



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
INSTITUTE OF MATHEMATICS AND
IMAGE COMPUTING

Segmentierung histologischer Gewebeschnitte von Mammakarzinomen mithilfe der Methode der Blind Color Decomposition

*Segmentation of Histological Slides of Breast Cancer using
the Blind Color Decomposition Method*

Bachelorarbeit

im Rahmen des Studiengangs
Mathematik in Medizin und Lebenswissenschaften
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Annkristin Lange

ausgegeben und betreut von
Prof. Dr. Jan Modersitzki
Institute of Mathematics and Image Computing

mit Unterstützung von
Judith Lotz, M.Sc. und Nick Weiss, M.Sc.
Fraunhofer MEVIS

Lübeck, den 3. Juli 2015

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Judith Lotz und Nick Weiss für die tolle Betreuung bedanken. Geduldig habt ihr meine Fragen beantwortet und mich mit viel Engagement unterstützt.

Herzlichen Dank auch an die Pathologie Hamburg West, die freundlicherweise die histologischen Bilder für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jan Modersitzki für die guten Anmerkungen und die konstruktive Kritik.

All meinen Freunden und meiner Familie, die mich tatkräftig unterstützt haben, die die Bachelorarbeit Korrektur gelesen haben und dafür gesorgt haben, dass ich nicht verhungere, gilt außerdem mein herzlichster Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Lübeck, den 3. Juli 2015

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Methode der Blind Color Decomposition von histologischen Bildern beschrieben, implementiert und auf Gewebeschnitte von Mammakarzinomen angewendet. Die Motivation liegt in der automatischen Klassifizierung von Mammakarzinomen begründet. Dazu ist die Bestimmung des Anteils von hormonrezeptor- bzw. wachstumsfaktorrezeptorpositiven Zellen notwendig. Dieser kann mit dem genannten Verfahren bestimmt werden. Dabei beruht das Verfahren auf den unterschiedlichen Absorptionsspektren von verschiedenen Gewebetypen (oder wie im beschriebenen Fall von Antikörpern der Hormonrezeptoren bzw. Wachstumsfaktorrezeptoren). Dazu werden die Referenzfarbwerte der Gewebetypen bestimmt und die einzelnen Bildelemente diesen zugeordnet. Im Anschluss kann nun der Anteil derjenigen Bildelemente, die positiv zugeordnet wurden, bestimmt werden. Bei positivem Rezeptorstatus liefert das Verfahren gute Ergebnisse, bei negativem Status hingegen sind noch Anpassungen nötig um zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen.

Abstract

In this thesis, the method of Blind Color Decomposition (BCD) of histological images is described, implemented and used for histological slides of breast cancer. It is motivated by the automatic classification of breast cancer. For the classification it is necessary to know the amount of hormone receptor positive cells respectively growth factor receptor positive cells. The BCD method can be used to determine the amount. It is based on the different absorption characteristics for the different tissue types (or in our case antibodies of receptors). For this purpose, the reference colors of the tissue types were determined and used to assign each picture element to them. Afterwards, the amount of the picture elements which were assigned to the antibody can be determined. In case of a positive receptor status the method produces good results whereas in case of a negative receptor status some alignments are necessary to achieve good results.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung & Motivation	1
2	Grundlagen der Bildverarbeitung, der Physik und der Klassifizierung	4
2.1	Farbwahrnehmung und Farbräume	4
2.2	Definition eines diskreten Bildes	4
2.3	Das Lambert-Beersche Gesetz	5
2.4	Clusteranalyse	6
2.4.1	Der kmeans-Algorithmus	6
2.4.2	Der Expectation-Maximization-Algorithmus	7
2.5	Das Fisher-Kriterium	10
3	Der Ablauf der Blind Color Decomposition - Methode	11
3.1	Linearisierung der Daten	11
3.2	Transformation vom RGB-Farbraum in die Maxwellsche Farbebene	13
3.3	Bestimmung der Referenzwerte der Gewebetypen	13
3.4	(Stückweise) Lineare Zerlegung des histologischen Bildes	16
4	Testdaten und Umsetzung des Verfahrens	17
4.1	Histologische Testbilder	17
4.2	Problem bei der Transformation vom RGB-Farbraum zur Maxwell- scher Farbebene	20
4.3	Untersuchungen des EM-Algorithmus und der Laufzeit	20
5	Ergebnisse	25
6	Auswertung & Ausblick	29
	Literaturverzeichnis	31

1 Einleitung & Motivation

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die Inzidenz, also die jährliche Neuerkrankungsrate in Deutschland, liegt laut Robert-Koch-Institut bei rund 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr [17]. Es gibt dabei viele unterschiedliche Arten von Brustkrebs (medizinisch Mammakarzinom genannt). Eine Kategorisierung des Mammakarzinoms kann über die Bestimmung der Überexpression von Hormonrezeptoren (Östrogen & Progesteron) und/oder Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER2 erfolgen. Diese ist für einige Arten typisch und entscheidet darüber, welche Therapieform für die jeweiligen Patienten und Patientinnen am besten geeignet ist [1, 16]. Mit spezifischen Antikörpern lässt sich eine Überexpression nachweisen. Dazu binden sich die Antikörper an die Rezeptoren und machen sie so sichtbar. In dieser Arbeit soll nun eine mögliche Methode vorgestellt werden, mit der ein Pathologe die Anzahl der positiv reagierenden Zellen bestimmen und damit eine automatische Klassifikation und Schweregradeinschätzung des Tumors vornehmen kann. Die Vorteile liegen darin, dass die Gewebezuteilung objektiver und der Pathologe entlastet wird. Objektiver wird die Gewebezuteilung dadurch, dass die Unterschiede zwischen den Einschätzungen/Bewertungen von zwei verschiedenen Pathologen sowie die zwischen den Einschätzungen zweier unterschiedlicher Bilder desselben Pathologen verringert werden.

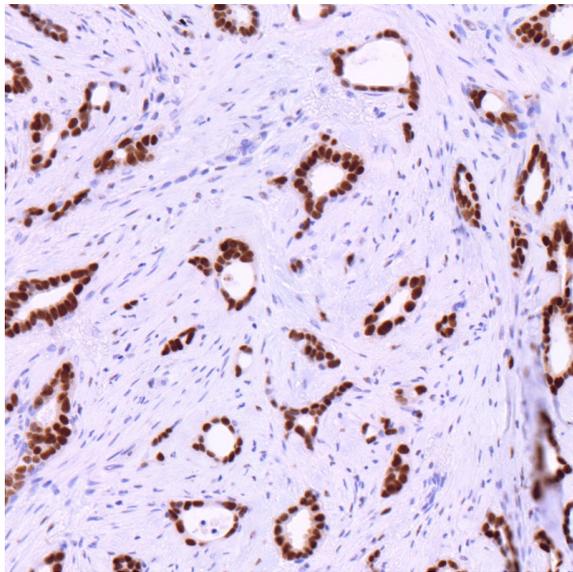


Abbildung 1: Ein Beispielbild eines Gewebeschnittes, in dem die positive Reaktion (in braun) auf einen Östrogen-Antikörper dargestellt ist. Quelle: Pathologie Hamburg West ¹

¹Diese Bild wurde, wie alle weiteren histologischen Bilder in dieser Arbeit, freundlicherweise von der Pathologie Hamburg West zur Verfügung gestellt. Dafür an dieser Stelle herzlichen Dank!

Ein Pathologe untersucht Gewebe auf krankhafte Veränderungen. Dazu entnimmt er einen Teil des Gewebes. Dieses wird dann behandelt (Genaueres im Kapitel 4.1) und anschließend unter dem Mikroskop untersucht. Diese histologischen Gewebeschnitte können auch eingescannt, digital betrachtet und weiterbearbeitet werden. Ein Beispielfeld eines solchen Gewebeschnittes gefärbt mit Östrogen-Antikörpern, ist in Abbildung 1 zu sehen. In diesen Gewebeschnitten sind nun alle Zellen, die auf den spezifischen Antikörper reagieren, in einer anderen Farbe (in Abb. 1 braun) als das umliegende Gewebe dargestellt. Diese unterschiedliche Färbung beruht auf den unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der Rezeptoren und der verschiedenen Gewebetypen.

Um nun den Anteil der positiven Zellen schätzen zu können, wäre es von Vorteil, wenn nur diese in einem separaten Bild dargestellt sind. Diese Separation nennt man in der Bildverarbeitung Segmentierung. Segmentierungsverfahren bilden die Grundlage für die Analyse von medizinischen Bilddaten. Dabei werden die Bildobjekte, die von Interesse sind (Tumore, bestimmte Gewebetypen, Organe etc.) vom Hintergrund abgegrenzt [10]. Dies kann durch verschiedene Ansätze erreicht werden. Ein einfaches Verfahren zur Segmentierung ist die Festlegung eines Schwellwertbereiches, in dem die Farbwerte der gefärbten Zellen liegen. Dann kann für jedes Bildelement bestimmt werden, ob es in dem Bereich liegt, also positiv reagiert, oder nicht. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass der Schwellwert explizit von einem Experten festgelegt werden muss. Man spricht dann von einer unüberwachten Methode. Außerdem ist die Einteilung der Pixel strikt, d.h. dass jedes Pixel entweder positiv oder nicht positiv ist. Da sich die Absorptionsspektren aber überlappen, ist eigentlich eine Methode erforderlich, die Teile von Pixeln richtig zuordnet ("soft classification") [8]. Aufgrund von verschiedenen Gewebetypen, unterschiedlicher Konzentration der Färbemittel und Dauer der Färbung kommt es zu Variationen in der Färbung, die dann bei der Segmentierung Schwierigkeiten bereiten.

Eine andere Möglichkeit ist das Verfahren der Blind Color Decomposition (BCD), vorgestellt von Gavrilovic et al. [8]. Es nutzt die unterschiedlichen Absorptionsspektren der verschiedenen Gewebetypen, um Referenzfarbwerte für die einzelnen Gewebetypen zu bestimmen, und umgeht so das Problem der Variationen in der Färbung. Für alle Bildelemente kann damit die Wahrscheinlichkeit, mit der diese mit den Referenzfarben übereinstimmen, berechnet werden. So kann bestimmt werden, wieviel von einem Bildelement zu einem Gewebetyp gehört. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Unüberwachtheit der Methode. Im Gegensatz zu anderen, ähnlichen Verfahren [20] sind somit keine Vorabinformationen zum Absorptionsspektrum der Gewebetypen/Rezeptoren notwendig.

Andere ähnliche Ansätze zur Zerlegung sind die Independent Component Analysis (ICA, Unabhängigkeitsanalyse) und nichtnegative Matrixfaktorisierung (NMF). Beide Verfahren sind ebenfalls unüberwacht. Laut [8] liefert die BCD-Methode für vollständig separierbare Gewebetypen bessere Ergebnisse als NMF und ICA. Außerdem lässt sie sich im Gegensatz zu den anderen beiden auch bei nur partiell separierbaren Gewebetypen anwenden.

Ziel dieser Arbeit ist die Aufarbeitung und Erläuterung der BCD-Methode, die Implementierung und auch die Evaluierung des Verfahrens im vorgestellten Anwendungsbereich.

