Quantitatives Tumorgrading mit Methoden der Bildanalyse

Catherine P. Janson, Dymitr D. Komitowski

Abteilung Histodiagnostik und Pathomorphologische Dokumentation,
Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
c.janson@dkfz-heidelberg.de

Dieser Beitrag präsentiert Methoden der computergestützten Aufnahme und Analyse histologischer Bilder, speziell für das Grading von Karzinomen glandulärer Epithelien. Als interessierende Gewebekomponenten werden Tumorepithel, Tumorzellkerne und Drüsenlichtungen angesehen. Eine Doppelfärbung und Zwei-Kanal-Bildaufnahme ermöglichen es, all diese Komponenten darzustellen und zu segmentieren. Die im Anschluß berechneten quantitativen Merkmale beschreiben Anzahl und Flächen aller Gewebekomponenten, Maße für die räumliche Anordnung der Tumorzellkerne sowie Formmerkmale der Drüsenlichtungen. Eine detailliertere Untersuchung von Zellkerneigenschaften bei höherer optischer Auflösung erfaßt geometrische und optische Merkmale sowie die Chromatinstruktur der Kerne. Die Anwendung und Ergebnisse an 50 Prostatatumoren werden vorgestellt.

Keywords: Bildanalyse, Tumorgrading, Gewebestrukturen, Zellkerne

1 Einführung

Die klassische mikroskopische Untersuchung histologischer Präparate bleibt trotz fortschreitender Entwicklungen der Molekularpathologie massgebend für die Beurteilung des Malignitätsgrads von Tumoren. Dabei werden Wachstumsmuster und Zellkernmorphologie des Gewebes je nach Ausmaß der Entartung klassifiziert. In der Routinediagnostik jedoch ist diese Bewertung abhängig von der individuellen Erfahrung und Einschätzung des Experten, die Reproduzierbarkeit gerade in Grenzfällen bleibt fraglich.
Zur Unterstützung der Entscheidungsfindung entstanden Methoden der computergestützten Bildaufnahme und -auswertung [1-5], die durch quantitative Beschreibung zu höherer Objektivität und Reproduzierbarkeit beitragen. Allerdings konzentrieren sich diese Entwicklungen zumeist nur auf einen Teilaspekt der relevanten Kriterien. Daher stellen wir einen Ansatz vor, der sowohl das Wachstumsmuster des Gewebes als auch die Drüsenstruktur und Veränderungen der Zellkerne erfaßt.

2 Material und Methoden

Die Methoden der Bildanalyse fanden Anwendung an 50 Neoplasien der menschlichen Prostata, zur Verfügung gestellt von der Urologie der Universitätsklinik Heidelberg. Davon waren 43 Adenokarzinome unterschiedlichen Malignitätsgrads und sieben gutartige Hyperplasien. Das nach Fixierung in Paraffin eingebettete Material wurde in ca. 3 μm

dicken Schnitten verarbeitet. Die Bildanalysen zu Wachstumsmuster und Zellkerneigenschaften wurden jeweils an zwei parallelen Schnitten durchgeführt. Zur Visualisierung aller relevanten Gewebekomponenten wurde am ersten Schnitt eine Doppelfärbung angewendet. Dabei wurden die Zytokeratine des Epithels mit dem spezifischen Antikörper lu-5 immunhistochemisch für Durchlichtmikroskopie nachgewiesen, die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid für Fluoreszenzmikroskopie angefärbt. Am zweiten Schnitt erfolgte eine stöchiometrische Chromatinfärbung nach Feulgen.

