

Wojciech Bieniecki*, Artur Gródecki*, Szymon Grabowski*,
Katarzyna Kościelska-Kasprzak**, Dominika Drulis-Fajdasz**,
Oktawia Mazanowska**, Marian Klinger**

Zastosowanie algorytmu hit-miss do segmentacji barwnych obrazów mikroskopowych w badaniu metodą ELISPOT

1. Wprowadzenie

Celem badań naukowych, prowadzonych przez zespoły: Katedry Informatyki Stosowanej Politechniki Łódzkiej oraz Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu, jest zaprojektowanie systemu do automatycznej analizy obrazów mikroskopowych metodą ELISPOT. Metodę ELISPOT opisano szczegółowo w [6, 7]. Zasadniczo analiza preparatów w metodzie ELISPOT dotyczy przetwarzania obrazów monochromatycznych; algorytmy przetwarzania wstępnego, segmentacji oraz analizy morfologicznej obiektów zostały opublikowane w naszych wcześniejszych pracach [9, 10]. Zbudowano system komputerowy SpotView, który umożliwia automatyczną lub półautomatyczną analizę obrazów w metodzie ELISPOT. W skład systemu wchodzi algorytmy wykrywania obszaru zainteresowania (ROI), algorytmy przetwarzania wstępnego dla obrazów monochromatycznych, algorytmy segmentacji obrazów monochromatycznych oraz algorytmy analizy ilościowej obrazu. W niniejszej pracy zaprezentowano podejście do segmentacji obrazu barwnego wykorzystujące transformację „trafi-nie trafi” (*Hit-Miss*, HM).

Transformacja HM jest bazową binarną operacją morfologiczną i najczęściej jest używana do wyszukiwania w obrazie specyficznych układów pikseli obiektów i tła [8]. Za pomocą tej transformacji możliwe jest wyszukiwanie w obrazie obiektów o różnych kształtach lub jednego obiektu o różnej orientacji na płaszczyźnie.

Według [5] HM jest jedną z najszybszych operacji logicznych zapewniających porównywanie pikseli pierwszoplanowych i tła maski ze zbiorami pikseli obrazu. Jednakże ma ona tendencję do błędnego działania w przypadku obrazów zaszumionych, gdyż wymaga idealnego dopasowania wszystkich punktów pierwszego i drugiego planu wzorca i obrazu.

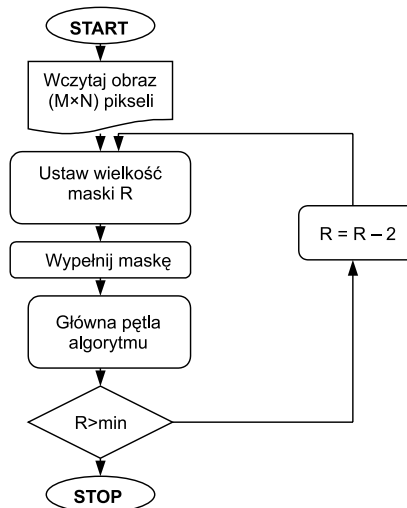
* Katedra Informatyki Stosowanej, Politechnika Łódzka

** Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Istnieje wiele sposobów wykorzystania tej techniki do wyszukiwania wzorów. W pracy [2] uzyskano odporność na zakłócenia używając tylko pikseli brzegowych obiektu i tła lub tylko ich szkieletów jako elementu strukturalnego. Wilson [3] zautomatyzował etap projektowania maski poprzez wprowadzenie procesu uczącego, w celu znalezienia najmniejszego podzbioru pikseli, który osiągnie pożądaną poziom dyskryminacji. Kraus i in. [4] wygenerowali nieliczny zbiór elementów strukturalnych, poprzez progowanie pojedynczego przypadku figury w skali odcieni szarości. Kluczowym zadaniem tej metody jest dobranie odpowiedniego progu tolerancji. Jeżeli tolerancja jest zbyt duża, to podzbiór masek będzie za ubogi i zablokuje zdolność dyskryminacyjną. Jeżeli natomiast tolerancja jest zbyt mała, nietypowe przypadki wzorca występującego w obrazie będą pomijane. W pracy [1] zastosowano nieco inne podejście; zgromadzono dane kilku przypadków figury i poddano ich sumę progowaniu w celu wygenerowania związanych elementów strukturalnych. Następnie zostały wydobyte z nich wzorce wielopikselowe używane do skonstruowania klasyfikatora.

