

Ανάπτυξη λογισμικού για fractal ανάλυση ιστοπαθολογικών εικόνων

Παυλόπουλος Π.Μ., Καβανιζάς Ν., Αγαπητός Ε., Πατισούρης Ε.

Software Development for Fractal Analysis of Histopathologic Images

Pavlopoulos PM, Kavantzias N, Agapitos E, Patsouris E

Department of Pathology, Medical School, National University of Athens, Greece.

Introduction: Considering the multiple applications of fractal analysis in the field of histopathology, we developed "Fractalyser", a specialized fractal analysis program for Windows operating system.

Material and Methods: The application was developed in Visual Basic 6.0 environment. The program was designed with multiple document interface and Windows XP compatibility. It can open, edit and analyze the most common image file types. The program has some basic image processing functions such as invert, horizontal and vertical flip, grayscale conversion and crop. The user can precisely select the area of interest applying parameterized threshold or edge detection algorithms in the color image, while getting real time graphical feedback on the process. The produced binary image, which is projected as a red layer on the original image, can be further optimized before fractal analysis with "dilation", "erosion" or several noise reduction filters. The estimation of the fractal dimension of the image is carried out by using the "box-counting" algorithm.

Results: The accuracy of the application was assessed by analyzing images with theoretically known fractal dimension. The errors ranged from 0.0 to 5.8%, being conversely proportional to the number of grid offsets. Repeated comparisons of the statistical results of the program with the corresponding data of a commercially available statistical package confirmed their validity and precision.

Conclusion: As it has been observed in thorough testing, the application presented here constitutes a stable, relatively fast, reliable and easy to use tool for fractal analysis. "Fractalyser" is provided as freeware to researchers.

Key words: fractal analysis, fractal dimension, image analysis

Εισαγωγή: Με δεδομένες τις πολλαπλές εφαρμογές της fractal γεωμετρίας στον χώρο της ιστοπαθολογίας, αναπτύξαμε μια εξειδικευμένη εφαρμογή fractal ανάλυσης για Windows.

Υλικό και μέθοδος: Η εφαρμογή αναπτύχθηκε σε περιβάλλον Visual Basic 6.0 με διεπιφάνεια πολλαπλών αρχείων και Windows XP συμβατότητα. Μπορεί να ανοίγει, να επεξεργάζεται και να αναλύει όλους τους συνήδεις τύπους αρχείων εικόνας. Το πρόγραμμα διαδέτει ορισμένες βασικές λειτουργίες επεξεργασίας εικόνας, όπως αντιστροφή, οριζόντια και κάθετη αναστροφή, μετατροπή έγχρωμης εικόνας σε ασπρόμαυρη και αποκοπή τμημάτων. Ο χρήστης μπορεί με ακρίβεια να επιλέξει τις περιοχές ενδιαφέροντος μέσω παραμετροποιήσιμων αλγορίθμων ουδού και ανίχνευσης ορίων απευθείας στην έγχρωμη εικόνα, έχοντας στη διάθεσή του preview σε πραγματικό χρόνο. Η παραγόμενη δυαδική εικόνα, η οποία προβάλλεται ως ερυθρό επίπεδο επί της αρχικής εικόνας, μπορεί να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω με εφαρμογή φίλτρων μείωσης δορυύβου, dilation ή erosion. Ο υπολογισμός της fractal διαστάσεως πραγματοποιείται με εφαρμογή του αλγορίθμου box-counting.

Αποτελέσματα: Η ακρίβεια του προγράμματος ελέγχθηκε μέσω εικόνων με θεωρητικώς γνωστή fractal διάσταση. Τα σφάλματα του προγράμματος κυμάνθηκαν μεταξύ 0,0% και 5,8%, παρουσιάζοντας γενικώς μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο του αριθμού μετακινήσεως του πλέγματος. Επανελημμένες συγκρίσεις των στατιστικών αποτελεσμάτων του προγράμματος με αντίστοιχα ενός εμπορικώς διαθέσιμου στατιστικού πακέτου επιβεβαίωσαν την ακρίβεια και την αξιοπιστία τους.

Συμπέρασμα: Όπως διαπιστώθηκε σε ενδελεχείς δοκιμές, η παρουσιαζόμενη εφαρμογή αποτελεί ένα σταθερό, ταχύ και φιλικό στον χρήστη εργαλείο fractal ανάλυσεως. Το πρόγραμμα Fractalyser παρέχεται για ερευνητική χρήση ως freeware μετά από αίτηση των ενδιαφερομένων.

