

Canlı Hücre Bölütlemesi için Gözetici Öğrenme Modeli

A Supervised Learning Model for Live Cell Segmentation

Can Fahrettin Koyuncu¹, İrem Durmaz², Rengül Çetin-Atalay², Çiğdem Gündüz-Demir¹

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

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

Özetçe— Hücre seviyesindeki biyolojik olayların daha hızlı ve güvenilir analizi için otomatik hücre görüntüleme sistemleri önerilmiştir. Bu sistemlerde ilk basamak olan hücre bölütlemesinin başarısı, sonraki basamakları da etkilemektedir. Dolayısıyla, başarılı sistemlerin tasarlanması için gürbüz ve etkin bölütleme algoritmalarının geliştirilmesi kritiktir. Literatürde hücre bölütlemesi için en sık kullanılan yöntem, işaretçi kontrollü su-seddi algoritmalarıdır. Bu algoritmalar, işaretçilerin hücrelere birebir denk geldiğini varsayar ve bu işaretçileri genişleterek hücre sınırlarını tespit eder. Dolayısıyla, bu algoritmalar için, işaretçilerin doğru tanımlanması çok önemlidir. İşaretçiler, çoğunlukla, yoğunluk/gradyan üzerinde bölgesel minimum/maksimum bulunarak ya da siyah beyaza çevrilmiş görüntüde morfolojik işlemler uygulanarak tanımlanır. Bu çalışmada, canlı hücre bölütlemesi için yeni bir işaretçi kontrollü su-seddi algoritması önermekteyiz. Önerilen bu algoritmanın literatüre iki ana katkısı vardır. İlk olarak, literatürdeki yaklaşımlardan farklı olarak, işaretçilerin tespiti için yeni bir gözetici öğrenme modeli geliştirilmiştir. Bu modelde, her piksel için, komşu piksellerin yoğunluk ve gradyanlarına bağlı özniteliklerin çıkarılması ve bu pikselin işaretçi pikseli olup olmadığına çıkarılan bu öznitelikleri kullanan bir sınıflandırıcı ile karar verilmesi önerilmiştir. İkinci olarak, piksellerin gösteriminde, komşu piksellerin yön bilgisine göre gruplanıp özniteliklerin bu gruplara göre çıkarılması önerilmiştir. 1954 hücre üzerinde yapılan deneyler, önerilen bu algoritmanın, diğer su-seddi algoritmalarına göre daha yüksek bölütleme başarısı verdiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler — hücre bölütlemesi; işaretçi kontrollü su-seddi algoritması; hücre hatları; destek vektör makineleri.

Abstract— Automated cell imaging systems have been proposed for faster and more reliable analysis of biological events at the cellular level. The first step of these systems is usually cell segmentation whose success affects the other system steps. Thus, it is critical to implement robust and efficient segmentation algorithms for the design of successful systems. In the literature, the most commonly used methods for cell segmentation are marker controlled watersheds. These watershed algorithms assume that markers one-to-one correspond to cells and identify their boundaries by growing these markers. Thus, it is very important to correctly define the markers for these algorithms. The markers are usually defined by finding local minima/maxima on intensity or

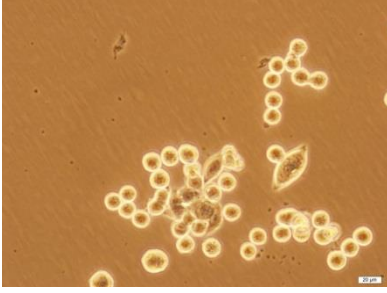
gradient values or by applying morphological operations on the corresponding binary image. In this work, we propose a new marker controlled watershed algorithm for live cell segmentation. The main contributions of this algorithm are twofold. First, different than the approaches in the literature, it implements a new supervised learning model for marker detection. In this model, it has been proposed to extract features for each pixel considering its neighbors' intensities and gradients and to decide whether this pixel is a marker pixel or not by a classifier using these extracted features. Second, it has been proposed to group the neighboring pixels based on the direction information and to extract features according to these groups. The experiments on 1954 cells show that the proposed algorithm leads to higher segmentation results compared to other watersheds.

