

appeared in
10. Workshop Farbbildverarbeitung 2004, Koblenz, Online-Proceedings
<http://www.uni-koblenz.de/icv/fws2004/>

Farbauswertung in der Mikroskopie - wo liegen die Herausforderungen der Anwender?

Peter Schwarzmann

Heerstr. 39, 72555 Metzingen

Zusammenfassung. Anwender von Werkzeugen zur Bildauswertung stellen zunehmend erhöhte Anforderungen an die qualitative und quantitative Auswertung zytologischer und histologischer Schnitte. Realistische Modellvorstellungen in Auswerteprogrammen lassen systematische Fehlerquellen qualitativ und quantitativ beurteilen. Der Beitrag beschreibt Fehlerquellen bei der quantitativen Auswertung feiner Strukturen, die Abhängigkeit des Farbtones bei Konzentrationsänderungen von breitbandigen Farbstoffen und schließlich die rechnerische Entmischung von Farbstoffen.

1 Einleitung

Die klassische Herausforderung der automatischen Bildauswertung in der Mikroskopie mit großem gesundheitspolitischem und wirtschaftlichem Hintergrund war, und ist auch heute noch, das Massenscreening zur Früherkennung des Zervixkarzinoms mit nach Papanicolaou gefärbten Präparaten (PAP-Smears). Trotz großer und langjähriger internationaler Programme ist diese Aufgabe bis heute noch nicht zufriedenstellend gelöst. An diesem Zellbildauswerteproblem lassen sich wesentliche Herausforderungen sehr gut darstellen und auf andere Aufgaben übertragen. So erlauben heute neue Verfahren in der Mikroskopie, zusammen mit neuen Präparationstechniken und Farbmarkern, attraktive, qualitative, und vor allem auch quantitative Einsichten, in die Struktur und Funktionalität von Zellen und Geweben. Zur Illustration zeigt Abb. 7 einen Ausschnitt aus einem PAP-Präparat und Abb. 8 (oben) aus einem histologischen Präparat.

Den Anwender, in diesem Falle den Zytologen, interessieren semantische Aussagen in solchen Präparaten wie: Zellkern, Zytoplasma, Chromatinverteilung, DNA-Gehalt, Kernformen, Populationsdichten usw.; die Technik der Bildverarbeitung operiert dagegen mit: Grauwerten von Pixeln, Schwellwerten, Flächen, RGB-Farbwerten, Objektdetektion, Objektsegmentation usw. Die Verbindung zwischen diesen beiden Denkwelten ist nicht einfach herzustellen und enthält die Herausforderungen für die heutige problemorientierte Bildauswertung. Ein Erfolg versprechender Verbindungsweg führt über genügend realistische Modellvorstellungen. Einige Probleme mit Farbmodellen auf dem Weg dorthin soll dieser Beitrag ansprechen, da die an sich bekannten Probleme immer wieder in Vergessenheit geraten und regelmäßig wieder neu aufgegriffen werden. Angesprochen werden Probleme kleiner Strukturen, der Farbverschiebung bei sich ändernder Farbstoffkonzentration, sowie der Entmischung von Farben bei Überlagerung.

2 Benutzte Grundlagen

2.1 Farbe und spektrale Signatur

Farbe ist eine Eigenschaft des menschlichen Gesichtssinnes; sie ist das Ergebnis einer Information reduzierenden, bewertenden Integration der spektralen Signatur mit 3 Sensorempfindlichkeiten mit Schwerpunkten im roten, grünen und blauen Bereich. Abb. 1 gibt die Verhältnisse wieder.

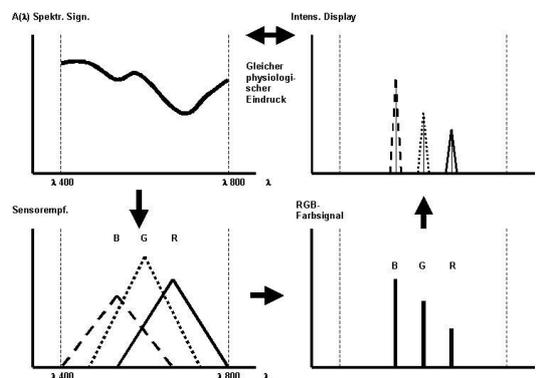


Abb. 1. Stationen auf dem Wege von der spektralen Signatur eines Signales bis zur Farbdarstellung für das visuelle System des Auges.

