(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 028 372 A1** 2006.01.05

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2004 028 372.9**
(22) Anmeldetag: **11.06.2004**
(43) Offenlegungstag: **05.01.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***G06T 7/40*** (2006.01)

(71) Anmelder:
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE

(74) Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

(72) Erfinder:
Herzog, Otthein, Prof. Dr., 28355 Bremen, DE;
Friedl, Peter, Dr. Dr., 97076 Würzburg, DE;
Gottfried, Björn, 28215 Bremen, DE

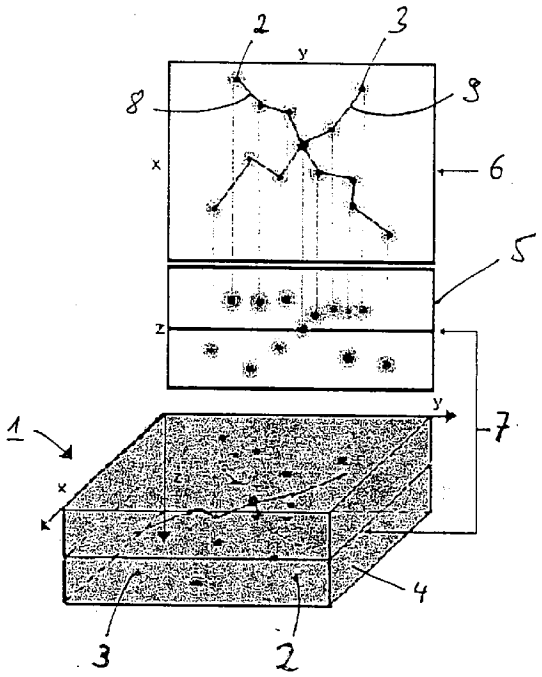
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
US2003/01 25 621 A1
MOELLER J., GOTTFRIED B., SCHLIEDER C., HERZOG O.,
FRIEDL P.: Automated Tracking of Cell Movements and Resolution of Cell-Cell Collisions in Three-dimensional Collagen Matrices. Poster at the Keystone Symposium on Cell Migration and Invasion, Breckenridge, Colorado, USA, January, 18-23, 2003,
Abstract (abrufbar unter http./www-aqki.tzi.de/bv/publications/index.html?key=MoellerGottfried 2003)
SONG, L.; DONOVAN, R.M.: Segmentation of cell images using an expert system; Engineering in Medicine and Biology Society, 1988, Proceedings of the Annual Internat.Conf. of the IEEE, 4-7 Nov. 1988, pp: 1383-1384, Vol. 3;
ANORAGANINGRUM, D.: Cell segmentation with median filter and mathematical morphology operation Image Analysis and Processing, 1999, IEEE Proceedings, Internat. Conference on, 27-29 Sept. 1999, pp: 1043-1046;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen Abbildung von Zellen**

(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 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 Schritte 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 Häufigkeit 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.



Beschreibung

[0001] 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.

[0002] 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 Alterntive zu Tierversuchen gegeben.

Stand der Technik

[0003] 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.

[0004] 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.

Aufgabenstellung

[0005] 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.

[0006] 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 Objektgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,

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

d) Bestimmen des Segmentierungsschwellwertes als die Häufigkeit des maximalen Gradienten der Bildpunkte, deren Anzahl zuletzt zum Objektgrößenwert hinzugefügt wurde,

– 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 Häufigkeit 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.

[0007] 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 abgeschätzte Größe als Anzahl von Bildpunkten erreicht oder überschritten ist. Damit ergibt sich ein Segmentierungsschwellwert 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.

[0008] Bei der Schwellwertbestimmung wird also der Schwellwert zunächst dem häufigsten maximalen Gradienten gleichgesetzt und dann solange schrittweise verringert, bis die Anzahl der Bildpunkte, die aufgrund des jeweiligen Schwellwertes ausgewählt würden, der zu erwartenden Abbildungsgröße der Zelle entspricht oder sie überschreitet.

[0009] 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.

[0010] Da nicht absolute Eigenschaften der Bildpunkte, sondern die relative Veränderung dieser Eigenschaften zu benachbarten Bildpunkten die Basis für das erfindungsgemäße 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.

