

Automatisierte quantitative Analyse der Zellzusammensetzung von bronchoalveolaren Spülungen

Julian Wörmann¹, Andrea Braun², Martin Mempel^{2,3}, Karl-Hans Englmeier¹,
Peter Hamm¹

¹Institute for Biological and Medical Imaging, Helmholtz Zentrum München

²Division of Environmental Dermatology and Allergy

Helmholtz Zentrum München/Technische Universität München (TUM)

ZAUM - Center for Allergy and Environment (TUM), Germany

³Department of Dermatology and Allergy Biederstein, TUM, Germany

julian.woermann@helmholtz-muenchen.de

Kurzfassung. Eine in der Immunologie häufig verwendete Methode zur Bewertung von Entzündungsreaktionen ist die quantitative Auswertung von Leukozyten, wie z.B. die Bestimmung der Zusammensetzung der Entzündungszellen in bronchoalveolaren Spülungen (BAL) bei Lungenerkrankungen. Die vorliegende Arbeit stellt eine bildbasierte Applikation zur automatisierten BAL-Zellklassifikation in Mikroskopaufnahmen vor, welche gegenüber der gängigen manuellen Auswertung sowohl einen erheblichen Zeitgewinn, als auch einen Fortschritt bezüglich der Klassifikationsgenauigkeit darstellt. Die automatische differenzierte Zellzählung erfolgt in vier Schritten und erlaubt durch die Einführung eines Konfidenzparameters eine interaktive Validierung des Anwenders, wodurch eine sehr hohe Sensitivität erzielt wird.

1 Einleitung

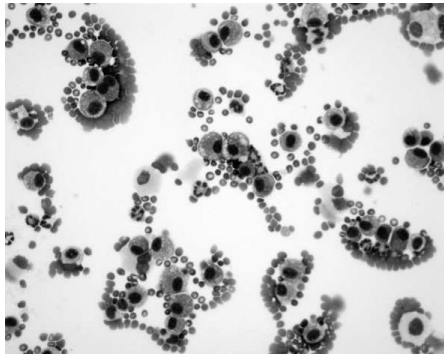
In der Allergieforschung wird anhand von Mausmodellen die allergische Reaktion der Lunge anhand der Zellzusammensetzung der bronchoalveolaren Spülung (BAL) bestimmt. Die durch Spülung der Lunge gewonnenen Cytospin-Präparate von BAL Zellen werden durch eine differenzierte Zellfärbung gefärbt und anhand ihrer morphologischen Besonderheiten charakterisiert. Dabei ist die absolute und relative Häufigkeit von insgesamt vier verschiedenen Leukozyten von Interesse: Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophile und Neutrophile. Die quantitative Auswertung ist ein wichtiger Parameter in der Bestimmung und Bewertung der Stärke verschiedener Atemwegserkrankungen (z.B. Asthma). Der hohe Zeitaufwand der manuellen Zellzählung durch einen Experten begründet sich vor allem darin, dass für eine statistische Auswertung eine hinreichende Anzahl an Proben ausgezählt werden muss. Des Weiteren erschweren geringe Vergrößerungen dem Laboranten die Auszählung der Zellen am Mikroskop, was zu einem erhöhten Fehlerfaktor und somit zu einer verringerten Sensitivität führt.

Bestehende Ansätze um die bildbasierte differenzierte Zellzählung zu automatisieren, führen eine Segmentierung der Zellkerne und Zellplasmen via Watershed-Transformation [1], Thresholding [2] oder einer Kombination aus Thresholding und Fast-Marching [3] durch. Die speziell für die Analyse der BAL Zellen vorgestellte Methode von Lezoray und Lecluse [4] verbindet Histogramm-Clustering mit anschließender Color-Watershed-Transformation, um die Zellen zu segmentieren, und verwendet entsprechend der Färbung Farbmerkmale im HSV-Raum und Texturmerkmale der Nuklei und Plasmen. Die genannten Methoden sind jedoch nur teilweise auf dem vorliegenden Falle der Differenzierung von *einzelnen* Leukozytentypen anwendbar, für die nach unserem Wissen noch keine vorgestellte automatisierte Lösung existiert.

