

GAUSS TABANLI MODELLEME KULLANARAK CANLI HÜCRE GÖRÜNTÜLERİNİN ÖĞRETİCİSİZ BÖLÜTLENMESİ

UNSUPERVISED SEGMENTATION OF LIVE CELL IMAGES USING GAUSSIAN MODELING

Salim Arslan¹, İrem Durmaz², Rengül Çetin-Atalay², Çiğdem Gündüz-Demir¹,

1. Bilgisayar Mühendisliği Bölümü
Bilkent Üniversitesi
{salima, gunduz}@cs.bilkent.edu.tr

2. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Bilkent Üniversitesi
{durmaz, rengul}@bilkent.edu.tr

ÖZETÇE

Kanser için hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında ilk aşama, farklı antikanser maddelerin hücre kültürü ortamında etkinliğinin ölçülerek taranması ve ilaç adaylarının belirlenmesidir. Bu amaçla geliştirilen testler, prosedürleri gereği zaman alıcı olmakta ve ihtiyaç duydukları donanımdan dolayı her laboratuvarı yapılamamaktadır. Öte yandan, mikroskop altında görüntüye dayalı yapılacak bir tarama testi, canlı hücre görüntülerinde ek işleme gerek duymadan uygulanabilir olmasından dolayı daha az zaman alma ve gerektirdiği ekipmanın bulunabilirliği ile nispeten daha az maliyetinden dolayı daha yaygın kullanıma potansiyeline sahiptir. Bu tip bir testle ilgili görüntüdeki hücresel bölgelerin kontrol grubu ile karşılaştırılıp hücre ölüm miktarlarının saptanması mümkündür. Bu çalışmada, canlı hücre görüntülerini öğreticisiz bölütleyerek hücresel bölgeleri otomatik saptayan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, öncelikle gradyan eşikleme ve morfolojik operatörlerle arka alan ve hücresel bölgelerin yaklaşık olarak bulunmasına, ardından bu bölgelerdeki renk ve gradyan bilgisinin Gauss tabanlı modellenerek son sınırların belirlenmesine dayanır. Farklı dokulara ait kanserli hücre hatlarından farklı büyütmeye kullanılarak alınmış görüntüler üzerinde yaptığımız çalışmalar, bu yöntemin hücresel bölgelerin yüksek doğrulukla saptanmasında umut verici sonuçlar verdiğini göstermiştir.

ABSTRACT

The first step of targeted cancer drug development is to screen and determine drug candidates by in vitro measuring the effectiveness of the drugs. The tests developed for this purpose can be time consuming due to their procedures and cannot be conducted in every laboratory due to the required hardwares. On the other hand, an image-based screening test has a potential to be less time consuming since it can directly be carried out on the live cell images and to be more extensively used because of the availability of its required equipments and their relatively less expensive cost. With such an image-based test, it is possible to quantify the cell death by finding cellular regions and comparing it against the control group. In this work, we propose a new method that automatically locates the cellular regions by the unsupervised segmentation of live cell images. This method relies on approximately locating cellular regions and the background with gradient-based thresholding and morphological operators and then finding the final boundaries by modeling the gradient of these regions with Gaussians. Working on the images of different cell lines captured with different magnifications, our experiments show that the proposed method leads to promising results.