[0011] 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.

[0012] 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.

[0013] In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird der vorbestimmte Schätzwert als 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.

[0014] 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.

[0015] In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens wird beim Segmentieren der zweiten Abbildung der vorbestimmte Schätzwert als die durchschnittliche 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 als die 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 Zelle in der zweiten Abbildung gut annähern.

[0016] 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.

[0017] 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.

[0018] 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.

[0019] Die Erfindung sieht weiterhin Vorrichtungen zur Ausführung der erfindungsgemäßen Verfahren nach den Ansprüchen 9, 10 und 11 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.

Ausführungsbeispiel

[0020] Im folgenden wird die Erfindung anhand von vorteilhaften Ausführungsformen mit Bezug auf die Figuren näher erläutert. Dabei zeigen:

[0021] Fig. 1 eine schematische perspektivische Ansicht von Zellen in einer Kollagenmatrix mit einem Querschnitt und einer Aufsicht,

[0022] Fig. 2 ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen darstellt,

[0023] Fig. 3 einen Ablaufplan eines Teiles des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen,

[0024] Fig. 4 ein Blockdiagramm, das das erfindungsgemäße Verfahren zur Segmentierung darstellt,

[0025] Fig. 5a eine beispielhafte Abbildung einer Zelle,

[0026] Fig. 5b eine Klassifizierung der Abbildung aus Fig. 5a,

[0027] Fig. 5c eine Segmentierung der Abbildung aus Fig. 5a mit einer Darstellung eines Umrisses ei-

nes Segmentes,

[0028] Fig. 5d den in die Abbildung aus Fig. 5a eingetragenen Umriss aus Fig. 5c und

[0029] Fig. 6 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Aufnahme von Abbildungen von biologischen Zellen.

[0030] 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.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 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.

[0036] 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.

[0037] Darauf folgt die Bestimmung **41** eines maxi-

malen 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**). Der Segmentierungsschwellwert wird so bestimmt, dass die Anzahl der Bildpunkte, deren maximaler Gradient ebenso häufig wie oder häufiger als die durch den Segmentierungsschwellwert gegebene Grenze ist, einem vorbestimmten Schätzwert für die Größe der abgebildeten Zelle erreicht oder überschreitet.

[0038] Im folgenden Schritt **43** werden die Bildpunkte in eine Objektklasse und eine Umgebungsklasse mittels des Segmentierungsschwellwertes klassifiziert, wobei die Bildpunkte, deren maximaler Gradient eine bei oder über dem Segmentierungsschwellwert liegende Häufigkeit aufweist, 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.

[0039] 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 Fig. 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 Zellumgebung wiedergibt. In einem abschließenden Schritt **45** wird derjenige Bereich ausgewählt, der anhand der vorhergehenden Zellinformationen die Zelle ab besten wiedergibt.

[0040] 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.

[0041] 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.

[0042] Das erfindungsgemäße Segmentierungsverfahren ergibt sich auch aus dem folgenden beispielhaften Algorithmus.

1) Erzeugung eines Histogramms maximaler Gradienten der Abbildung
2) Aufsteigende Sortierung des Histogramms nach Häufigkeiten der maximalen Gradienten
3) i:= höchstmöglicher_Gradient
4) Solange (abgezählte_Gradienten < geschätzte_Objektgröße) und (i > kleinstmöglicher_Gradient)
{
4.a) abgezählte_Gradienten := abgezählte_Gradienten + Histogramm[i]
4.b) i:= i – 1
}
5) Schwelle := höchstmöglicher_Gradient – 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.

[0043] 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 ein „Histogramm" für Gradienten-Häufigkeiten.

[0044] 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.

[0045] 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.

