Rekonstruktion und Klassifikation dendritischer Spines aus konfokalen Bilddaten

A. Herzog[1)], G. Sommerkorn[1)], U. Seiffert[1)], B. Michaelis[1)],

K. Braun[2)], W. Zuschratter[2)]

1) Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Institut für Prozeßmeßtechnik und Elektronik

2) (Blaue Liste) Institut für Neurobiologie Magdeburg

andreas.herzog@e-technik.uni-magdeburg.de

Im Verlauf von Lernprozessen ändert sich die Dichte und Morphologie der Spinesynapsen in Nervenzellen. Eine statistische Auswertung dieser Veränderungen setzt jedoch eine weitgehend automatisierte Erkennung und Klassifizierung der Spines voraus. Die hier vorgestellten Verfahren sind in der Lage, in konfokalen dreidimensionalen Bilddaten die Spines zu erkennen, ihre Form unter Berücksichtigung der Abbildungsfehler des Mikroskops zu rekonstruieren und sie in Klassen einzuordnen.

Keywords: 3D-Rekonstruktion, 3D-Deconvolution, Klassifikation

1 Einleitung

Im Verlauf von Lernprozessen kommt es in Nervenzellen zu Veränderungen der Dichte und Morphologie der Spinesynapsen (Spines) [1]. Um diese Veränderungen zu bestimmen, ist es notwendig, die dendritischen Spines dreidimensional zu erfassen und zu vergleichen. Da der Bildaufnahme immer eine aufwendige Präparation vorausgeht (Fixierung, Färbung), die nicht in vivo möglich ist, läßt sich nicht dasselbe Präparat vor und nach dem Lernvorgang analysieren. Es müssen daher die Spinesynapsen in einer Vielzahl von Präparaten statistisch ausgewertet werden. Für die Untersuchungen stehen Bilder von zwei verschiedenen Tiergruppen (isoliert und sozialisiert aufgewachsen) zur Verfügung. Es sollen mögliche Unterschiede in Form und Anzahl der Spines festgestellt und statistisch ausgewertet werden.

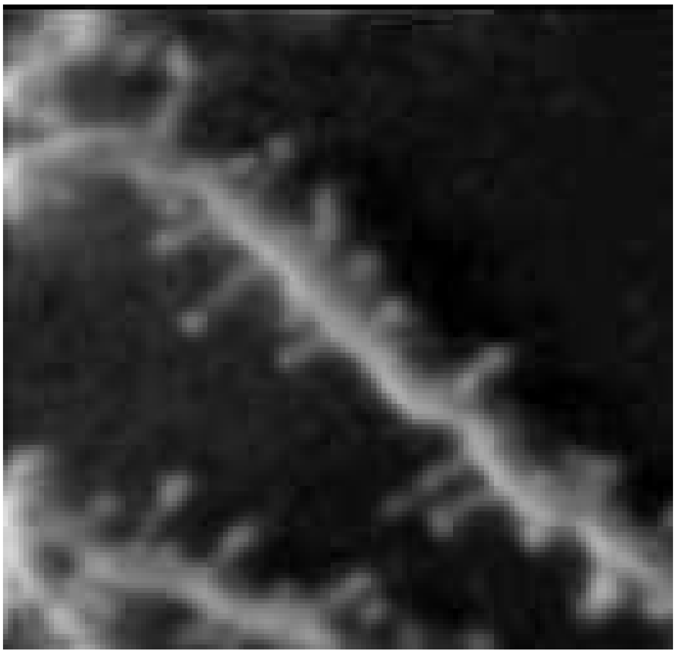

Abbildung 1 : Dendrit mit Spines

Abbildung 1 zeigt einen Abschnitt aus dem auditorischen Cortex eines Haushuhnkükens, in dem Dendriten mit abgehenden Spines zu erkennen sind. Für die dreidimensionale Erfassung der etwa 0,5-2,0 µm langen und 0,1-0,5 µm dicken Spines steht ein konfokales Laserscan-Mikroskop zur Verfügung, welches an der Auflösungsgrenze betrieben wird. Damit ist eine umfangreiche Bildvorverarbeitung zwingend erforderlich. Besonders nachteilig für eine Formrekonstruktion der Spines wirkt sich, neben Rauscheinflüssen, die wesentlich schlechtere Bandbreite des Mikroskops in z- Richtung gegenüber der x- und y- Richtung aus [2]. Es kommt dadurch zu einer Formveränderung, die abhängig von der (zufälligen) Lage der Spineachse im Raum ist. Der Abbildungsfehler läßt sich über die Punktantwort (point spread function - PSF) des Mikroskops bestimmen. Die PSF wurde mit Hilfe von Referenzkörpern (Latexbeads) bestimmt.

