

Przemysław MAZUREK, Dorota OSZUTOWSKA-MAZUREK

WEST-POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, SZCZECIN, DEPARTMENT OF SIGNAL PROCESSING AND MULTIMEDIA ENGINEERING,
26. Kwietnia 10, 71-126, Szczecin
GRYFICE HOSPITAL MEDICAM, DEPARTMENT OF PATHOMORPHOLOGY,
Niechorska 27, 72-300, Gryfice

Analiza wpływu segmentacji jąder komórkowych w rozmazach Papanicolaou na pomiar wymiaru fraktalnego

Dr inż. Przemysław MAZUREK

Adiunkt w Katedrze Przetwarzania Sygnałów i Inżynierii Multimedialnej na Wydziale Elektrycznym Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Autor ponad 140 artykułów w zakresie cyfrowego przetwarzania sygnałów i obrazów, estymacji, akwizycji i przetwarzania biosygnałów.



e-mail: przemyslaw.mazurek@zut.edu.pl

Mgr Dorota OSZUTOWSKA-MAZUREK

Młodszy asystent w Zakładzie Anatomii i Patomorfologii SPZZOZ Gryfice Medicam.



e-mail: adorotta@op.pl

Streszczenie

W artykule badano wrażliwość metody pryzm trójkątnych (TPM - Triangular Prism Method) do estymacji wymiaru fraktalnego dla różnych rozmiarów jądra komórkowego w cytologii ginekologicznej wybarwionej metodą Papanicolaou. Zmiana obszaru analizy pozwala na zmniejszenie wpływu algorytmu segmentacji na wynik. Wykorzystanie kanału zielonego gęstości optycznej i zmian wymiaru fraktalnego dla par skal: 1-2 oraz 2-3 pozwala na otrzymanie wyników dla systemu klasyfikacji z małą wrażliwością na segmentację.

Słowa kluczowe: Estymacja, Wymiar fraktalny, Przetwarzanie obrazów, Jądra komórkowe.

Analysis of influence of cell nuclei segmentation in Papanicolaou smears on fractal dimension measurements

Abstract

In the paper the influence of segmentation algorithms on estimation for the fractal dimension is analyzed. The Papanicolaou smears are very complex images and their automatic analysis is very hard. Segmentation algorithms of cell nuclei should support blurred and noised edges between cytoplasm and cell nucleus. The estimation of the cell nuclei image parameters is necessary, but the edge related parameters are not sufficient. The classification of the cells (correct/atypical) needs surface related parameters. Fractal based estimators are important for classification. The Papanicolaou images are colourful but only the green channel is important [9]. The TPM (Triangular Prism Method) is applied to the square area ($2N+1$ edge size) [5]. Multiple box selection variants occur and the multiple TPM analysis is applied and the mean value is calculated. The fractal dimension is calculated for a pair of scales (1-2, 2-3, 3-4). The correct and atypical cell nuclei are known and the analysis is separated. The histograms of difference between the known and reduced cell area are shown (Figs. 6-11). The atypical cells are less sensitive due to a larger size of the analysis area in comparison to the correct ones. Two scales (1-2) and (2-3) are useful, especially for smaller reduction parameter (erosion up to 9 pixels of original cell nuclei). Both scales are used in the classification system [9]. The fractal dimension changes are less than $\pm 1\%$.

Keywords: estimation, fractal dimension, image processing, cell nuclei.

1. Wprowadzenie

Analiza cyfrowych obrazów cytologii ginekologicznej jest użyteczna w wykrywaniu atypii. Wymaga to analizy bardzo dużej ilości komórek, a w szczególności jąder komórkowych. Wykorzystanie mikroskopów wyposażonych w kamerę cyfrową oraz skanerów pozwala na rejestrację obrazu, który może być przetwarzany przez automatyczny system wspomagający klasyfikację [16]. Zadanie to, dla rozmazu Papanicolaou, jest bardzo trudne, z uwagi na znaczny stopień złożoności struktur obrazu.