1. GİRİŞ

Kansere karşı hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında, ilaç adayı antikanser maddelerin etkinliklerinin anlaşılması yolunda ilk deneyler hücre kültürü ortamında yapılmaktadır. Antikanser madde etkinliğinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan yöntem, A.B.D. Ulusal Kanser Enstitüsü'nce geliştirilen SRB sitotoksikite biyoanalizidir [1]. Bu yöntem, verilen antikanser maddenin sitotoksik etkisini belirleyerek hücreleri ne kadar öldürdüğünü ölçmeye dayanır. Bunun için, fiks edilen hücreler sulforodamin B (SRB) maddesi ile boyanır. Bu boya hücrelerin içerdiği proteinlere bağlanan ve suda çözünen bir maddedir. Bu bağlamda ne kadar hücre, dolayısıyla ne kadar protein, varsa deney solüsyonunda o oranda boya çözünür. Çözeltideki SRB boyası soğurma miktarı 515 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlenir. Bulunan değer hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Uygulanan bu yöntem, içerdiği prosedürler gereği zahmetli olmanın yanı sıra gerektirdiği ekipmanlardan ötürü her laboratuvarı yapılamamaktadır. Öte yandan, bu şekilde bir testin, fiks etme ve boyama gibi ek prosedür gerektirmeden doğrudan mikroskop altında canlı hücre görüntülerinde üzerinde gerçekleştirilebilmesi zaman ve maliyet açısından önemlidir. Dahası, nispeten kolay bulunan ekipmanlar (mikroskop, kamera ve bilgisayar) gerektirmesi nedeniyle görüntüye dayalı bir test daha yaygın kullanılabilme potansiyeline sahiptir. SRB sitotoksikite biyoanaliz testine alternatif geliştirilecek görüntüye dayalı bir etkinlik ölçme testinde, antikanser madde verilmiş canlı hücre kültürlerindeki hücresel bölgeler otomatik olarak bölütlendikten sonra kontrol grubu ile karşılaştırılabilir ve bu şekilde hücre ölüm miktarı nicelenebilir. Bu çalışmada, böyle bir testin ilk aşamasını oluşturan hücresel bölge bölütlemesi için gürbüz bir algoritma geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Literatürde genel görüntüler üzerinde çalışan pek çok öğreticisiz bölütleme algoritması vardır. Bunlara örnek olarak piksel renk histogramına göre öbekleme yapan [2], eşikleme uygulayan [3] ve bölge büyütmeye kullanan [4], [5] algoritmalar gösterilebilir. Bu algoritmalar genel görüntülerde çalışmak üzere tasarlandıkları için, canlı hücre kültürü görüntülerine özgü belirleyici özelliklerden faydalanmazlar. Öte yandan, bu görüntülerin hücre ve ekilen tabak (arka alan) olmak üzere iki bölgeden oluştuğu, tabak dokusunun hücresel bölge dokusuna göre daha desensiz olduğu gibi bilgilerin yanı sıra, hücre tipine özgü niteliklerin bölütleme algoritmalarının kullanılması, başarının artırılmasına olanak sağlar. Bu motivasyon doğrultusunda yapılan çalışmada, canlı hücre görüntülerine özgü bilgileri kullanan bir bölütleme algoritması önerilmektedir. Bu algoritma, öncelikle gradyan eşikleme ve

morfolojik operatörlerle kenar yoğunluğunun fazla olduğu hücrel bölge az desenli arka alandan kabaca ayırır. Sonrasında, renk ve gradyanlarına göre öbeklenmiş pikseller üzerinde, biri hücre bölge diğeri ise arka alan için olmak üzere iki tane Gauss sınıflandırıcı modeli öğrenir. Son olarak, her pikseli öğrenilen modelleri kullanarak tekrar sınıflar ve bu şekilde hücrel bölgeyi saptar.

Literatürde hücre görüntüleri üzerine yapılan çalışmalar hücrel bölge bölütlenmesinden çok hücrelerin teker teker bölütlenmesi üzerinedir [6], [7], [8]. Bu çalışmalar, daha çok fikse edilip boyanmış, canlı olmayan hücre görüntüleri üzerine odaklanmıştır. Boyama işleminin hücreleri daha belirgin hale getirip bölütlemeyi kolaylaştırmasına rağmen, hücrelerin fikse edilip boyandıktan sonra tekrar büyümeye devam ettirilmesi mümkün değildir. Bu durum aynı hücre kültüründe ölüm süreçlerinin izlenememesi anlamına gelmektedir ki benzer bir sorun SRB sitotoksitesite biyoanaliz testinde de bulunmaktadır. Nispeten az sayıda olan canlı hücre bölütleme çalışmaları ise daha çok yüksek çözünürlükteki görüntüleri kullanmaktadır [9], [10]. Yaptığımız deneyler, önerdiğimiz yöntemin düşük çözünürlük ve düşük büyütmedeki görüntülerde çalışabildiğini göstermiştir. Dolayısıyla, öncelikle hücrel bölgelerin düşük çözünürlükte hızlıca tespit edilip, sonra sadece bu bölgeler göz önüne alınarak hücrelerin yüksek çözünürlükte teker teker bölütlenmesiyle hesaplama zamanını düşürmek mümkündür.