Keywords — cell segmentation; marker controlled watershed algorithms; cell lines; support vector machines.

I. GİRİŞ

Hücrelerin otomatik analizine olanak sağlayan görüntüleme sistemlerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu otomatik sistemlerin kullanılması, kullanıcı kaynaklı hataları azaltmakta ve daha hızlı analizlere olanak vermektedir. Bu sistemlerin ilk basamağı, genellikle, verilen görüntüdeki hücrelerin yerlerinin bulunarak bölütlenmesidir. Bu nedenle, görüntüleme sistemlerinin başarısı hücre bölütleme algoritma başarısından doğrudan etkilenmektedir.

Literatürdeki bölütleme çalışmaları iki ana grup altında incelenebilir. Bunlardan ilki, başka hücrelere temas etmeyen izole hücrelerin bölütlenmesidir. İlgili çalışmalarda, hücre pikselleri arka plan piksellerinden eşikleme [1, 2] ya da öbekleme [3] gibi yöntemler kullanılarak ayrılır ve sonrasında hücre pikselleri üzerinde bulunan bağlı bileşenler hücre olarak belirlenir. Diğer grup çalışmaları ise, üstüste büyüyen kümelenmiş hücrelerin bölütlenmesi üzerinedir. Bunun için en çok aktif kontur modelleri ve işaretçi kontrollü su-seddi algoritmaları kullanılır. Aktif kontur modelleri, tipik olarak, piksellerin gradyan bilgisi üzerinde bir enerji fonksiyonu tanımlar ve bu fonksiyonu minimize eden konturları bularak hücre sınırlarını tespit eder [4]. İşaretçi kontrollü su-seddi algoritmaları öncelikle hücre merkezlerine karşılık gelen



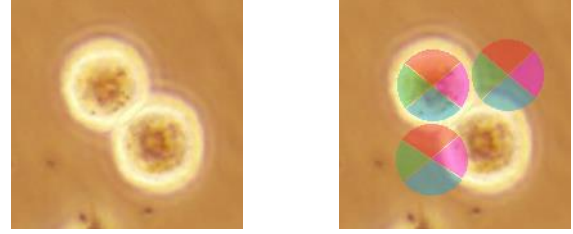
Şekil 1. Kato-3 hücre hattından alınan örnek hücre görüntüsü.

işaretçileri tanımlar ve bunları genişleterek hücreleri bölütler. İşaretçilerin tespit edilmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri, yoğunluk/gradyan değerleri üzerinde bölgesel minimumların (maksimumların) bulunmasıdır [5]. Bir başka çok kullanılan yöntem, görüntünün karşılık geldiği siyah-beyaz görüntü için ters uzaklık transformasyonunu hesaplayıp bunun üzerinde bölgesel maksimumları bulmaktır [6]. Ayrıca, siyah-beyaz görüntü üzerinde iteratif morfolojik erozyon [7] ile işaretçi bulan yöntemler de bulunmaktadır.