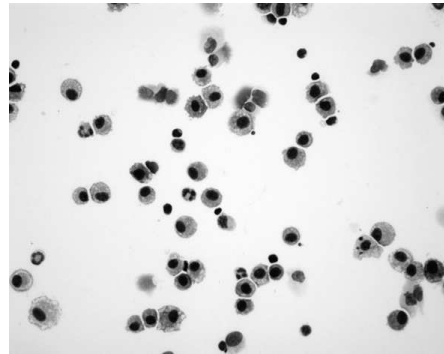
2 Material und Methoden

Die durch Cytozentrifugation auf einem Objektträger fixierten BAL Zellen werden durch "Diff Quick Staining Set" (Medion Diagnostic) mit Eosin und Thiazin gefärbt. Die Differenzierung der Zelltypen erfolgt anhand von morphologischen Kriterien: Eosinophile können anhand ihres polymorphoiden Kerns und des kationischen Zytoplasmas (rote Granula) erkannt werden; das Zytoplasma der Neutrophilen hingegen wird nicht gefärbt, ihr Zellkern besteht meistens aus 3-4 Segmenten; Makrophagen können von Lymphozyten anhand ihres höheren Verhältnis an Zytoplasma zu Kern und den weniger kondensierten Kern abgegrenzt werden.

Das zur Aufnahme der Bilder verwendete Mikroskop ist ein Leica DM LB mit einer Leica DC 300F Kamera, welche RGB-Bilder mit einer Auflösung von 1030 x 1300 Pixel erzeugt. Ausgehend von der digitalen Erfassung der eingefärbten Proben (Abb. 1), erfolgt der Ablauf der Applikation in vier Schritten: Vor-



(g) Beispiel einer schwierig zu analysierenden Probe, aufgrund des hohen Anteils an Erythrozyten



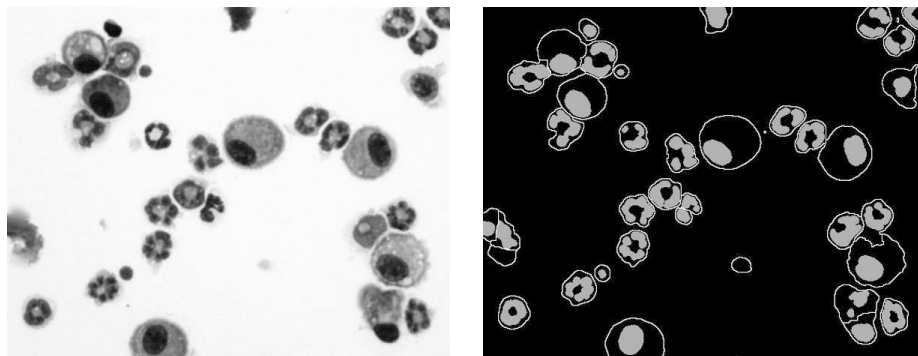
(h) Beispiel einer einfach zu analysierenden Probe

Abb. 1. Gegenüberstellung von schwierig und einfach zu analysierenden Cytospin-Präparaten der BAL Zellen.

verarbeitung, Segmentierung, Merkmalsextraktion und Klassifizierung. In der ersten vorverarbeitenden Stufe wird Bildrauschen mit Hilfe eines nicht-linearen und kantenerhaltenden Filters [5] entfernt und die inhomogene Bildausleuchtung per homomorphischer Filterung beseitigt. Besonderes Augenmerk gilt dem zweiten Schritt, der Segmentierung von Zellkernen und Zellplasma (Abb. 2), deren Ergebnis unmittelbare Auswirkung auf die Klassifizierung hat. Als Grundlage hierfür findet eine marker-basierte Watershed-Transformation Anwendung. Die regionalen Maxima einer Distanztransformation, die auch bei sich berührenden Zellrändern das Zentrum einer Zelle definieren, bilden die gesuchten Marker.

