

Analyse der Kernstrukturen in zytopathologischen Mikroskopbildern

Thorsten Klein¹, Alexander Schega¹, Dietrich Meyer-Ebrecht¹
und Alfred Böcking²

¹Lehrstuhl für Messtechnik und Bildverarbeitung,
RWTH Aachen, 52056 Aachen

²Institut für Cytopathologie,
Heinrich-Heine-Universität, 40255 Düsseldorf
Email: klein@lfm.rwth-aachen.de
Internet: www.lfm.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Die Zytopathologie versucht mit Hilfe von mikroskopischen Zellbildern Krebs in einem möglichst frühen Stadium zu erkennen. Dazu werden verschiedene Färbungen der Zellen mit speziellen etablierten Analyseverfahren eingesetzt. Ziel dieser Arbeit ist eine Kombination von verschiedenen Merkmalen einzelner Zellen und die damit verbundene Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit. Es werden mit Hilfe verschiedener Verfahren der Bildverarbeitung weitere Merkmale aus den Mikroskopbildern extrahiert.

1 Einleitung

Die Zytopathologie ist ein Teilgebiet der Pathologie, in dem Abstriche, Körperflüssigkeiten oder Punktate auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und dann unter dem Lichtmikroskop visuell subjektiv analysiert werden. Ziel der Analyse ist eine möglichst frühe Tumordiagnostik. Bei einem neuartigen Ansatz, der multimodalen Zellanalyse (MMCA) erfolgt die Analyse in einen mehrstufigen Prozess. Die Präparate werden nacheinander in verschiedenen Färbungen betrachtet, die jeweils unterschiedliche Merkmale der Zellen darstellen. In der konventionellen Färbung (PAP- oder MGG-Färbung) können morphologische Merkmale der Zelle dargestellt werden. Falls damit keine eindeutige Diagnose möglich ist, werden die Präparate entfärbt und mit einer anderen Färbung wieder eingefärbt. So kann zum Beispiel der DNA-Gehalt einer Zelle (DNA-Zytometrie) in der Feulgen-Färbung nach einer manuellen Auswahl der Zellen automatisch mit Hilfe des Computers bestimmt werden. Bei der Feulgenfärbung wird nur das Erbmaterial (DNA) eingefärbt. Der bestimmte DNA-Gehalt ist ein Maß für eine gestörte chromosomale Ausstattung des Zellkerns und dient so zur Krebsdiagnose. Mit der Feulgen-Färbung werden weitere Merkmale (Chromatinmuster) der Zellkerne sichtbar, die zur Zeit nur subjektiv analysiert und befundet werden können. In diagnostisch zweifelhaften Fällen kann mit Hilfe der AgNOR-Färbung als weiteres Merkmal die Aktivität der Eiweiß-Synthese

dargestellt werden. Die speziellen Regionen (aktive Nukleus Organisierende Regionen (NOR)) werden durch diese Silbernitrat-Färbung dunkel gefärbt. Ihre Anzahl und Verteilung wird derzeit rein visuell durch die Ärzte interpretiert.

2 Stand der Forschung

In dem Projekt der Multimodalen Zellanalyse wurde ein System entwickelt, das dem Mediziner ermöglicht, die Zellen nach Durchführung verschiedener Färbungen zu repositionieren und mit Hilfe von Bildverarbeitungsroutrinen subpixelgenau zu koregistrieren [3]. Hierdurch können für eine Zelle viele verschiedene Merkmale kombiniert betrachtet werden. Es ist dadurch eine bessere Diagnose möglich, da nicht - wie bisher - alle Färbungen unabhängig von einander analysiert werden. Ein Teil der Analyse ist die DNA-Zytometrie, welche als anerkanntes Verfahren bereits in vielen Instituten eingesetzt wird. Die weiteren Merkmale (z.B. Nukleolen), die nach einer Feulgenfärbung sichtbar werden, werden zur Zeit noch nicht für die weitere Diagnose genutzt. Es ist aber bekannt, dass gerade die Verteilung des Erbmaterials innerhalb des Zellkernes weitere Diagnosemöglichkeiten bietet. Die herkömmlichen Färbungen und die AgNOR-Färbung werden derzeit rein subjektiv, ohne weitere quantitative, computergestützte Hilfe ausgewertet.