Opracowanie metod segmentacji obrazu i analizy obrazu poszczególnych komórek jest utrudnione z uwagi na nakładanie się komórek, ich grupowanie się w klastrach oraz istniejące zanieczyszczenia materiału biologicznego. Jądra komórek stanowią najbardziej istotne elementy obrazu i są znacznie bardziej ciemniejsze w stosunku do pozostałych elementów obrazu. Można wykorzystać algorytmy automatycznej segmentacji, w najprostszym przypadku bazujące na progowaniu, do ekstrakcji obrazu jąder komórkowych. Obraz poddawany jest normalizacji jasności. Detekcja obszaru jądra wymaga progowania na poziomie około 50%, a wartość progu nie jest wartością krytyczną.

Niestety, nawet najlepsze istniejące algorytmy segmentacji, jak i też próby segmentacji wykonane przez człowieka zawodzą z uwagi na to, że o ile część jąder jest łatwo separowana od tła, to istnieje zwykle duża ilość komórek, w których krawędź jądra jest rozmyta. Przyczyną rozmycia, zależną od sposobu rejestracji, jest bardzo płytka strefa ostrości obrazu. Rozmaz Papanicolaou charakteryzuje się pewną zmienną grubością, większą niż jest to możliwe do jednokrotnej rejestracji za pomocą kamery (konieczna jest rejestracja obrazu z wieloma nastawami głębi ostrości).

Dla obrazów cytologii ginekologicznej zaproponowano kilka rozwiązań, przy czym najbardziej obiecującym jest analiza obrazu z wykorzystaniem wymiaru fraktalnego. Wymiar fraktalny pozwala na ocenę stopnia złożoności obiektu [1-4, 6-7, 10, 15]. W literaturze znane są rozwiązania dla analizy wymiaru fraktalnego obwodu jądra (z wykorzystaniem pomiaru tzw. linii brzegowej) [11], pola jądra (z wykorzystaniem metody box-counting) oraz gęstości optycznej (z wykorzystaniem np. algorytmu TPM) [8, 12, 13]. Pomiar wymiaru fraktalnego dla gęstości optycznej jest istotny, ponieważ uwzględnia teksturę jądra, co jest rozpatrywanym parametrem przez osobę analizującą obraz cytologii (cytoscreenera). Pomiar obwodu jąder komórkowych jest również ważny i pozwala na wykrycie atypii [11].

Segmentacja obrazu powoduje estymuje położenie konturu i z uwagi na nieidealność tego procesu deformację konturu i obszaru jądra. Zmiana obszaru analizy wpływa na wynik analizy wymiaru fraktalnego. Ponadto najbardziej obiecująca metoda dla gęstości optycznej (TPM) wymaga obszaru analizy będącego kwadratem o boku $2N+1$ pikseli. Pomiar wymiaru fraktalnego obiektu zależy dodatkowo od punktu startowego analizy wielorozdzielczej.

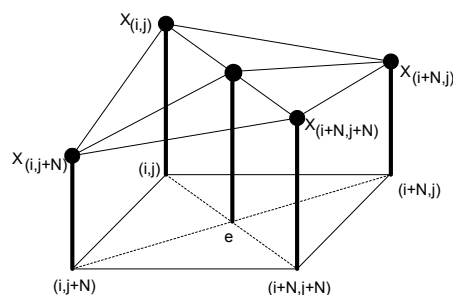
Aspekty powyższe przeanalizowano w celu wyznaczenia wrażliwości metody, co jest istotne w celu wyznaczenia zakresu stosowności metod fraktalnych.

