

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT  
FREIBURG  
INSTITUT FÜR INFORMATIK

Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung  
Prof. Dr. Hans Burkhardt



Automatische Analyse Biologischer Strukturen  
in 2D Durchlicht-Mikroskopie Aufnahmen

Studienarbeit

Philip Schroll

Juni 2007 – August 2007

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel erstellt wurde. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die Studienarbeit wurde nicht, auch nicht auszugsweise, bereits für eine andere Prüfung angefertigt.

Freiburg, den 1. September 2007

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG**  
**INSTITUT FÜR INFORMATIK**

Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung  
Prof. Dr.-Ing. Hans Burkhardt

22. Mai 2007

**Aufgabenstellung für die Studienarbeit**  
**von Herrn Phillip Schroll.**

**Automatische Analyse Biologischer Strukturen**  
**in 2D Durchlicht-Mikroskopie Aufnahmen**

Angiogenese spielt eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen. In [4] und [5] wurde ein geeignetes Modell vorgestellt, um unterschiedliche wachstumshemmende Faktoren in vitro zu untersuchen. Dabei wird das Gefäßwachstum (in Form der Länge der "Ausprossungen") von standardisierten Zellpräparaten unter einem gewöhnlichen Durchlicht-Mikroskop analysiert. Wobei die Auswertung immer nach einem definierten Zeitpunkt stattfindet.

Da die Auswertung der Aufnahmen, u.A. die Messung der Länge der Ausprossungen sehr zeitaufwendig ist, soll in der vorliegenden Studienarbeit die Bildanalyse automatisiert werden. Im einzelnen beinhaltet diese Teilaufgaben:

- Implementation einer geeigneten Bildvorverarbeitung, u.A. Kantenextraktion
- Implementation der Hough-Transformation für Kreise.
- Entwurf und Implementation geeigneter Wavelet-Filter.
- Implementation der Hough-Transformation für Geraden.
- Implementation einer genauen Längenmessung in diskreten Bildern.
- Evaluation der Algorithmen.

## Literatur:

- [1] Gonzales R., Woods E., Digital Image Processing, Chapter 7: Wavelets, Prentice Hall. 2001
- [2] Schulz, J., Schmidt, T., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Pasternak, T., Dovzhenko, A. and Palme, K., Fast Scalar and Vectorial Grayscale Based Invariant Features for 3D Cell Nuclei Localization and Classification, Proceedings of the 28th Pattern Recognition Symposium of the German Association for Pattern Recognition (DAGM 2006), Berlin, Germany
- [3] Gonzales R., Woods E., Digital Image Processing, Chapter 10: Hough Transform, Prentice Hall. 2001
- [4] Stahl A., Wenger A., Weber H., Stark G.B., Augustin H.G., Finkenzeller G., Bidirectional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal co-culture model, Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) 322 (2004) 684-692
- [5] Stahl A, Wu X, Wenger A, Klagsbrun M, Kurschat P. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts. FEBS Letters. 2005 Oct 10; 579(24):5338-42.

<i>Referent:</i>	Prof. Dr.-Ing. H. Burkhardt
<i>Betreuer:</i>	Dipl.-Inf. J. Fehr
<i>Ausgabedatum:</i>	01. 06. 2007
<i>Abgabedatum:</i>	01. 09. 2007
<i>Bearbeitungszeit:</i>	3 Monate

.....  
Prof. Dr.-Ing. H. Burkhardt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herstellung der Zellpräparate . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Segmentierung</b>	<b>4</b>
2.1	Sprossen-Segmentierung . . . . .	4
2.1.1	Sprossen-Selektion . . . . .	6
2.2	Sphäroid-Segmentierung . . . . .	8
2.2.1	Schwellwertverfahren . . . . .	8
2.2.2	Gauss-Filter . . . . .	9
2.2.3	Graphcut . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Merkmalsreduktion</b>	<b>11</b>
3.1	Normierung . . . . .	11
3.2	Schnelle Korrelation . . . . .	11
<b>4</b>	<b>Klassifikation</b>	<b>15</b>
4.1	Kantenextraktion . . . . .	15
4.1.1	Sobelfilter . . . . .	15
4.1.2	Gradientenrichtungs-Filter . . . . .	16
4.2	Template Matching . . . . .	17
<b>5</b>	<b>Geradenerkennung und Vermessung</b>	<b>19</b>
5.1	Hough-Transformation . . . . .	19
5.2	Längenmessung . . . . .	20
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
6.1	Sprossen-Segmentation . . . . .	21
6.2	Sphäroid-Segmentation . . . . .	21
6.3	Korrelation und Längenmessung . . . . .	23
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>25</b>

# 1 Einleitung

Ziel der Mustererkennung ist die bestmögliche Zuordnung eines unbekannten Musters zu einer Bedeutungsklasse. Typische Anwendungsbeispiele sind Texterkennung, Spracherkennung, Gesichtserkennung oder auch die automatische Qualitätskontrolle. Die Vorgehensweise teilt sich dabei in die Vorverarbeitungsphase, die Merkmalsgewinnung, die Merkmalsreduktion und die Klassifikation. Im Rahmen der Studienarbeit wurde ein Verfahren zur automatischen Erkennung und Vermessung von Blutgefäßen in Zellpräparaten entwickelt.

Die Neubildung von kleinen Blutgefäßen, sogenannten Kapillaren, die durch den Wachstumsfaktor *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ausgelöst wird, nennt man Angiogenese. Die Kapillaren entstehen, indem Endothelzellen aus bestehenden Gefäßen auswandern, sich teilen und neue Gefäßstrukturen bilden. Dieses Kapillarwachstum ist bei vielen Krankheiten von großer Bedeutung. Tumoren sind beispielsweise auf dieses mitwachsende Kapillarnetz angewiesen, das sie mit Nährstoffen versorgt.

Wir interessieren uns in dieser Arbeit für die krankhafte Neubildung von Kapillaren im Auge, welche die visuelle Wahrnehmung einschränken und zur Erblindung führen können. Diese im Alter auftretende Krankheit wird *altersbedingte Makuladegeneration* (*AMD*) genannt, da die *Makula* bzw. der „Gelber Fleck“ betroffen ist. Dies ist die Stelle des schärfsten Sehens, die uns zum Lesen und Erkennen feiner Details befähigt. In der Altersgruppe der 75 - 80 Jährigen ist fast jeder Dritte von dieser Krankheit betroffen.

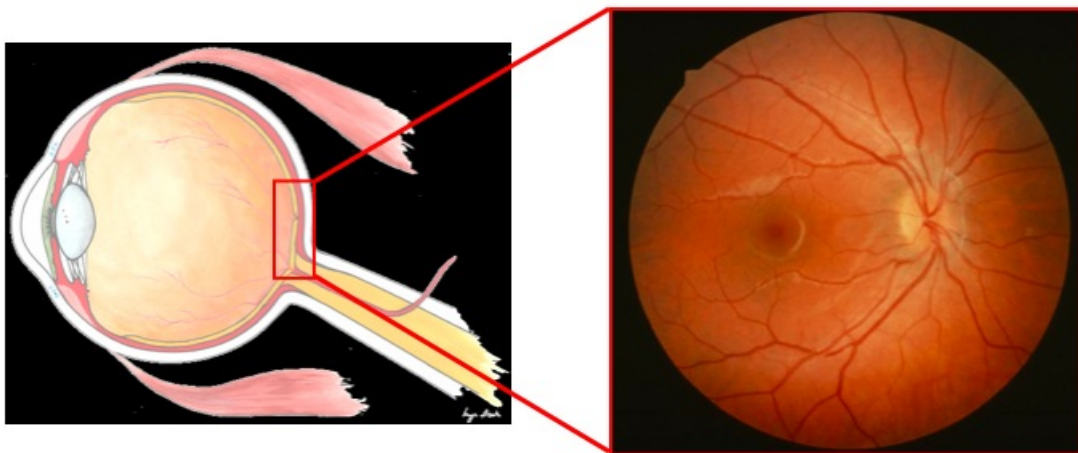


Abbildung 1: Die Makula, die Stelle des schärfsten Sehens im Auge. (Quelle: Prof. Bach, Augenklinik Freiburg)

Man unterscheidet zwischen der nicht therapierbaren *trockenen* AMD, an der die überwiegende Mehrheit der Betroffenen leidet, und der teilweise therapierbaren *feuchten* AMD. Ursache der *feuchten* AMD sind Stoffwechsellagerungen in und unter der Netzhaut sowie neue Blutgefäße, die unter die Netzhaut wachsen und die Netzhautmitte anschwellen lassen.

Es gibt verschiedene Methoden die *feuchte* AMD zu therapieren. Seit den 1980er Jahren wird die *Laserphotokoagulation* eingesetzt. Hierbei werden mittels Laserenergie diejenigen Zellen der Netzhaut abgetötet, welche angiogene Wachstumsfaktoren ausschütten. Diese Behandlung spielt bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie eine wichtige Rolle, kann

aber bei der Behandlung der AMD nicht eingesetzt werden, da eine Laserung in der Makula zu einem Verlust des zentralen Sehens führen würde.

Mit der Einführung der *Photodynamischen Therapie* (PDT) in den 1990er Jahren wurde versucht, dieses Problem zu umgehen. Hier wird dem Patienten eine Substanz intravenös gespritzt, welche durch Laserlicht aktiviert wird und zum Verschluss kleiner Blutgefäße führen kann. Durch die Ansammlung der photosensiblen Substanz in den neugebildeten Kapillaren werden selektiv die krankhaften Blutgefäße behandelt und umgebende Netzhautzellen geschont. Ein Nachteil der PDT besteht darin, dass nicht die Ursache der Kapillarbildung bekämpft wird, sondern lediglich bereits bestehende Kapillaren verschlossen werden [amd].

## 1.1 Herstellung der Zellpräparate

Eine Methode, welche die Ursache der Angiogenese bekämpft sind Angiostatische Präparate. Sie verlangsamen oder stoppen das Kapillarwachstum. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Behandlung erfolgte nicht *in vivo*, also am lebenden Patienten, sondern in einer Zellkultur (siehe Abb. 2).

