

Automatisches optisches Scanning-Mikroskop- und Bildanalyse-System für biologische und medizinische *High-Throughput-Screening* (HTS) Applikationen

Einleitung:

In interdisziplinärer Zusammenarbeit mehrerer universitärer und privatwirtschaftlicher Einrichtungen wurde ein vielseitig einsetzbares, computergesteuertes Scanning-Mikroskop und Bildverarbeitungssystem entwickelt, das für *High-Throughput-Screening* (HTS)-Applikationen eingesetzt werden kann. Vielfältige Anwendungsgebiete finden sich im biomedizinischen Bereich, der klinischen Forschung und dort, wo Zeit und kosteneffiziente Analysen entscheidend sind. Das System ermöglicht die Automatisierung von arbeitsintensiven und fehleranfälligen Handarbeiten sowie die Auswertung und Beurteilung einer großen Anzahl von Versuchsproben, wodurch exakte und reproduzierbare Untersuchungen mit hoher Statistik möglich werden. Ein optimiertes Management von elektronischen Daten durch speziell entwickelte Hard- und Software wird zur weiteren Unterstützung und zur Offline-Evaluierung durch Experten zur Verfügung gestellt.

Potentielle Einsatzbereiche:

Das System ermöglicht

- einen gezielten Einsatz beispielsweise im Prä-Screening pharmakologisch wirksamer Substanzen (z.B. auch auf toxische Effekte) im Hochdurchsatzniveau auch unter Vermeidung von Tiermodellen.
- ein generelles Substanz-Screening für die pharmazeutische Industrie
- die Entwicklung von Simulationsmodellen auf Basis von Zellkulturen, bzw. Dünnschnittschnitten
- Toxizitätsstudien und Wirksamkeitsprüfungen bei großer Anzahl von Versuchsproben (insbes. die Identifizierung von seltenen Ereignissen) in kürzester Zeit (d.h. Minuten bis Stunden)

Ein bereits existierendes *Scanning*-Mikroskop wurde ursprünglich im Zuge der Analyse von physikalischen Daten aus der Hochenergieforschung an der Universität Münster entwickelt. Hierbei ging es darum, hochauflösende fotografische Emulsionen dreidimensional zu *scannen* und Spuren hochenergetischer, geladener Teilchen zu analysieren und nach bestimmten Kriterien auszusondern. Auf Grund der Menge der zu untersuchenden Emulsionsplatten und der hohen Spurdichte in den Emulsionen war eine vollautomatische, computergestützte Analyse erforderlich. Hierzu wurde ein Durchlichtmikroskop (siehe Abbildung 1) konstruiert, dessen optischer Tisch für Emulsionsplatten bis zu einer Größe von 360 mm x 710 mm optimiert ist. Eine CCD-Kamera mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einem „field of view“ von etwa 200µm x 200µm nimmt bis zu 30 Bilder (*frames*) pro Sekunde auf. Die digitalen Bilder der Kamera werden dann per Computer automatisch analysiert. Die Positioniergenauigkeit der drei Achsen liegt im Mikrometerbereich. Sind Kalibrierungsmarken vorhanden, ist das Anfahren bestimmter Positionen auch zu einem späteren Zeitpunkt wiederholbar.

