

# Variation der Fokusebenen zur 3D-Rekonstruktion weißer Blutkörperchen

Andrea Fürsich<sup>1,2</sup>, Sebastian Mues-Hinterwäller<sup>1</sup>, Thorsten Zerfaß<sup>1</sup>,  
Thomas Wittenberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fraunhofer-Institut für Integrierte Schaltungen IIS, Erlangen

<sup>2</sup>Institut für Computervisualistik, Universität Koblenz-Landau

Email: fuersich@uni-koblenz.de

**Zusammenfassung.** Für die Rekonstruktion mikroskopisch beobachtbarer Objekte sind aus der Literatur Verfahren bekannt, die aus mehreren lichtmikroskopischen Aufnahmen unterschiedlicher Fokussierung die Objektoberfläche rekonstruieren. Das sog. Shape-from-Focus-Verfahren berechnet dazu durch Maximierung eines Schärfemaßes für jede Pixelposition einen Höhenindex. Während diese Maximierung bei diffusen Oberflächen gute Ergebnisse liefert, sind bei teilweise transparenten Objekten, wie beispielsweise weißen Blutkörperchen, Erweiterungen notwendig. Dieser Beitrag beschreibt Ansätze zur Verbesserung der Höhenkarte für diesen Anwendungsfall, die zum einen auf einer Median-Maximierung und zum anderen auf einem Differenzbildverfahren basieren. Zudem beschränkt sich die Rekonstruktion bisher meist ausschließlich auf den Rekonstruktionsvorgang. Dieser Beitrag befasst sich zusätzlich mit der Verbesserung des Rekonstruktionsergebnisses durch gezielte Festlegung der Fokussiererei. Die berechnete Höhenkarte wird schließlich als Punktwolke dreidimensional visualisiert.

## 1 Einleitung

Die Untersuchung des Blutes spielt für die Diagnosefindung im Bereich der inneren Medizin eine bedeutende Rolle. Mit dem durchflusszytometrischen Automaten steht eine Analyseverfahren zur automatischen Erstellung eines Differentialblutbildes zur Verfügung. Bei Abnormalitäten im Differentialblutbild ist jedoch immer noch die Betrachtung einzelner Zellen unter dem Lichtmikroskop mittels manuellem Durchfokussieren notwendig. Um den Hämatologen bei der objektiven Beurteilung der Blutproben bzw. spezieller Einzelzellen zu unterstützen, bietet die Auswertung digitaler Blutaussstriche am Computer Möglichkeiten einer räumlichen Darstellung der Zelle, wodurch zusätzliche strukturelle Informationen sichtbar und reproduzierbar gemacht werden können. Verfahren, die auf einer Variation der Fokusebene basieren, stellen einen Ansatz zur dreidimensionalen Rekonstruktion von Zellen dar. Bekannte Anwendungen dieses Ansatzes existieren hauptsächlich für diffuse Objekte aus der Industrie oder Geologie [1]. Bei den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) als zu rekonstruierende Objekte, handelt es sich dagegen um partiell transparente Objekte mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern.

## 2 Stand der Forschung

Grundsätzlich nutzen Verfahren zur 3D-Rekonstruktion, die auf einer Änderung der Fokuseinstellung beruhen, den Effekt der Unschärfe bei defokussierter Abbildung.

*Shape-from-Defocus* Verfahren schätzen durch Vergleich der Unschärfe zweier korrespondierender lokaler Bildbereiche die Höheninformation des beobachteten Objektes ab [2]. Voraussetzung dafür ist jedoch eine präzise Kamerakalibrierung.

Das sogenannte *Shape-from-Focus* Verfahren dagegen verwendet eine Serie von Bildern vom zu rekonstruierenden Objekt, die durch sukzessive Veränderung der Fokusebene mit einer konstanten Schrittweite  $\Delta z$  aufgenommen werden. Für jeden Bildpunkt wird die Bildschärfe mittels eines lokalen Schärfemaßes ermittelt. In der Literatur werden eine Vielzahl von Schärfemaßen vorgeschlagen, wie z.B. die Varianz, der Laplace-Operator oder der Gradientenbetrag. Anhand der Betrachtung des Verlaufs der Schärfemaßwerte für einen bestimmten Bildpunkt  $p(x, y)$  über alle Ebenen  $z$  kann der Maximalwert bestimmt werden. Die Zuordnung des jeweiligen Höhenindex  $z$  zu dieser Pixelposition liefert eine Höhenkarte, die zur dreidimensionalen Visualisierung des Objektes herangezogen werden kann [1].

## 3 Fortschritt durch den Beitrag

Im vorliegenden Beitrag dient das *Shape-from-Focus* Verfahren als Grundlage für die Rekonstruktion von weißen Blutkörperchen. Aufgrund der Morphologie der Leukozyten wird die einfache Maximierung eines Schärfemaßes durch eine Median-Maximierung ersetzt. Durch die Verwendung eines Differenzbildverfahrens kann die Höhenkarte zusätzlich verbessert werden. Außerdem wird neben dem eigentlichen Rekonstruktionsprozess die zur Rekonstruktion verwendete Fokuserie eigens festgelegt, wodurch mögliche Fehlerquellen bei der Maximierung und zusätzlicher Rechenaufwand vermieden werden.