Die Segmentierung der Zellkerne erfolgt auf Basis von Schwellwertoperationen im HSV-Farbraum und einer nachgestellten Anwendung morphologischer Operatoren. Abbildung 2 zeigt die mittels Schwellwert extrahierten Zellkerne und die durch die Watershed-Transformation erhaltenen Zellkonturen im Vergleich zum Originalbild. Da Makrophagen und Lymphozyten i.Allg. nur einen Zellkern besitzen, werden die Regionen dem zuvor erstellten Markerbild hinzugefügt, was die Segmentierung von Zellclustern verbessert. Die im dritten Schritt vorgenommene Extraktion von diskriminierenden Merkmalen basiert auf den Farb- und Formmerkmalen der vier Zelltypen. Dazu zählen die Größe der Zelle, die Größe der Zellkerne und deren Anzahl, das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma, Farbton und Sättigung von Kern und Plasma und formbasierte Merkmale wie die Rundheit und die Kompaktheit der Zellkerne.

Vor der eigentlichen Klassifizierung wird mittels eines Entscheidungsbaumes jede Region aufgrund ihrer extrahierten Merkmale einer von vier Klassen zugeordnet. Zunächst erfolgt die Trennung der Regionen von allen Objekten, die nur einen einzigen, kompakten Zellkern aufweisen. Makrophagen und Lymphozyten erfüllen dieses Kriterium und werden weiterhin aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellgröße voneinander getrennt. Aus den übrigen Regionen werden die Segmente extrahiert, die in ihrem Schwerpunkt einen höheren Grauwert aufweisen, als an ihrem äusseren Rand. Diese Vorgehensweise begründet sich darin, dass die in



(a) Mikroskopaufnahme

(b) Segmentierungsergebnis von Kern und Plasma

Abb. 2. Segmentierungsergebnis eines Ausschnitts einer zu klassifizierenden Zellprobe.

Tabelle 1. Klassifikationsergebnis der vorgestellten Applikation anhand 18 repräsentativer Beispiele von Cytospin-Präparaten der BAL Zellen.

(a) Richtig positiv Rate bezogen auf die Expertenanzahl			(b) Klassifikationsergebnis bezogen auf alle segmentierten Objekte		
	Soll	rp		Anzahl	Prozent
Makrophagen	470	373	Objekte	1450	100 %
Lymphozyten	145	97	davon falsch	97	6,69 %
Eosinophile	466	339	klassifiziert		
Neutrophile	34	20			
			zur Validierung	524	36,14 %
Summe	1115	829	davon Zellschrott	317	60,50 %
Prozent	100 %	74,35 %	davon Zellen	207	39,50 %

der Regel am Rand befindlichen Zellkerne der Eosinophile und Neutrophile eine höhere Sättigung besitzen, als das Zytoplasma im Zentrum. Dies bewirkt eine Trennung der Zellen von Farbresten und Zellbruchstücken. Letztere Regionen, die keiner der drei Gruppen zugeordnet werden konnten, gehen somit nicht in die Klassifikation mit ein und stehen dem Benutzer zur Validierung zur Verfügung.

Die Klassifikation erfolgt nach der Methode des geringsten Abstandes zu Prototypen der vier Objektklassen, die zuvor aus einer Mittelwertbildung der Merkmale von jeweils zehn repräsentativen Zellen auf Trainingsbildern berechnet wurden. Die Klassifizierung verläuft dabei separat in den zuvor erstellten Gruppen, wobei die ersten zwei Gruppen jeweils einen Prototypen besitzen. Die segmentierten Regionen werden der Klasse zugeordnet, wenn ihre Distanz einen festgelegten Schwellwert (Konfidenzparameter) nicht überschreitet. Die Regionen der dritten Gruppe (Eosinophile und Neutrophile) werden zusätzlich einer Distanzmessung zu den Klassenprototypen unterzogen, um die jeweilige Klassenzugehörigkeit festzustellen. Der Konfidenzparameter gibt Aufschluss darüber, ob eine Zelle mit Sicherheit einer der Klassen zugeordnet wird, oder ob die Region als nicht eindeutig klassifiziert markiert und dem Anwender zur interaktiven Validierung hervorgehoben wird.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorgestellten Applikation wurden anhand 18 repräsentativer Beispiele von Cytospin-Präparaten der BAL Zellen ermittelt, die neben den gesuchten Leukozyten auch Erythrozyten, Zellschrott und Farbrückstände enthalten. Abbildung 1 verdeutlicht die Variation der Zellzusammensetzung in verschiedenen Proben. Tabelle 1(a) zeigt die von der Applikation richtig klassifizierten Zellen in Bezug auf die manuelle Auswertung von einem Experten. Die Klassifizierung erreichte dabei eine Rate von insgesamt 74,35 % richtiger Zuordnung

