

Artur BAL

POLITECHNIKA ŚLĄSKA, INSTYTUT AUTOMATYKI – CENTRUM BIOTECHNOLOGII,
ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice

Wybrane metody poprawy wyników segmentacji obiektów w postaci skupisk na przykładzie obrazów kometowych

Dr inż. Artur BAL

Absolwent Politechniki Śląskiej, gdzie pracuje na stanowisku adiunkta w Instytucie Automatyki. Jego zainteresowania badawcze dotyczą m.in. zagadnień związanych z akwizycją, przetwarzaniem i analizą obrazów oraz kalibracją kolorymetryczną urządzeń pozyskujących (w szczególności kamer) i reprodukcujących (monitory i projektory) obrazy. Jest kierownikiem Laboratorium Wizualnej Archiwizacji Cyfrowej działającego w Instytucie Automatyki Politechniki Śląskiej.



e-mail: artur.bal@polsl.pl

Streszczenie

W pracy przedstawiono metody poprawy wyników segmentacji obiektów w postaci skupisk. Poprawa jakości segmentacji dla takich obiektów może być uzyskana m.in. poprzez odpowiednie połączenie filtracji dolnoprzepustowej (np. filtracji medianowej) z metodami pozwalającymi na określenie przynależności poszczególnych obszarów uzyskanych po segmentacji wybraną metodą do obszarów wynikowych reprezentujących obiekty interesujące z punktu widzenia celu segmentacji (w pracy zastosowano w tym celu operację morfologicznego zamknięcia oraz metodę grafową wykorzystującą koncepcję minimalnego drzewa rozpinającego). W pracy zwrócono także uwagę na możliwość poprawy wyników segmentacji poprzez wyznaczenie otoczki wypukłej rozpiętej na obszarach spełniających określone wymagania. Wyniki działania opisanych metod przedstawiono na przykładzie poprawy wyników segmentacji obrazów otrzymanych w wyniku jednokomórkowej elektroforezy żelowej.

Słowa kluczowe: analiza obrazów, segmentacja obrazów, binaryzacja obrazów, filtracja obrazów, operacje morfologiczne, obrazy kometowe.

Selected methods for improvement of image segmentation of cluster-structured objects on an example of comet assay images

Abstract

This paper deals with the problem of segmentation of cluster-structured objects, that is the objects which are formed by a set of unconnected elements smaller than the object. Images representing such objects are very difficult for segmentation. A good example of cluster-structured objects are "comet" images from Single Cell Gel Electrophoresis (comet assay). In the analysis of comet assay images a pivotal role plays the detection of comet regions - the comet region is formed by unconnected fragments of DNA (Fig. 1) which originate from the same cell nucleus. Because those regions are not solid, the usage of standard segmentation methods leads to poor results (Fig. 2). Pre- and post-processing methods can be used for improvement of segmentation results. Some of them are presented in the paper. The aim of the work was not the selection of the best improvement method of the comet assay segmentation results but the presentation of different approaches which could be used in the case of segmentation of this kind of objects. The first presented method is based on the idea of artificial removing of connectivity lack - this is done by the usage of a low-pass filter with large window before segmentation (Fig. 3). The next method uses the morphological closing for assignment of regions r_i to the metaregion R_k which represent one comet (Fig. 4). For improving R_k shape the idea of convex hull spanned on $r_i \in R_k$ is used (Fig. 5). In this method the assignment condition is enclosed in structuring elements - because of limitations of the discrete space, in which the structuring element is defined, there are also some limitations of conditions which can be used. This drawback does not exist in the last of the presented method which uses the conception of the minimum spanning tree for assignment of regions r_i to R_k . In this method the segmentation result is represented by graph G , whose vertexes v_i represent regions r_i , and length d_{ij} of edge e_{ij} between vertexes v_i and v_j is equal to the closest distance between pixels of r_i and r_j (distances d_{ij} in general case can be variously defined). In G the minimum

spanning trees T_k are searched, such that $\forall e_{ij} \in T_k : d_{ij} \leq \varepsilon$, then for each T_k its convex hull is created - it defines the region of comet K_p (Fig. 6).

