



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΠΡΟΗΓΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Κωνσταντίνος Μαυρόκοτας**

**ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ, ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΥΡΗΝΑ  
ΚΑΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΣΕ ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΑΠΟ THINPREP PAP TEST**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2020**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος σπουδών με τίτλο 'Τεχνολογίες Προηγμένων Υλικών' του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών που αποτελεί πολυτεχνική σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η υλοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τον καθηγητή μου, Δημήτρη Φωτιάδη που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ μαζί του και μου πρότεινε το θέμα όπου και τελικά ακολούθησα. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ευανθία Τριπολίτη για την άψογη συνεργασία μας και για την καθοδήγηση της εντός και εκτός εργαστηρίου αλλά και την καθοριστική συμβολή της σε τεχνικό επίπεδο που κατέστησε εφικτή την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και για την κυρία Αντωνία Χαρχαντή για την άψογη συνεργασία καθώς ήταν η ιατρός μέσω της οποίας διασταυρώναμε τα δεδομένα μας και προσδιορίζαμε την αποτελεσματικότητα της δικής μας μεθόδου. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το άψογο επαγγελματικό κλίμα και το πνεύμα στήριξης όλη αυτή τη περίοδο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα διπλωματική επιχειρήθηκε η δημιουργία αποτελεσματικού αλγορίθμου για τον εντοπισμό των πυρήνων των κυττάρων σε εικόνες που πάρθηκαν με τη χρήση CCD κάμερας ενσωματωμένης σε κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου για thin prep PAP test δείγματα. Επίσης, επιχειρήθηκε ο αποτελεσματικός καθορισμός των ορίων των κυττάρων και ο διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών με βάση το χρώμα. Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου όσο αφορά τον εντοπισμό των πυρήνων και τον καθορισμό των ορίων των κυττάρων συγκρίθηκαν με εκείνα γιατρού κυτταρολόγου και έτσι προέκυψαν τα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα του προγράμματος. Συνολικά εξετάστικαν 17 εικόνες που απεικονίζουν 1371 κύτταρα με το εύρος των εικονιζόμενων κυττάρων να είναι από 51 ως και 106 ενώ ο μέσος όρος κυττάρων ανά εικόνα είναι 80. Οι εικόνες είναι τυχαίες ώστε να προσομοιώσουν όσο το δυνατόν καλύτερα ένα ρεαλιστικό πρόβλημα καθώς σε πολλά σημεία παρουσιάζεται το φαινόμενο της επικάλυψης όπου το ένα κύτταρο είναι πάνω στο άλλο καθιστώντας δυσκολότερο τον αποτελεσματικό εντοπισμό των πυρήνων και των καθορισμό των ορίων τους.

Στην αρχή παρουσιάζονται σε ένα εισαγωγικό κεφάλαιο συνοπτικά βασικές έννοιες όπως τι είναι το κύτταρο, το thin prep PAP test και το οπτικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια ακολουθεί το πολύ βασικό κεφάλαιο της ανασκόπησης της βιβλιογραφίας όπου παρουσιάζεται συγκεντρωμένη όλη η σχετική δουλειά που έχει γίνει και έχει δημοσιευθεί στο παρελθόν. Ακολουθεί ένα κεφάλαιο με βασικές αρχές της επεξεργασίας εικόνας που συγκεκριμένα μιλάει για διάφορες τεχνικές που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ώστε να αναδείξουμε ή να απομονώσουμε συγκεκριμένα σημεία σε μια ιατρική ή και άλλου τύπου εικόνα. Μέτα υπάρχει ένα κεφάλαιο για τα οπτικά μικροσκόπια σαν αυτό που εμείς χρησιμοποιήσαμε για τη λήψη των εικόνων και ένα κεφάλαιο για το PAP test και τη γενικότερη διαδικασία πρόληψης του καρκίνου του τράχηλου της μήτρας. Τέλος ακολουθεί η προτεινόμενη μεθοδολογία συνοδευόμενη από αποτελέσματα και συμπεράσματα.

Ο αλγόριθμος έτρεξε για κάθε μια από τις εικόνες και συνολικά εντόπισε 1295 αληθινούς πυρήνες κυττάρων (true positives) από το σύνολο των 1371, γεγονός που καθιστά το sensitivity στο 94%. Ο αριθμός των πυρήνων που ο αλγόριθμος δεν εντόπισε, ανέρχεται στους 96, ενώ ο αριθμός των αντικειμένων που ο αλγόριθμος λανθασμένα εντόπισε ανέρχεται σε 244 (false positives), επίσης υπολογίστηκε το positive predictive value (PPV) που ήταν στο 86% και μας δίνει πόσοι απ το σύνολο των εντοπισμένων πυρήνων πραγματικά ήταν πυρήνες. Τέλος υπολογίστηκε και η συνολική επίδοση του αλγορίθμου, γνωστή ως F1 score και ανέρχεται στο 90% και είναι το αρμονικό μέσο του sensitivity και του positive predictive value.

## ABSTRACT

In the present study we attempted to create an effective algorithm for cell nuclei detection in images taken using a CCD camera integrated in a common composite light field optical microscope for thin prep PAP test samples. Attempts were also made to effectively define cell boundaries and to separate cell populations based on color. The results of the algorithm in terms of locating the nuclei and determining the boundaries of the cells were compared with those of a cytologist doctor and thus the data for the effectiveness of the program were obtained. A total of 17 images depicting 1371 cells were examined with the range of cells shown being from 51 to 106 while the average number of cells per image is 80. The images are random to simulate a realistic problem as in many places the phenomenon of overlapping occurs where one cell is on top of the other making it more difficult to effectively locate the nuclei and define their boundaries.

In the beginning, an introductory chapter summarizes basic concepts such as what a cell is, the thin prep PAP test, and the optical. Then follows the very basic chapter of the literature review which presents all the relevant work that has been done and has been published in the past. Then follows a chapter with basic principles of image processing that specifically talks about various techniques that we can use to highlight or isolate specific points in a medical or other type of image. Then there is a chapter on optical microscopes like the one we used and a chapter on the PAP test and the general procedure for preventing cervical cancer. Finally follows the proposed methodology accompanied by results and conclusions.

The algorithm was performed for each image and identified a total of 1295 true positives (true positives) from a total of 1371, making the sensitivity at 94%. The number of nucleus that the algorithm did not detect is 96, while the number of objects that the algorithm incorrectly identified as nucleus is 244 (false positives), also the positive predictive value (PPV) was calculated to be 86% and shows us how many of all the identified objects were actually nuclei. Finally, the total performance of the algorithm, known as F1 score was calculated at 90% and is the harmonious means of sensitivity and positive predictive value

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Το κύτταρο	9
1.2 Thinprep τεστ ΠΑΠ	10
1.3 Οπτικό μικροσκόπιο	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	12
2.1 Εντοπισμός κυττάρων σε Thin prep PAP test	12
2.2 Εντοπισμός κυττάρων σε συμβατικό PAP test	14
2.3 Εντοπισμός κυττάρων στο αίμα	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΡΧΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΙΚΟΝΑΣ	20
3.1 Επεξεργασία εικόνας	21
3.1.1 Είδη ψηφιακών εικόνων	21
3.1.2 Ανάλυση εικόνας	24
3.1.3 Βασική επεξεργασία εικόνας	26
3.2 Βελτιστοποίηση εικόνας	27
3.2.1 Επεξεργασία με βάση τη φωτεινότητα	27
3.2.2 Αρνητική εικόνα και αντίθεση	28
3.3 Φίλτρα εικόνας και θόρυβος	29
3.3.1 Είδη φίλτρων	29
3.3.2 Θόρυβος	30
3.4 Τμηματοποίηση ή segmentation εικόνας	30
3.4.1 Τμηματοποίηση με χρήση ακμών	31
3.4.2 Τμηματοποίηση με χρήση προβολών και Διαίρεση/Ένωση	33

3.4.3 Κατωφλίωση και Πολυκατωφλίωση	33
3.5 Εξαγωγή χαρακτηριστικών	34
3.5.1 Χαρακτηριστικά χώρου	35
3.5.2 Χαρακτηριστικά από μετασχηματισμό	35
3.5.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά και ροπές	36
3.5.4 Διακριτός μετασχηματισμός συνημιτόνου	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	39
4.1 Γενικές πληροφορίες	40
4.2 Κατηγορίες μικροσκοπίων	40
4.2.1 Φωτονική μικροσκοπία	40
4.2.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	44
4.3 Κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο διελεύσεως	47
4.4 Χρήση του οπτικού μικροσκοπίου διελεύσεως	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	52
5.1 Η έννοια και η σημασία της μετάπλασης	53
5.2 Αιτιολογία	54
5.3 Προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος και ανίχνευση	56
5.3.1 Το Pap test	56
5.3.2 Κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων του pap test	57
5.4 Βασικά στατιστικά μέτρα απόδοσης του pap test	59
5.4.1 Ευαισθησία και ειδικότητα	59
5.4.2 Ορθότητα και ακρίβεια	60
5.4.3 Θετική και αρνητική προγνωστική αξία	61
5.4.4 Καμπύλη ROC	62

5.4.5 Επισκόπηση μελετών απόδοσης για το rap test	63
5.5 Τεχνικές ενίσχυσης του rap test	64
5.6 Τύποι κυττάρων στο rap test	65
5.6.1 Φυσιολογική κυτταρολογία και καλοήθειες αντιδραστικές αλλοιώσεις	65
5.6.2 Μεταπλασία	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συσχετισμός συστημάτων ταξινόμησης αποτελεσμάτων rap test.	58
Πίνακας 2. Σύγκριση ευαισθησίας που επέδειξε το rap test σε περίπτωση συλλογής του δείγματος από τον εξεταζόμενο και από ειδικευμένο προσωπικό.	64
Πίνακας 3. Η επίδοση του αλγορίθμου σε αριθμούς.	94
Πίνακας 4. Σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με άλλες ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους.	103



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Το κύτταρο

## 1.2 Thinprep τεστ ΠΑΠ

## 1.3 Οπτικό μικροσκόπιο

### 1.1 Το κύτταρο

Το κύτταρο είναι η δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής. Όλοι οι οργανισμοί, από τους πιο απλούς έως τους πιο σύνθετους - όπως ο άνθρωπος - αποτελούνται από ένα ή περισσότερα κύτταρα. Για παράδειγμα, ένα μέσο ανθρώπινο σώμα αποτελείται από περισσότερα από 75 τρισεκατομμύρια κύτταρα, όμως υπάρχουν και αυτόνομες μορφές ζωής που αποτελούνται από ένα μόνο κύτταρο, το οποίο επιτελεί όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για την ύπαρξή του. Παρόλο που τα κύτταρα αυτά διαφέρουν πολύ μεταξύ τους στους διάφορους οργανισμούς, όλα έχουν κοινή καταγωγή και κοινές ανάγκες. Για αυτό το λόγο εμφανίζουν και πολλά κοινά βασικά χαρακτηριστικά. Τα περισσότερα κύτταρα είναι πάρα πολύ μικρά και δεν μπορούμε να τα δούμε με γυμνό μάτι. Αρχικά τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες σχημάτισαν μια μεμβράνη, μέσα στην οποία κλείστηκαν άλλες ουσίες. Αυτές οι δομές ήταν τα πρώτα κύτταρα. Σιγά σιγά, όμως, μετά από εκατομμύρια χρόνια εξελίχτηκαν και έδωσαν τα πιο απλά κύτταρα που γνωρίζουμε σήμερα, και τα οποία αποτελούνται από το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη είναι το φυσικό σύνορο του κυττάρου, που το ξεχωρίζει από το περιβάλλον του. Βοηθά το κύτταρο να κρατά τα συστατικά του ενωμένα, να επικοινωνεί με το περιβάλλον του, να τρέφεται και ταυτόχρονα να εκκρίνει τις άχρηστες ουσίες, να ελέγχει την είσοδο και την έξοδο ουσιών από το κύτταρο, καθώς επίσης και να αμύνεται στα μικρόβια ή τις τοξίνες που το προσβάλλουν. Το κυτταρόπλασμα είναι ο χώρος εσωτερικά από την κυτταρική μεμβράνη και είναι ζελατινώδες. Σε αυτό πραγματοποιούνται όλες οι λειτουργίες του κυττάρου. Επιπλέον, σε κάποιο σημείο του κυτταροπλάσματος είναι συγκεντρωμένο το γενετικό υλικό. Στο γενετικό υλικό βρίσκονται όλες οι πληροφορίες που χρειάζεται το κύτταρο για να ελέγξει τη δομή και τη λειτουργία του. Αυτά τα αρχικά κύτταρα ονομάζονται προκαρυωτικά και οι πιο χαρακτηριστικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι τα βακτήρια, τα οποία είναι απλά, συνήθως μονοκύτταρα (από ένα μόνο κύτταρο) και έχουν διάφορες δομές. Κατά την πορεία της εξέλιξης, επειδή το γενετικό υλικό των κυττάρων έπρεπε να προφυλαχθεί από διάφορα μικρόβια ή χημικές ουσίες, σχηματίστηκε ο πυρήνας, ο οποίος χωρίζεται από το κυτταρόπλασμα με μια διπλή μεμβράνη, την πυρηνική μεμβράνη, που επιλέγει ποιες ουσίες θα ανταλλαχθούν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Ο πυρήνας περιέχει σχεδόν όλο το γενετικό υλικό ενός κυττάρου και τα κύτταρα που τον διαθέτουν ονομάζονται ευκαρυωτικά. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, όπως τα φυτά και τα ζώα, με πιο εξελιγμένο ζώο τον

άνθρωπο. Όλα τα κύτταρα για να επιβιώσουν, αλλά και για να φτιάξουν τις δομές τους και να λειτουργήσουν, πρέπει να φτιάχνουν πρωτεΐνες. Έτσι, κάθε κύτταρο, από το πιο απλό έως το πιο σύνθετο, έχει κάποιες δομές μέσα στο κυτταρόπλασμά του, που λέγονται ριβοσώματα. Αυτά βοηθούν το κύτταρο να συνθέσει τις πρωτεΐνες που του είναι απαραίτητες. Κάθε κύτταρο έχει ως σκοπό του την αύξηση και την αναπαραγωγή του. Βέβαια, οι μονοκύτταροι οργανισμοί μπορούν να αυξηθούν μόνο μέχρι ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συνήθως είναι μικροσκοπικοί. Επίσης, πρέπει να κάνουν και όλες τις λειτουργίες που τους είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Οι πολυκύτταροι οργανισμοί, αντίθετα, αποτελούνται από πάρα πολλά κύτταρα, τα οποία είναι εξειδικευμένα, δηλαδή εκτελούν μία μόνο λειτουργία. Για παράδειγμα στον άνθρωπο, τα μυικά κύτταρα βοηθούν στην κίνηση, τα νευρικά κύτταρα δέχονται και μεταφέρουν μηνύματα κ.ο.κ. Αυτό ουσιαστικά σημαίνει ότι τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών δεν μπορούν να ζήσουν μόνα τους, αλλά συνυπάρχουν και συνεργάζονται για τις ανάγκες του οργανισμού. Τα κύτταρα που επιτελούν την ίδια λειτουργία έχουν και την ίδια μορφή και λέμε ότι αποτελούν έναν ιστό. Πολλοί διαφορετικοί ιστοί φτιάχνουν ένα όργανο, το οποίο επίσης κάνει κάτι συγκεκριμένο. Όμοια, πολλά όργανα μαζί αποτελούν ένα σύστημα οργάνων και πολλά συστήματα οργάνων απαρτίζουν τον οργανισμό. Για παράδειγμα, πολλά μυικά κύτταρα φτιάχνουν τον μυϊκό ιστό. Ο μυϊκός και ο συνδετικός ιστός φτιάχνουν ένα μυ και πολλοί μύες μαζί φτιάχνουν το μυϊκό σύστημα, ένα από τα πολλά συστήματα (π.χ. πεπτικό, νευρικό) του ανθρώπινου οργανισμού [1].

## 1.2 Thin prep ΠΑΠ τεστ

Το τεστ Παπανικολάου (Παπ Τεστ) είναι μια προληπτική δοκιμασία ελέγχου που ανιχνεύει με επιτυχία κύτταρα ενδεικτικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ή κύτταρα που μπορεί μελλοντικά να εξελιχθούν σε καρκινικά κύτταρα. Εφευρέθηκε από τον Έλληνα Γεώργιο Παπανικολάου πριν από 50 χρόνια και ουσιαστικά δεν έχει αλλάξει από τότε. Τα κύτταρα του τράχηλου της μήτρας μπορεί να εξελίσσονται χωρίς να υπάρχουν συμπτώματα ή πόνος. Ακόμα και μικρές αλλοιώσεις στα κύτταρα μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο αν δεν αντιμετωπιστούν με θεραπεία. Επίσης με το Παπ τεστ ελέγχεται η ορμονική λειτουργία όπως και η χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων. Τέλος ανιχνεύονται φλεγμονές του κόλπου ή του τραχήλου καθώς και οι αιτιολογικοί τους παράγοντες. Ο γιατρός που κάνει το Παπ τεστ ξύνει κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας με την βοήθεια μίας μικρής σπάτουλας και μίας βούρτσας. Τα κύτταρα επαλείφονται σε μία γυάλινη πλάκα την οποία και στέλνει στο εργαστήριο για μικροσκοπική εξέταση [2].

Η απλή επάλειψη στη γυάλινη πλάκα προκαλεί ακανόνιστη επίστρωση που δυσκολεύει την ακριβή αξιολόγηση. Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει ότι η πλειονότητα του υλικού των κυττάρων δεν επιστρώνεται στη γυάλινη πλάκα και απορρίπτεται με την σπάτουλα ή το βουρτσάκι λήψεως. Σήμερα η τεχνική Thin Prep δίνει λύσεις στους περιορισμούς του κλασικού Παπ τεστ και αποτελεί την πραγματική βελτίωση. Τα κύτταρα συλλέγονται κατά τον ίδιο τρόπο και χωρίς επιπρόσθετη ταλαιπωρία. Αλλά αντί να επιστρωθούν στη γυάλινη πλάκα, ο γιατρός

τοποθετεί τα κύτταρα σε φιαλίδιο με διάλυμα συντήρησης [2]. Στη συνέχεια γίνεται επίστρωση στη γυάλινη πλάκα αυτόματα με ειδική συσκευή. Αυτή η διαδικασία εξασφαλίζει τη συλλογή όλων των κυττάρων της λήψης και τη σωστή συντήρηση και επίστρωση τους. Υπολογίζεται πως η ακρίβεια στη διάγνωση μπορεί να αυξηθεί μέχρι 25%. Αυτό μας δίνει συνολική ακρίβεια της εξέτασης περίπου 90%. Το ποσοστό αυτό είναι εξαιρετικά υψηλό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ειδικά σε περιπτώσεις παρακολούθησης προηγούμενων βλαβών του τραχήλου ή σε ασθενείς με ύποπτα ευρήματα ή ανακριβείς διαγνώσεις [3]. Επιπλέον το Thin Prep Παπ τεστ επιτρέπει πολλαπλές εξετάσεις στο ίδιο δείγμα χωρίς επαναληπτική επίσκεψη και λήψη και αποτελεί σήμερα την πιο ευαίσθητη μέθοδο προληπτικού ελέγχου και διάγνωσης βλαβών του τραχήλου της μήτρας. Είναι η πρώτη πραγματική βελτίωση του τεστ Παπανικολάου από την πρωτοεμφάνισή του πριν 50 χρόνια [2].

### 1.3 Οπτικό μικροσκόπιο

Ως οπτικά ή φωτονικά αναφέρονται τα μικροσκόπια εκείνα που χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 380 - 760 nm. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσεως, πολωτικό μικροσκόπιο, αντίθετης διαφορικής συμβολής, μικροσκόπιο φθορισμού, συνεστιακό μικροσκόπιο, κλπ. Η μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου εξαρτάται από τη δύναμη των φακών του, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού φακού. Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε ότι βάζοντας δυνατότερους φακούς θα ήταν δυνατό να πετύχουμε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις. Πράγματι με αυτό το σκεπτικό θα βλέπαμε το παρασκευάσμά μας μεγαλύτερο χωρίς όμως να έχουμε πιο μεγάλη ευκρίνεια της εικόνας ("άδεια μεγέθυνση"), όπως ακριβώς συμβαίνει όταν μεγεθύνουμε πολύ μια φωτογραφία έτσι που να φαίνονται οι κόκκοι του film. Υπάρχει μ' άλλα λόγια μια μέγιστη χρήσιμη μεγέθυνση που είναι συνάρτηση της διακριτικής ικανότητας του οργάνου που ορίζεται ως η ικανότητά του να διακρίνει δυο σημειακές φωτεινές πηγές που βρίσκονται πολύ κοντά η μια με την άλλη. Κατά καιρούς έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες βελτίωσης της διακριτικής ικανότητας του μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας ακτινοβολίες με μήκος κύματος μικρότερο εκείνου του ορατού φωτός με αποτέλεσμα τη κατασκευή διαφόρων τύπων μικροσκοπίων όπως το υπεριώδες μικροσκόπιο, το μικροσκόπιο ακτινών X και άλλων μεταξύ των οποίων και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στις διάφορες παραλλαγές του. Στη πράξη τα μικροσκόπια που συναντάμε συνήθως σ' ένα εργαστήριο έχουν φακούς που στη καλύτερη περίπτωση έχουν αριθμητικό άνοιγμα  $A = 1.4$ . Οι φακοί με μεγαλύτερο αριθμητικό άνοιγμα ( $A = 1.6$ ) έχουν δυο μεγάλα μειονεκτήματα, τη πολύ υψηλή τιμή αγοράς αλλά και το πολύ μικρό βάθος εστίασης, κάτι που τους κάνει ιδιαίτερα δύσχρηστους [4].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### 2.1 Εντοπισμός κυττάρων σε Thin prep PAP test

### 2.2 Εντοπισμός κυττάρων σε συμβατικό PAP test

### 2.3 Εντοπισμός κυττάρων στο αίμα

Οι ιατρικές εικόνες επιδέχονται εκτεταμένη επεξεργασία από υπολογιστές και προγράμματα επεξεργασίας για τη βελτιστοποίηση τους ή την διευκόλυνση εξαγωγής συμπερασμάτων. Μεταξύ αυτών των εικόνων είναι και οι εικόνες οι οποίες προέρχονται από οπτικά μικροσκόπια που απεικονίζουν κυτταρικούς πληθυσμούς. Οι εικόνες μπορούν να επεξεργαστούν με υπολογιστή, με σκοπό να βοηθήσουν ιατρούς και ερευνητές να εξαγάγουν συμπεράσματα ή να διαγνώσουν κάποια παθολογία. Το παρόν κεφάλαιο συγκεντρώνει εργασίες που έχουν γίνει στο παρελθόν σε εικόνες που έχουν παρθεί από οπτικά μικροσκόπια και απεικονίζουν μεμονωμένα κύτταρα ή μικρούς και μεγάλους κυτταρικούς πληθυσμούς με σκοπό τον εντοπισμό των κυττάρων και ενδεχομένως τη διάγνωση κάποιας παθολογίας. Συγκεκριμένα θα ασχοληθούμε με τρεις μεγάλες κατηγορίες, η πρώτη αφορά προηγούμενες εργασίες πάνω στο thin prep PAP test που είναι και το θέμα της παρούσας εργασίας. Στη συνέχεια θα δούμε τι προσπάθειες έχουν γίνει στον αποτελεσματικό εντοπισμό κυττάρων σε εικόνες από συμβατικά PAP test και τέλος θα δούμε γενικότερα τι τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό κυττάρων ακόμα και σε άλλους ιστούς ή στο αίμα. Οι τεχνικές της τρίτης κατηγορίας όμως ενδέχεται να διαφοροποιούνται σημαντικά σε σχέση με εκείνες που θα μπορούσαν να αποδώσουν σε ένα PAP test εξαιτίας των φυσικών ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα τα κύτταρα αίματος δεν έχουν πυρήνα και έχουν σχεδόν σφαιρικό σχήμα ενώ και τα όριά τους είναι περισσότερο ευδιάκριτα, πράγμα που διαφοροποιεί τον τρόπο προσέγγισης στον εντοπισμό τους.

### 2.1 Εντοπισμός κυττάρων σε Thinprep PAP test

Σε δημοσίευση της N. Mustafa et al. [6] που ήταν και μια από τις πρώτες που έγιναν σε thin prep PAP test, επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθεί ένας αλγόριθμος (SBRG) για το στάδιο της τμηματοποίησης (segmentation). Ο αλγόριθμος SBRG [6] εκμεταλεύεται τις εντάσεις της εικόνας και συγκεκριμένα τη διαφορά ανάμεσα στα pixels που αποτελούν το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, ως εκ τούτου φαινόταν να προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες τεχνικές τμηματοποίησης εκείνης της εποχής, ωστόσο η διαδικασία έπρεπε να επαναληφθεί για κάθε μια περιοχή σε μια εικόνα. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ένας τροποποιημένος αλγόριθμος SBRG για την αυτόματη ταξινόμηση όλων των περιοχών ενδιαφέροντος της εικόνας. Πρώτον, η προτεινόμενη τεχνική χρησιμοποίησε αλγόριθμο ομαδοποίησης (clustering), συγκεκριμένα τον K-means

Clustering Algorithm για τον προσδιορισμό μιας οριακής-αρχικής τιμής. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε για κάθε περιοχή ενδιαφέροντος ένα σημείο που έχει συντεταγμένες (x, y) και ξεκίνησε η τμηματοποίηση όπου αυτές οι συντεταγμένες εφαρμόστηκαν ως seed pixel τοποθεσία στην εικόνα. Έτσι το αποτέλεσμα ήταν τα 'seed pixels' να βρεθούν με επιτυχία στο σημείο που ήταν οι πυρήνες των κυττάρων για κάθε περιοχή ενδιαφέροντος που πρακτικά ήταν το κυτταρόπλασμα γύρω από τον πυρήνα. Έτσι συμπερασματικά, υπήρχε πλέον μια επιτυχής ομαδοποίηση των κυττάρων και ένας καθαρός εντοπισμός και διαχωρισμός τους από το πίσω φόντο της εικόνας [6].

Σε δημοσίευση του N. M. Harandi et al. [7] επιχειρήθηκε ο εντοπισμός κυττάρων σε εικόνες χαμηλής ή μέτριας ανάλυσης, είτε ο εντοπισμός των πυρήνων ενός κυττάρου σε εικόνα υψηλής ανάλυσης και στη συνέχεια ο καθορισμός του κυττάρου είτε ως υγιές, είτε ως παθολογικό, ανάλογα με τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του πυρήνα. Αρχικά επιχειρήθηκε να γίνει χρήση ενός sobel φίλτρου που πρακτικά είναι ένας αλγόριθμος για την ενίσχυση των ορίων σε μια εικόνα. Δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικός στον εντοπισμό των ορίων των κυττάρων που δεν ήταν αρκετά ευδιάκριτα, τελικά έγινε χρήση ενός περισσότερο αποτελεσματικού εργαλείου, εκείνο των geometric active counters που πρακτικά αποτελεί αλγόριθμο που διαχωρίζει τα αντικείμενα της εικόνας από το πίσω φόντο εστιάζοντας στο σημείο των ορίων των αντικειμένων. Συγκεκριμένα οι αρχικές εικόνες τροποποιήθηκαν με τη χρήση στο  $\frac{1}{4}$  τους ώστε να χαλάσει η αναλύση τους, στη συνέχεια μετατράπηκαν στη γκρι κλίμακα για να μπορούν να επεξεργαστούν ευκολότερα και μετά τους εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος geometric active counters (GACWR) με μία μεταβαλλόμενη μεταβλητή  $\nu$  η οποία ανάμεσα στις τιμές 1 και 2.5 φαίνεται να έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα όσο αφορά τον εντοπισμό των κυττάρων και τα όριά τους. Τέλος εφαρμόστηκε ένα nonlinear diffusion φίλτρο που μείωσε περισσότερο το σφάλμα και τα ψευδή σήματα στην εικόνα. Όσο αφορά τον εντοπισμό του πυρήνα σε ένα μόνο κύτταρο, πάλι έγινε χρήση του sobel φίλτρου όπως επίσης και των Roberts, Praewitt και Canny φίλτρων τα οποία αποδείχτηκαν όλα αναποτελεσματικά στον εντοπισμό του πυρήνα όπως επίσης και στον εντοπισμό των ορίων του κυτταροπλάσματος. Έτσι η στρατηγική που εφαρμόστηκε αφορούσε αρχικά τη χρήση του histogram equalization για κάθε εικόνα, πράγμα που πρακτικά βελτίωσε την αντίθεση κάθε εικόνας προκειμένου να δοθεί έμφαση στις αχνές άκρες του κυττάρου. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ένα binarization βήμα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Sauvola [7] και ακολούθησε το βήμα της επιλογής του στίγματος -που πρακτικά είναι ο πυρήνας. Αυτό το βήμα περιελάμβανε τη χρήση του μετασχηματισμού Hough. Τέλος, ο διαχωρισμός του πυρήνα από το υπόλοιπο κύτταρο έγινε με τη χρήση GACWR αλγορίθμου [7].

Η δημοσίευση του Chuen-Horng Lin et al. αφορούσε τον εντοπισμό κυττάρων και πυρήνων σε thin prep PAP test. Δοκίμασαν τον αλγόριθμο σε διάφορα κύτταρα, από υγιή μέχρι παθολογικά και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο αλγόριθμος κατάφερε αρκετά καλά να εντοπίζει τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα αλλά και να αναγνωρίζει τα ψευδή σήματα που υπήρχαν σε κάποιες εικόνες. Στην αρχή η εικόνα μετατράπηκε στη γκρι κλίμακα για να απλουστευτεί η πληροφορία και κατόπιν εφαρμόστηκε ένας Haar Discrete Wavelet μετασχηματισμός (HDWT) για τον εντοπισμό των χαμηλότερων συχνοτήτων της. Για τον

εντοπισμό των ορίων στα κύτταρα εφαρμόστηκε ένα 'sobel' φίλτρο που όμως έδινε αρκετά ψευδή όρια για το κύτταρο. Στη συνέχεια έγινε εφαρμογή του Hysteresis thresholding βήμα αναγκαίο για την εφαρμογή της μεθόδου του Otsu (Otsu's thresholding) ώστε να βρεθεί ένα όριο-τιμή  $T_H$ , κάτω από το οποίο τα pixels θα έπαιρναν μια τιμή  $\chi$  και πάνω από το οποίο τα pixels θα έπερναν μια τιμή  $\gamma$ . Επειδή τα κύτταρα έχουν μια συγκεκριμένη γεωμετρία, επιλέχθηκε ο watershed segmentation. Το αποτέλεσμα ήταν το πρόγραμμα να εντοπίσει τους πυρήνες ως κουκίδες και τα όρια αρκετών κυττάρων, είτε ομάδων κυττάρων, στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα όρια και έτσι παρουσιάζονταν μόνο οι πυρήνες των κυττάρων. Αυτό το αποτέλεσμα χαλούσε όταν γινόταν εισαγωγή εικόνας με ένα μόνο κύτταρο, γιατί το πρόγραμμα εντόπιζε στο εσωτερικό του και άλλες έντονες κουκίδες πέρα του πυρήνα. Όσο αφορά τον εντοπισμό της παθολογίας σε ένα κύτταρο, ο πυρήνας έχει διευρυνθεί σε σχέση με ένα φυσιολογικό κύτταρο. Γι' αυτό έγινε χρήση ενός seeded region growing feature extraction algorithm (SRGFEA) [9] αλγορίθμου και διαχωρισμός τριών περιπτώσεων, όμως αυτός ο αλγόριθμος είχε αποτελεσματική εφαρμογή σε μεμονωμένα κύτταρα που παρουσίαζαν παθολογία. Τέλος οι ερευνητές συνέκριναν τον αλγορίθμο τους στο κομμάτι της κατάτμησης με άλλους αλγορίθμους όπως το CCTA, GVF, ACM, και τον SRGFEA [8-9].

## 2.2 Εντοπισμός κυττάρων σε συμβατικό PAP test

Η M.Plissiti et al. εστίασαν στον εντοπισμό του πυρήνα σε ένα κύτταρο και του προσδιορισμού των ορίων του. Αρχικά χρησιμοποίησαν το contrast-limited adaptive histogram equalization για να ενισχυθεί η αντίθεση στην εικόνα και ειδικότερα στην περιοχή του πυρήνα, και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή του gradient vector flow (GVF) αλγόριθμο ώστε το πρόγραμμα να εντοπίσει αυτόματα τα όρια του πυρήνα. Τα όρια από τον αλγόριθμο συγκρίθηκαν με ειδικού κυτταρολόγου και έτσι προέκυψε η αποτελεσματικότητα της μεθόδου με το sensitivity να είναι 82.38%. Ο αλγόριθμος χρειαζόταν να εξετάσει μεμονωμένα κύτταρα [10].

Η M. Plissiti et al. επιχείρησαν ξανά τον αυτόματο εντοπισμό του πυρήνα σε ένα κύτταρο. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση περιφερειακών ελαχίστων στην εικόνα (regional minima) ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκε ένας fuzzy C-means αλγόριθμος ομαδοποίησης για τη μείωση των ψευδών ενδείξεων από το προηγούμενο βήμα. Συγκεκριμένα αρχικά χρησιμοποίησαν το contrast-limited adaptive histogram equalization και έγινε μετατροπή της εικόνας RGB (Red,Green,Blue). Στη συνέχεια συνδίασαν τις τρεις εικόνες που προέκυψαν από τη μετατροπή και αφαιρέθηκαν στίγματα μικρότερα μιας τιμής. Αφού ολοκληρώθηκε το βήμα της επεξεργασίας εικόνας για τον εντοπισμό του πυρήνα, αναζήτησαν έντονα-χρωματικά-περιοχές στην εικόνα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο αλγόριθμος να εντοπίσει πέρα του πυρήνα και πολλά ψευδή αντικείμενα. Στο βήμα της ομαδοποίησης ορίστηκε μια ελάχιστη απόσταση μέσα στην οποία δεν θα μπορούσαν να υπάρχουν περισσότερα από ένα έντονα στίγματα, πράγμα που βελτίωσε το αποτέλεσμα εξαλείφοντας ψευδή στίγματα και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή του αλγορίθμου ομαδοποίησης fuzzy C-means για να οριστεί το τελικό αποτέλεσμα. Ο τελικός αλγόριθμος είχε sensitivity 90.57% και έβρισκε εφαρμογή όχι μόνο σε ένα κύτταρο, αλλά και σε

μικρές ομάδες κυττάρων σε μια εικόνα, γεγονός που έκανε περισσότερο ρεαλιστική την εφαρμογή του [11].

Σε άλλη δημοσίευση, η M. Plissiti et al. εστίασαν στον αποτελεσματικό εντοπισμό των ορίων δύο κυττάρων όταν αυτά έχουν περιοχές που ταυτίζονται, δηλαδή σε κάποια περιοχή το ένα κύτταρο είναι πάνω στο άλλο. Για να το επιτύχουν αυτό χρησιμοποίησαν έναν SLIC αλγόριθμο κατάτμησης. Σε δεύτερο βήμα, ομαδοποίησαν τα pixels ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, δηλαδή πόσο έντονα ήταν. Έτσι κατάφεραν να αξιοποιήσουν το γεγονός πως στις περιοχές που το ένα κυτταρόπλασμα ταυτιζόταν με το άλλο, τα pixels γίνονταν πιο έντονα σε σχέση με τις περιοχές που υπήρχε μόνο ένα κυτταρόπλασμα ενώ για τον διαχωρισμό του πυρήνα από το κυτταρόπλασμα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος K means segmentation. Η μέθοδος ήταν αποτελεσματική αλλά έβρισκε εφαρμογή σε εικόνα με δύο μόνο κύτταρα γεγονός που περιορίζει τις συνθήκες εφαρμογής της [12].

Η M. Plissiti et al. παρουσίασαν αλγόριθμο με σκοπό τον εντοπισμό πυρήνα σε κύτταρα. Αυτή τη φορά το πρόβλημα αντιπροσώπευε περισσότερο ρεαλιστικές συνθήκες καθώς υπήρχαν σε μια εικόνα πληθυσμοί κυττάρων και όχι μόνο ένα κύτταρο καθώς επίσης χρησιμοποιήθηκαν και εικόνες που παρουσιαζόταν overlapping, δηλαδή υπήρχαν περιοχές που το ένα κύτταρο ταυτιζόταν με το άλλο είτε σε ένα τμήμα του, είτε ακόμα και ολόκληρο. Στην αρχή επεξεργάστηκαν την εικόνα για περισσότερη αντίθεση και πιο σαφή όρια χρησιμοποιώντας contrast-limited adaptive histogram equalization ενώ εφάρμοσαν και αλγόριθμο για global thresholding που πρακτικά δίνει το περίγραμμα των κυτταρικών πληθυσμών σε μία περιοχή. Στη συνέχεια για τον εντοπισμό του πυρήνα, έψαξαν για έντονες περιοχές στα τρία κανάλια της αρχικής εικόνας και εφάρμοσαν κανόνα αποστάσεων, όπου δεν θα μπορούσαν να υπάρχουν δύο οι περισσότερες έντονες περιοχές σε μια ελάχιστη απόσταση. Αυτό το βήμα βελτίωσε το αποτέλεσμα απαλείφοντας κάποια ψευδή στίγματα. Τέλος για το κομμάτι της ομαδοποίησης των σημείων που είχαν παραμείνει, δοκίμασαν και συνέκριναν δύο διαφορετικές τεχνικές, έναν αυτόματο αλγόριθμο fuzzy C-means και έναν αλγόριθμο support vector machines (SVM), ο οποίος όμως απαιτούσε εκπαίδευση πριν τη χρήση από μια data set. Ο αλγόριθμος έδωσε καλά αποτελέσματα αντιμετωπίζοντας ένα συνολικό και ρεαλιστικό πρόβλημα ενώ ο 'fuzzy C-means' αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τον SVM [13].

Σε μία από τις πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις οι M.Plissiti et al. υπογράμμισαν την σημαντικότητα ενός αλγορίθμου που θα μπορεί να εντοπίζει καρκινικά και προκαρκινικά κύτταρα σε συμβατικά PAP tests. Έτσι δημιούργησαν μια online βάση δεδομένων την SIPaKMeD η οποία περιλαμβάνει πολλές εικόνες κυττάρων που έχουν ταξινομηθεί από ειδικό κυτταρολόγο σε πέντε μεγάλες ομάδες, Superficial-Intermediate, Parabasal, Koilocytotic, Dyskeratotic και τέλος Metaplastic κύτταρα με τις δύο πρώτες κατηγορίες να αποτελούν φυσιολογικά κύτταρα, τις επόμενες δύο παθολογικά κύτταρα και την τελευταία κατηγορία να αφορά προκαρκινικά ή και καρκινικά κύτταρα. Ο σκοπός αυτής της βάσης δεδομένων είναι να μπορούν αυτόματα να ελέγξουν την αποτελεσματικότητα των δικών τους αλγορίθμων στον εντοπισμό κυττάρων και παθολογίας σε αυτά. Τέλος οι ερευνητές δοκίμασαν και οι ίδιοι αλγόριθμο ομαδοποίησης,

συγκεκριμένα τον Support Vector Machine (SVM) τον Radial Basis Function (RBF) και τον Multi-layer perceptron (MLP), με τον τελευταίο να αποδεικνύεται περισσότερο αποτελεσματικός. Η δυσκολότερη κατηγορία ομαδοποίησης αποδείχθηκε η Τρίτη, δηλαδή τα koilocytotic κύτταρα [14].

Στη προσπάθεια να βελτιώσουν προηγούμενη δική τους δουλειά, η M. Plissiti et al. προσέγγισαν ξανά το πρόβλημα του αποτελεσματικού εντοπισμού πυρήνων και κυττάρων σε εικόνες, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας μεγάλους κυτταρικούς πληθυσμούς σε μια εικόνα, προσομειώνοντας καλύτερα ένα ρεαλιστικό πρόβλημα. Αρχικά λοιπόν για να ορίσουν μια μικρότερη περιοχή ενδιαφέροντος, εφάρμοσαν ένα binary mask στην αρχική εικόνα που πρακτικά εντόπισε όλα τα κύτταρα ή τις ομάδες κυττάρων και τα διαχώρισε από το πίσω φόντο. Στη συνέχεια εφάρμοσαν contrast-limited adaptive histogram equalization στο RGB της αρχικής εικόνας, το οποίο είχε σαν αποτέλεσμα την πιο έντονη αντίθεση και τα πιο σαφή όρια, ενώ η τελική εικόνα επιλέγεται με μια εντολή OR. Μετά στην εικόνα που προέκυψε, εφάρμοσαν το morphological erosion για να αφαιρέσουν όλα τα αντικείμενα διαστάσεων μικρότερα από ένα κύτταρο. Αφού ολοκληρώθηκε το βήμα της επεξεργασίας εικόνας, έψαξαν για έντονες περιοχές που θα συμβόλιζαν τον πυρήνα. Σε αυτές τις έντονες περιοχές τα pixels είχαν πιο σκούρο χρώμα από την ευρύτερη περιοχή ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια ειδικός κυτταρολόγος σημείωσε στην αρχική εικόνα τα αληθινά όρια του πυρήνα ώστε στη συνέχεια να μπορέσει να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του αλγορίθμου που θα προέκυπτε. Στο τέλος οι ερευνητές εφάρμοσαν ένα deformable model και συγκεκριμένα το gradient vector flow (GVF), παρουσιάζοντας πολύ υψηλό ποσοστό αποτελεσματικού εντοπισμού πυρήνων που ξεπερνούσε το 90% [15-17].

Η M. Plissiti et al. εστίασαν στον αποτελεσματικό εντοπισμό των πυρήνων αλλά και των ορίων των κυττάρων σε εικόνες που επεικόνιζαν περισσότερα από ένα κύτταρα και μικρές ομάδες κυττάρων. Ο εντοπισμός του πυρήνα βασίστηκε ξανά σε μορφολογικά χαρακτηριστικά με παρόμοια βήματα όπως και σε προηγούμενες προσεγγίσεις του προβλήματος, όμως το κομμάτι της κατάτμησης των ορίων του πυρήνα έγινε με χρήση του μετασχηματισμού watershed χρησιμοποιώντας τους πυρήνες ως στίγματα που είχαν οριστεί έτσι σε προηγούμενο βήμα. Στη συνέχεια έγινε χρήση του αλγορίθμου K-means, και του support vector machines (SVM) για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητά τους στην ομαδοποίηση των δεδομένων. Τέλος οι ερευνητές συνέκριναν τα αποτελέσματα της κατάτμησης μεταξύ του gradient vector flow (GVF) και του region based active counter (ACM) μοντέλου για την εξαγωγή συμπερασμάτων, τα οποία έδειξαν ότι η προσέγγιση είχε καλύτερα ποσοστά επιτυχίας σε σχέση με προηγούμενες [18].

Μια αρκετά ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τον αποτελεσματικό εντοπισμό των πυρήνων στα κύτταρα, ήταν αυτή της χρήσης του watershed transform για την κατάτμηση και τον αποτελεσματικό εντοπισμό των ορίων του πυρήνα. Αρχικά ακολουθήθηκε διαδικασία επεξεργασίας εικόνας όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω, με χρήση του contrastlimited adaptive histogram equalization και χρήση του global thresholding για να μειωθεί η περιοχή αναζήτησης από το σύνολο της εικόνας μόνο στην περιοχή που βρίσκονται τα κύτταρα. Τέλος, σε αυτό το βήμα γίνεται χρήση ενός binary mask που είναι αποτέλεσμα μιας εντολής OR στο RGB



της αρχικής εικόνας. Σε αυτό το mask, όλα τα στίγματα που είναι μικρότερα σε διαστάσεις από ένα μεμονωμένο κύτταρο αφαιρούνται. Στη συνέχεια γίνεται αναζήτηση έντονων χρωματικά περιοχών αφού ο πυρήνας είναι πιο έντονος από τη γύρω περιοχή που αποτελεί το κυτταρόπλασμα. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα αυτού του βήματος, εφαρμόστηκε παράλληλα και ένας κανόνας μέσης απόστασης, ο οποίος έλεγε ότι δεν μπορούν να υπάρχουν περισσότερα από ένα ευρήματα με μια ελάχιστη απόσταση η οποία ήταν η μέση ακτίνα πυρήνα-κυτταροπλάσματος. Στη συνέχεια έγινε χρήση του 'watershed transform'. Επειδή όμως ο 'watershed' έδειξε πέρα από τους σωστούς πυρήνες και διάφορα στίγματα ως πυρήνες, σε δεύτερο βήμα έγινε ομαδοποίηση (clustering) έτσι ώστε να μείνουν μόνο οι αληθινοί πυρήνες. Για την ομαδοποίηση έγινε χρήση του Fuzzy C-means clustering για τον διαχωρισμό των ευρημάτων σε δύο ομάδες, τους αληθινούς πυρήνες και τα στίγματα. Τέλος οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρούσα προσέγγιση στο πρόβλημα με τη χρήση του μετασχηματισμού watershed ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τον GVF με τον αλγόριθμο να παρουσιάζει καλύτερη επίδοση, πιο σωστό εντοπισμό του αληθινού πυρήνα και sensitivity 91.77% [19].

Ο T. Chankong et al. εστίασαν στην ανάγκη εντοπισμού καρκινικών κυττάρων σε PAP test με τη δημιουργία αλγορίθμου εντοπισμού. Αρχικά χρησιμοποίησαν τον fuzzy C means αλγόριθμο για το κομμάτι της ομαδοποίησης σε τρεις ομάδες, μία για το κυτταρόπλασμα, μία για τον πυρήνα και μία το πίσω φόντο. Έτσι ο αλγόριθμος ομαδοποιούσε το κάθε τμήμα της εικόνας, όμως μπορούσε να βρεί εφαρμογή σε μεμονωμένα κύτταρα και όχι σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Στη συνέχεια για την αποτελεσματική κατηγοριοποίηση του κάθε κυττάρου με βάση τη παθολογία του, χρησιμοποιήθηκαν διαδικτυακές βάσεις δεδομένων που ήδη είχαν ομαδοποιημένους τέτοιους πληθυσμούς. Έτσι δοκιμάστηκαν διάφοροι αλγόριθμοι, ανάμεσα τους και ένας support vector machine (SVM) για να βρεθούν τα ποσοστά αποτελεσματικότητας τους τα οποία προέκυπταν με τη διασταύρωση που γινόταν από τη βάση δεδομένων. Σε πολλές περιπτώσεις υπήρξαν μεγάλα ποσοστά αποτελεσματικής ομαδοποίησης, με περισσότερες από μία τεχνικές, ενώ στη συγκεκριμένη δημοσίευση επίσης χρησιμοποιήθηκαν και εικόνες από Thin prep PAP test [20].

### **2.3 Εντοπισμός κυττάρων στο αίμα**

Πολλές έρευνες έχουν δημοσιευθεί στο τομέα του εντοπισμού κυττάρων στο αίμα. Οι έρευνες εστιάζουν στον εντοπισμό ερυθρών κυττάρων στο αίμα, είτε στην αποτελεσματική καταμέτρηση τους, ενώ υπάρχουν και δημοσιεύσεις που εστιάζουν στον εντοπισμό και την καταμέτρηση λευκών αιμοσφαιρίων. Τέλος, πάνω στο αντικείμενο υπάρχουν έρευνες που προσπαθούν να εντοπίσουν καρκινικά κύτταρα στο αίμα. Οι προσεγγίσεις παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με εκείνες για τον εντοπισμό πυρήνων ή και κυττάρων σε εικόνες από thin prep PAP test ή και συμβατικό PAP test, όμως υπάρχουν βασικές διαφορές αφού τα κύτταρα του αίματος δεν έχουν πυρήνα, έχουν σχεδόν άψογο σφαιρικό σχήμα, ενώ το φαινόμενο που δύο η περισσότερα κύτταρα είναι το ένα πάνω στο άλλο δεν παρατηρείται τόσο συχνά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η

στρατηγική προσέγγιση σε κάθε πρόβλημα να είναι διαφορετική, καθώς δεν μπορεί να γίνει χρήση μιας γενικής στρατηγικής, αφού δεν μπορούμε να εκμεταλευτούμε κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά των δύο προβλήματα παρά μόνο σε περιορισμένη κλίμακα.

