

ANALYSE VON OBJEKTAGGLOMERATEN IN BILDERN

U. Jütting, P. Gais, K. Rodenacker, U. Schenck*), G. Burger

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München
Institut für Strahlenschutz
D-8042 Neuherberg bei München

*) Institut für Klinische Zytologie
Technische Universität
D-8000 München

Zusammenfassung

Zur analytischen Zytologie von Schilddrüsenaspiraten wurde an einem Bildanalyse-System ein Programm zur vollautomatischen Vermessung von Einzelzellen und Zellverbänden entwickelt und eingesetzt.

Bilder von Giemsa-gefärbten Schilddrüsenpräparaten werden in einem TV-Mikroskop automatisch erfaßt und digitalisiert. Ein Autofokus und ein schneller Tisch übernehmen Scharfstellen und Bildfeldwechsel. Die Bildinhalte werden grob segmentiert in Einzelzellkerne und Kernagglomerate sowie den verbleibenden Untergrund und mittels spezieller Prozeduren gereinigt. Auf das resultierende Binärbild wird ein Zerlegungsalgorithmus angewandt, der zufällige Kernverbände, ebenso wie folliculäre Anordnungen, in Einzelzellen trennt. Jedes so gewonnene Objekt wird erneut gereinigt und die Größe, der Umfang und die mittlere optische Dichte gemessen. Mittels geeigneter Algorithmen werden sodann Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den isolierten Zellkernen zur Erkennung der Follikel untersucht. Die verwendeten Algorithmen werden beschrieben.

1. Einleitung

Die analytische Zytopathologie stellt heute eines der wichtigsten Anwendungsgebiete der quantitativen Bildverarbeitung in der Medizin dar. Die vorliegenden Zell- und Gewebepreparate werden dabei nicht oder nicht nur einer visuellen mikroskopischen Beobachtung und Beurteilung unterzogen, sondern sie werden von einer okularseitig an das Mikroskop angeschlossenen Fernsehkamera erfaßt und mittels geeigneter Algorithmen vermessen. Die wichtigste zytopathologische Information befindet sich in den einzelnen Zellkernen, bzw. den ganzen Zellen sowie im Falle histologischer Schnitte zusätzlich im Aufbau und der Strukturierung des Gewebeverbandes. An den einzelnen Zellen interessieren morphologische Merkmale, wie Größe und Form von Zellkern und Zytoplasma, zytochemische Merkmale, wie Farbstoffanlagerungen an den Zellbausteinen sowie strukturelle Merkmale, wie z.B. besonders die Chromatinstruktur des Kerns. Solche Merkmale sind leicht zu bestimmen, wenn die Zellen in den Präparaten vereinzelt vorliegen und sich durch geeignete Färbung ausreichend kontrastreich darstellen. Man versucht dies in einigen Anwendungsgebieten durch Herstellung von Glasträgerpräparaten aus monodispersen Zellsuspensionen zu erreichen. Hierbei geht jedoch immer begleitende Zellbildinformation verloren. Dies gilt sowohl für die exfoliative Ausstrichzytologie, wie besonders für die Feinnadelpunktionszytologie. Will man hier mit Originalpräparaten arbeiten, muß man nicht nur vor-

handene Einzelzellen entdecken, sondern ebenso Anlagerungen und Zellhaufen untersuchen und mittels geeigneter Trennverfahren möglichst viele brauchbare Einzelzellen daraus herstellen. Schließlich interessieren in allen Fällen, in denen Zellhäufungen nicht nur rein statistisch begründet sind, auch noch Merkmale der Zellagglomerate. Hierüber soll am Beispiel der Bildanalyse konventioneller Schilddrüsenpunktate berichtet werden.