Keywords: image analysis, image segmentation, image binarization, image filtering, morphological operations, comet assay images.

1. Wstęp

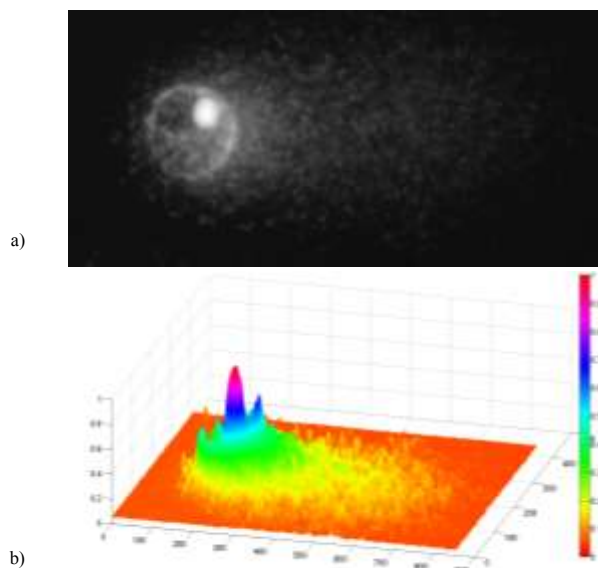
Informacja obrazowa jest ważnym, a w niektórych przypadkach jedynym źródłem danych o analizowanych obiektach lub procesach. W celu pozyskania danych obrazu lub ich sekwencja muszą być poddane procesowi analizy, a etapem warunkującym jego prawidłową realizację jest segmentacja obrazów. Celem segmentacji jest wydzielenie w obrazie fragmentów, określanych mianem obszarów (ang. *image regions*), które są interesujące z punktu widzenia danego zastosowania. W idealnym przypadku znalezione w obszary o_i powinny odpowiadać rzeczywistym obiektom O_r , jednak osiągnięcie tego celu jest zazwyczaj bardzo trudne nawet dla stosunkowo prostych obrazów. Dużymi utrudnieniami w prawidłowej realizacji tak rozumianej segmentacji są m.in.:

- duże zróżnicowanie cech pikseli, które powinny należeć do tego samego obszaru,
- małe zróżnicowanie cech pikseli, które powinny należeć różnych sąsiadujących ze sobą obszarów,
- obecność tekstur w obrazach,
- brak spójności między pikselami, które powinny zostać wydzielone z obrazu jako jeden obszar.

Występowanie tych zjawisk powoduje, że segmentacja obrazów zwykle jest prowadzona jako proces przynajmniej dwuetapowy. Typowym schematem działania zgodnym z takim podejściem jest rozwiązanie, w którym pierwszym etapem jest właściwa segmentacja, a drugim jest proces poprawy uzyskanych wyników tzw. przetwarzanie końcowe. Najczęściej spotykanym przykładem takiego procesu jest usuwanie nadsegmentacji (ang. *oversegmentation*) tzn. nadmiarowego podziału obrazu na obszary. Proces przetwarzania końcowego polega w tym przypadku na przyłączeniu, zgodnie z pewnymi przyjętymi regułami, nieprawidłowo wydzielonych obszarów do sąsiadujących z nimi obszarów, które zostały uznane za prawidłowo wyznaczone [1].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie metod - zarówno przetwarzania wstępnego, jak i przetwarzania końcowego - prowadzących do zmniejszenia nadsegmentacji, które można wykorzystać do poprawy wyników segmentacji obrazów przedstawiających obiekt lub obiekty w postaci skupisk - obiekty te są celem analizy i znajdują się na tle nie mającym znaczenia z punktu widzenia celu analizy.

