

Ein geometrisches Modell für die Zellsegmentierung

Fritz Jetzek^{1,2}, Christian-Dennis Rahn² und Leonie Dreschler-Fischer²

¹Evotec Technologies GmbH, 22525 Hamburg

²Arbeitsbereich Kognitive Systeme, Universität Hamburg, 22527 Hamburg
Email: {jetzek,rahn,dreschle}@kogs.informatik.uni-hamburg.de

Zusammenfassung. Die exakte Segmentierung von Zellen in Mikroskopaufnahmen gehört seit jeher zu den aktiven Forschungsgebieten der Bildverarbeitung. Herkömmliche Verfahren setzen allerdings höchstens indirekt auf eine genaue Modellierung der Zellmorphologie. Im vorliegenden Beitrag wird ein geometrisches Modell aufgestellt, das diesem Mangel begegnet.

Zentraler Punkt ist dabei die Beschreibung der Zellkontur durch eine an diskreten Punkten aufgespannten Membran. Die daraus resultierende Form wird zunächst mit Hilfe der Variationsrechnung hergeleitet. Anschließend wird eine beispielhafte Implementation vorgestellt, die die gewonnenen Erkenntnisse aufgreift und für die Segmentierung nutzbar macht. Erste Experimente mit dem Verfahren liefern vielversprechende Ergebnisse.

1 Problemstellung

Die automatische Segmentierung von Zellen in Mikroskopaufnahmen gehört zu den wichtigsten bildanalytischen Aufgaben in der biomedizinischen Forschung. Zur Bearbeitung biologischer Fragestellungen werden Strukturen von Zellen, z.B. Rezeptoren oder Zytoskelettbestandteile, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. In Reaktion auf äußere Reize reagieren diese Strukturen dann etwa mit einer Umlagerung. Für die Quantifizierung solcher Beobachtungen ist die Segmentierung einzelner Zellen innerhalb einer Aufnahme notwendig.

Das Segmentierungsproblem ist komplex, da Zellen eine sehr heterogene Morphologie besitzen, die schwierig zu modellieren ist. Ferner ergeben sich Schwierigkeiten durch Okklusion sowie durch Fälle von eng benachbarten Zellen, deren Trennfläche nicht eindeutig erkennbar ist.

2 Stand der Forschung

Viele klassische Zellsegmentierungsverfahren verwenden Wachstumsalgorithmen wie Voronoigraphen oder die Wasserscheidentransformation. Die Algorithmen werden typischerweise mit Informationen über die Lage der Zellkerne initialisiert und approximieren dann unter Verwendung der lokalen Intensitätsverteilung im

Zytoplasma die Zellkonturen [1]. Neuere Verfahren erweitern den Ansatz durch die Verwendung von aktiven Konturen (Snakes), die auch bei stark verrauschtem Material noch gute Ergebnisse erzielen [2].

Ein alternativer Ansatz verzichtet ausdrücklich auf eine Modellierung von Zellen; vielmehr werden Pixel bzw. Voxel aufgrund von Eigenschaften der Intensitäten in der lokalen Nachbarschaft geclustert [3].

Abseits der Bildverarbeitung wurde von Ingber das Tensegritätsmodell formuliert, bei dem die mechanischen Eigenschaften von Zellen, insbesondere die Natur des Zytoskeletts zum Tragen kommen [4].

3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

Die Modellierung der Form einer Zelle bauen wir auf Annahmen über das Zellwachstum auf. Wir benutzen Erkenntnisse des Tensegritätsmodells zur Definition der geometrischen Eigenschaften der Kontur. Den Mittelpunkt der Betrachtung bilden die von uns in Anlehnung an das Zytoskelett definierten *Wachstumsachsen* der Zelle, die sich auf der Kontur als Krümmungsextrema wieder finden. Wir zeigen, dass die zwischen diesen Punkten liegenden Abschnitte durch Kurven zweiter Ordnung dargestellt werden können. Der Ansatz bietet damit die Möglichkeit, Zellkonturen im Subpixelbereich zu ermitteln.

