

GEM İMGELERİNDEKİ Fe_3O_4 NANO PARÇACIKLARIN BÖLÜTLENMESİ

SEGMENTATION OF Fe_3O_4 NANO PARTICLES IN TEM IMAGES

Ulas Vural and Ayse Betul Oktay

Bilgisayar Mühendisliği Bölümü
İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Göztepe, İstanbul, Türkiye

Eposta: { ulas.vural, abetul.oktay }@medeniyet.edu.tr

Özetçe —Geçirimli elektron mikroskobu ile çekilmiş imgelerdeki nanoparçacıkların otomatik olarak bölütlenmesi, şekillerinin ve boyutlarının bulunması maddelerin analizi için oldukça önemlidir. Günümüzde, manuel olarak yapılan bu işlem hem öznel sonuçlar üretmekte hem de çok zaman almaktadır. Bu çalışmada, nanoparçacıkları bölütlemek için yeni bir yöntem sunulmuştur. Yöntem, ilk olarak makine öğrenmesi ile arkaplan/nesne ayrımı yapmaktadır. Daha sonra, bağlı bileşenler analizi ile nesneleri kabaca belirleyip, Hough dönüşümü ile nanoparçacıkları bulmaktadır. Yöntem, on farklı imge üzerinde test edilmiştir. Yöntemin bulduğu nanoparçacıklar uzmanların elle çizdiği sonuçlara ve ImageJ yazılımı ile çizilen sonuçlara benzer olup, sonuçlar ümit vericidir.

Anahtar Kelimeler—Nanoparçacık, Bölütleme, Hough dönüşümü, Adaboost

Abstract—Automatic segmentation of nanoparticles and determination of their shapes and sizes from transmission electron microscopy images are crucial for material analysis. Manual segmentation of nanoparticles produces subjective results and it is time-consuming. In this study, a new method is proposed for the automatic segmentation of the nanoparticles. First, background and foreground detection is employed with machine learning. Then, the nanoparticles are coarsely detected with connected component analysis and they are determined with Hough Transform. The method is tested on ten different images. The nanoparticles segmented with our method are similar to the nanoparticles segmented manually by experts and ImageJ software and the results are promising.

Keywords—Nanoparticles, Segmentation, Hough transform, Adaboost

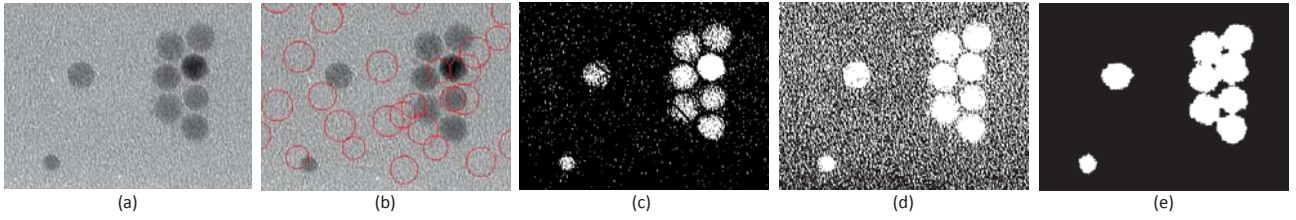
I. GİRİŞ

Manyetik nanoparçacıklar uygulama alanlarının çokluğu nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Nanoparçacıkla sentezlenen malzemelerin özellikleri nanoparçacıkların şekilleri ve boyutları ile yakından ilintilidir. Günümüzde nanoparçacıkların yapısal özellikleri Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) kullanılarak belirlenmektedir. Nanoparçacıklar daire, elips ya da

poligon gibi şekillerdedir ve boyutları değişmektedir. GEM ile alınan görüntüler insanlar tarafından gözle analiz edilmekte ve parçacıkların boyutları ölçülmektedir. Otomatik olmayan bu yöntem uzmanların çok fazla zamanını almakla birlikte, öznel sonuçlara da yol açmaktadır. Ayrıca, üstüste gelen nanoparçacıkların belirlenip ölçülmesi sıkıntı yaratmaktadır. Bu nedenle, GEM görüntülerinden otomatik olarak nanoparçacıkları bölütleyerek boyutlarını bulan bir sisteme ihtiyaç vardır.