Im nachfolgenden Kapitel 2 werden dazu einige Grundlagen behandelt, die zum Verständnis des Verfahrens hilfreich sind. Dabei beschäftigen wir uns zuerst mit Farben und wie sie zustande kommen, um uns so durch das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz den Färbungen der Gewebeschnitte zu nähern. Außerdem betrachten wir zwei Algorithmen zur Bestimmung von Clustern, d.h. Gruppen von Objekten mit gleichen Eigenschaften. Diese werden wir brauchen, um unsere Referenzfarben zu bestimmen. Zum Abschluss dieses Grundlagenkapitels wird noch ein Kriterium zur Güte der Clusterbestimmung vorgestellt.

Der detaillierte Ablauf des Verfahrens der Blind Color Decomposition ist Bestandteil des darauffolgenden Kapitels 3. Dazu betrachten wir die einzelnen Schritte Linearisierung der Daten, Transformation in den Maxwell'schen Farbraum, um die Referenzfarbwerte zu bestimmen, und die anschließende lineare Zerlegung.

In Kapitel 4 folgt eine Erklärung der praktischen Umsetzung. Dazu werden zunächst die Testbilddaten vorgestellt und die genaue Fragestellung näher erläutert. Anschließend wird auf die Probleme und Besonderheiten bei der Implementierung eingegangen.

Die Ergebnisse der Anwendung der BCD-Methode mit den Testbildern werden im anschließenden Kapitel 5 vorgestellt. Zudem werden die Ergebnisse mit denen des Pathologen verglichen.

Zum Abschluss findet in Kapitel 6 eine Diskussion der Ergebnisse und ein Ausblick statt. Nicht alle Fragestellungen konnten bearbeitet und beantwortet werden, ein Überblick über die noch offenen Fragen ist daher Bestandteil dieses Kapitels.

2 Grundlagen der Bildverarbeitung, der Physik und der Klassifizierung

2.1 Farbwahrnehmung und Farbräume

Um sehen zu können, besitzt der Mensch im Auge zwei unterschiedliche Typen von Rezeptoren, die Zapfen und die Stäbchen. Die Stäbchen sind hauptsächlich für das Schwarz-Weiß-Sehen bei Dunkelheit zuständig. Farben wahrnehmen können wir mit den Zapfen. Diese unterscheiden sich, je nachdem in welchem Wellenlängenbereich sie Licht absorbieren, und werden oft als blaue, grüne und rote Zapfen bezeichnet, da dies der jeweils charakteristische Wellenlängenbereich ist [4, p. 1-12]. Da alle Farben, die wir sehen, mithilfe der drei Zapfentypen erzeugt werden, ist eine mögliche digitale Darstellung der Farben die dreidimensionale Farbdarstellung mit den drei Farben Rot, Grün und Blau (der RGB-Farbraum). Dieser ist ein additiver Farbraum, d.h. wenn keine Farbe vorliegt, wird die Farbe schwarz dargestellt, sind dagegen alle Farben vollständig vorhanden, ist weiß zu sehen. In Abbildung 2 wird dies verdeutlicht. Der RGB-Farbraum wird standardmäßig zur Anzeige in Monitoren verwendet. Dabei werden die roten, grünen und blauen Farbwerte häufig im Bereich zwischen 0 und 255 angegeben. Dies liegt im Binärsystem begründet, 2^8 ist 256 und die einzelnen Farbwerte lassen sich so gut als 8-bit Farbwerte darstellen. Insgesamt erhält man so $256^3 = 16.777.216$ mögliche Farben [9].

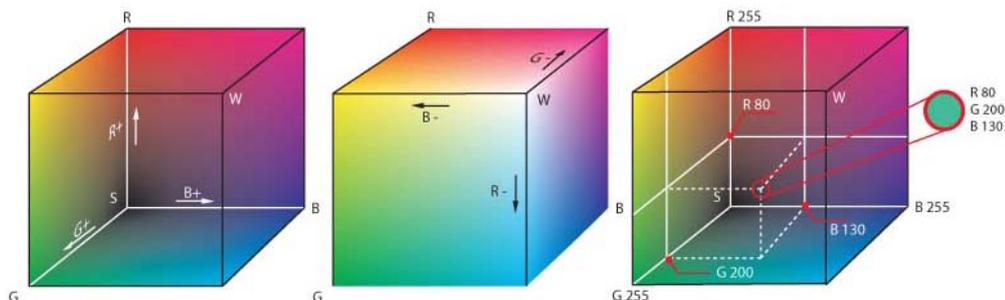


Abbildung 2: Der RGB-Farbraum als Würfel dargestellt (Quelle: Wikipedia)

2.2 Definition eines diskreten Bildes

Da wir uns in dieser Arbeit mit digitalen histologischen Bildern beschäftigen, wollen wir zuerst definieren, was überhaupt ein Bild ist (analog zu [10]). Dabei beschränken wir uns auf die diskrete Darstellung eines Bildes, da wir im weiteren Verlauf nur mit dieser arbeiten werden.

Definition 1.

Die Abbildung $f : [1, \dots, M] \times [1, \dots, N] \rightarrow \{0, \dots, 255\}$ bezeichnen wir als Grauwertbild. Ein RGB-Farbbild ist dann durch $f : [1, \dots, M] \times [1, \dots, N] \rightarrow \{0, \dots, 255\}^3$,

$$\text{also } f(x, y) = \begin{pmatrix} f_r(x, y) \\ f_g(x, y) \\ f_b(x, y) \end{pmatrix} \text{ gegeben.}$$

Hier stehen für jeden Farbkanal 256 Grauwert- bzw. Farbabstufungen zur Verfügung. Wie im letzten Kapitel erläutert, erhält man so für ein Farbbild rund 16 Millionen mögliche Farbwerte. Die Auflösung des Bildes, also die Anzahl der Bildelemente (Pixel), ist durch M und N gegeben.

2.3 Das Lambert-Beersche Gesetz

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Änderung der Lichtintensität (Extinktion E) bei Durchgang von Licht durch ein Medium mit absorbierender Substanz. Die Konzentration der absorbierenden Substanz c sowie die Dicke des Mediums d beeinflussen dabei die Stärke der Änderung. Wie in [14] kann die Änderung selbst differenziell formuliert werden. Wir erhalten

$$dI = -\alpha_\lambda c I dd, \tag{2.1}$$

dabei ist I die Intensität des transmittierten Lichtes und α_λ die Absorptionskonstante. Durch Integration erhält man die Beziehung

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \alpha_\lambda c d \tag{2.2}$$

mit Integrationskonstante $\ln(I_0)$ für $d = 0$. Nach der Intensität des transmittierten Lichtes aufgelöst ergibt sich

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha_\lambda c d}. \tag{2.3}$$

Nutzt man die Darstellung im dekadischen Logarithmus erhält man die Extinktion

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda c d, \tag{2.4}$$

mit $\varepsilon_\lambda = \log(e) \alpha_\lambda$.

Falls Streuung, Beugung und Reflexion vernachlässigt werden können, ist die Extinktion gleich der Absorption. Dies ist in unserem Fall gegeben, da wir nur Färbemittel betrachten, die dies einhalten. Außerdem können wir $\alpha_\lambda c$ zu A_λ zusammenfassen.

Wir halten also fest:

Definition 2.

Sei I die Intensität des transmittierten Lichtes, I_0 die Intensität des einfallenden Lichtes, d die Schichtdicke des Gewebes und A_λ das Produkt aus Absorptionskonstante und Konzentration. Dann ist die Absorption durch

$$\ln(I_0) - \ln(I) = A_\lambda d \tag{2.5}$$

gegeben.

2.4 Clusteranalyse

Als Cluster bezeichnet man Gruppen von Objekten mit gleichen Eigenschaften. In unserem Fall sind dies die Farbwerte eines Gewebetyps, die sich alle ähneln sollten. Verschiedene Verfahren haben sich etabliert um Cluster zu bestimmen. Zwei dieser Verfahren, der kmeans-Algorithmus und der EM-Algorithmus, wurden in dieser Arbeit angewendet und werden daher hier vorgestellt. Ein Nachteil beider Algorithmen ist allerdings, dass die Anzahl der Cluster von vornherein bekannt sein muss. In unserem Fall stellt dies für die Anwendung keinen großen Nachteil dar, da die Anzahl der Cluster zwei beträgt, da wir nur zwischen positiv und nicht-positiv unterscheiden. Über die Verteilung der Objekte innerhalb der einzelnen Cluster ist im Vorhinein nichts bekannt. In [19] wird gezeigt, dass in so einem Fall die Annahme, dass die Cluster normalverteilt sind die bestmögliche ist. Daher gehen wir hier von normalverteilten Clustern aus, so dass sich beide Algorithmen anwenden lassen.

2.4.1 Der kmeans-Algorithmus

Der kmeans-Algorithmus ist ein deterministisches Clusteranalyseverfahren, d.h., jedes Objekt wird mit einer Wahrscheinlichkeit von eins genau einem Cluster zugeordnet [2]. Da wir aber daran interessiert sind, mit welchem Anteil ein Pixel zu einem Gewebetyp gehört, ist der kmeans-Algorithmus zur alleinigen Ermittlung der Cluster nicht geeignet. Allerdings liefert er Hinweise darauf, wo sich mögliche Cluster befinden. Die Ergebnisse des kmeans-Algorithmus können wir daher als Startwerte für den EM-Algorithmus nutzen (s. Ende des nächsten Abschnitts). Bei dem kmeans-Algorithmus werden die Cluster ermittelt, indem die Clusterzentren so bestimmt werden, dass die Streuungsquadratsumme innerhalb der Cluster ($SQ_{in}(K)$) minimiert wird. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Streuungsquadratsumme zwischen

den Clustern maximiert wird [2, p. 308f.].

Formal ausgedrückt gilt es das Optimierungsproblem

$$SQ_{in}(K) \sum_k \sum_{g \in k} d_{g,k}^2 \rightarrow \min \quad (2.6)$$

zu lösen, wobei $d_{g,k}^2 = \sum_j (x_{gj} - x_{kj})^2$ die euklidische Distanz zwischen dem Objekt g und dem Clusterzentrum k darstellt.

Der Algorithmus folgt dabei folgenden Schritten:

1. Wahl von zufälligen Werten als Startwerte für die Clusterzentren
2. Berechnung des Abstandes zwischen jedem Objekt und jedem Clusterzentrum
3. Zuordnung der Objekte zu dem Cluster mit dem geringsten Abstand
4. Neuberechnung der Clusterzentren

Die letzten drei Schritte werden solange wiederholt, bis der Algorithmus konvergiert und kein Objekt mehr das Cluster wechselt. Das der kmeans-Algorithmus tatsächlich konvergiert zeigt der folgende Satz.

Satz 1.

Der hier vorgestellte kmeans-Algorithmus konvergiert gegen ein lokales Minimum, im Allgemeinen aber nicht gegen ein globales Minimum.

Beweis: siehe [18]

2.4.2 Der Expectation-Maximization-Algorithmus

Bei dem EM-Algorithmus handelt es sich um ein probabilistisches Clusteranalyseverfahren, d.h., für jedes Objekt wird die Wahrscheinlichkeit, mit der dieses zu einem Cluster gehört, berechnet. Er stellt eine Verallgemeinerung des kmeans-Algorithmus dar. Der EM-Algorithmus besteht aus einem Expectation und einem Maximization-Schritt. Im ersten Schritt werden mithilfe der Erwartungswerte die Wahrscheinlichkeiten berechnet, mit denen die Objekte zu einem Cluster gehören. Anschließend werden im Maximization-Schritt mithilfe dieser Wahrscheinlichkeiten die Erwartungswerte und die Kovarianzmatrizen neu geschätzt (Maximum-Likelihood-Methode).