zu einer der vier Leukozytentypen. Tab. 1(b) verdeutlicht die geringe falsch-positiv Rate. Bezogen auf alle zu klassifizierenden Objekte, wurden 6,69 % dabei einer falschen Klasse zugeordnet und 36,14 % als nicht eindeutig klassifizierbar markiert und dem Anwender zur Validierung weitergegeben. Dabei befanden sich unter den zu validierenden Objekten 60,50 % richtig erkannte Erythrozyten, Farbrückstände und Zellschrott, und 39,50 % Zellen, die entweder zuvor aussortiert, oder keinem Prototypen zugeordnet werden konnten.

Die Implementierung wurde in MatLab auf einem Intel Core 2 Quad 2,66 GHz mit 4 GByte RAM realisiert und benötigte für die Segmentierung durchschnittlich 93,1 Sekunden und für die Klassifikation 30,8 Sekunden Rechenzeit.

4 Diskussion

Das Hauptaugenmerk der vorgestellten Methode liegt vorrangig auf einer Segmentierung aller in der Probe enthaltenen Objekte. Die erreichte Sensitivität von 0,929 verdeutlicht, dass annähernd alle zu analysierenden Objekte segmentiert wurden. Die anschließende Klassifizierung zeigt gute Ergebnisse, vor allem in Hinblick auf die geringe falsch-positiv Rate von 6,69%.

Die Ursachen von Fehlklassifikationen liegen zum einen in der stark schwankenden äußerlichen Form von Zellen gleichen Zelltyps. Zum anderen beeinträchtigen unzureichend segmentierte Zellen oder Zellkerne die vor der Klassifikation stattfindende Einteilung der Probe in einer der Gruppen. Des Weiteren kann der Farbton und die Sättigung der Kerne sowie der Plasmen einerseits durch die Färbung, und andererseits durch ein verändertes Mikroskop-Setup stark variieren, was ebenfalls eine eindeutige Zuordnung erschwert.

Ziel der zukünftigen Arbeit ist daher die Anpassung des Algorithmus an sich ändernde Aufnahmebedingungen, sodass der Einfluss von variierenden Aufnahmeparametern wie Farbton, Helligkeit und Sättigung minimiert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Methoden stellen eine bildbasierte Applikation zur automatisierten BAL-Zellklassifikation dar, welche gegenüber der bisherigen manuellen Auswertung sowohl einen erheblichen Zeitgewinn, als auch eine reproduzierbare, präzise und objektivierbare Klassifikation durchführt.

Literaturverzeichnis

1. Dorini LB, Minetto R, Leite NJ. White blood cell segmentation using morphological operators and scale-space analysis. *SIBGRAPI*. 2007; p. 294–304.
2. Mirčić S, Jorgovanović N. Automatic classification of leukocytes. *J Automat Contr*. 2006;16:29–32.
3. Rehn T, Zerfaß T, Wittenberg T. Berandungsgenaue Segmentierung von Plasma und Nucleus bei Leukozyten. *Proc BVM*. 2007; p. 252–6.
4. Lezoray O, Lecluse M. Automatic segmentation and classification of cells from broncho alveolar lavage. *Image Anal Stereol*. 2007;26:111–9.
5. Smith SM, Brady JM. SUSAN - A new approach to low level image processing. *Int J Computer Vis*. 1997;23(1):45–78.