Detektion und Quantifizierung der Membranstrukturen von Nervenzellen

J. Bredno, V. Metzler, W. Nacimiento*, T. Lehmann, K. Spitzer

Institut für Medizinische Informatik und *Neurologische Klinik
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52057 Aachen
Email: jbredno@bootes.imib.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Quantitative diagnostische Aussagen aufgrund histologischer Untersuchungen erfordern eine reproduzierbare Auswertung von Zellbildern. Der Einsatz eines rechnergestützten Auswertungssystems kann die Qualität der Aussagen steigern, indem der subjektive Einfluß des Untersuchers minimiert wird. Mit einem für die Aufgabe der Zelldetektion spezialisierten deformierbaren Membranmodell können geometrische Informationen über die Form einer Zelle im Bild gewonnen werden. Die Geometrie und ein zusätzlich ermitteltes lokales Qualitäts- und Wichtungsmaß für die aufgefundene Kontur werden verwendet, um diagnostisch relevante Membranstrukturen zu extrahieren und quantitative Kennwerte zu ermitteln. Das Verfahren wird zur quantitativen Auswertung bei einer neurobiologischen Fragestellung eingesetzt. Hier werden histologisch präparierte Zellen automatisch ausgewertet und in 94% der Fälle korrekt erkannt.

Schlüsselwörter: Deformierbares Membranmodell, Computer-Assisted Microscopy, Konturdetektion, Quantitative Mikroskopie

1 Einleitung

Um in einer histologischen Versuchsreihe relevante Ergebnisse zu messen, muß eine sichere Methode vorliegen, um Aussagen über den Zustand von präpariertem Gewebe zu erhalten. Die Begutachtung und Einordnung durch eine geschulte Person ist zeitintensiv und vom subjektiven Eindruck des Betrachters abhängig. Eine Rechnerunterstützung *(Computer-Assisted Microscopy)* bietet hier mit der Automatisierung des Vorgangs und dem Ausschalten subjektiver Eindrücke Vorteile gegenüber der herkömmlichen visuellen Beurteilung der Präparate [1]. Ergebnisse werden vergleichbar und können statistisch verifiziert werden. Zu diesem Zweck benötigt man robuste Algorithmen, die insbesondere den Anforderungen mikroskopischen Bildmaterials und biologischer Präparate gerecht werden. Dort sind komplexe Strukturen oft undeutlich und mit großen Variationen im Erscheinungsbild gegeben.

In der Neurologischen Klinik der RWTH Aachen werden motorische Nervenzellen aus dem Rückenmark von Ratten untersucht, um Aussagen über pathologische Veränderungen von synaptischen Boutons an der Oberfläche dieser Zellen nach einer Rückenmarksläsion zu erhalten. Die Präparation der Schnitte erfolgt mit unterschiedlichen immunhistochemischen Färbetechniken, die bestimmte Neurotransmitterstoffe einfärben. Die nachgewiesene Reduktion von inhibitorischen axosomatischen Boutons nach einer Läsion [2] ist zu quantifizieren. Dazu wird die unterschiedliche Farbintensität markierter Boutons gemessen und auf objektive Parameter abgebildet. Ein Präparat ist in Abbildung 1 gezeigt.

Eine rechnerunterstützte Auswertung muß als schwierige Teilaufgabe geometrische Informationen über die Lage der Zellmembran in einem Bild gewinnen [3]. Diese Bildsegmentierung ist bei biologischem Material oft schwierig [4]. Algorithmen auf Basis deformierbarer Konturmodelle ermöglichen es, in einem Bild Formen aufzufinden und geometrisch zu repräsentieren. Speziell die formgebenden Eigenschaften biologischer Objekte können dabei modelliert werden [5, 6].

Mit den Algorithmen werden diagnostisch relevante Bereiche eines Bildes extrahiert, aus denen Kennwerte erarbeitet werden. Diese Kennwerte werden dem Nutzer als Protokolle zur Verfügung gestellt, anhand derer eine Qualitätskontrolle durchgeführt wird.