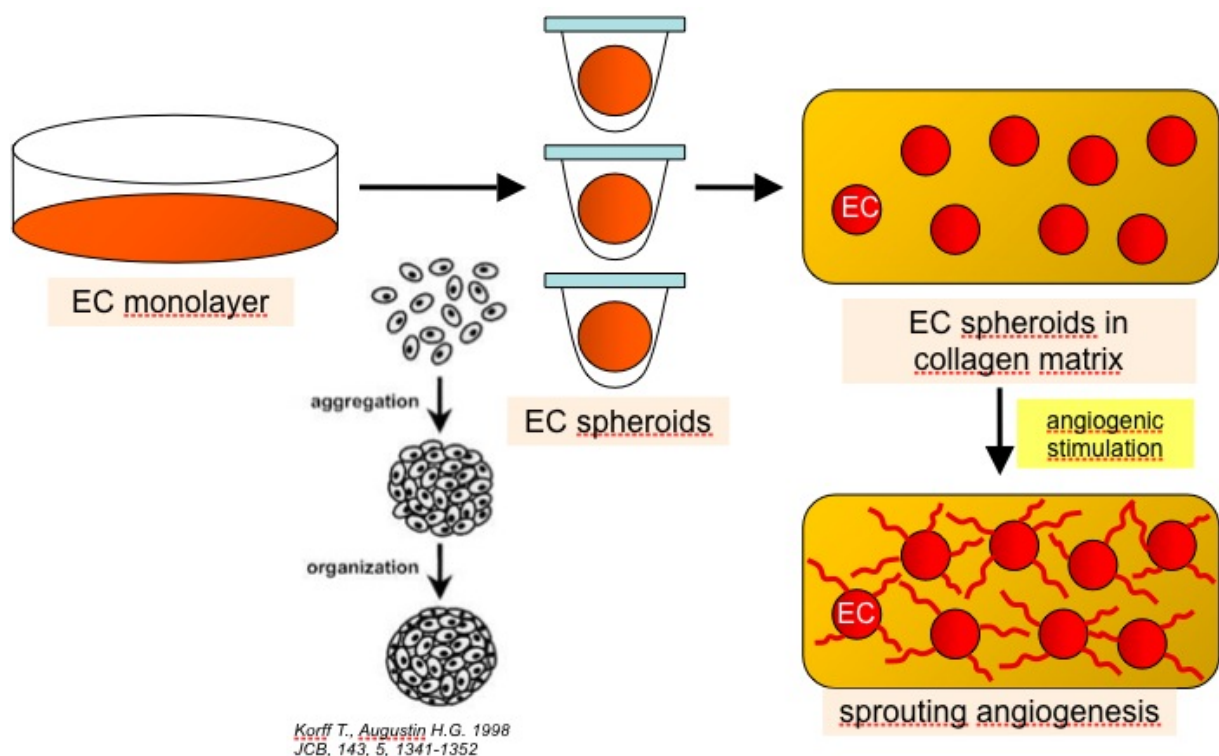


Abbildung 2: *in vitro* Angiogenese (Quelle: Prof. Bach, Augenklinik Freiburg)

Dazu wurden Endothelzellen (EC) aus herkömmlichen zweidimensionalen Kulturschalen gelöst und über Nacht in hängenden Tropfen zu sphäroidalen Zellaggregaten geformt (Sphäroide). Etwa 500 einzelne Zellen bilden so einen Sphäroid. Die Sphäroide werden aus den hängenden Tropfen geerntet und in eine Kollagenmatrix eingebettet. Hier dienen sie dreidimensionale Endothelzellaggregate (ähnlich zu bestehenden Blutgefäßen *in vivo*) als Startpunkte für die Ausbildung neuer Kapillarstrukturen. Durch Zugabe angiogener Substanzen

wie beispielsweise *VEGF* wird der ruhende Sphäroid aktiviert und bildet Sprossungen in die umgebende Kollagenmatrix aus. Das Ausmaß dieser Sprossbildung korreliert mit der Potenz des angiogenen Stimulus. Die Länge der sphäroidalen Sprossungen kann somit zur Quantifizierung angiogener oder anti-angiogener Substanzen genutzt werden.

Diese Sphäroide wurden einzeln mit dem Durchlichtmikroskop aufgenommen. Abbildung 3 zeigt solch einen Sphäroid, dessen Sprossen per Hand vermessen wurden.

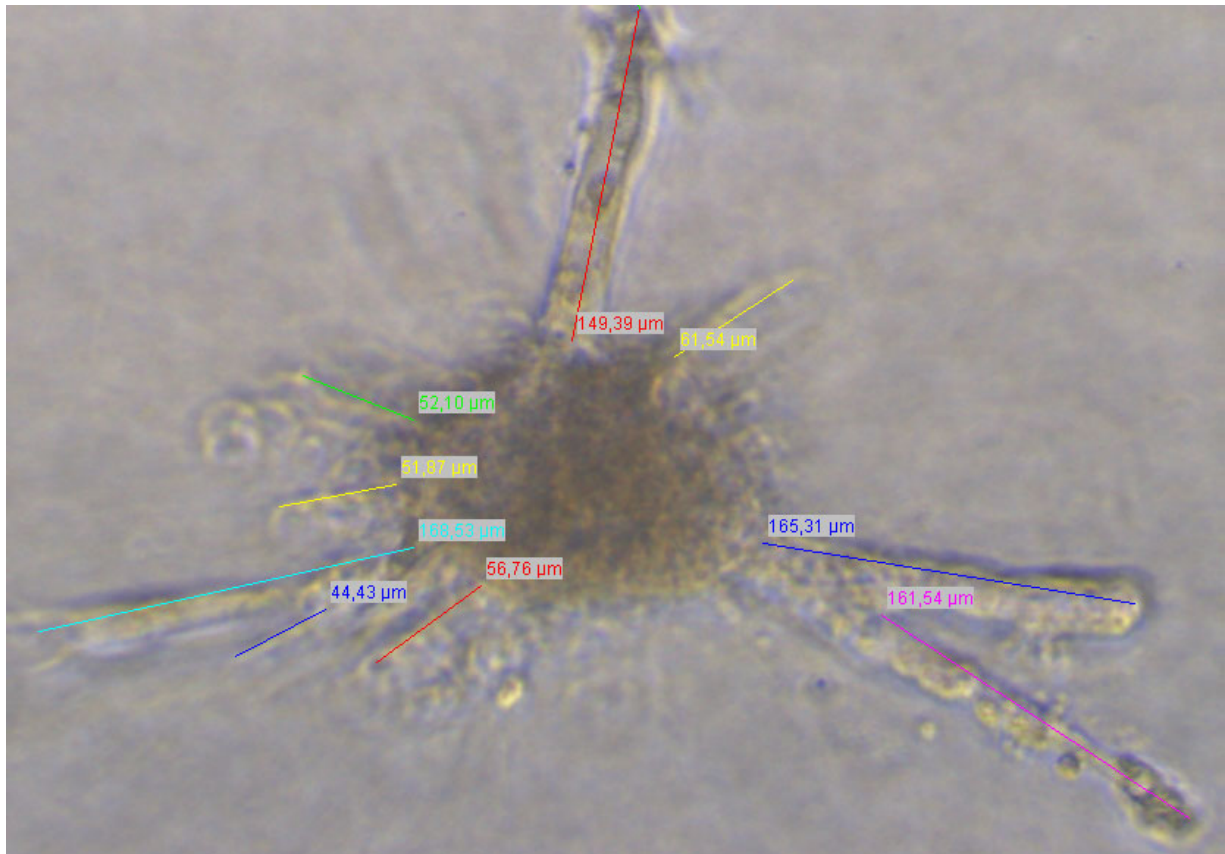


Abbildung 3: handvermessene Sprossen (Länge in  $\mu\text{m}$ ).



## 2 Segmentierung

In diesem Kapitel wurde zuerst die Merkmalsextraktion durchgeführt, d.h die markierten Sprossen aus den Bildern ausgelesen. Anschließend wurden aus den unbehandelten Mikroskopbilder die Sphäroidekerne segmentiert.

### 2.1 Sprossen-Segmentierung

Um Kapillarsprossen automatisch in einer Mikroskopaufnahme detektieren zu können, muss zunächst ihre Form untersucht werden. Dazu mussten die Sprossen von dem Zellkörper getrennt werden. Konkret wurden Sprossen aus den ca. 100 manuell vermessene Aufnahmen ausgelesen. Um ein hohes Maß an Diversifität zwischen den Sprossen zu erhalten, wurden pro Bild maximal sechs Sprossen segmentiert. Abbildung 4 zeigt die aus Abb. 3 ausgelesenen Sprossen.

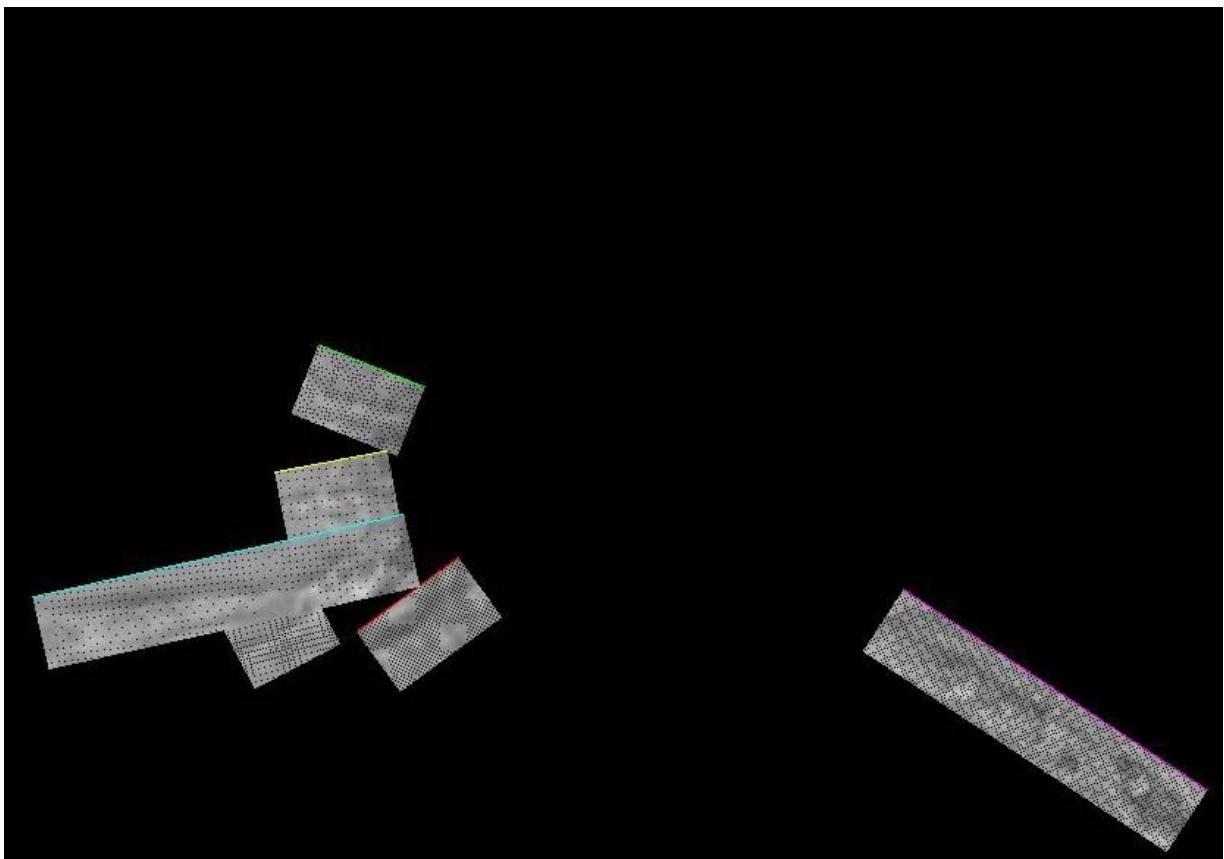


Abbildung 4: Auslesen der handmarkierten Sprossen per Software.

Zur Lokalisierung der Sprossen wurde nach den sechs Markierungsfarben (rot, grün, blau, gelb, rosa und türkis) in den bereits vermessenen Zellbildern gesucht. Um zu verhindern, dass die ebenfalls im Bild befindlichen Längenmaße irrtümlich als Sprossenmarkierung interpretiert werden, wurden nur unmittelbar benachbarte Pixel einer Farbe berücksichtigt. Die Suche erfolgte zeilenweise vom rechten, oberen Bildrand an.

