

Detektion von Kanten lebender Knochenzellen in vitro

Sebastian Magosch¹, Hans-Gerd Lipinski¹,
Martin Wiemann² und Dieter Bingmann²

¹Fachbereich Informatik/Medizinische Informatik, Fachhochschule Dortmund

²Physiologisches Institut der Universität Essen

Email: sebastian@magosch.de

Zusammenfassung. Es wird eine Methode vorgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, gezielt lebende Zellen in einer Knochenzellkultur anhand ihrer geometrischen Form zu selektieren. Dabei werden die Kanten der Zellen mit Hilfe von Kantendetektoren bestimmt. Die Überwachung der angewendeten Kantenbestimmungs-Methode erfolgt dabei durch die gleichzeitige Darstellung von Originalbildern und überlagerten Kanten.

1 Problemstellung

Bei der biologischen Bewertung der Vitalität von lebenden Knochenzellen in einer Zellkultur ist deren Mobilität und die damit verbundene äußere geometrische Form der Zellen von großer Bedeutung. Daher sind möglichst automatisierte Verfahren zur Zellformbestimmung wünschenswert, insbesondere in solchen Fällen, in denen eine große Zahl von Zellen (>1000) gleichzeitig überwacht werden muss.

Durch den Einsatz digitaler Kameras und spezieller Einfärbungsmethoden lassen sich mikroskopische Bilder von vitalen Knochenzellen sowohl in Form von einzelnen Bildern als auch von Schichtbilderserien, die eine räumliche Rekonstruktion des Zellpräparates erlauben, gewinnen. Diese Bilddaten können dann mit Hilfe komplexer Algorithmen weiterverarbeitet werden, um bestimmte Informationen zur Morphologie oder Funktion der Zellen zu gewinnen. Die besonders wichtige morphologische Strukturanalyse der Zellen bzw. Zellkompartimente kann mit Hilfe von Kantendetektoren bei vorheriger Vorverarbeitung der Bilder z.B. mit rauschunterdrückenden Filtertechniken automatisiert erfolgen.

Durch diese automatisierten Verfahren können gezielt Informationen über die morphologischen Strukturen aus einem Bild extrahiert werden. Dabei liefern insbesondere Kanten eine wichtige Information über die Form und die Lage eines Objektes. Dieses ist aus biologischer Sicht besonders wichtig, weil lebende Knochenzellen in Knochenzellpräparaten sowohl ihre Position als auch ihre Form fortlaufend ändern.

Die automatische Bestimmung einer Kontur in einem digitalen Bild ist nicht trivial, da in der Praxis keine optimalen mikroskopischen Bilder mit definierten Kanten als Vergleichsobjekte zur Verfügung stehen. Oft besitzen diese Zellbilder Schatten, Texturen, Reflexionen sowie Überdeckungen, welche die Objektform

wesentlich beeinträchtigen. Probleme ergeben sich zusätzlich durch eine mangelhafte Qualität des analogen Ausgangsbildes, welches durch Rauschen (z.B. des Bildsensors), geringen Kontrast, grobe Auflösung und unzureichende Ausleuchtung entstehen kann.

Mit Hilfe eines neu entwickelten Verfahrens und der Variation bekannter Methoden können vitale Knochenzellbilder so verarbeitet werden, dass die Umrisse der wichtigen morphologischen Strukturen innerhalb des Bildes möglichst optimal in kürzester Zeit gewonnen werden.

2 Stand der Forschung

Sowohl Kantendetektoren als auch Glättungsalgorithmen sind mittlerweile in zahlreichen Variationen in der Literatur zu finden. Die meisten der damit erzielten Erfolge lassen sich auf histologische Bilddaten nur begrenzt anwenden, da hier die Kanten oft besonders unscharf sind und die Bilder zudem eine Vielzahl von Bildstörungen aufweisen. Dabei werden Objektkanten entweder gar nicht oder offensichtlich falsch erkannt. Eine exakte Bestimmung der Kanten ist allerdings problematisch, da deren Lage auch für den sachkundigen Betrachter nicht eindeutig feststellbar ist.

