

Segmentierung ungefärbter, lebender Zellen in Hellfeld-Mikroskopbildern

Marko Tscherepanow, Frank Zöllner and Franz Kummert

Angewandte Informatik, Technische Fakultät,
Universität Bielefeld, Postfach 100 131, D-33501 Bielefeld
Email: {marko,fzoellne,franz}@techfak.uni-bielefeld.de

Zusammenfassung. In diesem Beitrag werden drei Verfahren zur automatischen Segmentierung von ungefärbten, lebenden Zellen in Hellfeld-Bildern verglichen. Auf der Grundlage dieser Segmente soll in Zukunft eine Lokalisation subzellulärer Strukturen in parallel dazu aufgenommenen Fluoreszenzbildern stattfinden. Neben der Wasserscheidentransformation wurden zwei eigene Ansätze auf der Basis aktiver Konturen untersucht. Als Vergleichskriterien dienten der Segmentierungsfehler im Bezug zu Referenzsegmenten, die von biologischen Experten erstellt wurden, sowie die benötigte Rechenzeit. Das Ziel ist hierbei eine an unsere Problemstellung angepasste Auswahl des Segmentierungsverfahrens. Die gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch auch für alternative Anwendungen vorteilhaft, da wesentliche Eigenschaften der Segmentierungsverfahren deutlich werden.

1 Problemstellung

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden die Genome einer Vielzahl von Spezies dekodiert. Die Funktion der entsprechenden Proteine ist jedoch häufig ungeklärt. Im Rahmen der Proteomik wird versucht, diese Funktion zu bestimmen, beispielsweise um diagnostische oder therapeutische Targets zu ermitteln. Die subzelluläre Lokalisierung unbekannter Proteine in lebenden Zellen liefert wesentliche Informationen über ihre Funktion [1]. Dazu werden die Proteine z.B. mit dem Green-Fluorescent-Protein markiert. Ansammlungen der betrachteten Proteine in Fluoreszenzbildern werden somit als helle Punkte oder Regionen sichtbar. Um diese Bildbereiche einzelnen Zellen zuordnen zu können, sind weitere Informationen erforderlich. Diese gewinnen wir aus Hellfeld-Bildern, die parallel zu den Fluoreszenzbildern aufgenommen werden. Hellfeld-Bilder besitzen hierbei zwei wesentliche Vorteile gegenüber kontrastreicheren Mikroskopiertechniken, wie beispielsweise der Phasenkontrast-Mikroskopie oder speziellen Anfärbungen: erstens kann der optische Strahlengang beibehalten werden, ohne das einfallende Licht insbesondere bei Fluoreszenzaufnahmen zu stark abzuschwächen und zweitens wird das Risiko eventueller Beeinflussung der Untersuchungen durch zusätzliche Substanzen eliminiert. Da Hellfeld-Bilder ungefärbter Zellen im Allgemeinen einen geringen Kontrast aufweisen, intensitätsabhängig und ungleichmäßig beleuchtet sind [2], werden zusätzliche Anforderungen an die verwendeten Segmentierungsverfahren gestellt.

2 Stand der Forschung

Gebräuchliche Verfahren zur Zellsegmentierung setzen häufig Bilder voraus, die einen deutlich höheren Kontrast als Hellfeld-Aufnahmen besitzen (z.B. [3, 4]). Sie sind damit nur beschränkt einsetzbar. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation von Proteinen eine vergleichsweise hohe Vergrößerung erfordert. Die von uns genutzten Zellen des Falters *Spodoptera frugiperda* (Sf9) besitzen bei einer 60-fachen Vergrößerung einen mittleren Durchmesser von 177 Bildpunkten, wobei ein Bildpunkt etwa 0.15 Mikrometern entspricht. Somit können Verfahren, die Suchfenster einer definierten Größe nutzen, nur schwer eingesetzt werden. Schwellwertbasierte Methoden besitzen weiterhin den Nachteil, dass benachbarte Zellen nur sehr schlecht unterscheidbar sind, da sie dieselben Bildcharakteristika besitzen. Eine Trennung benachbarter Zellen ist jedoch möglich, wenn man Informationen über ihre Zellmembranen in die Segmentierung einbezieht, da diese die Zellen von ihrer Umgebung abgrenzen. Dies kann beispielsweise durch die Wasserscheiden-Transformation [5] und aktive Konturen realisiert werden [6].