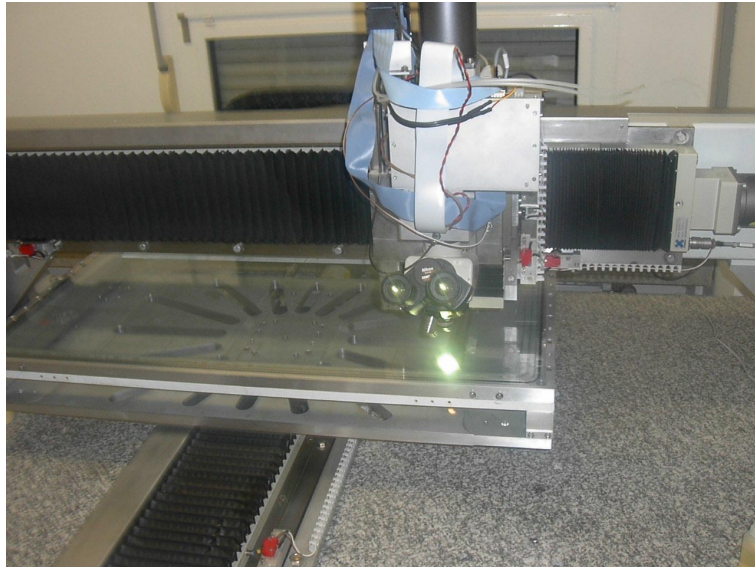


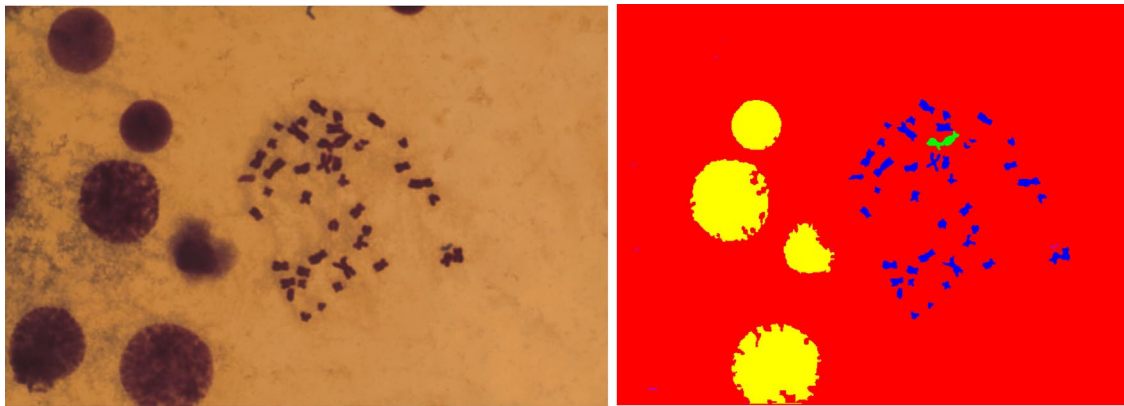
Abbildung 1: Das Bild zeigt das Scanning-Mikroskop, welches für die Neutrino-Forschung im Rahmen von physikalischen Hochenergieexperimenten verwendet wird.

Eine durchgeführte Machbarkeitsstudie wies bereits frühzeitig die Möglichkeit eines Wissentransfers von Hochenergiephysik zu biophysikalischen Anwendungen und klinischer Forschung auf. Einige dieser Untersuchungen, die mit dem derzeitigen System durchgeführt wurden sind im folgenden beispielhaft angegeben.

Automatische Zählung von Chromosomen und Strukturen:

Basierend auf der automatischen Bildaufnahme und Bildbearbeitung kann z.B. ein bestimmter Bereich der Chromosomen- und Zellanalyse abgedeckt werden. Von Interesse ist hier beispielsweise, Zellaberrationen (z.B. nach Umwelteinflüssen) aufzufinden und zeitkritische Analysen mit einer hohen Statistik vollautomatisch durchzuführen. Ein weiterer Vorteil von automatischen Systemen ist die objektive Reproduzierbarkeit der Messung und die Möglichkeit, interessante Ereignisse zu speichern. Diese können zu einem späteren Zeitpunkt vom Experten *offline* analysiert oder in einer Datenbank für Langzeitanalysen gespeichert werden. Das Abzählen von Chromosomen und die Analyse von Zellaberrationen sind Methoden mit vielen Anwendungen der pränatalen Diagnostik, der Krebszytogenese oder der biologischen Dosimetrie u.a. mehr. Häufig spielt nicht nur die reine Anzahl der Chromosomen eine Rolle, sondern auch ihre Zuordnung zu autosomalen, doppelt vorliegenden Chromosomenpaaren, bzw. den Geschlechtschromosomen.

