

Digitale Bildanalyse ermöglicht neue Methoden der Krebsdiagnostik



Über 200.000 Todesfälle werden jährlich allein in Deutschland durch Krebs verursacht. Dies ist ein Appell an die Forschung, verstärkt an zuverlässigeren Früherkennungsmethoden zu arbeiten. Denn die Chancen für eine langfristige Heilung sind umso höher, je früher therapeutisch eingegriffen wird. Im Frühstadium zeigt eine bösartige Tumorerkrankung jedoch selten deutlich sichtbare oder spürbare Symptome. Präventive Untersuchungsprogramme sind deshalb eine unabdingbare Voraussetzung für eine wirksame Vorsorge. Daher sind wirtschaftlich einsetzbare Diagnoseverfahren gefragt, die ohne belastende Untersuchungen auskommen und eine hohe diagnostische Treffsicherheit garantieren. Ein interdisziplinäres Team am Lehrstuhl für Bildverarbeitung verfolgt dieses Ziel in enger Zusammenarbeit mit Cytopathologen der Universität Düsseldorf.

Für eine frühe Krebsdiagnostik sind Zelle und Zellkern aufschlussreicher als eine Diagnostik an Gewebeschnitten oder Organabbildungen. Krebs entsteht in einzelnen Zellen nach

einer Reihe von Transformationen des Erbgutes, der DNS, die unter anderem zu einer pathologisch gesteigerten Zellteilungsrate sowie zur Störung des Gleichgewichtes zwischen Zellteilung und Zelltod führen. Die Zytopathologie verfügt über eine Vielzahl von Analysemethoden, um in mikroskopischen Präparaten Tumorzellen und deren Vorstufen zu entdecken und bezüglich des Tumortyps zu klassifizieren. Analysiert werden hier nicht nur die Form des Zellkerns und des ihn umgebenden Zytoplasmas, sondern auch Zellkerneigenschaften wie DNS-Gehalt, Chromatinmuster oder das Vorhandensein bestimmter Kernproteine. Hinzu kommen so genannte immunzytochemische Marker, die das Auftreten von für den Tumortyp spezifischen Proteinen signalisieren. Mit diesen Methoden können bösartige Tumore auf Zell- und Zellkernebene um Monate bis Jahre früher als mit allen anderen Methoden entdeckt und oft auch präzise bezüglich der notwendigen Therapiemaßnahmen eingeordnet werden. Die Gewinnung zytologischer Präparate ist zudem kaum mit Unannehmlichkeiten, Schmerzen oder gar den Risiken eines blutigen Eingriffs verbunden: Untersuchungsmaterial wird mittels Abstrichen von Schleimhäuten, als Sediment aus Körperflüssigkeiten oder als

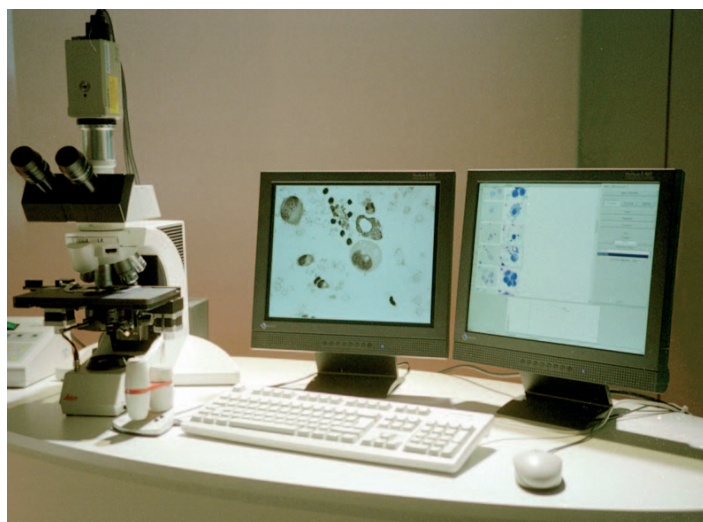
Punktat mit einer sehr feinen Nadel aus den inneren Organen gewonnen.

