

Automatische mikroskopische Relokalisation von Zellkern-Ensembles mit Hilfe eines multimodalen Szenenvergleiches

Sven-Olaf Ropers¹, Thomas Würflinger¹, André Alexander Bell¹,
Alfred Böcking² und Dietrich Meyer-Ebrecht¹

¹Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen, 52056 Aachen
Internet: <http://www.lfm.rwth-aachen.de/mmza>

²Institut für Cytopathologie, Heinrich-Heine-Universität,
Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

Internet: <http://www.med.uni-duesseldorf.de/CytoPathologie/>
Email: {sr,tw,ab}@lfm.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Die vorgestellte Methode ist ein Lösungsansatz für die automatische erneute Aufnahme von Serien von Zellbildern an gespeicherten Positionen dar, die nun in anderen zytologischen Färbungen vorliegen. Alleiniges Wiederaufsuchen der Positionen (Repositionierung) reicht zur Wiederauffindung (Relokalisation) der Zellen aufgrund von Ungenauigkeiten nicht aus. Ein auf Segmentierung basierender Vergleich von Zellkernkonstellationen (Szenen) in unterschiedlichen Färbungen soll die anschließende Positionskorrektur und eine robuste Initialisierung für die abschließende Registrierung der multimodalen Bilder ermöglichen. Die Erfolgsquote der hier beschriebenen Methode liegt bei $\approx 85\%$.

1 Einleitung

Entartete Zellen sind die frühesten Manifestationen einer Tumorbildung; an ihnen sind bereits Vorstadien von Krebs zu diagnostizieren. Einen Fortschritt soll hier die *Multimodale Zellanalyse* (MMZA) bringen. Krebsdiagnosen sollen zu einem früheren Zeitpunkt an nur wenigen Körperzellen mit höherer Treffsicherheit möglich werden. Kern ist die Kombination sich ergänzender Analysemethoden in einem kaskadierten Umfärbeprozess am selben mikroskopischen Präparat an jeweils relokalierten Zellen, mithilfe einer an einem ansteuerbaren Mikroskop durchgeführten Positionsspeicherung. Die Vorteile verschiedener Färbungen werden kombiniert durch Korrelation jeweils sichtbar gemachter Eigenschaften an individuellen Zellen [1].

Die ab der zweiten Färbung erfolgende *Repositionierung* am Mikroskop führt aufgrund ungenauen Einlegens des Präparates und Toleranzen in der Mikroskop-Mechanik nicht unmittelbar zur exakten *Relokalisation* identischer Zellkern-Ensembles. Obwohl die Zellen meist teilweise im *field of view* (FOV) liegen (typisches, translatorisches, Displacement $10-30\mu\text{m}$, Zellkerndurchmesser ca. $10\mu\text{m}$), sind doch Nachkorrekturen erforderlich, um die Anzahl multimodal auswertbarer Zellen zu maximieren. Für den routinemäßigen Einsatz muss dieser Vorgang

automatisiert werden. Dazu wird die vom Menschen vorgenommene Erkennung von (Sub-)Zellkernensembles und deren Vergleich (*Szenenvergleich*) simuliert. Hierfür werden zunächst Zellkerne im gespeicherten Bild und im Mikroskop-Live-Bild vorsegmentiert. Das resultierende Wissen über die Bildszenen dient als Vergleichskriterium, aufgrund dessen über eine (Teil-)Identität der Szenen entschieden und ggf. die Aufnahmeposition korrigiert wird.

2 Stand der Forschung

Die Voraussetzungen dieses Problems sind verschieden von denen der klassischen Bildregistrierung: Die ROI liegen i.a. nach Repositionierung noch nicht komplett im FOV. Daher müssen auch Subszenen identifiziert werden, und zwar zur Aufnahmezeit. Bilder von Zellkernen auf annähernd homogenem Hintergrund führen bei rein pixelbasierter Registrierung zu lokalen Optima, weshalb ein inhaltsbasierter Vergleich zu bevorzugen ist. Die Unterschiedlichkeit der Färbungen erschwert die Registrierung auch mit dem Mutual-Information-Kriterium, wenn die Initialisierung nicht sehr nahe am globalen Minimum erfolgt. Somit bedarf auch die abschließende subpixelgenaue Registrierung einer Initialisierung mittels Szenenvergleich. Für das vorliegende Problem wurden in der Literatur keine Lösungsansätze gefunden.