2. YÖNTEM

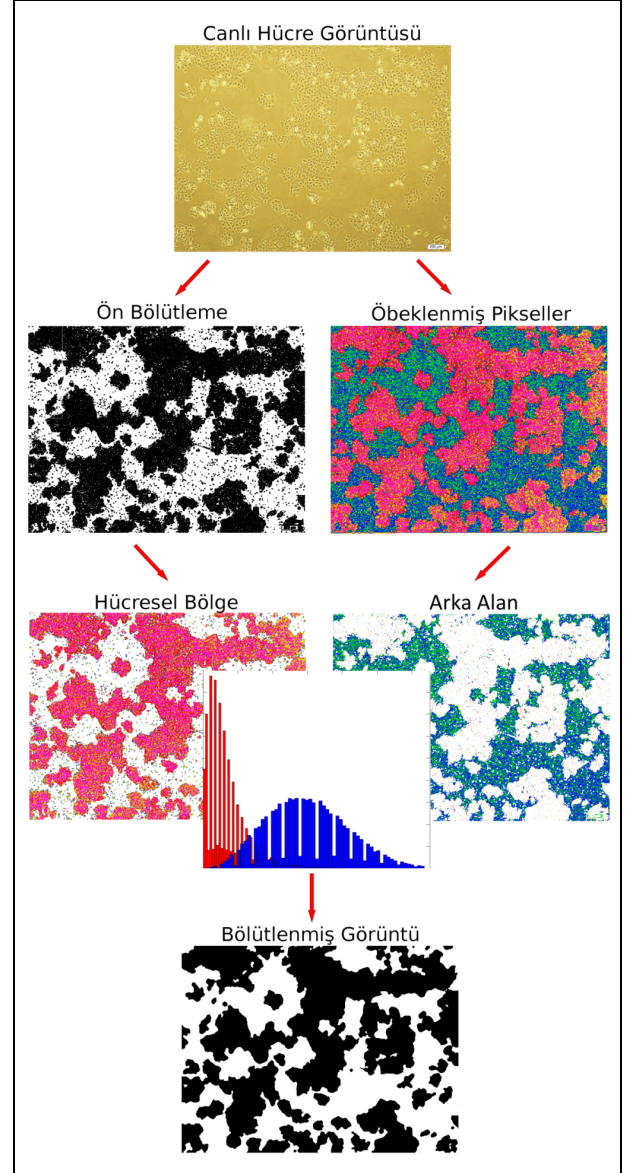
Bu çalışmada, Gauss tabanlı öğreticisiz bir model kullanılarak hücrel bölgelerin otomatik bölütlenmesi için bir algoritma geliştirilmiştir. Bu algoritma başlıca üç basamaktan oluşur. İlk basamak olan ön bölütlemeye, gradyan bilgisine göre eşikleme ve morfolojik operatörler kullanılarak hücrel bölgeler arka alandan kabaca ayrılır. Sonraki basamakta, pikseller renk ve gradyan bilgisine göre gruplanıp görüntünün öbeklenme haritası elde edilir. En son basamakta ise, ön bölütleme ile elde edilen iki ayrı bölgedeki (arka alan ve hücrel bölgelerdeki) öbeklenmiş piksellerin Gauss dağılımı gösterdiği varsayılarak bir parametrik model öğrenilir. Sonrasında bu öğrenilen model ile her piksel tekrar sınıflandırılır ve son bölütleme elde edilir. Önerilen algoritmanın şematik gösterimi Şekil 1'de verilmiştir.

2.1. Ön Bölütleme

Ön bölütleme, son bölütleme işlemine temel oluşturacak görüntünün elde edilmesi için yapılır. Bu amaçla, öncelikle gri seviyedeki görüntüye yatay ve dikey Sobel operatörleri uygulanır ve bulunan değerlerin şiddetleri eşiklenerek hücrel bölgeler için yaklaşık sınır pikselleri ile bu bölgeler içinde kalan kimi pikseller bulunur. Eşik değeri Otsu yönteminden faydalanılarak elde edilir. Bu işlemde, hücrel bölgelerin, sınırlarında ve içlerinde, yüksek frekanslı pikselleri içerdiği bilgisinden faydalanılır. Ancak bölgelerin içinde kalan tüm pikseller yüksek frekanslı değildir. Bu yüzden, bulunan pikseller kare yapı elemanlı genişleme morfolojik operatörü ile genişletilir ve aralarındaki küçük boşluklar kapatılır.

