

Semiautomatische Segmentierung individueller Zellen in Laser-Scanning-Microscopy Aufnahmen humaner Haut

Christian-Dennis Rahn und H. Siegfried Stiehl

Arbeitsbereich Kognitive Systeme,
Universität Hamburg, 22527 Hamburg
Email: rahn@informatik.uni-hamburg.de

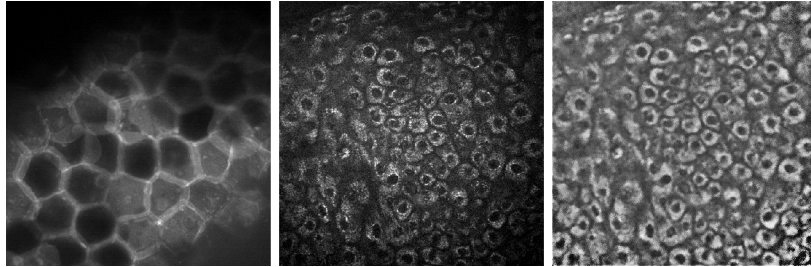
Zusammenfassung. Es wird ein mehrstufiges Verfahren für die semi-automatische Segmentierung individueller Zellen aus Bildern des humanen Hautgewebes vorgestellt. Die zu segmentierenden Laserrastermikroskopie-Bilder zeigen einen geringen Kontrast und ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis. Nach einer Vorverarbeitung werden die Bilder durch einen Voronoi-Graphen partitioniert. Die entstehenden Polygone entsprechen bereits grob den einzelnen Zellen. In diese Polygone werden B-Spline Kurven einbeschrieben, die mittels Aktiver Konturen den Bilddaten angepasst werden. Erste Experimente belegen die Eignung dieses Verfahrens.

1 Einleitung

Für die Charakterisierung des globalen Zustands eines biologischen Gewebes kann eine Charakterisierung der einzelnen Zellen des Gewebes notwendig sein. Erfolgt die Beurteilung des Gewebes z.B. aufgrund der Formen, die Zellen in Bilddaten zeigen, ist die Segmentierung einer signifikanten Anzahl von Zellen erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wird ein semi-automatisches Verfahren für die zweidimensionale Segmentierung individueller Keratinozyten in humanem Hautgewebe aus dreidimensionalen monochromen Laser-Scanning-Microscopy (LSM) Volumendaten vorgestellt. Die Bilddaten unterliegen aufgrund der sehr geringen detektierbaren Photonendichte bei der untersuchten Anwendung starkem Rauschen und zeigen eine nur geringe Dynamik der Bildintensität. Diese beiden Eigenschaften lassen die Zellen vielfach nicht als durch geschlossene Konturen umschlossene Objekte erscheinen. Zusätzlich unterliegen die Bilder einem starkem Schattierungseffekt. Eine Optimierung der Signalqualität bereits im Vorfeld der Bildaufnahme (z.B. durch die Verlängerung der Bildintegrationszeit) ist im vorliegenden Fall technisch nicht möglich bzw. wegen möglicher Beeinflussungen der Probe (*photo damage*) unerwünscht.

Abb. 1. LSM Beispielbilder der humanen Epidermis. Stratum Corneum (links), Stratum Spinosum (mitte), das mittlere Bild nach der beschriebenen Vorverarbeitung (rechts). Die Bildausschnitte entsprechen einer wahren Größe von $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$.



2 Methoden

2.1 Bildaufnahme

In dieser Arbeit werden LSM-Volumenbilddaten von Biopsieproben der humanen Epidermis verwendet. Die Proben wurden für einen möglichst guten Strukturerehalt ohne Kontrastierung (z.B. Immuno-Labeling) aufgenommen. Beispielbilder aus zwei unterschiedlichen epidermalen Schichten sind in Abb. 1 gezeigt. Gut erkennbar sind hier die sehr unterschiedlichen geometrischen Eigenschaften der jeweiligen Zellen in unterschiedlichen Schichten. Zusätzlich gibt es Unterschiede zwischen den Intensitätseigenschaften der Zellen des Stratum Corneums (SC) und denen der tieferliegenden Strata (S. Granulosum, S. Spinosum, S. Basale). Während im SC breite *ridges*, die hohe Intensität zeigen, die dunkel erscheinenden Zellen trennen, zeichnen sich die Zellen in den anderen Schichten als Objekte hoher Intensität vor dunklem Hintergrund ab.

Ein *voxel* entspricht bzgl. der Auflösung einem Volumen von $0.4\mu\text{m} \times 0.4\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ in der Probe, die optische Auflösung ist etwas geringer. Das Gerät ist in der Lage tomographische Bildstapel zu generieren. In dieser Arbeit werden jedoch ausschliesslich 2-D Bilddaten behandelt.

2.2 Vorverarbeitung

Die untersuchten Bilddaten unterliegen den eingangs erwähnten Störungen, die nicht durch technische Massnahmen bereits im Vorfeld der Bildgewinnung minimiert werden können und daher nachträglich durch die folgenden Methoden reduziert werden.