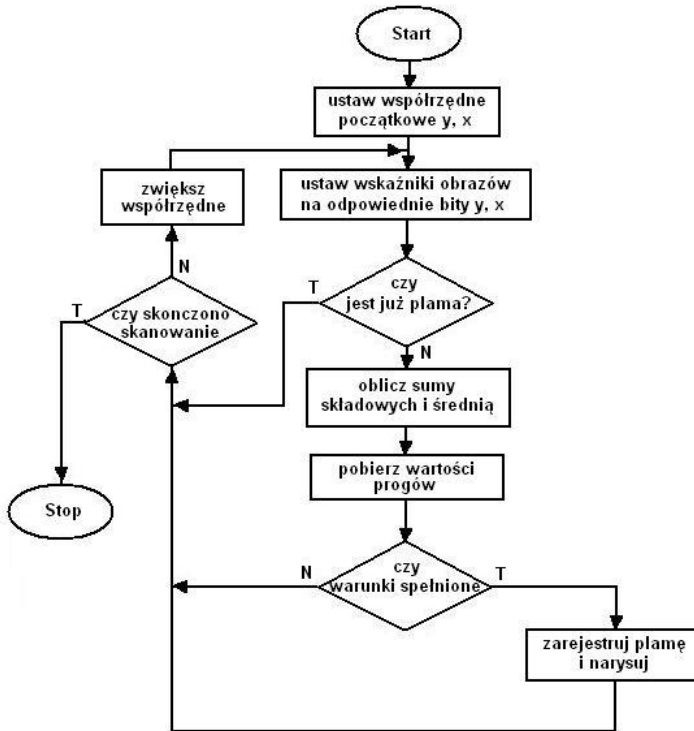
2. Opis algorytmu

W niniejszej pracy zaproponowano modyfikację założeń HM umożliwiającą implementację algorytmu dla obrazów monochromatycznych oraz barwnych. Ze względu na fakt, że poszukiwane obiekty są plamkami o określonych parametrach morfologicznych takich jak: zakres koloru, zakres wielkości, kolisty kształt – możliwe jest zaprojektowanie odpowiednich masek oraz warunków trafienia oraz nietrafienia w poszukiwany obiekt. Aby wykryć plamy o różnych średnicach (dla badanych obrazów 6–60 pikseli), zastosowano algorytm wieloprzebiegowy (rys. 1). W każdym przebiegu obraz skanowany jest maską o malejącym rozmiarze.



Rys. 1. Schemat głównego algorytmu funkcji

suma wartości wszystkich jego barw składowych. Dla każdej lokalizacji maski sumowana jest wartość każdej składowej dla każdego piksela, a następnie wyznaczana jest średnia wartość tych sum: osobno dla pikseli obiektu (pod jedynkami) i dla pikseli tła. Te dwie wartości są porównywane następnie z wartościami progowymi i podejmowana jest decyzja.



Rys. 3. Schemat algorytmu zasadniczej pętli funkcji

Wartości progowe są ustalane lokalnie dla każdego położenia maski na podstawie średniej wartości sum składowych barwy każdego punktu maski. W ten sposób poprawiono odporność algorytmu na nierównomierny rozkład jasności tła.

Tabela 1
Wartości średnie składowych pikseli tła i plamy

Składowa	Punkt tła (jasny)	Punkt plamy (ciemny)
Czerwona	249	167
Zielona	204	105
Niebieska	113	84

Tabela 2 przedstawia zależności, przyjętych wartości progów od przedziałów średniej jasności wszystkich pikseli pod maską (Avg). Oprócz porównywania sumowanych barw z progami, zastosowane zostały tzw. punkty kontrolne (oznaczone na rys. 2 symbolem „3”). Aby detekcja zakończyła się pozytywnie, wartości pikseli punktów kontrolnych muszą być mniejsze od progu barwy dla plamy, zwiększonego o 6% swojej wartości. Wielkość tę nazywamy marginesem punktów kontrolnych.

