1

Schadensbeurteilung von Zellpopulationen durch morphologische Formanalyse

V. Metzler[1], H. Bienert[2], T. Lehmann[1], K. Spitzer[1]

[1]Institut für Medizinische Informatik
[2]Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung "Biomat"
Rheinisch–Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52057 Aachen
Email: metzler@imib.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Im IZKF "Biomat" wird die Bioverträglichkeit von Biomaterialien über den Schädigungsgrad von Zellpopulationen beurteilt. Dazu werden spezielle Zellinien (hier L-929 Fibroblasten) dem Material im indirekten oder direkten Kontakt unter definierten Bedingungen ausgesetzt, wodurch die Zellen ihre Morphologie proportional zur Toxizität des zu untersuchenden Materials verändern. Die automatische Analyse des Schädigungsgrads der Zellen liefert dem Untersucher, im Gegensatz zur üblichen Beschreibung eines visuellen Eindrucks, quantitative Maße, die erst eine objektive Vergleichbarkeit von Ergebnissen ermöglichen. Darüber hinaus kann das Laborpersonal von einer zeitaufwendigen und fehlerintensiven Routinetätigkeit entlastet werden. Nach der digitalen Aufnahme der Präparate mit einer CCD Kamera werden die Zellbilder mit Methoden der mathematischen Morphologie analysiert. Der Algorithmus besteht aus drei Phasen: Der Binarisierung, der morphologischen Trennung zusammenhängender Zellen und der Vermessung der Objekte. Im Gegensatz zu herkömmlichen morphologischen Analysemethoden liefert das Verfahren im praktischen Einsatz zufriedenstellende diskriminative Papameter.

Schlüsselwörter: Quantitative Zytologie, mathematische Morphologie, adaptives Thresholding, Formanalyse, Zytotoxizität, Biomaterialien

1 Einleitung

Bisher werden Zytotoxizitätsstudien vorzugsweise qualitativ oder semiquantitativ durchgefüht. Durch Fortschritte in der digitalen Bildgebung und der Molekularbiologie (immunhistochemische Färbetechniken), wurde in den letzen Jahren die quantitative Auswertung zytologischer Präparate ermöglicht [1, 2].

Zur Beurteilung der Toxizität von Biomaterialien werden standardisierte Zellinien unter wohldefinierten Bedingungen einem Biomaterial ausgesetzt. Dabei signalisieren morphologische Veränderungen der Zellen einen toxischen Einfluß des Biomaterials. Zur quantitativen Beurteilung pathologischer Veränderungen wird, nachdem die Zellpopulationen entsprechend gefärbt, mikroskopiert und digital aufgenommen wurden, eine Formanalyse durchgeführt. Hierzu müssen zwei wesentliche Verarbeitungsschritte vorgenommen werden. Zunächst werden

* Das Projekt *Quantitative Mikroskopie* wird vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie gefördert (BMBF 01ks9503/9).

die zytologischen Präparate segmentiert, was die Binarisierung mit adaptiven Schwellwerten erfordert, um robuste Ergebnisse auch für inhomogene Beleuchtungen und Zelldichten erreichen zu können (Abschn. 2). Anschließend werden die binären Objekte mit Hilfe verschiedener morphologischer Filtertechniken [3] in einzelne, getrennt zu analysierende Zellen zerlegt (Abschn. 3).

Die Evaluierung der Methode wurde mit Hemalaun–gefärbten (blau) L–929 Fibroblasten durchgeführt, welche sich unter Einfluß eines Toxins (hier Ethanol) abrunden und schrumpfen. Als Merkmale der Zellmorphologie werden verschiedene Parameter, wie z.B. Zellgröße und –umfang oder ihre Kompaktheit extrahiert. Die experimentellen Ergebnisse zeigen die Signifikanz der gewählten Parameter (Abschn. 4).

