(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Dezember 2005 (22.12.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/122092 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G06T 7/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/006231

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Juni 2005 (10.06.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 028 372.9 11. Juni 2004 (11.06.2004) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT BREMEN** [DE/DE]; Bibliothekstrasse 1, 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **HERZOG, Otthein** [DE/DE]; Am Querkamp 22A, 28355 Bremen (DE). **FRIEDL, Peter** [DE/DE]; Helmuth-Zimmerer-Strasse 19, 97076 Würzburg (DE). **GOTTFRIED, Björn** [DE/DE]; Frielinger Strasse 4, 28215 Bremen (DE).

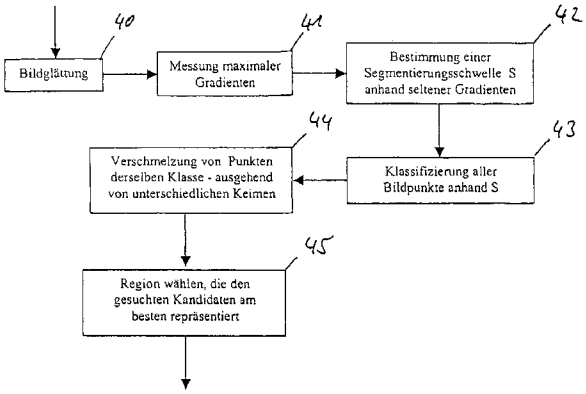
(74) Anwalt: **KECK, Stephan**; Eisenführ, Speiser & Partner, Postfach 10 60 78, 28060 Bremen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SEGMENTING A DIGITAL REPRESENTATION OF CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SEGMENTIERUNG EINER DIGITALEN ABBILDUNG VON ZELLEN



(57) **Abstract:** The invention relates to a method and a device for segmenting a digital representation (22) of biological cells (2, 3), a method and a device for analysing the dynamic behaviour of biological cells (2, 3), and a method and a device for visualising the dynamic behaviour of biological cells (2, 3). The aim of the invention is to provide a segmenting method which has only low technical requirements, requires no special preparation or manipulation of the cells to be observed, and presupposes as few hypotheses as possible about cell characteristics. To this end, the inventive method comprises the following steps: a maximum gradient is determined (41) for each pixel of the representation as the maximum of the differences between an image value of the pixel and the corresponding image values of all or selected adjacent pixels; a segmenting threshold value is determined (42) on the basis of the frequencies of the maximum gradient; the pixels are classed (43) in an object category and an environment category by means of the segmenting threshold; and a segment region of the digital representation is formed (44) by means of a category merging method, especially a region growth method.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen Abbildung (22) von biologischen Zellen (2, 3), ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3) sowie ein Verfahren und eine Vorrichtung zur

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/122092 A1

KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3). Um ein Verfahren zur Segmentierung vorzustellen, welches nur geringe technische Anforderungen hat, keine spezielle Präparation oder Manipulation an den zu beobachtenden Zellen benötigt und möglichst wenige Annahmen über Zelleigenschaften voraussetzt, wird vorgeschlagen, dass es die folgenden Schritten aufweist: Bestimmen (41) eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte, Bestimmen (42) eines Segmentierungsschwellwertes anhand der Häufigkeiten der maximalen Gradienten, Klassifizieren (43) der Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes, und Bildung (44) eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung mittels eines Klassenverschmelzungsverfahrens, insbesondere eines Bereichswachstumsverfahrens.

Verfahren und Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von biologischen Zellen, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen sowie ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen.

Die Messung der Bewegung biologischer Zellen wird als Screeningverfahren zur pharmakologischen Wirkstoffsuche beispielsweise in der Tumor- und Immunforschung benutzt. Damit ist eine Methode als in-vitro Alternative zu Tierversuchen gegeben.

In einem bekannten Verfahren werden die Zellen mittels geeigneter Färbetechniken fluoreszierend eingefärbt, um damit die Unterscheidung zwischen den Zellen und dem Hintergrund bzw. der Umgebung zu erleichtern. Diese Technik hat den Nachteil, dass durch das Einfärben die Zellphysiologie beeinflusst werden kann, insbesondere Beweglichkeit und Bewegung der Zellen, also Eigenschaften, die zu untersuchen sind. Das Verfahren ist im wesentlichen auf eine zweidimensionale Probe wie beispielsweise einen Zellrasen beschränkt, da eine Präparation dreidimensionaler Proben sehr aufwändig wäre. Zudem ist die Auflösung der dritten Dimension gerätetechnisch besonders aufwändig, da es ein automatisiertes motorisiertes Mikroskop erfordert und große Datenmengen generiert, die Routineapplikationen erschweren. Insbesondere bei Langzeitversuchen ergeben sich die Probleme dadurch, dass die Fluoreszenzwirkung mit der Zeit durch Abbau oder Einlagerung in bestimmten Zellbestandteilen verändert wird. Wenn sich eine markierte Zelle während der Beobachtungszeit teilt, kann nicht sichergestellt werden, dass die Markierung auch an beide Tochterzellen gleichermaßen weitergegeben wird.

Konventionelle Verfahren zur Zellverfolgung machen Annahmen über Eigenschaften der Zelle wie etwa Form oder Größe, die als konstant angenommen werden. Diese Annahmen sind aber nicht für alle Zelltypen haltbar, insbesondere nicht für mobile Zellen. Weiterhin sind diese Verfahren entweder sehr aufwändig etwa im Hinblick auf benötigte Hardware oder Rechenleistung und / oder sehr empfindlich gegenüber unklaren Abgrenzungen zwischen Zelle und Umgebung. Die Abgrenzungen sind vor allem bei dreidimensionalen Proben von Zellen in einer heterogenen Kollagenmatrix nicht ausreichend gegeben.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von biologischen Zellen anzugeben, welches nur geringe technische Anforderungen hat, keine spezielle Präparation oder Manipulation an den zu beobachtenden Zellen benötigt und möglichst wenige Annahmen über Zelleigenschaften voraussetzt.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von biologischen Zellen gelöst, das die folgenden Schritte aufweist:

- Bestimmen eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte,

- Bestimmen eines Segmentierungsschwellwertes anhand der Häufigkeiten der maximalen Gradienten mit den Schritten,

a) Zuordnen einer Gradientenhäufigkeit zu allen maximalen Gradienten als die Anzahl von Bildpunkten mit dem jeweiligen maximalen Gradienten,

b) Bestimmen eines Umgebungsgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,

c) Iteratives Vergleichen zwischen Umgebungsgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die die Umgebung einer biologischen Zelle abbilden, und Hinzufügen der Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächsthäufigsten maximalen Gradienten zum Umgebungsgrößenwert, bis der Umgebungsgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und

d) Bestimmen des Segmentierungsschwellwertes aus der Anzahl der Wiederholungen des Schrittes c),

- Klassifizieren der Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes, wobei die Bildpunkte, deren maximaler Gradient eine bei oder über dem Segmentierungsschwellwert liegende Größe aufweist, in die Objektklasse und die anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse eingeordnet werden, und

- Bildung eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung mittels eines Klassenverschmelzungsverfahrens, insbesondere eines Bereichswachstumsverfahrens.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass eine von Zelleigenschaften weitgehend unabhängige, gegenüber geringer Abbildungsqualität unempfindliche aber dennoch einfache Segmentierung aufgrund von Bildwertänderungen zwischen Bildpunkten möglich ist. Die für diese Erfindung wesentliche Eigenschaft der Bildpunkte einer zu segmentierenden Abbildung ist der Grad der Unterschiedlichkeit zu seinen umgebenden Bildpunkten. Für jeden auftretenden maximalen Gradienten wird die Anzahl des Auftretens bestimmt, also die Anzahl der Bildpunkte mit entsprechendem maximalen Gradienten. Ausgehend vom dem am häufigsten auftretenden maximalen Gradienten werden solange weitere, jeweils weniger häufige, maximale Gradienten hinzugenommen und jeweils die Gesamtzahl der Bildpunkte bestimmt, deren maximaler Gradient zu den ausgewählten gehört, bis eine vorbestimmte für die Umgebung der Zelle abgeschätzte Größe als Anzahl von Bildpunkten erreicht oder überschritten ist. Damit ergibt sich ein Segmentierungsschwellwert in Abhängigkeit von der Anzahl der bis zum Erreichen oder Überschreiten nötigen Iterationen, also abhängig davon, wie viele der häufigsten maximalen Gradienten hierzu zusammengefasst werden mussten, als eine Abgrenzung zwischen Bildpunkten, für die zunächst angenommen wird, dass sie die Zelle abbilden, und anderen Bildpunkten, für die angenommen wird, dass sie die Zellumgebung abbilden.

Durch das sukzessive Hinzunehmen der maximalen Gradienten mit fallender Häufigkeit, bis damit mehr Bildpunkte erfasst werden, als mit einen Schätzwert für die Umgebungsgröße, der sich aus der Differenz zwischen Bildgröße und einem Schätzwert für die Zellgröße ergibt, vorgegeben, erhält man einen von der Anzahl der Iterationen abhängigen, steigenden Schwellwert. Dieser Schwellwert kann als gleich der Anzahl der Iterationen gewählt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Schwellwert um einen vorbestimmten Wert größer oder kleiner als die Anzahl der Iterationen anzusetzen, also eine absolute Differenz zwischen der Anzahl der Iterationen und dem Schwellwert vorzusehen. Eine wei-

tere Möglichkeit ist es, die Anzahl der Iterationen mit einen vorbestimmten Faktor (größer oder kleiner als 1) zu multiplizieren und somit eine relative Abweichung zwischen der Anzahl der Iterationen und dem Schwellwert zu erhalten. Diese Möglichkeiten können auch kombiniert werden.

In einer Ausgestaltung der Erfindung wird der Segmentierungsschwellwert als die Anzahl der Wiederholungen des Schrittes c) bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass bei dieser Wahl im allgemeinen die besten Segmentierungsergebnisse erzielt werden können. In speziellen Anwendungsfällen und bei besonderen Abbildungskonstellationen können jedoch mit einem veränderten Schwellwert bessere Ergebnisse erzielt werden. In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung wird zur Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes die Anzahl der Wiederholungen mit einem vorbestimmten Faktor, insbesondere im Bereich von 0,5 bis 1,5, bevorzugt im Bereich von 0,66 bis 1,33, besonders bevorzugt im Bereich von 0,8 bis 1,2, multipliziert und/oder zu der Anzahl der Wiederholungen eine vorbestimmte Konstante, insbesondere im Bereich von –10 bis +10, bevorzugt im Bereich von –5 bis +5, addiert. Es ist zu bemerken, dass die vorbestimmte Konstante auch kleiner als Null sein kann.

