

K. Amunts, V. Istomin*

VERFAHREN ZUR AUTOMATISCHEN BILDAUSWERTUNG IN DER NEUROBIOLOGIE

Summary

For more than ten years attempts have been made to apply automatic procedures for exploration of cortical cytoarchitectonics. Investigations of human and pigs brains were carried out by a method described as „automatic morphocorticography“. In the result of image analysis we got a set of parameter curves reflecting AREA-specific, individual, ontogenetic and pathological changes. The paper deals with various applications of this method and explores some measurement results and its clinical interpretation.

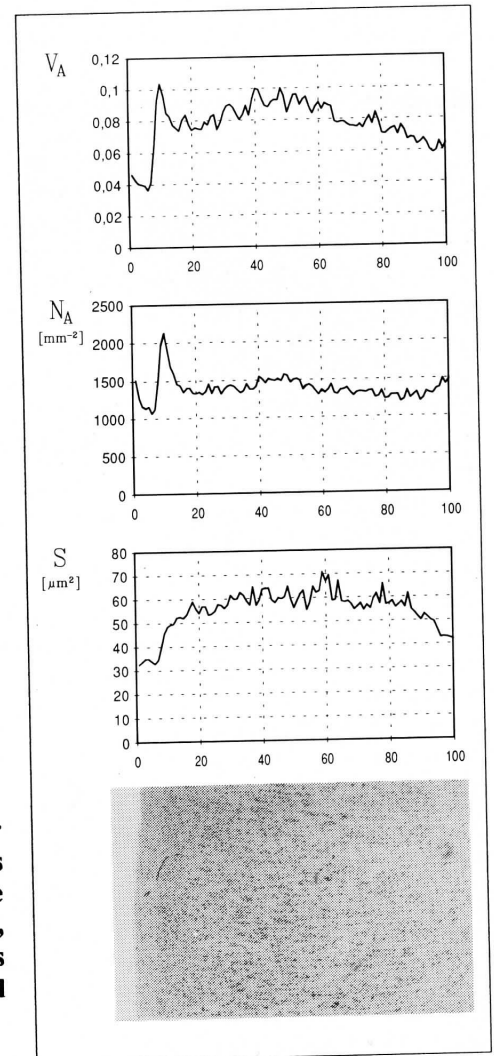


Bild 1: Gegenüberstellung von Zytoarchitektonik der Großhirnrinde des AREA 4 (12-jähriger Junge) mit dem Morphocorticogramm V_A - Volumendichte, N_A - Anzahldichte, S - mittlere Oberfläche aller Zellelemente, Abszisse - Entfernung zur Kortexoberfläche (in Anteilen von 100)

Einleitung

Das menschliche Gehirn und sein phylogenetisch jüngster Bestandteil, die Großhirnrinde (cortex cerebri), gehören zu den kompliziertesten bekannten Strukturen. Die Wirkungsweise des Gehirns und seine Reaktionen auf äußere und innere Einwirkungen sowie auf pathologische Veränderungen ist äußerst komplexer Natur. So kommt es schon bei einem einfachen optischen Reiz zu einer Aktivierung mehrerer, sich in beträchtlicher Entfernung voneinander befindender Strukturen verschiedener zytoarchitektonischer Felder. Innerhalb solcher eines Feldes (AREAs) ist durch die Vielzahl unterschiedlicher Zellelemente, die horizontal in 6 Schichten und mehrere Unterschichten und vertikal säulenförmig angeordnet sind (Bild 1), eine formalisierte, quantitative Beschreibung repräsentativer Kortexareale erforderlich. So müssen z.B. für die Auswertung eines Feldes der menschlichen Großhirnrinde in Abhängigkeit von Alter und baulichen Besonderheiten 400 - 800 Meßfelder, das sind 5 - 10 mm entlang der Oberfläche des Cortex, ausgewertet werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Das ist nur im vollautomatischen Betrieb möglich. So besteht also eine wichtige Voraussetzung für das weitere Verständnis der Funktionsweise der Großhirnrinde in der Erarbeitung von Algorithmen und Programmen zur Erfassung reproduzierbarer und spezifischer Parameter der Struktur des cortex cerebri.