Die zytopathologische Diagnostik stützt sich heute weitgehend auf eine visuelle Inspektion der Zellpräparate unter dem Mikroskop. Hierfür ist ein langjähriges Training erforderlich. Für breit angelegte Vorsorgeprogramme steht derart geschultes Fachpersonal jedoch nicht im ausreichenden Umfang zur Verfügung. Ziel unserer Arbeit ist es deshalb, ein maschinelles, digitales Bildauswerteverfahren zur quantitativen Zellanalyse zu entwickeln, das diese Lücke schließen kann. Ein weiterer positiver Effekt für die diagnostische Qualität ist, dass quantitative Verfahren in ihrer Interpretation weit weniger inter- und intraindividuellen Schwankungen unterworfen sind als eine rein visuelle, subjektive Bildinspektion.

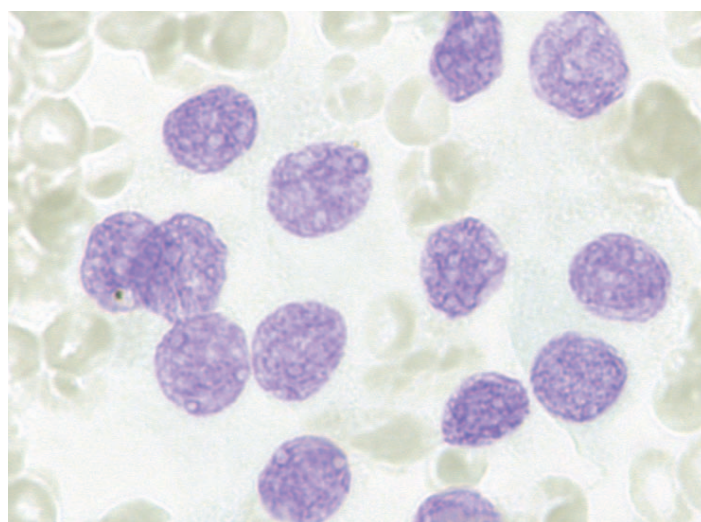
Diesen Weg geht ein schon über Jahre bekanntes Verfahren, das jetzt mit moderner Bildverarbeitungstechnik und verbesserten Algorithmen – vor allem als Kernelement der unten beschriebenen Multimodalen Zellanalyse – an Bedeutung gewinnt: die DNS-Bildzytometrie, Bild 1. Als Indikator für die Transformation zu einer Krebszelle dient der DNS-Gehalt im Zellkern. Belegt wird die Kausalität zwischen Veränderungen des DNS-Gehaltes und bösarti-

ger Entartung einer Zelle durch neuere zellbiologische Forschungsarbeiten. Digitale Mikroskopbildverarbeitung macht den DNS-Gehalt messbar: Der auf den Objektträger aufgebrauchte Zellabstrich wird mit einem Farbstoff, der Feulgen-Färbung, eingefärbt, der sich an die DNS anlagert, Bild 2. Die Farbstoffmenge ist hierbei proportional zum DNS-Gehalt. In digitalisierten Mikroskopbildern werden nun die Zellkerne automatisch segmentiert, siehe Bild 3, und anschließend die integrale optische Dichte der Feulgen-Färbung innerhalb der so gefundenen Zellkernfläche gemessen. Sie liefert nach geeigneten Normierungs- und Korrekturschritten ein zuverlässiges Maß für den DNS-Gehalt. An die Stelle einer subjektiven Beurteilung des starken Variations unterworfenen Erscheinungsbildes der Zellen tritt jetzt die Beurteilung einer Messkurve, die die Häufigkeitsverteilung des über mehrere hundert Zellen ermittelten DNS-Gehaltes wiedergibt. Für eine Entscheidung zwischen unauffälligem, auffälligem und positivem Befund werden standardisierte Grenzwerte vorgegeben.

Computergestützte Messverfahren lösen allerdings eine grundsätzliche Problematik der Präventivdiagnostik noch nicht, wie ein Zahlenbeispiel aus der Gebärmutterhalskrebs-Vorsorge

