



KKU Res.j. 2014; 19(4) : 526-538

<http://resjournal.kku.ac.th>

การตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์จากภาพพื้นหลังแบบอัตโนมัติ Automatic Chromosome G-band Segmentation from Background Images

พิเชษ วะยะลุน^{1,2}, นัฐริยา เหล่าประชา¹, และ สายยัญ สายยศ^{1,2*}Pichet Wayalun^{1,2}, Natthariya Laopracha¹, and Saiyan Saiyod^{1,2*}¹ภาควิชาวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น²ห้องปฏิบัติการด้านการเชื่อมโยงฮาร์ดแวร์มนุษย์และการสื่อสาร ภาควิชาวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*Correspondent author: saiyan@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ปัญหาในการตัดแยกภาพโครโมโซมเกิดจากภาพโครโมโซมมีคุณภาพต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดความคมชัดและหลุมที่เกิดขึ้นในโครโมโซม ดังนั้นการเพิ่มคุณภาพภาพและเติมข้อมูลในส่วนที่ขาดหายสำหรับภาพโครโมโซมจึงเป็นส่วนสำคัญที่ต้องทำ โดยในงานวิจัยฉบับนี้ได้นำเสนอวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซม G-band ซึ่งอยู่ในพื้นฐานของ Histogram Equalization, Adaptive Threshold, Flood-Fill, Canny Edge Detection และ Axis-Aligned Bounding Boxes โดยเทคนิค HAFCA ซึ่งจะสามารถเพิ่มคุณภาพภาพ และการเติมข้อมูลส่วนที่ขาดหายภายในภาพโครโมโซมได้ โดยผลการวิจัยพบว่าวิธีการตัดแยกโครโมโซม HAFCO ให้ความถูกต้องสูงสุดที่ 97.27%

Abstract

The problem of chromosome segmentation is due to poor image quality, particularly lack of contrast and hole appeared in chromosome images. These images must be first enhanced and holes are to be filled up in the subsequent step. This research presents the technique developed for human chromosome image segmentation, base on Histogram Equalization, Adaptive Threshold, Flood-Fill, Canny Edge Detection and Axis-Aligned Bounding Boxes. Under this approach, HAFCO technique can improve enhancement and fill hole of chromosome images. From our study, we found that HAFCO give promising results in segmentation. A success rate of 97.27% has been achieved.

คำสำคัญ: การวิเคราะห์ภาพ ภาพโครโมโซม การตัดแยกภาพโครโมโซม การวิเคราะห์ภาพโครโมโซม การเพิ่มประสิทธิภาพภาพโครโมโซม

Keywords: Image Analysis, Chromosome Image, Chromosome Segmentation, Chromosome Analysis, Chromosome Enhancement

1. บทนำ

การวิเคราะห์ภาพโครโมโซมเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยให้แพทย์สามารถตรวจและวินิจฉัยโรคต่างๆ ได้เช่น โรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม (1) โรคกระเพาะ (2,3) รวมถึงโรคที่มีความผิดปกติอื่นๆ (4) โดยกระบวนการวิเคราะห์โครโมโซมจะประกอบด้วยการวิเคราะห์และจัดเรียงโครโมโซมในระยะเมตาเฟส (Metaphase) (5)

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางคอมพิวเตอร์ได้ประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ภาพโครโมโซมจากกล้องจุลทรรศน์ แต่เนื่องจากภาพที่ได้มีคุณภาพอยู่ในระดับต่ำขาดความคมชัด ระดับความเข้มและความสว่างภายในภาพไม่คงที่จึงทำให้กระบวนการตัดแยกโครโมโซมจากภาพพื้นหลังผิดพลาดไม่ถูกต้อง ข้อมูลในการวิเคราะห์จึงขาดหาย ส่งผลให้การวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดตามไปด้วย ดังนั้นขั้นตอนการตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพพื้นหลัง จึงต้องมีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมก่อนเป็นลำดับแรก โดยมีผู้วิจัยหลายท่านได้นำเสนอไว้ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มงานวิจัยด้านการตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ และกลุ่มงานวิจัยด้านการเพิ่มคุณภาพของภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์มีรายละเอียดดังนี้

1. กลุ่มงานวิจัยด้านการตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์

งานวิจัยของ Mihail และคณะ (6) พัฒนาวិธีการตัดแยกโครโมโซมโดยใช้วิธี Kittler-Illingworth, OTSU ในการประมวลผลภาพเบื้องต้น และทำการตัดแยกภาพโครโมโซมด้วยวิธี Recursive Algorithm และ Cross Section Sequence Graph (CSSG) แต่ประสิทธิภาพของวิธีการยังไม่ดีเท่าที่ควรอันเนื่องมาจากคุณภาพของข้อมูลภาพโครโมโซมที่ใช้ในการทดลองมีลักษณะข้อมูลโครโมโซมที่ขาดความคมชัดและมีสัญญาณรบกวนเป็นจำนวนมาก

งานวิจัยของ Liang (7) ได้พัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ โดยใช้วิธี Threshold Algorithm, Recursive Algorithm และ Pale Path แต่เนื่องจากภาพโครโมโซมที่ใช้ในการทดลองมีความสว่างของชุดข้อมูลภาพที่มากจนเกินไปจึงส่งผลให้ข้อมูลภาพโครโมโซมเกิดการขาดหายไปบางส่วน ส่งผลให้ความถูกต้องในการตัดแยกของวิธีการไม่มีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร

งานวิจัยของ Britto (8) ได้พัฒนาวิธีตัดแยกโครโมโซมชนิดจีแบนด์โดยอาศัยหลักการพิจารณาเส้นรอบรูปด้วยวิธี Active Contour Models, Gradient Vector Flow (GVF) และ Active Contours ในการตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ แต่การทดลองยังประสบปัญหาเรื่องข้อมูลภาพที่มีคุณภาพต่ำ เช่น ความคมชัดของชุดข้อมูลภาพ สัญญาณรบกวนบริเวณภาพที่มีจำนวนมาก และการขาดหายของข้อมูลภาพบางส่วนเมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มคุณภาพของภาพโครโมโซม จากปัญหาดังกล่าวจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของวิธีการไม่ดีเท่าที่ควร

งานวิจัยของ Srisang และคณะ (9) ได้ประยุกต์ใช้วิธี Voronoi Diagrams และ Delaunay Triangulations ในการตัดแยกภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์แบบอัตโนมัติ แต่ยังคงพบว่ามีภาพโครโมโซมบางภาพยังไม่สามารถตัดแยกได้ อันเนื่องมาจากลักษณะของภาพโครโมโซมบางส่วนขยายตัวไม่เต็มที่มีลักษณะการซ้อนทับ และสัมผัสกันเป็นจำนวนมากในบางชุดข้อมูล อีกทั้งระดับความคมชัดของชุดข้อมูลเป็นสิ่งที่ส่งผลให้ประสิทธิภาพการตัดแยกภาพโครโมโซมไม่ดีเท่าที่ควร

