



รหัสโครงการ EE-BME 106/1

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ

Development of an optimized imaging analysis tool for Live/Dead
cell

imaging of 3D cancer spheroids

ผู้วิจัย

นายณัฐคุณ ปิยปาณกรณ์ รหัส 6110110116

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ จินดาภรณ์ เขาลัก

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ภาคการเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2564

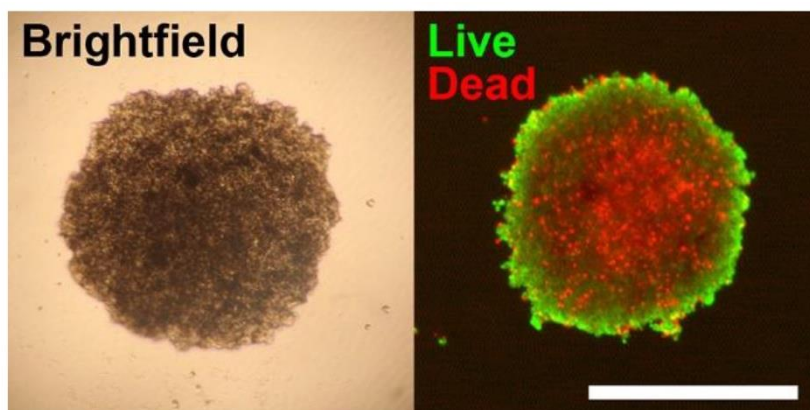
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาโครงการ

โรคมะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดในผู้หญิงสูงทั่วโลกและการลุกลามของโรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลต่ออัตราการตายของผู้ป่วย ดังนั้นการพัฒนายาต้านมะเร็ง (anti-cancer agent) นั้นจึงมีความจำเป็นอย่างมากในปัจจุบันในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านมะเร็งในระดับเซลล์ในห้องทดลองนั้น

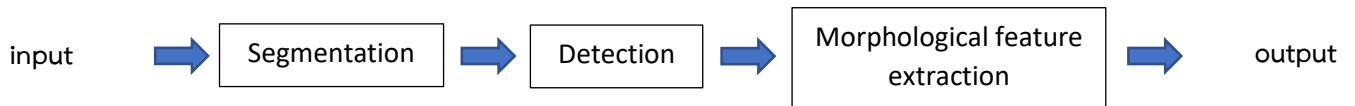
ปัจจุบันการเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติ (3D cancer spheroid) เพื่อใช้ทดสอบยาเป็นที่ยอมรับมากเนื่องจากเหมือนสภาวะจริงในก้อนมะเร็งของผู้ป่วย โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงเป็นก้อนสามมิติ แล้วจึงใส่ยาที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงวัดการเปลี่ยนแปลงของก้อนมะเร็งโดยวัดจากขนาดในส่วนของ brightfield image ควบคู่ไปกับการใช้ Live/Dead assay การทดสอบนี้ใช้สารสำคัญสองตัวในการตรวจวัด คือ green-fluorescent dye calcein ใช้ย้อมเซลล์ที่มีชีวิตและ red-fluorescent dye EthD-1 ใช้ย้อมเซลล์ที่ตายแล้ว จากนั้นจะวัดความเข้มสีแดงต่อสีเขียว หรือใช้พื้นที่ของสีแดงต่อสีเขียวเพื่อดูอัตราการตายของเซลล์ในก้อนมะเร็ง ดังรูปในการทำการงานนี้เราจะศึกษาเฉพาะภาพ Brightfield และ Live/Dead แบบ 2D greyscale เท่านั้น แบบ RGB อยู่นอกเหนือขอบเขตในการศึกษา



<https://worldwide.promega.com/>

รูปภาพที่ 1.1 ภาพเซลล์มะเร็งใน 2 รูปแบบ (ก) Brightfield (ข) Live/Dead assay

คณะผู้จัดทำจึงมีความประสงค์ที่จะทำโครงการ...(โดยใช้โปรแกรม imagej ในการสร้าง algorithm)



1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อให้ผู้ที่ใช้โปรแกรมนี้อาจวิเคราะห์ภาพได้ง่ายขึ้น
- เพื่อพัฒนาความสามารถของระบบคอมพิวเตอร์ที่ช่วยในการวิเคราะห์พื้นที่ทั้งในรูปแบบ Bright field และ Live/Dead assay ด้วย algorithm ที่คิดขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์ภาพตามที่ผู้ใช้งานต้องการแบบอัตโนมัติ