Die Unterteilung der Abbildung anhand des Segmentierungsschwellwertes ergibt zwei Gruppen von Bildpunkten. Kleinere Bereiche von irrtümlich in die Gruppe der Zellenumgebung eingeordneten Bildpunkten finden sich im Bereich der Zelle und umgekehrt. Mittels eines aus der Bildverarbeitung bekannten Klassenverschmelzungsverfahrens, z.B. eines region-growing-Verfahrens, wird die Gruppe der der Zelle zugeordneten Bildpunkte zu einem zusammenhängenden Bereich zusammengeführt. Vereinzelte kleinere Bildpunktbereiche oder einzelne Bildpunkte können bei diesem Verfahren fallengelassen werden, werden also der Gruppe der der Zellumgebung zugeordneten Bildpunkte zugerechnet. Entsprechendes ergibt sich, wenn das Klassenverschmelzungsverfahren auf die Gruppe der der Zellumgebung zugeordneten Bildpunkte angewandt wird.

Da nicht absolute Eigenschaften der Bildpunkte, sondern die relative Veränderung dieser Eigenschaften zu benachbarten Bildpunkten die Basis für das erfin-

dungsgemäße Verfahren bildet, ist das Verfahren unempfindlich gegen schwankende Bildparameter wie beispielsweise Beleuchtung oder Kontrast. Dies verringert den nötigen technischen Aufwand und erweitert die Anwendungsmöglichkeiten. Da keine Veränderungen, beispielsweise durch Präparation wie Einfärbung, an den Zellen vorgenommen werden müssen, werden die Beobachtungsergebnisse nicht durch diese Veränderungen gegebenenfalls verfälscht.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist der untersuchte Bildwert eines Bildpunktes der Grauwert des Bildpunktes. Obwohl auch andere Bildwerte eines Bildpunktes wie etwa Farbeigenschaften verwendet werden können, hat der Grauwert gegenüber diesen den Vorteil geringerer Ansprüche an Bildaufnahmeeinrichtungen und Speicherkapazität. Hierbei kann eine Auflösung von 256 Grauwerten bereits ausreichen.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden die Bildpunkte einer 4er- oder 8er-Nachbarschaft um den zu untersuchenden Bildpunkt ausgewählt. Die 8er-Nachbarschaft umfasst die Punkte, die direkt an den zu untersuchenden Bildpunkt angrenzen, während die 4er-Nachbarschaft nur jeden zweiten dieser 8 umgebenden Punkte umfasst. Werden die Gradienten gleichmäßig in alle Richtungen in der Ebene zur Bestimmung des maximalen Gradienten herausgezogen, ergibt sich keine Ungleichgewichtung einer bestimmten Richtung, was zu einer Verzerrung der Segmentierung führen könnte.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird der vorbestimmte Schätzwert aus der Differenz der Bildgröße und dem Produkt von durchschnittlicher Querschnittsfläche einer Zelle und Auflösung der digitalen Abbildung bestimmt. Dieser Schätzwert fußt auf der Annahme, dass die Zelle selbst bei Änderung der Form ihre Größe annähernd beibehalten wird. Weitere Annahmen, die besondere Kenntnisse über die zu untersuchenden Zellen voraussetzen oder die die Auswahl der Zellen einschränken, die untersucht werden können, werden nicht gemacht.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen anhand eines Bilddatensatzes mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen der Zellen in einem Untersuchungsbereich mit den Schritten:

- Segmentieren einer ersten Abbildung zur Bestimmung von ersten Zellpositionen in der ersten Abbildung,

- Segmentieren einer zweiten Abbildung zur Bestimmung von zweiten Zellpositionen in der zweiten Abbildung und

- Zuordnen der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen,

wobei die Segmentierung gemäß dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt. Das dynamische Verhalten der einzelnen Zelle wird dadurch analysiert, dass in den zeitlich aufeinander folgenden Abbildungen jeweils Segmentbereiche bestimmt werden, die den abgebildeten Zellen entsprechen, und diese Segmentbereiche einander zugeordnet werden. Neben einer Bewegung kann das dynamische Verhalten auch Teilungen oder Formveränderungen der Zelle bzw. Zellen enthalten. Allgemein werden unter dynamischen Verhalten alle Veränderungen von Zelleigenschaften verstanden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens wird beim Segmentieren der zweiten Abbildung der vorbestimmte Schätzwert aus der durchschnittlichen Anzahl von Bildpunkten der Zellen darstellenden Segmentbereiche in der ersten Abbildung bestimmt. Dieser verbesserte Schätzwert liegt näher an der tatsächlichen Größe als der weiter oben angeführte, da hier zur Bestimmung des Schätzwertes die erkannten Größen der Zellen in der ersten Abbildung benutzt werden. Findet sich in der ersten Abbildung, die auch ein Ausschnitt aus einer größeren Abbildung sein kann, beispielsweise nur eine einzige Zelle, so ergibt sich der Schätzwert aus der Größe bzw. Bildpunktanzahl dieser Zelle, und es wird davon ausgegangen, dass sich die Größe der Zelle zwischen der ersten und zweiten Abbildung nicht wesentlich verändert. Der Schätzwert

wird also die Größe der Umgebung der Zelle in der zweiten Abbildung gut annähern.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens erfolgt die Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen anhand mindestens einer Zelleigenschaft aus der Gruppe Gesamtlichtstärke, Nähe, Größe und Form. Besonders bevorzugt wird hierbei die Eigenschaft Nähe verwendet, da die Zeitdifferenz zwischen zwei Abbildungen so eingestellt werden kann, dass die Zelle sich bis zur zweiten Abbildung nicht aus dem Nahbereich ihrer Position in der ersten Abbildung entfernt hat. Wählt der Benutzer in der zweiten Abbildung nur einen Ausschnitt um die Position einer Zelle in der ersten Abbildung, so kann damit zusätzlich die zur Segmentierung benötigte Rechenleistung oder –zeit verkürzt werden. Reicht das Kriterium der Nähe allein zur Entscheidung nicht aus, so können weitere Eigenschaften benutzt werden, um eine zuverlässige Zuordnung sicherzustellen.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen anhand eines Bilddatensatzes mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen der Zellen in einem Untersuchungsbereich mit den Schritten:

- Aufnahme einer zeitlichen Abfolge von digitalen Abbildungen,
- Segmentieren einer Startabbildung,
- Auswahl einer oder mehrerer zu untersuchenden Zellen,
- Analyse des dynamischen Verhaltens der zu untersuchenden Zellen und
- Aufbereitung der Analyseninformationen,

wobei die Segmentierung gemäß dem oben beschriebenen Segmentierungsverfahren und / oder die Analyse des dynamischen Verhaltens gemäß dem oben

beschriebenen Analyseverfahren erfolgt. In der ersten Abbildung der zeitlichen Abfolge von Abbildungen wird nach dem Segmentieren eine Auswahl derjenige(n) Zelle(n) getroffen, die im weiteren analysiert werden sollen. Damit werden Startpositionen für die nachfolgende, dann automatisch ablaufende Analyse des dynamischen Verhaltens der Zelle bzw. Zellen gesetzt.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Visualisierungsverfahrens erfolgt die Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen anhand einer Zellpositionen zugeordneten Bewegungsrichtung und / oder einer zugeordneten Geschwindigkeit. Ausgehend von einer Start- oder ersten Abbildung erhält man nach der Zuordnung der Zellpositionen zur zweiten Abbildung eine Richtung und eine Geschwindigkeit für diese Zuordnung, die benutzt werden können, um eine Zuordnung von Zellpositionen zu einer dritten Abbildung zu verbessern. Diese Zuordnung erfolgt weitgehend unabhängig von Störungen durch Änderungen der Zellgröße, der Zellform oder der Schärfe der Abbildung.

Die Erfindung sieht weiterhin Vorrichtungen zur Ausführung der erfindungsgemäßen Verfahren nach den Ansprüchen 13, 14 und 15 sowie ein Computerprogramm vor mit Computerprogrammcode zur Steuerung eines Computers zur Durchführung der Schritte eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wenn das Computerprogramm auf einem Computer ausgeführt wird.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von vorteilhaften Ausführungsformen mit Bezug auf die Figuren näher erläutert. Dabei zeigen:

Fig. 1 eine schematische perspektivische Ansicht von Zellen in einer Kollagenmatrix mit einem Querschnitt und einer Aufsicht,

Fig. 2 ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen darstellt,

Fig. 3 einen Ablaufplan eines Teiles des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen,

Fig. 4 ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Segmentierung darstellt,

Fig. 5a eine beispielhafte Abbildung einer Zelle,

Fig. 5b eine Klassifizierung der Abbildung aus Fig. 5a,

Fig. 5c eine Segmentierung der Abbildung aus Fig. 5a mit einer Darstellung eines Umrisses eines Segmentes,

Fig. 5d den in die Abbildung aus Fig. 5a eingetragenen Umriss aus Fig. 5c,

Fig. 6 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Aufnahme von Abbildungen von biologischen Zellen,

Fig. 7a eine weitere beispielhafte Abbildung einer Zelle,

Fig. 7b die Abbildung aus Fig. 7a nach eine Vorbearbeitung,

Fig. 7c ein Gradientenbild der Abbildung aus Fig. 7b,

Fig. 7d das Gradientenbild aus Fig. 7c in binarisierter Form nach der Anwendung des erfindungsgemäß bestimmten Schwellwertes,

Fig. 7e eine Abbildung der segmentieren Zelle nach Anwendung einer Klassenverschmelzung,

Fig. 7f ein Gradientenhistogramm mit den Häufigkeiten der maximalen Gradienten aus Fig. 7d,

Fig. 7g eine sortierte Darstellung der maximalen Gradienten aus Fig. 7d mit steigender Häufigkeit,

Fig. 7h das Gradientendiagramm aus Fig. 7f mit eingezeichnetem Schwellwert,

Fig. 8a bis 8e weitere beispielhafte Zell-Abbildungen ähnlich den Fig. 7a bis 7e,

Fig. 8f ein Gradientenhistogramm mit den Häufigkeiten der maximalen Gradienten aus Fif. 8d und

Fig. 8g eine sortierte Darstellung der maximalen Gradienten aus Fig. 8d mit steigender Häufigkeit.