Ziel der hier vorgestellten Algorithmen ist es, mit möglichst wenig Interaktion die Bildvorverarbeitung, die Merkmalsextraktion und die sich anschließende Klassifikation zu realisieren.

2 Übergang vom Grauwertbild zum Modell

Es wurden verschiedene Verfahren untersucht, um den Einfluß der PSF auf die Form der Spines zu eliminieren. Deconvolution- und Segmentierungsalgorithmen [3], sowohl nacheinander, als auch in Kombination ausgeführt, haben sich besonders bei dünnen Spinehälsen als nicht ausreichend erwiesen.

Abhilfe schaffte eine modellhafte Beschreibung, die in der Lage ist, die gesamte Struktur (Dendrit und Spine) auch im Subpixelbereich darzustellen. Ausgehend von der Annahme, daß sowohl Dendriten als auch insbesondere Spines in erster Näherung im Rahmen der realen Auflösung des Mikroskops einen Schlauch mit rundem Querschnitt darstellen, ist die nachfolgende Modellbeschreibung zulässig. Als Strukturelement zur Beschreibung des Schlauches dienen Zylinder mit Halbkugeln an den Stirnseiten (Abbildung 2). Sie lassen sich mit zwei Gelenkpunkten (Mittelpunkte der Stirnseiten des Zylinders) und einem Radius vollständig, auch im Subpixelbereich, beschreiben. Die Strukturelemente eines Körpers (Dendrit oder Spine) sind an den Gelenkpunkten miteinander zu einer Kette verbunden.

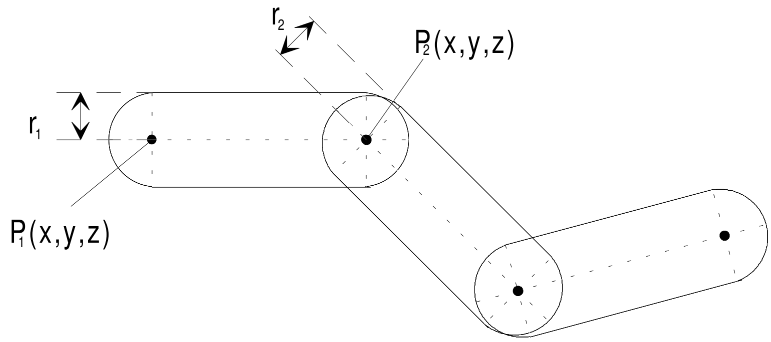

Abbildung 2 : Strukturelemente

Die Modellierung beginnt mit dem Dendriten. Ausgehend von einem Startelement erfolgt die Suche nach dem Verlauf des Dendriten mit Probeelementen, die in 25 verschiedene Raumrichtungen gelegt werden. Dabei wird das Element mit dem höchsten mittleren Grauwert und der kleinsten Abweichung von der bisherigen Kettenrichtung gewählt. Es stellt zugleich den Ausgangspunkt für die weitere Suche dar. Anschließend wird zunächst der Fehler des Dendritenmodells unter Einbeziehung der PSF minimiert (siehe Abschnitt 3).

Die lokalen Maxima auf einer Schlauchfläche in einem geringen Abstand (2-4 Voxel) um den Dendriten bilden einen Punkt des Spinemodells. Ein Suchalgorithmus bestimmt für jeden dieser Punkte die Verbindung zur Dendritenoberfläche unter der Bedingung, daß der Quotient zwischen mittlerem Grauwert und Varianz maximal wird. Diese Verbindung ist das Startelement für die Modellierung der Spines, die dann nach dem selben Algorithmus wie beim Dendriten vervollständigt werden.

In einigen Fällen kann es bei der Bestimmung des Ausgangsmodells zu Fehlinterpretationen bei dicht nebeneinander liegenden, sich kreuzenden oder unterbrochenen Spines kommen. In diesen Fällen ist es notwendig einzugreifen, indem das grobe Modell interaktiv ergänzt wird. Die Interaktion erfordert keine hohe Genauigkeit, da das grobe Modell nur als Startwert für das automatisches Anpassen an das Mikroskopbild dient.