[0046] 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.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Segmentierung einer digitalen **Abb.** (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 Objektgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,
c) Iteratives Vergleichen zwischen Objektgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die eine biologische Zelle abbilden, und Hinzufügen der Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächsthäufigsten maximalen Gradienten zum Objektgrößenwert, bis der Objektgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und
d) Bestimmen des Segmentierungsschwellwertes als die Häufigkeit des maximalen Gradienten der Bildpunkte, deren Anzahl zuletzt zum Objektgrößenwert hinzugefügt wurde,
– 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 Häufigkeit aufweist, in die Objektklasse und die anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse eingeordnet werden, und
– Bildung (**44**) eines Segmentbereichs der digitalen **Abb.** (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 **Abb.** (22) bestimmt wird.

5. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (**2**, **3**) anhand eines Bilddatensatzes (**20**) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter **Abb.** (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.

6. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens nach Anspruch 5, 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.

7. Verfahren zur Analyse des dynamischen Verhaltens nach Anspruch 5, 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.

8. Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen anhand eines Bilddatensatzes (**20**) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter **Abb.** (22) der Zellen in einem Untersuchungsbereich mit den Schritten:
– Aufnahme einer zeitlichen Abfolge (**20**) von digitalen **Abb.** (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 4 und/oder die Analyse des dynamischen Verhaltens gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7 erfolgt.

9. Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (**2**, **3**) nach Anspruch 8, 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.

10. Vorrichtung zur Segmentierung einer digitalen **Abb.** (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 Gradienten,
b) Mitteln zur Bestimmung eines Objektgrößenwerts als Anzahl der Bildpunkte, für die der häufigste maximale Gradient bestimmt wurde,
c) Mitteln zum iterativen Vergleichen zwischen Objektgrößenwert und einem vorgegebenen Schätzwert für die Anzahl von Bildpunkten, die eine biologische Zelle abbilden, und zur Hinzufügung der Anzahl der Bildpunkte mit dem jeweils nächsthäufigsten maximalen Gradienten zum Objektgrößenwert, bis der Objektgrößenwert den Schätzwert überschreitet oder erreicht, und
d) Mitteln zur Bestimmung des Segmentierungsschwellwertes als die Häufigkeit des maximalen Gradienten der Bildpunkte, deren Anzahl zuletzt zum Objektgrößenwert hinzugefügt wurde,
– 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 Häufigkeit aufweist, in die Objektklasse und der anderen Bildpunkte in die Umgebungsklasse, und
– Mitteln zur Bildung (**44**) eines Segmentbereichs der digitalen **Abb.** (22) mit Mitteln zur Klassenverschmelzung, insbesondere zum Bereichswachstum.

11. Vorrichtung zur Analyse des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (**2**, **3**) anhand eines Bilddatensatzes (**20**) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter **Abb.** (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 10,
– Mitteln zur Segmentierung einer zweiten Abbildung zur Bestimmung von zweiten Zellpositionen in der zweiten Abbildung gemäß Anspruch 10 und
– Mitteln zur Zuordnung der zweiten Zellpositionen zu den ersten Zellpositionen.

12. Vorrichtung zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens biologischer Zellen (**2**, **3**) anhand eines Bilddatensatzes (**20**) mehrerer in zeitlichen Abständen nacheinander erstellter **Abb.** (22) der Zellen (**2**, **3**) in einem Untersuchungsbereich mit:
– Mitteln zur Aufnahme einer zeitlichen Abfolge von digitalen Abbildungen,
– Mitteln zur Segmentierung einer Startabbildung gemäß Anspruch 10,
– Mitteln zur Auswahl einer oder mehrerer zu untersuchenden Zellen,
– Mitteln zur Analyse des dynamischen Verhaltens der zu untersuchenden Zellen nach Anspruch 11 und
– Mitteln zur Aufbereitung der Analyseninformationen.

