

## MCV Measurement of Abnormal Red Blood Cells Using Adaptive Neuro-Fuzzy System with Image Processing

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original research

#### Authors

Babazadeh Khameneh N.<sup>1</sup> MSc,  
 Salehian P.\* MD,  
 Arabalibeik H.<sup>2</sup> PhD,  
 Setayeshi S.<sup>3</sup> PhD

#### How to cite this article

Babazadeh Khameneh N, Salehian P, Arabalibeik H, Setayeshi S. MCV Measurement of Abnormal Red Blood Cells Using Adaptive Neuro-Fuzzy System with Image Processing. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(3): 97-104.

### ABSTRACT

**Aims** Size, shape, and volume of Red Blood Cells are important factors in diagnosing blood-associated disorders such as iron deficiency and anemia. Every day, thousands of blood samples are tested by microscopes and automated cell counter devices in pathology laboratories around the world, which may be expensive and time-consuming. The objective of this study was to measure mean corpuscular volume of abnormal red blood cells using the adaptive neuro-fuzzy system with image processing.

**Materials & Methods** This study was conducted on 60 blood samples from the archive of pathology laboratory of Sarem hospital including 40 normal samples and 20 abnormal samples. Adaptive local thresholding and bounding box methods were used to extract the inner and outer diameters of red cells to calculate MCV. An adaptive-network-based fuzzy inference system was used to classify blood samples to normal and abnormal groups. In this method, normal and abnormal blood samples were examined using image processing techniques and MATLAB software.

**Findings** The Accuracy of the proposed method and area under the curve were found as 96.6% and 0.995%, respectively.

**Conclusion** The proposed method provides diagnostic capability using a drop of the blood sample and showed suitable performance on pathological images. The designed automatic system can be a convenient and cost effective alternative for common laboratory procedures. In addition, the method provides a basis for calculating other parameters of blood test or CBC such as mean cell hemoglobin, mean cell hemoglobin concentration, RDW, hematocrit, and red blood cell count.

**Keywords** Mean Cell Volume; Adaptive Neural Network Base Fuzzy Inference System (ANFIS); Image Processing

\*Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Islamic Azad University, Pardin Branch Tehran, Iran

<sup>2</sup>Science and Technology in Medicine Research Center (RCSTIM), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Energy Engineering & Physics Department, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111

Phone: +98 (21) 44670888

Fax: +98 (21) 44670432  
 piroozsalehian@yahoo.com

#### Article History

Received: February 29, 2016

Accepted: June 25, 2016

ePublished: August 15, 2017

### CITATION LINKS

[1] Harrison's principles of internal medicine [2] Automated cell counter device (principles, calibration, quality control and error) [3] Abnormal red blood cells detection using adaptive neuro-fuzzy system [4] Digital image processing [5] A threshold selection method from gray-level histograms [6] Morphological image analysis: Principles and applications [7] Computer and robot vision [8] Torus [9] ANFIS: Adaptive-network-based fuzzy inference system [10] An introduction to ROC analysis [11] Simultaneous determination of size and refractive index of red blood cells by light scattering measurements [12] Estimation of human red blood cells size using light scattering images

## اندازه‌گیری MCV (حجم متوسط گلبول‌های قرمز خون) غیرنرمال با استفاده از سیستم عصبی-فازی تطبیقی به روش پردازش تصویر

ناهید بابازاده خامنه MSc

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پردیس، تهران، ایران

پیروز صالحیان\* MD

مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صرم، بیمارستان فوق تخصصی صرم، تهران، ایران

حسین عربعلی‌بیگ PhD

مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

سعید ستایشی PhD

گروه پروتو پزشکی، دانشکده مهندسی انرژی و فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** اندازه، شکل و حجم گلبول قرمز فاکتورهای مهمی در تشخیص ناهنجاری‌های مربوط به گلبول‌های قرمز از قبیل کمبود آهن و کم‌خونی هستند. روزانه هزاران نمونه خون در آزمایشگاه‌های پاتولوژی سراسر دنیا با میکروسکوپ و دستگاه خودکار شمارنده سلولی بررسی می‌شوند و این کار معمولاً پرهزینه و وقت‌گیر است. هدف این مطالعه، اندازه‌گیری حجم متوسط گلبول‌های قرمز خون غیرنرمال با استفاده از سیستم استنتاج عصبی-فازی تطبیقی به روش پردازش تصویر بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ۶۰ نمونه از آرشیو نمونه‌های خون آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان صرم شامل ۴۰ نمونه نرمال و ۲۰ نمونه غیرنرمال بررسی شدند. از آستانه‌گذاری محلی تطبیقی و روش کوچک‌ترین مستطیل محیط بر سلول قرمز به‌منظور استخراج قطر داخلی و خارجی گلبول قرمز برای محاسبه حجم متوسط سلول‌های قرمز خون استفاده شد. برای طبقه‌بندی نمونه‌های خون به دو گروه نرمال و غیرنرمال از ANFIS استفاده شد. در این روش، نمونه‌های خون نرمال و غیرنرمال با استفاده از تکنیک‌های پردازش تصویر و نرم‌افزار MATLAB بررسی شد.

**یافته‌ها:** دقت روش پیشنهادی و مساحت زیر منحنی به ترتیب ۹۶/۶٪ و ۹۹/۹۵٪ به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** روش پیشنهادی قابلیت تشخیص با استفاده از یک قطره خون را فراهم می‌کند و روی تصاویر پاتولوژیک عملکرد خوبی دارد. سیستم اتوماتیک طراحی شده می‌تواند جایگزینی مناسب و مقرون‌به‌صرفه برای روش‌های معمول آزمایشگاهی باشد. به‌علاوه، این روش می‌تواند پایه محاسبه سایر پارامترهای آزمایش خون یا CBC از قبیل میانگین هموگلوبین سلول، میانگین غلظت هموگلوبین سلول، RDW، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز خون باشد.

