

(12) **Patentschrift**

(21) Anmeldenummer: A 1444/2010 (51) Int. Cl. : **G06T 5/00** (2006.01)
 (22) Anmeldetag: 27.08.2010 **G06T 7/40** (2006.01)
 (45) Veröffentlicht am: 15.05.2012 **G01N 21/88** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
 DE 102005020612 A1
 DE 19840873 A1
 JP 2009069996 A
 WO 2006121410 A1

(73) Patentinhaber:
 TISSUEGNOSTICS GMBH
 1020 WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR ERKENNUNG EINER GEWEBESTRUKTUR**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung und/oder Beurteilung einer flächig vorliegenden Gewebestruktur, die durch zumindest eine Zielstrukturfärbung markiert ist. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass von der Gewebestruktur zumindest ein digitales Eingabebild (K) erstellt wird, dass auf das digitale Eingabebild (K) ein statistisches Filter (F) angewendet und durch Bildung der Differenz des durch Anwendung des Filters (F) erhaltenen Zwischenbildes (Z) und des Eingabebildes (K) ein Differenzbild (D) gebildet wird, dass von dem Eingabebild (K) unter Anwendung eines vorgegebenen Schwellenwertes (P5) ein binäres Bild (B) erstellt wird, dass das binäre Bild (B) mit einer logischen ODER-Funktion mit dem Differenzbild (D) pixelweise verknüpft wird und dass das aus dieser Verknüpfung resultierende Ergebnisbild (E) als Maske zur Erkennung und/oder Beurteilung der von der zu untersuchenden Gewebestruktur erstellten Eingabebilder (K) oder der von der zu untersuchenden Gewebestruktur abgeleiteten Eingabebilder (K') eingesetzt und/oder jeweils mit diesen Eingabebildern (K, K') verknüpft wird.

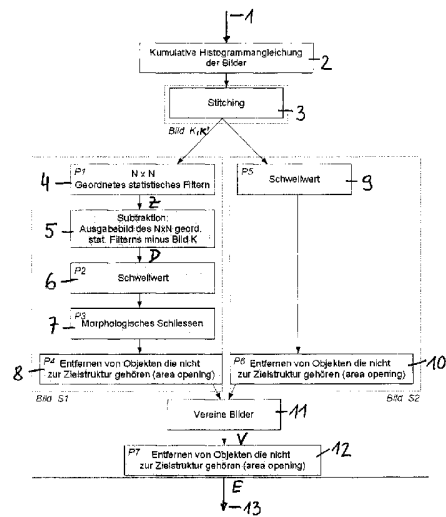


Fig. 4

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

[0002] Bekannte Verfahren dieser Art liefern Bilder, die die zu beurteilenden Gewebestrukturen nicht klar und genau genug wiedergeben.

[0003] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sollen Gewebestrukturen und vor allem Gewebestrukturen, die eine vielkernige Struktur haben, genau erkannt und beurteilt werden können. Dazu werden - wie an sich üblich - die in Form von Gewebeschnitten vorliegenden Strukturen mit einer spezifischen Zielstrukturfärbung für die interessierenden Gewebestrukturen markiert. Es ist möglich, eine oder mehrere Zielstrukturfärbungen vorzunehmen. Dazu können vorteilhafterweise Fluoreszenzfärbungen vorgenommen werden; prinzipiell ist jegliche Art von Zielstrukturfärbungen beim erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar. Des Weiteren sollen Gewebestrukturen in Gewebeschnitten automatisiert erkannt werden können, nachdem diese Strukturen zuvor durch eine spezifische Zielstrukturfärbung markiert und mikroskopisch aufgenommen bzw. dargestellt worden sind.

[0004] Vorrangiges Ziel der Erfindung ist es, ein möglichst einfaches Verfahren anzugeben, das mit wenig Rechenaufwand bzw. einer geringen Anzahl von Rechenschritten eine möglichst gute Beurteilung von Bildern von Gewebestrukturen zulässt, wobei die Genauigkeit der Auswertung der Bilder von Gewebestrukturen hoch sein soll. Diese Ziele werden bei einem erfindungsgemäßen Verfahren der eingangs genannten Art mit den im Kennzeichen des Anspruches 1 angeführten Merkmalen erreicht.

[0005] Durch die Anwendung eines statistischen Filters und die Verknüpfung des digitalen Eingabebildes mit dem erhaltenen Differenzbild werden Masken erhalten, die, angewandt auf die von der Gewebestruktur aufgenommenen Gesamtbilder, die zielgefärbten Strukturen besser erkennen lassen und diese exakter abgrenzen.

[0006] In der Praxis zeigte es sich, dass es für die erreichbare Genauigkeit von Vorteil ist, wenn als statistisches Filter ein geordnetes statistisches Filter, ein Maximalwertfilter, ein lineares Filter, ein lineares Grauwertfilter, ein Mittelwertfilter oder ein Medianfilter eingesetzt wird.

[0007] Um unterschiedliche Färbungen und Gegebenheiten der Gewebestruktur bei der Auswertung besser berücksichtigen zu können, ist es von Vorteil, wenn vorgesehen ist, dass zur Erstellung der Ergebnisbilder Eingabebilder herangezogen werden, die von der selben Gewebestruktur in unterschiedlichen Farbkanälen bzw. unter unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen werden und/oder dass zur Erstellung von Ergebnisbildern von der Gewebestruktur abgeleitete Eingabebilder eingesetzt werden, wobei diese abgeleiteten Eingabebilder von anderen Farbkanälen und/oder von vorzugsweise parallelen Zellschnitten benachbarter Gewebestrukturbereiche aufgenommen werden und dass diese Ergebnisbilder als Masken zur Beurteilung der zu untersuchenden Gewebestruktur eingesetzt werden.

[0008] Für die Erstellung der digitalen Bilder der Gewebestruktur ist es von Vorteil, wenn von einer mit zumindest einer Zielstrukturfärbung markierten Gewebestruktur eine Mehrzahl von in Randbereichen einander überdeckenden Teilbildern aufgenommen wird und diese Teilbilder zu dem Eingabebild zusammengesetzt werden, wobei für die Teilbilder eine kumulative Histogrammgleichung der Teilbilder zu deren Egalisierung vorgenommen wird, worauf die jeweils ein uniformiertes Histogramm besitzenden Teilbilder zu dem Eingabebild als Gesamtbild zusammengesetzt bzw. vereinigt werden.

[0009] Ein rasches und exaktes Zusammensetzen der aufgenommenen Teilbilder kann dann vorgenommen werden, wenn für das Zusammensetzen und Vereinigen der Teilbilder zu dem Eingabebild für überlappende, einander entsprechende und/oder höchste Übereinstimmung besitzende Randbereiche der Kreuzkorrelationskoeffizient berechnet wird und die Randbereiche mit höchster Übereinstimmung überlappt werden, wobei vorteilhafterweise die Pixelwerte in den Randbereichen gemittelt werden.

[0010] Es ist von Vorteil, wenn die Schwellenwerte bzw. Parameter für die einzelnen Verfahrensschritte vorab und an die jeweilige Gewebestruktur angepasst vorgegeben werden; dazu ist vorgesehen, dass das Differenzbild unter Anwendung eines vorgegebenen Schwellenwertes binarisiert wird und/oder dass vor der ODER-Verknüpfung das binarisierte Differenzbild unter Anwendung eines Schwellenwertes einem morphologischen Schließen und unter Anwendung eines Schwellenwertes einem nachfolgenden morphologischen Öffnen unterworfen wird und/oder dass das binäre Bild unter Anwendung eines Schwellenwertes einem morphologischen Öffnen unterzogen wird und/oder dass das Vereinigungsbild unter Anwendung eines Schwellenwertes einem morphologischen Öffnen unterzogen wird.