13. Computerprogramm mit Computerprogrammcode zur Steuerung eines Computers zur Durchführung der Schritte der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wenn das Computerprogramm auf einem Computer ausgeführt wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

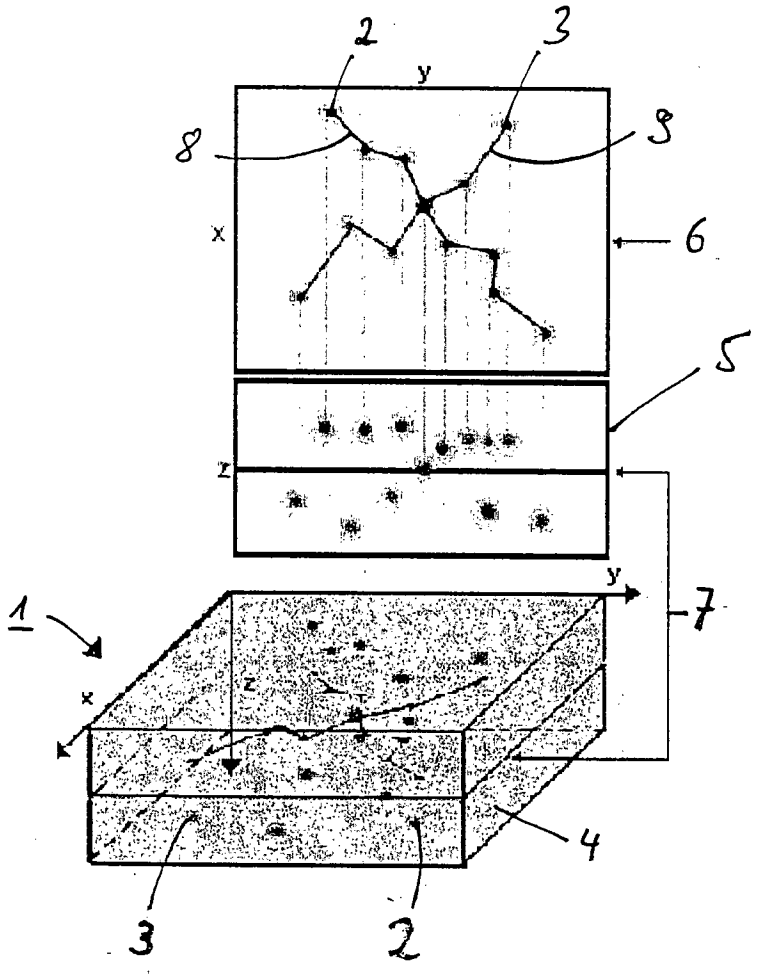


Fig. 1

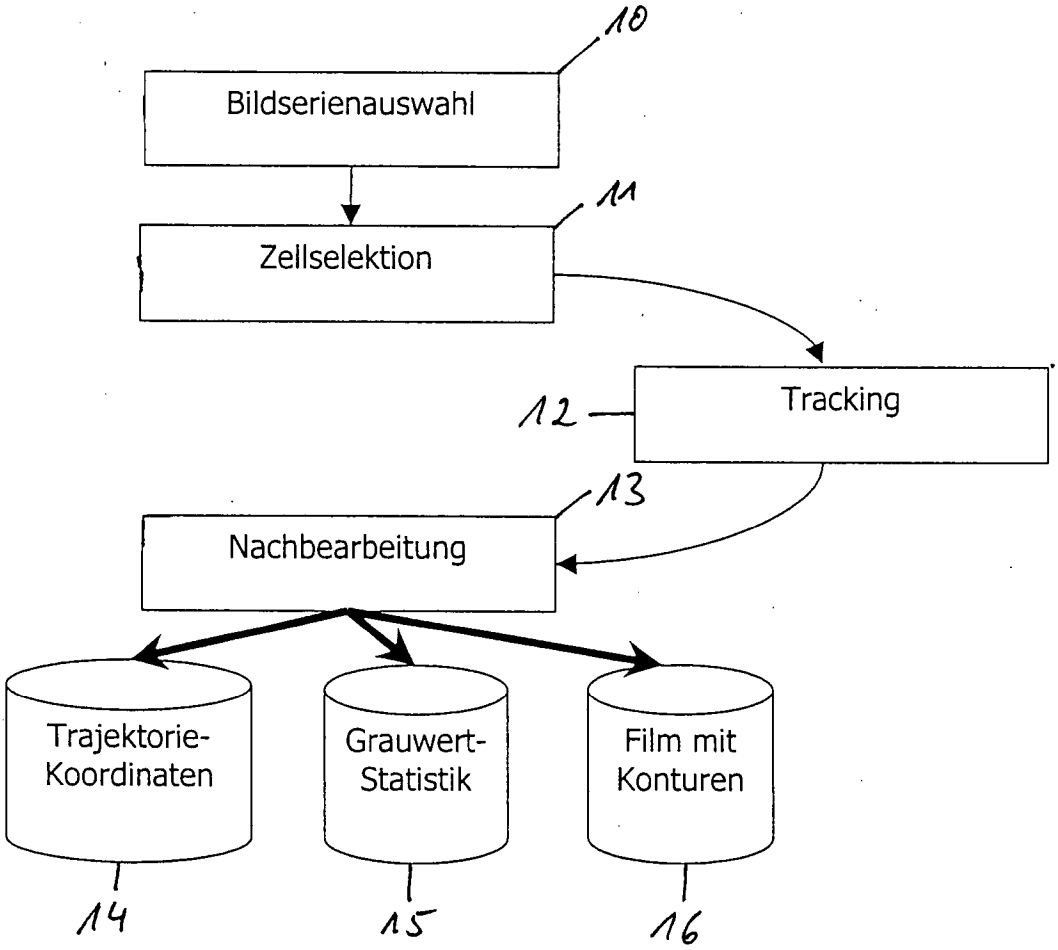

10
Bildserienauswahl
11
Zellselektion
12
Tracking
13
Nachbearbeitung
Trajektorie-Koordinaten
Grauwert-Statistik
Film mit Konturen
14
15
16