**کلیدواژه‌ها:** حجم متوسط گلبول‌های قرمز خون، سیستم عصبی فازی تطبیقی، پردازش تصویر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵

\*نویسنده مسئول: piroozsalehian@yahoo.com

### مقدمه

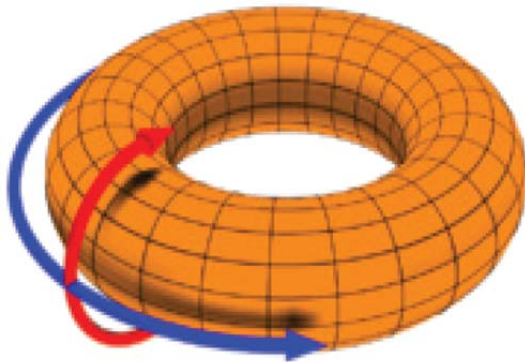
خون یک بافت در گردش و حاوی پلاسما، مایع و سلول است، در واقع می‌توان گفت بافت پیوندی تخصص‌یافته است که سلول‌های آن، درون ماده زمینه‌ای مایع به نام پلاسما شناورند. از نظر حجمی تقریباً ۵۵٪ خون، پلاسما و ۴۵٪ آن سلول‌های خونی شامل سلول‌های قرمز، سلول‌های سفید و پلاکت هستند. گلبول‌های قرمز بیشترین سلول‌های خونی را تشکیل می‌دهند. آنها سلول‌هایی بدون هسته و مقعرالطرفین هستند. در شرایط طبیعی قطر آنها به‌طور متوسط ۸ میکرون است. کم‌خونی بر شکل، اندازه، حجم، رنگ و تعداد گلبول‌های قرمز خون در یک حجم معین، تاثیر مستقیم می‌گذارد. سلول‌های قرمز تحت تاثیر انواع مختلف بیماری

خونی قرار دارند. حجم متوسط سلول‌های قرمز (MCV) در یک فرد نرمال  $90/0 \pm 8/0$  فمتولیتراست [1]. مقدار MCV در افتراق میان بیماری‌های کم‌خونی ناشی از کمبود آهن، فقر اسیدفولیک، تالاسمی و سایر موارد کم‌خونی بسیار کمک‌کننده است.

یکی از آزمایش‌های معمول در آزمایشگاه‌های پاتولوژی، شمارش سلول‌های خونی بوده است که در اغلب آزمایشگاه‌ها با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی انجام می‌شود. برای اطمینان از صحت و دقت نتایج این آزمایش به آگاهی کامل از عملکرد آنها و آشنایی با روش‌های کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای مربوط به آن نیاز است. آگاهی از روش‌های کالیبراسیون و کنترل کیفیت ابزار پایه‌ای مانند سمپلر، اسپکتروفتومتر، فتومتر و سانتیفریوژ میکروهماتوکریت برای تضمین کیفیت نتایج آزمایش‌هایی که برای کالیبراسیون این دستگاه کاربرد دارد، ضروری است. در اغلب دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی اساس کار بر مقاومت الکتریکی استوار است. این روش اولین بار توسط *والاس کولتر* در سال ۱۹۵۶ مطرح شد و مبنای کار دستگاه‌هایی مانند کولتر، بک‌من، سیسمکس، ابوت و غیره قرار گرفت. در این مکانیزم، خون در یک محلول بافری الکتریکی رقیق شده و از بین دو الکترود حامل جریان الکتریکی مستقیم عبور می‌کند. با عبور هر سلول خونی از این مسیر، مقاومت الکتریکی و یک پالس الکتریکی ایجاد می‌شود. تغییر در پتانسیل بین الکترودها متناسب با مدت زمانی است که گلبول از فضای بین دو الکترود عبور می‌کند که این فضا در اصطلاح دریچه نامیده می‌شود. ارتفاع هر پالس نشان‌دهنده حجم سلول و تعداد پالس نشان‌دهنده تعداد سلول است [2]. با توجه به تکامل بسیار این سیستم، بیشترین حجم تولید از نظر اقتصادی و دقت و صحت مناسب، امروزه به‌عنوان سیستم استاندارد تلقی می‌شود. مزیت‌های این سیستم شامل سرعت و دقت بالا، امکان محاسبات اندکس‌ها، امکان افتراق احتمالی رده‌های سفید (رده گرانولوسیت از آگرانولوسیت)، به‌طور کلی آرایه منحنی‌های مربوط به توزیع پلاکتی، توزیع و پراکندگی حجم‌های متفاوت RBC یا همان RDW هستند. معایب این سیستم‌ها نیز شامل قیمت و استهلاک بالا و هزینه تعمیرات بسیار زیاد، وجود قطعات بسیار حساس که تولید آنها در داخل امکان‌پذیر نیست، عدم امکان انجام Diff، نیاز به محلول‌های شست‌وشو که معمولاً ۵ نوع است، کاهش حساسیت سیستم در طول مدت کار و عدم امکان تکنولوژیک تولید در داخل به‌طور کامل است. علاوه بر آن باید مسایل دیگری مانند آلودگی و بیروسی کارکنان و زیست‌محیطی با ویروس‌های هپاتیت و HIV مورد توجه قرار گرفته شود که با روش‌های معمول احتمال آن بیشتر است.

روش معمول تشخیص کم‌خونی، معاینات بالینی بیمار و مشاهده گزارشات آزمایشگاهی است که حاوی اطلاعات مهمی از جمله تعداد و حجم گلبول‌های قرمز، میزان غلظت هموگلوبین و غیره بوده است که تمامی این محاسبات توسط دستگاه شمارش سلول در آزمایشگاه‌های پاتولوژی انجام می‌شود. روزانه هزاران نمونه خون در آزمایشگاه‌های پاتولوژی سراسر دنیا به‌وسیله میکروسکوپ و دستگاه خودکار شمارنده سلولی بررسی می‌شوند. این کار معمولاً پرهزینه و وقت‌گیر است. بنابراین تشخیص خودکار نمونه‌های غیرنرمال در کاهش وقت و هزینه بسیار کمک‌کننده خواهد بود. از جمله روش‌های خودکار می‌توان به روش پراکندگی لیزری اشاره کرد که برای تعیین اندازه گلبول قرمز استفاده می‌شود، ولی هزینه بالایی دارد. سؤال مطرح شده در اینجا این است که آیا می‌توان با استفاده از تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های خون و تکنیک‌های