[0011] Für die Optimierung der Schwellenwerte bzw. der für die einzelnen Verfahrensschritte erforderlichen Parameter kann vorgesehen sein, dass die für die Binarisierung und/oder Digitalisierung und/oder Filterung der Bilder eingesetzten Parameter oder Schwellenwerte ermittelt werden, indem vorerst Schwellenwerte vorgegeben werden und mit diesen Schwellenwerten das erfindungsgemäße Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 geführt wird und eine Abänderung bzw. Anpassung der Werte der Schwellenwerte nach Beurteilung und Bewertung des mit den jeweiligen vorgegebenen Schwellenwerten erhaltenen Ergebnisbildes in Hinblick auf eine Optimierung der Strukturerkennung vorgenommen wird und dass daraufhin das Verfahren mit den neu vorgegebenen, abgestimmten Schwellenwerten bis zum Erreichen eines vorbestimmten Qualitätskriteriums wiederholt wird und dann mit der Untersuchung von zielstrukturfärbten Gewebestrukturen begonnen wird.

[0012] Im folgenden wird die Erfindung anhand der Zeichnung beispielsweise näher erläutert.

[0013] Fig. 1 zeigt ein Beispiel für ein geordnetes statistisches Filtern.

[0014] Fig. 2 zeigt eine Darstellung verschiedener Konnektivitäten.

[0015] Fig. 3 zeigt ein Beispiel für eine logische ODER-Verknüpfung.

[0016] Fig. 4 zeigt ein Flussdiagramm.

[0017] Fig. 5 bis 15 zeigen Bilder, die nach einzelnen Schritten bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens von einer Gewebestruktur aufgenommen worden sind.

[0018] Fig. 16 zeigt ein Overlay des Eingabebildes mit der generierten Maske, welches die detektierte Zielstruktur hervorhebt.

[0019] Nach einer histologischen Prozessierung des zu untersuchenden Gewebes, insbesondere Fixierung, Einbettung, Schnittherstellung und Färbung, wird von einem mit der vorgegebenen Zielstrukturfärbung versehenen Gewebeschnitt - wie beispielsweise in Fig. 5 dargestellt - ein digitales Eingabebild K aus Teilbildern erstellt, die das Gesichtsfeld bzw. das Abbild des Schnittes umfassen und mit einer horizontalen Überlappung z.B. von etwa 5 % Pixel bzw. einer vertikalen Überlappung z.B. von etwas 3 % Pixel aufgenommen werden.

[0020] Diese aus Teilbildern erstellte Gesamtaufnahme (bei 1) eines Zellschnittes wird durch eine kumulative Histogramm-Angleichung (bei 2) der einzelnen Teilbilder für die nachfolgende Bearbeitung egalisiert. Ein Histogramm repräsentiert die Häufigkeitsverteilung aller möglichen Intensitätswerte des Eingabebildes K. Die Intensitätswerte werden zu Klassen zusammengefasst. Eine Klasse entspricht jeweils einer Graustufe. Um die Teilbilder einer Gesamtaufnahme besser vergleichen zu können, wird in ein sogenanntes kumulatives Histogramm berechnet, welches die Häufigkeiten der Grauwerte aller Teilbilder einer Aufnahme kompakt repräsentiert. Dies geschieht wie folgt: Sei m_j ein Histogramm und i die Anzahl der zugehörigen Klassen (Bins), wird ein kumulatives Histogramm M definiert als $M = \sum_{j=1}^i m_j$, M ist somit die Summe aller entsprechenden Werte des ursprünglichen Histogramms m_j . Nun folgt eine Normalisierung, für die zuerst eine kumulative Verteilungsfunktion KVF auf das Histogramm angewendet wird. Diese summiert für jede Klasse X_i alle Werte der Klassen $i=0$ bis $(i=X-1)$ auf und speichert diesen Wert an der Position X_i . Für das Histogramm M lautet dann die allgemeine Formel:

$$M(v) = \text{runde} \frac{KVF(v) - KVF_{\min}}{(XDIM \cdot YDIM \cdot \text{Anzahl_der_Einzelbilder}) - KVF_{\min}} \cdot (\text{GRAUWERTE} - 1)$$

[0021] KVF_{\min} ist der kleinste Wert der kumulativen Verteilungsfunktion und *runde* ist die mathematische Rundung, da nur ganzzahlige Werte erlaubt sind. Jeder Wert im kumulativen Histogramm *M* wird nun gemäß dieser Formel ersetzt. Dafür wird der Wert im Histogramm durch den entsprechenden Wert der durch die Verteilungsfunktion *KVF* berechnet wurde wie folgt ersetzt: Die Differenz des Wertes an der Stelle *v* von *KVF* minus dem Wert KVF_{\min} dividiert durch die Differenz aus dem Produkt der Bilddimensionen ($XDIM=$ Breite, $YDIM=$ Höhe) und der Anzahl der Teilbilder minus KVF_{\min} multipliziert mit dem Normalisierungsfaktor ergeben nach obiger Formel den neuen Wert der Klasse.

[0022] Um zum Beispiel eine Normalisierung zwischen 0 und 255 zu bekommen, wird beispielsweise $GRAUWERTE=256$ gesetzt. Nach einer Normalisierung mit *M* besitzt jedes Bild der Aufnahme ein uniformes Histogramm.

[0023] Anschließend werden die Teilbilder beispielsweise durch *Stitching* (bei 3) zu dem digital vorliegenden Eingabebild *K* vereint. Dies geschieht indem für aneinander angrenzende Teilbilder der Kreuzkorrelationskoeffizient für jeweils benachbarte Randbereiche berechnet wird. Die Randbereiche mit der höchsten Übereinstimmung werden für das Zusammensetzen der benachbarten Teilbilder herangezogen und die Werte in überlappenden Randbereichen gemittelt. Nach diesem Schritt erhält man das normalisierte Eingabebild *K* gemäß Fig. 6.

[0024] Danach wird (bei 4) ein statistisches Filter *F* der Größe $N \times N$ über das zusammengesetzte Eingabebild *K* bewegt. Bei diesem beispielsweise eingesetzten geordneten statistischen Filter *F* wird der Pixel im Zentrum des jeweiligen Fensters im Eingabebild *K* mit dem höchsten Intensitätswert der umgebenden Pixel ersetzt. Bei diesem in Fig. 1 erläuterten Vorgang befindet sich jeder Pixel genau einmal im Zentrum des Filters *F*. Der Pixelwert an der Stelle *X*, in diesem Beispiel 4, wird durch den Pixelwert 8 ersetzt. Dieser Wert wurde als der größte Pixelwert der angrenzenden Nachbarpixel ermittelt. In den Randbereichen des Bildes können die fehlenden Pixel mittels Spiegelung oder Auffüllung mit 0 ergänzt werden. Die Intensitätswerte *A* bis *H* werden der Größe nach aufsteigend sortiert und der Pixel an der Position *X* wird ersetzt mit dem höchsten Intensitätswert der aufsteigend sortierten Pixel. Dieser Schritt kann durch den Parameter bzw. Schwellenwert *P1*, das heißt die Größe der Nachbarschaft ($N \times N$), spezifiziert werden. Fig. 1 veranschaulicht diesen Vorgang für $N=3$. Fig. 7 zeigt das nach dem Filtern erhaltene Zwischenbild *Z*.

[0025] Eine weitere Möglichkeit für einen statistischen Filter anstelle des oben beschriebenen geordneten statistischen Filters wäre ein Mittelwertfilter, ein Medianfilter oder eine Mittelung der *N* höchsten Intensitätswerte.