Λέξεις-κλειδιά: fractal ανάλυση, fractal διάσταση, ανάλυση εικόνας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη και η ανάλυση μικροσκοπικών ιστοπαθολογικών εικόνων μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, πραγματοποιούνται παραδοσιακά με τη βοήθεια μεθόδων της συμβατικής ευκλείδειας γεωμετρίας. Η τελευταία είναι γνωστό ότι αποτελεί επαρκές εργαλείο για τον χαρακτηρισμό και τη μελέτη θεωρητικών αντικειμένων που μπορούν να περιγραφούν ικανοποιητικά ως αδρούσιμα απλών γεωμετρικών σχημάτων, όπως ο κύκλος, το τετράγωνο ή η πυραμίδα. Οι δομές, ωστόσο, που πραγματικά απαντώνται στη φύση, όπως επί παραδείγματι οι ακτογραμμές, τα σύννεφα και ειδικά για τον χώρο της ιστοπαθολογίας τα κύτταρα, οι πυρήνες, τα αγγεία ή άλλες ιστικές δομές παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό πολυπλοκότητας, χαρακτηριζόμενες επιπλέον από το γνώρισμα της αυτοομοιότητας (self-similarity).¹⁻³ Τέτοιες δομές περιγράφονται καλύτερα μέσω του νέου κλάδου των μαθηματικών που δεμελιώθηκε από

τον B. Mandelbrot, της fractal γεωμετρίας.³ Με τη βοήθεια αυτής είναι δυνατόν να εκτιμηθεί αντικειμενικά και να προσδιοριστεί ποσοτικά ο βαθμός της πολυπλοκότητας και του ακανόνιστου που παρουσιάζει ένα αντικείμενο, μέσω ενός μεγέθους που καλείται fractal διάσταση.^{3,4}

Κατά τα τελευταία χρόνια η fractal ανάλυση έχει βρει εφαρμογές σε διάφορους τομείς της κλινικής και εργαστηριακής ιατρικής,⁵ ενώ διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζεται προσφάτως για εφαρμογές της fractal γεωμετρίας και στον χώρο της ποσοτικής ιστοπαθολογίας, καθώς έχει αποδειχθεί η χρησιμότητα των fractal παραμέτρων ιδίως στη μελέτη της παθολογικής ανατομικής των νεοπλασμάτων. Πράγματι, όπως έχει δείχθει σε σειρά πρόσφατων μελετών, παθολογικοί πυρήνες διαφόρων νεοπλασματικών ιστών παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές fractal διαστάσεως σε σχέση με φυσιολογικούς πυρήνες.⁶⁻⁹ Επίσης, αγγειακές διατομές από νεοπλασματικό νεοαγγειακό δίκτυο χαρακτηρίζονται από αυξημένο βαθμό πολυπλοκό-

τητας, όπως αυτός καταδεικνύεται από μετρήσεις της fractal διαστάσεως.¹⁰

Με δεδομένες και προφανείς τις πολλαπλές εφαρμογές της fractal ανάλυσης στο χώρο της ιστοπαθολογίας αναπτύξαμε το πρόγραμμα Fractalyser™, μια εξειδικευμένη εφαρμογή για προσωπικό υπολογιστή, η οποία πραγματοποιεί μετρήσεις fractal διαστάσεως με τη βοήθεια του αλγόριθμου box-counting.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

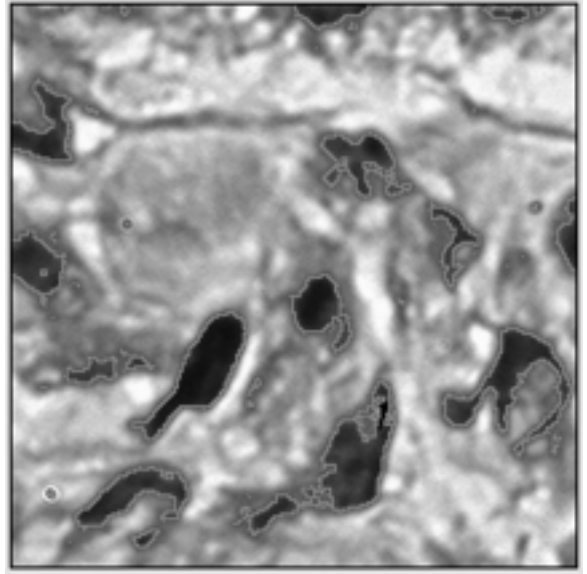
Η εφαρμογή αναπτύχθηκε σε περιβάλλον Visual Basic v.6.0 (Microsoft Corp.) με αρχιτεκτονική πολλαπλών αρχείων (multiple document interface), που επιτρέπει την ταυτόχρονη επισκόπηση και επεξεργασία περισσότερων της μιας εικόνων. Το Fractalyser διαθέτει παραθυρικό περιβάλλον και φιλική στον χρήστη διεπιφάνεια, ενώ είναι συμβατό με λειτουργικό σύστημα Windows 2000/XP.

