Benutzergeführte Auswertung von Bildsequenzen mikroskopierter Mikrozirkulationsgebiete

Anwendungen der Digital Video Workbench

Jens Hektor[1], Florian Zschocke[1], Thomas Förster[1], Reinhard Grebe[2], Holger Schmid-Schönbein[1]

[1]Inst. f. Physiologie, RWTH, Pauwelsstr. 30, D-52057 Aachen, Germany
[2]Département Génie Biologique, UTC, F-60205 Compiègne, France

Zusammenfassung. Rheoskopie ist eine Methode, Blutzellen unter wohldefinierten fluiddynamischen Bedingungen studieren zu können. Bei der seit kurzem verfügbaren Invivo-Rheoskopie werden Blutzellen auf ihren Bahnen durch bestimmte Mikrozirkulationspräparate (Mesenterien) mit Hilfe eines computergesteuerten Mikroskops verfolgt. Diese Verfolgungsfahrten werden mittels einer CCD auf Videoband aufgezeichnet und können später offline mit Hilfe einer geeigneten Software ausgewertet werden.
In diesem Beitrag wird eine Methode zur benutzergeführten Auswertung solcher Bildsequenzen vorgestellt. Nach Bewegungskorrektur der Einzelbilder der Aufzeichnung werden anschließend mit einer Kombination aus einem einfachen Subtraktionsverfahren und einem modifizierten Isoseg-Algorithmus die Lage der Blutzellen in den Einzelbildern bestimmt und daraus relevante Parameter wie Geschwindigkeit, Lage und Orientierung im Gefäß sowie Verformung der Zellen bestimmt. Mit dieser Methode läßt sich das unterschiedliche Verhalten normaler und gehärteter Zellen miteinander vergleichen und quantifizieren.

Schlüsselwörter: Mikrozirkulation, Rheoskopie, Segmentierung, Digitalisierung

1 Einleitung

Aufgabe der Mikrozirkulation ist es, die Vitalität und Funktionalität eines Gewebes sicherzustellen. Dazu muß sie den An- bzw. Abtransport von O_2 und CO_2 gewährleisten, das Gewebe ausreichend mit Nährstoffen versorgen und den Transport von Stoffwechselprodukten übernehmen. Weiterhin dient sie als "Autobahn" für den Informationsaustausch z.B. bei der Immunabwehr. Wegen dieser zentralen Bedeutung der Mikrozirkulation ist es wichtig, quantitative Aussagen über deren Zustand machen zu können. Hierbei sind auch rheologische Parameter von Belang, da sowohl Adsorption wie auch Resorption von der Fließfähigkeit des Blutes abhängen. Für diese ist neben der Plasmaviskosität das Verhalten des hauptsächlichen zellulären Anteils im Blut, der roten Blutzellen (Erythrozyten), entscheidend.

Trotz zahlreicher Invitro- und wegen seltenerer Invivo-Experimente besteht weiterhin ein Bedarf, Daten über die fluiddynamischen Eigenschaften roter Blutzellen invivo zu sammeln. Dazu wurde kürzlich die Methode der "Invivo Rheoskopie" vorgestellt [1]. Bei dieser Methode wird der Objekttisch eines Mikroskops so bewegt, daß die beobachteten Blutzellen bei Ihrer Passage durch die Mikrozirkulation im Sichtfeld des Objektivs bleiben. Hierzu ist es notwendig, zunächst einen Weg entlang interessierender Gefäße festzulegen und dann die Bahngeschwindigkeit der der Erythrozyten anzupassen. Solche Fahrten mit im Bild "stehenden" Zellen können auf Video aufgezeichnet werden, um später einer digitalen Bildverarbeitung zu Auswertungszwecken zugeführt zu werden.

Aufgabe der Bildverarbeitung ist hier zunächst einmal die Akquirierung solcher Sequenzen, sowie eine Identifikation der Zellen in den Bildern, weiterhin die Bestimmung ihrer Geschwindigkeit und Form, der Position innerhalb des Gefäßes und ihrer Orientierung relativ zur Flußrichtung. Des weiteren ist die zeitliche Entwicklung dieser Größen unter wechselnden fluiddynamischen Bedingungen von Interesse. Da Erythrozyten als sehr gut verformbare Zellen sich den ständig wechselnden Anforderungen durch äußere Kräfte anpassen können, erwartet man auch hier die Beobachtung von Veränderungen während Ihrer Passage.

