

Analyse von multimodalen Zellkerninformationen für eine frühe cytopathologische Krebsdiagnose

Thorsten Klein¹, Alexander Schega³, Paul Aschenborn⁴,
Dietrich Meyer-Ebrecht¹ und Alfred Böcking²

¹Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen, 52056 Aachen

²Institut für Cytopathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

³piCognition, Aachen

⁴Philips Medizin Systeme, Böblingen

Email: Thorsten.Klein@rwth-aachen.de

Zusammenfassung. In der Zytopathologie werden Informationen aus mikroskopischen Zellbildern für eine möglichst frühe Krebsdiagnostik eingesetzt. Die Diagnostik beruht auf verschiedenen Färbungen der Zellpräparate, die jeweils unterschiedliche Eigenschaften der Zellen hervorheben. Die hier vorgestellte Kombination und automatische Auswertung verschiedener Zellkernfärbungen ermöglicht eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit unter Verwendung von Bildverarbeitungsverfahren. Die Ergebnisse wurden manuell validiert. Die diagnostischen Parameter werden zur Zeit klinisch evaluiert.

1 Einleitung

Die Zytopathologie ist ein Teilgebiet der Pathologie, in dem Abstriche, Körperflüssigkeiten oder Punktate auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und dann unter dem Lichtmikroskop i.A. visuell subjektiv analysiert werden. Ziel der Analyse ist eine möglichst frühzeitige Krebsdiagnostik und Malignitätsgradbestimmung. Die Diagnostik beruht auf der Auswertung unterschiedlicher Färbungen der Zellpräparate, die nacheinander durchgeführt werden und zur Zeit unabhängig voneinander begutachtet werden. Eine visuelle Färbung stellt morphologische Merkmale der Zelle dar. Falls auf dieser Basis keine eindeutige Diagnose möglich ist, werden die Präparate entfärbt und einer neuen Präparation unterzogen. So kann zum Beispiel der DNA-Gehalt einer Zelle (DNA-Zytometrie [1]) in der Feulgen-Färbung nach einer manuellen Auswahl der Zellen automatisch per Computer bestimmt werden. Bei der Feulgenfärbung wird nur die DNA eingefärbt. Der in dieser Präparation bestimmte DNA-Gehalt einer Zelle ist ein Maß für Störungen der Chromosomenzahl pro Zellkern. In weiterhin zweifelhaften Fällen kann mit Hilfe einer dritten Kernfärbung, der Silbernitrat-Färbung, ein weiteres Merkmal, das direkt die Aktivität der Eiweiß-Synthese abbildet, dargestellt werden. Die betreffenden Zellkernregionen (aktive Nukleolus-organisierende Regionen (AgNOR) [2]) werden in dieser Färbung dunkel gefärbt. Ihre manuell bestimmte Anzahl dient ebenfalls als diagnostisches Merkmal.

2 Stand der Forschung

In dem Forschungsprojekt der Multimodalen Zellanalyse [3] wurde ein System entwickelt, das dem Mediziner ermöglicht, die Zellen in den verschiedenen Färbungen zu repositionieren und mit Hilfe von Bildverarbeitungsverfahren subpixelgenau zu koregistrieren. Dadurch können für ein und dieselbe Zelle alle Merkmale kombiniert betrachtet werden. Dieses Vorgehen ermöglicht eine genauere Diagnose, d.h. Fehleinschätzungen werden verringert, da nicht wie bisher alle Färbungen unabhängig von einander analysiert werden. Einer der Analyseschritte, die DNA-Zytometrie, stellt ein Verfahren dar, das in der klinischen Praxis bereits an vielen Stellen zum Einsatz kommt.

Darüber hinaus sind in den verschiedenen Präparationen zusätzliche Informationen enthalten, die durch eine rein visuelle Auswertung durch den Pathologen nicht hinreichend reproduzierbar ermittelt werden können. So ist zum Beispiel die Größe der Nukleolen oder der AgNORs und die Verteilung der DNA diagnostisch relevant. Für diese quantitativen Merkmale gibt es zu Zeit noch keine automatischen und reproduzierbaren Messmethoden zur Unterstützung der Pathologen.

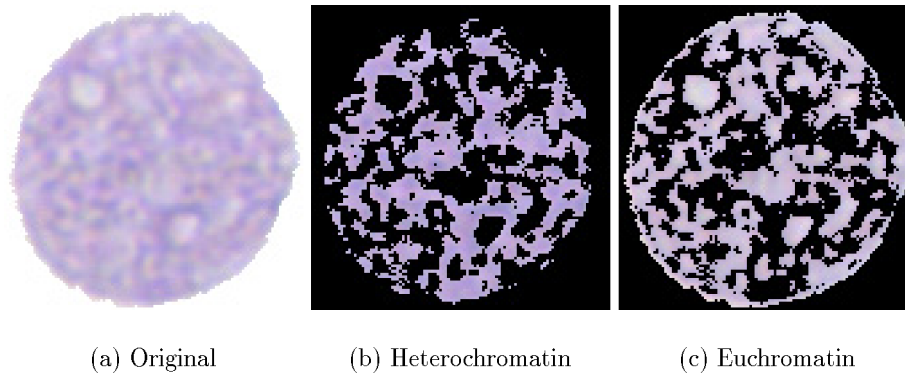
3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