Η αναπτυσσόμενη εφαρμογή μπορεί να ανοίγει αρχεία εικόνας τύπου bmp, jpg, gif και tiff, ενώ αποθηκεύει τις παραγόμενες εικόνες και τα διαγράμματα σε μορφή bmp. Τα αριθμητικά αποτελέσματα αποθηκεύονται σε μορφή txt.

Το Fractalyser δεν αποτελεί πλήρες πακέτο επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας και ως εκ τούτου μπορεί να εκτελεί περιορισμένο μόνο αριθμό γενικών λειτουργιών, όπως αντιστροφή (invert), οριζόντια και κάθετη αναστροφή (flip horizontal and vertical), παραμετροποιήσιμη μετατροπή έγχρωμης εικόνας σε ασπρόμαυρη (grayscale conversion) και αποκοπή τμημάτων (crop).

Βασική λειτουργία του προγράμματος είναι η εφαρμογή παραμετροποιήσιμου ουδού (threshold) στην ψηφιακή εικόνα για επιλογή επιφανειών ενδιαφέροντος, καθώς και η επίσης παραμετροποιήσιμη λειτουργία ανίχνευσης ορίων (edge detection), μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η ανάδειξη των περιγραμμάτων των αντικειμένων και η γραφική τους επισήμανση. Και για τις δύο λειτουργίες ο χρήστης έχει στη διάθεσή του preview τμήματος της εικόνας σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 1).

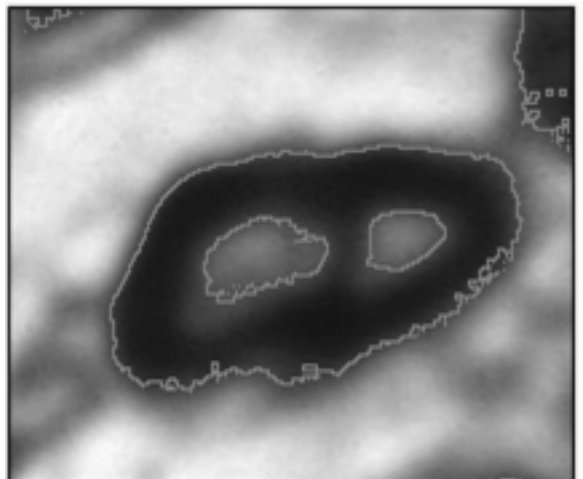
Με τις προαναφερθείσες λειτουργίες, οι οποίες επιτελούνται απ' ευθείας σε έγχρωμα αρχεία, δημιουργείται μια δυαδική εικόνα (binary image), ως ξεχωριστό επίπεδο (layer) το οποίο επιπροβάλλεται στην αρχική εικόνα. Ψηφιακός δόρυβος με τη μορφή μεμονωμένων



Εικόνα 1. Λειτουργία ανίχνευσης ορίων. Διακρίνεται το παράθυρο των ρυθμίσεων καθώς και το τμήμα εικόνας για preview πραγματικού χρόνου.

pixel ("salt and pepper" noise) ή μικρών αδροίσεων pixel μπορεί να αφαιρεθεί με τη χρήση ειδικών φίλτρων ή και χειροκίνητα. Το πρόγραμμα μπορεί επίσης να εφαρμόσει τους βασικούς τελεστές της μαθηματικής μορφολογίας, dilation και erosion.

