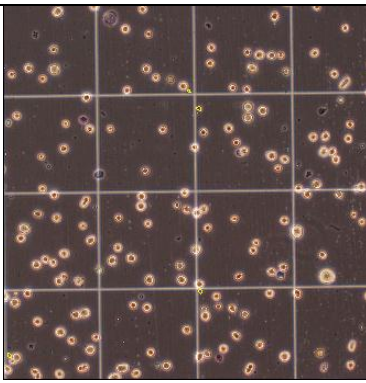
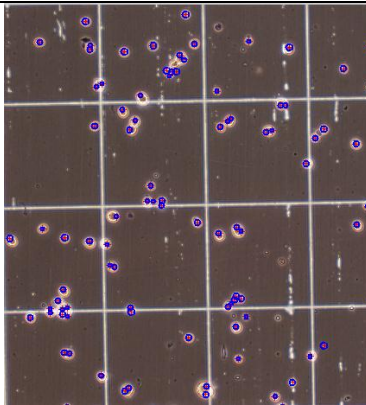
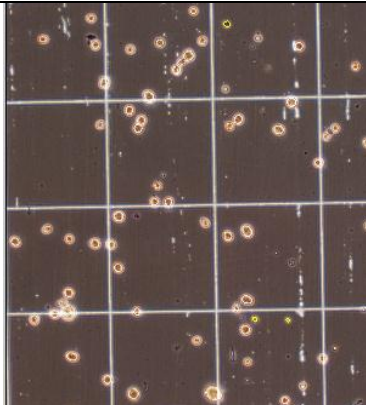
ภาคผนวก ง
ผลการระบุตัวตนของเซลล์

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
1		
2		
3		
4		

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
5		
6		
7		
8		

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
9		
10		
11		
12		

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
13		
14		
15		
16		

รูปภาพ	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย
17		
18		
19		
20		

ภาคผนวก จ
คำสั่งที่ใช้ในการประมวลผลรูปภาพ

```
%Analyze Image

load mydata1.mat
global num_a1
global num_a2
global num_a3
global num_a4
global num_de1
global num_de2
global num_de3
global num_de4
global per_s1
global per_s2
global per_s3
global per_s4
global per_de1
global per_de2
global per_de3
global per_de4

group_image = cell(1,4);
num_avi = cell(1,4);
num_death = cell(1,4);
num_image = 4;
group_image{1} = crop1;
group_image{2} = crop2;
group_image{3} = crop3;
group_image{4} = crop4;

clear crop1 crop2 crop3 crop4
for k = 1:num_image
    clear death_cell
    clear se
```



```

he = group_image{k};
[Object2 Object4] = clustering(he);
[circen cirrad area] = noise_live(Object2);
fh = figure ;
% togglefig('Results')
imshow(he);
hold on;
plot(circen(:,1), circen(:,2), 'r+');
for ii = 1 : size(circen, 1)
    figure( fh );
    rectangle('Position',[circen(ii,1) - cirrad(ii), circen(ii,2) - cirrad(ii), 2*cirrad(ii),
2*cirrad(ii)],...
'Curvature', [1,1], 'edgecolor', 'b', 'linewidth', 1.5);
end
clear se
[BW] = noise(Object4);
[La,num] = bwlabel(BW);
[death_cell]=death_count(La,num,he);
hold off;
saveas(fh,sprintf( 'current_frame_%02d.png',k));
% area_live_cell = area;

if num > 0
    [count_b count_s count_n total new_count_b new_total] =
compare(death_cell,area,num);
    num_avi{k} = ii;
    num_death{k} = new_total;

else
    num_death{k} = 0;
    num_avi{k} = ii;
%live_cell = num_Ava;
%death_cell = new_total;