Fig. 1 zeigt eine schematische perspektivische Ansicht 1 von Zellen 2, 3 in einer Kollagenmatrix 4 mit einem Querschnitt 5 und einer Aufsicht 6. Wird eine Abbildung von der Kollagenmatrix 4 mit den Zellen 2, 3 gemacht, so muss auf eine Ebene 7 fokussiert werden. Wenn sich die Zellen 2, 3 bewegen, hier dargestellt durch die Wege 8, 9, so befinden sie sich nicht nur an unterschiedlichen x-y-Positionen, sondern können ebenfalls ihre z-Position verändern. Die Positionen der Zellen 2, 3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Fig. 1 durch Punkte gekennzeichnet. Die Aufsicht 6 kann beispielsweise in zeitlichen Abständen aufgenommen werden und die dabei erhaltenen Abbildungen können zur Visualisierung der Zellbewegung benutzt werden. Ebenso ist es möglich, anhand anderer Eigenschaften wie etwa Zellform oder Zellgröße das dynamische Verhalten der Zellen zu untersuchen.

Fig. 2 zeigt ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens, insbesondere der Bewegung, biologischer Zellen darstellt. In einem ersten Schritt 10 wird aus den zur Verfügung stehenden zeitlich aufeinanderfolgenden Abbildungen eine Bildserie ausgewählt. Im folgenden Schritt der Zellselektion 11 werden in der ersten Abbildung Zellpositionen ausgewählt. Die zu diesen Zellpositionen gehörigen Zellen werden im Schritt der Verfolgung (Tracking) 12 verfolgt und ihre Bewegung wird analysiert. In einer Nachbearbeitung 13 werden die beim Tracking 12 gewonnenen Informationen

kontrolliert, ggf. nachbearbeitet und aufgearbeitet und können dann als Trajektorie-Koordinaten 14, also als Bewegungsinformationen, als Grauwert-Statistik 15, also als Information über die Beschaffenheit der Zellen, oder als Film mit Konturen der Zellen 16, insbesondere zur Überprüfung der Qualität der Zellverfolgung, ausgegeben werden. Die Schritte 10, 11 und 13 sind hierbei interaktiv mit einem Benutzer, während das Tracking 12 automatisch abläuft. Die Abbildungen stehen nach erfolgter Aufnahme im Computer zur Verfügung; daher ist das Verfahren nicht nur offline, sondern auch online einsetzbar.

Fig. 3 zeigt einen Ablaufplan des Schrittes 12 der Fig. 2, des Trackings. Aus einer Bildserie 20 wird in Schritt 21 ein Bild 22 ausgewählt, das entweder beim Start des Trackings 12 das erste und bei späteren Schritten das nächstfolgende Bild ist. Ergibt eine Überprüfung 23, dass das letzte Bild der Bildserie 20 abgearbeitet ist, so ist das Ende 24 des Trackings 12 erreicht. Andernfalls wird ein Zähler Z initialisiert (Schritt 25) und für die dem Wert von Z entsprechende Zelle unter der Kontinuitätsannahme eine Bestimmung 26 eines Bildausschnittes aus dem Bild 22 vorgenommen. Die Kontinuitätsannahme geht davon aus, dass die jeweilige Zelle sich von ihrer Position im vorherigen Bild nicht wesentlich entfernt hat.

Ergibt eine Überprüfung 27, dass die Zelle zu Z nicht Teil eines Clusters, also einer Ansammlung von aufgrund ihrer Position nicht voneinander zu unterscheidenden Zellen, ist, so wird die Position der Zelle im Bildausschnitt bestimmt (Schritt 28) und eine Überprüfung 29 durchgeführt, ob die Zelle mit einer anderen Zelle kollidiert ist. Eine Kollision in diesem Sinne entspricht dem optisch nicht mehr auflösbaren Überlappen der Zellgrenzen, somit die x-y-Position zweier oder mehrerer Zellen praktisch zusammentreffen, was sich aufgrund der nicht aufgenommenen z-Position nicht vom einem Zusammentreffen aller drei Koordinaten unterscheiden lässt. Ein partielles Zusammentreffen liegt vor, wenn die zwei oder mehreren Zellen trotz teilweiser Überlappung als getrennte Objekte mit individuell verschiedenen x-y-Werten aufgelöst werden können.

Liegt keine Kollision vor, so werden die Zellkoordinaten festgehalten (Schritt 30) und in einem Speicher 31 abgelegt. Liegt eine Kollision vor, so wird ein neuer Cluster angenommen (Schritt 32) und die entsprechenden Informationen in einem weiteren Speicher 33 abgelegt.

Ergibt die Überprüfung 27, dass die Zelle zu Z Teil eines Clusters ist, so wird eine Untersuchung 34 vorgenommen, ob sich dieser Cluster aufgespalten hat. Dabei werden Informationen mit dem Speicher 33 der Clusterinformationen ausgetauscht. Die entsprechenden Zellkoordinaten werden ebenfalls in Schritt 30 festgehalten und entsprechend im Speicher 31 abgelegt. Auf Schritt 30 folgt eine Überprüfung 35, ob alle zu verfolgenden Zellen bereits bearbeitet sind. Sind noch Zellen unbearbeitet, so erfolgt eine Erhöhung 36 des Zählers Z und das Verfahren wird bei Schritt 26 fortgesetzt. Sind alle Zellen bearbeitet, so wird bei Schritt 21 fortgesetzt.

Fig. 4 zeigt ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Segmentierung darstellt. Die hier dargestellten Schritte können in Schritt 28 in Fig. 3 enthalten sein. Es kann eine Bildglättung 40 erfolgen, deren Ergebnis eine Abbildung wie in Fig. 5a sein kann. Fig. 5a zeigt eine beispielhafte Abbildung einer Zelle als das Ergebnis einer Digitalisierung eines lichtmikroskopischen Aufnahme mit 256 Graustufen.

Darauf folgt die Bestimmung 41 eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte. Dabei werden die Bildwerte des Bildpunktes und der benachbarten Bildpunkte miteinander verglichen und die größte Differenz wird dem Bildpunkt als maximaler Gradient zugeordnet. Darauf folgend wird ein Segmentierungsschwellwert anhand der Häufigkeiten der maximalen Gradienten bestimmt (Schritt 42). Bei der Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes werden die häufigsten maximalen Gradienten schrittweise zusammengefasst und die Anzahl der damit erfassten Bildpunkte wird mit einem Schätzwert für die Anzahl der Bildpunkte verglichen, die der Umgebung der zu segmentierenden Zelle angehören.

Aus der Anzahl der zusammengefassten maximalen Gradienten wird der Schwellwert bestimmt. Im einfachsten hier dargestellten Fall stimmt der Schwellwert mit der Anzahl der zusammengefassten Gradienten überein. Andere Möglichkeiten sind die Addition bzw. Subtraktion eines festen, vorbestimmten Wertes zu der Anzahl, um damit den Schwellwert zu erhalten. Weiterhin ist es zudem möglich, die Anzahl mit einem vorbestimmten Faktor zu multiplizieren, d.h. um diesen Faktor zu vergrößern oder zu verkleinern, um den Schwellwert zu bestimmen.

Im folgenden Schritt 43 werden die Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes klassifiziert, wobei die Bildpunkte, deren maximaler Gradient dem Segmentierungsschwellwert entspricht oder über diesem liegt, in die Objektklasse und die anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse eingeordnet werden. Dies ergibt eine Abbildung wie in Fig. 5b, die also eine Klassifizierung der Abbildung aus Fig. 5a als eine Zwischenstufe eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Segmentierung zeigt. Es ist zu erkennen, dass in dieser Zwischenstufe auch noch kleinere Bereiche der Zellenumgebung zur Klasse der Zelle gezählt werden.

Anschließend erfolgt eine Verschmelzung 44 von Punkten derselben Klasse von unterschiedlichen Keimen ausgehend zur Bildung eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung. Ist wie in Fig. 5a bis 5d ein Ausschnitt der Abbildung so gewählt, dass die Zelle in der Mitte dieses Ausschnitts abgebildet wird, so kann die Verschmelzung auch von der Bildmitte ausgehen. Als Ergebnis einer Verschmelzung zeigt Fig. 5c eine Segmentierung der Abbildung aus Fig. 5a mit einer Darstellung eines Umrisses eines Segmentes. Mittels eines Bereichswachstumsverfahrens können aus den Bildpunkten, die zur Klasse der Zelle gezählt werden, Konturen extrahiert werden. Ein Homogenitätskriterium bestimmt, wann das Bereichswachstumsverfahren an einen anzunehmenden Rand der Zelle stößt. Dieses Kriterium kann vorbestimmt sein und beispielsweise darin bestehen, dass aus der 4er-Nachbarschaft eines Bildpunktes höchstens zwei Bildpunkte zu einer anderen Klasse gehören dürfen. Es ist zu erkennen, dass nur ein zusammenhängender Bereich die Zelle darstellt und der umgebende Bereich die Zellumge-

bung wiedergibt. In einem abschließenden Schritt 45 wird derjenige Bereich ausgewählt, der anhand der vorhergehenden Zellinformationen die Zelle ab besten wiedergibt.

Fig. 5d zeigt den in die Abbildung aus Fig. 5a eingetragenen Umriss aus Fig. 5c. Wie hier zu erkennen ist, stimmt der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmte Umriss augenscheinlich gut mit dem wirklichen Umriss der Zelle überein. Die Segmentierung war also erfolgreich.