2. กลุ่มงานวิจัยทางด้านการเพิ่มคุณภาพของภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์

งานวิจัยของ Wenzhong (10) ได้ประยุกต์ใช้วิธี Top-Hat Transform, Bot-Hat Transform, Closing และ Opening เพื่อทำการเพิ่มคุณภาพของภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ด้านการวัดประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าว ใช้วิธีการหาเส้นขอบภาพหลังจากการเพิ่มคุณภาพของภาพจากผลการทดลองพบว่าเส้นขอบภาพโครโมโซมมีการขาดหายเป็นช่วงๆ และมีการสร้างเส้นขอบขนาดเล็กภายในภาพโครโมโซมซึ่งมีสาเหตุจากสัญญาณรบกวนที่มีจำนวนมากในชุดข้อมูล และข้อมูลที่ขาดหายภายในภาพโครโมโซม จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของวิธีการที่พัฒนาไม่ดีเท่าที่ควร

งานวิจัยของ Wang และคณะ (11) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมโดยการประยุกต์ใช้ Cross-Scale Feature Correlation ในการเพิ่มคุณภาพภาพ งานวิจัยดังกล่าวใช้วิธีการ Contrast Improvement Ratio (CIR) ในการวัดประสิทธิภาพ โดยเปรียบเทียบกับวิธีการการเพิ่มคุณภาพภาพ ได้แก่ Contrast Stretching (CS), Adaptive

Contrast Enhancement (ACE), Contrast Gain Transform (CGT), Multiscale Contrast Enhancement (MCE) และ Wavelets ซึ่งเป็นวิธีการที่นำเสนอ ด้านการวัดประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าวได้ทำการทดลองกับภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ จำนวน 10 ภาพซึ่งวิธีการที่พัฒนาให้ค่า CIR โดยเฉลี่ยที่ 3.984506 มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น

งานวิจัยของ Wu และ Castleman (12) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมโดยใช้ Cubic-Spline Wavelet และใช้วิธีการกำหนดค่า Threshold จากภาพพื้นหลัง โดยข้อมูลที่ใช้ในการทดลองคือภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ 20 เซลล์ไลต์ ในด้านการวัดประสิทธิภาพของวิธีที่นำเสนอใช้วิธีพิจารณาความแตกต่างจากภาพก่อนการทดลองและหลังทำการทดลองเพิ่มคุณภาพภาพ

งานวิจัยของ Pal และคณะ (13) ได้นำเสนอวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมโดยใช้ Minimization และ Fuzzy การวัดประสิทธิภาพใช้วิธีการวัดค่า Threshold ระหว่างวิธี Fuzzy และวิธีการที่ไม่ใช่ Fuzzy ผลจากการทดลองยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากภาพโครโมโซมที่ใช้ในการทดลองมีสัญญาณรบกวนเป็นจำนวนมาก

งานวิจัยของ Wu และคณะ (14) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมโดยใช้ Wavelet Transforms เป็นพื้นฐานในการพัฒนา และใช้เทคนิคของ Multiscale Point-wise Product (MPP) เข้าร่วมในงานวิจัยดังกล่าวและใช้วิธีการจำแนกข้อมูลภาพโครโมโซมในการวัดประสิทธิภาพ ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองคือภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ 30 เซลล์ไลต์ จำนวน 15,763 โครโมโซม ซึ่งผลการทดลองให้คุณภาพความถูกต้องที่ 95%

งานวิจัยของ Choi และคณะ (15) นำเสนอวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพภาพโครโมโซมโดยการสร้าง Fuzzy rule base เพื่อกำหนดระดับในการกรองสัญญาณรบกวน จากการวัดประสิทธิภาพการเพิ่มคุณภาพของภาพใช้วิธีการดูด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบระหว่างภาพที่ยังไม่ผ่านการเพิ่มคุณภาพของภาพกับภาพที่ผ่านการเพิ่มคุณภาพของภาพ ผลการทดลองพบว่าภาพที่ผ่านการเพิ่มคุณภาพของภาพด้วยวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีโดยอาศัยการดูด้วยตาเปล่า

Ehsani และคณะ (16) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์ ด้วยวิธี Adaptive and

Interactive Histogram Matching (AIHM) ซึ่งใช้ในการปรับความคมชัดให้กับภาพโครโมโซม ในงานวิจัยดังกล่าวใช้วิธีการเลือกค่าฮิสโตแกรมที่เหมาะสมที่สุดกับภาพโครโมโซมในแต่ละภาพ ซึ่งในแต่ละภาพจะมีความคมชัดแตกต่างกัน โดยทุกภาพจะถูกปรับให้มีความคมชัดในระดับดีที่สุดซึ่งจะใช้เป็นค่าฮิสโตแกรมมาตรฐาน ผลการทดลองวิธีการดังกล่าวกับเครื่องมือวัดคุณภาพภาพโครโมโซม Contrast Improvement Ratio (CIR) โดยเปรียบเทียบคุณภาพกับวิธีต่างๆ ได้แก่ Contrast Gain Transform (CGT) และ Local Standard Deviation Adaptive Contrast Enhancement (LSD-ACE) วิธีการ AIHM ให้คุณภาพภาพหลังการปรับปรุงดีที่สุด และภาพผลการปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีต่างๆ

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยต่างๆที่ได้กล่าวมานั้นยังไม่มียานวิจัยใดที่กล่าวถึงวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพพื้นหลัง ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการนำข้อมูลภาพโครโมโซมเข้าสู่การประมวลผล หากการตัดแยกภาพโครโมโซมจากพื้นหลังไม่ถูกต้องจะส่งผลให้การวินิจฉัยโรคผิดพลาดด้วยเช่นกัน

งานวิจัยนี้จึงนำเสนอวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพพื้นหลังโดยแก้ปัญหาในเรื่องความคมชัดของข้อมูลแถบลายโครโมโซม ระดับความสว่างภาพโครโมโซมที่ไม่คงที่ และการขาดหายของข้อมูลแถบลายภายในภาพโครโมโซมในบางช่วงในขั้นตอนจากการประมวลผลภาพเบื้องต้น เพื่อทำการปรับแต่งให้ภาพโครโมโซมมีความคมชัด ร่วมกับการเติมส่วนที่ขาดหายของข้อมูลภายในภาพโครโมโซมการหาขอบภาพโครโมโซมเพื่อกำหนดขอบเขตและตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพพื้นหลัง โดยภาพโครโมโซมที่ผ่านการตัดแยกดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2. วิธีวิจัย

2.1 Histogram Equalization

Histogram Equalization (HE) (17) เป็นขั้นวิธีหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพภาพ ซึ่งเป็นวิธีการปรับความคมชัดโดยใช้ฮิสโตแกรมของภาพทำโดยการกระจายค่าความเข้มที่เกิดขึ้นในภาพ ซึ่งได้จากการคำนวณหาค่าของ