3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

Dieser Beitrag umfasst eine Gegenüberstellung dreier Ansätze für die Segmentierung ungefärbter Zellen in Hellfeld-Mikroskopbildern. Die Verfahren werden hinsichtlich des Segmentierungsfehlers und der benötigten Berechnungszeit untersucht, um eine an unsere Problemstellung angepasste Auswahl zu ermöglichen. Da prinzipielle Eigenschaften der betrachteten Methoden deutlich werden, sind die gewonnenen Erkenntnisse jedoch auch für alternative Anwendungen vorteilhaft, z.B. um den erforderlichen Rechenzeitbedarf oder die Form der entstehenden Segmente abzuschätzen.

4 Methoden

Neben der Segmentierung der Zellen mit Hilfe der Wasserscheidentransformation als Referenzverfahren vergleichen wir zwei Ansätze zur Berechnung aktiver Konturen bzw. Snakes. Beide Snake-Algorithmen realisieren ein Wachstum der aktiven Konturen und lassen somit eine Initialisierung analog zu den Markern bei der Wasserscheidentransformation zu. Der erste Ansatz, der bereits in [7] vorgestellt wurde, entspricht einem Greedy-Verfahren [8], d.h., er führt eine lokale Optimierung der Kontur durch. Dieses Verfahren wurde nun dahingehend modifiziert, dass eine Berechnung mit Hilfe der Variationsrechnung [6] durchgeführt werden kann. Der entsprechende zweite Ansatz realisiert eine globale Optimierung der Kontur.

Die Initialisierung aller drei Verfahren erfolgt mit Markern, d.h. kleinen Regionen innerhalb potentieller Zellen. Diese werden entsprechend [7] mit Hilfe der Distanztransformation und morphologischer Operatoren automatisch in den Hellfeld-Bildern ermittelt. Der Durchmesser dieser Regionen entspricht 5% des

Tabelle 1. Vergleich der Zellsegmentierung. Mittelwert μ , Standardabweichung σ und Median m des Segmentierungsfehlers über alle 575 manuell extrahierten Zellen.

Segmentierungsverfahren	μ	σ	m
Wasserscheidentransformation	1,628	2,730	0,142
Greedy-Snakes	0,109	0,087	0,081
Variationsrechnungsbasierte Snakes	0,123	0,096	0,094

maximalen Zellradius. Damit ist ein deutliches Wachstum der Segmente erforderlich. Bei der markergesteuerten Wasserscheidentransformation ist dies problemlos möglich. Für die Berechnung der aktiven Konturen war jedoch die Integration eines zusätzlichen Energieterms notwendig. Dieser Term verringert sich mit zunehmenden Abstand vom Marker und ermöglicht so eine Ausdehnung der Kontur.

5 Ergebnisse

Die Leistungsfähigkeit der Verfahren wurde anhand eines von Experten erstellten Datensatzes (50 Bilder mit 1344×1024 Bildpunkten, 60-fache Vergrößerung, 575 manuell extrahierte Zellen) evaluiert. Für die Bewertung erfolgte ein Vergleich der gefundenen Segmente mit den $n = 575$ manuell bestimmten Zellen auf der Basis der maximalen Entfernung d_i^{\max} der jeweiligen korrespondierenden Konturen einer Zelle i . Um die Ergebnisse für verschiedene Zellen besser vergleichen zu können, erfolgte weiterhin eine Normierung von d_i^{\max} auf die Zellgröße (siehe Gleichung 1).