Fig. 2

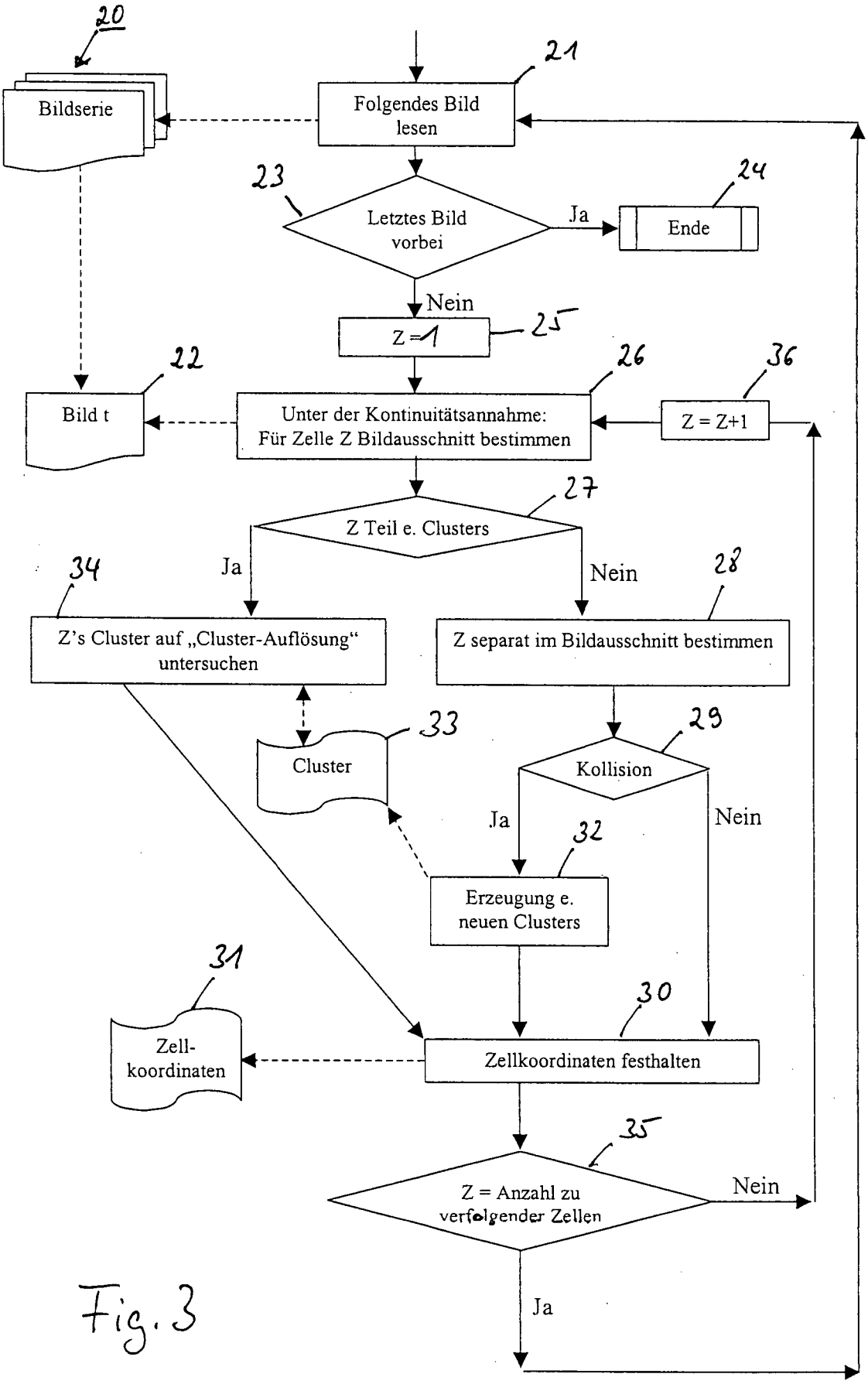

20
Bildserie
21
Folgendes Bild lesen
23
Letztes Bild vorbei
Ja
24
Ende
Nein
Z=1
25
22
Bild t
26
Unter der Kontinuitätsannahme: Für Zelle Z Bildausschnitt bestimmen
36
Z = Z+1
27
Z Teil e. Clusters
Ja
Nein
34
Z's Cluster auf „Cluster-Auflösung" untersuchen
28
Z separat im Bildausschnitt bestimmen
33
Cluster
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

