
Webb-baserad virtuell mikroskopi

MIKAEL LUNDIN, JOHAN LUNDIN OCH JORMA ISOLA

Genom att digitalisera hela mikroskoppreparat och utveckla teknik för att kunna se alla delar av ett sådant preparat med valfri förstoring på en datorskärm kan man genomföra ett flertal nya funktioner inom klinisk laborieverksamhet, kvalitetskontroll och forskning. Virtuellt mikroskopi innebär ett stort steg framåt för undervisningen inom patologi, hematologi och cytologi, där t.ex. omfattande samlingar av virtuella cell- och vävnadsprover kan göras tillgängliga på webben. Vår forskargrupp har nyligen färdigställt en atlas över bröstkörtelns histopatologi bestående av mer än 150 hela histologiska preparat; vi presenterar här den teknik som använts.

VAD ÄR VIRTUELL MIKROSKOPI?

Traditionellt fotograferade mikroskopbilder som ingår i tryckta läroböcker eller i diabildserier representerar endast små och på förhand utvalda områden av exempelvis cell- och vävnadsprover. Virtuellt mikroskopi innebär att mikroskoppreparat digitaliseras i sin helhet med en detaljupplösning som motsvarar det starkast förstörande objektivet i ett ljusmikroskop, och de "virtuella" preparaten kan därefter ses på en datorskärm. För att detta

skall motsvara verklig mikroskopering bör man kunna fritt zooma och navigera i preparaten. Den enorma mängd bildinformation som krävs för ett virtuellt preparat har hittills försvårat utvecklingen av funktionerande system för virtuell mikroskopi, det är t.ex. det inte praktiskt möjligt att distribuera bilderna med flyttbara medier (cd, dvd). Den för närvarande enda realistiska lösningen är att lagra de virtuella preparaten på en bildserver och göra dem tillgängliga via ett datanätverk. Detta utgör dock en stor teknisk utmaning, och ytterst få tillämpningar av virtuell mikroskopi har hittills beskrivits.

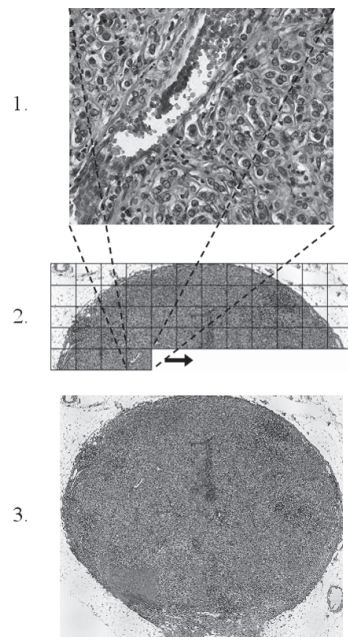
Inom vår forskningsgrupp framkastades idén om att flyg- och satellitbilsindustrin antagligen i stor utsträckning brottas med just dessa problem. Liksom digitalisering av mikroskoppreparat sker genom att man systematiskt fotograferar och sammanfogar ett stort antal digitala bilder, produceras även bilder av större geografiska områden genom sammanfogning av flyg- eller satellitfotografier tagna med stor förstoring. Analogt med mikroskopin behöver man likaså kunna navigera i dessa stora digitala montage och zooma in på intressanta områden. Det finns dock ingen motsvarighet till mikroskopet då det gäller verktyg för att överblicka ett digitalt flygbildsmontage av ett geografiskt område. Där

FÖRFATTARNA

MK Mikael Lundin är doktorand vid Kirurgiska kliniken, HUCS, med specialintresse inom webb- och databasprogrammering

MD Johan Lundin är docent i biomedicinsk informatik vid Helsingfors universitet och forskare vid Folkhälsans forskningscentrum, samt vid Cancerkliniken, HUCS

Jorma Isola är professor i cancerbiologi vid Tammerfors universitet



Figur 1. Ett mikroskoppreparat digitaliseras genom att ett datorstyrt mikroskop systematiskt fotograferar ett stort antal enskilda bilder (1). Vårt eget datorprogram "limmar" därefter ihop de enskilda bilderna till en enda storbild samtidigt som bildkvaliteten kan förbättras digitalt (skärpa, färgtemperatur, kontrast) (2). I fogarna används överlappningsteknik. Den färdiga storbilden (3) består i det här fallet av $12 \times 12 = 144$ bilder à $16 \text{ MB} = 2,15 \text{ GB}$. Bilden komprimeras därefter till ca 100 MB (1:20) utan visuell kvalitetsförlust. Den komprimerade bilden flyttas till vår internetserver och kan där ses med valfri förstoring.

för har utvecklingen inom denna sektor varit snabb, och man har t.o.m. tagit fram system för att över internet zooma och navigera i bilder med en storlek på upptill flera terabyte.

