

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. K. Höfler)**

Entwicklung einer Automatisierten Bildanalyse-Routine zur Fertilitätsbestimmung an Hodenbiopsien

Peter Sangha

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. F. Fend
2. Privatdozent Dr. F.- M. Köhn

Die Dissertation wurde am 22.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.11.2001 angenommen.

1	EINLEITUNG	4
1.1	Allgemeines	4
1.2	Indikationen für eine Hodenbiopsie	5
1.3	Nomenklatur der Keimzellen	6
1.4	Beurteilung einer Hodenbiopsie	8
1.5	Methodische Grundlagen	9
1.5.1	Historie und Beschreibung der Flow-Zytometrie und Bild-Zytometrie	9
1.5.2	Vergleich Flow-Zytometrie und Bild-Zytometrie	10
1.5.3	Kerntexturanalyse	11
1.6	Stand der Forschung	12
1.7	Ziel dieser Studie	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.2	Desintegration	15
2.3	Feulgen-Färbung	16
2.4	Deskription der untersuchten Zellkerne	18
2.4.1	Spermatogonien	18
2.4.2	Spermatozyten	18
2.4.3	Prä spermatiden I. Ordnung	18
2.4.4	Prä spermatiden II. Ordnung	19
2.4.5	Spermatiden	19
2.4.6	Spermien	19
2.4.7	Sertoli-Zellen, Fibrozyten und Leydig'sche Zwischenzellen	19
2.5	Bildanalyseeinheit	20
2.5.1	Meßprinzip	20
2.5.2	Aufbau der Bildanalyseeinheit	21
2.5.3	Meßvorgang	21
2.6	Klassifikations-Schema	23
2.6.1	Konstruktion eines Klassifikations-Schemas	23
2.6.2	Selektion und Beschreibung von Kerntexturmerkmalen	25
2.6.3	Diskriminanten des Entscheidungsbaumes	28
2.6.4	Normierung des Datenmaterials	28
2.6.5	Systematik des Entscheidungsbaumes	29
2.6.6	Beispiele für gemessene Zellkerne	30
2.7	Statistik	34

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Beschreibung der Grundgesamtheit	36
3.2	Deskription der Messergebnisse	37
3.3	Multiple Regressionsanalyse	40
3.3.1	Darstellung der Regressionskoeffizienten des Training-Sets	40
3.3.2	Anwendung der Geradengleichung auf das Test-Set	41
3.4	Johnsen-Score-Äquivalent	41
3.4.1	Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent	41
3.4.2	Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Differenz	43
4	DISKUSSION	45
5	AUSBLICK	50
6	ZUSAMMENFASSUNG	52
7	ABSTRACT	54
8	LITERATURVERZEICHNIS	55
9	ANHANG	62
9.1	Reagenzien	62
9.1.1	Azur-A Feulgenfärbung	62
9.1.2	Desintegration	62
9.2	Entscheidungsbaum	63
9.3	Abbildung der Bildanalyse-Einheit	64
10	DANKSAGUNG	65

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Hodenbiopsie hat seit ihrer Einführung in den 60er Jahren durch Charny für die Diagnostik des testikulären Hypogonadismus wenig an Bedeutung verloren (Charny 1940, 1429). Moderne Methoden wie beispielsweise die Bestimmung der α -Glucosidase und Inhibin B haben zwar das Indikationsspektrum für die Hodenbiopsie eingeengt, dennoch ist die Beurteilung der Morphologie des Hodengewebes in manchen Fällen immer noch unabdingbar. Infertilität wird bei ca. 15% aller Paare mit Kinderwunsch beobachtet (Mikuz 1997, 779). Eine Paarsterilität liegt vor, wenn einem Paar trotz abgesetzter Kontrazeptiva über den Zeitraum eines Jahres keine Befruchtung gelingt. In der Regel erreichen 80 bis 85% aller Paare mit gynäkologisch und andrologisch unauffälligem Befund innerhalb von 12 Monaten eine Konzeption. Die Statistik der letzten 20 Jahre belegt, daß in 30% der Fälle der Mann alleine eine pathologische Veränderung aufweist sowie in 20% eine gemeinsame Fertilitätsstörung von Mann und Frau vorliegt. Dies bedeutet, daß der Mann an der Unfruchtbarkeit eines Paares zu 50% beteiligt ist (Shaban, 1996,1). Die Ätiologie männlicher Fertilitätsstörungen ist vielschichtig und kann in drei Gruppen unterteilt werden (Mikuz 1997,779):

Ätiologie der männlichen Fertilitätsstörungen

Prätestikuläre Störungen	Testikuläre Störungen	Posttestikuläre Störungen
<ul style="list-style-type: none">● Gonadotropinmangel● Östrogenüberschuß● Androgenüberschuß● Hyperprolaktinämie● Kortisonüberschuß	<ul style="list-style-type: none">● Hypospermatogenese● Reifungsstop● Sertoli-Cell-only-Syndrom● Klinefelter-Syndrom● Andere Chromosomenanomalien	<ul style="list-style-type: none">● Verschluß-Azoospermie (Aplasie, Young-Syndrom, Mukoviszidose, Epididymitis, Vasektomie)● Motilitätsstörungen (Immotile-ciliae-Syndrom, Ausreifungsstörungen, Spermatozoen-Antikörper, biochemische Anomalien der Samenflüssigkeit)

Tabelle 1 (Mikuz 1997, 779)

Zwischen 30 bis 75% der Fertilitätsstörungen beim Mann sind idiopathisch (Swerdloff 1985, 906). Beispiele für bekannte Ursachen männlicher Infertilität sind (Nieschlag 2000, 95)

- Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Funktion
- Kopulations- bzw. Erektionsstörungen
- Spermatozoen-Antikörper
- Verschlüsse der Samenwege
- Infektionen
- Lageanomalien
- Retrograde Ejakulation
- Medikamente, Drogen und Toxine

1.2 Indikationen für eine Hodenbiopsie

Die häufigste Indikation für eine Hodenbiopsie ist das Fehlen von Spermatozoen im Ejakulat in mehreren Untersuchungen. Nach Erhebung einer ausführlichen Anamnese (Familie z.B. Zystische Fibrose, Infektionen, Einwirkung von Noxen) erfolgt eine genaue klinische Untersuchung. Diese erlaubt im Vorfeld der Hodenbiopsie unter Umständen bereits die Diagnose einer CBAVD (congenital bilateral absence of the vas deferens). Bei dieser Konstellation wird von einer mikrochirurgisch tätigen Einrichtungen der mikrochirurgischenpididymalen Spermatozoenaspisation der Vorzug gegeben. Vor der Etablierung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion erfolgte in der Regel keine histologische Untersuchung des Hodengewebes bei erhöhten FSH-Werten. Da jedoch inzwischen bekannt ist, daß auch bei Azoospermie, reduziertem Hodenvolumen und erhöhtem FSH Tubuli mit fokal erhaltener Spermatogenese - bei sonst hochgradig geschädigtem Hodengewebe - vorhanden sein können (Schulze 1999, 88), erfolgt die Hodenbiopsie bei diesen Patienten aus diagnostischen Gründen und zur Durchführung testikulärer Spermatozoenextraktion. Ein regelrechter histologischer Befund deutet auf eine Obstruktion im Bereich des Rete Testis, des Nebenhodens oder Samenleiters hin. Massive Veränderungen der Spermatogenese finden sich beim Sertoli-Cell-only-Syndrom, ausgeprägter Hypospermatogenese und Reifungsstops.

1.3 Nomenklatur der Keimzellen

Im Samenepithel vollzieht sich die Entwicklung der befruchtungsfähigen Keimzellen von Spermatogonien bis zu den Spermien. Die Benennung der einzelnen Zellpopulationen wird in der Literatur sehr variabel gehandhabt. Aus diesem Grund ist für unsere Klassifizierung die Festlegung einer logischen und praktikablen Nomenklatur erforderlich. Zur besseren Vergleichbarkeit ist zusätzlich ein gängiges modernes Klassifikationsschema angegeben (Nieschlag 2000,32-33).

- Spermatogonien
- Spermatozyten (primäre und sekundäre Spermatozyten)
- Prä spermatiden I. Ordnung (runde Spermatiden vor der 2. Reifeteilung)
- Prä spermatiden II. Ordnung (runde Spermatiden nach der 2. Reifeteilung)
- Spermatiden (elongierte Spermatiden)
- Spermien

Abbildung 1 auf der folgenden Seite zeigt die verschiedenen Stadien der Spermatogenese.

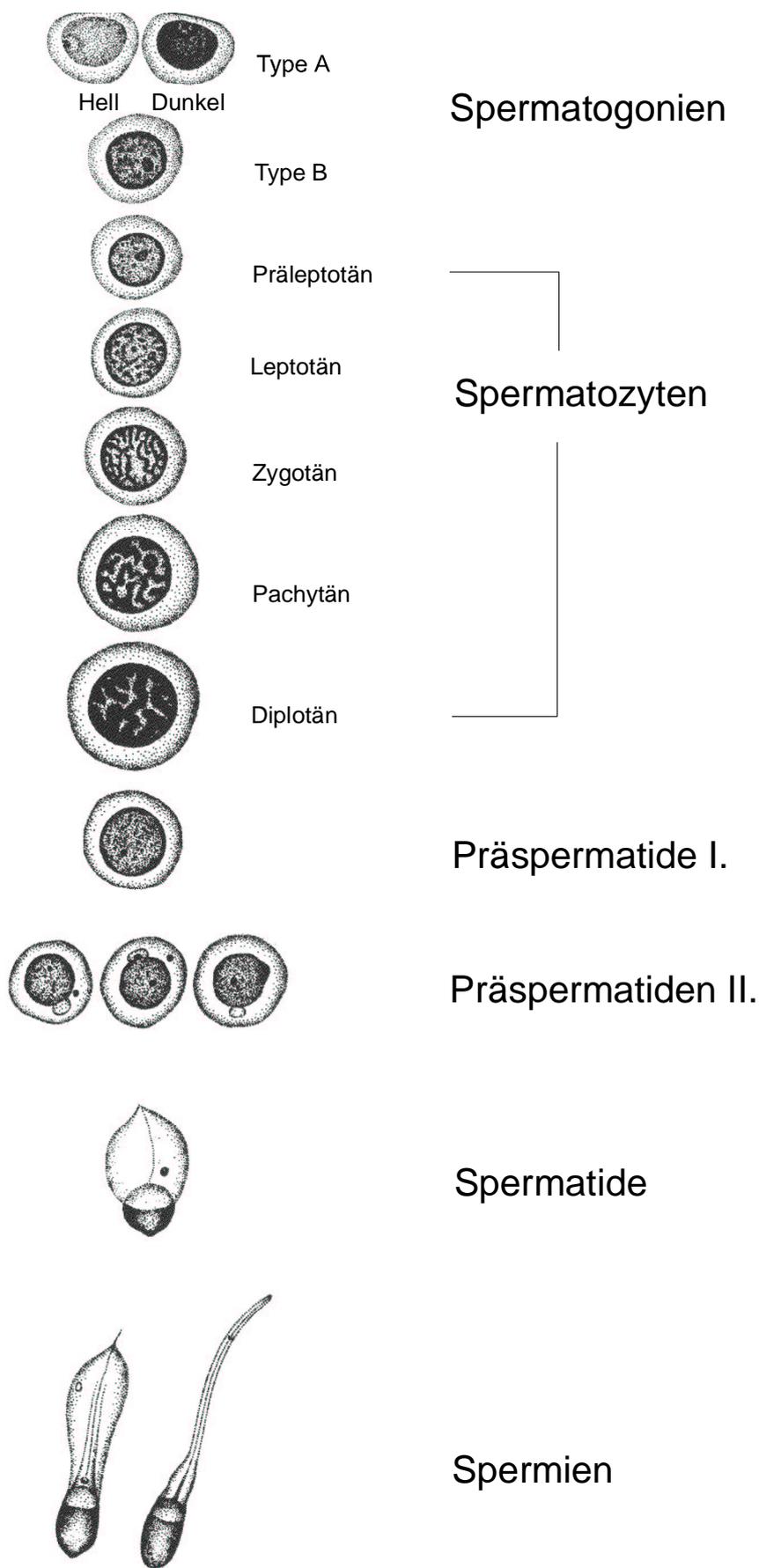


Abbildung 1 (nach Trainer 1987, 802)

1.4 Beurteilung einer Hodenbiopsie

Für die Bewertung des Fertilitätsgrades hat sich der Johnsen-Score bewährt. Hierfür werden 50 Tubulus-Querschnitte beurteilt und jedem Kanälchen je nach Ausprägung der Spermatogenese ein Wert von 1 (keine Zellen in den Tubuli) bis 10 (normale Spermatogenese) zugeteilt. Das ausschlaggebende Entscheidungskriterium ist bei dieser Methode die Anzahl der am weitesten entwickelten Samenzellen in einem Tubulus. Ein Spermium in einem Tubulus entspräche somit bereits einem Johnsen-Score von 8.

Score 1: Epithelfreie Tubuli

Score 2: Keine Samenzellen, nur Sertolizellen

Score 3: Nur Spermatogonien

Score 4: Weniger als 5 Spermatozyten pro Tubulus

Score 5: Keine Spermatozyten, nur Spermatozyten

Score 6: Weniger als 10 Spermatozyten pro Tubulus

Score 7: Keine Spermien, nur Spermatozyten

Score 8: Weniger als 10 Spermien pro Tubulus

Score 9: Desquamation/Desorganisation

Score 10: Regelrechte Spermio-genese

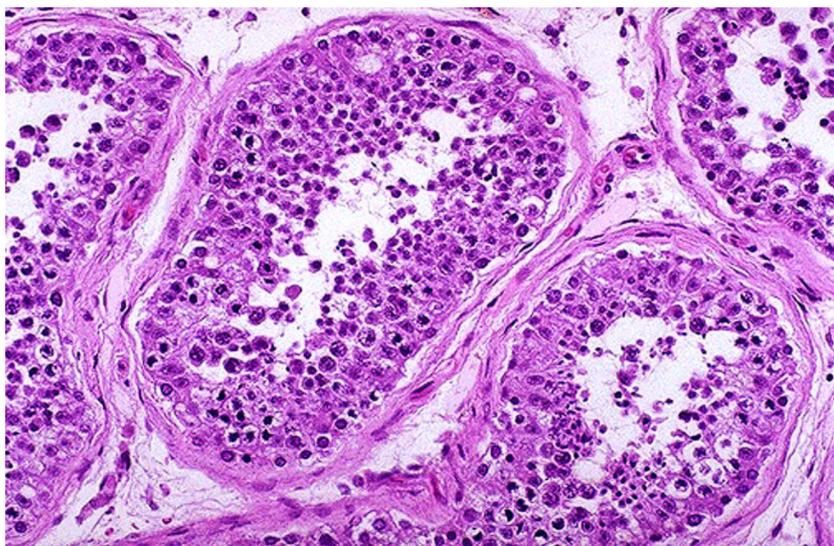


Abbildung 2 (Tubuli seminiferi, 300-fache Vergr., HE-Färbung)

Von diesen 50 Werten bildet man das arithmetische Mittel und erhält ein Ergebnis das als repräsentativ für den gesamten Hoden angesehen werden kann.

In den USA werden für die Beurteilung der Fertilität lediglich drei Bewertungsgruppen verwendet.

- Massive Reifungsstörungen (Johnsen-Score 1-6)
- Leichtere Reifungsstörungen (Johnsen-Score 6-8)
- Weitgehend normale Spermatogenese (Johnsen-Score 8-10)

Für den Kliniker reicht diese Information zwar in vielen Fällen aus, läßt jedoch bei weitem keine so exakte Klassifizierung einer Störung zu. Die präzise Benennung eines Reifungsstops beispielsweise wird angesichts der Therapierbarkeit leichter Reifestörungen in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen.

1.5 Methodische Grundlagen

1.5.1 Historie und Beschreibung der Flow-Zytometrie und Bild-Zytometrie

Die Entdeckung der stöchiometrischen Bindung von Pararosanilin an die DNA durch Robert Feulgen im Jahre 1924 kann als Geburtsstunde der DNA-Zytometrie angesehen werden (Feulgen 1924, 203-248). Caspersson gelang es daraufhin in den 30er Jahren erstmals, durch die Entdeckung der Mikrospektrophotometrie, den DNA-Gehalt von einzelnen Zellkernen zu messen (Caspersson 1936, 73-151). Da diese Methode sehr zeitaufwendig war, konnte sie sich für Routineuntersuchungen größerer Zellzahlen langfristig nicht etablieren. Mitte der 70er Jahre löste die DNA-Flow-Zytometrie die bis dahin als Goldstandard geltende Mikrospektrophotometrie ab. Die Flow-Zytometrie basiert auf der Auswertung eines Fluoreszenzsignals, welches nach Anregung durch einen Laserstrahl von einem direkt proportional an die DNA bindenden Farbstoff abgegeben wird. Diese Signale werden ohne Zuhilfenahme bildgebender Verfahren von einer Photoelektrode empfangen und elektronisch ausgewertet (Otto 1994, 259-268). Die Flow-Zytometrie wurde rasch standardisiert und erlangte früh klinische Bedeutung (Lovett 1984, 115-140).

Anfang der 80er Jahre begann die Entwicklung der computergestützten videobasierten digitalen Bild-Zytometrie (DNA Image Cytometry) (Preston 1980, 1-14). Aufgrund zunehmend leistungsfähigerer Computer und der Einführung hochauflösender elektronischer Kamerasysteme ist es gelungen, eine verhältnismäßig schnelle und genaue Messung Feulgen-gefärbter Zellkerne, weitaus effizienter als bisher mit der Mikrospektrophotometrie möglich, durchführen zu können. Infolgedessen konnte diese Methode seitdem bereits in einigen großen klinischen Studien angewandt werden (Lee 1994, 261-307).

1.5.2 Vergleich Flow-Zytometrie und Bild-Zytometrie

Zu den am meisten etablierten Verfahren in der quantitativen DNA-Bestimmung zählen bis heute die DNA-Flow-Zytometrie und die DNA-Bild-Zytometrie.

