

3D-Visualisierung vitaler Knochenzellen

Alexander Roth¹, Kay Melzer¹, Kay Annacker¹, Hans-Gerd Lipinski¹, Martin Wiemann² und Dieter Bingmann²

¹Bereich Med. Informatik, Fachhochschule Dortmund, 44227 Dortmund

²Institut für Physiologie, Universität Essen, 45122 Essen

Email: alexander.roth@fh-dortmund.de

Zusammenfassung. Eine dreidimensionale Zellbildvisualisierung vitaler Knochenzellen stellt hohe Ansprüche an das Ausgangsbildmaterial. Schon geringe Bildstörungen wie Rauschen, schwacher Kontrast und eine ungleichmäßige Ausleuchtung führen unter Umständen zu unbrauchbaren Resultaten. Um trotzdem zu einer brauchbaren Darstellung zu gelangen, müssen diese Artefakte so weit wie möglich eliminiert werden, bevor die eigentliche 3D-Visualisierung und Weiterverarbeitung durchgeführt wird. Ein neu entwickelter Algorithmus erlaubt es, in einer Vorverarbeitungsstufe vor der eigentlichen 3D-Visualisierung die Bilder von störenden Elementen zu befreien indem auf die fouriertransformierten Daten eine 18-bändige Equalizerfunktion angewendet wird, welche die für die weitere Verarbeitung wichtigen Bildelemente gegenüber den Störanteilen neu gewichtet. Mit Hilfe des entwickelten Equalizers ist es möglich, nach der Bilderfassung (aber vor der 3D-Rekonstruktion) die Bildqualität der histologischen Bilddaten entscheidend zu verbessern. Das hier vorgestellte Verfahren wurde an zahlreichen Bildern aus der Praxis getestet und führte durchweg zu besseren Ergebnissen.

1 Einleitung

Knochenzellen bilden ein komplexes Netzwerk von zellverbindenden morphologischen Strukturen innerhalb der extrazellulären Knochenmatrix aus. Untersuchungen über den Informationsaustausch, welcher über dieses Netzwerk zwischen den einzelnen Zellen erfolgt, erfordern eine möglichst genaue Kenntnis über die morphologisch-topologischen Zusammenhänge.

Mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops lassen sich Bilder vitaler Knochenzellen aus Zellkulturen gewinnen. Die anschließende morphologische Strukturanalyse und Darstellung erfolgt mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung und der Computergrafik [1]. Eine automatisierte dreidimensionale Zellbildauswertung vitaler Knochenzellen stellt dabei hohe Ansprüche an das Ausgangsbildmaterial. Schon geringe Bildstörungen führen unter Umständen zu unbrauchbaren Resultaten für eine dreidimensionale Visualisierung. In der Praxis lassen sich Bildstörungen wie Rauschen, schwacher Kontrast und andere störende Artefakte bei der Erfassung an einem konfokalen Lasermikroskop nicht vollständig vermeiden. Um trotzdem zu einer brauchbaren Darstellung zu gelangen, müssen

diese Artefakte so weit wie möglich eliminiert werden, bevor die eigentliche 3D-Visualisierung und die dafür notwendigen Vorverarbeitungen durchgeführt werden.

Im Folgenden wird ein Verfahren vorgestellt, das sich als sehr geeignet für die Eliminierung von Bildstörungen im Rahmen von räumlichen Darstellungen vitaler Knochenzellen mit Hilfe computergrafischer Methoden erwiesen hat.

2 Material und Methoden

Kalvarienfragmente neugeborener Ratten wurden in einem Wachstumsmedium (ICN in 5 % fetales Kälberserum) gehalten. Das Zellgewebe wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM über Nacht angefärbt. Die Knochenfragmente wurden für die experimentellen Untersuchungen in eine Beobachtungskammer mit Deckglas-Boden überführt und mit einem 40fach Immersionsobjektiv betrachtet. Ein Z-Stapel von Fluoreszenzbildern wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen (Hamamatsu Orca ER), die Bestandteil einer konfokalen Laser Scanning Einrichtung war (UltraView, Perkin Elmer, Cambridge, England) (Abb. 1).