1.3 ทบทวนวรรณกรรม

Team	Method	Dimension (2D/3D)	Morphological feature	Software/Hardware	Ref
Hubert,Et al.	1. CellTiter-Glo® Cell Viability Assay 2. RealTime-Glo® MT Cell Viability Assay	2D&3D	- All cell numbers using magnetic 3D bioprinting. - Spheroid size was highly reproducible.	Magnetic 3D Bioprinting (Hardware)	[1]
Pasarat,Et al.	- FDI-6 Inhibits TNBC Cell Proliferation. - FDI-6 Inhibits TNBC Cell Migration and Invasion.	3D	Analyze effect of FDI-6 on the viability of the TNBC cells in 3D spheroid assays.	LionheartFX (Automated Microscope)	[2]

Patricia,Et al.	Investigated the morphological differences and changes in gene and protein expression of specific eccrine SG markers in our novel organotypic 3D SG model, primary 2D cultures and native human sweat glands.	2D&3D	<ul style="list-style-type: none"> - Morphological and histochemical analysis of the organotypic 3D SG model - Cell culture optimization of 3D SG model regarding viability - Gene expression of primary SG cells culture in 2D vs 3D - Apical-basal orientation in 3D SG models - Quantification of AQP5 as a secretion marker in 2D and 3D culture - Physiological functionality of sweat gland cells in vitro 	GraphPad Prism 5.0 software	[3]
BioTek	<ul style="list-style-type: none"> - Prevent cells from adhering to labware such that they self-aggregate into spheroids. - Provide a three dimensional scaffold that cells can use for structure and adhere to. 	2D&3D	Analyze 3D culture cell	Gen5 (Software)	[4]
BioTek1	Label-free imaging and Gen5 image analysis tools automatically identify spheroids and report size for quantification and comparison across treatment conditions.	2D&3D	Analyze object sum area (realtime)	<ul style="list-style-type: none"> - BioSpa Cell Analysis System (Hardware) - Gen5 (Software) 	[5]

Ref[1] : <https://worldwide.promega.com/>

Ref[2] : <https://www.mdpi.com/>

Ref[3] : <https://journals.plos.org/>

Ref[4] : <https://www.biotek.de/>

Ref[5] : <https://www.biotek.com/>

Summarize

จากการศึกษาทำให้รู้ว่าทุกๆวรรณกรรมมีส่วนที่เหมือนและต่างจากโครงการที่ผู้จัดทำกำลังดำเนินการอยู่ แต่จะมีอยู่ 3 วรรณกรรม Ref[2],[4],[5] ที่มีความคล้ายกับงานที่กำลังทำโดยใน Ref[2] นั้นจะเป็นงานวิจัยที่เราจะทำต่อเนื่องจากที่เราทำในส่วนของการติดตามผลของยาต้านมะเร็งตัวหนึ่ง (FDI-6) ตามขนาดความเข้มข้นของยา (FDI-6 concentration(μM)) ใน 3D spheroid assays และ Live/Dead staining ของเซลล์ 2 ชนิด คือ MDA-MB-231 และ Hs578T

ในส่วนที่เราจะนำไปพัฒนาต่อคือ การวิเคราะห์ภาพสำหรับ Live/Dead images of 3D cancer spheroids ให้ได้ Feature ที่ผู้ใช้งานต้องการเพราะการวิเคราะห์ภาพจาก Live/Dead assay ทำได้ยากโดยทั่วไปนักวิจัยจะนำเสนอในรูปแบบของรูปภาพ (Qualitative images) แต่ผลที่ได้ไม่สามารถวิเคราะห์ออกมาเป็นค่าหรือทดสอบทางสถิติได้ (Lack of qualitative analysis) และในส่วนของ Ref [4],[5] จะเป็นในส่วนของหลักการของการได้ภาพเซลล์มะเร็งมาและ Software ที่ซัพพอร์ตกับเครื่องที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ทั้งนั้นในส่วนที่เราจำทำไม่ได้จะสร้างเครื่องถ่ายภาพหรือ Software ที่มีความเสถียรมากขนาดนั้นแต่จะเป็นการสร้างโปรแกรมที่ประกอบด้วยส่วน **Segmentation** และ **Morphological feature extraction** เป็นหลัก โดยในส่วนของ Segmentation ช่วงแรกจะเป็นการสร้างขึ้นจากสิ่งที่มีอยู่ในโปรแกรม Imagej ก่อนแล้วจึงดูผลลัพธ์หากยังไม่เสถียรหรือครอบคลุมบางกรณีก็จะเปลี่ยนไปใช้ในส่วน of Segmentation ที่ฉลาดขึ้นและสามารถเรียนรู้ได้ด้วยตนเอง (Machine learning) เพื่อให้ได้ Feature ที่แม่นยำและครบถ้วนมากที่สุด