2. Algorytm TPM

Metoda pryzm trójkątnych TPM - ang. Triangular Prism Method [5] jest jednym z algorytmów estymacji wymiaru fraktal-

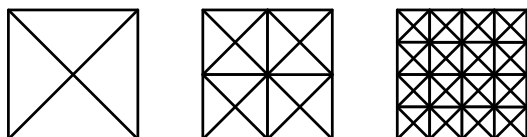
nego dla powierzchni. Wymaga on kwadratowego obszaru analizy (o boku kwadratu równemu $2N+1$, co odpowiada także ilości pikseli na bok tego kwadratu), przy czym zastosowanie interpolacji w przypadku innego rozmiaru wpływa na wynik, dlatego też nie powinno stosować się interpolacji. Ponieważ rozmiar jądra komórki jest mocno zróżnicowany (nawet o kilka rzędów wielkości), to maksymalny rozmiar jest określony najmniejszym typowym jądrem, a minimalny rozmiar analizy wynosi $2 \cdot N + 1 = 2 \cdot 1 + 1 = 3$. Wartość N określa skalę ($N=1$ to skala 1, $N=2$ to skala 2, itd.).

Wzory opisujące pole powierzchni znajdują się w [17] i odnoszą się do obszaru między narożnikami czterech trójkątów (rys. 1).



Rys. 1. Punkty analizy dla algorytmu TPM
Fig. 1. Points of analysis for TPM algorithm

Zmieniając wartość N wykonuje się analizę dla różnych skal obrazu, przy czym największa skala i zarazem analizowany obszar jest dzielony na mniejsze obszary (rys. 2).

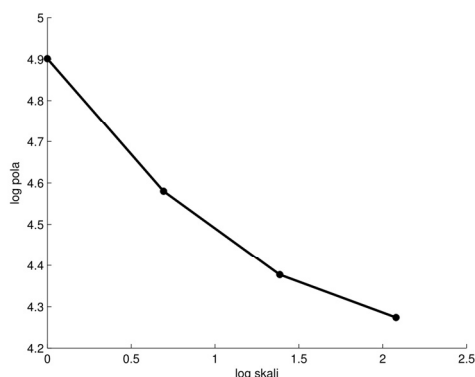


Rys. 2. Trzy kolejne skale analizy TPM (widok z góry)
Fig. 2. Three following scales of TPM (top view)

Sumaryczne pole dla każdej skali (określonej długością boku) jest zmienne, i po przedstawieniu wyniku na wykresie Richardsona [14], możliwe jest określenie wymiaru fraktalnego. Wymiar fraktalny D_F jest określony wzorem [5]:

$$D_F = 2 - m. \quad (1)$$

gdzie m jest współczynnikiem kierunkowym prostej na wykresie ze skalami logarytmicznymi. Wartość wymiaru zawiera się między 2 a 3. Przykładowy wykres Richardsona dla jądra komórkowego przedstawiony jest na rys. 3.

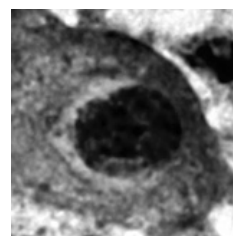


Rys. 3. Przykładowy wykres Richardsona dla jądra komórkowego
Fig. 3. Example of Richardson's plot for cell nucleus

Wymiar fraktalny niekoniecznie jest jedną liczbą i może zmieniać się w zależności od skali. Sytuacja taka występuje dla jąder komórek analizowanych na obrazach cytologii wybarwianej metodą Papanicolaou. Analiza fraktalna jest bardzo wymagająca, ponieważ konieczna jest rejestracja obrazu dla dużej rozdzielczości (powiększenie np. 400x) z wykorzystaniem kamery cyfrowej o rozdzielczości kilku-, kilkunastu megapikseli. Wiąże się z tym także konieczność ustawienia ostrości, dla bardzo płytkiej głębi ostrości. Wymiar fraktalny metodą TPM można szacować dla obszaru kwadratowego, jednak istnieje wiele możliwych pokryć obszaru jądra największym z możliwych obszarów analizy. Założono uśrednioną wartość ze wszystkich możliwych wariantów skali dla największego dopuszczalnego obszaru analizy. Na podstawie poprzednich prac [9] rozpatrywane są cztery skale, pozwalające na uzyskanie trzech wymiarów fraktalnych (para skal 1-2, para skal 2-3 oraz para skal 3-4). Dany wymiar fraktalny jest określany na podstawie nachylenia prostej regresji, a wybór danej pary skal określa dwa punkty na wykresie Richardsona, niezbędne do estymacji wymiaru fraktalnego dla tej pary.