Qualitätsprofile dieser beiden Methoden sind in der untenstehenden Tabelle einander vergleichend gegenübergestellt.

Vergleich Flow-Zytometrie – Bild-Zytometrie

Attribute	Flow-Zytometrie	Bild-Zytometrie
Zellzahl	benötigt mehr als 10.000 Zellen	Ideal bei geringer Zellzahl
Zeitaufwand	sehr gering	hoch
Kontrollmöglichkeit	keine	optisch
Sensitivität	gute S-Phase Bestimmung	hoch bei aneuploiden und tetraploiden peaks
S-Phase	Gut geeignet für S-Phase Bestimmung	nicht geeignet für S-Phase Bestimmung
CVs	niedrige CVs	hohe CVs

Tabelle 2

In mehreren vergleichenden Studien konnte gezeigt werden, daß die statische DNA-Bild-Zytometrie, trotz der viel geringeren Zahl gemessener Zellkerne, der Flow-Zytometrie äquivalente Ergebnisse liefern kann (Baldetorp 1992, 577-585; Dawson 1990, 1115-1124; Elsheik 1992, 296-304; Koss 1989, 916-924; Lee 1991, 178-182; McFadden 1990, 637-642; Wingren 1988, 793-797; Yuan 1992, 461-465; Zbieranowski 1992, 303-313). Die Bild-Zytometrie besitzt jedoch den Vorteil, deutlich sensibler im Auffinden aneuploider Einzelzellen und aneuploider Stammlinien zu sein (Falkmer 1992, 360-367). Vor allem diese Eigenschaft sowie die optische Kontrollmöglichkeit und die relativ geringe Anzahl zu messender Zellen prädestinieren dieses Verfahren für einen Einsatz in der Fertilitätsprüfung von Hodenbiopsien.

1.5.3 Kerntexturanalyse

Die rasche Entwicklung von Computertechnologien hat es möglich gemacht, auch komplexere Strukturen zu analysieren, mathematisch zu beschreiben und somit vergleichenden Analysen zugänglich zu machen (siehe unter 2.6.1 S. 24). Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung eines fixierten und mit einem basophilen Farbstoff gefärbten Zellkerns erkennt man ein Kerngerüst, das von der DNA und Histon-Proteinen gebildet wird. Hierbei handelt es sich um Chromatin, welches als Euchromatin locker verteilt vorliegt oder dichte Massen bildet, die man als Heterochromatin bezeichnet. Innerhalb des Zellkernes liegen die Chromosomen in unterschiedlichen Kernkompartimenten frei verteilt und unterschiedlich dicht kondensiert vor. Das Heterochromatin beinhaltet alle kondensierten chromosomalen Anteile der DNA, welche nicht transkribiert werden. Diese können somit als inaktives Genmaterial betrachtet werden. In der Eukaryoten Zelle liegen mehr als 90% der DNA des Zellkerns in inaktiver Form vor (Alberts 1989, 512-514). Daher wird der Gehalt eines Zellkerns an Heterochromatin gerne mit dem Gesamt-DNA-Gehalt des Zellkernes gleichgesetzt. Das Euchromatin hingegen ist weitgehend entspiralisierte DNA und wird als aktives Genmaterial angesehen. Diese 10% der DNA sind freigelegt, damit die genetische Information für die Proteinbiosynthese abgelesen werden kann. Generell ist die Menge an Euchromatin eines Zellkernes

Ausdruck der Stoffwechselaktivität einer Zelle (Alberts 1989, 512-514). Mikroskopisch hebt sich das Euchromatin als hellerer Kernanteil vom dunkler erscheinenden Heterochromatin ab. Die Verteilung von hellerem und dunklerem Chromatin-Komponenten ergibt die sogenannte Chromatin- oder Kerntextur. Diese Möglichkeit, Zellkerne nicht mehr nur nach der Ploidie unterscheiden zu können, führte in den letzten Jahren zu einem steigenden Interesse an der Analyse der Kerntextur (Bibbo 1981, 23-28; Bartels 1982, 29-34; King 1988, 114-124; van den Houte 1991, 155-164; Wied 1984, 243-246).

1.6 Stand der Forschung

Nachdem der Johnsen-Score eine sehr zeitintensive Beurteilungsweise für den Pathologen darstellt, sind bereits zahlreiche Versuche unternommen worden, alternative Möglichkeiten zur Befunderhebung bei einer Fertilitätsprüfung zu finden. Mit der DNA-Flow-Zytometrie war man beispielsweise imstande, das Zellkollektiv nach dem DNA-Gehalt zu fraktionieren (Hittmair 1992, 1040-1045). Die diploide Gruppe jedoch besteht aus fünf verschiedenen Zelltypen, die nicht weiter unterschieden werden konnten. Es konnte also ein Reifungsstopp auf Höhe der Spermatogonien nicht von einem Sertoli-Cell-Only-Syndrom unterschieden werden. Desweiteren war der Nachweis der haploiden Zellen nicht sehr zuverlässig. Eine Differenzierung von Spermien und Spermatiden war nicht möglich. Ein Reifungsstopp auf der Ebene der Spermatiden hätte folglich gar nicht festgestellt werden können, sondern wäre als Normospermie klassifiziert worden. Eine Weiterentwicklung stellte die immunhistochemische Markierung des Zytoskeletts (Vimentins) in den Stromazellen dar (Hittmair 1994, 746-750). Dies führte einerseits zu einer genaueren Klassifizierung in der diploiden Gruppe, hatte aber auf der anderen Seite einen immensen Kosten-Anstieg zur Folge, der diese Methode unrentabel erscheinen ließ.

Die Bildanalyse führte anfangs zu den gleichen, mäßig differenzierten Aussagen wie die oben beschriebene Flow-Zytometrie (Iwamoto 1997, 2370-2374).

Gottschalk-Sabag gelang 1995 eine weitere Unterteilung der einzelnen Ploidie-Gruppen nach der optischen Dichte mittels Bildanalyse (Gottschalk-Sabag 1995, 403-407). Da er jedoch den einzelnen Dichte-Stufen keine Zellen zuordnen konnte (Ausnahme waren die Sertoli-Zellen, die als Standard dienten), stellte dies noch keine befriedigende Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen dar. Gottschalk-Sabag war es auch, der im folgenden Jahr eine bildanalytische Klassifizierung von Spermienköpfen durchführte (Gottschalk-Sabag 1996, 77-79).

Edward D. Kim bewerkstelligte in einer Studie von 1997 die bildanalytische Bestimmung von Spermatisden und Spermien nach quantitativen Gesichtspunkten (Kim 1997, 147-150). Bei einem Kollektiv von 18 Personen wurde der Anteil der tetra-, di- und haploiden Zellen bestimmt, wobei die haploide Gruppe aufgrund morphologischer Kriterien wie z.B. Fläche, Form und Dichte in Spermien und Spermatisden aufgeteilt werden konnte. Es handelte sich in erster Linie um eine quantitative Bestimmung mit dem Zweck, einen objektiven Zahlenwert für den Spermienanteil einer Gewebeprobe zu erhalten, um so beispielsweise die Größe einer Biopsie zur Spermengewinnung richtig zu wählen. Über den Anteil der übrigen Zellpopulationen, außer über ihren DNA-Gehalt, konnten keine Aussagen getroffen werden. Ein Versuch, die diploide Gruppe in größere und kleinere Zellen zu unterteilen, erbrachte keine nennenswerten Ergebnisse. Grundvoraussetzung für die Probanden dieser Studie war, daß sie keinerlei Reifungsstörungen aufwiesen und allesamt normosperm waren. Daher muß die Anwendbarkeit für eine Fertilitätsprüfung eines heterogenen Kollektivs fraglich erscheinen.

1.7 Ziel dieser Studie

Seit Jahrzehnten gilt der semiquantitativ bestimmte Johnsen-Score als Gold-Standard in der Beurteilung von Hoden-Biopsien. Durch die rasante Entwicklung auf dem Sektor der Computertechnologie werden bildverarbeitende Systeme in der Zyto-Diagnostik zunehmend interessanter und das Spektrum der Anwendbarkeit stetig breiter. Moderne Zytometer erlauben eine fast vollständig automatisierte Messung mehrerer hundert Zellkerne in weniger als 25 Minuten mit äußerster

Präzision und Zuverlässigkeit (Garner 1994, 346-352). Die Bereitstellung benutzerfreundlicher Software, der Preisverfall auf dem Gebiet der Kamera- und Computertechnologie sowie deren einfache Verfügbarkeit sind ideale Voraussetzungen für den Routineeinsatz der statischen DNA-Zytometrie in der klinischen Pathologie.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Studie, eine automatisierte bildanalytische Routine zur Fertilitätsbestimmung an Hodenbiopsien zu entwickeln, wobei hier nicht nur die Ploidie der einzelnen Reifungsstadien als Unterscheidungskriterium Anwendung fand. Vielmehr wurden morphologische Parameter, insbesondere die Analyse von Kerntextur-Merkmalen zur Differenzierung eingesetzt. Die Validität dieses neuen Verfahrens sollte durch einen Vergleich der Resultate mit den korrespondierenden Johnsen-Scores überprüft werden. Anhand der relativen Häufigkeiten der einzelnen Zellgruppen und durch Einsatz der Multiplen Regression wurde ein Johnsen-Score-Äquivalent kalkuliert, um die Einführung eines neuen Bewertungsschemas zu vermeiden und eine bessere Vergleichbarkeit zu garantieren. Der flächendeckende Einsatz dieser neuen Technik könnte eine Entlastung der befundenden Pathologen zur Folge haben und gleichzeitig zu einer Kosteneinsparung im Gesundheitswesen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Das Gesamtkollektiv von 139 Fällen setzt sich wie folgt zusammen:

- 96 Orchiektomiepräparate (von Patienten mit Prostata-Carcinom)
- 10 Biopsien des kontralateralen Hodens bei Hoden-Tumoren
- 12 Fälle von tumor-umliegendem, ipsilateralem, nicht pathologischem Gewebe
- 21 Hodengewebeentnahmen aus dem Sektionsgut

Im ipsi- und kontralateralen Hodengewebe der Tumorpatienten wurde immunhistochemisch ein carcinoma in situ ausgeschlossen (PLAP, DAKO Code No. M 858). Es fanden lediglich formalinfixierte Präparate Verwendung, denn es stellte sich im Laufe dieser Studie heraus, daß aus Bouin-fixiertem Hodengewebe kein zuverlässig reproduzierbarer Zellertrag nach Desintegration gewonnen werden kann. Das vergleichsweise schwächere Fixans Formalin erwies sich diesbezüglich als hervorragend geeignet für die Desintegration. Von allen Präparaten wurden Hämatoxylin-Eosin-Schnitte angefertigt, anhand derer die Intaktheit der Morphologie überprüft und der Johnsen-Score ermittelt wurde. Die heterogene Verteilung der dieser Untersuchung zugrundeliegenden Grundgesamtheit (siehe Ergebnisse) erscheint gut geeignet, die Leistungsfähigkeit dieser neuen sowohl qualitativ als auch quantitativen Fertilitätsbestimmung zu überprüfen.

2.2 Desintegration

Zur statischen DNA-Zytometrie werden Abklatschpräparate von Frischgeweben oder Zellvereinzlungspräparate, sogenannte Monolayer-Präparate verwendet, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Diese Art der Gewebepreparation stellt sicher, daß immer vollständige Zellkerne zur Analyse gelangen und somit die gesamte DNA eines Zellkernes ermittelt werden kann (Reith 1994, 185-193). Darüber hinaus liegen die Zellkerne bei dieser Art der Präparation einzeln verteilt und überlappen sich nicht, so daß sie sehr gut segmentiert werden

können. Dies ermöglicht eine rasche Analyse vieler Kerne in kurzer Zeit und erlaubt zudem eine weitgehende Automatisierung der Messung. Der größte Nachteil der Präparationsmethode liegt darin, daß der Gewebeverband zerstört wird und es somit unter bestimmten Umständen schwierig werden kann, Einzelzellen, die von besonderem Interesse sind, in der zytologischen Präparation wiederzufinden.

Die Präparation wurde nach folgendem Schema durchgeführt (Mikuz 1985, 343): Zu Beginn wurden 50 µm dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Präparaten angefertigt. Diese wurden vier mal für je 15 Minuten zum Entparaffinieren in Xylol gegeben. Anschließend wurde diesen Schnitten in einer absteigenden Alkoholreihe das Xylol wieder entzogen. Dies wurde durch Eintauchen der Schnitte in 96%, 80% und 70% Alkohol sowie in 4% Formalin für jeweils 15 Minuten erreicht. Nach einer 10-minütigen Spülung unter fließendem Wasser wurden die Präparate in Aqua dest. gelegt. Im Anschluß an eine mechanische Zerkleinerung wurde dem entparaffinierten Hodengewebe 1 ml einer 0,1% Pronase-Lösung beigemischt. Dieses Gemisch wurde für 2,5 Stunden in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert und in regelmäßigen Abständen in einem Vortex durchgemischt. Durch Aufbewahrung im Kühlschrank für eine halbe Stunde bei 7°C wurde die Enzymaktivität abgestoppt. Nach Abfiltration und einer Zellzählung in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer wurden Cytospins (Hettich, Rotina 35, 10 Minuten bei 1500 U/min) hergestellt, die nach ihrer Trocknung abschließend mit Formalin refixiert wurden. Reagenzien siehe Anhang 8.1.2, S. 63

2.3 Feulgen-Färbung

Eine exakte Färbung bezüglich der Dichte, Verteilung und absoluten Menge der Kern-DNA ist für die Bildanalyse unverzichtbar, da auf diesen Informationen basierend Texturparameter, Algorithmen und Diskriminanten zur Zelldifferenzierung kalkuliert werden. Heute wird die Feulgen-Färbung als Standardfärbung für quantitative DNA Messungen mittels Bildanalyse empfohlen (Reith 1994, 185-193). Die Feulgen-Färbung beruht auf der Freilegung von Aldehyd-Gruppen durch eine vorausgehende Hydrolyse der DNA. Durch diese Hydrolyse werden die Purinba-

sen abgespalten und Zuckeraldehyd-Gruppen (Desoxyribopentosealdehyd-Gruppen) aus dem Rückgrat des DNA-Moleküls freigelegt. In einem zweiten Reaktionsschritt kann nun der Farbstoff über eine Schiff'sche Reaktion an diese Aldehydgruppen binden. Dies führt zu einer stabilen Farbverbindung (Reith 1994, 185-193). Als Farbstoffe werden Pararosanilin oder Azur-A Farbstoffe verwendet, mit einem Absorptionsmaximum bei 565 nm im roten bzw. 580 nm im blauen Farbbereich. Die Geschwindigkeit, mit der die Zuckeraldehydgruppen freigesetzt werden, ist abhängig vom Kondensierungsgrad der DNA und damit vom Aktivitätsgrad des genetischen Materials. Nicht kondensierte, transkriptional aktive DNA ist gegenüber der sauren Hydrolyse empfindlicher als kondensierte, inaktive DNA. Wird die DNA zu lange der sauren Hydrolyse ausgesetzt, werden die Zuckermoleküle, die das Rückgrat des Moleküls darstellen zerstört und die DNA somit aufgelöst. Durch die Abstimmung der Expositionszeit der DNA in der Salzsäure können folglich das Euchromatin und das Heterochromatin selektiv angefärbt und somit einer getrennten Quantifizierung zugänglich gemacht werden (Rasch 1973, 1053-1065).

Die Färbung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Die für 3 Minuten in Aqua dest. rehydrierten Cytospins wurden 60 Minuten in einer 5-molaren Salzsäure bei 20°C hydrolysiert. In einer jeweils frisch hergestellten Azur-A Lösung mit einem pH-Wert von 1,5 wurden die Präparate für 60 Minuten bei 20°C gefärbt. Daran schloß sich die Entfernung des überschüssigen Farbstoffes durch drei unterschiedlich lange Sulfitwasserbäder an (30 Sekunden, fünf und zehn Minuten). Nach einer 5-minütigen Spülung unter fließendem kaltem Leitungswasser wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und vor dem Eindecken mit Xylol behandelt. Diese Feulgen-gefärbten Präparate wurden streng lichtgeschützt aufbewahrt. Reagenzien siehe Anhang 8.1.1, S.63

2.4 Deskription der untersuchten Zellkerne

Die Zuordnung isolierter Zellkerne zu bestimmten Zelltypen erfordert eine definierte Vorgehensweise und eine präzise Kenntnis der Morphologie. Die Klassifizierung (modifiziert nach Tonutti 1960, 8-16) wurde im wesentlichen anhand der folgenden Charakteristika der Kerne vorgenommen.

2.4.1 Spermatogonien

Es werden zwei Typen von Spermatogonien unterschieden, A und B, wobei A noch in eine helle und dunklere Form differenziert werden kann. Diese Unterteilungen fanden jedoch bei dieser Untersuchung keine Beachtung. Der Durchmesser der Zellkerne schwankt im Mittel zwischen 8 – 10 µm, ihre Gestalt ist kugelig, selten ellipsoid. Der reiche, zum Teil grobkörnige Chromatingehalt verdeckt häufig den großen Nukleolus.

2.4.2 Spermatozyten

Das Maß für die Zellkerne von Spermatozyten oben beschriebener Nomenklatur liegt zwischen 11 und 12,5 µm. In der Wachstumsperiode wird aus einem kleinen, chromatindichten, fast strukturlosem Kern über Zwischenstufen ein größeres, locker gefügtes, kugeliges Gebilde, das bei erhaltener Kernmembran charakteristisch knäuelartig aufgewickelte Chromatinbänder (Spirem-Stadium) zu erkennen gibt.

2.4.3 Präspematiden I. Ordnung

Präspematiden I. Ordnung wurden nicht gesondert klassifiziert, da die Zellen nur verhältnismäßig kurz in diesem Entwicklungsstadium verharren und sehr schnell in die zweite Reifeteilung eintreten. Sie sind infolgedessen sehr selten und eignen sich deshalb nicht für eine automatisierte Zellklassifizierung.