*) Dr. med. Katrin Amunts, Wissensch. Mitarbeiterin, Fraunhofer-Gesellschaft, Einrichtung für Bildverarbeitung, Berlin-Ost
Dr. med. Vadim Istomin, Wissensch. Mitarbeiter am Laboratorium für Zytoarchitektonik, Dep. of Psychiatry des Mount Sinai Hospital, New York

Material und Methodik

Es wurden histologische Präparate der Großhirnrinde mehrerer zytoarchitektonischer Felder des Menschen und des Hauschweins untersucht. Das Material wurde unter Beachtung der geometrischen Verhältnisse des Kortex in Form von etwa 1x1x1 cm großen Blöckchen entnommen (Bild 2 A). Die Probenentnahme und die Herstellung der 10 µm-dicken Serienschritte erfolgten im rechten Winkel zur Oberfläche

der Rinde und parallel zu der vertikalen Säulenordnung der Zellelemente. Diese Herangehensweise unterscheidet sich von der in der klassischen Neuroanatomie und -pathologie gebräuchlichen sowie von der quantitativen Kortexauswertung anderer Gruppen [1], eignet sich aber besonders gut für die Auswertung zytoarchitektonischer Besonderheiten. Die Färbung wurde nach traditionellem Schema mit Kresylechtviolett durchgeführt (Bild 2 B, C). Die Messungen erfolgten am Bildanalyse-System TAS (Leitz) mit Hilfe eines Programmpakets zur Automatischen Morphocorticographie [2]. Die Auswertung der Präparate geschah unter Beachtung der verschiedenen Färbeintensitäten der histologischen Präparate [3] in mehreren Phasen: Zuerst wurden bei einer Objektivvergrößerung von 1x die zu messenden Rinden-Fragmente in Form von Parallelogrammen oder Rechtecken interaktiv ausgewählt und ihre Koordinaten gespeichert (Bild 2D). Für jedes Fragment wurde eine Zerlegung in sich überlappende Fenster durchgeführt, die nacheinander bei einer Objektivvergrößerung von 16x von der Kortexoberfläche bis zur weißen Substanz abgetastet wurden (Bild 2, E). In jedem Meßfeld erfolgten automatisch Fokussierung, Grauwertdiskriminierung (Segmentierung) und Erkennung der zu messenden Objekte. Dazu mußten im Binärbild diese von anderen Elementen wie Staub, Farbkristallen und weiteren Arte-

fakten sowie Blutgefäßen und Dendritenfragmenten unterschieden werden. Anschließend wurden aneinander grenzende Zellen getrennt [14], (Bild 3). Diese Schritte liefen unter Nutzung der Prinzipien der Mathematischen Morphologie ab [5,6]. Dabei wird für jeden betrachteten Bildpunkt dessen Umgebung analysiert und mit einer Schablone verglichen, die strukturierendes Element genannt wird. Dieses strukturierende Element

den könnte, daß innerhalb eines zytoarchitektonischen Feldes parallel zur Oberfläche keine und im rechten Winkel zu ihr signifikante Differenzen der morphometrischen Parameter auftreten [7]. Es entstehen 3 Profilkurven (Bild 2G), die die Veränderungen des jeweiligen Parameters von der Kortexoberfläche bis zur weißen Substanz widerspiegeln. Diese Phase erfolgte vollautomatisch und nahm 4-8 h ein, wobei eine Fläche von 15-40 mm² ausgemessen wurde. Um eine Vergleichbarkeit der Kurven verschiedener Individuen zu erreichen, wurde die Gesamttiefe des Kortex gleich 100 gesetzt und alle Kurven entsprechend normiert. Durch Projektion der Profilkurven auf die entsprechenden Rindenareale konnte jedem Abschnitt der Kurven eine zytoarchitektonische Schicht oder Unterschicht zugeordnet werden (Bild 2H). Das stellt eine wesentliche Objektivierung der Bestimmung der Schichtgrenzen dar, die rein visuell nur von erfahrenen Neuropathologen durchgeführt werden kann. Da diese 3 Parameterkurven in ihrer Gesamtheit für ein zytoarchitektonisches Feld reproduzierbar sind und seine charakteristischen, struk-