Fig. 6 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Aufnahme von Abbildungen von biologischen Zellen. Die zu verfolgenden Zellen befinden sich in einer Kollagenmatrix, einer 3-dimensionalen Struktur, die auf einem Objektträger 52 liegt. Der Objektträger 52 befindet sich in einem Inkubator 53, der mit Hilfe einer Infrarotquelle 54 oder einer anderen Wärmequelle die Probe in einem kontrollierten thermischen Zustand hält. Das Mikroskop 55 fokussiert eine feste Ebene der Probe und wird während der Analyse nicht mehr verändert. Eine CCD-Kamera 56 nimmt in einem festen Zeittakt, zum Beispiel alle zwei Minuten, ein Bild der Probe auf, das auf einem mit der CCD-Kamera 56 verbundenen Computer (nicht dargestellt) übertragen und dort gespeichert wird. Die damit im Computer vorliegenden Abbildungen können einer Segmentierung unterworfen und, nachdem vom Benutzer eine oder mehrere Zellen zur Verfolgung und Visualisierung ihres dynamischen Verhaltens ausgewählt wurden, zur Analyse des dynamischen Verhaltens benutzt werden. Die dabei gewonnenen Informationen können auf verschiedene Weise im Computer aufgearbeitet und dem Benutzer zur Verfügung gestellt werden.

Das erfindungsgemäße Segmentierungsverfahren ergibt sich auch aus dem folgenden beispielhaften Algorithmus.

1) Erzeugung eines Histogramms maximaler Gradienten der Abbildung (als Hist bezeichnet)

2) Aufsteigende Sortierung des Histogramms nach Häufigkeiten der maximalen Gradienten (als SHist bezeichnet)

3) Initialisierungen (kleinstmöglicher_Wert := 0, höchstmöglicher_Wert := 255; i := höchstmöglicher_Wert; abgezählte Pixel := 0)

4) Solange (abgezählte_Pixel < geschätzte_Umgebungsgröße) und

(i > kleinstmöglicher_Gradient)

{

4.a) abgezählte_Pixel := abgezählte_Pixel + SHist[i]

4.b) i := i – 1

}

5) Schwelle := höchstmöglicher_Wert – i

6) alle Bildpunkte der Abbildung markieren, deren maximaler Gradient >= Schwelle

7) Durchführung von Bereichswachstumsverfahren: vom Ausschnittsmittelpunkt aus nord-östlich, süd-östlich, süd-westlich und nord-westlich

8) Das größte Segment entspricht der gesuchten Zelle.

9) Es wird die Kontur um das Segment festgestellt.

Nach der Sortierung in Schritt 2) ist das „Histogramm" kein Histogramm im eigentlichen Sinne mehr. Es ist nun eine aufsteigende Aufstellung der Anzahl von Bildpunkten entsprechend der aufsteigenden Häufigkeit der jeweiligen maximalen

Gradienten. Es ist also kein Histogramm für Gradienten-Größen sondern zeigt die Verteilung der Gradienten-Häufigkeiten.

Die in Schritt 6) markierten Bildpunkte ergeben eine Näherung für den Bereich, den die Zelle in der Abbildung einnimmt. Durch das Bereichswachstum in Schritt 7) werden diese Bildpunkte zu einem zusammenhängenden Bereich zusammengefasst. Irrtümlich ausgewählte Bildpunkte, die außerhalb liegen (siehe Fig. 5b), sind hiervon ausgeschlossen.

Das Bereichswachstum hat seinen Startpunkt in der Mitte eines Bildausschnittes, der so gewählt wird, dass die Zelle im mittleren Bereich des Ausschnittes dargestellt wird. Die Wahl dieses Bildausschnittes basiert auf der Position der Zelle in einer zeitlich vorhergehenden Abbildung. Durch die Annahme, dass die Zelle sich nicht weit fortbewegt hat, kann die zur Segmentierung benötigte Rechenleistung bzw. –zeit weiter reduziert werden, da nicht die gesamte Abbildung, sondern nur ein Ausschnitt bearbeitet werden muss.

Fig. 7f zeigt ein Gradientenhistogramm, das sich aus dem in Fig. 7c dargestellten Gradientenbild einer Zellabbildung ergibt. In Fig. 7a ist die Abbildung einer Zelle zu sehen, die in Fig. 7b nach einer Glättung gezeigt ist. Fig. 7c zeigt die Gradientengrößen für jedes Pixel. In Fig. 7c ist zur besseren Visualisierung in der Darstellung der Kontrast erhöht worden. Die Skalierung der x-Achse des in Fig. 7f gezeigten Histogramms geht von 0 bis 255, entsprechend der möglichen Differenzen im Grauwert benachbarter Bildpunkte. Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch, um die Variation der Häufigkeiten besser darzustellen. In dem in Fig. 7f gezeigten Histogramm treten keine maximalen Gradienten mit einem Wert von 40 oder mehr auf. Diesen maximalen Gradienten wird damit eine Häufigkeit von 0 zugeordnet. Dementsprechend sind die ersten 215 Positionen im aufsteigend sortieren Diagramm von Fig. 7g leer.

Beginnend mit dem häufigsten Gradienten, also von rechts nach links in Fig. 7g, werden die dem jeweiligen Gradienten zuzuordnenden Bildpunkte abgezählt, bis die Grenze des Umgebungsgrößenschätzwertes erreicht ist. In Fig. 7g ist dies

durch die helle Linie dargestellt, die diejenigen häufigsten Gradienten 60 von dem Rest des Diagramms trennt, die zusammengenommen für eine Anzahl von Bildpunkten stehen, die über der geschätzten Anzahl von Umgebungsbildpunkten liegt. Es ist hierbei SHist[255-247], die Anzahl der Bildpunkte mit den 9 häufigsten maximalen Gradienten, noch kleiner als der Schätzwert für die Umgebungsgröße, während SHist[255-246] schon größer als dieser Schätzwert ist. In der Praxis hat es sich gezeigt, dass für viele Fälle die halbe Pixelanzahl der gesamten Abbildung als guter erster Schätzwert angenommen werden kann.

In Fig. 7h ist der Schwellwert, der aus der Anzahl der zusammengenommenen häufigsten maximalen Gradienten bestimmt wurde, in das Gradientenhistogramm aus Fig. 7f eingezeichnet. Alle Bildpunkte, deren maximale Gradienten kleiner als der Schwellwert 62 sind, deren Gradienten somit links vom Schwellwert dargestellt sind, werden der Umgebung zugeordnet. Diejenigen Bildpunkte, deren Gradient über der Schwelle liegt, hier also größer als 9 ist, werden als zur Zelle gehörig angenommen. Hierbei kann angenommen werden, dass die Umgebungsbildpunkte kleine Gradienten haben und dass die Bildpunkte, die die Zelle abbilden, eher große Gradienten aufweisen. In der praktischen Anwendung hat sich gezeigt, dass sich bei speziellen Bildmaterial aus der Anzahl der Wiederholungen ein weiter verbesserter Schwellwert durch eine Multiplikation mit einem Faktor im Bereich von 0,5 bis 1,5 erreichen lässt. Mit der Anwendung des Schwellwertes auf das Gradientenbild 7c ergibt sich das binarisierte Bild 7d, aus dem mittels einer Verschmelzung vom Ausschnittsmittelpunkt in alle Richtungen die Zellfläche in einer Abbildung wie in Fig. 7e erhalten wird.

Hier wurde die Anzahl der häufigsten maximalen Gradienten direkt als Schwellwert angenommen, es ist jedoch möglich, bei der Bestimmung des Schwellwertes in vorbestimmter Weise hiervon abzuweichen. Beispielsweise kann es unter Umständen vorteilhaft sein, einen höheren oder niedrigen Schwellwert anzunehmen. Der Schwellwert kann dann beispielsweise durch Subtraktion oder Addition eines festen Wertes oder durch Multiplikation mit einem vorgegeben Faktor ermittelt werden. Auch diese Anpassung des Schwellwertes kann von einer Segmentierung an eine darauffolgende als Parameter übergeben werden.

Mit den Fig. 8a bis 8g ist das erfindungsgemäße Verfahren entsprechend zu den Fig. 7a bis 7h am Beispiel einer anderen Zellabbildung nochmals dargestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von biologischen Zellen ist grauwert- und forminvariant und kann mit Bildmaterial arbeiten, das heterogen ausgeleuchtet sein kann. Es kommt ohne Markierungen wie Fluoreszenzen oder Annahmen über Form und Farbe der zu segmentierenden Zellen aus. Erst ein solches automatisiertes Verfahren erlaubt es, so umfangreiche Untersuchungen anzustellen, dass Aussagen mit statistischer Relevanz getroffen werden können. Es ist weiterhin geeignet, biologisch relevante Charakteristika wie Farbwert, Zellgröße und –form zu detektieren. Außer nicht gefärbten Zellen, die die bevorzugte Anwendung darstellen, sind auch mit einen Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen detektierbar.

Unter Umständen kann auch eine vereinfachte Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden. Hierbei wird auf eine Sortierung verzichtet und stattdessen wird der Umgebungsgrößenwert als Anzahl der Bildpunkte, für die der kleinste maximale Gradient bestimmt wurde, angenommen und unter iterativem Vergleichen zwischen Umgebungsgrößenwert und dem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die die Umgebung einer biologischen Zelle abbilden, und die Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächstgrößeren maximalen Gradienten zum Umgebungsgrößenwert hingenommen, bis der Umgebungsgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, wobei der Segmentierungsschwellwert aus der Anzahl der Wiederholungen des iterativen Vergleichens und Hinzunehmens bestimmt wird. Für die hier gezeigten Zellabbildungen ist im allgemeinen das komplexere Verfahren gemäß der Erfindung vorteilhaft, während es bei geeignetem Bildmaterial ausreicht, die vereinfache Variante einzusetzen. Im oben beschriebenen Algorithmus fallen dabei die Schritte 2) bis 5) weg und werden durch eine Schleife der folgenden Form ersetzt:

abgezählte_Pixel := 0

Solange (abgezählte_Pixel < geschätzte Umgebungsgröße)

abgezählte_Pixel := abgezählte_Pixel + Hist[i]

i := i + 1.

Vorteilhaft daran ist, dass auf das Sortieren verzichtet und somit eine algorithmische Vereinfachung erreicht werden kann, womit sich die zur Segmentierung notwendige Rechenzeit reduzieren lässt.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung wird zur Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes die Anzahl der Wiederholungen durch eine Konstante festgelegt. Abhängig von der Verteilung von Objekt- und Umgebungspixeln in einem speziellen Experiment kann ein bestimmter Wert für diese Konstante festgelegt werden. Sinnvolle Bereiche erschließen sich aus speziellem Datenmaterial; bei den betrachteten Beispielen ergaben sich typischerweise Werte im Bereich von 5 bis 20. Bei günstigen Bedingungen kann man mit einer konstanten Schwelle auskommen, die mit einem anwendungsabhängigen Faktor variiert werden kann.