Dla zilustrowania różnic wynikających ze stosowania poszczególnych metod wyniki ich stosowania przedstawiono dla obrazów pochodzących z jednokomórkowej elektroforezy żelowej (ang. *single cell gel electrophoresis*) - metoda ta nazywana jest także testem kometowym (ang. *comet assay*), a uzyskane obrazy (ze względu na swoje wizualne podobieństwo do komet w kosmosie) nazywane są obrazami kometowymi - przykładowy obraz tego typu przedstawia rysunek 1. Test kometowy jest uznana i szeroko stosowaną metodą oceny ilości wystąpień dwuniciowych uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach, które zostały poddane działaniu czynników uszkadzających takich jak np. promieniowanie jonizujące [4-6]. Ocena stopnia uszkodzenia pojedynczej komórki polega na określeniu ilości DNA, które pod wpływem pola elektrycznego znalazło się poza jej jądrem. Na podstawie oceny stopnia uszkodzenia wielu komórek w ramach danej próbki dokonuje się oceny całego testu kometowego.



Rys. 1. Przykładowy obraz kometowy (a) oraz jego przestrzenne przedstawienie w pseudokolorach - oś OZ reprezentuje poziomy szarości oryginalnego obrazu po ich unormowaniu do zakresu $(0,1)$

Fig. 1. Example of comet assay image (a) and its pseudo colour 3D representation - Z-axis represents grey level value of the original images normalised to the range $[0,1]$

Ocena stanu komórek zazwyczaj przeprowadzana jest na podstawie oceny wizualnej przez odpowiednio przeszkoloną osobę podczas obserwacji komórek przez mikroskop fluorescencyjny. Wadami takiego sposobu oceny są m.in. niska dokładność i powtarzalność oraz duże zróżnicowanie wyników oceny realizowanej przez różne osoby, trudność w przy porównywaniu wyników testów kometowych otrzymanych w różnym czasie lub w różnych ośrodkach. Z tego względu coraz częściej do oceny wyników testu kometowego wykorzystywane są rozwiązania bazujące na komputerowym przetwarzaniu i analizie cyfrowych obrazów komet.

W przypadku komputerowej oceny obrazów kometowych dużym problemem jest określenie obszaru pojedynczej komety czyli obszaru zajmowanego przez DNA pochodzące z jądra danej komórki - w dalszej części pracy problem ten określany jest mianem *segmentacji obrazów kometowych*. W przypadku idealnej segmentacji tego typu obrazów każda kometka jest reprezentowana przez jeden spójny obszar a na obrazie wynikowym występują jedynie obszary reprezentujące komety. Trudność w realizacji tego zadania wynika bezpośrednio z cech tych obrazów, a zwłaszcza z braku wyraźnej granicy między obszarem tła i obszarem komety. Granica ta, w ogólnym przypadku, ma postać grup pikseli reprezentujących fragmenty DNA między którymi znajdują się grupy pikseli reprezentujące tło - problem przenikających się obszarów tła i komety jest dobrze widoczny na rysunku 1b. Negatywny wpływ tego zjawiska nasila wraz ze zwiększaniem powiększenia optycznego stosowanego podczas akwizycji obrazów komet.

2. Segmentacja obrazów kometowych

Ze względu na własności obrazów kometowych (jasny obiekt na ciemnym tle) oraz szybkość działania do segmentacji obrazów kometowych najczęściej stosowane są metody bazujące na idei przydziału pikseli $p(i,j)$ obrazu wejściowego I do jednej z dwóch klas $\{c_1, c_2\}$ reprezentujących odpowiednio tło oraz obiekty na podstawie progowania poziomów szarości $I(i,j)$ tych pikseli. Wynikiem tego procesu jest obraz binarny