Durch die Repositionierung und subpixelgenaue Koregistrierung der einzelnen Zellen wird es möglich [4], die Informationen aus den verschiedenen Färbungen zu kombinieren. Für die Feulgenfärbung wurde erstmals zusätzlich zur bekannten DNA-Zytometrie eine automatische Detektion und Analyse der Nukleolen innerhalb des Zellkernes entwickelt. Diese Detektion setzt eine Auswertung der Chromatinstruktur (Verteilung der DNA innerhalb des Zellkernes) voraus. Auch für diese Problemstellung konnte ein stabiles Verfahren entworfen werden. Die Information über die Nukleolen wiederum wird in der Silbernitrat-Färbung zur Klassifikation der AgNORs eingesetzt. Darüber hinaus können nun erstmals die AgNORs automatisch detektiert, gezählt und vermessen werden. Mit Hilfe der vorgestellten Methoden kann der Pathologe jetzt auf weitere diagnostisch relevante, stabil und reproduzierbar ermittelte quantitative Informationen zurückgreifen.

4 Methoden und Ergebnisse

4.1 Trennung der Chromatingruppen

Als Grundlage für die Analyse der Feulgenfärbung muss eine Trennung von Hetero- und Euchromatin (spiralisierte und entspiralisierte DNA) durchgeführt werden. Bei der Feulgenfärbung lagert sich ein Farbstoff an der DNA stöchiometrisch an. Als Folge davon wird das Heterochromatin dunkel eingefärbt. Diese Tatsache kann man für eine Trennung der beiden Gruppen ausnutzen.

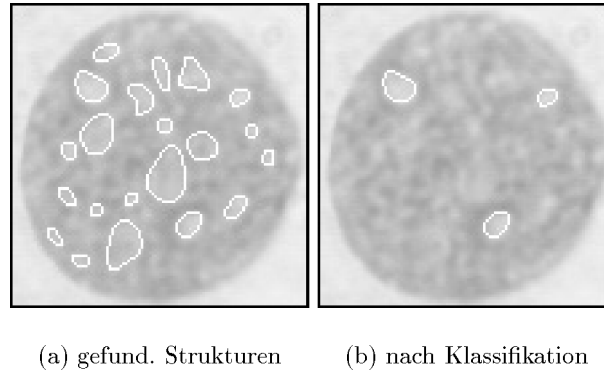
Abb. 1. Zellkern in Feulgenfärbung

Als ein erster Schritt wird eine Grauwerttransformation aus einer Kombination der einzelnen Farbkanäle der ursprünglichen Mikroskopaufnahmen durchgeführt. Grundsätzlich haben sich hierfür zwei Darstellungsformen als geeignet erwiesen. Zum einen eine gewichtete Kombination der Einzelkanäle nach einer Farbraumtransformation vom RGB- in den HSV-Farbraum. Gerade die Farbsättigung enthält für diese Problemstellung entscheidende Information. Zum Zweiten erwies sich eine Berechnung einer optischen Dichte (diese wird u.a. auch für die DNA-Bildzytometrie genutzt) und ihre geeignete Grauwertrepräsentation als tauglich.

Auf Basis dieses Grauwertbildes wird anschließend ein Distanzmaß berechnet, mit dessen Hilfe eine robuste Unterscheidung in Eu- und Heterochromatin möglich ist. Abbildung 1 zeigt das Originalbild mit den berechneten Chromatingroupen.

4.2 Detektion der Nukleolen

Bei der Detektion der Nukleolen handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess aus Detektion, Segmentierung und Klassifikation. Die Detektion der meist kreisähnlichen Strukturen wird mit Hilfe einer Hough-Transformation realisiert. Die Kombination mit einer anschließenden Segmentierung mittels aktiver Konturen führt zu einer scharfen Repräsentation in Frage kommender Bildstrukturen. Da auf diesem Wege zunächst deutlich mehr Strukturen markiert werden, bei denen es sich nicht ausschließlich um Nukleolen handelt, wird außerdem eine nachgeschaltete Klassifikation nötig. Dazu werden verschiedene visuelle Merkmale (Rundheit, Varianz, Größe) berechnet und derart kombiniert, dass eine Fehler-rate in der Klassifikation von unter 3% erreicht wird. Zur Ermittlung der optimalen Kombination wurde auf das Modell der neuronalen Netze zurückgegriffen, mit dem die benötigten Merkmals-Gewichtungen mittels eines Backpropagation-Ansatzes bestimmt wurden. Die Ergebnisse wurden manuell validiert.

