

# Автоматическое определение интенсивности деления клеток по снимкам с микроскопа

Д. А. Лаптев,

Факультет вычислительной математики и кибернетики МГУ  
laptev.d.a@gmail.com

## Аннотация

В статье рассматривается задача распознавания делящихся клеток на фотографии с микроскопа. Ее целью является определение числа клеток, которые находятся в стадии митоза (деления). Актуальность задачи вызвана необходимостью исследования благотворного влияния различных сред на интенсивность процесса деления. В процессе решения задачи были рассмотрены несколько распространенных методов, некоторые эвристики, были модифицированы алгоритмы свертки, бинаризации и анализа полученного бинарного изображения.

Ключевые слова: Свертка, бинаризация, учет информации о цвете, симметричность, выпуклая оболочка, разбиение связанных областей.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время задача выделения объектов на изображении является очень распространенной в самых различных областях. Проблема выделения клеток на изображении не является новой, существует большое число публикаций, посвященных выделению отдельных клеток, подсчету их числа, определению размеров, например, работа [1]. Все эти задачи успешно решаются с использованием методов свертки, бинаризации и геометрических преобразований.

Задача, которая рассматривается в данной статье, отличается от них тем, что необходимо учитывать и корректно распознавать очень маленькие объекты — почки. На ее примере рассмотрены несколько методов: пример работы с заданными формами объектов и учетом априорной информации (цвета). Одним из распространенных методов выделения объекта на фоне является алгоритм разреза графов [2], который учитывает априорную информацию. В данной статье рассмотрен иной подход, который учитывает цветовую информацию лишь косвенно.

Во второй и третьей частях статьи рассмотрены постановка задачи и ее особенности. Четвертая часть посвящена описанию алгоритма бинаризации изображения. В пятой части речь идет о выделении связанных областей и о сглаживании координат. В шестой части рассмотрены два алгоритма определения клеток с почками, основанные на анализе формы, а также рассмотрен вопрос обработки нескольких „слипшихся“ клеток.

## 2. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Задача распознавания клеток в состоянии митоза на изображении была поставлена для фотографий с микроскопа, сделанных в спектральном диапазоне. Основной целью является определение процента делящихся клеток (именно это число характеризует среду, благотворную для деления).

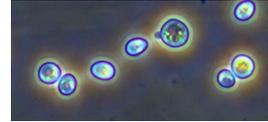


Рисунок 1: Исходное изображение

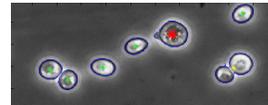


Рисунок 2: Распознанные области

На фотографиях клетки без почек в основном имеют форму, близкую к эллиптической и любой цвет от белого до темно-синего. Единственной цветовой характеристикой клетки является синий ореол вокруг нее, хотя наблюдаются частые исключения из этого правила. Клеткой в стадии митоза можно считать объект, похожий по форме на ассиметричную восьмерку, где одна часть (почка) меньше другой (рис. 2, клетка, помеченная красной звездочкой).

## 3. СПЕЦИФИКА ЗАДАЧИ

1. Размер данного изображения достаточно большой (2560 на 1920 пикселей), поэтому при выборе решения необходимо ориентироваться на быстродействие методов. При этом разрешение не может быть сильно уменьшено, так как уменьшение разрешения делает делящиеся клетки с небольшими почками неотличимыми от обычных клеток.
2. Клетки на фотографии, в среднем, являются маленькими объектами, на некоторых изображениях с микроскопа их число достигает 200 и более. При этом почки являются еще более мелкими объектами, поэтому их распознавание усложнено слабой детализацией изображения, несмотря на высокое разрешение фотографии.
3. Цветовая гамма и освещение могут меняться в зависимости от среды, в которой были сделаны фотографии.
4. На изображениях число клеток может различаться в несколько раз, что не позволяет использовать априорные знания об их количестве.

## 4. СВЕРТКА И БИНАРИЗАЦИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Одним из наиболее удобных способов представления изображения является бинарное изображение, которое и было использовано в задаче (см. также [3]). Чтобы состав-



Рисунок 3



Рисунок 4



Рисунок 5



Рисунок 6

вить бинарное изображение, необходимо разделить пиксели изображения на два класса: объект и фон. Одним из распространенных методов такого разделения является алгоритм свертки [4]. Идея заключается в том, чтобы в каждом пикселе посчитать модуль разности интенсивности цвета в этой точке и соседних с ней, а затем, подставив эти значения в неубывающую функцию, отсечь вычисленные значения по некоторому порогу: те пиксели, для которых значения окажутся больше порога — пометить объектом, остальные — фоном. В нашей задаче была выбрана следующая формула:

$$B_{i,j} = \begin{cases} 0, & \text{если } \max_{i_1, j_1 \in I} |A_{i,j} - A_{i_1, j_1}| < C_{edge}; \\ 1, & \text{иначе,} \end{cases}$$

$A$  — исходное изображение,  $B$  — бинарное изображение,  $I$  — область связности,  $C_{edge}$  — пороговое значение.

