Automatische Segmentierung und morphometrische Analyse von Nervenbiopsien

A. Knepper[1], A. Dölemeyer[1], M. Mugler[2], J. M. Schröder[2], D. Meyer-Ebrecht[1]

[1] Lehrstuhl für Meßtechnik
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52056 Aachen
Email: achim@lfm.rwth-aachen.de

[2] Institut für Neuropathologie
Klinikum der RWTH Aachen, 52057 Aachen
Email: neupath@alpha.imib.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Lichtmikroskopische Aufnahmen gefärbter Semidünnschnitt-Präparate von Nervenbiopsien müssen bei einer Vielzahl von neuromuskulären Erkrankungen morphometrisch analysiert werden. Es wird hier eine weitgehend automatische Ermittlung klinisch relevanter Parameter vorgestellt. Die nach Vorverarbeitung, Kantendetektion und region growing noch verbundenen Objekte werden mit einem statistischen und einem geometrischen Ansatz aufgetrennt. Für die klassifizierten Nervenfasern wird die Axon-Markscheiden-Relation bestimmt. Außerdem werden neue Beschreibungen der Rundheit der Nervenfasern eingeführt.

Schlüsselwörter: Nervenbiopsie, Segmentierung, Canny-Operator, Distanztransformation, Morphometrie

1 Einleitung

Am Institut für Neuropathologie des Klinikums der RWTH Aachen befindet sich das Referenzzentrum für neuromuskuläre Krankheiten bei der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie. Die Mehrzahl der hier im Jahr untersuchten ca. 400 Nervenbiopsien bedürfen einer diagnostischen Präzisierung mit Hilfe morphometrischer Methoden. Die Bildanalyse ist wegen der Komplexität und Größenverteilung der beteiligten Strukturen und wegen des oft nur quantitativ, weniger qualitativ erfaßbaren Ausfalls bestimmter Größenklassen und Fasertypen von entscheidender diagnostischer Bedeutung. Das gilt insbesondere für die Quantifizierung von De- und Regenerationsvorgängen sowie von Therapieerfolgen (Kompensation und Rehabilitation) oder Mißerfolgen und Prognosefaktoren [1].

Derzeit erfolgen die Auswertungen der zu messenden Strukturen "von Hand" am Mikroskop mit dem Meßokular oder auf Fotografien. Es wurden daher in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie, gefördert von dem START-Programm der RWTH, analyseunterstützende Verfahren zur weitgehend automatischen Ermittlung signifikanter morphometrischer Parameter (Faserdichte, Größenverteilungen, Axon-Markscheide-Relation, Markscheidendicke, Formmerkmale) entwickelt.

2 Segmentierung

Die als Eingangsbilddaten verwendeten lichtmikroskopischen Aufnahmen von eingefärbten Semidünnschnitt-Präparaten werden in ein für die nachfolgende Segmentierung optimales Merkmalsbild transformiert.

Hierbei wird als Gütekriterium der Kontrast des bei der Transformation entstehenden Graustufenbildes gewählt. Es wird eine Regressionsgerade durch die im dreidimensionalen RGB-Farbraum eingetragenen Bildpunkte berechnet. Die Projektion jedes Bildpunktes auf die linear skalierte Regressionsgerade definiert dann seinen monochromatischen Grauwert [2].

Für die Einteilung des Bildinhaltes nach Objekt (Markscheideflächen) und Hintergrund (Axone, Bindegewebe) kann neben Formwissen (z.B. jede Markscheide umgibt nur ein Axon) auch die homogene Verteilung des Hintergrunds ausgenutzt werden. Die Segmentierung erfolgt mit einem durch ein Kantenmerkmalsbild gesteuertem region growing und einer anschließenden Objekttrennung von fehlerhaft zusammengefaßten Strukturen. Das verwendete Verfahren des region growing entspricht dem zugrunde liegenden biologischen Modell der Nervenfaser und der hier angewandten Färbetechnik, da ausgehend von Keimpunkten im Objektinnern räumlich zusammenhängende, kompakte Regionen gebildet werden.