Diese Methodik ist eng an biologischen Erkenntnissen orientiert, so dass hier die Grundlage für wesentlich robustere Segmentierungsverfahren gelegt wird. Das Problem der Segmentierung wird reduziert auf die Erkennung von Landmarken, die mit den Endpunkten von Wachstumsachsen korrespondieren.

4 Methoden

Schwerpunkt des Beitrags ist eine Beschreibung der Zellkontur. Wir verwenden physikalische Modelle für die Erklärung der kontinuierlichen Krümmung von Konturabschnitten. Des weiteren zeigen wir, inwiefern die lokale Häufung von Wachstumsachsen sowie deren Länge mit der Form der dazwischen liegenden Konturabschnitte zusammenhängt.

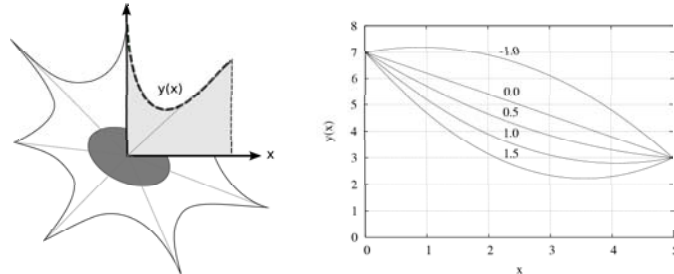
4.1 Physikalisch motivierte Zellmodellierung

In [5] wurde folgendes Energiefunktional als Zellmembranmodell vorgeschlagen:

$$J = \frac{1}{2} \kappa \int (C_1 + C_2 - C_0)^2 dA + \lambda_1 \int dV + \lambda_2 \int dA \quad (1)$$

Das erste Integral beschreibt hier die Membrankrümmung, κ ist ein Elastizitätsmodul, C_1 und C_2 sind die Hauptkrümmungen und C_0 die *spontane Krümmung* der Membran. λ_1 und λ_2 sind Lagrange-Multiplikatoren zur Erhaltung von Zellvolumen und -oberfläche und können als Oberflächenspannung und osmotischer Druck interpretiert werden. In der Literatur sind einige vielversprechende FEM-Simulationen zur Beschreibung von Zellformen mittels Gl. (1) beschrieben.

Abb. 1. Links: Zum Prinzip der Konturmodellierung. Die Zellachsen sind gestrichelt dargestellt. Ein Achsenende liegt jeweils im Nukleus, das andere definiert eine Landmarke. Zwei benachbarte Achsen spannen eine Minimalfläche auf. Rechts: Eine $y_i(x)$ -Funktion für unterschiedliche Werte von λ_i .



Für eine effiziente Segmentierung von Bilddaten ist Gl. (1) wegen ihrer Komplexität jedoch ungeeignet. Hinsichtlich einer 2-D Segmentierung adhärenter, sternförmiger Zellen schlagen wir ein stark vereinfachendes Funktional als Zellmodell vor, das die Projektionsfläche der Zelle (in 3-D das Volumen) sowie das Konturlängenquadrat (in 3-D das Quadrat der Oberfläche) unter gegebenen Randbedingungen minimiert. Die Oberflächungskrümmung ist nicht mehr explizit vorgesehen. Durch die Verwendung des Konturlängenquadrats wird eine elastische Zellmembran beschrieben.