Η διαδικασία αφορά συνήθως ξανά την επεξεργασία εικόνας με χρήση histogram thresholding και διάφορων μορφολογικών τελεστών, ενώ ακολουθεί το βήμα της τμηματοποίησης, στη συνέχεια γίνεται χρήση του μετασχηματισμού Hough ο οποίος είναι πολύ αποτελεσματικός για καμπύλες και συγκεκριμένα τον circular Hough transform για τη καταμέτρηση των κυττάρων [21]. Σε άλλη προσέγγιση γίνεται εντοπισμός λευκών αιμοσφαιρίων και η ομαδοποίησή τους σε κατηγορίες, ανάλογα με τη κατάσταση του κάθε κυττάρου. Η διαδικασία ξεκινάει με την επεξεργασία εικόνας που αφορά από μετατροπή της εικόνας στη γκρι κλίμακα έως και τον ορισμό περιοχής ενδιαφέροντος με παρόμοια μάλιστα μεθοδολογία σαν αυτή που έχει περιγραφεί παραπάνω στα PAP tests, ενώ το βήμα της ταξινόμησης είναι βασισμένο στις νευρονικές δομές [22]. Σε άλλη προσέγγιση τα βήματα της επεξεργασίας εικόνας που ακολουθήθηκαν ήταν παρόμοια, μετατροπή στη γκρι κλίμακα, ενίσχυση αντίθεσης και δημιουργία μιας δεύτερης εικόνας εστιασμένης στην περιοχή ενδιαφέροντος θεωρώντας το πίσω φόντο ως θόρυβο. Στη συνέχεια η προσέγγιση εστίαζε στο κομμάτι της ενίσχυσης της εικόνας και συγκεκριμένα σε μια τεχνική φιλτραρίσματος των pixels, που κάθε στίγμα μικρότερο των 100 pixels θα αφαιρούνταν από την εικόνα, ενώ θα ακολουθούσε η εφαρμογή ενός φίλτρου Gaussian [23]. Σε δημοσίευση του S. Khobragade et al. προσπάθησαν να κατασκευάσουν αλγόριθμο για τον εντοπισμό καρκινικών κυττάρων στο αίμα. Η προσέγγιση στο βήμα της επεξεργασίας εικόνας και στη συνέχεια στο κομμάτι της τμηματοποίησης ήταν παρόμοια, όπως έχει περιγραφεί και σε άλλες δημοσιεύσεις, ενώ στον εντοπισμό των καρκινικών κυττάρων έγινε χρήση γεωμετρικών κριτηρίων και εκμετάλλευση της έντασης της εικόνας [24]. Η ανάγκη δημιουργίας ενός αλγορίθμου για την αποτελεσματική καταμέτρηση κυττάρων αίματος μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση ασθενειών όπως η αναιμία και η λευχαιμία, ενώ μπορεί να λειτουργήσει οικονομικά και αποτελεσματικά κάπου ανάμεσα στις υπάρχουσες τεχνικές οι οποίες είτε κοστίζουν πάρα πολύ, είτε το αποτέλεσμα εξαρτάται από τις ικανότητες του ατόμου που χειρίζεται το μικροσκόπιο. Έτσι λοιπόν στην προσέγγιση του προβλήματος, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη τεχνική του Thresholding για να ξεχωρίσουν τα αντικείμενα ενδιαφέροντος, δηλαδή τα κύτταρα από το φόντο. Για την καταμέτρηση τους, χρησιμοποιήθηκαν μορφολογικά χαρακτηριστικά με τον εντοπισμό πρώτα του κέντρου του κυττάρου και μετά την επέκταση εντοπισμού των υπόλοιπων pixels που αποτελούν το κύτταρο μέχρι τα όρια του, ενώ εφαρμόστηκαν και προαναφερθείσες τεχνικές επεξεργασίας εικόνας, όπως το Contrast-Limited Adaptive Histogram Equalization για μεγαλύτερη αντίθεση στην εικόνα και το global thresholding για τον διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών από το πίσω φόντο. Για το κομμάτι της κατάτμησης γίνεται χρήση του μετασχηματισμού watershed, ο οποίος έδειξε αρκετά υψηλά ποσοστά ακρίβειας στον εντοπισμό (sensitivity) που ήταν 92% [25].

Ο J. M. Sharif et al. έκαναν κατάτμηση κυττάρων αίματος και συγκεκριμένα ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η διαδικασία προέβλεπε την μετατροπή της έγχρωμης εικόνας, στη συνέχεια τη δημιουργία μιας εικόνας που θα ξεχωρίζει το πίσω φόντο από τη περιοχή ενδιαφέροντος που

είναι τα κύτταρα αμέσως μετά τη χρήση μορφολογικών χαρακτηριστικών για τον προσδιορισμό του κάθε κυττάρου και των ορίων του. Τέλος, για το κομμάτι της τμηματοποίησης έγινε χρήση του αλγορίθμου 'watershed'. Για τις περιοχές που δύο κύτταρα ταυτίζονταν, δηλαδή ήταν το ένα πάνω στο άλλο έγινε χρήση του 'watershed transform' και τα αποτελέσματα ήταν υποσχόμενα αν και η έρευνα ήταν σε πρώτο στάδιο [26]. Αναγνωρίζοντας πως ο εντοπισμός κυττάρων αίματος απαιτεί πόρους ανθρωπίνου δυναμικού αλλά και υψηλό κόστος υποδομών στα εργαστήρια, ερευνητές επιχείρησαν να κατασκευάσουν αποτελεσματικό αλγόριθμο επεξεργασίας εικόνας και καταμέτρησης των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων σε μια εικόνα. Η επεξεργασία της εικόνας περιελάμβανε αρχικά την μετατροπή της σε εικόνα δύο διαστάσεων για να μειωθεί η πληροφορία στην επεξεργασία και στην συνέχεια την εφαρμογή αλγόριθμου ενίσχυσης της αντίθεσης. Σε επόμενο βήμα, κάθε μεμονωμένο κύτταρο εντοπίζεται με βάση τις συντεταγμένες του κέντρου του και τοποθετείται σε παράθυρο συγκεκριμένων διαστάσεων. Στη συνέχεια κάθε παράθυρο που δημιουργήθηκε προβάλλεται στην αρχική έγχρωμη εικόνα. Το επόμενο βήμα αφορά την αφαίρεση από την εικόνα όλων των υπόλοιπων ειδών κυττάρων όπως τα λευκά αιμοσφαίρια. Το πιο σημαντικό κομμάτι αυτής της διαδικασίας ήταν η αποτελεσματική εφαρμογή του νευρωνικού δικτύου (NN) που θα οδηγούσε στη σωστή ομαδοποίηση και διαχωρισμό των κυττάρων. Η μέθοδος παρουσίασε τα εξής αποτελέσματα: ευαισθησία (sensitivity) 86%, ειδικότητα (specificity) 76% και τέλος ακρίβεια (accuracy) 74% [27]. Σε δημοσίευση του H. Tulsani et al. [28] ανέπτυξαν αλγόριθμο που εντοπίζει και μετράει όλα τα κύτταρα αίματος σε μια εικόνα, είτε ήταν λευκά αιμοσφαίρια, είτε ερυθρά. Η στρατηγική επικεντρώθηκε στον marker based watershed segmentation που είναι αλγόριθμος επεξεργασίας εικόνας, δίνοντας διάφορα ενδιαφέροντα αποτελέσματα στο κομμάτι της απεικόνισης. Ο αλγόριθμος επίσης κάνει αυτόματη κατάτμηση των αντικειμένων της εικόνας και αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμος στον εντοπισμό διαφορετικών κυττάρων, όπως είναι μεταξύ τους τα λευκά από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, βασιζόμενος στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά [28-29].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΡΧΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

### 3.1 Επεξεργασία εικόνας

3.1.1 Είδη ψηφιακών εικόνων

3.1.2 Ανάλυση εικόνας

3.1.3 Βασική επεξεργασία εικόνας

### 3.2 Βελτιστοποίηση εικόνας

3.2.1 Επεξεργασία με βάση τη φωτεινότητα

3.2.2 Αρνητική εικόνα και αντίθεση

### 3.3 Φίλτρα εικόνας και θόρυβος

3.3.1 Είδη φίλτρων

3.3.2 Θόρυβος

### 3.4 Τμηματοποίηση ή segmentation εικόνας

3.4.1 Τμηματοποίηση με χρήση ακμών

3.4.2 Τμηματοποίηση με χρήση προβολών και Διαίρεση/Ένωση

3.4.3 Κατωφλίωση και Πολυκατωφλίωση

### 3.5 Εξαγωγή χαρακτηριστικών

3.5.1 Χαρακτηριστικά χώρου

3.5.2 Χαρακτηριστικά από μετασχηματισμό

3.5.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά και ροπές

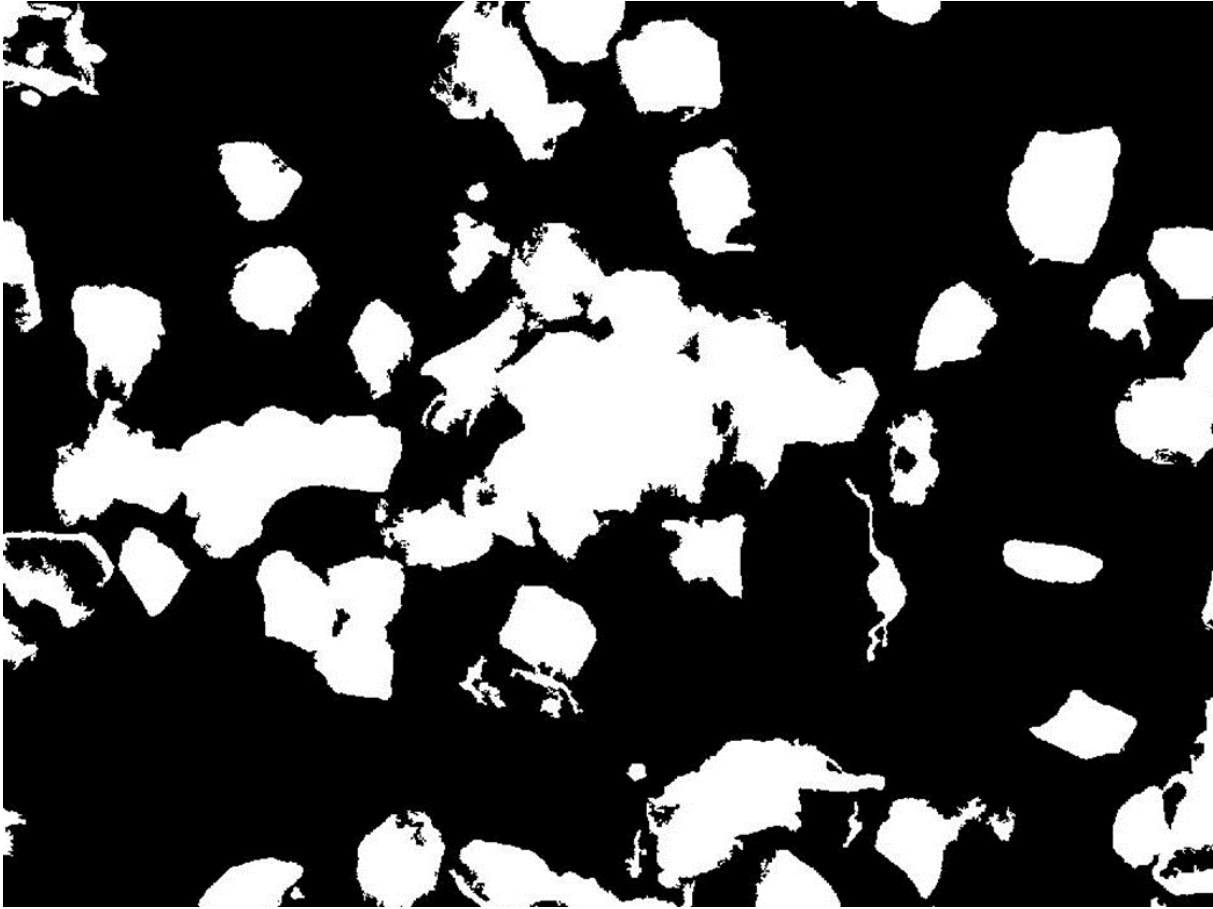
3.5.4 Διακριτός μετασχηματισμός συνημιτόνου

### 3.1 Επεξεργασία εικόνας

Μία εικόνα μπορεί να οριστεί ως μία συνάρτηση δύο διαστάσεων  $f(x,y)$ , όπου  $x$  και  $y$  οι συντεταγμένες, και η τιμή της  $f$  για κάθε ζευγάρι συντεταγμένων  $(x,y)$ , καλείται ως φωτεινότητα της εικόνας στο σημείο αυτό. Στις μονοχρωματικές εικόνες, συνηθίζεται να χρησιμοποιείται ο όρος 'επίπεδο γκρι'. Μία αναλογική εικόνα έχει συνεχή πεδία τιμών  $(x,y)$  και συνεχείς τιμές φωτεινότητας. Για την ψηφιοποίηση μίας αναλογικής εικόνας, με άμεσο σκοπό την επεξεργασία της από τον υπολογιστή, απαιτείται η μετατροπή των συντεταγμένων σε διακριτές τιμές (δειγματοληψία sampling) και η μετατροπή των συνεχών τιμών φωτεινότητας σε διακριτές (κβάντιση quantization). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει μία ψηφιακή εικόνα. Η επεξεργασία εικόνας ασχολείται με την αλλαγή των χαρακτηριστικών μιας εικόνας, προκειμένου είτε να βελτιώσουμε την πληροφορία της εικόνας ώστε να φαίνεται καλύτερη στο ανθρώπινο μάτι είτε να καταστεί περισσότερο κατάλληλη μία εικόνα για την επεξεργασία της από ηλεκτρονικό υπολογιστή [30]. Ένα pixel αντιστοιχεί στην τιμή της ακτινοβολίας σε ένα συγκεκριμένο σημείο του χώρου αλλά και στην τιμή της ακτινοβολίας σε μια στοιχειώδη επιφάνεια και όχι σε ένα μεμονωμένο σημείο. Συνήθως τα pixels είναι οργανωμένα σε ορθογωνικές διατάξεις. Στις ψηφιακές εικόνες που η αναπαράσταση των εικόνων γίνεται με πίνακες, η τιμή ενός pixel ισούται με την αντίστοιχη τιμή του στοιχείου του πίνακα [31].

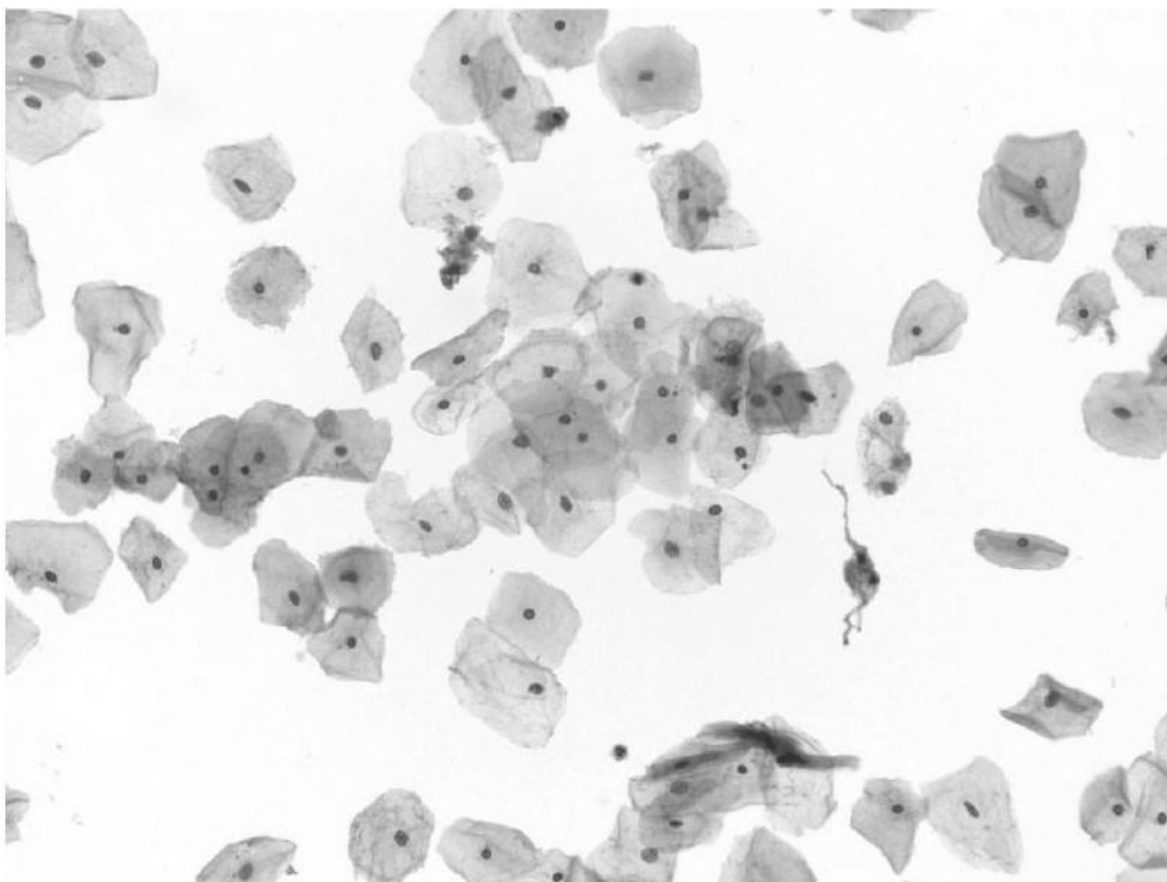
#### 3.1.1 Είδη ψηφιακών εικόνων

Η βασική δομή της πληροφορίας είναι ο πίνακας, ένα διατεταγμένο σύνολο πραγματικών αριθμών που έχει διαστάσεις  $M \times N$ . Αυτό το αντικείμενο εξυπηρετεί την αναπαράσταση των εικόνων, οι οποίες είναι διατεταγμένα σύνολα χρωμάτων και εντάσεων του φωτός. Τα στοιχεία των πινάκων αυτών αποτελούνται αποκλειστικά και μόνο από πραγματικές τιμές αφού δεν υποστηρίζονται εικόνες πινάκων φανταστικών τιμών. Το πρόγραμμα αποθηκεύει τις περισσότερες εικόνες σαν δισδιάστατους πίνακες. Υπάρχει και η δυνατότητα να επεξεργαστούμε ορισμένους τύπους αρχείων εικόνας όπως τα εξής: BMP (Microsoft Windows Bitmap), JPEG (Joint Photographic Experts Group), PCX (Paintbrush), PNG (Portable Network Graphics), TIFF (Tagged Image File Format) [30]. Υπάρχουν διάφοροι τύποι εικόνας, όπως η 'Binary image' που κάθε pixel είναι μαύρο ή άσπρο. Εφόσον υπάρχουν δύο μόνο τιμές που μπορεί να πάρει ένα pixel, χρειαζόμαστε μόνο ένα bit για κάθε pixel. Ακολουθεί ένα παράδειγμα όπου έχουμε μία εικόνα που έχει τα δύο μόνο χρώματα, λευκό για τις ακμές και μαύρο για το φόντο [30].



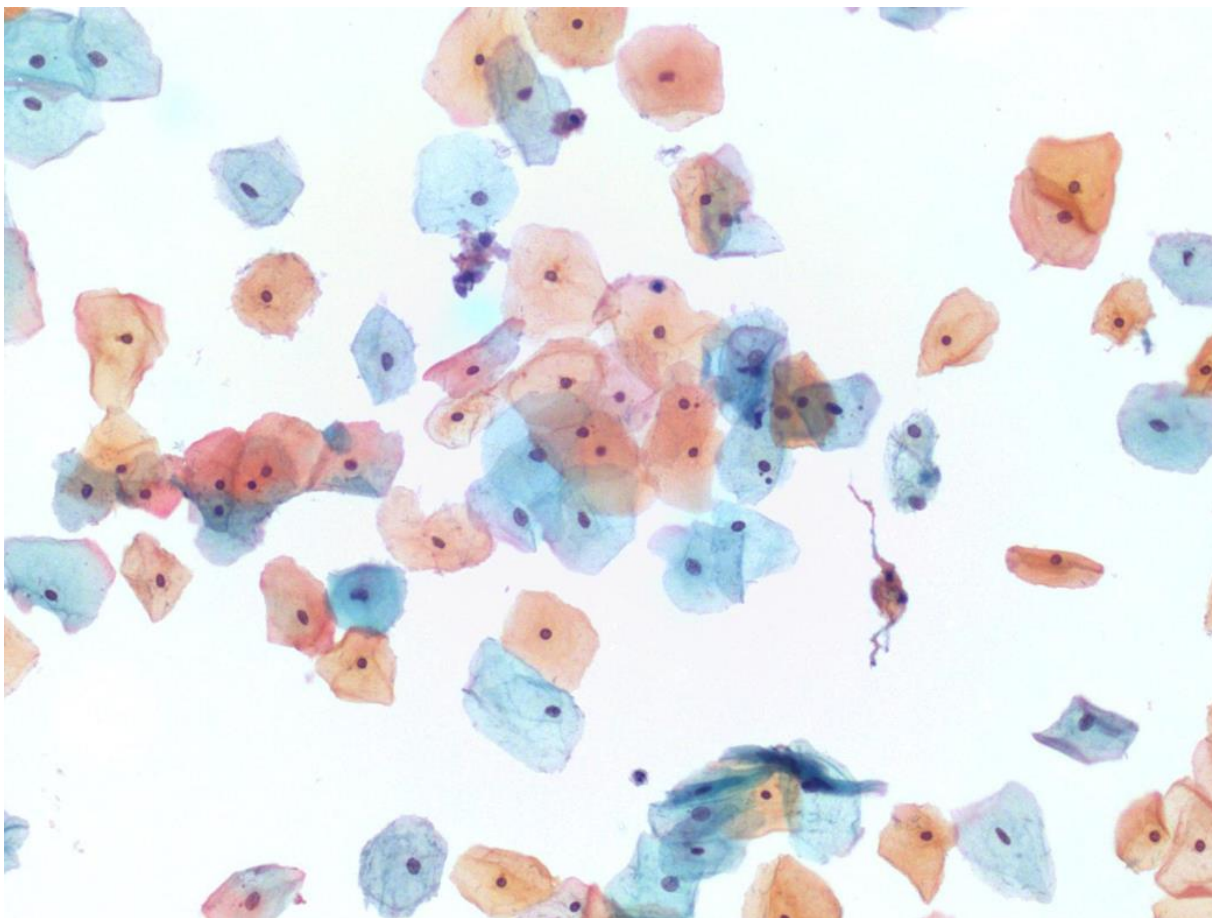
**Εικόνα 1.** Παράδειγμα μιας διαδικής εικόνας (Binary Image).

Στη συνέχεια η Greyscale όπου κάθε pixel παίρνει μία τιμή γκριζου, από το 0 (μαύρο) μέχρι το 255 (άσπρο) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.** [30].



**Εικόνα 2.** Παράδειγμα μίας Greyscale Image.

Ακολουθεί η True colour, ή αλλιώς η RGB εικόνα **Εικόνα 3** όπου κάθε pixel έχει μία τιμή χρώματος, και το χρώμα περιγράφεται με βάση το ποσοστό που περιέχει σε κόκκινο(Red), μπλε(Blue), πράσινο (Green). Κάθε ένα από αυτά τα RGB στοιχεία μπορεί να πάρει τιμή 0-255, γεγονός που μας δίνει=16,777,216 διαφορετικά πιθανά χρώματα στην εικόνα [30].



**Εικόνα 3.** Παράδειγμα μίας RGB εικόνας.

Υπάρχουν συναρτήσεις μετατροπής από το ένα χρωματικό μοντέλο στο άλλο. Αυτές οι εντολές αφορούν την μετατροπή εικόνας φωτεινότητας(intensity image) σε εικόνα χρωματικού δείκτη (indexed image), τη μετατροπή σε δυαδική εικόνα από τους άλλους τύπους με τη χρήση κατωφλίου φωτεινότητας, τη μετατροπή εικόνας χρωματικού δείκτη (indexed image) σε εικόνα φωτεινότητας (intensity image), τη μετατροπή ενός πίνακα τιμών σε εικόνα φωτεινότητας (intensity image) με κλιμάκωση των τιμών του, τη μετατροπή μιας εικόνας RGB σε εικόνα φωτεινότητας (intensity image) και επίσης τη μετατροπή μιας εικόνας RGB σε εικόνα χρωματικού δείκτη (indexed image) [31].

### **3.1.2 Ανάλυση εικόνας**

Ως ανάλυση εικόνας, ορίζεται το μέγεθος που δείχνει από πόσα εικονοστοιχεία αποτελείται μια ψηφιακή εικόνα στη μονάδα του μήκους επί το πλάτος. Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των χαρακτηριστικών τα οποία βρίσκονται σε διασπορά, ώστε να προσδιοριστεί εάν και σε τι βαθμό διασποράς είναι ομογενείς ή ανομοιογενείς και μετριέται σε pixels ανά



ίντσα. Υπάρχουν κάποια βήματα για την ανάλυση της εικόνας, όπως είναι το 'Thresholding' που αποτελεί μια λειτουργία μετατροπής μιας ασπρόμαυρης εικόνας σε δυαδική. Αυτό το βήμα βοηθάει στη μετέπειτα επεξεργασία της εικόνας αφού απλουστεύει τη πληροφορία. Η λειτουργία περιλαμβάνει τον καθορισμό ενός threshold και έπειτα την αλλαγή για όλα τα pixel με gray level κάτω από το threshold level, σε 0 (μαύρο) και τα υπόλοιπα με gray level ίσο ή μεγαλύτερο του 255 (άσπρο). Το threshold μπορεί να βρεθεί είτε με μαθηματικές μεθόδους είτε μελετώντας την εικόνα και το ιστόγραμμα της. Κατά την διάρκεια που επιλέγεται να γίνει το threshold υπάρχει η πιθανότητα για λάθη 2 ειδών, τα οποία είναι α) να μην συμπεριλαμβάνονται στη νέα εικόνα όλα τα επιθυμητά pixel, β) κάποια από τα pixel που περιλαμβάνονται στη νέα εικόνα δεν έπρεπε να υπάρχουν. Πριν επιλεγεί το threshold θα πρέπει να αποφασιστεί ποιο είδος λάθους είναι το πιο αποδεκτό. Προτιμάται το λάθος β) και έπειτα χρησιμοποιείται automatic thresholding όπου το threshold level είναι μια εικόνα που αποτελείται από 2 μέρη, τη περιοχή ενδιαφέροντος και το πίσω φόντο. Το gray level της περιοχής ενδιαφέροντος κατανέμεται από μια στατιστική κατανομή ενώ το gray level του background (φόντο) από μια άλλη [32].

Ένα δεύτερο βήμα στην ανάλυση εικόνας αποτελεί η αφαίρεση περιγράμματος. Σε αυτό το βήμα όλα τα pixel που βρίσκονται στο περίγραμμα της εικόνας αλλάζουν το χρώμα τους στο χρώμα του φόντο γίνονται δηλαδή άσπρα. Έτσι, εξασφαλίζεται η αποφυγή προβλημάτων όταν αργότερα εφαρμοστούν μάσκες, αφού με την διαδικασία αυτή δε χάνεται ιδιαίτερα σημαντική πληροφορία. Στη συνέχεια ακολουθεί ο διαμερισμός της εικόνας όπου γίνεται διαίρεση της δυαδικής εικόνας στα αντικείμενα που την αποτελούν και με αυτόν τον τρόπο επιλέγουμε αντικείμενα διαφορετικού μεγέθους. Μετά, βρίσκουμε το μεγαλύτερο τμήμα στην εικόνα που υποτίθεται ότι αυτό είναι το μονοπάτι και μετατρέπουμε τα pixel με διαφορετική 'ετικέτα' από αυτή του μονοπατιού στο χρώμα του background. Τα αντικείμενα στα οποία δίνεται η ίδια ετικέτα είναι συνδεδεμένα. Υπάρχουν 2 διαφορετικοί ορισμοί για τη σύνδεση, ο πρώτος είναι ο Four connectedness που 2 pixel συνδέονται μόνο εάν έχουν κοινό όρο και ο Eight connectedness που τα pixels συνδέονται εάν ακουμπούν οι γωνίες τους. Ένα άλλο βήμα είναι εκείνο της σκελετοποίησης. Σε αυτή την διαδικασία βρίσκεται ο μεσαίος άξονας των γραμμών ή των αντικειμένων στην εικόνα όπου το εξωτερικό στρώμα του απομακρύνεται με μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία. Αν μια γραμμή έχει πάχος αρκετά pixel τότε ελαττώνεται σε γραμμή πάχους ενός μόνο pixel. Ο τρόπος που συνδέονται τα pixel στο σκελετό εξαρτάται από τον τύπο σύνδεσης που επιλέγεται για την σκελετοποίηση. Μπορεί να υπάρξουν προβλήματα κατά την σκελετοποίηση αφού μπορεί να επηρεαστεί από τον θόρυβο. Επόμενο βήμα είναι η αραίωση όπου στη συγκεκριμένη διαδικασία αφαιρείται το εξωτερικό στρώμα ενός αντικειμένου εφαρμόζοντας μάσκες σε όλα τα pixel στην επιφάνεια του. Αν η μάσκα ταιριάζει, τότε το pixel στο κέντρο της διαγράφεται και η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου δοκιμαστούν όλα τα pixel. Τέλος υπάρχει το κλάδεμα που είναι μια επαναληπτική διαδικασία όπου εφαρμόζεται για την αφαίρεση των κλάδων μετά την εφαρμογή αλγορίθμου εντοπισμού των ορίων σε μία εικόνα. Συγκεκριμένα αφαιρείται το ακριανό pixel του κάθε κλάδου σε κάθε

επανάληψη, η όλη διαδικασία σταματάει όταν δε μπορούν να γίνουν άλλες αλλαγές στην εικόνα [31].

### 3.1.3 Βασική επεξεργασία εικόνας

Μια χρήσιμη προσέγγιση στην ψηφιακή επεξεργασία εικόνας είναι να θεωρήσουμε την φωτεινότητα  $f(i, j)$  όπου η συνιστώσα  $i$  αντιπροσωπεύει την κλίμακα έντασης (0 έως 255 σε ένα σύστημα των 8 bit) και ο κατακόρυφος άξονας  $j$  μετρά τον αριθμό των pixels σε κάθε σημείο της εικόνας σαν τυχαία μεταβλητή με συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας. Η μορφή της εικόνας περιέχει συνολική πληροφορία για το περιεχόμενο της εικόνας. Όμως, γενικά η μορφή δεν είναι διαθέσιμη και πρέπει να εκτιμηθεί από την ίδια την εικόνα κάνοντας χρήση της εμπειρικής πυκνότητας πιθανότητας που λέγεται ιστόγραμμα. Το ιστόγραμμα μιας εικόνας φέρει σημαντική πληροφορία για το περιεχόμενο της. Γενικά περιγράφει την κατανομή των χρωμάτων ενός συνόλου εικονοστοιχείων και εκφράζει τη συχνότητα με την οποία κάθε ένα χρώμα εμφανίζεται στο σύνολο του. Είναι μια γραφική αναπαράσταση της κατανομής φωτεινότητας μιας εικόνας. Επιπροσθέτως το ιστόγραμμα χρησιμοποιείται για την ανάλυση, την αξιολόγηση, την βελτιστοποίηση, την τροποποίηση και την εξαγωγή των χαρακτηριστικών μιας εικόνας. Δίνει πολλά στοιχεία για το χρώμα της εικόνας, όπως φωτεινότητα, αντίθεση και χρωματική της ισορροπία, άρα δίνει επαρκή πληροφορία για ανάλυση και αξιολόγηση μιας εικόνας. Το ιστόγραμμα παρουσιάζει άμεσα και γραφικά ποιο είδος ανεπαρκειών φωτεινότητας ή αντίθεσης μπορεί να υπάρχουν σε μια εικόνα. Μια εικόνα με κανονική αντίθεση και κανονική φωτεινότητα παρουσιάζει ένα ιστόγραμμα ομαλό, με ακραίες τιμές όσο πιο κοντά γίνεται στο 0 και το 255 και με ομαλή κατανομή pixel σε όλο το εύρος ενδιάμεσων τιμών. Μια εικόνα, που είναι σκοτεινή, παρουσιάζει συγκέντρωση pixel προς την πλευρά του 255. Οι εικόνες με χαμηλή αντίθεση θα έχουν ιστόγραμμα που είναι συγκεντρωμένο σε μια πολύ στενή περιοχή του άξονα  $X$ , σε μορφή συστάδας. Η θέση της συστάδας θα δείξει εάν η εικόνα είναι πάρα πολύ σκοτεινή, φωτεινή ή πάρα πολύ γκριζα. Επίσης, όταν ένα ιστόγραμμα με διασπορά τιμών παρουσιάζει ένα αρκετά μεγάλο τοπικό μέγιστο, είναι ένδειξη φόντου στη εικόνα. Το ιστόγραμμα χρώματος χρησιμοποιείται για εικόνες όπως η RGB. Αν και δίνει σημαντική πληροφορία για τα χρώματα μιας εικόνας, ωστόσο χρειάζεται προσοχή κατά την χρήση του. Για παράδειγμα, δεν είναι καλό για σύγκριση εικόνων γιατί 2 πολύ διαφορετικές εικόνες μπορεί να έχουν παρόμοιο ιστόγραμμα χρώματος ενώ 2 εικόνες με το ίδιο αντικείμενο σε άλλο χρώμα εμφανίζονται ως τελείως διαφορετικές. Όμως, το ιστόγραμμα χρώματος αγνοεί τελείως το σχήμα και είναι ευαίσθητο στη μεταβολή της φωτεινότητας. Τέλος μας παρέχεται η δυνατότητα να εφαρμόσουμε την τεχνική εξισσορόπησης ιστογράμματος μιας εικόνας, καθώς μετασχηματίζει τις γκρι φωτεινότητες μιας εικόνας έτσι ώστε αυτές να κατανέμονται ομοιόμορφα σ'όλη την κλίμακα φωτεινοτήτων. Με τον τρόπο αυτό η εικόνα που προκύπτει είναι αυξημένης αντίθεσης σε σχέση με την αρχική [31].

### 3.2 Βελτιστοποίηση εικόνας

Η βελτιστοποίηση της εικόνας αποσκοπεί στην βελτίωση της ποιότητάς της, έτσι ώστε να δώσει στην εικόνα μια μορφή πιο κατάλληλη για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση. Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι βελτίωσης ποιότητας πρώτη αφορά την εικόνα στο πεδίο του χώρου και η δεύτερη στο πεδίο της συχνότητας. Στο πεδίο του χώρου, οι τεχνικές εκμεταλλεύονται τις γεωμετρικές ιδιότητες της εικόνας, ενώ στο πεδίο της συχνότητας επεξεργάζονται το φάσμα της εικόνας [31].

#### 3.2.1 Επεξεργασία με βάση τη φωτεινότητα

Η αντιστροφή της φωτεινότητας μιας εικόνας πρακτικά δίνει το αρνητικό της. Αυτό σε μερικές περιπτώσεις είναι επιθυμητό και μπορεί να αναδείξει κάποιες περιοχές που στην κανονική μορφή δεν είναι ευδιάκριτες. Υπάρχει μια έτοιμη συνάρτηση, η οποία μας βοηθάει στην υλοποίηση της αντιστροφής φωτεινότητας μιας εικόνας όμως, υπάρχει και η δυνατότητα να επιτευχθεί η αντιστροφή φωτεινότητας και με άλλη εντολή, η οποία πετυχαίνει διάφορες επιδράσεις στην αντίθεση μιας εικόνας. Η κλιμάκωση της φωτεινότητας είναι ίδια με την επέκταση της αντίθεσης, όταν η μεταβολή φωτεινότητας μιας εικόνας είναι στην περιοχή  $[0, L-1]$ . Εάν η μεταβολή φωτεινότητας μιας εικόνας δίνεται από το τμήμα  $(AB)$ , η κλιμάκωση της στο διάστημα  $[0, L-1]$  πραγματοποιείται αν η ελάχιστη τιμή φωτεινότητας αντιστοιχεί με το κατώτερο όριο και η μέγιστη τιμή με το ανώτερο όριο, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές κλιμακώνονται ανάλογα. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου η επεξεργασία μιας εικόνας καταλήγει με τιμές φωτεινότητας εκτός της επιθυμητής κλίμακας των 256 αποχρώσεων του γκρι, η οποία είναι μια ακραία περίπτωση. Σαν αποτέλεσμα έχει έπειτα από κάποιους μαθηματικούς χειρισμούς να προκύπτουν φωτεινότητες εκτός του διαστήματος  $[0, L-1]$ . Άρα πρέπει να γίνεται η κλιμάκωση φωτεινότητας στα κανονικά επίπεδα. Υπάρχει μια συνάρτηση η οποία υλοποιεί την διαδικασία της κλιμάκωσης φωτεινότητας σε μια εικόνα και είναι η 'rescale'[31].

Η διαδικασία ανάδειξης μιας συγκεκριμένης περιοχής φωτεινότητας σε μια εικόνα ονομάζεται τεμαχισμός της κλίμακας φωτεινότητας. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν δύο τεχνικές από τις οποίες, η μια οδηγεί την περιοχή  $[a, b]$  στη μέγιστη τιμή φωτεινότητας υποβαθμίζοντας την υπόλοιπη περιοχή στο μηδέν ενώ η άλλη οδηγεί μόνο μια περιοχή  $[a, b]$  στη μέγιστη τιμή φωτεινότητας χωρίς να επηρεάσει την υπόλοιπη περιοχή. Στη συνέχεια υπάρχει η δυνατότητα του 'κόψιμου φωτεινότητας', σε αυτή την περίπτωση έχουμε το κόψιμο των επιπέδων φωτεινότητας εάν ισχύει  $I' = I_1$  για τιμές φωτεινότητας  $I \leq I_1$  και/ή  $I' = I_2$  για τιμές φωτεινότητας  $I \geq I_2$ . Αν όμως ισχύει  $I_1 = 0$  και  $I_2 = L - 1$ , τότε το κόψιμο φωτεινότητας μοιάζει με την επέκταση αντίθεσης χωρίς όμως να υπάρχει κλιμάκωση των τιμών φωτεινότητας μεταξύ των  $I_1$  και  $I_2$ . Αν υπάρχει κλιμάκωση των ενδιάμεσων τιμών φωτεινότητας τότε δημιουργείται επέκταση της αντίθεσης. Επίσης, το κόψιμο της φωτεινότητας γίνεται και με κατωφλίωση, αφού εδώ γίνεται κόψιμο των επιπέδων φωτεινότητας κάτω από το επίπεδο κατωφλίου και ισχύει  $I_1 = 0$  για  $I < I_1 = I_2$ . Η απόδοση της μέγιστης τιμής φωτεινότητας για τιμές μεγαλύτερες από το

επίπεδο κατωφλίου ισχύει  $I_2 = L - 1$  για  $I > I_1 = I_2$ . Έτσι, με αυτό τον τρόπο δημιουργούμε μια δυαδική εικόνα [31]. Αφού ως φωτεινότητα μιας εικόνας μπορεί να ορισθεί η μέση φωτεινότητα των εικονοστοιχείων της τότε οι τεχνικές μετασχηματισμού φωτεινότητας βασίζονται στις συναρτήσεις μετασχηματισμού  $T(g)$  με βάση την σχέση:  $h'(k) = T(h(k)), k = 0, \dots, L - 1$ . Σκοπός τους είναι η ρύθμιση των φωτεινοτήτων των εικόνων έτσι ώστε να προκύψει μια βελτιωμένη εικόνα, στην οποία οι περιοχές φωτεινοτήτων να τονιστούν ή να εξομαλυνθούν. Αν  $g$  είναι η αρχική κλίμακα φωτεινοτήτων και  $q$  η νέα κλίμακα φωτεινοτήτων μετά τον μετασχηματισμό ισχύει ότι:  $q = T(g)$ , και  $qdg = gdg \Rightarrow q = g * dg/dg$ . Χρησιμοποιώντας κατάλληλες συναρτήσεις μετασχηματισμού  $T$  μπορούμε να πετύχουμε ένα πλήθος μετατροπών που βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορες περιπτώσεις. Επειδή η επεξεργασία κάθε εικονοστοιχείου μιας εικόνας εξαρτάται από την φωτεινότητα του ίδιου του εικονοστοιχείου, οι τεχνικές αυτές λέγονται τεχνικές σημειακής επεξεργασίας [34].

### 3.2.2 Αρνητική εικόνα και αντίθεση

Η αρνητική μορφή μιας ψηφιακής εικόνας είναι χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές, όπως η αναπαράσταση ιατρικών εικόνων. Το αρνητικό μιας εικόνας παράγεται χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση μετασχηματισμού που είναι η εξής:  $T(g) = 255 - g$ . Στην αρνητική εικόνα η φωτεινότητα στην έξοδο μειώνεται καθώς η φωτεινότητα στην είσοδο αυξάνεται. Όσο αφορά την χαμηλή αντίθεση, τέτοιες εικόνες μπορούν να προκύψουν από ανεπαρκή φωτισμό, είτε λόγω της μικρής δυναμικής περιοχής του οπτικού αισθητήρα, είτε λόγω λανθασμένης ρύθμισης των παραμέτρων λήψης των εικόνων, όπως για παράδειγμα η λανθασμένη ρύθμιση του διαφράγματος κατά τη διάρκεια λήψης της φωτογραφίας. Γενικά, η τεχνική αύξησης της αντίθεσης σε μια ψηφιακή εικόνα έχει ως στόχο την αύξηση της δυναμικής περιοχής της φωτεινότητας που μας ενδιαφέρει. Η συνάρτηση μετασχηματισμού πρέπει να έχει κατάλληλη μορφή, ώστε να αυξάνει την αντίθεση σε προκαθορισμένες περιοχές ενδιαφέροντος. Έτσι, στις περιοχές που έχουμε μεγάλη συγκέντρωση εικονοστοιχείων πρέπει να εφαρμοστεί μεγαλύτερη επέκταση για να έχουμε καλύτερη απεικόνιση. Υπάρχει συνάρτηση, η οποία βοηθά στην αύξηση της αντίθεσης στα επιθυμητά επίπεδα περισσότερο αντικειμενικά. Η συνάρτηση αυτή υπολογίζει την αθροιστική συνάρτηση πιθανότητας της εικόνας εισόδου και θεωρεί σαν ελάχιστη φωτεινότητα της εικόνας την αθροιστική πιθανότητα ίση με 0.01 και σαν μέγιστη την πιθανότητα ίση με 0.99. Έτσι, τα ακρότατα 78 και 161 δίνουν καλύτερο αποτέλεσμα επειδή ο προσδιορισμός τους είναι περισσότερο αντικειμενικός. Πολλές φορές είναι καλύτερα να εφαρμόσουμε τοπική αύξηση της αντίθεσης, ώστε να γίνει αύξηση της αντίθεσης μόνο στις περιοχές που χρειάζεται και όχι σε ολόκληρη την εικόνα. Για παράδειγμα, μπορούμε να επιβάλλουμε την μη αλλαγή των φωτεινοτήτων σε περιοχές ομοιογενείς από πλευράς φωτεινότητας, καθώς επίσης και σε περιοχές υψηλής αντίθεσης. Σε όλα τα υπόλοιπα εικονοστοιχεία της εικόνας η αντίθεση αυξάνεται σύμφωνα με έναν προκαθορισμένο μετασχηματισμό [31].

### 3.3 Φίλτρα εικόνας και θόρυβος

Φίλτρο μιας εικόνας είναι η διαδικασία κατά την οποία μεταβάλλεται η τιμή ενός στοιχείου μιας εικόνας με μαθηματικές σχέσεις και επενεργεί στα εικονοστοιχεία της, ώστε να γίνει πιο εμπλουτισμένη. Ο λόγος για να φιλτράρουμε τις εικόνες, είναι επειδή θέλουμε οι επεξεργασμένες εικόνες να είναι καλύτερες από τις αρχικές. Τα φίλτρα συνήθως χρησιμοποιούνται και για την απαλοιφή ή την πρόσθεση θορύβου σε μια εικόνα. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιούμε στις εικόνες είναι η έννοια της συνδεσιμότητας, δηλαδή το να βλέπουμε ποια pixels «γειτονεύουν» με άλλα pixels. Η εφαρμογή των φίλτρων σε μια εικόνα βασίζεται στην έννοια της «γειτονιάς». Δηλαδή η τιμή για κάθε pixel στην εικόνα (target) αντικαθίσταται με μία νέα τιμή η οποία εξαρτάται μόνο από την τιμή των pixels σε μία προκαθορισμένη γειτονιά γύρω από το target pixel. Υπάρχουν διάφορα φίλτρα τα οποία μας βοηθούν στην επεξεργασία, όπως το φίλτρο μέσης τιμής, αριθμητικής μέσης τιμής, γεωμετρικής μέσης τιμής, μεσαίας τιμής, ενδιάμεσου σημείου, φίλτρο Gauss, φίλτρο min/max και επίσης φίλτρο Laplacian [31].

#### 3.3.1 Είδη φίλτρων

Υπάρχουν κάποιες συναρτήσεις που βοηθούν στο φιλτράρισμα μιας εικόνας. Αρχικά υπάρχει το φίλτρο της μέσης τιμής το οποίο είναι γραμμικό και χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση των εικόνων και την μείωση του θορύβου σε αυτές. Η λειτουργία του φίλτρου μέσης τιμής συνίσταται στην αντικατάσταση της φωτεινότητας σε κάθε εικονοστοιχείο με τη μέση φωτεινότητα στην γειτονιά του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταβλητότητας τοπικά σε κάθε εικονοστοιχείο και συνεπώς παίρνουμε μια περισσότερο θαμπή εικόνα. Στη συνέχεια υπάρχει το φίλτρο αριθμητικής μέσης τιμής. Η αριθμητική μέση τιμή προκαλεί την εξομάλυνση μιας περιοχής και η αίσθηση μείωσης του θορύβου προκαλείται από το θολό αποτέλεσμα στην περιοχή. Μετά υπάρχει το φίλτρο γεωμετρικής μέσης τιμής το οποίο απεικονίζει το πραγματικό μέρος των τιμών της εικόνας και παρατηρείται λιγότερη θολή εικόνα από το προηγούμενο της αριθμητικής μέσης τιμής. Το κάθε pixel της εικόνας με θόρυβο αντικαθίσταται από το γινόμενο των pixels στη γειτονιά του, υψωμένο στη δύναμη  $1/mn$ . Το φιλτράρισμα με φίλτρο μεσαίας τιμής είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε για την μείωση του θορύβου σε ψηφιακές εικόνες. Το κάθε pixel της εικόνας με θόρυβο αντικαθίσταται από τη μεσαία τιμή των pixels στη γειτονιά του. Όσο αφορά το φίλτρο ενδιάμεσου σημείου, αυτό υπολογίζει την ενδιάμεση τιμή μεταξύ ελάχιστου και μεγίστου στην περιοχή της μάσκας και τοποθετεί το αποτέλεσμα στη θέση του εξεταζόμενου στοιχείου της περιοχής. Συνδυάζει τα φίλτρα της μέγιστης και ελάχιστης τιμής και προσδιορίζει τη μέση τιμή τους ενώ λειτουργεί αποδοτικά σε ομοιόμορφο ή κανονικό τύπο θορύβου.

Ακολουθεί το φίλτρο Gauss το οποίο εστιάζει στην ομαλότερη εικόνα ώστε να μπορέσει να εξαχθεί ένα ομαλό περίγραμμα. Είναι ένα συμμετρικό φίλτρο που προκαλεί θάμπωμα της εικόνας. Δηλαδή, το μεγαλύτερο βάρος έγκειται στο κέντρο και υπάρχει ομαλή εξασθένιση όσο

απομακρυνόμαστε από το κέντρο. Συνήθως, οι υψηλές συχνότητες στο φάσμα μιας εικόνας συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των αντικειμένων, δηλαδή στις λεπτομέρειες, ενώ οι χαμηλές αντιπροσωπεύουν μεγάλες περιοχές αντικειμένων. Εφαρμόζοντας αυτό το φίλτρο οι υψηλές συχνότητες χάνονται και ο διαχωρισμός των αντικειμένων, γίνονται περισσότερο δυσδιάκριτες. Με την εφαρμογή του φίλτρου οι περιοχές της εικόνας που διαχωρίζουν τα αντικείμενα, δηλαδή τα όρια τους, θα έρθουν σε πιο κοντινές τιμές μετά την εφαρμογή του, γεγονός το οποίο τείνει να εξαλείψει τις σημαντικές διαφορές μεταξύ γειτονικών pixels. Έτσι, τα όρια των αντικειμένων γίνονται δυσδιάκριτα και θολά. Τα φίλτρα *min/max* θα τα αναλύσουμε το καθένα ξεχωριστά. Στο *min* φίλτρο κάθε pixel της εικόνας με θόρυβο αντικαθίσταται από την ελάχιστη τιμή των pixels στη γειτονιά του. Αναδεικνύονται τα pixels με την μικρότερη φωτεινότητα, οπότε υποβαθμίζει το θόρυβο *salt*. Στο φίλτρο *max* κάθε pixel της εικόνας με θόρυβο αντικαθίσταται από την μέγιστη τιμή των pixels στη γειτονιά του. Αναδεικνύονται τα pixels με την μεγαλύτερη φωτεινότητα οπότε υποβαθμίζει το θόρυβο *pepper*. Τέλος υπάρχει το φίλτρο *Laplacian* που χρησιμοποιείται για να γίνει ο εμπλουτισμός μιας εικόνας. Με αυτό το φίλτρο προκύπτουν απότομες μεταβολές φωτεινότητας σε μια εικόνα ενώ εξομαλύνει τις περιοχές ομαλής μεταβολής της φωτεινότητας. Η εικόνα με το φιλτράρισμα είναι αυτή στην οποία έχουν ομογενοποιηθεί όλες οι περιοχές ομαλής μεταβολής της φωτεινότητας. Για να πάρουμε καθαρή εικόνα, δηλαδή αυτή με το φίλτρο *Laplacian*, αρκεί να αφαιρέσουμε την αρχική από αυτή που προέκυψε από το φιλτράρισμα [31].

### 3.3.2 Θόρυβος

Το βασικότερο εμπόδιο στην ψηφιακή επεξεργασία σήματος αλλά και της εικόνας είναι ο θόρυβος. Με τον όρο θόρυβο εννοούμε μία μεταβολή στην τιμή του σήματος από την πραγματική του τιμή [30]. Υπάρχουν πολλά είδη θορύβου που χρησιμοποιούνται για να διαπιστώσουμε την απόδοση ενός φίλτρου. Ο ομοιόμορφος θόρυβος δεν δημιουργείται πρακτικά αλλά είναι χρήσιμος για την εξομοίωση αλγορίθμων απαλοιφής θορύβου. Ο κανονικός θόρυβος υπάρχει σε μια εικόνα κυρίως λόγω της απόδοσης του αισθητηρίου λήψης κάτω από συνθήκες μη επαρκούς φωτισμού ή υψηλής θερμοκρασίας ενώ ο σημειακός θόρυβος ή αλλιώς θόρυβος *salt* και *pepper* δημιουργείται συνήθως από το on/off διακοπών (μηχανικών ή ηλεκτρονικών) στη διαδικασία λήψης ή μετάδοσης μιας εικόνας. Τέλος, υπάρχουν και άλλοι τύποι θορύβου, όπως ο θόρυβος *Rayleigh*, ο θόρυβος *gamma* κτλπ [35].