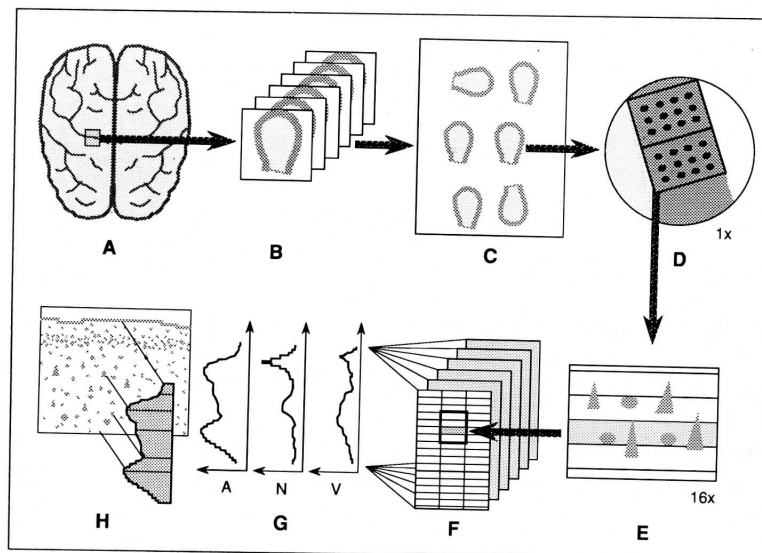


Bild 2:
Experimentelle Phasen zur Gewinnung der Morphocorticogramme

kann aus einem Punkt oder einer Gruppe von Punkten in verschiedenen Anordnungen bestehen. In Abhängigkeit vom Ergebnis dieser Analyse erfolgen dann unterschiedliche Bildtransformationen. Bei Anwendung mehrerer strukturierender Elemente kann eine große Anzahl von Filtern erstellt werden, mit deren Hilfe jede beliebige Bildoperation ausgeführt werden kann - z.B. einzelne Punkte entfernen, „Löcher“ füllen, Objekte voneinander trennen und ihre Lage zueinander bewerten. Im Anschluß daran wurden in jedem Meßfeld 3 voneinander unabhängige Parameter bestimmt - die Volumendichte (VA), die Anzahldichte (NA) und die mittlere Oberfläche aller Zellelemente (S). Diese Daten wurden innerhalb der Schnittserie eines Präparates und parallel zur Oberfläche gemittelt (Bild 2F), da nachgewiesen wer-

turellen Besonderheiten widerspiegeln, wurden sie als Morphocorticogramm (MCG) bezeichnet (Bild 1), die Methode selbst als Morphocorticographie [2].

Eigenschaften der MCG

Zur Überprüfung der Methode wurden Untersuchungen an verschiedenen Objekten durchgeführt (AREA 4, 10, 17, 44 des menschlichen Kortex beim Erwachsenen [8,4], AREA 4 bei normal und gestört verlaufender Entwicklung [9]). Ein weiterer Schwerpunkt war die Erfassung zytoarchitektonischer Seitendifferenzen nach einer experimentellen Hemiatrophie beim Schwein [10,11]. Dabei zeigte sich, daß die