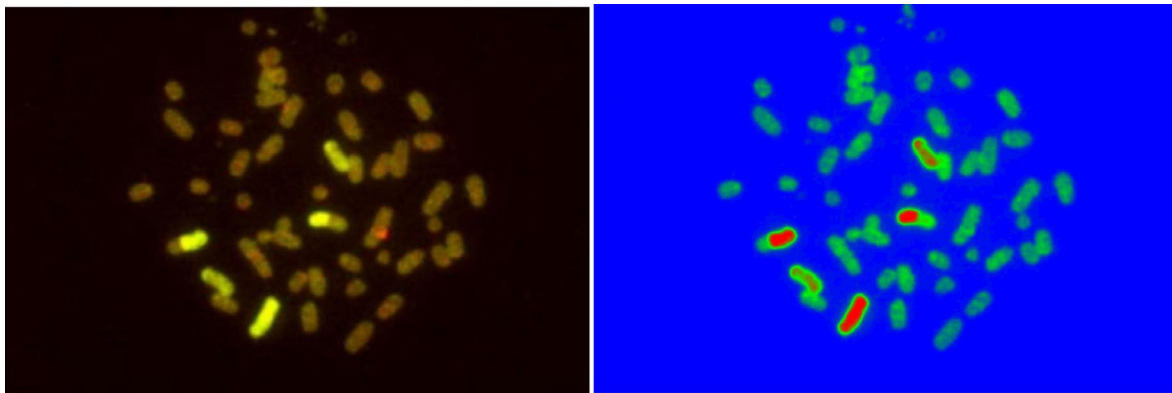
Das System ist in der Lage, nach Aufschluss von Zellen und Zellkernen den zu untersuchenden Bereich selbstständig zu finden, zu markieren und zu zählen. Das 3-dimensionale *Scanning* ermöglicht hierbei die Abgrenzung beieinander- oder übereinanderliegender Strukturen.



Results:

Value Range	# of Objects	Mean	Std Dev	Color
30 - 300	40	123.3	62.7	blue
300 - 600	1	355.0	0.0	green

Abbildung 2: Das linke Bild zeigt die ursprüngliche mikroskopische Ansicht von Blutkörperchen in der Metaphase. Der Chromosomensatz einer Zelle hat sich in der Mitte des Gesichtsfeldes verteilt. Im rechten Bild wurde in mehreren Bildbearbeitungsschritten Untergrund entfernt und aneinanderliegende Chromosomen getrennt. Die anschließende Analyse ermittelt die Anzahl der Objekte im Bild, die nach ihrer Größe (Anzahl der Pixel) klassifiziert und gezählt werden (30 – 300 und 300 – 600). Insgesamt 40 Chromosomen mit einer mittleren Fläche von 123 Pixeln wurden gefunden. Zwei Chromosomen überlappen und werden auf Grund der größeren Fläche in eine höhere Pixel-Klasse eingeordnet.



Results:

Object No	Area	Perimeter	Major axis length
1	994	140	55
2	415	122	43
3	640	100	37
4	449	80	28
5	521	118	44

Abbildung 3: Links, oben: Das originale Bild von Chromosomen im Fluoreszenzlicht mit den markierten fluoreszierenden Chromosomen. In der Falschfarbenanalyse rechts oben ist das Signal durch noch einmal hervorgehoben worden. Die farblich markierten Objekte können in dem Bild (Graustufenbild) und nach Anzahl, Fläche und Seitenverhältnis analysiert werden. In diesem Beispiel wurde ein Chromosomenpaar „falsch“ repariert. Man erhält so fünf markierte Objekte statt vier. Objekt 2 und 5 sind ungefähr gleich groß, während die Objekte 3 und 4 zusammen etwa die Fläche (und die Struktur) von Objekt 1 ausmachen.

Mit Hilfe spezieller Filterfunktionen (z.B. Größe, Länge, Breite oder andere topologische Merkmale) können Analysen nach bestimmten Kriterien durchgeführt werden. Dies ermöglicht beispielsweise ein Vergleich der in der Probe vorliegenden Chromosomen mit im System gespeicherten Informationen für einen „normalen“ Chromosomensatz. Hierdurch können einerseits Veränderungen in der Chromosomenanzahl, andererseits aber auch Chromosomenbrüche und andere Veränderungen erkennbar gemacht werden. Zusätzlich können bei Chromosomenbrüchen die einzelnen Bruchstücke zugeordnet werden.