2.1 Bildaufnahme

Das Bildaufnahmesystem besteht aus einem Umkehrmikroskop Fluovert (Leitz GmbH, Wetzlar), einer Video-Kamera (AVT Horn, Aalen), einem Analog-Digital-Konverter (Eltec, Mainz) und einer Unix-Workstation Indy SC (Silicon Graphics Inc., Mountain View, Kalifornien). Die gesamte Software zu Bildaufnahme und -auswertung wurde in unserem Labor in der Programmiersprache C entwickelt. Das Mikroskop verfügt sowohl über Durchlicht- als auch eine Fluoreszenzeinrichtung, sodaß ein Bildausschnitt in beiden Kanälen aufgenommen werden kann, lediglich durch Umschalten der entsprechenden Filter und Shutter (Abb. 1). Für die Aufnahme der Gewebsstrukturen wurde ein Objektiv Leitz Neofluar (40x, numerische Apertur 0.75) benutzt, je Präparat wurden 60 verschiedene Bildausschnitte aufgenommen. Zur Untersuchung der Chromatinstruktur mit einer höher auflösenden Optik (100x, numerische Apertur 1.3) wurden 150 Zellkerne je Präparat in Einzelbildern digitalisiert.

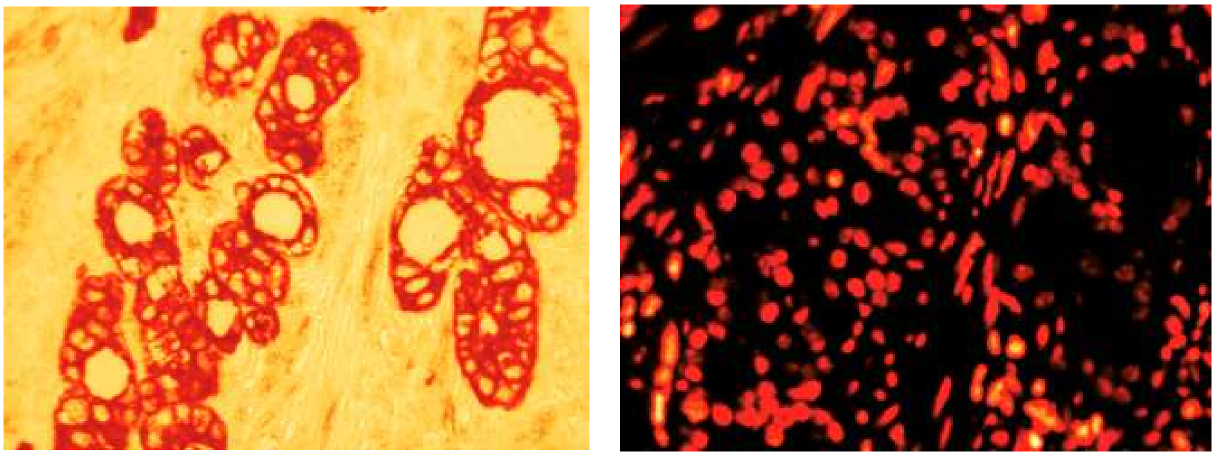

Abbildung 1: Originalbilder: derselbe Bildausschnitt in Durchlicht und Fluoreszenz

2.2 Segmentierung

Die Untersuchung der Gewebestrukturen erforderte die Segmentierung der Komponenten (Tumor-)Epithel, Zellkerne und Drüsenlichtungen. Das Epithel wurde auf Basis des Durchlichtbildes in zwei Schritten segmentiert. Eine Grobsegmentierung bestand aus Clusteralgorithmus [6] und anschließendem Closing [7]. Der Clusteralgorithmus klassifiziert jeden Bildpunkt anhand seiner Grauwertinformation, sodaß jede der Klassen eine