Bu çalışmamızda, yeni bir işaretçi kontrollü su-seddi algoritması sunulmaktadır. Bu algoritma, işaretçilerinin tespiti için gözetici öğrenmeye dayalı yeni bir yaklaşım önermektedir. Önerdiğimiz bu yaklaşımda, görüntü piksellerinin her biri için komşu piksellerin yoğunluk ve gradyan değerlerine bağlı öznelikler tanımlanmış ve bu öznelikleri kullanan bir sınıflandırıcı ile pikseller işaretçiye ait ya da değil şeklinde iki sınıfa ayrılmıştır. Bu yaklaşımın, önceki çalışmalardan ana farkı şudur: sınıflandırıcı, işaretçilere (hücre merkezlerine) karşılık gelen piksellerin özneliklerini eğitim örnekleri üzerinde öğrenir ve bu suretle işaretçilerin, görüntü karakteristiklerini daha iyi yansıtmaya olanak sağlar. Bu ise, bölütlemeye daha yüksek başarımların elde edilmesine imkan verir. Ayrıca, bu çalışmamızda, piksellerin gösterimi için yoğunluk ve gradyan tabanlı öznelikler tanımlanmıştır. Bu tanımlamada, her bir pikselin komşu pikselleri alınmış, komşu pikseller yön bilgisine göre dört gruba ayrılmış ve her bir grupta yer alan komşu piksellerin ortalama yoğunluk ve gradyan değerleri ilgili pikselin gösteriminde kullanılmıştır. Komşu piksellerin gruplanarak kullanılması ile elde edilen özneliklerin yüksek bölütleme başarımları verdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, deneyler, Kato-3 hücre hattından alınan toplam 1954 hücre üzerinde gerçekleştirilmiştir; bu hücrelere ait örnekler Şekil 1'de verilmiştir. Deneysel çalışmalarda elde edilen görsel ve nicel sonuçlar, önerdiğimiz bu yaklaşımın, diğer işaretçi kontrollü su-seddi algoritmalarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir.

II. YÖNTEM

Önerdiğimiz yöntem başlıca üç basamaktan oluşur. İlk basamakta, her bir görüntü pikseli için yoğunluk ve gradyan tabanlı öznelikler çıkarılır. Sonraki basamakta, bu öznelikleri kullanan bir sınıflandırıcı ile pikseller,



Şekil 2. Üç piksel için, komşu piksellerin gruplandırması: Burada, üst, sol, alt ve sağ komşuluklar, kırmızı, yeşil, mavi ve pembe ile gösterilmiştir.

işaretçiye ait ya da değil şeklinde ikiye sınıflandırılır ve işaretçiye ait pikseller işlenerek su-seddi algoritmasında kullanılacak işaretçiler tespit edilir. En son olarak, bir önceki basamakta tespit edilen işaretçiler, su-seddi algoritması ile genişletilerek hücreler bölütlenir. Bu basamakların detayları aşağıda verilmiştir.

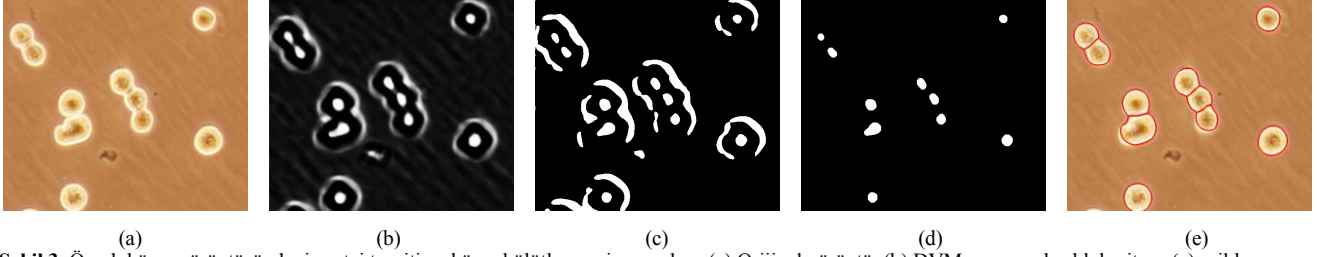
A. Öznelik Tanımlanması

Piksellerin nicelenmesi için yoğunluk ve gradyan tabanlı 12 tane öznelikten faydalanılmıştır. Bu amaçla, her bir piksel üzerinde, bu pikseli merkez alan r yarıçaplı disk şeklinde bir pencere oturtulmuş ve bu pencere içinde kalan pikseller merkez pikseli ile yaptıkları açıya göre dörde gruplanmıştır. Şekil 2'de de gösterildiği üzere, bu gruplar; sırasıyla $[\pi/4, 3\pi/4)$, $[3\pi/4, 5\pi/4)$, $[5\pi/4, 7\pi/4)$ ve $[7\pi/4, \pi/4)$ aralığında bulunan üst, sol, alt ve sağ komşu pikselleridir. Daha sonra, her bir grup için, bu grupta yer alan komşu piksellerin ilgili gri seviye değerleri kullanılarak üç farklı öznelik tanımlanmıştır. Bunlar; yoğunluk değer ortalaması, yatay Sobel filtresi ile bulunan gradyan ortalaması ve dikey Sobel filtresi ile bulunan gradyan ortalamasıdır.