Abbildung 2 zeigt eine erste Stufe einer solchen Chromosomenanalyse. Dargestellt ist ein aufgebrochener Zellkern mit den entsprechenden Chromosomen (in Metaphase). Allein durch den Filter „*Größe der Strukturen*“ werden die einzelnen Objekte farbig markiert und automatisch gezählt. Auf dem rechten Bild sieht man die Objekte, die von der speziell entwickelten Software erkannt wurden. Chromosomen können z.B. anhand der Größe identifiziert und automatisch gezählt werden. Insgesamt werden 40 relevante Objekte mit einer mittleren Größe von 123.3 (blau markiert) gefunden. Lediglich eines der Objekte ist grün markiert (hier Größe 355) und stellt in diesem Fall mehrere übereinanderliegende Objekte dar. Eine weitere Analyse ist für dieses Fallbeispiel nicht durchgeführt worden.

Automatisierte Auswertungen von FISH (*fluorescence in-situ hybridisation*)- Analysen.

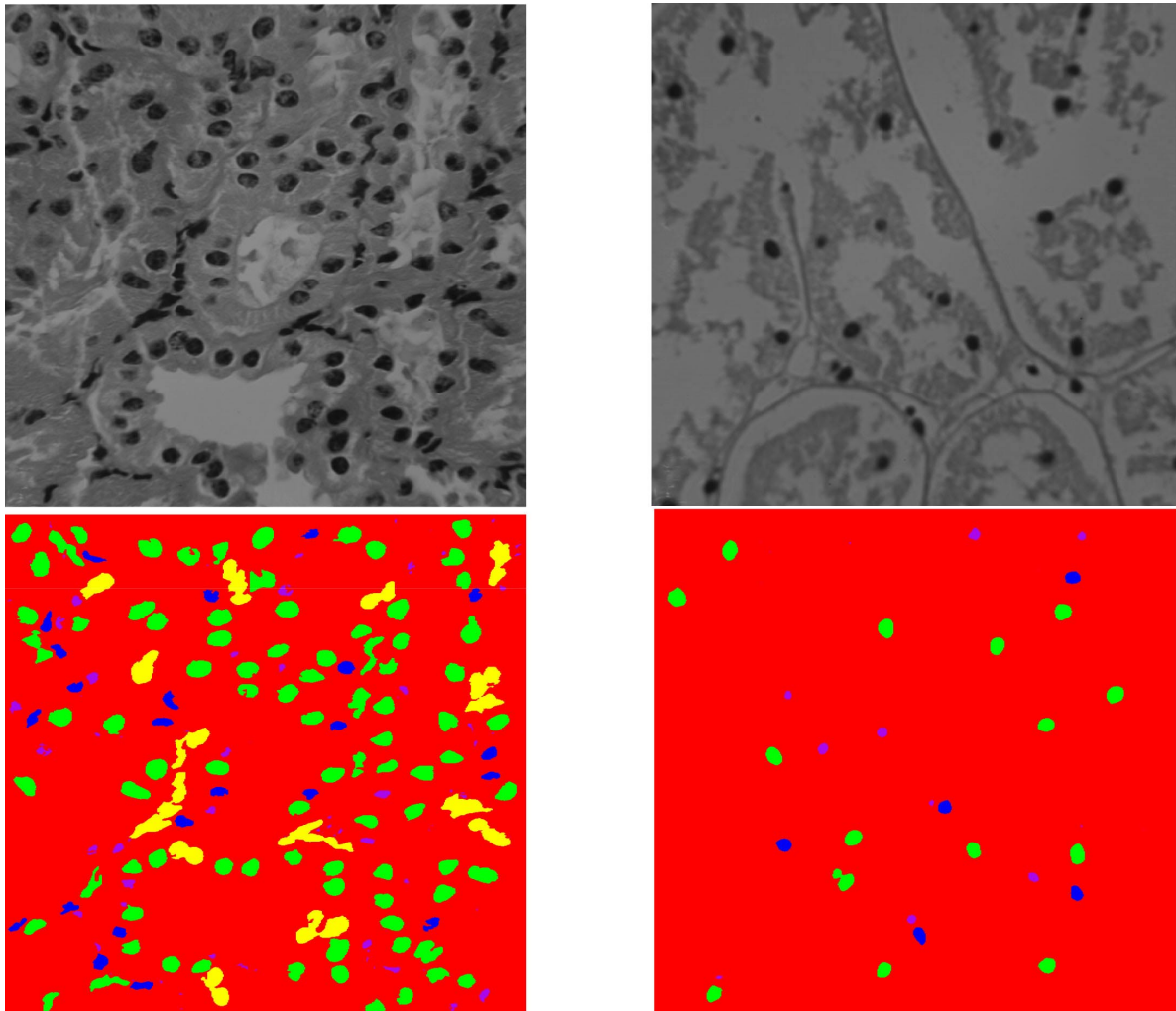
Computergestützte Analysen sind besonders interessant für zeitkritische in-situ-Anwendungen, wie sie in Abbildung 3 gezeigt werden. Die FISH-Technik (*fluorescence in situ hybridisation*) wird verwendet, um Zellreparaturmechanismen zu untersuchen. Zellen wurden hier z.B. mit Röntgenstrahlen bestrahlt, und fluoreszenzmarkierte Chromosomen dann anschließend für die Beobachtung dieser Mechanismen im UV-Licht beobachtet. Falls die Reparatur fehlschlägt, verbinden sich Fragmente der Chromosomen mit „falschen“ Stücken der DNA. Dies wird in Abbildung 3 oben rechts gezeigt, wo zwei markierte Chromosomenstücke sich mit nichtmarkierten Chromosomen verbunden haben. Weil die Fluoreszenz üblicherweise in wenigen Minuten abklingt, ist eine schnelle Analyse wünschenswert.