Für K Cluster und N Datenpunkte ergibt sich folgender Algorithmus (nach Fahrmeir [6, S. 498ff.] und Bacher [2]):

1. Berechnung der Start-Erwartungswerte $\boldsymbol{\mu}_k \in \mathbb{R}^2$ und Start-Kovarianzmatrizen $\boldsymbol{\Sigma}_k \in \mathbb{R}^{2 \times 2}$, $k = 1, \dots, K$

2. **Expectation-Schritt:**

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Objekt n zu einem Cluster k gehört, ist gegeben durch

$$\hat{p}(k, n) = \frac{\hat{p}(k) f(\mathbf{x}_n, \boldsymbol{\mu}_k, \boldsymbol{\Sigma}_k)}{\sum_{n=1}^N \hat{p}(k) f(\mathbf{x}_n, \boldsymbol{\mu}_k, \boldsymbol{\Sigma}_k)}, \quad n = 1, \dots, N, \quad (2.7)$$

wobei

$$f(\mathbf{x}_n, \boldsymbol{\mu}_k, \boldsymbol{\Sigma}_k) = \frac{1}{2\pi \det(\boldsymbol{\Sigma}_k)} \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x}_n - \hat{\boldsymbol{\mu}}_k) \boldsymbol{\Sigma}_k^{-1} (\mathbf{x}_n - \hat{\boldsymbol{\mu}}_k)'\right) \quad (2.8)$$

die Dichtefunktion der zwei-dimensionalen Normalverteilung ist.

3. **Maximization-Schritt:**

In diesem Schritt findet nun sowohl die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für ein Cluster

$$\hat{p}(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \hat{p}(k, n), \quad (2.9)$$

als auch die Berechnung der Erwartungswerte

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_k = \frac{1}{N \hat{p}(k)} \sum_{n=1}^N \hat{p}(k, n) \mathbf{x}_n, \quad (2.10)$$

und die Berechnung der Kovarianzmatrizen

$$\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_k = \frac{1}{N \hat{p}(k)} \sum_{n=1}^N \hat{p}(k, n) (\mathbf{x}_n - \hat{\boldsymbol{\mu}}_k) (\mathbf{x}_n - \hat{\boldsymbol{\mu}}_k)' \quad (2.11)$$

statt.

4. Wiederholung der Schritte 2 und 3 bis der Abstand zwischen den Erwartungswerten zweier aufeinanderfolgender Iterationen kleiner als ein Grenzwert tol ist, also

$$\|\boldsymbol{\mu}_{\text{alt}} - \boldsymbol{\mu}\|_2 < \text{tol} \quad (2.12)$$

gilt. In unserem Fall wurde ein Grenzwert von 0.001 gewählt, eine größere Genauigkeit führt zu einer deutlich längeren Laufzeit.

Die Laufzeit des EM-Algorithmus hängt sehr stark von der Wahl der Startwerte ab. In der Literatur finden sich verschiedene Vorschläge für Startwerte, zum Beispiel

- für den Erwartungswertvektor:
 - zufällige Datenpunkte
 - Ergebnisse eines vorherigen kmeans-Algorithmus
- für die Kovarianzmatrizen:
 - die Einheitsmatrix E
 - $0.001 * \text{die Einheitsmatrix}$
 - Diagonalmatrizen mit Diagonaleinträgen von einem Zehntel der maximalen Varianz in Bezug auf die globale Kovarianz (vorgeschlagen von [7])
 - Diagonalmatrix mit globaler Varianz auf der Diagonalen

Die Wahl von zufälligen Datenpunkten als Erwartungswertvektor hat den Vorteil, dass sie im günstigsten Fall nah bei den wirklichen Clustermittelpunkten liegen und so der Algorithmus nur wenige Iterationen braucht. Im schlechtesten Fall liegen die zufälligen Werte aber weit von den tatsächlichen Mittelpunkten entfernt und nah beisammen. Dann sind viele Iterationen nötig, um die Cluster richtig zu bestimmen. Dieses Problem umgeht man, wenn man die Ergebnisse eines vorherigen kmeans-Algorithmus nutzt. Allerdings hat man in diesem Fall immer die zusätzliche Laufzeit des kmeans-Algorithmus.

Eine Kovarianzmatrixwahl von $0.001 * \text{Einheitsmatrix}$ liefert sehr gute Ergebnisse. Der EM-Algorithmus braucht bei dieser Wahl oft nur noch einen Iterationschritt. Diese Kombination ist so gut, weil wir davon ausgehen, dass der kmeans-Algorithmus eine gute Näherung liefert und wir daher nur noch in einer kleinen Umgebung um den Punkt herum suchen.

Für diese verschiedenen Optionen wurde der EM-Algorithmus getestet. Die Ergebnisse sind im Kapitel 5 dargestellt. Da die Kombination aus den Ergebnissen eines vorherigen kmeans-Algorithmus für den Erwartungswertvektor und $0.001 * \text{der Einheitsmatrix}$ als Kovarianzmatrix die mit Abstand schnellsten Laufzeiten haben, haben wir uns für diese Kombination entschieden. Dafür spricht auch, dass die Iterationsanzahl und damit die Laufzeit nicht vom Zufall abhängt und der Algorithmus somit, wenn für die Berechnung des kmeans-Algorithmus jedesmal die gleichen Startwerte genutzt werden, determiniert.

2.5 Das Fisher-Kriterium

Anhand des Fisher-Kriteriums kann man feststellen, wie gut sich zwei Cluster voneinander trennen lassen. Je größer der erhaltene Wert ist, desto besser lassen sich die Cluster trennen. In Ergänzung zu [5, S. 117-120] wurde die Größe der einzelnen Cluster als zusätzlicher Faktor bei der Berechnung der Intervarianz miteinbezogen. Dies bewirkt, dass der Wert des Fisher-Kriteriums unabhängig von der Anzahl der Objekte ist und um den Wert eins herum verteilt ist.

Die Intravarianz, also die Varianz innerhalb der einzelnen Cluster, ist gegeben durch

$$S_W = \sum_{X_1} (x_i - m_1)(x_i - m_1)^T + \sum_{X_2} (x_i - m_2)(x_i - m_2)^T, \quad (2.13)$$

hingegen ist die Intervarianz, die die Varianz zwischen den Clustern bezeichnet, durch

$$S_B = R_1(m_1 - m)(m_1 - m)^T + R_2(m_2 - m)(m_2 - m)^T \quad (2.14)$$

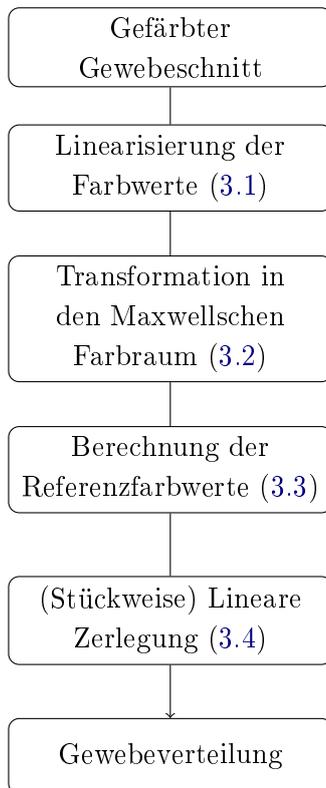
gegeben, wobei m den Mittelwert aller Objekte angibt, m_i den Mittelwert des Clusters i und R_i die Anzahl der Objekte, die zu dem Cluster i gehören. Zusammen ergibt sich das Fisherkriterium

$$\text{maximiere } J(w) = \frac{w^T S_B w}{w^T S_W w}, \quad (2.15)$$

wobei w den Richtungsvektor für die beste Trennung zwischen den Clustern angibt. Dieser Richtungsvektor kann explizit angegeben werden, wie in [5, S. 120] erläutert, maximiert $w = S_w^{-1}(m_1 - m_2)$ den Funktionswert $J(w)$, $J : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$.

3 Der Ablauf der Blind Color Decomposition - Methode

In diesem Kapitel wird der genaue Ablauf des Verfahrens analog zu den Ausführungen in [13] erklärt. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, ergeben sich für dieses Kapitel die folgenden Abschnitte, die sich an den einzelnen Bestandteilen des Verfahrens orientieren.



Als erstes werden die **Farbwerte** des Gewebeschnittes mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes **linearisiert**.

Anschließend werden die Daten vom RGB-Farbraum in den **Maxwell'schen Farbraum transformiert**, um Intensitätsschwankungen zu entfernen.

Mit Hilfe des Expectation Maximization - Algorithmus können dann Cluster erkannt und damit die **Referenzfarbwerte** der verschiedenen Gewebetypen bestimmt werden.

Abschließend kann für jeden Gewebetyp eine **Gewebeverteilung** erstellt werden, in dem für jedes Pixel die Übereinstimmung mit dem Referenzfarbwert berechnet wird. Dabei gibt die Gewebeverteilung an, wieviel von dem jeweiligen Gewebetyp in den einzelnen Pixeln enthalten ist.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte nun näher erläutert.

3.1 Linearisierung der Daten

Alle Färbemittel absorbieren Licht, manche allerdings streuen das Licht zusätzlich. Da die BCD-Methode auf den Absorptionseigenschaften der verschiedenen Gewebetypen beruht, eignen sich diese nicht für die Anwendung. Falls die Färbemittel kein Licht streuen, kann das Lambert-Beersche Gesetz (2.3) angewendet werden, um die

spektrale Signatur $\varphi(\mathbf{p}, \lambda)$ des gefärbten Gewebes

$$\varphi(\mathbf{p}, \lambda) = S(\lambda) e^{-\sum_{j=1}^n A_j(\lambda) d_j(\mathbf{p})}, \quad \varphi : \mathbb{R}^2 \times \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R} \quad (3.1)$$

zu berechnen. Dabei ist $S(\lambda)$ die Intensität der Lichtquelle des Mikroskops abhängig von der Wellenlänge λ , $A_j(\lambda)$ das Absorptionsspektrum des Gewebetyps j (mit $j = 1, \dots, n$, $n \in \mathbb{R}$) und $d_j(\mathbf{p})$ der Anteil des Gewebetyps j im Pixel \mathbf{p} , $\mathbf{p} \in \mathbb{R}^2$ (Gewebeverteilung).