Transformation der Rauschcharakteristik. Aufgrund einer sehr geringen Dichte der detektierten Photonen unterliegen die Bilder einem Poisson-Rauschen [1], und das Rauschen ist daher abhängig von der lokalen Bildintensität. Eine Wurzel-Transformation der Intensitäten transformiert das Poisson-Rauschen in ein homogenes Gauß-Rauschen. Nach dieser Transformation beträgt das Signal-Rausch-Verhältnis bei den untersuchten Bildern ungefähr $SNR \approx 3$.

Rauschunterdrückung. Unter den gegebenen Randbedingungen ist für eine erfolgreiche Segmentierung eine Rauschunterdrückung notwendig. Weil zudem die Kontraste der Zellgrenzen in den Bildern nur wenig ausgeprägt sind, ist eine kantenerhaltende Filterung notwendig. Hierfür sind zwei Verfahren betrachtet worden: Ein einfaches Median-Filter und ein nichtlineares Diffusions-Filter. Es hat sich experimentel herausgestellt, dass das Median-Filter hier geringfügig bessere Ergebnisse für die anschließende Segmentierung liefert.

Schattierungskorrektur. Bedingt durch die Geometrie der Optik des verwendeten Mikroskops unterliegen die erzeugten Bilder einer signifikanten Vignettierung, d.h. die Intensitäten nehmen vom Bildzentrum zu den Rändern hin stark ab. Mittels *homomorphic filtering* kann diese Schattierung effektiv reduziert werden. Um die Vignettierung im Bild I zu reduzieren, wird das folgende übliche Verfahren angewendet:

$$\hat{I} = \exp(\log(I) - \log(G_\sigma \star I)) \quad , \quad (1)$$

wobei G_σ ein Gauß-Tiefpassfilterkern mit grosser Varianz σ^2 ist. Die Intensität im korrigierten Bild \hat{I} ist im gesamten Bildbereich sehr homogen (vgl. Abb. 1, mitte und rechts).

2.3 Segmentierung

Voronoi-Partitionierung. Zuerst wird für jede Zelle im Bild ein zentraler Ort markiert. Dies geschieht bisher manuell, ist jedoch prinzipiell automatisierbar. Die markierten Orte werden für die Konstruktion eines Voronoi-Graphen verwendet. Die daraus resultierenden konvexen Polygone \mathcal{P}_j stellen bereits eine grobe Segmentierung der Zellen dar (siehe [2, 3]).

Jedem Polygon $\mathcal{P}_j = \{P_0^{(j)}, \dots, P_{N_j-1}^{(j)}\}$ wird nun eine approximierende B-Spline Kurve \mathcal{C}_j einbeschrieben, wobei die Polygonecken $P_i^{(j)}$ als Stützpunkte der Kurve dienen. Typischerweise gilt für die Anzahl der Polygonecken bzw. Stützpunkte $5 \leq N_j \leq 8$.

B-Spline Kurven. Für die Darstellung einer Zellkontur werden geschlossene kubische, uniforme B-Spline Kurven verwendet, da diese besonders glatt und sehr effizient zu berechnen sind. Dadurch ergeben sich zudem Vereinfachungen für nachfolgende Schritte. Viele andere Verfahren (z.B. [4]) verwenden stattdessen diskrete Netze zur Darstellung einer Kontur.

Sei die Kontur \mathcal{C} gegeben durch die Stützpunkte P_0, \dots, P_{N-1} , dann setzt sich \mathcal{C} aus N B-Spline-Segmenten \mathcal{B}_j zusammen. Jedes Segment \mathcal{B}_j wird dabei von den vier Stützpunkten $Q_i^{(j)} = P_{(j+i) \bmod N}$ für $0 \leq i < 4$ aufgespannt und ist definiert durch die Funktion

$$B^{(j)}(t) = G^{(j)} \cdot M_B \cdot (t^3, t^2, t, 1)^T \quad , \quad 0 \leq t < 1 \quad . \quad (2)$$

Die Matrix M_B besteht aus den üblichen B-Spline Basiskoeffizienten und $G^{(j)} = (Q_0^{(j)} \quad Q_1^{(j)} \quad Q_2^{(j)} \quad Q_3^{(j)})$ ist die Geometriematrix für das Spline-Segment \mathcal{B}_j .

Aktive Konturen. Weil die Zellen in den gestörten Bildern nur selten geschlossene Konturen zeigen, wird ein Segmentierungsverfahren benötigt, welches die unterbrochenen Konturen genügend genau approximieren kann. Die von Kass et. al. ([5]) vorgeschlagenen *Snakes* erreichen dies in eleganter Weise: Eine parametrisch definierte Kontur \mathcal{C} wird den Daten angepasst durch die Minimierung eines speziellen Energiefunktional E :

$$E(\mathcal{C}) := E_{int} + E_{img} + E_{ext} . \quad (3)$$

Der Term für die interne Energie ist nur über die Form der Kontur definiert:

$$E_{int}(\mathcal{C}) := \oint_{\mathcal{C}} \alpha \cdot \|C_t\|^2 + \beta \cdot \|C_{tt}\|^2 dt \quad (4)$$