2.4.4 Prä spermatiden II. Ordnung

Die zweite Reifeteilung läßt die Prä spermatiden II. Ordnung entstehen. Deren Kern ist bei einer Größe von 7 - 8 μm stets von runder Form. Die Kernmembran umschließt ein gröberes Liniennetzwerk, das die relativ großschollige Chromatinsubstanz in gleichmäßiger Verteilung trägt. Nicht selten sind mehrere Kernkörperchen vorhanden.

2.4.5 Spermatiden

Spermatiden gehen aus der zuvor beschriebenen Population durch die dritte Reifeteilung hervor. Der relativ kleine Kern mißt im Querschnitt 5 - 6,5 μm . Die Chromatinstruktur ist verhältnismäßig dicht und zeigt gelegentlich hellere Kernlücken. Ein oder mehrere große Nukleolen werden beobachtet.

2.4.6 Spermien

Die Spermiogenese charakterisiert die Differenzierungsperiode, in der aus ortsgelassenen Spermatiden bewegliche Spermien entstehen. Die in Umwandlung begriffene Spermatide zeigt im Kern eine starke Verdichtung des Chromatins. Der Kern nimmt eine zunehmend längliche Gestalt an, diese Formen können bereits als Spermien deklariert werden. Der Kern liegt der Basis des Kopfes breit auf, der 4 - 5 μm in der Länge und 3 - 3,5 μm in der Breite mißt, und verjüngt sich zu seiner Spitze.

2.4.7 Sertoli-Zellen, Fibrozyten und Leydig'sche Zwischenzellen

Verhältnismäßig einfach zu erkennen sind die Sertoli-Zellen. Deren Kern ist von länglich-eckig bzw. ellipsoider Form, im Unterschied zu den kugeligen Kernen der Samenzellvorstufen relativ groß und mißt in der Achse 4 - 6 μm bzw. 12 - 15 μm . Der Kernrand zeigt nicht selten tiefe Einkerbungen. Das Kerngerüst ist ein feines Netzwerk und nur schwach mit Chromatin besetzt. Auffällig wirkt der große, dichte Nukleolus.

Zum Zwischengewebe werden die Fibrozyten, die aufgrund spindelförmiger Struktur und Vorkommen in zahlreichen anderen Bildanalyse-Untersuchungen gut zu erkennen sind sowie die Leydig'schen Zwischenzellen gerechnet. Deren Kern ist kugelig (7 – 9 μm) und besitzt ein bis zwei Nukleolen. Die Kernmembran ist deutlich ausgebildet und umschließt ein zartes Kerngerüst, welches neben feinverteilten Chromatinstäubchen auch grobschollige Kernsubstanz trägt, die vornehmlich peripher gelagert ist.

2.5 Bildanalyseeinheit

2.5.1 Meßprinzip

Grundvoraussetzung für die statische Bild-Zytometrie ist die von Feulgen stammende Erkenntnis, daß Pararosanilin beziehungsweise Azur-A Farbstoffe spezifisch und vor allem stöchiometrisch die DNA eines Zellkernes anfärben (Feulgen 1924, 203-248). Licht, das einen unter dem Mikroskop fokussierten Zellkern durchdringt, der mit einem solchen Farbstoff gefärbt ist, wird selektiv von diesem absorbiert. Gemäß dem Lambert-Beer'schen-Gesetz (Bunsen 1862, 29-34) ist die Menge an absorbiertem Licht direkt proportional zur Konzentration der dieses Licht absorbierenden Substanz. Die Farbe des durchtretenden Lichtes hängt vom Absorptionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ab. Eine selektiv gefärbte Substanz, wie zum Beispiel die durch die Feulgen Reaktion gefärbte DNA, kann somit genau quantifiziert werden. Als Voraussetzung hierfür gilt, daß das abgegebene Licht konstant ist und daß nur Licht einer Wellenlänge verwendet wird. Dies wird durch eine Spannungsstabilisierung der Lichtquelle und das Einschleiben eines optischen Sperrfilters in den Strahlengang des Mikroskops erreicht. Dieser Filter ist nur für Licht jener Wellenlänge durchlässig, das dem Extinktionsmaximum des verwendeten Farbstoffes entspricht (Böcking 1994, 107-128). Die Absorption in optischen Dichteeinheiten (OD) errechnet sich aus dem Verhältnis von ausgesandtem Licht zu durchgetretenem Licht. In einem digitalisierten Bild ist die Transmission direkt proportional dem Pixelgrauwert. Daher ist eine Bestimmung

der Färbeintensität, der Grauwertverteilung über die Fläche sowie der Chromatin-Textur anhand eines digitalisierten Bildes zulässig.

2.5.2 Aufbau der Bildanalyseeinheit

Das verwendete Bildanalyse-System ist ein Cytosavant der Firma Oncometrics aus Vancouver, Canada. Der Cytosavant besteht aus folgenden Komponenten:

- Nikon-Mikroskop
- Plan-apochromatischem 20-fach Objektiv von Nikon
- Tubus Nikon
- Xillix Kamera (Vancouver, Canada).

Die Xillix-Kamera ist mit einem hochauflösenden full-frame CCD-Chip (charged coupled device) ausgerüstet, der eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel bei einer Pixelgröße von $0,1 \mu\text{m}^2$ ($0,34 \mu\text{m} * 0,34 \mu\text{m}$) garantiert. Die hohe Auflösung dieser Kamera erlaubt die Verwendung von relativ gering vergrößernden Objektiven (20-fach). Wesentlicher Effekt dieser geringen Vergrößerung ist eine hohe Tiefenschärfe, sodaß der gesamte Zellkern in dieser Vergrößerung scharf abgebildet wird. Trotz der geringen Objektiv-Vergrößerung bleibt die Auflösung des Systems immer unter der theoretischen optischen Auflösung des verwendeten Lichts der Wellenlänge von 600 nm. Sowohl hohes räumliches Auflösungsvermögen als auch Tiefenschärfe sind Grundvoraussetzungen für die präzise Messung der DNA-Verteilung im Zellkern (Garner 1994, 347-348). Zusätzlich gehört ein Personal Pentium-Computer, ausgestattet mit einer speziellen Matrox-Bildbearbeitungskarte und einer für die Bildbearbeitung geeigneten Software (Classify Software, Oncometrics Inc.), zu der in dieser Studie verwendeten Bildanalyseeinheit.

2.5.3 Meßvorgang

Die Cytosavant Bildanalyse-Einheit stellt ein vollautomatisches Meßsystem dar, welches innerhalb eines einzigen Arbeitsvorganges 50 Objektträger bearbeiten kann. Dies wird durch einen dem Mikroskop angeschlossenen automatischen

slide-loader, der pneumatisch betrieben wird, ermöglicht. Vor jeder Messreihe muß das System zunächst auf eine exakte Köhler'sche Beleuchtung und eine präzise Ausleuchtung des Gesichtsfeldes kalibriert werden, um eine gleichbleibende Qualität der Ergebnisse zu garantieren.

Nicht alle Zellen befinden sich in ein und derselben optischen Ebene, nicht einmal bei Monolayer- oder Dünnschnittpräparaten. Für eine exakte Messung von Kern-texturmerkmalen ist es unbedingt notwendig, daß alle Zellkerne exakt fokussiert werden, wie Poon et al. bereits 1992 zeigen konnten (Poon 1992 a, 766-774). Bei jedem neuen Objektträger wird überprüft, ob sich darauf Zellkerne befinden. Anschließend wird anhand eines Licht-Intensitäts-Algorithmus näherungsweise eine optische Ebene berechnet. Von dieser ausgehend werden in 0,50 µm Schritten Bilder von den Zellkernen angefertigt. Es sind zahlreiche Texturmerkmale beschrieben worden, die ein Minimum oder Maximum in der exakten Schärfenebene aufweisen (Poon 1992 b, 481-489). So kann anhand einiger Features jenes Bild eines Zellkerns isoliert werden, das optimal fokussiert ist, die anderen unschärferen Bilder werden im Anschluß sofort gelöscht. Kerne, von denen kein Bild mit exakter Schärfe gewonnen werden kann, werden ebenfalls verworfen. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß alle Zellen optisch fokussiert sind, obwohl sie nicht in der gleichen optischen Ebene liegen.

Alle Zellkern-Bilder werden zuerst von einem einfachen Threshold-Algorithmus in der virtuellen Schärfe-Ebene segmentiert. So wird die erste Zellkern-Maske generiert, deren Begrenzung stark erweitert ist. Nach Erzeugung einer gradierten Abbildung für alle Pixel werden diejenigen mit dem niedrigsten Gradienten entfernt, unter der Voraussetzung, daß die Kontinuität der Zellkerngrenze intakt bleibt. Die Segmentation stellt einen der kritischen Punkte für die Leistung der Klassifikation dar. Der oben beschriebene Segmentations-Algorithmus hat sich als überlegen erwiesen und garantiert eine hohe Qualität der Ergebnisse (MacAulay 1990, 394-398). Auf einem Objektträger werden circa 2.000 absolut zufällig ausgewählte Objekte von der CCD-Kamera aufgenommen, digitalisiert und in ein Video-Overlay als frame abgelegt und gespeichert. Pro Fall erhält man etwa 2.000 Bil-

der in 256 Graustufen (8 Bit), die in einer Zellgalerie einer interaktiven Nachbetrachtung zur Verfügung stehen.

2.6 Klassifikations-Schema

Ziel dieses Klassifizierungsschemas soll es sein, an noch nicht befundeten Hodenbiopsien den Fertilitätsgrad zu bestimmen. Jedoch ist in diesem Fall die Kategorisierung der Präparate wesentlich komplexer als beispielsweise bei der Dignitätsbestimmung eines Tumors, bei dem in aller Regel nur eine Gruppe von Zellen diagnostische Relevanz besitzt. Hier hingegen haben sechs verschiedene Zellpopulationen Einfluß auf das Untersuchungsergebnis, das im Gegensatz zu den überwiegend qualitativen Resultaten bei Tumoruntersuchungen neben der qualitativen auch quantitativen Ansprüchen genügen muß.

2.6.1 Konstruktion eines Klassifikations-Schemas

Die Konstruktion eines Klassifikations-Schemas gliedert sich in 2 Phasen. In der Learning-Phase werden Präparate mit definierten Zellen verwendet um ein Klassifikations-Schema entwickeln zu können. In der zweiten Phase (Test-Phase) wird das Schema an unbekanntem Präparaten getestet und anhand der Zuordnungsrichtigkeit die Leistungsfähigkeit dieser Methode überprüft. Das Procedere eines Klassifikations-Schemas, vom Learning-Set beginnend bis zum klassifizierten Test-Set, skizziert die nachfolgende Grafik (Schulerud 1998, 67).

Klassifikations-Schema

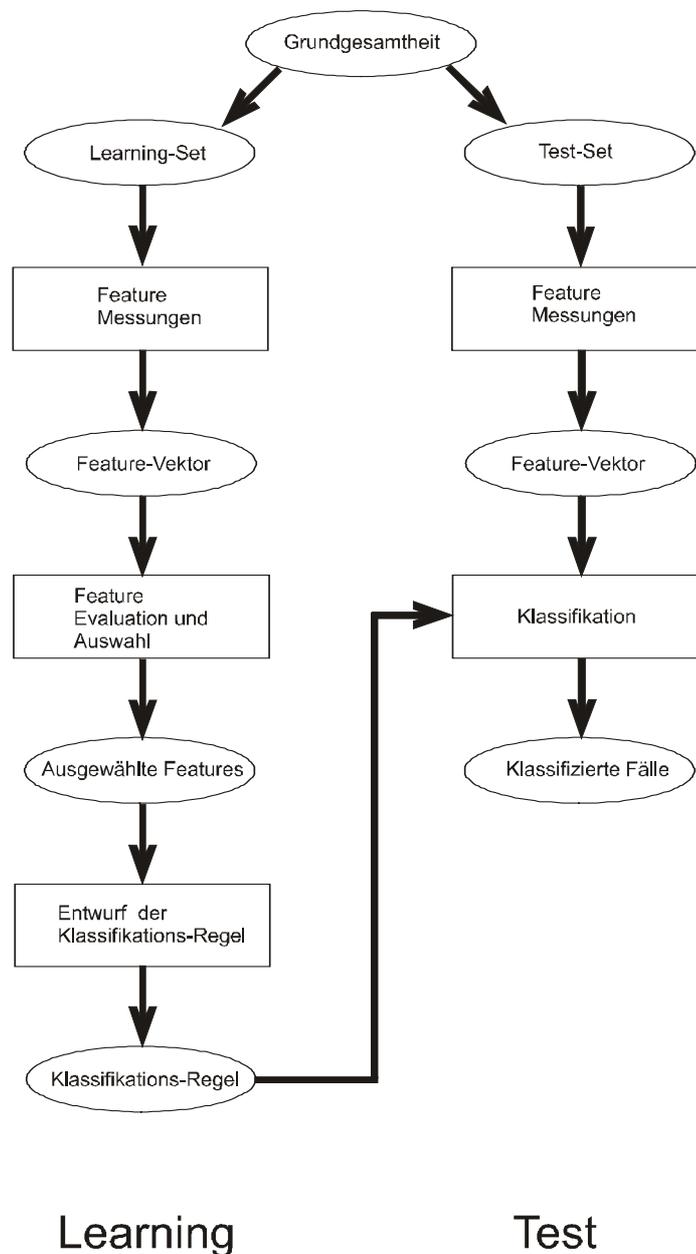


Abbildung 3 (nach Schulerud 1998, 67)

Zur Verfügung standen die 139 unter 2.1 beschriebenen Fälle sowie fünf weitere, die als Learning-Set dienten. Von diesen fünf Präparaten wurden bildanalytisch jeweils circa 2.000 Zellen gemessen, die anschließend manuell in sechs Gruppen selektiert wurden.

1. Sertoli-Zellen, Leydig'sche-Zwischenzellen und Fibrozyten
2. Spermatogonien
3. Spermatozyten
4. Präspmatiden II. Ordnung
5. Spmatiden
6. Spermien

Diese einzelnen Gruppen mit jeweils mindestens 500 Zellen stellen das Learning-Set dar, anhand dessen mittels Kerntexturanalyse Features (charakteristische Kennzeichen) bestimmt werden, die zur Differenzierung der gemessenen Zellen dienen.

2.6.2 Selektion und Beschreibung von Kerntexturmerkmalen

Zur mathematischen Beschreibung nukleärer Texturmerkmale stehen eine Reihe verschiedener Parameter, sogenannte Deskriptoren (Features), zur Verfügung. Die hierfür verwendeten Texturparameter sind in der unten angeführten Tabelle zusammengefaßt und nach Gruppen geordnet. Prinzipiell lassen sich folgende Klassen von Deskriptoren unterscheiden:

- Morphometrische Parameter: zur Beschreibung der äußeren Form der Zellkerne.
- Run Length Parameter: diese beschreiben die Chromatinverteilung im Zellkern anhand von Linien gleicher Grauwerte benachbarter Pixel.
- Diskrete Texturparameter: diese geben die Verteilung unterschiedlicher Dichteregionen im Zellkern an.
- Markovian Features: diese beschreiben die Grauwertvariationen zwischen benachbarten Pixel in einem digitalisierten Bild des Zellkerns.
- Non-Markovian Features: diese beschreiben den Umfang der Unterschiede verschiedener Grauwerte innerhalb des Zellkerns.
- Photometrische Parameter: diese beschreiben die optische Dichte der Zellkerne.

- **Fraktale Parameter:** diese stellen Flächenmessungen dreidimensionaler Strukturen im Zellkern dar, die durch Transformation der digitalen Bildinformation jedes einzelnen Pixel mit Hilfe einer optischen Dichtefunktion erzeugt werden.

Kerntexturmerkmale

Morphologic features		Run length texture features	Discrete texture features
area	Harmonv12	texture orientation	lowDNAarea
x centroid	Harmonv13	size txt orientation	medDNAarea
v centroid	Harmonv14	short0 runs	hiDNAarea
mean radius	Harmonv15	short45 runs	lowDNAamount
max radius	Harmonv16	short90 runs	medDNAamount
var radius	Harmonv17	run0 lenath	hiDNAamount
sphericitv	Harmonv18	run45 lenath	lowDNAcompactness
eccentricitv	Harmonv19	run90 lenath	medDNA compactness
cell orientation	Harmonv20	lona45 runs	hiDNA compactness
inertia shape	Harmonv21	lona90 runs	mhDNA compactness
compactness	Harmonv22	run135 lenath	low av densitv
elongation	Harmonv23	run0 percent	med av densitv
Frequencv low	Harmonv24	run45 percent	Hi av densitv
Frequencv hiah	Harmonv25	run90 percent	mh av densitv
Harmonv01	Harmonv26	run135 percent	LowVSmed DNA
Harmonv02	Harmonv27	lona135 runs	lowVShiah DNA
Harmonv03	Harmonv28	arav0 level	lowVSmh DNA
Harmonv04	Harmonv29	arav45 level	low den object
Harmonv05	Harmonv30	arav90 level	med den object
Harmonv06	Harmonv31	arav135 level	High den object
Harmonv07	Harmonv32		low cntr mass
Harmonv08	Randæ averaæ		med cntr mass
Harmonv09	Centre of aravitv		High cntr mass
Harmonv10			
Harmonv11			

Markovian texture features	Non-Markovian texture features	Photometric features	Fractal features
entropv enerav correlation contrast Homogeneity	cluster shade cluster prominence densitv liath spot densitv dark spot randæ extreme	mean intensitv var intensitv DNA Index DNA Amount OD maximum OD variance OD skewness OD kurtosis	fractal dimension fractal1 area fractal2 area

Tabelle 3

Je nach Leistungsfähigkeit des Analysegerätes werden bis zu 200 Kerntexturmerkmale (Features) aus der digitalen Bildinformation extrahiert. Im Gegensatz dazu stellt die klassische DNA-Zytometrie eine Einparameter-Messung dar. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die effektivsten Features herauszufiltern (Schulerud 1998, 63-82). Wenig Sinn macht es beispielsweise, die Kombination verschiedener Features manuell auszuprobieren oder lediglich die besten solitären Features zu verknüpfen. Eine Option ist die Qualitätsprüfung bestimmter Feature-Kombinationen anhand einer Multivarianzanalyse. Dabei werden jene Parameter isoliert, anhand derer sich die Zellkollektive am besten unterscheiden lassen (Bartels 1994, 207-231). Im Rahmen dieser Studie wurden die Features in einem nicht-parametrischen Mann-Whitney Rang-Summen-Test evaluiert und nach den F-Werten sortiert. Die Klassifikationsregel wurde anschließend mit Hilfe einer linearen stepwise backward Regressionsanalyse aufgestellt (Mairinger 1999, 258-262).