Tabela 2
Progi jasności dla plamy i tła

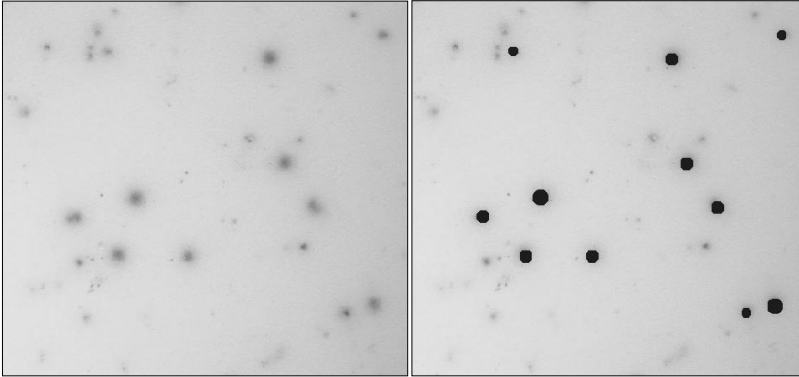
Przedział lokalnej sumy – Avg		Wartość progu	
OD	DO	Plama	Tło
	180	0	0
180	250	Avg – 12	Avg + 8
250	300	Avg – 15	Avg + 10
300	350	Avg – 17	Avg + 10
350	400	Avg – 18	Avg + 12
400	460	Avg – 20	Avg + 12
460	510	Avg – 24	Avg + 12
510	570	Avg – 22	Avg + 10
570	630	Avg – 22	Avg + 10
630		Avg – 24	Avg + 10

Na podstawie wyznaczonych progów oraz średnich wartości sum barw dla maski podstawowej i dodatkowej podejmowana jest decyzja, czy punkty pod maską spełniają kryteria plamy. Jeżeli tak, plama jest rejestrowana i następuje przesunięcie maski. Jeżeli nie, rejestracja plamy zostaje pominięta. Algorytm kończy działanie po przeskanowaniu całego obrazu.

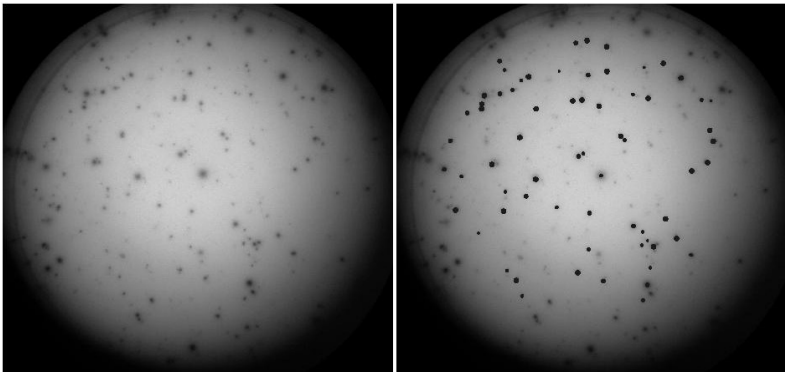
3. Dyskusja właściwości algorytmu

Algorytm został zbadany pod kątem skuteczności działania, a także szybkości skanowania. Z racji największego nacisku na – ocenianą subiektywnie – dokładność odwzorowania plamek, początkowo przeprowadzono segmentację obrazów o równomiernym i nierównomiernym oświetleniu. Na rysunku 4 przedstawiono równomiernie oświetlony obraz źródłowy i wynik działania algorytmu na nim. Rysunek 5 przedstawia natomiast obraz nierównomiernie oświetlony. Jak wynika z przedstawionych rysunków, algorytm rozpoznaje plamy przy różnym oświetleniu, ale tylko do pewnej lokalnej wartości granicznej jasności

obrazu. Jeżeli obraz jest zbyt ciemny lokalnie, różnice w barwach między tłem a obiektem są zbyt małe, aby wykryć plamę. Zdjęcia z rysunków 4 i 5 skanowane były przy mało restrykcyjnych parametrach, tj. niskich wartościach progów lokalnych dla barwy obiektu oraz dużym marginesie progów dla pikseli kontrolnych.