Otomatik olarak nanoparçacıkları bulan ve boyutlarını belirleyen bir sistem geliştirmek zordur. Bunun en önemli nedeni imgelerde çok fazla gürültü olmasıdır. Bunun dışında üstüste gelen parçaları gözle dahi ayırdedebilmek neredeyse imkansızdır. Ayrıca, arkaplandaki doku çoğunlukla nanoparçacıkla karıştırılabilmektedir. Şekil 1.(a)'da Fe_3O_4 nanoparçacıkları içeren bir imge kesiti gösterilmiştir.

GEM imgelerindeki parçacıkları bulmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır [1], [2]. Konomi ve diğerleri [3], nanoparçacıkları noktalardan oluşan şablonlarla temsil etmiş ve Bayes metodu ile parçacıkları bulup önceden tanımlı 5 sınıfa ayırmışlardır. Geliştirmiş oldukları metodu GEM imgelerinde Fe_3O_4 nanoparçacıklarından gözle açıkça ayırtılabilen altın nanoparçacıkları üzerinde test etmişlerdir. [4]'te imge analizi ile Fe_2O_3 nanoparçacıkların boyutunu bulmak için eliptik biçim değiştirebilir model sunulmuştur. Bu sistem sınırlı sayıda GEM görüntüsünde test edilmiştir ve kullanılan model karmaşıktır. [5] aşamalı bir şekilde önce nanoparçacık imgelerindeki kenarları bulmuş daha sonra doğrusal olmayan izdüşüm yöntemi ile sınırlardan öznelilikler çıkartıp yarı-otomatik bir şekilde bunları önceden tanımlı sınıflara ayırmıştır. Başka bir çalışmada ise nihai erozyon metodu ile birleşik parçacıklar ayrıldıktan sonra referans şekillere göre bir kontur geliştirilerek nanoparçacıklar bulunmuştur [6]. Bunların yanında, National Institute of Health (NIH) tarafından açık kaynak kodlu ImageJ [7] isimli yazılım kullanıcıların mikroskop görüntülerindeki hücreleri yarı-otomatik olarak belirlemeleri için sunulmuştur. ImageJ yazılımı oldukça temel görüntü işleme yöntemlerini sunmakta, nanoparçacıkların şekilleri için geometrik modelleri hesaplayamamaktadır.



Şekil 1. (a) GEM imgesinden bir kesit, (b) Imgeye doğrudan Hough dönüşümü uygulanması, (c) Otsu yöntemiyle nesne ayrımı, (d) Renk sıklık değerlerine bağlı arkaplan/nesne ayrımı ve (e) önerilen yöntemin Adaboost ile bulduğu arkaplan/nesne ayrımı. Yöntemlerin hiç birine filtre uygulanmamıştır.

Bu çalışmada, GEM imgelerindeki dairesel şekillerdeki Fe_3O_4 nanoparçacıklarının bölütlenip, çaplarının bulunması için bir yöntem sunulmuştur. Yöntem ilk olarak arkaplan/nesne ayrımı yapmaktadır. Arkaplan ayrımı için imgelerden yerel ikili örüntü öznelikleri çıkartılıp Adaboost ile eğitilmektedir. Adaboost ikili sınıflandırma yaparak bir pikselin arkaplan olup olmadığını vermekte ve test sonucunda bir ikili imge elde edilmektedir. İmge üzerinde nesne olarak işaretlenmiş bölgeler öncelikle bağlı bileşen analizinden geçirildikten sonra uygun bağlı bileşen grupları asgari kapsayan dairelerle gösterilmektedir. Üst üste binmiş nanoparçacıklardan içerdiği düşünülen bağlı bileşen grupları ortalama bağlı bileşen boyutuna göre belirlenmektedir. Ortalama boyuttan büyük olan bu gruplardaki nanoparçacıklar ise Hough dönüşümü ile tespit edilmektedir.