2. Aufgabenstellung

Am IfZ der TU München (Prof. Dr. H.-J. Soost) wurden in den vergangenen 10 Jahren 21000 Schilddrüsenpunktate aus kalten Knoten untersucht. Darunter waren 954 verdächtige und positive Fälle. Es handelte sich dabei zum größten Teil um Präparate, die das Zellbild der follikulären Proliferation zeigten. Dieses Zellbild ist ebenso typisch für follikuläre Adenome wie für hochdifferenzierte follikuläre Karzinome. Eine eindeutige visuelle Klassifizierung in diese beiden Tumorarten ist nicht möglich. An eine vollautomatische Präparate-diagnose werden daher folgende Anforderungen zu stellen sein:

- Untersuchung der Populationen aller Einzelzellen im Präparat
- Erkennung des Vorkommens von follikulären Strukturen und Vermessung
 - der Einzelzellen in diesen Strukturen
 - der Strukturen selbst.

3. Durchführung

Untersuchung an Einzelzellen

Da sich bei den Giemsa-gefärbten Präparaten die Zellkerne meist ausreichend kontrastreich darstellen (Abb. 1, Bild OR), geschieht die Grobsegmentierung aller Objekte mittels eines einfachen Schwellwertalgorithmus. Dazu wird zuerst eine Graubildouverture /4/ durchgeführt. Dadurch verschwinden kleinere Artefakte und Untergrundobjekte. Sodann werden von diesem Bildfeld das Grauwertistogramm aller Pixel erzeugt, der den Kernen zuzuordnende Peak mit den höchsten Grauwerten bestimmt und anhand von Mittelwert und Streumaß dieses Peaks die Schwelle festgelegt. Das damit erhaltene Binärbild (Abb. 1, Bild BB) wird sodann weiter verarbeitet. Dies geschieht in folgenden zwei Schritten:

- Die Szene wird sukzessive erodiert mit dem kleinsten möglichen Radius von einem Bildpunkt. Dabei wird ständig abgefragt ob sich das Bild des vorhergehenden Erosionsschrittes noch rekonstruieren läßt. Ist das nicht mehr der Fall, werden die Restobjekte vor dem Verschwinden abgetrennt und festgestellt, ob es Einzelobjekte oder Agglomerate sind. Im Falle von Zusammenlagerungen (Konnexitätszahl $\neq 0$), wird durch schrittweise Exoskelettierung /3/ die Trennung der Einzelkerne durchgeführt, wie in Abb. 2 schematisch dargestellt.

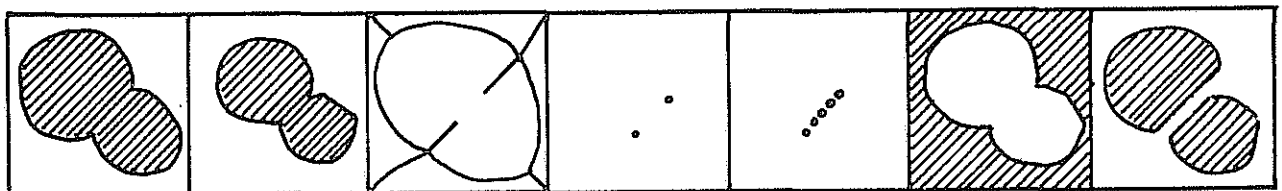


Abb. 2: A B=DIL(A) C=EXSK(B) D=AND(A,C) ... D E=NOT(A) F=NOR(D,E)

- Alle Einzelobjekte werden von links oben im Bildfeld beginnend erfaßt und durch eine geeignete Fermeture vorverarbeitet. Sodann werden die mittlere Kernextinktion (KEM 1), die Fläche (KEFL) und der Objektumfang (KERD) bestimmt, daraus kombinierte Merkmale, wie Formmerkmal (KEP2A) oder die totale Kernextinktion (KETOTE) errechnet und abgespeichert. Objekte, deren Fläche oder Formmerkmal bestimmte visuell abgeschätzte Grenzwerte überschreiten, werden verworfen.