Ansprüche

1. Verfahren zur Segmentierung einer digitalen Abbildung (22) von biologischen Zellen (2, 3) mit den Schritten:

- Bestimmen (41) eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte,
- Bestimmen (42) eines Segmentierungsschwellwertes anhand der Häufigkeiten der maximalen Gradienten mit den Schritten,

a) Zuordnen einer Gradientenhäufigkeit zu allen maximalen Gradienten als die Anzahl von Bildpunkten mit dem jeweiligen maximalen Gradienten,

b) Bestimmen eines Umgebungsgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,

c) Iteratives Vergleichen zwischen Umgebungsgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die die Umgebung einer biologischen Zelle abbilden, und Hinzufügen der Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächsthäufigsten maximalen Gradienten zum Umgebungsgrößenwert, bis der Umgebungsgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und

d) Bestimmen des Segmentierungsschwellwertes aus der Anzahl der Wiederholungen des Schrittes c),

- Klassifizieren (43) der Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes, wobei die Bildpunkte, deren maximaler Gradient eine bei oder über dem Segmentierungsschwellwert liegende Größe aufweist, in die Objektklasse und die anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse eingeordnet werden, und
- Bildung (44) eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung (22) mittels eines Klassenverschmelzungsverfahrens, insbesondere eines Bereichswachstumsverfahrens.

2. Verfahren zur Segmentierung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass der untersuchte Bildwert eines Bildpunktes der Grauwert des Bildpunktes ist.

3. Verfahren zur Segmentierung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die ausgewählten benachbarten Bildpunkte die einer 4er- oder 8er-Nachbarschaft um den Bildpunkt sind.

4. Verfahren zur Segmentierung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der vorbestimmte Schätzwert als Produkt von durchschnittlicher Querschnittsfläche einer Zelle (2, 3) und Auflösung der digitalen Abbildung (22) bestimmt wird.

5. Verfahren zur Segmentierung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Segmentierungsschwellwert als die Anzahl der Wiederholungen des Schrittes c) bestimmt wird.

6. Verfahren zur Segmentierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes die Anzahl der Wiederholungen mit einem vorbestimmten Faktor, insbesondere im Bereich von 0,5 bis 1,5, bevorzugt im Bereich von 0,66 bis 1,33, besonders bevorzugt im Bereich von 0,8 bis 1,2, multipliziert und/oder zu der Anzahl der Wiederholungen eine vorbestimmte Konstante, insbesondere im Bereich von –10 bis +10, bevorzugt im Bereich von –5 bis +5, addiert wird.

7. Verfahren zur Segmentierung einer digitalen Abbildung (22) von biologischen Zellen (2, 3) mit den Schritten:

- Bestimmen (41) eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte,
- Bestimmen (42) eines Segmentierungsschwellwertes anhand der maximalen Gradienten mit den Schritten,

a) Bestimmen eines Umgebungsgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der kleinste maximale Gradient bestimmt wurde,

b) Iteratives Vergleichen zwischen Umgebungsgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die die Umgebung einer biologischen Zelle abbilden, und Hinzufügen der Anzahl der Bildpunkte mit dem

jeweils nächstgrößeren maximalen Gradienten zum Umgebungsgrößenwert, bis der Umgebungsgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und

c) Bestimmen des Segmentierungsschwellwertes aus der Anzahl der Wiederholungen des Schrittes b),

- Klassifizieren (43) der Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes, wobei die Bildpunkte, deren maximaler Gradient eine bei oder über dem Segmentierungsschwellwert liegende Größe aufweist, in die Objektklasse und die anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse eingeordnet werden, und
- Bildung (44) eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung (22) mittels eines Klassenverschmelzungsverfahrens, insbesondere eines Bereichswachstumsverfahrens.

8. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3) anhand eines Bilddatensatzes (20) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen (22) der Zellen (2, 3) in einem Untersuchungsbereich mit den Schritten:

- Segmentieren einer ersten Abbildung zur Bestimmung von ersten Zellpositionen in der ersten Abbildung,
- Segmentieren einer zweiten Abbildung zur Bestimmung von zweiten Zellpositionen in der zweiten Abbildung und
- Zuordnen der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen,

wobei die Segmentierung gemäß einem Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche erfolgt.

9. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass beim Segmentieren der zweiten Abbildung der vorbestimmte Schätzwert als die durchschnittliche Anzahl von Bildpunkten der Zellen (2, 3) darstellenden Segmentbereiche in der ersten Abbildung bestimmt wird.

10. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den

ersten Zellpositionen anhand mindestens einer Zelleigenschaft aus der Gruppe Gesamtlichtstärke, Nähe, Größe und Form erfolgt.

11. Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen anhand eines Bilddatensatzes (20) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen (22) der Zellen in einem Untersuchungsbereich mit den Schritten:

- Aufnahme einer zeitlichen Abfolge (20) von digitalen Abbildungen (22),
- Segmentieren einer Startabbildung,
- Auswahl einer oder mehrerer zu untersuchender Zellen (2, 3),
- Analyse des dynamischen Verhaltens der zu untersuchenden Zellen und
- Aufbereitung der Analyseninformationen,

wobei die Segmentierung gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder die Analyse des dynamischen Verhaltens gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10 erfolgt.

12. Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3) nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass bei der Analyse des dynamischen Verhaltens der Zellen die Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen anhand einer Zellpositionen zugeordneten Bewegungsrichtung und / oder einer zugeordneten Geschwindigkeit erfolgt.

13. Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen Abbildung (22) von biologischen Zellen (2, 3) mit:

- Mitteln zur Bestimmung (41) eines maximalen Gradienten je Bildpunkt der Abbildung als das Maximum der Differenzen zwischen einem Bildwert des Bildpunktes und den entsprechenden Bildwerten aller oder ausgewählter benachbarter Bildpunkte,
- Mitteln zur Bestimmung (42) eines Segmentierungsschwellwertes anhand der Häufigkeiten der maximalen Gradienten mit:

a) Mitteln zur Zuordnung einer Gradientenhäufigkeit zu allen maximalen Gradienten als die Anzahl von Bildpunkten mit dem jeweiligen maximalen Gradien-

ten,

b) Mitteln zur Bestimmung eines Umgebungsgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,

c) Mitteln zum iterativen Vergleichen zwischen Umgebungsgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die Umgebung einer biologischen Zelle abbilden, und zur Hinzufügung der Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächsthäufigsten maximalen Gradienten zum Umgebungsgrößenwert, bis der Umgebungsgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und

d) Mitteln zur Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes aus der Anzahl der Iterationen beim iterativen Vergleichen,

- Mitteln zur Klassifizierung (43) der Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes und Einordnung der Bildpunkte, deren maximaler Gradient eine bei oder über dem Segmentierungsschwellwert liegende Größe aufweist, in die Objektklasse und der anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse, und

- Mitteln zur Bildung (44) eines Segmentbereichs der digitalen Abbildung (22) mit Mitteln zur Klassenverschmelzung, insbesondere zum Bereichswachstum.

14. Vorrichtung zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3) anhand eines Bilddatensatzes (20) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen (22) der Zellen (2, 3) in einem Untersuchungsbereich mit:

- Mitteln zur Segmentierung einer ersten Abbildung zur Bestimmung von ersten Zellpositionen in der ersten Abbildung gemäß Anspruch 12,

- Mitteln zur Segmentierung einer zweiten Abbildung zur Bestimmung von zweiten Zellpositionen in der zweiten Abbildung gemäß Anspruch 12 und

- Mitteln zur Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen.

15. Vorrichtung zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (2, 3) anhand eines Bilddatensatzes (20) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter Abbildungen (22) der Zellen (2, 3) in einem Untersu-

chungsbereich mit:

- Mitteln zur Aufnahme einer zeitlichen Abfolge von digitalen Abbildungen,
- Mitteln zur Segmentierung einer Startabbildung gemäß Anspruch 12,
- Mitteln zur Auswahl einer oder mehrerer zu untersuchenden Zellen,
- Mitteln zur Analyse des dynamischen Verhaltens der zu untersuchenden Zellen nach Anspruch 13 und
- Mitteln zur Aufbereitung der Analyseninformationen.

16. Computerprogramm mit Computerprogrammcode zur Steuerung eines Computers zur Durchführung der Schritte der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wenn das Computerprogramm auf einem Computer ausgeführt wird.