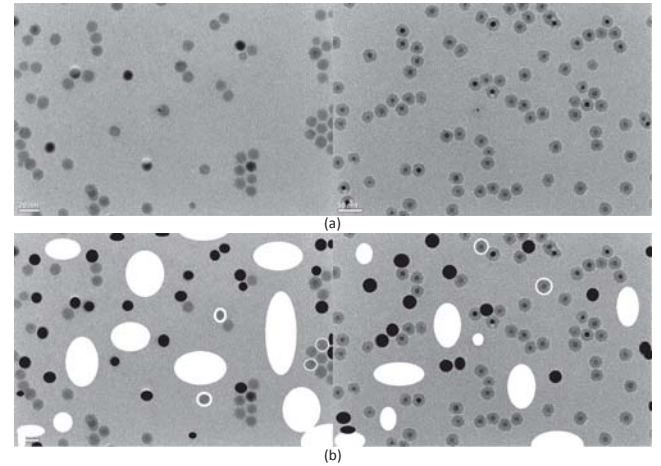
Geliştirilen yöntem farklı ölçeklerdeki silikonlu ve silikonsuz gerçek GEM imgeleri üzerinde test edilmiştir. Yöntemin bulduğu sonuçlar, uzmanlar tarafından elle çizilen ve yarı-otomatik ImageJ yazılımıyla üretilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Yöntemin bulduğu dairesel parçacık çaplarının log normal dağılıma sahip olduğu sıklık grafikleriyle gösterilmiştir.

II. YÖNTEM

GEM imgeleri üzerindeki Fe_3O_4 nanoparçacıkları dairesel şekillerde görülmektedir. Dairesel şekillerin bulunmasında oylama temelli Hough dönüşümleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, Hough dönüşümünün gürültüye karşı hassasiyeti bilinmektedir. Hough dönüşümünün oldukça gürültülü bir yapıda olan GEM görüntüleri (Şekil-1.(a)) üzerinde doğrudan kullanılması mümkün değildir (Şekil-1.(b)). Bu nedenle, GEM imgeleri üzerinde ön işleme ile arkaplan ve nesne ayrımının yapılması gereklidir. Eşik değer seçimine ihtiyaç duymayan, kümeleme tabanlı Otsu yöntemi de gürültülü GEM imgelerinde başarılı sonuçlar vermemektedir (Şekil-1.(c)). Tek imge üzerinde arka plan çıkarımı için imgede bulunan elemanların parlaklık değerlerinin sıklık grafiği (histogram) kullanılmaktadır. Bu yöntem hem eşik değerinin hassas bir şekilde belirlenmesine ihtiyaç duyar hem de GEM imgeleri gibi gürültülü imgelerde istenilen sonuçları vermez (Şekil-1.(d)). Bu yöntemlerin başarılı şekilde çalışmamasının en temel nedeni nesnelerin ve arkaplanın dokulu yapıda olmaları ve sıklıkla diğer gruba ait renk değerlerini içlerinde barındırmalarıdır.

GEM imgeleri üzerinde hem renk değerlerini hem de doku özelliklerini hesaba katarak arka plan/nesne ayrımı yapılması gereklidir. Bu nedenle, makine öğrenmesi temelli bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, iki sınıflı AdaBoost sınıflandırıcı kullanılmaktadır. W genişliği ve H yüksekliğindeki I GEM imgesinin $i \in [1, W], j \in [1, H]$ olduğunda her bir p_{ij} elemanı

için parlaklık ve doku değerlerinin sıklık grafiklerinden bir x_{ij} öznelilik vektörü oluşturulur. Oluşturulan her bir x öznelilik vektörünün boyutu D olur ve D iki sıklık grafiğinin toplam selesi sayısına eşittir. Parlaklık değerlerinin sıklık grafikleri boyutları WS olarak belirlenmiş kare bir komşuluk penceresi içindeki diğer elemanların parlaklık değerleri de kullanılarak hesaplanır. Bu pencere içindeki azami ve asgari parlaklık değerleri de birer öznelilik olarak kullanılır. Benzer şekilde ve aynı büyüklükte kare bir komşuluk penceresinden elde edilen doku sıklığı grafiği için ise yerel ikili örüntülerin (Local Binary Patterns) [8] değerleri kullanılmaktadır.



Şekil 2. (a) Eğitimde kullanılan GEM imgeleri, (b) Elle verilmiş etiket değerler: Siyah renk nesneleri, beyaz renk ise arka planı göstermektedir.