```

```
end

end

total1 = num_avi{1}+num_death{1};
total2 = num_avi{2}+num_death{2};
total3 = num_avi{3}+num_death{3};
total4 = num_avi{4}+num_death{4};

% image 1
num_a1 = num_avi{1};
    set(handles.edit1,'string',num2str(num_a1));
num_de1 = num_death{1};
    set(handles.edit2,'string',num2str(num_de1));
per_s1 =(num_a1/total1)*100;
    set(handles.edit4,'string',num2str(per_s1));
per_de1= (num_de1/total1)*100;
    set(handles.edit3,'string',num2str(per_de1));

% image 2
num_a2 = num_avi{2};
    set(handles.edit5,'string',num2str(num_a2));
num_de2 = num_death{2};
    set(handles.edit6,'string',num2str(num_de2));
per_de2= (num_de2/total2)*100;
    set(handles.edit7,'string',num2str(per_de2));
per_s2 =(num_a2/total2)*100;
    set(handles.edit8,'string',num2str(per_s2));

% image 3
num_a3 = num_avi{3};
    set(handles.edit9,'string',num2str(num_a3));
num_de3 = num_death{3};
    set(handles.edit10,'string',num2str(num_de3));
```

```
per_de3= (num_de3/total3)*100;
    set(handles.edit11,'string',num2str(per_de3));
per_s3 =(num_a3/total3)*100;
    set(handles.edit12,'string',num2str(per_s3));
    % image 4
num_a4 = num_avi{4};
    set(handles.edit13,'string',num2str(num_a4));
num_de4 = num_death{4};
    set(handles.edit14,'string',num2str(num_de4));
per_de4= (num_de4/total4)*100;
    set(handles.edit15,'string',num2str(per_de4));
per_s4 =(num_a4/total4)*100;
    set(handles.edit16,'string',num2str(per_s4));
close Figure 1
close Figure 2
close Figure 3
close Figure 4
    clear num_image
    img1 = imread('current_frame_01.png');
    axes(handles.axes1);
    image(img1);
    axis off
    img2 = imread('current_frame_02.png');
    axes(handles.axes2);
    image(img2);
    axis off
    img3 = imread('current_frame_03.png');
    axes(handles.axes3);
    image(img3);
    axis off
    img4 = imread('current_frame_04.png');
    axes(handles.axes4);
    image(img4);
```

```
axis off  
clear Object2 Object4 he circen cirrad area La num BW k
```

```
% Counting Cell

load update1.mat
load update2.mat
load update3.mat
load update4.mat

global num_a1
global num_a2
global num_a3
global num_a4
global num_de1
global num_de2
global num_de3
global num_de4
global per_s1
global per_s2
global per_s3
global per_s4
global per_de1
global per_de2
global per_de3
global per_de4

%update image
%updte 1
num_vup1 = (num_a1 + xrows_v) - xrows_vd;
    set(handles.edit1,'string',num2str(num_vup1));
num_dup1 = (num_de1 + xrows_d) - xrows_dd;
    set(handles.edit2,'string',num2str(num_dup1));
    total1 = num_vup1 + num_dup1;
per_s1 =(num_vup1/total1)*100;
    set(handles.edit4,'string',num2str(per_s1));
```

```

per_de1= (num_dup1/total1)*100;
    set(handles.edit3,'string',num2str(per_de1));
%updte 2
num_vup2 = (num_a2 + xrows_v2) - xrows_vd2;
    set(handles.edit5,'string',num2str(num_vup2));
num_dup2 = (num_de2 + xrows_d2) - xrows_dd2;
    set(handles.edit6,'string',num2str(num_dup2));
total2 = num_vup2+num_dup2;
per_s2 =(num_vup2/total2)*100;
    set(handles.edit8,'string',num2str(per_s2));
per_de2= (num_dup2/total2)*100;
    set(handles.edit7,'string',num2str(per_de2));

    %updte 3
num_vup3 = (num_a3 + xrows_v3) - xrows_vd3;
    set(handles.edit9,'string',num2str(num_vup3));
num_dup3 = (num_de3 + xrows_d3) - xrows_dd3;
    set(handles.edit10,'string',num2str(num_dup3));
total3 = num_vup3+num_dup3;
per_s3 =(num_vup3/total3)*100;
    set(handles.edit12,'string',num2str(per_s3));
per_de3= (num_dup3/total3)*100;
    set(handles.edit11,'string',num2str(per_de3));
%updte 4
num_vup4 = (num_a4 + xrows_v4) - xrows_vd4;
    set(handles.edit13,'string',num2str(num_vup4));
num_dup4 = (num_de4 + xrows_d4) - xrows_dd4;
    set(handles.edit14,'string',num2str(num_dup4));
total4 = num_vup4+num_dup4;
per_s4 =(num_vup4/total4)*100;
    set(handles.edit16,'string',num2str(per_s4));
per_de4= (num_dup4/total4)*100;
    set(handles.edit15,'string',num2str(per_de4));