Genom att modifiera programvara som utvecklats inom satellit- och flygbildsindustrin och genom att samtidigt utveckla ett system för att automatiskt digitalisera större serier av mikroskoppreparat, har vi skapat en ny plattform för virtuell mikroskopi. I denna artikel beskriver vi kort de tekniska lösningarna och lyfter fram de viktigaste användningsområdena.

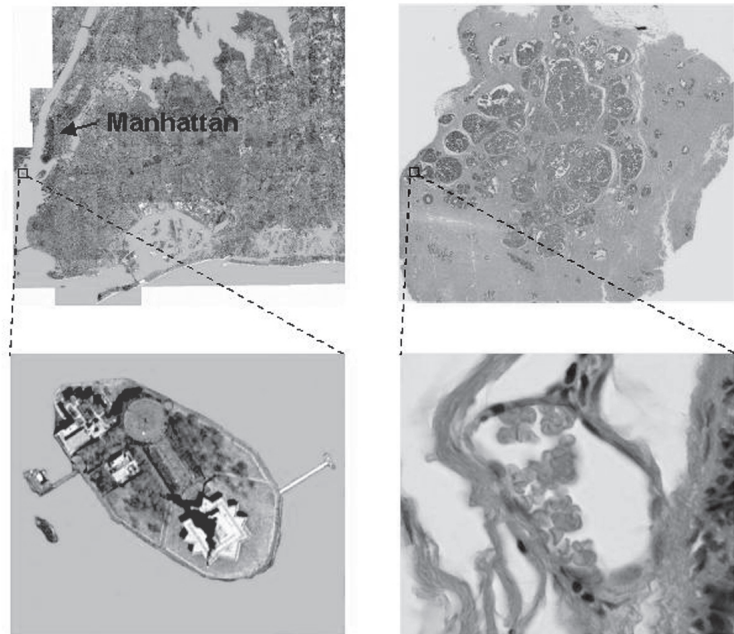
DIGITALISERING AV MIKROSKOPPREPARAT

Digitalisering av mikroskopglas sker med hjälp av ett datorstyrt motoriserat mikroskop

utrustat med en digital kamera. Vid digitaliseringen styrs robotmikroskopet över ytan som skall digitaliseras och ett stort antal mindre bilder (ca $1\,200$ bilder / cm^2) fotograferas efter autofokusering (Figur 1). Bilderna sammanfogas därefter digitalt så att en enda stor bildfil skapas. I motsats till den närmast o begränsade storleken på ett montage av flyg- eller satellitbilder begränsas storleken på ett virtuellt mikroskoppreparat dels av glasets kanter, dels av ljusets våglängd.

Ljusets våglängd begränsar den spatiala upplösningen i ett ljusmikroskop till ca $0,2 \mu\text{m}$. För att fånga upp all denna bildinformation krävs enligt Nyquist-Shannons teorem ungefär den dubbla digitaliseringsresolutionen ($0,10 \mu\text{m}$) [1, 2]. Ett mikroskopglas av standardstorlek (10 cm^2) med denna resolution ger en bildstorlek på 250 gigabyte, motsvarande ca 300 fullskrivna cd-skivor, eller ca $15\,000$ disketter. Utskriven skulle en sådan bild uppta en yta på ca 25×40 meter. Att digitalisera med maximal resolution är dock oerhört resurskrävande, och kompromisser mellan detaljupplösning och överkomlig datamängd måste göras. I praktiken har det visat sig att en något lägre resolution ger tillfredsställande resultat men med exponentiellt minskande filstorlek. Trots att den yta som skall digitaliseras i ett preparat dessutom oftast kan avgränsas betydligt, är datamängden redan i ett litet virtuellt preparat överväldigande, vilket illustreras av jämförelsen i (Tabell I; Figur 2). Den respons vi fått av patologer visar att en digitaliseringsupplösning på ca $0,25 \mu\text{m}$ ($40\times$, NA $1,3$) är ett minimikrav för histopatologiska preparat. Detta betyder att ca 4 gigabyte data behövs per cm^2 . För hematologiska och cytologiska preparat krävs något högre upplösning. Beroende på preparatet (detaljrikedom, tomma områden, färgvariationer) kan mikroskopbilder komprimeras i medeltal 1:25 utan visuell kvalitetsförlust. En bild av storleken 10 gigabyte kan således arkiveras som en 400 megabyte datorfil.

