

# Aktive Konturen für die robuste Lokalisation von Zellen

Marko Tscherepanow, Frank Zöllner und Franz Kummert

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

**Zusammenfassung.** In diesem Beitrag wird ein Verfahren zur automatischen Lokalisation und Segmentierung ungefärbter Zellen in Hellfeld-Mikroskopbildern vorgestellt. Hierfür erfolgt insbesondere eine Nutzung von aktiven Konturen und morphologischen Operatoren, da diese Techniken eine Einbeziehung von Vorwissen über den Zellaufbau und die Zellform zulassen und somit Ansätzen, die ausschließlich auf der Auswertung von Bildpunkt-Intensitäten basieren, überlegen sind. Die verwendeten Algorithmen wurden dabei an die spezifischen Eigenschaften von Hellfeld-Bildern, wie z.B. starke Störungen, angepasst.

## 1 Problemstellung

Im Rahmen des Projekts ALPIC (Automatic Localization of Proteins In Cells) werden Methoden zur automatisierten Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen entwickelt. Solche Verfahren können u.a. für die Suche nach potentiellen diagnostischen oder therapeutischen Targets dienen und ermöglichen so ein hocheffizientes Wirkstoff-Screening. Die Lokalisation der Proteine wird durch die Aufnahme von Fluoreszenzbildern mit einem Mikroskop beobachtet. Um die relative Position der Proteine bezüglich der umgebenden Zelle ermitteln zu können, werden weitere Informationen benötigt, z.B. ergänzende Aufnahmen, aus denen die Positionen der einzelnen Zellen ableitbar sind. Die somit realisierbare Verknüpfung von markierten Proteinen mit spezifischen Zellen ist unbedingte Voraussetzung für eine Zuordnung der entsprechenden Positionen zu Zellkompartimenten. Die aktuellen Forschungen konzentrieren sich hierbei auf die automatische Lokalisation und Segmentierung ungefärbter Zellen in Hellfeld-Bildern, da diese Mikroskopiermethode problemlos parallel zur Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt werden kann. Weiterhin erfordert sie keine spezielle Technik und ist deshalb im Allgemeinen verfügbar. Das Ziel hier ist es zunächst im Hinblick auf eine weitere Verarbeitung sehr gute Approximationen der Zellkonturen zu erreichen.

## 2 Stand der Forschung

Aktuelle Verfahren zur Zell-Lokalisation basieren häufig auf Schwellwertverfahren. Damit werden entweder die Bilder direkt segmentiert [1] oder Initialisierung

gen für aufbauende Verarbeitungsschritte ermittelt [2]. Diese Verfahren sind jedoch an spezielle Anfärbemethoden oder Mikroskopiertechniken gebunden, die in einer deutlichen Abgrenzung von Zellen oder Zellkompartimenten sowie Bildhintergrund resultieren. Daher ist ihre Anwendung eingeschränkt. Eine Anfärbung der Zellkerne erfordert beispielsweise, dass den Zellen bestimmte Substanzen zugeführt werden müssen, wodurch Wechselwirkungen entstehen können. Ein weiteres grundsätzliches Problem schwellwertbasierter Methoden besteht in der unzureichenden Unterscheidungsmöglichkeit einzelner Zellen in Zellclustern.

Eine alternative Möglichkeit zur Segmentierung von Zellen ist die direkte Nutzung von Techniken, die Zellen anhand ihrer Abgrenzung von der Umgebung, die durch die Zellmembran definiert wird, erkennen können. Beispiele hierfür sind die Watershed-Transformation [3] und aktive Konturen [4]. Beide Methoden setzen eine geeignete Initialisierung voraus. Der Einsatz der Watershed-Transformation erfordert die Unterdrückung irrelevanter Minima im Gradientenbild, z.B. durch Verwendung einer Marker-Funktion, die relevante Minima kennzeichnet. Aktive Konturen benötigen dagegen eine Initialisierung nahe der tatsächlichen Kontur. Die Bestimmung einer Marker-Funktion ist dabei insbesondere in Hellfeld-Bildern einfacher automatisch realisierbar, da sie eine deutlich geringere Genauigkeit erfordert als die Bestimmung einer initialen Kontur. Der Vorteil aktiver Konturen gegenüber der Watershed-Transformation besteht in der Verwendung von Kontinuitätsbedingungen, wodurch eine gezielte Suche nach Objekten mit bestimmten Eigenschaften z.B. Konvexität ermöglicht wird. Weiterhin können Zellmembranen, die im Bild schlecht sichtbar sind, automatisch geschlossen werden.