3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

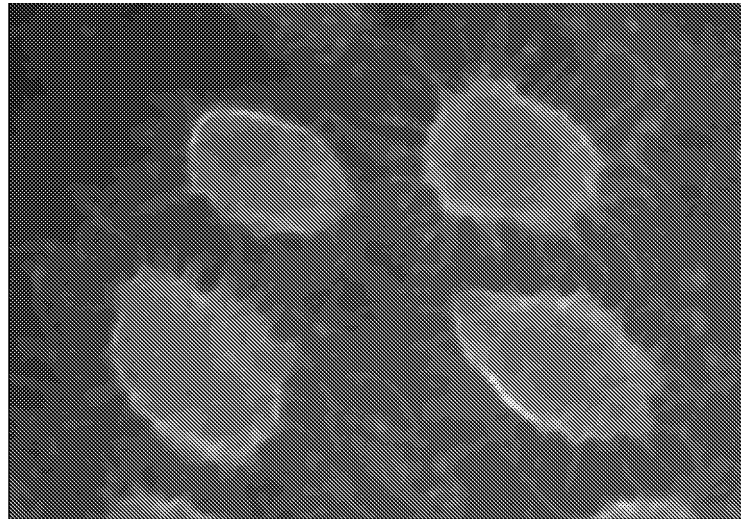
Unter Verwendung wichtiger bekannter Kantendetektieralgorithmus kann der jeweils am besten für die Situation geeignete Algorithmus eingesetzt werden [1,2]. Hierbei wird eine besonders hohe Sensitivität verwendet um die Fehlerrate möglichst gering zu halten. Mit Hilfe eines neu entwickelten Laumlängenalgorithmus können die fälschlich erkannten Kanten herausgefiltert werden, so dass nur die Konturen ausgewählter Zellobjekte und nicht die von Störungen ermittelt werden. Dabei ist es möglich, die Kanten einer sehr großen Zahl von mobilen Zellen in sehr kurzer Zeit (< 1 s) zu bestimmen.

4 Methoden

Kalvarienfragmente von neugeborenen Ratten wurden in einem Wachstumsmedium gehalten und über Nacht mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die Knochenfragmente wurden anschließend für die experimentellen Untersuchungen in eine Beobachtungskammer mit einem Deckglas-Boden überführt und danach mit einem 40fach Immersionsobjektiv betrachtet. Ein Bildstapel von Fluoreszenzbildern wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen (siehe Abbildung 1), die Bestandteil einer konfokalen Laser Scanning Einrichtung ist.

Die Grundlage für die durchgeführten Filterungen bilden bekannte Kantendetektionsalgorithmen, wie z.B. Differenz-, Laplace-, Sobel-, Prewitt-, Kirsch-, Robison-, Canny- und Marr-Hildreth-Operator, sowie Glättungs- und Skeletierungsalgorithmen, die zur Bestimmung der Zellumrisse angewendet werden [1,2].