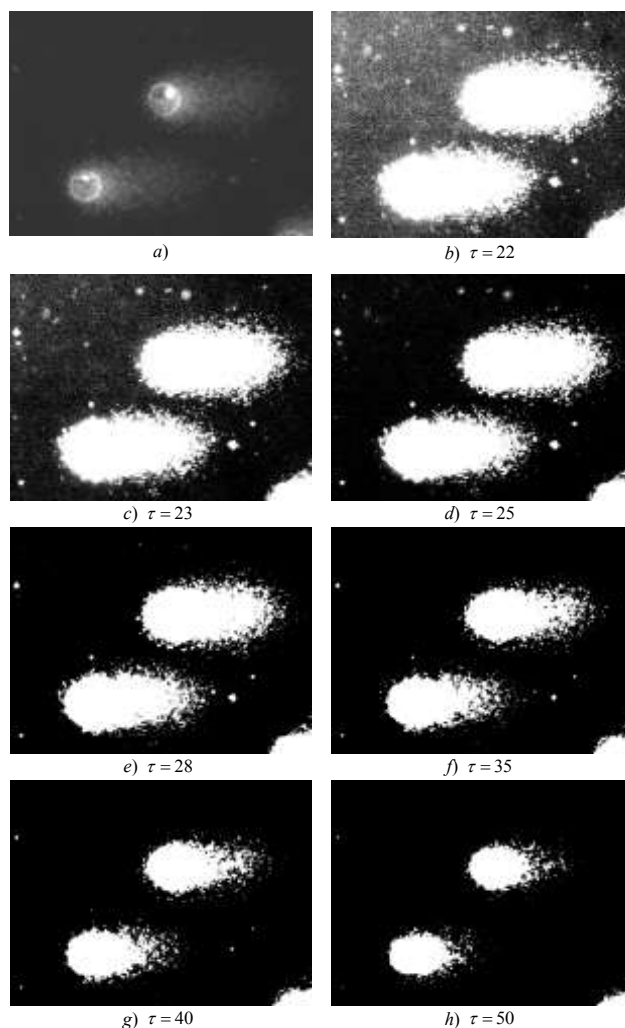
$$B(i,j) = \begin{cases} c_1 & \text{gd}y \ I(i,j) < \tau(i,j) \\ c_2 & \text{gd}y \ I(i,j) \geq \tau(i,j) \end{cases}$$

gdzie wartość τ jest tzw. progiem binaryzacji. W pracy przedstawiono wyniki dla wartości τ stałej dla całego obrazu (binaryzacja globalna). Ponadto na potrzeby wizualizacji wyników przyjęto $c_1 = 0$ i $c_2 = 1$ dla unormowanej skali poziomów szarości $(0,1)$.

Na rysunku 2 przedstawiono przykładowe wyniki binaryzacji pewnego obrazu kometowego (rys. 2a) dla różnych wartości globalnego progu τ . Cechą szczególną uzyskanych wyników jest brak spójności między grupami pikseli, które reprezentują fragmenty DNA należące do tej samej komety - z punktu widzenia celu segmentacji jest to efekt niepożądany. Taki brak spójności wynika wprost z faktu, że poszczególne komety są skupiskami - w tym przypadku skupiskami fragmentów DNA pochodzącymi z tego samego jądra komórkowego - a nie obiektami spójnymi. Zdecydowana większość metod segmentacji nie jest przystosowana do segmentacji obiektów w postaci skupisk i ich stosowanie dla obiektów takich jak komety da podobne wyniki jak te uzyskane w efekcie zastosowania progowania.

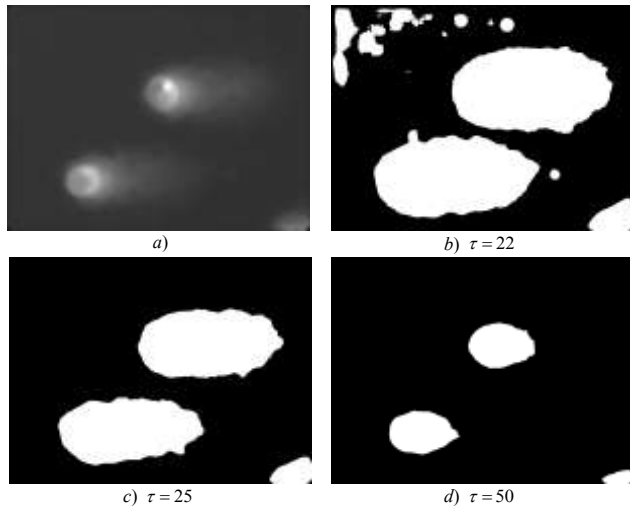
3. Metody poprawy jakości segmentacji obrazów kometowych

Aby za pomocą metod segmentacji przeznaczonych do segmentacji obiektów spójnych uzyskać wynik pożądaný z punktu widzenia oceny obrazów kometowych można zastosować jedno z dwóch podejść. Podejście pierwsze polega na zapobieganiu wystąpienia nadsegmentacji poprzez sztuczną likwidację w segmentowanym