Чтобы избежать рваных контуров было принято решение выбрать в качестве множества  $I$  24-связную область (двойное кольцо вокруг пикселя). При выборе такого параметра выделенные границы могут получиться минимум три пикселя шириной и вероятность получить разрывный контур существенно снижается при адекватном выборе параметра  $C_{edge}$ .

Существуют методы автоматического определения порога для изображения в серых тонах на основе анализа гистограммы (см. работу [5]). К сожалению, в данной задаче этот метод применить нельзя: мы работаем не с изображением в явном виде, а с градиентом изображения, и если рассмотреть гистограмму значений градиента в точках по всему изображению, график получается монотонным и гладким. Таким образом, нужно найти другие методы определения порога.

Для начала, перейдем к порогу, равному отношению числа пикселей объекта к общему числу пикселей (обозначим это значение  $C_{percent}$ ). Обозначим гистограмму значений градиента через  $f(x)$ , тогда получим следующее взаимно однозначное соотношение:

$$C_{edge} : \int_0^{C_{edge}} f(x) dx = C_{percent}.$$

Введенное таким образом, значение  $C_{edge}$  легко вычисляется и позволяет отойти от оперирования абстрактными значениями и перейти к универсальному представлению порога через процент пикселей объекта. Зная значение  $C_{percent}$ , можно получить бинарное изображение — назовем это функцией вычисления границ по порогу.

Для корректного определения порога была использована информация о цвете границ клеток (они в большинстве случаев синие). Можно построить бинарное изображение по этому признаку: синие пиксели — объект, остальные — фон. Назовем последовательность этих действий функцией определения границ по цвету. Помимо рваных границ, проблема здесь возникает в том, что фоновые пиксели, отстающие на некоторое расстояние от клетки, также часто удовлетворяют этому условию, хотя они не принадлежат клеткам и их не надо учитывать (см. рисунок 4). Эта проблема решается вычитанием фона изображения, при этом интенсивность фоновых пикселей становится близка к нулю, а границы клеток остаются практически неизменными. Однако при реализации алгоритма был выбран другой вариант, который выигрывает в быстродействии:

1. Выбрать значение  $C_{percent}$  заведомо большим, чем процент пикселей-объектов на изображении.
2. Применить функцию определения границ по порогу (границы очень размазаны и много постороннего шума) — рисунок 3
3. Применить функцию определения границ по цвету (границы определяются немного рваными, пиксели фона частично относятся к объекту) — рисунок 4
4. Пересечь изображения, полученные двумя функциями, получив при этом первое приближение (фон почти отделяется, границы тонкие) — рисунок 5
5. Вычислить  $C_{percent}$  как отношение числа пикселей объекта к общему числу пикселей
6. Снова запустить функцию определения границ по порогу — рисунок 6

Полученное таким образом бинарное изображение практически не имеет шума на пикселях фона, а также имеет достаточно толстые границы, которые в большинстве случаев являются замкнутыми.

Кроме того, в процессе предобработки применяется алгоритм борьбы с мелким шумом, медианная фильтрация [6], которая позволяет избавиться от отдельных небольших выбросов.

## 5. ВЫДЕЛЕНИЕ СВЯЗНЫХ ОБЛАСТЕЙ И СГЛАЖИВАНИЕ

После того, как изображение бинаризовано, необходимо перейти к какому-либо признаковому пространству. В на-

шем случае признаковое пространство выбрано как координаты точек, составляющих границу связной области. Для выделения связных областей можно использовать метод, описанный, например, в работе [7]. Центр масс для удобства лучше смещать в начало координат и после этого переводить все координаты в полярные.

В силу специфики задачи, рассматриваются только те области, которые имеют нулевой уровень вложенности (области, вложенные друг в друга рассматриваются как шум — чаще всего это внутренние структуры клетки).

На практике полученные координаты непригодны для распознавания: изображение является массивом точек, поэтому координаты получаются дискретными и график сильно изломан. Борьба с этим можно, например, применив сглаживание или фильтрацию [8] с переменной шириной окна:  $WindowSize = \max\left(\frac{1}{4\pi}sl, \frac{l}{35}\right)$ , где  $s$  — минимальное отношение радиуса почки к радиусу клетки,  $l$  — число пикселей, составляющих границу, длина массива  $x$ . Численные параметры подобраны исходя из результатов работы алгоритма.