3 Materialien

Der Mikroskop-Arbeitsplatz besteht aus dem Durchlichtmikroskop Leica DMLA mit 63-fach-Objektiv (Öl-Immersion) und PC-gesteuertem, motorbetriebenem Kreuztisch, einer Digitalkamera JAI CV-M90 (768x576 Pixel RGB 3x8Bit) und einem PC für Mikroskopansteuerung, Bildaufnahme und -analyse. Daraus resultieren eine Pixelkantenlänge von $0.0992 \mu\text{m}$ sowie ein FOV von $76.2 \times 57.1 \mu\text{m}$. Die automatische Aufnahme mittels Szenenvergleich wurde an acht Präparaten aus entzündlichen und tumorzellenhaltigen Körperhöhlenergüssen durchgeführt. Es lagen jeweils Bildserien (≈ 200 Bilder, ≈ 12 Zellen/Bild) in einer oder zwei der Färbungen *May-Grünwald-Giemsa* (MGG), *Feulgen* (FEU) und *Silbernitrat* (SIL) vor. Auf ihnen basierend wurde eine weitere Färbung aufgenommen. Es ergaben sich zwölf Serienaufnahmen mit insgesamt 2014 Zellkonstellationen, sechsmal FEU nach MGG, dreimal SIL nach FEU und dreimal SIL nach MGG.

4 Methoden

Die automatische Relokalisation beginnt mit der Repositionierung und einem Autofokus. Es folgen die Vorsegmentierung von Zellkernen und der Szenenvergleich. Bei Ungleichheit dehnt eine Suchstrategie die Suche über das FOV hinaus aus. Im Folgenden werden Vorsegmentierung und Szenenvergleich erläutert.

4.1 Vorsegmentierung

Wegen der Ausführung zur Aufnahmezeit und des anschließenden Vergleiches lediglich ganzer Konstellationen von Zellkernen wird auf dieser Stufe die Geschwindigkeit auf Kosten einer exakten Delineation bevorzugt. Deshalb wird von *Vorsegmentierung* gesprochen.

Die weitgehend monochromatischen Bilder werden zur Vorverarbeitung mittels färbungsspezifisch empirisch ermittelter Linearkombinationen der Farbkanäle in Grauwertbilder transformiert. Für MGG und SIL werden mittels des Otsu-Verfahrens zunächst der Hintergrund segmentiert und durch erneute Anwendung auf dem Rest-Histogramm Zellkerne von Zytoplasma getrennt. Da letzteres von FEU nicht angefärbt wird, reicht eine einmalige Schwellwertbestimmung nach dem Dreieck-Algorithmus [2].

Die resultierenden Binärbilder benötigen eine morphologische Nachbearbeitung. Nach einem Closing werden per Flood-Filling Löcher gefüllt. Um anschließend zu kleine oder zu lang gestreckte Objekte zu entfernen, ohne dabei die Form der Zellkerne zu beeinflussen, werden nun ein Opening und ein kleineres Closing durchgeführt und das Ergebnis mit dem Eingangsbild UND-verknüpft.

Die Trennung sich berührender und überlappender Zellkerne erfolgt allein aufgrund von Formkriterien: Zellkerne sind meist konvex, wohingegen Cluster gegenüberliegende Konkavitäten aufweisen. Wird auf das Binärbild die Distanztransformation angewendet und das Ergebnisbild invertiert, so trennt eine abschließende Wasserscheidentransformation den geforderten Formkriterien entsprechende Kerncluster entlang den Verbindungslinien der Konkavitäten, was für die vorliegende Anwendung ausreicht.