Abb. 1. Originalbild eines Knochenzellansammlung in der Zellkultur



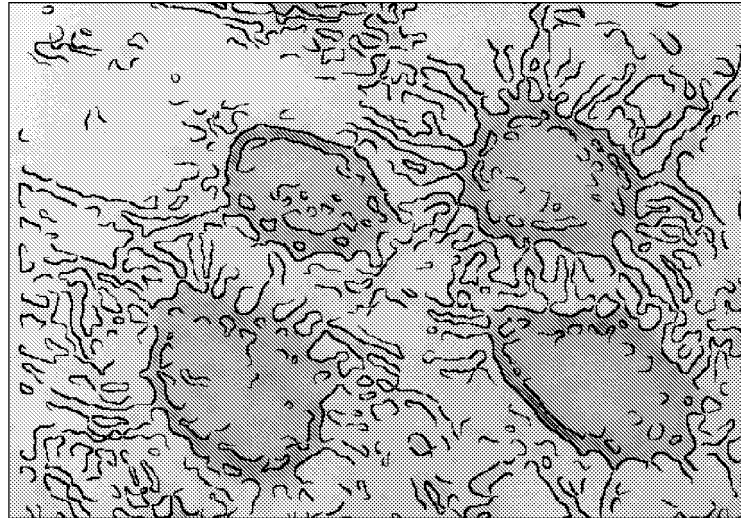
5 Ergebnisse

Neben effizienter Buffering-Methoden, wurde eine "Dual-Bild-Darstellung", ein Overlay-Mix-Modus sowie ein "Grauwertbandpassfilter" entwickelt. Durch den Einsatz dieser Techniken werden gleichzeitig sowohl die Original-Bilddaten als auch die detektierten Kanten visualisiert. Durch das Übereinanderlegen von detektierten Kanten und Originalbild wird eine eindrucksvolle virtuelle Plastizität der zellulären Strukturen erzeugt, die für den Betrachter zumindest eine visuelle Klassifizierung der Objektgrenzen ermöglicht, da es durch ergänzenden Einsatz einer speziellen Grauwertmanipulation möglich wird, die Zellen virtuell einzufärben.

Des Weiteren wurde ein neuartiger Lauflängenfilter entwickelt, der die Längen detektierten Kanten nach vorheriger Skelettierung vermisst und anhand ihrer Länge die Zellen selektiert. Dazu werden die Zellbilder binärisiert und die zugehörigen Kanten ermittelt. Die Skelettierung erfolgt mit Hilfe eines Thinning-Algorithmus [1], welcher die Umrisse der Zellen im Binärbild erzeugt. Da diese eine Breite von nur einem Pixel aufweisen, kann man den Umfang der Zellen detektieren. Lässt man nur ganz bestimmte Größen des Umfangs (Lauflänge") zu, kann man eine Sortierung nach Zelltypen vornehmen. Damit ist es möglich, Zellen, die einen ganz bestimmten Zustand während ihres Bewegungsablaufes einnehmen (der sich in ihrer geometrischen Form ausdrückt), automatisch zu selektieren.

Die Abbildung 2 zeigt das Resultat der angewendeten Verfahren auf eine Zellansammlung. Dargestellt sind die nach Anwendung des Thinning-Algorithmus ermittelten Kanten, welche in die invertierten Originalbilddaten (vgl. Abbildung 1) eingezeichnet wurden. Durch eine effiziente Buffering-Verarbeitung der

Abb. 2. Überlagerung detektierter Kanten und invertiertem Originalbild



Bilder ist es möglich, auch relativ große Bildmatrizen (2000 x 2000 pixel) als üblicherweise zu erarbeiten und damit auf Grund der größeren Datenbasis exaktere biologische Ergebnisse zu erzielen.

6 Diskussion

Die Entwicklung und Anwendung von Zellkantendetektoren erlauben es, anstelle einer interaktiven Festlegung von Zellgrenzen automatisch komplexe Objektkonturen zu erkennen und weiterzuverarbeiten. Die Auswahl der möglich vom Programm her zur Verfügung gestellten Verfahren obliegt dabei dem biowissenschaftlichen Anwender. Mit Hilfe der Verfahren ist es möglich, vitale Zellen, die während ihres Bewegungsablaufs in einer Zellkultur fortlaufend ihre äußere Form ändern, automatisch zu selektieren. Dieses ist für Biowissenschaftler in sofern hilfreich, da sich mit der neuen Methode auch große Zellzahlen automatisch überwachen lassen.

Literaturverzeichnis

1. J.R. Parker, Algorithms for Image Processing and Computer Vision, John Wiley & Sons, Inc. Canada, 1997.
2. R. Klette, P. Zamperoni, Handbuch der Operatoren für die Bildverarbeitung, Verlag Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1995.