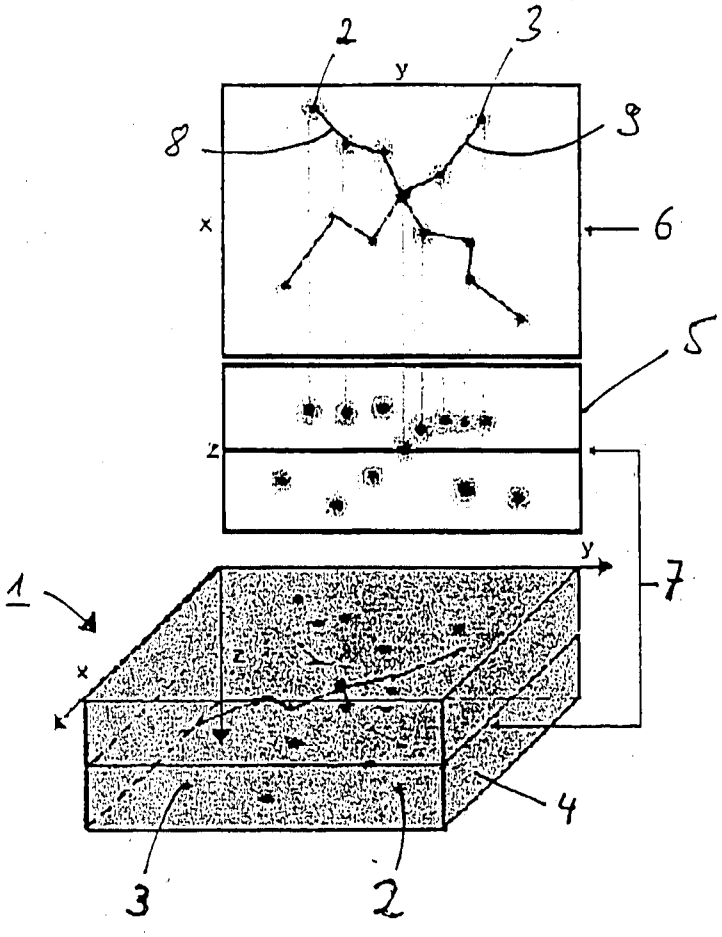


Fig. 1

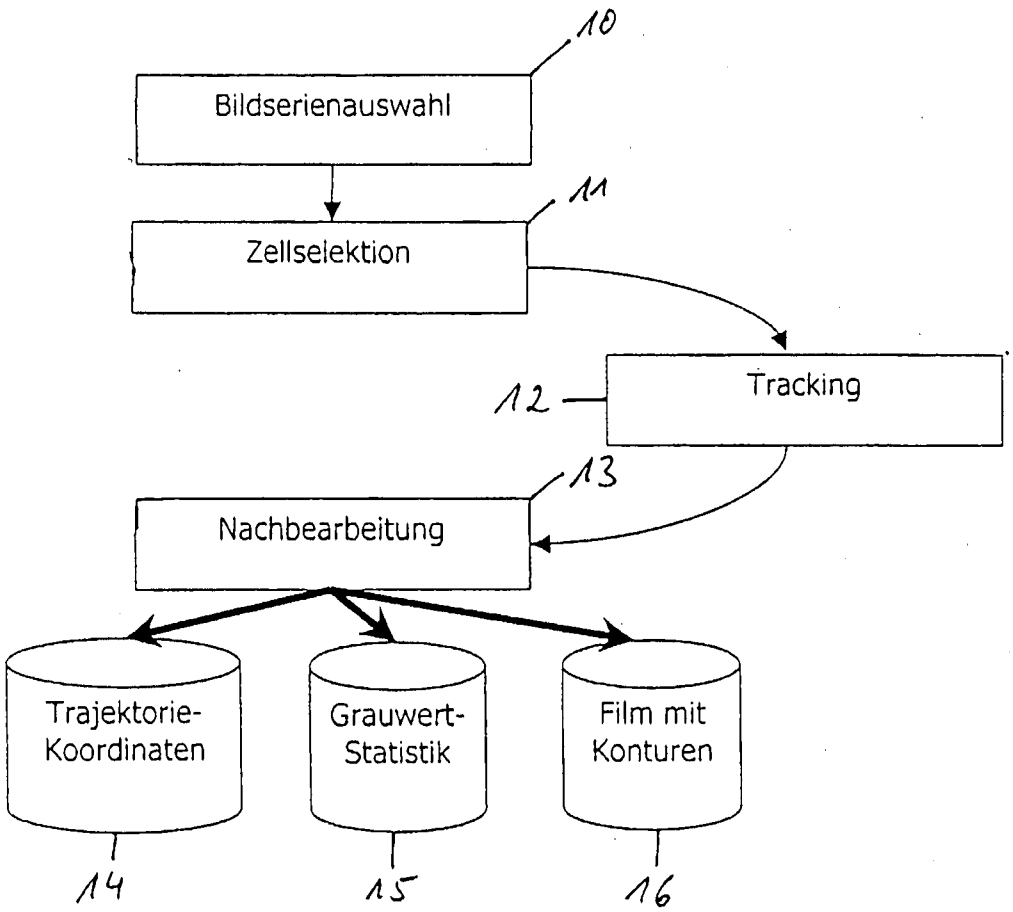

10
Bildserienauswahl
11
Zellselektion
12
Tracking
13
Nachbearbeitung
Trajektorie-Koordinaten
Grauwert-Statistik
Film mit Konturen
14
15
16

Fig. 2

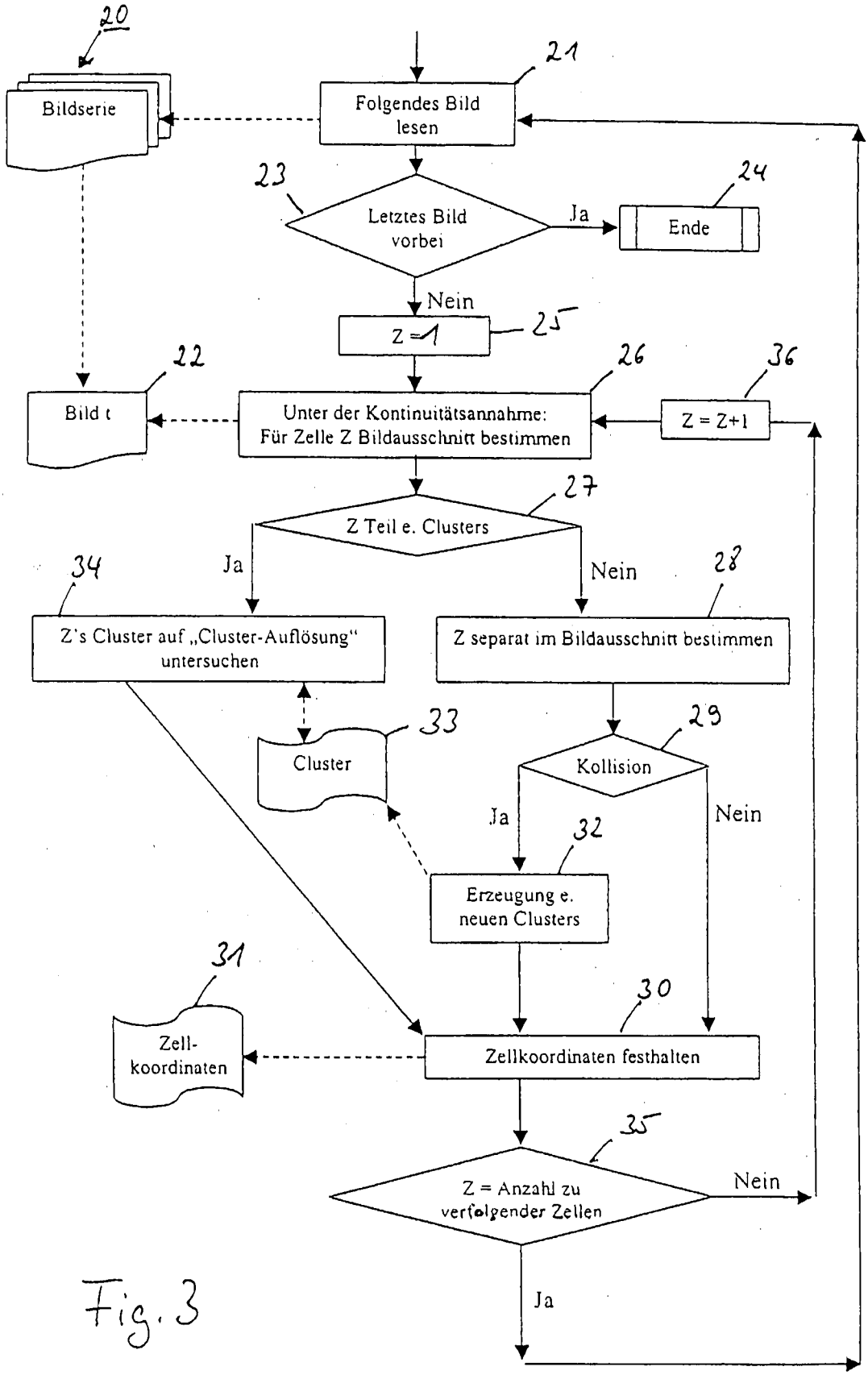

20
Bildserie
21
Folgendes Bild lesen
23
Letztes Bild vorbei
Ja
24
Ende
Nein
Z=1
25
22
Bild t
26
Unter der Kontinuitätsannahme: Für Zelle Z Bildausschnitt bestimmen
36
Z = Z+1
27
Z Teil e. Clusters
Ja
Nein
34
Z's Cluster auf „Cluster-Auflösung" untersuchen
28
Z separat im Bildausschnitt bestimmen
33
Cluster
29
Kollision
Ja
Nein
32
Erzeugung e. neuen Clusters
31
Zell-koordinaten
30
Zellkoordinaten festhalten
35
Z = Anzahl zu verfolgender Zellen
Nein
Ja

Fig. 3

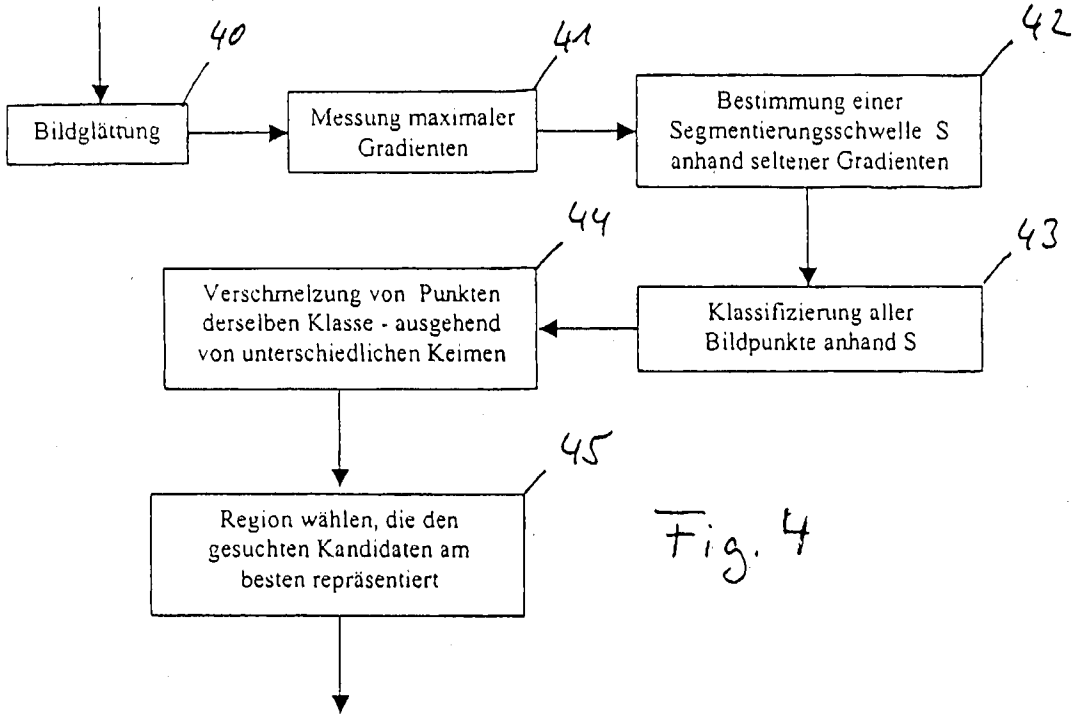

40
Bildglättung
41
Messung maximaler Gradienten
42
Bestimmung einer Segmentierungsschwelle S anhand seltener Gradienten
43
Klassifizierung aller Bildpunkte anhand S
44
Verschmelzung von Punkten derselben Klasse - ausgehend von unterschiedlichen Keimen
45
Region wählen, die den gesuchten Kandidaten am besten repräsentiert