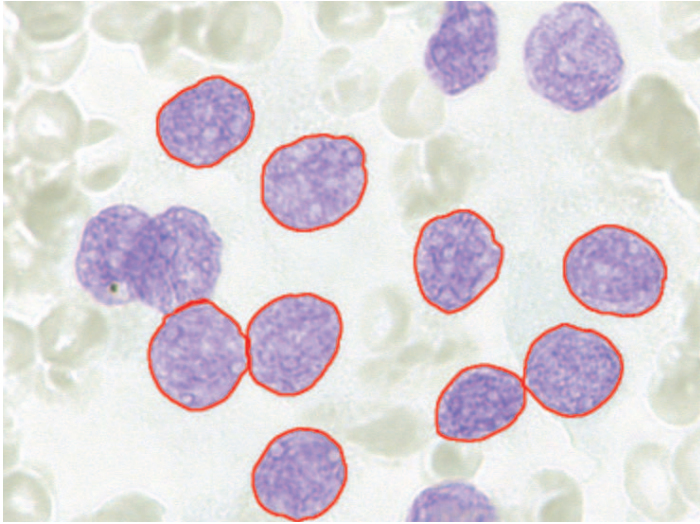


*Bild 1:
Prototyp des Arbeitsplatzes zur
Multimodalen Zellanalyse im Lehrstuhl
für Bildverarbeitung.*

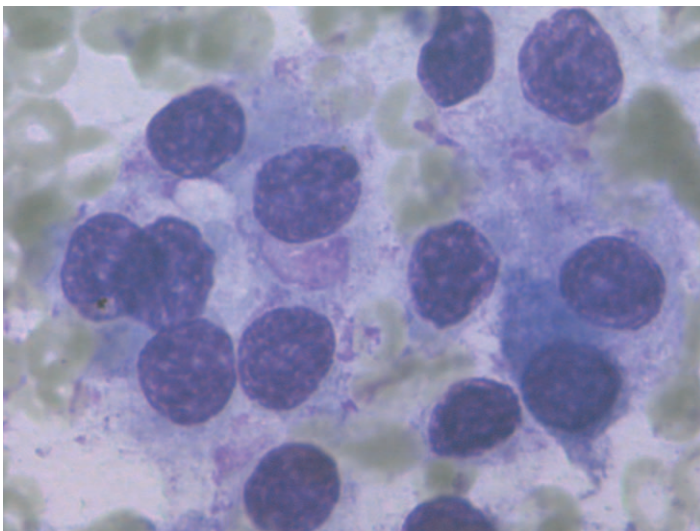


*Bild 2:
Zellen aus einem follikulären Karzinom
der Schilddrüse in Feulgen-Färbung,
deren Kerne in Abhängigkeit von ihrem
DNS-Gehalt bläulich erscheinen.*

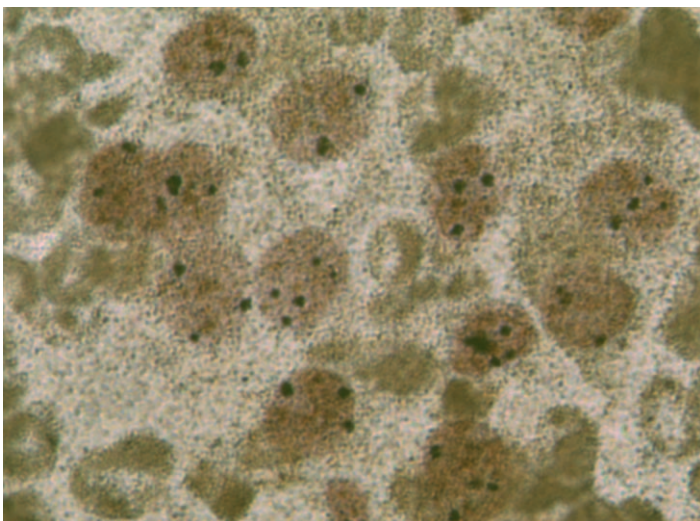
Computergestützte Zytopathologie liefert frühzeitige und treffsichere Diagnosen



*Bild 3:
Zellen aus Bild 2 mit rot ein-
gezeichneter Berandung der
automatisch segmentierten
Zellkerne.*



*Bild 4:
Zellen aus Bild 2, hier jedoch
in sogenannter MGG-Färbung,
die Formeigenschaften dar-
stellt. Die Zellkerne erscheinen
dunkelblau, und das umgeben-
de Zytoplasma hellblau.*