Öznelik çıkarılmasında, pikselleri penceredeki konumlarına/yönlerine göre gruplandırılmadığı ana motivasyon, kullanılan canlı hücre görüntülerinin karakteristiğini daha iyi yansıtabilme ve bu şekilde daha etkin öznelikler tanımlayabilmektir. Şekil 1'de görüldüğü gibi, Kato-3 hücre hattından alınan hücrelerin iç kısımları genellikle daha koyu, sınırları ise daha parlaktır. Dolayısıyla, hücre merkezinden alınan P pikseli için, üst komşu piksellerinin dikey gradyan ortalamasının negatif değerinde, yatay gradyan ortalamasının ise sifıra yakın olması beklenir. Benzer şekilde, hücre merkezinden alınan bu P pikseli için, alt komşu piksellerinin dikey gradyan ortalamasının pozitif değerinde, yatay gradyan ortalamasının ise yine sifıra yakın olması beklenir. Benzer durumlar sağ ve sol komşuluklar için de düşünülebilir. Öte yandan, hücre sınırından ya da arka plandan alınan pikseller için, komşu pikselleri benzer özellik göstermez. Bu nedenle, tanımladığımız bu özneliklerin, pikselleri, hücre merkezlerine de karşılık gelen işaretçi ya da değil sınıflandırmasında kullanılabilacağı öngörülmüştür.

B. İşaretçilerin Tespiti

İşaretçilerin tespiti iteratif bir algoritma kullanılarak yapılır. Her iterasyonda, öznelik çıkarmak için kullanılan



Şekil 3. Örnek hücre görüntüsünde, işaretçi tespiti ve hücre bölütlenmesi aşamaları: (a) Orijinal görüntü, (b) DVM sonucu olasılık haritası, (c) eşikleme sonucu işaretçi pikselleri, (d) maske kullanılarak elde edilen işaretçiler ve (e) işaretçilerin su-seddi ile genişletilmesi ile bulunan hücre sınırları.

pencerenin r yarıçap değeri farklı alınır ve aşağıda anlatılacak işlemler tekrarlanarak işaretçiler bulunur. Daha sonra, farklı iterasyonlarda bulunan işaretçiler birleştirilir ve nihai işaretçi kümesi elde edilir. Bu basamakta, iteratif bir yaklaşım kullanma nedenimiz, görüntüde farklı büyüklükte hücrelerin yer alabilmesidir. Bu nedenle, farklı yarıçaptaki pencerelerin kullanılması, farklı büyüklükteki hücrelere karşılık gelen işaretçilerin daha iyi tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

Her bir iterasyonda, pikseller, seçilen pencere ile çıkarılan özneliklerine göre sınıflandırılır. Bunun için, bu öznelikler üzerinde çalışan bir doğrusal çekirdekli destek vektör makinesi (DVM) kullanılır. Ancak, DVM ile elde edilen sınıflamanın yerine, bu sınıflandırma sonucu elde edilen işaretçi olma ardıl olasılıklarından faydalanılır. Bu olasıklar eşiklenerek işaretçi pikselleri tespit edilir; eşik değerinin hesaplanmasında Otsu yöntemi kullanılır. Bu aşamada, işaretçi olma olasılığının en az olduğu piksellerin elenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle, DVM ile elde edilen sınıfların yerine olasılıkların kullanılması yoluna gidilmiştir. Bu şekilde, hücre merkezlerine karşılık gelen daha çok işaretçi pikselin bulunması sağlanmıştır. Öte yandan, bu kullanım, özellikle hücre dışında kalan ve hücre sınırlarına yakın alanlarda da yanlış işaretçi piksellerin bulunmasına yol açar. Bu yanlış pozitiflerin elenmesi, hesaplanan bir maske yardımıyla yapılır. Öncelikle, bu maskenin dışında kalan yanlış pozitifler elenir. Kalan pikseller üzerinde morfolojik açma işlemi uygulanır ve sonrasında işaretçi pikseller üzerinde bulunan bağlı bileşenler işaretçi olarak tespit edilir. Burada, önceki iterasyonlarda bulunan işaretçilere karşılık gelen pikseller ve bunların yakın çevre pikselleri gözönüne alınmaz.