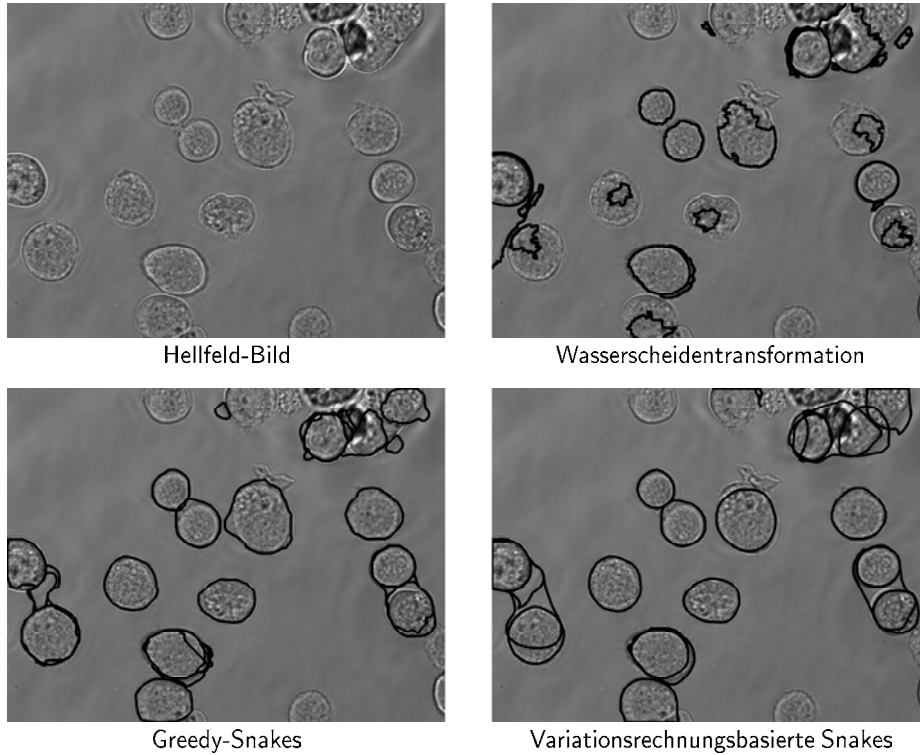
$$\bar{d}^{\text{err}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{d_i^{\max}}{b_i} \quad (1)$$

Hierfür wurde die Kontur der Referenzsegmente durch eine Ellipse approximiert [9], da die von uns genutzten Sf9-Zellen eine annähernd elliptische Form besitzen. Die Länge b_i der kleinen Halbachse dieser Ellipse dient dabei als Maß für die Größe der Zelle. Somit wird der Segmentierungsfehler auf den kleinstmöglichen Radius der Zelle normiert. Daher entspricht \bar{d}^{err} einer Worst-Case-Abschätzung.

Im Gegensatz zu dem in [7] genutzten Fehlerkriterium \bar{A}^{err} , das auf der Anzahl falsch segmentierter Bildpunkte basiert, ermöglicht \bar{d}^{err} eine Berücksichtigung der Form der gefundenen Segmente; bei einer gleichen Anzahl falsch segmentierter Punkte erhöht sich \bar{d}^{err} mit zunehmenden Abstand dieser Punkte von der Referenzkontur. Dieses Vorgehen ist erforderlich, da insbesondere bei der Wasserscheidentransformation Segmente auftreten können, die zwar nur eine geringe inkorrekt segmentierte Fläche umfassen, sich aber in Regionen erstrecken, die weit vom Referenzsegment entfernt sind.

Über dem verwendeten Datensatz wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median des Segmentierungsfehlers \bar{d}^{err} ermittelt (siehe Tab. 1). Beide Snake-Verfahren realisierten eine Segmentierung mit sehr geringem Fehler, wobei die resultierenden Segmente im Mittel um 11% bzw. 12% des Zellradius

Abb. 1. Segmentierung eines Hellfeld-Bildes. Die Konturen der gefundenen Segmente wurden schwarz eingezeichnet. Dabei ist zu beachten, dass die Wasserscheidentransformation jeden Bildpunkt genau einem Segment zuordnet, wogegen Snakes verschiedener Marker durchaus Teilbereiche derselben Zellen repräsentieren können.



von den Referenzsegmenten abweichen. Die schlechten Resultate der Wasserscheidentransformation bezüglich Mittelwert und Standardabweichung ergeben sich daraus, dass Segmente mit extrem großen Fehler gebildet werden, die einen starken Einfluss auf das Resultat ausüben. Dass die Anzahl dieser Segmente jedoch nicht sehr hoch sein kann, wird durch den Median deutlich, der nur geringfügig höher ist als bei den Verfahren auf der Basis aktiver Konturen.