3. Segmentacja jądra a wymiar fraktalny

Jądra komórek charakteryzują się często rozmytym brzegiem (rys. 4), co utrudnia segmentację.



Rys. 4. Przykład jądra komórkowego
Fig. 4. Example of cell nucleus

Wykorzystanie, przykładowo analizy wielorozdzielczej dla kanału zielonego pozwala na wyeksponowanie plamy odpowiadającej jądra komórkowego (rys. 5).



Rys. 5. Kanał zielony po zwiększeniu kontrastu (z lewej) i odpowiadający obraz niskoskalowy (z prawej)
Fig. 5. Green channel after contrast enhancement (left) and low scale corresponding image (right)

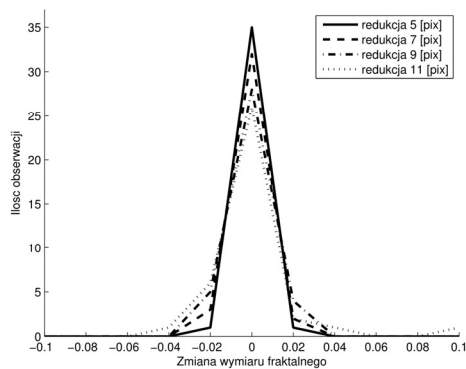
Oszacowany środek jądra komórkowego z wykorzystaniem algorytmu środka ciężkości pozwala na wycięcie obszaru do analizy. Obszar ten nie może być zbyt duży, ponieważ obejmować może także cytoplazmę. Dla tego obszaru wyznacza się algorytmem TPM wymiar fraktalny jądra.

Zawężenie obszaru analizy pozwala na zwiększenie marginesu bezpieczeństwa. Daje to większą gwarancję, że analizie podlega jądro komórkowe.

Założone rozwiązanie nie rozpatruje krawędzi jądra komórkowego, które jest jednak wykorzystywane przez cytoscreenerów. Zakłada się, że wewnątrz jądra komórkowego samo niesie informację o atypii [9]. Jest to interesująca hipoteza, która wymaga szerszych badań.

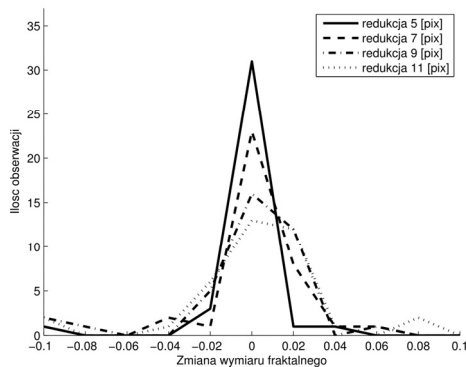
4. Analiza jąder komórkowych

W analizie wykorzystano bazę 36 przypadków komórek prawidłowych oraz 27 przypadków atypii. Komórki poddawane analizie były komórkami oddzielnymi, bez nakładkowania z innymi. Na rysunkach (rys. 6-11) przedstawiono histogramy zmiany wymiaru fraktalnego dla różnych par skal. Jądra komórek atypowych charakteryzują się większym wymiarem fraktalnym, dlatego też rozpatrywane są oddzielnie.



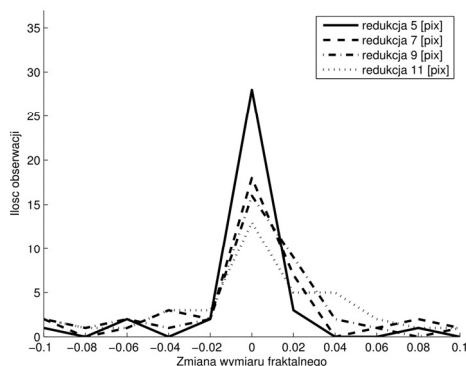
Rys. 6. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek prawidłowych (para skal 1-2)

Fig. 6. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 1-2)