[0026] In Folge wird (bei 5) ein Differenzbild *D* durch Differenzbildung zwischen dem zuvor beim geordneten statistischen Filtern erhaltenen Zwischenbild *Z* und dem nach Anwendung des uniformen Histogramms erhaltenen Eingabebild *K* berechnet. Das erhaltene Differenzbild *Z* ist in Fig. 8 dargestellt.

[0027] Nach dieser Operation wird das Differenzbild *Z* (bei 6) unter Vorgabe eines Schwellwertes *P2* in ein binäres Bild übergeführt, das beispielsweise in Fig. 9 dargestellt ist.

[0028] Im Binärbild abgetrennte Bildbestandteile z.B. betreffend biologisches Material, z.B. aufgrund inhomogener Färbung oder anderer Artefakte werden (bei 7) durch ein morphologisches Schließen mit einem Strukturelement (z.B. einer Scheibe), unter Vorgabe eines Parameters bzw. Schwellwertes *P3*, vereint. Das diesbezügliche Bild ist in Fig. 10 dargestellt.

[0029] Nach diesem Schritt (bei 8) werden zusammenhängende biologische Komponenten bzw. Pixel, die nicht zur Zielstruktur gehören, mit einer Größe entfernt, die durch einen Parameter bzw. Schwellenwert *P4* vorgegeben wird. Das sich durch dieses morphologische Öffnen ergebende Bild *S1* ist in Fig. 11 dargestellt.

[0030] Parallel dazu wird das normalisierte zusammengesetzte Eingabebild *K* mittels eines

vorgegebenen Schwellwertes P5 (bei 9) binarisiert. Dieses Bild B ist in Fig. 12 dargestellt.

[0031] Strukturen, die aufgrund ihrer Größe nicht zur Zielstruktur gehören, werden aus durch ein morphologisches Öffnen (bei 10) entfernt, das derartige Artefakte aus dem binären Bild B entfernt. Alle verbundenen Komponenten mit weniger als durch einen vorgegebenen Parameter oder Schwellenwert P6 entsprechende Pixel werden dadurch entfernt. Als verbunden können z.B. Pixel mit vier oder acht Nachbarn ungleich 0 betrachtet werden. Fig. 2 zeigt diese beiden Konnektivitäten. Die erste Variante (Konnektivität=4) würde den Pixel in der Mitte als verbundene Komponente klassifizieren. Im Gegensatz dazu wäre bei einer Konnektivität=8 dieser Pixel nicht verbunden, da die Pixel in den Diagonalen nicht größer 0 sind. Vorzugsweise wird eine Konnektivität = 8 eingesetzt. Das sich ergebende Bild S2 ist in Fig. 13 dargestellt.

[0032] Das bereinigte binäre Bild S2 und das nach Bereinigung des Differenzbildes D erhaltene Bild S1 werden (bei 11) vereint. Dies geschieht mittels einer logischen ODER-Verknüpfung. Dadurch werden alle jenen Pixel der beiden Bilder übernommen, deren Intensitätswerte ungleich 0 sind. Die Prozesse zur Generierung von S1 und S2 sind komplementäre Prozesse mit dem gleichen Ziel, dass die logische ODER-Verknüpfung am besten abgebildet wird. Beide Zweige des Flussdiagramms ergänzen sich. Da detektierte Zielstrukturpixel aus beiden übernommen werden sollen, wird dies mit der ODER-Verknüpfung gemacht. Fig. 3 veranschaulicht diesen Vorgang anhand eines Beispiels. Das rechte Quadrat ist die logische ODER-Verknüpfung des linken und mittleren Quadrates. Fig. 14 zeigt das aus der ODER-Verknüpfung resultierende Vereinigungsbild V.

[0033] Durch diese ODER-Verknüpfung können kleine Artefakte entstehen, die wiederum aufgrund ihrer Größe nicht zur Zielstruktur gehören. Das Vereinigungsbild V kann unter Anwendung eines Parameters bzw. Schwellenwertes P7 morphologisch (bei 12) geöffnet werden. Das resultierende Ergebnisbild E ist in Fig. 15 dargestellt.

[0034] Dieses Ergebnisbild E wird (bei 13) als Maske eingesetzt und mit dem Eingabebild K zur genaueren Darstellung bzw. besseren Erkennbarkeit und Beurteilbarkeit des Eingangsbildes mit diesem verknüpft, indem die von der Maske umfassten Bildbereiche hervorgehoben werden. Ein derart verknüpftes Bild ist in Fig. 16 dargestellt.

[0035] Zu dem in Fig. 4 dargestellten Flussdiagramm für das erfindungsgemäße Verfahren für die Erkennung von Gewebestrukturen wird bemerkt, dass diese erforderlichen Parameter vorgegeben werden bzw. versucht wird, diese Parameter zu optimieren und an die vorliegenden unterschiedlichen Gewebestrukturen anzupassen, um bestmögliche Resultate zu erhalten. Der Parameter bzw. Schwellenwert P1 bestimmt die Größe der N mal N Nachbarschaft, die für ein geordnetes statistisches Filter vorgegeben wird. Dieser Schwellenwert P1 bestimmt auch die Charakteristiken von anderen eingesetzten statistischen Filter, um diese an die Gegebenheiten der zu beurteilenden Gewebestruktur anzupassen.

[0036] Der Parameter bzw. Schwellenwert P2 gibt die Schwelle für die Binarisierung des Zwischenbildes Z an. Der Parameter bzw. Schwellenwert P3 gibt die Größe des Flächenbereiches, insbesondere des Durchmesser einer Scheibe, für zusammenhängende Pixel vor, die miteinander durch das morphologische Schließen verbunden werden sollen. Der Parameter bzw. Schwellenwert P4 gibt die Größe der miteinander verbundenen Komponenten bzw. Pixelbereiche an, die aus dem Differenzbild D bei dessen morphologischem Schließen entfernt werden sollen.

[0037] Der Parameter bzw. Schwellenwert P5 ist das Maß für die Binarisierung des Eingabebildes E. Pixel mit einem digitalen Wert größer oder gleich dem Schwellenwert bekommen beispielsweise den binären Wert 1. Pixel kleiner als der Schwellenwert wird der Wert 0 zugewiesen.

[0038] Der Parameter bzw. Schwellenwert P6 wird für das morphologische Öffnen des binären Bildes B eingesetzt, um die Größe in Pixel der maximal zu entfernenden verbundenen Komponenten anzugeben, die durch das Schwellenwertverfahren bei der Binarisierung des Eingabebildes E entstanden sein könnten.

[0039] Der Parameter bzw. Schwellenwert P7 gibt bei dem morphologischen Öffnen des Vereinigungsbildes V die maximale Größe in Pixel der zu entfernenden verbundenen Pixelbereiche

bzw. Komponenten an, welche Artefakte durch die logische ODER-Verknüpfung entstanden sein könnten.

[0040] Für die Optimierung der Parameter bzw. Schwellwerte kann beispielsweise derart vorgegangen werden, dass der extern vorgegebene Wert P5 durch eine vollautomatische Parameteroptimierung anhand von Expertenmarkierungen auf einem kleinen Teil der Zielstruktur berechnet wird. Hierfür wird der Algorithmus mit allen möglichen Kombinationen von Parametern aufgerufen bzw. durchgeführt und jede dadurch entstandene Maske gespeichert. Diese Masken werden anschließend mit den Expertenmasken verglichen. Als Übereinstimmungsmaß dient das statistische F1-Maß. Dieses wird mittels Trefferquote (engl. Recall) und Genauigkeit (engl. Precision) wie folgt berechnet:

$$F_{\beta} = (1 + \beta^2) * \frac{\text{precision} * \text{recall}}{\beta^2 * \text{precision} + \text{recall}}$$

[0041] Für die Auswertung wird $\beta = 1$ gesetzt und dadurch Precision und Recall gleichgewichtet. Jene Parameterkombination, die den besten bzw. höchsten F1-Wert erreicht, wird für die Auswertung herangezogen und gibt damit sinnvolle Parameterwerte für P1 bis P7 vor.