3 Fehlerminimierung durch Verändern der Modellparameter

Das zunächst grobe Modell kann an das aufgenommene Mikroskopbild durch Verschieben der Gelenkpunkte und Verändern der Radien angepaßt werden.

Das Modell wird in ein Bild mit begrenzter Auflösung umgewandelt. Dabei erhalten die nicht vollständig im Modell liegenden Voxel einen Grauwert, der dem Volumenanteil des Modells am Voxel entspricht (Abbildung 3). So ist es auch möglich Strukturen unterhalb der Voxelgröße darzustellen.

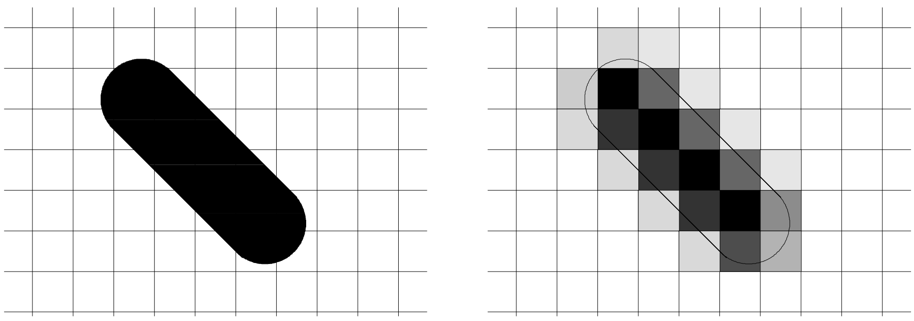

Abbildung 3 : Umwandlung des Modells (links) in ein Grauwertbild mit begrenzter Auflösung (rechts)

Um das Modellbild mit dem aufgenommenen Mikroskopbild vergleichen zu können, muß das Modellbild mit der PSF des Mikroskops gefaltet werden. Die PSF wurde dabei, wie in der Einleitung beschrieben, mit Referenzkörpern (Latexbeads) bestimmt.

Zum Anpassen des Modells wird die Grauwertverteilung im Gebiet jedes einzelnen Elements im gefalteten Modellbild und Mikroskopbild analysiert und der mittlere Grauwert sowie der Schwerpunkt ermittelt. Die Differenz der mittleren Grauwerte ergibt das Maß für die Änderung des Radius. Der Vektor zwischen den Schwerpunkten dient als Verschiebungsvektor des Elements. Der Verschiebungsvektor der Gelenkpunkte berechnet sich aus der vektoriellen Addition der Verschiebungsvektoren der angrenzenden Elemente.

Die Iterationen werden abgebrochen, wenn der mittlere quadratische Fehler zwischen dem gefalteten Modellbild und dem Mikroskopbild eine Schwelle unterschreitet oder sich kaum noch Änderungen ergeben.

4 Merkmalsextraktion

Die vorliegenden Spines wurden hinsichtlich geeigneter formbeschreibender Merkmale untersucht. Naheliegende klassische Merkmale wie Längen und Radien könnten zunächst als geeignet erscheinen. Berücksichtigt man allerdings die Forderung nach einer „freien“ unvoreingenommenen Formklassifikation, so erweisen sich diese als unzureichend, da nur spezielle Eigenschaften erfaßt werden. Es wurde deshalb auf Merkmale orientiert, die die zu klassifizierenden Körper nicht nur durch das visuelle Erscheinungsbild charakterisieren wie es dem Menschen eigen ist.

Bevor vergleichbare Merkmale gewonnen werden können, ist eine gleichartige Ausrichtung aller Spines im Raum erforderlich. Unter Zuhilfenahme der Karhunen-Loève-Transformation werden die Spines in ein neues Koordinatensystem überführt, in dem sich der Koordinatenursprung im Schwerpunkt des Spines befindet und der Spinekopf in Richtung der positiven z-Achse zeigt. Weiterhin wurde festgelegt, daß der mittlere Durchmesser der resultierenden x-Richtung gegenüber der y-Richtung größer ist.

Um Störeinflüsse weitestgehend zu unterdrücken wurde auf Merkmale mit integralem Charakter orientiert. Als besonders geeignet erwiesen sich statistische Momente [4] niedriger und mittlerer Ordnung, die bereits in [5] zu Formbeschreibungen herangezogen wurden. Die allgemeine Berechnungsvorschrift für dreidimensionale Momente zeigt die Gleichung (1).

$$m_{pqr} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x^p y^q z^r f(x,y,z) dxdydz \quad \text{mit } p, q, r = 0, 1, 2, ... \tag{1}$$

Die Ordnung eines Moments ergibt sich aus der Summe der drei Exponenten *p, q, r*. $f(x,y,z)$ ist die Dichtefunktion eines Spines. Diese wird durch den Grauwert an jedem Abtastpunkt repräsentiert.