2.2 Farbspektren in Emission und Absorption

Typischer Vertreter der Mikroskopie in Emission ist die Fluoreszenzmikroskopie. Die spektrale Verteilung der Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe ist schmalbandig im Vergleich zum sichtbaren Spektrum. Abb. 2 (links) skizziert Emissionsspektren einiger Fluoreszenzfarbstoffe.

Ganz anders dagegen die Situation bei Absorptionsfarbstoffen (normale Hellfeldmikroskopie). Die Farbstoffe zeigen Wellenlänge abhängige Absorptionskennlinien meist über das gesamte sichtbare Spektrum. Abb. 2 (rechts) zeigt beispielhaft die Absorptionskonstanten von 2 gängigen Farbstoffen (Hämatoxylin und Diaminobenzidin DAB). Die einzelnen Farbstoffe können durch Farbfilter nicht auseinandergehalten werden - die Farbinformation ist über das gesamte Spektrum verteilt. Jeder Farbstoff zeigt 'Übersprechen' in die Bereiche des anderen.

2.3 Die Quantifizierung des Farbstoffgehaltes

In Emission: Der Farbstoffgehalt M_{em} der Probe ist proportional zur gemessenen Intensität:

$$M_{em} = b \cdot I \cdot d \cdot k$$

mit b : Proportionalitätskonstante, I : gemessene Intensität, d : Dicke der gefärbten Schicht, k : Farbkonzentration.

In Absorption: Der Farbstoffgehalt ist proportional zur Extinktion M_{abs} der Probe:

$$M_{abs} = a(\lambda) \cdot k \cdot d = \ln I_0(\lambda) - \ln I(\lambda)$$

mit $a(\lambda)$: Wellenlängen abhängige Absorptionskonstante, I_0 : Einfallende Intensität, I : Transmittierte Intensität. Dieser Ausdruck geht aus der Absorptionsbeziehung hervor:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot e^{-a(\lambda) \cdot k \cdot d}$$

2.4 Farbmischung und -Entmischung in Absorption

Am Beispiel von 2 Farbstoffen soll dies erläutert werden (eine Erweiterung auf weitere ist möglich). Modelle für die Farbmischung können sowohl im RGB-Farb-raum als auch direkt aus den spektralen Signaturen der Farbstoffe entwickelt werden. Modelle im RGB-Farb-raum (oder davon abgeleiteten Räumen) erfordern aber die Beachtung von Farbverschiebungen bei Konzentrationsänderungen der Farbstoffe wie in einem der nachfolgenden Abschnitte dargestellt.

Es sind 2 grundsätzlich unterschiedliche Modelle zu unterscheiden: Die 'additive' bzw. 'parallele' Farbmischung innerhalb eines Bildpixels und die 'subtraktive' bzw. 'serielle' Farbmischung innerhalb eines Bildpixels. Abb. 3 verdeutlicht den Sachverhalt. Desweiteren sind natürlich auch Mischungen dieser beiden Modelle denkbar; sie sollen aber im Rahmen dieses Beitrages nicht behandelt werden.

Für den additiven Fall erhält man für die 3 Farbkomponenten eines Bildpixels im RGB-Raum:

$$I_x = \int_{F_1} \int_{\lambda} I_0 \cdot e^{-a_1(\lambda) \cdot d \cdot k_1} \cdot S_x(\lambda) \cdot d\lambda \cdot df + \int_{F_2} \int_{\lambda} I_0 \cdot e^{-a_2(\lambda) \cdot d \cdot k_2} \cdot S_x(\lambda) \cdot d\lambda \cdot df + \int_{F_0} I_0 \cdot df$$