Fig. 4

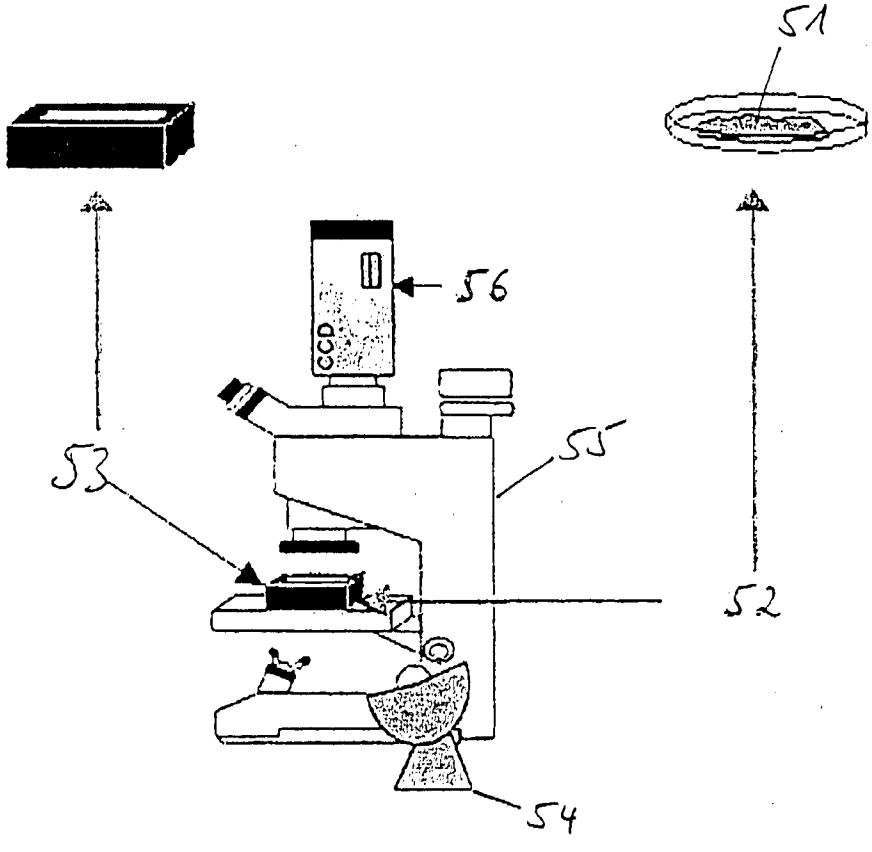

51
56
CCD
55
53
52
54

Fig. 6

Fig. 5a

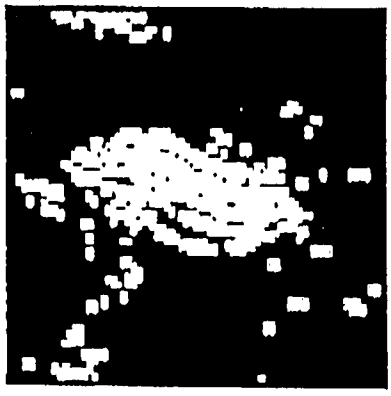


Fig. 5b

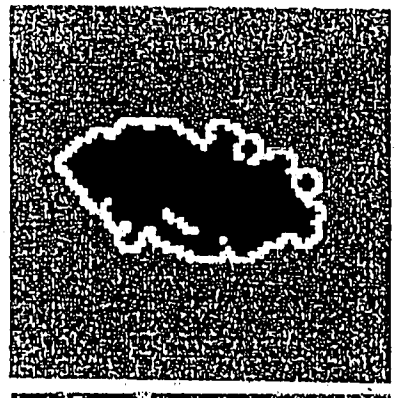


Fig. 5c

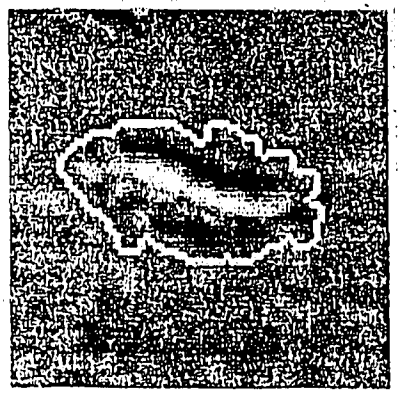


Fig. 5d

Fig. 7a

Fig. 7b

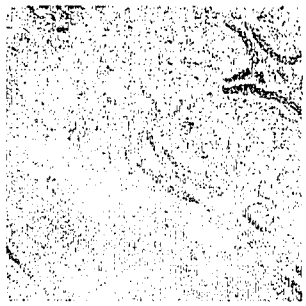


Fig. 7c

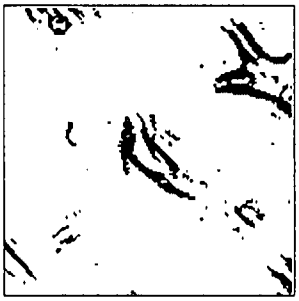


Fig. 7d

Fig. 7e

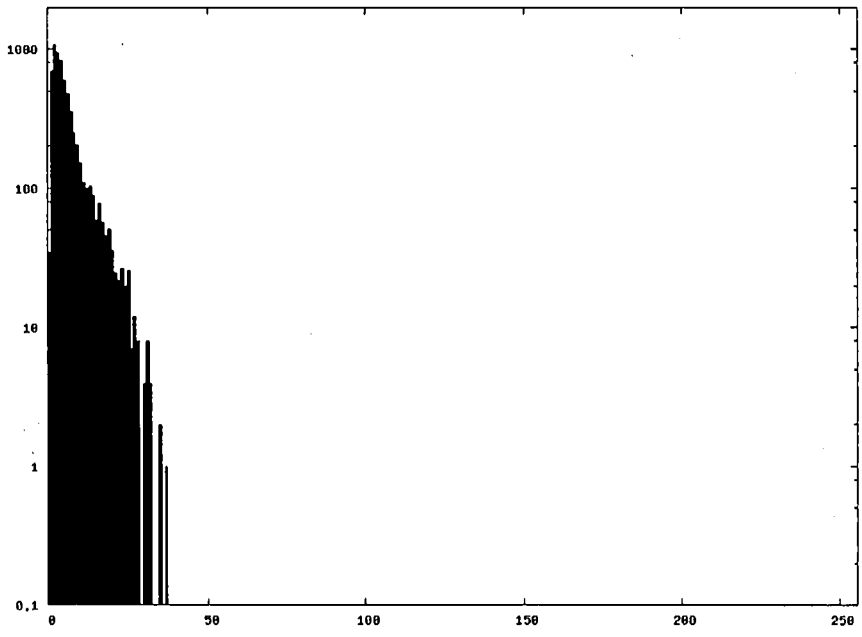


Fig. 7f

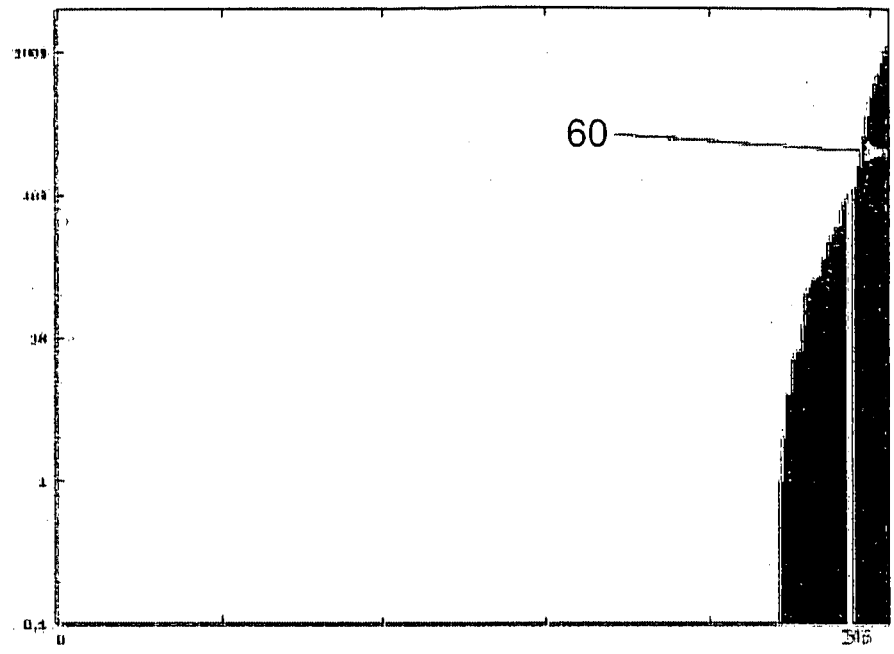


Fig. 7g

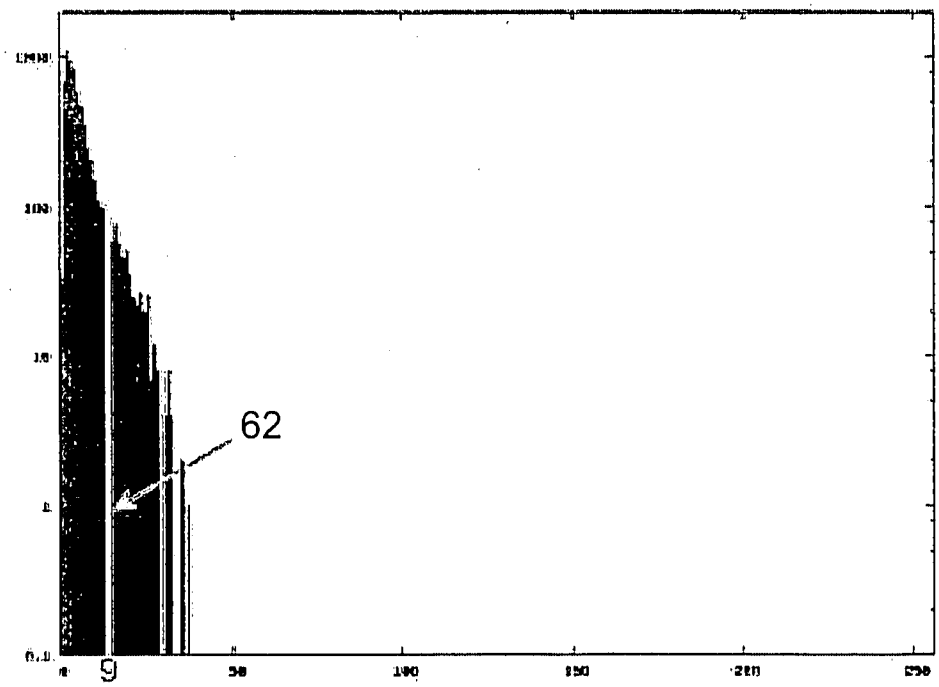


Fig. 7h

Fig. 8a

Fig. 8b

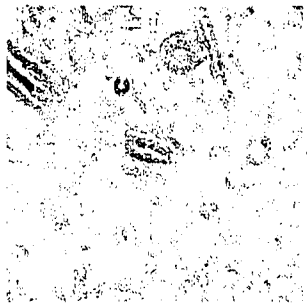


Fig. 8c

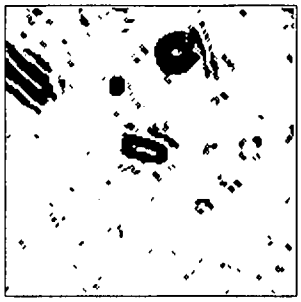


Fig. 8d

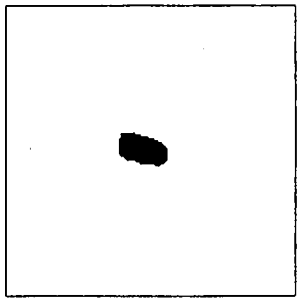


Fig. 8e

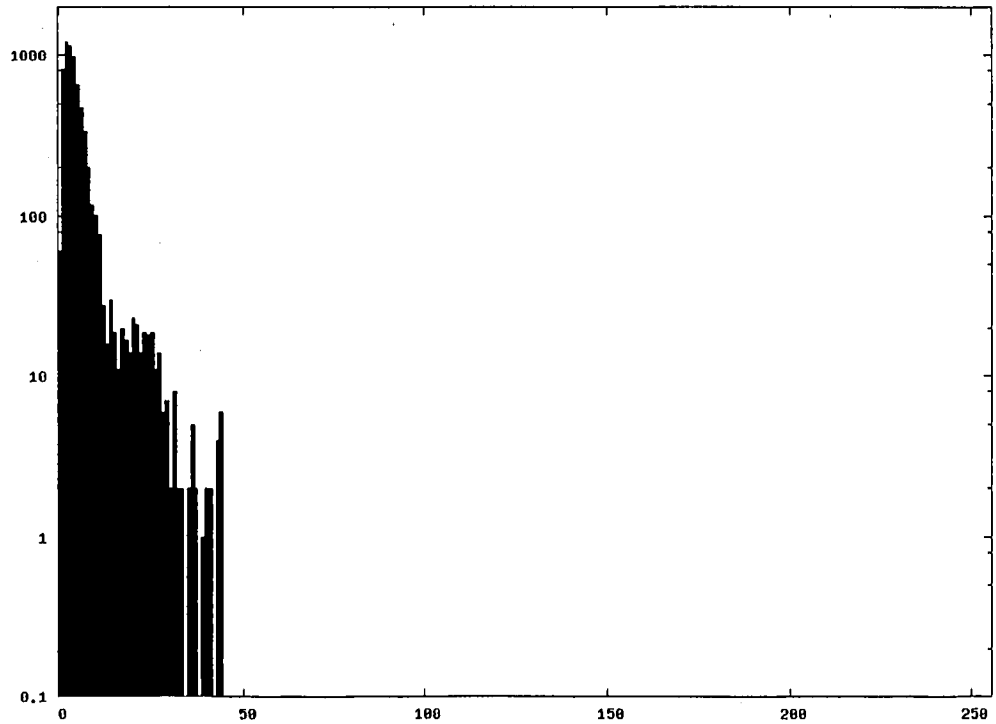


Fig. 8f

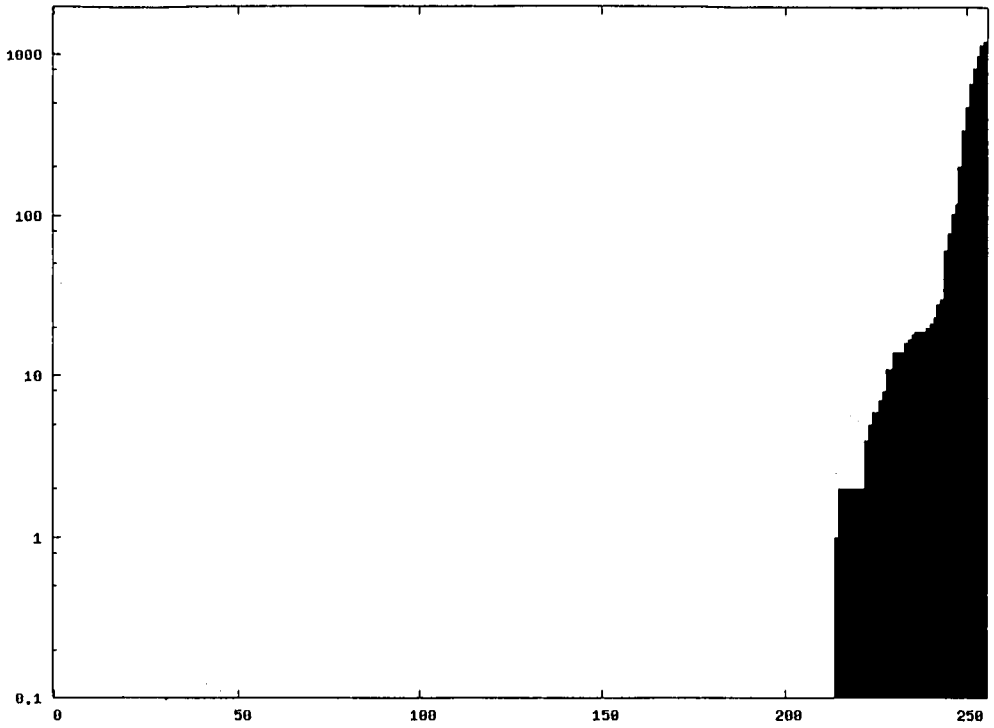


Fig. 8g

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/006231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G06T7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G06T G06F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BORST, HUGO; ABMAYR, WOLFGANG UND GAIS, PETER: "THRESHOLDING METHOD FOR AUTOMATIC CELL IMAGE SEGMENTATION" THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, 'Online! vol. 27, no. 1, 1979, pages 180-187, XP002348409 USA Retrieved from the Internet: URL:www.jhc.org/cgi/reprint/27/1/180> 'retrieved on 2005-10-10! abstract page 180, left-hand column, line 1 - page 182, right-hand column, line 15 Abschnitt "RESULTS" figure 4 ----- -/--	1-16

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 October 2005	19/10/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Eckert, L

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

International Application No
PCT/EP2005/006231

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANOWITZ S D ET AL: "A NEW METHOD FOR IMAGE SEGMENTATION" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON PATTERN RECOGNITION. (ICPR). ROME, 14 - 17 NOV., 1988, WASHINGTON, IEEE COMP. SOC. PRESS, US, vol. VOL. 1 CONF. 9, 14 November 1988 (1988-11-14), pages 270-275, XP000112659 ISBN: 0-8186-0878-1 abstract Abschnitte "1. Introduction", "2. The new adaptive thresholding method"	1-16