برای شناسایی و مشخص شدن تعداد اشیای موجود در تصویر از روش برچسب‌گذاری اشیا استفاده شد. در این روش به هر یک از اشیای موجود در تصویر به ترتیب یک عدد نسبت داده شد که با آن عدد قابل شناسایی بود<sup>[7]</sup>. بین ویژگی‌های گلبول قرمز دو ویژگی کلیدی قطر حفره داخلی گلبول قرمز و قطر دایره بیرونی آن وجود داشت. برای استخراج این دو ویژگی از ویژگی‌های کوچک‌ترین مستطیل محیط بر گلبول قرمز استفاده شد. بنابراین میانگین مجموع طول و عرض این مستطیل به عنوان قطر دایره بیرونی گلبول قرمز لحاظ شد. گلبول‌های قرمز انسان پهن و در مرکز مقعرالطرفین هستند، لذا نزدیک‌ترین شکل هندسی به آن توریس است که با استفاده از این شبیه‌سازی هندسی و ریاضی می‌توان ویژگی‌های گلبول قرمز از جمله حجم را محاسبه کرد (شکل ۱) [8].



شکل ۱) شکل هندسی توریس

توریس را می‌توان به صورت پارامتری تعریف کرد که در آن پارامتر  $u$  و  $v$  در بازه  $(0, 2\pi)$  قرار دارند،  $R$  فاصله از مرکز توریس تا مرکز تیوب و  $r$  شعاع تیوب است:

$$1) y(u, v) = (R + r \cos u) \sin v$$

$$2) z(u, v) = r \sin v$$

در دستگاه مختصات دکارتی می‌توان تعریف کرد:

$$3) (R - \sqrt{X^2 + Y^2})^2 + Z^2 = r^2$$

که به طور ساده‌تر می‌توان نوشت:

$$4) (x^2 + y^2 + z^2 + R^2 - r^2)^2 = 4R^2(x^2 + y^2)$$

$A$  مساحت رویه توریس از معادله:

$$5) A = 4 \pi^2 R r = (2\pi R) (2\pi r)$$

و  $V$  حجمی که یک توریس محصور می‌کند از معادله زیر به دست می‌آید [8]:

$$6) V = 2\pi^2 R r^2 = (\pi r^2) (2\pi R)$$

حجم‌های خارج از محدوده زیر، ناخواسته محسوب شده و باید قبل از انجام محاسبات از لیست حذف شوند.

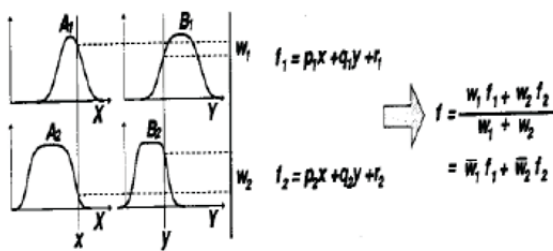
$$7) (a \times \text{median}) \leq \text{Volume} \leq (b \times \text{median})$$

پردازش تصویر، ویژگی‌های حجمی گلبول‌های قرمز خون را استخراج نموده و براساس آن نمونه‌های خون را به دو گروه نرمال و غیرنرمال (مبتلا به کم‌خونی) طبقه‌بندی کرد یا خیر؟ هدف این مطالعه، اندازه‌گیری حجم متوسط گلبول‌های قرمز خون غیرنرمال با استفاده از سیستم استنتاج عصبی- فازی تطبیقی (ANFIS) به روش پردازش تصویر بود.

## مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، از شبیه‌سازی هندسی شکل توریس برای اندازه‌گیری پارامترهای مورد استفاده در محاسبه حجم سلول‌های قرمز در تصاویر میکروسکوپی، برای قطعه‌بندی تصاویر پاتولوژیک از تکنیک آستانه‌گذاری محلی تطبیقی، از تکنیک کوچک‌ترین مستطیل محیط بر سلول قرمز برای استخراج ویژگی‌های هندسی سلول قرمز استفاده شد. برای طبقه‌بندی نمونه‌های خون به دو گروه نرمال و غیرنرمال، سیستم استنتاج عصبی- فازی تطبیقی طراحی شد. در نهایت به منظور ارزیابی درصد صحت تشخیص سیستم اتوماتیک، از منحنی ROC (Receiver Operating Characteristic) استفاده شد. داده‌های اولیه استفاده شده در این مطالعه از نوع تصویری، در اندازه  $640 \times 480$  و به فرمت بیت مپ بودند. تصاویر از نمونه‌های خون نرمال و غیرنرمال تهیه شدند. تعداد لام‌های متعلق به افراد نرمال ۴۰ عدد و تعداد لام‌های متعلق به افراد غیرنرمال ۲۰ عدد بود. از هر لام ۳۰ الی ۵۰ عکس گرفته و در کل حداقل ۱۵۰۰ تصویر نرمال و ۱۰۰۰ تصویر غیرنرمال تهیه شد. برای تهیه تصاویر در آزمایشگاه از میکروسکوپ نیکون NY100 و دوربین (Panasonic) استفاده شد. دوربین از یک طرف به میکروسکوپ و از طرف دیگر به کامپیوتر متصل شده بود. لنز چشمی میکروسکوپ روی ۴۰ و بزرگ‌نمایی آن روی ۱۰۰ تنظیم و تمامی عکس‌ها در شرایط محیطی و آزمایشگاهی یکسان تهیه شدند. کالیبره‌بودن دستگاه موضوع مهمی است که باید قبل از گرفتن عکس‌ها از آن اطمینان داشته باشیم و تمامی عکس‌ها بایستی در شرایط یکسان مانند میزان بزرگ‌نمایی میکروسکوپ، رزولوشن دوربین، فاصله لام تا لنز چشمی، اندازه لنز چشمی، شدت نور میکروسکوپ و غیره تهیه شوند<sup>[3]</sup>. در آغاز تصاویر رنگی گرفته شده به تصاویری با سطوح خاکستری تبدیل شدند. مقدار سطوح خاکستری تصاویر در بازه  $0.255$  قرار داشت. بنابراین در تصویر رنگی به فرمت NTSC (The National Television Systems Committee) تبدیل و سپس مقادیر دو مولفه Hue و Saturation را که حاوی اطلاعات رنگی تصویر بودند، صفر و فقط مولفه luminance را که حاوی اطلاعات سطوح خاکستری تصویر بود، نگه داشته شد و مجدداً به فضای رنگی برگشت داده شد. در واقع با این کار اطلاعات سطوح خاکستری از تصویر رنگی استخراج شد<sup>[4]</sup>. برای تبدیل تصاویر با سطوح خاکستری به تصویر باینری از آستانه‌گذاری استفاده شد. روش آستانه‌گذاری آتسو، مقدار بهینه آستانه را به نحوی پیدا کرد که پراکندگی داخل هر کلاس کمترین مقدار ممکن را داشته و در مقابل، پراکندگی بین دو کلاس نیز بیشترین مقدار را داشته باشد<sup>[5]</sup>. سلول‌های قرمزی که به لبه تصویر چسبیده‌اند، اشیای ناخواسته محسوب می‌شوند و باید از محاسبات خارج شوند. بنابراین پس از آن که تصویر خاکستری به یک تصویر باینری تبدیل شد، با استفاده از روش بازیافت تصویر، این اشیای ناخواسته حذف شدند. این روش از الگوریتم ترکیبی و سریع بازیافت تصاویر استفاده می‌کند<sup>[6]</sup>.