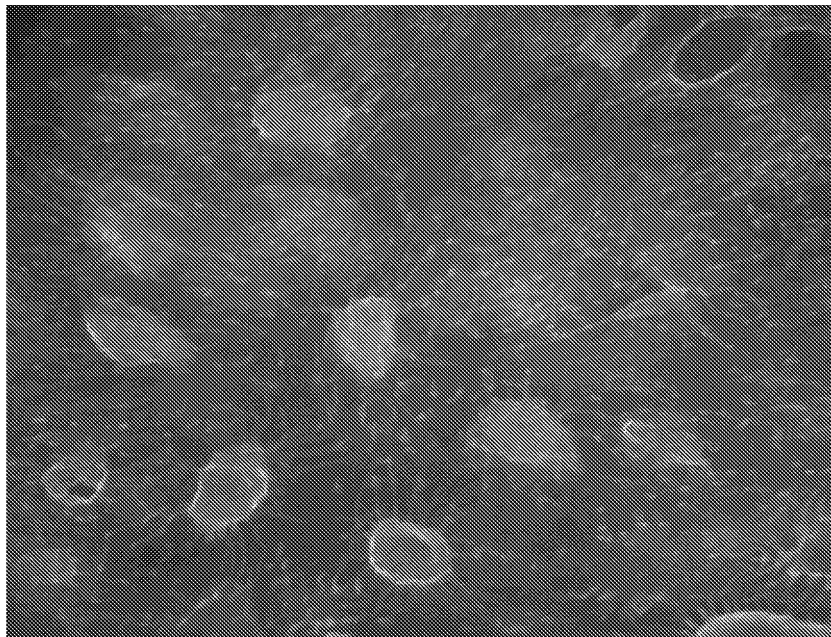


Abb. 1. Ein Bild aus dem Zellbildstapel im Original.

Die mathematische Grundlage für die durchgeführten Filterungen bildete die 2-dimensionale Fourier-Transformation (FFT), mit deren Hilfe die Bildinformationen in die Ortsfrequenzen des Bildes überführt wurden [2]. Im Ortsfrequenz-

raum wurden ausgewählte Ortsfrequenzbereiche gewichtet und das Ergebnis mit der inversen Fouriertransformation in den Ortsbereich zurück transformiert. Die so vorverarbeiteten Bildstapel wurden nun mit Hilfe des Marching-Cube-Algorithmus dreidimensional vektorisiert und über eine Open-GL Schnittstelle dargestellt.

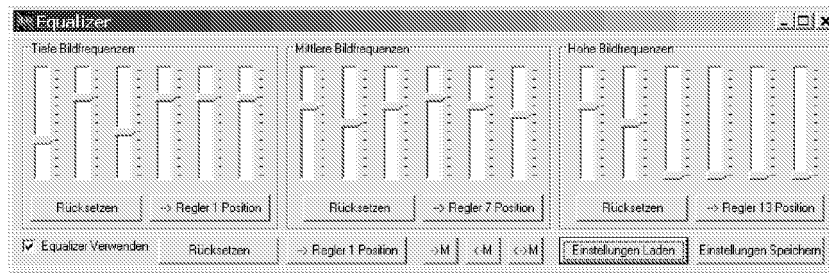
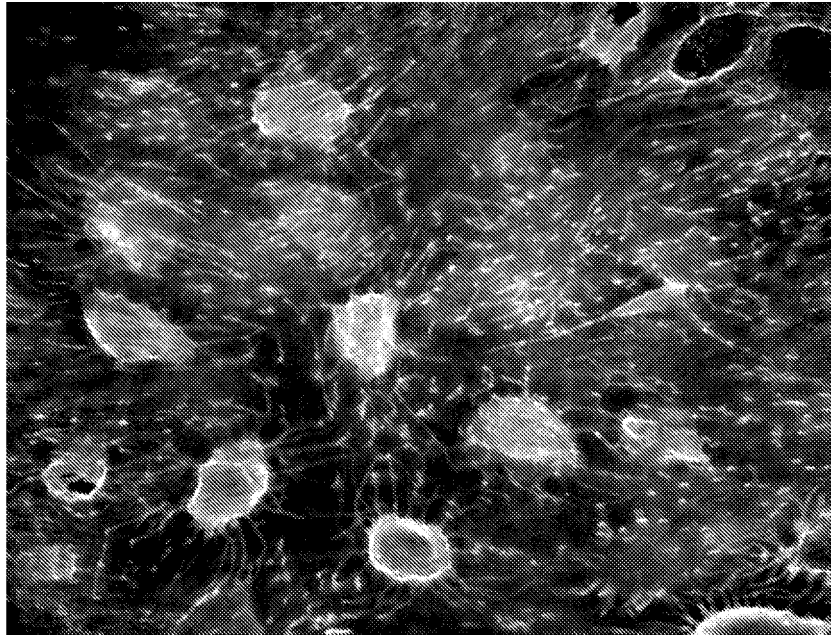