[0042] Die Fig. 5 bis 15 stellen Aufnahmen einer Gewebestruktur der plazentalen Villi dar und werden in Folge anhand des Flussdiagramms nochmals näher erläutert.

[0043] Das Eingabebild K mit der Zielstrukturfärbung ist in Fig. 5 ersichtlich. Zielstruktur ist der Synzytiotrophoblast der plazentalen Villi, der durch Zytokeratin 7-Anfärbung per Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert wurde. Nun folgt die Normalisierung mit einem kumulativen Histogramm. Das Ergebnis ist in Fig. 6 ersichtlich. Durch die Normalisierung ist die Zielstruktur besser vom Hintergrund und der Autofluoreszenz anderer Zellen abgegrenzt. Dieses Bild wird nun mittels eines NxN (mit P1=3) geordneten statistischen Filters zum Zwischenbild Z gemäß Fig. 7 transformiert. Dann wird ein Differenzbild D aus dem Eingabebild K und dem Zwischenbild Z berechnet und das in Fig. 8 dargestellte Differenzbild D wird mittels Schwellwertberechnung und Parameter (P2 = 0,08) binarisiert und ergibt das in Fig. 9 dargestellte Bild. Ein folgendes morphologisches Schließen, z.B. mit einem Strukturelement „Scheibe“ mit einer Größe von durch den Parameter P3 vorgegebenen 7 Pixel (P3=7) schließt nun die Stellen mit den höchsten Intensitäten zu einer einheitlichen Fläche und ergibt das in Fig. 10 dargestellte Bild. Durch diese Operation entstandene Artefakte werden durch ein morphologisches Öffnen mit dem Parameter P4 = 20 entfernt und man erhält das Bild S1 gemäß Fig. 11.

[0044] Parallel dazu wird durch Schwellwertberechnung das normalisierte Eingabebild E unter Anwendung des Parameters P5=0,20 binarisiert (Fig. 12) und Artefakte werden durch ein morphologisches Öffnen mit einer Konnektivität=4 oder =8 unter Anwendung des Parameters P6 = 300 entfernt und man erhält das Bild S2 gemäß Fig. 13. Die beiden Bilder S1 und S2 werden durch logische Oder-Verbindung zum Vereinigungsbild V vereint (Fig. 14). Ein abschließendes morphologisches Öffnen mit Parameter P7 = 100 entfernt entstandene Artefakte und man erhält das Ergebnisbild E gemäß Fig. 15.

[0045] Eine mögliche Anwendung für diese Maske ist es, sie für die Lokalisation eines gefärbten Zielproteins im gleichen oder konsekutiven Gewebe einzusetzen. Ein Overlay zur Veranschaulichung dieses Vorganges ist in Fig. 16 zu sehen. Hier wurde ein Kanal mit einer Färbung zur Erkennung von RAGE (receptor for advanced glycated end-products) mit der berechneten Maske überlagert.

[0046] Die für die Gewebstrukturerkennung benötigten Parameter der einzelnen Schritte wurden mittels der oben beschriebenen Parameteroptimierung ermittelt. Dafür wurden Masken angefertigt, in denen Experten manuell die Zielstruktur markierten. Diese Expertenmasken dienten sowohl zur Evaluierung als auch zur Parameterbestimmung. Nach erfolgreicher Optimierung der Parameter können die Werte für die gesamte Aufnahme verwendet werden. Ein Vergleich mit einer manuellen Bestimmung der Parameter durch einen Experten hat ergeben, dass die Genauigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. Algorithmus wesentlich besser ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erkennung und/oder Beurteilung einer flächig vorliegenden Gewebestruktur, die durch zumindest eine Zielstrukturfärbung markiert ist, **dadurch gekennzeichnet**,
 - dass von der Gewebestruktur zumindest ein digitales Eingabebild (K) erstellt wird,
 - dass auf das digitale Eingabebild (K) ein statistisches Filter (F) angewendet und durch Bildung der Differenz des durch Anwendung des Filters (F) erhaltenen Zwischenbildes (Z) und des Eingabebildes (K) ein Differenzbild (D) gebildet wird,
 - dass von dem Eingabebild (K) unter Anwendung eines vorgegebenen Schwellenwertes (P5) ein binäres Bild (B) erstellt wird,
 - dass das binäre Bild (B) mit einer logischen ODER-Funktion mit dem Differenzbild (D) pixelweise verknüpft wird und
 - dass das aus dieser Verknüpfung resultierende Ergebnisbild (E) als Maske zur Erkennung und/oder Beurteilung der von der zu untersuchenden Gewebestruktur erstellten Eingabebilder (K) oder der von der zu untersuchenden Gewebestruktur abgeleiteten Eingabebilder (K') eingesetzt und/oder jeweils mit diesen Eingabebildern (K, K') verknüpft wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass als statistisches Filter (F) ein geordnetes statistisches Filter, ein Maximalwertfilter, ein lineares Filter, ein lineares Grauwertfilter, ein Mittelwertfilter oder ein Medianfilter eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Erstellung der Ergebnisbilder (E) Eingabebilder (K) herangezogen werden, die von der selben Gewebestruktur in unterschiedlichen Farbkanälen bzw. unter unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen werden und/oder dass zur Erstellung von Ergebnisbildern (E) von der Gewebestruktur abgeleitete Eingabebilder (K') eingesetzt werden, wobei diese abgeleiteten Eingabebilder (K') von anderen Farbkanälen und/oder von vorzugsweise parallelen Zellschnitten benachbarter Gewebestrukturbereiche aufgenommen werden und
 - dass diese Ergebnisbilder (E) als Masken zur Beurteilung der zu untersuchenden Gewebestruktur eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass von einer mit zumindest einer Zielstrukturfärbung markierten Gewebestruktur eine Mehrzahl von in Randbereichen einander überdeckenden Teilbildern aufgenommen wird und diese Teilbilder zu dem Eingabebild (K) zusammengesetzt werden, wobei für die Teilbilder eine kumulative Histogrammangleichung der Teilbilder zu deren Egalisierung vorgenommen wird, worauf die jeweils ein uniformiertes Histogramm besitzenden Teilbilder zu dem Eingabebild (K) als Gesamtbild zusammengesetzt bzw. vereinigt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass für das Zusammensetzen und Vereinigen der Teilbilder zu dem Eingabebild (K) für überlappende, einander entsprechende und/oder höchste Übereinstimmung besitzende Randbereiche der Kreuzkorrelationskoeffizient, gegebenenfalls nach Bildung eines Mittelwertes für die Intensitätswerte der einzelnen Pixel im überlappenden Bereich, berechnet wird und die Randbereiche mit höchster Übereinstimmung überlappt werden, wobei vorteilhafterweise die Pixelwerte in den Randbereichen gemittelt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Differenzbild (D) unter Anwendung eines vorgegebenen Schwellenwertes (P2) binarisiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor der ODER-Verknüpfung das binarisierte Differenzbild (D) unter Anwendung eines Schwellenwertes (P3) einem morphologischen Schließen und unter Anwendung eines Schwellenwertes (P4) einem nachfolgenden morphologischen Öffnen unterworfen wird und/oder dass das binäre Bild (B) unter Anwendung eines Schwellenwertes (P6) einem morphologischen Öffnen unterzogen wird und/oder dass das Vereinigungsbild (V) unter Anwendung eines Schwellenwertes (P7) einem morphologischen Öffnen unterzogen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Ergebnisbild (E) als Maske zur Erkennung von Gewebestrukturen in Zellschnitten und/oder von Metastrukturen oder Vielzellenstrukturen in Gewebeschnitten eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die für die Binarisierung und/oder Digitalisierung und/oder Filterung der Bilder eingesetzten Parameter oder Schwellenwerte (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7) ermittelt werden, indem vorerst Schwellenwerte vorgegeben werden und mit diesen Schwellenwerten das erfindungsgemäße Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 geführt wird und eine Abänderung bzw. Anpassung der Werte der Schwellenwerte nach Beurteilung und Bewertung des mit den jeweiligen vorgegebenen Schwellenwerten erhaltenen Ergebnisbildes (E) in Hinblick auf eine Optimierung der Strukturerkennung vorgenommen wird und dass daraufhin das Verfahren mit den neu vorgegebenen, abgestimmten Schwellenwerten bis zum Erreichen eines vorbestimmten Qualitätskriteriums wiederholt wird und dann mit der Untersuchung von zielstrukturgefärbten Gewebestrukturen begonnen wird.
10. Datenträger auf dem ein Programm zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 abgespeichert ist, und/oder Computerprogramm mit Programmcode-Mitteln, eingerichtet zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wenn das Programm auf einem Computer ausgeführt wird, und/oder Computerprogramm nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gespeichert auf einem Datenträger, und/oder Datenträger mit elektronisch auslesbaren Steuersignalen, die so mit einem programmierbaren Computersystem zusammenwirken können, dass ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgeführt wird, und/oder Computerprogrammprodukt mit Programmcode zur Ausführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wenn das Programm auf einem Computer ausgeführt wird.