1.4 ขอบเขตของโครงการ

- สามารถวิเคราะห์ขนาดของก้อนมะเร็งในรูปแบบ Bright field ได้
- วิเคราะห์พื้นที่ของเซลล์ที่ตายแล้วยังมีชีวิตได้
- วิเคราะห์ได้ทั้งที่เป็นภาพเดี่ยว (individual images) และกลุ่มภาพ (stacks)
- สามารถ export ออกมาเป็น excel file ได้
- โปรแกรมต้องใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือวิธีการที่ซับซ้อน

1.5 แนวทางการดำเนินโครงการ



1.ภาพ Live/Dead assay (Channel 1 : ภาพเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิต, Channel 2 : ภาพเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว และภาพที่ทำการ Merge เซลล์ที่มีชีวิตและตายแล้วเข้าด้วยกัน (Brightfield))

2.ภาพที่ได้เป็นภาพเดี่ยว (individual images)

3.ภาพ 2D grayscale

4.นามสกุล TIF.file

Concept 1 : ใช้ Segmentation method ที่มีอยู่ในปัจจุบันมาประกอบกัน

Concept 2 : ใช้ Segmentation method ที่ฉลาดมากยิ่งขึ้น สามารถเรียนรู้ได้ด้วยตนเอง

Concept : สร้างเงื่อนไขต่างๆ เพื่อตรวจจับเฉพาะสิ่งที่สนใจ อาจจะมีการเพิ่ม option ให้ผู้ใช้งานสามารถเลือกเองได้ว่ายอมรับความถูกต้องได้แค่ไหน

1.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของเซลล์ที่มีชีวิต

2.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต

3.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของภาพ Brightfield

1.สามารถวิเคราะห์ขนาดของก้อนมะเร็งในรูปแบบ Bright field ได้

2.วิเคราะห์พื้นที่ของเซลล์ที่ตายแล้วยังมีชีวิตได้

3.วิเคราะห์ได้ทั้งที่เป็นภาพเดี่ยว (individual images) และกลุ่มภาพ (stacks)

4.สามารถ export ออกมาเป็น excel file ได้

5.โปรแกรมต้องใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือวิธีการที่ซับซ้อน

1.6 แผนการดำเนินโครงการและโครงสร้างการทำงาน

<div> <div>ระยะเวลา</div> <div>ขั้นตอน</div> </div>	เทอม1/64				เทอม 2/64				
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.
ศึกษาและทำความเข้าใจข้อมูลของโครงการ : Development of an optimized imaging analysis tool for Live/Dead cell imaging of 3D cancer spheroids									
ศึกษาการใช้งานของโปรแกรม ImageJ									
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการ									
ทดลองทำ Macro แยกเซลล์มะเร็งที่ตายแล้วและเซลล์ที่ยังมีชีวิต									
ออกแบบ Segmentation method (*Concept 1)									
ทดสอบและแก้ไข Segmentation method (*Concept 1)									
หาก Concept 1 ไม่ได้ผลลัพธ์ที่น่าพึงพอใจ ออกแบบ Segmentation method (**Concept 2)									
ทดสอบและแก้ไข Segmentation method (**Concept 2)									
ศึกษาการสร้างโปรแกรม									
สร้างเงื่อนไขให้ผู้ใช้งาน เพื่อตรวจจับเฉพาะสิ่งที่สนใจ (Detection)									
สร้างเป็นโปรแกรมที่พร้อมใช้งาน									
จัดทำรายงานและสรุปผล									