Anhand des Anfangs- sowie Endpunktes der Linien wurde die jeweilige Länge  $k$ , sowie die

Steigung  $\varphi$  der Sprossen berechnet. Mit Hilfe der Rotations - Matrix

$$A = k \begin{pmatrix} \cos \varphi & b \cdot \sin \varphi \\ -\sin \varphi & b \cdot \cos \varphi \end{pmatrix} \quad (1)$$

wurden diese aus den unmarkierten Rohbildern mit einer Breite  $b$  von 50 Pixeln ausgelesen (siehe Abb. 5).



Abbildung 5: Ausgelesene Sprossen nach Farbe (rot, grün, blau, gelb, rosa und türkis).

Beim Entlanglaufen der Sprosse mittels Matrix  $A$  fallen die auszulesenden Grauwerte selten genau auf einen Pixel. Durch Runden der Werte auf den nächsten Pixel kann es passieren, dass einzelne Pixel übergangen werden, wie in Abb. 4 an den schwarzen Stellen in den Sprossen zu sehen ist. Um diese Fehler zu vermeiden wurde die bilineare Interpolation verwendet. Abbildung 6 illustriert diese Interpolationsmethode,  $x_1$  bis  $x_4$  stellen vier Pixel aus dem Pixelgitter dar, während  $x$  den Farbwert des neuen Pixels wiedergibt. Der Grauwert  $x$  berechnet sich für die jeweils benachbarten Pixel wie folgt:

$$x = (1 - a)(a - b) \cdot x_1 + a(1 - b) \cdot x_2 + ab \cdot x_3 + (1 - a)b \cdot x_4 \quad (2)$$

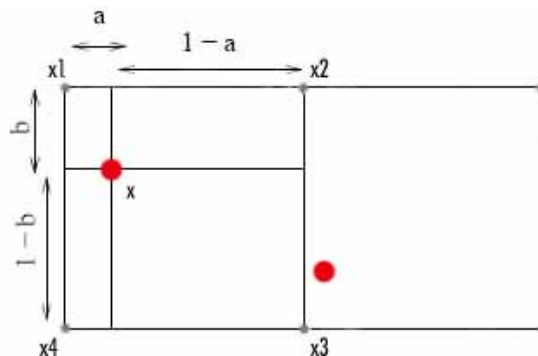


Abbildung 6: Funktionsweise der bilinearen Interpolation.

### 2.1.1 Sprossen-Selektion

Die ausgelesenen Sprossen konnten aus mehreren Gründen nicht automatisch weiterverarbeitet werden, sondern mussten manuell nachsortiert werden. Das lag an den teilweise ungenauen Markierungen bzw. an der Krümmung der Sprosse, aber auch an den zu dicht beieinander liegenden Sprossen (Abb. 7 links).

Die Sprossentextur sollte verschieden zu der des Zellrandes sein. In Abb. 7 rechts ist kaum ein Unterschied zwischen Zellrand und Sprosse auszumachen. Dies kann bei der automatischen Sprossenerkennung zu Fehlinterpretationen vom Zellrand als Sprosse führen.

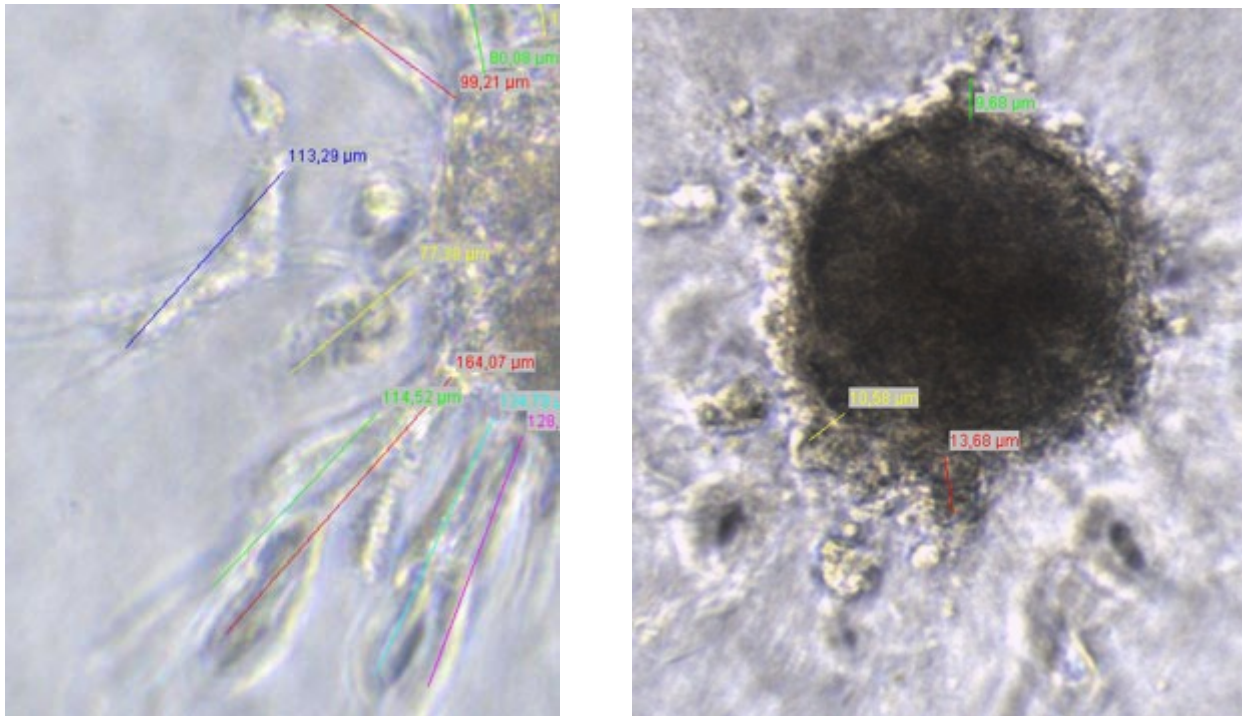


Abbildung 7: Bilder, die schlechte Segmentierungsergebnisse lieferten.

Da wir die Sprossensegmentierung anhand der Markierungsfarben durchgeführt haben, führte das Überlappen der zur Markierung gehörenden farbigen Längen zu teilweise stark verkürzten Sprossen (siehe Abb. 8 links). Dies stellte allerdings kein großes Problem dar, weil Sprossen unter einer definierten Länge automatisch aussortiert werden konnten und Teilsprossen für uns ausreichend waren.

Des Weiteren waren zu breite Sprossen vorhanden (Abb. 8 rechts). Wir konnten die Pixelbreite der auszulesenden Sprossen nicht erhöhen, da sonst eng benachbarte Sprossen in einem Ausschnitt gelandet wären, wie bspw. die mittleren Sprossen in rosa und türkis aus Abb. 8 links. Somit mussten auch diese zu breiten Sprossen aussortiert werden, deren Segmentierungsergebnis in Abb. 9 zu sehen ist.

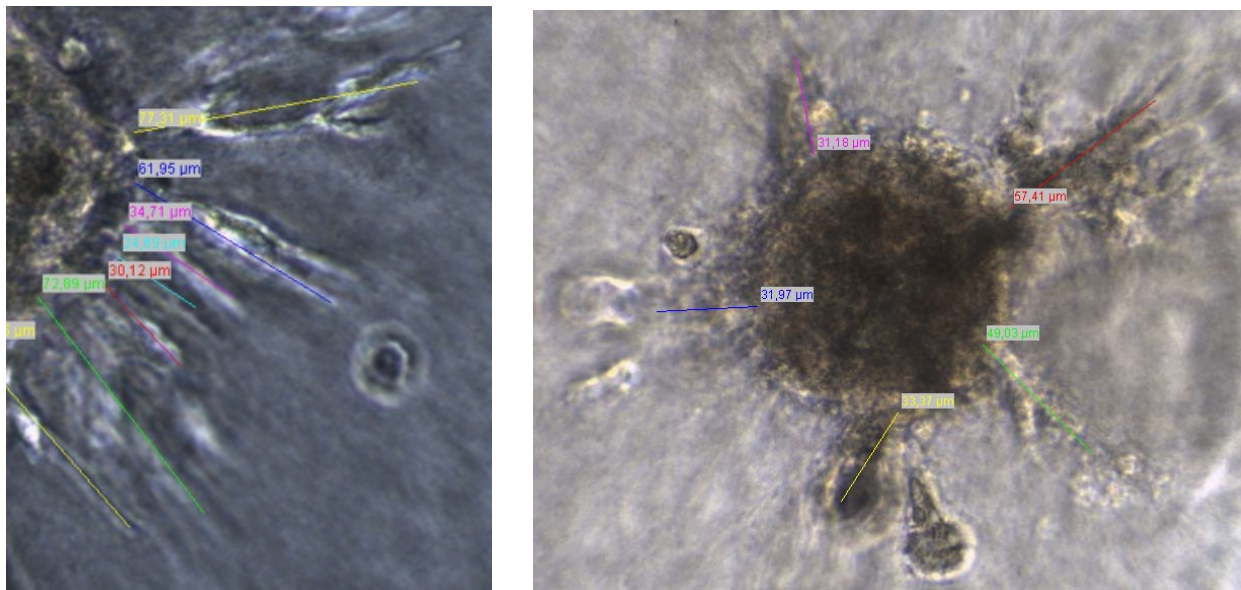


Abbildung 8: Bilder, die schlechte Segmentierergebnisse lieferten.

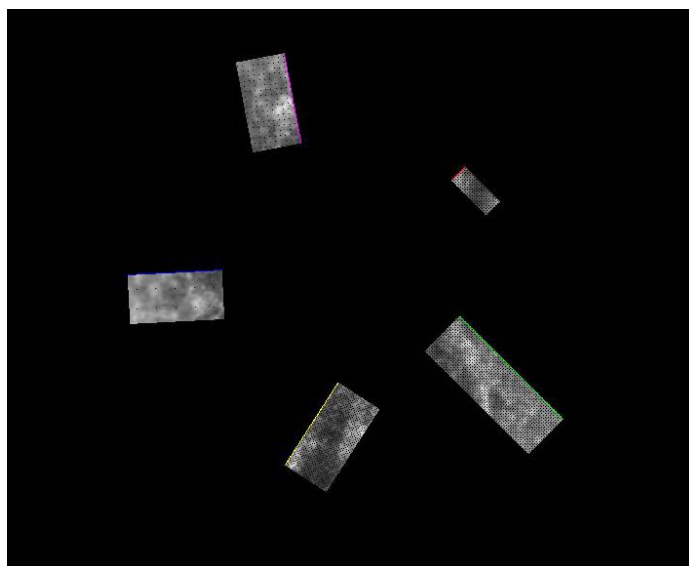


Abbildung 9: Segmentierergebnisse von Abb. 8 rechts.

## 2.2 Sphäroid-Segmentierung

Nach der Segmentierung der Sprossen wurde als nächstes der Sphäroid selbst segmentiert. Für diese Aufgabe haben wir verschiedene Verfahren untersucht.

### 2.2.1 Schwellwertverfahren

Hierbei wird lokal für jeden Pixel anhand eines Schwellwertes entschieden, ob er dem Vordergrund oder Hintergrund angehört. Um dieses Schwellwert zu bestimmen, wird das Histogramm des Bildes benötigt. Die uns vorliegenden Mikroskopbilder bestehen zum größeren Teil aus dem eher helleren Hintergrund und nur ein kleiner Teil des Bildes besteht aus dem dunkleren Sphäroid. Das Histogramm in Abb. 10 stellt diese Häufigkeitsverteilung der 8-Bit Grauwerte von Abb. 3, beginnend bei schwarz (Grauwert = 0) bis weiß (Grauwert = 255) dar. Der am häufigsten vorkommende Grauwert (Hintergrund) und der Richtung schwarz am seltensten vorkommende Wert (Vordergrund) sind markiert. Die von beiden umgebene Markierung stellt die Grenze zwischen Vorder- und Hintergrund dar. An diesem Punkt beginnt eine signifikante Steigung in Richtung des Maximums.