Hierzu 8 Blatt Zeichnungen

A	B	C
H	X	D
G	F	E

1	3	4
8	4	2
6	7	5

1	2	3
8	8	4
7	6	5

Fig. 1

0	1	0
1	1	1
0	1	0

1	1	1
1	1	1
1	1	1

Fig. 2

1	0	1
0	0	0
1	0	1

1	0	0
1	1	0
1	1	1

1	0	1
1	1	0
1	1	1

Fig. 3

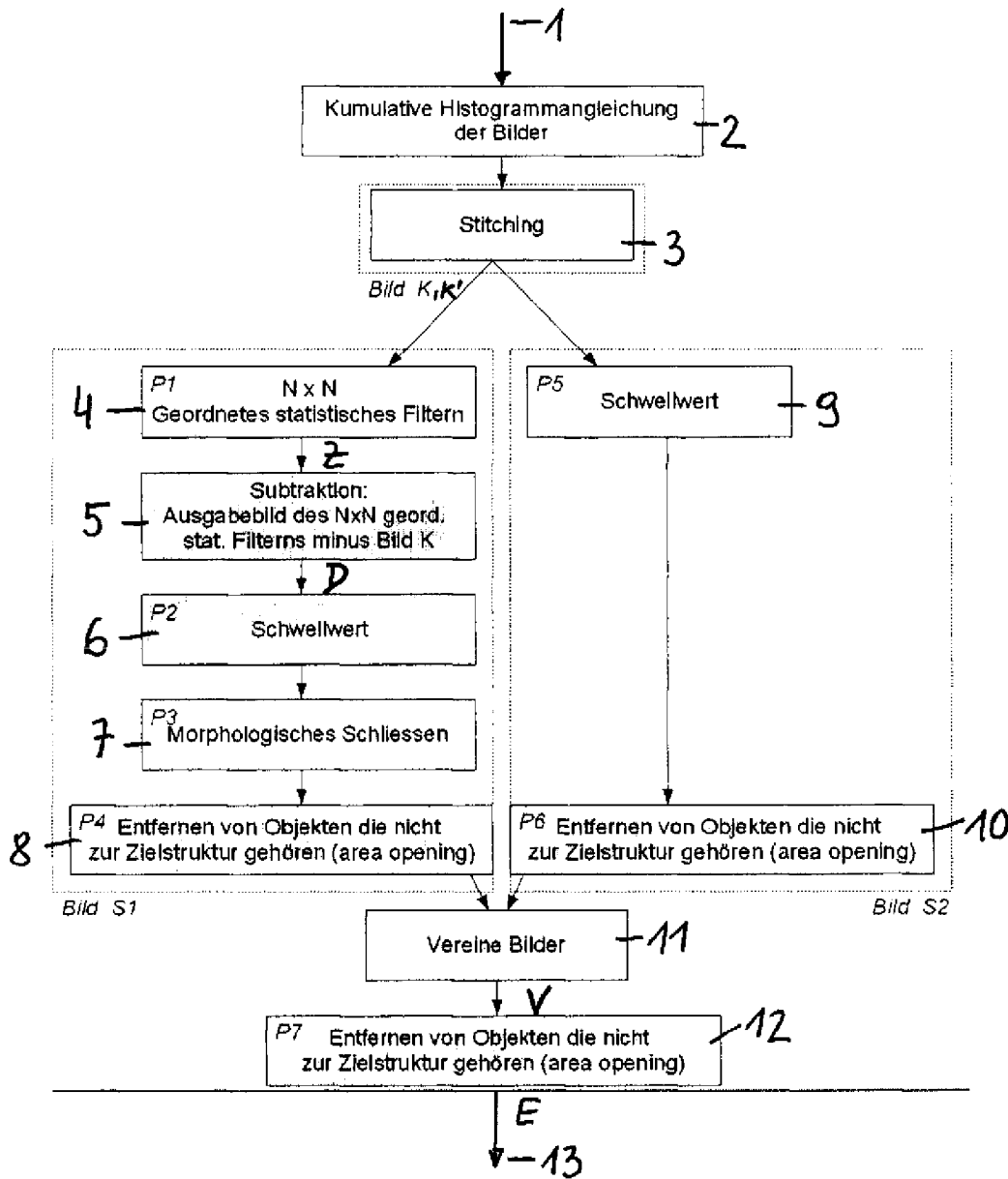
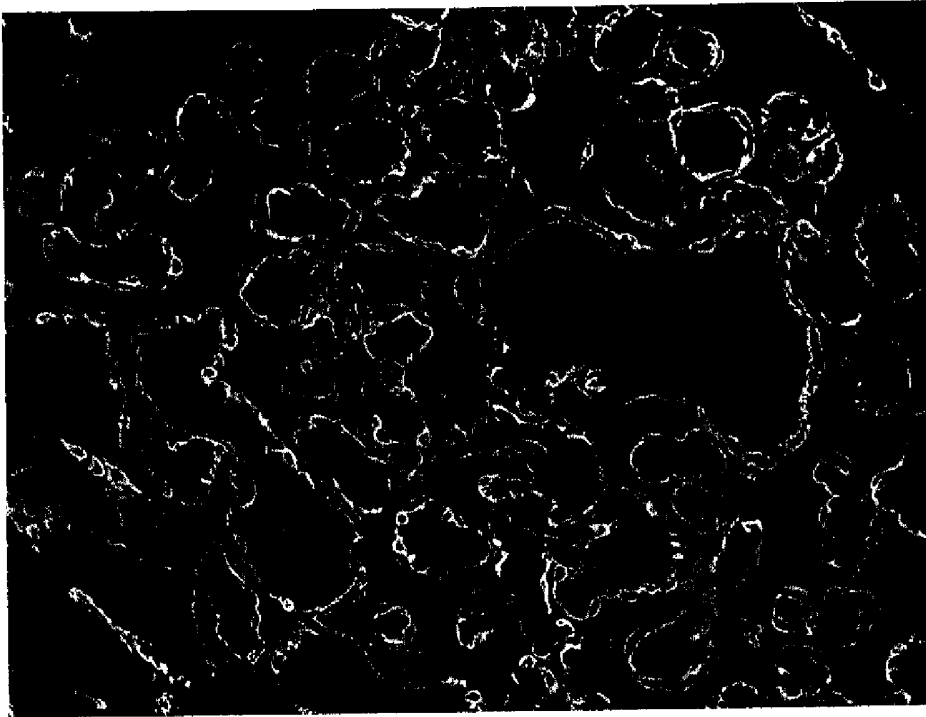
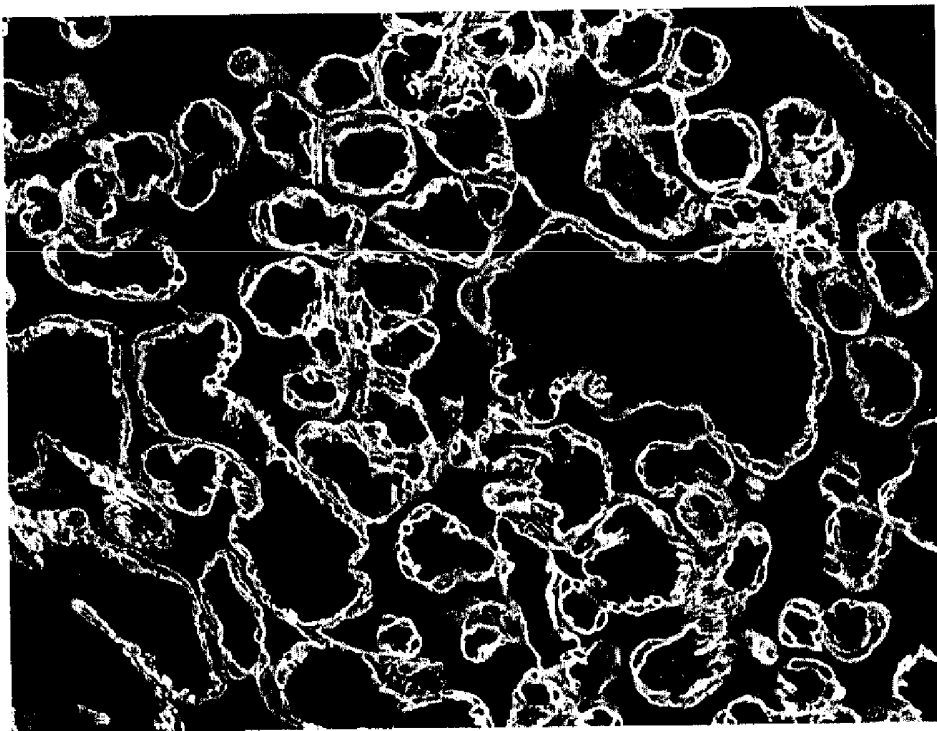