خروجی نهایی سیستم فازی در شکل ۳ نمایش داده شده است [۹].



شکل ۳) خروجی سیستم فازی

به طوری که  $a < 1$  و  $b > 1$  هستند. به منظور طبقه‌بندی نمونه‌های خون به دو گروه نرمال و غیرنرمال از ANFIS استفاده شد. سیستم ANFIS، شبکه تطبیق‌پذیر و قابل آموزشی است که از نظر عملکرد کاملاً مشابه سیستم استنتاج فازی است. برای سادگی کار فرض می‌کنیم که سیستم فازی ما دو ورودی  $x$  و  $y$  داشته و خروجی آن  $z$  است. حال اگر قوانین به صورت زیر باشند:

۸) Rule1: if  $x$  is  $A_1$  and  $y$  is  $B_1$  then  $f_1 = p_1x + q_1y + r_1$

۹) Rule2: if  $x$  is  $A_2$  and  $y$  is  $B_2$  then  $f_2 = p_2x + q_2y + r_2$

و اگر برای غیرفازی‌سازی از غیرفازی‌ساز میانگین مراکز استفاده کنیم، خروجی به صورت زیر خواهد بود:

$$۱۰) f = \frac{w_1 f_1 + w_2 f_2}{w_1 + w_2} \bar{w}_1 f_1 + \bar{w}_2 f_2 \text{ است } \bar{w}_1 = \frac{w_1}{w_1 + w_2}, \bar{w}_2 = \frac{w_2}{w_1 + w_2}$$

خروجی لایه‌ها:

لایه ۱: در این لایه ورودی‌ها از توابع عضویت عبور می‌کنند:

$$۱۱) O_{1,i} = \mu_{A_i}(x) \text{ for } i=1,2$$

$$۱۲) O_{1,i} = \mu_{B_i}(x) \text{ for } i=3,4$$

توابع عضویت می‌تواند هر تابع پارامتری مناسب باشد که در اکثر موارد توابع گاوسین انتخاب می‌شوند، مانند تابع زنگی با شکل عمومی که مجموعه پارامترها هستند. پارامترهای این لایه به پارامترهای اولیه معروف هستند.

$$۱۳) \mu_{A_i}(x) = \frac{1}{1 + \left| \frac{x - c_i}{a_i} \right|^{2b_i}}$$

لایه ۲: خروجی این لایه ضرب سیگنال‌های ورودی است که در واقع معادل قسمت "اگر" قوانین هستند.

$$۱۴) O_{2,i} = w_i = \mu_{A_i}(x) \mu_{B_i}(y), i=1,2$$

لایه ۳: خروجی این لایه نرمالیزه شده لایه قبلی است:

$$۱۵) O_{3,i} = \bar{w}_i = \frac{w_i}{w_1 + w_2}, i = 1,2$$

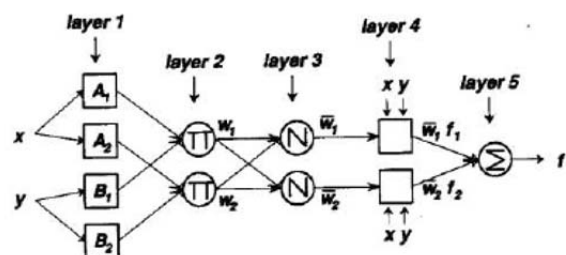
لایه ۴: غیرفازی‌سازی میانگین مرکز:

$$۱۶) O_{4,i} = \bar{w}_i f_i = \bar{w}_i (p_i x + q_i y + r_i)$$

لایه ۵:

$$۱۷) O_{5,i} = \sum_i \bar{w}_i f_i = \frac{\sum_i w_i f_i}{\sum_i w_i}$$

اکنون یک شبکه تولید شده که معادل سیستم استنتاج فازی سوگنو (TSK) است (شکل ۲) [۹].



شکل ۲) نمایی از سیستم فازی سوگنو

۱۸)

$$\text{output}(x) = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_i(x) [\prod_{j=1}^m \mu_{A_j}(x_j)]}{\sum_{i=1}^n [\prod_{j=1}^m \mu_{A_j}(x_j)]}$$

۱۹)

$$\text{output}(x) = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_i(x) [\text{output}_{i,j}(x_j)]}{\sum_{i=1}^n [\text{output}_{i,j}(x_j)]}$$

۲۰)

$$F^1(x) = a_0^1 + a_1^1 x_1 + a_2^1 x_2 + \dots + a_n^1 x_n \quad (\text{First Order})$$