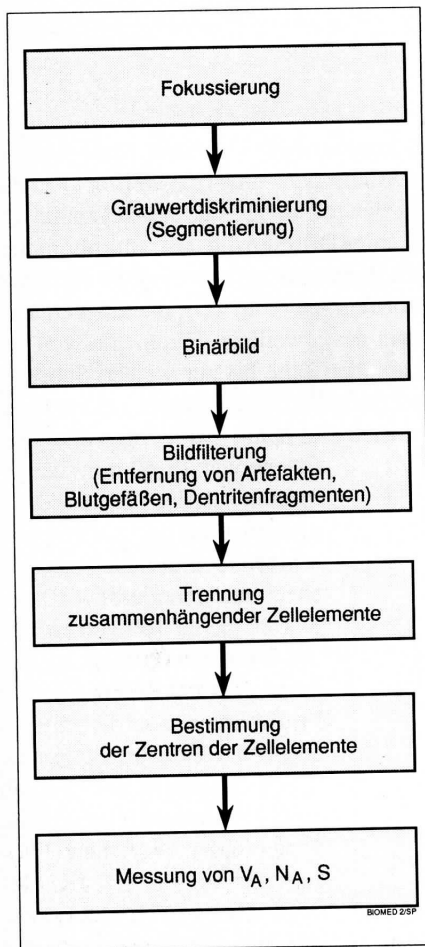


Bild 3: Reihenfolge der Bearbeitungsschritte in einem Meßfeld

MCG ein sehr sensibles Instrument zur Erfassung von Veränderungen der Großhirnrinde unter Einwirkung verschiedener Faktoren sind. Diese Eigenschaften sollen im folgenden kurz beschrieben werden. Die MCG sind, wie schon erwähnt, charakteristisch für ein zytoarchitektonisches Feld. Die strukturellen Besonderheiten solch eines AREA betreffen die Anzahl, Form, Größe und Anordnung der Zellelemente. Das macht man sich auch bei der rein visuellen Unterteilung der Großhirnrinde in verschiedene zytoarchitektonische Felder, aber auch bei ihrer Gliederung in Schichten und Unterschichten, zu Nutzen. So kann z.B. das AREA 4 (nach Brodmann) durch riesige, in der V. Schicht vorhandene Neurone, die Beetz'schen Pyramidenzellen, von anderen Feldern unterschieden werden. Diese typischen Baumerkmale eines Feldes werden in einem MCG in Form von Profilkurven der morphometrischen Parameter VA, NA und S darge-

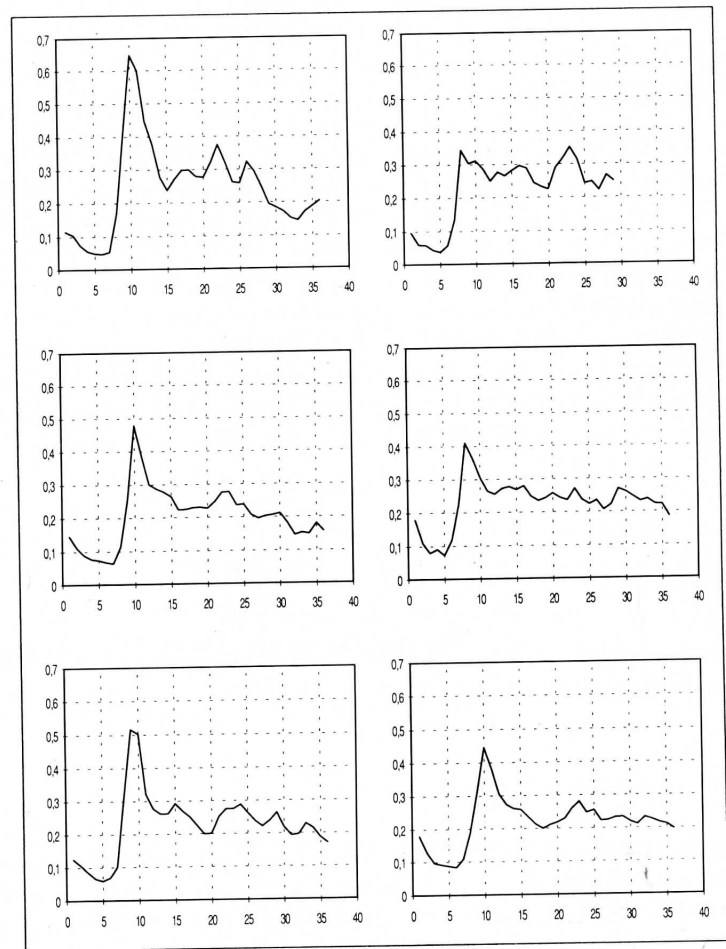


Bild 4: Profilkurven der Volumendichte VA ausgewählter Rindenareale beim Hausschwein Bez. wie oben

stellt. Neben der Ausbildung von Extrema hoher Amplitude und niedriger Frequenz, die eine Einteilung der Rinde in Schichten und Unterschichten erlauben, zeigen die Kurven auch höherfrequente Anteile geringerer Amplitude innerhalb dieser Strukturen, die ihrerseits auf eine besondere „Mikrozytoarchitektur“ hinweisen. Im AREA 4 ist das besonders in den Schichten III und V der Fall (Bild 1). Die AREA-spezifischen Eigenschaften der Profilkurve der Volumendichte VA und ihre Veränderungen beim Übergang in andere zytoarchitektonische Bereiche konnten beim Hausschwein anschaulich dargestellt werden. Es wurden hierbei 4 Sektionen innerhalb der medialen, paramedialen und lateralen Hauptregion untersucht. Gültig für alle 3 Rindenabschnitte ist eine deutliche Trennung von I. und II. Schicht durch einen raschen Anstieg der Kurve, breite Schichten III und V sowie eine verhältnismäßig schwach entwickelte IV. Schicht (Bild