Rys. 4. Równomiernie oświetlony obraz i wynik jego segmentacji

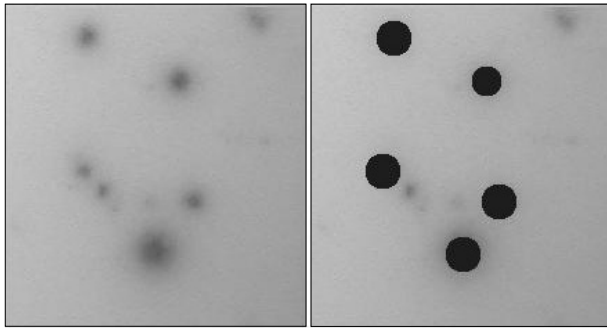


Rys. 5. Nierównomiernie oświetlony obraz i wynik jego segmentacji

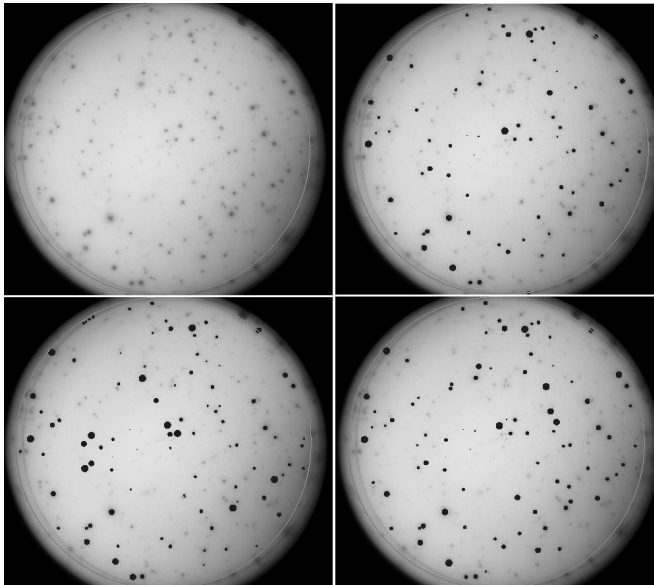
Takie ustawienia parametrów umożliwiają wykrywanie niezbyt ciemnych, ale wyróżniających się na jasnym tle plam. Niestety, wpływają one niekorzystnie na nieco ciemniejsze miejsca, rejestrowane są tam zwykle większe plamy, niż pozwoliłaby na to percepcja plamy przez człowieka. Sytuację tę dobrze przedstawia rysunek 6. Plama zarejestrowana najbliżej lewej krawędzi wycinka ma faktycznie zdecydowanie mniejszą średnicę.

Chcąc uniknąć efektu „nadmiernego rozmiaru”, ograniczono margines dla pikseli kontrolnych do 104% progów plamy, co z kolei spowodowało pomijanie jaśniejszych plam na jasnym tle. Rysunek 7 przedstawia wynik skanowania jednego obrazu przy wykorzysta-

niu różnych wartości marginesu jasności pikseli kontrolnych i różnych progów lokalnych dla tła i plamy. Górny lewy obraz (rys. 7) to zdjęcie źródłowe, górny prawy przedstawia zdjęcie przetworzone za pomocą standardowych ustawień progów lokalnych i standardowym marginesie punktów kontrolnych. Zarejestrowano na nim 85 plam. Dolny lewy (rys. 7) przetworzono przy zmniejszonych progach lokalnych, lecz również zmniejszonym marginesie kontrolnym do 104% i wykryto 94 plamy. Natomiast prawy dla standardowych progów, lecz przy zwiększonym marginesie punktów kontrolnych do 108%, zawiera 93 zarejestrowane plamy i nie wykazuje efektu „nadmiernego rozmiaru”.