## 4 Methoden

### 4.1 Festlegung der Fokuserie

Die Festlegung der Fokuserie beruht zum einen auf der Bestimmung der axialen Ausdehnung einer weißen Blutzelle und zum anderen auf der Ermittlung der optimalen Schrittweite  $\Delta z$  für die Aufnahme der Fokuserie.

Ist die Höhe des betrachteten Objektes bekannt, kann vermieden werden, dass Bilder oberhalb und unterhalb der Zellgrenze verarbeitet werden. Die Verarbeitungsschritte können somit auf Schichtbilder reduziert werden, die für die Rekonstruktion relevante Informationen enthalten. Da es sich bei den Leukozyten um verformbare Gebilde handelt, von denen nicht genau bekannt ist, wie sie auf dem Objektträger liegen, wird ihre axiale Ausdehnung durch Aufsummierung der Gradientenbeträge über einem bestimmten Schwellwert innerhalb

des segmentierten Zellbereichs bestimmt. Anhand der Steigung im Verlauf der Kurve über alle  $z$ -Positionen lässt sich der relevante Bereich festlegen, in dem die Zelle liegt.

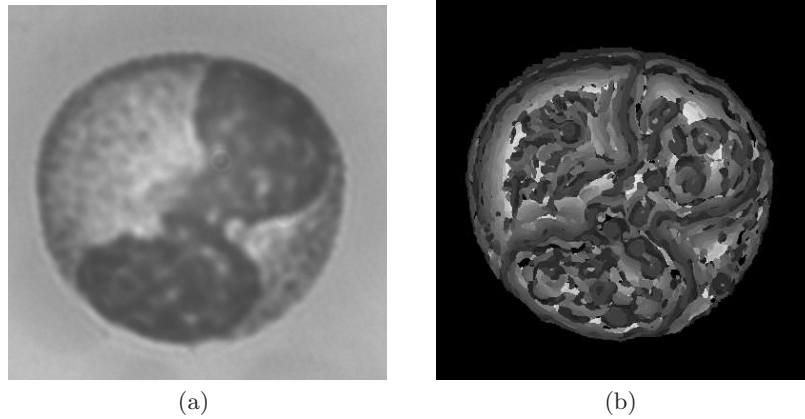
Neben der Festlegung des gesamten zu betrachtenden Bereichs ist die Bestimmung der Schrittweite, mit der die Mikroskopbühne verfahren wird, ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt. Ein bestimmter Bereich um die fokussierte Ebene wird als Schärfentiefebereich bezeichnet und stellt ein Maß für die Auflösung entlang der optischen Achse dar. Objektpunkte, die innerhalb dieses Bereichs liegen, werden mit der gleichen Auflösung abgebildet. Eine Aufnahme im Schärfentiefebereich ist daher ausreichend, um die gesamte darstellbare Information zu erhalten. Werden die Abstände zwischen den einzelnen Aufnahmeebenen verringert, führt das nicht zu einem zusätzlichen Informationsgewinn, sondern die Abbildung eines Punktes kann über alle  $z$ -Positionen nicht mehr eindeutig einer Ebene zugeordnet werden. Werden dagegen die Abstände zwischen den Aufnahmen größer als der Schärfentiefebereich gewählt, wird die mögliche Auflösung nicht ausgenutzt. Der optimale Abstand zwischen den Aufnahmepositionen entspricht somit dem Schärfentiefebereich.

## 4.2 Bestimmung der Höhenkarte

Das Verfahren zur Maximierung des Schärfemaßes basiert auf der Annahme, dass das Schärfemaß einen charakteristischen, parabelähnlichen axialen Verlauf aufweist. Da die Leukozyten auch nach der Färbung zum Teil transparent sind, kann es passieren, dass mehrere Objektpunkte unterschiedlicher Entfernung auf ein und dieselbe Position im Bild abgebildet werden und somit mehrere Maxima im Verlauf des Schärfemaßes auftreten [3]. Aufgrund experimenteller Untersuchungen wird aber angenommen, dass für die Mehrzahl der Punkte das Hauptmaximum entweder am Zellkern oder der Zellhülle gefunden wird, so dass in der Höhenkarte zwischen benachbarten Positionen keine extrem unterschiedlichen Höhenwerte auftreten. Um auftretende Ausreißer zu beseitigen, wird die Höhenkarte anhand einer Median-Maximierung ermittelt, wobei ein lokaler Bereich um die aktuelle Position Einfluss auf die Maximumfindung nimmt. Durch Anwendung des Median-Filters auf die Schärfemaßbilder werden Werte mit großer Abweichung in der lokalen Umgebung eliminiert. Dabei wird in Abhängigkeit von der verwendeten Maskengröße die Ortsauflösung gesenkt. Die Bestimmung der Höhenkarte findet im Anschluss daran durch Maximierung der Werte aus den auflösungsreduzierten Schärfemaßbildern statt.