Mithilfe der spektralen Signatur und der Transferfunktion des Mikroskops $\mathbf{F}(\lambda) = [F_1(\lambda), F_2(\lambda), F_3(\lambda)]$ können die RGB-Farbwerte $\mathbf{c}(\mathbf{p}) = [c_1(\mathbf{p}), c_2(\mathbf{p}), c_3(\mathbf{p})]$ in jedem Pixel mit

$$\mathbf{c}(\mathbf{p}) = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \varphi(\mathbf{p}, \lambda) \mathbf{F}(\lambda) d\lambda \quad (3.2)$$

angegeben werden. Die Wellenlänge λ variiert zwischen λ_{\min} und λ_{\max} , den Grenzen des sichtbaren Lichtes (ca. 380nm und 780nm). Durch Einsetzen von (3.1) erhält man

$$\mathbf{c}(\mathbf{p}) = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} S(\lambda) \prod_{j=1}^n e^{-A_j(\lambda) d_j(\mathbf{p})} \mathbf{F}(\lambda) d\lambda. \quad (3.3)$$

Da für jeden Gewebetyp j das Farbspektrum von gar keiner Absorption bis hin zu voller Absorption reicht (d.h. $d_j(\mathbf{p}^0) = 0$ und $d_j(\mathbf{p}^\infty) \rightarrow \infty$ für $j = 1, \dots, n$), gilt

$$\mathbf{c}^0 \equiv \mathbf{c}(\mathbf{p}^0) = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} S(\lambda) \mathbf{F}(\lambda) d\lambda. \quad (3.4)$$

Aus dem Mittelwertsatz der Integralrechnung folgt, dass n Wellenlängen für jeden Farbkanal k existieren, so dass ein $\lambda_{k,j} \in [\lambda_{\min}, \lambda_{\max}]$ existiert. Zusammen mit (3.4) folgt aus (3.3)

$$\begin{aligned} c_k(\mathbf{p}) &= \prod_{j=1}^n e^{-A_j(\lambda_{k,j}) d_j(\mathbf{p})} \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} S(\lambda) \mathbf{F}_k(\lambda) d\lambda \\ &= \prod_{j=1}^n e^{-A_j(\lambda_{k,j}) d_j(\mathbf{p})} c_k^0 \\ &= e^{-\sum_{j=1}^n A_j(\lambda_{k,j}) d_j(\mathbf{p})} c_k^0. \end{aligned}$$

3.2 Transformation vom RGB-Farbraum in die Maxwellsche Farbebene

Wie in Definition 2 erhält man die Absorption nun durch Anwenden des Logarithmus auf beiden Seiten der Gleichung. Für die Absorption gilt dann

$$\ln(c_k^0) - \ln(c_k(\mathbf{p})) = \sum_{j=1}^n A_j(\lambda_{k,j}) d_j(\mathbf{p}) . \quad (3.5)$$

In den Abbildungen 3 und 4 sind Streudiagramme der Farbwerte vor und nach der Linearisierung des Beispielbildes (Abbildung 1) im RGB-Farbraum zu sehen.

3.2 Transformation vom RGB-Farbraum in die Maxwellsche Farbebene

Der RGB-Farbraum kann als Farbwürfel wie in Abbildung 5 dargestellt werden. Alle Farbwerte auf einer Ursprungsgeraden haben das gleiche Verhältnis von rot, grün und blau, nur mit unterschiedlicher Intensität. Da die Intensität aufgrund des Färbeverfahrens Schwankungen unterliegt, soll sie hier nicht betrachtet werden. Daher werden alle Farbwerte in die Maxwellsche Farbebene transformiert, die durch die Farbwerte rot, grün und blau verläuft und orthogonal zur schwarz-weiß-Geraden ist. Der Mittelpunkt der Ebene befindet sich im Abstand von $\frac{1}{\sqrt{3}}$ vom Farbwert schwarz, dem Ursprung des RGB-Farbraums.

Die Koordinaten $\alpha(\mathbf{p})$ und $\beta(\mathbf{p})$ in der Maxwellschen Farbebene lassen sich durch eine perspektivische Transformation mit Projektionszentrum im Ursprung

$$\begin{pmatrix} \alpha(\mathbf{p}) \\ \beta(\mathbf{p}) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} & -\frac{1}{\sqrt{2}} & 0 \\ -\frac{1}{\sqrt{6}} & -\frac{1}{\sqrt{2}} & \sqrt{\frac{2}{3}} \end{pmatrix} \frac{\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p}))}{\|\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p}))\|_1} \quad (3.6)$$

bestimmen. Dabei entsteht ein neues, zwei-dimensionales Koordinatensystem mit dem Ursprung im Zentrum des Dreiecks. Die Werte der Transformationsmatrix sind die Werte der RGB-Eckpunkte.

3.3 Bestimmung der Referenzwerte der Gewebetypen

Wenn man sich die Häufigkeitsverteilung anschaut, d.h. wie viele Farbwerte aus dem RGB-Farbraum auf einen Farbwert in der Maxwellschen Ebene transformiert wurden, dann bilden die transformierten Daten Cluster in der Maxwellschen Ebene. Der Expectation Maximization - Algorithmus (s. Kapitel 2.4) kann angewandt werden, um die jeweiligen Clusterzentren (α_j, β_j) zu bestimmen. Mit diesen und der Inversen der Transformationsmatrix aus (3.6) erhält man ein lineares Gleichungssystem, mit dem die Referenzfarbwerte $(a_1, a_2, a_3)^T$ bestimmt werden können. Da dieses Gleichungssystem unterbestimmt ist, wird zusätzlich noch die Bedingung, dass die Referenzwerte Einheitsvektoren sind ($a_1 + a_2 + a_3 = 1$), hinzugenommen. Das LGS

3.3 Bestimmung der Referenzwerte der Gewebetypen

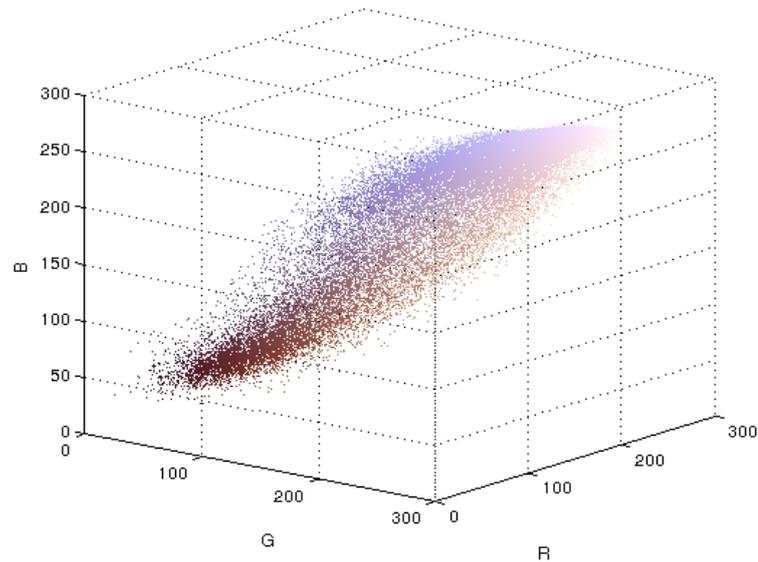


Abbildung 3: Ein Streudiagramm der Farbwerte des Beispielbildes aus Abbildung 1 im RGB-Farbraum. Die Farbe der Punkte ist ihr tatsächlicher Farbwert.

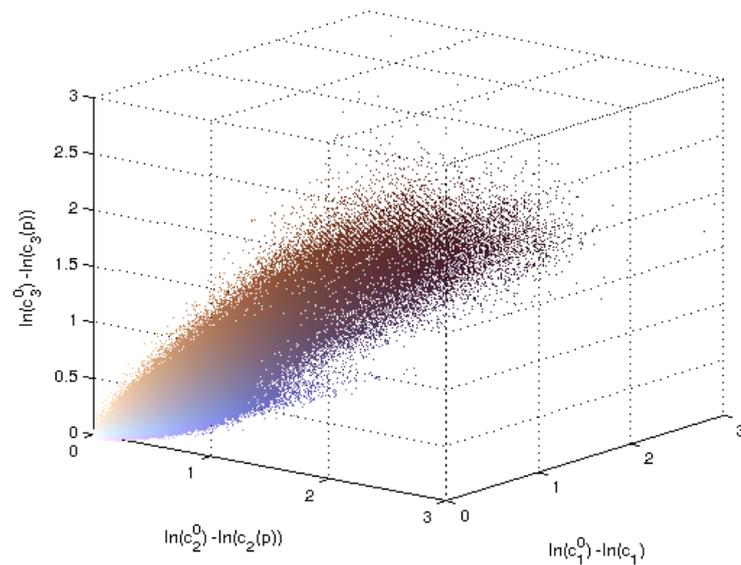


Abbildung 4: Ein Streudiagramm der linearisierten Farbwerte des Beispielbildes. Als Farb-
werte wurden die ursprünglichen Werte gewählt.

3.3 Bestimmung der Referenzwerte der Gewebetypen

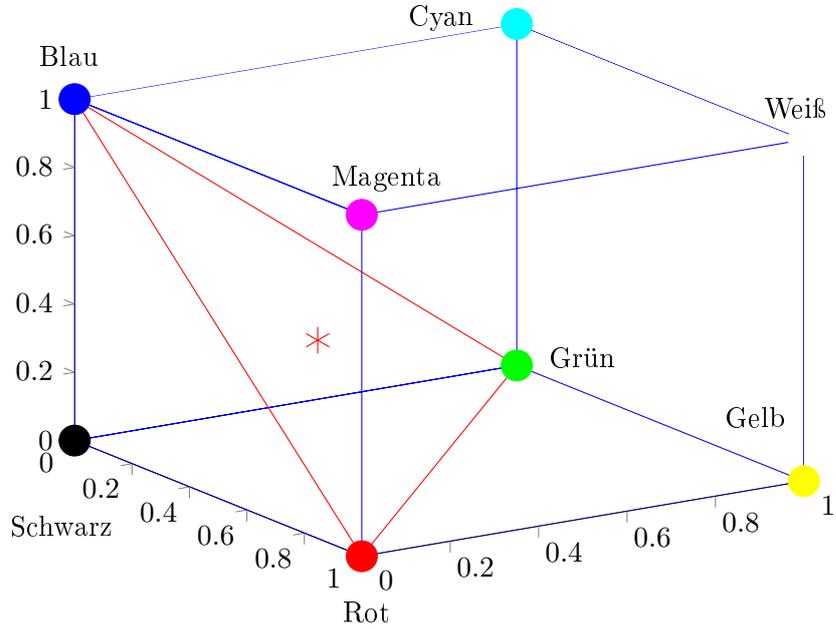


Abbildung 5: Der RGB-Farbraum mit der Maxwellschen Farbebene (rotes Dreieck), der rote Stern stellt den Mittelpunkt und neuen Koordinatenursprung der Ebene dar.

erweitert sich dementsprechend zu

$$\begin{pmatrix} \alpha(\mathbf{p}) \\ \beta(\mathbf{p}) \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} & -\frac{1}{\sqrt{2}} & 0 \\ -\frac{1}{\sqrt{6}} & -\frac{1}{\sqrt{2}} & \sqrt{\frac{2}{3}} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \end{pmatrix}. \quad (3.7)$$

Die Matrix hat vollen Rang, dadurch ist das Gleichungssystem eindeutig lösbar und man kann mit Hilfe der Inversen auflösen zu

$$\begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} & -\frac{1}{\sqrt{6}} & \frac{1}{3} \\ -\frac{1}{\sqrt{2}} & -\frac{1}{\sqrt{6}} & \frac{1}{3} \\ 0 & \sqrt{\frac{2}{3}} & \frac{1}{3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \alpha(\mathbf{p}) \\ \beta(\mathbf{p}) \\ 1 \end{pmatrix}. \quad (3.8)$$

Für die Referenzfarbwerte zum Gewebetyp j gilt damit

$$\begin{aligned} a_{j,1} &= \sqrt{\frac{1}{2}}\alpha_j - \sqrt{\frac{1}{6}}\beta_j + \frac{1}{3}, \\ a_{j,2} &= -\sqrt{\frac{1}{2}}\alpha_j - \sqrt{\frac{1}{6}}\beta_j + \frac{1}{3}, \\ a_{j,3} &= \sqrt{\frac{2}{3}}\beta_j + \frac{1}{3} = 1 - a_{j,1} - a_{j,2}. \end{aligned}$$