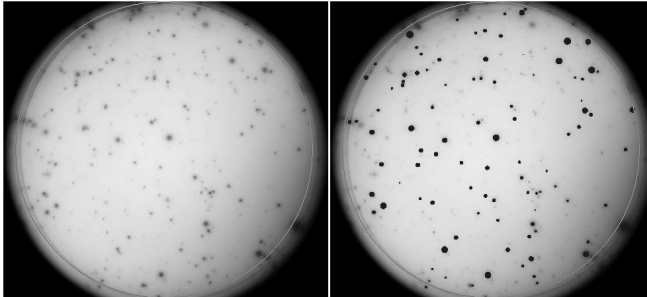


Rys. 6. Wykrywanie nadmiernego rozmiaru plam



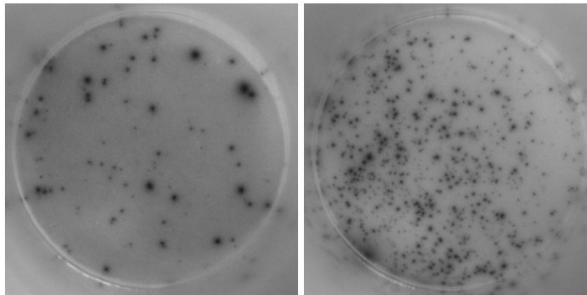
Rys. 7. Wyniki segmentacji dla różnych wartości progów

Z testów tych wynika, iż obniżanie progów i zwiększanie marginesu punktów kontrolnych wpływa na większą czułość na jasne plamy, lecz pojawia się problem zwiększonego rozmiaru. Zwiększanie wartości progów i zmniejszanie marginesu kontrolnego powoduje zmniejszenie czułości algorytmu i pomijanie plam o mniejszym kontraście. Najlepsze wyniki otrzymano dla progów jasności przedstawionych w tabeli 1 i marginesu punktów kontrolnych równego 108% progu jasności plam.



Rys. 8. Obraz poddany obróbce wstępnej i wynik jego segmentacji

Wstępna obróbka zdjęć może znacznie poprawić efektywność metody. Rysunek 8 przedstawia wynik segmentacji obrazu, który uprzednio został poddany operacji zwiększenia kontrastu i usunięcia szumu. Plamy są bardziej wyraźne (ciemne), natomiast tło uległo rozjaśnieniu, co spowodowało większą przejrzystość obrazu i lepsze efekty segmentacji. Wykryto o 10% więcej plamek w porównaniu z obrazami niepoddanymi wstępnej obróbce.

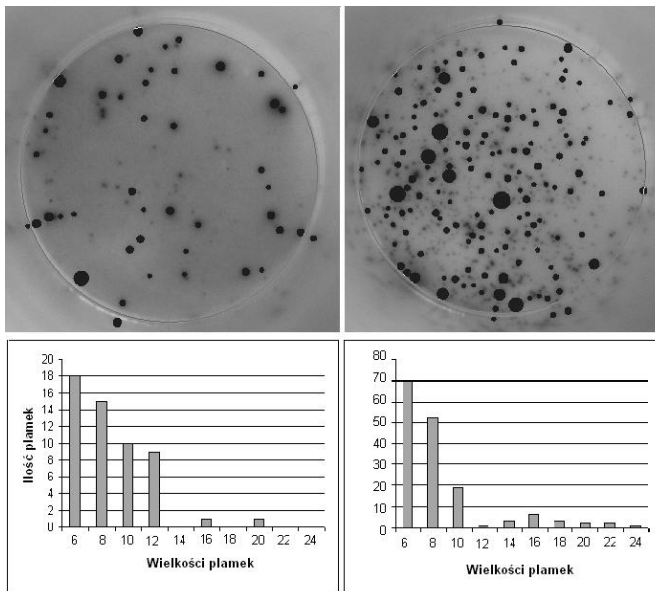


Rys. 9. Zdjęcia o różnej charakterystyce plamek
Objaśnienia w tekście

Istotny wpływ na jakość segmentacji ma również zakres zmienności rozmiaru maski skanującej. Należy odpowiednio dopasować ten zakres według charakterystyki badanego obrazu. Na rysunku 9 przedstawione są dwa zdjęcia o różnej charakterystyce występujących na nich plamek. Zdjęcie (rys. 9 po lewej stronie) zawiera większe plamki, lecz

w mniejszej ilości, natomiast zdjęcie (rys. 9 po prawej stronie) – dużą liczbę małych plamek. Rezultaty skanowania powyższych obrazów maską o promieniu z zakresu 6–24 pikseli przedstawiono na rysunku 10.