Die Durchführung der Zelldifferenzierung mit einer hohen Anzahl an Features erweist sich als ungünstig, da ab einer bestimmten Anzahl die Zuordnungsgenauigkeit nicht mehr zu- sondern abnimmt. Dies wird als „peaking phenomenon“ bezeichnet. Deshalb sollte bei einer limitierten Datenmenge darauf geachtet werden, daß nur eine begrenzte Anzahl an Parametern eingesetzt wird, die dann eine optimale Differenzierung der Zellpopulationen zuläßt. Die empfohlene Anzahl an Features richtet sich nach der Größe der zur Verfügung stehenden Datenmenge und dem jeweiligen Klassifikations-Schema. Für ein lineares Klassifikations-Schema sollte die Zahl der im Learning-Set vorhandenen Zellen mindestens dem fünffachen der Zahl der extrahierten Features entsprechen. Für komplexere Klassifikations-Schemata ist eine höhere Anzahl an Musterzellen notwendig (Schulerud 1998, 63-82).

Die in dieser Untersuchung berechneten Diskriminanten enthalten höchstens fünf Features, sodaß bei den ausreichend vorhandenen Musterzellen von einer maximalen Differenzierungsgenauigkeit unter diesen Voraussetzungen ausgegangen werden darf.

2.6.3 Diskriminanten des Entscheidungsbaumes

Eine Diskriminante bezeichnet die Kombination mehrerer Features, die zur Unterscheidung von zwei Zelltypen dient. Bei Anwendung mehrerer dieser Diskriminanten in einem „Entscheidungsbaum“ wird der verwertbare Teil der circa 2.000 pro Fall gemessenen Zellen in die vorgegebenen sechs Gruppen aufgeteilt. Der eigens konstruierte „Entscheidungsbaum“ umfaßt 44 Einzel-Schritte, die jedoch nicht nur aus Diskriminanten bestehen. Auch andere Befehle, wie Thresholds oder das Verschieben von Zellen zwischen verschiedenen Gruppen fließen in die Systematik des Entscheidungsbaumes ein.

In dieser Studie verwendete Diskriminanten:

Sertoli-Zellen	Spermatozyten	Spermien	Präspermatiden
DNA-Index Med_av_dst Fractal1_area	Eccentricity Lin DNA area Fractal1_area Long 135_runs	DNA-Index homogeneity	Area Max_radius DNA-amount Mh DNA compactness Centre_of_gravity

Spermatogonien	Haploid-Diploid
Max_radius Low DNA compactness Mh DNA compactness Low_centre_mass	X_centroid Harmony 02 DNA Index Med.DNA area

Tabelle 4

2.6.4 Normierung des Datenmaterials

Vor der Anwendung des Entscheidungsbaumes auf die gemessenen Zellen ist es erforderlich, Material, das aus zeitlich verschiedenen Färbungen, Messreihen und Präparationen stammt, anhand eines Standards zu normieren, um die Vergleich-

barkeit der Daten zu gewährleisten. Hierbei wird zwischen externen und internen Standards unterschieden. Als externer Standard können beispielsweise Ratten-Hepatozyten dienen. Diese werden mit dem zu untersuchenden Material in ein und demselben Ablauf gefärbt und gemessen. Auf diese Weise garantieren sie die Vergleichbarkeit verschiedener Datensätze. Für die Festlegung von internen Standards werden Kerne aus dem Untersuchungskollektiv verwendet.

Aufgrund der geringen Streuung der integrierten optischen Dichte (IOD) von Sertoli-Zellen, wurde von 500 manuell ausgewählten Sertoli-Zellen der Mittelwert der IOD berechnet. Dieser Durchschnittswert (153) war Grundlage für die Normierung der gesamten Rohdaten und wurde als arbiträrer, fall-unabhängiger Standard benutzt.

2.6.5 Systematik des Entscheidungsbaumes

Zu Beginn werden die unbrauchbaren Kerne aussortiert. Hierbei handelt es sich um fragmentierte, unscharfe Kerne oder Artefakte. Als nächstes werden die sich überlappenden Zellkerne entfernt. Die verworfenen Kerne werden jedoch nicht gelöscht, sondern einer eigenen Gruppe zugeführt, um gegebenenfalls noch eine optische Kontrolle aller gemessenen Zellen durchführen zu können. Die Spermatozyten werden im nächsten Schritt anhand einer Diskriminante separiert. Im Anschluß werden Sertoli-Zellen, Leydig'sche Zwischenzellen und Fibrozyten in eine Gruppe zusammengefaßt. Die Spermatogonien können ebenfalls anhand einer Diskriminante differenziert werden. Nach der Selektion der Prä spermatiden II. Ordnung werden die verbleibenden haploiden Zellkerne in Spermatiden und Spermien getrennt.

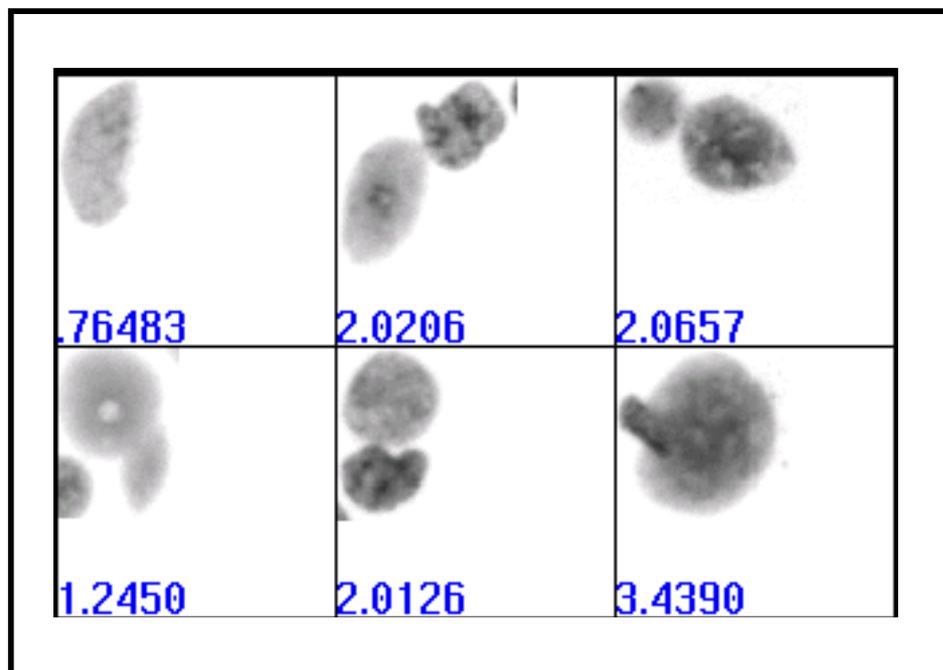
Die endgültige Aufteilung erfolgte in folgende Gruppen:

1. Verworfenene Zellkerne, Artefakte, Doubletten, etc.
2. Sertoli-Zellen, Leydig'sche-Zwischenzellen und Fibrozyten
3. Spermatogonien
4. Spermatozyten
5. Prä-spermatiden II. Ordnung
6. Spermatiden
7. Spermien

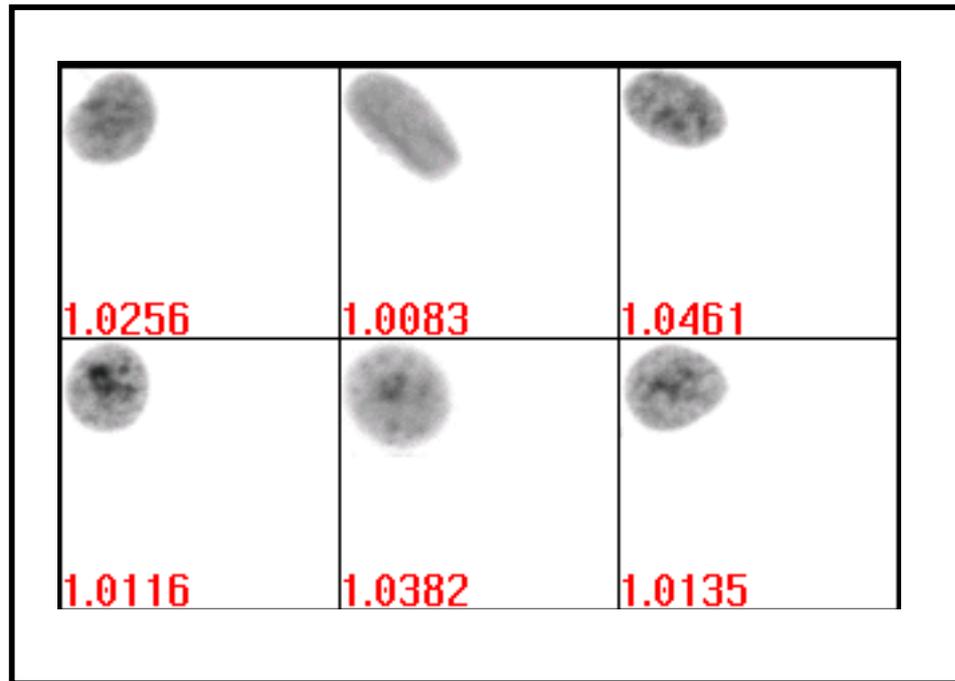
Entscheidungsbaum siehe Anhang 8.2

2.6.6 Beispiele für gemessene Zellkerne

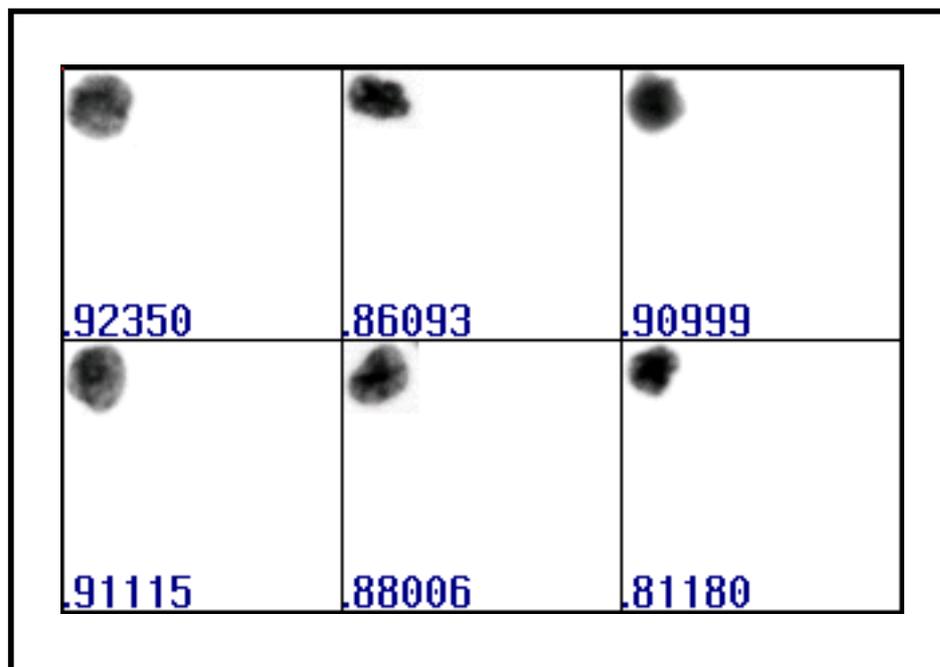
Verworfenene Objekte



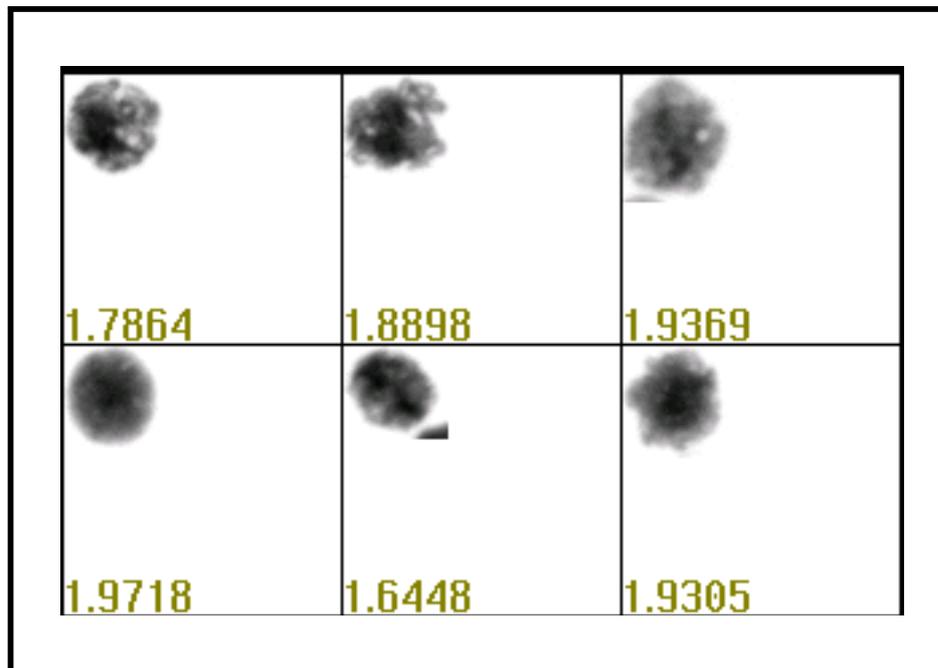
Sertoli-Zellen, Leydig'sche Zwischenzellen



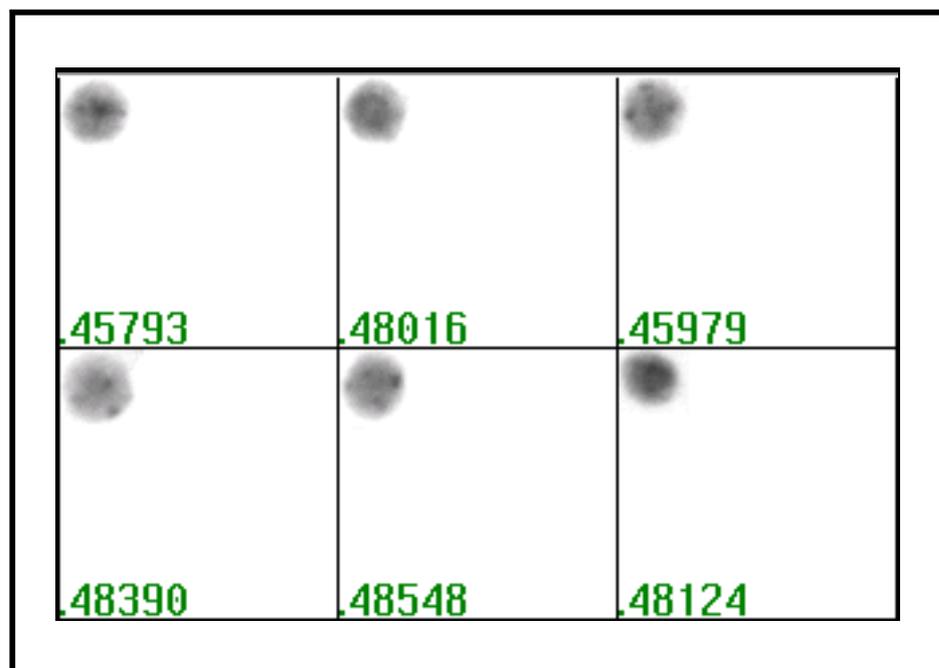
Spermatogonien



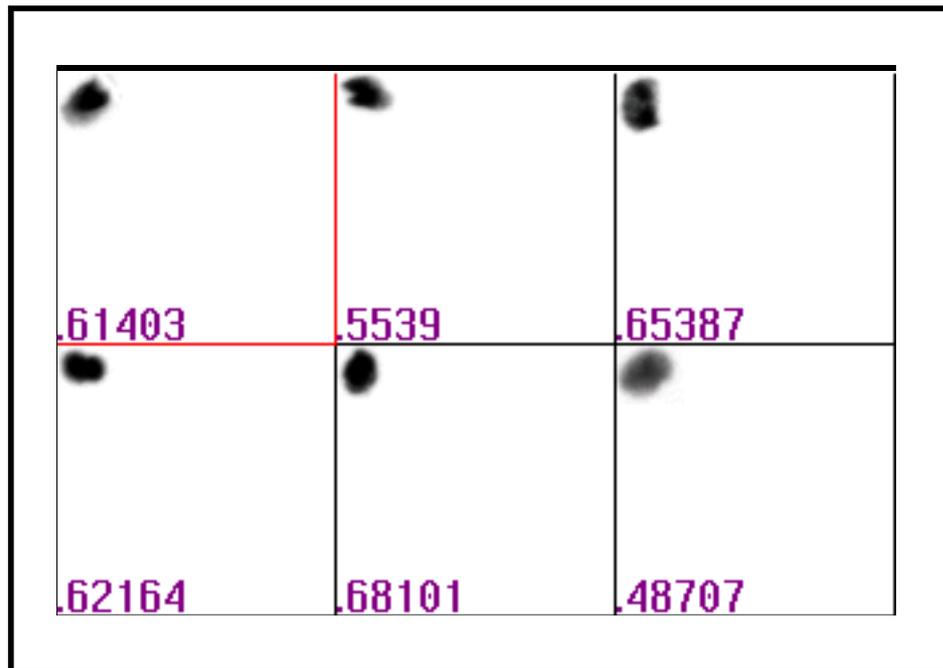
Spermatozyten



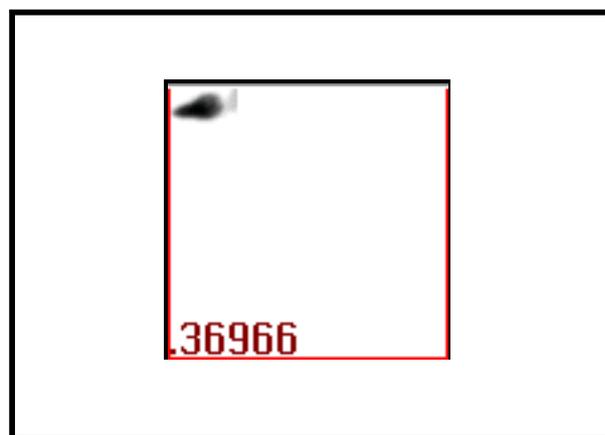
Präspermatiden



Spermatiden



Spermium



Abbildungen 4-10

Auf die Test-Phase wird im folgenden Statistik-Teil näher eingegangen.