3.4 (Stückweise) Lineare Zerlegung des histologischen Bildes

Ziel dieses Kapitels ist die Berechnung der Gewebeverteilungen \mathbf{d} . Dazu werden die berechneten Referenzvektoren \mathbf{a}_j genutzt, um das Absorptionsspektrum A_j in (3.5) zu schätzen. So erhält man das Gleichungssystem

$$\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p})) = \begin{pmatrix} \mathbf{a}_1 & \dots & \mathbf{a}_n \end{pmatrix} \hat{\mathbf{d}}(\mathbf{p}) . \quad (3.9)$$

Voraussetzung, um die Gleichung (3.9) nach $\hat{\mathbf{d}}(\mathbf{p})$ auflösen zu können, ist, dass die Cluster vollständig separierbar sind. Dies bedeutet sowohl paarweise separierbar als auch einer-gegen-alle separierbar. Zur Überprüfung nutzen wir das Fisher-Kriterium, welches in Kapitel 2.5 vorgestellt wurde. Falls die Cluster vollständig separierbar sind kann die Pseudo-Inverse genutzt werden und man erhält

$$\hat{\mathbf{d}}(\mathbf{p}) = \left(\begin{pmatrix} \mathbf{a}_1 & \dots & \mathbf{a}_n \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} \mathbf{a}_1 & \dots & \mathbf{a}_n \end{pmatrix} \right)^{-1} \begin{pmatrix} \mathbf{a}_1 & \dots & \mathbf{a}_n \end{pmatrix}^T (\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p}))) . \quad (3.10)$$

Ein Element von $\hat{\mathbf{d}}(\mathbf{p})$ wird, falls es kleiner als Null sein sollte, auf Null gesetzt, da eine negative Dichte nicht sinnvoll ist. Für den Fall, dass $k = 2$ gilt, also nur zwischen 2 Gewebetypen unterschieden werden soll, kann man immer diese Zerlegung verwenden.

Falls allerdings $k > 2$ gilt, kann es passieren, dass die Cluster nur partiell separierbar sind, also paarweise separierbar, aber nicht einer-gegen-alle separierbar. Wenn sich also ein Cluster (bspw. das zweite von dreien) nur schlecht von den anderen trennen lässt, wird die stückweise lineare Zerlegung verwendet. Dabei werden die einzelnen Gewebeverteilungen gebildet, indem nur Teilmatrizen mit den Referenzvektoren des zweiten Clusters und jeweils einem weiteren Cluster genutzt werden. Da dadurch mehrere Gewebeverteilungen für das zweite Cluster entstehen, nimmt man hier das Minimum der berechneten $\hat{d}_2(\mathbf{p})$ für dieses Cluster, da dann $\hat{d}_1(\mathbf{p})$ und $\hat{d}_3(\mathbf{p})$ maximal sind. Für diesen speziellen Fall, dass sich das zweite Cluster schlecht von den anderen beiden Clustern trennen lässt, ergeben sich die Gewebeverteilungen aus

$$\begin{pmatrix} \hat{d}'_2(\mathbf{p}) \\ \hat{d}'_1(\mathbf{p}) \end{pmatrix} = \left([\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1]^T [\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1] \right)^{-1} [\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1]^T (\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p}))) ,$$

$$\begin{pmatrix} \hat{d}''_2(\mathbf{p}) \\ \hat{d}''_3(\mathbf{p}) \end{pmatrix} = \left([\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_3]^T [\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_3] \right)^{-1} [\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_3]^T (\ln(\mathbf{c}^0) - \ln(\mathbf{c}(\mathbf{p}))) ,$$

$$\hat{d}_2(\mathbf{p}) = \min(\hat{d}'_2(\mathbf{p}), \hat{d}''_2(\mathbf{p})) .$$

4 Testdaten und Umsetzung des Verfahrens

In diesem Kapitel wollen wir zuerst genauer auf die Testdaten und ihren medizinischen Hintergrund eingehen. Anschließend wollen wir die Implementierung der Methode und ein dabei auftretendes Problem betrachten. Den Schluss bilden Untersuchungen der Ergebnisse und der Laufzeiten des EM-Algorithmus. Die Methode der Blind Color Decomposition wurde dabei zuerst in MATLAB implementiert. Das Verfahren funktioniert dort vollständig, jedoch dauert die Berechnung des EM-Algorithmus und damit das ganze Verfahren sehr lange. Daher wurde das Verfahren zusätzlich in der auf Performance angelegten Programmiersprache Julia implementiert.

4.1 Histologische Testbilder

Getestet wurde die Methode an 30 Ausschnitten aus Gewebeschnitten von Mammakarzinomen. Die Auswahl der Ausschnitte wurde von Experten vorgenommen. Es handelt sich dabei um Schnitte von zehn verschiedenen Patientinnen, die mit drei unterschiedlichen Färbungen behandelt wurden. Bevor die Gewebeschnitte als Scans

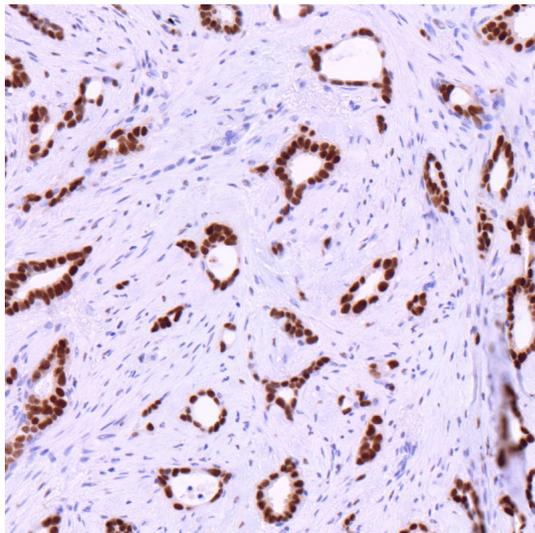


Abbildung 6: Beispielbild eines Gewebeschnittes, positive Reaktion (braun) auf einen Östrogen-Antikörper, Quelle: Pathologie Hamburg West

digital vorliegen, müssen zuerst einige Schritte absolviert werden. Als Erstes wird während einer kleinen Operation Gewebe entnommen, das danach mit Formalin fixiert wird. Anschließend wird das Präparat entwässert und in einen Paraffinblock eingebettet. Nach dem Schneiden in mikrometerdünne Schnitte werden diese mit einer Übersichtsfärbung H & E (Hämatoxylin & Eosin) gefärbt. Diese Übersichtsfärbung bewirkt eine Färbung der Zellkerne in blau und des Zytoplasmas in pink ([12, 20]).

Tabelle 1: IRS-Score, Quelle: Remmele & Stegner, 1987

Färbeintensität (IS)		Positive Zellen (PP)		IRS = IS * PP	
0	keine Reaktion	0	keine	0 - 2	negativ
1	schwache Reaktion	1	weniger als 10%	3 - 4	schwach positiv
2	mäßige Reaktion	2	zwischen 10 - 50%	6 - 8	mäßig positiv
3	starke Reaktion	3	zwischen 51 - 80%	9 - 12	stark positiv
		4	mehr als 80%		

In der Immunhistochemie werden Antikörper benutzt, um spezifische Antigene im Gewebe sichtbar zu machen. Dazu wird der Gewebeschnitt mit dem spezifischen Antikörper und Hämatoxylin als Gegenfärbung gefärbt. Bei Mammakarzinomen werden standardmäßig die beiden Hormonrezeptoren Östrogen (ER) und Progesteron (PR) sowie der Wachstumsfaktorrezeptor HER2 untersucht. Abbildung 6 stellt einen solchen Gewebeschnitt gefärbt mit Östrogen-Antikörpern dar.

Hormonrezeptoren: Wenn Östrogen- oder Progesteronrezeptoren nachweisbar sind, gilt ein Mammakarzinom als hormonpositiv. Zur Bestimmung, ob ein Mammakarzinom hormonpositiv ist oder nicht, wird in Deutschland in der Regel der Immunreaktive Score (IRS-Score) verwendet. Dieser ergibt sich dabei aus der Multiplikation des Scores für den Anteil der positiven Zellen und dem Score für die Färbeintensität. Remmele und Stegner haben den IRS-Score 1987 vorgeschlagen [15]. In Tabelle 1 ist die genaue Einteilung zu sehen. Mithilfe der BCD-Methode kann das erste Kriterium, der Anteil der positiven Zellen, berechnet werden.

Wachstumsfaktorrezeptor: HER2 steht für Human Epidermal Growth Factor Receptor Typ 2, einen Wachstumsfaktorrezeptor, der an der Zelloberfläche sitzt. Zur Bestimmung, ob ein Brusttumor HER2-positiv ist, wird zusätzlich zum Anteil der positiven Zellen und dem Intensitätsgrad noch die Membranfärbung betrachtet. Auch hier dient die Methode der BCD dazu, den Anteil der positiven Zellen zu bestimmen. Für Fälle, in denen die Methode ein unklares Ergebnis (Score 2+) liefert, müssen weitere Untersuchungen wie ein Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-Test (FISH) oder ein Chromogen-in-situ-Hybridisierung-Test (CISH) Aufschluss über den Status geben.

Die Unterschiede der verschiedenen Färbungen bei den unterschiedlichen Status der Hormonrezeptoren und des Wachstumsfaktorrezeptors sind in Abbildung 7 verdeutlicht.

Tabelle 2: Einteilung der Ergebnisse für HER2, Quelle: [11]

Score	Reaktion	Ergebnis
0	keine Membranreaktion	negativ
1+	schwache inkomplette Membranreaktion	negativ
2+	ungleichmäßige oder schwache zirkuläre Membranreaktion in > 10 % der invasiven Tumorzellen oder starke zirkuläre Membranreaktion in < 30 % der invasiven Tumorzellen	unklar
3+	gleichmäßige intensive zirkuläre Membranreaktion in mehr als 30 % der invasiven Tumorzellen	positiv

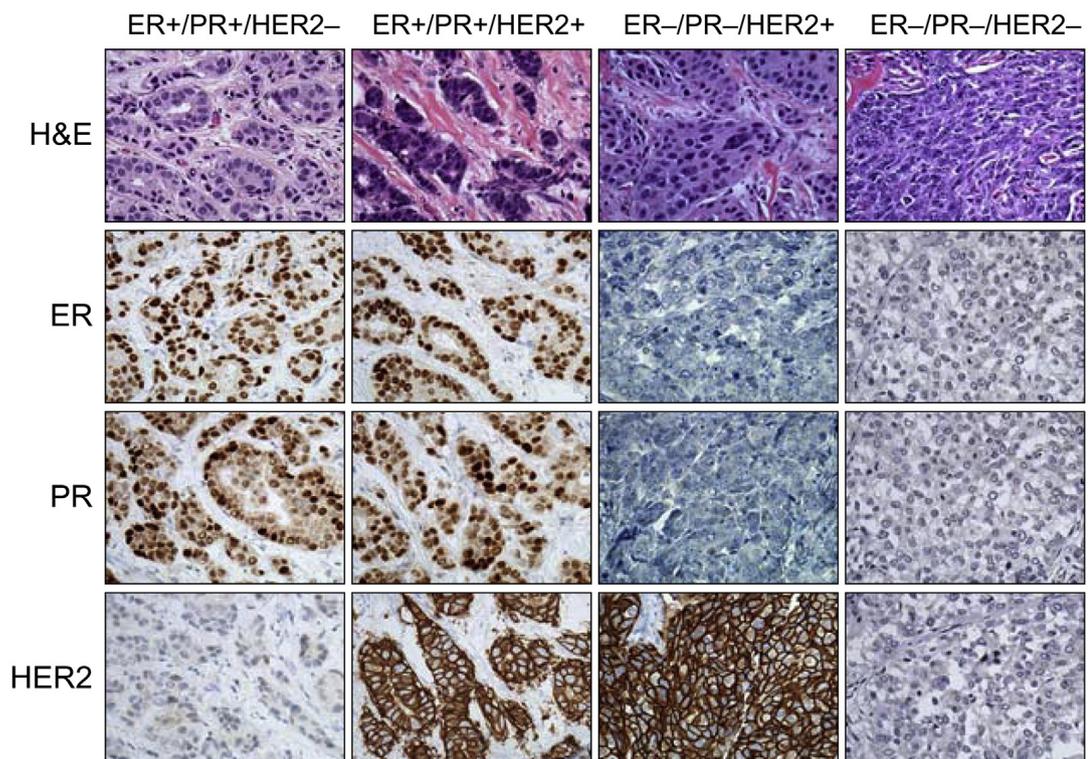


Abbildung 7: Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Färbungen bei unterschiedlichem Rezeptorstatus. Quelle: [16]