2 Konturdetektion mit dem deformierbaren Membranmodell

Die auszuwertenden Zellen wurden unter dem Mikroskop so plaziert, daß sich in der Mitte des Bildes der Zellkern befindet. Mit dieser a-priori-Information wird mit dem deformierbaren Membranmodell, ausgehend von einem Punkt im Zellinnern, die Zellkontur bestimmt. Das verwendete Modell wurde als aktives Konturverfahren realisiert. Solche Modelle und Algorithmen werden zur Bestimmung einer Kontur in undeutlichem Bildmaterial eingesetzt [6]. Sie können nicht klar erkennbare Abschnitte interpolieren, die Detektion verläuft objekt-, statt punkt- oder frequenzorientiert. Für die deformierbare Membran werden Verhaltensweisen festgelegt, die dazu führen, daß sie iterativ die Lage der im Bildmaterial enthaltenen Formen annimmt. Die Dynamik der definierten Kontur wird durch mechanische Membraneigenschaften festgelegt, die möglichst genau das Verhalten einer biologischen Membran unter Innendruck simulieren sollen. Aus diesem Grunde werden Eigenschaften wie Elastizität oder Splineinterpolation hier nicht verwendet.

2.1 Modellierung der Kontur

Die Membran wird beim verwendeten Modell durch eine Abfolge von geraden Kanten repräsentiert, die von Knoten unterstützt werden. Die Anzahl der Kanten und Knoten ist variabel, eine maximale und minimale Kantenlänge kann eingestellt werden. Auf die Membran wirken mehrere Einflüsse, die mechanisch modelliert wurden.

- Der wichtigste innere Einfluß, der das Suchverhalten der Kontur bestimmt, ist ein Innendruck. Dieser führt zu einer Ausdehnung der modellierten Membran aus der Startlage im Zellinneren heraus.
- Als äußerer Einfluß resultierend aus dem Bild, werden dessen Grauwerte als energetische Höhen und Potentiale interpretiert. Eine Kante erfährt durch anliegende Potentialdifferenzen Normalkräfte. Die Kräfte entlang einer Kante summieren sich zu Momenten um die stützenden Knoten. Die Stützkräfte zur Aufnahme dieser Momente und die Resultierende des Innendrucks wirken auf angrenzende Knoten einer Kante.

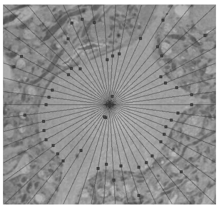

Abb. 1. Im Bild einer Nervenzelle sind Schnittverläufe eingezeichnet, die zur adaptiven Zuordnung energetischer Profilhöhen zu den Grauwerten des Bildes ausgewertet werden. Auf den Strahlen eingezeichnete Marker kennzeichnen Stellen, an denen eine konservative Kantenerkennung die Zellmembran gefunden hat.

- Mit inneren Einflüssen des deformierbaren Membranmodells kann der Detektionsalgorithmus den Verlauf von undeutlichen Zellabschnitten rekonstruieren. Diese können mit der pathologischen Reduktion von Neurotransmitterstoffen oder einem tangentialen Anschnitt der Zellmembran erklärt werden. Eine Zellmembran ist van-der-Waals-gebunden, sie nimmt immer eine Form an, die durch eine minimale Verformungsenergie (zweite Ableitung der Kontur) gekennzeichnet ist. Undeutliche Bereiche der Membran können durch das Modell rekonstruiert werden, indem auf Knoten Deformierungskräfte wirken, die die lokale zweite Ableitung minimieren und die Kontur dadurch glätten.

Die Zuordnung der Grauwerte eines Bildes zu energetischen Höhen erfolgt nach einer Voranalyse (Abbildung 1). Mit dieser wird erreicht, daß die zu erkennende Kontur im Bild sich dem deformierbaren Modell als eine Energiebarriere darstellt, die vom Innendruck nicht überwunden werden kann. Die in der Abbildung eingezeichneten Schnittverläufe werden analysiert, um Informationen über die Grauwerte im Innern und am Rand einer Zelle zu erhalten.