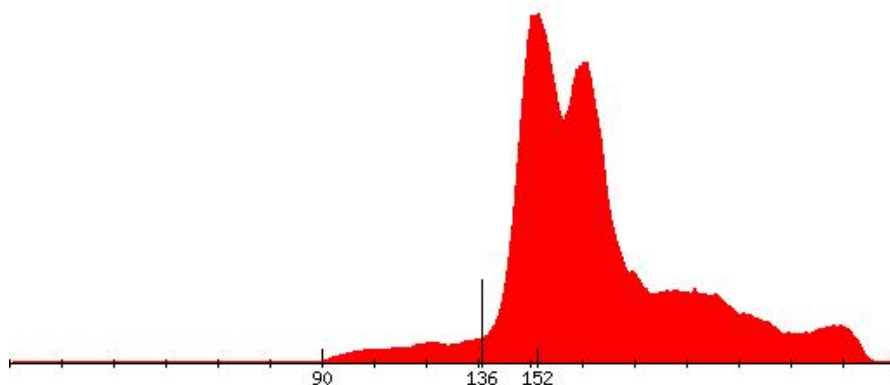


Abbildung 10: Histogramm der Abb. 3.

Der Punkt diente uns als Threshold, alle Grauwerte oberhalb dieses Wertes wurden auf weiß, alle darunter auf schwarz gesetzt. Da allerdings auch die Sprossen dunkle Partien aufweisen, wurden auch Teile der Sprossen schwarz eingefärbt. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des Thresholds, der so für die Segmentierung des Sphäroids ungeeignet war, da auch Teile der Sprosse irrtümlicherweise als Sphäroid erkannt wurden.

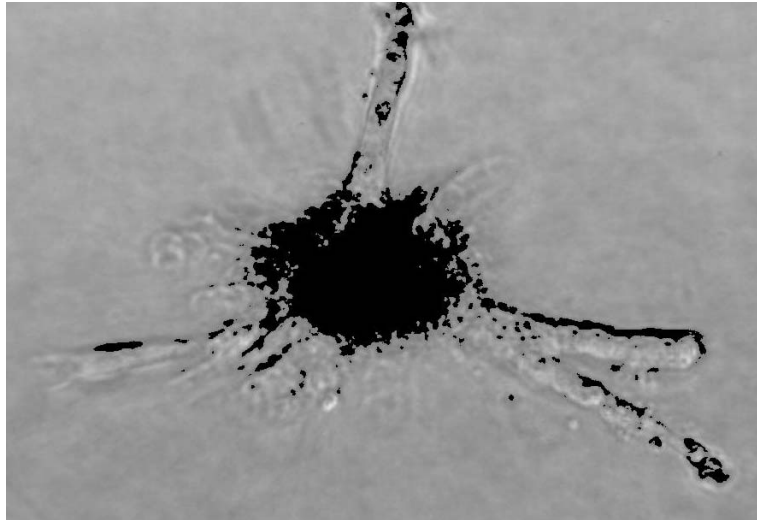


Abbildung 11: Threshold von Abb. 3.

### 2.2.2 Gauss-Filter

Der Gaussfilter ist ein lokaler Filter, der große Strukturen erhält und Details weichzeichnet. Um die rauen Zellränder abzurunden und die schmalen Sprossenkanten zu verwischen, haben wir uns für den Einsatz des Gaussfilters als Vorverarbeitung entschieden.

Bei der Gaussfilterung werden näher liegende Pixel höher gewichtet als weiter entfernte Pixel. Dabei geht der Abstand der Bildpunkte nicht linear sondern entsprechend der rotationssymmetrischen Gausschen Glocke in die Gewichtung ein. Ein Gaussfilter der Größe  $n \times m$  ist folgendermaßen definiert:

$$g_{nm} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{n^2+m^2}{2\sigma^2}} \quad (3)$$

Die Varianz  $\sigma^2$  ist gegeben durch:

$$\sigma^2 = \text{Var}(X) = E(X^2) - (E(X))^2 \quad (4)$$

und stellt ein Maß für die Abweichung des Grauwertes von Pixel  $x$  vom Erwartungswert  $E(X)$  seiner Nachbarn.  $\sigma = \sqrt{\text{Var}(X)}$  ist die Standardabweichung.

Für unsere Problemstellung stellte sich ein Filter der Größe  $11 \times 11$  Pixel als passend heraus, d.h. die Sprossen wurden meist herausgefiltert. Dieses Kriterium war allerdings nicht robust, weswegen wir uns für den Einsatz des Graphcut-Algorithmus entschieden. Abb. 12 zeigt das Ergebnis des Threshold, welches in diesem Fall ein akzeptables Ergebnis liefert.



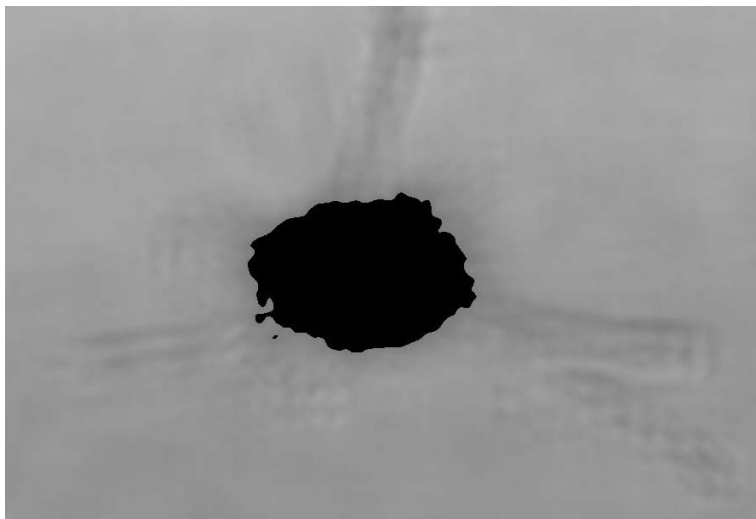


Abbildung 12: Threshold von Abb. 3 nach Anwendung des Gaussfilters.

### 2.2.3 Graphcut

Hierbei handelt es sich um ein globales Verfahren, aus den einzelnen Pixeln des Bildes wird ein Graph erstellt, wobei jeder Pixel einem Knoten entspricht. Jeder Knoten wiederum ist mit seinem Nachbarn über gewichtete Kanten verbunden. Als Gewichtsfunktion wird die Grauwertdifferenz benachbarter Bildpunkte verwendet. Zusätzlich werden Startpunkte für das Objekt und den Hintergrund gesetzt, die wir aus dem Histogramm erhalten. Das Ziel besteht darin, den Graphen so zu schneiden, dass die geringsten Kosten entstehen. Der maximale Fluss ist der Schnitt, der die geringsten Kosten verursacht. Um den maximalen Fluss des Graphen zu berechnen wurde die Software von Yuri Boykov und Vladimir Kolmogorov verwendet [maxflow]. In Abb. 13 ist zur besseren Visualisierung der Graphcut nach Anwendung des Sobelfilters zu sehen. Der Sobelfilter wird in Kapitel 4 genauer beschrieben.

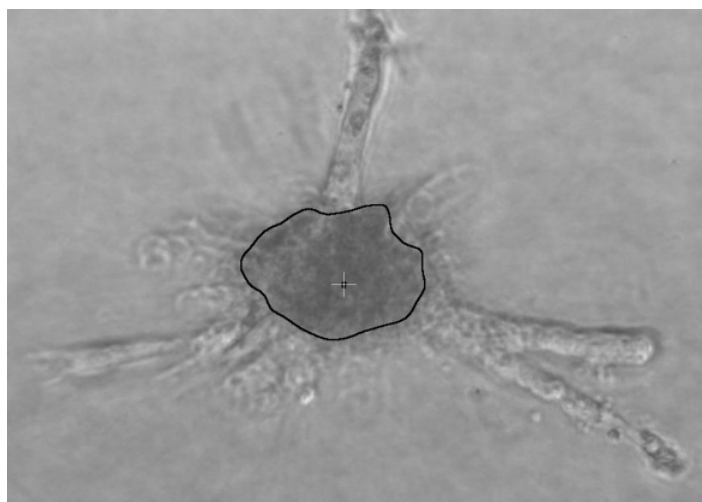


Abbildung 13: Kante des graphcut-Algorithmus, angewandt auf Abb. 3.

### 3 Merkmalsreduktion

Die segmentierten Sprossen werden nun in Klassen zusammengefasst, für die jeweils ein Prototyp (Template) gespeichert wird. Das Kriterium für die Zuordnung zu einer Klasse ist eine hohe Ähnlichkeit zu dem Prototyp der Klasse. Eine Möglichkeit die Ähnlichkeit zweier Signale  $A$  und  $B$  zu bestimmen, besteht darin, sie zu korrelieren, d.h ihr Skalarprodukt zu berechnen. In unserem Fall bei einer Breite von je 50 Pixeln für jedes Signal entspricht das 50 Multiplikationen. Die Korrelation  $K$  ist definiert durch:

$$\text{Korrelation } K = \sum_{i=0}^{49} (A_i \cdot B_i) \quad (5)$$

Da die Sprossen allerdings verschoben oder gespiegelt vorliegen können, darf man sich nicht mit einer Korrelation begnügen. Das zu testende Signal muss zyklisch um je einen Pixel verschoben und skalar multipliziert werden. Die Translation, an der die beiden Signale die größte Ähnlichkeit aufweisen, ist die Stelle, an der das größte Skalarprodukt steht. Der Aufwand für den Vergleich zweier Sprossenquerschnitte steigt somit auf 2500 Multiplikationen.

#### 3.1 Normierung

Die Multiplikation der Grauwerte ist allerdings stark abhängig von der Helligkeit des vorliegenden Bildes. Haben die Bilder eine hohe Grundhelligkeit, werden sie auch eine höhere Korrelation aufweisen, als dunkle Bilder. Um diesen unerwünschten Effekt zu eliminieren werden die Bilder folgendermaßen normiert:

$$K_{norm} = \frac{\sum_i (A_i - \bar{A})(B_i - \bar{B})}{\text{Var}(A) \cdot \text{Var}(B)} \quad (6)$$

$\bar{A}$  bzw.  $\bar{B}$  stellen die Mittelwerte der Signale dar, die Varianz  $\text{Var}(X)$  ist in Gl. (4) definiert.

#### 3.2 Schnelle Korrelation

Um diese Kosten der Korrelation zu verringern, arbeiten wir im Frequenzbereich. Hier genügt es, das Signal  $A$  mit dem komplex konjugierten des Signals  $B$  komponentenweise zu multiplizieren und wieder zurückzutransformieren.

$$K = FFT^{-1}(FFT(A) \cdot FFT^*(B)) \quad (7)$$

Die Fast Fourier Transformation (FFT) stellt eine schnelle Transformation in den Frequenzbereich dar. Die Kosten der FFT betragen  $O(|A| \cdot \log |A|)$ , also in unserem Fall 350. Die Gesamtkosten belaufen sich mit dieser Methode also auf 750 Multiplikationen und sind somit schon für einen Vergleich zweier Sprossen dreimal schneller. Wir haben uns für die Aufteilung in 50 Klassen entschieden. Da die Hintransformation der Sprossen nur einmal pro Sprosse berechnet werden muss, fällt der Zeitgewinn noch deutlicher ins Gewicht.