### 3.4 Τμηματοποίηση ή *segmentation* εικόνας

Στην προσπάθεια να μπορέσει ο υπολογιστής να μιμηθεί την ανθρώπινη νοημοσύνη και συμπερασματολογία ώστε να εξαγάγει χρήσιμη πληροφορία από μια εικόνα, προέκυψε η διαδικασία της τμηματοποίησης. Αυτή η διαδικασία αφορά τον διαχωρισμού μιας εικόνας σε κατάλληλες περιοχές που αναπαριστούν αντικείμενα που αυτή περιέχει ή για τον γενικότερο προσδιορισμό περιοχών ενδιαφέροντος σε αυτή. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αντικείμενα

μπορούν να περιγραφούν από κλειστές καμπύλες. Η εύρεση των αντικειμένων ή των περιοχών ενδιαφέροντος σε μια εικόνα αποτελεί αναγκαίο στάδιο προεπεξεργασίας σε πολλές περιπτώσεις, όπως είναι η ανίχνευση αντικειμένων και η ανάκτηση εικόνων. Άρα η διαδικασία αποτελεί απαραίτητο βήμα για τον προσδιορισμό των περιοχών ή των αντικειμένων που περιέχει μια εικόνα για παραπέρα επεξεργασία, ανάλυση ή αναγνώριση. Το αποτέλεσμα της τμηματοποίησης χρησιμεύει ως ενδιάμεσο βήμα για την περαιτέρω επεξεργασία της εικόνας ανάλογα με την εφαρμογή. Σε πολλές περιπτώσεις βασίζεται στον έγχρωμο χαρακτήρα της εικόνας επεκτείνοντας την μονοχρωματική επεξεργασία σε πολυδιάστατη χρωματικά επεξεργασία. Ως τμηματοποίηση γενικά μπορεί να οριστεί σαν τη διαδικασία διαχωρισμού των αντικειμένων από το πίσω φόντο ή διαφορετικά σαν τη διαμέριση της σε ασύνδετες μεταξύ τους περιοχές, κάθε μια από τις οποίες είναι ομοιογενής και συνεκτική ως προς κάποια ιδιότητα. Η δυσκολία του προβλήματος της τμηματοποίησης βρίσκεται στο ότι ο κάθε άνθρωπος μπορεί να κατατμήσει την ίδια εικόνα με διαφορετικό τρόπο. Επίσης τα κριτήρια ομοιογένειας των περιοχών διαφοροποιούνται σε κάθε εικόνα. Για την τμηματοποίηση των εικόνων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, όπου κάθε μια σχετίζεται με το είδος της εφαρμογής και το είδος των εικόνων. Δηλαδή, ανάλογα την εφαρμογή πρέπει να επιλέγεται και η κατάλληλη τεχνική τμηματοποίησης. Δεν υπάρχει όμως γενική μέθοδος και προδιαγραφές που να καθορίζουν την ποιότητα και την αποτελεσματικότητα των τεχνικών αυτών. Μερικές μέθοδοι τμηματοποίησης εικόνας είναι η τμηματοποίηση με βάση τις ακμές, η τμηματοποίηση με χρήση προβολών, η τμηματοποίηση με διαίρεση και ένωση και η τμηματοποίηση με κατωφλίωση ή πολυκατωφλίωση. Συνήθως, για την ανάπτυξη και την επιλογή μιας τεχνικής τμηματοποίησης χρησιμοποιούνται οι ιδιότητες της ασυνέχειας και ομοιότητας. Με τον έλεγχο της ασυνέχειας εξετάζεται η απότομη μεταβολή στις τιμές των εικονοστοιχείων και έτσι προσδιορίζονται απομονωμένα σημεία, καμπύλες και ακμές. Με τον έλεγχο της ομοιότητας ως προς ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά οδηγεί σε τεχνικές τμηματοποίησης που βασίζονται σε ταξινόμηση. Μπορούμε να διακρίνουμε τεχνικές τμηματοποίησης που αφορούν γκρι εικόνες και έγχρωμες εικόνες. Στις γκρι εικόνες κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι αποχρώσεις του γκρι καθώς και η φύση της εικόνας. Στις έγχρωμες εικόνες, το χρώμα και η υφή είναι τα βασικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την τμηματοποίηση των εικόνων. Τέλος θα πρέπει να επισημανθεί πως οι υπάρχουσες τεχνικές τμηματοποίησης δεν καλύπτουν αποτελεσματικά όλες τις δυνατές εφαρμογές παρά αποτελούν ερεθίσματα για την ανάπτυξη εξειδικευμένων τεχνικών τμηματοποίησης που αφορούν συγκεκριμένες εφαρμογές [31].

### **3.4.1 Τμηματοποίηση με χρήση ακμών**

Μία πρώτη διαδικασία είναι η εξαγωγή ακμών ή ορίων, η οποία πραγματεύεται τις ασυνέχειες στα φωτομετρικά, γεωμετρικά και φυσικά χαρακτηριστικά των αντικειμένων μιας εικόνας, δηλαδή των ακμών τους. Ακμή ή περίγραμμα σε μια εικόνα  $x_{ij}$ , ορίζεται ως το σύνολο των σημείων στη θέση  $i,j$  της εικόνας, όπου παρατηρείται μια σημαντική αλλαγή της έντασης ή του χρώματος της εικόνας. Το μέγεθος της μεταβολής αυτής, αποτελεί το ύψος της ακμής ή

καλύτερα, ακμή, μπορεί να θεωρηθεί μια καμπύλη, στις δυο πλευρές της οποίας υπάρχουν σημαντικές διαφορές που αφορούν τις εντάσεις φωτεινότητας ή ακόμη ένα ή και περισσότερα χαρακτηριστικά του χώρου. Για την εξασφάλιση συνεκτικών ακμών, χρησιμοποιείται η μέθοδος της αποκοπής των μη-μεγίστων εικονοστοιχείων, κατά την οποία το κεντρικό εικονοστοιχείο θα πρέπει να παρουσιάσει μεγαλύτερη τιμή του μέτρου της κλίσης από τα γειτονικά του εικονοστοιχεία κατά τη διεύθυνση της κλίσης. Επίσης, εφαρμόζεται η μέθοδος κατωφλίωσης με χρήση υστέρησης αντί της επιλογή μιας τιμής κατωφλίου το οποίο θα εφαρμοσθεί σε όλη την εικόνα. Η κατωφλίωση πρέπει να συνοδεύεται από διαδικασία λέπτυνσης των ακμών. Η επιλογή των βέλτιστων αλγορίθμων εξαγωγής ακμών, προέκυψε από τους παρακάτω λόγους: α) την αύξηση του λόγου του σήματος προς θόρυβο με την απομάκρυνση των εσφαλμένων ακμών, β) την επιτυχή ανίχνευση της ακμής, τη σωστή θέση της ακμής και τη μοναδικότητα της απόκρισης κάθε ακμής και γ) την εξαγωγή και των καμπυλόγραμμων ακμών, εκτός των γραμμικών, με καλή συνεκτικότητα και μήκος ακμής. Οι ακμές, χαρακτηρίζουν τα όρια και συνεπώς είναι ένα πρόβλημα υψηλής σπουδαιότητας στην επεξεργασία εικόνας. Οι ακμές στις εικόνες είναι περιοχές, οι οποίες έχουν μεγάλη σφοδρότητα αντίθεσης, ένα άλμα στην σφοδρότητα από ένα ριxel στο άλλο. Η ακμή, ανιχνεύει μια εικόνα σημαντικά περιορίζοντας το σύνολο των δεδομένων και φίλτρων εκτός των άχρηστων πληροφοριών, εφόσον εξοικονομεί τα σημαντικά δομικά αγαθά σε μια εικόνα [31].

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να διεκπεραιωθεί η ανίχνευση ακμών όμως, η πλειοψηφία των διαφόρων μεθόδων μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες, αυτή της βαθμωτής μεταβολής και του Laplace. Η μέθοδος της βαθμωτής μεταβολής ανιχνεύει τις ακμές ψάχνοντας το μέγιστο και το ελάχιστο στην πρώτη παράγωγο της εικόνας. Η μέθοδος του Laplace ψάχνει για zero crossings στην δεύτερη παράγωγο της εικόνας για να βρεί ακμές. Μια ακμή έχει μονοδιαστατική δομή του κεκλιμένου επιπέδου και υπολογίζει την παράγωγο της εικόνας που μπορεί να τονίσει την τοποθεσία του. Χρησιμοποιώντας ακμές για μια ασπρόμαυρη εικόνα, εννοούμε τις αλλαγές της φωτεινότητας μεταξύ των γειτονικών περιοχών της. Αλλαγές της φωτεινότητας αντιστοιχούν συνήθως σε διαφοροποίηση ιδιοτήτων της απεικόνισης τρισδιάστατων αντικειμένων, όπως αλλαγές στην υφή, στο βάθος, στα όρια των αντικειμένων και σε διαφορετικό φωτισμό και αντανάκλαση. Η ανίχνευση ακμών είναι πολύ σημαντική για την ψηφιακή επεξεργασία εικόνας, διότι με τις ακμές μπορούμε να περιγράψουμε, να προσδιορίσουμε, να αναπαραστήσουμε και να αναγνωρίσουμε αντικείμενα που περιέχονται σε ψηφιακές εικόνες. Οι ακμές εμφανίζονται σε διάφορες κλίμακες και με διαφορετική ένταση στις απεικονίσεις. Η ανάλυση κυματιδίων είναι κατάλληλη για ανίχνευση ακμών, καθώς αποτελεί ανάλυση πολλαπλών κλιμάκων και τοπική ανάλυση. Η ανάλυση κυματιδίων αποτελεί ένα νέο ερευνητικό πεδίο και προέκυψε ως εξέλιξη της ανάλυσης Fourier. Αντί των ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών συναρτήσεων, χρησιμοποιεί άλλες συναρτήσεις τα οποία ικανοποιούν ορισμένες μαθηματικές συνθήκες και με χρήση της επίθεσης συναρτήσεων, αναπαριστά σήματα και εικόνες. Σε αντίθεση με την ανάλυση Fourier, διατηρεί τη χωρική πληροφορία και είναι κατάλληλη για την προσέγγιση δεδομένων με απότομες αλλαγές-ασυνέχειες. Τέλος, η ανάλυση πολλαπλών κλιμάκων, η οποία επεξεργάζεται δεδομένα σε διαφορετικές κλίμακες. Υπάρχουν



και κάποια σφάλματα στην ανίχνευση ακμών, όπως η παράλειψη σημείων ακμής, η λανθασμένη αναγνώριση σημείων που δεν είναι πραγματικές ακμές και η μετατόπιση σημείων ακμής [31].

### **3.4.2 Τμηματοποίηση με χρήση προβολών και Διαίρεση/Ένωση**

Η προβολή των δυαδικών εικόνων σε διάφορες διευθύνσεις μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για την χωρική κατανομή των αντικειμένων που περιέχει. Δηλαδή, η απομόνωση και ο διαχωρισμός της περιοχής ενός αντικειμένου μπορεί να γίνει με τη βοήθεια συνήθως της οριζόντιας και της κάθετης προβολής ή ακόμα και προβολών σε άλλες γωνίες. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής σε εικόνες φωτεινότητας προϋποθέτει τη μετατροπή της σε δυαδική ή τη χρήση προβολών που αντιστοιχούν και αφορούν συγκεκριμένο χαρακτηριστικό που μπορεί να διαχωρίζει τα αντικείμενα από το φόντο. Όμως, η τεχνική αυτή παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες ιδιαίτερα, όταν η εικόνα περιέχει περισσότερα του ενός αντικείμενα και όταν τα αντικείμενα δεν είναι σαφώς διαχωρισμένα από το φόντο. Αν πάρουμε επιπλέον προβολές μιας εικόνας και σε άλλες γωνίες είναι δυνατόν να καθορίσουμε ακριβέστερα την περιοχή διαχωρισμού του αντικειμένου [31].

Όσο αφορά την τμηματοποίησης με διαίρεση και ένωση σε αυτή τη μέθοδο η αρχική εικόνα διαιρείται σε τέσσερα τεταρτημόρια και κατόπιν εξετάζεται αν σε κάθε τεταρτημόριο υπάρχει ομοιομορφία ως προς κάποιο χαρακτηριστικό. Αν σε ένα τεταρτημόριο δεν υπάρχει ομοιομορφία, τότε αυτό διαιρείται σε άλλα τέσσερα. Αν δύο τεταρτημόρια είναι μεταξύ τους ομοιόμορφα τότε αυτά ενώνονται. Η όλη διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου γίνει η τελική τμηματοποίηση της εικόνας [31].

### **3.4.3 Κατωφλίωση και Πολυκατωφλίωση**

Η κατωφλίωση είναι ένα χρήσιμο και απλό εργαλείο για την τμηματοποίηση εικόνων που απεικονίζονται με αποχρώσεις του γκρι και βασίζεται στο γεγονός ότι, τα αντικείμενα μιας εικόνας μπορούν να διακριθούν από τον φόντο βάσει του χρώματος τους. Η τεχνική αυτή αποτελεί την απλούστερη προσέγγιση στο θέμα της αυτόματης τμηματοποίησης μιας εικόνας. Αποδίδει ικανοποιητικά σε εικόνες που περιέχουν ένα ή περισσότερα αντικείμενα σε κάποιο φόντο. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι, οι τιμές των pixels, που ανήκουν στα αντικείμενα, διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των pixels που ανήκουν στο φόντο. Επιλέγοντας συνεπώς, ένα εύρος για τις τιμές που ανήκουν σε κάποιο αντικείμενο, είμαστε σε θέση να το διαχωρίσουμε από το φόντο. Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται για τη μετατροπή μιας εικόνας σε δυαδική. Η πληροφορία για τις τιμές που πρέπει να επιλεγθούν, μπορεί να δοθεί από το ιστόγραμμα της εικόνας. Η ύπαρξη ενός ή περισσότερων αντικειμένων, αντιστοιχεί στην ύπαρξη κορυφών στο ιστόγραμμα. Άρα, επιλέγοντας τα όρια των κορυφών, μπορούμε να βρούμε το εύρος των τιμών των pixels που ανήκουν σε κάποιο αντικείμενο. Η προσέγγιση αυτή, δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε περιπτώσεις όπως αυτές των εικόνων κειμένου, όπου ως γνωστό, η εικόνα

περιέχει μόνο δύο κύριες αποχρώσεις του γκρι (π.χ. άσπρο, μαύρο). Οπότε, οι μέθοδοι κατωφλίου, πρέπει να εφαρμόζονται σε εικόνες όπου είναι ξεκάθαρη η διαφορά μεταξύ των αποχρώσεων της περιοχής ενδιαφέροντος και του πίσω φόντο.

Για την τμηματοποίηση περίπλοκων εικόνων, είναι αναγκαία η χρήση τεχνικών επιλογής κατωφλίων για πολλά επίπεδα. Υπάρχουν πάρα πολλές δυσκολίες όσον αφορά την επιλογή κάποιου κατωφλίου σε εικόνες με πολλά αντικείμενα, οι οποίες οφείλονται κυρίως στις κατανομές των αποχρώσεων, στα μικρά και αλληλεπικαλυπτόμενα αντικείμενα. Αρκετές τεχνικές έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που προαναφέρθηκαν. Οι περισσότερες από αυτές, βασίζονται στην ταύτιση των ακμών και την ταξινόμηση. Αρχικά, όλες οι τεχνικές, ταξινομούν τα εικονοστοιχεία σε αυτά που ανήκουν σε ακμές και μη. Ακολούθως, για την εξαγωγή ακμών των κατωφλίων, χρησιμοποιούνται υπολογιστικά δαπανηρές, επαναληπτικές διαδικασίες. Σε κάθε επανάληψη, οι τιμές των κατωφλίων τροποποιούνται με σκοπό την ικανοποίηση των χαρακτηριστικών συνθηκών που αφορούν τις ακμές. Μια τεχνική πολυκατωφλίωσης πρέπει να είναι γενική και απλή, να μην περιορίζεται από τη μορφή του ιστογράμματος και αν είναι δυνατόν, να αξιοποιεί και πρόσθετες πληροφορίες και όχι μόνο τις φωτεινότητες της εικόνας. Υπάρχουν πολλές τεχνικές κατωφλίωσης, όπως η απλή κατωφλίωση και η μη παραμετρική κατωφλίωση του Otsu. Στην εικόνα εξόδου (BW) έχουν αντικατασταθεί όλα τα pixels της εικόνας εισόδου που έχουν φωτεινότητα μικρότερη από «level», με την τιμή 1 (λευκά) και όλα τα υπόλοιπα με την τιμή 0 (μαύρα). Η μη παραμετρική μέθοδος Otsu βασίζεται στην επεξεργασία του ιστογράμματος της εικόνας και στον προσδιορισμό του κατωφλίου με βάση το κριτήριο της μεγιστοποίησης της διαχωρισιμότητας μεταξύ των περιοχών κειμένου και υποβάθρου. Πρώτο βήμα είναι να υπολογίζουμε το ολικό τετράγωνο της τυπικής απόκλισης των επιπέδων του γκρι της εικόνας. Δεύτερο βήμα υποθέτουμε ότι τα pixels της εικόνας διακρίνονται σε L διακριτά επίπεδα  $graylevel [1, 2, \dots, L]$  και  $n_i$  έστω το πλήθος των εικονοστοιχείων που έχουν επίπεδο γκριζου τόνου  $i$  και  $N=n_1+n_2+\dots+n_L$  το συνολικό πλήθος των εικονοστοιχείων της εικόνας [36].

### 3.5 Εξαγωγή χαρακτηριστικών

Ως χαρακτηριστικό μπορεί να θεωρηθεί οποιοδήποτε μετρήσιμο μέγεθος που εξάγεται από μια εικόνα. Τα χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τα αντικείμενα και επομένως πρέπει να εκλέγονται κατάλληλα και ανάλογα με την περίπτωση. Ουσιαστικά, η περιγραφή αντικειμένων με χαρακτηριστικά, απεικονίζει τα αντικείμενα στο χώρο των χαρακτηριστικών με αποτέλεσμα, η αναγνώρισή τους να ισοδυναμεί με τη μέτρηση της ομοιότητας μεταξύ των χαρακτηριστικών των αντικειμένων. Ένα σύνολο από καλά χαρακτηριστικά πρέπει να ικανοποιεί τις ακόλουθες ιδιότητες: α) διακριτικότητα ώστε το σύνολο των χαρακτηριστικών να είναι ικανό να διαχωρίζει τα αντικείμενα μεταξύ τους, β) αξιοπιστία για να προκύπτουν ικανοποιητικά κοντινές τιμές για τα χαρακτηριστικά παρόμοιων αντικειμένων, γ) μικρό υπολογιστικό κόστος το οποίο ανάλογα με την εφαρμογή θα πρέπει να είναι ικανοποιητικά μικρό και δ) καλή προσαρμογή με τη διαδικασία ταξινόμησης αφού μετά την διαδικασία εξαγωγής

χαρακτηριστικών ακολουθεί το στάδιο ταξινόμησης σε συστήματα αναγνώρισης. Είναι πολύ χρήσιμο τα χαρακτηριστικά να είναι ανεξάρτητα της κλιμάκωσης, της περιστροφής και της μετατόπισης αλλά και να μην είναι ευαίσθητα στο θόρυβο. Οι σημαντικότερες κατηγορίες χαρακτηριστικών είναι τα χαρακτηριστικά χώρου, τα χαρακτηριστικά από μετασχηματισμό, τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, οι γεωμετρικές ροπές και τέλος τα χαρακτηριστικά υφής [37].

### **3.5.1 Χαρακτηριστικά χώρου**

Τα χαρακτηριστικά χώρου αφορούν μετρήσεις που βασίζονται στα πλάτη της εικόνας σε σχέση είτε με τις φωτεινότητες της, είτε με οποιαδήποτε άλλη μέτρηση φυσικών χαρακτηριστικών της εικόνας. Η μέση τιμή της φωτεινότητας στο παράθυρο είναι δυνατόν να θεωρηθεί ως ένα χαρακτηριστικό ενός αντικειμένου. Όσο αφορά το ιστόγραμμα, με τη χρήση του, μπορούν να εξαχθούν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση και άλλα πρόσθετα χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά ιστογράμματος βασίζονται στο ιστόγραμμα μιας περιοχής στην εικόνα. Η μορφή του ιστογράμματος μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για το χαρακτήρα της εικόνας. Για παράδειγμα ένα ιστόγραμμα με ένα στενό λοβό υποδηλώνει ότι έχουμε εικόνα χαμηλής αντίθεσης, ενώ ένα ιστόγραμμα με δύο ξεκάθαρους λοβούς, που απέχουν σημαντικά μεταξύ τους, σημαίνει ότι η εικόνα αυτή αποτελείται από αντικείμενα και φόντο τα οποία έχουν διαφορετικές αποχρώσεις του γκρι. Ένας άλλος τρόπος εξαγωγής χαρακτηριστικών για μια εικόνα είναι εκείνος με τη χρήση του δευτέρου βαθμού συνδεδεμένων πιθανοτήτων. Με αυτή τη μέθοδο προκύπτει ένας πίνακας ο οποίος ονομάζεται πίνακας συνεμφάνισης και με τη χρήση του μπορούμε να υπολογίσουμε διάφορα χαρακτηριστικά όπως η αυτοσυνέλιξη, η μεταβλητότητα, η απόλυτη τιμή και η αντίστροφη διαφορά [31].

### **3.5.2 Χαρακτηριστικά από μετασχηματισμό**

Ο μετασχηματισμός μας παρέχει πληροφορίες της εικόνας στο πεδίο της συχνότητας. Για τον άμεσο μετασχηματισμό μιας εικόνας μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε γνωστούς δισδιάστατους μετασχηματισμούς, όπως είναι ο διακριτός μετασχηματισμός Fourier αλλά και μετασχηματισμοί με καλύτερα χαρακτηριστικά συμπίεσης της πληροφορίας, όπως είναι ο διακριτός μετασχηματισμός συνημίτονου και δισδιάστατοι μετασχηματισμοί κυματιδίων. Οι μετασχηματισμοί συνημίτονου και κυματιδίων παρουσιάζουν καλύτερα χαρακτηριστικά συμπίεσης της πληροφορίας του σήματος. Γι αυτό τον λόγο, οι τιμές των συντελεστών των μετασχηματισμών αυτών περιέχουν σημαντική πληροφορία που τους καθιστούν σε πολλές περιπτώσεις ισχυρά χαρακτηριστικά.

Ένας απλός τρόπος εξαγωγής χαρακτηριστικών μπορεί να βασίζεται στη χρήση μασκών στο φάσμα. Οι μάσκες αυτές μπορεί να είναι ορθογώνιες, δακτύλιοι, τρίγωνα, κύκλοι κ.ά. Εξαγωγή χαρακτηριστικών μπορούμε να έχουμε είτε άμεσα στο φάσμα είτε αντιστρέφοντας το περιεχόμενο των μασκών και εξάγοντας χαρακτηριστικά στο πεδίο του χώρου. Στο πεδίο της

συχνότητας μπορούμε να εφαρμόσουμε σε κάθε μάσκα τεχνικές εξαγωγής χαρακτηριστικών, όπως περίπου αυτές που χρησιμοποιήσαμε στο πεδίο του χώρου. Είναι γνωστές ορισμένες ιδιότητες του φάσματος, όπως το ότι τα περιγράμματα και τα όρια απεικονίζονται σε υψηλές συχνότητες. Έτσι, χαρακτηριστικά που προκύπτουν από τις υψηλές συχνότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό ακμών και ορίων ενώ σχισματικές μάσκες υπό γωνία είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού αντικειμένων [31].

### 3.5.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά και ροπές

Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά προκύπτουν άμεσα από τη γεωμετρική μορφή των αντικειμένων. Το πρώτο είναι η περίμετρος και ορίζεται ως το μήκος του εξωτερικού περιγράμματος ενός αντικειμένου. Σε μια ψηφιακή εικόνα το χαρακτηριστικό της περιμέτρου μπορεί να ισούται απλά με το πλήθος των εικονοστοιχείων της περιμέτρου. Στη συνέχεια ακολουθεί η επιφάνεια η οποία σε μία ψηφιακή εικόνα είναι το πλήθος των εικονοστοιχείων από τα οποία αποτελείται ένα αντικείμενο. Ακολουθεί η μέγιστη και ελάχιστη ακτίνα που ορίζονται ως η μέγιστη και ελάχιστη απόσταση αντίστοιχα, του κέντρου μάζας του αντικειμένου από την περιφέρεια του ενώ μερικές φορές ο λόγος  $R_{max}/R_{min}$  λαμβάνεται ως επιπλέον χαρακτηριστικό για την εκκεντρότητα ή τη μήκυνση του αντικειμένου. Μετά ακολουθούν οι σπές, το πλήθος των οποίων σε ένα αντικείμενο μπορεί να ληφθεί ως ένα ισχυρό χαρακτηριστικό του. Μετά, είναι ο αριθμός Euler ο οποίος ορίζεται από τη μαθηματική σχέση ' $E = \text{πλήθος συνδεδεμένων περιοχών} - \text{πλήθος οπών}$ '. Τέλος είναι η καμπυλότητα ενός αντικειμένου η οποία ορίζεται από την εξής μαθηματική σχέση  $C = 4\pi A/P^2$ .

Οι γεωμετρικές ροπές μπορούν να θεωρηθούν ως ένα πολύ χρήσιμο σύνολο στατιστικών χωρικών χαρακτηριστικών των αντικειμένων. Η χρησιμότητα τους έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές εφαρμογές ανάλυσης εικόνων, σχημάτων και ανάκτησης εικόνων, όπως στην οπτική αναγνώριση χαρακτήρων. Υπάρχουν οι κανονικοποιημένες κεντρικές ροπές και οι κεντρικές ροπές όπου με βάση τις συντεταγμένες του κέντρου βάρους μπορούν να καθορισθούν ροπές που να είναι ανεξάρτητες από τη θέση των αντικειμένων [31].

### 3.5.4 Διακριτός μετασχηματισμός συνημίτονου

Εξαγωγή χαρακτηριστικών μπορεί να γίνει και με τον διακριτό μετασχηματισμό συνημίτονου που είναι αυτός που έχει την μεγαλύτερη χρήση στην επεξεργασία εικόνας και ιδιαίτερα στην περιοχή της συμπίεσης μιας εικόνας. Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά του μετασχηματισμού αυτού είναι, ότι μπορεί και συγκεντρώνει την περισσότερη από την ενέργεια του σήματος που μετασχηματίζεται σε λίγους μόνο συντελεστές κοντά στη 'dc' του συνιστώσα. Επειδή έχει την ιδιότητα να συμπιέζει την πληροφορία σε μικρό αριθμό συντελεστών είναι ένας πολύ κατάλληλος μετασχηματισμός για την εξαγωγή χαρακτηριστικών. Ο μονοδιάστατος διακριτός μετασχηματισμός συνημίτονου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή

χαρακτηριστικών από μονοδιάστατες καμπύλες όπως οι υπογραφές και τα ιστογράμματα ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα στις εικόνες ή σε τμήματα αυτών για την εξαγωγή χαρακτηριστικών.

Η υφή παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε πολλά θέματα τεχνητής όρασης όμως είναι από τα χαρακτηριστικά εκείνα που δεν είναι σαφώς διαχωρισμένα με τρόπο όπως για παράδειγμα είναι το χρώμα. Η κλίμακα με την οποία παρατηρούμε μια εικόνα καθορίζει το αν έχουμε εικόνα υφής ή όχι. Μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατηγοριοποίηση του περιεχομένου της εικόνας, αφού αναφέρεται στην παρουσία χωρικών οπτικών προτύπων μέσα σε αυτή που έχουν ιδιότητες ομοιογένειας. στις ψηφιακές εικόνες. Δεν υπάρχει αυστηρός ορισμός της υφής καθώς οι εικόνες είναι πίνακες εικονοστοιχείων, καθένα από τα οποία περιγράφεται από το χρώμα του. Στην περίπτωση των ασπρόμαυρων εικόνων κάθε στοιχείο περιγράφεται από έναν και μοναδικό αριθμό, την ένταση της φωτεινότητας στο συγκεκριμένο σημείο. Η υφή σχετίζεται με τα επίπεδα φωτεινότητας που εμφανίζονται στην εικόνα και τον τρόπο που αυτά κατανέμονται, ώστε να δίνεται η αίσθηση του τρισδιάστατου και του ανάγλυφου. Μικρομεταβολές στη φωτεινή ένταση των σημείων μιας εικόνας, εμφανιζόμενες με κάποιον συστηματικό τρόπο, χαρακτηρίζουν την υφή της. Η ανάλυση της υφής στις εικόνες είναι χρήσιμη σε έναν μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Η πιο άμεση εφαρμογή είναι η αναγνώριση περιοχών μιας εικόνας.

Μεταξύ όλων των στατιστικών μεθόδων εξαγωγής χαρακτηριστικών υφής η δημοφιλέστερη, που είναι βασισμένη στην εκτίμηση των δευτέρου βαθμού στατιστικών, είναι ο πίνακας συνεμφάνισης. Ο πίνακας συνεμφάνισης μπορεί να περιγράψει ιδιότητες υφής τέτοιες που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναπαράσταση και τη σύγκριση υφής. Τα βασικά χαρακτηριστικά που μπορούν να εξαχθούν από τον ομαλοποιημένο πίνακα συνεμφάνισης είναι η ενέργεια, η εντροπία, η αντίθεση, η ομοιογένεια και η συσχέτιση.

Μια άλλη μέθοδος είναι αυτή της αυτοσυσχέτισης, σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η υφή προσδιορίζεται από μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, η οποία περιγράφει το χωρικό μέγεθος των πρωταρχικών σχηματισμών της εικόνας. Μάλιστα, μεγάλοι σχηματισμοί είναι ενδεικτικοί μιας πιο τραχείας υφής, ενώ οι μικροί μιας πιο λεπτής υφής. Όταν οι πρωταρχικοί σχηματισμοί είναι σχετικά μεγάλοι, η τιμή της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης μειώνεται αργά σε σχέση με την απόσταση, ενώ αν είναι μικροί μειώνεται γρήγορα. Στην περίπτωση περιοδικών σχηματισμών, η αυτοσυσχέτιση αυξάνεται και μειώνεται με περιοδικό τρόπο. Για εικόνες αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενα σχήματα υφής, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης παρουσιάζει περιοδική συμπεριφορά με περίοδο ίση με το διάστημα μεταξύ γειτονικών στοιχείων της υφής. Όταν η υφή είναι χονδροειδής, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης 'πέφτει' αργά σε αντίθεση με την περίπτωση εκλεπτυσμένης υφής, όπου έχουμε γρήγορα πτώση.

Επίσης υπάρχουν τα χαρακτηριστικά υφής του Laws. Τα ενεργειακά μέτρα υφής, που προτάθηκαν από τον Laws, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές ως χαρακτηριστικά υφής. Είναι γνωστά ως φίλτρα μέτρησης της ενέργειας της υφής. Με τη χρήση όλων αυτών των φίλτρων μπορούν να εξαχθούν αρκετά χαρακτηριστικά υφής. Τα χαρακτηριστικά αυτά προκύπτουν από την συνέλιξη των μασκών με την εικόνα και τη μέτρηση

της ενέργειας που περιέχουν οι εικόνες που προκύπτουν. Τέλος υπάρχει η μέθοδος του φάσματος υφής η οποία βασίζεται στο ότι μια εικόνα μπορεί να αναλυθεί σε μονάδες υφής. Οι μονάδες υφής αποτελούνται από 9 στοιχεία, καθένα από τα οποία μπορεί να έχει τιμή (0,12) ανάλογα με την τιμή του κεντρικού στοιχείου  $V_0$  [38].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

### 4.1 Γενικές πληροφορίες

### 4.2 Κατηγορίες μικροσκοπίων

#### 4.2.1 Φωτονική μικροσκοπία

#### 4.2.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

### 4.3 Κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο διελεύσεως

### 4.4 Χρήση του οπτικού μικροσκοπίου διελεύσεως

Στην προσπάθειά μας να παρατηρήσουμε κύτταρα, ιστούς ή και ολόκληρους οργανισμούς, προκειμένου να τους μελετήσουμε, ερχόμαστε αντιμέτωποι με το φράγμα του μεγέθους. Τα κύτταρα δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι, με εξαίρεση ορισμένα απ' αυτά, όπως τα αυγά των ψαριών. Στην πραγματικότητα αδυνατούμε να παρατηρήσουμε αντικείμενα μικρότερα των 0,1 mm ( $10^{-4}$  m). Ήταν λοιπόν απαραίτητο να αναπτυχθούν κατάλληλα οπτικά μέσα, ώστε να υποβοηθείται το μάτι μας να «βλέπει» την οργάνωση των κυττάρων. Είναι άλλωστε γνωστό ότι μόνο με συνδυασμό της παρατήρησης των κυτταρικών δομών και της βιοχημικής ανάλυσης είναι δυνατή η αποκρυπτογράφηση της λειτουργικότητας της βασικής μονάδας της ζωής. Μόλις τον 17ο αιώνα κατασκευάστηκε το πρώτο φωτονικό μικροσκόπιο που επέτρεψε την παρατήρηση μικροοργανισμών. Από τότε βελτιώθηκε κατά πολύ η τεχνική κατασκευής μικροσκοπίων. Σήμερα μπορούμε να παρατηρήσουμε με τη χρήση φωτονικού μικροσκοπίου αντικείμενα διαμέτρου μέχρι και 0,1  $\mu\text{m}$  ( $10^{-7}$  m), ενώ με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το όριο παρατήρησης φθάνει το 1nm ( $10^{-9}$  m). Στα πρώτα απλά μικροσκόπια, ένας μόνο μεγεθυντικός φακός χρησίμευε για την απευθείας παρατήρηση του αντικειμένου. Στα σύγχρονα σύνθετα μικροσκόπια, ένας φακός (ο αντικειμενικός φακός) σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλο μέσα στο σωλήνα του μικροσκοπίου, ενώ ένας δεύτερος φακός (ο προσοφθάλμιος φακός) χρησιμοποιείται ως απλό μικροσκόπιο για την παρατήρηση του ήδη μεγεθυσμένου ειδώλου. Με τον τρόπο αυτό οι δύο φακοί συνεισφέρουν στην ολική μεγεθυντική ισχύ του οργάνου και έτσι η μεγεθυντική ισχύς του σύνθετου φωτονικού μικροσκοπίου μπορεί να αυξηθεί κατά πολύ, σε σχέση με εκείνη του απλού μικροσκοπίου [39].

## 4.1 Γενικές πληροφορίες

Ο λόγος του μεγέθους του ειδώλου προς το μέγεθος του αντικειμένου είναι αυτό που καλούμε μεγέθυνση. Η ποιότητα πάντως ενός μικροσκοπίου εξαρτάται κυρίως από την ικανότητά του να διακρίνει παρά να μεγεθύνει αντικείμενα. Διακριτική ικανότητα (resolution) είναι η δυνατότητα να βλέπουμε τα είδωλα δύο παρακείμενων σημείων ως δύο ξεχωριστές οντότητες. Για να γίνει κατανοητή η διαφορά μεταξύ διακριτικής ικανότητας και μεγέθυνσης σκεφτείτε το παράδειγμα που ακολουθεί: κάθε φωτογραφία είναι ένα ψηφιδωτό από πολύ μικρούς κόκκους (εικονοστοιχεία ή pixels). Οι λεπτομέρειες που μπορείτε να παρατηρήσετε σε μια συγκεκριμένη φωτογραφία δεν μπορεί να είναι ποτέ μικρότερες από το μέγεθος του κόκκου από τον οποίο συντίθεται. Όσο λοιπόν και να μεγεθύνετε τη φωτογραφία ποτέ δεν θα αποκτήσει εικόνα με μεγαλύτερη ευκρίνεια από αυτή του μικρού μεγέθους. Επομένως, η μεγέθυνση αναφέρεται στο μέγεθος ενώ η διακριτική ικανότητα στην ελάχιστη απόσταση δύο σημείων ώστε να μη συγχέονται.

Τα σύγχρονα φωτονικά μικροσκόπια μεγεθύνουν μέχρι 1.000 έως 2.000 φορές και η διακριτική τους ικανότητα (όριο) φτάνει τα 0,1  $\mu\text{m}$ . Η μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα για ένα φωτονικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιεί ορατή ακτινοβολία είναι περίπου 0,3  $\mu\text{m}$  με ξηρό αντικειμενικό φακό όπου παρεμβάλλεται ο αέρας μεταξύ παρασκευάσματος και φακού, και 0,2  $\mu\text{m}$  με καταδυτικό φακό, όπου παρεμβάλλεται ειδικό λάδι με δείκτη διάθλασης περίπου ίδιο με το φακό. Με υπεριώδη ακτινοβολία, η διακριτική ικανότητα αυξάνεται (0,1  $\mu\text{m}$ ) εξαιτίας του μικρότερου μήκους κύματος. Το όριο της διακριτικής ικανότητας καθορίζει και το ανώτατο όριο της αποδοτικής μεγέθυνσης που είναι δυνατή μ' αυτούς τους φακούς. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πάλι, η διακριτική ικανότητα είναι πολύ καλύτερη επειδή το μήκος κύματος ενός ηλεκτρονίου είναι πολύ μικρότερο από το μήκος κύματος ενός φωτονίου. Γενικά, η διακριτική ικανότητα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του φωτονικού μικροσκοπίου [39].

## 4.2 Κατηγορίες μικροσκοπίων

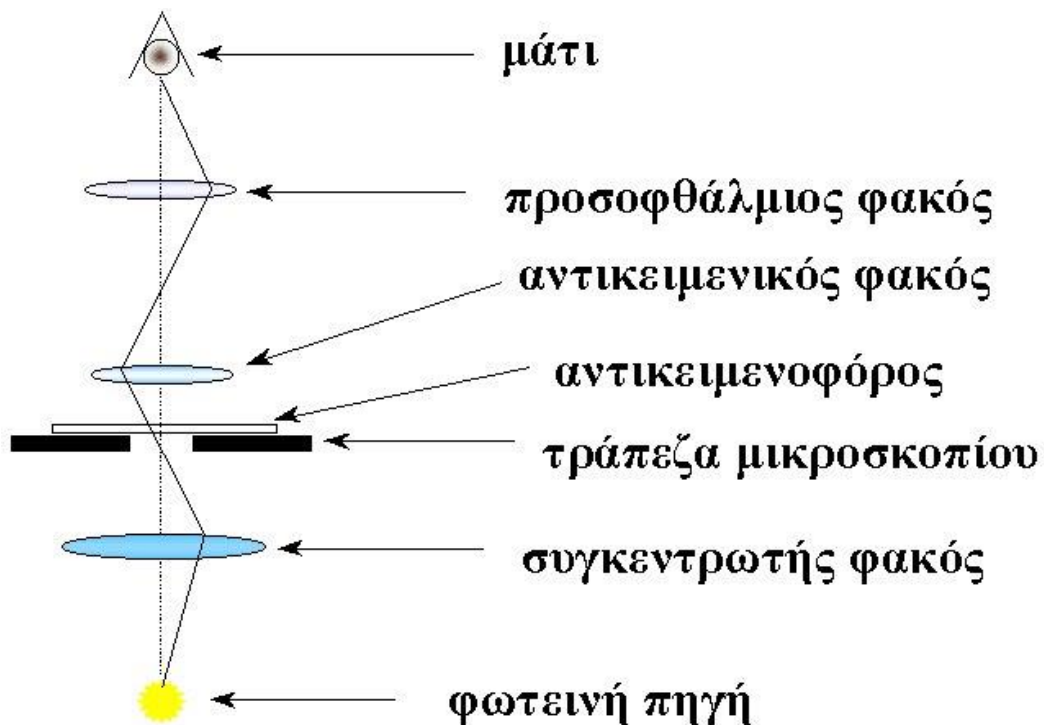
Σήμερα υπάρχουν δύο διακριτές κατηγορίες μικροσκοπίων, τα φωτονικά μικροσκόπια και τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια. Και οι δύο κατηγορίες μικροσκοπίων βασίζονται στις ίδιες αρχές για τον σχηματισμό του ειδώλου, μόνο που στο φωτονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιούνται γυάλινοι φακοί για να κατευθύνουν τη δέσμη των φωτονίων, ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται ένα σύστημα ηλεκτρομαγνητικών φακών για να εστιάσει τη δέσμη των ηλεκτρονίων.

### 4.2.1 Φωτονική μικροσκοπία

Ως Οπτικά ή Φωτονικά αναφέρονται τα μικροσκόπια εκείνα που χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 380-760 nm. Ανάλογα με τη



διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Η μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου δίνεται από το τύπο  $M = m1 * m2$  όπου  $m1$  και  $m2$  είναι οι εγκάρσιες μεγεθύνσεις των δυο φακών, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού [4]. Από τότε που ο Robert Hooke κατασκεύασε το πρώτο σύνθετο μικροσκόπιο μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις στο φωτονικό μικροσκόπιο. Ακολουθεί μια τυπική διάταξη των φακών και της πορείας των φωτεινών ακτίνων στο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.



**Εικόνα 4.** Διάγραμμα των φακών και πορείας των φωτεινών ακτίνων στο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

Ορισμένες από τις κύριες παραλλαγές του φωτονικού μικροσκοπίου είναι το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (bright-field microscope) το οποίο πρόκειται για την εξελιγμένη μορφή του μικροσκοπίου του Hooke. Είναι το κλασικό φωτονικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των φωτογραφιών της παρούσας διπλωματικής και θα αναλυθεί περισσότερο στη συνέχεια του κεφαλαίου. Στη συνέχεια υπάρχει το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου. Αυτό το μικροσκόπιο είναι ίδιο με το φωτεινού πεδίου με μόνη διαφορά ότι στο συγκεντρωτή φακό υπάρχει ένας αδιαφανής δίσκος που σκεπάζει το κέντρο του φακού με αποτέλεσμα το παρασκεύασμα να φωτίζεται μόνο από πολύ πλάγιες ακτίνες που δεν εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό παρά μόνο αν υποστούν διάθλαση μέσα στο παρασκεύασμα. Έτσι η εικόνα που παρατηρούμε είναι φωτεινό αντικείμενο (από διάθλαση των ακτίνων μέσα στο παρασκεύασμα) σε σκοτεινό πεδίο. Η πορεία των ακτίνων φαίνεται στην. Αυτό το είδος

μικροσκοπίου συνιστάται για τη παρατήρηση μονοκύτταρων οργανισμών που θέλουμε να τους παρατηρήσουμε ζωντανούς ή/και αχρωμάτιστους. Σήμερα τα μικροσκόπια αυτά έχουν επισκιαστεί από τα μικροσκόπια αντίθεσης φάσης [4]. Οι περιορισμένες δυνατότητες του κλασικού φωτονικού μικροσκοπίου οφείλονται και σε μερικές ενδογενείς ιδιότητες της ζωντανής ύλης. Τέτοιο μειονέκτημα είναι η διαφάνεια των περισσότερων κυτταρικών συστατικών στην ορατή φασματική περιοχή, με εξαίρεση μερικών χρωστικών, ιδιαίτερα φυτικών, που απορροφούν το φως ορισμένου μήκους κύματος. Αυτήν ακριβώς την αδυναμία καλύπτει το μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Στηρίζεται στην αρχή ότι καθώς οι ακτίνες του φωτός περνούν διαμέσου του βιολογικού υλικού επηρεάζονται από τις φυσικές του ιδιότητες και διαθλώνται, οπότε αλλάζει η φάση τους ανάλογα με τη σύσταση των περιοχών. Με το μικροσκόπιο αυτό οι διαφορές του δείκτη διάθλασης που έχουν οι περιοχές του παρασκευάσματος με διαφορετική σύσταση μετατρέπονται σε διαφορές έντασης του φωτός, που γίνονται αντιληπτές από το ανθρώπινο μάτι. Χρησιμοποιείται για την παρατήρηση ενδοκυτταρικών δομών σε ζωντανά κύτταρα [39].

Ακολουθεί το μικροσκόπιο φθωρισμού το οποίο βασίζεται στην αρχή ότι ορισμένες ενώσεις απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και την αποδίδουν ξανά ως ορατή ακτινοβολία (φθορισμός). Είναι παρόμοιο με το συμβατικό μικροσκόπιο εκτός από το ότι το προσπίπτον φως περνά από δύο ομάδες φίλτρων. Η πρώτη αφήνει να περάσουν μόνο τα μήκη κύματος που διεγείρουν τη φθορίζουσα ουσία, ενώ η δεύτερη ομάδα φίλτρων αφήνει να περάσει μόνο ο ειδικός φθορισμός που εκπέμπεται από τη φθορίζουσα ουσία [39]. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για τη παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών. Υπάρχουν στη φύση ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν όπως είναι η χλωροφύλλη, μερικά έλαια και κηροί. Αυτές οι ουσίες λέμε ότι εμφανίζουν "πρωτογενή φθορισμό" ή "αυτοφθορισμό". Οι περισσότερες όμως ουσίες ή κυτταρικές δομές που μας ενδιαφέρουν επιστημονικά δεν εμφανίζουν πρωτογενή φθορισμό. Έτσι αυτά τα παρασκευάσματα θα πρέπει να χρωματισθούν για να μας δώσουν φθορισμό. Στόχος είναι ο φθορισμός ορισμένων μόνο περιοχών, ουσιών ή οργανιδίων των παρασκευασμάτων. Ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι συνηθισμένες ιστολογικές χρωστικές. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν χρωσθεί με φθοριοχρώματα αναφέρεται ως δευτερογενής φθορισμός. Μια παραλλαγή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού είναι και η τεχνική 'sandwich' όπου το φθοριόχρωμα είναι ήδη συνδεδεμένο με ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο στη συνέχεια προσκολλάται στο πρωτογενές αντίσωμα. Από πλευράς κατασκευής το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το παρασκεύασμα μπορεί να φωτίζεται εκτός από το κλασικό τρόπο και με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι φακοί των μικροσκοπίων αυτών είναι ειδικής κατασκευής, από γυαλί που δεν εμφανίζει "αυτοφθορισμό", και έχουν χαραγμένη πάνω τους τη λέξη fluor ή ultrafluor, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και για παρατήρηση σε διάταξη φωτεινού πεδίου. Ακολουθεί το πολωτικό μικροσκόπιο το οποίο είναι ένα απλό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το παρασκεύασμα φωτίζεται με πολωμένο φως. Το αποτέλεσμα είναι να μπορούμε

να παρατηρήσουμε παρασκευάσματα που έχουν διαφορετική διαπερατότητα στο πολωμένο φως λόγω φαινομένων οπτικής ανισοτροπίας. Τα μικροσκόπια αυτά είναι χρήσιμα κυρίως για τη παρατήρηση τροφίμων, ορυκτών και γενικά παρασκευασμάτων που μας ενδιαφέρει η κρυσταλλική τους δομή. Χαρακτηριστικό των μικροσκοπίων αυτών είναι η κυκλική τράπεζα που μπορεί να περιστραφεί κατά  $360^{\circ}$  ενώ οι φακοί τους έχουν χαραγμένη τη λέξη POL. Στη συνέχεια υπάρχει το μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής. Το είδος αυτής της μικροσκοπίας βρίσκει περιορισμένες εφαρμογές συνήθως στη παρατήρηση κυτταρικών οργανιδίων χωρίς χρώση και οι εικόνες που βλέπουμε έχουν μια χαρακτηριστική ανάγλυφη εμφάνιση σε τόνους του γκρι. Είναι ένα είδος διαφορικής συμβολής χρησιμοποιώντας ειδικά πολωτικά πρίσματα τοποθετημένα σύμφωνα με τη σχεδίαση Nomarski. Αυτό το μικροσκόπιο αποτελεί εξέλιξη του μικροσκοπίου συμβολής ή συμβολομετρίας που η μόνη χρήση του ήταν η μέτρηση του όγκου κυττάρων και κυτταρικών οργανιδίων [4].

Ακολουθεί το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser του οποίου η αρχή λειτουργίας του πρωτοπεριγράφηκε από τον Minski το 1961 και βρίσκεται σε πολύ γρήγορη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια. Αντίθετα με το κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από  $10 \mu\text{m}$ , στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού ή ηλίου-νέου ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές, αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου και φυσικά μπορούν να ψηφιοποιηθούν για αποθήκευση ή εκτύπωση. Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες  $x$  και  $y$  αλλά και ως προς τον  $z$  με αποτέλεσμα να παίρνουμε καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το φθορισμό. Είναι αδύνατον να παρατηρηθούν φθορίζοντα παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των  $10 \mu\text{m}$  λόγω του δυνατού θορύβου από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος. τρισδιάστατες καλά εστιασμένες εικόνες που συγκρίνονται με εκείνες του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (ΗΜΣ) αλλά που να μας δείχνουν συγχρόνως και τη κατανομή των φθοριοχρωμάτων. Λόγω των πολλών εφαρμογών σχεδόν σε όλους τους τομείς, όλοι οι μεγάλοι κατασκευαστές μικροσκοπίων έχουν ήδη κατασκευάσει τέτοια μικροσκόπια τα οποία και βελτιώνονται συνεχώς [4].

Άλλες παραλλαγές του φωτονικού μικροσκοπίου είναι το, το βιντεομικροσκόπιο και το στερεοσκόπιο. Το στερεοσκόπιο βρίσκει εφαρμογές εκεί που χρειάζεται να παρατηρηθεί σε

μεγέθυνση η εξωτερική μορφολογία ενός αντικείμενου ή ιστού όταν χρησιμοποιείται προσπίπτων ή πλάγιος φωτισμός οργανισμού, ή και την εσωτερική μορφολογία διαφανών παρασκευασμάτων όταν αυτά φωτίζονται από κάτω. Τα στερεοσκόπια είτε έχουν αντικειμενικούς φακούς σταθερής εστιακής απόστασης (μεγέθυνσης) είτε μεταβαλλόμενης (zoom). Συνήθως τα όργανα αυτά μπορούν να μεγεθύνουν μέχρι περίπου 80X γιατί μεγαλύτερες μεγεθύνσεις έχουν πολύ μικρό βάθος εστίασης και επομένως οι εικόνες δε μπορούν πλέον να θεωρηθούν στερεοσκοπικές. Το παρασκεύασμα συνήθως δε χρειάζεται καμία προετοιμασία και μπορεί να παρατηρηθεί αρκεί να μπορεί να τοποθετηθεί στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου. Στα στερεοσκόπια ο φωτισμός του παρασκευάσματος μπορεί να γίνει και από πάνω και από κάτω. Τα πιο σύγχρονα στερεοσκόπια διαθέτουν και σύστημα φωτισμού με υπεριώδη ακτινοβολία για μετατροπή τους σε μικροσκόπια φθορισμού ενώ βρίσκουν εκτεταμένη εφαρμογή στη γεωπονία όπως είναι η μελέτη και προσδιορισμό εντόμων, μικρών καρπών, ασθενειών σε φυτά, πλαγκτονικών οργανισμών κλπ. Όσο αφορά το βιντεομικροσκόπιο αυτό έχει εξελιχθεί από τα διάφορα ενδοσκόπια που χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια στην ιατρική, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς είτε για τη πραγματοποίηση εγχειρήσεων. Η λειτουργία του στηρίζεται στη τεχνολογία των οπτικών ινών και των video cameras υψηλής ανάλυσης που δουλεύουν και με πολύ χαμηλό φωτισμό. Τα πλεονεκτήματά του είναι πολλά σε σύγκριση με το κλασικό οπτικό στερεοσκόπιο. Μερικά από αυτά είναι, η μεγέθυνση που μπορεί να είναι συνεχής, και κυμαίνεται από 1X - 1000X, το βάθος εστίασης που είναι τουλάχιστο δέκα φορές μεγαλύτερο εκείνου του οπτικού στερεοσκοπίου, λειτουργούν με χαμηλό φωτισμό, η κεφαλή του οργάνου μπορεί να μετακινηθεί προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι εικόνες στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευθούν σε μαγνητικό δίσκο ηλεκτρονικού υπολογιστή για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση εικόνας. Λόγω της αρκετά μεγάλης μεγέθυνσης, αλλά και καλής διακριτικής ικανότητας που έχουν αυτά τα όργανα πολλές φορές μπορούν να υποκαταστήσουν το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ) δεδομένου ότι αυτό σπάνια χρησιμοποιείται για τη παρατήρηση βιολογικών παρασκευασμάτων σε μεγεθύνσεις μεγαλύτερες της τάξης 1000X [4].