A	ONG S H ET AL: "Image analysis of tissue sections" COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, NEW YORK, NY, US, vol. 26, no. 3, May 1996 (1996-05), pages 269-279, XP004532242 ISSN: 0010-4825 pages 270,271 Abschnitte "3. Image Segmentation", "4. Classification" figure 4	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/006231

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G06T7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G06T G06F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BORST, HUGO; ABMAYR, WOLFGANG UND GAIS, PETER: "THRESHOLDING METHOD FOR AUTOMATIC CELL IMAGE SEGMENTATION" THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, 'Online! Bd. 27, Nr. 1, 1979, Seiten 180-187, XP002348409 USA Gefunden im Internet: URL:www.jhc.org/cgi/reprint/27/1/180> 'gefunden am 2005-10-10! Zusammenfassung Seite 180, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 182, rechte Spalte, Zeile 15 Abschnitt "RESULTS" Abbildung 4 ----- -/--	1-16

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[ ] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10. Oktober 2005	19/10/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Eckert, L

1

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/006231

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YANOWITZ S D ET AL: "A NEW METHOD FOR IMAGE SEGMENTATION" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON PATTERN RECOGNITION. (ICPR). ROME, 14 - 17 NOV., 1988, WASHINGTON, IEEE COMP. SOC. PRESS, US, Bd. VOL. 1 CONF. 9, 14. November 1988 (1988-11-14), Seiten 270-275, XP000112659 ISBN: 0-8186-0878-1 Zusammenfassung Abschnitte "1. Introduction", "2. The new adaptive thresholding method"	1-16
A	ONG S H ET AL: "Image analysis of tissue sections" COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, NEW YORK, NY, US, Bd. 26, Nr. 3, Mai 1996 (1996-05), Seiten 269-279, XP004532242 ISSN: 0010-4825 Seiten 270,271 Abschnitte "3. Image Segmentation", "4. Classification" Abbildung 4	1-16