Abb. 2. Einstellfenster für die Equalizer-Funktion.

3 Ergebnisse

Der Bilddatenstapel wurde sequentiell mit Hilfe des FFT Algorithmus in seine Ortsfrequenzen zerlegt. Auf diese Ortsfrequenzen wurde nun eine Gewichtungsfunktion angewendet (Image-Equalizer-Funktion), mit deren Hilfe Frequenzanteile, die nur Bildstörungen enthalten, eliminiert und Frequenzanteile, die sowohl Störungen als auch wesentliche Bildinformationen enthalten etwas gegenüber den Frequenzanteilen mit den gesuchten Bildinformationen abgeschwächt wurden. Um dieses zu erreichen, wurde ein Image-Equalizer implementiert, der nach erfolgter Fouriertransformation den Ortsfrequenzbereich in 18 feste Frequenzbänder zerlegt (Abb. 2). Die Breite der Frequenzbänder nimmt mit aufsteigender Frequenz zu, wobei sich ein Anstieg von 32,4011 % zur jeweils nächsten Frequenzbandbreite durch Versuche als Optimal gezeigt hat. Eingestellt wird jeweils der höchstfrequente Bereich des Frequenzbandes. Von dort aus wird linear zur nächsten Frequenzbandgrenze interpoliert. Nun wird eine entsprechende Gewichtung vorgenommen. Dadurch wird erreicht, dass der jeweilige Ortsfrequenzbereich entweder gedämpft, verstärkt oder unverändert bleibt. Da die optimale Einstellung der Regler u. U. sehr zeitaufwendig sein kann, unterstützt die entwickelte Software den Benutzer beim Einstellen der Filterregler durch eine Vielzahl systematischer Hilfestellungen. Nach erfolgter Rücktransformation der modifizierten Ortsfrequenzen in den Ortsbereich wurden die Bilddaten für die Visualisierung auf ein optimales Maß gespreizt und das Ergebnis zwischengespeichert. Abschließend kann der Datensatz dreidimensional visualisiert werden. Hierfür wird der gefilterte Bilddatenstapel mit Hilfe eines erweiterten Marching-Cube Algorithmus vektorisiert und kann nun 3-dimensional oder sogar stereoskopisch dargestellt werden (Abb. 4)[3].