```

```

%save data
save data_image.mat num_vup1 num_dup1 per_s1 per_de1 num_vup2 num_dup2
per_s2 per_de2 num_vup3 num_dup3 per_s3 per_de3 num_vup4 num_dup4 per_s4
per_de4

%function Image segmentation
function [Object2 Object4] = clustering(he)
cform = makecform('srgb2lab');
lab_he = applycform(he,cform);
ab = double(lab_he(:,:,2:3));
nrows = size(ab,1);
ncols = size(ab,2);
ab = reshape(ab,nrows*ncols,2);
%figure,imshow(ab)
%number of k
nColors = 4;
matrix =
[134.762898096934,136.132041874909;143.593329485191,151.987283091021;134.7248460
56207,130.320775156392;135.354485143884,118.731943726460];
[cluster_idx cluster_center] = kmeans(ab,nColors,'distance','sqEuclidean','start',matrix);

pixel_labels = reshape(cluster_idx,nrows,ncols);
segmented_images = cell(1,4);
rgb_label = repmat(pixel_labels,[1 1 3]);

for k = 1:nColors
    color = he;
    color(rgb_label ~= k) = 0;
    segmented_images{k} = color;
end
Object1= segmented_images{1};
%figure,imshow(Object1), title('objects in cluster 1');
Object2= segmented_images{2};

```

```
%figure,imshow(Object2), title('objects in cluster 2');  
Object3= segmented_images{3};  
% figure,imshow(Object3), title('objects in cluster 3');  
Object4= segmented_images{4};  
% figure,imshow(Object4), title('objects in cluster 4');
```



```
%function noise_live
function [circen cirrad area] = noise_live(Object2)
red = Object2(:,:,2);

red = adapthisteq(red);
%figure,imshow(red)

se = strel('disk',4);
BW = imopen(red,se);

%figure,imshow(BW)
tic
[accum, circen, cirrad, area] = ...
    CircularHough_Grd(BW, [8 26],...
    17, 22, 1);
toc

if any(cirrad <= 0)
    inds = find(cirrad>0);
    cirrad = cirrad(inds);
    circen = circen(inds,:);
end
```

```
% function noise_dead
function [BW] = noise(Object4)
%red1 = Object4(:, :, 2);

I=rgb2gray(Object4);
%figure,imshow(I)
BW = im2bw(I, graythresh(I));

% figure,imshow(bw);

BW = imfill(BW, 'holes');
% figure,imshow(BW);

se = strel('disk',12);
BW = imopen(BW,se);
```

```

%function type of dead cell

function [death_cell]=death_count(La,num,he)
cform = makecform('srgb2lab');
lab_l1 = applycform(he,cform);
L=double(lab_l1(:,,1));
a=double(lab_l1(:,,2));
b=double(lab_l1(:,,3));

featureMatrix=zeros(6,num);
LaBW=La>0;
B = bwboundaries(LaBW,'noholes'); % Find boundary of each cancer cell
stats = regionprops(La,'Centroid','Area');

death_cell = cat(1,stats.Area);

%xlswrite('death_cell.xls',death_cell);

for k = 1:num
    featureMatrix(1,k)=mean(L(La==k));
    featureMatrix(2,k)=mean(a(La==k));
    featureMatrix(3,k)=mean(b(La==k));

    % obtain (X,Y) boundary coordinates corresponding to label 'k'
    boundary = B{k};
    % compute a simple estimate of the object's perimeter
    delta_sq = diff(boundary).^2;
    perimeter = sum(sqrt(sum(delta_sq,2)));
    % obtain the area calculation corresponding to label 'k'
    area = stats(k).Area;
    % compute the roundness metric
    roundness = 4*pi*area/perimeter^2;