*Bild 5:
Zellen aus Bild 2 in der Silber-Färbung,
die sich an spezielle Kernproteine an-
lagert. Das Zytoplasma erscheint hell-
braun und die Zellkerne dunkelbraun.*

verdeutlicht: Für die Treffsicherheit wird eine Sensitivität von maximal 80 Prozent und eine Spezifität von bis zu 98,8 Prozent angegeben. Die Sensitivität bezeichnet hierbei den Prozentsatz von den tatsächlich vorhandenen Erkrankungsfällen, die von dem Diagnoseverfahren erkannt werden. Umgekehrt steht die Spezifität für den Anteil der tatsächlich gesunden Frauen, die als solche diagnostiziert werden. Für Gebärmutterhalskrebs wird in Deutschland eine Inzidenz von jährlich 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen genannt. Bei 100.000 Untersuchungen würden bei einer 80-prozentigen Sensitivität zwölf der 15 Neuerkrankungen entdeckt, drei dagegen übersehen. Andererseits wird bei 1,2 Prozent oder rund 1.200 der untersuchten gesunden Frauen fälschlich eine Erkrankung diagnostiziert. Dadurch werden Ängste geweckt, Nachuntersuchungen mit weiteren Arztbesuchen der Patientin sind erforderlich und möglicherweise kommt es sogar zu unnötigen operativen Eingriffen. Für die Vorsorgediagnostik sind diese Folgen einer unzureichenden Spezifität ein wesentliches Hindernis.

Sensitivität und Spezifität eines Diagnoseverfahrens sind gegenläufig miteinander verknüpft. Sollen möglichst alle Er-

krankungen durch Vorgabe geeigneter, enger Grenzwerte erkannt werden, würde das Diagnoseverfahren dadurch sensibler aber gleichzeitig weniger spezifisch. Das heißt, die Anzahl der fälschlich als erkrankt diagnostizierten Personen würde steigen. Umgekehrt werden Diagnoseverfahren weniger sensitiv, wenn die Spezifität durch Vorgabe weniger enger Grenzwerte erhöht wird. Aus diesem Dilemma helfen nur zuverlässigere Diagnoseverfahren, also die Verbindung einer hohen Sensitivität mit einer annähernd 100-prozentigen Spezifität. Kein Diagnoseverfahren genügt allein für sich diesem Anspruch. Bei unsicheren Befunden werden deshalb weitere Verfahren hinzugezogen, so genannte adjuvante Verfahren, die komplementäre Informationen hinzufügen, indem das Untersuchungsmaterial mit unterschiedlichen Farbstoffen oder immunzytochemischen Markern präpariert wird. So kann beispielsweise nach einer morphologischen Färbung, Bild 4, eine Feulgen-Färbung

für die DNS-Zytometrie, Bild 2, erfolgen oder eine Silbernitrat-Färbung, Bild 5, für eine Analyse signifikanter Kernproteine, die Indikatoren für die Zellteilungsaktivität sind.

Der Schlüssel zu einer höheren diagnostischen Zuverlässigkeit liegt also in der Zusammenführung sich ergänzender Analysen. Eine bisher nicht erreichte Treffsicherheit kann erzielt werden, wenn die Analyseergebnisse jeder der eingesetzten Färbungen oder Markerbehandlungen darüber hinaus auf individuelle Zellen bezogen werden können, Bild 6, anstatt lediglich pauschal für ein Zellkollektiv oder gar für unterschiedliche Präparate erhoben zu werden. Das Forschungsprojekt Multimodale Zellanalyse (MMZA) konnte zeigen, dass dies durch Nutzung speziell entwickelter Bildverarbeitungsverfahren realisierbar ist. Dazu wird ein Präparat wiederholt entfärbt und erneut präpariert. Da die Zellen gut am Objektträger fixiert sind, können bereits in einer ersten Färbung analysierte Zellen

bei der Folgeanalyse in anderer Färbung durch das computergesteuerte Mikroskop, Bild 1, wieder angefahren werden. Ein komplexer automatisierter Rechenprozess bringt die umgefärbten Zellkerne, deren Durchmesser bei acht bis zehn Mikrometer liegt, bildpunktgenau zur Deckung. Es zeigte sich, dass beispielsweise bei Schilddrüsenzellpräparaten Tumorzellen durch zwei aufeinander folgende Analysen in verschiedenen Färbungen sicher entdeckt werden. Ein dritter Analyseschritt erlaubt erstmalig, diese Tumorzellen vor einem invasiven Eingriff in gutartige und bösartige Tumore zu differenzieren. Das ist ein unschätzbare Vorteil, denn im ersten Fall ist auf diese Weise eine operative Entfernung der Schilddrüse vermeidbar.