Die Knoten bewegen sich proportional zu den einwirkenden Kräften. Im Laufe der Iteration wird das Membranmodell so deformiert, daß Knoten eine Lage an der Zellmembran einnehmen und sich hier stabilisieren. Diese Punkte werden eingefroren. In der Nähe solcher stabilisierter Bereiche können undeutliche Konturabschnitte durch Verfolgung des Verlaufs der Kontur rekonstruiert werden. Implizit sinkt damit die Aktivität der modellierten Membran in der Nähe der zu erkennenden Zellmembran, ähnlich wie dies in einem *Annealing-Prozess* vom Algorithmus vorgegeben wird. Abbildung 2 zeigt die Einflüsse auf eine deformierbare Membran.

2.2 Bewertung der Kontur mit Konfidenzwerten

Eine fehlerfreie automatische Detektion kann bei der Formerkennung von bio-

Abb. 2. Die Einflüsse auf die deformierbare Membran während der Konturdetektion logischen Strukturen nicht erreicht werden. Dennoch ist es auch bei Bildmaterial mit leichten Erkennungsfehlern noch möglich, diagnostisch relevante Kennwerte aus den gut erkannten Bereichen zu extrahieren. Zur Unterstützung der nachfolgenden Quantifizierung wird jeder Kante eine Konfidenz zugeordnet, die die lokale Detektionsqualität angibt, also die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Kante korrekt erkannt wurde und entlang einer Zellmembran im Bild verläuft. So erhalten Kanten, die eine glatte Kontur entlang einer Energiebarriere bilden, hohe Konfidenzwerte. Unstetigkeiten in der Kontur oder ein nicht erwünschtes Energieprofil über eine Kante führen zur Abwertung der Konfidenz. Die Aufgabe der Konfidenz ist es, zu verhindern, daß sich Detektionsfehler auf ermittelte Kennwerte einer Zelle auswirken. Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie die lokale Konfidenz der Kontur zur Verbesserung der Robustheit quantitativer Parameter eingesetzt wird.

2.3 Kennwerte

Nachdem die Kontur detektiert und den einzelnen Membranabschnitten ein Konfidenz- und damit ein Qualitätsmaß zugewiesen ist, werden die Bildinformationen entlang der Membran unter Annahme einer vorgegebenen Membrandicke als *Region of Interest* aus dem Bild extrahiert. Nun werden verschiedene diagnostisch relevante Kennwerte bestimmt. Dies sind die durchschnittliche Schwärzung der Membran und die Besetzung mit synaptischen Boutons, in denen Neurotransmitterstoff enthalten ist. Eine morphologische Analyse ermittelt deren Größenverteilung. Dabei werden in einer Abfolge von morphologischen Öffnungen Kreisscheiben verschiedenen Durchmessers in der binarisierten Darstellung der Zellmembran aufgefunden [7]. Jede Kreisscheibe ist die Abbildung eines synaptischen Boutons. Deren Anzahl wird über die Membranlänge normiert angegeben. Bei der Kennwertbestimmung werden Beleuchtungseinflüsse durch Regressionsrechnungen unterdrückt.

Die Bestimmung der Kennwerte wichtet die gelesenen Bildinformationen jeweils mit der Konfidenz der entsprechenden Kante. Unsicher erkannte Bereiche mit niedriger Konfidenz tragen damit wenig zu den ermittelten Kennwerten einer Zelle bei, leichte Fehler bei der Konturdetektion wirken sich nicht auf diese aus.