بنابراین در این شبکه از سوگنو ضرب و فازی‌سازی گاوسین و غیرفازی‌سازی میانگین مرکز استفاده شد. برای آموزش پارامترهای شبکه عصبی-فازی تطبیقی از الگوریتم یادگیری ترکیبی استفاده شد [۹]. منحنی ROC برای ارزیابی عملکرد (حساسیت و ویژگی آزمون) در یک سیستم به کار رفت. این روش در بررسی نتایج عددی آزمایشگاهی در حوزه پزشکی کاربرد بسیاری دارد. زمانی که هدف، بررسی میزان تعلق یک سری نتایج عددی به دو کلاس مختلف یا میزان تفکیک‌پذیری دو کلاس مختلف توسط این اعداد است، از منحنی ROC استفاده می‌شود. منحنی ROC یک گراف دو بُعدی است که در محور افقی آن میزان ویژگی یا مثبت غیرواقعی داده‌های آزمون و در محور عمودی آن میزان حساسیت یا مثبت واقعی این داده‌ها نمایش داده می‌شود. حساسیت یک آزمون، میزان قابلیت آن برای شناسایی بیماری درون یک جمعیت بیمار بوده و در واقع میزان تشخیص درست بیماران توسط آزمون است.

$$۲۱) \text{TPF} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$$

تعداد افراد بیمار = (TP+FN)

میزان ویژگی یک آزمون، قابلیت آن برای شناسایی عدم وجود یک بیماری در یک جمعیت فاقد بیماری است، در واقع می‌توان گفت نرخ تعداد افرادی که بیمار نیستند و به طور صحیح توسط آزمون تشخیص داده شده‌اند.

$$۲۲) \text{TNF} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$$

تعداد افراد غیربیمار = (TN+FP)

میزان دقت آزمون، نرخ درستی نتایج یک آزمون است، در واقع تعداد افرادی که درست تشخیص داده شده‌اند (بیمار و غیربیمار) تقسیم بر جمعیت کلیه افراد است.

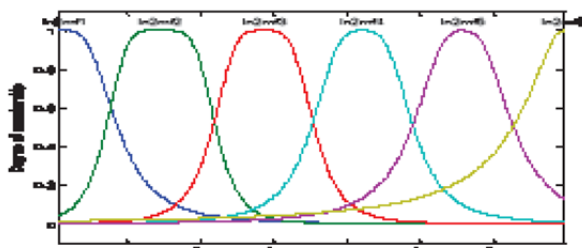
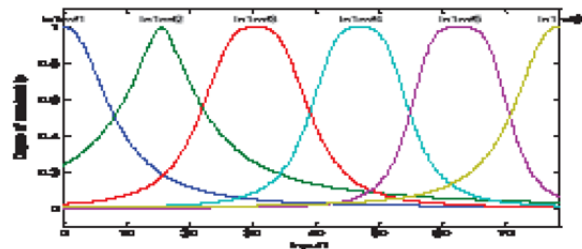
$$۲۳) (\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN})$$

مساحت زیر منحنی ROC، میزان کارایی سیستم را نشان می‌دهد. بیشترین مساحت یک است (نمودار ۱).

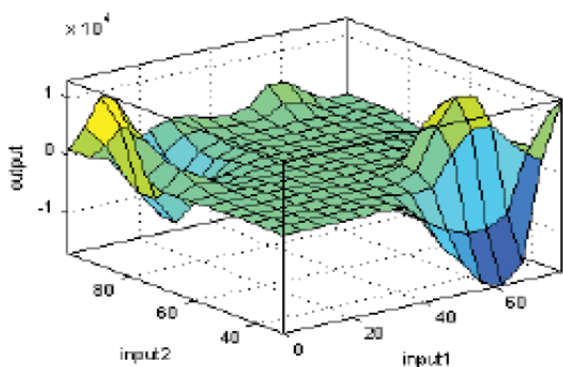


اندازه قطرهای داخلی و خارجی سلول‌های قرمز محاسبه شدند. برای حذف حجم‌های ناخواسته، حجم‌هایی که در بازه ۵۰٪ مقدار میانه قرار داشتند به‌عنوان حجم‌های قابل قبول انتخاب شدند. از روش ارزیابی تقاطعی برای انتخاب و جایگزین داده‌های آموزش و داده‌های آزمون استفاده شد. بنابراین شبکه عصبی-فازی به‌ازای تمام داده‌های نرمال و غیرنرمال موجود در سیستم یک‌بار آزمایش شد. داده‌های آموزش شامل ۲۱۵۱۳ سلول قرمز بود (۱۳۸۳۵ داده نرمال و ۷۶۷۸ داده غیرنرمال).

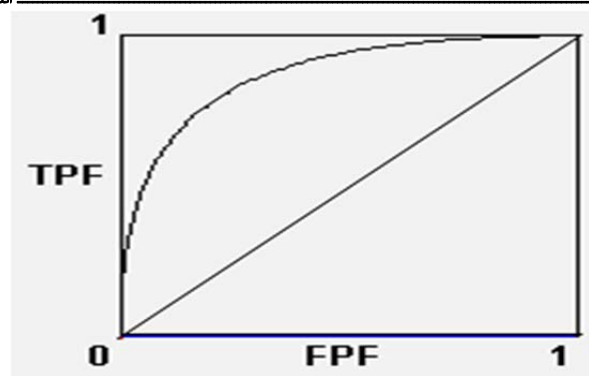
شعاع بیرونی و شعاع حفره سلول‌های قرمز به‌عنوان دو متغیر ورودی در شبکه عصبی-فازی به کار برده شد. به‌ازای هر ورودی تابع عضویت از نوع گاوسین نسبت داده می‌شود، بنابراین پایگاه قواعد شامل ۳۶ قاعده است. پس از ۱۰۰ دور آموزش، میانگین مربعات خطای آموزش و آزمون به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۰۳۰۷ بود. شکل توابع عضویت دو متغیر ورودی شبکه پس از آموزش ANFIS و رویه حاصل از ورودی‌ها و خروجی شبکه به ترتیب در نمودارهای ۲ و ۳، شکل‌های ۶ و ۷ نمایش داده شده است. خروجی مطلوب و خروجی واقعی شبکه ANFIS به‌ازای داده‌های آزمون متعلق به یک دسته (هر دسته شامل ۴ نفر نرمال و ۲ نفر غیرنرمال) در شکل ۱۱ نشان داده شده است. میزان دقت سیستم و مساحت زیر منحنی ROC به ترتیب ۹۶/۶٪ و ۹۹۵۰/۰٪ بود (نمودار ۴).