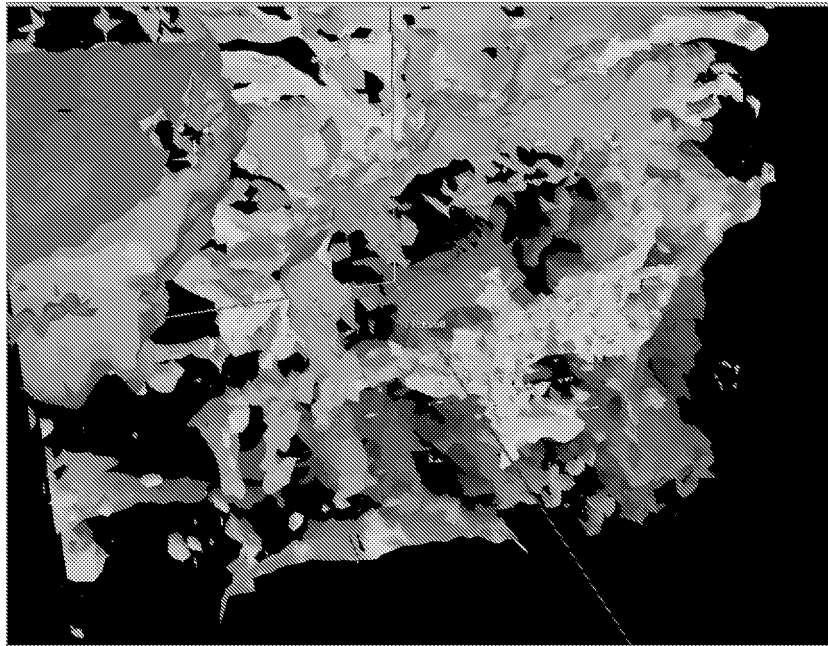
Abb. 3. Das Bild aus Abb. 1 nach erfolgter Filterung.



4 Diskussion

Das Hauptproblem bei der dreidimensionalen Zellbildauswertung und Visualisierung von Knochenzellbildern (Zellkultur) stellen die zahlreichen störenden Artefakte dar, die schon bei der Bilderfassung entstehen. Gerade die nur schwer zu erkennenden feinen tentakelartigen Verbindungsstrukturen zwischen den Zellen gehen bei herkömmlichen Filterungsverfahren (Tiefpassfilter, Bandpassfilter) schnell verloren, da sie nur schwer gegen die Artefakte abzugrenzen sind. Mit Hilfe des Image-Equalizers ist es jedoch möglich, genau diejenigen Ortsfrequenzen hervorzuheben, welche genau diese feinen Verbindungsstrukturen repräsentieren. Natürlich liegen auch in diesen Ortsfrequenz-Bereichen Störanteile. Offensichtlich fallen sie jedoch gegenüber den eliminierten Störungen nicht mehr ins Gewicht. Durch die sehr feine Einstellungsmöglichkeit des Equalizers mit Hilfe der 18 Frequenzbänder ist eine gute Differenzierung von Störungen und wesentlichen Informationen möglich geworden. Das verbleibende Problem ist jedoch die jeweils optimalen Einstellungen für die Regler des Equalizers zu finden. Obwohl bereits viele Ansätze zur Anwenderunterstützung in das Programm eingeflossen sind, bleibt es doch letztendlich der Mensch, der die Entscheidung über die Filterung treffen muss. Ein Aufwand der sich lohnt, wie man aus dem direkten Vergleich von Abb. 1 und Abb. 3 ersehen kann. Das Ziel unserer Arbeit, den erfahrenen Physiologen zu unterstützen, nicht ihn zu ersetzen, wurde erreicht.

Abb. 4. Abschließend kann der Datensatz 3-dimensional visualisiert werden.



Nach erfolgter Bildverbesserung ist die weiterverarbeitende Software in der Lage, die Zellausläufer zu verfolgen und deren räumlichen Verlauf zu rekonstruieren und zu visualisieren. Dieses ermöglicht nun den 3-dimensionalen Blick auf lebende Knochenzellen, woraus sich natürlich gegenüber den Bildern abgetöteter Zellen völlig neue Möglichkeiten, z.B. die der Langzeitbeobachtung und der funktionellen Bildanalyse (z.B. extra- und interzellulärer Calciumtransport), ergeben.

Literaturverzeichnis

1. Parazza F., Humbert C., Usson Y., Method For 3D Volumetric Analysis Of Intracellular Fluorescence Distribution In Confocal Microscopy, Computerized Medical Imaging and Graphics, 17(1993), 189-200
2. Press W.H., Teukolsky S.A., Fourier Transforms Of Real Data In Two and Three Dimensions, Computers in Physics, 5(1989), 84-87
3. Melzer K., Lipinski H.-G., Grönemeyer D.H.W., Stereoskopische 3D Verfahren und 3D-Interaktionsmethoden für chirurgische Navigationssimulatoren, Biomed. Technik, Band 46, Ergänzungsband 1(2001), 382-383