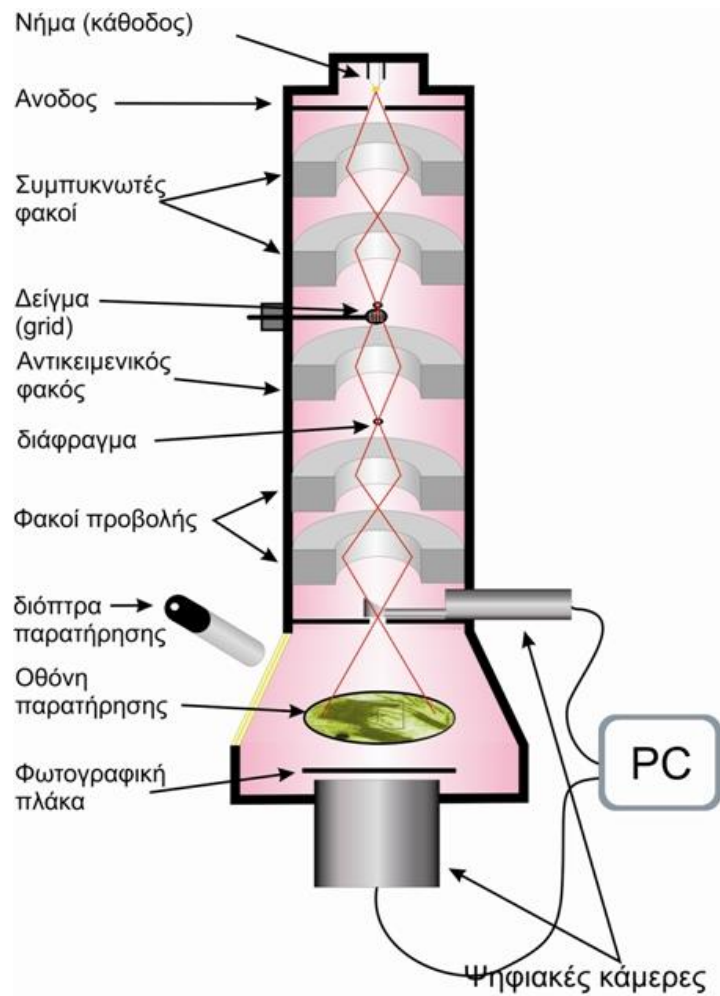
#### **4.2.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία**

Δύο είναι οι βασικοί τύποι ηλεκτρονικών μικροσκοπίων, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Χρησιμοποιούν δέσμη ηλεκτρονίων και τα δύο για το σχηματισμό του ειδώλου, αλλά διαφορετικούς μηχανισμούς.

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (transmission electron microscope) χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων τα οποία διαπερνούν το παρασκεύασμα. Η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από ένα νήμα βολφραμίου που όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα πυρακτώνεται και εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς στους οποίους αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει, μπορούμε

να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους και επομένως να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο υπό εξέταση αντικείμενο. Οι κυρίες ρυθμίσεις σε ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης επιτυγχάνονται με τον συγκεντρωτή φακό που εστιάζει τη δέσμη στο παρασκεύασμα, τον αντικειμενικό φακό που εστιάζει την εικόνα στην οθόνη και τον ενδιάμεσο φακό ή φακό προβολής για τη ρύθμιση της μεγέθυνσης. Η εικόνα σχηματίζεται πάνω σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού αυτά διαπεράσουν το παρασκεύασμα [40]. Το μεγάλο πλεονέκτημα του ΗΜΔ είναι η εξαιρετική διακριτική του ικανότητα (2 nm). Με το μικροσκόπιο αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθούν μεγεθύνσεις έως και  $\times 10^6$ , ενώ με τις ηλεκτρονιογραφίες επαυξάνεται η μεγέθυνση κατά 10 περίπου φορές. Ο σχηματισμός του ειδώλου εξαρτάται από την τοπική απορρόφηση ή σκέδαση της δέσμης των ηλεκτρονίων στο παρασκεύασμα, που έχει υποστεί μια εξειδικευμένη επεξεργασία ώστε ορισμένες περιοχές του έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα ηλεκτρονίων ενώ άλλες όχι. Οι περιοχές με μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων εμφανίζονται σκοτεινές γιατί λίγα ηλεκτρόνια τις διαπερνούν. Αντίθετα, άλλες περιοχές του παρασκευάσματος είναι ανοικτόχρωμες γιατί τις διαπερνούν περισσότερα ηλεκτρόνια [39].

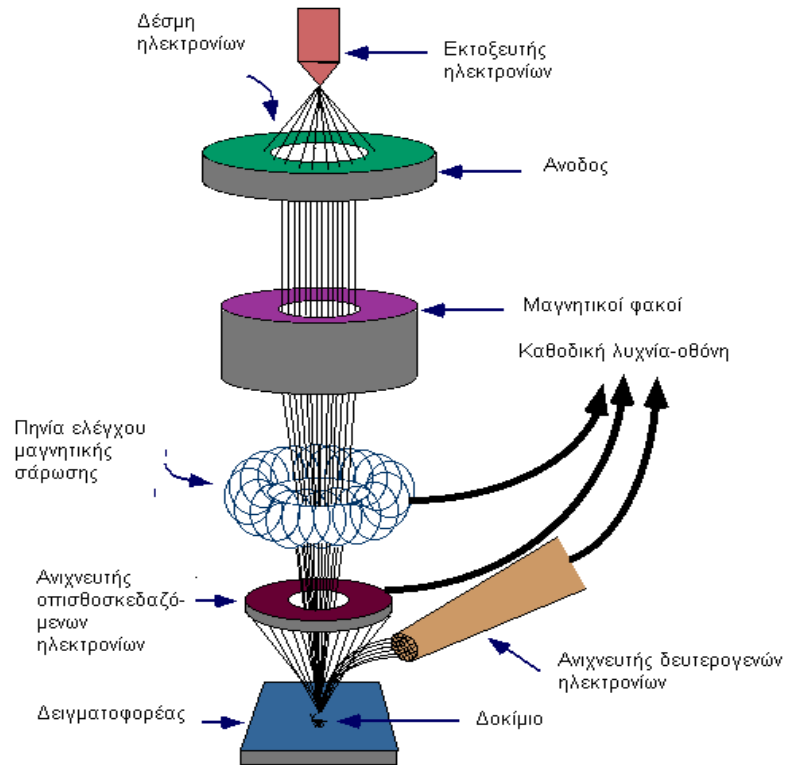
Ο τρόπος που λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούν να παρατηρηθούν. Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να παρατηρηθεί με το κλασικό ΗΜΔ θα πρέπει να αντέχει σε υψηλό κενό, να είναι σταθερό σε βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, να είναι λεπτό αρκετά ώστε να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια και να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων. Ένα βιολογικό δείγμα για να αποκτήσει τις πιο πάνω ιδιότητες θα πρέπει να υποβληθεί σε μία διαδικασία η οποία περιλαμβάνει αρχικά την μονιμοποίηση ή στερέωση ώστε να επιτευχθεί η ακινητοποίηση όλων των διαδικασιών του κυττάρου. Η μονιμοποίηση μπορεί να επιτευχθεί είτε με χημικούς είτε με φυσικούς τρόπους. Οι χημικοί τρόποι περιλαμβάνουν την επεξεργασία του δείγματος με ουσίες όπως οι αλδεΐδες ή άλλες ουσίες των οποίων η συγκέντρωση και Ρh πρέπει να είναι ρυθμισμένα με μεγάλη ακρίβεια. Οι φυσικοί τρόποι μονιμοποίησης χρησιμοποιούν γρήγορη ψύξη του δείγματος. Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να διατηρηθεί η δραστηριότητα ουσιών όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) ή οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια μετά τη μονιμοποίηση η διαδικασία περιλαμβάνει την αφυδάτωση. Σε αυτό το στάδιο γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκόολη ή ακετόνη. Ακολουθεί η εμπότιση ή έγκλειση όπου για να μπορέσει να κοπεί ένα βιολογικό παρασκεύασμα σε λεπτές τομές θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης να αντικατασταθεί με το μέσο έγκλεισης. Κατόπιν ακολουθεί η τμήση τομών που το δείγμα κόβεται σε πολύ λεπτές τομές πάχους 50-100 nm και τοποθετείται πάνω σε ειδικά πλέγματα τα οποία με τη σειρά τους τοποθετούνται στο ΗΜΔ. Τέλος υπάρχει η χρώση. Τα βιολογικά δείγματα συνήθως είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται είναι πολύ ελαφριά για να σκεδάσουν τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια και να δώσουν την απαιτούμενη αντίθεση. Για το λόγο αυτό χρειάζεται να τα 'χρωματίσουμε' με χημικές ουσίες που δεσμεύονται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας [41].



**Εικόνα 5.** Διάγραμμα των φακών και της πορείας των ηλεκτρονίων σε ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης.

Η ανάγκη να εξεταστεί το εσωτερικό του κυττάρου όπως ο πυρήνας και τα μιτοχόνδρια δημιούργησαν απαιτήσεις για πολύ μεγάλες μεγεθύνσεις. Έτσι προέκυψε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης ((scanning electron microscope) το οποίο επίσης χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως ώστε να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα [40]. Η διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονιακού μικροσκοπίου σάρωσης είναι 3-20 nm [39]. Σε αυτό το μικροσκόπιο όμως η δέσμη ηλεκτρονίων δεν διαπερνά το παρασκεύασμα αλλά σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του δείγματος και οι βασικές πληροφορίες που παίρνουμε αφορούν κυρίως τη μορφολογία και τη σύσταση της επιφάνειας. Όσο αφορά τα βασικά στάδια λειτουργίας ενός ΗΜΣ αυτά περιλαμβάνουν το σχηματισμό μιας δέσμης ηλεκτρονίων από τη πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού

δυναμικού, στη συνέχεια τη δημιουργία με τη χρήση μεταλλικού ανοίγματος, ηλεκτρομαγνητικού φακού και πηνίου σάρωσης μιας λεπτής εστιασμένης μονοχρωματικής δέσμης η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και τέλος της αλληλεπίδρασης δέσμης-δείγματος η οποία καταγράφεται από τους ανιχνευτές και μετατρέπεται σε εικόνα [40]. Καθώς η δέσμη των ηλεκτρονίων σαρώνει γρήγορα την επιφάνεια του δείγματος ορισμένα μόρια του διεγείρονται προς υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα και απελευθερώνουν δευτερογενή ηλεκτρόνια, που σχηματίζουν το είδωλο του δείγματος στην οθόνη [39].



**Εικόνα 6.** Διάγραμμα των φακών και της πορείας των ηλεκτρονίων σε ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

#### 4.3 Κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο διελεύσεως.

Η πρόοδος της ηλεκτρονικής και των μικροϋπολογιστών δεν άφησε ανέπαφη και τη μικροσκοπία. Τα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια διαθέτουν πλήθος αυτοματισμών και άλλων μηχανισμών που τα κάνουν πιο εύκολα στη χρήση ακόμα και από άτομα χωρίς ειδικές γνώσεις. Η χρήση όμως αυτών των μικροσκοπίων περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην έρευνα και τη διάγνωση στην ιατρική λόγω μεγάλου κόστους αγοράς και συντήρησης [4]. Το ουσιαστικό τμήμα του σύνθετου φωτονικού μικροσκοπίου είναι το οπτικό σύστημα που αποτελείται από δύο συγκλίνοντες ομοαξονικούς φακούς (ή σύστημα φακών), τον προσοφθάλμιο και τον

αντικειμενικό [39]. Ο προσοφθάλμιος φακός είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του σωλήνα. Υπάρχουν τέσσερις τύποι: Huygens, Ramsden, Kellner και αντισταθμιστικοί (compensating). Οι τελευταίοι είναι και οι πιο σύγχρονοι και επιτρέπουν την παρατήρηση χωρίς το μάτι να είναι σε επαφή με φακό. Ο χαραγμένος αριθμός π.χ. 10X δείχνει τη μεγέθυνση του φακού που αν τον πολλαπλασιάσουμε με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού μας δίνει την τελική μεγέθυνση του μικροσκοπίου. Σε όλους σχεδόν τους προσοφθάλμιους φακούς υπάρχει δυνατότητα τοποθέτησης κλίμακας μέτρησης μέσα στο φακό αφού τον ξεβιδώσουμε. Ο σωλήνας στην κορυφή του οποίου βρίσκεται ο προσοφθάλμιος φακός μπορεί να είναι μονός, στα μονοφθάλμια μικροσκόπια και διπλός στα διοφθάλμια για πιο άνετη παρατήρηση. Ο σωλήνας συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί για να τοποθετηθεί σωλήνας άλλου τύπου, για παράδειγμα σωλήνας με υποδοχή για φωτογραφική μηχανή video camera, ή να περιστραφεί για χρήση του μικροσκοπίου από εμπρός ή από πίσω [4].

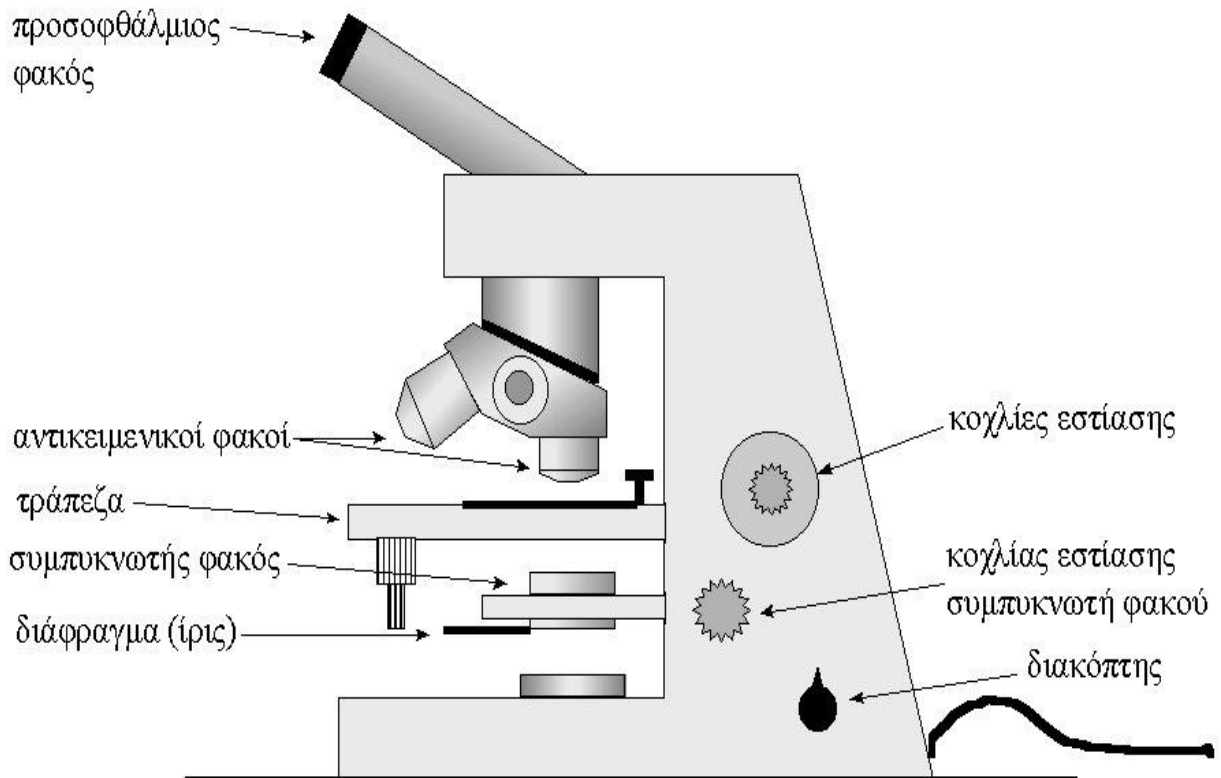
Ο αντικειμενικός φακός έχει μικρή εστιακή απόσταση και λίγο μακρύτερα από την εστία του τοποθετείται το προς παρατήρηση αντικείμενο. Το είδωλο που δίνει ο αντικειμενικός φακός είναι πραγματικό και ανεστραμμένο. Η απόσταση μεταξύ προσοφθάλμιου και αντικειμενικού φακού είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των εστιακών τους αποστάσεων, έτσι ώστε το είδωλο που τελικά βλέπει ο παρατηρητής είναι φανταστικό, μεγεθυσμένο είδωλο του πραγματικού ανεστραμμένου ειδώλου του αντικειμενικού φακού [39]. Ένα μικροσκόπιο συνήθως έχει θέσεις για 3 με 6 φακούς. Σε ορισμένα ερευνητικά μικροσκόπια η περιστρεφόμενη κεφαλή μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα και να αντικατασταθεί με άλλη που έχει διαφορετικό set φακών. Έτσι σχετικά εύκολα μπορεί το μικροσκόπιο να μετατραπεί σε αντίθεσης φάσης, φθορισμού κλπ. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τα πιο σημαντικά εξαρτήματα του συστήματος σχηματισμού εικόνας του μικροσκοπίου γιατί από αυτούς εξαρτάται η τελική διακριτική ικανότητα και η αρχική μεγέθυνση. Οι φακοί αυτοί έχουν κατασκευαστεί έτσι που οι εικόνες να μην έχουν σφαιρικά ή χρωματικά σφάλματα, και να μην έχουν αστιγματισμό. Επίσης έχουν χαραγμένες στο σώμα τους διάφορες ενδείξεις π.χ. Plan 40/0.65 160/0.17, που σημαίνει φακός επίπεδος μεγέθυνσης 40X, αριθμητικό άνοιγμα 0.65, για χρήση σε μικροσκόπιο με σωλήνα μήκους 160 mm, και με καλυπτρίδα πάχους 0.17+0.01 mm. Η ένδειξη  $d=0$  σημαίνει ότι ο φακός είναι σχεδιασμένος για να χρησιμοποιείται χωρίς καλυπτρίδα. Το χρώμα των γραμμών και συμβόλων που είναι χαραγμένα πάνω στον αντικειμενικό φακό επίσης είναι ενδεικτικά του οπτικού τύπου του φακού π.χ. κόκκινα γράμματα συμβολίζουν φακό για πολωμένο φως ενώ πράσινα γράμματα συμβολίζουν φακό αντίθεσης φάσης. Πολλές φορές ο τύπος του φακού και η μεγέθυνσή του συμβολίζονται και με χρωματιστά δαχτυλίδια χαραγμένα πάνω τους [4].

Το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου είναι προσαρμοσμένο και ενσωματώνεται λειτουργικά σε ένα μηχανικό σύστημα-φορέα. Αυτό συγκροτείται από τη βάση, που στηρίζει το όλο όργανο, τον οπτικό σωλήνα, που έχει προσαρμοσμένους τους φακούς, την τράπεζα, που είναι κινητή και στην οποία τοποθετείται το αντικείμενο, και τον βραχίονα, που φέρει δύο κοχλίες, τον μεγάλο, που λέγεται αδρός και μέσα σ' αυτόν τον μικρό, που λέγεται μικρομετρικός [42].



Η τράπεζα έχει ένα κυκλικό άνοιγμα που επιτρέπει να περνούν οι φωτεινές ακτίνες ώστε να φωτίζεται το αντικείμενο. Το διερχόμενο φως προέρχεται από λαμπτήρα που βρίσκεται ενσωματωμένος στη βάση του οργάνου και η έντασή του ρυθμίζεται με ροοστάτη. Το αντικείμενο σταθεροποιείται στην τράπεζα με ένα ειδικό πίεστρο εφοδιασμένο με κλίμακα. Η μετακίνηση του αντικειμένου επάνω στην τράπεζα είναι δυνατή προς δύο κατευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους (δεξιά/αριστερά - πάνω/κάτω) και πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος κοχλιών [42]. Η τράπεζα του μικροσκοπίου μπορεί να είναι τετράγωνη σταθερή ή στρογγυλή περιστρεφόμενη (για πολωτικά μικροσκόπια) και με σύστημα μικρομετρικών κοχλιών για τη μετακίνηση του παρασκευάσματος. Το υλικό κατασκευής της τράπεζας είναι συνήθως κάποιο μέταλλο ενώ σε κάποια σύγχρονα μικροσκόπια μπορεί να είναι από κεραμικό που είναι ανθεκτικό σε διάφορες διαβρωτικές ουσίες. Σε ορισμένα μικροσκόπια υπάρχει μηχανισμός αυτόματης μετακίνησης της αντικειμενοφόρου πλάκας με δυνατότητα συστηματικής σάρωσής της ή και ακόμα με τη δυνατότητα εναλλαγής αντικειμενοφόρων πλακών. Τα συστήματα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε αυτοματοποιημένες αιματολογικές και κυτταρολογικές εξετάσεις και βιοψίες [4].

Ο αδρός κοχλίας χρησιμοποιείται για να ανεβοκατεβάξει την τράπεζα (μεγάλη μετατόπιση) όταν εστιάζουμε κάτω από μικρή μεγέθυνση (4X ή 10X), ενώ η περιστροφή του μικρομετρικού κοχλίου οδηγεί σε μικρή μόνο μετατόπιση της τράπεζας και χρησιμοποιείται σε όλες τις μεγεθύνσεις προκειμένου να γίνει ευκρινέστερο το είδωλο. Κάτω από το κυκλικό άνοιγμα της τράπεζας βρίσκεται ένα εξάρτημα που σε μερικά μικροσκόπια κινείται κατακόρυφα με τη βοήθεια κοχλίου, ενώ σε άλλα είναι σταθερό. Πρόκειται για το φωτιστικό σύστημα Abbe, ένα σύνθετο σύστημα που συγκροτείται ουσιαστικά από τον συμπυκνωτή φωτός και το διάφραγμα-ίριδα, συχνά δε συνοδεύεται και από ένα φορέα φίλτρων. Ο συμπυκνωτής αποτελείται από σύστημα βοηθητικών φακών με διάφορο αριθμητικό άνοιγμα και σχετική ανεξαρτησία κινήσεων, ώστε να συνδυάζονται κατά περίπτωση και να εξασφαλίζουν συνολικά τη ροή περισσότερων φωτεινών ακτινών μέσα από το αντικείμενο. Το διάφραγμα, με μεταβαλλόμενη διάμετρο, επιτρέπει την αυξομείωση του φωτισμού ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο αντικειμενικό, το πάχος του αντικειμένου κ.λπ [42]. Η ίριδα περιορίζει τον φωτεινό κώνο που φωτίζει το παρασκεύασμα έτσι που αυτό να δέχεται τις ακτίνες που δεν προέρχονται από περίθλαση ή διάθλαση. Η ίριδα δεν πρέπει ποτέ να χρησιμοποιείται για την αύξηση ή ελάττωση της φωτεινής έντασης ενώ ο συγκεντρωτής (ή συμπυκνωτής) φακός χρησιμοποιείται για την εστίαση της φωτεινής πηγής στο επίπεδο του παρασκευάσματος. Η κακή ρύθμιση του συμπυκνωτή έχει σαν αποτέλεσμα τον κατά πολύ περιορισμό της διακριτικής ικανότητας του οργάνου [4].



**Εικόνα 7.** Τα τμήματα ενός σύγχρονου οπτικού μικροσκοπίου.

#### 4.4 Χρήση του οπτικού μικροσκοπίου διελεύσεως

Η διαδικασία της χρήσης του οπτικού μικροσκοπίου ξεκινάει με τη τοποθέτηση στη θέση μικροσκόπησης του αντικειμενικού φακού με τη μικρότερη μεγέθυνση (4X). Ακολουθεί το άνοιγμα της φωτεινής πηγής του μικροσκοπίου και το άνοιγμα του διαφράγματος ώστε να περνά το φως. Ο φωτεινός κύκλος που παρατηρείται μέσα από το προσοφθάλμιο φακό ονομάζεται οπτικό πεδίο. Στην συνέχεια γίνεται τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας με το παρασκεύασμα στην τράπεζα του μικροσκοπίου και γίνεται σταθεροποίηση του με το ελατηριωτο άγκιστρο που υπάρχει δεξιά. Με τη βοήθεια των κατακόρυφων κοχλίων μπορεί να γίνει μετακίνηση της τράπεζας εργασίας ώστε το παρασκεύασμα να βρεθεί στο κέντρο του οπτικού πεδίου. Ακολουθεί οπτική παρατήρηση από το χρήστη ο οποίος με το ένα μάτι βλέπει μέσα από το προσοφθάλμιο φακό και περιστρέφει τον μακρομετρικό κοχλία μέχρι να μπορεί να δει καθαρά το παρασκεύασμα. Ο φακός πρέπει να απέχει περίπου 1mm από το παρασκεύασμα. Στη συνέχεια γίνεται εστίαση με τον μικρότερο κοχλία μέχρι να φανεί όσο το δυνατόν πιο καθαρά το παρασκεύασμα. Αν ο χρήστης επιθυμεί να παρατηρήσει με μεγαλύτερη μεγέθυνση μπορεί να περιστρέψει τον φορέα αντικειμενικών φακών διαδοχικά (10X, 40X) και μετά να εστιάσει με μικρές κινήσεις κάνοντας χρήση μόνο του μικρότερου κοχλία. Ακολουθεί ρύθμιση του διαφράγματος, καθώς όσο γίνεται χρήση μεγαλύτερων μεγεθύνσεων τόσο μεγαλύτερη ανάγκη για φωτισμό προκύπτει. Τέλος όταν ολοκληρωθεί η μικροσκοπική παρατήρηση γίνεται

επαναφορά του φορέα αντικειμενικών φακών στο μικρότερο φακό (4X), σβήνει η φωτινή πηγή και γίνεται απομάκρυνση του παρασκευάσματος από τη τράπεζα και καθαρισμός των φακών [43].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

5.1 Η έννοια και η σημασία της μετάπλασης

5.2 Αιτιολογία

5.3 Προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος και ανίχνευση

5.3.1 Το Pap test

5.3.2 Κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων του pap test

5.4 Βασικά στατιστικά μέτρα απόδοσης του pap test

5.4.1 Ευαισθησία και ειδικότητα

5.4.2 Ορθότητα και ακρίβεια

5.4.3 Θετική και αρνητική προγνωστική αξία

5.4.4 Καμπύλη ROC

5.4.5 Επισκόπηση μελετών απόδοσης για το pap test

5.5 Τεχνικές ενίσχυσης του pap test

5.6 Τύποι κυττάρων στο pap test

5.6.1 Φυσιολογική κυτταρολογία και καλοήθεις αντιδραστικές αλλοιώσεις

5.6.2 Μεταπλασία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας πρέπει ασφαλώς να θεωρηθεί με βάση το συνολικό ποσοστό περιστατικών καρκίνου και το μέγεθος που έχει προσλάβει το συγκεκριμένο φαινόμενο για την ανθρώπινη ζωή γενικότερα. Για να γίνει αντιληπτή η σημασία του καρκίνου (από όποια αιτία και αν προέρχεται), αρκεί να αναφερθεί πως το 2008 συνέβησαν περίπου 12.7 εκατομμύρια περιστατικά καρκίνου και 7.6 εκατομμύρια θάνατοι, με ποσοστά των 56% και 64% αντίστοιχα να λαμβάνουν χώρα σε οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες. Ειδικότερα όσον αφορά στην περίπτωση περιστατικών καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ιδιαίτερα σημαντική είναι η κατάταξη που παρουσιάζει η συγκεκριμένη αιτιολογία για τις γυναίκες, με το καρκίνο του

μαστού να συγκεντρώνει την πλειονότητα των περιστατικών τόσο στις οικονομικά ανεπτυγμένες όσο και στις οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και του πνεύμονα να ακολουθεί στην περίπτωση των αναπτυσσόμενων χωρών. Χαρακτηριστική είναι η ακόλουθη εικόνα, στην οποία φαίνεται η κατάταξη των γυναικείων καρκινικών αιτιών σε παγκόσμια κλίμακα, επισημαίνοντας κάθε φορά τη θέση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στη σχετική λίστα. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την τρίτη αιτία διάγνωσης καρκίνου και την τέταρτη αιτία θανάτων λόγω καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα στο γυναικείο πληθυσμό. Πάνω από το 85% των περιπτώσεων και των θανάτων συμβαίνουν στις αναπτυσσόμενες χώρες με την Ινδία να συγκεντρώνει το ποσοστό του 27% του συνόλου των θανάτων. Οι υψηλότερες αναλογίες περιστατικών εμφανίζονται στην Ανατολική, Δυτική και Νότια Αφρική, όπως επίσης και στη Νότια – Κεντρική Ασία και στην Νότια Αμερική. Στον αντίποδα, τα χαμηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στη Δυτική Ασία, στην Αυστραλία, στη Νέα Ζηλανδία αλλά και στη Βόρεια Αμερική. Η εμφάνιση υψηλών ποσοστών καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε περιοχές με χαμηλή ποιότητα ιατρικών υπηρεσιών σχετίζεται με την έλλειψη προληπτικού ελέγχου και τη μη υποστήριξη των σχετικών δοκιμών. Ενδεικτικό αυτής της διαπίστωσης είναι το γεγονός ότι η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα στις ΗΠΑ είναι περίπου το ήμισυ αυτών για τον υπόλοιπο κόσμο και οφείλεται κυρίως στην επιτυχία του προληπτικού πληθυσμιακού ελέγχου με το test Pap [44].

### **5.1 Η έννοια και η σημασία της μετάπλασης**

Ως μεταπλασία ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία ένας τύπος επιθηλίου μετατρέπεται σε ένα άλλο. Πρόκειται για ένα συνηθισμένο φαινόμενο που ακολουθεί μια ορμονική αλλαγή ή ερέθισμα. Αφορά πολλά και διαφορετικά μέρη του σώματος, ενώ όσον αφορά στον τράχηλο της μήτρας οι μεταπλαστικές αλλαγές περιλαμβάνουν μετατροπή του αδενικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου σε πλακώδες επιθήλιο, με το ερέθισμα να είναι η έκθεση του αδενικού επιθηλίου στο όξινο pH του κόλπου. Δύο είδη επιθηλίων του τραχήλου της μήτρας είναι το κυλινδρικό-αδενικό και το πλακώδες και συναντώνται στη θέση που ονομάζεται αδενοπλακώδης συμβολή (ΑΠΣ - squamocolumnar junction) και η οποία ποικίλει κατά τη διάρκεια της ζωής εξαιτίας των τεκταινόμενων μεταπλαστικών αλλαγών. Έτσι, ενώ πριν την εφηβεία η ΑΠΣ συνήθως βρίσκεται στο έξω τραχηλικό στόμιο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας και λόγω της επιδράσεως των οιστρογόνων στις κολλαγόνες ίνες του τραχήλου, ένα μέρος του κατώτερου ενδοτραχηλικού σωλήνα εκστρέφεται προς τον εξωτράχηλο δημιουργώντας τη «ζώνη μεταπτώσεως», την περιοχή στην οποία αρχίζει η καρκινογένεση στον τράχηλο της μήτρας [44,45].

## 5.2 Αιτιολογία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά στον προσδιορισμό των αιτιών του, μια διαδικασία η οποία συνεχίζεται ακόμα και σήμερα. Εντούτοις, δεν έχει αναδειχθεί ένα συγκεκριμένο αίτιο ως αποκλειστικός παράγοντας της νόσου. Αντίθετα, οι μελέτες έχουν αναδείξει τη δράση ενός συνδυασμού παραγόντων. Ο ιός Human Papilloma Virus (HPV) είναι ένας από τους βασικότερους. Ο συγκεκριμένος ιός ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των papilloma viruses, τα κυριότερα χαρακτηριστικά των οποίων είναι το μικρό τους και χωρίς εξωτερικό περίβλημα μέγεθος, η κοινή γενετική τους δομή, το κυκλικό διπλής έλικας DNA που περιέχει κατά κύριο λόγο οκτώ περιοχές κωδικοποίησης (εν δυνάμει γονίδια) και η ιδιότητά τους να προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων, προκαλώντας πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα έγκειται και η σχέση του συγκεκριμένου ιού με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [46].

Η δομή του ιού είναι εικοσαεδρική, με διάμετρο μεταξύ 52nm και 55nm. Στο εσωτερικό του περιέχει ένα διπλής έλικας DNA, με περίπου 8.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων (base pairs, bp). Το καψίδιο του συνίσταται από δύο δομικές πρωτεΐνες, L1 και L2, που κωδικοποιούνται από το DNA. Το γενετικό υλικό αντιπροσωπεύεται από τα γονίδια του ιού, των οποίων η λειτουργική περιοχή χωρίζεται σε τρία μέρη, την πρώιμη περιοχή (E, early) που καταλαμβάνει το 50% περίπου του DNA και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες E1 έως E7 οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή του ιού. Την όψιμη περιοχή (L, late) που καταλαμβάνει περίπου το 40% του DNA και κωδικοποιεί την κύρια πρωτεΐνη καψιδίου L1 (major capsid protein) και τη δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου L2 (minor capsid protein), οι οποίες απαιτούνται για τη συγκέντρωση του ιού. Τέλος ένα ευρύ, μη κωδικοποιημένο τμήμα που αναφέρεται ως long control region (LCR) ή non-coding region (NCR) ή upstream regulatory region (URR) και σχετίζεται με την αναπαραγωγή του ιού [44].

Ο ιός έχει διάφορους τύπους, δηλαδή διάφορες μεταλλάξεις του ιού οι οποίοι είναι δυνατό να απομονωθούν. Στην περίπτωση των ανθρώπων, ο αριθμός τους υπερβαίνει τους 100, μέγεθος το οποίο μεγαλώνει κατά πολύ αν συνυπολογιστούν απομονώσεις μερών της γενετικής ακολουθίας. Για να θεωρηθεί ένας τύπος διαφορετικός από τους ήδη υπάρχοντες θα πρέπει να καταγραφεί το σύνολο του γενετικού του κώδικα και ταυτόχρονα η ακολουθία του γονιδίου L1 (που δείχνει και τη μεγαλύτερη σταθερότητα στη διατήρησή της) να διαφέρει περισσότερο από 10% από τον πιο κοντινό γνωστό τύπο. Στην περίπτωση που η διαφορά είναι μεταξύ 2% και 10% ορίζεται ένας υποτύπος (subtype), ενώ για διαφορές μικρότερες του 2% ορίζεται μια παραλλαγή (variant). Η ομαδοποίηση των τύπων γίνεται με βάση την ομοιότητα στο γενετικό τους κώδικα και συνεπάγεται ανάλογη ομοιότητα στις ιδιότητες που παρουσιάζουν. Οι πιο υψηλόβαθμες ομάδες τύπων του ιού ονομάζονται «γέννη» (genus), με τύπους από διαφορετικά γένη να παρουσιάζουν συνολική ομοιότητα από 23% έως 43%, ενώ ο διαχωρισμός κάθε γένους γίνεται σε «είδη» (species), με τα διαφορετικά είδη ενός γένους να παρουσιάζουν ομοιότητα από 60% έως 70% στην ταύτιση του DNA. Μέχρι σήμερα έχουν σχηματιστεί 16 γένη που αναγνωρίζονται

με βάση τα ελληνικά γράμματα. Εκείνο το γένος το οποίο σχετίζεται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, είναι το πρώτο (Alpharapillomaviruses) [46].

Η παρουσία πολλών τύπων HPV σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μια μικρή όμως ομάδα ευθύνεται σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά για τη συγκεκριμένη νόσο, τουλάχιστον συγκριτικά με τους υπολοίπους. Ειδικότερα, οι HPV16 (στα καρκινώματα πλακώδους επιθηλίου) και HPV18 (στα αδενοκαρκινώματα τραχήλου) ευθύνονται για το 70% περίπου των διαγνώσεων καρκίνου της μήτρας, σε ποσοστά 50% και 20% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, οι δύο παραπάνω τύποι σε συνδυασμό με τους HPV31 και HPV45 καλύπτουν περισσότερο απ' το 80% των διαγνώσεων καρκίνου της μήτρας [44]. Εκείνο που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι η άμεση σχέση του ιού HPV και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το ιατρικώς αποδεκτό πρότυπο, που έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Κοινωνία Καρκίνου (American Cancer Society), είναι ότι η ασθενής πρέπει να έχει μολυνθεί από τον HPV για να αναπτύξει καρκίνο τραχήλου [47].

Στο αρχικό στάδιο ο ιός μολύνει τα κύτταρα των επιθηλιακών ιστών (συνήθως στη ζώνη μετάπλασης) μέσω μικρών εκδορών ή άλλων επιθηλιακών τραυμάτων που προσβάλλουν τομείς της βασικής μεμβράνης. Ακολούθως, τα γονίδια του ιού μεταφέρονται στον πυρήνα του ξενιστή και αντιγράφονται μαζί με το υπόλοιπο «υγιές» γονιδίωμα του ξενιστή, ακολουθώντας τη διαδικασία μεταγραφής και μετάφρασης του κύτταρου – ξενιστή, με αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας ζωής του ιού. Με την προσβολή αυξάνονται πρώτα οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών E1 και E2, μέχρι να γίνει η ενσωμάτωση στον ξενιστή, οπότε και αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών E6 και E7 πρωτεϊνών, αύξηση η οποία συνεπάγεται και την ανάλογη αδρανοποίηση δύο άλλων βασικών πρωτεϊνών καταστολής όγκων, της p53 από την E6 και της pRb από την E7 αντίστοιχα [48]. Εξαιτίας της αδρανοποίησης της p53 δεν είναι δυνατό να παρεμποδιστεί ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οπότε και η περαιτέρω μόλυνσή τους. Επιπρόσθετα, με την αδρανοποίηση του ρετινοβλαστώματος pRb απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F, ενισχύοντας το συγκεκριμένο πολλαπλασιασμό. Τα γονίδια L1 και L2 συμμετέχουν στη διαδικασία, ενθουλακώνοντας το γονιδίωμα του ιού σε ένα καψίδιο για να το προστατεύσουν, σταθεροποιώντας έτσι το ιϊκό φορτίο. Ο χρόνος βέβαια που απαιτείται για να οδηγήσει μια λοίμωξη σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ποικίλει σε αρκετούς μήνες ή και χρόνια [44, 48].

Εκτός από την παρουσία του ιού HPV ένα πλήθος άλλων παραγόντων σχετίζεται με την εκδήλωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι παράγοντες αυτοί είναι, η σεξουαλική δραστηριότητα που πρόκειται για έναν παράγοντα που διαδραματίζει βασικό ρόλο όσον αφορά στη μετάδοση του ιού HPV και στην έναρξη της διαδικασίας μόλυνσης. Η χρήση αντισυλληπτικών σκευασμάτων που αν και πρόκειται για έναν αμφιλεγόμενο παράγοντα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης πολλές έρευνες οδήγησαν στον συμπέρασμα πως η παρατεταμένη χρήση αντισυλληπτικών αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, εφόσον έχει προηγηθεί μόλυνση με κάποιον από τους τύπους του ιού HPV που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί και το κάπνισμα, η γενικότερη σχέση

καπνίσματος και καρκίνου έχει στοιχειοθετηθεί πολλές φορές. Δε μπορεί λοιπόν παρά να έχει σχέση και με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με τα παράγωγα της νικοτίνης να έχουν ανιχνευθεί μέσα στην τραχηλική βλέννη. Επίσης, ο συνδυασμός του με την παρουσία του ιού HPV μπορεί να επιτείνει τη διαδικασία δημιουργίας κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων. Άλλος παράγοντας είναι τα μικρόβια και οι μικροοργανισμοί. Η διαδικασία της καρκινογένεσης μπορεί να ενισχυθεί από την παρουσία μικροβιακών παραγόντων όπως η τριχομονάδα του κόλπου, ο έρπης των γεννητικών οργάνων και τα χλαμύδια. Τέλος η μη επαρκής λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος που μπορεί να οφείλεται σε άλλες νόσους οι οποίες το έχουν καταστήσει ανεπαρκές να αντιμετωπίσει ακόμα και τύπους του ιού HPV που ανήκουν στις ομάδες χαμηλού κινδύνου. Εκείνο το σημείο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι κοινή συνιστώσα όλων των προαναφερόμενων παραγόντων είναι η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, με τις άλλες αιτίες να ενισχύουν τη διαδικασία καρκινογένεσης [45, 49].

### **5.3 Προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος και ανίχνευση**

Ο προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος αποτελεί μέρος της διαδικασίας πρόληψης στη δευτερογενή της μορφή με βασικό στόχο να ανιχνευθούν τυχόν προκαρκινικές αλλοιώσεις, πριν εκδηλωθούν τα όποια συμπτώματα, καθιστώντας έτσι τα screening tests ένα αποτελεσματικό «εργαλείο» στην καταπολέμηση της νόσου, επιβεβαιώνοντας περίτρανα την αξία του «προλαμβάνειν» έναντι του «θεραπεύειν» [44].

#### **5.3.1 Το Pap test**

Πρόκειται για το screening test με τη μεγαλύτερη περίοδο εφαρμογής και δοκιμών αφού μόνο για την περίπτωση της Αμερικής χρησιμοποιείται τουλάχιστον για 40 έτη και ευθύνεται για τη μείωση των θανάτων εξαιτίας καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά 74%. Ανακαλύφθηκε από τον ιατρό Γεώργιο Παπανικολάου, ο οποίος διακρίνοντας ότι καρκινικά κύτταρα μπορούσαν να παρατηρηθούν στις κολπικές εκκρίσεις από γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, δημοσίευσε το 1943 το άρθρο «Διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από το κολπικό επίχρισμα». Βασικός του μηχανισμός είναι η αφαίρεση δείγματος επιθηλιακών κυττάρων από τον τράχηλο της μήτρας με μια σπάτουλα και από τον ενδοτραχηλικό σωλήνα με ένα βουρτσάκι, έτσι ώστε να συλλεχθούν όλες οι κατηγορίες κυττάρων της περιοχής (πλακώδη, αδενικά και μεταπλαστικά). Τα κύτταρα στη συνέχεια τοποθετούνται σε γυάλινα πλακίδια όπου στερεώνονται με χρήση σπρέι ή διαλύματος αλκοόλης για να εξεταστούν στη συνέχεια στο μικροσκόπιο. Τα τελευταία χρόνια η διαδικασία έχει διαφοροποιηθεί με τη χρήση του thin prep Pap test για την ταυτόχρονη συλλογή πλακωδών και αδενικών κυττάρων. Ακολουθώντας, το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό φιαλίδιο με υγρό διαλύτη και ανακατεύεται, στη συνέχεια τα κύτταρα στρώνονται σε γυάλινο πλακίδιο, αποδίδοντας καλύτερη παρατήρηση από το μικροσκόπιο καθώς αποφεύγονται φαινόμενα αλληλοεπικάλυψης [45].



### 5.3.2 Κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων του pap test

Η κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων του pap test, βασίζεται στο σύστημα Bethesda και έχει ως εξής ανάλογα με τα εκάστοτε ευρήματα. 1) Κατηγορία WNL (within normal limits), η οποία αφορά παθολογικά ευρήματα εντός φυσιολογικών ορίων. 2) Καλοήθεις κυτταρικές αλλοιώσεις, φλεγμονή και αντιδραστικές αλλοιώσεις. 3) Κατηγορία ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) ή «άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας». Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν κύτταρα στα οποία έχει βρεθεί κάποια ατυπία, χωρίς όμως να μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η σοβαρότητα και η βαρύτητά της, με αποτέλεσμα να είναι πιθανή ή ύπαρξη αλλοιώσεων, οι οποίες με τη σειρά τους θα διαπιστωθούν μέσω κολποσκόπησης με ή χωρίς βιοψία και αναζήτηση HPV-DNA. Έχει παρατηρηθεί, ότι σε σύνολο περίπου 1.000 tests αυτής της κατηγορίας, ανευρίσκεται τελικά και ένας καρκίνος. Κατηγορία AGUS. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν κύτταρα στα οποία έχει βρεθεί κάποια ατυπία από αδενικά κύτταρα, που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Ο κίνδυνος που ελλοχεύει στα αποτελέσματα αυτής της κατηγορίας αφορά ένα ποσοστό 30-50%, ανάλογα με την ηλικία και το ιστορικό της ασθενούς και μπορεί να είναι HSIL, αδενοκαρκίνωμα in situ (μη μεταστατικό) και διηθητικός καρκίνος. 4) Κατηγορία LSIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion). Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν κύτταρα στα οποία έχουν βρεθεί αλλοιώσεις χαμηλού βαθμού, ή αλλοιώσεις που οφείλονται σε θηλωματοϊούς και την ελαφριά δυσπλασία CIN1 (Cervical Intraepithelial Neoplasia). Η περαιτέρω διερεύνηση εξαρτάται από την ηλικία της εξεταζόμενης, με τις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας να χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Η συγκεκριμένη αναγκαιότητα πηγάζει από το ποσοστό των περιστατικών που αργότερα εμφανίζονται ως HSIL. 5) Κατηγορία HSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion). Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν κύτταρα στα οποία έχουν βρεθεί αλλοιώσεις υψηλού βαθμού. Περιλαμβάνει τη δυσπλασία μετρίου βαθμού CIN2, τη σοβαρή δυσπλασία CIN3 και το καρκίνωμα in situ (carcinoma in situ - cis). Απαιτείται στη συνέχεια κολποσκόπηση, η οποία σπανίως οδηγεί σε ευρήματα LSIL, με σημαντικό το ποσοστό εμφάνισης διηθητικού καρκίνου όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1** [45, 50].

Η παραπάνω ταξινόμηση χρησιμοποιήθηκε από το 1988 έως και το 2001. Από το 2001 βρίσκεται σε χρήση το αναθεωρημένο σύστημα Bethesda, σύμφωνα με το οποίο: Α) Οι κατηγορίες 1 και 2 συνενώθηκαν σε μια κατηγορία, «αρνητικά για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια». Με τον τρόπο αυτό οι αντιδραστικές μεταβολές χαρακτηρίζονται πιο καθαρά ως «αρνητικές». Β) Οι αλλοιώσεις ASCUS που είχαν προκαλέσει διλήμματα αναφορικά με την αντιμετώπιση τους διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: ASCUS-καλοήθεις αλλοιώσεις και ASC-H (atypical squamous cells with possible HSIL) ή «άτυπα πλακώδη κύτταρα που δεν αποκλείουν την ύπαρξη υψηλού βαθμού πλακώδους ενδοεπιθηλιακής βλάβης». Τα κύτταρα δεν είναι φυσιολογικά αλλά ο κυτταρολόγος δεν είναι σίγουρος για την βαρύτητα της βλάβης. Το ASC-H έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι προκαρκινική κατάσταση. Η αναθεωρημένη λοιπόν κατηγοριοποίηση έχει ως εξής: Ι) Αποτέλεσμα αρνητικό για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια: Οργανισμοί, αντιδραστικές κυτταρικές αλλοιώσεις, κυλινδρικά κύτταρα, ατροφία.

II)Επιθηλιακές κυτταρικές ανωμαλίες: i. Πλακώδη κύτταρα: άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας (ASCUS), άτυπα πλακώδη κύτταρα με κίνδυνο να υποκρύπτεται υψηλόβαθμη πλακώδης αλλοίωση (ASC-H), πλακώδης ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση χαμηλού βαθμού (LSIL) και υψηλού βαθμού (HSIL), καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. ii. Αδενικά κύτταρα: άτυπα αδενικά κύτταρα (AGS), άτυπα αδενικά κύτταρα μάλλον νεοπλασματικά, ενδοτραχηλικό αδenoκαρκίνωμα in situ, αδenoκαρκίνωμα. III) Άλλο [50]. Ο συσχετισμός της ταξινόμησης κατά Bethesda, σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα ταξινόμησης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1** [51].

Σύστημα ταξινόμησης	Καλοήθεις κυτταρικές αλλαγές, εντός φυσιολογικών ορίων	Μη φυσιολογικές κυτταρικές αλλοιώσεις				
		ASCUS AGUS	LGSIL HPV	HGSIL		Διηθητικό καρκίνωμα
Κατά Bethesda	Φλεγμονή Αντίδραση Επανόρθωση					
Κατά Reagan και συνεργάτες			Ελαφρά δυσπλασία	Μέτρια δυσπλασία	Σοβαρά Δυσπλασία  Ca in situ	
Κατά Richart			CIN I	CIN II	CIN III	
Κατά Παπανικολάου	Κατ. I	Κατ. II	Κατ. III		Κατ. IV	Κατ. V

**Πίνακας 1.** Συσχετισμός συστημάτων ταξινόμησης αποτελεσμάτων pap test.

Είναι βασικό να αναφερθεί πως η αποτελεσματικότητα του PAP test δεν είναι καθολική, όπως συμβαίνει άλλωστε σε κάθε ιατρική εξέταση. Μια τέτοια περίπτωση αναποτελεσματικότητας μπορεί να οφείλεται, στο μέγεθος (διαμέτρου < 0.5cm) και στη θέση (ψηλά στον ενδοτραχηλικό σωλήνα) των CIN αλλοιώσεων, στην ανεπιτυχή λήψη δείγματος και στην υποκειμενικότητα του εξεταστή. Για αυτούς τους λόγους καθίσταται αναγκαία η χρήση συμπληρωματικών τεχνικών αλλά και ο τακτικός έλεγχος που θα ελαχιστοποιήσει το ενδεχόμενο λανθασμένων αποτελεσμάτων [51].