Dieses Verfahren erscheint zunächst aufwändig. Jedoch sorgt die schrittweise Einengung des Unsicherheitsbereiches für die nötige Effizienz. Die Grenzwerte für den Abbruch der Analyse werden auf jeder Stufe so gesetzt, dass die

Sensitivität ausreichend hoch ist. Zwischen „sicher-krebsnegativ“ und „sicher-krebspositiv“ verbleibt eine Zone von Präparaten mit verdächtigen Zellen. Nur diese müssen weiteren Färbungen und Bildanalyse-schritten unterzogen werden, Bild 7. Der Aufwand für Folgeanalysen hält sich so in Grenzen, auch wenn im ersten Schritt die Sensitivität zu Lasten der Spezifität hoch getrieben werden muss, um das Restrisiko eines übersehenen Befundes zu minimieren. Im Verband ebendiese Maßnahmen den Weg für eine verantwortbare und bezahlbare bildverarbeitungs-gestützte Krebsfrühdagnostik. Das Forschungsprojekt Multimodale Zellanalyse (MMZA) wird durch den Viktor-und-Mirka-Pollak-Fond für biomedizinische Technik gefördert.

Autoren:
 Univ.-Prof. Dr.-Ing. Til Aach ist Inhaber des Lehrstuhls für Bildverarbeitung. Dipl.-Ing. André Bell ist Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bildverarbeitung. Prof. Dr. med. Alfred Böcking ist Direktor des Instituts für Cytopathologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Univ.-Prof. i.R. Dr.-Ing. Dietrich Meyer-Ebrecht war Leiter des Lehrstuhls für Bildverarbeitung. Dipl.-Inf. Timna Schneider und Dipl.-Inf. Thomas Würflinger sind Wissenschaftliche Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bildverarbeitung.

<http://www.lfb.rwth-aachen.de/mmza>

10

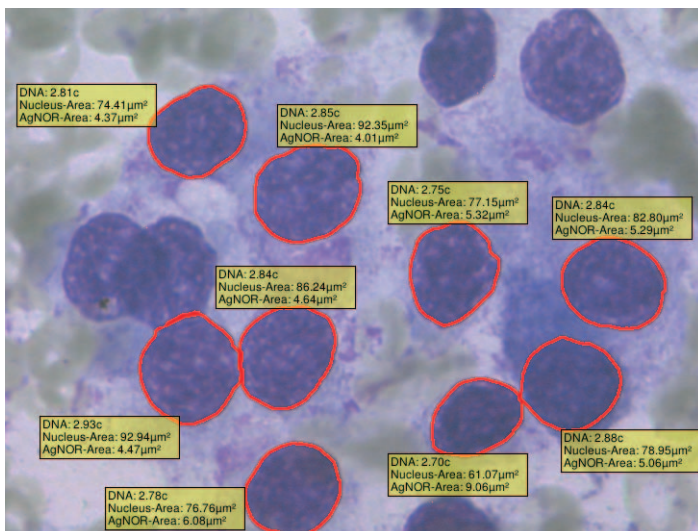


Bild 6: Ergebnisse der DNS-Messung aus Bild 3 und der Kernprotein-Analyse aus Bild 5, zusammengefasst an identischen Zellen.