จุดนั้นๆใหม่ ทำให้ค่าฮิสโตแกรมของภาพผลลัพธ์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ โดยวิธีการดังกล่าวสามารถอธิบายดังสมการที่ 1

$$S_k = T_{(r_k)} = \sum_{i=0}^k \frac{n_i}{N} \quad (1)$$

โดยที่

S_k คือ Output intensity

n_i คือ จำนวนพิกเซลที่ความเข้มพิกเซลเท่ากับ i

N คือ จำนวนพิกเซลทั้งหมด

2.2 Adaptive Threshold

Adaptive Threshold คือวิธีการหาค่า Threshold แบบปรับค่าตามข้อมูลท้องถิ่นซึ่งเหมาะสำหรับภาพที่มีความสว่างไม่สม่ำเสมอ ที่ต้องใช้ค่า Threshold หลายค่าเนื่องจากแต่ละบริเวณจะใช้ Threshold ไม่เท่ากัน โดยค่า Threshold ที่ได้จากวิธีการดังกล่าวเกิดจากการหาค่าเฉลี่ยของทุกพิกเซลภายใต้ Moving window ที่มีขนาด $N \times N$ จากนั้นทำการหาค่า Threshold เช่นนี้ไปเรื่อย ๆ กับบริเวณที่ไม่ซ้ำกันจนกระทั่งได้มีการกำหนดค่า Threshold ครบในทุก ๆ พิกเซล ถ้าค่า Gray Level ของพิกเซลนั้นมีค่ามากกว่าค่า Threshold ของพิกเซลนั้นแล้วจะกำหนดให้เป็นสีขาว แต่ถ้าค่า Gray Level ของพิกเซลนั้นน้อยกว่า Threshold ของพิกเซลนั้นแล้วจะกำหนดให้เป็นสีดำ ทำเช่นนี้จนครบทุกพิกเซลจะได้ผลลัพธ์เป็นภาพขาวดำ (18)

2.3 Flood Fill

Flood Fill คือวิธีการปรับปรุงข้อมูลภาพที่ขาดหายเนื่องจากภาพที่ผ่านการทำ Binary image ไม่สามารถแยกวัตถุและพื้นหลังได้ชัดเจน ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธี Flood Fill (19) โดยขั้นตอนประกอบด้วย การกำหนดขอบเขตของวัตถุที่อยู่ภายในภาพที่มีการเชื่อมต่อกัน และการแบ่งพื้นที่ใช้หลักการของ Connect component labeling (20)

เมื่อแยกวัตถุแต่ละชิ้นได้แล้ว ขั้นตอนวิธีจะทำการระบายจุดที่ต้องการ Fill เรียกว่าจุด Seed Point โดยเป็นจุดใดๆ ภายในภาพเท่านั้น โดยเงื่อนไขการระบายคือ ไม่ระบายจุดที่ระบายแล้ว และไม่ระบายขอบภาพ การระบายเป็นลักษณะ Recursive คือ กระทำจนถึงขอบของวัตถุ แล้วกลับมาระบายยังจุดที่เหลือยัง Seed Point ต่อไป การพิจารณาค่าพิกเซลที่ใช้ในการระบายใช้เทคนิค

Neighborhood Operations (21) โดยใช้ค่าของ Neighborhood pixel มากระทำ เพื่อแทนค่าตำแหน่งของ pixel ใด pixel หนึ่ง โดยการหาค่าเฉลี่ยแทนค่ากลางดังรูปที่ 1 แสดงตัวอย่างตำแหน่งพิกเซลที่ต้องการแทนค่า โดยวิธีการคำนวณ ดังแสดงในสมการที่ 2

Z_1	Z_2	Z_3
Z_4	Z_5	Z_6
Z_7	Z_8	Z_9

รูปที่ 1 Moving window ที่ใช้ในการคำนวณ Flood Fill

$$Z'_5 = \frac{1}{9}(Z_1 + Z_2 + \dots + Z_9) \quad (2)$$

โดยที่

Z'_5 คือตำแหน่งพิกเซลที่ต้องการแทนด้วยค่าของ

Neighborhood pixel

$Z_1 \dots Z_9$ คือตำแหน่งพิกเซลข้างเคียงที่ใช้ในการพิจารณาค่า Neighborhood pixel

2.4 Canny Edge Detection

Canny Edge Detection Algorithm (22) โดยขั้นตอนเริ่มจากการกำจัดสัญญาณรบกวน ด้วยตัวกรองเกาส์เซียน (Gaussian filter) (23) แสดงดังสมการที่ 3 หลังจากนั้นทำการคำนวณค่าขนาด (magnitude) และทิศทาง (orientation) ของ gradient โดยใช้การหาอนุพันธ์อันดับหนึ่ง ถัดมาใช้ nonmaxima suppression กับ gradient magnitude เพื่อให้ได้ขอบที่บางลง ขั้นตอนสุดท้ายใช้ Double Thresholding Algorithm (20) เพื่อระบุพิกเซลที่เป็นขอบและช่วยเชื่อมต่อขอบ โดยในขั้นแรกคือการทำให้ภาพให้เรียบ เพื่อลดสัญญาณรบกวนโดยใช้ตัวกรองเกาส์เซียน

$$I_S[i,j] = I[i,j] * G[i,j;\sigma] \quad (3)$$

โดยที่

* คือ การคอนโวลูชัน

$I_S[i,j]$ คือ ภาพผลลัพธ์จากการทำให้เรียบ

$I[i, j]$ คือ ภาพตั้งต้น

$G[i, j; \sigma]$ คือ ตัวกรองเกาส์เซียน

σ คือ ค่าการกระจายของเกาส์เซียน

ขั้นตอนต่อมาเป็นการหาเกรเดียนต์ของค่าระดับเทา ซึ่งอาศัยการหาขอบโดยวิธีโซเบล โดยสามารถคำนวณค่าเกรเดียนต์เวกเตอร์ตามแนวนอน (G_x) และแนวตั้ง (G_y) ดังสมการที่ 4 และ 5

$$G_x = (x_1 + 2x_2 + x_3) - (x_7 + 2x_8 + x_9) \quad (4)$$

$$G_y = (x_3 + 2x_6 + x_9) - (x_1 + 2x_4 + x_7) \quad (5)$$

โดยที่

G_x คือ เกรเดียนต์เวกเตอร์ตามแนวนอน

G_y คือ เกรเดียนต์เวกเตอร์ตามแนวตั้ง

แล้วจึงนำเกรเดียนต์เวกเตอร์ทั้งแนวนอนและแนวตั้งที่ได้ไปหาขนาดและทิศทางของเกรเดียนต์เวกเตอร์ซึ่งคำนวณตามสมการที่ 6 และ 7