## 5.4 Βασικά στατιστικά μέτρα απόδοσης του pap test

Υπάρχουν κάποιες βασικές έννοιες οι οποίες αφορούν την αξιολόγηση των αποδόσεων των διαφόρων τεχνικών ανίχνευσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι χρησιμοποιούμενες ως στατιστικά μέτρα απόδοσης έννοιες περιγράφονται παρα κάτω [44].

### 5.4.1 Ευαισθησία και ειδικότητα

Η Ευαισθησία (sensitivity ή recall rate ή power) εκφράζει την ικανότητα του test να αναγνωρίζει σωστά τους ασθενείς. Μετρά δηλαδή το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων του test στο σύνολο των πραγματικών θετικών αποτελεσμάτων (το ποσοστό των πραγματικών ασθενών ανθρώπων που σωστά έχουν προσδιοριστεί από το test ως ασθενείς). Η Ειδικότητα (specificity) εκφράζει την ικανότητα του test να αναγνωρίζει σωστά εκείνους που δεν είναι ασθενείς. Μετρά δηλαδή το ποσοστό των αληθώς αρνητικών αποτελεσμάτων του test στο σύνολο των πραγματικών αρνητικών αποτελεσμάτων (το ποσοστό των πραγματικά υγιών ανθρώπων που σωστά έχουν προσδιοριστεί από το test ως υγιείς). Στη βέλτιστη λοιπόν περίπτωση θα είχε επιτευχθεί 100% ευαισθησία (δηλαδή θα είχαν προβλεφθεί όλοι οι άνθρωποι από την ομάδα των ασθενών ως ασθενείς) και 100% ειδικότητα (δηλαδή θα είχαν προβλεφθεί όλοι οι άνθρωποι από την ομάδα των υγιών ως υγιείς).

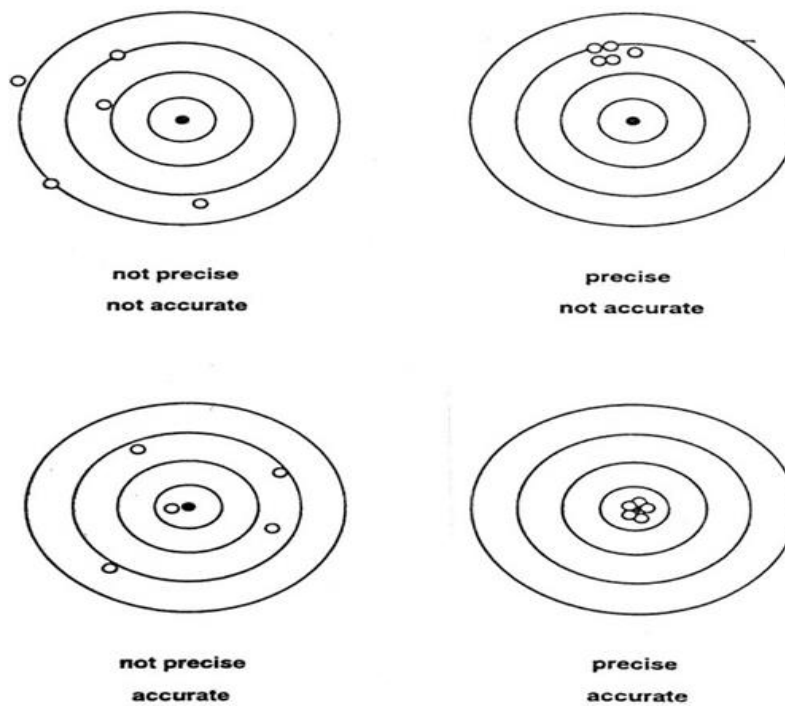
Τα δύο αυτά μέτρα, είναι ιδιαίτερα σημαντικά εφόσον πρόκειται για την αξιολόγηση ενός νέου διαγνωστικού test. Έστω λοιπόν ότι ζητούμενο είναι μια τέτοια αξιολόγηση, με την ομάδα στην οποία πρόκειται να γίνει ο προληπτικός έλεγχος να περιλαμβάνει ανθρώπους που μπορεί να έχουν την ασθένεια για την οποία προορίζεται το test αλλά μπορεί και όχι. Ανάλογα με τη σχέση των αποτελεσμάτων του test και της πραγματικής κατάστασης του ατόμου μπορεί να ληφθούν τα εξής αποτελέσματα. 1) Αληθώς θετικό (true positive-TP) που ο ασθενής αναγνωρίστηκε σωστά ως ασθενής. 2) Ψευδώς θετικό (false positive-FP) που κάποιος υγιής αναγνωρίστηκε λανθασμένα ως ασθενής. 3) Αληθώς αρνητικό (true negative-TN) όπου κάποιος υγιής αναγνωρίστηκε σωστά ως υγιής και 4) Ψευδώς αρνητικό (false negative-FN) όπου κάποιος ασθενής αναγνωρίστηκε λανθασμένα ως υγιής. Έτσι λοιπόν ένα θετικό αποτέλεσμα ενός test με υψηλή ειδικότητα χρησιμοποιείται για να επιβεβαιώσει την ασθένεια. Αντίστοιχα, ένα αρνητικό αποτέλεσμα ενός test με υψηλή ευαισθησία χρησιμοποιείται για να αποκλείσει την ασθένεια [52].

Ειδικά για την περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, τα προαναφερόμενα αποτελέσματα έχουν την εξής ερμηνεία. Το ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι κατά την κυτταρολογική εξέταση δεν ανιχνεύθηκαν τα άτυπα κύτταρα τα οποία ήταν παρόντα στο επίχρισμα. Το ψευδώς θετικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι κατά την κυτταρολογική εξέταση ανιχνεύθηκαν κατά λάθος άτυπα κύτταρα στο εξεταζόμενο επίχρισμα χωρίς αυτά να υφίστανται [45].

### 5.4.2 Ορθότητα και ακρίβεια

Η Ορθότητα (accuracy) αναφέρεται στη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων από μία τιμή η οποία είναι αποδεκτή ως η αληθής (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Αποτελεί με άλλα λόγια το βαθμό του πόσο κοντά στις πραγματικές τιμές μιας ποσότητας είναι οι μετρούμενες τιμές της (βαθμός προσέγγισης πραγματικότητας), δείχνοντας ουσιαστικά την ικανότητα του διαγνωστικού test να προβλέπει σωστά την ύπαρξη ασθένειας ή όχι. Η Ακρίβεια (precision) εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου και το βαθμό στον οποίο επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (υπό τις ίδιες συνθήκες) δίνουν ίδια αποτελέσματα. Μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές και θα βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα μέτρο της σωστής πραγματοποίησης της δοκιμής, αντανακλώντας την ποιότητα του προσωπικού και των διαδικασιών που εφαρμόζονται [52].

Υποσύνολα της ακρίβειας θεωρούνται η επαναληψιμότητα (repeatability) και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility), με την πρώτη να αφορά το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα, και τη δεύτερη να αφορά το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους. Ανάλογα λοιπόν με τις εκάστοτε συνθήκες του εργαστηριακού ελέγχου, υφίστανται η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ή ενδιάμεση πιστότητα (στο ίδιο εργαστήριο), η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (σε διαφορετικά εργαστήρια), η εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα (ίδιο τμήμα δείγματος) και η μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα (διαφορετικά τμήματα του ιδίου δείγματος). Η σχέση μεταξύ ορθότητας και ακρίβειας γίνεται εύκολα αντιληπτή μέσω της ακόλουθης εικόνας [44].



**Εικόνα 8.** Σχέση μεταξύ ορθότητας και ακρίβειας.

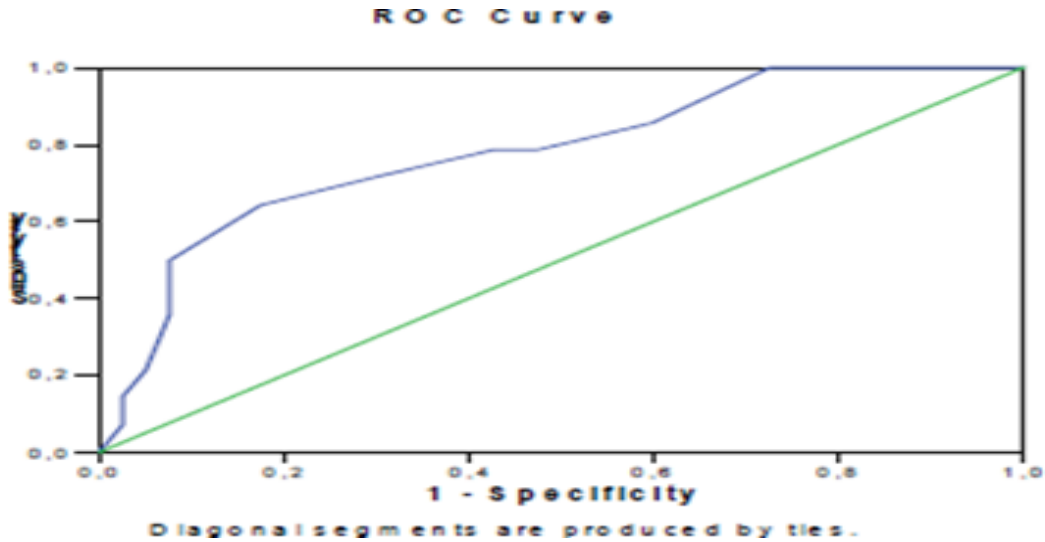
### 5.4.3 Θετική και αρνητική προγνωστική αξία

Η Θετική προγνωστική αξία (Positive predictive value - PPV) εκφράζει την αναλογία των ασθενών που σύμφωνα με το test είναι θετικοί και έχουν στην πραγματικότητα την ασθένεια. Το συγκεκριμένο μέτρο απαντά στο ερώτημα «αν ένα άτομο διαγνωσθεί θετικό, ποια είναι η πιθανότητα να έχει πραγματικά την ασθένεια;». Δείχνει λοιπόν ουσιαστικά πόσο καλό είναι το διαγνωστικό test στο να επιβεβαιώνει την ασθένεια (θετικό αποτέλεσμα). Η αρνητική προγνωστική αξία (Negative predictive value - NPV) εκφράζει την αναλογία των ασθενών που σύμφωνα με το test είναι αρνητικοί και δεν έχουν στην πραγματικότητα την ασθένεια. Το συγκεκριμένο μέτρο απαντά στο ερώτημα «αν ένα άτομο διαγνωσθεί αρνητικό, ποια η πιθανότητα να μην έχει την ασθένεια;». Δείχνει λοιπόν ουσιαστικά πόσο καλό είναι το διαγνωστικό test στο να απορρίπτει την ασθένεια (θετικό αποτέλεσμα) [52]. Στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας η θετική προγνωστική αξία ενός PAP test αφορά στην ακρίβεια με την οποία ένα θετικό αποτέλεσμα επιχρίσματος προβλέπει την ύπαρξη νεοπλασίας στον τράχηλο, ενώ η αρνητική προγνωστική του αξία την ακρίβεια με την οποία ένα αρνητικό αποτέλεσμα επιχρίσματος προβλέπει την απουσία της νόσου [45].

#### 5.4.4 Καμπύλη ROC

Βασικός στόχος κατά τη διαδικασία αξιολόγησης ενός test μέσω σχετικών στατιστικών μέτρων είναι να βρεθεί ένα σημείο διαχωρισμού (cut-off point) πέρα από το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ότι το test είναι θετικό. Έτσι, αν  $T$  είναι η μέτρηση του διαγνωστικού test, το ζητούμενο είναι η τιμή  $t$  για την οποία ισχύει 1)  $\text{An } T \leq t \Rightarrow$  η νόσος δεν είναι παρούσα (αρνητικό test) και 2)  $\text{An } T > t \Rightarrow$  η νόσος είναι παρούσα (θετικό test). Για την επιλογή αυτού ακριβώς του σημείου διαχωρισμού χρησιμοποιούνται οι καμπύλες ROC (Receiver Operating Characteristic curves), οι οποίες απεικονίζουν (με μια καμπύλη) τους συνδυασμούς της αναλογίας των ψευδών θετικών περιπτώσεων (1-specificity) (άξονας  $X$ ) και της ευαισθησίας (άξονας  $Y$ ) για όλες τις τιμές του ελέγχου  $T$  που παρατηρούνται στο δείγμα. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι πιθανότητες false positive fraction- FPF στο  $X$ -άξονα και true positive fraction-TPF στον  $Y$ -άξονα. Η επιλογή των πιθανών σημείων διαχωρισμού γίνεται από την άνω αριστερή περιοχή του διαγράμματος, περιοχή στην οποία υφίσταται χαμηλός αριθμός ψευδώς θετικών περιπτώσεων και υψηλή ευαισθησία.

Συμπερασματικά οι καμπύλες ROC, είναι η διαγραμματική απεικόνιση των χαρακτηριστικών ενός ποσοτικού διαγνωστικού test, βοηθούν να εξεταστεί η απόδοση του test για διαφορετικά σημεία προγνωστικού ελέγχου και βοηθούν στην επιλογή του σημείου απόφασης όσον αφορά αν ένας έλεγχος θεωρείται θετικός ή αρνητικός. Σημαντική ποσότητα στις καμπύλες ROC αποτελεί η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC – area under curve), της οποίας το εμβαδόν συνδέεται με την πιθανότητα η τιμή του test για ένα ασθενή να είναι μεγαλύτερη από την τιμή του test για ένα άτομο που δεν έχει την ασθένεια [53]. Στην περίπτωση ενός τέλει διαγνωστικού test ισχύει  $\text{AUC}=1$  και ενός μη πληροφοριακού test ισχύει  $\text{AUC}=0.5$ . Άλλα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης είναι η μέγιστη κάθετη απόσταση (maximum vertical distance), δηλαδή η απόσταση της ROC curve από τη διαγώνιο γραμμή (όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση αυτή, τόσο πιο πληροφοριακό είναι το διαγνωστικό test) και το σημείο συμμετρίας (symmetry point), στο οποίο ισχύει ότι  $\text{sensitivity} = \text{specificity}$  [44].



**Διάγραμμα 1.** Παράδειγμα καμπύλης ROC

#### 5.4.5 Επισκόπηση μελετών απόδοσης για το pap test

Η διαδικασία προληπτικού ελέγχου είναι ιδιαίτερα σημαντική. Για να είναι όμως αποτελεσματική και να οδηγήσει στην έγκαιρη πρόληψη της ασθένειας θα πρέπει το επιλεγμένο διαγνωστικό test να παρουσιάζει εκείνα τα χαρακτηριστικά που θα αποτρέπουν ενδεχόμενα υπερδιάγνωσης ή εσφαλμένης διάγνωσης. Στη συνέχεια παρατίθενται μελέτες σχετικά με τα στατιστικά μέτρα απόδοσης του pap test για τον καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Σε αμερικάνικη μετα-ανάλυση των D.C. McCrory et al. (1999), για τις κολποσκοπικά ή ιστολογικά επιβεβαιωμένες CIN-2 αλλοιώσεις βρέθηκε ευαισθησία 87% και ειδικότητα 100%, ενώ για τις CIN-1 αλλοιώσεις η ευαισθησία ήταν μόνο 52% και η ειδικότητα 96% [54]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει στη μελέτη των Bhatla και Moda (2009), η σύγκριση της ευαισθησίας που παρουσιάζει το test στις περιπτώσεις που το δείγμα έχει συλλεχθεί από το κλινικό προσωπικό καθώς και από τον ίδιο τον εξεταζόμενο, όπως επίσης και σε σχέση με τη συμβατική κυτταρολογική εξέταση, για τις περιπτώσεις αλλοιώσεων HSIL και καρκίνου, αναδεικνύοντας τη σημασία που έχει η διαδικασία συλλογής του προς εξέταση δείγματος για την επιτυχία της εφαρμογής του test [55].

<b>Comparison of self – collected HPV with clinician obtained HPV and conventional cytology</b>			
	<b>% Self – collected HPV (sensitivity)</b>	<b>% Clinician obtained HPV (sensitivity)</b>	<b>% Cytology (sensitivity)</b>
Wright et al, 2000	66	84	61
Belinson et al, 2003	87.5	96.8	88.3

**Πίνακας 2.** Σύγκριση ευαισθησίας που επέδειξε το pap test σε περίπτωση συλλογής του δείγματος από τον εξεταζόμενο και από ειδικευμένο προσωπικό.

### 5.5 Τεχνικές ενίσχυσης του pap test

Όσο αφορά την απόδοση της τεχνικής προέκυψε το συμπέρασμα στην παρούσα φάση δεν υπάρχει κάποια τεχνική ανίχνευσης ή κάποιος συγκεκριμένος συνδυασμός που να εξασφαλίζει το απόλυτο της αντιμετώπισης της νόσου, είτε πρόκειται για προληπτικό έλεγχο (screening), είτε για διαλογή των σοβαρών περιστατικών (triage), είτε για λήψη μιας ιατρικής απόφασης σχετικά με την αντιμετώπιση του εκάστοτε περιστατικού. Επίσης, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη το στοιχείο της εξασφάλισης ενός κατά το δυνατό χαμηλού κόστους, αφού ακόμα και αν μια τεχνική ανίχνευσης αποτελεί την αποτελεσματικότερη λύση από πλευράς ευαισθησίας και ειδικότητας, αυτό δε σημαίνει ταυτόχρονα ότι αποτελεί και τη βέλτιστη λύση, μιας και στην περίπτωση του μαζικού προληπτικού ελέγχου, θα οδηγούσε σε δυσβάσταχτα οικονομικά κόστη. Ακόμα όμως και στην περίπτωση της διαλογής των σοβαρών περιστατικών, η συνέχεια της «διαδρομής» με αφετηρία την ανίχνευση ύποπτων ευρημάτων, θα πρέπει να γίνει με την καλύτερη δυνατή επιλογή εκ των διαθέσιμων εναλλακτικών, ώστε να αποφευχθούν άστοχες κινήσεις που θα είναι επιβαρυντικές για την υγεία του ασθενούς αλλά και για το κόστος της διαδικασίας. Είναι αναγκαία λοιπόν η ανάπτυξη υποστηρικτικών συστημάτων που θα βοηθήσουν στη συγκεκριμένη κατεύθυνση, βοηθώντας τους γιατρούς να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του screening, του triage ή ακόμα και της απόφασης για εγχείρηση.

Στα πλαίσια αυτής λοιπόν της αναγκαιότητας η Αμερικανική Υπηρεσία Φαρμάκων και Τροφίμων έχει εγκρίνει κατά καιρούς διάφορες τεχνικές ενίσχυσης του pap test. Αυτές είναι οι εξής. 1) AutoPap 300 QC Παπανικολάου (Screener-Αυτόματο Σύστημα): ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα ελέγχου της ποιότητας του δείγματος, έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. 2) Papnet Testing System: ένα σύστημα υπολογιστή που επιλέγει τα 128 χειρότερα κύτταρα που λαμβάνονται από το τεστ Παπανικολάου, τα οποία στη συνέχεια εξετάζονται και αξιολογούνται από κυτταρολόγο. 3) Σύστημα Pathfinder: ένας αυτοματοποιημένος υπολογιστής με βάση το μικροσκόπιο, που βοηθά κυτταρολόγους στον εντοπισμό, τη σήμανση και την καταγραφή ύποπτων κυττάρων στην εξέταση κατά Παπανικολάου. Πέρα όμως από αυτές τις τεχνικές, οι οποίες εφαρμόζονται στη συνηθέστερη μέθοδο προληπτικού ελέγχου (το pap test), η συμβολή της τεχνολογίας στη



στήριξη της κλινικής απόφασης συνίσταται σε πολυπλοκότερα συστήματα, τα οποία λαμβάνουν υπόψη τους ένα πλήθος μεταβλητών, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματικότερη υποστήριξη της κλινικής διαδικασίας [44].

## 5.6 Τύπο κυττάρων στο pap test

Αφορά τραχηλικό επίχρισμα ή δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης (LBC) το οποίο έχει ορθώς ληφθεί με χρήση σπάτουλας, broom ή ψήκτρας θα περιέχει μία ποικιλία επιθηλιακών κυττάρων από το μη-κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, ζώνη μετασχηματισμού και ενδοτραχηλικό σωλήνα σχετικά με την ανατομία, ιστολογία και λειτουργία του τραχήλου μήτρας.

### 5.6.1 Φυσιολογική κυτταρολογία και καλοήθειες αντιδραστικές αλλοιώσεις

Ένα φυσιολογικό τραχηλικό επίχρισμα ή πλακίδιο LBC θα περιέχει:

- 1) Πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα από τον εξωτράχηλο που αποτελούνται από α) Επιπολής πλακώδη κύτταρα, β) Διάμεσα πλακώδη κύτταρα, γ) Παραβασικά πλακώδη κύτταρα, δ) Σκαφοειδή κύτταρα.
- 2) Κυλινδρικό επιθήλιο από τον ενδοτραχηλικό σωλήνα με Ενδοτραχηλικά κύτταρα.
- 3) Μεταπλαστικά πλακώδη κύτταρα από την ζώνη μετασχηματισμού Μικροβιακή χλωρίδα κόλπου δηλαδή Γαλακτοβάκιλλοι, *Gardnerella vaginalis*, *Λεπτότριχες vaginalis*.
- 4) Τραχηλική βλέννα.

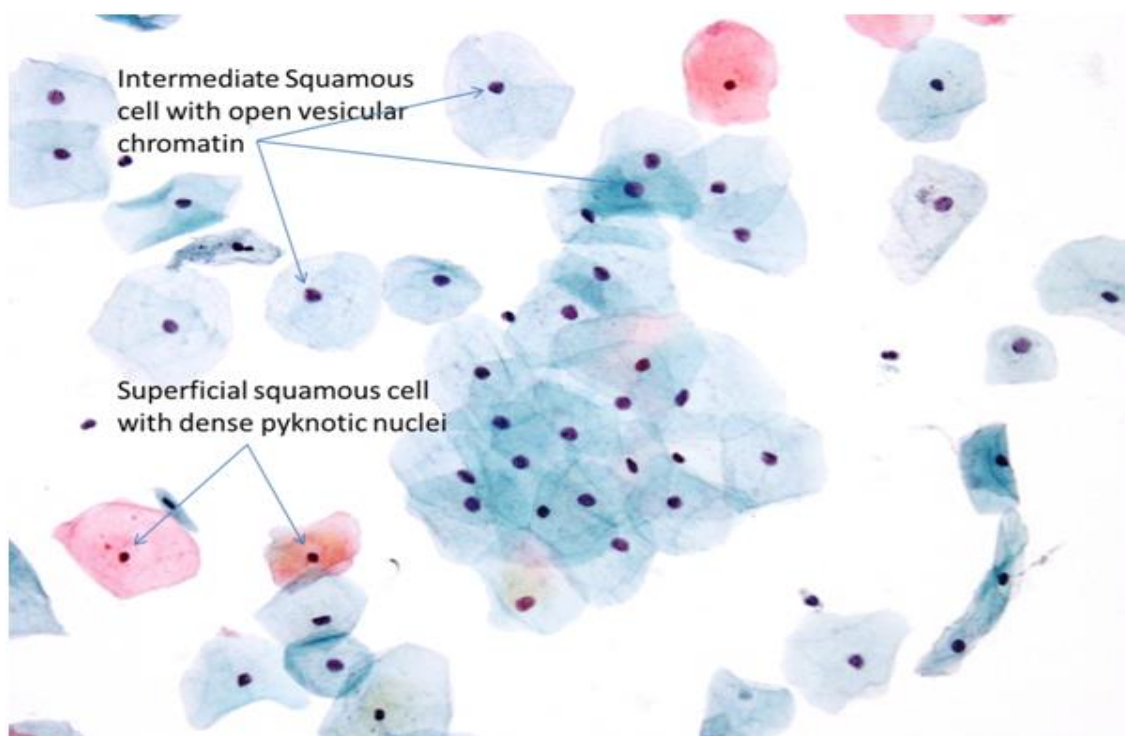
Ένα φυσιολογικό τραχηλικό επίχρισμα ή πλακίδιο LBC θα περιέχει:

- 1) Αποφολιωμένα κύτταρα ενδομητρίου (εξαρτάται από το στάδιο του εμμήνου κύκλου) που αφορά α) Επιθηλιακά κύτταρα, β) Επιπολής στρωματικά κύτταρα γ) Εν τω βάθει στρωματικά κύτταρα.
- 2) Ιστικοκύτταρα, λευκοκύτταρα, και ερυθροκύτταρα, Προσμίξεις π.χ. σπερματοζωάρια, ή κόκκοι πούδρας (talc)

Όσο αφορά τη βασική κυτταρολογική διάταξη, ο τύπος των επιθηλιακών κυττάρων σε ένα τραχηλικό επίχρισμα καθορίζεται από: 1) Τον βαθμό ωριμότητας του τραχηλικού επιθηλίου, 2) Την εντόπιση της πλακωδοκυλινδρικής συμβολής, 3) Την παρουσία μεταπλαστικών αλλοιώσεων στη ζώνη μετασχηματισμού, 4) Το στάδιο του εμμήνου κύκλου κατά τη λήψη του επιχρίσματος και 5) Την επίδραση των ορμονών στην κύηση ή στη λήψη αντισυλληπτικών χαπιών ή στη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.

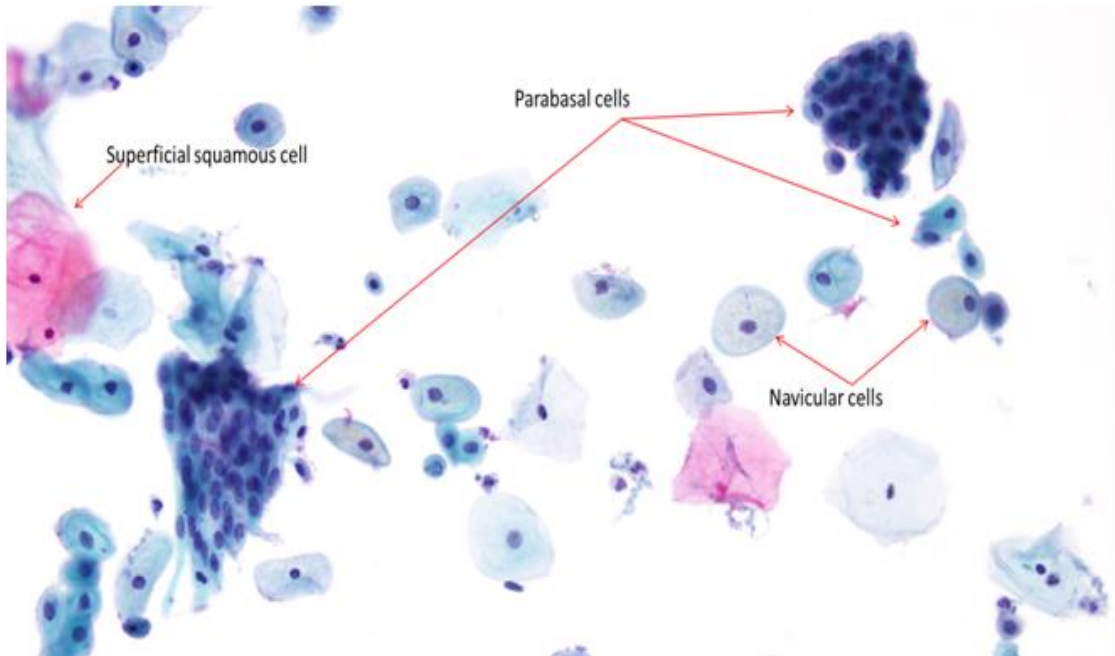
Αρχικά έχουμε τα επιπολής πλακώδη κύτταρα που είναι μεγάλα πολυγωνικού σχήματος κύτταρα μεγέθους 40 – 60μ (microns) με κεντρικό πυκνωτικό πυρήνα και άφθονο ημιδιαφανές

εωσινόφιλο/βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, που ενδεχομένως περιέχει κοκκία κερατοϋαλίνης. Στα τραχηλικά επιχρίσματα ή πλακίδια LBC, τα επιπολής πλακώδη κύτταρα εμφανίζονται γενικώς ως διακριτά μεμονωμένα κύτταρα. Στη συνέχεια είναι τα διάμεσα πλακώδη κύτταρα. Παρόμοιου μεγέθους με τα επιπολής πλακώδη κύτταρα, τα διάμεσα κύτταρα έχουν ελαφρώς μεγαλύτερο κεντρικό φυσαλιδώδη πυρήνα με λεπτή ίση κατανομή της χρωματίνης και άφθονο διαφανές βασεόφιλο/εωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα διάμεσα πλακώδη κύτταρα μπορεί να παρουσιαστούν μεμονωμένα ή κατά αθροίσεις. Σκαφοειδή κύτταρα, αντιπροσωπεύουν μία ποικιλία των διάμεσων κυττάρων, που συχνά εμφανίζονται στην κύηση ή μετά τοκετό. Τα κύτταρα είναι δίκην «σκάφους» με πεπαχυμένο εξωτερικό περίβλημα του βασεόφιλου/εωσινόφιλου κυτταροπλάσματος και έκκεντρους πυρήνες. Κεντρική κυτταροπλασματική καφέ/κίτρινη χρώση υποδηλώνει παραγωγή γλυκογόνου. Σκαφοειδή κύτταρα εμφανίζονται σε υψηλά επίπεδα προγεστερόνης όταν επιπολής πλακώδη κύτταρα αποφολιδώνονται πιο εύκολα: έτσι πιθανόν να είναι ορατά με χρήση αντισυλληπτικών βασιζόμενων μόνον σε προγεστερόνη. Διάμεσα κύτταρα συχνά υφίστανται κυτταρόλυση. Αυτή είναι μία φυσιολογική διαδικασία με την παρουσία γαλακτοβάκιλλων που εμφανίζεται ιδιαίτερα προς το τέλος του κύκλου ή με την λήψη αντισυλληπτικών χαπιών βασιζόμενων μόνον σε προγεστερόνη. Ως αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση γυμνών πυρήνων στο επίχρισμα ή στο πλακίδιο LBC.



**Εικόνα 9.** Κυτταρολογία φυσιολογικών πλακωδών κυττάρων [56].

Ακολουθούν τα Παραβασικά πλακώδη κύτταρα, τα οποία είναι μικρά ωοειδή ή στρόγγυλα ανώριμα πλακώδη κύτταρα. Τα κύτταρα έχουν έναν μεγάλο κεντρικό φυσαλιδώδη πυρήνα με λεπτή ισοκατανομημένη χρωματίνη και πυκνό βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα μπορεί να εμφανιστούν είτε μεμονωμένα είτε κατά αθροίσεις.



**Εικόνα 10.** Παραβασικά κύτταρα σε φυσιολογικό επίχρισμα Παπανικολάου [56].

Μετά είναι τα απύρνηνα πλακώδη κύτταρα που είναι ακριβώς όπως τα πλακώδη κύτταρα χωρίς πυρήνα. Αυτά δεν αποφολιδώνονται φυσιολογικά από τον τράχηλο ή τον κόλπο, αλλά εμφανίζονται στο κατώτερο τριτημόριο κόλπου και αιδοίου, η δε παρουσία τους στο τραχηλικό επίχρισμα μπορεί να υποδηλώνει: α) Παρακεράτωση και υπερκεράτωση (λευκοπλακία) του εξωτραχήλου, β) Πρόσμιξη του τραχηλικού επιχρίσματος από δειγματοληψία του αιδοίου ή κατώτερου τριτημορίου του κόλπου, γ) Φλεγμονώδη αντίδραση, δ) Ρήξη εμβρυικών μεμβρανών π.χ. απύρνηνα εμβρυικά κύτταρα, ε) Το δείγμα είναι επίχρισμα αιδοίου.

Ακολουθούν τα ενδοτραχηλικά κύτταρα τα οποία είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδοτραχήλου. Αυτά μπορεί να αποπίπτουν μεμονωμένα, σε λωρίδες δίκην «πασσαλοειδούς φράκτη» είτε σε επίπεδους σχηματισμούς με πολύ φυσιολογική αρχιτεκτονική. Μερικές φορές, μπορεί να εμφανίζονται δίκην «μελισσοκηρήθρας» σε επίπεδους σχηματισμούς που περιέχουν άφθονη βλέννα. Ο πυρήνας βρίσκεται στην βάση με ίση κατανομή λεπτής ή κοκκιώδους χρωματίνης. Πολυπυρήνωση και αυξημένο μέγεθος πυρήνα εμφανίζεται συχνά σε λοίμωξη, συμπεριλαμβανομένης και της λοίμωξης από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) καθώς

και σε εγκυμοσύνη. Τα κύτταρα είναι κυλινδρικά και συμμετρικά κατά τον επιμήκη άξονα. Το κυτταρόπλασμα περιγράφεται ως λεπτό και είναι συχνά κενοτοπιώδες και ενδεχομένως περιέχει κυτταροπλασματική προεξοχή, ως κατάλοιπο της προσκόλλησης των κυττάρων της βασικής μεμβράνης.

### 5.6.2 Μεταπλασία

Πρώιμα μεταπλαστικά κύτταρα σχηματίζονται από πολλαπλασιασμό των βασικών/εφεδρικών κυττάρων. Τα πρώιμα μεταπλαστικά κύτταρα δεν αποφολιδώνονται, επομένως εφόσον ανευρίσκονται στο τραχηλικό επίχρισμα, θα έχουν συλλεχθεί απευθείας. Λόγω της απευθείας δειγματοληψίας, πρώιμα μεταπλαστικά κύτταρα θα εμφανίζονται ως τμήματα ιστού. Τα κύτταρα είναι μικρά με υψηλή πυρηνοπλασματική αναλογία, έχουν λεπτή ισοκατανεμημένη χρωματίνη, καλώς καθορισμένη λεπτή πυρηνική μεμβράνη και ενδεχομένως να είναι προσκολλημένα στα γειτονικά ενδοτραχηλικά κύτταρα. Immature squamous metaplasia. Στη συνέχεια είναι τα ανώριμα μεταπλαστικά κύτταρα που εμφανίζονται σε τραχηλικά επιχρίσματα ως μεμονωμένα κύτταρα ή σε σχηματισμούς (μεμονωμένη εμφάνιση πιο συχνά σε LBC, λόγω μηχανικής ανάδευσης). Ανώριμα μεταπλαστικά κύτταρα έχουν την τάση να διατηρούν ένα ελαφρώς κυλινδρικό σχήμα (εκ μετατροπής από αδενικά σε πλακώδη κύτταρα), έχουν υψηλή πυρηνοπλασματική αναλογία με αδρή κοκκίωση της χρωματίνης και προέχον εωσινόφιλο πυρήνιο. Μιτώσεις μπορεί να παρατηρηθούν σπανίως. Μετά υπάρχουν τα ώριμα πλακώδη μεταπλαστικά κύτταρα που είναι ωοειδή ή πολυγωνικά (εκ μετατροπής σε «πλακώδους» τύπου κυττάρων), έχουν σαφή κυτταροπλασματικά όρια με πυκνό βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Μεσοκυττάρια γέφυρες μπορεί να παρατηρηθούν ως κυτταροπλασματικές «προεκβολές». Όταν εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε σχηματισμούς, τα ώριμα μεταπλαστικά κύτταρα, διαφοροδιαγιγνώσκονται δύσκολα από τα παραβασικά κύτταρα.

Εάν η ζώνη μετασχηματισμού (ZM) έχει ληφθεί σωστά, θα υπάρχουν στο τραχηλικό επίχρισμα ενδοτραχηλικά κύτταρα ή πλακώδη μεταπλαστικά κύτταρα. Ο κυτταρολόγος θα χρειαστεί να λάβει υπόψη του την ηλικία και την ορμονική κατάσταση της ασθενούς καθώς η θέση της πλακωδοκυλινδρικής συμβολής (SCJ) ποικίλλει σε εντόπιση κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας. Φυσιολογικά ένα τραχηλικό επίχρισμα θα περιέχει από μία έως 10 ομάδες ενδοτραχηλικών κυττάρων (η ομάδα θα πρέπει να αποτελείται από 10 κύτταρα), μία ομάδα είναι συχνά αρκετή ώστε να τεκμηριώσει την λήψη της ζώνης μετασχηματισμού. Μετά την εμμηνόπαυση, η πλακωδοκυλινδρική συμβολή (SCJ) απομακρύνεται εντός του ενδοτραχηλικού σωλήνα πέρα από το σημείο που μπορεί να φτάσει ψήκτρα, broom ή σπάτουλα και επομένως επιχρίσματα που έχουν ληφθεί μετά την εμμηνόπαυση σπανίως περιέχουν ενδοτραχηλικά κύτταρα. Επιχρίσματα που έχουν ληφθεί παρουσία εκτροπίου περιέχουν άφθονα καλοήγη ενδοτραχηλικά κύτταρα. Ανώριμα μεταπλαστικά κύτταρα ανευρίσκονται σε νεαρές γυναίκες ή μετά από θεραπεία στον τράχηλο, είναι δε σπάνια σε επιχρίσματα από γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας.

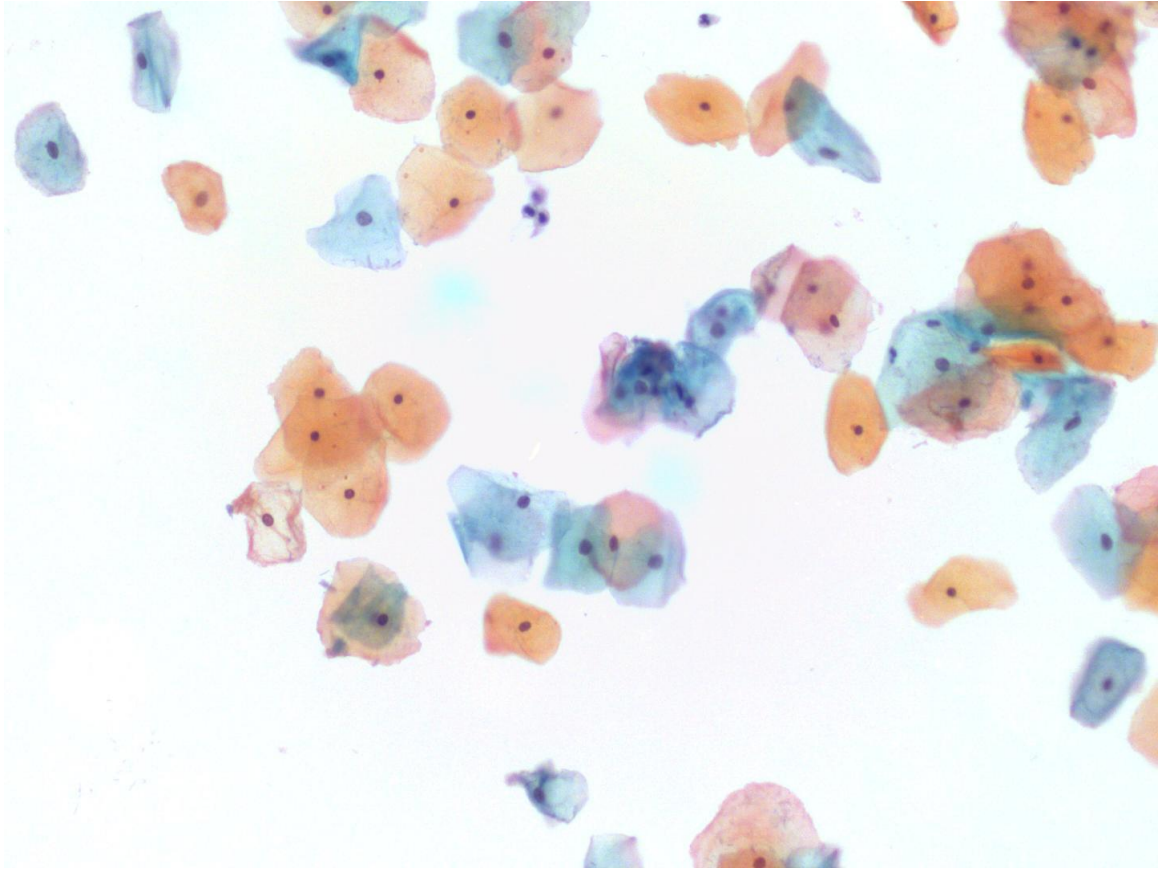
Ενδομητρικά κύτταρα θα πρέπει θεωρητικά να αποφολιδώνονται κατά την διάρκεια των ημερών 0-12 του εμμήνου κύκλου αλλά επίσης εξαρτάται από σημαντικές φυσιολογικές και παθολογικές αλλοιώσεις όπως η δυσλειτουργική αιμόρροια, ενδομητρικός πολύποδας, υπερπλασία ενδομητρίου, ενδομήτριο σπείραμα (IUCD) ή καλώς διαφοροποιημένο καρκίνωμα του ενδομητρίου όπου εμφανίζονται σε οποιοδήποτε χρόνο. Επιθηλιακά κύτταρα αποφολιδώνονται μεμονωμένα ή σε 3-διάστατες ομάδες συχνά αναφερόμενες ως «μουροειδείς σχηματισμοί». Τα ενδομητρικά κύτταρα έχουν υψηλή πυρηνοπλάσματική αναλογία με λεπτό βασεόφιλο κυτταρόπλασμα (δύσκολο να αναγνωριστεί μερικές φορές). Οι πυρήνες έχουν αδρή, ισοκατανεμημένη χρωματίνη και μεμονωμένο μικρό πυρήνιο. Παρά την τυπική 3-διάσταση εμφάνιση, αυτά τα κύτταρα μπορεί να παρερμηνευτούν με τις υπερχρωματικές συμπαγείς ομάδες των κυττάρων υψηλόβαθμης πλακώδους ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης ιδιαίτερα με CIN3. Καθόσον η παρουσία των ενδομητρικών κυττάρων μπορεί να είναι δείκτης παθολογικής κατάστασης σε μετα-εμμηνοπαυσιακή γυναίκα, η παρουσία τους θα πρέπει να αναφερθεί, και θα πρέπει να συσταθεί περαιτέρω διερεύνηση.

Η εμμηνόπαυση συνδέεται με φθίνουσα οιστρογονική δραστηριότητα που εκδηλώνεται στο τραχηλικό επίχρισμα καθόσον το ώριμο πολύστοιβο επιθήλιο αντικαθίσταται από ανώριμο ατροφικό επιθήλιο. Επιχρίσματα συνήθως περιέχουν παραβασικά κύτταρα είτε ως μεμονωμένα αποστρογγυλεμένα κύτταρα είτε ως κυτταρικοί σχηματισμοί. Γυμνοί πυρήνες (πυρήνες χωρίς κυτταρόπλασμα) μπορεί επίσης να παρατηρούνται. Λοίμωξη και/ή φλεγμονώδεις αλλοιώσεις είναι συχνές. Η παρουσία ενδοτραχηλικών κυττάρων σε ένα μετα-εμμηνοπαυσιακό επίχρισμα φθίνει σταδιακά λόγω της αντιμετάθεσης της ζώνης μετασχηματισμού. Η αντιμετάθεση προκαλεί την βαθύτερη μετατόπιση της ενδοτραχηλικής περιοχής εντός του ενδοτραχηλικού σωλήνα σε σημείο όπου να μην είναι προσβάσιμη για λήψη με σπάτουλα / ψήκτρα. Σε ατροφικά επιχρίσματα, όπου υπάρχει κάποια αμφιβολία στην διάγνωση, ενδεχομένως θα ωφελούσε η χορήγηση μικρής διάρκειας τοπική οιστρογονική θεραπεία στην ασθενή και επανάληψη του επιχρίσματος εντός 90 ημερών [56].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη παρούσα διπλωματική επιχειρήθηκε η δημιουργία αποτελεσματικού αλγορίθμου για τον εντοπισμό των πυρήνων των κυττάρων σε εικόνες που πάρθηκαν με τη χρήση φωτογραφικής κάμερας ενσωματωμένης σε κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου για thin prep PAP test δείγματα. Επίσης επιχειρήθηκε ο αποτελεσματικός καθορισμός των ορίων των κυττάρων και ο διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών με βάση το χρώμα. Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου όσο αφορά τον εντοπισμό των πυρήνων και τον καθορισμό των ορίων των κυττάρων συγκρίθηκαν με εκείνα γιατρού κυτταρολόγου και προέκυψαν τα στατιστικά για την αποτελεσματικότητα του προγράμματος. Συνολικά εξετάσθηκαν 17 εικόνες που απεικονίζουν 1371 κύτταρα με την κάθε εικόνα να περιλαμβάνει κατά μέσο όρο 80 κύτταρα. Οι εικόνες είναι τυχαίες ώστε να προσομοιώσουν όσο το δυνατόν καλύτερα ένα ρεαλιστικό πρόβλημα καθώς σε πολλά σημεία παρουσιάζεται το φαινόμενο όπου το ένα κύτταρο είναι πάνω στο άλλο καθιστώντας δυσκολότερο τον αποτελεσματικό εντοπισμό των πυρήνων και των καθορισμό των ορίων τους.

Αρχικά παρουσιάζεται μια εικόνα ενδεικτική, για να γίνει πιο κατανοητή η μορφή τους. Στη συγκεκριμένη, απεικονίζονται 51 κύτταρα που είναι σημαντικά λιγότερα από αυτά που επεξεργαζόμαστε στις επόμενες εικόνες. Η συγκεκριμένη είναι η πρώτη από τις 17 φωτογραφίες που πάρθηκαν. Η ανάλυσή της εικόνας είναι 1440X1080 pixels και απεικονίζει κύτταρα του τράχηλου της μήτρας που πάρθηκαν μέσω της τεχνικής thin prep PAP test. Συγκεκριμένα απεικονίζονται μόνο μη παθολογικά κύτταρα διαφόρων σταδίων της κυτταρικής ζωής και ξεχωρίζουν όλα σημαντικά από το πίσω λευκό φόντο. Αυτή η αντίθεση είναι πολύ σημαντική στη μετέπειτα επεξεργασία της εικόνας και είναι ένας από τους βασικούς λόγους που έγινε πολύ ευρέως γνωστό το thin prep test σε σχέση με το συμβατικό PAP test όπου η αντίθεση δεν ήταν τόσο έντονη ανάμεσα στο δείγμα και το φόντο καθώς επίσης υπήρχε και περισσότερος 'θόρυβος' από βλέννα που είχε περάσει στο δείγμα.



**Εικόνα 11.** Εικόνα παράδειγμα σαν αυτές που επεξεργαζόμαστε στη συνέχεια.

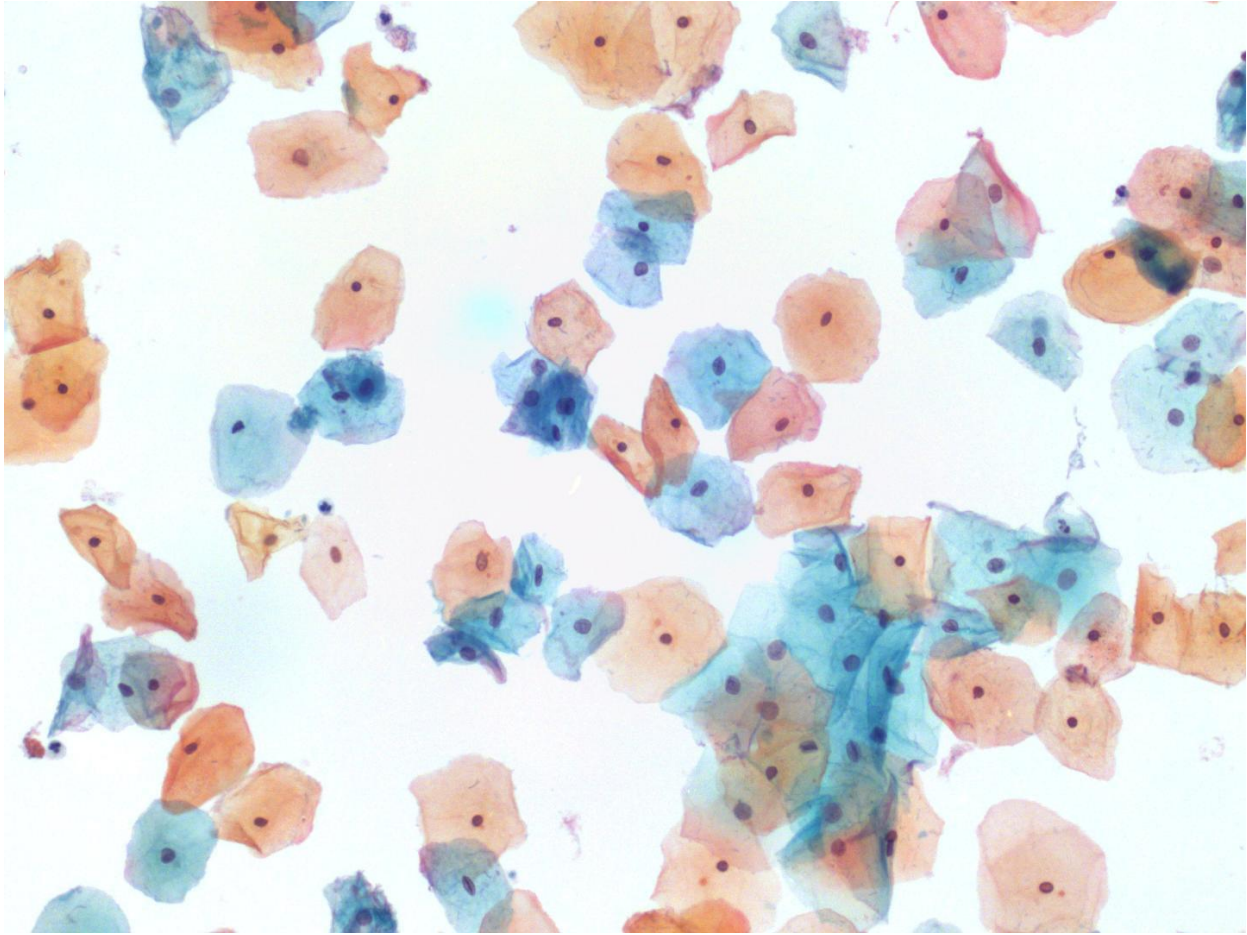
Η επεξεργασία ξεκινάει με τη δημιουργία αλγορίθμου διαχωρισμού των κυτταρικών πληθυσμών με βάση το χρώμα. Πρακτικά, από την αρχική εικόνα θα δημιουργήσουμε δυο άλλες με διαχωρισμένους τους πληθυσμούς. Ιδανικός αλγόριθμος για αυτή τη δουλειά είναι ο *k means segmentation* και τον χρησιμοποιούμε με κάποιες τροποποιήσεις όπως θα δείξουμε αναλυτικά στη συνέχεια.