homogene Menge an Grauwerten repräsentiert. Die Closing Prozedur entspricht einer Verschmelzung der so gefundenen Regionen. Die entstandene grobe Maske wurde anschließend mit einer Feinsegmentierung nachkorrigiert. Diese führt eine bedingte Erosion der Grobmaske auf Basis der Gradienteninformation des Originalbildes durch. Das bedeutet, die Bildpunkte am Rand der Maske werden dann entfernt, wenn der dazugehörige Gradientenwert in einer bestimmten Umgebung minimal ist [8].
Für die Segmentierung der Zellkerne am Fluoreszenzbild wurde eine Methode der lokaladaptiven Schwellwertbestimmung angewendet. Dabei wird nicht ein globaler Schwellwert für das gesamte Bild festgelegt, sondern die Grauwertschwellen werden lokal unterschiedlich nach bestimmten Kriterien bestimmt. Diese Kriterien ermöglichen das Auffinden maximal großer disjunkter Regionen hoher Lichtintensität [9].
Die Drüsenlichtungen haben die Eigenschaft, daß sie nicht zum Epithel gehören und als Hohlräume weder Epithel- noch Bindegewebszellkerne enthalten. Diese Bedingung '*nicht Epithel und enthält keinerlei Zellkerne*' wurde geprüft durch Vergleich der bereits gewonnenen Segmentierungsergebnisse, so wurden die glandulären Lumina detektiert. Zusätzlich konnte so zwischen Epithel- und Stromakernen differenziert werden (Abb. 2). Für weitere Auswertungen wurden ausschliesslich die Epithelzellkerne berücksichtigt.
Bei der Zellkernuntersuchung in stärkerer Vergrößerung war in jedem Bildausschnitt jeweils ein Kern. Die Kernkontur wurde nach Polarkoordinatentransformation mit einem Straßensuch-Algorithmus detektiert [10], die Regionen verdichteten Chromatins mit dem bereits erwähnten lokal-adaptiven Schwellwert [9].

2.3 Merkmalsbestimmung

Auf Basis der Segmentierungsergebnisse wurden für die verschiedenen Gewebekomponenten quantitative Merkmale berechnet. Im Einzelnen sind zu nennen

- für die Epithelobjekte: Anzahl der Objekte pro Bild, mittlere Fläche eines Objektes, Anteil der gesamten Epithelfläche an der Bildfläche

- für die Drüsenstrukturen: Anzahl und Gesamtfläche der glandulären Lumina im Bild, relative Anzahl und Fläche (d.h. Anzahl in Relation zu Epithelfläche), mittlere Fläche eines Lumens, für jedes Lumen die Formmerkmale Exzentrizität, Konkavität, Güte der Ellipsenanpassung und Formfaktor

- zur Erfassung der räumlichen Anordnung der Zellkerne: Zellularität (Anzahl der Zellkerne: Epithelfläche), Fläche und Umfang der umgebenden Voronoipolygone.

- zur detaillierten Beschreibung der Zellkerne: Kernfläche, große und kleine Halbachse, Exzentrizität, Formfaktor, integrale optische Dichte, mittlere optische Dichte, Variabilität der optischen Dichte innerhalb des Kerns, Anzahl, Fläche, optische Dichte und Lokalisation der Regionen verdichteten Chromatins.

Für die weitere statistische Analyse wurden die genannten Merkmale pro Präparat zu Mittelwert (M) und Variationskoeffizient (CV) zusammengefaßt.