2.2. Görüntü Öbeklenmesi

Bu basamakta görüntü pikselleri için renk ve gradyan bilgileri kullanılarak öznitelikler tanımlanır ve pikseller bunlara göre öbeklenir. Renk bilgisi için, piksellerin Lab renk uzayındaki yoğunluk değerleri, gradyan bilgisi içinse her bir renk kanalına ayrı ayrı yatay ve dikey Sobel operatörleri uygulanmasıyla elde edilen değerlerin şiddetleri öznitelik olarak kullanılır.

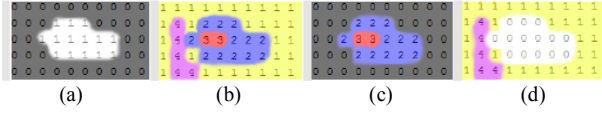


Şekil 1: Önerilen algoritmanın şematik gösterimi.

Öznitelikleri çıkarılan pikseller k -ortalama algoritması ile k gruba öbeklenir. k parametresinin küçük seçilmesi, hücrel bölge ve arka alan piksellerinin benzer öbek dağılımı göstermesine yol açar. Bu ise, öbek dağılım bilgisini kullanan bir sonraki basamakta bölütleme başarısını düşürür. Büyük seçilen k parametresi ise gereğinden fazla öbek tanımlayarak bir sonraki basamaktaki sınıflandırıcı karmaşıklığını artırır ve sınıflandırıcı başarısının düşmesine yol açabilir. Yapılan deneysel çalışmalarda, kullanılan hücre görüntüleri göz önüne alınarak k değeri 5 olarak seçilmiştir. Bunun sonucu yapılan gözlemlerde, genel olarak, hücrel bölge ve arka alana ait piksellerin ikiye öbeğe ayrıldığı, kalan öbeğin ise hücre sınır piksellerine karşılık geldiği görülmüştür.

2.3. Son Bölütleme

Bu basamak, ön bölütleme ve öbeklenmiş piksel bilgilerini birleştirerek pikselleri tekrar sınıflar ve bu şekilde hücrel bölgeleri bölütler.



Şekil 2: Pikel haritalarının çıkarılması: (a) ön bölütleme, (b) öbeklenmiş piksel haritası, (c) hüresel bölgeler için öbeklenmiş piksel haritası, (d) arka alan için öbeklenmiş piksel haritası.

Sınıflandırıcıların öğrenilmesi için, ilk olarak hüresel bölge ve arka alanın ayrı ayrı öbeklenmiş piksel haritaları çıkarılır. Bu haritalarda, sadece ilgili bölgenin pikselleri göz önüne alınıp diğer bölge pikselleri göz ardı edilir (Şekil 2). Sonrasında, haritalarda yer alan her bir pikselin komşularının öbek dağılımlarının histogramları tanımlanır. Komşuluk tanımı için $n \times n$ boyutunda bir pencere pikseller üzerinde gezdirilir. Bu şekilde, hüresel bölgede yer alan her bir h_i pikseli için, komşularının öbek histogram bilgisini içeren k boyutunda bir H_i vektörü tanımlanmış olur. Benzer şekilde, arka alanda yer alan her bir a_i pikseli için de k boyutunda bir A_i vektörü tanımlanır. Bu çalışmada, hüresel bölge ve arka alan sınıflarındaki H_i ve A_i vektörlerinin normal dağılım gösterdiği varsayılarak, Gauss tabanlı bir parametrik sınıflandırıcı tanımlanmıştır. Bu sınıflandırıcı için kullanılacak μ_H ve μ_A ortalama vektörleri, ilgili piksellerin H_i ve A_i vektörleri üzerinde maksimum-olasılık kestirimi kullanarak hesaplanır. Bu çalışmada, her vektör elemanının varyansının aynı olduğu ve farklı elemanların birbirinden bağımsız olduğu (aralarındaki kovaryansın 0 olduğu) varsayılmıştır. Dahası elemanların varyansı iki sınıf için de aynı alınmıştır. Dolayısıyla, kestirimi yapılacak varyans değeri (σ^2) hem H_i hem de A_i vektörleri üzerinde hesaplanır. 0-1 kayıp fonksiyonu kullanılarak her sınıf için aşağıdaki diskriminant fonksiyonları tanımlanmıştır. Burada, aynı varyans değerinin kullanıldığı göz önüne alınmış ve gerekli sadeleştirmeler yapılmıştır.