```

```
featureMatrix(4,k)=area;  
featureMatrix(5,k)=roundness;  
  
end  
for k = 1:length(B)  
    boundary = B{k};  
    plot(boundary(:,2), boundary(:,1), 'y', 'LineWidth', 1);  
    centroid = stats(k).Centroid;  
end  
%hold off;  
set(gca,'XTick',[]); set(gca,'YTick',[]); axis image;
```

```

%compare of area
function [count_b count_s count_n total new_count_b new_total] =
compare(death_cell,area,num)
% compare

area_death_cell = death_cell;
av_a = mean(area);
Max = max(area(:));
nozerocurrent = nonzeros(area);
Min = min(nozerocurrent);

% Parameters (default values)

count_n = 0;
count_b = 0;
count_s = 0;
new_count_b = 0;

for N =1:num
    if area_death_cell(N) <= Min

        count_b=count_b+1;

        broken(N)= area_death_cell(N);

        SUM =sum(broken);
        newcount_b = SUM/av_a;
        %
        new_count_b = round(newcount_b);
        % text(num2str(num),'Color','y',...
        % 'FontSize',10);

```

```
elseif area_death_cell(N) >= Max

    count_s=count_s+1;

else

    count_n=count_n +1;
end

total = count_b+count_s+count_n;
new_total = new_count_b+count_s+count_n;

end
```

ภาคผนวก ฉ
ข้อมูลการเผยแพร่วิทยานิพนธ์

Preliminary Results of Death Cell Counting Based on K-mean Clustering

Fatima Chobngam¹, Kanyanatt Kanokwiroon²,
Surapong Chatpun¹

¹Institute of Biomedical Engineering

²Department of Biomedical Science

Faculty of Medicine, Prince of Songkla University
Hatyai, Songkhla, Thailand

fa.ma.electrical@hotmail.com; kkanyana@medicine.psu.ac.th;
surapong.c@psu.ac.th

Warit Wichakool³, Somchai Limsiroratana⁴,
Pornchai Phukpattaranont³

³Department of Electrical Engineering

⁴Department of Computer Engineering

Faculty of Engineering, Prince of Songkla University
Hatyai, Songkhla, Thailand

wichakool@gmail.com; somchai@coe.psu.ac.th;
pornchai.p@psu.ac.th

Abstract— Death cells and living cells counting after cancer drug treatment is a mandatory process for in vitro study to evaluate the effectiveness of the treatment in cancer research. The conventional process using trypan blue dye staining requires expertise and it is time-consuming and tedious work. The aim of this study was to develop a computer-assisted program that counts a number of cells by using image analysis. There were five steps to complete in this study; i) input image acquiring, ii) cell extraction from a background, iii) noise reduction, iv) cell counting and v) output with expert comparison. K-mean algorithm was selected to use to extract features and cluster objects in the images. Hough transform was also performed after completion of k-mean algorithm and noise removal. The counting results using our code had a greater number of both death cells and living cells compared with the counting results from the expert. The accuracy of death cells counting and living cells counting were in range of 33% to 97% and 74% to 100%, respectively. However, the process time was short, only 2-3 second per image. This computer-assisted program needs to further develop as a graphic user interface (GUI) to make it easier for users as well as making higher accuracy.