## 6. АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК И ПОЧЕК

Для определения на изображении клеток и почек необходимо в первую очередь проверить, является ли выделенный в связную область объект клеткой (возможно с почкой), шумом, или группой клеток, выделенных в одну связную область. Для этого проверяются следующие факты:

1. Лежит ли центр масс связной области за пределами выделенной области, или внутри. Если центр масс лежит за пределами выделенной связной области, связная область помечается шумом.
2. Превосходит ли размер связной области максимальный размер клетки. Если размер связной области больше размера максимальной клетки — это скорее всего несколько клеток, объединенных в одну связную область.
3. Минимальный размер клетки превосходит размер связной области. Если он окажется больше размера минимальной клетки — это шум.
4. Наконец для всех оставшихся областей, проверяется наличие у них элемента, напоминающего клетку и почку. Остановимся на этом подробнее ниже.

Для определения клетки и почки у нее, после проверки нескольких методов на эффективность было отобрано два метода, которые показали лучшие результаты.

Первый метод заключается в том, чтобы построить выпуклую оболочку (вычислительно эффективный алгоритм приведен в книге [9]), а далее анализировать отклонения от нее. Если граница связной области является приближенной к выпуклой оболочке, скорее всего это отдельная клетка и этот случай можно легко выявить. Параметром в данном случае является максимальное допустимое значение невязки. Далее, некоторая последовательность точек, в которых отклонение от выпуклой оболочки ненулевое (точки не входят в выпуклую оболочку), анализируется следующим образом: если кривизна на этом участке больше некоторой величины, зависящей от длины границы связной области, а длина промежутка

больше радиуса минимальной клетки (и меньше радиуса большей клетки), то область помечается как клетка с почкой:

$$\left| \sum_{k=i+1}^j \left( \rho_k - \rho_i + \frac{k-i}{j-i} (\rho_i - \rho_j) \right) \right| > Cl,$$

$$j - i \geq R_{min}, j - i \leq R_{max},$$

$$i, j : i \in L, j \in L, \forall k (i < k < j) : k \notin L,$$

$L$  — выпуклая оболочка,  $l = \text{len}(\rho)$ ,  $C = \text{const}$ .

Тем не менее, метод не всегда подходит из-за того, что не всегда корректно определяются границы клетки, а также из-за дискретности координат границы.

Чтобы компенсировать некоторые недостатки первого метода, используется второй метод, идея которого очень проста, но действенна. Выделенные границы проверяются на симметричность: фактически, проверяется несколько точек границы (в реализации алгоритма 32), имеющих угловую координату  $\phi$  в промежутке от 0 до  $\pi$ , для каждой из них находится точка с угловой координатой  $2\pi - \phi$ . Для них оценивается разница в координатах  $\rho$ , если она больше, чем размер минимальной клетки, умноженной на некоторую константу, и кроме того для двух соседних точек (уже с меньшим шагом, например, 64) разница также больше, область помечается как клетка с почкой:

$$\exists i = 0, \dots, 31 : \rho_{\text{ind}\left(\frac{\pi+i}{32}\right)} \geq cl,$$

$$\rho_{\text{ind}\left(\frac{\pi+i-1}{64}\right)} \geq cl,$$

$$\rho_{\text{ind}\left(\frac{\pi+i+1}{64}\right)} \geq cl,$$

$$l = \text{len}(\rho), c = \text{const},$$

$$\text{ind}(\phi) = \underset{k}{\text{argmin}} |\phi_k - \phi|.$$

Особенность метода в том, что нередко он определяет две спаренные клетки как одну, или как клетку с почкой, так как очертания спаренных клеток могут быть достаточно симметричны. Устранить этот недостаток достаточно просто: область не является клеткой с почкой, если  $\frac{\max(\rho)}{\min(\rho)} > C = \text{const}$ .

После всех проделанных этапов, нераспознанными остаются только большие связные области. Одним из вариантов их обработки является выделение их с меньшим порогом на этапе выделения границ. В этом случае алгоритм выделения границ оставит границы более тонкими и некоторые спаренные клетки, возможно, будут выделены алгоритмом в разные области. При этом нет необходимости пересчитывать все изображение, только его части, которые содержат нераспознанные области.