Die Zelle wird in N dreieckige Segmente S_i partitioniert, deren eine Ecke im Zentrum des Nukleus liegt. Die beiden anderen Ecken liegen auf der Zellkontur auf Endpunkten (*Landmarken*) p_i von benachbarten Zellachsen (vgl. das Zytoskelett). Der (bei den betrachteten Zellen zumeist konkave) Konturteil in S_i zwischen den Landmarken p_i und p_{i+1} werde in einem lokalen Koordinatensystem als $y_i(x)$ bezeichnet (siehe Abb. 1). Für jedes Segment S_i sieht das Funktional dann folgendermaßen aus:

$$J_i = \int_{x_0}^{x_1} 1 + (y_i')^2 dx + \lambda_i \int_{x_0}^{x_1} y_i dx \quad (2)$$

Das erste Integral minimiert das Konturlängenquadrat und der zweite Term den Flächeninhalt. Die λ_i steuern die relative Bedeutung des jeweiligen Flächeninhalts. Eine analytische Lösung von Gl. (2) erfolgt über die Euler-Gleichung

$$\lambda_i - 2y_i'' = 0, \quad (3)$$

und ergibt eine mit λ_i parametrisierte, quadratische Funktion für $y_i(x)$. Somit kann nach diesem Modell die Kontur einer Zelle stückweise durch Polynome mit niedrigem Grad beschrieben werden. Um die Randbedingungen für jedes Konturstück y_i symmetrisch angeben zu können, werden kubische Spline-Kurven verwendet. Die Krümmungsparameter λ_i werden durch den Zelltypus und die jeweiligen Wachstumsachsen bestimmt (s.u.).

4.2 Implementation

Wir gehen für die Umsetzung unseres Modells an Zellen aus menschlichem Knochenmarkskrebsgewebe (U2OS) bereits von gegebenen Landmarken p_i aus. Sie markieren Krümmungsextrema der Membranlinie. Durch ihre Lage zueinander sowie zum Kern soll die Membranlinie aus verschiedenen langen Abschnitten $y_i(x)$ mit mehr oder weniger stark gekrümmten Verlauf bestimmt werden.

Wir gehen weiter davon aus, dass der Zellkern bereits segmentiert vorliegt. Im konkreten Fall der Fluoreszenzmikroskopie können z.B. Mehrkanalaufnahmen mit speziell gefärbten Kernen generiert werden, aus denen sich dann mittels einfacher Schwellwertanalyse die einzelnen Kerne extrahieren lassen.

Für jede Landmarke p_i berechnen wir den nächstgelegenen Punkt p'_i auf der Kernkontur. Beide Punkte zusammen bilden einen lokalen Richtungsvektor $P_i = p_i - p'_i$ (die *Wachstumsachse*), der grob die Orientierung des Zytoplasmas in dieser Richtung angibt. Die Menge dieser Vektoren kann dann nach der Reihenfolge ihrer Fußpunkte p'_i auf der Kernlinie sortiert werden; dabei auftretende Teilprobleme wie etwa der Sortierung von Vektoren mit identischen Fußpunkten wurden mittels einer Analyse der lokalen Lage der Vektoren bezüglich der Kernkontur gelöst. Diese Sortiermethode ist für sternförmige Zellen eindeutig.

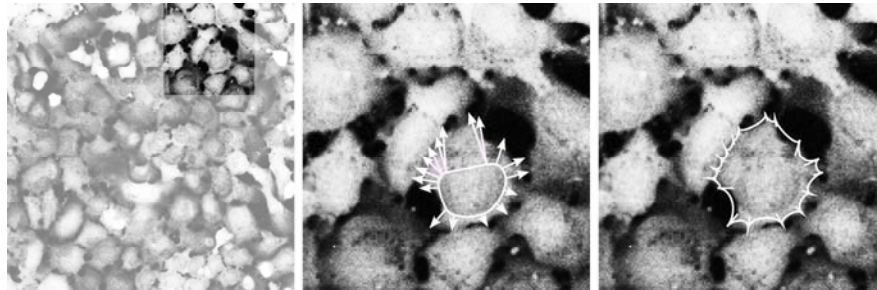
Wir nutzen die Wachstumsachsen zur Parametrisierung der jeweils zwischen benachbarten Vektoren aufgespannten Konturabschnitte $y_i(x)$. Die Betrachtungen zur Minimierung von Fläche und Bogenlänge in Abschnitt 4.1 lassen sich umsetzen unter Verwendung der Länge und der Spannweite jeweils benachbarter Achsen. Um für die letztere ein Maß zu erhalten, normieren wir zunächst sämtliche Achsen zu $n_i = P_i / \|P_i\|$ und berechnen für die jeweils benachbarten Achsen das Skalarprodukt $\langle n_i, n_{i+1} \rangle$. Dessen Wertebereich ist bei den vorliegenden Konturen durch $[-1..1]$ gegeben, wobei -1 für den maximalen Winkel von 180° steht. Der Bereich wird abgebildet auf $[1..0]$, um höhere Werte für größere Spannweiten zu erhalten. Schließlich skalieren wir die n_i und n_{i+1} mit den jeweils gebildeten Werten. Zur Modellierung von Membranlinienabschnitten $y_i(x)$ mittels einer kubischen Spline werden die so entstandenen Paare dann direkt zur Parametrisierung eingesetzt (siehe Abb. 2).