5 Klassifikation mit Selbstorganisierenden Karten

Da die Frage, ob und welche Klassen vorhanden sind, Bestandteil der Aufgabenstellung waren, mußten Algorithmen angewendet werden, die eine Klassifizierung ohne vorgegebene Klasseneinteilung durchführen können. Es bieten sich die weitverbreiteten Selbstorganisierenden Karten [6] an. Selbstorganisierende Karten (Kohonen Maps) sind künstliche neuronale Netze, die in einem Lernvorgang Eingangsdaten in Klassen aufteilen können, ohne daß Lernziele von außen vorgegeben werden müssen (unsupervised learning). Sie bestehen aus einer eindimensionalen Eingangsschicht und einer zweidimensionalen Kohonen Schicht. Jedes Neuron der Kohonen Schicht ist mit jedem Neuron der Eingangsschicht über einen Gewichtsvektor verbunden, der die gleiche Länge wie der Eingangsdatenvektor hat.

In einer Trainingsphase werden alle verfügbaren Eingangsdaten über die Eingangsschicht dem Netz präsentiert. Die Eingangsdaten bilden sich auf die Kohonen Schicht ab. Ein Lernalgorithmus verändert die Gewichtsvektoren so, daß ähnliche Eingangsdaten zu gleichen oder benachbarten Neuronen zugeordnet werden. Die Anzahl der Klassen ist abhängig von der Wahl der Größe der Kohonen Schicht, wobei es aber vorkommt, daß Klassen nicht besetzt sind (kein Eingangsmuster bildet sich auf sie ab).

Die eigentliche Klassifikation erfolgt in einer zweiten Phase, dem Recall. Hier können die Merkmale jedes einzelnen Spines als Eingangsdaten an das Netz gelegt werden. Das Netz nimmt eine Zuordnung zu einem Neuron in der Kohonen Schicht vor. Jedes Neuron entspricht einer Klasse. Über die Euklidische Distanz des Eingangsdatenvektors zum Gewichtsvektor der Klasse läßt sich bestimmen, wie gut der Spine in die Klasse paßt.

Sollen weitere Daten klassifiziert werden, werden auch sie entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu einer ganz bestimmten vorhandenen Klasse zugeordnet.

6 Ergebnisse und Diskussion

Die Modellbildung liefert ein stark abstrahierendes Abbild des Dendriten und der Spines. Eine genauere Beschreibung der Spines scheint wegen der nicht reproduzierbaren Anteile des Bildaufnahmeverfahrens (variierende PSF im biologischen Material, Rauscheinflüsse) nicht sinnvoll. Sollten sich aus biologischer Sicht über das Modell hinausgehende Informationen als bedeutend erweisen, kann ausgehend vom vorhandenen Modell auf kompliziertere Modelle (z.B. unsymmetrische Strukturelemente) übergegangen werden. Die Bildqualität müßte dann aber zum Beispiel durch andere Präparationstechniken verbessert werden.

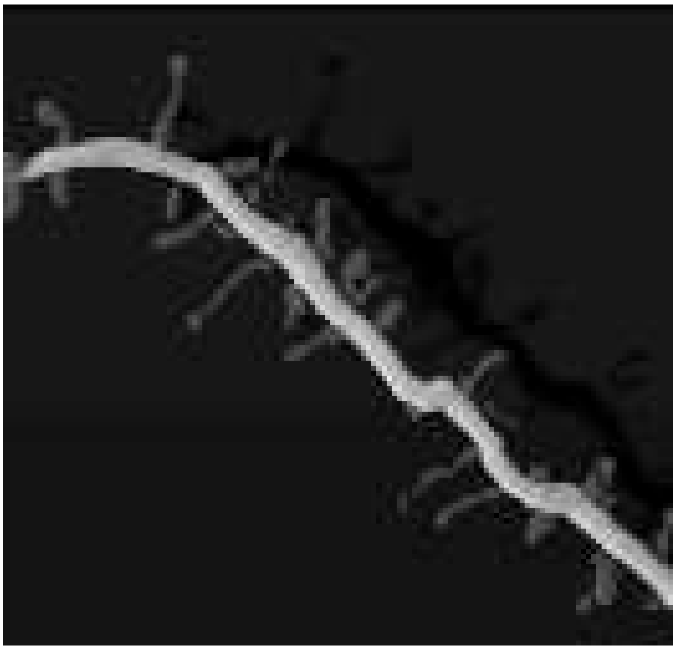

Abbildung 4 : Aus Modell rekonstruiertes Bild des Dendriten (hell) mit Spines (dunkel)