Kullanılan maskenin hesaplanmasında, Kato-3 hücre hattının özelliklerinden faydalanılır. Şekil 1'de görüldüğü üzere, bu hücrelere ait pikseller, ya yoğunluk değeri yüksek parlak görünümündedir. Ayrıca, koyu piksellerin gradyan değerlerinin, arka plana göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, her bir P pikseli, I yoğunluk ve G gradyan değerine göre aşağıdaki şekilde üç gruba ayrılır. Burada, G gradyan değeri, yatay ve düşey Sobel filtrelerinin beraber kullanılması ile bulunan büyüklük değeridir. Kullanılan t_I ve t_G ise yoğunluk ve gradyan üzerinde Otsu yöntemi kullanılarak hesaplanan eşik değerlerine karşılık gelmektedir.

$$I \geq 0.4 \times t_I \text{ ise parlak}$$

$$I < 0.4 \times t_I \text{ ve } G \geq t_G \text{ ise koyu}$$

$$I < 0.4 \times t_I \text{ ve } G < t_G \text{ ise arkaplan}$$

Daha sonra, gruplanan piksellerdeki gürültünün azaltılarak daha iyi bir maskenin hesaplanması amacıyla, bu pikseller üzerinde çoğunluk filtresi uygulanır ve küçük bölgeler elenir. Son olarak, parlak ve koyu pikseller, bölgesel bölgeler olarak düşünümlere bir maske elde edilir. Elde edilen bu maske, ayrıca, bir sonraki basamakta da kullanılacaktır. Şekil 3(a)'da verilen örnek bir görüntü için hesaplanan olasılık haritası, bunun eşiklenmesi ile bulunan işaretçi pikselleri ve maskeleme ile elde edilen görüntüler, sırasıyla Şekil 3(b), 3(c) ve 3(d)'de verilmiştir.