2 Lokal–adaptive Schwellwertbinarisierung

Unter den existierenden Segmentierungsverfahren gibt es nur wenige, die zur Segmentierung zytologischer Aufnahmen eingesetzt werden können [4, 5]. Bei der Segmentierung lichtmikroskopierter Zellpopulationen müssen verschiedene Problemfälle berücksichtigt werden. In der Regel ist die Lichtintensität nicht konstant, die Schichtdicke und die Konzentration des Farbstoffs kann variieren und die Zellen können sehr inhomogen auf dem Bild verteilt sein. Da es sich aber um Zellen gleichen Typs mit ähnlichen Grauwertcharakteristiken handelt, kann eine Schwellwertsegmentierung vorgenommen werden [6]. Globale Verfahren, die eine Schwelle für das gesamte Bild berechnen sind hier allerdings aus den oben genannten Gründen nicht einsetztbar (Abb. 1b). Auch der Einsatz

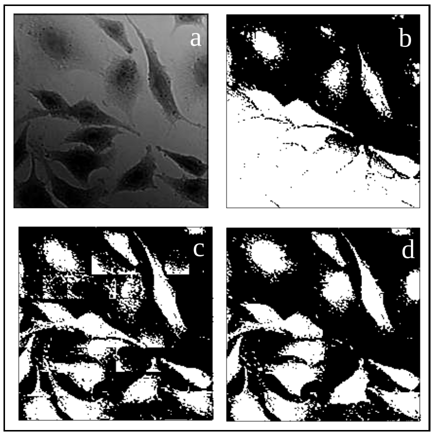


Abb. 1. Das cytologische Präparat in (a) ist inhomogen ausgeleuchtet und variiert in der Zelldichte. Eine globale Schwellwertbinarisierung (b) führt dabei ebenso zu schlechten Ergebnissen wie ein lokales Schwellwertverfahren mit konstanter Fenstergröße (c). Erst das lokal adaptive Schwellwertverfahren, das die Fenstergröße auf die lokale Grauwertverteilung abstimmt, liefert zufriedenstellende Ergebnisse (d).

lokaler Schwellen für Teilbilder konstanter Größe führt nicht zu befriedigenden Ergebnissen, denn es entstehen oft Artefakte in Fenstern, die keine Objektinformation enthalten (Abb. 1c). Die optimale Fenstergröße kann also nur abhängig von der lokalen Grauwertverteilung bestimmt werden. Grundidee der Strategie ist, daß hohe lokale Standardabweichungen der Grauwerte die Präsenz von Hintergrund– und Objektinformation im Fenster signalisieren. Umgekehrt sind niedrige Standardabweichungen darauf zurückzuführen, daß nur Hintergrund erfaßt wurde. Die lokale Fenstergröße zur Schwellwertberechnung wird, ausgehend von einem minimalen Fenster (i.d.R. 25×25 Pixel) sukzessive vergrößert, bis die Standardabweichung einen Schwellwert erreicht hat. Dieser kann abhängig von der Standardabeichung des ganzen Bildes angegeben werden. Das Verfahren liefert für jedes Pixel eine individuelle Fenstergröße, die zur Berechnung der Schwelle verwendet wird. Die Strategie der lokalen Adaption der Fenstergöße kann prinzipiell mit jedem beliebigen Schwellwertverfahren realisiert werden, in diesen Fall wurde das Verfahren von Otsu verwendet [7].

3 Morphologische Zelltrennung

Die morphologische Trennung binärer Objekt in einzelne Zellen kann in zwei Schritten vorgenommen werden. Zunächst müssen für alle abgebildeten Zellen *Marker* gefunden werden, danach kann die Form der Zellen ausgehend von den sie repräsentierenden Markern rekonstruiert werden. Dieses Vorgehen ist insbesondere dann möglich, wenn es sich um konfluente Zellen handelt, die in Monolayern vorliegen. In der Praxis kommen im wesentlichen zwei Verfahren zur Markerextraktion zum Einsatz: Entweder werden die *ultimate–eroded–points*[1] [8], oder die *Distanz–Transformierte* beginnend mit ihren Maxima, rekonstruiert [9]. Dabei wird jeweils das Verschmelzen von Markern verhindert. Beide Verfahren sind zur zuverlässigen Quantifizierung morphologischer Veränderungen ungeeignet, denn einerseits kommt es meist zu Übersegmentierungen und andererseits werden die Trennlinien zwischen den Objekten nur ungenau rekonstruiert. Diese Nachteile werden durch das hier vorgestellte mehrstufige Verfahren vermieden (Abb 2).