Die beschriebene Routine läuft vollautomatisch und verarbeitet ein Punktionspräparat mit rund 10000 Einzelzellen in ca. 14 Stunden, wobei die Bildfeldgröße 256 x 256 Pixel beträgt und der Pixelabstand 0.5 um ist. Das Ergebnis sind Verteilungen, wie sie in Abb. 3 für KEFL, KETOTE und KEM1 für ein Präparat beispielhaft dargestellt sind. Da die Trennung von Agglomeraten zu Fehlern in der Flächenbestimmung und in den daraus abgeleiteten Merkmalen führt, werden bei den gezeigten Verteilungen die Anteile für echte Einzelzellen und für Zellen aus Zusammenlagerungen getrennt bestimmt. Wären die Zusammenlagerungen nur statistisch bedingt, könnten letztere Verteilungen durch Vergleich mit denen der Einzelzellen korrigiert werden.

Da dies zumindest für alle folliculären Zellverbände (Abb. 4) nicht gilt, sind diese in jedem Fall getrennt zu erkennen und zu behandeln.

Erkennung folliculärer Zellverbände:

Für die Erkennung folliculärer Zellverbände wurden zwei Algorithmen entwickelt, die im Folgenden schematisch dargestellt sind.

Verfahren 1:

A = gereinigtes und zerlegtes
Binärbild
B = FERMETURE(A,radius)
C = NOT(B)
D = ELRA(C) Rand löschen
Inneres der Follikel
E = OR(B,D)
F = EROSION(E,radius/2)
G = EXOR(E,F)
äußerer Rand
H = GRASSF(A,G)
mögliche äußere Follikelzellen

SL: if (D = 0) goto end
I = EOB(D)
erstes Objekt von oben
J = EXOR(I,D)
K = DILATATION(I,radius/2)
L = EXOR(K,I)
innerer Rand
M = GRASSF(L,A)
mögl. innere Follikelzellen
N = AND(M,H)
mögliche Follikelzellen
P = FERMETURE(N,radius)
Merkmalsextraktion
if (CONNEX(P) = 0) goto SL
end: Bildfeld abgearbeitet

Verfahren 2:

A = gereinigtes und zerlegtes
Binärbild
B = FERMETURE(A,radius)
C = SKELETT(B)
D = OR(A,C)
Einzelzellen und Skelettlinien
E = NOT(D)
F = ELRA(E) Rand löschen
Inneres von Follikeln

SL: if (F = 0) goto end
G = EOB(F)
erstes Objekt von oben
H = EXOR(F,G)
I = DILATATION(G,radius/2)
J = GRASSF(I,A)
mögliche Follikelzellen
K = FERMETURE(J,radius)
Maske von Follikel

Merkmalsextraktion
goto SL
end: Bildfeld abgearbeitet

Dabei sind hier Erosion, Dilatation, Fermeture und Ouverture sowie Skelett, Operationen der mathematischen Morphologie, angewandt auf Binärbilder, wie sie von Serra /2/ entwickelt wurden. Diese Operationen sowie GRASSF (= Grassfire) sind in /1/ beschrieben. Die weiteren verwendeten Operationen sind Grundoperationen oder selbsterklärend.

Die Ergebnisse der wichtigsten Verarbeitungsschritte der beiden Verfahren werden anhand einer ausgewählten Szene (Abb. 1) schematisch dargestellt.

Man erkennt, daß in beiden Fällen die notwendige Bedingung für die Existenz eines Follikels, das Auftreten von Innenbereichen im Verarbeitungsschritt D bzw. F ist. Als nächstes werden im Verfahren 1 Zellkerne gefunden in H und M, die zu einem 'äußeren und einem inneren Rand' des Follikels gehören. Schließlich ist noch die Bedingung zu erfüllen, daß die Objekte einen Mindestabstand zueinander nicht überschreiten. Dazu muß die Operation P wieder zu einer geschlossenen Fläche mit Innenbereich führen. Im gezeigten Beispiel verschwindet das rechtsliegende mögliche Follikel. Das Endergebnis ist in Abb.1 im Bild FOLL wiedergegeben.

Im Verfahren 2 müssen die Objekte nur zu einem inneren Rand gehören, der in diesem Fall definiert ist durch die Skelettlinien und die innere Berandung von Follikelzellen.