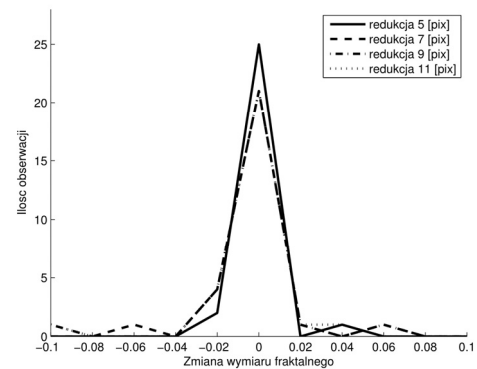
Rys. 7. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek prawidłowych (para skal 2-3)

Fig. 7. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 2-3)



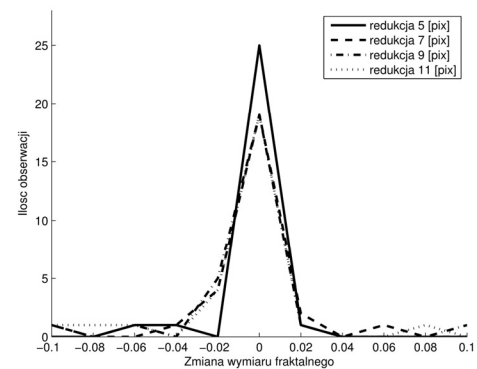
Rys. 8. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek prawidłowych (para skal 3-4)

Fig. 8. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 3-4)



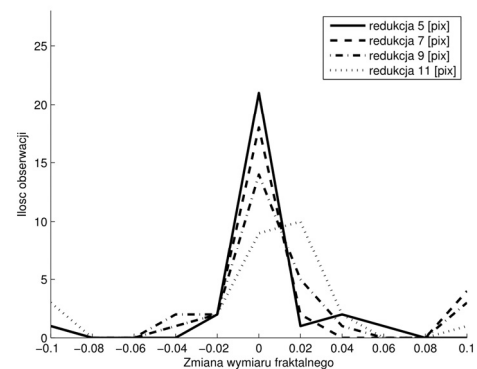
Rys. 9. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek atypowych (para skal 1-2)

Fig. 9. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 1-2)



Rys. 10. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek atypowych (para skal 2-3)

Fig. 10. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 2-3)



Rys. 11. Histogram dla zmiany wymiaru fraktalnego dla jąder komórek atypowych (para skal 3-4)

Fig. 11. Histogram plot for fractal dimension changes for correct cell nuclei (scale pair 3-4)

Cechą charakterystyczną dla estymacji wymiaru fraktalnego różnymi metodami jest to, że zmiany wymiaru fraktalnego zależne od wyboru miejsca startowego obrazie, czy przebiegu jednowymiarowym są największe dla największych skal. Małe skale są uśredniane w oparciu o większą liczbę elementów, przez co wariancja estymaty wymiaru fraktalnego jest mniejsza.

Jest to znane zjawisko, któremu można przeciwdziałać poprzez wybór różnych miejsc startowych, jednak zawsze redukcja wariancji estymaty będzie większa dla mniejszych skal, niż dla dużych. Można to zaobserwować porównując poszczególne przypadki redukcji analizowanego obszaru jądra. Im bardziej zredukowany jest obszar analizy, tym mniej jest konfiguracji, które

poddawane są analizie i wykres jest bardziej rozproszony i spłaszczony.

W większości przypadków zmiana wymiaru fraktalnego jest zawarta w przedziale od -0.01 do 0.01 (+/-1%). Dla atypowych jąder komórek wyniki są bardziej niezależne od redukcji obszaru analizy. Wynika to z tego, że jądra komórek atypowych zwykle mają większe pole, nawet kilka razy w stosunku do jąder komórek prawidłowych. Obszar analizy jest wtedy większy, a proces uśredniania powoduje zmniejszenie wariancji estymowanego wymiaru fraktalnego.