4.2 Problem bei der Transformation vom RGB-Farbraum zur Maxwellscher Farbebene

Zur Anwendung des Verfahrens sind die Werte, an denen keine Absorption vorliegt (c_0 -Werte), notwendig. Diese kann man mithilfe der Formel (3.4) berechnen. Hat man die dafür benötigten Angaben nicht zur Hand, kann auch ein weißes Bild oder ein absorptionsfreier Bildausschnitt benutzt werden, um die \mathbf{c}^0 -Werte zu bestimmen. Dazu werden für jeden Farbkanal k die Mittelwerte c_k^0 berechnet. Da in unserem Fall alle Testbilder mit demselben Mikroskop aufgenommen wurden, haben wir einen weißen Ausschnitt eines Bildes verwendet, um die \mathbf{c}^0 -Werte zu bestimmen, wie in [8] empfohlen. Bei der Transformation aller Farbwerte in die Maxwellsche Farbebene tritt das Problem auf, dass einige Farbwerte außerhalb des Maxwellschen Dreiecks landen. Dies kommt dadurch zustande, dass die Farbwerte dieser Pixel größer als die \mathbf{c}^0 -Werte sind.

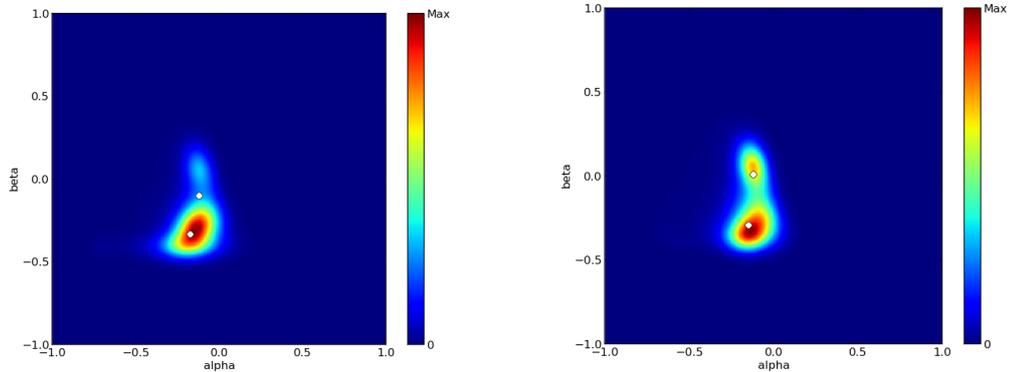
Mögliche Lösungen sind:

1. setze die \mathbf{c}^0 -Werte maximal, d.h. auf $(r,g,b) = (255, 255, 255)$
2. Berechnung der \mathbf{c}^0 -Werte wie bisher, allerdings werden die Werte, die nicht in dem Dreieck liegen, nicht mit in die Berechnung der Cluster einbezogen

Für beide Lösungsmöglichkeiten wurde das Verfahren getestet. In den Abbildungen 8(a) und 8(b) sind die transformierten Farbwerte als Häufigkeitsverteilung dargestellt und in weiß die Ergebnisse des EM-Algorithmus eingezeichnet. Wie zu erkennen ist, sind die Ergebnisse des EM-Algorithmus sichtbar verschieden, ebenso wie die entstandenen Ergebnisbilder, zu sehen in den Abbildungen 9(a) bis 10(b) im Kapitel 5. Aufgrund der dort noch näher erläuterten Unterschiede haben wir uns für die zweite Lösungsmöglichkeit entschieden.

4.3 Untersuchungen des EM-Algorithmus und der Laufzeit

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Laufzeituntersuchungen in den beiden Programmiersprachen MATLAB und Julia sowie mit unterschiedlichen Startwerten vorgestellt. Julia ist eine relativ neue dynamische Programmiersprache für technische Berechnungen. Bei der Entwicklung wurde besonderes Augenmerk auf die Leistungsfähigkeit gelegt [3]. Zuerst schauen wir uns die Ergebnisse des EM-Algorithmus in MATLAB und Julia an. Da dieser maßgeblich die Laufzeit des Verfahrens beeinflusst, findet zunächst eine eingehendere Untersuchung des Algorithmus statt, bevor die gesamte Laufzeit des Verfahrens betrachtet wird. Die Laufzeiten und Iterationen sind mit $k = 2$ berechnet worden und es wurden, wenn nicht anders angegeben, nur die Werte, die im Maxwellschen Dreieck liegen, zur Clusterbestimmung genutzt. Als



(a) c^0 -Werte maximal, d.h. $(r,g,b) = (255, 255, 255)$

(b) nur die Werte im Maxwell'schen Dreieck werden miteinbezogen

Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der transformierten Farbwerte mit den Ergebnissen des EM-Algorithmus

Testsystem wurde ein Intel Core i7 Prozessor mit 3.4 GHz und 16 GB Arbeitsspeicher verwendet.

Vergleich der Ergebnisse der Mittelpunktberechnung der Cluster Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, bilden die linearisierten und transformierten Daten Cluster in der Maxwell'schen Ebene. Für das Beispielbild sind die berechneten gerundeten Mittelpunkte der Cluster sowie die Abweichungen in der 2-Norm in der Tabelle 3 dargestellt. Wie erwartet unterscheiden sich die Mittelpunkte kaum, die Abweichungen liegen im Hundertstelbereich. In den Abbildungen 8(a) bis 8(b) sind Häufigkeitsverteilungen der Cluster des Beispielbildes dargestellt. Die vom EM-Algorithmus berechneten Mittelpunkte der Cluster sind in weiß eingezeichnet.

Abhängigkeit von der Wahl der Startwerte Wie schon in Kapitel 2.4 erläutert wurde, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Startwerte für den EM-Algorithmus zu wählen. Diese wurden hier für 15 Testbilder getestet. Die Anzahl der benötigten Iterationen für die Implementierung in Julia sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Anzahl der Iterationen der zufälligen Werte kann, wie hier mit der $\sigma =$ Einheitsmatrix, sehr gering sein. Da es sich aber um zufällige Werte handelt, kann die Anzahl aber auch sehr groß sein, wie in dem Fall $\sigma = \frac{1}{1000}$ Einheitsmatrix. Die Laufzeit des kmeans-Algorithmus, die bei einer Wahl der Ergebnisse des kmeans-Algorithmus als Erwartungswertvektor noch dazukommt, beträgt zwischen einer und drei Sekunden, im schlechtesten Fall sechs bis sieben Sekunden. Trotzdem ist diese Wahl in den meisten Fällen schneller als die Wahl von zufälligen Werten. Daher haben wir uns für die Kombination der Ergebnisse des kmeans-Algorithmus und $0.001 * \text{Einheitsmatrix}$

4.3 Untersuchungen des EM-Algorithmus und der Laufzeit

Tabelle 3: Vergleich der Mittelwerte des Beispielbildes

	alpha		beta		2-Norm
	matlab	julia	matlab	julia	
Cluster 1	-0.1218	-0.1208	-0.0152	0.0067	0.0219
Cluster 2	-0.1493	-0.1475	-0.3071	-0.2964	0.0109

Tabelle 4: Anzahl der Iterationen in Abhängigkeit von der Startwertwahl, Aufrufe am 22. und 23.6.15

Bild	$\sigma = E$		$\sigma = 0.001 * E$		$\sigma = \text{gesVarianz}$		$\sigma = 0.1 * \text{gesVarianz}$	
	kmeans	Zufall	kmeans	Zufall	kmeans	Zufall	kmeans	Zufall
1	41	2	1	63	19	20	1	11
2	27	27	1	12	21	12	20	30
3	25	26	1	14	17	15	19	19
4	2	2	1	14	10	31	12	13
5	18	18	1	17	13	11	13	15
6	2	2	1	62	36	49	37	54
7	9	9	1	26	13	27	22	16
8	42	2	1	10	16	17	1	1
9	28	28	24	36	24	22	1	1
10	34	2	1	21	18	61	20	28
11	16	16	1	8	14	15	1	5
12	15	16	1	13	10	9	12	22
13	12	2	1	9	13	46	16	11
14	13	13	1	19	13	15	16	9
15	45	2	37	39	39	17	1	1
\emptyset	21.9	11.1	4.9	24.1	18.4	24.5	12.8	15.7

4.3 Untersuchungen des EM-Algorithmus und der Laufzeit

entschieden. Auch in der MATLAB Implementierung ist dies die beste Wahl. Für den Fall, dass der kmeans-Algorithmus die Clusterzentren findet, ist dann nur noch ein Iterationsschritt im EM-Algorithmus nötig. Die anderen Fälle treten vor allem dann auf, wenn keine Färbung des Antikörpers zu sehen ist, d.h. wenn eigentlich nur ein Cluster existiert, der kmeans-Algorithmus aber zwei finden will.

Laufzeit des EM-Algorithmus Bei einem Vergleich der Dauer der Berechnung des EM-Algorithmus und der Anzahl der benötigten Iterationen in MATLAB und in Julia stellt man fest, dass die Berechnung in Julia in einer um den Faktor 16 schnelleren Geschwindigkeit stattfindet als in MATLAB. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für 15 Bilder bei einem Aufruf dargestellt. Dabei ist die Zeit gerundet in Sekunden angegeben. Als Startwerte wurde die Kombination aus kmeans-Algorithmus und $0.001 \cdot$ Einheitsmatrix gewählt. Die Ergebnisse lassen sich darauf zurückführen, dass der Code der Einfachheit halber nicht mit dem Ziel der größten Effizienz, sondern intuitiv geschrieben ist. Dadurch enthält er einige for-Schleifen, die die Berechnung in MATLAB, das optimal für Matrixoperationen arbeitet, sehr ineffizient machen. In Julia konnte der MATLAB-Code weitestgehend übernommen werden, nur kleinere Änderungen der Syntax waren notwendig. In Julia läuft die Berechnung deutlich effizienter ab.

Laufzeit der kompletten Methode ohne den EM-Algorithmus Zum Abschluss der Laufzeituntersuchungen wurde die Laufzeit der kompletten BCD-Methode ohne Berechnung des EM-Algorithmus untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse des EM-Algorithmus eines vorherigen Aufrufs gespeichert und diese anstelle einer neuen Berechnung aufgerufen und verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung in MATLAB und Julia ist in Tabelle 6 zu finden. Auch hier sieht man deutliche Unterschiede, die Berechnung ist in Julia um mehr als ein Dreifaches schneller als in MATLAB.