Aufgrund des nicht zu standardisierenden Bildmaterials (wechselnder Untergrund, variable Beleuchtungsbedingungen) kann hierbei kein unüberwachtes Verfahren zum Einsatz kommen, so daß bei der Auswertung solcher Bildsequenzen eine Interaktion mit dem Benutzer notwendig bleibt.

2 Material

Die vorliegenden aufgezeichneten Sequenzen stammen von Versuchen mit isoliert perfundierten Rattenmesenterien am Institut für Physiologie der RWTH Aachen. Hierbei werden "normale" bzw. mit Dimaid gehärtete Erythrozyten bei einem niedrigen Hämatokrit von $10-20$ aus einem Vorratsgefäß mit definiertem hydrostatischen Druck in das unter dem Mikroskop gut sichtbare Mikrozirkulationsnetzwerk geleitet.

Die Steuerung des Mikroskops (Leitz, invertierter Aufbau) wurde einer Workstation (SGI Indy) mit der "travelling microscope" Software [2] übertragen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe einer CCD auf Videoband aufgezeichnet. Wegen der teilweise hohen Geschwindigkeiten ($\sim 1-3\ mm\ s^{-1}$) der Zellen, wird als Lichtquelle ein Stroboskop (Chadwick & Hellmuth, 50 Hz) eingesetzt, so daß scharfe Aufnahmen erzielt werden. Um einen gut konstrastierten Erythrozyten darzustellen, wird ein die Soretbande des Hämoglobins absorbierender Filter eingesetzt.

Die Digitalisierung und Auswertung der Sequenzen wird derzeit mit Hilfe der "Digital Video Workbench" (DVW) [3] durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine frei verfügbare Software für SGI Indy/O2 und Linux Workstations [4]. In diese Digitalisiersoftware lassen sich zur Laufzeit selbsterstellte Auswerteroutinen hinzuladen, die den Bedürfnissen des jeweiligen Bildmaterials angepasst sind. Hiermit können Digitalisierung der Sequenz und Auswertung in einem Schritt vorgenommen werden.

3 Methode

Da Videosignale im Zeilensprungverfahren mit Halbbildern ("interlacing") aufgezeichnet werden, hat man in Videobildern schnell bewegter Objekte in jedem Halbbild eine andere Information, so daß als erster Verarbeitungsschritt ein Trennen des Vollbildes I in die Halbbilder I_1, I_2 durchgeführt wird. Da sich hierbei die vertikale Auflösung reduziert, aber aus Gewöhnungsgründen ein Vollbildformat gewünscht ist, ergibt sich folgende Abbildungsvorschrift, bei der fehlende Zeilen $y, y = 0 \ldots Y-1$ interpoliert werden:

$$I_1(x,y) = \begin{cases} I(x,y) & : \quad y = 0, 2, \ldots Y-3 \\ \frac{1}{2}\left(I(x,y-1) + I(x,y+1)\right) & : \quad y = 1, 3, \ldots Y-2 \\ 0 & : \quad y = Y-1 \end{cases}$$

$$I_2(x,y) = \begin{cases} 0 & : \quad y = 0 \\ I(x,y) & : \quad y = 1, 3, \ldots Y-1 \\ \frac{1}{2}\left(I(x,y-1) + I(x,y+1)\right) & : \quad y = 2, 4, \ldots Y-3 \end{cases}$$

Anschließend muß die durch die Bewegung des Objektträgers bedingte Verschiebung der (Halb-) Bilder gegeneinander bestimmt werden. Als bestes Maß zur Bestimmung der Verschiebung des schwach texturierten Gewebes hat sich hier die Kreuzkorrelationsfunktion K erwiesen:

$$K_{I_k I_{k+1}}(x, y, \Delta x, \Delta y) = \sum_{-w}^{w} \sum_{-w}^{w} I_k(x + \Delta x, y + \Delta y) - I_{k+1}(x, y)$$

Hierbei wird vom Benutzer als Referenzpunkt eine gut zu erkennende Struktur im Bild mit der Maus vorgegeben. Als typischer Fensterbereich w sind acht bis 16 Pixel zu wählen.

Um eine einfache Detektion der Erythrozyten in den überlappenden Bereichen aufeinanderfolgender Bilder zu erreichen, wird ein Subtraktionsverfahren angewendet, so daß der Hintergrund zu großen Teilen den Wert 0 annimmt. Aufgrund des Rechnens mit vorzeichenlosen acht-Bit Werten und des Clippens negativer Werte, werden hier im wesentlichen neben nicht vollständig eliminierten Gewebestrukturen die Zellen eines Bildes dargestellt.