Cecha ta jest bardzo istotna dla systemów analizy, ponieważ ten rodzaj jąder jest najważniejszy. Klasyfikacja jądra prawidłowego jako atypowego jest mniejszym błędem niż klasyfikacja jądra atypowego jako prawidłowego, ponieważ jądra sklasyfikowane jako atypowe (prawidłowo lub też nieprawidłowo) są analizowane zawsze przez cytoscreenera i dalej przez patomorfologa.

Wykresy charakteryzują się jednomodalnością, co świadczy o stabilności pomiarów. Wielomodalność świadczyłaby o zmiennym wymiarze fraktalnym w zależności od analizowanego obszaru jądra dla małych skal.

Znaczne zmniejszanie obszaru analizy (np. o 11 pikseli z każdej strony jądra komórkowego) nie jest rozwiązaniem dobrym, ponieważ pojawiają się ogony na wykresach, a wymiar fraktalny różni się o wtedy o więcej niż 10% w stosunku do obrazu oryginalnego.

Wyznaczone histogramy, pozwalają na określenie możliwości analizy fraktalnej. Para skal 1-2 jest dla obu rodzajów jąder komórkowych stabilna względem obszaru segmentacji. Para skal 2-3 może także być wykorzystana, ale dla małego zawężenia obszaru analizy (np. 5 pikseli). Większa redukcja niż kilka pikseli zaczyna wpływać na wynik. Para 3-4 charakteryzuje się dużą zmiennością i stosowanie jej może prowadzić do poważnych błędów.

5. Wnioski

Przedstawiona analiza wrażliwości dotyczy parametrów (wymiarów fraktalnych dla poszczególnych par skal) rozpatrywanych jako zmienne niezależne. Analiza wymiaru fraktalnego dla mniejszych par skal (1-2 oraz 2-3) jest istotna w procesie klasyfikacji. Skale kolejne (np. 3-4) charakteryzują się większą wrażliwością, co wynika z mniejszej liczby obszarów analizy.

Analiza fraktalna obszaru jądra (gęstości optycznej) zamiast analizy wielu parametrów opisujących jądro dostarcza wystarczającą ilość danych do klasyfikacji, jak pokazano w [9]. Zwiększanie ilości parametrów powoduje, że klasyfikator może dopasować się do danych, co jest niepożądane. Podczas projektowania klasyfikatora niezbędne jest wykorzystanie jak najbardziej prostego klasyfikatora, który realizuje podział przestrzeni za pomocą jak najbardziej gładkiego płata powierzchni. Klasyfikacja jest możliwa za pomocą płaszczyzny lub lepiej lekko wygiętego płata, ponieważ konieczne jest uzyskanie jak najprostszego aproksymatora, a nie interpolatora.

Uniezależnienie się od obszaru przejściowego między rozmytym obrazem jądra a cytoplazmą pozwala na wykorzystanie różnych algorytmów segmentacji. Istotne jest to, że zaproponowana metoda analizy wrażliwości nie bazuje na jednym określonym algorytmie segmentacji. Segmentacja, która wykonuje redukcję obszaru jądra nie powoduje istotnych zmian w estymacji wymiaru fraktalnego, jeśli redukcja ta nie jest zbyt duża. Algorytm segmentacji może zostać wsparty operacją morfologiczną erozji w celu wymuszenia zawężenia obszaru analizy, a zarazem zwiększenia jakości estymacji wymiaru fraktalnego.

Realizacja zadań segmentacji i klasyfikacji za pomocą zaprezentowanych metod może być zrealizowana w czasie rzeczywistym, ponieważ algorytmy te charakteryzują się niskim stopniem złożoności obliczeniowej, a zarazem możliwością implementacji równoległej. Zasadniczym ograniczeniem jest sam czas skanowania slajdu, jednak przy potokowej akwizycji i klasyfikacji nie stanowi to ograniczenia. Ten rodzaj pracy występuje w laborato-

riach, gdzie proces skanowania i analizy dotyczy nie pojedynczego slajdu, ale większych serii.