ได้ดำเนินการแล้ว



อยู่ระหว่างดำเนินการ



ยังไม่ได้ดำเนินการ

*Concept 1 : การใช้ Segmentation Method ที่มีอยู่ในปัจจุบันมาประกอบรวมกัน

****Concept 2 : เปลี่ยนไปใช้ Segmentation Method ที่ฉลาดมากยิ่งขึ้น สามารถเรียนรู้ได้ด้วยตนเอง (Machine Learning)**

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและผู้ใช้ประโยชน์จากโครงการ

งานวิจัยนี้ได้รับประโยชน์จากการดำเนินงานโครงการในหลายด้านได้แก่

- 1) งานวิจัยนี้เป็นการออกแบบแนวคิดและพัฒนาขั้นตอนวิธีในการวิเคราะห์ภาพ เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ในด้านการวิเคราะห์และวินิจฉัยภาพด้วยกระบวนการอัตโนมัติ ประโยชน์ที่ได้รับโดยตรงเลยก็คือเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จะช่วยให้แพทย์ทำงานได้ง่ายและมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งด้วยในอนาคต
- 2) การพัฒนาอัลกอริทึมให้ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความสามารถของผู้พัฒนา ฉะนั้นจึงเป็นประโยชน์โดยตรงแก่ผู้ทำงานวิจัย

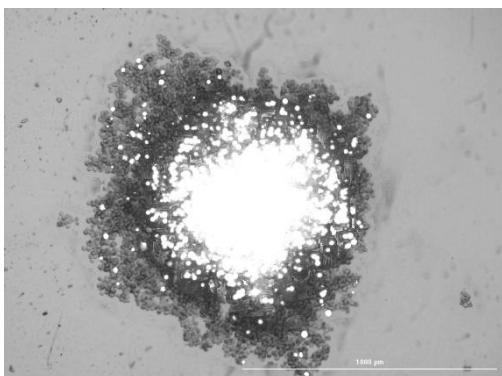
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

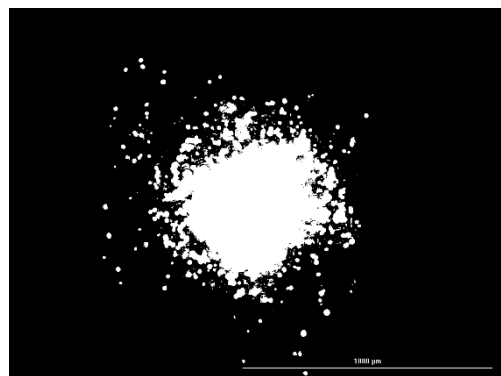
2.1 เทคนิคการปรับปรุงภาพ

วิธีการปรับปรุงภาพเพื่อให้ได้สัดส่วนพื้นที่ที่เราสนใจนั้นจะใช้วิธีการพื้นฐานคือ การ Thresholding เป็นวิธีการแยกภาพเฉพาะส่วนที่เราสนใจจะนำไปใช้งานโดยหลักการก็มีอยู่ง่ายๆ ว่านำภาพ 1 Channel (หรือ Grayscale Image) มาแปลงค่า intensity ของแต่ละ Pixel ให้เหลือเพียง 2 ค่า คือ 0(ดำ) กับ 255(ขาว) เราเรียกภาพที่มีค่า intensity เพียง 2 ค่า ว่า “Binary Image” โดยเราจะใช้ Threshold Value ในการแบ่งว่า Pixel ที่มี intensity XX ควรจะมีค่าเท่าไร ดังนี้

1. pixel ที่มีค่า มากกว่าเท่ากับ Threshold Value มีค่าเท่ากับ 255 หรือสีขาว
2. pixel ที่มีค่า น้อยกว่า Threshold Value มีค่าเท่ากับ 0 หรือสีดำนั่นเอง



Original image



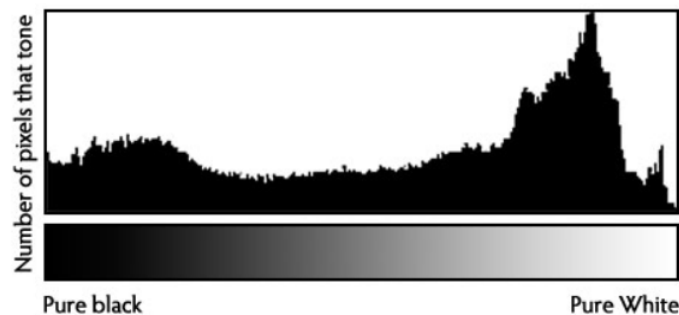
Thresholding

ที่มา : ภาพการทำ Thresholding ในโปรแกรม ImageJ

2.2 Histogram

Histogram หมายถึง กราฟที่แสดงถึงจำนวนของพิกเซลที่ความสว่างต่างๆของภาพทั้งในระบบ RGB และ gray scale โดยแบ่งระดับความสว่างออกเป็น 256 ระดับตั้งแต่ 0 ถึง 255 โดย

ในแกนนอนไ้ระดับความสว่างซ้ายมือที่มีค่าความสว่างน้อย(สีดำ) ไปยังด้านขวามือที่มีค่าความสว่างมาก(สีขาว) และแกนตั้งแสดงถึงจำนวนพิกเซลในแต่ละระดับความสว่าง



ภาพประกอบที่ 1 Histogram depicting the frequency distribution.