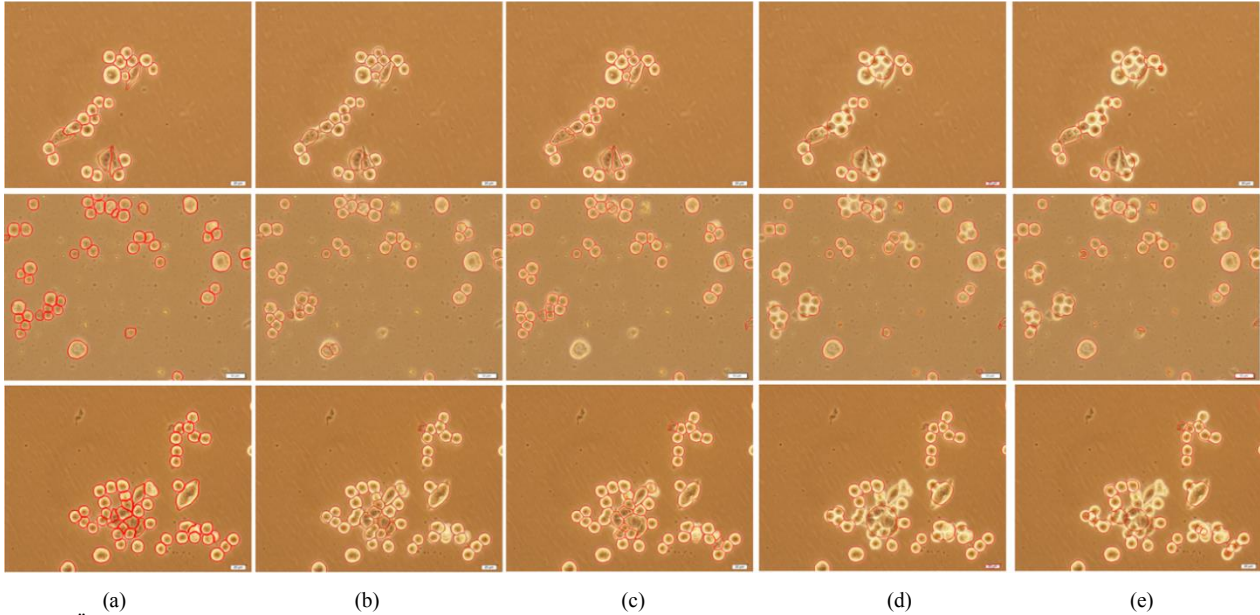
C. Hücre Bölütlenmesi

İşaretçi kontrollü su-seddi algoritması, verilen işaretçileri, belirlenen bir fonksiyona göre genişletir. Bu çalışmada, fonksiyon olarak, yukarıda anlatılan maske için hesaplanan ters uzaklık transformasyonu kullanılmaktadır. Hiçbir kısıta bağlı olmadan, tüm maske üzerinde yapılacak bu şekilde bir genişletme, işaretçi tanımlanamamış hücrelerin bulunması durumunda, hücre sınırlarının hatalı bulunmasına yol açar. Bundan dolayı, algoritmamızda, genişletme için bahsedilecek kısıt kullanılmıştır. Bu kısıtta, her bir işaretçi için, en yakın arka plan pikseli bulunur ve bu piksele olan uzaklığa bir ofset eklenerek, bu işaretçi için genişletme işlemi bu uzaklık ile sınırlandırılır. Bu basamak sonunda, elde edilen sonuçlar Şekil 3(e)'de resmedilmiştir.

III. DENEYSSEL SONUÇLAR

Deneyler, Kato-3 hücre hattından alınmış 44 görüntü üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüler, Olympus DP72 model dijital kamera ile 1360x1024 çözünürlükte alınmıştır. Bunlardan 10 görüntü (474 hücre) eğitim kümesine, kalan 34 görüntü (1480 hücre) ise test kümesine dahil edilmiştir.

Önerilen yöntem, işaretçi tespit aşamaları farklı olan üç su-seddi algoritması ile karşılaştırılmıştır. İlki, yoğunluk değerlerinin bölgesel minimumlarını işaretçi olarak alır. İkincisi, bir maske üzerinde ters uzaklık transformu hesaplar ve bunların bölgesel maksimumlarını işaretçi olarak alır. Her iki algoritma da, gürültüye karşılık gelebilecek fazladan işaretçilerin önlenmesi amacıyla h -minimum transformu ve maskeleme kullanır. Sonucusu ise, maske üzerinde koşullu morfolojik erozyon [6] işlemi uygulayarak işaretçileri bulur.



Şekil 4. Önerilen algoritma ve karşılaştırma yöntemleri için elde edilen görsel sonuçlar: (a) Manuel bölütleme, (b) gözetici öğrenme modeli, (c) yoğunluk tabanlı algoritma, (d) uzaklık tabanlı algoritma ve (e) koşullu morfolojik erozyon.

Algoritmaların görsel karşılaştırılması Şekil 4'te verilmiştir. Buradan, önerdiğimiz algoritmanın daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Ayrıca, test kümesi için nicel karşılaştırmalar da yapılmıştır. İlk olarak, işaretçiler hücreler ile eşlenmiş ve precision, recall ve F-skor metrikleri hesaplanmıştır (Tablo 1). Sonrasında, doğru bulunan işaretçilerin genişletilmesi ile elde edilen hücre sınırları üzerinde aynı metrikler hesaplanmıştır (Tablo 2). Bu tablolar, önerdiğimiz algoritmanın, karşıtlarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir.