Da die FFT auf die Länge 1 normierte Bilder als Eingabe verlangt, wurden die Signale vor der Transformation noch durch die L2-Norm dividiert. Die L2-Norm ist die Wurzel des Skalarproduktes.



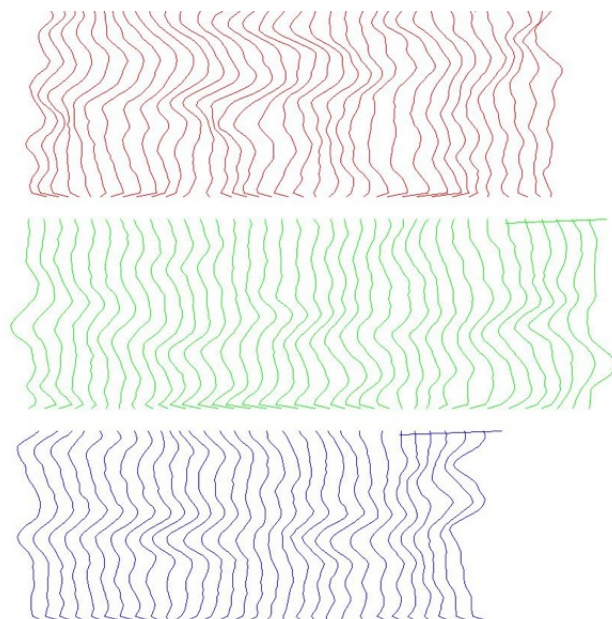


Abbildung 14: Querschnitte der ersten drei Sprossen aus Abb. 5 .



Abbildung 15: Eine um ihr Korrelationsmaximum translatierten Sprossenklasse.

Abbildung 14 zeigt das Höhenprofil der ersten drei Sprossen aus Abb. 5 in Abständen von je 2 Pixeln.

Abbildung 15 repräsentiert zum Vergleich einen Teil einer der 50 Klassen, nach der Verteilung der Sprossenquerschnitte in ihre jeweiligen Klassen. Zur Verdeutlichung wurden die Querschnitte so translatiert, dass sich ihr Korrelationsmaximum auf gleicher Höhe befindet.

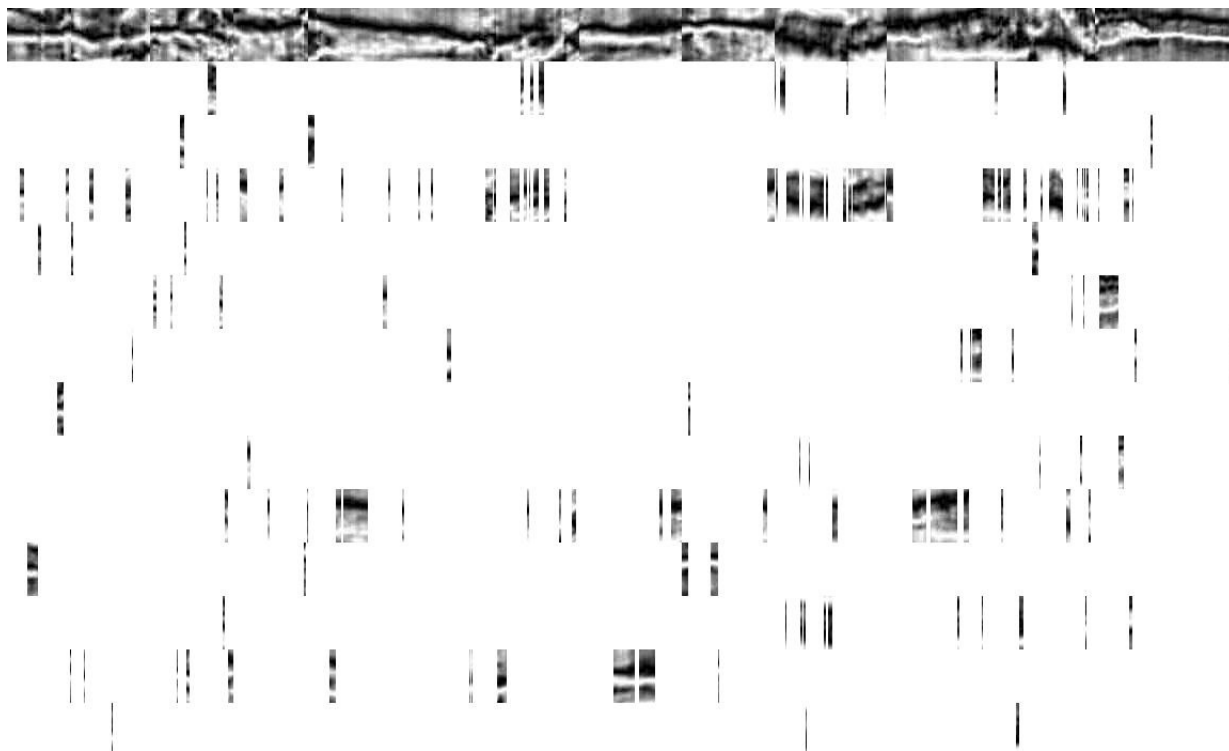


Abbildung 16: zeilenweise Darstellung der Sprossenklassen.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Korrelation von 10 Sprossen. Die Klassen haben zu ihrer nachfolgenden Klassen stets die niedrigste Korrelation. Die erste Zeile repräsentiert die ersten 10 Sprossen, alle anderen Zeilen stellen Sprossendurchmesser mit hoher Korrelation dar. Es ist gut zu erkennen, dass nicht jede Sprosse für sich in einer Klasse landet, sondern dass die Klassen sich aus Sprossenquerschnitten der vollständigen Sammlung zusammen stellen.

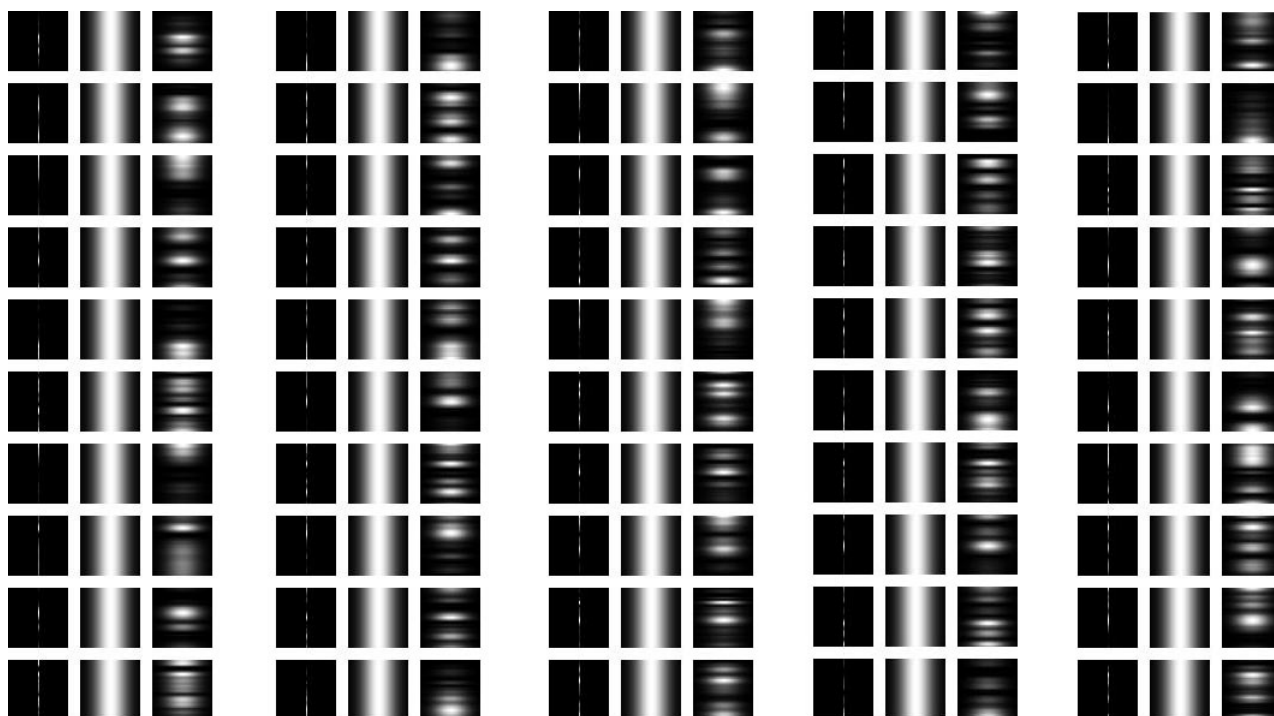


Abbildung 17: jeweils die linke Spalte zeigt die gefundenen Templates.

In Abb. 17 sind die 50 gefundenen Templates jeweils auf der linken Seite zu sehen. Rechts von den Templates ist der eindimensionale Gaussfilter und neben diesem das Resultat aus Gaussfilter und dem Template zu erkennen. Da die ein Pixel breiten Templates nicht sehr gut zu erkennen sind wurde der Übersichtlichkeit halber das Signal mit dem Gaussfilter verbreitert.

## 4 Klassifikation

In diesem Kapitel versuchen wir die extrahierten Merkmale in dem Originalbild wiederzufinden, also die Sprossen automatisch zu erkennen. Dazu wird das Originalbild vorverarbeitet.

### 4.1 Kantenextraktion

Nachdem die Sprossen und Sphäroide aus den markierten Bildern extrahiert wurden, beginnen wir nun mit der Bearbeitung der Ausgangsbilder. Ziel der Kantenextraktion ist die Aufbereitung des Mikroskopbildes für die anschließende automatische Erkennung der Sprossen.

#### 4.1.1 Sobelfilter

Um die spätere Arbeit des Sprossenfindens zu erleichtern wurde die Ausgangsbilder auf ihre relevanten Stellen reduziert. Damit sind die Stellen gemeint, an denen ein beträchtlicher Farbunterschied zwischen zwei benachbarten Pixeln besteht, sich also eine Kante befindet. Eine Methode, um dieses Gradientenbild zu berechnen, ist die Faltung der Bildmatrix mit dem Sobelfilter.

$$S_x = \begin{matrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{matrix} \quad S_y = \begin{matrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{matrix} \quad (8)$$

Der Sobelfilter stellt eine diskrete Annäherung an die lokale Ableitung eines Bildes dar. Um die Gradienten in  $x$ - und in  $y$ - Richtung zu erhalten wird das Ausgangsbild  $A$  erst mit  $S_x$  und danach mit  $S_y$  gefaltet. Das richtungsunabhängige Ergebnis erhält man durch folgende Berechnung, in der die Faltung durch  $\star$  ausgedrückt wird:

$$S = \sqrt{(A \star S_x)^2 + (A \star S_y)^2} \quad (9)$$

Da der Hintergrund ebenso Farbstufen aufweist, werden auch hier vermeintliche Kanten entdeckt. Um dieses Hintergrundrauschen herauszufiltern wurde anschließend eine Thresholdfunktion auf das Gradientenbild angewendet, was in Abb. 18 zu sehen ist.