ที่มา : (<http://digital-photography-school.com/how-to-read-and-use-histograms/>)

Histogram มีประโยชน์อะไร

- เมื่อนำกราฟ histogram ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับภาพจริง เพื่อปรับการรับแสงของกล้องให้เหมาะสมกับภาพที่ต้องการถ่าย
- ใช้ในการปรับแต่งและควบคุมโทนสีของภาพ

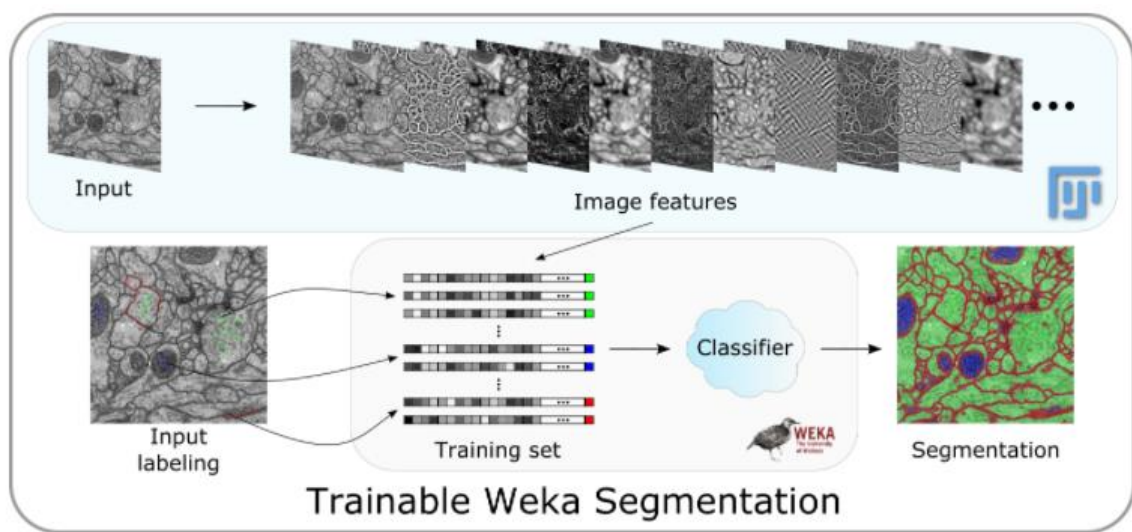
2.3 Trainable Weka Segmentation

Trainable Weka Segmentation คือปลั๊กอินของ ImageJ/Fiji ที่รวมชุดของอัลกอริทึมการเรียนรู้ของเครื่องกับชุดคุณลักษณะรูปภาพที่เลือกไว้เพื่อสร้างการแบ่งส่วนตามพิกเซล สามารถเรียก Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis) ได้จากปลั๊กอิน ซึ่งประกอบด้วยชุดเครื่องมือสร้างภาพและอัลกอริทึมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างแบบจำลองเชิงคาดการณ์ พร้อมด้วยอินเทอร์เฟซผู้ใช้แบบกราฟิกเพื่อให้เข้าถึงฟังก์ชันนี้ได้ง่าย

โดยเป้าหมายหลักของปลั๊กอินนี้คือเปรียบเทียบตัวแยกประเภทที่มีอยู่เพื่อดำเนินการแบ่งส่วนภาพตามการจัดประเภทพิกเซล

ข้อดีของ Weka มีดังนี้

1. ใช้งานได้อย่างเสรีภายใต้ GNU General Public License
2. สามารถทำงานได้บนเกือบทุกแพลตฟอร์ม
3. การรวบรวมเทคนิคการประมวลผลล่วงหน้าและการสร้างแบบจำลองข้อมูลที่ครอบคลุม