2.7 Statistik

Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit des beschriebenen Klassifikations-Schemas könnte an dem aus 139 Fällen bestehenden Test-Set erfolgen (2.6.1 Konstruktion eines Klassifikationsschemas, S. 23). Dies würde aber lediglich einen Vergleich des Johnsen-Score mit den relativen Häufigkeiten der verschiedenen Reifungsstadien eines Falles zulassen. Da jedoch bei einer multiplen Regressions-Analyse die Möglichkeit besteht, den prognostischen Wert einzelner Zellpopulationen für den Fertilitätsgrad zu berechnen, kann man anhand der relativen Häufigkeiten der verschiedenen Reifungsstadien und der partiellen Regressions-Koeffizienten ein Johnsen-Score-Äquivalent berechnen. Um zu quantifizieren, inwieweit dieser Äquivalenz-Wert mit dem tatsächlichen Johnsen-Score übereinstimmt, wurde das Test-Set wiederum streng randomisiert in ein Training- (95 Fälle) und ein Test-Set (44 Fälle) unterteilt.

Am Training-Set wurde eine Multiple Regressions-Analyse mit den Johnsen-Scores als abhängiger Variable und den relativen Häufigkeiten der einzelnen Reifungsstadien pro Fall inklusive Fibrozyten, Sertoli-Zellen und Leydig'sche Zwischenzellen durchgeführt. Die Multiple Regression erlaubt eine Analyse des Datenmaterials auf höchstem Niveau, d.h. in einer metrischen Skalierung. So gehen weder Informationen den Johnsen-Score betreffend, da keine Einteilung in Untergruppen nötig ist, noch Informationen aus den Meßergebnissen verloren, da auch hier keine Ordinal-Skalierung erforderlich ist. Anhand der Multiplen Regression wird bei den ausgesuchten Zellgruppen überprüft, welche einen signifikanten Zusammenhang mit dem Johnsen-Score des zugehörigen Falles erkennen lassen und wie groß dieser ist. Voraussetzung hierfür sind stetig verteilte Zufallsgrößen, die einer Normalverteilung entsprechen. Bei der hier verwendeten Fallzahl von 95 darf man von einer Normalverteilung ausgehen.

Es wird eine Geradengleichung der Form:

$$Y = a + b * x_1 + c * x_2 + d * x_3 + e * x_4 + f * x_5$$

berechnet, wobei a eine Konstante darstellt und x_1 bis x_5 stellvertretend für die relativen Häufigkeiten der einzelnen Zellgruppen pro Fall steht. Die Variablen b,

c, d, e, und f entsprechen den Werten für die Steigungen der Regressionsgleichung, sie werden auch als partielle Regressionskoeffizienten bezeichnet. Auf einen einzelnen Fall angewendet bedeutet dies: man addiert zum konstanten Faktor a die Produkte der Steigungswerte und relativen Häufigkeiten der verschiedenen Zellpopulationen und erhält in der Summe einen Wert, der als korrespondierender Johnsen-Score zum Meßergebnis betrachtet werden kann.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den berechneten und den ausgezählten Johnsen-Scores besteht, wurde der Korrelationstest nach Pearson durchgeführt und dieses Ergebnis auf Signifikanz kontrolliert. Anhand eines derartigen Tests kann die erwartete lineare Korrelation nachgewiesen werden. Als mögliches Ergebnis r kommen hierbei Werte zwischen -1 und $+1$ in Frage, wobei -1 und $+1$ eine völlig negative bzw. positive Korrelation darstellen und 0 stellvertretend für keine lineare Korrelation steht. Voraussetzung für den Korrelationstest nach Pearson ist die Tatsache, daß die Merkmalspaare (Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent) als Stichprobe einer zweidimensionalen Normalverteilung angesehen werden dürfen. Dies ist unerlässlich, um bei $r = 0$ auf Unabhängigkeit der Merkmalsausprägungen schließen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Grundgesamtheit

Der mittlere Johnsen-Score für einen „normalen“ Hoden liegt nach Aussage von Johnsen bei 9,39 ($\pm 0,24$) (Johnsen 1970, 2). Der Durchschnittswert der von uns untersuchten Präparate lag bei 7,76 ($s=1,98$).

Verteilung der Johnsen-Scores

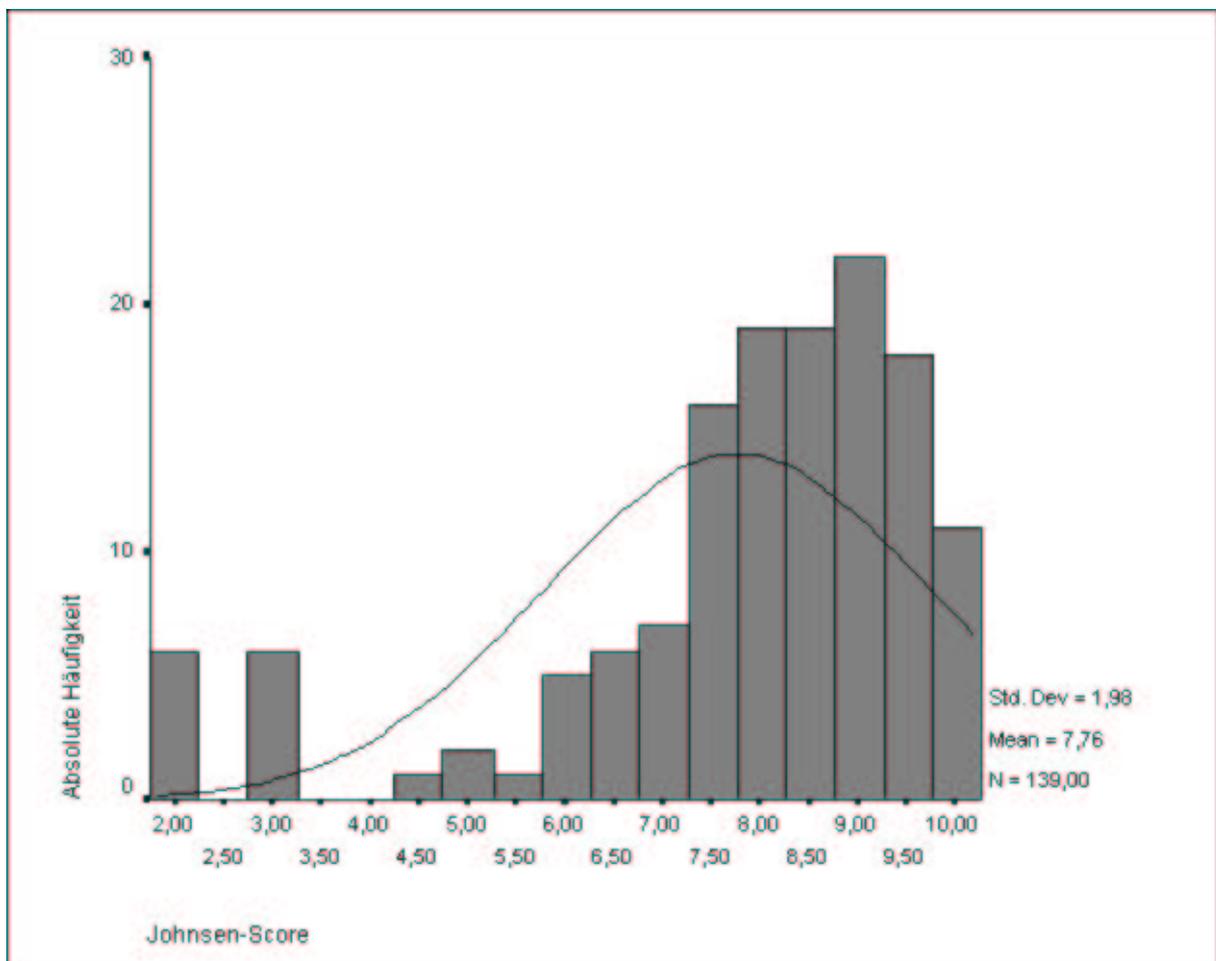
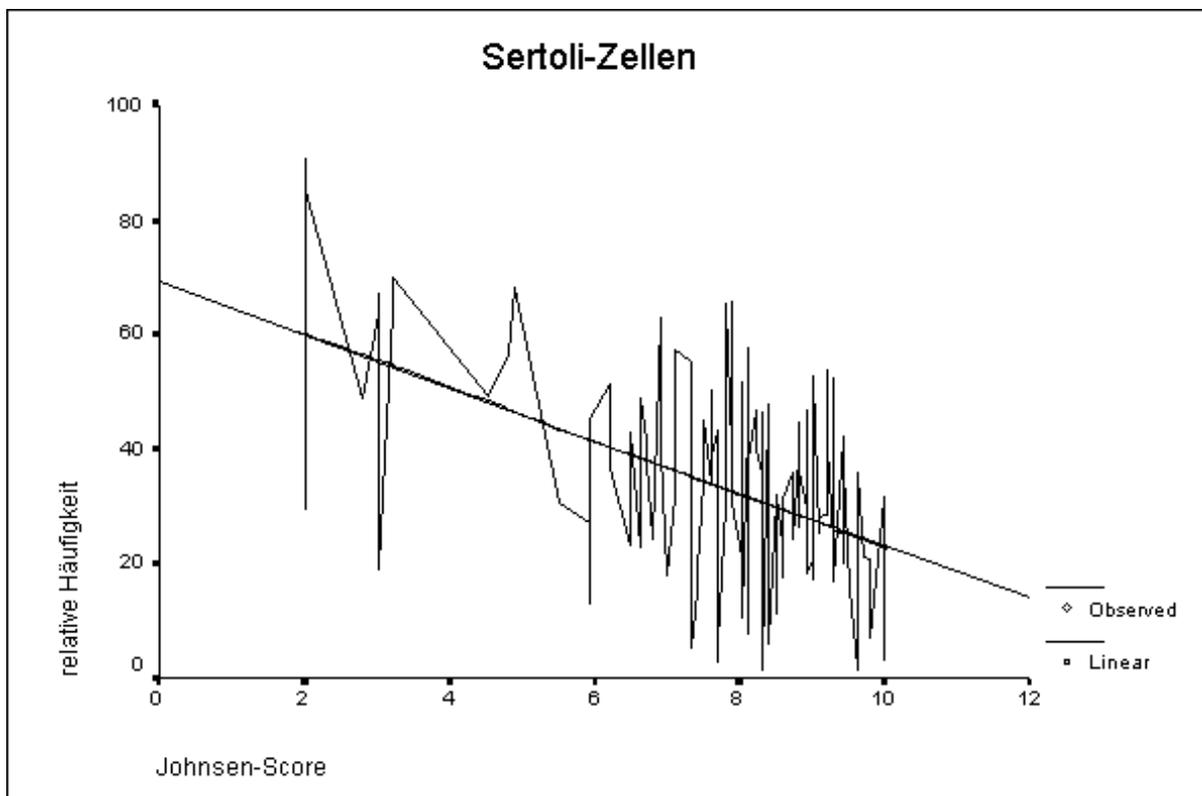
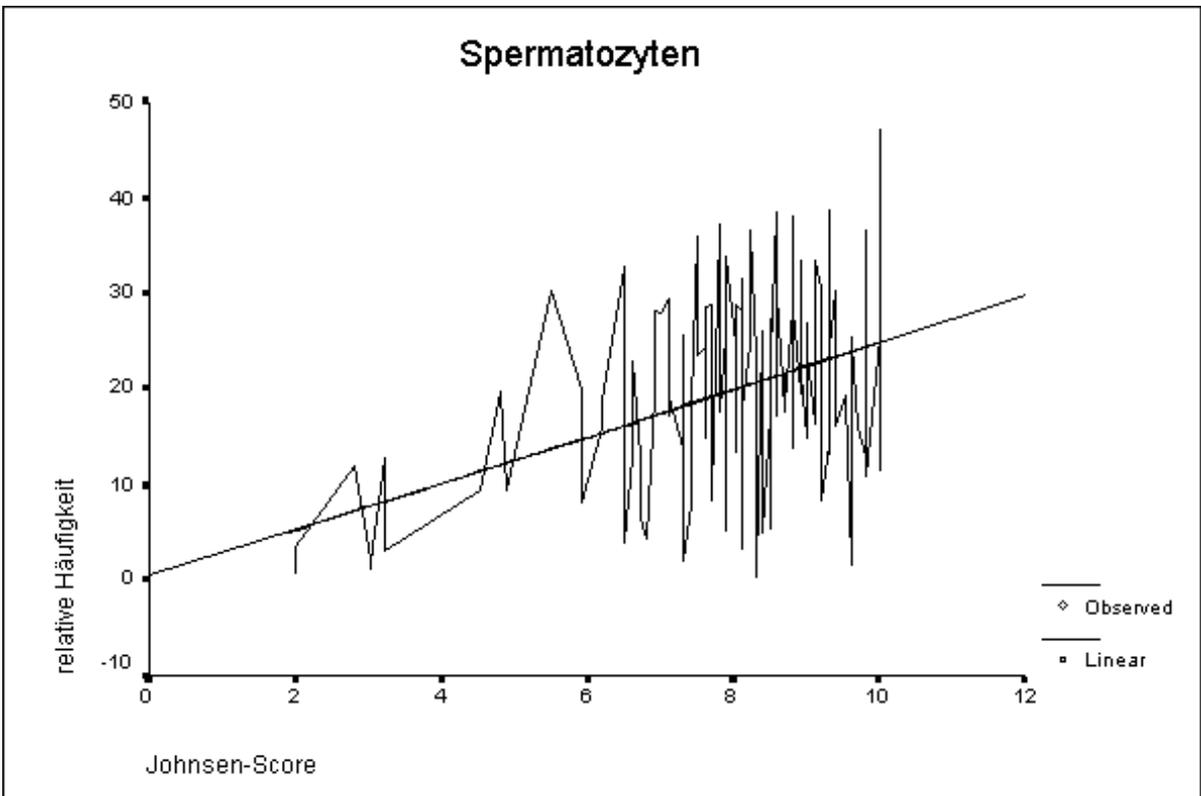
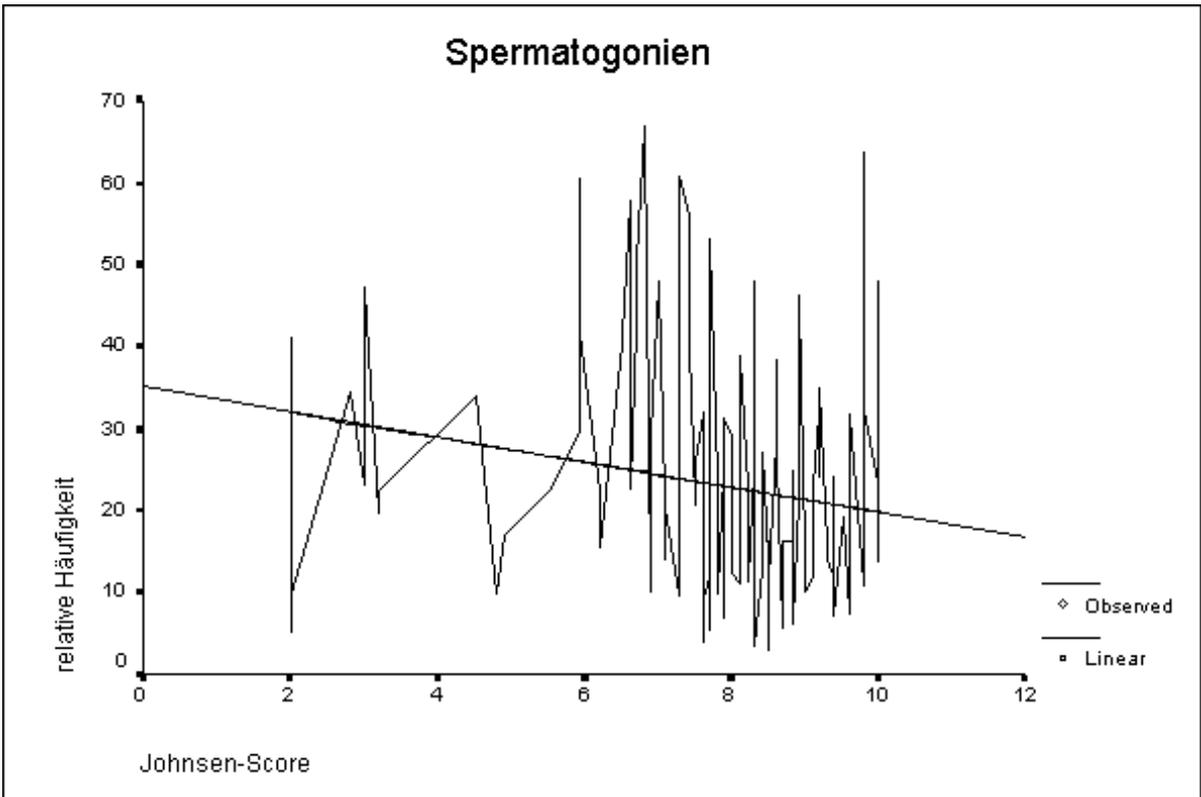