Ο προσδιορισμός της fractal διαστάσεως γίνεται με εφαρμογή του αλγορίθμου box-counting στη δυαδική εικόνα (Εικ. 2). Σύμφωνα με



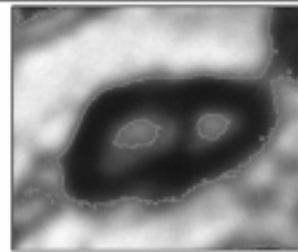
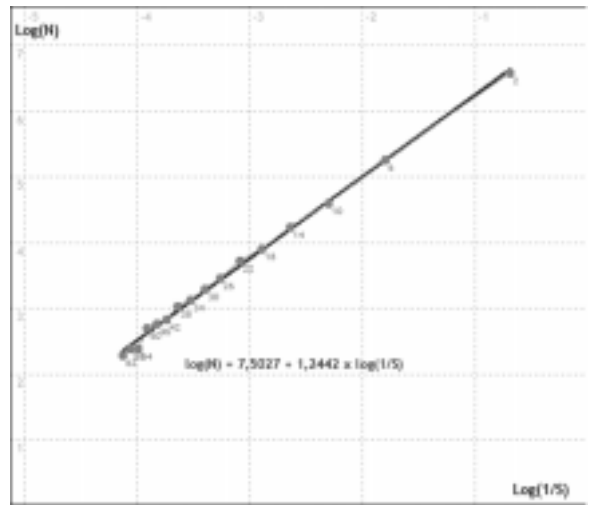
Εικόνα 2. Παράθυρο ρυθμίσεων για fractal ανάλυση.

τη μέθοδο αυτή εφαρμόζονται διαδοχικώς στην εικόνα πλέγματα (grids) με διαφορετικό κάθε φορά μέγεθος κελιών (boxes), ενώ από το πρόγραμμα καταγράφεται κάθε φορά ο αριθμός των κελιών που καταλαμβάνονται από το υπό μελέτη αντικείμενο (“δετικά” κελιά). Ακολουθώντας, υπολογίζεται για κάθε μέγεθος κελιού ο λογάριθμος του αντιστρόφου του μεγέθους του κελιού [$\log(1/S)$] και ο λογάριθμος των “δετικών” κελιών ($\log N$). Βάσει των τιμών αυτών δημιουργείται η αντίστοιχη γραφική απεικόνιση και χαράσσεται η ευθεία, η οποία περιγράφει κατά τον καλύτερο τρόπο τα δεδομένα σημεία του διαγράμματος, μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως “γραμμική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων” (least-squares linear regression). Η fractal διάσταση του αντικειμένου εκφράζεται από την κλίση (slope) της συγκεκριμένης ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Εικ. 3). Το πρόγραμμα υπολογίζει ακόμη τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson, (r , correlation coefficient) καθώς και τον συντελεστή προσδιορισμού, (r^2 , coefficient of determination), βάσει του οποίου εκτιμάται ο βαθμός προσαρμογής της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων στις πραγματοποιηθείσες μετρήσεις.

Το εύρος μεγέθους των κελιών, όπως και ο αριθμός μετακινήσεων του πλέγματος για κάθε δεδομένο μέγεθος κελιού μπορούν να προσδιοριστούν από τον χρήστη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τον έλεγχο της ακρίβειας, της ταχύτητας, αλλά και της σταθερότητας της εφαρμογής πραγματοποιήθηκαν εκτενείς μετρήσεις ευκλείδειων και fractal αντικειμένων με θεωρητικώς γνωστή fractal διάσταση, όπως κύκλων, γραμμών, τυχαίου μονοχρωματικού δορύβου, τριγώνων του Sierpinski και νήσων του Koch. Μελετήθηκαν επίσης πραγματικές ιστοπαθολογικές εικόνες, κυρίως για έλεγχο των αλγορίθμων ουδού και ανίχνευσης ορίων. Το πρόγραμμα παρουσίασε σφάλματα στον υπολογισμό της fractal διαστάσεως μεταξύ 0% και 5,8% χωρίς την εφαρμογή μετακινήσεων του πλέγματος. Ο χρόνος αναλύσεως για εικόνα διαστάσεων 800x600 pixel κυμάνθηκε μεταξύ 2,0 και 2,3 sec, σε υπολογιστή P4, 1,9GHz, 512MB. Με ενεργοποιημένη τη λειτουργία μετακινήσεων τα αντίστοιχα σφάλματα σε σχέση με τις θεωρητικώς αναμενόμενες τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ



Box size (S)	Filled boxes (N)	Log(1/S)	Log(N)
2	776	-0,6931	6,6542
10	126	-2,3026	4,8363
18	65	-2,8904	4,1744
26	38	-3,2581	3,6376
34	31	-3,5264	3,434
42	25	-3,7377	3,2189
50	18	-3,912	2,8904
58	16	-4,0604	2,7726

Regression Line: $\log(N) = 7,473 + 1,1552 \times \log(1/S)$
 Fractal Dimension: $D = 1,1552$
 Pearson Correlation Coefficient : $r = 0,999263$
 Coefficient of Determination: $r^2 = 0,998527$

Εικόνα 3. Παράδειγμα αριθμητικών αποτελεσμάτων καθώς και διάγραμμα Log(N)-Log(1/S).