Keywords-Computer-assisted program, Cell counting, K-mean, Hough transform, Apoptosis

I. INTRODUCTION

In cancer researches, the effects of novel treatment on cancer cells have been studied in many directions and aspects. One perspective using to evaluate the effectiveness of cancer treatment is the identification of apoptotic [1]. Apoptosis is a program cell death which particularly observed from cell morphological changes. In general, apoptotic cell can be quantified with various modalities such as flow cytometry, morphological staining assessment [2, 3]. Regarding to in vitro study, trypan blue dye exclusion stain technique, a conventional method, can distinguish the differences between living cells and death cells. The accurate result of dye stain counting has to be performed by a person who has biological

expertise. However, counting by this conventional method is tedious and time-consuming.

Recently, image processing analyses and software have been developed to help researchers to deal with cell counting such as ImageJ, DeathEasy Caspase [4, 5]. Furthermore, using image processing analyses for counting purpose makes the task easier and faster. Therefore, this work aimed to develop a computer-assisted program that counts the number of cells, including living cells and death cells, in a trypan blue dye assay by using image analysis.

II. METHODS

In the process to develop a computer program for cell counting, the steps to perform are input, cell extraction from a background, noise reduction, cell counting and output with expert comparison. Figure.1 shows the framework of our study.

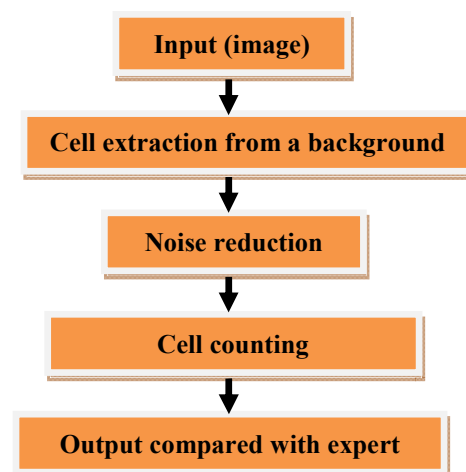


Fig 1. Framework for cell counting in trypan blue dye assay image

A. Input

A set of digital images captured from a microscope in a trypan blue dye assay were used as input of the process. Each image contained living cells, death cells and background as shown in Figure 2. The living cells were not stained to trypan blue dye because their cell membranes were intact. On the other hand, cells destroyed by the drug treatment had higher membrane permeability for the dye to penetrate into. Therefore, death cells were stained and had dark blue color.

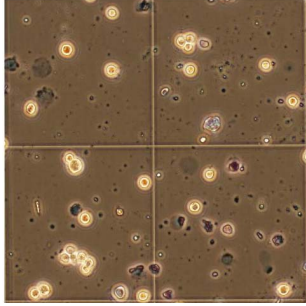


Fig 2. A sample image from a trypan blue dye assay

The input images were captured in RGB color model [6, 7]. In the RGB model, each color appears as a combination of red, green, and blue. Generally, RGB values are normalized and its values are between 0 and 1. As shown in Figure 3, RGB values are at three corners; cyan, magenta, and yellow are the three other corners, black is at their origin, and white is at the corner farthest from the origin.

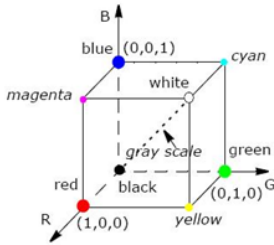


Fig 3. RGB model

B. Cell extraction from background

In this step, the objects of image were extracted by using k-mean algorithm [8-10]. K-mean algorithm is an approach to cluster and determine the center of each group by defined number of k. It is commonly employed and converged fast to a local optimum. Briefly, k-mean algorithm performs the following sequences

1. Assign number of cluster (value of k)
2. Assign a centroid of each cluster
3. Determine the distance between centroid and objects
4. Make a group based on minimum distance
5. Calculate the new means to be the centroid of each cluster as expressed in equation (1).

$$m_i^{(t+1)} = \frac{1}{s_i^{(t)}} \sum_{x_j \in s_i^{(t)}} x_j \quad (1)$$

Where m_i^{t+1} is the new cluster centers, x_j is each observation which is a d -dimensional real vector and $s_i^{(t)}$ the number of samples.