2.1 Kantendetektion

Ausgangsbasis des region growing ist ein Kantenmerkmalsbild sowie eine adaptive Schwellwertbildung für Bereiche mit nicht geschlossenen Konturen. Der Kantendetektor sollte so gewählt werden, daß drei Kostenfunktionen [3] gleichzeitig optimiert werden.

- Fehlerrate - nur Kanten werden detektiert.
- Lokalisation - der Abstand zwischen den vom Kantendetektor gefundenen Kantenpixeln und der korrekten Kante soll so klein wie möglich sein.
- Filterantwort - auf eine einzige Kante nur eine Filterantwort.

Der Operator nach Shen-Castan (infinite symmetric exponential filter) [4] berücksichtigt nur die ersten beiden Bedingungen, zeigt aber bei Eingangsdaten mit schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis eine gute Performance. Bei dem hier vorliegenden Bildmaterial ist der Canny-Operator [5], trotz seiner Approximation des optimalen Detektors durch den Gradienten des Gauß-Filters, besser geeignet, da alle drei Kostenfunktionen berücksichtigt werden.

Die Bildfunktion wird mit den Richtungsableitungen der Gauß-Funktion in beiden Richtungen gefaltet. Der Gradientenbetrag liefert ein gutes Maß für die Stärke der Kante. In einem abschließenden Schritt werden alle Punkte entfernt, die kein lokales Maximum bilden (nonmaximum-suppression).

2.2 Objekttrennung

Kontrastarme Übergänge zwischen eng anliegenden Nervenfasern müssen nachbearbeitet werden, wenn die Gradienteninformation nicht ausreicht um Kantenpunkte zu detektieren. Zur Separierung der beim region growing verschmolzenen Objekte werden zwei Ansätze verfolgt, die beide die morphometrische Analyse nur vernachlässigbar beeinflussen.

Die statistische Objekttrennung orientiert sich an der Grauwertintensität des Objektes. Für alle Objekte des Gesamtbildes werden sequentiell die Bildpunkte in sichere und unsichere Pixel eingeteilt. Bei sicheren Pixeln ist die Differenz zum mittleren Grauwert der Region größer als die Standardabweichung der Grauwerte der Region. Die Auftrennung erfolgt, indem nur solche unsicheren Bereiche gelöscht werden, die an mindestens zwei unverbundene sichere Bereiche grenzen [6].

Bei der nachfolgende geometrischen Objekttrennung dient die Form des Objektes als einziges Kriterium der Separation. Hierzu wird mit einem effizienten sequentiellen Algorithmus [7] innerhalb von zwei Iterationen die Distanztransformation des binarisierten Markscheidenmerkmalbildes mit vorher aufgefüllten Axonen berechnet. Die resultierenden Distanzwerte der Objekte (in Abb. 1 grauwertkodiert dargestellt) können auch eine dreidimensionale Struktur bilden, wenn die Distanzwerte als Höhenkoordinate aufgefaßt werden. Ein kreisförmiges Objekt z.B. wird dann einen Kegel bilden. An der Verbindungsstelle zweier Objekte entsteht ein Sattelpunkt, d.h. benachbarte Distanzwerte weisen in einer Richtung aufsteigende und orthogonal dazu abfallende Werte auf. Beginnend von diesen Sattelpunkten werden Trennungslinien für verschmolzene Objekte gebildet, indem in Richtung fallender Distanzwerte der kürzeste Pfad zum nächst gelegenen Objektrand berechnet wird.