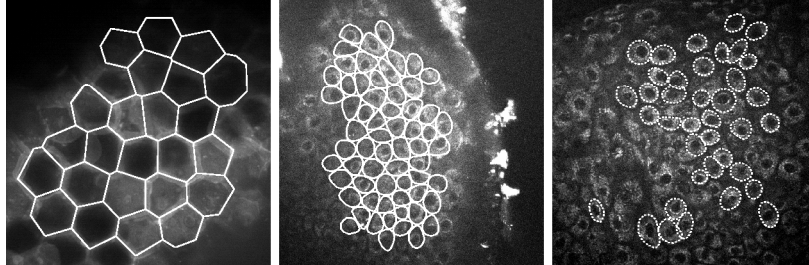
Hier bezeichnen die Indizes $_t$ und $_{tt}$ jeweils die erste und zweite Ableitung nach t , α und β sind Gewichtungskonstanten. Die B-Spline-Darstellung der Kontur \mathcal{C} ermöglicht ein algebraisches Lösen der Gl. (4) zwecks einer numerisch stabilen und zeitlich effizienten Minimierung von Gl. (3). Der Datenterm E_{img} wird durch *sampling* des Gradientenbetragsbildes $\|\nabla G_\sigma \star I\|^2$ entlang der Kontur geschätzt. G_σ ist wieder ein Tiefpassfilter. Die externe Energie E_{ext} enthält zwei implizite Anteile: Die Option, die Kontur während der Iterierung interaktiv durch Verschieben der Stützpunkte zu beeinflussen, sowie *Balloon*-Kräfte F_i^B , die auf die Stützpunkte P_i mit konstanter Stärke γ radial nach aussen wirken.

3 Experimente

Die Abb. 2 zeigt beispielhafte Ergebnisse des beschriebenen mehrschrittigen Verfahrens. Die linke Teilabbildung demonstriert, dass bereits die Voronoi-Partitionierung von SC sehr gute Segmentierungsergebnisse liefern kann. In der Mitte sind die häufig den Zellkonturen bereits sehr ähnlichen Initialpositionen der Aktiven Konturen gezeigt. Kubische B-Spline-Kurven mit einer geringen Anzahl von Stützpunkten sind somit gut geeignet um die Kontur von Keratinozyten zu beschreiben. Rechts sind die Ergebnisse der semiautomatischen Segmentierung dargestellt. Um die Aktiven Konturen nicht in die falschen lokalen Minima konvergieren zu lassen, ist für einige Zellen ein (vom Aufwand her minimaler) interaktiver Eingriff notwendig.

Goldstandard. Die Ergebnisse von Experimenten, in denen Bilder durch mehrere Personen manuell segmentiert wurden, zeigen eine sehr grosse Variabilität und somit schlechte Reproduzierbarkeit der manuellen Segmentierung. Die Generierung eines Goldstandards aufgrund solcher Daten erscheint daher als nicht tragfähig. Somit steht ein Vergleich der Segmentierungsergebnisse des beschriebenen Verfahrens mit einem Goldstandard noch aus.

Abb. 2. Beispielergebnisse. Voronoi-Partitionierung im SC (links). Den Voronoi-Polygonen einbeschriebene B-Spline Konturen (mitte). Semiautomatisch segmentierte Zellen (rechts).



4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde ein Verfahren vorgestellt, um aus stark gestörten LSM-Bilddaten die Konturen von einzelnen Zellen semiautomatisch zu segmentieren. Der nötige Interaktionsaufwand für den Benutzer zur Segmentierung vieler Zellen wurde stark reduziert. Das Verfahren startet mit einer Voronoi-Partitionierung des Bildbereichs. Die resultierenden Polygone entsprechen bereits grob den Formen der Zellen. Diesen Polygonen werden B-Spline-Kurven einbeschrieben, die anschliessend mittels eines Aktiven Konturen-Verfahrens den Bilddaten angepasst werden.

Für eine Validierung des Verfahrens muss ein Goldstandard generiert werden. Ausserdem ist eine Definition für E_{img} zu finden, die für Gl. (3) weniger lokale Minima aufweist. Weiterhin ist geplant, das beschriebene Verfahren von 2-D auf 3-D zu erweitern.

Danksagung. Wir danken der Firma Beiersdorf AG, Hamburg, für die freundliche finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Literaturverzeichnis

1. Rahn CD. Laser Scanning Microscopy Flatfield Images Part I: Characterization of Noise Properties. Universität Hamburg, FB Informatik, AB KOGS; 2003.
2. Ginzkey B. Schätzung des Alterswandels der Hepatozytengrößen mittels Voronoi-diagrammen. Dissertation. Medizin. Fakultät, University Leipzig; 1998.
3. Klemenčič A, Kovačič S, Pernuš F. Automated Segmentation of Muscle Fiber Images Using Active Contour Models. *Cytometry* 1998;32:317–326.
4. Svoboda D, Matula P. Tissue Reconstruction Based on Deformation of Dual Simplex Meshes. In: Nyström, et al., editors. DGCI. LNCS 2886. Springer, Berlin; 2003. p. 514–523.
5. Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. Snakes: Active Contour Models. *Int J Comp Vis* 1987;p. 321–331.