Digitaliseringsresolutionen avgör hur mycket detaljer som kan ses i de virtuella preparaten på stor förstoring. En hög digitaliseringsresolution är dock inte automatiskt detsamma som hög bildkvalitet. Den subjektiva upplevelsen av bildkvalitet påverkas av inställningar för bl.a. vitbalans, färgtemperatur, skärpa, kontrast, fokusering och bildkompression.



Figur 2. Analogi mellan satellit- och mikroskopbilder. Uppe till vänster New York med omnejd (20.000 km²), till höger ett papillärt adenom (2 cm²). Samma mängd bilddata (10 GB), men resolutionen (pixelstorleken) i mikroskopbilderna är 10 miljoner gånger högre (3 m vs 0,3 µm). Nere till vänster en förstoring av Liberty Island (500 x 300 m) med frihetsgudinnans stjärnformade sockel, till höger ett till datamängd motsvarande stort område i mikroskopbilderna (50 x 30 µm) med ett litet blodkärl där erythrocyter syns.

Tabell 1. Samma avbildningsteknik – olika användningsområden (se figur 2)

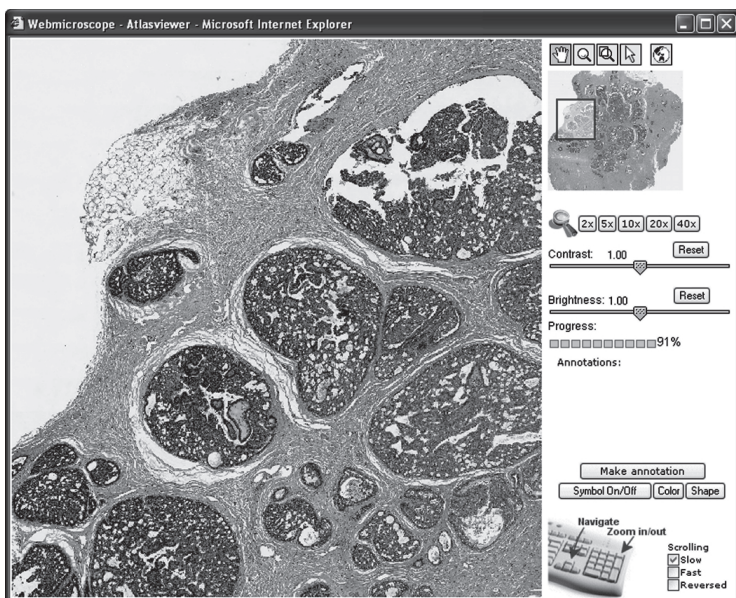
	Flygbildsmosaik	Virtuellt mikroskop-preparat
Bild	New York området	Papillärt adenom
Bildstorlek	10 GB	10 GB
Area	20000 km ²	2 cm ²
Pixel storlek	3 m	0,3 µm
5 x 5 pixlar	Bethesda fountain	En cellkärna
50 x 50 pixlar	Liberty Island	Tvärsnittet av en arteriol
Gräns för yta att fotografera	Ingen (jordklotet?)	Objektglaset
Upplösningsgräns	I praktiken obegränsad	Begränsad av ljusets våglängd

VIRTUELL MIKROSKOPERING

Genom att modifiera programvara utvecklad för satellit- och flygfotografering har vi konstruerat ett system som möjliggör virtuell mikroskopering över internet med en standardwebbläsare och en helt vanlig dator (~300 MHz processor nödvändig). Snabbheten baserar sig på en avancerad interaktion mellan bildservern och användarens webbläsare, där inte hela bilden utan endast det aktuella området som syns på bildskärmen överförs i komprimerad form. Ytterligare krävs att en kontinuerlig överföring av data inte låser mikroskoperingen medan bilddata laddas. Detta gör att man fritt kan zooma och navigera i ett preparat medan bilden uppdateras på skärmen. Gränssnittet är utformat i enlighet med önskemål från patologer, med för-

handsinställda zoomnivåer som motsvarar mikroskopets olika objektiva, och en tangentnavigering som motsvarar styrningen av objektbordet. Funktioner som är unika för virtuell mikroskopi är en helt steglös zoomning, musnavigering och en översiktsbild som visar var i preparatet man befinner sig (Figur 3).