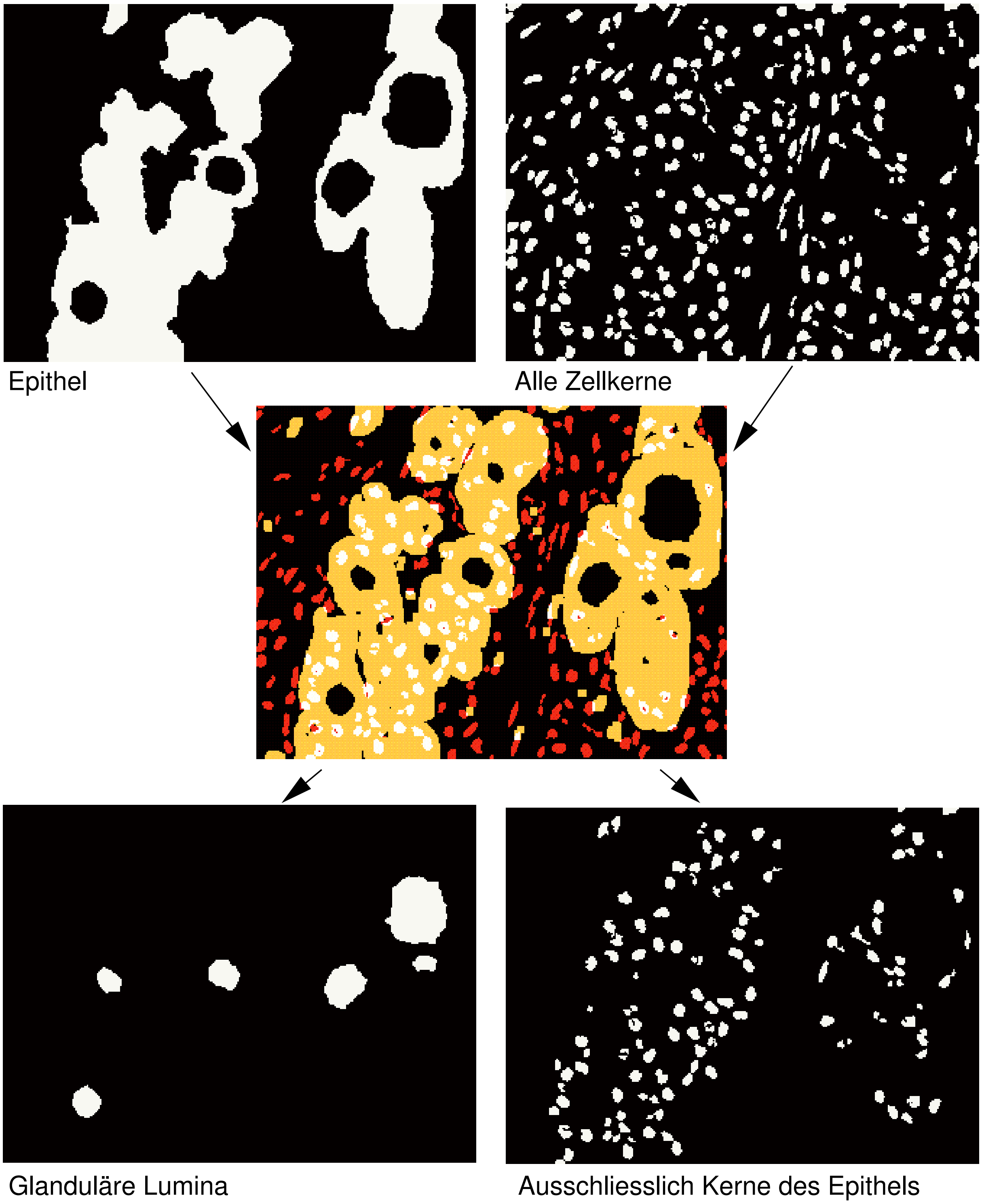

Abbildung 2: Ablauf und Ergebnisse der Segmentierung der Gewebekomponenten

3 Ergebnisse

Die berechneten Merkmale wurden der Überlebenszeit der Patienten gegenübergestellt. Dazu wurden diese eingeteilt in die Gruppen Hyperplasie (7 Patienten), Überlebenszeit mehr als 60 Monate (13) und weniger als 60 Monate (30). Mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Rangsummen-Test wurde auf Gruppenunterschiede geprüft. Mittelwerte und Standardabweichung der Merkmale, die signifikante Unterschiede aufwiesen ($p<0.05$), zeigt Tabelle 1. Im univariaten Vergleich ließ sich die Referenzgruppe der Hyperplasien deutlich von den Adenokarzinomen unterscheiden, die ihrerseits nur geringfügige Unterschiede ergaben. Eine multivariate Klassifikation der Fälle mittels 'Nearest-Neighbour' Methode wurde zusätzlich mit 5 ausgewählten Variablen durchgeführt, um eine Aussage zu erhalten, wie korrekt die Tumorfälle anhand der berechneten Merkmale den entsprechenden Prognosegruppen zugeordnet werden. Es ergab sich eine Rate der korrekten Klassifikation von 84%, wobei Fehlklassifikationen nur in der Gruppe mit Überlebenszeit < 60 Monaten auftraten. Nach Kreuzvalidierung wurden 75% der Fälle korrekt klassifiziert.