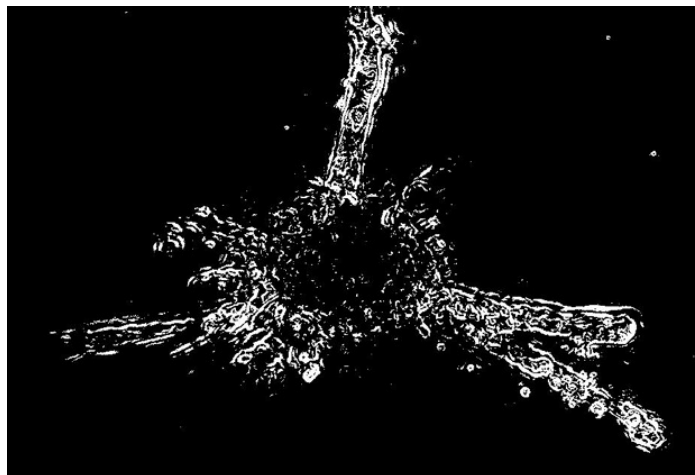


Abbildung 18: Threshold des Sobelfilter angewandt auf Abb. 3

#### 4.1.2 Gradientenrichtungs-Filter

Der Sobelfilter betont sämtliche im Bild vorhandenen Kanten, für uns von Interesse sind aber vor allem gerade Kanten. Deshalb haben wir die normierten Gradientenrichtungen für jeden Bildpunkt in vertikaler, sowie horizontaler Richtung gemessen. Um nun geraden Kanten zu finden haben wir die Varianz im Bereich von jeweils  $5 \times 5$  Pixeln der beiden Bilder berechnet. Abb. 19 zeigt das Ergebnis der Addition der beiden Varianzen der Gradientenbilder. Im Gegensatz zum Sobelfilter sind in diesem Bild die vielen kleinen rundlichen Strukturen verschwunden.

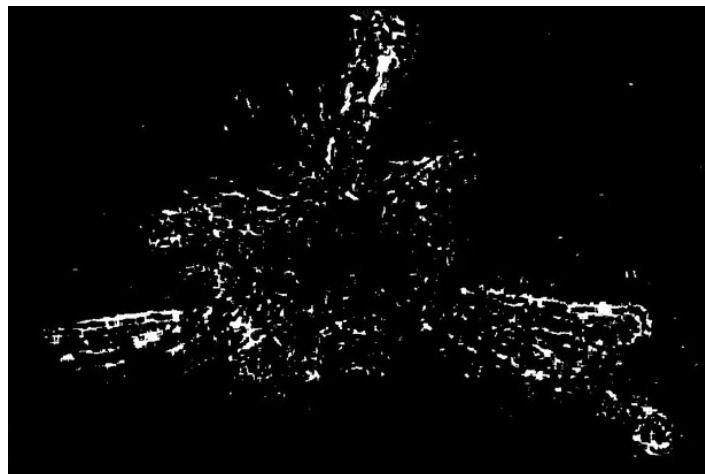


Abbildung 19: Threshold der Varianz des Gradientenbildes aus Abb. 3



Abbildung 20: Multiplikation von Abb. 13, Abb. 18 und Abb. 19

## 4.2 Template Matching

Das Template Matching versucht die im vorigen Schritt gefundenen Templates bzw. ähnlich aussehende Bilder im Mikroskopbild wiederzufinden. Mithilfe des vorverarbeiteten Bildes (siehe Abb. 20) konnten entlang der Richtung der verbliebenen Gradienten die Sprossen-kandidaten ausgelesen werden. Um sicher zu sein, die Sprosse nicht zu verfehlen, wurde in positiver und negativer Gradientenrichtung je 50 Pixel ausgelesen. Um die 100 Pixel breiten Sprossen-kandidaten und die 50 Pixel breiten Templates korrelieren zu können, müssen die die Templates bis zur Breite von 100 Pixeln mit Nullen aufgefüllt werden.

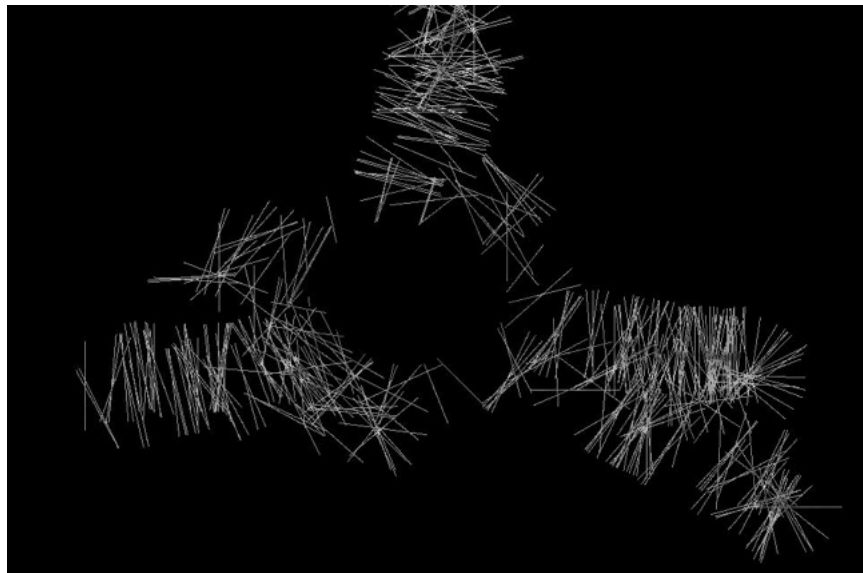


Abbildung 21: Markierung der Sprossen-kandidaten anhand von Abb. 20.

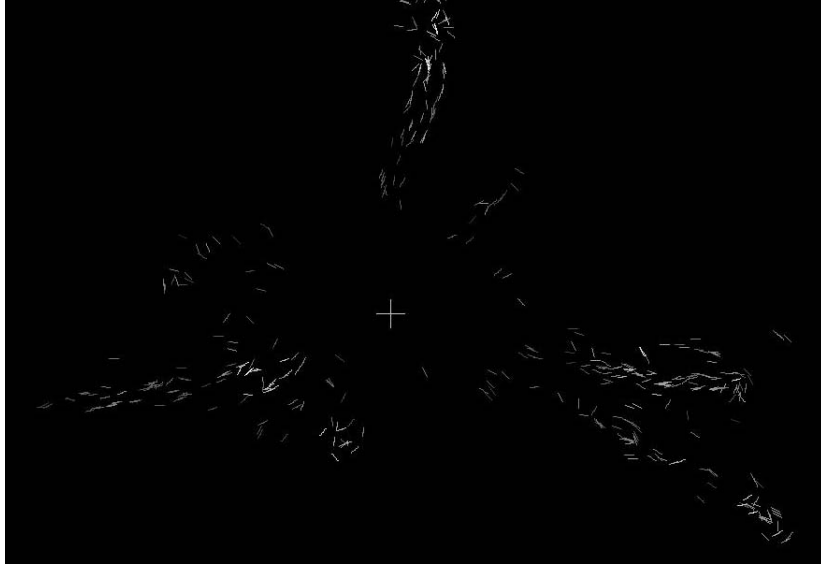


Abbildung 22: Ergebnis des Template Matching für Abb. 21.

In Abb. 21 sind die zur Korrelation markierten Sprossenkandidaten zu erkennen. Um die Anzahl der Kandidaten zu verringern wurde auch ein Pixel ober- und unterhalb eines Kandidaten auf dessen gesamter Breite das Gradientenbild auf Null gesetzt. Die Ihre Ausrichtung entlang der Gradientenrichtung stimmt weitgehend mit der erwarteten Ausrichtung - orthogonal zu den Sprossen - überein.

Die folgende Abb. 22 stellt die Korrelationsantwort der jeweiligen Sprossenkandidaten aus Abb. 21 mit den Templates dar. Die oberste nahezu vertikale Sprosse wurde sehr gut erkannt, während es bei der rechten Sprosse in horizontaler Ausrichtung deutliche Abweichungen der Votes von der Sprossenmitte gibt. Ein hoher Grauwert stellt hierbei eine hohe Korrelation dar, während die dunkleren Votes von einer schlechten Übereinstimmung der Kandidaten mit den Templates zeugen.

Abb. 23 stellt einen Ausschnitt der korrelierten Templates mit den Sprossenkandidaten dar. Die schwarz gezeichneten Templates sind diejenigen mit der höchsten Übereinstimmung zu dem darunterliegenden Sprossenkandidaten.

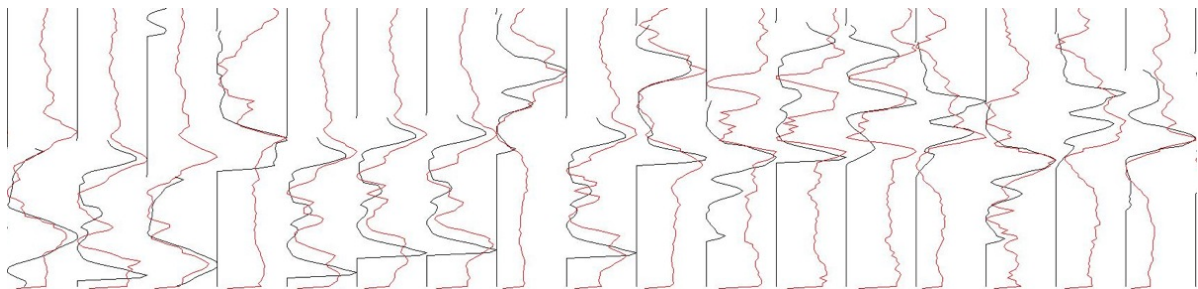


Abbildung 23: Diagramm des Template Matching für Abb. 21. Die schwarzen Linien sind Templates, die roten Sprossenkandidaten

## 5 Geradenerkennung und Vermessung

### 5.1 Hough-Transformation

Die Hough-Transformation hat das Ziel kollineare Punkte in einem Bild zu erkennen, beispielsweise Kreise oder Linien. Wir sind an der Detektion von Linien interessiert, welche entlang der Sprossen laufen. Gewöhnlich werden Geraden durch die Formel  $y = m * x + b$  beschrieben, wobei  $m$  für die Steigung und  $b$  für den y-Achsenabschnitt steht. Um das Problem der Formalisierung vertikaler Linien zu umgehen wird die Hesse Normalenform als Geradengleichung verwendet.

$$\text{Hesse Normalenform: } r = x * \cos \varphi + y * \sin \varphi \quad (10)$$

Wird ein Punkt in den Parameterraum transformiert, stellt die sinusartige Kurve im Houghraum sämtliche durch den Punkt verlaufenden Geraden dar. Der Schnittpunkt zweier solcher Kurven im Parameterraum beschreibt die durch die beiden Punkte laufende Gerade im Ortsraum. Um den Rechenaufwand in Grenzen zu halten wird der Parameterraum diskretisiert. Wir haben uns für eine Schrittweite von 0,2 Grad entschieden.

Alle Sprossenandidaten, welche im Houghraum auf einen Punkt fallen, liegen somit im Ortsraum in etwa auf einer Geraden. Durch Weglassen der Kandidaten, die nicht auf einer Geraden liegen, bereinigten wir das Ergebnis von den „Querschlägern“.