Makine öğrenmesi için eğitim aşamasında GEM imgelerinde elle işaretlenmiş nesne ve arkaplan pikselleri kullanılmıştır (Bkz. Şekil-2). Kullanılan eğitim imgelerinde tüm imge kullanılmamış sadece sınırlı sayıda nesne ve arkaplan elemanı kullanıcı tarafından işaretlenmiştir. Her bir işaretlenmiş p_{ij} elemanının sınıf değeri $y_{ij} \in \{-1, 1\}$ olarak belirlenmiştir. Tüm y_{ij} sınıf değerleri eğitim aşamasında kullanılacak Y etiket kümesini oluştururlar. Kullanılan AdaBoost algoritması [9] D boyutlu x özneliliklerinin bir kümesi olan $X \in R^D$ ve bu kümenin her bir elemanını bir sınıf etiketine eşleyen Y kümesini girdi olarak alır. Test aşamasında kullanılan her bir etiketsiz imge elemanı sınıflandırma işleminden sonra eğer nesne ise $+1$, arkaplan ise -1 değerini alır.

Arkaplan/nesne ayrımı sonrası elde edilen BG arkaplan/nesne imgesi iki renklidir. BG üzerinde morfolojik erozyon ve yayılım işlemleri uygulamak mümkündür. Bununla

birlikte, morfolojik işlemler bir önceki aşamada bulunan nesnelerin daireselliklerinin kaybolmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, BG imgesi üzerinde bağlı bileşenler analizi (connected component analysis) yapılması tercih edilmiştir. Analiz sonrasında imge üzerinde bulunan tüm b bağlı bölgeleri, $S(b)$ alanlarına göre sıralanarak B bağlı bölgeler kümesini oluştururlar. B kümesi içinde yer alan bağlı bileşenler tekli Fe_3O_4 nanoparçacıkları içerdikleri gibi gürültü ve üstüste binmiş parçacıkları da içermektedir. B kümesi içinde problemli b bağlı bileşenlerinin bulunması için otomatik olarak eşik değeri belirleyebilen bir yöntem geliştirilmiştir. Bunun için öncelikle B kümesinin içinde yer alan bağlı bölgelerin ortalama alanı $Ort(S(B))$ bulunmaktadır. Ortalama alana bağlı olarak her $b \in B$ bağlı bölgesinin sınıflandırılması Denklem 1 ile yapılmıştır:

$$C(b) = \begin{cases} S(b) < \alpha_1 * Ort(S(B)) & \text{ise } Gurultu, \\ S(b) > \alpha_2 * Ort(S(B)) & \text{ise } Coklu, \\ Diger & Tekli. \end{cases} \quad (1)$$

Bu aşamada $C(b) = Gurultu$ olan b bağlı bölgeleri B kümesinden çıkartılır. *Tekli* parçacıklar sınıfındaki her b grubu için asgari kapsayan daire $KD(b)$ bulunur ve bu bağlı bölgeler bulunan kapsayan dairelerle ifade edilirler. GEM imgesinde üst üste binmiş olarak görünen Fe_3O_4 nanoparçacıklarının ek adımlarla ayrıştırılması gerekmektedir. Bu aşamada $C(b) = Coklu$ şartını sağlayan her b bağlı bölgesi için Hough dönüşümü uygulanır. Hough dönüşümü için verilmesi gereken merkezler arası asgari mesafe mD ve asgari ve azami yarıçap uzunluğu mR ve MR parametreleri tekli parçacıklar için bulunmuş $KD(b)$ kapsayan dairelerinin $r(KD(b))$ yarıçaplarına bağlı olarak otomatik bir şekilde ayarlanır (Denklem-2). Bu aşamada bulunan dairelerden merkezleri arkaplana denk gelenler filtrelendir.

$$\begin{aligned} mD &= \beta_1 * Ort(r(KD(b))) \\ mR &= \beta_2 * Ort(r(KD(b))) \quad \forall b, C(b) = Tekli. \\ MR &= \beta_3 * Ort(r(KD(b))) \end{aligned} \quad (2)$$

III. DENEYLER

Sistem, OpenCV açık kaynak kodlu bilgisayarla görme kütüphanesi kullanılarak geliştirilmiştir ve tüm testler 2,5Ghz işlemci ve 4GB belleği olan bir bilgisayarda gerçekleştirilmiştir. Sisteminin eğitim aşaması ortalama 27,8 saniye sürmektedir. Her biri 1002x668 boyutlarında olan 9 adet test imgesi üzerinde denenmiştir. Deneylerde tüm değişkenler bir kez ayarlanmış ve imgeye göre ince ayar yapılmamıştır. Kullanılan değişkenlerin deneysel olarak belirlenmiş değerleri şu şekildedir: $\alpha_1=0,5, \alpha_2=1,2, \beta_1=0,75, \beta_2=0,7, \beta_3=1.2$ ve $WS=3$.