$$g_H(x) = \frac{1}{\sigma^2} \mu'_H x - \frac{1}{2\sigma^2} \mu'_H \mu_H \quad (1)$$

$$g_A(x) = \frac{1}{\sigma^2} \mu'_A x - \frac{1}{2\sigma^2} \mu'_A \mu_A \quad (2)$$

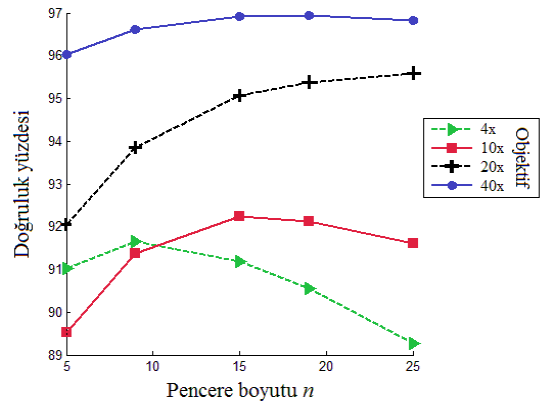
Sınıflandırıcının öğrenilmesinden sonra, görüntüde yer alan her bir piksel için x histogram vektörü tüm pikseller göz önüne alınarak hesaplanır; öğrenmeden sonra ön bölütleme ile bulunmuş hüresel bölge ve arka alan bilgisinden bir daha faydalanılmaz. Hesaplanan x vektörü kullanılarak discriminant fonksiyonları bulunur ve piksel $g_H(x) > g_A(x)$ ise hüresel bölge olarak, değilse arka alan olarak sınıflandırılır. Piksellerin sınıflandırılması sonrasında bulunan bölgelerdeki küçük alanların temizlenmesi ile son bölütleme elde edilir. Pikel sınıflandırması için, daha becerikli (genelde daha karmaşık) sınıflandırıcıların kullanılması mümkündür. Bu çalışmada, sınıflandırıcı karmaşıklığı ve elde edilecek doğruluk oranı da göz önüne alınarak nispeten basit olan Gauss tabanlı bir sınıflandırıcı tercih edilmiştir. Deneylerde, bu sınıflandırıcının yüksek doğrulukta sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

3. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu çalışmada kullanılan görüntüler, Huh7 (karaciğer kanseri), Kato-3 (gastrik epiteliyal kanser), MCF7 (meme kanseri) ve MFE-296 (endometriyal kanser) hücre hatlarından alınmıştır. Görüntüler, Olympus DP72 model kamera kullanılarak farklı

objektiflerle alınmış, çözünürlük olarak 1035x774 kullanılmıştır. Bu görüntülerden dört tanesi 4x, sekiz tanesi 10x, iki tanesi 20x ve diğer iki tanesi 40x objektif ile elde edilmiştir. Küçük büyütme ile çekilmiş görüntülerin daha çok kullanılmasının nedeni, bir görüntüde daha fazla sayıda hücrenin değerlendirmeye alınmak istenmesidir. Ancak, 4x objektif her mikroskopta standart bulunmadığı için deneylerin 10x görüntülerde yapılmasına karar verilmiştir. Nicel başarı oranlarının belirlenmesi için, görüntülerdeki hücre alanlarının sınırları, biyologlarımız tarafından manuel olarak çizilmiştir.