Die erzeugte Höhenkarte wird anschließend nochmals auf Plausibilität hin untersucht und die entsprechenden Werte gegebenenfalls ersetzt. Dazu wird auf der berechneten Höhenkarte zunächst eine Median-Filterung ausgeführt. Die Differenz zwischen der originalen und der gefilterten Höhenkarte liefert diejenigen Stellen, an denen durch die Filterung „Rauschen“ entfernt wurde [4]. Während große Differenzwerte auf unerwünschte Ausreißer hinweisen, wird eine geringe Variation der Werte in der Maske aber nicht als Fehlerwert angesehen, sondern spiegelt die Struktur des Objektes wieder. Es wird deshalb ein Schwellwert verwendet, der den Teil der Differenzwerte als Fehlerwerte ausschließt, die

**Abb. 1.** Beispielbild aus der Fokusserie eines Leukozyten (a) und die dazugehörige Höhenkarte (b)



einen Schwellwert nicht überschreiten. Für die ermittelten Fehlerpunkte wird der Höhenwert durch Mittelung in einer lokalen Umgebung neu berechnet. Dabei fließt der mittlere Wert, der als Ausreißer erkannt wurde, nicht mehr mit ein, um die Höhe dieses Pixels besser an die umgebenden Werte anzugleichen.

## 5 Ergebnisse

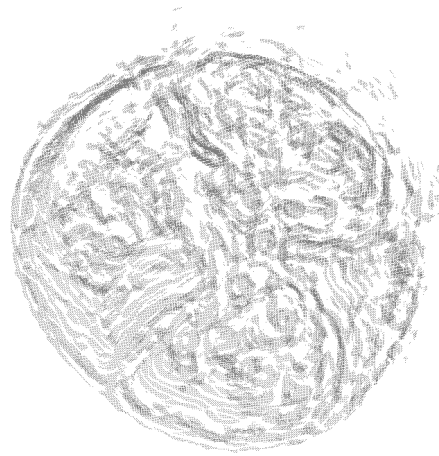
Die beschriebenen Methoden wurden an Fokussereien von unterschiedlichen Leukozyten, sowie an der Fokusserie eines Kalibermusters getestet. Für die Aufnahme wurde ein Durchlichtmikroskop der Firma Zeiss mit einem 1000-fachen Gesamtvergrößerungsfaktor verwendet. Das verwendete Objektiv ist für die Anwendung in Immersionsöl vorgesehen und besitzt eine numerische Apertur von 1.3.

Die berechneten Höhenkarten wurden anhand von Grauwertbildern dargestellt. Abb. 1 zeigt ein Bild aus der Fokusserie eines Leukozyten und die dazugehörige Höhenkarte. Für die dreidimensionale Visualisierung der Rekonstruktionsergebnisse wurde aus der Höhenkarte eine Punktwolke erstellt (siehe Abb. 2). Die Herstellung des korrekten Abbildungsverhältnis zwischen lateraler Ausdehnung und Höhe des Objektes geschieht dabei über einen konstanten Höhenfaktor, der mit dem Bildindex  $z$  multipliziert wird [1].

## 6 Diskussion

Die Anwendung des *Shape-from-Focus* Verfahrens zur Rekonstruktion von Leukozyten, insbesondere die Adaptionen bei der Bestimmung der Höhenkarte und die eigens dafür festgelegte Fokusserie liefern eine dreidimensionale Darstellung, bei der deutlich die Struktur der unterschiedlichen Zellbestandteile erkennbar wird. Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass die im Verlauf des

**Abb. 2.** Ansicht der dreidimensionalen Punktwolke eines Leukozyten



Schärfemaßes auftretenden Maxima unterschiedlichen Zellstrukturen zugeordnet werden können. Somit ist es denkbar, dass zukünftig verschiedene Oberflächenstrukturen, wie Kern und Plasma getrennt voneinander darstellbar werden.

### **Literaturverzeichnis**

1. Niederoest M, Niederoest J, Scucka J. Automatic 3D reconstruction and visualization of microscopic objects from a monoscopic multifocus image sequence. *International Archives of the Photogrammetry* 2003;(XXXXIV-5).
2. Ens J, Lawrence P. An investigation of methods for determining depth from focus. *IEEE PAMI* 1993;15(2):97–108.
3. Dierig T. Gewinnung von Tiefenkarten aus Fokuserien. Ph.D. thesis. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; 2002.
4. Scheurmann T. Berührungslose Gestaltvermessung von Mikrostrukturen durch Fokussuche. *Wissenschaftliche Schriftreihe des ICT* 1997;13.