Şekil 3(a)-(c)'de sistemin üzerinde test edildiği 9 gerçek GEM imgesi gösterilmiştir. İmgeler üzerindeki nanoparçacıklar 3 farklı renk ile işaretlenmiştir. Sistemin bağlı bileşen analizi sonrası bulunduğu sınırlar mavi renk ile, Denklem 1 ile bulunan parçacıklar kırmızı renk ile, Denklem 2 sonrası Hough dönüşümü ile bulunan parçacıklar ise sarı renk ile gösterilmiştir. Mavi sınırlar bağlı bileşen analizi ile bulunduğu için dairesel özellik taşımamaktadır. Kırmızı renk ile gösterilen parçacıklar asgari kapsayan daireler olduğu için üstüste binmeyen parçacılarda başarılı sonuçlar verirken,

üstüste binmiş parçacıkları bulamamaktadır. Eğitimlerinin sadece 20nm ölçeğindeki resimlerle yapılmasına rağmen sistemin 50nm ölçeğindeki imgelerde de başarılı bir şekilde çalıştığı not edilmelidir (Şekil-3.(a)). Ayrıca, nanoparçacıkların boyutları log-normal dağılım göstermelidir [4]. 3(d)'de, 3(c)'de bulunan dairesel parçacıkların yarıçaplarına göre dağılımları gösterilmiştir. Bu dağılımların lognormal dağılıma sahip olduğu gözükmemektedir.