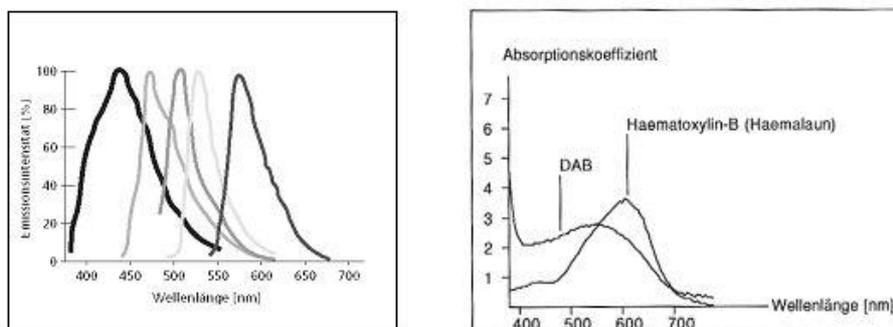


Abb. 2. Links: Emissionsspektren einiger Fluoreszenzfarbstoffe (v.l.n.r. BFP, CFP, GFP, YFP, DSRed); rechts: Absorptionskonstanten von 2 Absorptionsfarbstoffen: Hämatoxylin (bläulich), Diaminobenzidin DAB (braungelblich)

mit: x : eine der 3 Komponenten R , G oder B ; F_1 , F_2 : Flächenanteile der Farbpartikel A_1 und A_2 ; F_0 : Flächenanteil ohne Färbung; a_1 , a_2 : Absorptionskonstanten von Partikel A_1 und A_2 ; k_1 , k_2 : Farbkonzentration in Partikel A_1 und A_2 ; S_x : Sensitivität des Farbkanals x (R, G oder B).

Das inverse Problem, die Bestimmung von $\int_{F_1} d \cdot k_1 \cdot df$ bzw. $\int_{F_2} d \cdot k_2 \cdot df$, bedeutet dann 'einfach (! - aber meist nicht durchführbar!)' die Auflösung des Integralgleichungssystems nach diesen beiden Werten; bei bekannten Farbstoffen sind alle anderen Größen ja bekannt.

Für den subtraktiven Fall der Überlagerung der beiden Färbungen ergeben sich die folgenden Beziehungen:

$$I_x = \int_{\lambda} I_0 \cdot e^{-a_1(\lambda) \cdot k_1 \cdot d_1} \cdot e^{-a_2(\lambda) \cdot k_2 \cdot d_2} \cdot S_x(\lambda) \cdot d\lambda$$

Auch in diesem Falle erhalten wir für das inverse Problem der Bestimmung von $(k_1 \cdot d_1)$ und $(k_2 \cdot d_2)$ ein Integralgleichungssystem. Es ist allerdings bedeutend einfacher als im additiven Falle. Dies deshalb, weil innerhalb des Bildpixels konstante Werte für die Extinktion $k \cdot d$ angenommen werden können.

In beiden Fällen vereinfachen sich die Verhältnisse beträchtlich, wenn für die Sensorempfindlichkeit sehr schmalbandige (Idealfall: δ -Stoß) Wellenlängenabhängigkeiten durch Verwendung schmalbandiger Farbfilter angenommen werden können. Im subtraktiven Falle erhält man dann zur Lösung ein lineares Gleichungssystem, welches bei Messung in 3 Kanälen sogar überbestimmt ist und damit eine Ausgleichsrechnung zulässt. Gleiches würde gelten, wenn sehr schmalbandig absorbierende Farbstoffe zur Verfügung stehen würden.

3 Messung von Farbstoffgehalten feiner Strukturen in Absorption

Klassisches Beispiel für eine solche Messung ist die *IOD* (Integrierte Optische Dichte) zur Bestimmung des DNA-Gehaltes eines entsprechend gefärbten Zellkernes. Die Strukturen liegen an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops.

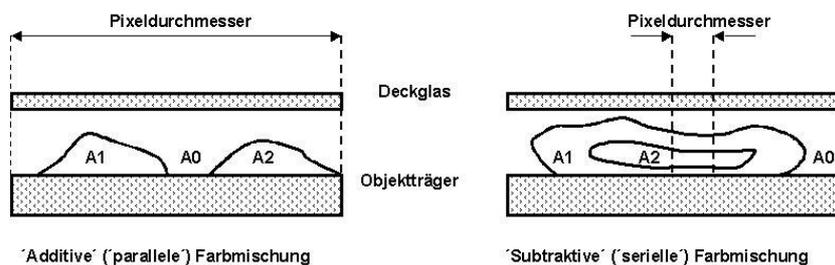


Abb. 3. Das 'additive' ('parallele') und das 'subtraktive' ('serielle') Mischungsmodell für 2 Farbstoffe. A_1 und A_2 sind mit unterschiedlichen Farbstoffen gefärbte Objekte.