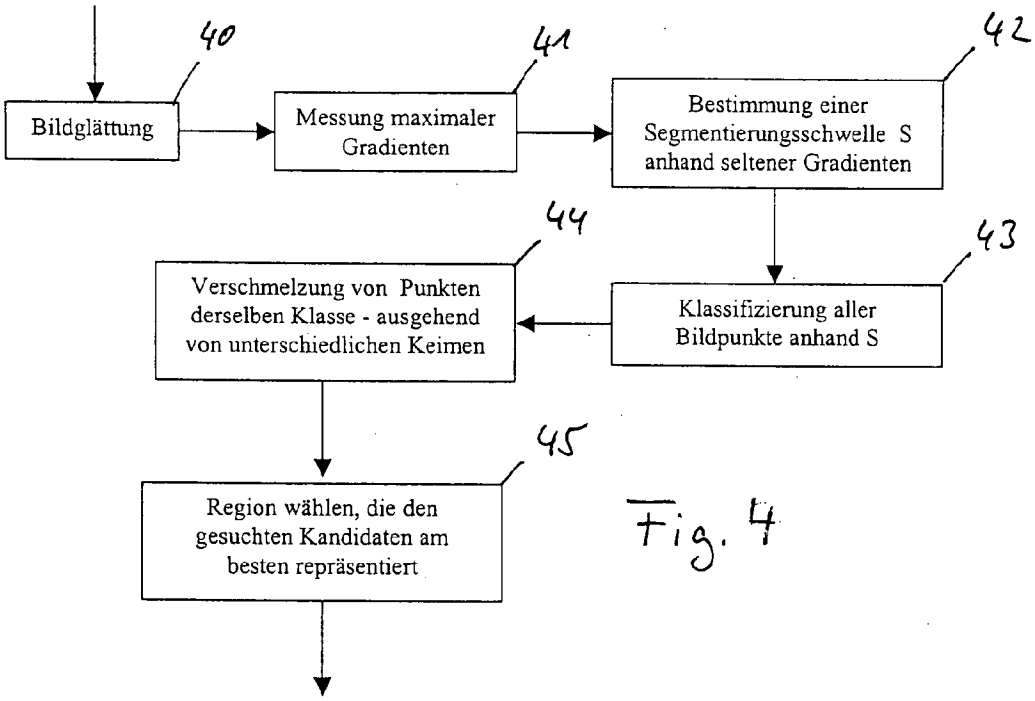

40
Bildglättung
41
Messung maximaler Gradienten
42
Bestimmung einer Segmentierungsschwelle S anhand seltener Gradienten
43
Klassifizierung aller Bildpunkte anhand S
44
Verschmelzung von Punkten derselben Klasse - ausgehend von unterschiedlichen Keimen
45
Region wählen, die den gesuchten Kandidaten am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