4). In Abhängigkeit davon, in wieweit sich die III. Schicht noch in Unterschichten zerlegen läßt, sind in den MCG in diesem Bereich noch lokale Maxima ausgebildet. Gut abgrenzen läßt sich die Schicht VI von der weißen Substanz in Bezug auf Zellgröße und Anzahl. Bei detaillierter Betrachtung lassen sich für jeden Bereich bestimmte Besonderheiten herausarbeiten. Darüber hinaus bestehen zwischen den Volumendichten der einzelnen Schichten große Abhängigkeiten. Die Korrelationskoeffizienten schwanken zwischen 0.95 und 0.77 ($p < 0.01$). Diese Abhängigkeiten weisen auf das modulare Organisationsprinzip des Kortex hin und werden durch Ergebnisse von Untersuchungen pathologischer Veränderungen im Gehirn unterstützt. Darüber hinaus zeigen die MCG aber auch individuelle Besonderheiten, die den Verlauf der 3 Parameterkurven, das heißt das Verhältnis ihrer lokalen Minima und Maxima zueinander,

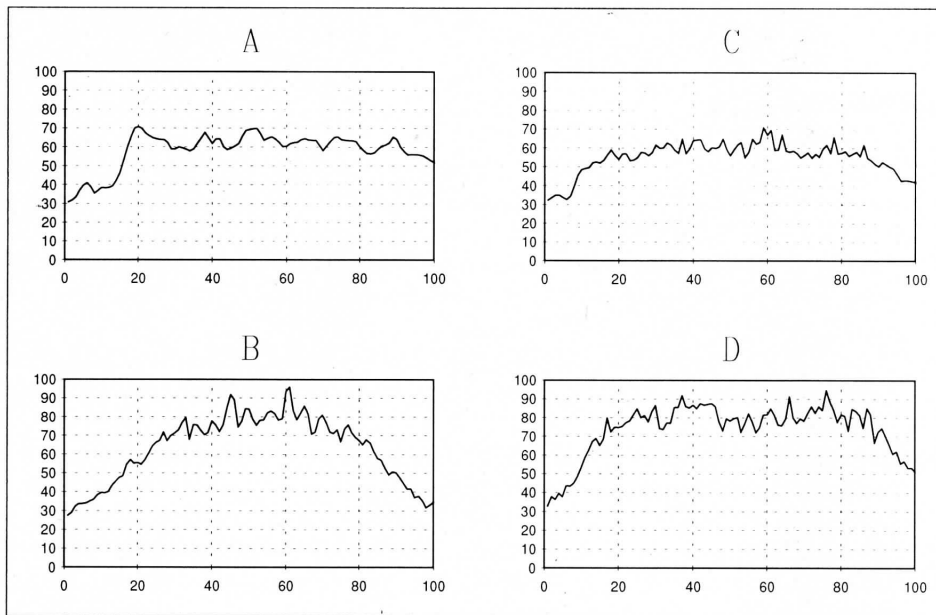


Bild 5: Profilkurven der mittleren Oberfläche aller Zellelemente S des AREA 4 zu verschiedenen Zeitpunkten: A - ein Monat, B - 3 Jahre, C - 12 Jahre, D - 39 Jahre Bez. wie oben