Fig. 4

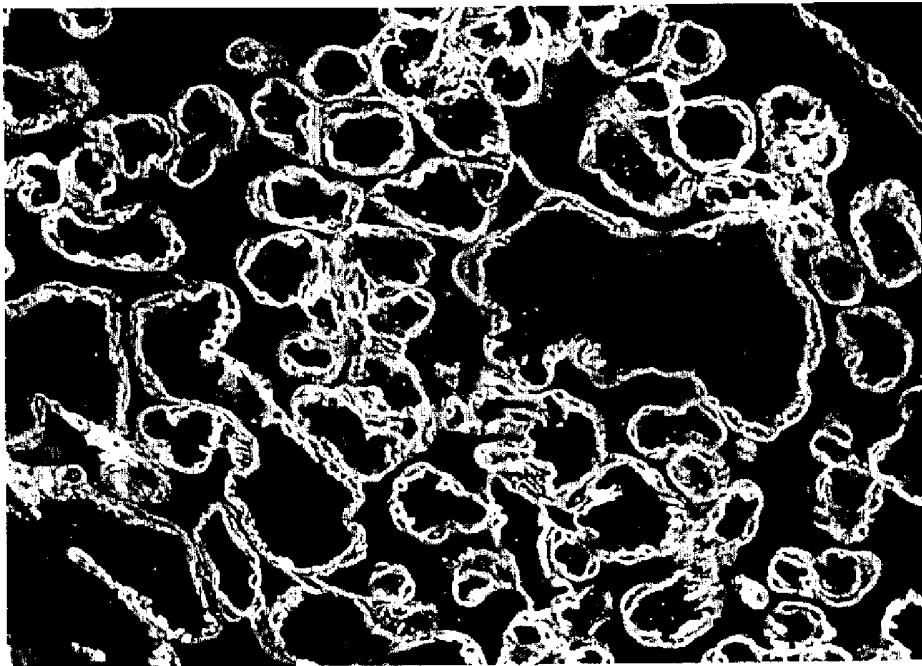


Schritt 1: Eingabebild mit Zielstrukturfärbung

Fig. 5



Schritt 2 und 3: Normalisiertes zusammengesetztes Eingabebild K, K' Fig. 6

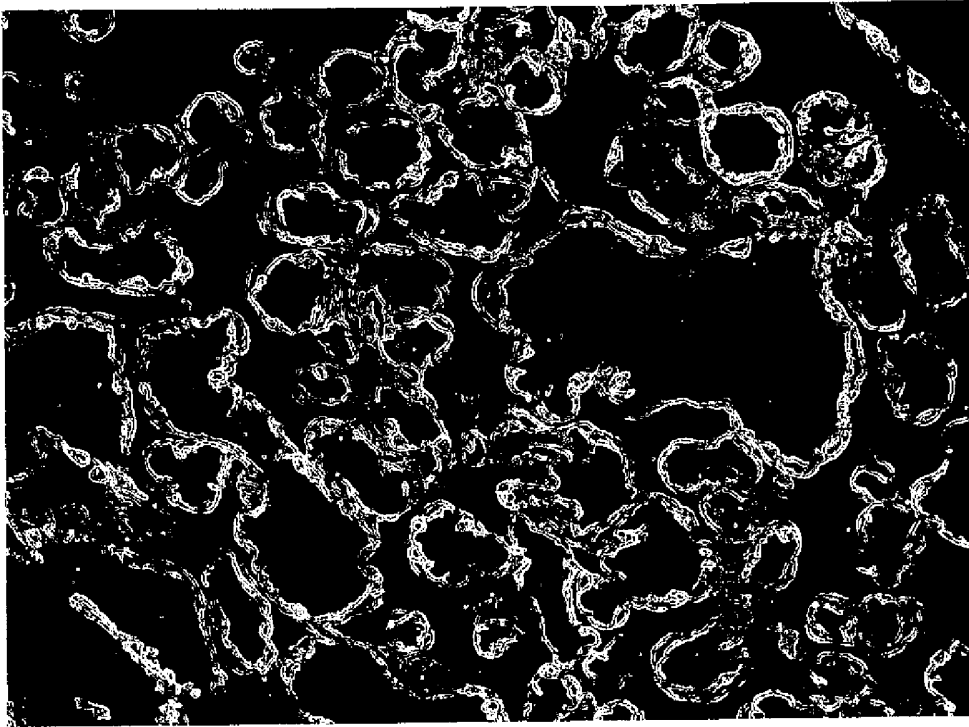


Schritt 4: Bild Z nach der Anwendung des $N \times N$ geordneten statistischen Filterns Fig. 7