$$M(x, y) = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (6)$$

$$\alpha(x, y) = \arctan\left(\frac{G_x}{G_y}\right) \quad (7)$$

โดยที่

$M(x, y)$ คือ ขนาดของเกรเดียนต์

$\alpha(x, y)$ คือ ทิศทางของเกรเดียนต์เวกเตอร์

ขั้นตอนต่อมาคือการกำจัดพิกเซลที่เป็นขอบที่ไม่ใช่ค่าสูงสุด โดยเลือกเฉพาะพิกเซลที่มีค่าขนาดของเกรเดียนต์เวกเตอร์สูงสุด ซึ่งต้องมีทิศทางเดียวกันเท่านั้น โดยขั้นตอนนี้จะช่วยกำจัดสัญญาณรบกวนที่ยังคงเหลือและส่วนที่เป็นพื้นหลังออก ขั้นตอนสุดท้ายคือการแบ่งข้อมูลเพื่อตัดสินใจว่าส่วนใดคือขอบแท้จริงของวัตถุโดยการกำหนดให้ค่าขีดแบ่งทั้งสอง ขีดแบ่งบน (T_1) และขีดแบ่งล่าง (T_2) จากนั้นพิจารณาแต่ละจุด ถ้ามีค่ามากกว่า T_1 กำหนดพิกเซลนั้นเป็นขอบ ถ้ามีค่าน้อยกว่า T_2 พิกเซลนั้นไม่ใช่ขอบ

2.5 Bounding Box

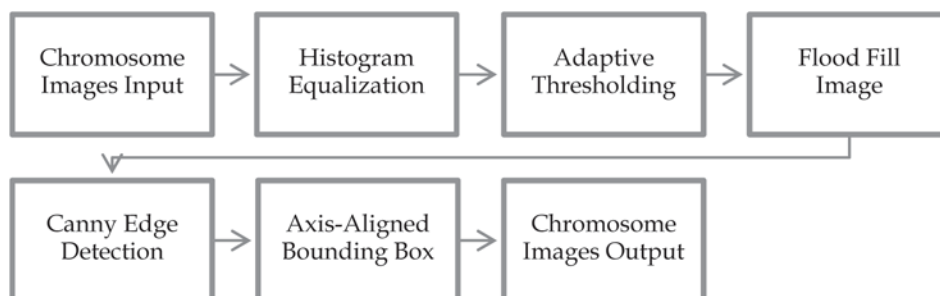
Bounding box เป็นการกำหนดกรอบในการตัดแยกโครโมโซมจากภาพพื้นหลัง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้ Axis-Aligned Bounding Box (AABB) (24) โดย AABB คือ รูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่ประกอบด้วยวัตถุที่กำหนดและเส้นขอบของรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่ขนานไปกับแกน จากรูปที่ 2 แสดงตัวอย่าง AABB ในลักษณะภาพ 2 มิติ แนวคิดในการสร้างกรอบครอบวัตถุด้วยวิธี AABB คือจะค้นหามุมของวัตถุ จากนั้นจึงทำการหาค่าต่ำสุดและสูงสุดของพิกัด X, Y, Z และใช้ค่าต่างๆ ที่หามาทำการสร้าง กรอบ AABB ในกรณี AABB bounding box จะตัดกันได้ที่ต่อเมื่อระยะห่างของการฉายภาพในสามแกนมีการซ้อนทับกัน และการหาค่าสูงสุดและต่ำสุดของทิศทาง X, Y, Z จะสามารถคำนวณได้จากพิกัดของ 3 แกน



รูปที่ 2 ภาพตัวอย่าง AABB Bounding Box

3. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้ทำการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมโดยใช้ Histogram Equalization เพื่อปรับความคมชัดและลดการสูญเสียของข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น (5) การแปลงภาพสีเป็นภาพขาว-ดำ โดยใช้วิธีการ Adaptive Threshold และเพิ่มข้อมูลส่วนที่ขาดหายโดยใช้วิธีการ Flood Fill หาขอบภาพโครโมโซมด้วย Canny Edge Detection กำหนดกรอบในการตัดแยกด้วย Axis-Aligned Bounding Box เพื่อส่งผลให้การตัดแยกภาพมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ขั้นตอนการตัดแยกภาพโครโมโซมด้วยวิธีการ HAFCA

3.1 ขั้นตอนการตัดแยกภาพโครโมโซมด้วยวิธีการ HAFCA

3.1.1 การปรับปรุงคุณภาพโครโมโซมด้วยวิธี Histogram Equalization คือขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพก่อนการวิเคราะห์ โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการ Histogram Equalization ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะช่วยปรับภาพเซลล์ให้มีความคมชัดและปรับระดับความสว่างให้มีความสม่ำเสมอมากยิ่งขึ้น เนื่องจากภาพเซลล์ที่มีความสว่างมากจนทำให้แท่งโครโมโซมกลืนกับภาพพื้นหลัง

3.1.2 การแปลงภาพขาว-ดำด้วยวิธีการ Adaptive Threshold คือขั้นตอนการแยกวัตถุจากภาพพื้นหลัง โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการ Adaptive Threshold เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีคุณสมบัติแยกแยะวัตถุกับพื้นหลังได้ดีในลักษณะภาพที่มีระดับความสว่างไม่สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับภาพเซลล์โครโมโซม

3.1.3 การเติมข้อมูลที่ขาดหายในภาพโครโมโซมด้วยวิธีการ Flood Fill คือขั้นตอนอุดรอยร้าวในภาพโครโมโซม เนื่องจากภาพโครโมโซมเมื่อผ่านกระบวนการแปลงภาพขาว-ดำ จะพบว่ามีข้อมูลภายในภาพบางส่วนขาดหายเป็นรูปร่างปิด ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้วิธีการ Flood Fill ในการอุดรอยร้าวภายในภาพโครโมโซมเพื่อให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

3.1.4 การหาขอบภาพโครโมโซมด้วยวิธีการ Canny คือขั้นตอนในการหาขอบภาพโครโมโซมโดยงานวิจัยนี้ใช้วิธีการ Canny ในการหาขอบภาพ เนื่องจากลักษณะภาพโครโมโซมเองมีคุณภาพของภาพอยู่ในระดับต่ำ มีสัญญาณรบกวนในภาพสูง ซึ่งวิธีการ Canny แก้ปัญหาการหาเส้นขอบสำหรับภาพในลักษณะดังกล่าวได้ดี

3.1.5 การกำหนดกรอบบนภาพโครโมโซมโดยใช้วิธี AABB คือขั้นตอนการกำหนดกรอบล้อมรอบโครโมโซม

เพื่อทำการตัดแยกแท่งโครโมโซมออกจากภาพพื้นหลัง โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการ AABB เนื่องจากวิธีการดังกล่าวเหมาะสมกับลักษณะภาพโครโมโซมที่มีการกระจายตัวอย่างอิสระ โดยวิธีการ AABB จะเป็นการกำหนดกรอบโดยพิจารณาทิศทางของวัตถุเป็นหลัก ซึ่งเหมาะกับการวางตัวของแท่งโครโมโซม

3.2 ข้อมูลและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ในการทดลองการตัดแยกภาพโครโมโซมจินแนนด์จากภาพพื้นหลัง ข้อมูลภาพโครโมโซมที่ใช้ในการทดลองและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองมีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 ชุดข้อมูลภาพโครโมโซมชนิดจีแบนด์