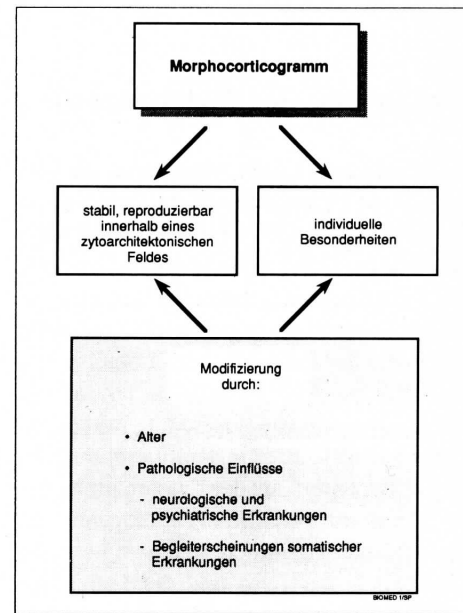


Bild 6: Eigenschaften der Morphocorticogramme

und absolute Unterschiede betreffen, ohne die für das zytoarchitektonische Feld wesentliche Form zu verändern. Außer den individuellen und den sich aufgrund des zytoarchitektonischen AREA ergebenden Besonderheiten der MCG verändern sich diese auch in Abhängigkeit vom Alter [4]. Dazu wurden histologische Präparate des AREA 4 des Kortex (56 neurologisch unauffällige Fälle im Alter von wenigen Tagen bis 90 Jahren) ausgemessen. Das AREA 4 gehört zum motorischen Kortex und ist für die Generierung willkürlicher Bewegungen verantwortlich. Die MCG wurden innerhalb von 4 Altersgruppen (0-2 Jahre, 3-6 Jahre, 7-14 Jahre und Erwachsene von 27-90 Jahre) gemittelt. Der Vergleich dieser Kurven zeigte die unterschiedliche Bedeutung der einzelnen morphometrischen Parameter für die Ontogenese. So weist die mittlere Oberfläche aller Zellelemente die größten zeitlichen Veränderungen auf. Außerdem kommt es mit zunehmendem Alter zu einer immer stärkeren Ausbildung lokaler Maxima auf der S-Kurve, besonders in den Schichten III und V, die sich von Fall zu Fall wiederholen, parallel mit der Entwicklung großer Pyramidenzellen ablaufen und damit ein Merkmal der Differenzierung des Kortex sind (Bild 5A,B,C;D, 1). Außerdem konnten wir feststellen, daß die größten quantitativen

Veränderungen der gemessenen Parameter die Kurvenbereiche der 2 am deutlichsten ausgeprägten lokalen Maxima in der VA und der NA-Kurve sind. Diese Bereiche entsprechen den Körnerschichten, auf deren besonders intensive Entwicklung während der Ontogenese auch von anderer Seite hingewiesen wurde [12]. Die für die ungestörte Ontogenese erhaltenen Daten dienten als Vergleichsmaterial für die Gegenüberstellung mit Meßergebnissen von 20 Kindern mit perinatalen, d.h. um die Geburt auftretenden Entwicklungsstörungen [9]. Alle Kinder wiesen schwere Bewegungsstörungen, die den Muskeltonus, die aufrechte Körperhaltung, die Fähigkeit zu gehen und sich zu bewegen, betrafen und unterschiedlich ausgebildet waren. Die visuelle Beurteilung der Veränderungen des Kortex erbrachte eine Vielzahl von teilweise gegensätzlichen Merkmalen eines pathologischen Rindenumbaus wie z.B. Veränderungen der Zytoarchitektonik (in einzelnen Fällen Störungen der Säulenstruktur und des laminaren Aufbaus, Bildung von Kern-ähnlichen Gebilden), das Auftauchen von unreifen und abartigen Zellen, ischämische Merkmale und andere [13]. Es muß gesagt werden, daß diese Veränderungen nichtspezifisch für das entsprechende Krankheitsbild sind. Außerdem gab es sehr schwere klinische Fälle mit

nur gering oder gar nicht veränderter Zytoarchitektonik und Histologie. Die aufgezeigten Probleme machen den Einsatz quantitativer, formalisierter Untersuchungsmethoden zwingend erforderlich. Der direkte Vergleich der in 2 Altersgruppen (3-6 Jahre und 7-14 Jahre) gemittelten MCG der Kontrollgruppe und der Gruppe kranker Kinder erbrachte mehrere Abweichungen. So kann man feststellen, daß die Gruppe Kranker mit zunehmendem Alter stärker hinter der Kontrollgruppe zurückbleibt, es kommt zu einer Verlangsamung oder zum Stillstand der Entwicklung einiger morphometrischer Parameter. Es lassen sich aber auch der normalen Entwicklung völlig entgegengesetzte Entwicklungstendenzen zeigen, die z.B. den Übergang von III. zu V. Schicht betreffen. An diesem Ort läßt sich auch ein direkter Zusammenhang zwischen einem morphometrischen Parameter und einem klinischen Merkmal nachweisen. Die Art und die Lokalisation der gefundenen Veränderungen deuten auf sekundäre Umbauten dieses Rindenabschnitts hin und nicht auf eine ursprüngliche Schädigung des AREA 4, die dann zu den aufgeführten neurologischen Ausfällen führt.