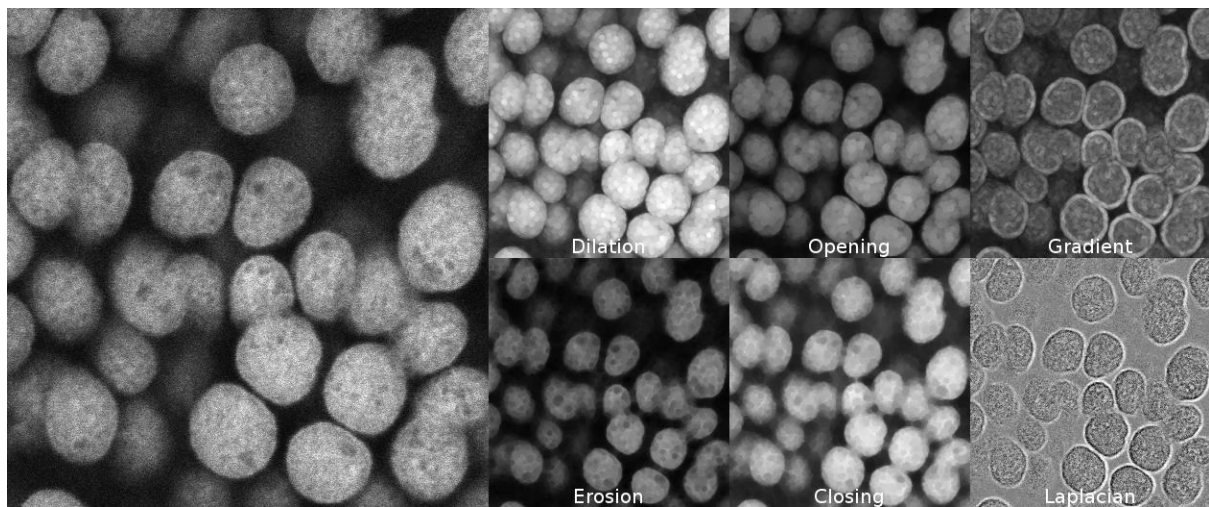
ที่มา : <https://imagej.net/>

2.4 MorphoLibJ

MorphoLibJ คือชุดของวิธีการ morphology ทางคณิตศาสตร์และปลั๊กอินสำหรับ ImageJ ซึ่งสร้างขึ้นที่ห้องปฏิบัติการ INRA-IJPB Modeling และ Digital Imaging และเป็นฟังก์ชันการทำงานหลายอย่างที่ขาดหายไป ใน ImageJ และปลั๊กอินอื่นๆ ไม่ได้ครอบคลุมหรือครอบคลุมเพียงบางส่วนเท่านั้นโดยใน MorphoLibJ มีตัวอย่างดังต่อไปนี้

1. Morphological filtering : เป็นตัวกรองทั่วไปที่สามารถนำมารวมกันเพื่อมอดิไฟซ์ชั้นที่หลากหลาย

2. Morphological reconstruction : เป็นอัลกอริทึมที่สามารถทำการตรวจจับค่าต่ำสุดของภูมิภาคหรือค่าสูงสุดในภาพระดับสีเทา
3. Watershed segmentation : เป็นอัลกอริทึมที่หลอมรวมภาพระดับสีเทาเข้ากับแบบจำลองระดับความสูงแบบดิจิทัล และตรวจจับแอ่งกักเก็บน้ำต่างๆ
4. Binary / label images utilities : เป็นอัลกอริทึมสำหรับการประมวลผลและการจัดการภาพไบนารีและภาพที่ป้ายกำกับ



The collection of morphological filters is available in the Plugins > MorphoLibJ menu. Filters are **implemented both for 2D and 3D images**, and work for binary, gray level or color (RGB) images.

ที่มา : <https://imagej.net/>

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานโครงการ

3.1 การออกแบบระบบ

ทางผู้จัดทำได้มีการวางระบบแบบแผนที่จะจัดทำในขั้นตอนการดำเนินงานโครงการไว้ดังนี้



3.1.1 input

จากการศึกษาในหัวข้อโครงการนี้สามารถบอกคุณลักษณะของภาพที่นำมาใช้ในการศึกษาได้ดังนี้

- รูปภาพเป็นแบบ 2D grayscale
- นามสกุลภาพเป็น.TIF file
- ภาพ Live/Dead assay (Channel 1 : ภาพเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิต, Channel 2 : ภาพเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว และภาพที่ทำการ Merge เซลล์ที่มีชีวิตและตายแล้วเข้าด้วยกัน (Brightfield))
- ภาพไม่มีความต่อเนื่องของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง
- ภาพเซลล์มะเร็งที่ทำการ treat ยาต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