### 3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

In diesem Beitrag wird ein Verfahren vorgestellt, das eine Nutzung von aktiven Konturen bzw. Snakes mit einer, der Marker-Funktion des Watershed-Algorithmus vergleichbaren, relativ ungenauen Initialisierung zulässt. Dadurch wird insbesondere die automatische Lokalisation von Zellen stark vereinfacht. Das Ziel besteht hierbei in der robusten Detektion und Segmentierung von Zellen in Hellfeld-Bildern, die typischerweise starke Kontrastunterschiede und Störungen aufweisen. Daher war die Entwicklung zusätzlicher Mechanismen zur Unterdrückung irrelevanter Bildstrukturen notwendig.

### 4 Methoden

Die Lokalisation der Zellen erfolgt in zwei wesentlichen Verarbeitungsschritten. Zunächst werden die Bilder mit Hilfe morphologischer Operatoren [3] vorverarbeitet und unter Verwendung der Distanz-Transformation [5] initiale Konturen bestimmt (siehe Abschnitt 4.1). Anschließend findet eine Segmentierung entsprechend dem in Abschnitt 4.2 dargestellten Verfahren statt.

#### 4.1 Morphologische Operatoren und Distanz-Transformation

Aufgrund der in Hellfeld-Bildern auftretenden starken Helligkeitsschwankungen innerhalb der Zellen können Gradientenbilder nicht direkt zur Berechnung der Konturen genutzt werden. Vielmehr ist eine vorherige Verringerung intrazellulärer Gradienten notwendig. Dafür werden morphologische Operatoren [5] genutzt. Das Ergebnisbild enthält ausschließlich lineare Strukturen, die eine definierte minimale Ausdehnung besitzen. Hiermit ist eine deutliche Reduktion intrazellulärer Gradienten möglich, wobei die Zellmembranen weitgehend erhalten bleiben.

Im Anschluss an die Bestimmung der Zellmembranen erfolgt eine automatische Markierung der Zellen. Dazu werden mit Hilfe der Distanz-Transformation [5] Bildregionen ermittelt, die einen möglichst großen Abstand zu vermeintlichen Zellmembranen und dem Bildhintergrund besitzen. Die Begrenzungen dieser Bildregionen dienen als initiale Konturen für das Wachstum der Snakes.

#### 4.2 Aktive Konturen

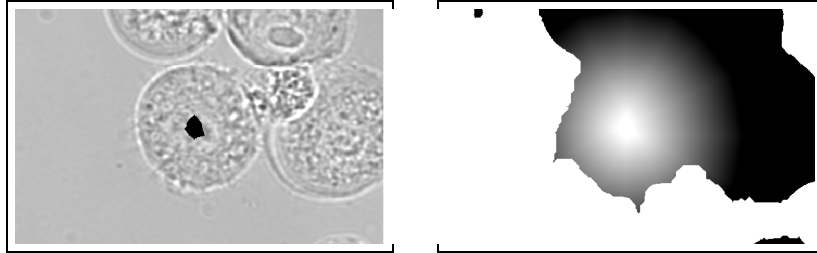
Zur Bestimmung der Snakes wird aufgrund seiner effizienten Berechenbarkeit der Greedy-Ansatz nach Williams und Shah [6] genutzt. Um eine Zellsegmentierung ausgehend von markierten Bildregionen zu ermöglichen, erfolgte analog zu dem auf der Variationsrechnung beruhenden Balloon-Ansatz von Cohen [7] die Integration einer externen Kraft bzw. Energie ( $E_{\text{dist}}$ ), die ein Wachstum der Snakes ermöglicht. Gleichung 1 stellt das entsprechende Energiefunktional  $E_{\text{snake}}^*$  einer parametrischen Kurve  $\underline{v}(s)$  der Länge  $l$  dar, das im Rahmen der Segmentierung minimiert wird.