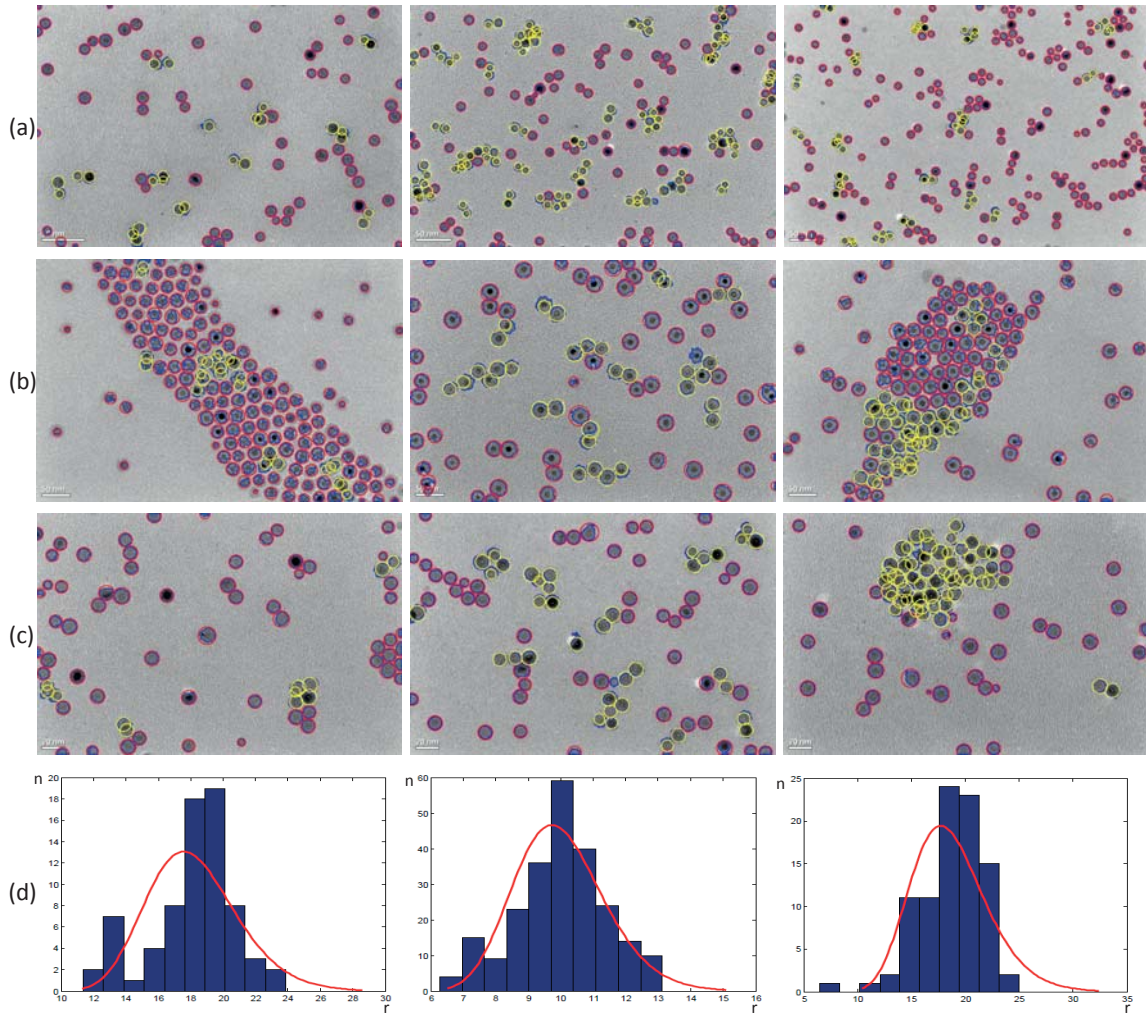
Nanoparçacıkları içeren kesin gerçek (İng. ground truth) yoktur. Bu nedenle, geliştirilen sistemin uzmanların sonuçlarına benzer sonuçlar üretmesi beklenmektedir. Sistemin ürettiği sonuçlar 5 adet GEM imgesi üzerinde sayısal olarak üç uzmanın çizimleri ve ImageJ yazılımının sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapmak için Dice metriği [10] kullanılmıştır. Bu metriğe göre 2 uzmanın çizdiği dairelerin kesişiminin 2 katı, dairelerin toplamına bölünmüştür. Dice metriğinin 1'e yakın olması çizimlerin örtüşme miktarının büyük olduğunu göstermektedir. Tablo 1'de uzmanların elle çizimleri arasındaki piksel farkları, uzman çizimleri ve sistemin arasındaki farklar ve bunların ImageJ yazılımı ile bulunan farklar gösterilmiştir. Mesela, Uzman 1 ve Uzman 2'nin çizimleri ortalaması Dice metriğine göre 0,88'dir. Tablo 1'deki rakamlara göre önerilen sistemin ürettiği sonuçlar Uzman1 ve Uzman2'ye Uzman3'den daha yakındır. Ayrıca, ImageJ programının ürettiği sonuçlar ortalamadan çıkartıldığında, sistemin ortalama Dice skoru Uzman2 ile de aynı seviyelere gelmektedir. ImageJ sonuçlarına bakıldığı zaman sonuçların daha düşük olduğu görülmektedir. Bu ImageJ yazılımının daire oturtmaması ve gürültüyü elimine edememesinden kaynaklanmaktadır. Bir uzmanın bir resmi elle çizmesi yaklaşık 7-13 dakika, yarı-otomatik ImageJ programı ile çizmesi ise 1,5 dakika sürmektedir. Önerilen sistemde ise 5 çalıştırma sonunda ortalama imge başına çalışma süresi ise 1,3 saniyedir.

Tablo 1. Uzmanların, ImageJ yazılımının ve önerilen sistemin 5 imge üzerindeki işaretleme sonuçlarının Dice metriğine göre karşılaştırılması

	Uzman1	Uzman2	Uzman3	ImageJ	Sistem
Uzman1	-	0,88	0,84	0,79	0,86
Uzman2	0,88	-	0,82	0,82	0,85
Uzman3	0,84	0,82	-	0,73	0,83
ImageJ	0,79	0,82	0,73	-	0,77
Sistem	0,86	0,86	0,83	0,77	-
Ortalama Hata	0,84	0,84	0,80	0,78	0,83
Ortalama Hata (ImageJ Hariç)	0,86	0,85	0,83	0,78	0,85
Ortalama Süre (sn)	799,2	672,6	468,8	108,0	1,3