Zur Demonstration der Fehlerquelle bei derartigen Messungen seien 2 Präparate mit gleichem Farbstoffgehalt pro Präparatfläche F , jedoch mit unterschiedlicher Strukturgröße, angenommen (Abb. 4). Die grobe Struktur sei wesentlich größer als ein Bildpixel, die feine dagegen liege darunter, so dass die Bildpixel gemittelte Werte der Struktur darstellen.

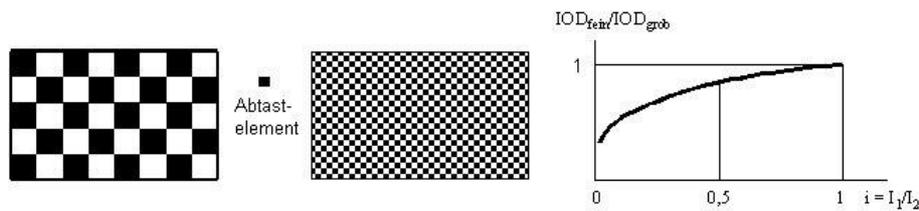


Abb. 4. Systematischer Fehler bei der Messung der IOD für Strukturen an der Auflösungsgrenze des Abtaststrahlers. Das Diagramm zeigt den Grenzwert des Messfehlers bezogen auf den wahren Wert als Fkt. des Kontrastes.

Nimmt man als Grenzfall für den Fehler an, dass ein Pixel den Mittelwert der beiden Transmissionswerte darstellt, so erhält man als IOD d.h. Farbstoffgehalt des Präparates die Werte:

$$IOD_{grob} = 0,5 \cdot F \cdot (\ln I_0 - \ln I_1) + 0,5 \cdot F \cdot (\ln I_0 - \ln I_2)$$

$$IOD_{fein} = F \cdot [\ln I_0 - \ln(0,5 \cdot (I_1 + I_2))]$$

Führt man noch ein Kontrastmaß $i = I_1/I_2$ ein, so erhält man nach einfachen Umformungen für das Verhältnis der beiden Messwerte:

$$\frac{IOD_{fein}}{IOD_{grob}} = \frac{\ln I_0 - \ln I_2 + \ln 2 - \ln(i + 1)}{\ln I_0 - \ln I_2 - \ln \sqrt{i}}$$

Beachtet man, dass $I_2 < I_0$ bleiben muss, so erhält man die Messabweichung als Funktion des Kontrastes i wie exemplarisch in Abb. 4 (rechts) für $I_2 = I_0$ dargestellt.

Zusätzlich sind Farbfehler zu erwarten, wenn es sich um farbige Strukturen handelt. Ein einfaches Beispiel möge dies veranschaulichen: wie in Abb. 4 sei diesmal ein Muster aus blauen und gelben Flächen gegeben. Erwartungsgemäß geht dieses Muster an der Auflösungsgrenze in ein grünes Moirémuster über.

Der beschriebene Fehler kommt zu den bekannten Fehlern durch Beugungserscheinungen und Glare hinzu.

4 Farbverschiebungen in Absorption bei Konzentrationsänderungen

Gegeben sei ein Farbstoff mit der spektralen Absorptionskonstanten $a(\lambda)$, der Farbstoffkonzentration k_0 und der Objektstärke d . Bei einfallendem weißem Licht I_0 erhält man dann als transmittiertes Licht I_{k_0} :

$$I_{k_0}(\lambda) = I_0 \cdot e^{-a(\lambda) \cdot k_0 \cdot d}$$

Ändert sich die Farbstoffkonzentration auf den Wert k , so ergibt sich für das Verhältnis der beiden Intensitäten:

$$\frac{I_k(\lambda)}{I_{k_0}(\lambda)} = e^{-a(\lambda) \cdot d \cdot (k - k_0)}$$

Man sieht, obwohl lediglich die Farbkonzentration k geändert wurde, ist das Intensitätsverhältnis keine Konstante, sondern mit der Absorptionskonstanten $a(\lambda)$ Wellenlängen abhängig. Ein Beispiel möge wieder die Auswirkungen verdeutlichen (Abb. 5). Angenommen wurde eine mit der Wellenlänge λ linear ansteigende Absorptionskonstante $a(\lambda)$. Skizziert sind die Verhältnisse für $k < k_0$, $k = k_0$ und $k > k_0$. Wie man sieht, verschiebt sich der Intensitätsschwerpunkt für $k < k_0$ zu größeren (rot) und für $k > k_0$ zu kleineren (blau) Wellenlängen.