Fazit zu den Untersuchungen der Laufzeiten Bei der Wahl der optimalen Parameter, d.h., die Ergebnisse des kmeans-Algorithmus als Erwartungswertvektor und $0.001 \cdot$ die Einheitsmatrix als Kovarianzmatrix, sowie einer Berechnung in Julia liegt die durchschnittliche Laufzeit des gesamten Verfahrens bei unter 30 Sekunden. Da die Zeit, in der ein Pathologe einen Gewebeschnitt begutachtet, keine allzu große Rolle spielt, ist dieses Ergebnis für die Anwendung vollkommen ausreichend.

4.3 Untersuchungen des EM-Algorithmus und der Laufzeit

Tabelle 5: Vergleich der Dauer (in Sekunden) und Anzahl der Iterationen, Aufruf 22.6.15

Bild	MATLAB			Julia		
	Dauer	Iterationen	Dauer / It.	Dauer	Iterationen	Dauer / It.
1	52.5	1	52.2	3.2	1	3.2
2	42.1	1	42.1	2.7	1	2.7
3	45.1	1	45.1	2.8	1	2.8
4	106.1	1	106.1	6.6	1	6.6
5	103.5	1	103.5	6.5	1	6.5
6	87.6	1	87.6	5.4	1	5.4
7	98.2	1	98.2	6.1	1	6.1
8	92.8	1	92.8	5.8	1	5.8
9	1124.6	24	46.9	68.0	24	2.8
10	61.5	1	61.5	3.8	1	3.8
11	60.3	1	60.3	3.7	1	3.7
12	49.2	1	49.2	3.1	1	3.1
13	95.9	1	95.9	5.8	1	5.8
14	88.7	1	88.7	5.4	1	5.4
15	2292.6	37	62.0	142.9	37	3.9
∅	293.4	4.9	72.8	18.1	4.9	4.5

Tabelle 6: Laufzeit BCD ohne EM, Angabe in Sekunden, Aufruf am 22.6.15

	MATLAB	Julia
1	27.4	7.2
2	27.1	6.9
3	26.6	7.4
4	27.3	12.0
5	27.1	9.5
6	27.0	9.8
7	26.8	9.8
8	27.3	8.7
9	27.6	8.8
10	27.1	8.0
11	27.2	7.3
12	26.8	7.6
12	26.8	9.4
14	27.2	8.8
15	26.7	9.5
∅	27.1	8.7

5 Ergebnisse

Am Ende des BCD-Verfahrens erhalten wir die Gewebeverteilungen, in unserem Fall jeweils zwei. Für das Beispielbild sind diese in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt, die Berechnung erfolgte in Julia. Dabei wurde bei der Clusterbestimmung einmal c_0 maximal gewählt und das andere Mal wurden nur die Werte, die nach der Transformation in der Maxwell'schen Ebene lagen, zur Clusterbestimmung genutzt.

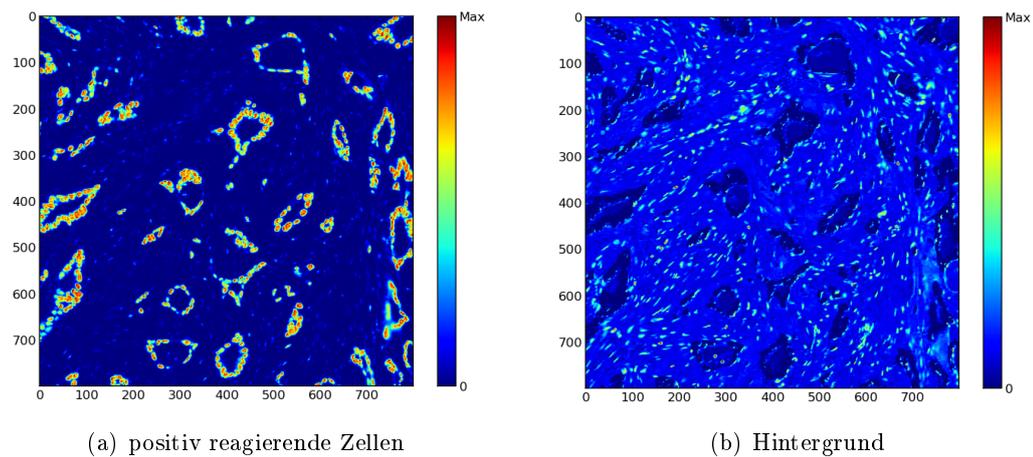


Abbildung 9: Die Ergebnisbilder für das Testbild aus Abbildung 1, hier wurden die c_0 -Werte maximal gesetzt.

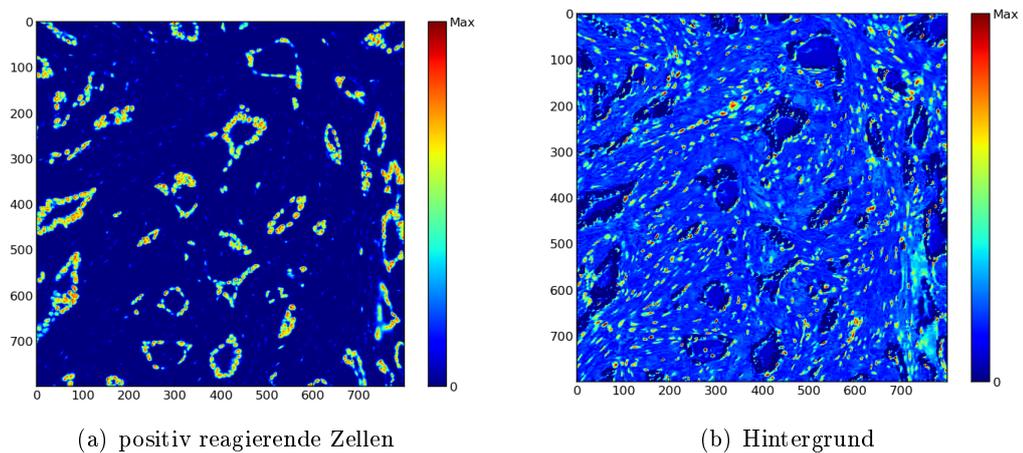


Abbildung 10: Die Ergebnisbilder für das Testbild aus Abbildung 1, nur die α und β -Werte, die im Maxwell'schen Dreieck liegen, wurden zur Referenzwertbestimmung genutzt.

Zu erkennen ist, dass sich die Hintergrund-Ergebnisbilder unterscheiden. In dem Fall, dass nur die α und β -Werte, die im Maxwell'schen Dreieck liegen, zur Berechnung

der Referenzfarbwerte benutzt wurden, sind deutlich mehr Zellkerne, die nicht positiv reagieren, abgebildet. Dies deutet darauf hin, dass die Anzahl der falsch positiven Zellen in dem Fall, dass die c_0 -Werte maximal gesetzt wurden, größer ist. Daher haben wir uns für das zweite Vorgehen entschieden, um das Problem der nicht im Dreieck liegenden Farbwerte nach der Transformation zu lösen. Diese Gewebeverteilungen können nun genutzt werden, um den Anteil der Antikörper im Gewebe zu berechnen.

In jeweils einer der zwei entstandenen Gewebeverteilungen pro Bild sind nur die Zellen, die positiv auf die Antikörper reagieren, dargestellt. Für jedes Pixel wird nun verglichen, in welcher Gewebeverteilung der Anteil größer ist und dann demjenigen mit dem höheren Wert zugeordnet. In den Abbildungen 11(a) und 11(b) sind die Ergebnisse nach der Zuordnung der Pixel zu rezeptorpositiv und rezeptornegativ zu sehen. Die zugeordneten Pixel sind in weiß, die restlichen in schwarz dargestellt. Auf dieser Grundlage findet nun die Anteilsberechnung statt. Dazu wird die Anzahl der zugeordneten Pixel durch die Anzahl aller Pixel geteilt. Dabei erhält man für jeden ursprünglichen Gewebeschnitt zwei Anteile, zum einen den der positiv auf den Rezeptor reagierenden Zellen und zum anderen den der negativ reagierenden Zellen. Zur Zeit ist noch Vorwissen nötig, um die beiden Anteile richtig zuzuordnen, da bei der Clusterbestimmung nicht beeinflussbar ist, ob der Referenzfarbwert des Antikörpers als erstes oder zweites Cluster bestimmt wird. Zu möglichen Lösungen mehr im Ausblick im nächsten Kapitel.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse für 10 Patienten und Patientinnen mit drei unterschiedlichen Färbungen dargestellt. Zudem wurde für die Hormonrezeptoren der Score für den Anteil mit angegeben. Eine Angabe des IRS-Scores selber ist nicht möglich, da hierfür zusätzlich die Intensität der Färbung betrachtet werden muss. Das gleiche gilt für die Einteilung des Wachstumsfaktorrezeptors (vgl. Tabellen 1 und 2). Dies könnte eventuell durch die Einbeziehung des berechneten Gewebeanteils geschehen, dieser Ansatz konnte aus Zeitgründen aber nicht weiter verfolgt werden. Bestandteil von Tabelle 7 ist außerdem die vom Pathologen vorgenommene Klassifizierung, sowie der mit einem Schwellwertverfahren berechnete prozentuale Anteil. Da zur Färbeintensität keine Angabe gemacht werden kann und die Einteilung des Pathologen lediglich in positiv und negativ und nicht nach IRS-Score vorliegt, können unsere Ergebnisse nicht genau mit denen des Pathologen verglichen werden. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren sind teilweise doch sehr deutlich.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass das Verfahren große Schwierigkeiten hat, einen negativen Rezeptorstatus zu erkennen. Dies liegt darin begründet, dass in diesem Fall keine Färbung des Antikörpers vorliegt, die als Referenzfarbwert genutzt

werden kann. Daher findet dann eine Segmentierung zwischen dem Hintergrund und dem normalen Gewebe statt. Dies führt zu falschen Ergebnissen bei der Anteilsberechnung, die auf der Segmentierung beruht.

In Fällen mit positivem Rezeptorstatus hingegen liefert das BCD-Verfahren gute Ergebnisse. Die Segmentierung in positiv und nichtpositiv, wie in [Abbildung 11](#) für das Beispielbild vorgenommen, funktioniert gut.