0% και 3,9%. Ωστόσο, ο χρόνος υπολογισμού αυξήθηκε δυσανάλογα.

Για την επιβεβαίωση της ακρίβειας των στατιστικών υπολογισμών του προγράμματος, τα αποτελέσματα του Fractalyser αντιπαρατέθηκαν επανειλημμένα με αντίστοιχα αποτελέσματα του στατιστικού πακέτου Statistica (StatSoft, v.6.0).

Το πρόγραμμα διαθέτει κώδικα αντιμετώπισης σφαλμάτων και δεν παρουσίασε αξιόλογα προβλήματα σταθερότητας κατά τις δοκιμές σε περιβάλλον Windows XP Professional και Windows 2000.

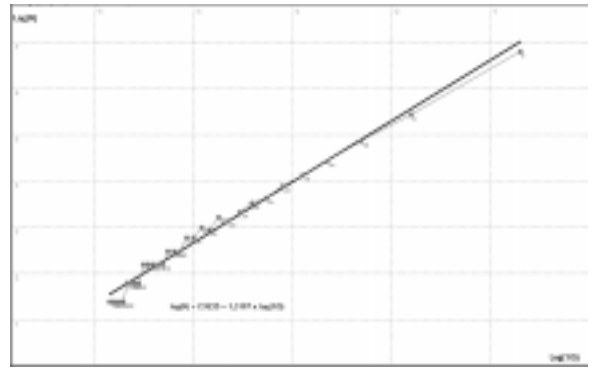
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εμπορικά διαθέσιμα προγράμματα που εκτελούν fractal ανάλυση εντάσσονται συνήθως σε ιδιαίτερος ακριβά πακέτα ανάλυσης εικόνας, γεγονός που καθιστά την απόκτησή τους προβληματική, τουλάχιστον για τα ελληνικά δεδομένα. Ορισμένα επίσης, τα οποία παρέχονται δωρεάν μέσω διαδικτύου, απαιτούν μη ευρέως διαδεδομένα λειτουργικά συστήματα (Linux), ή παρουσιάζουν συχνά και σημαντικά προβλήματα αξιοπιστίας και σταθερότητας. Κανένα από τα γνωστά σε εμάς προγράμματα εξάλλου δεν διαθέτει το ιδιαίτερα βοηθητικό για τον χρήστη χαρακτηριστικό της απευθείας εργασίας σε έγχρωμες εικόνες. Επικουρικά χαρακτηριστικά του Fractalysier, όπως η αφαίρεση θορύβου, η χειροκίνητη απάλειψη ή η επιλογή περιοχών της δυαδικής εικόνας, τα οποία αποδεικνύονται εξαιρετικά χρήσιμα για την ανάλυση ιστοπαθολογικών εικόνων, απουσιάζουν επίσης από άλλα αντίστοιχα προγράμματα.

Είναι γνωστό και αποδεκτό ότι ο ευρέως χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος box-counting, παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα που τον χαρακτηρίζουν, παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία τόσο στον αλγόριθμο ανίχνευσης ορίων, όσο και στην επιλογή του εύρους των κελιών¹¹⁻¹³. Κατά συνέπεια η αξιόπιστη ανάλυση μιας εικόνας εξαρτάται εν πολλοίς από την ορθή επιλογή του εύρους των κελιών. Για τον καθορισμό του βέλτιστου εύρους ένας έμπειρος χρήσης θα βασιστεί στις διαστάσεις της εικόνας και του υπό μέτρηση αντικειμένου, καθώς και στην προσεκτική μελέτη ενός αρχικού γραφήματος με εκτενές εύρος κελιών (Εικ. 4). Πρακτικώς, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η σωστή μέτρηση της fractal διαστάσεως πρέπει να γίνεται από το κεντρικό και πλέον ευθύγραμμο τμήμα της προκύπτουσας καμπύλης.

Για την τελική μέτρηση, όταν είναι επιθυμητή η μέγιστη δυνατή ακρίβεια, είναι δυνατή η εφαρμογή αριθμού μετακινήσεων του πλέγματος, ώστε να βρεθεί ο κατά το δυνατόν μικρότερος αριθμός "θετικών" κελιών, όπως απαιτεί η θεωρητική διατύπωση της μεθόδου. Αν και είναι εφικτός ο καθορισμός από τον χρήστη του αριθμού των μετακινήσεων ανά δεδομένο μέγεθος κελιού, γενικώς συνιστάται να ακολουθούνται οι προτεινόμενες από το πρόγραμμα ρυθμίσεις.