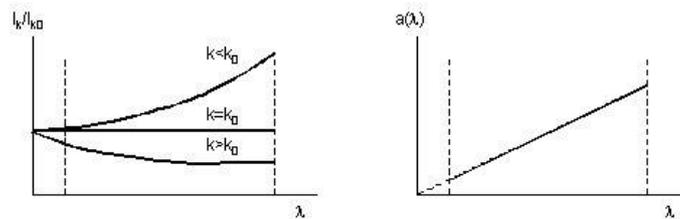


Abb. 5. Beispiel für eine Farbverschiebung bei Farbstoffkonzentrationsänderung; angenommen ist eine linear mit λ ansteigende Absorptionskonstante $a(\lambda)$.

5 Entmischung von Farbkomponenten

Ein kritischer Prozessschritt bei der Auswertung zytologischer und histologischer Präparate ist die Segmentation der Komponenten (Zellen, Zytoplasma, Zellkern) für Standardabsorptionsfärbungen (Hämatoxylin, Eosin, Diaminobenzidin). Es zeigt sich, dass hellere Kernbereiche dabei oft dem Zytoplasma zugeordnet werden, oder bei anderer Einstellung des Klassifikators dann dünne Zytoplasmagebiete nicht mehr erkannt werden. Aus Abb. 3 als Prinzipskizze und Abb. 8 (unten rechts) als reale Szene ergibt sich als Grund dafür: Eosin gefärbtes Zytoplasma überlagert die Zellkerne. Deutlich verbesserte Segmentationsergebnisse versprechen daher Bildvorverarbeitungsschritte, welche das Bild in die beiden Färbungen aufteilen. Es macht daher Sinn, aus den im Grundlagenabschnitt beschriebenen Modellvorstellungen nach einer Lösung für das Trennungproblem der beiden Farbstoffe zu suchen.

Ausgangspunkt bleibt, dass breitbandig absorbierende Farbstoffe zugelassen werden müssen, und daher der Lösungsweg über die Integralgleichungsform gehen muss. Eine solche Lösung kann umgangen werden, wenn folgende Näherung akzeptierbar

ist: Aus den bekannten Absorptionskennlinien $a_1(\lambda)$ und $a_2(\lambda)$, sowie den Beziehungen zur Berechnung der Farbkanalintensitäten, wird eine Tabelle mit 2 Eingängen ($k_1 \cdot d$) und ($k_2 \cdot d$) und 3 Ausgängen $I_{rot}, I_{grün}, I_{blau}$ berechnet, und die Werte im RGB-Farbraum aufgetragen. Abb. 6 gibt solch ein Mischungsdiagramm für 2 Farbstoffe wieder.

Die Menge aller Mischungsverhältnisse stellt sich dort als Fläche dar, welche vom 0-Punkt ausgeht (Schwarzpunkt, keine Transmission) und im Weißpunkt (kein Farbstoff, völlige Transparenz) endet. Auf dieser Fläche lassen sich die jeweiligen Farbanteile als Netz für die Parameter ($k_1 \cdot d_1$) und ($k_2 \cdot d_2$) einzeichnen. Aus den Intensitätsmessungen der 3 Farbkanäle können dann durch Interpolation im Diagramm oder in der Tabelle die Farbstoffkonzentrationen mit ausreichender Genauigkeit entnommen werden. Messfehler bzw. Ungereimtheiten zeigen sich bei diesem Vorgehen dadurch, dass Messwerte nicht genügend nahe auf der Mischungsfläche liegen. Wie alle Absorptionsverfahren, werden die Fehler zunehmend größer, wenn man sich dem 0-Punkt (vollständige Absorption) nähert. Die Auswertungsgrenze kann ein Stück verschoben werden, wenn in einer zweiten Bildaufnahme mit stärkerer Beleuchtung gearbeitet wird.