3.1.2 การออกแบบ Segmentation

ในขั้นตอนนี้เราจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

- ขั้นตอนแรกเราจะนำเอา Segmentation ที่มีอยู่ในโปรแกรมที่เราจะใช้สร้าง Segmentation method (Imagej) มาประกอบรวมกันเพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของภาพที่ได้มาในขั้นตอนนี้ผู้จัดทำได้ Segmentation ย่อยๆแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือนำ Segmentation ย่อยๆนั้นมารวมกันภาพได้เงื่อนไขที่กำหนดขึ้นเพื่อให้ทุกระบวนการทั้งหมดเป็นแบบอัตโนมัติและมีความถูกต้องมากที่สุดที่ผู้ใช้งานจะสามารถยอมรับได้

- ขั้นตอนที่สอง จะเป็นการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของ Segmentation method ที่ฉลาดมากยิ่งขึ้น (มากกว่าในขั้นตอนแรก) เพื่อที่จะนำมาแก้ไขปัญหาในส่วนที่ Segmentation method แรกทำไม่ได้ ในขั้นตอนนี้ทางผู้จัดคิดว่าถ้าขั้นตอนแรกไม่ได้ค่าความถูกต้องตามที่ต้องการ ก็จะมาเปลี่ยนมาใช้ขั้นตอนนี้โดยที่มี Segmentation method ที่จะศึกษาดังนี้ MorphoLibJ และ Trainable Weka Segmentation

3.1.3 การออกแบบ Detection

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างเงื่อนไขเพื่อตรวจจับเฉพาะสิ่งที่สนใจ ในที่นี้คือ ตรวจจับเฉพาะพื้นที่ที่เซลล์เกาะกลุ่มกันเป็นก้อนๆ ส่วนที่เป็นเซลล์เล็กๆบริเวณรอบๆก็จะถูก remove ออกไป

3.1.4 Morphological feature extraction

ในส่วนนี้จะเป็ผลลัพธ์ที่ได้จากขั้นตอน Segmentation ซึ่งจะมีผลลัพธ์ดังนี้

- 1.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของเซลล์ที่มีชีวิต
- 2.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต
- 3.พื้นที่ทั้งหมดและพื้นที่เฉลี่ยของภาพ Brightfield

3.1.5 output

ในส่วนนี้จะเป็นส่วนของตัวโปรแกรมที่พร้อมให้ผู้ใช้งานใช้งานโปรแกรมได้อย่างไม่ยุ่งยาก และได้ผลลัพธ์ตามที่ต้องการ ซึ่งในขั้นตอนนี้ผู้จัดทำได้วางแผนไว้ว่าจะใช้โปรแกรม Matlab ในการสร้างหน้าโปรแกรม(GUI)ให้กับผู้ใช้งาน

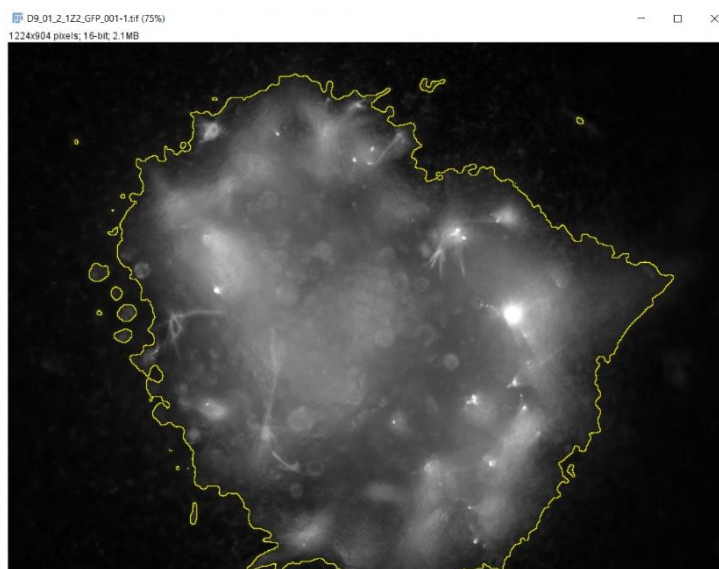
3.2 การจำลองการทำงานของระบบ

Segmentation ในขั้นตอนนี้ทางผู้จัดทำได้ทำการนำ Segmentation ที่มีอยู่ในโปรแกรม Imagej มาต่อรวมกันกลายเป็นไฟล์ Macro เพื่อทำการแยกเซลล์มะเร็งที่สนใจกับพื้นหลังทั้ง 3 แบบ ได้แก่ ภาพเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิต, ภาพเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว, ภาพเซลล์มะเร็งที่ตายแล้วและมีชีวิตมาทำการ Merge กัน (Brightfield) โดยจะแบ่งดังนี้