Das System ermöglicht eine automatische Trennung von „physiologischen“ und „pathologischen“ Befunden. Alle pathologischen Befunde und die vom System gemachten Analysen können in eine *Relational Database* eingetragen werden. Bei Auswertung dieser Datenbank sieht der auswertende Experte somit nur die selteneren, pathologischen Befunde und bekommt gleichzeitig Informationen über die Häufigkeit dieser Ereignisse. Alle übrigen physiologischen Befunde können auf Wunsch zusätzlich angezeigt werden.

Automatisierte Auswertung histologischer Gewebeschnitte

Histologische Untersuchungen an großen Probenanzahlen, die einen hohen Durchsatz von Daten erfordern, sind ebenfalls Anwendungsgebiet für automatische Mikroskope. Statistische Analysen können genutzt werden, um Auswirkungen von Dosierungen bestimmter Stoffe zu testen (wichtig für pharmazeutische Untersuchungen). Das folgende Beispiel (Abbildung 4) zeigt die automatische Auswertung histologischer Schnitte aus einem Toxizitätsversuch. Das linke Bild in Abbildung 4 zeigt das histologische Präparat eines gesunden Gewebes. Gut erkennbar ist die hohe Dichte von vitalen Zellen. Das rechte Bild zeigt das gleiche Gewebe nach Zugabe einer nicht weiter spezifizierten toxischen Substanz. Die Zahl der vitalen Zellen ist erheblich reduziert, die Zellkerngröße ist signifikant kleiner. Eine erste Auswertung erfolgte

hier über die Identifizierung und Zählung der vitalen Zellkerne innerhalb eines Sichtfeldes. Eine solche Analyse kann natürlich über weitaus größere Bereiche ausgedehnt werden, um statistische signifikante Ergebnisse zu erzielen. Andere Analysemethoden mit anderen Filtern sind gleichfalls möglich. In diesem Fall wurden die grün markierten Objekte als Zellkerne identifiziert, deren Größe zunächst willkürlich zwischen 700 und 1800 eingeordnet ist.



Results:

Value Range	C o u n t s		Color
	alive	dead	
0 - 400	105	17	purple
400 - 700	23	5	blue
700 - 1800	87	15	green
1800-	14	0	yellow

Abbildung 4: Vergleich von lebendem (links) und totem (rechts) Zellgewebe. Das vitale Gewebe besitzt große Zellkerne (dunkle graue und ovale Objekte) mit hoher Dichte. Nach Zugabe einer toxischen Substanz wird das Gewebe signifikant verändert (kleine Zellen ,geringe Zelldichte). Anhand der Anzahl, Form und Farbe kann der Anteil der toten Zellen bestimmt werden. Das Ergebnis der Analyse ergibt eine signifikant reduzierte Anzahl an vitalen Zellen (grün) von 87 auf 15.