Rys. 2. Wyniki binaryzacji obrazu kometowego (a) dla różnych wartości progu binaryzacji τ (b-h), wartości τ podano dla 8-bitowej skali szarości

Fig. 2. Results of binarization of comet assay image (a) obtained for different values of the binarization threshold τ (b-h), threshold values are given for 8-bit greyscale



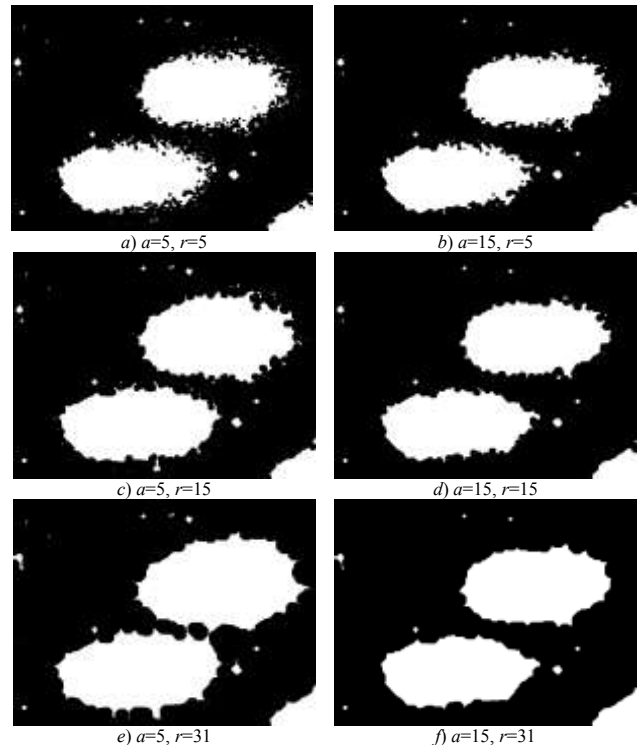
Rys. 3. Wyniki binaryzacji obrazu kometowego z rysunku 2a) po filtracji medianowej z oknem 51×51 (a) dla różnych wartości progu binaryzacji τ (b–d), wartości τ podano dla 8-bitowego kodowania skali szarości

Fig. 3. Examples of binarization results of comet assay image 2a) after usage of median filter with window size 51×51 (a) for different values of the binarization threshold τ , threshold values are given for 8-bit greyscale

obrazie braku spójności między grupami pikseli reprezentującymi fragmenty DNA - efekt ten można osiągnąć np. poddając obraz filtracji dolnoprzepustowej z odpowiednio dużą maską. Przykładowy wynik zastosowania takiego podejścia do obrazu z rysunku 2a) przedstawiono na rysunku 3. - binaryzacja w tym przypadku została poprzedzona filtracją medianową z oknem o wymiarach 51×51 pikseli (oznaczymy to rozwiązanie jako METODA 1.). W celu pozostawienia na obrazie jedynie obszarów reprezentujących komety konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych operacji np. usuwania z obrazu obszarów o zbyt małej powierzchni.

Podejście drugie jest realizowane w ramach przetwarzania końcowego i polega na usuwaniu nadsegmentacji poprzez łączenie poszczególnych obszarów w większe obszary (niekoniecznie spójne) lub też ich usuwanie. Ze względu na to, że poszczególne obszary po segmentacji obrazów kometowych nie sąsiadują ze sobą (są oddzielone od siebie obszarem reprezentującym tło) standardowe metody usuwania nadsegmentacji (np. takie jak opisane w [1]) są nieprzydatne. W przypadku braku spójności między łączonymi obszarami (co zachodzi dla obrazów kometowych) jako kryterium łączenia obszarów można przyjąć odległość geometryczną w przestrzeni obrazu między tymi obszarami.