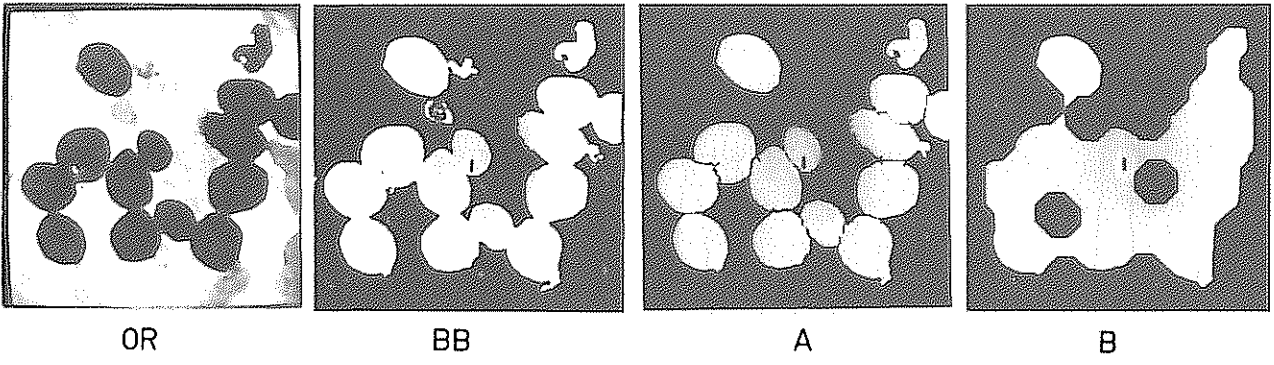
Beide Verfahren wurden anhand visuell ausgesuchter Zellverbände mit unterschiedlich stark erkennbaren follikulärem Charakter erprobt und miteinander verglichen. Es zeigt sich, daß beim Verfahren 2 mehr Follikelzellen akzeptiert und damit mehr Follikel gefunden werden. Beide Verfahren werden z.Z. in die automatische Bildverarbeitungsroutine eingebaut.

Von den gefundenen Follikeln werden sodann die Merkmalsverteilungen der Einzelzellen erstellt, als auch folgende Follikelmerkmale wahlweise bestimmt:

Fläche des Follikels	
Fläche der Follikelzellen	
Anzahl der Follikelzellen	
Fläche des Follikelinneren	} Formparameter
Randlänge des Follikelinneren	
Randlänge des Follikeläußeren.	

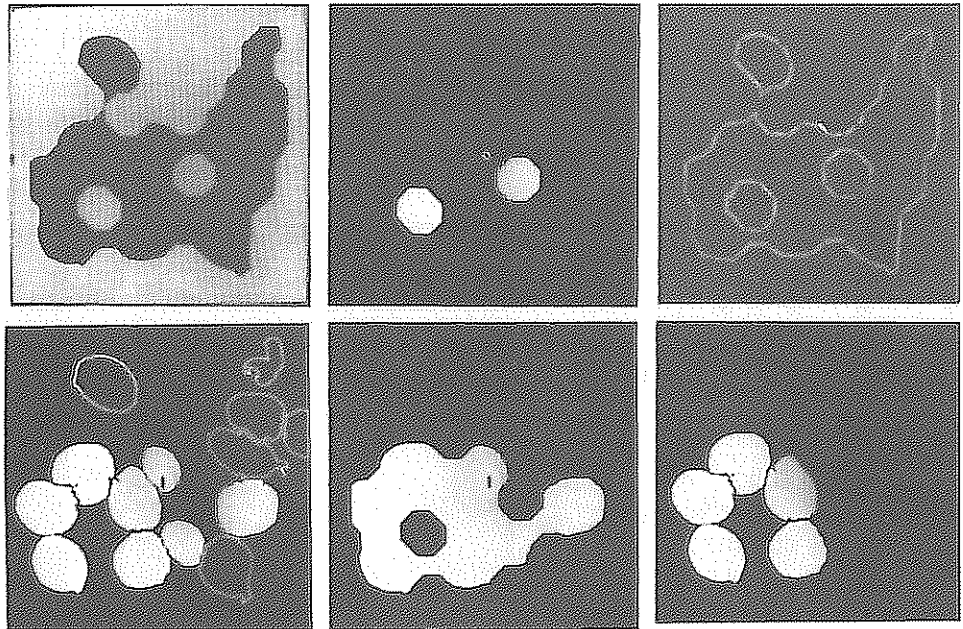
Ergebnis:

Bisher wurden 21 Punktionspräparate vollautomatisch abgetastet und die Einzelzellmerkmale bestimmt. Pro Präparat wurden zwischen 5000 und 30000 Zellkerne vermessen. Anhand der Einzelzellmerkmale scheint eine überzeugende Klassifikation von Adenomen und Karzinomen nicht möglich. In der Literatur finden sich darüber unterschiedliche Auffassungen, die meist aus Ergebnissen anhand weniger, interaktiv ausgesuchter Zellen resultieren. Es ist zu erwarten, daß die Einbeziehung der follikulären Strukturen in die Maschinendiagnose eine eindeutige Stellungnahme gestatten.



Verfahren 1

C	D	G/L
N	P	FOLL



Verfahren 2

C	D	F
I	FOLL	FOLL

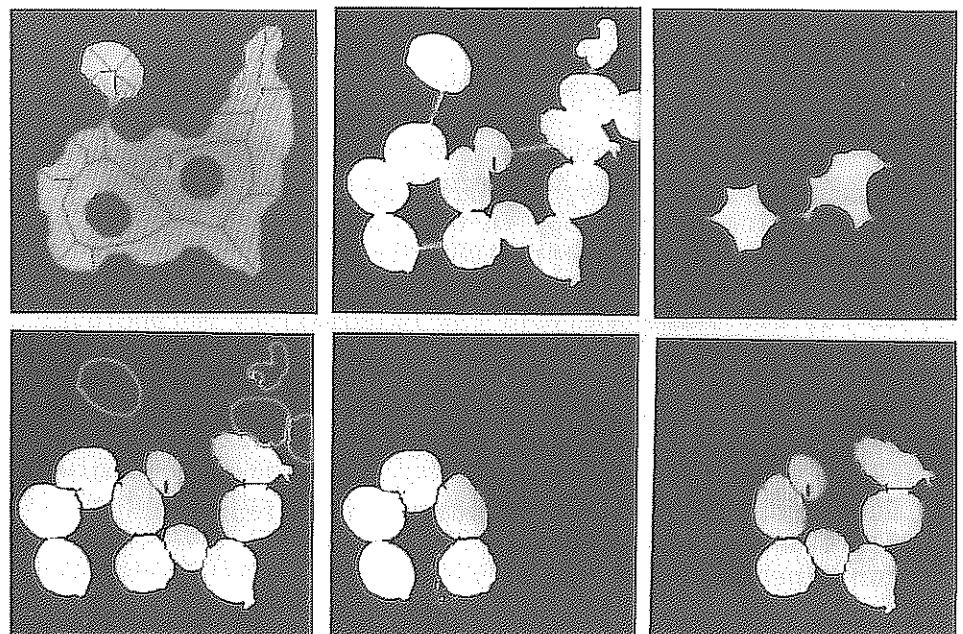


Abb.1

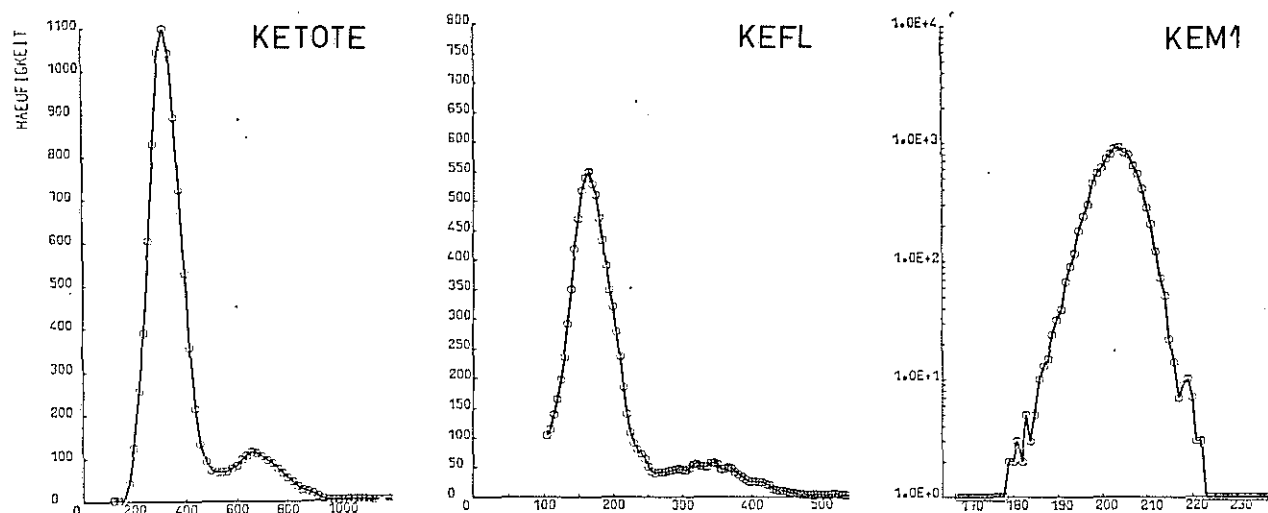


Abb. 3: Häufigkeitsverteilungen der Merkmale KETOTE, KEFL und KEM1

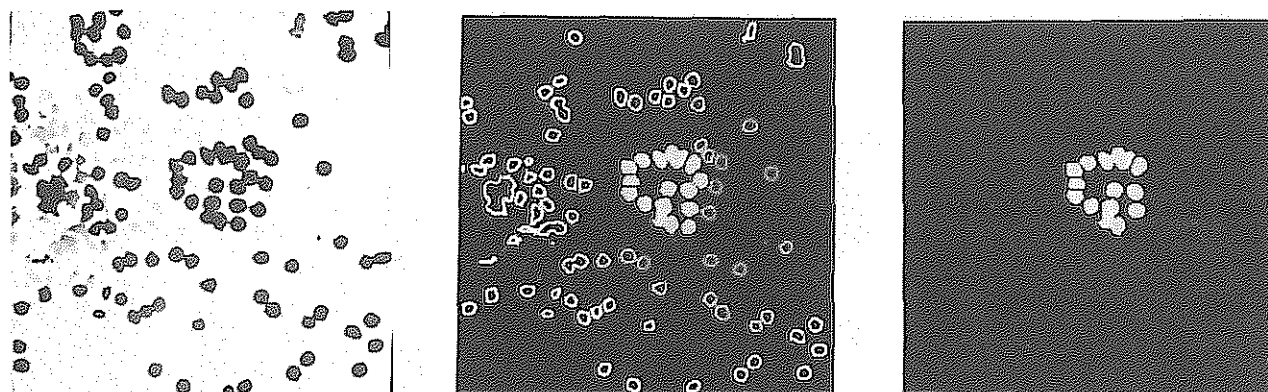


Abb. 4: Beispiel einer Follikelbestimmung in einem Punktionspräparat

Referenzen:

- /1/ Rodenacker, K., Gais, P., Jütting, U., Burger, G.
Mathematical Morphology in Grey-Images
EUSIPCO, Erlangen, Sept. 1983, in Druck
- /2/ Serra, J.: Image Analysis and Mathematical Morphology,
Academic Press, London, 1982
- /3/ Meyer, F.: Cytologie Quantitative et Morphologie Mathématique,
Thèse, Ecole des Mines de Paris, 1979
- /4/ Guedj, M.: Rapport sur le stage d'ingénieur,
Ecole des Mines de Paris,
Fontainebleau, 1982

Mustererkennung 1983

*Vorträge des 5. DAGM-Symposiums
vom 11. – 13. Oktober 1983 in Karlsruhe*

*Wissenschaftliche Tagungsleitung
H. Kazmierczak, Karlsruhe*

*Veranstalter
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Mustererkennung (DAGM)
Ausrichtung durch die Nachrichtentechnische Gesellschaft
im VDE (NTG)*

VDE-VERLAG GmbH

Berlin · Offenbach