4.2 Szenenvergleich

Mit Hilfe des Szenenvergleiches soll die (Teil-)Übereinstimmung von Zellkern-Ensembles in zwei Bildern unterschiedlicher Färbung sowie die Parameter einer zum Matching führenden Translation ermittelt werden. Mit paarweiser Überlagerung der segmentierten Binärbilder, dem *Kern-Masken-Matching*, wird zunächst das beste Matching ermittelt. Auf diesem wird im *Bildvergleich* über die Identität entschieden.

Kern-Masken-Matching: Jeder Kern der ersten Maske g_1 wird mit jedem Kern der zweiten Maske g_2 , $g_1(x, y), g_2(x, y) \in \{0, 1\}$, im Schwerpunkt überlagert. Für jedes Paar berechnet sich das zu maximierende Gütekriterium Q_1 über den gemeinsamen Bildbereich zu

$$Q_1 = \sum_{x,y} (g_1(x, y) \text{ AND } g_2(x, y)) \cdot \frac{A_{small}}{A_{big}}, \quad (1)$$

mit A_{small} , der Fläche des kleineren, und A_{big} , der Fläche des größeren Kerns. Q_1 vereint ein globales mit einem lokalen Vergleichskriterium. Ist nur ein gemeinsamer Zellkern in beiden Färbungen hinreichend gut segmentiert, wird das korrekte Matching gefunden. Auch verschiedene Szenen führen zu einem Matching. Die weiteren Operationen werden auf dem gemeinsamen Bildausschnitt

des Matchings durchgeführt. Das Matching wird nun mittels Registrierung der Grauwertbilder mit dem Mutual-Information-Kriterium fein justiert.

Bildvergleich: Mit dem Bildvergleich wird nun die hypothetisierte Gleichheit beider Subszenen anhand der Kernmasken überprüft. Zunächst soll ein *multimodaler Schwellwert* die Segmentierung in der vermeintlich weniger robust segmentierbaren Färbung unter Kenntnis der anderen Segmentierung verbessern. Dazu wird die Anzahl der Vordergrundpixel in dieser Färbung der entsprechenden Anzahl in der anderen angepasst, indem ihr Schwellwert adaptiert und erneut auf das Grauwertbild angewendet wird. Dies setzt voraus, dass bei der Abbildung der Färbungsintensitäten gleicher Strukturen von einer Färbung auf die andere möglichst wenig Kontrastumkehr vorkommt. Mit beiden Masken wird anschließend das Güte-Kriterium Q_2 berechnet:

$$Q_2 = \frac{\sum_{x,y} (g_1(x,y) \text{ AND } g_2(x,y))}{\sum_{x,y} (g_1(x,y) \text{ OR } g_2(x,y))} \quad (2)$$

Dieser Anteil identischer Vordergrundpixel wird 1 für perfekte Übereinstimmung (s. Abb. 1). Die Gleichheit der Szenen wird mit einem empirisch ermittelten Schwellwert entschieden. Ist dieser überschritten, wird die Kreuztischposition mit dem durch das Matching ermittelten Translationsvektor korrigiert und das Bild aufgenommen. Andernfalls wird die Umgebung mit der Suchstrategie abgesucht.