Abb. 2. Detektion der Nukleolen

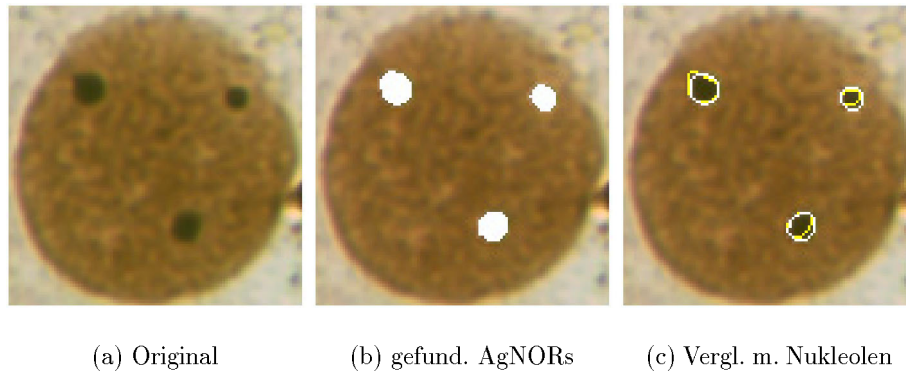
4.3 Kombination der Ergebnisse

Innerhalb der Nukleolen befindet sich RNA, die in der Feulgenfärbung nicht angefärbt wird. Daher werden diese Strukturen bei der Trennung der Chromatinarten als Euchromatin erkannt. Die Ergebnisse der Nukleolendetektion müssen also als Korrektiv in der Chromatingruppentrennung berücksichtigt werden. Auf Basis der erkannten Strukturen werden dann verschiedene Maßzahlen für das Chromatin des restlichen Zellkernes berechnet (durchschnittliche Größe, Verteilungshistogramme). Wie weiter oben bereits erwähnt wurde, werden die gefundenen Nukleolen außerdem in der AgNOR-Analyse verwendet.

4.4 Automatische AgNOR-Analyse

Mit Hilfe der Silbernitrat-Färbung werden die AgNORs automatisch detektiert. Hierbei wird nach einer Grauwerttransformation wiederum auf Basis des HSV-Farbraumes ein Kantenbild berechnet. Dieses Kantenbild liefert die Grundlage für Profillinienscans, die Punkte für mögliche AgNORs ermitteln. Ausgehend von diesen Startpunkten wird ein pixelbasiertes Regionenwachstum durchgeführt. Die gefundenen Regionen werden dann nach statistischen Merkmalen (Grauwertmittel, usw.) klassifiziert. Anschließend werden die AgNORs mit Hilfe der Nukleolen aus der vorherigen Feulgen-Färbung in Satelliten und Cluster unterschieden. Bei einem Satelliten handelt es sich um ein einzelnes AgNOR, während Cluster aus einer Agglomeration von AgNORs bestehen, die in der Feulgenfärbung als korrespondierenden Nukleolus sichtbar sind (siehe Abbildung 3). Sollte keine entsprechende Nukleoleninformation vorhanden sein, werden mit einem Distanz- und Größenmaß die Cluster detektiert. Diese Informationen ermöglichen eine automatische Bestimmung der Zahl und Größe der AgNORs pro Zellkern. Bisher dient nur die Anzahl der AgNORs als diagnostisches Merkmal, aber gerade die Größe verspricht einen entscheidenden diagnostischen Mehrwert zu liefern.

Die Ergebnisse wurden anschließend bezüglich der Zahl der AgNORs gegen manuell ausgezählten Ergebnisse validiert. Da die AgNORs innerhalb des Zellkernes

Abb. 3. Ergebnis der AgNOR-Analyse

auch in der zur Bildebene orthogonalen Z-Richtung verteilt liegen, wurden die Analyseschritte zusätzlich auf Fokussereien der Zellkerne übertragen.

5 Diskussion

Die automatisch berechneten Merkmale aus den unterschiedlichen Färbungen und ihre Kombination stellen einen diagnostischen Gewinn für den Pathologen dar. So kann zum Beispiel mit Hilfe der Größeninformation der AgNORs sicher zwischen Adenomen und Karzinomen der Schilddrüse unterschieden werden. Die Größeninformation der Nukleolen wird zur Zeit noch nicht diagnostisch verwertet. Es ist aber zu erwarten, dass auch sie diagnostisch relevant ist und unter Umständen eine zusätzliche Silbernitrat-Färbung überflüssig macht. Die Verteilung und Analyse der Chromatinstrukturen muss in Zukunft hinsichtlich ihrer diagnostischen Relevanz untersucht werden. Es ist aber diagnostisch nachgewiesen, dass eine Tumorerkrankung auch in dem umliegenden Gewebe eine Veränderung der Chromatinstrukturen hervorruft (malignancy associated changes). Bisher fehlt allerdings eine Möglichkeit diese Veränderungen darzustellen.

Das Projekt wird vom Viktor-und-Mirka-Pollak-Fonds unterstützt.

Literaturverzeichnis

1. Böcking A, et al. Consensus report for the ESACP task force on standardisation of diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 1995.
2. Rüschoff J. Nukleolus Organisierende Regionen (NORs) in der Pathomorphologischen Tumordiagnostik. Gustav Fischer; 1992.
3. Böcking A, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D. Towards a single cell cancer diagnosis. Multimodal and Monocellular Measurements of Markers and Morphology (5M). *Cellular Oncology* 2004.
4. Würflinger T, et al. Automatic Coregistration, Segmentation and Classification for Multimodal Cytopathology. In: *MIE*; 2003.