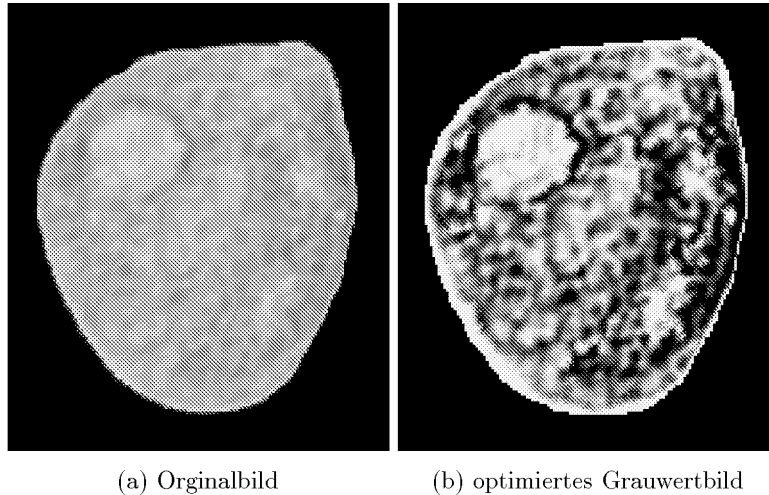
3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

Der Einsatz eines Bildverarbeitungssystem ermöglicht eine computergestützte Befundung von Zellen. Nach der Feulgenfärbung kann eine Unterscheidung von genetisch aktiver und inaktiver DNA innerhalb des Zellkernes durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Berechnung weiterer Merkmale (z.B. Größe, Verteilung der DNA, etc.) und führt ggf. zu einer Verbesserung der Diagnose. Des Weiteren werden erkannte mikroskopische Strukturen, wie z.B. die Nukleolen, gespeichert und für die Analyse nachfolgender Färbungen mit genutzt. Es ist bekannt, dass innerhalb der Nukleolen die NORs liegen können, die erst nach einer Silbernitrat-Färbung sichtbar werden. Eine Kombination dieser Merkmale ermöglicht wahrscheinlich eine Verbesserung der Diagnosen und stellt einen ersten Ansatz zu einer automatischen Auswertung dar wie z.B. der automatischen Bestimmung der AgNOR's.

4 Methoden und Ergebnisse

4.1 Vorverarbeitung

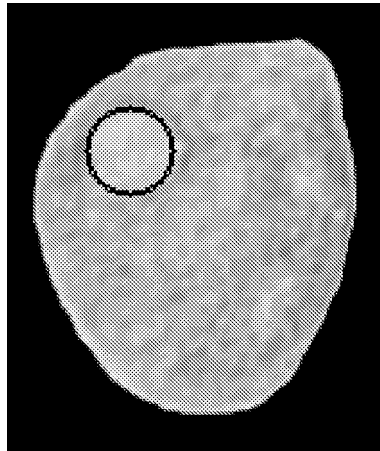
Die Mikroskopaufnahmen liegen im RBG-Format vor (siehe Abb. 1a). Als erster Schritt wurde eine geeignete Grauwerttransformation entwickelt, die den Kontrast der ursprünglichen Bilder optimiert. Innerhalb eines Präparates gibt es technisch bedingte Schwankungen, sodass die Grauwerttransformation adaptiv für jedes Bild durchgeführt werden muss. Es hat sich gezeigt, dass dazu der

Abb. 1. Grauwerttransformation

Blaukanal kaum relevante Informationen liefert. Zunächst wird eine lineare Grauwerttransformation des Rot- und Grünkanals durchgeführt. Anschließend werden die annähernd homogenen Regionen in dem resultierenden Bild mit Hilfe einer Wasserscheidentransformation extrahiert. Für jede dieser Regionen wird der entsprechende Kanal aus dem ursprünglichen Bild verwendet, der den größten Kontrast bietet. Die Kontrastbestimmung wird mit einem einfachen Sobeloperator durchgeführt. Auf dem so berechneten Ergebnisbild wird im Anschluß noch eine Histogrammequalisierung durchgeführt (siehe Abb. 1b).