1. Macro[1] ➔ ใช้กับภาพเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิต
2. Macro[2] ➔ ใช้กับภาพเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว
3. Macro[3] ➔ ใช้กับภาพ Brightfield

Macro[1] : มีหลักการทำงานดังนี้

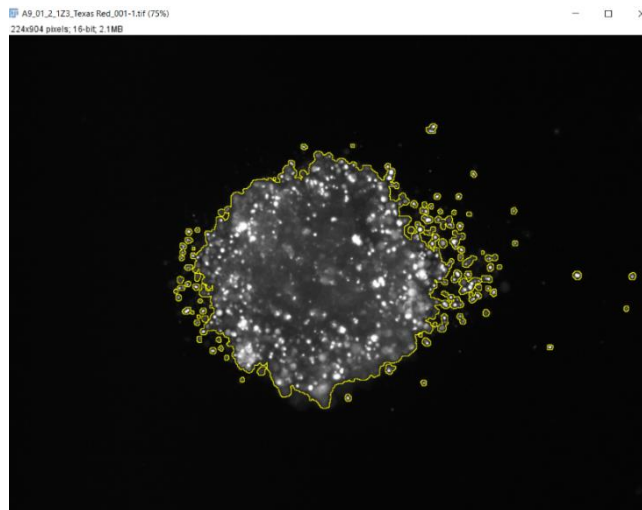
Scaleconversions(8-bit) ➔ SetThreshold(30,255) ➔ Convert to Mask ➔ Mean filter(radius=5)
➔ Fill hole



รูปภาพ : ผลลัพธ์จากการรัน Macro[1] ใน Imagej

Macro[2] : มีหลักการทำงานดังนี้

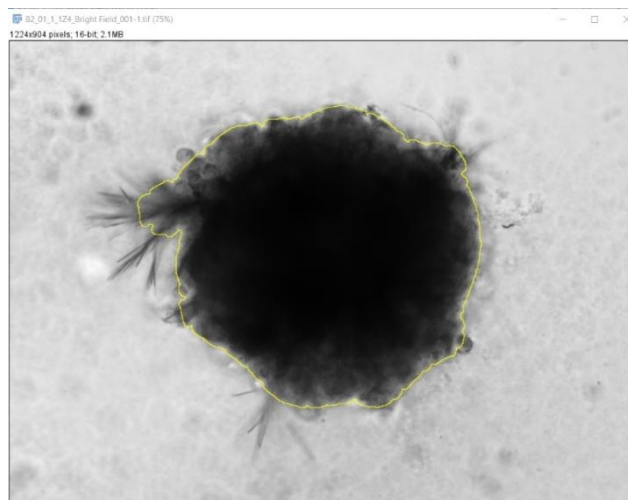
Scale conversions(8-bit) → SetThreshold(55,255) → Convert to Mask → Mean filter(radius=2)
→ Maximum filter(radius=2) → Fill hole



รูปภาพ : ผลลัพธ์จากการรัน Macro[2] ใน Imagej

Macro[3] : มีหลักการทำงานดังนี้

Scale conversions(8-bit) → SetThreshold(0,122) → Convert to Mask → Remove outliers(radius=40,threshold=50,which=Bright) → Maximum filter(radius=8) → Fill hole



รูปภาพ : ผลลัพธ์จากการรัน Macro[3] ใน Imagej

3.3 การสรุปผลการดำเนินงาน

สามารถทำในส่วนของ Segmentation ย่อยๆได้แล้วขั้นต่อไปคือการนำเอา Segmentation ย่อยๆนั้นมารวมกันภายใต้เงื่อนไขที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้กระบวนการทั้งหมดเป็นไปแบบอัตโนมัติและประเมินผลลัพธ์ว่าผลที่ได้นั้นสามารถยอมรับได้หรือไม่ (%accuracy) ถ้าหากไม่ได้ทางผู้จัดทำต้องเปลี่ยนไปใช้ Segmentation method ที่ฉลาดมากยิ่งขึ้น (Concept 2)