5 Ergebnisse

Das beschriebene Verfahren berücksichtigt die Form adhärenter Zellen als das Resultat einer zwischen benachbarten Punkten aufgespannten Membran. Liegen die Landmarken als Schätzungen dieser Punkte einmal vor, kann durch das einfache Modell der segmentweisen Approximation der Zellkontur mittels Bezier-Splines ein akzeptables Ergebnis erzielt werden. Dies gilt insbesondere für weit auseinander liegende Landmarken, die in weiträumig aufgespannte Kontursegmente resultieren.

Ermutigende Resultate ergeben sich aber auch in diffusen Bereichen des Zytoplasmas, die insgesamt eher konvex erscheinen. Hier lässt sich zeigen, dass eine engere Bündelung der Achsen und eine einhergehende Verflachung der Splines ebenfalls eine erfolgreiche Abgrenzung der Zelle gegen ihre Umgebung bewirkt.

Abb. 2. Membranapproximation mit Splines. Links: Konfokale Aufnahme von U2OS-Gewebe; Mitte: manuell gesetzte Landmarken, automatisch detektierte Kernlinie und Wachstumsachsen; rechts: approximierte Membrankontur mit unterschiedlich skalierten Richtungsvektoren. Der Durchmesser der abgebildeten Zellen beträgt ca. $15\mu\text{m}$.



6 Diskussion

Für den vollständig automatischen Einsatz des Verfahrens sind noch weitere Constraints einzubeziehen, etwa die Relation von der Orientierung des Zellkerns im Verhältnis zu der Orientierung der gesamten Zelle. Speziell für weniger dicht gebautes Gewebe ist außerdem das Problem von Überhängen noch anzugehen.

Als nächste Schritte auf dem Weg zu einer robusten Segmentierung sind schließlich das automatische Erkennen von Landmarken und ihre Zuordnung zu Zellen (auch zur Lösung von Okklusionsproblemen) zu nennen; momentan sei dazu auf die Arbeiten von Rohr [6] verwiesen. Weiterhin kann das vorgestellte Verfahren auch mit Aktiven Konturen kombiniert werden.

Literaturverzeichnis

1. Bengtsson E, Wahlby C, Lindblad J. Robust Cell Image Segmentation Methods. *Patt Recog Image Analysis* 2004;4(2):157–167.
2. Rahn CD, Stiehl HS. Semiautomatische Segmentierung individueller Zellen in Laser-Scanning-Microscopy Aufnahmen humaner Haut. In: *Procs BVM*; 2005. p. 153–158.
3. Ronneberger O, Fehr J, Burkhardt H. Voxel-Wise Gray Scale Invariants for Simultaneous Segmentation and Classification. In: *Procs DAGM*. Springer; 2005.
4. Ingber DE. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Science* 1993;104:613–627.
5. Helfrich W. Elastic properties of lipid bilayers. Theory and possible experiments. *Z Naturforschung C* 1973;28:11–12.
6. Rohr K. *Landmark-Based Image Analysis*. Kluwer, Dordrecht; 2001.