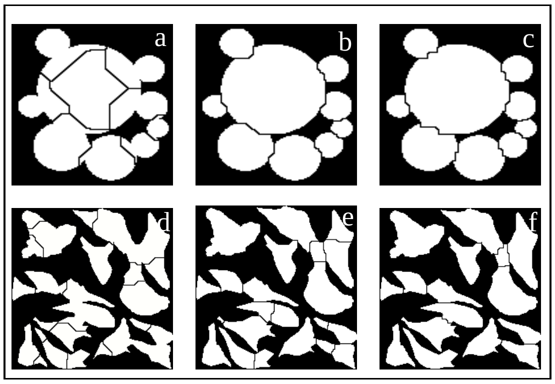


Abb. 2. Die Separierungen (a) und (d) wurden von den ultimate–eroded–points, bzw. (b) und (e) von den Maxima der Distanztransformation rekonstriert. Die Markerzahl wurde durch Filtern reduziert. Das einfachere Problem (oben) ist mit der Distanzrekonstruktion noch befriedigend zu lösen. Das mehrstufige Verfahren errechnet in beiden Fällen (c) und (f) jeweils gute Trennungen.

▷ Die Marker werden durch sukzessives Anwenden eines *erweiterten Erosionsoperators* ermittelt. Dieser besteht aus einer einfachen Erosion, gefolgt von einem maskierten Opening. Durch das nachgeschaltete Opening werden nach jedem Erosionsschritt 'falsche Marker', die immer bei mehrfacher Erosion strukturreicher binärer Objekte entstehen, entfernt. Eine Übersegmentierung wird dadurch vermieden.

1 dabei wird ein Objekt solange erodiert, bis eine weiter Erosion das Objekt vollständig entfernen würde.

▷ Die Rekonstuktion wird entsprechend den ursprüngliche Objektgrößen durch sukzessive Anwendung eines *erweiterten Dilatationsoperators* durchgeführt. Dabei werden die Marker verschiedener Erosionsstufen sukzessive addiert, um sie anschließend durch eine SKIZ–Operation[2] bis zur Größe der Objekte der entsprechenden Stufe zu dilatieren, ohne deren Verschmelzung zuzulassen. Diese Art der Rekonstruktion liefert sinnvolle Separierungen, selbst wenn die zu trennenden Objekte unterschiedlich groß sind.

4 Ergebnisse und Ausblick

Abb. 3 zeigt die verschiedenen Schritte der Formanalyse. Nach der Binarisierung des Präparats (Abschn. 2) können mit einem nicht–linearen Rekonstruktionsfilter unerwünschte Objekte effizient entfernt werden [10], da die minimale Größe der zu detektierenden Zellen bekannt ist. Aus den separierten Zellen werden

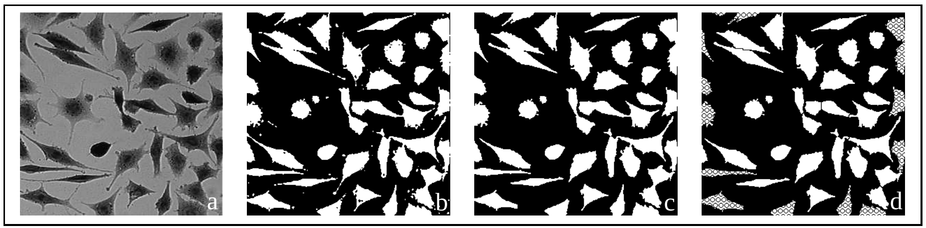


Abb. 3. Der Ausschnitt (a) wird zur Formanalyse zunächst binarisiert (b). Ein Rekonstruktionsfilter entfernt sowohl falsche Objekt– als auch falsche Hintergrundpixel (c). Nach der morphologischen Trennung werden diejenigen Objekte entfernt, deren Formparameter nicht zu ermitteln sind (d).

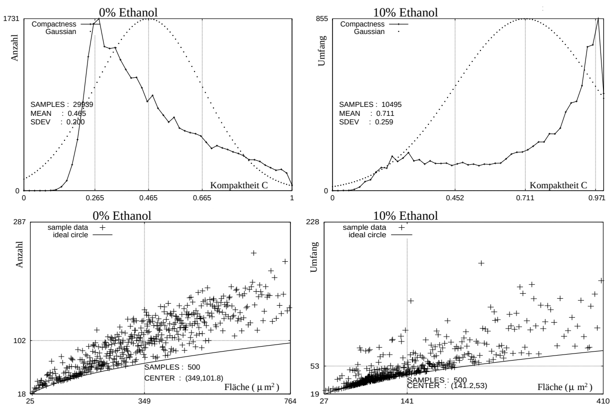
verschiedene Formparameter extrahiert. Neben den Parametern der Größenverteilung, der Dichte und der Besetzung einer Zellpopulation liefert die Verteilung der Kompaktheit C, die aus der Fläche A und dem Umfang U einer Zelle hergeleitet wird, wichtige Information über den Schädigungsgrad der Zellen [2].