نمودار ۲) شکل توابع عضویت دو متغیر ورودی پس از آموزش شبکه



نمودار ۳) رویه حاصل از ورودی‌ها و خروجی شبکه ANFIS

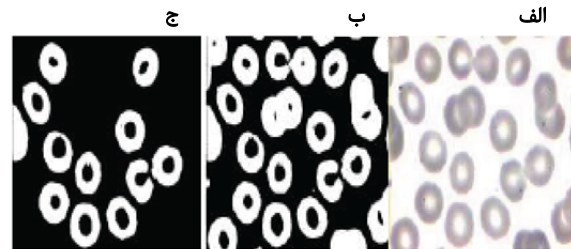


نمودار ۱) منحنی ROC

زمانی که میزان کارایی یک آزمون افزایش می‌یابد، منحنی ROC به گوشه بالایی سمت چپ حرکت کرده، مساحت زیر منحنی نیز افزایش یافته و به یک نزدیک می‌شود [10].

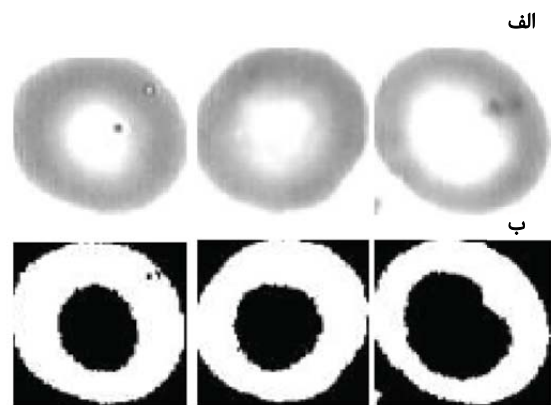
### یافته‌ها

در ابتدا تصویر رنگی گرفته‌شده به تصویری با سطوح خاکستری تبدیل شد. سلول‌های قرمزی که به لبه تصویر چسبیده بودند، اشیای ناخواسته محسوب شده و با استفاده از روش بازیافت تصویر حذف شدند (شکل ۴).



شکل ۴) الف: تصویر اصلی؛ ب: تصویر باینری حاصل از آستانه‌گذاری آتسو؛ ج: تصویر پردازش‌شده

از مختصات مکانی هر یک از اشیای برای استخراج زیرتصویر با سطوح خاکستری از تصویر اصلی استفاده شد. بنابراین هر زیرتصویر خاکستری فقط شامل یک سلول بود. سپس هر زیرتصویر با سطوح خاکستری با استفاده از الگوریتم آتسو با آستانه بهینه محلی به زیرتصویر باینری تبدیل شد (شکل ۵).

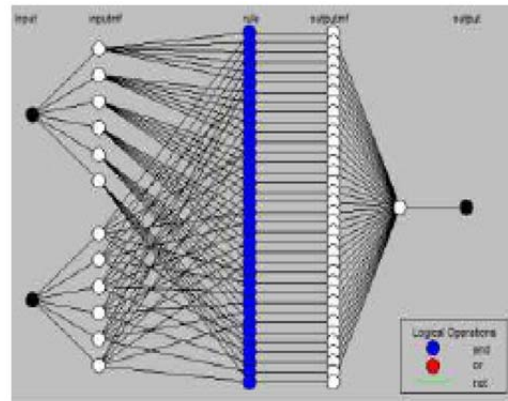


شکل ۵) الف: زیرتصویر باینری با سطوح خاکستری؛ ب: تصویر باینری حاصل از آستانه‌گذاری محلی تطبیقی

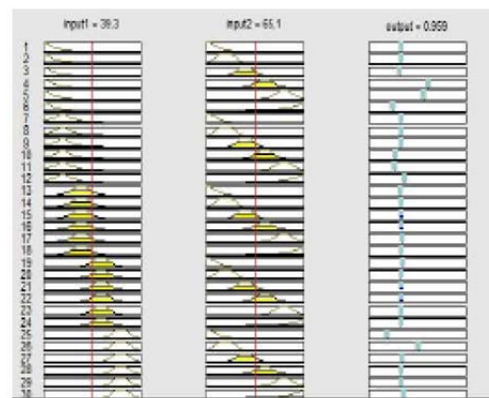
## بحث

در سال ۲۰۰۵ میلادی، پی بودیوانت و همکاران<sup>[11]</sup> یک روش بر پایه تبدیل فوریه سریع (Fast Fourier Transform) برای تعیین همزمان اندازه و ضریب شکست مجموعه‌ای از سلول‌های قرمز خون با استفاده از میزان توزیع زاویه اندازه‌گیری شده از نورهای پراکنده را بررسی کرده‌اند. اندازه سلول قرمز خون و غلظت هموگلوبین، پارامترهای کلینیکی مهمی هستند که برای چندین تست تشخیصی، مورد نیاز هستند. اندازه‌گیری توزیع زاویه‌ای نور پراکنده یک مجموعه از سلول‌ها یا یک سلول، برای تعیین این دو پارامتر استفاده می‌شود. به طور کلی با متناسب کردن تابع فازی اندازه‌گیری شده با تابع فازی پراکنده‌ساز، اندازه و ضریب شکست به دست می‌آید. تابع فازی پراکنده‌ساز با نظریه‌های پراکندگی الکترومغناطیسی پیش‌بینی می‌شود، اگرچه این روش در زمان واقعی قابل جوابگویی نیست. اخیراً برای این منظور، روش‌هایی بر پایه راه‌حل‌های پارامتریک از معکوس مساله پراکندگی نور توسعه پیدا کرده است.