Στο συγκεκριμένο κομμάτι έγινε εφαρμογή του *k means segmentation* αλγορίθμου ο οποίος τυπικά κάνει διαχωρισμό σε τρεις ομάδες με βάση το επικρατέστερο χρώμα στη κάθε μια. Εμείς αρχικά ζητάμε από τον αλγόριθμο να μας προβάλλει την αρχική εικόνα για να έχουμε μια καλύτερη άποψη της επεξεργασίας που θα ακολουθήσει. Στη συνέχεια ζητάμε από τον αλγόριθμο να προβάλλει την εικόνα 'σκιά' που πλέον έχει αντιληφθεί τη χρωματική διαφορά (**Εικόνα 13**). Μετά χρησιμοποιούμε μια εντολή *if* βασισμένη σε κριτήρια φωτεινότητας ώστε ο αλγόριθμος να προβάλλει μόνο την εικόνα με το μπλέ χρώμα ως βασικό χρώμα. Αυτό δίνει σαν αποτέλεσμα σε εμάς μια νέα εικόνα με μόνο τους μπλε κυτταρικούς πληθυσμούς. Αυτό το βήμα ήταν αναγκαίο γιατί όταν τρέχει ο *k means segmentation* αλγόριθμος, κάθε φορά δημιουργεί τρεις εικόνες που στη κάθε μία πρωταγωνιστεί και ένα διαφορετικό χρώμα, με την εικόνα στην οποία πρωταγωνιστεί ένα συγκεκριμένο χρώμα να αλλάζει κάθε φορά. Επομένως δεν

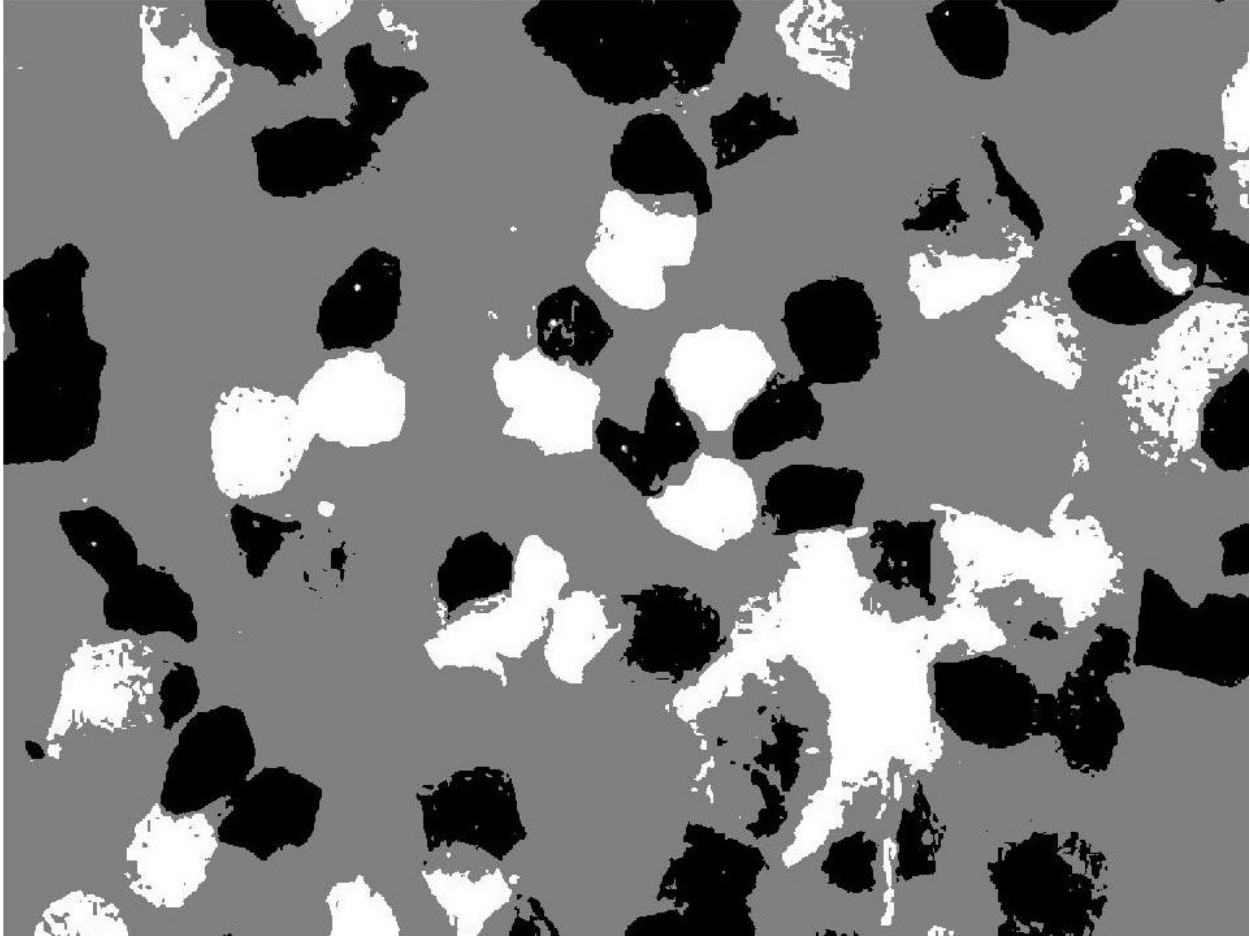
μπορούσαμε να ζητήσουμε απ τον αλγόριθμο να προβάλει μια συγκεκριμένη εικόνα κάθε φορά, καθώς αυτή διαφοροποιείται τυχαία. Αφού έχουμε προβάλει την αρχική εικόνα, την εικόνα σκιά και την εικόνα με τους μπλε κυτταρικούς πληθυσμούς, ζητάμε από τον αλγόριθμο να ‘καθαρίσει’ όλα τα δεδομένα που έχει συλλέξει και να ξαναπάρει για είσοδο την αρχική εικόνα, όπως θα δούμε παρακάτω.

Ο αλγόριθμος λοιπόν ξαναπαίρνει για είσοδο την αρχική εικόνα, αυτή τη φορά όμως ακολουθεί ένας αλγόριθμος Low-Light Image Enhancement που χρησιμοποιείται κυρίως για να βελτιώσει την ευκρίνεια σε φωτογραφίες με χαμηλό φωτισμό που έχουν παρθεί νύχτα για παράδειγμα. Εμείς χρησιμοποιούμε τον αλγόριθμο για βελτίωση της αντίθεσης και συγκεκριμένα για να κάνουμε εντονότερο το κόκκινο χρώμα που παρουσιάζουν τα κύτταρα και ως εκ τούτου να πάρουμε καλύτερα αποτελέσματα στην επεξεργασία στον ‘k means segmentation’ αλγόριθμο που θα ακολουθήσει. Η εικόνα που προκύπτει ξανά χρησιμοποιείται ως είσοδος στο ίδιο αλγόριθμο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Η εφαρμογή του αλγορίθμου για ενίσχυση του κόκκινου έγινε δύο φορές, γιατί φάνηκε πειραματικά ότι η μία φορά δεν έδινε αξιόλογα αποτελέσματα, ενώ με την ενίσχυση μέσω της χρήσης του αλγορίθμου, δύο φορές τα αποτελέσματα στη συνέχεια βελτιώθηκαν, όπως θα δείξουμε και στη πορεία. Με εφαρμογή και τρίτης φοράς του αλγορίθμου, άρχιζαν να υπάρχουν τα αντίθετα αποτελέσματα και το κόκκινο χρώμα αντί να γίνει πιο έντονο, έτεινε να χάνει τα έντονα χαρακτηριστικά του μη ξεχωρίζοντας αρκετά από το λευκό πίσω φόντο της εικόνας. Ο αλγόριθμος ολοκληρώνεται δεύτερη φορά και ορίζουμε την εικόνα που έχει προκύψει ως είσοδος στον κλασσικό k means segmentation που χρησιμοποιήσαμε και νωρίτερα. Η εφαρμογή του αλγορίθμου γίνεται κανονικά μέχρι την εφαρμογή του κριτηρίου της φωτεινότητας ώστε αυτή τη φορά να πάρουμε μόνο την εικόνα με το κόκκινο χρώμα. Έτσι συνολικά έχουμε έναν αλγόριθμο που αρχικά προβάλει την αρχική εικόνα (**Εικόνα 12**), στη συνέχεια μια εικόνα ‘σκιά’ που έχει γίνει μια πρώτη ομαδοποίηση με βάση το χρώμα η οποία μας προϊδεάζει για τη συνέχεια (**Εικόνα 13**) και μετά μία εικόνα με βάση τους μπλε κυτταρικούς πληθυσμούς (**Εικόνα 14**) και μία εικόνα με βάση τους κόκκινους κυτταρικούς πληθυσμούς (**Εικόνα 15**). Ακολουθούν οι εικόνες από την εφαρμογή του αλγορίθμου.

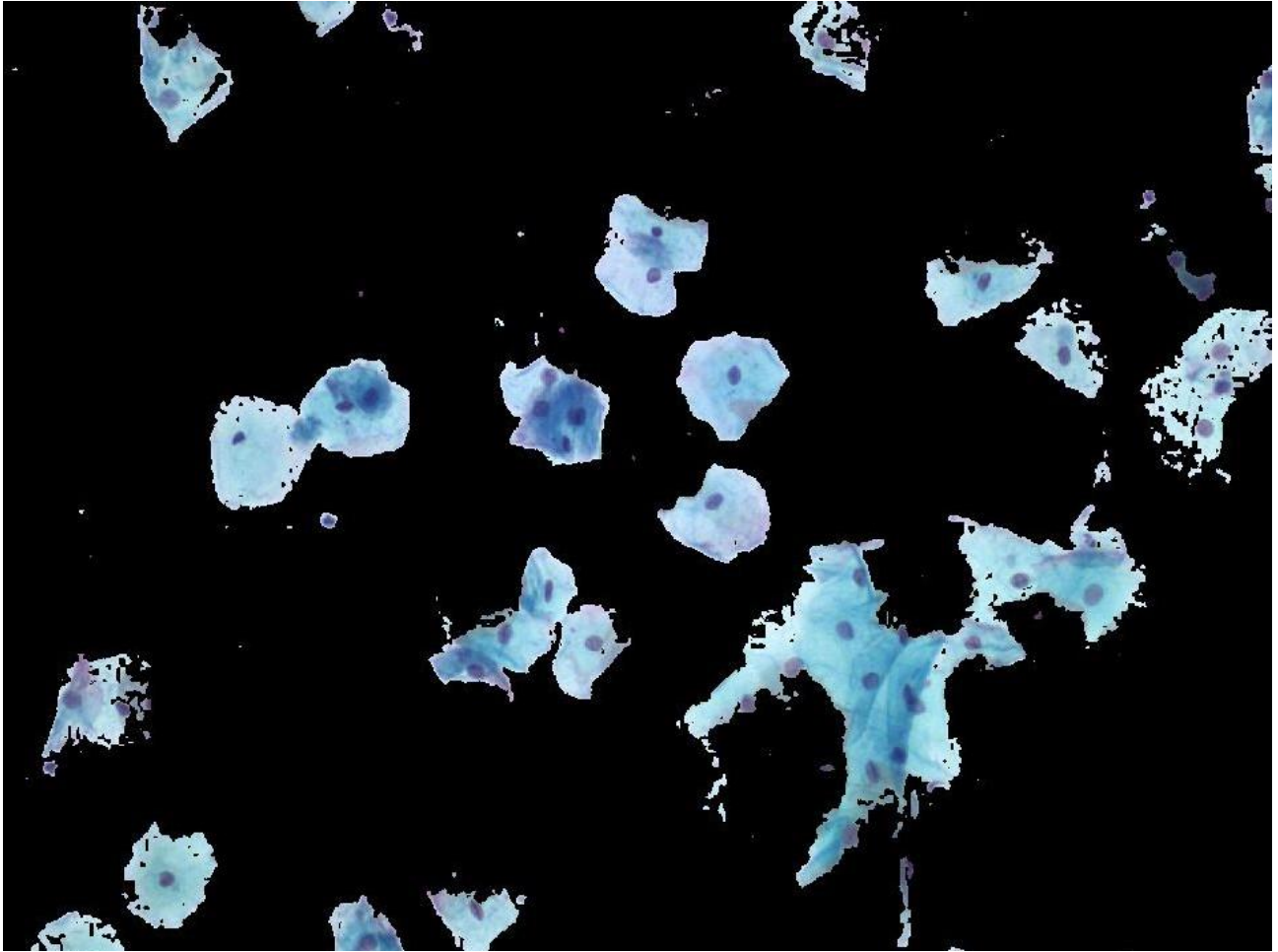




**Εικόνα 12.** Η αρχική εικόνα που εφαρμόσαμε τον αλγόριθμο διαχωρισμού κυτταρικών πληθυσμών με βάση το χρώμα.



**Εικόνα 13.** Η εικόνα σκιά της αρχικής, με μία πρώτη ομαδοποίηση πληθυσμών με βάση το χρώμα.

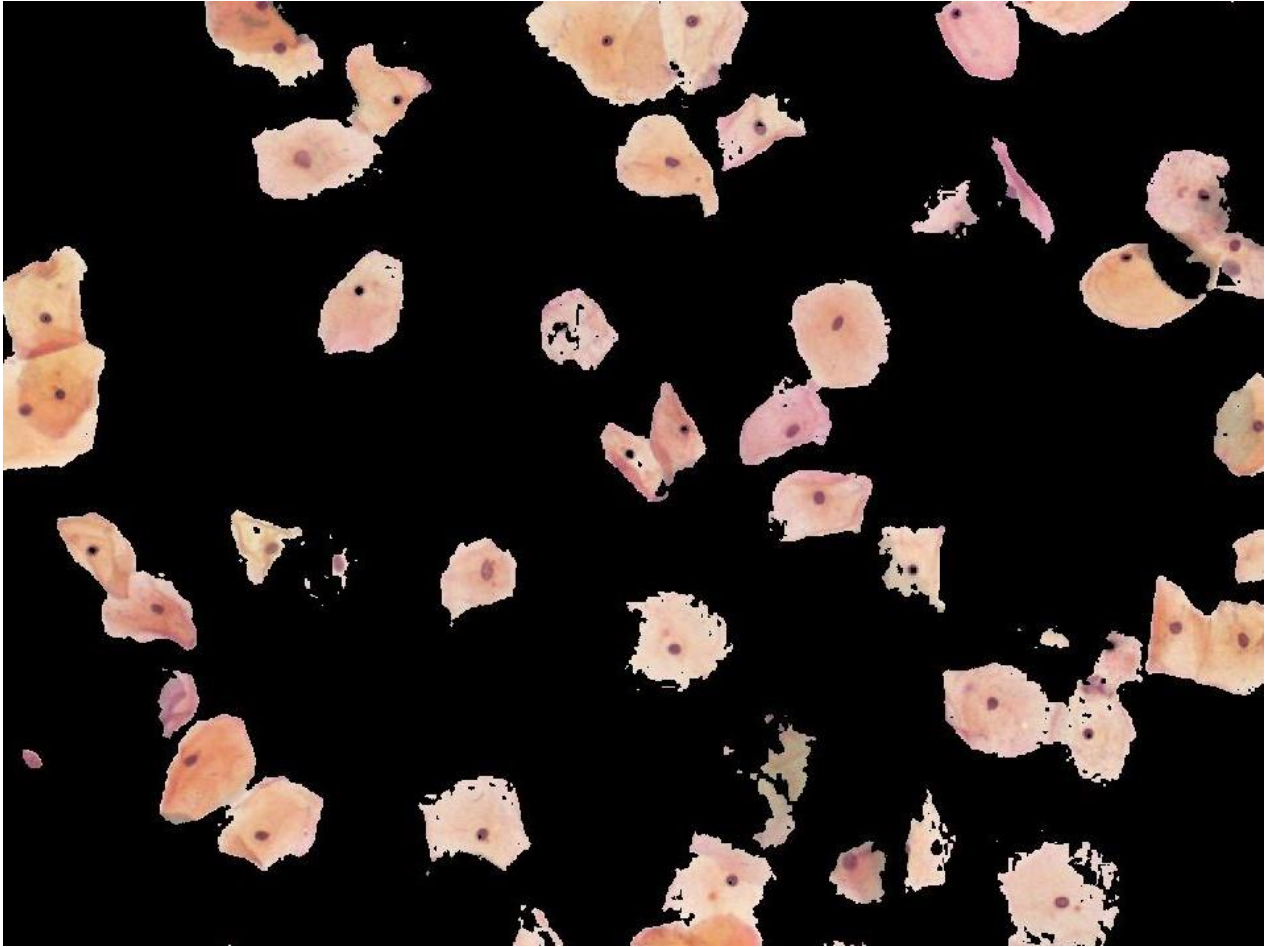


**Εικόνα 14.** Η εικόνα με τους μπλέ κυττάρικους πληθυσμούς που προκύπτει από την αρχική.



**Εικόνα 15.** Η εικόνα με τους κόκκινους κυτταρικούς πληθυσμούς που προκύπτει από την αρχική και έπειτα από ενίσχυση της αντίθεσης.

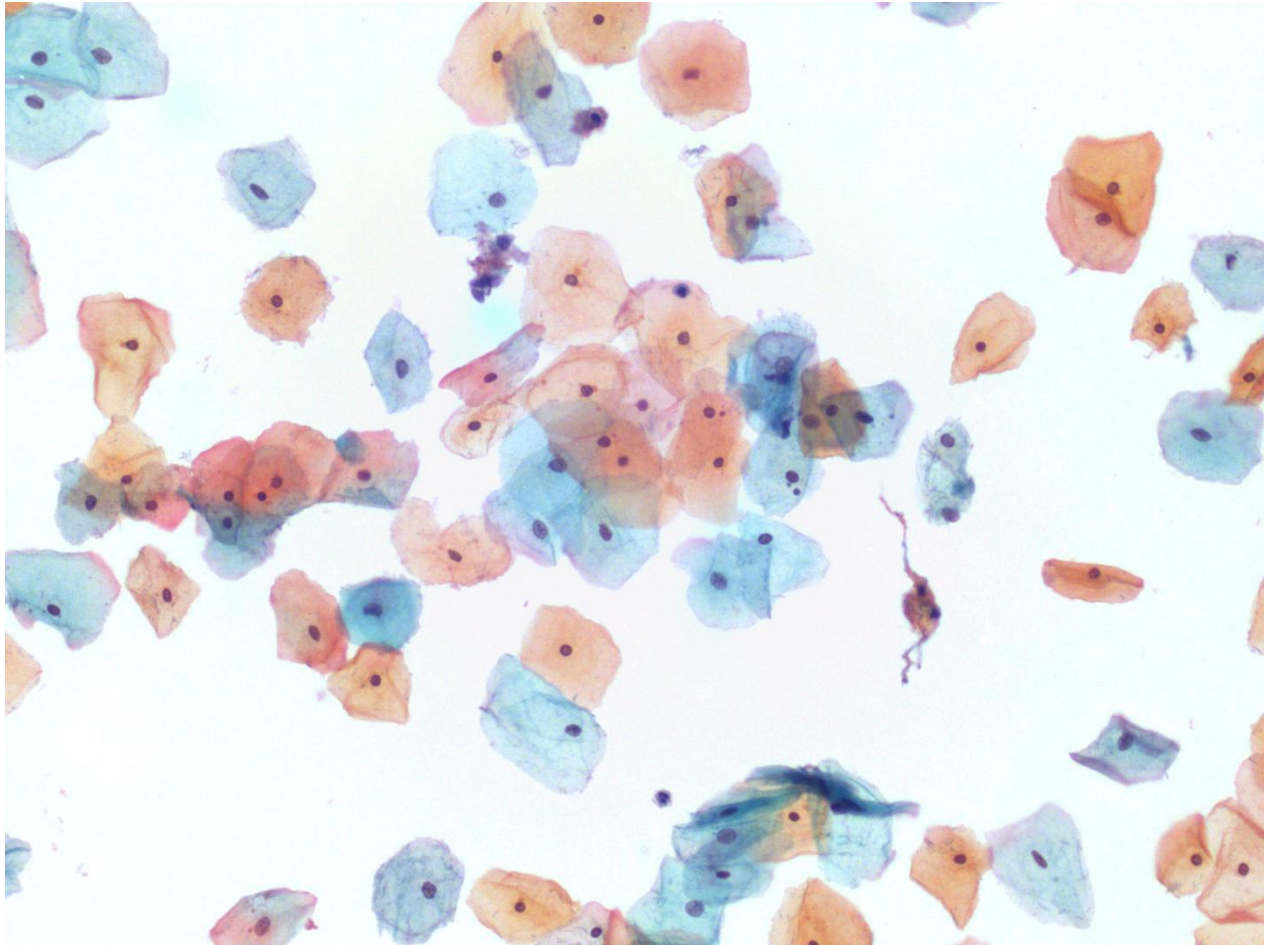
Ο αλγόριθμος βρίσκει εφαρμογή σε όλες τις εικόνες και έχει υψηλή αποτελεσματικότητα. Η τεχνική ενίσχυσης της αντίθεσης με βάση τον αλγόριθμο Low-Light Image Enhancement βοήθησε τα κόκκινα κύτταρα να παρουσιάζονται όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένα στο τελικό αποτέλεσμα αφού ενίσχυσε τα κόκκινα pixels της αρχικής εικόνας και οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα, δεν μπορούσε όμως να βρει αποτελεσματική εφαρμογή και για τα μπλέ pixels αφού αυτά έχαναν την αντίθεση με το πίσω λευκό φόντο της αρχικής εικόνας. Ακολουθεί ένα παράδειγμα με εφαρμογή του kmeans segmentation αλγορίθμου για τους κόκκινους πληθυσμούς χωρίς την τεχνική ενίσχυσης ενσωματωμένης στο κώδικα, ως απόδειξη των φτωχότερων αποτελεσμάτων που βγάζει ο αλγόριθμος στο τελικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 16.** Η εικόνα με τους κόκκινους κυτταρικούς πληθυσμούς που προκύπτει από την αρχική, χωρίς τεχνική ενίσχυσης των κόκκινων pixels.

Στη συνέχεια περνάμε στον βασικό αλγόριθμο που έχει στόχο τον εντοπισμό των πυρήνων των κυττάρων και τον καθορισμό των ορίων τους. Αυτή η αποστολή είναι αρκετά δύσκολη όσο αφορά τον εντοπισμό, καθώς πολλά ψευδή στίγματα μπορεί να αναγνωριστούν ως αληθινούς πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα πολλοί αληθινούς πυρήνες μπορεί να μην αναγνωριστούν εξ αιτίας του φαινομένου της επικάλυψης, όπου το κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου καλύπτει ένα άλλο κύτταρο, είτε τον πυρήνα αυτού. Με δύο λόγια, ένα κύτταρο κρύβει ένα άλλο και αυτό δυσκολεύει τον εντοπισμό. Σε αληθινές συνθήκες εργαστηρίου ο ειδικός θα έκανε μεγάλο ζουμ στο σημείο με τη χρήση του μικροσκοπίου, μέχρι να δει τον πυρήνα που καλύπτεται (από το κυτταρόπλασμα ενός άλλου κυττάρου) ή μέχρι να αποφανθεί πως δεν μπορεί να συμπεράνει τι βλέπει με βεβαιότητα. Στο δικό μας πρόβλημα η εικόνα είναι συγκεκριμένων διαστάσεων και στατική αν και ο αλγόριθμος μπορεί να λειτουργήσει και σε εικόνες που έχουν εστίασει περισσότερο. Παρόλα αυτά, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες εικόνες γιατί δείχνουν καθαρά τα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα εικόνες τέτοιων διαστάσεων είναι περισσότερο ρεαλιστικό να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια σκαναρίσματος όλου του δείγματος σε μελλοντικά βήματα

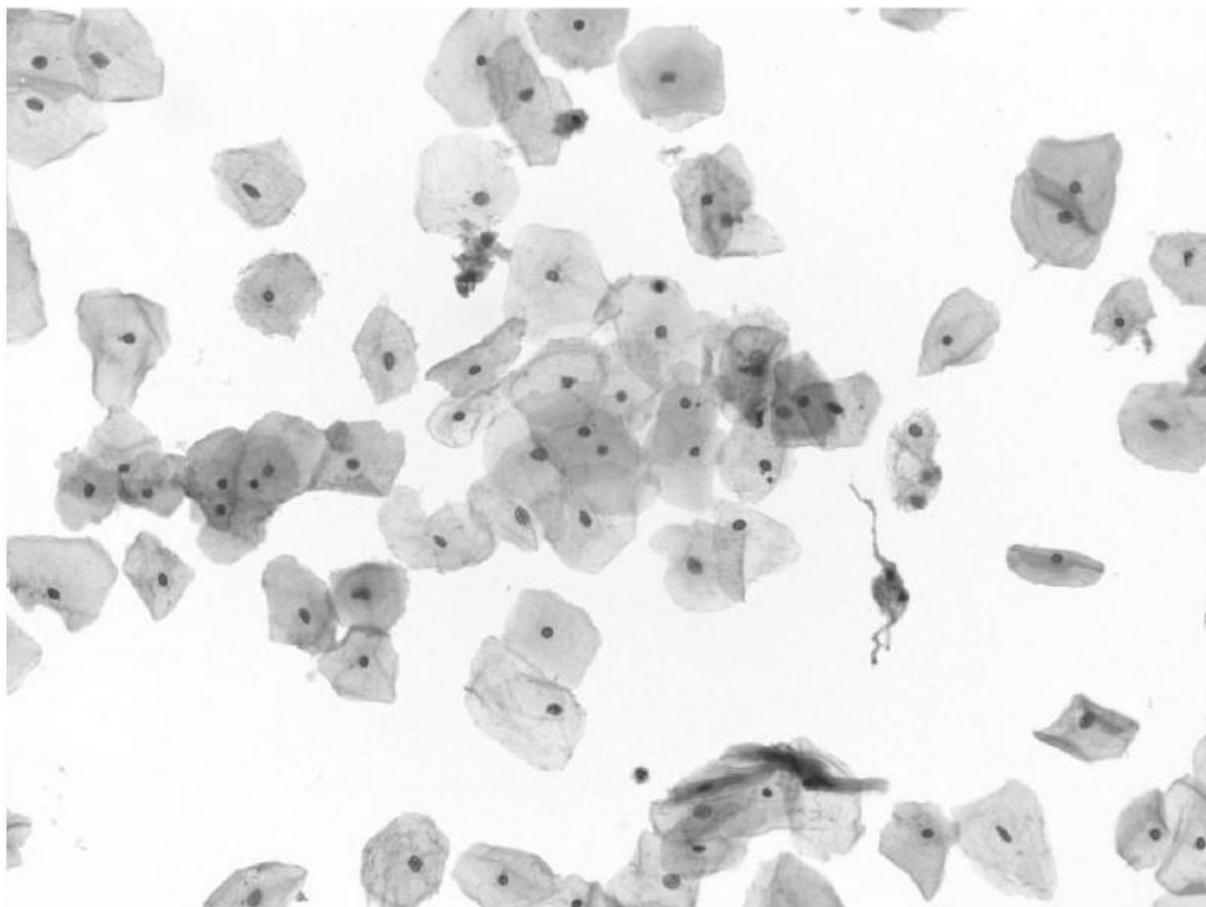
βελτίωσης, ώστε ο αλγόριθμος να καταφέρει να μπει σε επιχειρησιακή λειτουργία. Στο συγκεκριμένο σημείο φτιάχνουμε έναν αλγόριθμο εντοπισμού πυρήνων και καθορισμό ορίων στα κύτταρα, δίνοντας του μια συγκεκριμένη εικόνα ως είσοδο, την ίδια εικόνα δίνουμε και στον ειδικό κυτταρολόγο ώστε και ο ίδιος με τη σειρά του να καταμετρήσει τους πυρήνες και να καθορίσει τα όρια. Στο τέλος προσπαθούμε να δούμε πόσο καλά ο αλγόριθμος κατάφερε να μιμηθεί τις επιδόσεις του ειδικού κυτταρολόγου έχοντας ακριβώς την ίδια πληροφορία για να βγάλει τα συμπεράσματα.



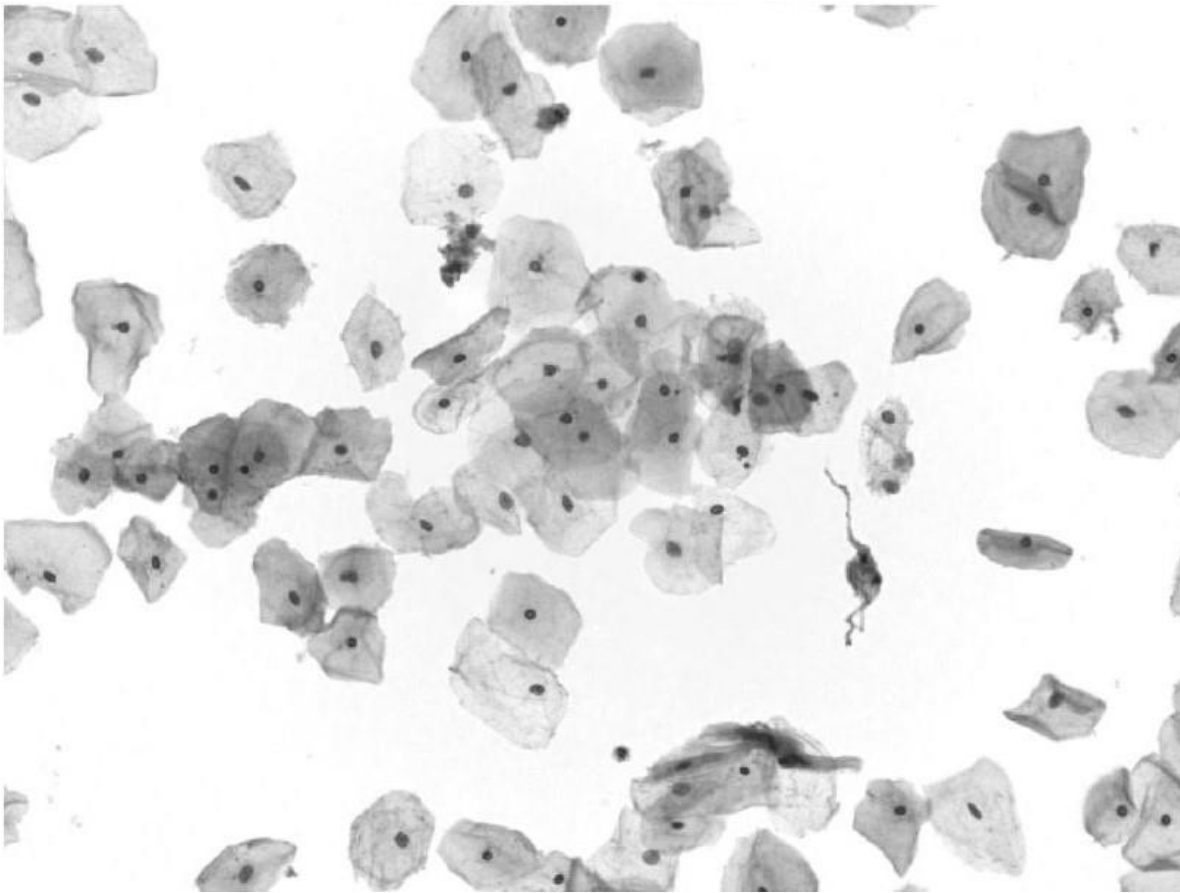
**Εικόνα 17.** Η αρχική εικόνα την οποία επεξεργαζόμαστε και εφαρμόζουμε τον αλγόριθμο εντοπισμού πυρήνων.

Αρχικά διαβάζουμε την εικόνα εισόδου και στη συνέχεια τη προβάλλουμε (**Εικόνα 17**) ώστε να μπορούμε να δούμε ποια εικόνα θα επεξεργαστούμε. Μετά τη μετατρέπουμε σε γκρι κλίμακα (**Εικόνα 18**) που έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή της εικόνας σε πίνακα δύο διαστάσεων πλέον και ως εκ τούτου απλοποίηση της πληροφορίας. Στη συνέχεια διαχωρίζουμε

την αρχική εικόνα σε κόκκινο, πράσινο και μπλε κανάλι και παίρνουμε για είσοδο το πράσινο κανάλι (Εικόνα 19).



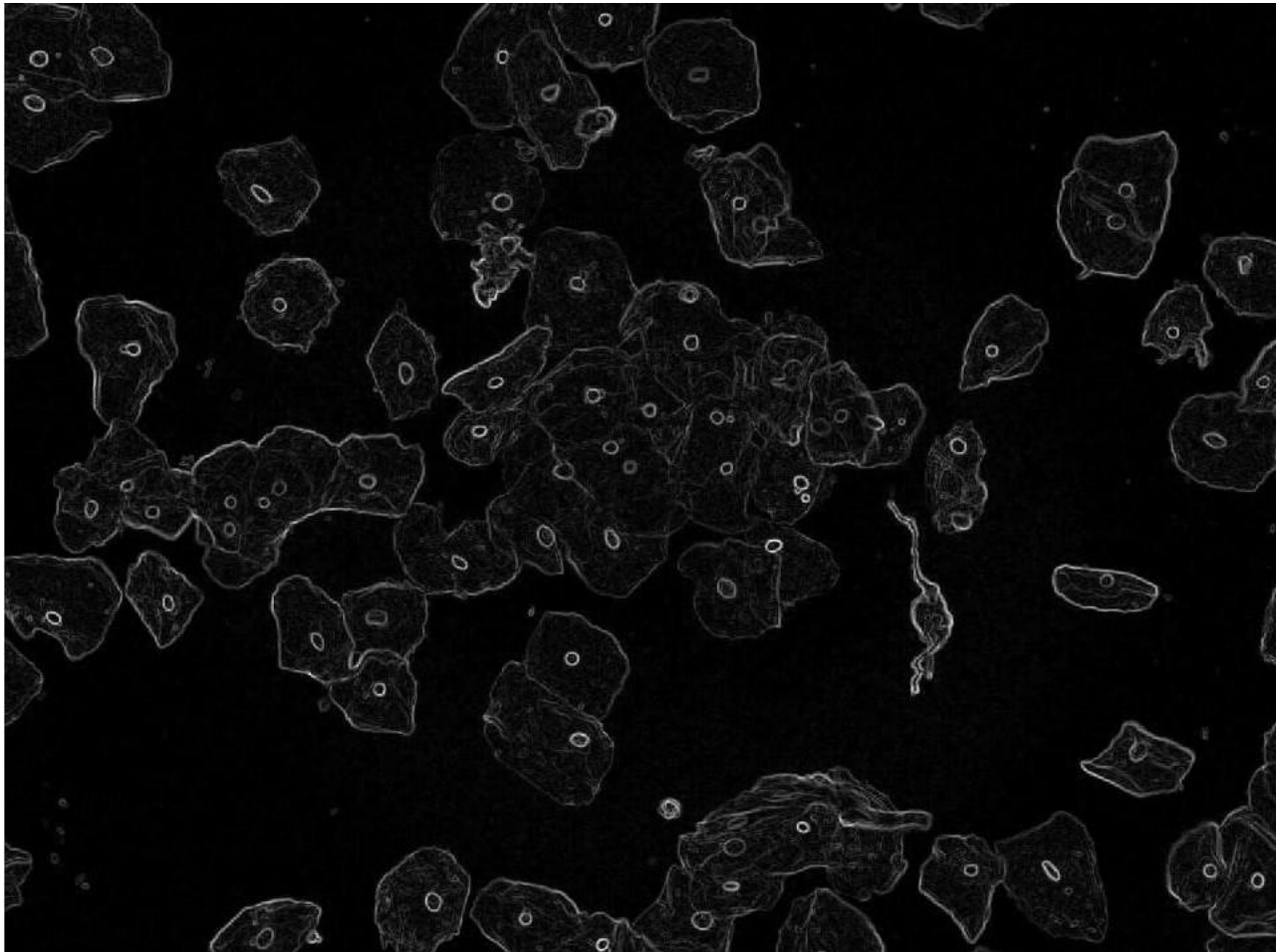
**Εικόνα 18.** Μετατροπή της αρχικής εικόνας στη γκρι κλίμακα.



**Εικόνα 19.** Το πράσινο κανάλι της εικόνας.

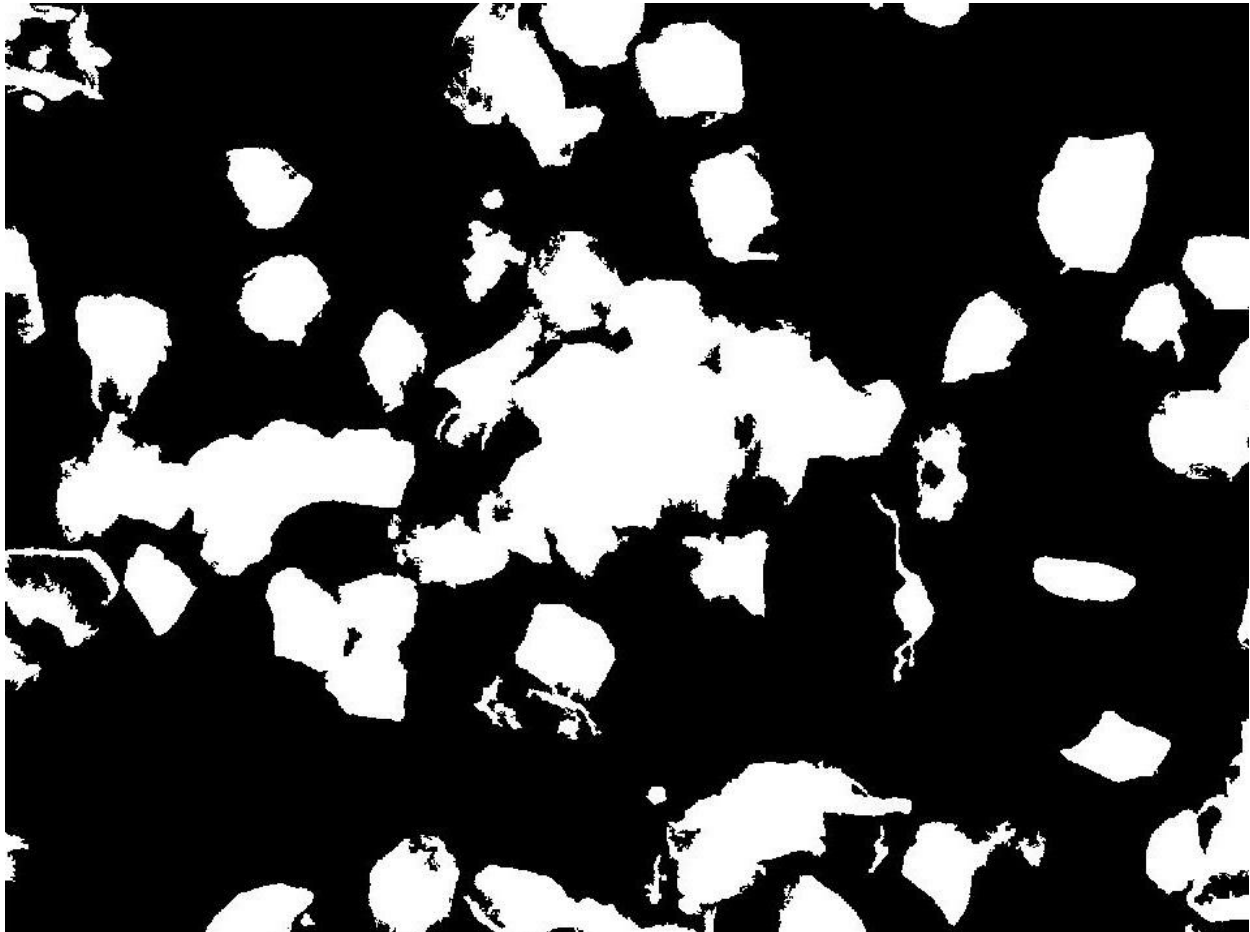
Μετά κάνουμε χρήση του Sobel φίλτρου, και έτσι δημιουργούμε μία gradient magnitude εικόνα (**Εικόνα 20**) η οποία αποθηκεύεται ως gradmag πίνακας.





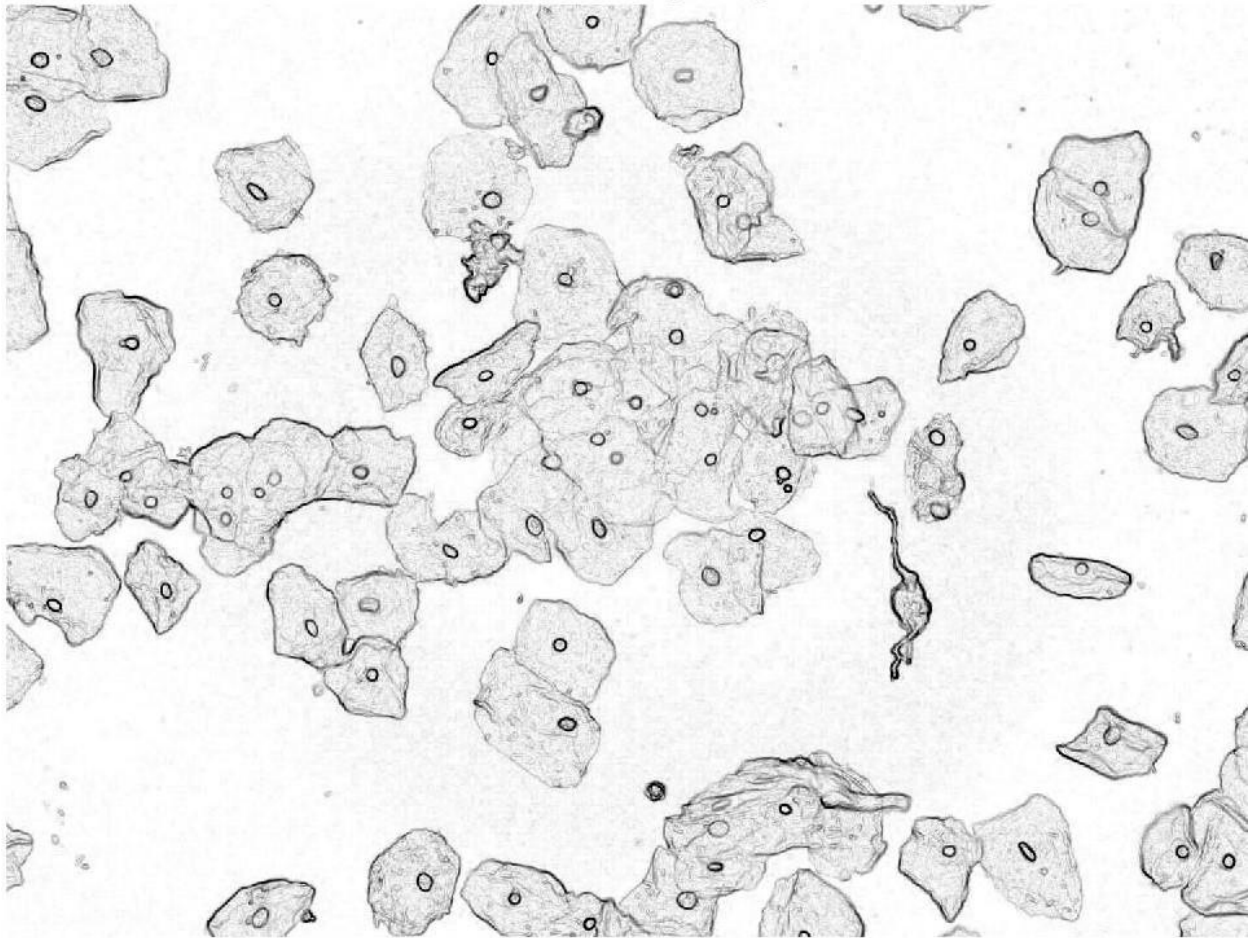
**Εικόνα 20.** Η gradient magnitude εικόνα που δημιουργήσαμε.

Τα βήματα της επεξεργασίας συνεχίζονται καθώς δημιουργούμε μια διαδική εικόνα πράγμα που σημαίνει ότι τα pixels μπορούν να είναι είτε λευκά είτε μαύρα. Στο συγκεκριμένο σημείο έχει μεγάλη σημασία η τιμή κατωφλιού που δίνουμε και αυτή η τιμή είναι το 5. Αυτή η τιμή μας βοηθάει ώστε η διαδική ή αλλιώς η binary image που φτιάξαμε (**Εικόνα 21**) να έχει όσο το δυνατόν σωστότερα διαχωρισμένα τα κύτταρα από το πίσω φόντο χωρίς παράλληλα να έχει χαθεί κάποια σημαντική πληροφορία. Αυτή η διαδική εικόνα θα μας είναι πολύ χρήσιμη στη συνέχεια.



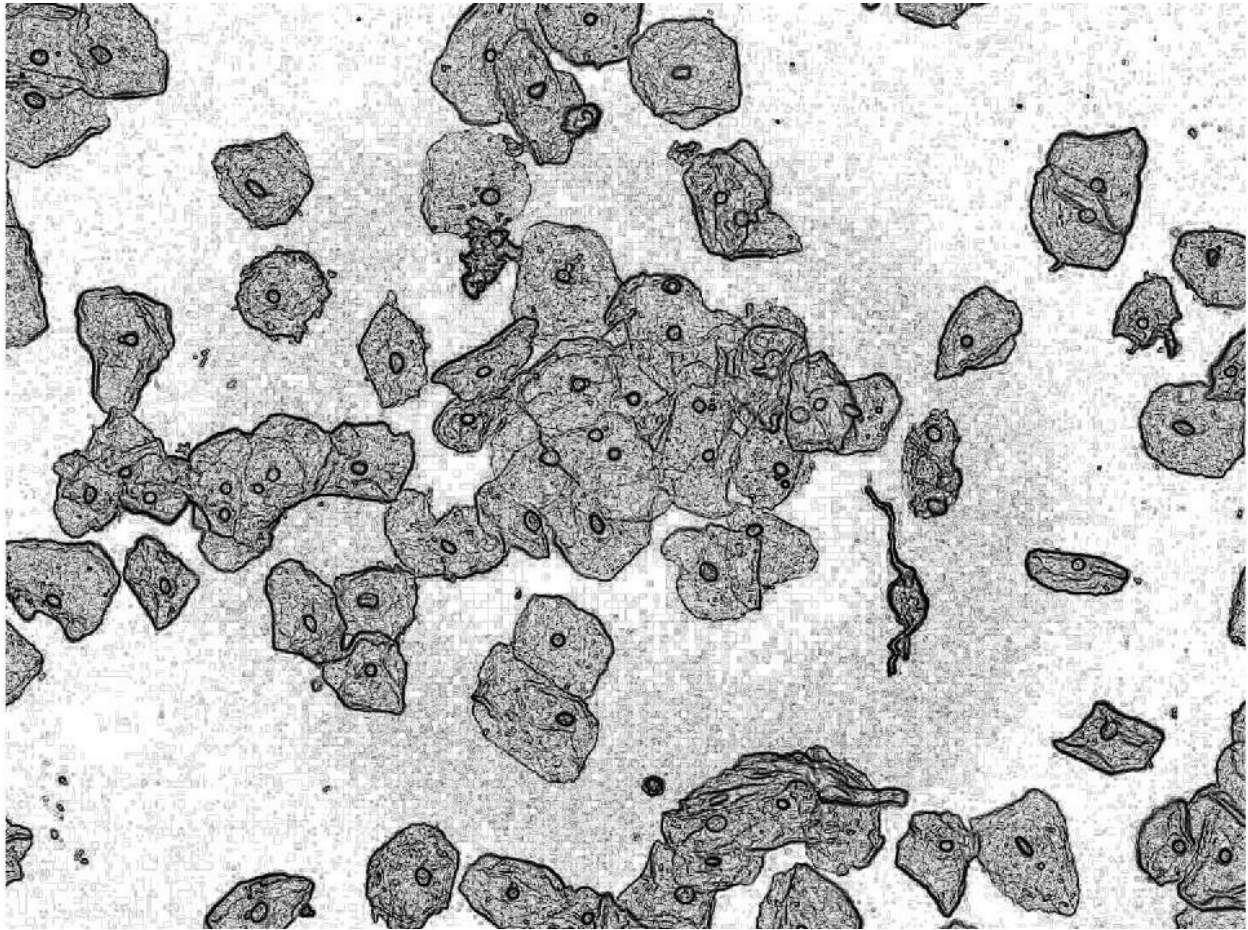
**Εικόνα 21.** Η διαδική εικόνα που δημιουργήσαμε.

Μετά, χρησιμοποιούμε ξανά την εικόνα `gradmag` που προβάλαμε νωρίτερα (**Εικόνα 20**) και αυτή τη φορά δημιουργούμε την αντίθετη της εικόνα την οποία αποθηκεύουμε ως `A1n`. Η εικόνα που προκύπτει είναι εκείνη πάνω στην οποία θα προβάλουμε το τελικό αποτέλεσμα με τους εντοπισμένους πυρήνες (**Εικόνα 22**).