Wygodnym narzędziem pozwalającym na realizację tego celu jest wykorzystanie operacji morfologicznych [2] np. w postaci operacji morfologicznego zamknięcia. Ze względu na możliwość występowania w wyniku segmentacji dużej liczby bardzo małych, w tym również 1-pikselowych, obszarów zastosowanie operacji morfologicznej powinno zostać poprzedzone filtracją, której celem jest usunięcie z obrazu obszarów będących wynikiem zaszumienia obrazu (podobny wynik da zastosowanie filtracji przed segmentacją). Przykładowe wyniki zastosowania filtracji medianowej, a następnie morfologicznego zamknięcia przedstawia rysunek 4 (METODA 2.). Podobnie jak w przypadku wyników z METODY 1. (rys. 3) w celu pozostawienia w obrazie wynikowym jedynie obszarów reprezentujących komety konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych operacji, w wyniku których usunięte zostaną z obrazu obszary nie reprezentujące komet. Filtracja medianowa została przeprowadzona dla okna $a \times a$ pikseli, dla $a \in \{5, 15\}$. Jako maskę operacji morfologicznego zamknięcia przyjęto przybliżenie koła w przestrzeni dyskretnej - za elementy maski przyjmowano piksele, dla których odległość d od ich środka do środka maski spełniała warunek $d \leq r$, gdzie $r \in \{5, 15, 31\}$. Rozmiar maski jest parametrem wpływającym na to jak duży fragment obrazu wokół kolejnych obszarów jest traktowany jako część przynależna do jednego obszaru. Wielkość okna filtracji wpływa natomiast na wielkość obszarów usuwanych z segmentacji oraz na kształt konturów obszarów.



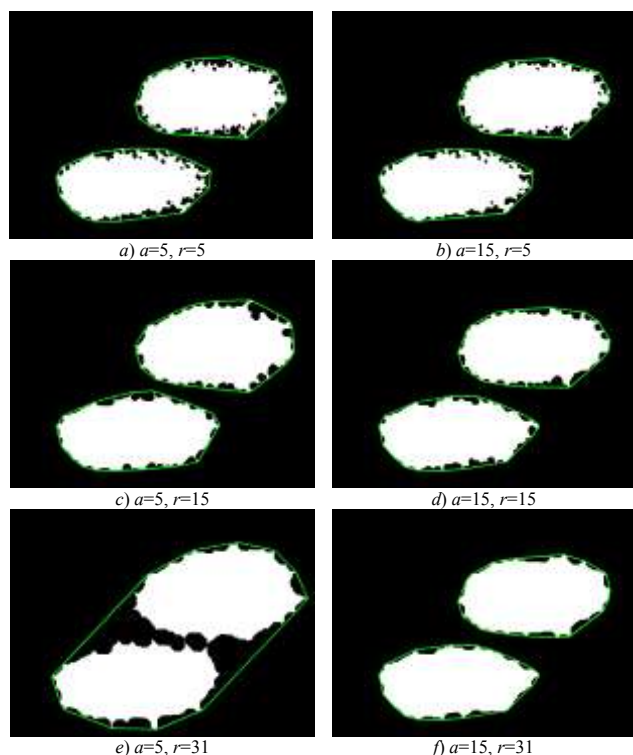
Rys. 4. Wyniki binaryzacji obrazu z rysunku 2a) uzyskane dla sekwencji operacji: progowanie z progiem $\tau = 25$, filtracja medianowa z oknem o wymiarach $a \times a$, morfologiczne otwarcie z maską w postaci koła średnicy r pikseli

Fig. 4. Examples of binarization results of comet assay image 2a) for sequence of operation: binarization with $\tau = 25$, median filtering with window size $a \times a$, morphological closing with disk shape mask with diameter r pixels

Wadą tej metody jest trudność uzyskania (nawet dla dużych wartości a) łagodnego przebiegu konturów obszarów r_i . Problem ten można rozwiązać przyjmując za obszar komety K_j obszar R_j wyznaczony przez otoczkę wypukłą (ang. *convex hull*) rozpiętą na obszarze r_i spełniającym warunki uznania go za obszar reprezentujący komety. Rezultaty zastosowania takiego podejścia dla obrazów z rysunku 4. przedstawiono na rysunku 5. W celu pozostawienia na obrazach jedynie obszarów reprezentujących komety z obrazów zostały usunięte obszary r_i , których pole $a_i \leq 25000$.