$$E_{\text{snake}}^* = \int_0^l [\alpha E_{\text{cont}} + \beta E_{\text{curv}} + \gamma(E_{\text{dist}})E_{\text{image}} + \delta(E_{\text{dist}})E_{\text{dist}}] ds \quad (1)$$

Ziel dieser Methode ist eine iterative Ausdehnung der Konturen, bis sie sich unter Berücksichtigung ihrer Kontinuitätsbedingungen (repräsentiert durch  $E_{\text{cont}}$  und  $E_{\text{curv}}$ ) auf Bildpunkten mit möglichst hohem Gradienten (entsprechend  $E_{\text{image}}$ ) befinden. Diese Bildpunkte stellen Zellmembranen dar. Im Gegensatz zum Ansatz von Cohen [7] werden jedoch nicht die Normalenvektoren als Grundlage verwendet, sondern die Entfernung der von der initialen Kontur eingeschlossenen Fläche. Dadurch wird eine Überlappung der Kontur beim Wachstum ausgehend von konkaven Initialisierungen vermieden. Eine Vergrößerung der Entfernung von der initialen Kontur resultiert dabei in einer Verringerung von  $E_{\text{dist}}$  (siehe Abbildung 1). Die Steuerung der Parameter  $\gamma$  und  $\delta$  in Abhängigkeit der Entfernung von der markierten Bildregion reduziert weiterhin das Risiko eines verfrühten Abbruchs des Konturwachstums durch intrazelluläre Strukturen.

Neben hohen Gradienten wird die Ausdehnung der Snakes durch Bildregionen begrenzt, die anhand einer geringen Varianz ihrer Grauwerte sicher dem Hintergrund zugeordnet werden können, indem die Energie  $E_{\text{dist}}$  in diesen Bereichen ihren maximalen Wert erhält (siehe Abbildung 1).

**Abb. 1.** Verteilung von  $E_{dist}$ . In einem Hellfeld-Bild (links) erfolgte die Markierung einer Zelle (schwarzer Bereich in der Bildmitte). Ausgehend von dieser Bildregion verringert sich  $E_{dist}$  kontinuierlich (rechts), wobei Weiß hohen und Schwarz niedrigen Energien entspricht. Zusätzlich erhalten Bildpunkte, die dem Hintergrund zugeordnet werden, den maximalen Wert.



## 5 Ergebnisse

Unser Verfahren wurde anhand von Sf9-Zellen mit einem mittleren Durchmesser von ca.  $16\text{--}20\mu\text{m}$  getestet. Hierzu fand eine Aufnahme von Hellfeld-Bildern mit zwei optischen Vergrößerungen (40-fach und 60-fach) statt. Bei einer 60-fachen Vergrößerung entspricht dabei  $1\mu\text{m}$  ca. 6.45 Bildpunkten. Die Aufnahmen erfolgten mit verschiedenen Fokuseinstellungen und unterschiedlichem Dichtegrad der Zellen. In diesen Bildern wurden manuell Zellen bestimmt und entsprechende Maskenbilder errechnet, die zur Auswertung dienen.

Für die Evaluierung des vorgestellten Ansatzes fand zunächst eine Bestimmung initialer Konturen (siehe Abschnitt 4.1) statt, die automatisch den jeweiligen Maskenbildern zugeordnet wurden. Anschließend erfolgte eine Berechnung der Snakes entsprechend Abschnitt 4.2. Die Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  des Energiefunktional (siehe Gleichung 1) wurden sowohl allgemeingültig, d.h. für alle Bilder der jeweiligen optischen Vergrößerung, als auch bildspezifisch gewählt. Falls sich die Snakes in zwei aufeinander folgenden Iterationsschritten nicht veränderten oder eine maximale Anzahl an Iterationsschritten erreicht war, fand ein Abbruch des Verfahrens statt. Anschließend wurde die durchschnittliche Abweichung  $\bar{A}^{\text{err}}$  der von den resultierenden Snakes eingeschlossenen Bildregionen von den manuell erzeugten Zellmasken ermittelt (siehe Gleichung 2).