Abbildung 1 zeigt die Segmentierung eines Hellfeld-Bildes durch die drei untersuchten Verfahren. Auch hier ist erkennbar, dass die aktiven Konturen der Wasserscheidentransformation überlegen sind. Im Gegensatz zu den Snake-Verfahren lässt die Wasserscheidentransformation jedoch keine Überlagerungen verschiedener Segmente zu. Da bei allen Verfahren im Anschluss an die Segmentierung in Zukunft eine Klassifikation erforderlich ist, die zwischen korrekt segmentierten Zellen und anderen Bildbereichen, wie z.B. Verunreinigungen und unvollständigen Zellen, unterscheidet, stellt dies jedoch für das Gesamtsystem keinen Nachteil dar.

Neben der Qualität wurde auch die benötigte Zeit für die Segmentierung aller 50 Bilder auf einem AMD Athlon 64 Prozessor mit 2GHz Taktfrequenz evaluiert. Die durchschnittlichen Verarbeitungszeiten pro Bild betragen 19,5s (Wasserscheidentransformation), 6,0s (Greedy-Snakes) und 24,6s (variationsrechnungsbasierte Snakes). Aufgrund des im Vergleich zu den anderen beiden Verfahren deutlich geringeren Rechenzeitbedarfs der Greedy-Snakes eignet sich dieses Verfahren besonders gut für zeitkritische Anwendungen, wie z.B. Hochdurchsatz-Experimente.

6 Diskussion

Für unsere Problemstellung erscheint der Einsatz der Greedy-Snakes am sinnvollsten, da hierbei sowohl der Segmentierungsfehler als auch der Rechenzeitbedarf minimal ist. Die globale Optimierung der Kontur hat zu keiner Verbesserung der Segmentierung, aber zu einem deutlich höheren Rechenaufwand geführt. Sie könnte jedoch für alternative Zelltypen erforderlich sein. Der Vorteil der Wasserscheidentransformation besteht trotz vergleichsweise schlechter Ergebnisse darin, dass eine Parametrisierung, wie z.B. die Wahl der Gewichte für die Energieterme bei aktiven Konturen, entfällt. Da bei allen drei Verfahren Segmente gebildet werden, die nicht einzelnen Zellen entsprechen, konzentriert sich unsere weitere Forschung auf eine Klassifikation der segmentierten Regionen.

Literaturverzeichnis

1. Murphy RF, Velliste M, Porreca G. Robust Numerical Features for Description and Classification of Subcellular Location Patterns in Fluorescence Microscope Images. *Journal of VLSI Signal Processing* 2003;35:311–321.
2. Wu K, Gauthier D, Levine M. Live Cell Image Segmentation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1995;42(1):1–12.
3. Liebel U, Starkuviene V, Erfle H, et al. A microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. *FEBS Lett* 2003;554:394–398.
4. Debeir O, Van Ham P, Kiss R, Decaestecker C. Tracking of Migrating Cells Under Phase-Contrast Video Microscopy With Combined Mean-Shift Processes. *IEEE Trans Med Imaging* 2005;24(6):697–711.
5. Soille P. *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer; 2003.
6. Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. Snakes: Active Contour Models. *International Journal of Computer Vision* 1987;1(4):321–331.
7. Tscherepanow M, Zöllner F, Kummert F. Aktive Konturen für die robuste Lokalisation von Zellen. In: *Procs BVM*. Springer; 2005. p. 375–379.
8. Williams DJ, Shah M. A fast algorithm for active contours and curvature estimation. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing: Image Understanding* 1992;55(1):14–26.
9. Fitzgibbon AW, Pilu M, Fisher RB. Direct Least Square Fitting of Ellipses. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 1999;21(50):476–480.