ในการวิจัยนี้ข้อมูลภาพที่ใช้ในการทดลองคือชุดข้อมูลภาพโครโมโซมชนิด G-band ชนิดไฟล์ภาพ JPG ขนาดภาพ 900 X 900 พิกเซลขึ้นไป จำนวน 20 ชุดข้อมูล ซึ่งใน 1 ชุดข้อมูลประกอบด้วยภาพโครโมโซม 46 ภาพ

3.2.2 ซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม Visual Studio 2008 C++ และโปรแกรม OpenCV 2.1 ในการเขียนโปรแกรมสร้างเครื่องมือเพื่อใช้ในการทดลองการตัดแยกภาพโครโมโซม

3.2.3 การวัดประสิทธิภาพการตัดแยกภาพโครโมโซม

การวัดประสิทธิภาพการตัดแยกภาพโครโมโซมแบบซ้อนทับ ที่ใช้ในงานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมและการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมดังต่อไปนี้

1. Petros และคณะ (25) ทำการพัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซม และใช้เครื่องมือในการวัดความถูกต้องของการตัดแยกโครโมโซม โดยวัดประสิทธิภาพจาก

จำนวนโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้องส่วนด้วยจำนวนของโครโมโซมทั้งหมดในภาพเซลล์ ดังสมการที่ 8

$$chromosom_segmentation = \frac{A}{B} \times 100 \quad (8)$$

โดยที่

A คือภาพโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้อง

B คือภาพโครโมโซมทั้งหมดในภาพ

2. Petros และคณะ (26) ทำการพัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซม เพื่อวัดประสิทธิภาพวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพ ผู้วิจัยได้ใช้วิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมที่ผ่านการเพิ่มคุณภาพและทำการตรวจวัดค่าความถูกต้องจากการตัดแยก โดยวัดประสิทธิภาพจากจำนวนพิกเซลของภาพโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้องส่วนด้วยจำนวนพิกเซลของภาพโครโมโซมทั้งหมดในชุดข้อมูล Chromosome Segmentation Accuracy (CS_AC) ดังสมการที่ 9

$$CS_AC = \frac{A}{B} \times 100 \quad (9)$$

โดยที่

A คือจำนวนพิกเซลโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้อง

B คือจำนวนพิกเซลโครโมโซมทั้งหมดในภาพ

CS_AC คือค่าความถูกต้องในการตัดแยก

3. Karvelis และคณะ (27) ทำการพัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมโดยใช้พื้นฐานวิธี Recursive watershed ซึ่งการวัดประสิทธิภาพการตัดแยกสำหรับวิธีการที่พัฒนาเป็นการนำจำนวนโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้องหารด้วยจำนวนของโครโมโซมทั้งหมดในภาพเซลล์ Correct Segmentation of Chromosome (CSC) ดังสมการที่ 10

$$CSC = \frac{A}{B} \times 100 \quad (10)$$

โดยที่

A คือจำนวนโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้อง

B คือจำนวนโครโมโซมทั้งหมดในภาพ

CSC คือค่าความถูกต้องในการตัดแยก

จากงานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซมที่กล่าวมา พบว่าโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการวัดประสิทธิภาพโดยการนำจำนวนภาพโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้องทำการหารด้วยจำนวนภาพโครโมโซมทั้งหมดในชุดข้อมูล ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกวิธีการวัดประสิทธิภาพการตัดแยกภาพโครโมโซมดังสมการที่ 10 โดยการวัดประสิทธิภาพวิธีการตัดแยกโดยวัดจากจำนวนภาพโครโมโซมที่ตัดแยกได้ถูกต้องทำการหารด้วยจำนวนภาพโครโมโซมทั้งหมดในชุดข้อมูล

3.3 โมเดลที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพ

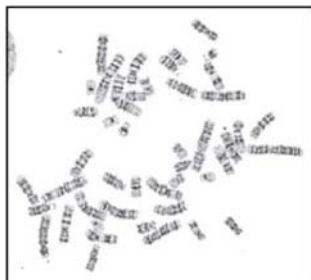
งานวิจัยนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการตัดแยกข้อมูลสำหรับ 8 โมเดล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดโมเดลที่ทดสอบ

โมเดล	รายละเอียดโมเดลที่ทดสอบ	ชื่อย่อ
1	OTSU+Flood-Fill+Canny Edge Detection+AABB	OFCA
2	OTSU+Erode +Canny Edge Detection+AABB	OECA
3	Adaptive Threshold +Erode+ Canny Edge Detection+AABB	AECA
4	OTSU+ Canny Edge Detection+ AABB	OCA
5	Flood Fill+Canny Edge Detection +Watershear	FCW
6	Erode+Canny Edge Detection+ Watershear	ECW
7	Canny Edge Detection+Watershear	CW
8	Histogram Equalization +Adaptive Threshold+Flood Fill+Canny Edge Detection+AABB	HAFCA

4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

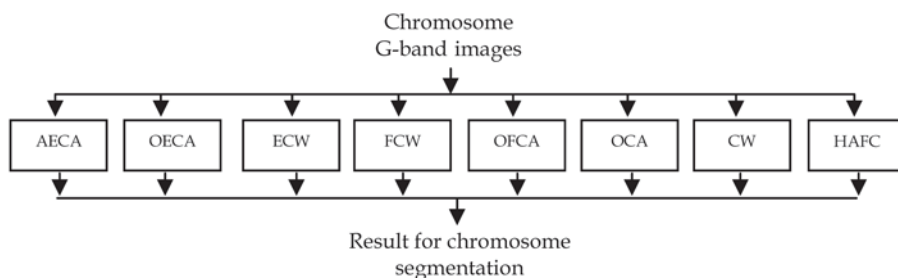
การวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตัดแยกภาพโครโมโซม โดยทำการทดสอบระบบด้วยการนำชุดข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด 20 ชุด โดยในแต่ละชุดจะมีภาพโครโมโซมอยู่ 46 ภาพ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ชุดข้อมูลโครโมโซมในการทดสอบ

จากนั้นทำการทดลองป้อนชุดข้อมูลภาพโครโมโซมเพื่อทำการตัดแยกภาพโครโมโซมแบบอัตโนมัติจากภาพพื้นหลังด้วยวิธี AECA, OECA, ECW, FCW, OFCA, OCA, CW และ HAFCA ตามลำดับโดยแสดงขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 5