Weiterentwicklungen

Erste Ausbaustufe

Basierend auf den bisher erreichten Zielen der Hard- und Softwareentwicklung soll nun ein für biomedizinische Anwendungen weitgehend optimiertes Mikroskop konstruiert werden. Damit soll der Funktionsbereich des bisherigen Prototyps erheblich erweitert werden. Das derzeitige Bildgebungsverfahren basiert z.B. auf die nunmehr leicht veraltete CCD-Technologie. Diese soll in der Weiterentwicklung durch die weitaus vielseitigere und mittlerweile auch vergleichbar schnelle CMOS-Technologie ersetzt werden.

Ein weiteres Ziel besteht darin, eine relativ große Fläche von 100 cm² bei einem „field of view“ von ca. 200 µm (abhängig von der Vergrößerung) innerhalb von Minuten abzurastern. Dieses wird wichtig für die Lokalisation seltener Ereignisse, bei der angestrebt wird, ein relevantes Ereignis aus einer Ereignisvielfalt von 10⁶ bis 10⁷ herauszufiltern. Damit können großflächige Gewebeschnitte aber auch große Objektträgermatrizen effektiv und schnell untersucht werden. Dieses endgültige Ziel wird allerdings erst in einer zweiten Stufe unter Einsatz von Piezo-Aktuatoren erreicht.

Die Bilder werden mit einer hochauflösenden CMOS-Farbkamera (2056 x 1544 Pixel) mit einer Bildrate von 30 Bildern/s aufgenommen. Erste Tests der neuen Kamera sind bereits durchgeführt.

Der Prototyp der Ausbaustufe 1 soll Ereignisse im unbeobachteten Betrieb über viele Stunden automatisch detektieren. Lokalisierte Events werden mit einer vollständigen Analyse in einer Datenbank für eine spätere Experten-Evaluierung gespeichert.

Aufbau des Scanning-Mikroskops der ersten Ausbaustufe

Der Aufbau des geplanten Systems ist in Abbildung 6 zu sehen. Es besteht aus den folgenden Komponenten:

1. Optischer Tisch (open-frame Konzept) für Bewegung der Probe in x/y Richtung und eine z-Achse für die Fokussierung des Mikroskops.
2. Optisches Mikroskop mit Durchlicht und Epi-Fluoreszenzbeleuchtung
3. CMOS-Farbkamera
4. Portal
5. Computer (nicht in der Abbildung zu sehen)