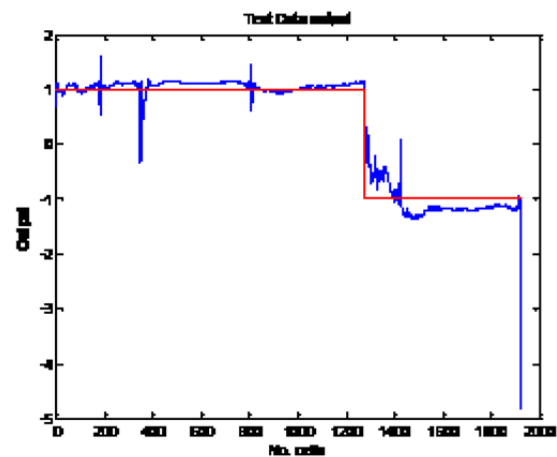
در این روش‌ها به جای استفاده از تابع فازی کل، موقعیت زاویه دید نور پراکنده، برای تعیین اندازه و ضریب شکست سلول‌های منفرد استفاده می‌شود. اگرچه کاربرد این روش برای مجموعه‌ای از سلول‌ها مشکوک به نظر می‌رسد. آنها نشان داده‌اند که تبدیل فوریه از تابع فازی اندازه‌گیری شده از مجموعه‌ای از سلول‌های قرمز خون می‌تواند به سرعت، دقت تعیین اندازه و ضریب شکست سلول‌ها کمک کند. این روش برای تعیین مقدار میانگین اندازه‌ها و میانگین غلظت هموگلوبین سلول‌های قرمز خون متعلق به افراد نرمال و بیماران مبتلا به کم‌خونی استفاده شده است. نورهای پراکنده شده به سمت جلو از سوی نمونه‌ها، به وسیله یک لنز جمع‌آوری می‌شود و روی یک ردیاب CCD با مشخصات ST6، USA، SBI6 تصویر می‌شود. توزیع زاویه‌ای نور پراکنده از طریق شناسایی شدت نور در تک‌تک پیکسل‌های موجود در یک جهت افقی به دست می‌آید. برای این منظور، هر پیکسل از CCD برای یک زاویه پراکندگی تنظیم می‌شود. نور تک‌رنگ از طریق یک واسط که متشکل از پراکندگی‌های مدور است، به سمت جلو پراکنده می‌شود و نشان‌دهنده نوسان شدت نور با افزایش زاویه پراکندگی ( $\theta$ ) است. فرکانس این نوسان یک شاخص حساس به اندازه پراکندگی‌های حاضر در واسط است. با استفاده از تئوری Mie مقادیر تابع فازی محاسبه می‌شوند. سه پراکندگی، قطر یکسان  $6/\Delta m\mu$  ولی ضریب شکست‌های متفاوت دارند. ضریب شکست محیط واسط  $1/33$  است. دوره تناوب نوسان الگوی زاویه پراکندگی برای سه پراکندگی مشابه است. موقعیت زاویه‌های شدت نور با افزایش ضریب شکست پراکندگی از طریق سیستم شیفت به سمت مقدار کوچک‌تر  $\theta$  کشیده می‌شود. در نهایت، همان‌طور که انتظار می‌رود میانگین قطر سلول‌های قرمز خون متعلق به فرد نرمال بزرگ‌تر از افراد مبتلا به کم‌خونی است. توزیع اندازه سلول‌های قرمز در افراد مبتلا به کم‌خونی بزرگ‌تر است. ضریب شکست سلول‌های قرمز افراد مبتلا به کم‌خونی در مقایسه با سلول‌های قرمز افراد نرمال کمتر است. از روی اندازه و ضریب شکست سلول‌های قرمز، پارامترهای پاتولوژی از قبیل میانگین حجم سلول‌های قرمز و میانگین غلظت هموگلوبین سلول‌های قرمز با استفاده از رابطه بین ضریب شکست سلول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین در سلول قرمز می‌توانند مشخص شوند<sup>[11]</sup>. در سال ۲۰۰۹ میلادی آپستلیوس و همکاران<sup>[12]</sup> یک روش برای تخمین اندازه گلبول‌های قرمز خون انسان با استفاده از تصاویر حاوی نورهای پراکنده ارائه کرده‌اند.



شکل ۶ ساختار شبکه ANFIS



شکل ۷ پایگاه قواعد ANFIS و نحوه عمل آن هنگام اعمال یکی از نمونه‌های داده



نمودار ۴ خروجی مطلوب (نقطه چین) و خروجی واقعی شبکه به‌ازای داده‌های تست متعلق به یک دسته ۶تایی

نتایج عددی حاصل از پیاده‌سازی شبکه عصبی-فازی در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱) جدول نتایج شبکه ANFIS

پارامترها	مقدار
تعداد توابع عضویت شبکه ANFIS	۶
واریانس کلاس نرمال	۰/۱۱۲۳
واریانس کلاس غیرنرمال	۰/۱۳۶۱
میانگین خطای آموزش شبکه	۰/۰۰۵
میانگین خطای تست شبکه	۰/۰۳۰۷
دقت سیستم	%۹۶/۶
مساحت زیر منحنی ROC	۰/۹۹۵۰

فراهم می‌کند و روی تصاویر پاتولوژیک عملکرد خوبی دارد. سیستم اتوماتیک طراحی شده می‌تواند یک جایگزین مناسب و مقرون به صرفه برای روش‌های معمول آزمایشگاهی باشد. به علاوه، روش پیشنهادی می‌تواند اساس محاسبه سایر پارامترهای آزمایش خون یا CBC از قبیل HCT، MCH، MCHC، تعداد گلبول‌های قرمز خون و غیره نیز باشد.

**تشکر و قدردانی:** این مقاله حاصل پژوهش انجام شده مشترک میان مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی بیمارستان فوق تخصصی صارم، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی دانشگاه تهران، دپارتمان پرتو پزشکی دانشگاه صنعتی امیر کبیر و دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات است. از تمامی همکاران مربوطه که ما را در پیش‌برد مطالعه حاضر یاری کردند، قدردانی می‌شود.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

**تعارض منافع:** موردی وجود نداشته است.

**منابع مالی:** توسط مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی بیمارستان فوق تخصصی صارم، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی دانشگاه تهران و دپارتمان پرتو پزشکی دانشگاه صنعتی امیر کبیر تامین شده است.