Στα υπό ανάπτυξη μελλοντικά χαρακτηριστικά του προγράμματος περιλαμβάνεται η απο-



Εικόνα 4. Διάγραμμα Log(N)-Log(1/S). Διακρίνονται τα σημεία που αντιπροσωπεύουν στις παρατηρηθείσες μετρήσεις καθώς και η ευθεία ελαχίστων τετραγώνων. Ο υπολογισμός της fractal διαστάσεως πρέπει να γίνει από το κεντρικό, πιο ευθύγραμμο τμήμα.

θήκευση εικόνων με μορφή jpg, η δυνατότητα ταυτόχρονης ύπαρξης πολλαπλών δυαδικών επιπέδων ανάλυσης στην ίδια εικόνα, η εφαρμογή της μεθόδου Otsu για την αυτόματη ανεύρεση ενός βέλτιστου ουδού κλασματοποίησης, η συγγραφή αρχείου βοηθείας καθώς και η περαιτέρω βελτιστοποίηση των χρησιμοποιούμενων αλγορίθμων για μείωση του χρόνου ανάλυσης. Τέλος, καταβάλλεται προσπάθεια ενσωμάτωσης και άλλων αλγορίθμων, εκτός του box-counting, για τον υπολογισμό της fractal διαστάσεως, όπως επί παραδείγματι μεθόδων επιφανείας-περιμέτρου.

Το πρόγραμμα Fractalysier παρέχεται δωρεάν, μέσω διαδικτύου, για ερευνητικούς σκοπούς, μετά από αίτηση των ενδιαφερομένων στη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου:

pavlopoulos@medscape.com.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Avnir D, Biham O, Lidar D, Malcai O. Is the geometry of nature fractal? Science (Washington DC), 279:39-40, 1998.
2. Losa GA. Fractals in pathology: are they really useful? Pathologica 87:310-317, 1995.
3. Mandelbrot BB. The Fractal Geometry of Nature, 3rd ed. New York, WH Freeman, 1983.
4. Coffey DS. Self-organization, complexity and chaos: the new biology for medicine. Nat Med, 4:882-885, 1998.
5. Lefebvre F, Benali H. A fractal approach to the segmentation of microcalcifications in digital mammograms. Med Phys, 22:381-390, 1995.

6. Sedivy R, Windischberger Ch, Svozil K, Moser E, Breiteneker G. Fractal Analysis: An Objective Method for Identifying Atypical Nuclei in Dysplastic Lesions of the Cervix Uteri. *Gynecol Oncol* 75:78–83, 1999.
7. Waliszewski P. Distribution of gland-like structures in human gallbladder adenocarcinomas possesses fractal dimension. *J Surg Oncol*, 71:189–195, 1999.
8. Landini G, Rippin JW. Fractal dimensions of the epithelial-connective tissue interfaces in premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth. *Anal Quant Cytol Histol*, 15:144–149, 1993.
9. Moore GW, Berman JJ, Sydnor DL. Fractal dimension for pathology images: A repeatable and quantitative measurement of nuclear rim irregularity. *Am J Clin Pathol*, 102:538, 1994.
10. Heymans O, Blacher S, Brouers F, Pierard GE. Fractal quantification of microvasculature heterogeneity in cutaneous melanoma. *Dermatology (Basel)*, 198:212–217, 1999.
11. West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science (Washington DC)*, 284:1677–1679, 1999.
12. Rigaut JP, Schoevaert-Brossault D, Downs AM, Landini G. Asymptotic fractals in the context of grey-scale images. *J Microsc*, 189:57–63, 1998.
13. Ahammer H, DeVaney TT. The influence of edge detection algorithms on the estimation of the fractal dimension of binary digital images. *Chaos*, 14(1):183-8, 2004.

Corresponding author:

Peter M. Pavlopoulos

2^a Viziinou str., GR-145 76 Dionisos

Tel: 210 62.11.720, Mobile: 6944 88.20.20

e-mail: pavlopoulos@medscape.com

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Πέτρος Μ. Παυλόπουλος

Βιζυηνού 2^a, Διόνυσος 145 76

Τηλ: 210 62.11.720, 6944 88.20.20

e-mail: pavlopoulos@medscape.com