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada, GEM imgelerinden otomatik olarak nanoparçacıkları bölütleme için bir yöntem sunulmuştur. İmgelerdeki nanoparçacıklar, arkaplandaki dokunun parçacıklarla benzerlik göstermesi ve üstüste gelen parçacıklar nedeniyle Otsu eşik değeri, renk sıklık değerleri ile nesne ayırımı gibi klasik metotlarla bulunamamaktadır. İlk etapta, doku ve parlaklık öznelikleri kullanılarak arkaplan/nesne ayırımı yapılmış, bağlı bileşenler analizi ve Hough dönüşümü ile parçacıklar bölütlenmiştir. Yöntem, kesin gerçek olmadığı için uzman sonuçları ve ImageJ yazılımı ile bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır ve sonuçlar ümit vericidir. Sistemin ürettiği sonuçlar uzmanların ürettiği sonuçlarla başarılı bir şekilde örtüşmektedir. Nanoparçacık



Şekil 3. (a-c) Sistemin üzerinde test edildiği imgeler ve bölütleme sonuçları: Mavi sınırlar bağlı bileşen analizi sonuçlarını, kırmızı sınırlar asgari kapsayan daire sonuçlarını, sarı sınırlar ise Hough dönüşümü sonrası bulunan sınırları göstermektedir. (d) ise (c) satırındaki imgelerin bölütlenmesi sonucu ortaya çıkan dairelerin yarıçaplarına göre dağılımlarını göstermektedir. Dağılımlar olması gerektiği gibi lognormal dağılımdır.

boyutlarının imgeye göre otomatik olarak belirlenebilmesi farklı ölçeklerde ve farklı yapılarıdaki imgeler üzerinde ek ayarlama ihtiyacını ortadan kaldırmıştır. Gelecekte, çeşitli optimizasyon yöntemleri kullanılarak sadece dairesel değil poligonal şekillerdeki nanoparçacıkları bölütlemek için sunulan yöntemin geliştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] A. Mendizabal, J. Cabrera, L. Salgado, N. N. Garcia, and J. C. Gonzalez, "Unsupervised segmentation algorithm of hrtem images," in *ICIP*. IEEE, 2004, pp. 2757–2760.
- [2] L. Cervera Gontard, D. Ozkaya, and R. Dunin-Borkowski, "A simple algorithm for measuring particle size distributions on an uneven background from tem images," *Ultramicroscopy*, vol. 111, 2011.
- [3] B. A. Konomi, S. S. Dhavala, J. Z. Huang, S. Kundu, D. Huitink, H. Liang, Y. Ding, and B. K. Mallick, "Bayesian object classification of gold nanoparticles," *The Annals of Applied Statistics*, vol. 7, no. 2, pp. 640–668, 06 2013.
- [4] R. Fisker, J. Carstensen, M. Hansen, F. BÄ,dker, and S. MÄ,rup, "Estimation of nanoparticle size distributions by image analysis," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 2, no. 3, pp. 267–277, 2000.
- [5] C. Park, J. Huang, D. Huitink, S. Kundu, B. Mallick, H. Liang, and Y. Ding, "A multi-stage, semi-automated procedure for analyzing the morphology of nanoparticles," *IIE Transactions special issue on nanomanufacturing*, vol. 44, no. 7, pp. 507–522, 2012.
- [6] C. Park, J. Huang, J. Ji, and Y. Ding, "Segmentation, inference and classification of partially overlapping nanoparticles," *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, vol. 35, no. 3, pp. 1–1, 2013.
- [7] W. Rasband, "Imagej. u. s. national institutes of health, bethesda, maryland, usa,," <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- [8] T. Ojala, M. Pietikainen, and D. Harwood, "Performance evaluation of texture measures with classification based on kullback discrimination of distributions," in *Proc. of the 12th IAPR Int. Conf. on Pattern Recognition*, 1994, pp. 582 – 585.
- [9] J. Friedman, T. Hastie, and R. Tibshirani, "Additive logistic regression: a statistical view of boosting," *The annals of statistics*, vol. 28, no. 2, pp. 337–407, 2000.
- [10] L. R. Dice, "Measures of the amount of ecologic association between species," *Ecology*, vol. 26, no. 3, pp. 297–302, July 1945.