Gruppe:	Hyperplasie	Überleben ≥ 60 Monate	Überleben < 60 Monate
Wachstumsmuster:			
(CV) Fläche Epithelobjekte (10^2)	67.56±11.93	98.58±27.06	93.10±27.76
(M) rel. Anz. gland. Lumina (10^6)	27.14±8.71	54.77±23.59	49.28±24.00
(M) Fläche gland. Lumina (10^6)	1141.33±504.13	886.70±520.62	708.96±744.15
(M) Konkavität gland. Lumina (10^2)	53.57±9.61	45.63±12.16	40.72±9.53
(M) Zellularität (10^4)	37.42±5.55	43.69±6.58	46.63±7.65
(M) Fläche Voronoipolygone (10^2)	298.55±43.03	258.66±37.14	247.42±34.29
Zellkerne:			
(CV) Kernfläche (10^2)	17.97±3.41	27.24±7.83	30.42±9.14
(CV) Integrale optische Dichte (10^2)	14.99±2.17	23.82±3.61	25.74±6.14
(CV) Formfaktor (10^2)	4.43±1.59	10.43±3.51	9.97±3.26
(M) Optische Dichte einer Chromatinregion	80.97±8.26	80.28±11.69	101.99±27.93

Tabelle 1: Mittelwert und Standardabweichung der wichtigsten Merkmale

4 Diskussion

Computergestützte Bildanalyse eröffnet Möglichkeiten, die Entscheidungsfindung in der histologischen Diagnostik in objektiver und reproduzierbarer Weise zu unterstützen. Dennoch muß kritisch hinterfragt werden, inwieweit derartige Methoden in der pathologischen Praxis zur Anwendung kommen können. Die Lösung kann nur in schnellen, unkomplizierten und benutzerfreundlichen Aufnahme- und Auswertungssystemen liegen. Zudem gilt es in der Zukunft nachzuweisen, daß aus der verbesserten Diagnostik tatsächlich ein therapeutischer Nutzen für die Patienten folgt.

Literatur

[1] Bartels PH, Thompson D, Bartels HG, Montinori R, Scarpelli M, Hamilton PW : Machine Vision-based Histometry of Premalignant and Malignant Prostatic Lesions. Path Res Pract 1995;191:935-944

[2] Bibbo M, Kim DH, Pfeifer T, Dytch HE, Galera-Davidson H, Bartels PH: Histometric Features for the Grading of Prostatic Carcinoma. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 1991;13:61-68

[3] Irinopoulou T, Rigaut J, Benson M: Toward Objective Prognostic Grading of Prostatic Carcinoma Using Image Analysis. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 1993;15:341-344

[4] Komitowski DD, Janson CP: Quantitative Features of Chromatin Structure in the Prognosis of Breast Cancer. Cancer 1990;65:2725-2730

[5] Schultz DS, Harry T, Wong KL, Stilmant MM, Zahniser DJ, Hutchinson ML: Computer-Assisted Grading of Adenocarcinoma in Prostatic Aspirates. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 1990;12:91-97

[6] Coleman GB, Andrews HC: Image Segmentation and Clustering. Proc. IEEE 1976;67:773-785

[7] Serra J: Image Analysis and Mathematical Morphology. London, New York, Paris Academic Press 1982: 50-56

[8] MacAulay C, Palcic B (1990) An Edge Relocation Segmentation Algorithm. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 1990;12:165-171

[9] Komitowski DD, Zinser G: Quantitative Evaluation of Heterochromatin in Epihelial Atypia by an Image Processing Method. Pathology in Research and Practice 1985; 180:682-686

[10] Zinser G., Komitowski DD: Segmentation of Cell Nuclei in Tissue Section Analysis. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1983, 31:94-100