6. Determine the minimum distance between object and centroid and do objects clustering again.
7. Repeat task 5 and 6 until no object move from a group.

In this study, we assigned $k=4$ to group the objects in the input images. Figure 4 shows the result after using k-mean algorithm. There are four clusters can be extracted: background, death cells, edge of living cells and living cells. Therefore, we used the cluster 2 and 4 to process for cell counting.

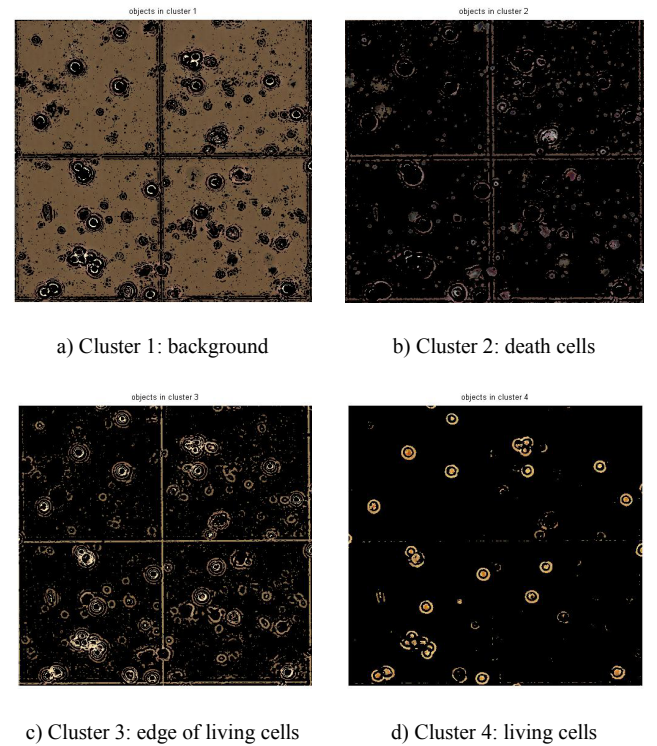


Fig 4. An example of clusters using k-mean algorithm

C. Noise reduction

To do noise reduction, we used an averaging filter and 2D median filter (medfilt2) to remove salt and pepper noise. Furthermore, we performed morphological opening (imopen) to remove small objects from the foreground of an image.

D. Cell counting

To extract features of images processed with k-mean algorithm and noise reduction, we used Hough transform to find shapes of cells [11, 12]. As presented in Figure 5, living cells are circled by blue color and death cells are drawn by red color.

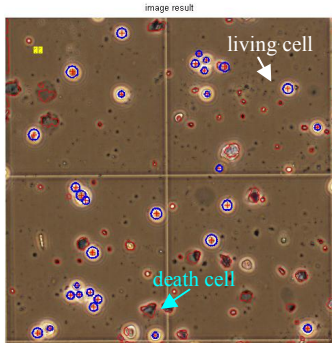


Fig 5. An example of images after Hough transforms

E. Output compared with expert

The output of our code was compared with the expert who has an experience in cell counting at least two year in order to evaluate the accuracy of the results and the effectiveness of the code. The accuracy of cell counting was determined as addressed in equation (2).

$$\% \text{ accuracy} = 100 - \left(\frac{|\text{Expert} - \text{Program}|}{\text{expert}} \times 100 \right) \quad (2)$$