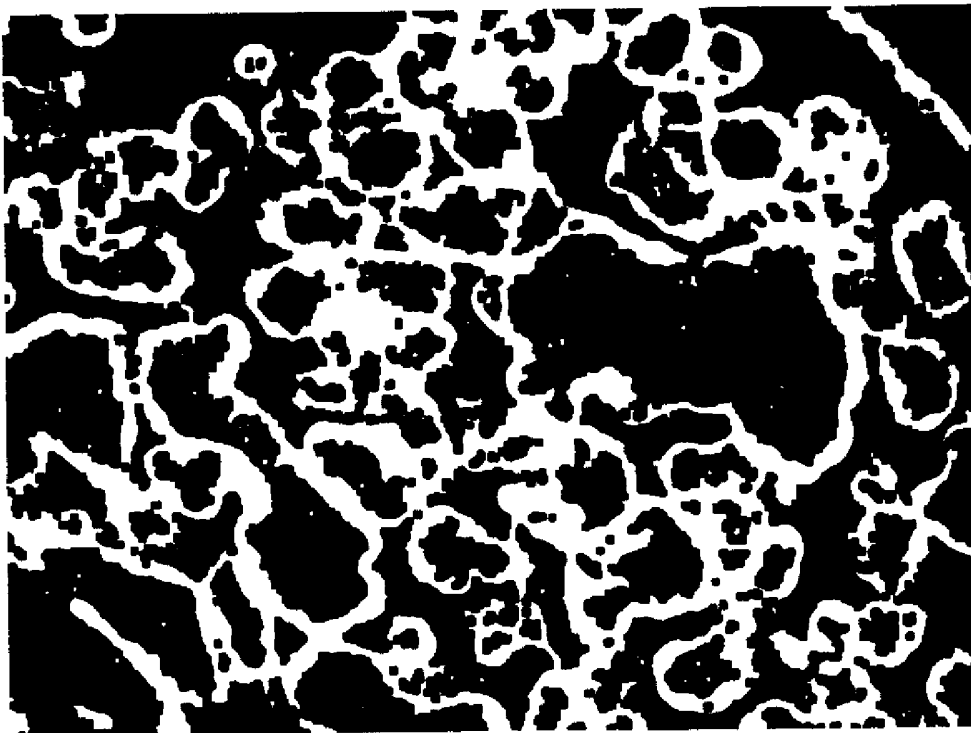
Schritt 5: Resultierendes Bild D nach der Subtraktion

Fig. 8



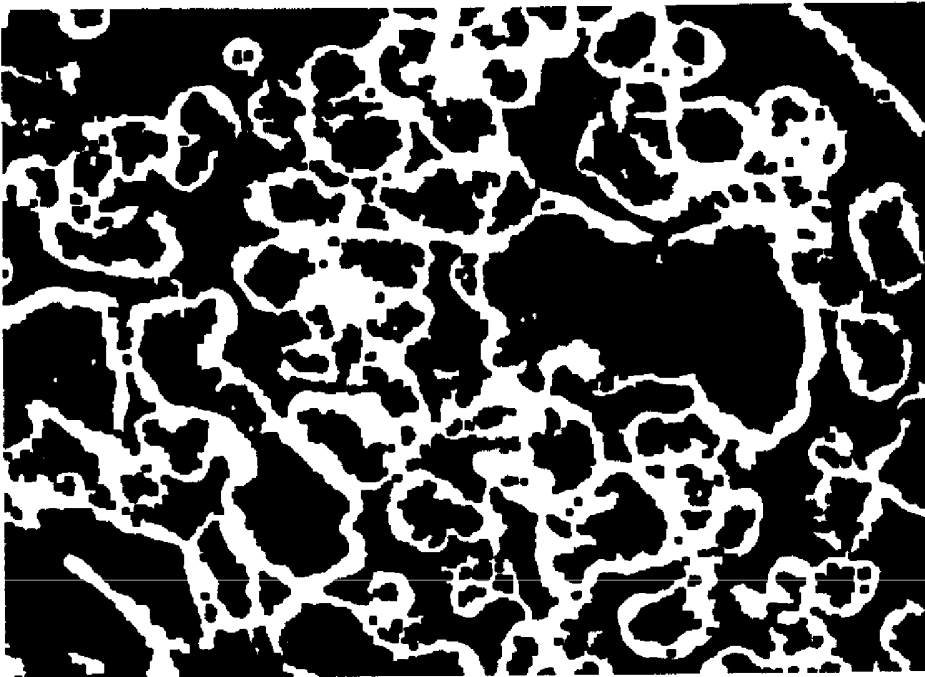
Schritt 6: Bild nach Schwellwert-Binarisierung

Fig. 9



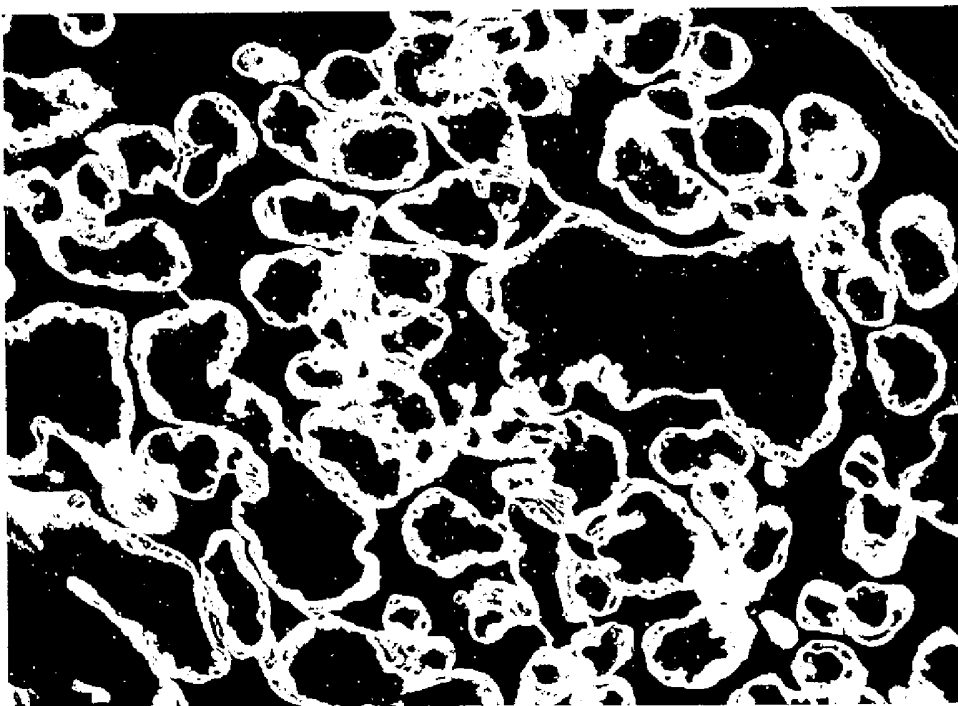
Schritt 7: Bild nach dem morphologischen Schließen

Fig. 10



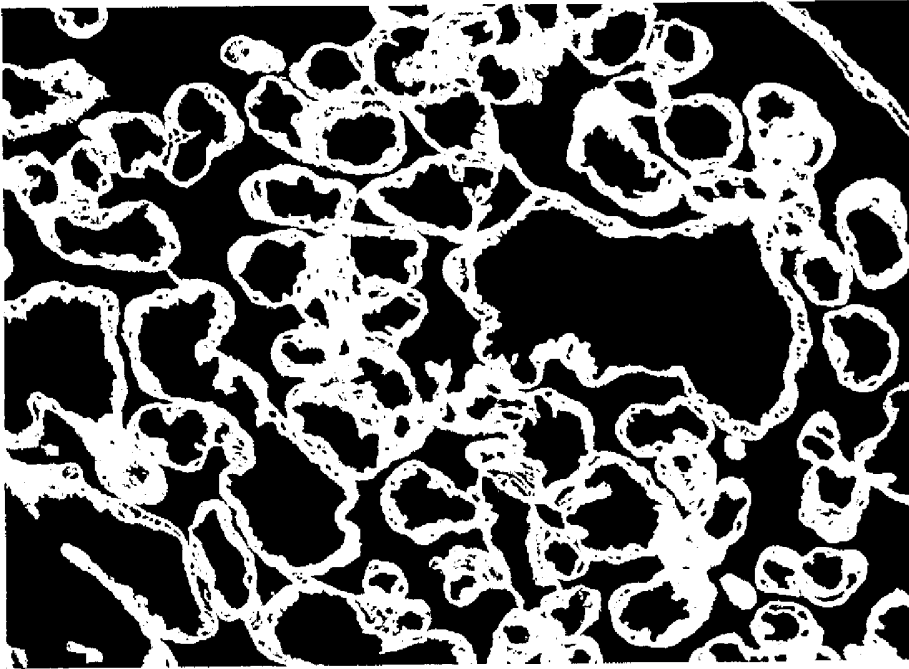
Schritt 8: Bild S1 nach dem Entfernen von nicht zur Zielstruktur gehörenden Objekten