Rysunek 10 zawiera również wykresy statystyk wykrytych plamek o różnych rozmiarach. Wynika z niego, że podany zakres średnicy maski jest odpowiedni tylko dla lewego obrazu. Na prawym obrazie błędnie zostały zinterpretowane gęste skupiska plamek. Wykryto znacznie więcej plam, ale wiele małych zostało jeszcze pominiętych.

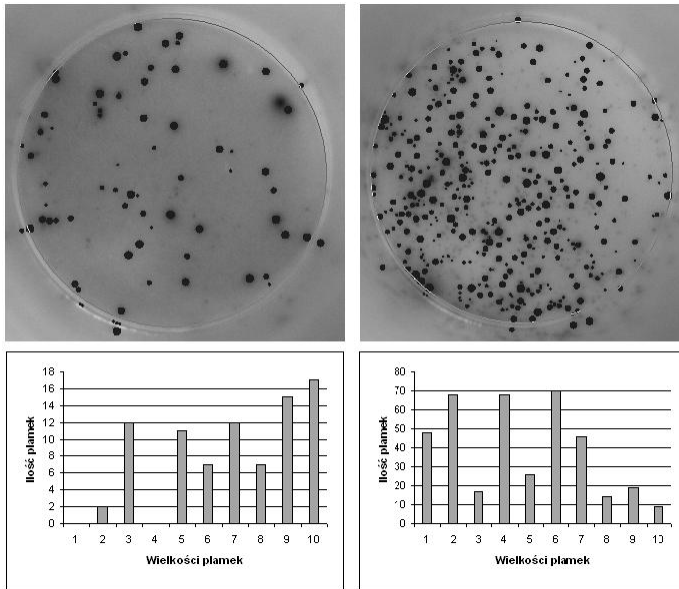


Rys. 10. Rezultaty skanowania maską o promieniu 6–24 pikseli

Rysunek 11 przedstawia wyniki skanowania tych samych obrazów, lecz maską o promieniu 1–10 pikseli. Liczba iteracji również wynosiła 10. Rezultaty skanowania przy mniejszych maskach są zdecydowanie lepsze. W przypadku prawego obrazu wykryto niemalże dwukrotnie większą liczbę plamek. Na lewym obrazie również wykryto więcej plam niż w przypadku wcześniejszych ustawień. Pominięta została tylko jedna – największa. Należy również zwrócić uwagę na czas skanowania. Dla większych masek skanowanie obrazów 1129×1160 pikseli trwało 101 s, a dla mniejszych masek 32 s.

Testy wydajnościowe przeprowadzone zostały na dwóch konfiguracjach sprzętowych:

- I – Celeron D 352 (3.2 GHz), 256 MB RAM;
- II – Celeron 433 MHz, 160 MB RAM.



Rys. 11. Rezultaty skanowania maską o promieniu 1–10 pikseli

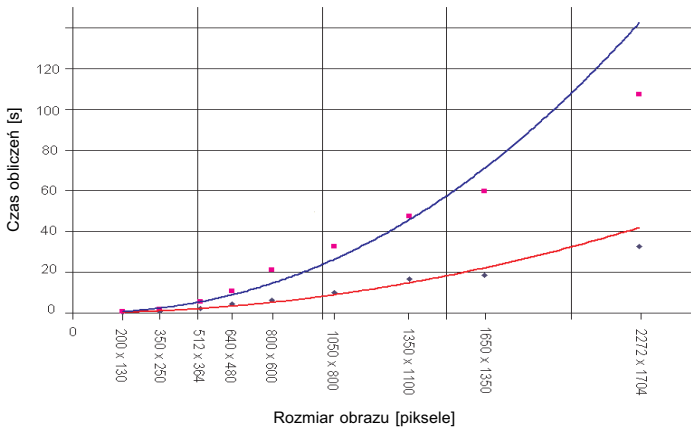
Tabela 3
Zależność czasu obliczeń od rozmiaru obrazu

Rozmiar obrazu		Czas skanowania	
[piksele]		[s]	
Szerokość	Wysokość	Konfiguracja I	Konfiguracja II
2272	1704	82	268
1650	1350	46	149
1350	1100	42	119
1050	800	25	82
800	600	16	53
640	480	11	27
512	364	6	14
350	250	2	5
200	130	0,7	1,5

W tabeli 3 zestawione zostały wyniki testów wydajnościowych w formie czasów skanowania obrazu w zależności od jego rozmiarów.