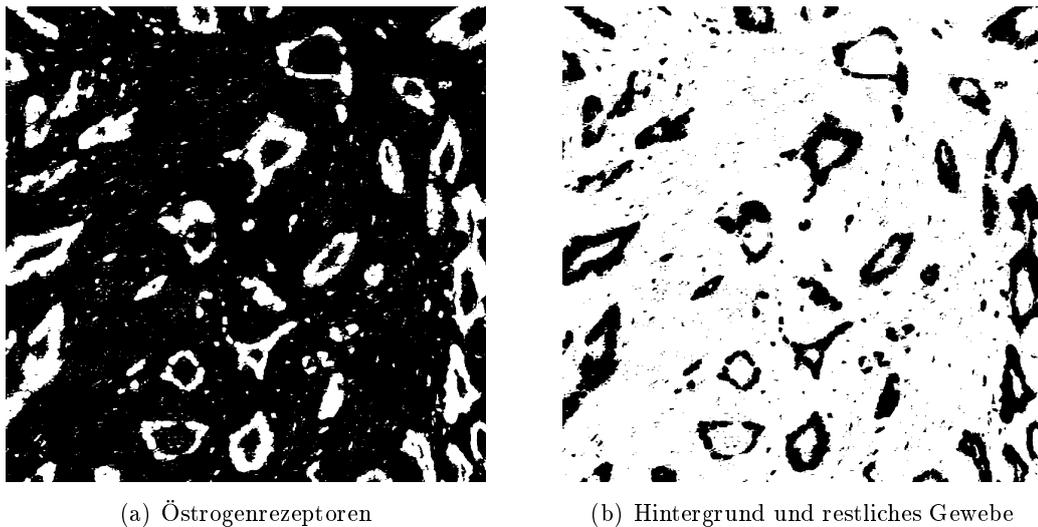


Abbildung 11: Nach der Zuordnung der Pixel zu den jeweiligen Gewebetypen. Die zugeordneten Pixel sind in weiß, die restlichen in schwarz dargestellt. Auf dieser Grundlage findet nun die Anteilsberechnung statt.

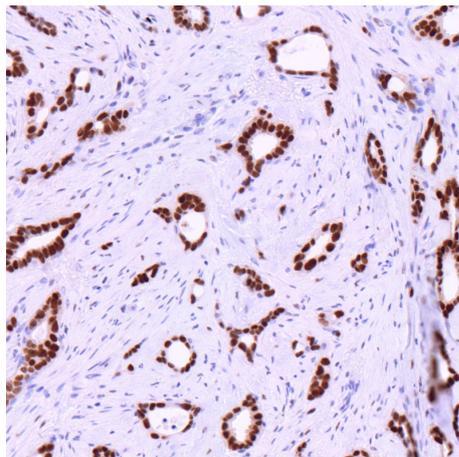


Abbildung 12: Zum Vergleich noch einmal das ursprüngliche Bild.

Tabelle 7: Anteil der Hormon- & Wachstumsfaktorrezeptoren am Gewebe

Nr.	Rezeptor	Anteil am Gewebe (in %)	PP-Score (k.A. für HER2)	Einschätzung des Pathologen	Schwellwertverfahren
1	ER	16.76	2	positiv	-
	PR	14.02	2	positiv	-
	HER2	15.16	-	negativ	1.80
2	ER	73.87	3	positiv	18.42
	PR	62.71	3	positiv	51.33
	HER2	34.88	-	negativ	0.02
3	ER	45.18	2	positiv	21.81
	PR	40.17	2	positiv	33.44
	HER2	6.53	-	negativ	0.05
4	ER	30.81	2	positiv	10.82
	PR	39.37	2	positiv	32.73
	HER2	13.21	-	negativ	0.10
5	ER	66.51	3	positiv	39.54
	PR	61.13	3	positiv	52.04
	HER2	29.10	-	negativ	0.002
6	ER	26.58	2	negativ	-
	PR	16.74	2	negativ	-
	HER2	32.47	-	positiv	17.40
7	ER	7.83	1	negativ	-
	PR	24.56	2	negativ	-
	HER2	50.39	-	positiv	31.96
8	ER	10.67	2	negativ	-
	PR	35.25	2	negativ	-
	HER2	44.05	-	positiv	4.84
9	ER	22.86	2	negativ	-
	PR	11.47	2	negativ	-
	HER2	15.50	-	positiv	6.33
10	ER	16.63	2	negativ	-
	PR	19.08	2	negativ	-
	HER2	27.07	-	positiv	1.20

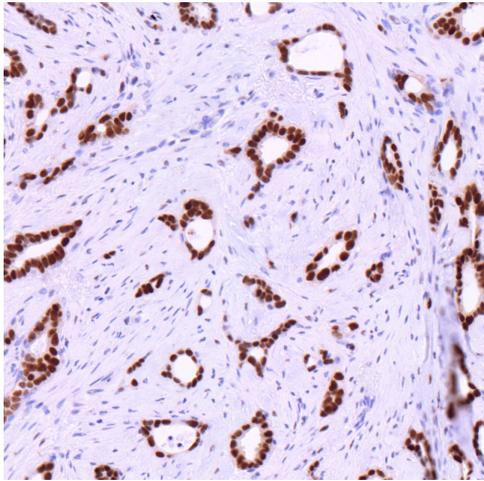
6 Auswertung & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren der Blind Color Decomposition zur Zerlegung von histologischen Bildern reproduziert und für immunhistochemische Gewebesschnitte von Mammakarzinomen getestet. Die Vorteile des Verfahrens liegen in der Unüberwachtheit und der ‘soft classification’ der einzelnen Pixel.

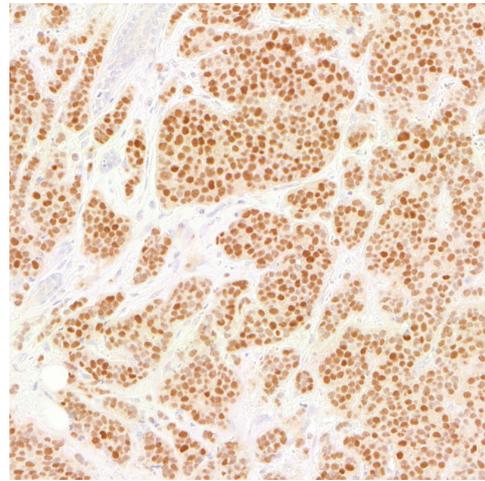
Für Gewebeschnitte, die eine deutliche Färbung der Hormon- bzw. Wachstumsfaktorrezeptoren zeigen, liefert das Verfahren gute Ergebnisse. Schwierigkeiten treten bei negativen Hormonrezeptor- bzw. Wachstumsfaktorrezeptorstatus dann auf, wenn keine oder nur sehr wenig Färbung des Antikörpers abgebildet ist. Da dann kein Referenzfarbwert des Rezeptors gebildet werden kann, liefert der Algorithmus keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Eine mögliche Vorgehensweise wäre bei einer geringen, aber vorhandenen Färbung eine Unterscheidung in drei Cluster (positiv reagierende Zellen, nichtreagierende Zellen und Hintergrund). Aber auch diese Vorgehensweise liefert bei keiner Färbung keine guten Unterscheidungen. Eine andere Möglichkeit wäre es, Vorwissen einfließen zu lassen, indem der Farbwert des Antikörpers vorher bestimmt wird und zur Zuteilung genutzt wird. Damit verliert das Verfahren allerdings einen seiner größten Vorteile, die Unüberwachtheit.

Eine andere, noch offene Frage, die in Kapitel 4 schon angesprochen wurde, ist die nach der Bestimmung der Färbeintensität. Durch das Verfahren erhalten wir Gewebeverteilungen, in denen auch Informationen über die Dichte des absorbierten Gewebes und damit indirekt über die Farbintensität enthalten sind. Wie man diese nun nutzen kann, um die Färbeintensität zu bestimmen, ist noch offen. Eine Schwierigkeit dabei ist, dass die Einteilung der Intensität für alle Gewebeschnitte der gleichen Färbung gleich sein soll, d.h., es wird ein Maximalwert benötigt, der vorher bestimmt werden muss. Als Beispiel dazu der Vergleich zweier Gewebeschnitte in Abbildung 13 die sich sowohl vom Anteil der positiven Zellen als auch in der Intensität, mit der die Färbung auftritt, deutlich unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verfahren der Blind Color Decomposition einen guten Ansatz zur Segmentierung von histologischen Gewebeschnitten bildet, für die spezielle Anwendung in diesem Fall aber noch offene Fragen geklärt werden müssen, bevor der Immunreaktive Score und der Score für den HER2-Rezeptor bestimmt und so eine vollständige Einschätzung des Mammakarzinoms vorgenommen werden kann.



(a) Testbild mit einem berechneten prozentualen Anteil von ca. 17 % und einer stärkeren Färbintensität.



(b) Testbild mit einem berechneten prozentualen Anteil von ca. 74 % und einer schwächeren Intensität.

Abbildung 13: Zwei Testbilder, in denen sich die Intensität der ER-Antikörper deutlich unterscheidet. Beides sind Gewebeschnitte eines östrogenpositiven Mammakarzinoms.

Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Aitken, J. S. Thomas, S. P. Langdon, D. J. Harrison, and D. Faratian. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Annals of Oncology*, 21(6):1254–1261, 2010.
- [2] Johann Bacher. *Clusteranalyse: Anwendungsorientierte Einführung*. Oldenbourg, München, 1994.
- [3] Jeff Bezanson, Stefan Karpinski, Viral B. Shah, and Alan Edelman. Julia: A Fast Dynamic Language for Technical Computing. In: *Computing Research Repository*, 2012.
- [4] Herbert Blitzer, Karen Stein-Ferguson, Jeffrey Huang, and Jack Jacobia. *Understanding Forensic Digital Imaging*. Academic Pr Inc, 2008.
- [5] Richard O. Duda, Peter E. Hart, and David G. Stork. *Pattern Classification*. Wiley, 2 edition, 2001.
- [6] Ludwig Fahrmeir, Alfred Hamerle, and Gerhard Tutz (Hsg.). *Multivariate statistische Verfahren*. de Gruyter, 2 edition, 1996. erweiterte Auflage.
- [7] M.A.T. Figueiredo and A.K. Jain. Unsupervised Learning of Finite Mixture Models. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 24(3):381–396, März 2002.
- [8] M. Gavrilovic, J.C. Azar, J. Lindblad, C. Wahlby, E. Bengtsson, C. Busch, and I.B. Carlbom. Blind Color Decomposition of Histological Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 32(6):983–994, June 2013.
- [9] Rafael C. Gonzalez and Richard E. Woods. *Digital Image Processing*. Pearson Education Inc., 3 edition, 2008.
- [10] Heinz Handels. *Medizinische Bildverarbeitung : Bildanalyse, Mustererkennung und Visualisierung für die computergestützte ärztliche Diagnostik und Therapie*. Vieweg+Teubner, Wiesbaden, 2 edition, 2009.
- [11] R. Kreienberg (Hrsg.). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms - Leitlinienprogramm Onkologie*. W. Zuckschwerdt, 3 edition, 2012.
- [12] Gudrun Lang. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. SpringerWienNewYork, 2 edition, 2012.

- [13] Annkristin Lange. Blind Color Decomposition of Histological Images. Seminararbeit am Institute of Mathematics and Image Computing, Universität zu Lübeck, 2015.
- [14] Werner Mäntele. *Biophysik*. Ulmer, Stuttgart, 2012. S. 189f.
- [15] W. Remmele and HE. Stegner. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*, 8(3):138–140, May 1987.
- [16] Ashley G. Rivenbark, Siobhan M. O’Connor, and William B. Coleman. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 183(4):1113 – 1124, Oktober 2013.
- [17] Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland 2009/2010, 2013.
- [18] Shokri Z. Selim and M. A. Ismail. K-means-type algorithms: A generalized convergence theorem and characterization of local optimality. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, PAMI-6(1):81–87, Jan 1984.
- [19] Petre Stoica and P. Babu. The gaussian data assumption leads to the largest cramér-rao bound [lecture notes]. *Signal Processing Magazine, IEEE*, 28(3):132–133, May 2011.
- [20] Mitko Veta, Josien P.W. Pluim, Paul J. van Diest, and Max A. Viergever. Breast Cancer Histopathology Image Analysis: A Review. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 61(5):1400–1411, May 2014.