III. RESULTS AND DISCUSSION

The image samples of study were four images cropped from one slide assay. After performing with our developed computer program, living cells and death cells were detected as shown in Figure 6. Living cells almost had a circular shape whereas death cells had an irregular shape with different size. In fact, apoptotic cell death has many changes in morphology such as blebbing, cell shrinkage and cell fragmentation. Therefore, the number of death cells should be carefully count especially when cells are fragmented. In this study, we determined an averaged area of a single living cell to use as a reference area. We did area summation of fragmented death cells and then divided by a referenced area from a single living cell to get the number of death cells. The results of cell counting obtained from four images are presented in Table I. Our computer-assisted counting results had a greater number of both death cells and living cells compared with the counting results from the expert. The over counting of living cells comes from the death cells which are in the early stage of apoptosis and the appearance of noise nearby living cells. For

the death cells, the over counting comes from the fragmented cells which might not be parts of cell but they were debris or image background noise.

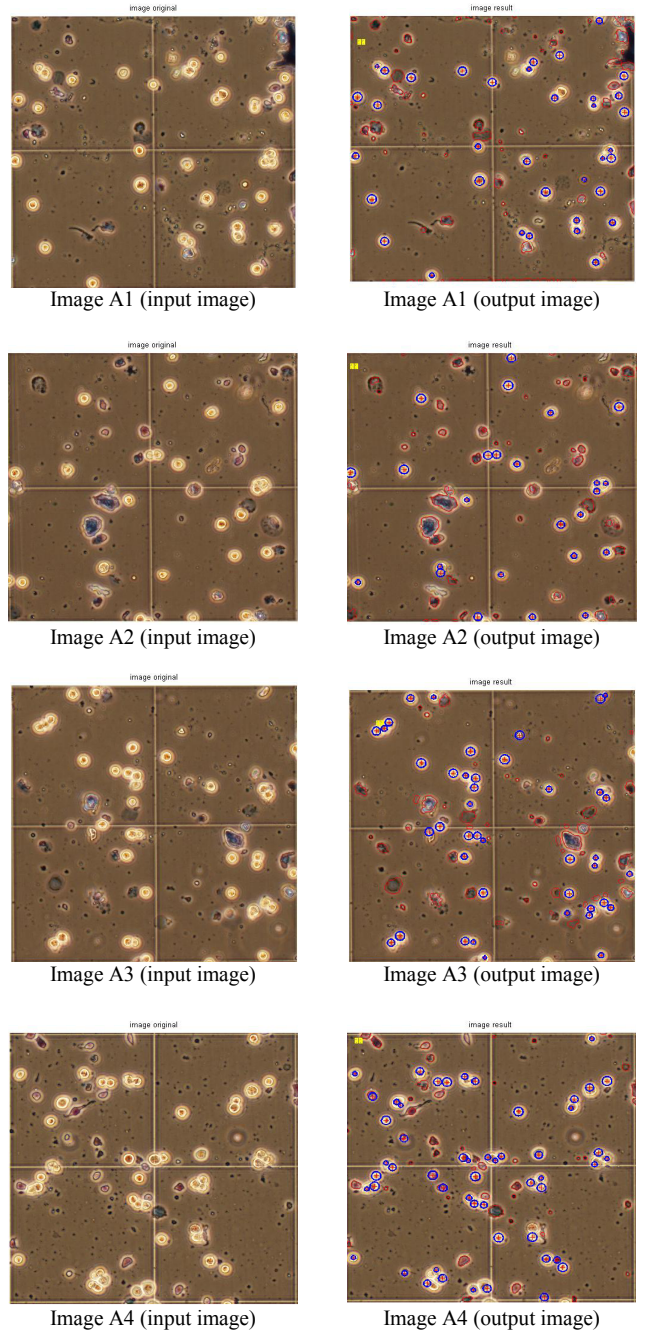


Fig 6. Input images and output images performed with the developed computer program