Diskussion der Ergebnisse

Die durchgeführten Messungen an verschiedenen Untersuchungsobjekten weisen die Morphocorticographie als wertvolle Methode zur Untersuchung des Gehirns aus. Die Morphocorticogramme zeigen charakteristische Veränderungen unter Einwirkung verschiedener Faktoren - der Lokalisation, individueller und artspezifischer, altersabhängiger und pathologischer (Bild 6). Es ist somit möglich, eine detaillierte und objektive Beschreibung der Zytoarchitektonik der Rinde im Verlaufe der Ontogenese zu erhalten, die wesentlich zu einem besseren Verständnis des Baus und der Funktionsweise des Gehirns beitragen kann. Außerdem eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Erforschung der Pathogenese verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen (Epilepsie, Alzheimer'sche Krankheit, Schizophrenie u.a.), die auf histologischem Niveau meist keine spezifischen Verminderungen erkennen lassen. Notwendig ist eine Weiterentwicklung der Methode, die im Endeffekt die Auswertung der gesamten Kortexoberfläche erlauben würde. Das erfordert die Ausarbeitung komplizierter und effizienter Algorithmen und Verfahren der Bildauswertung, die auch dem mehrfach gefalteten Aufbau der Großhirnrinde und der Problematik des Überganges eines zytoarchitektonischen Feldes in ein anderes Rechnung tragen müßten. Eine weitere Entwicklungsrichtung ergibt sich unter Anwendung moderner, z.B. histochemischer und immunohistochemischer Färbeverfahren, die eine unmittelbare Beziehung zur Funktionsweise des Gehirns herstellen lassen.

Literaturhinweis

- [1] Zilles, K.; Werners, R.; Büsching, U; Schleicher, A.: Ontogenesis of the laminar structures in areas 17 and 18 of the human visuell cortex. A quantitative study. *Anat. Embryol.* Vol. 174 (1986), S. 129-144.
- [2] Istomin, V.V.; Shkljarov, M.I.: An automated investigation of human brain cortex using TV image analyse system TAS. *Korsakov's journal of neuropathology and psychiatry* Nr. 7 (1984), S. 969-974 (russ.).
- [3] Istomin, V.V.: Principles of adaptive brain sections staining for automated structure analysis. *Korsakov's journal of neuropathology and psychiatry* Nr. 7 (1985), S. 1024-1032 (russ.).
- [4] Istomin, V.V.; Fiedler (Amunts), K.: Die Automatische Morphocorticografie - eine Methode zum Erfassen von Veränderungen der Zytoarchitektonik des menschlichen Cortex cerebri. *Bild und Ton* Vol. 43, Nr. 1(1990), S. 11-14.
- [5] Serra, J.: *Image analysis and mathematical morphology.* New York (1986). 610 S.
- [6] Müller, S.; Meyer, F.; Nickolay, B.: Anwendung der mathematischen Morphologie für die Erkennung von Oberflächenfehlern. *Vision & Voice Magazine*, Vol. 5, No. 3 (1991), S. 185-195.
- [7] Haug, H.: The evaluation of cell-densities and nerve-cell-size distribution by stereological procedures in a layered tissue (cortex cerebri). *Microscopia acta*, Vol. 82, No. 2 (1979), S. 147-161.
- [8] Istomin, V.V.: Quantitative cytoarchitectonic analysis of some cerebral cortex fields by results of automated morphocorticography. *Korsakov's journal of neuropathology and psychiatry* Nr. 7 (1987), S. 961-967 (russ.).
- [9] Fiedler (Amunts) K.; Istomin, V.V.; Krivitzkaja, G.N.: Quantitative zytoarchitektonische Veränderungen des Neocortex bei Kindern mit Bewegungsstörungen zerebraler Genese. *Zentralbl. allg. Pathol. pathol. Anat.*, Vol. 136 Nr. 5 (1990), S.468.
- [10] Istomin, V.V.; Fiedler (Amunts), K.; Pollak, K.-H.: Quantitative Erfassung zytoarchitektonischer Seitendifferenzen durch automatische Bildverarbeitung am Beispiel einer experimentellen kortikalen Hemiatrophie. *Hirnforschung* Vol.31, Nr. 3 (1990), S. 307-314.
- [11] Pollak, K.-H.; Istomin, V.V.; Fiedler (Amunts), K.: Einfluß großflächiger Hirnhautfibrosen auf die Entwicklung des Hemisphärenvolumens. *Zentralbl. allg. Pathol. pathol. Anat.* Vol. 136, Nr. 3 (1990), S. 255-264.
- [12] Poljakov, G.I.: *Classification of neocortical neurons in human brain.* Medicina, Moscow, 1973. 306 S.
- [13] Amunts, K.; Krivitzkaja, G.N.: Cytoarchitectonical variations of the human cortex cerebri (AREA 4) in children with perinatal brain disturbances. *Korsakov's journal of neuropathology and psychiatry*, Nr. 10 (1991), S. 77-81 (russ.)