Dieses Subtraktionsbild kann nun mit Hilfe eines K-Means Clustering Algorithmus [5] binarisiert werden, so daß die im Überlappungsbereich befindlichen Zellen gegen das Gewebe getrennt werden.

Dieses Binärbild wird jetzt in einzelne Objekte aufgeteilt ("gelabelt"), indem zusammenhängende Pixelmengen ein Label erhalten. Label, die eine für

Erythrozyten zu geringe Fläche einnehmen, stellen in diesen Bildern Gewebestrukturen dar, die vom Subtraktionsverfahren nicht vollständig eliminiert wurden, aber vom Segmentierungsalgorithmus nicht dem Hintergrund zugeordnet wurden. Diese werden an dieser Stelle mit Hilfe eines Schwellwertkriteriums für die Fläche entfernt.

Aus diesen Labeldaten können bereits die Position der Zelle innerhalb des Gefäßes und die Orientierung der Zellen relativ zur Gefäßrichtung quantifiziert werden. Diese ergeben sich aus den Momenten erster und zweiter Ordnung der jeweiligen Label [6]. Hierbei ist eine weitere Interaktion notwendig, da die Orientierung des Blutgefäßes ebenfalls vom Benutzer mit der Maus vorzugeben ist.

Durch wiederholte Anwendung dieses Verfahrens auf die gesamte Bildsequenz kann jetzt noch zusätzlich die Geschwindigkeit der Zellen in den Gefäßen bestimmt werden. Insgesamt ergeben sich die für die Beurteilung des Strömungsverhaltens des Blutes notwendigen Daten.

4 Implementierung

Die im Abschnitt 3 beschriebenen Routinen wurden in "C++" unter Verwendung einer am Institut für Physiologie entwickelten Klassenbibliothek zur Bildverarbeitung als "shared object" für Unix-Workstations implementiert. Zusammen mit den Routinen zur Benutzerinteraktion, welche in "TCL/TK" implementiert wurden, bilden sie ein ladbares Modul für DVW. DVW stellt für den Zugriff auf die Daten und die Darstellung errechneter Bilder ein Programmierinterface (API) bereit, so daß Ein/Ausgabeoperationen größerer Datenmengen vermieden werden können.

5 Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Methode zur Auswertung mikroskopierter Verfolgungsfahrten befindet sich derzeit im Einsatz im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit. Hierbei soll das Verhalten größerer Zahlen einzelner roter Blutzellen in der Mikrozirkulation in statistisch auswertbaren Größenordnungen erfaßt und beschrieben werden. DVW bietet hier eine Unterstützung, dies effizient durchzuführen.

Insgesamt sind am Institut bereits mehrere solcher Plugins für DVW realisiert worden. Diesen bieten den Vorteil einer einheitlichen Oberfläche für verschiedenste Anwendungen (Fluoreszenzangiografie, Analyse von Ultraschalldopplerbildern, Auswertung mikroskopischer Erythrozytenaufnahmen verschiedenster Art). Dies verkürzt die Einarbeitungszeit des Personals bei Bearbeitung neuer Fragestellungen erheblich.

Literatur

1. Schmid-Schönbein H, Jansen J, Heidtmann H, Horstkott H, Grebe R: High resolution flow visualization in microvascular networks; the travelling microscope applied to microrhelogical studies in vivo. Int. J. Microcirc., 16(suppl. 1), 1996.

2. Hektor J, Jansen J, Heidtmann H, Schmid-Schönbein H, Grebe R: A Setup for Computer Assisted Tracking of Erythrocytes in Microvascular Networks. Journal of Computer Assisted Microscopy, to be published in 1998.
3. Hektor J, Jansen J, Broicher F, Grebe R: Digital Video Workbench (DVW) - Ein Hilfsmittel zur Online Bildverarbeitung. Proceedings des 1. Aachener Workshop Bildverarbeitung für die Medizin. Algorithmen · Systeme · Anwendungen. Lehmann T, Scholl I, Spitzer K (Hrsg.), Verlag der Augustinus Buchhandlung, Aachen, 1996
4. ftp://ftp.Physiology.RWTH-Aachen.DE/pub/DVW/,
http://WWW.Physiology.RWTH-Aachen.DE/bs/image/DVW.html .
5. Wittkop S: Parallele statistikbasierte und geometrieorientierte Segmentierung von multivarianten dreidiemsionalen Bilddaten. Diplomarbeit Informatik, Institut für Physiologie, RWTH Aachen, 1994.
6. Pratt W K: Digital Image Processing. John Wiley & Sons Inc., New York, 1991.