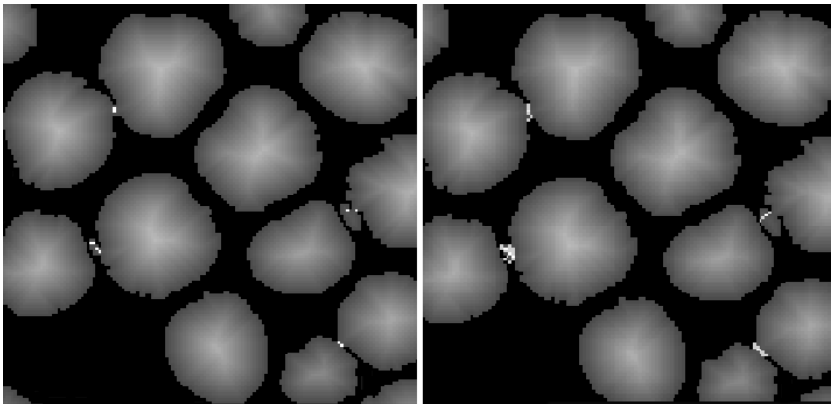

Abb. 1: Sattelpunkte (links) und Trennungslinien (rechts) im distanztransformierten Bild.

3 Morphometrische Messungen

Bei der anschließenden morphometrischen Analyse werden klinisch relevante Parameter aus den gewonnenen Objektklassen extrahiert. Neben den in der klinischen

Routine schon verwendeten Maßen wurden neue, differenziertere Beschreibungen der Form und der Größenverteilung von Nervenfasern entwickelt.
Während bei der Bestimmung der Faserdichte (prozentualer Anteil der Objektfläche an der Gesamtbildfläche) auch vom Rand beschnittene Objekte mit erfaßt werden, sind Randobjekte bei der Berechnung aller anderen Parameter nicht berücksichtigt worden. Neben der Berechnung der Axon- und Markscheideflächen und ihrer Größenverteilung ist vor allem ihr Verhältnis, die Axon-Markscheide-Relation, von entscheidender diagnostischer Bedeutung.

Der unscharf gefaßte Begriff der Rundheit wurde durch drei unter klinischen Aspekten entworfenen Beschreibungen präzisiert. Diese Definitionen einer allgemeinen, globalen und lokalen Rundheit genügen den notwendigen Bedingungen der Rotations-, Skalierungs- und Verschiebungsinvarianz. Eine allgemeine Formbeschreibung wird durch das Verhältnis von Fläche zu quadriertem Umfang gewonnen, die globale Rundheit läßt sich mittels Bestimmung normierter Zentralmomente zweiter Ordnung, bezogen auf die Kreisform, analytisch beschreiben [8]. Ein lokales Rundheitsmaß beschreibt die hochfrequenten Anteile der Außenkontur. Welligkeiten der Markscheideumhüllungen, ungeachtet einer globalen Deformation des Objektes, weisen auf spezielle pathologische Veränderungen hin (z.B. an den Schmidt-Lantermanschen Inzisuren [9]). Dieses lokale Maß ergibt sich aus der energetischen Betrachtung höherer Koeffizienten der in ihr Spektrum zerlegten Kontur [10].

Die abschließende Bestimmung der mittleren Markscheidedicke erfolgt aus einer Distanztransformation der Objekte mit anschließender Skelettierung. Im Vergleich zu Erosionsverfahren wird so sensibler auf Irregularitäten des Konturbereiches reagiert und werden Abhängigkeiten von einer Vorzugsrichtung vermieden.