Deneylerimiz, beklenen şekilde, kullanılan objektif ile pencere boyutu (n değerinin) arasında doğrusal bir bağıntı olduğunu göstermiştir. Her objektif için farklı pencere boyutu ($n = \{5, 9, 15, 19, 25\}$) ile doğruluk yüzdeleri hesaplanmış ve ortalamaları Şekil 3'de gösterilmiştir. Bunlar doğrultusunda, her bir görüntü için, kullanılan objektife göre seçilen pencere boyutu ile alınan doğruluk, hassaslık ve belirlilik yüzdeleri Tablo 1'de verilmiş ve bunlara karşılık gelen görsel sonuçlar Şekil 4'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, bir çok görüntü için yüksek başarılı bölütleme yapılabildiğini göstermektedir. Hatalı bulunan bölgeler, genelde sınıra yakın, daha az belirgin hüresel bölgelerdir. Akıllı bir genişleme morfolojik operatörü tanımlayarak bu hataları azaltmak mümkündür. Bu tip bir tanımlama, çalışmanın ilerleyen aşamalarında düşünülebilir. Ayrıca, görüntünün tamamına yakınının hücrelerden oluştuğu durumlarda, arka alandan yeterince bilgi alınamadığından dolayı kimi bölütleme hataları yapılabilmektedir. Buna örnek görüntü, Şekil 4'de üçüncü satırın ikinci sütununda verilmiştir.



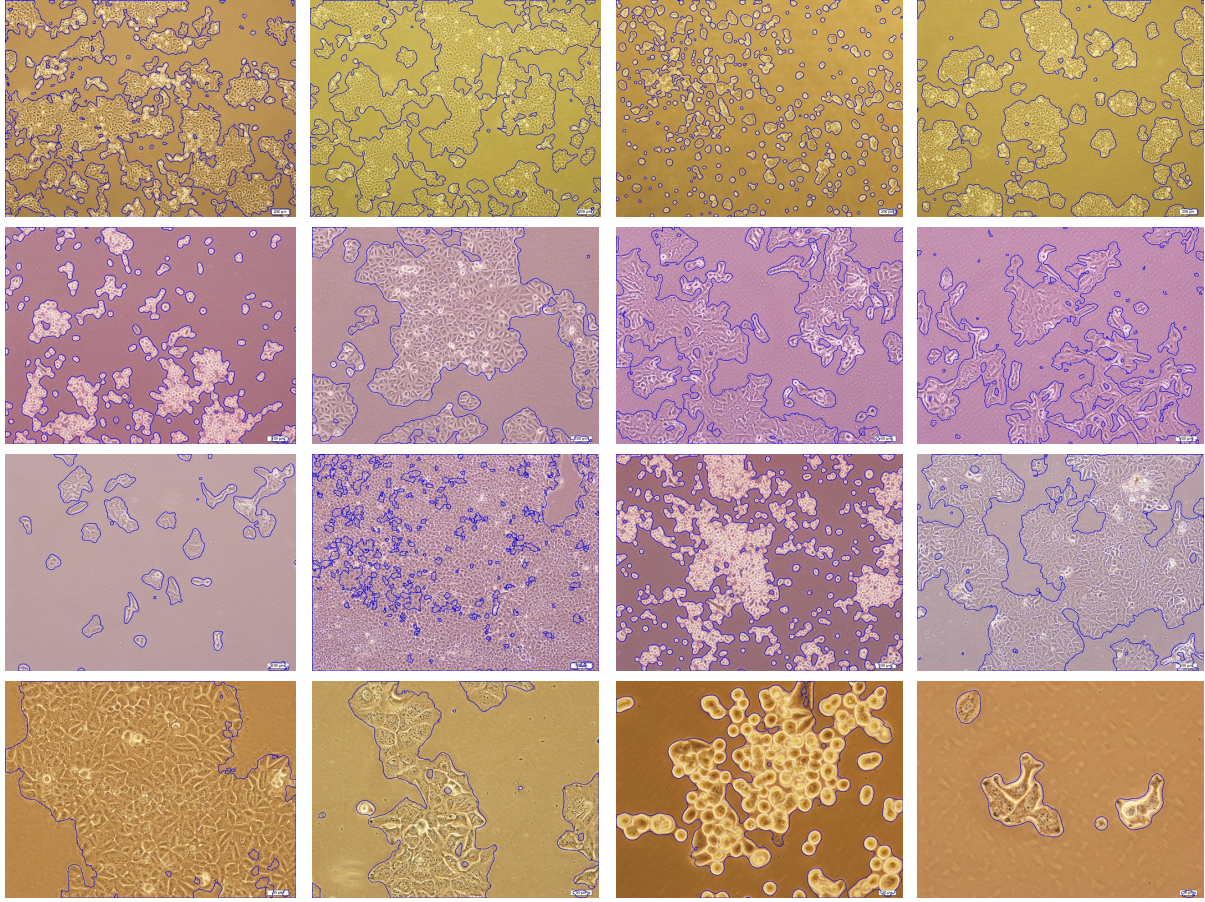
Şekil 3: Pencere boyutu ile doğruluk yüzdesi ilişkisi.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, canlı hücre görüntülerini bölütleyerek hüresel bölgeleri otomatik saptayan bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, gradyan eşikleme ve morfolojik operatör ile hüresel bölge ve arka alanı saptayarak, bu bölgeler üzerinde renk ve gradyan bilgisini kullanan Gauss tabanlı bir sınıflandırıcı geliştirilmesine dayanır. Canlı hücre görüntülerinde yaptığımız deneyler çalışmalar, geliştirdiğimiz bu yöntemin umut verici sonuçlar verdiğini göstermiştir. İleriki çalışmalarımızda, bu yöntemin ilaç etkinliğini ölçmede kullanılması ve elde edilen sonuçlardan hücre bölütleme algoritmalarında yararlanılması planlanmaktadır.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK 109E206 numaralı proje tarafından desteklenmektedir.