Stosowanie operacji morfologicznych do realizacji łączenia obszarów na podstawie ich odległości geometrycznej wiąże się z pewnymi niedogodnościami wynikającymi m.in. z faktu wykorzystywania przestrzeni dyskretnej oraz równoległej realizacji operacji dla wszystkich obszarów. Przykładem takiej niedogodności jest trudność (szczególnie dla małych wartości) dokładnego przełożenia wymaganego warunku geometrycznego w postaci odległości między obszarami na maskę stosowaną przy realizacji operacji morfologicznej.

Problemy takich pozbawiona jest METODA 3. wykorzystująca podejście zaproponowane w pracy [3]. W rozwiązaniu tym obraz po segmentacji O jest reprezentowany przez graf G , którego wierzchołki v_i reprezentują obszary r_i , natomiast wagi d_{ij} przypisane do krawędzi e_{ij} tego grafu reprezentują odległość między obszarami r_i i r_j . Graf G jest grafem pełnym dzięki czemu zawiera on informacje o odległości d_{ij} dla $\forall \{r_i, r_j\} \in O$. W celu wyznaczenia obszarów r_i , które powinny zostać połączone w G poszukiwane są minimalne drzewa rozpinające T_k , takie że długość krawędzi $e_{ij} \in T_k$ spełnia warunek $d_{ij} \leq \varepsilon$. Każde takie drzewo reprezentuje jeden metaobszar $R_k = \{r_i : v_i \in T_k\}$. W celu wyznaczenia kształtu obszaru R_k i tym samym kształtu komety wyznaczana jest otoczka wypukła rozpięta na obszarach $r_i \in R_k$.



Rys. 5. Poprawa kształtu obszarów reprezentujących komety poprzez rozpięcie otoczek wypukłych na obszarach r_i spełniających określone warunki (w tym przypadku $a_i \leq 25000$, gdzie a_i to pole powierzchni obszaru r_i), danymi wejściowymi procedury są wyniki przedstawione na rysunku 4

Fig. 5. Improvement of the shape of comet regions obtained by the spanning of convex hulls on regions r_i fulfilling specific conditions (in this case $a_i \leq 25000$, where a_i is area of region r_i), the results presented Fig. 4 are the input data for this procedure

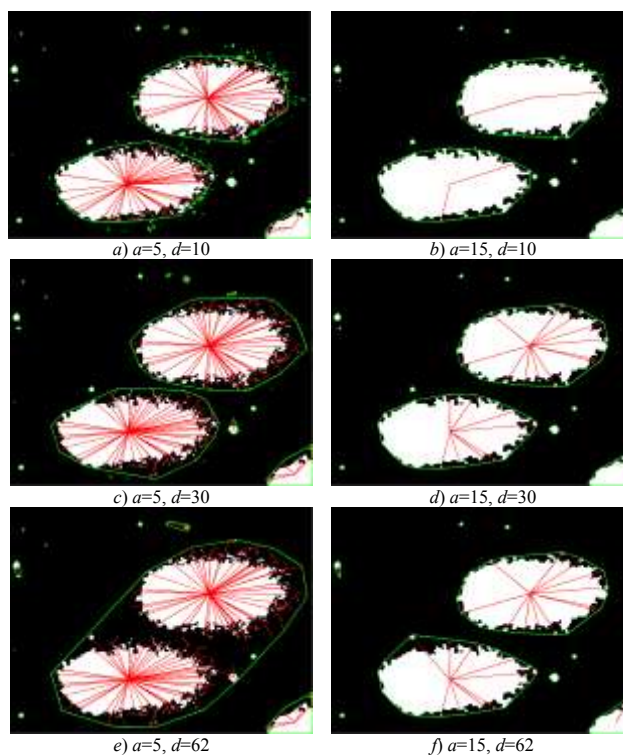
Rozwiązanie to pozwala na pełną dowolność np. w wyborze metryki zastosowanej do wyznaczania odległości między obszarami, co więcej wartości d_{ij} mogą uwzględniać nie tylko odległość geometryczną między r_i i r_j , ale również różnice np. średnich poziomów szarości tych obszarów lub ich powierzchni. Kosztem płaconym za taką elastyczność jest zwiększona w stosunku do METOD 1. i 2. złożoność obliczeniowa.