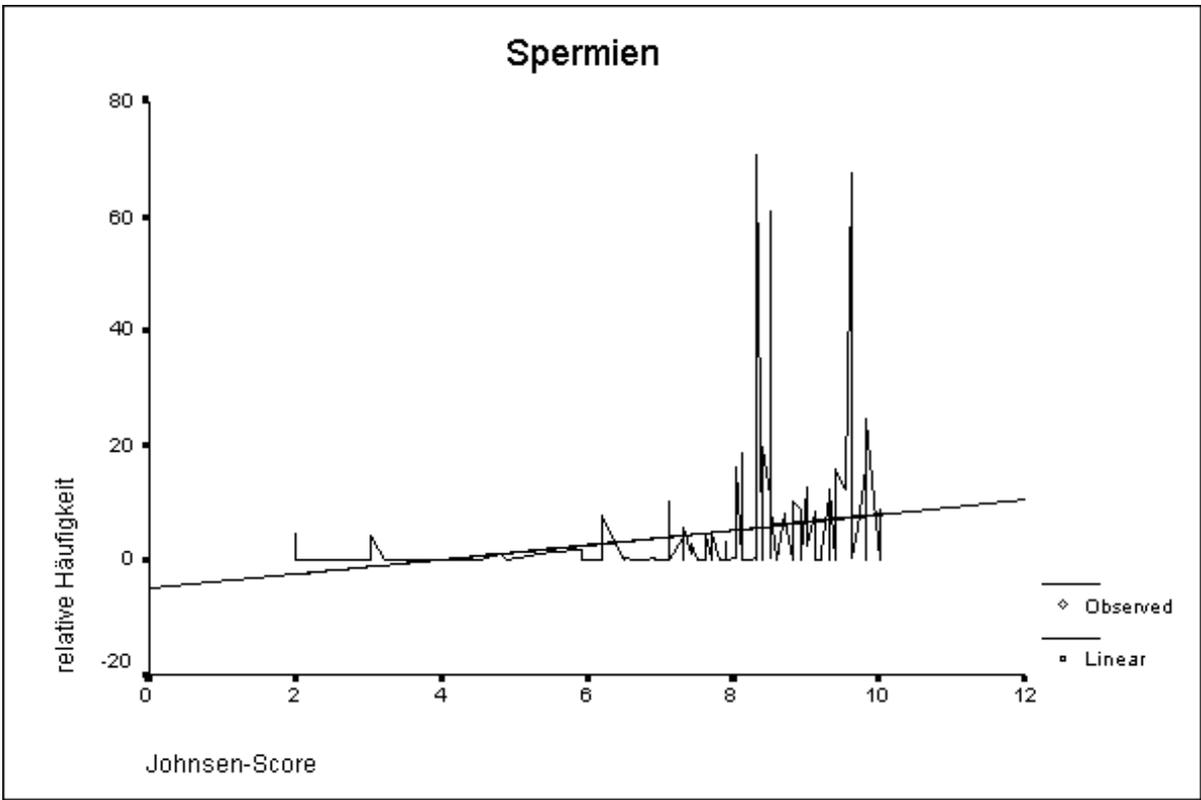
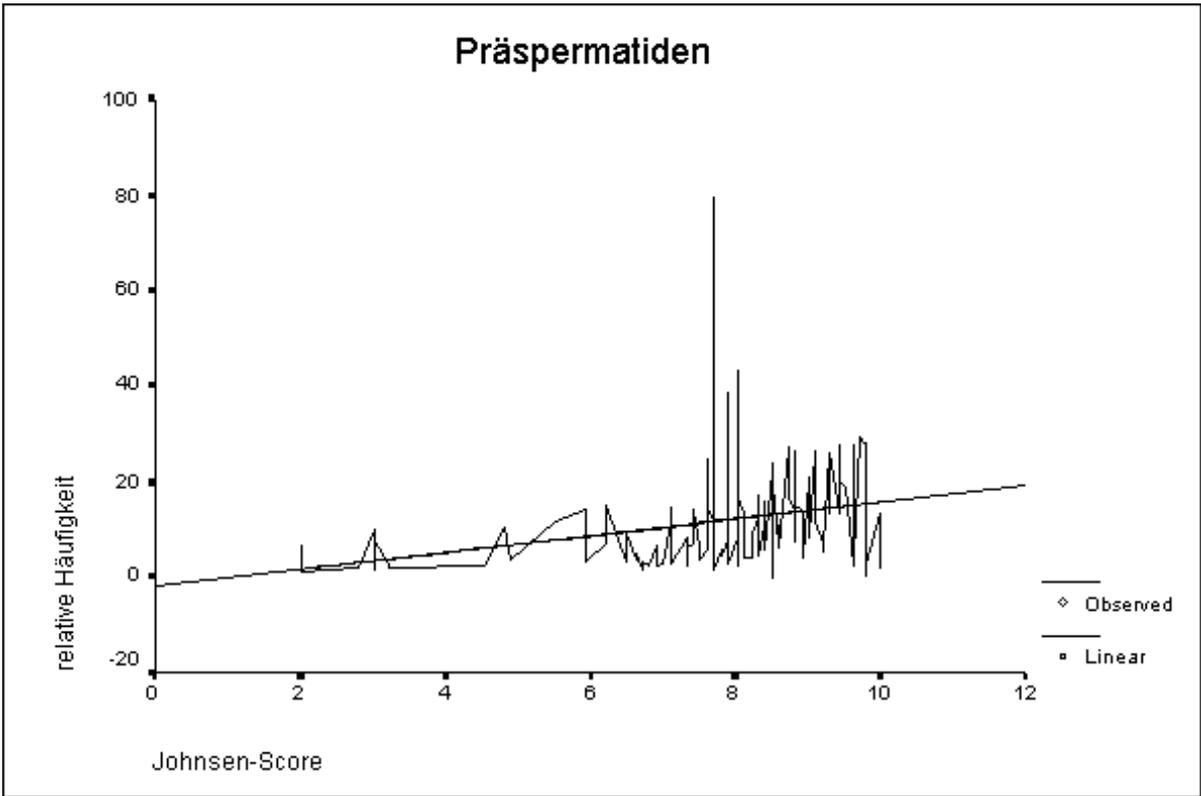
Abbildung 11

3.2 Deskription der Messergebnisse

Von den 139 Fällen, auf die das Klassifikations-Schema angewendet worden war, wurden durchschnittlich etwa 1.859 Objekte pro Präparat gemessen, wovon im Mittel 37,9% ($s=0,1047$) als nicht verwertbar, d.h. als Fragmente, Artefakte, Doubletten etc. eingestuft wurden. Die folgenden sechs Grafiken sollen den Zusammenhang einzelner Zellpopulationen mit dem Johnsen-Score verdeutlichen. Zusätzlich wurden lineare Regressionsgeraden berechnet. Weitere statistische Beschreibungen folgen im Anschluß an Abbildung 17.







Abbildungen 12-17

	R ²	Steigung	Signifikanz-Niveau
Sertoli-Zellen	0,282	-4,62	0,01
Spermatogonien	0,048	-1,52	0,01
Spermatozyten	0,233	2,43	0,01
Prä spermatiden	0,116	1,77	0,01
Spermatiden	0,027	0,61	0,05
Spermien	0,061	1,32	0,01

Tabelle 5

3.3 Multiple Regressionsanalyse

3.3.1 Darstellung der Regressionskoeffizienten des Training-Sets

In der nachfolgenden Tabelle sind die Konstante und fünf partielle Regressionskoeffizienten für die 95 analysierten Fälle des Training-Sets aufgelistet. Die aus den Sertoli-Zellen, Leydig'schen Zwischenzellen und Fibrozyten bestehende Gruppe hatte keine prognostische Relevanz für den Johnsen-Score, d.h. ihr Koeffizient lag zu nahe bei 0.

	Partieller Regressionskoeffizient	Standardfehler	Signifikanz-Niveau
Konstante	2,892	0,740	0,001
Spermatogonien	0,03212	0,014	0,025
Spermatozyten	0,14100	0,017	0,001
Prä spermatiden II.	0,06050	0,016	0,001
Spermatiden	0,03642	0,021	0,084
Spermien	0,07715	0,019	0,001

Tabelle 6

Alle Koeffizienten sind hochsignifikant mit Ausnahme des partiellen Regressionskoeffizienten für die Spermatogonien, der signifikant auf dem 2,5% Niveau ist und dem Koeffizienten für die Spermatiden, der lediglich dem 8,4% Niveau entspricht.

3.3.2 Anwendung der Geradengleichung auf das Test-Set

Das Test-Set wies einen tatsächlichen durchschnittlichen Johnsen-Score von 7,65 (s=1,91) auf. Das berechnete Johnsen-Score-Äquivalent führte zu einem Mittelwert von 7,61 (s=1,48).

Anhand eines Beispiels soll die Kalkulation des Johnsen-Score-Äquivalent eines Falles mit einem tatsächlichen Johnsen-Score von 9,6 veranschaulicht werden. 58% der gemessenen Zellen wurden als verwertbar eingestuft.

Relative Häufigkeit der einzelnen Gruppen:

Sertoli-Zellen:	1,11%
Spermatogonien:	7,22%
Spermatozyten:	1,67%
Prä spermatiden:	2,22 %
Spermatiden:	20,00%
Spermien:	67,78%

$$\text{Äquivalent} = 2,892 + 0,03212 * 7,22 + 0,141 * 1,67 + 0,0605 * 2,22 + 0,03642 * 20,00 + 0,07715 * 67,78 = \underline{\underline{9,45}}$$

$$\text{Johnsen-Score} - \text{Johnsen-Score-Äquivalent} = 0,15$$

3.4 Johnsen-Score-Äquivalent

3.4.1 Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent

Der Zusammenhang zwischen dem tatsächlichen Johnsen-Score und dem berechneten Johnsen-Score-Äquivalent wird in Abbildung 18 illustriert. Die zugehörige Regressionsgerade weist eine Steigung von 0,58 (30°) auf. Bei völliger Übereinstimmung der Daten wäre eine Steigung von 1,00, d.h. 45° zu erwarten (siehe Abbildung 19).

Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent

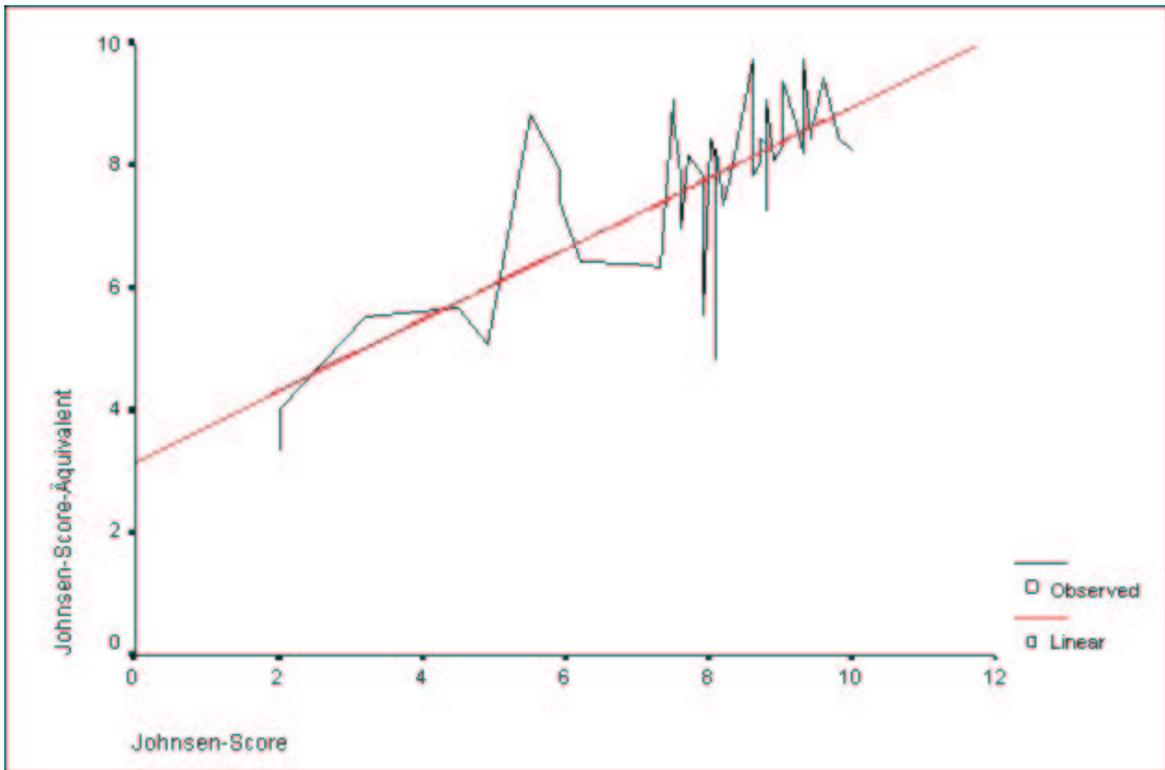


Abbildung 18

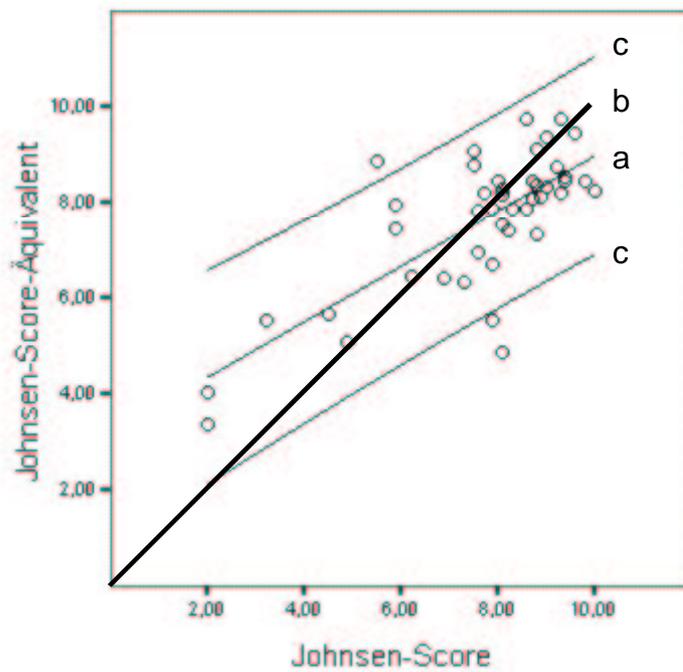


Abbildung 19 (a=Regressionsgerade, b=Winkelhalbierende, c=Konfidenzintervall)

In Abbildung 19 ist der Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent als Scatterplot mit einer linearen Regressionsgeraden und den dazugehörigen 95% Konfidenz-Intervallen beschrieben. Zusätzlich wurde die Winkelhalbierende eingetragen, die einer vollständigen Übereinstimmung von Johnsen-Score und Äquivalent entspricht.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson und die korrespondierenden Signifikanz-Niveaus sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Korrelation nach Pearson (Johnsen-Score - Score-Äquivalent)

		Johnsen-Score	Score-Äquivalent
Johnsen-Score	Pearson Korrelation	1,00	0,747
	Sig. (zweiseitig)		
Score-Äquivalent	Pearson Korrelation	0,747	1,00
	Sig. (zweiseitig)	0,01	

Tabelle 7

3.4.2 Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Differenz

Wenn die Differenz zwischen gezähltem und berechnetem Score gebildet wird, erkennt man, daß bei Fällen mit niedrigen Johnsen-Scores das Johnsen-Score-Äquivalent eher zu hoch berechnet wird und bei Fällen mit höherem Johnsen-Score die Äquivalenz-Scores etwas zu niedrig kalkuliert werden. Die durchschnittliche Abweichung betrug absolut berechnet 0,98 Score-Punkte ($s=0,799$).

Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Differenz

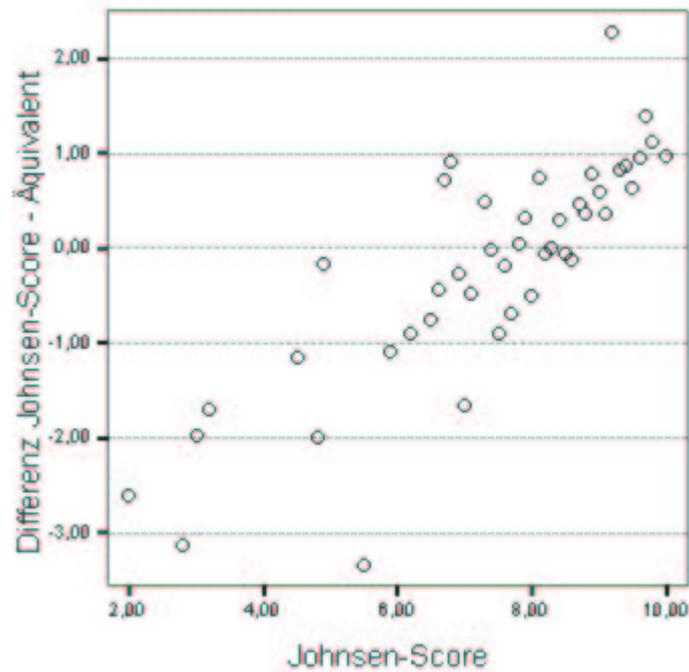


Abbildung 20

Durch einen Korrelationstest nach Pearson lässt sich der Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und der Differenz quantifizieren.