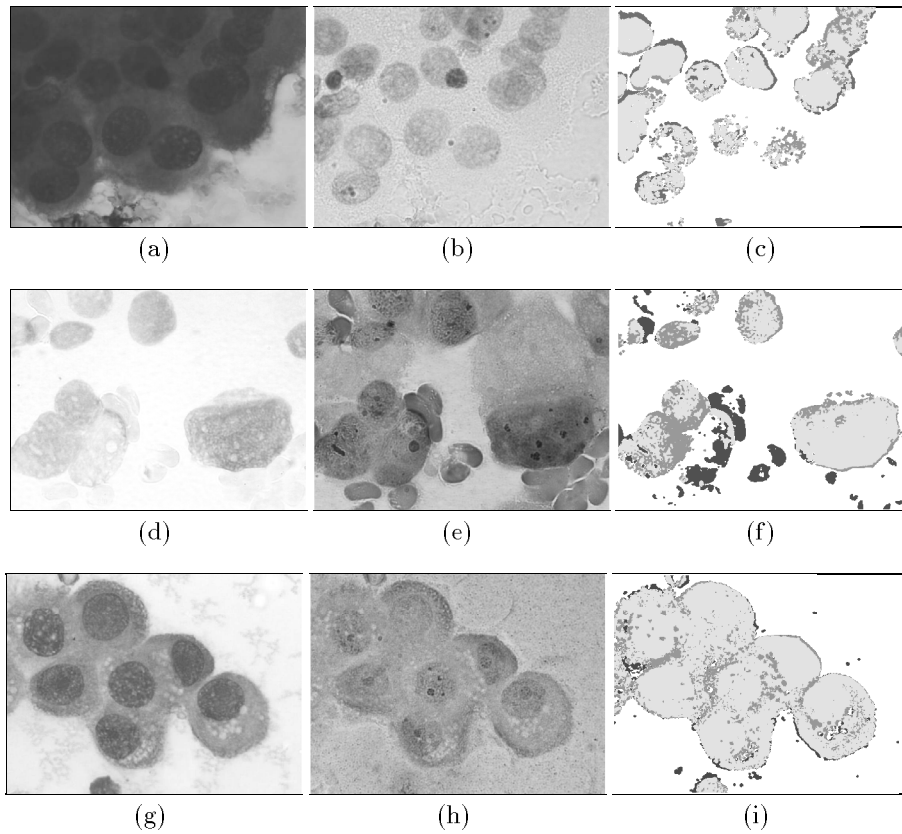
5 Ergebnisse

Für eine bis auf ca. $1\mu\text{m}$ genaue Relokalisation war aufgrund mechanischer Ungenauigkeiten eine durchschnittlich 1.6-fache Wiederholung von Szenenvergleich und Korrektur der Tischposition erforderlich. Die hier nicht behandelte Suchstrategie für initiale Fehlpositionierungen über das FOV hinaus, führte zu einer Steigerung der Erfolgsquote um 7%. Zwei der acht Objektträger waren wegen ungeklärter Koordinatensprünge nicht auswertbar, für die restlichen Serien ergab sich eine Erfolgsrate von 85.4% (1328/1556 Bilder bzw. Szenen). Die nicht erfolgreich relokalierten Szenen gliedern sich in 14.3% nicht gefundene bzw. nicht als identisch erkannte und nur 0.3% fälschlich als identisch erkannte auf. Die diagnostisch bedenkliche Aufnahme falscher Zellen kommt also nur sehr selten vor. Drei Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.

6 Diskussion

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, die Relokalisation von umgefärbten Zellen für die multimodale Zellanalyse zu automatisieren. Liefert der beschriebene Szenenvergleich auch bei schlechter Segmentierung robuste Ergebnisse, so liegt doch in der Segmentierung Verbesserungspotential für die Gesamterfolgsrate, z.B. durch Einsatz eines Verfahrens, das bei ähnlicher Geschwindigkeit die lokale Bildinformation besser nutzt.

Abb. 1. Originalbilder und Maskenbild-Überlagerungen erfolgreicher Szenenvergleiche: (a)MGG, (b)FEU, (d)FEU, (e)SIL, (g)MGG, (h)SIL, (c, f, i) Überlagerungen, gemeinsamer Vordergrund hellgrau, Rest-Vordergrund mittel- und dunkelgrau



Danksagung

Das Projekt wird vom Viktor-und-Mirka-Pollak-Fonds unterstützt.

Literaturverzeichnis

1. Böcking A, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D. Towards a single cell cancer diagnosis. Multimodal and Monocellular Measurements of Markers and Morphology (5M). Cellular Oncology 2004;26:73-39.
2. Platzek C. Evaluierung verschiedener Segmentierungsalgorithmen. Universität Karlsruhe; 2004.