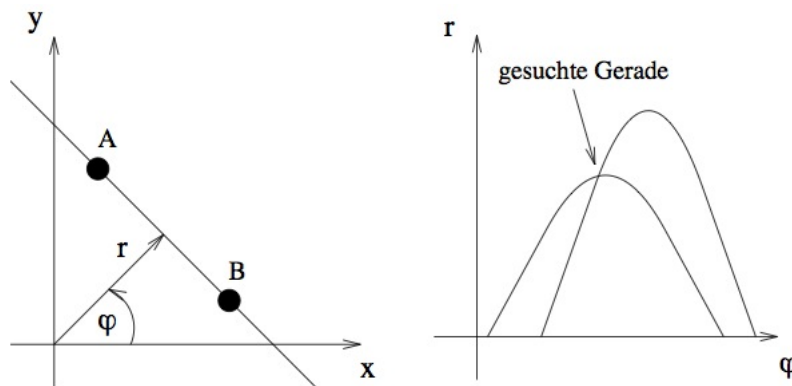


Abbildung 24: links zwei Punkte im Ortsraum und rechts die zugeordneten Geraden im Houghraum



## 5.2 Längenmessung

Die Ergebnispunkte der Korrelation wurden im letzten Schritt auf die Punkte reduziert, die annähernd eine Gerade bilden. Nun mussten die Punkte zu einer Geraden verbunden werden. Dazu wurden die Punkte eingelesen und auf ihren Abstand hin untersucht. Benachbarte Punkte wurden jeweils in einer Liste gespeichert. Punkte die einen Maximalabstand überschritten wurden in einer neuen Liste gespeichert. So entstanden  $n$  Listen mit benachbarten Punkten. Im nächsten Schritt wurden der Anfangs- sowie Endpunkt einer Liste miteinander verbunden und der Abstand der beiden Punkte berechnet. Das Ergebnis ist in Abb.25 zu sehen. Der weiße Punkt in der Mitte des Sphäroids ist das Ergebnis des Houghfilters für Kreise, den wir allerdings nicht weiter benutzt haben.

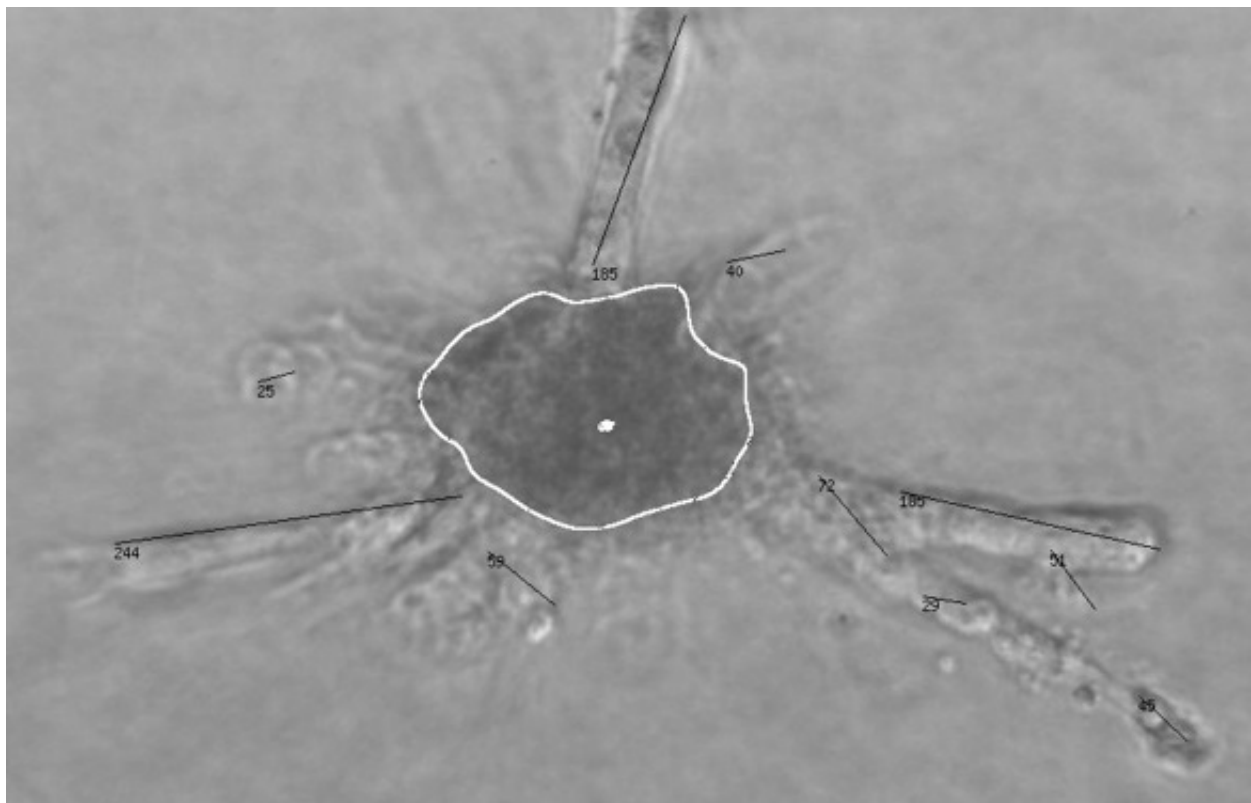


Abbildung 25: Die vom Programm gefundenen und vermessenen Sprossen

## 6 Ergebnisse

Es werden die Ergebnisse Sprossenselektion und der Sphäroid-Segmentation mit Negativbeispielen beschrieben, sowie die Resultate der Korrelation und der Längenmessung analysiert.

### 6.1 Sprossen-Segmentation

Die Segmentierung der Sprossen hat gut funktioniert. Was eine spätere Nachsortierung aber unvermeidbar machte, war unter anderem die große Variation der Sprossen. Extrembeispiele mussten ebenso aussortiert werden, wie zu nahe beieinander liegende oder zu krumme Sprossen. Die folgende Abb. 26 zeigt einen Teil der ausgewählten Sprossen.

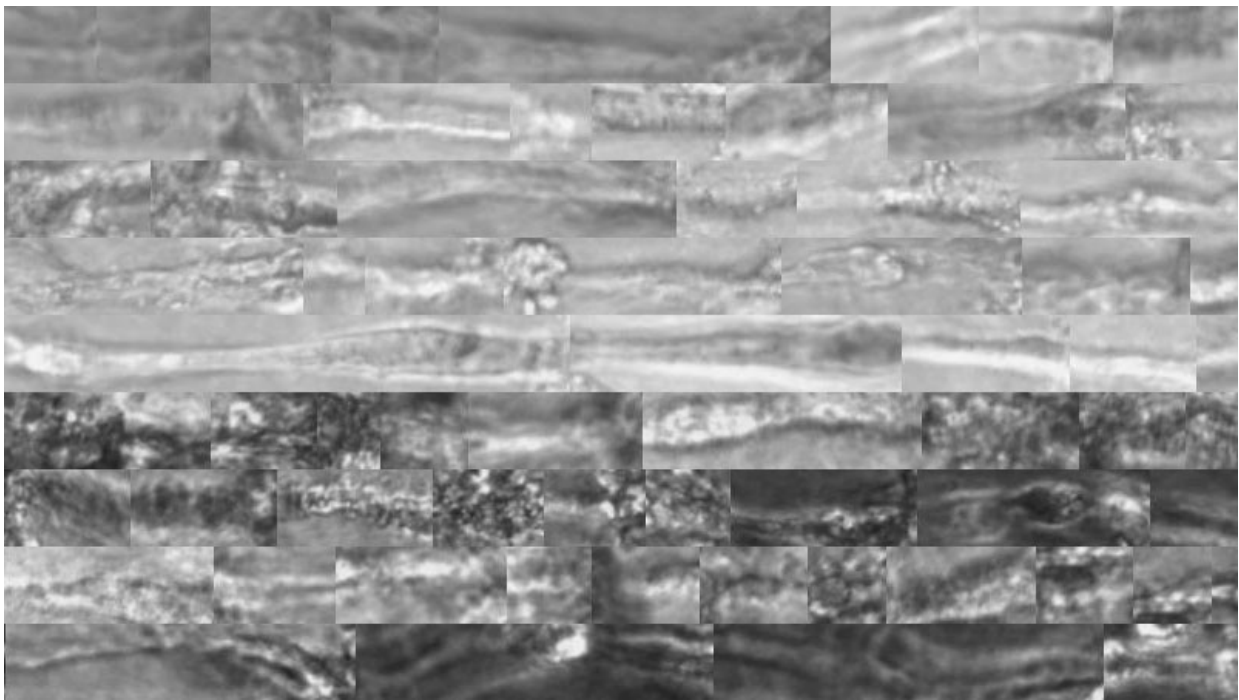


Abbildung 26: Ein Teil der manuell ausgewählten Sprossen

### 6.2 Sphäroid-Segmentation

Die Sphäroidsegmentation hat bis auf Bilder mit dunklen Sphäroid und dunklen Sprossen oder zu hellen Sphäroiden ebenfalls gut funktioniert. Beispiele für unzureichende Segmentationsergebnisse sind in Abb. 27 und Abb. 28 zu sehen. In Abb. 27 ist die linke Sprosse sehr breit und dunkel, was Unterscheidung vom Sphäroid nahezu unmöglich macht. Die bunten Geraden stellen die manuell markierten Sprossen dar.

Abbildung 28 zeigt eine zu kleine Segmentation des Sphäroids. Die Ursache ist der mangelnde Farbunterschied zwischen Hintergrund und Zellkörper. Dies stellt aber keine Beeinträchtigung der Sprossenmessung dar, sondern erhöht nur die Kosten der Korrelation, da auch Kanten im Sphäroid korreliert werden.

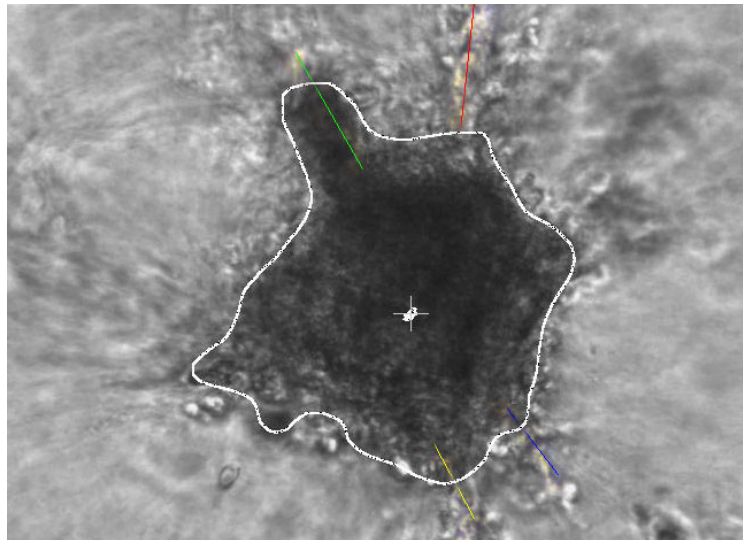


Abbildung 27: schlechte Erkennung des Sphäroids

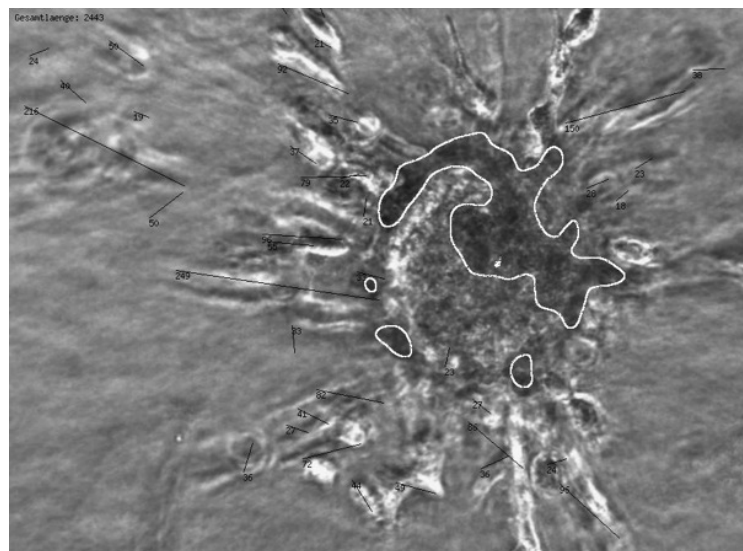


Abbildung 28: schlechte Erkennung des Sphäroids

### 6.3 Korrelation und Längenmessung

Bei Bildern mit wenigen Sprossen ist die Sprossenform anhand des Korrelationsergebnisses relativ gut zu erkennen. In Abb. 29 ist in der Mitte das Korrelationsergebnis und links der Resultat der Geradengenerierung mit Maximalabstand 25 von Pixeln, rechts mit Maximalabstand 20 von Pixeln zu sehen. An den beiden unteren Sprossen ist im Bild sieht man die Schwierigkeit die Punkten zu Geraden zu verbinden. In Abb. 30 wurden die Geraden mit einem Abstand von maximal 25 Pixeln verbunden.