Korrelation nach Pearson (Johnsen-Score – Differenz)

		Johnsen-Score	Differenz
Johnsen-Score	Pearson Korrelation	1,00	0,633
	Sig. (zweiseitig)		0,01
Differenz	Pearson Korrelation	0,633	1,00
	Sig. (zweiseitig)	0,01	

Tabelle 8

4 Diskussion

Die semiquantitative Beurteilungsweise von Hoden-Biopsien nach Johnsen ist die allgemein anerkannte Methode, Störungen der Spermatogenese im Rahmen einer Fertilitätsprüfung zu diagnostizieren. Sowohl die typischen Veränderungen des DNA-Gehaltes aufgrund von mitotischen und meiotischen Reifeteilungen als auch die charakteristische Kernmorphologie in den verschiedenen Stadien der Spermatogenese lassen die DNA-Bildanalyse mit Kerntexturparametern als vielversprechende Methode für eine automatisierte Fertilitätsbestimmung erscheinen. Unter der Voraussetzung von ausreichender Zuverlässigkeit und Präzision könnte die DNA-Bildanalyse die aufwendige und zeitintensive semiquantitative Bewertung von Hoden-Biopsien ersetzen. In dieser Studie wurde untersucht, inwieweit sich die DNA-Bildanalyse bei Hoden-Biopsien für die Fruchtbarkeitsbestimmung eignet.

Zahlreiche Versuche, alternative, weniger arbeitsintensive Methoden zu entwickeln, brachten bislang jedoch keinen durchschlagenden Erfolg. Die anfangs favorisierte DNA-Flow-Zytometrie ließ nur eine Bestimmung des DNA-Gehaltes der gemessenen Zellkerne zu. Diese Ergebnisse waren im Hinblick auf die hohe Zahl von Zellen gleichen Ploidiegrades nicht sehr nützlich. Durch die rasante Entwicklung auf dem Sektor der Computertechnologie wurden die Messung und Weiterverarbeitung von Datenmaterial außerordentlich vereinfacht. Kim et al. (Kim 1997, 147-150) gelang anhand der Bild-Analyse erstmals die morphologische Differenzierung von Zellkernen gleicher Ploidie der haploiden Gruppe. An einem normospermen Kollektiv von nur 18 Testpersonen war es sein Ziel, den Anteil an Spermien in einer Gewebeprobe zu ermitteln, um das erforderliche Volumen einer Biopsie zur Gewinnung einer bestimmten Anzahl an Spermien festlegen zu können. Spermien und Spermatiden waren jedoch die einzigen Reifungsstadien, die nach morphologischen Kriterien differenziert werden konnten. Ein wesentlicher Kritikpunkt an der Arbeit von Kim et al. war das kleine Untersu-

chungskollektiv (18 Patienten), deren Biopsien zudem ausschließlich homogen normosperm waren.

In der vorliegenden Studie wurde eine Grundgesamtheit von 139 Fällen mit einer heterogenen Verteilung der Fertilität verwendet. Der durchschnittliche Johnsen-Score betrug in diesem Kollektiv 7,65 (der Wert für einen „normalen“ Hoden liegt laut Johnsen bei 9,39). Für diesen niedrigen Mittelwert gab es mehrere Ursachen. Zum einen war aufgrund des relativ hohen Durchschnittsalters des Sektionsgutes (69 Jahre) und der Prostata-Carcinom-Erkrankten eine altersentsprechende Atrophie festzustellen. Andererseits können die bei Hodentumoren bekannten Reifungsstörungen der Spermatogenese auftreten. Für die Beurteilung der Validität eines neuen diagnostischen Verfahrens ist der niedere Score-Bereich besonders wichtig, um zu prüfen, wie sicher Fertilitätsstörungen erkannt werden können.

Die Auswahl der 50 Tubuli zur konventionellen Befunderhebung an einem Hämatoxylin-Eosin-Schnitt ist nicht streng zufällig, folglich darf dieses Ergebnis nicht als vollständig objektiv angesehen werden. Gerade für die Bewertung des Johnsen-Scores, der sich immer an der am weitesten entwickelten Reifungsstufe orientiert, muß eine rein zufällige Wahl der Tubuli gewährleistet sein, um objektive Resultate zu erhalten. Bei der Desintegration von Hodengewebe für die DNA-Bildanalyse werden sämtliche Tubuli einer Biopsie erfaßt. Die Zellen werden dabei aus dem Gewebeverbund gelöst, d.h. alle vertretenen Zellpopulationen sind nach der Herstellung der Cytospins völlig zufällig auf einem Objektträger verteilt. Zusätzlich unterliegt die Messung ebenfalls dem Zufallsprinzip. Wenn sich beispielsweise an einer Stelle eines Objektträgers viele Zellen befinden, werden verstärkt auch in anderen Bereichen Zellen gemessen, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch ein eventuell vorhandenes systemisches Phänomen auszuschließen. Es darf folglich angenommen werden, daß die Desintegration sowie die Messung einem streng statistisch randomisierten Auswahlverfahren äquivalent sind.

Ein weiterer großer Vorteil der Desintegration von Gewebe zur bildanalytischen Messung ist die Intaktheit der Zellkerne. Die DNA-Bildanalyse kann auch für die

Messung an histologischen Schnitten angewendet werden. Allerdings wird ein Großteil der Kerne aufgrund der Schichtdicke dieser Schnitte (etwa 5 μm) fragmentiert. Das führt zu unpräziser Bestimmung des DNA-Gehaltes, der in diesem Fall zu niedrig gemessen wird. Bei der Desintegration werden Schnitte von 50 μm angefertigt, bei denen die Fragmentation der Kerne eine vergleichsweise untergeordnete Rolle spielt. Manchmal kann es sich bei dieser Methode als schwierig erweisen, bestimmte Zellkerne nach der Präparation auf dem Objektträger wiederzufinden. Aufgrund der eindeutigen zellkernmorphologischen Charakteristika war es jedoch sehr gut möglich, die gemessenen Kerne den Zelltypen zuzuordnen.

Die Separation der Zellkerne erfolgte anhand von Diskriminanten im Entscheidungsbaum. Durch Anwendung dieser kalkulierten Diskriminanten, die sich aus maximal 5 Features zusammensetzen, wird eine 100% Reproduzierbarkeit der Zellzuordnung garantiert. Nach Schulerud et al. (Schulerud 1998, 67) sollte die Fallzahl mindestens dem fünffachen der Zahl der angewandten Features entsprechen. In der vorliegenden Studie wird der Forderung von Schulerud durch eine Fallzahl von 139 entsprochen. Bei Kim et al. wurden 4 Features bei einer Kollektivgröße von nur 18 Personen angewendet.

Um die Güte der Klassifikation bestimmen zu können, ist es nötig, das Gesamtdatenmaterial in ein Training- und ein unabhängiges Test-Set aufzuteilen. Es wäre falsch, Fälle, die zur Bestimmung der Diskriminanten dienen, in die Qualitätsbeurteilung des Klassifikationsschemas einzubeziehen, da hierbei überdurchschnittlich gute Resultate erwartet werden können. Der Prozentsatz falsch klassifizierter Zellen sämtlicher Fälle stellte in Kims Studie das Maß für die Qualität der Zuordnung dar.

Basis für die weiteren Berechnungen in dieser Studie war die multiple Regressionsanalyse. Diese bietet den großen Vorteil, daß Daten in ihrer ursprünglichen Skalierung in die Kalkulation einbezogen werden. Es ist also keine Gruppierung von Daten erforderlich, die selbstverständlich immer mit einem erheblichen Ver-

lust an Information verbunden wäre. Der Johnsen-Score geht ebenso wie die relativen Häufigkeiten der einzelnen Zelltypen als Dezimalzahl in die Berechnung ein.

Ein weiterer Vorzug der multiplen Regressionsanalyse besteht in der qualitativen Einbeziehung der Klassifikationsgüte in Relation zum Johnsen-Score. Dies erfolgt anhand der Höhe der partiellen Regressionskoeffizienten, die je nach Qualität der Zuordnung zu den jeweiligen Zelltypen in die weitere Berechnung einfließt. Zellen wie z.B. Spermatozyten, die sehr gut klassifiziert werden können, sind in der Kalkulation stärker gewichtet. Infolgedessen wirken sich falsch zugeordnete Zellen nicht zwangsläufig linear auf das Ergebnis aus. Bei der Bestimmung der partiellen Regressionskoeffizienten wurden die Sertoli-Zellen von der Analyse durch die Statistiksoftware SPSS ausgeschlossen, da ihr Koeffizient zu nahe bei Null lag. Die einzeln betrachtete Relation zwischen Johnsen-Score und Sertoli-Zell-Gruppe erscheint richtig und eindeutig (S. 38). Mit zunehmendem Reifungsgrad wird der relative Anteil dieser Zellen immer geringer. Bei der Kalkulation der multiplen Regressionskoeffizienten hingegen werden alle Zelltypen eines Falles in Abhängigkeit von ihren Johnsen-Scores verwendet. Die Kombination der Analyse mit den anderen Zelltypen scheint also für den Ausschluß der Sertoli-Zell-Gruppe verantwortlich zu sein.

Die partiellen Regressionskoeffizienten stellen mit einer Konstante die Basis für eine allgemeine Geradengleichung dar, die das Johnsen-Score-Äquivalent zum Ergebnis hat. Durch Anwendung dieses statistischen Verfahrens war es möglich, den bisher gebräuchlichen Bewertungsrahmen des Johnsen-Score beizubehalten. Dies gewährt einerseits eine bessere Vergleichbarkeit der Messdaten und zum anderen ist die Einführung eines neuen Klassifikationsschemas entbehrlich.

Das von uns berechnete Johnsen-Score-Äquivalent wich im Durchschnitt um 0,98 Score-Punkte vom tatsächlichen Johnsen-Score ab. Die Winkelhalbierende (Abbildung 19) als Repräsentante einer vollständigen Korrelation zwischen Johnsen-Score und Äquivalent liegt im 95% Konfidenzintervall der linearen Regressionsgeraden. Im Bereich des Schnittpunktes dieser beiden Geraden (7,4) ist die Abwei-

chung von Johnsen-Score und Äquivalent am geringsten. Prinzipiell besteht für alle Präparate vom Score 2-10 die Möglichkeit, auf der Winkelhalbierenden zu liegen. Bei einem Wert um 7,4 ist die Wahrscheinlichkeit jedoch größer als beispielsweise bei einem Score von 2,0. Dieser eindeutige Zusammenhang zwischen berechneten und tatsächlichen Scores wurde durch einen Korrelationstest nach Pearson quantifiziert (0,747).

Auffällig war die inhomogene Verteilung der Differenzen zwischen Johnsen-Score und Johnsen-Score-Äquivalent in Bezug auf den Johnsen-Score. Im niedrigen Bereich (Score: 1-7) führten die Berechnungen eher zu höheren Ergebnissen und umgekehrt im höheren Bereich (Score: 7-10) zu niedrigeren Resultaten. Mögliche Erklärung hierfür könnte ein höheres Maß an Objektivität dieser Methode sein, die im Gegensatz zu einer von Menschen durchgeführten Untersuchung unabhängig von Emotionen und irrationalen Entscheidungen ist.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen die erfolgreiche Anwendung der zytometrischen Bildanalyse mit Kerntexturparametern für die Fertilitätsbeurteilung von Hodenbiopsien. Diese Methode garantiert ein hohes Maß an Präzision in der Beurteilung und steht für eine außerordentliche Vereinfachung in der Befunderhebung, da eine Automatisierung bereits zu einem großen Anteil realisiert werden konnte. Die Resultate dieser Arbeit stellen eine deutliche Optimierung in der zytometrischen Beurteilung von Hodenbiopsien dar und sind gleichzeitig Impuls, die konventionelle Beurteilungsweise nach Johnsen zu reflektieren.

5 Ausblick

Neben der Flow-Zytometrie gewinnt die bildanalytische DNA-Zytometrie mit Texturparametern zunehmend an Bedeutung. Gerade in der klinisch diagnostischen Histopathologie kann diese Technik von sehr großem Nutzen für die Verbesserung und Vereinfachung pathologischer Diagnosen von zytologischen und histologischen Präparaten sein. Der entscheidende Vorteil der bildzytometrischen Methode ist ein potentiell hohes Maß an Automatisierung, die bereits heute zu einem hohen Grad möglich ist. Gerade dieser Aspekt erlangt wegen der Kostenexplosion im medizinischen Versorgungssystem immer größere Relevanz, da Wettbewerbsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit an Kliniken eine zunehmend bedeutsamere Rolle spielen. Unter der Annahme, daß eine MTA an einem Arbeitstag (8h) circa 40 Präparate desintegrieren und färben kann, bedeutet dies einen Zeitaufwand von etwa 15 Minuten pro Fall. Die Zeit für die Herstellung eines Paraffinblockes braucht nicht in der Berechnung berücksichtigt werden, da sie für die herkömmliche Methode ebenfalls nötig ist. Moderne Zytometer messen 2.000 Zellen in weniger als 15 Minuten. Zellselektion, Histogramm-Kalkulation und statistische Auswertung können durch fortschrittliche Computertechnik anwenderfreundlich und schnell realisiert werden. Konsequenz dieses Verfahrens könnte eine Umverteilung der Arbeit vom Arzt an die MTA sein, wobei beide in etwa den gleichen Zeitaufwand benötigen. Unter Verwendung von Jahresmittelbeträgen für die Ermittlung der Personalkosten (exemplarisch Landeshauptstadt München 1998: Ärzte 116.000 DM, MTAs 75.000 DM) könnte somit ein Einsparpotential von circa 35% realisiert werden. In dieser Berechnung ist die Amortisation der Bildanalyse-Einheit nicht enthalten, da sie neben der Anwendung für Hodenbiopsien auch für andere Untersuchungen eingesetzt werden kann. Einen weiteren großen Fortschritt würde die Verwendung von Feinnadel-Aspiraten anstelle von Biopsien bedeuten. Dies stellt einerseits eine weniger invasive Untersuchungsmethode für den Patienten dar und zum anderen wäre die Desintegration für die Messung entbehrlich. Daraus könnte eine zusätzliche Zeitersparnis und zugleich eine weitere Reduktion der Kosten resultieren, da eine zunehmende Zahl

an Gewebeproben ambulant und nicht wie bisher stationär entnommen werden könnten.

Ein anderes Anwendungsfeld stellt die Untersuchung von Hodenbiopsien im Rahmen einer TESE (testicular sperm extraction) dar. Hierbei werden aus einer Hodenbiopsie Spermien extrahiert, um Eizellen mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion zu befruchten. Durch die Desintegration eines kompletten Biopsiezylinders wäre es möglich, die absolute Zahl an Spermien und Spermatiden mit Hilfe der in dieser Studie entwickelten Methode zu erfassen. Die Bildanalyse von desintegrierten Hodenbiopsien könnte deshalb ein wertvolles Instrument zur Abschätzung der Rentabilität einer TESE werden.

Die zytometrische DNA-Bildanalyse ist somit eine sehr zukunftsweisende und vielversprechende Technik für die Medizin des 21. Jahrhunderts. Eine prospektive Untersuchungsreihe sollte weitere Gewißheit über die Güte dieses neuen Verfahrens geben können, ferner wäre die Eignung für Material aus Feinnadelaspiraten zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung:

Seit Jahrzehnten gilt der semiquantitativ bestimmte Johnsen-Score als Gold-Standard in der Beurteilung von Hoden-Biopsien. Da es sich hierbei um eine sehr zeitintensive Beurteilungsweise handelt, sind bereits zahlreiche Versuche unternommen worden, alternative Möglichkeiten zur Befunderhebung bei Fertilitätsprüfungen zu finden. Die DNA-Flow-Zytometrie wies zwar den Weg in die richtige Richtung, blieb jedoch den durchschlagenden Erfolg schuldig, da die Samenzellen nur anhand ihres DNA-Gehalts differenziert werden konnten. Durch die rasanten Entwicklung auf dem Sektor der Computertechnologie wurden bildverarbeitende Systeme für die Zyto-Diagnostik zunehmend interessanter. Insbesondere die Beurteilung der Kernmorphologie stellte eine neue Möglichkeit zur Unterscheidung der Zellkerne dar. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Studie, eine automatisierte bildanalytische Routine zur Fertilitätsbestimmung an Hodenbiopsien zu entwickeln.

Material und Methoden:

Das Gesamtkollektiv von 139 Fällen setzt sich aus folgenden Teilbereichen zusammen:

- 96 Orchiectomiepräparate (von Patienten mit Prostata-Carcinom)
- 10 Biopsien des kontralateralen Hodens bei Hoden-Tumoren
- 12 Fälle von tumor-umliegendem, ipsilateralem, nicht pathologischem Gewebe
- 21 Hodengewebeentnahmen aus dem Sektionsgut

Von allen Präparaten wurden Hämatoxylin-Eosin-Schnitte angefertigt, anhand derer der Johnsen-Score ermittelt sowie die Intaktheit der Morphologie überprüft wurde. Zur statischen DNA-Zytometrie wurden Feulgen-gefärbte Zellvereinzlungspräparate von Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material verwendet.

Diese Präparate wurden in einer Bildanalyseeinheit gemessen und die einzelnen Reifungsstadien anhand des eigens entwickelten Entscheidungsbaumes unterschieden. Wesentliche Grundlage zur Unterscheidung waren die Morphologie der Zellkerne sowie die Kerntexturanalyse, die die Verteilung von helleren und dunkleren Chromatinkomponenten berücksichtigt.

Ergebnis:

Das Gesamtkollektiv wurde randomisiert in ein Training- und ein Test-Set aufgeteilt. So konnte anhand einer multiplen Regressionsanalyse des Training-Sets mit den korrespondierenden Johnsen-Scores der prognostische Wert der verschiedenen Reifungsstadien für die Fertilitätsbeurteilung bestimmt werden. Zusätzlich ließ sich durch Berechnung über die Regressionskoeffizienten der bisher gebräuchliche Bewertungsrahmen, der Johnsen-Score von 1-10, erhalten. Bei Anwendung auf das Test-Set konnte eine Korrelation von 0,747 nach Pearson (hochsignifikant) zwischen dem semiquantitativ gezählten und dem vom Computer selbständig berechneten Johnsen-Score erzielt werden.