Vår forskningsgrupp upprätthåller en internetserver för virtuell mikroskopi som är kopplad till Helsingfors universitets nätverk, som i sin tur är en del av det nordiska universitetsnätverket (NORDUNET). En snabb hemanslutning (ADSL) till internet räcker i princip till för en fungerande virtuell mikroskopering, och med en fast förbindelse (2 Mbit och uppåt) löper mikroskoperandet mycket smidigt. På vår bildserver finns en funktion för att mäta



Figur 3. Bildskärmsavbildning av användargränssnittet för virtuell mikroskopi. Uppe till höger ser användaren en översikt av hela preparatet, och en ruta markerar den del av preparatet som förstöras.

dataöverföringshastigheten. En tillräckligt snabb förbindelse har uppmätts av användare runt om i Europa och från Nordamerika.

ANVÄNDNINGSSOMRÅDEN

Det höga kravet på bildkvalitet medför att vi med vårt nuvarande system kan digitalisera endast ett begränsat antal preparat per dygn. Systemet är således än så länge inte lämpat för digitalisering av mikroskoppreparat för kliniskt rutinbruk. De största fördelarna med virtuell mikroskopi finns inte heller inom rutinpatologin. Däremot erbjuder virtuell mikroskopi helt nya möjligheter inom undervisning och forskning. Delvis helt nya funktioner har blivit möjliga att förverkliga, såsom omfattande kvalitetsgranskning och standardisering, samt arrangemang av större preparatseminarier.

GRUNDUTBILDNINGEN I MEDICIN OCH CELLBIOLOGI

Digitalisering av preparatserier som traditionellt använts inom grundutbildningen i patologi, hematologi och cytologi ger stora pedagogiska fördelar. Preparaten kan förses med informativa annoteringar som pekar ut de viktiga fyndena i preparaten. Undervisningen är

inte beroende av specialutrymmen med mikroskoputrustning. Läraren kan styra mikroskopbilderna på elevernas monitorer och peka ut och förklara aktuella områden och fynd. Tentamina kan göras mer pedagogiska, t.ex. kan eleverna ge sina svar med hjälp av annoteringar som läraren lätt kan kommentera.

SPECIALISTUTBILDNINGEN I PATOLOGI, CYTOLOGI OCH HEMATOLOGI

Större serier av virtuella preparat som organiserats enligt aktuella klassifikationssystem och som är tillgängliga på internet kan fungera som komplement till klassiska textböcker. Multipla exempelfall av även rariteter kan inkluderas i dessa "bildatlas", och textsektioner kan förses med snabbänkar till andra informationssystem, t.ex. PubMed. Interaktiva pedagogiska funktioner, såsom gradering av tumörer där användaren omedelbart kan jämföra sina resultat med graderingar gjorda av experter på området, är likaså möjliga tillämpningar. Specialistläkarföreningarnas återkommande nationella och internationella preparatseminarier kan lätt genomföras med hjälp av virtuell mikroskopi. Där har problemet på samma sätt som vid kvalitetskontroll varit distribution av preparaten för förhandsgranskning.

Vi har arrangerat ett flertal preparatseminarier i samarbete med bl.a. IAP Finland (International Academy of Pathology, <http://www.webmicroscope.net/seminars>) och sammanställt en första omfattande bildatlas som täcker bröstkörtelns histopatologi, med över 150 virtuella preparat. Atlasen som är organiserad enligt WHOs senaste klassifikation [3] finns allmänt tillgänglig på vår internetserver (<http://www.webmicroscope.net/breastatlas>).

FORSKNING

I vetenskapliga artiklar illustreras fynden ofta med fotografier vilka av tryckningstekniska skäl ofta är av otillräcklig kvalitet (små, svartvita). Genom att bifoga virtuella mikroskoppreparat som webblänkar kan författaren av t.ex. en fallstudie låta läsaren se de aktuella preparaten i sin helhet (ex: <http://www.webmicroscope.net/supplements>). Vid beskrivning av immunhistokemiska färgningar kan tolkningskriterier och mönster illustreras fullständigt. Kraven på en större öppenhet och insyn vid publiceringen av forskningsresultat har blivit allt tydligare. Med webbaserad virtuell mikroskopi kan både mikroskopglas och deras tolkning göras tillgängliga

ga för andra forskare. Extremexemplet är studier baserade på vävnadsmikromatriser (tumor microarray, TMA), där t.o.m. hela studiematerialet kan läggas ut för öppen evaluering. Virtuellt mikroskopi erbjuder ytterligare fördelar i form av möjlighet till automatisk resultatanalys, förenklade histomorfometriska mätningar samt analys av multipla undersökare oberoende av tid och plats.