Przykładowy wynik zastosowania tej metody do poprawy wyników segmentacji obrazów kometowych przedstawia rysunek 6. W celu lepszego porównania z wynikami prezentowanymi na rysunkach 4. i 5. jako graniczną wartość d przyjęto $\varepsilon = 2r$ - co wynika tego, że przy stosowaniu operacji morfologicznych łączone są obszary, które znajdują się w odległości nie większej niż $2r$ co jest konsekwencją równoległego stosowania operacji morfologicznych dla wszystkich obszarów. Wartości d_{ij} reprezentują geometryczne odległości (w tym przypadku wykorzystano klasyczną odległość euklidesową) między obszarami, rozumiane jako odległość między najbliższymi pikselami odpowiednich obszarów.

4. Podsumowanie

W pracy przedstawiono metody jakie mogą być zastosowane do poprawy wyników segmentacji, otrzymanych dowolną metodą, obiektów w postaci skupisk (jako przykład przedstawiono ich zastosowanie do poprawy wyników binaryzacji). Metody te można także wykorzystać do poprawy niektórych błędów segmentacji obiektów spójnych.

Z punktu widzenia wykorzystania poszczególnych metod najważniejszymi różnicami między nimi są złożoność obliczeniowa oraz możliwy zakres wpływu przez użytkownika na przebieg ich działania. Jeżeli we wszystkich metodach stosowana jest ta sama metoda filtracji to największą złożonością obliczeniową charakteryzuje się METODA 3. Miejsce pozostałych metod w takim rankingu uzależnione jest od przyjętych parametrów tych metod tzn. wielkości okien filtracji oraz maski operacji morfologicznej. Dużą zaletą METODY 3. w porównaniu do METOD 1. i 2., jest natomiast jej elastyczność w zakresie możliwo-



Rys. 6. Wyniki poprawy segmentacji przy wykorzystaniu podejścia grafowego (bez usuwania obszarów nie reprezentujących komet): zielone kontury - obszary wynikowe, linie czerwone - krawędzie drzew rozpinających, białe obszary - dane wejściowe (z rys. 4)

Fig. 6. Results of segmentation improvement by the usage of graph approach (without removing regions not representing comets): green contours - resulting regions, red lines - edges of spanning trees, white regions - input data (from Fig. 4)

ści dostosowania działania metody do potrzeb wynikających z cech zadania. Wynika to m.in. z możliwości definiowania w tej metodzie odległości między obszarami nie tylko na podstawie ich położenia w obrazie, ale także na podstawie innych cech tych obszarów.

Istotną cechą różniącą METODĘ 3. od obu pozostałych metod jest także sposób realizacji procesu łączenia obszarów - w METODZIE 3. jest on sekwencyjny, a w przypadku METOD 1. i 2. łączenie obszarów realizowane jest równoległe. Zaletą sekwencyjnej realizacji tego procesu jest m.in. możliwość dołączania obszarów w dowolnej zdefiniowanej kolejności np. według ich malejącej wielkości (takie kryterium odpowiada malejącemu znaczeniu poszczególnych obszarów z punktu widzenia ich wpływu na wynik analizy obrazu). Takich możliwości nie ma w przypadku, gdy łącznie odbywa się równoległe.

Praca częściowo finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu N N518 283640.

5. Literatura

- [1] Palus H.: Przetwarzanie końcowe w segmentacji obszarowej obrazów barwnych, *Przegląd Elektrotechniczny*, vol. 84, s. 96–99, 2008.
- [2] Soille P.: *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*, Springer-Verlag New York, wyd. 2, 2003.
- [3] Bal A.: Grafowa metoda segmentacji obiektów w postaci skupisk na przykładzie obrazów kometowych, *PAK*, vol. 58, s. 313–315, 2012.
- [4] Olive P. L., Włodek D., Banáth J. P.: DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis, *Cancer Research*, vol. 51, s. 4671–4676, 1991.
- [5] Rojas E, Lopez M. C., Valverde M.: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 722, s. 225–254, 1999.
- [6] Collins A. R.: The comet assay for DNA damage and repair, *Molecular Biotechnology*, vol. 26, s. 249–261, 2004.