$$C = \frac{4\pi A}{U^2} \qquad \text{mit} \qquad 0 \leq C \leq 1 \tag{1}$$

Ebenso ist der Schwerpunkt eines Scatterdiagramms über Zellgröße und Zellumfang von Interesse. Abb. 4 zeigt das Verteilungs– und Scatterdiagramm für die Ethanolkonzentrationen 0% (keine Schädigung) und 10% (maximale Schädigung). Zusätzlich wurde zur Evaluierung der Methode der Einfluß von 5% Ethanol untersucht. Es wurden jeweils 268 Bilder mit ca. 60000 Zellen analysiert. Die Tabelle in Abb. 4 stellt die extrahierten Parameter gegenüber. Die pathologischen Veränderungen, abhängig von der Konzentration des Toxins sind deutlich zu erkennen. Ziel ist es zunächst eine Dosis/Wirkung–Kurve für Ethanol zu erstellen und daraus eine Schwelle für die Toxizität zu definieren. Anschließend wird das Verfahren für verschiedene Biomaterialextrakte normiert um deren Toxizität quantifizieren zu können.

[2] Die *SK*eleton–of–*I*nfluence–*Z*one berechnet die Skelettierung des Hintergrundes. Sie ist das binäre Analogon der Watershed–Transformation.

Das Verfahren wird im Zellkulturlabors des IZKF “Biomat” eingesetzt. Auf diese Weise können Bioverträglichkeitstests standardisiert und das Laborpersonal von fehleranfälligen Routinetätigkeiten entlastet werden. Die Qualitätskontrolle solcher Laborversuche wird ebenfalls ermöglicht, denn der Vergleich mit den Extremdosen (Negativ– und Positvkontrolle) ermöglicht eine Beurteilung der Tauglichkeit erstellter Präparate. Eine Erweiterungen des Verfahrens zur Beurteilung der Thrombozyten–Adhäsion wird zur Zeit vorgenommen.



	0%	5%	10%
Kompaktheit (Mittel)	0.465	0.514	0.711
Schwerpunkt - X	348.9	287.9	141.2
Schwerpunkt -Y	101.8	90.0	53.0
Zelldichte [c/mm^2]	422.9	279.7	38.0
Bedeckung [%]	16.07	8.92	2,55

Abb. 4. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse der L-929 Zellinie, bei jeweile 0% und 10% Ethanol. Die Parameter der Verteilung der Kompaktheit C (links) sind durch eine Gaußkurve veranschaulicht. Rechts sind Scatterdiagramme (Zellgröße aufgetragen gegen –umfang) mit je 500 Zellen dargestellt. Der Schwerpunkt der Plots ist jeweils angegeben. Die Tabelle zeigt zusätzlich die Parameter für 5% Ethanol–geschädigte Zellen und weitere einfache diskriminative Parameter.

Literatur

1. I.T. Young. Quantitative microscopy. *IEEE EMB*, 15(1):59–66, 1996.
2. J.C. Russ. *Computer–Assisted Microscopy.* Plenum Press, New York, 1990.
3. R.M. Haralick, S.R. Sternberg, X. Zhuang. Image analysis using mathematical morphology. *IEEE PAMI*, 9(4):532–550, 1987.
4. R.M. Haralick, L.G. Shapiro. Image segmentation techniques. *CVGIP*, 29:100–132, 1985.
5. C. Garbay. Image structure representation and processing: A discussion of some segmentation methods in cytology. *IEEE PAMI*, 8(2):140–146, 1986.
6. C. McAulay, B. Palcic. A comparison of some quick and simple threshold selection methods for stained cells. *Analyt. Quantit. Cytol. Histol.*, 10(2):134–138, 1988.
7. N. Otsu. A threshold selection method from grey level histograms. *IEEE SMC*, 9:62–66, 1979.
8. J. Serra. *Image Analysis and Mathematical Morphology.* Academic Press, London, 1982.
9. G. Borgefors. Distance transforms in digital images. *CVGIP*, 34:679–698, 1986.
10. P. Salembier, J. Serra. Morphological multiscale image segmentation. In *Procs. SPIE*, 1818:620–631, 1992.