Fig. 11



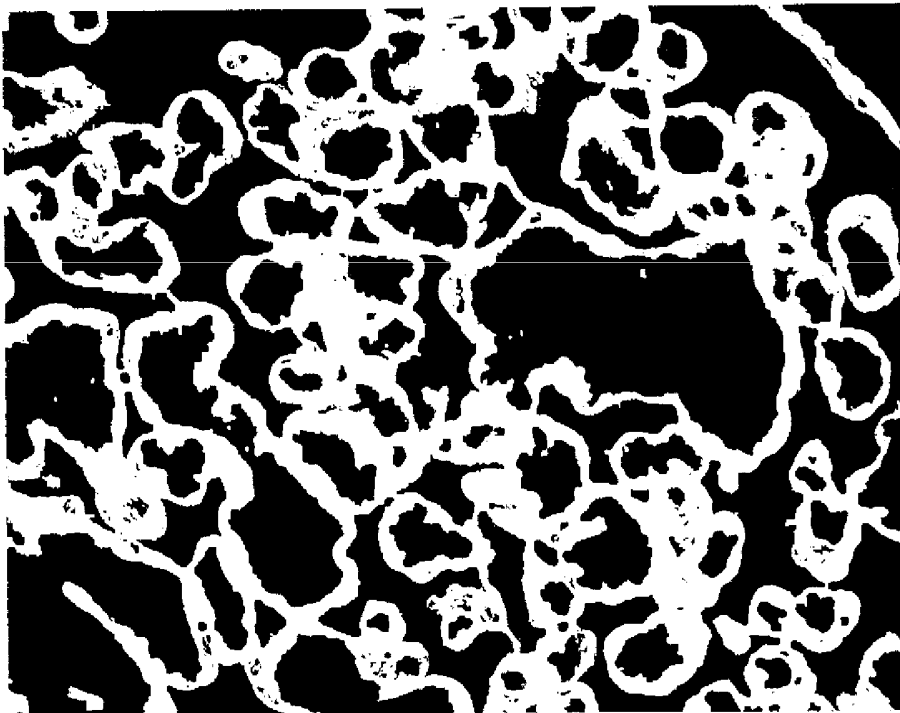
Schritt 9: Schwellwertberechnung des normalisierten Eingabebildes K

Fig. 12



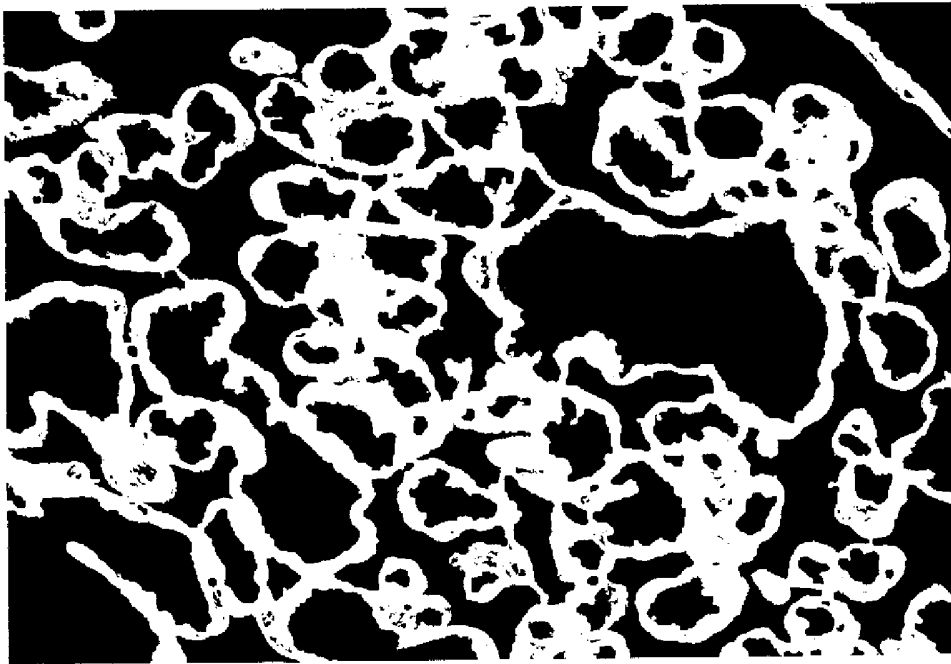
Schritt 10: Bild S2 nach dem Entfernen von nicht zur Zielstruktur gehörenden Objekten

Fig. 13



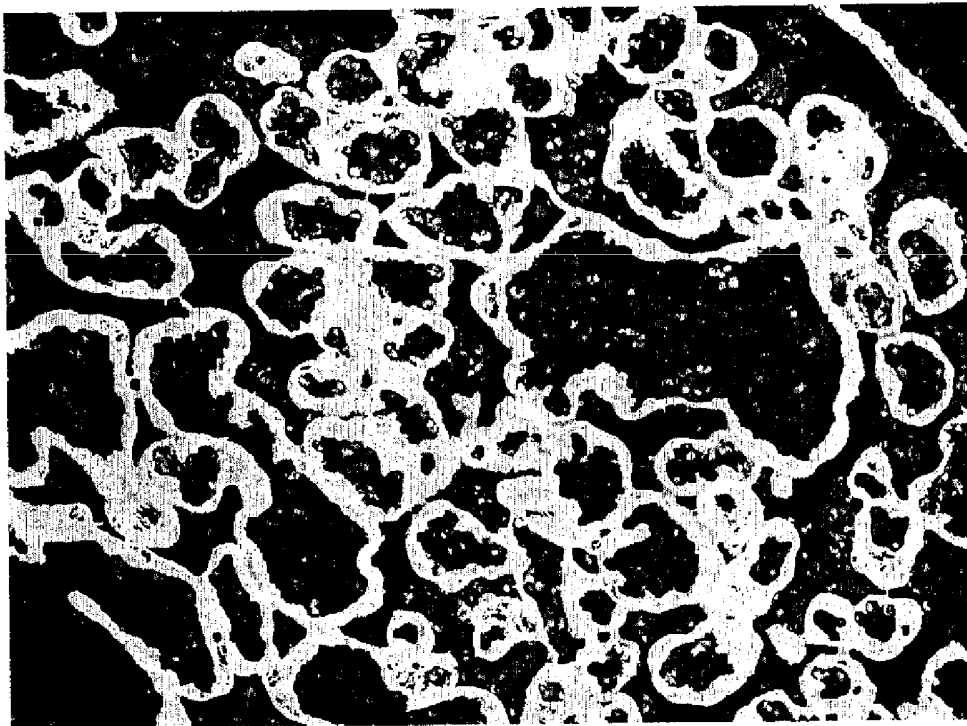
Schritt 11: Oder-Verknüpfung der Bilder S1 und S2 zu Bild V

Fig. 14



Schritt 12: Ergebnisbild E nach der Entfernung von nicht zur Zielstruktur gehörenden Artefakten

Fig. 15



Schritt 13: Overlay von Eingabebild K und Maske

Fig. 16