Dostępność architektur równoległych, takich jak GPGPU - programowalnych kart graficznych, pozwala na realizację systemów analizy obrazu w czasie rzeczywistym. Przetwarzanie w czasie rzeczywistym jest także istotne z uwagi na bardzo dużą rozdzielczość obrazu dla całego slajdu i rozmiar pliku. Przetwarzanie w czasie rzeczywistym pozwolić może na redukcję zapisywanych danych tylko dla istotnych obszarów.

Praca wsparta projektem UE EFRR ZPORR Z/2.32/II/1.3.1/ 267/05 "Szczecin University of Technology - Research and Education Center of Modern Multimedia Technologies".

Pragniemy podziękować Pani dr n. med. Kindez Sycz (dyrektor Zakładu Patomorfologii Samodzielnej Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego w Szczecinie) za udostępnienie rozmazów cytologii ginekologicznej.

6. Literatura

- [1] Ballerini L, Franz L.: Fractal Analysis of Microscopic Images of Breast Tissue, WSEAS Trans. on Circuit, Vol.11, No.2 p.7, 2001. doi:10.1186/1471-2407-10-260
- [2] Bauer W., Mackenzie C.D.: Cancer Detection via Determination of Fractal Cell Dimension, 1999, <http://cdsweb.cern.ch/record/376287>
- [3] Bedin V., Adam R.L., de Sa B., Landman G., Metzke K.: Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma", BMC Cancer, 10:260, 2010, <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/260>
- [4] Blackledge J. Dubovitskiy D.: An Optical Machine Vision System for Applications in Cytopathology, ISAST Transactions on Computers and Intelligent Systems, Vol 2, Issue 1, pp 95-109, 2010.
- [5] Clarke K. C.: Computation of the Fractal Dimension of Topographic Surfaces using the Triangular Prism Surface Area Method. Computer and Geosciences, Vol. 12. No. 5, pp.713-722, 1986.
- [6] Dey P.: Fractal geometry: Basic principles and applications in pathology, Anal Quant Cytol Histol 2005, 27(5) pp 284-290, PMID: 16447821.
- [7] Goutzanis L., Papadogeorgakis N., Pavlopoulos P.M., Katti K., Petsinis V., Plochoras I., Pantelidakis C., Kavantzis N., Patsouris E., Alexandridis C.: Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma, Oral Oncology 44, pp. 345-353, 2008, doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.04.005.
- [8] Kaye B.H.: A Random Walk Through Fractal Dimensions, VCH 1994.
- [9] Mazurek P., Oszutowska D.: Estimation of Fractal Dimension According to Optical Density of Cell Nuclei in Papanicolaou Smears, Information Technologies in Biomedicine (Pietka E. ed.), Lecture Notes in Computer Science, 2012.
- [10] McKenna S.J.: Automated analysis of Papanicolaou smears. PhD Thesis, University of Dundee, 1994.
- [11] Oszutowska D., Waker-Wójciuk G., Mazurek P.: Fractal analysis limitations in digital analysis of Papanicolaou cytological images, Measurement Automation and Monitoring, pp.52-54, 2012.
- [12] Peitgen H.O., Jurgens H., Saupé D.: Fractal for the Classrooms, Part I: Introduction to Fractals and Chaos, Springer-Verlag, 1992.
- [13] Seuront L.: Fractals and Multifractals in Ecology and Aquatic Science, CRC Press, 2010.
- [14] Steven L.: Linear Richardson Plots from Non-Fractal Data Sets, Dutch Mathematical Geology, Vol. 25, No. 6, pp. 737-751, 1993. doi: 10.1007/BF00893176.
- [15] Yokoyama T., Kawahar A., Kage M., Kojiro M., Takayasu H., Sato T.: Image analysis of irregularity of cluster shape in cytological diagnosis of breast tumors: Cluster analysis with 2D-fractal dimension, Diagn Cytopathol 2005, 33(2) pp. 71-77, PMID: 16007648.
- [16] Zieliński K. W., Strzelecki M.: Komputerowa analiza obrazu biomedycznego. Wstęp do morfometrii i patrologii ilościowej. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002.