4.2 Detektion der Nukleolen

Die Nukleolen im Zellkern enthalten RNA, die bei Feulgenfärbung nicht gefärbt wird. Die Lage, Größe und Anzahl der Nukleolen sind diagnostische Merkmale für die Krebserkennung. In den Bildern zeichnen sich Nukleolen durch eine meist runde Struktur aus. Sie sind innen relativ homogen hell und durch einen dunklen Rand begrenzt. Es kann vorkommen, dass dieser dunkle Rand nicht komplett den Nukleolus umschließt. Da die Größe der Nukleolen stark variiert, ist ihre Detektion ein zweistufiger Prozess. Es werden zuerst mit Hilfe einer Hough-Transformation die Startkonturen für eine spätere Segmentierung unter Verwendung aktiver Konturen ermittelt. Die Ergebnisse der Hough-Transformation (gefundene Kreisstrukturen) werden durch Einbeziehung von statistischen Merkmalen (Verteilung der Grauwerte, Untersuchung auf dunklen Rand) auf die tatsächlichen Nukleolen reduziert. Die so gefundenen Kreisstrukturen dienen als Initialkontur für eine Segmentierung der Nukleolen mit Hilfe aktiver Konturen (siehe Abb. 2).

Abb. 2. detektierter Nukleolus

4.3 Trennung von Eu- und Heterochromatin

In einen weiteren Schritt wird ausgehend vom vorher berechneten Grauwertbild (siehe Abb. 1b) eine Trennung zwischen aktiver und passiver DNA berechnet. Die aktive DNA erscheint im Bild heller, da sie entspiralisiert vorliegt und somit die Dichte der Farbstoffe geringer ist. Die Trennung wird mit Hilfe einer modifizierten Wasserscheidentransformation [1] durchgeführt, wobei die Ergebnisse der Nukleolendetektion hier mit einfließen. Nach erfolgreicher Trennung können verschiedene Merkmale der Chromatinstruktur berechnet werden. So erhält der Pathologe objektive, reproduzierbare Ergebnisse über die Verteilung in Eu- und Heterochromatin über die Größe bzw. Granularität der einzelnen Bereiche. Diese Zusatzinformationen unterstützen die Diagnose.

4.4 AgNOR-Analyse

Die AgNORs [2] können über den gesamten Zellkern verteilt liegen; der Pathologe unterscheidet so genannte Cluster und Satelliten. Die AgNORs innerhalb der Nukleolen sind die Cluster. Zur Zeit werden nur die Summe der Cluster und Satelliten für die Diagnose verwendet. Mit Hilfe der gefundenen Nukleolen wird die Zuordnung der AgNORs zu den Clustern für den Beobachter vereinfacht. Die AgNORs können in der automatischen AgNOR-Analyse genau vermessen werden. Damit wurden weitere genauere Informationen über die Größe, Anzahl und Art der AgNORs innerhalb eines Zellkernes darstellbar.

5 Diskussion

Mit Hilfe der gefunden Strukturen im Zellkern wurde eine Basis geschaffen, verschiedene weitere Analyseschritte zu vereinfachen oder zu automatisieren. Die

Darstellung der Nukleolen innerhalb der AgNOR-Färbung erleichtert dem Mediziner die Interpretation der Bilddaten. Die multimodalen Merkmale der Zellkerne dienen als Zusatzinformation für eine Klassifizierung der Zellen, die direkt in die Diagnose integriert werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Rodenacker K und Bengtson E: A feature set for cytometry on digitized microscopic images. *Analytical Cellular Pathology*, 2003.
2. Rüschoff J: Nukleolus Organisierende Regionen (NORs) in der Pathomorphologischen Tumordisgnostik. Gustav Fischer Verlag, 1992.
3. Würflinger T, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D, Böcking A: Automatic Coregistration, Segmentation, and Classification for Multimodal Cytopathology MIE 2003, Proceedings of the Medical Informatics Europe '03 Conference, St. Malo, France, 2003