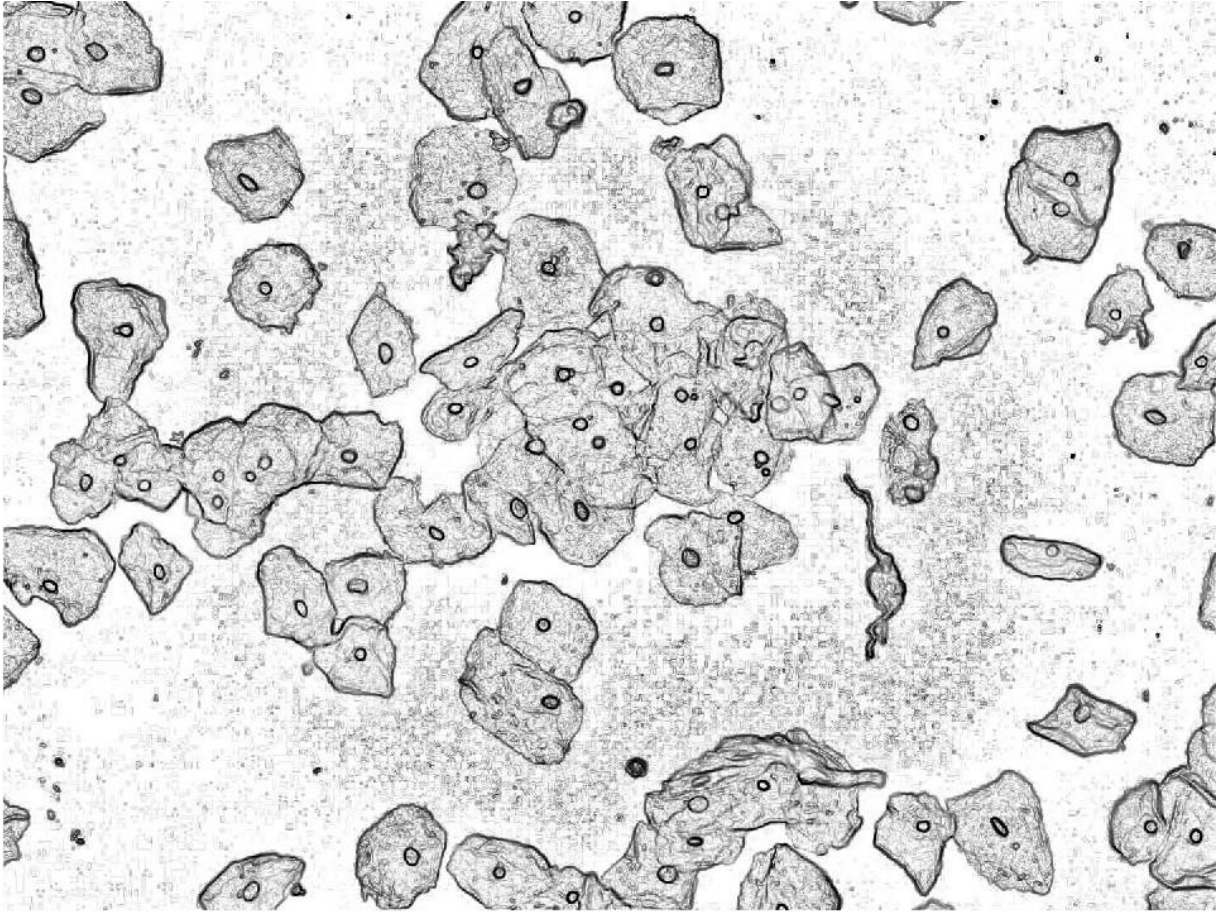


**Εικόνα 22.** Η αντίθετη εικόνα της gradmag που την ονομάζουμε *Aln*.

Στη συνέχεια εφαρμόζουμε έναν Low-Light Image Enhancement αλγόριθμο δύο σταδίων για ενίσχυση της αντίθεσης, το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας (**Εικόνα 23**) ακολουθεί αμέσως το δεύτερο που προκύπτει και η τελική ενισχυμένη εικόνα (**Εικόνα 24**).

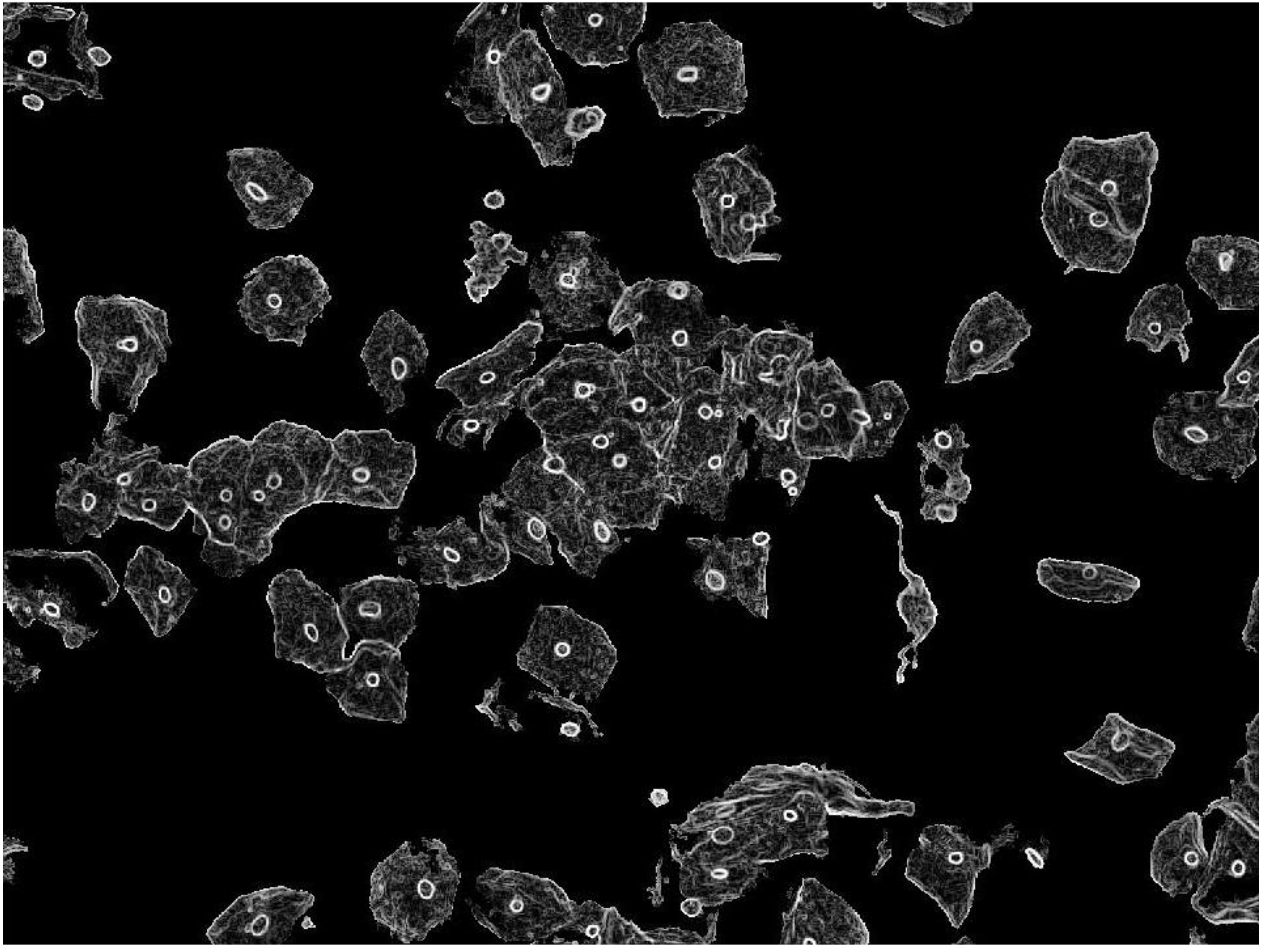


**Εικόνα 23.** Η εικόνα ενισχυμένης αντίθεσης που προκύπτει με βάση την Alivn.



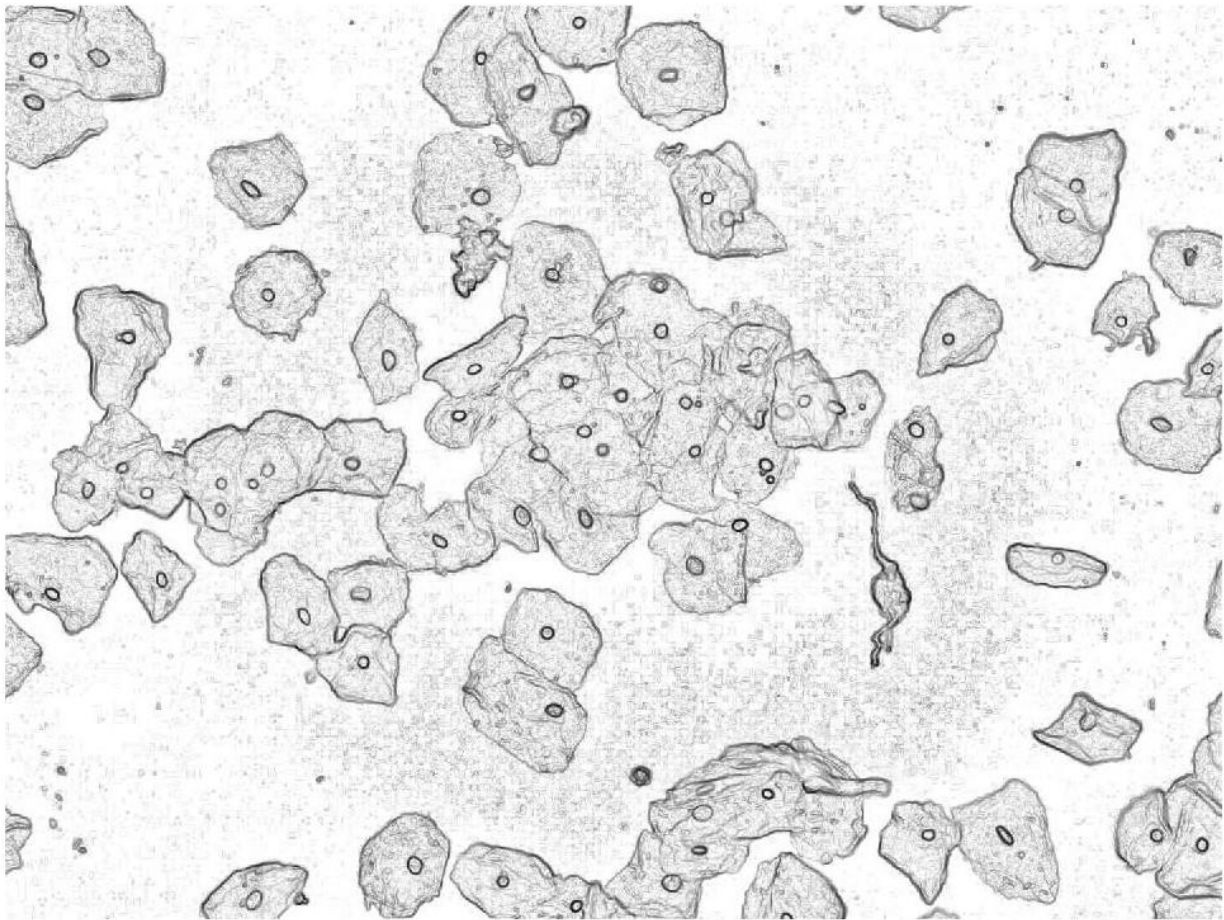
**Εικόνα 24.** Η εικόνα BIn που προκύπτει.

Σε αυτό το σημείο χρησιμοποιούμε την διαδική εικόνα που είχαμε φτιάξει νωρίτερα (**Εικόνα 21**) και την συνθέτουμε με την εικόνα AIn (**Εικόνα 22**), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας εικόνας (**Εικόνα 25**) που είναι ιδανική για την εφαρμογή του αλγόριθμου εντοπισμού σε επόμενο βήμα. Η εικόνα που προκύπτει ονομάζεται FF.



**Εικόνα 25.** Η εικόνα FF, η μία από τις δύο εικόνες που χρησιμοποιούμε για τον αλγόριθμο εντοπισμού.

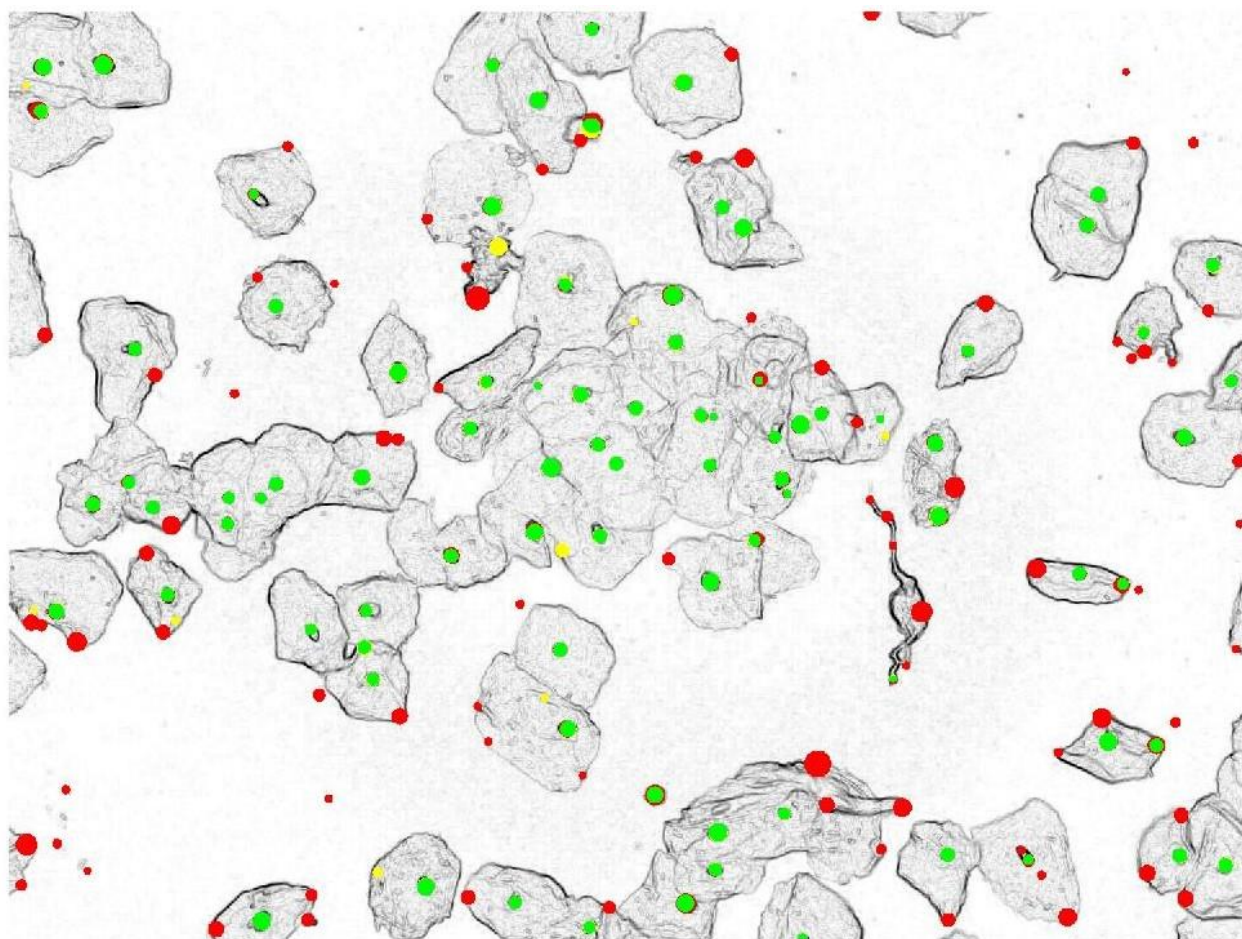
Η δεύτερη εικόνα που θα χρησιμοποιήσουμε για τον αλγόριθμο εντοπισμού θα προκύψει από τη σύνθεση της εικόνας BIn (Εικόνα 24) με την AIn (Εικόνα 22). Η εικόνα που προκύπτει την ονομάζουμε Z (Εικόνα 26) και είναι ιδανική για την εφαρμογή του αλγορίθμου εντοπισμού στο επόμενο βήμα της επεξεργασίας.



**Εικόνα 26.** Η εικόνα Z, η μία από τις δύο εικόνες που χρησιμοποιούμε για τον αλγόριθμο εντοπισμού.

Σε αυτό το σημείο έχει ολοκληρωθεί η επεξεργασία εικόνας και πλέον θα προχωρήσουμε στον αλγόριθμο εντοπισμού. Ανοίγουμε τις δύο εικόνες, την FF (**Εικόνα 25**) και την Z (**Εικόνα 26**) στο Image Segmenter App. Σε αυτό το σημείο θεωρούμε τους πυρήνες ως κυκλικά αντικείμενα. Άρα χρησιμοποιούμε την εντολή find circles του Image segmenter App και ψάχνουμε στην κάθε εικόνα ορίζοντας ένα εύρος με τη μικρότερη διάμετρο στο 8 και τη μέγιστη στο 36 ενώ κρατάμε την ευαισθησία στο προκαθορισμένο επίπεδο. Η εντολή αυτή τρέχει ως αλγόριθμο τον μετασχηματισμό Hough (Hough Transform) για κυκλικά αντικείμενα. Όσο αφορά την FF (**Εικόνα 25**), ψάχνουμε για κυκλικά αντικείμενα αποτελούμενα από φωτεινά pixels και ο αλγόριθμος βρίσκει 94 τέτοια στοιχεία. Σε αυτό το σημείο παρατηρούμε οπτικά ότι πράγματι ο αλγόριθμος έχει εντοπίσει τους αληθινούς πυρήνες μέσα σε αυτά. Αποθηκεύουμε τα δεδομένα ως seg\_01. Ακολουθούμε την ίδια διαδικασία και για την Z (**Εικόνα 26**) αλλά αυτή τη φορά ψάχνουμε για κυκλικά αντικείμενα αποτελούμενα από σκοτεινά pixels. Σε αυτό το σημείο ο αλγόριθμος εντοπίζει 164 αντικείμενα και παρατηρούμε πως πάλι ο αλγόριθμος έχει εντοπίσει τους αληθινούς πυρήνες. Τέλος αποθηκεύουμε τα δεδομένα ως seg\_02.

Έχουμε λοιπόν επεξεργαστεί την αρχική εικόνα με τέτοιο τρόπο ώστε να προκύψουν δύο πολύ διαφορετικές εικόνες που ο αλγόριθμος εύρεσης κυκλικών αντικειμένων μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αποτελεσματικός. Ο αλγόριθμος και στις δύο εικόνες εντόπισε το 94% των αληθινών πυρήνων όμως ταυτόχρονα εντόπισε πολλά ψευδή στίγματα ως πυρήνες. Για να μειώσουμε αυτά τα ποσοστά, τρέχουμε έναν αλγόριθμο που θέλουμε να κρατήσει την τομή αυτών των δύο δεδομένων που αποθηκεύσαμε ως seg\_01 και seg\_02, δηλαδή θέλουμε να κρατήσουμε μόνο τα κοινά δεδομένα τα οποία στη συνέχεια τα προβάλλουμε πάνω στην **Εικόνα 22** για να γίνει ευκολότερα αντιληπτό το αποτέλεσμα. Αφού έχει ολοκληρωθεί ο αλγόριθμος, προβάλλουμε όλα τα δεδομένα όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 27**).

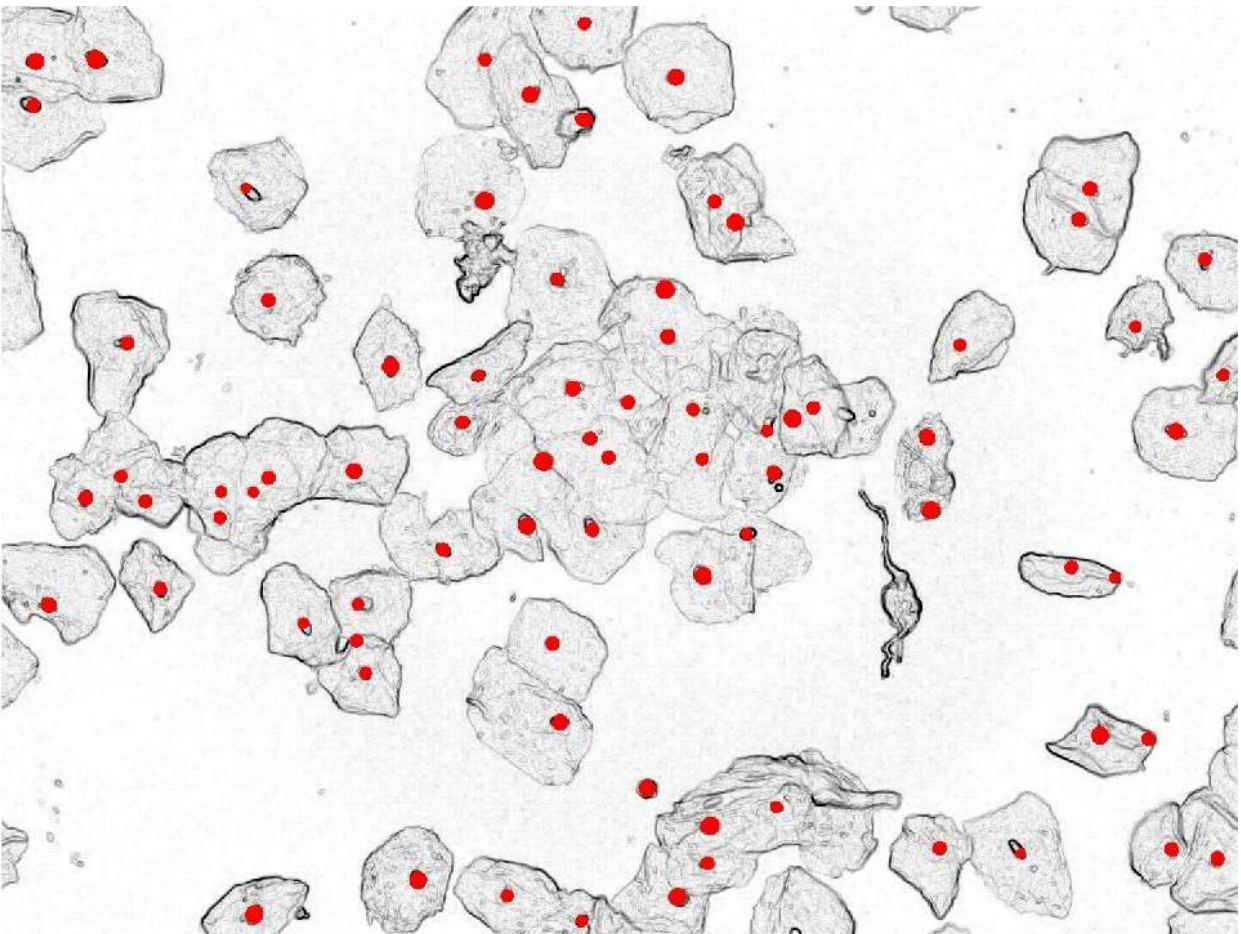


**Εικόνα 27.** Προβολή όλων των κυκλικών αντικειμένων που εντόπισε ο αλγόριθμος για κάθε μία από τις δύο εικόνες.

Σε αυτό το σημείο ο αλγόριθμος προβάλλει με πράσινο χρώμα τα δεδομένα που ήταν κοινά και στις δύο εικόνες εντοπισμού. Από εδώ και πέρα μόνο αυτά τα δεδομένα θα κρατήσουμε αφού περιλαμβάνουν τους αληθινούς πυρήνες. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα δεδομένα που ο αλγόριθμος εντόπισε μόνο στην FF (**Εικόνα 25**) ενώ με κόκκινο χρώμα τα



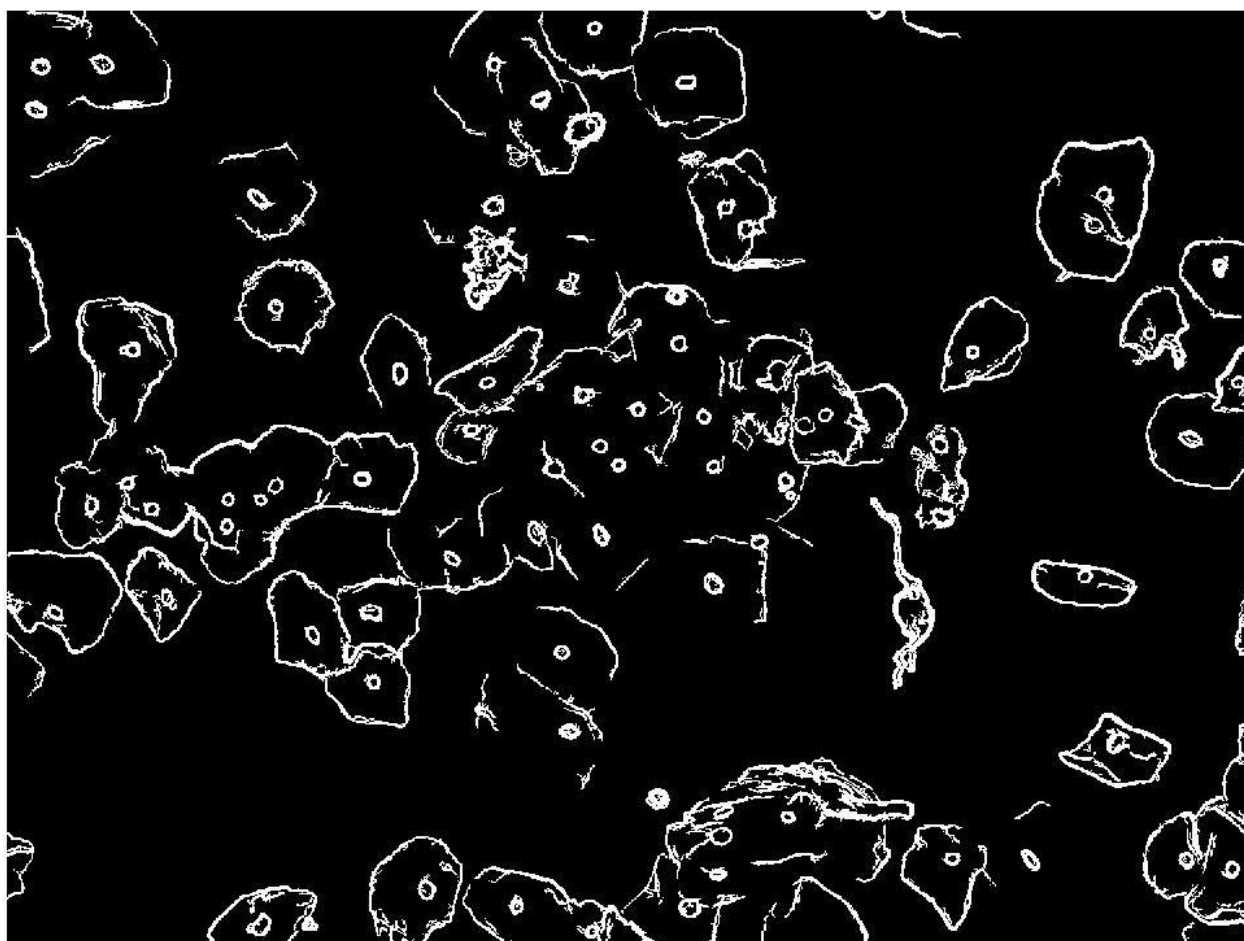
δεδομένα που εντοπίστηκαν μόνο στη Z (**Εικόνα 26**). Σε αυτό το σημείο έχουμε καταφέρει να μειώσουμε σημαντικά τα ψευδή στίγματα διατηρώντας ταυτόχρονα όλους τους αληθινούς πυρήνες. Παρόλα αυτά, εφαρμόζουμε έναν ακόμα αλγόριθμο στον οποίο ζητάμε να αφαιρέσει τα κυκλικά αντικείμενα που εντόπισε και είναι μικρότερα από 100 pixels. Τελικά ο αλγόριθμος μας προβάλλει τον αριθμό των αντικειμένων που έχει κρατήσει και αυτός ο αριθμός αφορά 78 αντικείμενα. Σημαντικά χαμηλότερος από τα 94 και 164 που είχε βρει ο αλγόριθμος για κάθε μία από τις δύο εικόνες αντίστοιχα στο αρχικό στάδιο της επεξεργασίας. Στη συνέχεια προβάλλουμε τους εντοπισμένους πυρήνες (**Εικόνα 28**).



**Εικόνα 28.** Η τελική επεξεργασία με τους εντοπισμένους πυρήνες να προβάλλονται πάνω στην εικόνα AInv.

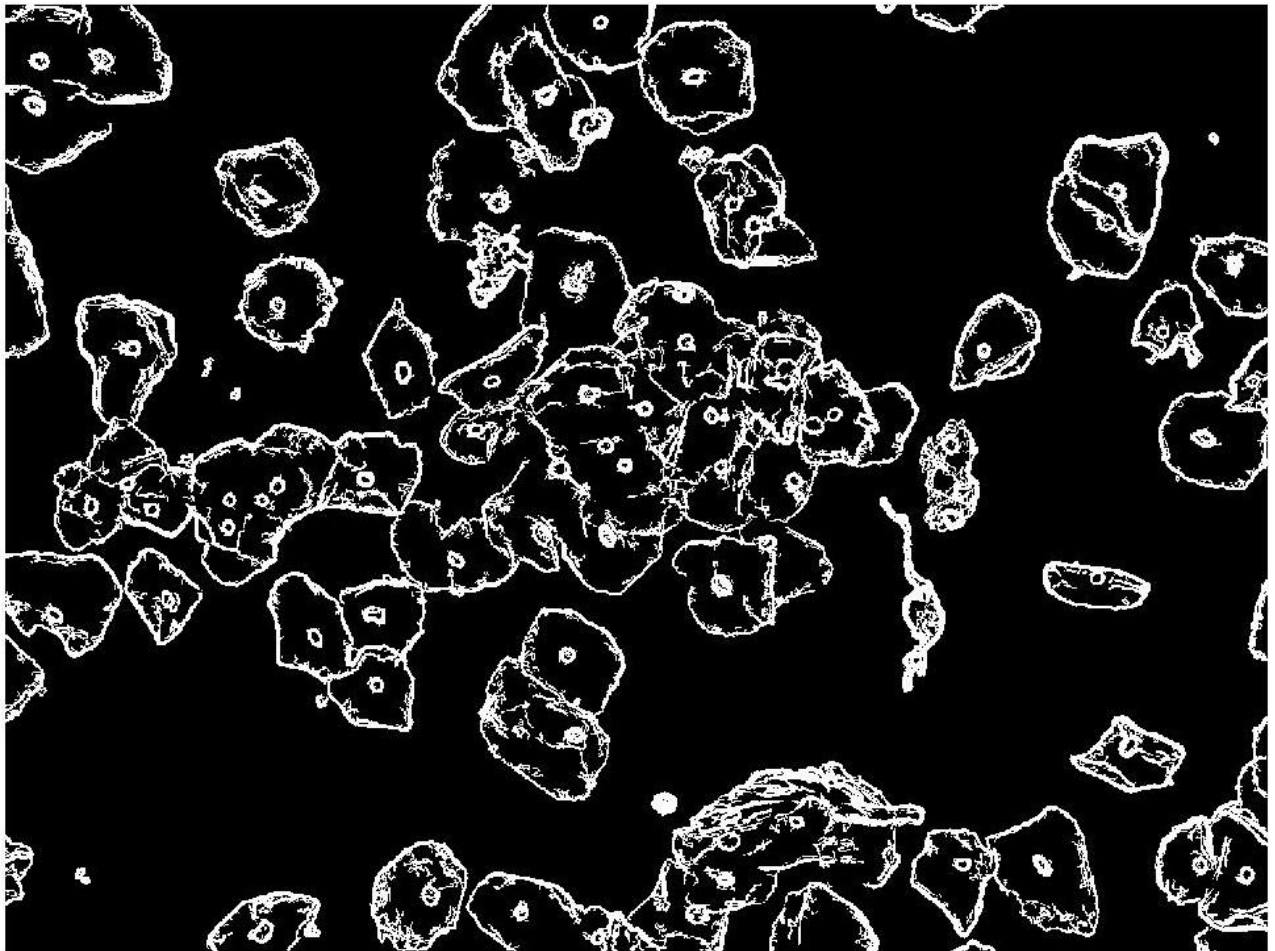
Αφού έχουμε ολοκληρώσει τον αλγόριθμο εντοπισμού των πυρήνων, περνάμε στον αλγόριθμο καθορισμού των ορίων των κυττάρων. Αυτή τη φορά ανοίγουμε στο Image Segmenter App την AInv (**Εικόνα 22**) και την Z (**Εικόνα 26**). Αυτό το κάνουμε γιατί αν και η FF (**Εικόνα 25**) ήταν πολύ καλή για την εφαρμογή αλγορίθμου εντοπισμού πυρήνα, δεν είναι μια καλή εικόνα για τον εντοπισμό των ορίων των κυττάρων αφού εξ αιτίας της διαδικασίας κατωφλίωσης έχουν

χαθεί σε αρκετά σημεία τα σαφή όρια των κυττάρων, άρα η είσοδος μιας τέτοιας εικόνας στη μετά επεξεργασία θα μας δώσει και φτωχότερα αποτελέσματα. Δεν υπάρχει όμως το ίδιο πρόβλημα με την AInv (**Εικόνα 22**) η οποία αν και δεν είναι αρκετά αποτελεσματική για χρήση στον εντοπισμό των πυρήνων, είναι αρκετά καλή για τον καθορισμό των ορίων των κυττάρων. Στα παράθυρα που μας ανοίγονται, πατάμε την εντολή `auto cluster` ή οποία τρέχει έναν αλγόριθμο που πρακτικά διαχωρίζει το πίσω φόντο από τα αντικείμενα μπροστά και ονομάζεται 'active counter'. Στη συνέχεια αποθηκεύουμε τα δεδομένα ως `seg_03` και `seg_04` αντίστοιχα. Αφού έχουμε τα δεδομένα, τρέχουμε έναν αλγόριθμο που θα αθροίσει τα όρια που εντόπισε σε κάθε εικόνα πρακτικά προβάλλοντας την μια εικόνα πάνω στην άλλη. Στην αρχή προβάλλουμε τα όρια που εντόπισε ο αλγόριθμος `active counter` στην εικόνα AInv (**Εικόνα 33**).



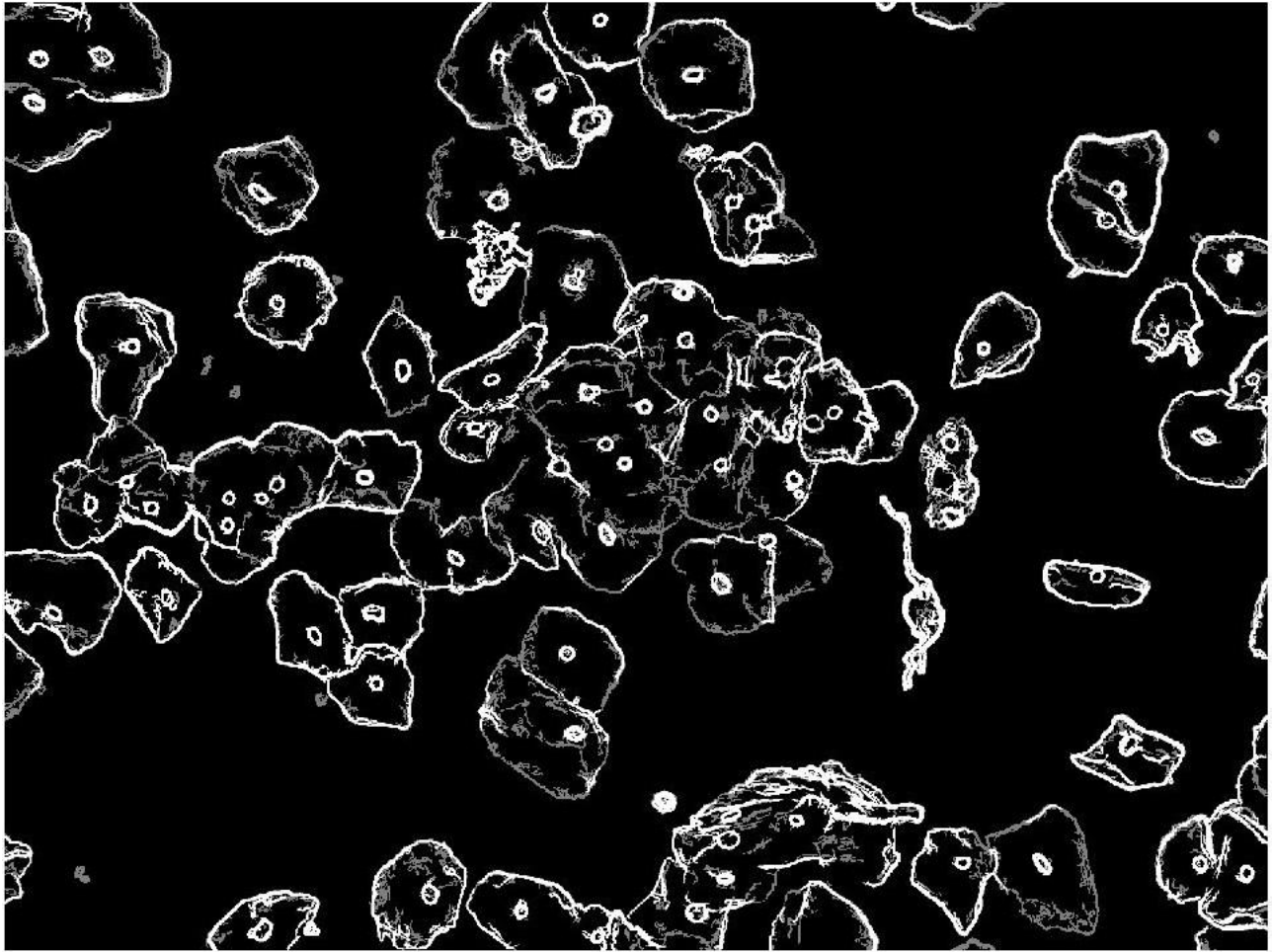
**Εικόνα 33.** Τα όρια των κυττάρων που εντόπισε ο αλγόριθμος στην εικόνα AInv.

Στη συνέχεια προβάλλουμε τα όρια που εντόπισε ο αλγόριθμος 'active counter' στην εικόνα Z (**Εικόνα 34**).



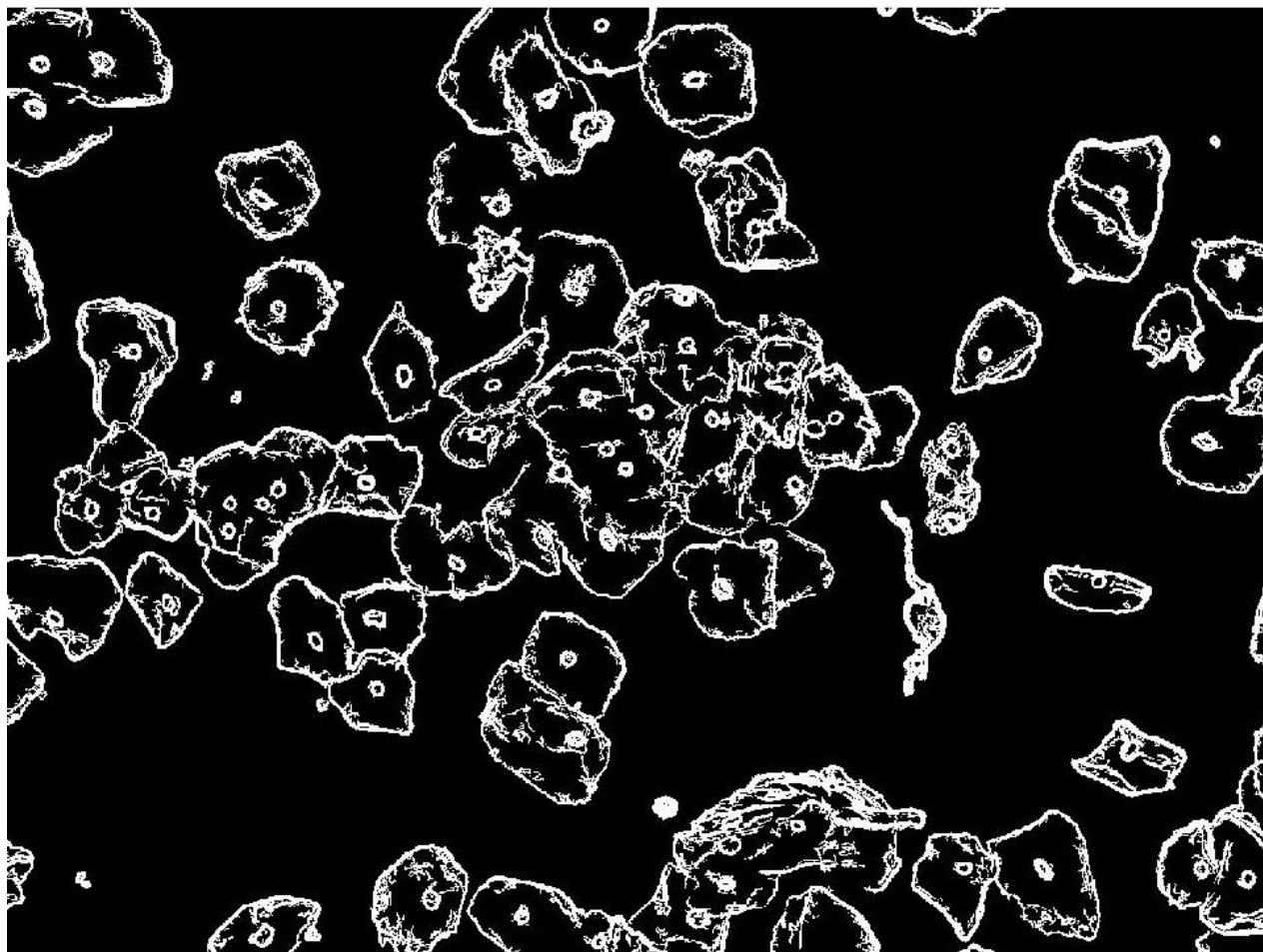
**Εικόνα 34.** Τα όρια των κυττάρων που εντόπισε ο αλγόριθμος στην εικόνα Z.

Στη συνέχεια ζητάμε από τον αλγόριθμο να αθροίσει τα όρια των δύο εικόνων δημιουργώντας μια τρίτη εικόνα στην οποία και προβάλλει τις δύο προηγούμενες, την μια πάνω στην άλλη (**Εικόνα 34**).



**Εικόνα 35.** Τα τελικά όρια των κυττάρων για την Εικόνα 17, όπως προκύπτουν μετά την επεξεργασία.

Ένα τελευταίο προερατικό βήμα της επεξεργασίας αφορά τη μετατροπή των ορίων σε λευκό χρώμα (Εικόνα 36) κάνοντας τα έτσι ενιαία.



**Εικόνα 36.** Τα τελικά όρια των κυττάρων για την Εικόνα 17, όπως προκύπτουν μετά την επεξεργασία και σε λευκό ενιαίο χρώμα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

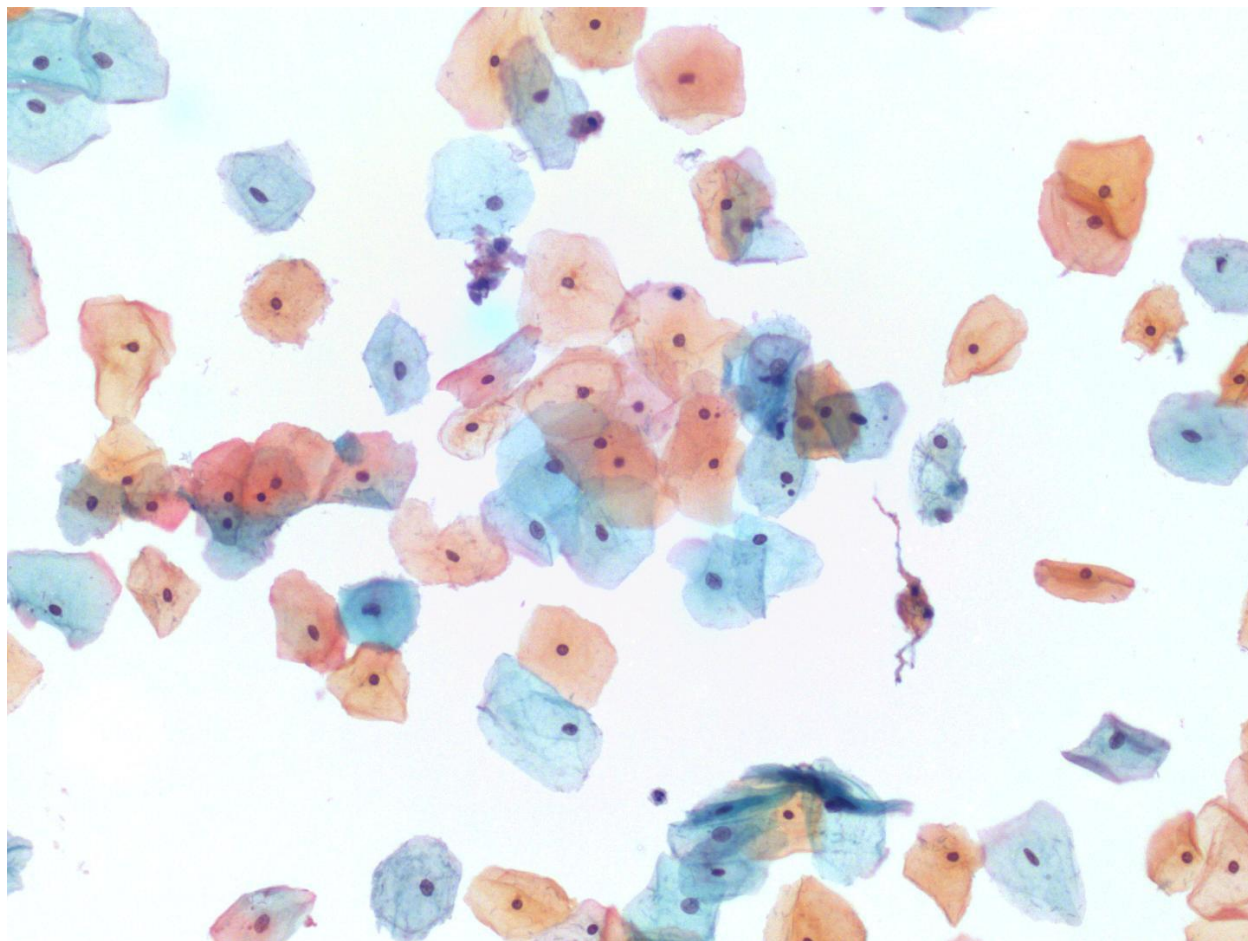
Η προτεινόμενη μέθοδος αξιολογήθηκε σε 17 εικόνες από thin prep PAP τεστ που αποτελούνταν από 1371 αναγνωρισμένους πυρήνες κυττάρων. Η αναγνώριση των πυρήνων έγινε από ειδικό κυτταρολόγο και τα αποτελέσματα του συγκρίθηκαν με εκείνα του αλγορίθμου εντοπισμού. Ο αλγόριθμος έτρεξε για κάθε μια από τις εικόνες και συνολικά εντόπισε 1295 αληθινούς πυρήνες κυττάρων (true positives), γεγονός που καθιστά το sensitivity στο 94%. Ο αριθμός των πυρήνων που ο αλγόριθμος δεν εντόπισε, ανέρχεται στους 96, ενώ ο αριθμός των αντικειμένων που ο αλγόριθμος λανθασμένα εντόπισε ανέρχεται σε 244 (false positives), επίσης υπολογίστηκαν και άλλα μέτρα όπως το positive predictive value (PPV) που ήταν στο 86% και μας δίνει πόσοι απ το σύνολο των εντοπισμένων πυρήνων πραγματικά ήταν πυρήνες. Τέλος υπολογίστηκε και η συνολική επίδοση του αλγορίθμου, γνωστή ως F1 score και ανέρχεται στο 90%. Αναλυτικά ακολουθεί ο **Πίνακας 3** με τις επιδόσεις του αλγορίθμου σε αριθμούς.

True Positive Rate (TPR)	94%
Positive Predictive Value (PPV)	86%
False Negative Rate (FNR)	6%
False Discovery Rate (FDR)	14%
<b>F1 Score</b>	<b>90%</b>

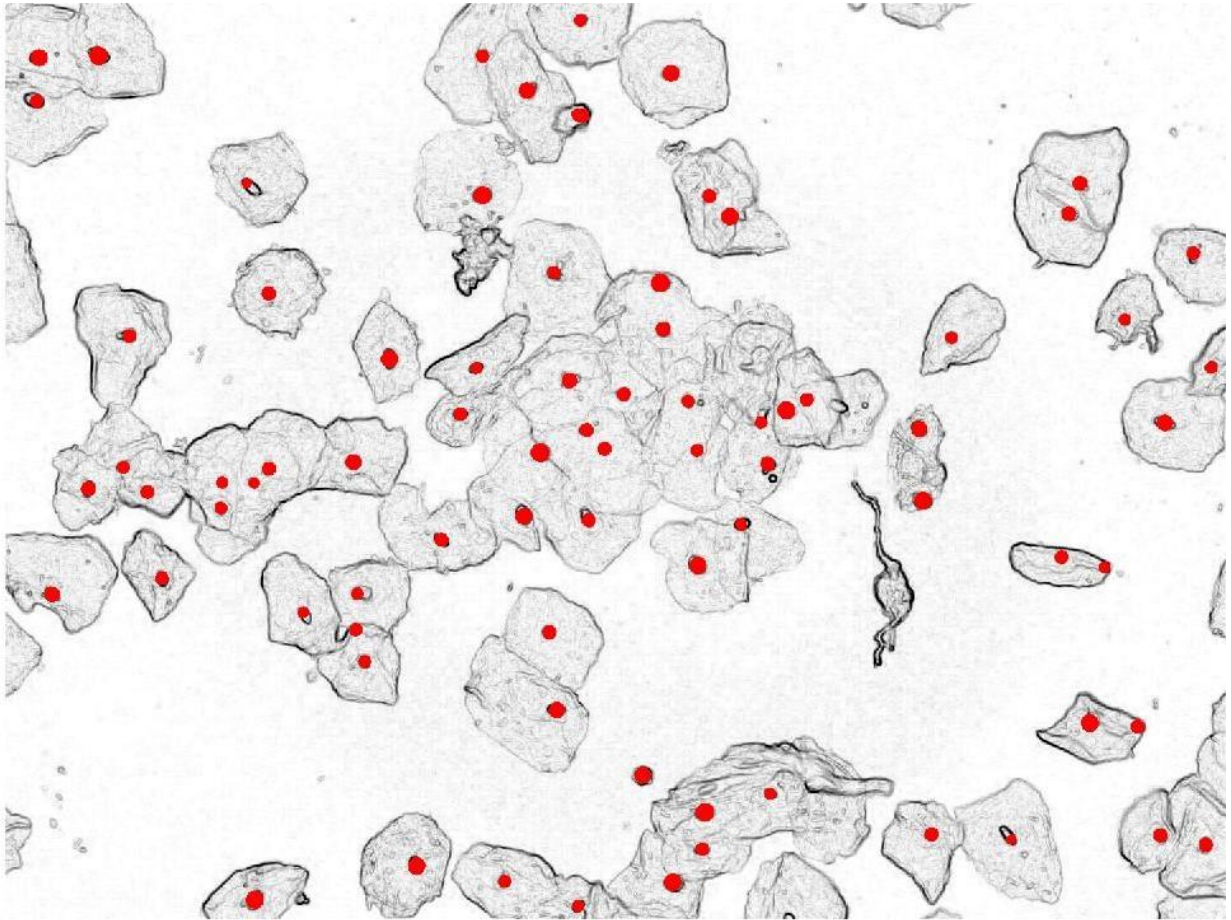
**Πίνακας 3.** Η επίδοση του αλγορίθμου σε αριθμούς.