Eine Interpretation von Momenten höherer Ordnung hinsichtlich ihres formbeschreibenden Charakters ist nicht trivial. Momente niedriger Ordnung beinhalten Informationen bezüglich der Varianzen, Schiefen und verschiedener Symmetrien. Für Momente höherer Ordnung können keine Äquivalente aufgeführt werden. Es ist aber davon auszugehen, daß mit steigender Ordnung die Genauigkeit der Formbeschreibung wächst. Dabei erhöht sich aber gleichzeitig die Gefahr der Berücksichtigung zufälliger Artefakte. Bei der Merkmalsextraktion spielt die Normierung eine wichtige Rolle. Es muß geklärt werden, wie der Größenunterschied von Spines mit gleicher Form zu werten ist.

Die bisher ausgewerteten Daten lassen den Schluß zu, daß es keine abgegrenzten Klassen gibt. Der Übergang zwischen den Spineformen scheint kontinuierlich zu sein. Dies entspricht durchaus den biologischen Erwartungen. Die Kohonen Map kann das Kontinuum der vorhandenen Formen in Klassen einteilen. Um auswertbare Ergebnisse zu erzielen, muß die Anzahl der Klassen so gewählt werden, daß auf der einen Seite genügend Spines in eine Klasse eingeordnet werden und auf der anderen Seite ausreichend Klassen für die Unterscheidung der Tiergruppen zur Verfügung stehen. Es hat sich gezeigt, das 4 bis 9

Klassen als hinreichend zu betrachten sind. Abbildung 5 zeigt ein Klassifikationsergebnis basierend auf einer 3x3 Kohonen Map. Die Klasseneinteilung (Anlernen des Netzes) erfolgte für beide Tiergruppen gemeinsam. Anschließend wurde die relative Anzahl der Spines in den Klassen für jede Tiergruppe getrennt bestimmt. Es zeigten sich prägnante Unterschiede, die mit den biologischen Annahmen übereinstimmen.

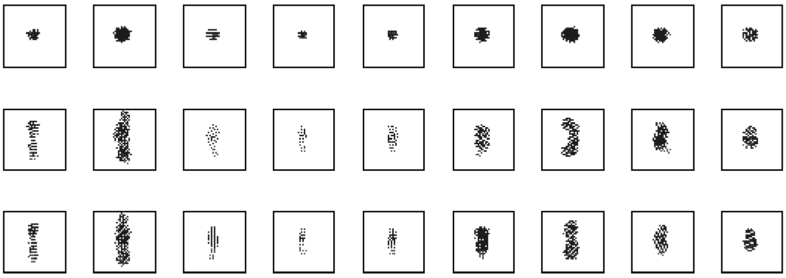

Abbildung 5 : Vertreter der einzelnen Klassen

Die dieser Veröffentlichung zugrunde liegenden Vorhaben werden mit Mitteln der DFG (INK 15/TP A4) und des Kultusministeriums des Landes Sachsen-Anhalt (665A/2384) gefördert.

Literatur

[1] Wallhäußer E, Scheich H: Auditory Imprinting Leads to Differential 2-Deoxyglucose Uptake and Dendritic spine Loss in the Chick Rostral Forebrain. Dev. Brain Res., pp. 29-44.

[2] Pawley JB: Fundamental Limits in Confocal Microscopy. Handbook of Biological Confocal Microscopy, part 8. Plenum Press, New York, revised edition 1989.

[3] Conchello JA, Hansen EW: Enhanced 3-D reconstruction from confocal scanning microscope images. Appied Optics vol. 29, No. 26, pp 3795-3804, 10 September 1990.

[4] Hu MK: Visual Pattern Recognition by Moment Invariants. IRE Trans.Inform. Theory, vol. 8, pp. 179-187, February 1962.

[5] Reeves AP, Prokop AP, Andrews AP, Kuhl AP: Three-Dimensional Shape Analysis using Moments and Fourier Descriptors. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 10, no 6, pp. 937-943, November 1988.

[6] Kohonen T: Self-Organizing Maps. Springer Verlag, 1995.