Şekil 4: Kullanılan görüntüler üzerinde alınan görsel sonuçlar.

Tablo 1: Farklı hücre hatlarından alınmış görüntüler için doğruluk, hassaslık ve belirlilik yüzdeleri.

Objektif	Hücre hattı	Doğruluk	Hassaslık	Belirlilik
4x	Huh7	87.04	98.71	79.73
	Mfe296	93.95	96.73	90.98
	Kato3	89.85	99.09	88.41
	Mcf7	96.21	97.92	95.06
10x	Kato3	92.11	99.83	90.14
	Mcf7	96.71	97.43	95.88
	Huh7	89.86	97.88	83.86
	Huh7	88.86	98.53	85.31
	Mfe296	97.11	95.32	97.28
	Mcf7	90.10	89.89	99.94
	Kato3	88.68	99.76	82.89
20x	Mcf7	95.03	94.13	99.14
	Mfe296	96.15	94.60	96.98
40x	Kato3	95.32	97.61	93.65
	Huh7	98.33	98.85	98.29

6. KAYNAKÇA

- [1] Monks, A., Scudiero, D., Johnson, G., Paull, K., and Sausville, E., "Mini-review. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets", *Anti-Cancer Drug Design*, 12:533-541, 1997.
- [2] Scheunders, P., "A genetic c-means clustering algorithm applied to color image quantization", *Pattern Recognit.*, 30(6):859-866, 1997.
- [3] Cheng, H.D., Jiang, X.H., and Wang, J., "Color image segmentation based on homogram thresholding and region merging", *Pattern Recognit.*, 35(2):373-393, 2002.
- [4] Deng, Y., and Manjunath, B.S., "Unsupervised segmentation of color texture regions in images and video", *IEEE T Pattern Anal. Mach. Intell.*, 23(8): 800-810, 2001.
- [5] Shih, F.Y., and Cheng, S., "Automatic seeded region growing for color image segmentation", *Image Vis. Comput.*, 23(10):877-886, 2005.
- [6] Mouroutis, T., Roberts, S.J., and Bharath, A.A., "Robust cell nuclei segmentation using statistical modeling", *Bioimaging*, 6(2):79-91, 1998.
- [7] Yang, F., and Jiang, T., "Cell image segmentation with kernel-based dynamic clustering and an ellipsoidal cell shape model", *J. of Biomed. Inform.*, 34(2):67-73, 2001.
- [8] Ta, V., Lezoray, O., Elmoatz, A., and Schüpp S., "Graph-based tools for microscopic cellular image segmentation", *Pattern Recognit.*, 42(6):1113-1125, 2009.
- [9] Wu, K., Gauthier, D., and Levine, M.D., "Live cell image segmentation", *IEEE T Biomed. Eng.*, 42(1):1-12, 1995.
- [10] Simon, I., Pound, C.R., Partin, A.W., Clemens, J.Q., and Christens-Barry, W.A., "Automated image analysis system for detecting boundaries of live prostate cancer cells", *Wiles-Liss Inc. Cytometry*, 31(4):287-294, 1998.