Η προτεινόμενη μέθοδος είναι μια πλήρως αυτοματοποιημένη διαδικασία. Η βασική ιδέα είναι η εξής: Κατά πόσο μπορεί ένας αλγόριθμος να προσεγγίσει τις επιδόσεις ενός ειδικού κυτταρολόγου έχοντας και οι δύο τους ως αφετηρία ακριβώς την ίδια πληροφορία, δηλαδή μια στατική εικόνα. Στη συνέχεια προσπαθούμε να μετρήσουμε αυτές τις επιδόσεις με κάποια ευρέως διαδεδομένα στατιστικά μέτρα, όπως το sensitivity και το positive predictive value (PPV). Το πρώτο προσδιορίζει στατιστικά πόσους από τους αληθινούς πυρήνες κατάφερε να εντοπίσει ο αλγόριθμος. Ενώ το δεύτερο μετράει πόσα αντικείμενα από το σύνολο που εντοπίστηκαν ήταν αληθινά πυρήνες. Αυτό το μέτρο είναι πολύ χρήσιμο καθώς κάθε τεχνική εντοπισμού αναπόφευκτα θα αναγνωρίσει και διάφορα ψευδή στίγματα ως αντικείμενα ενδιαφέροντος, στη προκειμένη περίπτωση ως πυρήνες κυττάρων. Επίσης χρησιμοποιούμε το F1 score που είναι ένα μέτρο για τη συνολική επίδοση του αλγορίθμου, συγκεκριμένα αποτελεί το αρμονικό μέσο ανάμεσα στην ευαισθησία (Sensitivity) και το Positive Predictive Value .

Στη συνέχεια παρατήθεται η επίδοση του αλγορίθμου ποιοτικά. Η ποιοτική παρατήρηση αφορά την εικόνα εισαγωγής και την προβολή του αποτελέσματος αρχικά όσο αφορά τους εντοπισμένους πυρήνες και στη συνέχεια για τα όρια των κυττάρων.



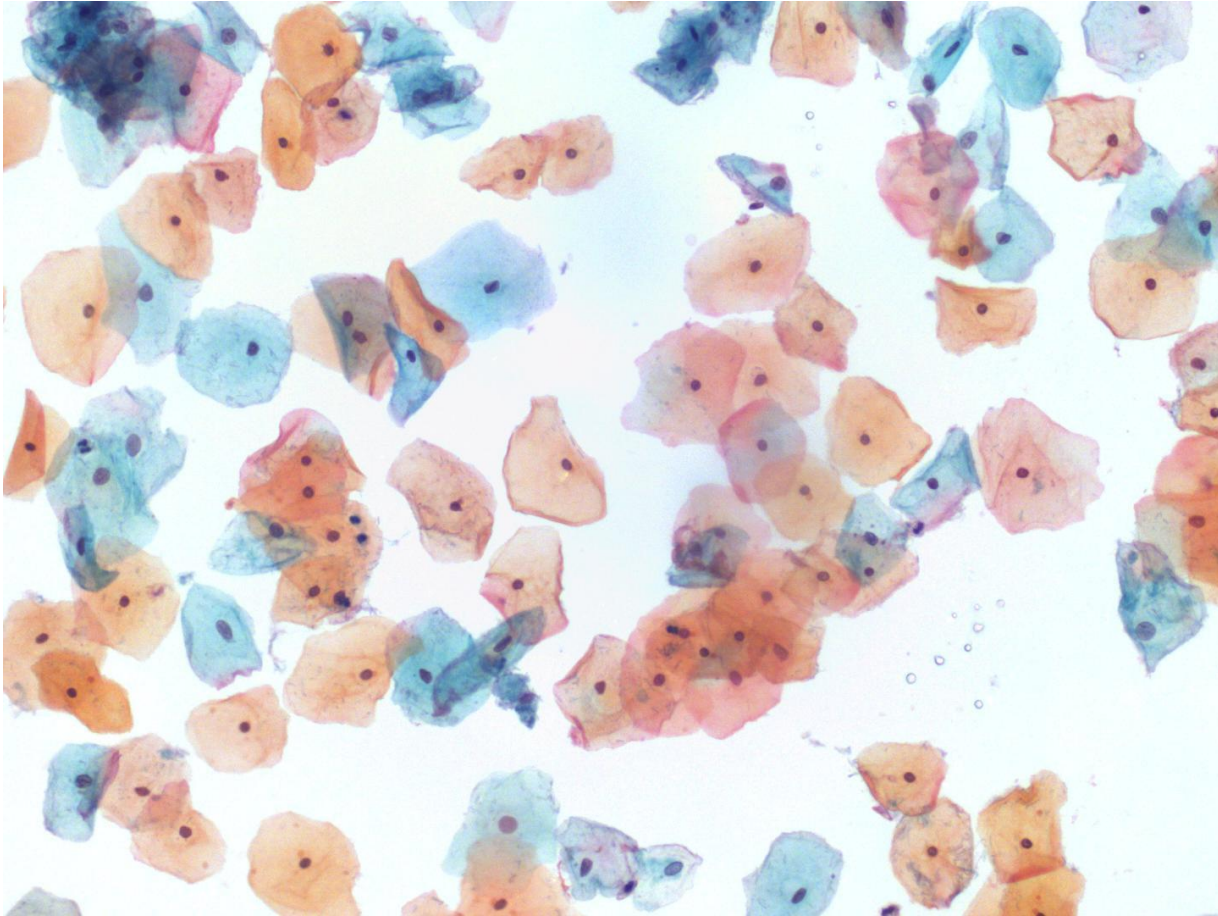
**Εικόνα 17.** Η αρχική εικόνα την οποία επεξεργαζόμαστε και εφαρμόζουμε τον αλγόριθμο εντοπισμού πυρήνων.



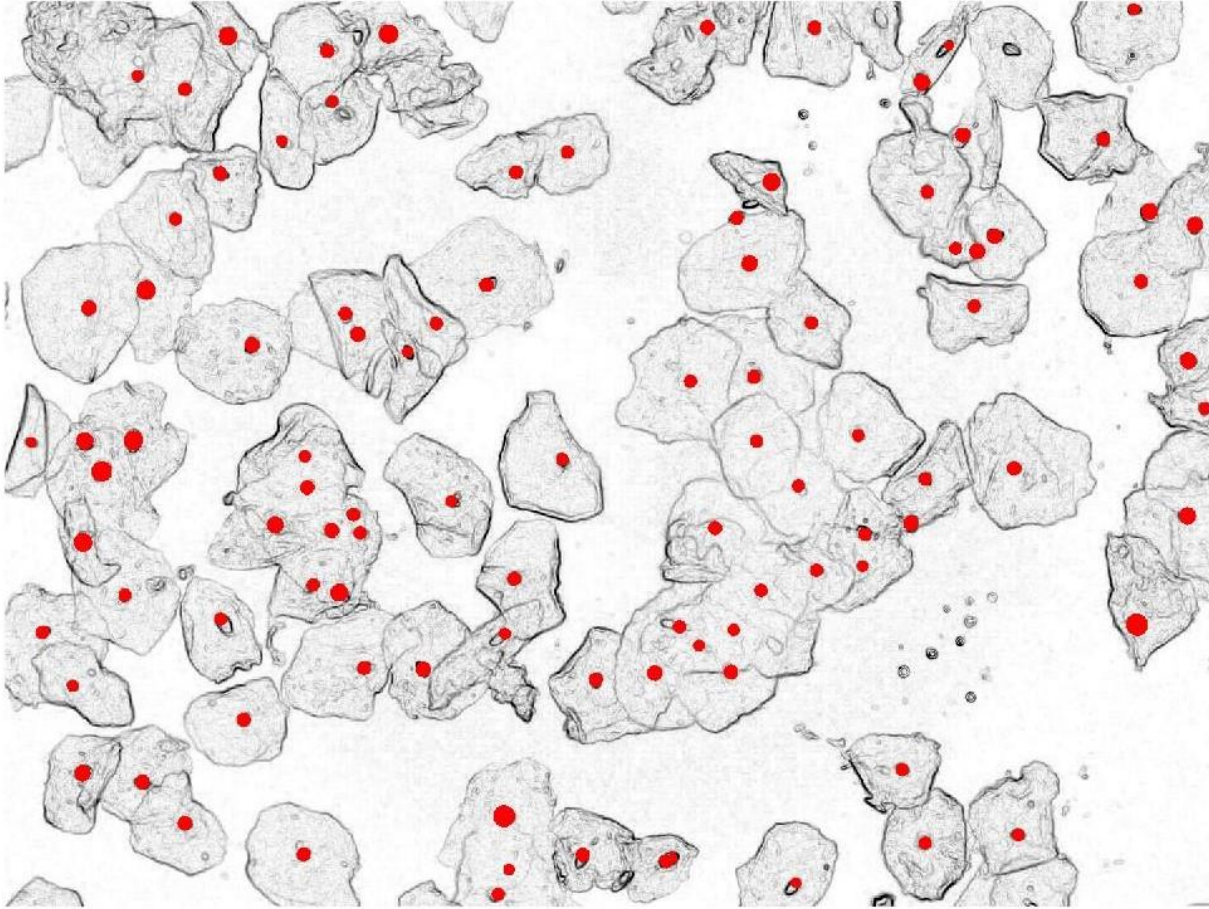
**Εικόνα 28.** Η τελική επεξεργασία με τους εντοπισμένους πυρήνες να προβάλλονται πάνω στην εικόνα AInv.

Ο ειδικός κυτταρολόγος είχε εντοπίσει 70 πυρήνες στη συγκεκριμένη εικόνα. Ο αλγόριθμος εντόπισε 78, χάνοντας όμως δύο αληθινούς πυρήνες. Αυτό θα πει ότι ο αλγόριθμος βρήκε 68 από τους 70 αληθινούς πυρήνες ενώ ταυτόχρονα βρήκε και 10 ψευδή στίγματα ως αληθινούς πυρήνες τα οποία δεν καταφέραμε να απαλείψουμε σε κάποιο από τα αφαιρετικά βήματα. Η συγκεκριμένη εικόνα στατιστικά ήταν μια πολύ αντιπροσωπευτική της γενικότερης επίδοσης του αλγορίθμου για αυτό και χρησιμοποιήθηκε ως παράδειγμα. Ακολουθεί ένα ακόμα παράδειγμα της επίδοσης της μεθόδου για τον εντοπισμό πυρήνα.



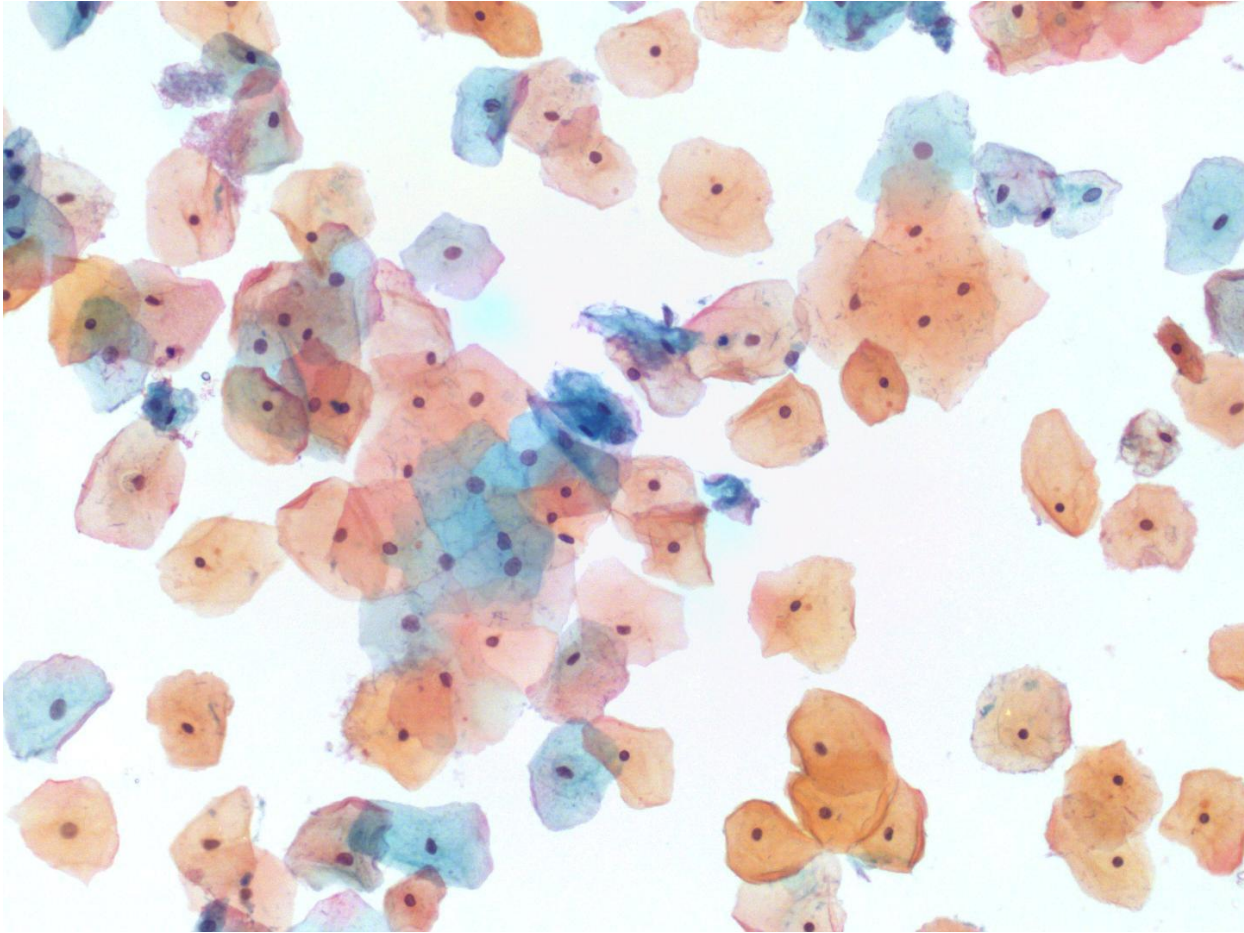


**Εικόνα 29.** Η αρχική εικόνα που επεξεργαζόμαστε για να εντοπίσουμε τους πυρήνες των κυττάρων.

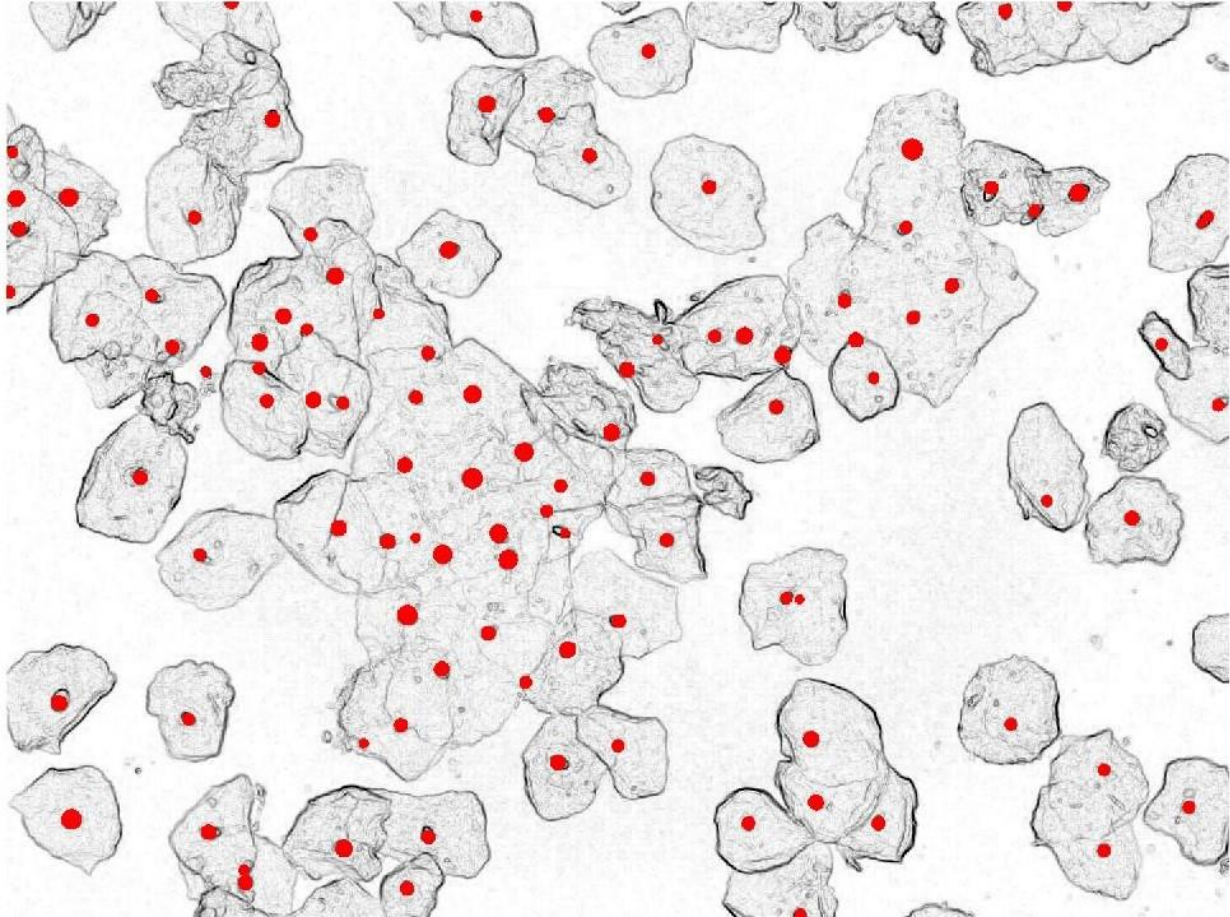


**Εικόνα 30.** Η τελική επεργασία με τους εντοπισμένους πυρήνες.

Στη συγκεκριμένη εικόνα ο κυτταρολόγος εντόπισε 97 πυρήνες ενώ ο αλγόριθμος εντόπισε συνολικά 98 αντικείμενα ως πυρήνες. Ο αλγόριθμος έχασε 4 αληθινούς πυρήνες που κατάφερε να εντοπίσει ο κυτταρολόγος στην ίδια εικόνα, ενώ ταυτόχρονα ο αλγόριθμος εντόπισε 5 ψευδή στίγματα ως αληθινούς πυρήνες. Ακολουθεί άλλη μία εικόνα ως παράδειγμα.



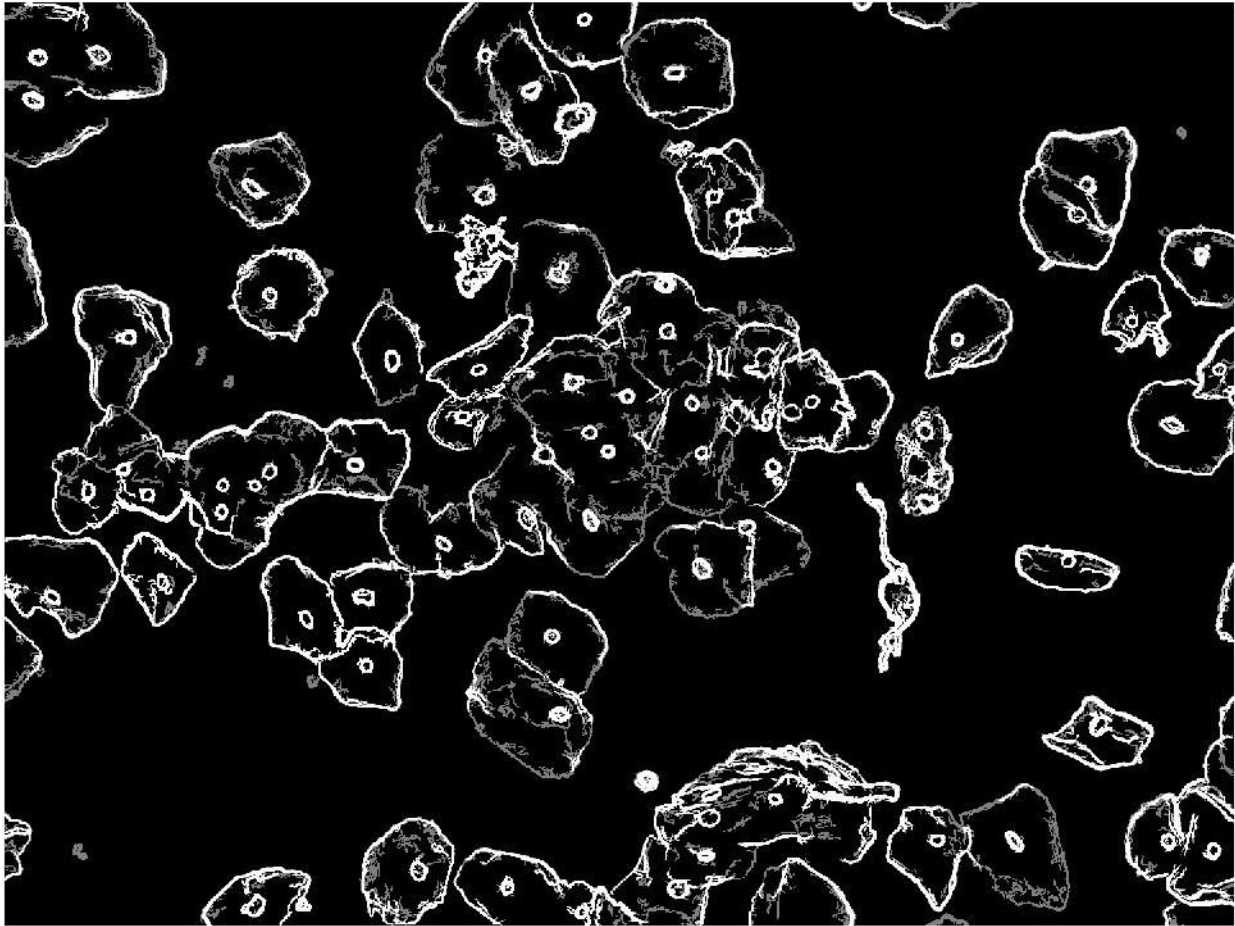
**Εικόνα 31.** Η αρχική εικόνα που επεξεργαζόμαστε για να εντοπίσουμε τους πυρήνες των κυττάρων.



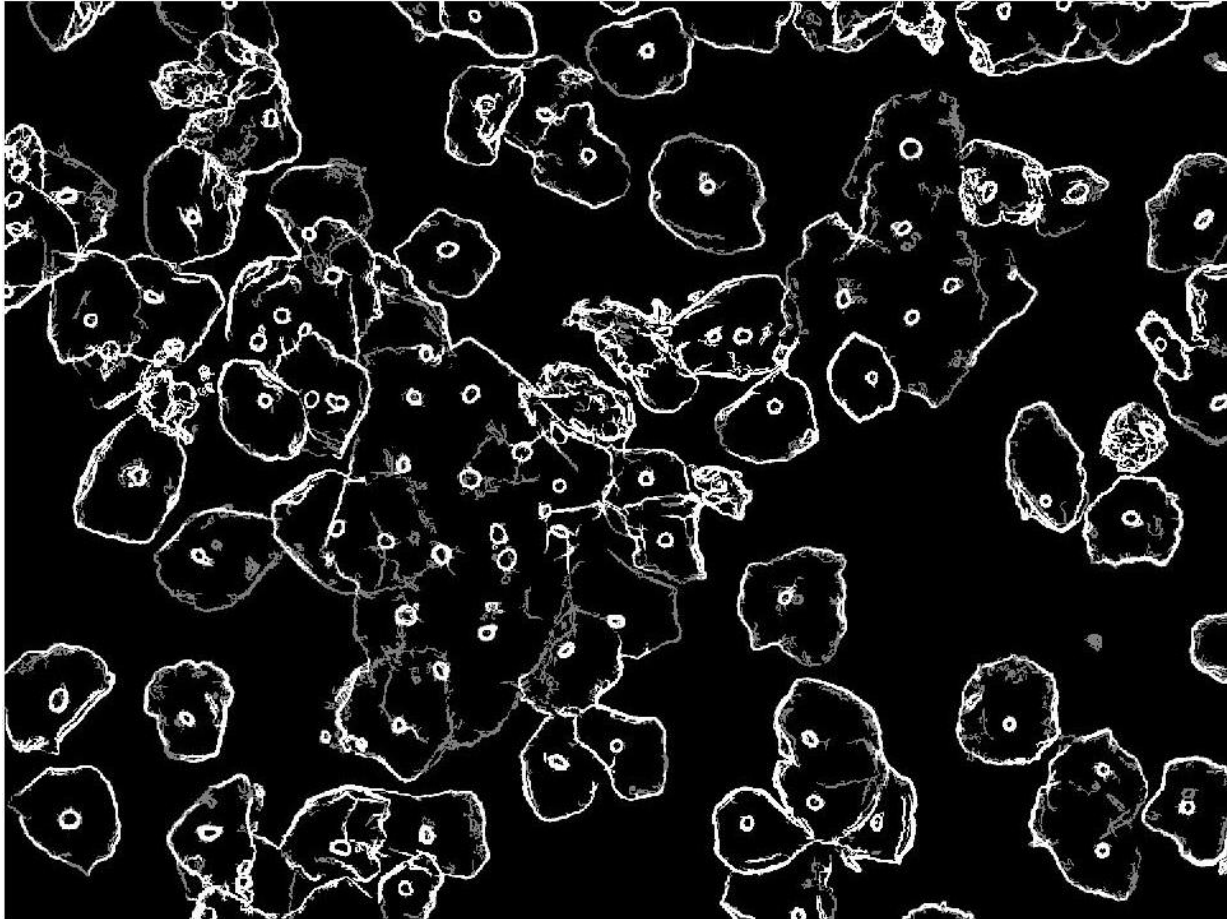
**Εικόνα 32.** Η τελική επεργασία με τους εντοπισμένους πυρήνες

Σε αυτή την εικόνα ο κυτταρολόγος εντόπισε 88 πυρήνες ενώ ο αλγόριθμος εντόπισε συνολικά 101 αντικείμενα ως πυρήνες. Ο αλγόριθμος έχασε 4 αληθινούς πυρήνες που κατάφερε να εντοπίσει ο κυτταρολόγος, ενώ ταυτόχρονα ο αλγόριθμος εντόπισε 17 ψευδή στίγματα ως αληθινούς πυρήνες.

Στη συνέχεια ακολουθούν δύο παραδείγματα με τα εντοπισμένα όρια των κυττάρων.



**Εικόνα 35.** Τα τελικά όρια των κυττάρων για την Εικόνα 17.



**Εικόνα 37.** Τα τελικά όρια των κυττάρων για την Εικόνα 31.

Στη συνέχεια θα συγκρίνουμε τη προτεινόμενη μέθοδο με παρόμοια δουλειά που έχει γίνει στη βιβλιογραφία. Αυτό το εγχείρημα δεν είναι εύκολο στη συγκεκριμένη περίπτωση γιατί ο κάθε αλγόριθμος προσεγγίζει το πρόβλημα εντελώς διαφορετικά, είτε χρησιμοποιώντας μεμονωμένες εικόνες κυττάρων ή μικρών κυτταρικών πληθυσμών, είτε μη παρέχοντας τα ίδια στατιστικά δεδομένα με την παρούσα μέθοδο, είτε παρέχοντας στατιστικά για έναν αλγόριθμο ομαδοποίησης δεδομένων και όχι έναν αλγόριθμο εντοπισμού, είτε απλά δοκιμάζοντας την τεχνική σε εικόνες με κακή ανάλυση εξ αιτίας της χρήσης ζουμ, ή τέλος σε εικόνες από συμβατικά PAP test.

Στον **Πίνακα 4** συγκρίνουμε τη προτεινόμενη μέθοδο με άλλες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως πιθανές λύσεις στο πρόβλημα εντοπισμού πυρήνα. Συγκεκριμένα η σύγκριση γίνεται με το gradient vector flow (GVF), με τον μετασχηματισμό watersheds, με το support vector machine (SVM), με τον Fuzzy C means (FCM) αλγόριθμο, ο οποίος είναι αλγόριθμος ομαδοποίησης δεδομένων και χρησιμοποιείται ως τελικό βήμα ώστε να διαχωρίσει τους πυρήνες από τα ψευδή στίγματα και βρίσκει εφαρμογή μετά από μία τεχνική εντοπισμού με βάση την ένταση στην εικόνα. Ακολουθεί σύγκριση με ένα active counter model (ACM) και τέλος με έναν multi-layer perceptron (MLP) αλγόριθμο.

	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>	<b>F1 Score</b>
GVF	91.77%	74.23%	82.07%
Watersheds	88.92%	79.46%	83.92%
FCM	90.57%	75.28%	82.92%
SVM	69.86%	92.02%	80.94%
ACM	80.09%	-	-
MLP	78,81%	-	-
<b>Proposed Method</b>	<b>94%</b>	-	<b>90%</b>

**Πίνακας 4.** Σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με άλλες ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους.

Η σύγκριση των τιμών δείχνει πως η προτεινόμενη μέθοδος έχει πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα εντοπισμού πυρήνα. Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε 17 τυχαίες εικόνες για να αντιπροσωπεύει ένα ρεαλιστικό πρόβλημα καθώς συναντάται συχνά το φαινόμενο που ένα κύτταρο καλύπτεται από ένα άλλο, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό του πυρήνα. Για κάθε εικόνα που χρησιμοποιήθηκε υπήρχε ένας ελάχιστος αριθμός 51 κυττάρων, ενώ σε μερικές ο αριθμός έφτασε ως τα 106 κύτταρα. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να βρει

εφαρμογή ακόμα και σε εικόνες με 12-15 κύτταρα χωρίς να χρειαστεί αλλαγή σε κάποια παράμετρο, μάλιστα όσο καλύτερη σε ανάλυση είναι η εικόνα εισόδου, τόσο πιο υποσχόμενα είναι τα αποτελέσματα στον εντοπισμό.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα διπλωματική επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός ενός αλγορίθμου που με βάση την εικόνα εισαγωγής η οποία προέρχεται από δειγμάτων thin prep PAP test για κύτταρα του τράχηλου της μήτρας θα μπορεί σε πρώτη φάση (1) να διαχωρίζει τους κυτταρικούς πληθυσμούς με βάση το χρώμα, στη συνέχεια (2) να εντοπίζει τους πυρήνες σε όλα τα κύτταρα και τέλος να (3) καθορίζει τα όρια για κάθε απεικονιζόμενο κύτταρο.

Στο κομμάτι του διαχωρισμού πληθυσμών με βάση το χρώμα η τεχνική ενίσχυσης της αντίθεσης που χρησιμοποιήσαμε βοήθησε ώστε να κερδίσουμε περισσότερα pixels, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να φαίνονται πιο ολοκληρωμένα στο τελικό αποτέλεσμα σε σχέση με την απλή εφαρμογή του αλγορίθμου διαχωρισμού χωρίς κάποια ενίσχυση. Η συγκεκριμένη τεχνική έκανε την εικόνα καταλληλότερη για εισαγωγή στον αλγόριθμο και βελτίωσε τα αποτελέσματά, διατηρώντας παράλληλα το αυθεντικό χρώμα στα κύτταρα σε αντίθεση με άλλες τεχνικές αντίθεσης που άλλαζαν την εικόνα σε βαθμό απαγορευτικό ώστε να βρουν εφαρμογή. Η τεχνική ενίσχυσης της αντίθεσης ήταν αποτελεσματική μόνο στο κομμάτι των κυττάρων που είχαν χρώματα στις αποχρώσεις του κόκκινου και όχι σε εκείνα τα κύτταρα που ήταν στις αποχρώσεις του μπλε. Μια μελλοντική δουλειά λοιπόν, θα μπορούσε να εστιάσει στην ενίσχυση της αντίθεσης και για τους μπλε κυτταρικούς πληθυσμούς διατηρώντας παράλληλα την αυθεντικότητα της εικόνας κατά την επεξεργασία. Έτσι περισσότερα pixels θα μπορούσαν να κερδιστούν και για τους μπλε κυτταρικούς πληθυσμούς, που θα είχε ως αποτέλεσμα και τα μπλε κύτταρα να φαίνονται πιο ολοκληρωμένα στον τελικό διαχωρισμό.

Όσο αφορά το κομμάτι του αποτελεσματικού εντοπισμού πυρήνα για κάθε απεικονιζόμενο κύτταρο, ο αλγόριθμος είχε πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα καταφέροντας να εντοπίσει το 94% όλων των πυρήνων. Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου συγκρίθηκαν και επαληθεύτηκαν με αυτά ειδικού κυτταρολόγου στον οποίο παρείχαμε ακριβώς την ίδια πληροφορία, δηλαδή την ίδια στατική εικόνα. Στο τέλος μετρήσαμε κατά πόσο η δική μας μέθοδος μπορούσε να προσεγγίσει τις επιδόσεις του κυτταρολόγου στον εντοπισμό. Αυτή η τιμή που καταγράψαμε στον εντοπισμό πυρήνα είναι μια από τις υψηλότερες σε όλες τις αντίστοιχες δημοσιεύσεις που έχουν γίνει και με τις οποίες μπορεί να συγκριθεί άμεσα η παρούσα προτεινόμενη μέθοδος. Μεγάλη αξία στα αποτελέσματα δίνει το γεγονός πως οι εικόνες ήταν εντελώς τυχαίες, απεικόνιζαν μεγάλους κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους παρουσιαζόταν έντονα το φαινόμενο της επικάλυψης ενός κυττάρου από ένα άλλο. Επίσης μεγάλη αξία έχει το γεγονός πως ο αριθμός των ψευδών πυρήνων ήταν αρκετά μικρός συγκρινόμενος με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Με άλλα λόγια, ο αλγόριθμος δοκιμάστηκε σε ένα αληθινό πρόβλημα της κυτταρολογίας και έδωσε υποσχόμενα αποτελέσματα.

Στο κομμάτι του καθορισμού των ορίων για κάθε κύτταρο, το αποτέλεσμα δεν είναι μετρήσιμο με μαθηματικές σχέσεις, αλλά οπτικό. Εκεί μπορούμε να πούμε ότι ο αλγόριθμος ξεπέρασε σε επίδοση τον κυτταρολόγο, εντοπίζοντας περισσότερα σωστά όρια για τα κύτταρα

από τον ειδικό και παράλληλα έδωσε ελάχιστα ψευδή όρια. Η μέθοδος θα μπορούσε σίγουρα να χρησιμοποιηθεί για να παράσχει βοήθεια σε κυτταρολόγο, υποδεικνύοντας του σαφή όρια για τα κύτταρα που το ανθρώπινο μάτι θα μπορούσε να χάσει ή θα δυσκολευόταν να εντοπίσει με τη πρώτη ματιά, ενισχύοντας και επιταχύνοντας έτσι τη δουλειά του ειδικού.

Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς αλλαγές στις παραμέτρους σε εικόνες που ακεινονίζουν σημαντικά μικρότερους κυτταρικούς πληθυσμούς της τάξης των 12 με 15 κυττάρων επίσης, καθιστώντας την σημαντικά αυτοματοποιημένη. Παρόλα αυτά, εικόνες με 80 κύτταρα κατά μέσο όρο χρησιμοποιήθηκαν γιατί είναι πιο ρεαλιστική προσέγγιση στη συνολική στρατηγική του σκαναρίσματος ενός ολόκληρου δείγματος. Παράλληλα, αυτές οι εικόνες διατηρούν τη λεπτομέρεια που ψάχνει ένας ειδικός στη διάγνωση και όλα τα κύτταρα φαίνονται καθαρά. Η αποτελεσματικότητα του αλγορίθμου συσχετίζεται άμεσα με την ποιότητα της ανάλυσης για την εικόνα εισαγωγής. Άρα, όσο καλύτερη η κάμερα λήψης της εικόνας, τόσο καλύτερη επεξεργασία και εν τέλει τόσο υψηλότερος ο βαθμός αποτελεσματικού εντοπισμού πυρήνα και ο καθορισμός ορίων για κάθε κύτταρο.

Αξίζει να σημειωθεί πως η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να μπει σε επιχειρησιακή λειτουργία υποστηρικτικά στο ανθρώπινο προσωπικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για μελλοντικές εργασίες βελτιστοποίησης της μέχρι τελικά να μπορεί να μπει σε επιχειρησιακή λειτουργία αυτόνομα και αξιόπιστα. Ένα βήμα στη σωστή κατεύθυνση θα ήταν η βελτιστοποίηση του αποτελεσματικού εντοπισμού πυρήνα, γεγονός που μπορεί εύκολα να επιτευχθεί με κάμερες υψηλής ανάλυσης χωρίς παρεμβάσεις στον κώδικα του αλγορίθμου. Από εκεί και πέρα, η βελτιστοποίηση μπορεί να αφορά την περαιτέρω μείωση των ψευδών πυρήνων και φυσικά την δοκιμή του αλγορίθμου σε εικόνες που απεικονίζουν κύτταρα μολυσμένα με τον HPV και αφού αρχικά επιτυγχάνεται ο εντοπισμός για όλους τους πυρήνες, η μέθοδος να περνάει στον διαχωρισμό υγιών και παθολογικών πυρήνων με τη χρήση κάποιου fuzzy αλγορίθμου ομαδοποίησης και διάφορων άλλων γεωμετρικών κριτηρίων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ενότητα 18 Βιολογία 'Το κύτταρο (δομή και λειτουργία)'.
- [2] [www.testpap.com](http://www.testpap.com)
- [3] [www.womanshealth.gr/thinprep-pap-test/pap-test/](http://www.womanshealth.gr/thinprep-pap-test/pap-test/)
- [4] Κ. Φασσέας, 'Οπτικά (Φωτονικά) Μικροσκόπια. Γενικές Αρχές' Καθηγητής Γ.Π.Α.
- [5] Γ. Γεωργίου, Χ. Ξενοφώντος, 'Εισαγωγή στη MATLAB', pp 13-15, Κύπρος, 2007.
- [6] N. Mustafa, N. Ashidi, M. Yusoff, 'Automated Multicells Segmentation of ThinPrep Image Using Modified Seed Based Region Growing Algorithm' Malaysia, 2008.
- [7] N. M. Harandi, S Sadri, N. A. Moghaddam, 'An Automated Method for Segmentation of Epithelial Cervical Cells in Images of ThinPrep', Journal of Medical Systems, Vol 34 No 6 pp 1043-58, Iran, 2009.
- [8] C. LIN, 'IMAGE SEGMENTATION BASED ON EDGE DETECTION AND REGION GROWING FOR THINPREP-CERVICAL SMEAR' Taiwan, R.O.C, Vol. 24, No. 7 pp 1061-1089 .c World Scientific Publishing Company, 2010.
- [9] C CHEN, 'IMAGE SEGMENTATION BASED ON EDGE DETECTION AND REGION GROWING FOR THINPREP-CERVICAL SMEAR' Taiwan, R.O.C, Vol. 24, No. 7, World Scientific Publishing Company, pp 1061-1089, 2010.
- [10] M. E. Plissiti, C. Nikou A. Charchanti 'ACCURATE LOCALIZATION OF CELL NUCLEI IN PAP SMEAR IMAGES USING GRADIENT VECTOR FLOW DEFORMABLE MODELS', BIOSIGNALS, pp 284-289, 2010.
- [11] M.E. Plissiti, E.E. Tripoliti, A. Charchanti, O. Krikoni, D.I. Fotiadis, 'Automated Detection of Cell Nuclei in PAP stained cervical smear images using Fuzzy Clustering' Greece, 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, pp 637-641, 2009.
- [12] M. E. Plissiti, M. Vrigkas and C. Nikou, 'Segmentation of cell clusters in Pap smear images using intensity variation between superpixels', Conference: 22nd International Conference on Systems, Signals and Image Processing, 2015.
- [13] M. E. Plissiti, C. Nikou A. Charchanti, 'Automated Detection of Cell Nuclei in Pap Smear Images Using Morphological Reconstruction and Clustering', IEEE transactions on information technology in biomedicine: a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Vol 15, No 2, pp 233-241, 2010.

- [14] M. E. Plissiti, P. Dimitrakopoulos, G. Sfikas, C. Nikou, O. Krikoni, A. Charchanti, 'SIPAKMED: A new dataset for feature and image based classification of normal and pathological cervical cells in Pap smear images', IEEE International Conference on Image Processing (ICIP) 2018, Athens, Greece, 7-10 October 2018.
- [15] M.E. Plissiti, O. Krikoni, 'Automated segmentation of cell nuclei in PAP smear images', IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine ITAB 2006, Ioannina, Greece, 26-28 October 2006
- [16] A. Charchanti, M.E. Plissiti, 'Automated segmentation of cell nuclei in PAP smear images', IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine (ITAB 2006), Ioannina, Greece, 26-28 October 2006
- [17] M.E. Plissiti, A. Charchanti, D.I. Fotiadis, 'Automated segmentation of cell nuclei in PAP smear images' IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine (ITAB 2006), Ioannina, Greece, 26-28 October 2006
- [18] M. E. Plissiti, C. Nikou and A. Charchanti, 'Combining shape, texture and intensity features for cell nuclei extraction in Pap smear images', Pattern Recognition Letters, 32, pp 838-853, 2011.
- [19] M. E. Plissiti, C. Nikou and A. Charchanti, 'Watershed-Based segmentation of cell nuclei boundaries in Pap smear images', IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine (ITAB 2010), Corfu, Greece, 3-5 November 2010.
- [20] T. Chankong, N. Umpon, S. Auephanwiriyaikul, ' Automatic cervical cell segmentation and classification in Pap smears', Comput Methods Programs Biomed, Vol 113 No 2, pp 539-56, 2014.
- [21] B. Venkatalakshmi, k. Thilagavathi, 'Automatic Red Blood Cell Counting Using Hough Transform', IEEE Conference on Information & Communication Technologies (ICT), 2013.
- [22] S. Nazlibilek, D. Karacor, T. Ercan, M. H. Sazli, O. Kalender, Y. Ege, 'Automatic segmentation, counting, size determination and classification of white blood cells' Biomedical Research, Vol 26, No 4, 2015.
- [23] S. Khan, A. Khan F. S. Khattak, A. Naseem, 'An Accurate and Cost Effective Approach to Blood Cell Count', International Journal of Computer Applications (0975 – 8887), Vol 50, No 1, 2012.
- [24] S. Khobragade, D. D. Mor, Dr. C. Y. Patil, 'Detection of Leukemia in Microscopic White Blood Cell Images', Medicine International Conference on Information Processing (ICIP), India, 2015.
- [25] S. Chourasiya M. T. Scholar, G U. Rani, 'Automatic Red Blood Cell Counting using Watershed Segmentation', India, 2014.
- [26] J. M. Sharif, M. F. Miswan, M. A. Ngadi, Md. Salam, M. Abdul Jamil, 'Red Blood Cell Segmentation Using Masking and Watershed Algorithm: A Preliminary Study', International Conference on Biomedical Engineering (ICoBE), pp. 258-262, 2012.

- [27] J. Poomcokrak, C. Neatpisarnvanit, 'RED BLOOD CELLS EXTRACTION AND COUNTING', Chemistry, 2009.
- [28] H. Tunsali, 'Segmentation using Morphological Watershed Transformation for Counting Blood Cells', International Journal of Computer Applications & Information Technology, Vol. 2, No 3, pp 28-36, 2013.
- [29] S. Saxena, N. Yadan, 'Segmentation using Morphological Watershed Transformation for Counting Blood Cells', International Journal of Computer Applications & Information Technology, Vol. 2, No 3, pp 28-36, India, 2013.
- [30] Αθανασία Κολοβού (Ε.Τ.Ε.Π.) 'Εισαγωγή στην Επεξεργασία Εικόνας'.
- [31] Φ. Π. Ζιώγος, Σχολή Τεχνολογικών Εφαρμογών Τμήμα Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστικών Συστημάτων Τ.Ε., Πτυχιακή Εργασία.
- [32] Βουτσκοπούλου Ευαγγελία, "Ανάπτυξη αλγορίθμων για τμηματοποίηση (segmentation) ψηφιακής εικόνας και υλοποίησης τους σε περιβάλλον Matlab", Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Διαχείρισης Πληροφοριών, ΤΕΙ Καβάλας, 2006.
- [33] Ε. Β., Χάτζικος, "Matlab για επιστήμονες και μηχανικούς", Εκδόσεις Τζιόλα, Αθήνα 2010.
- [34] Ν. Η. Παπαμάρκος, "Ψηφιακή επεξεργασία & ανάλυση εικόνας", Εκδόσεις Γκιούρδας, Β 2η έκδοση, Αθήνα 2013,.
- [35] Ι. Ν. Έλληνας., "Ψηφιακή επεξεργασία εικόνας & βίντεο", Αθήνα 2010, Εκδόσεις: Ιωάννης Έλληνας.
- [36] Ά. Σκαράκη, Σ. Σφακιανάκη, "Συστήματα αυτόματης χρωματικής ανάλυσης για τον χρονικό προσδιορισμό μελανιάς στο δέρμα", Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Εφαρμοσμένης Πληροφορικής & Πολυμέσων, ΤΕΙ Κρήτης, 2012.
- [37] Σ. Σταυρινίδης, "Δημιουργία συστήματος αλληλεπίδρασης ανθρώπου υπολογιστή για την εκμάθηση του σωστού τρόπου γραφής των αριθμών με αναγνώριση χειρόγραφων χαρακτήρων και μοντελοποίηση χρηστών με τη χρήση ασαφούς λογικής", Τμήμα Πληροφορικής Π.Ε., ΑΕΙ Πειραιά.
- [38] Ω.Καργοπούλου, "Τεχνικές επεξεργασίας για βελτιστοποίηση υπερηχογραφικών εικόνων και εξαγωγή χαρακτηριστικών, με χρήση του Matlab", Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Εφαρμοσμένης Πληροφορικής, Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, 2011.
- [39] Ν. Γιαννακούρης. Κεφάλαιο 1., 'Μικροσκόπια και Μικροσκόπηση'.
- [40] Ι. Ηλιόπουλος, Σ. Καλαϊτζίδης 'Τεχνικές με μικροδέσμες ηλεκτρονίων'.
- [41] Βιολογία των Μικροοργανισμών ,Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαιο 4.

[42] N. A. Campbell, J.B. Reese, Βιολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης. ISBN: 978-960-524-305-0, 2010.

[43] Ε.Κ.Φ.Ε. Αργολίδας, 'Το οπτικό μικροσκόπιο, Περιγραφή – Χρήση'.

[44] Χ. Α. Παπακωνσταντίνου, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών. Τομέας Συστημάτων Μετάδοσης Πληροφορίας και Τεχνολογίας Υλικών. Διπλωματική Εργασία.

[45] Εκπαιδευτικό διαδικτυακό πρόγραμμα Eurocytology, Άρθρο 'Κυτταρολογία τραχήλου της μήτρας διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση'  
<http://www.eurocytology.eu/static/eurocytology/gre/cervical/LP1ContentAcont.html>.

[46] Monographon Human Papillomaviruses, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/>.

[47] P.J.F. Snijders, R.D.M. Steenbergen, D.A.M. Heideman, C.J.L.M. Meijer, "HPV- mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications", Journal of Pathology, vol. 208, pp. 152-164, 2006.

[48] A. Chaturvedi, M.L. Gillison, "Human Papillomavirus and head and neck cancer", Epidemiology, pathogenesis and prevention of head and neck cancer, pp. 87-116, 2010.

[49] R. Herrero, L.A. Brinton, W.C Reeves, M.M Brenes, F. Tenorio, R.C. Britton, "Invasive cervical cancer and smoking in Latin America", J Natl Cancer Inst 1989; Vol 81 pp205-11.

[50] National Cancer Institute Workshop (NCIW): The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses, JAMA Vol 262 pp 931-934, 1989.

[51] D. Solomon, V. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'Connor, M. Prey, S. Raab, M. Sherman, D. Wilbur, T. Jr Wright, N. Young, Forum Group members Bethesda 2001.

[52] S. Kanchanaraksa PhD, "Evaluation of Diagnostic and Screening Tests: Validity and Reliability", Johns Hopkins University, 2008.

[53] Ι. Ντζούφρας Παρουσίαση σημειώσεων στο μάθημα Βιοστατιστική ΙΙ, Μάθημα 6, Διαγνωστικοί Έλεγχοι, ΠΜΣ Επαγγελματική και Περιβαλλοντική Υγεία, Διαχείριση και Οικονομική Αποτίμηση, Ακ. Έτος 2006-2007, Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση [http://stat-athens.aueb.gr/~jbn/courses/biostats2\\_uoa/pdf/06\\_diagnostic\\_tests.pdf](http://stat-athens.aueb.gr/~jbn/courses/biostats2_uoa/pdf/06_diagnostic_tests.pdf).

[54] D.C. McCrory, D.B. Matchar, L. Bastian, S. Datta, V. Hasselblad, J. Hickey, E. Myers, K. Nanda, "Evaluation of cervical cytology", AHCPR Publication No. 99- E10: 1-274. Rockville (MD), USA, AHCPR, 1999.

[55] N. Bhatla, N. Moda, "The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening Strategies", Department of Obstetrics & Gynecology, All India Institute of Medical Sciences, Indian J Med Res Vol 130, pp 261-265, 2009.

[56] [www.eurocytology.eu/el/course/933](http://www.eurocytology.eu/el/course/933)