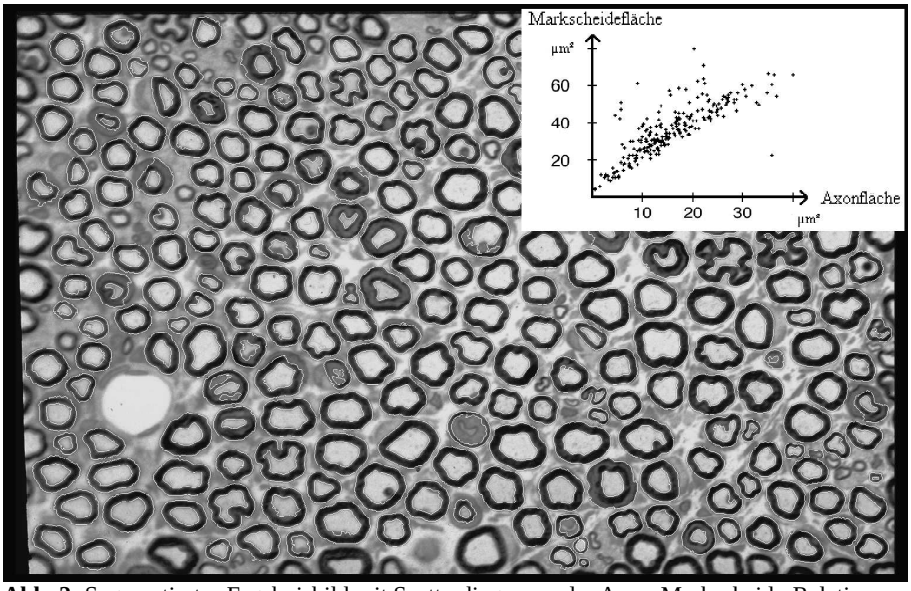

Abb. 2: Segmentiertes Ergebnisbild mit Scatterdiagramm der Axon-Markscheide-Relation.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Mustererkennungssystem zur Klassifikation, Vermessung und Formbeschreibung von Nervenfasern vorgestellt. Damit ist eine objektive und reproduzierbare morphometrische Auswertung der Präparate möglich geworden.

Es wurden gefärbte Semi-Dünnschnitt-Präparate benutzt, in denen Markscheiden besonders kontrastreich sind. Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Nervenbiopsien reicht eine 160-fache Vergrößerung der Präparate für eine hinreichend genaue automatische morphometrische Auswertung aus. Die Auswertung erfolgte an digitalisierten Diapositiven und an mit einer hochauflösenden CCD-Farbkamera (1950x1300 Pixel) aufgenommenen Bildern. Neben den bisher in der klinischen Routine benutzten Parametern Faserdichte, Faseranzahl, Axon- und Markscheidefläche und deren Relation sowie Durchmesser des flächengleichen Kreises können jetzt zusätzlich drei Formbeschreibungen und die mittlere Markscheidedicke automatisch bestimmt werden. Die klinische Relevanz der jetzt neu zur Verfügung gestellten morphometrischen Maße ist gegenwärtig noch Gegenstand von weiterführenden Untersuchungen.

5 Literatur

1. Bertram M, Schröder JM: Developmental changes at the node and paranode in human sural nerves: Morphometric and fine-structural evaluation. Cell Tissues Res 273:499-509, 1993.
2. Russ JC: Optimal Grey Scale Images from Multiplane Color Images. J. Comp. Ass. Microsc., 7(4):221-233, 1995.
3. Parker JR: Algorithms for image processing and computer vision. John Wiley & Sons, New York, 1997.
4. Canny J: A Computational Approach to Edge Detection. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell., 8(6):679-698, 1986.
5. Shen J. Castan S: An Optimal Linear Operator for Step Edge Detection. Comp. Vision, Graphics, and Image Proc., 54(2):112-133, 1992.
6. Renn T: Entwicklung von Algorithmen zur Analyse von Nerven- und Muskelbiopsien bei neuromuskulären Krankheiten. Diplomarbeit, RWTH Aachen, 1997.
7. Russ JC: Computer-Assisted Microscopy. Plenum Press, New York, 1990.
8. Schalkoff RJ: Digital Image Processing and Computer Vision. John Wiley & Sons, New York, 1989.
9. Schröder JM, Seiffert KE: Untersuchungen zur homologen Nerventransplantation. Morphologische Ergebnisse. Zentrbl Neurochir, 2:103-118, 1972.
10. Zabele GS, Koplowitz J: Fourier Encoding of Closed Planar Boundaries. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell., 7:98-102, 1989.