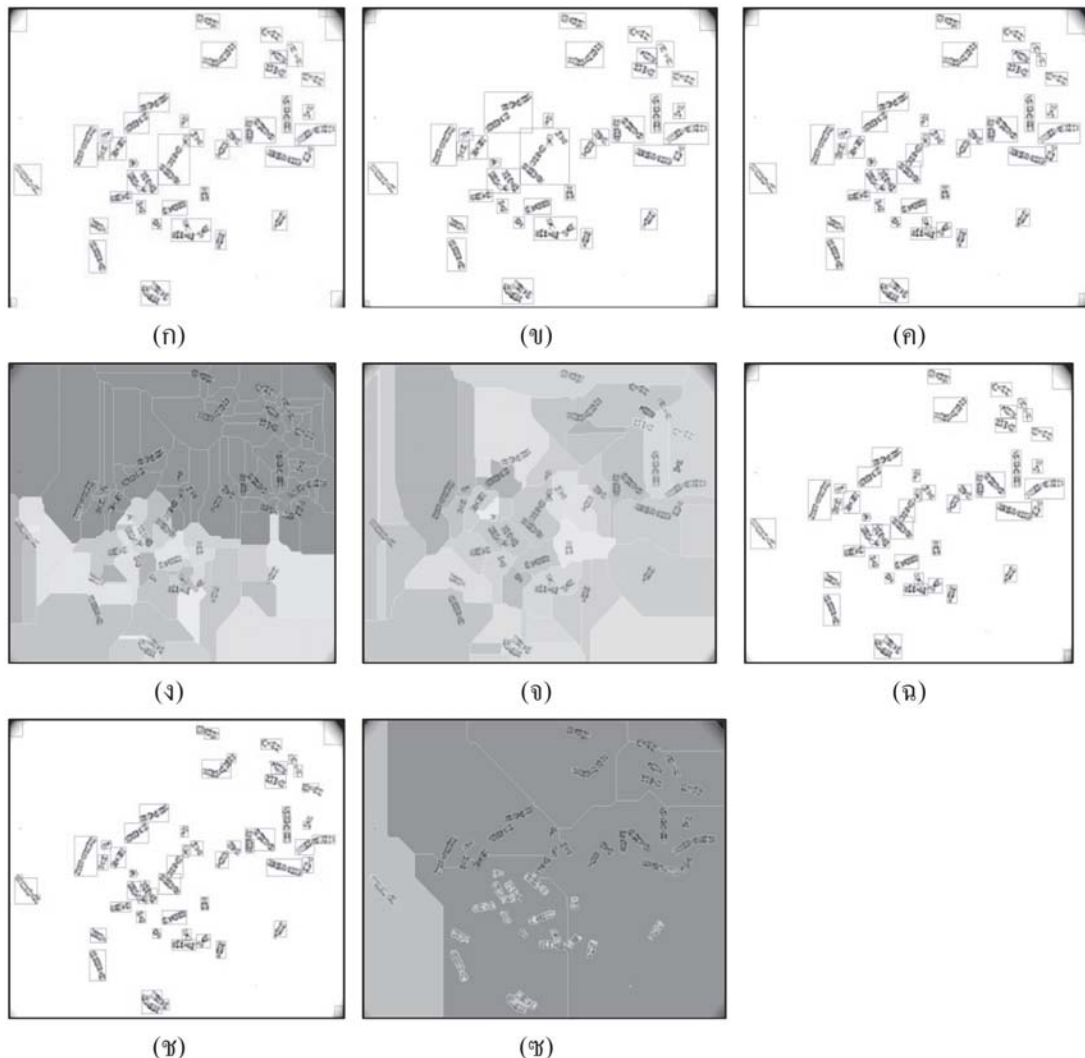
จากรูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการตัดแยกภาพโครโมโซมจากชุดข้อมูลด้วยวิธีการอัตโนมัติโดยการนำชุดข้อมูลโครโมโซมเข้าสู่กระบวนการการตัดแยกในแต่ละวิธีอย่างอิสระโดยกำหนดค่าต่างๆ ในแต่ละวิธี พร้อมทั้งทำการจับเวลาที่ใช้ในการตัดแยกในแต่ละชุดข้อมูล จากผลการทดลองจะได้ชุดข้อมูลที่ผ่านการตัดแยกสำเร็จโดยแบ่งเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ชุดข้อมูล พร้อมทั้งเวลาที่ใช้ในการตัดแยกของทุกชุดข้อมูล จากนั้นจึงทำการนับจำนวนของภาพโครโมโซมที่ตัดแยกได้อย่างถูกต้องด้วยมือในแต่ละชุดข้อมูลและทำการหาค่าเฉลี่ยของความถูกต้องจากการตัดแยกทั้ง 20 ชุด และทำการหาค่าเฉลี่ยเวลาที่ใช้ในการตัดแยกทั้ง 20 ชุดข้อมูลเช่นกัน ทำในลักษณะนี้ทั้งหมด 8 กลุ่ม ผลจากการทดลองโดยแสดงประสิทธิภาพการตัดแยกในแต่ละวิธี และเวลาที่ใช้โดยเฉลี่ยทั้ง 8 วิธีดังตารางที่ 2



รูปที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบการตัดแยกภาพโครโมโซมจากชุดข้อมูลแบบอัตโนมัติ

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพพื้นหลัง

วิธีการ	เวลา (ms.)	ประสิทธิภาพ(%)	S.D.
AECA	60.5	94.3	0.160
OECA	20.8	84.36	0.047
ECW	24.5	76.93	0.044
FCW	25.2	88.53	0.053
OFCA	23	75.61	0.053
OCA	22.7	60.2	0.055
CW	24.2	66.78	0.048
HAFCA	60.2	97.27	0.178



รูปที่ 6 แสดงภาพชุดข้อมูลตัวอย่างผลการตัดแยกภาพโครโมโซม (ก) วิธี HAFCA (ข) วิธี AECA (ค) วิธี OECA (ง) วิธี ECW (จ) วิธี FCW (ฉ) วิธี OFCA (ช) วิธี OCA (ซ) วิธี CW

จากตารางที่ 2 พบว่าวิธี HAFCA ให้ประสิทธิภาพการตัดแยกสูงสุดกว่าวิธีอื่นถึง 97.27% เนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถกระจายค่าความหนาแน่นให้กับทุกพิกเซลในภาพโครโมโซมได้อย่างเท่ากัน ทำให้ค่าความเข้มของพิกเซลในบริเวณที่ปลายมีความแตกต่างจากค่าความเข้มของพิกเซลภาพพื้นหลังด้วยวิธี HE (28)(29) และยังสามารถแยกแยะระหว่างภาพโครโมโซมและพื้นหลังได้อย่างชัดเจนถึงแม้ว่าภาพโครโมโซมจะมีความสว่างมากจนอาจทำให้ภาพโครโมโซมกลืนไปกับภาพพื้นหลังด้วยวิธี Adaptive Threshold (30)(31)(32) วิธีการดังกล่าวยังสามารถแก้ปัญหาการขาดหายของข้อมูลภาพในภาพโครโมโซมด้วยวิธี