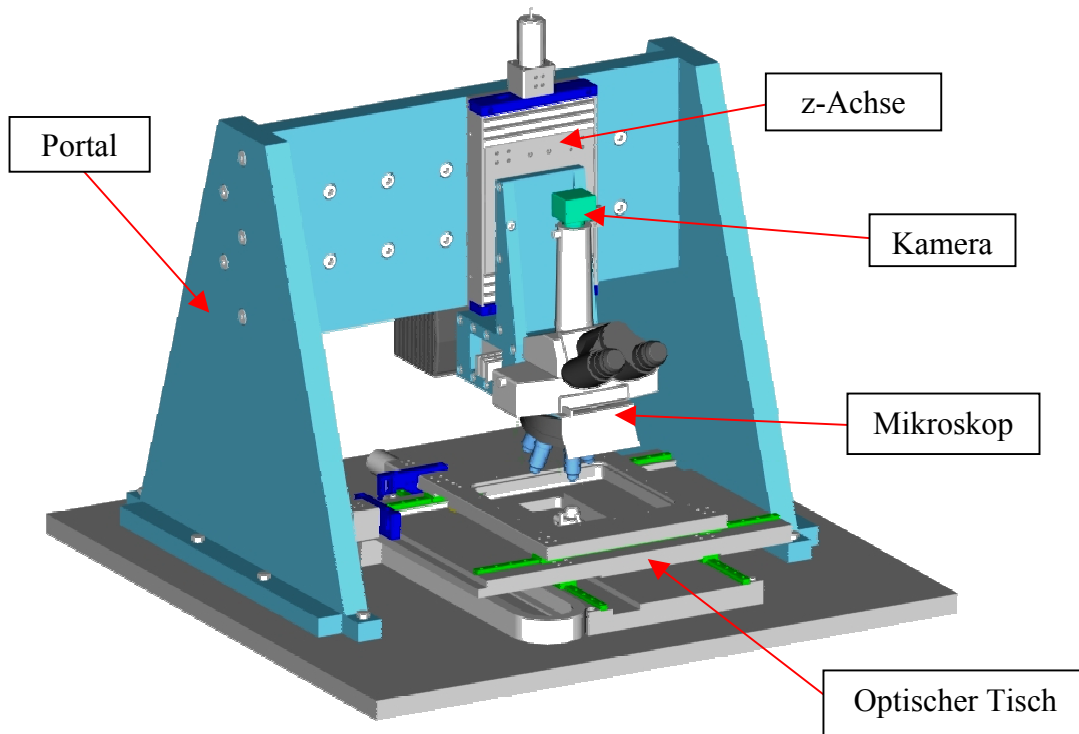


Abbildung 6: CAD-Zeichnung des Scanning-Mikroskops auf einer 1 m x 1 m großen Arbeitsplatte. Unter der Arbeitsplatte befindet sich, im Bild nicht sichtbar, der auf Schwingungsdämpfung optimierte Sockel. Das System ist je nach Anwendungszweck nahezu beliebig skalierbar und kann somit auch für größere Probenflächen genutzt werden.

1. Optischer Tisch (open frame) und z-Achse

Der optische Tisch besitzt einen zum Scanning nutzbaren Bereich von 200 mm x 200 mm bei einer Positioniergenauigkeit von 0.1 μm . Für die Bewegung der Proben in der x/y Ebene und für die z-Achse kommen Linearmotoren zum Einsatz. Durch eine großzügig bemessene Öffnung im Tisch hat man eine große Auswahl an möglichen installierbaren Lichtquellen. Die z-Achse mit einem Verfahrbereich von 50 mm übernimmt die Fokussierung des Mikroskops. Die Scharfeinstellung erfolgt dabei automatisch mit Hilfe von Positions- und Bildinformationen.

2. Mikroskop

Das Mikroskop besteht aus einem angepassten Standardmikroskop für biologische und medizinische Anwendungen. Es bietet dem Benutzer ein weites Spektrum an Mikroskopiertechniken. In der jetzigen Version werden Durchlicht- und Epifluoreszenzverfahren unterstützt. Das System lässt sich aber auch leicht erweitern. Optional sind auch Phasenkontrast-, Hellfeld-, Dunkelfeld- und Polarisationsmikroskopie möglich. Als Objektive stehen derzeit 10x, 50x und 100x Vergrößerung zur Verfügung. Damit ergibt sich je nach Vergrößerung ein Durchmesser des „field of view“ von 2.2, 0.44 und 0.22 mm bei Verwendung eines Okulars mit der Okularzahl 22.

3. CMOS-Farbkamera

Die Kamera ist mit einem Farb-CMOS Chip ausgestattet und bietet eine Auflösung von 2056 x 1544 Pixel und eine Lichtempfindlichkeit von 0,5 Lux. Bei der maximalen Auflösung wird derzeit eine Aufnahmezeit von 30 Bildern pro Sekunde erreicht, die durch die Kapazität des angeschlossenen PCI-Datenbusses begrenzt wird. Im Vergleich mit einer CCD-Kamera ist eine CMOS-Kamera klein, leicht und sparsam im Energieverbrauch, wodurch keine aufwändige Kühlung erforderlich ist. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, Pixel direkt zu adressieren und auszulesen. Die Verbindung zwischen Kamera und *Framegrabber* geschieht über den kommerziellen CameraLink™ Standard. Dieser serielle Übertragungsstandard erlaubt Datenraten von 1,2 – 2,3 Gbit/s.

4. Portal

Alle Komponenten sind an einem robusten Rahmen befestigt, der im Betrieb auftretende Vibrationen dämpfen soll. Diese Vibrationen sind im Bild um so stärker sichtbar, je höher die gewählte Vergrößerung ist. Der Rahmen hat die Form eines Portals, wodurch sich das System noch relativ kompakt aufbauen lässt.