Schlußfolgerung:

Die DNA-Zytometrie mit Kerntexturanalyse hat sich als geeignete Methode erwiesen, die einzelnen Zellen der Spermatogenese zu differenzieren und anhand dieser Ergebnisse ein Johnsen-Score-Äquivalent zu berechnen. Dieses Verfahren, das dem DNA-Gehalt und zellkernmorphologischen Charakteristika Rechnung trägt, steht für eine bedeutsame Verbesserung in der zytometrischen Interpretation von Hodenbiopsien und gibt Anlaß, über die bisher gebräuchliche semiquantitative Vorgehensweise nachzudenken. Eine prospektive Untersuchungsreihe sollte weitere Gewißheit über die Güte dieses neuen Verfahrens geben können, ferner wäre die Eignung für Material aus Feinnadelaspiraten zu überprüfen.

7 Abstract

Objectives:

To investigate the possibility of creating an image analysis routine using multiple nuclear texture features to automatically determine fertility of testis biopsies.

Methods:

The study population consisted of 144 samples (96 preparations from orchyectomies, 27 specimens of tumour surrounding non-pathological testis-tissue and 21 samples from autopsies). Nuclear texture features were determined using single-cell preparations. Consequently discriminant functions were analyzed by multivariate regression analysis in order to build a binary tree for distinguishing maturation cells. A training-set was investigated according to multiple regression analysis which facilitated the computing of a Johnsen-score equivalent. The relation to the actual Johnsen-score was proven by a Pearson's correlation test applied to an independent test-set.

Results:

Due to multiple regression analysis of the training set we could attain a general straight line equation which is based on the partial regression coefficients and the percentages of the single cell types. The analysis of the test-set according to that scheme showed a statistically significant correlation between the commonly used semiquantitative method and the calculated Johnsen-score equivalent (Pearson 0,747 $p=0,01$). The average difference between both techniques was 0,98 (sd=0,799).

Conclusion:

DNA image analysis using nuclear texture features revealed to be a successful tool to evaluate the fertility of single cell preparations of testis biopsies. The characteristics of this method ensure a high degree of accuracy and a maximum potential of automation was put into effect.

8 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.
The complex global structure of chromosome.
In „Molecular Biology of the cell“,
Garland Publishing INC, New York, 1989, 2nd edition, 512-514
- Baldetorp, B., Ferno, M., Fallenius, A., Fallenius Vecchi, G., Idvall, I., Olsson, H.,
Sigurdsson, H., Akerman, M., Killander, D. Image
cytometric DNA analysis in human breast cancer analysis may add prognostic
information in diploid cases with low S-phase fraction by flow cytometry. *Cytome-
try* 13 (1992) 577-585
- Bartels, P.H., Bibbo, M., Dytch, H.E., Pishotta, F.T., Yamauchi, K., Wied, G.L.
Diagnostic marker displays for intermediate cells from the uterine cervix.
Acta Cytol. 26 (1982) 29-34
- Bartels, P.H., Thompson, D., Weber, J.E.
Data analysis.
In „Marchevsky and Bartels Image analysis. A primer for Pathologists.“,
Raven Press, New York, 1994, 207-23
- Bibbo, M., Bartels, P.H., Sychra, J.J., Wied, G.L.
Chromatin appearance in intermediate cells from patients with uterine cancer.
Acta Cytol. 25 (1981) 23-28
- Böcking, A., Striepecke, E., Auer, H., Füzesi, L.
Static DNA Cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpre-
tation.
In „Compendium on the computerized cytology and histology laboratory“,
Wied, G.L., Bartels, P.H., Rosenthal, D.L., Schenk, U.,
Tutorials of Cytology, Chicago, 1994, 107-128
- Bunsen, R.W., Roscoe, H.E.
Photochemische Untersuchungen.
Poggendorfs Annalen 172 (1862) 529

- Caspersson, T.
Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns.
Skand. Arch. Physiol. 8 (1936) 73-151
- Charny, C., W.
Testicular Biopsy. Its value in male sterility.
JAMA 115 (1940) 1429
- Dawson, A.E., Norton, J.A., Weinberg, D.S.
Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry.
Am. J. Pathol. 136 (1990) 1115-1124
- DeCherney, A., H.
Decision Making in Infertility.
Philadelphia, BC Decker, 1988
- Elsheikh, T.M., Silverman, J.F., McCool, J.W., Riley, R.S.
Comparative DNA analysis of solid tumors by flow cytometric and image analyses of touch imprints and flow cell suspensions [see comments].
Am. J. Clin. Pathol. 98 (1992) 296-304
- Falkmer, U.G.
Methodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma.
Hum. Pathol. 23 (1992) 360-367
- Feulgen, R., Rossenbeck, H.
Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende Elektivfärbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
Z. Physiol. Chem. 135 (1924) 203-248
- Garner, D.M., Harrison, A., MacAulay, C., Palcic, B.
Cyto-Savant and Its Use in Automated Screening of Cervical Smears.
In „Compendium on the computerized Cytology and Histology laboratory“,
Wied, G.L., Bartels, P.H., Rosenthal, D.L., Schenck, U.,
Tutorials of Cytology, Chicago, Illinois, 1994, 346-352

- Gottschalk-Sabag, S., Weiss, D.B., Glick, T., Sherman, Y.
Assessment of Testicular Spermatozoa Morphology by Image Analysis.
Eur. Urol. 30 (1996) 77-79
- Gottschalk-Sabag, S., Weiss, D.B., Sherman, Y.
Assessment of spermatogenic process by deoxyribonucleic acid image analysis.
Fertil. Steril. 64 (1995) 403-407
- Hittmair, A., Rogatsch, H., Mikuz, G., Feichtinger, H.
Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry.
Fertil. Steril. 64 (1994) 746-750
- Hittmair, A., Rogatsch, H., Offner, F., Feichtinger, H., Öfner, D., Mikuz, G
Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study.
Fertil. Steril. 58 (1992) 1040-1045
- Iwamoto, T., Fujisawa, M., Tanaka, H., Okada, H., Arakawa, S., Kamidono, S.
Image cytometry for quantitative analysis of DNA in the testes of infertile men with varicocele: Comparison with Flow-Cytometry.
J. Urol. 157 (1997) 2370-2374
- Johnsen, S., G.
Testicular biopsy score count-mount for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males.
Hormones 1 (1970) 2
- Kim, E.D., Lin, W.W., Abrams, J., Lipshultz, L.I.
Testis biopsy image analysis effectively quantifies spermatogenic cell types.
J. Urol. 157 (1997) 147-150
- King, E.B., Chew, K.L., Duarte, L., Hom, J.D., Mayall, B.H., Miller, T.R., Petrakis, N.L.
Image cytometric classification of premalignant breast disease in fine needle aspirates.
Cancer 62 (1988) 114-124

- Koss, L.G., Wersto, R.P., Simmons, D.A., Deitch, D., Herz, F., Freed, S.Z.
Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, image cytophotometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors.
Cancer 64 (1989) 916-924
- Lee, A.K., Dugan, J., Hamilton, W.M., Cook, L., Heatley, G., Kamat, B., Silverman, M.L.
Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: a comparison between image analysis and flow cytometry.
Mod. Pathol. 4 (1991) 178-182
- Lee, S., Tolmachoff, T., Marchevsky, A.M.
DNA content analysis ("ploidy") by image analysis. Clinical Applications and Comparison with Flow cytometry.
In „Marchevsky and Bartels Image analysis. A primer for Pathologists.“,
Raven Press, New York, 1994, 261-307
- Lovett, E.J., Schmitzer, B., Keren, D.F., Flint, A., Hudson, J.L.
Applications of flow cytometry to diagnostic pathology.
Lab. Invest. 50 (1984) 115-140
- MacAulay, C., Palcic, B.
Fractal texture features based on optical density surface area: Use in image analysis of cervical cells.
Anal. Quant. Cytol. Histol. 12 (1990) 394-398
- Mairinger, T., Mikuz, G., Gschwendtner, A.
Are nuclear texture features a suitable tool for predicting non-organ-confined prostate cancer?
J. Urol. 162 (1999) 258-262
- McFadden, P.W., Clowry, L.J., Daehnert, K., Hause, L.L., Koethe, S.M.
Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric DNA distributions having a wide coefficient of variation of the G0/G1 peak.
Am. J. Clin. Pathol. 93 (1990) 637-642

- Mikuz, G.
Männliche Geschlechtsorgane.
In „Pathologie“,
Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Urban Schwarzenberg,
München-Wien-Baltimore, 1997, 1. Auflage, 779
- Mikuz, G., Hofstädter, F., Delgado, R.
Extraction of cells from paraffin-embedded tissue sections for single cell DNA cytophotometry.
Anal. Quant. Cytol. Histol. 7 (1985) 343
- Nieschlag, E.
Physiologie des Hodens. Nosologie andrologischer Krankheiten.
In „Andrologie. Grundlage und Klinik der reproduktiven Gesundheit.“,
Nieschlag, E., Behre, H.M., Springer-Verlag,
Berlin Heidelberg New York, 2000, 2. Auflage, 33-35,95
- Otto, F.J., Liedl, T.M.
Durchflußzytometrische DNA-Analyse.
In „Durchflußzytometrie in der Zelldiagnostik“,
Schmitz, G., Rothe, G., Schattauer,
Stuttgart, 1994, 259-268
- Poon, S.S.S., Ward, R.K., Palcic, B.
Automated image detection and segmentation in blood smears.
Cytometry 13 (1992 a) 766-774
- Poon, S.S.S., Ward, R.K., Palcic, B.
Feature Extraction from three-dimensional images in quantitative microscopy. Mi-
cron and Microscopica Acta 23 (1992 b) 481-489
- Preston, K.Jr.
Automation of the analysis of cell images.
Anal. Quant. Col. 2 (1980) 1-14
- Rasch, R.W., Rasch, E.M.
Kinetics of hydrolysis during the Feulgen reaction for deoxiribinucleic acid: a re-
evaluation.
J. Histochem. Cytochem. 21 (1973) 1053-1065

- Reith, A., Danielsen, H.
Assessment of DNA ploidy in Tumor Material.
In „Compendium on the computerized cytology and histology laboratory“,
Wied, G.L., Bartels, P.H., Rosenthal, D.L., Schenk, U.,
Tutorials of Cytology, Chicago, 1994, 185-193

- Schulerud, H., Kristensen, G.B., Liestol, K., Vlatkovic, L., Reith, A., Albrechtsen, F.,
Danielsen, H.E.
A review of caveats in statistical nuclear image analysis.
Anal. Cell. Pathol. 16 (1998) 63-82

- Schulze, W., Thoms, F., Knuth, U.A.
Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously per-
formed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men.
Hum. Reprod. 14 Suppl 1 (1999) 82-96

- Shaban, S.F.
Male infertility overview.
URL <http://www.ivf.com/shaban.html> (1996) 1

- Swerdloff, R., S., Overstreet, J., W., Sokol, R., Z., Rajfer, J.
Infertility in the male. UCLA conference.
Ann. Intern. Med. 103 (1985) 906

- Tonutti, E., Weller, O., Schuchardt, E., Heinke, E.
Zur mikroskopischen Anatomie.
In „Die männliche Keimdrüse, Struktur – Funktion – Klinik, Grundzüge der Andro-
logie,
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960

- Trainer, T.D.
Histology of the normal testis.
In „Histology for Pathologists“,
Am. J. Surg. Pathol. 11 (10) (1987) 797-809

- van den Houte, K., Kiss, R., dePrez, C., Verhest, A., Pasteels, J.L., van Velthoven, R.

e Use of computerized cell image analysis to characterize cell nucleus populations from normal and neoplastic renal tissue.

Eur. Urol. 19 (1991) 155-164

- Wied, G.L., Bibbo, M., Pishotta, F.T., Bartels, P.H.
Intermediate cell markers for malignancy. Consistency of expression.
Analyt. Quant. Cytol. 8 (1984) 243-246
- Wingren, S., Hatschek, T., Stal, O., Boeryd, B., Nordenskjold, B.
Comparison of static and flow cytofluorometry for estimation of DNA index and S-phase fraction in fresh and paraffin-embedded breast carcinoma tissue.
Acta. Oncol. 27 (1988) 793-797
- Yuan, J., Hennessy, C., Givan, A.L., Corbett, I.P., Henry, J.A., Sherbet, G.V., Leonard, T.W.
Predicting outcome for patients with node negative breast cancer: a comparative study of the value of flow cytometry and cell image analysis for determination of DNA ploidy.
Br. J. Cancer 65 (1992) 461-465
- Zbieranowski, I., Le Riche, J.C., Palcic, B., Gascoyne, R., Connors, J.
Determination of DNA ploidy in archival tissue from non-Hodgkin's lymphoma using flow and image cytometry.
Anal. Cell. Pathol. 4 (1992) 303-313

9 Anhang

9.1 Reagenzien

9.1.1 Azur-A Feulgenfärbung

Azur-A Lösung:

Azur-A	1,5 g
A. dest.	300,0 ml
1 N HCl	30,0 ml
K ₂ S ₂ O ₅	6,0 g

Sulfitwasser:

K ₂ S ₂ O ₅	4,945 g
A. dest.	939,56 ml
1 N HCl	49,45 ml

9.1.2 Desintegration

Tris-NaCl-Stammlösung:

Tris	60,56 g in 500,0 ml A. dest. lösen
1 N HCl	400,0 ml (pH=7,5)
mit A. dest. auf 1 l auffüllen	

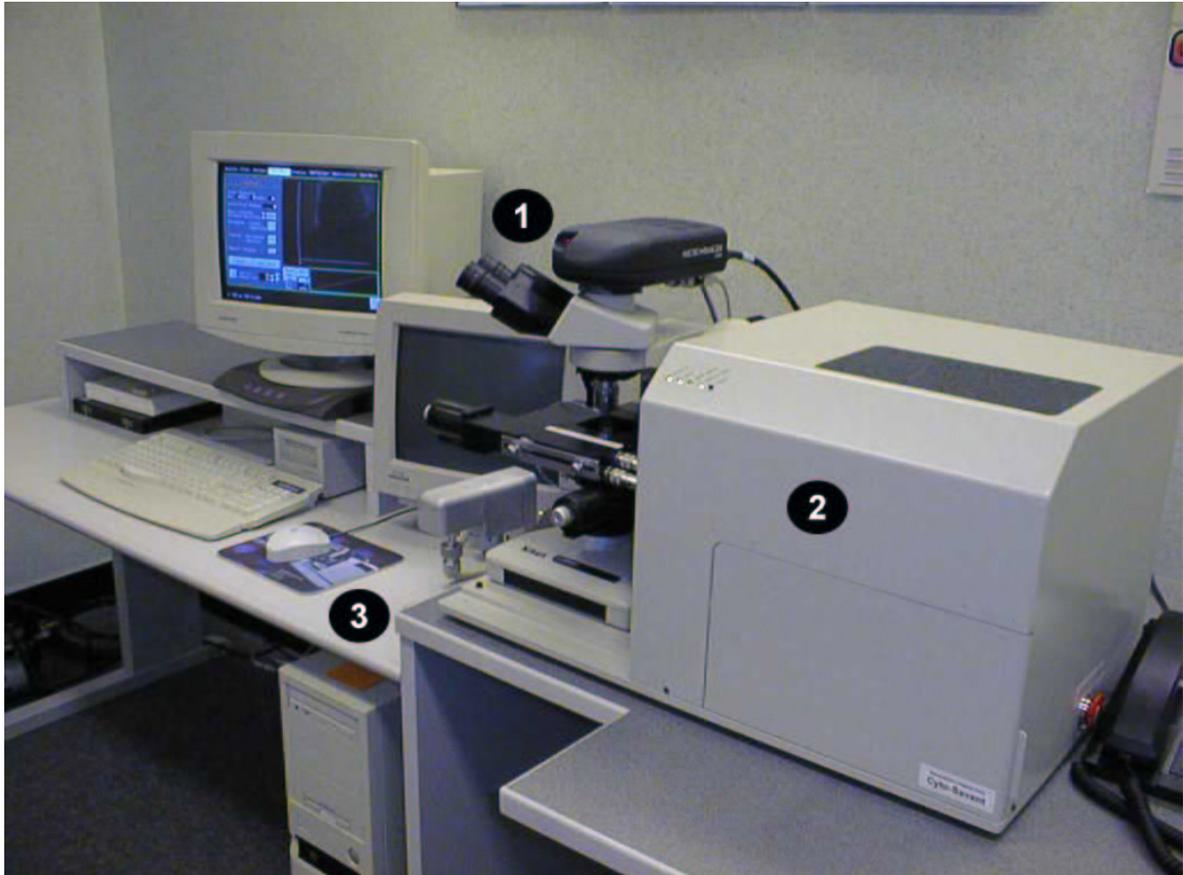
Tris-Gebrauchspuffer:

NaCl	45,0 g mit A. dest. auf 5 l auffüllen
Tris-NaCl-Stammlösung	263,0 ml

0,1% Protease:

Protease Typ XXIV (Sigma)	10,0 mg
Tris-Gebrauchspuffer	10,0 ml
pH auf 7,2 einstellen	

9.3 Abbildung der Bildanalyse-Einheit



1. Kamera mit Mikroskop
2. Pneumatischer Slide-Loader
3. Rechneinheit

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler und Herrn Prof. Dr. Gregor Mikuz, FRCPATH, die die Durchführung meiner Dissertation an ihren Instituten ermöglicht und mich dabei großzügig unterstützt haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Betreuern, Herrn Prof. Dr. Falko Fend, Herrn Prof. Dr. Thomas Mairinger und Herrn Prof. Dr. Andreas Gschwendtner, die mir mit ihrem großen Erfahrungsschatz, ihrer stets konstruktiven Kritik und jederzeit gewährtem Rat bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit zur Seite standen und mein Interesse an Forschung und Wissenschaft geweckt und gefördert haben.

Auch bei Frau Gabriela Schweigl und Frau Theresia Tilg möchte ich mich an dieser Stelle bedanken. Ihre Hilfsbereitschaft, absolute Zuverlässigkeit, große Sorgfalt und das harmonische Arbeitsklima bildeten die Basis für eine erfolgreiche Zusammenarbeit im Bildanalyse-Labor.

München, März 2001