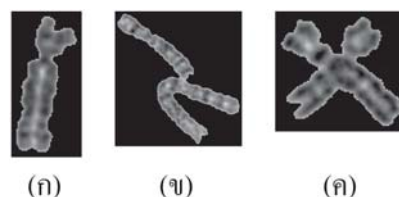
Flood Fill และสามารถแก้ปัญหากรณีภาพโครโมโซมเกิดการขาดหายของเส้นขอบภาพโครโมโซมซึ่งมีผลต่อการตัดแยก เนื่องจากมีสัญญาณรบกวนเป็นจำนวนมากบริเวณภาพโครโมโซมซึ่งวิธีการนี้ได้ใช้วิธี Canny (33)(34) ในการหาเส้นขอบภาพโครโมโซม และใช้วิธี AABF ในการกำหนดขอบเขตในการตัดแยกภาพโครโมโซมออกจากชุดข้อมูล ในด้านเวลาที่ใช้ในการตัดแยกวิธี HAFCA ใช้เวลาเป็นอันดับ 2 รองจากวิธี AECA ที่ 60.2 วินาที ที่ S.D = 0.178 เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมภาพก่อนการตัดแยกได้เพิ่มวิธีการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมด้วยวิธี HE, Adaptive Threshold, Flood Fill และ Canny ซึ่งวิธีดังกล่าว

จะทำการประมวลผลข้อมูลทุกพิกเซลภายในภาพ จึงทำให้ใช้เวลาในการตัดแยกภาพโครโมโซมมากกว่าวิธีการอื่น ตรงข้ามกับวิธี วิธี OCA และ OECA ที่ใช้ในการตัดแยก น้อยกว่าคือ 22.7 และ 20.8 วินาที ที่ค่า S.D. = 0.047 และ 0.055 โดยในขั้นตอนการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมของ ทั้งสองวิธีใช้หลักการกำหนดค่า Threshold ในการตัดแยก ภาพโครโมโซมจากพื้นหลัง ทำการปรับแต่งภาพให้มีความ เนียน และกำจัดสัญญาณรบกวนบนภาพ ซึ่งเป็นขั้นตอน ที่ง่ายและรวดเร็วส่งผลให้เวลาที่ใช้ลดลง แต่คุณภาพของ ภาพโครโมโซมที่ได้จะอยู่ในระดับต่ำส่งผลให้การตัดแยก โครโมโซมมีประสิทธิภาพต่ำไปด้วย

จากผลการทดลองสามารถแสดงตัวอย่างผลการตัด แยกดังรูปที่ 6

จากรูปที่ 6 แสดงภาพชุดข้อมูลตัวอย่างผลการตัด แยกภาพโครโมโซมด้วยวิธีต่างๆ พบว่าวิธี HAFCA ให้ ประสิทธิภาพสูงสุดโดยกรอบ AABB สามารถครอบภาพ โครโมโซมได้ทุกภาพได้อย่างถูกต้องไม่มีส่วนใดของภาพ โครโมโซมโดนตัดออกไป ในส่วนวิธีการตัดแยกอื่นยัง พบว่ามีภาพโครโมโซมบางภาพได้รับการตัดแยกไม่ถูก ต้อง โดยมีการครอบของกรอบ AABB ไม่ครบทุกส่วนของ ภาพโครโมโซม และในบางภาพยังมีการตัดแยกได้เฉพาะ ส่วน ซึ่งภาพเหล่านั้นจะไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

และจากการทดลองยังพบว่าโครโมโซมในภาพ เซลล์สามารถแบ่งลักษณะการวางตัวของแท่งโครโมโซม เป็น 3 ลักษณะคือ โครโมโซมแบบแท่งเดี่ยว โครโมโซม แบบแท่งสัมผัสกัน และโครโมโซมแบบแท่งทับซ้อนกัน ดังรูปโครโมโซมที่ 8 (ก) - (ค) และพบว่าวิธี HAFCA มี ประสิทธิภาพสูงสุดในการตัดแยกภาพโครโมโซมจากภาพ พื้นหลังชนิดแท่งสัมผัสกัน และชนิดแท่งเดี่ยว ส่วนวิธีการ FCW มีประสิทธิภาพสูงสุดตัดแยกภาพโครโมโซมจาก ภาพพื้นหลังชนิดแท่งทับซ้อนกัน โดยแสดงดังตารางที่ 3



รูปที่ 7 ลักษณะโครโมโซม(ก)ภาพโครโมโซมแท่งเดี่ยว (ข) ภาพโครโมโซมแท่งสัมผัสกัน (ค) ภาพ โครโมโซมแท่งซ้อนทับกัน

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการจำแนกข้อมูลผลการตัดแยกภาพโครโมโซมตามลักษณะการวางตัวของแท่งโครโมโซม

วิธีการ	ประสิทธิภาพ(%)		
	เดี่ยว	สัมผัส	ซ้อนทับ
AECA	81.17	73.33	71.33
OECA	85.91	64.17	57.42
ECW	77.11	54.52	40.83
FCW	93.51	80	80.32
OFCA	77.54	58.75	40.92
OCA	79.4	42.08	46.33
CW	75.16	25.45	22.58
HAFCA	98.63	100	74

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางการตัดแยกภาพโครโมโซม โดยนำเทคนิคการปรับความเข้มและความสว่างของภาพด้วยวิธี Histogram Equalization การแปลงภาพโครโมโซมให้เป็นภาพขาว-ดำด้วยวิธี Adaptive Threshold การปรับแต่งข้อมูลที่ขาดหายภายในภาพโครโมโซมด้วยวิธี Flood Fill การหาขอบภาพโครโมโซมด้วยวิธี Canny และการสร้างกรอบเพื่อกำหนดพื้นที่การตัดแยกด้วยวิธี AABB จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตัดแยกโครโมโซมจากภาพพื้นหลังโดยการเพิ่มคุณภาพภาพโครโมโซมจะส่งผลให้การตัดแยกมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีที่ไม่ผ่านการประมวลผลภาพเบื้องต้น และเมื่อเพิ่มเทคนิคการปรับปรุงข้อมูลที่ขาดหายภายในภาพโครโมโซมเข้าไปจะเพิ่มประสิทธิภาพในการตัดแยกสูงถึง 97.27% ที่ค่า S.D. = 0.178 ซึ่งวิธีการดังกล่าวเมื่อพิจารณาตามลักษณะการวางตัวของแท่งโครโมโซมในภาพเซลล์โครโมโซมแบบแท่งเดี่ยวและโครโมโซมแบบแท่งสัมผัส จะได้รับความถูกต้องในการตัดแยกสูงที่ ความถูกต้อง 98.63% และ 100% ตามลำดับ ดังนั้นแนวทางการปรับปรุงคุณภาพภาพ และการเพิ่มข้อมูลส่วนที่ขาดหายในภาพโครโมโซม จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้น

โดยในอนาคตผู้วิจัยมีแนวคิดในการแก้ปัญหาในการพิจารณาแถบภายในโครโมโซมบางภาพที่มีค่าพิกเซลคล้ายกับค่าพิกเซลพื้นหลังแต่มีขนาดกว้างจนทำให้ปรากฏลักษณะการขาดของโครโมโซมที่เห็นได้เด่นชัดเมื่อเข้าสู่กระบวนการตัดแยกจึงทำให้โครโมโซมหนึ่งตัวขาดออกเป็นสองส่วน ถ้าหากสามารถแก้ปัญหาในส่วนนี้ได้จะทำให้ระบบมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนข้อมูลและภาพ kariotype จาก นายแพทย์ วีระยุทธ ประพันธ์พจน์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ (Center for Medical Genetic Research) สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต

7. เอกสารอ้างอิง

- (1) Piper J, Granum E, Rutovitz D, Rutledge H. Automation of chromosome analysis. Signal Processing. 1980 July; 2(3): 203-21.
- (2) Hampton GM. Simultaneous assessment of loss of heterozygosity at multiple micro satellite loci using semi-automated fluorescence-based detection :sub regional mapping of chromosome 4 in cervical carcinoma. Proc Natl Acad Sci. 1996: 6704-9.
- (3) Truong K. Quantitative fish detection of chromosome 3 arm imbalances in lung tumors by automated image cytometry. Med Sci Monit. 2004: 426-32.
- (4) Boehm D. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-Green dye. Human Mutation. 2004: 368-78.
- (5) Grisan E, Poletti E, Ruggeri A. Automatic Segmentation and Disentangling of Chromosomes in Q-Band Prometaphase Images. IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine. 2009 July 13(4): 575-81.
- (6) Mihail P, Paul G, James K, Cerry K, Joe S, Charles C. Automatic karyotyping of metaphase cells with overlapping chromosomes. Computers in Biology and Medicine. 1999: 61-81.
- (7) Liang J. Automatic Chromosome Segmentation. Cytometry. 1994 :196-208.
- (8) Britto AP. Chromosome Segmentation and Investigations using Generalized Gradient Vector Flow Active Contours. OJHAS. 2005 April-June; 4(2): 1-12.
- (9) Srisang W, Jaroensutasinee K, Jaroensutasinee M. Segmentation of Overlapping Chromosome Images Using Computational Geometry. Walailak Journal of Science and Technology (WJST). 2006; 3(2): 181-94.

- (10) Wenzhong Y. Mathematical Morphology Based Enhancement for Chromosome Images. ICBBE 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering; 2009 June 11-13; 2009. P. 1-3.
- (11) Wang YP, Wu Q, Castleman K, Xiong Z. Image Enhancement Using Multiscale Oriented Wavelets. Proceedings 2001 International Conference on Image Processing; 2001 Oct 07-10; 2001. P. 610 - 613.
- (12) Wu Q, Castleman KR. Wavelet-Based Enhancement of Human Chromosome Images. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society; 1998 29 Oct - 01 Nov; 1998. P. 963 - 966.
- (13) Pal SK, Rosenfeld A. Image Enhancement and Thresholding by Optimization of Fuzzy Compactness. Pattern Recognition. 1988; 7: 77-86.
- (14) Wu Q, Wangt YP, Liu Z, Chent T, Castlemad KR. The Effect of Image Enhancement on Biomedical Pattern Recognition. Proceedings of the Second Joint EMBSBMES Conference Houston; 2002 Oct 23-26; 2002. P. 1067-1069.
- (15) Choi Y, Krishnapuram R. A Fuzzy-Rule-Based Image Enhancement Method for Medical Applications. Proceedings of the Eighth IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems; 1995 Jun 9-10; 1995. P. 75-80
- (16) Ehsani SP, Mousavi HS, Khalaj BH. Chromosome Image Contrast Enhancement Using Adaptive, Iterative Histogram Matching. 2011 7th Iranian Machine Vision and Image Processing (MVIP); 2011 Nov. 16-17; 2011. P. 1-5.
- (17) Yeganeh H, Ziaei A, Rezaie A. A Novel Approach for Contrast Enhancement Based on Histogram Equalization. Proceedings of the International Conference on Computer and Communication Engineering; 2008 May 13-15; 2008. P. 256 - 260.
- (18) Benson S, Chen C-IH. Adaptive Thresholding for High Dual-Tone Signal Instantaneous Dynamic Range in Digital Wideband Receiver. IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC); 2010 May 3-6; 2010. P. 616-619.
- (19) Kaehler GBaA. Learning OpenCV. USA: O'Reilly; 2008.
- (20) Gonzalez RC, Woods RE. Digital Image Processing: Prentice Hall; 2002.
- (21) Canny J. A computational approach to edge detection. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Interlligence. 1986; PAMI-8: 679 - 698
- (22) Petrou M, Petrou C. Image Processing The Fundamentals. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2010.
- (23) Songhua H, Lizhen Y. Optimization of Collision Detection Algorithm based on OBB. International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation; 2010.
- (24) Tu C, Yu L, editors. Research on Collision Detection Algorithm Based on AABB-OBB Bounding Volume. First International Workshop on Education Technology and Computer Science; 2009 March 13-14; 2010. P. 853-855.
- (25) Karvelis P, Tzallas A, Fotiadis D, Georgiou I. A Multichannel Watershed-Based Segmentation Method for Multispectral Chromosome Classification. IEEE Transactions on Medical Imaging. 2008; 27(5): 697-708.
- (26) Karvelis P, Fotiadis D, DG DT, Georgiou I. Enhancement of Multichannel Chromosome Classification Using a Region-Based Classifier and Vector Median Filtering. IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine. 2009; 13(4): 561-570.

- (27) Karvelis P, Fotiadis D, Syrrou M, Georgiou I. Segmentation of Chromosome Images Based on A Recursive Watershed Transform. The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference; 2005 November. 2005. P. 497-502.
- (28) Bassiou N, Kotropoulos C. Color Image Histogram Equalization by Absolute Discounting Back-off. Computer Vision and Image Understanding 2007; 107: 108-122.
- (29) Rogowska J, Preston K, Sashin D. Evaluation of Digital Unsharp Masking and Local Contrast Stretching as Applied to Chest. IEEE Trans on Biomedical Engineer. 1988; 35(10); 821-827.
- (30) Shi Z, Gu F, Lennox B, Ball AD. The Development of An Adaptive Threshold for Model-based Fault Detection of A Nonlinear Electro-Hydraulic System. Control Engineering Practice. 2003; 13; 1357-1367.
- (31) Nafis UK, Arya KV, Pattanaik M. Histogram Statistics Based Variance Controlled Adaptive Threshold In Anisotropic Diffusion for Low Contrast Image Enhancement. Signal Processing. 2013; 93; 1684–1693.
- (32) Deng S, Tian Y, Hub X, Wei P, Qin M. Application of New Advanced CNN Structure With Adaptive Thresholds to Color Edge Detection. Commun Nonlinear Sci Numer Simulat. 2012; 17; 1637-1648.
- (33) Ding L, Goshtasby A. On the Canny Edge Detector. Pattern Recognition. 2001; 34; 721-725.
- (34) Medina-Carnicer R, R.Munoz-Salinas, E.Yeguas-Bolivar, L.Diaz-Mas. A Novel Method to Look for The Hysteresis Thresholds for The Canny Edge Detector. Pattern Recognition. 2011; 44; 1201–1211.