Другой способ состоит в последовательном приближении области двумя эллипсами, тремя, и так далее, пока их число не превысит максимального заданного (или зависящего от площади) значения, или пока они не приблизят область с достаточной точностью. Проводить эту процедуру можно, например, с помощью EM-алгоритма [10]. Можно свести задачу распознавания отдельных клеток на одной связной области к задаче разделения смеси двумерных нормальных распределений: сгенерировать точки, несколько удаленные от границы, выделенной алгоритмом, а затем по ним восстановить плотность, не учитывая при этом граничные точки.

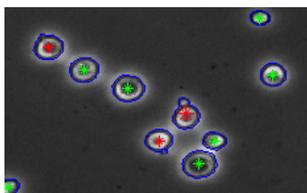


Рисунок 7

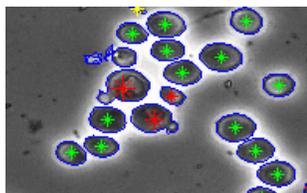


Рисунок 8

## 7. ВЫВОДЫ

В статье рассмотрена задача распознавания клеток и клеток в состоянии митоза на фотографии. Данная задача решена с помощью последовательного применения методов, каждый из которых был модифицирован с учетом ее специфики: алгоритм свертки, бинаризация с учетом цветовой компоненты, выделение связанных областей, фильтрация и отсеивание шума. Для анализа наличия почек проведены проверки на симметричность и отклонения от выпуклой оболочки. Кроме того, рассмотрены пути обработки сгустков клеток, отнесенных в одну связную область. Итоговый алгоритм допускает на изображениях с общим числом клеток около ста примерно одну-две ошибки первого и второго рода — точность, сравнимая с ручным подсчетом.

Возможные дальнейшие пути работы над этой задачей:

1. Учет априорной информации о форме объектов для улучшения алгоритма выделения границ [11], а также учет информации о цвете, например, модификация алгоритмов разреза графов, на примере, изложенном в работе [12].
2. С другой стороны, расширение класса фотографий, с которыми может работать алгоритм (например, анализ фотографий, снятых в других цветовых режимах).
3. Реализация упомянутых выше способов обработки сгустков клеток из одной связной области.

## 8. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность И. В. Володяеву за предоставленные материалы, Д. П. Ветрову и Д. А. Кропоткову за предоставленные идеи и поддержку в решении задачи. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 08-01-00405.

## 9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Yingying Deng Qingmin Liao, “An accurate segmentation method for white blood cell images,” *Biomedical Imaging*, pp. 245–248, 2002.

- [2] Vladimir Kolmogorov Yuri Boykov, “An experimental comparison of min-cut/max-flow algorithms for energy minimization in vision,” *EMMVCPR*, pp. 359–374, 2001.
- [3] Pietikäinen M. Mäenpää T. Ojala, T., “Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 2002.
- [4] D. Ziou and S. Tabbone, “Edge detection techniques an overview,” *International Journal of Pattern Recognition and Image Analysis*, , no. 8(4), pp. 537–559, 1998.
- [5] Tony Lindeberg, “Edge detection and ridge detection with automatic scale selection,” Technical report ISRN KTH NA/P-96/06-SE, 1996.
- [6] Ben Weiss, “Fast median and bilateral filtering,” Technical report Shell & Slate Software Corp., 2006.
- [7] Игнатенко А. В. Баяковский Ю. М., “Машинная графика. Курс лекций,” <http://graphics.cs.msu.ru/courses/cg>, 2008.
- [8] James V. Herod Evans M. Harrell II, “Linear methods of applied mathematics,” <http://mathphysics.com/pde/>, 1994.
- [9] Р.Ривест К.Штайн Т. Кормен, Ч. Лейзерсон, “Алгоритмы. Построение и анализ,” 1999.
- [10] Christopher M. Bishop, “Pattern recognition and machine learning,” 2006.
- [11] Florian Tischhäuser Daniel Cremers, “Diffusion snakes: Introducing statistical shape knowledge into the mumford-shah functional,” *International Journal of Computer Vision*, , no. 50(3), pp. 295–313, 2002.
- [12] Yuri Boykov Vladimir Kolmogorov, “From photohulls to photoflux optimization,” *ICCV*, 2005.

## ОБ АВТОРАХ

Лаптев Дмитрий — студент 3-го курса кафедры математических методов прогнозирования ВМК МГУ им. М.В.Ломоносова. E-mail: laptev.d.a@gmail.com

## ABSTRACT

In the article the problem of finding dividing cells on the photos is observed. The point is to find out the number of cells in the state of mitosis. The reason is that it is necessary to explore what environment is better for the cell's rate of division. While solving this task few methods were observed, some heuristic algorithms were developed, convolution and binarisation algorithms were modified. To analyse the binary image different approaches were used, the combination of them made up the resulting algorithm.