KLINISK LABORATORIEVERKSAMHET

Före klinisk-patologiska möten där problemfall tas upp, cirkulerar preparatglasen som skall behandlas bland deltagande läkare så att alla får en chans att bekanta sig med fallen på förhand. Mötena fungerar både som konsultations- och undervisningstillfällen. Med hjälp av virtuellt mikroskopi förenklas denna process, läkarna får längre tid på sig att undersöka fallen, och läkare från perifera enheter i sjukvårdsdistrikten kan delta. Intressanta områden kan märkas ut på förhand (annoteringar), och även läkare som inte deltar i själva mötet kan komma med sina synpunkter. De digitaliserade glasen kan arkiveras tillsammans med mötesprotokoll för att framöver fungera som undervisningsmaterial. Med webb-baserad virtuellt mikroskopi kan konsultation sjukhus emellan göras snabbt och bekvämt, oberoende av geografiska avstånd.

KVALITETSKONTROLL

Kvalitetskontroll inom patologi, hematologi och cytologi kräver serier med så gott som identiska preparat, vilket för vissa typer av preparat och diagnoser t.o.m. är omöjligt att åstadkomma. Cirkulering av preparat mellan laboratorier har upplevts som besvärligt. Man har i praktiken varit tvungen att begränsa sig till fall där en större serie preparat som så långt som möjligt motsvarar varandra kan produceras och därefter postas till deltagande laboratorium. Trots att en serie glas kan vara snittade från samma tumör kan variationen snitten emellan bli stor om snitten är många. Med virtuellt mikroskopi för kvalitetskontroll ser alla deltagare exakt samma snitt, och alla typer av preparat kan användas. Kvalitetskontrollen kan göras mer omfattande, t.ex. på nationell eller internationell nivå. Ett fortlöpande samarbetsprojekt där vårt system används är kvalitetsgranskning inom ERSPC-studien (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer) (<http://www.webmicroscope.net/QA>) [4].

FRAMTIDSPERSPEKTIV

Responserna från patologer har varit övervägande positiv och visar att virtuellt mikroskopi skall uppfattas som ett nyttigt komplement till verklig mikroskopering. Bildskärmar och digitala bilder kommer inte att ersätta traditionella mikroskop på samma sätt som röntgenavdelningar har digitaliserats. Skarpa digitala skärmar har dock på en kort tid trängt undan traditionella bildrörsmonitorer och kommer inom en inte alltför avlägsen framtid att uppnå en närapå fotografisk bildkvalitet. Detta tillsammans med kontinuerligt stigande överföringshastigheter på internet betyder att tröskeln för att använda virtuellt mikroskopi för allt fler praktiskt nyttiga funktioner blir lägre. Sett ur ett något annorlunda perspektiv kommer de rätt låga tekniska kraven på användarens utrustning – en helt vanlig dator och en lite snabbare internetkontakt – att göra den fascinerande mikroskopiska världen tillgänglig för en mycket bredare krets än i dag.

MK MIKAEL LUNDIN
FORSKNINGSGRUPPEN FÖR BIOMEDICINSK
INFORMATIK
AVDELNINGEN FÖR CANCERSJUKDOMAR
INSTITUTIONEN FÖR KLINISK MEDICIN
HELSINGFORS UNIVERSITET
POSTADRESS: HUCS INSTITUT
PB 105, 00290 HELSINGFORS
mikael.lundin@helsinki.fi

DOCENT JOHAN LUNDIN
FORSKNINGSGRUPPEN FÖR BIOMEDICINSK
INFORMATIK
AVDELNINGEN FÖR CANCERSJUKDOMAR
INSTITUTIONEN FÖR KLINISK MEDICIN
HELSINGFORS UNIVERSITET
POSTADRESS: HUCS INSTITUT
PB 105, 00290 HELSINGFORS
johan.lundin@helsinki.fi

PROFESSOR JORMA ISOLA
INSTITUTET FÖR MEDICINSK TEKNOLOGI
33014 TAMMERFORS UNIVERSITET
jorma.isola@uta.fi

REFERENSER

1. Glatz-Krieger, K., D. Glatz, and M.J. Mihatsch, *Virtual slides: high-quality demand, physical limitations, and affordability*. Hum Pathol, 2003. 34(10): p. 968-74.
2. *The Nyquist-Shannon Sampling Theorem*.
3. Standaert, B. and L. Denis, *The European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer: an update*. Cancer, 1997. 80(9): p. 1830-4.
4. tumours, W.h.o.c.o., *Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, ed. P.D. Fattaneh A.Tavassoli. 2003, Lyon: IARC Press.