Fig. 4

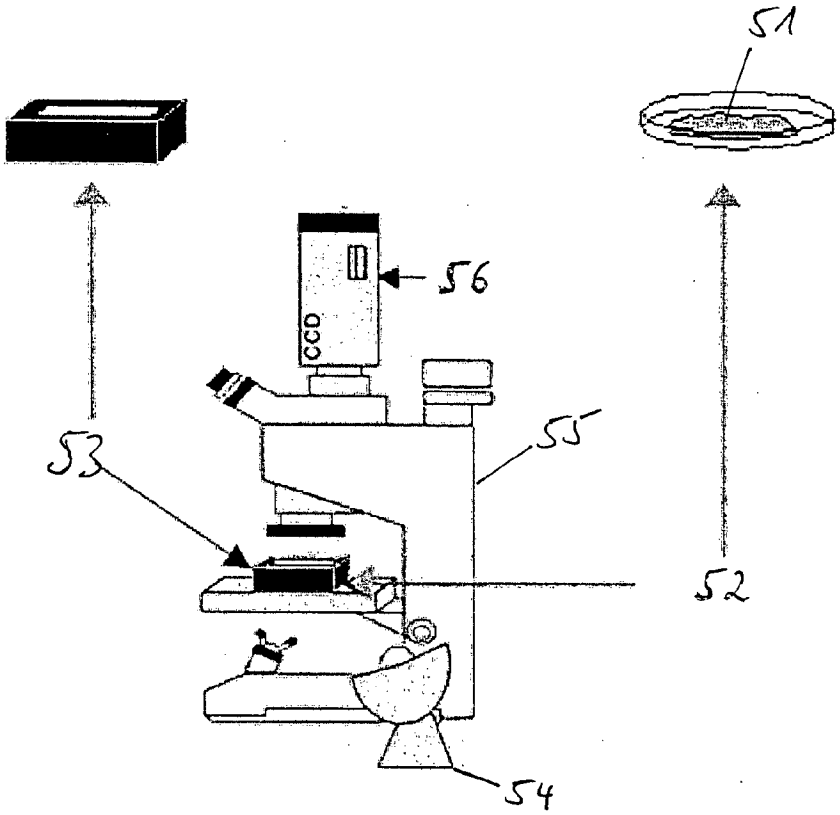

51
56
CCD
55
53
52
54

Fig. 6

Fig. 5a

Fig. 5b

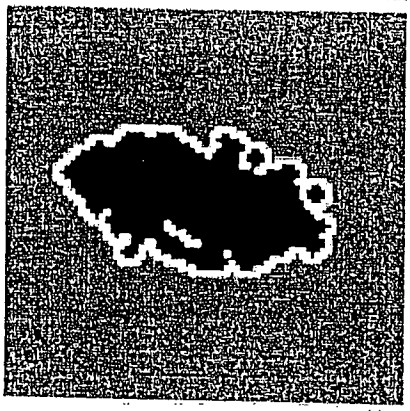


Fig. 5c

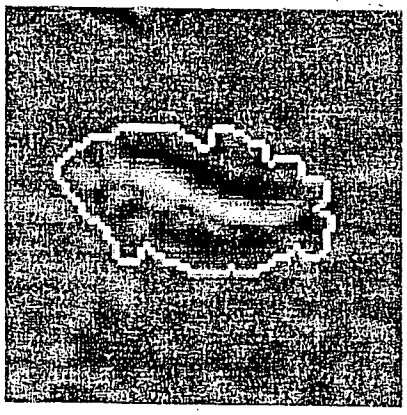


Fig. 5d