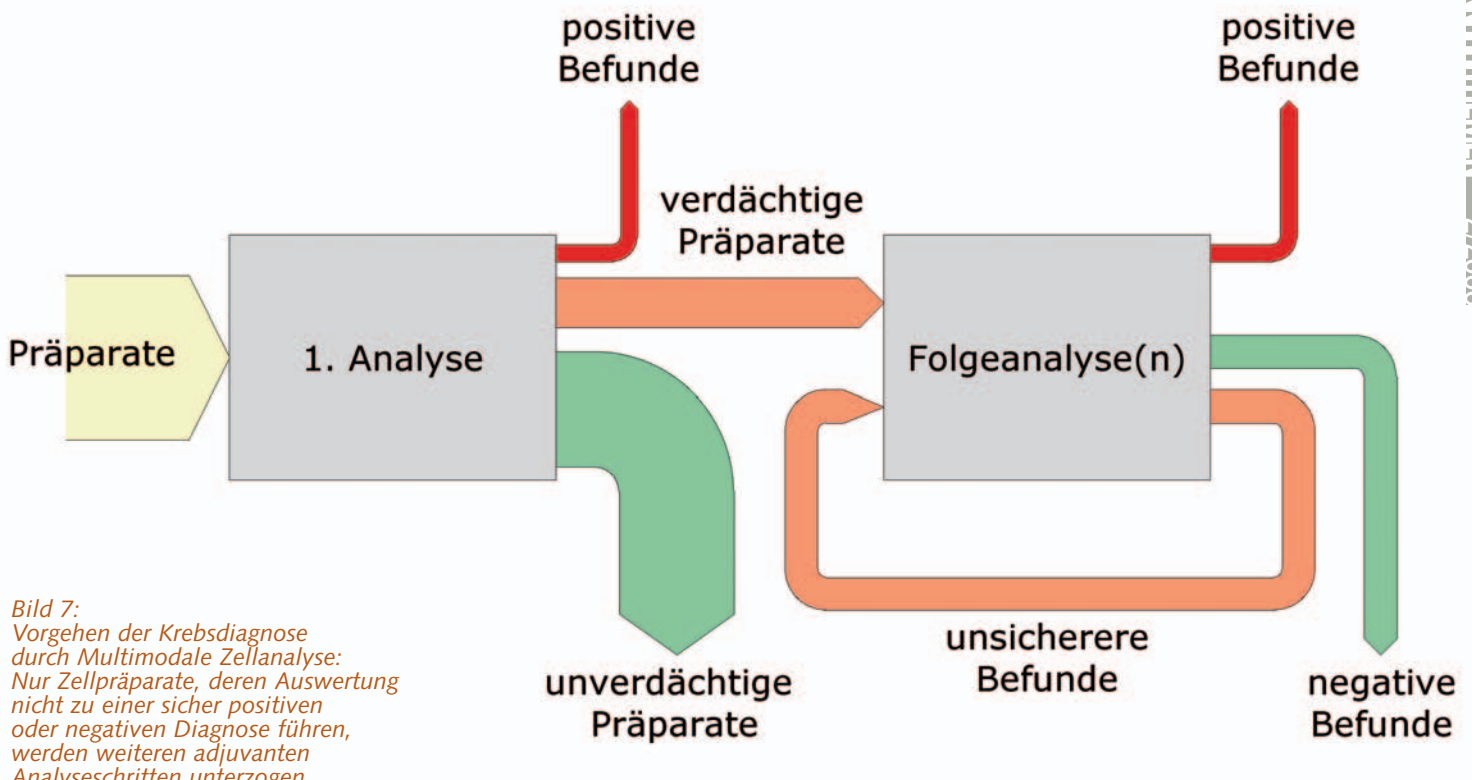


Bild 7:
Vorgehen der Krebsdiagnose durch Multimodale Zellanalyse:
Nur Zellpräparate, deren Auswertung nicht zu einer sicher positiven oder negativen Diagnose führen, werden weiteren adjunktiven Analyseschritten unterzogen.

Anzeige



DER EIGENE WEG

Sie sind

Mediziner, promovierte Naturwissenschaftler oder Diplom-Kaufleute (m/w)

und **Sie suchen** breite Aufgaben- und Verantwortungsbereiche in einem internationalen Umfeld und möchten dabei Ihre eigenen Ideen einbringen und verwirklichen können? Außerdem arbeiten Sie gerne in interdisziplinären Teams, sind begeisterungsfähig, Neuem gegenüber aufgeschlossen und wollen Dinge bewegen?

Dann sind Sie bei uns genau richtig!

Wir bieten Ihnen in unterschiedlichen Unternehmensbereichen die Chancen und Möglichkeiten, die Sie suchen.

Nähere Informationen erhalten Sie unter www.grunenthal.de

Kontakt: Andrea Lenzen, Unternehmensbereich Personal,
E-Mail: andrea.lenzen@grunenthal.com



GRÜNENTHAL ist ein unabhängiges, forschendes und international tätiges Pharmaunternehmen. Die Zukunftssicherung durch innovative Forschung ist ein wesentlicher Bestandteil unserer Unternehmensphilosophie. Mit hohem Engagement konzentrieren wir uns auf unseren eigenen Weg: das Schmerz-Management in relevanten Indikationen.

GRÜNENTHAL GMBH
52099 Aachen, Deutschland