$$\bar{A}^{\text{err}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{A_i^{\text{diff}}}{A_i^{\text{man}}} \quad (2)$$

Um  $\bar{A}^{\text{err}}$  zu berechnen, erfolgte zunächst für alle  $n$  Zellen eine Bestimmung der Anzahl  $A_i^{\text{diff}}$  an Bildpunkten, die sich innerhalb der Snake und außerhalb der Zellmaske oder in der Zellmaske und außerhalb der Snake befanden. Um die Segmentierungsfehler unterschiedlicher Zellen vergleichen zu können, erfolgte eine Normierung der  $A_i^{\text{diff}}$  auf die Anzahl  $A_i^{\text{man}}$  der von der jeweiligen manuell ermittelten Kontur eingeschlossenen Bildpunkte (siehe Gleichung 2). Tabelle 1 zeigt die erzielten Ergebnisse der Segmentierung von 49 Hellfeld-Bildern.

**Tabelle 1.** *Ergebnisse der Zellsegmentierung.* Mittlerer Segmentierungsfehler über alle Zellen bei allgemeingültigen ( $\bar{A}_{\text{const}}^{\text{err}}$ ) und bildspezifischen ( $\bar{A}_{\text{var}}^{\text{err}}$ ) Snakeparametern.

| Optische Vergrößerung | Bilder | Zellen | $\bar{A}_{\text{const}}^{\text{err}}$ | $\bar{A}_{\text{var}}^{\text{err}}$ |
|-----------------------|--------|--------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 40                    | 16     | 307    | 0.156                                 | 0.124                               |
| 60                    | 33     | 347    | 0.162                                 | 0.118                               |

Der Segmentierungsfehler  $\bar{A}^{\text{err}}$  besitzt für bildspezifische Parameter einen geringeren Wert (ca. 12%) als für allgemeingültige (ca. 16%), da hierbei eine weniger starke Generalisierung erforderlich ist. Bei einer Bewertung der Resultate in Tabelle 1 ist weiterhin zu berücksichtigen, dass Zellbegrenzungen häufig nicht eindeutig definierbar sind. Deshalb können Bildpunkte im Bereich der Zellmembran unterschiedlich zugeordnet werden. Somit stellen unsere Ergebnisse eine sehr gute Segmentierung der manuell definierten Zellen dar.

## 6 Diskussion

In dem vorliegenden Beitrag wurde ein Verfahren auf der Basis aktiver Konturen vorgestellt, das eine Lokalisation und Segmentierung ungefärbter Zellen in Hellfeld-Bildern ermöglicht. Dafür erfolgte die Entwicklung von Methoden, die unter Ausnutzung der Morphologie von Zellen auch trotz starker Kontrastunterschiede und Störungen zuverlässig arbeiten. Tests auf unterschiedlichen Bildern mit verschiedenen Auflösungen belegen, dass der genutzte Ansatz robust und wenig stör anfällig ist. Seine Anwendung ist daher nicht nur auf die Suche nach Zellen im Rahmen der Proteinlokalisierung beschränkt. Vielmehr sind alternative Einsatzgebiete z.B. im Rahmen des Trackings von Leukozyten denkbar.

## Literaturverzeichnis

1. Liebel U, Starkuviene V, Erfle H, Simpson JC, Poustka A, Wiemann S, et al. A microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. *FEBS Lett* 2003;554:394–398.
2. Zimmer C, Labruyère E, Meas-Yedid V, Guillén N, Olivo-Marin JC. Improving Active Contours for Segmentation and Tracking of Motile Cells in Videomicroscopy. In: *Procs ICPR*. vol. 2; 2002. p. 286–289.
3. Soille P. *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer, Berlin; 2003.
4. Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. Snakes: Active Contour Models. *International Journal of Computer Vision* 1987;1(4):321–331.
5. Borgefors G. Distance Transformations in Digital Images. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 1986;34(3):344–371.
6. 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.
7. Cohen LD. Note: On Active Contour Models and Balloons. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing: Image Understanding* 1991;53(2):211–218.