TABLE I. COMPARISON OF CELL COUNTING WITH EXPERT AND DEVELOPED COMPUTER PROGRAM

Image #	Method	Death Cell	Living Cell	Accuracy of death cell counting	Accuracy of living cell counting
A1	Expert	33	36	33%	100%
	Program	55	36		
A2	Expert	33	24	91%	96%
	Program	36	25		
A3	Expert	34	37	74%	86%
	Program	43	42		
A4	Expert	39	42	97%	74%
	Program	38	53		

The elapsed time for the processes since input step to cell counting step was approximately two to three seconds for each image. However, the elapsed time might increase when the resolution of image increases. There are several concerns using our developed computer-assisted program on the accuracy of the results, for example the quality of the input image, the k-value and the initial centroid of clusters,

IV. CONCLUSION

The outcome of this study was a computer-assisted program that can count a number of living cells and death cells. This study showed that k-mean and Hough transform were effective algorithms to apply for this purpose. However, this computer-assisted program needs to further develop as a graphic user interface (GUI) to make it easier for users as well as making higher accuracy.

V. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Faculty of Medicine, Prince of Songkla University grant 54-296-25-1-3.

VI. REFERENCES

[1] S. W. Lowe and A. W. Lin, "Apoptosis in cancer". *Carcinogenesis*. 21(3), pp. 485-95, 2000.
 [2] D. J. Harrison, "Counting apoptosis-why and how?". *Clin Mol Pathol*. 49(5), pp. M245-6, 1996.
 [3] S. Jantova, A. Repicky, E. Paulovicova, S. Letasiova, and L. Cipak, "Antiproliferative activity and apoptosis induced by 6-bromo-2-(morpholin-1-yl)-4-anilinoquinazoline on cells of leukemia lines". *Exp Oncol*. 30(2), pp. 139-42, 2008.
 [4] E. Gering and C. T. Atkinson, "A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis". *J Parasitol*. 90(4), pp. 879-81, 2004.

[5] D. S. Beeckman, G. Meesen, P. Van Oostveldt, and D. Vanrompay, "Digital titration: automated image acquisition and analysis of load and growth of *Chlamydomonas psittaci*". *Microsc Res Tech*. 72(5), pp. 398-402, 2009.
 [6] W. Yuedong and X. Heru. "The color image processing technology of the milk somatic cells". in *Computer Engineering and Technology (ICCET)*, 2nd International Conference on, pp. V4-280-V4-283, 2010.
 [7] L. Huey Nee, M. Y. Mashor, and R. Hassan. "White blood cell segmentation for acute leukemia bone marrow images". in *Biomedical Engineering (ICoBE)*, 2012 International Conference on, pp. 357-361, 2012.
 [8] J. M. Sharif, M. F. Miswan, M. A. Ngadi, M. S. H. Salam, and M. Mahadi bin Abdul Jamil. "Red blood cell segmentation using masking and watershed algorithm: A preliminary study". in *Biomedical Engineering (ICoBE)*, 2012 International Conference on, pp. 258-262, 2011.
 [9] A. Z. Chitade and S. K. Katiyar, "Color based image segmentation using k-mean clustering". *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(10), pp. 5319-5325, 2010.
 [10] S. Ray and R. H. Turi. "Determination of number of clusters in K-means clustering and application in colour image segmentation". in the 4th International Conference on Advances in Pattern Recognition and Digital Techniques Calcutta, India: Narosa Publishing House, New Delhi, India, pp. 137-143, 1999.
 [11] N. H. Mahmood and M. A. Mansor, "Red blood cells estimation using Hough transform technique". *Signal & Image Processing : An International Journal*. 3(2), pp. 53-64, 2012.
 [12] L. H. Liew, B. Y. Lee, and M. Chan. "Cell detection for bee comb images using Circular Hough Transformation". in *Science and Social Research (CSSR)*, 2010 International Conference on, pp. 191-195, 2010.