**سهم نویسندگان:** ناهید بابازاده خامنه (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیل‌گر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ پیروز صالحیان (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/اروش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ حسین عربعلی‌بیک (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ سعید ستایشی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)

## منابع

- 1- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. 2958p.
- 2- Dahim P. Automated cell counter device (principles, calibration, quality control and error). Tehran: Seda Publish Center; 2009. pp.14-45. [Persian]
- 3- Babazadeh Khameneh N, Arabalibeik H, Salehian P, Setayeshi S. Abnormal red blood cells detection using adaptive neuro-fuzzy system. Stud Health Technol Inform. 2012;173:30-4.
- 4- Gonzalez RC, Woods RE. Digital image processing. 3rd edition. New Jersey: Pearson Education, Inc; 2008.
- 5- Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Trans Sys Man Cyber. 1979;9(1):62-6.
- 6- Soille P. Morphological image analysis: Principles and applications. Berlin: Springer; 2010.
- 7- Haralick RM, Shapiro LG. Computer and robot vision. Boston: Addison-Wesley Longman Publishing; 1992. 630p.
- 8- Torus. Wikipedia [Internet]. San Diego: 2001; [updated 2008 Jan 28; cited 2009 Dec]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Torus>.
- 9- Roger Jang JS. ANFIS: Adaptive-network-based fuzzy inference system. IEEE Trans Sys Man Cyber. 1993;23(3):665- 83.
- 10- Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern Recogn Lett. 2006;27(8):861-74.

فرآیند بازیابی اطلاعات تصویر شامل نرمال‌سازی تصویر، اعمال تبدیل کسینوسی گسسته دو بُعدی روی تصویر و اعمال تبدیل موجک بر تصویر بود. یک شبکه عصبی از نوع RBF-NN (RBF-Neural Network) که تخمین‌زننده ویژگی‌های هندسی گلبول قرمز خون است- بررسی شد. روش پیشنهادی زمانی که سه ویژگی هندسی مهم گلبول قرمز خون با استفاده از یک پایگاه داده شامل ۱۵۷۵ تصویر شبیه‌سازی شده توسط روش مرزی مورد بررسی قرار گرفته، استفاده شده است [12].

روش پیشنهادی باعث صرفه‌جویی در وقت و کاهش هزینه‌های خرید سیستم، مصرف محلول‌ها و استهلاک دستگاه می‌شود. به‌کارگیری این روش حتی با یک قطره خون بدون هیچ رنگ‌آمیزی به‌ویژه در موارد اورژانسی و در نوزادان، مقرون به صرفه و غیرتهاجمی‌تر است. زیرا محلول‌های شست‌وشوی دستگاه‌های معمولی نظیر کولتر و مانند آن با خون بیماران آغشته و در طبیعت پخش می‌شود و احتمال انتشار عوامل عفونی و ویروسی دارد. روش پیشنهادی پردازش در مقایسه با روش‌های معمول اندازه‌گیری، به دلیل اینکه از هیچ محلولی استفاده نمی‌شود و تمام اطلاعات مستقیماً توسط نور از گلبول‌های قرمز استخراج می‌شود، اساساً با کالیبراسیون دقیق می‌تواند دقت بالاتری داشته باشد. نکته مهم در دستگاه‌های متکی به روش امیدانس و غیره این است که ضرایب اندازه‌گیری توسط پالس‌های الکترونیکی انجام می‌شوند و اندازه‌گیری مستقیماً توسط ذرات فتون یا نور نیست. تمام ارقام به دست آمده در دستگاه‌های مشابه کولتر با ضرایب متعددی اصلاح می‌شود به گونه‌ای که واسطه بین اندازه واقعی یک جسم با محاسبات پیچیده پالس‌های الکترونیک مقدور است. امیدانس تغییرات دامنه خود را در دستگاه کولتر متناظر با حجم گلبول قرمز نشان می‌دهد در حالی که در روش پیشنهادی MCV مستقیماً از اندازه‌گیری روتی و توسط فتون‌ها با استفاده از شبکه عصبی-فازی به دست می‌آید. استفاده از حجم کم، استهلاک بسیار پایین سیستم، عدم نیاز به محلول‌های شست‌وشو، عدم آلودگی محیط زیست و قیمت و هزینه بسیار پایین این سیستم‌ها، مزایای غیرقابل انکار این روش‌ها است.

این مطالعه به منظور طراحی سیستم اتوماتیک برای طبقه‌بندی نمونه‌های خون نرمال و غیرنرمال، براساس تصاویر میکروسکوپی سلول‌های قرمز خون انجام شد. استفاده از آستانه‌گذاری محلی تطبیقی برای پیدا کردن آستانه بهینه در باینری کردن زیر شکل‌ها، موجب جبران تفاوت میزان روشنایی موجود میان زیرتصاویر می‌شود. انتخاب ۵۰٪ مقدار میانه نسبت به سایر حالت‌ها، کامل‌تر و مطمئن‌تر است، زیرا انتخاب ۳۰٪ مقدار میانه، موجب ازدست‌دادن داده‌های مفید می‌شود. در انتخاب ۶۰٪ امکان ایجاد پراکندگی در داده‌ها وجود دارد. انتخاب ۷۰٪ مقدار میانه باعث ایجاد پراکندگی در داده‌ها می‌شود. نتایج حاصل از دستگاه شمارنده سلول به شرایط محیط آزمایشگاه، شرایط نگهداری نمونه‌های خون، ماده ضدانعقاد، تعداد سلول‌های قرمز که به یکدیگر چسبیده‌اند و تعداد سلول‌های سفید خون موجود در نمونه بستگی دارد. براساس مرور بر مطالعات انجام شده در این زمینه، تنها کاری که قابل مقایسه با روش پیشنهادی است، این است که از تکنیک نورهای پراکنده برای تخمین اندازه سلول قرمز استفاده شود که فرآیندی زمان‌بر و هزینه‌بر بود.

## نتیجه‌گیری

روش پیشنهادی، قابلیت تشخیص با استفاده از یک قطره خون را

12- Apostolopoulos G, Tsinopoulos S, Dermatas E. Estimation of human red blood cells size using light scattering images. J Comput Method Sci Eng. 2009;1,2:19-30.

11- Ghosh N, Buddhiwant P, Uppal A, Majumder SK, Patel HS, Gupta PK, editors. Simultaneous determination of size and refractive index of red blood cells by light scattering measurements. Appl Phys Lett. 2006;8(8).