Rysunek 12 przedstawia te same wyniki w postaci wykresu (na wykresie linia trendu czasów pracy komputera I przebiega wyżej). Można zauważyć, iż wraz ze wzrostem roz-

miarów obrazu rośnie kwadratowo czas obliczeń wykonywanych przez maszynę. Dotyczy to w równej mierze obydwu maszyn testowych. Na różnicę czasów wykonywania algorytmu przez komputery wpływa nie tylko częstotliwość taktowania procesora i rozmiar pamięci operacyjnej, ale również dodatkowo wprowadzone w nowszym procesorze (konfiguracja I) funkcje i technologie. Algorytm badano również pod kątem reakcji na różne przesunięcia maski. Ustalano różne przesunięcie pionowe i poziome (od 1 do 3 pikseli), mierzono czas obliczeń i badano skuteczność działania algorytmu dla obrazu. Wyniki przedstawiono w tabeli 4 oraz na rysunku 13.

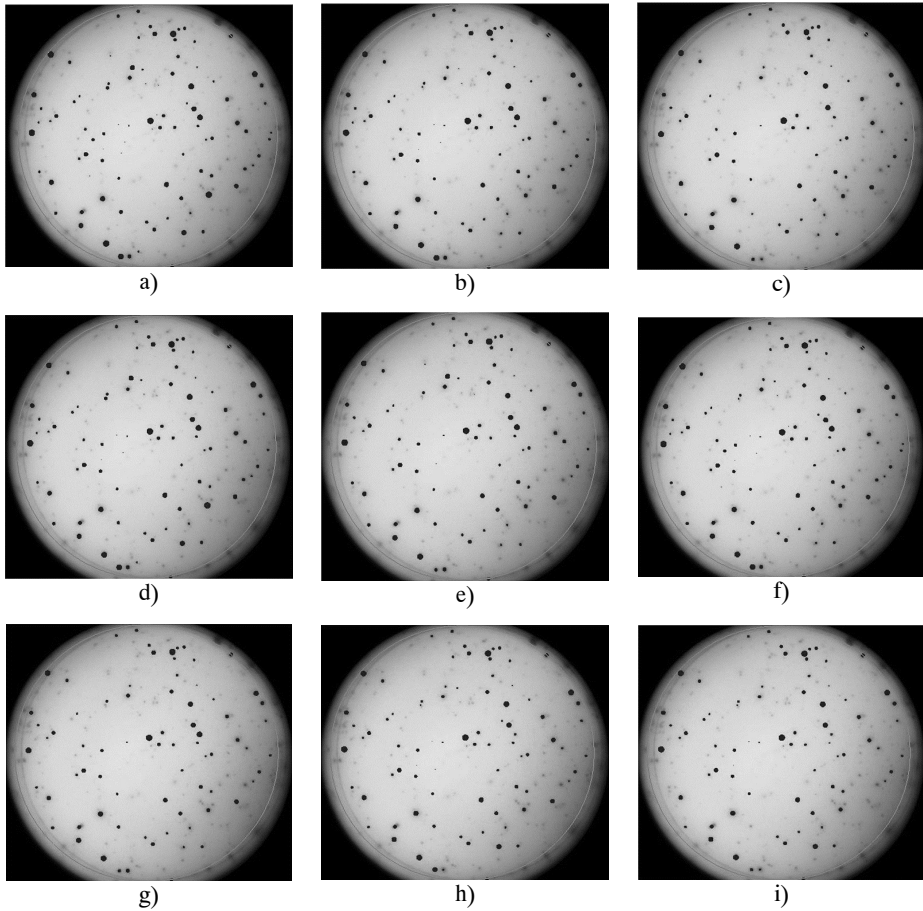


Rys. 12. Wykres zależności czasu obliczeń od rozmiaru obrazu
Objaśnienia w tekście