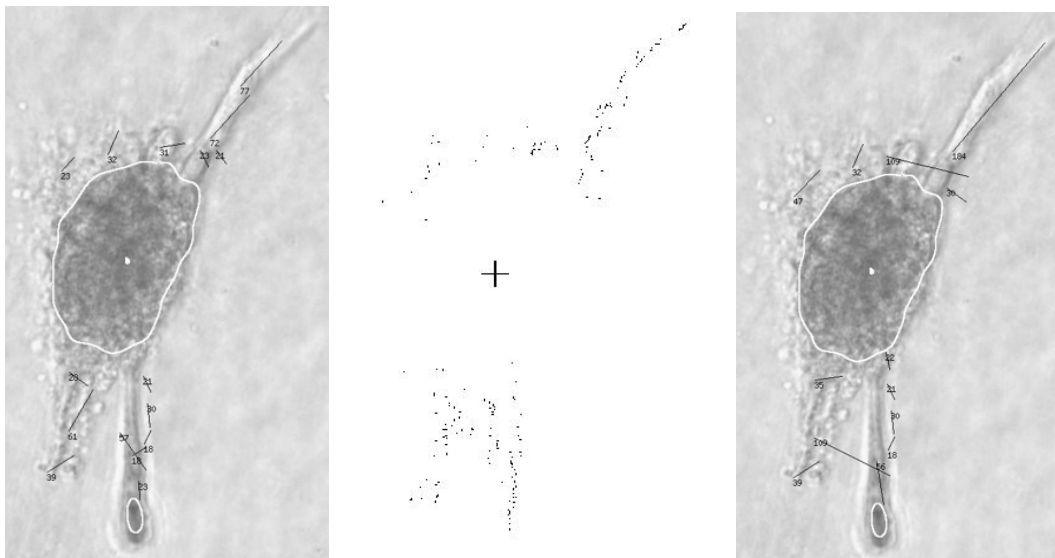


Abbildung 29: rechts und links die Ergebnisse der Geradensuche.

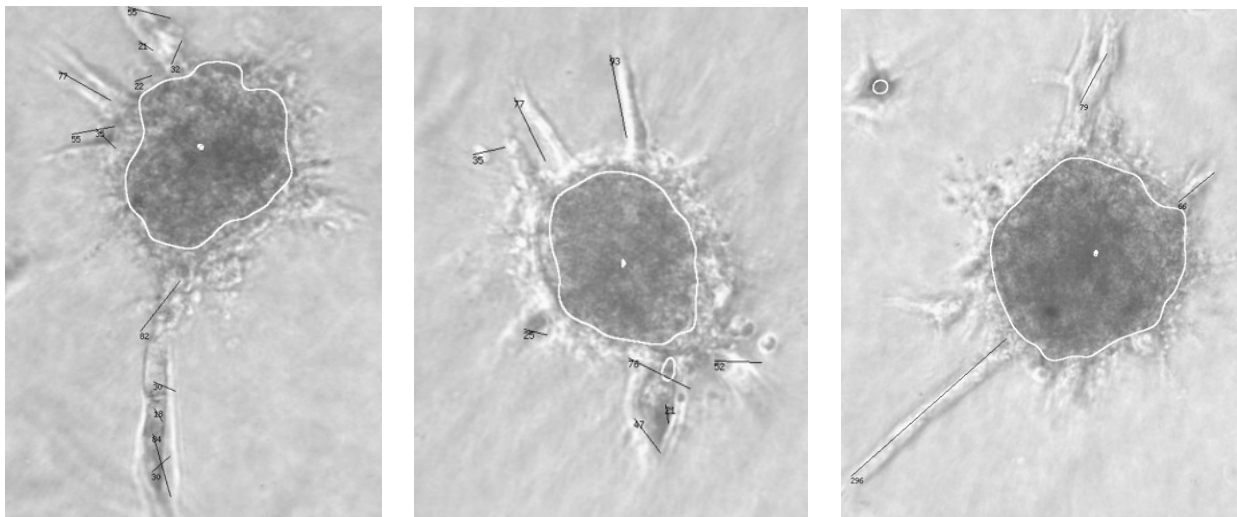


Abbildung 30: Gefundene und Vermessene Sprossen

Wenn jedoch eine große Zahl an Sprossen im Bild vorhanden ist, wird es zunehmend schwerer die Korrelationspunkte den jeweiligen Sprossen zuzuordnen.

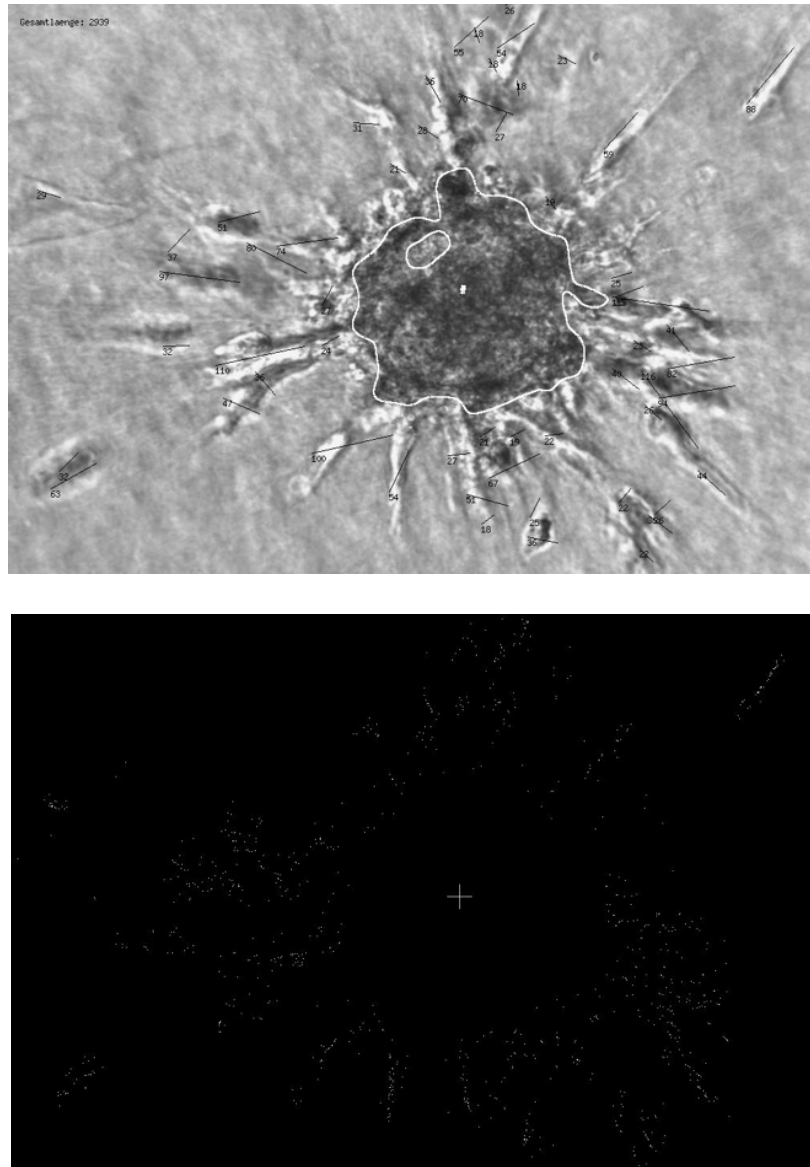


Abbildung 31: oben die verbundenen Punkte unten das Ergebnis des Houghvotings

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben zu Beginn die schon markierten Sprossen aus den Bildern ausgelesen und geeignete Sprossen für die Korrelation ausgewählt. Nachfolgend wurden die Sprossenquerschnitte in Klassen unterteilt.

Als nächstes wurden die Originalbilder mit dem Gradientenfilter auf ihre Kanten reduziert. Um kleine Grauertunterschiede im Hintergrund herauszufiltern wurden nur die geraden Kanten weiterverwendet. Die Kanten im inneren des Sphäroids konnten wir durch die Segmentation desselbigen eliminieren. Anhand der Gradientenrichtungen der Kanten wurden Sprossenkandidaten aus den Originalbildern ausgelesen und mit den Templates der Sprossenquerschnitte korreliert. Durch die Anwendung des Houghfilters wurden die Korrelationsergebnisse auf die Punkte reduziert, die in etwa auf Geraden lagen. Anschließend wurden die Anfangs- und Endpunkte der Geraden verbunden und ihre Länge gemessen. Das Verbinden der Punkte stellte sich besonders bei einer großen Anzahl und eng benachbarten Sprossen als schwierig heraus.

Verbesserungsmöglichkeiten sehen wir unter anderem in der Erstellung des Codebooks und der Geradenfindung.

Als Prototypen einer Klasse haben wir stets den ersten Kandidaten gewählt. Besser wäre ggf. den Sprossenquerschnitt als Template zu wählen, der den am häufigsten vorkommenden Kandidaten am ähnlichsten ist.

Alternativ zur Geradenfindung im Ortsraum, ist auch eine Separierung im Houghraum denkbar. Da sich alle Punkte, die auf einer Gerade liegen im Houghraum an einer Stelle kreuzen, könnte man diese Punkte in einer Liste speichern. Anschließend müssten die Punkte sortiert und verbunden werden, falls sie einen Maximalabstand nicht überschreiten.

## Literatur

[maxflow] VLADIMIR KOLMOGOROV und YURI BOYKOV:  
*www.adastral.ucl.ac.uk/vladkolm/software.html*, 2001

[amd] ALTERSBEDINGTE MAKULADEGENERATION: ETABLIERTE UND NEUE BEHAND-  
LUNGSVERFAHREN  
*www.uke.uni-hamburg.de/kliniken/augenklinik/downloads/klinik-  
augenheilkunde/AMDInternetDtsch.pdf*

[Gonzalez, Woods] RAFAEL C. GONZALEZ, RICHARD E. WOODS  
*Digital ImageProcessing, 2nd International Edition Prentice Hall*, 2002

[gdLibrary] GD GRAPHICS LIBRARY  
*www.boutell.com/gd/*