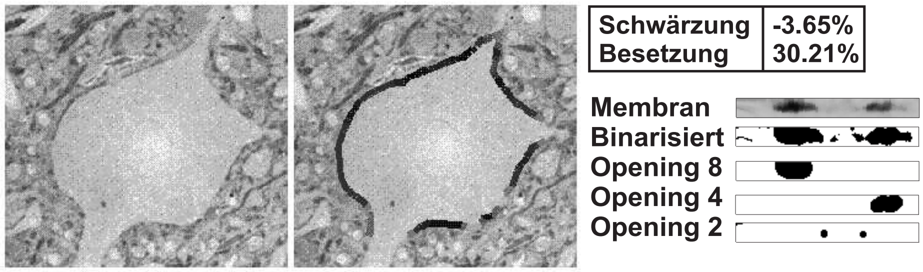

Abb. 3. Die Auswertung zu einer Zelle zeigt die aufgefundene Zellmembran und die zugehörigen Kennwerte. Die Schwärzung ist relativ zu einer Referenzzelle angegeben. Zusätzlich ist für einen kurzen Abschnitt der Zellmembran die morphologische Auswertung dargestellt.

3 Ergebnisse und Ausblick

In Abbildung 3 ist die ausgewertete Zelle mit der vom System ermittelten Kontur dargestellt. Je heller die Membran eingezeichnet wurde, desto geringer ist die Konfidenz an den entsprechenden Stellen. Der Nutzer erhält eine einfache Qualitätskontrolle des Detektionsalgorithmus. Bei günstigen Bedingungen, also einer möglichst konstanten Färbeantwort und identischer Ausleuchtung der Präparate, konnten in einer Versuchsreihe Erfolgsraten von 94% erreicht werden. Bei den übrigen Bildern sind deutliche Fehler in der detektierten Kontur zu erkennen, so daß die Kennwerte zu diesen Zellen bei der visuellen Kontrolle zurückgewiesen werden können.

Allgemein steht mit dem deformierbaren Membranmodell jetzt ein System zur Verfügung, das biologische Formen auf Bildmaterial gut erkennen kann und eine detektierte Kontur für beliebige Auswertungen zur Verfügung stellt. Dieses wird im beschriebenen Auswertungssystem für die histologische Untersuchungsreihe der Neurologischen Klinik der RWTH Aachen eingesetzt, um Kennwerte zu Nervenzellen zu bestimmen. Das System wird zur Zeit verifiziert und in naher Zukunft in der neurobiologischen Routine Einsatz finden. Durch die Methode der Konfidierung von Abschnitten einer erkannten Kontur kann der Einfluß eventueller Detektionsfehler auf ermittelte Kennwerte verringert werden. Das Verfahren wird auch auf verschiedene andere Fragestellungen aus dem Bereich der quantitativen Mikroskopie angepaßt. Als sehr günstig erwies sich dabei die Konfigurierbarkeit des Systems auf unterschiedlichstes Bildmaterial. Von etwa 40 externen Parametern, die die Verhaltensweisen des Membranmodells bestimmen, müssen dabei lediglich fünf nachgestellt werden. Allgemein können histologische Problemstellungen untersucht werden, bei denen sich Kennwerte, die einem Gewebe zugeordnet werden sollen, an Grauwerten des Bildes oder Geometrien im Bild ablesen lassen.

4 Literatur

1. J.C. Russ: *Computer-Assisted Microscopy*. Plenum Press, New York, 1990
2. W. Nacimiento, J. Noth: Zelluläre Pathomechanismen und experimentelle Therapien nach Rückenmarkstrauma. *Nervenheilkunde*, 16: 1-11, 1997
3. C.A. Glasby, G.W. Hogan: *Image Analysis for the Biological Sciences*. John Wiley & Sons, New York, 1994
4. T. Lehmann, W. Oberschelp, E. Pelikan, R. Repges: *Bildverarbeitung für die Medizin, Grundlagen, Modelle, Methoden, Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin, 1. Auflage, 1997.
5. S. Lobregt, A. Viergerer: A discrete dynamic contour model. *IEEE Trans. Med. Imaging,* 14(1): 12-24, 1995
6. D. Rückert, P. Burger, S. Forbat, R. Mohiaddin, G. Yang: Automatic tracking of the aorta in cardiovascular MR images using deformable models. *IEEE Trans. Med. Imaging,* 16(5): 581-590, 1997
7. R. Haralick, S. Sternberg, X. Zhuang: Image Analysis using mathematical morphology. *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 9(4): 532-550, 1987