Den Effekt derartiger Farbstoffüberlagerungen zeigt Abb. 8 an einem Beispiel. Das Bild zeigt im oberen Teilbild die vollständig gefärbte Probe also Hämatoxylin als Kernfärbung (blau) und Eosin (purpur) als Zytoplasmafärbung. Zu beachten ist der Rotstich auch in den Kernbereichen. Im Bild unten links wurde nur mit Hämatoxylin gefärbt. Das Bild unten rechts zeigt eine nur mit Eosin gefärbte Probe. Zu beachten ist hier, dass keine von den Kernen herrührenden 'Löcher' sichtbar sind. Dies bedeutet, dass das Zytoplasma auch die Kerne mit gleicher Dicke überdeckt und damit im doppelt gefärbten Präparat helle Stellen der Kerne als Zytoplasma erscheinen lässt und somit die Kernsegmentation deutlich behindert.

6 Schlussfolgerungen

Die Anforderungen der Anwender von Bildauswertewerkzeugen zielen bei zytologischen und histologischen Präparaten zunehmend auf mehr semantische Aussagen. Es wird dabei erwartet, dass eingeführte Präparationsverfahren im Labor nicht verändert werden müssen, d.h. die bisher üblichen Färbungen weiter verwendet werden können. Die Nutzung realistischer Modelle für die Bildentstehung lassen eine Verbesserung der Auswertergebnisse zu. Der Beitrag stellt Modelle vor für die quantitative Auswertung feiner Strukturen, für Farbverschiebungen im RGB-Raum bei Konzentrationsänderungen von breitbandigen Farbstoffen und für die Verbesserung von Segmentationsverfahren für Zellen, Zellzytoplasma und Zellkern durch Verfahren zur Trennung der Farbstoffanteile.

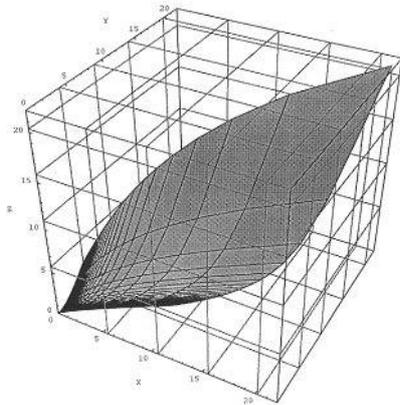


Abb. 6. Mischungsdiagramm im RGB-Farbraum für 2 Farbstoffe

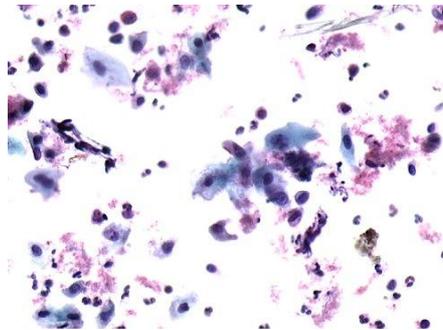


Abb. 7. Ausschnitt aus einem nach Papanicolaou gefärbten Ausstrichpräparat

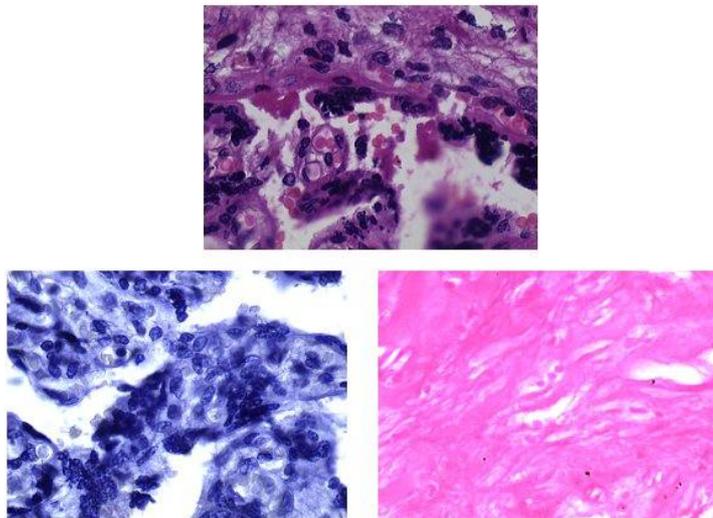


Abb. 8. Unterschiedlich gefärbte Ausschnitte aus einem histologischen Schnitt; oben: Hämatoxylin und Eosin, links: nur Hämatoxylin (typische Kernfärbung); rechts: nur Eosin (typische Zytoplasmafärbung)