Tabela 4
Zależność czasu obliczeń od przesunięcia maski

Przesunięcie maski		Czas obliczeń [s]	Liczba plam	Rysunek
pion	poziom			
1	1	308	95	13a
2	2	80	83	13b
3	3	34	72	13c
1	2	155	88	13d
1	3	105	81	13e
2	1	160	90	13f
2	3	52	75	13g
3	1	103	84	13h
3	2	52	77	13i

Największą skuteczność algorytmu uzyskano dla przesunięcia 1 dla obu kierunków. Jednakże odbyło się to kosztem czasu obliczeń. W porównaniu z przesunięciem 1 w pionie i 2 w poziomie uzyskano wyniki o 5,6% lepsze, ale czas obliczeń wzrósł aż o 92,5%. Przesunięcie 2-1 wydaje się najlepszym kompromisem. Ubytek skuteczności ok. 5,5% jest dopuszczalny wobec tak dużej oszczędności czasu. Przesunięcia o 3 są niedopuszczalne ze względu na zbyt małą efektywność, która ma wyższy priorytet niż szybkość.



Rys. 13. Rezultaty skanowania z różnym przesunięciem maski

4. Podsumowanie

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły w znacznym stopniu poprawić działanie algorytmu pod kątem zróżnicowanych danych wejściowych i poprawić jego skuteczność. Zaletą przedstawionego podejścia jest wysoka jakość segmentacji, dzięki wiedzy *a priori*

o poszukiwanych obiektach (obiekty okrągłe o średnicy z przedziału 0,03–0,1 mm). Wadą algorytmu jest jego powolność, zwłaszcza przy dużych wymiarach obrazu. W zastosowaniu do systemu SpotView wada ta nie dyskwalifikuje algorytmu, ponieważ nie jest to system czasu rzeczywistego.

Literatura

- [1] Gillies A.M., *Automatic generation of morphological template features*. Proc. SPIE, vol. 1350, Image Algebra and Morphological Image Processing, San Diego, 1990, 252–261.
- [2] Zhao D., Daut D.G., *Shape recognition using morphological transformation*. J. Visual Comm. and Image Rep. 2, Sept 1991, 230–243.
- [3] Wilson S.S., *Mathematical Morphology in Image Processing*. New York, 1992.
- [4] Kraus E., Dougherty E., *Segmentation free morphological character recognition*. Proc. SPIE, vol. 2181, Document Recognition, San Jose, 1994, 14–23.
- [5] Bloomberg D.S., Vincent L., *Blur Hit-Miss Transform and its use in Document Image Pattern Detection*. Proc. SPIE, vol. 2422, Document Recognition II, San Jose, 1995, 278–292.
- [6] Gebauer B.S., Hricik D.E., Atallah A., Bryan K., Riley J., Tary-Lehmann M., Greenspan N.S., Dejelo C., Boehm B.O., Hering B.J., Heeger P.S., *Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool*. Am. J. Transplant., vol. 2, 2002, 857–866.
- [7] Hricik D.E., Rodriguez V., Riley J., Bryan K., Tary-Lehmann M., Greenspan N., Dejelo C., Schulak J.A., Heeger P.S., *Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients*. Am. J. Transplant., vol. 3, 2003, 878–884.
- [8] Fisher R.B., Perkins S., Walker A., Wolfart E., *Hypermedia Image Processing Reference*. John Wiley & Sons LTD, 2004.
- [9] Wójcicki D., Bieniecki W., Grabowski S., Kościelska-Kasprzak K., *Algorytmy przetwarzania wstępnego obrazów mikroskopowych w badaniu aktywności wydzielniczej limfocytów*. XIII konf. „Sieci i systemy informatyczne”, Łódź, 2005, 573–580.
- [10] Bieniecki W., Grabowski S., Kościelska-Kasprzak K., Drulis-Fajdasz D., Mazanowska O., Klinger M., *An Algorithm for Smart ROI Detection in ELISPOT Examination Images*. XV konf. „Sieci i systemy informatyczne”, Łódź, 2007, 133–136.