	<i>Precision</i>	<i>Recall</i>	<i>F-skor</i>
Gözetici öğrenme modeli	0.88	0.81	0.85
Yoğunluk tabanlı algoritma	0.84	0.74	0.79
Uzaklık tabanlı algoritma	0.75	0.56	0.64
Koşullu morfolojik erozyon	0.64	0.53	0.58

Tablo 1. Bulunan işaretçilerin hücreler ile eşlenmesi neticesinde elde edilen nicel sonuçlar. Sonuçlar test kümesi üzerinde alınmıştır.

	<i>Precision</i>	<i>Recall</i>	<i>F-skor</i>
Gözetici öğrenme modeli	0.84	0.79	0.82
Yoğunluk tabanlı algoritma	0.82	0.66	0.73
Uzaklık tabanlı algoritma	0.59	0.47	0.52
Koşullu morfolojik erozyon	0.58	0.44	0.50

Tablo 2. Doğru bulunan işaretçilerin genişletilmesi ile elde edilen sınırlar için nicel sonuçlar. Sonuçlar test kümesi üzerinde alınmıştır.

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada, canlı hücre görüntülerinde bölütleme yapan bir işaretçi kontrollü su-seddi algoritması geliştirilmiştir. Bu algoritmada, işaretçilerin tespit edilmesi için gözetici öğrenme modeli kullanılması önerilmiştir. Bu modelde, her bir piksel için öznitelikler tanımlanmış ve bir sınıflandırıcı ile pikseller işaretçi ya da değil olarak belirlenmiştir. Kato-3 hücre hattı görüntüleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen görsel ve nicel sonuçlar, önerilen yöntem için umut vericidir.

Önerilen algoritma, işaretçilerin tespitinde yoğunluk ve gradyanları kullanma açısından, önceki çalışmamıza [8] benzerlik göstermektedir. Önceki bu çalışmamız, yoğunluk ve gradyanların eşiklenmesine ve elde edilen sonuçlar üzerinde kural tabanlı işaretçi tespitine dayanır. Bu işe, farklı hücre hatları için farklı eşik değerleri ve kurallar tanımlamayı gerektirebilir. Öte yandan, önceki çalışmadan farklı olarak, bu çalışmamızda önerdiğimiz algoritma, işaretçi tespitinde gözetici bir öğrenme modeli kullanır. Bunun işe, farklı hücre hatlarında daha kolay çalışabilme potansiyeli bulunmaktadır. Bunun, farklı hücre hatlarından alınmış görüntüler üzerinde araştırılması sonraki çalışma olarak planlanmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Chen X., et al., "Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy," *IEEE T. Biomed. Eng.*, 53: 762–766, 2006.
- [2] Topal C., Akinlar C., "Edge Drawing: A combined real-time edge and segment detector," *J. Vis. Com. Im. R.*, 23(6): 862–872, 2012.
- [3] Park M., et al., "Microscopic image segmentation based on color pixels classification," *Proc. of ICIMCS*, 53–59, 2009.
- [4] Zimmer C., et al., "Segmentation and tracking of migrating cells in video microscopy with parametric active contours: A tool for cell-based drug testing," *IEEE T. Med. Imaging*, 21: 1212–1221, 2002.
- [5] Fenistein D., et al., "A fast, fully automated cell segmentation algorithm for high-throughput and high-content screening," *Cytom. Part A*, 73: 958–964, 2008.
- [6] Cheng J., Rajapakse J.C., "Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function," *IEEE T. Biomed. Eng.*, 56: 741–748, 2009.
- [7] Yang X., et al., "Nuclei segmentation using marker-controlled watershed, tracking using mean-shift, and kalman filter in time-lapse microscopy," *IEEE T. Circuits Syst.*, 11: 2405–2414, 2006.
- [8] Koyuncu C.F., et al., "Smart marker for watershed-based segmentation," *PLoS ONE*, 7(11): e48664, 2012.