5. Computer

Für die Datenanalyse und –archivierung wird ein PC mit Intel Pentium 4 Prozessor mit 2.53GHz und einem *Mainboard* mit 533MHz *Front Side Bus* verwendet. Er ist mit 1 GB DDR333 Arbeitsspeicher und einem 2 x 80GB RAID Festplattensystem ausgerüstet. Dieser Computer kontrolliert auch die Steuerung der drei Linearmotoren durch einen CNC-Controller.

Zweite Ausbaustufe

In einer zweiten Phase der Entwicklung wird die Begrenzung der Bildaufnahmezeit durch die mechanischen Einschränkungen in der „Start“- und „Stop“-Phase des optischen Tisches durch ein spezielles Verfahren (Patentierung in Aussicht genommen) aufgehoben, so dass die Bildaufnahmezeit lediglich von der Elektronik des Kamerasystems begrenzt wird. Man erhält ein scharfes Bild, obwohl sich der optische Tisch gleichförmig weiterbewegt. Ein Prototyp eines solchen Systems wurde bereits für die Anwendung in der Hochenergiephysik von einem zusammenarbeitenden Institut erfolgreich entwickelt. Ein weiterer Punkt ist die derzeit mit einem Rechner erfolgende Filterung der Daten. Sie soll in diesem zweiten Schritt zu einem großen Teil durch einen speziellen *Framegrabber* mit FPGA's (*Field Programmable Gate Arrays*) erfolgen. Diese erlauben eine Vorverarbeitung der enormen Datenmengen von bis zu 320 MB/s bei 100 Bildern/s, sowie deren schnelle und effiziente Komprimierung.

Zusammenfassung

Das im Aufbau befindliche automatisierte optische Mikroskop ist mit den zur Verfügung stehenden Bildverarbeitungsmöglichkeiten eine umsatzfähige, innovative Entwicklung, die eine Bereicherung für Pharmazie, Medizin und Biologie darstellt. Es wird ein geschwindigkeitsoptimiertes System bezüglich der Bildaufnahme und Verarbeitung darstellen. Der denkbare Anwendungsbereich ist vielfältig, da das Konzept die Anwendung einer großen Anzahl an optischen Mikroskopiermethoden erlaubt und prinzipiell nicht in der Art der Anwendung limitiert ist. Durch die einfache Bedienung und weitestgehend automatische Arbeit wird für den Betrieb nur ein minimaler Aufwand an geschultem Personal benötigt. Die ansonsten kostenintensiven histologischen Massenuntersuchungen können mit dem Mikroskop wesentlich preiswerter und präziser durchgeführt werden. Unkritische Proben werden hierbei schon im Vorfeld vom Computer aussortiert und nur verdächtige Gewebeproben durch einen Experten begutachtet. Durch individuelle Anpassung der Software kann jeder Mikroskopiervorgang durch eine Vorauswahl des Computers beschleunigt oder abhängig von der Art der Analyse auch vollautomatisiert werden. Dies ermöglicht eine schnelle Auswertung im HTS-Verfahren, wie sie manuell nicht möglich ist. Ebenfalls unterliegt die Anzahl der zu scannenden Objektträger pro Durchgang fast keiner Beschränkung, da die optischen Tische nicht an die Größe konventioneller Mikroskope gebunden sind.

Die computergestützte Analyse ermöglicht hochpräzise und reproduzierbare Messungen. Die erzielten Ergebnisse sind objektiv, da immer definierte Analysebedingungen eingehalten werden. Subjektive und fehlerhafte Beurteilungen, die beispielsweise auch durch Ermüdung entstehen, werden durch ein automatisiertes System vermieden.

Die zeitlichen und personellen Einsparungen eröffnen eine neue Dimension in der medizinischen Diagnostik. Untersuchungen mit deutlich erhöhter Statistik ergeben ein fehlerreduziertes Endergebnis und somit eine genauere wissenschaftliche Aussage. Auf dem pharmazeutischen Dienstleistungssektor ergibt sich ein breites Anwendungsspektrum für Massenanalysen, beispielsweise von biologischen Proben. Dort besteht ein Bedarf an kostengünstigeren, schnell und flexibel durchführbaren Analysen. Das Konzept dieses Mikroskops kann diesen Ansprüchen von Analysen der modernen Medizin und Pharmazie gerecht werden und einen Beitrag zur Forschung und Entwicklung leisten.